



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Síntesis de una biblioteca de $\Psi$ -stylostatinas con potencial actividad antimicrobiana

Carlos López Martínez

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y QUÍMICA TERAPÉUTICA

**SÍNTESIS DE UNA BIBLIOTECA DE  
 $\Psi$ -STYLOSTATINAS CON POTENCIAL  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

**CARLOS LÓPEZ MARTÍNEZ**  
**2015**



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y QUÍMICA TERAPÉUTICA

**Programa de doctorado: Química Orgánica Experimental e Industrial**

**SÍNTESIS DE UNA BIBLIOTECA DE  
Ψ-STYLOSTATINAS CON POTENCIAL  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

Memoria presentada por Carlos López Martínez para optar al título de Doctor por la  
Universitat de Barcelona

Directora: Dra. Anna Diez Pascual

Carlos López Martínez

CARLOS LÓPEZ MARTÍNEZ

2015



## **ÍNDICE**

---



---

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
1.1. ANTIBIÓTICOS Y ANTIMICROBIANOS.....	3
1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.....	5
1.3. APARICIÓN DE RESISTENCIAS.....	6
1.3.1. Panorama actual.....	8
1.3.2. Situación general de las resistencias bacterianas en Europa.....	10
1.3.3. Iniciativas oficiales para la prevención de la aparición y crecimiento de las resistencias a antibióticos.....	11
1.4. CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS.....	12
1.5. PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS.....	14
1.5.1. Ventajas y desventajas del uso de los péptidos como antibióticos.....	15
1.5.2. Modificaciones de los péptidos.....	17
1.6. ANTIBIÓTICOS PEPTÍDICOS COMERCIALES.....	18
1.7. SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.....	22
1.7.1. Arquitectura y energía de membrana.....	22
1.7.2. Toxicidad selectiva basada en la estructura del péptido antibiótico.....	24
1.7.3. Afinidad in vivo por microorganismos.....	26
1.7.4. Localización peptídica antimicrobiana.....	26
1.7.5. Otras funciones de los péptidos que contribuyen a aumentar la defensa del huésped.....	27
1.8. MECANISMOS DE ACCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.....	27
1.8.1. Determinantes para la actividad antimicrobiana.....	28
1.8.2. Interacción inicial del péptido con las membranas diana.....	34
1.8.3. Sucesos tras unión a membrana.....	36
1.8.4. Mecanismos de acción.....	38
1.8.5. Causas de muerte celular.....	44
1.9. OBJETIVOS.....	46
<b>2. SÍNTESIS EN DISOLUCIÓN DE LACTAMAS DIPEPTÍDICAS.....</b>	<b>49</b>
2.1. PRECURSORES SINTÉTICOS DE NUESTRO GRUPO.....	51
2.2. SÍNTESIS DEL COMPUESTO Fmoc- $\{$ Ser(OBn)-Thr( <sup>t</sup> Bu) $\}$ (2).....	55

2.3. SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS Fmoc- $\{$ Ser(OBn)-Leu $\}$ (3) y Fmoc- $\{$ Ser(OBn)-Lys(Cbz) $\}$ (4).....	64
2.4. SÍNTESIS DE LA OXAZOLOPIPERIDONA 5 .....	70
2.5. RECAPITULACIÓN .....	75
<b>3. DISEÑO Y SÍNTESIS DE LA QUIMIOTECA PEPTÍDICA.....</b>	<b>77</b>
3.1. DISEÑO DE LA QUIMIOTECA DE $\psi$ -STYLOSTATINAS.....	79
3.1.1. Diseño de la biblioteca siguiendo criterios bibliográficos.....	79
3.2. PRECEDENTES DE SÍNTESIS.....	89
3.3. SÍNTESIS DE LAS $\Psi$ -STYLOSTATINAS .....	91
3.3.1. Secuencia sintética.....	92
3.3.2. Péptidos sintetizados .....	101
3.4. RECAPITULACIÓN .....	107
3.5. ANEXO. INTRODUCCIÓN A LA SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA.....	108
<b>4. ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....</b>	<b>119</b>
4.1. OBSERVACIONES PRELIMINARES.....	121
4.2. ESTUDIOS ESTRUCTURALES .....	124
4.2.1. Estudios de dicroísmo circular .....	124
4.2.2. Modelización molecular .....	133
4.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA .....	137
4.3.1. Ensayo sobre modelos de membrana: liposomas .....	137
4.3.2. Evaluación de la actividad antibiótica .....	139
4.4. ANEXO.....	146
4.4.1. MALDI-TOF .....	146
<b>5. RESULTADOS Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>149</b>
5.1. RESULTADOS.....	150
5.2. CONCLUSIONES .....	153
<b>6. SECCIÓN EXPERIMENTAL .....</b>	<b>155</b>
6.1. EXPERIMENTAL DEL CAPÍTULO 2.....	157

6.1.2. Síntesis y caracterización de los compuestos 2 a 29b. ....	159
6.2. EXPERIMENTAL DEL CAPÍTULO 3.....	191
6.2.1. Caracterización de los péptidos .....	194
6.3. EXPERIMENTAL DEL CAPÍTULO 4.....	210
6.3.1. Preparación de liposomas .....	210
<b>7. ESPECTROS .....</b>	<b>217</b>
7.1. ESPECTROS DEL CAPÍTULO 2 .....	219
7.2. HPLC/MALDI-TOF/AAA DEL CAPÍTULO 3 .....	265
7.3. ESPECTROS DE DICROISMO CIRCULAR DEL CAPÍTULO 4 .....	332



## **ABREVIATURAS**



$\delta$ desplazamiento químico (expresado en ppm)	<b>HEPES</b> tampón (ver composición en capítulo 6)
<b>[<math>\alpha</math>]<sub>D</sub></b> rotación óptica medida con bombilla de sodio	<b>His</b> L-histidina
<b>{aa}</b> análogo de aminoácido	<b>HIV</b> virus de la inmunodeficiencia humana
<b>{aa-aa}</b> análogo de dipéptido	<b>HMBC</b> Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>2P+5A</b> péptido con 2 residuos polares por 5 apolares	<b>HOBt</b> 1- hidroxibenzotriazol
<b>3P+4A</b> péptido con 3 residuos polares por 4 apolares	<b>HPLC</b> cromatografía líquida de alta eficiencia
<b>A</b> L-Alanina	<b>Hz</b> hercios
<b>aa</b> aminoácido	<b>I</b> L-isoleucina
<b>AAA</b> análisis de aminoácidos	<b>IgG</b> inmunoglobulina G
<b>Abs</b> absorbancia	<b>Ile</b> L-isoleucina
<b>Ac<sub>2</sub>O</b> anhídrido acético	<b>IR</b> infrarojo
<b>ACN</b> acetonitrilo	<b>J</b> constante de acoplamiento
<b>AcOEt</b> acetato de etilo	<b>K</b> L-lisina
<b>AcOH</b> ácido acético	<b>L</b> L-leucina
<b>AcONa</b> acetato de sodio	<b>Leu</b> L-leucina
<b>ADN</b> ácido desoxirribonucleico	<b>Lindlar</b> paladio/ BaSO <sub>4</sub>
<b>Ala</b> L-alanina	<b>LPS</b> lipopolisacárido
<b>Anh.</b> anhidro	<b>Lys</b> L-lisina
<b>Arg</b> L-arginina	<b>m</b> multiplete
<b>Asn</b> L-asparagina	<b>MALDI-TOF</b> Espectrometría de masas de desorción iónica inducida por laser, asistida por matriz y con análisis de tiempo de vuelo
<b>Bn</b> bencilo	<b>Me</b> metilo
<b>BnBr</b> bromuro de bencilo	<b>MeOH</b> metanol
<b>CCF</b> cromatografía en capa fina	<b>Met</b> L-metionina
<b>Cl-Trt</b> resina cloruro de 2-clorotritilo	<b>M<sub>H</sub></b> momento hidrofóbico
<b>CMI</b> concentración mínima inhibitoria	<b>mHz</b> megahercio
<b>D</b> ácido L- aspártico	<b>min</b> minutos
<b>d</b> doblete	<b>MTE</b> microscopia de transmisión electrónica
<b>DC</b> dicroísmo circular	<b>N</b> L-asparagina
<b>DCM</b> diclorometano	<b>nm</b> nanómetros
<b>dd</b> doblete de dobletes	<b><i>o</i>-Ns</b> <i>o</i> -nitrobencensulfonilo
<b>ddd</b> doblete de dobletes de dobletes	<b><i>o</i>-NsCl</b> cloruro de <i>o</i> -nitrobencensulfonilo
<b>DEAD</b> dietilazodicarboxilato	<b>P</b> L-prolina
<b>DIEA</b> diisopropiletilamina	<b>PC</b> fosfatidilcolina
<b>DIPCDI</b> N,N'-diisopropilcarbodiimida	<b>Phe</b> L-fenilalanina
<b>DMF</b> N,N-dimetilformamida	<b>ppm</b> partes por millón
<b>dt</b> doblete de tripletes	<b>PPTS</b> <i>p</i> -toluensulfonato de piridinio
<b>F</b> L-fenilalanina	<b>Pro</b> L-prolina
<b>FDA</b> "Food and Drug Administration"	<b>PS</b> fosfatidilserina
<b>Fmoc</b> N <sup>α</sup> -9-fluorenilmetoxicarbonil	
<b>Fmoc-aa-OH</b> N <sup>α</sup> -9-fluorenilmetoxicarbonil-aminoácido	
<b>FmocOSu</b> carbonato de 9-fluorenil metil y de N-succinidimil	
<b>Gly</b> L-glicina	
<b>h</b> horas	

<b>PyBOP</b>	hexafluorofosfonato de benzotriazol-1-il-tris-pirrolidino-fosfonio		<b>t.a</b>	temperatura ambiente
<b>q</b>	cuadruplete		<b>TBTA</b>	tricloroacetoimidato de <i>tert</i> -butilo
<b>qd</b>	cuadruplete de dobletes		<b><sup>t</sup>Bu</b>	<i>tert</i> -butilo
<b>qt</b>	cuadruplete de tripletes		<b>T<sub>c</sub></b>	temperatura crítica
<b>R</b>	L-arginina		<b>td</b>	triplete de dobletes
<b>Rf</b>	factor de retención		<b>TFA</b>	ácido trifluoroacético
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear		<b>THF</b>	tetrahidrofurano
<b>S</b>	L-serina		<b>Thr</b>	L-treonina
<b>sa</b>	señal amplia		<b>T<sub>R</sub></b>	tiempo de retención
<b>Ser</b>	L-serina		<b>Trp</b>	L-triptófano
<b>T</b>	L-treonina		<b>Trt</b>	tritilo
<b>t</b>	triplete		<b>tt</b>	triplete de tripletes
			<b>UV</b>	ultravioleta

**RESUMEN**

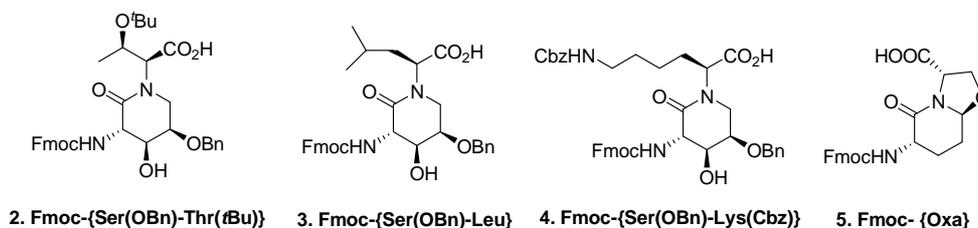
---



## RESUMEN

Utilizando el cicloheptapéptido stylostatin 1 (cNSLAIPF) como nuestro modelo [1], diseñamos y preparamos una biblioteca de ciclopéptidos con un uso potencial como antibióticos que atacasen directamente la membrana celular procarionta siguiendo un mecanismo similar al propuesto por Ganz [2]. Para ello se sintetizaron péptidos con aminoácidos naturales y otros que incluyesen nuestras lactamas de síntesis de conformación restringida, introduciendo cambios en la hidrofobicidad/amfipaticidad, el número de cargas positivas o el tamaño del péptido.

En primer lugar se realizó la síntesis de nuestras 3-aminolactamas de conformación restringida. Se obtuvieron las siguientes 3-aminolactamas



A continuación se abordó la síntesis de nuestra biblioteca de  $\Psi$ -stylostatinas siguiendo una metodología de tipo Fmoc/*t*Bu y utilizando para ello una resina de tipo cloruro de 2-clorotritilo. De los 36 péptidos planificados se sintetizaron 11 que incluyen nuestras lactamas y otros 19 formados por aminoácidos naturales, con rendimientos moderados y purzas superiores al 90 %. Varios de los péptidos que incluyen nuestros “scaffolds” lactámicos se degradaron al intentar desbencilarlos en su posición C-5.

Una vez obtenidos los péptidos de nuestra biblioteca se realizaron estudios de dicroísmo circular con los que se observó la posible agregación en varios de nuestros compuestos. Los cálculos de modelización molecular mostraron que diferentes  $\Psi$ -stylostatinas presentaban diferentes grados de flexibilidad.

En último lugar se realizó la evaluación de nuestras  $\Psi$ -stylostatinas como antibióticos y antitumorales. En ninguno de los dos casos se encontró actividad.

[1] Forns, P.; Piró, J.; Rubiralta, M.; Cuevas, C.; Diez, A.; *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 5825-5833.

[2] Ganz, T. *Nature*, **2001**, *412*, 392-393.



**CAPÍTULO 1**  
**Introducción y objetivos**

---



La presente tesis constituye la continuación de los estudios realizados sobre  $\Psi$ -stylostatinas como potenciales agentes anticancerosos,<sup>1</sup> pero ahora enfocados a la obtención de antibióticos que actúen sobre la membrana procariota.

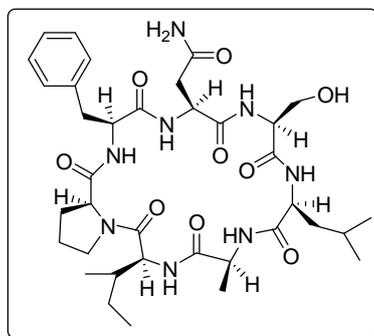


Figura 1. Stylostatin I

Este tipo de antibióticos se llaman “de nueva generación”, ya que este mecanismo de acción no ha mostrado hasta el presente muchos mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos y se espera que estas resistencias no aparezcan tan fácilmente como con los antibióticos clásicos.

A continuación se pretende mostrar una visión global del grupo terapéutico de los antibióticos en general, y de los antibióticos peptídicos en particular.

## 1.1. ANTIBIÓTICOS Y ANTIMICROBIANOS

Según la RAE se denomina antibiótico (del griego, *anti*, contra; *bios*, vida) a cualquier compuesto químico capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causarles la muerte, por su acción bactericida, y que es producido por un ser vivo o fabricada por síntesis. Normalmente, cuando hablamos de antibióticos, nos referimos en concreto a las bacterias pero muchas veces se utiliza el término de manera amplia para otros microorganismos. De forma más general, se denomina antimicrobiano a aquel que combate los microorganismos o evita su aparición. Así, en la presente tesis nos

<sup>1</sup> Forns, P.; Piró, J.; Rubiralta, M.; Cuevas, C.; Diez, A.; *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 5825-5833.

referimos en múltiples ocasiones a antimicrobianos pues un antibiótico también puede presentar actividad contra otros microorganismos patógenos.

Aunque los diferentes mecanismos de acción de los antibióticos no se conocieron de forma científica hasta bien entrado el siglo XX, la utilización de compuestos orgánicos en el tratamiento de la infección se conoce desde la antigüedad. Los extractos de plantas medicinales y hongos se llevan utilizando desde hace muchos siglos.<sup>2</sup>

La primera observación del llamado efecto antibiótico fue realizada en el siglo XIX por el químico francés Louis Pasteur (destrucción de gérmenes del ántrax por parte de algunas bacterias saprofitas). Hacia principios del siglo XX el bacteriólogo alemán Rudolf von Emmerich aisló una sustancia capaz de destruir los gérmenes del cólera y la difteria en un tubo de ensayo, aunque no eran efectivas en el tratamiento humano.

En la primera década del siglo XX, el físico y químico alemán Paul Erlich ensayó la síntesis de compuestos orgánicos capaces de atacar de manera selectiva a los microorganismos infecciosos sin lesionar al organismo huésped.

La penicilina es el arquetipo de los antibióticos. Se trata de un derivado del hongo *Penicillium notatum*. Flemming descubrió de forma accidental este compuesto en 1928; esta sustancia demostró su eficacia frente a cultivos de laboratorio de algunas bacterias patógenas como las de la gonorrea, o algunas bacterias responsables de meningitis o septicemia. Este descubrimiento permitió el desarrollo de posteriores compuestos antibacterianos producidos por organismos vivos.

Desde la generalización del empleo de antibióticos en los años 50, cambió radicalmente el panorama de este tipo de enfermedades. Enfermedades infecciosas que habían sido primera causa de muerte como la tuberculosis, la neumonía o la septicemia, descendieron espectacularmente a nivel de mortandad. También han supuesto un avance espectacular en el campo de la cirugía ya que ahora es posible realizar operaciones mucho más complejas y prolongadas con un riesgo mínimo de infección.

---

<sup>2</sup> Wainwright, M.; “Cura milagrosa: historia de los antibióticos”. Colección Ciencia y Tecnología. Pomares-Corredor, Barcelona **1992**.

Pese a ello, el uso indiscriminado y/o inadecuado de los antibióticos ha llevado a la aparición de resistencias bacterianas a muchos de los medicamentos clásicos. Así, la OMS<sup>3</sup> en un estudio global realizado en 2014 sobre las resistencias bacterianas ha hallado evidencias desoladoras sobre la inmensa extensión de estas, muy variable de país a país y que ha llevado a que tratamientos con antibióticos muy usados comúnmente sean inútiles contra muchas especies y cepas bacterianas. Por ejemplo, se han reportado múltiples casos de fracaso terapéutico en el tratamiento de la gonorrea con cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación, o un aumento de resistencias a antibióticos carbapenémicos considerados como último recurso terapéutico en infecciones nosocomiales provocadas por *Klebsiella pneumoniae*. Muy pocos nuevos antibióticos han sido introducidos en el mercado en los últimos años, seguramente debido al hecho de que, al creer controladas la mayoría de enfermedades infecciosas provocadas por bacterias, se han dedicado pocos recursos a la investigación de nuevos antibióticos. Hoy en día se hace imprescindible la inversión en investigación sobre nuevos candidatos a antibióticos que no presenten resistencias bacterianas, ya que se trata de un tema de máxima emergencia en salud pública.

## 1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos se pueden clasificar de forma sencilla en base a dos criterios:

- **Según su acción**

**Antibióticos bactericidas** (betalactámicos, aminoglicósidos). Destruyen las bacterias.

**Antibióticos bacteriostáticos** (tetraciclinas, cloranfenicol). Inhiben el crecimiento bacteriano.

---

<sup>3</sup> Organización Mundial de la Salud (OMS). “Antimicrobial resistance: global report on surveillance” 2014.

- **Según su diana<sup>4</sup>**

**Fármacos que actúan sobre la pared bacteriana.** A este nivel actúan, por ejemplo, muchos  $\beta$ -lactámicos (cefalosporinas, penicilinas...). La desaparición de esta pared celular lleva a la entrada excesiva de agua y a la lisis celular.

**Alteración sobre la membrana citoplasmática.** Existen pocos fármacos que actúen sobre la membrana celular, pero siempre se suelen caracterizar por ser potentes y muy tóxicos. Ejemplos de fármacos que actúen a este nivel son la polimixina B, la anfotericina, la nistatina o la colistina (polimixina E). Pueden actuar llevando a cabo una serie de procesos de fosforilación oxidativa, uniones específicas (por ejemplo la de la anfotericina B con el grupo esteroles de la membrana) o como detergentes catiónicos (polimixina B o colistina). La muerte celular en este caso se da por la permeabilización incontrolada de metabolitos, iones, agua, etc...

**Inhibición de la síntesis proteica.** Suelen ser antibióticos de amplio espectro que pueden actuar a varios niveles. Así, la estreptomicina y el cloranfenicol interfieren la síntesis proteica afectando al ribosoma; las tetraciclinas actúan sobre el tRNA, etc...

**Bloqueo de la síntesis de los ácidos nucleicos.** Muchos fármacos actúan impidiendo la replicación del ADN. Ejemplos son el ácido nalidíxico, la griseofulvina, rifampicina...

### 1.3. APARICIÓN DE RESISTENCIAS

La aparición de resistencias representa un grave problema de salud pública en la actualidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro Europeo para el Control y la Prevención de las Enfermedades (ECDC) estiman que las bacterias resistentes a los antibacterianos causan en la UE alrededor de 400.000 infecciones, 2,5 millones de días adicionales de hospitalización y 25.000 muertes por año, con un gasto adicional asociado superior a los 1.500 millones de euros por los costes derivados de la atención sanitaria y la pérdida de productividad.<sup>5</sup> Muchos antibióticos de primera

---

<sup>4</sup> Lorenzo Velásquez, B. "Farmacología y su proyección a la clínica" 12ª edición, editorial Oteo, 871-874.

<sup>5</sup> *Farmacéuticos* "La Lucha contra la resistencia bacteriana" Diciembre 2013, 390, 50-58.

generación se han visto reemplazados por otros cada vez más complejos debido a la evolución bacteriana que se da por selección de cepas resistentes.<sup>6</sup> Esta selección de bacterias resistentes tiene un impacto muy negativo sobre el paciente infectado, pues conduce, con elevada probabilidad, al fracaso terapéutico. Además, esto es relevante para el resto de individuos o colectividad, ya que aumentan las posibilidades de adquirir y desarrollar infecciones por bacterias resistentes a antimicrobianos. Las bacterias han ido generando mecanismos para combatir a los antibióticos mediante un proceso de adaptación y evolución continuo mediante diferentes mecanismos genéticos. La generación de estas resistencias representa el problema más relevante derivado del uso indiscriminado de antibióticos. Aunque la aparición de resistencia microbiana está ligado a un amplio y diverso colectivo de factores, variable en cada país, podemos encontrar unos factores que habitualmente la producen:<sup>5</sup>

- **Factores naturales:** incremento de la presión ecológica sobre las especies microbianas; prevalencia desigual de enfermedades infecciosas en áreas geográficas diversas.
- **Factores ligados a la prescripción de antimicrobianos en seres humanos y animales:** errores en el diagnóstico, mala selección de los antibióticos (no se realizan antibiogramas o cultivos o se hacen erróneamente), abuso en la prescripción de antibióticos (siendo este caso especialmente problemático en clínica (hospitales), uso indiscriminado de antibióticos en veterinaria, por ejemplo en explotaciones agrícolas o ganaderas, uso para indicaciones no autorizadas.
- **Factores ligados a la distribución y dispensación de antimicrobianos:** dispensación de antibióticos sin receta (automedicación inadecuada); distribución sin control farmacéutico, adquisición/distribución a través de internet.
- **Factores ligados al paciente:** incumplimiento o falta de adherencia al tratamiento; autoconsumo procedente de restos de tratamientos anteriores.

---

<sup>6</sup> Rice L.B.; *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71 (7), 991-995.

- **Existencia de infecciones secundarias a enfermedades inmunosupresoras (VIH):** estas enfermedades aumentan la prevalencia y el consiguiente uso de antibióticos para enfermedades como la neumonía, las enfermedades diarreicas, la tuberculosis o la malaria.
- **Factores ligados a la industria farmacéutica:** presión comercial a médicos y veterinarios; elevado número de presentaciones comerciales de medicamentos, con poca diferenciación entre ellas; escaso nivel de inversión e innovación.
- **Factores ligados a la actuación de la Administración pública/ privada y a la regulación sanitaria:** deficiencias en recursos para el diagnóstico y la formación continuada; ausencia de consensos científicos sobre utilización de antibióticos, eliminación inadecuada de los restos de envases en atención primaria y hospitalaria, eliminación inadecuada de excretas procedentes de hospitales y explotaciones ganaderas

### 1.3.1. Panorama actual

Actualmente se utilizan combinaciones de antibióticos para obtener los mismos resultados que hace unos años y minimizar la aparición de nuevas resistencias. Además, muchos laboratorios abandonaron en parte la investigación en torno a los antibióticos debido a que se pensó que los que ya había en el mercado aseguraban un tratamiento efectivo contra la mayoría de enfermedades conocidas. De unos 506 fármacos en fase clínica en 2004, sólo 5 fueron nuevos antibióticos. Además el número de antibióticos aprobados por la FDA ha disminuido un 56 % en los últimos 20 años. La reactivación de estas investigaciones -a todas luces necesaria y urgente- representa un tiempo y un esfuerzo económico importante, además de un retraso importante en la aparición de nuevas terapias anti infecciosas. Todo esto augura unas malas perspectivas de futuro a medio plazo.

Numerosas organizaciones se han puesto en marcha para el estudio y control de la aparición de nuevas resistencias, así como para el asesoramiento de cómo evitarlas.<sup>7</sup>

Así, en 2013, la Comisión Europea publicó un Eurobarómetro<sup>8</sup> realizado sobre los 27 estados miembros de la UE. De este Eurobarómetro se pudieron sacar una serie de conclusiones muy significativas:

- En los 12 meses anteriores al estudio el 35 % de los entrevistados tomaron antimicrobianos. Un 8 % de los españoles (5 % a nivel medio de la UE) los tomaron de forma indiscriminada, sin prescripción médica.
- Se observó, mediante una encuesta, un elevado desconocimiento del uso racional de los antibióticos.
- Los europeos, en su gran mayoría, saben que el uso innecesario de los antibióticos los vuelven ineficaces. Además dos terceras partes saben que el uso frecuente de antibióticos puede ocasionar diarrea y que los antibióticos no son eficaces contra virus (en casos de resfriados y gripe).
- Solo un tercio de los encuestados en Europa recuerda haber recibido información sobre el uso inadecuado de antibióticos en el año inmediatamente anterior.

Los datos extraídos de este Eurobarómetro 2013 concluyen en que las campañas mediáticas son eficientes en la difusión de información, pero deben dirigirse más eficazmente a aquellos que actualmente carecen de conocimientos sobre el tema. Así, médicos y farmacéuticos tienen un papel clave que desempeñar para cambiar los puntos

---

<sup>7</sup> Felmingham, D.; White, A R.; Jacobs, M.R.; Appelbaum, P.C.; Poupard, J.; Miller, L.A.; Grüneberg, R.N. *Journal of antibiotic chemotherapy* **2005**, *56*, Suppl.S2,ii3-ii21 b) Avorn, J.L.; Barrett, J.F.; Davey, P.J.; McEwen, S.A.; O'Brien T.F.; Levy, S.B. "Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. Alliance for the prudent use of Antibiotics". Boston, MA, United States of America. World Health Organization

<sup>8</sup>European Commission: Directorate-General for Health and Consumers; "Research and Speechwriting" Unit and co-ordinated by Directorate-General for Communication. Special Eurobarometer 407. Antimicrobial resistance. [http://ec.europa.eu/public\\_opinion/archives/ebs/ebs\\_407\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/public_opinion/archives/ebs/ebs_407_en.pdf).

de vista erróneos y el comportamiento de los ciudadanos en relación con las características y el uso correcto de los antibacterianos.

### 1.3.2. Situación general de las resistencias bacterianas en Europa.

El último informe publicado por el ECDC en noviembre de 2013<sup>9</sup> recoge los datos referidos a 2012 sobre la resistencia a los antimicrobianos de las cepas aisladas reportadas a los organismos de control europeos.

Según datos de este informe, en los casos de las bacterias *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, la mayoría de los aislados reportados presentaban resistencia a por lo menos uno de los antibióticos sujetos a vigilancia. Muchos de ellos tenían resistencia combinada a cefalosporinas de 3ª generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. Se observó asimismo un aumento de resistencias de *K. pneumoniae* a carbapenemas solos, y resistencia combinada cuando se utilizan en combinación con otro antibiótico en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.

Así, *E.coli* presenta resistencias claras a aminopenicilinas (amoxicilina...) en más de la mitad de los aislados, fluoroquinolonas (ciprofloxacino) y cefalosporinas de 3ª generación (ceftriaxona, cefixima), siendo en España peor que en la media de la UE. En nuestro país el panorama evolutivo de las resistencias a los antibióticos de *E.coli* es muy preocupante, ya que está aumentando significativamente la frecuencia de aislados resistentes a diversos antibióticos, con la única excepción de las resistencias a carbapenemas, casi nula.

El caso de *K. pneumoniae* es similar. Esta presenta una resistencia combinada a cefalosporinas de 3ª generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos, con frecuente presencia de aislados productores de betalactamasas de espectro extendido (ESBL+) en las cepas con resistencia a cefalosporinas de 3ª generación. Además, y aunque en Europa aún no es tan evidente, en muchos países del mundo ha aumentado mucho la resistencia a antibióticos carbapenémicos, haciendo que en muchas zonas estos no sean eficaces en la mitad de las personas con infecciones por *K.pneumoniae*.<sup>3</sup>

---

<sup>9</sup> European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance. Stockholm: ECDC. Noviembre 2013.

*P.aeruginosa* presenta elevados porcentajes de resistencia. En la mayoría de países informan de tasas superiores al 10% para todos los grupos de antibióticos. Se notificaron elevadas resistencia a carbapenemas (17,1%) y resistencias combinadas del 13,8 % a tres grupos combinados. El 5,8 % de los aislados eran resistentes a las 5 clases de antibióticos considerados en el registro epidemiológico.

Como buena noticia, y tomando datos referentes a España, la evolución de las cepas resistentes a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* se han estabilizado, o disminuido, en su incidencia.

### **1.3.3. Iniciativas oficiales para la prevención de la aparición y crecimiento de las resistencias a antibióticos.**

La *Comisión Europea* elaboró en 2011 un Plan de Acción quinquenal (CE, 2011) con el fin de atajar la propagación de las resistencias bacterianas. Contiene 7 ámbitos clave en los que se consideró imprescindible tomar medidas: uso adecuado de antimicrobianos, prevención de las infecciones y su propagación, creación de nuevos antimicrobianos, cooperación para evitar las resistencias, mejorar el seguimiento y la vigilancia médica y veterinaria, fomentar la investigación y apoyar la comunicación, educación y la formación al respecto. En los primeros años de aplicación se consideró que la iniciativa iba por buen camino gracias a inversiones en la investigación, en gran medida a través de la Iniciativa sobre Medicamentos Innovadores (IMI), la contribución presupuestaria para PyMEs y universidades y la publicación de normas para la recogida de datos armonizada sobre las resistencias bacterianas en alimentos y animales. Además se solicitó a los estados miembros de la UE que elaboraran e implementaran a nivel nacional estrategias o planes de acción para contener el desarrollo de resistencias a antibióticos.

Así, a petición de la Agencia Española de medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) se desarrolló el “Plan Estratégico y de Acción para Reducir el Riesgo de Selección y Diseminación de Resistencias a Antibióticos”. Para ello se reunió a miembros de ministerios de Sanidad, Servicios Sociales, Agricultura, Economía,

miembros de las diferentes universidades, sociedades científicas y organizaciones profesionales sanitarias (médicos, farmacéuticos y veterinarios).

A nivel del profesional farmacéutico comunitario se realiza un especial énfasis en la difusión de información sobre el uso racional de los antibióticos y el consejo en la dispensación de estos. También se realiza una labor importante con la recogida selectiva de medicamentos a través de puntos Sigre, contribuyendo a evitar el vertido incontrolado y el uso indebido de estos antibióticos.

#### 1.4. CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS

Las bacterias se pueden clasificar, a grandes rasgos en:

- **Gram positivas.**

Presentan tinción positiva frente al test de Gram y se caracterizan por la presencia de pared celular, la cual está compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano. Este peptidoglicano está formado por cadenas de elevado peso molecular constituidas por unidades diméricas de *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilmurámico. Dichas cadenas se unen entre si mediante pequeños péptidos de 3 a 10 aminoácidos. Además, se observa la presencia de ácidos teicoicos y lipoteicoicos.

- **Gram negativas.**

Presentan tinción negativa frente al test de Gram. Las bacterias gram negativas se caracterizan por no tener pared celular. Presentan dos membranas diferenciadas, una interna y otra externa, con una capa de peptidoglicano entre ellas. La unión entre estas membranas está facilitada por lipoproteínas. Es de destacar el hecho que sea la membrana externa la que regula el tránsito de sustancias. Además, presentan en la membrana externa lipopolisacáridos (LPS). Estos son exclusivos de las bacterias gram negativas y constituyen una diana interesante para antibióticos, por su característica carga neta negativa (propia de procariontes). Su función consiste en proteger a la bacteria de la acción de sales biliares y antibióticos lipofílicos. Se trata de endotoxinas resistentes al calor consideradas como el factor clave en el choque séptico en humanos

(septicemia) y en la inducción de fuertes respuestas inmunes en células normales de mamíferos.<sup>10</sup>

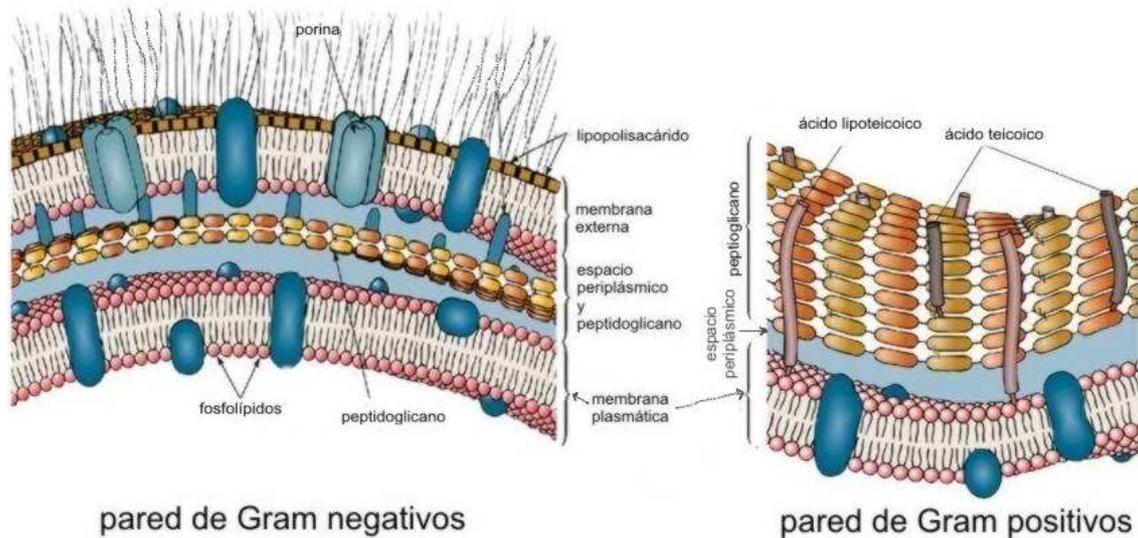


Figura 2. Esquema de membrana celular de tipo gram negativo (izquierda) y Gram positivo (derecha)<sup>11</sup>

El lipopolisacárido se divide en tres partes fundamentales:

- El **Lípido A** está localizado en la parte interna. Se trata de una región hidrofóbica muy poco variable entre especies de bacterias de tipo fosfolípidico formado por un disacárido de glucosamina fosforilado con ácidos grasos de cadena larga. El lípido A se considera clave en la actuación como endotoxina por parte del lipopolisacárido. Además, se trata de una diana ideal para el ataque de péptidos y proteínas de naturaleza catiónica, como la polimixina B.<sup>12</sup>
- El **núcleo polisacárido** se encuentra localizado en la superficie de la membrana. Está compuesto por una cadena polisacáridica de naturaleza hidrofílica. Así, el núcleo interno contiene de 1 a 4 moléculas de ácido 3-desoxi- $\alpha$ -D-manooctulosónico unidas directamente al disacárido de glucosamina del lípido A. También encontramos monosacáridos de heptulosa variados. En

<sup>10</sup> <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biology/Glycobiology/glycobiology-pdf/lipopolysaccharides.pdf>

<sup>11</sup> Sanchez De Ribas, C.; *Química Viva*, **2006**, 5(2). [www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/sanchez.html](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/sanchez.html).

<sup>12</sup> Tsubery, H.; Ofek, I.; Cohen, S.; Eisenstein, M.; Fridkin, M. *Mol. Pharmacol.* **2002**, 62, 1036-1042.

general los residuos formantes de este núcleo interno están fosforilados de diversas maneras, lo que aún aumenta más la carga neta negativa del lipopolisacárido. En el núcleo externo encontramos sobretodo hexosas comunes, como la glucosa, la galactosa y la *N*-acetilglucosamina, siendo más diversa estructuralmente que el núcleo interno.<sup>10</sup>

- Fuera de la membrana se encuentra el **Antígeno O (o antígeno somático)**, formado por unidades repetitivas de oligosacáridos que están compuestas por grupos de dos a seis azúcares (entre ellos la galactosa o la abecucosa). El antígeno O es la estructura constitutiva del lipopolisacárido que diferencia las bacterias. Así estas estructuras distintivas han sido usadas para identificar y asignar serogrupos a diferentes cepas de *E.coli* o *Salmonella* entérica, entre otras.<sup>10</sup>

## 1.5. PÉPTIDOS ANTIBIÓTICOS

En los últimos años ha surgido la necesidad de obtener nuevos antibióticos. La aparición de resistencias a los ya existentes ha causado un descenso en los niveles de eficacia de éstos. Esta problemática se ha subsanado momentáneamente con el uso de asociaciones de antibióticos, pero simplemente se trata de un remedio temporal a la carencia de nuevos agentes antimicrobianos.

Una posible solución a esta problemática la constituyen los péptidos. Se entiende por "péptido" una molécula formada por dos o más aminoácidos. Un péptido suficientemente largo es conocido como polipéptido. Una proteína consta de uno o más polipéptidos.

Los péptidos son responsables de un gran número de actividades biológicas en el cuerpo humano. Actúan a diversos niveles en múltiples campos: como reguladores de procesos metabólicos, como mensajeros extracelulares (hormonas, neurotransmisores...), en los procesos respiratorios.... Asimismo, se han aislado multitud de péptidos naturales que juegan un papel importante como defensa antibacteriana en el organismo que los produce.

### 1.5.1. Ventajas y desventajas del uso de los péptidos como antibióticos en terapéutica

Existen muchas ventajas en el uso de péptidos como potenciales antibióticos. Así la búsqueda de nuevos antibióticos peptídicos se basa en que:<sup>13</sup>

- Son altamente biocompatibles.
- Presentan un amplio espectro de efectividad pudiendo ser utilizados en muchos casos como antimicrobianos en general (bacterias, hongos, infecciones virales) y pueden actuar contra neutralizadores de endotoxinas en procesos de septicemia, como inmunomoduladores o contra procesos inflamatorios.
- Matan de manera efectiva a muchas bacterias multiresistentes en concentraciones similares a antibióticos clásicos.
- Su modo de acción acostumbra a ser bactericida, altamente deseable en terapéutica. Además se trata de una acción muy rápida en general.
- Pueden tener un efecto sinérgico con antibióticos convencionales debido a que muchos de ellos aumentan la permeabilidad de la membrana.
- Las resistencias a antibióticos peptídicos catiónicos se consideran poco probables debido a que la mayoría atacan las estructuras base de las membranas bacterianas, hecho que hace muy poco posible una adaptación bacteriana que permitiese la aparición de la resistencia. Este hecho queda aún más reforzado por el hecho de que estos péptidos acostumbran a presentar múltiples dianas sobre las bacterias procariotas.
- En algunos casos pueden atravesar la membrana y afectar a procesos citoplasmáticos clave.

---

<sup>13</sup> Marr, A.K.; Gooderham, W.; Hancock, R. *Current Opinion in Pharmacology*, **2006**, 6, 468–472

En cualquier caso los péptidos presentan ciertos problemas al ser usados como antibióticos:<sup>13,14</sup>

- Se trata de compuestos muy caros de producir en cantidades suficientes.
- En muchos casos no son tan potentes como algunos antibióticos convencionales
- En algunos casos presentan una elevada toxicidad, debido a las elevadas dosis terapéuticas (baja biodisponibilidad/ inespecificidad) y/o a la baja selectividad contra células procariotas. Una elevada hidrofobicidad, anfipaticidad o helicidad acostumbran a aumentar la toxicidad al alterar también las células eucariotas del huésped (presentando, por ejemplo, actividad hemolítica). Se hace imprescindible buscar el máximo de selectividad contra células procariotas para el uso terapéutico de péptidos como antibióticos.
- Muchos péptidos que muestran una elevada actividad *in vitro* pierden esta actividad en soluciones salinas fisiológicas *in vivo*.
- Problemas de tipo farmacocinético como la baja absorción por vía oral debido a la falta de transportadores específicos y a su elevado peso molecular, la baja estabilidad metabólica, consecuencia de la rápida degradación llevada a cabo por las peptidasas endógenas, originando efectos biológicos de corta duración, y su rápida excreción a través del hígado y de los riñones.
- Presentan algunos efectos secundarios debido a las diferentes conformaciones que puede adoptar un péptido flexible frente a diversos receptores. Esto también dificulta su unión a la molécula diana.

Todas estas limitaciones ponen en compromiso el elevado interés que despiertan los péptidos como nuevos fármacos y moléculas bioactivas. De hecho, aún con estas limitaciones se valoran como solución terapéutica a problemas de complicada solución

---

<sup>14</sup> Mc Martin, C. "Pharmacokinetics of Peptides and Proteins: Opportunities and Challenges", en *Advances in Drug Research*; Testa, B., Ed.; Academic press: London, **1992**, 41-106.

como las bacterias multiresistentes que cada vez son un problema más grave contra la salud pública (como es el caso de *Pseudomonas*, por ejemplo). Por esto, en los últimos años se está investigando con la finalidad de resolver estas limitaciones y poder aprovechar el enorme potencial de estas moléculas.

### 1.5.2. Modificaciones de los péptidos

Existen múltiples modificaciones que se pueden realizar sobre un péptido para aumentar la afinidad, la eficacia y la especificidad, así como su biodisponibilidad. El esqueleto peptídico no es un requisito absoluto para una elevada afinidad, sino que sirve únicamente de matriz estructural sobre la que colocar las cadenas laterales, que serán las que ejerzan la acción. Así, con el propósito de realizar un diseño racional, Farmer y Ariëns<sup>15</sup> establecieron una serie de reglas a seguir con tal de convertir un péptido en un peptidomimético. Un peptidomimético es una estructura, generalmente pequeña de tipo protéico o similar diseñada para mimetizar un péptido. Esta estructura química alterada intenta ajustar y/o mejorar las propiedades moleculares (estabilidad, actividad biológica, menor toxicidad...). Una definición moderna de peptidomimético fue realizada por V.Hruby,<sup>16</sup> el cual describe un peptidomimético como un compuesto, diseñado experimentalmente, la estructura farmacológica del cual mimetiza la zona del péptido natural que contiene elementos de unión al receptor en el espacio 3D y mimetiza la unión y la actividad, ya sea como agonista o antagonista de un ligando peptídico natural. Así, el diseño racional de peptidomiméticos se considera la principal vía en la consecución de conocimientos aplicables en la búsqueda de agonistas/antagonistas de péptidos bioactivos.

Existen muchos cambios que pueden introducirse en los péptidos con objeto de estudiar y/o mejorar sus características:<sup>15,17</sup> Estos cambios son de tipo muy variado: sustituir los aminoácidos L por D-aminoácidos (ya que impiden reconocimiento enzimático), *N*- ó  $\alpha$ -alquilación de los aminoácidos, utilización de aminoácidos  $\alpha$ ,  $\beta$ -

---

<sup>15</sup> a) Farmer, P.S.; Ariëns, E.J. *Drug Design*, Academic Press: New York, **1980**, 119-143. b) Farmer, P.S.; Ariëns, E.J. *Trends Pharmacol. Sci.* **1983**, *3*, 362-365.

<sup>16</sup> Hruby, V. J.; Balse, P. M.. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 945-970.

<sup>17</sup> Tourwé, D.; Can Peptide Mimetics be Rationally Designed? The Somatostatin Case. <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/161902-Can-Peptide-Mimetics-be-Rationally-Designed-The-Somatostatin-Case/>.

insaturados, introducción de aminoácidos no naturales o capados *N* y *C* terminales, entre otros.

Una mayor rigidez conformacional del esqueleto peptídico se puede obtener con el uso de la ciclación, ya sea global o con el uso de aminoácidos con restricción conformacional (naturales o no)<sup>18</sup>, usando el concepto de “spatial screening”<sup>19</sup> o con miméticos de estructura secundaria.

Un paso mayor de cambio en la estructura consiste en la modificación del esqueleto peptídico, utilizando para ello sustituciones de un fragmento del péptido por una molécula no peptídica, isómeros del enlace amida, extensiones de cadena, sustituciones del carbono (por ejemplo en los azapéptidos)...<sup>17</sup>

Toda la información obtenida con estas modificaciones, asociada a estudios conformacionales (modelado molecular, espectroscopia de RMN...) se utiliza para generar un modelo del farmacóforo en 3D. La aplicación de los elementos de este farmacóforo en un “scaffold” llevaría al diseño final de un nuevo peptidomimético.

## 1.6. ANTIBIÓTICOS PEPTÍDICOS COMERCIALES

Debido a su elevada toxicidad y complicada biodisponibilidad, aún se utilizan pocos antibióticos peptídicos en terapéutica. Entre los que sí se usan tenemos:

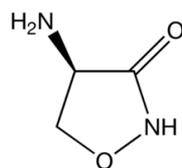
---

<sup>18</sup> Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 512-523

<sup>19</sup> Kessler, H.; Gratias, R.; Hessler, G.; Gurrath, M.; Muller, G.; *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1201-1205.

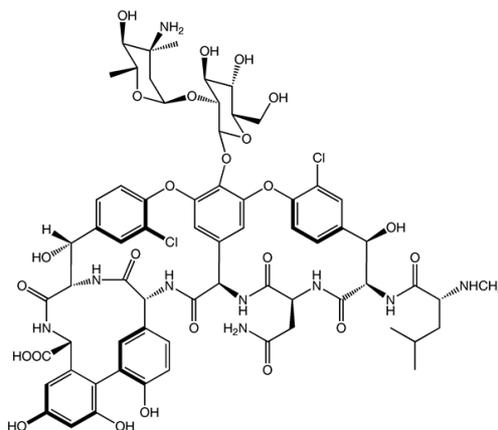
- **Contra gram positivo:**

**Cicloserina.** Se trata de una molécula muy parecida estructuralmente a la D-Alanina, y actúa como inhibidor competitivo. Es de amplio espectro, pero en la actualidad casi no se usa debido a su neurotoxicidad.



**Figura 3.** Estructura molecular de la Cicloserina.

**Vancomicina.** Glucopéptido de amplia aplicación contra *S.aureus* y *S.pneumoniae*, además, es el fármaco de elección ante colitis ocasionadas por *C. Difficile* (debido al uso de antibióticos en el tracto intestinal).



**Figura 4.** Estructura molecular de la Vancomicina.

**Bacitracina-A.** Se trata de un compuesto de naturaleza polipeptídica. Es muy tóxico a nivel sistémico y por ello se utiliza a nivel tópico. También es válido contra gram negativos como *Neisseria*.

**Daptomicina.**<sup>20</sup> Se trata de un antibiótico de elevada relevancia en la práctica clínica actual, principalmente porque presenta una elevada actividad contra cepas Gram positivas que presentan resistencias a antibióticos clásicos como es el caso de cepas resistentes a meticilina de *Staphylococcus aureus* y cepas de enterococos resistentes a vancomicina.

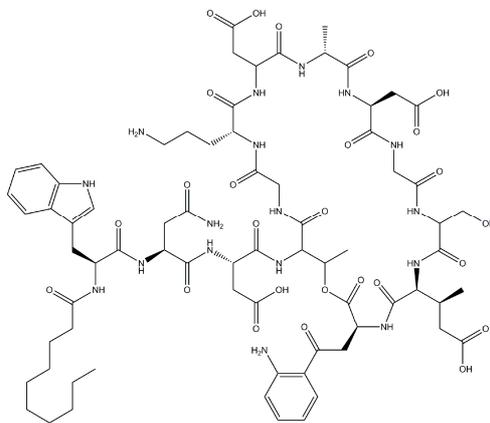


Figura 5

- **Contra gram negativo:**

**Polimixina-B,**<sup>12</sup> **Gramicidina-S** (también activa frente a gram positivo y hongos)<sup>21,22</sup> y **Tirocidina-A.**

Estos péptidos presentan una serie de características comunes. Están producidos por diferentes especies de *Bacillus* y contienen aminoácidos con configuraciones L y D, además de presentar aminoácidos no proteínogenéticos. Son cíclicos y cargados positivamente y tienen carácter bactericida. Todas estas características los hacen muy interesantes para su estudio y farmacomodulación.

---

<sup>20</sup>Tófoli, E.G.; Salgado H.R.N.; *Pharmaceutics* **2015**, 7(3), 106-121.

<sup>21</sup> Kawai, M.; Tanaka, R.; Yamamura, H.; Yasuda, K.; Narita, S.; Umemoto, H.; Ando, S.; Katsu, T. *Chem. Commun.* **2003**, 1264–1265.

<sup>22</sup> Lee, D.L.; Hodges, R.S.; *Biopol.* **2003**, 71, 28–48.

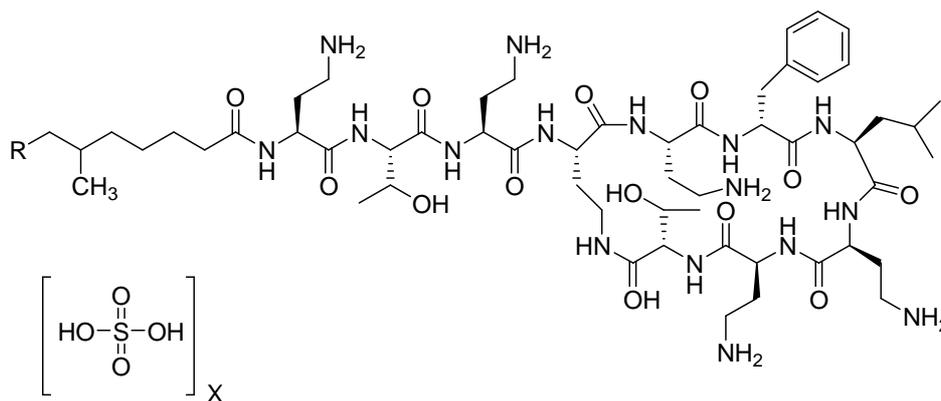


Figura 6. Sulfato de Polimixina B

- **Otros antibióticos peptídicos**

En general se trata de péptidos con un elevado número de cargas positivas, lo cual les confiere mucha potencia, pero también una elevada toxicidad, por lo que no se pueden usar en terapéutica. Ejemplos:

**Pentalisina.** Se trata de un polímero de lisina con cierta actividad permeabilizadora contra cepas de *P. Aeruginosa*.

**Protamina.** Aparte de ser usada en la transferencia genética mediada por retrovirus, tiene propiedades antibióticas<sup>23</sup> e inhibe la actividad de la pepsina.

Existen, además, muchos péptidos policatiónicos en células fagocíticas de diferentes especies animales. Son tóxicos. Entre estos están las **Defensinas, Cecropinas, Magaininas y la Melitina.**<sup>24</sup>

Existe mucha información al respecto de los mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos y de su especificidad contra patógenos bacterianos. Múltiples revisiones han sido escritas abordando este tema.<sup>25,26,27</sup> Cabe destacar especialmente la

<sup>23</sup> Johansen, C.; Gill, T.; Gram, L. *J. Appl. bacterial.* **1995**, 78 (3), 297-303.

<sup>24</sup> Oren, Z.; Shai, Y. *Biopoly* **1998**, 47, 451-463.

<sup>25</sup> Rivas, L.; Luque Ortega, J.R.; Fernández Reyes, M.; Andreu, D. *J. Appl. Biomed.*, **2010**, 8, 159-167.

<sup>26</sup> Wimley, W.C.; Hristova, K.; *J. Membrane Biol.* **2011**, 239, 27-34.

revisión escrita por Yeaman y Yount,<sup>28</sup> que refleja de forma muy nítida y bien clasificada los mecanismos de especificidad y toxicidad selectiva de los péptidos antimicrobianos, los determinantes estructurales a tener en cuenta para que un péptido tenga actividad antimicrobiana y los diferentes mecanismos de acción contra membranas bacterianas. Basándonos en todas estas revisiones (especialmente en la remitida por Yeaman y Yount), elaboramos un resumen que pretende detallar mejor el modo de acción y los mecanismos a través de los cuales un péptido puede ejercer un papel como antibiótico. Estos aspectos quedan recopilados en los apartados 1.7 y 1.8.

## **1.7. SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS**

En diferentes estudios se han aislado polipéptidos de prácticamente cualquier tejido en los que se han buscado. En el estudio de péptidos antibióticos es indispensable determinar hasta qué punto éstos distinguen entre las células del huésped y las células microbianas para determinar la toxicidad potencial. Múltiples estudios han permitido establecer una comparativa que pretende mostrar a qué niveles existe selectividad y especificidad.

### **1.7.1. Arquitectura y energía de membrana**

Existen diferencias fundamentales entre membranas eucariotas (propias de mamíferos) y procariotas (propias de bacterias).

- **Composición de la membrana y su carga.**

Aunque todas las membranas celulares están constituidas por una bicapa fosfolípida de naturaleza anfipática, la naturaleza de ésta puede ser muy variada. Las membranas celulares de muchos patógenos bacterianos están formadas por fosfolípidos hidroxilados como el fosfatidilglicerol, la cardiolipina y la fosfatidilserina. Estos fosfolípidos proporcionan a la membrana una carga neta negativa. En cambio las células

---

<sup>27</sup> Shai, Y.; *Biopolymers*. **2002**, *66*, 236-248.

<sup>28</sup> Yeaman, M.; Yount, N. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 27-55.

de mamíferos tienen una composición rica en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esteroides como el colesterol, que presentan una carga neta neutra. La composición pues, aporta una razón importante para entender la selectividad de los péptidos antibióticos sobre membranas procariotas.

- **Asimetría de membrana.**

La membrana celular no es uniforme ni estática, sino que la carga y la anfipaticidad de las caras interna y externa de la membrana celular son muy variables. Al tener diferente composición fosfolípida la membrana procariota y la eucariota se genera aún más diferencia en esta asimetría dinámica. Un ejemplo ilustrativo de este fenómeno es el demostrado por Lasch<sup>29</sup>. Lasch realizó un estudio de espectroscopía infrarroja en el que se observó que un péptido de tipo polilisina interactúa con el lipopolisacárido induciendo una separación de éste y el fosfolípido fosfatidiletanolamina en dos dominios diferenciados. Este fenómeno causa una exagerada o anormal asimetría entre diferentes capas de fosfolípidos comprimiendo la bicapa en muchos puntos de la membrana microbiana.

- **Ligandos microbianos para péptidos antimicrobianos.**

Se ha demostrado que, en general, los enantiómeros D y L de los péptidos antimicrobianos muestran poca selectividad en su unión a receptores. Esto sugiere que no existen receptores estereoespecíficos en las células microbianas diana. En cualquier caso, ciertas estructuras pueden ser cruciales en la selectividad de los péptidos por los patógenos microbianos. Así, Teuber y Bader<sup>30</sup> demostraron que la polimixina B presenta una unión muy elevada a las diferentes membranas de *Salmonella typhimurium* (entre 30 y 60 nmol de péptido por mg de membrana). Basándose en la estequiometría del lipopolisacárido, fosfatidilglicerol y la cardiolipina en las membranas, estos investigadores calcularon que las capacidades teóricas de unión de la polimixina B eran prácticamente idénticas a las que presentarían estos fosfolípidos si fuesen modelados como receptores específicos para este péptido. Así, diferentes constituyentes de membrana se comportan como pseudoreceptores para este péptido. En general, los

---

<sup>29</sup> Lasch, P.; Schultz, C.P.; Naumann, D. *Biophys. J.* **1998**, 75, 840-852.

<sup>30</sup> Teuber, M.; Bader, J. *Arch. Microbiol.* **1976**, 109, 51-58.

ligandos electronegativos de la membrana facilitan una interacción inicial entre péptidos catiónicos y ciertos patógenos.

- **Potencial transmembrana.**

Otra diferencia fundamental entre las membranas de los microbios y la de las células de los mamíferos está en su diferente separación de cargas entre la parte extracelular e intracelular de la membrana. A este gradiente electroquímico se le llama potencial transmembrana ( $\Delta\psi$ ). La diferencia en  $\Delta\psi$  entre patógenos bacterianos (-130 a -150 mV) y las células huésped de mamíferos (-90 a -110 mV) proporciona una característica que aporta una diana selectiva para los péptidos catiónicos. Este parámetro ayuda a conseguir una toxicidad selectiva de los péptidos catiónicos a través de un mecanismo llamado "self promoted uptake"<sup>31</sup>, entre otros.

### **1.7.2. Toxicidad selectiva basada en la estructura del péptido antibiótico.**

Muchos péptidos antibióticos que se conocen no están estructurados, o tienen una conformación extendida antes de su interacción con las células diana. Otros, en cambio, sí que tienen conformaciones específicas gracias a enlaces intramoleculares de diversa naturaleza. Una vez se unen a su diana, estos péptidos pueden seguir una dinámica que les lleva a adoptar diferentes estructuras en su sitio activo. Así, pueden adoptar conformaciones específicas, autoasociación u oligomerización en el seno del patógeno diana, pero no de la célula huésped. Se trata claramente de un ejemplo de toxicidad selectiva. Existen muchos ejemplos descritos en la literatura en los que se intenta demostrar esta idea.

Unger<sup>32</sup> estudio la interacción de análogos de melitina y magainina cíclicos y lineales con modelos de membrana *in vitro*. Los péptidos cíclicos fueron menos eficientes en su unión inicial a la membrana fosfolipídica. Una vez se normalizaron las concentraciones en los puntos de unión tanto péptidos cíclicos como lineales presentaban una permeabilización de membrana similar. Una vez unidos a la membrana fosfolipídica se observó que los péptidos cíclicos reversionaron a un 75 % de la estructura

---

<sup>31</sup> Hancock, R.E. *Lancet*. **1997**, 349, 418-422.

<sup>32</sup> Unger, T.; Oren, Z.; Shai, Y. *Biochemistry* **2001**, 40, 6388-6397.

helical de sus análogos lineales, y como dato más importante, se comprobó que el análogo cíclico de melitina mostró una actividad antibacteriana incrementada, con menor tendencia hemolítica, mientras que el derivado cíclico de magainina presentó funciones biológicas opuestas.

Así, Tam<sup>33</sup> ensayó la influencia de la conformación en la selectividad membranolítica de péptidos antimicrobianos. Para ello realizó ensayos con análogos de conformación restringida de Protegrin 1, un péptido catiónico de 18 aminoácidos contra múltiples cepas bacterianas Gram positivo, Gram negativo, hongos o incluso HIV-1, con una amplia variedad y diferenciada variedad de resultados. En este estudio se observó que el análogo de Protegrin 1 cíclico y más conformacionalmente restringido de todos (ccPG-3) muestra diez veces menos capacidad hemolítica y hasta 30 veces más capacidad selectiva como membranolítico contra patógenos microbianos en comparación con otros análogos que mostraban perfiles citotóxicos y antimicrobianos equivalentes a la Protegrin 1.

En un estudio de Zhang<sup>34</sup> se ensayaron péptidos catiónicos antibióticos de diversas estructuras y origen frente a diferentes membranas modelo con diferente composición en fosfolípidos. Todos eran de naturaleza catiónica, pero diversos en conformación (hélices  $\alpha$ , hojas  $\beta$ , extendidos, cíclicos...). Independientemente a la conformación, todos los péptidos interaccionaron con la membrana compuesta de fosfatidilglicerol (aniónica) y la penetraron. Esta penetración se midió por la salida de calceína previamente introducida dentro de las membranas. En cambio, sólo los péptidos catiónicos que tenían estructuras de helice  $\alpha$  o estaban extendidos interaccionaron con membranas compuestas de fosfatidil colina (zwitteriónica), y con un menor nivel de penetración.

Este mismo equipo de investigación observó la habilidad de algún péptido con conformación de hoja  $\beta$  de inducir una translocación de fosfolípidos en la célula diana a concentraciones menores de las necesarias para la permeabilización. Las conclusiones obtenidas por este grupo de investigación, hacen creer que muchos péptidos antimicrobianos no sólo interactúan con biomembranas de composición y asimetría

---

<sup>33</sup> Tam; J.P.; Wu, C.; Yang, J.L. *Eur J Biochem* **2000**, 267, 3289-3300.

<sup>34</sup> Zhang, L.; Rozek, A.; Hancock, R.E. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 35714-35722.

específica, sino que además, pueden promover la remodelación de las propiedades de membrana en sus dianas celulares.

### 1.7.3. Afinidad *in vivo* por microorganismos

En 2001, Welling y colaboradores<sup>35</sup> ensayaron la hipótesis de que los péptidos catiónicos antimicrobianos pueden discriminar entre células microbianas y eucariotas *in vivo*. En este estudio se comparó como se acumulaban estos péptidos en tejidos infectados preferentemente a tejidos inflamados. Para ello se utilizaron derivados sintéticos de lactoferrina y ubiquicidina humanas marcadas con <sup>99m</sup>Tc y se inyectaron de forma intravenosa en animales infectados experimentalmente con *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans*. Como control se indujo inflamación de forma estéril usando para ello microorganismos inactivados por calor o lipopolisacárido purificado en el músculo del muslo. Como agentes comparativos se determinaron los niveles de defensinas, IgG y ciprofloxacino. Los péptidos unidos a <sup>99m</sup>Tc y las defensinas se acumularon en una proporción significativamente más alta en los tejidos infectados en ratones y conejos que en los tejidos que tenían inflamación, pero no infección. En general estudios como éste indican que los péptidos localizan rápidamente y se acumulan en los sitios de infección, seguramente por su afinidad preferencial a asociarse a superficies bacterianas antes que con tejidos no infectados.

### 1.7.4. Localización peptídica antimicrobiana

Existen maneras de que un péptido antimicrobiano sea menos dañino para el huésped simplemente a través de una localización estratégica o una expresión que minimice su interacción con tejidos potencialmente vulnerables del huésped. Por ejemplo, muchos péptidos antimicrobianos de origen eucariota conocidos en vertebrados son secretados en superficies epiteliales relativamente inertes, tales como la mucosa traqueal, lingual o intestinal de mamíferos, o en la piel de mamíferos o anfibios.<sup>36</sup> Estos presentan actividad contra gran cantidad de patógenos, una rápida inducción tras contacto y ausencia de memoria inmunológica, en contraste con los

---

<sup>35</sup> Welling, M.M.; Lupetti, A.; Balter, H.S.; Lanzzeri, S.; Sout, B.; Rey, A.M.; Savio, E.O.; Paulusma-Annema, A.; Pauwels, E.K.; Nibbering, P.H. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42*, 788-794.

<sup>36</sup> Metz-Boutigue, M.H.; Shooshtarizadeh, P.; Prevost, G.; Haikel Y.; Chich J.F.; *Curr Pharm Des*, **2009**, *16*, 1024-1039.

péptidos antimicrobianos de origen exógeno. Su inmediatez de acción y su eficacia frente a una infección explica porque han sido tan mantenidos a través del proceso evolutivo, pudiéndolos encontrar en organismos que van desde una simple ameba a organismos complejos como el de los primates o el ser humano. La secreción de estos péptidos es una de las principales medidas fisiológicas para prevenir la colonización microbiana de los diferentes tejidos del organismo.

Otra localización a destacar consiste la presencia de péptidos antimicrobianos en el interior de gránulos de leucocitos fagocitarios. En el proceso de la fagocitosis se internalizan los patógenos, exponiéndolos al duro microentorno del fagolisosoma. Entre todas las sustancias aquí presentes se encuentran las defensinas, extremadamente potentes, pero también muy poco selectivas frente a microorganismos. Así, las defensinas quedan recluidas en los gránulos de los fagocitos, minimizando así su potencial acción tóxica sobre el huésped, pero a la vez concentrando su actividad contra patógenos.

#### **1.7.5. Otras funciones de los péptidos que contribuyen a aumentar la defensa del huésped.**

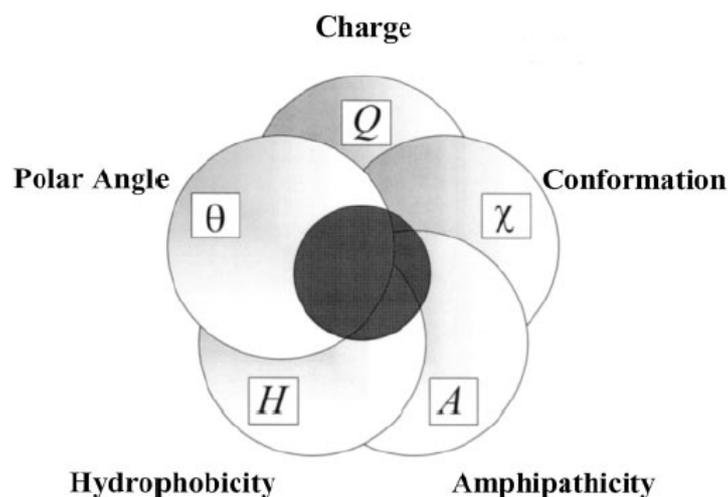
Los péptidos pueden realizar ciertas actividades de apoyo para luchar contra los microorganismos de forma específica. Así, pueden interferir en receptores eucariotas para patógenos bacterianos, pueden ejercer su acción reclutando leucocitos hacia los centros de infección o potenciando la actividad antibacteriana de otros antibióticos, sean peptídicos o no (por ejemplo desestructurando el LPS).

### **1.8. MECANISMOS DE ACCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS**

Para estudiar el mecanismo de acción de un péptido hay que tener en cuenta varios factores. En primer lugar hay que valorar los determinantes estructurales que facilitan uno u otro mecanismo. La interacción inicial con la membrana es algo determinante que suele favorecer uno u otro modo de ataque. El ataque en sí a la membrana es muy variado y puede ser de forma más o menos específica. Finalmente es importante considerar también los mecanismos de muerte celular producidos tras el ataque a la membrana.

### 1.8.1. Características estructurales determinantes para la actividad antimicrobiana

Existen ciertos determinantes para la actividad antimicrobiana de un péptido. Un requisito esencial para cualquier péptido terapéutico es la toxicidad selectiva por una diana microbiana con respecto al huésped. Una vez dirigido al microbio, existen unos criterios que permiten al péptido identificar determinantes moleculares del patógeno, accesibles y ampliamente conservados. Los péptidos antimicrobianos tienen características anfipáticas que imitan a los fosfolípidos, cosa que les permite interactuar y aprovechar la vulnerabilidad inherente en estructuras esenciales microbianas, como las membranas celulares. Así se pueden determinar ciertas características estructurales relevantes de cara a la actividad antimicrobiana.



**Figura 7.** Interrelación entre los determinantes estructurales en los péptidos antimicrobianos.

#### ***Carga positiva***

La mayoría de los péptidos antimicrobianos caracterizados hasta el día de hoy muestran una carga neta positiva, con un rango que acostumbra a ir de 2 a 9 cargas y pueden contener dominios catiónicos muy definidos. El carácter catiónico es de importancia indudable en la atracción electrostática inicial de los péptidos hacia las membranas fosfolípicas negativas de los microbios.

La superficie de las membranas bacterianas es altamente negativa debido a los fosfolípidos que la forman (fosfatidilglicerol, cardiolipina, fosfatidilserina), ricos en grupos ácidos. Además el lipopolisacárido (en Gram negativo) y los ácidos teicóicos/teicurónicos (en Gram positivo) de las bacterias, otorgan carga negativa adicional al conjunto de la membrana. Así como se explicó previamente (apartado 1.7.1), el potencial transmembrana ( $\Delta\psi$ ) es normalmente un 50 % mayor en procariotas con respecto a células de mamíferos. Un potencial quimiosmótico de este tipo puede actuar de una manera similar a una electroforesis para concentrar los péptidos cargados positivamente sobre superficies microbianas.

Muchos estudios han demostrado esta idea de la correlación entre catiocinidad y actividad antimicrobiana<sup>37</sup>. En cualquier caso hay que tener en cuenta que no se trata de una regla absoluta. Como ejemplo de esto se puede utilizar el estudio de Dathe<sup>38</sup> con análogos de la magainina 2. En este se muestra que un incremento de carga de 3 a 5 lleva a un incremento en la actividad antibacteriana. No obstante, existe un límite por encima del cual al aumentar la carga positiva no aumenta la actividad. En este caso una carga neta de 6 a 7 residuos cargados lleva a hemólisis y una pérdida de actividad antimicrobiana. Este descenso en actividad antimicrobiana puede ser debida a las interacciones excesivamente fuertes establecidas entre péptido y fosfolípidos, que pueden llegar a evitar la translocación del péptido hacia el interior de la membrana.

En cualquier caso es adecuado limitar el número de cargas al mínimo requerido para su actividad, ya que una presencia numerosa de cargas suele comportar una toxicidad demasiado alta.

### **Conformación**

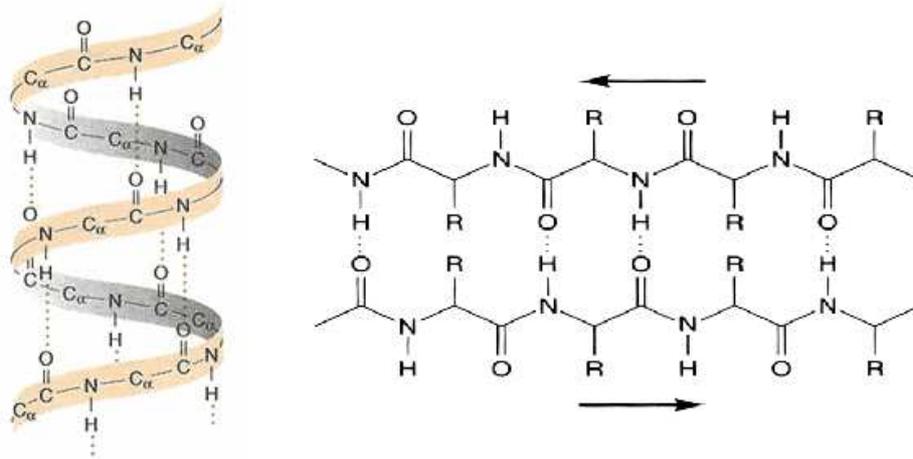
Los péptidos antibióticos tienen una procedencia muy diversa, lo que les hace diferir sustancialmente en secuencia y origen. No obstante hay cierta similitud en la tipología tridimensional. Así, se podría establecer una clasificación:

---

<sup>37</sup> a) Besalle, R.; Haas, H.; Gloria, A.; Shalit, I.; Fridkin, M.; *Antimicrob Agents Chemother* **1992**, *36*, 313-317. b) Dathe, M.; Wieprecht, T.; Nikolenko, H.; Handel, L.; Maloy, W.L.; MacDonald, D.L.; Beyermann, M.; Bienert, M. *FEBS Lett* 1997, *403*, 208-212. c) Matsuzaki, K.; Nakamura, A.; Murase, O.; Sugishita, K.; Fujii, N.; Miyajima, K. *Biochemistry* **1997**, *36*, 2104-2111.

<sup>38</sup> Dathe, M.; Nikolenko, H.; Meyer, J.; Beyermann, M.; Bienert, M.; *FEBS Lett.* **2001**, *501*, 146-150.

1. **Helices  $\alpha$ .** Son muy abundantes en los fluidos extracelulares de insectos y ranas y usualmente existen como conformeros inestructurados o extendidos en solución. Muchos de ellos sólo adoptan esta estructura helicoidal una vez interaccionan con las membranas fosfolipídicas.



**Figura 8** Esquema de hélice alfa (izquierda) y de hoja beta (derecha).

2. **Hojas  $\beta$ .** Estas representan un grupo de moléculas muy diverso a nivel de estructura primaria. A pesar de sus diferencias, estos péptidos tienen características comunes, como su composición anfipática con superficies hidrofílicas e hidrofóbicas diferenciadas.
3. **Péptidos ricos en prolina-arginina y ricos en triptófano.** Se trata de estructuras muy poco conocidas y estudiadas pero muy comunes en general. En cualquier caso pueden formar estructuras relativamente similares a hélices  $\alpha$  o  $\beta$ , pero con ciertas diferencias que les impiden ser consideradas dentro de esos grupos.<sup>31</sup>

### ***Amfipaticidad y momento hidrofóbico***

La amfipaticidad refleja la abundancia relativa y la polarización de los dominios hidrofóbicos e hidrofílicos dentro de un péptido o proteína. Se trata de una característica difícil de definir a nivel de fórmula.

Casi todos los péptidos antimicrobianos forman estructuras amfipáticas al interactuar con membranas diana. Multitud de conformaciones protéicas pueden presentar amfipaticidad, siendo la hélice  $\alpha$  una de las más sencillas, elegante y estudiada en muchos casos como modelo.

El momento hidrofóbico ( $M_H$ ) es un ejemplo de medida de esta amfipaticidad. Representa una aproximación cuantitativa que se calcula como suma vectorial de las hidrofobicidades propias de cada aminoácido, normalizados asumiendo una hélice  $\alpha$  ideal.<sup>39</sup>

Un aumento de la amfipaticidad y/o la helicidad aumenta la actividad antimicrobiana, pero aún suele aumentar más la actividad hemolítica contra membranas neutras o de tipo zwitterionico (propias de mamíferos, por ejemplo). Pathak y colaboradores<sup>40</sup> sugirieron que la amfipaticidad era más importante que la hidrofobicidad o el porcentaje de la molécula que presenta helice  $\alpha$  la hora de modular la actividad antimicrobiana. Pese a ello, estudios realizados por Wieprecht demostraron que, al aumentar el momento hidrofóbico de una magainina no se observó aumento en la liberación de calceína en vesículas formadas por fosfatidilglicerol. En cambio el aumento del  $M_H$  produjo una elevada liberación de calceína en membranas compuestas por fosfatidilcolina/fosfatidilglicerol (3:1), que presentaban una carga neta no tan negativa. Además, se observó que pequeños incrementos en el  $M_H$  resultaron en una necesidad de hasta 8 veces menos cantidad de péptido requerido para la hemólisis de eritrocitos humanos. Así un  $M_H$  incrementado solo suele presentar efectos modestos en la interacción del péptido con membranas con carga negativa, pudiendo presentar una mayor toxicidad en las células del huésped.

---

<sup>39</sup> Eisenberg, D. *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 595-623.

<sup>40</sup> Pathak, N.; Salas-Aubert, R.; Ruche, G.; Janna, M.H.; McCarthy, D.; Harrison, RG. *Proteins*, **1995**, *22*, 182-186.

La anfipaticidad en las hojas  $\beta$  se da cuando varias láminas, con una cantidad relativamente baja de dominios helicoidales, se organizan para formar superficies polares y apolares claramente diferenciadas. Estas láminas  $\beta$  son frecuentemente antiparalelas y están estabilizadas de varias maneras:

- Por puentes disulfuro<sup>41</sup>
- Por ciclación del esqueleto (protegrinas, gramicidina o diversas defensinas)

La rigidez conformacional observada en ocasiones en péptidos antimicrobianos que forman hoja  $\beta$  puede llegar a promover algún tipo de polimerización, limitando la exposición de las caras hidrofóbicas al medio hidrofílico.

Existen ejemplos de la inserción de la cara hidrofóbica del péptido en bicapas lipídicas, y la asociación de sus cadenas laterales cargadas positivamente con los grupos polares lipídicos, lo que lleva a una separación tridimensional del carácter hidrofóbico y la carga. Una vez asociado con la membrana, la naturaleza anfipática de estos péptidos que presentan hoja  $\beta$  parece que puede facilitar la formación de canales transmembrana. Existen muchos modelos propuestos para explicar el mecanismo exacto por el cual estos péptidos pueden formar estos canales (ver capítulo 1.8.4).

Se ha de tener en cuenta que, al igual que en el caso de las hélices  $\alpha$ , un aumento del  $M_H$  puede llevar a una disrupción de membranas neutras. Así, estudios de Kondejewski<sup>42</sup> muestran que usando derivados sintéticos de Gramicidina S con reducciones significativas en hidrofobicidad aumentan hasta 10.000 veces la selectividad hacia microorganismos.

### ***Hidrofobicidad***

Se define hidrofobicidad como el porcentaje de residuos hidrofóbicos de un péptido. La hidrofobicidad es una característica esencial para la interacción con la

---

<sup>41</sup> Sitaram, N.; Nagaraj, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1462*, 29-54.

<sup>42</sup> Kondejewski, L.H.; Jelokhani-Niaraki, M.; Farmer, S.W.; Lix, B.; Kay, C.M.; Sykes, B.D.; Hancock, R.E.; Hodges R.S.; *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 13181-13192.

membrana microbiana, y representa el grado de partición de un péptido en la bicapa lipídica. Este porcentaje de residuos hidrofóbicos en péptidos antimicrobianos acostumbra a representar el 50 %.

Hay que tener en cuenta, no obstante, que un incremento en los niveles de hidrofobicidad puede llevar a un aumento de toxicidad para las células del huésped y a una pérdida de especificidad contra patógenos microbianos.

Wieprecht<sup>43</sup> desarrolló un estudio interesante que pretendía establecer la relación entre la hidrofobicidad de los péptidos y su permeabilización de membrana. En sus investigaciones con análogos de magainina se mantuvieron constantes los otros parámetros estructurales (es decir carga, momento hidrofóbico o helicidad), pero se varió el porcentaje de residuos hidrofóbicos. En primer lugar se observó que la hidrofobicidad no tenía efecto en la unión a membranas y en su permeabilización cuando las vesículas estaban formadas de fosfatidilglicerol (carga neta negativa). En cambio, en una vesícula con proporción de fosfatidilcolina (carga neta neutra)/ fosfatidilglicerol 3:1 se observaba que el péptido más hidrofóbico presentaba 60 veces más actividad permeabilizadora que el menos hidrofóbico. En vesículas compuestas por completo de fosfatidilcolina, el efecto era aún más claro (hasta 300 veces más activo a nivel de permeabilidad). Esta diferencia muestra hasta qué punto tiene influencia la hidrofobicidad en la unión y permeabilización de membranas celulares. En cualquier caso se observan diferencias significativas a nivel de permeabilización con poca variación de hidrofobicidad, lo que debería permitir modular mejor el comportamiento del péptido, evitando aumentar demasiado la hidrofobicidad, ya que esto podría comportar un aumento de toxicidad.

### ***Ángulo polar***

El ángulo polar consiste en una medida de la proporción relativa de caras polares y no polares en la conformación peptídica de hélice  $\alpha$ . Así en un péptido en el que encontrásemos una cara compuesta exclusivamente por residuos hidrofóbicos y la otra solo compuesta por residuos con carga, el ángulo polar sería de 180°. Una menor

---

<sup>43</sup> Wieprecht, T.; Dathe, M.; Beyermann, M.; Krause, E.; Maloy, W.L.; MacDonald, D.L.; Bienert, M. *Biochemistry* **1997**, *36*, 6124-6132.

segregación entre estos dominios o un incremento de la proporción de residuos hidrofóbicos en la hélice reducirían proporcionalmente este ángulo polar.

La validez de esta medida la ensayaron Uematsu y Matsuzaki<sup>44</sup>. En su estudio se observó que dos tipos de péptidos modelo con ángulos polares de 100° y 180° mostraban selectividad hacia membranas con carga neta negativa llegando a crear poros toroidales o similares. Los resultados finales mostraron que los péptidos con menor ángulo polar provocaron una mayor permeabilización de membrana, translocación y ratio de formación de poros. Como dato desfavorable se observó que el ratio de colapso del poro también se incremento significativamente. Estos resultados parecen sugerir que los péptidos con menor ángulo polar crean poros fácilmente pero de forma bastante más inestable que aquellos péptidos con un ángulo polar mayor.

### 1.8.2. Interacción inicial del péptido con las membranas diana

Esta interacción es muy importante y se puede dar de dos formas:

#### *Interacciones electrostáticas*

Los péptidos antimicrobianos catiónicos y las bicapas fosfolipídicas cargadas negativamente de las bacterias presentan una atracción mutua y potente. Existen múltiples estudios que demuestran este hecho.<sup>38,45</sup> Este punto de vista también está respaldado por la conservación de carga positiva que se observa entre los muchos péptidos antimicrobianos aislados de diferentes organismos. Las fuerzas electrostáticas se ponen de manifiesto a distancias moleculares relativamente altas. En concreto lisina y arginina presentan una atracción significativamente alta.

Hancock<sup>31</sup> sugirió un mecanismo de interacción con membranas llamado “self promotion uptake”. Según este la acción inicial del péptido provoca un desplazamiento competitivo de los cationes divalentes asociados al lipopolisacárido que estabilizan la membrana externa de los Gram negativo. Sobre estas dianas, la afinidad peptídica es

---

<sup>44</sup> Uematsu, N.; Matsuzaki, K.; *Biophys. J.*, **2000**, 79, 2075-2083.

<sup>45</sup> a) Vaz Gomes, A.; de Waal, A.; Berden, J.A.; Westerhof, H.V. *Biochemistry* **1993**, 32, 5365-5372.; b) Besalle R.; Haas, H.; Gloria, A.; Shalit, I.; Fridkin, M.; *Antimicrob. Agents Chemoter.*; **1992**, 36, 313-317. c) Matsuzaki K.; Nakamura, A.; Murase, O.; Yoneyama, S.; Zasslof, M.; Miyajima K.; *Biochemistry*, **1997**, 36, 2104-2111.

tres veces mayor que la de esos cationes divalentes. Así, diferentes estudios en los que se utilizaban cepas de especies bacterianas con una reducida carga neta negativa en el lipopolisacárido presentaban resistencia a péptidos antibióticos catiónicos.<sup>46</sup>

En el caso de Gram positivo no encontramos lipopolisacárido ni membrana externa, pero en su pared celular se encuentran ácidos teicóicos y teicurónicos con carga negativa. La significancia de esta carga negativa en la pared celular como diana para péptidos catiónicos antimicrobianos ha sido demostrada por Peschel<sup>47</sup> usando una cepa mutante de *S. aureus* en la cual se aumentó la carga neta negativa mediante modificación de los ácidos teicóicos, con lo que se observó un incremento de la actividad bactericida de los péptidos antimicrobianos catiónicos.

### ***Interacciones con membranas mediadas por receptor***

Diferentes estudios con enantiómeros D de péptidos modelo han demostrado similar actividad antimicrobiana que sus respectivos enantiómeros L. Esto hace que el dogma básico que se suele utilizar es que la interacción típica con la membrana procarionota no está mediada por ningún receptor.

En cualquier caso, ciertos estudios sugieren que puede haber importantes excepciones para esta generalización. Un ejemplo de este tipo de interacción inicial es el caso de la nisina, un péptido pequeño y cíclico que se ha usado en la industria alimentaria durante décadas. La nisina presenta actividad antimicrobiana a nivel nanomolar y se une específicamente al lípido bacteriano II, un componente de membrana implicado en la síntesis del peptidoglicano. En presencia de nisina las vesículas modelo que incluían lípido II presentaban una liberación de fluoresceína de su interior 1000 veces superior a las vesículas equivalentes sin lípido II.<sup>48</sup>

---

<sup>46</sup>a) Helander I.M.; Kilpelainen, I.; Vaara, M.; *Mol. Microbiol.*; **1994**, *11*, 481-487. b) Helander, I.M.; Nummila, K.; Kilpelainen, I.; Vaara, M.; *Prog. Clin. Biol. Res.*; **1995**, *392*, 15-23.

<sup>47</sup> Peschel, A.; Otto, M.; Jack, R.W.; Kalbacher, Jung, G.; Gonz, F.; *J.Biol.Chem.*; **1999**, *274*, 8405-8410.

<sup>48</sup> Breukink, E.; Kruijff, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1462*, 223-234.

### 1.8.3. Sucesos tras unión a membrana

Se trata de eventos que suceden tras la interacción inicial, ya sea ésta específica a través de receptores o por atracción electrostática. Son muy importantes ya que influyen de forma muy significativa los diferentes mecanismos de acción de los péptidos y/o su toxicidad selectiva.

#### *Concentración límite*

Tras la interacción inicial de los péptidos con la membrana, éstos empiezan a acumularse hasta llegar a una 2ª fase. Esto ocurre cuando se alcanza una concentración de péptido en la superficie llamada concentración límite. En esta fase, los péptidos empiezan a entrar y atravesar la bicapa lipídica usando para ello una elevada variedad de mecanismos, llegando incluso a extender su actividad antimicrobiana a dianas interiores de la membrana celular. Varios parámetros tienen influencia en este límite: concentración de péptido, capacidad de agregación, composición fosfolipídica de la membrana, fluidez,  $\Delta\psi$  (potencial transmembrana), etc...<sup>49</sup>.

#### *Transición conformacional en membrana*

Muchos antibióticos peptídicos se encuentran desordenados en ambientes acuosos, exhibiendo una forma extendida o una conformación de tipo random-coil.<sup>50</sup> Tras su unión a la membrana diana ocurre un cambio de conformación.

Muchos péptidos desestructurados a nivel terciario asumen rápidamente una conformación en hélice  $\alpha$  una vez interaccionan con las bicapas fosfolipídicas aniónicas o con disolventes que mimetizan las condiciones de membrana. Es muy interesante constatar que muchos péptidos necesitan una bicapa cargada negativamente para que tenga lugar esta transición. Así esto se ha demostrado en el caso de magaininas por técnicas como DC<sup>51</sup>, o RMN<sup>52</sup>. Otro aspecto muy importante a tener en cuenta es que

---

<sup>49</sup> Yang, L.; Weiss T.M.; Lehrer R.I.; Huang H.W. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 2002-2009.

<sup>50</sup> Bello, J.; Bello, H.R.; Granados, E. *Biochemistry* **1982**, *21*, 461-465.

<sup>51</sup> Matsuzaki, K.; Harada, M.; Funakoshi, S.; Fujii, N.; Miyajima, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1063*, 162-170. b) Matsuzaki, K.; Harada, M.; Handa, T.; Funakoshi, S.; Fujii, N.; Yajima, H.; Miyahima, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *981*, 130-134.

esta transición conformacional en membrana puede prevenir una actividad membranolítica no discriminativa hasta el momento en que el péptido alcanza su diana apropiada. De esta manera se puede minimizar la toxicidad para el huésped (evitando el ataque a membranas celulares eucariotas).

En comparación con las hélices  $\alpha$ , los péptidos con conformación en hoja  $\beta$  están mucho más ordenados, tanto en disolución acuosa como en ambientes de superficie de membrana, debido a la constricción impuesta por puentes disulfuro o ciclación de su estructura. En cualquier caso, es posible que las estructuras cuaternarias peptídicas propuestas para varios péptidos con hoja  $\beta$  en disolución acuosa se disocien al interactuar con la superficie de las células diana. Así, la potencial monomerización de estos péptidos podría facilitar los diferentes mecanismos antimicrobianos o la toxicidad selectiva.

### ***Autoasociación y multimerización***

Múltiples evidencias sugieren que los péptidos antimicrobianos pueden autoasociarse o multimerizar después de su interacción inicial con las membranas diana. Se forman estructuras complejas asociadas a mecanismos de acción específicos. El potencial de cualquier péptido para formar estructuras cuaternarias está directamente relacionado a su composición y conformación en su forma monomérica. Un péptido con unos dominios hidrofóbico e hidrofílico bien definidos puede orientarlos eficientemente hacia los constituyentes de membrana adecuados o hacia los dominios adecuados de otros péptidos. Además, esta orientación puede facilitar a estos péptidos una adecuada partición en el seno de la membrana hidrofóbica. Este tipo de asociación puede crear poros transmembrana o canales. En ellos, por ejemplo, los péptidos podrían asumir configuraciones en las cuales las caras hidrofóbicas se alineasen hacia la membrana mientras que el canal hidrofílico queda formado solo por las regiones apolares y cargadas de los péptidos.

---

<sup>52</sup> Hirsh, D.J.; Hammer, J.; Maloy, W.L.; Blazyk, J.; Schaefer, J. *Biochemistry* **1996**, 35, 12733-12741.

#### 1.8.4. Mecanismos de acción

Existe una elevadísima cantidad de mecanismos de acción estudiados o propuestos para los péptidos antimicrobianos a nivel de la permeabilización o el ataque a la membrana diana. Los modelos que se explican a continuación son los más conocidos en base a su estudio utilizando péptidos descritos frente a membranas artificiales. Cabe destacar que no existe un consenso universal en cuanto a una clasificación, ni los mecanismos propuestos están necesariamente demostrados por completo.

#### *Mecanismos de ataque directos sobre la membrana microbiana*

##### **A.- El mecanismo en “carpet”<sup>53,54</sup> (Figura 9)**

Este modelo de mecanismo de acción en alfombra es altamente inespecífico. Los péptidos, atraídos electrostáticamente, se disponen de forma paralela sobre la membrana microbiana de modo que su superficie hidrofílica este en contacto con las cabezas de los fosfolípidos y los residuos hidrofóbicos estén orientados al núcleo hidrofóbico de la membrana. Una vez alcanzada una concentración límite los péptidos interrumpen la continuidad de la membrana insertándose en la membrana en paralelo a la bicapa lipídica mediante sus regiones hidrofóbicas. Las regiones polares de los péptidos quedan expuestas al exterior, de modo que actúan de forma similar a un detergente, desintegrando finalmente la membrana en forma de micelas en los casos en los que se alcanzan concentraciones muy elevadas de péptidos. Este modelo que presenta un colapso más catastrófico constituye una etapa más avanzada del mecanismo en “carpet” y es llamada mecanismo o modelo de tipo “detergente”.

##### **B.- El mecanismo “Barrel-stave” (Figura 9)**

El nombre “*barrel-stave*” describe la topología del canal transmembrana que se forma al organizarse los péptidos antimicrobianos sobre la membrana siguiendo este mecanismo de acción. Los péptidos, en número variable, se posicionan en un anillo con

---

<sup>53</sup> Gazit, E.; *J. Mol. Biol.*; **1996**, 258, 860-870.

<sup>54</sup> Bechinger, B.; Lohner, K.; *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1758, 1529-1539.

forma de barril, alrededor de un poro acuoso, similar a un canal iónico protéico. La palabra “stave” se refiere a las fibras, similares a radios, que pueden estar compuestas por péptidos aislados o complejos de éstos y que se encuentran en el interior de este “barril”. Siguiendo este mecanismo, las caras hidrofóbicas de los péptidos quedan hacia fuera, orientadas hacia las cadenas acilo de la membrana y las superficies/residuos polares quedan hacia el interior formando el poro hidrofílico.<sup>55</sup> Este mecanismo sigue los siguientes pasos:

1. Unión del péptido a la membrana, normalmente en su forma monomérica.
2. Transición conformacional en membrana: se aparta la región polar de los fosfolípidos de membrana, induciéndose así un afinamiento de la membrana celular.
3. Inserción del dominio hidrofóbico del péptido en el interior de la membrana. Este proceso queda facilitado por la atracción entre los aminoácidos cargados y la región polar de los fosfolípidos.
4. Cuando los péptidos alcanzan la concentración límite, se produce una autoagregación de monómeros y una inserción más profunda en el seno de la membrana hidrofóbica. Esta agregación permite evitar la exposición de los residuos polares a la membrana interior hidrofóbica, ya que los péptidos adoptan una “configuración transmembrana” en la que las regiones hidrofóbicas de péptidos y membrana quedan encaradas.
5. Una vez finalizada esta asociación el poro queda formado, pudiéndose llegar a la muerte celular por disfunción de membrana o por inhibición de alguna función intracelular.

---

<sup>55</sup> Breukink, E.; de Kruijff, B.; *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1462*, 223-224.

### C.- El mecanismo de poro toroidal o “Toroid Pore” (Figura 9)

Según este mecanismo de acción, los péptidos se insertan en la membrana provocando una disminución en la curvatura de esta. Los péptidos que se encuentran en la membrana son empujados junto a los lípidos de manera que se forma un poro en forma de “agujero de gusano”. La curvatura de la membrana a través del poro provoca que las regiones polares de ambas capas de la membrana lleguen a unirse. Así las paredes del poro quedan formadas por las cabezas polares de los lípidos de membrana y los péptidos insertados en ella.

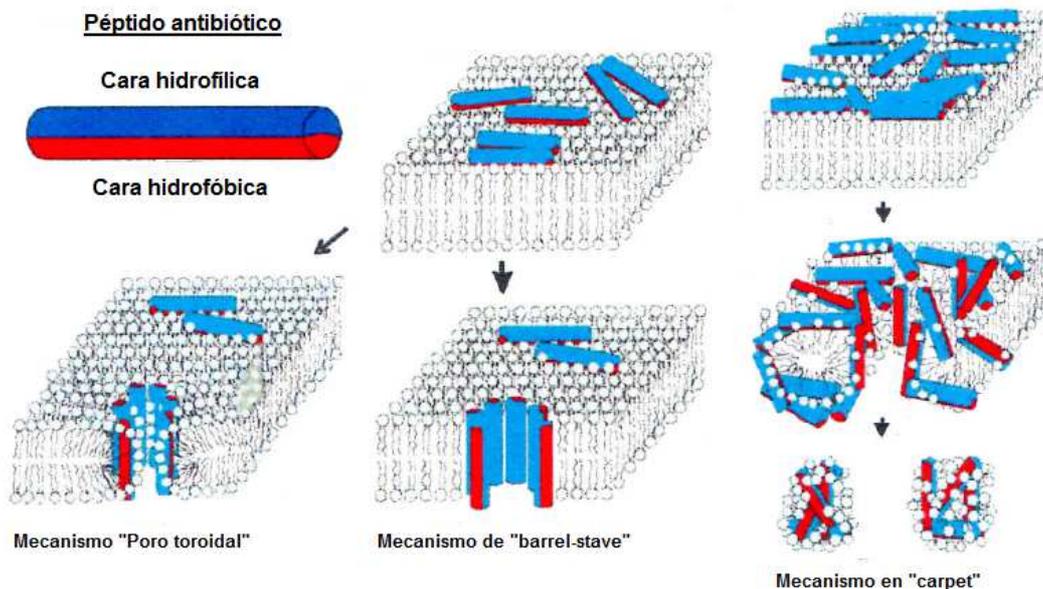


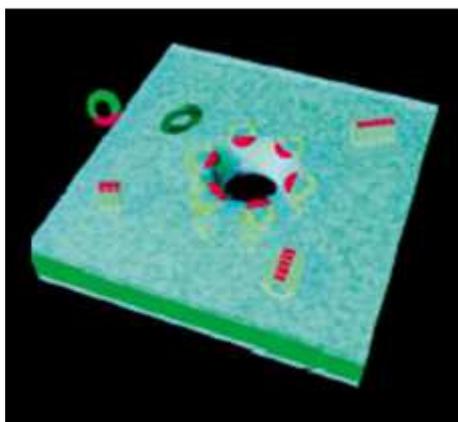
Figura 9. Mecanismos de acción clásicos propuestos para péptidos antimicrobianos.

### D.- El mecanismo de Ganz

En el año 2001 Ganz propuso un mecanismo de acción para pequeños ciclopeptidos de naturaleza catiónica probablemente inspirado en el modelo “barrel-stave”.<sup>56</sup> Estos péptidos, de marcado carácter anfipático, tendrían capacidad para ensamblarse entre ellos formando túbulos. Estos túbulos se organizarían sobre la

<sup>56</sup> a) Ganz, T. *Nature* **2001**, *412*, 392-393. b) Huang, H.W. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 8347-8352. c) Shai, Y. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1462*, 55-70. d) Matsuzaki, K. *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1376* (3), 391-400.

membrana microbiana y se insertarían en su interior, formando un poro. La permeabilización de la membrana celular a diferentes compuestos a través de éste podría provocar la muerte celular. Se trata de un mecanismo que presenta similitudes a los descritos de tipo poro toroidal y “*barrel-stave*” pero más específico para este tipo de péptidos.



**Figura 10.** Esquema de la formación de un poro mediante ciclopéptidos según la hipótesis de Ganz

### E. Nuevos mecanismos de acción propuestos:

En los últimos años diferentes opiniones, como la de Wimley<sup>57</sup>, refieren que habiendo más de 1000 antimicrobianos peptídicos conocidos, no existe casi evidencia experimental de que formen poros en las membranas en la mayoría de casos. Para ciertos péptidos se proponen otro tipo de mecanismos alternativos en los que se unirían a la membrana desorganizándolo y deshaciendo la organización lipídica de una manera no específica.

Entre estos novedosos mecanismos son de destacar los modelos de “**molecular shape**”<sup>58</sup> en el cual las interacciones entre el péptido y los fosfolípidos pueden ser descritas por diagramas de fases para describir la tendencia del péptido antimicrobiano a permeabilizar la membrana por alteración del empaquetado lipídico o el modelo de

<sup>57</sup> Wimley W.C.; *ACS Chem. Biol.*; **2010**, *5*, 905-917.

<sup>58</sup> a) Bechinger, B.; *Curr Opin Colloid Interface Sci*, **2009**, *14*, 349-355. b) Bechinger, B.; Lohner, K.; *Biochim Biophys Acta*, **2006**, *1758*, 1529-1539.

“**lipid clustering**”<sup>59</sup> en el cual los antimicrobianos peptídicos inducen agrupación o separación de fase de los lípidos con pérdida de función de membrana. En los modelos de “**sinking raft**”<sup>60</sup> los péptidos anfipáticos pueden causar una pérdida del balance de membrana por unión y deformación (hundimiento) de las balsas lipídicas (zonas ricas en colesterol y ácidos grasos saturados menos fluidas que otras zonas de la membrana glicerofosfolipídica de la bicapa lipídica), formándose poros transitorios letales para microorganismos.

En general, la mayoría de mecanismos propuestos sean a través de poros, o desestructuración de membrana más o menos selectiva, están poco demostrados a nivel experimental. Multitud de autores defienden la validez de uno u otro modelo en función de su criterio o de su experiencia con un tipo concreto de antimicrobianos peptídico. Uno de los principales retos futuros consistiría en adoptar un consenso en cuanto a que modelos de ataque a membrana son los que representan mejor a la mayoría de los péptidos antimicrobianos.

### ***Mecanismos de ataque indirecto sobre la membrana microbiana***

#### **A.- Desestructuración del lipopolisacárido (LPS)**

Se produce mediante la unión entre las cargas negativas del LPS y las cargas positivas del antibiótico peptídico catiónico debido a la atracción electrostática. Este proceso desplaza la unión original del LPS con átomos de calcio y magnesio y desestructura la cubierta de la membrana externa, ya que el LPS forma parte de ella (mecanismo de “self promotion uptake”<sup>31</sup>). Esta actuación puede no llevar a la permeabilización completa de la membrana celular bacteriana, pero puede facilitar el ataque sobre esta de algún otro antimicrobiano de forma sinérgica. Un ejemplo de esto consiste en el estudio de análogos de polimixina que aún uniéndose al LPS, han perdido su actividad bactericida. Aún así, consiguen permeabilizar suficientemente la membrana

---

<sup>59</sup> a)Eband, R.M., Eband, R.F.; *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788, 289-294.b) Eband, R.F.; *Biochemistry*, **2010**, 49, 4076-4084.

<sup>60</sup> a)Pokorny, A.; Almeida, P.F.; *Biochemistry*, **2004**, 43, 8846-8857.b) Pokorny,A.; *Biophys. J.*, **2008**, 95, 4748-4755.c)Almeida P.F.; Pokorny, A.; *Biochemistry*, **2009**, 48, 8083-8093.

para que otros antibióticos hidrofóbicos que normalmente no podrían penetrar la bacteria puedan ejercer su actividad bactericida.<sup>61</sup>

## B.- Oponización

Es importante recordar que los existen multitud de péptidos mediadores en la respuesta inmune. Existen ciertos péptidos y proteínas plasmáticas (opsoninas) que facilitan la fagocitosis de microbios actuando como mediadoras entre los antígenos de membrana de estos y los receptores de opsoninas sobre los fagócitos.

La polimixina B constituye un ejemplo entre la familia de los péptidos catiónicos que actúa según el mecanismo de oponización.<sup>62</sup> Así en un estudio llevado a cabo por el grupo de investigación de Tsubery<sup>61</sup> se utilizaron derivados cíclicos de polimixina B y E unidos a colas lineales aminoacídicas formiladas que presentaban un doble mecanismo de acción. Por un lado, la parte cíclica se unía al LPS volviendo permeable la membrana interna de bacterias de tipo Gram negativo a antibióticos hidrofóbicos. Por el otro, la cola lineal aminoacídica (fMLF, potente quimiotáctico para células fagocíticas) le proporcionaba al péptido un efecto quimiotáctico y actividad como opsonina. En este estudio se administraron dosis letales de *Klebsiella pneumoniae* resistente a eritromicina a 18 ratones, sobreviviendo un total de 14 de ellos tras administración peritoneal de eritromicina y el análogo de polimixina B (la administración de eritromicina o el análogo de polimixina B solos no producía efecto). Se determinó también la capacidad quimiotáctica del análogo de polimixina B, siendo esta unas tres veces mayor que la del mismo análogo sin la cola lineal. En su ensayo como opsoninas el análogo de polimixina B mostró un gran incremento en la unión de células de *Pseudomonas aeruginosa* con macrófagos peritoneales de ratón con respecto el alcanzado por este mismo análogo sin la cadena lineal quimiotáctica.

---

<sup>61</sup> Tsubery, H.; Yaakov, H.; Cohen, S.; Giterman, T.; Matityahou, A.; Fridkin, M.; Ofek, I.; Antimicrob. Agents Chemother.; 2005, 49, 3122-3128.

<sup>62</sup> Tsubery, H.; Yaakov, H.; Cohen, S.; Giterman, T.; Matityahou, A.; Fridkin, M.; Ofek, I. *Antimicrob. Agents & Chemoter.* **2000**, 49(8), 3122-3128.

### ***Mecanismos de ataque para péptidos que atraviesan la membrana celular (“CPPs”).***

El interés de este tipo de péptidos consiste especialmente en su habilidad para transportar a través de la membrana plasmática una amplia cantidad de sustancias, como pequeños fármacos, iones metálicos, otros péptidos o ácidos nucleicos.<sup>63</sup> Así, se podrían introducir moléculas que no son capaces de atravesar la membrana plasmática como las “pepducinas”, inhibidores peptídicos que interfieren la transducción de señal y usadas previamente con éxito en células tumorales<sup>64</sup>, se podrían realizar acumulos de medicamentos en compartimentos celulares diversos de otras maneras inaccesibles,<sup>65</sup> introducción de moléculas que actúen contra el RNA del patógeno (Ébola, Salmonella...)<sup>66</sup>...En general estos péptidos presentan muchos aspectos en común con los péptidos antimicrobianos como su carácter catiónico y su anfipaticidad. Aunque pueden utilizar modelos de entrada a la célula similares a los propuestos para péptidos antimicrobianos, siguen otros muchos mecanismos propios, más diversos y complejos que los de los péptidos antimicrobianos (macropinocitosis, endocitosis...)<sup>67</sup>.

#### **1.8.5. Causas de muerte celular**

Los mecanismos precisos que llevan a la muerte celular con el uso de antimicrobianos peptídicos han sido fuente de interés y objeto de estudio. En un principio se pensaba que estos péptidos solo provocaban la inviabilidad celular mediante una acumulación de daños sobre la membrana microbiana, ya fuera a través de desestructuración, poros, pérdida de iones, despolarización, inhibición de la síntesis de biopolímeros... Todos estos fenómenos representan el resultado de la acción llevada a cabo por los péptidos antibióticos sobre la membrana. Pero múltiples evidencias indican la existencia de otro tipo de mecanismos, ya sean aislados o complementarios a los clásicos, sobre todo cuando la permeabilización de la membrana es insuficiente para

---

<sup>63</sup> Torchilin, V.P. *Biopolymers*, **2008**, *90*, 604-610.

<sup>64</sup> Watkins, C.L.; Brennan, P.; Fegan, C.; Takayama, K.; Nakase, I.; Futaki, S.; Jones, A.T.; *J. Control Release*, **2009**, *140*, 237-244.

<sup>65</sup> Rao, K.S.; Ghorpade, A.; Labhasetwar, V.; *Expert Opin. Drug Deliv.* **2009**, *6*, 771-784.

<sup>66</sup> Mitev, G.M.; Mellbye, B. L.; Iversen, P.L.; Geller, B.L.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3700-3704.

<sup>67</sup> Alves, I.D.; Jiao, C.Y. Aubry, S.; Aussedat, B.; Burlina, F.; Chassaing, G.; Sagan, S.: *Biochim. Biophys. Acta.*; **2010**;1798(12), 2231-2239.

causar la muerte celular. En resumen, existen mecanismos de acción que llevan a la muerte celular con una disrupción de membrana mínima.

### ***Disfunción de membrana***

La membrana citoplasmática es responsable de regular muchas funciones vitales a nivel celular. Estas funciones incluyen, entre otras, una permeabilidad selectiva y el mantenimiento de gradientes, obtención de energía por transporte electrónico y oxidaciones fosforilativas, síntesis de biopolímeros, motilidad, etc... Cualquier disfunción sobre la membrana citoplasmática puede interferir con una o más de estas funciones y llevar a la muerte celular de forma directa o indirecta.

### ***Inhibición de la síntesis del biopolímero extracelular***

La inhibición del peptidoglicano o de otras síntesis macromoleculares puede suponer también un mecanismo importante de lucha antimicrobiana. Los precursores del peptidoglicano son activados y transportados a través de la membrana citoplasmática y su ensamblaje se produce cerca de la membrana también. Los péptidos catiónicos pueden perturbar la membrana o la integridad de la síntesis del peptidoglicano, ya sea en su etapa de síntesis del precursor, a nivel de su translocación o en la fase de ensamblaje. Debido a su elevado contenido en peptidoglicano, este mecanismo de acción es especialmente efectivo contra bacterias Gram positivo.

### ***Diana intracelular***

La permeabilización, ya sea por formación de poros o por desestructuración del LPS, puede no ser fatal pero causar la internalización del péptido. En este caso, si existe una diana intracelular adecuada, se puede producir inviabilidad o muerte celular. Existen multitud de posibilidades por las cuales se puede llegar a producir la muerte celular siguiendo este mecanismo.

## 1.9. OBJETIVOS

En la revista *Nature* Ganz y colaboradores publicaron un modelo de acción para una nueva generación de antibióticos.<sup>56</sup> Estos son pentapéptidos cíclicos de tamaño pequeño con una determinada proporción de residuos polares y apolares, y normalmente están cargados positivamente. Esto les confiere capacidad para formar poros en las membranas bacterianas. La permeación de compuestos que tiene lugar lleva a la muerte celular. Debido a la naturaleza de los péptidos, el modo de acción es selectivo contra membranas procariotas.

Basándonos en este mecanismo de acción, continuamos en la presente tesis los estudios realizados sobre  $\Psi$ -stylostatinas<sup>1</sup>. La Stylostatin 1 es el péptido *ciclo*(Asn-Ser-Leu-Ile-Ala-Pro) (Figura 11).

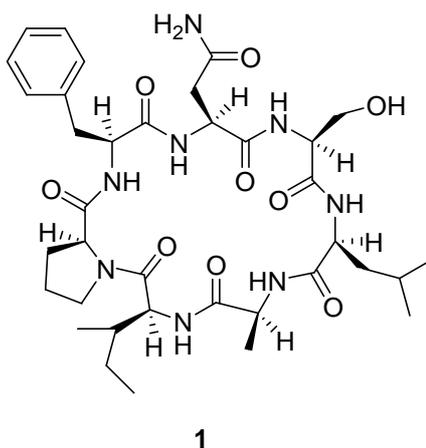
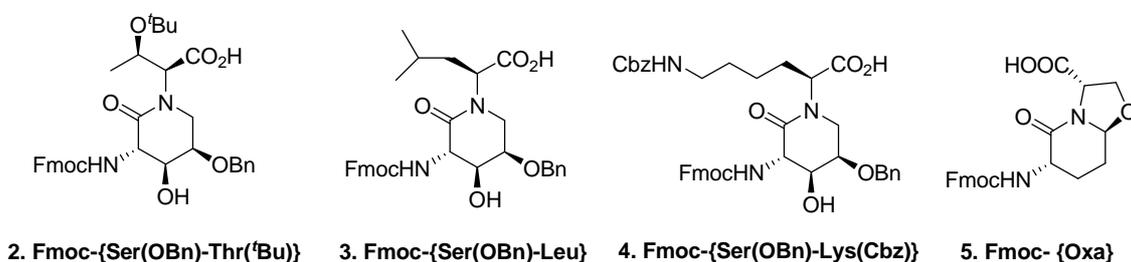


Figura 11. Stylostatin 1

Basándonos en su estructura, que comprende dos aminoácidos polares y cinco apolares, y en el modelo de Ganz, iniciamos un segundo estudio con la intención de obtener compuestos antibióticos de “nueva generación”. Este mecanismo de acción propuesto por Ganz no ha mostrado hasta el presente muchos mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos y se espera que estas resistencias no aparezcan tan fácilmente como con los antibióticos clásicos. En general se pretenden recopilar datos que permitan formular una hipótesis que relacione la estructura y la actividad de este tipo de compuestos.

En la presente tesis doctoral se pretende sintetizar una biblioteca de ciclopéptidos que combine las diferentes características que se explican en apartados anteriores del presente capítulo. Para ello se sintetizarán tanto compuestos basados exclusivamente en aminoácidos naturales como otros que incluyan nuestros análogos pseudodipeptídicos de síntesis (la síntesis peptídica se detalla en el capítulo 3). Los objetivos son varios:

- Obtención de 3-aminolactamas sintéticas, que se introducirán en nuestros péptidos como sustitutos rígidos de dipéptidos, actuando como análogos de aminoácidos.



**Figura 12. Lactamas de tipo VI y VIII a utilizar en nuestra biblioteca.**

- Diseño teórico de la quimioteca, realizada paralelamente a la síntesis de nuestras lactamas. (ver capítulo 3.1). Para esta síntesis se tendrán en cuenta criterios bibliográficos como el tamaño, la relación de cargas positivas y la carga neta, la conformación o la hidrofobicidad y anfipaticidad del ciclopéptido.
- Síntesis en fase sólida de nuestra quimiotéca peptídica (capítulo 3.3), incluyendo en ella tanto péptidos basados en aminoácidos naturales como aquéllos que incluyen nuestras lactamas, ya sean del grupo 3P+4A (péptidos compuestos por siete aminoácidos de los cuales 3 son polares y otros 4 apolares, con o sin aminoácidos básicos que proporcionen una carga neta positiva a la molécula a pH fisiológico), 2P+5A (dos polares por 5 apolares), además de las series compuestas por siete aminoácidos incluyendo dos lisinas en su estructura y de una serie de péptidos que incluyen ocho aminoácidos en su estructura y contienen dos lisinas (dos cargas positivas).

- Realización de estudios experimentales de dicroísmo circular (DC). Aun cuando no podamos utilizar usar los patrones clásicos de conformación ( hélice  $\alpha$ , hoja  $\beta$ , etc...), con esta técnica se pretende obtener un patrón conformacional. Se efectuarán variaciones de ciertos parámetros como temperatura o concentración para intentar demostrar algún tipo de agregación molecular si se registrasen variaciones en la conformación de referencia.
- Se llevarán a cabo ensayos sobre liposomas con el objetivo de ensayar si nuestros péptidos presentan actividad sobre la membrana celular procariota. Para ello se utilizarán extractos polares de membranas de *E.coli* y fluoresceína como marcador fluorescente.
- Realización de cálculos de modelización molecular con objeto de establecer el grado de flexibilidad de estas moléculas y obtener el máximo de información estructural que nos permitan conocer más datos acerca de la estructura de los péptidos y encontrar evidencias de agregación molecular.
- Realización de ensayos biológicos con nuestros péptidos con objeto de determinar si son activos como antimicrobianos. Para ello se utilizarán cepas microbianas de referencia lo más variadas posible. Las técnicas de rutina más utilizadas son la medida de la sensibilidad determinada por dilución seriada en tubos o placas y el antibiograma. Este ensayo *in vivo* lo realizarán colaboradores externos en el Hospital Clínico de Barcelona. Un segundo ensayo biológico de nuestros péptidos, en este caso frente a diferentes tejidos tumorales, será realizado por la empresa Pharmamar con objeto de determinar si nuestros nuevos péptidos aún conservan algún tipo de actividad anti cancerígena (como la stylostatin I modelo) pese a las variaciones que se llevarán a cabo.

A nivel estadístico pretendemos recopilar datos para poder formular una hipótesis que correlacione la estructura con la posible actividad antibiótica que se observe.

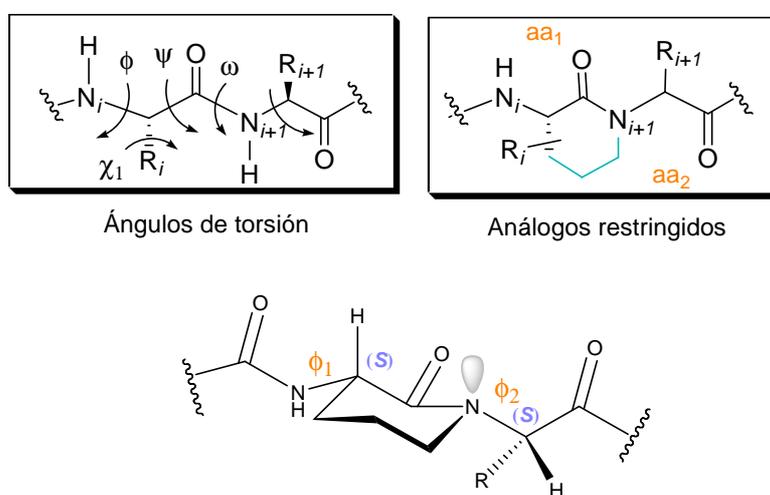
**CAPÍTULO 2**  
**Síntesis en disolución de lactamas dipeptídicas**

---



## 2.1. PRECENTES SINTÉTICOS DE NUESTRO GRUPO

Desde hace unos años, nuestro grupo de investigación se ha especializado en la utilización de 3-aminopiperidonas diversamente funcionalizadas para preparar análogos de dipéptidos de conformación restringida. Así, consideramos que la piperidona une el carbono alfa de un aminoácido con el átomo de nitrógeno del residuo siguiente. De esta manera los ángulos de enlace  $\omega$ ,  $\psi$  i  $\chi_1$  (ver Figura 13) quedan restringidos dentro del anillo, y los ángulos  $\phi_1$  i  $\phi_2$  también tienen la movilidad reducida, ya que dependen de la conformación en silla que adopte cada anillo de piperidona.



**Figura 13.** Restricción conformacional del péptido mediante un anillo de tipo lactámico.

Además en el año 1982, Freidinger<sup>68</sup> demostró que la introducción de un anillo de lactama en una cadena peptídica inducía una conformación de giro  $\beta$ . En trabajos anteriores de nuestro grupo,<sup>69</sup> también se ha observado que la lactama puede inducir giros de tipo  $\gamma$ .

<sup>68</sup> Freidinger, R.M.; Perlow, D. S.; Veber, D.F. *J.Org. Chem.* **1982**, *47*, 104-109.

<sup>69</sup> Fernández, M. M.; Diez, A.; Rubiralta, M.; Montenegro, E.; Casamitjana, N. *J.Org.Chem.* **2002**, *67*, 7587-7599.

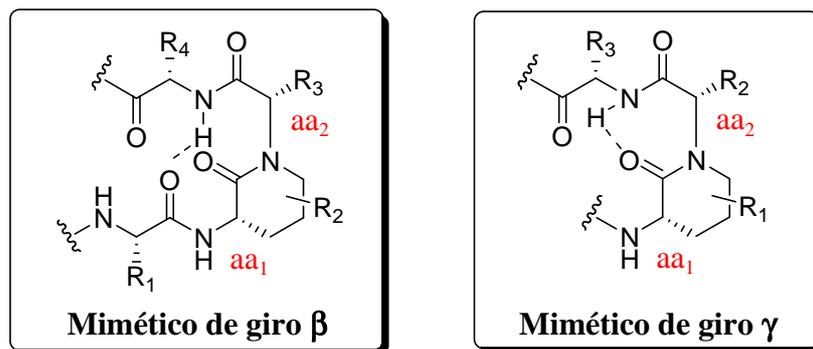


Figura 14. Papel de las lactamas como inductoras de giros  $\beta$  y  $\gamma$ .

Actualmente disponemos en nuestro equipo de una colección de diversas lactamas (ver Figura 15) que hemos empleado como “scaffolds”, o esqueletos de soporte de grupos funcionales, como inductores de estructuras secundarias de tipo giro  $\beta$  o  $\gamma$ , o bien como sustitutos de dipéptidos en estructuras más complejas.

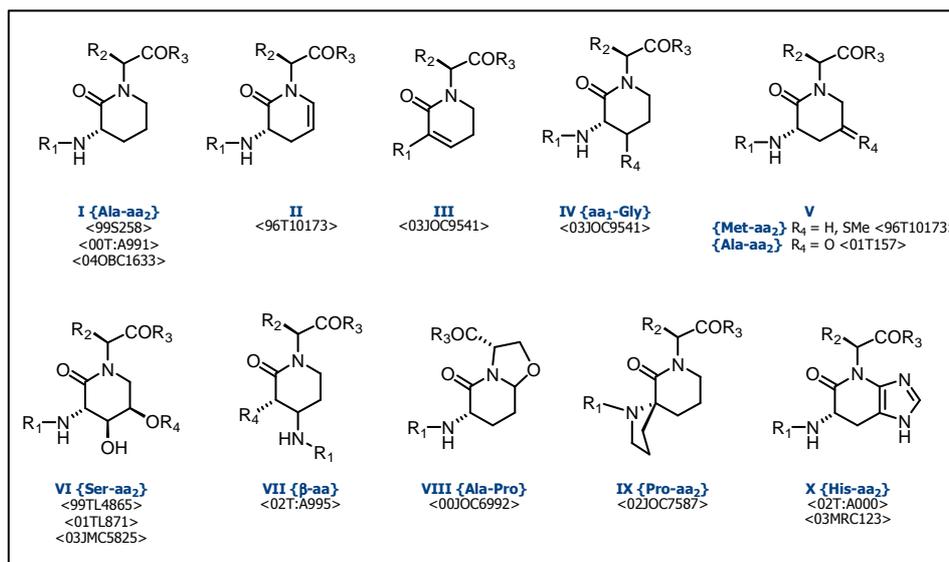


Figura 15. Quimioteca de lactamas de las que dispone el grupo en la actualidad.

Por ejemplo, la lactama de tipo I se ha empleado en la síntesis de una quimioteca de inhibidores de tripsina de estructura dimérica,<sup>70</sup> la lactama de tipo II se empleó para obtener derivados de conformación restringida de metionina, los cuales se ensayaron

<sup>70</sup> García, M.; Del Rio, X.; Silvestre, S.; Rubiralta, M.; Segarra, V.; Lovoza, E.; Diez, A. *Org. & Biol.Chem.* **2004**, 2, 1633-1642.

como inhibidores del transporte hepático del glutatión (GSH)<sup>71</sup>. La lactama de tipo **III** se ha empleado principalmente para la funcionalización de la posición 4 del anillo mediante adiciones conjugadas<sup>72</sup> y, por tanto, la obtención de lactamas de tipo **IV** (derivadas de Trp). La funcionalización de la posición 5 se llevó a cabo aplicando la reactividad de compuestos orgánicos con zinc, y se obtuvo la 3-amino-5-hidroxi-2-piperidona, conocida por presentar actividad como inhibidor del enzima convertidor de angiotensina.<sup>73</sup> Una de las lactamas que ha tenido una aplicación más amplia hasta el presente es el compuesto polihidroxilado de tipo **VI**<sup>74,75</sup> el cual, entre otros, se utilizó para la obtención de  $\beta$ -aminoácidos de conformación restringida de tipos **VII**<sup>76</sup>.

Finalmente, también hemos desarrollado la síntesis y algunas aplicaciones de derivados bicíclicos como los compuestos de tipo **VIII**<sup>77</sup>, **IX**<sup>69</sup> y **X**<sup>78</sup>. Es importante destacar que las oxazolopiperidonas son inductoras de giros de tipo  $\beta$ -II', mientras que las espirolactamas demostraron ser inductores de giros de tipo  $\gamma$ .

Posteriormente, nos propusimos como nuevo reto la aplicación de estas estructuras lactámicas en la síntesis de quimiotecas pseudopeptídicas con una determinada actividad biológica. Con esta finalidad modificamos péptidos naturales de actividad biológica conocida sustituyendo algunos aminoácidos por análogos sintéticos de conformación restringida.

Este nuevo reto implica una etapa previa de búsqueda bibliográfica de los péptidos nativos que nos interesan, un diseño de los correspondientes derivados, la síntesis de las lactamas con la funcionalización necesaria, la síntesis de las quimiotecas, y los ensayos biológicos de nuestros compuestos.

---

<sup>71</sup> a) Estiarte M. A.; De Souza, M. V. N.; Del Rio, X.; Dodd, R.H.; Rubiralta, M.; Diez, A. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 10173-10186. b) Colell, A.; Garcia-Ruiz, C.; Rodríguez, R.; Estiarte, M.A.; Diez, A.; Kaplowitz, N.; Rubiralta, M.; Fernandez-Checa, J.C. *Hepatology*, Part 2 Suppl.S, **1996**, *24*, 51.

<sup>72</sup> Ecija, M.; Diez, A.; Rubiralta, M.; Casamitjana, N.; Kogan, M. J.; Giralt, E. *J.Org.Chem.* **2003**, *68*, 9541-9553.

<sup>73</sup> Estiarte, M.A.; Diez, A.; Rubiralta, M.; Jackson, R.F.W. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 157-161.

<sup>74</sup> Piró, J.; Rubiralta, M.; Giralt, E.; Diez, A. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4865-4868.

<sup>75</sup> Piró, J.; Rubiralta, M.; Giralt, E.; Diez, A. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 871-873.

<sup>76</sup> Piró, J.; Forns, P.; Blanchet, J.; Bonin, M.; Micouin, L.; Diez, A. *Tetrahedron: Asymm.* **2002**, *13*, 995-1004

<sup>77</sup> Estiarte, M.A.; Rubiralta, M.; Giralt, E.; Diez, E.; Thormann, M.; Giralt, E. *J.Org.Chem.* **2000**, *65*, 6992-6999.

<sup>78</sup> Escolano, C.; Kogan, M.J.; Rubiralta, M.; Giralt, E.; Diez, A. *Magnetic resonance in Chemistry*, **2003**, *41*, 219-222.

En estudios previos<sup>1</sup> se ensayó la introducción de una de nuestras 3-aminolactamas de tipo VI como sustituta del dipéptido Ser-Leu con la finalidad de introducir restricción conformacional en análogos de Stylostatin 1. De este estudio pudimos obtener una serie de conclusiones interesantes:

- Las lactamas se pueden utilizar en síntesis peptídica estándar.
- La introducción del anillo de lactama induce un giro en los péptidos lineales, permitiendo obtener una ciclación hasta 15 veces más rápida que en su ausencia.
- Una vez ciclado, el  $\Psi$ -péptido carece de uno de los enlaces de hidrógeno que fija la conformación del péptido nativo. Este hecho se refleja en una mayor flexibilidad que el péptido nativo (que sólo presenta una conformación *cis* en Ile-Pro).
- Las dos familias de conformaciones observadas corresponden a una conformación *cis* o *trans* del enlace  $\omega$  Ile-Pro.
- Se observa cierta actividad anticancerosa a concentraciones  $\mu\text{M}$ , menor en el caso de los derivados con la 3-aminolactama.

Conociendo estas características, decidimos introducir varias de nuestras 3-aminolactamas como análogos dipeptídicos de conformación restringida en nuestra biblioteca de potenciales antibióticos, tal y como habíamos ensayado previamente en nuestro grupo al introducir análogos cíclicos de Ser-Leu en sustitución de los naturales que presenta la estructura nativa de la Stylostatin 1.<sup>1</sup>

Para la síntesis de nuestras  $\Psi$ -stylostatinas con análogos dipeptídicos, cuyo diseño se detallará en el capítulo 3, se decidieron utilizar las lactamas de tipo **VI** y **VIII** siguientes:

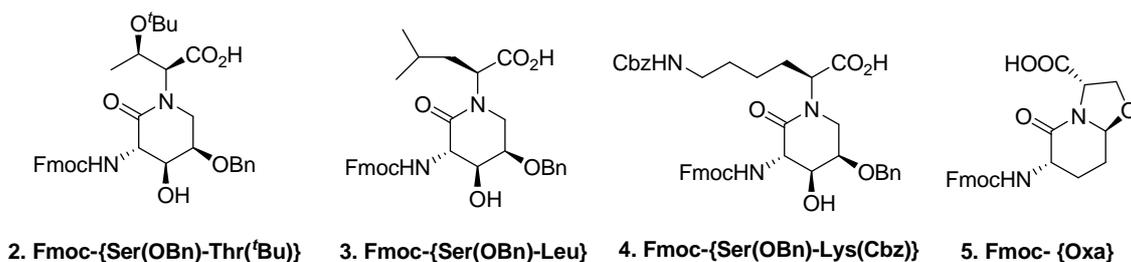
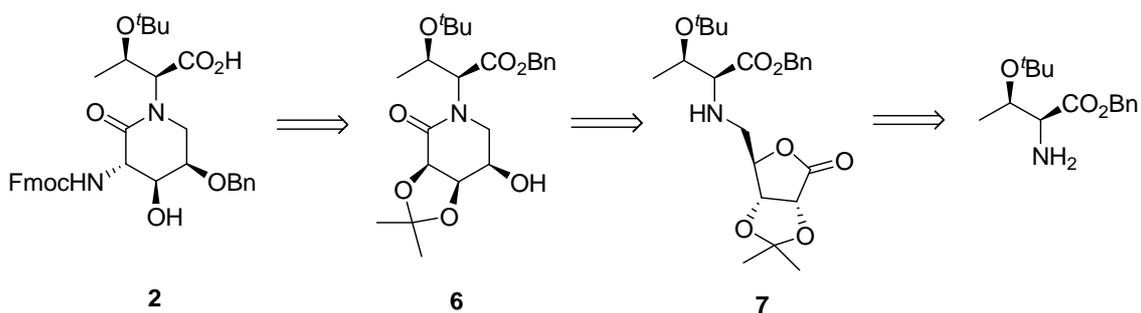


Figura 16

## 2.2. SÍNTESIS DE LA 3-AMINOLACTAMA 2

Tal como se ha comentado en el capítulo anterior, el primer objetivo de este trabajo fue la síntesis de la (3*S*,4*S*,5*R*)-5-benciloxi-*N*-[(1*S*,2*R*)-2-(*tert*-butoxi)-1-(carboxi)-propilamino]-3-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-4-hidroxipiperidin-2-ona, abreviada a partir de ahora como Fmoc-{Ser(OBn)-Thr(<sup>t</sup>Bu)} (compuesto **2**).

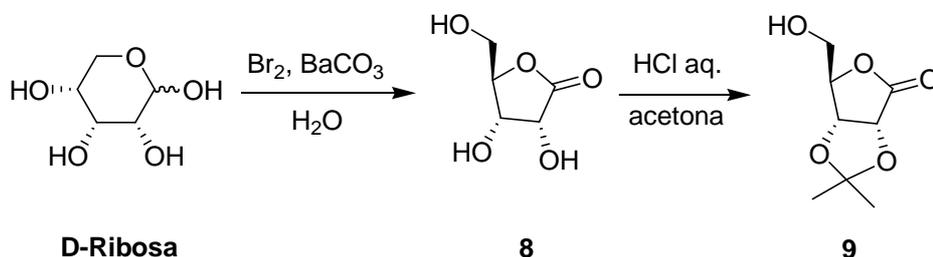
La síntesis se abordó partiendo del éster bencilico de la L-treonina de manera análoga a la descrita en el trabajo previo realizado en nuestro grupo para la síntesis de la lactama Fmoc-{Ser(OBn)-Leu}(**3**)<sup>74</sup>. En el Esquema 1 se muestra el análisis retrosintético. A partir de la D-ribonolactona se formaría el anillo de lactama y posteriormente se llevarían a cabo las transformaciones funcionales para la obtención del compuesto objetivo.



Esquema 1. Diseño retrosintético de la síntesis del compuesto Fmoc-{Ser(OBn)-Thr(<sup>t</sup>Bu)}(**2**)

Para llevar a cabo la síntesis del acetal de la D-ribono-1,4-lactona **9** se partió de la D-ribosa, que se oxida a la D-ribonolactona **8** indicada en el Esquema 2 por tratamiento con Br<sub>2</sub> y BaCO<sub>3</sub> en agua. Posteriormente se protegen los grupos hidroxilo

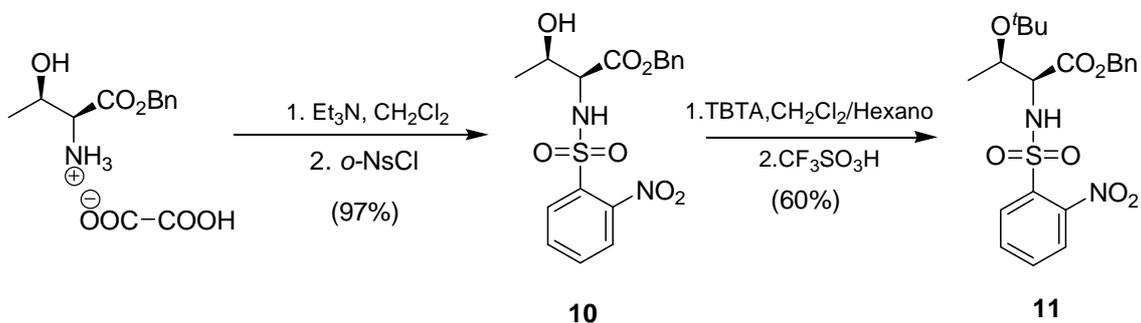
de las posiciones 2 y 3 en forma de acetal, por tratamiento con ácido clorhídrico en acetona.



Esquema 2

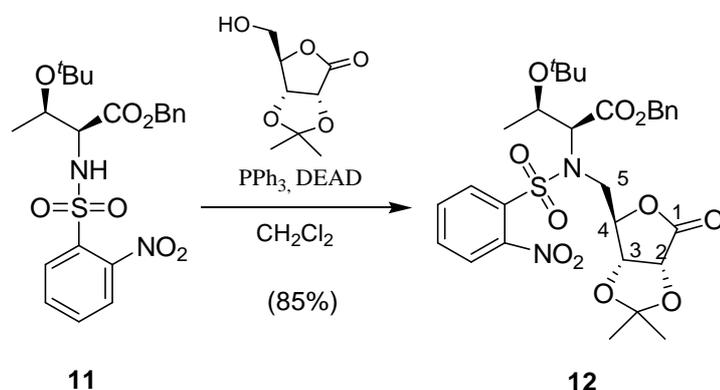
Este compuesto está comercializado en la actualidad, pero su elevado coste económico nos decidió a sintetizarlo en nuestro laboratorio a partir de la D-Ribosa, mucho más asequible.

Una vez obtenida la D-ribonolactona **9** se realizó la síntesis de la sulfonamida **10** por reacción del éster bencílico de la L-treonina con *o*-NsCl y Et<sub>3</sub>N con un 97 % de rendimiento. El compuesto **11** se sintetizó al hacer reaccionar **10** con TBTA en un medio ácido catalítico (ácido trifluorometansulfónico, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H). La reacción duraba 5 días y se alcanzaba un 60 % de rendimiento. También es posible usar BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, con el que se obtienen resultados similares en cuestión de rendimiento, pero se alargaba el tiempo de reacción hasta 8 días (Esquema 3).



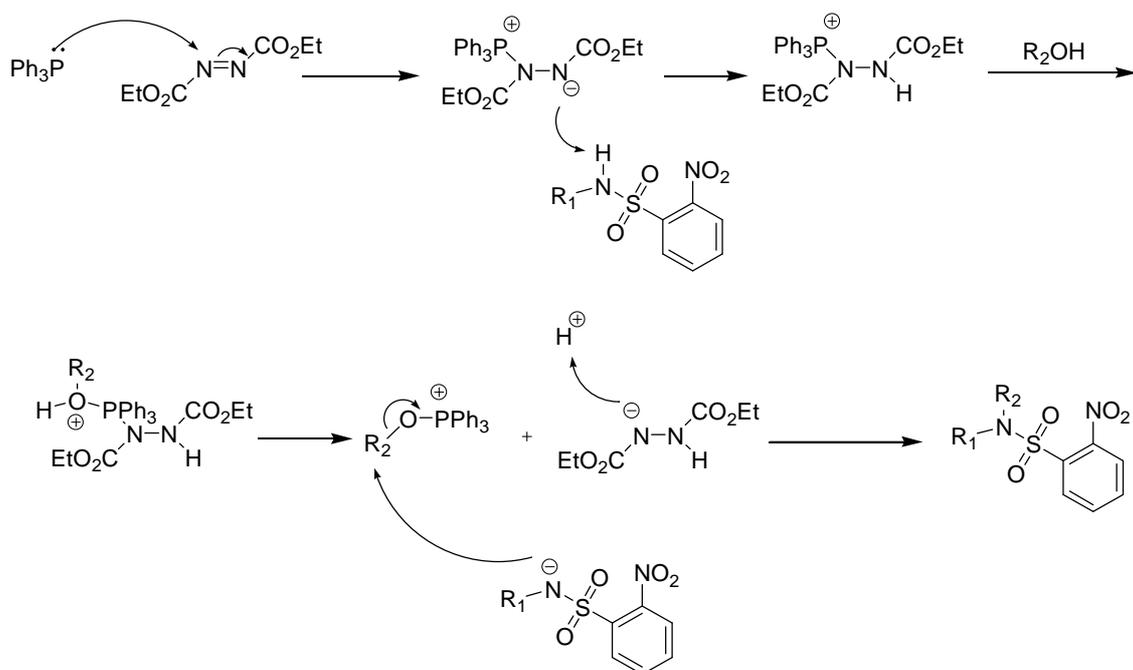
Esquema 3

Una vez se obtuvo la *L*-treonina convenientemente protegida se procedió a su *N*-alquilación con el acetal de la *D*-ribonolactona **9** mediante una reacción de Mitsunobu, consiguiéndose de esta manera el compuesto **12** con un 85 % de rendimiento tras su precipitación con éter dietílico fría y posterior filtración al vacío (Esquema 4).



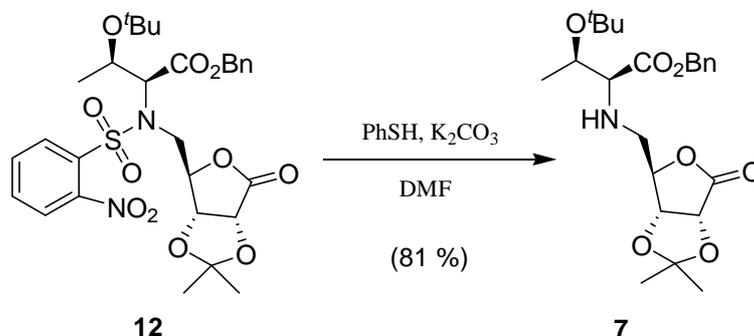
Esquema 4

La sulfonamida **12** se caracterizó por sus datos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , de los que cabe destacar la desaparición de la señal correspondiente al grupo NH y la presencia de señales entre  $\delta$  4,84 y 5,24 ppm correspondientes a los protones del anillo de ribonolactona (H2, H3 y H4). En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN, las señales de los carbonos del anillo resuenan a  $\delta$  74,6 (C2) 75,4 (C3) y 78,0 (C4).



Esquema 5. Mecanismo de la reacción de Mitsunobu

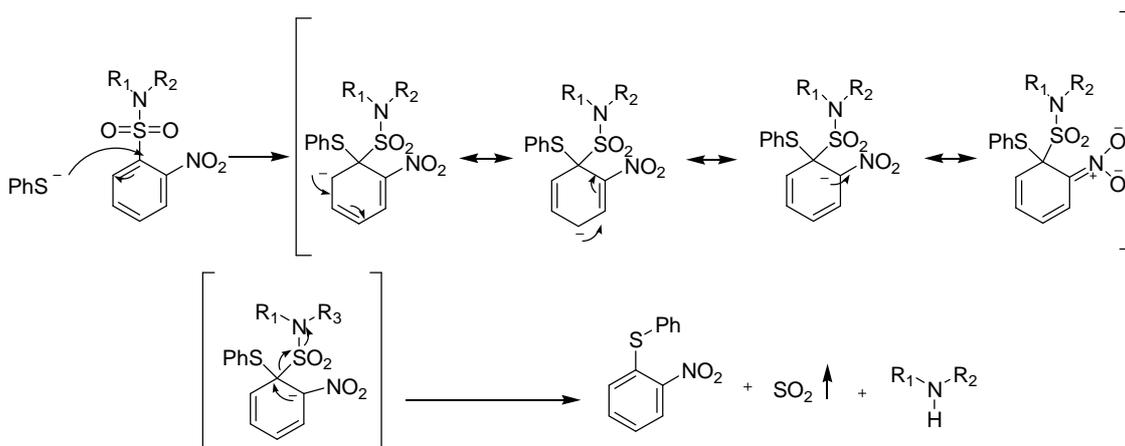
Posteriormente, se realizó una desulfonación bajo condiciones de Fukuyama<sup>79</sup> que permite conseguir la amina secundaria **7** con un rendimiento del 81 %. (Esquema 6).



Esquema 6

Esta reacción consiste en una sustitución nucleófila aromática (S<sub>N</sub>Ar), en la que el tiofenol ataca a un fenilo pobre en electrones debido al efecto electroatrayente del grupo nitro en orto, que además deslocaliza la carga negativa del intermedio. La fuerza motora de la reacción consiste en el hecho de que el grupo saliente genera SO<sub>2</sub> gas. De esta manera se libera la amina secundaria en condiciones suaves (

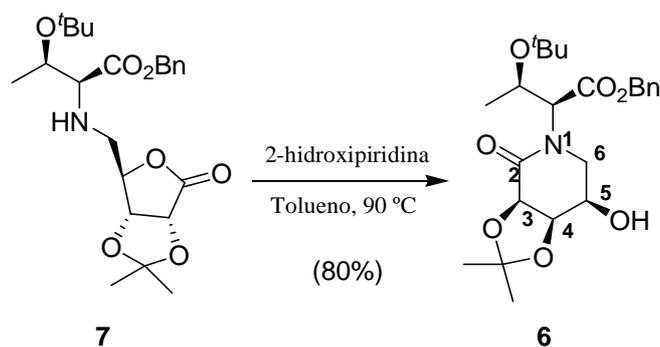
Esquema 7).



Esquema 7. Mecanismo de desprotección de Fukuyama

<sup>79</sup> Fukuyama, T.; Jow, C.K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (36), 6373-6374.

Se sintetizó el núcleo de la lactama a partir de la amina secundaria. Para ello se escogió un método que consistía en el tratamiento con 2-hidroxipiridina en tolueno a 90 °C, el cual se había utilizado con éxito para producir la abertura de lactonas con aminoalcoholes.<sup>80,81</sup> Este método presenta la ventaja de que el disolvente no tiene carácter nucleófilo y por tanto no representa un medio agresivo para el éster benzílico, a diferencia del método utilizado anteriormente en nuestro grupo para llevar a cabo el proceso de lactamización de aminas secundarias (AcONa/ MeOH a reflujo). Se obtuvo el producto **6** con un 80 % de rendimiento. La lactama **6** se caracterizó por sus datos espectroscópicos de <sup>1</sup>H-RMN. Estos muestran un gran desapantallamiento del protón en α de la treonina ( $\Delta\delta = 2,22$  ppm). En el caso de la amina secundaria **7** la encontramos en  $\delta = 3,12$  y en la lactama **6** a  $\delta = 5,34$ .



Esquema 8

En este punto se estudió la protección ortogonal de la posición C-5, necesaria tanto para evitar la interferencia de este grupo funcional en la formación del grupo sulfito posterior (compuestos **8a** y **8b**) como para evitar la deshidratación del grupo hidroxilo durante la síntesis en fase sólida posterior, como se observó en un trabajo previo con la lactama Ser-Leu, en el que se formaba un doble enlace entre las posiciones 4 y 5 de la lactama.<sup>1</sup> En primer lugar se intentó proteger el hidroxilo con el grupo *tert*-butilo. Este tipo de protección permitiría desproteger el grupo carboxilo hidrogenando con paladio, manteniendo inalterados los otros grupos protectores. Se intentó usando

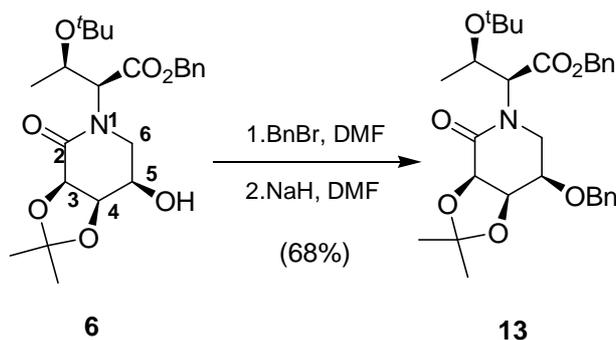
<sup>80</sup> Strekowski, L.; Visnick, M.; Battiste, M.A. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4836-4839.

<sup>81</sup> Hanessian, S. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 1035.

TBTA en un medio ácido catalítico (ácido trifluorometansulfónico,  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ ) como anteriormente. Este método no funcionó, llevando a la descomposición del compuesto **6**.

Se pensó entonces en utilizar un grupo bencilo como protector. Aunque también el ácido carboxílico está protegido con este grupo, la diferente estabilidad del éster y éter bencilo debería permitirnos una desprotección selectiva del grupo ácido. En caso de que esto no fuese posible y tras la hidrogenación se desprotegiesen ambos grupos, se estudiaría la protección de C-5 con otros grupos protectores previa a la incorporación a la síntesis en fase sólida de nuestro derivado pseudodipeptídico.

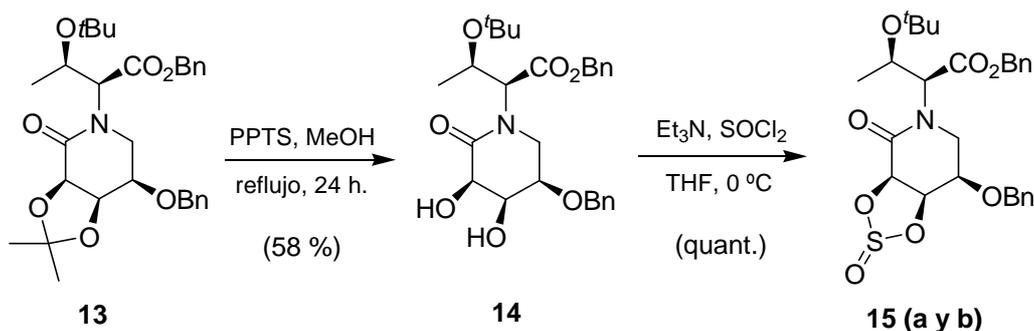
Así pues, se protegió el hidroxilo sobre C5 con un grupo bencilo ( $\text{NaH}$ ,  $\text{BnBr}$  en DMF) obteniendo así el compuesto **13** con un rendimiento del 68 % (Esquema 9). Cabe destacar la importancia de la adición previa del electrófilo ( $\text{BnBr}$ ) a la base ( $\text{NaH}$ ), ya que si este orden se invierte, el producto sufre descomposición. La formación de **13** se puso de manifiesto por las señales espectroscópicas características del bencilo: una doble señal de metileno correspondiente a un sistema AB en  $^1\text{H}$  ( $\delta = 4,55$  y  $4,67$ ) y un aumento de integración correspondiente a un fenilo en la zona aromática ( $\delta = 7,3-74$ ), además de la aparición de una señal en  $^{13}\text{C}$  correspondiente al metileno ( $\delta = 71,9$ ) y varias a los carbonos del fenilo.



Esquema 9

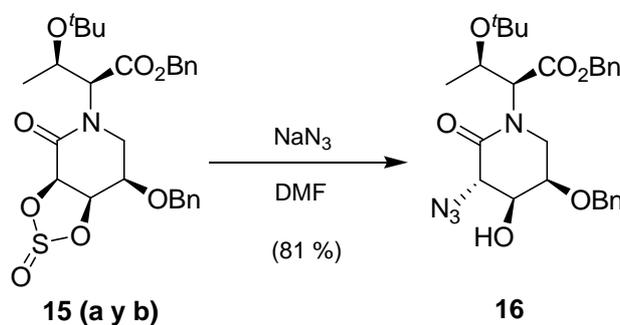
Posteriormente se hidrolizó el acetal del compuesto **13** con tal de obtener el diol correspondiente **14**. Para ello se trató la lactama de partida con PPTS en MeOH a reflujo durante 24 horas. Se obtuvo el compuesto **7** con un 58 % de rendimiento.

Para poder introducir un grupo amino en la posición 3 se partió del diol **14** que, por tratamiento con  $\text{SOCl}_2$  y  $\text{Et}_3\text{N}$  en THF, permitió obtener los sulfitos **15a** y **15b** de forma cuantitativa. Estos compuestos son diastereómeros entre ellos ya que se introduce un nuevo estereocentro (Esquema 10).



Esquema 10

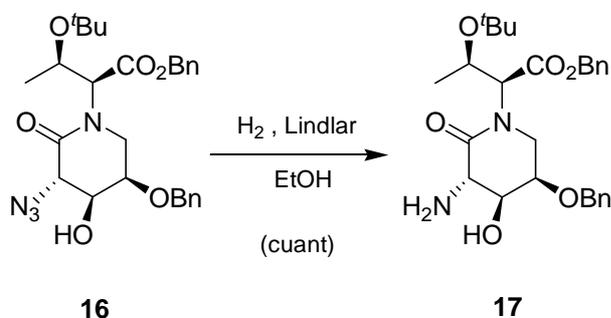
Debido a la dificultad que entraña la separación de **15a** y **15b**, y al hecho de que ambos isómeros rindan el mismo producto en la reacción siguiente, se purificó el crudo por cromatografía pero no se separaron los dos diastereómeros. Así, esta mezcla diastereomérica se trató con  $\text{NaN}_3$  en DMF<sup>82</sup> obteniéndose la azida **16** como único producto y con un rendimiento del 81 %. Esta transformación queda patente con la aparición de una señal a  $2100\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de IR (Esquema 11).



Esquema 11

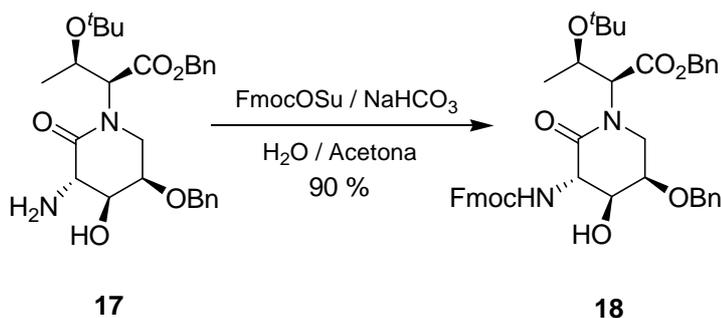
<sup>82</sup> Guiller, A.; Gagnieu, C.H.; Pacheco, H. *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 6343-6344.

La posterior hidrogenólisis mediada con catalizador de Lindlar llevó a la amina objetivo **17** con un rendimiento cuantitativo (Esquema 12). El cambio del grupo azida por el grupo amino provoca un apantallamiento del protón en H3 ( $\Delta\delta = 0,57$  ppm).



Esquema 12

Para poder emplear el pseudodipéptido **2** en la posterior síntesis en fase sólida según la metodología Fmoc/ *t*Bu se procedió a la protección del grupo amino.<sup>83</sup> El tratamiento de la amina **17** con FmocOSu y NaHCO<sub>3</sub> en acetona/ agua permitió obtener el compuesto **18** con un 90 % de rendimiento (Esquema 13). La obtención de este compuesto se comprueba fácilmente observando las nuevas señales que aparecen en la zona aromática, así como el nuevo grupo metileno que se observa a  $\delta = 4,43$  ppm.

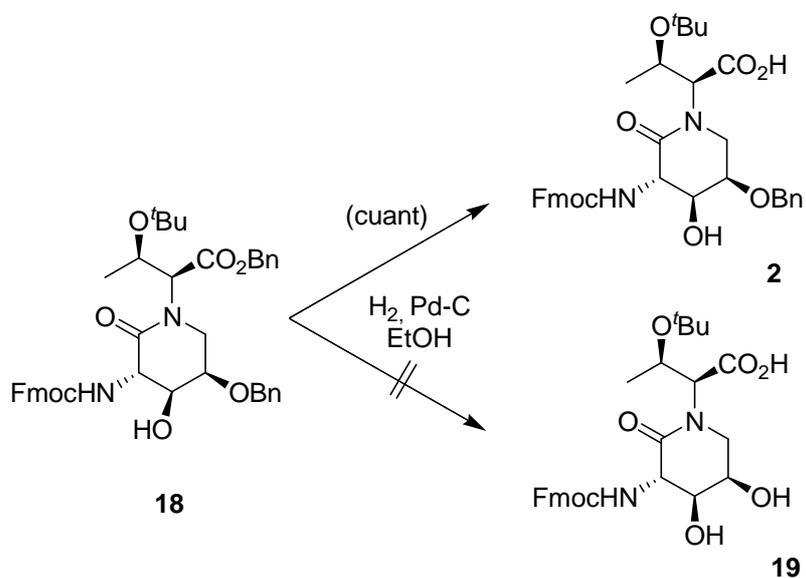


Esquema 13

Posteriormente se ensayó la eliminación selectiva del grupo protector bencilo sobre el ácido carboxílico mediante hidrogenólisis con Pd-C. Así se consiguió obtener

<sup>83</sup> Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press: New York, Boca Raton (Florida), **1997**, 8-40.

el compuesto **2** deseado. Al forzar las condiciones (incremento de tiempo o catalizador) sólo se conseguía la degradación de la molécula sin conseguir obtener el producto **19**.



Esquema 14

El compuesto **2** se identificó por sus datos espectroscópicos. Así, el espectro de MALDI-TOF indica la presencia de un solo bencilo que se corrobora por la presencia de las señales aromáticas correspondientes en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN. La posición del bencilo sobre la molécula se determinó por la presencia de la función ácida en el espectro de IR ( $3390\text{ cm}^{-1}$ ) y a través del espectro bidimensional HMBC, ya que se aprecia el acoplamiento a distancia entre C-5 y los protones del sistema bencílico.

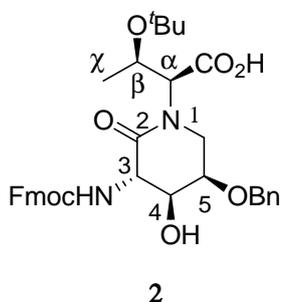
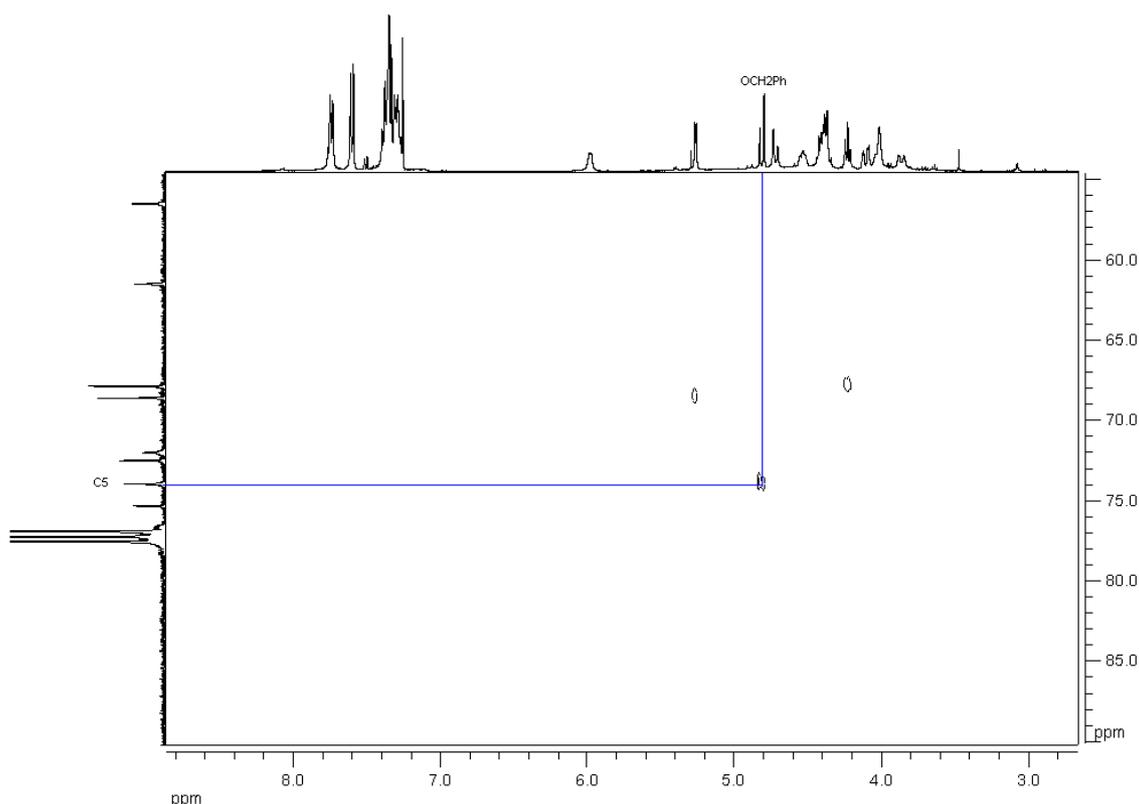


Figura 17. Espectro HMBC ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) del compuesto **2**.



Así pues, se obtuvo el pseudodipéptido lactámico **2** en 11 etapas y un 9,2 % de rendimiento global.

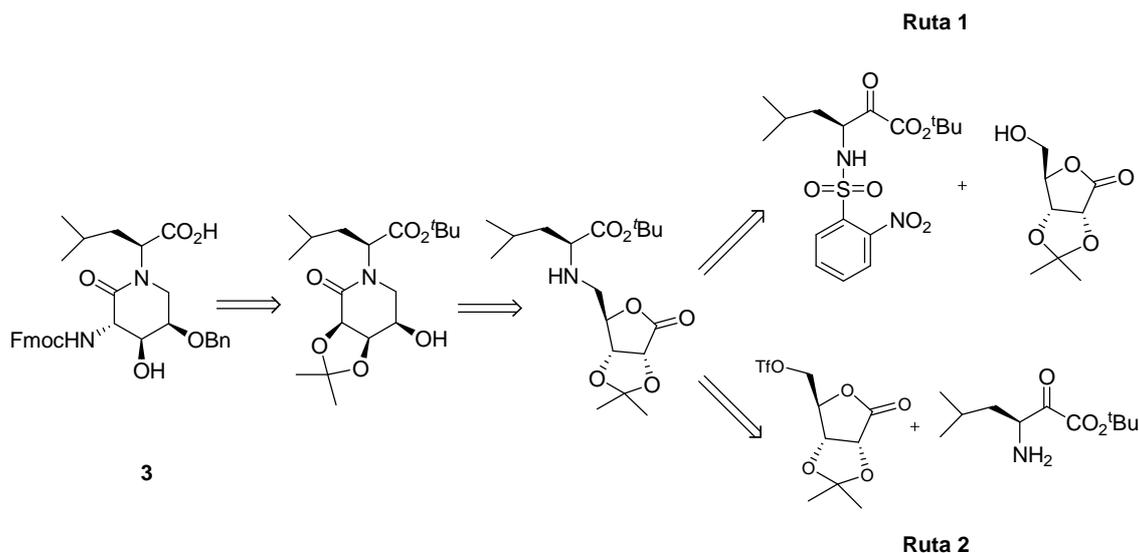
### 2.3. SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS Fmoc-**{Ser(OBn)-Leu}** (**3**) y Fmoc-**{Ser(OBn)-Lys(Cbz)}** (**4**)

El estudio sintético del compuesto Fmoc-**{Ser(OBn)-Leu}** (**3**) fue previamente realizado en nuestro grupo de investigación con objeto de utilizarlo como inductor de giro  $\beta$ . Este fue introducido con éxito como análogo del dipéptido natural serina-leucina<sup>1</sup> en un péptido cíclico llamado Stylostatin 1, que mostraba propiedades antileucémicas<sup>84</sup>.

Para la preparación del compuesto Fmoc-**{Ser(OBn)-Leu}** se estudiaron dos diferente vías sintéticas en nuestro grupo:

<sup>84</sup> Pettit, G.; Srirangam, J.; Herald, D.; Erikson, K.; Doubek, D.; Schmidt, J.; Tacket, L.; Bakus, G. *J.Org.Chem.* **1992**, *57*, 7217-7220.

- Ruta 1: Reacción de Mitsunobu entre una leucina nosilada, aumentando así la acidez del protón NH, y una ribonolactona, y posterior reacción de apertura de la ribonolactona **26a** y ciclación formando el anillo de lactama de **27a**.
- Ruta 2: Reacción entre una ribonolactona protegida con un triflato y la leucina formando el compuesto **26a**, actuando el triflato como buen grupo saliente.<sup>74</sup>



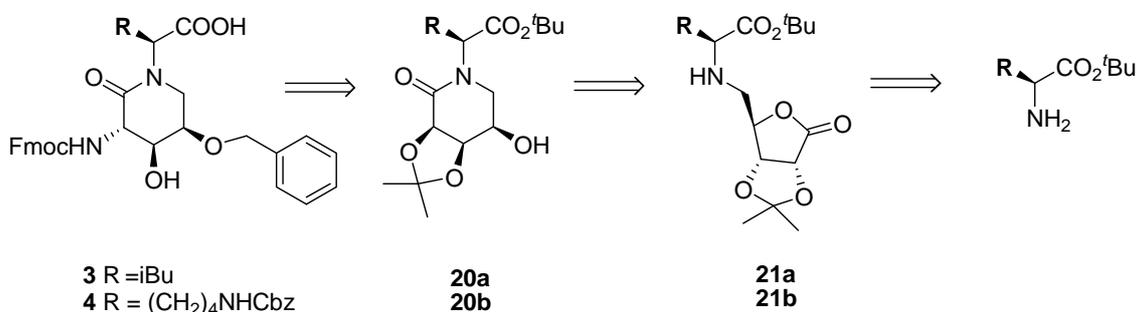
**Esquema 15. Análisis retrosintético para la obtención del compuesto Fmoc-{Ser(OBn)-Leu}**

En el presente trabajo se siguió la ruta 1 de síntesis debido a que las condiciones de reacción son más fácilmente reproducibles.

Así, se repitió la síntesis de Fmoc-{Ser(OBn)-Leu} y paralelamente se aplicó la metodología a la síntesis del compuesto Fmoc-{Ser(OBn)-Lys(Cbz)}, preparado por primera vez con el objetivo de poder introducir un aminoácido con una función básica en la cadena lateral de nuestras aminolactamas de conformación restringida. La síntesis fue muy similar a la del compuesto Fmoc-{Ser(OBn)-Leu} anterior en cuanto a las reacciones que se llevaron a cabo y por ello se explican conjuntamente.

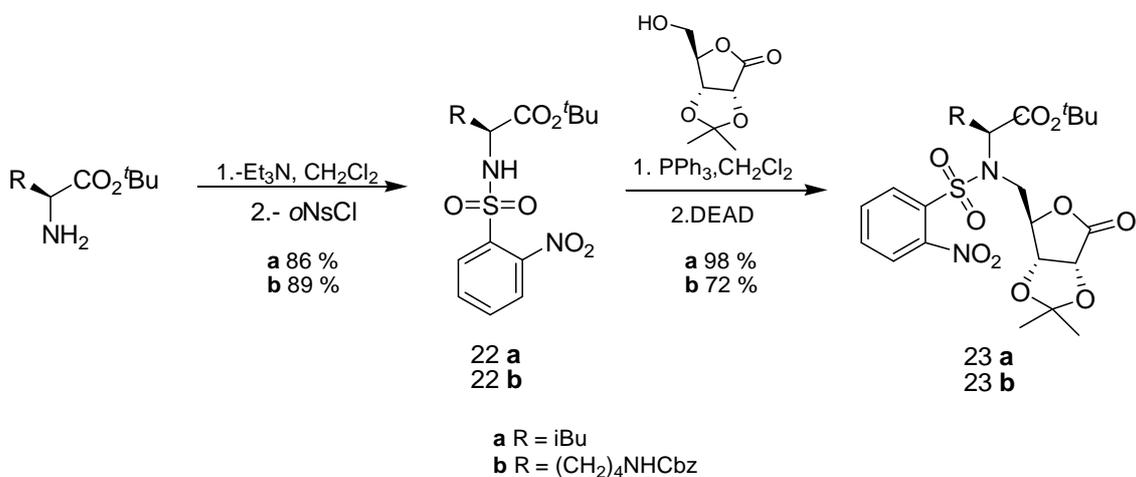
Para estas síntesis se partió de los aminoácidos leucina y lisina respectivamente, ésta última convenientemente protegida en su cadena lateral con el grupo Cbz (carboxibencilo), protector ortogonal con el éster *tert*-butílico presente sobre la función

ácida del compuesto. El diseño sintético es muy similar al previamente comentado para Fmoc- $\{\text{Ser}(\text{OBn})\text{-Thr}(t\text{Bu})\}$ (**2**):



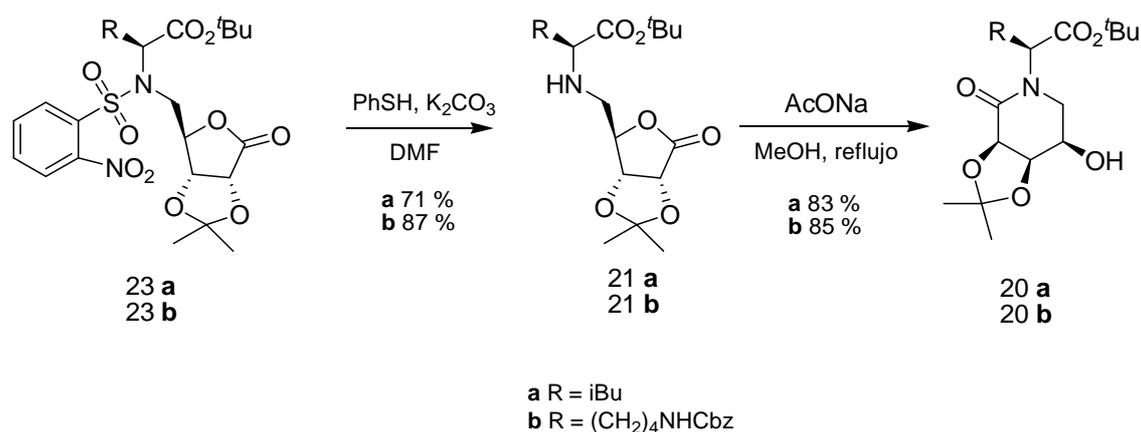
**Esquema 16. Retrosíntesis de Fmoc- $\{\text{Ser}(\text{OBn})\text{-Leu}\}$  (**3**) y Fmoc- $\{\text{Ser}(\text{OBn})\text{-Lys}(\text{Cbz})\}$  (**4**)**

La síntesis de las lactamas **3** y **4** se inició con la introducción del grupo *o*-NsCl sobre el grupo amino libre de los ésteres bencílicos de leucina y lisina. Este grupo, como ya se comentó (apartado 2.2), permite la protección de la amina y su necesaria transformación en sulfonamida, función compatible con la reacción de Mitsunobu posterior. Esta *N*-alquilación mediante reacción de Mitsunobu se lleva a cabo con el acetal de la D-ribonolactona, descrito previamente en el capítulo 2.2. El rendimiento en el caso del compuesto basado en lisina (**23b**) fue del 72 %, alcanzándose en el caso de la serie con leucina (**23a**) un rendimiento casi cuantitativo (Esquema 17). Como en el caso de la síntesis de **2**, la presencia de las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de las posiciones 2,3 y 4 correspondientes al anillo de ribonolactona fueron los datos de la caracterización de los compuestos **23a** y **23b** más destacables.



**Esquema 17**

Una vez introducida la ribonolactona, que proporciona los estereocentros deseados en nuestra molécula, se procedió a la desprotección del grupo nosilo mediante desulfonación bajo condiciones de Fukuyama,<sup>85</sup> en estos casos con rendimientos similares al obtenido en la síntesis de **2**. La ciclación de estos compuestos se realizó con acetato de sodio<sup>86</sup> en lugar de la 2-hidroxipiridina usada anteriormente para **2**. Esto es debido a que el grupo protector sobre la función ácida es en este caso menos sensible a un ataque nucleofílico del disolvente MeOH. Se obtuvieron resultados similares y satisfactorios, tanto para **20a** como para **20b** (83 y 85 %, respectivamente). Estas lactamas se caracterizaron por sus datos espectroscópicos. Se observó un gran desapantallamiento del protón en posición  $\alpha$  en ambos casos ( $\Delta\delta = 2,13$  y  $\Delta\delta = 2,14$  respectivamente).

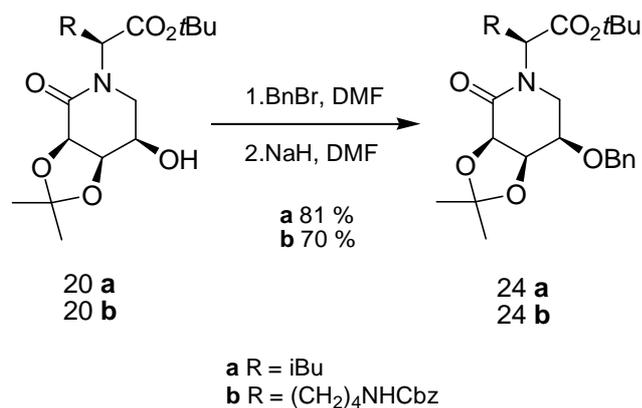


Esquema 18

En ambos casos se protegió el grupo hidroxilo en posición C5 con bromuro de bencilo (Esquema 19)

<sup>85</sup> Fukuyama, T.; Jow, C.K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (36), 6373-6374.

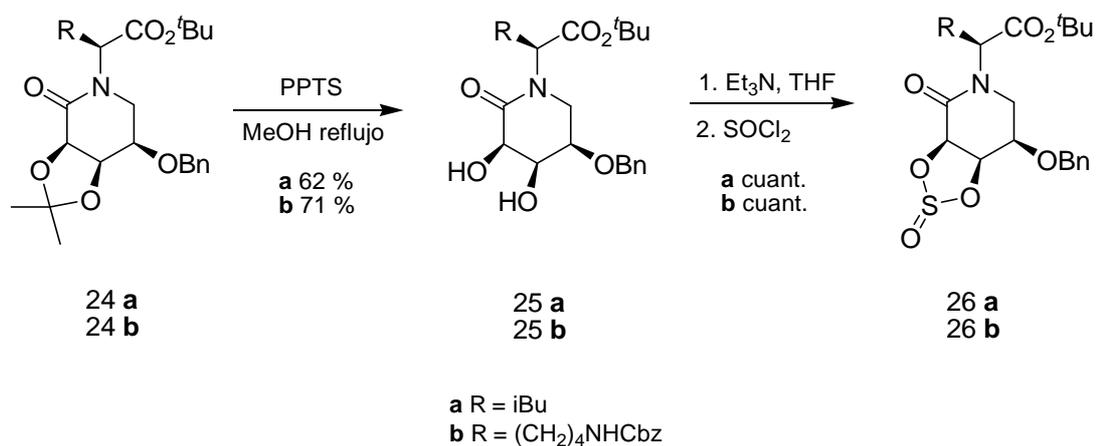
<sup>86</sup>



Esquema 19

Las lactamas **24a** y **24b** se identificaron por las señales correspondientes a protones ( $\delta\text{H} = 7,25\text{-}7,42$  ppm) y carbonos ( $\delta\text{C} = 128.3\text{-}128.7$  y  $137.6\text{-}137,7$  ppm) aromáticos en los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$ , y por señal a  $\delta = 4.69\text{-}4.70$  (s) ppm en el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  correspondiente al metileno bencílico. Los rendimientos fueron algo mejores que en el caso de la serie de la lactama **2**.

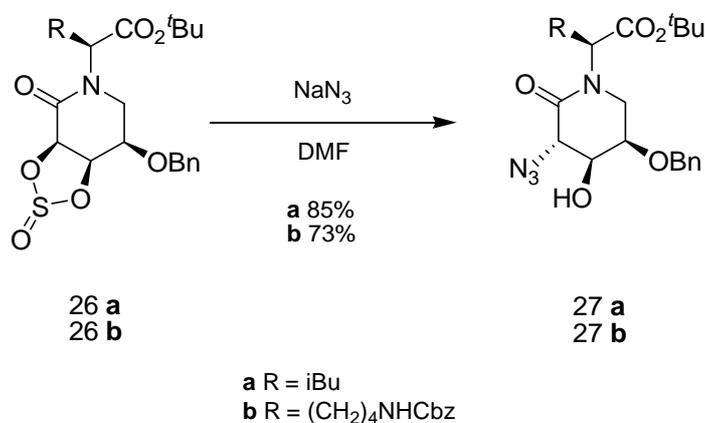
Posteriormente se desprotegeron los hidroxilos de C3 y C4 con PPTS con unos rendimientos aceptables (**25a** = 62%; **25b** = 71%). La formación del sulfito se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas para **2**, de forma cuantitativa.



Esquema 20

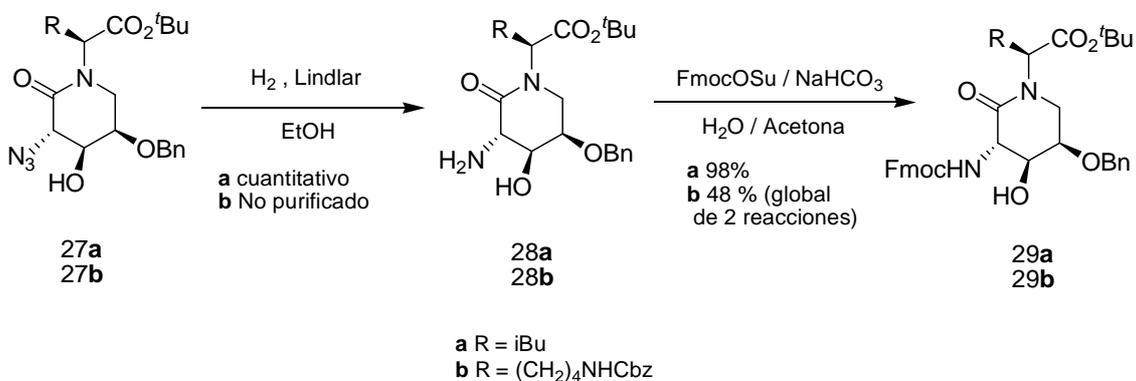
La introducción del grupo azida sobre la posición 3 se realizó en estos casos también de forma satisfactoria, con unos rendimientos similares en las tres síntesis, con sólo un ligero descenso en el caso de **27b**. Los compuestos fueron fácilmente

detectados por la aparición de la banda característica de las azidas en el espectro de IR ( $2111\text{ cm}^{-1}$ ).



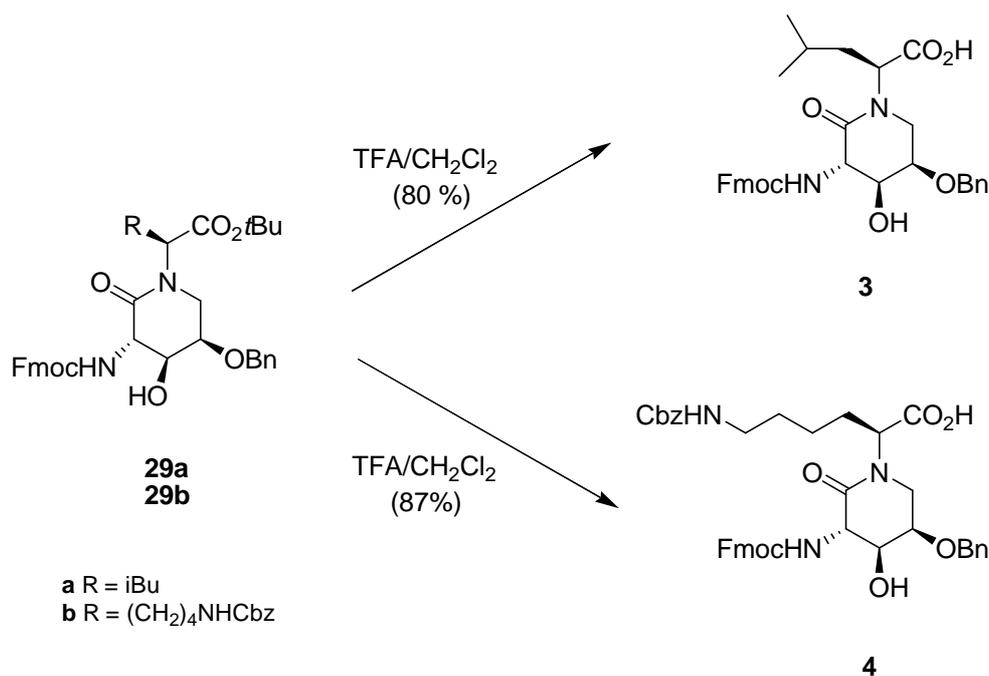
Esquema 21

Cabe destacar la obtención no cuantitativa del compuesto **28b** tras la hidrogenólisis selectiva con Lindlar en el caso de la serie **b**, seguramente debido a una reacción de desprotección parcial del grupo Cbz de la cadena lateral de la lisina. En cualquier caso, el producto no se purifica y se introduce directamente el grupo protector Fmoc. Esto produce un claro descenso del rendimiento de obtención del compuesto de la serie con lisina con respecto al de la serie con leucina. Los compuestos **29a** y **29b** fueron identificados mediante las señales en la zona aromática correspondientes al grupo protector Fmoc obtenidas en los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$ , así como al nuevo grupo metileno observado a  $\delta = 4,31$  (serie **a**) y  $\delta = 4,40$  (serie **b**).



Esquema 22

Finalmente se procedió a desproteger el ácido carboxílico de **29a** y **29b** con TFA para que los compuestos **3** y **4** estuviesen ya preparados para su introducción como “scaffolds” en las posteriores síntesis en fase sólida (Esquema 23). Estos compuestos **3** y **4** se identificaron tanto por su masa como por sus datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , en los que se observó la desaparición de las señales correspondientes al grupo protector *tert*-butilo sobre la función ácida.



Esquema 23

## 2.4. SÍNTESIS DE LA OXAZOLOPIPERIDONA 5

Previamente a la preparación de las 3-aminolactamas mencionadas en los capítulos 2.1 y 2.2, en nuestro grupo se había realizado la síntesis de una 3-aminolactama de tipo oxazolopiperidónico<sup>77</sup>. Esta molécula fue sintetizada como un dipéptido conformacionalmente restringido mediante su incorporación en una estructura bicíclica. Una de las estructuras bicíclicas más estudiadas dentro de este campo es la de la indolicidin-2-ona y sus derivados. El interés actual en este tipo de compuestos (tanto con el esqueleto carbonatado como con la presencia de algún heteroátomo como S o O) queda reflejado en la cantidad de síntesis descritas en la literatura en los últimos años (Figura 18).

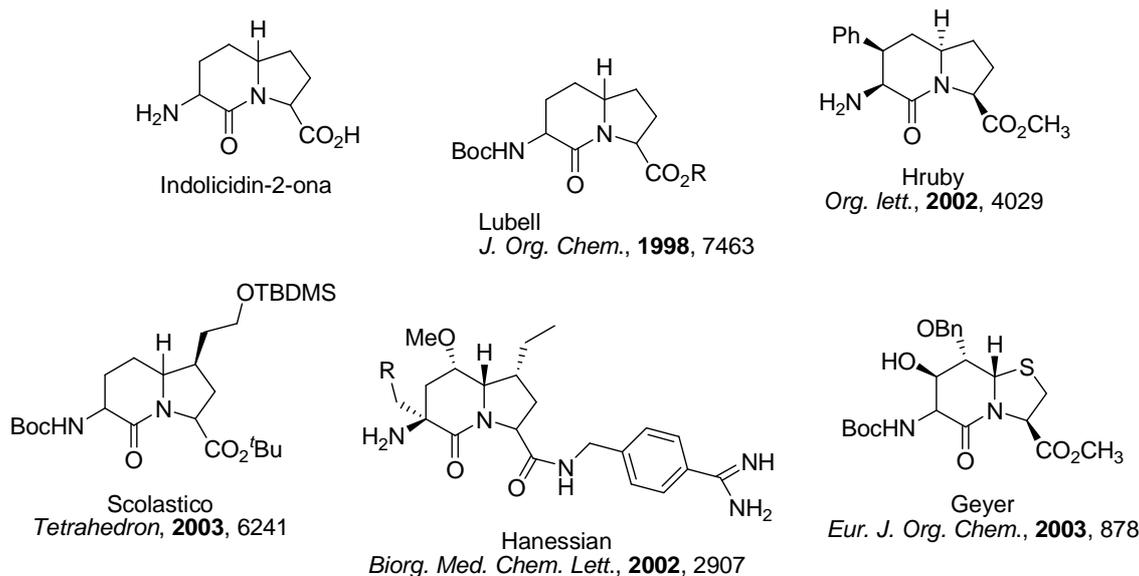


Figura 18. Ejemplos de estructuras de indolizidinonas y derivados sintetizados en los últimos años

Así las indolicidin-2-onas y sus derivados sustituidos con esqueleto carbonado se han incorporado en diferentes péptidos biológicamente activos de los que se ha estudiado su aplicación como inhibidores de caspasas<sup>87</sup>, como análogos de la gramicidina S (péptido antibacteriano)<sup>88</sup> y de la Leu-encefalina,<sup>89</sup> como agonistas parciales del receptor de tiroliberina (un tripéptido del hipotálamo que controla la liberación de la hormona estimulante de la tiroides),<sup>90</sup> como inhibidores de trombina<sup>91</sup> y como agonistas de colecistoquinina y receptores opiáceos,<sup>92</sup> entre otros.

En relación a las estructuras bicíclicas derivadas de las indolicidonas que incorporan un heteroátomo (S, O) en su esqueleto, se encuentran varias síntesis y aplicaciones descritas en la literatura. Los trabajos pioneros de Nagai<sup>93</sup> sobre la

<sup>87</sup> Karanewsky, D.S.; Bai, X.; Linton, S.D.; Krebs, J.F.; Wu, J.; Phran, B.; Tomaselli, K.; *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, 8, 2757-2762.

<sup>88</sup> Roy, S.; Lombart, H.G.; Lubell, W.D.; Hancock, R.E.W.; Farmer, S.W.; *J. Peptide Res.*, **2002**, 60, 198-214.

<sup>89</sup> Xiong, C.; Zhang, J.; Davis, P.; Wang, W.; Ying, J.; Porreca, F.; Hruby, V. J.; *Chem Comm.*, **2003**, 13, 1598-1599.

<sup>90</sup> Chu, W.; Perlman, J.H.; Gershengorn, M.C.; Moeller, K.D.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 3093-3096. b) O'Down, B.F.; Lee, D.; Huang, W.; Nguyen, T.; Cheng, R.; Liu, Y.; Wang, B.; Gershengorn, M.C.; George, S.R.; *Mol. Endocrinol.*, **2000**, 183-193.

<sup>91</sup> Hanessian, S.; Therrien, E.; Granberg, K.; Nilsson, I.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 243-247.

<sup>92</sup> Ndungu, J.M.; Cain, J.P.; Davis, P.; Ma, S-W.; Vanderah, T.W.; Lai, J.; Porreca, F.; Hruby, V.J.; *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 2233-2236.

<sup>93</sup> a) Nagai, U.; Sato, K.; *Tetrahedron Lett.*, 1985, 26, 647-650. b) Nagai, U.; Sato, K.; Nakamura, R.; Kato, R.; *Tetrahedron*, **1993**, 49, 3577-3592. (revisar)

preparación del biciclo 3-ftalimido-2-oxo-7,1-tiazabicyclo[4.3.0]nonan-9-carboxilato de metilo, el llamado BTD ( $\beta$ -turn dipeptide), actualmente disponible comercialmente, y su posterior aplicación en el desarrollo de inhibidores de metaloproteasas, impulsaron el desarrollo de análogos tiaindolicidínicos para su aplicación en el campo de los peptidomiméticos. Recientemente, los grupos de Hruby<sup>94</sup> y Geyer<sup>95</sup>, han descrito nuevas síntesis de 6,5-tiazolidinlactamas funcionalizadas, mientras que el grupo de Gonzalez-Muñiz<sup>96</sup> ha descrito la incorporación de inductores de giro beta como el BTD y el IBTM en péptidos conformacionalmente restringidos derivados de los ligandos de la colecistoquinina.

En cambio, el número de artículos publicados referentes a los análogos oxigenados es muy inferior en relación a sus homólogos de azufre. Se han publicado síntesis de estas 3-aminolactamas bicíclicas con un átomo de oxígeno incorporado en el anillo de 6 miembros del biciclo, concretamente en la posición  $\alpha$  en la cabeza de puente, en los trabajos realizados por Moeller,<sup>97</sup> Schofield,<sup>98</sup> Baldwin,<sup>99</sup> y Zhang.<sup>100</sup>

Con respecto a estructuras pseudodipeptídicas derivadas de oxaindolizidinonas con átomo de oxígeno en el anillo de 5 miembros, solo existe una síntesis descrita en la actualidad en la literatura, la descrita por nuestro grupo<sup>77</sup> (

Esquema 24).

Este compuesto se obtuvo previamente al trabajo experimental realizado en esta tesis por miembros de nuestro equipo de investigación aplicando el método puesto a

---

<sup>94</sup> a) Ndungu, J.M; Gu, X.; Gross, D.E.; Ying, J.;Hruby, V.J.; *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 3245-3247. b) Gu, X.; Tang, X.; Cowell, S.; Ying, J.; Hruby, V.J.; *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 6669-6672.

<sup>95</sup> Tremmel, P.; Brand, J.; Knapp, V.; Geyer, A.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 878-884.

<sup>96</sup> Martín- martínez, M.;de la Figuera, N.; Latorre, M.; García-López, M. T.; Cenarruzabeitia, E.; Del Río, J. ; Gonzalez-Muñiz, R.; *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 7667-7674

<sup>97</sup> a) Sun, H.; Moeller, K.D.; *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 1547-1555. b) Cornille, F.; Fobian, Y.M.; Slomczynska, U.; Beusen, D.D.; Marshall, G.R.; Moeller, K.D.; *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 6989-6992. c) Cornille, F.; Slomczynska, U.; Smythe, M.L.; Beusen, D.D.; Moeller, K.D.; Marshall, G.R.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 909-917. d) Slomczynska, U.; Chalmers, D.K.; Cornille, F.; Smythe, M.L.; Beusen, D.D.; Moeller, K.D.; Marshall, G.R.; *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 1198-1204.

<sup>98</sup> Claridge, T.D.W.; Hulme, C.; Kelly, R. J.; Lee, V.; Nash, I.A.; Schofield, C. J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, 935-936.

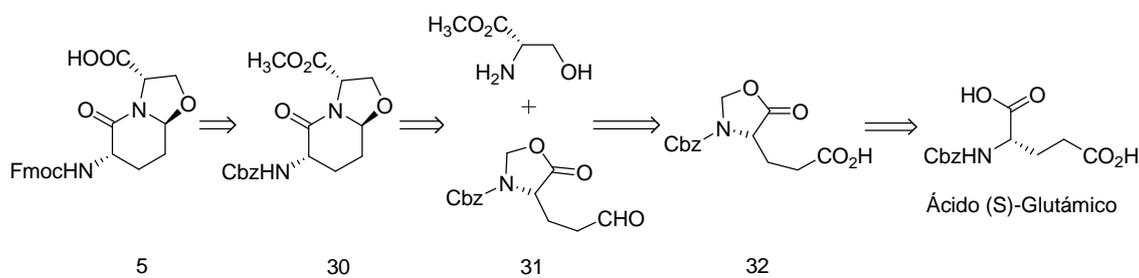
<sup>99</sup> Baldwin, J.E.; Hulme, C.; Schofield, C.J.; Edwards, A.J.; *J. Chem. Soc., Chem Commun.*, **1993**, *30*, 4019-4020.

<sup>100</sup> Zhang, X.; Jiang, W.; Schmitt, A.C.; *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 4943-4935.

punto previamente en nuestro grupo.<sup>77</sup> Su caracterización y los diferentes procedimientos de obtención se encuentran detallados en el artículo previamente mencionado. En la presente tesis, esta oxazolopiperidona **5** es utilizada como análogo rígido de dipéptido, con objeto de inducir un giro  $\beta$  en alguno de nuestro péptidos de la serie de 8 aminoácidos (con dos cargas positivas).

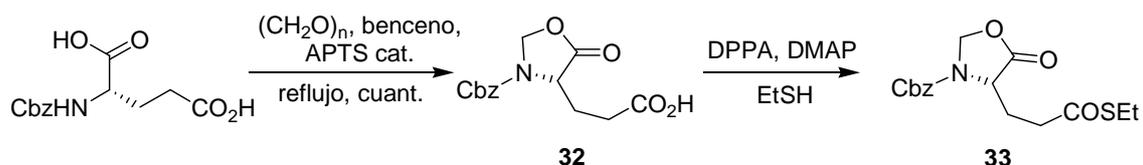
La formación de este biciclo se llevó a cabo en una única etapa por condensación del éster metílico de la serina y el aldehído **31**, sintetizado a partir del ácido glutámico convenientemente protegido (

Esquema 24)



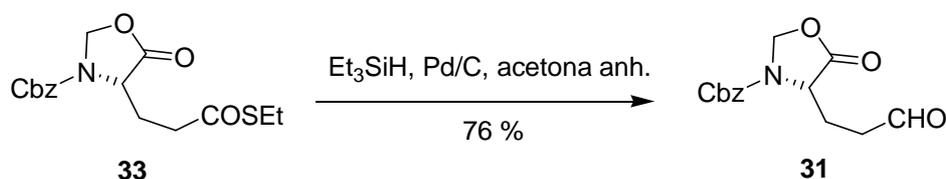
Esquema 24. Retrosíntesis de la oxazolopiperidona **5**

Para la síntesis de la oxazolidinona **32** se hizo reaccionar el ácido (S)-glutámico con paraformaldehído a reflujo durante 2 horas en presencia de ácido p-toluensulfónico catalítico y benceno como disolvente. Se utilizó un sistema Dean-Stark para ir eliminando el agua formada del medio de reacción, desplazando de esta manera el equilibrio hacia la formación del producto deseado. La transformación posterior pretende conseguir la formación del tioéster a través del cual llegar a obtener el aldehído mediante la aproximación de Fukuyama. Para la obtención de este tioéster, y tras varias optimizaciones del método, se hizo reaccionar el ácido **32** con etanotiol, DPPA y cantidades catalíticas de DMAP. El compuesto **33** se obtuvo con muy buenos rendimientos (96 %). (Esquema 25)



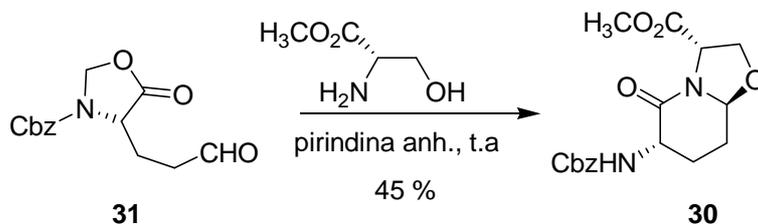
Esquema 25. Síntesis del tioéster 33

Posteriormente, se redujo el tioéster **33** con  $\text{Et}_3\text{SiH}$  y Pd/C (reducción de Fukuyama)<sup>101</sup>, proceso que tuvo lugar sin problemas, obteniéndose el aldehído deseado con un 76 % de rendimiento (Esquema 26).



Esquema 26. Reducción de Fukuyama

Una vez obtenido el aldehído **31**, este se hizo reaccionar con el éster metílico de la serina para proporcionar el biciclo [4.3.0] deseado. Este tipo de reacción, descrita en la literatura previamente,<sup>102</sup> se caracteriza por tiempos de reacción largos y rendimientos moderados. Esta reacción se optimizó en trabajos previos de nuestro grupo<sup>77</sup> y se había observado que el uso de piridina anhidra como disolvente a temperatura ambiente conducía a la formación de la oxazolopiperidona **30** como único diastereómero, mientras que el uso de temperaturas superiores favorecía la obtención de mezclas diastereoméricas.<sup>77</sup> (Esquema 27)

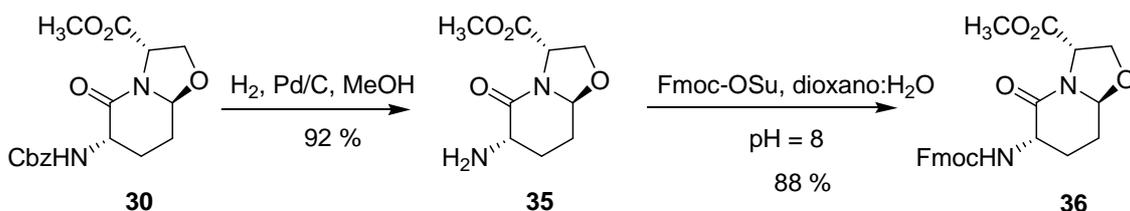


Esquema 27. Obtención del biciclo 30

<sup>101</sup> Fukuyama, T.; Lin, S.; Li, L.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 7050-7051.

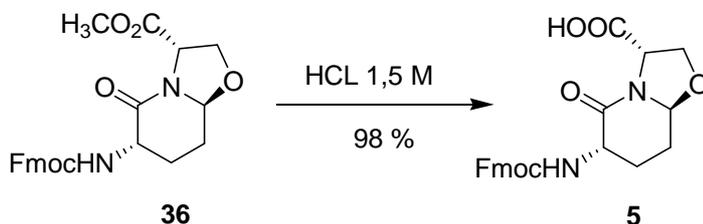
<sup>102</sup> a) Subasinghe, N.L.; Bontemps, R.J.; McIntee, E.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L.; *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 2356-2361. b) Baldwin, J.E.; Lee, E.; *Tetrahedron*, **1986**, *42*, 6551-6554.

Una vez obtenido el compuesto **30** se realizaron una serie de transformaciones para preparar el biciclo para la síntesis peptídica. Estas se iniciaron con la reducción del grupo protector Cbz mediante hidrogenación catalítica con Pd/C 10 %. A continuación se protegió el grupo amino libre con Fmoc, con tal de posibilitar el uso de la estrategia de protección Fmoc/<sup>t</sup>Bu para la síntesis peptídica posterior (Esquema 28).



**Esquema 28.** Reacciones llevadas a cabo para sustituir el grupo protector Cbz por el grupo Fmoc

Finalmente, se llevó a cabo la hidrólisis del éster metílico en medio ácido por tratamiento con HCl 1,5 M (Esquema 29).

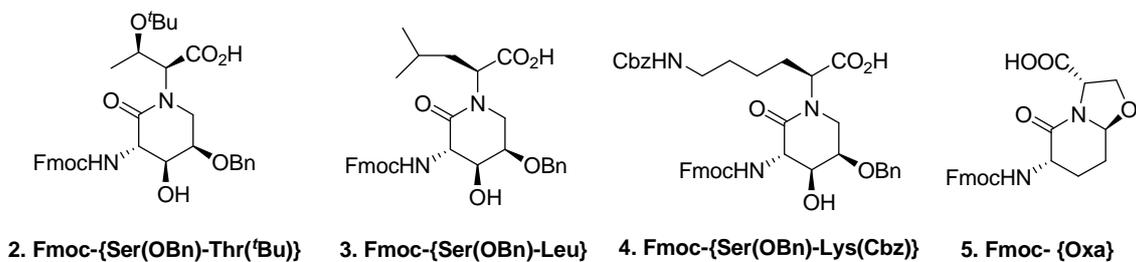


**Esquema 29.** Hidrólisis del éster metílico para la obtención de la oxazolopiperidona **5**

De esta manera se obtuvo el compuesto deseado, la oxazolopiperidona **5**, convenientemente funcionalizada para su posterior incorporación a la síntesis en fase sólida.

## 2.5. RECAPITULACIÓN

Tal y como habíamos propuesto se han sintetizado las siguientes lactamas dipeptídicas, ya adecuadamente protegidas, para su posterior uso en la síntesis de nuestra quimioteca peptídica:



**Figura 19.** Lactamas dipeptídicas sintetizadas para su introducción en ciclopéptidos

**CAPÍTULO 3**  
**Diseño y síntesis de la quimioteca peptídica**

---



Una vez obtenidas nuestras lactamas Fmoc-{Ser(OBn)-Thr(<sup>t</sup>Bu)} (**2**), Fmoc-{Ser(OBn)-Leu} (**3**) y Fmoc-{Ser(OBn)-Lys(Cbz)} (**4**) y Fmoc-{Oxa} (**5**), se inició la síntesis de nuestra quimioteca de  $\psi$ -stylostatinas con potencial actividad antimicrobiana. Para ello, previamente se había realizado el diseño teórico de esta quimioteca.

### 3.1. DISEÑO DE LA QUIMIOTECA DE $\psi$ -STYLOSTATINAS

Mientras en nuestro grupo de investigación se llevaban a cabo estudios sobre  $\Psi$ -stylostatinas como potenciales antitumorales<sup>1</sup>, Ganz publicó en la revista *Nature* un modelo de acción de una nueva generación de antibióticos.<sup>56a</sup> Éstos son pentapéptidos cíclicos anfipáticos de tamaño pequeño (de 6 a 8 aminoácidos) con una determinada proporción de residuos polares y apolares que normalmente están cargados positivamente. Esto les confiere capacidad para formar poros en las membranas bacterianas según un modelo de tipo “barrel-stave”<sup>103</sup>, hecho que produce una permeación de compuestos que lleva a la muerte celular. Debido a la naturaleza de los péptidos (con carga positiva), el modo de acción es selectivo contra membranas procariontas.<sup>104</sup>

Tal como hemos comentado en la introducción, iniciamos nuestros estudios utilizando la Stylostain 1 [*ciclo*(Phe-Asn-Ser-Leu-Ile-Ala-Pro)] como modelo para obtener péptidos antibióticos de nueva generación debido a que en su estructura comprende dos aminoácidos polares y cinco apolares.

#### 3.1.1. Diseño de la biblioteca siguiendo criterios bibliográficos

Como ya se ha comentado en la introducción, existen ciertas características observadas muy a menudo en los diferentes péptidos antibióticos descritos.<sup>105</sup> Estas características, entre otras, son:

---

<sup>103</sup> Apartado 1.8.4

<sup>104</sup> Apartado 1.8.1

<sup>105</sup> a) Vaara, M. *Microbiol. Rev.* **1992**, *56* (3), 395-411. b) Oren, Z.; Shai, Y. *Biopolymers* **1998**, *47*, 451-463. c) Tsubery, H.; Yaakov, H.; Cohen, S.; Giterman, T.; Matityahou, A.; Fridkin, M.; Ofek, I. *Antimicrob. Agents & Chemoter.* **2000**, *49*(8), 3122-3128. d) Jelokhani-Niaraki, M.; Prenner, E.J.; Kondejewski L.H.; Kay C.M.; McElhaney, R.N.; Hodges, R.S. *J. Pept. Res.* **2001**, *58*, 293-306. e) Tsubery, H.; Ofek, I.; Cohen, S.; Eisenstein, M.; Fridkin, M. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62* (5), 1036-1042. f) Tam, J.P.; Lu, Y.-A.;

- **Tamaño y estructura del péptido**
  
- **Amfipaticidad**
  
- **Hidrofobicidad**
  
- **Número de cargas positivas (número total de aminoácidos básicos)**
  
- **Conformación del péptido**

Así pues, se diseñó una biblioteca peptídica que presentase algunas de las características observadas en péptidos antibióticos encontrados en la bibliografía, introduciendo cambios en la Stylostatin 1 nativa.

#### ***Tamaño y estructura del péptido***

El hecho de que se trate de un péptido cíclico y de tamaño pequeño, representa un punto clave en la búsqueda de actividad. El carácter cíclico aporta cierta rigidez, necesaria para cumplir el modelo de Ganz<sup>56a</sup>, y aumenta las posibilidades de agregación. Además, el hecho de que sea un péptido cíclico lo protege de la descomposición enzimática en el tracto intestinal.

#### ***Amfipaticidad***

Una relación adecuada de residuos aminoacídicos polares y apolares sería necesaria para que se diese un mecanismo de acción similar al descrito por Ganz<sup>56a</sup>.

---

Yang J-L. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277(52), 50450 –50456. g) Risso, A.; Braidot, E.; Sordano, M.C.; Vianello, A.; Macri, F.; Skerlavaj, B.; Zanetti, M.; Gennaro, R.; Bernardi, P. *Molec. & Cell Biol.* **2002**, 22 (6), 1926-1935. h) Lee, D.L.; Hodges, R.S., *Biopolymers*, **2003**, 71, 28-48. i) Yeaman, M.; Yount, N. *Pharmacol. Rev.* **2003**, 55, 27-55. j) Kawai, M.; Tanaka, R.; Yamamura, H.; Yasuda, K.; Narita, S.; Umemoto, H.; Ando, S.; Katsu, T. *Chem. Commun.* **2003**, 1264-1265. k) Kiho, T.; Iwata, Y.; Kogen, H.; Miyamoto, S. *Drug Design & Discovery* **2003**, 18, 109-116. l) Appelt, C.; Eisenmenger, F.; Kuhne, R.; Schmieder, P.; Söderhäll, J.A. *Biophys. J.* **2005**, 89, 2296 –2306. m) Ofek, I. *et al. Antimicrob. Agents & Chemother.* **2005**, 3122.

Para ello se decidió modificar la proporción de aminoácidos polares y apolares, variando la relación de polaridad de los dominios hidrofóbico e hidrofílico, dando lugar a dos series diferenciadas dentro de la biblioteca: la “3P+4A” (que consta de 3 aminoácidos polares por 4 apolares) y la “2P+5A” (2 polares por 5 apolares).

### ***Hidrofobicidad***

En muchos de estos péptidos, la región apolar es mayor que la polar. Esto permite un hipotético mayor nivel de partición de nuestros péptidos a nivel de membrana celular, y mayores posibilidades de obtener actividad. No obstante, la hidrofobicidad elevada puede suponer un aumento de toxicidad, por lo que se estudiará también este parámetro entre los péptidos que presenten algún grado de actividad (si es que se encuentran).

### ***Número de cargas positivas (número total de aminoácidos básicos)***

Se decidió introducir carga positiva, ya que puede jugar un papel clave en el reconocimiento del lipopolisacárido bacteriano (bacterias Gram negativas) y para la atracción electrostática inicial hacia la membrana celular procariota. Para ello se sustituye la asparragina original por lisina o arginina.

También se diseñó una serie de péptidos que presentasen dos cargas en su estructura, en la región polar del mismo, incluyendo tanto leucina como treonina en su estructura.

### ***Introducción de lactamas dipeptídicas como inductoras de giro***

Otro punto de diversidad consistiría en la introducción de las cuatro aminolactamas pseudodipeptídicas elegidas de nuestra colección y sintetizadas en esta tesis: Fmoc-{Ser(OBn)-Thr(<sup>t</sup>Bu)} (**2**), Fmoc-{Ser(OBn)-Leu} (**3**) y Fmoc-{Ser(OBn)-Lys(Cbz)} (**4**) y Fmoc-{Oxa} (**5**), Estas sustituirían la serina y la leucina del péptido nativo, actuando como análogos aminoácidos rígidos inductores de giro  $\beta$ .

La síntesis de la lactama Fmoc- $\{\text{Ser}(\text{OBn})\text{-Leu}\}$  fue previamente descrita en nuestro grupo.<sup>74</sup> Cabe destacar que en un trabajo previo que se realizó en nuestro grupo<sup>1</sup>, se observó que, al introducir la lactama  $\{\text{Ser}\text{-Leu}\}$  en la stylostatin 1, la flexibilidad global de la molécula cíclica aumenta al perder un puente de hidrógeno intramolecular (ver capítulo 4), lo cual puede ser positivo para aumentar la actividad biológica.<sup>106</sup>

La lactama Fmoc- $\{\text{Ser}(\text{OBn})\text{-Thr}(\text{tBu})\}$ , descrita en la presente tesis, pretende además variar la relación de polaridad (con un aminoácido polar más).

En el caso de la lactama Fmoc- $\{\text{Ser}(\text{OBn})\text{-Lys}(\text{Cbz})\}$ , además de aumentar la polaridad de la stylostatin 1 original se busca introducir un aminoácido básico (con carga positiva en condiciones fisiológicas) en la región del giro  $\beta$ .

En el caso de la introducción de la oxazolopiperidona Fmoc- $\{\text{Oxa}\}$  se pretende introducir un mimético de giro  $\beta$  sin cadenas laterales funcionalizadas, aumentando el carácter apolar de la molécula.

### ***Aumento del tamaño del péptido a ocho aminoácidos***

Otra posible variación de la molécula consistiría en aumentar a 8 el número de aminoácidos constituyentes del péptido, así como la introducción de 2 cargas positivas proporcionadas por dos lisinas situadas en puntos opuestos de la molécula. Además también constarían de dos zonas apolares en regiones también opuestas, donde podrían ir situadas nuestras lactamas induciendo el giro de la molécula.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se diseñó una quimioteca de compuestos basada en la secuencia de la stylostatin 1 modelo con objeto de poder estudiar la interrelación de todas estas variables estructurales. En la **Figura 20** se representa el diseño de la quimioteca.

---

<sup>106</sup> Kerns E.H.; Di, L. "Drug-like Properties: Concepts, Structure, Design and methods. From ADME to toxicity optimization". Elsevier, San Diego, **2008**, 37-39



Series "2P+5A" (serie 1) y "3P+4A" (series 2 y 3) formadas por aminoácidos naturales						
Serie	Número	Abreviación	Nombre	Características		
				C	P	A
1	P1	cNSLAIPF	<i>ciclo</i> (Asn-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)	0	2	5
	P2	cKSLAIPF	<i>ciclo</i> (Lys-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)	1	1	5
	P3	cRSLAIPF	<i>ciclo</i> (Arg-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)	1	1	5
	P4	cDSLAIPIF	<i>ciclo</i> (Asp-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)	1	1	5
2	P5	cNSTAIPF	<i>ciclo</i> (Asn-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)	0	3	4
	P6	cKSTAIPF	<i>ciclo</i> (Lys-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)	1	2	4
	P7	cRSTAIPF	<i>ciclo</i> (Arg-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)	1	2	4
	P8	cDSTAIPF	<i>ciclo</i> (Asp-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)	1	2	4
3	P9	cNSKAIPF	<i>ciclo</i> (Asn-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)	1	2	4
	P10	cKSKAIPF	<i>ciclo</i> (Lys-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)	2	1	4
	P11	cRSKAIPF	<i>ciclo</i> (Arg-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)	2	1	4
	P12	cDSKAIPF	<i>ciclo</i> (Asp-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)	2	1	4

Figura 21. Series 1, 2 y 3

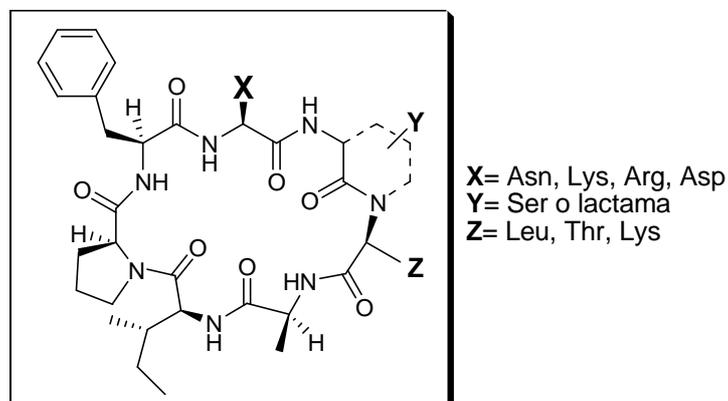
Las tres series siguientes (**Ruta A**) incluyen en su estructura nuestras lactamas de síntesis, con o sin el bencilo en C-5 de la lactama, siendo por lo demás similares en estructura a sus análogos con aminoácidos naturales. Así la serie 4 es de tipo "2P+5A" e incluye la lactama {Ser-Leu}. Las series 5 y 6 son de tipo "3P+4A" e incluyen las lactamas {Ser-Thr} y {Ser-Lys}:

Serie "2P+5A" (Serie 4) y serie "3P+4A" (serie 5) con las 3-aminolactamas correspondientes						
Serie	Número	Abreviación	Nombre	Características		
				C	P	A
4	P13	cN{SLOBn}AIPF	c[Asn-{Ser(OBn)-Leu}-Ala-Ile-Pro-Phe]	0	2	5
	P14	cN{SL}AIPF	c[Asn-{Ser-Leu}-Ala-Ile-Pro-Phe]	0	2	5
	P15	cK{SLOBn}AIPF	c[Lys-{Ser(OBn)-Leu}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	1	5
	P16	cK{SL}AIPF	c[Lys-{Ser-Leu}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	1	5

5	P17	cN{STOBn}AIPF	c[Asn-{Ser(OBn)-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe]	0	3	4
	P18	cN{ST}AIPF	c[Asn-{Ser-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe]	0	3	4
	P19	cK{STOBn}AIPF	c[Lys-{Ser(OBn)-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	2	4
	P20	cK{ST}AIPF	c[Lys-{Ser-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	2	4
	P21	cR{STOBn}AIPF	c[Arg-{Ser(OBn)-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	2	4
	P22	cR{ST}AIPF	c[Arg-{Ser-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	2	4
	P23	cD{STOBn}AIPF	c[Asp-{Ser(OBn)-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	2	4
	P24	cD{ST}AIPF	c[Asp-{Ser-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	2	4
6	P25	cK{SKOBn}AIPF	c[Lys-{Ser(OBn)-Lys}-Ala-Ile-Pro-Phe]	2	1	4
	P26	cK{SK}AIPF	c[Lys-{Ser-Lys}-Ala-Ile-Pro-Phe]	2	1	4

Figura 22. Series 4, 5 y 6

En la **Figura 23** se muestra un esquema que pretende resumir las variaciones que se llevarán a cabo en las series 1 a 6:



**Figura 23.** Esquema resumen del diseño de las series 1 a 6, ya sean **3P+4A** (Z = Lys o Thr) o **2P+5A** (Z = Leu) y contengan o no una lactama sintética, de la biblioteca de  $\psi$ -stylostatinas.

A continuación se diseñaron dos series de péptidos que contaban con dos lisinas (con una potencial doble carga positiva a pH fisiológico). Estarían incluidos en la ruta **B.**

S	N	Abreviación	Nombre	Características		
				C	P	A
7	P27	cKKLAIPF	<i>ciclo(Lys-Lys-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)</i>	2	0	5
	P28	cKSLKIPF	<i>ciclo(Lys-Ser-Leu-Lys-Ile-Pro-Phe)</i>	2	1	4
	P29	cKSLAKPF	<i>ciclo(Lys-Ser-Leu-Ala-Lys-Pro-Phe)</i>	2	1	4
8	P30	cKKTAIPF	<i>ciclo(Lys-Lys-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)</i>	2	1	4
	P31	cKSTKIPF	<i>ciclo(Lys-Ser-Thr-Lys-Ile-Pro-Phe)</i>	2	2	3
	P32	cKSTAKPF	<i>ciclo(Lys-Ser-Thr-Ala-Lys-Pro-Phe)</i>	2	2	3

Figura 24. Series 7 y 8

Un resumen de este planteamiento sintético se puede esquematizar con la Figura 25. Este esquema puede variar incluyendo en su estructura leucina o treonina. Además cada uno de los péptidos de esta serie incluye una segunda lisina como sustituta de uno de los aminoácidos. No se modifica el dueto Pro-Phe pues es el que da un giro a la cadena lineal y permite una buena ciclación de los precursores lineales de los ciclopéptidos.

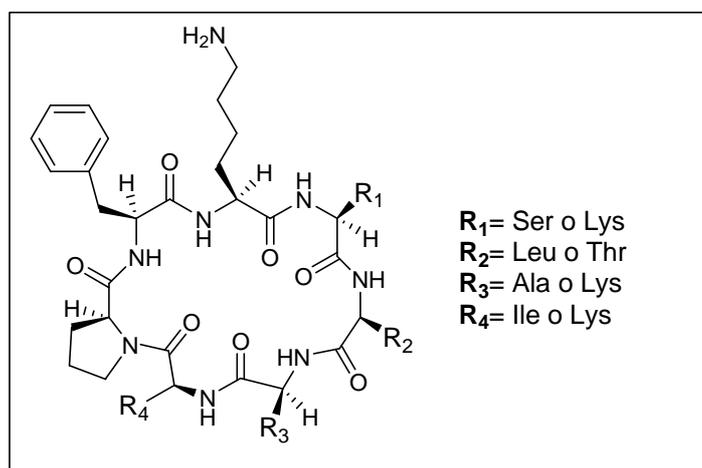


Figura 25. Serie con dos cargas (lisina). La lisina sustituye en cada caso a uno de los aminoácidos resaltados.

En la novena serie (ruta **C**, Figura 26) se incluyen las lactamas {Ser(OBn)-Leu} (en la que se mantiene el grupo bencilo para aumentar la apolaridad) y {Oxa} (dipéptido sin cadenas laterales funcionalizadas) con la intención de que los péptidos tengan dos zonas apolares separadas por aminoácidos básicos (lisina). Para ello, también se aumenta el tamaño del péptido a 8 aminoácidos con la inclusión de una segunda lisina en su estructura (manteniendo la primera en la misma posición que otros péptidos de la biblioteca, como P2 y P6). Esta separación de dos regiones apolares por dos regiones polares con aminoácidos básicos es común en algunos antibióticos péptidicos ya conocidos, como la Gramicidina.<sup>21,22</sup>

Serie	Núm.	Abreviación	Nombre	Características		
				C	P	A
9	P33	cK{SLOBn}AKIPF	<i>ciclo</i> [Lys- <b>{Ser(OBn)-Leu}</b> -Ala-Lys-Ile-Pro-Phe]	2	1	5
	P34	cKSLAKIPF	<i>ciclo</i> [Lys-Ser-Leu- <b>Ala-Lys</b> -Ile-Pro-Phe]	2	1	5
	P35	cK{Oxa}AKIPF	<i>ciclo</i> [Lys- <b>{Oxa}</b> -Ala-Lys-Ile-Pro-Phe]	2	0	6
	P36	cKS{Oxa}KIPF	<i>ciclo</i> [Lys- <b>Ser-{Oxa}</b> -Lys-Ile-Pro-Phe]	2	0	6

**Figura 26.** Serie 9

Así, nuestro objetivo consiste en la síntesis de una biblioteca que consta de 9 series para un total de 36 péptidos. Dichas síntesis se llevarían a cabo mediante la preparación de los precursores lineales en fase sólida mediante química Fmoc/<sup>t</sup>Bu y resina 2-clorotritilo<sup>107</sup> y ciclación en disolución (ver apartado 3.2).

<sup>107</sup> Ver capítulo 3.2.1.

Diseño de la quimioteca de $\psi$ -stylostatinas						
S <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	Abreviación <sup>3</sup>	Nombre	Carac. <sup>4</sup>		
				C	P	A
1	P1	cNSLAIPF	<i>ciclo</i> (Asn-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)	0	2	5
	P2	cKSLAIPF	<i>ciclo</i> (Lys-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)	1	1	5
	P3	cRSLAIPF	<i>ciclo</i> (Arg-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)	1	1	5
	P4	cDSLAIPIF	<i>ciclo</i> (Asp-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)	1	1	5
2	P5	cNSTAIPF	<i>ciclo</i> (Asn-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)	0	3	4
	P6	cKSTAIPF	<i>ciclo</i> (Lys-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)	1	2	4
	P7	cRSTAIPF	<i>ciclo</i> (Arg-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)	1	2	4
	P8	cDSTAIPF	<i>ciclo</i> (Asp-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)	1	2	4
3	P9	cNSKAIPF	<i>ciclo</i> (Asn-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)	1	2	4
	P10	cKSKAIPF	<i>ciclo</i> (Lys-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)	2	1	4
	P11	cRSKAIPF	<i>ciclo</i> (Arg-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)	2	1	4
	P12	cDSKAIPF	<i>ciclo</i> (Asp-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)	2	1	4
4	P13	cN{SLOBn}AIPF	c[Asn-{Ser-Leu(OBn)}-Ala-Ile-Pro-Phe]	0	2	5
	P14	cN{SL}AIPF	c[Asn-{Ser-Leu}-Ala-Ile-Pro-Phe]	0	2	5
	P15	cK{SLOBn}AIPF	c[Lys-{Ser-Leu(OBn)}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	1	5
	P16	cK{SL}AIPF	c[Lys-{Ser-Leu}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	1	5
5	P17	cN{STOBn}AIPF	c[Asn-{Ser-Thr(OBn)}-Ala-Ile-Pro-Phe]	0	3	4
	P18	cN{ST}AIPF	c[Asn-{Ser-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe]	0	3	4
	P19	cK{STOBn}AIPF	c[Lys-{Ser-Thr(OBn)}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	2	4
	P20	cK{ST}AIPF	c[Lys-{Ser-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	2	4
	P21	cR{STOBn}AIPF	c[Arg-{Ser-Thr(OBn)}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	2	4
	P22	cR{ST}AIPF	c[Arg-{Ser-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	2	4
6	P23	cD{STOBn}AIPF	c[Asp-{Ser-Thr(OBn)}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	2	4
	P24	cD{ST}AIPF	c[Asp-{Ser-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe]	1	2	4
6	P25	cK{SKOBn}AIPF	c[Lys-{Ser-Lys(OBn)}-Ala-Ile-Pro-Phe]	2	1	4
	P26	cK{SK}AIPF	c[Lys-{Ser-Lys}-Ala-Ile-Pro-Phe]	2	1	4

7	P27	cKKLAIPF	<i>ciclo(Lys-Lys-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)</i>	2	0	5
	P28	cKSLKIPF	<i>ciclo(Lys-Ser-Leu-Lys-Ile-Pro-Phe)</i>	2	1	4
	P29	cKSLAKPF	<i>ciclo(Lys-Ser-Leu-Ala-Lys-Pro-Phe)</i>	2	1	4
8	P30	cKkTAIPF	<i>ciclo(Lys-Lys-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)</i>	2	1	4
	P31	cKSTKIPF	<i>ciclo(Lys-Ser-Thr-Lys-Ile-Pro-Phe)</i>	2	2	3
	P32	cKSTAKPF	<i>ciclo(Lys-Ser-Thr-Ala-Lys-Pro-Phe)</i>	2	2	3
9	P33	cK{SLOBn}AKIP F	<i>ciclo[Lys{Ser-Leu(OBn)}-Ala-Lys-Ile- Pro-Phe]</i>	2	1	5
	P34	cKSLAKIPF	<i>ciclo[Lys-Ser-Leu-Ala-Lys-Ile-Pro-Phe]</i>	2	1	5
	P35	cK{Oxa}AKIPF	<i>ciclo[Lys-{Oxa}-Ala-Lys-Ile-Pro-Phe]</i>	2	0	6
	P36	cKS{Oxa}KIPF	<i>ciclo[Lys-Ser-{Oxa}-Lys-Ile-Pro-Phe]</i>	2	0	6

1. Número de serie a la que pertenece cada ciclopeptido

2. Número de ciclopeptido

3. La abreviación de los aminoácidos de los péptidos de la quimioteca está de acuerdo con la nomenclatura de una letra.

4. Diferenciación de los péptidos basada en el número de residuos potencialmente cargados (C), el número de residuos polares (descontando los que puedan estar cargados), (P) y número de residuos apolares (A).

**Figura 27.** Tabla resumen de la biblioteca peptídica planificada

### 3.2. PRECEDENTES DE SÍNTESIS

En 1999, Smythe y colaboradores describieron la síntesis de la Stylostatin 1 por ciclación en disolución entre los residuos Phe-Asn (via a) y entre Ile-Pro (via b). Demostraron que la segunda vía permitía obtener la stylostatin 1 con mejor rendimiento y como único producto.<sup>108</sup>

En un trabajo previo de nuestro grupo<sup>1</sup> se decidió ensayar la incorporación de nuestras 3-aminolactamas como análogos rígidos de dipéptidos en la stylostatin 1. Para

<sup>108</sup> Smythe, M.L. J. *Org. Chem.* **1999**, *64*, 3095-3101.

ello se utilizó la resina Wang como soporte polimérico y la Ile fue el primer aminoácido que se unió a la resina. Con esta síntesis se consiguió sintetizar tanto la stylostatin 1 como su análogo lactámico, pero se obtuvo mayoritariamente el producto epimerizado en C $\alpha$  de la Ile. Esto se debe seguramente a que para unir este primer aminoácido a la resina es necesaria una activación previa de éste, factor que favorece la epimerización del protón en el carbono  $\alpha$ .

Esta síntesis permitió obtener una serie de conclusiones que resultaron muy útiles posteriormente (ya comentadas en el capítulo 2.1):

- Las lactamas se pueden utilizar en síntesis peptídica en condiciones estándar.
- La introducción del anillo de lactama dobla los péptidos lineales, lo que facilita la ciclación al estar más cerca en el espacio los puntos reactivos (hasta 15 veces mayor rapidez de ciclación).
- Una vez ciclado, el  $\psi$ -péptido carece de uno de los enlaces de hidrógeno que fija la conformación del ciclopéptido nativo, con lo que se observa una mayor flexibilidad y la aparición de formas *trans* del enlace  $\omega$  Ile –Pro, cuando en la stylostatina nativa dicho enlace sólo es *cis*.

### ***Optimización del método***

En la presente tesis hemos optimizado esta síntesis en fase sólida cambiando la resina, así como el primer aminoácido que se unía. Se escogió la resina cloruro de 2-clorotritilo (también llamada “resina de Barlos”) y se introdujo la prolina como primer aminoácido. La resina cloruro de 2-clorotritilo se caracteriza por utilizar un método de unión del primer aminoácido que no requiere de una activación previa de éste, evitando así una posible epimerización.<sup>109</sup> Además, y debido al elevado impedimento estérico del grupo *o*-clorotritilo, se puede prevenir la formación de dicetopiperazinas, muy habitual en dipéptidos que contienen prolina (situación que se daría en nuestro caso tras la introducción del segundo residuo aminoacídico).<sup>110,111,112</sup> Esta resina, además, permite

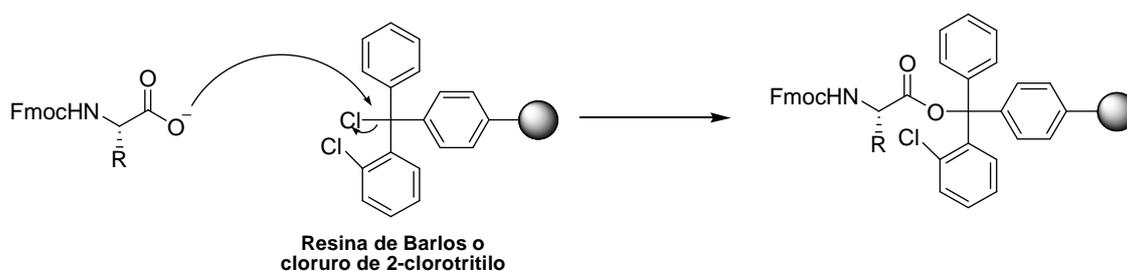
---

<sup>109</sup> Barlos, K. et al. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 38, 555.

<sup>110</sup> Barlos, K. et al. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 3947.

<sup>111</sup> Barlos, K. et al. *Ann. Chem.* **1993**, 215.

mantener protegidas las cadenas laterales ya que permite escisiones suaves del péptido lineal de la resina con el uso de AcOH en lugar de TFA. El método que se utilizaba durante la optimización inicial del método (TFA/DCM al 1%) presentaba problemas que ya desprotegía parcialmente las cadenas laterales de los aminoácidos, propiciando ciclaciones anómalas.



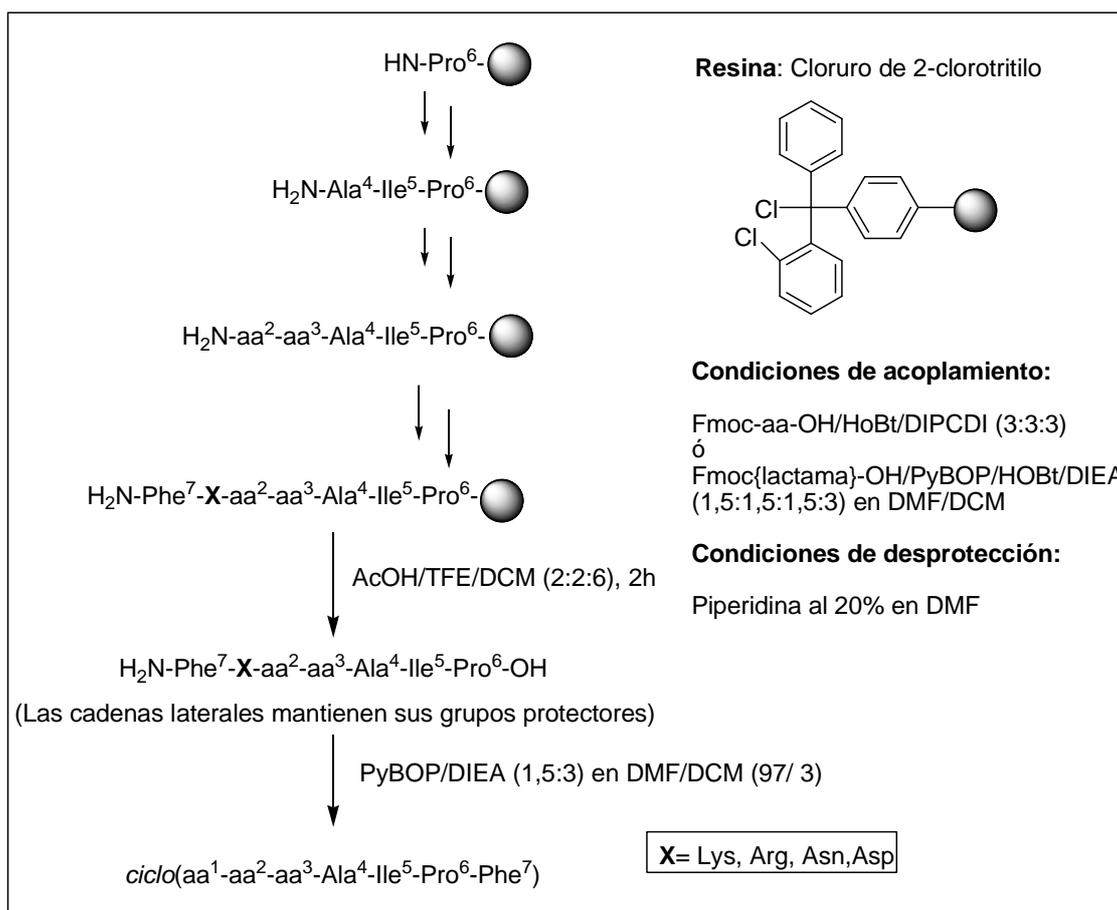
Esquema 30. Unión del primer aminoácido a la resina de Barlos.

### 3.3. SÍNTESIS DE LAS $\Psi$ -STYLOSTATINAS

La síntesis de nuestros péptidos, ya validada, se abordó sintetizando en primer lugar los derivados de stylostatina 1 constituidos por aminoácidos naturales (series **1** a **3**), para posteriormente realizar los primeros ensayos de introducción de nuestras lactamas: Fmoc-{Ser(OBn)-Leu} (**3**) correspondiente a la serie 4 (2P+5A); Fmoc-{Ser(OBn)-Thr(*t*Bu)} (**2**), y Fmoc-{Ser(OBn)-Lys(Cbz)} (**4**) correspondientes a las series 5 y 6 respectivamente (3P+4A). A continuación se sintetizaron los ciclopéptidos de las series **7** y **8** y finalmente los de la serie **9**, que constaban de ocho aminoácidos. Los diferentes grupos funcionales y cadenas laterales de los aminoácidos que se utilizaron estaban protegidos de forma ortogonal a Fmoc, ya fuera con *t*Bu, Pbf, Trt o Boc (lábil en medio ácido), o bien con Bn o Cbz (se desprotegen mediante hidrogenólisis).

Para los ciclopéptidos de las series **1** a **6** se utilizó el procedimiento sintético esquematizado en la Figura 28. En las series **7** a **9** se utilizó el mismo método pero variando todos los aminoácidos excepto prolina y fenilalanina, que en todos nuestros péptidos se mantienen inalterados para propiciar una correcta y rápida ciclación.

<sup>112</sup> R. Steinauer, et al. in "Innovation & Perspectives in Solid Phase Synthesis, 3rd International Symposium", R. Epton (Eds), Mayflower Worldwide Ltd., Birmingham, **1993**, pp. 689.



**Figura 28.** Esquema sintético básico de los péptidos de nuestra quimioteca. Series **1** a **6**. Nótese que en el caso de las lactamas sintéticas estas equivalen al dipéptido aa<sup>2</sup>-aa<sup>3</sup>.

### 3.3.1. Secuencia sintética

En primer lugar es necesario calcular la cantidad de resina necesaria, utilizando para ello su funcionalización teórica. Ésta viene indicada por la casa comercial o bien debe valorarse tras la introducción del primer aminoácido. La funcionalización de la resina se acostumbra a indicar en forma de mmoles de "puntos reactivos"/ g de resina. Por ejemplo, para un péptido de peso molecular de 800 mg/mmol con un rendimiento global del proceso esperado de un 20 % del que se desea obtener unos 22 mg y utilizando una resina de funcionalización 0,7 mmol/g, se tendrían que utilizar unos 200 mg de resina para la síntesis en fase sólida (aproximadamente).

La secuencia sintética sería la siguiente:

## 1.- Solvatación/ lavado de la resina.

En este primer paso se solvata la resina con DCM para aumentar el volumen de la resina al máximo, lo que facilita el contacto de los puntos reactivos con disolvente y reactivos. Para ello se utiliza DCM desacidificado por filtración a través de una columna de alúmina, ya que la resina 2-clorotritilo es muy sensible al medio ácido. Finalmente se realizan los lavados.

Paso	Función	Reactivos/ Disolventes	Tiempo
1	Solvatación	DCM	20min
2	Lavado	DMF	5 x 30s

Tabla 1. Preparación de la resina

## 2.- Acoplamiento del primer aminoácido sobre la resina.

2.1- *Método original utilizado para anclar Pro sobre la resina cloruro de 2-clorotritilo, con cuantificación.* Una vez la resina está hinchada con DCM y lavada con DMF, se acopla directamente el primer aminoácido, que en nuestro caso es prolina, según el método detallado en la Tabla 2, dejándose reaccionar durante 1 hora. Tras esto se realiza una esterificación con MeOH para “capar”<sup>113</sup> la resina, es decir, para impedir que pueda haber acoplamiento en los puntos reactivos que hayan quedado libres de prolina. En este punto se llevará a cabo la cuantificación real de la funcionalización de la resina.

Paso	Función	Reactivos/ Disolventes	Tiempo
1	Lavado	DCM	5 x 30s
2	Lavado	DMF	5 x 30s
3	Acoplamiento	Fmoc-Pro-OH/ DIEA/ 2-Cl-Trt 3:9:1 en DMF/DCM	1h
4	Lavado	DMF	5 x 30s
5	Lavado	DCM	5 x 30s

<sup>113</sup> La palabra “capado” se refiere al enmascaramiento de los posibles residuos funcionales sobre los que no se ha unido el primer aminoácido

6	Capado	DCM/ MeOH/ DIEA 17:2:1	1 x 10min 2 x 1min
7	Lavado	DMF	5 x 30s
8	Lavado	DCM	5 x 30s

**Tabla 2.** Pasos seguidos para el acoplamiento de Pro y “capado”

La elevada labilidad de la resina 2-clorotritilo en condiciones ácidas hace especialmente importante ajustar la cantidad de resina a utilizar en esta síntesis, utilizando para ello algún método para determinar la funcionalización real. El método que se decidió utilizar fue una valoración semicuantitativa basada en una estimación del nivel de acoplamiento del primer aminoácido, basándose en la reactividad del grupo protector Fmoc<sup>114</sup>.

Se siguen los siguientes pasos:

1. Se toman 3 cubetas de UV de "matched silica" de 3 x 10 mm.
2. Se pesa resina seca con el primer Fmoc-aa acoplado (en una cantidad aproximada de 1  $\mu$ mol con respecto al Fmoc) en 3 matraces aforados de 3 mL.
3. Se enrasan los 3 matraces aforados con piperidina al 20 % V/V en DMF recién preparada.
4. Se agita durante unos 3 minutos. Se ha de permitir sedimentar la resina en el fondo de los matraces.
5. Se transfiere la cantidad suficiente de cada matraz aforado para llenar 3 cubetas de UV. Se realiza la medición frente a un blanco de piperidina al 20 % en DMF.
6. Se lee la absorbancia a 290 nm y se obtiene una estimación del nivel de acoplamiento del primer aminoácido mediante la ecuación siguiente:
  - Carga de Fmoc:  $\text{mmoles/g} = (\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{referencia}}) / (1,65 \times \text{mg de resina})$ .

<sup>114</sup> Catálogo NovaBiochem 2002/2003

El valor que se obtiene nos indica la funcionalización real de la resina tras el primer acoplamiento. Se recalculan las cantidades de cada aminoácido y reactivo a partir de este valor.

2.2.- *Método definitivo con cuantificación de origen.* Debido a la elevada variabilidad en su funcionalización que presentaba la resina en cada uso y con objeto de agilizar el proceso de síntesis de los péptidos lineales se decidió optar por una resina comercial Pro-CITrt en la síntesis de nuestra quimioteca. Esta resina presenta la prolina ya anclada y sin grupo protector, con lo que además de evitar tener que realizar el primer acoplamiento no es necesario realizar una medida de la funcionalización, ya que viene dada por el fabricante.

### 3.- Elongación del péptido a partir de Pro-CITrt usando una estrategia Fmoc/ <sup>t</sup>Bu.

Los siguientes pasos consisten en hacer crecer el péptido sobre nuestra resina. Se trata de un proceso reiterativo que se realiza con cada aminoácido que se quiere añadir a la cadena en crecimiento, según la tabla siguiente:

Paso	Función	Reactivos/ Disolventes	Tiempo
1	Lavado	DMF	5 x 30s
2	Desprotección	Piperidina al 20 % en DMF**	2 x 1min 2 x 10min
3	Lavado	DMF	5 x 30s
4	Lavado	DCM	5 x 30s
5	Test: 1) Ensayo negativo : volver al paso 1 2) Ensayo positivo: ir al paso 6		
6	Lavado	DMF	5 x 30s
7	Acoplamiento	Fmoc-aa-OH/ HOBt/ DIPCDI 3:3:3 en DMF/DCM*	1h
8	Lavado	DMF	5 x 30s

9	Lavado	DCM	5 x 30s
10	<p>Test:</p> <p>1) Ensayo positivo : volver al paso 6</p> <p>2) Ensayo negativo: Nuevo ciclo de acoplamiento</p>		

\* Nota: si es necesario un reacoplamiento éste se realiza utilizando la mitad de equivalentes durante una hora o los mismos equivalentes que la primera vez durante 30min.

\*\*Los pasos 1 a 3 se obvian en Pro-CITrt porque ya se halla desprotegida.

**Tabla 3.Elongación del péptido**

En este proceso es muy importante la realización de tests colorimétricos, al final de cada acoplamiento y desprotección, que nos sirven de control para determinar si la reacción ha tenido lugar a nivel cualitativo. Para ello se utilizan el test de ninhidrina (que permite detectar de forma cualitativa la presencia de grupos amino primarios en una resina) y el test de cloranilo (el cual permite la detección de aminas secundarias libres, en nuestro caso prolina, en una resina).<sup>115</sup>

#### **4. Incorporación de las 3-aminolactamas.**

En las síntesis de los péptidos que incluyen nuestras aminolactamas sintéticas se utilizan unas condiciones de acoplamiento más enérgicas (se usa PyBOP en lugar de DIPCDI y DIEA como base)<sup>116</sup> en el momento de incorporación de la lactama, ya que por la escasa cantidad disponible se intenta maximizar el rendimiento del acoplamiento, que podría quedar comprometido al disminuir el número de equivalentes utilizados. El resto de acoplamientos de la síntesis se llevan a cabo como se indica anteriormente en el punto 3.

<sup>115</sup> Ver anexo 3.5 para una explicación detallada de los tests de ninhidrina y cloranilo

<sup>116</sup> Ver en anexo 3.5 los mecanismos de acoplamiento con HOBt/DIPCDI y con HOBt/PyBOP/DIEA.

Paso	Función	Reactivos/ Disolventes	Tiempo
1	Lavado	DMF	5 x 30s
2	Desprotección	Piperidina al 20 % en DMF	2 x 1min 2 x 10min
3	Lavado	DMF	5 x 30s
4	Lavado	DCM	5 x 30s
5	Test:  1) Ensayo negativo : volver al paso 1 2) Ensayo positivo: ir al paso 6		
6	Lavado	DMF	5 x 30s
7	Acoplamiento	Fmoc-{lactama}-OH/ HOBt/ PyBOP/ DIEA 1,5:1,5:1,5:3 en DMF/DCM	1h
8	Lavado	DMF	5 x 30s
9	Lavado	DCM	5 x 30s
10	Test:  3) Ensayo positivo : Capado 4) Ensayo negativo: Nuevo ciclo de acoplamiento		
11	Capado	Ac <sub>2</sub> O/ DIEA 2:1	2 x 10min
12	Lavado	DMF	5 x 30s
13	Lavado	DCM	5 x 30s

**Tabla 4.** Incorporación de las 3-aminolactamas.

### 5.- Escisión del enlace péptido-resina 2-clorotritilo.

Para obtener el péptido lineal, se comienza desprotegiendo el último aminoácido de la cadena (primero del péptido). Una vez realizado esto se trata la resina con AcOH/ TFE/ DCM (2:2:6) durante dos horas. Esta disolución permite escindir el péptido de la resina en condiciones suaves, manteniendo protegidas las cadenas laterales, hecho que facilita la posterior ciclación. Tras este paso se filtra el exceso de reactivos y se lava la

resina tres veces más con la mezcla de la escisión. Los filtrados se recogen y se evaporan. El crudo resultante se diluye con 15-20 mL de hexano y a continuación se realiza una evaporación al vacío para eliminar el AcOH de forma azeótropica con el hexano. Si tras esta operación se observa que aún pudiese quedar AcOH (por no obtenerse el sólido blanco habitual o por el olor característico) se volvería a adicionar hexano y se repetiría el proceso. Es importante asegurar la eliminación completa del AcOH pues podría comprometer la ciclación del péptido al “capar” el péptido lineal.

### **6.- Ciclación del péptido protegido sobre sus cadenas laterales**

El péptido lineal se utiliza directamente sin purificar llevando a cabo la ciclación una vez se ha eliminado todo el AcOH. La ciclación se lleva a cabo con DMF/ DCM 97/3, 1,5 equivalentes de PyBOP y 3 equivalentes de DIEA. La dilución ha de ser de aproximadamente  $10^{-4}$  M para asegurar que la ciclación se produzca de forma intramolecular y no se produzca polimerización. Es importante mantener los grupos protectores de las cadenas laterales de los distintos aminoácidos para evitar posibles ciclaciones indeseadas.

### **7.- Desprotección de las cadenas laterales.**

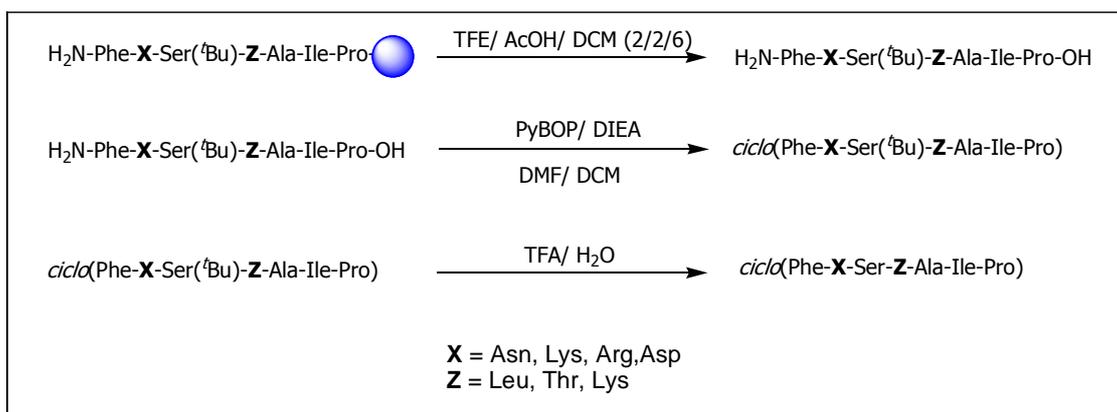
Una vez ciclado el péptido se eliminan los grupos protectores. Esto se realiza usando 1 mL de TFA/ H<sub>2</sub>O 95/5 (o cantidad suficiente para asegurar que todo el péptido quede disuelto) durante 10-15 min. A continuación se evapora el disolvente.

### **8.- Purificación del péptido por HPLC semipreparativo.**

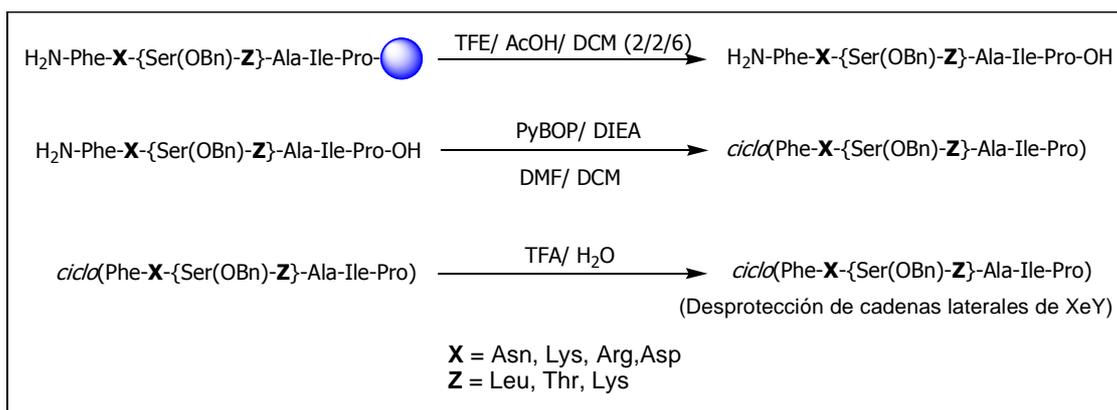
Se utilizan unas condiciones adecuadas previamente validadas por HPLC analítico (columna de fase inversa Symmetry C<sub>18</sub>, 4,6 x 150 mm). Para la purificación se utiliza una columna de fase inversa Symmetry C<sub>18</sub>, 19 x 100 mm. Las fases móviles utilizadas fueron gradientes de acetonitrilo en agua. Una explicación más detallada esta descrita en el apartado 6.2.

### 9.- Desprotección de los grupos bencilo en C-5 de los péptidos que incluyen lactama.

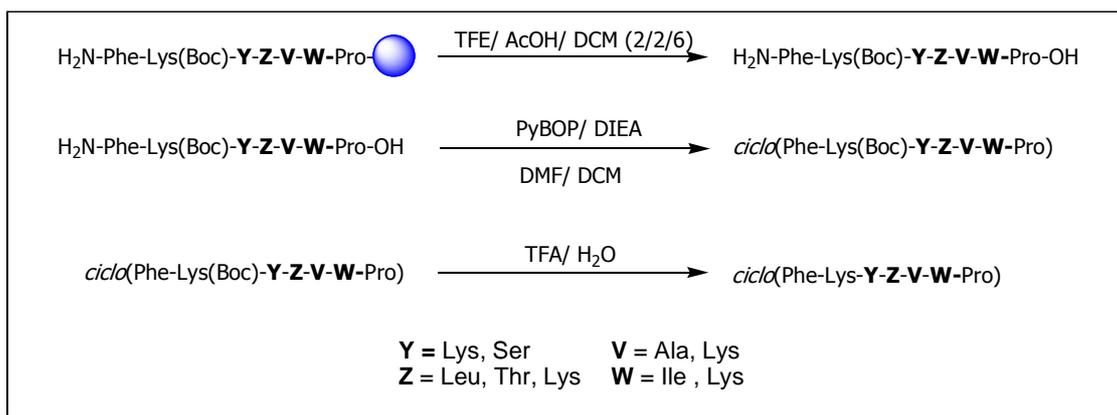
Para ello se hidrogena a presión bajo atmósfera de nitrógeno y en presencia de Pd-C. Esta reacción se monitoriza por HPLC analítico. Una vez ha desaparecido el producto de partida se realiza un espectro de MALDI-TOF para confirmar que se ha obtenido el producto deseado.



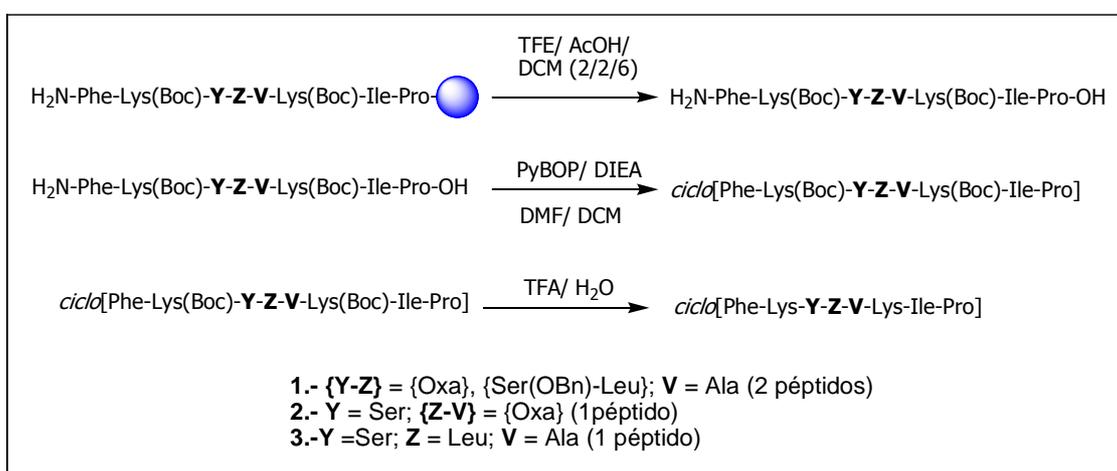
**Figura 29.** Escisión, ciclación y desprotección de los péptidos. Series 1 a 3.



**Figura 30.** Escisión, ciclación y desprotección de las  $\psi$ -stylostatinas lactámicas. Series 4, 5 y 6.



**Figura 31.** Escisión, ciclación y desprotección de las  $\psi$ -stylostatinas. Series 7 y 8.



**Figura 32.** Escisión, ciclación y desprotección de las  $\psi$ -stylostatinas. Serie 9.

## 10.- Caracterización de los péptidos por HPLC, AAA y MALDI\_TOF.

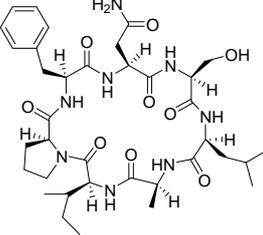
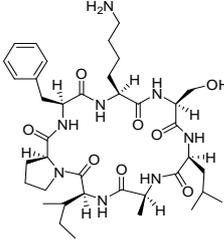
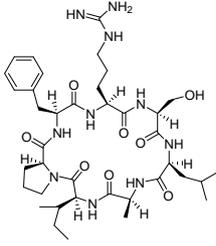
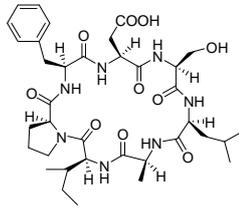
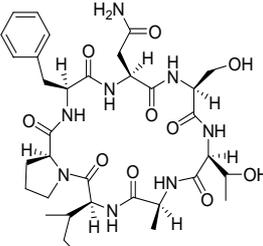
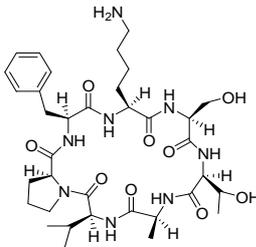
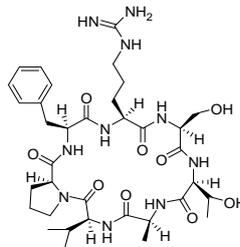
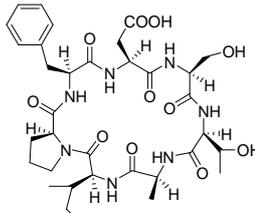
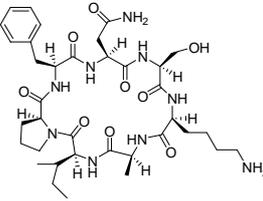
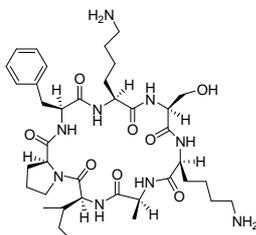
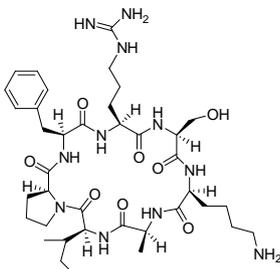
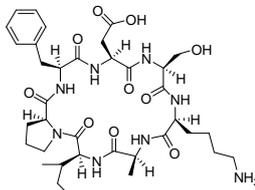
Los compuestos obtenidos se caracterizan por sus tiempos de retención en dos gradientes diferentes de HPLC analítico, espectrometría de masas MALDI-TOF y análisis de aminoácidos. Cabe destacar que debido a la higroscopia de los péptidos no se puede llevar a cabo fácilmente su caracterización por RMN.

Mediante el proceso descrito se sintetizó gran parte de nuestra quimioteca. A continuación se detallan los péptidos que se obtuvieron, con purezas mayores al 90 % y un rendimiento muy variable (teniendo en cuenta la ciclación, desprotección y, en los casos que corresponda, la eliminación del grupo bencilo sobre las lactamas).

### **3.3.2. Péptidos sintetizados.**

#### *Series 1, 2 y 3.*

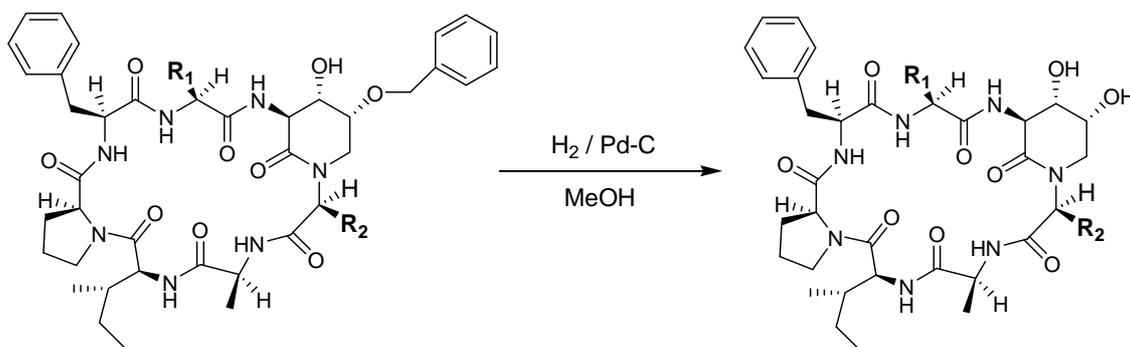
Los péptidos correspondientes a las tres primeras series, formados exclusivamente por aminoácidos naturales, no presentaron problemas sintéticos relevantes en ninguna de las etapas de la síntesis, pese a que la ciclación en disolución disminuyó bastante el rendimiento del péptido ciclado respecto al lineal (de este último no hay datos exactos por no purificarse una vez escindido de la resina). La purificación, en cambio, si fue realmente costosa en muchos casos, sobretodo los que incorporaban uno o más aminoácidos básicos en su estructura. Fue necesario repurificar en varias ocasiones, y en condiciones de elución variables, diversas fracciones obtenidas por HPLC semipreparativo debido a que no llegaban a presentar un nivel de pureza suficiente. Esto hace que las condiciones de purificación sean imposibles de describir con exactitud, pues las condiciones de elución variaban al repurificar las diversas fracciones de cada crudo.

Serie 1			
			
<b>P1. cNSLAIPF</b> Rendimiento: 13%	<b>P2. cKSLAIPF</b> Rendimiento: 14%	<b>P3. cRSLAIPF</b> Rendimiento: 20%	<b>P4. cDSLAIPIF</b> Rendimiento: 11%
Serie 2			
			
<b>P5. cNSTAIPF</b> Rendimiento: 15%	<b>P6. cKSTAIPF</b> Rendimiento: 5%	<b>P7. cRSTAIPF</b> Rendimiento: 12%	<b>P8. cDSTAIPF</b> Rendimiento: 12%
Serie 3			
			
<b>P9. cNSKAIPF</b> Rendimiento: 15%	<b>P10. cKSKAIPF</b> Rendimiento: 23%	<b>P11. cRSKAIPF</b> Rendimiento: 7%	<b>P12. cDSKAIPF</b> Rendimiento: 12%

**Figura 33.** Resumen de los ciclopéptidos sintetizados de las series 1, 2, 3 y sus rendimientos.

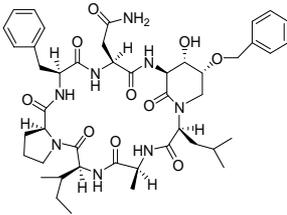
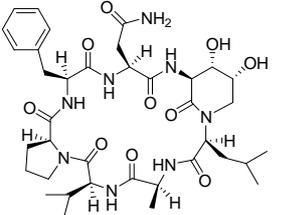
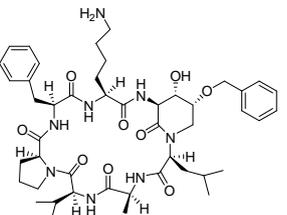
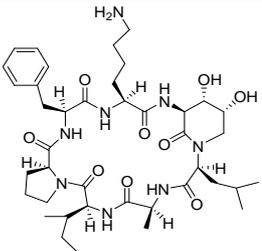
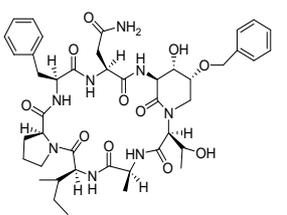
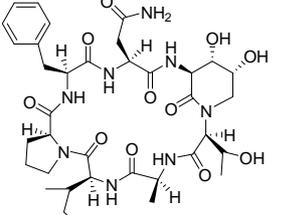
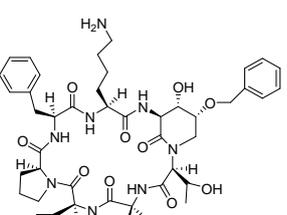
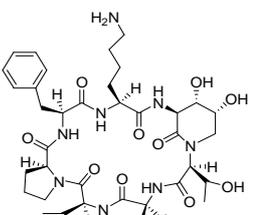
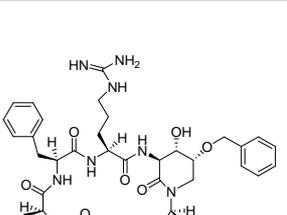
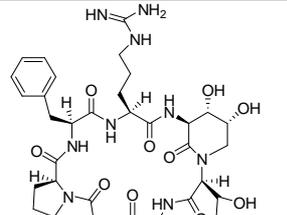
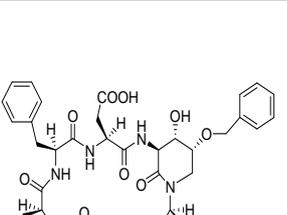
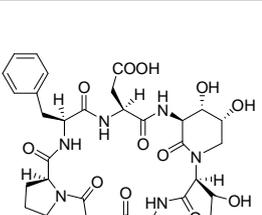
## Series 4, 5 y 6.

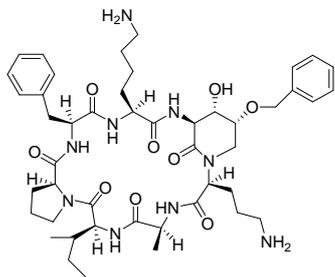
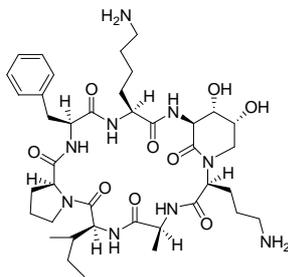
La desbencilación de los péptidos cíclicos que incluyen nuestras lactamas se lleva a cabo tras la síntesis y posterior purificación de los mismos mediante HPLC semipreparativo. Esta hidrogenólisis no fue posible llevarla a cabo a presión atmosférica (no se apreciaba ningún tipo de reactividad) y se tuvo que recurrir a la hidrogenación a presión. En la Figura 34 se muestran las condiciones en las que se realizó la desbencilación de las lactamas. No se consiguieron obtener los péptidos **P18** y **P24** degradándose el producto de partida (**P17** y **P23** respectivamente) en el medio de reacción. El péptido **P25** no se consiguió purificar completamente y se utilizó directamente como producto de partida para la obtención del **P26**. No obstante, **P25** se degradó en el medio de reacción y no se pudo obtener el citado **P26**.



PP	PR	R1	R2	t.	Presión	Conc.	Pd/C	Disolvente	%
<b>P15</b>	<b>P16</b>	Lys	Leu	7 días	4 bares	1,25 mg/mL	30 mg	MeOH	100
<b>P19</b>	<b>P20</b>	Lys	Thr	6 días	3.5 bares	0.93 mg/ mL	20 mg	MeOH	100
<b>P21</b>	<b>P22</b>	Arg	Thr	2 días	4 bares	1,075 mg/mL	20 mg	MeOH	100
<b>P17</b>	<b>P18</b>	Asn	Thr	2 días	4 bares	0.20 mg/mL	30 mg	MeOH	-
<b>P23</b>	<b>P24</b>	Asp	Thr	4 días	4 bares	0.33 mg/mL	30 mg	MeOH	-
<b>P25</b>	<b>P26</b>	Lys	Lys	7 días	4 bares	1,03 mg/mL	30 mg	MeOH	-
<b>P25</b>	<b>P26</b>	Lys	Lys	7 días	4 bares	0.36 mg/mL	15 mg	THF	-

**Figura 34.** Desprotección del alcohol secundario en C-5 de la lactama en hidrogenador a presión con catalizador de paladio en las series 4 a 6.

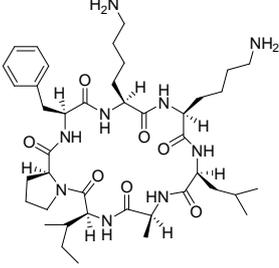
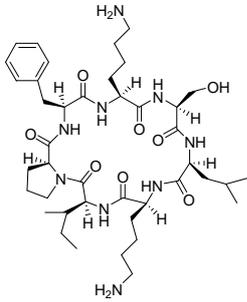
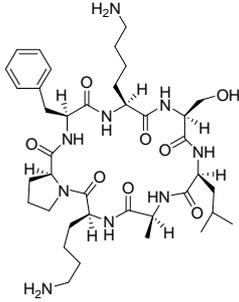
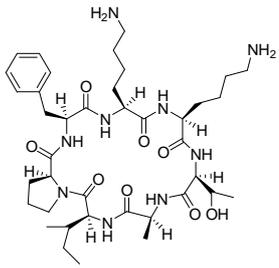
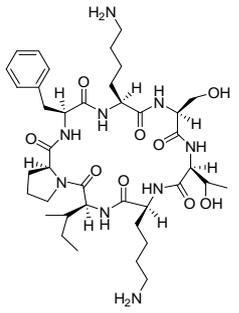
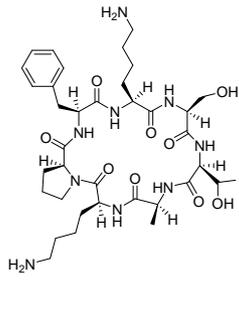
Serie 4			
 <p><b>P13.</b> <b>cN{SLOBn}AIPF</b></p> <p>Ya descrito<sup>1</sup></p>	 <p><b>P14.</b> <b>cN{SL}AIPF</b></p> <p>Ya descrito<sup>1</sup></p>	 <p><b>P15.</b> <b>cK{SLOBn}AIPF</b></p> <p>Rendimiento: 18 %</p>	 <p><b>P16.</b> <b>cK{SL}AIPF</b></p> <p>Rendimiento: Cuantitativo</p>
Serie 5			
 <p><b>P17.</b> <b>cN{STOBn}AIPF</b></p> <p>Rendimiento: 10 %</p>	 <p><b>P18.</b> <b>cN{ST}AIPF</b></p> <p>Degradado</p>	 <p><b>P19.</b> <b>cK{STOBn}AIPF</b></p> <p>Rendimiento: 21%</p>	 <p><b>P20. cK{ST}AIPF</b></p> <p>Cuantitativo</p>
 <p><b>P21.</b> <b>cR{STOBn}AIPF</b></p> <p>Rendimiento: 17 %</p>	 <p><b>P22.</b> <b>cR{ST}AIPF</b></p> <p>Cuantitativo</p>	 <p><b>P23.</b> <b>cD{STOBn}AIPF</b></p> <p>Rendimiento: 12 %</p>	 <p><b>P24.</b> <b>cD{ST}AIPF</b></p> <p>Degradado</p>

<b>Serie 6</b>	
 <p><b>P25. cK{SKOBn}AIPF</b></p> <p>No cuantificado ya que no se purifica completamente</p>	 <p><b>P26. cK{SK}AIPF</b></p> <p>Degradado</p>

**Figura 35.** Resumen de los ciclopéptidos sintetizados de las series 4 a 6 y sus rendimientos.

### *Series 7 y 8.*

Nuestras series de ciclopéptidos con dos aminoácidos básicos fueron sintetizadas y cicladas exitosamente, excepto por el hecho de que se apreció algún subproducto adicional por desprotecciones prematuras de los grupos protectores Boc sobre las lisinas. La purificación, en la mayoría de los casos, resultó aún más dificultosa que la de los péptidos de las series 1 a 3 pese a que se obtuvieron, en general, buenos rendimientos.

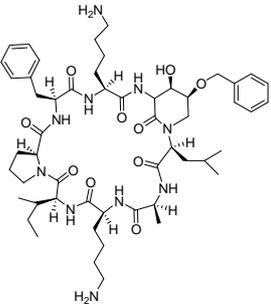
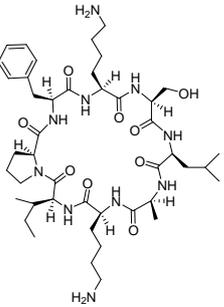
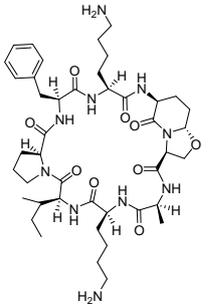
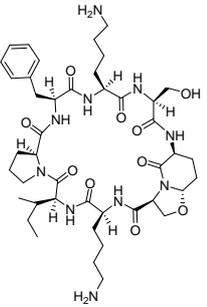
<b>Serie 7</b>		
 <p><b>P27. cKKLAIPF</b></p> <p>Rendimiento: 42%</p>	 <p><b>P28. cKSLKIPF</b></p> <p>Rendimiento: 21%</p>	 <p><b>P29. cKSLAKPF</b></p> <p>Rendimiento: 13%</p>
<b>Serie 8</b>		
 <p><b>P30. cKKTAIPF</b></p> <p>Rendimiento: 19%</p>	 <p><b>P31. KSTKIPF</b></p> <p>Rendimiento: 29%</p>	 <p><b>P32. cKSTAKPF</b></p> <p>Rendimiento: 13 %</p>

**Figura 36.** Resumen de los ciclopéptidos sintetizados de las series 7 y 8 y sus rendimientos.

### Serie 9

En la última serie, en la que se sintetizaban ciclopéptidos de 8 aminoácidos, cabe destacar la relativa facilidad en la que se purificaron los péptidos **P35** y **P36**,

concretamente, los que incluían el sintón {Oxa}. En general se obtuvieron muy buenos rendimientos.

<b>Serie 9</b>			
			
<b>P33.</b>	<b>P34.</b>	<b>P35.</b>	<b>P36.</b>
<b>cK{SLOBn}AKIPF</b>	<b>KSLAKIPF</b>	<b>cK{Oxa}AKIPF</b>	<b>cKS{Oxa}KIPF</b>
Rendimiento: 26 %	Rendimiento: 28 %	Rendimiento: 36 %	Rendimiento: 27 %

**Figura 37.** Resumen de los ciclopeptidos sintetizados de la serie 9 y sus rendimientos.

En la sección experimental se detallan todos péptidos que se obtuvieron, sus rendimientos y sus perezas, así como su caracterización por análisis de aminoácidos, HPLC y MALDI-TOF.

### 3.4. RECAPITULACIÓN

Aunque la purificación de todos nuestros ciclopeptidos y la eliminación del grupo bencilo en C-5 en los péptidos que incluían nuestras lactamas presentaron dificultades importantes, se consiguió sintetizar la mayor parte de los péptidos que nos habíamos propuesto al diseñar nuestra biblioteca. Los rendimientos fueron modestos (entre un 10 % y un 30 % en la mayoría de los casos) debido sobretudo al hecho de añadir fases sintéticas adicionales a la síntesis peptídica habitual como la ciclación, o la hidrogenación catalítica a presión. Esta última etapa sólo resultó exitosa en tres de

nuestros péptidos, provocando la degradación del producto de partida en el resto de casos.

De los 36 péptidos propuestos se consiguieron sintetizar con éxito, con purezas aceptables (más del 90 %) y rendimientos moderados (en la mayoría de casos entre un 10% y un 30 %), un total de 30 ciclopéptidos. Los péptidos **P13** y **P14** ya se habían descrito previamente en nuestro grupo y no se volvieron a sintetizar. Con los 30 péptidos obtenidos, y después de su correspondiente caracterización, se realizaron estudios de dicroísmo circular (DC) y ensayos de actividad biológica, tanto sobre modelos de membrana procariota (liposomas) como para evaluar su potencial actividad como antibióticos y antitumorales.

### 3.5. ANEXO. INTRODUCCIÓN A LA SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA

Uno de los mayores problemas que plantea la síntesis en disolución de péptidos complejos es la necesidad de aislar y purificar el péptido en formación después de cada una de las etapas, antes de incorporar un nuevo residuo de aminoácido a la cadena. La mezcla de reacción contendrá reactivos de condensación, restos de grupos protectores y otros productos secundarios. Las etapas de purificación suponen la pérdida de cierta cantidad de producto, causando una disminución del rendimiento total del proceso, y esto puede resultar desastroso en el esquema sintético de un péptido con más de 20 aminoácidos.<sup>117</sup>

En 1963 R.B.Merrifield descubrió una técnica de gran importancia como método de síntesis de muchos péptidos: se trata de la llamada “síntesis en fase sólida” o “síntesis sobre soporte sólido”.<sup>118</sup> Esta idea tan revolucionaria, que se extendió a otros campos de la química, le llevó a ganar el premio nobel en el año 1984. Las reacciones que se utilizan en esta técnica son las mismas que en una síntesis en disolución, pero una de las especies reaccionantes se encuentra anclada a un polímero sólido.

---

<sup>117</sup> Weininger, S.J.; Stermitz, F.R.; *Química Orgánica*, Ed. Reverté, S.A. España, **1988**.

<sup>118</sup> Merrifield, R.B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154.

La principal ventaja de esta síntesis sobre polímeros (con todas las cadenas unidas a él) es que éste se separa fácilmente del resto de reactivos, debido a su insolubilidad en los disolventes usados. Los reactivos en exceso, subproductos de reacción y los propios disolventes son fácilmente separados del polímero mediante simple filtración. Todo esto permite una automatización del proceso, incluso añadiendo hasta 5 aminoácidos en un día a una cadena peptídica. Desde hace años se encuentran disponibles unos sintetizadores comerciales automatizados que facilitan mucho la producción de cadenas peptídicas.

Actualmente, la utilización de esta técnica de síntesis en fase sólida no se limita solamente a los péptidos. Aunque fue diseñada para formar cadenas peptídicas, hoy en día se utiliza también para sintetizar cadenas de polisacáridos y polinucleótidos. En este último caso, este método de síntesis ha llegado a sustituir totalmente el método clásico en disolución. Además, la síntesis en fase sólida tiene una alta utilización en síntesis orgánica de moléculas de bajo peso molecular, constituyendo la técnica de elección en síntesis paralela y combinatoria.

La síntesis en fase sólida, sobretodo cuando se usa para realizar síntesis en paralelo,<sup>119</sup> presenta muchas ventajas:<sup>120</sup>

- Facilidad de purificación por filtración. Esto permite evitar métodos de purificación como las columnas cromatográficas.
- Permite trabajar con grandes excesos de reactivos, hecho que mejora en muchos casos los rendimientos de las reacciones a la vez que se disminuyen los tiempos de reacción (síntesis más rápidas y eficaces).
- Permite una gran automatización del proceso con el uso, cada vez más extendido, de aparatos específicos para este tipo de química. Una vez optimizado el proceso, esta automatización permite realizar numerosas síntesis en paralelo.

---

<sup>119</sup> Obrecht, D.; Villalgordo, J.M. *Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries*, Pergamon: Oxford, **1998**.

<sup>120</sup> Brown, A.R.; Hermkens, P.H.H.; Ottenheijm, H.C.J.; Rees, D.C. *Synlett*. **1998**, 817-827.

- Existen soportes sólidos con gran variedad de funcionalizaciones. Se considera que actualmente se puede llevar a cabo cualquier transformación mediante este tipo de síntesis.

Por el contrario, existen también varios inconvenientes:

- La optimización previa de las reacciones es requisito indispensable para su uso en fase sólida, ya que existe un gran número de reacciones secundarias durante los pasos de activación, acoplamiento y desprotección
- Existen limitaciones analíticas para el seguimiento de la secuencia sintética.
- La solvatación de la resina polimérica y la difusión de los reactivos son dos parámetros importantes para el éxito de la síntesis peptídica en fase sólida, hecho que limita los disolventes adecuados para la SPPS.
- Si las reacciones de acoplamiento no tienen lugar de forma cuantitativa, el péptido resultante puede estar impurificado con otros péptidos de menor número de residuos.
- Son necesarias dos reacciones adicionales respecto a la síntesis en disolución: la unión a la resina y la escisión de esta al final de la síntesis.
- En general como máximo se obtienen 100 mg de producto final, pudiéndose llegar hasta los 500 mg en algún caso.
- Los procesos acostumbran a ser caros debido a los elevados precios de las resinas y a los excesos de reactivos que se utilizan.

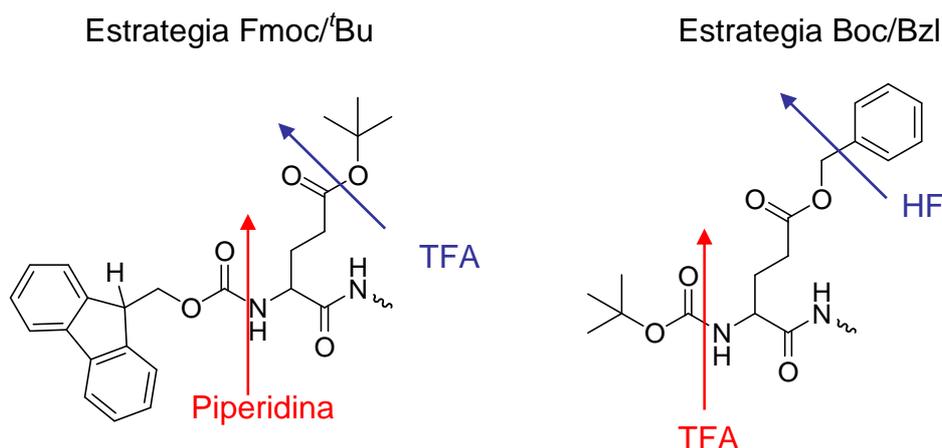
Como ya se ha explicado la síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) está basada en la adición secuencial de aminoácidos con la cadena lateral protegida o desprotegida a un soporte polimérico.(Ver Figura 28, capítulo 3.3).

Tal como se observa en la Figura 28, se realiza en primer lugar el anclaje del primer aminoácido al soporte polimérico. Posteriormente se realiza la desprotección del grupo  $\alpha$ -amino seguida de la adición de un segundo aminoácido  $N^\alpha$ -protegido mediante un agente acoplante o a través de un aminoácido pre-activado. Este proceso de desprotección/acoplamiento se realiza tantas veces como sean necesarias hasta obtener el péptido deseado. El péptido resultante se encuentra unido a la resina por su extremo C- terminal a través de un “linker”. Dependiendo de la naturaleza de este “linker” el péptido resultante será un carboxiácido o una carboxiamida. Aunque la desprotección de la cadena lateral suele ser simultánea a la escisión del péptido de la resina en algunos casos, como en la síntesis de péptidos cíclicos, puede ser conveniente mantener las cadenas laterales de estos péptidos protegidas en esta etapa. Existen diferentes resinas en el mercado que permiten evitar esta desprotección de las cadenas laterales. Finalmente por filtración se separan el péptido disuelto del polímero insoluble.

### **Estrategias en la SPPS**

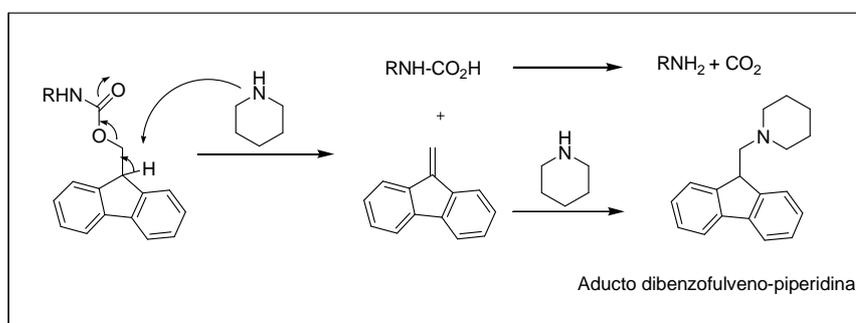
Existen dos estrategias principales en la SPPS, en función del grupo protector sobre el grupo  $N^\alpha$ -amino (Figura 38)

- Boc/Bzl: en esta estrategia los aminoácidos tienen el grupo  $\alpha$ -amino protegido como Boc y los grupos funcionales de las cadenas laterales generalmente se encuentran protegidos como Bzl. La desprotección del grupo Boc tiene lugar con TFA y la escisión final de la peptidil resina se lleva a cabo con un ácido fuerte como es HF o TFMSA.
- Fmoc/<sup>t</sup>Bu: en este caso los aminoácidos tienen el grupo  $\alpha$ -amino protegido como Fmoc. Actualmente, esta estrategia es la más utilizada dentro del campo de la química peptídica en fase sólida. La desprotección del grupo protector Fmoc en condiciones básicas suaves posibilita el uso de grupos protectores lábiles en medio ácido para las cadenas laterales, como es el caso del grupo *tert*-butil. Es por eso que esta estrategia recibe con frecuencia el nombre de Fmoc/<sup>t</sup>Bu.



**Figura 38.** Estrategias de protección/ desprotección en fase sólida

La reacción de desprotección del Fmoc tiene lugar a través de un mecanismo de eliminación E1cB, que se inicia mediante la extracción de un protón para dar lugar a un anión estabilizado de dibenzociclopentadienilo (Esquema 31). El dibenzofulveno formado reacciona con la piperidina para formar un aducto estable como producto secundario de la reacción de desprotección.



**Esquema 31.** Mecanismo de desprotección del grupo Fmoc.

En la estrategia Fmoc/*t*Bu, el desanclaje final de la resina tiene lugar normalmente por acidólisis mediante un tratamiento con TFA, que en la mayoría de los casos sirve para desproteger simultáneamente los grupos protectores de las cadenas laterales.

## Mecanismos de epimerización

El riesgo de epimerización es una de las principales adversidades que aparecen cuando se trabaja con grupos funcionales directamente unidos a centros estereogénicos, ya que se produce una pérdida parcial o total de la estereoquímica. La actividad biológica de los péptidos y las proteínas depende en gran medida de la configuración de los centros quirales de los aminoácidos, por lo tanto es necesario minimizar este riesgo de epimerización durante la síntesis peptídica.

Una vez la función ácida se activa se observan dos mecanismos diferentes de epimerización: la enolización directa y la formación de la correspondiente 5(4H)-oxazolona

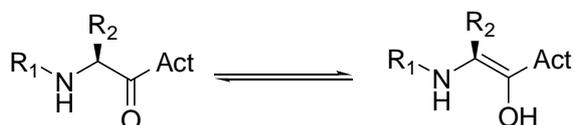
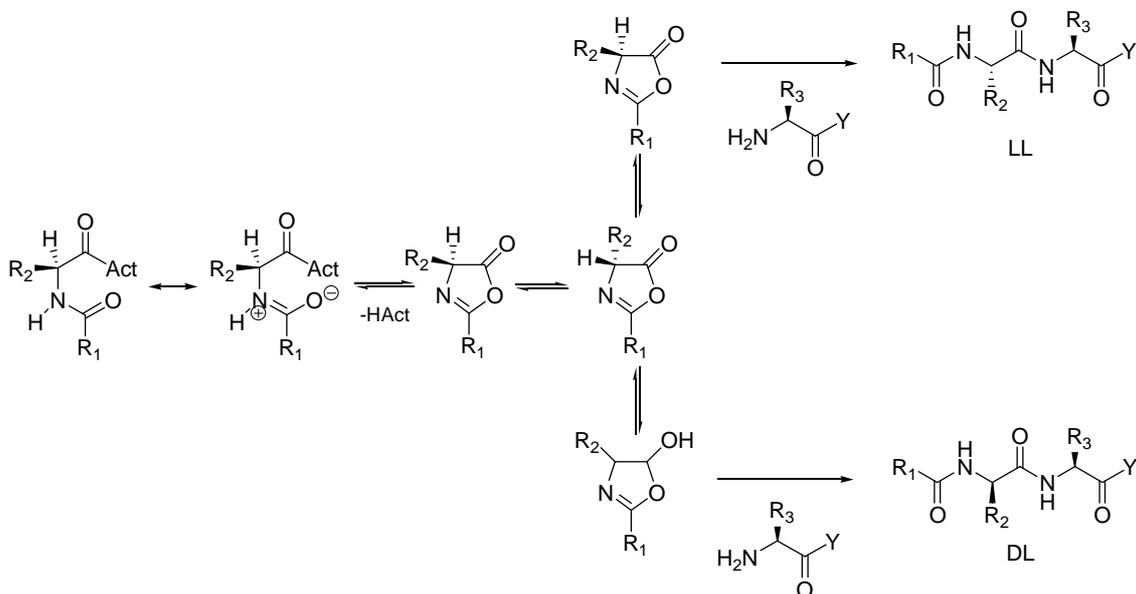


Figura 39. Enolización



Esquema 32. Principales mecanismos de epimerización en la síntesis peptídica en fase sólida

El objetivo principal para una reacción de acoplamiento consiste en la combinación de un buen rendimiento y la ausencia de epimerización. Este objetivo es en ocasiones difícil de conseguir, ya que los métodos que proporcionan mejores rendimientos requieren la conversión de la función ácida en un buen grupo activante. Estos grupos tienen a aumentar la acidez del protón en  $\alpha$ , lo cual favorece la enolización

y la formación de la 5(4H)- oxazolona correspondiente. Además, la presencia de una base (como la DIEA) en algunas condiciones de acoplamiento también contribuye a la epimerización, ya que favorece la extracción del protón en  $\alpha$ .

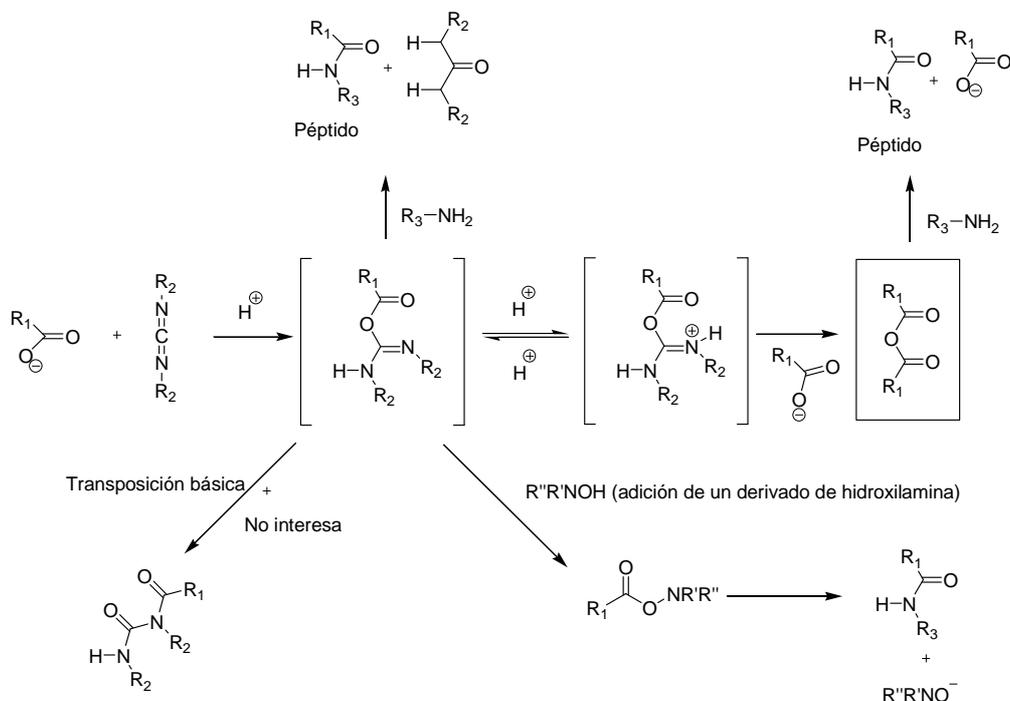
Es por tanto imprescindible encontrar un buen equilibrio entre un buen grupo saliente y una base adecuada para favorecer un buen rendimiento de acoplamiento y un nivel de epimerización aceptable, que sea lo más bajo posible.

### Formación del enlace peptídico

Tal como ya se ya mencionado, la formación del enlace amida representa una de las reacciones esenciales en la síntesis peptídica. En este trabajo se utilizan dos tipos de agentes acoplantes: las carbodiimidas y las sales de fosfonio.

#### Carbodiimidas

El mecanismo de activación mediante carbodiimidas es complejo y fuertemente dependiente del disolvente y aún no está completamente clarificado (Esquema 33).



**Esquema 33.** Mecanismo de formación del enlace peptídico mediante el uso de carbodiimidas.

El primer paso consiste en la adición del ácido carboxílico para formar la *O*-acilurea. Este intermedio es muy reactivo y puede reaccionar con el componente amino para obtenerse la correspondiente amida. Alternativamente esta *O*-acilurea puede sufrir una transposición para rendir la *N*-acilurea, la cual no es reactiva, o bien atacar al intermedio otro ácido carboxílico para obtenerse el anhídrido simétrico, el cual es un excelente agente acilante.

Se ha de tener en cuenta que si el ácido carboxílico es una *N*-carboxiamida (acetil, benzoílo o una cadena peptídica) o un carbamato de  $\alpha$ -aminoácido (Boc, Fmoc), la *O*-acilurea puede sufrir una ciclación intermolecular para resultar una 5(4*H*)-oxazolona, como se ha explicado anteriormente. Estas 5(4*H*)oxazolonas también son agentes acilantes, pero no tan potentes como la *O*-acilurea ni el anhídrido simétrico y además la tautomerización hacia la forma enólica provoca racemización.

Alternativamente, la *O*-acilurea puede ser atrapada por medio de nucleófilo presente en el medio, normalmente un derivado de hidroxilamina, para dar el correspondiente éster activo, que normalmente es una especie menos reactiva pero más estable. Es por esto que se añade normalmente HOBt o HOAt. La principal ventaja de estos aditivos consiste en aumentar la concentración de la especie activa, reducir la racemización e inhibir la deshidratación de las carboxiamidas de las cadenas laterales de Asn y Gln Para formar los correspondientes nitrilos.

### **Agentes acoplantes tipo sales de fosfonio (PyBOP y similares)**

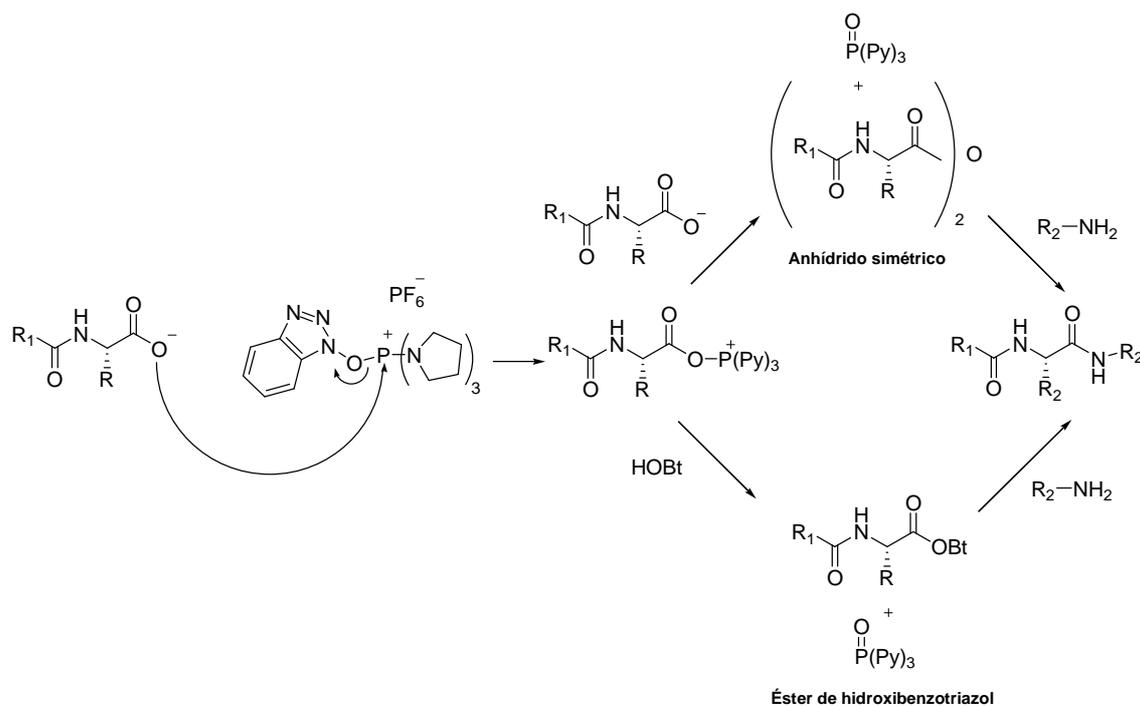
Existen una serie de acoplantes que permiten la generación *in situ* de ésteres activos. Estos han adquirido una gran importancia en la química péptida actual. Castro y colaboradores<sup>121</sup> desarrollaron en 1975 el BOP (Benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio hexafluorofosfato), un reactivo de fosfonio muy eficiente en síntesis peptídica en fase sólida, pero que presentaba una importante desventaja: la elevada toxicidad del HMPA formado durante la reacción. Este reactivo fue sustituido por un derivado llamado PyBOP<sup>122</sup>, en el cual los grupos amino son sustituidos por

---

<sup>121</sup> Castro, B.; Dormoy, J.R.; Evin, G.; Selve, C.; *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *16*, 1219-1222.

<sup>122</sup> Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B.; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 205-208.

pirrolidinas, con lo que los subproductos de reacción no presentan toxicidad. En el Esquema 34 se muestra el mecanismo de reacción de este agente acoplante.



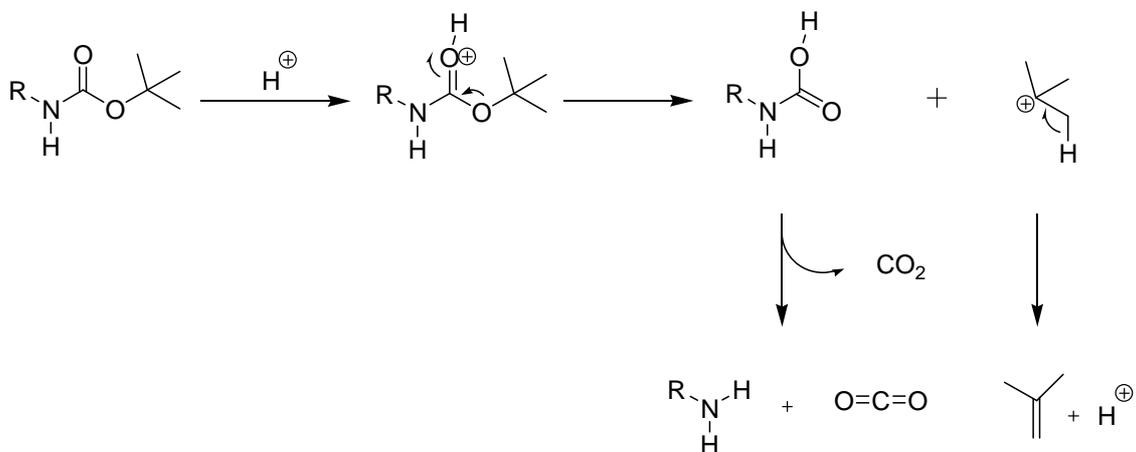
Esquema 34. Mecanismo de acción con el agente de acoplamiento PyBOP.

La adición de una base (normalmente DIEA) es necesaria para la formación del carboxilato del aminoácido, el cual lleva a cabo un ataque nucleofílico a la sal de acilfosfonio, especie altamente reactiva. En la ausencia de nucleófilo, la especie activa es la sal de aciloxifosfonio que reacciona inmediatamente con los iones carboxilato presentes en el medio para dar el anhídrido simétrico. En cambio, en presencia de un nucleófilo (como el HOBt), la especie activa es el éster de hidroxibenzotriazol.

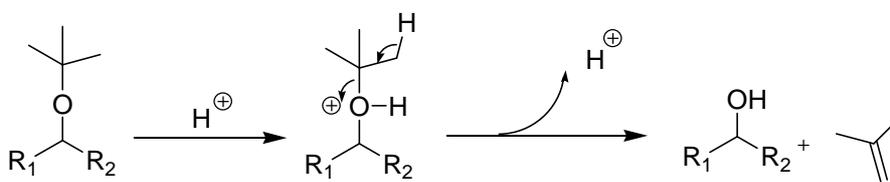
### Mecanismo de desprotección de las cadenas laterales.

Existen multitud de procedimientos de desprotección descritos para péptidos. El mecanismo de desprotección de las cadenas laterales de los péptidos descritos en este trabajo normalmente consistía en el tratamiento del compuesto protegido con un ácido

fuerte orgánico (TFA). Como ejemplos, en el Esquema 35 se detalla el mecanismo de desprotección del grupo Boc y en el Esquema 36 el del grupo protector <sup>t</sup>Bu:



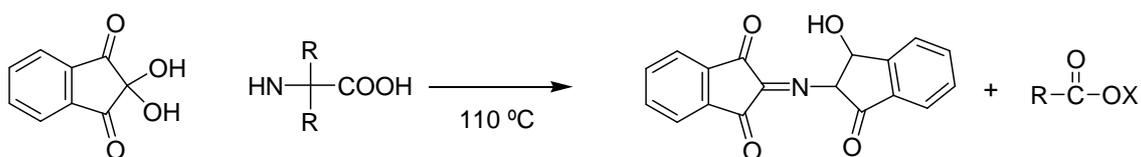
Esquema 35. Mecanismo de desprotección del grupo protector Boc



Esquema 36. Mecanismo de desprotección del grupo protector *tert*-butilo

### Ensayo de ninhidrina (Test de Kaiser)<sup>123</sup>

Este ensayo permite detectar de forma cualitativa la presencia de grupos amino primarios en una resina, sirviendo como control de reacción durante una síntesis peptídica. La reacción que tiene lugar se muestra a continuación:



<sup>123</sup> Kaiser, E.; Colecott, R.L.; Bossiger, C.D.; Cook, P.I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.

**Figura 40.** Esquema de la reacción que se produce durante el test de kaiser o de la ninhidrina.

Para realizar este ensayo se utilizan dos reactivos diferentes:

Reactivo A: Se prepara una disolución en caliente (40 °C aprox.) de 40 g de fenol en 10 mL de etanol absoluto. Paralelamente, se prepara una disolución de 65 mg de KCN en 100 mL de H<sub>2</sub>O y 2 mL de esta disolución se disuelven en 100 mL de piridina acabada de destilar. Ambas disoluciones se agitan por separado con 4 g de resina Amberlite MB-3 durante 45 minutos. A continuación se filtran y se mezclan los filtrados.

Reactivo B: Se prepara una disolución de 2,5 g de ninhidrina en 50 mL de etanol absoluto.

Finalizado cada ciclo de acoplamiento, se toma una pequeña cantidad de resina (0,5 mg aproximadamente) lavada y secada, y se introduce en un tubo de hemólisis al que se le añaden 3 gotas del reactivo A y 2 gotas del reactivo B. Como blanco se utiliza un segundo tubo con igual cantidad de los dos reactivos. A continuación se colocan los tubos en la placa calefactora a 110 °C durante 3 minutos, pasados los cuales se deja enfriar y se observa la coloración. Una tonalidad violeta-azulada indica que existen grupos amino libres (ensayo positivo), lo cual es indicativo de un acoplamiento incompleto. Si no existe cambio de color respecto al blanco el test se considera negativo, siendo el rendimiento del acoplamiento superior al 99,5 %.

### **Ensayo de cloranilo.**

Este ensayo cualitativo permite la detección de aminas secundarias libres (en nuestro caso prolina) en una resina. Esto sirve de control de acoplamiento, indicando si este se ha completado o no. Para ello se toma 1 mg de resina (aprox.) y se le adiciona acetona y la solución de cloranilo en proporción 3:1 (15 y 5 respectivamente). La muestra se observa tras 5 minutos. Una coloración azul-verdosa de la resina indica un ensayo positivo, es decir, la existencia de aminas secundarias libres y una coloración amarilla indica la ausencia de aminas secundarias. Igual que en el ensayo de ninhidrina, resulta útil la realización de un ensayo en blanco paralelo.

**CAPÍTULO 4**  
**Estudios estructurales y de actividad biológica**

---

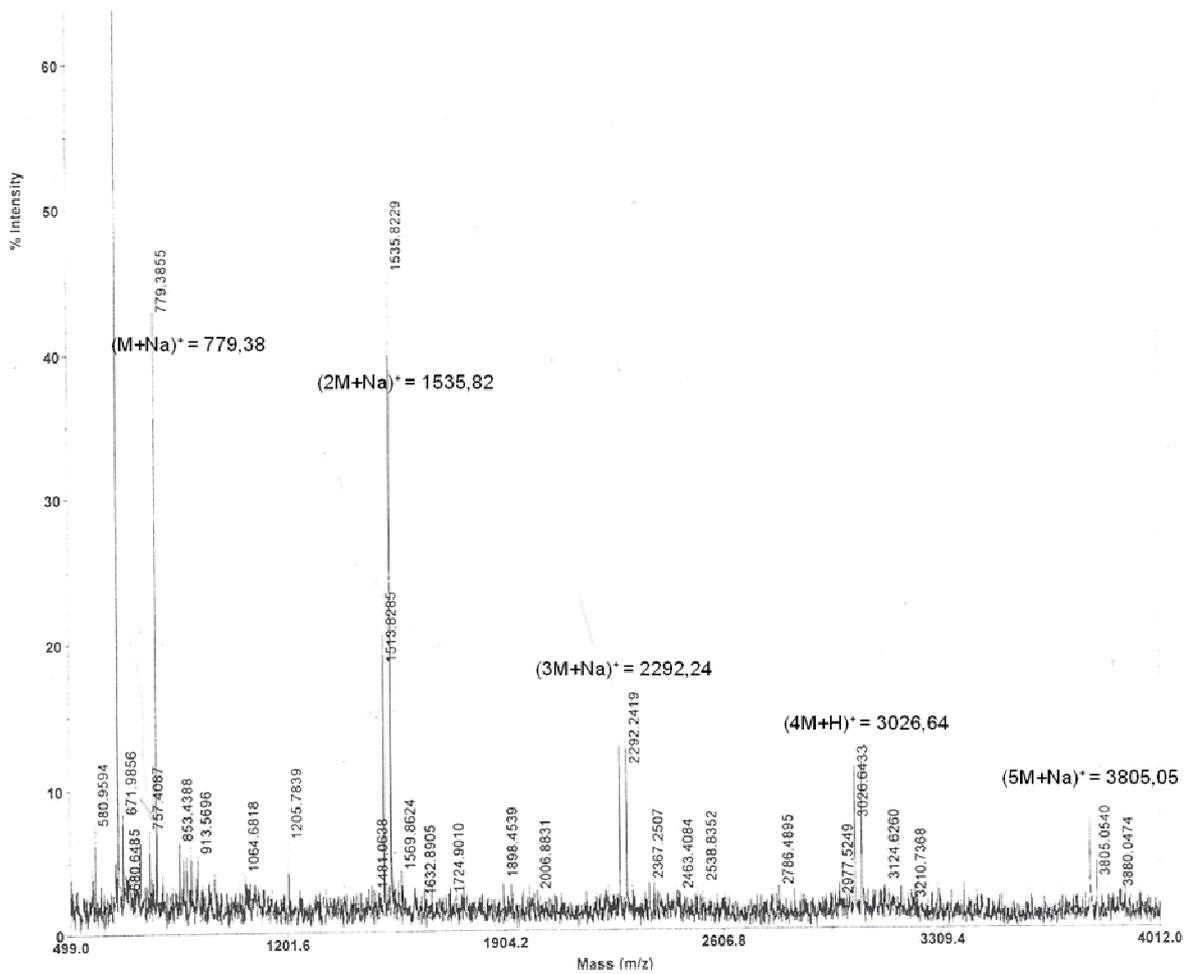


Una vez obtenidos los péptidos se llevaron a cabo estudios estructurales combinando experimentos de dicroísmo circular y cálculos teóricos de modelización molecular. En el caso del dicroísmo circular se pretende que al variar diferentes parámetros físicos como la concentración o la temperatura se observen cambios en la elipticidad que puedan indicar algún cambio conformacional en la estructura del péptido (como la formación de agregados). El objetivo de los experimentos de modelización molecular consiste en determinar el nivel de flexibilidad de los péptidos y buscar alguna posible conformación teórica compatible con la hipótesis de la agregación.

Por otro lado se ha puesto a punto un método para determinar si estos péptidos pueden actuar sobre biomembranas, utilizando para ello liposomas. Por último se ha evaluado la posible actividad como antibióticos o antitumorales de nuestros péptidos.

#### **4.1. OBSERVACIONES PRELIMINARES**

Durante la síntesis de péptidos y, teniendo en cuenta la hipótesis formulada por Gantz,<sup>56</sup> se realizaron varias observaciones experimentales que parecían indicar la posible presencia de algún tipo de agregado molecular en alguno de los péptidos. En primer lugar durante la purificación del péptido **P2**. cKSLAIPF (serie 1) se observó la aparición de señales en MALDI que correspondían a valores múltiplo de la masa de nuestro péptido, como si mostrara algún tipo de agregación molecular. La falta de pérdida de una molécula de agua por cada monómero adicional en la señal indicaba que no se trataba de una polimerización.



**Figura 41.** Posibles agregados del péptido 2. Se observan hasta 5 residuos de nuestro péptido agregados.

Posteriormente este fenómeno se observó en los nuevos péptidos sintetizados en varias ocasiones, aunque solo se consiguieron encontrar posibles agregados de dos unidades:

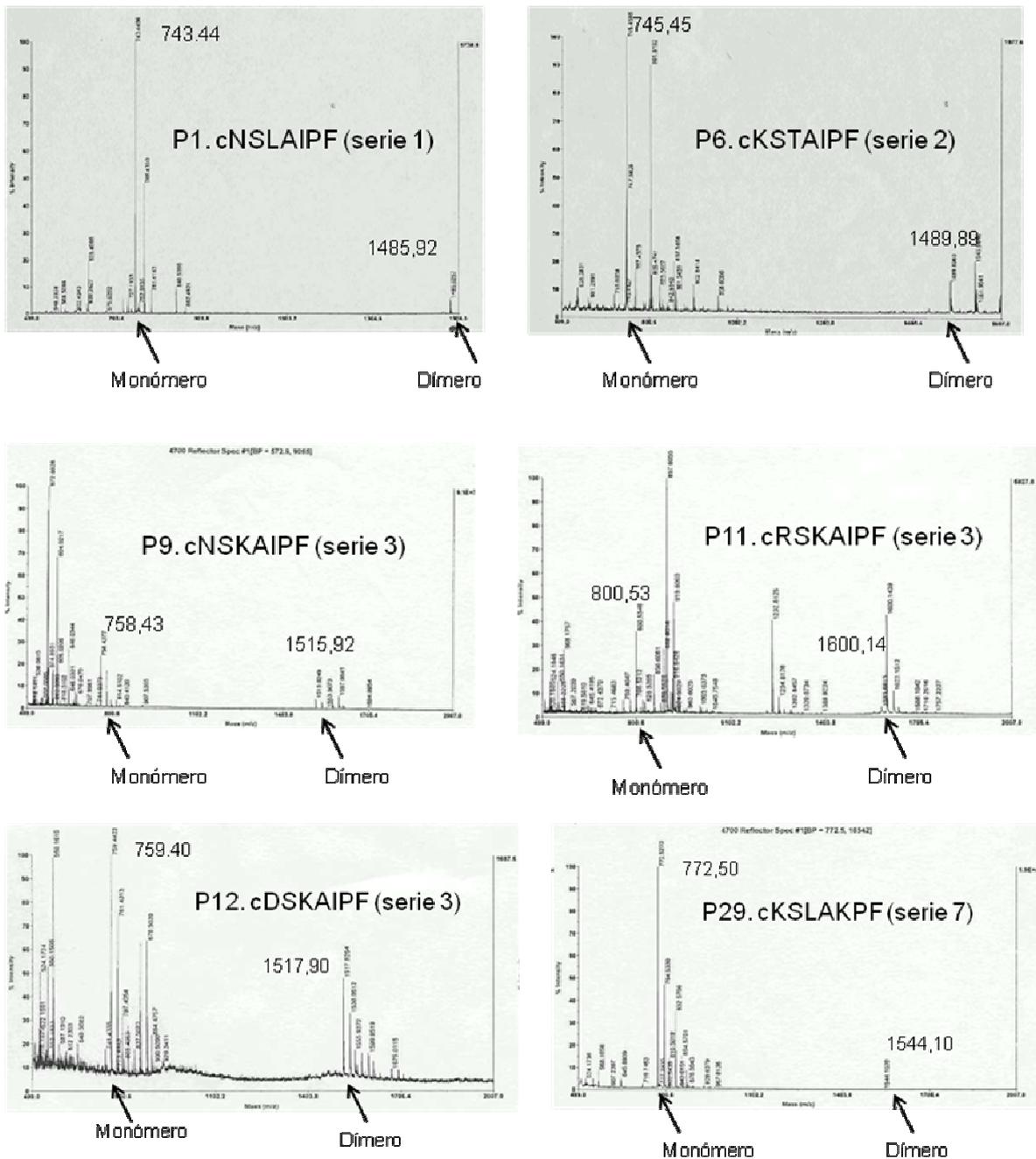
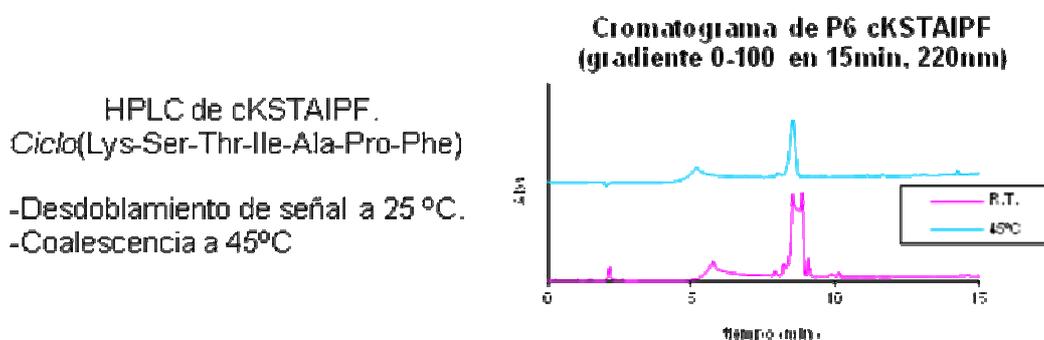


Figura 42. Péptidos en los que se observan posibles agregados

La técnica del MALDI-TOF, a diferencia de otras técnicas de masas es muy poco agresiva con las muestras. Se trata de una técnica no fragmentativa, por lo que permite ver, en algunos casos aislados, indicios de agregación supramolecular. En la Figura 42 se muestran los péptidos en los que se observó una posible formación de dímeros, pues se observa la masa del péptido ( $M+H^+$ ) y la del posible agregado ( $2M+H^+$ )

Un segundo indicio que nos llevó a pensar en la posible formación de agregados fueron los cromatogramas de HPLC de algunos de nuestros péptidos. En ellos se observan picos dobles correspondientes a péptidos ya purificados. Realizando el análisis de cada uno de los picos mediante HPLC-MS se observa que tienen la misma masa. Estos dos señales, al calentar el cromatógrafo a 40 °C, coalescen formando un solo pico lo que parece indicar que ambos picos corresponden al mismo péptido y no a estructuras epiméricas. Esto parece indicar que el péptido mantiene un equilibrio de algún tipo a baja temperatura, pudiéndose hipotetizar con la posibilidad de que fuese algún tipo de dímero.



## 4.2. ESTUDIOS ESTRUCTURALES

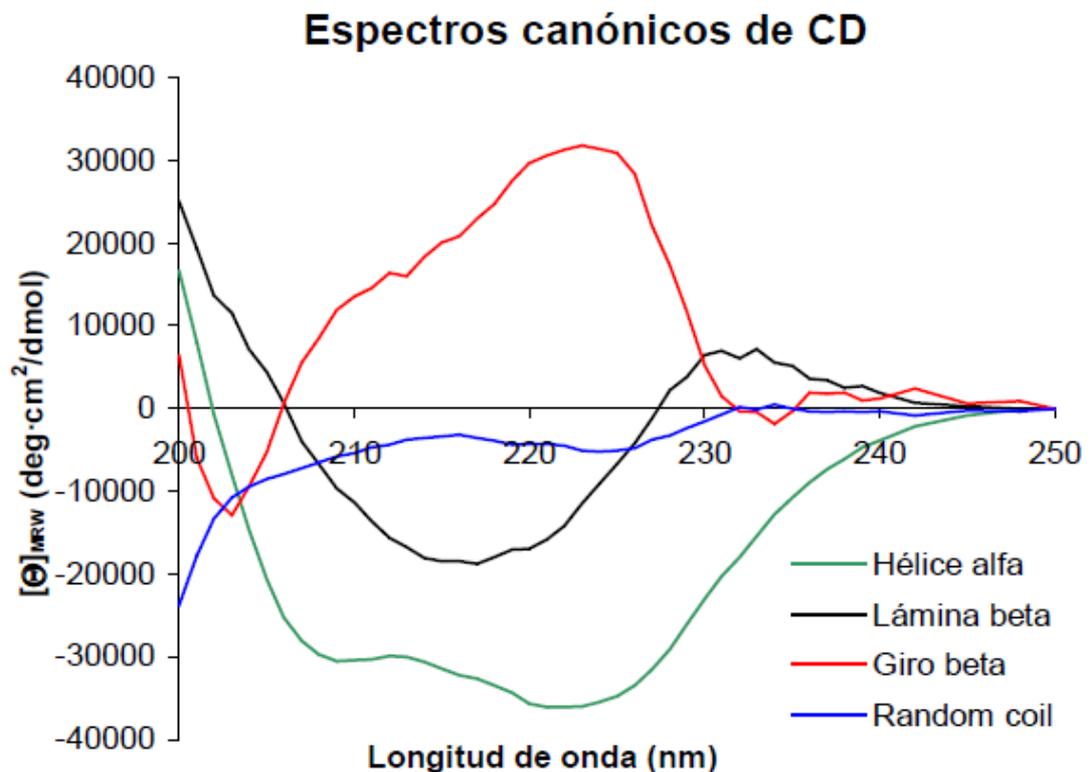
### 4.2.1. Estudios de dicroísmo circular

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica que permite estimar el contenido de las diferentes estructuras secundarias canónicas (hélice  $\alpha$ , lámina  $\beta$ , “random coil”, etc.) que presentan en solución péptidos y proteínas, debido a presentar espectros de DC muy característicos en la zona del UV lejano (178-250 nm).<sup>124</sup>

El fenómeno del dicroísmo circular se observa a aquellas longitudes de onda a las que absorbe la molécula estudiada y se debe a las diferencias de comportamiento que presentan los componentes de la luz linealmente polarizada en un medio anisótropo. El enlace peptídico, cuyos parámetros determinan la estructura secundaria que adopta el esqueleto peptídico, presenta un máximo de absorción a 210 nm, por lo que es alrededor

<sup>124</sup> Kakanishi, K.; Berova, N.; Woody, R. *Circular Dichroism: principles and applications*, Ed. VCH Publishers, Inc., New York, **1994**.

de esta zona del espectro donde se produce el efecto de dicroísmo circular. En general, la estimación se realiza a partir de la deconvolución del espectro de la proteína problema como suma de varios espectros canónicos, usándose en este proceso diferentes programas<sup>125</sup>. Estos programas, a partir de los espectros de DC de las estructuras canónicas o bien de una serie de proteínas, permiten calcular la contribución específica de las estructuras básicas en la proteína incógnita (el espectro observado es la suma de las diferentes estructuras básicas multiplicadas por una constante). Así la mayoría de programas trabajan utilizando una serie de proteínas de estructura conocida para estimar el contenido de estructura secundaria en otra proteína problema. Este es el caso de programas como el CDsstr<sup>126</sup>, CCA<sup>127</sup>, o SELCON<sup>128</sup>. El programa LINCOMB<sup>127</sup>, en cambio, utiliza estructuras predeterminadas similares a las mostradas en la Figura 43 para realizar sus cálculos.



**Figura 43.** Espectros canónicos de dicroísmo circular de cuatro conformaciones básicas.<sup>129</sup>

<sup>125</sup> Greenfield, N.J. *Anal. Biochem.* **1996**, 235, 1-10

<sup>126</sup> Johnson, W.C. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1999**, 35, 307-312.

<sup>127</sup> Perczel, A.; Park, K.; Fasman, G.D. *Anal. Biochem.* **1992**, 203, 83-93.

<sup>128</sup> Sreerama, N.; Woody, R. W. *Anal. Biochem.* **1993**, 209, 32-44.

<sup>129</sup> Yang, J.T.; Wu, C.C.; Martínez, H.M.; *Methods Enzymol.* **1986**, 130, 208-269.

Estos sistemas de cálculo implican que, para obtener resultados satisfactorios, necesitamos que la estructura de nuestra proteína esté representada adecuadamente en las estructuras de referencia que utiliza el programa de deconvolución. Si la proteína problema presenta algún motivo estructural no considerado en el programa, la contribución de éste al espectro de dicroísmo no se interpretará correctamente.

Los programas de deconvolución de DC están pensados generalmente para proteínas plegadas relativamente grandes, no teniendo sentido para una estructura al azar (“random coil”) que es muy típica en péptidos pequeños. Pese a eso, el programa más adecuado para péptidos pequeños es el CCA (Convex Constraint Analysis), desarrollado, como hemos explicado anteriormente, por Perczel y colaboradores.<sup>127</sup> Pese a todo, este programa presenta ciertas necesidades a cubrir para poder usarse correctamente, como el hecho específico de que sea necesario introducir externamente el número de conformeros puros presentes en la mezcla.

Es importante recalcar que el estudio de péptidos con aminoácidos no naturales puede introducir posibles alteraciones importantes en el espectro de dicroísmo, por lo que pueden complicar en gran medida su interpretación.

En los últimos años, la técnica del dicroísmo circular se ha utilizado en multitud de estudios relacionados con diversos aspectos del comportamiento químico de proteínas y ácidos nucleicos.<sup>130</sup> Algunos de las aplicaciones más relevantes fueron:

- Las interacciones proteína-ligando.
- Termodinámica del plegamiento de proteínas.
- Intermedios de plegamiento protéico.
- Cinética del plegamiento protéico.
- Transiciones conformacionales y agregación protéica.

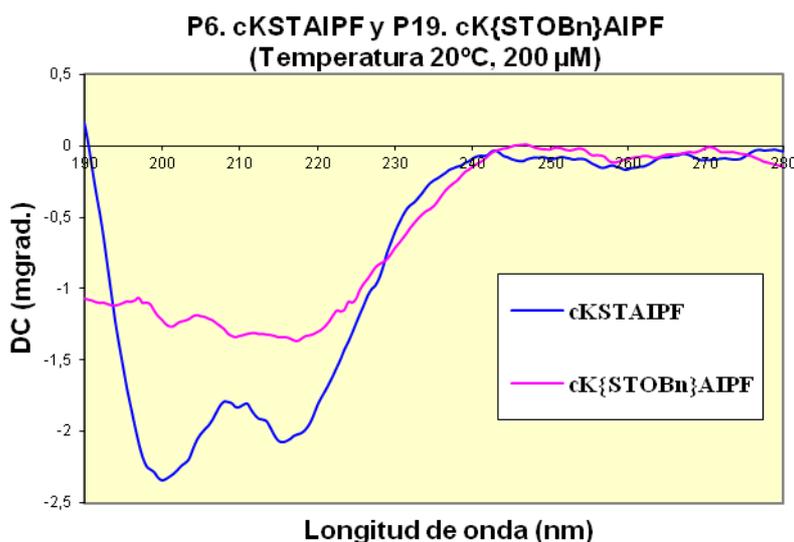
Pensamos que este último tipo de aplicación de la técnica del DC nos podía ser útil en el estudio del comportamiento de nuestros ciclopéptidos. Como se ha comentado anteriormente, utilizando la técnica de dicroísmo circular se han establecido unos

---

<sup>130</sup> Greenfield, N.J.; *trends in analytical chemistry*, vol.18, 4, **1999**.

patrones conformacionales de estructuras como hélice  $\alpha$  o hoja  $\beta$ , las cuales no pueden presentar nuestros péptidos, debido a su pequeño tamaño. Pese a ello esta técnica nos puede permitir obtener un patrón conformacional de cada ciclopéptido que permita, al variar distintos parámetros, observar cambios en la estructura conformacional e incluso agregados y posible formación de precipitados.

Para poner a punto este método se seleccionaron dos péptidos: el ciclopéptido **P6**. cKSTAI $\beta$ PF y el ciclopéptido lactámico **P19**. cK{STOBn}AIPF. En primer lugar se observó la elipticidad de la señal de estos compuestos a temperatura de 20 °C y a una concentración de referencia de 200  $\mu$ M. Los péptidos mostraron un patrón conformacional diferente uno del otro. Así, el péptido **P6** mostraba un mínimo a 200 nm y otro a 220 nm, mientras que el ciclopéptido lactámico **P19** muestra una señal más ancha y poco definida.



**Figura 44.** Patrones conformacionales de **P6** y **P19** a temperatura y concentración constante.

Una vez obtenidos estos patrones de referencia se realizó una variación de ciertos parámetros con objeto de determinar hasta que punto afectaban a la estructura molecular de nuestros compuestos.

#### *Variación de la temperatura*

En primer lugar se decidió realizar experimentos con variación de temperatura. Se pudo observar que, a igual concentración, la variación de temperatura no hacía variar el patrón conformacional de nuestros compuestos en el rango de valores explorado (de 4 °C a 45 °C), ni en el péptido **P6**. cKSTAI PF ni en el ciclopéptido lactámico bencilado **P19**. cK{STOBn}AIPF (Figura 45 y Figura 46).

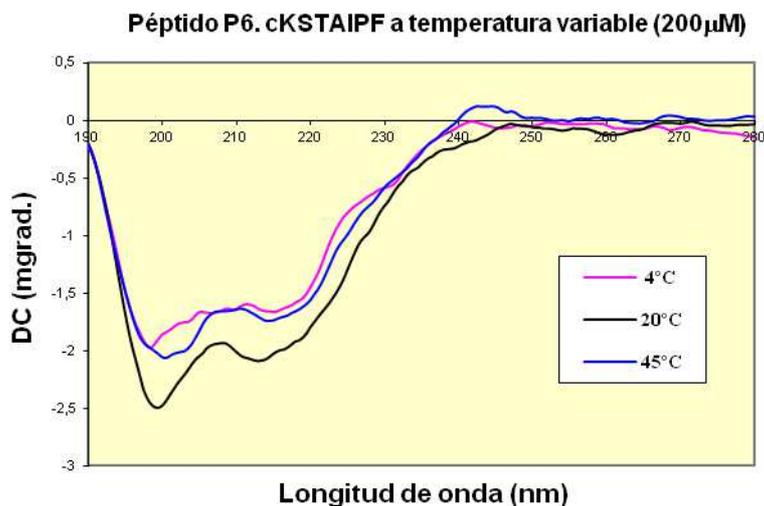


Figura 45. Variación de la elipticidad del péptido **P6** al variar la temperatura.

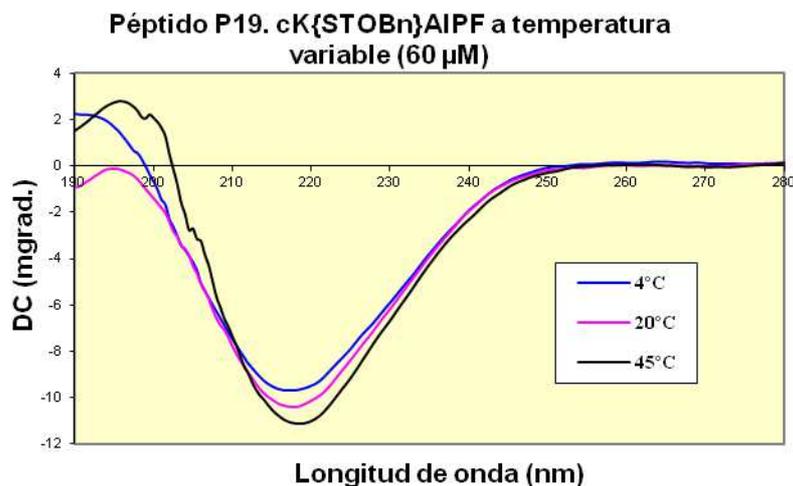
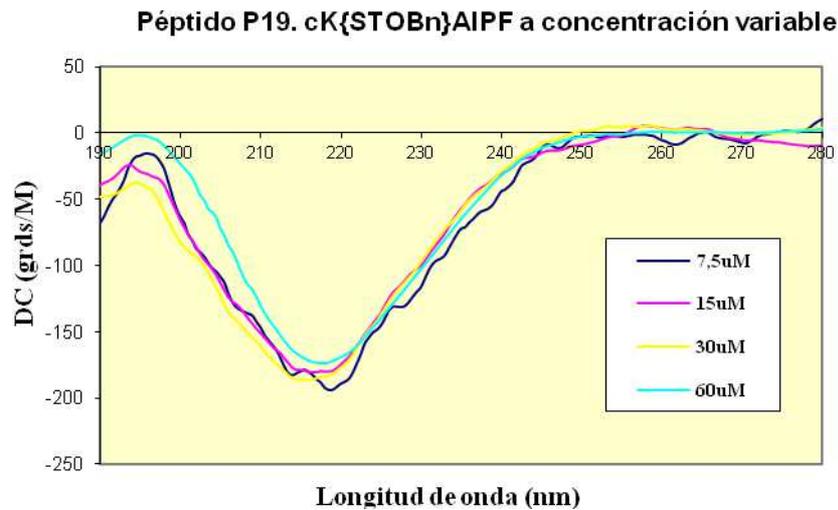


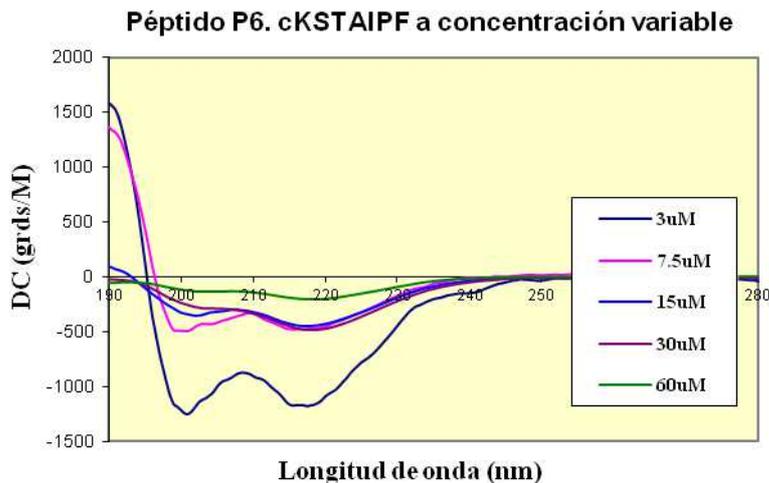
Figura 46. Variación de la elipticidad del péptido **P19** al variar la temperatura.

### Variación de la concentración

El siguiente parámetro que se ensayó fue la concentración. Al aumentar la concentración a temperatura constante en el péptido lactámico **P19**. cK{S(OBn)T}AIPF no se observó ningún cambio estructural. En cambio, al realizar lo propio con el péptido **P6**. cKSTAI PF se observó que al aumentar la concentración de péptido la señal se aplanaba. Este hecho podría reflejar algún tipo de asociación intermolecular con una posible precipitación del ciclopéptido (y desaparición de la señal) o un cambio conformacional inducido por la interacción entre moléculas.



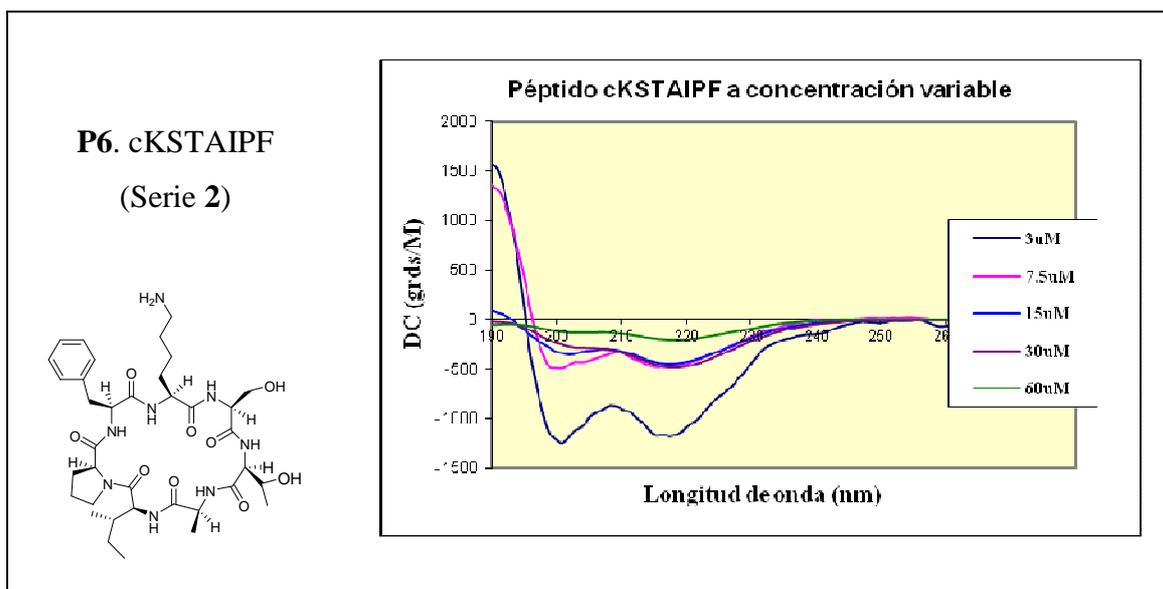
**Figura 47.** Variación de la elipticidad de **P19** al variar la concentración.



**Figura 48.** Variación de la elipticidad del péptido **P6** al variar la concentración.

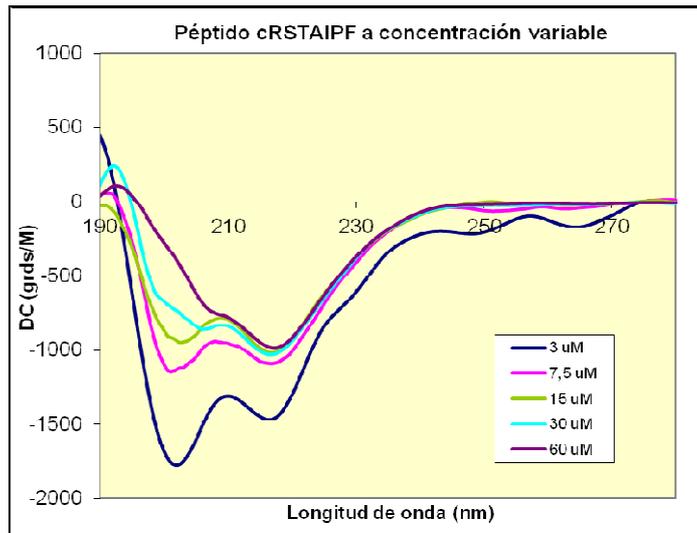
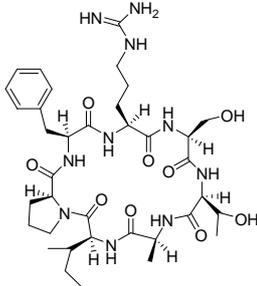
Esta posible agregación intermolecular representa un dato interesante a estudiar en el resto de péptidos de nuestra quimioteca, ya que puede permitir formular una hipótesis que relacione las características estructurales de los péptidos con la formación de complejos supramoleculares.

Así pues se realizaron espectros de DC de todos los ciclopéptidos que habíamos sintetizado previamente en nuestra biblioteca (ver todos los espectros en la sección de espectros de DC). En algunos de los ensayos realizados se observó un comportamiento de nuestros péptidos similar al observado en **P6**, con un aplanamiento de la señal tras el aumento de la concentración. Los casos en los que se observó este fenómeno fueron, además de **P6**; **P7**. cRSTAI PF, **P21**. cR{STOBn}AIPF y **P27**. cKKLAIPF (Figura 49).



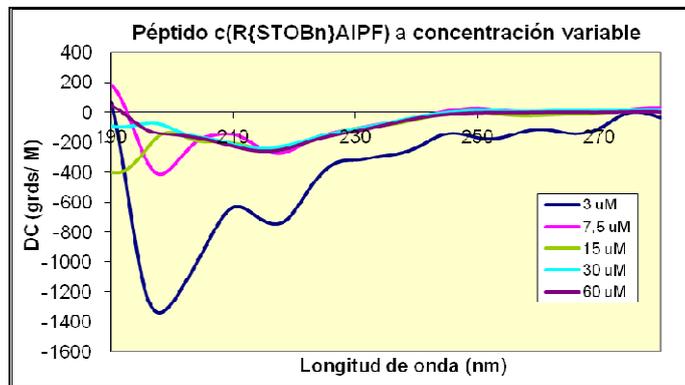
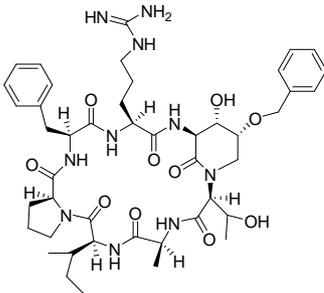
**P7. cRSTAIPF**

(Serie 2)



**P21. cR{STOBn}AIPF**

(Serie 5)



**P27. cKKLAIPF**

(Serie 7)

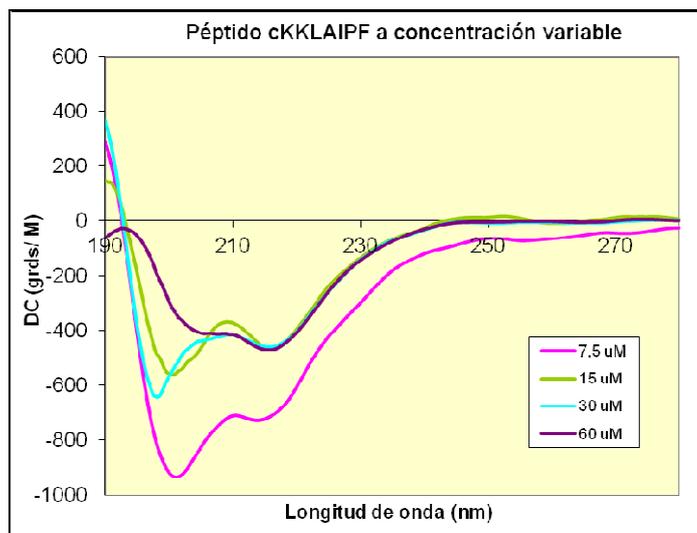
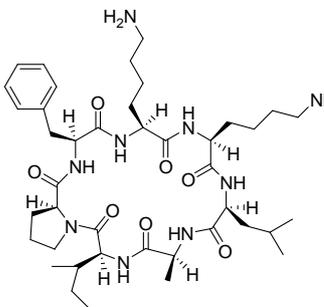
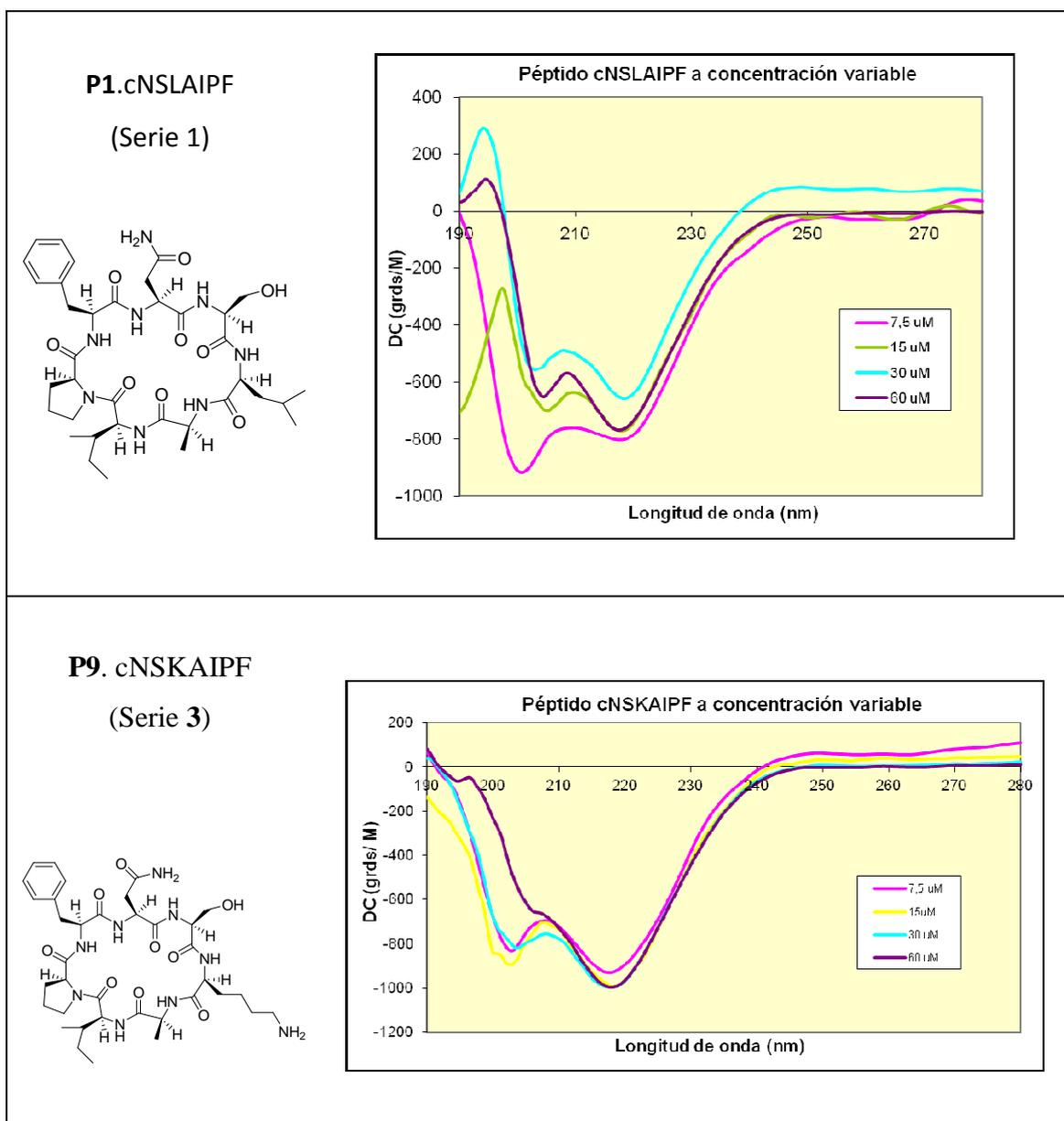
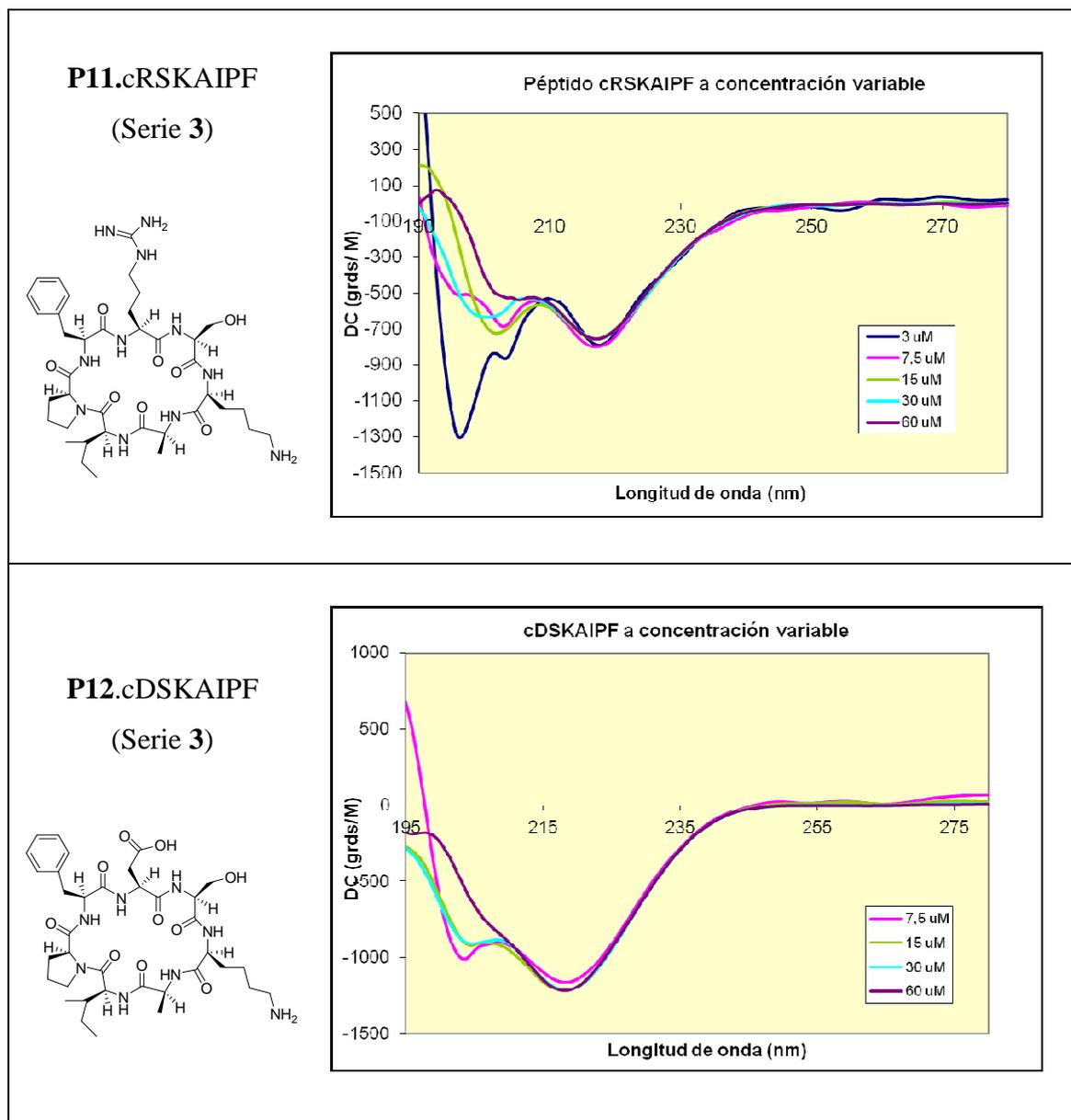


Figura 49. Disminución de la señal de elipticidad al aumentar la concentración.

Aunque en estos cuatro péptidos se observó una disminución generalizada de la intensidad de la elipticidad, en la mayoría de los espectros de DC realizados se observó solamente una atenuación selectiva de una de las bandas al aumentar la concentración (la situada a  $\lambda = 200$ ), mientras que la banda situada a  $\lambda = 220$  se mantiene inalterada. Este tipo de patrón, en mayor o menor medida, se repite en todos los péptidos que mostraban dimerización por MALDI y no mostraban una disminución generalizada de la señal como en **P6**.





**Figura 50.** Ejemplos de péptidos con disminución selectiva de la señal.

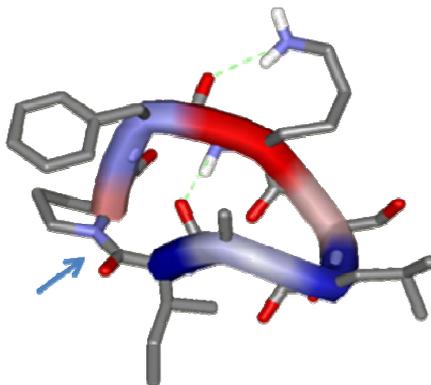
Este fenómeno también podría sugerir algún tipo de cambio conformacional fuese o no agregación sin llegar a precipitación.

Todos los espectros de dicroísmo circular realizados quedan resumidos en la sección “Espectros”

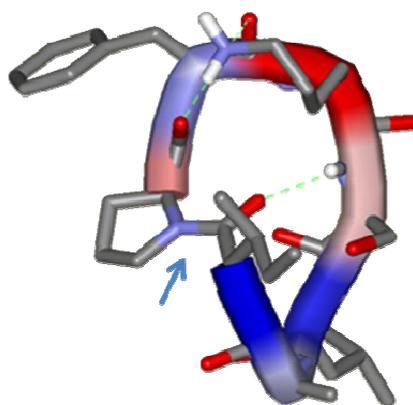
#### 4.2.2. Modelización molecular

Estos experimentos teóricos de determinación estructural tienen como objetivo medir el grado de flexibilidad que presentan nuestros compuestos. La stylostatin 1

original (**P1**. cNSLAIPF) es muy rígida ya que presenta varios puentes de hidrógeno intramoleculares que fijan la estructura, siendo *cis* el enlace  $\omega$  entre isoleucina y prolina. La sustitución de la asparragina para introducir aminoácidos cargados a pH fisiológico, ya sea negativamente (ácido aspártico) o positivamente (arginina o lisina) provoca la pérdida de uno de estos puentes de hidrógeno lo que conlleva un aumento de la flexibilidad. Así, por ejemplo, el péptido **P2** (cKSLAIPF) muestra dos familias de conformaciones, siendo el enlace entre prolina e isoleucina *cis* en unas y *trans* en otras.

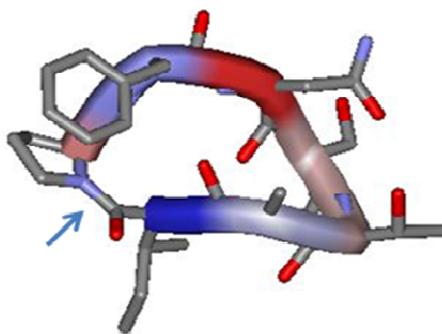


**Figura 51.** Conformación de mínima energía del péptido **P2** correspondiente a enlace *cis* entre Ile y Pro.



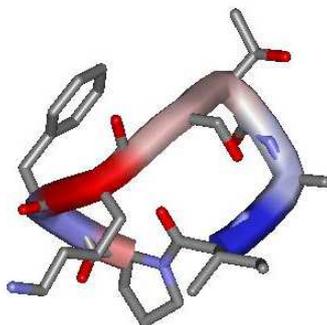
**Figura 52.** Conformación de mínima energía del péptido **P2** correspondiente a enlace *trans* entre Ile y Pro.

En el caso del péptido **P5** (cNSTAIPF) se observa que al conservar la asparragina de la stylostatina original, aunque se sustituya la leucina por treonina, se mantiene la conformación *cis* entre Ile y Pro (una sola familia de conformaciones).



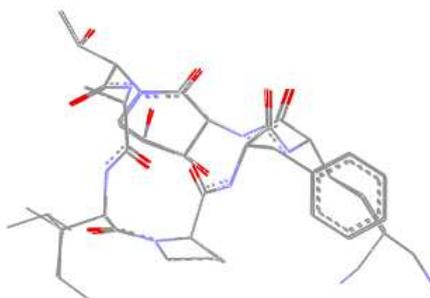
**Figura 53.** Conformación de mínima energía del péptido **P5** correspondiente a enlace *cis* entre Ile y Pro.

En cambio, al sustituir además la asparragina por lisina (péptido **P6**, cKSTAIPF) el enlace entre Ile y Pro pasa a ser de tipo *trans* (una sola familia de conformaciones). Este comportamiento refuerza la idea de que la molécula gana en flexibilidad respecto a la stylostatina I al perder el puente de hidrógeno que esta presenta entre el grupo carbonilo de la cadena lateral de la asparragina y el grupo amino de la leucina (o treonina).

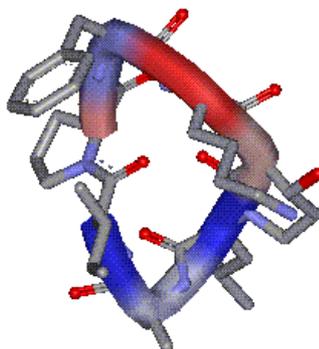


**Figura 54.** Conformación de mínima energía del péptido **P6** correspondiente a enlace *trans* entre Ile y Pro.

En el caso de los péptidos con lactama se ha podido comprobar que son muy flexibles y pueden presentar más de una familia de conformaciones de tipo Ile-Pro *cis* ó *trans*. Así tanto el péptido **P20**, cK{ST}AIPF como el péptido **P18**, cN{ST}AIPF presentan una familia de conformaciones *cis* y dos *trans*.

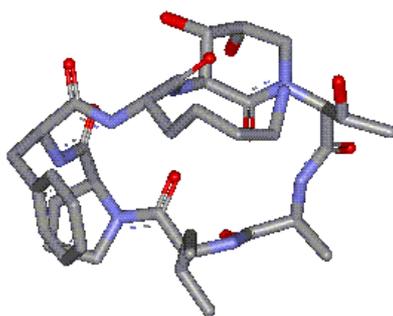


**Figura 55** Conformación de mínima energía del péptido **P20** correspondiente a enlace *cis* entre Ile y Pro.



**Figura 56.** Conformación de mínima energía del péptido **P20**. cK{ST}AIPF correspondiente a enlace *trans* entre Ile y Pro.

Las moléculas que presentan los aminoácidos Lys (pI = 9,6) y Arg (pI = 11,2) en su estructura suelen estar cargadas positivamente en condiciones de pH fisiológicas (pH = 7,4). Se puede incluir la carga positiva entre las variables a tener en cuenta a la hora de realizar los modelos moleculares de estas estructuras. En este caso, los cálculos muestran que el péptido **P20**. cK{ST}AIPF con carga positiva adopta una familia de conformaciones en la que el enlace  $\omega$  entre Ile y Pro es *trans*. Por tanto, se observa que al tener en cuenta la carga que la cadena lateral toma en condiciones fisiológicas, la molécula se rigidifica, aunque sin llegar al nivel de rigidez de la stylostatin 1.



**Figura 57.** Conformación de mínima energía del péptido **P20** teniendo en cuenta la carga positiva en los cálculos. El enlace entre Ile y pro es de tipo *trans*

### 4.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

#### 4.3.1. Ensayo sobre modelos de membrana: liposomas

Con los ensayos sobre liposomas se pretende ensayar la capacidad de nuestros péptidos para dañar membranas fosfolipídicas procariotas, simulando las condiciones ideales para que esto pueda suceder. La técnica consiste en la medición de la liberación de un compuesto fluorescente del interior de una membrana procariota por la formación de poros superficiales debido a la acción de nuestros péptidos. En primer lugar se lleva a cabo el encapsulamiento de una molécula fluorescente, la calceína, en el interior de los liposomas. La adición de un péptido que formase poros en esta membrana provocaría la liberación de este compuesto y el aumento de la señal de fluorescencia. Este incremento de señal podría ser medido con un fluorímetro lo que indicaría la efectividad del péptido contra membranas de este tipo.

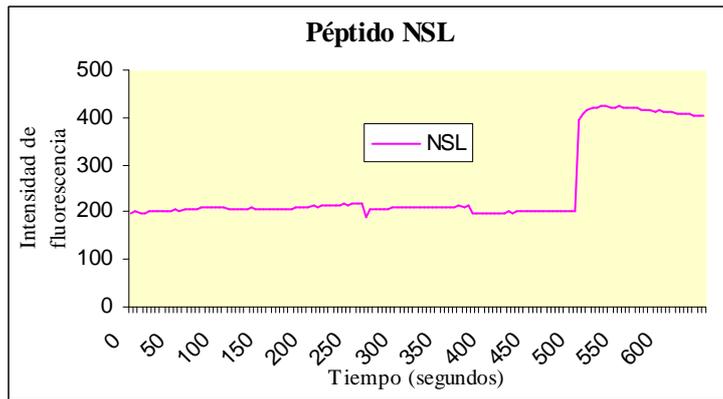
Para realizar este experimento, se utilizaron como modelo liposomas formados de extracto lipídico total de *E.coli*. Se escogió como tampón el preparado HEPES 2,5 mM (que proporciona un pH de 7,4, similar al fisiológico). El método de preparación de los liposomas queda explicado en el capítulo 6.3, así como los datos experimentales correspondientes.

El experimento se llevó a cabo con un espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-1501. En primer lugar se comprobaron los máximos de emisión y absorción realizando los espectros correspondientes (en torno a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) de 485 nm y a una longitud de onda de emisión ( $\lambda_{exc}$ ) de 515 nm) y en estas condiciones se realizó una cinética del blanco (suspensión de liposomas) para comprobar el estado de los liposomas y poder ajustar la dilución si la señal fuese demasiado intensa (las condiciones ideales para nuestro experimento contemplan una señal de fluorescencia de un 20 a un 30 % de la escala de la señal del aparato).

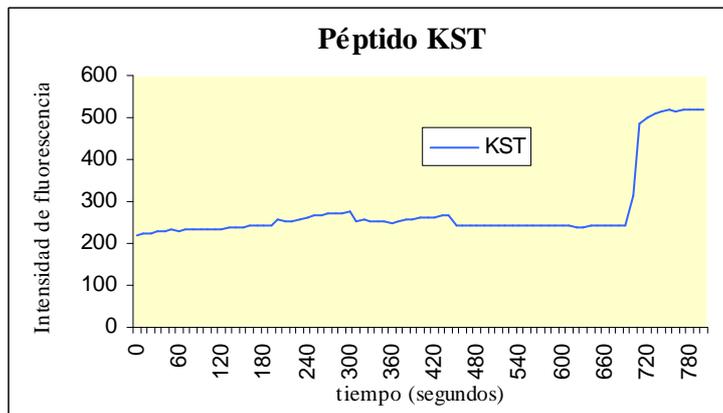
Una vez establecidas las condiciones iniciales se realiza la medición añadiendo cantidades crecientes de péptido en periodos concretos de tiempo. Para finalizar el experimento se añade Tritón<sup>®</sup> con la finalidad de lizar los liposomas y comparar el aumento de fluorescencia consecutivo con los producidos anteriormente por la adición de nuestros péptidos (si es que se produce algún tipo de permeación por la acción de éstos).

Se ensayo la Stylostatin 1 (**P1**. cNSLAIPF, serie **1**) como modelo neutro de tipo 2P+5A y el péptido que hasta el momento había proporcionado las mejores posibilidades de actividad, es decir **P6**. cKSTAIPF (serie **2**), de tipo 3P+4A, y que contiene un aminoácido básico (lisina) en su estructura que le permite estar cargado positivamente en condiciones fisiológicas (pH 7,4).

Los péptidos se adicionaron en concentraciones crecientes a tiempo concreto (ver capítulo 6.3). En ninguno de los dos ensayos se observó una liberación de calceína que permitiera pensar que estos péptidos atacan la membrana en concentraciones mínimas inhibitorias por debajo de 150 mg/L (ver capítulo 6.3). Por encima de estas concentraciones se considera que el péptido no es útil como posible antibiótico.



**Figura 58.** Ensayo de la acción sobre membrana procariota del péptido **P1** (cNSLAIPF). No se observa la formación de poros



**Figura 59.** Ensayo de la acción sobre membrana procariota del péptido **P6** (cKSTAIPF). No se observa la formación de poros

#### 4.3.2. Evaluación de la actividad antibiótica

##### *Ensayos como potenciales antibióticos.*

En una de las últimas etapas de nuestra investigación, la mayor parte de nuestros péptidos se enviaron al Hospital Clínico de Barcelona donde el equipo del doctor J.Vila

realizó la evaluación de su actividad antimicrobiana frente a diversas cepas bacterianas. Los ensayos de actividad se realizaron mediante el método de microdilución en caldo.<sup>131</sup>

En un primer ensayo se evaluaron varios de los péptidos (los correspondientes a la serie 2) frente a diferentes cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas (Figura 60). Como patrón se utilizó la colistina (Polimixina E).

**Microorganismos utilizados :**

<i>Escherichia coli</i>	EMP 5
<i>Escherichia coli</i>	Nor E5
<i>A. baumannii</i>	77
<i>A. baumannii</i>	77 (64)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	wt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	mexA.OprD
<i>Staphylococcus aureus</i>	1199
<i>Staphylococcus aureus</i>	1199

**Metodología empleada :** Microdilución en caldo. Rango de concentraciones 0.06 – 64 mg/L.

Péptidos	CMI (mg/L)			
	<i>E. coli</i> EMP5	<i>E.coli</i> NorE5	<i>A. baumannii</i> 77	<i>A. baumannii</i> 77 (64)
P5.cNSTAIPF	>64	>64	>64	>64
P6.cKSTAIPF	>64	>64	>64	>64
P7.cRSTAIPF	>64	>64	>64	>64
P8.cDSTAIPF	>64	>64	>64	>64

**Figura 60.** Tabla de CMIs (µg/mL) de diferentes péptidos frente a bacterias Gram negativas

<sup>131</sup> García, J.A.; Canton, R.; García, J.E.; Gómez, M.L.; Martínez, L.; Rodríguez, C.; Vila, J.; Procedimientos en Microbiología Clínica, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. “Métodos Básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos” 2000.

Péptidos	CMI (mg/L)			
	<i>P.aeruginosa</i> wt	<i>P.aeruginosa</i> mexA.OprD	<i>S. aureus</i> 1199	<i>S. aureus</i> 1199B
P5.cNSTAIPF	>64	>64	>64	>64
P6.cKSTAIPF	>64	>64	>64	>64
P7.cRSTAIPF	>64	>64	>64	>64
P8.cDSTAIPF	>64	>64	>64	>64

**Figura 61.** Tabla de CMIs ( $\mu\text{g/mL}$ ) de diferentes péptidos frente a bacterias Gram positivas

No se observó actividad antimicrobiana por debajo de  $64 \mu\text{g/mL}$  en ninguno de los casos.

Los siguientes experimentos que se realizaron se ensayaron utilizando para ello una menor variedad de cepas bacterianas para agilizar el proceso. Se utilizó como patrón antibiótico la colistina (polimixina E). El ensayo se realizó en dos tandas, conforme se fueron obteniendo péptidos purificados con la pureza necesaria y en cantidad suficiente:

#### Microorganismos utilizados :

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Staphylococcus aureus* ATCC 29213

**Metodología empleada :** Microdilución en caldo. Rango de concentraciones  $0.06 - 64 \text{ mg/L}$  (tanda 1) ;  $0.06-256 \text{ mg/L}$  (tanda 2).

Péptidos	CMI (mg/L)		
	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
<b>P10</b> cKSKAIPF	>64	>64	>64
<b>P16</b> cK{SL}AIPF	>64	>64	>64
<b>P20</b> cK{ST}AIPF	>64	>64	>64
<b>P22</b> cR{ST}AIPF	>64	>64	>64
<b>P27</b> cKKLAIPF	>64	>64	>64
<b>P28</b> cKSLKIPF	>64	>64	>64
<b>P31</b> cKSTKIPF	>64	>64	>64
<b>P32</b> cKSTAKPF	>64	>64	>64
<b>P33</b> cK{SLOBn}AKIPF	>64	>64	>64
<b>P34</b> cKSLAKIPF	>64	>64	>64
<b>P35</b> cK{Oxa}AKIPF	>64	>64	>64
<b>P36</b> cKS{Oxa}KIPF	>64	>64	>64
<b>Colistina (Polimixina E)</b>	0.25	0.25	----

Péptidos	CMI (mg/L)		
	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
<b>P1</b> cNSLAIPF	256	256	128
<b>P4</b> cDSLAIIPF	256	256	128
<b>P6</b> cKSTAIPF	≥256	≥256	≥256
<b>P9</b> cNSKAIPF	≥256	≥256	≥256
<b>P11</b> cRSKAIPF	≥256	≥256	≥256
<b>P12</b> cDSKAIPF	≥256	≥256	≥256
<b>P29</b> cKSLAKPF	≥256	≥256	≥256
<b>P30</b> cKKTAIPF	≥256	≥256	≥256
<b>P32</b> cKSTAKPF	≥256	≥256	≥256
<b>Colistina (Polimixina E)</b>	≤ 0,5	≤ 0,5	---

Lamentablemente, y tal como era de esperar a la vista de los resultados de modelización molecular y los ensayos sobre liposomas, los péptidos evaluados como antibióticos en bacterias no resultaron activos, ni frente a Gram negativo (el tipo de bacterias más susceptibles de ser atacadas, según el mecanismo de acción que proponemos)<sup>56a</sup>, ni frente a Gram positivo.

### *Ensayos como antitumorales*

Además de los ensayos como antibióticos y atendiendo al hecho que el péptido patrón de nuestra biblioteca se trata de una molécula con actividad biológica como antitumoral (stylostatin 1),<sup>84</sup> se realizaron una tanda de pruebas para evaluar parte de nuestros ciclopéptidos como potenciales antitumorales. Esta evaluación se llevó a cabo gracias a la colaboración de la compañía biofarmacéutica Pharmamar, empresa especializada en el descubrimiento, desarrollo, producción y comercialización de fármacos de origen marino. Así se ensayaron nuestros ciclopéptidos frente a líneas tumorales de mama, colon y pulmón. No se encontró actividad antitumoral en las concentraciones utilizadas en la determinación. Los ensayos realizados se muestran en la Tabla 5 :

Péptidos		C.T.Mama MDA-MB-231	C.T.Colon HT 29	C.T.NSCL (Pulmón) A549
<b>P1. cNSLAIPF</b> (serie 1)	GI 50	$>1,35 \cdot 10^{-5}$	$>1,35 \cdot 10^{-5}$	$>1,35 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,35 \cdot 10^{-5}$	$>1,35 \cdot 10^{-5}$	$>1,35 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,35 \cdot 10^{-5}$	$>1,35 \cdot 10^{-5}$	$>1,35 \cdot 10^{-5}$
<b>P2. cKSLAIPF</b> (serie 1)	GI 50	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$
<b>P3. cRSLAIPF</b> (serie 1)	GI 50	$>1,27 \cdot 10^{-5}$	$>1,27 \cdot 10^{-5}$	$>1,27 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,27 \cdot 10^{-5}$	$>1,27 \cdot 10^{-5}$	$>1,27 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,27 \cdot 10^{-5}$	$>1,27 \cdot 10^{-5}$	$>1,27 \cdot 10^{-5}$

<b>P4. cDSLAI PF</b> (serie 1)	GI 50	$>1,34 \cdot 10^{-5}$	$>1,34 \cdot 10^{-5}$	$>1,34 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,34 \cdot 10^{-5}$	$>1,34 \cdot 10^{-5}$	$>1,34 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,34 \cdot 10^{-5}$	$>1,34 \cdot 10^{-5}$	$>1,34 \cdot 10^{-5}$
<b>P5. cNSTAI PF</b> (serie 2)	GI 50	$>1,37 \cdot 10^{-5}$	$>1,37 \cdot 10^{-5}$	$>1,37 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,37 \cdot 10^{-5}$	$>1,37 \cdot 10^{-5}$	$>1,37 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,37 \cdot 10^{-5}$	$>1,37 \cdot 10^{-5}$	$>1,37 \cdot 10^{-5}$
<b>P6. cKSTAI PF</b> (serie 2)	GI 50	$>1,34 \cdot 10^{-5}$	$>1,34 \cdot 10^{-5}$	$>1,34 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,34 \cdot 10^{-5}$	$>1,34 \cdot 10^{-5}$	$>1,34 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,34 \cdot 10^{-5}$	$>1,34 \cdot 10^{-5}$	$>1,34 \cdot 10^{-5}$
<b>P7. cRSTAI PF</b> (serie 2)	GI 50	$>1,29 \cdot 10^{-5}$	$>1,29 \cdot 10^{-5}$	$>1,29 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,29 \cdot 10^{-5}$	$>1,29 \cdot 10^{-5}$	$>1,29 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,29 \cdot 10^{-5}$	$>1,29 \cdot 10^{-5}$	$>1,29 \cdot 10^{-5}$
<b>P8. cDSTAI PF</b> (serie 2)	GI 50	$>1,37 \cdot 10^{-5}$	$>1,37 \cdot 10^{-5}$	$>1,37 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,37 \cdot 10^{-5}$	$>1,37 \cdot 10^{-5}$	$>1,37 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,37 \cdot 10^{-5}$	$>1,37 \cdot 10^{-5}$	$>1,37 \cdot 10^{-5}$
<b>P9. cNSKAIPF</b> (serie 3)	GI 50	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$
<b>P10. cKSKAI PF</b> (serie 3)	GI 50	$>1,30 \cdot 10^{-5}$	$>1,30 \cdot 10^{-5}$	$>1,30 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,30 \cdot 10^{-5}$	$>1,30 \cdot 10^{-5}$	$>1,30 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,30 \cdot 10^{-5}$	$>1,30 \cdot 10^{-5}$	$>1,30 \cdot 10^{-5}$
<b>P11. cRSKAIPF</b> (serie 3)	GI 50	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$
<b>P12. cDSKAIPF</b> (serie 3)	GI 50	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$
<b>P16. cK{SL}AIPF</b> (serie 4)	GI 50	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$
<b>P22. cR{ST}AIPF</b> (serie 5)	GI 50	$>1,23 \cdot 10^{-5}$	$>1,23 \cdot 10^{-5}$	$>1,23 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,23 \cdot 10^{-5}$	$>1,23 \cdot 10^{-5}$	$>1,23 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,23 \cdot 10^{-5}$	$>1,23 \cdot 10^{-5}$	$>1,23 \cdot 10^{-5}$

<b>P27.</b> cKKLAIPF (serie 7)	GI 50	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$
<b>P28.</b> cKSLKIPF (serie 7)	GI 50	$>1,23 \cdot 10^{-5}$	$>1,23 \cdot 10^{-5}$	$>1,23 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,23 \cdot 10^{-5}$	$>1,23 \cdot 10^{-5}$	$>1,23 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,23 \cdot 10^{-5}$	$>1,23 \cdot 10^{-5}$	$>1,23 \cdot 10^{-5}$
<b>P29.</b> cKSLAKPF (serie 7)	GI 50	$>1,30 \cdot 10^{-5}$	$>1,30 \cdot 10^{-5}$	$>1,30 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,30 \cdot 10^{-5}$	$>1,30 \cdot 10^{-5}$	$>1,30 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,30 \cdot 10^{-5}$	$>1,30 \cdot 10^{-5}$	$>1,30 \cdot 10^{-5}$
<b>P30.</b> cKKTaipf (serie 8)	GI 50	$>1,27 \cdot 10^{-5}$	$>1,27 \cdot 10^{-5}$	$>1,27 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,27 \cdot 10^{-5}$	$>1,27 \cdot 10^{-5}$	$>1,27 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,27 \cdot 10^{-5}$	$>1,27 \cdot 10^{-5}$	$>1,27 \cdot 10^{-5}$
<b>P31.</b> cKSTKIPF (serie 8)	GI 50	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$	$>1,25 \cdot 10^{-5}$
<b>P32.</b> cKSTAKPF (serie 8)	GI 50	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$	$>1,32 \cdot 10^{-5}$
<b>P33.</b> cK{SLOBn}AKIPF (serie 9)	GI 50	$>9,83 \cdot 10^{-6}$	$>9,83 \cdot 10^{-6}$	$>9,83 \cdot 10^{-6}$
	TGI	$>9,83 \cdot 10^{-6}$	$>9,83 \cdot 10^{-6}$	$>9,83 \cdot 10^{-6}$
	LC 50	$>9,83 \cdot 10^{-6}$	$>9,83 \cdot 10^{-6}$	$>9,83 \cdot 10^{-6}$
<b>P34.</b> cKSLAKIPF (serie 9)	GI 50	$>1,13 \cdot 10^{-5}$	$>1,13 \cdot 10^{-5}$	$>1,13 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,13 \cdot 10^{-5}$	$>1,13 \cdot 10^{-5}$	$>1,13 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,13 \cdot 10^{-5}$	$>1,13 \cdot 10^{-5}$	$>1,13 \cdot 10^{-5}$
<b>P35.</b> cK{Oxa}AKIPF (serie 9)	GI 50	$>1,15 \cdot 10^{-5}$	$>1,15 \cdot 10^{-5}$	$>1,15 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,15 \cdot 10^{-5}$	$>1,15 \cdot 10^{-5}$	$>1,15 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,15 \cdot 10^{-5}$	$>1,15 \cdot 10^{-5}$	$>1,15 \cdot 10^{-5}$
<b>P36.</b> cKS{Oxa}KIPF (serie 9)	GI 50	$>1,13 \cdot 10^{-5}$	$>1,13 \cdot 10^{-5}$	$>1,13 \cdot 10^{-5}$
	TGI	$>1,13 \cdot 10^{-5}$	$>1,13 \cdot 10^{-5}$	$>1,13 \cdot 10^{-5}$
	LC 50	$>1,13 \cdot 10^{-5}$	$>1,13 \cdot 10^{-5}$	$>1,13 \cdot 10^{-5}$

**Tabla 5.** Evaluación de nuestros ciclopéptidos frente a muestras de células tumorales. Se muestran resultados de inhibición de crecimiento (GI 50), inhibición del crecimiento tumoral (TGI) y concentración letal (LC 50).

## 4.4. ANEXO

### 4.4.1. MALDI-TOF

El término desorción/ionización láser asistida por matriz (matrix-assited laser desorption, MALDI) fue acuñado por Franz Hillenkamp, Michael Karas y colaboradores en 1985.<sup>132</sup> Su estudio se basó en el hecho de que la alanina podía ser ionizada con más facilidad si se mezclaba con el aminoácido triptófano y se irradiaba con un pulso de láser a 266 nm. De esta manera, el triptófano podía absorber la energía del láser y ayudar a ionizar la alanina, que por si misma no es capaz de absorber esta energía. En 1987 Koichi Tanaka de Shimadzu Corp. Y sus colaboradores usaron un nuevo método al que bautizaron con el nombre “Método de matriz mediante combinación de líquido y metal ultra fino” (“ultra fine metal plus liquid matrix method”). Este método utilizaba partículas de cobalto de 30 nm en glicerol y un láser de nitrógeno a 337 nm para la ionización de las especies.<sup>133</sup>

Usando esta combinación, Tanaka fue capaz de ionizar biomoléculas tan grandes incluso como la carboxipeptidasa-A. Este trabajo tan interesante con el que demostró que con la adecuada combinación de una determinada longitud de onda y matriz es posible ionizar una proteína le valió el premio Nobel de Química<sup>134</sup>. A partir de ese momento nuevas matrices fueron utilizadas, como el ácido nicotínico para la ionización de la albúmina<sup>135</sup>, y ciertos derivados del ácido cinámico como el ácido ferúlico, cafeínico o sináptico<sup>136</sup>. A partir de principios de los años 90 el descenso del precio de los láseres de nitrógeno que pudiesen operar a 337 nm y los primeros instrumentos comerciales permitió la extensión en el uso de esta técnica.

---

<sup>132</sup> Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1985**. *57*. 2935–2939.

<sup>133</sup> Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**. *2* (20). 151–153.

<sup>134</sup> [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2002/chemadv02.pdf](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/chemadv02.pdf)

<sup>135</sup> Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**. *60* (20). 2299–301.

<sup>136</sup> Beavis, R.C.; Chait, B.T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**. *3* (12). 436–439.

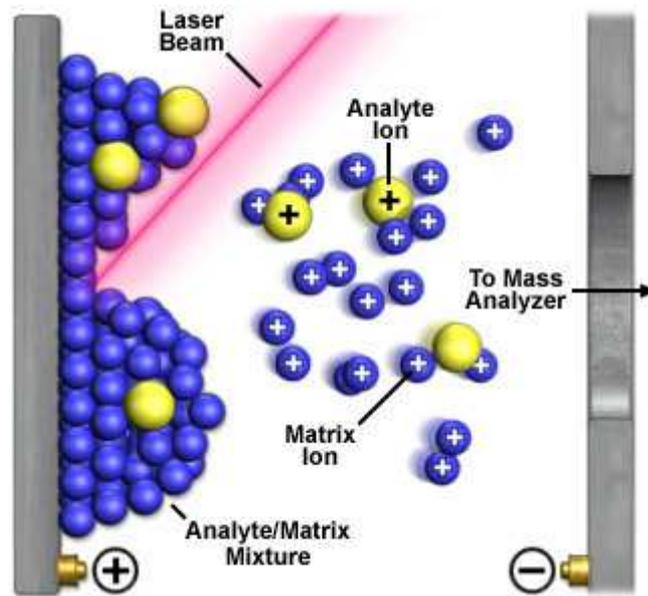
## **Descripción esquemática del método**<sup>137</sup>

Desde la introducción de este método a principios de la década de los años 90 este método de ionización ha sido muy utilizado y de gran ayuda para el colectivo científico en estudios de biopolímeros, proteínas, azúcares y otras moléculas grandes y pesadas. Estas tienen a ser frágiles y suelen fragmentar cuando ionizan por métodos convencionales de ionización. Se trata de un método muy similar en características a la ionización por electrospray por sus características de suavidad e iones producidos.

En primer lugar es necesaria la disolución de la muestra. Entonces se lleva a cabo la mezcla de esta con la matriz (que es variable en función del experimento y de la naturaleza de la muestra). Las dos características clave de este compuesto son su poco peso (en comparación con las moléculas pesadas de la muestra) y su fácil absorción de luz ultravioleta (en algún caso IR). A continuación se evapora el líquido en el que estaba contenido nuestro analito para obtener la mezcla sólida, un entramado de cristal en el cual se han incorporado pequeñas partículas de nuestra proteína (una cantidad de aproximadamente 100 ppm). Esta matriz tiene la función de proteger la muestra y facilitar su vaporización e ionización. A continuación el láser impacta sobre la matriz, vaporizando tanto la matriz como la muestra. El material de la matriz absorbe la energía de los fotones del láser y se ioniza en el proceso. Este material pasa esta energía UV a las moléculas protéicas vaporizadas, algunas de las cuales se ionizan.

---

<sup>137</sup> [http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization\\_maldi.html](http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_maldi.html)



En general, y aunque aún se están estudiando los mecanismos exactos mediante los cuales se da este suceso, las colisiones entre las moléculas de matriz y las de la muestra resultan en un tipo de ionización química “en vuelo”.

Como ya se ha comentado, la matriz hace también la función de amortiguador entre la frágil proteína y el potente laser. Si no hubiese matriz como intermediaria las moléculas se podrían romper, dejando inservible la muestra.

Una vez las moléculas son ionizadas, estas son conducidas de la cámara de evaporación al espectrógrafo de masas por el voltaje aplicado sobre la cámara. Aunque muchos iones de la matriz también llegan al SM, estos son más ligeros que los de la muestra con lo que se evita el riesgo de confundirlos, siendo fácil la separación de estas señales en los resultados.

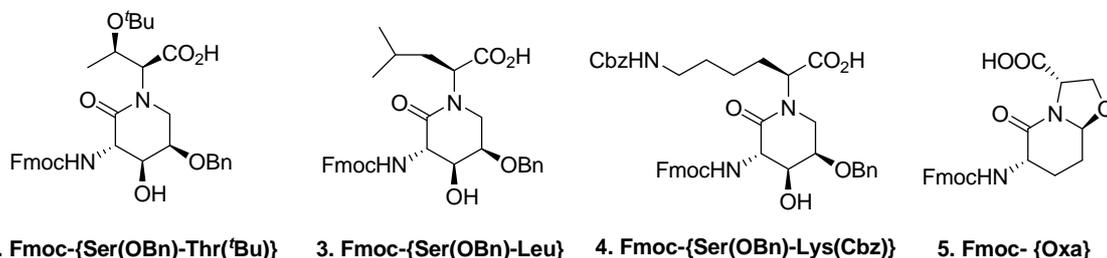
**CAPÍTULO 5**  
**Resultados y conclusiones**

---



## 5.1. RESULTADOS

### *Síntesis de las 3-aminolactamas*



En la presente tesis doctoral se sintetizaron las 3-aminolactamas **2**, **3** y **4** de tipo **VI** con la funcionalización necesaria para su posterior introducción en fase sólida. También se sintetizó previamente en nuestro grupo la oxazolopiperidona **5** de tipo **VIII**, también funcionalizada adecuadamente.

### *Síntesis en fase sólida de los péptidos con aminoácidos naturales*

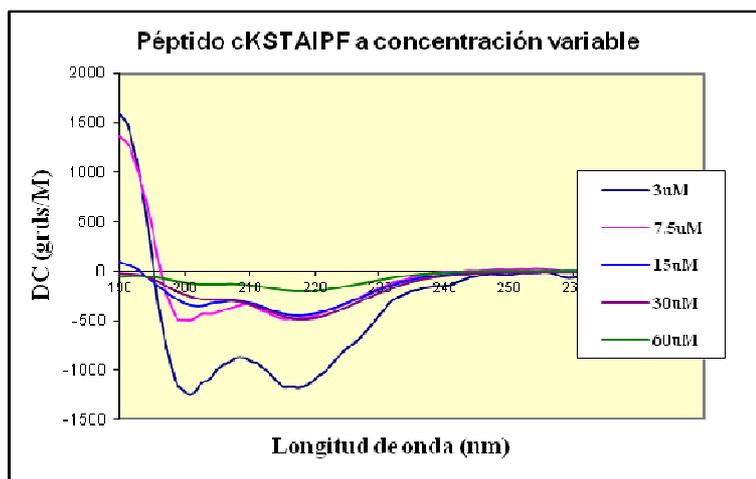
Para la síntesis peptídica se utilizó como resina un derivado del cloruro de 2-clorotritilo comercial con prolina incorporada, de funcionalización conocida. Se utilizó una metodología de tipo Fmoc/ <sup>t</sup>Bu. Todos los péptidos con aminoácidos naturales planificados (19) se obtuvieron con purzas superiores al 90 % y la mayor parte de ellos con rendimientos entre el 10 y el 30 %.

### *Síntesis en fase sólida de los péptidos con nuestros “scaffolds” lactámicos*

La inclusión de la lactamas **2**, **3** y **4** durante la síntesis en fase sólida fue exitosa ya que estas se incorporaban de forma plenamente satisfactoria al péptido en crecimiento sobre la resina. La obtención de los ciclopéptidos lactámicos desbencilados no fue posible en varios casos por degradación en el medio de reacción (**P18/P24/P26**, hidrogenólisis a presión). Tampoco se pudo obtener el ciclopéptido **P25** con suficiente pureza para su caracterización. No obstante, otras desbencilaciones si fueron exitosas y se consiguieron obtener los péptidos **P16**, **P20** y **P22** tras hidrogenación catalítica a presión con rendimientos cuantitativos. En total se consiguieron sintetizar y caracterizar un total de 11 péptidos que incluyen en su estructura una de nuestras lactamas.

**Estudios estructurales**

En los experimentos de dicroísmo circular se pudo observar una posible agregación o precipitación de varios de los ciclopeptidos en solución, pues disminuye la señal de elipticidad al aumentar la concentración del péptido en disolución (Figura 62).



**Figura 62.** Posible agregación observada por DC.

Los estudios de modelización molecular mostraron que nuestros derivados peptídicos, ya sean con aminoácidos naturales o lactámicos sintéticos, pierden rigidez respecto a la stylostatin 1 original por pérdida de un puente de hidrógeno intramolecular, presentando diferentes grados de flexibilidad.

**Ensayos de actividad biológica**

También se puso a punto la preparación de liposomas, así como su utilización como modelos de membrana celular procariota. Los ensayos con los péptidos **P6** y **P1** no permitieron demostrar ningún tipo de ataque sobre la membrana.

Los ensayos biológicos como antibióticos *in vivo* indican la ausencia de actividad antimicrobiana de nuestros péptidos frente a las especies y cepas evaluadas. En el caso de la evaluación como potenciales antitumorales tampoco se consiguió obtener actividad frente a ninguno de los cultivos de células tumorales ensayados.

## 5.2. CONCLUSIONES

De nuestro estudio hemos extraído varias conclusiones. En primer lugar, hemos optimizado la síntesis en fase sólida de nuestros péptidos (tanto los formados por aminoácidos naturales como los que contienen alguna de nuestras 3-aminolactamas de síntesis en su estructura). Fue posible, además, mantener protegidas las cadenas laterales funcionalizadas utilizando para ello una resina (cloruro de 2-clorotritilo) de la cual es posible la escisión de nuestro péptido en condiciones ácidas suaves. Esto facilitó una posterior ciclación en la que se evitaron en gran medida los subproductos de ciclación por cadena lateral. La optimización del método resultó imprescindible para obtener los péptidos deseados en las purezas y cantidades suficientes.

Encontramos dificultades en la desbencilación de los péptidos que incluyen nuestras 3-aminolactamas y varios de ellos se degradaron en el medio de reacción. De los que sí se consiguieron obtener se obtuvo un rendimiento cuantitativo, lo que parece indicar un diferente nivel de estabilidad frente a la hidrogenólisis en función de los aminoácidos que formen el péptido.

Pese a que se encontraron dificultades en la purificación de los péptidos, se obtuvieron la mayoría de ellos con rendimientos moderados (del 10 al 30 %) y purezas generalmente mayores al 90 %, lo que permitió conseguir la cantidad suficiente de nuestros compuestos para los diferentes ensayos biológicos que se llevaron a cabo.

Lamentablemente, tanto en los ensayos realizados sobre modelos de membrana procariota (liposomas) como los ensayos *in vivo* como antibióticos o antitumorales se encontraron resultados negativos.

En los estudios de dicroísmo circular se observó una posible agregación de varios de los ciclopéptidos en solución. A partir de estos datos se realizarán futuros estudios de modelización molecular para estudiar posibles asociaciones supramoleculares de nuestros péptidos.



**CAPÍTULO 6**  
**Sección experimental**

---



## 6.1. EXPERIMENTAL DEL CAPÍTULO 2.

Los datos de resonancia magnética nuclear de protón de 400 MHz se registraron en un espectrómetro Varian Mercury-400. Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono-13 se registraron en un espectrómetro Varian, modelo Mercury-400 (100 MHz), con sonda de banda ancha ATB  $^1\text{H}/^{19}\text{F}/\text{X}$  de 5mm. Los experimentos de RMN bidimensional se realizaron en un espectrómetro Varian Mercury-400. Los desplazamientos químicos se dan en valores de partes por millón (ppm) en escala  $\delta$  y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz. Normalmente se ha utilizado  $\text{CDCl}_3$  como disolvente, utilizando tetrametilsilano como referencia interna en el caso de los espectros de protón, y el propio  $\text{CDCl}_3$  (77,0 ppm) en los espectros de  $^{13}\text{C}$ . En algún caso se utilizó MeOH en espectros de  $^1\text{H}$ , en este caso también con tetrametilsilano como referencia interna. Las abreviaciones utilizadas en la asignación de señales son: s, singulete; d, doblete; t, triplete; q, cuádruplete; m, multiplete; dd, doble doblete; ddd, triplete de dobletes; dt, doble triplete; td, triplete doblete; qd, cuádruplete de dobletes; qt, cuádruplete de tripletes; sa, señal amplia.

Los espectros de infrarrojo se han registrado en un espectrofotómetro, Thermo Nicolet FT-R *Nexus* y solo se indican las absorciones más significativas, en  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de masas se han efectuado utilizando dos métodos diferentes. En primer lugar mediante un espectrómetro MALDI-TOF modelo Proteomics Analyzer 4700 de Applied Biosystems. En el caso de los datos de MALDI-TOF se indica, según se observe, la  $(\text{M}+\text{H})^+$ , la  $(\text{M}+\text{Na})^+$  o la  $(\text{M}+\text{K})^+$ . En todos los casos se utilizó como matriz ACH (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico). Para la preparación de las muestras se mezcla 1  $\mu\text{cl}$  del compuesto a ensayar (1 mg/mL) y 1  $\mu\text{L}$  de matriz (10 mg/mL, disolvente MeCN:H<sub>2</sub>O (1:1), 0,1 % de TFA), aplicando la mezcla sobre la placa de MALDI y dejándolo secar a temperatura ambiente antes de su medición.

También se han realizado espectros de masas utilizando un equipo que contaba de un HPLC Jasco (con un módulo de inyección automática AS-2050 Plus y una bomba cuaternaria PU-2098 Plus) acoplado a un espectrómetro de masas API<sup>TM</sup> –Mariner TOF de Applied Biosystems. Consta de un analizador TOF y la fuente de ionización es

mediante ESI (Electrospray). La determinación se realiza por análisis por LC-MS (HPLC/ESI(+)-MS.

Los valores de rotación óptica se registraron en un polarímetro Perkin Elmer 241 Polarimeter, con lámpara de sodio (D). Se dan los valores de  $[\alpha]_D$  en grados y la concentración en g/100 mL.

Los análisis elementales se han realizado en un analizador EA 1108 CHNS-O Carlo Erba Instruments, en los Servicios Cientificotécnicos de la Universidad de Barcelona.

Las purificaciones por cromatografía en columna se han llevado a cabo a presión ("flash") sobre SiO<sub>2</sub> SDS (Sílica 60, 35-70  $\mu\text{m}$ ). Las cromatografías en capa fina se han realizado sobre cromatofolios Merck de SiO<sub>2</sub> 60 F<sub>254</sub> (1.05554.0001). Las manchas se han visualizado con luz ultravioleta (254 nm) y se han revelado con KMnO<sub>4</sub> al 1% o revelador de ninhidrina.

Las disoluciones orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, antes de su filtración y posterior evaporación del disolvente al vacío.

En caso necesario, la purificación de los reactivos y disolventes utilizados en las reacciones se llevaron a cabo según los métodos descritos en la literatura.<sup>138</sup>

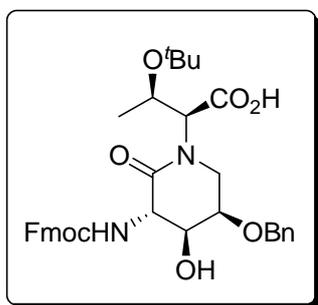
---

<sup>138</sup> Armarego, W.F.L.; Perrin, D.D.; Purification of laboratory chemicals, Butterworth Heinemann, 2000.

### 6.1.2. Síntesis y caracterización de los compuestos 2 a 29b.

La síntesis y caracterización de los compuestos preparados en este trabajo se encuentra a continuación siguiendo un orden estrictamente numérico con la finalidad de facilitar su localización.

#### (3*S*,4*S*,5*R*)-5-Benciloxi-*N*-[(1*S*,2*R*)-2-(*tert*-butoxi)-1-(carboxi)-propilamino]-3-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-4-hidroxipiperidin-2-ona. (2)



A una disolución de la lactama **18** (600 mg, 0,85 mmol) en MeOH (25 mL) se adiciona Pd/C al 10 % (100 mg). Se agita durante 3 h en presencia de un globo de hidrógeno. Es importante controlar bien la reacción para evitar la degradación del producto. Una vez ha desaparecido el producto de partida, se filtra sobre Celite® y se evapora el disolvente. Se obtiene el compuesto **2** de forma cuantitativa en forma de sólido blanco.

$[\alpha]_{\text{D}} = +1,8$  ( $c = 1,0$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

**IR** (NaCl): 3390 (OH), 1716 (CO), 1652 (CO).

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1,18 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1,25 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 3,86 (d,  $J = 13,2$ , 1H, H-6), 4,00 (m, 2H, H-4 y H-5), 4,10 (dd,  $J = 14$  y 3,6 Hz, 1H, H-6'), 4,23 (t,  $J = 7,2$  Hz, 1H, CH-Fmoc), 4,40 (m, 3H,  $\text{CHCH}_3$  y  $\text{CH}_2$ -Fmoc), 4,53 (t,  $J = 8$  Hz, 1H, H-3), 4,71 (dd,  $J = 12$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4,80 (d,  $J = 12$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}'$ ), 5,25 (d,  $J = 3,6$  Hz, 1H, NCH), 7,25-7,37 (m, 9H, Ph, H-2 y H-3 Fmoc), 7,60 (d, 7,6 Hz, 2H, H1-Fmoc), 7,74 (d,  $J = 7,6$  Hz, 2H, H4-Fmoc).

**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  20,1 ( $\text{CHCH}_3$ ), 28,9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 47,2 (C6, CH-Fmoc), 56,5 (C3), 61,5 (NCH), 67,9 ( $\text{CH}_2$ -Fmoc), 68,6 ( $\text{CHCH}_3$ ), 72 (C4), 72,5 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 73,9 (C5), 75,3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 120,1 (C4-Fmoc), 125,4 (C1-Fmoc), 127,3-128,8 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4, C2 y C3-Fmoc), 137,9 (Ph-C1), 141,5 (C5-Fmoc), 143,9 (C6-Fmoc), 158,4 (CO carbamato), 169,6 (CO), 172,69 (CO).

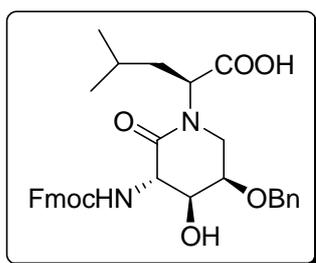
**CCF**:  $R_f = 0,61$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10 %).

**MALDI - TOF** (matriz ACH):  $(M + Na)^+ = 639,21$ ;  $(M + K)^+ = 655,18$ .

Análisis elemental calculada para  $C_{35}H_{40}N_2O_8$ : C, 68,17; H, 6,54; N, 4,54; O, 20,75.

Encontrada: C, 67,07; H, 6,55; N, 4,59; O, 21,79.

**(3*S*,4*S*,5*R*)-5-Benciloxi-3-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-4-hidroxi-*N*-[(1*S*)-3-metil-1-carboxibutil]-piperidin-2-ona. (3)**



Se disuelve la Fmoc-aminolactama protegida **29a** (460 mg, 0,73 mmol) en TFA/ $CH_2Cl_2$  1/1 (10 mL) y se agita la disolución hasta la completa desprotección del ácido carboxílico (24 horas). Se evapora y el residuo se tritura con  $Et_2O$  frío y finalmente se filtra para obtener el compuesto **3**

(80%) en forma de sólido gris.

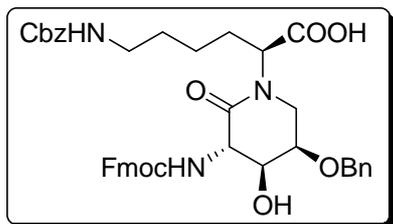
**$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  0,85 (d,  $J = 6,60$  Hz, 6H,  $CH(CH_3)_2$ ), 1,50-1,82 (m, 3H,  $CH(CH_3)_2$ ,  $CH_2$ ), 2,60 (sa, 3H, OH,  $NH_2$ ), 3,33 (dd,  $J = 13,1$  y 3,3 Hz, 1H, H-6), 3,40 (dd,  $J = 13,1$  y 3,3 Hz, 1H, H-6'), 3,86 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, OH-3), 3,72 (dd,  $J = 9,70$  y 0,8 Hz, 1H, H-3), 3,82 (dd,  $J = 9,90$  y 1,80 Hz, 1H, H-4), 4,08 (m, 1H, H-5), 4,69 (d,  $J = 12$  Hz, 1H,  $CH_2Ph$ ), 4,78 (d,  $J = 12$  Hz, 1H,  $CH_2Ph'$ ), 5,19 (dd,  $J = 9,70$  y 6,40 Hz, 1H, NCH), 7,31-7,35 (m, 5H,  $OCH_2Ph$ ).

**$^{13}C$ -RMN ( $CDCl_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  20,2 ( $CH(CH_3)_2$ ), 22,5 ( $CH(CH_3)_2'$ ), 24,0 ( $CH(CH_3)_2$ ), 36,6 ( $CH_2$ ), 43,5 (C6), 46,5 (CH-Fmoc), 55,7 (C3), 67,1 ( $CH_2$ -Fmoc), 69,9 (C5), 72,1 ( $CH_2Ph$ ), 74,5 (C4), 119,7 (C4-Fmoc), 125,2 (C1-Fmoc), 126,9-128,1 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4, C2 y C3-Fmoc), 138,4 (Ph-C1), 141,3 (C5-Fmoc), 144,2 (C6-Fmoc), 158,2 (CO carbamato), 170,0 (CO).

**ESI-MS**  $m/z$ : 573  $[M+H]^+$ .

**CCF:** Rf = 0- 0,05 (Hexano/AcOEt 1:1).

**(3*S*,4*S*,5*R*)-5-Benciloxi-*N*-[(1*S*)-6-(benciloxycarbonilamino)-1-carboxihexil]-3-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-4-hidroxipiperidin-2-ona. (4)**



Se disuelve la Fmoc-aminolactama protegida **29b** (260 mg, 0,36 mmol) en TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1/1 (12 mL) y se agita la disolución hasta la completa desprotección del ácido carboxílico (1 hora). Se realiza finalmente un lavado con éter frío (que se elimina por decantación).

Se obtiene el compuesto **4** (209 mg, 87 %) en forma de aceite amarillo brillante.

$[\alpha]_D = -40,7$  ( $c = 1,0$ ; CHCl<sub>3</sub>).

**IR** (NaCl): 3416 (OH), 1701 (CO), 1645 (CO).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  1,22-1,46 (m, 4H, CH<sub>2</sub> $\gamma$  y CH<sub>2</sub> $\delta$ ), 1,74-1,85 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 1,87-1,96 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta'$ ), 2,97 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 3,44 (sa, 2H, H-6), 4,03 (m, 1H, H-5), 4,08 (dd,  $J = 2$  y 10 Hz, 1H, H-4), 4,22 (t,  $J = 6,9$  Hz, 1H, CH-Fmoc), 4,31 (d,  $J = 7,0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4,35 (d,  $J = 10$  Hz, 1H, H-3), 4,70 (d,  $J = 11,8$  Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,73 (d,  $J = 11,9$  Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph'), 4,94 (m, 1H, NCH), 4,97 (d,  $J = 12,9$  Hz, 1H, NHCOOCH<sub>2</sub>Ph), 5,02 (d,  $J = 12,6$  Hz, 1H, NHCOOCH<sub>2</sub>Ph), 7,24-7,32 (m, 10H, Ph), 7,35-7,39 (m, 4 H, H-2 y H-3 Fmoc), 7,67 (d,  $J = 7,5$  Hz, 2H, H1-Fmoc), 7,77 (d,  $J = 7,5$  Hz, 2H, H4-Fmoc).

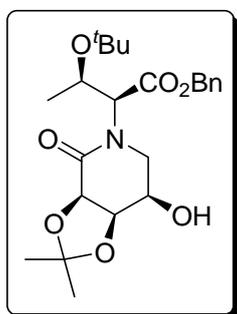
**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  22,8 (CH<sub>2</sub> $\gamma$ ), 27,4 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 29,1 (CH<sub>2</sub> $\delta$ ), 40,3 (NHCH<sub>2</sub>), 44,6 (C6), 47,1 (CH-Fmoc), 55,7 (C3), 56,7 (NCH), 66,1 (NHCOOCH<sub>2</sub>Ph), 67,1 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 69,8 (C4), 72,1 (OCH<sub>2</sub>Ph), 74,5 (C5), 119,7 (C4-Fmoc), 125,2 (C1-Fmoc), 127,0-128,2 (CH-Ph, C2-Fmoc y C3-Fmoc), 138,4 (Cipso-Ph), 141,3 (C5-Fmoc), 144,2 (C6-Fmoc), 157,6 (CO), 158,1 (CO), 170,0 (CO), 172,7 (CO).

**CCF:** R<sub>f</sub> = 0,00-0,08 (AcOEt/Hexano 1/1).

**MALDI - TOF** (matriz ACH): (M + H)<sup>+</sup> = 722,28; (M + Na)<sup>+</sup> = 744,25.

**Análisis elemental** calculado para C<sub>41</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>·3H<sub>2</sub>O: C, 63,47; H, 6,37; N, 5,42; O, 24,75. Encontrada: C, 63,42; H, 6,04; N, 5,33; O, 25,21.

**(3R,4R,5R)-N-[(1S,2R)-1-Benciloxycarbonil-2-(*tert*-butoxi)propilamino]-5-hidroxi-3,4-isopropilidendioxipiperidin-2-ona. (6)**



A una disolución de la amina **7** (3,49 g, 7,93 mmoles) en tolueno anhidro (125 mL), se adiciona 2-hidroxi-piridina (850 mg, 8,72 mmoles). Se agita a 95 °C durante 48 horas. Se evapora el disolvente y se cromatografía (AcOEt/hexano 4/6). Se obtiene la lactama **6** (2,80 g, 80 %) en forma de aceite.

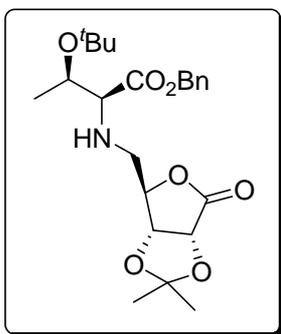
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 1,10 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,18 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 1,41 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,56 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 2,39 (d, 1H, OH), 3,65 (dd, *J* = 12,8 y 9,2 Hz, 1H, H-6), 3,78 (ddd, *J* = 13,2, 3,6 y 1,2 Hz, 1H, H-5), 4,06 (m, 1H, H-6'), 4,46 (qd, *J* = 6,4 y 3,2 Hz, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 4,54 (d, *J* = 7,4, 3,6 y 0,8 Hz, 1H, H-4), 4,60 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, H-3), 4,98 (d, *J* = 12 Hz, 1H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 5,26 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph'), 5,34 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, NCH), 7,3-7,4 (m, 5H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 20,4 (CHCH<sub>3</sub>), 24,4(O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26,2 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 28,9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 46,7 (C6), 60,94 (NCH), 66,4 (C5), 67,4 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 69,2 (CHCH<sub>3</sub>), 74,4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 74,7 (C4), 75,2 (C3), 110,9 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 128,8-128,9 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4), 135,3 (Ph-C1), 167,8 (CO), 169,7 (CO).

**CCF:** R<sub>f</sub> = 0,33 (Hexano/AcOEt 1:1).

**MALDI - TOF** (matriz ACH): (M + Na)<sup>+</sup> = 458,18.

**5-[(1*S*,2*R*)-1-Benciloxycarbonil-2-(*tert*-butoxi)propilamino]-5-desoxi-2,3-isopropilidendioxi- $\gamma$ -D-ribonolactona. (7)**



A una disolución de la sulfonamida **12** (7,11 g, 11,47 mmol) en DMF (100 mL) se adiciona  $K_2CO_3$  (4,75 g, 34,41 mmol) y a continuación feniltiol (1,29 mL, 12,62 mmol). Se agita durante 40 minutos a temperatura ambiente. Se extrae con  $Et_2O$ / $NaHCO_3$  5 %. Se seca, se evapora y se cromatografía ( $CH_2Cl_2$ ). Se obtiene el compuesto **7** (4,04 g, 81 %) en forma de aceite.

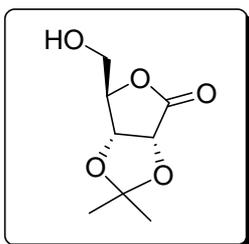
**$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  1,07 (s, 9H, C( $CH_3$ )), 1,20 (d,  $J=6,4$  Hz, 3H, CH $CH_3$ ), 1,38 (s, 3H,  $O_2C(CH_3)_2$ ), 1,47 (s, 3H,  $O_2C(CH_3)_2'$ ), 1,60 (sa, 1H, NH), 2,45 (dd,  $J = 13,8$  y 2,4 Hz, 1H, H-5), 3,12 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1H, NCH), 3,33 (dd,  $J = 13,8$  y 3,8 Hz, 1H, H-5'), 4,00 (qd,  $J = 6,2$  y 3 Hz, 1H, CH $CH_3$ ), 4,58 (sa, 1H, H-4), 4,63 (d,  $J = 5,8$  Hz, 1H, H-3), 4,89 (d,  $J = 6$  Hz, 1H, H-2), 5,05 (d,  $J_{AB} = 12,2$  Hz, 1H,  $CO_2CH_2Ph$ ), 5,18 (d,  $J_{AB} = 12,2$  Hz, 1H,  $CO_2CH_2Ph'$ ), 7,34-7,38 (m, 5H,  $CO_2CH_2Ph$ ).

**$^{13}C$ -RMN ( $CDCl_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  21,3 (CH $CH_3$ ), 25,8 ( $O_2C(CH_3)_2$ ), 27,0 ( $O_2C(CH_3)_2'$ ), 28,6 (C( $CH_3$ ) $_3$ ), 49,3 (C5), 67 ( $CO_2CH_2Ph$ ), 68,3 (CH $CH_3$ ), 68,8 (NCH), 74,1 (C( $CH_3$ ) $_3$ ), 75,8 (C2), 79,4 (C3), 83,4 (C4), 113,4 ( $O_2C(CH_3)_2$ ), 128,4-129,2 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4), 135,6 (Ph-C1), 173,0 (CO), 174,5 (CO).

**CCF:**  $R_f = 0,13$  ( $CH_2Cl_2$ ); 0,81 ( $CH_2Cl_2/MeOH$  5 %).

**MALDI - TOF** (matriz ACH):  $(M + Na)^+ = 458,20$ ;  $(M + K)^+ = 474,18$ .

### 2,3-isopropilendioxi-D-ribono-1,4-lactona (9)

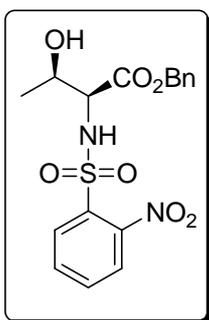


A una disolución de D- Ribosa (10 g, 67 mmoles) en agua (250 mL) se le añade carbonato de bario (19,7 g, 100 mmoles). La disolución se lleva a 0 °C y se le añade el bromo (3,4 mL, 74 mmoles) en tres intervalos de 20 minutos. Se agita esta disolución durante 1 hora a 0 °C y 24 h a temperatura ambiente. Se elimina el bromo excedente mediante corriente de aire sintético y se evapora el agua. El crudo resultante se extrae con acetona a reflujo hasta que se deje de observar producto en el crudo por CCF. Se concentran las fracciones que hemos extraído con acetona (hasta unos 250 mL) y se añaden 5 mL de HCl concentrado. Se agita durante 24 horas a temperatura ambiente y se neutraliza con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hasta pH 7-9. Se filtra, se evapora y se cromatografía con Hexano/ AcOEt (1:1). El rendimiento global de este proceso es del 40 %.

<sup>1</sup>H-RMN: 1,39 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,48 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 3,82 (dd, *J* = 12,4 y 1,6 Hz, 1H, H-5), 3,99 (dd, *J* = 12,4 y 1,6 Hz, 1H, H-5'), 4,64 (t, *J* = 2Hz, 1H, H-2), 4,79 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H, H-3), 4,84 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H, H-4).

CCF: R<sub>f</sub> = 0,21 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 10 %).

### Éster benzílico de la *N*-(*o*-nitrobencensulfonil)-L-treonina. (10)



A una disolución de la sal oxálica del ester benzílico de la L-Treonina (5 g, 24,04 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL), se adiciona Et<sub>3</sub>N (10 mL, 72,12 mmol). Se enfría mediante un baño de hielo y a continuación se adiciona *o*-NsCl (6,12 g, 27,64 mmol) lentamente. Se agita a temperatura ambiente durante 8 horas. Se extrae con HCl 0,1N y disolución acuosa saturada de NaCl. Se seca, se filtra y se evapora para obtener **10** (6,39, 97 %) en forma de aceite.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,34 (d, *J* = Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 1,94 (sa, 1H, OH), (dd, *J* = 2,8 y 9,2 Hz, 1H, NCH), 4,36 (qd, *J* = 2,8 y 6,4 Hz, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 4,91 (d, *J* = Hz, 1H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 4,96 (d, *J* = Hz, 1H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph'), 6,39 (d, 1H, NH), 7,13-7,16 (m, 2H,

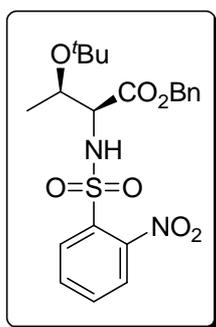
Bn-H2, Bn-H6, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 7,26-7,33 (m, 3H, Bn-H3, Bn-H4, Bn-H5 CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 7,58-7,62 (m, 2H, Ns-H4, Ns-H5), 7,76 (dd,  $J = \text{Hz}$ , 1H, Ns-H6), 7,98 (dd,  $J = \text{Hz}$ , 1H, Ns-H3).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  20,2 (CHCH<sub>3</sub>), 62,2 (NCH), 67,8 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 68,6 (CHCH<sub>3</sub>), 125,8 (Ns-C3), 128,5-128,8 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4), 130,37 (Ns-C6), 132,97 y 133,7 (Ns-C4, Ns-C5), 134,4 (Ns-C1)-134,87 (Ph-C1), 147,69 (Ns-C2), 169,89 (CO).

CCF: R<sub>f</sub> = 0,16 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 1 %).

MALDI - TOF (matriz ACH): (M + Na)<sup>+</sup> = 417,06.

### Éster bencílico de la *N*-(*o*-nitrobencensulfonil)-*O*-*tert*-butil-L-treonina. (11)



A una disolución de la sulfonamida **10** (11,28 g, 28,63 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ hexano 1/1 (200 mL), se adiciona TBTA (12,483 g, 57,26 mmol) y a continuación CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H (un par de gotas). Se agita a temperatura ambiente y cada 24 horas se adiciona un equivalente más de TBTA hasta que no quede producto de partida, en total 5 días (7 equivalentes). Se neutraliza el medio ácido con NaHCO<sub>3</sub> sólido. Se filtra (lavando varias veces el sólido con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ hexano 1/1 hasta que solo se vea un sólido blanco cristalino, correspondiente al residuo del TBTA que ha reaccionado y al exceso de NaHCO<sub>3</sub>). Los filtrados se evaporan y el crudo resultante se cromatografía (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 1 %). Se obtiene **11** (7,73 g, 60 %) en forma de aceite.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  1,07 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,29 (d,  $J = 6 \text{ Hz}$ , 3H, CHCH<sub>3</sub>), 4,11 (sa,  $J = 7,8 \text{ Hz}$ , 1H, NCH), 4,22 (qd,  $J = 6,3 \text{ y } 2,1 \text{ Hz}$ ), 4,71 (d,  $J_{AB} = 12,4 \text{ Hz}$ , 1H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 4,99 (d,  $J_{AB} = 12 \text{ Hz}$ , 1H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph'), 6,36 (sa, 1H, NH), 7,1-7,4 (m, 5H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 7,53-7,60 (m, 2H, Ns-H4, Ns-H5), 7,72 (dd,  $J = 7,6 \text{ y } 1,60 \text{ Hz}$ , 1H, Ns-H6), 7,93 (dd,  $J = 7,2 \text{ y } 2 \text{ Hz}$ , 1H, Ns-H3).

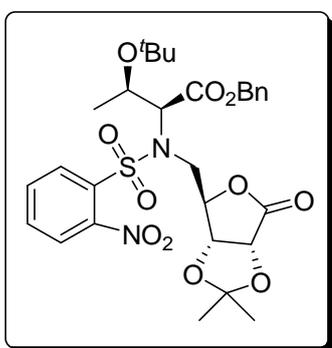
<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  21,1(CHCH<sub>3</sub>), 28,5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 63,1 (NCH), 67,5 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 68,1 (CHCH<sub>3</sub>), 74,5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 125,6 (Ns-C3), 128,5-128,7 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4), 130,1

(Ns-C6), 132,7-133,3 (Ns-C4, Ns-C5), 134,9-135 (Ns-C1, Ph-C1), 147,7 (Ns-C2) 170 (CO).

CCF: Rf = 0,8 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 1 %).

MALDI - TOF (matriz ACH): (M + Na)<sup>+</sup> = 473,12.

**5-[(1S,2R)-1-Benciloxycarbonil-2-(*tert*-butoxi)propil-(*o*-nitrobenzensulfonil)amino]-5-desoxi-2,3-isopropilidendioxi- $\gamma$ -D-ribonolactona. (12)**



A una disolución de la sulfonamida **11** (11,8 g, 26,22 mmoles), en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (150 mL), se adiciona trifetilfosfina (10,3 g, 39,33 mmoles) y la 2,3-*O*-isopropiliden- $\gamma$ -D-ribonolactona **69** (7,40 g, 39,33 mmoles). Se enfría la disolución resultante mediante un baño de hielo, adicionando a continuación DEAD (6,8 mL, 39,33 mmoles) gota a gota. Se agita a temperatura ambiente

durante 24 horas. A continuación se evapora el disolvente y se resuspende con éter frío. El sólido precipitado que se obtiene (que contiene el producto deseado) se lava con éter dietílico, filtrando al vacío hasta que no se vean impurezas en el sólido por capa fina. Se obtiene **12** (14,50 g, 85%) en forma de sólido polvoriento blanco.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  1,09 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)), 1,18 (d,  $J$  = 6,4 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 1,39 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,49 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,86 (dd,  $J$  = 15,8 y 7,2 Hz, 1H, H-5), 3,93 (dd,  $J$  = 16 y 7,2 Hz, 1H, H-5'), 4,47 (qd,  $J$  = 6,4 y 2,8 Hz, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 4,56 (d,  $J$  = 2,8 Hz, 1H, NCH), 4,84 (d,  $J$  = 5,6 Hz, 1H, H-2), 4,91 (sa, 1H, H-3), 4,94 (d,  $J_{AB}$  = 12 Hz, 1H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 5,17 (d,  $J_{AB}$  = 12 Hz, 1H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph'), 5,24 (t,  $J$  = 7,2 Hz, 1H, H-4), 7,3-7,4 (m, 5H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 7,5 (d,  $J$  = 7,2 Hz, 1H, Ns-H-6), 7,6-7,7 (m, 2H, Ns-4, Ns-5), 7,97 (d,  $J$  = 6,4 Hz, 1H, Ns-H3).

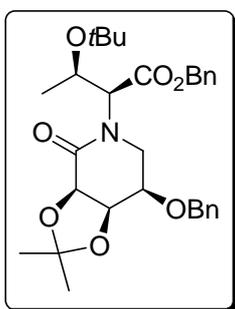
<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  20,5 (CHCH<sub>3</sub>), 25,9 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 27,0 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 28,7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 49,5 (C5), 65,9 (NCH), 67,9 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 69,0 (CHCH<sub>3</sub>), 74,6 (C2), 75,4 (C3), 78,0 (C4), 80,4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 113,9 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 124,3 (Ns-C3), 128,8-129,1

(Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4), 131,6- 134,3 (Ns-C1, Ns-C4, Ns-C5, Ns-C6), 134,9 (Ph-C1), 148,2 (Ns-C2), 169,5 (CO), 174,2 (CO).

CCF: Rf = 0,69 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 1 %).

MALDI - TOF (matriz ACH): (M + Na)<sup>+</sup> = 643,17.

**(3R,4R,5R)-5-Benciloxi-N-[(1S,2R)-1-benciloxycarbonil-2-(*tert*-butoxi)propilamino]-3,4-isopropilidendioxipiperidin-2-ona. (13)**



A una disolución de la 3-aminolactama **6** (3,08 g, 7,08 mmoles) en DMF (30 mL) se adiciona bromuro de benzilo (1,85 mL, 15,58 mmoles). A continuación se añade NaH (187 mg, 7,78 mmoles) en pequeñas porciones, manteniendo la temperatura de la disolución con un baño de agua. Se añaden 0,3 equivalentes adicionales de NaH (51 mg, 2,12 mmoles) y otros 0,6 de bromuro de benzilo (0,5 mL, 4,25 mmoles) tras 3 horas al comprobar que queda producto de partida sin reaccionar. Se deja agitar a temperatura ambiente una vez estabilizada la temperatura durante 24 horas. Se extrae con Et<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O. Se seca, se filtra y se evapora el disolvente. El crudo se cromatografía (AcOEt/hexano 3/7) para obtener **13** (2,53 g, 68 %) en forma de aceite.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +20,4 (c = 1,0; CHCl<sub>3</sub>).

IR (NaCl): 1741 (CO), 1664 (CO).

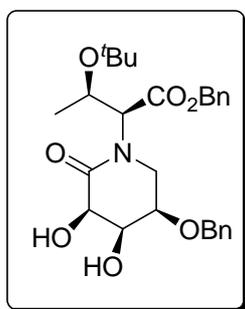
<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  1,11 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,18 (d,  $J$  = 6,4 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 1,39 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,54 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 3,70 (dd,  $J$  = 12,4 y 10 Hz, 1H, H-6), 3,85 (dt<sub>ap</sub>,  $J$  = 10 hz y 3,3 hz, 1H, H-5), 3,97 (ddd,  $J$  = 12,6, 4,15 y 1,5 Hz, 1H, H-6'), 4,46 (qd,  $J$  = 9,6 y 3,2 Hz, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 4,5 (d,  $J$  = 6,8, 1H, H-3), 4,57 (ddd,  $J$  = 6,8, 4 y 1,6 Hz, 1H, H-4), 4,55 (d,  $J$  = 12 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,67 (d,  $J$  = 12 hz, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph'), 4,96 (d,  $J$  = 12 Hz, 1H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 5,25 (d,  $J$  = 12 Hz, 1H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph'), 5,34 (d,  $J$  = 3,2 hz, 1H, NCH), 7,3-7,4 (m, 5H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 7,3-7,4 (m, 5H, OCH<sub>2</sub>Ph).

**$^{13}\text{C}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  20,5 (CHCH<sub>3</sub>), 24,7(O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26,7 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 29 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 43,4 (C6), 60,9 (NCH), 67,3 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 69,0 (CHCH<sub>3</sub>), 71,9 (OCH<sub>2</sub>Ph), 73,3 (C5), 74,4 (C4), 75,5 (C3), 111,2 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 128,1-128,9 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4), 135,3 (Ph-C1), 138 (Ph-C1), 168,2 (CO), 169,7 (CO).

CCF: Rf = 0,55 (Hexano/AcOEt 1:1).

MALDI - TOF (matriz ACH): (M + Na)<sup>+</sup> = 548,22; (M + K)<sup>+</sup> = 564,20.

**(3R,4R,5R)-5-Benciloxi-N-[(1S,2R)-1-Benciloxicarbonil-2-(tert-butoxi)propilamino]-3,4-dioxipiperidin-2-ona. (14)**



A una disolución de la lactama **13** (3050 mg, 5,81 mmoles) en MeOH (200 mL), se adiciona PPTS (1531 mg, 6,1 mmoles). Se refluje a 65 °C durante 24 horas. Se evapora el disolvente y se cromatografía (AcOEt/ hexano 2/8). Se obtiene **14** (1792 mg, 58 %) en forma de aceite.

$[\alpha]_{\text{D}} = +46,7$  (c= 1,0; CHCl<sub>3</sub>).

IR (NaCl): 3447 (OH), 1742 (CO), 1646 (CO).

**$^1\text{H}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  1,11 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,21 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 2,72 (s, 1H, OH-4), 3,63 (s, 1H, OH-3) 3,84 (dt,  $J = 7,2, 6,8$  y 2,4 Hz, 1H, H-5), 3,94 (d,  $J = 7,2$  Hz, 2H, H-6), 3,99 (dd,  $J = 2,8$  y 1,6 Hz, 1H, H-3), 4,43 (m, 1H, H-4), 4,46 (qd,  $J = 6,4$  y 4 Hz, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 4,59 (d,  $J_{\text{AB}} = 12$  Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,66 (d,  $J_{\text{AB}} = 12$  Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph'), 4,95 (d,  $J = 12,4$  Hz, 1H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 5,23 (d,  $J = 4$  Hz, 1H, NCH), 5,29 (d,  $J = 12$  Hz, 1H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph'), 7,3-7,4 (m, 5H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 7,3-7,4 (m, 5H, OCH<sub>2</sub>Ph).

**$^{13}\text{C}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  20,3 (CHCH<sub>3</sub>), 28,9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 46,7 (C6), 61,7 (NCH), 67,2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 68 (C-4), 68,7 (CHCH<sub>3</sub>), 69,7 (C-3), 71,5 (OCH<sub>2</sub>Ph), 71,9 (C5),

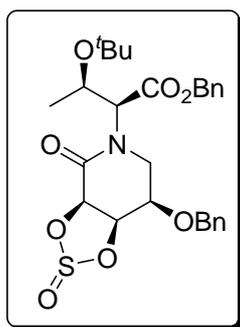
74,4 ( $C(CH_3)_3$ ), 127,8-129,4 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4), 135,3 (Ph-C1), 137,6 (Ph-C1), 169,5 (CO), 171,7 (CO).

CCF:  $R_f = 0,19$  (Hexano/AcOEt 1:1).

MALDI - TOF (matriz ACH):  $(M + Na)^+ = 508,19$ ;  $(M + K)^+ = 524,16$ .

**Análisis elemental** calculado para  $C_{27}H_{35}NO_7$ : C, 66,79; H, 7,27; N, 2,88; O, 23,06.  
Encontrada: C, 66,43; H, 6,80; N, 2,66; O, 26,11.

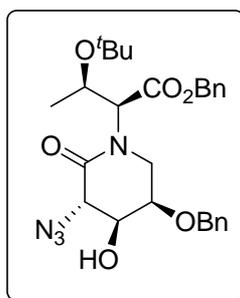
**(3*R*,4*R*,5*R*)-5-Benziloxi-*N*-[(1*S*,2*R*)-1-Benziloxicarbonil-2-(*tert*-butoxi)propilamino]-3,4-sulfinildioxipiperidin-2-ona. (15)**



A una disolución de la lactama **14** (390 mg, 0,80 mmol) en THF anhidro (5 mL), se adiciona  $Et_3N$  (476  $\mu$ l, 3,42 mmol) y se lleva a 0°C. Se adiciona  $SOCl_2$  (205  $\mu$ l, 2,8 mmol) gota a gota. Se agita durante una hora. Se evapora el disolvente y el crudo se disuelve en  $CH_2Cl_2$  y se extrae con agua. Se seca, se filtra y se evapora para obtener de forma cuantitativa la mezcla diastereomérica **15**, que no se separa por cromatografía en columna.

CCF:  $R_f = 0,71$  y 0,83 (Hexano/AcOEt 1:1);  $R_f = 0,21$  y 0,23 (Hexano/AcOEt 7:3).

**(3*S*,4*S*,5*R*)-3-Azido-5-Benziloxi-*N*-[(1*S*,2*R*)-1-benciloxicarbonil-2-(*tert*-butoxi)propilamino]-4-hidroxipiperidin-2-ona. (16)**



A una disolución de la mezcla diastereomérica de sulfitos **15** (2,06 g, 3,9 mmoles) en DMF (10 mL), se adiciona  $NaN_3$  (759 mg, 11,67 mmoles). Se agita a temperatura ambiente durante 7 días. Se extrae con  $Et_2O/H_2O$ . Se seca, se filtra y se evapora. Se purifica por cromatografía en columna (Hexano/AcOEt 7:3). Se obtiene la azida **16** (1,75 g, 81 %) en forma de aceite.

$[\alpha]_D = -21,2$  ( $c = 1,0$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

**IR (NaCl):** 3500 (OH), 2112 ( $\text{N}_3$ ), 1744 (CO), 1656 (CO).

**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  1,12 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1,20 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 3,8 (ddd,  $J = 8,8, 6,4$  y  $2,8$  Hz, 1H, H-5), 3,85 (dd,  $J = 14,4$  y  $2,4$  Hz, 1H, H-6), 3,95 (dd,  $J = 6,4$  y  $2,8$  Hz, 1H, H-4), 4,31 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H, H-3), 4,35 (dd,  $J = 14,4$  y  $4$  Hz, 1H, H-6'), 4,49 (qd,  $J = 6,4$  y  $3,6$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 4,56 (d,  $J_{\text{AB}} = 11,6$ , 1H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4,81 (d,  $J_{\text{AB}} = 12$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}'$ ), 4,99 (d,  $J_{\text{AB}} = 12$  Hz, 1H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5,25 (d,  $J_{\text{AB}} = 11,2$ , 1H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}'$ ), 5,31 (d,  $J = 3,2$  Hz, 1H, NCH), 7,3-7,4 (m, 5H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 7,3-7,4 (m, 5H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ).

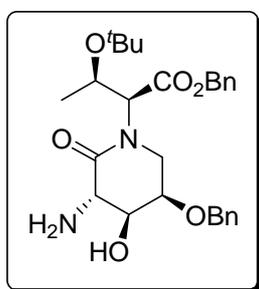
**$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  20,3 ( $\text{CHCH}_3$ ), 28,9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 46,1 (C6), 61,3 (NCH), 63,9 (C-3), 67,4 ( $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 69,4 ( $\text{CHCH}_3$ ), 70,9 (C-5), 71,8 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 73,6 (C-4), 74,7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 127,9-128,9 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4), 135,2 (Ph-C1), 137,5 (Ph-C1), 168,6 (CO), 169,4 (CO).

**CCF:**  $R_f = 0,34$  (Hexano/AcOEt 7:3).

**MALDI - TOF** (matriz ACH):  $(M + \text{Na})^+ = 533,2185$ .

**Análisis elemental** calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6$ : C, 63,51; H, 6,71; N, 10,97; O, 18,80. Encontrada: C, 66,13; H, 7,18; N, 9,11; O, 17,58.

**(3*S*,4*S*,5*R*)-3-Amino-5-Benciloxi-*N*-[(1*S*,2*R*)-1-Benciloxicarbonil-2-(*tert*-butoxi)propilamino]-4-hidroxipiperidin-2-ona. (17)**



A una disolución de la azida **16** (543 mg, 1,06 mmol) en EtOH (20 mL), se adiciona catalizador de Lindlar (181 mg). Se agita a temperatura ambiente en atmósfera de hidrógeno (globo) durante 12 horas. Se filtra sobre Celite<sup>®</sup> y se evapora el disolvente. Se obtiene la amina **17** cuantitativamente en forma de aceite.

$[\alpha]_D = +7,8$  ( $c = 1,0$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  1,12 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1,16 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 3,74-3,82 (sa, 2H, H-5 y H-3), 3,86 (dd,  $J = 14,2$  y  $3,2$  Hz, 1H, H-6), 4 (dd,  $J = 6,8$  y  $3,2$ , 1H, H-4), 4,25 (dd,  $J = 14$  y  $4$  Hz, 1H, H-6'), 4,47 (qd,  $J = 18$  y  $4,4$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 4,63 (d,  $J = 12$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4,81 (d,  $J = 12$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}'$ ), 4,97 (d,  $J = 12$  Hz, 1H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5,27 (d,  $J = 12$  Hz, 1H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}'$ ), 5,31 (d,  $J = 3,6$  Hz, 1H, NCH), 7,3-7,4 (m, 5H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 7,3-7,4 (m, 5H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ).

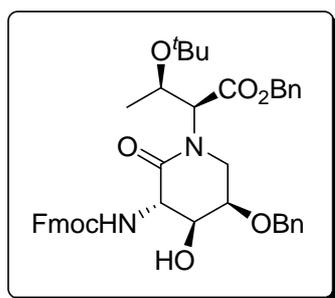
**$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  20,2 ( $\text{CHCH}_3$ ), 28,9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 46,9 ( $\text{C}_6$ ), 55,3 ( $\text{C}_5$ ), 61,3 (NCH), 67,2 ( $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 69,2 ( $\text{CHCH}_3$ ), 71,9 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 72 ( $\text{C}_3$ ), 73,9 ( $\text{C}_4$ ), 74,5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 127-128,8 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4), 135,4 (Ph-C1), 138,2 (Ph-C1), 170 (CO), 172,3 (CO).

**CCF:** Rf = 0,00-0,05 ( $\text{NH}_3^+$ , Hexano/AcOEt 1:1).

**MALDI - TOF** (matriz ACH): ( $\text{M} + \text{Na}$ ) $^+$  = 507,21; ( $\text{M} + \text{K}$ ) $^+$  = 523,18.

**Análisis elemental** calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ : C, 60.21; H, 7.86; N, 5.20; O, 26.73. Encontrada: C, 60,67; H, 6,31; N, 4,85; O, 28,17.

**(3*S*,4*S*,5*R*)-5-Benciloxi-N-[(1*S*,2*R*)-1-benciloxicarbonil-2-(*tert*-butoxi)propilamino]- 3-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-4-hidroxipiperidin-2-ona. (18)**



A una disolución de la amina **17** (515 mg, 1,06 Mmol) en acetona/ agua 1/1 (40 mL), se adiciona FmocOSu (361 mg, 1,06 mmol) y a continuación  $\text{NaHCO}_3$  (89 mg, 1,06 mmol). Se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y disolución acuosa saturada de NaCl. Se cromatografía (AcOEt/ hexano 4/1) para obtener **18** (680

mg, 90 %) en forma de sólido blanco.

**IR** (NaCl): 3397 (OH), 1740 (CO), 1653 (CO).

**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  1,14 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1,18 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 4,18 (dd,  $J = 14$  y  $2,8$  Hz, 1H, H-6), 4 (m, 2H, H-4 y H-5), 4,18 (dd,  $J = 14$  y  $3,6$  Hz, 1H, H-6'), 4,24 (t,  $J = 7,2$  Hz, 1H, CH-Fmoc), 4,43 (d,  $J = 6,8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 4,47 (qd,  $J =$ , 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 4,57 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H, H-3), 4,71 (d,  $J = 12$  Hz,

$^1\text{H}$ ,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4,78 (d,  $J = 12$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}'$ ), 4,99 (d,  $J = 12$  Hz, 1H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5,24-5,27 (m, 2H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}'$  y  $\text{NHCH}$ ), 5,82 (sa, 1H,  $\text{NH}$ ), 7,3-7,4 (m, 14H, Ph, H-2 y H-3 Fmoc), 7,60 (d,  $J = 7,2$  Hz, 2H, H1-Fmoc), 7,75 (d,  $J = 7,6$  Hz, 2H, H4-Fmoc).

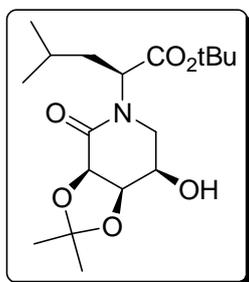
$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  20,3 ( $\text{CHCH}_3$ ), 29 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 47,1 ( $\text{C}_6$ ), 47,3 ( $\text{CH}$ -Fmoc), 56,4 ( $\text{C}-3$ ), 61,8 ( $\text{NHCH}$ ), 67,4 ( $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 67,9 ( $\text{CH}_2$ -Fmoc), 69,1 ( $\text{CHCH}_3$ ), 72,4 y 74 ( $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_5$ ), 72,4 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 74,6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 120,2 ( $\text{C}_4$ -Fmoc), 125,4 ( $\text{C}_1$ -Fmoc), 127,3-128,9 (Ph- $\text{C}_2$ , Ph- $\text{C}_3$ , Ph- $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_2$  y  $\text{C}_3$ -Fmoc), 135,2 (Ph- $\text{C}_1$ ), 141,5 ( $\text{C}_5$ -Fmoc), 143,9 ( $\text{C}_6$ -Fmoc), 169,2 (CO), 169,5 (CO).

CCF:  $R_f = 0,55$  (Hexano/AcOEt 1:1);  $R_f = 0,05$  (Hexano/AcOEt 8:2).

MALDI – TOF (matriz ACH):  $(\text{M} + \text{Na})^+ = 729,30$ ;  $(\text{M} + \text{K})^+ = 745,27$ .

Análisis elemental calculado para  $\text{C}_{42}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_8$ : C, 71,37; H, 6,56; N, 3,96; O, 18,11. Encontrada: C, 71,11; H, 6,45; N, 3,91; O, 18,53.

**(3*R*,4*R*,5*R*)-5-hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-*N*-[(1*S*)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butil]-piperidin-2-ona.(20a)**



A una disolución de la lactona **3** ( 2,8 g, 7,89 mmoles) en MeOH (75 mL), se adiciona acetato de sodio anhidro (3,2 g, 39,43 mmol) y se refluje durante 12 horas. El crudo resultante se filtra y se evapora el disolvente. La purificación se realiza mediante cromatografía en columna (AcOEt/hexano 1/1). Se obtiene la lactama **4** (2,33 g, 83 %) en forma de aceite.

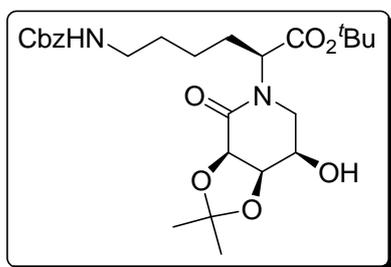
$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  0,95 (dd,  $J = 4,1$  y  $6,5$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  y  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2'$ ), 1,41 (s, 3H,  $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,45 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1,51 (s, 3H,  $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,54-1,73 (m, 3H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2,36 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H, OH), 3,24 (ddd,  $J = 12$ ; 4,1 y 0,9 Hz, 1H, H6), 3,34 (dd,  $J = 9,1$  y  $12$  Hz, 1H, H-6'), 4,12 (m, 1H, H-5), 4,55 (dd,  $J = 7,3$  y  $3,7$ , 1H, 1H, H-4), 4,57 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H, H-3), 5,19 (dd,  $J = 10,3$  y  $5,2$  Hz, 1H,  $\text{NCH}$ ).

**$^{13}\text{C}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  21,6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23,5 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 24,4 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25,2 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26,2 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 28,3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 38,0 (CH<sub>2</sub>), 44,0 (C<sub>6</sub>), 54,9 (NCH), 66,2 (C<sub>5</sub>), 74,6 (C<sub>4</sub>), 75,3 (C<sub>3</sub>), 82,2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 111,0 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 166,7 (CO), 170,8 (CO).

**ESI-MS  $m/z$ :** 302, 358 [M+H]<sup>+</sup>, 715 [2M+H]<sup>+</sup>.

**CCF:** R<sub>f</sub> = 0,43 (Hexano/AcOEt 1:1).

**(3R,4R,5R)- N-[(1S)-5-(benciloxycarbonilamino)-1-(tert-butoxicarbonil)pentil]-5-hidroxi-3,4-isopropilidendioxipiperidin-2-ona. (20b)**



A una disolución de la lactama **21b** ( 2,04 g, 5,04 mmoles) en MeOH (100 mL) se adiciona acetato de sodio anhidro (2,06 g, 25,19 mmoles). Se agita a reflujo durante 48 horas. Se evapora el disolvente. Se obtiene la lactama **20b** ( 1,74 g, 85 %) en forma de aceite.

**$[\alpha]_D$**  = + 14 (c= 1,0; CHCl<sub>3</sub>).

**IR (NaCl):** 3349 (OH), 1726 (CO), 1657 (CO), 1652 (CO).

**$^1\text{H}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  1,36-1,42 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\gamma$ ), 1,38 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,48 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 1,51-1,62 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\delta$ ), 1,68-1,72 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 1,92-1,95 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$ '), 2,41 (d,  $J$  = 6,2 Hz, 1H, OH), 3,18 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3,25 (dd,  $J$  = 12,6 y 3,3 Hz, 1H, H-6), 3,78 (dd,  $J$  = 12,5 y 8 Hz, 1H, H-6'), 4,10 (m, 1H, H-5), 4,53 (dd,  $J$  = 7,6 y 3,9, 1H, H-4), 4,60 (d,  $J$  = 7,6 Hz, 1H, H-3), 5,08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 5,14 (dd,  $J$  = 11,2 y 4,5 Hz, 1H, NCH), 7,34 (m, 5H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph).

**$^{13}\text{C}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  23,0 (CH<sub>2</sub> $\gamma$ ), 24,2 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26,1 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 28,3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28,4 y 29,1 (CH<sub>2</sub> $\beta$ , CH<sub>2</sub> $\delta$ ), 40,9 (NHCH<sub>2</sub>), 43,9 (C<sub>6</sub>), 56,0 (NCH), 65,4 (C<sub>5</sub>), 66,8 (CH<sub>2</sub>Ph carbamato), 74,5 (C<sub>4</sub>), 74,7 (C<sub>3</sub>), 82,4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 111,0

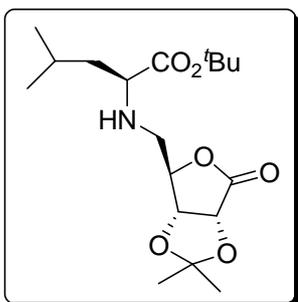
(O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 128,3-128,7 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4), 136,9 (Ph-C1), 156,6 (CO), 167,1 (CO), 170,3 (CO)

CCF: R<sub>f</sub> = 0,10 (AcOEt/Hexano 1/1), 0,56 (AcOEt).

ESI-MS *m/z*: 451, 529 [M+Na]<sup>+</sup>, 1035 [2H + Na]<sup>+</sup>.

**Análisis elemental** calculado para C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>·H<sub>2</sub>O: C, 59.53; H, 7.69; N, 5.34; O, 27.45. Encontrada: C, 59,29; H, 7,54; N, 5,77, O, 27,4.

**5-Desoxi-2,3-isopropilidendioxi-5-[(1S)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butilamino]- $\gamma$ -D-ribonolactona. (21a)**



A una disolución de la sulfonamida **23a** ( 4,15 g, 7,65 mmol) en DMF (80 mL) se adiciona K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,17 g, 22,97 mmol) y a continuación feniltiol (0,86 mL, 8,42 mmol). Se agita durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se extrae con Et<sub>2</sub>O/NaHCO<sub>3</sub> 5 %. Se seca, se evapora y se cromatografía (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Se obtiene el compuesto **21a** (1,92 g, 71 %) en

forma de aceite.

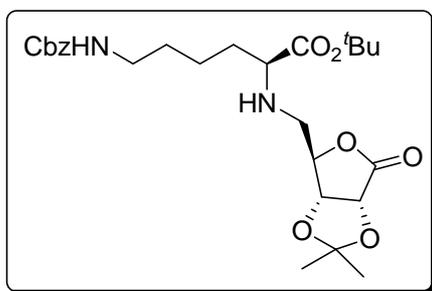
<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  0,90 (d, J = 6,6 Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,93 (d, J = 6,6 Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 1,36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,39 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,46 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,47 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 1,68 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,50 (dd, J = 13,6 y 1,9 Hz, 1H, H-5), 3,06 (dd, J = 8,0 Hz y 6,6 Hz, 1H, NCH), 3,25 (dd, J = 13,6 y 3,5 Hz, 1H, H-5'), 4,60 (dd, J = 3,2 y 2,2 Hz, 1H, H-4), 4,64 (d, J = 5,8 Hz, 1H, H-3), 4,82 (d, J = 5,8 Hz, 1H, H-2).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  22,1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23,0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 25,1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25,7 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26,9 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 28,3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 42,8 (CH<sub>2</sub>), 48,6 (C5), 61,9 (NCH), 75,9 (C2), 79,7 (C3), 81,6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 83,1 (C4), 113,3 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 174,4 (CO), 174,6 (CO).

ESI-MS *m/z*: 302, 358 [M+H]<sup>+</sup>, 715 [2M+H]<sup>+</sup>.

CCF: Rf = 0,82 (AcOEt/ hexano 1/1).

**5-[(1S)- 5-(benciloxycarbonilamino)-1-(*tert*-butoxicarbonil) pentilamino]-5-desoxi-2,3-isopropilidendioxi- $\gamma$ -D-ribonolactona. (21b)**



A una disolución de la sulfonamida **23b** ( 3,13 g, 5,77 mmol) en DMF (60 mL) se adiciona  $K_2CO_3$  ( 2,39 g, 17,32 mmol) y a continuación feniltiol (0,65 mL, 6,35 mmol). Se agita durante 55 minutos a temperatura ambiente. Se extrae con  $Et_2O$ /  $NaHCO_3$  5 %. Se seca, se evapora y se

cromatografía (Hexano/AcOEt 9/1 hasta la salida de los compuestos tiolados; Hexano/AcOEt 8/2 a continuación). Se obtiene el compuesto **21b** ( 2,04 g, 87%) en forma de aceite.

$[\alpha]_D = -12,5$  (c= 1,0;  $CHCl_3$ ).

IR (NaCl): 3346 (NH), 1784 (CO), 1722 (CO).

$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1,29-1,37 (m, 2H,  $CH_{2\gamma}$ ), 1,36 (s, 3H,  $O_2C(CH_3)_2$ ), 1,45 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ), 1,47 (s, 3H,  $O_2C(CH_3)_2'$ ), 1,49-1,61 (m, 4H,  $CH_{2\beta}$  y  $CH_{2\delta}$ ), 2,51 (dd,  $J = 13,4$  y  $1,4$  Hz, 1H, H-5), 3,00 (t,  $J = 6,64$  Hz, 1H, NCH), 3,16-3,22 (m, 3H, H-5' y  $NHCH_2$ ), 4,58 (dd,  $J = 3,3$  y  $2,4$  Hz, 1H, H-4), 4,63 (d,  $J = 5,8$  Hz, 1H, H-3), 4,82 (d,  $J = 5,8$  Hz, 1H, H-2), 5,09 (s, 2H,  $CH_2Ph$ ), 7,31-7,36 (m, 5H,  $CH_2Ph$ ).

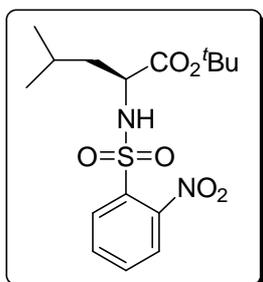
$^{13}C$ -RMN ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  23,3 ( $CH_{2\gamma}$ ), 25,8 ( $O_2C(CH_3)_2$ ), 27,0 ( $O_2C(CH_3)_2'$ ), 28,3 ( $C(CH_3)_3$ ), 29,9 ( $CH_{2\delta}$ ), 33,3 ( $CH_{2\beta}$ ), 41,0 (NCH<sub>2</sub>) 48,6 (C5), 63,3 (NCH), 66,9 ( $CH_2Ph$ ), 75,9 (C2), 79,5 (C3), 81,8 ( $C(CH_3)_3$ ), 83,1 (C4), 113,4 ( $O_2C(CH_3)_2$ ), 128,3-128,7 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4), 136,8 (Ph-C1), 156,6 (CO), 173,8 (CO), 174,6 (CO).

CCF: Rf = 0,69 (AcOEt/hexano 1/1)

ESI-MS  $m/z$ : 451, 507  $[M+H]^+$ , 539  $[M+NH_4]^+$ .

**Análisis elemental** calculado para  $C_{26}H_{38}N_2O_8 \cdot H_2O$ : C, 59.53; H, 7.69; N, 5.34; O, 27.45. Encontrada: C, 59,54 ; H, 7,55; N, 5,70; O, 27,21.

**Éster *tert*-butílico de la *N*-(*o*-nitrobencensulfonil)-L-leucina. (22a)**



A una disolución del éster *tert*-butílico de la L-leucina (22,9 g, 102,29 mmol) en  $CH_2Cl_2$  (200 mL), se adiciona  $Et_3N$  (42,7 mL, 306,87 mmol). Se enfría a 0 °C mediante un baño de hielo y a continuación se adiciona *o*-NsCl (29,52 g, 133 mmol) lentamente. Se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Se lava la fase orgánica con HCl 0,1N y disolución acuosa saturada de NaCl. Se seca, se filtra y se evapora para obtener **22a** (42,77 g, 86 %) en forma de aceite.

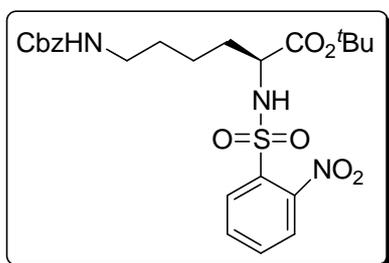
**$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  0,96 (d,  $J = 1,9$  Hz, 3H,  $CH(CH_3)_2$ ), 0,97 (d,  $J = 1,8$  Hz, 3H,  $CH(CH_3)_2'$ ) 1,19 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ), 1,53-1,58 (m, 2H,  $CH_2$ ), 1,84-1,91 (m, 1H,  $CH(CH_3)_2$ ), 4,08 (ddd,  $J = 9,7$ ; 9 y 5,9 Hz, 1H, NCH), 6 (d,  $J = 9,9$  Hz, 1H, NH), 7,71-7,73 (m, 2H, Ns-H4, Ns-H5), 7,91-7,94 (m, 1H, Ns-H6), 8,08-8,10 (m, 1H, Ns-H3).

**$^{13}C$ -RMN ( $CDCl_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  21,6 ( $CH(CH_3)_2$ ), 23,0 ( $CH(CH_3)_2'$ ), 24,6 ( $CH(CH_3)_2$ ), 27,8 ( $C(CH_3)_3$ ), 42,5 ( $CH_2$ ), 56,4 (NCH), 82,5 ( $C(CH_3)_3$ ), 125,8 (Ns-C3), 130,7 (Ns-C6), 133,1 y 133,7 (Ns-C4, Ns-C5), 134,6 (Ns-C1), 148,0 (Ns-C2) 170,8 (CO).

**ESI-MS  $m/z$ :** 371 [ $M+HCOO$ ]

**CCF:**  $R_f = 0,87$  (AcOEt/ hexano 1/1).

**Éster *tert*-butílico de la *N*'-benciloxycarbonil-*N*-(*o*-nitrobencensulfonil)-*L*-lisina (22b)**



A una disolución de Cbz-*L*-Lisina-*O-t*Bu ( 1 g, 2,69 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( 60 mL), se adiciona Et<sub>3</sub>N (1,12 mL, 8,04 mmol). Se enfría mediante un baño de hielo y a continuación se adiciona *o*-NsCl (714 mg, 3,22 mmol) lentamente. Se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Se extrae con HCl 0,1N y disolución acuosa saturada de NaCl. Se seca, se filtra y se evapora para obtener **22b** (1,25 g, 89 %) en forma de aceite.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -142,9 (c= 1,0; CHCl<sub>3</sub>).

**IR** (NaCl): 3408 (OH), 1724 (CO).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  1,21 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,45-1,56 (m, 4H, CH<sub>2</sub> $\gamma$  y CH<sub>2</sub> $\delta$ ), 1,65-1,74 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 1,77-1,83 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta'$ ), 3,18 (dd, 2H, J = 12,6 y 6,4, NCH<sub>2</sub>), 4,02 (dt, J = 8,6 y 4,9 Hz, 1H, NCH), 4,73-4,79 (sa, 1H, NH carbamato), 5,1 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6,09 (d, J = 9,2 Hz, 1H, NH), 7,30-7,37 (m, 5H, Ph), 7,68-7,73 (m, 2H, Ns-H4, Ns-H5), 7,91-7,93 (m, 1H, Ns-H6), 8,06-8,08 (m, 1H, Ns-H3).

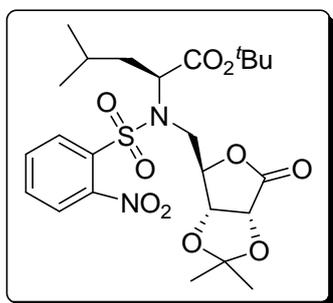
**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  33,1 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 40,8 (NCH<sub>2</sub>), 57,5 (NCH), 66,8 (CH<sub>2</sub>Ph), 82,8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 125,8 (Ns-C6), 128,3, 128,7 y 128,8 (Ph), 130,7 (Ns-C3), 133,1 (Ns-C1), 133,8 y 134,5 (Ns-C4 y Ns-C5), 136,8 (Ph-C1), 148,0 (Ns-C2), 156,6 (CO), 170,2 (CO).

**CCF:** Rf = 0,83 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 1 %), 0,15 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**ESI-MS** *m/z*: 466, 522 [M+H]<sup>+</sup>, 539 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

**Análisis elemental** calculado para C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S · H<sub>2</sub>O: C, 53,42; H, 6,16; N, 7,79; S, 5,94; O, 26,69. Encontrada: C, 53,72; H, 6,02; N, 7,51; S, 5,32; O, 27,43.

**5-Desoxi-2,3-isopropilidendioxi-5-[(1S)- 3 metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butil-(*o*-nitrobenzensulfonil)-amino]- $\gamma$ -D-ribonolactona. (13a)**



A una disolución de la sulfonamida **22a** (3 g, 8,06 mmoles), en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (30 mL), se adiciona trifetilfosfina (3170 mg, 12,10 mmoles) y la 2,3-*O*-isopropiliden- $\gamma$ -D-ribonolactona (2275 mg, 12,10 mmoles). Se enfría la disolución resultante mediante un baño de hielo, adicionando a continuación DEAD (al 40 % en tolueno) gota a gota (5,540 mL, 12,10 mmoles). Se agita a temperatura ambiente durante 18 horas. Transcurrido ese tiempo aún se observa producto de partida por lo que se añaden 4,03 mmoles adicionales de  $\text{PPh}_3$ , ribonolactona y DEAD (0,75 equivalentes) a  $0^\circ\text{C}$ , dejándose reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas más. A continuación se evapora el disolvente y se columna ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Se obtiene **2** ( 5750 mg, 98%) en forma de aceite amarillo.

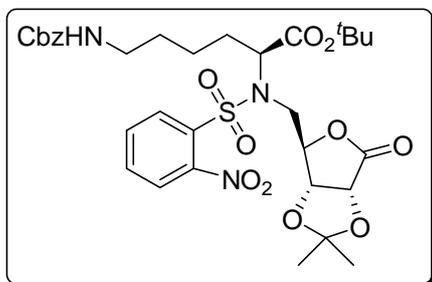
**$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  0,86 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0,92 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2'$ ), 1,36 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1,39 (s, 3H,  $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,47 (s, 3H,  $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2'$ ), 1,5-1,65 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,75-1,84 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3,66 (dd,  $J = 16,2$  y 7,5 Hz, 1H, H-5), 3,72 (dd,  $J = 16,2$  y 6,9 Hz, 1H, H-5'), 4,38 (t,  $J = 8,1$ , 1H, NCH), 4,75 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H, H-3), 4,81 (d,  $J = 7,0$  Hz, 1H, H-4), 4,85 (d,  $J = 5,6$  Hz, 1H, H-2), 7,64 (m, 1H, Ns-H4), 7,73 (m, 2H, Ns-H5, Ns-H6), 8,08 (m, 1H, Ns-H3).

**$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  22,1 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22,5 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2'$ ), 24,9 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 25,8 ( $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 27,0 ( $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2'$ ), 28,0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 39,3 ( $\text{CH}_2$ ), 47,0 (C5), 59,3 (NCH), 74,5 (C2), 77, 9 (C3), 80,3 (C4), 83,0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 114,1 ( $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 124,5 (Ns-C3), 131,9-134,3 (Ns-C4, Ns-C5, Ns-C6), 132,8 (Ns-C1), 148,4 (Ns-C2), 169,9 (CO), 173,5 (CO).

**ESI-MS  $m/z$ :** 587 [ $\text{M}+\text{HCOO}$ ] $^-$

**CCF:**  $R_f = 0,73$  (AcOEt/ hexano 1/1), 0,52 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / MeOH 1 %).

**5-[(1S)-5-(benciloxycarbonilamino)-1-*tert*-butoxicarbonil]pentil-(*o*-nitrobencensulfonil)-amino]-5-Desoxi-2,3-isopropilidendioxi- $\gamma$ -D-ribonolactona. (23b)**



A una disolución de la sulfonamida **22b** (6050 mg, 11,61 mmoles), en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (75 mL), se adiciona trifetilfosfina (6084 mg, 23,22 mmoles) y la 2,3-*O*-isopropiliden- $\gamma$ -D-ribonolactona (4366 mg, 23,22 mmoles). Se enfría la disolución

resultante mediante un baño de hielo, adicionando a continuación DEAD al 40 % en tolueno (10,632 mL, 23,22 mmoles) gota a gota. Se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Aún se observa producto de partida por lo que se añaden cantidades adicionales de  $\text{PPh}_3$  (2,28 g, 8,70 mmoles), y DEAD (3,79 mL, 8,70 mmoles) a  $0^\circ\text{C}$ , dejándose reaccionar a temperatura ambiente durante 12 horas más. A continuación se evapora el disolvente y se columna ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Se obtiene **23b** (5,75 g, 72%) en forma de aceite amarillo.

$[\alpha]_{\text{D}} = -17$  ( $c = 1,0$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

**IR** (NaCl): 1792 (CO), 1722 (CO).

**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  1,24-1,34 (m, 2H,  $\text{CH}_2\gamma$ ), 1,36 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1,38 (s, 3H,  $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,45 (s, 3H,  $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2'$ ), 1,48-1,54 (m, 2H,  $\text{CH}_2\delta$ ), 1,70-1,77 (m, 2H,  $\text{CH}_{2\beta, \text{ic}}$ ), 1,93-2,02 (m, 1H,  $\text{CH}_2\beta'$ ), 3,10-3,18 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ), 3,58 (dd,  $J = 16,1$  y 7,5 Hz, 1H, H-5), 3,74 (dd,  $J = 16,2$  y 5,8 Hz, 1H, H-5'), 4,32 (t,  $J = 8,2$ , 1H, NCH), 4,71 (d,  $J = 5,6$  Hz, 1H, H-3), 4,79 (t,  $J = 7,2$  Hz, 1H, H-4), 4,85 (d,  $J = 5,6$  Hz, 1H, H-2), 5,09 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 7,31-7,37 (m, 5H, Ph), 7,61-7,63 (m, 1H, Ns-H4), 7,69-7,72 (m, 2H, Ns-H5, Ns-H6), 8,04-8,06 (m, 1H, Ns-H3).

**$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  40,6 ( $\text{NHCH}_2$ ), 47,2 (C-5), 61,1 (NCH), 66,8 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74,6 (C2), 78,0 (C3), 80,6 (C4), 83,2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 114,1 ( $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 124,6 (Ns-C4),

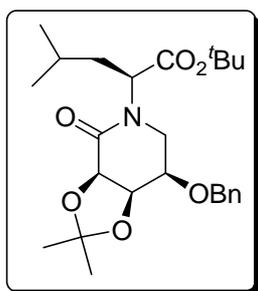
128,2, 128,3 y 128,8 (Ph), 131,8 (Ns-C3), 132,1 y 134,3 (Ns-C5, Ns-C6), 133,0 (Ns-C1), 136,8 (Ph-C1), 148,3 (Ns-C2), 156,6 (CO), 169,4 (CO), 173,5 (CO).

**ESI-MS**  $m/z$ : 636, 692  $[M+H]^+$ , 709  $[M+NH_4]^+$ .

**CCF**:  $R_f = 0,55$  (AcOEt/hexano 1/1), 0,52 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 1 %).

**Análisis elemental** calculado para C<sub>32</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>S · H<sub>2</sub>O: C, 54.15; H, 6.11; N, 5.92; O, 29.30; S, 4.52;. Encontrada: C, 54,05; H, 5,78; N, 6,12; O, 30,21; S, 3,84.

**(3R,4R,5R)-5-benciloxi-3,4-isopropilidendioxi-N-[(1S)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butil]-piperidin-2-ona. (24a)**



A una disolución de la lactama **20a** (1,24 g, 3,49 mmoles) en DMF anhidro (6 mL) se adiciona bromuro de benzilo (0,83 mL, 6,98 mmoles). A continuación se añade NaH al 60 % (137 mg, 3,42 mmoles) en pequeñas porciones, manteniendo la temperatura de la disolución con un baño de agua. Se agita a temperatura ambiente una vez estabilizada la temperatura durante

24 horas. Se extrae con Et<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O. Se seca, se filtra y se evapora el disolvente. El crudo se cromatografía (AcOEt/hexano 2/8) para obtener **24a** (1,26 g, 81 %) en forma de aceite.

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 0,92 (d,  $J = 3,5$  Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,94 (d,  $J = 3,6$  Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 1,40 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,41 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,49 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,51-1,58 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,64-1,68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,29 (ddd,  $J = 11,3$ ; 4,4 y 1,3, 1H, H-6), 3,48 (dd,  $J = 11,1$  y 10,1 Hz, 1H, H-6'), 3,94 (ddd,  $J = 10,1$ , 4,4 y 2,7 Hz, 1H, H-5), 4,50 (d,  $J = 6,6$  Hz, 1H, H-3), 4,62 (ddd,  $J = 6,6$ , 2,6 y 1,3 Hz, 1H, H-4), 4,70 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 5,20 (m, 1H, NCH), 7,25-7,42 (m, 5H, Ph).

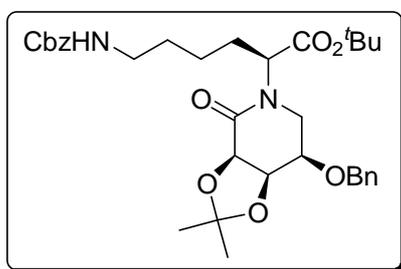
**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 21,4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23,5 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 24,9 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25,4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26,7 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 28,3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 38,0 (CH<sub>2</sub>), 41,2 (C<sub>6</sub>), 54,7 (NCH), 71,9 (CH<sub>2</sub>Ph), 72,5 (C<sub>5</sub>), 73,9 (C<sub>4</sub>), 75,4 (C<sub>3</sub>), 82,0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),

111,3 (O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 128,3-128,7 (Ph-C<sub>2</sub>,Ph-C<sub>3</sub>,Ph-C<sub>4</sub>), 137,7 (Ph-C<sub>1</sub>), 167,3 (CO), 170,9 (CO) .

ESI-MS *m/z*: 392, 448 [M+H]<sup>+</sup>.

CCF: R<sub>f</sub> = 0,83 (Hexano/AcOEt 1:1).

**(3*R*,4*R*,5*R*)-5-Benciloxi- N-[(1*S*)-5-(benciloxycarbonilamino)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pentil]-3,4-isopropilidendioxipiperidin-2-ona. (24b)**



A una disolución de la 3-aminolactama **20b** (400 mg, 0,79 mmoles) en DMF (4 mL) se adiciona bromuro de benzilo (0,19 mL, 1,58 mmoles). A continuación se añade NaH al 60 % (20 mg, 0,79 mmoles) en pequeñas porciones, manteniendo la temperatura de la disolución con un baño de agua. Se deja agitar a

temperatura ambiente una vez estabilizada la temperatura durante 24 horas. Se extrae con Et<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O. Se seca, se filtra y se evapora el disolvente. El crudo se cromatografía (AcOEt/hexano 2/8 hasta la salida del bromuro de bencilo en exceso; H/A a partir de ese momento) para obtener **24b** (331 mg, 70 %) en forma de aceite.

[α]<sub>D</sub> = - 4,4 (c= 1,0; CHCl<sub>3</sub>).

IR (NaCl): 1727 (CO), 1653 (CO).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,31-1,39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>γ), 1,37 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,41 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,48 (s, 3H, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 1,44-1,58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>δ), 1,63-1,70 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β), 1,90-1,99 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β'), 3,15 (dd, *J* = 10,9 y 9,8 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3,26 (dd, *J* = 11,3 y 3,4 Hz, 1H, H-6), 3,45 (dd, *J* = 10,9 y 9,8 Hz, 1H, H-6'), 3,92 (ddd, *J* = 9,8, 4,1 y 2,9 Hz, 1H, H-5), 4,50 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H, H-3), 4,61 (dd, *J* = 6,7 y 1,6 Hz, 1H, H-4), 4,69 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 5,07 (s, 2H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 5,10 (dd, *J* = 11,5 y 4,5 Hz, 1H, NCH), 7,30-7,38 (m, 10 H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph, CH<sub>2</sub>Ph).

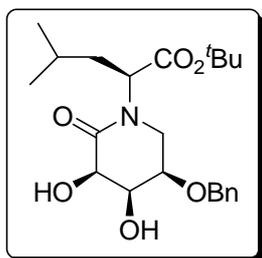
**$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  23,4 ( $\text{CH}_{2\gamma}$ ), 24,7 ( $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 26,7 ( $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2'$ ), 28,2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 28,7 ( $\text{CH}_{2\beta}$ ), 29,3 ( $\text{CH}_{2\delta}$ ), 41-41,1 ( $\text{C}_6$ ,  $\text{NCH}_2$ ), 55,9 ( $\text{NCH}$ ), 66,8 ( $\text{NHCOOCH}_2\text{Ph}$ ), 71,9 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 72,6 ( $\text{C}_5$ ), 73,9 ( $\text{C}-4$ ) 75,3 ( $\text{C}_3$ ), 82,3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 111,3 ( $\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), (128,3-128,7 ( $\text{Ph}-\text{C}_2$ ,  $\text{Ph}-\text{C}_3$ ,  $\text{Ph}-\text{C}_4$ ), 136,8, 137,6 ( $\text{Ph}-\text{C}_1$ ,  $\text{Ph}-\text{C}_1'$ ), 156,6 ( $\text{CO}$ ), 167,5 ( $\text{CO}$ ), 170,2 ( $\text{CO}$ ).

**CCF:**  $R_f = 0,39$  (Hexano/AcOEt 1:1).

**ESI-MS  $m/z$ :** 541, 597  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 1215  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ .

**Análisis elemental** calculado para  $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ : C, 65,44; H, 7,49; N, 4,62; O, 22,45. Encontrada: C, 65,54; H, 7,64; N, 4,48, O, 22,34.

**(3*R*,4*R*,5*R*)-5-benciloxi-3,4-dihidroxi-*N*-[(1*S*)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butil]piperidin-2-ona.(25a)**



A una disolución del compuesto **24a** (780 mg, 1,74 mmoles) en MeOH (50 mL), se adiciona PPTS (438 mg, 1,74 mmoles). Se refluje a 65 °C durante 24 horas. A continuación se añaden 0,3 equivalentes adicionales de PPTS (0,52 mmoles) y se deja a reflujo durante 24 horas más. Al finalizar la reacción se evapora el disolvente y se cromatografía (AcOEt/ hexano 2/8). Se obtiene **25a** (440 mg, 62 %) en forma de aceite.

**$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  0,92 (d,  $J = 3,86$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0,94 (d,  $J = 3,7$  Hz,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2'$ ), 1,41 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1,49-1,57 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,62-1,74 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,68 (s, 1H, OH-4), 3,42 (m, 2H, H-6), 3,71 (s, 1H, OH-3), 3,90 (ddd,  $J = 8,7$ , 6,5 y 1,8 Hz, 1H, H-5), 3,98 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1H, H-3), 4,46-4,48 (sa, 1H, H-4), 4,62 (d,  $J = 12$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4,71 (d,  $J = 12$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5,13 (dd,  $J = 10,5$  y 5,4 Hz, 1H,  $\text{NCH}$ ), 7,34 (m, 5H, Ph).

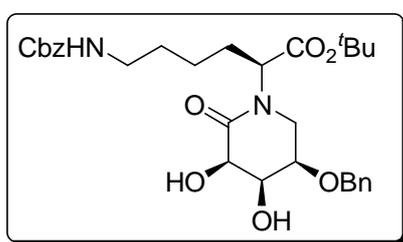
**$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  21,5 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 23,6 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2'$ ), 24,9 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 28,2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 37,2 ( $\text{CH}_2$ ), 44,0 ( $\text{C}_6$ ), 55,2 ( $\text{NCH}$ ), 67,2 ( $\text{C}_4$ ), 69,6 ( $\text{C}_3$ ), 71,7 ( $\text{C}_5$ ),

71,8 (CH<sub>2</sub>Ph), 82,1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128,1-128,8 (Ph-C2,Ph-C3,Ph-C4), 137,4 (Ph-C1), 170,6 (CO)

ESI-MS *m/z*: 352, 408 [M+H]<sup>+</sup>.

CCF: R<sub>f</sub> = 0,55 (Hexano/AcOEt 1:1).

**(3*R*,4*R*,5*R*)-5-Benciloxi-N-[(1*S*)-5-(benciloxycarbonilamino)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pentil]-3,4-dihidroxipiperidin-2-ona. (25b)**



A una disolución de la lactama **24b** ( 617 mg, 1,04 mmoles) en MeOH (40 mL), se adiciona PPTS (260 mg, 1,04 mmoles). Se refluxe durante 24 horas. Se evapora el disolvente y se cromatografía (AcOEt/hexano 1/1). Se obtiene **25b** (410 mg, 71 %) en forma

de aceite.

[α]<sub>D</sub> = + 14 (c= 1,0; CHCl<sub>3</sub>).

IR (NaCl): 3411 (OH), 1725 (CO), 1652 (CO).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,25-1,38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>γ), 1,41 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,42-1,48 (m, 1H, CH<sub>2</sub>δ), 1,52-1,59 (m, 1H, CH<sub>2</sub>δ'), 1,68-1,78 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β), 1,88-1,98 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β'), 2,94 (d, 1H, OH), 3,15 (td, *J* = 13,0 y 6,5 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3,41 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H, H-6), 3,84 (sa, 1H, OH), 3,89 (dt, *J* = 7,8; 7,7 y 2 Hz, 1H, H-5), 3,99 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, H-3), 4,45 (sa, 1H, H-4), 4,59 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4,69 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph'), 4,95 (sa, 1H, NH), 5,05-5,10 (m, 3H, NCH, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 7,29-7,38 (m, 10 H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph, CH<sub>2</sub>Ph).

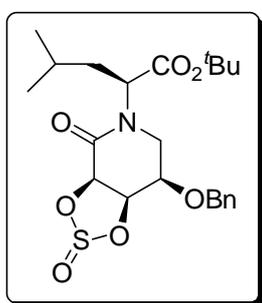
<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 22,9 (CH<sub>2</sub>γ), 27,7 (CH<sub>2</sub>β), 28,2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,1 (CH<sub>2</sub>δ), 40,9 (NCH<sub>2</sub>), 43,8 (C6), 56,3 (NCH), 66,8 (NHCOOCH<sub>2</sub>Ph), 67,5 (C4), 69,7 (C3), 71,6 y 71,7 (C5 y CH<sub>2</sub>Ph), 82,3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128,1-128,9 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4, Ph-C2', Ph-C3', Ph-C4'), 136,9 (Ph-C1), 137,4 (Ph-C1'), 156,6 (CO), 170,0 (CO), 171,1 (CO).

CCF: Rf = 0,16 (Hexano/AcOEt 1:1).

ESI-MS  $m/z$ : 501, 557 (M+H)<sup>+</sup>.

**Análisis elemental** calculado para C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> · 2H<sub>2</sub>O: C, 60,80; H, 7,48; N, 4,73; O, 27,00. Encontrada: C, 60,67; H, 7,30; N, 4,63; O, 27,4.

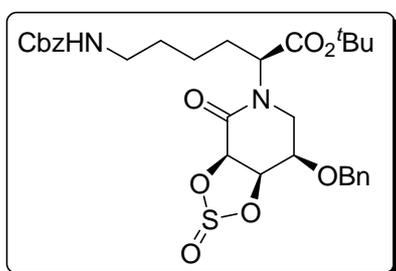
**(3R,4R,5R)-5-benciloxi-N-[(1S)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butil]-3,4-sulfinildioxipiperidin-2-ona. (26a)**



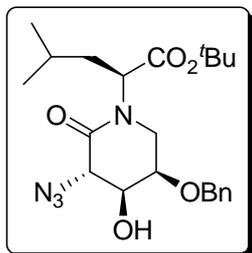
A una disolución de la lactama **25a** (440 mg, 1,08 mmol) en THF anhidro (5 mL), se adiciona Et<sub>3</sub>N (647  $\mu$ l, 4,61 mmol) y se lleva a 0°C. Se adiciona SOCl<sub>2</sub> (275  $\mu$ l, 2,8 mmol) gota a gota. Se agita durante una hora. Se evapora el disolvente y el crudo se disuelve en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se extrae con agua. Se seca, se filtra y se evapora para obtener de forma cuantitativa la mezcla diastereomérica **26a**, que no se separan por cromatografía en columna. Directamente se realiza la reacción siguiente.

CCF: Rf = 0,65 y 0,75 (Hexano/AcOEt 1:1); Rf = 0,20 y 0,24 (Hexano/AcOEt 7:3).

**(3R,4R,5R)-5-Benciloxi -N-[(1S)-5-(benciloxicarbonilamino)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pentil]-3,4-sulfinildioxipiperidin-2-ona. (26b)**



A una disolución del compuesto diólico **25b** (293 mg, 0,43 mmol) en THF anhidro (8 mL), se adiciona Et<sub>3</sub>N (257  $\mu$ l, 1,83 mmol) y se lleva a 0°C. Se adiciona SOCl<sub>2</sub> (109  $\mu$ l, 1,5 mmol) gota a gota. Se agita durante una hora. Se evapora el disolvente y el crudo se disuelve en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se extrae con agua. Se seca, se filtra y se evapora para obtener de forma cuantitativa la mezcla diastereomérica **26b**, que no se separan por cromatografía en columna. El producto de reacción es hecho reaccionar inmediatamente para obtener el siguiente producto.

**(3*S*,4*S*,5*R*)-3-Azido-5-benciloxi-4-hidroxi-*N*-[(1*S*)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butil]-piperidin-2-ona. (27a)**

A una disolución del sulfito **26a** (1,67 g, 3,69 mmoles) en HMPA (40 mL), se adiciona  $\text{NaN}_3$  (719 mg, 11,06 mmoles). Se agita la disolución a temperatura ambiente durante 18 horas. A continuación se adiciona  $\text{Et}_2\text{O}$  y se lava con disolución acuosa saturada de  $\text{NaCl}$  en primer lugar y, a continuación,  $\text{H}_2\text{O}$ . Se seca, se filtra y se evapora. Se purifica por cromatografía en columna (Hexano/ $\text{AcOEt}$  8/2). Se obtiene la azida **27a** (1,35 g, 85 %) en forma de aceite.

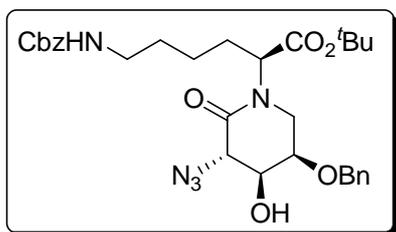
**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  0,90 (d,  $J = 4,8$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0,92 (d,  $J = 5$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2'$ ), 1,43 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1,5-1,6 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,64 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,42 (sa, 1H, OH), 3,36 (dd,  $J = 4,10$  y 1,2 Hz, 2H, H-6), 3,86 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, OH-3), 4,01 (dd,  $J = 6,7$  y 4,10 Hz, 1H, H-5), 4,29 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H, H-3), 4,68 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5,22 (dd,  $J = 10,5$  y 5,5 Hz, 1H, NCH), 7,31-7,40 (m, 5H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ).

**$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  21,6 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 23,5 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2'$ ), 24,7 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 28,2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 36,9 ( $\text{CH}_2$ ), 43,2 (C6), 54,7 (NCH), 63,2 (C3), 70,6 (C4), 72,5 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 72,9 (C5), 82,2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 127,9-128,9 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4), 137,4 (Ph-C1), 167,2 (CO), 170,5 (CO).

**ESI-MS  $m/z$ :** 377, 433 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , 477 [ $\text{M}+\text{HCOO}$ ] $^-$ .

**CCF:**  $R_f = 0,85$  (Hexano/ $\text{AcOEt}$  1:1).

**(3*S*,4*S*,5*R*)-3-Azido-5-Benciloxi-*N*-[(1*S*)-5-(benciloxycarbonilamino)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pentil]-4-hidroxipiperidin-2-ona. (27b)**



A una disolución de la mezcla de sulfitos diastereoméricos **26b** (310 mg, 0,51 mmoles) en DMF (6 mL), se adiciona NaN<sub>3</sub> (100 mg, 1,54 mmoles). Se agita a temperatura ambiente durante 2 días. Se extrae con Et<sub>2</sub>O/ H<sub>2</sub>O. Se seca, se filtra y se evapora. Se obtiene la azida **27b** (220 mg, 73 %) en forma de aceite.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -88,9 (c = 1,0; CHCl<sub>3</sub>).

**IR** (NaCl): 3400 (OH), 2111 (N<sub>3</sub>), 1727 (CO), 1652 (CO).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  1,24-1,33 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\gamma$ ), 1,42 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,46-1,57 (m, 2H, CH<sub>2</sub> $\delta$ ), 1,63-1,71 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 1,86-1,96 (m, 1H, CH<sub>2</sub> $\beta'$ ), 2,43 (d, J = 4,1, 1H, OH), 3,1 (dd, J = 12,8 y 6,4 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3,29-3,38 (m, 2H, H-6), 3,84 (m, 1H, H-4), 3,99 (dd, J = 6,6 y 4 Hz, 1H, H-5), 4,27 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-3), 4,60 (d, J<sub>AB</sub> = 11,9, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,70 (d, J<sub>AB</sub> = 11,9 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph'), 5,05 (s, 2H, NHCOOCH<sub>2</sub>Ph'), 5,12 (dd, J = 11,1 y 4,9 Hz, 1H, NCH), 7,3-7,4 (m, 5H, OCH<sub>2</sub>Ph).

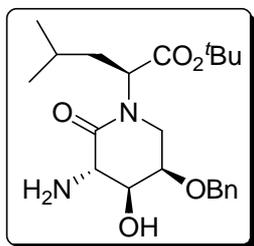
**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  22,7 (CH<sub>2</sub> $\gamma$ ), 27,5 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 28,2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,2 (CH<sub>2</sub> $\delta$ ), 40,8 (NCH<sub>2</sub>), 43,4 (C6), 55,9 (NCH), 63,2 (C3), 66,8 (CH<sub>2</sub>Ph carbamato), 70,5 (C4), 72,6 (C5), 72,6-72,7 (OCH<sub>2</sub>Ph, OCH<sub>2</sub>Ph'), 82,4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127,9-128,9 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4), 136,8, 137,4 (Ph-C1, Ph-C1'), 156,6 (CO), 167,5 (CO), 169,8 (CO).

**CCF:** R<sub>f</sub> = 0,47 (AcOEt/Hexano 1/1).

**ESI-MS** *m/z*: 526, 582 [M+H]<sup>+</sup>, 539 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

**Análisis elemental** calculado para C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·4H<sub>2</sub>O: C, 55.12; H, 7.25; N, 10.71; O, 26.92. Encontrada: C, 55,11; H, 6,61; N, 10,40, O, 27,88.

**(3*S*,4*S*,5*R*)-3-amino-5-benciloxi-4-hidroxi-*N*-[(1*S*)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butil]-piperidin-2-ona.(28a)**



A una disolución de la azida **27a** (1 g, 2,31 mmol) en EtOH (20 mL), se adiciona catalizador de Lindlar (1 g). Se agita a temperatura ambiente en atmósfera de hidrógeno (globo) durante 48 horas. Se filtra sobre Celite® y se evapora el disolvente. Se obtiene la amina **28a** cuantitativamente en forma de aceite.

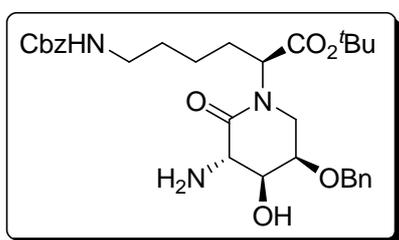
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 0,88 (d, *J* = 6,40 Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,90 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 1,43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,46-1,67 (m, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>), 2,60 (sa, 3H, OH, NH<sub>2</sub>), 3,33 (dd, *J* = 13,1 y 3,3 Hz, 1H, H-6), 3,40 (dd, *J* = 13,1 y 3,3 Hz, 1H, H-6'), 3,86 (d, *J* = 8 Hz, 1H, OH-3), 3,72 (dd, *J* = 9,70 y 0,8 Hz, 1H, H-3), 3,82 (dd, *J* = 9,90 y 1,80 Hz, 1H, H-4), 4,08 (m, 1H, H-5), 4,69 (d, *J* = 12 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4,78 (d, *J* = 12 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph'), 5,19 (dd, *J* = 9,70 y 6,40 Hz, 1H, NCH), 7,31-7,35 (m, 5H, OCH<sub>2</sub>Ph).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 21,5 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23,5 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'), 24,6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 28,2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 36,9 (CH<sub>2</sub>), 44,2 (C6), 54,5 (NCH), 54,9 (C3), 72,4 (C4), 72,8 (CH<sub>2</sub>Ph), 73,4 (C5), 82,0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127,7-128,7 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4), 138,1 (Ph-C1), 170,8 (CO).

**ESI-MS *m/z*:** 351, 407 [M+H]<sup>+</sup>.

**CCF:** R<sub>f</sub> = 0,00-0,05 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, Hexano/AcOEt 1:1).

**(3*S*,4*S*,5*R*)-3-Amino-5-benciloxi- N-[(1*S*)-5-(benciloxicarbonilamino)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pentil]-4-hidroxipiperidin-2-ona. (28b)**



A una disolución de la azida **27b** (450 mg, mmol) en EtOH (5 mL), se adiciona catalizador de Lindlar (240 mg). Se agita a temperatura ambiente en atmósfera de hidrógeno (globo) durante 2 horas. Se filtra sobre Celite® y se evapora el disolvente. Se obtiene la amina

**28b** (361 mg, aprox 84 %, no purificada ) en forma de aceite.

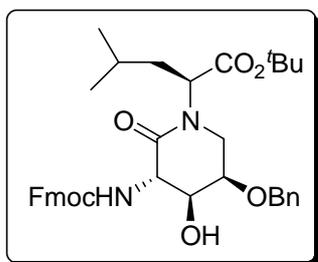
**IR** (NaCl): 3339 (NH<sub>2</sub>), 1725 (CO), 1653 (CO).

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,24-1,34 (m, 2H, CH<sub>2</sub>γ), 1,42 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,45-1,50 (m, 1H, CH<sub>2</sub>δ), 1,60-1,70 (m, 1H, CH<sub>2</sub>δ), 1,84-1,92 (m, 2H, CH<sub>2</sub>β), 3,08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3,29 (dd, J = 13,1 y 3,4 Hz, 1H, H-6), 3,40 (dd, J = 13,0 y 3,3 Hz, 1H, H-6'), 3,70 (d, J = 9,9 Hz, 1H, H-3), 3,76 (dd, J = 9,9 y 2,3 Hz, 1H, H-4), 4,07 (q, J = 3,1 Hz, 1H, H-5), 4,68 (d, J<sub>AB</sub> = 11,9, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,78 (d, J<sub>AB</sub> = 11,9 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph'), 5,06 (s, 2H, NHCOOCH<sub>2</sub>Ph), 5,12 (dd, J = 11,1 y 5,0 Hz, 1H, NCH), 7,28-7,36 (m, 10H, OCH<sub>2</sub>Ph, NHCOOCH<sub>2</sub>Ph).

**CCF: Rf** = 0,00-0,05 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, Hexano/AcOEt 1:1).

**ESI-MS** m/z: 500, 556 [M+H]<sup>+</sup>.

**(3*S*,4*S*,5*R*)-5-Benciloxi-3-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-4-hidroxi-N-[(1*S*)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butil]piperidin-2-ona. (29a)**



A una disolución de la amina **28a** (650 mg, 1,60 Mmol) en acetona (10 mL), se adiciona FmocOSu (702 mg, 2,08 mmol) y a continuación NaHCO<sub>3</sub> (430 mg, 5.12 mmol). Se agita a temperatura ambiente durante 18 horas.. Se cromatografía (AcOEt/ hexano 6/4) para obtener **29a** (990 mg, 98 %) en forma de sólido amarillento.

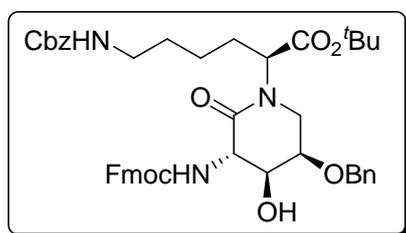
**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  0,88 (d,  $J = 6,40$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0,92 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2'$ ), 1,44 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1,51-1,66 (m, 3H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3,34 (dd,  $J = 12,9$  y  $3,1$  Hz, 1H, H-6), 3,40 (dd,  $J = 12,7$  y  $2,4$  Hz, 1H, H-6'), 4,00 a 4,08 (m, 2H, H-4,H-5), 4,24 (t,  $J = 7,1$  Hz, 1H, CH-Fmoc), 4,40 (d,  $J = 6,3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -Fmoc), 4,60 (dd,  $J = 9,1$  y  $4,1$  Hz, 1H, H-3), 4,71 (d,  $J = 11,9$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4,87 (d,  $J = 11,9$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}'$ ), 5,19 (dd,  $J = 9,60$  y  $6,50$  Hz, 1H, NCH), 5,97 (s, 1H, NH), 7,28-7,43 (m, 9H, Ph, H2 y H3-Fmoc), 7,61 (d,  $J = 7,4$  Hz, 2H, H1-Fmoc), 7,76 (d,  $J = 7,5$  Hz, 2H, H4-Fmoc).

**$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  21,4 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 23,5 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2'$ ), 24,6 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 28,2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 36,9 ( $\text{CH}_2$ ), 44,5 (C6), 47,3 (CH-Fmoc), 55,1 (NCH), 55,9 (C3), 68,0 ( $\text{CH}_2$ -Fmoc), 73,2 (C5), 73,3 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73,8 (C4), 82,3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 120,2 (C4-Fmoc), 125,4 (C1-Fmoc), 127,3-128,7 (Ph-C2, Ph-C3, Ph-C4, C2 y C3-Fmoc), 138,1 (Ph-C1), 141,5 (C5-Fmoc), 143,9 (C6-Fmoc), 159,1 (CO carbamato), 168,2 (CO), 170,5 (CO).

**ESI-MS  $m/z$ :** 573, 629  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**CCF:**  $R_f = 0,62$  (Hexano/AcOEt 1:1)

**(3*S*,4*S*,5*R*)-5-Benciloxi-*N*-[(1*S*)-5-(benciloxicarbonilamino)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pentil]-3-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-4-hidroxi-piperidin-2-ona. (29b)**



A una disolución de la amina **28b** (361 mg, 0,65 mmol) en acetona (5 mL), se adiciona FmocOSu (285 mg, 0,84 mmol) y a continuación  $\text{NaHCO}_3$  (174 mg, 2,08 mmol). Se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y disolución acuosa saturada de  $\text{NaCl}$ . Se cromatografía (AcOEt/ hexano 4/1) para obtener **29b** (300 mg, 59 %) en forma de sólido amarillento.

$[\alpha]_D = -23,6$  ( $c = 1,0$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

**IR** (NaCl): 3340 (OH), 1721 (CO).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 1,24-1,3 (m, 2H, CH<sub>2</sub>γ), 1,43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,39-1,50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>δ), 1,59-1,67 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β), 1,88-1,92 (m, 1H, CH<sub>2</sub>β'), 3,07 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 3,31 (dd, *J* = 12,8 y 2,0 Hz, 1H, H-6), 3,42 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H, H-6'), 4,02-4,05 (m, 2H, H-4 y H-5), 4,24 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H, CH-Fmoc), 4,40 (dd, *J* = 6,9 y 2,1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4,56 (dd, *J* = 8,5 y 4,3 Hz, 1H, H-3), 4,70 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,87 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph'), 5,01 (dd, *J* = 11,1 y 4,9 Hz, 1H, NCH), 5,07 (s, 2H, NHCOOCH<sub>2</sub>Ph), 5,92 (sa, 1H, NH), 7,27-7,43 (m, 14H, Ph, H-2 y H-3 Fmoc), 7,61 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H, H1-Fmoc), 7,76 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H, H4-Fmoc).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ 22,9 (CH<sub>2</sub>γ), 27,6 (CH<sub>2</sub>β), 28,3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,4 (CH<sub>2</sub>δ), 40,9 (NHCH<sub>2</sub>), 44,8 (C6), 47,3 (CH-Fmoc), 56,1 (C3), 56,7 (NCH), 66,8 (NHCOOCH<sub>2</sub>Ph), 68,0 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 73,0 (C5), 73,3 (OCH<sub>2</sub>Ph), 73,8 (C4), 82,4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 120,2 (C4-Fmoc), 125,4 (C1-Fmoc), 127,4-128,7 (CH-Ph, C2-Fmoc y C3-Fmoc), 138,1 (Cipso-Ph), 141,5 (C5-Fmoc), 143,9 (C6-Fmoc), 156,5 (CO), 159,0 (CO), 168,3 (CO), 169,9 (CO).

**CCF:** R<sub>f</sub> = 0,37 (Hexano/AcOEt 1:1).

**ESI-MS** *m/z*: 722, 778 [M+H]<sup>+</sup>.

**Análisis elemental** calculado para C<sub>45</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>·2H<sub>2</sub>O: C, 66.40; H, 6.81; N, 5.16; O, 21.62. Encontrada: C, 66,72; H, 6,68; N, 5,19; O, 21,41.

## 6.2. EXPERIMENTAL DEL CAPÍTULO 3.

Para la síntesis en fase sólida se utilizó la resina cloruro de 2-clorotritilo comercialmente funcionalizada con L-Prolina, con tamaño de partícula de 100 a 200 mesh y una funcionalización de 0,69 mmol/ g. de resina. Se utilizaron jeringas de polipropileno equipadas con una placa filtrante de polietileno poroso. La resina se mantiene en el interior de la jeringa, en la que se añade la cantidad de reactivo y/o disolvente necesaria, de manera que la resina quede bien cubierta y solvatada. La agitación se realiza manualmente mediante varas de teflón y una vez finalizada la reacción o lavado, el disolvente y los excesos de reactivo se eliminan por filtración. La síntesis manual múltiple en paralelo se realizó en un bloque de polipropileno VacMan® de 20 posiciones (Figura 63), equipado con llaves giratorias que conectan con un depósito central, sobre las cuales se colocan las jeringas. En uno de los laterales se encuentra la entrada del sistema de vacío, que facilita la filtración de los residuos provenientes de las diferentes etapas de lavado.



Figura 63. VacMan®

El control de nuestros péptidos, así como la puesta a punto del método que se utilizaría posteriormente en el HPLC de tipo semipreparativo, se realizó utilizando un HPLC analítico Waters, constituido por una bomba binaria modelo 1525, un autoinyector modelo 717 plus, un detector de longitud de onda dual modelo 2487 y un programa de control *Breeze* versión 3.2. Se utilizó una columna de fase inversa *Symmetry C<sub>18</sub>*, 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m (Waters) con un gradiente estándar de 0 a 100 % de B (acetonitrilo) en A (agua) en 15 minutos y al menos otro en condiciones de elución

más suaves (gradiente más “plano”). Las fases móviles que se utilizaron fueron: A:0,045 % TFA en H<sub>2</sub>O y B: 0,036 % de TFA en acetonitrilo.

Los productos se purificaron en un aparato Waters *Delta Prep*. 4000, constituido por Waters Prep LC Controller, un detector de longitud de onda dual model 2487, un colector de fracciones Waters *Fraction Collector II* y un programa de control *MassLynx* versión 3.5, con una columna de fase inversa *Symmetry C<sub>18</sub>*, 19 x 100 mm, 5 µm. Los crudos (50-100 mg) se disolvieron en H<sub>2</sub>O (10 mL) y a continuación se introdujeron en el inyector (capacidad de 10 mL). Las fases móviles que se utilizaron fueron: A:0,1 % TFA en H<sub>2</sub>O y B: 0,1 % de TFA en acetonitrilo. Las purificaciones se llevaron a cabo con un gradiente puesto a punto previamente en el HPLC de tipo analítico con tiempos de elución variables de 30 minutos a una hora (en función de la complejidad del crudo) Las fracciones se recogieron en intervalos de 20 a 30 segundos (dependiendo del compuesto) a la vez que se controlaba la elución del péptido midiendo la absorbancia a 220 y 254 nm.

Los péptidos se caracterizaron por HPLC, por MALDI-TOF y análisis de aminoácidos (AAA). En el caso del HPLC se dan datos de tiempo de retención y se calcula de forma aproximada la pureza. En el caso de los datos de MALDI-TOF se indica, según se observe, la (M+H)<sup>+</sup>, la (M+Na)<sup>+</sup> o la (M+K)<sup>+</sup> (ver preparación de muestras en 6.1). Los datos de los análisis de aminoácidos se expresan en abundancias relativas.

Los controles de funcionalización de nuestras resinas tras el primer acoplamiento aminoacídico se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro de UV-visible Shimadzu, model UV-2501 PC. Este método solo se llevo a cabo en la puesta a punto del método y en las síntesis previas a las de la presente tesis doctoral. A partir de entonces se utilizó una resina comercialmente funcionalizada con prolina y por tanto no fue necesario calcular la funcionalización (en este caso se utiliza la funcionalización suministrada por el proveedor)

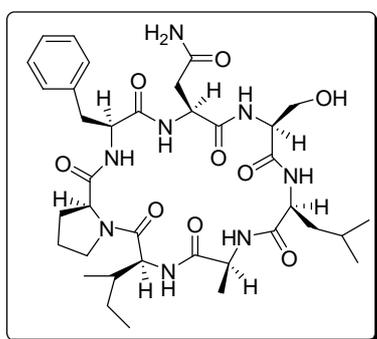
La liofilización de los péptidos se llevó a cabo usando un liofilizador Virtis, modelo Freezmobile 12 EL.

La desbencilación de las lactamas se lleva a cabo tras la purificación de las mismas mediante HPLC semipreparativo. Esta hidrogenolisis no fue posible llevarla a cabo a presión atmosférica y se tuvo que recurrir a la hidrogenación a presión. Para ello se utilizó un reactor autoclave Büchi Glas Uster, modelo "Miniclave drive" con agitación por acoplamiento magnético con un cuerpo de acero de 200 ml.

### 6.2.1. Caracterización de los péptidos

A continuación se detallan los datos experimentales obtenidos, necesarios para la caracterización de nuestros compuestos, tras la síntesis de nuestra biblioteca ciclopeptídica (proceso sintético detallado en el capítulo 3.3.1), así como las reacciones de desbencilación de C-5 por hidrogenación catalítica en los ciclopeptidos lactámicos cuando proceda.

#### P1. *ciclo(Asn-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)* (Stylostatin 1)



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 500 mg  
Funcionalización: 0,69 mmol/ g  
Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh  
Grupos protectores: Asn(Trt), Ser(<sup>t</sup>Bu)  
Rendimiento: 13 %  
Pureza: 92 %

Cantidad: 33 mg

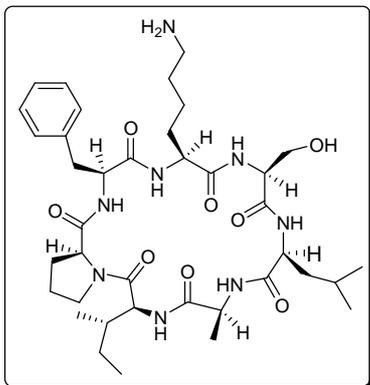
HPLC:  $t_r = 10,43$  min, gradiente 0 → 100% en 15 min, columna C,  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 10,24$  min, gradiente 15 → 70 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 11,61$  min, gradiente 25 → 35 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH): (M+H)<sup>+</sup> = 743,33; (M+Na)<sup>+</sup> = 765,32; (M+K)<sup>+</sup> = 781,29.

AAA: Asn 1,22; Ser 1,0; Leu 1,16; Pro 1,19; Ala 1,15; Ile 1,21; Phe 1,21.

**P2. Ciclo(Lys-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)**

Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 200 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Lys(Boc), Ser(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 14 %

Pureza: 96 %

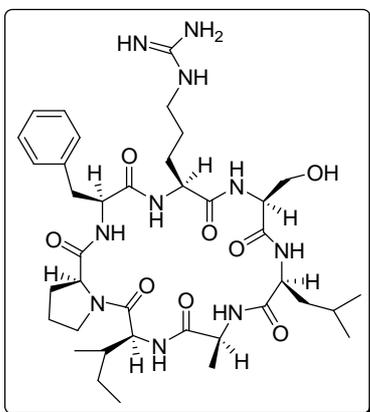
Cantidad: 15 mg

HPLC:  $t_r = 9,40$  min, gradiente 0 → 100% en 15 min, columna  $C_{18}$  (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 8,36$  min, gradiente 15 → 70 % en 15 min, columna  $C_{18}$  (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 757,52$ ;  $(M+Na)^+ = 779,50$ ;  $(M+K)^+ = 795,48$ .

AAA: Leu 1,03; Ser 0,88; Pro 1,10; Ala 1,03; Ile 0,93; Phe 1,02; Lys 1,01.

**P3. Ciclo(Arg-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)**

Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 200 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Arg(Pbf), Ser(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 20 %

Pureza: 99 %

Cantidad: 22 mg

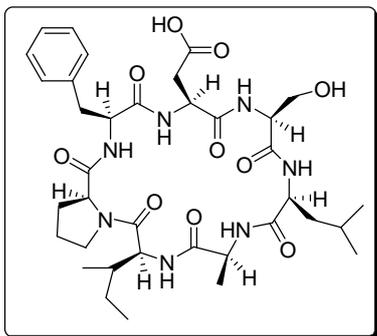
HPLC:  $t_r = 9,46$  min, gradiente 0 → 100% en 15 min, columna  $C_{18}$  (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 8,69$  min, gradiente 15 → 70% en 15 min, columna  $C_{18}$  (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 785,38$ ,  $(M+Na)^+ = 807,36$ ;  $(M+K)^+ = 823,33$ .

AAA: Leu 1,05; Ser 0,86; Pro 1,02; Ala 1,02; Ile 1,00; Phe 1,02; Arg 1,04.

#### P4. Ciclo(Asp-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 400 mg  
Funcionalización: 0,69 mmol/ g  
Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh  
Grupos protectores: Asp(<sup>t</sup>Bu), Ser(<sup>t</sup>Bu)  
Rendimiento: 11 %  
Pureza: 90 %

Cantidad: 22,4 mg

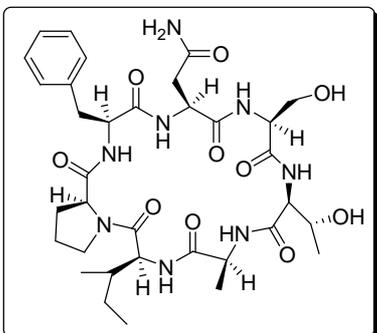
HPLC:  $t_r = 8,70$ , gradiente 0 → 100% en 15 min; columna  $C_{18}$  (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 8,50$  min, gradiente 15 → 70 % en 15 min, columna  $C_{18}$  (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+Na)^+ = 766,47$ ,  $(M+K)^+ = 782,42$ .

AAA: Asp 1,01; Leu 1,03; Ser 0,88; Pro 1,03; Ala 1,01; Ile 1,02; Phe 1,02.

#### P5. Ciclo(Asn-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 200 mg  
Funcionalización: 0,69 mmol/ g  
Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh  
Grupos protectores: Asn(Trt), Ser(<sup>t</sup>Bu), Thr(<sup>t</sup>Bu)  
Rendimiento: 15 %  
Pureza: 93 %

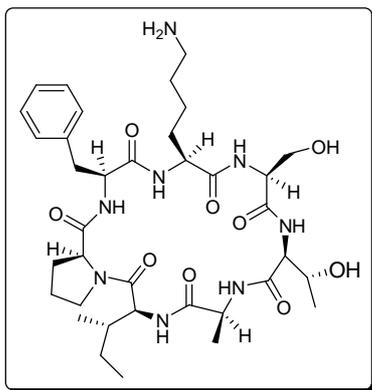
Cantidad: 16 mg

HPLC:  $t_r = 9,57$ , gradiente 0 → 100% en 15 min, columna C,  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 8,73$ , gradiente 15 → 70% en 15 min, columna C,  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 731,39$ ;  $(M+Na)^+ = 753,38$ ;  $(M+K)^+ = 769,35$ .

AAA: Asn 1,00; Thr 0,8; Ser 0,7; Pro 1,00; Ala 1,00; Ile 1,00; Phe 1,00.

**P6. Ciclo(Lys-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)**

Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 600 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Lys(Boc), Ser(<sup>t</sup>Bu), Thr(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento medio: 5 %

Pureza: 95 %

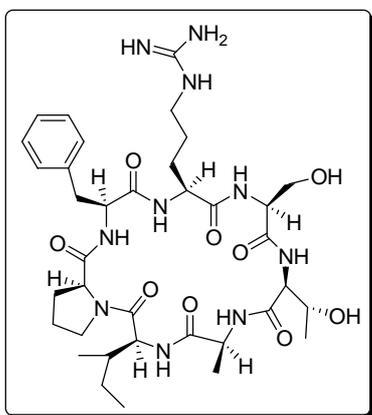
Cantidad total obtenida: 15 mg

HPLC:  $t_r = 8,5-8,7$  min, gradiente  $0 \rightarrow 100\%$  en 15 min, columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 8,25$  min, gradiente  $15 \rightarrow 45\%$  en 15 min,  $T = 45\text{ }^\circ\text{C}$ , columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 745,5$ ;  $(M+Na)^+ = 767,5$ ;  $(M+K)^+ = 783,4$ .

AAA: Thr 0,90; Ser 0,82; Pro 1,08; Ala 1,02; Ile 0,97; Phe 1,02; Lys 1,01.

**P7. Ciclo(Arg-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)**

Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 200 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Arg(Pbf), Ser(<sup>t</sup>Bu), Thr(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 12 %

Pureza: 88 %

Cantidad: 14 mg

HPLC:  $t_r = 8,72$  min (pico doble), gradiente  $0 \rightarrow 100\%$  en 15 min, columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 8,63$  min, gradiente  $0 \rightarrow 100\%$  en 15 min,  $T = 45\text{ }^\circ\text{C}$ , columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

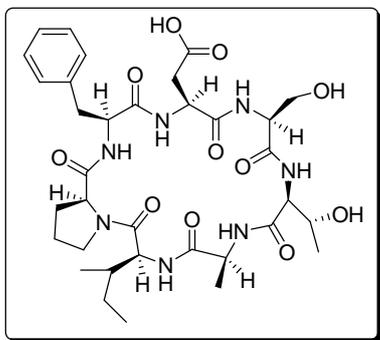
HPLC:  $t_r = 7,47$  min, gradiente  $15 \rightarrow 70\%$  en 15 min,  $T = 45\text{ }^\circ\text{C}$ , columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 7,3$  min, gradiente  $20 \rightarrow 30$  en 15 min, columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 773,50$ ,  $(M+Na)^+ = 795,41$ ;  $(M+K)^+ = 811,39$ .

AAA:; Thr 0,93; Ser 0,81; Pro 1,04; Ala 1,01; Ile 0,94; Phe 1,02; Arg 1,06.

**P8. Ciclo(Asp-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)**



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con

L-Prolina, 200 mg

Funcionalització: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Asp(<sup>t</sup>Bu), Ser(<sup>t</sup>Bu), Thr(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 11 %

Pureza: 84 %

Cantidad: 12 mg

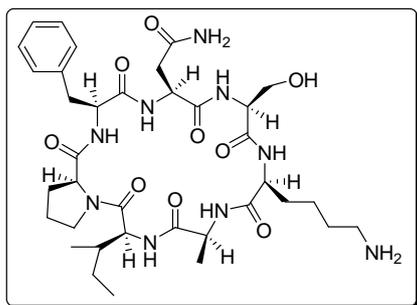
HPLC:  $t_r = 9,78$ , gradiente 0 → 100% en 15 min; columna C<sub>18</sub> (5μm), λ = 220 nm.

HPLC:  $t_r = 11,69$  min, gradiente 15 → 40 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5μm), λ = 220 nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M)^+ = 732,5$ ,  $(M+Na)^+ = 754,2$ ,  $(M+K)^+ = 770,35$ .

AAA: Asp 1,02; Thr 0,90; Ser 0,76; Pro 1,06; Ala 1,05; Ile 0,91; Phe 1,06.

**P9. Ciclo(Asn-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)**



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con

L-Prolina, 400 mg

Funcionalització: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Asn(Trt), Lys(Boc), Ser(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 15 %

Pureza: 91 %

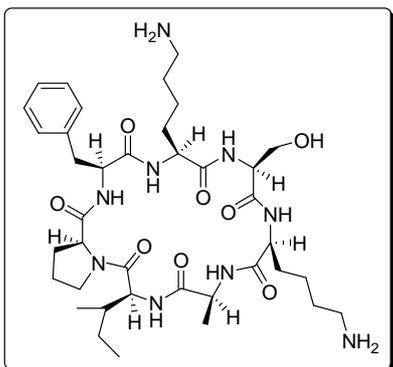
Cantidad: 32,6 mg

HPLC:  $t_r = 6,96$ , gradiente 0→ 100 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5μm), λ = 220 nm.

HPLC:  $t_r = 5,68$ , gradiente 15→ 70 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5μm), λ = 220 nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 758,44$ ;  $(M+Na)^+ = 780,43$ ;  $(M+K)^+ = 796,41$ .

AAA: Ser 0,92; Ala 1,00; Pro 1,08; Ile 1,06; Asn 1,02; Phe 1,07; Lys 1,07.

**P10. Ciclo(Lys-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)**

Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 200 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Lys(Boc), Ser(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 23 %

Pureza: 84 %

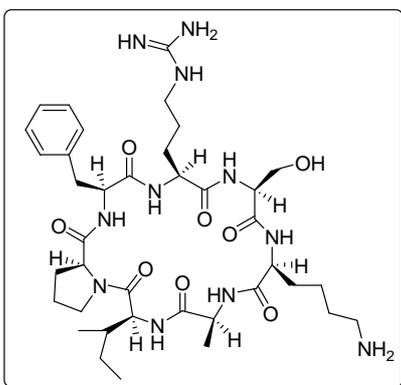
Cantidad: 25 mg

HPLC:  $t_r = 8,54$ , gradiente 0→ 100 % en 15 min, columna  $C_{18}$  (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 11,57$ , gradiente 0→ 50 % en 15 min, columna  $C_{18}$  (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 772,41$ ;  $(M+Na)^+ = 794,40$ ;  $(M+K)^+ = 812,41$ .

AAA: Ser 0,89; Pro 1,03; Ile 0,98; Ala 1,02, Phe 1,03; Lys 2,04.

**P11. Ciclo(Arg-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)**

Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 400 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Arg(Pbf), Lys(Boc), Ser(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 7%

Pureza: 93 %

Cantidad: 16 mg

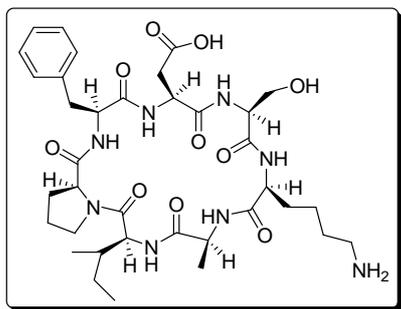
HPLC:  $t_r = 6,24$ , gradiente 0→ 100 % en 15 min, columna  $C_{18}$  (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 4,56$ , gradiente 15→ 70 % en 15 min, columna  $C_{18}$  (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 800,64$ ;  $(M+Na)^+ = 822,66$ ;  $(M+K)^+ = 838,62$ .

AAA: Ser 0,86, Pro 0,98, Ala 0,95, Ile 0,95, Phe 1,09, Lys 0,96, Arg 1,06.

**P12. Ciclo(Asp-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)**



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 400 mg  
Funcionalización: 0,69 mmol/ g  
Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh  
Grupos protectores: Asp(<sup>t</sup>Bu), Lys(Boc), Ser(<sup>t</sup>Bu)  
Rendimiento: 13 %

Pureza: 91 %

Cantidad: 28,4 mg

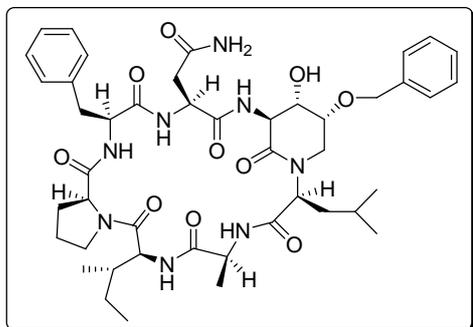
HPLC:  $t_r = 6,23$ , gradiente 0→ 100 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 5,91$ , gradiente 15→ 70 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH): (M+H)<sup>+</sup> = 759,47; (M+Na)<sup>+</sup> = 781,48; (M+K)<sup>+</sup> = 797,44.

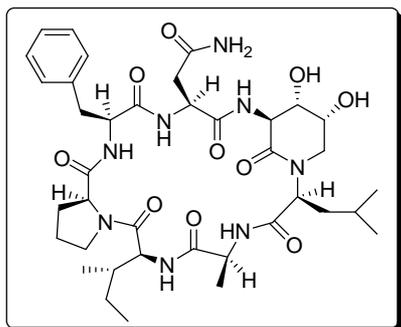
AAA: Asp 1,00; Ser 0,89; Pro 1,06; Ala 1,00; Ile, 1,01; Phe 1,04; Lys 1,01.

**P13. Ciclo(Asn-{Ser(OBn)-Leu}-Ala-Ile-Pro-Phe)**

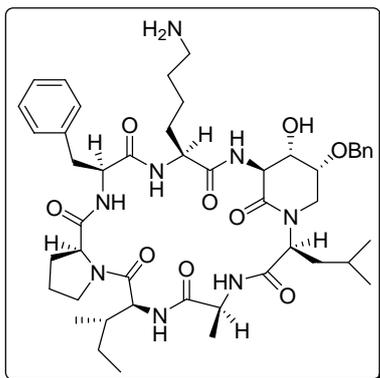


Ya descrito en el grupo, no se vuelve a sintetizar

**P14. Ciclo(Asn-{Ser-Leu}-Ala-Ile-Pro-Phe)**



Ya descrito en el grupo, no se vuelve a sintetizar

**P15. Ciclo(Lys-{Ser(OBn)-Leu}-Ala-Ile-Pro-Phe)**

Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con

L-Prolina, 300 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Lys(Boc)

Rendimiento: 18 %

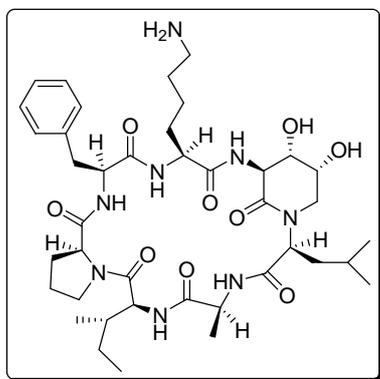
Pureza: 89 %

Cantidad: 33,7 mg

HPLC:  $t_r = 10,98$  min, gradiente 0  $\rightarrow$  100% en 15 min, columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 11,52$  min, gradiente 15  $\rightarrow$  70 % en 15 min, columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 889,50$ ;  $(M+Na)^+ = 911,48$ ;  $(M+K)^+ = 927,46$ .

**P16. Ciclo(Lys-{Ser(OH)-Leu}-Ala-Ile-Pro-Phe)**

Para la obtención del compuesto 16 se disolvieron 25 mg del compuesto 15 en 20 mL de MeOH. Esta disolución se trató con  $H_2$  a presión de 4 bares durante 7 días. Se realizaron controles de progreso de la reacción mediante HPLC analítico. Una vez acabada se separó el Pd-C por filtración y se evaporó el disolvente al vacío. El producto se resuspendió en  $H_2O$  y se liofilizó, obteniéndose un polvo blanco de forma cuantitativa.

Rendimiento: cuantitativo

Pureza: 91 %

Cantidad: 20 mg

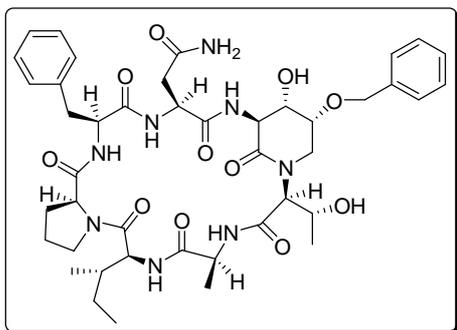
HPLC:  $t_r = 9,54$  min, gradiente 0  $\rightarrow$  100% en 15 min, columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 9,00$  min, gradiente 15  $\rightarrow$  70 % en 15 min, columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 799,36$ ;  $(M+Na)^+ = 821,37$ ;  $(M+K)^+ = 837,35$ .

AAA: Pro 1,05; Ile 1,01; Phe 0,95; Lys 0,97; Ala 1,06.

**P17. Ciclo(Asn-{Ser(OBn)-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe)**



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 100 mg.

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Asn(Trt), Thr(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 10 %

Pureza: 99 %

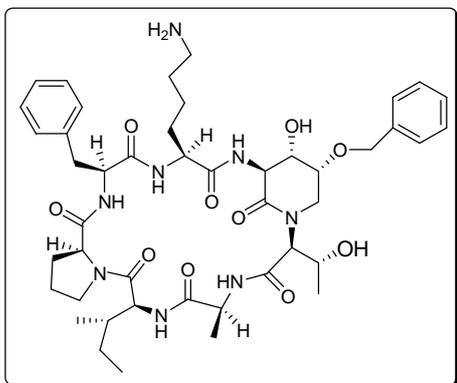
Cantidad: 6 mg

HPLC:  $t_r = 10,87$ , gradiente 0  $\rightarrow$  100% en 15 min, columna C,  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 11,13$ , gradiente 15  $\rightarrow$  70% en 15 min, columna C,  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 863,36$ ;  $(M+Na)^+ = 885,34$ ;  $(M+K)^+ = 901,32$ .

**P19. Ciclo(Lys-{Ser(OBn)-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe)**



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 200 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Lys(Boc), Thr(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 21 %

Pureza: 96 %

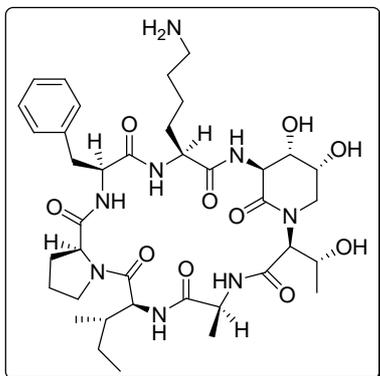
Cantidad: 26 mg

HPLC:  $t_r = 9,79$  min, gradiente 0  $\rightarrow$  100% en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 9,39$  min, gradiente 15  $\rightarrow$  70 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 877,54$ ;  $(M+Na)^+ = 899,54$ ;  $(M+K)^+ = 915,51$ .

AAA: Pro 1,19; Ala 1,07; Ile 1,14; Phe 0,83; Lys 0,84.

**P20. Ciclo(Lys-{Ser(OH)-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe)**

Para la obtención del compuesto **20** se disolvieron 18,6 mg del compuesto **19** en 20 mL de MeOH (para una concentración aproximada de 1 mg/mL). Esta disolución se trató con H<sub>2</sub> a presión de 3,5 bares durante 6 días. Se realizaron controles de progreso de la reacción mediante HPLC analítico. Una vez acabada se separó el Pd-C por filtración y se evaporó el disolvente al vacío. El producto se resuspendió en H<sub>2</sub>O/ acetonitrilo y se liofilizó, obteniéndose un polvo blanco de forma cuantitativa.

Rendimiento: cuantitativo (HPLC).

Pureza: 93 %.

Cantidad: 16,7 mg

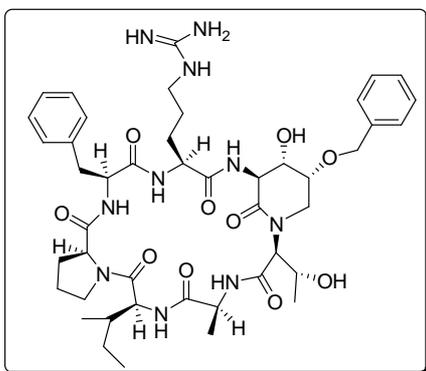
HPLC:  $t_r = 8,91$  min, gradiente 0 → 100% en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5μm),

$\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 7,57$  min, gradiente 15 → 70 % en 15 min, columna C18 (5μm),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH): (M+H)<sup>+</sup> = 787,48; (M+Na)<sup>+</sup> = 809,46; (M+K)<sup>+</sup> = 825,44.

AAA: Pro 1,09; Ile 1,01; Phe 0,90; Lys 0,94; Ala 1,06.

**P21. Ciclo(Arg-{Ser(OBn)-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe)**

Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con

L-Prolina, 200 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Arg(Pbf), Thr(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 17%

Pureza: 90 %

Cantidad: 22 mg

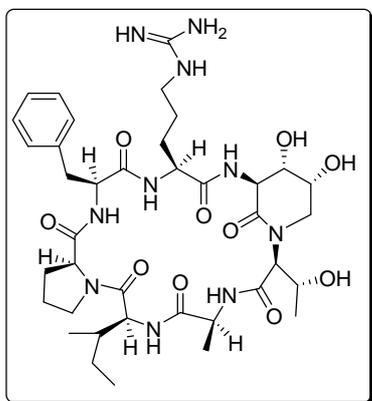
HPLC:  $t_r = 9,94$  min, gradiente 0 → 100 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5μm),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 9,58$  min, gradiente 15 → 70 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5μm),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH): (M+H)<sup>+</sup> = 905, 89; (M+Na)<sup>+</sup> = 927,82; (M+K)<sup>+</sup> = 943,79.

AAA: Pro 1,03; Ile 0,96; Phe 0,95; Arg 1,09; Ala 1,00.

**P22. Ciclo(Arg-{Ser(OH)-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe)**



Para la obtención del compuesto **P22** se disolvieron 21,5 mg del compuesto **P21** en 20 mL de MeOH (para una concentración aproximada de 1 mg/mL). Esta disolución se trató con H<sub>2</sub> a presión de 4 bares durante 2 días. Se realizaron controles de progreso de la reacción mediante HPLC analítico. Una vez acabada se separó el Pd-C por filtración y se evaporó el disolvente al vacío. El producto se resuspendió en H<sub>2</sub>O/ acetonitrilo y se

liofilizó, obteniéndose un polvo blanco de forma cuantitativa.

Rendimiento: cuantitativo

Pureza: 84 %

Cantidad: 19 mg

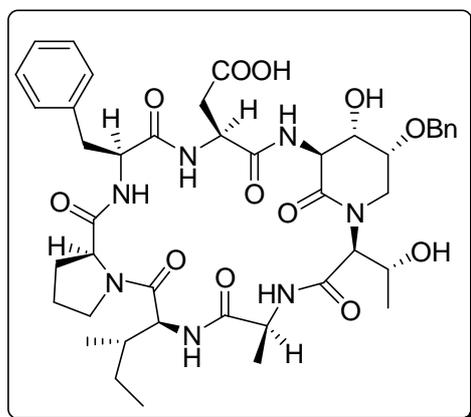
HPLC: t<sub>r</sub> = 9,05 min, gradiente 0 → 100 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5µm), λ = 220 nm.

HPLC: t<sub>r</sub> = 7.57 min, gradiente 15 → 70 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5µm), λ = 220 nm.

MALDI (matriz ACH): (M+H)<sup>+</sup> = 815,39; (M+Na)<sup>+</sup> = 837,37; (M+K)<sup>+</sup> = 853,35.

AAA: Pro 1,09; Ile 0,94; Phe 0,91; Arg 0,97; Ala 1,09.

**P23. Ciclo(Asp-{Ser(OBn)-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe)**



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 100 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Asp(<sup>t</sup>Bu), Thr(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 12 %.

Pureza: 97 %

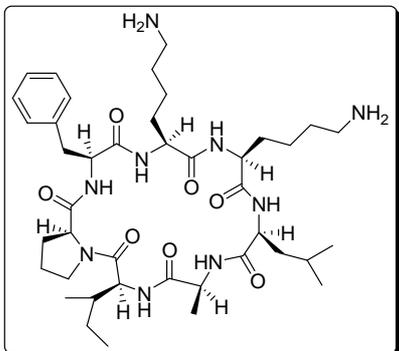
Cantidad: 7 mg

HPLC: t<sub>r</sub> = 11,33, gradiente 0 → 100% en 15 min; columna C<sub>18</sub> (5µm), λ = 220 nm.

HPLC: t<sub>r</sub> = 11,71 min, gradiente 15 → 70 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5µm), λ = 220 nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 864,43$ ,  $(M+Na)^+ = 886,41$ ,  $(M+K)^+ = 902,39$ .

### P27. Ciclo(Lys-Lys-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 200 mg  
 Funcionalización: 0,69 mmol/ g  
 Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh  
 Grupos protectores: Lys(Boc)  
 Rendimiento: 42 %  
 Pureza: 98 %

Cantidad: 47 mg

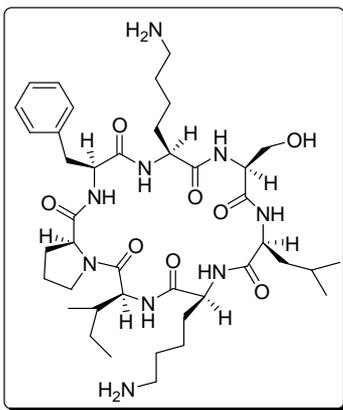
HPLC:  $t_r = 8,47$ , gradiente 0→ 100 % en 15 min, columna  $C_{18}$  ( $5\mu m$ ),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 7,02$ , gradiente 15→ 70 % en 15 min, columna  $C_{18}$  ( $5\mu m$ ),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 798,49$ ;  $(M+Na)^+ = 820,48$ ;  $(M+K)^+ = 836,46$ .

AAA: Ala 1,00; Pro 1,03; Ile 0,99; Leu 1,00; Phe 0,98; Lys 2,00.

### P28. Ciclo(Lys-Ser-Leu-Lys-Ile-Pro-Phe)



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 400 mg  
 Funcionalización: 0,69 mmol/ g  
 Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh  
 Grupos protectores: Lys(Boc), Ser(<sup>t</sup>Bu)  
 Rendimiento: 21 %  
 Pureza: 99 % (2 picos)  
 Cantidad: 47,2 mg

HPLC:  $t_r = 8,27$  y  $8,40$  min, gradiente 0→ 100 % en 15 min, columna  $C_{18}$  ( $5\mu m$ ),  $\lambda = 220$  nm.

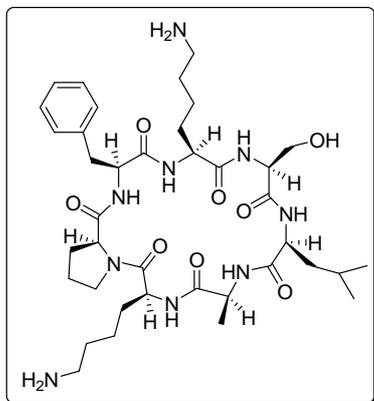
HPLC:  $t_r = 6,41$  y  $6,75$  min, gradiente 15→ 70 % en 15 min, columna  $C_{18}$  ( $5\mu m$ ),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 6,01$  min, gradiente 15→ 70 % en 15 min,  $T = 45$  °C, columna  $C_{18}$  ( $5\mu m$ ),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 814,50$ ;  $(M+Na)^+ = 836,49$ ;  $(M+K)^+ = 852,47$ .

AAA: Ser 0,82; Pro 1,03; Ile 1,01; Leu 1,03, Phe 1,03; Lys 2,12.

**P29. Ciclo(Lys-Ser-Leu-Ala-Lys-Pro-Phe)**



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 200 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Lys(Boc), Ser(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 13 %

Cantidad: 14 mg

HPLC:  $t_r = 7,12$  min, gradiente 0% → 100% en 15

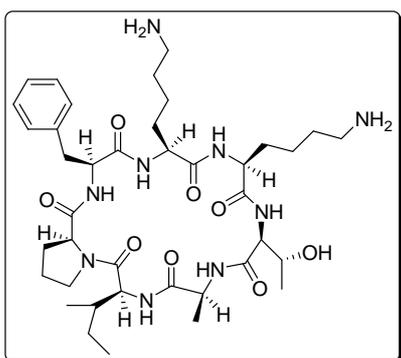
min, columna C<sub>18</sub> (5μm), λ = 220 nm.

HPLC:  $t_r = 5,99$  min, gradiente 15 % → 70 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5μm), λ = 220 nm.

MALDI (matriz ACH): (M+H)<sup>+</sup> = 772,44; (M+Na)<sup>+</sup> = 794,43; (M+K)<sup>+</sup> = 810,41.

AAA: Ser 0,91; Pro 1,03; Ala 1,03; Leu 1,00; Phe 1,03; Lys 2,03.

**P30. Ciclo(Lys-Lys-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)**



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 200 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Lys(Boc), Thr(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 19 %

Pureza : 98 %

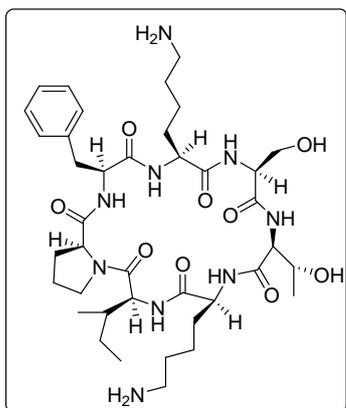
Cantidad: 20,7 mg

HPLC:  $t_r = 8,16$  min, gradiente 0→ 100 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5μm), λ = 220 nm.

HPLC:  $t_r = 6,38$  min, gradiente 15→ 70 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5μm), λ = 220 nm.

MALDI (matriz ACH): (M+H)<sup>+</sup> = 786,54; (M+Na)<sup>+</sup> = 808,53; (M+K)<sup>+</sup> = 824,51.

AAA:; Ala 1,03; Pro 1,12; Ile 0,98; Thr 0,86, Phe 1,03; Lys 2,07.

**P31. Ciclo(Lys-Ser-Thr-Lys-Ile-Pro-Phe).**

Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 200 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Lys(Boc), Ser(<sup>t</sup>Bu), Thr(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 29 %

Pureza: 89 %

Cantidad: 32 mg

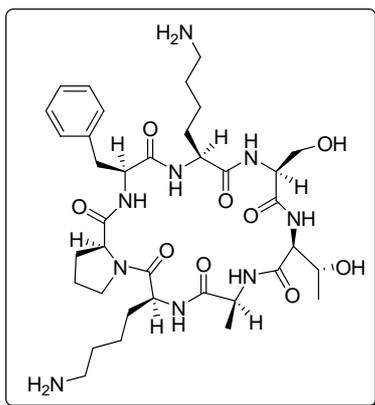
HPLC:  $t_r = 7,55$  y  $7,69$  min., gradiente  $0 \rightarrow 100$  % en 15 min., columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 5,32$  (ancho), gradiente  $15 \rightarrow 70$  % en 15 min., columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 7,92$  min. ( un pico fino), gradiente  $0 \rightarrow 100$  % en 15 min.,  $T = 45^\circ\text{C}$ , columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 802,54$ ;  $(M+Na)^+ = 824,55$ ;  $(M+K)^+ = 840,53$ .

AAA: Thr 0,90; Ser 0,75; Pro 1,16; Ile 0,97; Phe 1,06; Lys 2,16.

**P32. Ciclo(Lys-Ser-Thr-Ala-Lys-Pro-Phe)**

Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 200 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Lys(Boc), Ser(<sup>t</sup>Bu), Thr(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 18 %

Pureza: 96 %

Cantidad: 19 mg

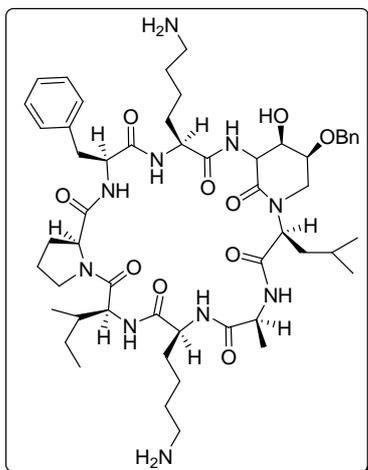
HPLC:  $t_r = 5,59$ , gradiente  $0 \rightarrow 100$  % en 15 min, columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 3,06$ , gradiente  $15 \rightarrow 70$  % en 15 min, columna  $C_{18}$  ( $5\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH):  $(M+H)^+ = 760,52$ ;  $(M+Na)^+ = 782,55$ ;  $(M+K)^+ = 798,51$

AAA: Ser 1,09; Pro 1,01; Ala 1,09; Thr 0,89; Phe 0,97; Lys 1,95.

**P33. Ciclo(Lys-{Ser(OBn)-Leu}-Ala-Lys-Ile-Pro-Phe)**



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 200 mg.

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Lys(Boc)

Rendimiento: 26 %

Pureza: 94 %

Cantidad: 33,2 mg

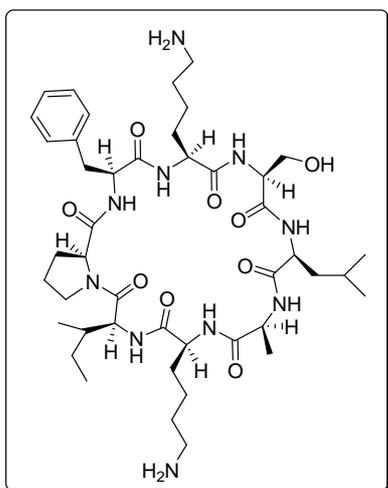
HPLC:  $t_r = 9,91$ , gradiente 0→ 100 % en 15 min,

columna C18 (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 9,84$ , gradiente 15→ 70 % en 15 min, columna C18 (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH): (M+H)<sup>+</sup> = 1017,57; (M+Na)<sup>+</sup> = 1039,56; (M+K)<sup>+</sup> = 1055,54.

**P34. Ciclo(Lys-Ser-Leu-Ala-Lys-Ile-Pro-Phe).**



Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con L-Prolina, 400 mg.

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Lys(Boc), Ser(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 28 %

Pureza: 92 %

Cantidad: 68,6 mg.

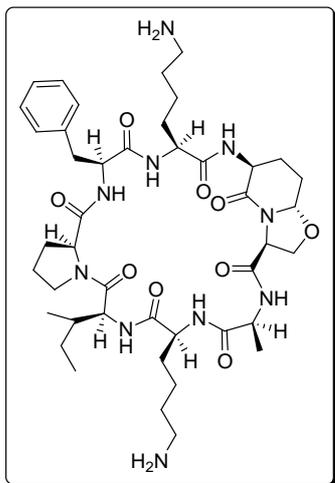
HPLC:  $t_r = 8,00$ , gradiente 0→ 100 % en 15 min,

columna C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

HPLC:  $t_r = 6,18$ , gradiente 15→ 70 % en 15 min, columna C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m),  $\lambda = 220$  nm.

MALDI (matriz ACH): (M+H)<sup>+</sup> = 885,61; (M+Na)<sup>+</sup> = 907,59; (M+K)<sup>+</sup> = 923,57.

AAA:; Leu 1,01; Ser 0,82; Pro 1,08; Ala 1,03; Ile 0,99; Phe 0,93; Lys 2,04.

**P35. Ciclo(Lys-{Oxa}-Ala-Lys-Ile-Pro-Phe)**

Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con

L-Prolina, 400 mg

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Lys(Boc)

Rendimiento: 36 %

Pureza: 92 %

Cantidad: 86 mg

HPLC: tr = 7,91, gradiente 0→ 100 % en 15 min, columna

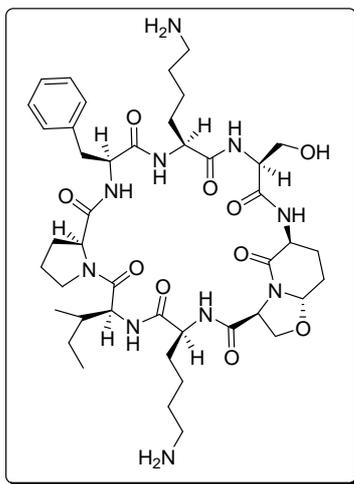
C18 (5 $\mu$ m),  $\lambda$  = 220 nm.

HPLC: tr = 5,67, gradiente 15→ 70 % en 15 min, columna C18 (5 $\mu$ m),  $\lambda$  = 220 nm.

MALDI (matriz ACH): (M+H)<sup>+</sup> = 867,54; (M+Na)<sup>+</sup> = 889,58; (M+K)<sup>+</sup> = 905,54.

AAA: Ser 0,81(subproducto de degradación de {Oxa}); Pro 1,10; Ala 1,09; Ile 0,98;

Phe 1,02; Lys 2,21.

**P36. Ciclo(Lys-Ser-{Oxa}-Lys-Ile-Pro-Phe).**

Resina: Cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con

L-Prolina, 400 mg.

Funcionalización: 0,69 mmol/ g

Tamaño de partícula de la resina: 100-200 mesh

Grupos protectores: Lys(Boc), Ser(<sup>t</sup>Bu)

Rendimiento: 27 %

Pureza: 97 %

Cantidad: 65,9 mg

HPLC: tr = 7,94, gradiente 0→ 100 % en 15 min,

columna C18 (5 $\mu$ m),  $\lambda$  = 220 nm.

HPLC: tr = 5,68, gradiente 15→ 70 % en 15 min, columna C18 (5 $\mu$ m),  $\lambda$  = 220 nm.

MALDI (matriz ACH): (M+H)<sup>+</sup> = 883,45; (M+Na)<sup>+</sup> = 905,44; (M+K)<sup>+</sup> = 921,41.

AAA: Ser 1,55 (relación aumentada por subproducto de degradación de {Oxa}); Pro

1,04; Ala 1,01(subproducto de degradación de {Oxa}); Ile 0,92; Phe 1,00; Lys 2,04.

### 6.3. EXPERIMENTAL DEL CAPÍTULO 4

Los estudios de dicroísmo circular se han realizado con un espectropolarímetro Jasco J-810, con un rango de trabajo de 163 a 900 nm equipado con lámpara de Xenón de 150 W y lámpara de mercurio-xenón. Se realizó la lectura de los espectros entre 190 y 280 nm, realizando dos acumulaciones a 20 nm/min (“data pitch” 0,5 nm, “band width” 1 nm, “response” 4 sec., sensibilidad estándar). Se utilizó una función de procesado de datos de tipo Savitzky-Golay<sup>139</sup> con la intención de suavizar las bandas de los espectros de DC y facilitar su interpretación (se trata de una técnica que preserva las características del espectro de DC, tales como los mínimos y máximos relativos). Como disolvente se utilizó un tampón fosfato de pH 7,4 (40,5 mL de una disolución 0,2 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 9,5 mL de una disolución 0,2 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, diluidos a 100 mL).

Los estudios de fluorescencia sobre liposomas se han realizado en un espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-1501.

#### 6.3.1. Preparación de liposomas

Con los ensayos sobre liposomas se pretende ensayar la capacidad de nuestros péptidos para atravesar membranas fosfolipídicas procariotas, simulando las condiciones ideales para que esto pueda suceder. Así pues, los liposomas están compuestos por una bicapa lipídica constituida de uno o más lípidos diferentes. En nuestro caso decidimos escoger dos como posibles modelos:

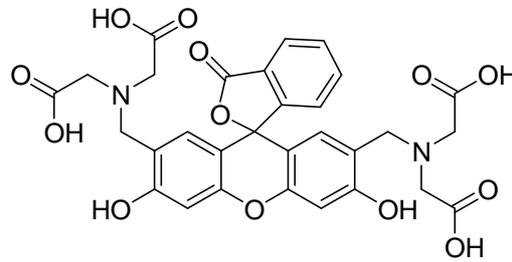
- PC/PS: consiste en una mezcla 80:20 de fosfatidilcolina y fosfatidil serina, ambas procedentes de extractos naturales. Esta mezcla presenta una carga neta negativa similar a la de la membrana bacteriana.
- Extracto lipídico total de E. Coli. Se decidió utilizar esta composición para la puesta a punto del método y los ensayos preeliminares.

La preparación de liposomas que nosotros realizaremos viene condicionada por el marcador fluorescente que se usará y que estará encapsulado en el interior de los

---

<sup>139</sup> Savitzky, A.; Golay, M.J.E.; *Analytical Chemistry*. 1964, 36, 1627-1639

liposomas. Se seleccionó la Calceína (ó Fluorexón). Se trata de un compuesto con 4 grupos ácidos (bastante insoluble a pH ácido por esa razón). Sus propiedades espectroscópicas dependen del grado de protonación del compuesto (pH) y de su concentración.



Calceína

Las fases de preparación de liposomas son las siguientes:

**A) Preparación de un film lipídico.** Este consta de 3 etapas:

- a. Disolución de los lípidos en  $\text{CHCl}_3$  y/o MeOH (10-25 mg/mL). Utilizamos en nuestro caso 2,5 mg de extracto lipídico total de *E.coli* en  $\text{CHCl}_3$  y unas gotas de MeOH.
- b. Evaporación del disolvente (bajo atmósfera inerte) a temperatura ambiente.
- c. Eliminación de trazas de disolvente (utilizamos para ello un desecador a vacío con parafina/KOH durante 48 horas).

Los liposomas se pueden conservar un máximo de 1 semana en esta fase. Es importante conservarlos en atmósfera de argón a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

**B) Hidratación del film.** En esta etapa se escogen las variables del experimento en función de las necesidades propias. Se ha de escoger un tampón adecuado, que proporcione el pH ideal para la realización de nuestro experimento y adecuado al tipo de aparato que usaremos (ya sean células, fluorímetro, etc...)

En nuestro caso se seleccionó un tampón 2,5 mM HEPES<sup>140</sup>. En 2,5 mL de tampón HEPES 2,5 mM se disuelven 125 mg del compuesto fluorescente calceína, previamente tratado con unas gotas de NaOH 3M. Se obtiene una disolución de color rojo intenso de pH 9,5. Este se ajusta a un pH de 8,5 con HCl 0,1 M. No se puede reajustar a pH 7,4 ya que precipita la calceína.

La hidratación se lleva a cabo a 37-40 °C (es importante que esta esté siempre por encima de la T<sub>c</sub> de los lípidos) tras la adición a 2,5 mL del tampón con calceína de 2,5 mg de fosfolípido de *E.coli*.

### **C) Homogenización del tamaño.**

Las estructuras que se forman pueden ser de tamaño variable (bicapas lipídicas, micelas...) y por tanto es muy necesario llevar a cabo una homogenización del tamaño. Existen varios procesos que se hacen de forma separada o combinada para conseguir esta estandarización de tamaño:

- Sonicación. Se lleva a cabo durante 1 hora a 40 °C.
- Ciclos de congelación (-78 °C)/ descongelación (40 °C). Se realizan a continuación de la sonicación. Se repite este ciclo 5 veces. Los ciclos de congelación se llevan a cabo en acetona/ nieve carbónica y la descongelación en baño de agua a 40 °C
- Extrusión. Este método no lo utilizamos para la preparación de nuestros liposomas.

Tras este proceso, los liposomas pueden utilizarse durante unos 7 días, conservándolos a 4 °C cuando no se utilizan.

En nuestro caso hemos encapsulado una molécula fluorescente y, por tanto, es necesario eliminar el exceso de la emulsión. Para ello se utilizan sobretodo dos técnicas:

- Diálisis

---

<sup>140</sup> Composición del tampón HEPES 2,5 mM: 2,5 mM de la sal hemisódica del ácido (N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico), 145 mM NaCl y 1 mM NaN<sub>3</sub>.

- Columna de exclusión molecular

En nuestro experimento preeliminar decidimos utilizar la columna de exclusión molecular. Este tipo de columna separa moléculas de distinto tamaño. Las más pequeñas quedan retenidas en los poros que se forman en los polímeros entrecruzados que forman su estructura. Seleccionamos para este experimento el polímero Sephadex TM LH-20. Este polímero está formado por gránulos de fibras de dextrano hidroxipropilado entrecruzadas.

Al eluir nuestro tampón con liposomas y la calceína en exceso no encapsulada por este tipo de columna obtenemos como primer producto de elusión los liposomas. La calceína libre, de tamaño mucho menor, queda retenida en los poros que forma el dextrano entrecruzado, tardando más en eluir a través de la columna. Así, con este sistema conseguimos obtener una suspensión de liposomas con calceína encapsulada en tampón HEPES.

Existen varias técnicas para poder comprobar el tamaño de los liposomas, como el light scattering, MTE, etc...pero en nuestro caso no las realizamos.

#### **D) Utilización de los liposomas como modelos de biomembrana**

Una vez preparados los liposomas procedimos a llevar a cabo el experimento. Se seleccionaron para ello dos péptidos: uno sin carga y con solo dos residuos polares (cNSLAIPF **P1**, serie 2P+5A, stylostatin I) y otro cargado y con tres residuos polares (cKSTAIPF **P6**, serie 3P+4A).

##### **1. Péptido cNSLAIPF**

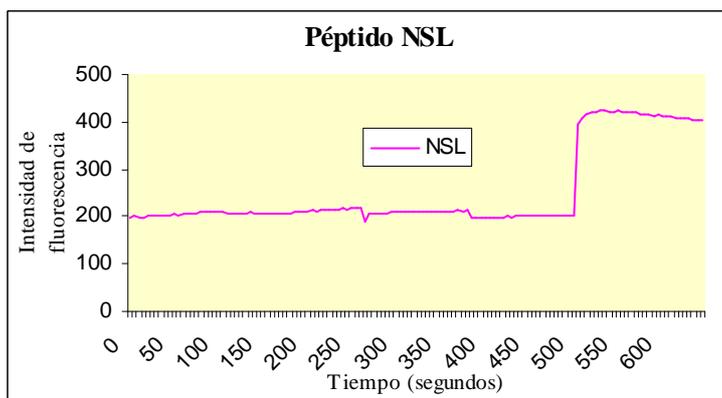
Se realizó el experimento a 40°C. Los máximos de emisión y excitación fueron determinados con anterioridad ( $\lambda_{\max}$  excitación = 485 nm,  $\lambda_{\max}$  emisión = 515 nm). Se realizó una dilución de los liposomas 1/ 150, llevándose hasta 600  $\mu$ L con tampón HEPES. Paralelamente se disolvieron 1,8 mg de NSL en 1,5 mL de tampón HEPES. Tras equilibrado de la recta de la cinética se adicionó la disolución con el péptido sobre la cubeta con la suspensión de liposomas en intervalos aproximados de dos minutos y en cantidades crecientes:

Adición 1: 120 segundos, se añaden 5  $\mu\text{L}$  de la disolución peptídica. (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de péptido).

Adición 2: 265 segundos, se añaden 20  $\mu\text{L}$  de la disolución peptídica (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de péptido).

Adición 3: 380 segundos, se añaden 50  $\mu\text{L}$  de la disolución peptídica (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de péptido).

Adición final (Tritón al 10 % en  $\text{H}_2\text{O}$ ): 507 segundos, 30  $\mu\text{L}$ .



**Figura 64.** Ensayo de la acción sobre membrana procarionta del péptido **P1**. No se observa la formación de poros

## 2. Péptido cKSTAI PF

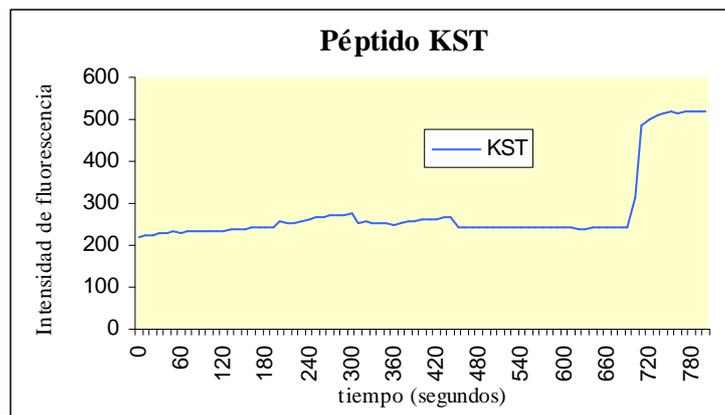
Se realizó el experimento a  $40^{\circ}\text{C}$ . Los máximos de emisión y excitación fueron determinados con anterioridad ( $\lambda_{\text{max}}$  excitación = 485 nm,  $\lambda_{\text{max}}$  emisión = 515 nm). Se realizó una dilución de los liposomas 1/ 150, llevándose hasta 600  $\mu\text{L}$  con tampón HEPES. Paralelamente se disolvieron 1,3 mg de NSL en 0,5 mL de tampón HEPES. Tras equilibrado de la recta de la cinética se adicionó la disolución con el péptido sobre la cubeta con la suspensión de liposomas en intervalos aproximados de dos minutos y en cantidades crecientes:

Adición 1: 170 segundos, se añaden 5  $\mu\text{L}$  de la disolución peptídica. ( 21,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de péptido).

Adición 2: 310 segundos, se añaden 20  $\mu\text{L}$  de la disolución peptídica ( 86,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de péptido).

Adición 3: 440 segundos, se añaden 50  $\mu\text{L}$  de la disolución peptídica (217  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de péptido).

Adición final (Tritón al 10 % en  $\text{H}_2\text{O}$ ): 710 segundos, 30  $\mu\text{L}$ .



**Figura 65.** Ensayo de la acción sobre membrana procariota del péptido **P6**. No se observa la formación de poros.



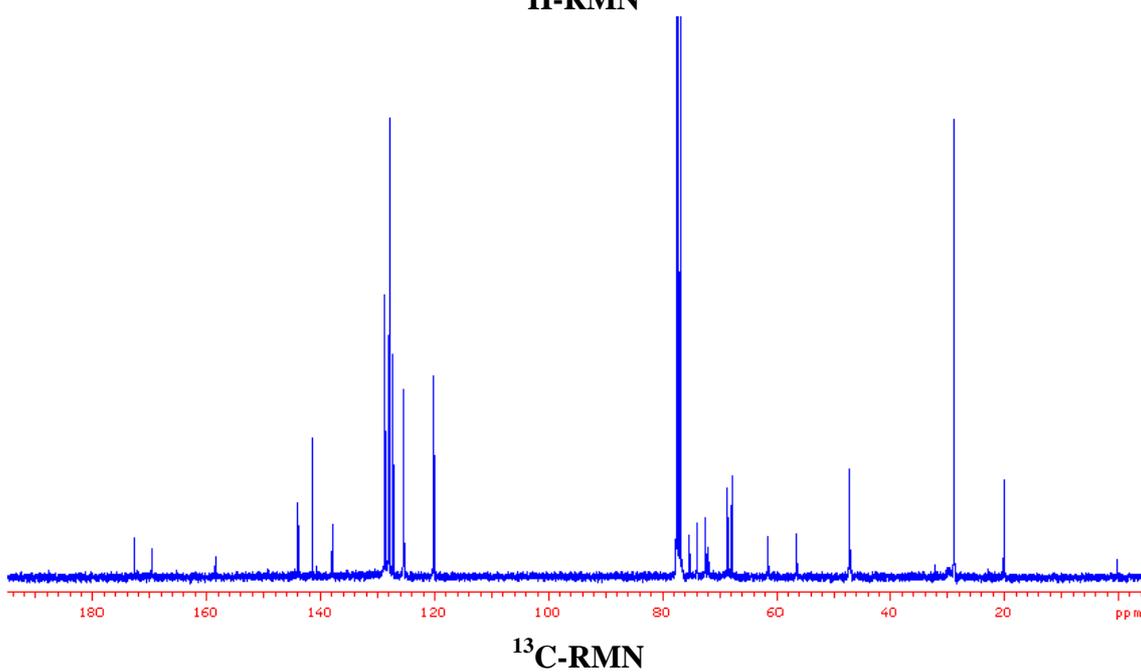
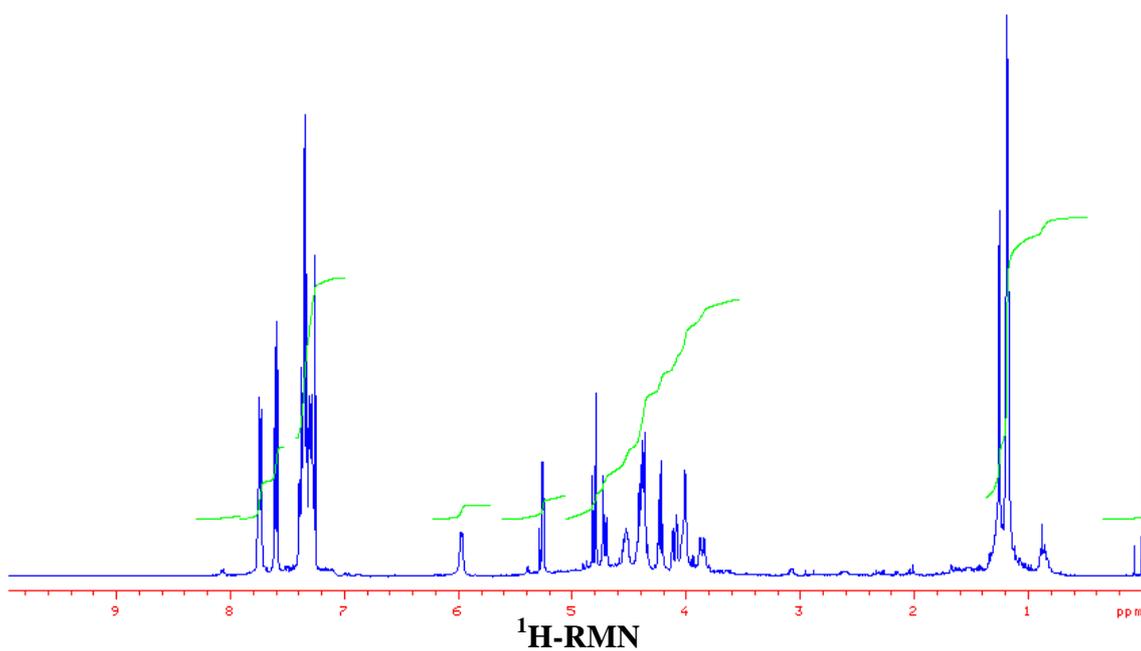
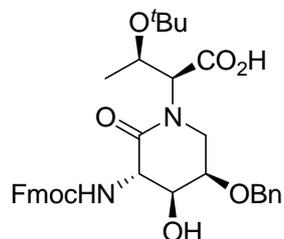
**CAPÍTULO 7**  
**Espectros**

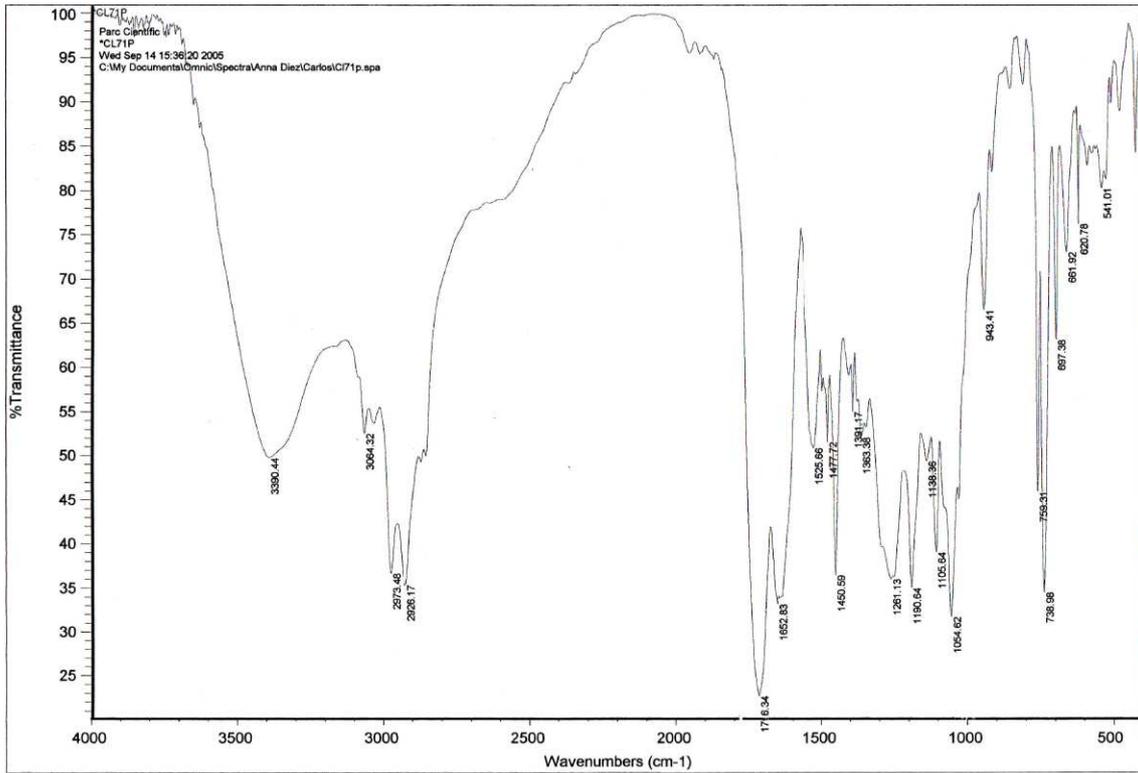
---



## 7.1. ESPECTROS DEL CAPÍTULO 2

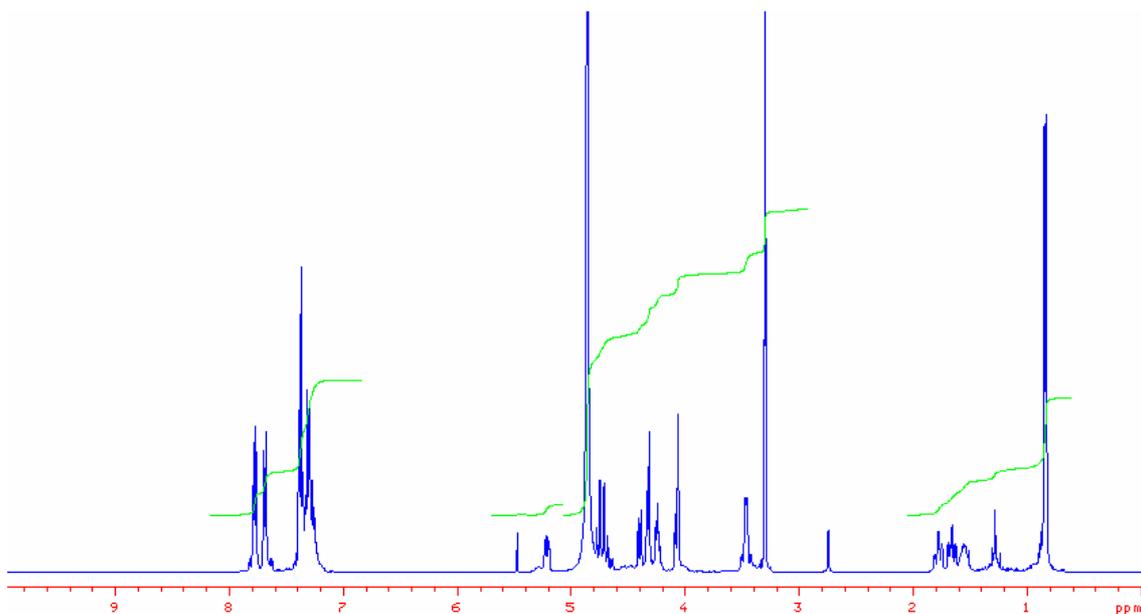
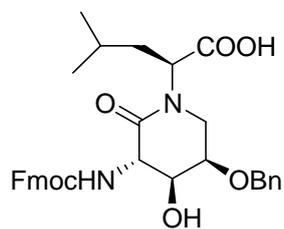
(3*S*,4*S*,5*R*)-5-Benciloxi-*N*-[(1*S*,2*R*)-2-(*tert*-butoxi)-1-(carboxi)-propilamino]-3-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-4-hidroxipiperidin-2-ona. (2)



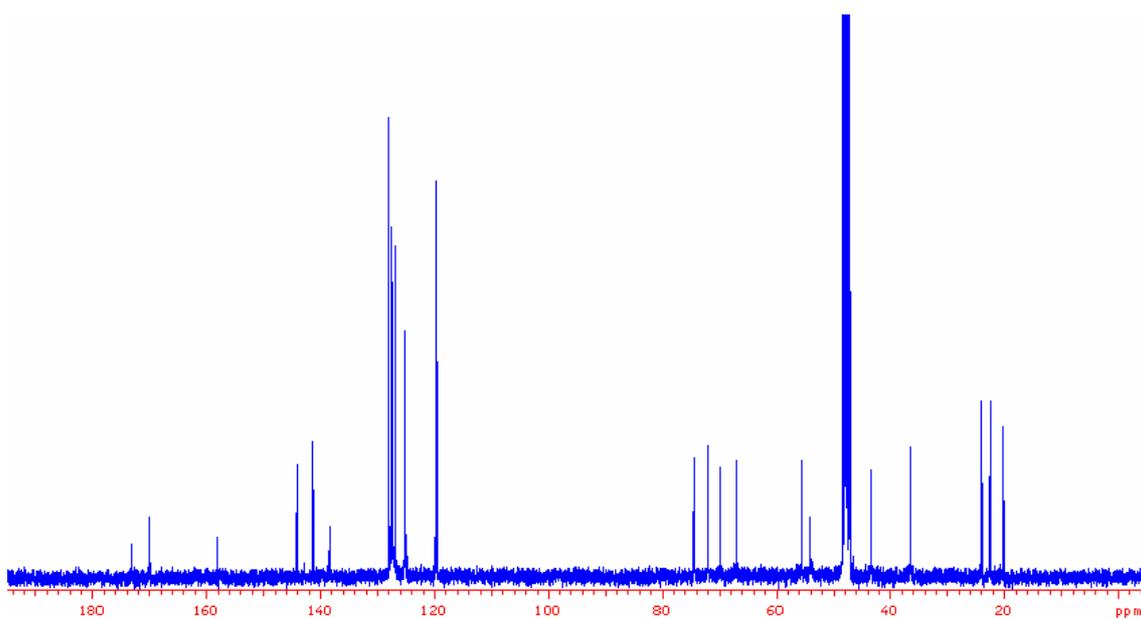


IR

**(3*S*,4*S*,5*R*)-5-Benciloxi-3-(9-fluorenilmetoxicarbonil amino)-4-hidroxi-*N*-[(1*S*)-3-metil-1-carboxibutil]-piperidin-2-ona. (3)**

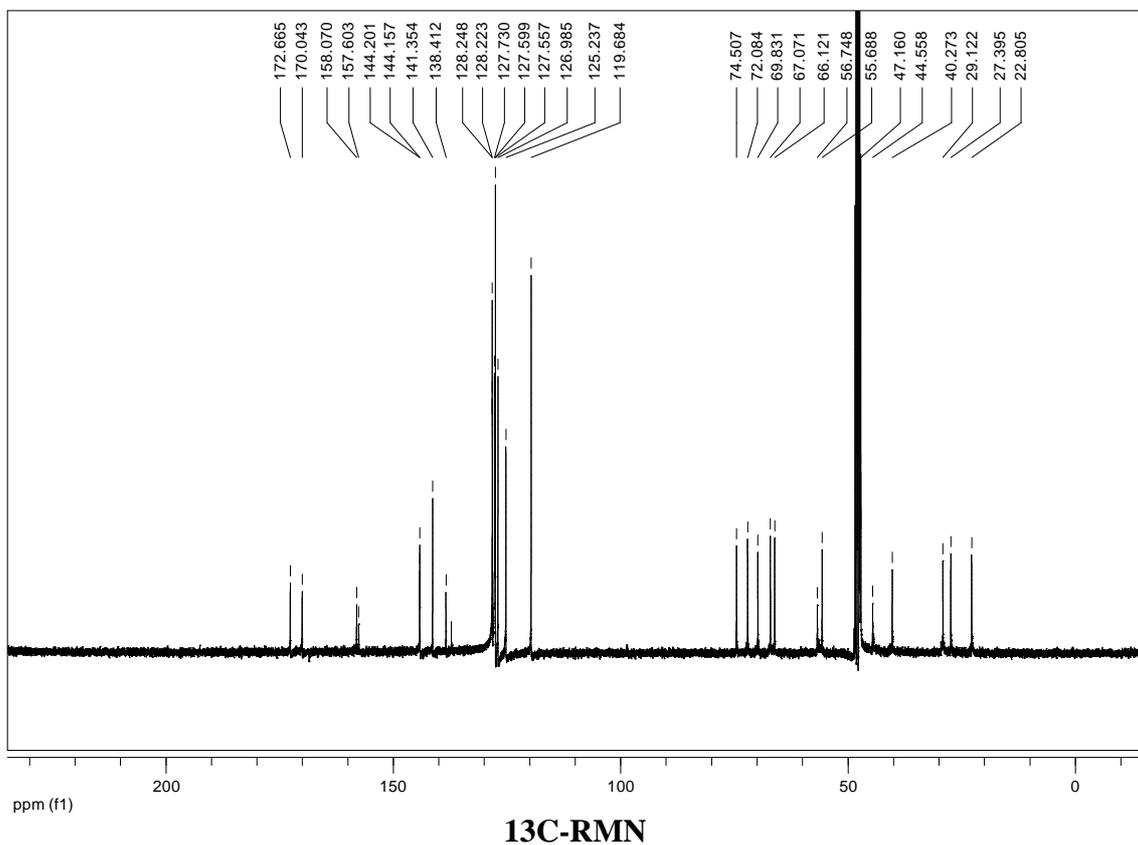
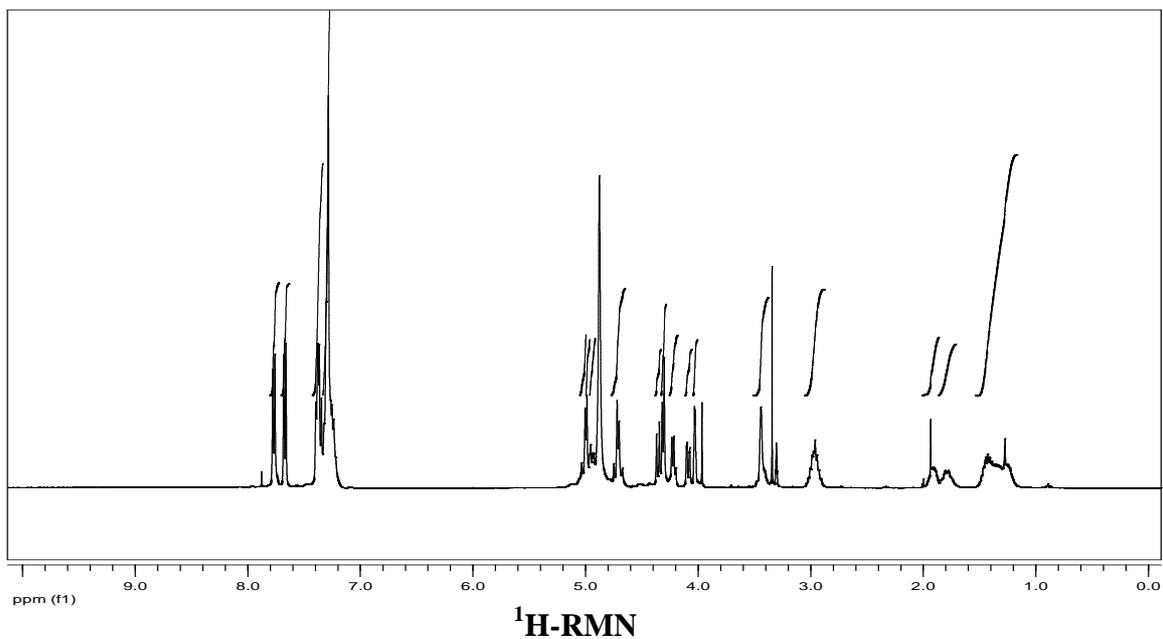
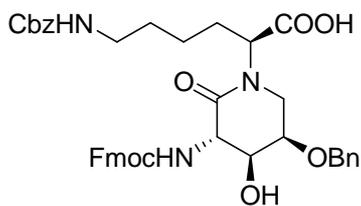


**<sup>1</sup>H-RMN**

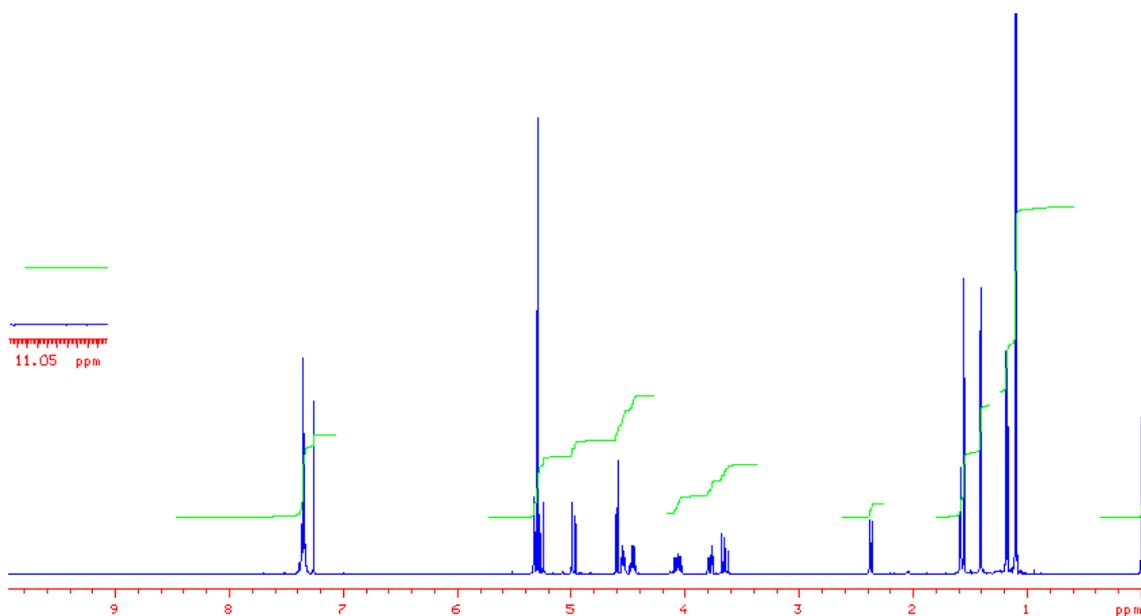
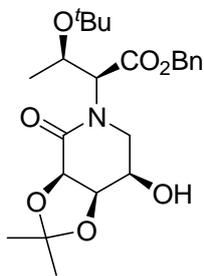


**<sup>13</sup>C-RMN**

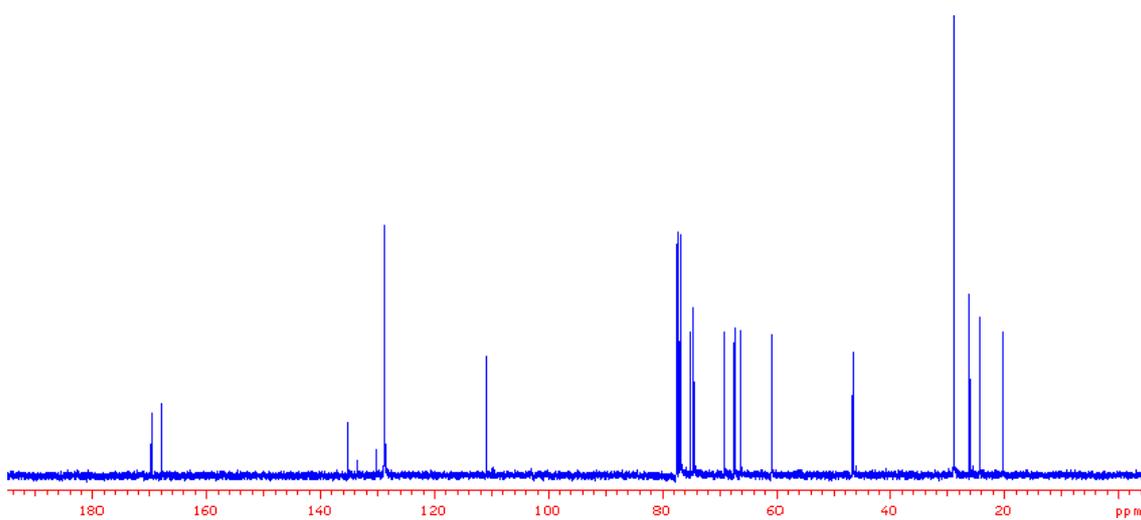
**(3*S*,4*S*,5*R*)-5-Benciloxi-*N*-[(1*S*)-6-(benciloxycarbonilamino)-1-carboxihexil]-3-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-4-hidroxipiperidin-2-ona. (4)**



**(3*R*,4*R*,5*R*)-N-[(1*S*,2*R*)-1-Benciloxycarbonil-2-(*tert*-butoxi)propilamino]-5-hidroxi-3,4-isopropilidendioxipiperidin-2-ona. (6)**

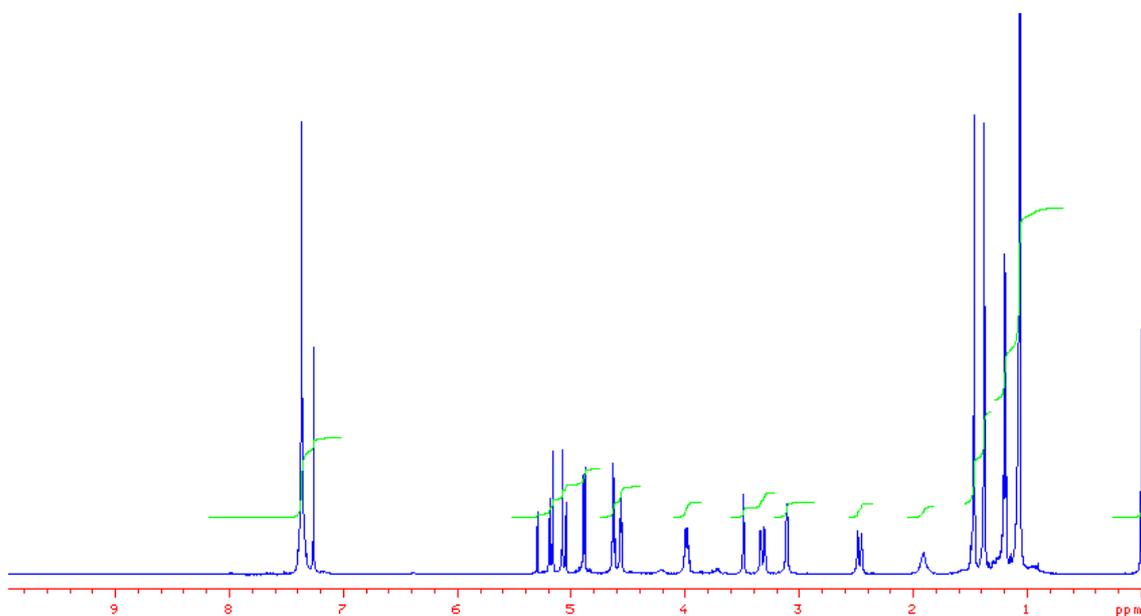
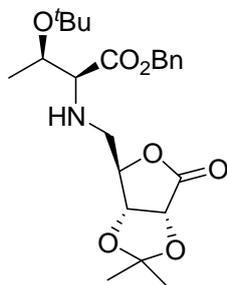


$^1\text{H-RMN}$

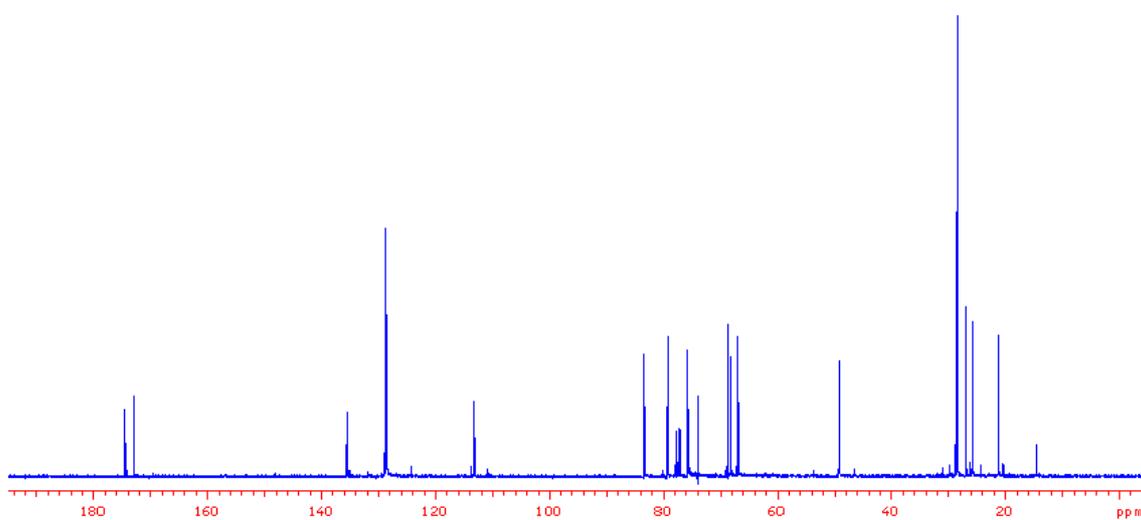


$^{13}\text{C-RMN}$

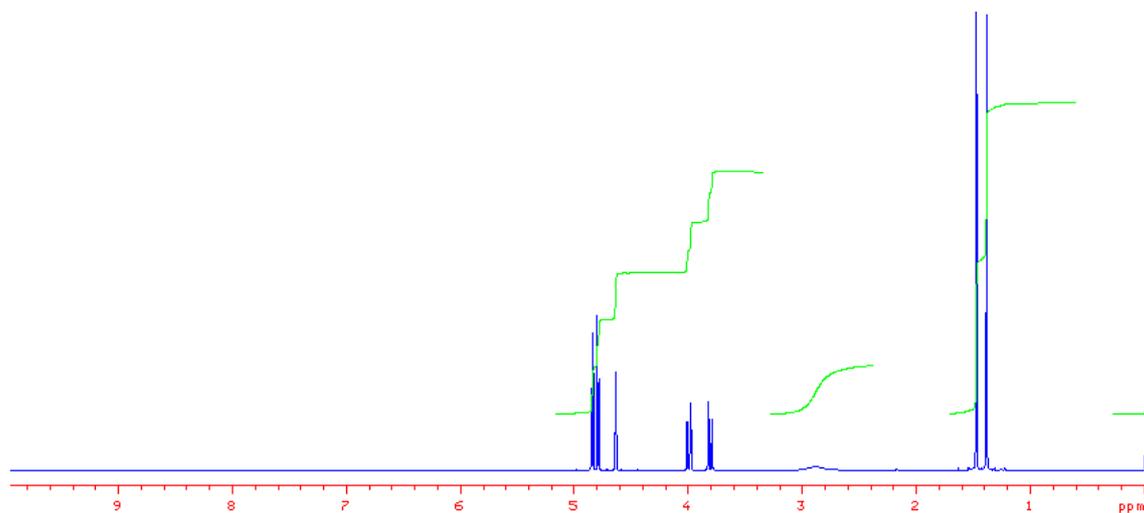
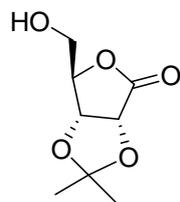
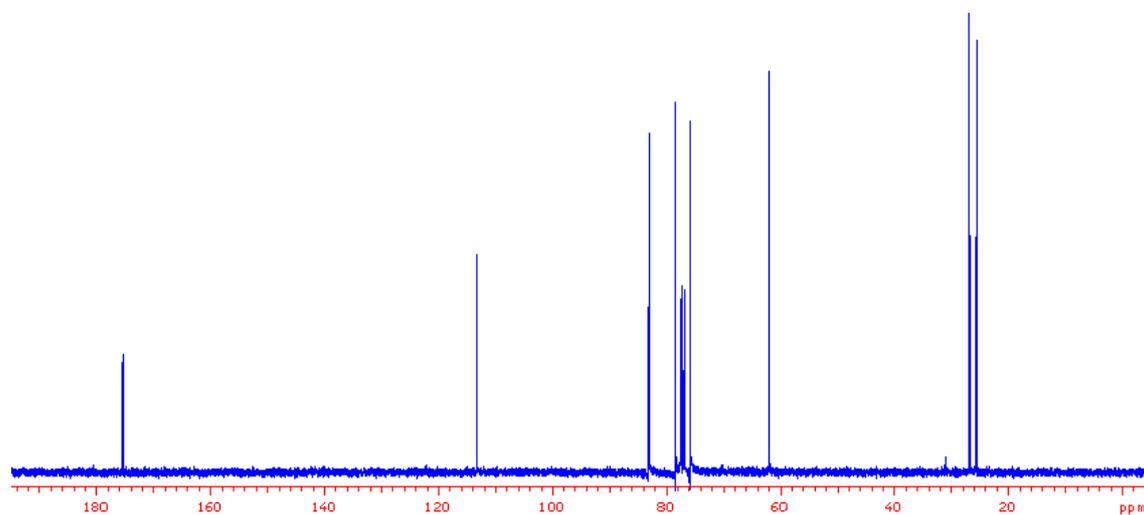
**5-[(1*S*,2*R*)-1-Benciloxycarbonil-2-(*tert*-butoxi)propilamino]-5-desoxi-2,3-isopropilidendioxi- $\gamma$ -D-ribonolactona. (7)**



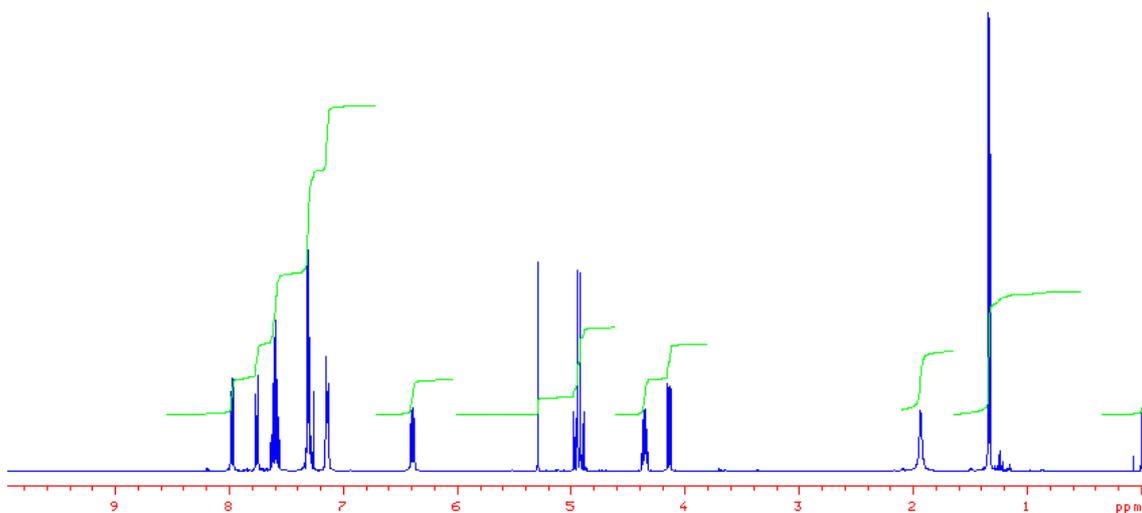
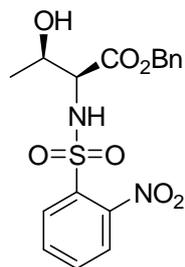
$^1\text{H-RMN}$



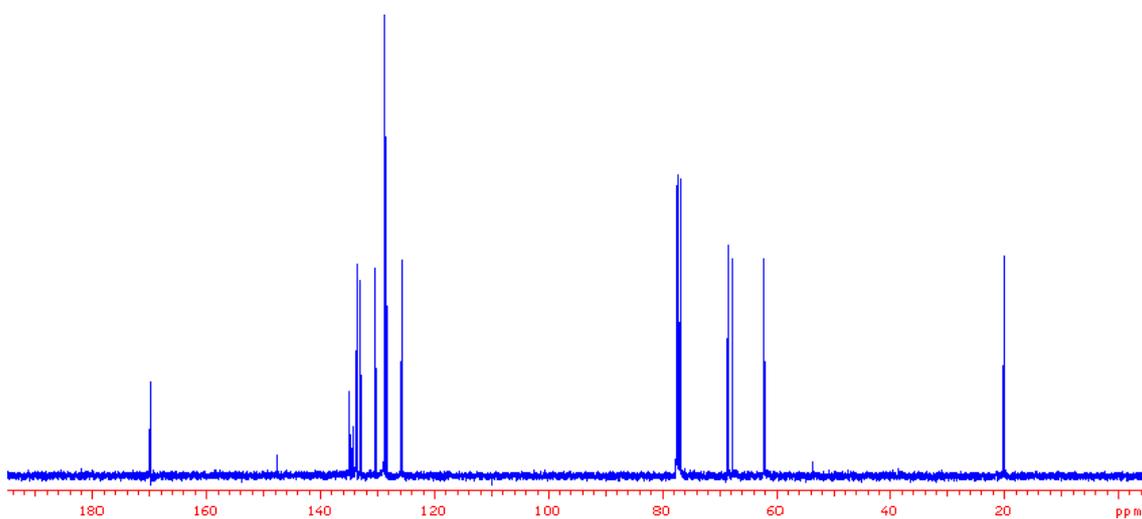
$^{13}\text{C-RMN}$

**2,3-isopropilendioxi-D-ribono-1,4-lactona (9)** **$^1\text{H}$ -RMN** **$^{13}\text{C}$ -RMN**

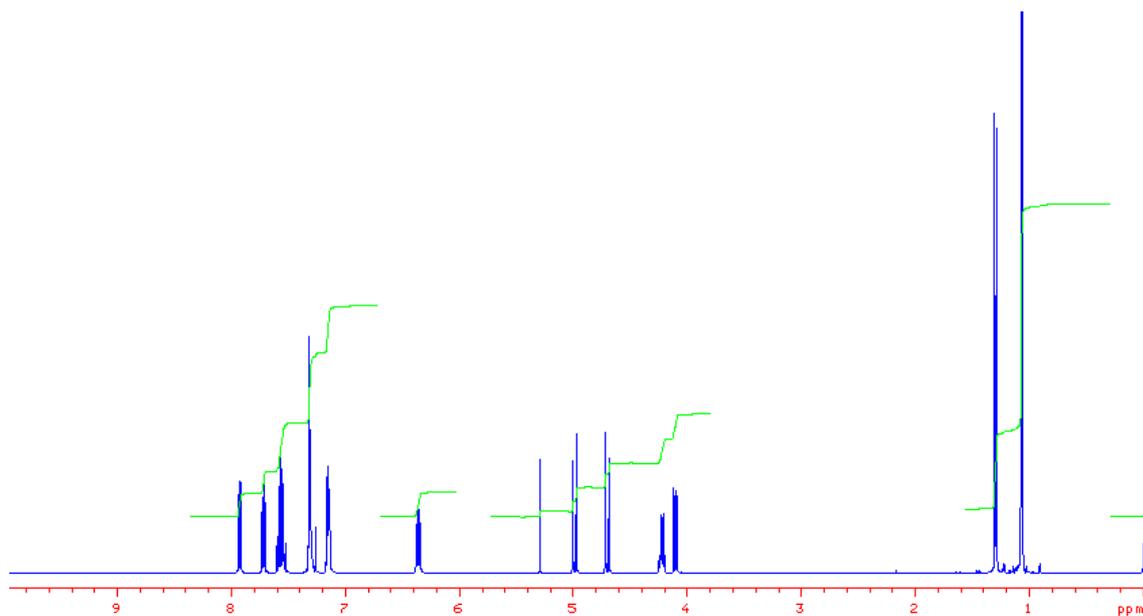
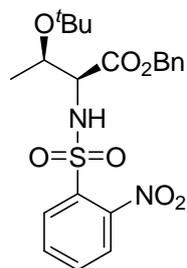
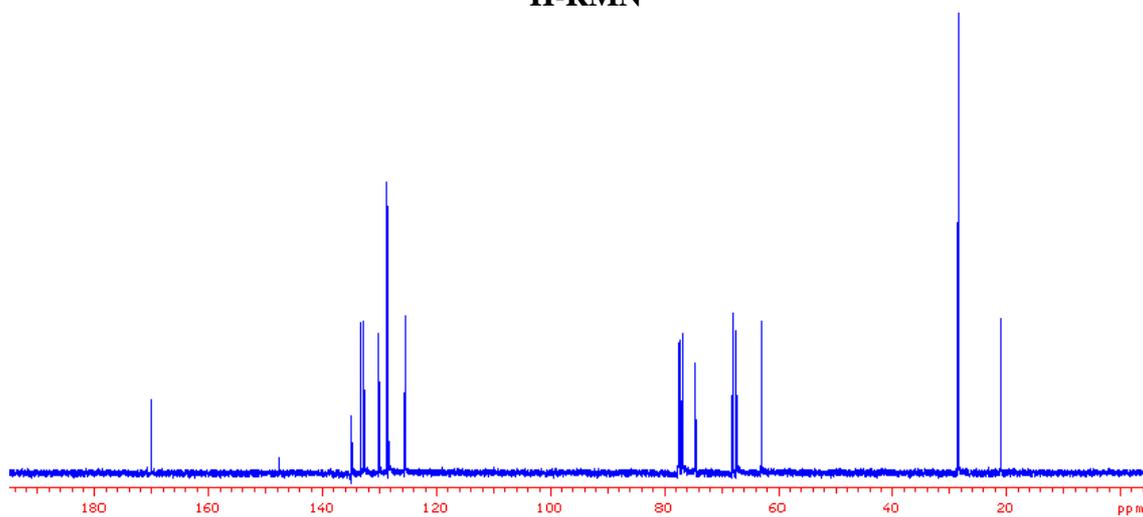
Éster bencílico de la *N*-(*o*-nitrobencensulfonil)-*L*-treonina. (10)



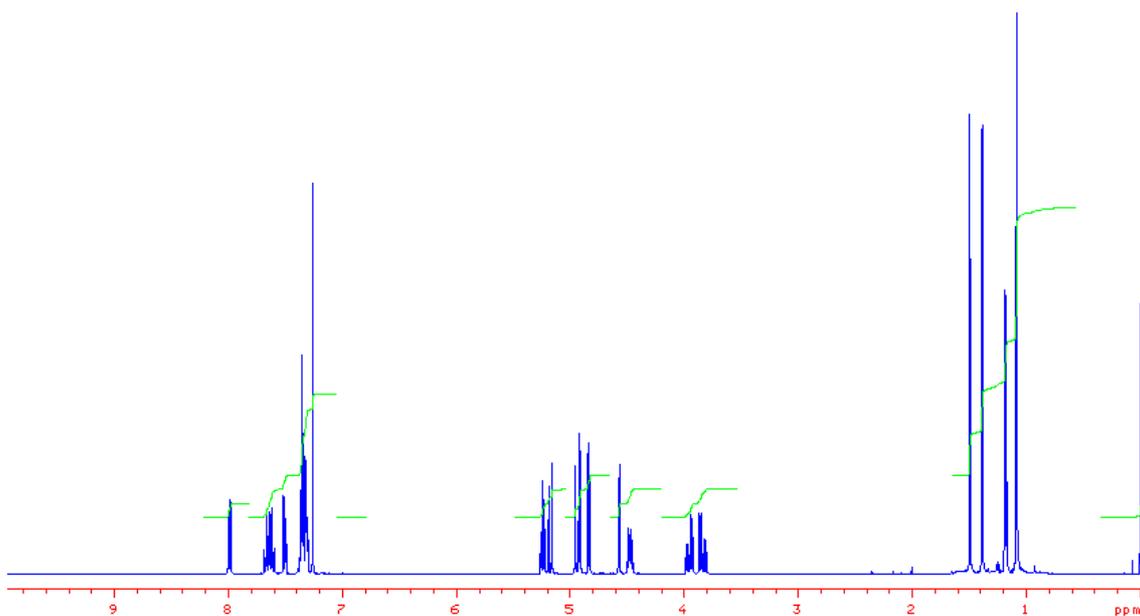
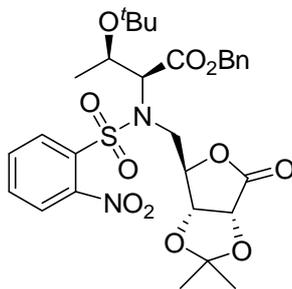
$^1\text{H-RMN}$



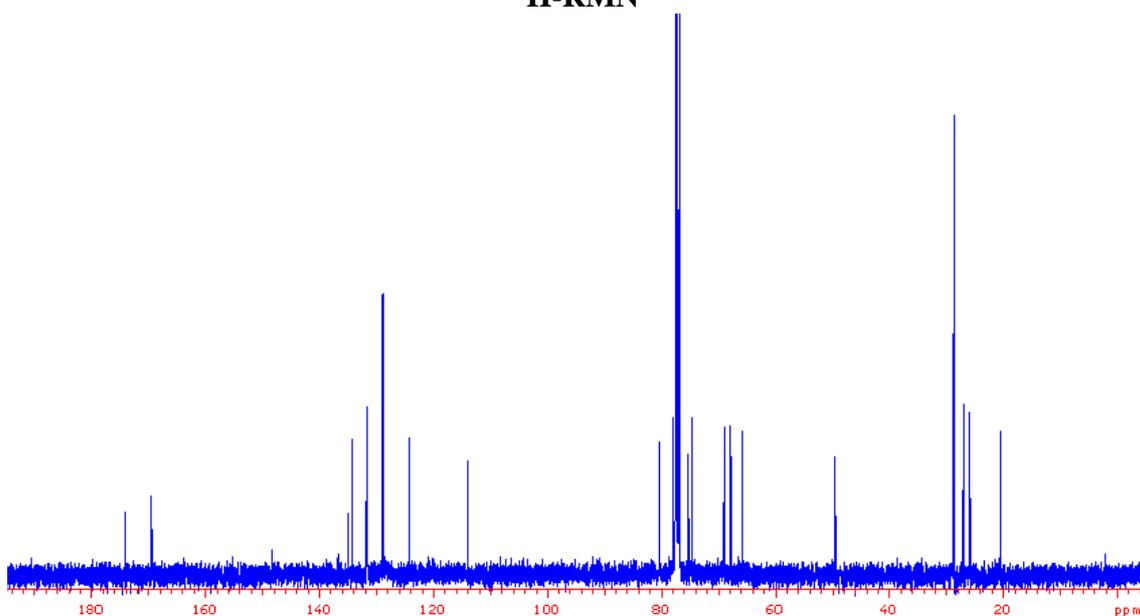
$^{13}\text{C-RMN}$

**Éster bencílico de la *N*-(*o*-nitrobencensulfonyl)-*O*-*tert*-butil-L-treonina. (11)****<sup>1</sup>H-RMN****<sup>13</sup>C-RMN**

**5-[(1*S*,2*R*)-1-Benciloxycarbonil-2-(*tert*-butoxi)propil-(*o*-nitrobenzensulfonil)amino]-5-desoxi-2,3-isopropilidendioxi- $\gamma$ -D-ribonolactona. (12)**

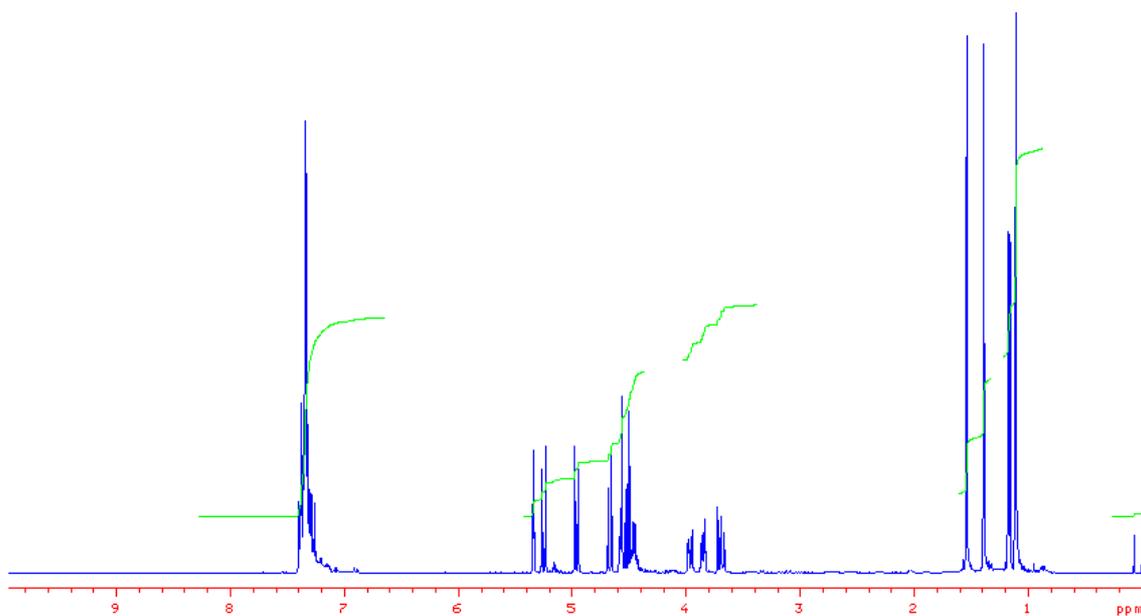
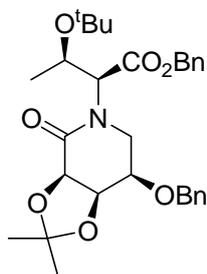


$^1\text{H-RMN}$

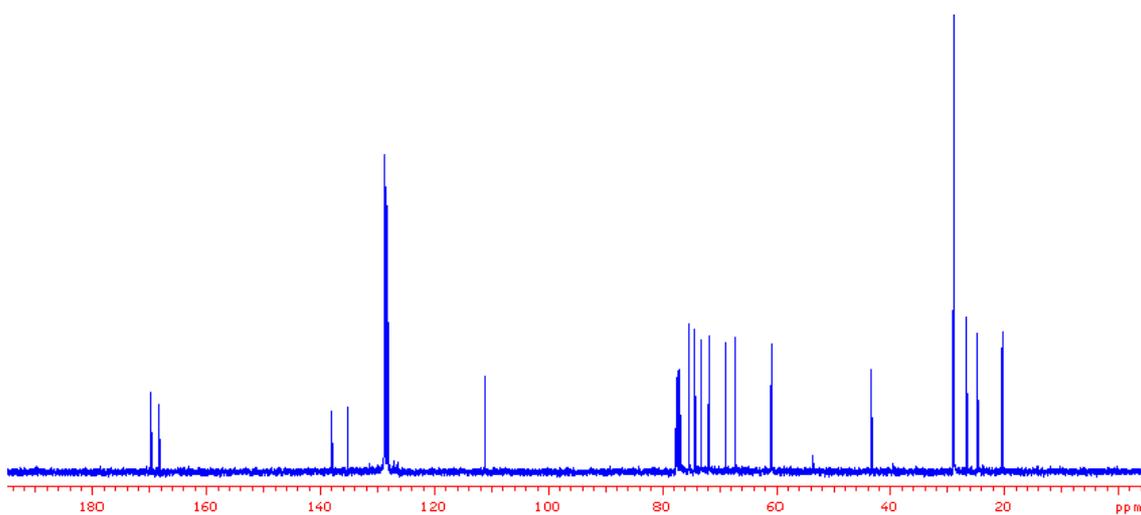


$^{13}\text{C-RMN}$

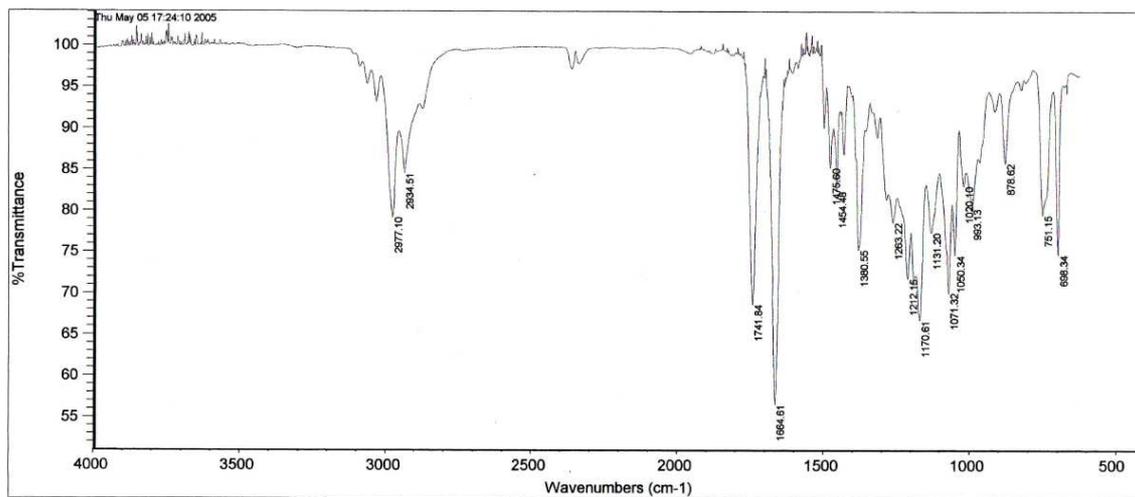
**(3*R*,4*R*,5*R*)-5-Benciloxi-*N*-[(1*S*,2*R*)-1-benciloxycarbonil-2-(*tert*-butoxi)propilamino]-3,4-isopropilidendioxipiperidin-2-ona. (13)**



<sup>1</sup>H-RMN

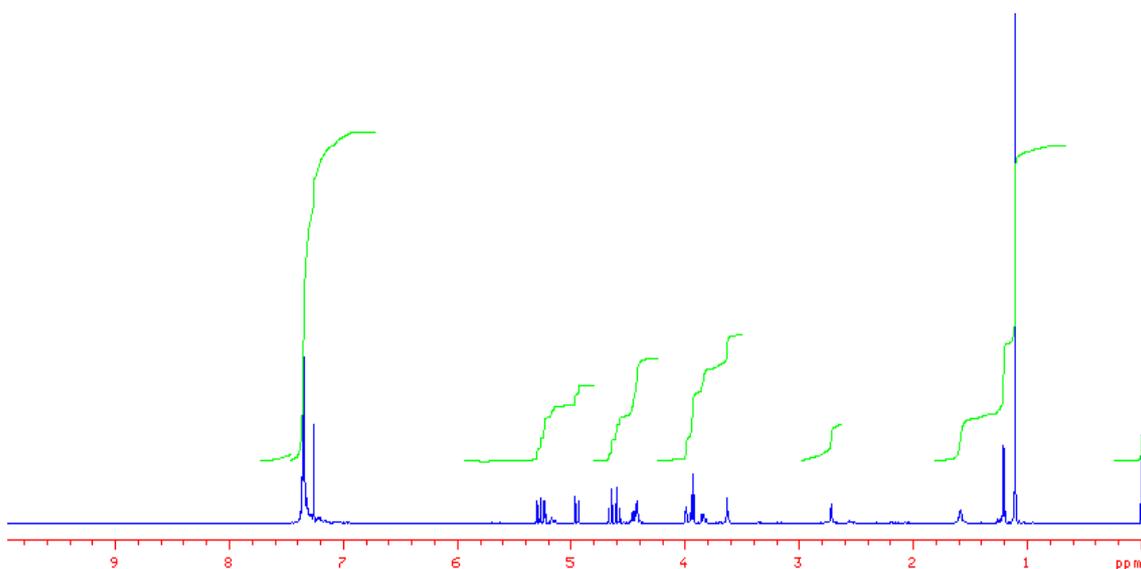
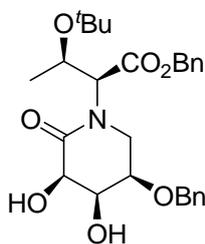


<sup>13</sup>C-RMN

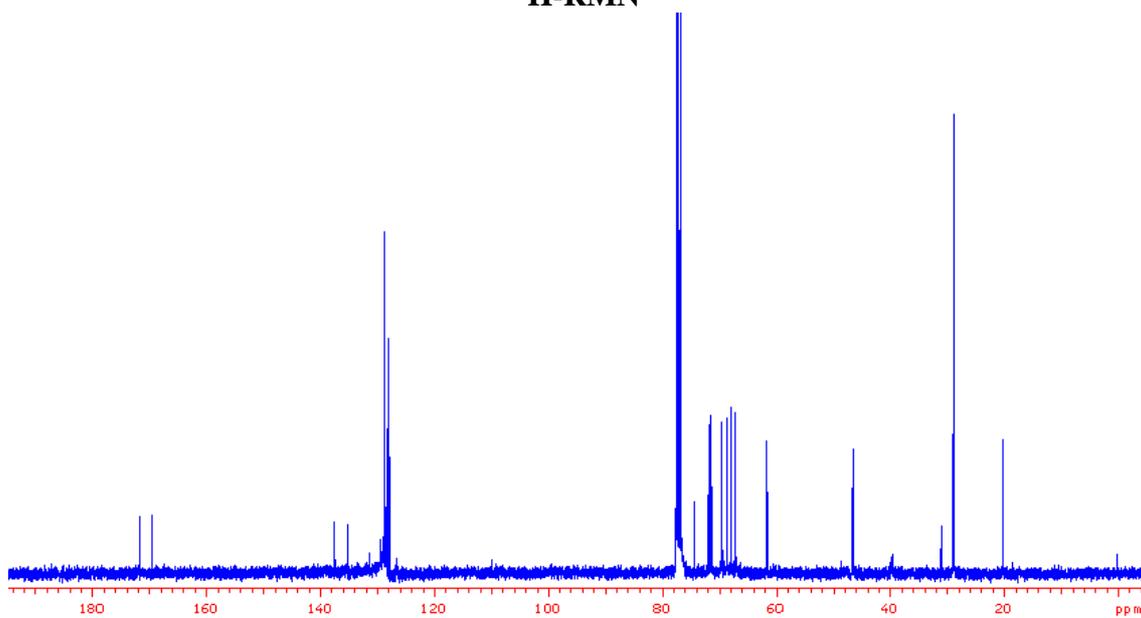


IR

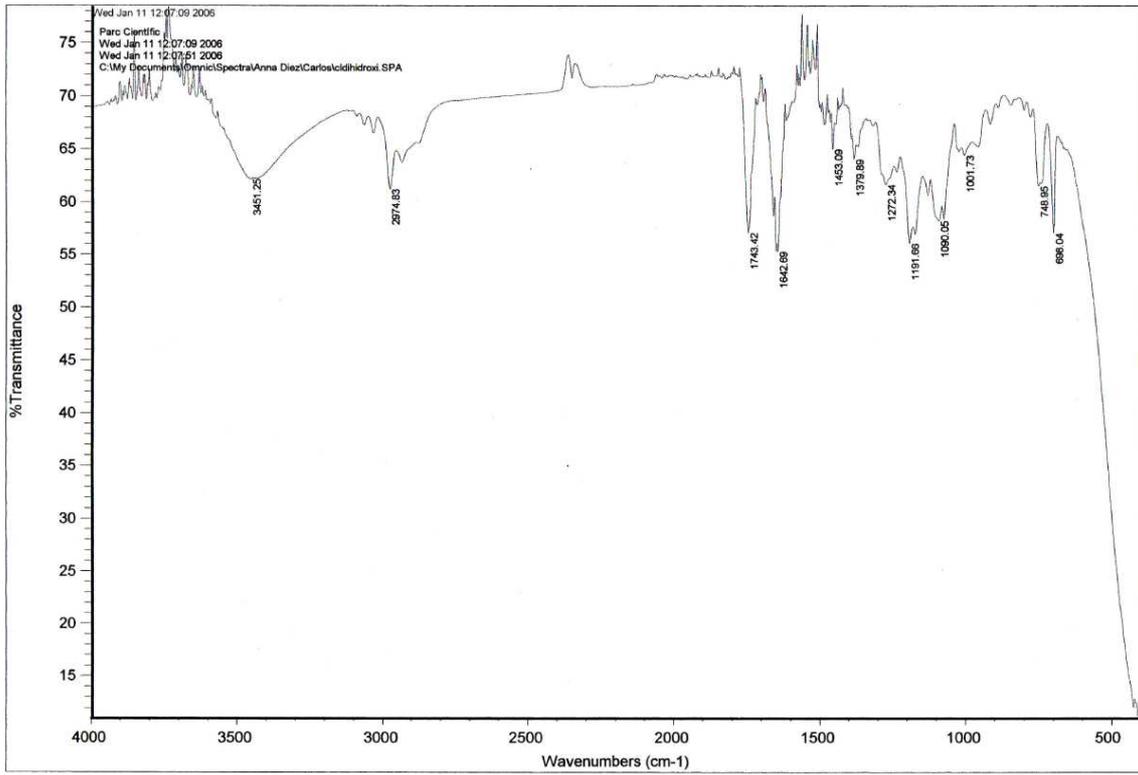
**(3*R*,4*R*,5*R*)-5-Benciloxi-*N*-[(1*S*,2*R*)-1-benciloxicarbonil-2-(*tert*-butoxi)propilamino]-3,4-dioxipiperidin-2-ona. (14)**



**<sup>1</sup>H-RMN**

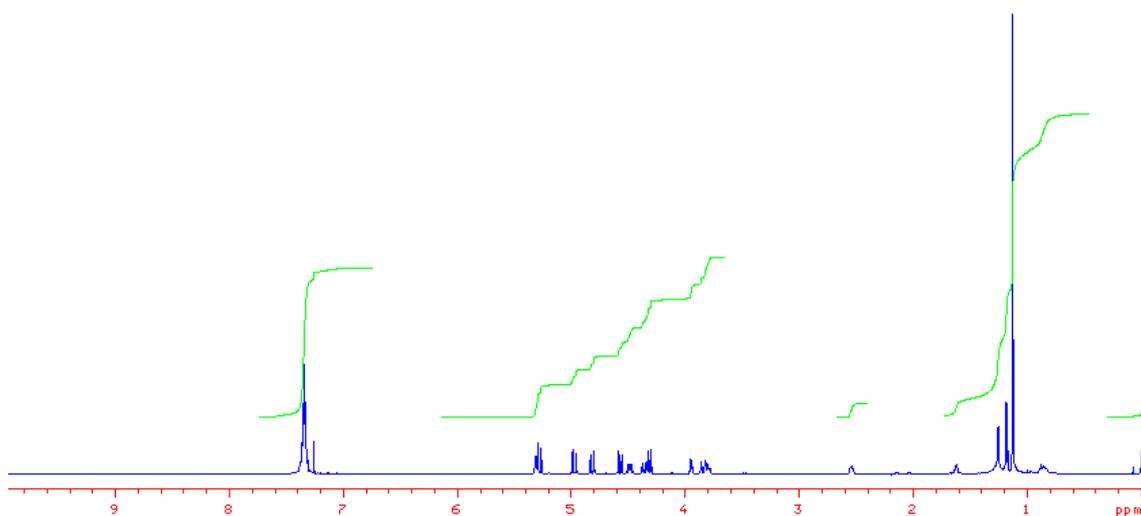
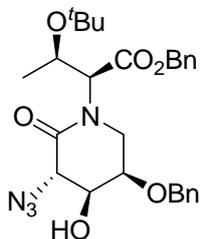


**<sup>13</sup>C-RMN**

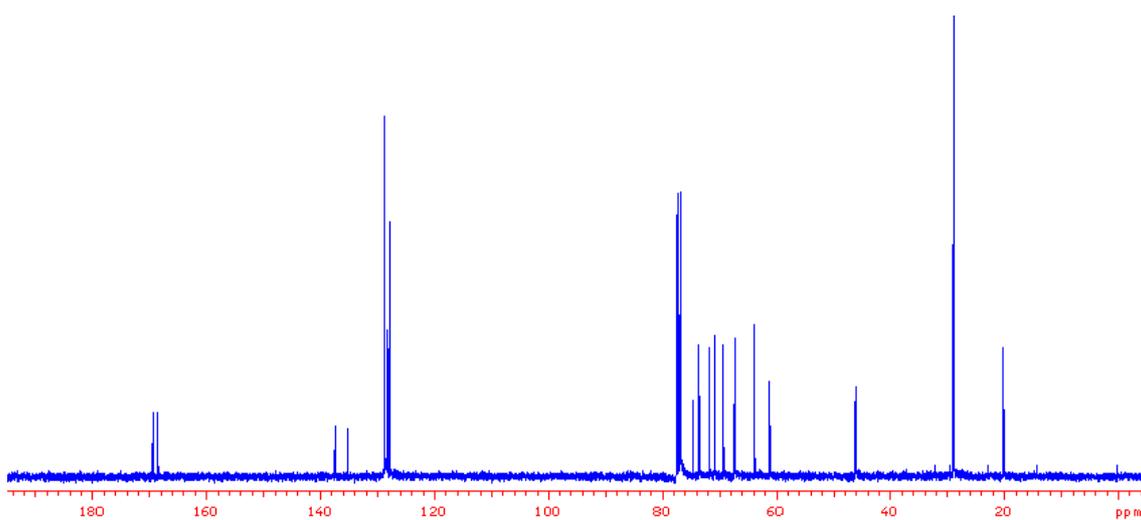


IR

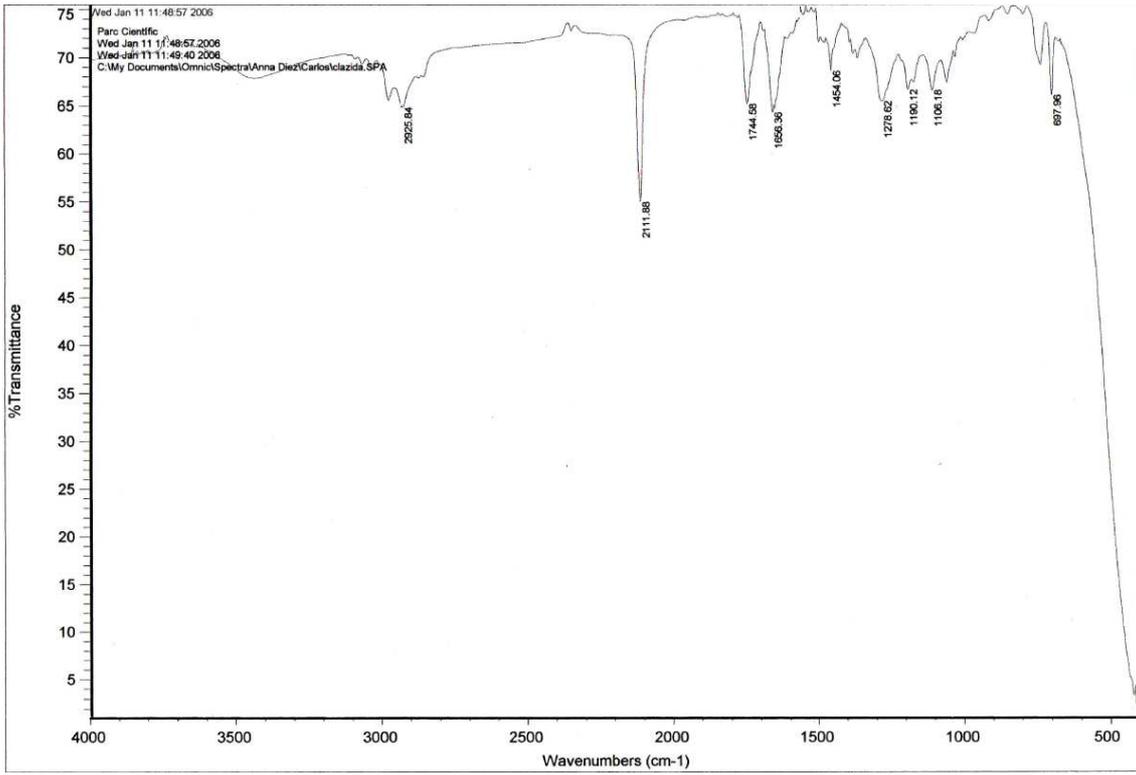
**(3*S*,4*S*,5*R*)-3-Azido-5-benciloxi-*N*-[(1*S*,2*R*)-1-Benciloxycarbonil-2-(*tert*-butoxi)propilamino]-4-hidroxipiperidin-2-ona. (16)**



**<sup>1</sup>H-RMN**

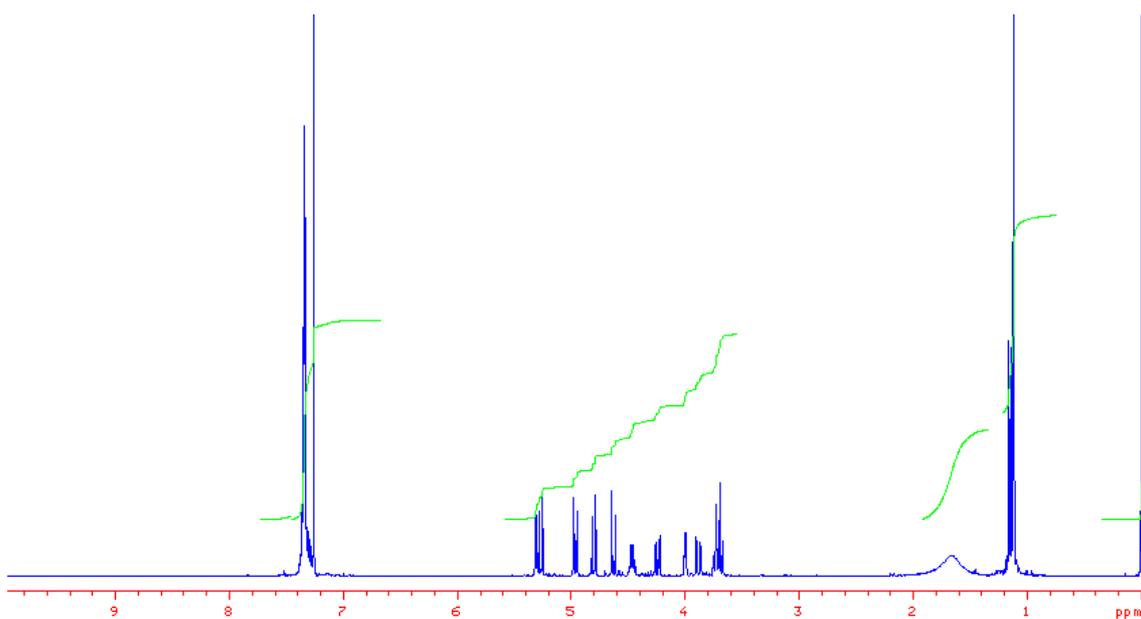
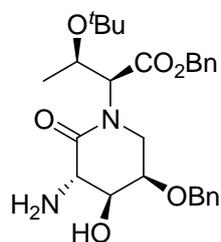


**<sup>13</sup>C-RMN**

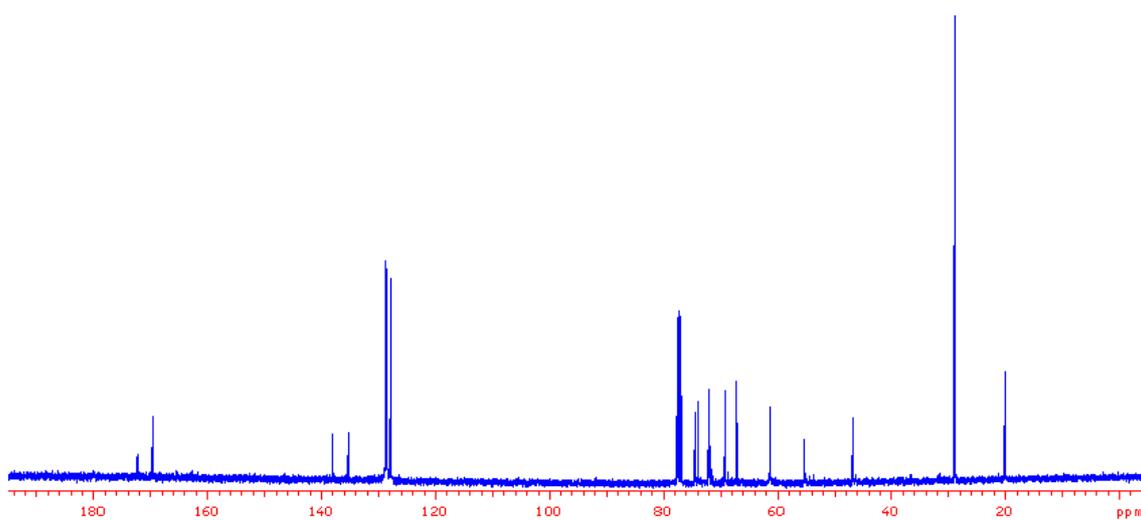


IR

**(3*S*,4*S*,5*R*)-3-Amino-5-benciloxi-*N*-[(1*S*,2*R*)-1-Benciloxicarbonil-2-(*tert*-butoxi)propilamino]-4-hidroxipiperidin-2-ona. (17)**

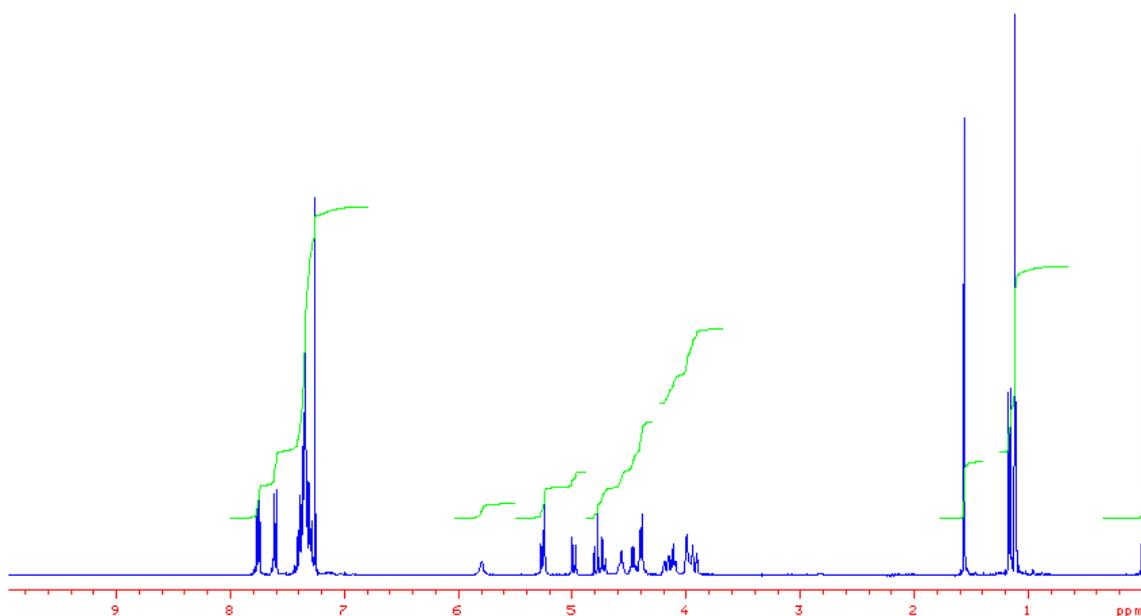
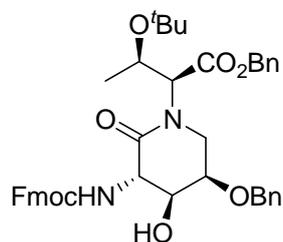


**$^1\text{H}$ -RMN**

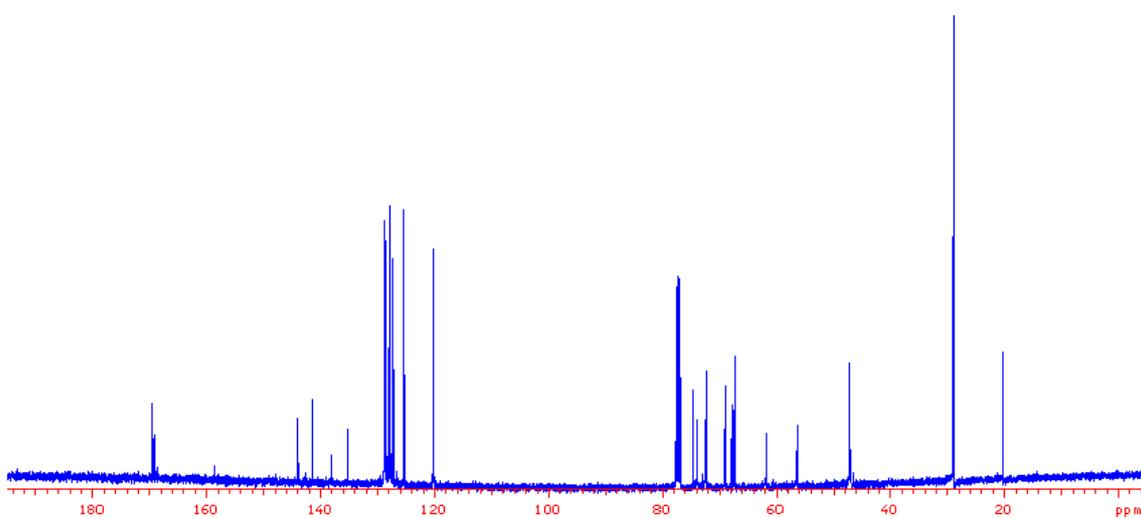


**$^{13}\text{C}$ -RMN**

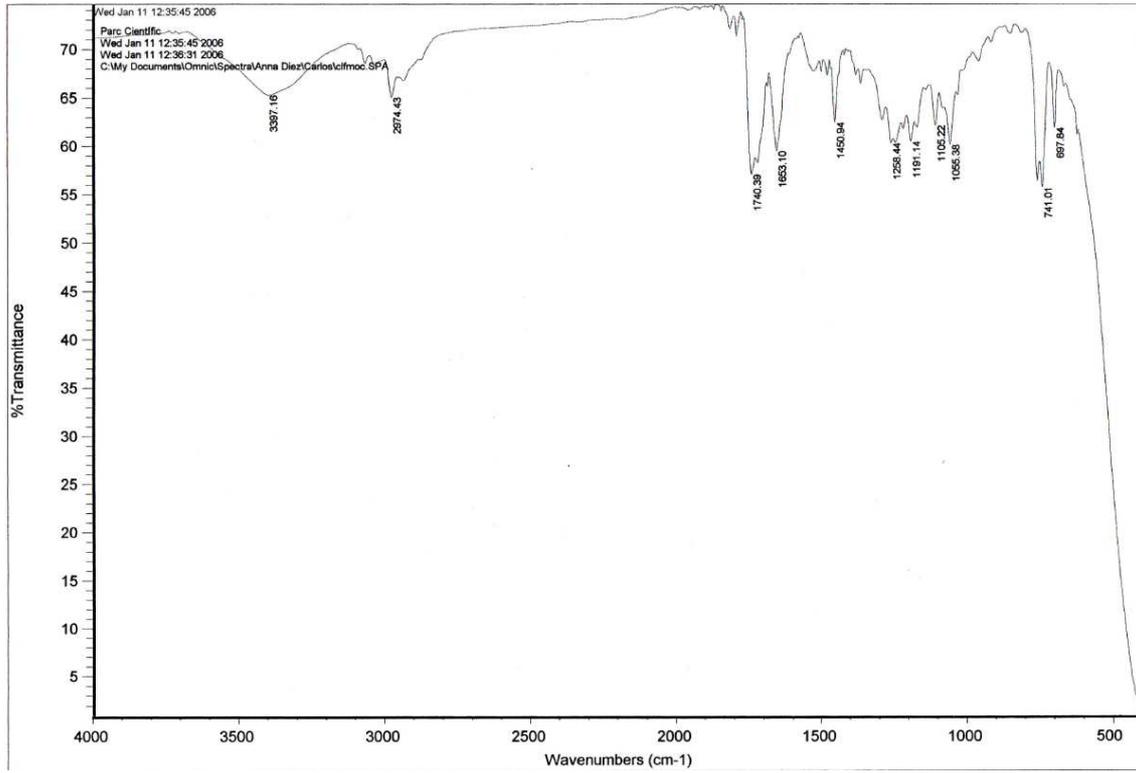
**(3*S*,4*S*,5*R*)-5-Benciloxi-*N*-[(1*S*,2*R*)-1-benciloxycarbonil-2-(*tert*-butoxi)propilamino]-3-(9-fluorenilmetoxycarbonilamino)-4-hidroxipiperidin-2-ona. (18)**



<sup>1</sup>H-RMN

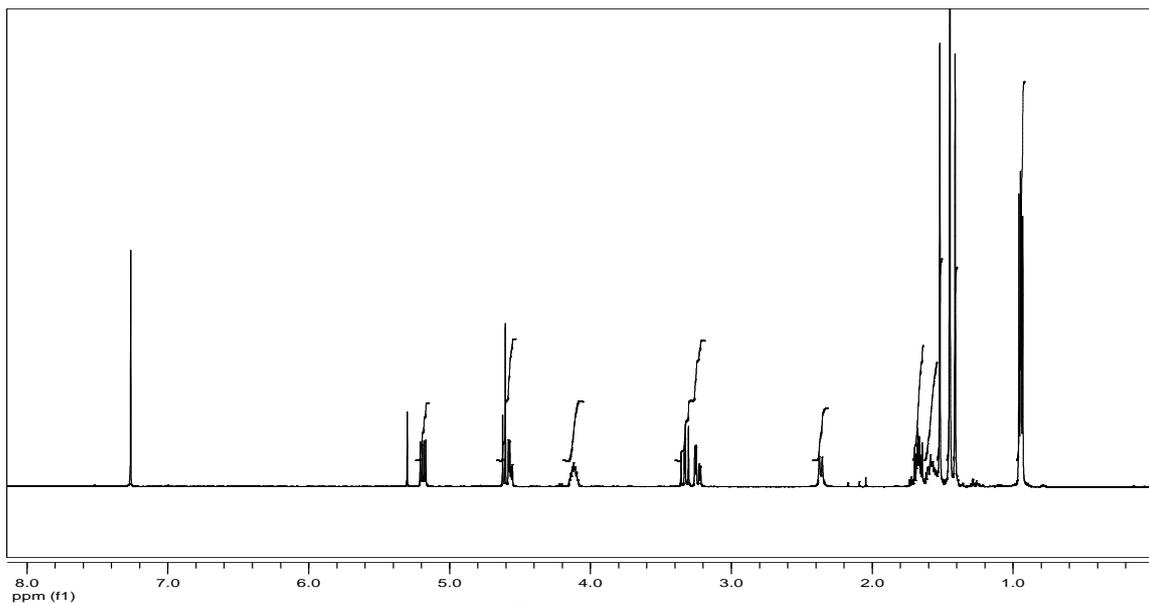
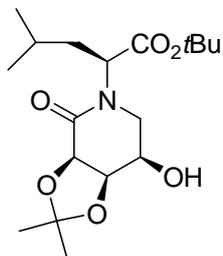


<sup>13</sup>C-RMN

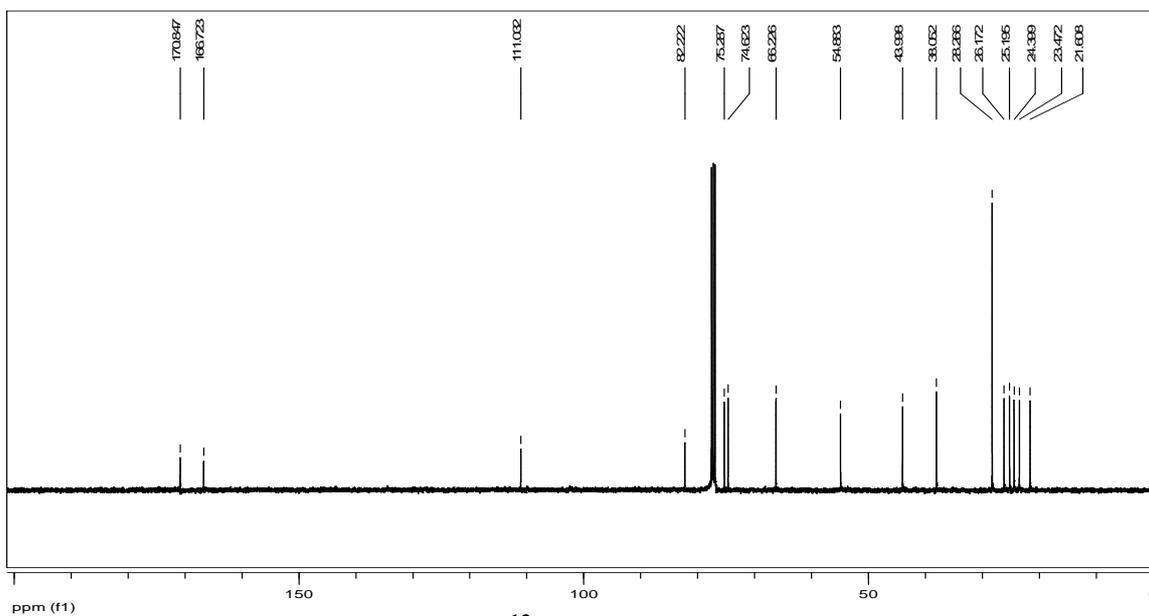


IR

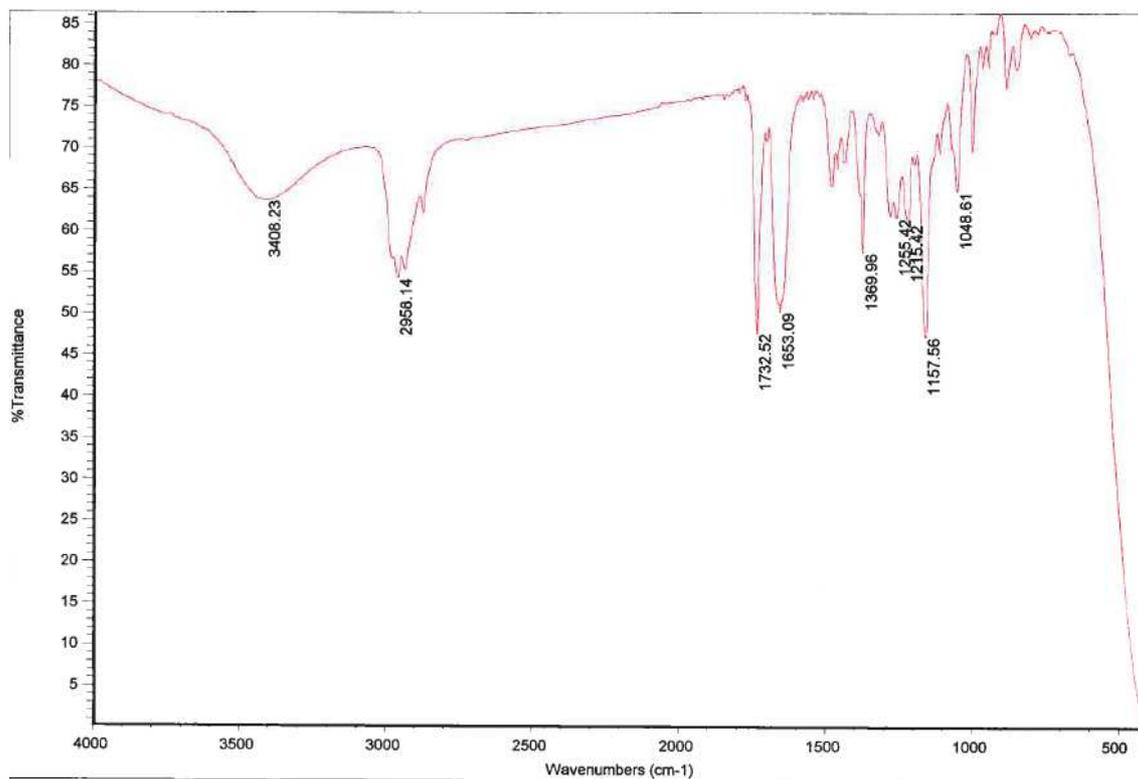
**(3R,4R,5R)-5-Hidroxi-3,4-isopropilidendioxi-N-[(1S)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butil]-piperidin-2-ona.(20a)**



<sup>1</sup>H-RMN

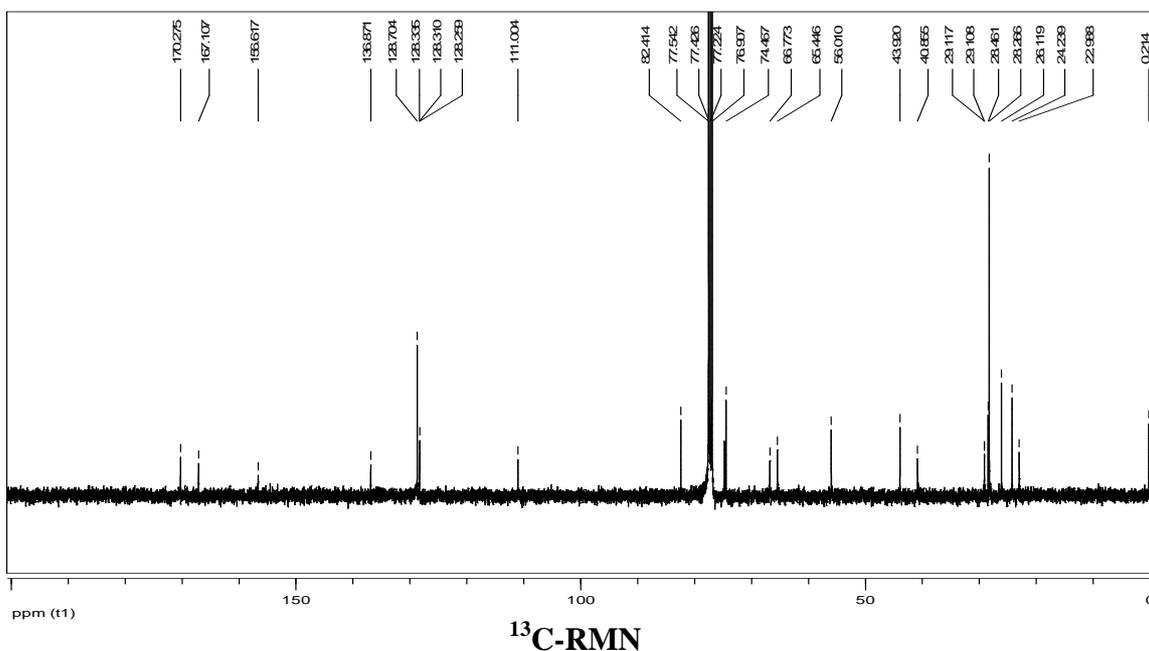
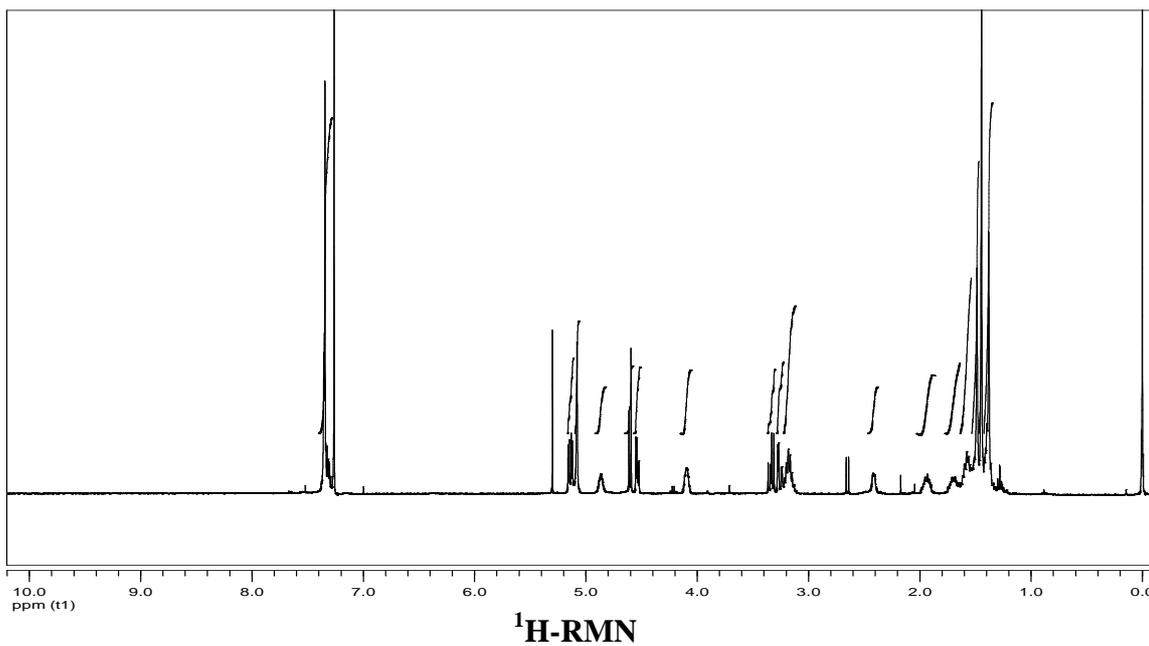
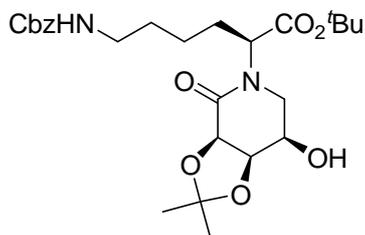


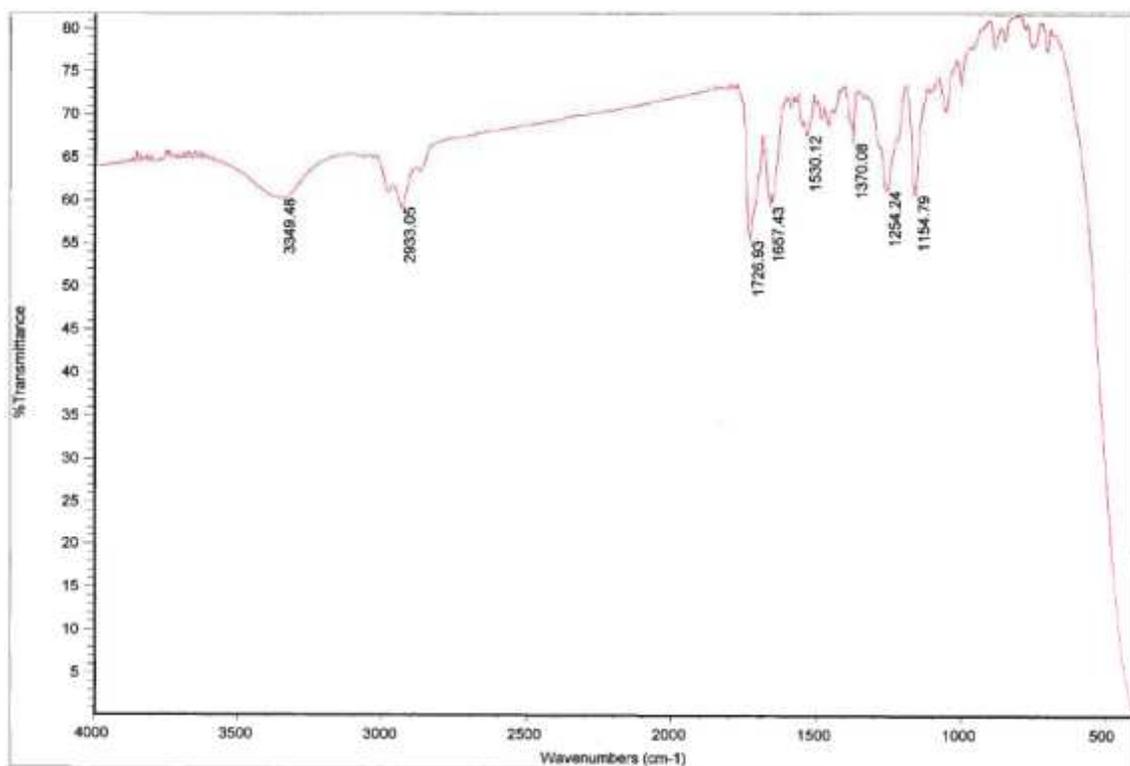
<sup>13</sup>C-RMN



**IR**

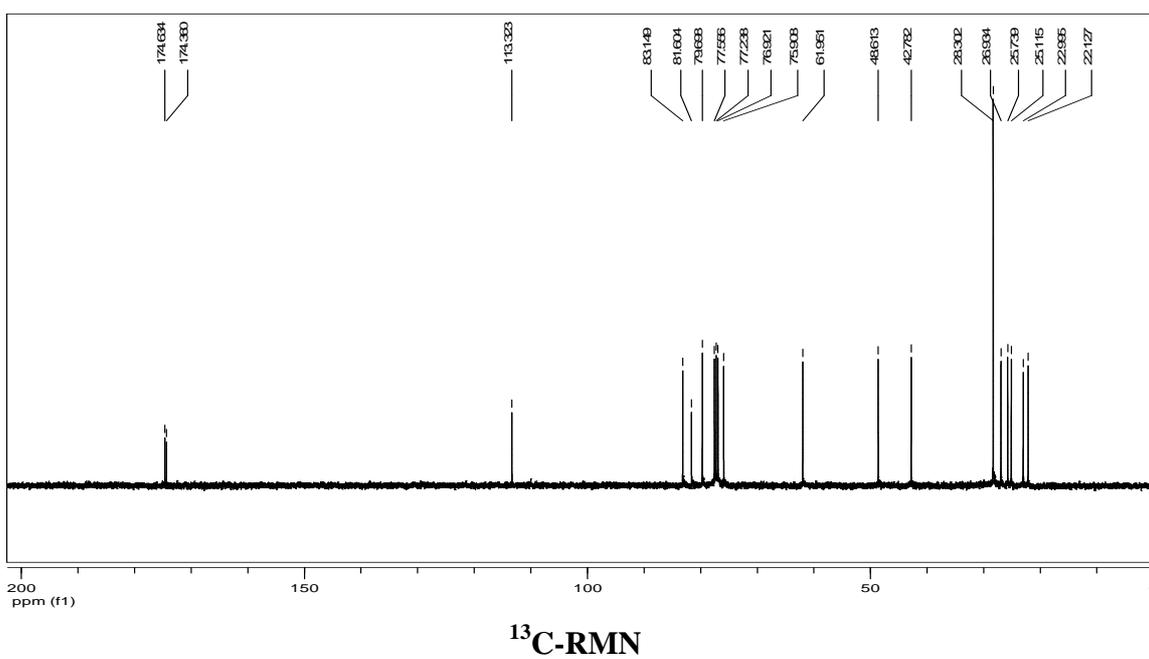
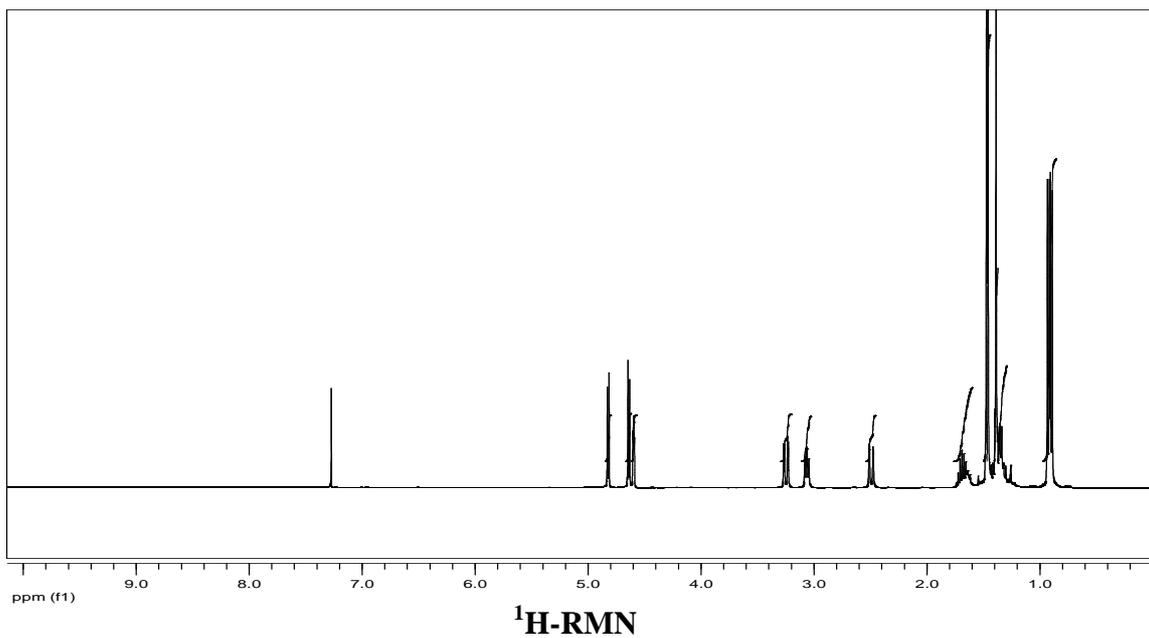
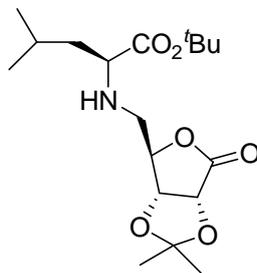
**(3*R*,4*R*,5*R*)-*N*-[(1*S*)-5-(benzylloxycarbonylamino)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)pentil]-5-hidroxi-3,4-isopropilidendioxipiperidin-2-ona. (20b)**

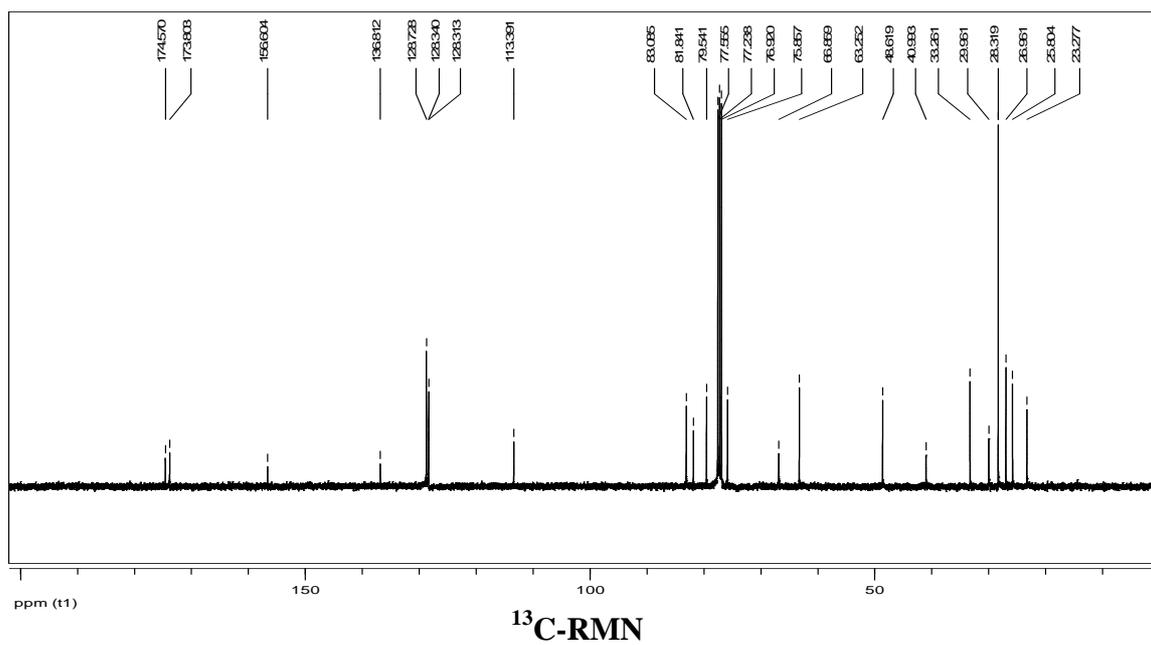
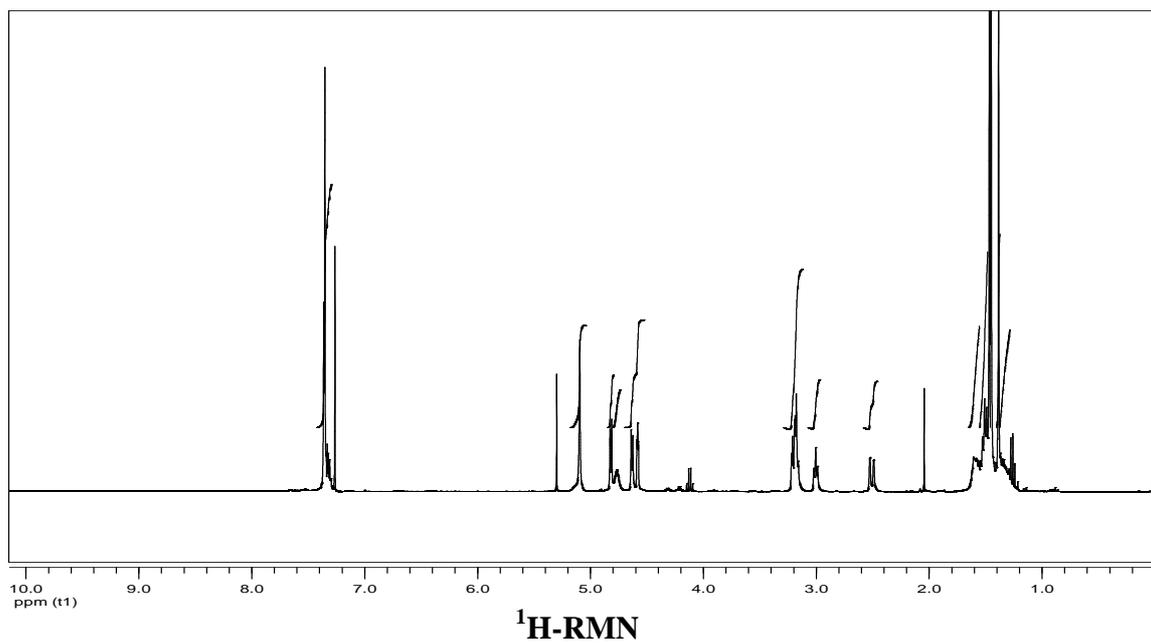
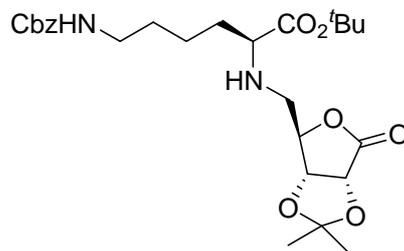




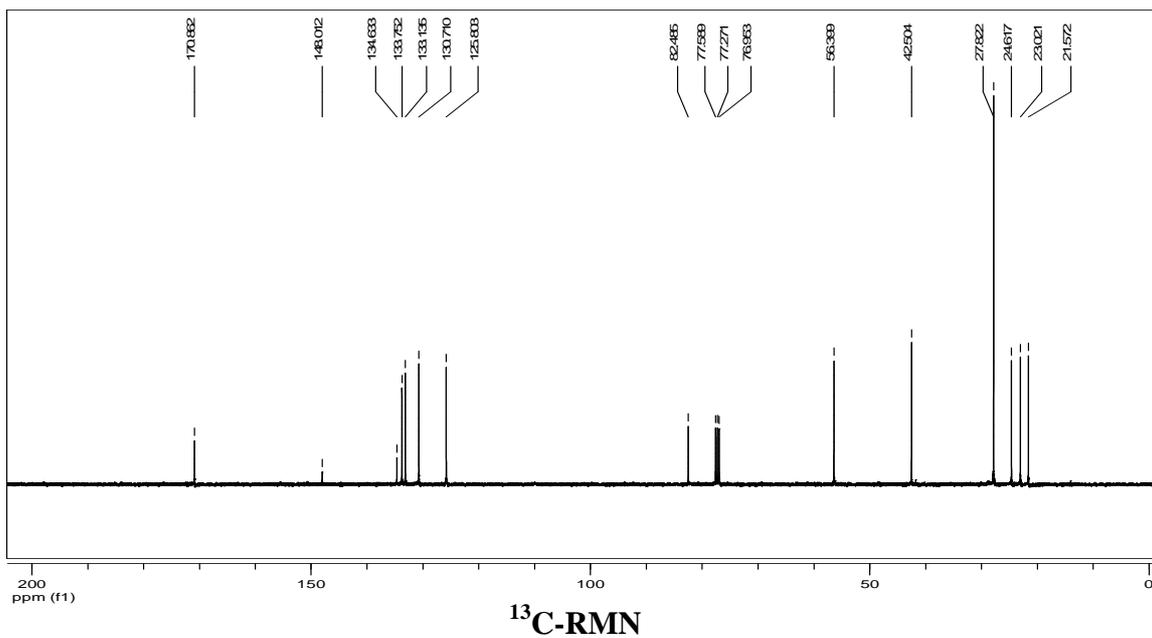
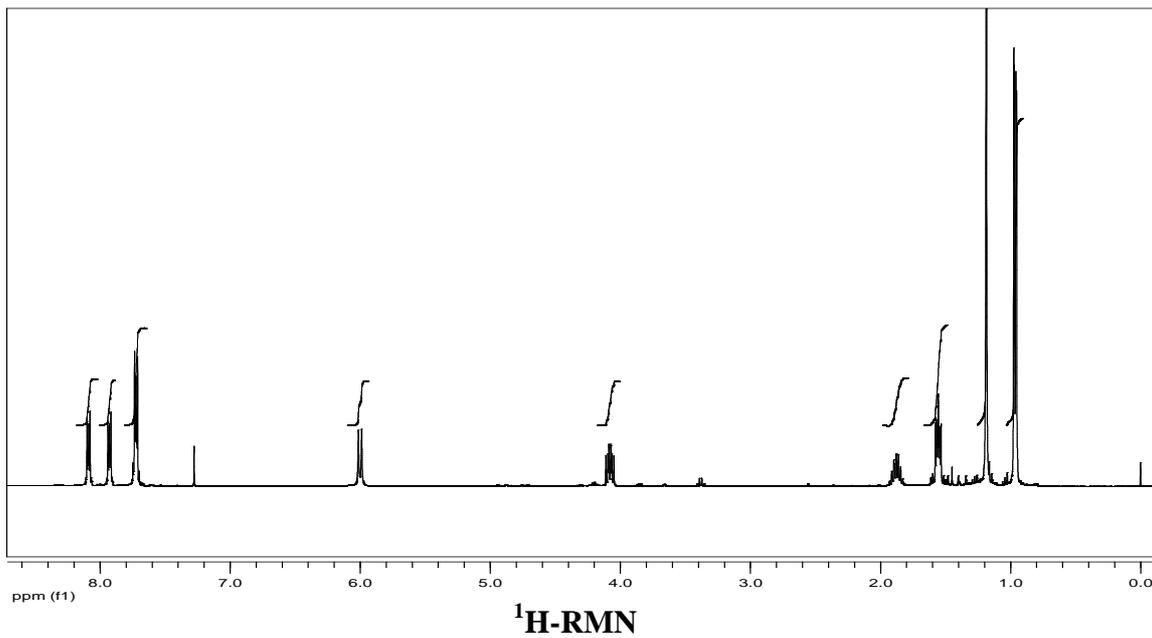
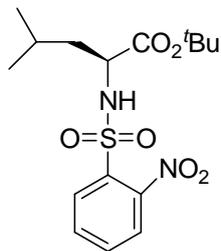
IR

**5-Desoxi-2,3-isopropilidendioxi-5-[(1S)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butilamino]- $\gamma$ -D-ribonolactona. (21a)**

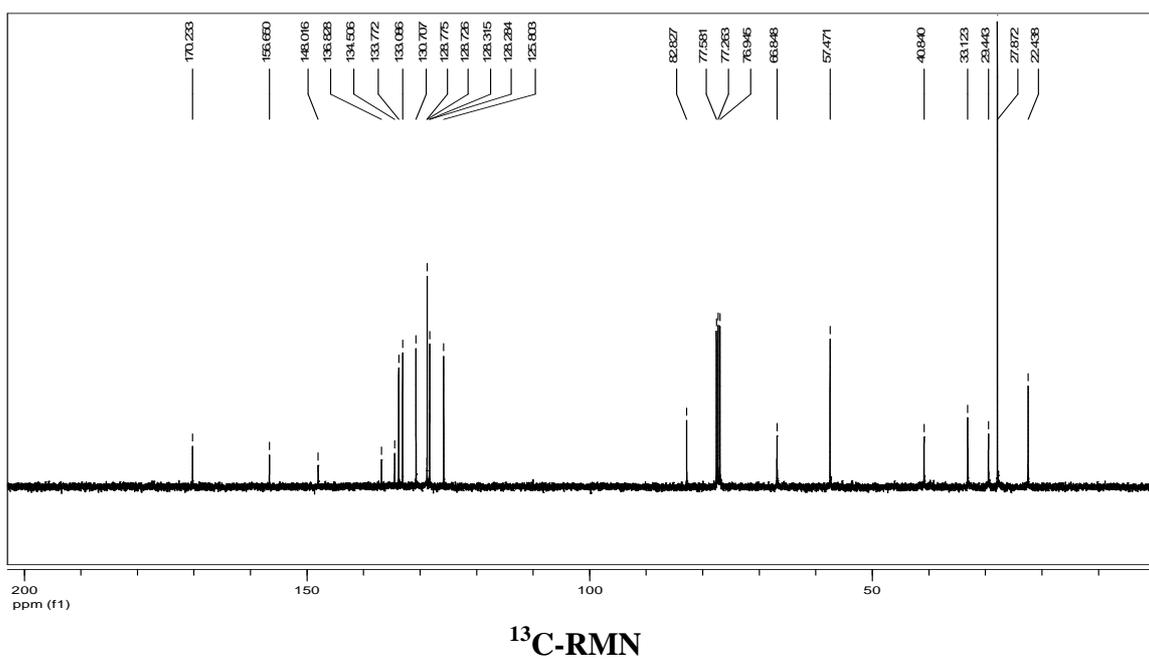
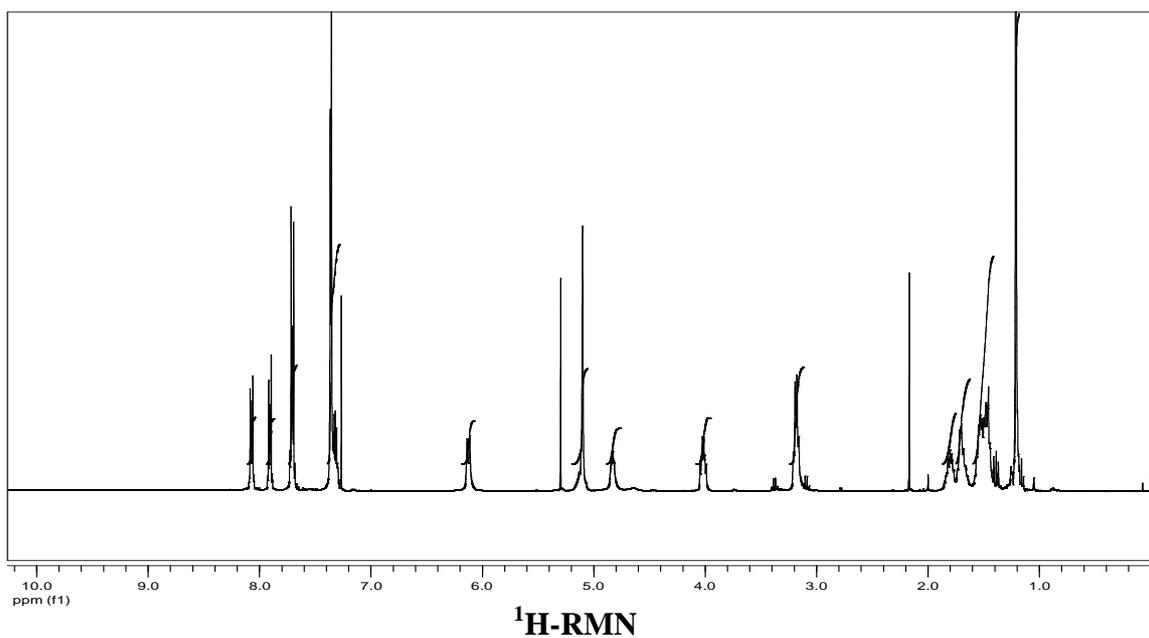
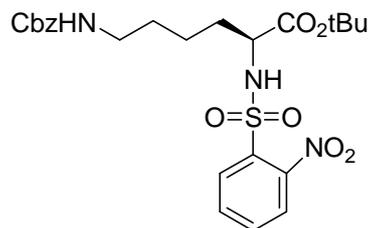


**5-[(1S)- 5-(benciloxycarbonilamino)-1-(*tert*-butoxicarbonil) pentilamino]-5-desoxi-2,3-isopropilidendioxi- $\gamma$ -D-ribonolactona. (21b)**

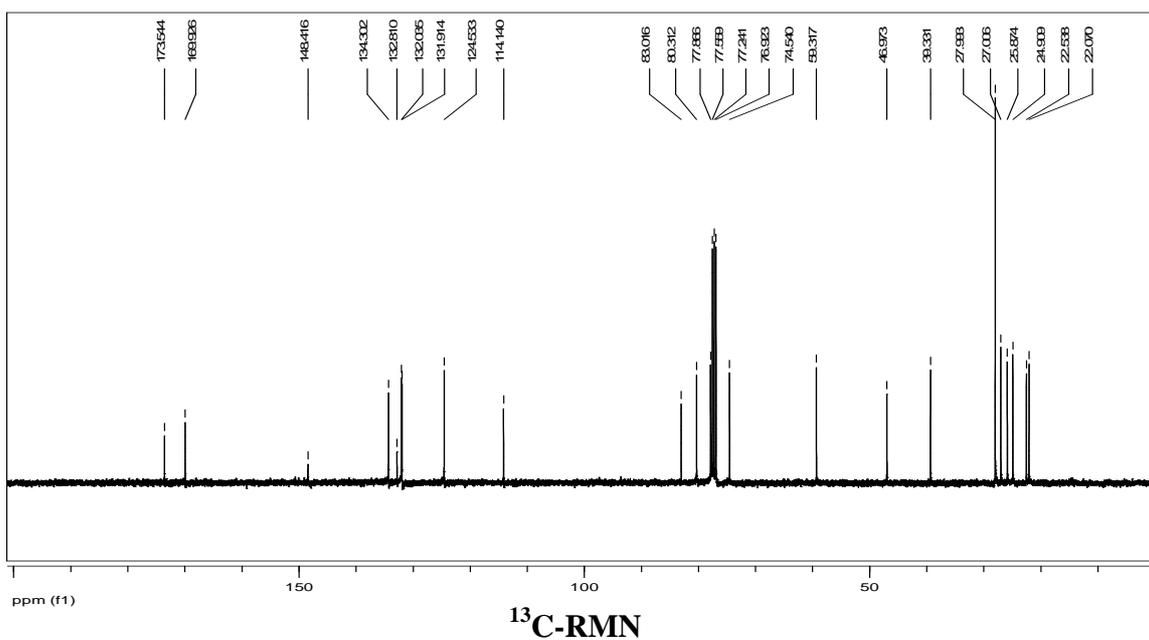
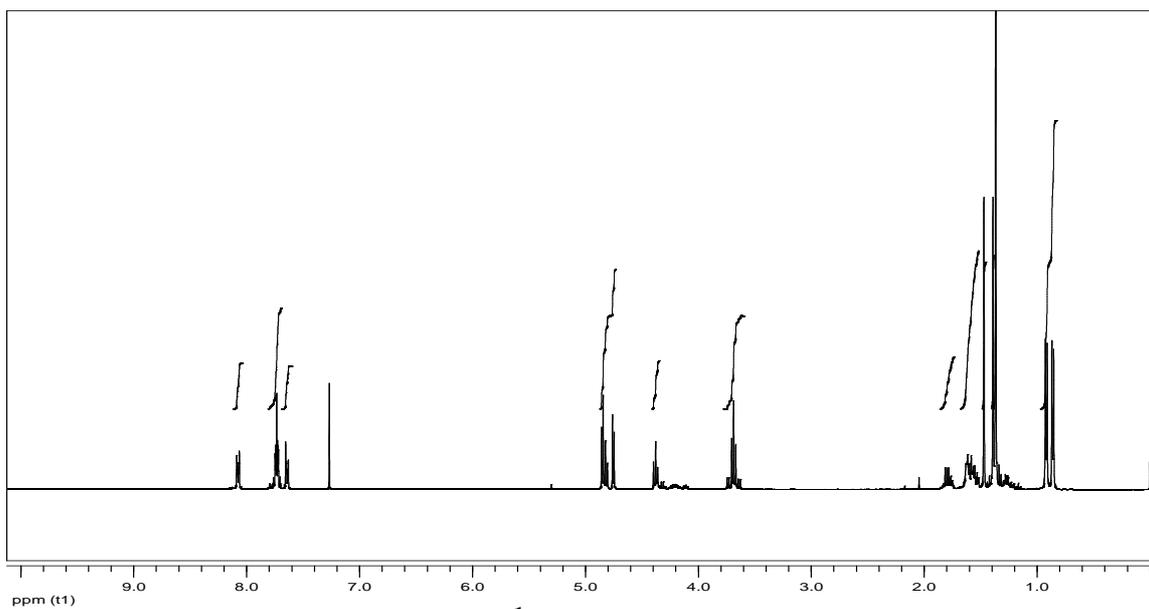
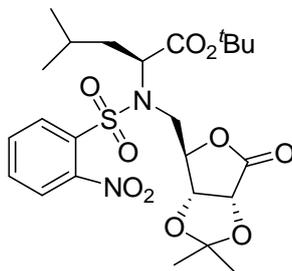
Éster *tert*-butílico de la *N*-(*o*-nitrobencensulfonil)-*L*-leucina (22a)



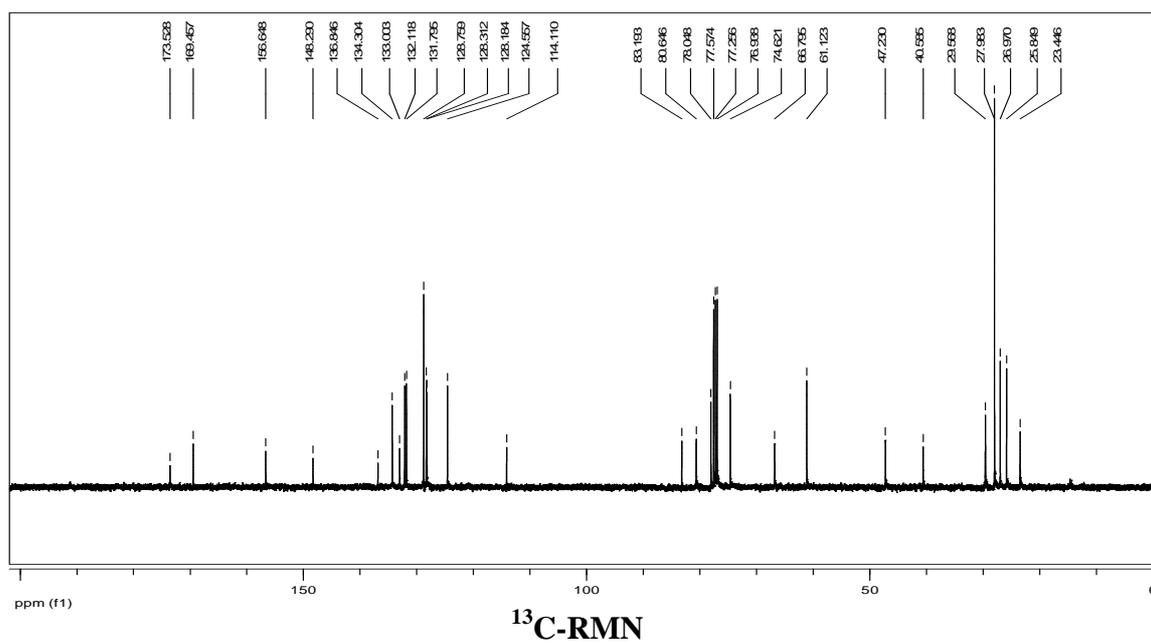
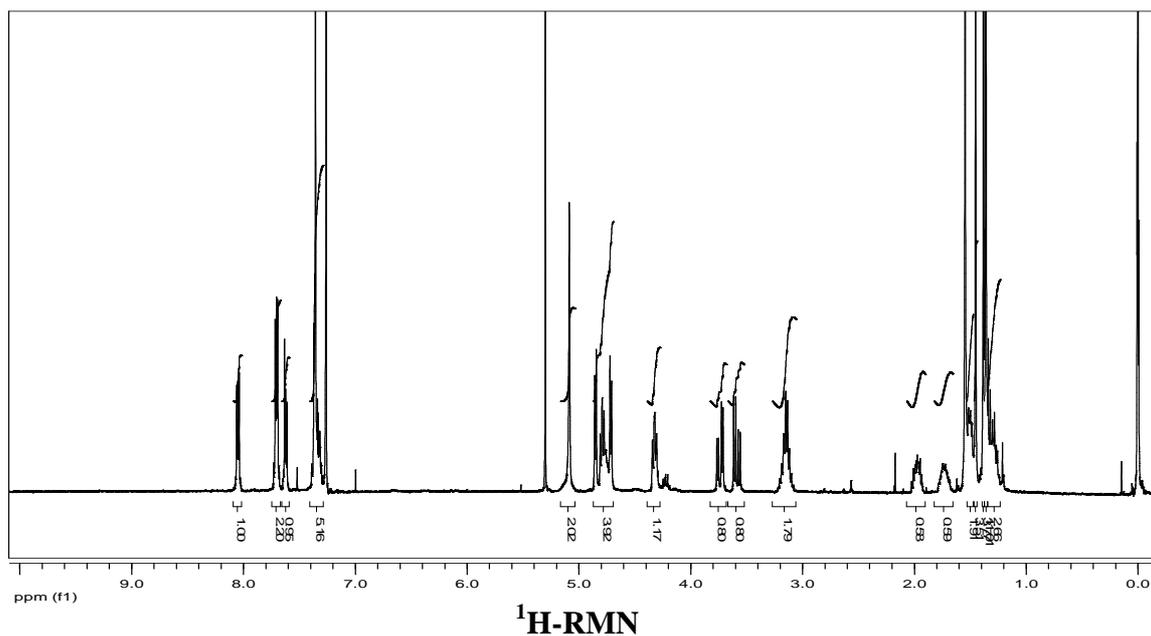
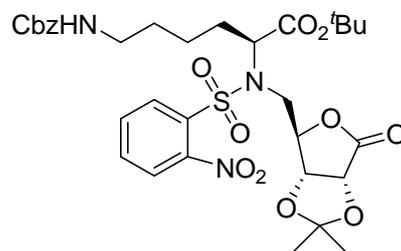
Éster *tert*-butílico de la *N*'-benciloxycarbonil-*N*-(*o*-nitrobencensulfonil)-*L*-lisina  
(22b)



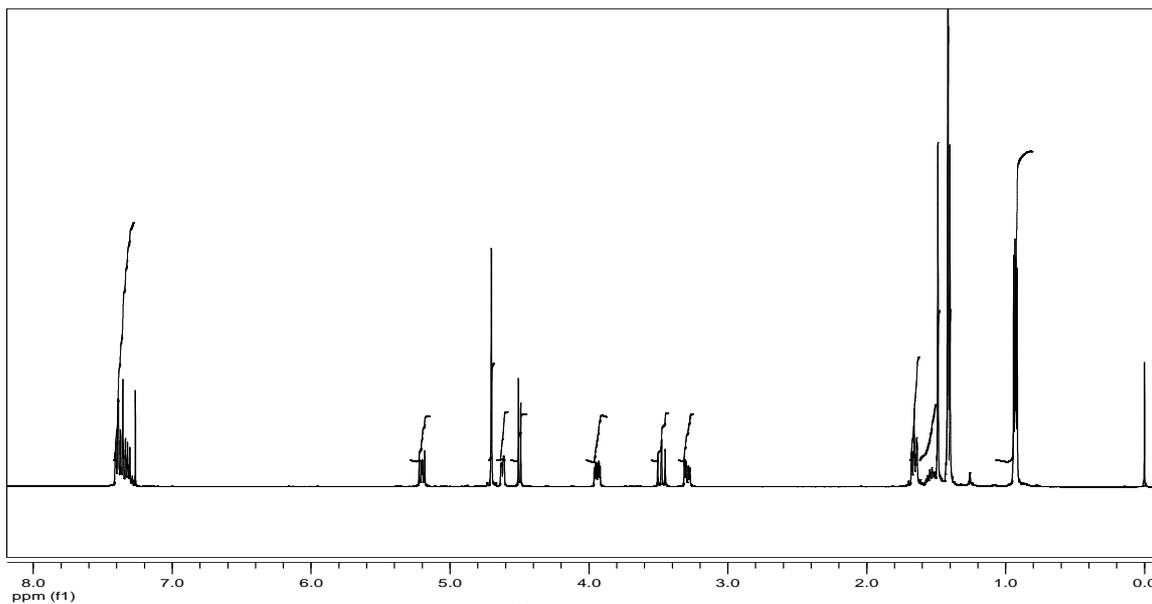
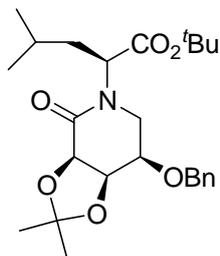
**5-Desoxi-2,3-isopropilidendioxi-5-[(1S)-3-metil-1-(tert-butoxicarbonil)butil-(*o*-nitrobenzensulfonil)-amino]- $\gamma$ -D-ribonolactona. (23a)**



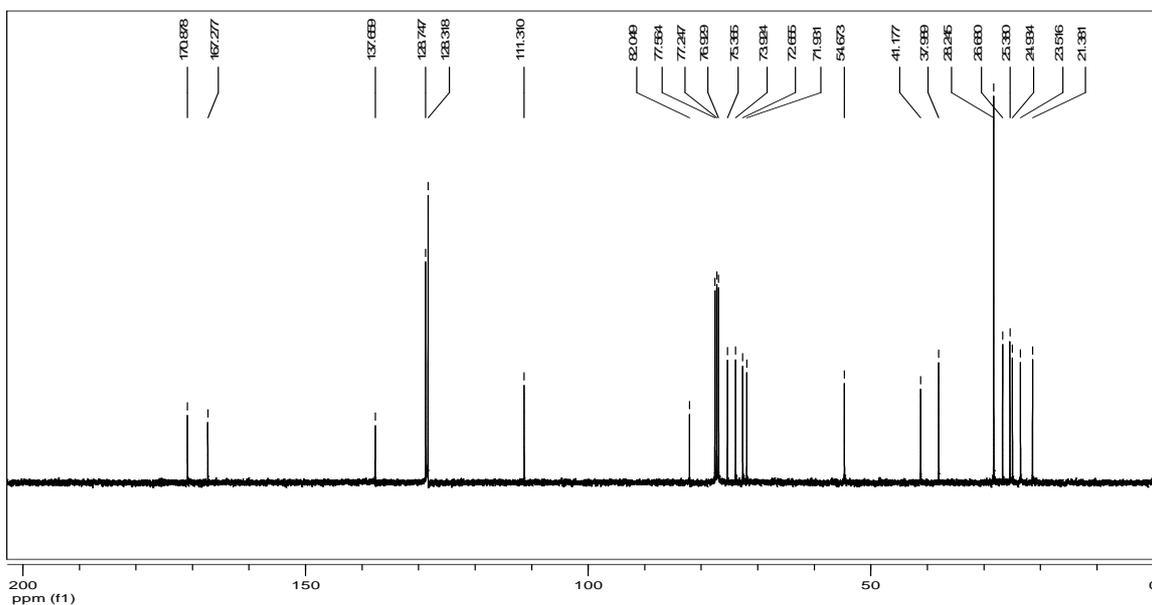
**5-[(1S)-5-(benzylloxycarbonylamino)-1-*tert*-butoxycarbonyl]pentil-(*o*-nitrobenzensulfonyl)-amino]-5-Desoxi-2,3-isopropilidendioxi- $\gamma$ -D-ribonolactona. (23b)**



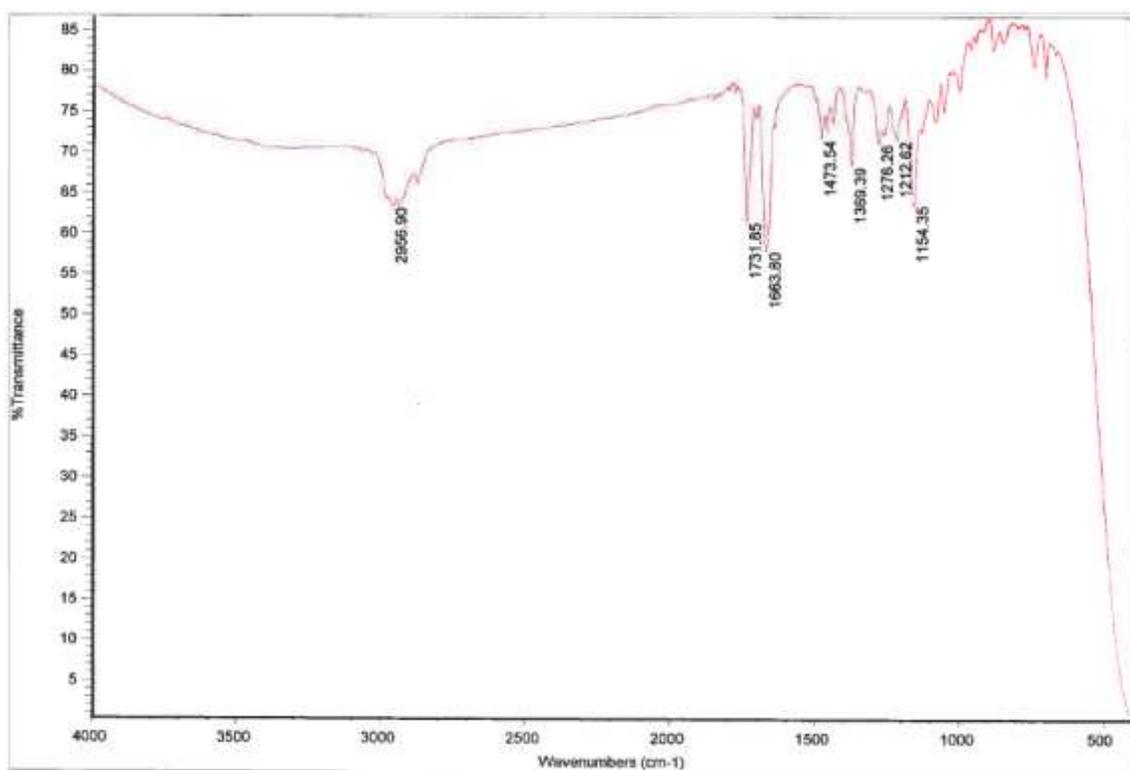
**(3*R*,4*R*,5*R*)-5-Benciloxi-3,4-isopropilidendioxi-*N*-[(1*S*)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butil]-piperidin-2-ona. (24a)**



<sup>1</sup>H-RMN

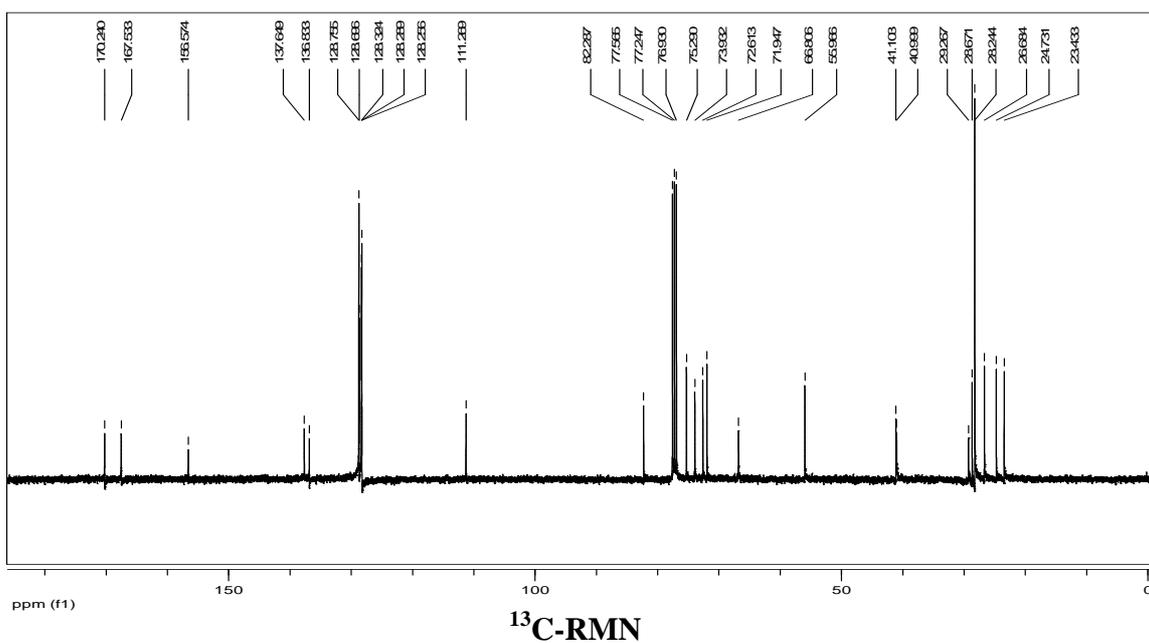
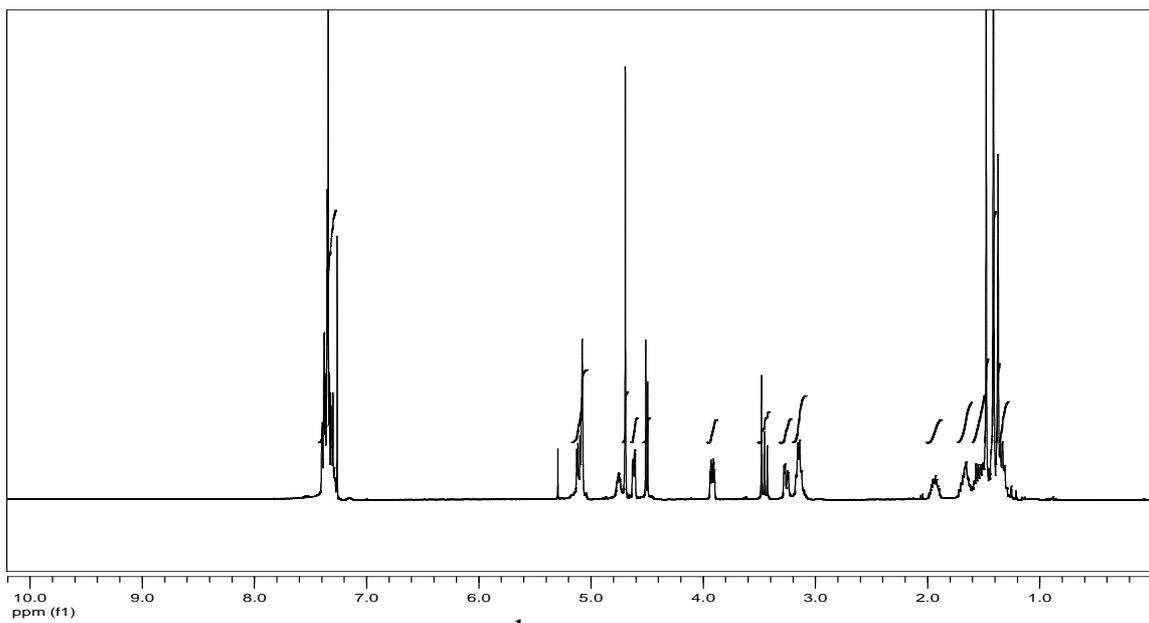
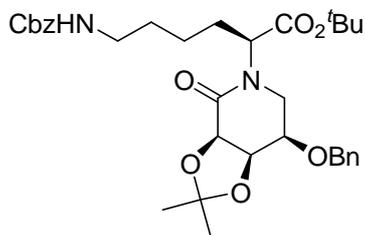


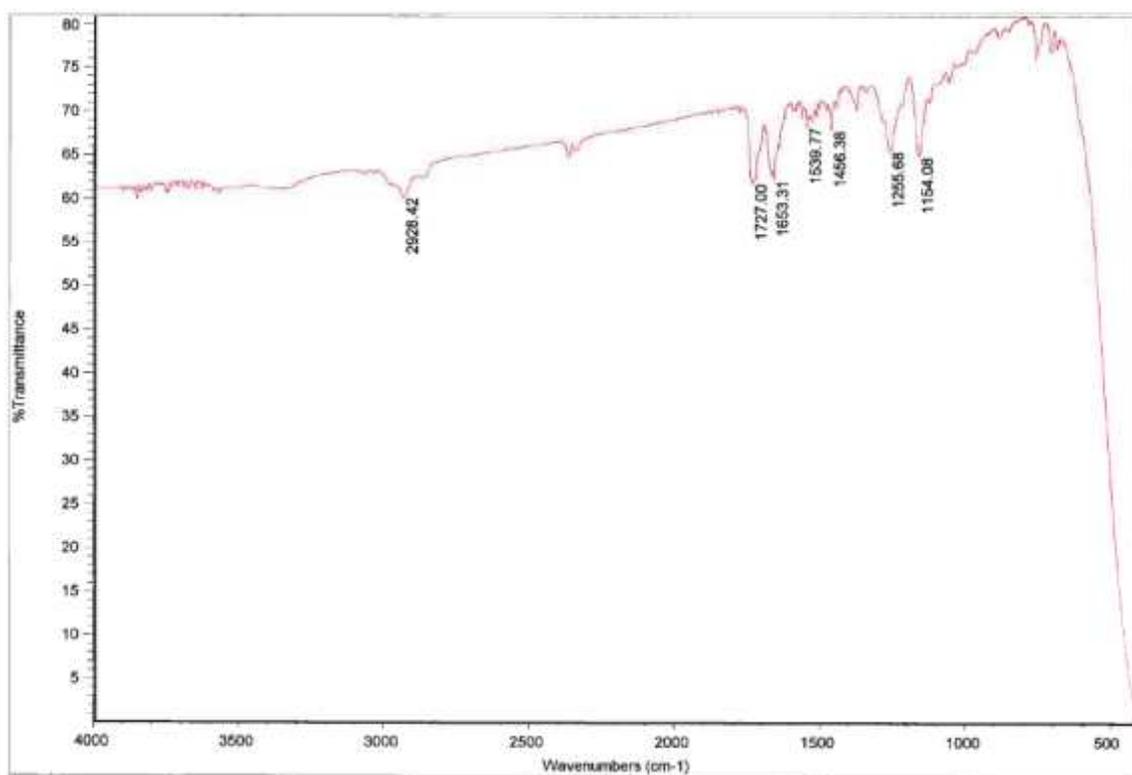
<sup>13</sup>C-RMN



**IR**

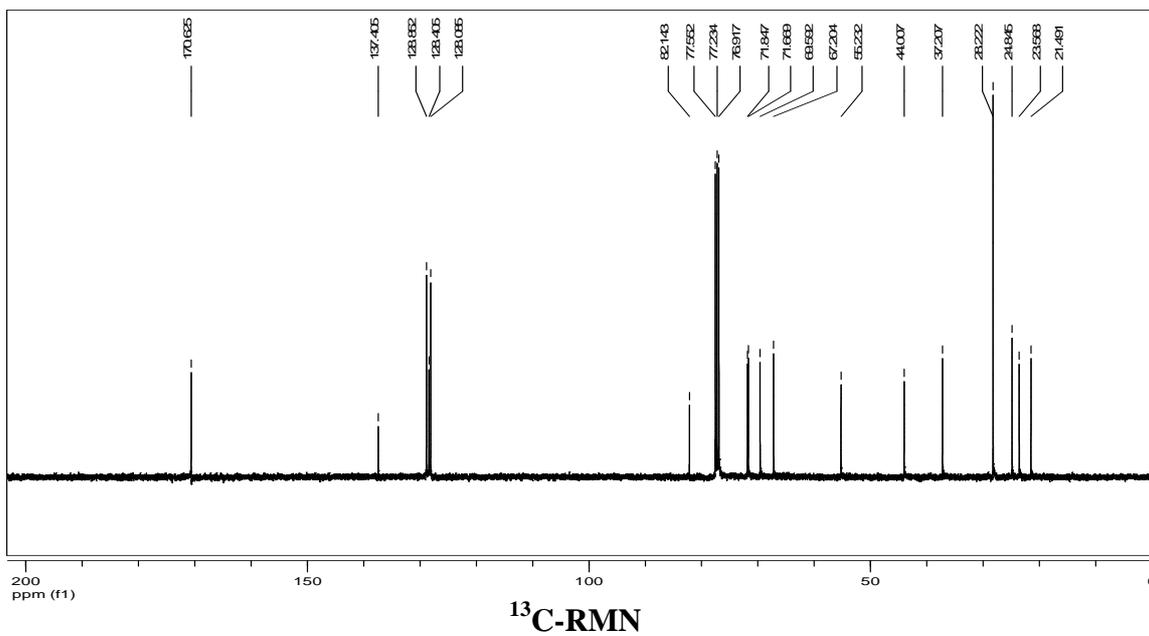
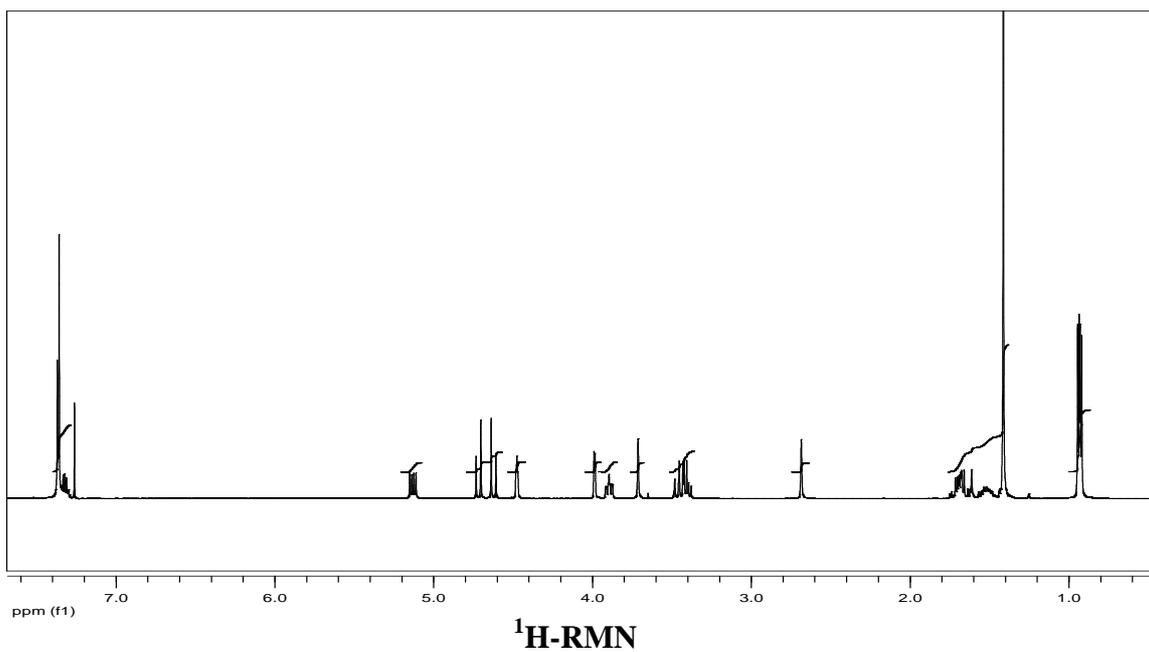
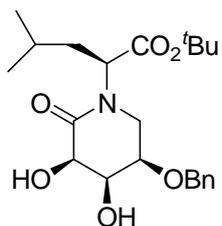
(3*R*,4*R*,5*R*)-5-Benciloxi-*N*-[(1*S*)-5-(benciloxycarbonilamino)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pentil]-3,4-isopropilidendioxipiperidin-2-ona. (24b)

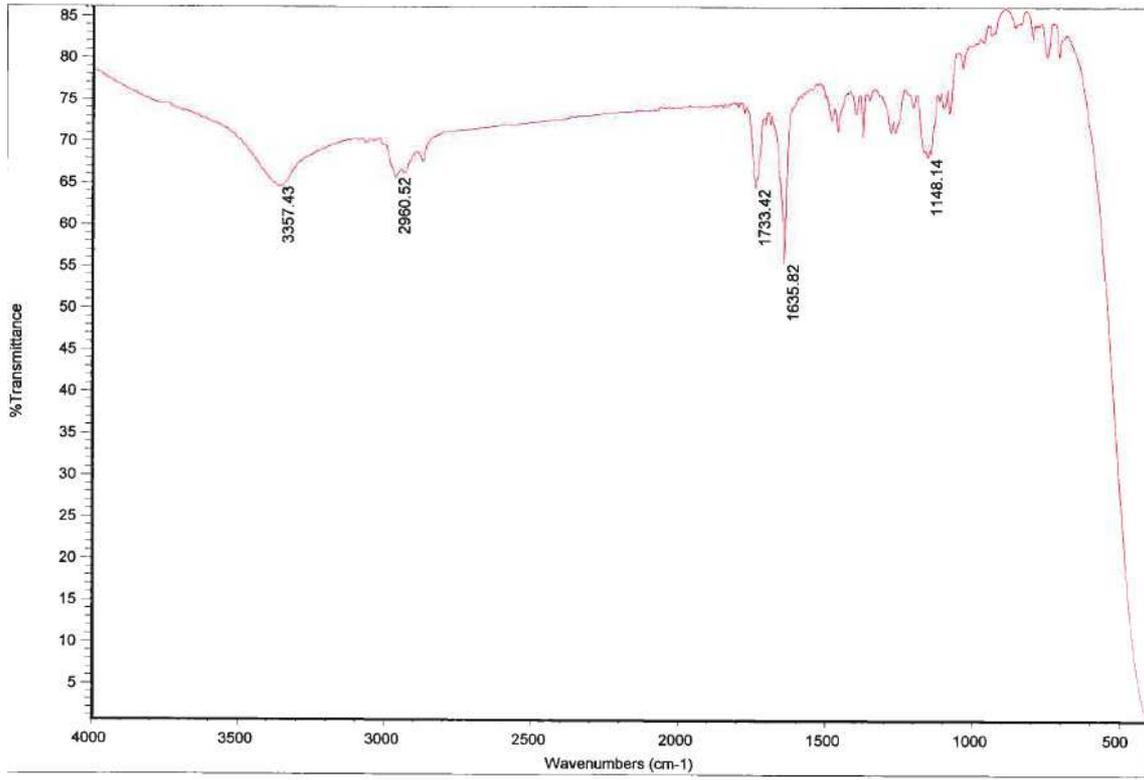




**IR**

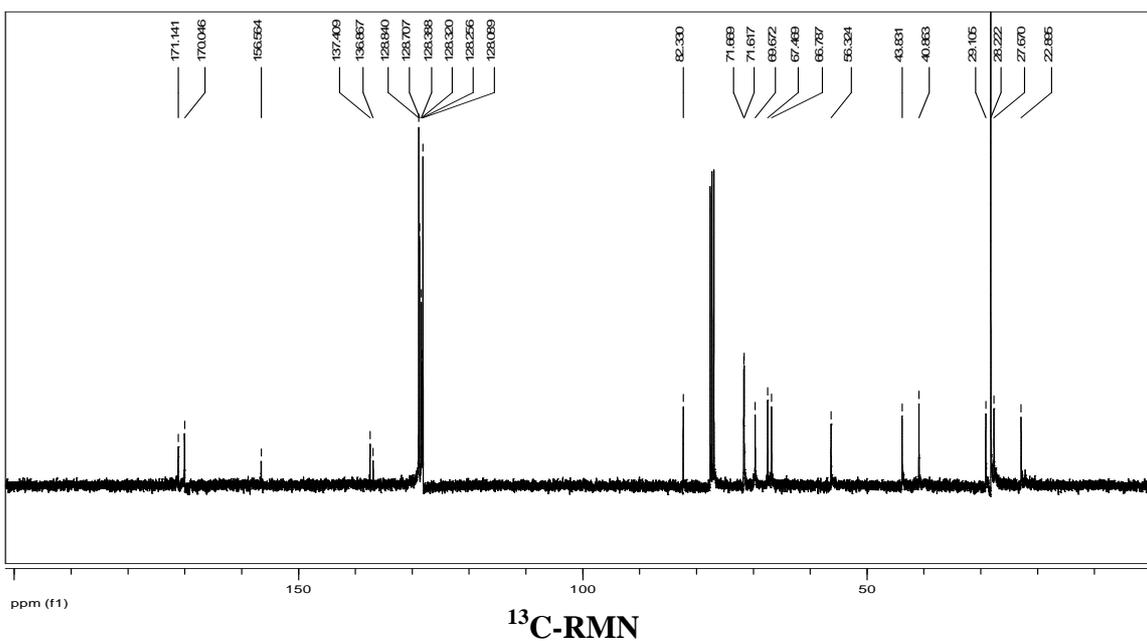
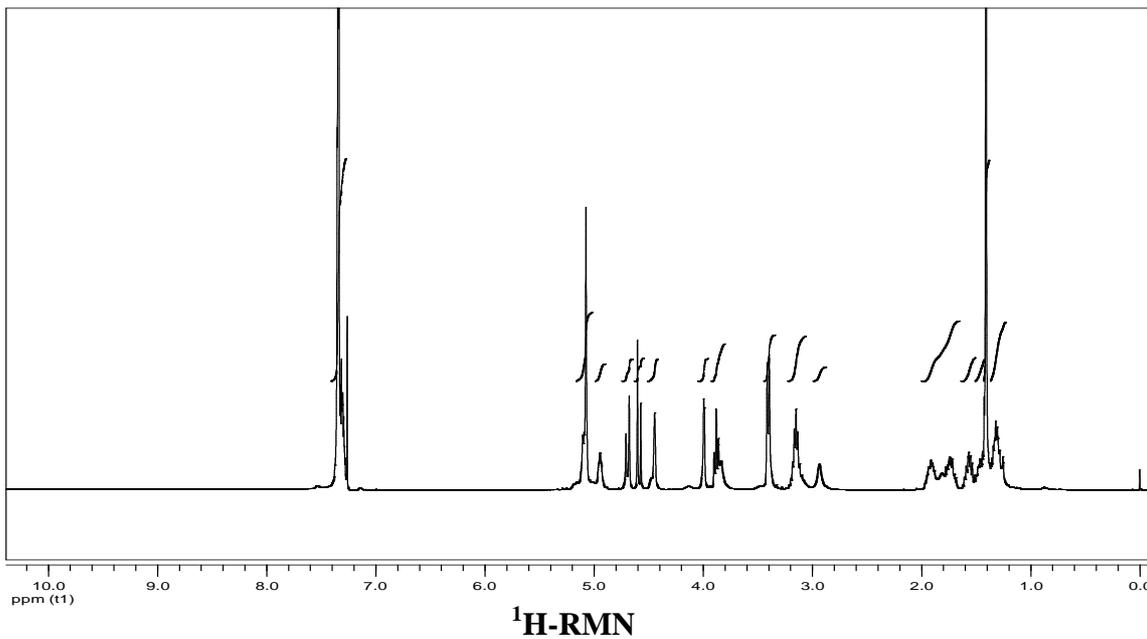
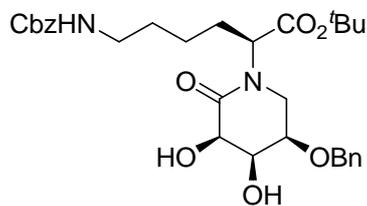
**(3*R*,4*R*,5*R*)-5-Benciloxi-3,4-dihidroxi-*N*-[(1*S*)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butil]-piperidin-2-ona. (25a)**

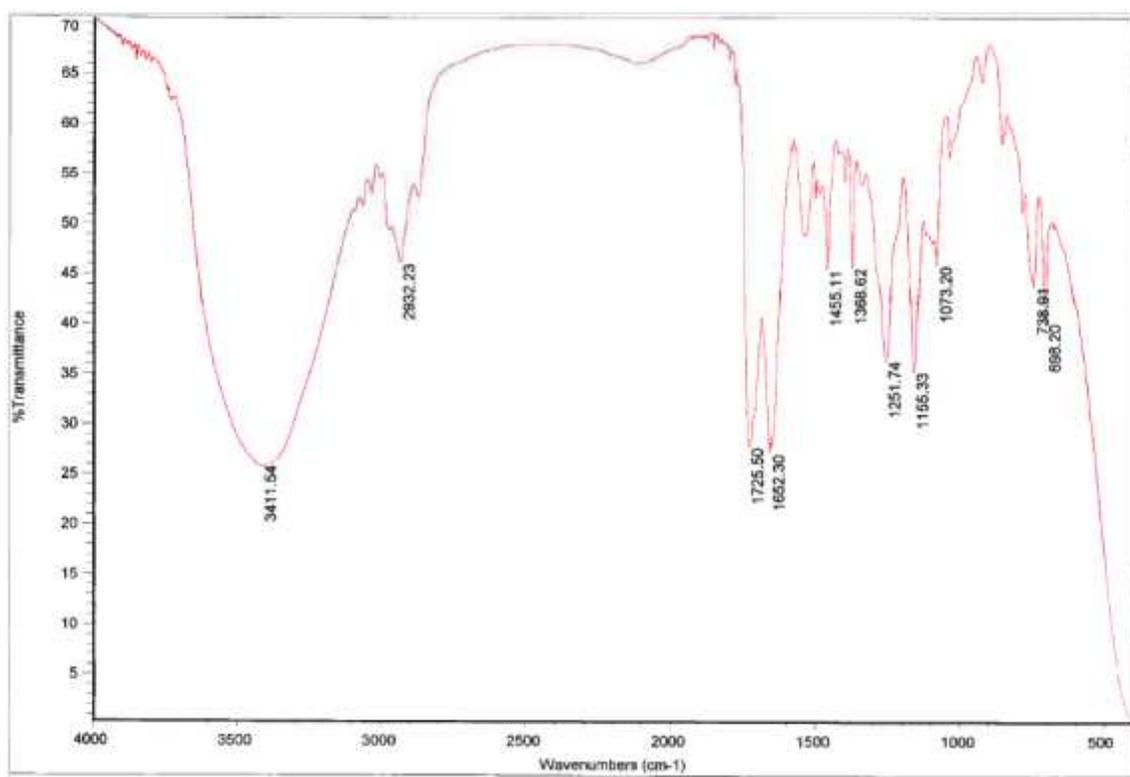




**IR**

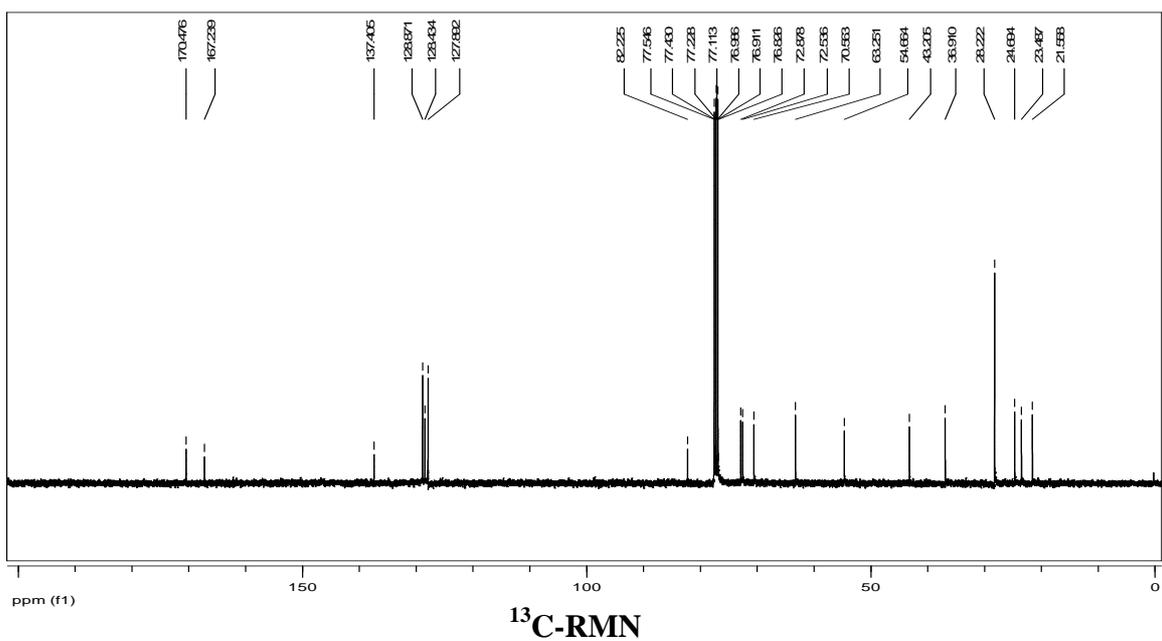
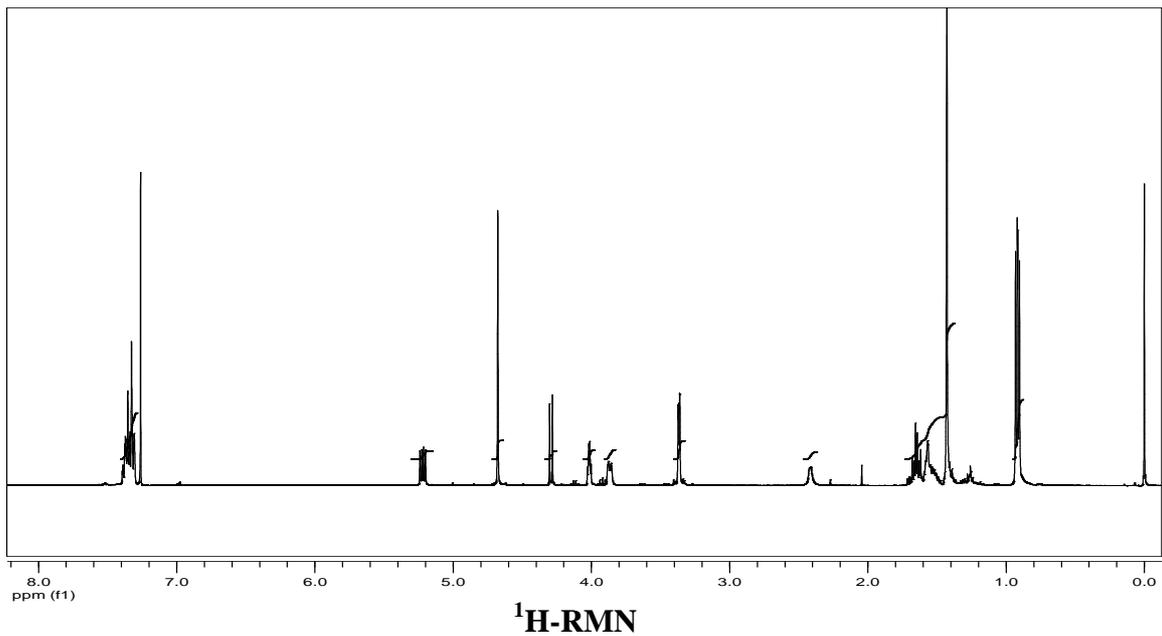
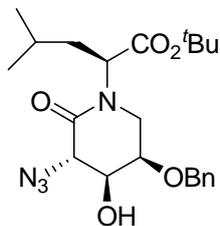
**(3*R*,4*R*,5*R*)-5-Benciloxi-*N*-[(1*S*)-5-(benciloxicarbonilamino)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pentil]-3,4-dihidroxipiperidin-2-ona. (25b)**

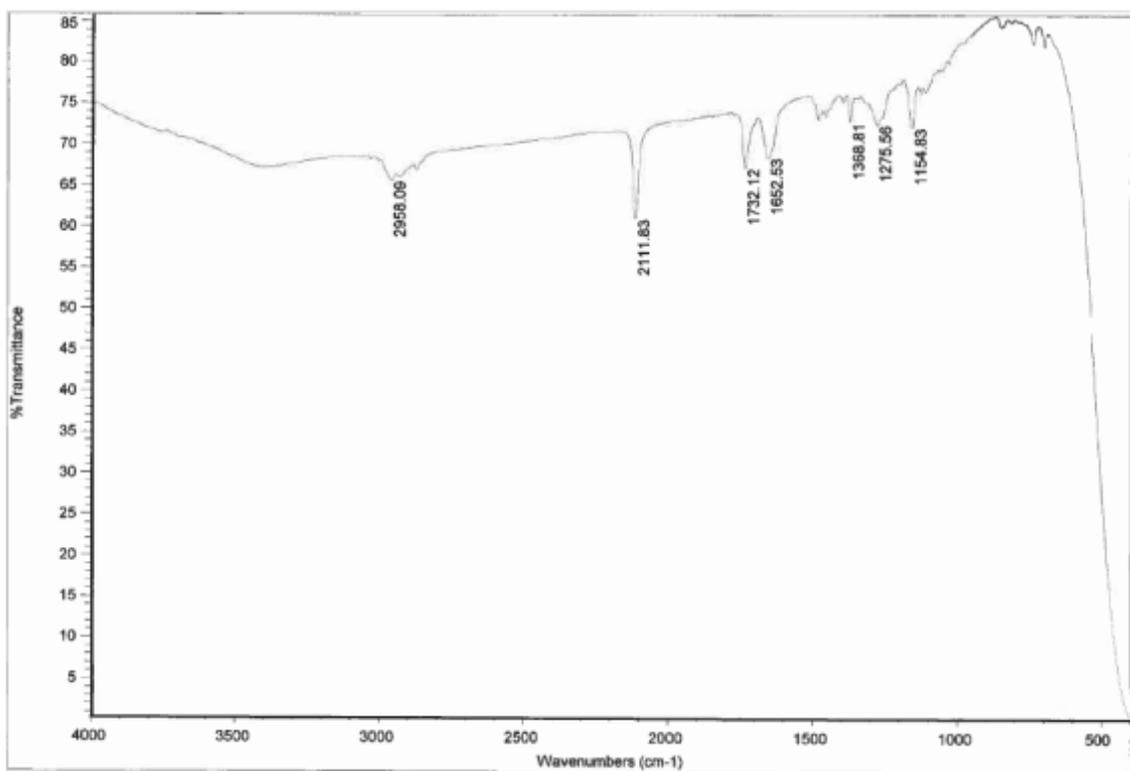




IR

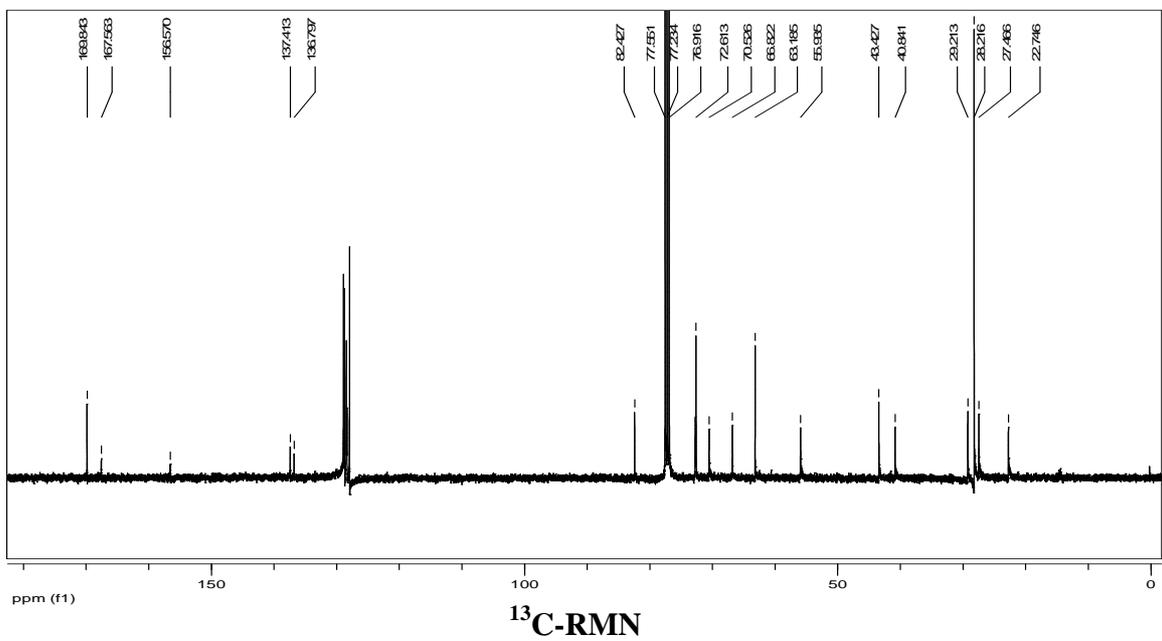
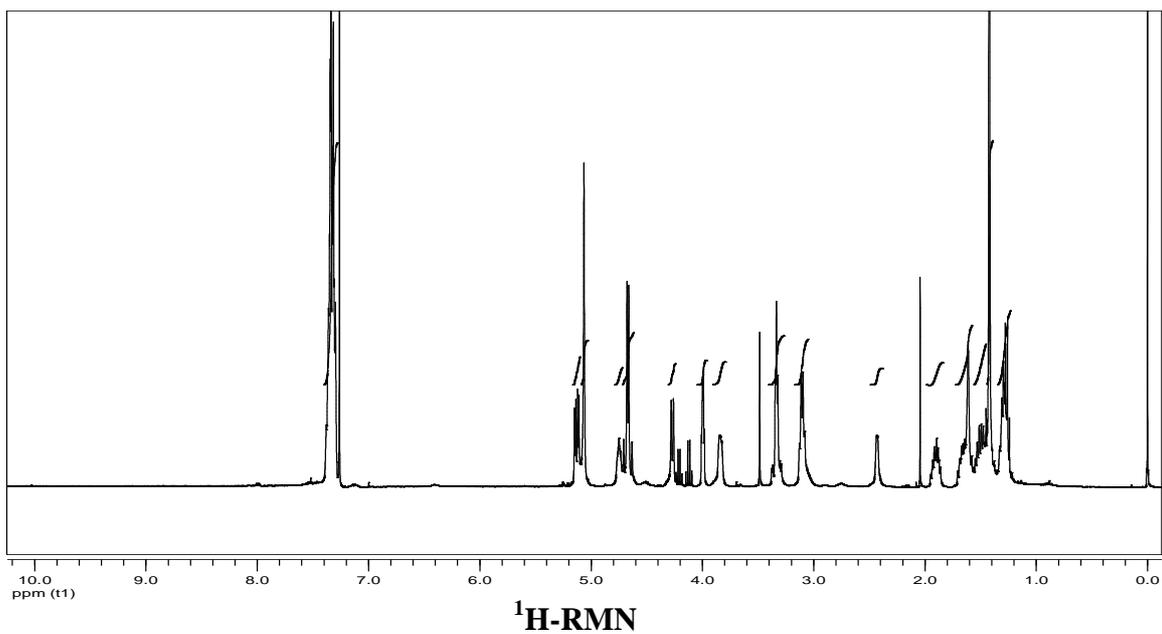
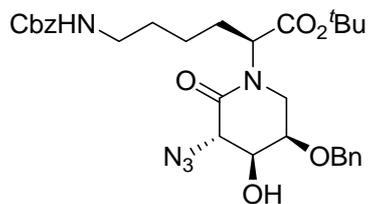
**(3*S*,4*S*,5*R*)-3-Azido-5-benciloxi-4-hidroxi-*N*-[(1*S*)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butil]-piperidin-2-ona. (27a)**

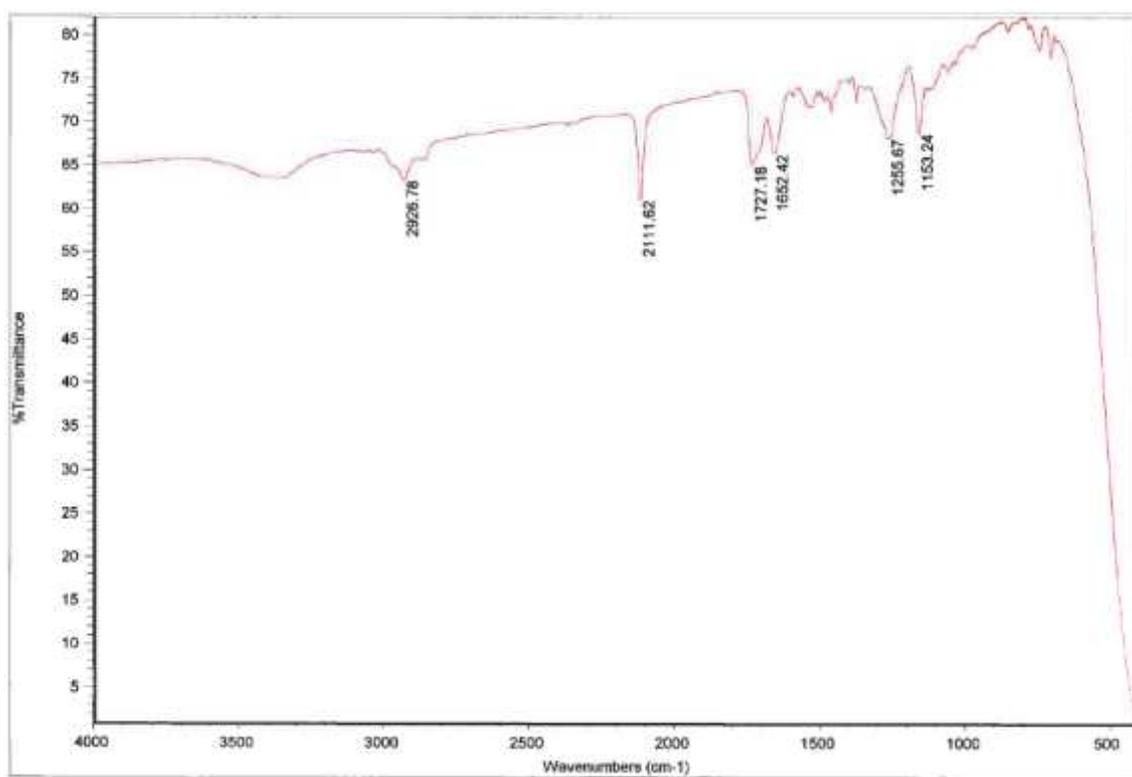




**IR**

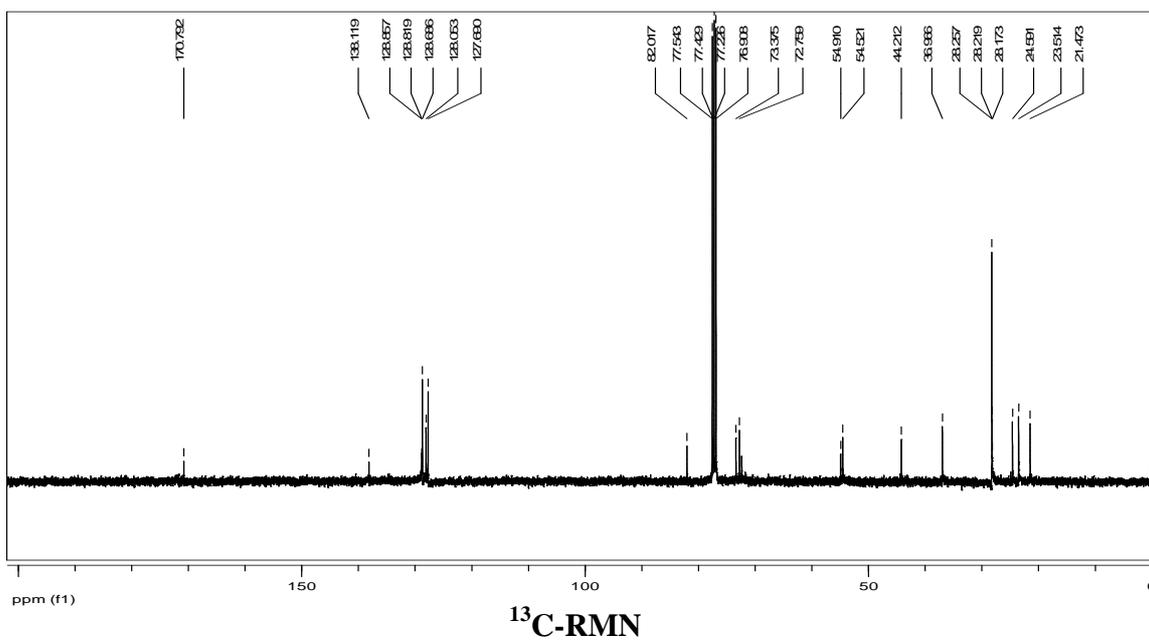
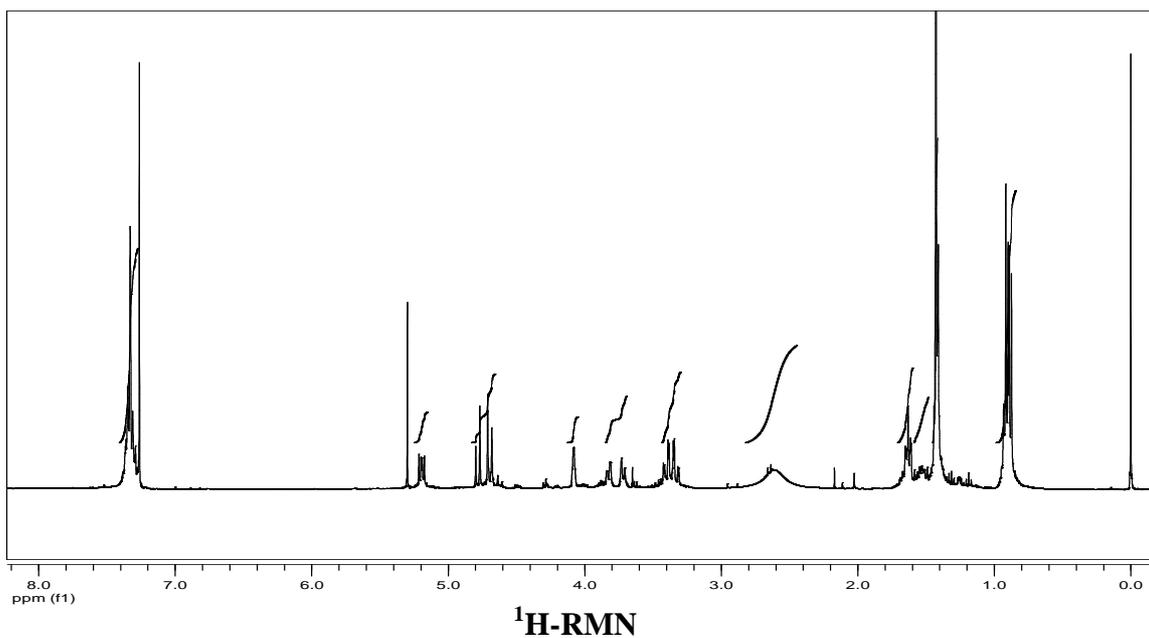
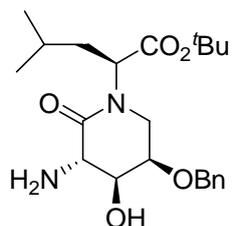
**(3*S*,4*S*,5*R*)-3-Azido-5-Benciloxi-*N*-[(1*S*)-5-(benciloxycarbonilamino)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pentil]-4-hidroxipiperidin-2-ona. (27b)**



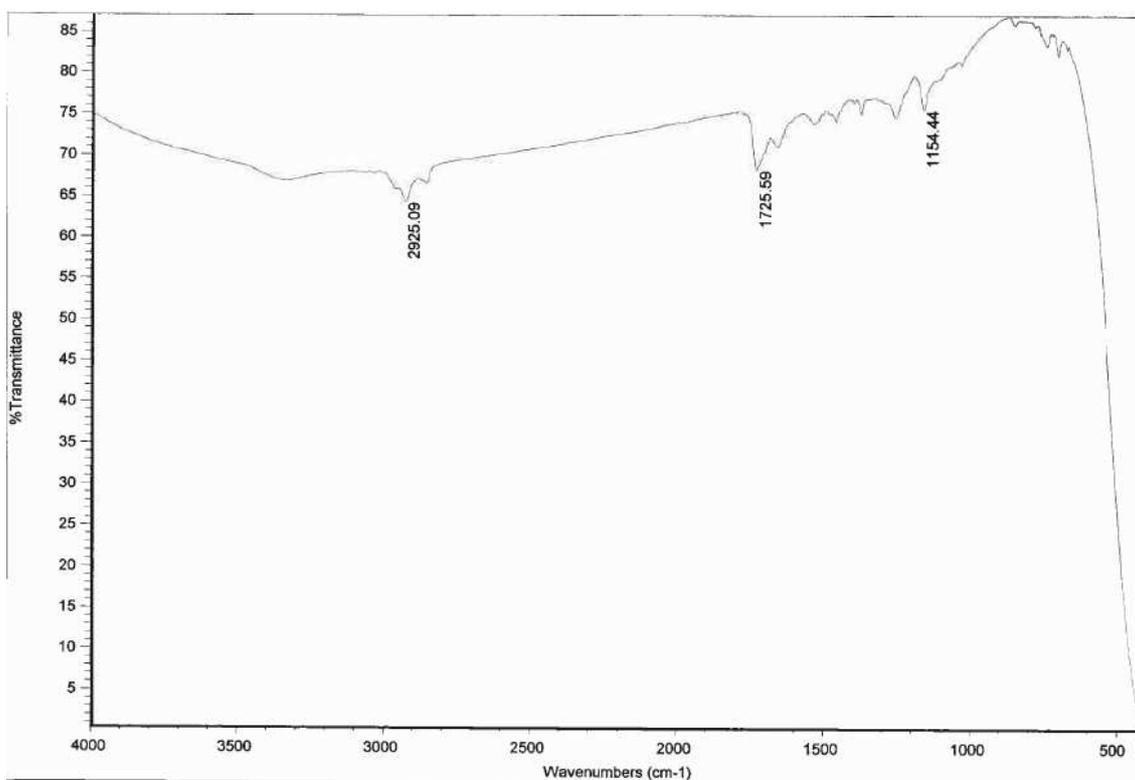
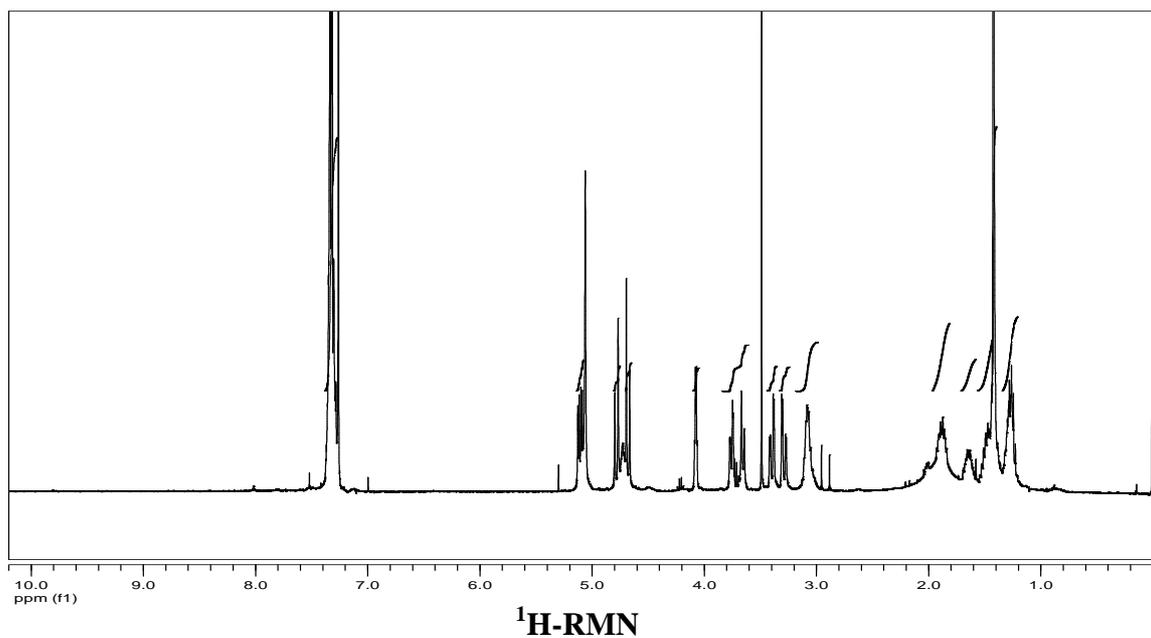
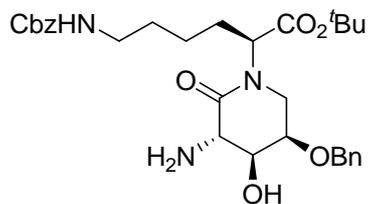


**IR**

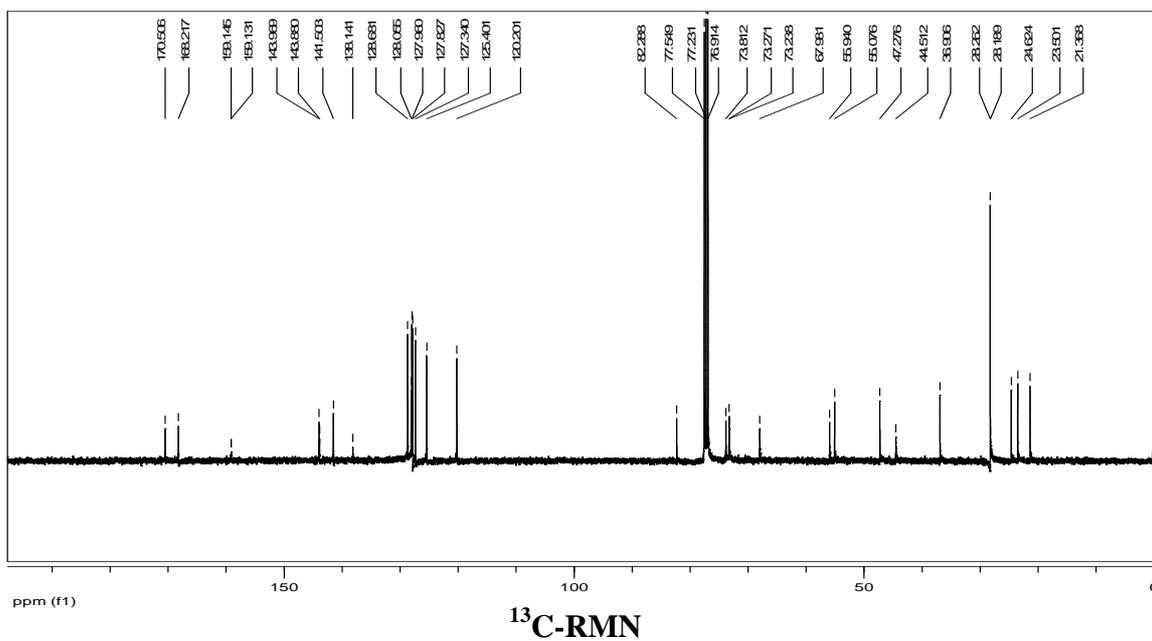
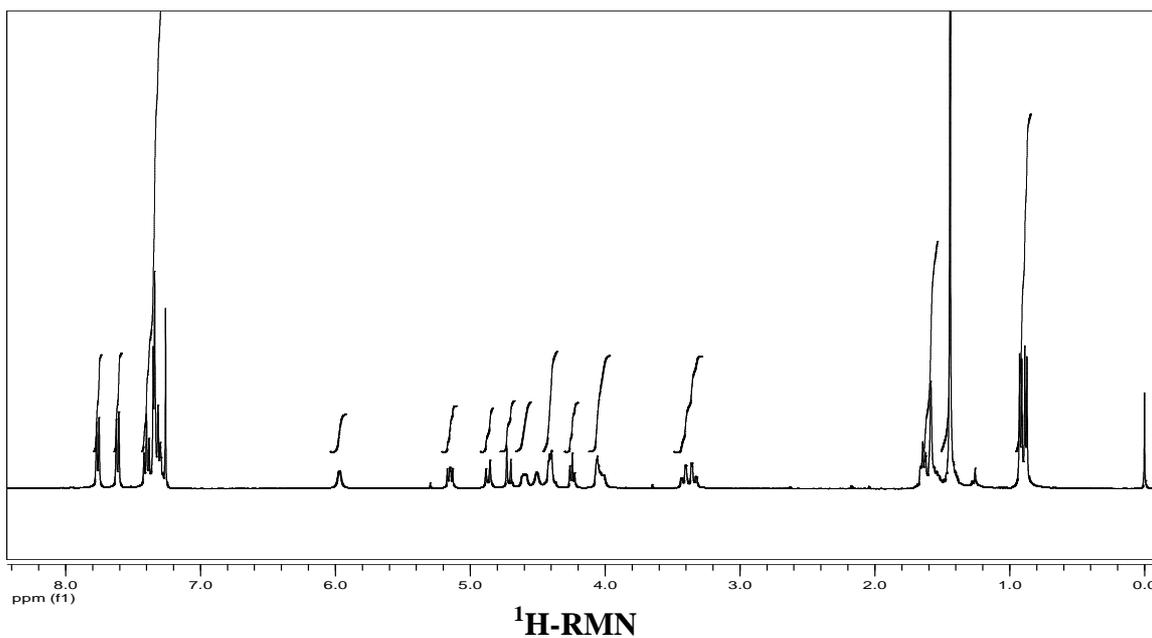
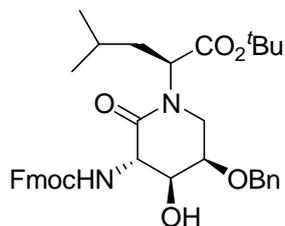
**(3*S*,4*S*,5*R*)-3-Amino-5-benciloxi-4-hidroxi-*N*-[(1*S*)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butil]-piperidin-2-ona. (28a)**



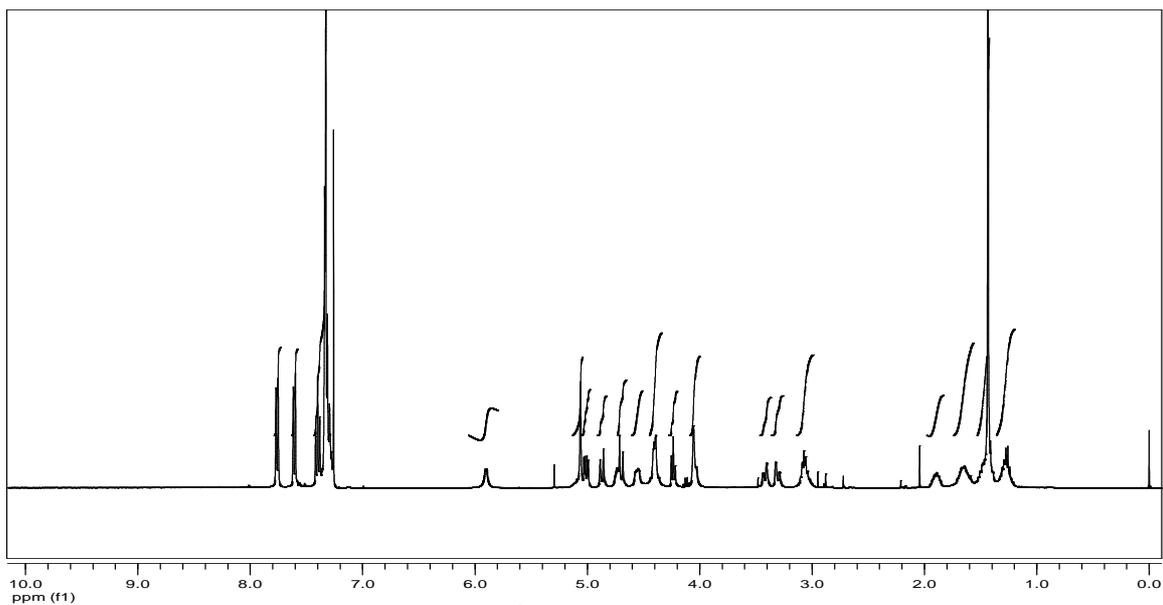
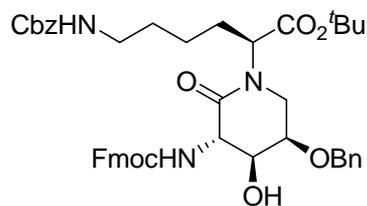
**(3*S*,4*S*,5*R*)-3-Amino-5-benciloxi-*N*-[(1*S*)-5-(benciloxycarbonilamino)-1-(*tert*-butoxycarbonil)pentil]-4-hidroxipiperidin-2-ona. (28b)**



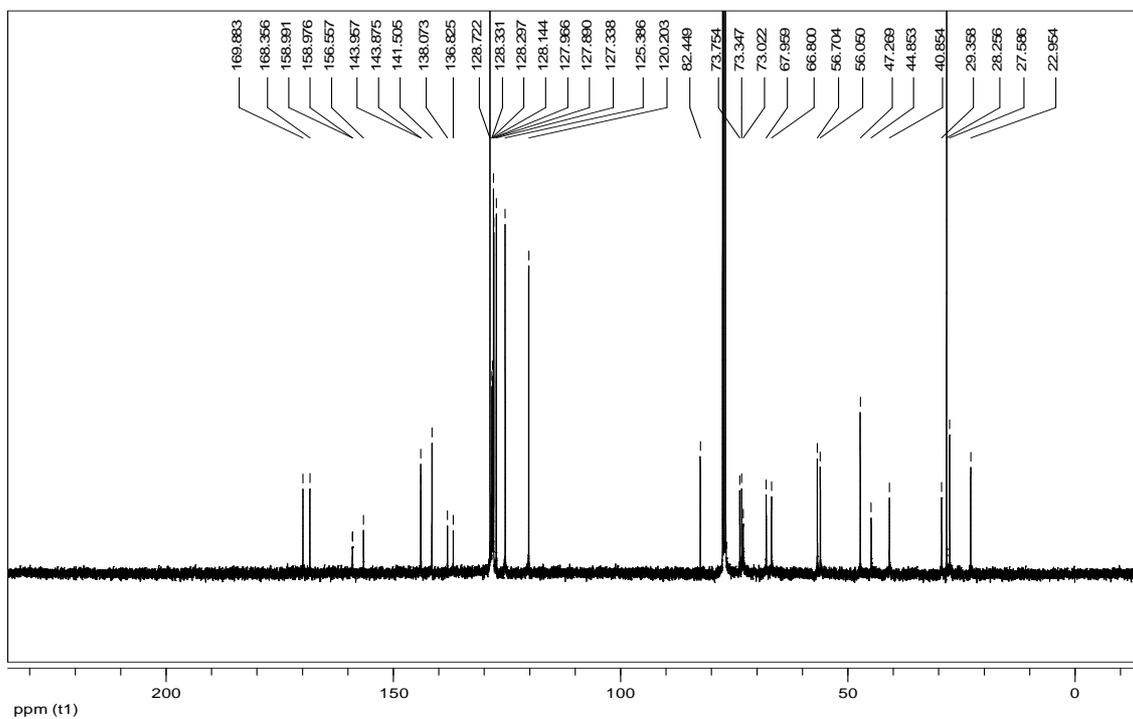
**(3*S*,4*S*,5*R*)-5-Benciloxi-3-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-4-hidroxi-*N*-[(1*S*)-3-metil-1-(*tert*-butoxicarbonil)butil]-piperidin-2-ona. (29a)**



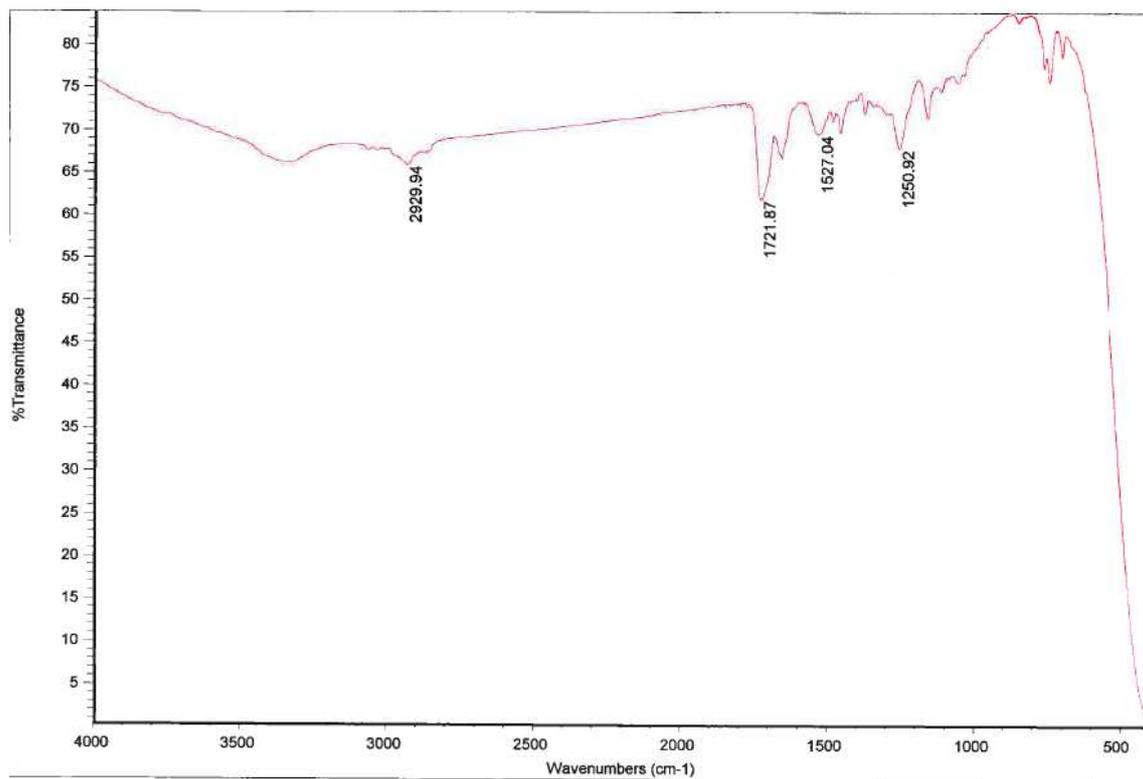
**(3*S*,4*S*,5*R*)-5-Benciloxi-*N*-[(1*S*)-5-(benciloxicarbonilamino)-1-(*tert*-butoxicarbonil)pentil]-3-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-4-hidroxi-piperidin-2-ona. (29b)**



**<sup>1</sup>H-RMN**

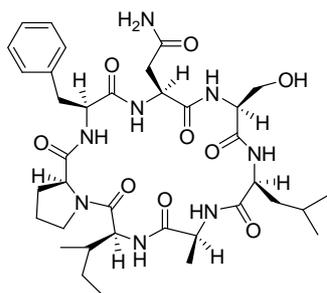


**<sup>13</sup>C-RMN**

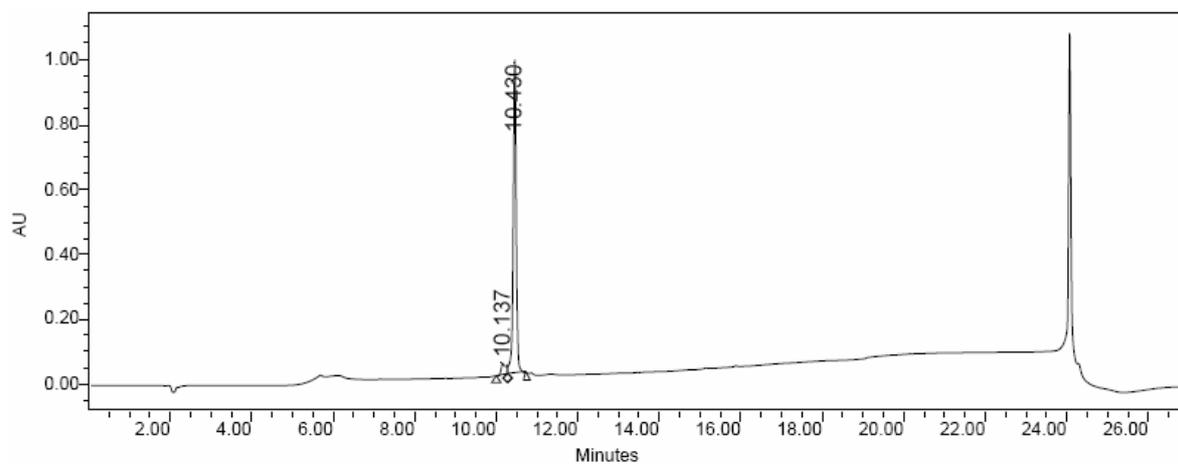


IR

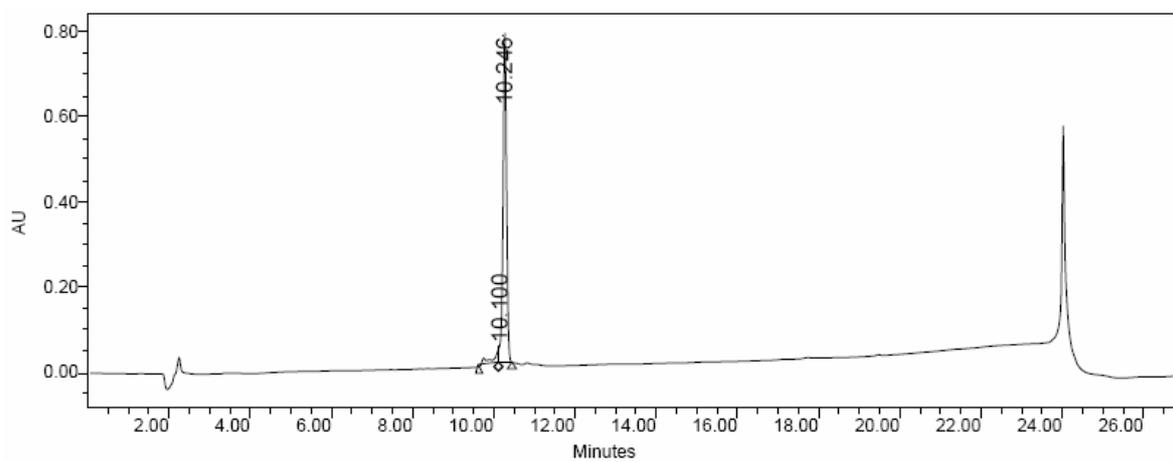
## 7.2. HPLC/MALDI-TOF/AAA DEL CAPÍTULO 3

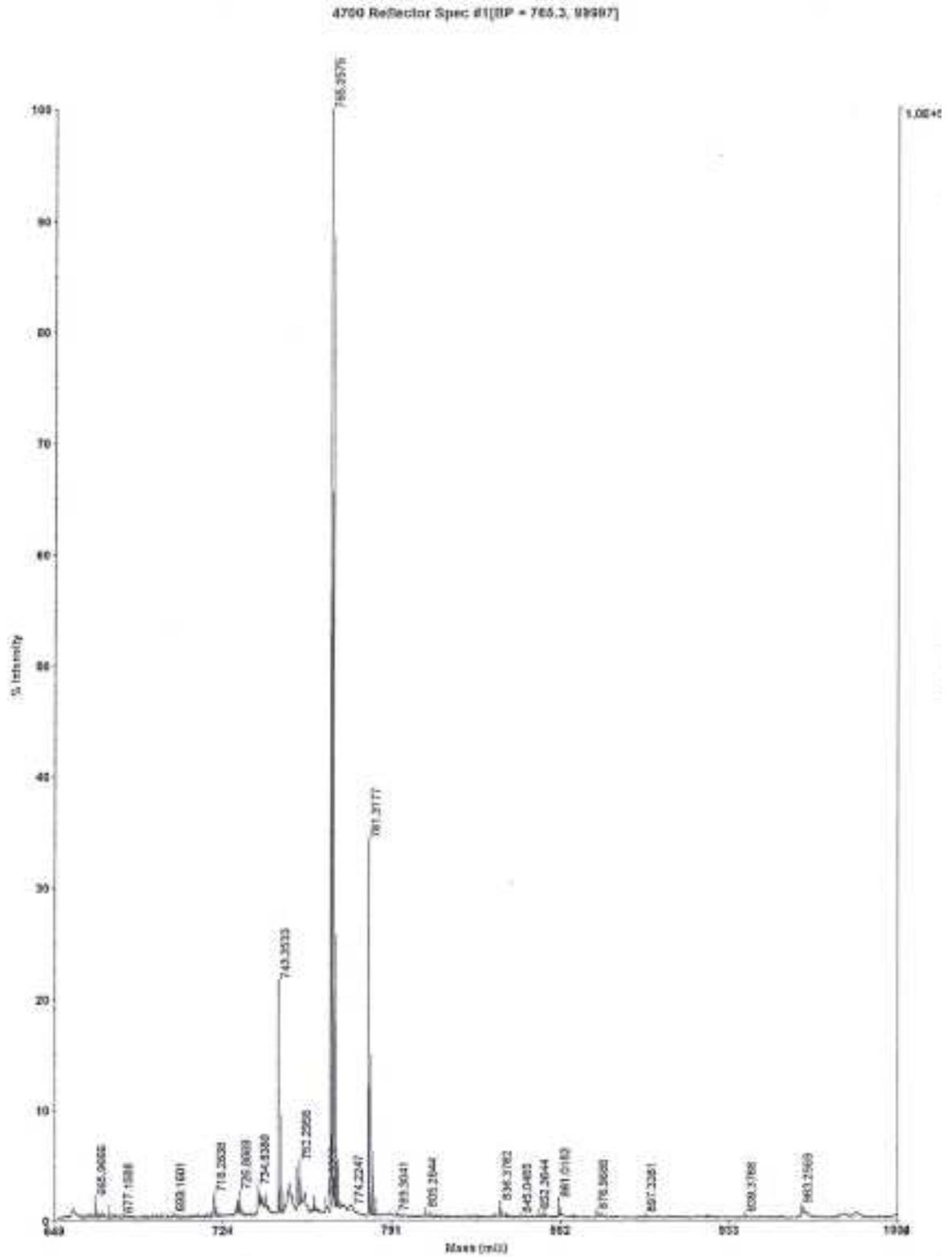
**P1.** *Ciclo(Asn-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)*

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (94% de pureza)

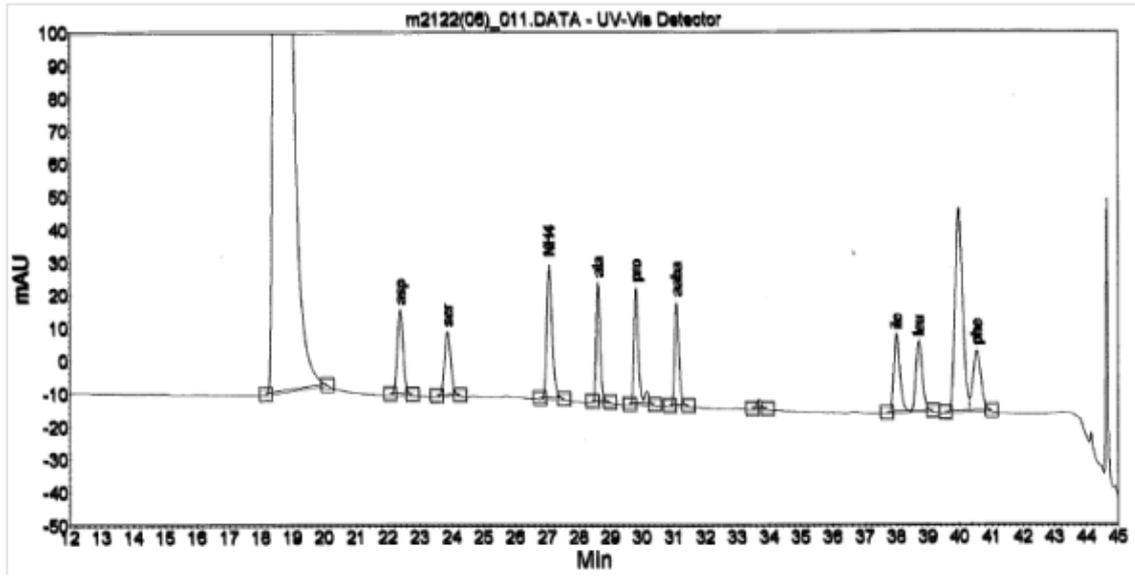


HPLC: 15 % a 70 % de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (92% de pureza)



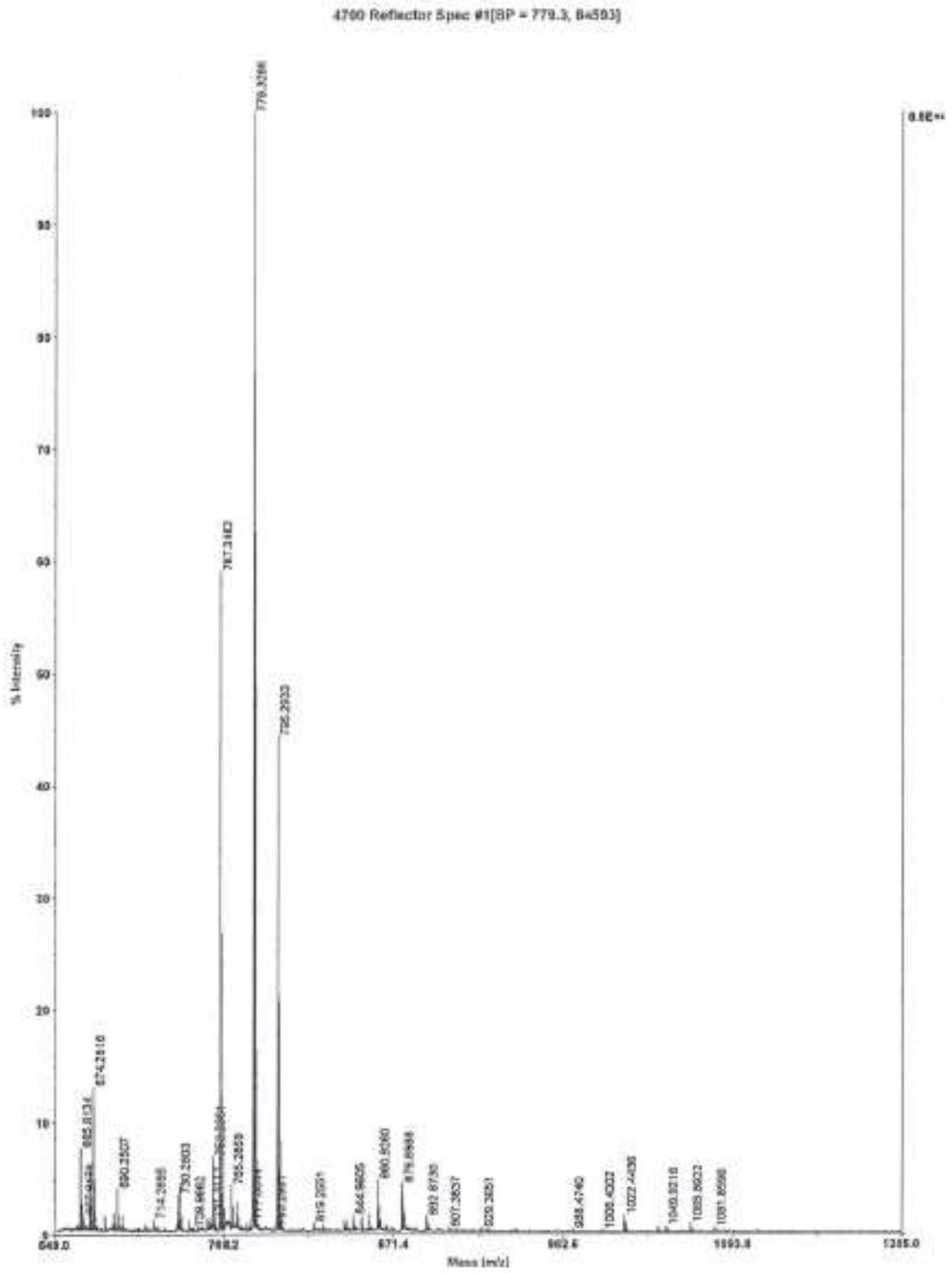


MALDI-TOF

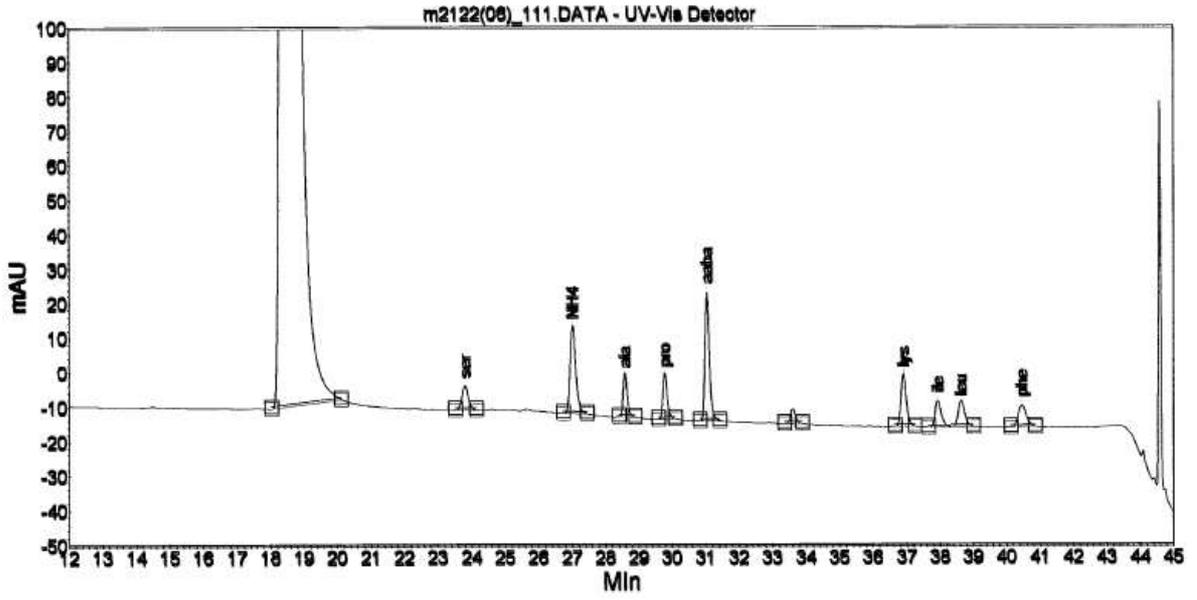


AAA

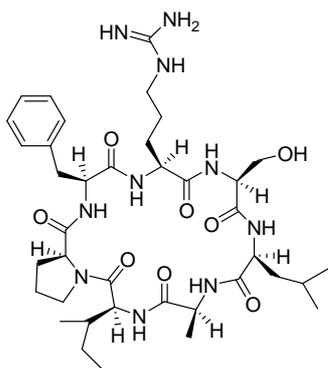




MALDI-TOF

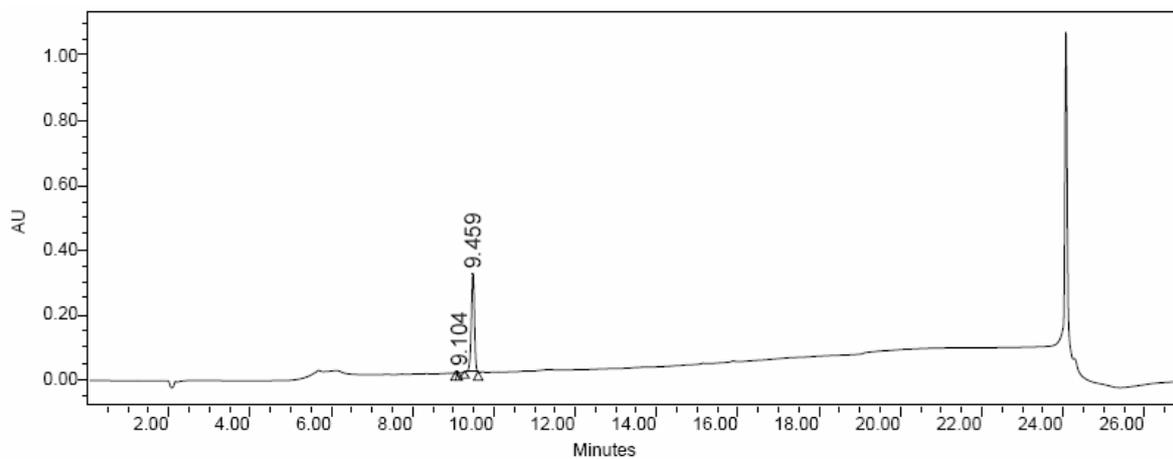


AAA

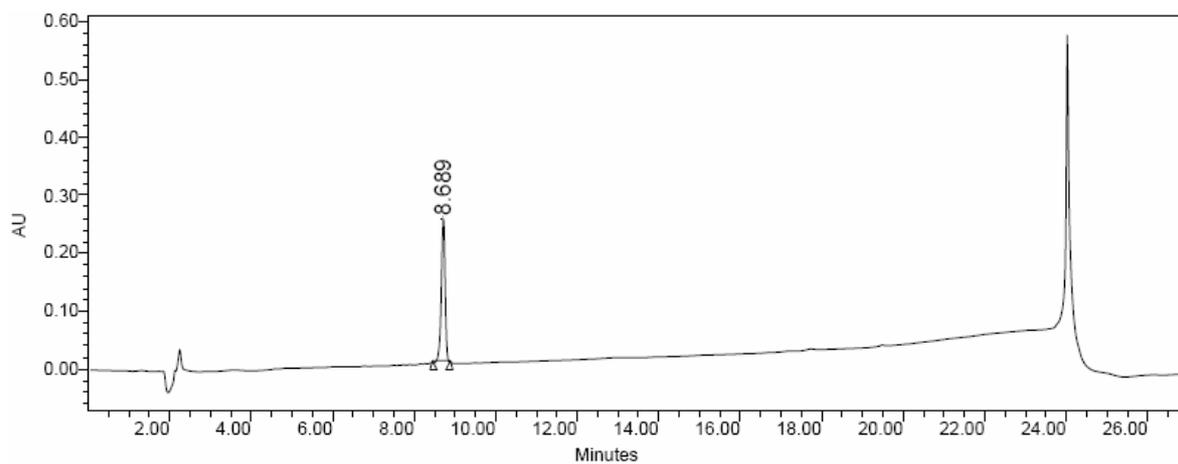


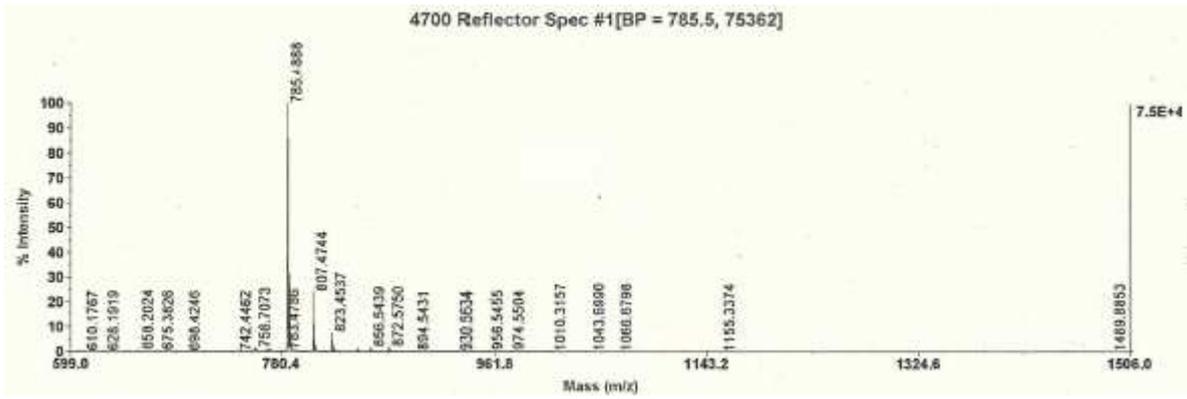
**P3.** *Ciclo*(Arg-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (99 % de pureza)

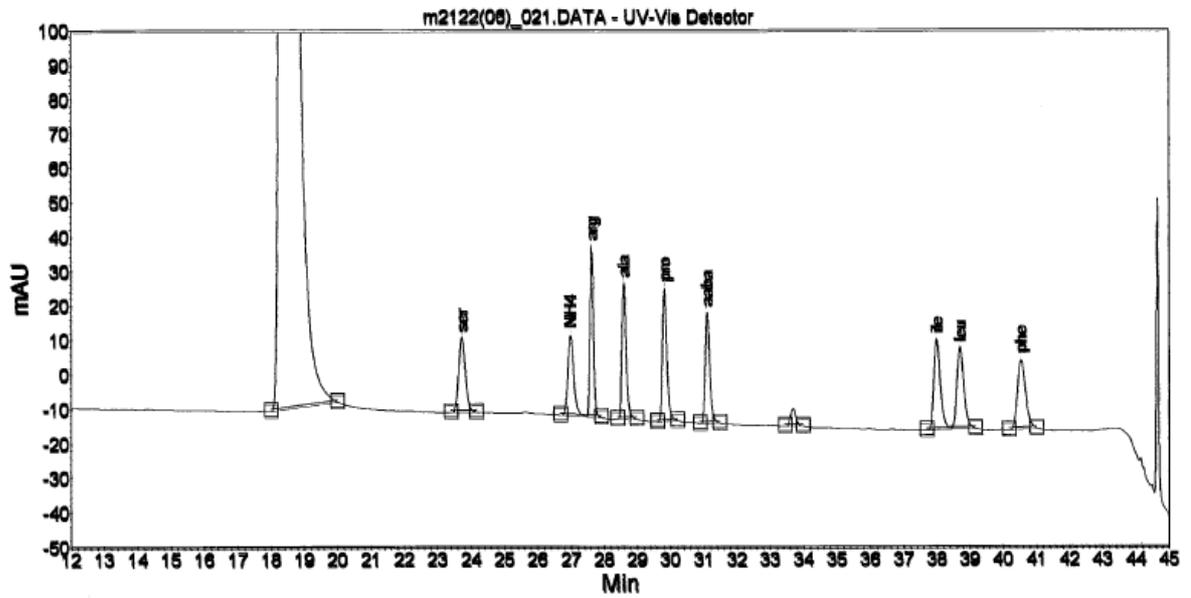


HPLC: 15 % a 70 % de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (99 % de pureza)

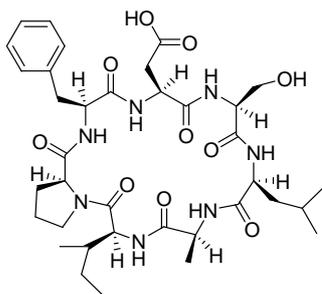




MALDI-TOF

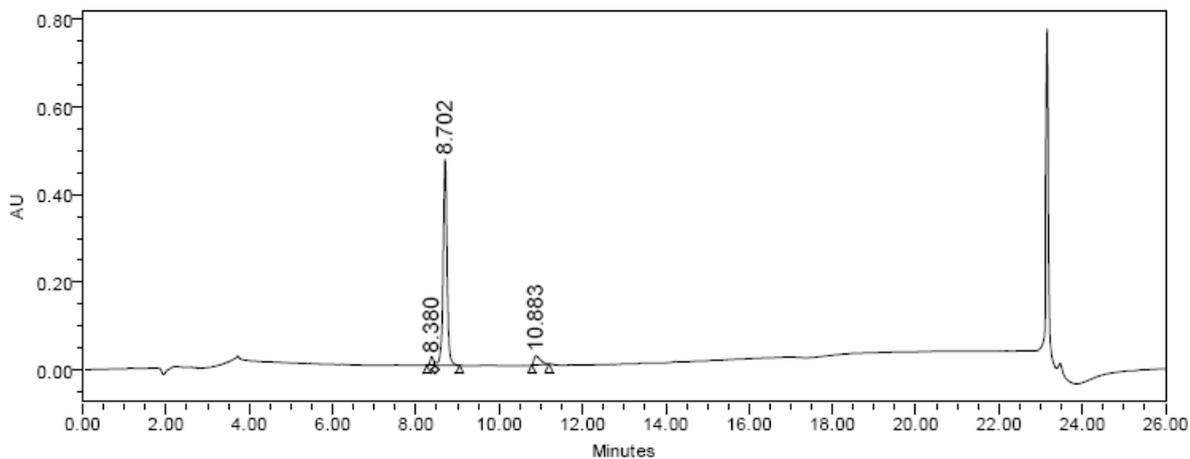


AAA

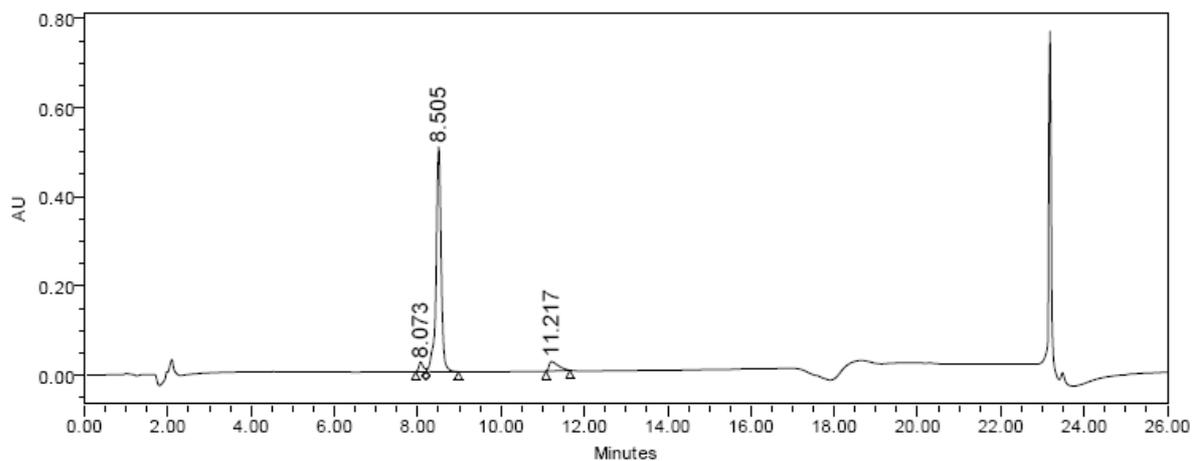


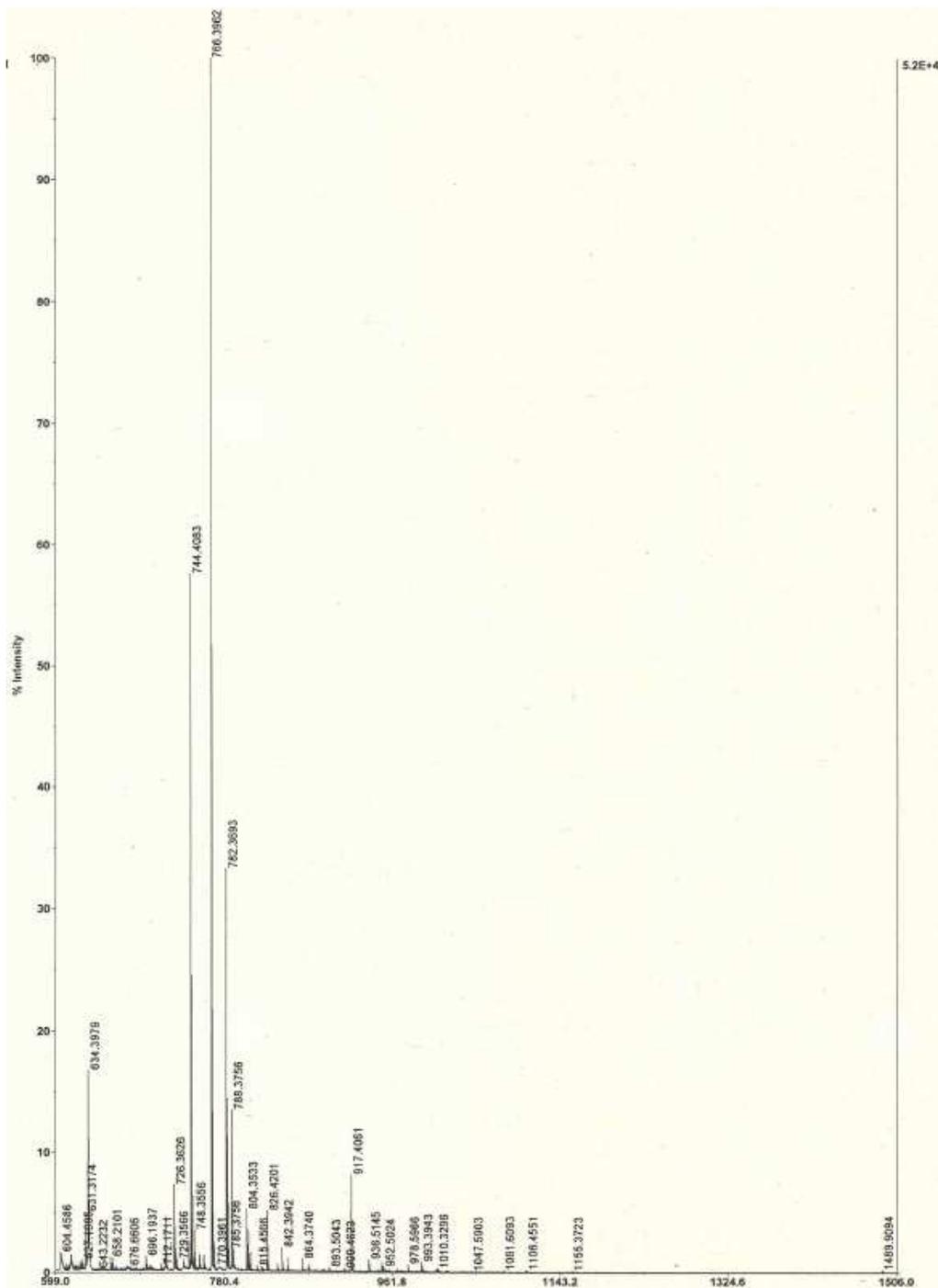
**P4.** *Ciclo(Asp-Ser-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)*

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (90 % de pureza)

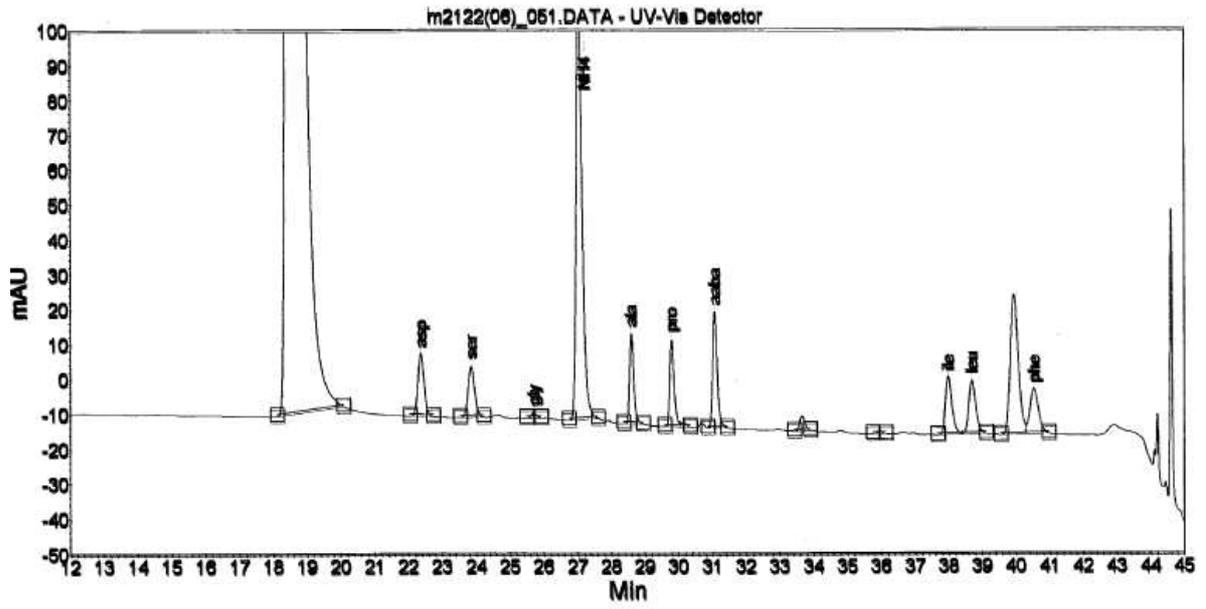


HPLC: 15 % a 70 % de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (90% de pureza)

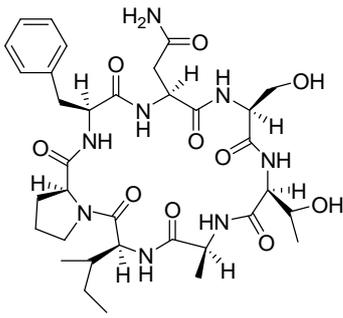




MALDI-TOF

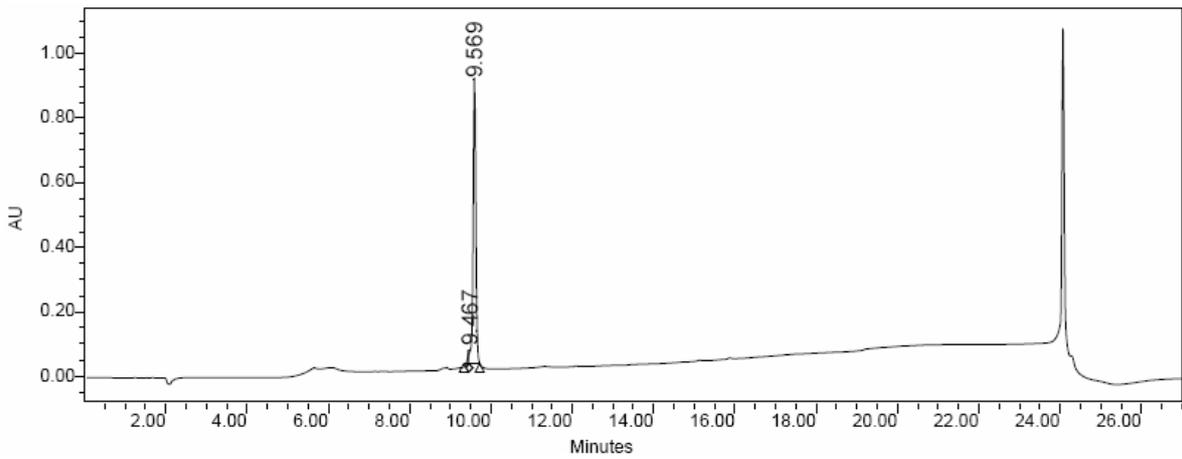


AAA

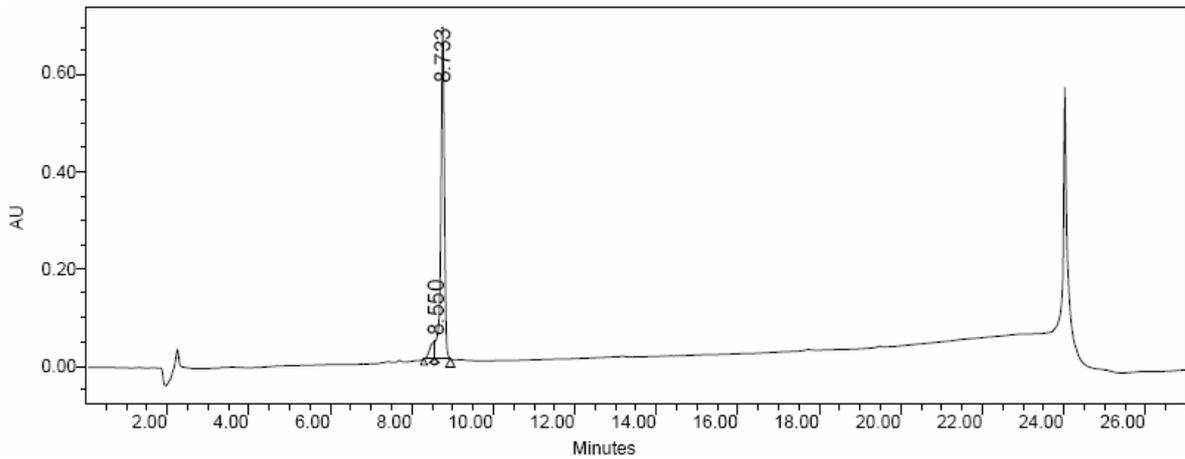


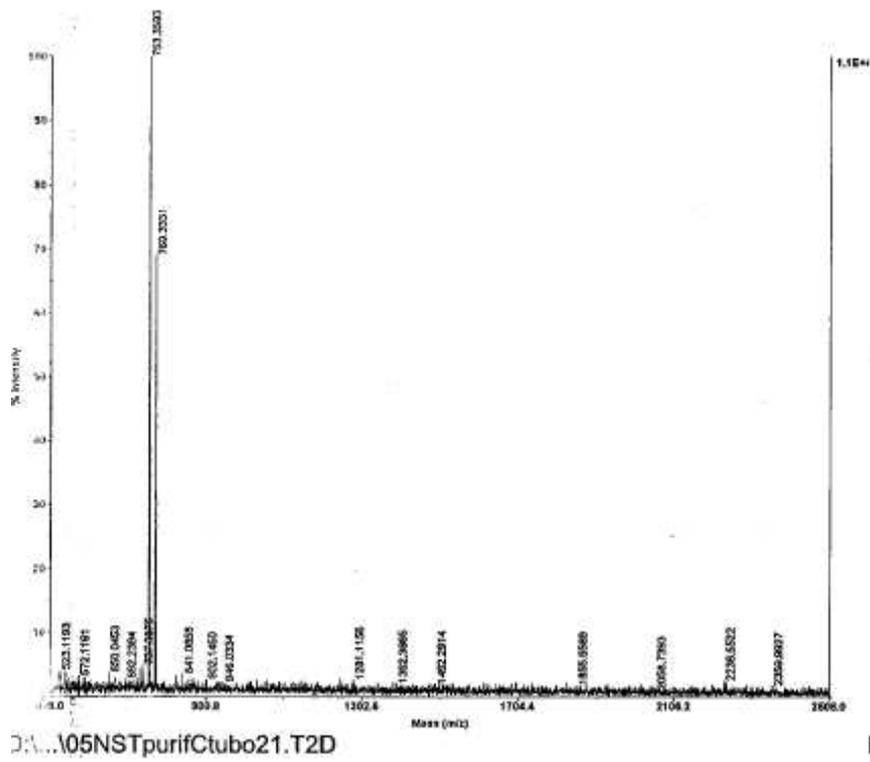
**P5.** *Ciclo*(Asn-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (96% de pureza)

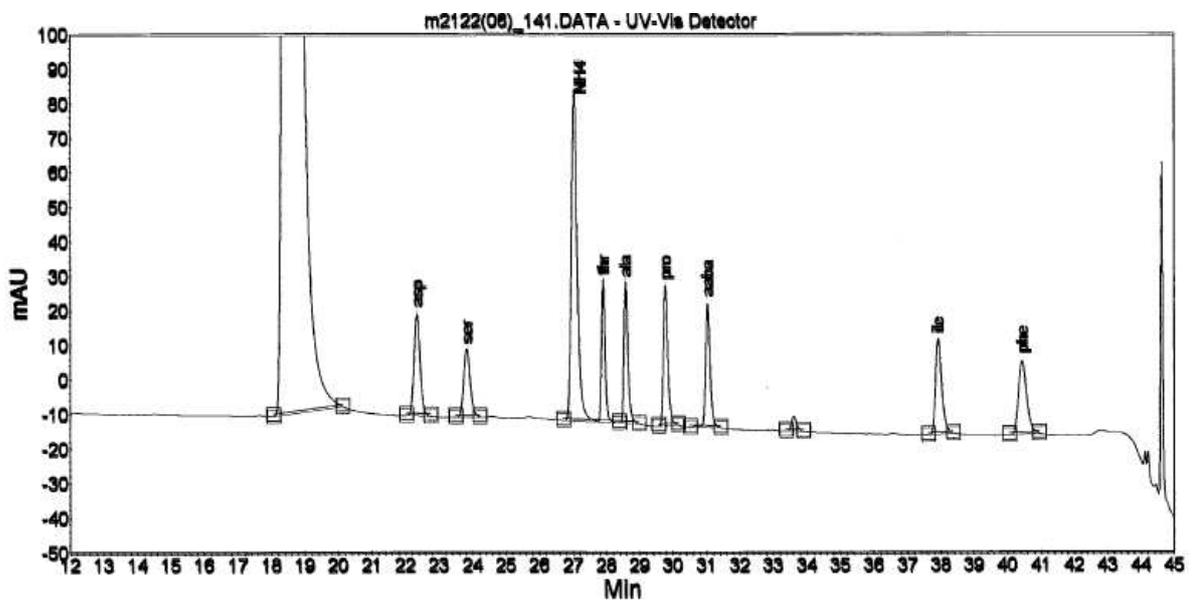


HPLC: 15 % a 70 % de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (93% de pureza)

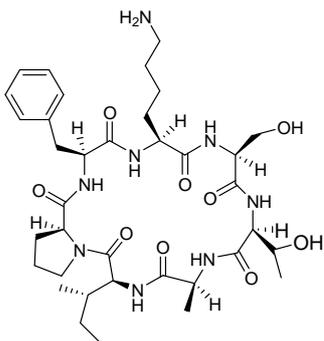




MALDI-TOF

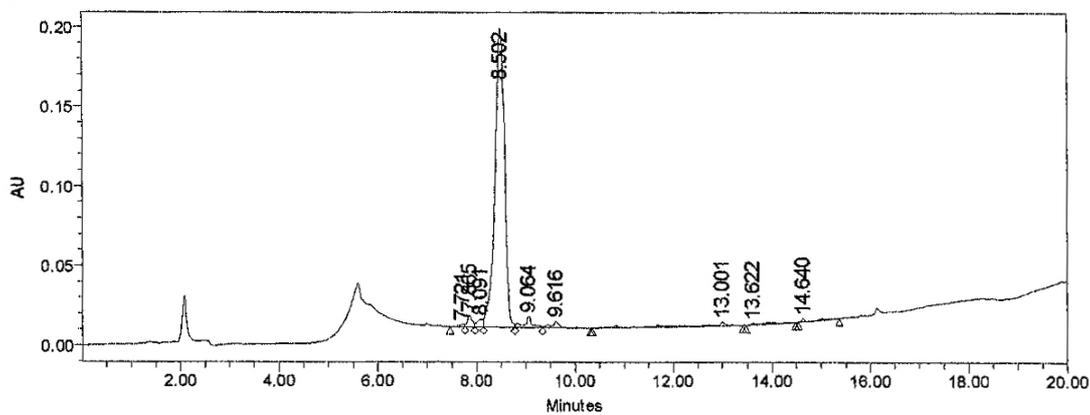


AAA

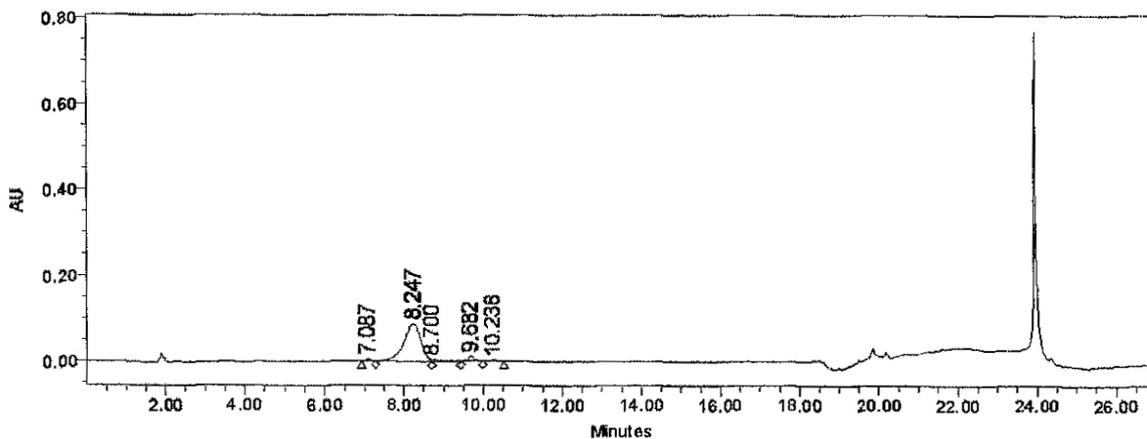


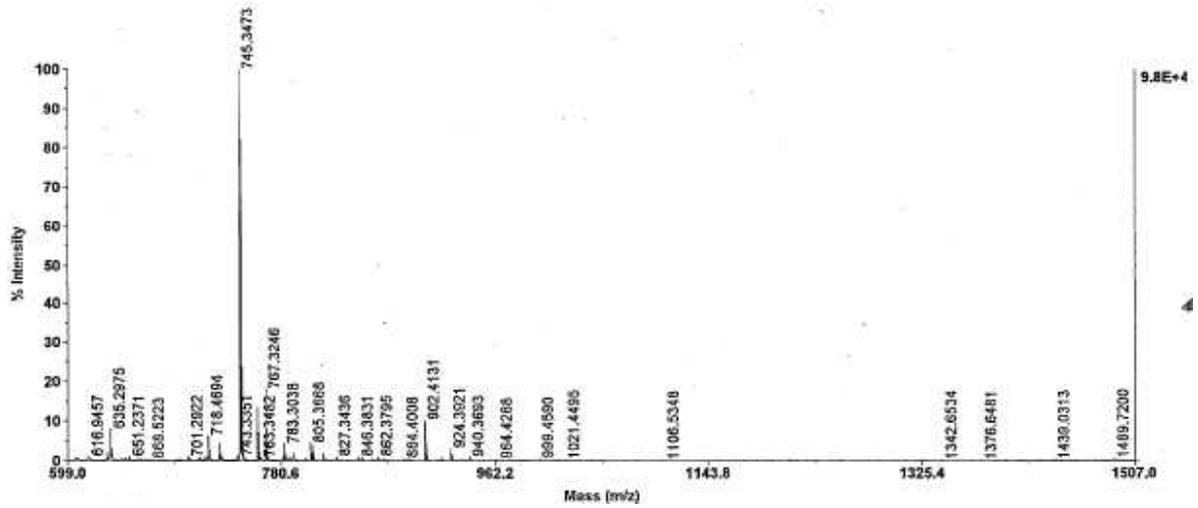
**P6. Ciclo(Lys-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)**

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (95 % de pureza)

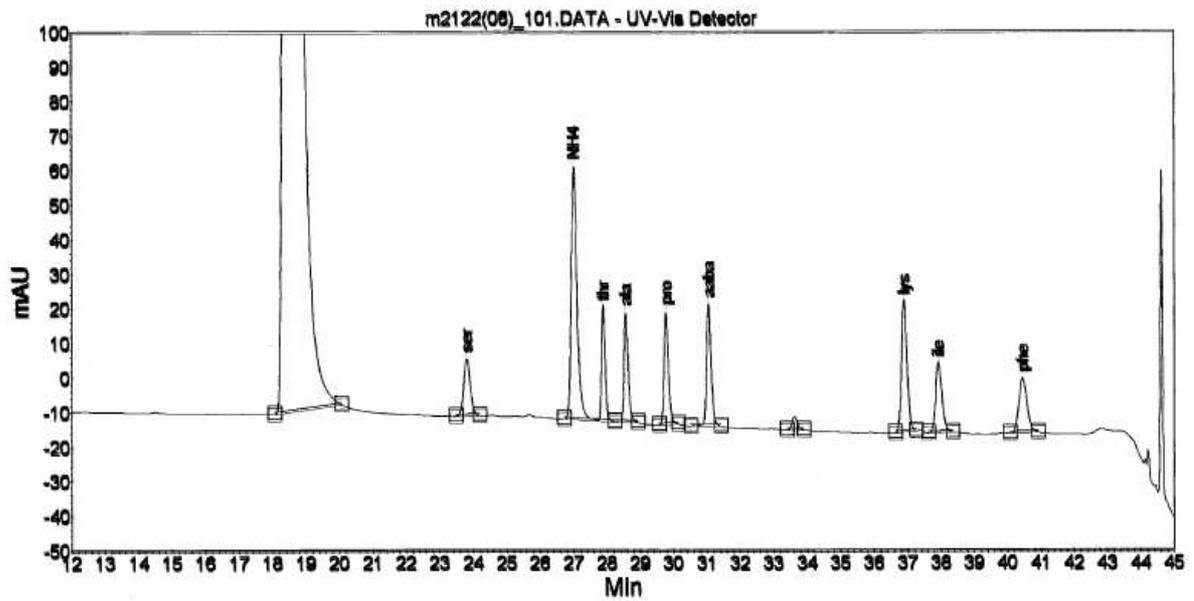


HPLC: 15 % a 45 % de ACN en 15 min, T= 45°C  $\lambda = 220$  nm (95 % de pureza)

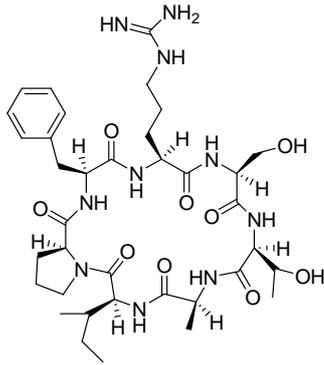




MALDI-TOF

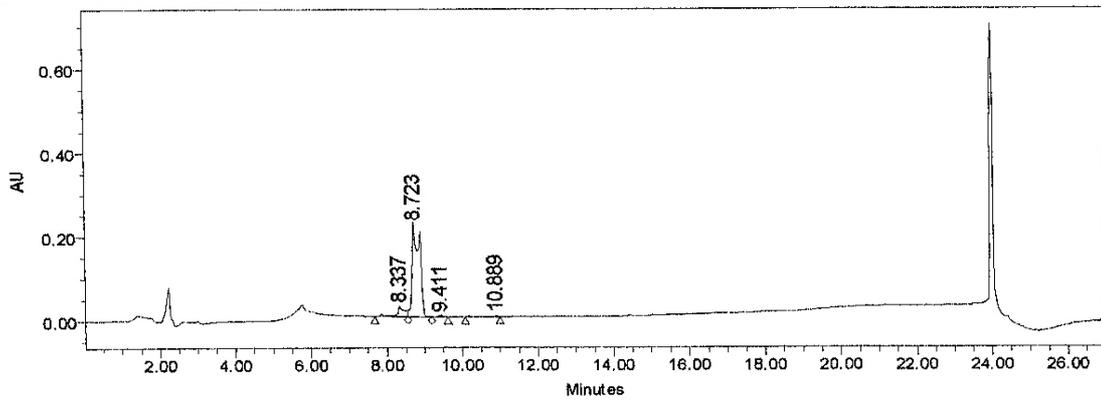


AAA

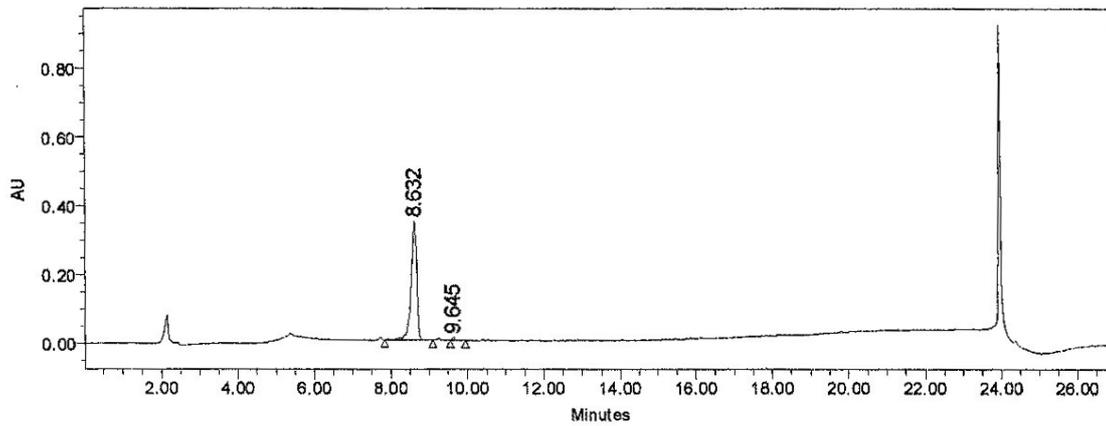


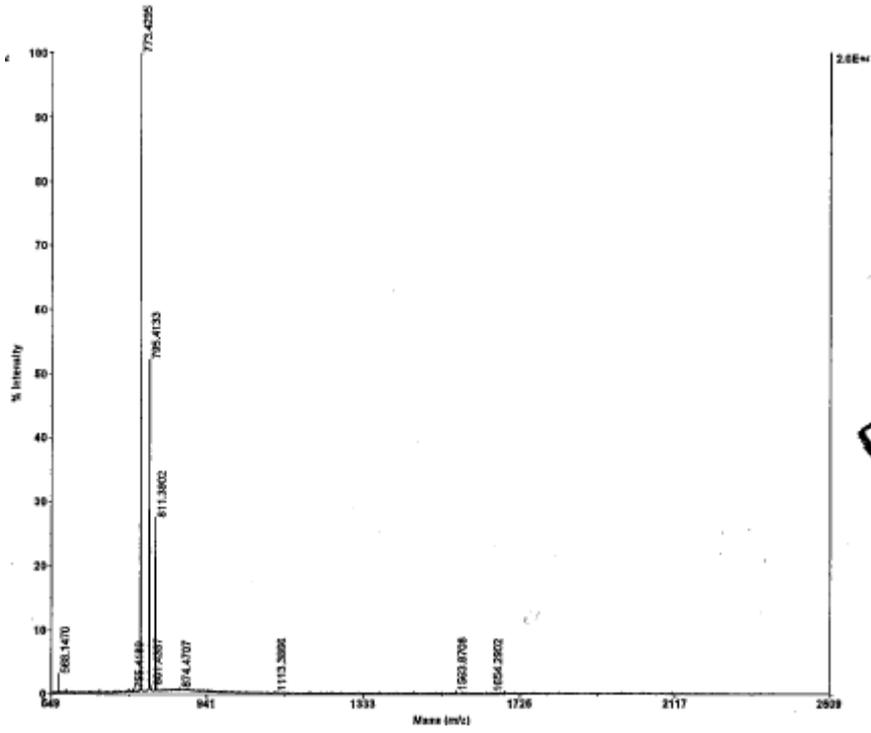
**P7.** *Ciclo*(Arg-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (88% de pureza). 2 picos

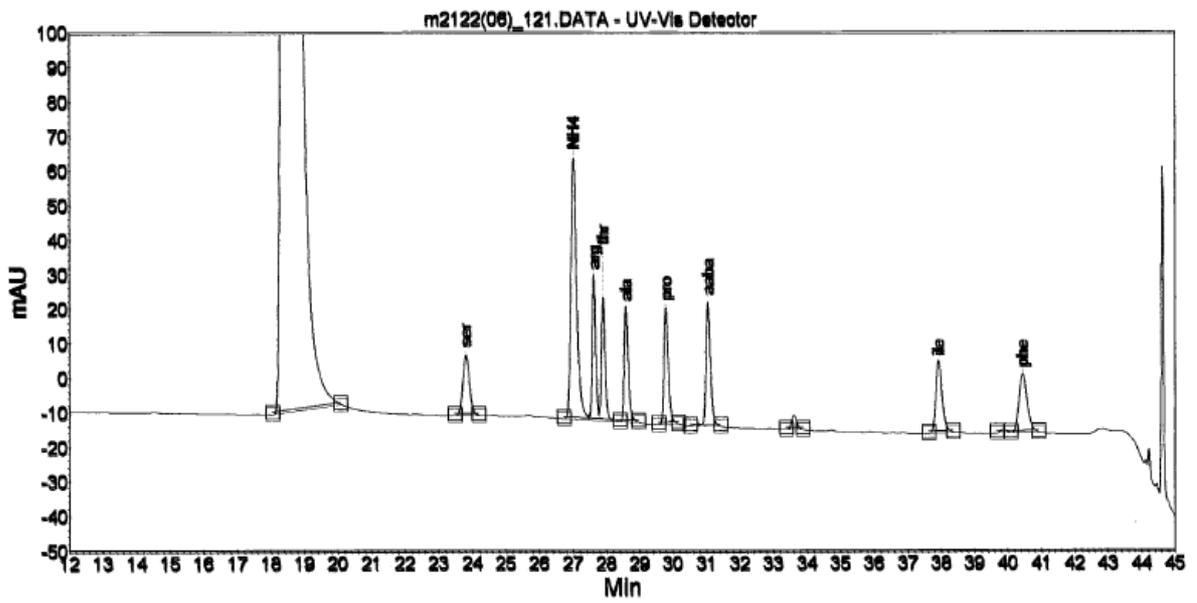


HPLC: 0 % a 100 % de ACN en 15 min. T = 45°C  $\lambda = 220$  nm (88% de pureza)

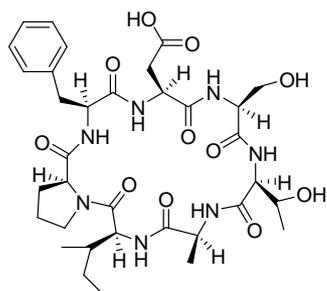




MALDI-TOF

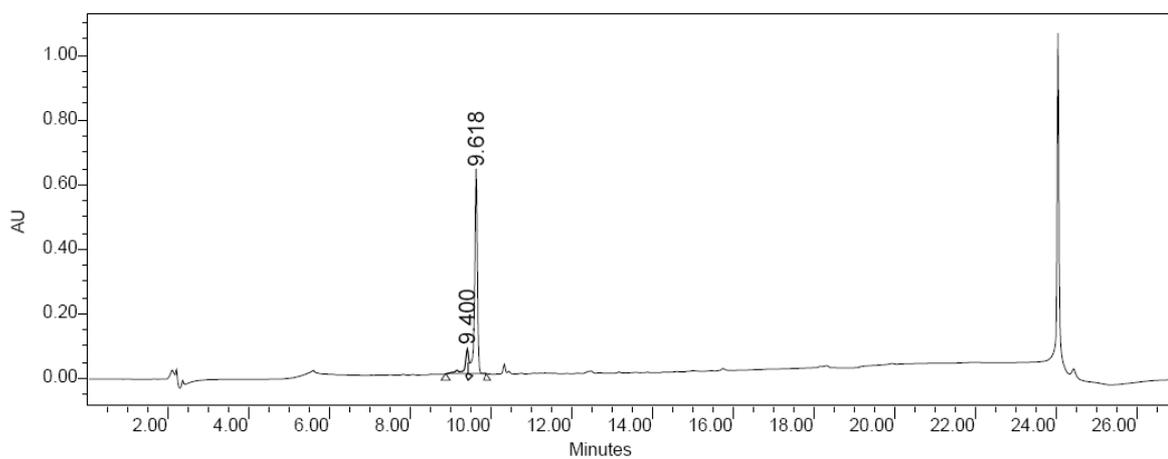


AAA

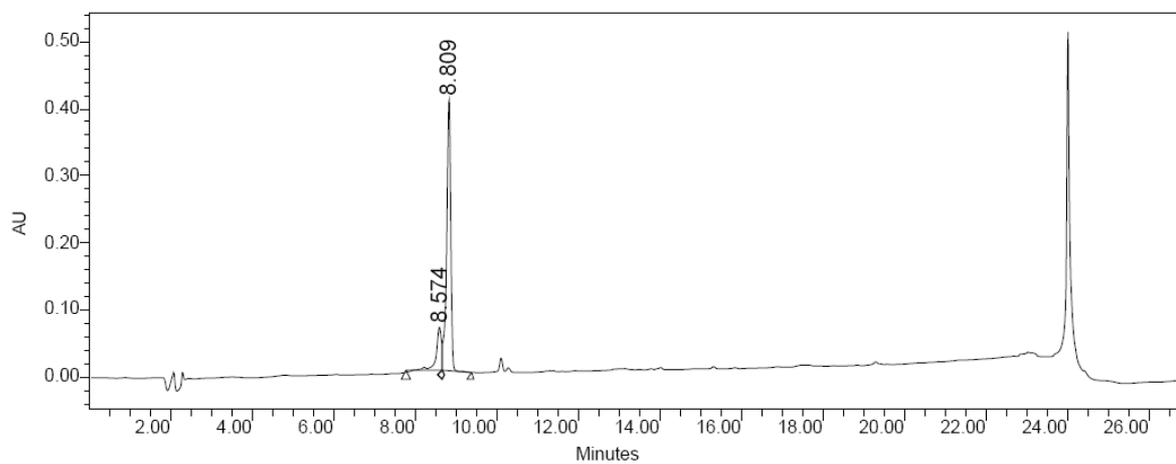


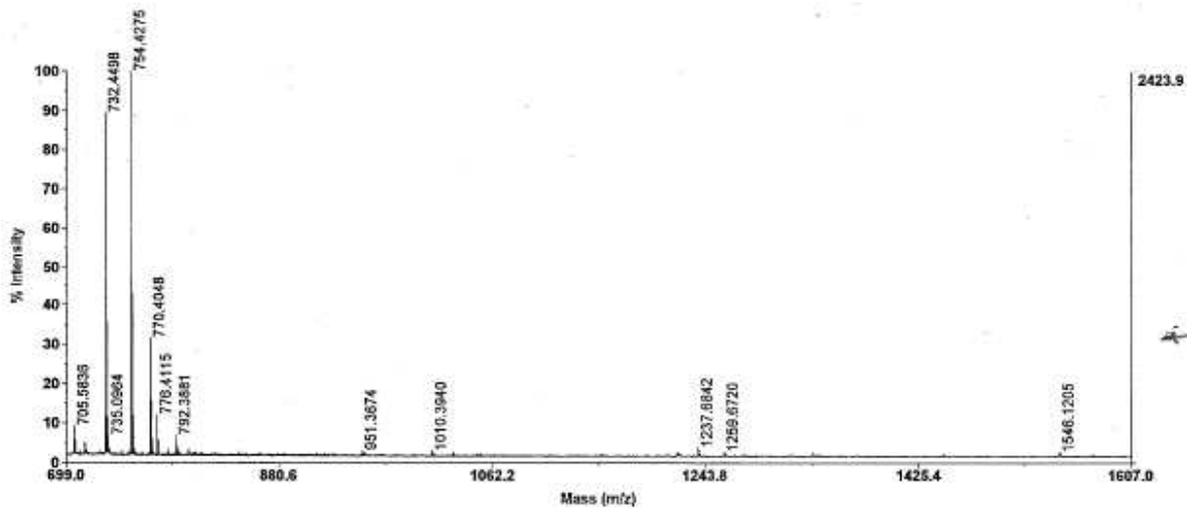
**P8.** *Ciclo*(Asp-Ser-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm ( 84 % de pureza)

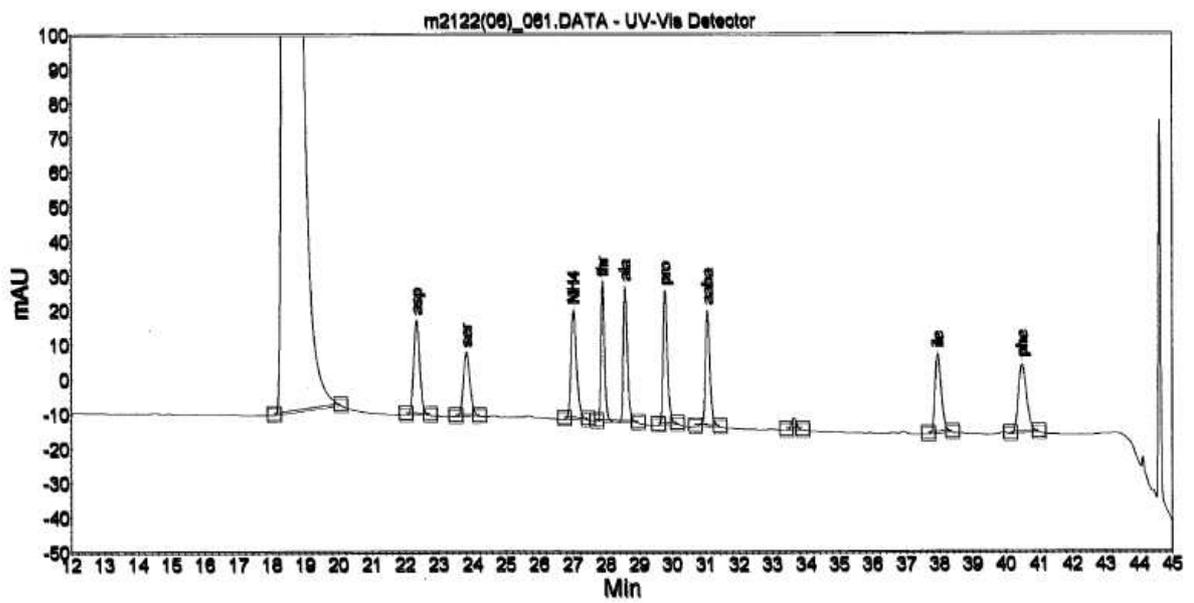


HPLC: 15 % a 70 % de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (84 % de pureza)

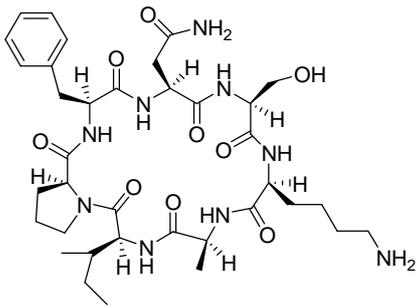




MALDI-TOF

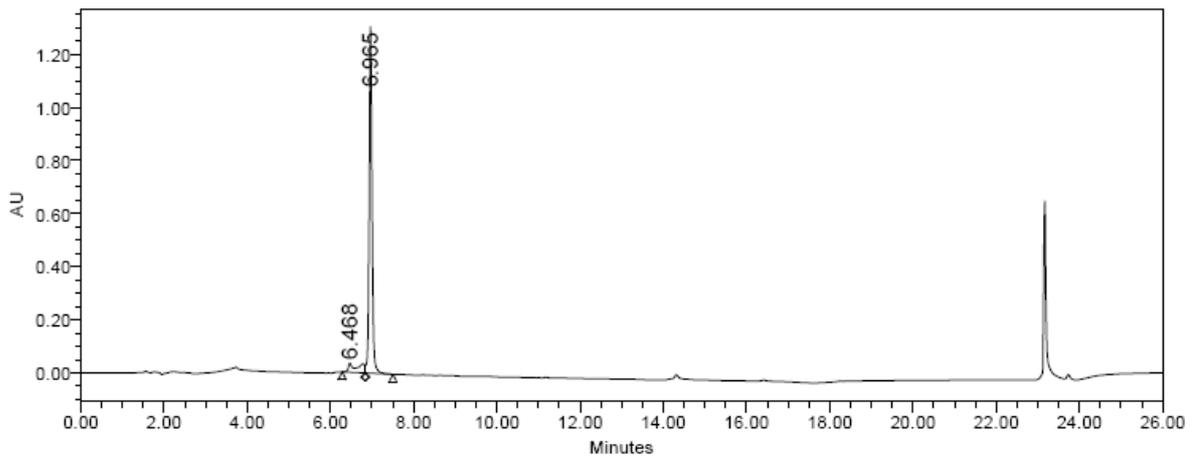


AAA

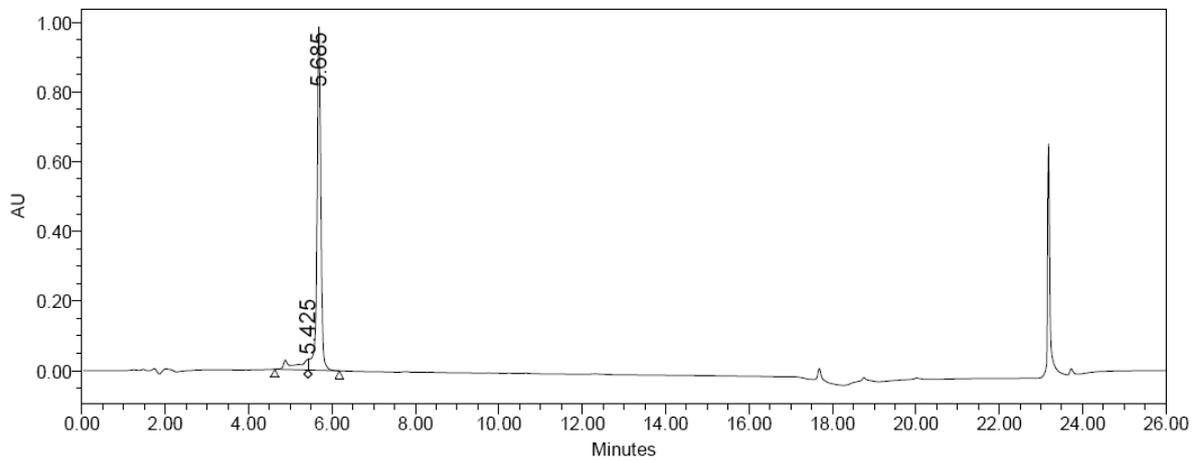


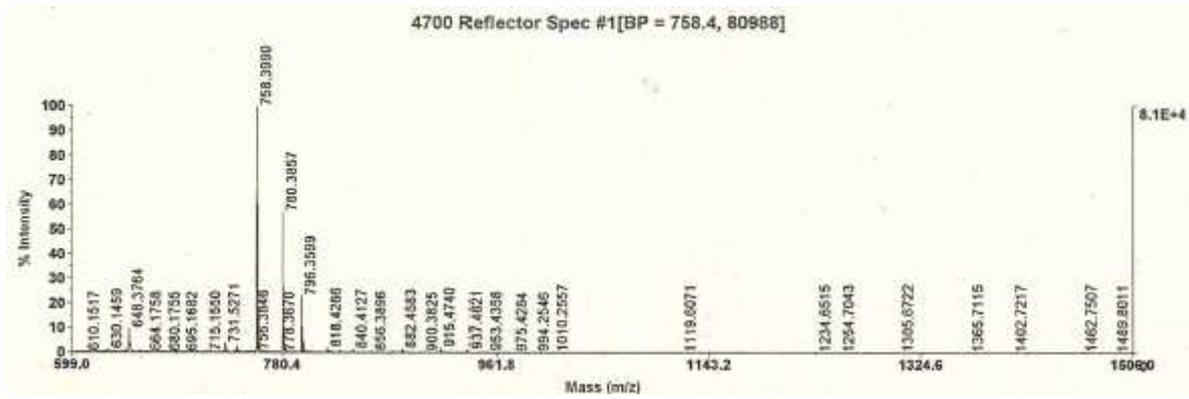
**P9.** *Ciclo(Asn-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)*

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (91 % de pureza)

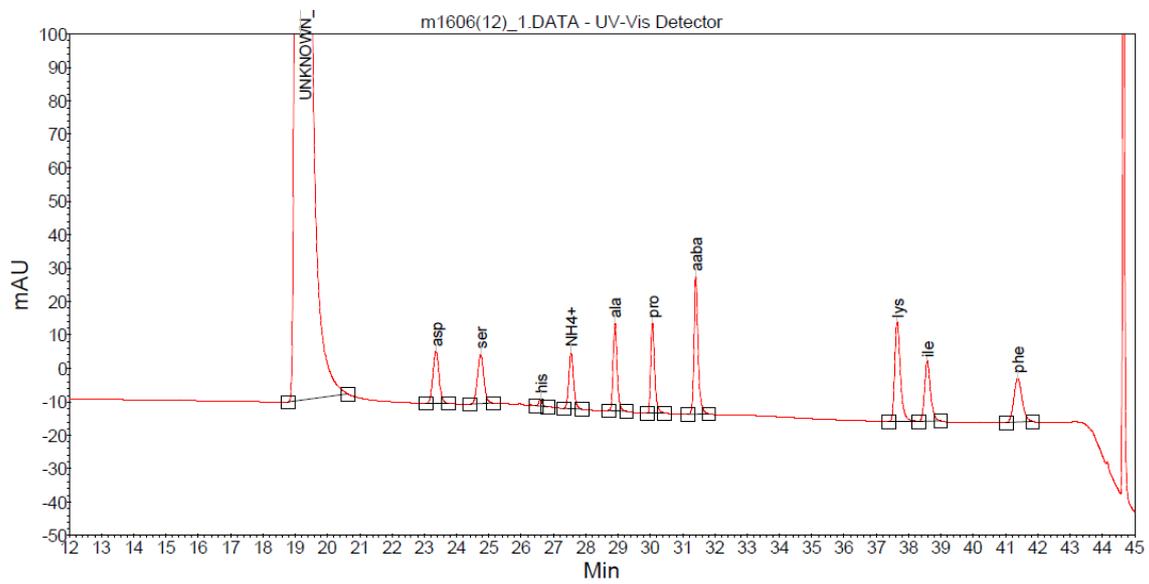


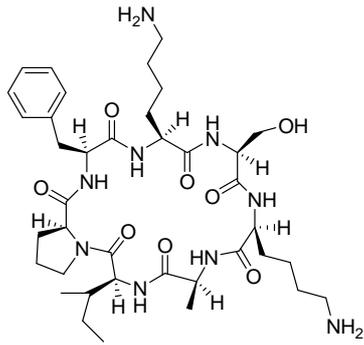
HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (91 % de pureza)





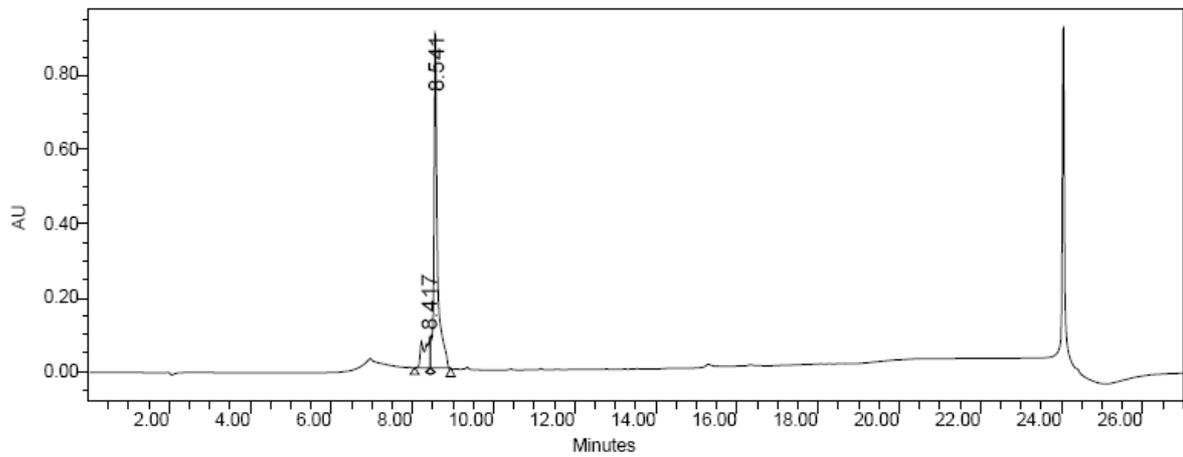
MALDI-TOF



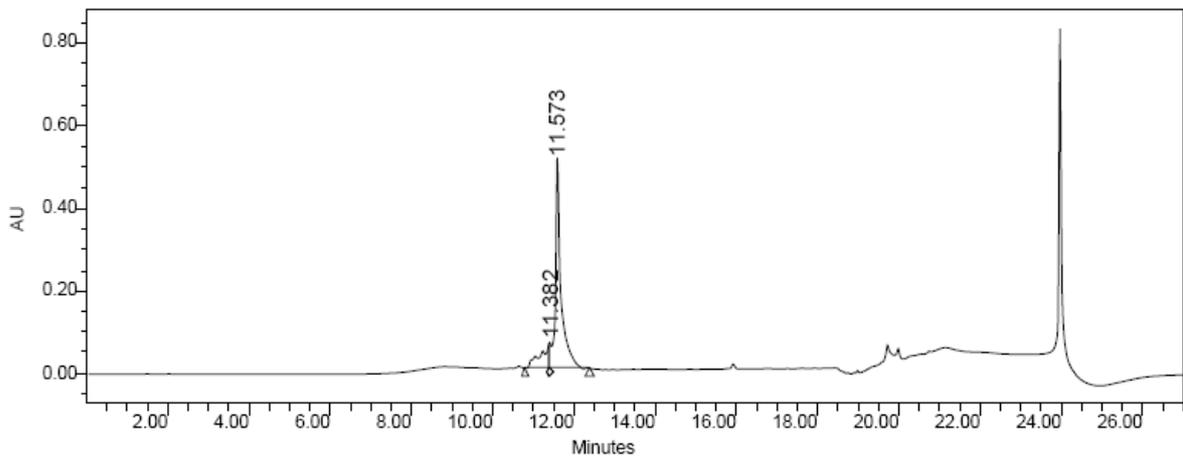


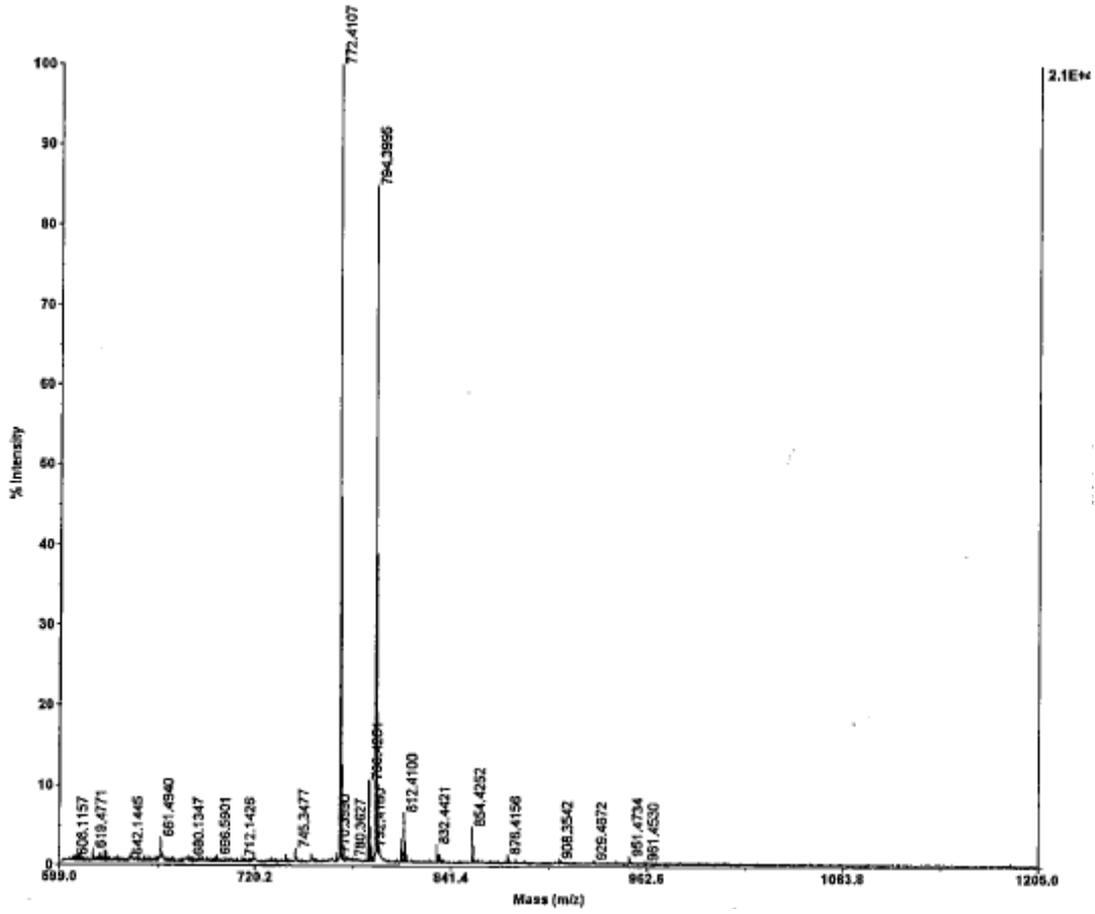
**P10.** *Ciclo(Lys-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)*

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (84 % de pureza)

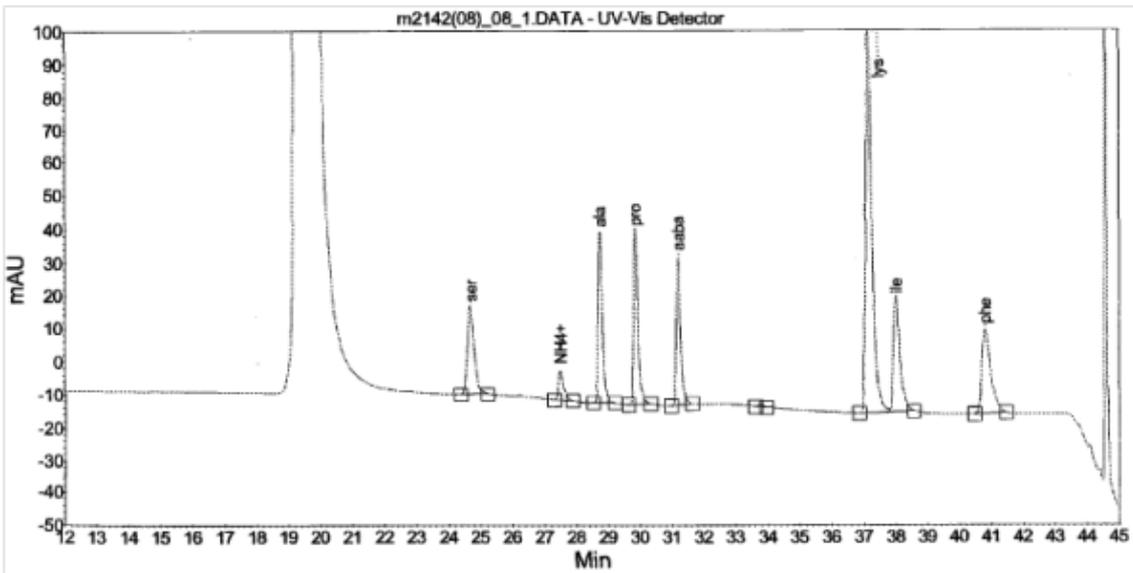


HPLC: 0 % a 50 % de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (81% de pureza)

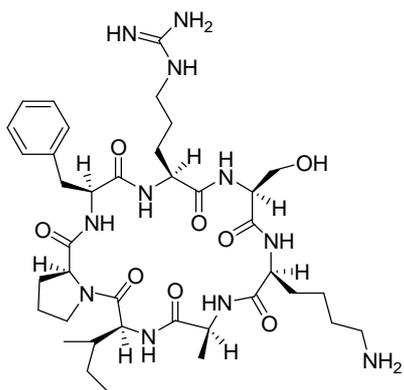




MALDI-TOF

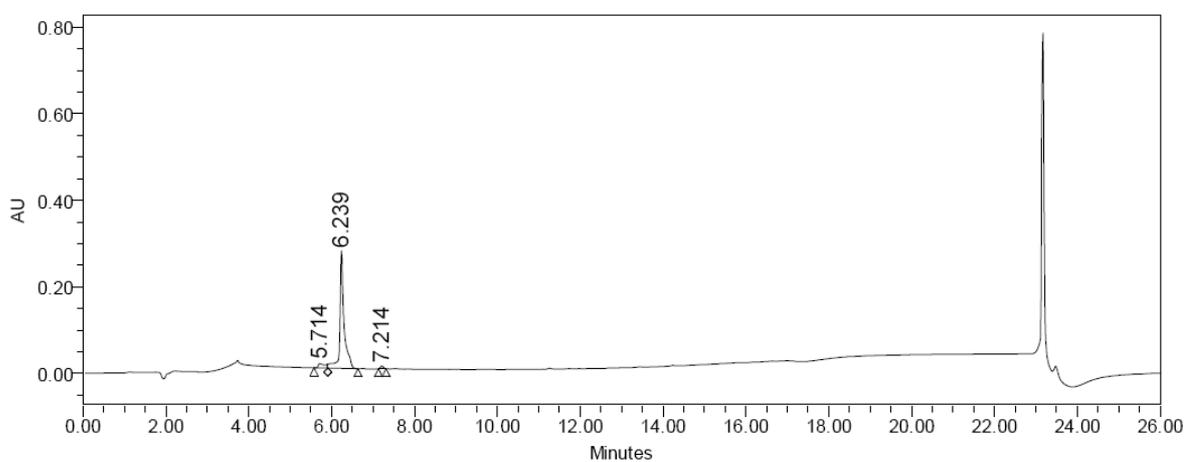


AAA

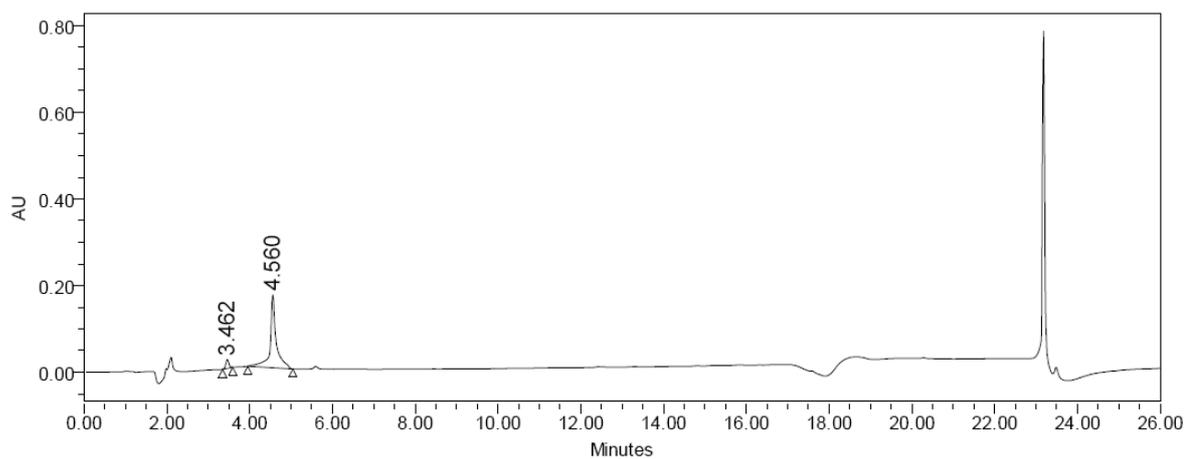


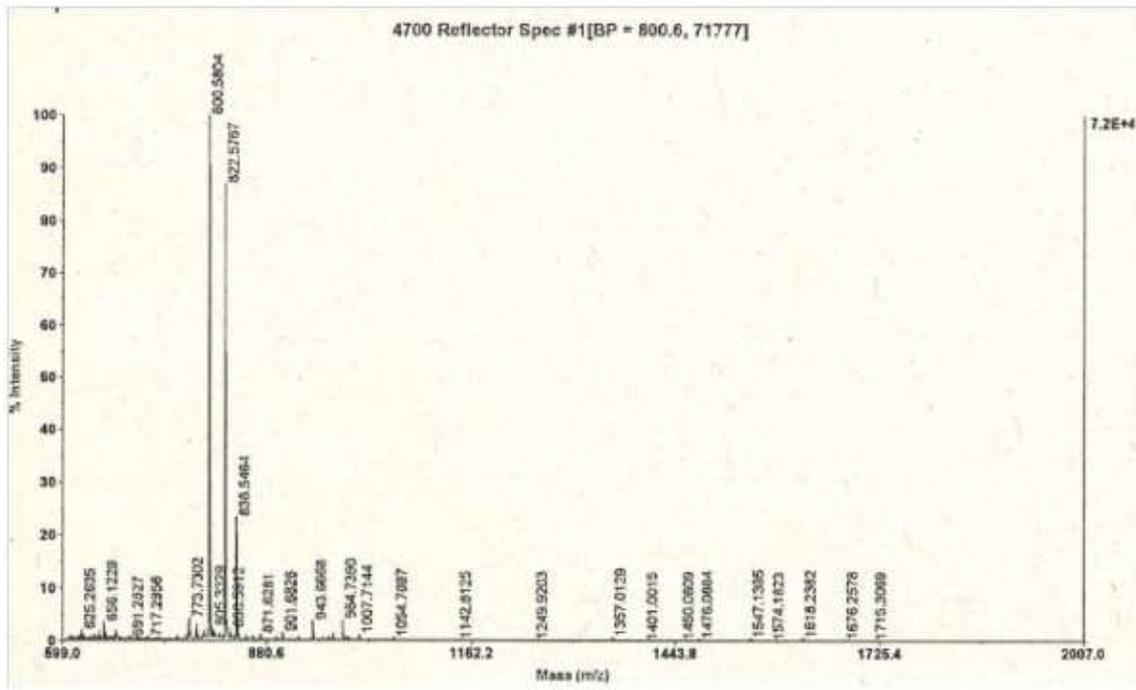
**P11.** *Ciclo*(Arg-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm ( 92 % de pureza)

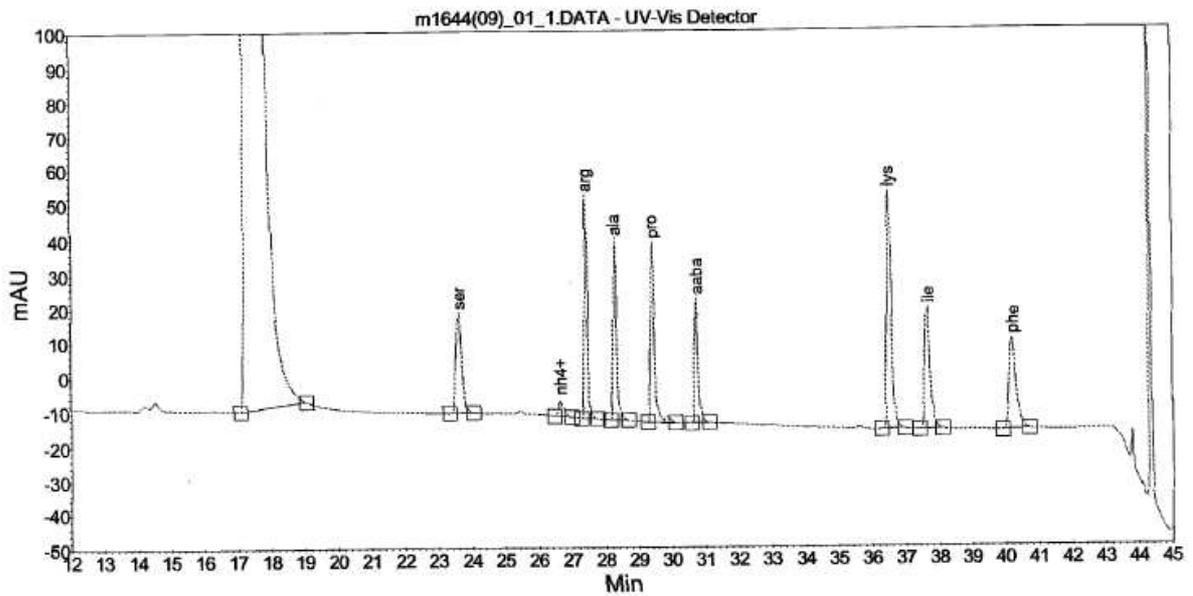


HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (94 % de pureza)

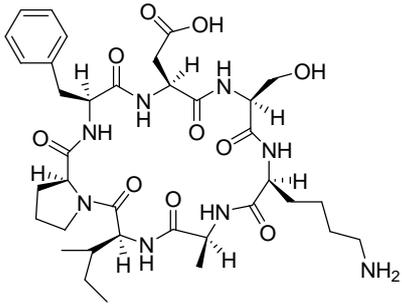




MALDI-TOF

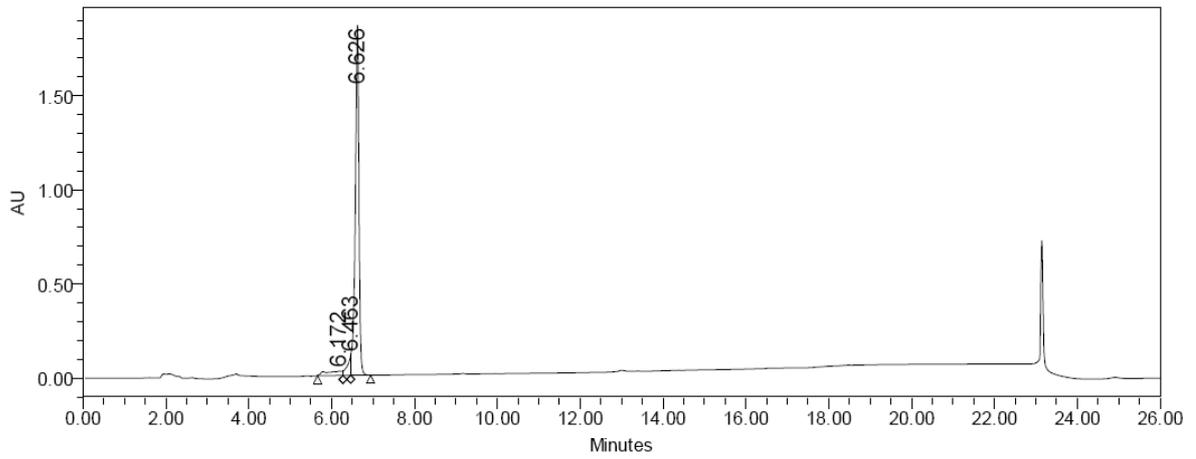


AAA

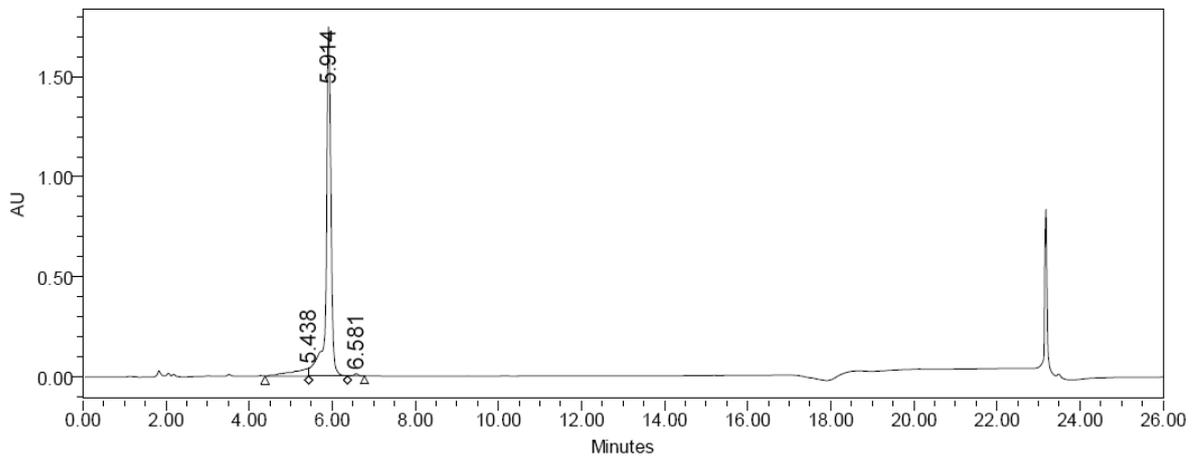


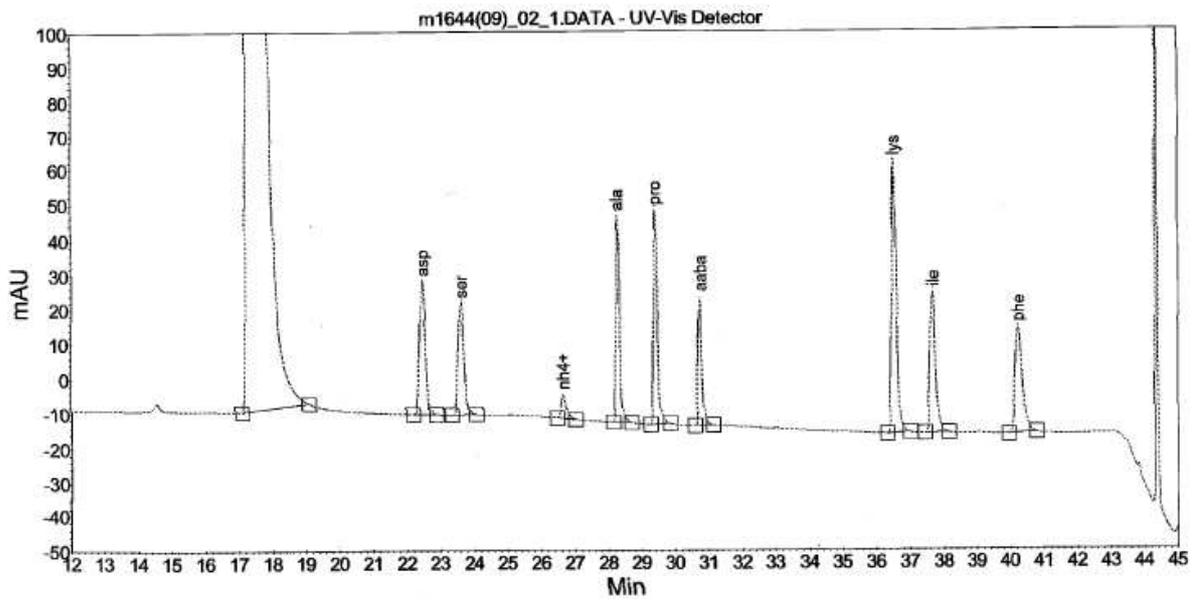
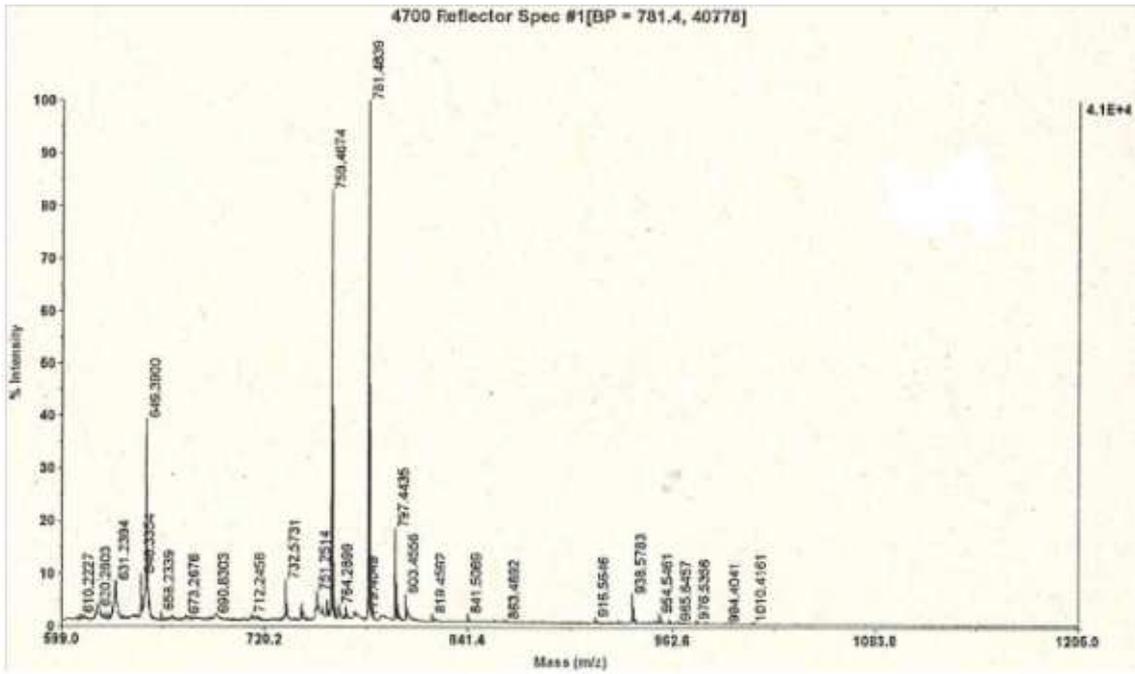
**P12.** *Ciclo*(Asp-Ser-Lys-Ala-Ile-Pro-Phe)

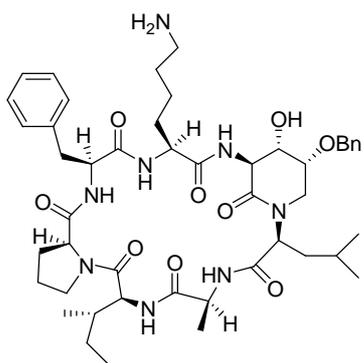
HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm ( 90 % de pureza)



HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm ( 92 % de pureza)

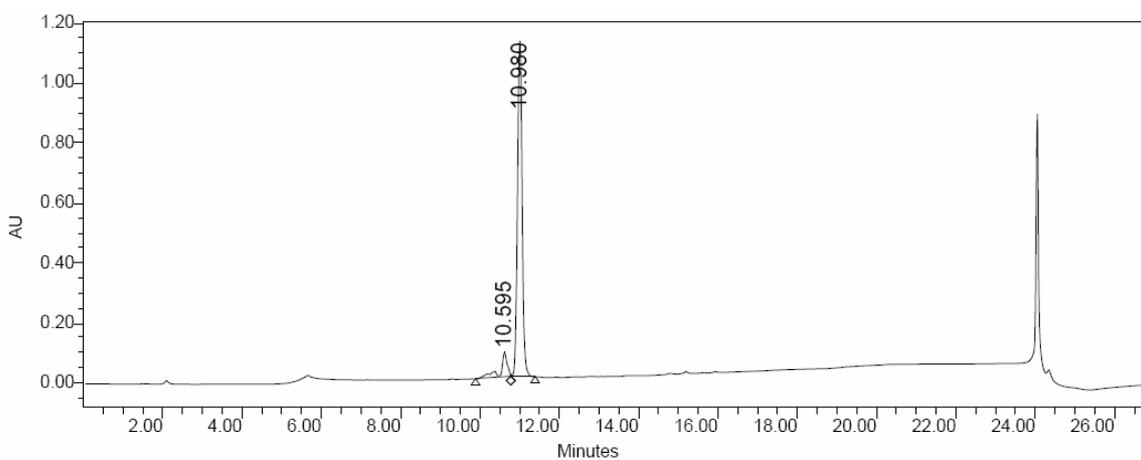




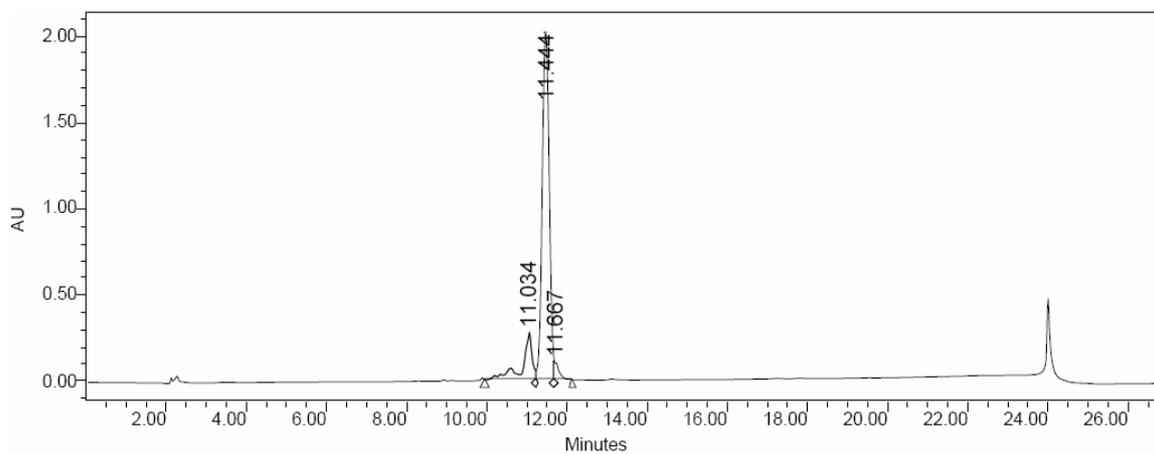


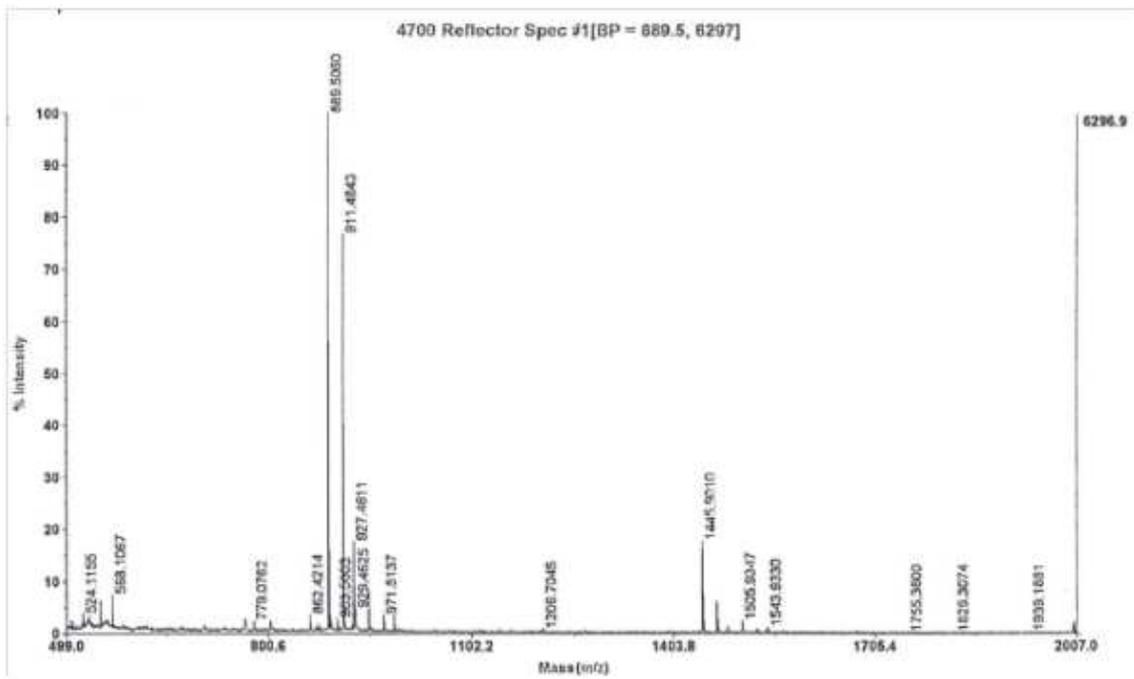
**P15.** *Ciclo(Lys-{Ser(OBn)-Leu}-Ala-Ile-Pro-Phe)*

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm ( 89% de pureza)



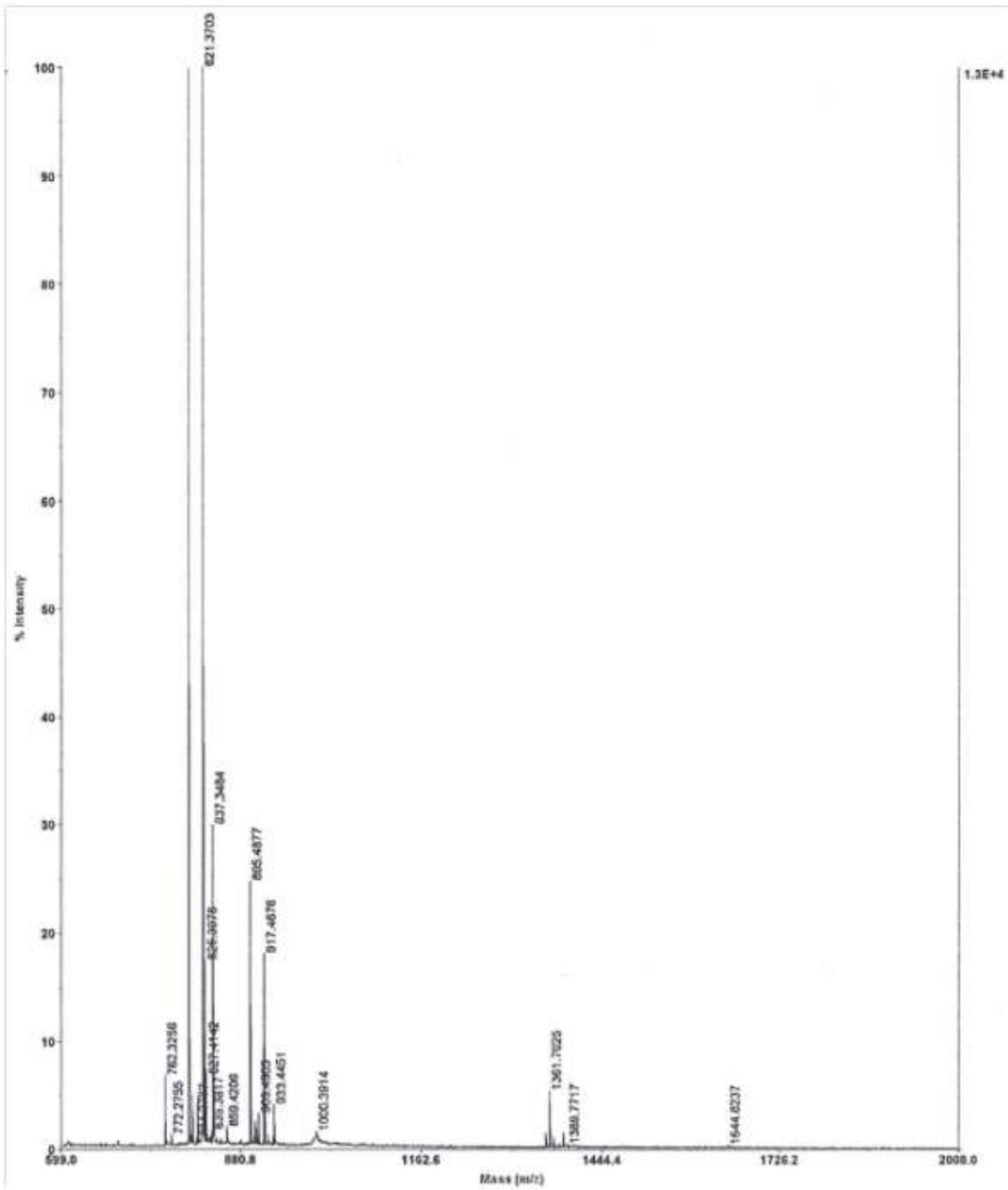
HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm ( 82 % de pureza)



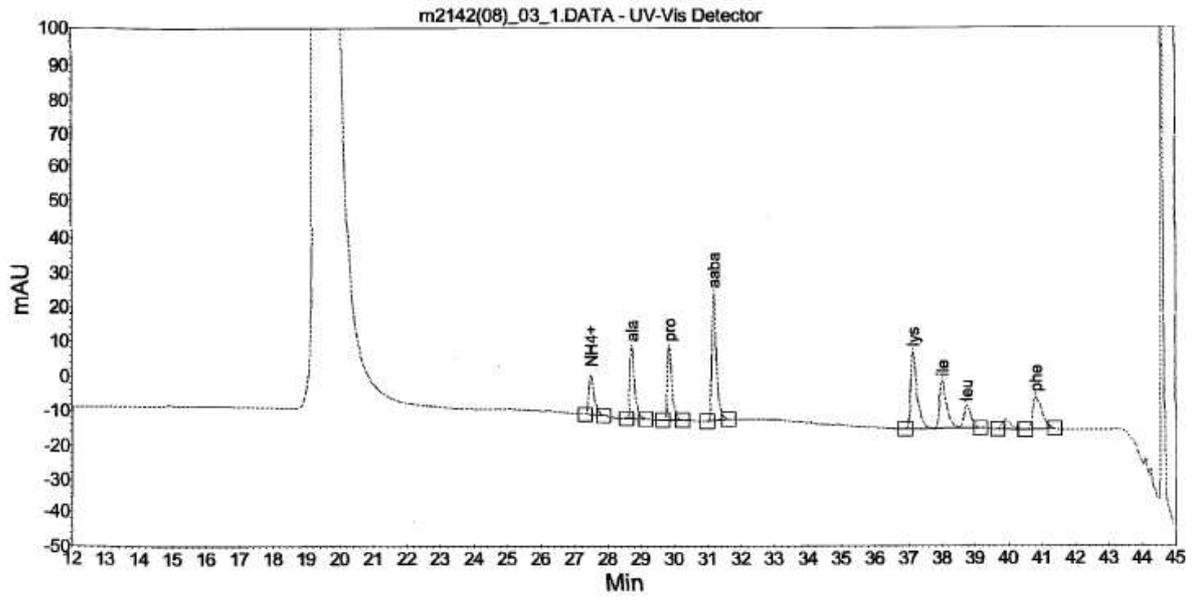


MALDI-TOF

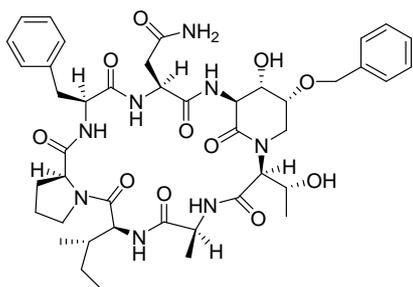




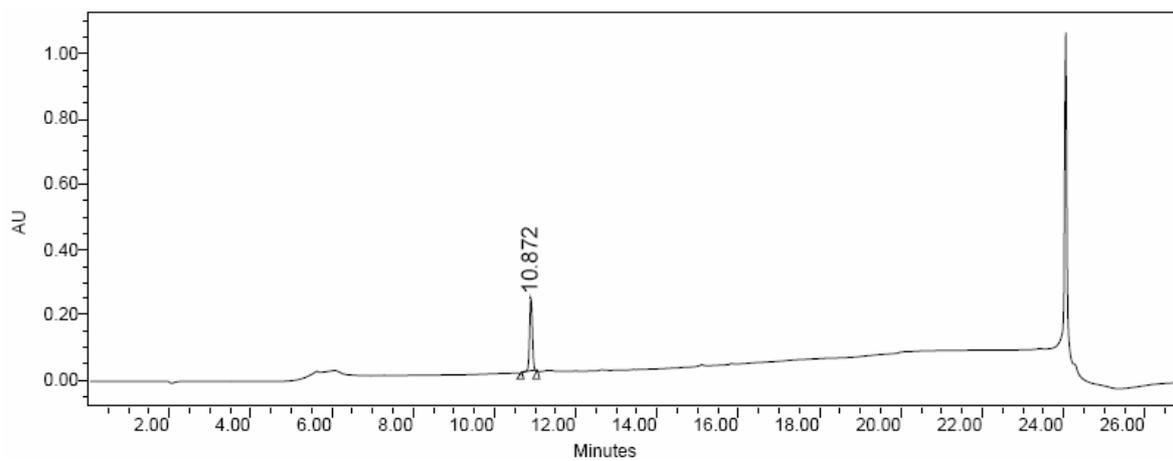
MALDI-TOF



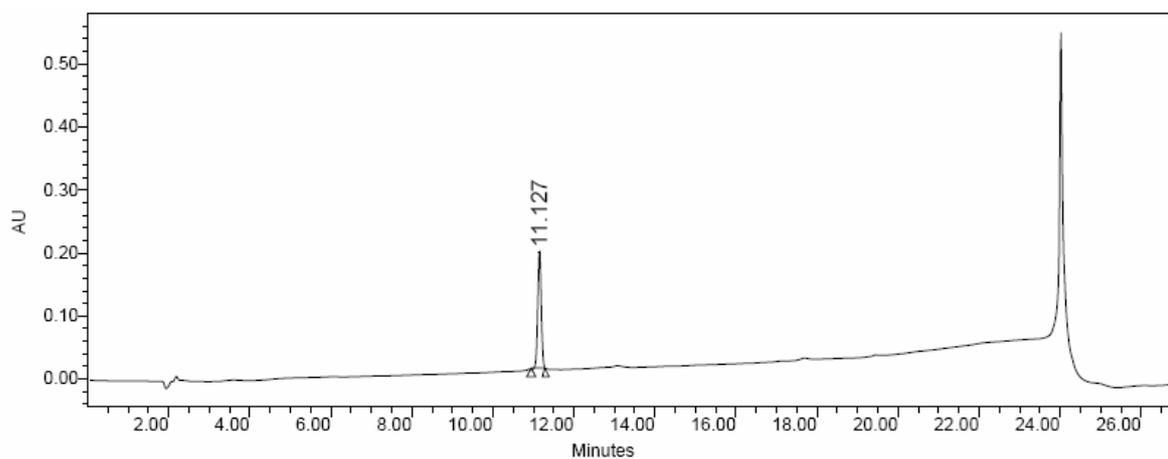
AAA

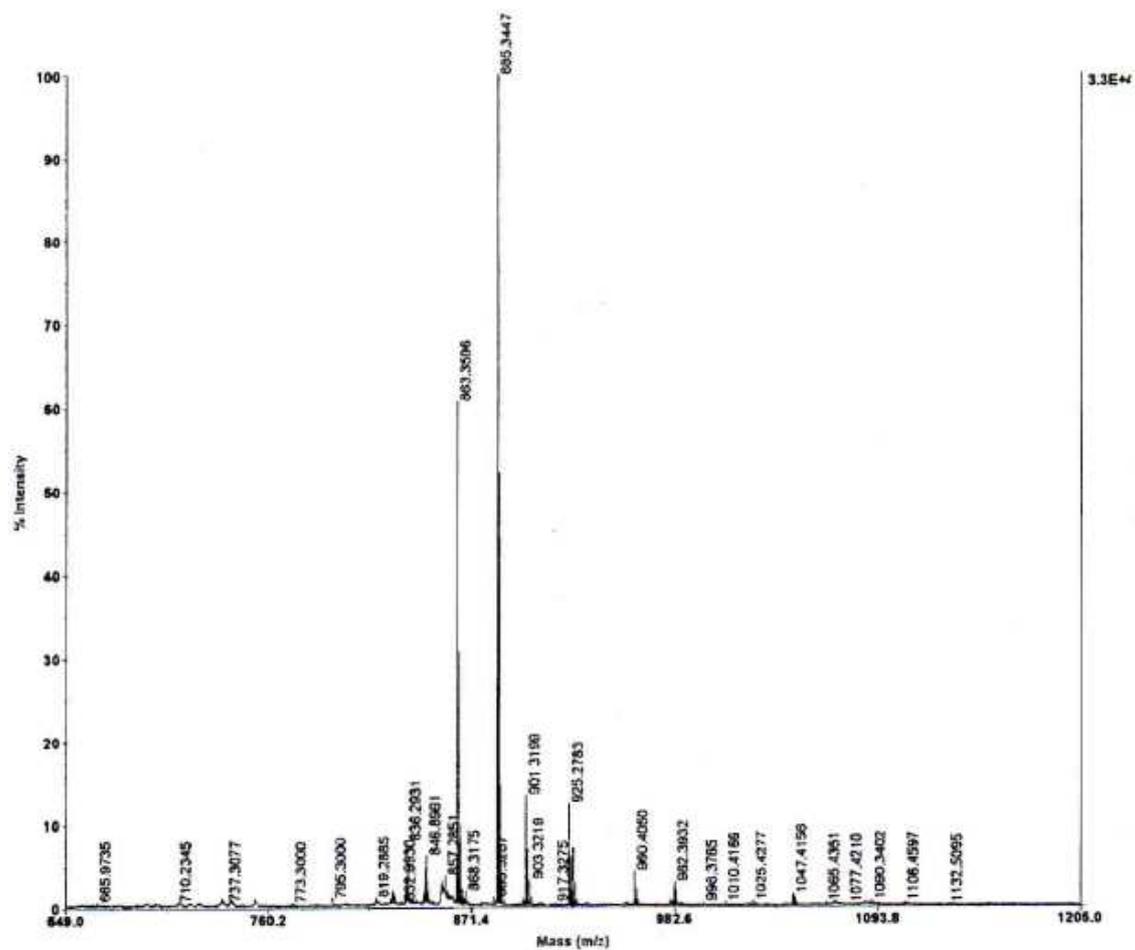
**P17. Ciclo(Asn-{Ser(OBn)-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe)**

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm ( 99 % de pureza)

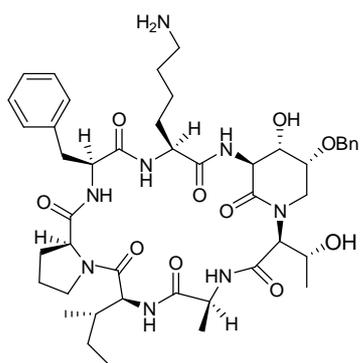


HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (99% de pureza)

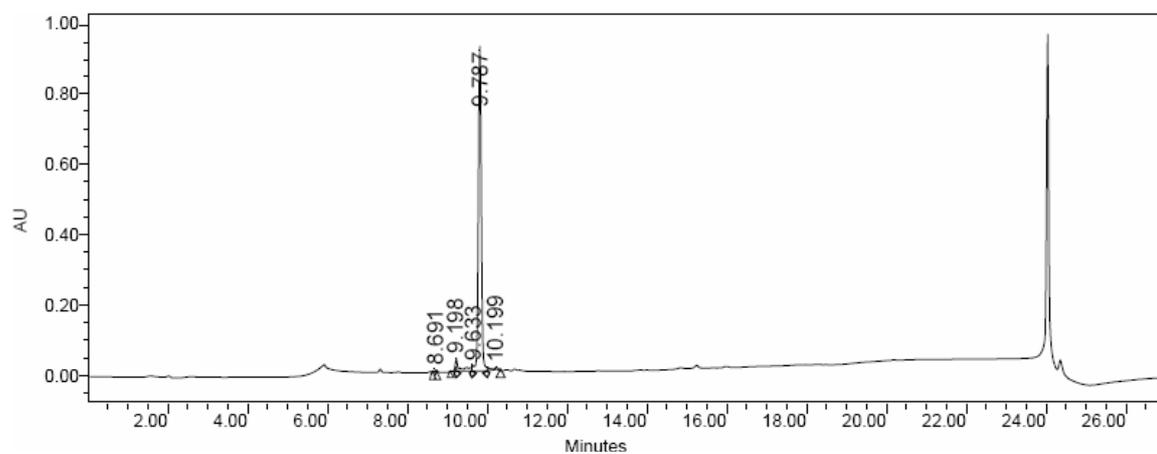




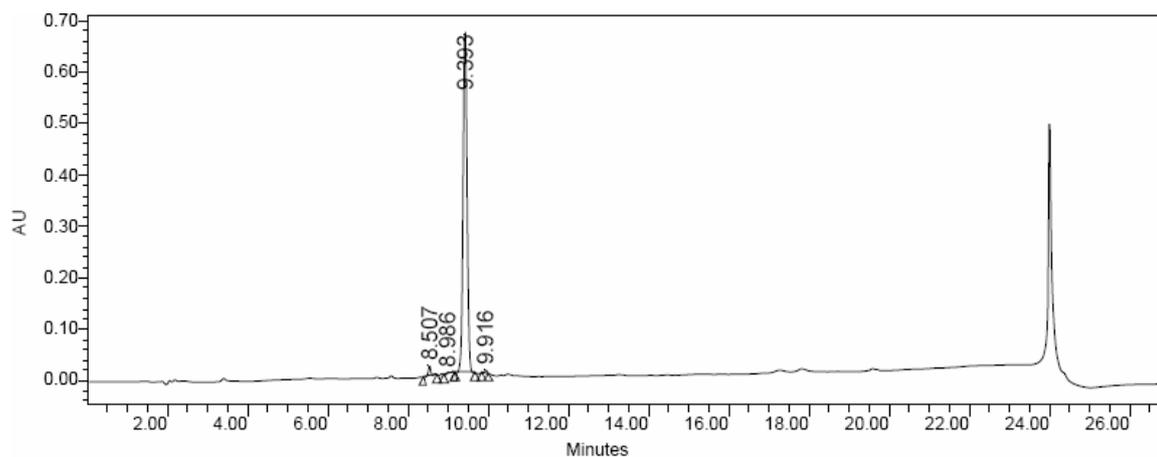
MALDI-TOF

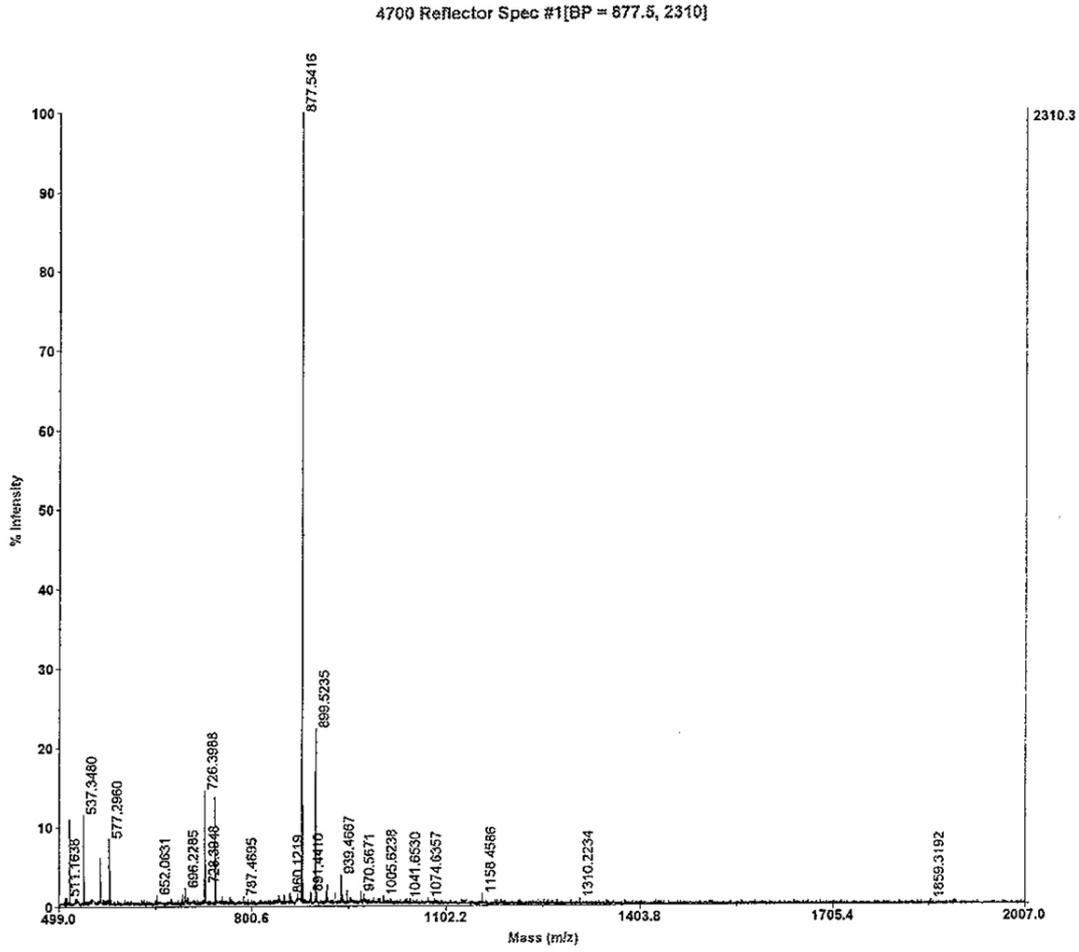
**P19.**(Lys- $\{\text{Ser}(\text{OBn})\}$ -Thr)-Ala-Ile-Pro-Phe)

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (96 % de pureza)

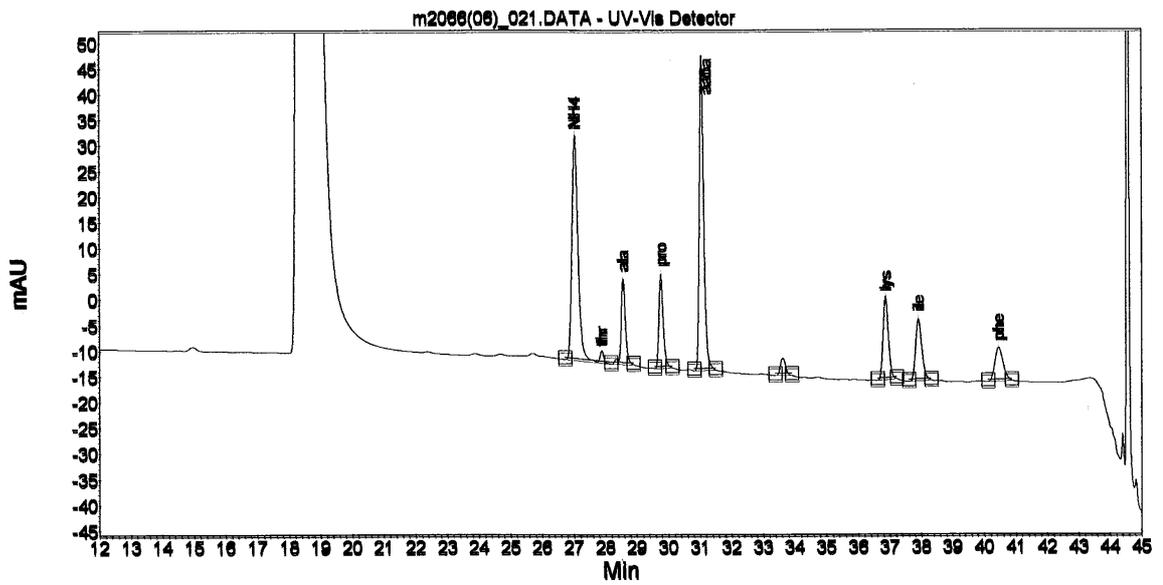


HPLC: 15 % a 70 % de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (96 % de pureza)

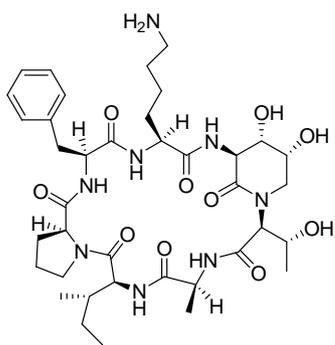




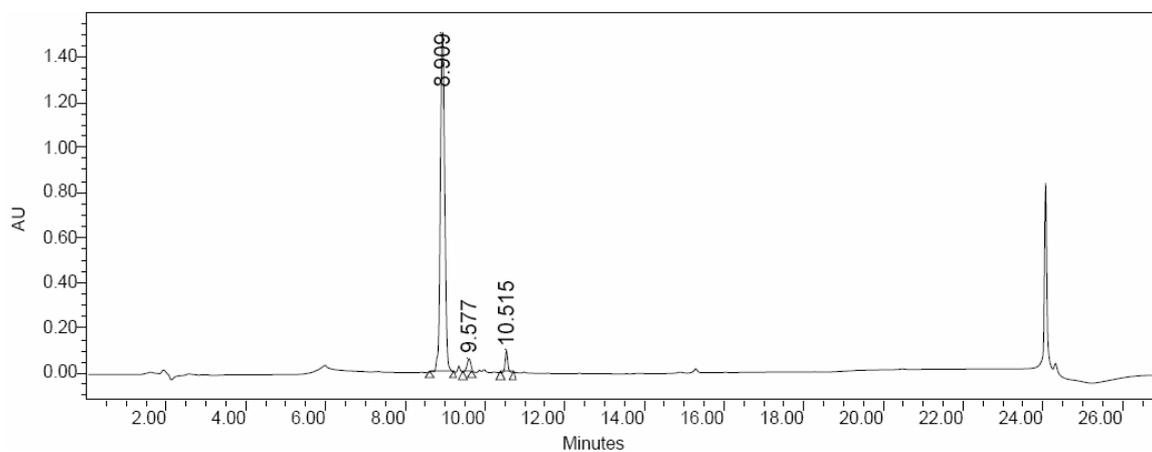
MALDI-TOF



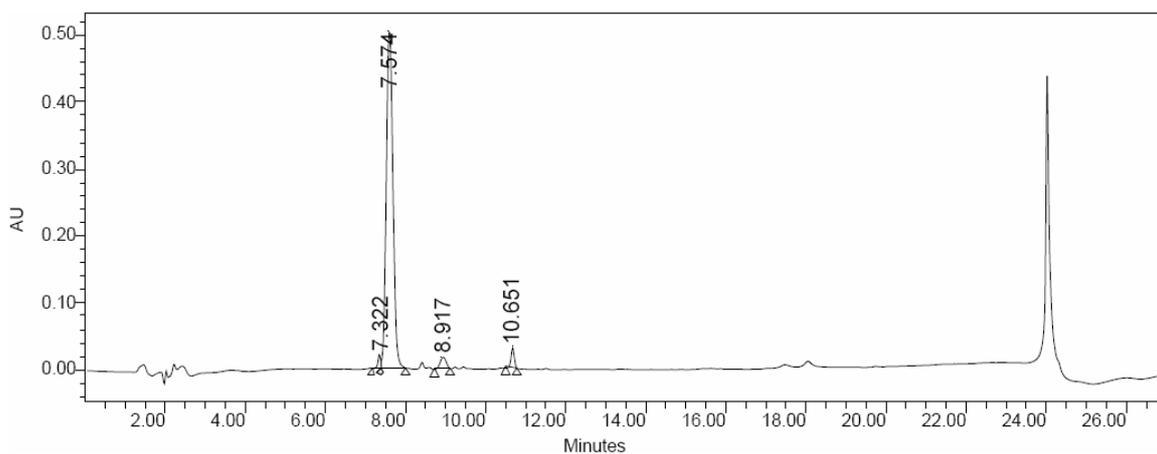
AAA

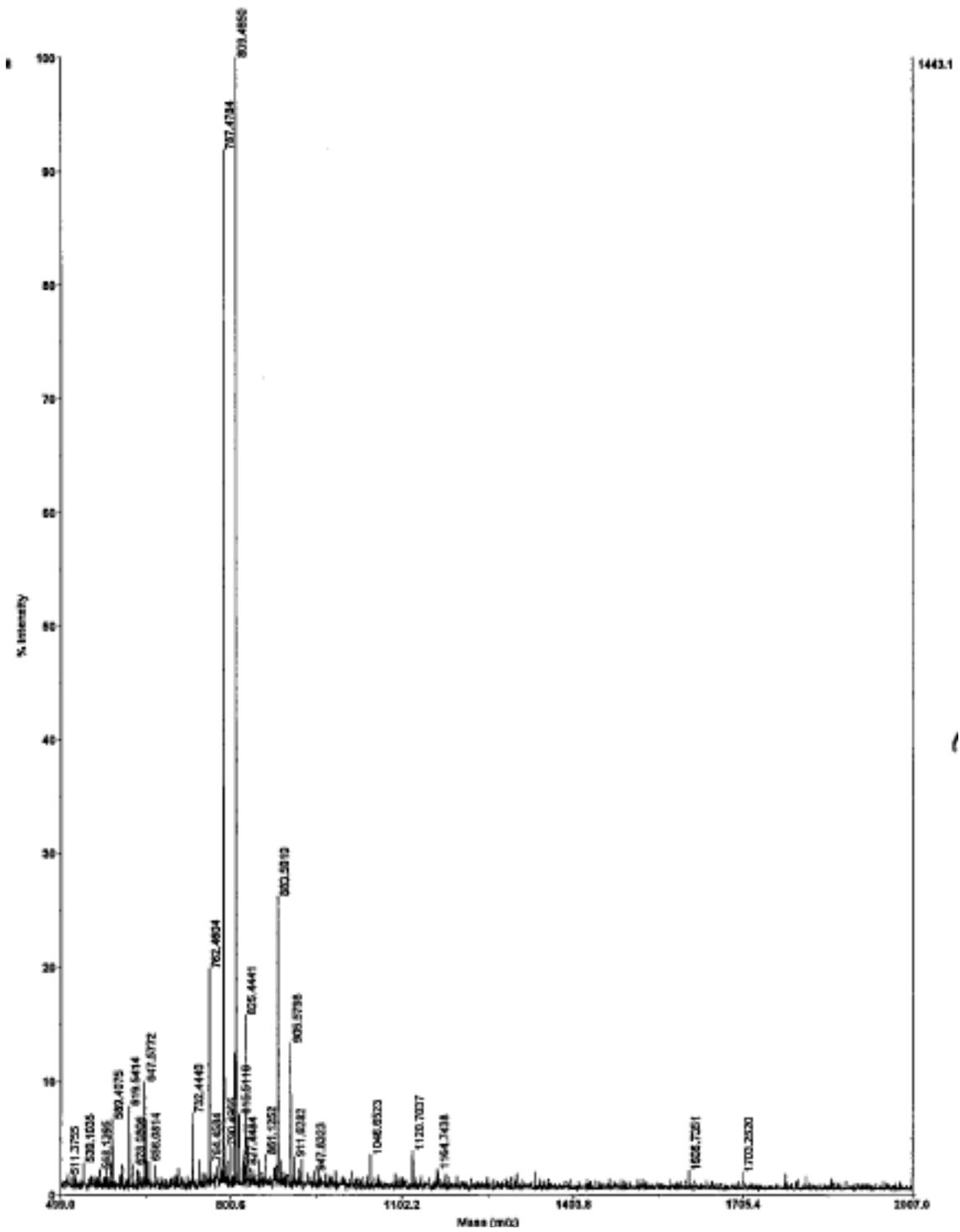
**P20. Ciclo(Lys-{Ser-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe)**

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (93 % de pureza)

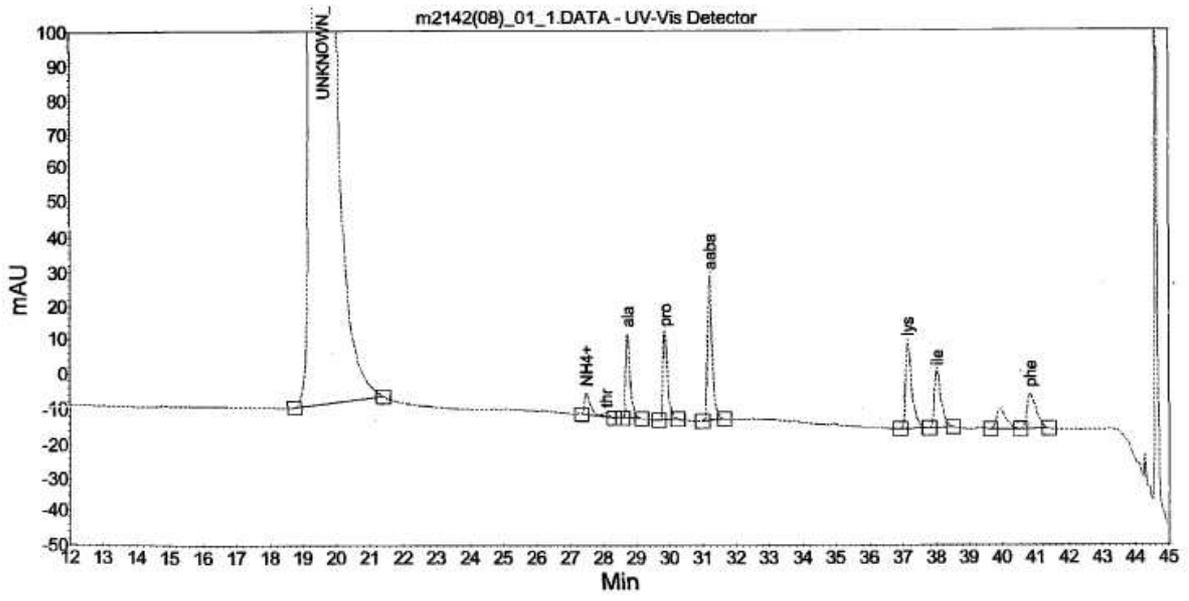


HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (93 % de pureza)

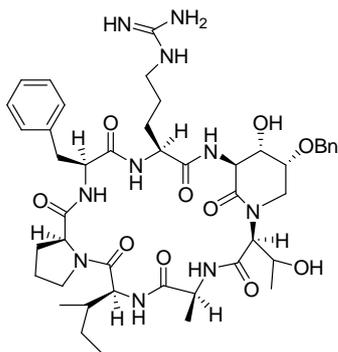




MALDI-TOF

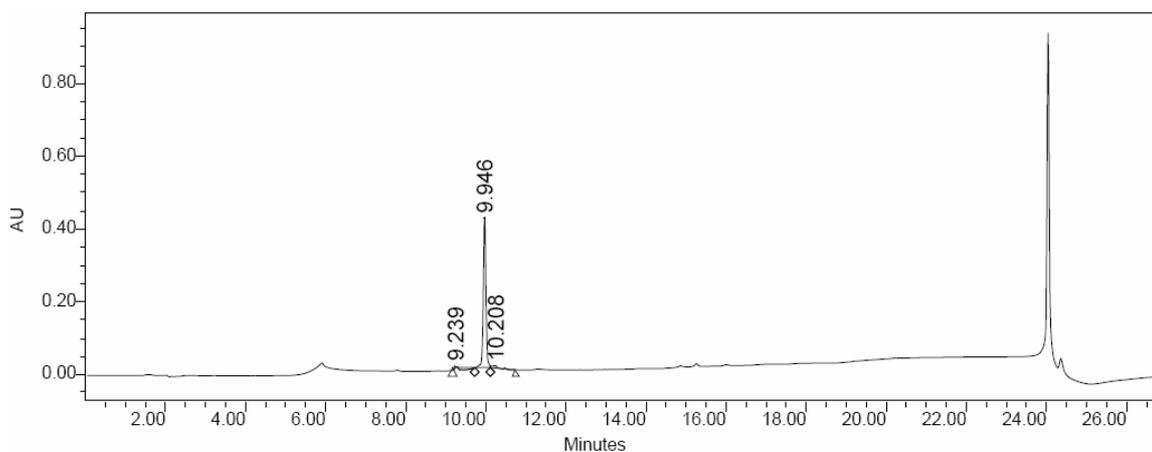


AAA

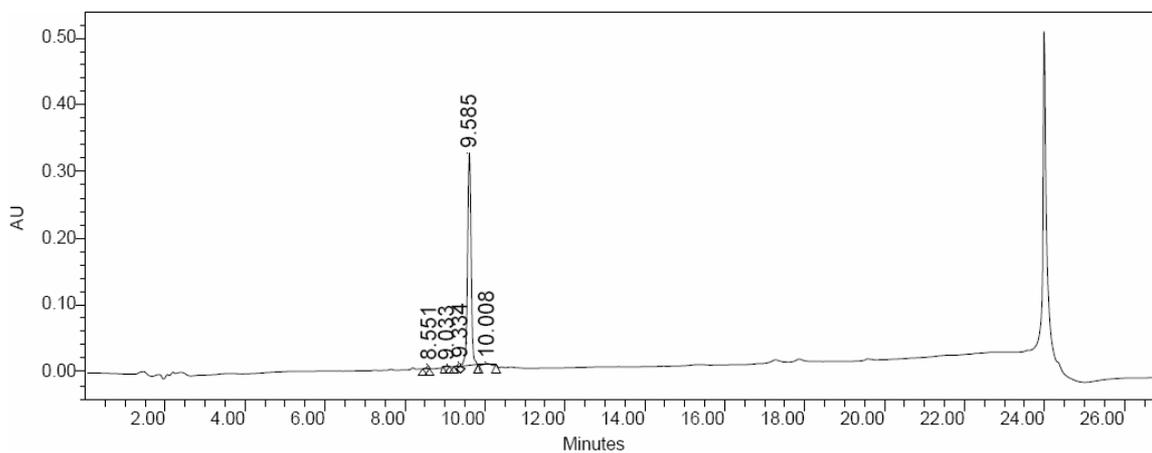


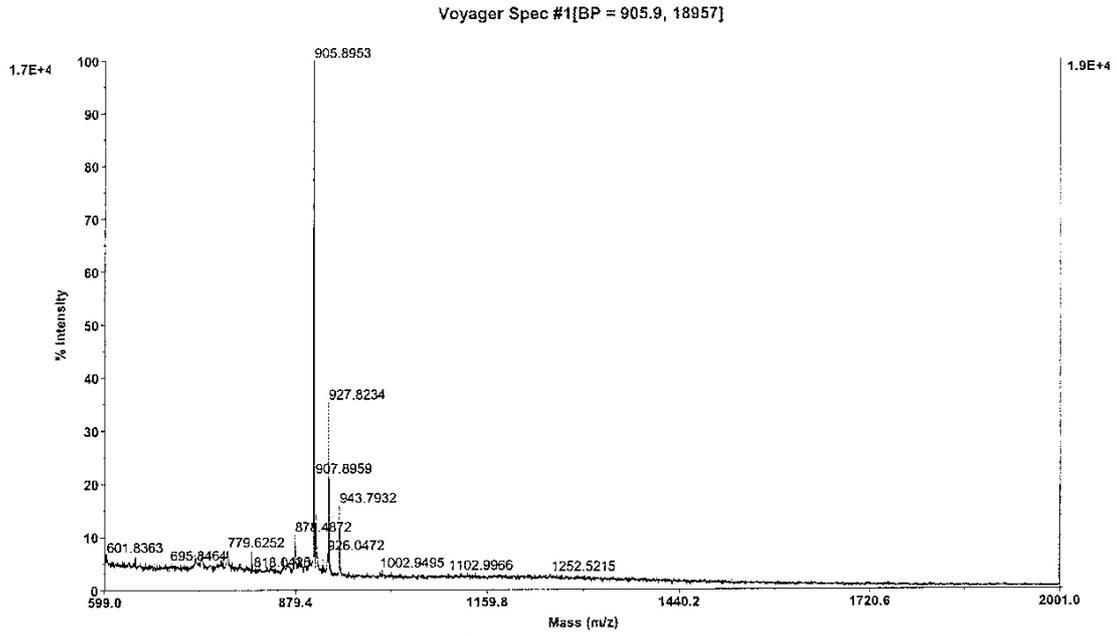
**P21.** *Ciclo(Arg-{Ser(OBn)-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe)*

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (90 % de pureza)

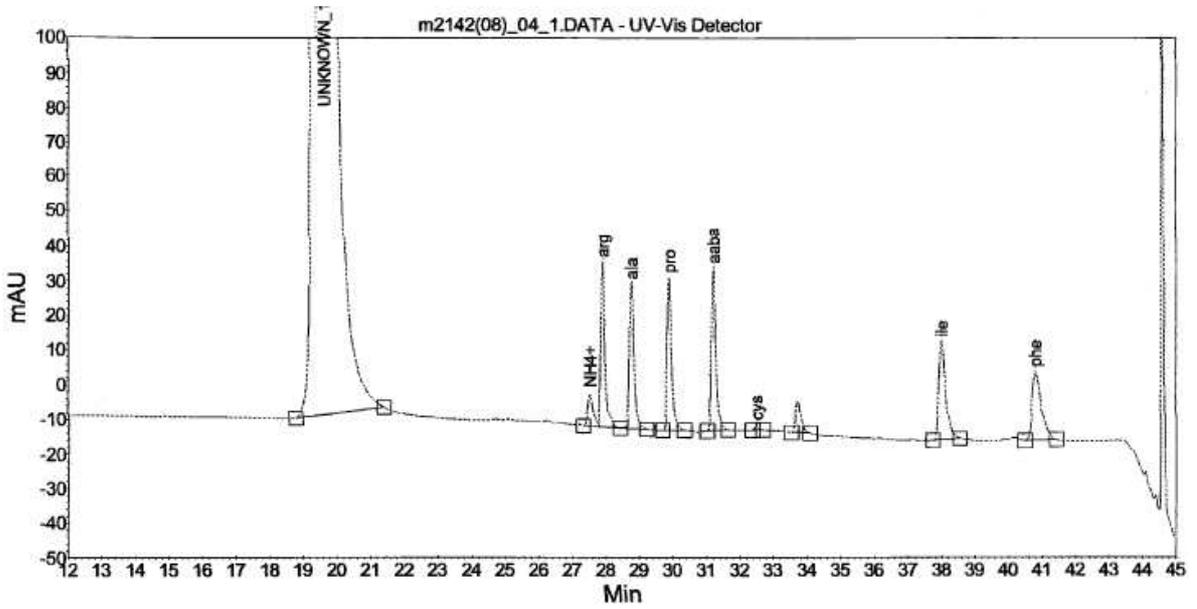


HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (95% de pureza)

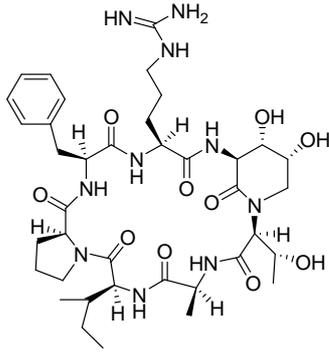




MALDI-TOF

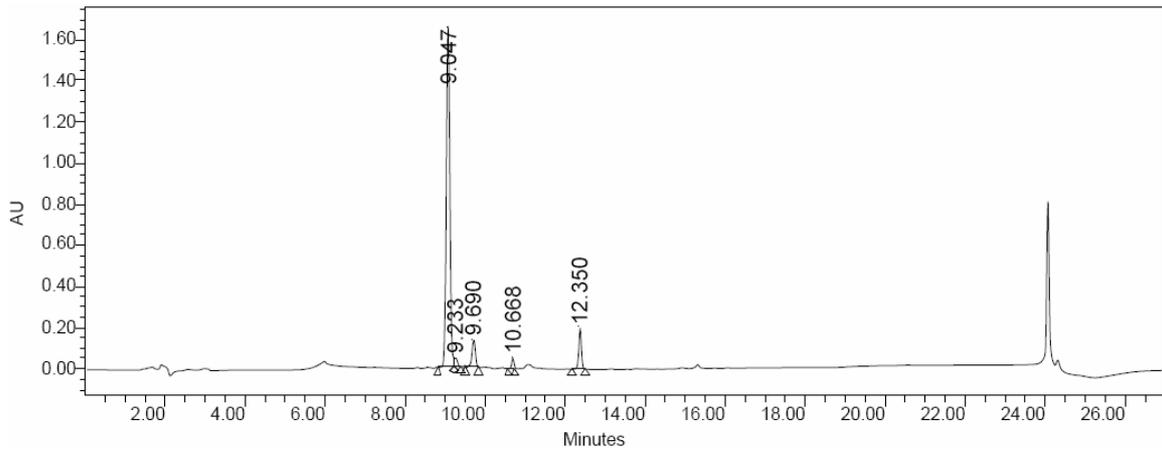


AAA

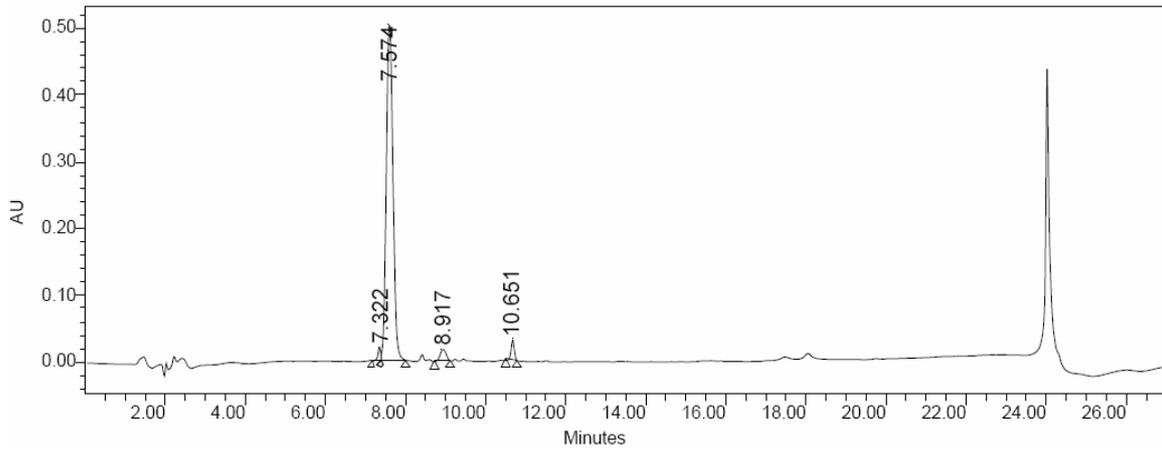


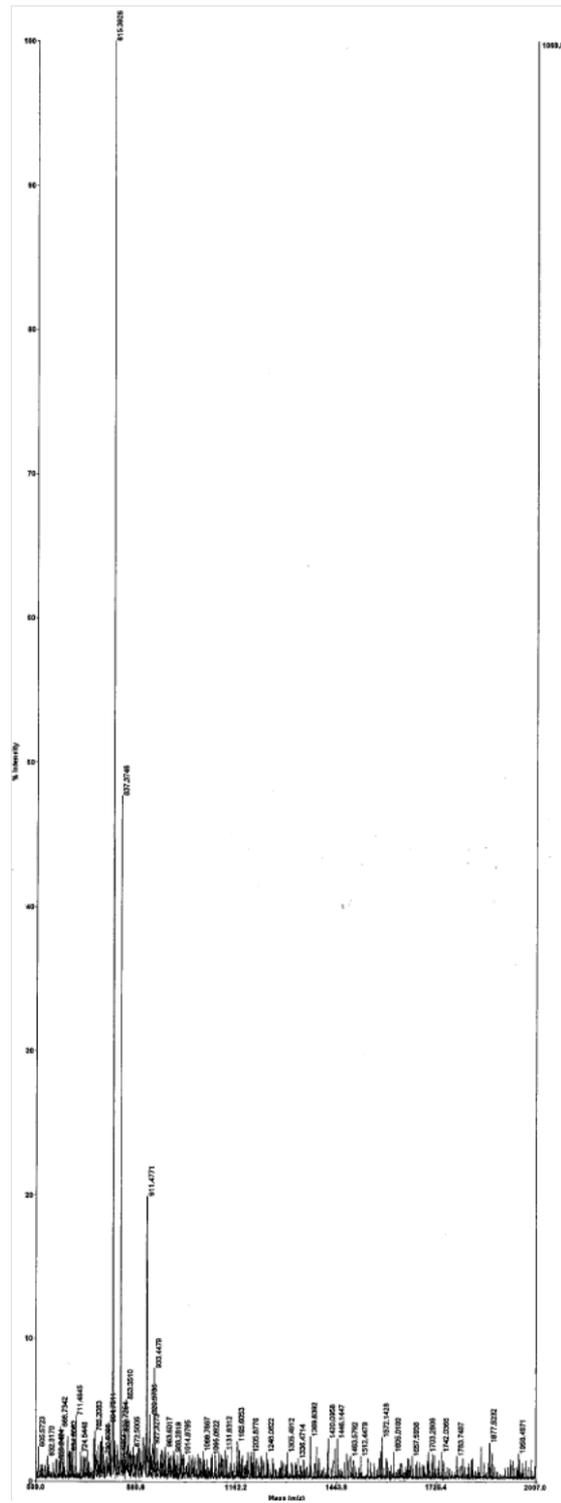
**P22.** *Ciclo*(Arg-{Ser-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe)

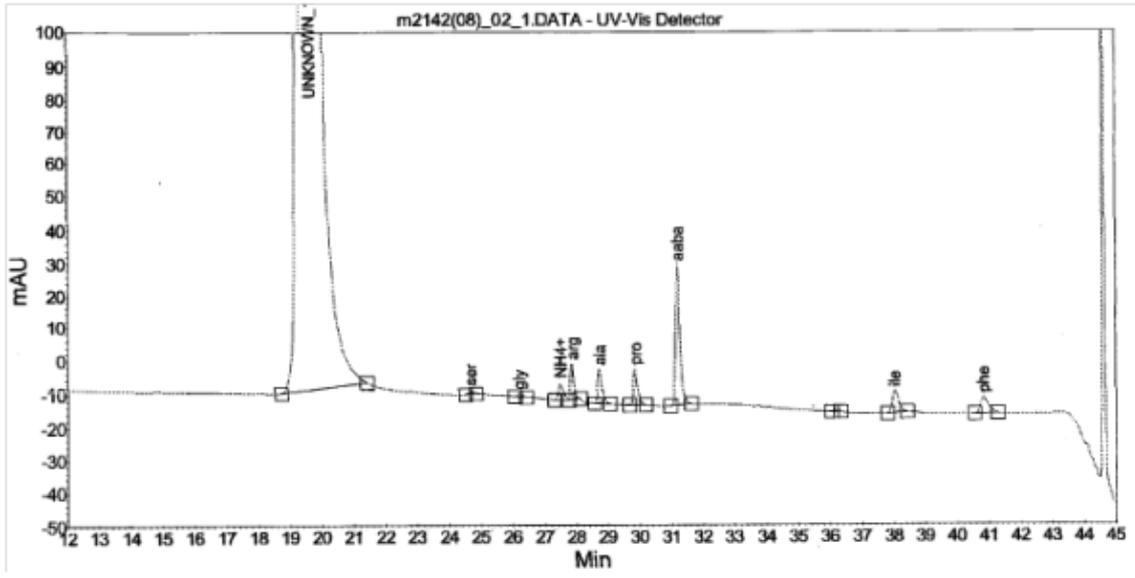
HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (84% de pureza)



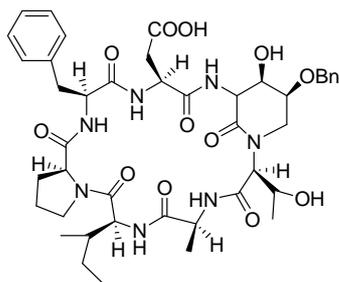
HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (93% de pureza)





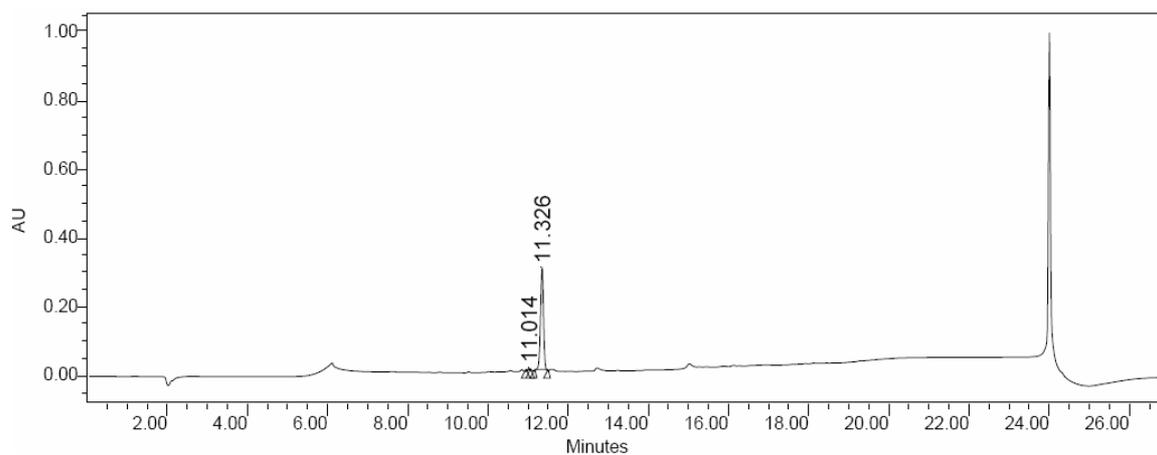


AAA

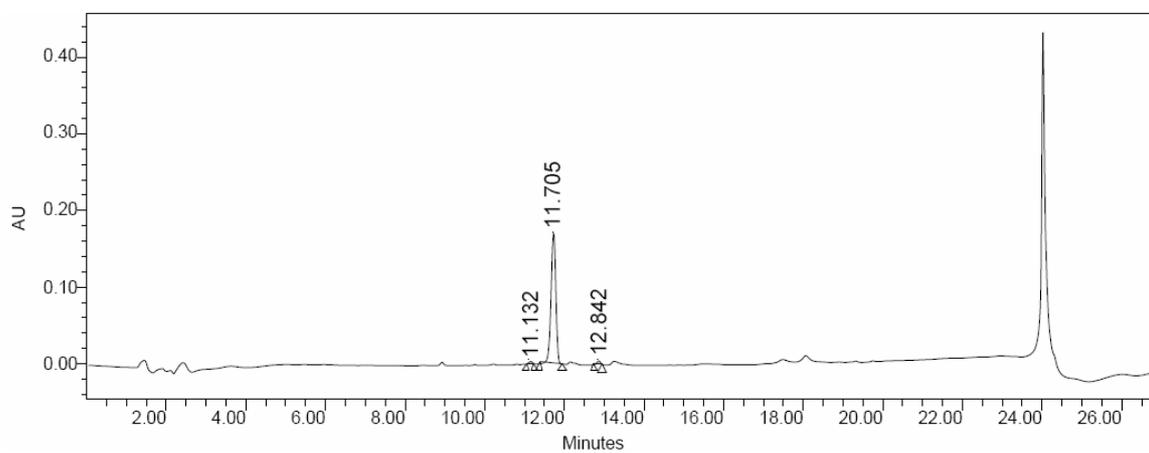


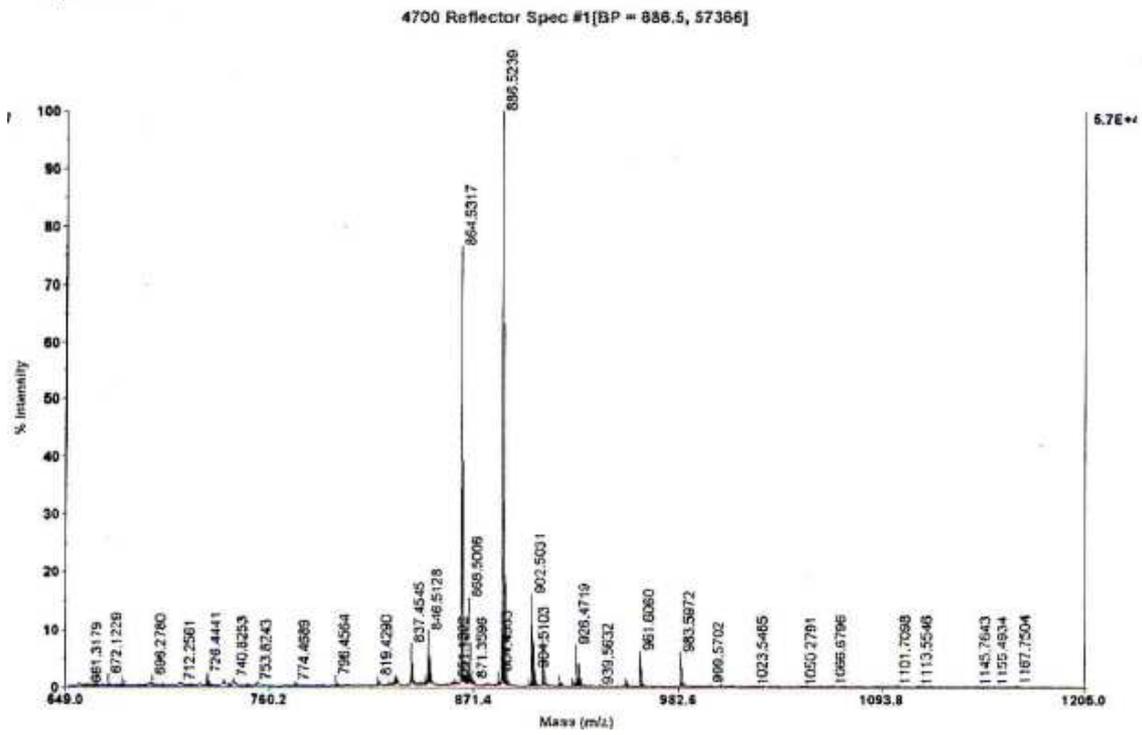
**P23.** *Ciclo(Asp-{Ser(OBn)-Thr}-Ala-Ile-Pro-Phe)*

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (98 % de pureza)

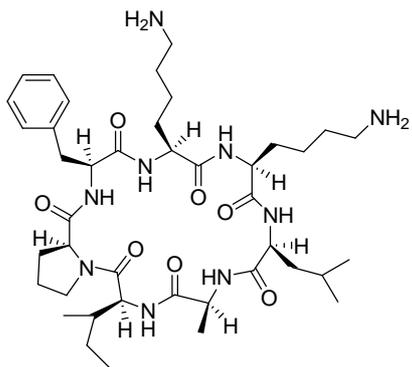


HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (97% de pureza)

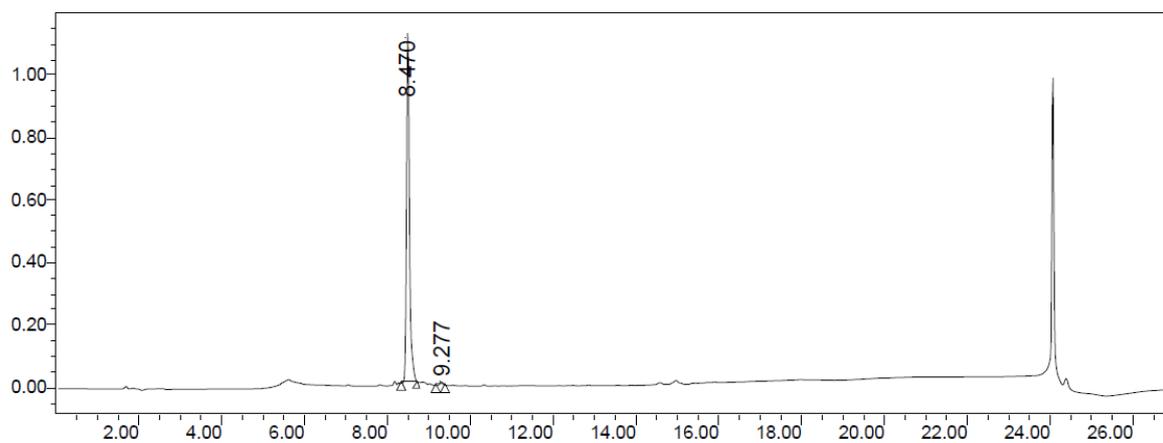




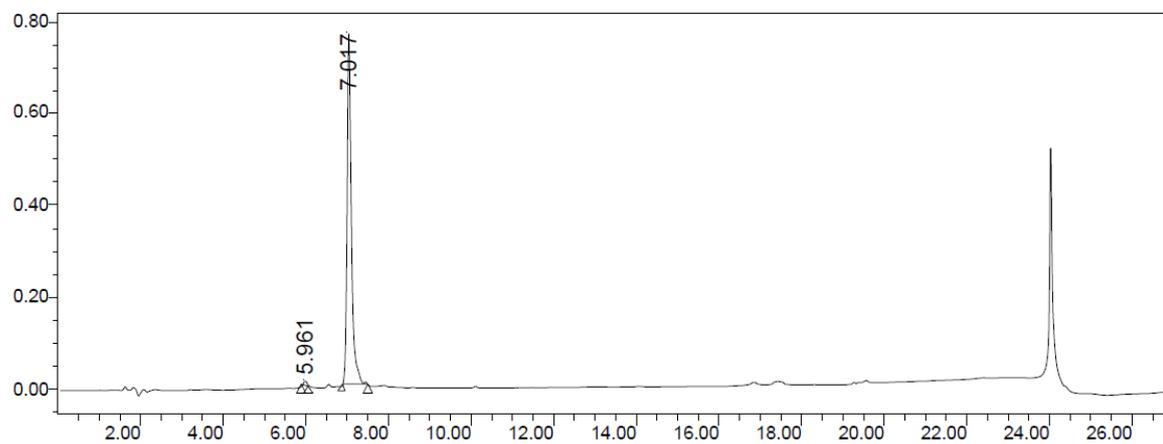
MALDI-TOF

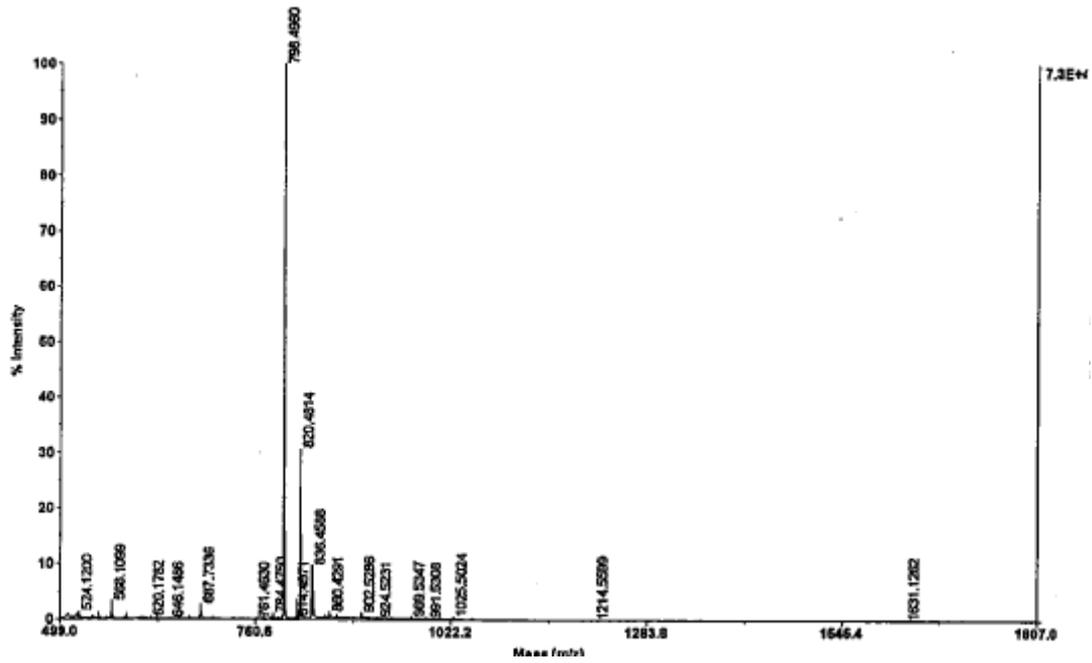
**P27.** *Ciclo(Lys-Lys-Leu-Ala-Ile-Pro-Phe)*

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (98 % de pureza)

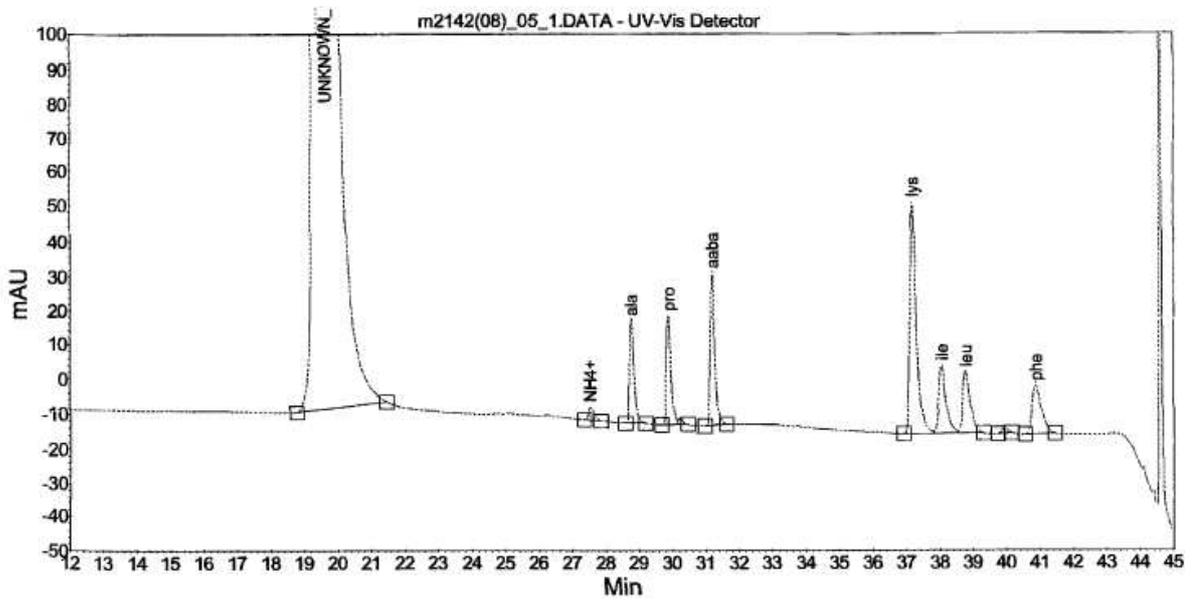


HPLC: 15 % a 70 % de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (98 % de pureza)

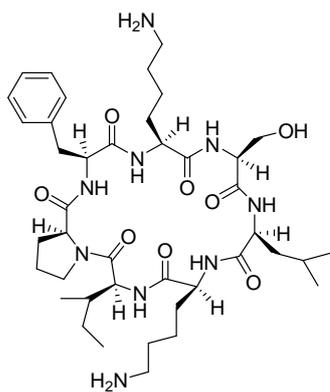




MALDI-TOF

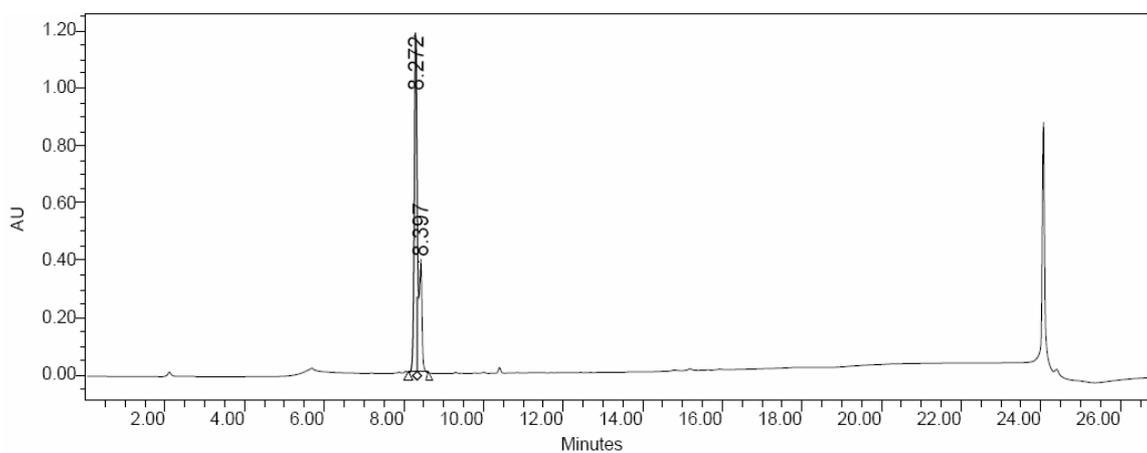


AAA

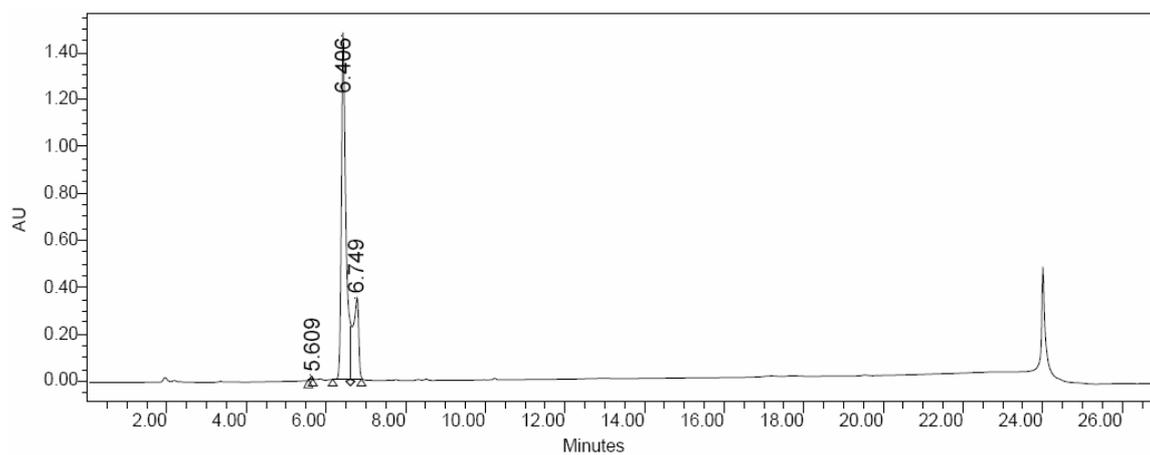


**P28.** *Ciclo(Lys-Ser-Leu-Lys-Ile-Pro-Phe).*

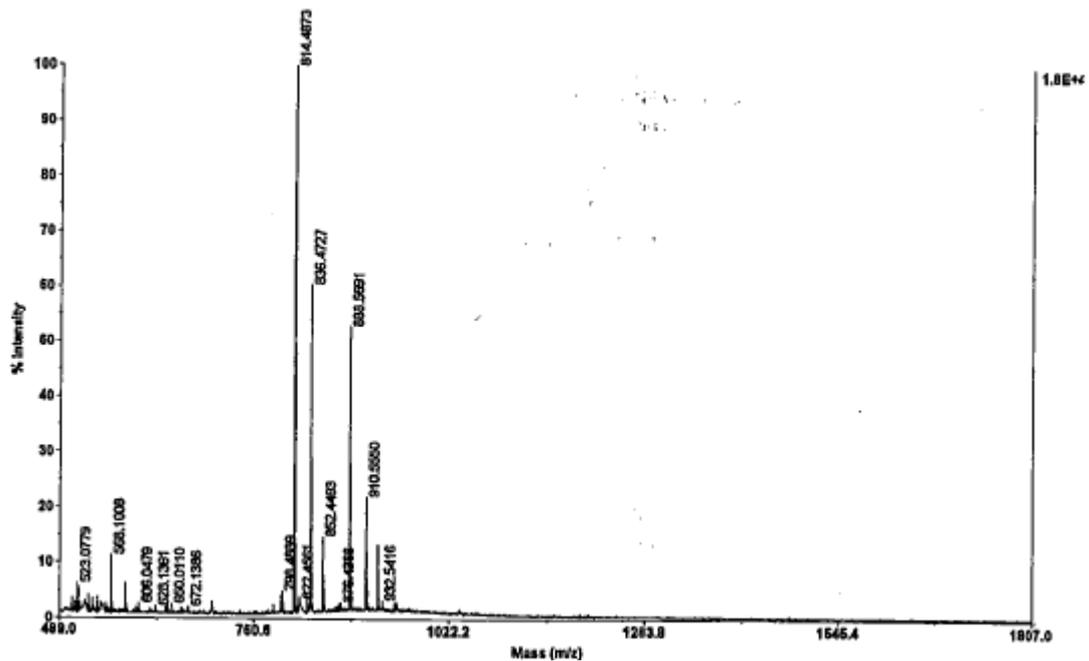
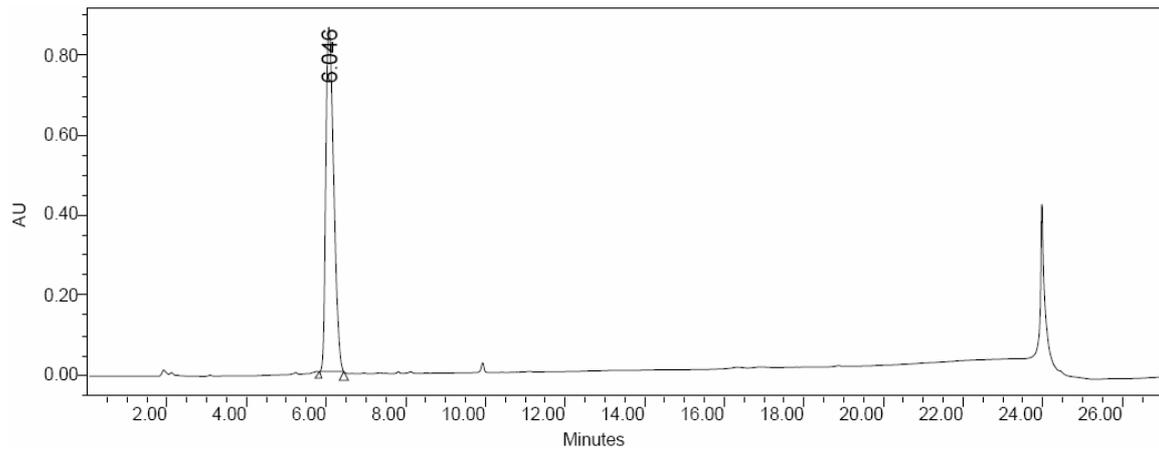
HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm ( 99% de pureza)



HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm ( 99% de pureza)

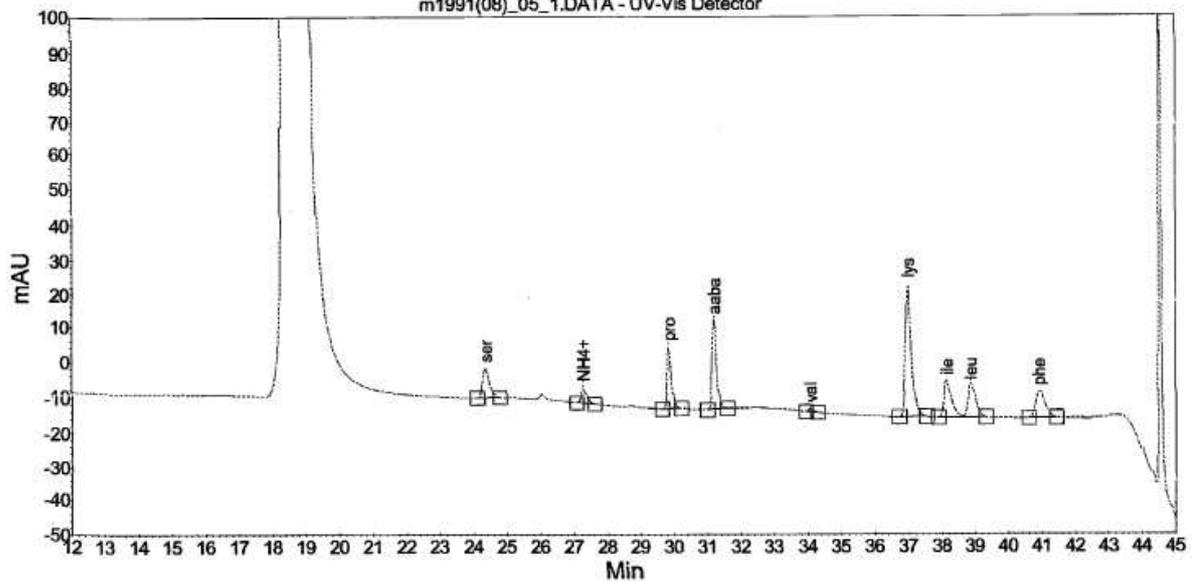


HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220 \text{ nm}$ ,  $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$  ( 99% de pureza)

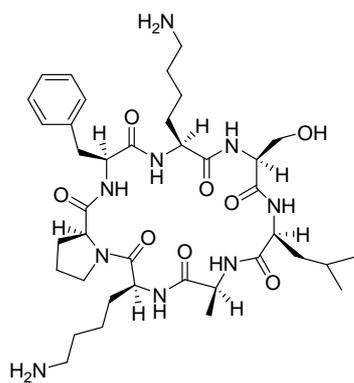


MALDI-TOF

m1991(08)\_05\_1.DATA - UV-Vis Detector

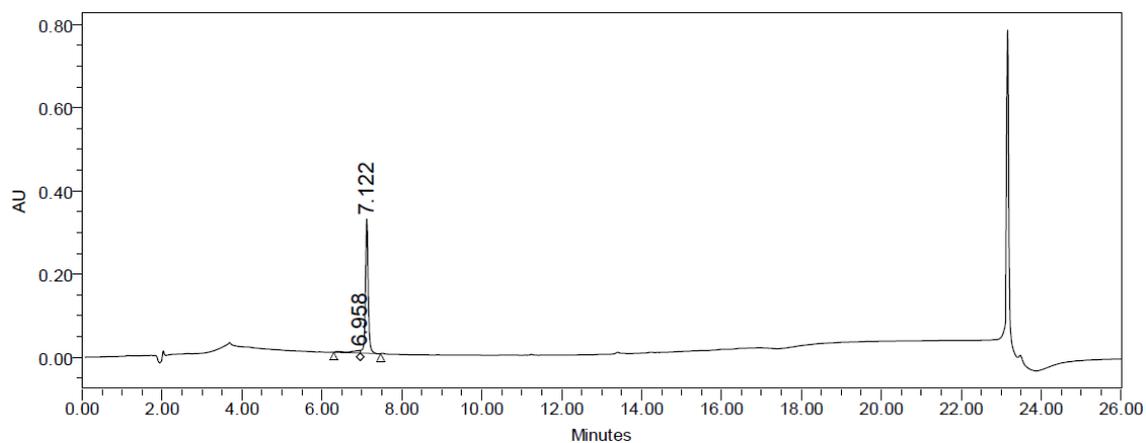


AAA

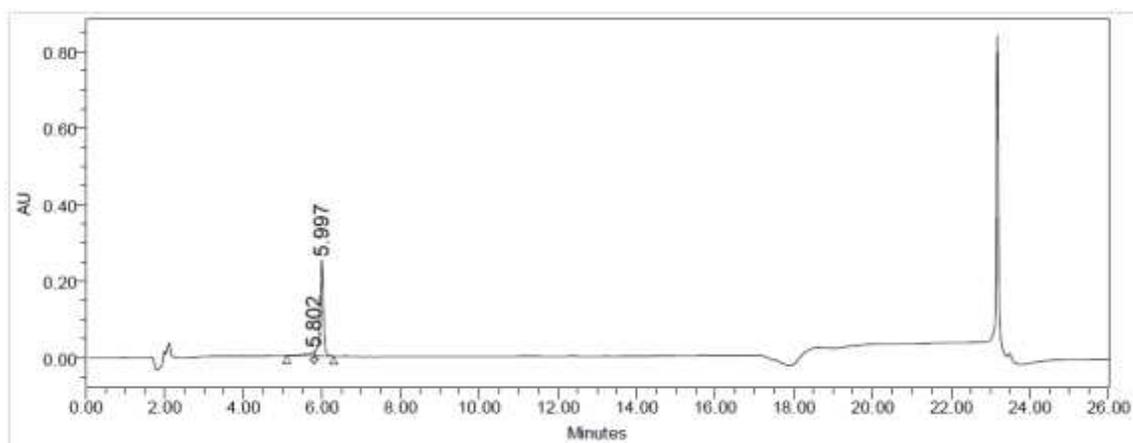


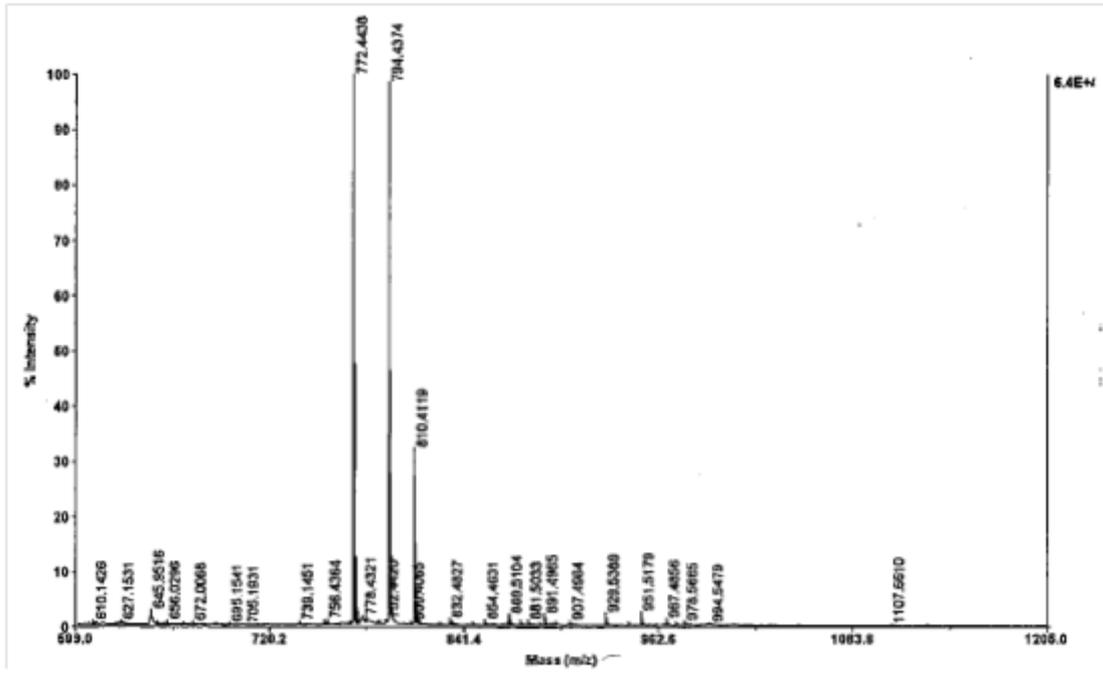
**P29.** *Ciclo(Lys-Ser-Leu-Ala-Lys-Pro-Phe)*

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (92 % de pureza)

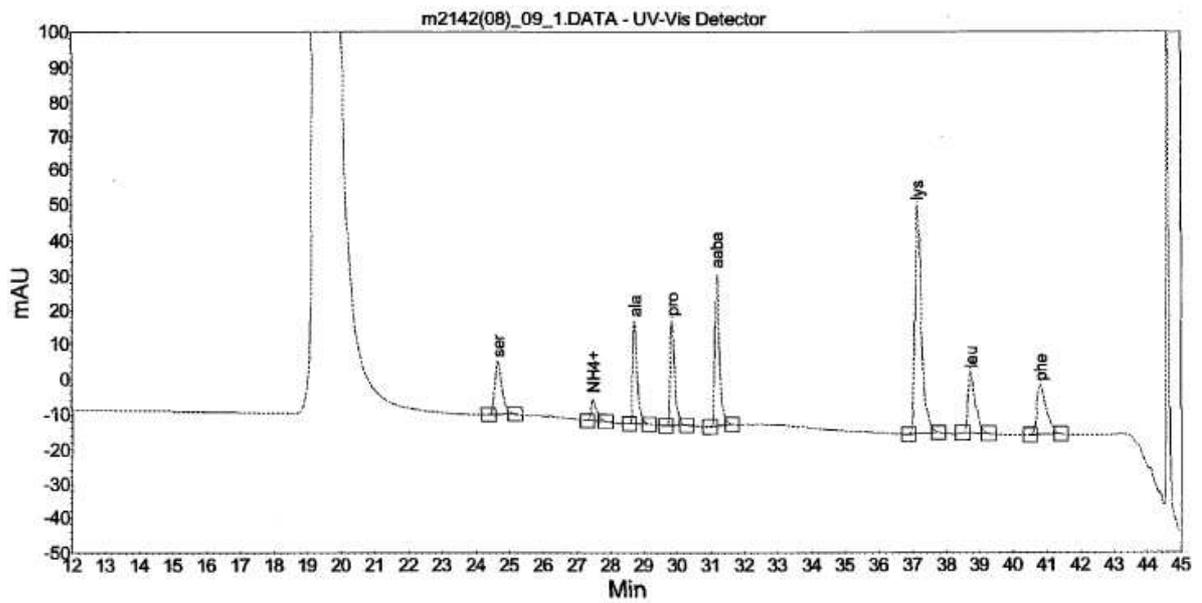


HPLC: 15 % a 70 % de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (92 % de pureza)

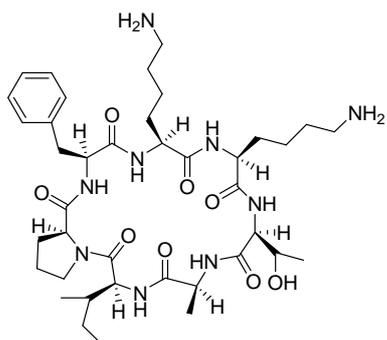




MALDI-TOF

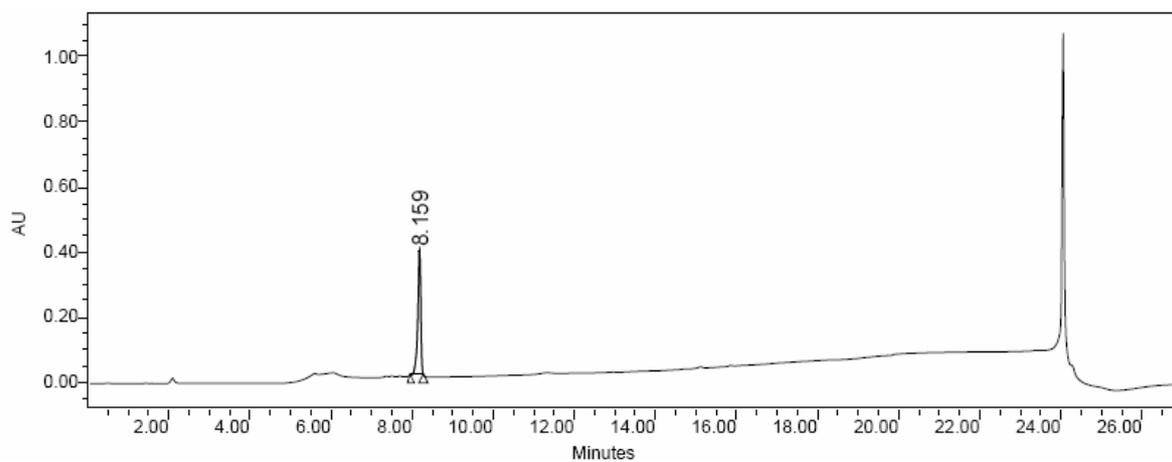


AAA

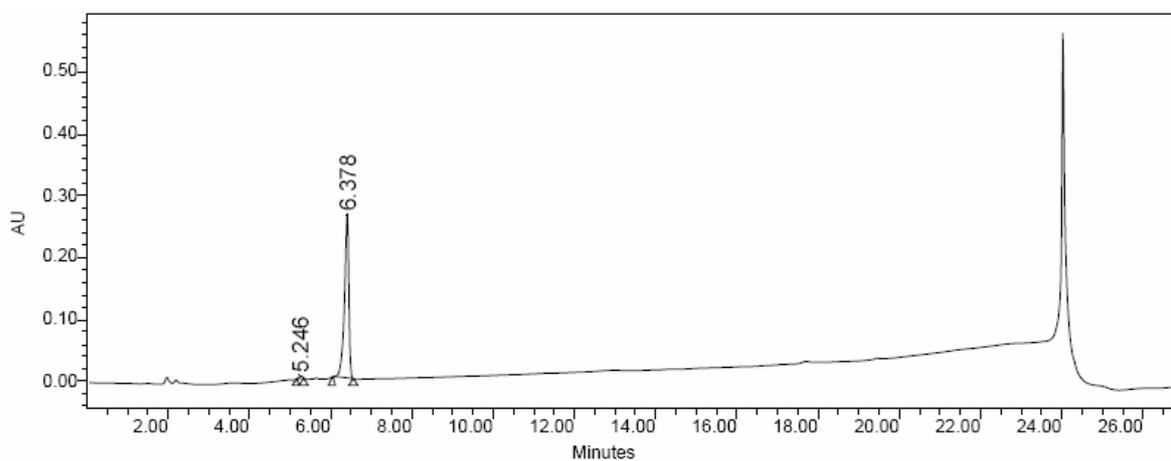


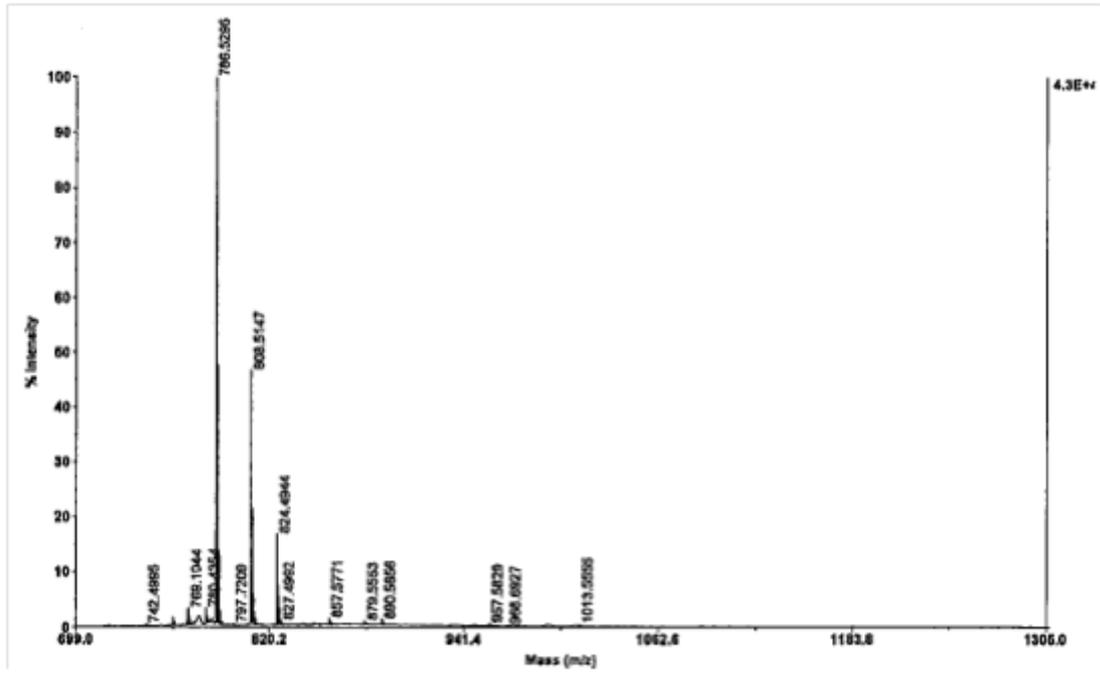
**P30.** *Ciclo(Lys-Lys-Thr-Ala-Ile-Pro-Phe)*

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (98% de pureza)

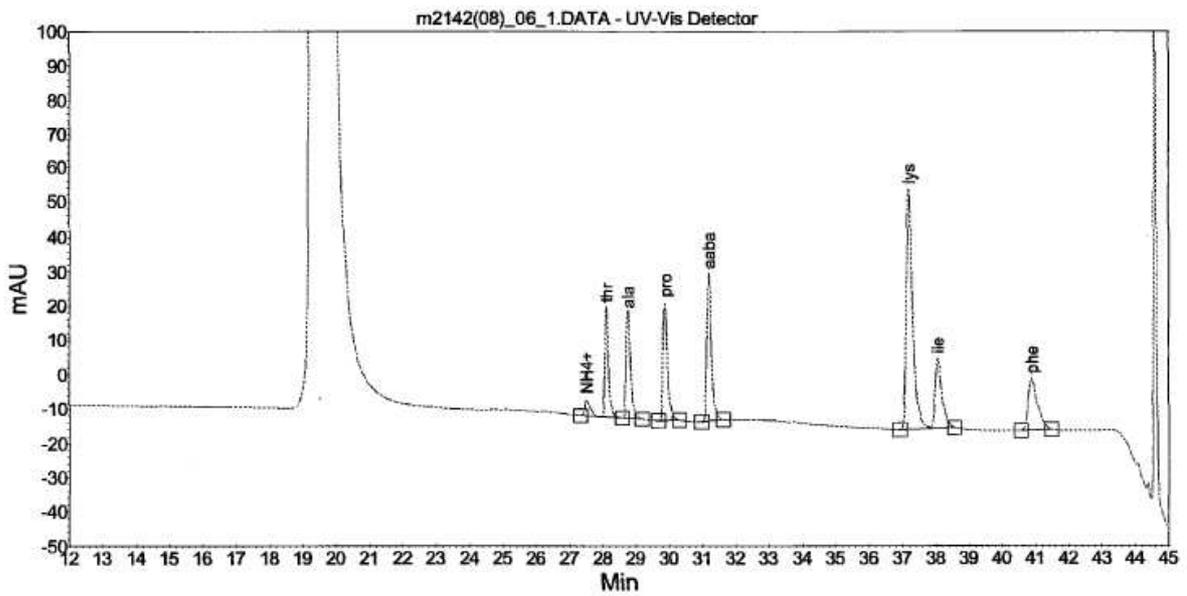


HPLC: 15 % a 70 % de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (98% de pureza)

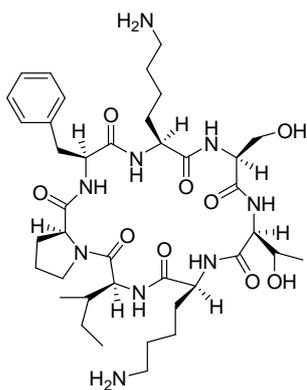




MALDI-TOF

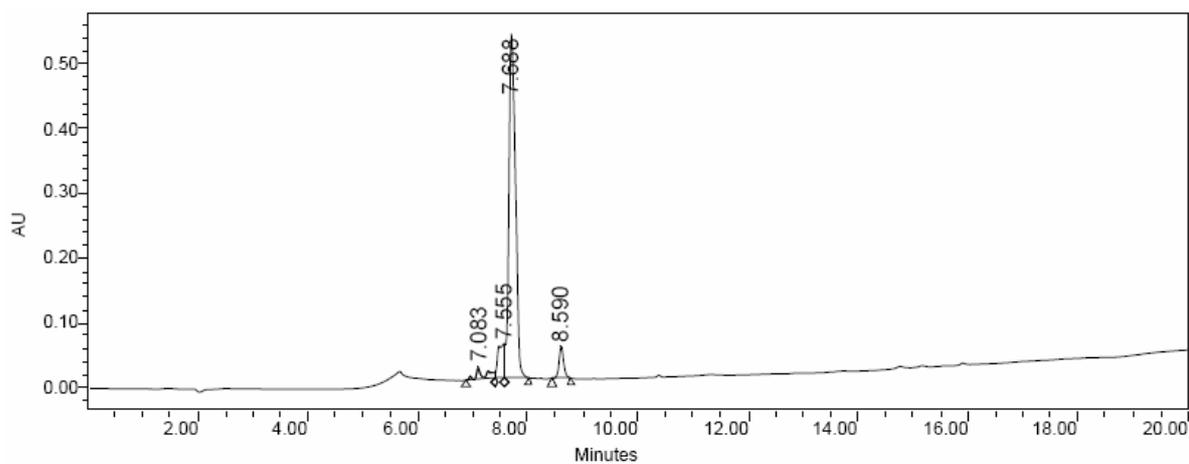


AAA

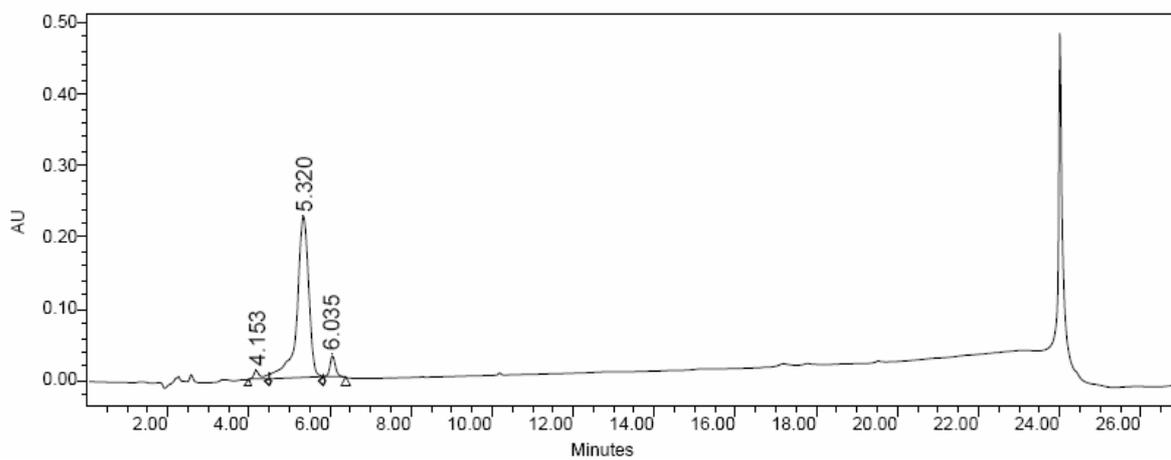


**P31.** *Ciclo(Lys-Ser-Thr-Lys-Ile-Pro-Phe).*

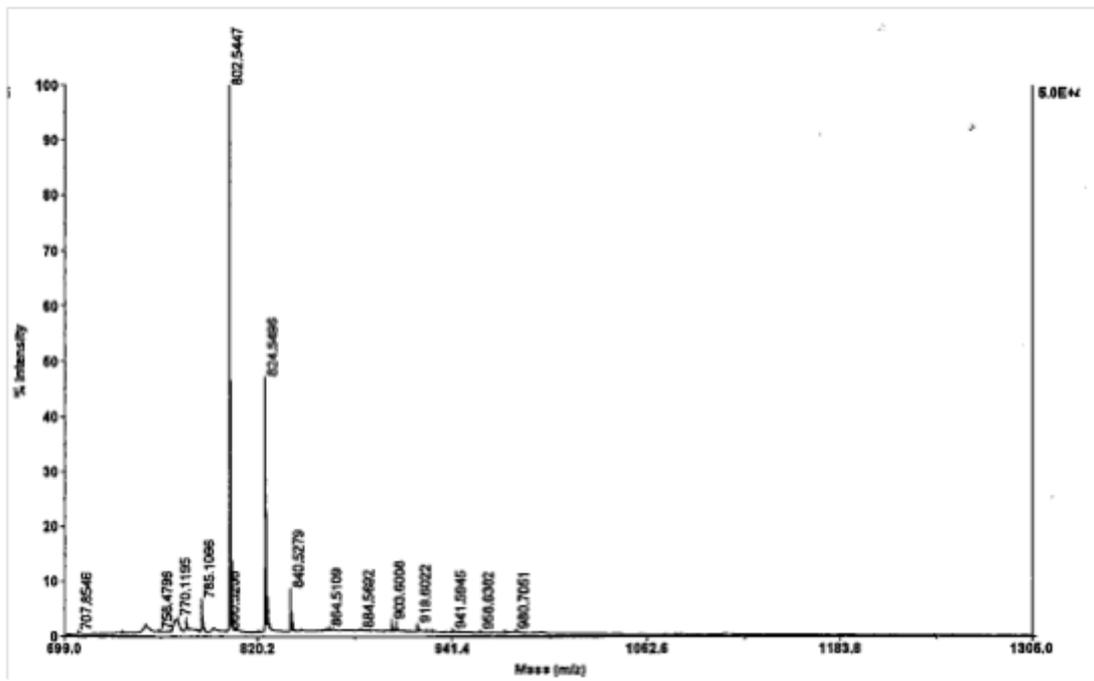
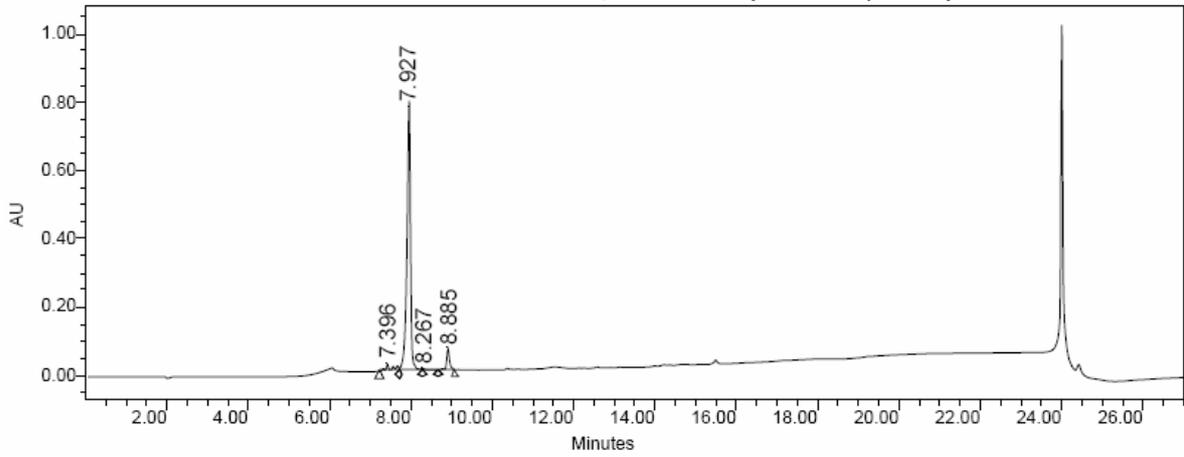
HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (81-90% de pureza)



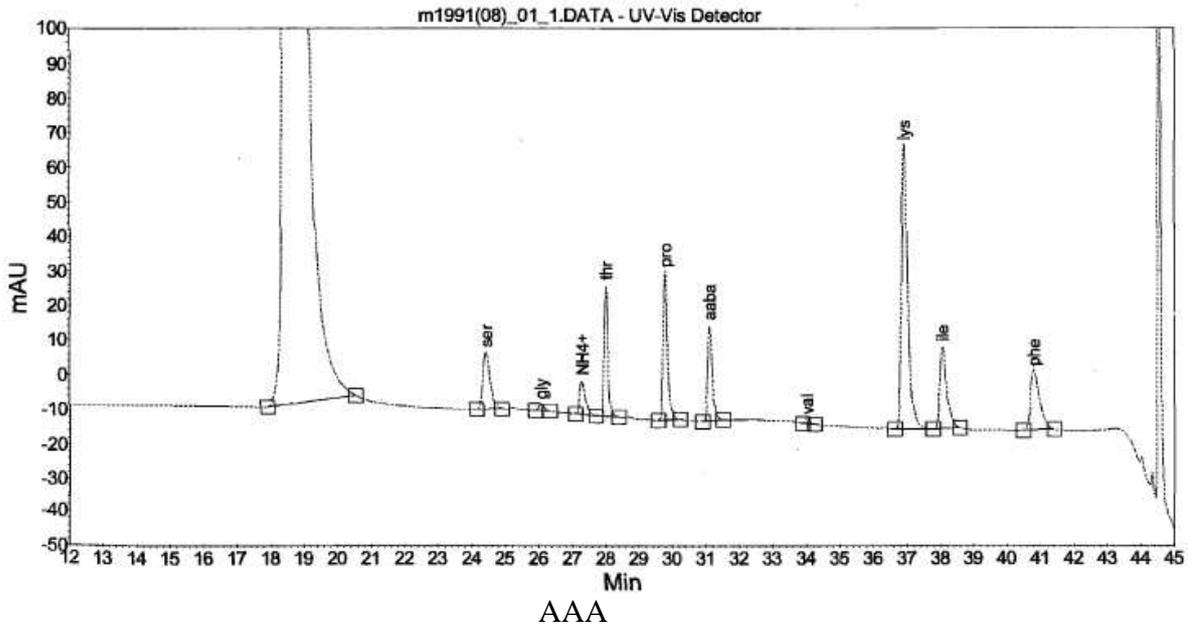
HPLC: 15 % a 70 % de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (90% de pureza)

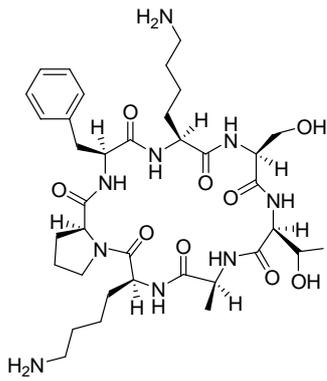


HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220 \text{ nm}$  ,  $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$  ( 89% de pureza)



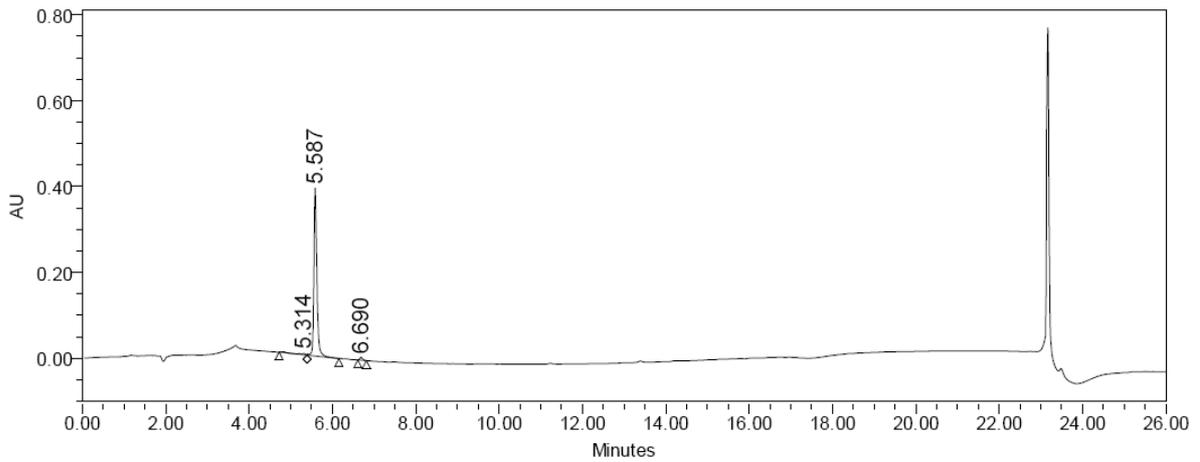
MALDI-TOF



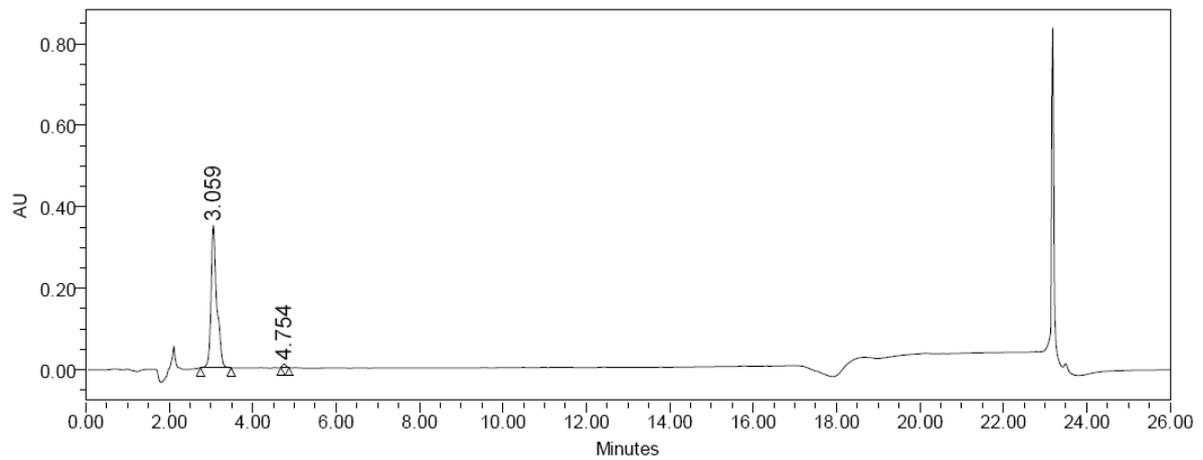


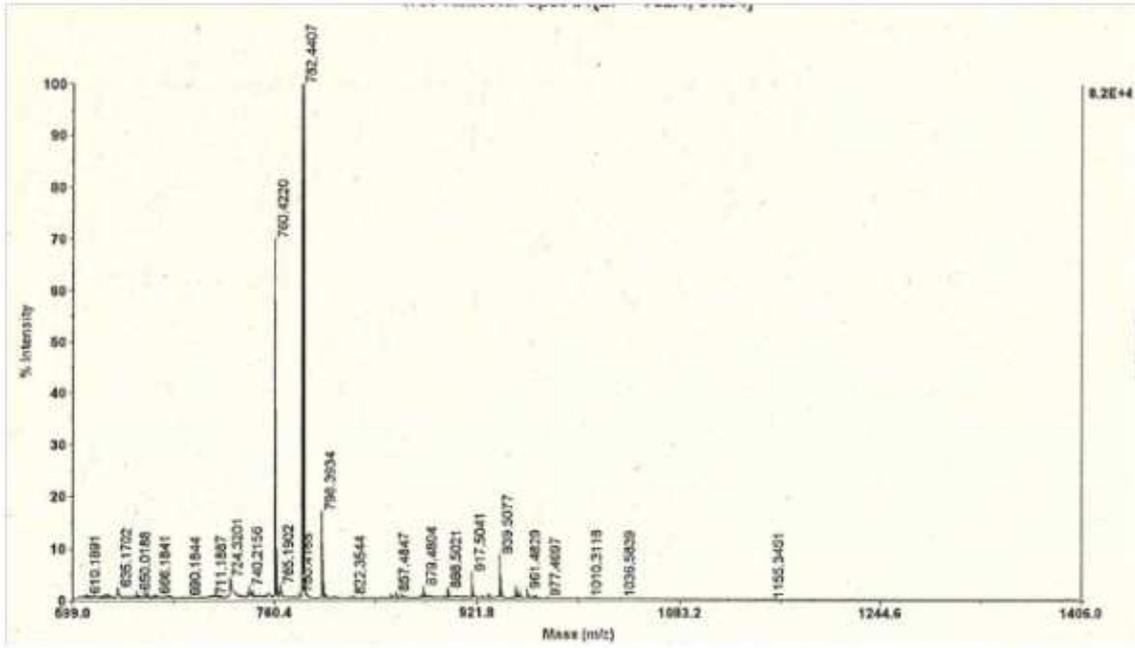
**P32** .Ciclo(Lys-Ser-Thr-Ala-Lys-Pro-Phe)

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (96 % de pureza)

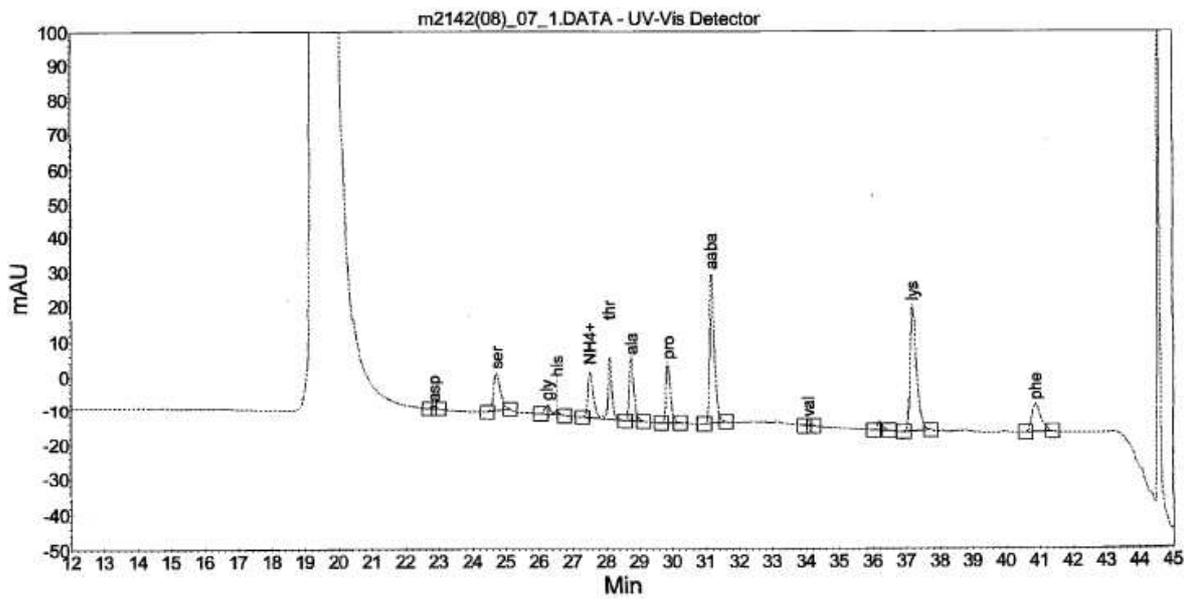


HPLC: 15 % a 70 % de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (96 % de pureza)

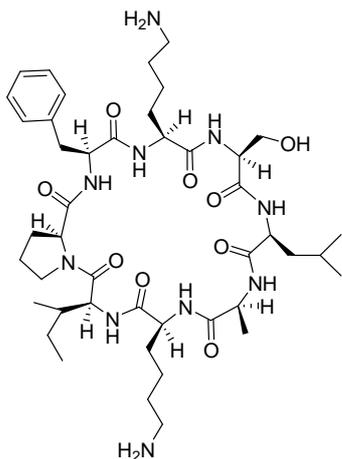




MALDI-TOF

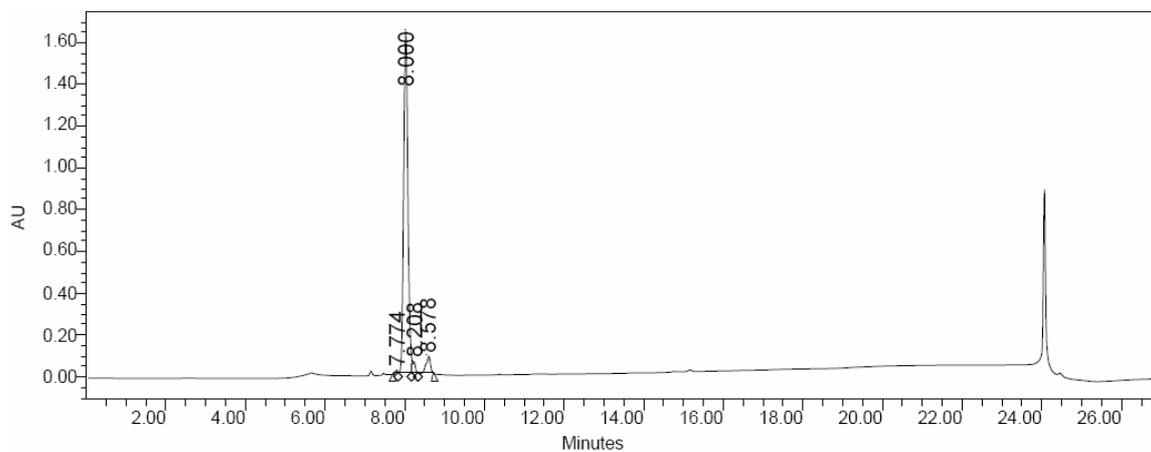


AAA

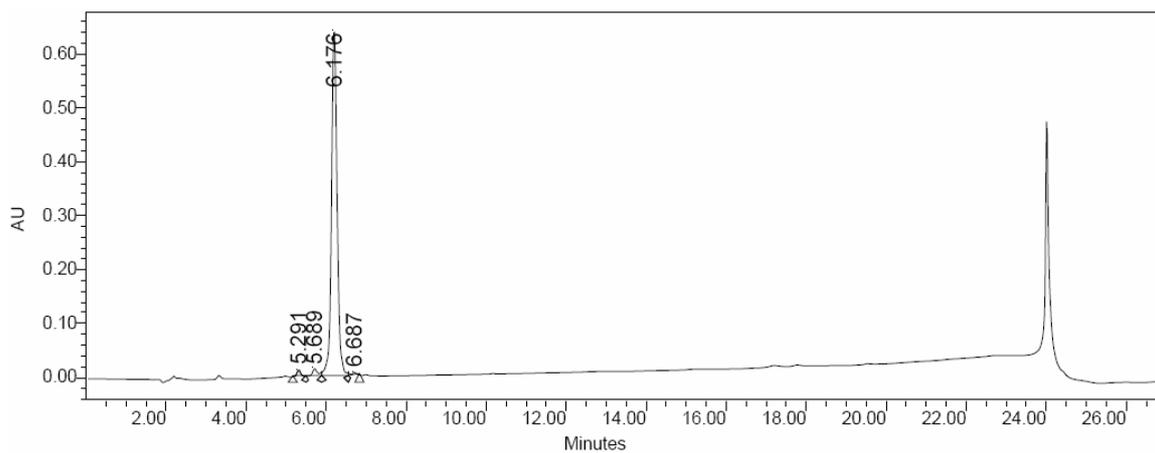


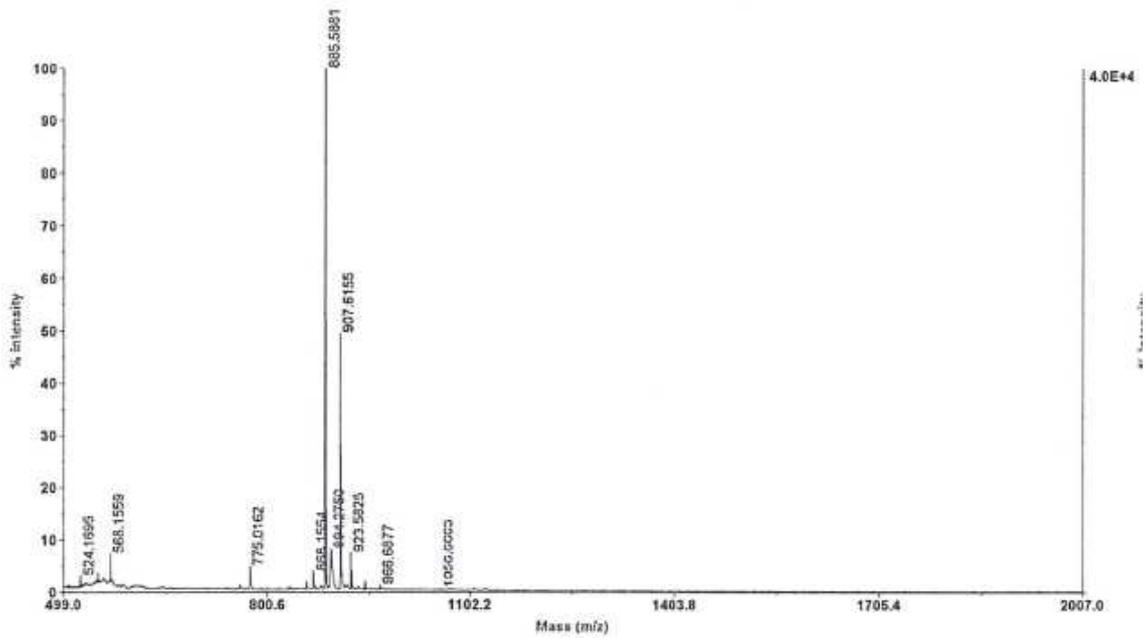
**P34.** *Ciclo(Lys-Ser-Leu-Ala-Lys-Ile-Pro-Phe).*

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (92 % de pureza)

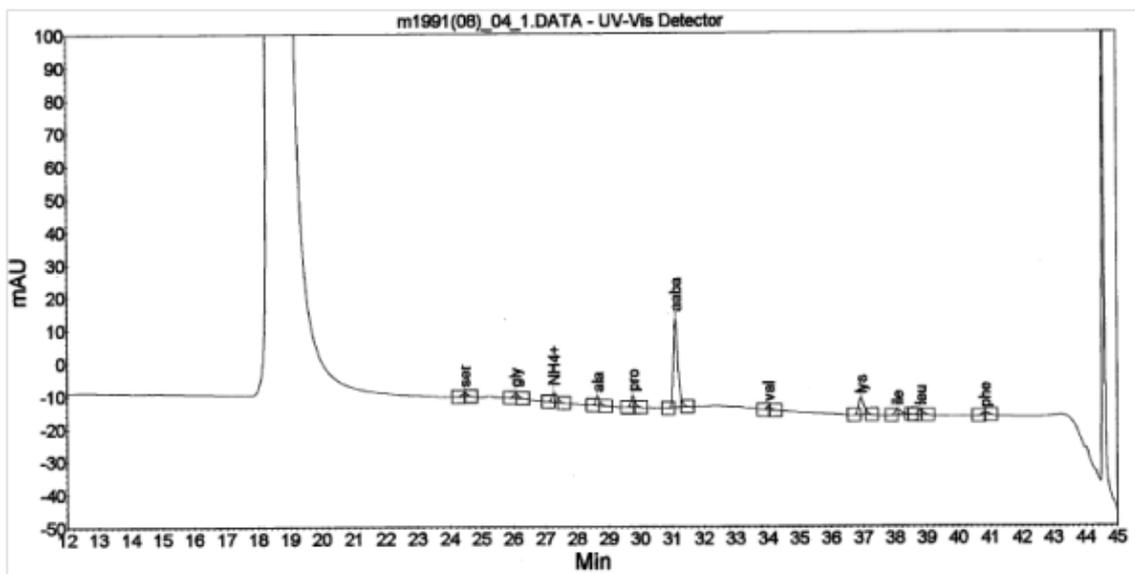


HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm , ( 96% de pureza)

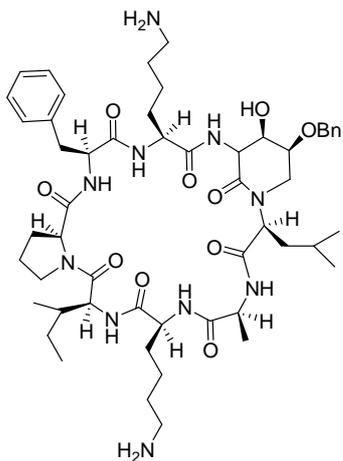




MALDI-TOF

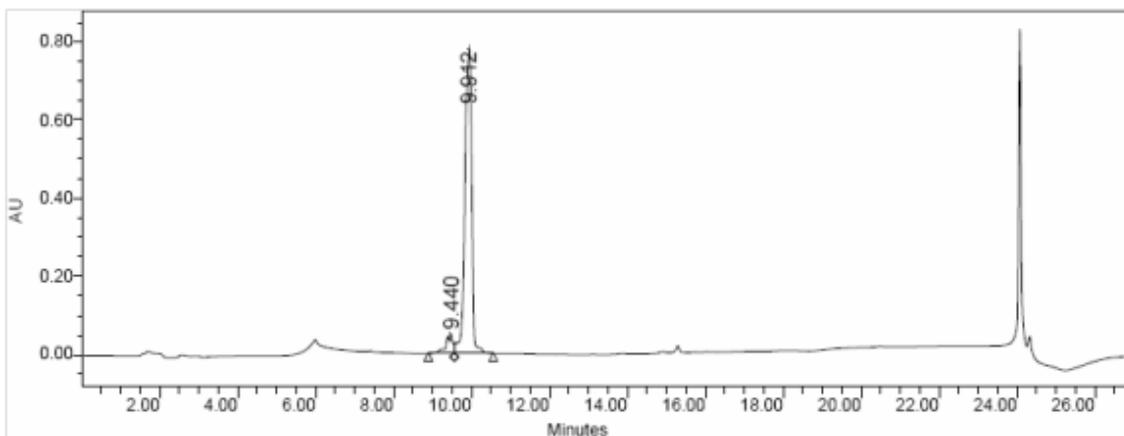


AAA

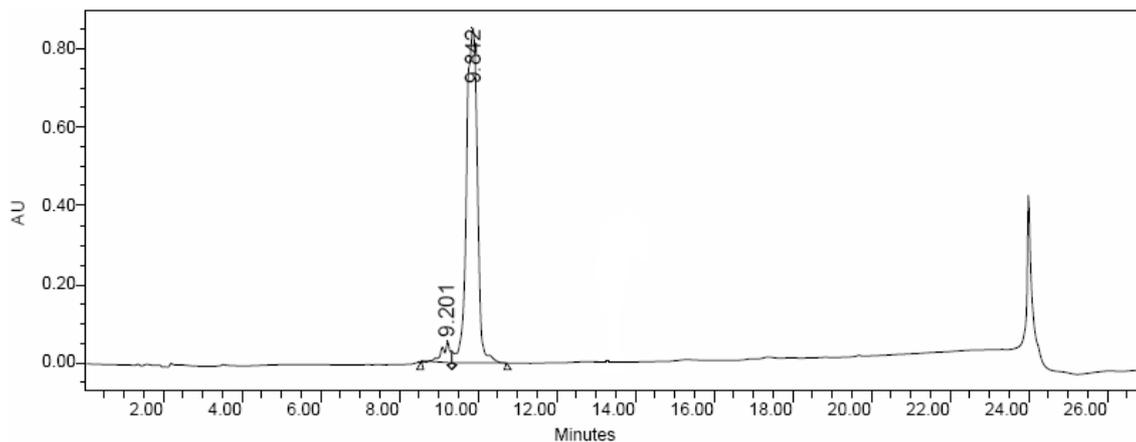


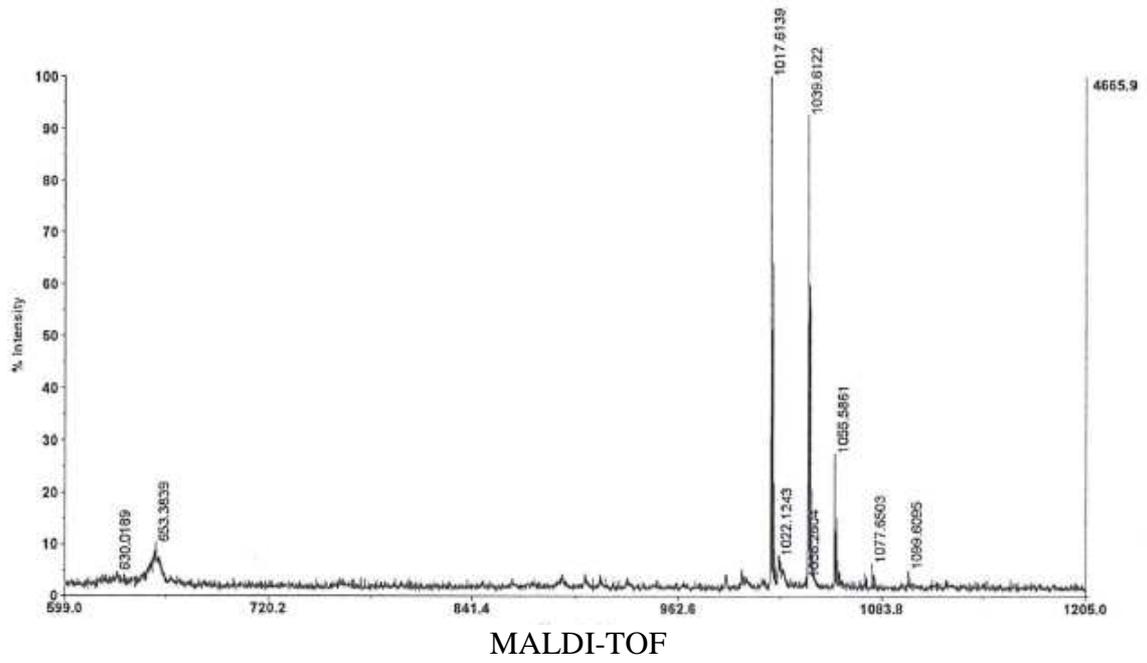
**P33.** *Ciclo(Lys-{Ser(OBn)-Leu}-Ala-Lys-Ile-Pro-Phe).*

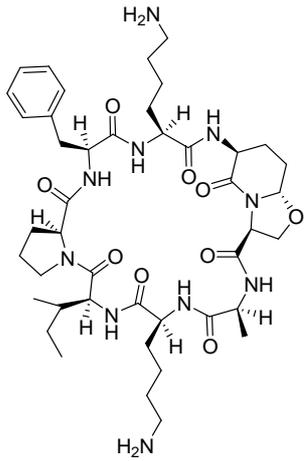
HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (94% de pureza)



HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (95% de pureza)

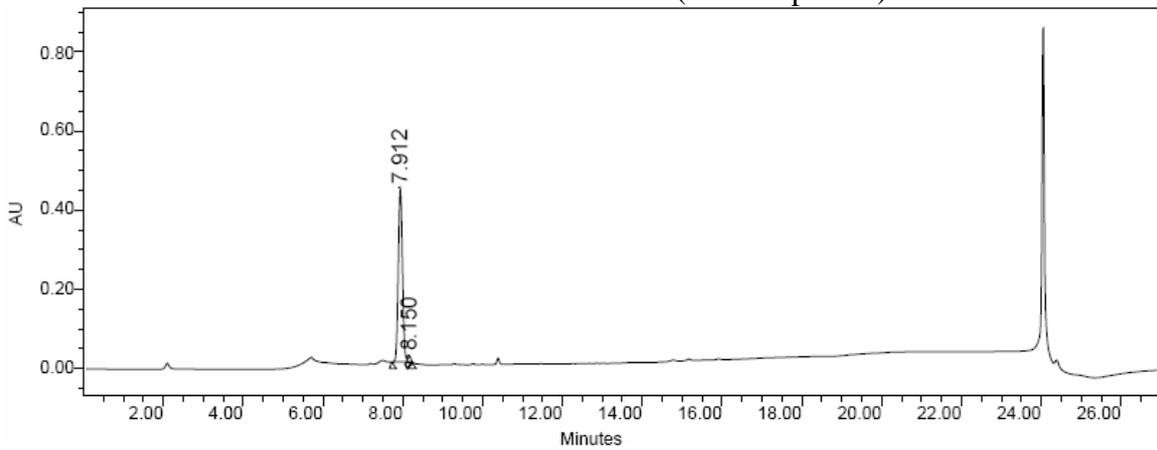




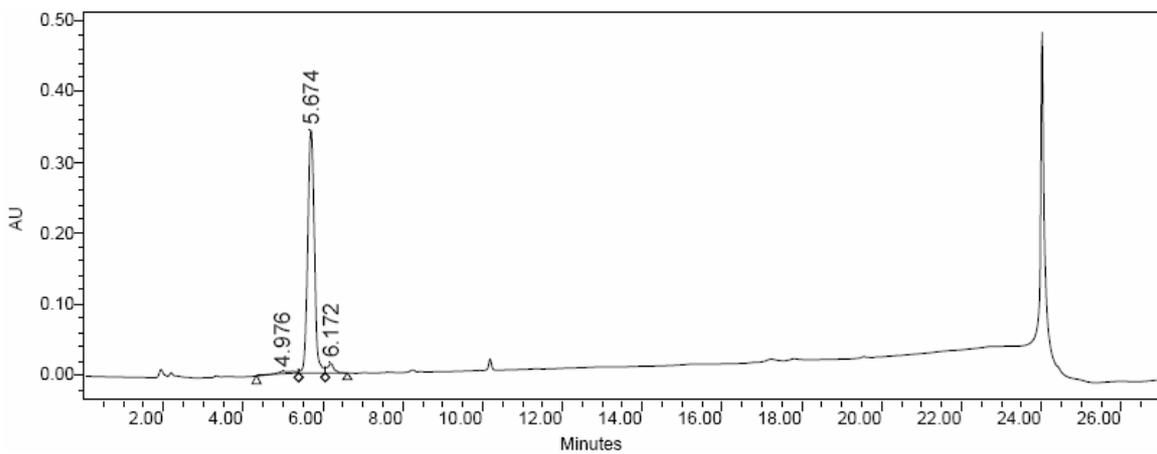


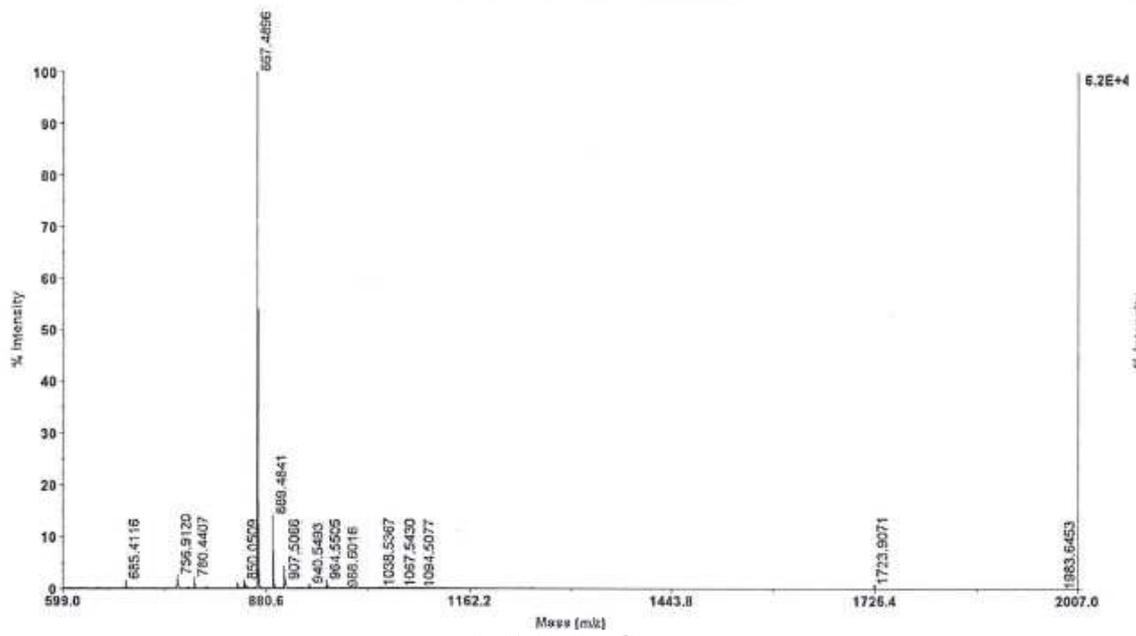
**P35.** *Ciclo(Lys-{Oxa}-Ala-Lys-Ile-Pro-Phe)*

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (98% de pureza)

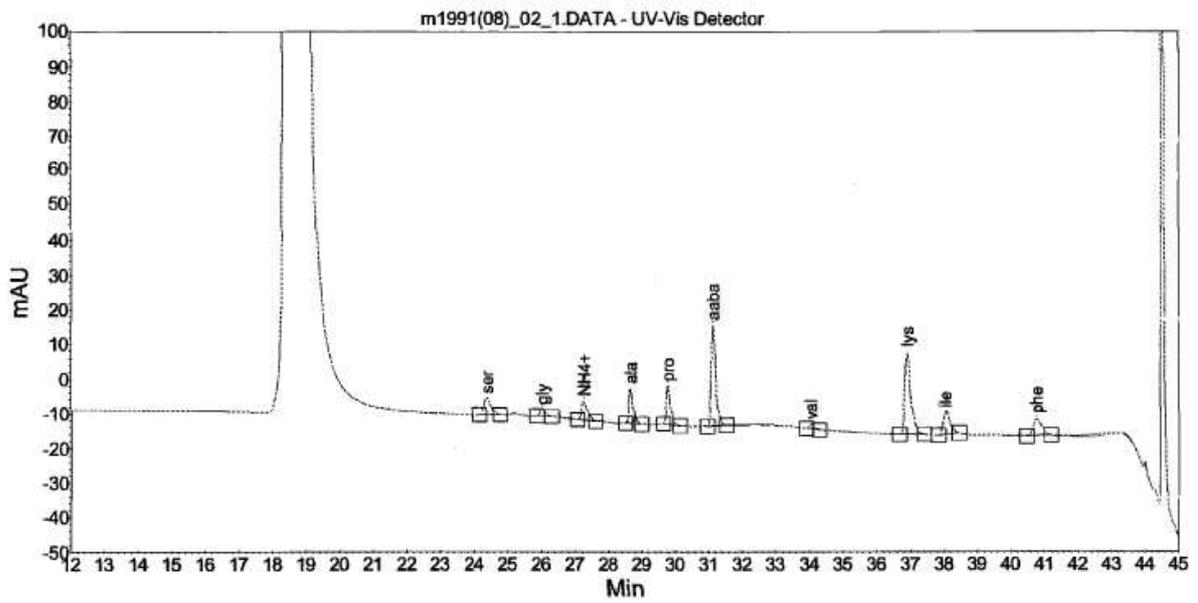


HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (92% de pureza)

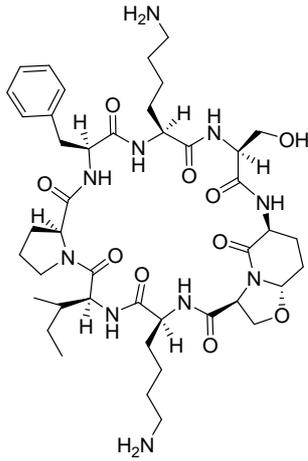




MALDI-TOF

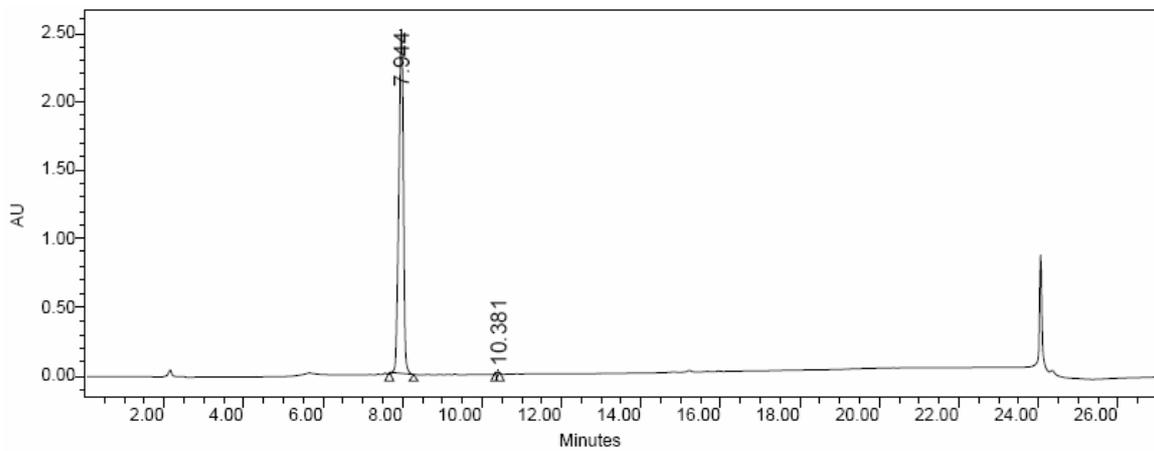


AAA

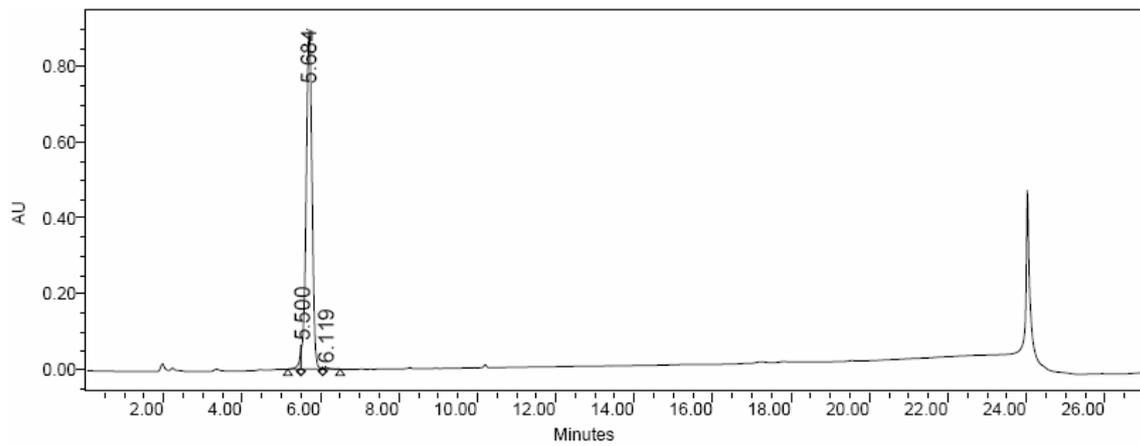


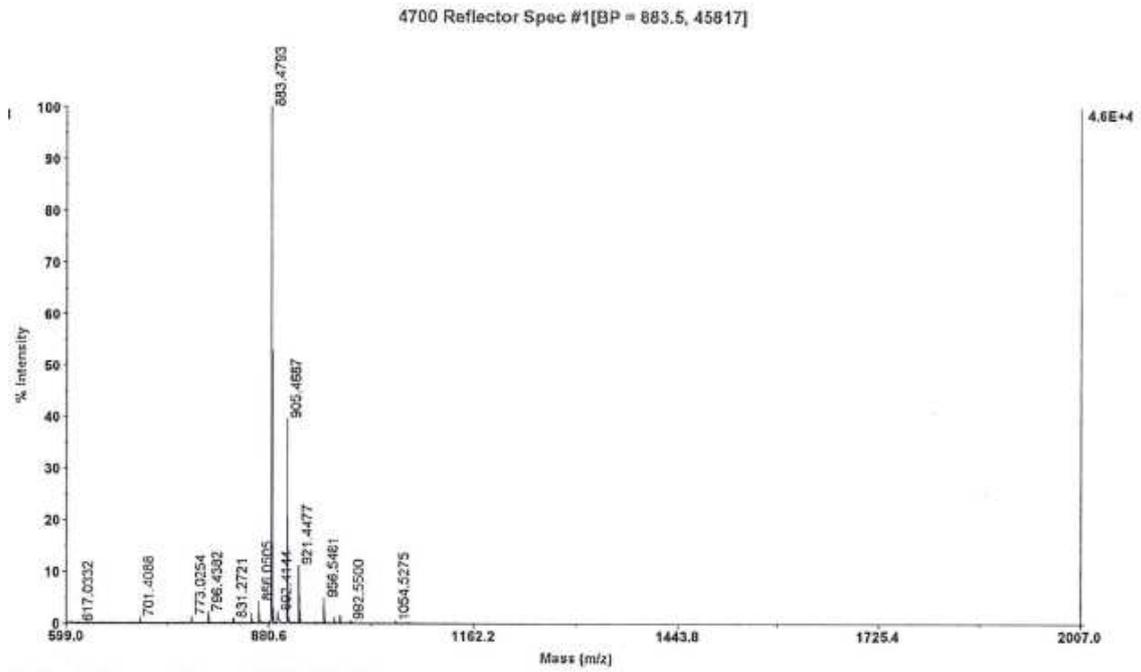
**P36.** *Ciclo(Lys-Ser-{Oxa}-Lys-Ile-Pro-Phe)*

HPLC: 0% a 100% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (99 % de pureza)

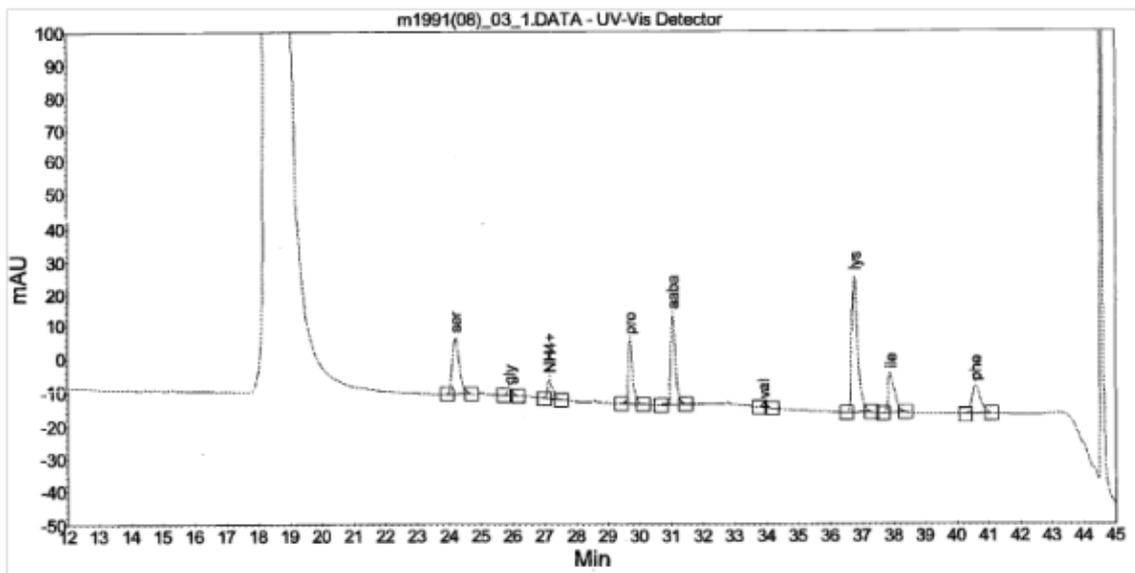


HPLC: 15% a 70% de ACN en 15 min  $\lambda = 220$  nm (97 % de pureza)





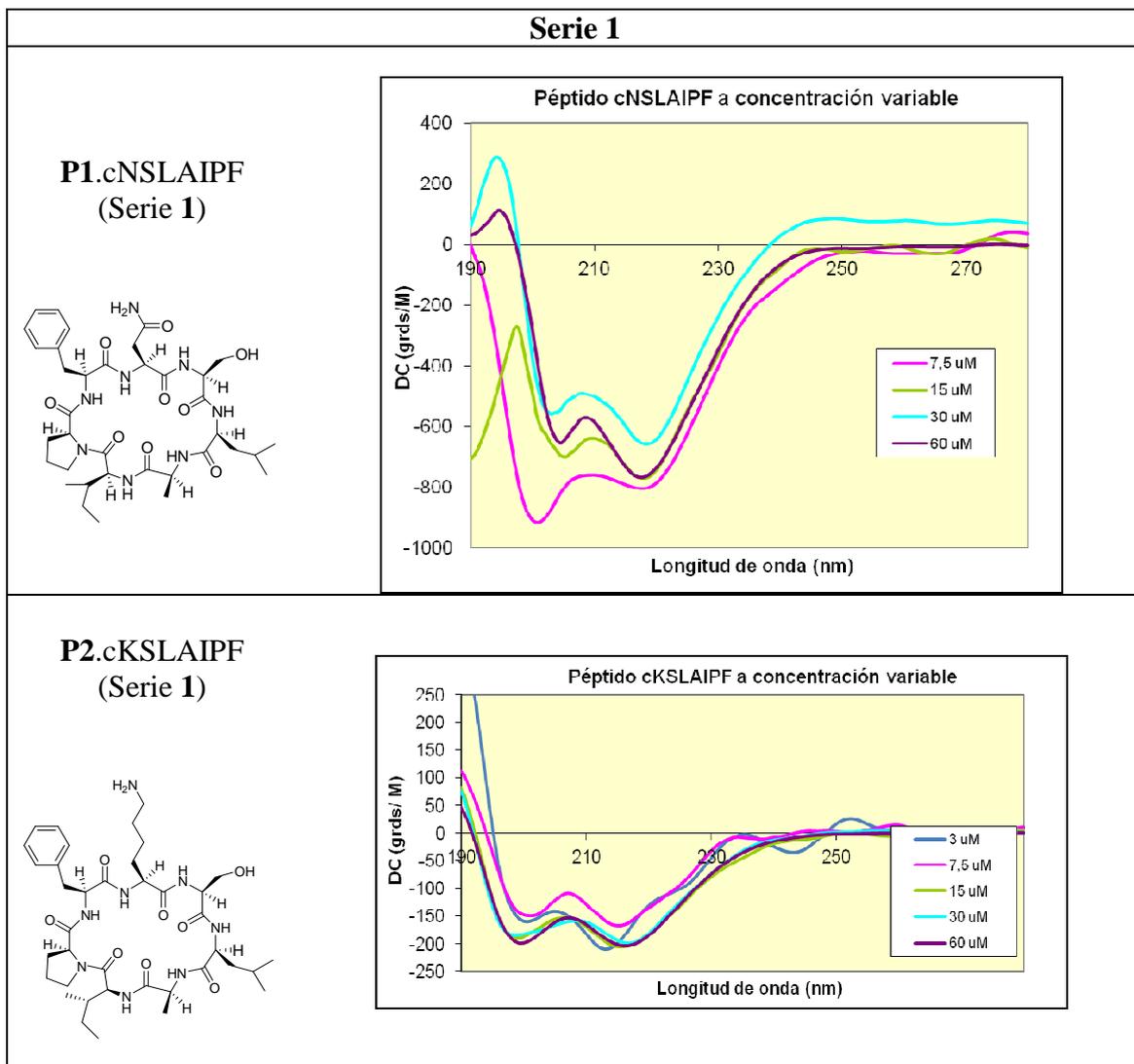
MALDI-TOF



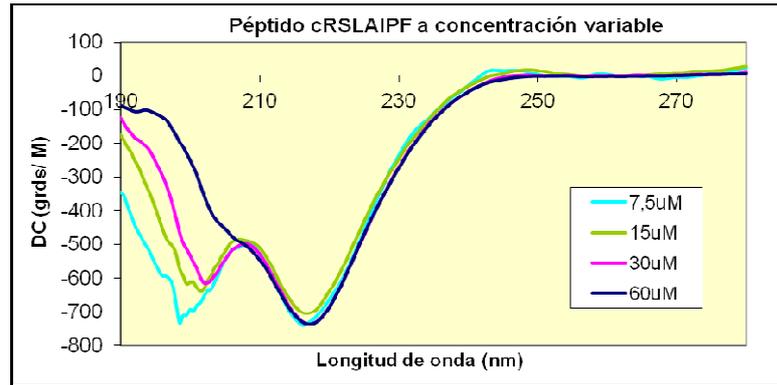
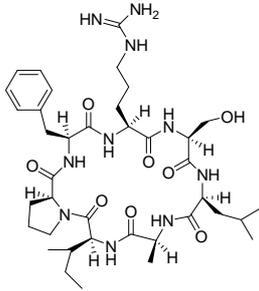
AAA

### 7.3. ESPECTROS DE DICROISMO CIRCULAR DEL CAPÍTULO 4

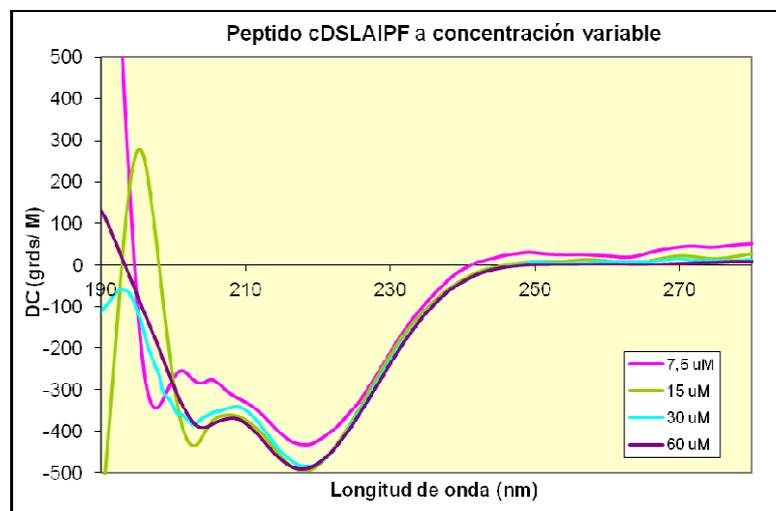
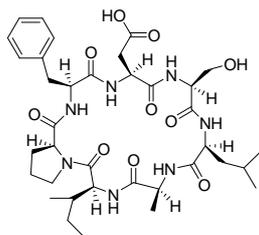
Es este apartado se recoge una relación de los espectros de DC de nuestros compuestos realizados en la presente tesis doctoral, ordenados numéricamente y por series.



**P3. cRSLAIPF**  
(Serie 1)

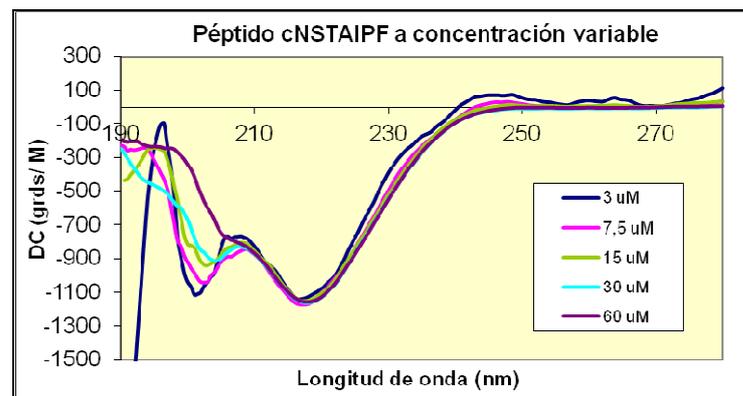
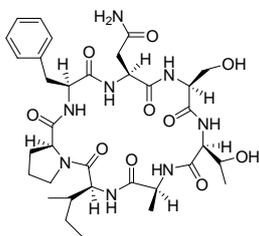


**P4. cDSLAIPIF**  
(Serie 1)

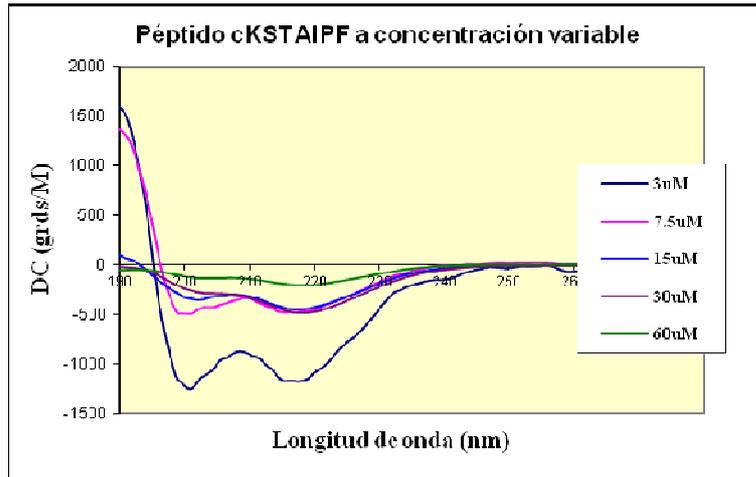
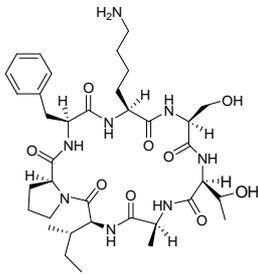


**Serie 2**

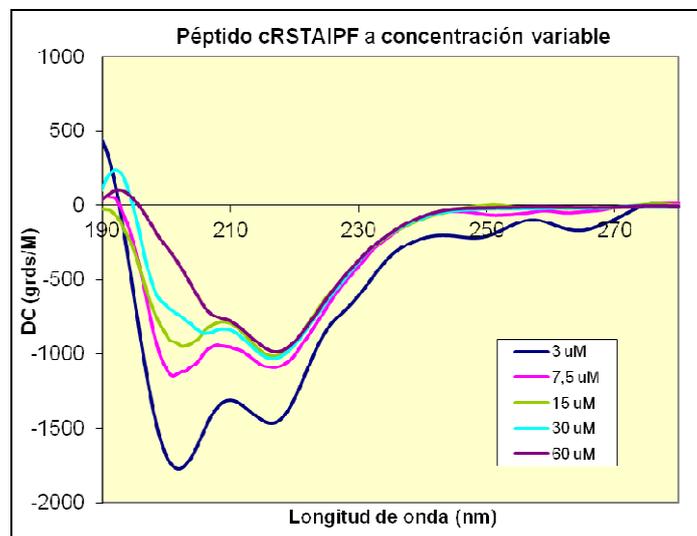
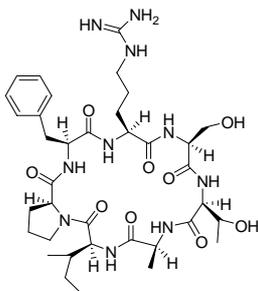
**P5. cNSTAIPF**  
(Serie 2)



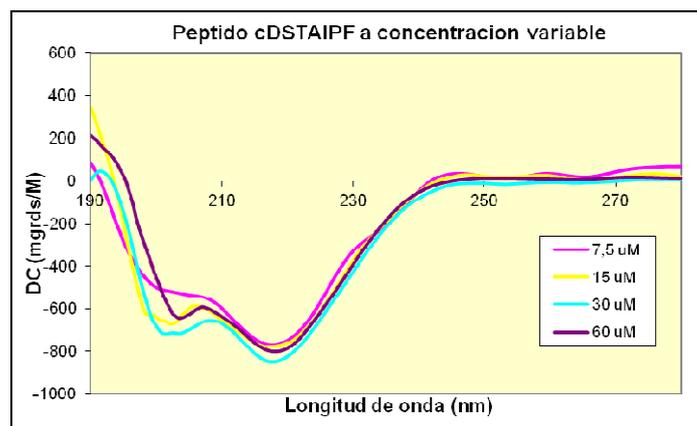
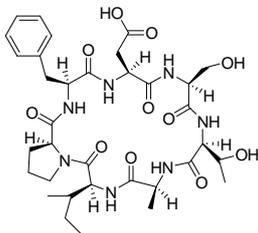
**P6. cKSTAIPF  
(Serie 2)**



**P7. cRSTAIPF  
(Serie 2)**

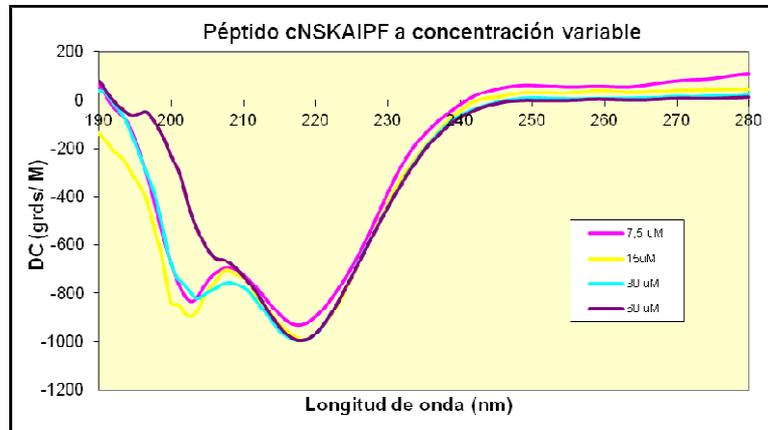
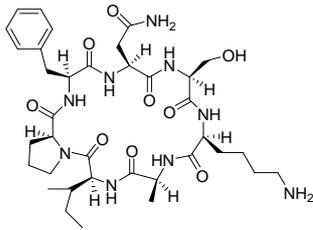


**P8. cDSTAIPF  
(Serie 2)**

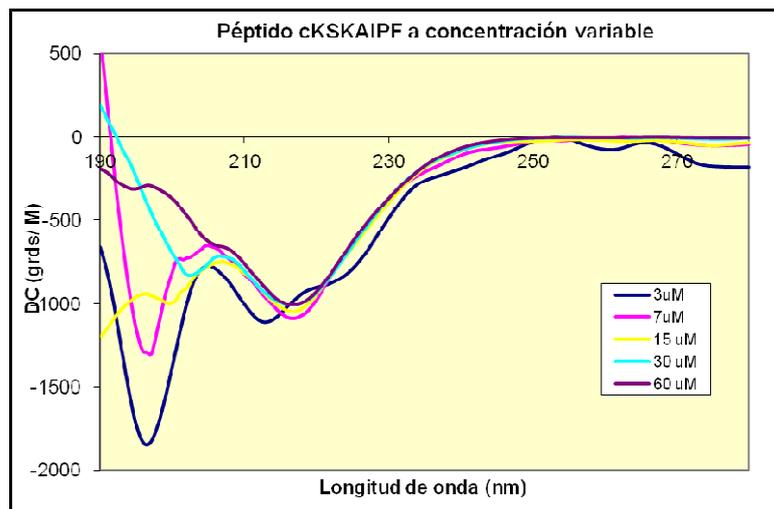
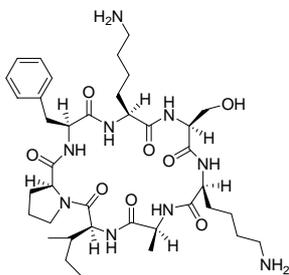


Serie 3

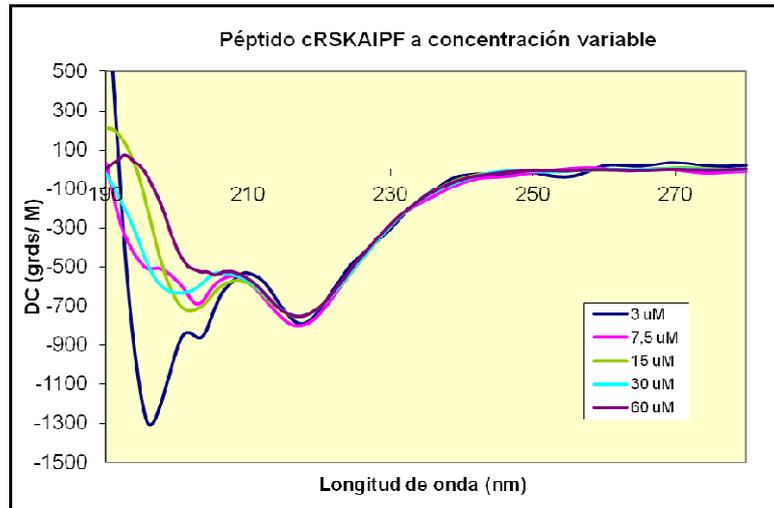
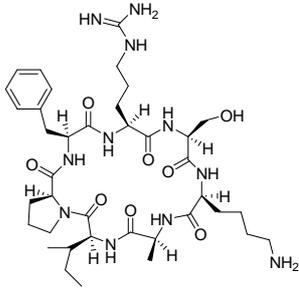
**P9. cNSKAIPF**  
(Serie 3)



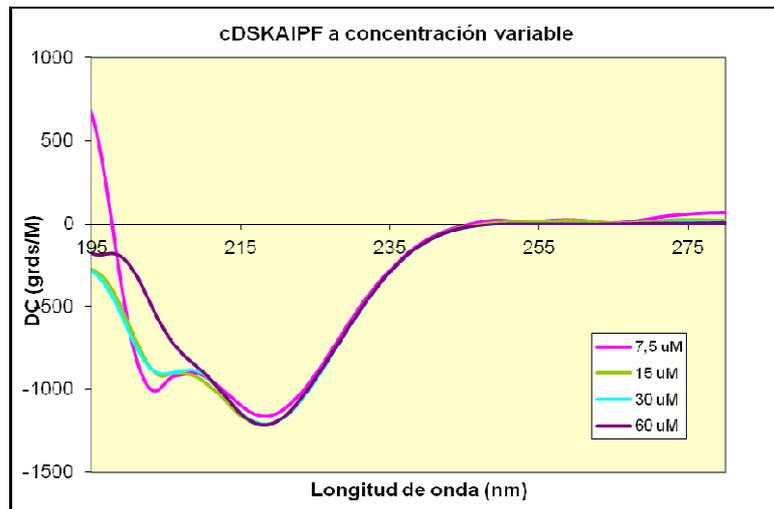
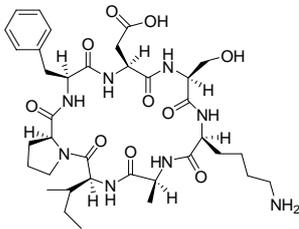
**P10. cKSKAIPF**  
(Serie 3)



**P11.cRSKAIPF**  
(Serie 3)

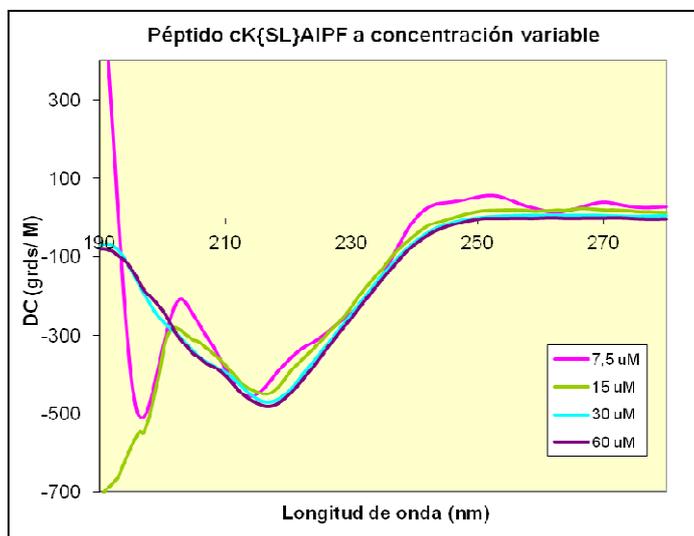
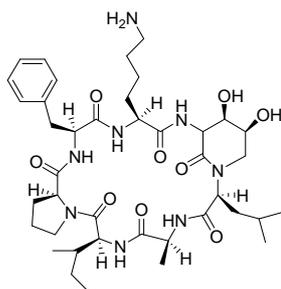


**P12.cDSKAIPF**  
(Serie 3)

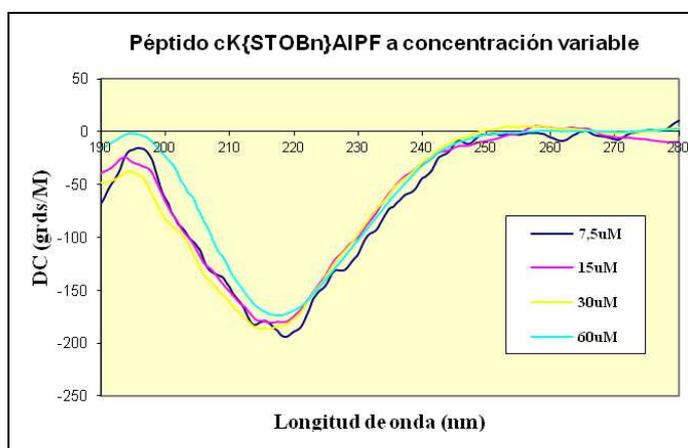
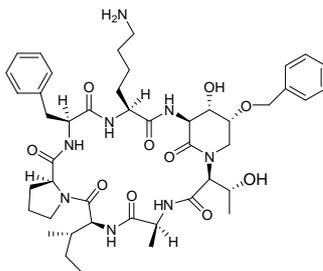


## Serie 4

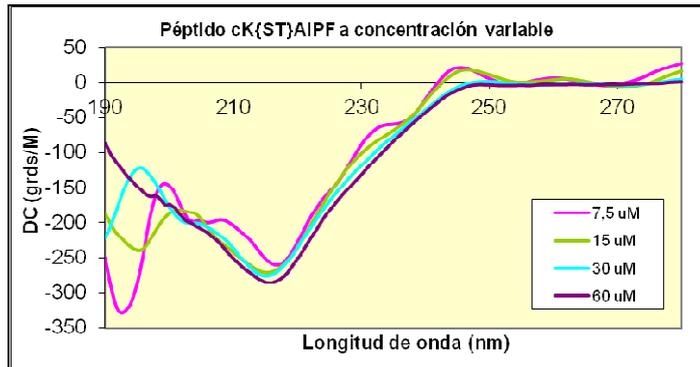
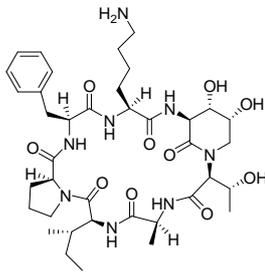
## P16.cK{SL}AIPF



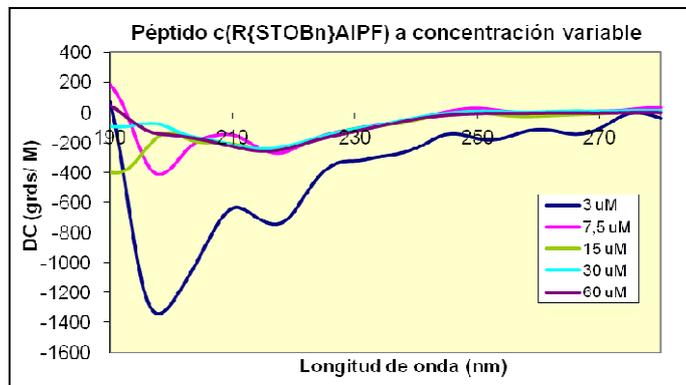
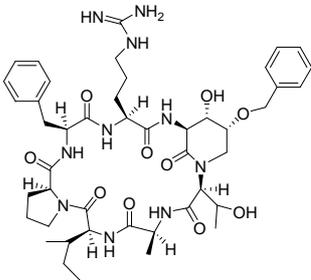
## Serie 5

P19.  
cK{STOBn}AIPF  
(Serie 5)

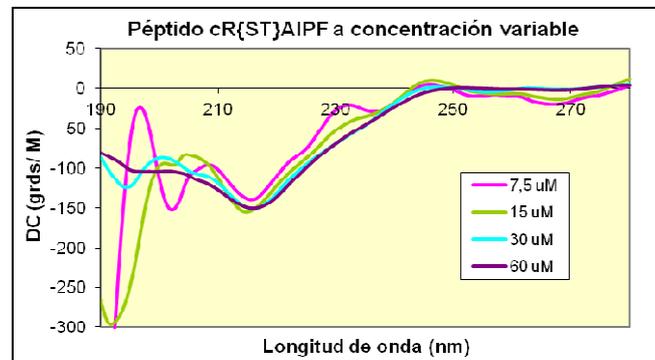
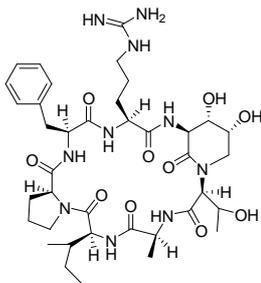
**P20. cK{ST}AIPF**  
(Serie 5)



**P21. cR{STOBn}AIPF**  
(Serie 5)

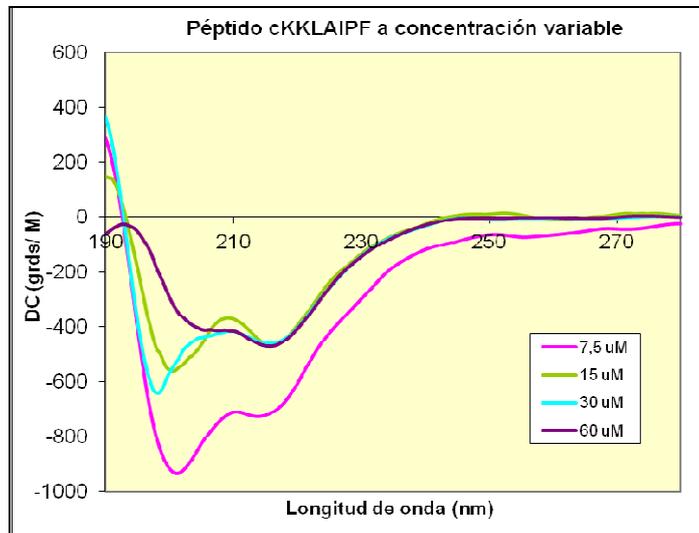
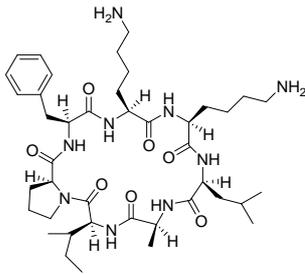


**P22. cR{ST}AIPF**  
(Serie 5)

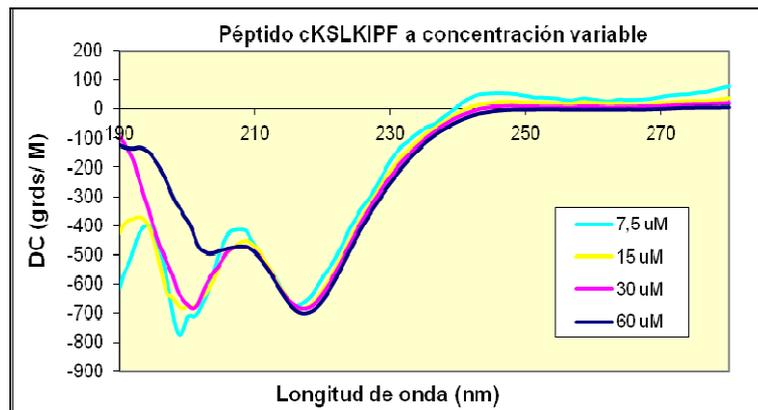
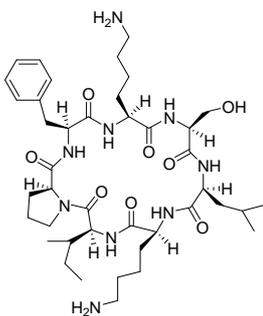


**Serie 7**

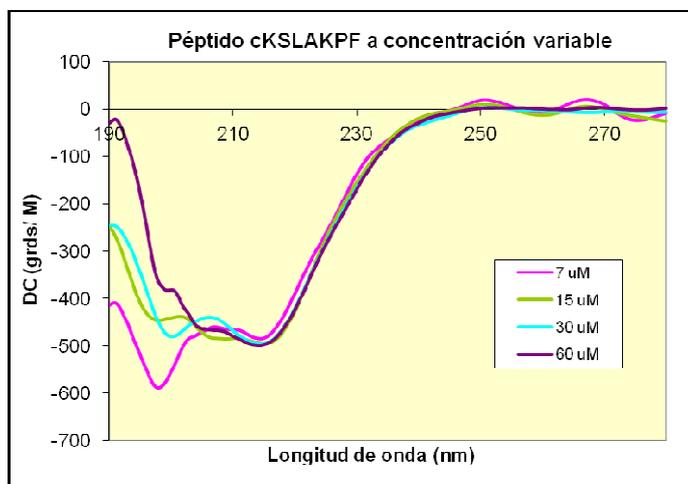
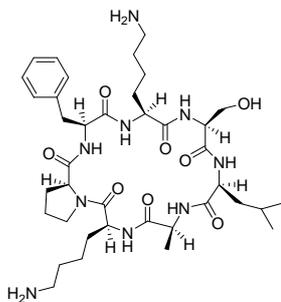
**P27. cKKLAIPF**  
(Serie 7)



**P28. cKSLKIPF**  
(Serie 7)

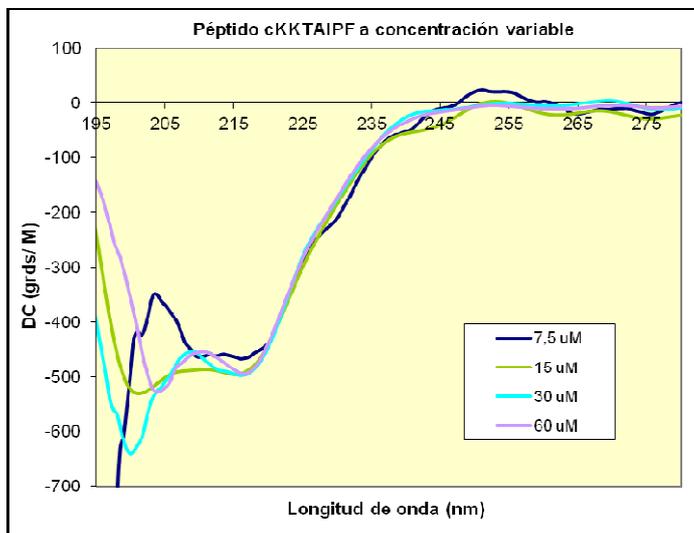
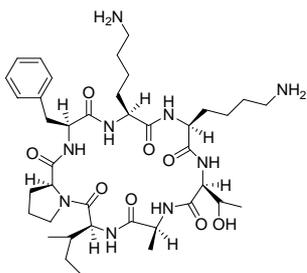


**P29. cKSLAKPF**  
(Serie 7)

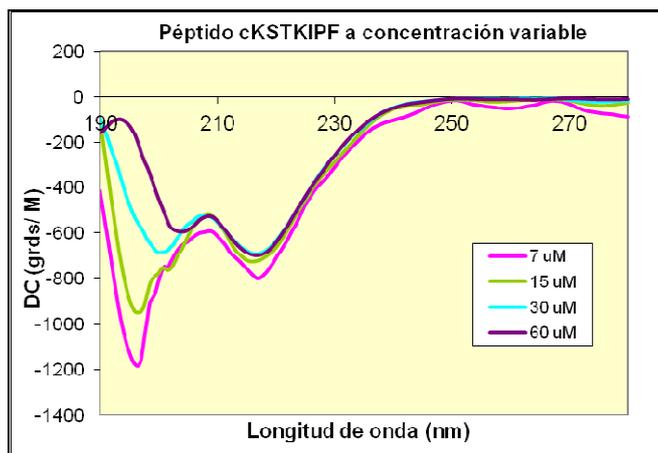
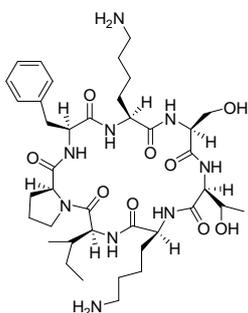


**Serie 8**

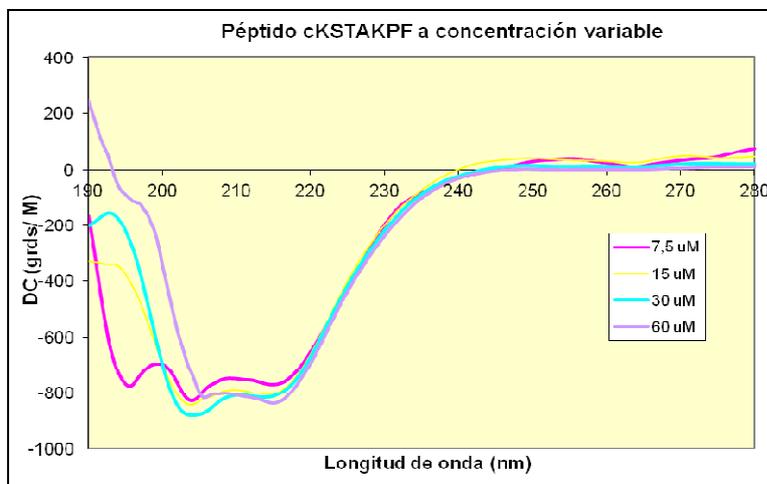
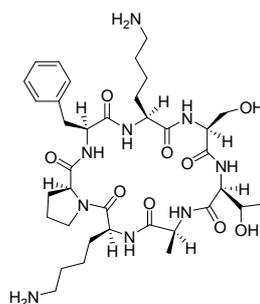
**P30. cKKTAIPF  
(Serie 8)**



**P31.cKSTKIPF  
(Serie 8)**

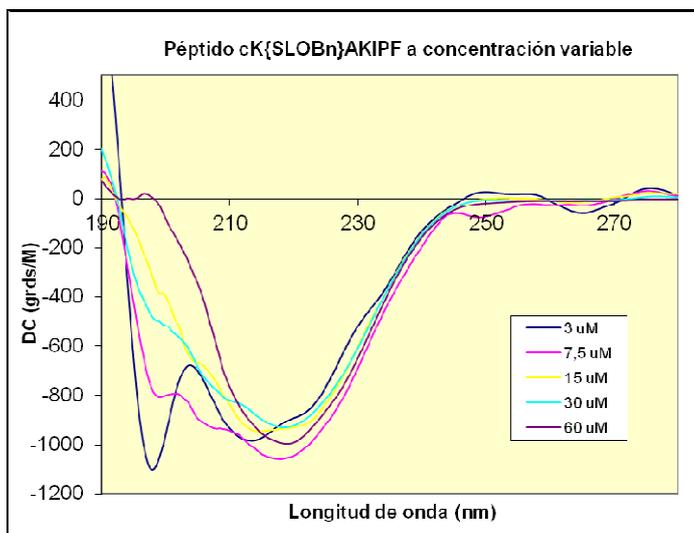
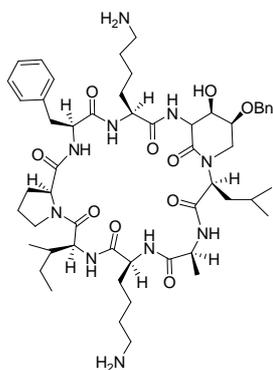


**P32. cKSTAKPF  
(Serie 8)**

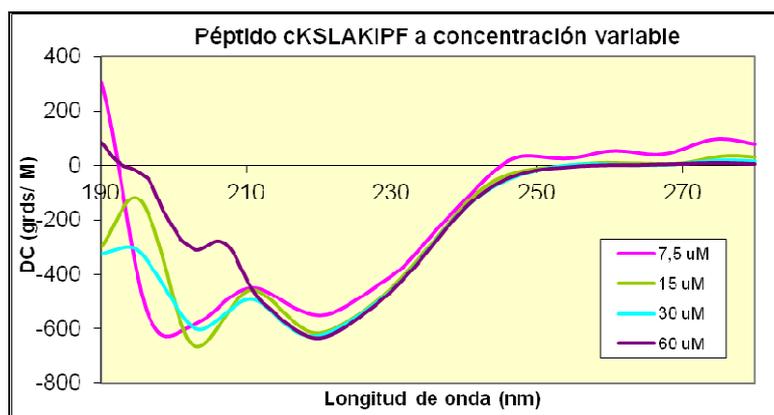
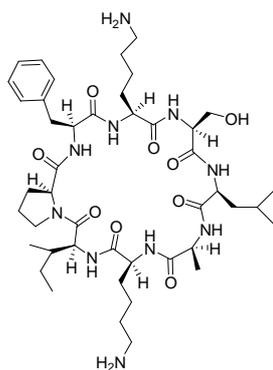


**Serie 9**

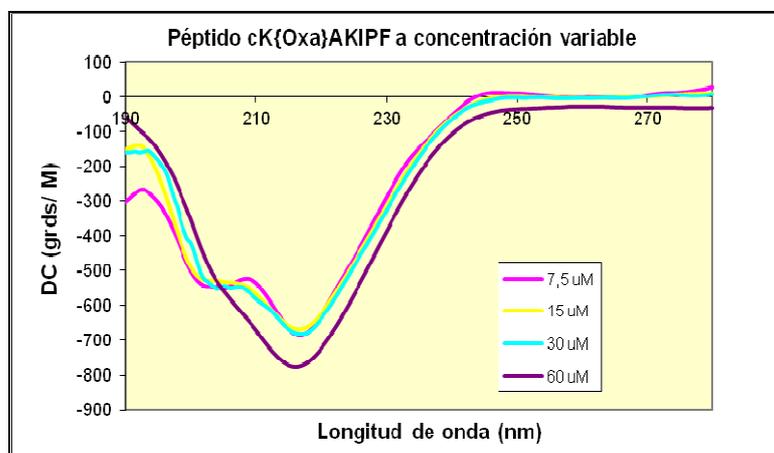
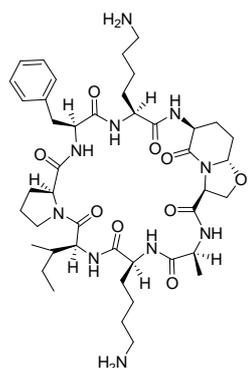
**P33.**  
cK{SLOBn}AKIPF  
(Serie 9)



**P34.** cKSLAKIPF  
(Serie 9)



**P35.** cK{Oxa}AKIPF  
(Serie 9)



**P36.cKS{Oxa}KIPF**  
(Serie 9)

