



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Desarrollo de nuevas estrategias en fase sólida para la obtención de péptidos modificados: Aplicación a la síntesis de análogos de peptinas

Carolina Torres García

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (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) service and by the UB Digital Repository (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.

Programa de Química Orgánica

Tesis Doctoral

**Desarrollo de nuevas estrategias en fase
sólida para la obtención de péptidos
modificados: Aplicación a la síntesis de
análogos de peptinas**

Carolina Torres García

Dirigida y revisada por:

Dr. Ernesto Nicolás
Galindo

(Universitat de Barcelona)

Dra. Miriam Royo
Expósito

(Parc Científic de Barcelona)

Barcelona, 2015

Abreviaturas y símbolos

Ac	acetilo
Ac₂O	anhídrido acético
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
AM-CM	resina aminometil ChemMatrix
AM-PS	resina aminometilpoliestireno
anh	anhidro
AOP	hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-il- <i>N</i> -oxi)-tris(dimetilamino)fosfonio
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
Boc₂O	bicarbonato de di- <i>tert</i> -butilo
BOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il- <i>N</i> -oxi-tris(dimetilamino)fosfonio
BTTP	<i>tert</i> -butilimino-tri(pirrolidino)fosforano
^tBu	<i>tert</i> -butilo
Bzl	bencilo
CCF	cromatografía en capa fina
Cl-Trt	resina cloruro de 2-clorotritilpoliestireno
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCE	1,2-dicloroetano
DCM	diclorometano
DHB	ácido 2,5-dihidroxibenzoico
DHP	dihidropirano
DHP-PS	resina dihidropiranilo con base de poliestireno
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIPAD	azodicarboxilato de diisopropilo
DKP	dicetopiperacina

DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimetilamino)piridina
<i>m</i>DMB	1,3-dimetoxibenceno
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DVB	1,4-divinilbenceno
EDC	cloruro de <i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDIA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
EM	espectrometría de masas
ESI	electrospray
MALDI-TOF	desorción iónica provocada por láser, asistida por matriz, y con detección por tiempo de vuelo
MOP	microscopía óptica con luz polarizada
eq	equivalente
Et₃N	trietilamina
Et₂O	éter dietílico
EtOH	etanol
f	funcionalización
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
GABA	ácido γ -aminobutírico
GPCRs	receptores acoplados a proteína G
h	hora
HATU	hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i>]piridin-il-metileno]- <i>N</i> -metilmetanaminio
HBTU	hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)dimetilamino)metileno]- <i>N</i> -metilmetanaminio
HFIP	hexafluoroisopropanol
HLAP	enzima <i>horse liver acetone powder</i>
HMPS	resina hidroximetilpoliestireno
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol

HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
HPLC-MS	cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas
Hz	Herz
IR	infrarrojo
<i>J</i>	constante de acoplamiento
K_i	constante de inhibición
MBHA	resina 4-metilbencidrilamina
MeCN	acetonitrilo
MeOH	metanol
min	minutos
MTBE	metil <i>terc</i> -butil éter
m/z	relación masa/carga
MW	microondas
Nbb	ácido 4-hidroxietil-3-nitrobenceno
Np	4-nitroanilida
Nu	nucleófilo
OSu	éster de <i>N</i> -hidroxisuccinimida
Oxyrna[®]	2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato de etilo
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo
PEG	polietilenglicol
PEGA	copolímero de polietilenglicol y dimetilacrilamida
P_f	punto de fusión
PLE	enzima pig liver esterase
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
PPTS	4-toluensulfonato de piridinio

PS	poliestireno
PTFE	politetrafluoroetileno (teflón)
PyAOP	hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il- <i>N</i> -oxi-tris(pirrolidinio)fosfonio
PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il- <i>N</i> -oxi-tris(pirrolidinio)fosfonio
R_f	factor de retención
Rink	ácido 2-(4-aminometil-2', 4'-dimetoxifenil)fenoxiacético
RMN	resonancia magnética nuclear
s	segundos
sa	singlete amplio
SNC	sistema nervioso central
SPPS	síntesis de péptidos en fase sólida
t	tiempo
T	temperatura
ta	triplete amplio
t.a.	temperatura ambiente
TATU	tetrafluoroborato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i>]piridin-il-metileno]- <i>N</i> -metilmetanaminio
TBAF	fluoruro de tetrabutilamonio
TBTU	tetrafluoroborato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)dimetilamino]metileno]- <i>N</i> -metilmetanaminio
THF	tetrahidrofurano
THP	tetrahidropirano
TFA	ácido trifluoroacético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TFMSA	ácido trifluorometansulfónico
TIS	triisopropilsilano
7TMD	siete dominios de transmembrana
TMS	tetrametilsilano

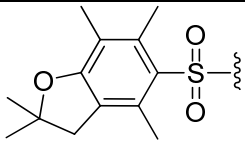
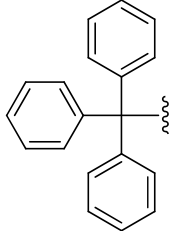

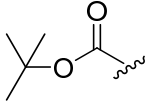
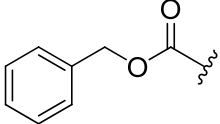
TMSBr	bromotrimetilsilano o bromuro de trimetilsililo
TMSOTf	trifluorometansulfonato de trimetilsililo
t_R	tiempo de retención
Trt	tritulo
UV	ultravioleta
V/V	volumen/volumen
δ	desplazamiento químico
ε	coeficiente de extinción molar
λ	longitud de onda

Aminoácidos: código de tres letras, código de una letra y estructura

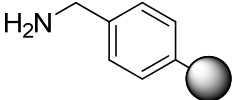
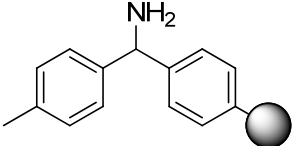
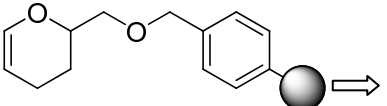
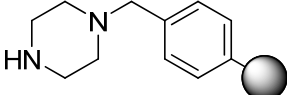
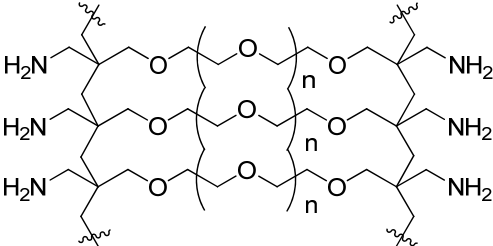
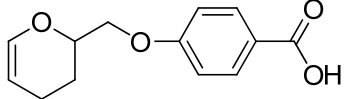
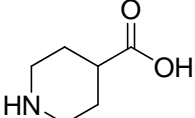
Aminoácido		Estructura	Aminoácido		Estructura
Asp D	Ácido L-aspártico		Ile I	L-isoleucina	
Glu E	Ácido L-glutámico		Leu L	L-leucina	
Ala A	L-alanina		Lys K	L-lisina	
Arg R	L-arginina		Met M	L-metionina	
Asn N	L-asparagina		Pro P	L-prolina	
Cys C	L-cisteína		Ser S	L-serina	
Phe F	L-fenilalanina		Tyr Y	L-tirosina	
Gly G	L-glicina		Thr T	L-treonina	
Gln Q	L-glutamina		Trp W	L-triptófano	
His H	L-histidina		Val V	L-valina	

Las abreviaturas de los aminoácidos siguen las reglas de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB especificadas en *Journal of Biological Chemistry*, **1981**, 256, 12-14 y *European Journal of Biochemistry*, **1984**, 138, 9-37.

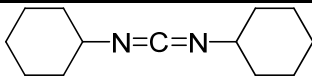
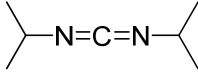
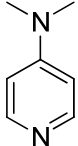
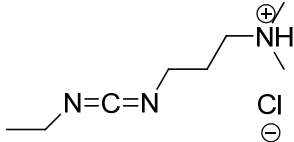
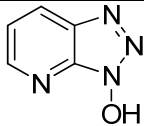
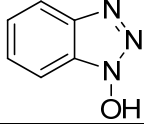
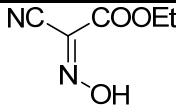
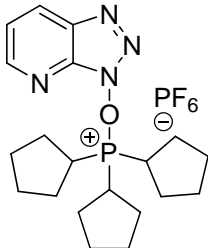
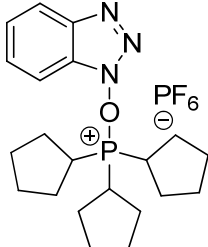
Grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos utilizados en el presente trabajo

Aminoácido	Estructura	Abreviatura	Nombre
Arg		Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo
Gln, Thr		Trt	trifenilmetil (tritilo)
Thr, Tyr		^t Bu	terc-butilo
Trp		Boc	terc-butoxicarbonilo
Trp		Z	benciloxicarbonilo

Soportes poliméricos y espaciadores bifuncionales utilizados en la síntesis en fase sólida de péptidos y derivados descritos en el presente trabajo

Estructura	Nombre
 \Rightarrow poliestireno	Resina AM-PS (aminometilpoliestireno)
 \Rightarrow poliestireno	Resina MBHA-PS (4-metilbencidrilamina)
 \Rightarrow poliestireno	Resina DHP-PS (dihidropiranilo)
 \Rightarrow poliestireno	Resina piperacinometilpoliestireno
	Resina AM-CM (aminometil ChemMatrix)
	ácido 4-[(3,4-dihidro-2H- piran-2-il)metoxi]benzoico
	Ácido isonipecótico

Agentes de acoplamiento y aditivos utilizados en la síntesis de péptidos y derivados descritos en el presente trabajo

Estructura	Abreviatura	Nombre
	DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
	DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
	DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimetil)aminopiridina
	EDC-HCl	Cloruro de <i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
	HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
	HOBt	1-hidroxibenzotriazol
	Oxyma®	2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato de etilo
	PyAOP	hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il- <i>N</i> -oxi-tris(pirrolidinio)fosfonio
	PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il- <i>N</i> -oxi-tris(pirrolidinio)fosfonio

Glosario de definiciones y conceptos asociados a los ensayos biológicos*

- **Actividad constitutiva de un receptor:** Actividad espontánea de un receptor en ausencia de ligandos agonistas que lo activen. Constituye la respuesta basal de un receptor.
- **Agonista:** Ligando que al unirse a un receptor altera un segundo mensajero intracelular y produce una respuesta fisiológica.
- **Agonista inverso:** Ligando que antagoniza la actividad constitutiva de un receptor, lo que conduce a una menor respuesta mediada por el receptor. Una aplicación terapéutica de los agonistas inversos es la reducción de la actividad constitutiva excesiva de un receptor.
- **Antagonista:** Ligando que no produce cambios en la actividad del receptor, es decir, no afecta a los segundos mensajeros ni a la respuesta fisiológica. Sin embargo, dado que los antagonistas interactúan con el centro de unión del receptor, su presencia interfiere en la interacción del receptor con los agonistas.
- **EC₅₀:** Concentración de ligando que produce la mitad de la respuesta máxima de un receptor. Se emplea como medida de potencia de un ligando y se determina a partir del punto de inflexión de las curvas dosis-respuesta.
- **Estado de alta afinidad para un GPCR:** Situación en que un GPCR se encuentra acoplado a una proteína G y presenta una afinidad alta por sus agonistas.
- **Estado de baja afinidad para un GPCR:** Situación en que un GPCR no se encuentra acoplado a una proteína G y presenta baja afinidad por sus agonistas.
- **IC₅₀:** Concentración de ligando necesaria para desplazar competitivamente la mitad de ligando radioactivo unido a un receptor.
- **K_D:** Concentración de ligando necesaria para ocupar la mitad de la población de un receptor. Se emplea como medida de afinidad de un ligando y se determina a partir de una curva de saturación o indirectamente a partir del punto de inflexión de una curva de competición.
- **Ligando alostérico:** Ligando que regula la función de un receptor mediante la unión a un centro distinto al que se une el ligando natural.

*Berg, K. A.; Clarke, W. P. Development of functionally selective agonists as novel therapeutic agents. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*. **2006**, *3*, 421-428.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL.....1

CAPÍTULO 1: DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS EN FASE SÓLIDA QUE IMPLICAN LA UNIÓN DE UN AMINOÁCIDO AL SOPORTE POLIMÉRICO A TRAVÉS DE SU CADENA LATERAL

INTRODUCCIÓN.....11

1. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA.....11
 - 1.1. El soporte polimérico.....13
 - 1.2. Estrategias de protección.....17
 - 1.3. Elongación de la cadena peptídica: agentes de acoplamiento.....19
 - 1.4. Liberación del péptido de la resina.....25
2. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE PÉPTIDOS LINEALES MODIFICADOS Y CÍCLICOS.....26
 - 2.1. Péptidos modificados en el extremo carboxilo.....26
 - 2.2. Péptidos cíclicos.....27
3. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE PÉPTIDOS UTILIZANDO LA CADENA LATERAL DE UN AMINOÁCIDO COMO PUNTO DE UNIÓN REVERSIBLE AL SOPORTE POLIMÉRICO.....28
 - 3.1. Introducción.....29
 - 3.2. La cadena lateral de un aminoácido como punto de unión al soporte polimérico.....29
 - 3.3. Dos casos particulares de unión entre la cadena la cadena lateral de un aminoácido y la resina: los aminoácidos aromáticos triptófano y fenilalanina
 - 3.3.1. Triptófano: el anillo de indol como punto de unión a la resina.....36
 - 3.3.2. Fenilalanina: el anillo aromático como punto de unión a la resina.....38

OBJETIVOS.....41

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....42

1. LA CADENA LATERAL DEL TRIPTÓFANO COMO PUNTO DE UNIÓN REVERSIBLE AL SOPORTE POLIMÉRICO: EL ENLACE HEMIAMINAL

- 1.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS PROTEGIDOS DEL TRIPTÓFANO.....42
 - 1.1.1. Introducción.....42
 - 1.1.2. Preparación del éster alílico de (S) N^{α} -(9-fluorenilmetoxycarbonil)triptófano (1).....43
 - 1.1.3. Preparación del éster metílico de (S) N^{α} -(9-fluorenilmetoxycarbonil)triptófano (2).....44
- 1.2. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 3,4-DIHIDRO-2H-PIRANO (DHP).....44
 - 1.2.1. Introducción.....44
 - 1.2.2. Preparación del ácido 4-[(3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxi]benzoico (3).....45
 - 1.2.3. Síntesis de la *N*-bencil-4-[(3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxi]benzamida (4).....46

1.2.4.	Síntesis de <i>N</i> -bencilcarbamato de (3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metilo (5).....	47
1.3.	UNIÓN ENTRE EL TRIPTÓFANO Y EL MODELO MONOMÉRICO: FORMACIÓN DEL ENLACE HEMIAMINAL.....	47
1.3.1.	Introducción.....	47
1.3.2.	Estudio en solución.....	48
1.3.2.1.	Ensayos con dihidropirano (DHP).....	48
1.3.2.2.	Ensayos con <i>N</i> -bencil-4-[(3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxi]benzamida (4).....	50
1.3.3.	Estudio en fase sólida.....	54
1.3.3.1.	Unión del triptófano a distintos soportes poliméricos.....	57
1.3.3.2.	Unión del triptófano al soporte polimérico a distintas temperaturas.....	57
1.3.3.3.	Unión del triptófano al soporte polimérico a distintas concentraciones de PPTS.....	58
1.3.3.4.	Unión del triptófano al soporte polimérico en función del volumen de disolvente (DCE).....	59
1.3.3.5.	Unión del triptófano al soporte polimérico a distintas concentraciones de Fmoc-(<i>S</i>)-Trp-OAlilo (1).....	60
1.4.	LIBERACIÓN DEL TRIPTÓFANO DEL SOPORTE POLIMÉRICO.....	62
1.4.1.	Estudio en solución.....	62
1.4.2.	Estudio en fase sólida.....	65
1.5.	APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA PARA EL TRIPTÓFANO A LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS.....	66
1.5.1.	Brevianamida F (12).....	66
1.5.1.1.	Síntesis de la Brevianamida F (12) en solución.....	67
1.5.1.2.	Síntesis de la Brevianamida F (12) en fase sólida.....	68
1.5.2.	Axinelina B (20).....	72
1.5.2.1.	Estrategia sintética 1.....	73
1.5.2.2.	Estrategia sintética 2.....	79
1.5.3.	Unguisina A (23).....	83
2.	LA CADENA LATERAL DE LA FENILALANINA COMO PUNTO DE UNIÓN REVERSIBLE AL SOPORTE POLIMÉRICO: EL ENLACE TRIACENO	
2.1.	SÍNTESIS DE DERIVADOS PROTEGIDOS DE FENILALANINA.....	88
2.1.1.	Introducción.....	88
2.1.2.	Preparación del éster metílico de (<i>S</i>)- <i>N</i> ^α -(9-fluorenilmetoxicarbonil)-4-aminofenilalanina (25).....	88
2.1.3.	Preparación del éster alílico de (<i>S</i>)- <i>N</i> ^α -(9-fluorenilmetoxicarbonil)-4-aminofenilalanina (27).....	89
2.2.	ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DEL ENLACE TRIACENO.....	90
2.2.1.	En solución.....	91
2.2.2.	En fase sólida.....	94
2.3.	LIBERACIÓN DE LA FENILALANINA DEL SOPORTE POLIMÉRICO.....	98
2.3.1.	En solución.....	98

2.3.2. En fase sólida.....	98
2.4. LA FUNCIÓN TRIACENO COMO ENLACE QUE NO DEJA TRAZAS: APLICACIÓN A LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA.....	99
2.4.1. Introducción.....	99
2.4.2. Estudio de la reducción de la sal de diazonio.....	100
2.4.3. Síntesis de péptidos modelo.....	105
2.4.3.1. Síntesis de péptidos modificados en el extremo carboxilo.....	105
2.4.3.1.1. Síntesis de Ac-AAPF-pNA (39).....	106
2.4.3.1.2. Síntesis del péptido biotinilado Ac-AAPF (40).....	108
2.4.3.1.3. Síntesis de un péptido carboxamida: Endomorfin-2 (41).....	109
2.4.3.2. Síntesis de péptidos protegidos.....	113
2.4.3.3. Síntesis de péptidos cíclicos.....	116
2.4.3.3.1. Eschizandroquina B (46).....	117
2.4.3.3.2. Unguisina A (23).....	118
2.4.3.4. Eliminación de trazas de Fe (III).....	121
2.5. EL ENLACE TRIACENO COMO ESPACIADOR MULTIFUNCIONAL: APLICACIÓN A LA SÍNTESIS DEL DEPSIPÉPTIDO ZIGOSPORAMIDA Y DERIVADOS.....	122
2.5.1. Síntesis en fase sólida de la Zigosporamida (52).....	123
2.5.1.1. Estrategia sintética 1.....	125
2.5.1.2. Estrategia sintética 2.....	127
2.5.2. Modificación del anillo aromático de la fenilalanina a través de la función triaceno.....	131
2.5.2.1. Derivatización de Fmoc-(S)-Phe-OAlilo.....	134
2.5.2.1.1. Síntesis de Fmoc-(S)-Phe(<i>p</i> OH)-OAlilo (53).....	134
2.5.2.1.2. Síntesis de Fmoc-(S)-Phe(<i>p</i> OMe)-OAlilo (54).....	135
2.5.2.1.3. Síntesis de Fmoc-(S)-Phe(<i>p</i> I)-OAlilo (55).....	136
2.5.2.1.4. Síntesis de Fmoc-(S)-Phe(<i>p</i> N ₃)-OAlilo (56).....	137
2.5.2.1.5. Síntesis de Fmoc-(S)-Phe(<i>p</i> F)-OAlilo (57).....	138
2.5.3. Síntesis de derivados del depsipéptido Zigosporamida (52).....	142

BIBLIOGRAFÍA.....	145
--------------------------	------------

CAPÍTULO 2: LA UNIÓN DE LA CADENA LATERAL DE LA FENILALANINA AL POLÍMERO A TRAVÉS DE LA FUNCIÓN TRIACENO COMO VÍA DE ACCESO A ESTRUCTURAS PEPTÍDICAS RELEVANTES: SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE ANÁLOGOS DE PEPTINAS

INTRODUCCIÓN.....	158
--------------------------	------------

1. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G (GPCRs).....	158
1.1. Introducción.....	158
1.2. Características generales de los GPCRs.....	159
1.3. Clasificación de los GPCRs.....	160
1.4. Oligomerización de GPCRs.....	161
1.5. Un caso particular de GPCRs: receptores de adenosina, dopamina y serotonina.....	162
1.5.1. Receptores de adenosina.....	163

1.5.2. Receptores de dopamina.....	164
1.5.3. Receptores de serotonina.....	164
1.6. Los GPCRs como dianas terapéuticas.....	165
2. LIGANDOS MÚLTIPLES.....	166
2.1. Introducción.....	166
2.2. Ligandos bivalentes.....	168
2.3. Estructuras privilegiadas.....	170
3. LIGANDOS BIVALENTES BASADOS EN ESTRUCTURAS PRIVILEGIADAS.....	171
3.1. Introducción.....	171
3.2. Ergopeptinas y ergopéptidos.....	172
3.3. Indoloquinolicidinas como estructuras privilegiadas.....	173
3.3.1. Aspectos estructurales.....	174
3.3.2. Indoloquinolicidinas como fuente de diversidad. Ejemplos de indolo[2,3- <i>a</i>]quinolicidinas con actividad biológica.....	175
3.4. (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-1-amino-2-indanol como estructura privilegiada.....	175
4. PEPTINAS.....	176
4.1.1. Características estructurales.....	176
4.1.2. Antecedentes sintéticos.....	177
4.1.2.1. Síntesis de peptinas en solución.....	177
4.1.2.2. Síntesis de peptinas en fase sólida.....	182
OBJETIVOS.....	185
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	186
1. QUIMIOTECA DE ANÁLOGOS DE PEPTINAS.....	186
1.1. Precursores sintéticos de peptinas: Síntesis del α -hidroxialquilmalonato monohidrolizado.....	186
1.1.1. Introducción.....	186
1.1.2. Preparación de 2-hidroxi-2-metilmalonato de dietilo (63).....	186
1.1.3. Preparación del ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico (64).....	187
1.2. Síntesis en fase sólida de análogos de peptinas.....	188
1.2.1. Introducción.....	188
1.2.2. Síntesis en fase sólida de la quimioteca de análogos de peptina.....	189
1.3. Síntesis en fase sólida de precursores lineales de peptinas.....	198
2. QUIMIOTECA DE HÍBRIDOS CON INDOLOQUINOLICIDINA.....	202
2.1. Síntesis de indoloquinolicidinas y derivados.....	202
2.1.1. Síntesis del ácido 1,2,3,4,6,7,12,12b-octahidroindolo[2,3- <i>a</i>]quinolicin-3-carboxílico.....	202
2.1.1.1. Síntesis de bromuro de 1-[2-(indol-3-il)etil]-3-metoxycarbonilpiridinio (65).....	202
2.1.1.2. Obtención del éster metílico del ácido 1-[2-(indol-3-il)etil]-1,4-dihidropiridina-3-carboxílico (66).....	203
2.1.1.3. Síntesis del éster metílico del ácido 1,2,6,7,12,12b-hexahidroindolo[2,3- <i>a</i>]quinolicin-3-carboxílico (67).....	204
2.1.1.4. Síntesis del éster metílico del ácido (3 <i>RS</i> , 12 <i>bRS</i>)-1,2,3,4,6,7,12,12b-octahidroindolo[2,3- <i>a</i>]quinolicin-3-carboxílico	

	(68) y del éster metílico del ácido (3 <i>RS</i> , 12 <i>bSR</i>)-1,2,3,4,6,7,12,12 <i>b</i> -octahidroindolo[2,3- <i>a</i>]quinolicin-3-carboxílico (69).....	205
2.1.1.5.	Obtención del ácido (3 <i>RS</i> , 12 <i>bRS</i>)-1,2,3,4,6,7,12,12 <i>b</i> -octahidroindolo[2,3- <i>a</i>]quinolicin-3-carboxílico (70) y del ácido (3 <i>RS</i> , 12 <i>bSR</i>)-1,2,3,4,6,7,12,12 <i>b</i> -octahidroindolo[2,3- <i>a</i>]quinolicin-3-carboxílico (71).....	207
2.2.	Síntesis de la quimioteca de híbridos indoloquinolicidina y análogos de peptina.....	208
2.2.1.	Diseño de la quimioteca de híbridos indoloquinolicidina y análogos de peptinas.....	208
2.2.2.	Síntesis en solución de los derivados indoloquinolicidina- α -hidroxi- α -malonato.....	209
2.2.3.	Quimioteca de híbridos indoloquinolicidina y análogos de peptinas....	211
2.3.	Síntesis de la quimioteca de híbridos de indoloquinolicidina y precursores lineales de peptinas.....	216
3.	QUIMIOTECA DE HÍBRIDOS CON (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-1-amino-2-indanol.....	220
3.1.	Síntesis de la quimioteca de híbridos (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-1-amino-2-indanol y análogos de peptinas.....	221
3.2.	Síntesis de la quimioteca de híbridos (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptinas.....	226
4.	ENSAYOS BIOLÓGICOS.....	229
4.1.	Quimioteca de análogos de peptinas.....	231
4.2.	Quimioteca de precursores lineales de peptinas.....	233
4.3.	Quimioteca de híbridos indoloquinolicidina y análogos de peptinas.....	235
4.4.	Quimioteca de híbridos indoloquinolicidina y precursores lineales de peptinas.....	240
4.5.	Quimioteca de híbridos (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-1-amino-2-indanol y análogos de peptinas.....	244
4.6.	Quimioteca de híbridos (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptinas.....	246

BIBLIOGRAFÍA.....	248
--------------------------	------------

CONCLUSIONES GENERALES.....	254
------------------------------------	------------

MATERIALES Y MÉTODOS

A.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS.....	259
A.1.1. Disolventes.....	259
A.1.2. Reactivos (síntesis química).....	260
A.2. INSTRUMENTACIÓN.....	261
A.2.1. Instrumentación general.....	261
A.3. TÉCNICAS GENERALES.....	261
A.3.1. Técnicas espectroscópicas.....	261
A.3.1.1. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	261
A.3.1.2. Espectroscopía ultravioleta (UV).....	262
A.3.1.3. Espectroscopía de infrarrojo (IR).....	262

A.3.2. Espectrometría de masas (EM).....	262
A.3.2.1. ESI.....	262
A.3.2.2. MALDI-TOF.....	262
A.3.3. Técnicas cromatográficas.....	263
A.3.3.1. Cromatografía en capa fina (CCF).....	263
A.3.3.2. Cromatografía en columna.....	263
A.3.3.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	263
A.3.4. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de fase normal quiral.....	265
A.4. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	266
A.4.1. Ensayo cualitativo de ninhidrina (Test de Kaiser).....	266
A.4.2. Ensayo cualitativo de cloranilo.....	266
A.4.3. Ensayo cualitativo para la detección de hierro.....	267
A.4.4. Hidrólisis y análisis de aminoácidos.....	267
A.4.4.1. Hidrólisis de péptidos unidos a resina.....	267
A.4.4.2. Hidrólisis de péptidos libres.....	267
A.4.4.3. Análisis por HPLC de muestras hidrolizadas.....	268
A.4.5. Determinación de la funcionalización del soporte polimérico por cuantificación de grupos Fmoc.....	268

PARTE EXPERIMENTAL

PROTOCOLOS GENERALES DE SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA

B.1. CONSIDERACIONES GENERALES.....	270
B.2. SOPORTES POLIMÉRICOS.....	270
B.3. PROTOCOLOS SINTÉTICOS.....	270
B.3.1. Acondicionamiento del soporte polimérico.....	270
B.3.2. Incorporación del patrón interno.....	271
B.3.3. Eliminación del grupo protector Fmoc.....	272
B.3.4. Eliminación del grupo protector Boc.....	273
B.3.5. Incorporación del espaciador bifuncional.....	274
B.3.6. Incorporación del aminoácido al soporte polimérico a través de su cadena lateral.....	275
B.3.7. Protocolo de bloqueo de centros activos de la resina.....	275
B.3.8. Elongación de la cadena peptídica.....	276
B.3.9. Eliminación del grupo protector alilo en fase sólida.....	277
B.3.10. Hidrólisis del éster metílico en fase sólida.....	278

PARTE EXPERIMENTAL CAPÍTULO 1

1. SÍNTESIS DE DERIVADOS PROTEGIDOS DE TRIPTÓFANO.....	279
1.1. Fmoc-(S)-Trp-OAlilo (1).....	279
1.2. Fmoc-(S)-Trp-OMe (2).....	280
2. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 3,4-dihidro-2H-pirano.....	281
2.1. Ácido 4-[(3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxi]benzoico (3).....	281
2.2. N-bencil-4-[(3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxi]benzamida (4).....	281
2.3. N-bencilcarbamato de (3,4-dihidro-2H-2-il)metilo (5).....	282
3. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DEL ENLACE HEMIAMINAL.....	283

3.1.	Acoplamiento en solución.....	283
3.1.1.	Fmoc-(<i>S</i>)-Trp(2-THP)-OAlilo (6).....	283
3.1.1.1.	Síntesis en condiciones de calefacción por microondas.....	283
3.1.1.2.	Síntesis en condiciones de calefacción convencional.....	283
3.1.2.	Fmoc-(<i>S</i>)-Trp(2-THP)-OMe (7).....	284
3.1.2.1.	Síntesis en condiciones de calefacción por microondas.....	284
3.1.2.2.	Síntesis en condiciones de calefacción convencional.....	285
3.1.3.	Éster alílico de N^{α} -{6-[4-(<i>N</i> -bencilcarbamoil)fenoximetil]tetrahidropiran-2-il}- N^{α} -(9-fluorenilmetoxicarbonil)triptófano (8).....	286
3.1.3.1.	Síntesis en condiciones de calefacción por microondas.....	286
3.1.3.2.	Síntesis en condiciones de calefacción convencional.....	286
3.1.4.	Éster metílico de N^{α} -{6-[4-(<i>N</i> -bencilcarbamoil)fenoximetil]tetrahidropiran-2-il}- N^{α} -(9-fluorenilmetoxicarbonil)triptófano (9).....	287
3.1.4.1.	Síntesis en condiciones de calefacción por microondas.....	287
3.1.4.2.	Síntesis en condiciones de calefacción convencional.....	288
3.1.5.	Fmoc-(<i>S</i>)-Trp(Boc)-OMe (10).....	288
3.1.6.	Fmoc-(<i>S, R</i>)-Trp(Boc)-OMe (11).....	289
3.2.	Acoplamiento en fase sólida.....	290
3.2.1.	Síntesis en condiciones de calefacción por microondas.....	290
3.2.1.1.	Unión del triptófano a distintos soportes poliméricos.....	291
3.2.2.	Síntesis en condiciones de calefacción convencional.....	291
3.2.2.1.	Unión del triptófano a distintos soportes poliméricos.....	292
3.2.2.2.	Unión del triptófano al soporte polimérico a distintas temperaturas.....	292
3.2.2.3.	Unión del triptófano al soporte polimérico a distintas concentraciones de PPTS.....	293
3.2.2.4.	Unión del triptófano al soporte polimérico en función del volumen de disolvente (DCE).....	293
3.2.2.5.	Unión del triptófano al soporte polimérico a distintas concentraciones de Fmoc-(<i>S</i>)-Trp-OAlilo (1).....	294
3.2.2.6.	Reproducibilidad de la unión del triptófano al soporte polimérico.....	295
4.	ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DEL TRIPTÓFANO.....	295
4.1.	En disolución.....	295
4.2.	En fase sólida.....	296
5.	APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA A LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS.....	297
5.1.	Brevianamida F (12).....	297
5.1.1.	Síntesis en solución.....	297
5.1.2.	Síntesis en fase sólida.....	298
5.1.2.1.	Preparación del soporte polimérico (13).....	298
5.1.2.2.	Síntesis de la Brevianamida F (12) siguiendo una estrategia convencional en fase sólida: Elongación de la cadena peptídica por el extremo amino.....	299
5.1.2.3.	Estudio de la estabilidad de la Brevianamida F (12) en las condiciones acidolíticas de escisión del soporte polimérico.....	300
5.1.2.3.1.	Ensayo en solución.....	300

5.1.2.3.2. Ensayo en fase sólida.....	300
5.1.2.4. Síntesis de la Brevianamida F (12) elongando la cadena peptídica a través del extremo carboxilo.....	301
5.1.2.5. Estudio de la liberación de la Brevianamida F (12) del soporte polimérico.....	302
5.2. Aproximaciones a la síntesis de la Axinelina B (20).....	303
5.2.1. Estrategia sintética 1.....	303
5.2.1.1. Ensamblaje del péptido sobre la resina.....	303
5.2.1.2. Ensayos de ciclación en fase sólida.....	304
5.2.1.3. Liberación de la cadena peptídica del soporte polimérico.....	305
5.2.2. Estrategia sintética 2.....	307
5.2.2.1. Síntesis de H-(S)-Pro-OAlilo·HCl (19).....	307
5.2.2.2. Ensamblaje del péptido sobre la resina.....	308
5.2.2.3. Estudio de la ciclación en fase sólida.....	308
5.2.2.4. Liberación de la cadena peptídica del soporte polimérico.....	309
5.3. Síntesis del péptido cíclico Unguisina A (23).....	310
5.3.1. Fmoc-(R)-Trp-OAlilo (21).....	310
5.3.2. Síntesis del precursor lineal desprotegido (22) de Unguisina A.....	311
5.3.3. Síntesis del péptido cíclico Unguisina A (23).....	312
5.3.4. Estudio de la liberación de la Unguisina A (23) y su precursor lineal del soporte polimérico.....	313
5.3.4.1. Estudio de la liberación del precursor lineal desprotegido (22).....	313
5.3.4.2. Estudio de la liberación del péptido cíclico Unguisina A (23)....	313
6. SÍNTESIS DE DERIVADOS PROTEGIDOS DE FENILALANINA.....	313
6.1. Fmoc-(S)-Phe(<i>p</i> NO ₂)-OMe (24).....	313
6.2. Fmoc-(S)-Phe(<i>p</i> NH ₂)-OMe (25).....	314
6.3. Fmoc-(S)-Phe(<i>p</i> NO ₂)-OAlilo (26).....	315
6.4. Fmoc-(S)-Phe(<i>p</i> NH ₂)-OAlilo (27).....	316
7. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DEL ENLACE TRIACENO.....	317
7.1. Estudio en solución.....	317
7.1.1. Protocolo experimental de los ensayos realizados.....	317
7.1.2. Síntesis del modelo monomérico (28).....	318
7.2. Estudio en fase sólida.....	318
7.2.1. Formación de la unión triaceno sobre el soporte polimérico comercial piperacinetilpoliestireno.....	318
7.2.1.1. Formación de la sal de diazonio (29).....	319
7.2.1.2. Formación de la unión triaceno.....	319
7.2.2. Formación de la unión triaceno sobre un soporte polimérico comercial funcionalizado con grupos amino.....	320
7.2.2.1. Funcionalización del soporte polimérico.....	320
7.2.2.2. Formación de la sal de diazonio (32).....	321
7.2.2.3. Formación de la unión triaceno.....	322
8. LIBERACIÓN DE LA FENILALANINA DEL SOPORTE POLIMÉRICO.....	322
8.1. En solución.....	322
8.2. En fase sólida.....	322

9.	EL ENLACE TRIACENO COMO UNIÓN QUE NO DEJA TRAZAS: APLICACIÓN A LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS.....	323
9.1.	Fmoc-(S)-Phe-OMe (36).....	324
9.2.	Fmoc-(R)-Phe-OMe (37).....	324
9.3.	Fmoc-Phe-OAlilo (38).....	325
9.4.	Síntesis de péptidos modelo.....	326
9.4.1.	Síntesis de péptidos modificados en el extremo carboxilo.....	326
9.4.1.1.	Síntesis del péptido Ac-AAPF-pNA (39).....	326
9.4.1.2.	Síntesis del péptido Ac-AAPF biotinilado (40).....	327
9.4.1.3.	Síntesis del péptido Endomorfin-2 (41).....	329
9.4.1.4.	Estudio de la racemización.....	330
9.4.1.4.1.	Síntesis del péptido modelo Ac-L-Phe-L-Phe-NH ₂ (42) utilizando la unión triaceno.....	330
9.4.1.4.2.	Síntesis de los péptidos modelo Ac-L-Phe-L-Phe-NH ₂ (42a) y Ac-D-Phe-L-Phe-NH ₂ (42b) utilizando la resina MBHA-PS con el espaciador Rink (Estrategia C).....	331
9.4.2.	Síntesis de péptidos protegidos.....	332
9.4.2.1.	Síntesis de derivados protegidos del péptido Hemorfina-7.....	332
9.4.2.1.1.	Síntesis del derivado protegido (44).....	333
9.4.2.1.2.	Síntesis del derivado protegido (45).....	334
9.4.3.	Síntesis de péptidos cíclicos.....	335
9.4.3.1.	Síntesis de Esquizondroquina B (46).....	335
9.4.3.2.	Síntesis de Unguisina A (23).....	335
10.	EL ENLACE TRIACENO COMO ESPACIADOR MULTIFUNCIONAL: APLICACIÓN A LA SÍNTESIS DEL DEPSIPÉPTIDO ZIGOSPORAMIDA Y DERIVADOS.....	337
10.1.	Estudio de la síntesis de la Zigosporamida.....	337
10.1.1.	Estrategia sintética 1.....	337
10.1.1.1.	Estudio de la ciclación del precursor lineal (47): Formación del enlace éster.....	338
10.1.2.	Estrategia sintética 2.....	339
10.2.	Zigosporamida (52).....	342
10.3.	Estudio de la derivatización de Fmoc-Phe-OAlilo.....	343
10.3.1.	Fmoc-Phe(pOH)-OAlilo (53).....	343
10.3.2.	Fmoc-Phe(pOMe)-OAlilo (54).....	344
10.3.3.	Fmoc-Phe(pN ₃)-OAlilo (55).....	344
10.3.4.	Fmoc-Phe(pl)-OAlilo (56).....	345
10.3.5.	Estudio de la síntesis de Fmoc-Phe(pF)-OAlilo (57).....	346
10.3.5.1.	Ensayos de síntesis de Fmoc-Phe(pF)-OAlilo (57).....	346
10.3.5.2.	Síntesis de Fmoc-Phe(pF)-OAlilo (57).....	347
10.4.	Síntesis de derivados del depsipéptido Zigosporamida.....	348
10.4.1.	Zigosporamida-[Phe ³ (pOH)] (58).....	348
10.4.2.	Zigosporamida-[Phe ³ (pOMe)] (59).....	349
10.4.3.	Zigosporamida-[Phe ³ (pN ₃)] (60).....	350
10.4.4.	Zigosporamida-[Phe ³ (pl)] (61).....	351
10.4.5.	Zigosporamida-[Phe ³ (pF)] (62).....	352

PARTE EXPERIMENTAL CAPÍTULO 2

1. SÍNTESIS DE PRECURSORES DE ANÁLOGOS DE PEPTINAS.....	354
1.1. Ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico (64).....	354
1.1.1. 2-hidroxi-2-metilmalonato de dietilo (63).....	354
1.1.2. Ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico (64).....	354
1.2. Síntesis de indoloquinolicidinas.....	355
1.2.1. Bromuro de 1-[2-(indol-3-il)etil]-3-metoxicarbonilpiridinio (65).....	355
1.2.2. Éster metílico del ácido 1-[2-(indol-3-il)etil]-1,4-dihidropiridina-3-carboxílico (66).....	356
1.2.3. Éster metílico del ácido 1,2,6,7,12,12b-hexahidroindolo[2,3- <i>a</i>]quinolicin-3-carboxílico (67).....	357
1.2.4. Ésteres metílicos de los ácidos (3 <i>RS</i> ,12 <i>bRS</i>)-1,2,3,4,6,7,12,12b-octahidroindolo[2,3- <i>a</i>]quinolicin-3-carboxílico (68) y (3 <i>RS</i> , 12 <i>bSR</i>)-1,2,3,4,6,7,12,12b-octahidroindolo[2,3- <i>a</i>]quinolicin-3-carboxílico (69).....	358
1.2.5. Ácido (3 <i>RS</i> , 12 <i>bRS</i>)-1,2,3,4,6,7,12,12b-octahidroindolo[2,3- <i>a</i>]quinolicin-3-carboxílico (70).....	360
1.2.6. Ácido (3 <i>RS</i> , 12 <i>bSR</i>)-1,2,3,4,6,7,12,12b-octahidroindolo[2,3- <i>a</i>]quinolicin-3-carboxílico (71).....	360
1.3. Unión del α -hidroxi- α -malonato al espaciador.....	361
1.3.1. Síntesis de (72).....	361
1.3.2. Síntesis de (73).....	362
1.4. Unión del α -hidroxi- α -malonato con los derivados de indoloquinolicidina (70) y (71).....	362
1.4.1. Síntesis de (74).....	362
1.4.2. Síntesis de (75).....	363
1.4.3. Hidrólisis de los productos (74) y (75): Obtención de (76) y (77).....	364
1.5. Unión del α -hidroxi- α -malonato con el derivado de (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-1-amino-2-indanol.....	365
1.5.1. Síntesis de (78).....	365
1.5.2. Síntesis de (79).....	366
2. QUIMIOTECA DE ANÁLOGOS DE PEPTINAS.....	366
2.1. Preparación de la aminoacil-resina (33).....	366
2.2. Elongación de la cadena peptídica lineal y ciclación intramolecular.....	367
2.3. Derivatización de la fenilalanina en los análogos de peptinas.....	368
2.3.1. Síntesis de los análogos de peptina no modificados (82) y (83).....	368
2.3.2. Síntesis de los análogos de hidroxipeptinas (84) y (85).....	369
2.3.3. Síntesis de los análogos de metoxipeptinas (86) y (87).....	370
2.3.4. Síntesis de los análogos de yodopeptinas (88) y (89).....	371
2.3.5. Síntesis de los análogos de azidopeptinas (90) y (91).....	372
2.3.6. Síntesis de los análogos de fluoropeptinas (92) y (93).....	372
3. QUIMIOTECA DE PRECURSORES PEPTÍDICOS LINEALES.....	373
3.1. Preparación de la aminoacil-resina (33).....	373
3.2. Elongación de la cadena peptídica.....	374
3.3. Obtención de los precursores peptídicos lineales.....	374
3.3.1. Síntesis del precursor peptídico lineal no modificado (95).....	374
3.3.2. Síntesis del precursor peptídico lineal hidroxilado (96).....	375

3.3.3. Síntesis del precursor peptídico lineal metoxilado (97).....	376
3.3.4. Síntesis del precursor peptídico lineal yodado (98).....	377
3.3.5. Síntesis del precursor peptídico lineal azida (99).....	377
3.3.6. Síntesis del precursor peptídico lineal fluorado (100).....	378
4. QUIMIOTECA DE HÍBRIDOS CON INDOLOQUINOLICIDINA.....	379
4.1. Quimioteca de híbridos indoloquinolicidina-peptina.....	379
4.1.1. Preparación de la aminoacil-resina (33).....	379
4.1.2. Formación del esqueleto de peptina.....	379
4.1.3. Derivatización de la fenilalanina en los híbridos indoloquinolicidina y análogo de peptina.....	381
4.1.3.1. Quimioteca de híbridos indoloquinolicidina (76) y análogo de peptina.....	381
4.1.3.1.1. Síntesis del híbrido no modificado (105).....	381
4.1.3.1.2. Síntesis del híbrido hidroxilado (106).....	381
4.1.3.1.3. Síntesis del híbrido metoxilado (107).....	382
4.1.3.2. Quimioteca de híbridos indoloquinolicidina (77) y análogo de peptina.....	383
4.1.3.2.1. Síntesis de los híbridos no modificados (108) y (109)....	383
4.1.3.2.2. Síntesis del híbrido hidroxilado (110).....	384
4.1.3.2.3. Síntesis de los híbridos metoxilados (111) y (112).....	384
4.2. Quimioteca de híbridos de indoloquinolicidina y precursores peptídicos lineales de peptina.....	385
4.2.1. Preparación de la peptidil-resina (33).....	385
4.2.2. Elongación de la cadena peptídica lineal.....	386
4.2.3. Derivatización de la cadena lateral de la fenilalanina de los híbridos de precursores peptídicos lineales de peptinas con indoloquinolicidina.....	387
4.2.3.1. Quimioteca de híbridos lineales con la indoloquinolicidina (70).....	387
4.2.3.1.1. Síntesis del híbrido no modificado (115).....	387
4.2.3.1.2. Síntesis del híbrido lineal hidroxilado (116).....	387
4.2.3.1.3. Síntesis del híbrido lineal metoxilado (117).....	388
4.2.3.1.4. Síntesis del híbrido lineal fluorado (118).....	389
4.2.3.2. Quimioteca de híbridos lineales con la indoloquinolicidina (71).....	389
4.2.3.2.1. Síntesis del híbrido lineal no modificado (119).....	389
4.2.3.2.2. Síntesis del híbrido lineal hidroxilado (120).....	390
4.2.3.2.3. Síntesis del híbrido lineal metoxilado (121).....	391
4.2.3.2.4. Síntesis del híbrido lineal fluorado (122).....	391
5. SÍNTESIS DE QUIMIOTECAS DE HÍBRIDOS CON (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-1-amino-2-indanol.....	392
5.1. Quimioteca de híbridos (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-1-amino-2-indanol y análogos de peptinas.....	392
5.1.1. Preparación de la peptidil-resina (33).....	392
5.1.2. Elongación de la cadena peptídica lineal y ciclación.....	392
5.1.3. Derivatización de la fenilalanina de los híbridos (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-1-amino-2-indanol y análogos de peptinas.....	394
5.1.3.1. Síntesis de los híbridos no modificados (125) y (126).....	394

5.1.3.2. Síntesis de los híbridos hidroxilados (127) y (128).....	395
5.1.3.3. Síntesis de los híbridos metoxilados (129) y (130).....	396
5.2. Quimioteca de híbridos de (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptinas.....	397
5.2.1. Preparación de la aminoacil-resina (33).....	397
5.2.2. Elongación de la cadena peptídica lineal.....	397
5.2.3. Derivatización de la fenilalanina de los híbridos de (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptinas.....	398
5.2.3.1. Síntesis del híbrido lineal no modificado (132).....	398
5.2.3.2. Síntesis del híbrido lineal hidroxilado (133).....	399
5.2.3.3. Síntesis del híbrido lineal metoxilado (134).....	399
5.2.3.4. Síntesis del híbrido lineal fluorado (135).....	400

INTRODUCCIÓN GENERAL

Tradicionalmente, la industria farmacéutica ha centrado sus esfuerzos en la síntesis y producción de fármacos basados en moléculas pequeñas (típicamente <500 Da). Sin embargo, en los últimos años los péptidos han emergido como potenciales candidatos terapéuticos, destinándose cada vez más recursos para su desarrollo como fármacos.^{1,2,3} Las ventajas que presentan los péptidos como potenciales agentes terapéuticos respecto a las moléculas orgánicas pequeñas son su elevada especificidad hacia las dianas de interés debido a su mayor tamaño y la presencia de un gran número de grupos funcionales en su estructura, lo que se traduce en un incremento del número de interacciones sobre la diana de interés. Esta elevada especificidad da lugar a una potencia de acción más alta y a una reducción de efectos secundarios. Por otra parte, el hecho de que los productos de degradación de los péptidos sean aminoácidos, minimiza los riesgos de toxicidad sistémica. Además, los péptidos poseen una vida media relativamente corta, lo que minimiza su acumulación en los tejidos y, por tanto, el riesgo de complicaciones causadas por sus metabolitos.

La biodisponibilidad y biodistribución de una molécula candidata a ser utilizada como fármaco (incluyendo parámetros como la absorción, transporte, cruce de membranas biológicas y barreras celulares) están determinadas por una combinación de sus propiedades fisicoquímicas como la solubilidad acuosa, lipofilia, la capacidad para formar enlaces de hidrógeno y la estabilidad química y metabólica.⁴ En este sentido, tradicionalmente los péptidos, al estar formados por aminoácidos naturales, se han considerado malos candidatos terapéuticos debido principalmente a su baja biodisponibilidad oral al ser eliminados fácilmente del sistema circulatorio a través del hígado y de los riñones, y a su baja estabilidad metabólica ya que se degradan fácilmente por una gran variedad de enzimas proteolíticas presentes en el sistema digestivo y en el plasma sanguíneo. Además, presentan una capacidad muy baja para atravesar las membranas fisiológicas debido, en general, a su elevada hidrofiliidad. Por otra parte, los péptidos se caracterizan por tener una elevada flexibilidad conformacional, dando lugar en ocasiones a una pérdida de selectividad al provocar interacciones con diferentes receptores (baja biodistribución específica) que causan la activación de diferentes dianas terapéuticas con los consecuentes efectos secundarios

que ello conlleva. Finalmente, los péptidos pueden provocar respuestas inmunogénicas y el coste de su producción es elevado.

Sin embargo, los péptidos tienen ventajas que justifican su estudio como potenciales fármacos, como son una potencia y una selectividad elevadas, poseen un amplio rango de dianas terapéuticas, tienen una baja toxicidad y una reducida acumulación en los tejidos, y poseen una elevada diversidad química y biológica (Tabla 1).

Ventajas	Desventajas
Elevada potencia	Baja estabilidad metabólica
Elevada selectividad	Baja permeabilidad a través de las membranas
Amplio rango de dianas terapéuticas	Baja biodisponibilidad oral
Toxicidad baja comparada con moléculas pequeñas	Elevados costes de producción
Baja acumulación en tejidos	Eliminación rápida
Elevada diversidad química y biológica	En ocasiones, baja solubilidad

Tabla 1. Ventajas y desventajas del uso de péptidos como fármacos

En el desarrollo de péptidos como agentes terapéuticos es necesario optimizar parámetros fundamentales como el efecto biológico, el perfil farmacocinético y una baja inmunogenicidad. Así, desde un punto de vista químico se han contemplado diversas estrategias para obtener buenos candidatos como fármacos, como son la utilización de péptidos cíclicos, pseudo-péptidos (modificación del enlace peptídico) o peptidomiméticos (moléculas no peptídicas que mimetizan las funciones de los péptidos), que mantienen la actividad biológica de los péptidos convencionales e incrementan la resistencia a la degradación y eliminación, la biodisponibilidad y la selectividad. Algunas de las modificaciones químicas más habituales se exponen a continuación:

- **Ciclación.** Usualmente, los péptidos cíclicos muestran mayor actividad biológica comparada con sus correspondientes análogos lineales debido a la rigidez conformacional que confiere la ciclación, lo que reduce el término de entropía

asociada a la energía libre de Gibbs permitiendo incrementar la interacción con la diana terapéutica de interés y, por tanto, la selectividad. Además, se reduce la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno al no disponer de los extremos amino y carboxilo libres y se incrementa la permeabilidad hacia las membranas biológicas debido a una disminución de la hidrofiliidad del péptido. Por otra parte, la ciclación incrementa la estabilidad de los péptidos ya que los hace más resistentes a la hidrólisis por exopeptidasas debido a la ausencia de los extremos amino y carboxilo respecto a los correspondientes análogos lineales, y a la acción de las endopeptidasas a causa de la pérdida de flexibilidad estructural del péptido como consecuencia de la ciclación.^{5,6}

- Sustitución de aminoácidos naturales por otros análogos no naturales como son los D-aminoácidos, *N*-metil- α -aminoácidos, aminoácidos restringidos estructuralmente o β -aminoácidos. Estos aminoácidos incrementan la estabilidad de los péptidos en plasma (resistencia a endopeptidasas) y la afinidad (actividad) hacia la diana terapéutica.⁷
- Bloqueo de los extremos amino o carboxilo mediante *N*-acilación, *C*-amidación o adición de cadenas de carbohidratos (glicosilación). Estas modificaciones aumentan la estabilidad en plasma de la secuencia peptídica (resistencia a exopeptidasas).
- Incorporación de cadenas de polietilenglicol (PEG). La adición de cadenas de PEG incrementa la estabilidad en plasma al aumentar la resistencia frente a exopeptidasas y reduce la inmunogenicidad. En muchos casos la pegilación también se lleva a cabo con objeto de aumentar el peso molecular del péptido y retardar así su excreción a través de los riñones.⁸
- Sustitución del enlace amida por un enlace éster (depsipéptido) o fosfonamida (-P(=O)OH-NH-), entre otros. Este tipo de modificación incrementa la estabilidad del péptido en plasma, generalmente haciéndolo más resistente frente a la actividad de las endopeptidasas.

Tradicionalmente, los péptidos con propiedades terapéuticas se han obtenido de plantas, animales o humanos (derivados de hormonas peptídicas o de fragmentos de proteínas largas), se han aislado de librerías genéticas o recombinantes, o se han

generado a partir de librerías químicas.^{9,10} Sin embargo, actualmente la síntesis química ofrece la posibilidad de preparar péptidos con una amplia diversidad estructural, constituyendo la mejor vía de acceso a los derivados peptídicos que se han descrito antes. La primera síntesis química de un péptido natural, la oxitocina, fue descrita por du Vigneaud en el año 1953 y supuso el inicio del desarrollo de los péptidos sintéticos como fármacos.¹¹ La síntesis se realizó en solución, con los inconvenientes que ello conllevaba, ya que los intermediarios peptídicos tenían que aislarse, purificarse y caracterizarse en cada etapa. La producción de péptidos por síntesis química en solución inicialmente tuvo una relativa baja aceptación debido, principalmente, a que se requerían tiempos largos y los costes de producción asociados eran muy elevados, lo que limitaba la competencia con los fármacos que ya se encontraban en el mercado. Por esta razón, pocos péptidos terapéuticos producidos por síntesis química llegaron al mercado farmacéutico y la mayoría de los que sí lo hicieron eran péptidos cortos, de longitud inferior a 20 aminoácidos.

Posteriormente, en el año 1963 Robert B. Merrifield introdujo la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS).¹² Este método revolucionó la síntesis química de este tipo de moléculas debido a que permitía obtener los péptidos de manera más sencilla y rápida. Además, el hecho de que esta técnica se pudiera automatizar dio lugar a un incremento del número de péptidos y análogos sintetizados. Un ejemplo de aplicación de la SPPS a gran escala fue el péptido Enfurtivide (T-20 o Fuzeon), donde el método sintético utilizado permitió reducir el coste de su producción en cantidades de multitoneladas.¹³ Desde entonces, la síntesis química a gran escala a través de la SPPS se ha convertido en una técnica muy utilizada para la producción de péptidos de aproximadamente entre 5 y 50 aminoácidos, además de ser la mejor opción respecto a los métodos biotecnológicos de ADN recombinante o biocatálisis para la síntesis de péptidos pequeños.¹⁴ Por lo tanto, la producción de péptidos sintéticos terapéuticos en la industria farmacéutica se ha visto favorecida por el desarrollo de la síntesis en fase sólida.¹⁵

La síntesis en fase sólida convencional basada en la incorporación sucesiva de aminoácidos al soporte polimérico a partir de uno de los extremos de la cadena, permitía sintetizar péptidos con elevados rendimientos y de manera efectiva. No

obstante, en ocasiones era necesario utilizar la SPPS en combinación con la síntesis en solución para poder introducir modificaciones químicas como la ciclación o la introducción de grupos en el extremo carboxilo del péptido, con objeto de mejorar sus propiedades biológicas. Considerando las ventajas de la fase sólida en la síntesis de péptidos, fue necesario desarrollar nuevas metodologías que ampliaran el abanico de posibilidades que la síntesis lineal convencional aportaba. En este sentido, durante los años 90 se desarrolló una nueva estrategia basada en la unión del péptido al soporte polimérico a través de la cadena lateral de uno de los aminoácidos, lo que permitía la introducción de modificaciones químicas en ambos extremos del péptido (tanto amino como carboxilo) y la ciclación de la cadena sobre la matriz polimérica.

El desarrollo de métodos basados en la unión de un aminoácido a la resina a través de su cadena lateral se ha centrado, en general, en utilizar aminoácidos trifuncionales con grupos en la cadena lateral fácilmente modificables de forma reversible (carboxilo, amino, hidroxilo, tiol). Sin embargo, esta estrategia ha sido poco explorada en el caso de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina o el triptófano.

El triptófano se ha convertido en foco de atención en el ámbito de la química bioorgánica gracias a las propiedades químicas y estructurales de su cadena lateral indólica. Así, el triptófano suele jugar un papel crucial en la función biológica de las proteínas que lo contienen, dado que el sistema indólico da lugar a diferentes tipos de interacciones como pueden ser hidrofóbicas,^{16, 17} π -catiónicas,¹⁸ de empaquetamiento con otros residuos aromáticos (interacciones *ring-stacking* o *edge-to-face*)¹⁹ o formación de puentes de hidrógeno.²⁰ Por otro lado, el triptófano es un precursor biosintético y sintético de sistemas heterocíclicos más complejos con propiedades biológicas relevantes.^{21, 22} Así, el carácter multifuncional del triptófano lo convierte en un sustrato diana para llevar a cabo transformaciones sintéticas en busca de compuestos para aplicaciones terapéuticas.^{23, 24} En este sentido, el desarrollo de estrategias sintéticas que conlleven la unión del aminoácido a través de su cadena lateral a un soporte sólido son potencialmente atractivas, ya que ello permitiría llevar a cabo modificaciones químicas en distintas posiciones del esqueleto para, de esta manera, acceder a nuevos derivados peptídicos como péptidos cíclicos o péptidos

modificados en el extremo carboxilo, o estructuras no peptídicas como derivados heterocíclicos a partir de modificaciones del sistema indólico.

Por lo que respecta a la fenilalanina, ésta es uno de los residuos habituales en el diseño de peptidomiméticos cuando las dianas biológicas presentan sitios de unión hidrofóbicos, debido a la naturaleza poco polar de su cadena lateral y a las restricciones estéricas que ésta genera.^{25, 26, 27} Un ejemplo de ello es el hecho de que muchas aspartil-proteasas (proteasa VIH, renina, catepsina D y E) para las que se han estudiado sustratos específicos, tienen preferencia por aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas en la posición P1.²⁸ La mayoría de inhibidores de la proteasa VIH en el mercado o en fases clínicas contienen fenilalanina u otros grupos hidrofóbicos y voluminosos en la posición P1. Por otra parte, este aminoácido se encuentra formando parte también de la estructura de algunos péptidos cíclicos pequeños, como son la Sansalvamida A²⁹ y la Cilengitida,³⁰ cuyas actividades como potenciales antitumorales se está evaluando actualmente. En este sentido, la fenilalanina se considera como un farmacóforo clave en muchas moléculas de naturaleza peptídica biológicamente importantes.

La presente Tesis doctoral se ha centrado en el desarrollo de nuevas metodologías sintéticas que implican la unión de estos dos aminoácidos, triptófano y fenilalanina, a soportes poliméricos a través de sus cadenas laterales y su aplicación a la síntesis de péptidos modificados, tanto lineales como cíclicos. Como ejemplo relevante desde un punto de vista biológico, se ha abordado la preparación de derivados de peptinas, tripéptidos de estructura tricíclica compleja que forman parte del núcleo de las ergopeptinas, moléculas con un amplio espectro de propiedades biológicas relacionadas con receptores de la proteína G.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Kaspar, A. A.; Reichert, J.M. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discovery Today*, **2013**, *18*, 807-817.
- ² Uhlig, T.; Kyprianou, T.; Martinelli F. G.; Oppici, C. A.; Heiligers, D.; Hills, D.; Ribes, X.; Verhaert, P. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EuPa Open Proteomics*, **2014**, *4*, 58-69.
- ³ Fosgerau, K.; Hoffmann, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, **2015**, *20*, 122-128.
- ⁴ Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatsky, M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today*, **2010**, *15*, 40-56.
- ⁵ Joo, S. H. Cyclic Peptides as Therapeutic Agents and Biochemical Tools. *Biomol. Ther.*, **2012**, *20*, 19-26.
- ⁶ Thapa, P.; Espiritu, M. J.; Cabalteja, C.; Bingham, J. The Emergence of Cyclic Peptides: The Potential of Bioengineered Peptide Drugs. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **2014**, *20*, 545-551.
- ⁷ Liebmann, C.; Szucs, M.; Neubert, K.; Hartrodt, B.; Arold, H.; Barth, A. Opiate receptor-binding affinities of some D-amino-acid substituted beta-casomorphin analogs. *Peptides*, **1986**, *7*, 195-199.
- ⁸ Hamley, I. W. PEG-Peptide Conjugates. *Biomacromolecules*, **2014**, *15*, 1543-1559.
- ⁹ Latham, P. W. Therapeutic peptides revisited. *Nat. Biotechnol.*, **1999**, *17*, 755-757.
- ¹⁰ Sato, A. K.; Viswanathan, M.; Kent, R. B.; Wood, C. R. Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2006**, *17*, 638-642.
- ¹¹ Du Vigneaud, V.; Ressler, C.; Swan, J.M.; Roberts, C.W.; Katsoyannis, P.G.; Gordon, S. The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, *75*, 4879-4880.
- ¹² Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149-2154.
- ¹³ Bray, B. L. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2003**, *2*, 587-593.

-
- ¹⁴ Amblard, M.; Fehrentz, J.A.; Martinez, J.; Subra, G. *Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. Mol. Biotechnol.*, **2006**, *33*, 239-254.
- ¹⁵ Bruckdorfer, T.; Marder, O.; Albericio, F. From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2004**, *5*, 29-43.
- ¹⁶ Mant, C. T.; Kovacs, J. M.; Kim, H. M.; Pollock, D. D.; Hodges, R. S. Intrinsic amino acid side-chain hydrophilicity/hydrophobicity coefficients determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography of model peptides: comparison with other hydrophilicity/hydrophobicity scales. *Biopolymers*, **2009**, *92*, 573-595.
- ¹⁷ Samanta, U.; Pal, D.; Chakrabarti, P. Environment of tryptophan side chains in proteins. *Proteins*, **2000**, *38*, 288-300.
- ¹⁸ Ma, J. C.; Dougherty, D. A. The Cation- π Interaction. *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 1303-1324.
- ¹⁹ Samanta, U.; Pal, D.; Chakrabarti, P. Packing of aromatic rings against tryptophan residues in proteins. *Acta Crystallogr., Sect. D Biol. Crystallogr.*, **1999**, *D55*, 1421-1427.
- ²⁰ Black, K. M.; Clark-Lewis, I.; Wallace, C. J. A. Conserved tryptophan in cytochrome c: importance of the unique side-chain features of the indole moiety. *Biochem. J.*, **2001**, *359*, 715-720.
- ²¹ Ruiz-Sanchis, P.; Savina Svetlana, A.; Albericio, F.; Alvarez, M. Structure, Bioactivity and Synthesis of Natural Products with Hexahydropyrrolo[2,3-b]indole. *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 1388-1408.
- ²² de Sa Alves, F. R.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. From nature to drug discovery: the indole scaffold as a 'privileged structure'. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2009**, *9*, 782-793.
- ²³ Gordon, E. M. *Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity in Drug Discovery*; Gordon, E. M. Kerwin, J. F., Jr., Eds.; Wiley-Liss, New York, 1998.
- ²⁴ Sawyer, T. K. *Structure Based Drug Design: Disease, Targets, Techniques and Development*; Veerapandian, P., Eds.; Marcel Dekker, New York, 1997.
- ²⁵ Roush, W. R.; González, F. V.; McKerrow, J. H.; Hansell, E. Design and Synthesis of Dipeptidyl α' , β' -Epoxy Ketones, Potent Irreversible Inhibitors of the Cysteine Protease Cruzain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 2809-2812.

- ²⁶ Fink, C. A.; Carlson, J. E.; Boehm, C.; McTaggart, P.; Qiao, Y.; Doughty, J.; Ganu, V.; Melton, R.; Goldberg, R. Design and Synthesis of Thiol Containing Inhibitors of Matrix Metalloproteinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 195-200.
- ²⁷ Garrett, G. S.; McPhail, S. J.; Tornheim, K.; Correa, P. E.; McIver, J. M. Synthesis of Potent and Selective Inhibitors of Human Plasma Kallikrein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 301-306.
- ²⁸ Lee, Y.; Silverman, R. B. Efficient Solid-Phase Synthesis of Compounds Containing Phenylalanine and Its Derivatives via Side-Chain Attachment to the Polymer Support. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 8407-8408.
- ²⁹ Liu, S.; Yang, Y.; Zhao, C.; Huang, J.; Han, C.; Han, J. Effect of the 4'-substituted phenylalanine moiety of sansalvamide A peptide on antitumor activity. *Med. Chem. Commun.*, **2014**, *5*, 463-467.
- ³⁰ Reardon, D. A.; Cheresch, D. Cilengitide: A Prototypic Integrin Inhibitor for the Treatment of Glioblastoma and Other Malignancies. *Genes & Cancer*, **2011**, *2*, 1159-1165.

CAPÍTULO 1

**DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS EN FASE SÓLIDA QUE
IMPLICAN LA UNIÓN DE UN AMINOÁCIDO AL SOPORTE POLIMÉRICO A
TRAVÉS DE SU CADENA LATERAL**

Publicaciones :

- Torres-García, C.; Díaz, M.; Blasi, D.; Farràs, I.; Fernández, I.; Ariza, X.; Farràs, J.; Lloyd-Williams, P.; Royo, M.; Nicolás, E. Side chain anchoring of tryptophan to solid supports using a dihydropyranil handle: synthesis of Brevianamide F. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **2012**, *18*, 7-19.
- Preciado, S.; Mendive-Tapia, L.; Torres-García, C.; Zamudio-Vázquez, R.; Soto-Cerrato, V.; Pérez-Tomás, R.; Albericio, F.; Nicolás, E.; Lavilla, R. Synthesis and biological evaluation of a post-synthetically modified Trp-based diketopiperazine. *MedChemComm.*, **2013**, *4*, 1171-1174.
- Torres-García, C.; Pulido, D.; Carceller, M.; Ramos, I.; Royo, M.; Nicolás, E. Solid-phase synthesis of phenylalanine containing peptides using a traceless triazene linker. *J. Org. Chem.*, **2012**, *77*, 9852-9858.
- Torres-García, C.; Pulido, D.; Albericio, F.; Royo, M.; Nicolás, E. Triazene as a powerful tool for solid-phase derivatization of phenylalanine containing peptides: Zygosporamide analogues as a proof of concept. *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, 11409-11415.

INTRODUCCIÓN

1. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) introducida por Robert B. Merrifield en el año 1963,¹ se ha convertido en la forma más habitual y sencilla de obtener péptidos en el laboratorio. Este método se basa en hacer crecer la cadena peptídica uniendo el primer aminoácido a un soporte insoluble a través de un enlace éster o amida, e incorporando el resto de aminoácidos de forma secuencial.

La unión del primer aminoácido a la resina se puede llevar a cabo de diversas maneras teniendo en cuenta el hecho de que todos los péptidos presentan cuatro grupos funcionales en su estructura (Figura 1):

1. Unión a través del extremo carboxilo (estrategia convencional, $C \rightarrow N$).² Esta metodología se basa en hacer crecer la cadena peptídica a partir del extremo amino, uniendo el primer aminoácido a la resina a través de su extremo carboxilo. En este caso, los aminoácidos que se incorporan secuencialmente a la cadena peptídica deben estar protegidos de forma ortogonal y también en la cadena lateral si está funcionalizada. Habitualmente, esta es la estrategia más utilizada en la síntesis de péptidos en fase sólida.
2. Unión a través del extremo amino (estrategia $N \rightarrow C$).³ En esta estrategia es el grupo α -amino del aminoácido el que queda unido al soporte polimérico, de manera que el crecimiento de la cadena peptídica se lleva a cabo a través del extremo carboxilo. Así, los aminoácidos que se incorporan deben estar protegidos ortogonalmente en dicho extremo y en la cadena lateral si está funcionalizada. El uso de esta metodología es limitado debido, por una parte, a la dificultad de encontrar grupos protectores para el extremo carboxilo de los aminoácidos compatibles con la estrategia sintética y, por otra, al mayor grado de epimerización en los acoplamientos.
3. Unión a través del esqueleto peptídico.^{4,5} En este caso, el primer aminoácido se une a través de su extremo amino a la resina y, sobre este mismo extremo, se

incorpora el segundo aminoácido, de forma que la elongación de la cadena peptídica tiene lugar en la dirección $C \rightarrow N$. Esta estrategia se puede utilizar para obtener péptidos modificados en el extremo carboxilo cuando el aminoácido en esta posición no es trifuncional y no se dispone de otro punto de unión a la resina.

- Unión a través de la cadena lateral de un aminoácido.⁶ Esta metodología permite la modificación del péptido, mientras está unido al soporte sólido, tanto a través del extremo amino (durante el proceso de elongación del péptido) como del extremo carboxilo. Así, se pueden obtener péptidos modificados en el extremo carboxilo o péptidos cíclicos en fase sólida. Debido a la simplicidad del método, su uso es más habitual que la estrategia 3.

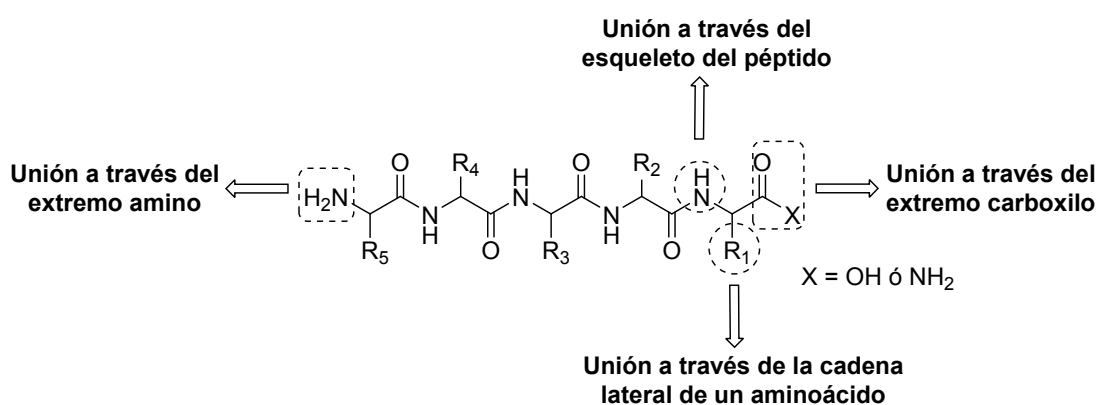


Figura 1. Modos de unión de un péptido al soporte polimérico

Una vez unido el primer aminoácido al soporte polimérico, el crecimiento de la cadena peptídica de interés se realiza incorporando secuencialmente el resto de aminoácidos mediante la utilización de agentes deshidratantes que permiten la formación del enlace amida entre aminoácidos en condiciones suaves, en un tiempo relativamente corto y con unos rendimientos químicos excelentes.

Un aspecto muy importante a tener en cuenta en la síntesis de péptidos es la gran diversidad funcional de los aminoácidos, por ello se requiere el uso de esquemas de protección adecuados que eviten la formación de subproductos y disminuyan, por tanto, el rendimiento de síntesis. La naturaleza de los grupos protectores depende del tipo de grupo funcional de la cadena lateral del aminoácido y del tipo de estrategia que se utilice para la síntesis, ya que deben de ser estables a los tratamientos repetitivos

de eliminación de otros grupos protectores temporales y a las condiciones de formación del enlace amida.

Una vez se ha obtenido el péptido de interés unido al soporte polimérico, se realiza la liberación de éste en unas condiciones que dependen del tipo de unión del péptido a la resina. Normalmente, los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos se seleccionan de tal manera que puedan eliminarse simultáneamente con la escisión del péptido del soporte polimérico.

La síntesis en fase sólida, de péptidos o de otras moléculas orgánicas, presenta diversas ventajas respecto a la síntesis en solución, entre las cuales destacan:

- Permite obtener rendimientos elevados o cuantitativos debido al hecho de poder trabajar con excesos de reactivos.
- El exceso de reactivos y de posibles subproductos solubles formados durante la síntesis se pueden eliminar fácilmente por filtración y lavados de la resina con diversos disolventes.
- No es necesaria la purificación de los intermedios que se obtienen en las diferentes etapas de la síntesis.
- El proceso se puede automatizar.
- Se puede adaptar fácilmente a estrategias combinatorias.

A continuación, se detallan los aspectos más importantes de la SPPS de péptidos, como son: el soporte polimérico, las estrategias de protección, los agentes de acoplamiento y los métodos acidolíticos para llevar a cabo la escisión del péptido del soporte polimérico.

1.1. El soporte polimérico

El soporte polimérico o resina debe tener una serie de propiedades fundamentales para poder utilizarse en SPPS:

- Debe ser mecánicamente resistente, de tal manera que soporte las tensiones mecánicas durante la síntesis.
- Debe ser estable a variaciones de temperatura.

- Los puntos activos del soporte polimérico deben ser accesibles de manera que puedan reaccionar con los reactivos químicos utilizados durante la síntesis.
- Debe tener niveles de funcionalización ($\text{mmol grupos reactivos}\cdot\text{g}^{-1}$ resina) adecuados.
- Las partículas que forman la resina deben tener un tamaño y formas adecuadas que permitan su fácil manipulación y rápida filtración durante la síntesis.
- El soporte polimérico debe ser químicamente inerte a las condiciones utilizadas durante la síntesis y completamente insoluble en los disolventes utilizados.

Se han desarrollado una gran variedad de resinas para la SPPS^{2,7} pero actualmente se utilizan básicamente tres tipos de soportes poliméricos.

- 1. Resinas con base de poliestireno (PS)** reticulado con un 1 % de 1,4-divinilbenceno (DVB) y funcionalizadas o derivatizadas convenientemente. Ejemplos de este tipo de resinas son: la 4-metilbencidrilamina (MBHA),⁸ hidroximetilpoliestireno (HMPS),⁹ cloruro de 2-clorotritilpoliestireno (Cl-Trt)¹⁰ clorometilpoliestireno (resina de Merrifield)¹¹ o aminometilpoliestireno (AM-PS)¹² (Figura 2). Estos soportes poliméricos se solvatan bien en disolventes no polares como el tolueno o el DCM, aunque también se pueden utilizar otros disolventes más polares como DMF, THF o dioxano.

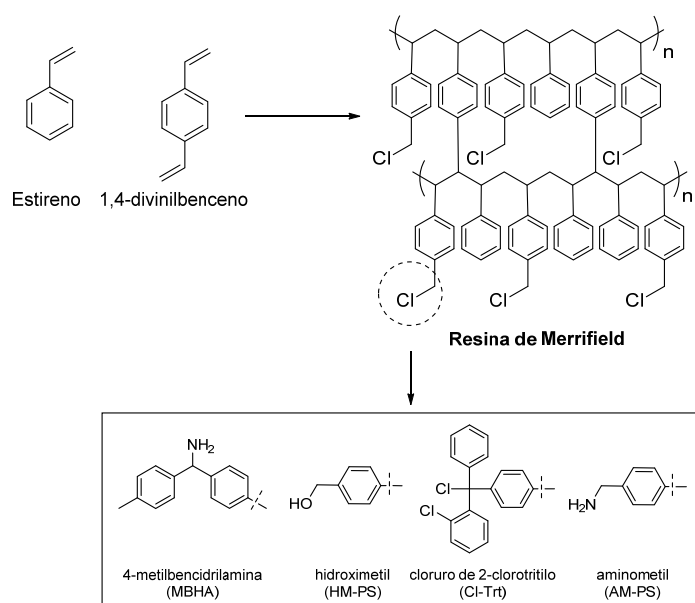


Figura 2. Resinas de poliestireno reticulado con un 1 % de 1,4-divinilbenceno

2. Resinas de poliamida.¹³ Sheppard y colaboradores desarrollaron una resina de poliamida con la intención de aumentar la eficiencia de la síntesis de péptidos por el hecho de que el soporte polimérico fuera químicamente lo más parecido posible a la cadena peptídica. Tanto la resina como la cadena peptídica en construcción se pueden solvatar adecuadamente utilizando disolventes polares apróticos. Este soporte polimérico surgió como alternativa a las resinas de poliestireno. Un ejemplo de este tipo de soporte polimérico es la resina Pepsin® (Figura 3). Las resinas de poliamida se solvatan bien, aumentando 10 veces su volumen respecto a su medida original en disolventes como DMF, H₂O o MeOH, en cambio, se solvatan peor en disolventes como DCM.²

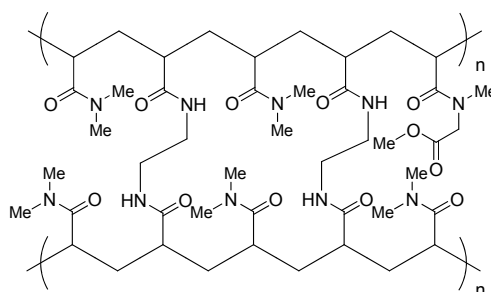


Figura 3. Estructura de la resina de poliamida Pepsin®

3. Resinas con cadenas de polietilenglicol (PEG). Dentro de esta familia de resinas se pueden diferenciar 3 tipos de soportes poliméricos:

- PEG-PS. El desarrollo de este tipo de resinas donde se combina un cuerpo hidrofóbico de poliestireno y cadenas hidrofílicas de PEG sobre el mismo soporte, surgió con objeto de que fueran compatibles tanto en disolventes polares como apolares.¹⁴ Zalipsky, Albericio y Barany (PEG-PS)^{15, 16} y las empresas Bayer y Rapp (TentaGel®)^{17, 18} (Figura 4) desarrollaron las primeras resinas de este tipo.

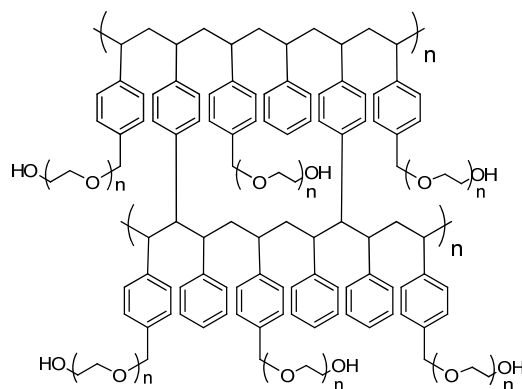


Figura 4. Estructura de la resina TentaGel®

- PEG-acrilamida: Meldal¹⁹ diseñó este tipo de resinas, basadas en la combinación de cadenas de PEG con poliamida. Un ejemplo es la resina PEGA (Figura 5), que se obtiene por la polimerización de bis-aminopropilpolietilenglicol con cloruro de acrililo. Esta resina se solvata bien en una gran variedad de disolventes, tanto polares (H₂O) como apolares (tolueno).

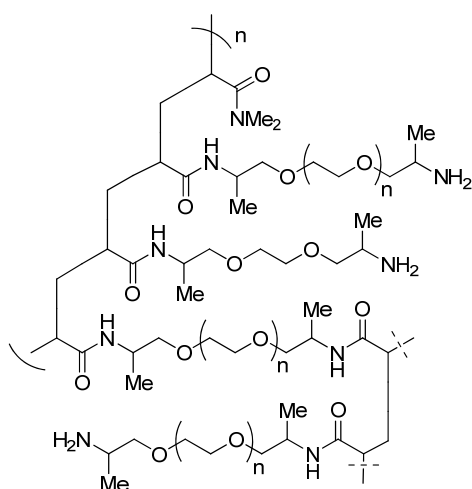


Figura 5. Estructura de la resina PEGA

- Resinas compuestas completamente de PEG (100 % PEG). Los soportes poliméricos basados totalmente en PEG están constituidos principalmente por enlaces de tipo éter, razón por la cual son muy estables químicamente. Côte²⁰ desarrolló la resina ChemMatrix® (Figura 6), la cual debido a su elevada reticulación posee una estabilidad mecánica más elevada respecto a otras resinas de PEG. Este soporte polimérico se solvata bien en la mayor

parte de disolventes y da excelentes resultados en la síntesis de péptidos complejos (con tendencia a formar agregados), péptidos largos y proteínas pequeñas.

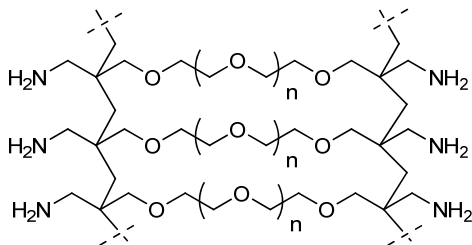


Figura 6. Estructura de la resina ChemMatrix®

Los soportes poliméricos se solvatan en contacto con ciertos disolventes y el hecho de que haya una buena solvatación de la resina es clave para la eficiencia de la síntesis. Además, la resina tiene que estar convenientemente funcionalizada para poder unir el primer aminoácido y el tipo de funcionalización determinará la estrategia sintética a seguir y la naturaleza del extremo carboxilo del péptido.

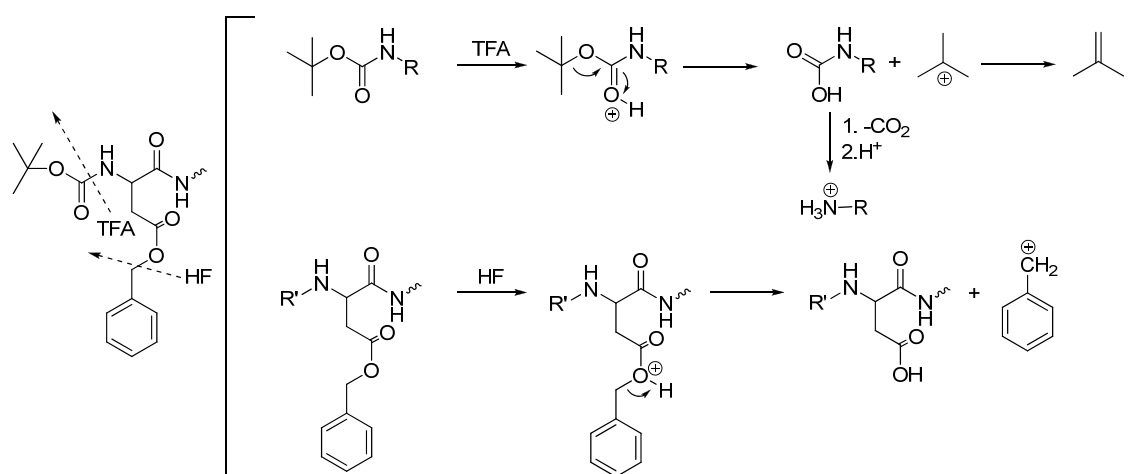
El primer aminoácido se puede unir directamente a la resina funcionalizada, o bien indirectamente a través de un espaciador bifuncional, que se incorpora entre la resina y el primer aminoácido de la secuencia peptídica a sintetizar.^{21, 22}

1.2. Estrategias de protección

Un aspecto muy importante que se debe tener en cuenta en la síntesis de péptidos, es la gran diversidad funcional de los aminoácidos naturales, lo cual exige el uso de esquemas de protección adecuados. En la síntesis en fase sólida convencional, para poder unir un aminoácido a la cadena peptídica en crecimiento es necesario proteger el extremo α -amino del aminoácido. Los grupos protectores más habituales del grupo amino son el grupo *tert*-butoxicarbonil (Boc) y el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc). Este tipo de protección es temporal ya que se elimina sucesivamente durante la síntesis, mientras que los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos son semipermanentes ya que deben permanecer intactos durante la síntesis para evitar posibles reacciones secundarias asociadas con las cadenas laterales de los aminoácidos. Por tanto, un punto clave durante el planteamiento de la síntesis

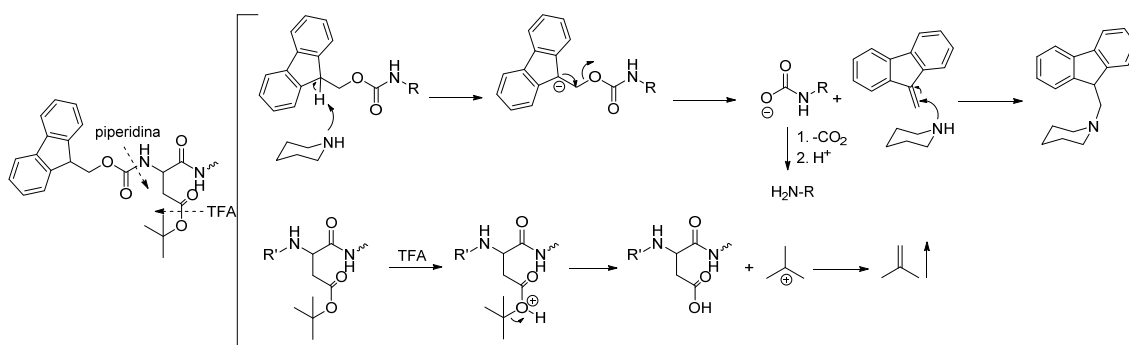
de un péptido es definir la estrategia de protección de los aminoácidos, teniendo en cuenta que los grupos protectores se tienen que poder eliminar bajo condiciones de reacción diferentes, es decir, deben de ser ortogonales o compatibles.

Considerando también los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales se pueden diferenciar dos estrategias de protección: la estrategia Boc/Bzl y la estrategia Fmoc/^tBu. La primera estrategia utiliza el grupo Boc como protector del grupo α-amino de los aminoácidos y es lábil a medio ácido, típicamente se elimina por tratamiento con TFA, mientras que los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos son de tipo bencílico (Bzl) y se eliminan simultáneamente con el desanclaje del péptido de la resina por tratamiento con HF anhidro (Esquema 1).



Esquema 1. Mecanismos de eliminación de los grupos protectores de la estrategia Boc/Bzl

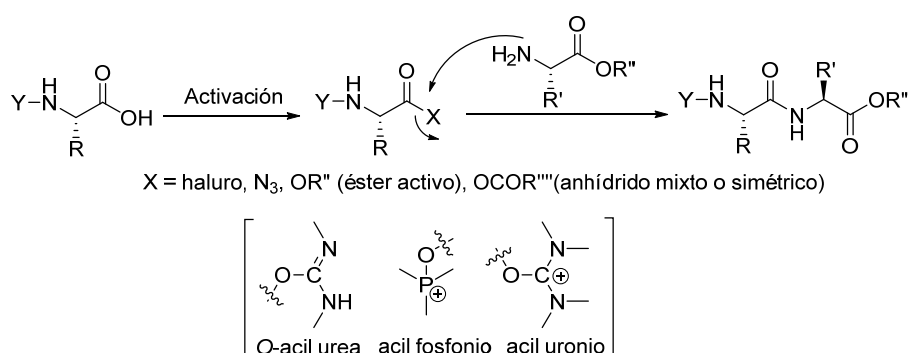
La estrategia Fmoc/^tBu se caracteriza porque el grupo protector del grupo α-amino de los aminoácidos es el Fmoc y es lábil al medio básico, típicamente se elimina por tratamiento con piperidina, mientras que los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos son de tipo *terc*-butilo (^tBu) y se eliminan durante el desanclaje del péptido por tratamiento con TFA (Esquema 2).



Esquema 2. Mecanismos de eliminación de los grupos protectores de la estrategia Fmoc/^tBu

1.3. Elongación de la cadena peptídica: agentes de acoplamiento

La elongación de la cadena peptídica requiere el acoplamiento sucesivo de los aminoácidos hasta completar la secuencia peptídica de interés. Con objeto de obtener un rendimiento prácticamente cuantitativo de formación del enlace amida entre cada uno de los aminoácidos, es imprescindible la activación del grupo α -carboxilo del aminoácido protegido en el extremo amino que se quiere incorporar, seguido del ataque nucleófilo del grupo α -amino libre de la cadena en crecimiento el cual desplaza al grupo saliente del agente activante (Esquema 3).²³ La especie activada puede ser un compuesto estable (un éster activo), un compuesto de estabilidad intermedia (haluro de acilo, acil azida o un anhídrido mixto o simétrico) que puede ser aislado o no, o un intermedio que no puede ser aislado ni detectado (especies intermedias como *O*-acilurea, acil fosfonio o acil uronio) dependiendo del agente activante que se utilice.

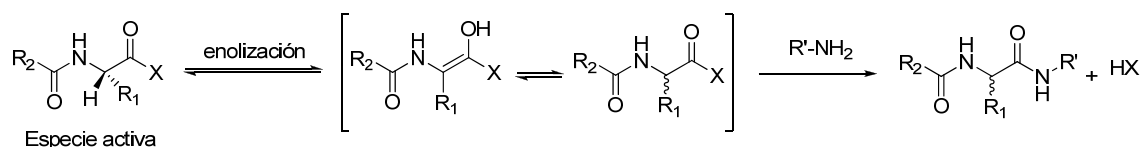


Esquema 3. Activación del extremo α -carboxilo en la formación del enlace peptídico

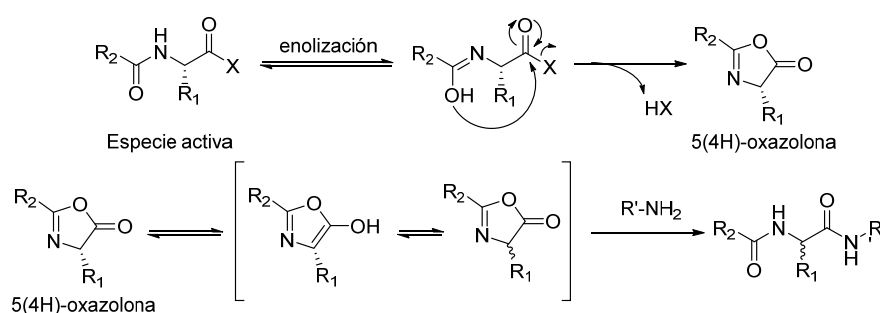
La elección del agente activante del grupo α -carboxilo es importante no sólo para conseguir un acoplamiento cuantitativo sino también para evitar reacciones

secundarias como la racemización asociada a la reacción de activación (Esquema 4 y Esquema 5). En síntesis de péptidos, la racemización puede ser debida a dos factores:²⁴

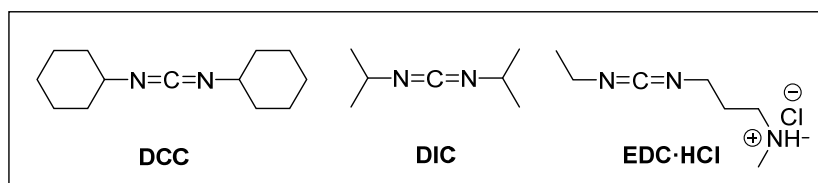
1. La enolización debida al aumento de acidez del H α durante el proceso de activación del grupo α -carboxilo



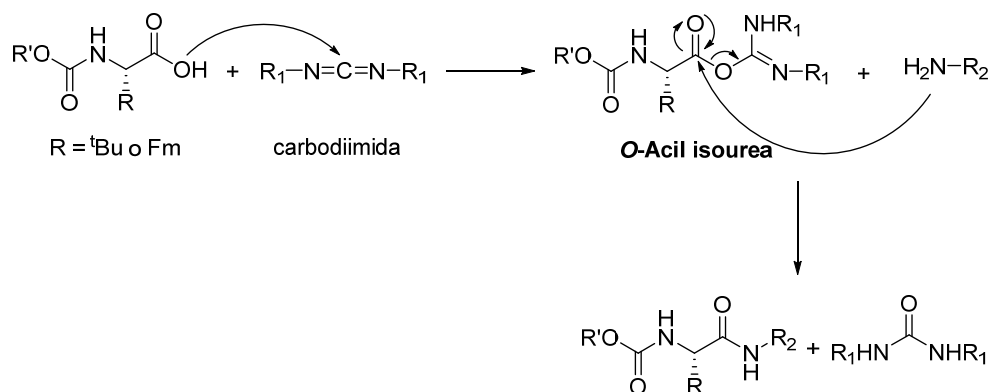
2. La formación de una 5(4H)-oxazolona



Los reactivos más ampliamente utilizados como agentes activantes del grupo α -carboxilo de un aminoácido son las carbodiimidias, entre las cuales destacan la *N,N'*-diclohexilcarbodiimida (DCC),^{25, 26} la *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC)²⁷ y el cloruro de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC·HCl).²⁸ Actualmente, la DIC es la carbodiimida más utilizada en la síntesis de péptidos en fase sólida dado que la urea que genera como subproducto de la reacción es soluble en los disolventes habituales de la síntesis y no precipita, a diferencia de la urea que se obtiene utilizando la DCC. Por otra parte, la EDC·HCl es la carbodiimida más utilizada en la formación de enlaces amida en disolución, dado que la urea que se forma como subproducto de la reacción se puede eliminar fácilmente mediante extracciones en medio ácido acuoso debido a su solubilidad (Esquema 6).



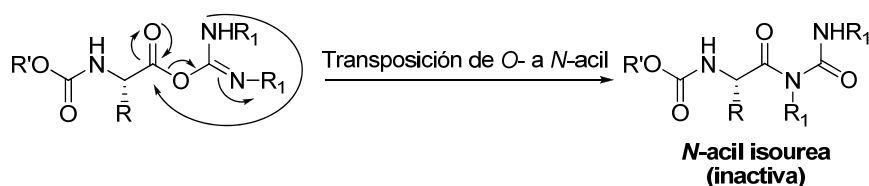
El mecanismo de formación del enlace peptídico mediante el uso de carbodiimidas es el siguiente:



Esquema 6. Mecanismo de acoplamiento en SPPS utilizando carbodiimidas

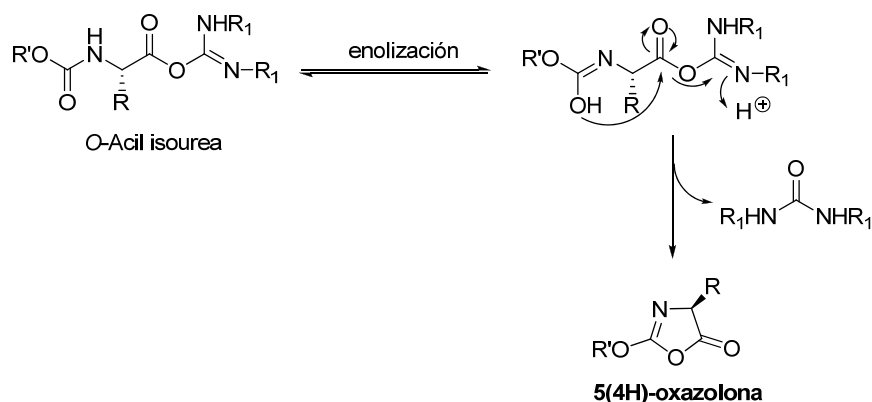
La utilización de carbodiimidas como agentes activantes también puede dar lugar a reacciones secundarias debido a la reactividad del intermedio que se forma, la *O*-acil isourea:

1. Formación de *N*-acil isourea como consecuencia de la transposición de *O*-acil a *N*-acil isourea, que se trata de una especie inactiva. Esta reacción es muy rápida en presencia de DMF.



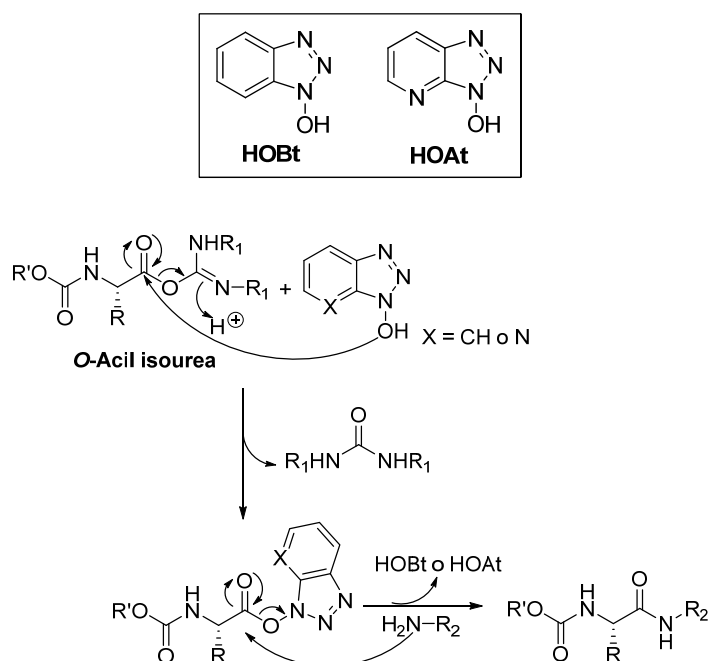
Esquema 7

2. Formación de 5(4H)-oxazolona.



Esquema 8

Con objeto de minimizar estas reacciones secundarias se introducen aditivos en la mezcla de reacción tales como el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt)²⁹ y el 1-hidroxiazabenzotriazol (HOAt).^{30,31} Estos aditivos reaccionan con el intermedio de *O*-acil isourea disminuyendo su reactividad y dando lugar a la formación de un éster activo de HOBt o HOAt (Esquema 9) que minimiza la racemización y acelera la reacción de formación del enlace amida.



Esquema 9. Mecanismo de formación del enlace peptídico utilizando carbodiimidas y aditivos. El HOAt, a diferencia del HOBt, da lugar a la formación de ésteres más activos en términos de rendimiento de acoplamiento y también a un menor grado de

racemización. La explicación de este comportamiento se debe a la presencia del átomo de nitrógeno en la posición 7 del anillo de benzotriazol. Por una parte, considerando el efecto electroatrayente de este átomo da lugar a que el éster intermedio que se forma tenga un mejor grupo saliente lo que se traduce en una mayor reactividad. Por otra parte, la localización específica en la que se encuentra el átomo de nitrógeno permite un efecto de cercanía del grupo adyacente, disminuyendo la posibilidad de racemización y aumentando la reactividad debido a la interacción que se establece (Figura 7).

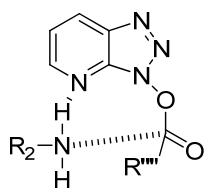


Figura 7. Efecto de cercanía del grupo adyacente

Debido al carácter explosivo de estos aditivos (HOBt y HOAt), El-Faham y Albericio³² han publicado recientemente el uso de la Oxyma[®] como alternativa (Figura 8). La Oxyma[®], además de evitar la racemización, permite obtener acoplamientos con elevada eficiencia, comparables a los obtenidos con HOAt y por tanto, superiores a los que se obtienen con HOBt. Su aplicabilidad se extiende tanto a la síntesis manual como automática.

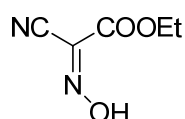


Figura 8. Estructura de 2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato de etilo (Oxyma[®])

Existen otros agentes de acoplamiento utilizados habitualmente en la síntesis de péptidos como alternativa a las carbodiimidas. Entre ellos, se encuentran las sales de fosfonio: BOP,³³ PyBOP,³⁴ HBTU,³⁵ TBTU³⁵ (Figura 9) y de uronio: AOP,³⁶ PyAOP,^{31, 37, 38} HATU,³¹ TATU,³⁹ que son derivados de los aditivos HOBt y HOAt respectivamente y son más reactivos que las carbodiimidas (Figura 10).

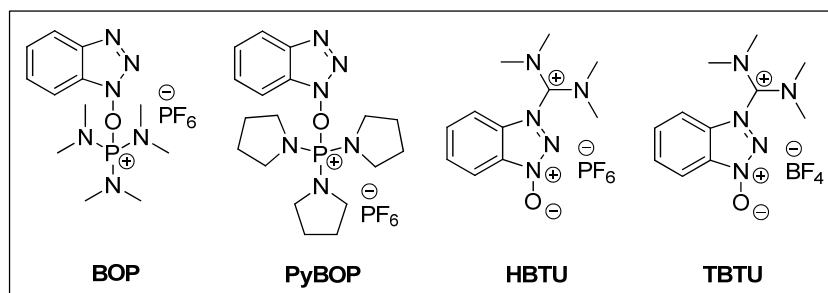


Figura 9. Sales de fosfonio y de uronio derivadas de HOBT

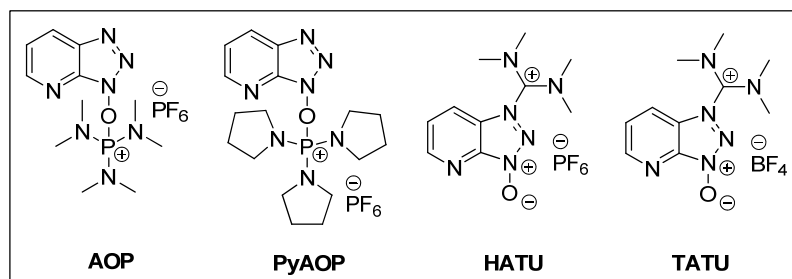
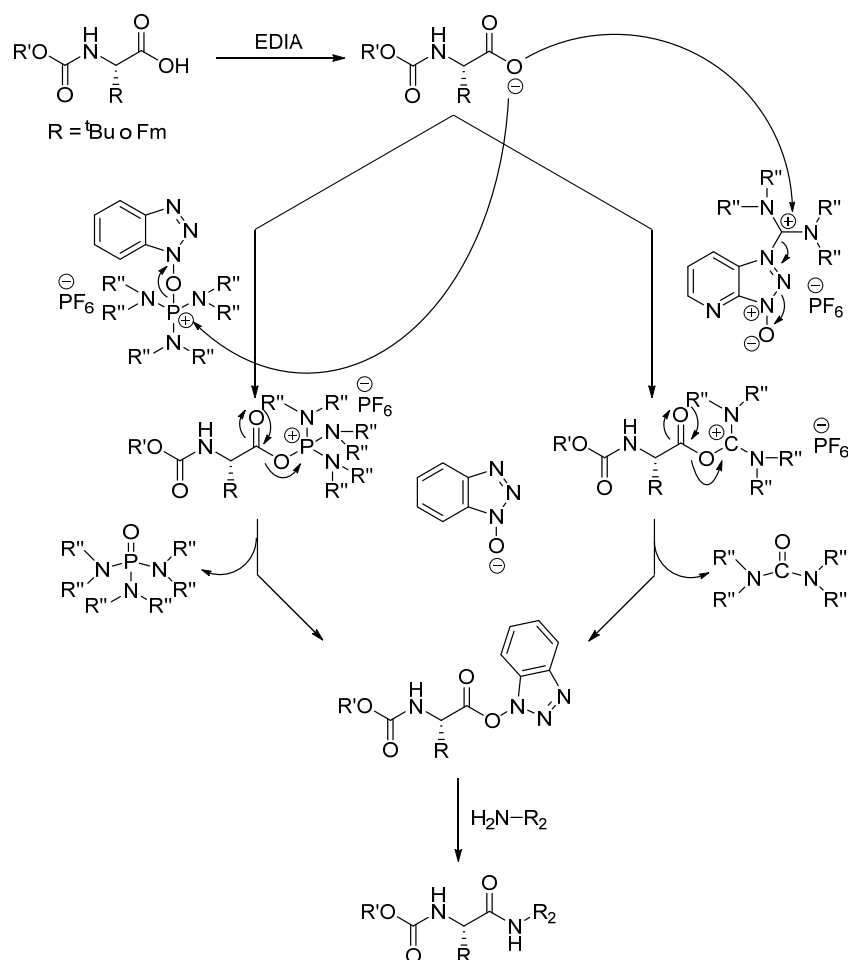


Figura 10. Sales de fosfonio y de uronio derivadas de HOAt

A diferencia de las carbodiimidas, la formación del enlace peptídico utilizando sales de fosfonio y de uronio como agentes de acoplamiento requiere que el aminoácido que se quiere incorporar a la cadena peptídica en crecimiento se encuentre en forma de carboxilato, por ello es necesario el uso de una base en combinación con estos reactivos. Normalmente, se utiliza como base una amina terciaria impedida como la EDIA.

Debido a que este tipo de reactivos incorporan el HOBT o el HOAt en su estructura, éstos actúan como grupos salientes cuando las sales de fosfonio o de uronio reaccionan con el carboxilato del aminoácido que se va a incorporar, dando lugar a una especie activa que reacciona con el grupo amino de la cadena peptídica en crecimiento (Esquema 10).



Esquema 10. Mecanismo de formación del enlace peptídico con sales de fosonio y uronio

1.4. Liberación del péptido de la resina

En muchos casos, la etapa final de liberación del péptido del soporte polimérico es la etapa clave en la síntesis de péptidos en fase sólida. En esta etapa es necesario encontrar unas condiciones adecuadas que permitan liberar el péptido de la resina de forma eficiente y al mismo tiempo mantener su integridad estructural.

Como se ha comentado anteriormente (apartado 1.2), principalmente existen dos estrategias de protección para la síntesis de péptidos en fase sólida: Boc/Bzl y Fmoc/^tBu. La estrategia Boc/Bzl se caracteriza por la utilización de ácidos fuertes para liberar el péptido de la resina, tales como HF anhidro, TFMSA, TMSOTf o HBr, siendo el HF anhidro el método más utilizado actualmente. A escala de laboratorio, este método es muy eficiente debido a que proporciona péptidos de elevada pureza y con rendimientos prácticamente cuantitativos, sin embargo, es difícil de extrapolar su uso

a nivel industrial debido a las limitaciones que presenta el HF. El HF es un líquido volátil (p.eb = 19 °C), extremadamente corrosivo y tóxico, y reacciona rápidamente con el vidrio, por ello para su manipulación se requieren sistemas especiales de PTFE (teflón) y sistemas de vacío y adsorción específicos y muy eficientes.⁴⁰ Todo ello hace que el coste económico del uso de HF sea muy elevado.

Sin embargo en la estrategia Fmoc/^tBu, la utilización de espaciadores bifuncionales adecuados permite utilizar condiciones acidolíticas que normalmente implican el uso de TFA, más manejable que el HF, por este motivo es la estrategia más ampliamente utilizada tanto a escala de laboratorio como a escala industrial.

2. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE PÉPTIDOS LINEALES MODIFICADOS Y CÍCLICOS

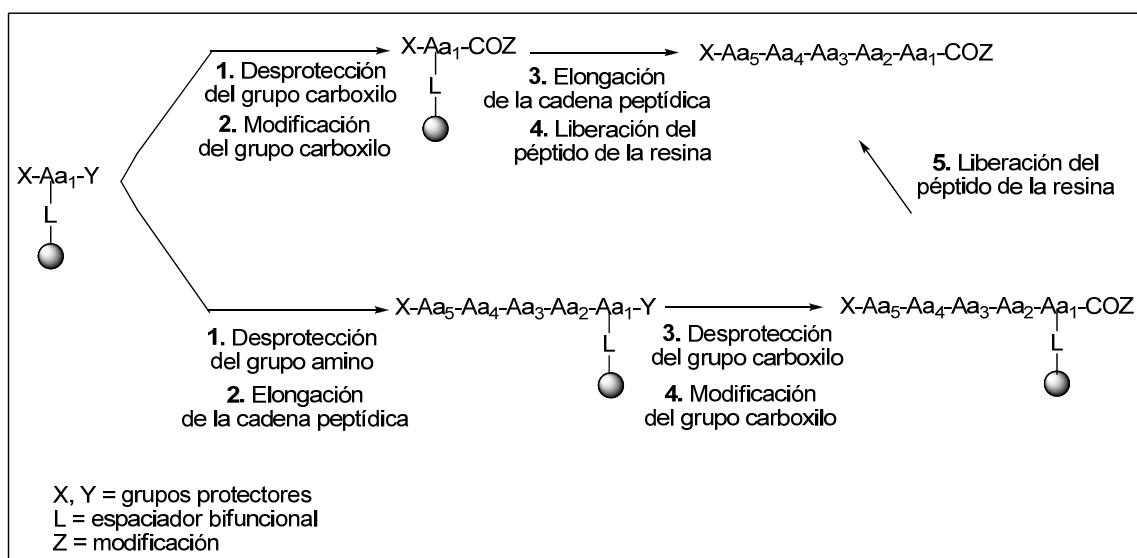
2.1. Péptidos modificados en el extremo carboxilo

Las metodologías sintéticas en fase sólida que permiten obtener péptidos modificados en el extremo carboxilo son limitadas debido a que, normalmente, en la estrategia de síntesis convencional, el primer aminoácido se une al soporte polimérico a través del grupo α -carboxilo.⁴¹ En este sentido, se pueden diferenciar dos tipos de aproximaciones para obtener estos derivados:

- Métodos para la síntesis directa de péptidos con grupos funcionales específicos en el extremo carboxilo. Esta aproximación implica la utilización de espaciadores bifuncionales o soportes poliméricos específicamente diseñados para modificar el extremo α -carboxilo del péptido durante la etapa de desanclaje de la cadena peptídica de la resina. Este tipo de métodos permiten obtener péptidos *N*-alquil amidas, *N*-aril amidas, péptidos con función hidrazida, alcohol ó tioéster, entre otros.
- Métodos de aplicabilidad general donde el extremo carboxilo no constituye el punto de unión del péptido a la resina. Dos metodologías a destacar dentro de este grupo son:
 1. Síntesis de péptidos en fase sólida inversa ($N \rightarrow C$).³
 2. Unión del péptido a la resina a través de la cadena lateral del aminoácido del extremo carboxilo.⁶ Esta aproximación permite obtener péptidos

modificados en el extremo carboxilo siendo posible la incorporación de un gran número de funcionalidades. Existen dos aproximaciones sintéticas distintas:

- Realizar, en primer lugar, la funcionalización del extremo carboxilo y posteriormente continuar con la elongación del péptido y el desanclaje. Una de las ventajas que presenta esta aproximación es la posibilidad de reducir la posible racemización del aminoácido, siempre y cuando esté protegido en el extremo amino con un grupo carbamato.
- Realizar la modificación del extremo carboxilo como último paso de la síntesis antes del desanclaje, una vez se ha elaborado toda la secuencia peptídica. Esta aproximación se lleva a cabo cuando las condiciones experimentales utilizadas en la modificación del extremo carboxilo no son compatibles con la elongación de la cadena peptídica (Esquema 11).

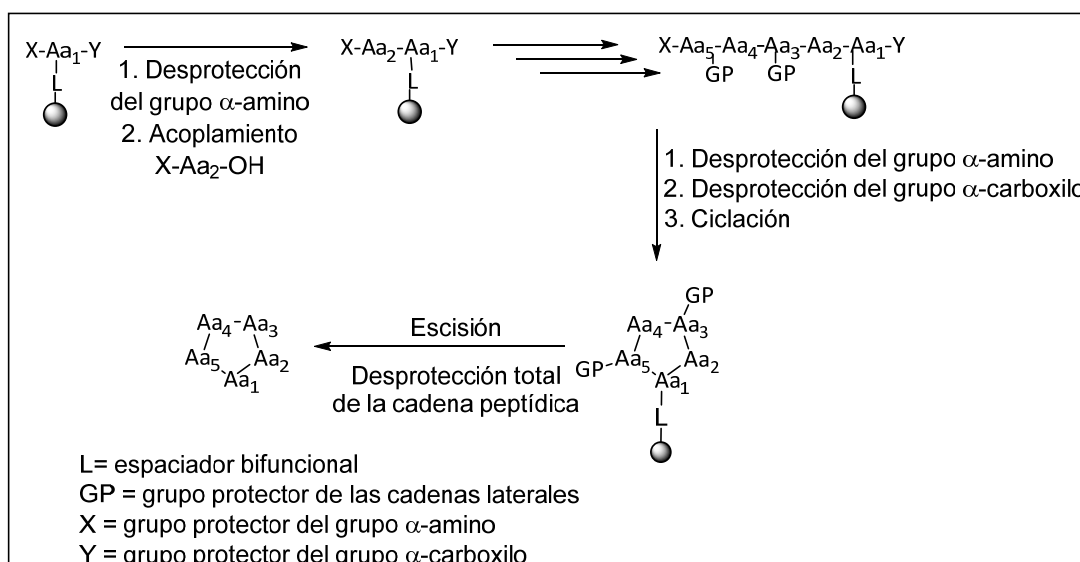


Esquema 11. Aproximaciones sintéticas para unir el péptido a la resina a través de la cadena lateral del aminoácido del extremo carboxilo

2.2. Péptidos cíclicos

Desde un punto de vista sintético, se han desarrollado diversas aproximaciones para preparar péptidos cíclicos, siendo la estrategia en fase sólida la más utilizada.⁴² La etapa clave es la formación del ciclo, proceso donde el esquema de protección

utilizado juega un papel crucial. Los primeros intentos de síntesis contemplaban la formación del anillo en solución en condiciones de alta dilución.^{43, 44} Sin embargo, en la última década se ha explorado la posibilidad de llevar a cabo la ciclación de la cadena peptídica en fase sólida, aprovechando las condiciones de pseudodilución⁴⁵ que se dan dentro de la matriz polimérica para evitar reacciones no deseadas como son los procesos de oligomerización. Normalmente, se mantiene el precursor lineal unido al soporte polimérico a través del enlace amida o éster o a través de la cadena lateral de un aminoácido durante la etapa de ciclación. A continuación, se libera el ciclo al final de la síntesis, a la vez que se lleva a cabo la eliminación de grupos protectores de los aminoácidos trifuncionales, tal y como se muestra en el Esquema 12.



Esquema 12. Ejemplo de ciclación en fase sólida uniendo el aminoácido al soporte polimérico a través de su cadena lateral

3. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE PÉPTIDOS UTILIZANDO LA CADENA LATERAL DE UN AMINOÁCIDO COMO PUNTO DE UNIÓN REVERSIBLE AL SOPORTE POLIMÉRICO

3.1. Introducción

Durante los años 90 se desarrolló una nueva estrategia de síntesis de péptidos en fase sólida basada en la unión reversible de un aminoácido al soporte polimérico a través de su cadena lateral. Esta estrategia puede ser muy útil en los siguientes casos:

1. Minimización de reacciones secundarias.

Algunos aminoácidos cuando se sitúan en el extremo carboxilo de la cadena peptídica en crecimiento pueden dar lugar a reacciones secundarias. Un ejemplo de este tipo de aminoácidos es la cisteína (Cys). La síntesis de péptidos con Cys en esta posición suele venir acompañada de elevados niveles de racemización y de la formación del subproducto *N*-piperidil-Alanina, resultante de una adición de Michael de la piperidina (utilizada para eliminar el grupo Fmoc) sobre un residuo de dehidro-Ala procedente de una β -eliminación del residuo de Cys. En este sentido, Barany y colaboradores demostraron que la unión de la cadena lateral del derivado Fmoc-Cys-O^tBu al soporte sólido a través del espaciador bifuncional xantenilo permitía minimizar las reacciones secundarias anteriormente descritas.^{46,47}

2. **Ciclación en fase sólida.** El hecho de unir un aminoácido al soporte polimérico a través de su cadena lateral permite, tras la elongación del péptido, disponer de los extremos carboxilo y amino libres para llevar a cabo la reacción de ciclación sobre el mismo soporte polimérico.⁴⁸
3. **Modificación del extremo carboxilo.** La disponibilidad del extremo carboxilo libre permite llevar a cabo diversas modificaciones del mismo, potencialmente interesantes desde el punto de vista biológico y químico (formación de tioésteres necesarios para la ligación química, introducción de sondas fluorescentes, péptidos *p*-nitroanilida, entre otros).^{49,50}

3.2. La cadena lateral de un aminoácido como punto de unión al soporte polimérico

En este tipo de metodología la cadena lateral del aminoácido se puede unir directamente al soporte polimérico funcionalizado, o bien indirectamente a través de un espaciador bifuncional que se incorpora entre la resina y el primer aminoácido de la secuencia peptídica a sintetizar. Los espaciadores bifuncionales⁵¹ son moléculas que presentan dos grupos funcionales, uno de los cuales forma un enlace con la resina, estable a las condiciones generales de la síntesis (incluido el desanclaje), y el otro se utiliza para anclar el primer aminoácido mediante un enlace estable a las condiciones

generales de síntesis, pero lábil a las condiciones particulares de liberación del péptido de la resina. Habitualmente, tras la etapa de liberación, el grupo funcional que se utiliza para unir la cadena peptídica al espaciador bifuncional permanece inalterado, obteniéndose así el péptido deseado sin ningún tipo de modificación en ese punto. En este sentido, el espaciador bifuncional actúa como un grupo protector del péptido. En estos casos se dice que el espaciador no deja traza química (*traceless linkers*) (Figura 11).

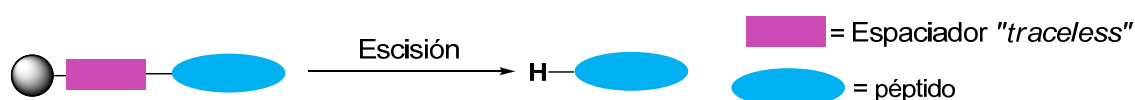
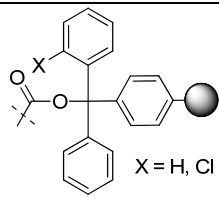
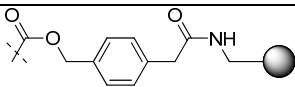
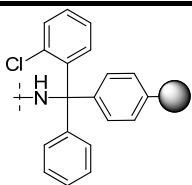
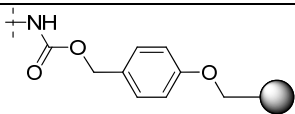
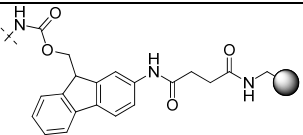
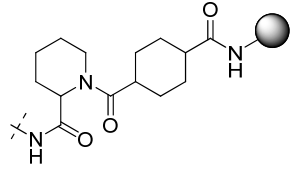
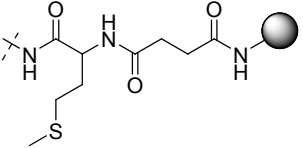


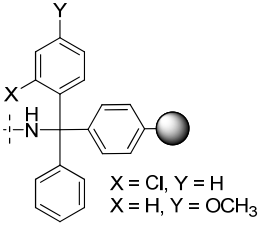
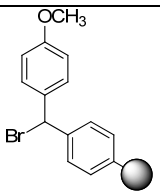
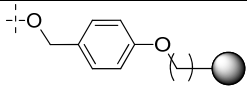
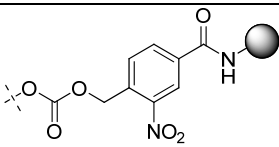
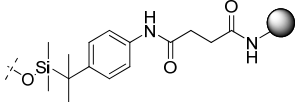
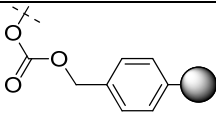
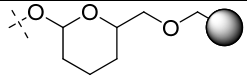
Figura 11. Espaciador que no deja traza (*traceless linkers*)

Este tipo de espaciadores se consideran monofuncionales ya que dan lugar a un único producto tras la etapa de liberación del péptido de la resina.

La unión que se establece entre el aminoácido y la resina o espaciador bifuncional dependerá de la naturaleza de la cadena lateral del residuo en cuestión. En la Tabla 1 se muestran algunos de los tipos de enlace descritos en la literatura.

AA	Resina/Espaciador	Estrategia	Condiciones de escisión
	<p>Espaciador PAL^{52, 53}</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/tioanisol/ β -mercaptoetanol/anisol (90:5:3:2)
Asn/Gln	<p>Resina o espaciador Rink^{54,55}</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/H ₂ O (90:10)
Asp/Glu	<p>Resina o espaciador</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/fenol (95:5)

	<p>Wang⁵⁶</p>  <p>X = H, Cl</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/DCM (2:98)
	<p>Resina cloruro de clorotritilo (CTC)⁵⁷</p>		
	 <p>Resina PAM⁵⁸ (fenilacetamidometil)</p>	Boc/Bzl	HF/anisol/sulfuro de dimetilo (87:8.5:4.5)
	 <p>Resina CTC^{59, 60, 61}</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/DCM (3-5:97-95)
	 <p>Resina Wang⁶²</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/tioanisol/etanditiol/anisol (90:5:3:2)
Lys	 <p>Resina tipo Fluorenilmetil⁶²</p>	Boc/Bzl	Piperidina o morfolina/DMF (20:80)
	 <p>Espaciador piperólico⁶³</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/TIS/H ₂ O (95:2.5:2.5)
	 <p>Espaciador metionina⁶⁴</p>	Fmoc/ ^t Bu Boc/Bzl	CNBr (60 eq) en ACN/AcOH/H ₂ O (50:40:10)

	 <p>X = Cl, Y = H X = H, Y = OCH₃</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/DCM (3-5:97-95)
	Resinas CTC y clorotritilo ^{60, 65}		
		Fmoc/ ^t Bu	TFA/TIS/H ₂ O (95:2.5:2.5)
	Resina bromo-(4- metoxifenil)metil ⁶⁰		
Ser/Thr		Fmoc/ ^t Bu	TFA/TIS/H ₂ O/tioanisol (92.5:2.5:2.5:2.5)
	Resina o espaciador Wang ⁶⁶		
		Boc/Bzl	Fotólisis a 350 nm en TFE/DCM (20:80)
Espaciador carbonato Nbb ^{62, 67}			
		Fmoc/ ^t Bu	TBAF/AcOH (50:50)
Espaciador sililo ⁶⁸			
		Boc/Bzl	HF/anisol (90:10) o TFA/TFMSA/tioanisol/etanditiol/anisol (85:5:5:3:2)
Espaciador carbonato ^{62,67}			
		Fmoc/ ^t Bu	TFA/DCM/EtOH (40:40:20)
Resina Ellman ^{69, 70}			

	<p>Resina CTC⁷¹</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/DCM (3-5:97-95)
Tyr	<p>Resina o espaciador Wang⁷²</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/TIS/H ₂ O/tioanisol (92.5:2.5:2.5:2.5)
	<p>Resina Sasrin⁶⁹</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/TIS/H ₂ O/tioanisol (92.5:2.5:2.5:2.5)
	<p>Espaciador carbonato Nbb⁶⁷</p>	Boc/Bzl	Fotólisis a 350 nm en TFE/DCM (20:80)
Cys	<p>Resina CTC⁷¹</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/DCM (3-5:97-95)
	<p>Espaciador S-Xantenilo⁴⁷</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/DCM/ ⁱ Pr ₃ SiH (0.2:99.3:0.5)
	<p>Espaciador basado en Pmc⁷³</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/H ₂ O (91:9)
Arg	<p>Espaciador</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/DCM (50:50)

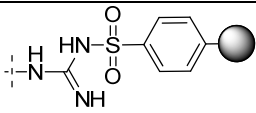
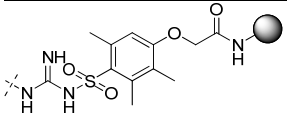
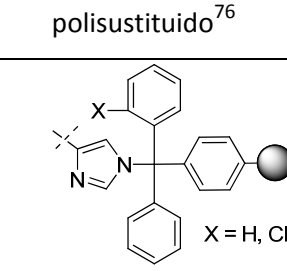
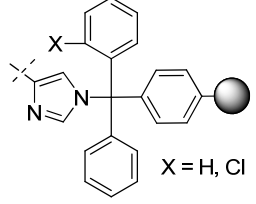
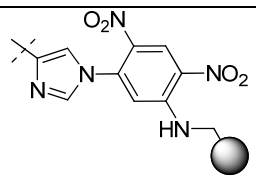
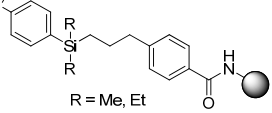
	 <p>Indolilacetilo⁷⁴</p>	Boc/Bzl	HF/anisol (80:20)
	 <p>Resina sulfonilo⁷⁵</p>	Boc/Bzl	1M TMSBr-tioanisol/TFA
	 <p>Espaciador sulfonilo polisustituido⁷⁶</p>	Boc/Bzl	1M TMSBr-tioanisol/TFA
	 <p>Resinas CTC y Trt⁷⁷</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/DCM (3-5:97-95)
His	 <p>Espaciador 2,4-dinitrobenceno⁷⁸</p>	Boc/Bzl	Tiofenol desoxigenado o ditiotretol en DMF
Phe	 <p>Espaciador de Ellman⁷⁹</p>	Fmoc/ ^t Bu	TFA/tioanisol (96:4)

Tabla 1. Ejemplos de unión de los aminoácidos al soporte polimérico a través de sus correspondientes cadenas laterales utilizando diferentes espaciadores bifuncionales

En este contexto, un caso particular de espaciadores bifuncionales son los que permiten obtener un mayor grado de diversidad en la etapa de liberación. Son los llamados espaciadores multifuncionales (Figura 12).

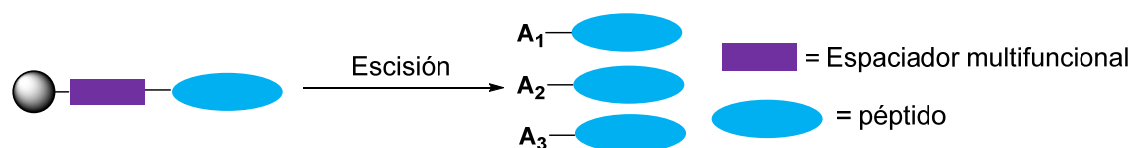


Figura 12. Espaciador multifuncional

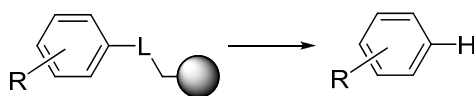
Este tipo de espaciadores resultan interesantes desde el punto de vista de la química combinatoria dado que permiten obtener un gran número de compuestos variando únicamente las condiciones de escisión del péptido del soporte polimérico.

Así, la utilización de un espaciador bifuncional es muy útil ya que permite:

- modificar la función química original del polímero comercial con objeto de poder unir el primer aminoácido a la resina.
- permite introducir, entre la resina y el propio espaciador, un aminoácido (que no forme parte de la secuencia peptídica de interés) que actúe como patrón interno para poder realizar cuantificaciones en las etapas de liberación del péptido de interés si fuera necesario.
- Permite obtener el péptido de interés con diferentes funciones químicas en el extremo carboxilo, como por ejemplo, ácido carboxílico, amida, aldehído, hidrazida, éster, alcohol o tioácido, entre otros.
- Permite obtener péptidos totalmente desprotegidos, o bien con las cadenas laterales protegidas (muy útiles desde el punto de vista de la síntesis convergente) en función del tipo de espaciador bifuncional que se escoja.

3.3. Dos casos particulares de unión entre la cadena lateral de un aminoácido y la resina: los aminoácidos aromáticos triptófano y fenilalanina

Las estrategias basadas en la unión del primer aminoácido a la matriz polimérica a través de su cadena lateral, como se ha comentado, han sido poco exploradas en el caso de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina o el triptófano, si bien los recientes avances que se han producido en el campo de la química en fase sólida han dado lugar a una nueva clase de soportes poliméricos que permiten la unión de moléculas a través de una cadena lateral aromática (Esquema 13).



L = funcionalidad temporal

Esquema 13

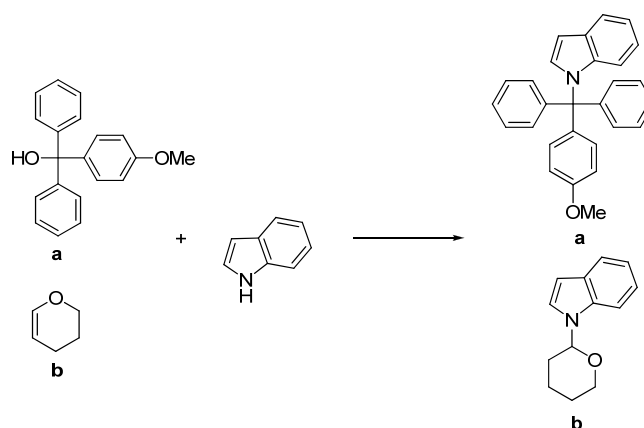
3.3.1. Triptófano: el anillo de indol como punto de unión a la resina

En comparación con el resto de aminoácidos trifuncionales, la vía menos estudiada de unión al soporte sólido por medio de la cadena lateral del aminoácido es la del triptófano.

De hecho, en la literatura sólo se ha descrito la síntesis de un tetrapéptido fosforilado a partir de la unión de Fmoc-Trp-Np (Np = 4-nitroanilida) a una resina clorotritilo a través de la cadena lateral del aminoácido.⁸⁰ Sin embargo, ensayos realizados en nuestro laboratorio con el derivado Fmoc-(S)-Trp-OAlilo utilizando condiciones similares a las descritas, dieron resultados negativos. En este mismo estudio también se consideró la resina comercial hidroxitritilo para unir el triptófano por el sistema indólico dado que ya se había descrito en la literatura la tritilación en solución del indol con buenos rendimientos a partir de trifenilcarbinol. En este caso el aminoácido se unió a la resina con rendimientos de moderados a altos, sin embargo, los rendimientos de desprotección de la cadena lateral del aminoácido fueron bajos.⁸¹

Un buen punto de partida para desarrollar nuevos métodos de unión del triptófano a un soporte insoluble a través del sistema indólico son los antecedentes descritos en la literatura acerca de grupos protectores del anillo de indol lábiles en condiciones ácidas utilizados en la química en solución.

Una de las alternativas *a priori* más interesantes es la utilización de uniones lábiles al medio ácido. En este sentido, se ha descrito la *N*-tritilación del indol en solución a partir de trifenilcarbinol siguiendo un protocolo sencillo y eficiente⁸² (Esquema 14, **a**) y la incorporación de la función tetrahidropiraniolo (THP)^{83, 84, 85} utilizando 1,2-dihidropiraniolo (DHP) (Esquema 14, **b**) como protectores temporales del núcleo indólico.



Esquema 14

Considerando la amplia gama de resinas y espaciadores bifuncionales disponibles en el mercado (Figura 2), las protecciones anteriormente descritas (Esquema 14) pueden extrapolarse a los soportes poliméricos correspondientes para unir de forma similar el triptófano a través del sistema indólico (Figura 13).

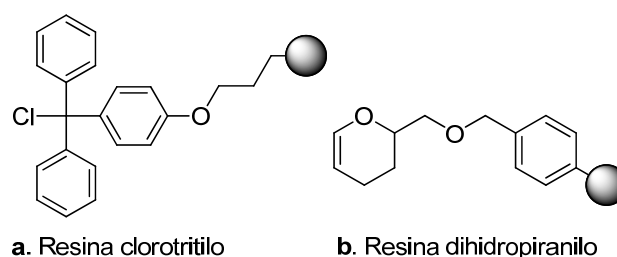
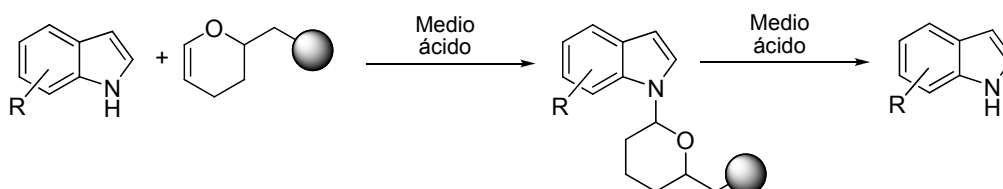


Figura 13

La aproximación que se basa en la utilización de la resina funcionalizada con grupos 3,4-dihidro-2H-piranilo (resina DHP) desarrollada por Ellman y colaboradores,⁸⁶ *a priori* resulta la más viable desde el punto de vista sintético. En este sentido, Smith y colaboradores⁸⁷ han descrito recientemente la incorporación reversible de un derivado indólico a una resina de este tipo (Esquema 15).

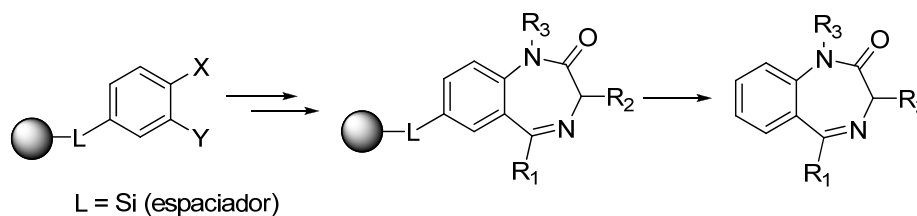


Esquema 15

Dada la reversibilidad demostrada del grupo THP y las condiciones accesibles tanto de introducción como de eliminación, se escogió esta opción para abordar la unión del triptófano a un soporte sólido a través de la cadena lateral.

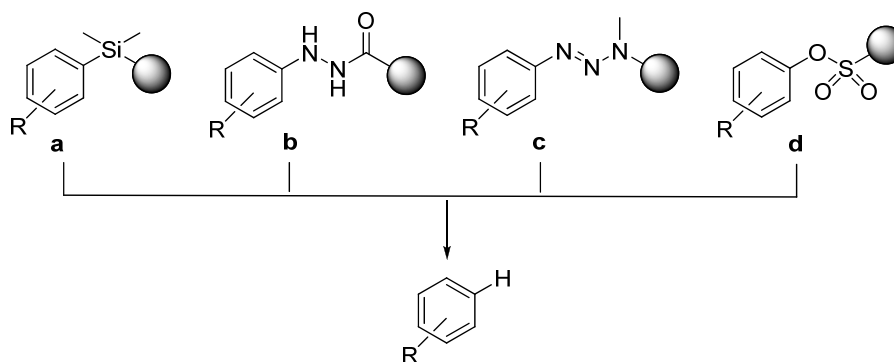
3.3.2. Fenilalanina: el anillo aromático como punto de unión a la resina

La incorporación de la fenilalanina a un soporte polimérico a través de su cadena lateral requiere una estrategia metodológica que implique la funcionalización del anillo aromático, a diferencia del triptófano cuya cadena lateral ya está funcionalizada. En este sentido, una de las estrategias de reciente desarrollo que resultan más interesantes tiene que ver con una nueva clase de soportes poliméricos que permiten la unión de una molécula a través de posiciones no estándar (un anillo aromático) utilizando espaciadores bifuncionales especialmente diseñados para poder liberar el producto final sin dejar ningún tipo de funcionalización aparente que indique el punto de unión entre dicho producto y el polímero.⁸⁸ El primer ejemplo de este tipo de soportes aparecido en la literatura fue descrito por Ellman^{89,90} para la síntesis en fase sólida de 1,4-benzodiazepinas y se basa en la utilización de silicio para unir la molécula a la resina (Esquema 16).



Esquema 16

Desde entonces, la aparición de nuevos soportes poliméricos para unir anillos aromáticos de forma reversible y sin dejar trazas no ha cesado, de tal manera que actualmente se dispone de diversas opciones para utilizar esta estrategia, como pueden ser las uniones con silicio (**a**),⁹⁰ hidrazida (**b**),⁹¹ triaceno (**c**)⁹² o sulfonato (**d**)⁹³ (Esquema 17).



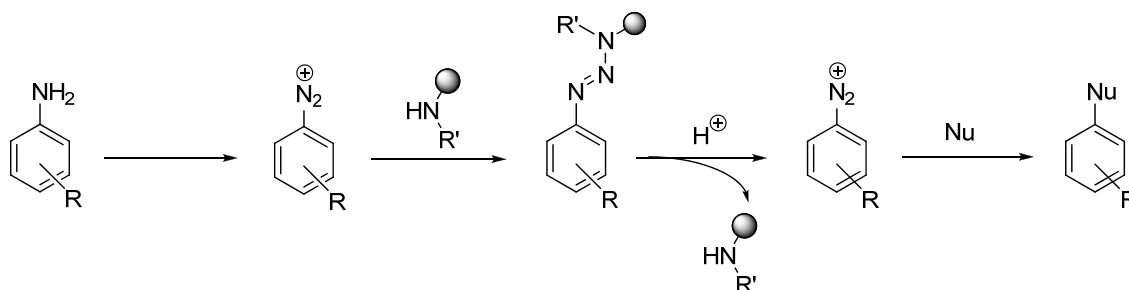
Esquema 17. Modos de unión de la fenilalanina a un soporte polimérico

Los únicos precedentes descritos en la literatura para la síntesis de péptidos que implican la unión de la fenilalanina a través de su cadena lateral son los trabajos de Silverman y colaboradores,^{94, 95} en los que se emplea una estrategia Boc/Bzl, y se limitan al uso de espaciadores de silicio en la preparación de péptidos cíclicos formados por aminoácidos bifuncionales (estrategia **a**, Esquema 17). Las estrategias **b**, **c** y **d** serían, *a priori*, compatibles con la síntesis de péptidos con la estrategia Fmoc/^tBu, ya que las condiciones de liberación de la cadena peptídica del soporte polimérico son ortogonales con las condiciones de desprotección del extremo α -amino y con la elongación de la cadena. Dichas condiciones son un proceso oxidativo suave seguido de tratamiento nucleófilo (estrategia **b**), tratamiento ácido (estrategia **c**) y catálisis de paladio (estrategia **d**).

Sin embargo, de los métodos descritos hasta ahora, la unión triaceno desarrollada por Bräse^{92, 96} para la síntesis de moléculas orgánicas pequeñas es, quizás, la más prometedora por las ventajas que aporta (Esquema 18):

- La función triaceno es fácilmente accesible a partir de sales de diazonio aromáticas.
- Permite la liberación de la molécula diana en condiciones ácidas suaves.
- Tras la síntesis se puede recuperar el soporte polimérico para síntesis posteriores.
- Permite la creación de diversidad estructural y funcional en el anillo aromático. La versatilidad que ofrece la química de las sales de diazonio permite la incorporación de distintos grupos funcionales al anillo aromático al tratar estas sales con diferentes nucleófilos.

- Es una unión muy estable (bases, oxidantes, reductores, complejos de metales de transición), lo que la hace compatible con la utilización de un gran número de grupos protectores.



Esquema 18. Unión de la fenilalanina a través de su cadena lateral a un soporte polimérico mediante un enlace triaceno

Las condiciones suaves empleadas en los métodos de formación y escisión de la función triaceno con la más que probable ausencia de racemización hacen de esta estrategia la más útil potencialmente para ser aplicada a la síntesis peptídica.

OBJETIVOS

Con objeto de desarrollar y validar las estrategias sintéticas que se plantean para la síntesis de péptidos y derivados, basadas en el acoplamiento de triptófano y fenilalanina al soporte polimérico a través de sus cadenas laterales, se plantearon los siguientes objetivos:

- En primer lugar, desarrollar y optimizar la síntesis de los derivados protegidos de triptófano y fenilalanina compatibles con las condiciones sintéticas previsibles para la unión de los mismos al soporte polimérico y la posterior elongación del péptido sobre la resina.
- Estudiar en solución las condiciones óptimas de reacción para las etapas de incorporación y de liberación de los aminoácidos protegidos al soporte polimérico utilizando espaciadores bifuncionales adecuados.
- Aplicar a la fase sólida las condiciones óptimas de reacción establecidas en solución para la unión y liberación de los derivados protegidos de fenilalanina y triptófano.
- Validar las estrategias sintéticas desarrolladas utilizando péptidos modelo de diferente naturaleza química y estructural (tamaño, polaridad, estructura lineal/cíclica).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. LA CADENA LATERAL DEL TRIPTÓFANO COMO PUNTO DE UNIÓN REVERSIBLE AL SOPORTE POLIMÉRICO: EL ENLACE HEMIAMINAL

1.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS PROTEGIDOS DEL TRIPTÓFANO

1.1.1. Introducción

Un aspecto primordial a tener en cuenta a la hora de unir un aminoácido trifuncional a través de su cadena lateral a un soporte insoluble es escoger el esquema de protección adecuado a la estrategia que se va a desarrollar. Así, se deben de proteger convenientemente las funcionalidades α -amino y α -carboxilo del aminoácido. Estos grupos protectores y la unión del triptófano a la resina deben de ser ortogonales entre sí y compatibles, por una parte, con la elongación de la cadena peptídica (donde se acoplan secuencialmente los aminoácidos a través del extremo α -amino de la cadena en crecimiento) y, por otra, compatibles también con la modificación del extremo carboxilo o la ciclación en fase sólida, tal y como se muestra en la Figura 14.

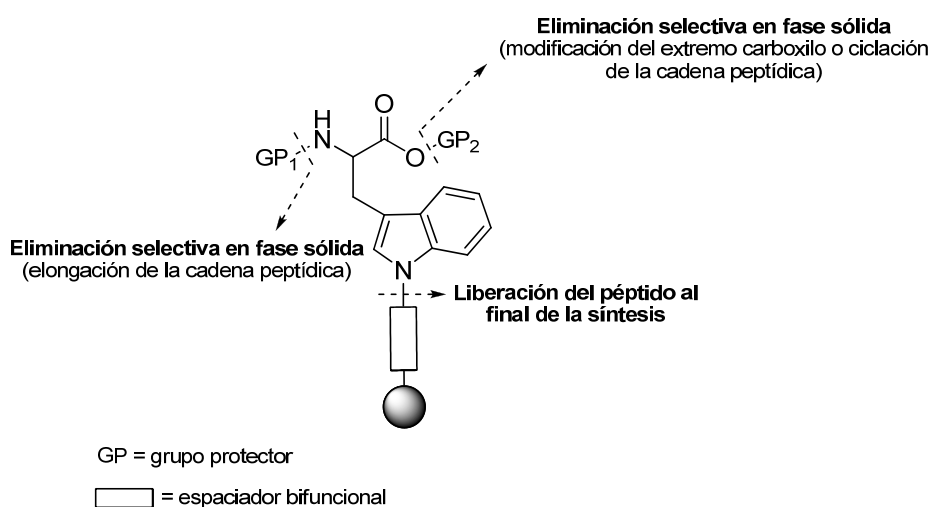


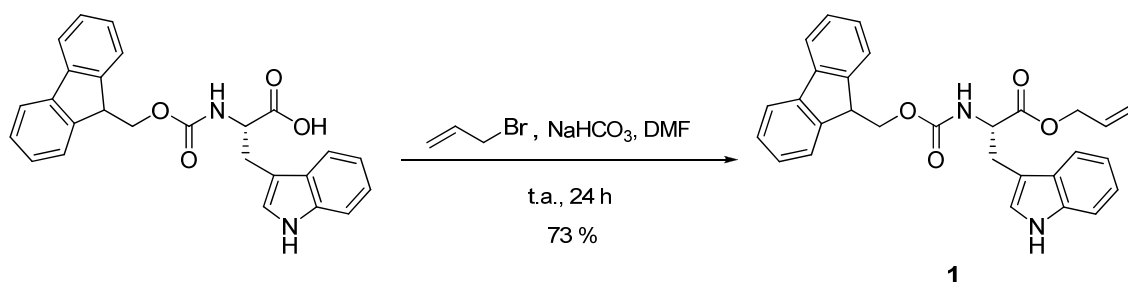
Figura 14

De acuerdo con los precedentes de la literatura⁸⁷ una de las opciones más viables para llevar a cabo la unión del triptófano a un soporte sólido a través del núcleo indólico implica la utilización de uniones no estándar que sean lábiles al medio ácido. Esto obliga a utilizar la estrategia Fmoc/^tBu y exige, por tanto, una protección para el grupo α -carboxilo compatible con esta metodología y con la unión entre el triptófano y el soporte sólido. En este sentido, el éster alílico se ha utilizado en diversas ocasiones en combinación con el grupo Fmoc en la síntesis de péptidos, ya que el éster alílico se puede eliminar en condiciones neutras utilizando catálisis de Pd.⁹⁷ Sin embargo, no se ha descrito hasta ahora un protocolo a escala preparativa del correspondiente derivado de triptófano con la cadena lateral desprotegida.

Otra opción interesante es la protección del extremo α -carboxilo en forma de éster metílico. La hidrólisis del éster metílico se puede llevar a cabo en fase sólida utilizando LiOH⁹⁸ de tal manera que se podría realizar la desprotección de los extremos amino y carboxilo en un solo paso, aspecto importante si se desean obtener péptidos cíclicos.

1.1.2. Preparación del éster alílico de (S) N^{α} -(9-fluorenilmetoxicarbonil)triptófano (1)

La síntesis de este derivado protegido de triptófano se realizó a partir del derivado de triptófano comercial Fmoc-(S)-Trp-OH. Este producto se hizo reaccionar con bromuro de alilo en medio básico en una única etapa dando lugar al derivado **1** (Esquema 19).⁹⁹

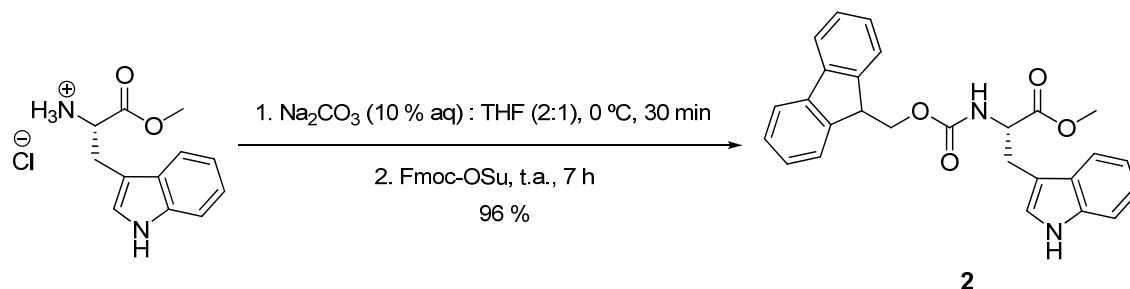


Esquema 19. Preparación del éster alílico de (S) N^{α} -(9-fluorenilmetoxicarbonil)triptófano **1**

La elevada pureza del producto obtenido tras el lavado del crudo mediante extracciones hizo posible su utilización en el acoplamiento a la resina sin necesidad de purificarlo previamente.

1.1.3. Preparación del éster metílico de (S) N^α-(9-fluorenilmetoxicarbonil)triptófano (2)

La obtención del derivado protegido de triptófano Fmoc-(S)-Trp-OMe **2** se llevó a cabo a partir del hidrocloreto del éster metílico comercial ópticamente activo (S), el cual se hizo reaccionar con Fmoc-OSu en medio básico en dos etapas (Esquema 20).



Esquema 20. Preparación del éster metílico de (S) N^α-(9-fluorenilmetoxicarbonil)triptófano **2**

La posterior purificación cromatográfica del crudo de reacción en gel de sílice permitió obtener el aminoácido protegido **2** con excelentes rendimientos (96 %).

1.2. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 3,4-DIHIDRO-2H-PIRANO (DHP)

1.2.1. Introducción

Tal y como se ha comentado anteriormente, una de las alternativas más interesantes para unir el triptófano a un soporte polimérico a través del núcleo indólico es la utilización de uniones lábiles al medio ácido. En este sentido, en nuestro laboratorio se ha podido comprobar el potencial que tiene el uso de una resina funcionalizada con grupos 3,4-dihidro-2H-pirano (resina DHP-PS), desarrollada por Ellman y colaboradores⁸⁶ para la síntesis en fase sólida de heterociclos. Este tipo de resina ha sido utilizada más recientemente por Smith y colaboradores⁸⁷ en la incorporación reversible de un derivado indólico, basándose en precedentes bibliográficos sobre la utilización del grupo tetrahidropirano (THP) como grupo protector del anillo indólico (apartado 3.3.1, Introducción, Esquema 15).

Se plantearon dos alternativas diferentes para poder acoplar el triptófano a través del nitrógeno indólico a un soporte polimérico funcionalizado con grupos 3,4-dihidro-2H-pirano. La primera de ellas se basó en la utilización de la resina comercial con este

tipo de funcionalización (la resina DHP-PS), mientras que la segunda consistió en funcionalizar adecuadamente un soporte polimérico con un espaciador bifuncional, lo que permitiría hacer extensible la metodología a diferentes tipos de resina. Además, el hecho de utilizar un espaciador bifuncional funcionalizado con grupos 3,4-dihidro-2H-pirano permitiría, por una parte, poder incorporar previamente un aminoácido como patrón interno con objeto de facilitar la determinación de rendimientos y, por otra, poder controlar el grado de funcionalización inicial del polímero si fuera necesario. En este sentido, A. Basso y colaboradores¹⁰⁰ han descrito la utilización del ácido (3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxiacético (Figura 15) como espaciador bifuncional para incorporarlo a una resina funcionalizada con grupos amino, para la síntesis de péptidos cíclicos a través de la unión al soporte polimérico del grupo hidroxilo del aminoácido hidroxiprolina (Hyp). En nuestro laboratorio, en estudios precedentes,¹⁰¹ este espaciador se obtuvo como un sólido higroscópico de bajo punto de fusión y de difícil manipulación, por lo que en el presente estudio se decidió utilizar como alternativa el ácido 4-[(3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxi]benzoico **3**, un sólido blanco no higroscópico con punto de fusión de 141-143°C (Figura 15).

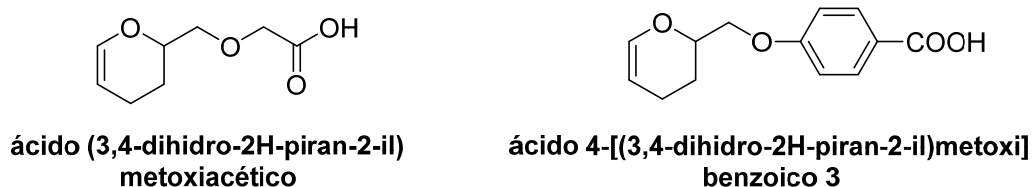


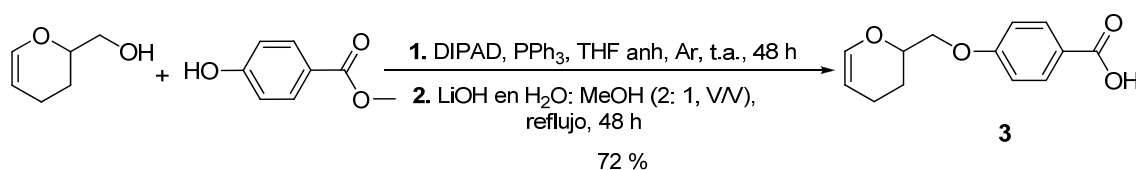
Figura 15. Estructuras de los espaciadores bifuncionales ácido (3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxiacético y ácido 4-[(3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxi]benzoico **3**

1.2.2. Preparación del ácido 4-[(3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxi]benzoico (**3**)

La síntesis del espaciador bifuncional ácido 4-[(3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxi]benzoico **3** se llevó a cabo en dos etapas (Esquema 21). Los mejores resultados se obtuvieron cuando ambas etapas se llevaron a cabo de manera consecutiva, sin aislar el intermedio de la primera etapa (25 % vs 72 % de rendimiento en el proceso global). Primeramente, el alcohol comercial (3,4-dihidro-2H-piran-2-il)-metanol se hizo reaccionar con *p*-hidroxibenzoato de metilo mediante una reacción de Mitsunobu,¹⁰² empleando DIPAD y PPh₃ bajo atmósfera de argón. Como es sabido, la reacción de Mitsunobu tiene una limitación importante relacionada con el valor del pK_a

de la especie nucleófila. Éste ha de ser inferior a 11 para que la reacción sea satisfactoria, ya que el rendimiento disminuye considerablemente si el pK_a es más grande que 11 y la reacción no se produce si el pK_a es superior a 13.^{103, 104} En nuestro caso, el pK_a del *p*-hidroxibenzoato de metilo es de 8.5.

La segunda etapa de reacción consistió en hidrolizar el éster intermedio 4-[(3,4-dihidro-2*H*-piran-2-il)metoxi]benzoato de metilo tratándolo con LiOH en H₂O/MeOH (2: 1) a reflujo. (Esquema 21).

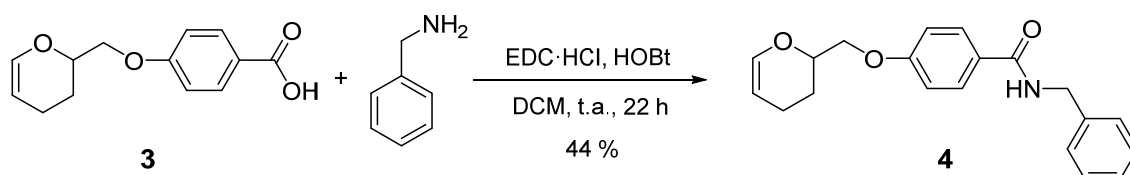


Esquema 21. Preparación del espaciador bifuncional ácido 4-[(3,4-dihidro-2*H*-piran-2-il)metoxi]benzoico **3**

1.2.3. Síntesis de la *N*-bencil-4-[(3,4-dihidro-2*H*-piran-2-il)metoxi]benzamida (**4**)

En un primer momento, antes de llevar a cabo los estudios en fase sólida, se creyó oportuno realizar un estudio exhaustivo en solución para optimizar las condiciones de unión y de liberación del aminoácido. Este estudio se llevó a cabo utilizando un modelo que mimetizara la unión entre la cadena lateral del triptófano y la matriz polimérica funcionalizada con **3**. El modelo escogido en analogía al soporte polimérico fue la *N*-bencil-4-[(3,4-dihidro-2*H*-piran-2-il)metoxi]benzamida **4**.

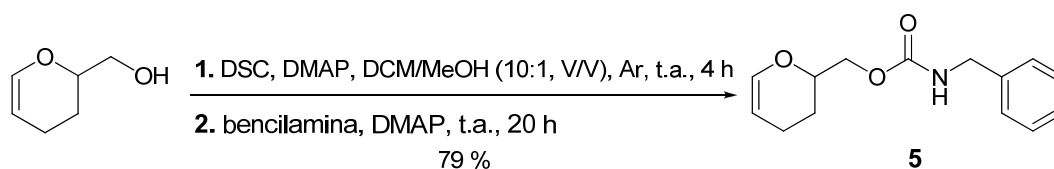
Para formar el enlace amida entre el espaciador bifuncional **3** y la bencilamina se utilizó como agente deshidratante la carbodiimida EDC·HCl y como activante el HOBT. La benzamida **4** se obtuvo con rendimientos moderados tras purificar el crudo de reacción por cromatografía con gel de sílice (Esquema 22).



Esquema 22. Preparación del modelo monomérico *N*-bencil-4-[(3,4-dihidro-2*H*-piran-2-il)metoxi]benzamida **4**

1.2.4. Síntesis de *N*-bencilcarbamato de (3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metilo (5)

Con objeto de explorar diferentes alternativas para funcionalizar la resina mediante un espaciador bifuncional, se planteó también la posibilidad de funcionalizar la resina uniendo directamente el alcohol comercial (3,4-dihidro-2H-piran-2-il)-metanol (precursor del espaciador bifuncional **3**) al polímero a través de una unión carbamato. Así, se preparó el *N*-bencilcarbamato de (3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metilo **5** como análogo monomérico de una resina aminometilada, a partir de (3,4-dihidro-2H-piran-2-il)-metanol comercial y bencilamina utilizando DSC en presencia de DMAP (Esquema 23).



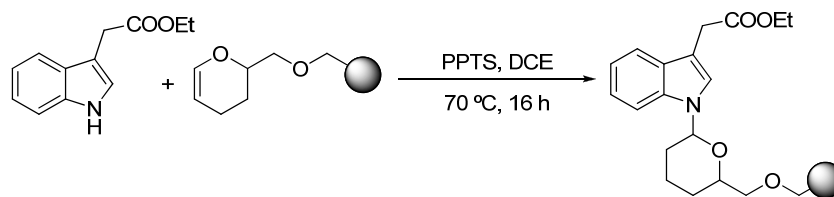
Esquema 23. Preparación de *N*-bencilcarbamato de (3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metilo **5**

1.3. UNIÓN ENTRE EL TRIPTÓFANO Y EL MODELO MONOMÉRICO: FORMACIÓN DEL ENLACE HEMIAMINAL

1.3.1. Introducción

Tal y como se ha comentado, la funcionalización de una resina con grupos tetrahidropiraniolo (THP) fue primeramente descrita por Thompson y Ellman⁸⁶ en el año 1994 para la unión de alcoholes a soportes poliméricos. Desde entonces, este tipo de soportes insolubles han demostrado ser eficientes en la unión de distintos tipos de moléculas orgánicas. Un ejemplo de ello es su utilización para unir a través de su cadena lateral aminoácidos trifuncionales como treonina, serina o hidroxiprolina.

Sin embargo, la protección en fase sólida de funciones nitrogenadas con grupos tetrahidropiraniolo (THP) ha sido poco estudiada. En este sentido, se ha descrito la unión reversible de purinas y bencimidazoles a través de uno de los nitrógenos imidazólicos.¹⁰⁵ En el caso particular de indoles, Smith y colaboradores⁸⁷ han descrito una estrategia basada en la utilización de una resina funcionalizada con grupos dihidropiraniolo (Resina de Ellman) tal y como se muestra en el Esquema 24.



Esquema 24. Formación del enlace hemiaminal en fase sólida

Las condiciones de acoplamiento se basan en la utilización de un ácido sulfónico (PPTS) y DCE como disolvente a temperaturas moderadamente altas (60-80 °C) y tiempos de reacción largos (12-30 h).

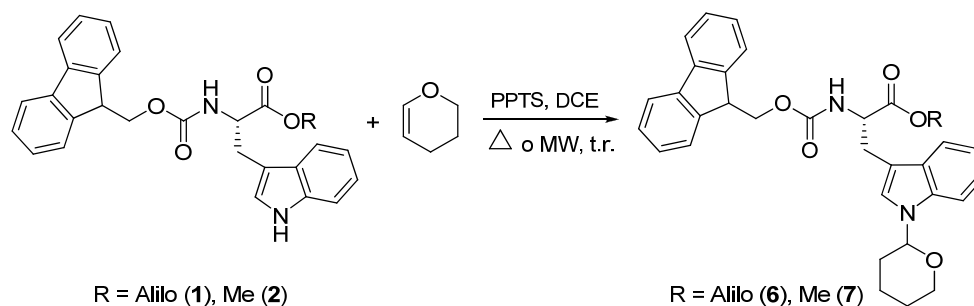
Considerando estos resultados se decidió realizar el estudio de la unión entre el triptófano y una resina funcionalizada con grupos dihidropirano a través del núcleo indólico de la cadena lateral del aminoácido.

1.3.2. Estudio en solución

1.3.2.1. Ensayos con dihidropirano (DHP)

Como primera aproximación, se optó por ensayar la reacción en solución con DHP para evaluar la estabilidad del aminoácido en las condiciones experimentales utilizadas para unirlos al soporte polimérico. Como alternativa a las condiciones de reacción descritas por Smith y colaboradores basadas en la utilización de calefacción clásica,⁸⁷ se decidió estudiar la reacción también en condiciones de calefacción por microondas con objeto de disminuir los largos tiempos de reacción requeridos por la calefacción convencional. Los derivados de triptófano que se utilizaron en el estudio fueron Fmoc-(S)-Trp-OAlilo **1** y Fmoc-(S)-Trp-OMe **2**, descritos con anterioridad.

El seguimiento de las reacciones se llevó a cabo por cromatografía líquida (HPLC). Así, los derivados de triptófano **1** y **2** (1.5 eq en cada caso) se hicieron reaccionar con DHP (1 eq) en presencia de PPTS (2.3 eq) y utilizando DCE como disolvente. En ambos casos, las reacciones se realizaron en condiciones térmicas clásicas (70 °C, 16 h) y en condiciones de calefacción por microondas (120 °C, 30 min), obteniéndose en todas ellas los productos **6** y **7** respectivamente (Esquema 25).

**Esquema 25.** Unión del triptófano con DHP

Los resultados obtenidos en cada caso se muestran en la Tabla 2 y corresponden a porcentajes de producto formado que se obtuvieron por comparación de áreas de picos cromatográficos. En todas las reacciones sólo se detectaron producto de partida y producto final (Tabla 2).

	6 (%)	7 (%)
Δ (16 h)	68	70
MW (30 min)	63	67

Tabla 2. Rendimientos de formación de los productos **6** y **7** utilizando condiciones térmicas clásicas y calefacción por microondas

A continuación, se decidió repetir la síntesis de los productos **6** y **7** a mayor escala para caracterizar los productos de reacción por resonancia magnética nuclear y, comprobar así que la reacción tenía lugar de manera adecuada.

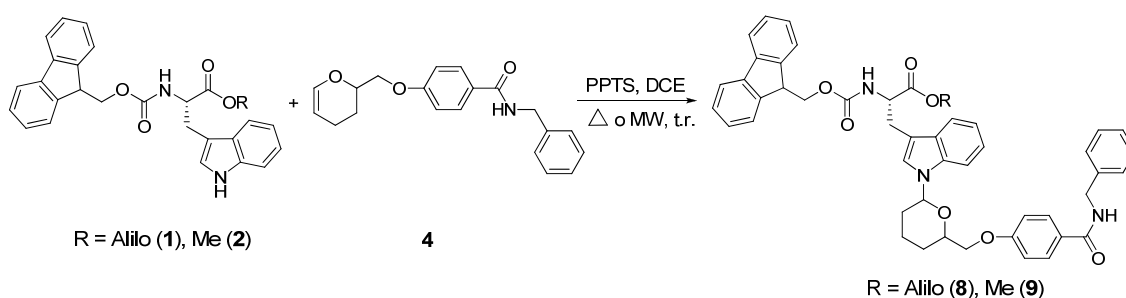
Los crudos de reacción obtenidos en ambos casos se purificaron por cromatografía en columna en gel de sílice neutralizada y se caracterizaron por RMN de ¹H. Se pudo comprobar que, inequívocamente, el triptófano se había unido a través del átomo de nitrógeno indólico al átomo de carbono en posición α del DHP. Así, por comparación con los productos de partida se comprobó la desaparición del singlete amplio correspondiente al protón del grupo NH indólico a 10.9 ppm (en el producto **1** y en el producto **2**) y la ausencia de átomos de hidrógeno olefínicos.

Los resultados obtenidos utilizando los dos derivados de triptófano fueron similares y en ambos casos los productos deseados (**6** y **7**) se obtuvieron con rendimientos que oscilaron alrededor del 65-70 %. Además, en los crudos de reacción no se detectaron

otros subproductos, lo cual indicó que los grupos protectores de los grupos α -amino y α -carboxilo fueron estables en las condiciones utilizadas.

1.3.2.2. Ensayos con *N*-bencil-4-[(3,4-dihidro-2*H*-piran-2-il)metoxi]benzamida (**4**)

Para complementar los estudios en solución y disponer de un modelo más parecido a lo que ocurriría en fase sólida con el espaciador bifuncional **3**, se consideró oportuno analizar también la reacción de los derivados de triptófano **1** y **2** con **4**, descrito con anterioridad. Las reacciones con los derivados de triptófano **1** y **2** se ensayaron utilizando las mismas condiciones descritas para la reacción con DHP (Esquema 26).



Esquema 26. Unión del triptófano con *N*-bencil-4-[(3,4-dihidro-2*H*-piran-2-il)metoxi]benzamida **4**

El seguimiento de la reacción de **4** con los derivados **1** y **2** se llevó a cabo por HPLC. Los primeros ensayos se realizaron en microondas (120 °C) ya que los tiempos de reacción eran mucho más cortos. Sin embargo, teniendo en cuenta que el objetivo final era realizar el proceso en fase sólida y que en estas condiciones las reacciones son en general más lentas, se ensayó el acoplamiento en solución en un tiempo de 30 min (como en los casos anteriores) y también de 3 h.

Los perfiles cromatográficos de la reacción de **4** con los aminoácidos **1** y **2** mostraron la completa desaparición del análogo monomérico **4** y la aparición de dos nuevos productos que resultaron ser los esperados **8** y **9**, respectivamente. Ambos picos cromatográficos correspondían a mezclas de diastereoisómeros que, al igual que **6** y **7**, fueron prácticamente indistinguibles. Las purezas de **8** y **9**, determinadas por integración de áreas de picos cromatográficos, fue superior al 95 %. Seguidamente, se decidió ensayar las condiciones de calefacción convencional (70 °C durante 16 h) para comparar estos resultados con los obtenidos utilizando calefacción por microondas. En

estas condiciones las reacciones también fueron completas y se detectó, únicamente, la formación de los productos deseados **8** y **9** (Figura 16). Los resultados, que se muestran en la Tabla 3, corresponden a los rendimientos de producto formado determinados por comparación de áreas de picos cromatográficos.

	8 (%)	9 (%)
Δ (16 h)	96	95
MW (30 min)	80	81
MW (180 min)	99	97

Tabla 3. Rendimientos de formación de los productos **8** y **9** utilizando condiciones térmicas clásicas y calefacción por microondas

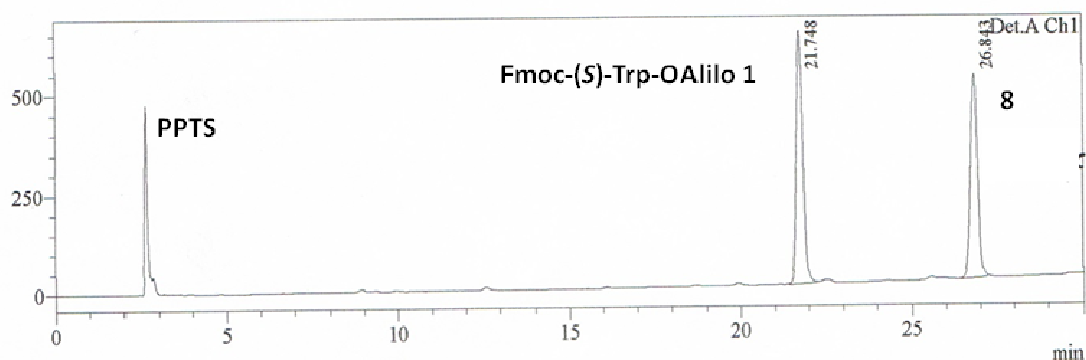


Figura 16. Análisis cromatográfico del crudo de reacción del compuesto **8** en condiciones de calefacción convencional a las 16 h de reacción. Condiciones cromatográficas: (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 40→100 % B en 30 min, (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm)

De manera análoga al planteamiento realizado en los ensayos con DHP (apartado 1.3.2.1), se decidió llevar a cabo la síntesis a mayor escala, para aislar y caracterizar los productos **8** y **9**. Así, el modelo monomérico **4** (1 eq) se hizo reaccionar con los derivados de triptófano **1** y **2** (1.5 eq) en presencia de PPTS (2.3 eq) y utilizando DCE como disolvente. En ambos casos, las reacciones se realizaron en condiciones de calefacción por microondas (120 °C, 3 h) (Esquema 26). El crudo de reacción de **8** se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice neutralizada y se analizó por ¹H-RMN, el espectro del cual indicó, inequívocamente, que el triptófano se había unido a través del átomo de nitrógeno indólico al átomo de carbono en posición α del DHP, tal y como se esperaba. Así, se comprobó respecto a los productos de partida, la desaparición del singlete amplio correspondiente al protón del NH indólico a 10.9 ppm

y la presencia del multiplete a 8.9 ppm correspondiente al NH del grupo amida. Por otra parte, el análisis por RMN indicó la presencia de prácticamente un único juego de señales, indicando muy probablemente la presencia de un diastereoisómero mayoritario (Figura 17).

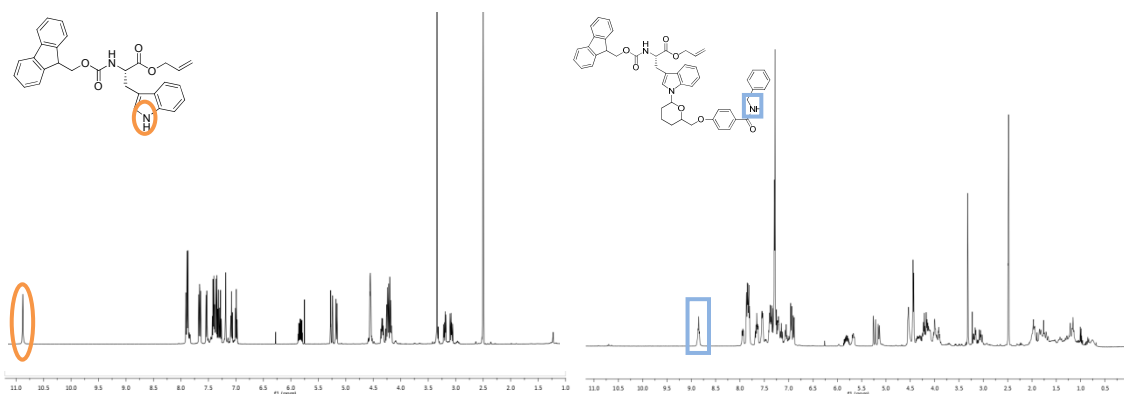
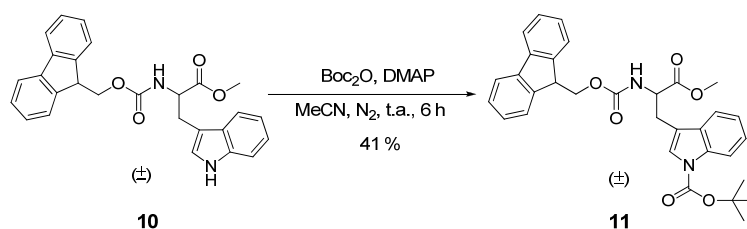


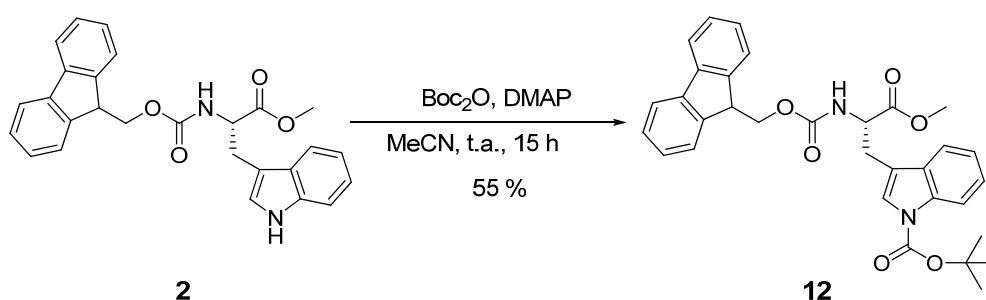
Figura 17. Espectros de RMN de ^1H de Fmoc-(S)-Trp-OAlilo **1** y del modelo monomérico **8**

Estos resultados indicaban que la reacción era eficiente en las condiciones de reacción utilizadas y que los derivados de triptófano **1** y **2** eran compatibles con las mismas. No obstante, se consideró oportuno evaluar si la integridad quiral del aminoácido había sido alterada por la temperatura requerida para llevar a cabo el proceso. Este estudio se realizó por cromatografía de fase normal quiral utilizando el derivado de aminoácido Fmoc-(S)-Trp-OMe **2** como modelo. Se preparó el producto racémico de **2** (producto **10**) partiendo del derivado comercial racémico H-Trp-OMe-HCl de forma similar a la descrita para el producto ópticamente puro (apartado 1.1.3). A continuación, el derivado racémico obtenido **10** se derivatizó utilizando Boc_2O en presencia de DMAP y la mezcla racémica resultante **11** se analizó con una columna quiral con objeto de buscar unas buenas condiciones para la separación de los enantiómeros (Esquema 27).



Esquema 27. Preparación de Fmoc-(S,R)-Trp(Boc)-OMe **11**

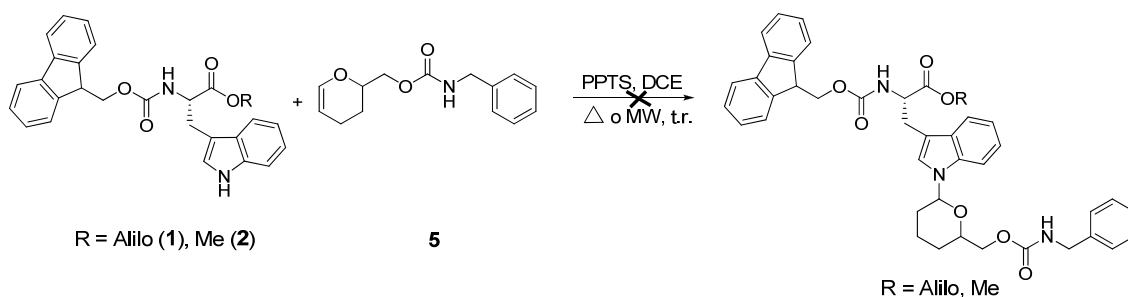
De forma paralela, se sometió una muestra del derivado de triptófano ópticamente puro **2** a las condiciones utilizadas para unirlo al modelo monomérico **4** y, a continuación, se incorporó el grupo Boc, en las mismas condiciones que las descritas en el Esquema 27 para la obtención del derivado racémico **11** pero con tiempos de reacción más largos (15 h). La purificación del aminoácido completamente protegido por columna cromatográfica permitió obtener el producto puro esperado **12** con un 55 % de rendimiento (Esquema 28).



Esquema 28. Preparación de Fmoc-(S)-Trp(Boc)-OMe **12**

Finalmente, el derivado de triptófano así obtenido se analizó por cromatografía líquida en fase quiral detectándose únicamente uno de los dos enantiómeros. Este resultado nos permitió concluir que las condiciones experimentales utilizadas para acoplar el triptófano a **4** no provocaban la racemización del aminoácido.

Como alternativa a **4**, se realizaron también los mismos ensayos con el modelo **5** donde la unión a la resina es a través de un enlace carbamato en las mismas condiciones experimentales a las ya descritas. Sin embargo, se pudo comprobar por HPLC que el producto **5** no era estable en estas condiciones, por lo que se decidió desestimar la utilización del alcohol comercial para funcionalizar la resina de forma directa (Esquema 29).



Esquema 29

1.3.3. Estudio en fase sólida

Una vez demostrada en solución la viabilidad de unir el triptófano a través de su cadena lateral al modelo monomérico **4** mediante la formación de un enlace hemiaminal, se ensayó la metodología en fase sólida con el espaciador bifuncional **3** utilizando las condiciones experimentales de calefacción por microondas (3 h, 120 °C), debido a la reducción considerable de los tiempos de reacción en relación a las condiciones de calefacción convencional.

Para realizar este estudio se utilizaron soportes poliméricos de distinta naturaleza, como es el caso de las resinas con base de poliestireno: la resina aminometilpoliestireno (AM-PS), la resina comercial funcionalizada con grupos dihidropiraniolo (DHP-PS) y la resina 4-metilbencidrilamina (MBHA-PS); y la resina con base de polietilenglicol ChemMatrix (AM-CM) (Figura 18).

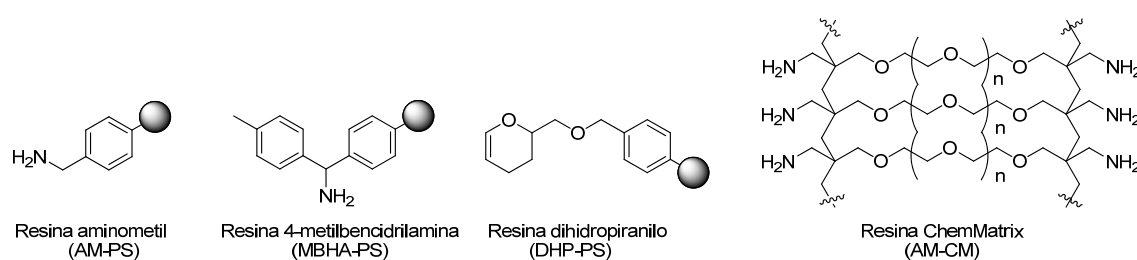
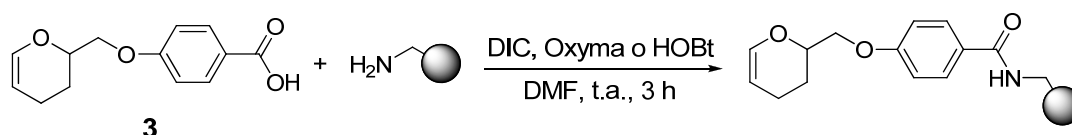


Figura 18. Soportes poliméricos utilizados en el estudio en fase sólida de la formación del enlace hemiaminal entre el derivado Fmoc-(S)-Trp-OAlilo **1** y el espaciador bifuncional **3**

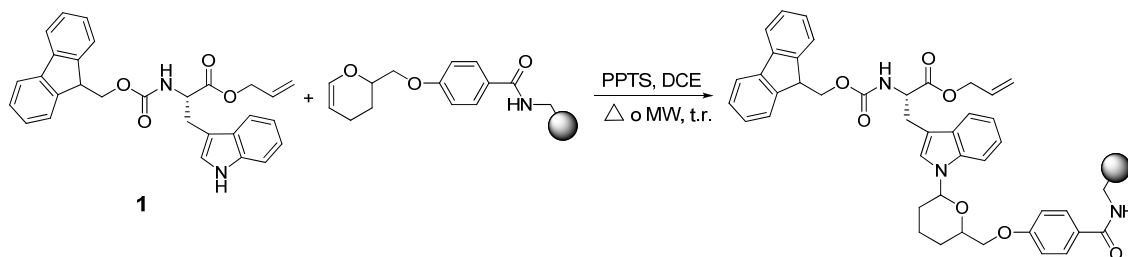
En la mayoría de casos, exceptuando la resina comercial DHP-PS, las matrices poliméricas se funcionalizaron previamente con el espaciador bifuncional **3**. El acoplamiento se llevó a cabo utilizando DIC en presencia de Oxyma[®] o HOBT, utilizando DMF como disolvente, tal y como se muestra en el Esquema 30.



Esquema 30. Unión del espaciador bifuncional **3** a la resina

Tras comprobar mediante el ensayo de ninhidrina que el acoplamiento había sido cuantitativo, se procedió a acoplar el derivado de triptófano protegido **1**. Los primeros ensayos de acoplamiento se realizaron en presencia de 3 eq de aminoácido protegido

1 y 1.6 eq de PPTS en DCE, utilizando condiciones de calefacción por microondas (120 °C, 3h). La resina AM-PS se escogió como ejemplo para ensayar también las condiciones de calefacción convencional (70 °C, 16 h) (Esquema 31).



Esquema 31. Formación del enlace hemiaminal en fase sólida

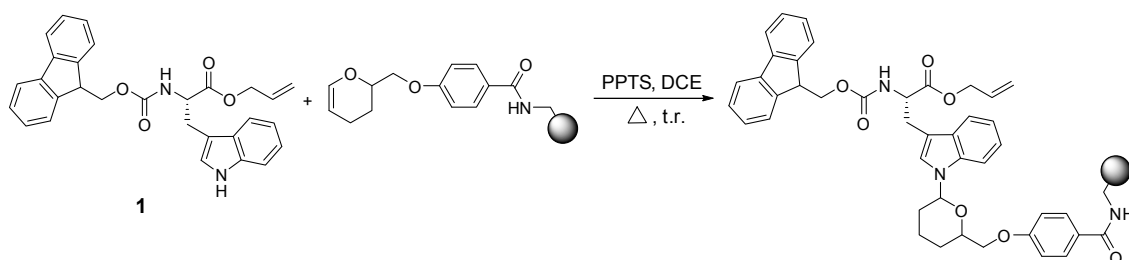
Los resultados obtenidos fueron variables, obteniéndose rendimientos que oscilaron entre el 30 % y el 60 %, determinados por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc. Sin embargo, el mismo procedimiento realizado a través de la calefacción convencional utilizando la resina AM-PS dio lugar a rendimientos superiores al 80 % (Tabla 4).

Resina	f_{inicial} (mmol·g ⁻¹)	f_{final} (mmol·g ⁻¹)	Condiciones de calefacción	Rendimiento (%)
DHP-PS	0.94	0.30	MW	32
AM-PS	1.21	0.68	MW	56
AM-PS	0.37	0.25	Convencional	85
MBHA-PS	0.92	0.53	MW	58
AM-CM	0.46	0.14	MW	31

Tabla 4. Rendimientos de formación del enlace hemiaminal utilizando soportes poliméricos de distinta naturaleza en condiciones de calefacción convencional y por microondas

A pesar de conseguir reducir el tiempo de reacción utilizando condiciones de calefacción por microondas, la calefacción convencional permitió obtener porcentajes de incorporación del aminoácido protegido **1** más elevados utilizando el mismo soporte polimérico (AM-PS). Considerando este resultado, se decidió establecer la calefacción convencional como método más eficiente para unir el derivado de triptófano al soporte polimérico. Sin embargo, al repetir este procedimiento, los resultados no fueron totalmente reproducibles, de manera que se decidió entonces estudiar de forma exhaustiva la formación de la unión hemiaminal en condiciones de

calefacción convencional, considerando todas las resinas utilizadas con anterioridad (AM-PS, AM-CM, DHP-PS, MBHA-PS). Para ello, se realizaron ensayos teniendo en cuenta como variables la temperatura de reacción, la concentración de aminoácido **1**, la concentración de PPTS y el volumen de disolvente. Además, se optó por realizar las reacciones en un reactor más adecuado (Figura 19) para asegurar que tanto la calefacción como la agitación mecánica fueran homogéneas (Esquema 32):



Esquema 32. Formación del enlace hemiaminal utilizando calefacción convencional

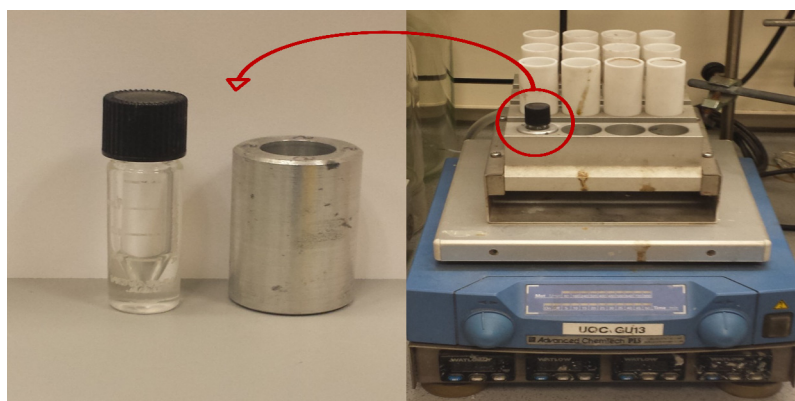


Figura 19. Reactor utilizado para llevar a cabo los ensayos en fase sólida de incorporación del triptófano al soporte polimérico

En cada una de las tablas que se presentan a continuación se recogen los resultados obtenidos al variar uno de los parámetros de reacción para cada tipo de resina (el tiempo de reacción fue de 16 h en todos los casos). A excepción de los ensayos en los que se estudió la variación del volumen de disolvente utilizado, en el resto de casos se utilizó la mínima cantidad de DCE para asegurar la total suspensión de los reactivos. En todos los ensayos realizados, los rendimientos de unión del derivado Fmoc-(S)-Trp-OAlilo **1** a los diferentes soportes poliméricos estudiados y las funcionalizaciones finales de los mismos se determinaron por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc.

1.3.3.1. Unión del triptófano a distintos soportes poliméricos

Los ensayos que se indican a continuación muestran el efecto de la naturaleza del soporte polimérico. Cada una de las resinas se trató con 1.5 eq de aminoácido protegido **1** y 2.3 eq de PPTS en DCE a 70 °C durante 16 h (Tabla 5).

	f_{inicial} (mmol·g ⁻¹)	f_{final} (mmol·g ⁻¹)	Rendimiento (%)
DHP-PS	0.90	0.12	19
AM-PS	0.93	0.28	49
MBHA-PS	1.00	0.42	71
AM-CM	0.53	0.02	5

Tabla 5. Rendimientos de formación del enlace hemiaminal utilizando distintos soportes poliméricos

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las resinas con base de poliestireno AM-PS y MBHA-PS son las más adecuadas para incorporar el triptófano a un soporte insoluble a través del anillo indólico de su cadena lateral. Esta conclusión también se puede derivar del estudio realizado utilizando condiciones de calefacción por microondas, tal y como se muestra en la Tabla 4. Por esta razón, en los ensayos posteriores se descartó la utilización de la resina AM-CM.

1.3.3.2. Unión del triptófano al soporte polimérico a distintas temperaturas

Los ensayos que se indican a continuación muestran el efecto de la temperatura al hacer reaccionar 1.5 eq de aminoácido protegido **1** y 2.3 eq de PPTS en DCE con distintos soportes poliméricos con base de poliestireno funcionalizados con el espaciador **3**. Los ensayos se realizaron a 70 °C, 80 °C y 90 °C. A pesar de que los resultados previos con la resina comercial DHP-PS no fueron del todo satisfactorios se decidió incluir esta resina en el resto de ensayos por las ventajas que aporta el hecho de ser comercialmente asequible y de la misma naturaleza que las resinas AM-PS y MBHA-PS (Tabla 6).

	Entrada	Temperatura (°C)	f_{inicial} (mmol·g ⁻¹)	f_{final} (mmol·g ⁻¹)	Rendimiento (%)
DHP-PS	1	70	0.90	0.12	19
	2	80	0.90	0.11	17
	3	90	0.90	0.11	17
AM-PS	4	70	0.37	0.24	84
	5	80	0.37	0.26	91
	6	90	0.37	0.28	96
MBHA-PS	7	70	1.00	0.45	75
	8	80	1.00	0.48	81
	9	90	1.00	0.50	84

Tabla 6. Rendimientos de formación del enlace hemiaminal utilizando distintas temperaturas

Como se puede observar en la Tabla 6 el efecto de la temperatura en el rango estudiado no es muy influyente, dado que en los tres soportes poliméricos los resultados obtenidos en cada caso son similares. Sin embargo, estos resultados continúan poniendo de manifiesto la dependencia con la matriz polimérica, obteniéndose rendimientos de incorporación muy elevados en el caso de las resinas AM-PS (84-96 %) y MBHA-PS (75-84 %), a diferencia de la resina comercial DHP-PS (17-19 %).

1.3.3.3. Unión del triptófano al soporte polimérico a distintas concentraciones de PPTS

En los ensayos que se realizaron con objeto de evaluar la variación de la concentración de PPTS en la incorporación del triptófano **1** a la resina a través del núcleo indólico, se utilizaron 1.5 eq de aminoácido protegido **1** y DCE como disolvente a 80 °C. Los ensayos se realizaron a 3 concentraciones distintas: 1 eq, 2 eq y 3 eq de PPTS. En el caso de la resina comercial DHP-PS se decidió estudiar además el efecto de variaciones más pequeñas de concentración de PPTS (0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 eq) tal y como se muestra en la Tabla 7:

	Entrada	PPTS (eq)	f_{inicial} (mmol·g ⁻¹)	f_{final} (mmol·g ⁻¹)	Rendimiento (%)
DHP-PS	1	0.5	0.90	0.12	18
	2	1.0	0.90	0.15	23
	3	1.5	0.90	0.15	23
	4	2.0	0.90	0.12	20
	5	2.5	0.90	0.13	20
AM-PS	6	1.0	0.37	0.18	59
	7	2.0	0.37	0.22	74
	8	3.0	0.37	0.20	67
MBHA-PS	9	1.0	1.00	0.45	69
	10	2.0	1.00	0.48	68
	11	3.0	1.00	0.50	73

Tabla 7. Rendimientos de formación del enlace hemiaminal utilizando diferentes concentraciones de PPTS

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la incorporación del aminoácido al soporte insoluble depende de la concentración de PPTS, sin embargo, las variaciones de concentración de ácido no dan lugar a diferencias muy significativas teniendo en cuenta las cantidades de PPTS utilizadas. Por otra parte, como en los casos anteriores, los mejores resultados se corresponden con la utilización de las resinas AM-PS y MBHA-PS.

1.3.3.4. Unión del triptófano al soporte polimérico en función del volumen de disolvente (DCE)

Los ensayos que se muestran a continuación muestran el efecto del volumen de disolvente al hacer reaccionar 1.5 eq de aminoácido protegido **1** y 2 eq de PPTS en DCE. Las reacciones, en todos los casos, se realizaron a 80 °C y utilizando diferentes volúmenes de disolvente en un rango que permitiera la completa disolución de los reactivos.

	Entrada	DCE (μL)	f_{inicial} ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)	f_{final} ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)	Rendimiento (%)
DHP-PS	1	100	0.90	0.20	32
	2	150	0.90	0.17	26
	3	200	0.90	0.19	29
	4	250	0.90	0.19	30
	5	300	0.90	0.16	26
AM-PS	6	100	0.37	0.22	74
	7	200	0.37	0.26	85
	8	300	0.37	0.20	67
MBHA-PS	9	100	1.00	0.38	64
	10	200	1.00	0.42	71
	11	300	1.00	0.42	71

Tabla 8. Rendimientos de formación del enlace hemiaminal utilizando diferentes volúmenes de DCE

Como se aprecia en la Tabla 8, las diferencias en cuanto al porcentaje de incorporación del aminoácido **1** a la resina no son significativas, obteniéndose una vez más los mejores resultados con las resinas AM-PS y MBHA-PS.

1.3.3.5. Unión del triptófano al soporte polimérico a distintas concentraciones de Fmoc-(S)-Trp-OAlilo (**1**)

Otra de las variables que se decidió analizar fue el efecto de la concentración de aminoácido protegido **1** en el porcentaje de incorporación del mismo a la resina. Para ello, se trabajó con 2 concentraciones diferentes: 1.5 y 3 eq. Se utilizaron 2 eq de PPTS y el volumen mínimo necesario de DCE para disolver los reactivos y la reacción se realizó a 80 °C.

	Entrada	1 (eq)	f_{inicial} ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)	f_{final} ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)	Rendimiento (%)
DHP-PS	1	1.5	0.90	0.18	28
	2	3.0	0.90	0.18	28

AM-PS	3	1.5	0.37	0.25	84
	4	3.0	0.37	0.27	90
MBHA-PS	5	1.5	1.00	0.44	73
	6	3.0	1.00	0.48	81

Tabla 9. Rendimientos de formación del enlace hemiaminal utilizando diferentes concentraciones de Fmoc-(S)-Trp-OAlilo **1**

El análisis de los resultados obtenidos permite concluir que la utilización de 1.5 eq de **1** fue suficiente para obtener rendimientos de incorporación aceptables, ya que la utilización de una cantidad doble de aminoácido protegido no modificó sustancialmente los porcentajes de acoplamiento. Además, estos resultados confirman que las resinas aminometiladas AM-PS y MBHA-PS son las más adecuadas para llevar a cabo el acoplamiento de triptófano.

Teniendo en cuenta todas las variables estudiadas se puede concluir que las resinas AM-PS y MBHA-PS dieron lugar a rendimientos de incorporación de aminoácido más elevados, siendo las condiciones óptimas de acoplamiento: Fmoc-(S)-Trp-OAlilo **1** (1.5 eq), PPTS (2.3 eq), 80 °C y 16 h de reacción.

Para finalizar este estudio, se decidió evaluar la reproducibilidad del método utilizando los soportes poliméricos AM-PS y MBHA-PS en las condiciones de reacción antes mencionadas, tal y como se muestra en la Tabla 10.

	Entrada	f_{inicial} (mmol·g ⁻¹)	f_{final} (mmol·g ⁻¹)	Rendimiento (%)
AM-PS	1	0.37	0.14	48
	2	0.37	0.25	85
	3	0.37	0.28	95
	4	0.37	0.26	91
MBHA-PS	5	1.00	0.22	78
	6	1.00	0.26	83
	7	1.00	0.20	75
	8	1.00	0.48	81

Tabla 10. Rendimientos de formación del enlace hemiaminal utilizando las resinas AM-PS y MBHA-PS. Estudio de la reproducibilidad

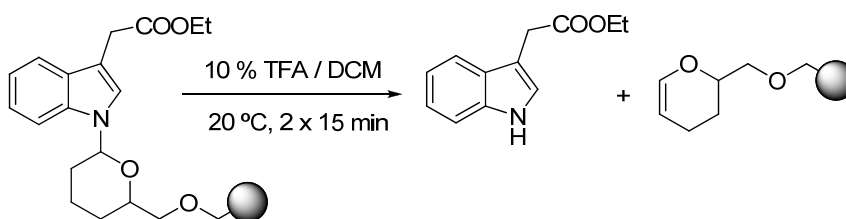
Los resultados obtenidos indicaron que el soporte polimérico más adecuado para incorporar el aminoácido protegido **1** a través del núcleo indólico de su cadena lateral era la resina MBHA-PS, dado que los resultados fueron más reproducibles.

1.4. LIBERACIÓN DEL TRIPTÓFANO

1.4.1. Estudio en solución

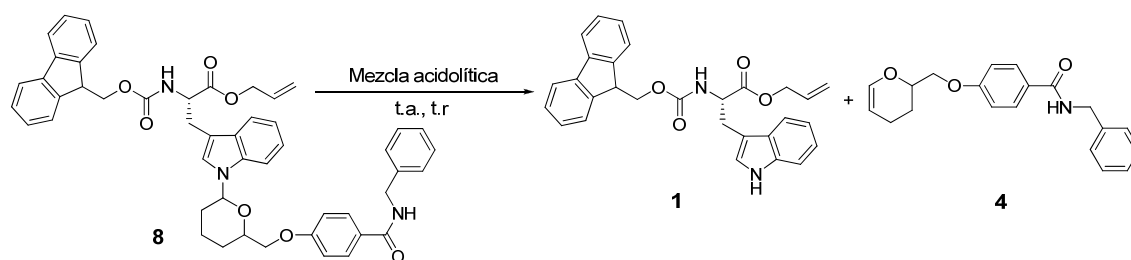
En un primer momento, se consideró oportuno probar en solución diversas condiciones que nos permitieran liberar el triptófano de la matriz polimérica, como paso previo a la implementación de la metodología en fase sólida. Este estudio se llevó a cabo con el modelo monomérico **8**, ya utilizado anteriormente en los estudios de incorporación del triptófano a la resina, que mimetiza la unión entre el triptófano y la resina a través del espaciador bifuncional **3**.

El diseño de los ensayos de liberación del triptófano se basó en los resultados obtenidos por Smith y colaboradores⁸⁷ con la resina de Ellman, ya que describen la escisión de un derivado indólico utilizando TFA al 10 % en DCM durante 15 min (dos tratamientos) (Esquema 33).



Esquema 33. Liberación del triptófano del soporte polimérico

Se probaron diferentes mezclas acidolíticas para encontrar unas condiciones adecuadas de escisión. En todos los casos se utilizó TFA y se variaron la composición de las mezclas y los tiempos de reacción. Los crudos de reacción se analizaron por HPLC (Esquema 34).



Esquema 34. Liberación del triptófano en solución

Los resultados de los diferentes ensayos se muestran en la tabla 11 y los rendimientos indicados corresponden a los porcentajes de los productos **1** y **8**, determinados por integración de áreas de picos cromatográficos.

Ensayo	Mezcla acidolítica	Tiempo (min)	% 8 ¹	% 1
1	TFA/ DCM (90:10)	30	50	14
2	TFA/DCM (10:90)	30	65 (41) ²	21 (16) ²
3	TFA/TIS/DCM (10:10:80)	60	-	13
4	TFA/H ₂ O (90:10)	60	34	8
5	TFA/mDMB/DCM (2:10:88)	60	75	17
6	TFA/mDMB/DCM (5:10:85)	30	-	90 ³
7	TFA/mDMB/DCM (10:2:88)	15	-	68 (56) ⁴
8	TFA/mDMB/DCM (10:10:80)	60	-	72
9	TFA/mDMB/DCM (40:10:50)	60	-	40
10	TFA/mDMB (90:10)	60	-	17
11	TFA/mDMB/THF (40:10:50)	60	34 (25) ⁵	21 (7) ⁵

¹Porcentaje de producto de partida sin reaccionar.

²Después de 60 min de reacción.

³Se obtuvo un resultado similar a 1 h de reacción.

⁴Después de 30 min de reacción.

⁵Después de 3 h de reacción.

Tabla 11. Ensayos de liberación del derivado de triptófano **1** del modelo monomérico **8**

Tal y como se muestra en la Tabla 11, el uso de TFA en ausencia de capturadores de carbocationes dio lugar a la obtención del derivado de triptófano **1** con bajos rendimientos y diferentes subproductos de reacción (ensayos 1-2), a diferencia de los resultados descritos por Smith y colaboradores.⁸⁷ Los resultados no mejoraron con la utilización de TIS (ensayo 3) o H₂O (ensayo 4) dos capturadores de carbocationes

utilizados normalmente en la síntesis de péptidos en fase sólida. Sin embargo, el 1,3-dimetoxibenceno (*m*DMB)¹⁰⁶ resultó ser un eficiente capturador de carbocationes utilizando concentraciones similares de TFA (comparar ensayo 6 con los ensayos 2 y 3). Por otra parte, la utilización de concentraciones más altas de TFA (ensayos 9-10) o de otros disolventes (comparar ensayos 9 y 11) no mejoraron los resultados. Sin embargo, la reducción de la concentración de TFA hasta un 5 % dio lugar a la liberación de **1** con excelente rendimiento (ensayo 6).

La Figura 20 muestra como ejemplo el cromatograma obtenido mediante el ensayo 6 donde se observa un pico cromatográfico del aminoácido protegido **1** ($t_R = 22.1$ min), un subproducto no identificado (obtenido con un 10 % de rendimiento, determinado por integración de áreas de los picos cromatográficos, $t_R = 25.7$ min), el exceso de *m*DMB ($t_R = 12.1$ min) y el aducto resultante de la reacción de sustitución electrófila aromática entre el capturador de carbocationes y el análogo monomérico **4** ($t_R = 20.3$ min).

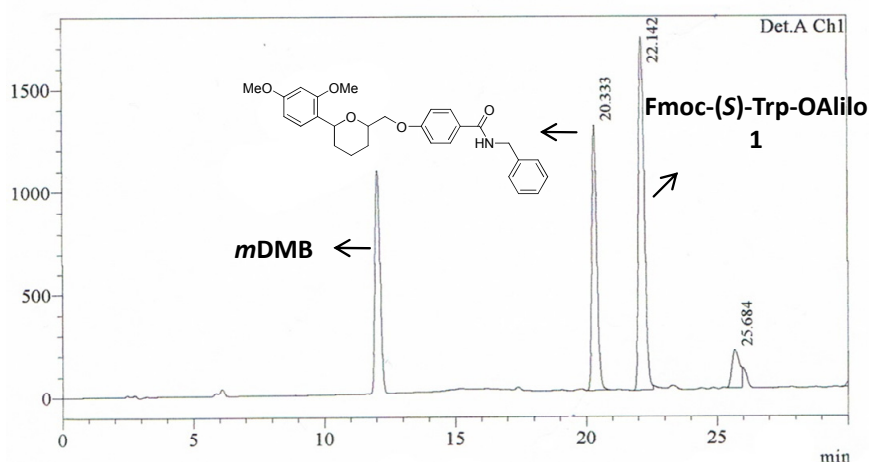


Figura 20. Análisis cromatográfico del crudo de reacción del ensayo 6. (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 40→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm)

Las identidades del aminoácido protegido **1** y el aducto se confirmaron por espectrometría de masas y por comparación cromatográfica con muestras puras de **1** y del producto resultante de la reacción entre **4** y *m*DMB en TFA, respectivamente.

Finalmente, el tratamiento del modelo monomérico **8** con mezclas acidolíticas con bajas concentraciones de TFA (ensayo 5), bajas concentraciones de *m*DMB (comparar

ensayos 7 y 8) o la utilización de tiempos de reacción más largos (ensayo 7) dio lugar a rendimientos de escisión de **1** más bajos.

1.4.2. Estudio en fase sólida

Dado que la utilización de 1,3-dimetoxibenceno (*m*DMB) proporcionó los mejores resultados en el estudio de liberación del derivado protegido Fmoc-(*S*)-Trp-OAlilo **1**, se optó por realizar un estudio en fase sólida utilizando mezclas acidolíticas con este capturador de carbocationes.

Para llevar a cabo el estudio de liberación en fase sólida se emplearon tanto la resina AM-PS como la resina MBHA-PS. En ambos casos se incorporó el espaciador bifuncional **3** seguido del derivado de triptófano Fmoc-(*S*)-Trp-OAlilo **1** utilizando las condiciones descritas en el apartado 1.3.2 (1.5 eq aminoácido, 2.3 eq PPTS, DCE). En cuanto a la calefacción de la mezcla de reacción, se llevó a cabo mediante microondas (120 °C, 3h) con la resina AM-PS y mediante calefacción convencional (80 °C, 16 h) con la resina MBHA-PS. En el primer caso, el derivado Fmoc-(*S*)-Trp-OAlilo **1** se incorporó al soporte polimérico con un 58 % de rendimiento, mientras que en el segundo caso se unió a la resina con un 80 % de rendimiento. En la Tabla 12 se muestran los distintos ensayos de liberación realizados sobre ambas resinas:

Resina	Condiciones de calefacción	Mezcla acidolítica	Tiempo	Rendimiento de liberación (%)
AM-PS	MW	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:10:85)	6 × 10 min	30
AM-PS	MW	TFA/ <i>m</i> DMB/TIS/H ₂ O/DCM (5:10:3:2:80)	6 × 10 min	48
MBHA-PS	Convencional	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:10:85)	6 × 10 min	80

Tabla 12. Rendimientos de liberación del derivado de triptófano **1** en fase sólida

El rendimiento de liberación de **1** de la resina fue mayor cuando para su unión al soporte polimérico se utilizaron condiciones de calefacción convencionales. Sin

embargo, en los casos en los que se utilizó calefacción por microondas, el rendimiento de desanclaje fue bastante menor, aunque mejoró adicionando otros capturadores de carbocationes a la mezcla acidolítica además de *m*DMB, concretamente TIS y agua, sin llegar sin embargo a los niveles conseguidos cuando la unión a la resina se llevó a cabo con la calefacción convencional.

Estas diferencias de comportamiento respecto a la escisión en función de las condiciones de calefacción utilizadas para la incorporación al soporte polimérico, podrían explicarse por una posible unión inespecífica del aminoácido a la matriz de poliestireno y/o a cambios estructurales en dicha matriz, provocados por la irradiación de microondas y las altas temperaturas de reacción.

Así pues, las mejores condiciones halladas para el desanclaje del triptófano de la matriz polimérica fueron TFA/*m*DMB/DCM (5:10:85, V/V/V) pero es importante que la unión a la resina sea por calefacción convencional.

1.5. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA PARA EL TRIPTÓFANO A LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

Una vez se dispuso de unas buenas condiciones para la incorporación del aminoácido al soporte polimérico y posterior liberación del mismo, la metodología se aplicó para la preparación de diferentes péptidos cíclicos de origen natural. Los modelos escogidos fueron: un dipéptido (Brevianamida F), un octapéptido de carácter muy hidrofóbico cuya síntesis química no está descrita (Axinelina B) y un heptapéptido sintetizado únicamente en solución (Unguisina A).

1.5.1. Brevianamida F (12)

La Brevianamida F, igual que el resto de 2,5-dicetopiperacinas (DKPs) son los péptidos cíclicos más pequeños que se conocen. Se caracterizan por tener un sistema heterocíclico particular que está presente en diversos productos naturales con un amplio rango de actividades biológicas (antitumoral, antimicrobiana, antiviral). Considerando sus propiedades físicas y químicas cabe destacar la resistencia a

proteólisis, la rigidez conformacional y la presencia de grupos dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno que favorecen su interacción con diversas dianas biológicas.¹⁰⁷

Concretamente, la Brevianamida F¹⁰⁸ (ciclo-(L-Trp-L-Pro)) es un dipéptido cíclico de origen natural aislado de ciertas bacterias, con actividad antibacteriana y antifúngica que, además, se ha utilizado en el tratamiento de disfunciones cardiovasculares (Figura 21).¹⁰⁹

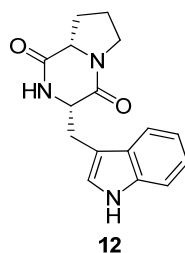
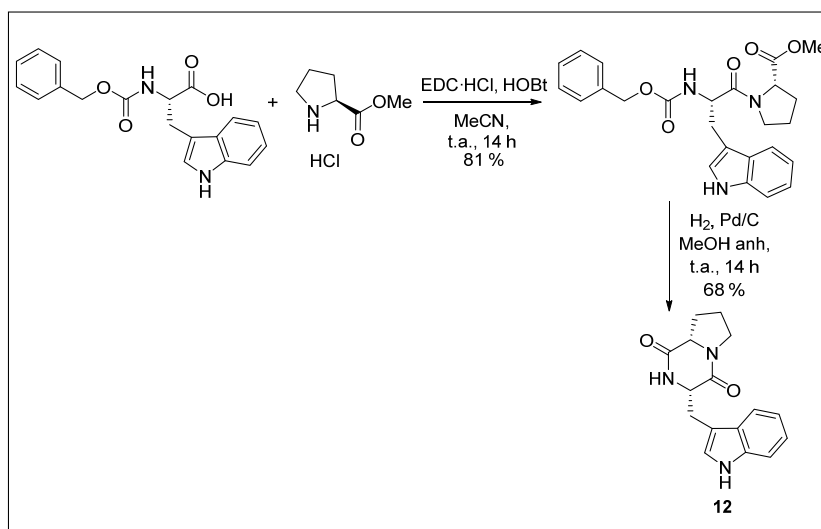


Figura 21. Brevianamida F **12**

1.5.1.1. Síntesis de la Brevianamida F (**12**) en solución

Con objeto de facilitar el estudio de la síntesis de la Brevianamida F **12** en fase sólida y validar la estrategia que se plantea, en primer lugar se optó por realizar la síntesis de la dicetopiperacina en solución para obtener el producto deseado y ser utilizado como patrón.

La obtención de la dicetopiperacina **12** se llevó a cabo siguiendo el protocolo que se presenta en el Esquema 35:



Esquema 35. Síntesis de la Brevianamida F **12** en solución

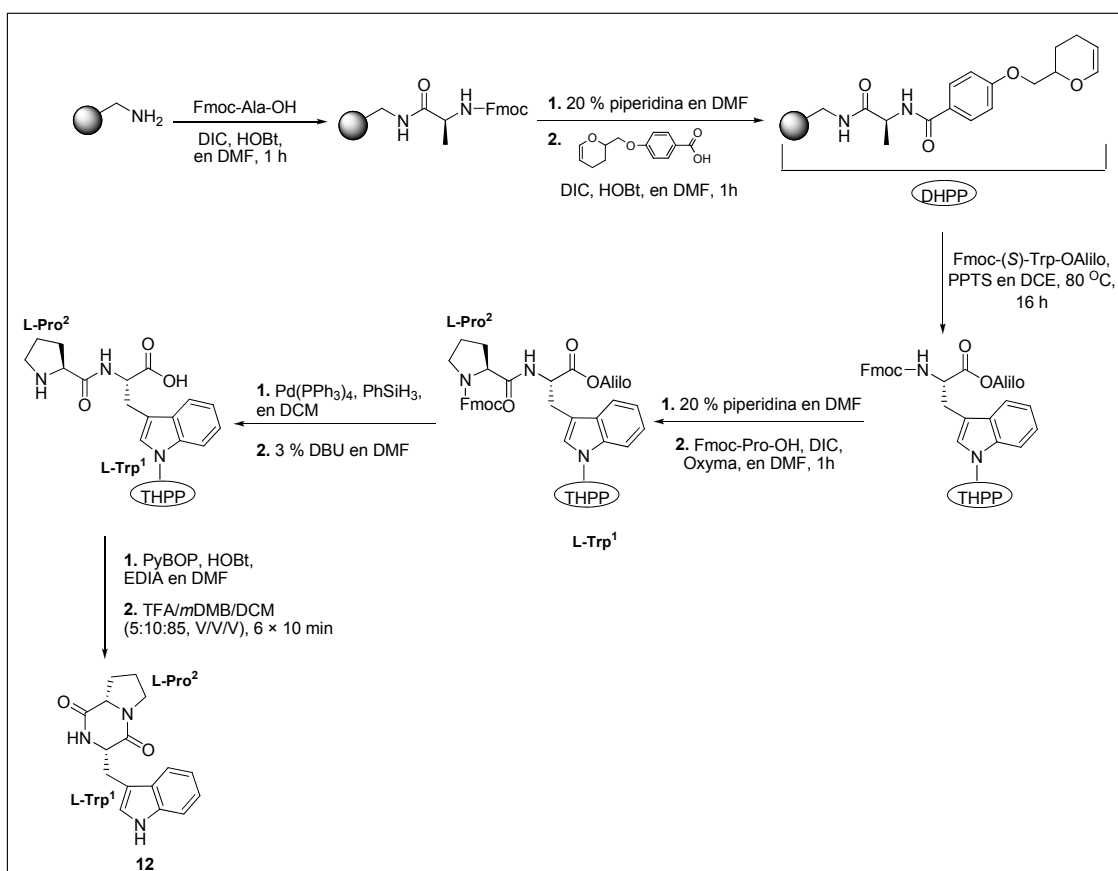
Se utilizó el hidrocloreuro del éster metílico de prolina comercial (H-(S)-Pro-OMe·HCl), el cual se trató en medio básico (EDIA) para reaccionar con el derivado comercial de triptófano protegido en el extremo α -amino con el grupo benciloxicarbonilo (Z) (Z-(S)-Trp-OH), utilizando como agente deshidratante el cloruro de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC·HCl) en presencia de HOBt. El dipéptido Z-Trp-Pro-OMe así obtenido se sometió a un tratamiento con H₂ en presencia de Pd/C a presión atmosférica. Con este tratamiento se eliminó el grupo protector Z y el dipéptido desprotegido cicló espontáneamente para dar lugar al producto deseado **12**. El producto final se obtuvo con un rendimiento del 68 % tras purificar el crudo de reacción por cromatografía en gel de sílice.

1.5.1.2. Síntesis de la Brevianamida F (**12**) en fase sólida

Inicialmente se planteó la síntesis de la dicetopiperacina **12** en fase sólida siguiendo una estrategia convencional, es decir, elongando la cadena peptídica a partir del extremo amino (dirección C→N).

Para este ensayo se utilizó la resina AM-PS ($f = 0.37 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$), a la que se unieron secuencialmente Fmoc-Ala-OH como patrón interno y el espaciador bifuncional **3**. Estos dos productos se incorporaron a la resina en condiciones similares a las descritas en el apartado 1.3.2 con DIC y HOBt en este caso. Seguidamente, se procedió a acoplar el derivado de triptófano Fmoc-(S)-Trp-OAlilo **1** en las condiciones descritas en el apartado 1.3.2. En esta ocasión, el rendimiento de incorporación del aminoácido fue del 64 %. Tras eliminar el grupo Fmoc con piperidina, se procedió al acoplamiento de Fmoc-Pro-OH utilizando como agente deshidratante DIC en presencia de Oxyma[®] como aditivo y, a continuación, se eliminó el éster alílico utilizando el complejo Pd(PPh₃)₄ en presencia de PhSiH₃. La eliminación del grupo alilo se realizó previamente a la del grupo Fmoc para evitar que el grupo amino actúe como capturador del grupo alilo y que, de esta manera, quede bloqueado. Acto seguido, se eliminó el grupo protector Fmoc con la base no nucleófila DBU, y se procedió a la ciclación del dipéptido utilizando una sal de fosfonio (PyBOP) como agente deshidratante en presencia de HOBt y medio básico de EDIA. El test de cloranilo realizado fue negativo indicando que no quedaban aminas secundarias libres tras la reacción. El producto obtenido se liberó

utilizando TFA en presencia de *m*DMB como capturador de carbocationes (TFA/*m*DMB/DCM (5:10:85, V/V/V), 6 × 10 min) y el crudo obtenido se analizó por HPLC (Esquema 36). El análisis mostró diferentes picos entre los cuales se pudo identificar la dicetopiperacina **12** por coelución con una muestra patrón del producto deseado (obtenida previamente en solución). La Brevianamida F **12** se obtuvo con un rendimiento inferior al 5 %, tal y como se pudo determinar por integración de áreas de los picos cromatográficos.

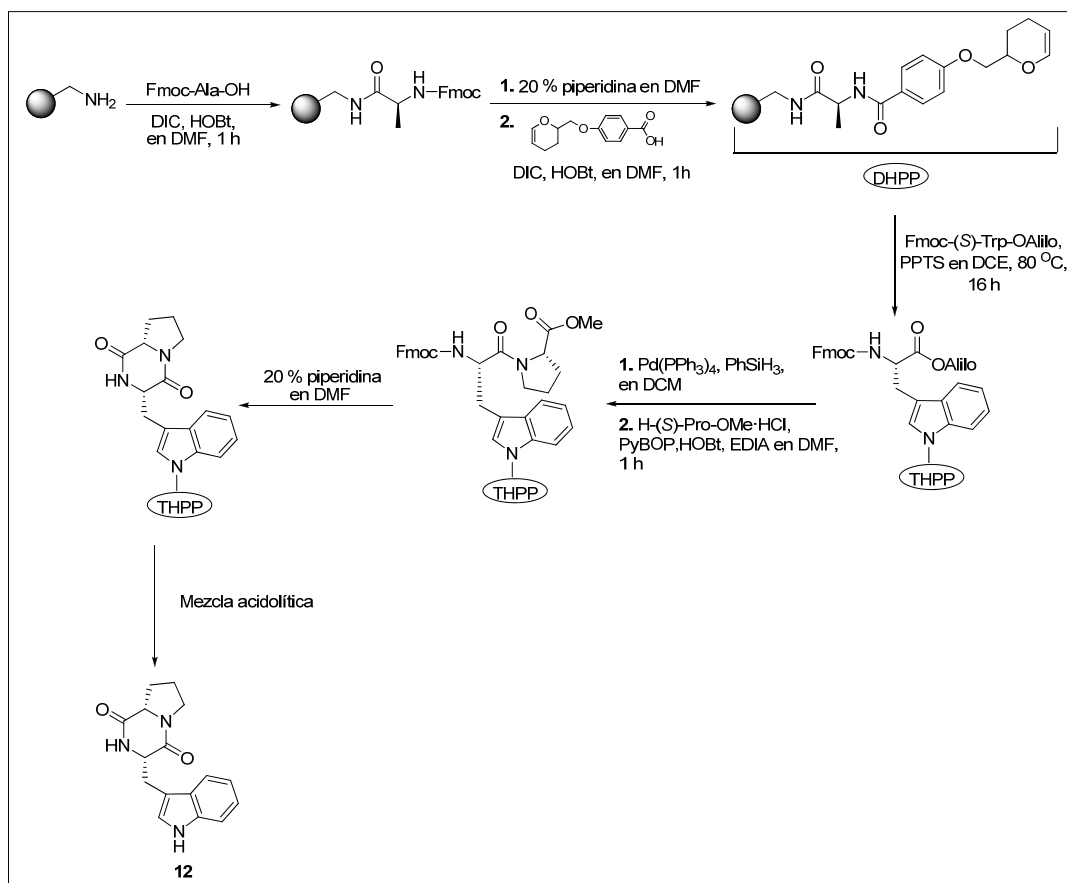


Considerando el resultado obtenido, se planteó la posibilidad de que la Brevianamida F no fuera estable en las condiciones acidolíticas utilizadas para la escisión del enlace hemiaminal de la resina. Por ello, se procedió a estudiar la estabilidad de la dicetopiperacina **12**, obtenida en disolución, en la mezcla acidolítica utilizada para liberar el producto de la resina, TFA/*m*DMB/DCM (5:10:85, V/V/V). Se realizaron tres tratamientos de 30 min y el crudo resultante se analizó por HPLC, comprobándose que la Brevianamida F era estable y no se degradaba en estas condiciones. Con la intención

de confirmar este resultado, también se creyó oportuno realizar una comprobación en fase sólida. Para ello, se incorporó la dicetopiperacina **12** a una resina AM-PS funcionalizada con el espaciador **3** a través de la cadena lateral del triptófano utilizando las condiciones de acoplamiento estándar (apartado 1.3.2). A continuación, se trató la resina resultante con diferentes mezclas acidolíticas que incluían todas ellas TFA y diferentes capturadores de carbocationes: TFA/DCM (10:90, V/V), TFA/TIS/DCM (10:5:85, V/V/V), TFA/*m*DMB/DCM (5:10:85, V/V/V). En todos los casos los tratamientos realizados fueron de 30 min y se llevaron a cabo 3 veces. Tras analizar cada uno de los crudos resultantes por HPLC, se comprobó que el dipéptido cíclico **12** era estable en las condiciones acidolíticas utilizadas. Como consecuencia, el bajo rendimiento obtenido en la síntesis de **12** en fase sólida era atribuible al hecho de llevar a cabo la síntesis sobre el soporte polimérico, más que a la etapa de desanclaje.

Aprovechando la versatilidad que la metodología descrita ofrece al anclar el aminoácido por la cadena lateral, se optó por llevar a cabo la síntesis de la cadena peptídica a través del extremo carboxilo (dirección *N*→*C*) tal como se hizo en solución.

La síntesis de ciclo-(L-Trp-L-Pro) **12** se llevó a cabo utilizando como soporte polimérico la resina AM-PS ($f = 0.37 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$), sobre la cual se incorporó Fmoc-Ala-OH como patrón interno y el espaciador bifuncional **3**, de la misma manera que en la síntesis anterior. El acoplamiento del derivado de triptófano protegido se realizó considerando las condiciones descritas en el apartado 1.3.2. En este caso, el rendimiento de incorporación del derivado de triptófano **1** fue del 76 %. A diferencia de la síntesis anterior, se procedió a eliminar primero el éster alílico utilizando $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ en presencia de PhSiH_3 . A continuación, se incorporó el derivado comercial de prolina H-(*S*)-Pro-OMe·HCl a través del extremo carboxilo utilizando PyBOP como agente de acoplamiento y HOBT como aditivo en medio básico (EDIA). Este procedimiento se realizó tres veces con objeto de asegurar que el acoplamiento fuera cuantitativo. Seguidamente, se eliminó el grupo protector Fmoc del triptófano utilizando piperidina. La presencia de medio básico favoreció la ciclación espontánea del dipéptido formándose *in situ* el producto deseado **12**, tal y como se comprobó posteriormente por HPLC tras el tratamiento de desanclaje (Esquema 37).



Esquema 37. Síntesis en fase sólida de la Brevianamida F **12** elongando la cadena peptídica a partir del extremo carboxilo

A continuación, se estudió la liberación del dipéptido cíclico del soporte polimérico utilizando mezclas acidolíticas de distinta naturaleza (Tabla 13). Los rendimientos de desanclaje obtenidos se determinaron por análisis de aminoácidos de las peptidil-resinas tratadas.

Ensayo	Mezcla acidolítica	Tiempo (min)	Rendimiento de liberación (%)
1	TFA/DCM (10:90)	2 × 15 min	59
2	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:5:90)	3 × 10 min	74
3	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:5:90)	6 × 10 min	89
4	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (10:5:85)	6 × 10 min	88
5	TFA/tioanisol /DCM (10:5:85)	6 × 10 min	73

Tabla 13. Rendimientos de liberación de la Brevianamida F **12** de la resina utilizando diferentes mezclas acidolíticas

Al igual que se pudo comprobar en la liberación del aminoácido de la resina (Tabla 11), la utilización de *m*DMB como capturador de carbocationes y bajas concentraciones de ácidos (ensayo 3), proporcionó los mejores resultados, lo cual resulta especialmente interesante debido a la posibilidad de poder aplicar esta estrategia a péptidos más elaborados y que sean sensibles al medio ácido. Por otra parte, también se puso de manifiesto que, aumentando el número de tratamientos, el rendimiento de liberación del producto de la resina era mayor (ensayos 2 y 3). Los análisis realizados mediante HPLC confirmaron la formación del producto deseado, que se obtuvo con elevado rendimiento (89 %) y elevada pureza (89 %) (Figura 22).

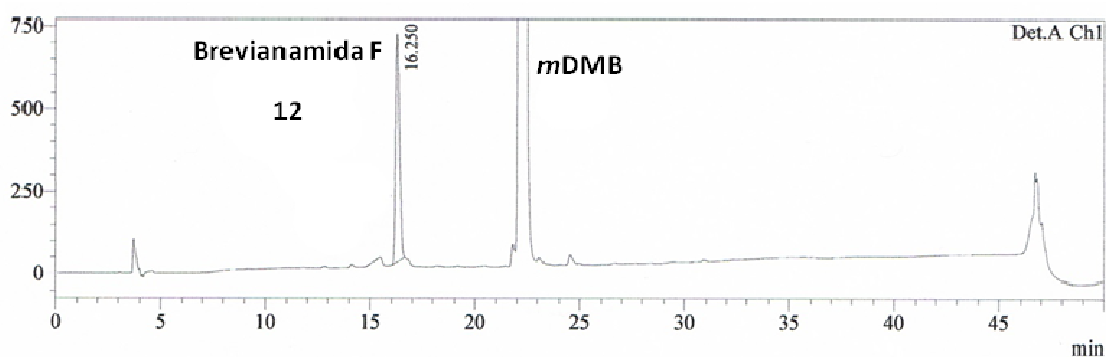


Figura 22. Análisis cromatográfico del crudo de reacción resultante del ensayo 3. Condiciones cromatográficas: (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 5→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm)

Finalmente un simple lavado del crudo obtenido con hexano permitió obtener el producto **12** puro con un 74 % de rendimiento global.

1.5.2. Axinelina B (**20**)

La Axinelina B¹¹⁰ **20** (Figura 23) es un octapéptido cíclico de origen marino con actividad antiproliferativa y citotóxica cuya síntesis no se ha descrito hasta el momento.

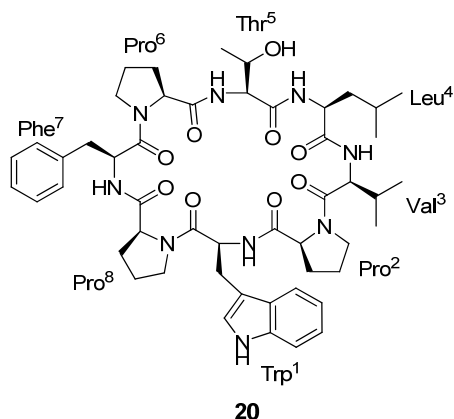


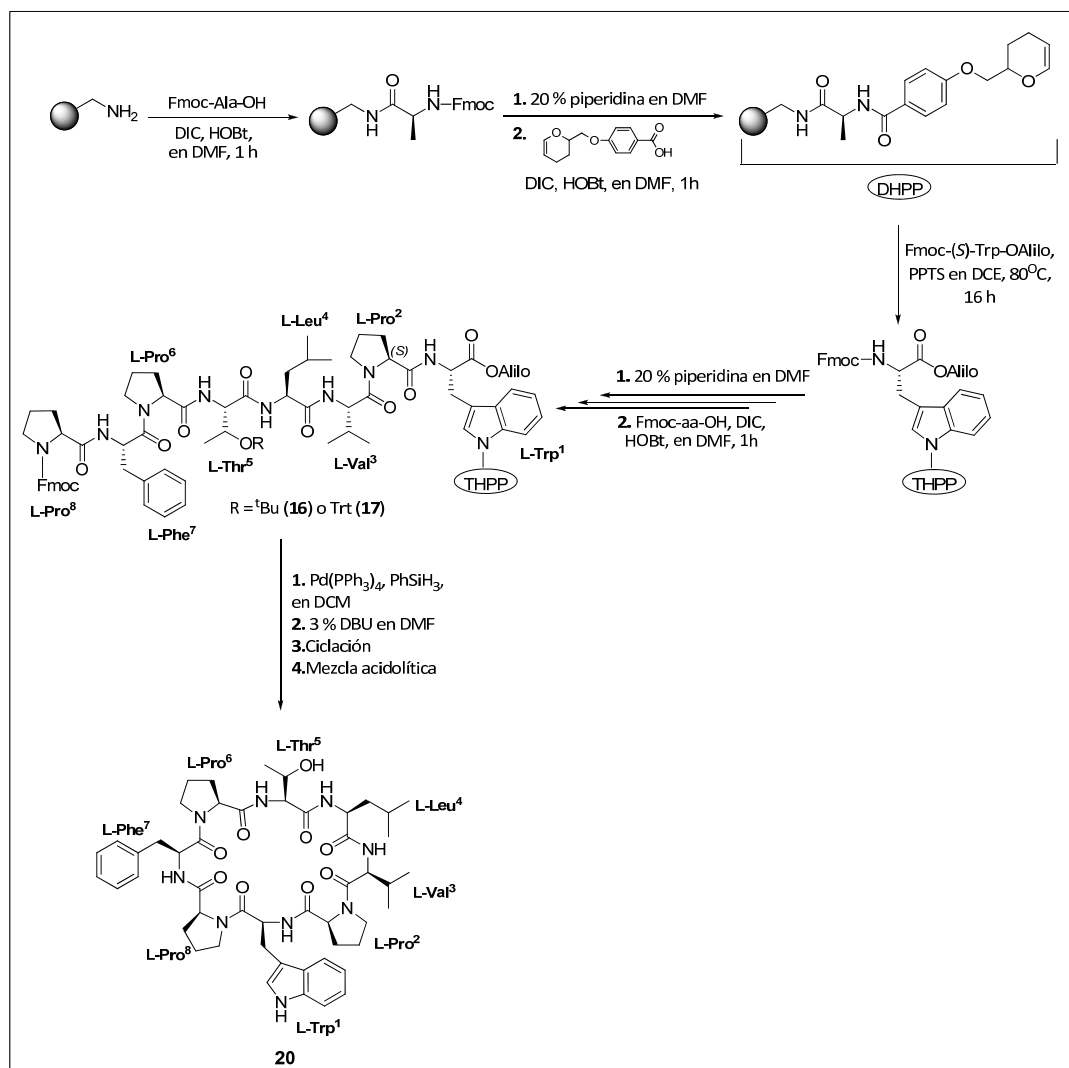
Figura 23. Axinelina B **20**

La elección de este péptido como modelo se debió a que, desde un punto de vista estructural, está muy poco funcionalizado y es rico en residuos de prolina, aminoácido que impone importantes restricciones conformacionales a la cadena peptídica.

Para la preparación de este péptido se estudiaron diferentes estrategias sintéticas que se detallan a continuación.

1.5.2.1. Estrategia sintética 1

Para sintetizar la Axinelina B en fase sólida se procedió, en primer lugar, a preparar el correspondiente precursor lineal protegido en los extremos **16**. La construcción de la cadena peptídica se llevó a cabo siguiendo protocolos convencionales de síntesis de péptidos en fase sólida, tal y como se muestra en el siguiente esquema:



Esquema 38. Síntesis de la Axinelina B **20** en fase sólida (Estrategia sintética 1)

La síntesis de la cadena peptídica se realizó utilizando la resina con base de poliestireno AM-PS ($f = 0.93 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) a la que se incorporó Fmoc-Ala-OH como estándar interno y se funcionalizó con el espaciador bifuncional **3**. Los acoplamientos se realizaron utilizando una carbodiimida (DIC) como agente de acoplamiento en presencia de HOBT como aditivo y DMF como disolvente. La incorporación de Fmoc-(S)-Trp¹-OAlilo **1** se realizó siguiendo las condiciones experimentales descritas en el apartado 1.3.2. El rendimiento de incorporación del derivado de triptófano se determinó por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc y fue del 84 %. El acoplamiento de los diferentes aminoácidos se llevó a cabo utilizando DIC como agente activante del ácido carboxílico, HOBT como aditivo para minimizar la racemización y DMF como disolvente. Así, se acoplaron de forma secuencial los siguientes aminoácidos: Fmoc-Pro²-OH, Fmoc-Val³-OH, Fmoc-Leu⁴-OH, Fmoc-Thr⁵(^tBu)-

OH, Fmoc-Pro⁶-OH, Fmoc-Phe⁷-OH y Fmoc-Pro⁸-OH realizando, cuando fue necesario, doble acoplamiento sobre los residuos de prolina para asegurar la completa incorporación del siguiente aminoácido. Paralelamente y, como control adicional, se siguió la evolución de la funcionalización de la resina a lo largo de la síntesis por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc. Una vez ensamblada la cadena peptídica sobre el polímero, se realizaron diversos ensayos de liberación del péptido lineal de la resina con algunas alícuotas de la peptidil-resina (Tabla 14). La presencia de un grupo *terc*-butilo protegiendo la cadena lateral de la treonina obligó a utilizar concentraciones de ácido superiores a las empleadas hasta el momento, para asegurar así la eliminación de dicho grupo protector. Por este motivo, también se decidió utilizar mezclas acidolíticas que incorporaban TIS (ensayo 2) como capturador de carbocationes.

Ensayo	Mezcla acidolítica	Tiempo (min)	Rendimiento de liberación (%)
1	TFA/DCM (90:10)	30	71
2	TFA/ <i>m</i> DMB/TIS/DCM (85:3:2:10)	60	90
3	TFA/INDOL/DCM (70:2:28)	60	98

Tabla 14. Rendimientos de liberación del precursor lineal de la Axinelina B de la resina utilizando diferentes mezclas acidolíticas

Los rendimientos de liberación del péptido de la resina se obtuvieron mediante análisis de aminoácidos de la peptidil-resina y cada una de las muestras tratadas se analizaron por espectrometría de masas (MALDI-TOF y ESI) y HPLC utilizando una columna C₁₈. Todas las mezclas acidolíticas dieron excelentes rendimientos de liberación incluso en el ensayo 1 que, a diferencia de lo que ocurría con la Brevianamida F, se obtiene un elevado porcentaje de liberación sin utilizar capturadores de carbocationes en la mezcla acidolítica. Sin embargo, aunque con un mayor porcentaje de liberación, el crudo peptídico obtenido utilizando *m*DMB y TIS como capturadores de carbocationes (ensayo 2) presentó un mayor número de impurezas que el obtenido en ausencia del capturador de carbocationes (ensayo 1) (Figura 24). Se decidió entonces utilizar una mezcla acidolítica con indol como capturador de carbocationes (ensayo 3), cuya

utilización en síntesis de péptidos que contienen triptófano ha sido descrita en la literatura, pero la calidad del crudo no mejoró.

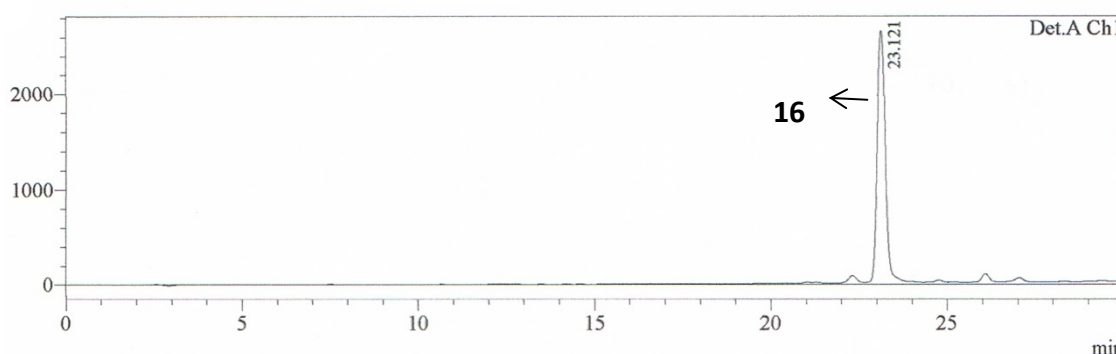


Figura 24. Análisis cromatográfico de los crudos peptídicos resultantes del ensayo 1 (pureza: 90 %). Condiciones cromatográficas: (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 5→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm)

Una vez confirmada la identidad del péptido lineal protegido en los extremos, se continuó con la síntesis y se procedió a eliminar el grupo protector alilo del extremo carboxilo utilizando Pd(PPh₃)₄ en presencia de PhSiH₃ y, a continuación, se eliminó el grupo Fmoc del extremo amino utilizando una disolución de DBU en DMF. Para comprobar que la eliminación de los grupos protectores de los extremos de la cadena había sido satisfactoria, se trató una alícuota de peptidil-resina con la mezcla acidolítica TFA/DCM (90:10, V/V) (ensayo 1, Tabla 14). El rendimiento de liberación del péptido lineal totalmente desprotegido fue del 71 %, determinado por análisis de aminoácidos, confirmándose la identidad del producto deseado por HPLC y espectrometría de masas.

La ciclación de la cadena peptídica se ensayó inicialmente utilizando DIC y HOBt (4 eq y 8 eq respectivamente) en DMF (dos tratamientos de 16 h). El proceso se siguió mediante el ensayo cualitativo de cloranilo, dado que la ciclación se llevó a cabo a través de un residuo de prolina, resultando negativo tras los dos tratamientos, lo cual parecía indicar que la ciclación había tenido lugar.

En base a los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de liberación de los precursores lineales de la Axinelina B y, a pesar de dar lugar a crudos algo más impuros, se optó por utilizar la mezcla acidolítica TFA/*m*DMB/TIS/DCM (85: 3: 2: 10) (ensayo 2), ya que el porcentaje de liberación de la cadena lineal fue más elevado. Se

realizaron dos tratamientos de 30 min. El crudo de reacción obtenido se analizó por espectrometría de masas (MALDI-TOF) (Figura 25) y HPLC-MS (C₁₈).

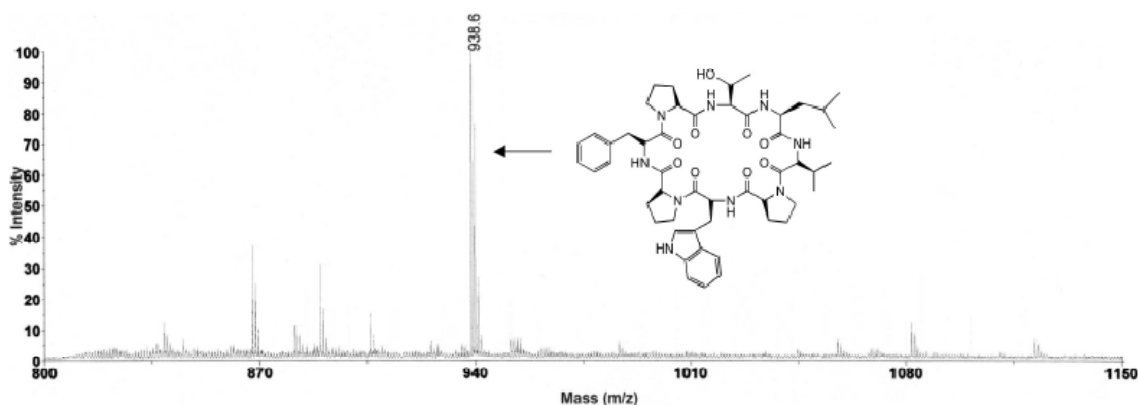


Figura 25. MALDI-TOF del crudo peptídico de la Axinelina B 20

La espectrometría de masas permitió detectar el producto deseado, sin embargo, el análisis por HPLC resultó complejo y no se pudo identificar de manera inequívoca el producto deseado. Así, inicialmente, se utilizaron las condiciones cromatográficas habituales (columna C₁₈, H₂O/MeCN como eluyentes) y el resultado obtenido fue un único pico correspondiente al *m*DMB, es decir, aparentemente el péptido quedaba retenido en la columna. Entonces, se optó por cambiar los eluyentes y utilizar mezclas H₂O/MeOH y H₂O/THF, pero no se logró detectar el péptido cíclico en ninguno de los casos. Otra alternativa fue la de utilizar una columna C₄, más apropiada para compuestos hidrofóbicos, ya que hay un menor grado de retención. En estas nuevas condiciones se logró detectar un pequeño pico cuya masa correspondía al péptido deseado (pureza 4 %). El uso de hexafluoroisopropanol para disolver los posibles agregados que se pudieran formar no introdujo mejoras en el análisis cromatográfico. Por todo esto, no resultaba del todo claro que la etapa de ciclación hubiera funcionado bien y se hubiera obtenido el producto deseado, sin embargo en el crudo se observó en un porcentaje muy bajo y además presentando un pico cromatográfico ancho, como si pudiera tratarse de algún tipo de agregado.

Considerando los buenos resultados obtenidos en la síntesis de la cadena peptídica lineal de la Axinelina B y los problemas derivados de la etapa de ciclación del péptido, se decidió realizar un segundo ensayo de síntesis del péptido cíclico, utilizando una resina de funcionalización más baja para favorecer el proceso de ciclación

intramolecular. Para este nuevo ensayo se utilizó el soporte polimérico MBHA-PS (f: 0.37 mmol·g⁻¹). A nivel sintético, se siguió básicamente un protocolo similar al ya descrito (Esquema 38). No obstante, en este caso se decidió utilizar la treonina protegida con el grupo tritilo en vez de *terc*-butilo, con objeto de eliminarlo de la resina antes de la escisión del péptido utilizando concentraciones más bajas de TFA (1 %) y así, posteriormente, poder liberar el péptido de la resina con TFA/*m*DMB para obtener el producto deseado. De esta manera, se conseguiría evitar el uso de concentraciones altas de TFA requeridas para eliminar el grupo *terc*-butilo, y un crudo peptídico más puro, al haber eliminado previamente los subproductos procedentes de la eliminación del grupo protector tritilo. Tras obtener la cadena lineal de Axinelina B, con una pequeña alícuota de resina se evaluó la liberación del péptido lineal **17** protegido en los extremos utilizando distintas mezclas acidolíticas tal y como se muestra en la Tabla 15.

Ensayo	Mezcla acidolítica	Tiempo (min)	Rendimiento de liberación (%)
1	TFA/DCM (10:90)	2 × 15 min	59
2	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:5:90)	6 × 10 min	Cuantitativo

Tabla 15. Rendimientos de liberación del precursor lineal de la Axinelina B de la resina utilizando diferentes mezclas acidolíticas

Tras confirmar la identidad del péptido lineal por HPLC, se ensayaron dos nuevas condiciones de ciclación en fase sólida utilizando sales de fosfonio, debido a su mayor reactividad en comparación con las carbodiimidas. Sobre dos alícuotas diferentes de peptidil-resina, se llevaron a cabo dos tratamientos de 1 h 30 min con PyBOP/EDIA/HOBt en un caso y con PyAOP/EDIA/HOAt en el otro. Los tiempos de reacción fueron más cortos que en el caso del ensayo realizado con carbodiimida para evitar reacciones secundarias, como la racemización que puede ocurrir al trabajar en condiciones básicas. El proceso de ciclación se siguió mediante el ensayo cualitativo de cloranilo, resultando negativo en ambos casos tras los dos tratamientos. A continuación, se trató una alícuota de cada peptidil-resina con TFA/TIS/DCM (1:5:94, 1 min + 15 min) con objeto de eliminar el grupo protector tritilo de la cadena lateral de la treonina y, acto seguido, se liberó el péptido con la mezcla acidolítica

TFA/*m*DMB/DCM (5: 5: 90, 6 × 10 min). Lamentablemente, al analizar ambos crudos peptídicos por HPLC-MS no se logró detectar ningún pico correspondiente al péptido cíclico deseado.

Llegados a este punto se consideró oportuno ensayar una nueva estrategia sintética, a causa de los problemas detectados en la ciclación y/o análisis de los crudos de reacción.

1.5.2.2. Estrategia sintética 2

La nueva estrategia sintética se basa en el mismo concepto que el utilizado para la síntesis en fase sólida de la Brevianamida F **12**. De esta manera se trata de evitar la ciclación a través del grupo amino de un residuo de prolina, menos asequible al ser una amina secundaria (Figura 26, A).

Así, aprovechando la versatilidad del método y la posibilidad de elongar la cadena peptídica a través del extremo carboxilo, se optó por acoplar el residuo de prolina en esta posición, permitiendo así la formación del ciclo entre el grupo amino primario de la fenilalanina y el grupo carboxilo del residuo de prolina (Figura 26, B).

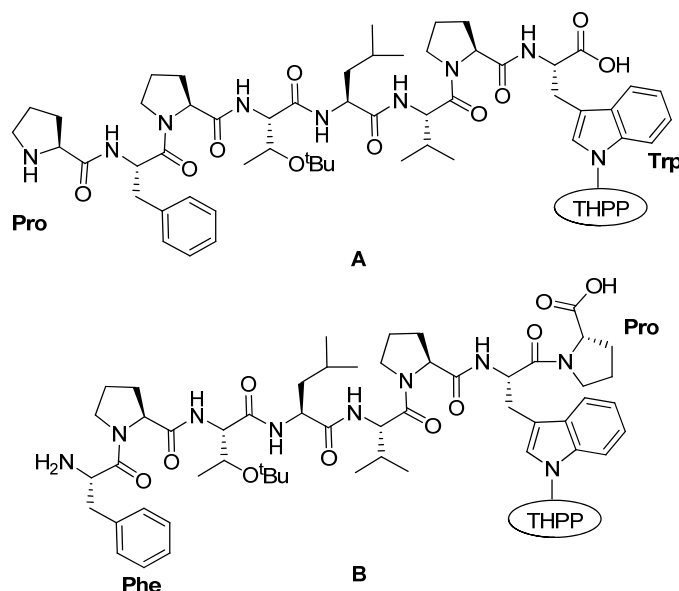
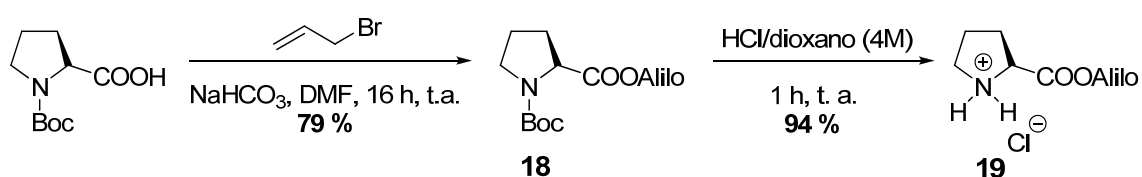


Figura 26. Precursores lineales de la Axinelina B

Para llevar a cabo este nuevo ensayo se utilizó el soporte polimérico MBHA-PS ($f = 0.37 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$). El protocolo de síntesis hasta la incorporación de Fmoc-Phe⁷-OH en la

dirección $C \rightarrow N$ fue similar al descrito en el apartado anterior (Esquema 38). En este caso, el rendimiento de incorporación de triptófano a la resina fue del 80 %, que se determinó por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc. A continuación, tras incorporar el residuo de Phe⁷, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo utilizando $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_3$ y PhSiH_3 .

El residuo de Pro⁸ se acopló sobre el extremo carboxilo utilizando el derivado H-(S)-Pro-OAlilo-HCl **19**, sintetizado previamente en solución siguiendo el esquema sintético que se muestra en el Esquema 39:



Esquema 39. Preparación de H-(S)-Pro-OAlilo **19**

La incorporación del derivado de prolina **19** se realizó utilizando la sal de fosfonio PyBOP en presencia de EDIA llevando a cabo dos tratamientos para asegurar que el acoplamiento se había producido cuantitativamente, dada la imposibilidad de poder comprobarlo a través de ensayos colorimétricos. A continuación, se eliminó el grupo protector alilo de la prolina incorporada utilizando $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_3$ y PhSiH_3 y, seguidamente, se eliminó el grupo protector Fmoc de la fenilalanina del extremo amino utilizando DBU. La integridad del precursor lineal se comprobó por HPLC-MS tras el tratamiento acidolítico de una pequeña alícuota de peptidil-resina. Finalmente, se procedió a la ciclación del péptido lineal utilizando PyBOP y HOBT en presencia de EDIA y DMF como disolvente. Se realizaron dos tratamientos de 1 h 30 min cada uno, tras los cuales el ensayo de ninhidrina resultó negativo. La peptidil-resina así obtenida se trató con la mezcla acidolítica TFA/TIS/DCM (1: 5: 94, 1 min +15 min) con objeto de eliminar el grupo protector tritilo de la cadena lateral de la treonina y, acto seguido, se liberó el péptido de la resina utilizando la mezcla TFA/*m*DMB/DCM (5: 5: 90, 6 × 10 min). El análisis del crudo peptídico por HPLC-MS se realizó utilizando una columna C₄ detectándose, en este caso, el péptido cíclico deseado (Figura 27).

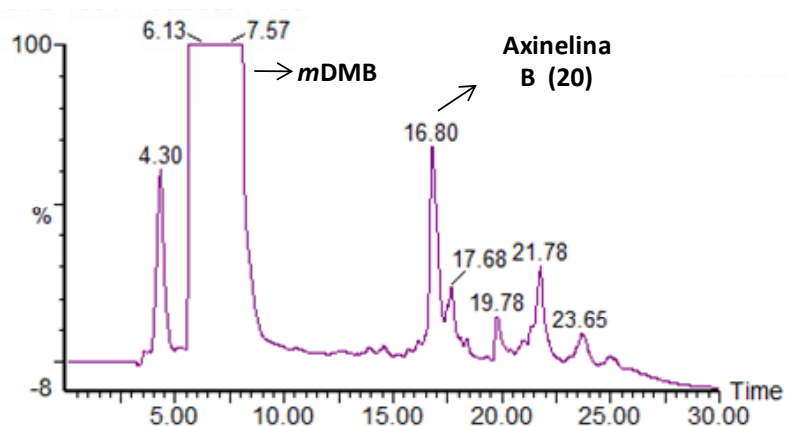


Figura 27. Análisis cromatográfico del crudo peptídico de la Axinelina B. Condiciones cromatográficas: (Symmetry C₄, 4.6 × 250 mm, 5 μm, 5→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm).

Los resultados obtenidos utilizando la estrategia sintética 2 ponen de manifiesto que, en el caso de la estrategia sintética 1, la reacción de ciclación no tuvo lugar de manera satisfactoria, a pesar de los resultados negativos obtenidos en los ensayos de cloranilo realizados. La dificultad de formar el enlace amida para ciclar el péptido a través de una amina secundaria se puede resolver al tener la posibilidad de incorporar residuos de aminoácidos a través del extremo carboxilo, permitiendo de esta manera que la ciclación tenga lugar a través de un extremo amino más reactivo. Otra consideración a tener en cuenta es el hecho de que al incorporar un residuo extra a través del extremo carboxilo del residuo de Trp¹ se aleja el extremo carboxilo del soporte polimérico, reduciendo así posibles impedimentos estéricos.

Desde el punto de vista de la liberación del péptido de la resina hay que destacar el bajo rendimiento obtenido (24 %), a diferencia de los rendimientos obtenidos para los correspondientes precursores lineales de la Axinelina B y la Brevianamida F. Por ello, se decidieron explorar otras condiciones acidolíticas cuyos resultados se muestran en la Tabla 16.

Ensayo	Mezcla acidolítica	Tiempo (min)	Rendimiento de liberación (%)
1	TFA/DCM (90:10)	10 min	7
2	TFA/DCM (10:90)	2 × 15 min	14
3	TFA/DCM (10:90) 45°C	30 min	11
4	TFA/ <i>m</i> DMB/DCE (5:5:90) 45°C	30 min	15
5	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:5:90)	6 × 10 min	24
6	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (10:20:70)	6 × 10 min	39
7	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (85:5:10)	10 min	9
8	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (85:5:10)	120 min	6
9	TFA/tioanisol/DCM (85:5:10)	10 min	8
10	TFA/tioanisol/DCM (10:5:85)	6 × 10 min	14

*Los rendimientos se determinaron por análisis de aminoácidos de las peptidil-resinas tratadas con las diferentes mezclas acidolíticas.

Tabla 16. Rendimientos de liberación de la Axinelina B **20** de la resina utilizando diferentes mezclas acidolíticas

En todos los casos, los crudos de reacción se analizaron mediante HPLC-MS de fase inversa (C₄) para confirmar la presencia del producto deseado en el crudo de reacción. Los resultados obtenidos siguen poniendo de manifiesto la dificultad de liberar el péptido cíclico del soporte polimérico, ya que no se consiguió llegar al 40 % de liberación en ninguno de los casos, a pesar de variar la temperatura, la concentración del capturador de carbocationes, la concentración de ácido o los tiempos de reacción. No obstante, se volvió a confirmar que los mejores resultados se consiguieron utilizando *m*DMB como capturador de carbocationes.

No está claro el por qué de los bajos rendimientos obtenidos en la liberación del péptido cíclico Axinelina B, y más si se compara con el de su precursor lineal o con la

Brevianamida F. Es posible que la naturaleza cíclica e hidrofóbica del péptido sea la causa de éstos resultados, bien desde el punto de vista del desanclaje por algún tipo de impedimento estérico, o bien porque dada la naturaleza hidrofóbica del péptido, una vez liberado permanezca fuertemente unido al soporte polimérico a través de interacciones no covalentes que hacen muy difícil su aislamiento.

1.5.3. Unguisina A (23)

Con objeto de obtener más información sobre las posibles causas de los problemas encontrados en el desanclaje de la Axinelina B, se optó por escoger otro péptido cíclico de tamaño similar pero de distinta naturaleza, la Unguisina A.

La Unguisina A¹¹¹ **23** es un heptapéptido cíclico aislado del hongo marino *Emericella unguis* (Figura 28). Estructuralmente se caracteriza por su carácter hidrofóbico ya que todos sus aminoácidos salvo el triptófano son bifuncionales, está formado por un gran número de aminoácidos D y, particularmente, contiene un residuo de ácido γ -aminobutírico (GABA) formando parte del ciclo. La presencia del residuo de GABA confiere flexibilidad conformacional a la estructura cíclica, lo cual, desde un punto de vista sintético, puede favorecer la ciclación de la cadena al facilitar la proximidad espacial de los residuos de aminoácidos situados en los extremos de la cadena.

Hunter y colaboradores¹¹² describieron la síntesis en fase sólida del precursor lineal de la Unguisina A y su posterior ciclación en solución. Sin embargo, la presencia del residuo de triptófano en la cadena permite plantear la síntesis total en fase sólida utilizando la metodología desarrollada.

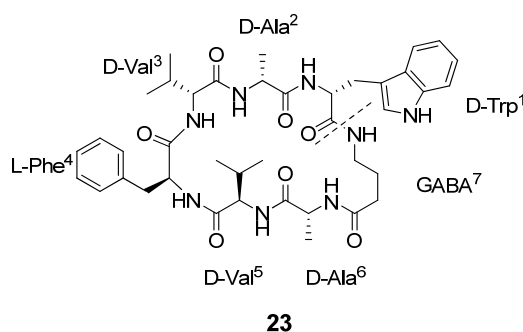
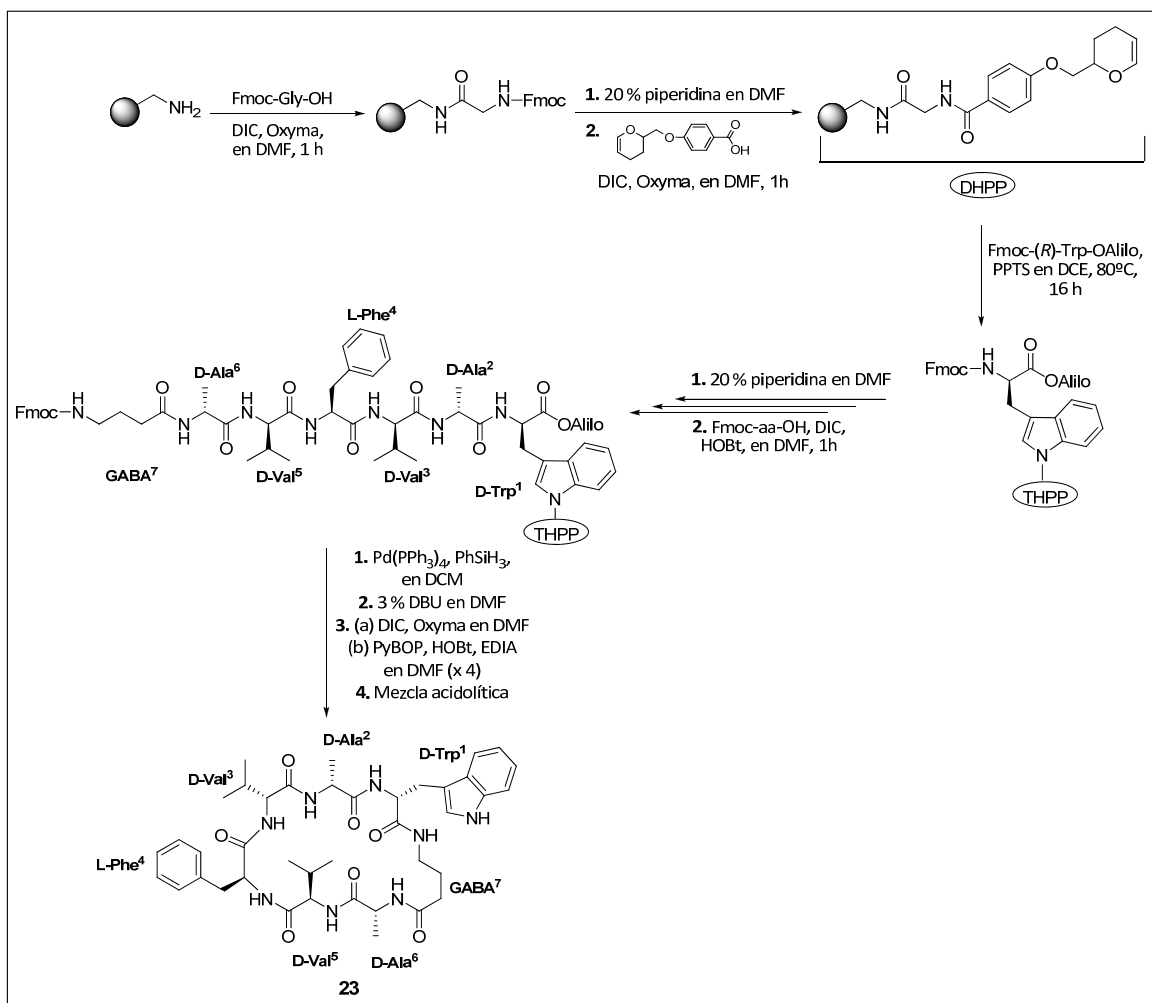


Figura 28. Unguisina A **23**

Para ello, en primer lugar se preparó el derivado Fmoc-(*R*)-Trp-OAlilo **21** siguiendo la misma estrategia sintética que para la síntesis del enantiómero *S* **1** (Esquema 19). El derivado **21** se obtuvo con un 80 % de rendimiento tras la purificación cromatográfica en gel de sílice.

La síntesis de la cadena peptídica se realizó utilizando la resina con base de poliestireno MBHA-PS ($f = 0.37 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$). Primeramente, se incorporó Fmoc-Gly-OH como estándar interno para poder cuantificar por análisis de aminoácidos y, a continuación, el soporte polimérico se funcionalizó con el espaciador bifuncional **3**. Los acoplamientos se realizaron utilizando una carbodiimida (DIC) como agente de acoplamiento en presencia de Oxyma[®] como aditivo y DMF como disolvente. La incorporación del derivado de triptófano **21** se realizó siguiendo las condiciones experimentales descritas en el apartado 1.3.2. El rendimiento de incorporación del derivado de triptófano fue del 70 %. El acoplamiento de los diferentes aminoácidos se llevó a cabo en las condiciones estándar utilizando DIC y Oxyma[®] y DMF como disolvente. Así, se acoplaron de forma secuencial los siguientes aminoácidos: Fmoc-D-Ala²-OH, Fmoc-D-Val³-OH, Fmoc-Phe⁴-OH, Fmoc-D-Val⁵-OH, Fmoc-D-Ala⁶-OH y Fmoc-GABA⁷-OH. A continuación, se procedió a eliminar el grupo protector alilo utilizando el Pd(PPh₃)₄ en presencia de PhSiH₃ y, seguidamente, se eliminó el grupo protector Fmoc del extremo amino con la base no nucleófila DBU (Esquema 40).



Esquema 40. Síntesis en fase sólida de la Unguisina B **23**

Una vez obtenida la cadena peptídica lineal desprotegida en sus extremos sobre la resina, se realizaron dos ensayos de liberación del péptido del soporte polimérico con alícuotas de peptidil-resina (Tabla 17).

Ensayo	Mezcla acidolítica	Tiempo (min)	Rendimiento de liberación (%)
1	TFA/DCM (10:90)	6 × 10 min	57
2	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:5:90)	6 × 10 min	65

Tabla 17. Rendimientos de liberación del precursor lineal de la Unguisina A utilizando diferentes mezclas acidolíticas

El rendimiento de liberación del precursor lineal desprotegido fue, aunque ligeramente, más elevado en presencia del capturador de carbocationes *m*DMB, considerando los mismos tiempos de reacción y concentración de TFA. El análisis por

HPLC-MS confirmó la identidad de la cadena lineal del heptapéptido (con una pureza del 78 %).

Para llevar a cabo la ciclación de la cadena peptídica lineal en fase sólida se utilizó inicialmente DIC como agente activante en presencia de Oxyma® y DMF como disolvente. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación mecánica durante 16 h, dando lugar a un test de ninhidrina positivo, lo que indicaba que la reacción no había finalizado. Se decidió entonces utilizar la mezcla activante PyBOP/HOBt/EDIA y DMF como disolvente, con lo que se consiguió finalmente un ensayo de ninhidrina negativo tras 5 tratamientos de 2 h cada uno de ellos.

La liberación del péptido cíclico de la resina se llevó a cabo utilizando las mismas condiciones acidolíticas ensayadas para el péptido lineal desprotegido. Los resultados se muestran en la Tabla 18.

Ensayo	Mezcla acidolítica	Tiempo (min)	Rendimiento de liberación (%)
1	TFA/DCM (10:90)	6 × 10 min	52
2	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:5:90)	6 × 10 min	71

Tabla 18. Rendimientos de liberación de la Unguisina A **23** utilizando diferentes mezclas acidolíticas

Nuevamente, la mayor liberación del péptido tuvo lugar cuando se empleó el capturador de carbocationes *m*DMB con una diferencia respecto al ensayo sin *m*DMB más significativa (19 %) que en el caso del péptido lineal (8 %).

Como ejemplo, se muestra el perfil cromatográfico del crudo peptídico obtenido en el ensayo 1, donde se observa que el péptido cíclico Unguisina A es el producto mayoritario (pureza 75 %) cuya identidad se pudo confirmar por espectrometría de masas (Figura 29).

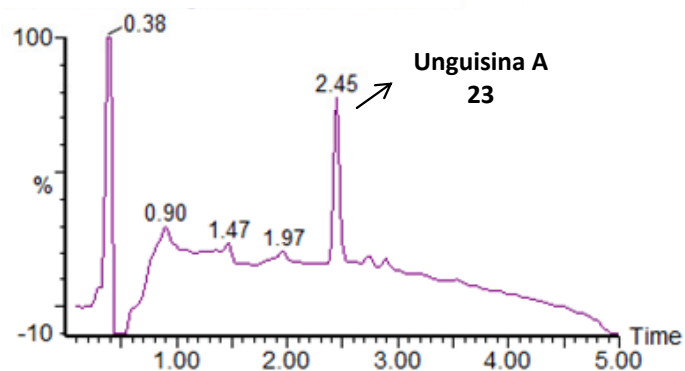


Figura 29. Análisis cromatográfico del crudo peptídico de la Unguisina A **23** resultante del ensayo 1. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

Estos elevados porcentajes de liberación del péptido cíclico confirman lo que ocurría con la Axinelina B donde el problema asociado a la liberación de la misma del soporte polimérico no era inherente a la metodología, sino que se trataba probablemente de un problema puntual, seguramente secuencia dependiente pero que en ningún caso le resta aplicabilidad a la metodología desarrollada.

2. LA CADENA LATERAL DE LA FENILALANINA COMO PUNTO DE UNIÓN REVERSIBLE AL SOPORTE POLIMÉRICO: EL ENLACE TRIACENO

2.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS PROTEGIDOS DE FENILALANINA

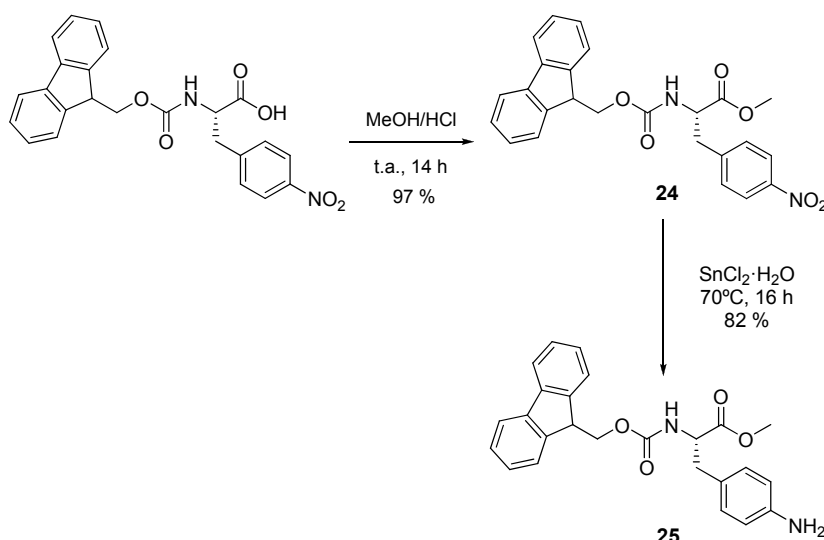
2.1.1. Introducción

Tal y como se ha comentado anteriormente, para poder unir un aminoácido trifuncional a través de su cadena lateral es necesario proteger convenientemente los grupos α -amino y α -carboxilo del aminoácido. Estas protecciones y la unión del aminoácido a la resina deben de ser ortogonales para evitar reacciones secundarias durante la síntesis, o la liberación prematura de cadenas peptídicas.

De acuerdo con la estrategia que se plantea, basada en la unión de la fenilalanina al soporte sólido a través de un enlace triaceno, es necesario funcionalizar el anillo aromático con un grupo amino, precursor sintético de la funcionalidad deseada. La labilidad del enlace triaceno al medio ácido implica la utilización del grupo Fmoc como protector de la función α -amino. Por lo que respecta al extremo α -carboxilo, y en analogía con lo descrito anteriormente para el caso del triptófano, la formación de los ésteres metílico o alílico siguen siendo dos posibles alternativas, ambas compatibles con la presencia del grupo Fmoc y, en este caso, también con la presencia de la funcionalidad triaceno. Por lo tanto, para poder llevar a cabo este estudio, se prepararon los correspondientes derivados de fenilalanina atendiendo a estos criterios.

2.1.2. Preparación del éster metílico de (S)- N^{α} -(9-fluorenilmetoxicarbonil)-4-aminofenilalanina (25)

La preparación del derivado protegido de fenilalanina **25** se llevó a cabo a partir del derivado comercial (S)- N^{α} -(9-fluorenilmetoxicarbonil)-4-nitrofenilalanina en dos etapas de reacción (Esquema 41).

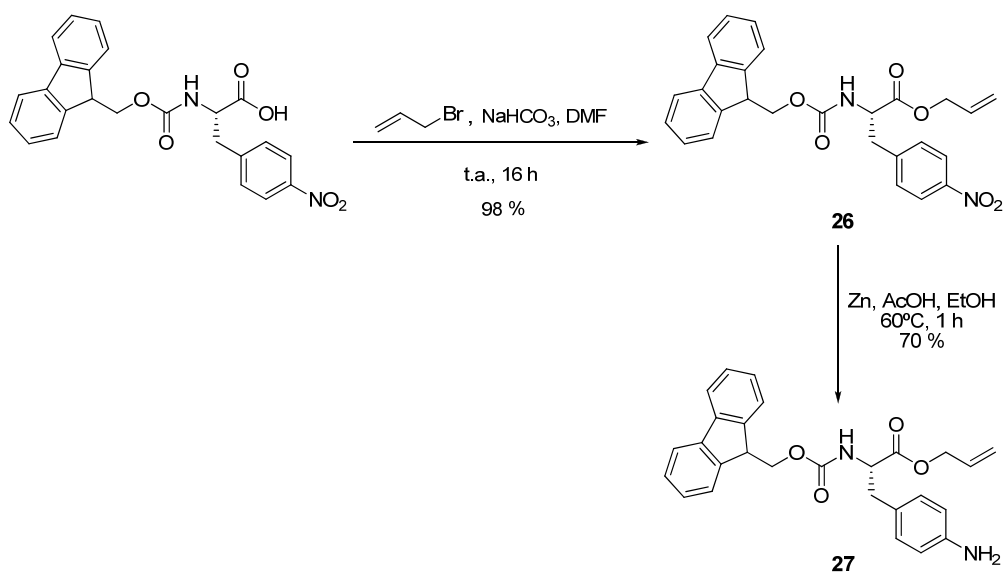


Esquema 41. Preparación del éster metílico de (*S*)-*N*^α-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-4-aminofenilalanina **25**

En la primera etapa de reacción, se llevó a cabo la protección del grupo α -carboxilo del aminoácido en forma de éster metílico utilizando HCl en MeOH anhidro. En estas condiciones, el éster **24** se obtuvo con un rendimiento prácticamente cuantitativo (97 %). En la segunda etapa, se realizó la reducción del grupo nitro con $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ¹¹³ en MeOH a 70 °C, obteniéndose el producto deseado **25** con un 82 % de rendimiento, que se utilizó sin previa purificación cromatográfica.

2.1.3. Preparación del éster alílico de (*S*)-*N*^α-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-4-aminofenilalanina (**27**)

La síntesis de este derivado de fenilalanina se realizó en dos etapas, partiendo del derivado comercial (*S*)-*N*^α-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-4-nitrofenilalanina. En primer lugar, se trató con bromuro de alilo en medio básico⁹⁹ para obtener el correspondiente éster alílico **26** mediante una reacción de sustitución nucleófila. La posterior reducción del grupo nitro se ensayó inicialmente utilizando $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, obteniéndose el producto deseado Fmoc-(*S*)-Phe(*p*NH₂)-OAlilo **27** con un 65 % de rendimiento tras purificar el crudo de reacción en gel de sílice. No obstante, al escalar esta última reacción se obtuvo un crudo difícil de manipular y purificar, por lo que se optó por explorar otras condiciones de reducción. La utilización de zinc como agente reductor en medio ácido¹¹⁴ permitió obtener el derivado **27** con elevada pureza y con un 70 % de rendimiento tras purificar el crudo en gel de sílice (Esquema 42).



Esquema 42. Preparación del éster alílico de (*S*)-*N*^α-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-4-aminofenilalanina **27**

2.2. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DEL ENLACE TRIACENO

La unión reversible de una molécula a un soporte sólido a través de la función triaceno se realiza utilizando, en general, resinas comerciales funcionalizadas con aminas secundarias tipo piperacina o bencilamina¹¹⁵ (Figura 30).

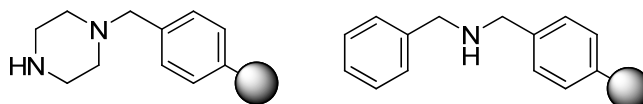
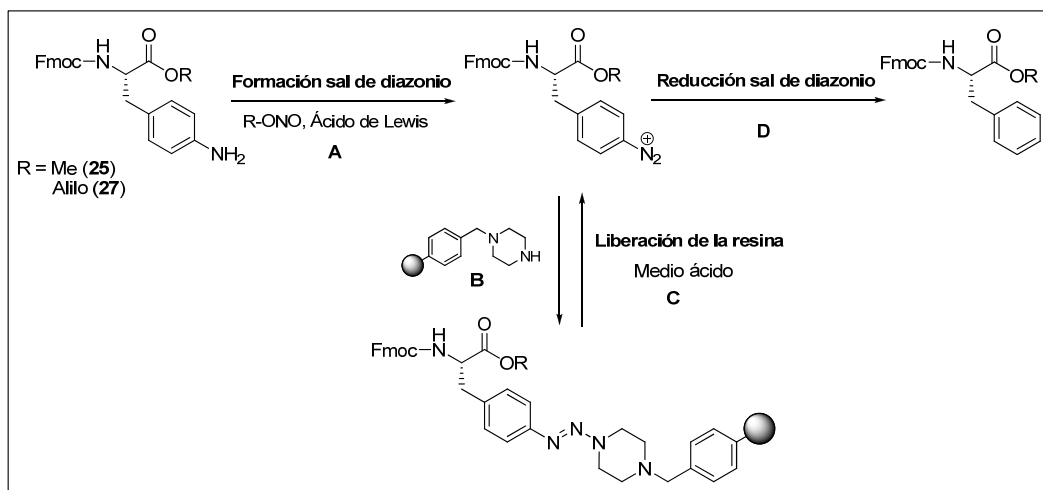


Figura 30. Soportes poliméricos comerciales funcionalizados con aminas secundarias tipo piperacina o bencilamina

La formación de la unión triaceno (Esquema 43) se lleva a cabo a partir de una amina aromática, que se transforma en la sal de diazonio correspondiente (etapa A) para hacerla reaccionar, a continuación, con la amina secundaria anclada al polímero (compuesto B). La función triaceno se descompone en condiciones ácidas suaves para regenerar la sal de diazonio (etapa C) cuya reducción posterior da lugar al anillo aromático exento de funcionalización, es decir, sin dejar traza en el punto de unión a la resina (etapa D).



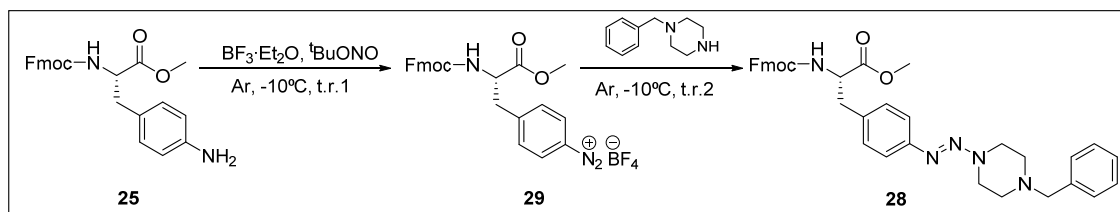
Esquema 43. Formación del enlace triaceno

2.2.1. En solución

En un primer momento, se creyó oportuno ensayar en solución la reacción de formación del enlace triaceno como paso previo a la implementación de la metodología en fase sólida. Este estudio facilitaría la búsqueda y optimización de las condiciones adecuadas de reacción, debido a la posibilidad de analizar más fácilmente cada etapa de reacción sin necesidad de liberar cada intermedio del soporte sólido.

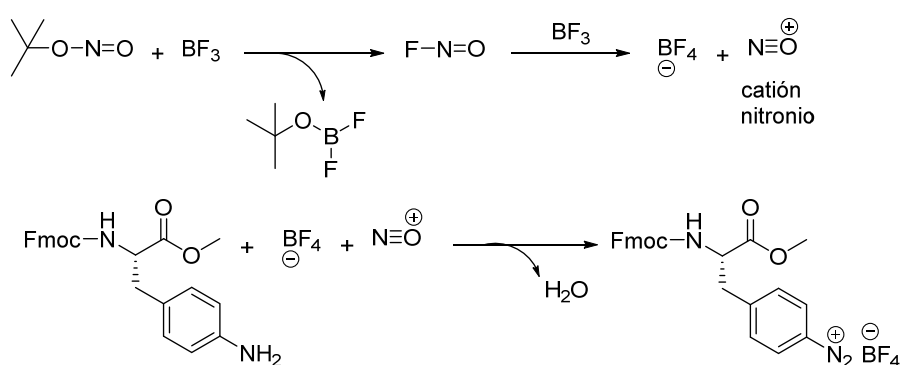
Los ensayos en solución se realizaron utilizando el derivado de fenilalanina Fmoc-(S)-Phe(*p*NH₂)-OMe **25** y el producto comercial 1-bencilpiperacina como modelo monomérico que mimetizara la unión entre la fenilalanina y una matriz polimérica funcionalizada con grupos piperacino.

Como punto de partida de este estudio, se consideraron los precedentes descritos en la literatura en lo que a formación de enlace triaceno en fase sólida se refiere.^{115, 116, 117} Así, para unir al polímero la amina aromática, se genera la sal de diazonio utilizando ^tBuONO y BF₃·Et₂O como ácido de Lewis. Esta reacción requiere atmósfera inerte (argón) y temperaturas bajas de reacción (-10 °C). En estas mismas condiciones, la sal de diazonio formada da lugar a la unión triaceno deseada por reacción con la amina secundaria presente en el soporte polimérico funcionalizado (Esquema 44).



Esquema 44. Formación del enlace triaceno en solución utilizando el derivado de fenilalanina **25** y la 1-bencilpiperacina como modelo monomérico

Desde un punto de vista mecanístico, el $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ actúa como ácido de Lewis generando el catión nitronio a partir de ${}^t\text{BuONO}$. Este catión es el responsable de la transformación del grupo amino en la sal de diazonio, proceso que lleva consigo la eliminación de una molécula de agua (Esquema 45).



Esquema 45. Mecanismo de formación de la sal de diazonio

La transformación de la sal de diazonio en la función triaceno tiene lugar por ataque nucleófilo de la amina secundaria al catión nitronio. En este sentido, la presencia de base en el medio de reacción es opcional según las condiciones de reacción descritas en la literatura.^{115, 116, 117}

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el derivado de fenilalanina Fmoc-(S)-Phe(*p*NH₂)-OMe **25** (1 eq) se hizo reaccionar con ${}^t\text{BuONO}$ (2 eq) y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2 eq) en THF o DCM para formar la sal de diazonio y, a continuación, se adicionó 1-bencilpiperacina (0.6 eq). Las reacciones se realizaron en atmósfera de argón y a -10°C . Este protocolo se llevó a cabo tanto en ausencia como en presencia de piridina como base. Los resultados de los diferentes ensayos realizados se muestran en la Tabla 19.

Ensayo	Disolvente	Base	t.r.1	t.r.2	Rendimiento (%)
1	THF	-	1.5 h	30 min	22
2	THF	Piridina (3 eq)	1 h	30 min	22
3	DCM	-	1.5 h	30 min	59
4	DCM	Piridina (60 eq)	1.5 h	3 h*	62

*El crudo de reacción se analizó a los 30 min de reacción, obteniendo un rendimiento de reacción del 52 %, y del 62 % a los 90 min de reacción.

Tabla 19. Rendimientos de formación del enlace triaceno en solución

Los rendimientos de reacción del derivado de fenilalanina **25** con la bencilpiperacina se determinaron por integración de áreas de picos cromatográficos.

El análisis por HPLC de los crudos de reacción mostró en todos los casos un pico cromatográfico mayoritario a un $t_R = 27$ min en las condiciones cromatográficas utilizadas. En ningún caso se detectó producto de partida restante. La Figura 31 muestra como ejemplo el cromatograma obtenido en el ensayo 3 (Tabla 19). Para caracterizar este producto, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en gel de sílice y se analizó por ^1H -RMN, espectrometría de masas (ESI) e IR, concluyendo que el producto correspondía al derivado triacénico **28**. Así, en el espectro de ^1H -RMN aparecía una señal a 3.72 ppm correspondiente al éster metílico del derivado de fenilalanina y también señales a 3.79 ppm y 2.61 ppm, correspondientes al anillo piperacínico. Además, la presencia en el IR de una banda intensa a 1448 cm^{-1} , característica de la vibración de tensión $\text{N}=\text{N}$ de la función triaceno, permitió confirmar inequívocamente la identidad del producto deseado.

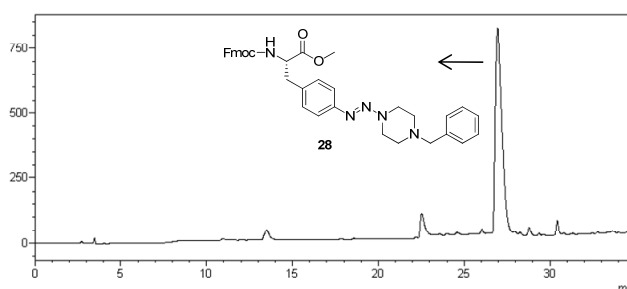


Figura 31. Análisis cromatográfico resultante del ensayo 3. Condiciones cromatográficas: (Nucleosil C_{18} , 4×250 mm, $10\ \mu\text{m}$, $0 \rightarrow 100\%$ B en 30 min (A: H_2O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo $1\ \text{mL}/\text{min}$, $\lambda = 220\ \text{nm}$).

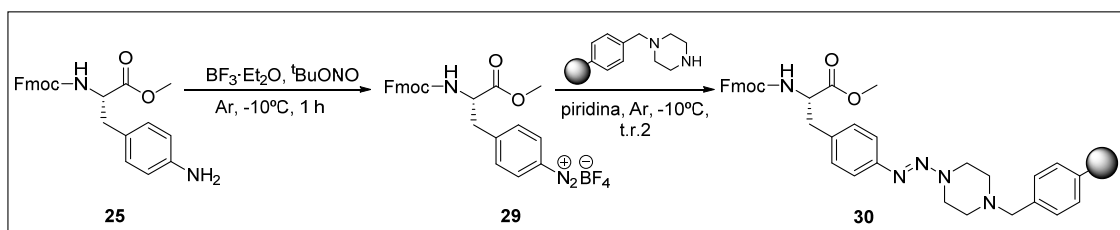
El producto **28** apareció siempre acompañado en proporciones variables de otro producto con un $t_R = 29$ min y un espectro de $^1\text{H-RMN}$ similar, lo que indicaba que probablemente se trataba de un estereoisómero, si se tiene en cuenta que la función triaceno puede dar lugar a estereoisomería Z/E. Sin embargo, la espectrometría de masas no fue concluyente al respecto. Este producto desconocido se obtuvo en menor proporción cuando se utilizó piridina como base y DCM como disolvente (ensayo 4).

Los resultados que se muestran en la Tabla 19 ponen de manifiesto que el DCM es mejor disolvente que el THF para llevar a cabo la reacción alcanzándose un rendimiento del 62 % del producto **28** (ensayo 4). Este porcentaje de incorporación, aunque no muy alto, se consideró aceptable para llevar a cabo la síntesis de péptidos en fase sólida, especialmente si se utilizan soportes poliméricos con funcionalizaciones elevadas, ya que en la preparación de péptidos cíclicos, por ejemplo, se requieren funcionalizaciones moderadas o bajas para favorecer la ciclación intramolecular sobre el polímero.

2.2.2. En fase sólida

Una vez que el estudio en solución permitió demostrar la viabilidad de unir la fenilalanina a través de su cadena lateral mediante un enlace triaceno utilizando el modelo monomérico 1-bencilpiperacina, se decidió ensayar la metodología en fase sólida.

De manera análoga al estudio realizado en solución, en fase sólida se utilizó el derivado de fenilalanina **25** y una resina comercial piperacinometilpoliestireno ($f = 1.1$ mmol·g $^{-1}$), funcionalizada con grupos piperacino. Las reacciones realizadas se detallan en el Esquema 46:



Esquema 46. Formación del enlace triaceno en fase sólida utilizando el derivado de fenilalanina **25** y la resina comercial piperacinometilpoliestireno

La formación de la sal de diazonio del derivado de fenilalanina **25** se llevó a cabo en solución utilizando ^tBuONO (2 eq), BF₃·Et₂O (2 eq) en DCM y atmósfera de argón, a -10°C de temperatura durante 1 h. Una vez obtenida la sal de diazonio **29** y, sin aislarla, se hizo reaccionar directamente con el soporte polimérico utilizando diferentes condiciones de reacción (Tabla 20):

Ensayo	Base	t.r.2 (h)	f _{final} (mmol·g ⁻¹)	Rendimiento de incorporación (%)
1	-	2	-	No detectado
2	Piridina (15 eq)	16	0.11	10
3	Piridina (30 eq)	3	0.64	64
4	Piridina (80 eq)	3	0.52	64

Tabla 20. Rendimientos de formación del enlace triaceno en fase sólida

Los rendimientos de incorporación del derivado de fenilalanina **25** a la resina se determinaron por cuantificación espectrofotométrica del divenzofulveno que se libera al eliminar el grupo protector Fmoc con piperidina.

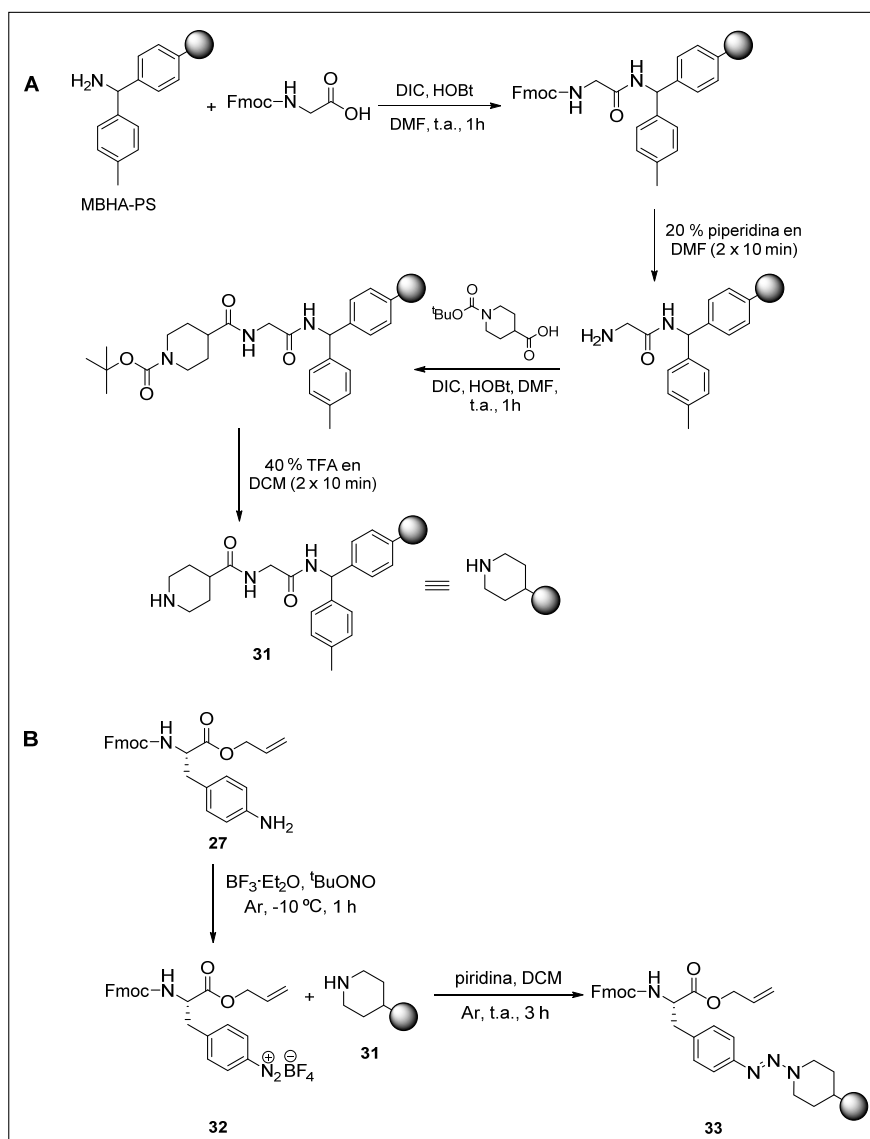
Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que, a diferencia de lo que ocurre en solución, la presencia de base era imprescindible para llevar a cabo la formación del enlace triaceno, ya que en ausencia de ésta (ensayo 1) no se consiguió acoplar el aminoácido **25** a la resina. El rendimiento más elevado se obtuvo utilizando un exceso de 30 eq de base, y éste no mejoró al aumentar la cantidad de piridina adicionada. Dicho rendimiento corresponde a un grado de funcionalización de la resina adecuado para la síntesis de péptidos.

A continuación, se planteó la posibilidad de utilizar un espaciador bifuncional que incorporara la función piperacino para funcionalizar un determinado soporte polimérico. Tal y como se ha comentado anteriormente, la utilización de un espaciador bifuncional permitiría, por una parte, poder trabajar con resinas de distintas naturalezas dependiendo de las características del producto a sintetizar y, por otra, controlar el grado de funcionalización del polímero, así como también llevar a cabo cuantificaciones por análisis de aminoácidos si se incorporara un aminoácido como patrón interno entre la resina y el espaciador bifuncional. En este sentido, se decidió

utilizar el ácido Boc-isonipecótico, disponible comercialmente, para ser unido a una resina funcionalizada con grupos amino (Esquema 47). El grupo protector Boc es compatible con la unión amida entre el espaciador y el soporte polimérico, ya que en las condiciones requeridas para la eliminación del grupo Boc (40 % TFA en DCM) el enlace amida es estable.

Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos para el triptófano con la resina MBHA-PS, se decidió utilizar este soporte polimérico para realizar un ensayo preliminar, para el que se escogió el derivado de fenilalanina Fmoc-(S)-Phe(*p*NH₂)-OAlilo **27**. En primer lugar, se acopló Fmoc-Gly-OH como patrón interno a la resina MBHA-PS ($f = 0.63 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) y, tras eliminar el grupo protector Fmoc con una disolución de piperidina en DMF, se procedió a acoplar el espaciador bifuncional. La incorporación del espaciador bifuncional ácido Boc-isonipecótico al soporte polimérico se realizó utilizando una carbodiimida (DIC) como agente de acoplamiento y HOBt como aditivo en DMF. La eliminación del grupo protector Boc dio lugar a la peptidil-resina **31** (Esquema 47 A).

Paralelamente, se formó la sal de diazonio **32** del derivado de fenilalanina **27** utilizando las condiciones de reacción descritas en el Esquema 46 y, a continuación se adicionó la sal de diazonio a la peptidil-resina **31** sobre la que ya se había adicionado la piridina (Esquema 47 B). El rendimiento de la reacción (91 %) se determinó por cuantificación espectrofotométrica del divenzofulveno que se liberó al tratar la peptidil-resina **33** con piperidina.



Esquema 47. Formación del enlace triaceno en fase sólida utilizando el derivado de fenilalanina **27** y el espaciador bifuncional comercial ácido Boc-isonipecótico

En ensayos posteriores utilizando las mismas condiciones de reacción se obtuvieron rendimientos que oscilaron entre el 70 y 93 %. Estos resultados ponen de manifiesto que la formación del enlace triaceno es más eficiente utilizando soportes poliméricos funcionalizados previamente con grupos piperacino que empleando la resina comercial piperacinometilpoliestireno.

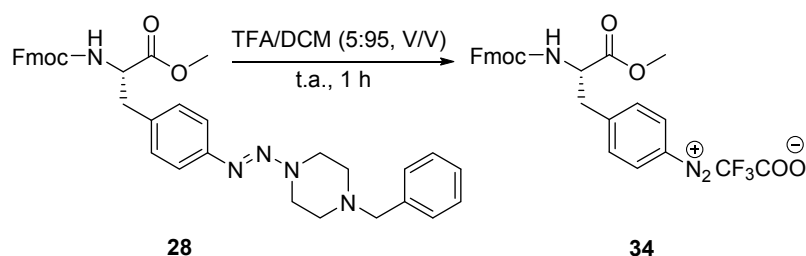
2.3. LIBERACIÓN DE LA FENILALANINA DEL SOPORTE POLIMÉRICO

2.3.1. En solución

Como paso previo al estudio de la escisión del enlace triaceno en fase sólida se optó por realizar un ensayo en solución, con el modelo monomérico **28**, que permitiera controlar más fácilmente las condiciones de reacción y facilitar el análisis de los productos obtenidos.

Teniendo en cuenta la labilidad del enlace triaceno en medio ácido, la escisión del mismo se ensayó utilizando TFA, tal y como se describe en la literatura (Esquema 48).

117

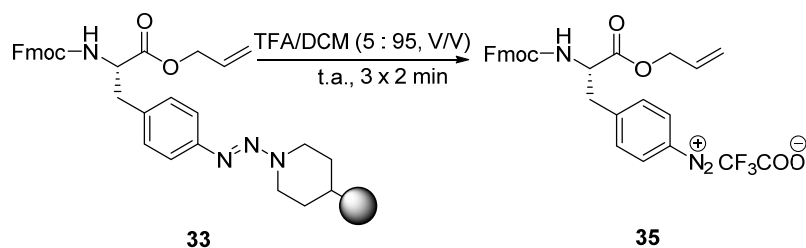


Esquema 48. Liberación de la fenilalanina en solución

Tras 1 h de tratamiento se analizó el crudo de reacción por HPLC, observándose un pico mayoritario (74 %) correspondiente a la sal de diazonio **34**, acompañado de un 4 % de derivado de triaceno **28**, cuantificados ambos por integración de áreas de los picos cromatográficos. Este resultado confirma la idoneidad del TFA para llevar a cabo el proceso de escisión del enlace triaceno.

2.3.2. En fase sólida

La escisión del enlace triaceno en fase sólida se realizó en condiciones similares a las descritas en el apartado anterior. En este caso, se consideró oportuno aumentar el número de tratamientos con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) y reducir los tiempos de reacción (2 min). Se analizaron por HPLC-MS (Figura 32) las alícuotas obtenidas en cada tratamiento, comprobándose que tras tres tratamientos no se detectaba más producto. El proceso global tuvo lugar con un rendimiento del 98 %, determinado por cuantificación espectrofotométrica del divenzofulveno que se liberó al tratar la peptidil-resina **33** con piperidina (Esquema 49).



Esquema 49. Liberación de la fenilalanina del soporte polimérico

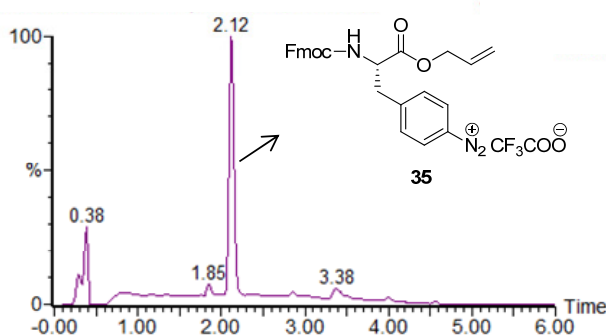


Figura 32. Análisis cromatográfico del crudo de la sal de diazonio **35**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm)

2.4. LA FUNCIÓN TRIACENO COMO ENLACE QUE NO DEJA TRAZAS: APLICACIÓN A LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA

2.4.1. Introducción

A la hora de abordar este proyecto, la unión triaceno había sido descrita originalmente por Bräse y colaboradores⁹² para la obtención en fase sólida de moléculas orgánicas pequeñas. Inicialmente, desarrollaron esta estrategia para poder unir moléculas a un polímero a través de un anillo aromático, de forma reversible y sin dejar trazas en el punto de unión entre la molécula y la matriz polimérica. Esto es posible al reducir la sal de diazonio que se obtiene tras la rotura acidolítica de la función triaceno, obteniéndose el producto deseado con un sustituyente H, es decir, sin ningún tipo modificación en el punto de anclaje a la resina (Figura 33).

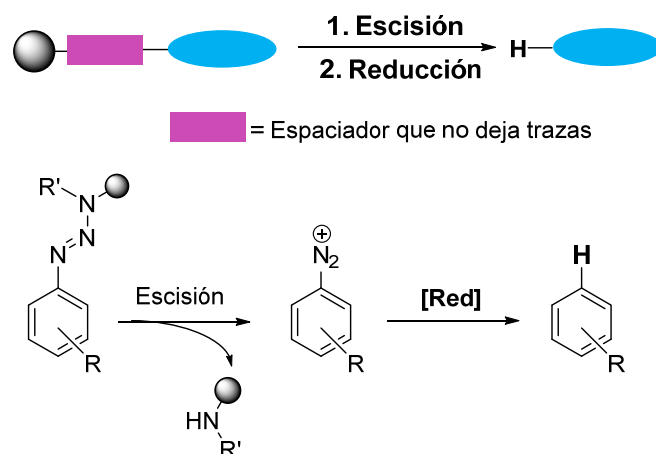


Figura 33. La función triaceno como enlace que no deja trazas

En este sentido, se han descrito en la literatura diferentes condiciones que permiten reducir la sal de diazonio una vez liberada la molécula. Algunos ejemplos son el uso de HCl en presencia de THF,⁹² H₂PO₃,⁹² HSiCl₃,¹¹⁸ condiciones que permiten llevar a cabo la escisión y reducción en una única etapa; o bien la utilización de TFA para liberar la sal de diazonio de la resina, seguido de un tratamiento con THF/DMF¹¹⁷ en una etapa posterior para llevar a cabo la reducción.

En base a lo descrito hasta el momento, se planteó la posibilidad de aplicar esta metodología para la obtención de péptidos cíclicos y modificados de distinta naturaleza.

2.4.2. Estudio de la reducción de la sal de diazonio

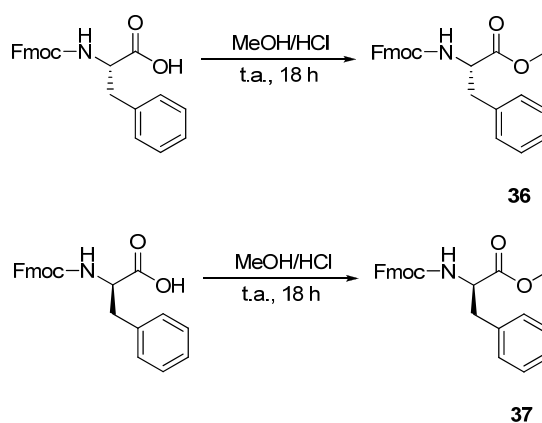
Como se ha comentado, en la literatura se han descrito diversos métodos para reducir la sal de diazonio que se obtiene tras escindir el enlace triaceno de un soporte polimérico en medio ácido.^{92, 117, 118} Dichas sales suelen ser estables, lo que se aprovecha, como se verá más adelante, para funcionalizar el anillo aromático con diferentes grupos funcionales.

La sustitución del catión diazonio por un átomo de hidrógeno se puede llevar a cabo con HCl y THF,⁹² HSiCl₃,¹¹⁸ H₂PO₃,⁹² o bien con TFA seguido de un tratamiento con THF/DMF.¹¹⁷ Un aspecto muy importante a tener en cuenta para la aplicación de la metodología es que las condiciones de reducción deben ser compatibles con la naturaleza de los péptidos, al ser éstos moléculas altamente funcionalizadas. Así, se

deben encontrar unas condiciones suaves de reducción, cuyo espectro de aplicación sea lo más amplio posible para poder utilizarlas con cualquier tipo de péptido, independientemente de su secuencia. Por este motivo, en un principio se descartó la utilización de triclorosilano, ya que reduce el núcleo indólico de la cadena lateral del triptófano a indolina y por tanto, no se podría utilizar para sintetizar péptidos que contuvieran residuos de triptófano.

En estudios precedentes realizados en nuestro grupo de investigación, se ensayó la reducción de la sal de diazonio con THF utilizando como modelo inicial la sal de diazonio Fmoc-(S)-Phe(pN_2^+)-OMe **34** derivada de la aminoacil-resina **30**. El tratamiento de la sal de diazonio **34** con THF a temperatura ambiente permitió obtener el producto deseado Fmoc-(S)-Phe-OMe **36** con un 65 % de rendimiento determinado por la integración de áreas de los picos cromatográficos tras el análisis del crudo de reacción por HPLC.

Tras encontrar estas condiciones de reducción se creyó oportuno realizar un estudio que permitiera evaluar la integridad quiral de la fenilalanina en las condiciones de reacción utilizadas. Este estudio se realizó por HPLC de fase normal quiral, utilizando una columna de empaquetamiento tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulosa (CHIRALCEL OD-H). Dado que la escisión de la fenilalanina del soporte polimérico proporciona el derivado Fmoc-Phe-OMe tras la reducción de la sal de diazonio, se prepararon como patrones los ésteres Fmoc-(S)-Phe-OMe **36** y Fmoc-(R)-Phe-OMe **37** a partir de los ácidos carboxílicos correspondientes, tal y como se indica en el Esquema 50.



Esquema 50. Preparación de los ésteres Fmoc-(S)-Phe-OMe **36** y Fmoc-(R)-Phe-OMe **37**

Los productos **36** y **37** se obtuvieron con buenos rendimientos (91 y 93 respectivamente) y se caracterizaron por distintas técnicas espectroscópicas. El derivado comercial de fenilalanina racémico, Fmoc-Phe-OMe, se analizó por cromatografía quiral encontrando unas condiciones óptimas que permitieran separar los dos enantiómeros (Figura 34 A).

Tras encontrar las condiciones óptimas de separación de los dos enantiómeros, se realizó el acoplamiento en fase sólida del derivado Fmoc-(*S*)-Phe(*p*NH₂)-OMe **25** y, seguidamente la posterior liberación del aminoácido como sal de diazonio cuya reducción se llevó a cabo utilizando THF. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice. El análisis de este producto en fase normal quiral (Figura 34 B) en las condiciones establecidas para separar la mezcla racémica mostró un pico único con el mismo tiempo de retención que el derivado **36**. Este resultado ponía de manifiesto que la integridad quiral del aminoácido no se alteraba en las condiciones de reacción utilizadas.

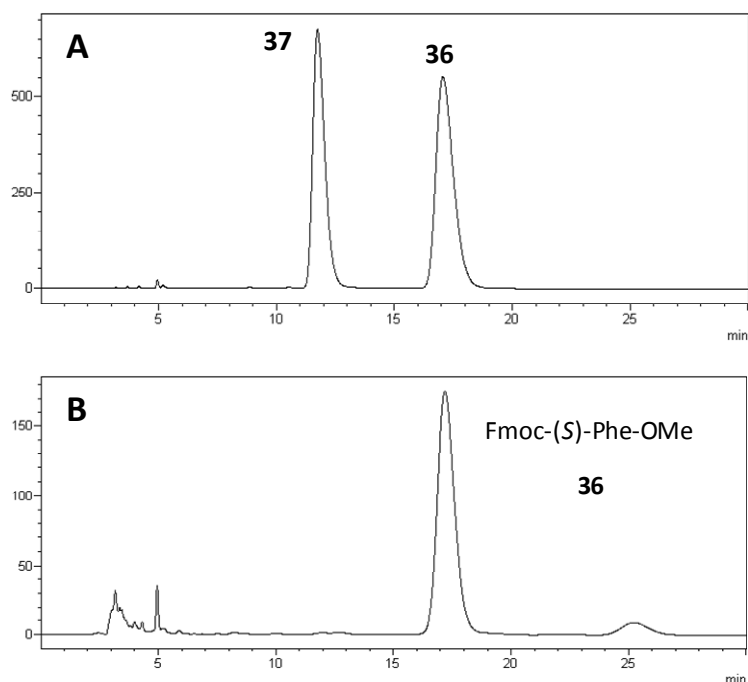


Figura 34. A. Análisis cromatográfico de la muestra racémica Fmoc-(*SR*)Phe-OMe. **B.** Análisis cromatográfico del compuesto obtenido tras la reducción de la sal de diazonio (**36**). Condiciones cromatográficas: columna de fase normal quiral CHIRACEL OD-H, (A: Hexano, B: *i*PrOH), sistema isocrático: 40 % de B en 30 min, 1ml/min, $\lambda = 220$ nm).

Sin embargo, ensayos realizados en nuestro laboratorio para aplicar estas condiciones de reducción con péptidos, pusieron de manifiesto la necesidad de tiempos de reacción muy largos (3-5 días) y, además, se obtenían crudos de reacción muy complejos. Estos resultados motivaron la búsqueda de una nueva metodología, cuya aplicabilidad se extendiera también a la reducción de sales de diazonio derivadas de péptidos de diferente naturaleza.

En este sentido, Wassmundt y colaboradores¹¹⁹ desarrollaron en el año 1995 un método para llevar a cabo la reducción de sales de diazonio aromáticas utilizando $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en DMF (Figura 35).

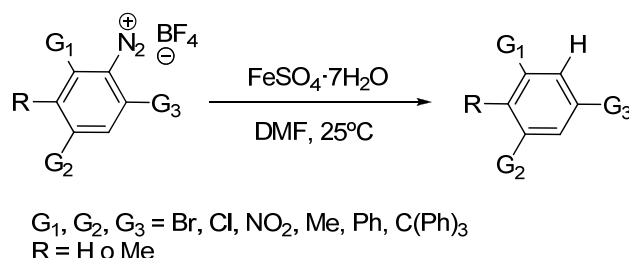
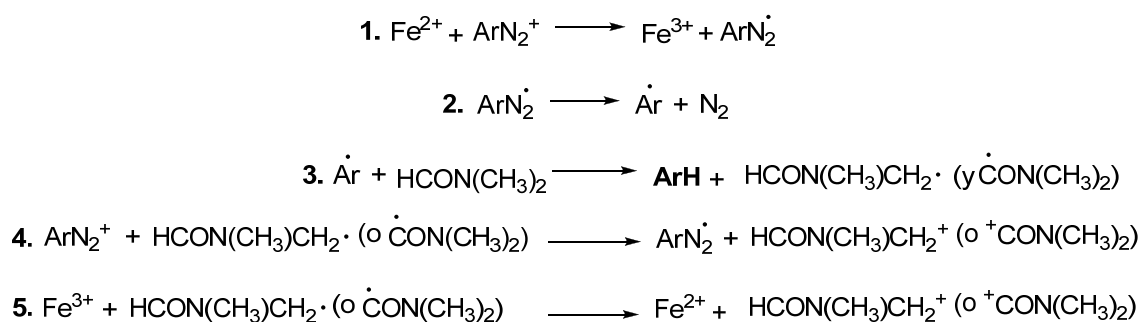


Figura 35. Reducción de sales de diazonio aromáticas utilizando $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en DMF

Esta reducción tiene lugar a través de un mecanismo radicalario tal y como se muestra en el siguiente esquema:

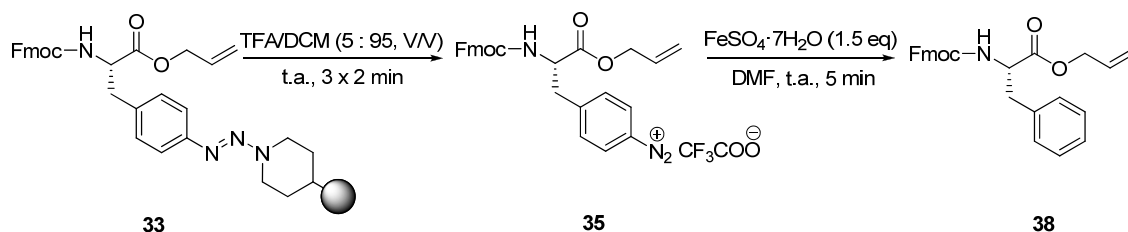


Esquema 51. Mecanismo de reducción de sales de diazonio utilizando $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en DMF

El ión ferroso reduce el catión diazonio a un radical diaceniilo (ecuación 1), que se fragmenta dando lugar al radical arilo y N_2 (ecuación 2). Este radical capta un radical hidrógeno de la DMF (ecuación 3), produciendo la especie aromática reducida y uno de los radicales isoméricos derivados del disolvente. El proceso se propaga por reacción de estos radicales con más sal de diazonio, para volver a generar radical diaceniilo (ecuación 4). De manera alternativa, el ión férrico formado en la etapa de iniciación

(ecuación 1) puede actuar también como oxidante de los radicales derivados de la DMF para regenerar el ión ferroso (ecuación 5).

Para ensayar el estudio de la reducción de la sal de diazonio con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se utilizó la sal Fmoc-(S)-Phe($p\text{N}_2^+$)-OAlilo **35** obtenida tras tratar la aminoacil-resina **33** con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (Esquema 52).



Esquema 52. Reducción de la sal de diazonio **35** utilizando $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en DMF

El análisis por HPLC-MS del crudo de reacción obtenido confirmó la presencia del producto deseado **38** obteniéndose con un 84 % de pureza (determinada por integración de áreas de los picos cromatográficos). El rendimiento de la reacción fue del 66 % tras la purificación del crudo por HPLC semipreparativo en fase inversa.

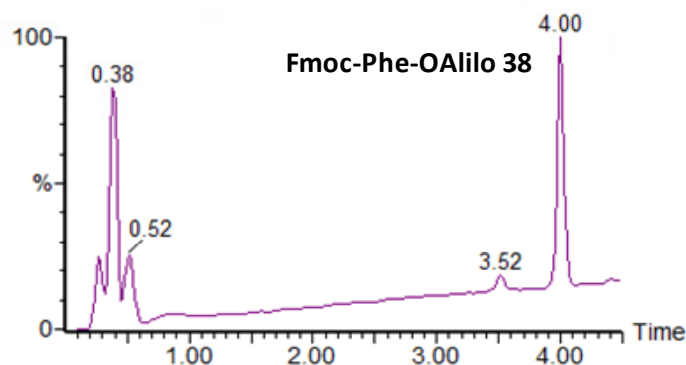


Figura 36. Análisis cromatográfico del crudo peptídico de Fmoc-Phe-OAlilo **38**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C_{18} , 4.6×50 mm, $3.5 \mu\text{m}$, $5 \rightarrow 100$ % B en 4.5 min (A: H_2O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, $\lambda = 220$ nm).

El resultado obtenido pone de manifiesto que la utilización de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en presencia de DMF es un método viable para reducir la sal de diazonio del anillo aromático de la fenilalanina y, por tanto, potencialmente útil en el marco de la estrategia para la unión reversible del aminoácido al soporte polimérico mediante el enlace triaceno. La reacción se realiza en condiciones suaves y tiempos muy cortos, dando lugar a crudos de elevada pureza. Sin embargo era necesario comprobar si, a

diferencia de lo que ocurriría en la reducción con THF, esta metodología también era útil para trabajar con péptidos.

Uno de los inconvenientes que, *a priori*, podría conllevar la utilización de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ es la presencia de trazas del metal en el péptido, sobretodo si se pretenden hacer ensayos biológicos. Así, un aspecto importante a incluir de cara al desarrollo de la metodología es asegurarse la eliminación del hierro remanente tras la reducción de la sal de diazonio. En este sentido, se pensó en la utilización de un test colorimétrico basado en la reacción del Fe(III) con tiocianato de amonio, que da lugar a un complejo de color rojo intenso ($[\text{Fe}(\text{NCS})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$). Este ensayo es muy sensible, ya que el complejo se puede detectar a niveles de ppb.

2.4.3. Síntesis de péptidos modelo

Con objeto de validar la metodología que se plantea, se ensayó la síntesis de péptidos biológicamente activos de distinta naturaleza en lo que a rasgos estructurales se refiere. Para sintetizar los diferentes péptidos modelo se utilizó la aminoacil-resina **33**, cuya síntesis se ha descrito anteriormente en el Esquema 47.

2.4.3.1. Síntesis de péptidos modificados en el extremo carboxilo

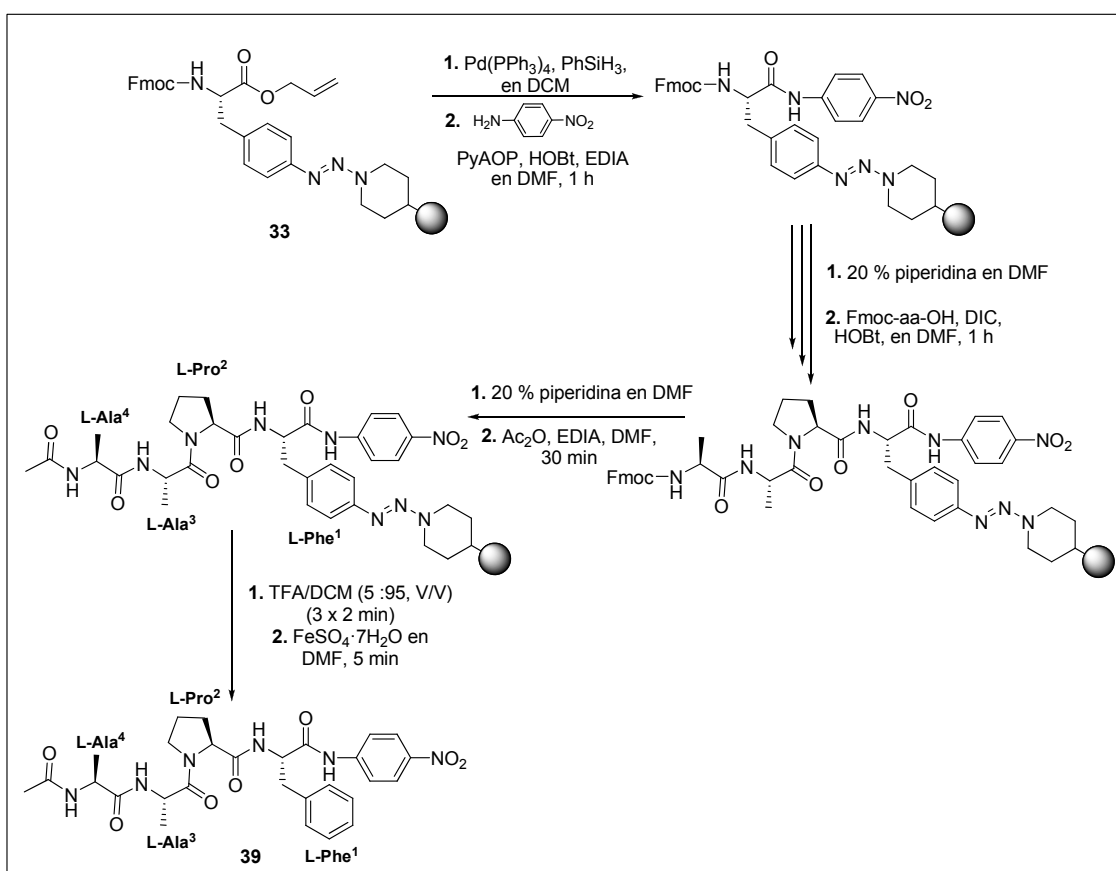
En ocasiones, dependiendo de la aplicación final de los péptidos, es necesario derivatizarlos. Sin embargo, cuando el extremo amino está funcionalizado, o debe de estar libre para no modificar la actividad biológica del mismo, una posibilidad es llevar a cabo la derivatización a través del extremo carboxilo. La utilización de una metodología basada en la unión del péptido al soporte polimérico a través de la cadena lateral de un aminoácido permite llevar a cabo la derivatización en fase sólida del extremo carboxilo de la cadena, aprovechando las ventajas que la síntesis en fase sólida ofrece.

Para realizar este estudio se escogieron como modelo dos péptidos modificados en el extremo carboxilo: el péptido Ac-AAPF-pNA **39**,¹²⁰ sustrato cromogénico utilizado en el estudio de actividad de proteasas y el análogo biotinilado Ac-AAPF **40**,^{121, 122} con potencial utilidad como sonda molecular. En ambos casos el esqueleto peptídico es el mismo, formado por aminoácidos cuyas cadenas laterales no tienen grupos reactivos

para poder derivatizar el péptido y con el extremo amino acetilado. La síntesis de ambos péptidos se llevó a cabo siguiendo dos estrategias sintéticas diferentes.

2.4.3.1.1. Síntesis de Ac-AAPF-pNA (39)

La estrategia utilizada para sintetizar el péptido Ac-AAPF-pNA **39** (Esquema 53) se basó en derivatizar en primer lugar el extremo carboxilo de la fenilalanina y, a continuación, elongar el péptido por el extremo amino, con objeto de evitar la posible racemización de la fenilalanina durante el acoplamiento de la *p*-nitroanilina. La cadena peptídica se ensambló siguiendo protocolos convencionales de síntesis de péptidos en fase sólida.



Esquema 53. Síntesis en fase sólida del péptido Ac-AAPF-pNA **39**

Primeramente, se trató la peptidil-resina **33** con el complejo $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ en presencia de PhSiH_3 para eliminar el grupo alilo del residuo de fenilalanina y, a continuación, se incorporó la *p*-nitroanilina al extremo carboxilo. Considerando el carácter poco nucleófilo de esta amina, debido a la presencia del grupo nitro en el anillo aromático, su incorporación al aminoácido se llevó a cabo con la sal de fosfonio PyAOP en presencia de HOBT y EDIA, y con un exceso de la amina (10 eq). Fueron necesarios 5

tratamientos de 1 h para llevar a cabo la completa formación de la *p*-nitroanilida, tal como se comprobó realizando el desanclaje de una alícuota de la peptidil-resina resultante y analizando el crudo obtenido por HPLC-MS. Tras eliminar el grupo protector Fmoc del extremo amino del residuo de fenilalanina con piperidina, se llevó a cabo la elongación de la cadena peptídica, acoplando secuencialmente los siguientes aminoácidos: Fmoc-Pro²-OH, Fmoc-Ala³-OH y Fmoc-Ala⁴-OH utilizando DIC y HOBt en DMF. Finalmente, se eliminó el grupo Fmoc del extremo amino de la cadena con una disolución de piperidina en DMF y se procedió a acetilar la amina resultante utilizando exceso de Ac₂O en presencia de EDIA y DMF como disolvente. Una vez ensamblada la cadena peptídica se procedió a liberar el péptido del soporte polimérico con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) y, seguidamente, se redujo la sal de diazonio tratando el crudo obtenido con FeSO₄·7H₂O en DMF durante 5 min. El análisis de aminoácidos de una alícuota de la peptidil-resina resultante indicó que la liberación del producto había tenido lugar con un 96 % de rendimiento. El análisis por HPLC-MS del crudo de reacción (Figura 37) mostró el producto deseado **39** (*t_R* = 6.3 min) con una pureza del 86 %, confirmando la aplicabilidad de la metodología basada en el uso de hierro en DMF para llevar a cabo la reducción de las sales de diazonio derivadas de péptidos, a diferencia de lo que ocurría con THF. Finalmente, la purificación del crudo de reacción por HPLC semipreparativo en fase inversa permitió obtener el producto puro con un 19 % de rendimiento global.

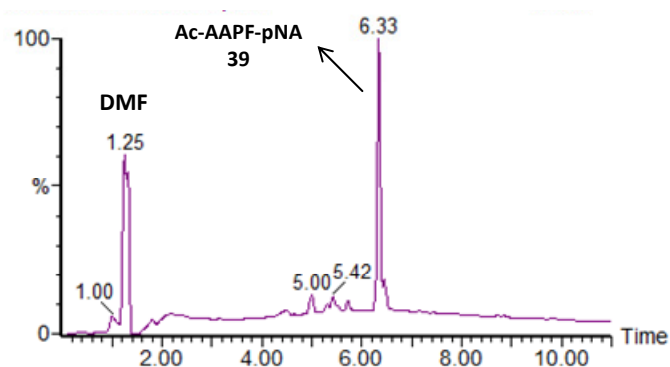
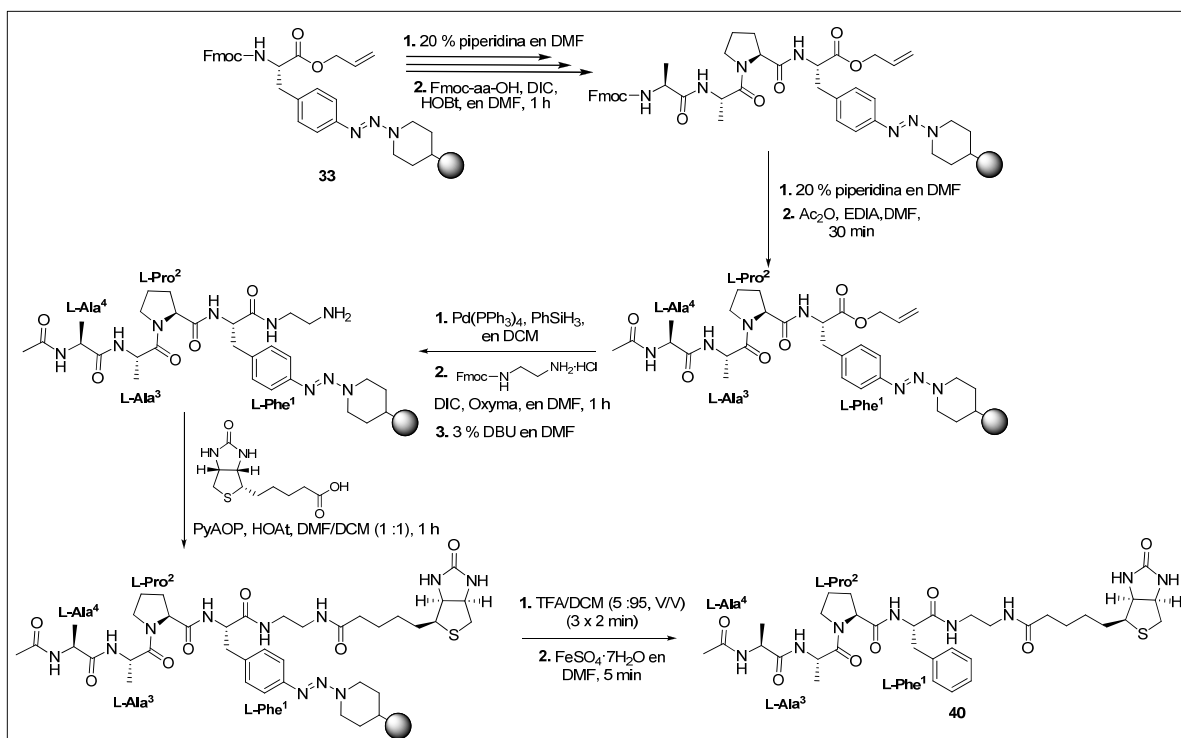


Figura 37. Análisis cromatográfico del crudo peptídico de Ac-AAPF-pNA **39**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm)

2.4.3.1.2. Síntesis del péptido biotinilado Ac-AAPF (40)

La estrategia sintética para la síntesis del péptido biotinilado **40** se basa, a diferencia del péptido **39**, en la construcción de la cadena peptídica por el extremo amino del residuo de fenilalanina en primer lugar y la derivatización del péptido por el extremo carboxilo como etapa final del ensamblaje de la cadena (Esquema 54).



Esquema 54. Síntesis en fase sólida del péptido biotinilado Ac-AAPF **40**

La construcción de la cadena peptídica se llevó a cabo de forma similar a la descrita para el péptido **39**. A continuación, se eliminó el grupo alilo utilizando el complejo Pd(PPh₃)₄ en presencia de PhSiH₃ y se procedió a la incorporación de la biotina. Para ello, se incorporó el espaciador Fmoc-NH(CH₂)₂NH₂-HCl utilizando DIC, Oxyma® y EDIA en DMF. Acto seguido, se eliminó el grupo protector Fmoc con una disolución de DBU en DMF y se acopló la biotina utilizando PyAOP, HOAt en presencia de EDIA y una mezcla DMF/DCM (1:1) como disolvente.

La liberación del péptido del soporte polimérico se realizó utilizando las condiciones acidolíticas ya descritas (TFA/DCM (5:95, V/V)), con un 97 % de rendimiento determinado por análisis de aminoácido) y la reducción de la sal de diazonio así obtenida se llevó a cabo utilizando FeSO₄·7H₂O en presencia de DMF.

El análisis del crudo peptídico así obtenido por HPLC-MS mostró el producto deseado ($t_R = 2.7$ min), que se obtuvo con una pureza del 93 %. Finalmente, la purificación del crudo de reacción por HPLC semipreparativo en fase inversa permitió obtener el producto puro con un 32 % de rendimiento global.

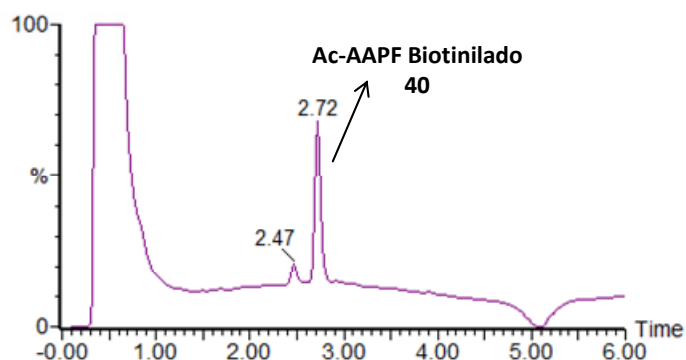


Figura 38. Análisis cromatográfico del crudo peptídico de Ac-AAPF biotinilado **40**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

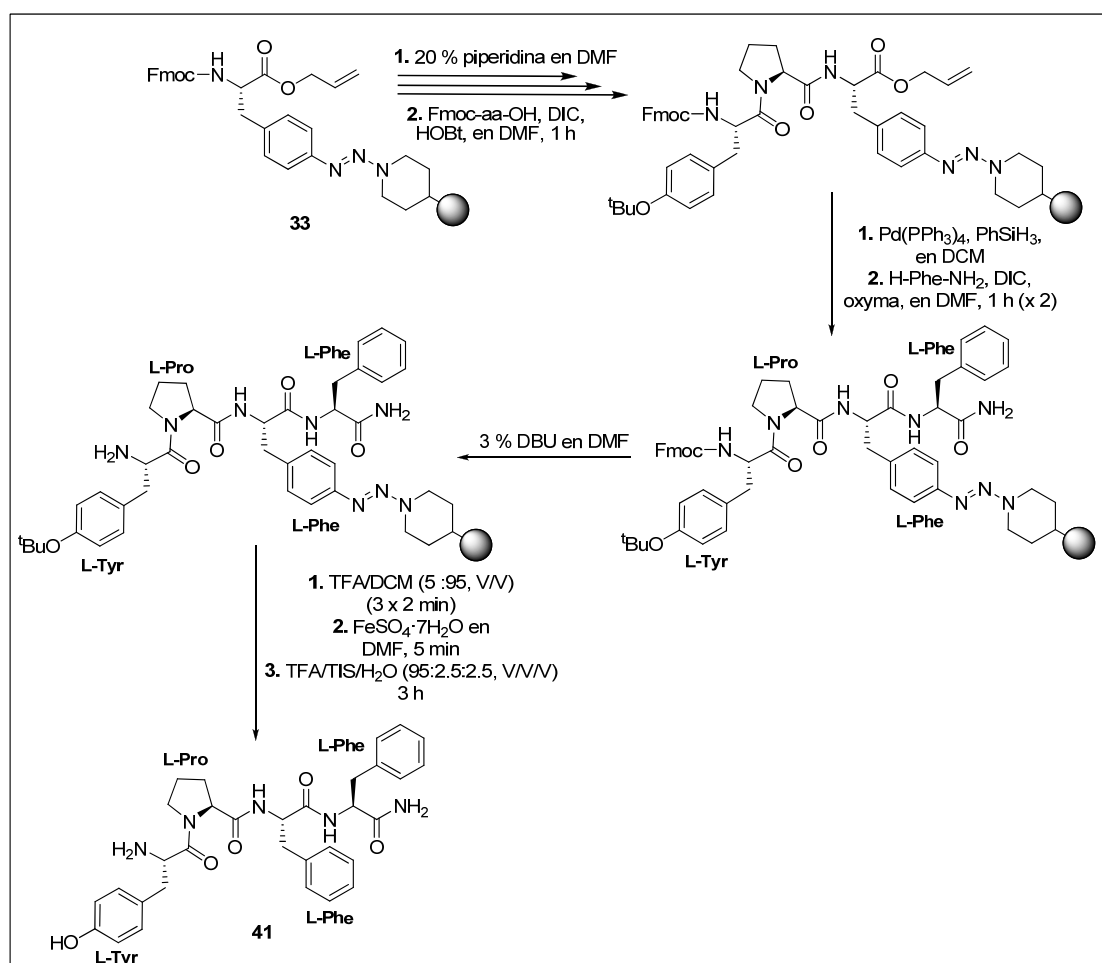
2.4.3.1.3. Síntesis de un péptido carboxamida: Endomorfina-2 (**41**)

En ocasiones, la actividad biológica de un péptido depende de la naturaleza de su extremo carboxilo y en muchos casos es necesario que esté en forma de carboxamida. La manera más habitual de preparar estos derivados peptídicos es utilizar resinas modificadas con espaciadores tipo Rink,¹²³ pero las condiciones acidolíticas de desanclaje (95% TFA) pueden ser incompatibles con la naturaleza de otras modificaciones de la secuencia peptídica. También existe la posibilidad de emplear resinas tipo Sieber¹²⁴ que permiten el desanclaje del péptido con porcentajes menores de TFA, pero los rendimientos de desanclaje pueden ser bajos.

En este sentido, la metodología descrita se adapta perfectamente, ya que permite incorporar en fase sólida, por el extremo carboxilo, un aminoácido derivatizado como carboxamida aprovechando el hecho de que muchos de ellos son comerciales. De esta forma se podrían obtener péptidos carboxamida sin necesidad de utilizar elevadas concentraciones de ácido para la liberación del péptido de la resina y con elevados rendimientos.

Como péptido modelo se escogió la Endomorfin-2 **41** un tetrapéptido carboxamida que actúa como agonista endógeno del receptor μ -opioide, con una elevada selectividad y especificidad.^{125, 126}

La estrategia sintética que se utilizó para sintetizar **41** consistió en elongar la cadena peptídica a partir del segundo residuo de fenilalanina y, a continuación, unir el derivado comercial carboxamida de la fenilalanina (H-Phe-NH₂) por el extremo carboxilo de la cadena (Esquema 55).



Esquema 55. Síntesis en fase sólida de la Endomorfin-2 **41**

En primer lugar, se realizó la construcción de la cadena peptídica adicionando secuencialmente los residuos Fmoc-Pro³-OH y Fmoc-Tyr⁴(^tBu)-OH, utilizando DIC y HOBT en DMF. A continuación, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo utilizando Pd (PPh₃)₄ y PhSiH₃ y se acopló H-Phe-NH₂ utilizando DIC y Oxyma[®] para minimizar la racemización. Este procedimiento se realizó dos veces con objeto de

asegurar que el acoplamiento fuera cuantitativo. Seguidamente, se eliminó el grupo protector Fmoc del extremo amino con una disolución de DBU en DMF y se liberó el péptido del soporte polimérico utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5: 95, V/V). La reducción de la sal de diazonio así obtenida se llevó a cabo utilizando $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en DMF. Considerando la baja concentración de ácido (TFA) con la que se produce la liberación del péptido, el tratamiento de escisión permite obtener el péptido deseado con la cadena lateral del residuo de Tyr⁴ protegida. La necesidad de utilizar concentraciones de ácido más elevadas para eliminar el grupo protector *tert*-butilo de la cadena lateral de este aminoácido, implica la realización de un tratamiento posterior sobre el crudo peptídico obtenido, utilizando la mezcla acidolítica TFA/TIS/H₂O (95: 2.5: 2.5, V/V/V). Una alícuota de la peptidil-resina obtenida se analizó por análisis de aminoácidos, indicando un rendimiento de liberación del péptido de la matriz polimérica del 98 %.

El análisis del crudo peptídico por HPLC-MS mostró el producto deseado ($t_R = 4.5$ min), con una pureza del 73 % (Figura 39). La purificación posterior del mismo por HPLC semipreparativo en fase inversa permitió obtener el producto puro con un 38 % de rendimiento global.

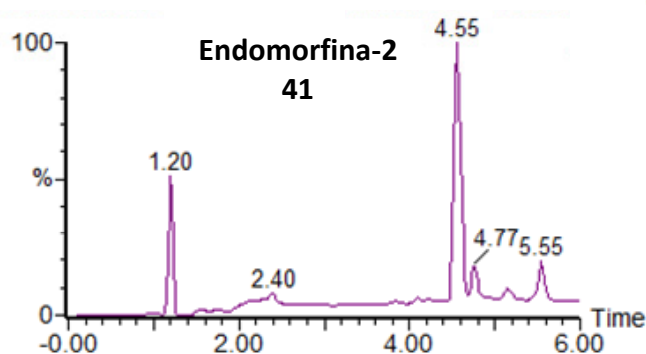
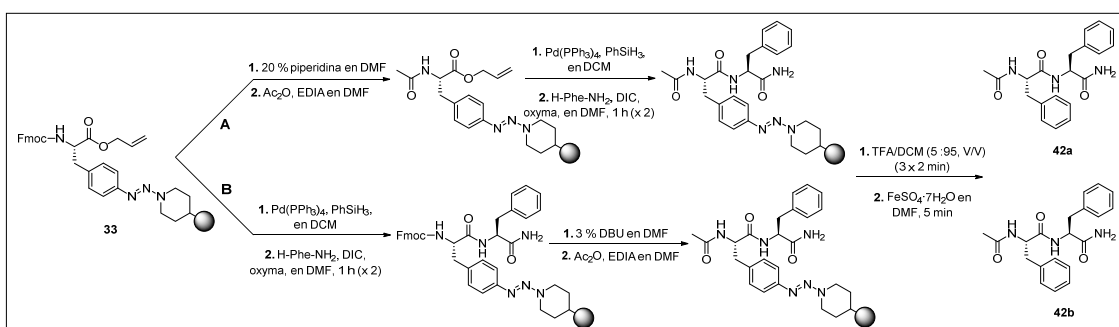


Figura 39. Análisis cromatográfico del crudo peptídico de Endomorfina-2 **41**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

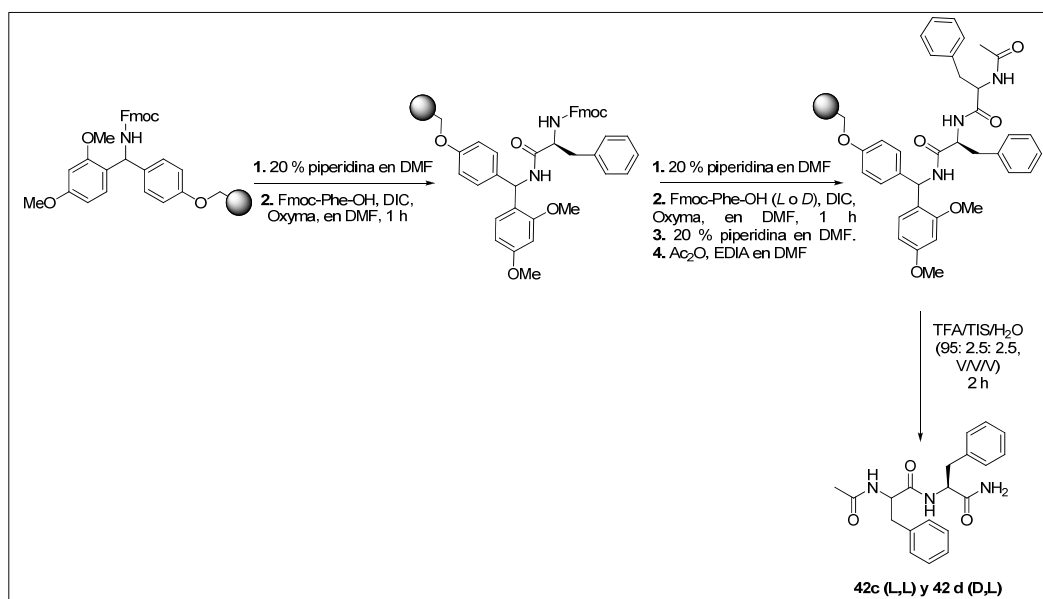
Teniendo en cuenta la estrategia sintética seguida para obtener **41**, se decidió evaluar si había habido epimerización durante el acoplamiento de H-Phe-NH₂ por el extremo carboxilo de la cadena (punto de anclaje al soporte polimérico), a pesar de no haber detectado la formación de diastereoisómeros por HPLC durante la síntesis.

Para ello se utilizó como modelo el dipéptido Ac-Phe-Phe-NH₂ **42**, cuya síntesis en fase sólida se realizó siguiendo dos rutas sintéticas diferentes (Esquema 56): una de ellas consistió en acetilar en primer lugar el residuo de fenilalanina unido al polímero y, a continuación, incorporar el derivado de fenilalanina carboxamida a través del extremo carboxilo (Estrategia A). La otra estrategia consistió en derivatizar en primer lugar el extremo carboxilo con el residuo de fenilalanina y, acto seguido, acetilar el extremo amino de la cadena dipeptídica (Estrategia B).



Esquema 56. Síntesis de los dipéptidos **42a** y **42b**

A efectos comparativos, se sintetizaron los diastereoisómeros Ac-L-Phe-L-Phe-NH₂ **42c** y Ac-D-Phe-L-Phe-NH₂ **42d** siguiendo una estrategia en fase sólida convencional, utilizando la resina MBHA-PS con el espaciador *Rink*, incorporado en condiciones estándar (Estrategia C) (Esquema 57).



Esquema 57. Síntesis de los dipéptidos **42c** y **42d** utilizando la resina MBHA y el espaciador *Rink*

El análisis por HPLC del crudo peptídico **42a** mostró un porcentaje de epimerización del 8-12 %, mientras que en el caso de **42b** no se observó epimerización. El hecho de derivatizar en primer lugar el extremo carboxilo del aminoácido, manteniendo el extremo amino del mismo protegido en forma de carbamato, reduce la epimerización que puede ocurrir durante el acoplamiento. Así pues, en base a estos últimos resultados, se puede afirmar que, probablemente, la ruta seguida para preparar **41** ha dado lugar a un mayor porcentaje de formación de diastereoisómero que si se hubiera acoplado H-Phe-NH₂ en primer lugar y, posteriormente, se hubiera elongado el resto del péptido.

2.4.3.2. Síntesis de péptidos protegidos

A pesar de los avances que se han producido en los últimos años en la síntesis de péptidos en fase sólida, la utilización de ésta se limita a la síntesis de polipéptidos con menos de 50 residuos de aminoácidos. Esta limitación se debe a diversos factores como pueden ser los impedimentos estéricos a consecuencia de la estructuración de la cadena peptídica en crecimiento y/o a la acumulación de subproductos no deseados derivados de reacciones de acoplamiento y desprotección no cuantitativas, que pueden dar lugar a la delección de aminoácidos o a secuencias peptídicas truncadas. En este sentido, la síntesis convergente se ha postulado como una opción viable para obtener secuencias peptídicas formadas por un gran número de aminoácidos.

En la síntesis en fase sólida clásica, la aproximación convergente requiere que los fragmentos peptídicos estén protegidos, excepto en los extremos que tienen que reaccionar entre sí, para evitar reacciones secundarias con los grupos reactivos de las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales. Por tanto, para la síntesis de estos fragmentos se utilizan resinas que permitan una unión de la cadena peptídica que sea lábil en condiciones suficientemente suaves para mantener el resto de grupos protectores intactos.

En este sentido, los soportes poliméricos de tipo tritilo (resina 2-clorotritilo) son muy adecuados, ya que la liberación del péptido se lleva a cabo con concentraciones de ácido suficientemente bajas como para que los grupos protectores de las cadenas laterales de la mayoría de aminoácidos permanezcan inalterados.

Al cumplir también el enlace triaceno con este requisito de poder escindirse con bajas concentraciones de ácido, se planteó la posibilidad de aplicar esta estrategia a la obtención de péptidos protegidos. Para ello, se escogió como péptido modelo la Hemorfina-7,¹²⁷ un heptapéptido lineal que contiene 5 aminoácidos trifuncionales. La Hemorfina-7 es un péptido endógeno perteneciente a la familia de los péptidos opioides, que se libera en la hidrólisis de la hemoglobina.

A la hora de plantear la síntesis de un fragmento peptídico protegido en un contexto de estrategia convergente, el hecho de poder unir la fenilalanina al polímero a través de la cadena lateral permite la posibilidad de tener el péptido desprotegido en el extremo carboxilo o en el extremo amino, es decir, la posibilidad de tener dos fragmentos con dos puntos de unión a la cadena peptídica alternativos. Por ello se planteó la síntesis de dos derivados del péptido protegido Hemorfina-7: uno de ellos con el extremo amino protegido (péptido **44**) y el otro con el extremo carboxilo protegido (péptido **45**) (Figura 40).

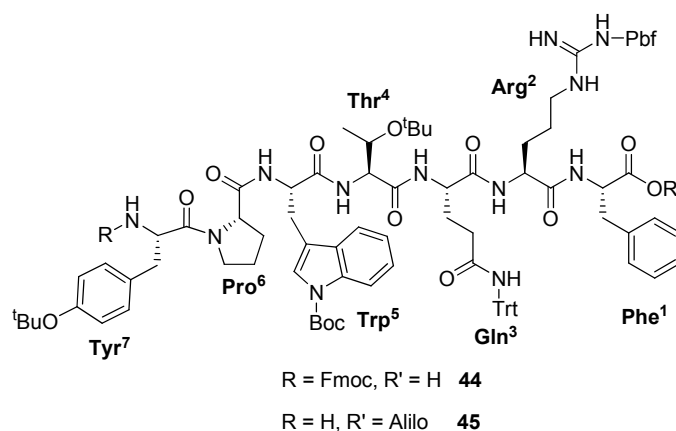
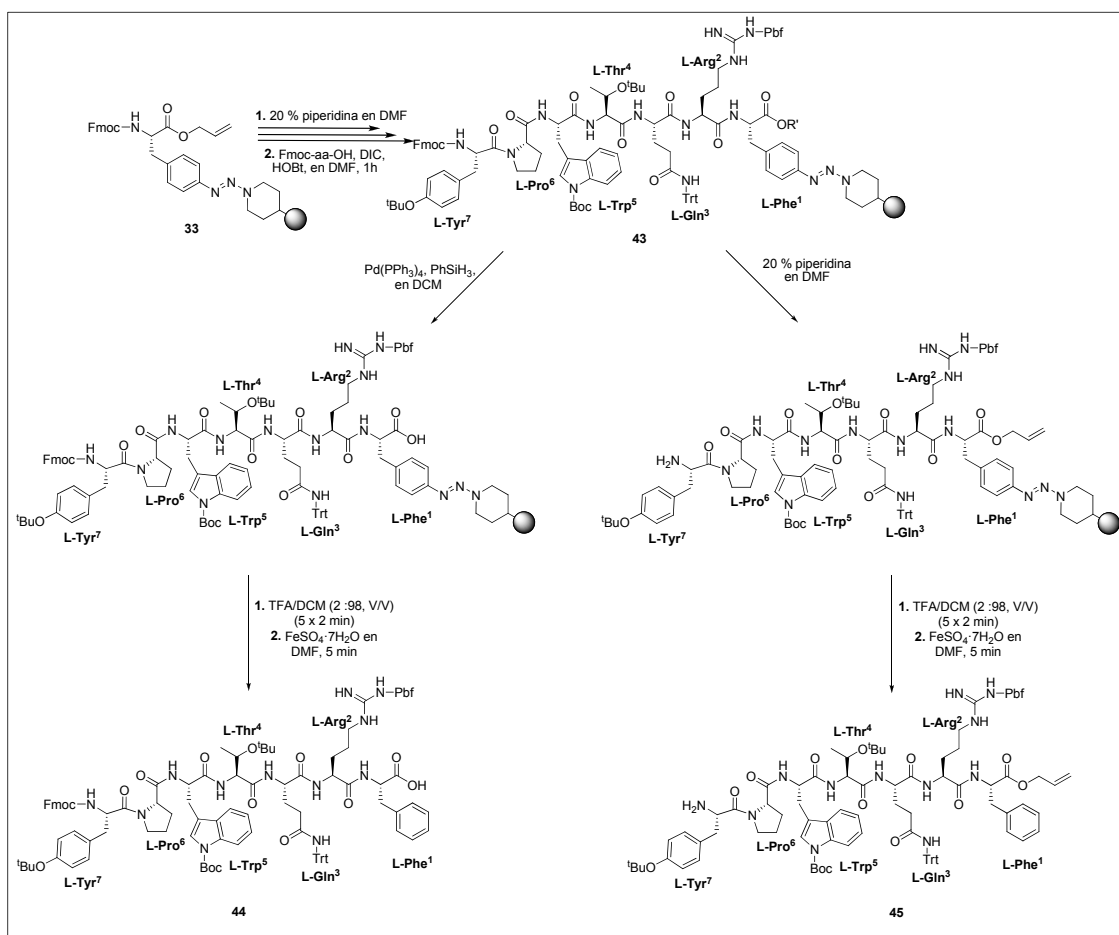


Figura 40. Derivados protegidos del péptido Hemorfina-7

La estrategia sintética que se siguió para obtener los derivados protegidos de Hemorfina-7 se muestra a continuación:



Esquema 58. Síntesis en fase sólida de los derivados protegidos de Hemorfina-7 **44** y **45**

A partir de la aminoacil-resina **33** tuvo lugar la elongación de la cadena peptídica por el acoplamiento secuencial de los siguientes aminoácidos: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Thr(^tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH y Fmoc-Tyr(^tBu)-OH. En todos los acoplamientos se utilizó DIC y HOBT. Una vez obtenida la cadena peptídica lineal protegida, la peptidil-resina se dividió en dos lotes, uno se trató con $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ y PhSiH_3 para eliminar el grupo protector alilo del extremo carboxilo, obteniendo el derivado protegido **44**; mientras que el otro lote se trató con una disolución de piperidina para desproteger el extremo amino y obtener el derivado protegido **45**. A continuación, se llevó a cabo la escisión de los péptidos **44** y **45** utilizando una alícuota de las peptidil-resinas correspondientes con TFA/DCM (5: 95, V/V) y finalmente, se procedió a reducir las sales de diazonio obtenidas utilizando $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en DMF.

El análisis por HPLC-MS de los crudos peptídicos mostró que había un porcentaje de péptidos protegidos sin uno de los grupos *terc*-butilo de la cadena lateral de uno de los

aminoácidos trifuncionales. Este resultado llevó a explorar la posibilidad de trabajar con concentraciones más bajas de ácido (2 % TFA). Así, una alícuota de cada una de las peptidil-resinas correspondientes se trató con la mezcla acidolítica TFA/DCM (2: 98, V/V) y se analizaron los crudos por HPLC, no detectándose en este caso los péptidos parcialmente desprotegidos. Hay que destacar que fueron necesarios 5 tratamientos acidolíticos para conseguir rendimientos de liberación superiores al 98 %, tal como se pudo determinar por análisis de aminoácidos. Este resultado pone de manifiesto el potencial de la unión triaceno para la síntesis de péptidos protegidos en el marco de una aproximación convergente.

Los péptidos protegidos se liberaron de las resinas en estas condiciones y los crudos obtenidos se analizaron por HPLC-MS, detectándose los péptidos deseados **44** ($t_R = 4.2$ min) y **45** ($t_R = 0.8$ min) con purezas del 93 % y 94 % respectivamente (Figura 41). La purificación posterior de los crudos por HPLC semipreparativo en fase inversa permitió obtener los péptidos puros con rendimientos globales del 35 % **44** y 32 % **45** respectivamente.

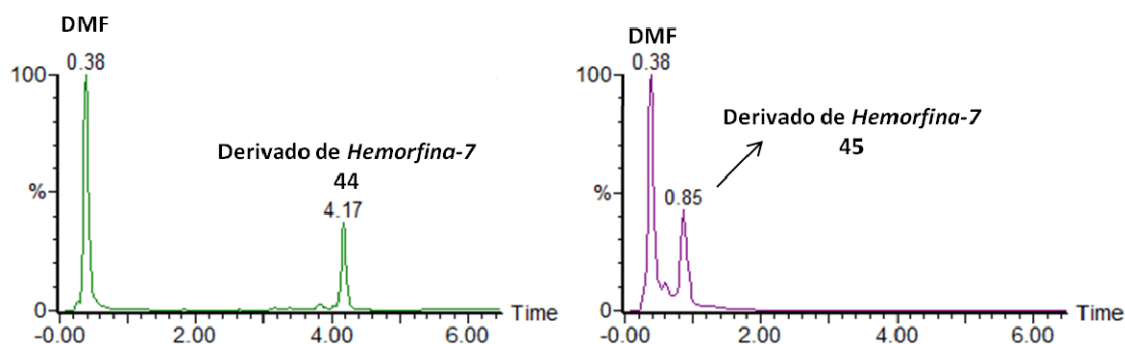


Figura 41. Análisis cromatográfico de los crudo peptídicos de los derivados protegidos de Hemorfina-7 **44** y **45**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

2.4.3.3. Síntesis de péptidos cíclicos

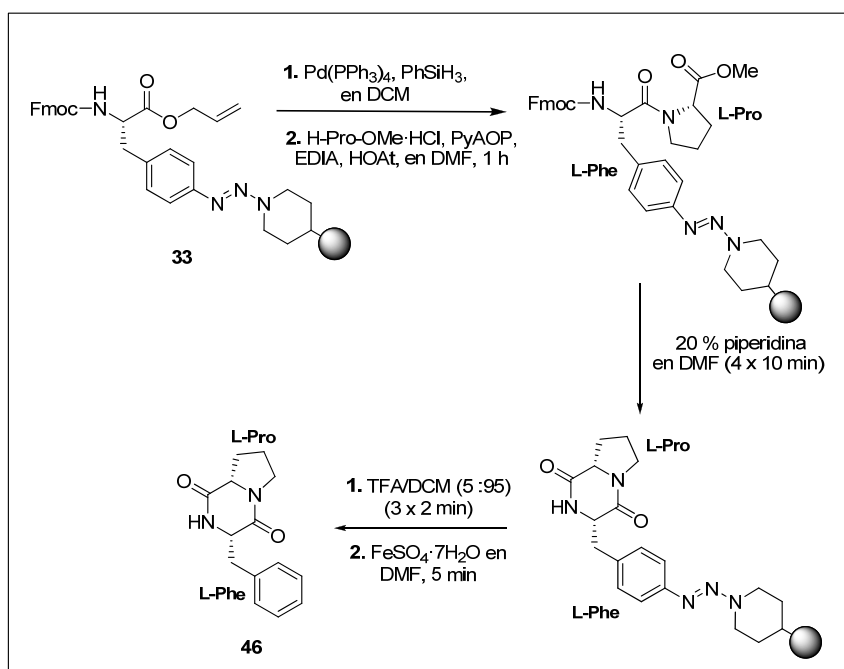
Tal como se ha visto en el apartado anterior, el hecho de tener unida la cadena peptídica a través de la cadena lateral de un aminoácido, permite desproteger a voluntad cualquiera de los dos extremos. En este sentido, la desprotección de los dos extremos permitiría plantear la ciclación en fase sólida de la cadena. Este hecho llevó a ensayar la síntesis de dos péptidos cíclicos de diferente tamaño utilizando la unión

triaceno a la matriz polimérica como estrategia sintética. Uno de ellos, la Eschizandroquina B **46**^{128, 129} es una dicetopiperacina con propiedades antifúngicas y antimicrobianas en un amplio rango de organismos. El otro, la Unguisina A **23**¹¹² se trata de un heptapéptido cíclico altamente hidrofóbico aislado del hongo marino *Emericella unguis*, con actividad antibacteriana contra *staphylococcus aureus* tal y como se ha comentado con anterioridad.

2.4.3.3.1. Esquizandroquina B (46)

Para plantear la estrategia de síntesis de la dicetopiperacina **46** se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de la síntesis de la Brevianamida F **12** mediante la metodología desarrollada para el triptófano (apartado 1.5.1). De esta manera se pretendía evitar que la ciclación tuviera lugar a través de la amina secundaria de la prolina.

La obtención del dipéptido cíclico **46** se llevó a cabo siguiendo el protocolo que se muestra en el Esquema 59:



Esquema 59. Síntesis en fase sólida de la dicetopiperacina **46**

La aminoacil-resina **33** se trató con $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ y PhSiH_3 para desproteger el extremo carboxilo y, a continuación, se incorporó el derivado comercial de prolina H-(S)-Pro-OMe·HCl utilizando una sal de fosfonio PyAOP y HOAt, en medio básico (EDIA).

Seguidamente, se eliminó el grupo protector Fmoc de la fenilalanina utilizando una solución de piperidina. De esta forma, se esperaba que la ciclación fuera espontánea para dar lugar al producto deseado **46**. Este resultado se comprobó al obtenerse un test de ninhidrina negativo y se confirmó posteriormente con el análisis del crudo peptídico por HPLC-MS, tras liberar el dipéptido cíclico de la resina con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) y reducir la sal de diazonio obtenida utilizando $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en DMF.

El análisis de aminoácidos de la resina final tras el tratamiento acidolítico indicó un rendimiento de liberación cuantitativo (> 99 %).

El análisis del crudo peptídico por HPLC-MS mostró el producto deseado con una pureza del 79 %, determinada por integración de las áreas de los picos cromatográficos (Figura 42). Finalmente, la purificación del crudo obtenido por HPLC semipreparativo permitió obtener el producto puro **46** con un 67 % de rendimiento global.

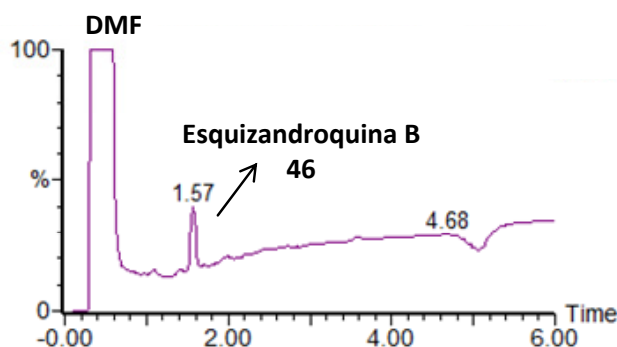


Figura 42. Análisis cromatográfico del crudo peptídico de Esquizandroquina B **46**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C_{18} , 4.6×50 mm, $3.5 \mu\text{m}$, 5→100 % B en 4.5 min (A: H_2O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, $\lambda = 220$ nm).

2.4.3.3.2. Unguisina A (23)

La Unguisina A, cuya síntesis se ha descrito previamente siguiendo la metodología de unión del triptófano al soporte polimérico por su cadena lateral (Apartado 1.4.6.), también se preparó siguiendo la estrategia desarrollada para la fenilalanina. En este sentido, la Unguisina A era un modelo muy adecuado puesto que los aminoácidos, triptófano y fenilalanina se encuentran en la secuencia del péptido, lo que permitiría establecer una comparación entre las dos estrategias (Figura 43).

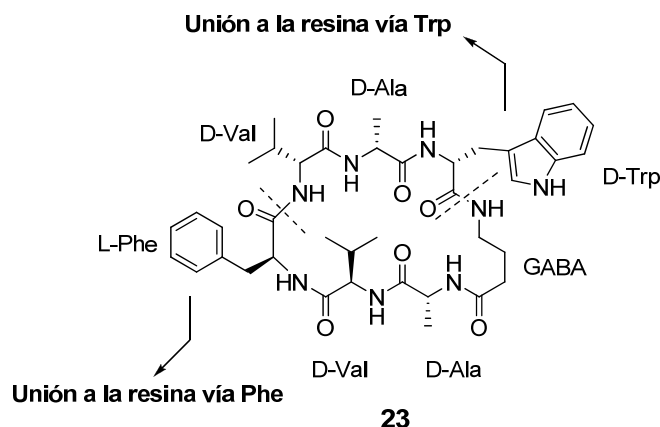
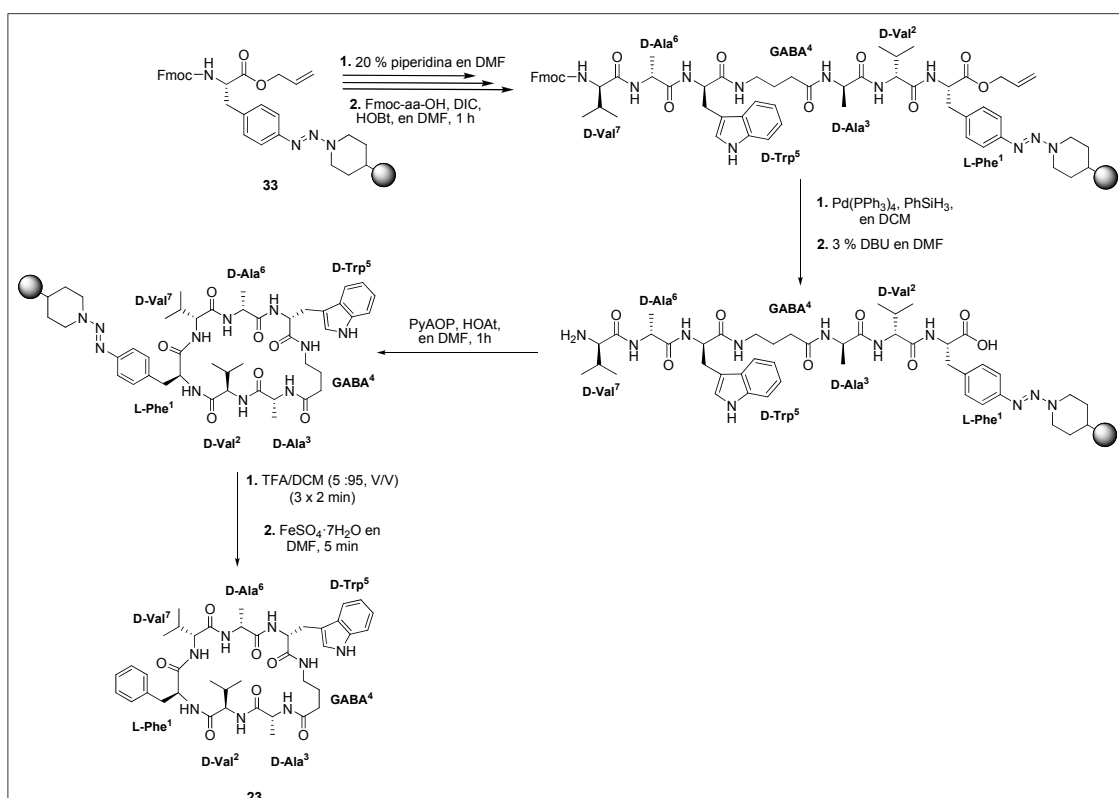


Figura 43. Unguisina A 23

La estrategia sintética que se utilizó para preparar la Unguisina A, uniendo al polímero la fenilalanina a través de su cadena lateral, se muestra en el Esquema 60:



Esquema 60. Síntesis en fase sólida de Unguisina A 23

La aminoacil-resina **33** se trató con piperidina para eliminar el grupo protector Fmoc y se llevó a cabo la elongación de la cadena peptídica utilizando DIC y HOBT en condiciones estándar de síntesis de péptidos. Se acoplaron secuencialmente los siguientes aminoácidos: Fmoc-D-Val²-OH, Fmoc-D-Ala³-OH, Fmoc-GABA⁴-OH, Fmoc-D-Trp⁵-OH, Fmoc-D-Ala⁶-OH, Fmoc-D-Val⁷-OH. La eliminación del grupo Fmoc del residuo

de GABA⁴ requirió de un medio básico más fuerte que el habitual y por eso, se utilizó una disolución de DBU/piperidina en DMF (10: 10: 80, V/V/V). Una vez finalizada la secuencia lineal, se procedió a eliminar el grupo protector alilo del extremo carboxilo utilizando Pd(PPh₃)₄ y PhSiH₃ y, a continuación, se eliminó el grupo protector Fmoc del extremo amino con una disolución de DBU en DMF. Finalmente, se llevó a cabo la ciclación del heptapéptido lineal con PyAOP en presencia de HOAt y medio básico (EDIA) en DMF. El resultado del ensayo de ninhidrina resultó negativo tras un único tratamiento. En el caso de la metodología desarrollada para el triptófano, la reacción de ciclación se llevó a cabo utilizando PyBOP y requirió 5 tratamientos de ciclación para obtener un ensayo de ninhidrina negativo. La mayor reactividad de PyAOP frente al PyBOP podría explicar esta diferencia de reactividad, pero no hay que descartar el factor estructural, dado que la ciclación entre los residuos L-Phe y D-Val está más favorecida por la disposición espacial que adoptan los aminoácidos, además de que el residuo de GABA queda justo en el medio de la secuencia lineal y, dada su flexibilidad, puede acercarse más espacialmente los grupos funcionales que deben reaccionar.

La liberación de **23** de la resina se llevó a cabo utilizando las condiciones acidolíticas habituales (TFA/DCM (5:95, V/V)), con un rendimiento de liberación del 76 %. Considerando el resultado obtenido para la dicetopiperacina Esquizandroquina B **46**, donde el rendimiento de liberación fue cuantitativo (>99 %), la diferencia de rendimientos se podría atribuir a factores estéricos relacionados con el tamaño del ciclo.

El análisis mediante HPLC-MS del crudo peptídico obtenido tras la reducción de la sal de diazonio con FeSO₄·7H₂O en DMF, permitió detectar el producto deseado con una pureza del 84 %, determinada por integración de las áreas de los picos cromatográficos (Figura 44). Finalmente, la purificación del crudo obtenido por HPLC semipreparativo proporcionó el producto puro **23** con un 30 % de rendimiento global.

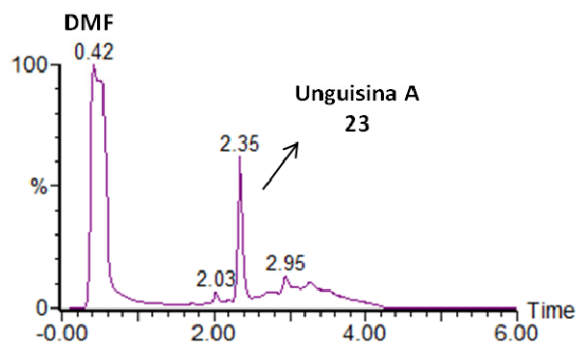


Figura 44. Análisis cromatográfico del crudo peptídico de Unguisina A **23**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

2.4.3.4. Eliminación de trazas de Fe (III)

Una vez purificados cada uno de los péptidos modelo se procedió a analizar la presencia de trazas de Fe (III) mediante el test colorimétrico basado en la reacción de Fe (III) con tiocianato amónico. Para ello, se disolvió una alícuota de péptido en una mezcla de HCl (5 %, V/V) y MeCN y se adicionó sobre una disolución saturada de tiocianato amónico. Aquellas muestras con trazas de Fe (III) presentaron una coloración rojiza intensa debido a la formación del complejo $[\text{Fe}(\text{NCS})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$, como fue el caso del péptido biotinilado Ac-AAPF **40** (B), la Esquizandroquina B **46** (C) y el derivado de Hemorfina-7 **45** (E). En estos casos, se trataron los productos con la resina de intercambio iónico Amberlite IRC748[®], lo que permitió eliminar el Fe (III) remanente tal y como se comprobó mediante el ensayo colorimétrico posterior (Figura 45).

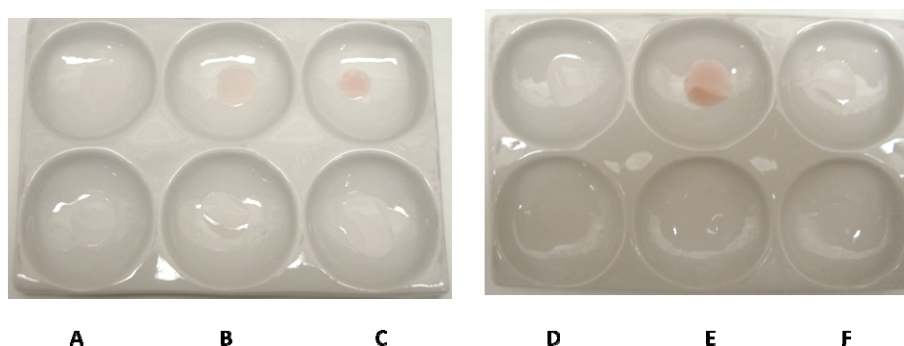
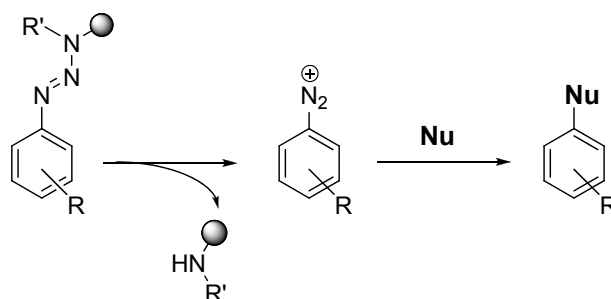


Figura 45. Ensayo colorimétrico para la detección de trazas de Fe (III). En la fila superior se muestran las disoluciones de los péptidos purificados (por HPLC) y en la fila inferior las disoluciones de los péptidos tras el tratamiento con la resina de intercambio iónico (A:

Endomorfin-2, **B**: Ac-AAPF biotinilado, **C**: Esquizandroquina B, **D**: Ac-AAPF-pNA, **E**: Hemorfin-7 y **F**: Unguisina A).

2.5. EL ENLACE TRIACENO COMO ESPACIADOR MULTIFUNCIONAL: APLICACIÓN A LA SÍNTESIS DEL DEPSIPÉPTIDO ZIGOSPORAMIDA Y DERIVADOS

Entre los aminoácidos que normalmente están presentes en péptidos naturales, la fenilalanina es de particular interés desde el punto de vista de reconocimiento molecular. La cadena lateral aromática de este aminoácido es responsable de un gran número de interacciones hidrofóbicas de tipo intermolecular con receptores celulares y de carácter intramolecular en la estabilización estructural, que pueden ser cruciales para la actividad intrínseca del péptido.^{130,131} En este sentido, la fenilalanina y derivados con modificaciones en el anillo aromático se han convertido en farmacóforos clave en estudios de la relación estructura-actividad de un gran número de péptidos y peptidomiméticos biológicamente activos.^{132,133} Esto ha motivado un gran interés en el desarrollo de nuevas estrategias que permitan sintetizar eficientemente péptidos que contengan derivados de este aminoácido, siendo especialmente atractivas las que se pueden adaptar a la fase sólida, aprovechando las ventajas que ésta aporta. En este sentido, la unión de la fenilalanina al soporte polimérico a través de un enlace triaceno permite la derivatización final de este aminoácido tras la escisión del péptido, ya que la liberación de la resina da lugar a una sal de diazonio que puede modificarse químicamente, de manera relativamente fácil, introduciendo diversas funcionalidades (Esquema 61).



Esquema 61. Derivatización del enlace triaceno

Así, en este contexto se puede afirmar que el enlace triaceno actúa como un espaciador multifuncional (Figura 46) dado que la escisión en presencia de nucleófilos de diferente naturaleza da lugar a diferentes tipos de derivados.

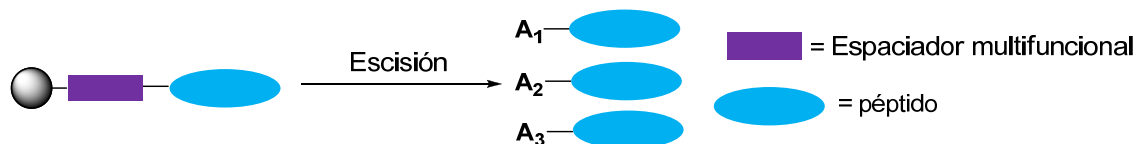


Figura 46. Espaciador multifuncional

Con objeto de explotar la versatilidad química que la función triaceno puede aportar, se decidió explorar la posibilidad de introducir diversidad en el anillo aromático de la fenilalanina a través de la síntesis en fase sólida de péptidos que contienen este aminoácido.

Para ello, se escogió como péptido modelo la Zigosporamida **52** (Figura 47), un depsipéptido cíclico natural aislado de el hongo marino *Zygosporium masonii*, que presenta propiedades citotóxicas frente a diferentes líneas cancerosas.¹³⁴

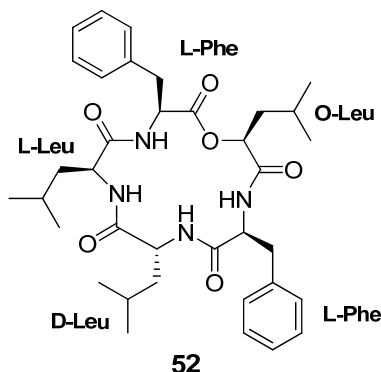


Figura 47. Zigosporamida **52**

2.5.1. Síntesis en fase sólida de la Zigosporamida (**52**)

La Zigosporamida es un péptido altamente hidrofóbico que contiene 5 aminoácidos: 2 residuos de Leu (L y D), 2 de Phe y un ácido (*S*)- α -hidroxiisocaproico que da lugar al enlace éster. Ma y colaboradores,¹³⁵ recientemente, describieron la síntesis en solución del depsipéptido, junto con otros análogos de Zigosporamida en los que residuos de alanina sustituyen a los residuos nativos en distintas posiciones del anillo, para evaluar así su citotoxicidad.

Teniendo en cuenta la estructura del ciclodepsipéptido, se consideró un buen modelo para el estudio que se pretendía al disponer de dos residuos de fenilalanina y, por tanto, dos posibles puntos de unión al soporte polimérico. Además la presencia de un enlace éster, que está en muchos péptidos cíclicos bioactivos, permitía analizar la compatibilidad de esta función químicamente sensible con las condiciones de reacción utilizadas para la derivatización del péptido durante la etapa de escisión.

Considerando los dos posibles puntos de unión del depsipéptido a la resina, a través de los dos residuos de fenilalanina, se plantearon dos estrategias sintéticas diferentes (

Figura 48).

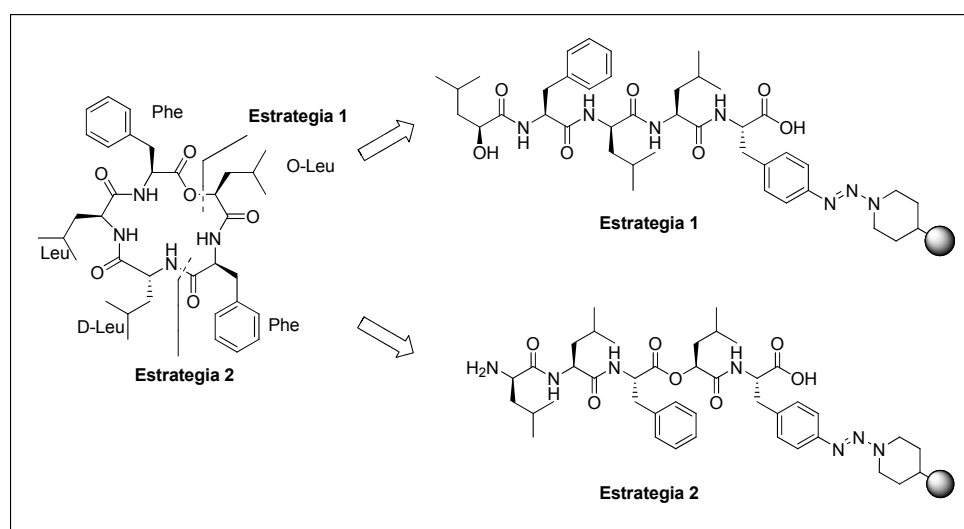


Figura 48. Aproximaciones sintéticas para la síntesis de la Zigosporamida 52

El análisis retrosintético de cada una de las estrategias planteadas permite hacer las siguientes observaciones en función de la cadena peptídica lineal que hay que ensamblar sobre el polímero:

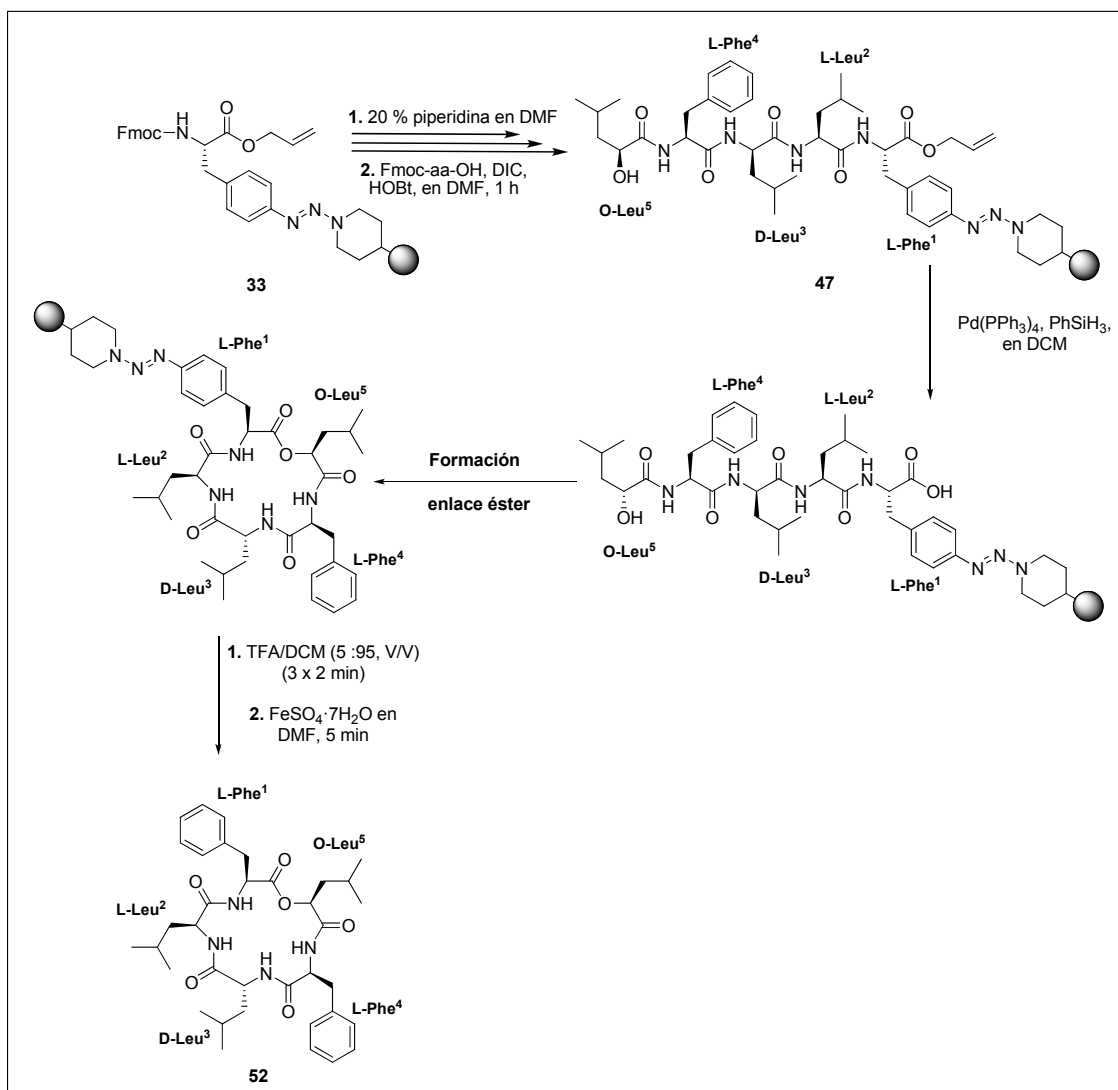
- **Estrategia sintética 1:** La formación del enlace éster tendría lugar en la última etapa sintética, que implica la ciclación de la cadena lineal. Ello permitiría evitar la exposición del enlace éster a las condiciones experimentales utilizadas durante el ensamblaje de la cadena.
- **Estrategia sintética 2:** La formación del éster se produciría en las primeras etapas de síntesis y la exposición a las restantes etapas sintéticas podrían afectar a su estabilidad. No obstante, la ciclación tendría lugar entre

aminoácidos de diferente configuración (L-Phe y D-Leu) y, en principio, estaría más favorecida.¹¹² De hecho, la estrategia descrita por Ma y colaboradores implica la ciclación entre estos dos residuos.

Considerando los posibles problemas asociados a la estabilidad del enlace éster con la estrategia sintética 2, se decidió explorar en primer lugar la estrategia 1.

2.5.1.1. Estrategia sintética 1

La ruta sintética utilizada se indica en el Esquema 62. La aminoacil-resina **33** se utilizó para ensamblar la cadena lineal del péptido **47** en condiciones estándar de síntesis de péptidos (DIC/HOBt para el acoplamiento y piperidina para la eliminación de grupos Fmoc). Así, se acoplaron en este orden, Fmoc-L-Leu²-OH, Fmoc-D-Leu³-OH, Fmoc-L-Phe⁴-OH y ácido α -hidroxiisocaproico. A continuación, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo de la fenilalanina utilizando Pd(PPh₃)₄ y PhSiH₃.



Esquema 62. Síntesis en fase sólida de la Zigosporamida **52** siguiendo la estrategia sintética 1

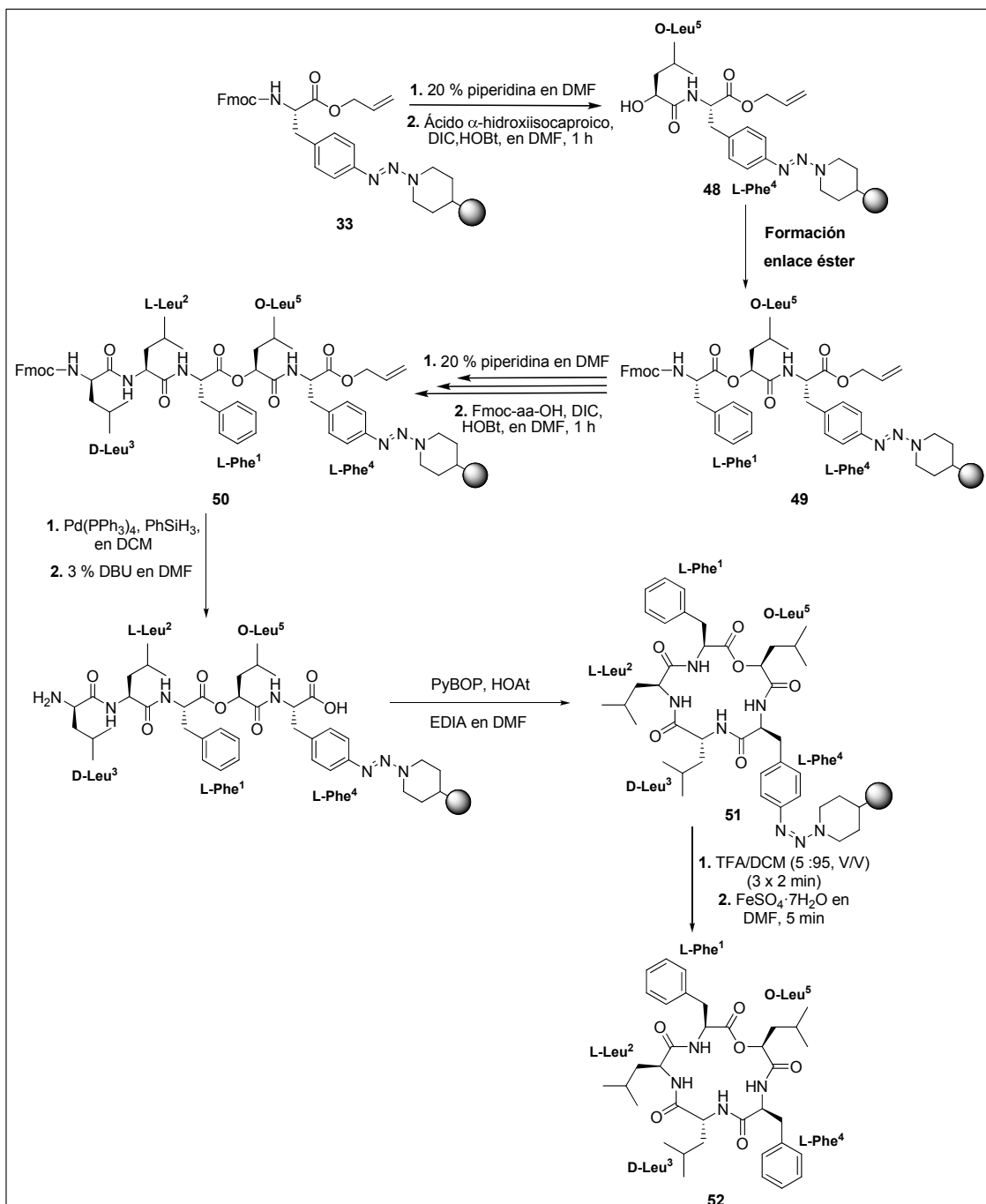
Tras obtener el péptido lineal, se procedió a estudiar la formación del enlace éster entre los residuos de fenilalanina y de ácido α -hidroxiisocaproico para ciclar la cadena peptídica. A continuación, se enumeran cada una de las condiciones de reacción utilizadas para llevar a cabo la formación del depsipéptido **52**:

En primer lugar, se optó por utilizar la carbodiimida DIC como agente activante del ácido carboxílico en presencia de DMAP. Para evitar la epimerización del residuo de ácido (*S*)-2-hidroxiisocaproico se utilizaron 0.3 eq de DMAP y la reacción se llevó a cabo en 3 h. Una alícuota de la peptidil-resina se trató con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) y la sal de diazonio resultante se trató con FeSO₄·7H₂O en presencia de DMF durante 5 min. El análisis por HPLC-MS del crudo de reacción mostró un único pico que correspondía al producto de partida.

A tenor de los resultados obtenidos con DIC, se optó por utilizar la sal de fosfonio PyBOP (4 eq) en presencia de HOAt (4 eq), EDIA (8 eq) y DMF como disolvente. Tras 3 h de reacción, una alícuota de la peptidil-resina resultante se trató con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) y la sal de diazonio resultante con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en DMF durante 5 min. El análisis por HPLC-MS del crudo de reacción mostró un único pico, igual que en el caso anterior, que correspondía al producto de partida. Considerando el resultado obtenido, se decidió repetir el tratamiento con el mismo lote de resina y aumentar el tiempo de reacción, tratando la peptidil-resina en las mismas condiciones de reacción durante 24 h, detectándose en este caso por HPLC-MS un 12 % de depsipéptido cíclico, acompañado de otros picos cromatográficos de difícil identificación.

2.5.1.2. Estrategia sintética 2

Tras los bajos rendimientos obtenidos en la ciclación de la cadena peptídica a través de la formación del enlace éster, se optó por ensayar la estrategia sintética 2, donde la formación del enlace éster tiene lugar en las primeras etapas de reacción y la ciclación implica la formación de un enlace amida entre aminoácidos de distinta configuración (Esquema 63).



Esquema 63. Síntesis en fase sólida de la Zigosporamida **52** siguiendo la estrategia sintética 2

Para esta síntesis se partió del mismo lote de aminoacil-resina **33** utilizada para ensayar la estrategia 1. Tras eliminar el grupo protector Fmoc de la fenilalanina con piperidina, se incorporó el ácido α -hidroxiisocaproico con DIC y HOBT en DMF. Tras 1 h de reacción, el test de ninhidrina confirmó la consecución del acoplamiento y se procedió, a continuación, a incorporar el segundo residuo de fenilalanina (Fmoc-L-Phe³-OH) a través de la formación de un enlace éster. En este caso, se decidió estudiar esta etapa más detenidamente realizando diferentes ensayos con la peptidil-resina **48**,

tal y como se muestra en la Tabla 21. Las alícuotas de peptidil-resina obtenidas de los diferentes tratamientos se trataron con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V), y la sal de diazonio resultante se trató con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en DMF durante 5 min. Los crudos obtenidos en cada ensayo se analizaron por HPLC-MS.

Entrada	Condiciones de reacción	49 (%) ¹	Epimerización (%) ¹
1.	Fmoc-L-Phe ³ -OH (10 eq), DIC (10 eq), HOBt (10 eq), 5h	-	-
2.	Fmoc-L-Phe ³ -OH (8 eq), DIC (8 eq), DMAP (0.5 eq), 2h	77	23
3.	Fmoc-L-Phe ³ -OH (8 eq), DIC (8 eq), DMAP (0.5 eq), 1h	94	6
4.	Fmoc-L-Phe ³ -OH (8 eq), DIC (8 eq), DMAP (0.1 eq), 1h	95	5

¹ Los porcentajes de cada producto se determinaron por integración de las áreas de los picos cromatográficos.

Tabla 21

Los resultados que se muestran en la Tabla 21. Los porcentajes de cada producto se determinaron por integración de las áreas de los picos cromatográficos.

Los resultados ponen de manifiesto que la formación del enlace éster entre el residuo de ácido α -hidroxiisocaproico y el residuo de Fmoc-L-Phe³-OH requiere la utilización de DMAP como catalizador, ya que, a pesar de trabajar con excesos elevados de DIC y HOBt (10 eq) y tiempos de reacción relativamente largos (5 h), no tiene lugar la formación del dipéptido deseado (entrada 1). La utilización de DIC en presencia de DMAP favorece la formación del producto (entradas 2, 3 y 4); sin embargo, cuando los tiempos de reacción son largos (2 h) se observa un porcentaje significativo del correspondiente producto epimerizado (23 %) (entrada 2). La reducción del tiempo de reacción a 1 h disminuye el porcentaje de subproducto (al 6 %) (entrada 3) hasta llegar a un 5 % cuando también se reduce la cantidad de DMAP hasta 0.1 eq (entrada 4) (Figura 49). Por tanto, a pesar de no poder evitar totalmente la formación de producto epimerizado, la reducción del tiempo de reacción (1 h) y la utilización de menos equivalentes de DMAP (0.1 eq) permiten obtener el depsipéptido deseado con una

pureza del 95 %, determinada por integración de las áreas de los picos cromatográficos.

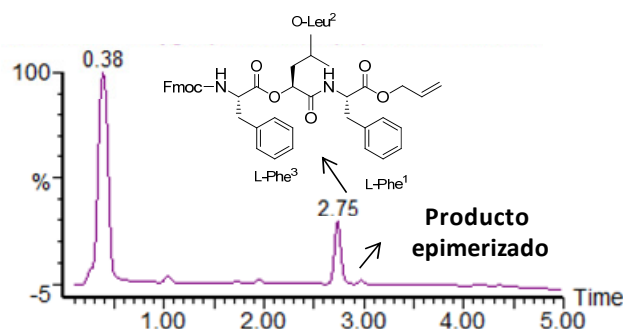


Figura 49. Análisis cromatográfico del crudo de reacción procedente del ensayo 4. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 60→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

Una vez se obtuvo la depsipeptidil-resina **49** (utilizando las condiciones de la entrada 4, Tabla 21) se procedió a ensamblar el resto de la cadena peptídica. El acoplamiento de los aminoácidos se llevó a cabo utilizando DIC y HOBT en DMF. A diferencia de los casos anteriores, el grupo protector Fmoc se eliminó utilizando una disolución de DBU, base no nucleófila, en DMF para evitar reacciones no deseadas debido a la labilidad del enlace éster. Una vez acoplados todos los aminoácidos de la cadena, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo con Pd(PPh₃)₄/PhSiH₃ y, a continuación, el grupo protector Fmoc del extremo amino con una disolución de DBU en DMF. Una vez obtenido el péptido lineal desprotegido, una alícuota de la peptidil-resina se trató con las condiciones habituales para obtener el péptido reducido, y se comprobó mediante el análisis del crudo de reacción por HPLC-MS que el enlace éster era estable a las condiciones de reacción utilizadas durante la síntesis.

La ciclación de la cadena peptídica se llevó a cabo con PyBOP, HOAt y medio básico de EDIA en DMF, comprobándose mediante un test cualitativo de ninhidrina que la reacción era completa a las 2 h. El péptido cíclico se liberó de la resina por tratamiento acidolítico y se redujo la sal de diazonio en las condiciones habituales, obteniéndose un crudo que mostró el producto deseado con un 55 % de pureza tras su análisis por HPLC-MS. El rendimiento global de síntesis fue del 44 % tras la purificación del crudo por HPLC semipreparativo de fase inversa. La identidad de la Zigosporamida **52** se

confirmó por RMN, al comparar el espectro del producto sintético con el del producto natural descrito en la literatura.¹³⁵

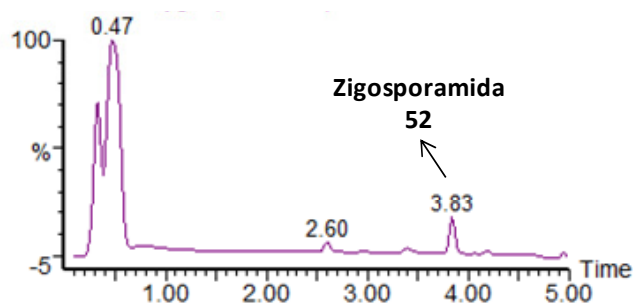


Figura 50. Análisis cromatográfico del crudo de reacción de la Zigosporamida **52**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

La peptidil-resina **51** se utilizó para ensayar la obtención de diferentes análogos de Zigosporamida por derivatización del residuo de fenilalanina unido a la matriz polimérica.

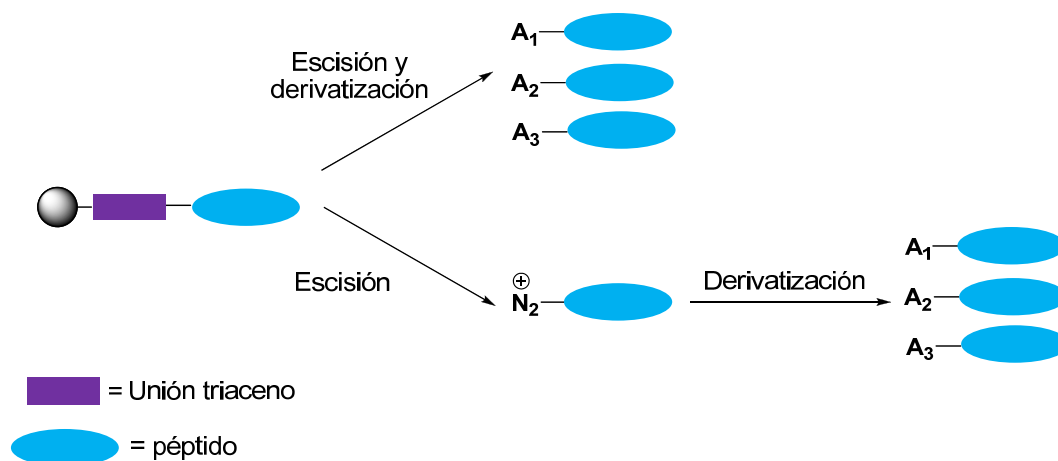
2.5.2. Modificación del anillo aromático de la fenilalanina a través de la función triaceno

Tal como se ha comentado con anterioridad, una de las ventajas que aporta la utilización de espaciadores multifuncionales en síntesis en fase sólida es la oportunidad de introducir diversidad durante el proceso de liberación del péptido del soporte polimérico. En el caso de la función triaceno, la versatilidad química de la sal de diazonio que se obtiene tras la escisión en medio ácido, permite plantear la derivatización de posición *para* del anillo de fenilalanina unido a la resina,^{143,144} para dar lugar a análogos peptídicos que pueden tener un potencial interés desde los puntos de vista químico y biológico. Así, en el marco del presente trabajo se decidió explorar esta posibilidad utilizando como modelo la Zigosporamida con objeto de ampliar el rango de aplicación de la función triaceno en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Como posibles funcionalizaciones del anillo aromático se escogieron los grupos OH, OMe, F, I y N₃. Los derivados de fenilalanina correspondientes a los tres primeros son utilizados comúnmente en estudios de relación estructura-actividad^{136, 137, 138} y los dos

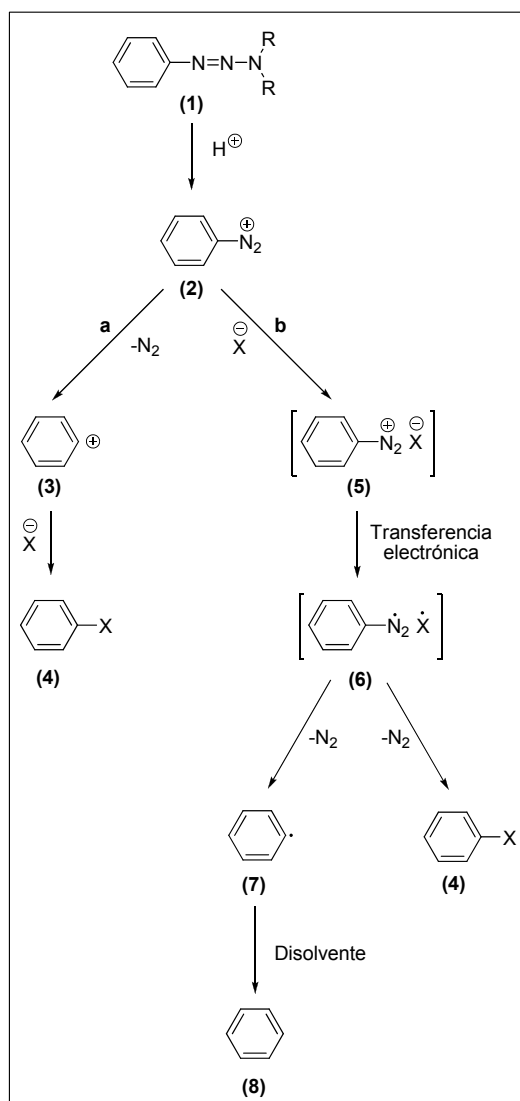
últimos (I y N₃) son potencialmente útiles desde el punto de vista sintético, como precursores implicados en procesos de *cross coupling*^{139, 140} o estrategias de *click chemistry*.^{141, 142}

Las derivatizaciones planteadas se pueden llevar a cabo durante la etapa de liberación del péptido de la resina o en una etapa posterior a la formación de la sal de diazonio (Esquema 64).



Esquema 64. Escisión y derivatización de la función triaceno

Desde el punto de vista mecanístico, estas transformaciones pueden tener lugar a través de diferentes vías, tal y como se muestra en el Esquema 65:



Esquema 65

La descomposición de la función triaceno **(1)** en medio ácido da lugar a la correspondiente sal de arenodiazonio **(2)**, la cual puede eliminar nitrógeno molecular mediante un mecanismo heterolítico (mecanismo a), o a través de un mecanismo homolítico (mecanismo b).^{143, 144} En el primer caso, el catión de arilo **(3)** que se forma (etapa lenta) reacciona con el nucleófilo presente en el medio para dar lugar al compuesto **(4)** mediante una reacción S_N1. La segunda vía requiere la presencia de un agente reductor que permita la transferencia electrónica para formar la especie intermedia **(6)** a través de la sal de diazonio **(5)**. La especie **(6)** puede generar el radical arilo **(7)** que, en presencia de un dador de hidrógeno (por ejemplo, un disolvente) daría lugar al compuesto reducido **(8)**. Alternativamente, podría generar el derivado **(4)** con la pérdida simultánea de nitrógeno molecular. Aunque la formación del catión arilo **(3)**

puede parecer menos probable teniendo en cuenta la elevada energía de estas especies, ambos mecanismos no son tan diferentes desde el punto de vista energético dado que la fuerza impulsora de la reacción es la formación de nitrógeno molecular. Por ello, existe la posibilidad de que ambos mecanismos compitan o coexistan dependiendo de las condiciones de reacción.

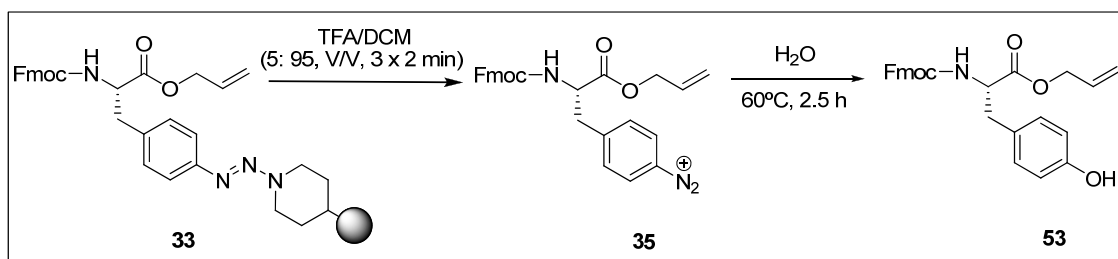
2.5.2.1. Derivatización de Fmoc-(S)-Phe-OAlilo

Como paso previo al estudio de la derivatización del anillo de fenilalanina del depsipéptido **52** se optó por llevar a cabo ensayos con un modelo más sencillo, la aminoacil-resina **33**, cuya síntesis ya se ha descrito utilizando las condiciones de reacción descritas previamente en el apartado 2.2.2.

2.5.2.1.1. Síntesis de Fmoc-(S)-Phe(pOH)-OAlilo (**53**)

En la literatura se han descrito diferentes metodologías que permiten llevar a cabo la hidroxilación de un anillo aromático en solución. Tradicionalmente, las sales de diazonio pueden experimentar reacciones de hidroxidediazonización en medio ácido acuoso fuerte y elevadas temperaturas (hasta 160 °C), aunque también se ha descrito una alternativa efectiva que permite obtener el derivado hidroxilado a través de la oxidación de los radicales arilo con sales de cobre.^{145,146}

Más recientemente, se ha utilizado una resina de intercambio catiónico¹⁴⁷ en medio ácido para hidroxilar la función triaceno; sin embargo, en el caso particular que nos ocupa no es viable porque el triaceno está unido a un soporte sólido. En un primer momento, se decidieron ensayar condiciones de reacción más suaves que pudieran aplicarse a moléculas complejas y muy funcionalizadas, como es el caso de los péptidos. Así, se ensayó la hidroxilación del anillo de la fenilalanina por hidrólisis de la sal de diazonio Fmoc-(S)-Phe(pN₂⁺)-OAlilo **35**, obtenida tras el tratamiento acidolítico de la peptidil resina **33** con TFA/DCM (5:95, V/V). El crudo de reacción obtenido se disolvió en H₂O y se dejó reaccionar a 60 °C (Esquema 66).



Esquema 66. Formación del derivado de fenilalanina hidroxilado **53**

Tras 2.5 h de reacción, el análisis por HPLC-MS del crudo obtenido ($t_R = 3.50$ min) puso de manifiesto que la reacción había finalizado, al detectarse el producto deseado **53** (con un 71 % de pureza) y comprobándose la ausencia de sal de diazonio (Figura 51). La purificación del crudo de reacción por HPLC semipreparativo permitió obtener el producto puro **53** con un 61 % de rendimiento, cuya identidad se confirmó por RMN y espectrometría de masas.

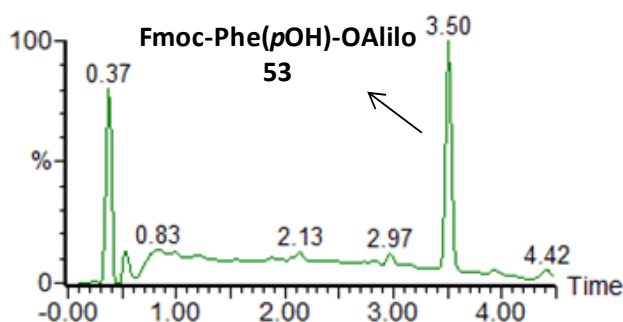
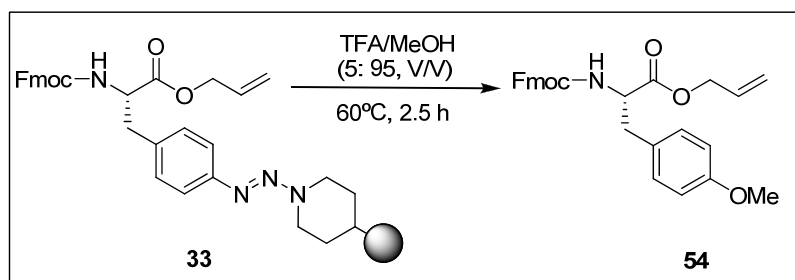


Figura 51. Análisis cromatográfico del crudo de Fmoc-Phe(pOH)-OAlilo **53**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm).

Dada la pureza del crudo cromatográfico obtenido, las condiciones experimentales utilizadas para obtener el derivado **53** se consideraron adecuadas para su aplicación a la síntesis del correspondiente derivado de Zigosporamida.

2.5.2.1.2. Síntesis de Fmoc-(S)-Phe(pOMe)-OAlilo (**54**)

A diferencia del caso anterior, la derivatización del anillo aromático de fenilalanina con un grupo metoxi se llevó a cabo en la misma etapa de liberación del aminoácido de la resina. Así, la peptidil-resina **33** se trató con la mezcla acidolítica TFA/MeOH (5:95, V/V) a 60 °C durante 1 h, siguiendo una metodología ya descrita (Esquema 67).¹¹⁷



Esquema 67. Formación del derivado de fenilalanina metoxilado **54**

El crudo de reacción obtenido se analizó por HPLC-MS, detectándose el producto deseado **54** ($t_R = 3.95$ min) con un 77 % de pureza, determinada por integración de las áreas de los picos cromatográficos (Figura 38). La purificación del crudo de reacción por HPLC semipreparativo permitió obtener el producto puro **54** con un 55 % de rendimiento global. La identidad del producto se confirmó por RMN y espectrometría de masas.

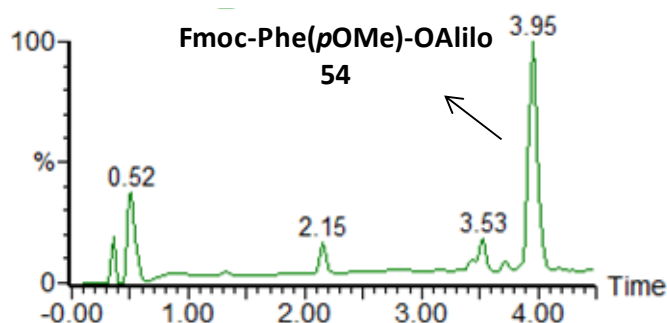
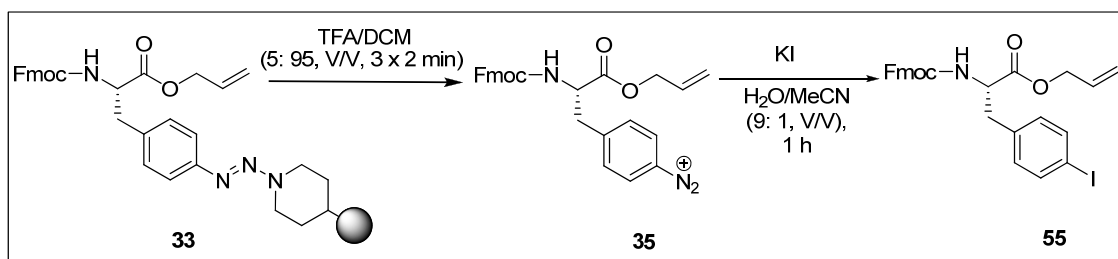


Figura 38. Análisis cromatográfico del crudo de Fmoc-Phe(*p*OMe)-OAlilo **54**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm).

2.5.2.1.3. Síntesis de Fmoc-(*S*)-Phe(*p*l)-OAlilo (**55**)

De la misma manera que en la obtención del derivado **53**, la síntesis de **55** se realizó en dos etapas. Primero se liberó el aminoácido de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5: 95, V/V) y, a continuación, la sal de diazonio **35** se trató con KI como fuente de iones yoduro, siguiendo las condiciones de reacción utilizadas por Filimov y colaboradores¹⁴⁸ para la yodación de tosilatos de arenodiazonio. No obstante, a diferencia de lo descrito en la literatura, donde se utiliza agua como disolvente, se optó por el uso de la mezcla H₂O/MeCN (9:1, V/V) para favorecer la disolución del crudo de reacción, teniendo en cuenta el carácter bastante apolar del mismo (Esquema 68).



Esquema 68. Formación del derivado de fenilalanina yodado **55**

Tras una 1 h de reacción a temperatura ambiente, el producto deseado **55** ($t_R = 4.28$ min) se detectó por HPLC-MS con un 53 % de pureza cromatográfica, acompañado de un producto con $t_R = 3.98$ min, correspondiente al derivado **38**. Dado que la formación de este subproducto estaba relacionada con la presencia de H₂O en el medio de reacción, se optó por reducir el contenido de ésta en la mezcla de disolvente, pero el resultado no mejoró (Figura 52).

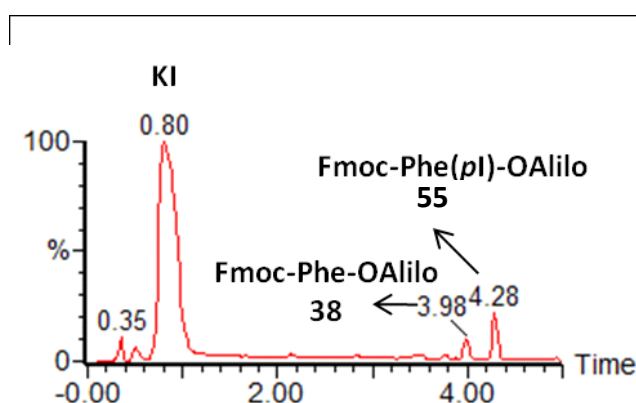
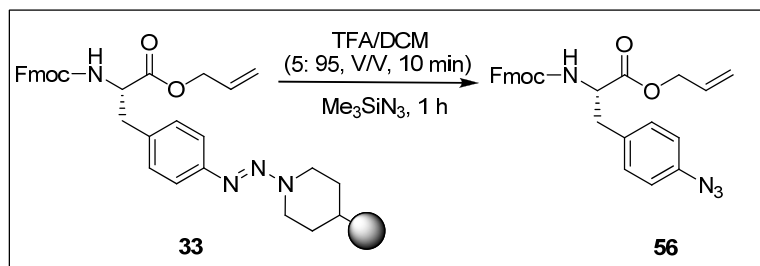


Figura 52. Análisis cromatográfico del crudo de la reacción de formación de Fmoc-Phe(pI)-OAlilo **54**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm).

La purificación del producto se llevó a cabo en dos etapas, primero mediante una extracción acuosa para eliminar las sales seguida de una purificación por HPLC semipreparativo, para obtener el producto deseado **55** con un 44 % de rendimiento.

2.5.2.1.4. Síntesis de Fmoc-(S)-Phe(pN₃)-OAlilo (**56**)

La síntesis del derivado azida **56**, a partir de la aminoacil-resina **33**, se realizó en una única etapa, mediante tratamiento con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) a la que, tras 10 min de reacción se adicionó Me₃SiN₃, siguiendo el protocolo descrito por Avemaria y colaboradores (Esquema 69).¹⁴⁹



Esquema 69. Formación del derivado azida de fenilalanina **56**

Tras 1 h de reacción, el análisis del crudo por HPLC-MS confirmó que la reacción había finalizado al no detectarse la sal de diazonio, obteniéndose el producto deseado **56** con elevada pureza (94 %) (Figura 53). La purificación del crudo obtenido por HPLC semipreparativo permitió obtener el producto puro con un 78 % de rendimiento global, lo cual permitió su caracterización por RMN y espectrometría de masas.

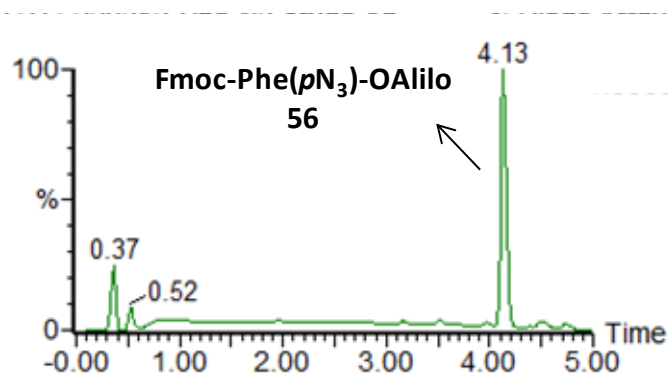


Figura 53. Análisis cromatográfico del crudo de Fmoc-Phe(pN_3)-OAlilo **56**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C_{18} , 4.6×50 mm, $3.5 \mu m$, $5 \rightarrow 100$ % B en 4.5 min (A: H_2O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, $\lambda = 220$ nm).

2.5.2.1.5. Síntesis de Fmoc-(S)-Phe(pF)-OAlilo (**57**)

Especial mención merece la obtención del derivado fluorado, dado que muchos de los compuestos activos biológicamente contienen átomos de flúor en su estructura.¹⁵⁰ La sustitución de átomos de hidrógeno por flúor, el elemento más electronegativo, altera estéricamente y electrónicamente las propiedades de las moléculas, afectando a la basicidad o acidez de grupos adyacentes, el momento dipolar, la reactividad o la estabilidad global de las mismas. Tradicionalmente, la sustitución del grupo diazo aromático por flúor se puede llevar a cabo de dos maneras diferentes: una es utilizando fluoruros de arenodiazonio, obtenidos por diazonización con HF (o medios que contengan HF), que se descomponen *in situ* a elevadas temperaturas.¹⁵¹ La otra es

por conversión de las sales de diazonio en tetrafluoroboratos y la posterior descomposición térmica de los mismos (reacción de Balz-Schiemann).

Inicialmente, se intentó obtener el producto **57** mediante tratamiento de la sal de diazonio Fmoc-(S)-Phe(pN_2^+)-OAlilo **35** con una disolución comercial de 70 % de HF en piridina durante 1 h 30 min. Sin embargo, cuando se analizó el crudo resultante por HPLC-MS sólo se detectó un 6 % del producto deseado **57**, un 13 % de la sal de diazonio inicial **35** y varios subproductos no identificados.

Döbele y colaboradores¹⁵² descubrieron una variante de la reacción de Balz-Schiemann utilizando triacenos como productos de partida y disolventes perfluorados como C_6F_{14} (Reacción Wallach). La aminoacil-resina **33** se sometió a estas condiciones de reacción pero se obtuvieron crudos de reacción complejos en los que se puede detectar el producto deseado. Este resultado es atribuible, probablemente, a las condiciones drásticas para llevar a cabo la reacción, que se basan en calentar a 80 °C durante 12 h.

Langlois y colaboradores¹⁵³ han descrito la descomposición térmica de ariltriacenos utilizando ácidos y cantidades subestequiométricas de aniones fluoruro (CsF) para dar lugar a derivados fluorados aromáticos. Tomando como base estas condiciones experimentales, se realizaron diversos ensayos modificando diferentes parámetros, como el tipo de ácido (TFA y ácido tríflico), el disolvente y el tiempo de reacción. En cada uno de los ensayos, el CsF se secó convenientemente para evitar la formación de productos secundarios como el producto hidrollizado. En la Tabla 22 se muestran los resultados obtenidos:

Ensayo	Condiciones de Reacción ¹	35 (%) ²	53 (%) ²	57 (%) ²
1	CsF, TFA, C_6F_{12} , 90 °C, 30 min	6	62	24
2	CsF, TFA, C_6F_{12} , 90 °C, 16 h	6	65	24
3	CsF, TfOH, C_6F_{12} , 90°C, 30 min	48	7	7

4	CsF, TfOH, TFE, 90°C, 30 min	4	-	34
5	CsF, TfOH, HFIP 90°C, 30 min	-	-	*54

¹En todos los casos se utilizaron 0.2 eq de CsF y 2.5 eq de ácido.

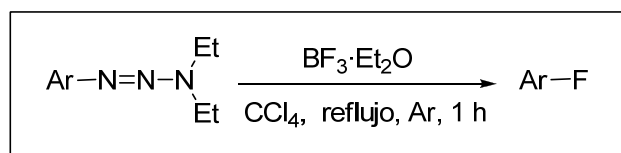
²Los porcentajes de los productos se determinaron por integración de las áreas de los picos cromatográficos.

*El derivado obtenido incorpora únicamente HFIP en el anillo aromático

Tabla 22. Estudio de la formación del derivado fluorado de fenilalanina **57**

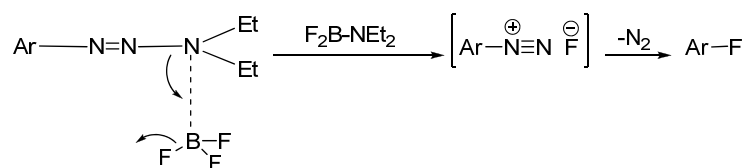
Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la utilización de TFA da lugar a un porcentaje mayor de producto hidroxilado **53** (ensayos 1 y 2) (62-65 %), a diferencia de lo que sucede con uso de TfOH (ensayos 4 y 5) (máximo 7 %). Por otra parte, la utilización de alcoholes fluorados parece incluso evitar la formación del derivado hidroxilado **53** (ensayos 4 y 5), pero el HFIP (hexafluoroisopropanol) da lugar al correspondiente derivado de fenilalanina en el que se ha incorporado HFIP con un 54 % de rendimiento, sin llegar a detectar el producto deseado **57** (ensayo 5). El mejor resultado se obtuvo con TFE, aunque con un rendimiento modesto del derivado **57** (34 %, ensayo 4). En este caso, la conversión de la sal de diazonio fue prácticamente completa.

Los bajos rendimientos de producto fluorado **57** y la elevada formación de subproductos utilizando la metodología Langlois y colaboradores, hacían necesaria la búsqueda de otras condiciones experimentales. En este sentido, Kovak y colaboradores¹⁵⁴ han descrito recientemente la utilización de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ y disolventes apróticos, como el CCl_4 , en la preparación en solución de compuestos fluorados a partir de derivados de triaceno (Esquema 70).



Esquema 70. Formación del derivado fluorado

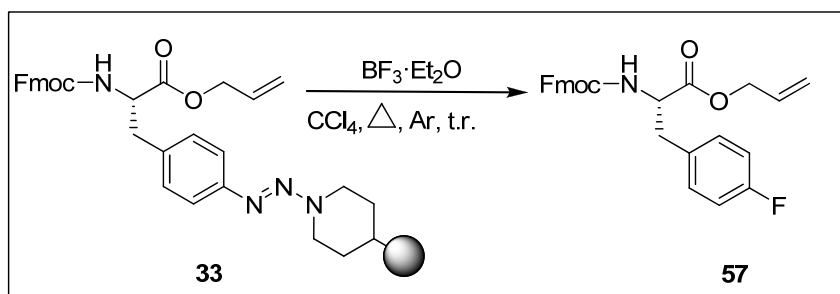
El mecanismo de reacción que se propone para esta conversión es el siguiente:



Esquema 71. Mecanismo de reacción para la formación del derivado fluorado a partir de la función triaceno utilizando $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$

La primera etapa de la reacción es probablemente la coordinación reversible del BF_3 a los átomos de nitrógeno, debido al carácter electrófilo y a la afinidad que tiene el ácido de Lewis por este átomo. Ello conlleva la desestabilización del enlace sencillo N-N debido a la deslocalización electrónica en el enlace triaceno, lo que provoca la rotura de este enlace liberando $\text{F}_2\text{B} \cdot \text{NEt}_2$, con la formación simultánea de la sal de arenodiazonio.

Se decidió entonces realizar algunos ensayos en fase sólida con la peptidil-resina **33** utilizando condiciones similares a las descritas por Kovak y colaboradores (Esquema 72, Tabla 23)



Esquema 72. Formación del derivado de fenilalanina fluorado

Ensayo	Condiciones de reacción ¹	33 (%)	57 (%)
1	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CCl_4 , 80 °C, 1 h	14	63
2	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CCl_4 , 80 °C, 1h 30min	20	73
3	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CCl_4 , 85 °C, 1h 30min	-	86

¹ En todos los casos se utilizaron 3 equiv de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$

Tabla 23

El crudo de reacción obtenido en cada uno de los ensayos se analizó por HPLC-MS y se determinó el porcentaje de producto fluorado **57** por integración de las áreas de los picos cromatográficos. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que con la utilización de unas condiciones muy similares a las descritas se detectó un cierto porcentaje de sal de diazonio (ensayo 1), sin embargo, tras aumentar el tiempo de reacción (ensayo 2) e incrementar la temperatura (ensayo 3) se obtuvo el producto fluorado Fmoc-(S)-Phe(*p*F)-OAlilo **57** con un 86 % de rendimiento y elevada pureza (90 %) (Figura 54).

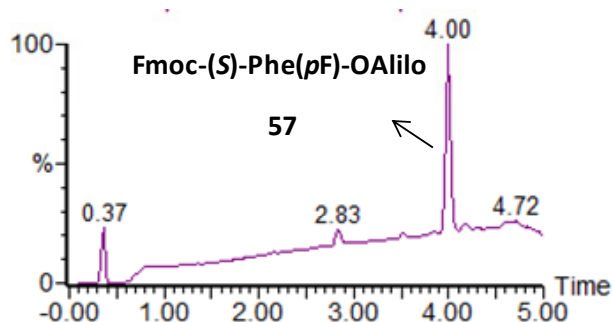
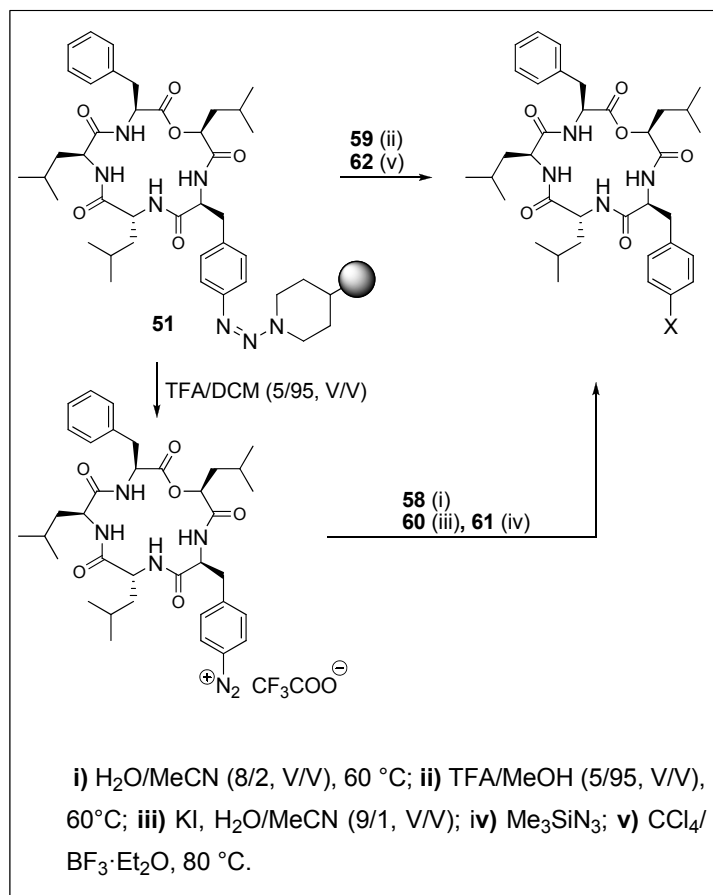


Figura 54. Análisis cromatográfico del crudo de Fmoc-Phe(*p*F)-OAlilo **57**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

La purificación del crudo obtenido del ensayo 3 por HPLC semipreparativo permitió obtener el derivado **57** puro con un 63 % de rendimiento global. La identidad del derivado se confirmó por RMN y espectrometría de masas.

2.5.3. Síntesis de derivados del depsipéptido Zigosporamida (**52**)

Una vez establecidas unas buenas condiciones para derivatizar el anillo aromático de la fenilalanina, se procedió a explorar la viabilidad de las mismas para obtener los correspondientes derivados del depsipéptido cíclico **52**, cuya síntesis ya había sido realizada. En todos los casos se partió de la peptidil-resina **51** y ésta se sometió a las diferentes condiciones experimentales encontradas para la formación de cada uno de los derivados descritos con anterioridad (Esquema 73).



Esquema 73. Derivatización del anillo aromático de un residuo de fenilalanina del depsipéptido Zigosporamida

El análisis de los crudos peptídicos por HPLC-MS mostró en cada caso el producto deseado, tal y como se muestra en la Figura 55.

Además, en todos los casos, las condiciones experimentales utilizadas para las diversas derivatizaciones fueron compatibles con la estabilidad del depsipéptido, dado que la integridad del mismo permaneció intacta.

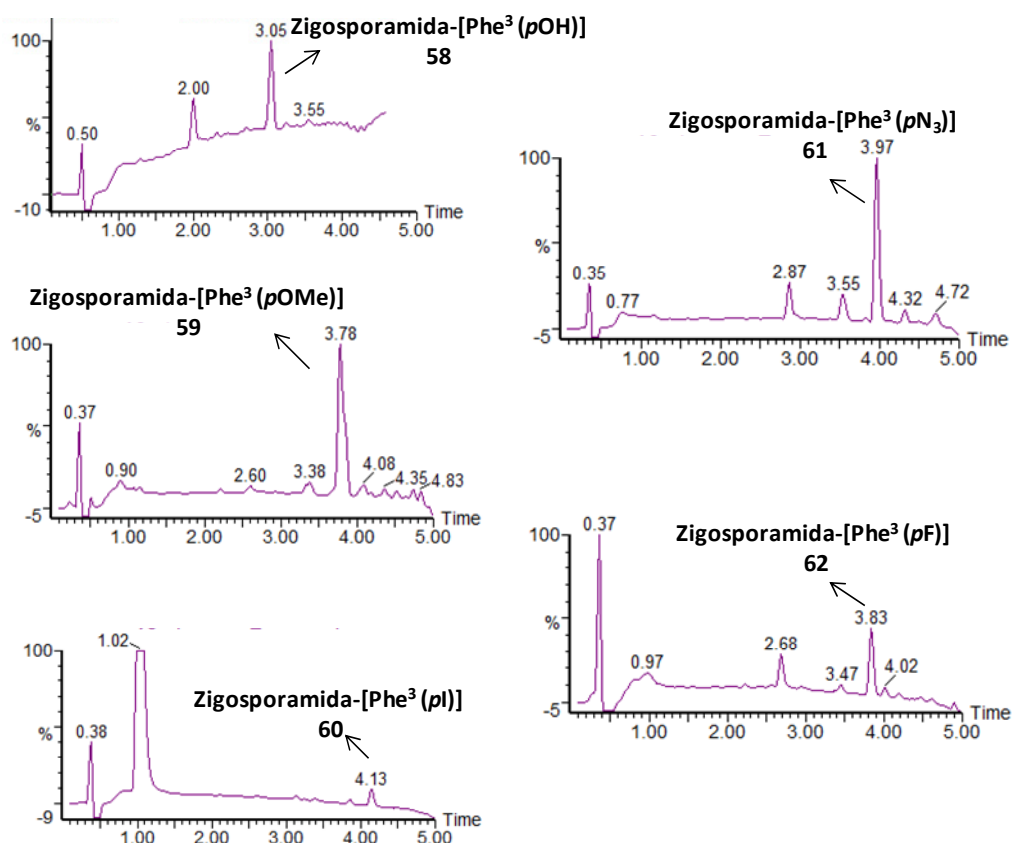


Figura 55. Análisis cromatográfico de los crudos de reacción de los análogos de Zigosporamida **58**, **59**, **60**, **61** y **62**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

La identidad de todos los derivados peptídicos sintetizados se confirmó por RMN y espectrometría de masas.

En la siguiente tabla se muestra la pureza de los crudos y el rendimiento global tras la purificación de cada uno de ellos por HPLC semipreparativo.

Derivado	Pureza (%)	Rendimiento (%)
58 (X = OH)	71	34
59 (X = OMe)	77	25
60 (X = I)	53	35
61 (X = N₃)	94	69
62 (X = F)	90	50

Tabla 24

BIBLIOGRAFÍA

- ¹Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149-2154.
- ²Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, **1997**, CRC Press, New York.
- ³Thieriet, N.; Guibé, F.; Albericio, F. Solid-Phase Peptide Synthesis in the Reverse (N→C) direction. *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 1815-1817.
- ⁴Jensen, K.J.; Alsina, J.; Songster, M.F.; Vágner, J.; Albericio, F.; Barany, G. Backbone amide linker (BAL) strategy for solid-phase synthesis of C-terminal modified and cyclic peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 5441-5452.
- ⁵Alsina, J.; Jensen, K.J.; Albericio, F.; Barany, G. Solid-phase synthesis with Tris(alkoxy)benzyl Backbone Amide Linkage (BAL). *Chem. Eur. J.*, **1999**, *5*, 2787-2795.
- ⁶Cherkupally, P.; Acosta, G. A.; Ramamurthy, S.; G. De la Torre, B.; Govender, T.; Kruger, H.G.; Albericio, F. Solid-phase peptide synthesis (SPPS), C-terminal vs. side-chain anchoring: a reality or a myth. *Amino Acids*, **2014**, *46*, 1827-1838.
- ⁷Tulla-Puche, J., Albericio, F. The Power of Functional Resins in Organic Syntheses, **2008**, Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- ⁸Matsueda, G. R.; Steward, J. M. A *p*-methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides. *Peptides*, **1981**, *2*, 45-50.
- ⁹Goldwasser, J. M.; Leznoff, C. C. The solid phase synthesis of monoester monoamides and monoester monoalcohols from symmetrical diacid chlorides. *Can. J. Chem.*, **1978**, *56*, 1562-1568.
- ¹⁰Barlos, K.; Chatzi, O.; Gatos, D.; Stavropoulos G. 2-Chlorotriyl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1991**, *37*, 513-520.
- ¹¹Barany, G.; Merrifield, R. B. Solid-phase peptide synthesis. Peptides (New York, 1979-1987), **1980**, *2*, 1-284.
- ¹²Mitchell, A. R.; Kent, S. B. H.; Engelhard, M.; Merrifield, R. B. A new synthetic route to tert-butyloxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)phenylacetamidomethyl-resin, an

improved support for solid-phase peptide synthesis. *J. Org. Chem*, **1978**, *43*, 2845-2852.

¹³ Haddon, R. C.; Williams, G. R. J. Polyamide Supports for Polypeptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 6584-6585.

¹⁴ Rademan, J.; Grötli, M.; Meldal, M.; Bock, K. SPOCC: A Resin for Solid-Phase Organic chemistry and Enzymatic Reactions on Solid Phase. *J. Am. Chem.Soc.*, **1999**, *121*, 5459-5466.

¹⁵ Zalipsky, S.; Albericio, F.; Barany, G. Peptides 1985, Proceedings of the Ninth American Peptide Symposium, Eds.C.M. Deber, V. J. Hruby y K. D. Kopple, Pierce, Rockford, Illinois, 257-260.

¹⁶ Kates, S. A.; McGuinness, B. F.; Blackburn, C.; Griffin, G. W.; Solé, N. A.; Barany, G.; Albericio, F. "High-Load" Polyethylene Glycol-Polystyrene (PEG-PS) Graft Supports for Solid-Phase Synthesis. *Pept. Sci.*, **1998**, *47*, 365-380.

¹⁷ Bayer, E.; Hemmasi, B.; Albert, K.; Rapp, W.; Dengler, M. *Peptides 1983, Proceedings of the Eighth American Peptide Symposium*, Eds. V. J. Hruby y D.H. Rich, Pierce, Rockford, Illinois, 87-90.

¹⁸ Rapp, W. Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries, A Handbook, **1996**, Ed. G. Jung, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 425-464.

¹⁹ Meldal, M. Pega: a flow stable polyethylene glycol dimethyl acrylamide copolymer for solid phase synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 3077-3080.

²⁰ Cote, S. New polyether based monomers and highly cross-linked amphiphile resin. **2005**, PCT Int. Appl. WO 2005012277.

²¹ Barany, G.; Kneib-Cordonier, N.; Mullen, D.G. Solid-Phase peptide synthesis: a silver anniversary report. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1987**, *30*, 705-739.

²² Songster, M. F.; Barany, G. [8] Handles for solid-phase peptide synthesis. *Meth. Enzymol.*, **1997**, *289*, 126-174.

²³ El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 6557-6602.

²⁴ Benoiton, N. L. 2-Alkoxy-5(4H)-oxazolones and the Enantiomerization of N-Alkoxy-carbonylamino Acids. *Pept. Sci.*, **1996**, *40*, 245-254.

- ²⁵ Sheehan, J. C.; Hess, G. P. A new method of forming peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 1067-1068.
- ²⁶ Merrifield, R.B. Solid-Phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin. *Biochemistry*, **1964**, *3*, 1385-1390.
- ²⁷ Sarantakis, D.; Teichman, J.; Lien, E.L.; Fenichel, R.L. A novel cyclic undecapeptide. WY-40,770, with prolonged growth hormone release inhibiting activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1976**, *73*, 336-342.
- ²⁸ Benoiton, N. L.; Chen, F. M. F. Not the alkoxycarbonylamino-acid O-acylisourea. *J. Chem.Soc., Chem. Commun.*, **1981**, *11*, 543-545.
- ²⁹ König, W.; Geiger, R. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolen. *Chemische Berichte*, **1970**, *103*, 799-798.
- ³⁰ Carpino, L.A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An Efficient Peptide Coupling Additive. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 4397-4398.
- ³¹ Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Minor, C. A.; Albericio, F. Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 201-203.
- ³² Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion. *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 9394-9403.
- ³³ Castro, B.; Dormoy, J.R.; Evin, G.; Selve, C. Reactifs de couplage peptidique I (1)-l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdimethylamino phosphonium (B.O.P) *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *16*, 1219-1222.
- ³⁴ Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 205-208.
- ³⁵ Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 1927-1930.
- ³⁶ Jou, G.; Gonzalez, I.; Albericio, F.; Lloyd, P. W.; Giralt, E. Total Synthesis of Dehydrodidemnim B. Use of Uronium and Phosphonium Salt Coupling Reagents in Peptide Synthesis in Solution. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 354-366.

- ³⁷ Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A. On the use of PyAOP, a phosphonium salt derived from HOAt, in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 4853-4856.
- ³⁸ Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. Use of Onium Salt-Based Coupling Reagents in Peptide Synthesis. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 9678-9673.
- ³⁹ Abdelmoty, I.; Albericio, F.; Carpino, L. A.; Forman, B. M.; Kates, S. A. Structural studies of reagents for peptide bond formation: Crystal and molecular structures of HBTU and HATU. *Lett. Pept. Sci.*, **1994**, *1*, 57-67.
- ⁴⁰ Muttenthaler, M.; Albericio, F.; Dawson, P. E. Methods, setup, and safe handling for anhydrous hydrogen fluoride cleavage in Boc solid-phase peptide synthesis. *Nat. Protoc.*, **2015**, *10*, 1067-1083.
- ⁴¹ Alsina, J.; Albericio, F. Solid-Phase Synthesis of C-Terminal Modified Peptides. *Pept. Sci.*, **2003**, *71*, 454-477.
- ⁴² Davies, J. S. The Cyclization of Peptides and Depsipeptides. *J. Pept.Sci.*, **2003**, *9*, 471-501.
- ⁴³ Angell, Y. M.; Thomas, T. L.; Flentke, G. R.; Rich, D. H. Solid-Phase Synthesis of Cyclosporin Peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 7279-7280.
- ⁴⁴ Jiménez, J. C.; Chavarria, B.; López-Macià, A.; Royo, M.; Giralt, E.; Albericio, F. Tentoxin as Scaffold for Drug Discovery. Total Solid-Phase synthesis of Tentoxin and a Library of Analogues. *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 2115-2118.
- ⁴⁵ Mazur, S.; Jayalekshmy, P. Chemistry of polymer-bound o-benzyne. Frequency of encounter between substituents on crosslinked polystyrenes. *J. Am Chem. Soc.*, **1978**, *101*, 677-683.
- ⁴⁶ Barany, G.; Han, Y.; Hargittai, B.; Liu, R-Q.; Varkey J. T. Side chain anchoring strategy for solid-phase synthesis of peptide acids with C-terminal cysteine. *Pept. Sci.*, **2003**, *71*, 652-666.
- ⁴⁷ Han, Y.; Barany, G. Novel S-xanthenyl protecting groups for cysteine and their applications for the N^α-9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy of peptide synthesis. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 3841-3848.
- ⁴⁸ Rovero, P. Homodetic cyclic peptides. In: Kates, S. A.; Albericio, F (eds) Solid-phase synthesis. A practical guide. Marcel Dekker, New York, NY, 331-364.

- ⁴⁹ Alsina, J.; Yokum, S. S.; Albericio, F.; Barany, G. A modified backbone amide linker (BAL) solid-phase peptide synthesis strategy accommodating prolyl, N-alkylamino acyl, or histidyl derivatives at the C-terminus. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 7277-7280.
- ⁵⁰ Díaz-Rodríguez, V.; Mullen, D. G.; Ganusova, E.; Becker, J. M.; Di Stefano, M. D.; Synthesis of peptides containing C-terminal methyl esters using trityl side-chain anchoring: application to the synthesis of α -factor and α -factor analogs. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 5648-5651.
- ⁵¹ Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry. *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 2091-2157.
- ⁵² Albericio, F.; van Abel, R.; Barany, G. Solid-phase synthesis of peptides with C-terminal asparagine or glutamine. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1990**, *35*, 284-286.
- ⁵³ Kates, S. A.; Sole, N. A.; Johnson, C.R. ; Hudson, D.; Barany, G.; Albericio, F. A novel, convenient three-dimensional orthogonal strategy for solid-phase synthesis of cyclic peptides. *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 1549-1552.
- ⁵⁴ Breipohl, G.; Knolle, J.; Stüber, W. Facile SPS of peptides having C-terminal Asn and Gln. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1990**, *35*, 281-283.
- ⁵⁵ Trzeciak, A.; Bannwarth, W. Synthesis of "head-to-tail" cyclized peptides on solid support by Fmoc chemistry. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 4557-4560.
- ⁵⁶ McMurray, J. S. Solid phase synthesis of a cyclic peptide using Fmoc chemistry. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 7679-7682.
- ⁵⁷ Teixido, M.; Altamura, M.; Quartara, L.; Giolitti, A.; Maggi, C. A.; Giralt, E.; Albericio, F. Bicyclic homodetic peptide libraries: comparison of synthetic strategies for their solid-phase synthesis. *J. Comb. Chem*, **2003**, *5*, 760-768.
- ⁵⁸ Rovero, P.; Quartara, L.; Fabbri, G. Synthesis of cyclic peptides on solid support. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 2639-2642.
- ⁵⁹ Giraud, M.; Albericio, F.; Quattrini, F.; Werbitzky, O.; Senn, K.; Williner, M. Method for peptide synthesis, 2008, PCT Int Appl WO 2008040536 A1 20080410.
- ⁶⁰ Barlos, K. Solid phase peptide synthesis via side chain attachment, 2013, PCT Int Appl WO 2013098802 A2 20130704.
- ⁶¹ Barlos, K. Solid phase peptide synthesis of insulin derivatives and analogs using side chain anchored lysine, 2013, PCT Int Appl WO 2013156977 A1 20131024.

- ⁶² Alsina, J.; Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. Solid-phase synthesis of “head-to-tail” cyclic peptides via lysine side-chain anchoring. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 9633-9636.
- ⁶³ Masurier, N.; Zajdel, P.; Verdie, P.; Pawlowski, M.; Amblard, M.; Martínez, J.; Subra, G. A new highly versatile handle for chemistry on a solid support: the pipecolic linker. *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 11536-11540.
- ⁶⁴ Kappel, J. C.; Barany, G. Methionine anchoring applied to the solid-phase synthesis of lysine-containing “head-to-tail” cyclic peptides. *Let. Pept. Sci.*, **2003**, *10*, 119-125.
- ⁶⁵ Rizzi, L.; Cendic, K.; Vaiana, N.; Romeo, S. Alcohols immobilization onto 2-chlorotriyl chloride resin under microwave irradiation. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 2808-2811.
- ⁶⁶ Yan, L. Z.; Edwards, P.; Flora, D.; Mayer, J. P. Synthesis of cyclic peptides through hydroxyl side-chain anchoring. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 923-925.
- ⁶⁷ Alsina, J.; Chiva, C.; Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. Active carbonate resins for solid-phase synthesis through the anchoring of an hydroxyl function. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 883-886.
- ⁶⁸ Nakamura, K.; Ishii, A.; Ito, Y.; Nakahara, Y. A novel silyl linker: motif for side-chain tethered approach to solid-phase glycopeptide synthesis. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 11253-11266.
- ⁶⁹ Graham, K.; Wang, Q.; Eisenhut, M.; Haberkorn, U.; Mier, W. A general method for functionalizing both the C- and N- terminals of Tyr₃-octreotate. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 5021-5024.
- ⁷⁰ Villorbina, G.; Canals, D.; Carde, L.; Grijalvo, S.; Pascual, R.; Rabal, O.; Teixidó, J.; Fabriàs, G.; LLebaria, A.; Casas, J.; Delgado, A. Solid-phase synthesis of a combinatorial library of dihydroceramide analogues and its activity in human alveolar epithelial cells. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 50-62.
- ⁷¹ Bernhardt, A.; Drewello, M.; Schutkowski, M. The solid-phase synthesis of side-chain-phosphorylated peptide 4-nitroanilides. *J. Pept. Res.*, **1997**, *50*, 143-152.
- ⁷² Cabrele, C.; Langer, M.; Beck-Sickinger, A. G. Amino acid side chain attachment approach and its application to the synthesis of tyrosine-containing cyclic peptides. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 4353-4361.
- ⁷³ García, O.; Nicolás, E.; Albericio, F. Solid-phase synthesis: a linker for side-chain anchoring of arginine. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 5319-5321.

- ⁷⁴ Beythien, J.; Barthelemy, S.; Schneeberger, P.; White, P. A novel solid-phase linker strategy for the side-chain anchoring of arginine: an expeditious route to arginine 7-amido-4-methylcoumarins. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 3009-3012.
- ⁷⁵ Zhong, H. M.; Greco, M. N.; Maryanoff, B. E. solid-phase synthesis of arginine-containing peptides by guanidine attachment to a sulfonyl linker. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 9326-9330.
- ⁷⁶ Edwards, P. D.; Mauger, R. C.; Cottrell, K. M.; Morris, F. X.; Pine, K. K.; Sylvester, M. A.; Scott, C. W.; Furlong, S. T. Synthesis and enzymatic evaluation of a P1 arginine aminocoumarin substrate library for trypsin-like serine proteases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 2291-2294.
- ⁷⁷ Alcaro, M. C.; Orfei, M.; Chelli, M.; Ginanneschi, M.; Papini, A. M. Solid-phase approach to the synthesis of cyclen scaffolds from cyclotrapeptides. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 5217-5219.
- ⁷⁸ Isied, S. S.; Kuehn, C. G.; Lyon, J. M.; Merrifield, R. B. Specific peptide sequences for metal ion coordination: solid-phase synthesis of cyclo-(Gly-His)₃. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 2632-2634.
- ⁷⁹ Lee, Y.; Silverman, R. B. Efficient solid-phase synthesis of compounds containing phenylalanine and its derivatives via side chain attachment to the polymer support. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 8407-8408.
- ⁸⁰ Bernhardt, A.; Drewello, M.; Schutkowski, M. The solid-phase synthesis of side chain-phosphorylated peptide-4-nitroanilides. *J. Pept. Res.*, **1997**, *50*, 143-152.
- ⁸¹ Farràs, I. Màster en química avançada, Universitat de Barcelona, 2011.
- ⁸² Reddy, D.R.; Iqbal, M.A.; Hudkins, R. L.; Messina-McLaughlin, P.A.; Mallamo, J.P. A simple synthetic protocol for the protection of amides, lactams, ureas and carbamates. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 8063.
- ⁸³ Ban, Y.; Yoshida, K.; Goto, J.; Oishi, T. Novel photoisomerization of 1-acylindoles to 3-acylindolenines. General entry to the total synthesis of Strychnosand Aspidosperma alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 6990-6992.
- ⁸⁴ Takeda, T.; Mukaiyama, T. Asymmetric total synthesis of indolmycin. *Chem. Lett.*, **1980**, *9*, 163-166.

- ⁸⁵ Brodfuehrer, P. R.; Chen, B. C.; Sattelberg, T. R.; Smith, P. R.; Reddy, J. P.; Stark, D. R.; Quinlan, S. L.; Reid, J. G.; Thottathil, J. K.; Wang, S. An Efficient Fischer Indole Synthesis of Avitriptan, a Potent 5-HT_{1D} Receptor Agonist. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 9192-9202.
- ⁸⁶ Thompson, L. A.; Ellman, J. A. Straightforward and general method for coupling alcohols to solid supports. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 9333-9336.
- ⁸⁷ Smith, A. L.; Stevenson, G. I.; Swain, C. J.; Castro, J. L. Traceless solid phase synthesis of 2,3-disubstituted indoles. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 8317-8320.
- ⁸⁸ Blaney, P.; Grigg, R.; Sridharan, V. Traceless Solid-Phase Organic Synthesis. *Chem.Rev.*, **2002**, *102*, 2607-2624.
- ⁸⁹ Bunin, B. A.; Plunkett, M. J.; Ellman, J. A. The combinatorial synthesis and chemical and biological evaluation of a 1,4-benzodiazepine library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 4708-4712.
- ⁹⁰ Plunkett, M. J.; Ellman, J. A. A Silicon-Based Linker for Traceless Solid-Phase Synthesis. *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 6006-6007.
- ⁹¹ Stieber, F.; Grether, U.; Waldmann, H. Development of the Traceless Phenylhydrazide Linker for Solid-Phase synthesis. *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 3270-3281.
- ⁹² Bräse, S.; Enders, D.; Kobberling, J.; Avemaria, F. A Surprising Solid-Phase Effect: Development of a Recyclable "Traceless" Linker system for Reactions on Solid Support. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 3413-3415.
- ⁹³ Pan, Y.; Holmes, C. P. A Traceless Perfluoroalkylsulfonyl (PFS) Linker for the Deoxygenation of Phenols. *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 2769-2771.
- ⁹⁴ Gu, W.; Silverman, R. B. Solid-Phase Total Synthesis of Scytalidamide A. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 8774-8779.
- ⁹⁵ Gu, W.; Liu, S.; Silverman, R. B. Solid-Phase, Pd-Catalyzed Silicon-Aryl Carbon Bond Formation. Synthesis of Sansalvamide A Peptide. *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 4171-4174.
- ⁹⁶ Bräse, S. The Virtue of the Multifunctional Triazene Linkers in the Efficient Solid-Phase Synthesis of th Heterocycle Libraries. *Acc. Chem. Res.*, **2004**, *37*, 805-816.
- ⁹⁷ Alsina, J.; Rabanal, F.; Chiva, C.; Giralt, E.; Albericio, F. Active carbonate resins: Application to the solid-phase synthesis of alcohol, carbamate and cyclic peptides. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 10125-10152.

- ⁹⁸ Gu, W.; Silverman, R.B. Solid-Phase Total Synthesis of Scytalidamide A. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 8774-8779.
- ⁹⁹ Kahnberg, P.; Lucke, A. J.; Glenn, M. P.; Boyle, G. M.; Tyndall, J. D.; Parsons, P. G.; Fairlie, D. P. Design, Synthesis, Potency, and Cytoselectivity of Anticancer Agents Derived by Parallel Synthesis from α -Aminosuberic Acid. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 7611-7622.
- ¹⁰⁰ Basso, A.; Ernst, B. Solid-phase synthesis of hydroxyproline-based cyclic hexapeptides. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *42*, 6687-6690.
- ¹⁰¹ Blasi, D. Máster en Química Orgánica Experimental, Universitat de Barcelona, 2006.
- ¹⁰² Mitsunobu, O.; Yamada, M.; Bull. Chem. Soc. Jpn., 1967, *40*, 2380-2382.
- ¹⁰³ Huges, D. L. The Mitsunobu Reaction. "Organic Reactions", vol.42, eds. Per Beak, P.; et al., John Wiley & Sons, Inc., New York, **1992**, p. 335.
- ¹⁰⁴ Wada, M.; Mitsunobu, O. Intermolecular dehydration between alcohols and active hydrogen compounds by means of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine. *Tetrahedron Lett.*, **1972**, *13*, 1279-1282.
- ¹⁰⁵ Nugiel, D. A.; Lyndon, A.; Cornelius, M.; Corbett, J. W. Facile Preparation of 2,5-Disubstituted Purines Using Solid-Phase Chemistry. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 201-203.
- ¹⁰⁶ Stathopoulos, P.; Papas, S.; Tsikaris, V. C-terminal N-alkylated peptide amides resulting from the linker decomposition of the Rink amide resin. *J. Pept. Sci.*, **2006**, *12*, 227-232.
- ¹⁰⁷ Milne, P.; Kilian, G. The properties, formation, and biological activity of 2,5-diketopiperazines. In: Mander, L., Liu, H.W. (eds). Comprehensive natural products II: chemistry and biology, Elsevier Science, **2010**, *5*, Amsterdam, 657-698.
- ¹⁰⁸ Mehdi, R. B. A.; Shaaban, K. A.; Rebai, I. K.; Smaoui, S.; Bejar, S.; Mellouli, L. Five naturally bioactive molecules including two rhamnopyranoside derivatives isolated from the Streptomyces sp. Strain TN58. *Nat. Prod. Res. B.*, **2009**, *23*, 1095-1107.
- ¹⁰⁹ Jaime, H.; Kilian, G.; Dyason, K.; Milne, P. J. The effect of the isomers of cyclo-(Trp-Pro) on heart and ion-channel activity. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2002**, *54*, 1659-1665.
- ¹¹⁰ Randazzo, A.; Dal Piaz, F.; Orru, S.; Debitus, C.; Roussakis, C.; Pucci, P.; Gómez-Paloma, L. Axinellins A and B: New Proline-Containing Antiproliferative Cyclopeptides from the Vanuatu Sponge Axinella carteri. *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, *11*, 2659-2665.

- ¹¹¹ Malmstrøm, J.; Unguisins A and B: New Cyclic Peptides from the Marine-Derived Fungus *Emericella unguis*. *J. Nat. Prod.*, **1999**, *62*, 787-789.
- ¹¹² Hunter, L.; Chung, J. H. Total Synthesis of Unguisin A. *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 5502-5505.
- ¹¹³ Bellamy, F. D.; Ou, K. Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium. *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 839-842.
- ¹¹⁴ Miranda-Olvera, A. D.; Rivero Espejel, I. A.; De León Rodríguez, L. M. From head to tail: microwave-assisted synthesis of para hydrazine nicotinamide phenylalanine8-oxytocin derivatives. *Letters in Organic Chemistry*, **2007**, *4*, 261-264.
- ¹¹⁵ Bräse, S.; Dahmen, S.; Lormann, M. E. P. Multifunctional Linkers as an Efficient Tool for the Synthesis of Diverse Small Molecule Libraries: The Triazene Anchors. *Methods Enzymol.*, **2003**, *369*, 127-150.
- ¹¹⁶ Gil, C.; Bräse, S. Efficient Solid-Phase Synthesis of Highly Functionalized 1,4-Benzodiazepin-5-one Derivatives and Related Compounds by Intramolecular Aza-Wittig Reaction. *Chem. Eur. J.*, **2005**, *11*, 2680-2688.
- ¹¹⁷ Schunk, S.; Enders, D. Solid-Phase Synthesis of Monocyclic β -Lactam Derivatives. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 8034-8042.
- ¹¹⁸ Lormann, M.; Dahmen, S.; Bräse, S. Hydro-dediazoniatioin of diazonium salts using trichlorosilane: new cleavage conditions for the T₁ traceless linker. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 3813-3816.
- ¹¹⁹ Wassmundt, F. W.; Kiesman, W. F. Efficient Catalysis of Hydrodediazoniatioins in Dimethylformamide. *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 1713-1719.
- ¹²⁰ Zimmerman, M.; Ashe, B. M. Substrate specificity of the elastase and the chymotrypsin-like enzyme of the human granulocyte. *Biochim. Biophys. Acta, Enzymol.*, **1977**, *480*, 241-245.
- ¹²¹ Kumar, V.; Aldrich, J. V. A Solid-Phase Synthetic strategy for Labeled Peptides: Synthesis of a Biotinylated Derivative of the δ Opioid Receptor Antagonist TIPP (Tyr-Tic-Phe-Phe-OH). *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 613-616.
- ¹²² Basak, A.; Jean, F.; Dugas, H.; Lazure, C. Biotinylation of an Enkephalin-Containing Heptapeptide via various spacer arms. Synthesis, comparative binding studies toward

Avidin, and application as substrates in enzymic reactions. *Bioconjugate Chem.*, **1994**, *5*, 301-305.

¹²³ Rink, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 3787 -3790.

¹²⁴ Sieber, P. A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 2107–2110.

¹²⁵ Shi, Z. H.; Wei, Y. Y.; Wang, C. J.; Yu, L. Synthesis and Analgesic Activities of Endomorphin-2 and Its Analogues. *Chem. Biodiversity.*, **2007**, *4*, 458-467.

¹²⁶ Zadina, J. E.; Hackler, L.; Ge, L., Kastin, A. J. A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature*, **1997**, *386*, 499-502.

¹²⁷ Zhao, Q.; Garreau, I.; Sannier, F.; Piot, J.M. Opioid peptides derived from hemoglobin: Hemorphins. *Pept. Sci.*, **1997**, *43*, 75-98.

¹²⁸ Bina, X. R.; Bina, J. E. The Cyclic Dipeptide Cyclo (Phe-Pro) Inhibits Cholera Toxin and Toxin-Coregulated Pilus Production in O1 El Tor *Vibrio Cholerae*. *J. Bacteriol.*, **2010**, *14*, 3829-3832.

¹²⁹ Brauns, S. C.; Milne, P.; Naudé, R.; Van De Venter, M. Selected Cyclic Dipeptides Inhibit Cancer Cell Growth and Induce Apoptosis in HT-29 Colon Cancer Cells. *Anticancer Res.*, **2004**, *24*, 1713-1720.

¹³⁰ Zhou, P.; Huang, J.; Tian, F. Specific Noncovalent Interactions at Protein-Ligand Interface: Implications for Rational drug Design. *Curr. Med. Chem.*, **2012**, *19*, 226-238.

¹³¹ Salonen, L. M.; Ellermann, M.; Diederich, F. Aromatic Rings in Chemical and Biological Recognition: Energetics and Structures. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 4808-4842.

¹³² Martín-Gago, P.; Gomez-Caminals, M.; Ramon, R.; Verdaguer, X.; Martin-Malpartida, P.; Aragon, E.; Fernandez-Carneado, J.; Ponsati, B.; Lopez-Ruiz, P.; Cortes, M. A.; Colas, B.; Macias, M. J.; Riera, A. Fine-tuning the π - π Aromatic Interactions in Peptides: Somatostatin Analogues Containing Mesityl Alanine. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 1820-1825.

¹³³ Jalali-Heravi, M.; Mani-Varnosfaderani, A. QSAR modelling of integrin antagonists using enhanced Bayesian regularised genetic neural networks. *SAR QSAR Environ. Res.*, **2011**, *22*, 293-314.

- ¹³⁴ Oh, D. C.; Jensen, P. R.; Fenical, W. Zygosporamide, a cytotoxic cyclic depsipeptide from the marine-derived fungus *Zygosporium masonii*. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 8625-8628.
- ¹³⁵ Wang, Y.; Zhang, F.; Zhang, Y.; Liu, J. O.; Ma, D. Synthesis and antitumor activity of cyclodepsipeptide Zygosporamide and its analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 4385-4387.
- ¹³⁶ Kawai, M.; Chorev, M.; Marin-Rose, J.; Goodman, M. Peptide sweeteners.4. Hydroxy and methoxy substitution of the aromatic ring in L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester. Structure-taste relationships. *J. Med. Chem.*; **1980**, *23*, 420-424.
- ¹³⁷ Salwiczek, M.; Nyakatura, E. K.; Gerling, U. I. M.; Ye, S.; Kokschi, B. Fluorinated amino acids: compatibility with native protein structures and effects on protein-protein interactions. *Chem. Soc. Rev.*; **2012**, *41*, 2135-2171.
- ¹³⁸ Vulpetti, A.; Dalvit, C. Fluorine local environment: from screening to drug design. *Drug Discovery Today*; **2012**, *17*, 890-897.
- ¹³⁹ Li, J.; Chen, P. R. Moving Pd-Mediated Protein Cross Coupling to Living Systems. *Chem. Bio. Chem.*, **2012**, *13*, 1728-1731.
- ¹⁴⁰ Vilaró, M.; Arsequell, G.; Valencia, G.; Ballesteros, A.; Barluenga, J. Arylation of Phe and Tyr Side Chains of Unprotected Peptides by a Suzuki-Miyaura Reaction in water. *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 3243-3245.
- ¹⁴¹ Sommer, S.; Weikart, N. D.; Brockmeyer, A.; Janning, P.; Mootz, H. D. Expanded Click Conjugation of Recombinant Proteins with Ubiquitin-Like Modifiers Reveals Altered Substrate Preference of SUMO2-Modified Ubc9. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 9888-9892.
- ¹⁴² Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 6974-6998.
- ¹⁴³ Zollinger, H. Reactivity and Stability of Arenediazonium Ions. *Accounts Chem. Res.*, **1973**, *6*, 335-341.
- ¹⁴⁴ Galli, C. Radical Reactions of Arenediazonium Ions: An Easy Entry into the Chemistry of the Aryl Radical. *Chem. Rev.*, **1988**, *88*, 765-792.

- ¹⁴⁵ Cohen, T.; Dietz, A. G.; Miser, J. R. A simple preparation of phenols from diazonium ions via the generation and oxidation of aryl radicals by copper salts. *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, 2053-2056.
- ¹⁴⁶ Chandler, S. A.; Hanson, P.; Taylor, A. B.; Walton, P. H.; Timms, A. W. Sandmeyer reactions. Part 5. Estimation of the rates of 1,5-aryl/aryl radical translocation and cyclisation during Pschorr fluorenone synthesis with a comparative analysis of reaction energetic. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2*, **2001**, 214-228.
- ¹⁴⁷ Satyamurthy, N.; Barrio, J. R.; Bilda, G. T.; Phelps, M. E. Efficient conversion of 1-aryl-3,3-dialkyltriazenes to phenols and oxygen-18 labeled phenols. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 4409-4412.
- ¹⁴⁸ Filimov, V. D.; Trusova, M.; Postnikov, P.; Krasnokutskaya, E. A.; Lee, Y. M.; Hwang, H. Y.; Kim, H.; Chi, K. W. Unusually Stable, Versatile, and Pure Arenediazonium Tosylates: Their Preparation, Structures, and synthetic Applicability. *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 3961-3964.
- ¹⁴⁹ Avemaria, F.; Zimmermann, V.; Bräse, S. Synthesis of Aryl Azides via Post-Cleavage Modification of Polymer-Bound Triazenes. *Synlett.*, **2004**, *7*, 1163-1166.
- ¹⁵⁰ Yamazaki, T.; Taguchi, T.; Ojima, I. Unique properties of fluorine and their relevance to medicinal chemistry and chemical biology. *Fluorine in Medicinal Chemistry and Chemical Biology*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, **2009**, 1-46.
- ¹⁵¹ Rosenfeld, M. N.; Widdowson, D. A. A Mild and Efficient Method of Aromatic Fluorination. *J. Chem. Soc., Chem. Com.*, **1979**, 914-916.
- ¹⁵² Döbele, M.; Vanderheiden, S.; Jung, N.; Bräse, S. Synthesis of Aryl Fluorides on a Solid Support and in Solution by Utilizing a Fluorinated Solvent. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 5986-5988.
- ¹⁵³ Pages, T.; Langlois, B. R. Fluorination of aromatic compounds from 1-aryl-3,3-dimethyltriazenes and fluorides anions in acidic medium 1. A model for ¹⁸F labeling. *J. Fluor. Chem.*, **2001**, *107*, 321-327.
- ¹⁵⁴ Kovak, M.; Anderluh, M.; Vercouillie, J.; Guilloteau, D.; Emond, P.; Mavel, S. Aromatic fluoro-de-triazonation with boron trifluoride diethyl etherate under non-protic acid conditions. *J. Fluor. Chem.*, **2013**, *147*, 5-9.

CAPÍTULO 2

LA UNIÓN DE LA CADENA LATERAL DE LA FENILALANINA AL POLÍMERO A TRAVÉS DE LA FUNCIÓN TRIACENO COMO VÍA DE ACCESO A ESTRUCTURAS PEPTÍDICAS RELEVANTES: SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE ANÁLOGOS DE PEPTINAS

INTRODUCCIÓN

1. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G (GPCRs)

1.1. Introducción

Los receptores acoplados a proteína G (*G protein-coupled receptors*, GPCRs) representan una de las superfamilias de proteínas más importantes debido a su implicación en prácticamente todos los procesos fisiológicos del organismo. Esta importancia queda manifiesta en el hecho de que, prácticamente, la mitad de los fármacos actualmente comercializados ejercen su actividad terapéutica a través de al menos un GPCR.¹

Los GPCRs son proteínas de membrana capaces de recibir la información proveniente de estímulos externos y transmitir ésta al interior celular, de modo que se genere la respuesta adecuada al estímulo recibido. Para ello, los GPCRs actúan como transductores de señales, es decir, son capaces de unir con especificidad y selectividad uno o varios ligandos que pueden provenir tanto del exterior (ligandos exógenos) como del interior (ligandos endógenos) del organismo. Estos ligandos pueden ser hormonas, péptidos, aminoácidos o iones, entre otros. La unión de los GPCRs a un ligando da lugar a un cambio conformacional que puede implicar su activación o inactivación. Este cambio estructural se transmite al interior celular, produciéndose así una modificación que activa un cierto tipo de proteínas G a las que se encuentran acoplados. Estas proteínas G, a su vez, activan diferentes cascadas intracelulares responsables de los distintos efectos finales (Figura 1).

La señalización de los GPCRs está relacionada con numerosas respuestas fisiológicas, de tal manera que muchas enfermedades y desórdenes están asociados a mutaciones y polimorfismos de estos receptores. Ello justifica que entre el 40 % y el 50 % de los nuevos fármacos desarrollados en la actualidad tengan como objetivo la activación o inhibición de estos receptores.

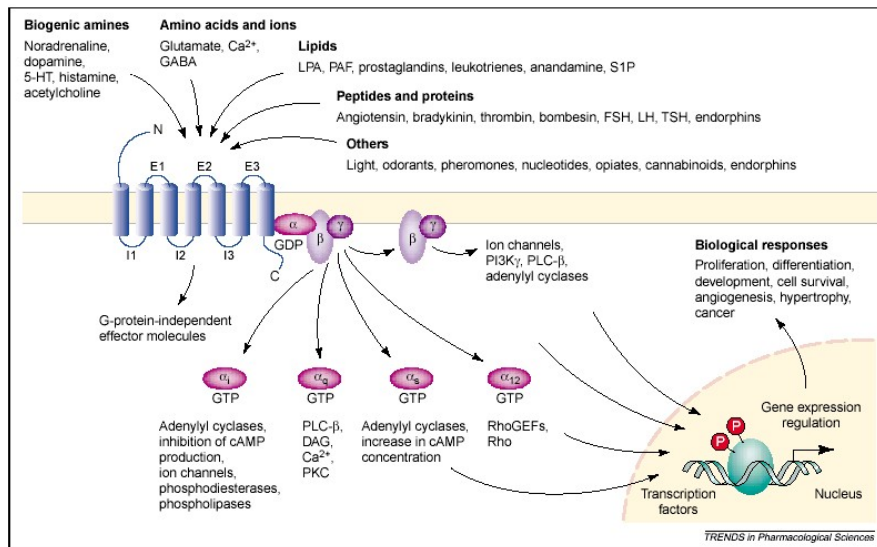


Figura 1. Estructura general de un receptor acoplado a proteína G mostrando los mecanismos de señalización celular responsables de las diversas funciones biológicas.

1.2. Características generales de los GPCRs

La superfamilia de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs), también llamados receptores de siete dominios de transmembrana (7TMD), comprende el mayor grupo de receptores de superficie celular y están codificados por más de 1000 genes del genoma humano.^{2,3} De manera general, estos receptores se caracterizan por presentar: (a) una estructura de siete α -hélices transmembranales conectadas mediante seis lazos, tres intracelulares y tres extracelulares; (b) un extremo amino orientado hacia el medio extracelular que, en general, contiene la zona de unión al ligando; y (c) un extremo carboxilo en el interior celular, en las proximidades del cual se produce la interacción con la proteína G heterotrimérica responsable de la activación de las cascadas de señalización correspondientes.

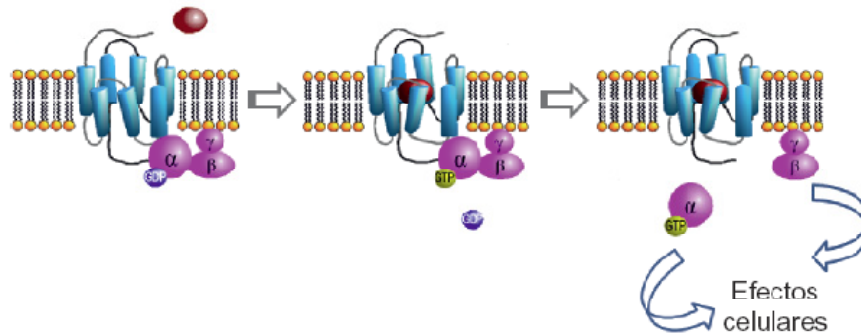


Figura 2. Representación esquemática general de la activación de un GPCR. La unión del ligando (en rojo) produce la activación de la proteína G heterotrimérica y la disociación de la subunidad α del dímero $\beta\gamma$, las cuales inician así sus cascadas de señalización correspondientes.

La unidad básica responsable de la transducción de señal está formada por el receptor, la proteína heterotrimérica G, constituida por tres subunidades (α , β y γ) y un efector. La unión del ligando al receptor induce cambios conformacionales que se transmiten desde el receptor a la proteína G, dando lugar a la disociación de las subunidades $G\alpha$ -GTP y el dímero $\beta\gamma$, las cuales posteriormente modulan la función del efector (Figura 2). Entre los sistemas efectores modulados por los GPCRs destacan la enzima adenilato ciclasa (AC), las fosfolipasas C y D (PLC, PLD) y los canales iónicos, entre otros.

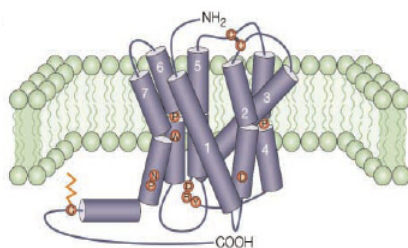
1.3. Clasificación de los GPCRs

Los GPCRs se clasifican en tres familias en base a la similitud de su secuencia y estructura y a la naturaleza farmacológica de sus ligandos (Figura 3).^{4,5} A pesar de que todos los GPCRs comparten una estructura común, las diferentes familias no tienen secuencias homólogas, lo cual indica que probablemente no están relacionadas filogenéticamente y que la similitud de su estructura transmembrana se debe exclusivamente a tener requerimientos funcionales comunes.

- Familia A. Aproximadamente el 90 % de GPCRs pertenecen a esta familia, donde se incluyen receptores para una gran variedad de hormonas y neurotransmisores. La homología entre los receptores de esta familia es baja y está restringida a un número de residuos altamente conservados. En estos receptores, el ligando se une normalmente a una cavidad formada por los

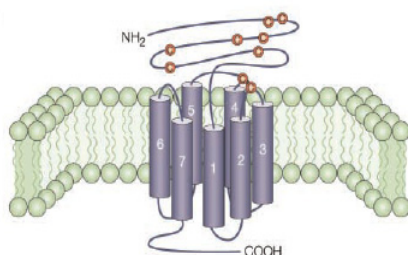
dominios transmembrana, aunque para alguna subfamilia el reconocimiento se produce en los lazos extracelulares y en el dominio del extremo amino.

- Familia B. Incluye aproximadamente 20 receptores diferentes para una variedad de hormonas peptídicas y neuropéptidos, como la calcitonina y el glucagón. Esta familia se caracteriza por poseer un dominio en el extremo amino formado por una gran cantidad de residuos de aminoácidos.
- Familia C. Incluye a los receptores metabotrópicos de glutamato, los receptores sensibles a calcio y los receptores de ácido γ -aminobutírico (GABA). Esta familia se caracteriza por tener unos dominios en los extremos carboxilo y amino excepcionalmente largos, siendo el segundo el implicado en la unión del ligando.



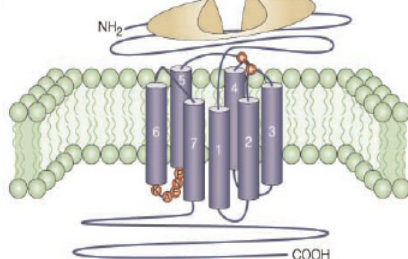
Familia A

Receptores de aminas biogénicas (serotonina, dopamina, histamina), adenosina, rodopsina, canabinoides, opioides.



Familia B

Receptores de glucagón, hormona paratiroidea, calcitonina, hormona liberadora de gonadotropina.



Familia C

Receptores metabotrópicos de glutamato, GABA.

Figura 3. Representación de las tres principales familias de receptores acoplados a proteínas G

1.4. Oligomerización de GPCRs

Tradicionalmente, el modelo de funcionamiento de los GPCRs describía a estos receptores como una unidad funcional, es decir, como monómeros que se unían a su

proteína G correspondiente en una proporción 1: 1. Sin embargo, desde mediados de los años 90, este concepto se ha ido modificando con la creciente evidencia de que los GPCRs monoméricos pueden comportarse también como bloques de construcción que forman dímeros, o incluso oligómeros de mayor tamaño. Los monómeros de los distintos GPCRs pueden formar homodímeros (cuando se asocian receptores del mismo tipo) o heterodímeros (cuando se asocian receptores de distinto tipo). De hecho, se han descrito diversos ejemplos de heterodimerización en GPCRs de las familias A y C.^{6,7}

Los dímeros/oligómeros presentan características funcionales diferentes a las de los receptores que los constituyen (monómeros). Así, la oligomerización confiere nuevas propiedades a los GPCRs, lo que establece un posible mecanismo para generar nuevas funciones en estos receptores. Además, los dímeros/oligómeros pueden implicar cambios en la afinidad de los ligandos y, por tanto, en la actividad intrínseca de los mismos.

La relevancia de los oligómeros de GPCRs a nivel fisiológico es destacable puesto que algunas de las observaciones detectadas *in vitro* han sido complementadas con las respectivas observaciones *in vivo*. Algunos ejemplos son los heterodímeros de los receptores AT1-B2 en la regulación de la presión arterial de las mujeres embarazadas⁸ o los heterodímeros opioides μ - δ en el efecto analgésico derivado de la administración de morfina.⁹ Dado que las propiedades farmacológicas de los heterodímeros juegan un papel crítico en la modulación de las funciones fisiológicas, los oligómeros deben ser considerados como dianas terapéuticas por sí solas.

1.5. Un caso particular de GPCRs: receptores de adenosina, dopamina y serotonina

Una característica de los receptores acoplados a proteína G que responden a ligandos endógenos, como neurotransmisores, péptidos, lípidos o nucleótidos, es que se expresan en una gran variedad de tejidos y células del cuerpo, con una elevada preferencia por el cerebro, a diferencia de los receptores que reciben señales de origen externo, los cuales presentan una distribución más localizada en los órganos sensoriales. A su vez, un determinado tejido expresa multitud de receptores (GPCRs)

diferentes. Sin embargo, cada tejido expresa a una única combinación de receptores, indicando el uso combinatorio de GPCRs para la regulación de diversas funciones.

En el sistema nervioso central (SNC) se expresan un elevado número de receptores acoplados a proteína G, más del 90 % de los GPCRs se expresan en el cerebro y, para algunos de ellos, su expresión está restringida a este tejido.¹⁰ El estudio de las asociaciones entre receptores acoplados a proteína G en determinados dominios de neuronas abre nuevas expectativas en el diseño racional de terapias para el tratamiento de desórdenes neurológicos como, por ejemplo, los trastornos motores o psiquiátricos.

1.5.1. Receptores de adenosina

La adenosina es un nucleósido de purina endógeno con funciones fisiológicas a nivel periférico (vasodilatación o inhibición de la agregación plaquetaria, entre otros) y también es secretada por la mayoría de células del sistema nervioso central (Figura 4).

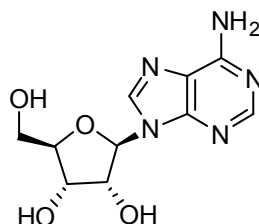


Figura 4. Estructura química de la adenosina

La adenosina se encuentra implicada en una gran variedad de actividades del SNC a través de su interacción con cuatro subtipos de GPCRs: A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 .¹¹ El receptor A_1 es el más abundante en el cerebro y se acopla principalmente a proteínas del tipo $G_{\alpha i}$,¹² de modo que su estimulación inhibe la enzima adenilato ciclasa.¹³ Por otra parte, el receptor A_2 se expresa principalmente en el estriado¹⁴ y su estimulación está asociada a la activación de la adenilato ciclasa mediante las proteínas $G_{\alpha s}$.¹⁵ A parte de su acción directa sobre células nerviosas, los receptores de adenosina también influyen indirectamente en el SNC sobre la acción de otros neurotransmisores, actuando como neuromoduladores. Recientemente, se han relacionado estas acciones con desórdenes del SNC, como Alzheimer, síndrome de Parkinson o epilepsia, entre otras.¹⁶

1.5.2. Receptores de dopamina

La dopamina es la principal catecolamina que actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central y controla una gran variedad de funciones como la modulación de la actividad sensorial, la actividad motora y endocrina, el aprendizaje, la memoria, la emotividad, la motivación y la afectividad, entre otras.¹⁷ Alteraciones en la funcionalidad de sus receptores se han relacionado con patologías como el síndrome de Parkinson, desórdenes afectivos, esquizofrenia o la adicción a las drogas (Figura 5).¹⁸

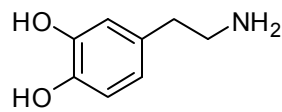


Figura 5. Estructura química de la dopamina

La dopamina media su acción a través de cinco receptores, que se dividen en dos subgrupos en función de criterios bioquímicos y farmacológicos.

- Receptores D₁ y D₅ (tipo D₁ o D_{1-like}). Se acoplan normalmente a las proteínas G_{αs} activando la enzima adenilato ciclasa.
- Receptores D₃ y D₄ (tipo D₂ o D_{2-like}). Se acoplan normalmente a las proteínas G_{αi}, inhibiendo la actividad de la enzima adenilato ciclasa.¹⁹

Los dos subgrupos presentan peculiaridades estructurales. Así, los receptores tipo D₁ contienen un dominio en el extremo carboxilo unas siete veces más largo que los de tipo D₂, mientras que estos últimos presentan un tercer lazo intracelular muy largo, característica común en muchos receptores acoplados a la proteína G_{αi} y que inhiben a la adenilato ciclasa.¹⁷

1.5.3. Receptores de serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT)²⁰ es una amina biogénica que actúa como neurotransmisor y regula una gran variedad de funciones sensoriales, motoras y las funciones de comportamiento en el sistema nervioso central, a través de diversos receptores (Figura 6). Hasta el momento, se conocen catorce subtipos de receptores serotoninérgicos, que se clasifican en siete familias en función de su diversidad estructural y su mecanismo de transducción de señales (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-

HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇). Con la excepción del receptor 5-HT₃ (que actúa a través de mecanismos de canales iónicos), el resto de receptores serotoninérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G.

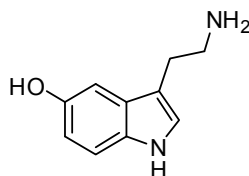


Figura 6. Estructura química de la serotonina

1.6. Los GPCRs como dianas terapéuticas

Los GPCRs representan la familia de proteínas de mayor impacto social, terapéutico y económico. Hoy en día, más del 50 % de los fármacos, con unas ventas anuales en el mundo que superan los 100 billones de dólares, regulan la función de los GPCRs, y un 30 % de estos fármacos está directamente dirigido a los GPCRs. Los GPCRs están involucrados en una amplia diversidad de enfermedades, como son alergias, disfunción cardiovascular, depresión, obesidad, cáncer, dolor, diabetes, y una variedad de trastornos del sistema nervioso central. Sólo una proporción muy pequeña de todos los GPCRs son actualmente diana de fármacos, por lo tanto, hay mucho interés en la identificación de nuevos receptores que puedan ser utilizados para el desarrollo de fármacos. En la Tabla 1 se muestra un pequeño ejemplo de los fármacos más vendidos dirigidos a GPCRs, donde se observa el amplio rango de indicaciones terapéuticas que cubren.²¹

Nombre comercial	Acción	Entidad molecular	Indicación terapéutica	Compañía
Plavix®	Antagonista	Clopidogrel	Ictus	Bristol-Myers Squibb
	P2Y ₁₂			
Zyprexa®	Antagonista	Olanzapine	Esquizofrenia	Elli Lilly
	5HT ₂ /D ₁ /D ₂			
Neurontin®	Agonista	GABApentin	Dolor neurológico	Pfizer
	GABA _B			

Diovan®	Antagonista AT ₁	Valsartan	Hipertensión	Novartis
Allegra/Telfast®	Antagonista H ₁	Fexofenadine	Alergias	Sanofi-Aventis
Imigran®	Agonista 5HT _{1D}	Sumatriptan	Migraña	GlaxoSmithKline
Leuplin/Lupron®	LH-RH agonista	Leuprorelin	Cáncer	Takeda/Abbot
Serevent®	Agonista β ₁	Salmeterol	Asma	GlaxoSmithKline
Gaster®	Antagonista H ₂	Famotidine	Úlcera gástrica	Yamanouchi
Risperdal®	Antagonista 5HT ₂ /D ₂	Risperidone	Esquizofrenia	Johnson&Johnson

Tabla 1. Fármacos más vendidos que actúan sobre GPCRs

La mayoría de estrategias terapéuticas dirigidas a receptores acoplados a proteína G involucrados en algún desorden se basan en el uso de agonistas o antagonistas específicos del receptor. Sin embargo, en los últimos años, se han propuesto nuevas estrategias que intentan abordar la modulación de los GPCRs teniendo en cuenta la formación de estructuras complejas, basadas en la formación de dímeros, trímeros, etc.

2. LIGANDOS MÚLTIPLES

2.1. Introducción

Estudios recientes indican que la aplicación de tratamientos con ligandos altamente específicos es insuficiente en la modulación de algunos sistemas complejos *in vivo*. Por otra parte, existen evidencias que señalan la interacción de un ligando con más de un receptor como una estrategia más efectiva en algunos desórdenes, en contra de la aproximación “una diana, una enfermedad”. Así, en la actualidad, el diseño deliberado y racional de ligandos múltiples, capaces de interactuar con más de un receptor simultáneamente, se ha establecido como una nueva tendencia en el desarrollo de agentes terapéuticos. La utilización de esta estrategia es especialmente útil en

situaciones donde la alteración de una única diana da lugar a resultados insuficientes. En estos casos, la modulación equilibrada de un número pequeño de dianas es más eficaz y da lugar a menos efectos secundarios que los tratamientos con fármacos altamente selectivos.^{22, 23, 24}

El diseño de ligandos múltiples ha generado compuestos que han alcanzado las últimas fases de desarrollo clínico.²⁵ Un ejemplo interesante se encuentra en el campo de los fármacos antipsicóticos, donde ligandos múltiples como la paliperidona, que actúa sobre los receptores D₂ de dopamina y 5-HT_{2A} de serotonina, presenta un perfil farmacológico más amplio, proporcionando más eficacia contra los síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia.²⁶

El uso de ligandos múltiples presenta ciertas ventajas respecto a otras aproximaciones de interacción simultánea con múltiples dianas, como son los cócteles de fármacos (un principio activo por pastilla) o los fármacos multicomponente (varios principios activos por pastilla).²² Los beneficios del uso de cócteles de fármacos dependen de la colaboración del paciente, especialmente en enfermedades asintomáticas como la hipertensión.²⁷ Con objeto de mejorar este aspecto, se desarrollaron los fármacos multicomponente, como es el caso de los fármacos Cadue²⁸ (amlodipina/atorvastatina) o Vytorin²⁹ (ecetimibina/sinvastatina), aprobados para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. No obstante, diferencias en el metabolismo de los pacientes pueden dar lugar a relaciones farmacodinámicas y farmacocinéticas complejas que dificulten la predicción de la variabilidad entre pacientes.

La estrategia alternativa al desarrollo de fármacos multicomponente es la utilización de ligandos múltiples, donde un único agente está formulado en una sola pastilla. En comparación con las combinaciones de fármacos, la desventaja principal es una mayor dificultad en el diseño de la estructura, ya que una única estructura debe interaccionar con dianas de diferente naturaleza. Sin embargo, los ligandos múltiples presentan algunas ventajas como la disminución del riesgo de interacciones fármaco-fármaco no deseadas, así como la posibilidad de tener mejores predicciones de las relaciones farmacocinéticas/farmacodinámicas como consecuencia de administrar un único fármaco, a diferencia de las otras aproximaciones.

El diseño racional de ligandos múltiples puede llevarse a cabo por combinación de farmacóforos de ligandos selectivos. Los farmacóforos pueden estar unidos a través de un espaciador (ligandos bivalentes) o superpuestos aprovechando rasgos estructurales comunes en ambos ligandos (Figura 7).



Figura 7. Diseño de ligandos múltiples. Existen tres aproximaciones para diseñar ligandos múltiples que interactúan con oligómeros GPCRs. La diferencia entre unas y otras se basa en el grado de superposición entre los farmacóforos.

2.2. Ligandos bivalentes

Los ligandos bivalentes, también llamados conjugados, son moléculas que contienen dos farmacóforos unidos covalentemente a través de un espaciador, lo que permite que interactúen simultáneamente y de manera específica con dos sitios de unión de los ligandos (Figura 8).^{30, 31} Los conjugados constituyen herramientas prometedoras desde el punto de vista farmacológico para interactuar sobre dímeros de GPCRs. Las afinidades varían dependiendo de la longitud del espaciador que une las dos moléculas de farmacóforo pero, en general, los conjugados tienden a incrementar la afinidad respecto a cada molécula por separado. De hecho, la utilización de ligandos bivalentes podría estabilizar la conformación dimérica de los receptores y, de alguna manera, incrementar la afinidad y/o potencia del ligando.



Figura 8. Estructura general de un ligando bivalente

Desde el punto de vista del diseño de los ligandos bivalentes, hay varios factores importantes a tener en cuenta y por ello, habitualmente, se basa en datos obtenidos de los estudios de relación estructura-función,³² con tal de afectar en la menor medida, o en el mejor de los casos, no afectar nada a la afinidad y la potencia de los ligandos una vez forman el conjugado. Así pues, es necesario escoger cuidadosamente

el punto de la estructura del ligando que se puede modificar químicamente, así como la longitud y estructura química del espaciador. La elección del punto de unión más adecuado del espaciador a las moléculas de farmacóforo se basa fundamentalmente en dos criterios: la viabilidad de la modificación química y la compatibilidad de la modificación con la actividad biológica del farmacóforo. En muchos casos, la presencia de grupos químicos reactivos (grupos amino, hidroxilo o ácido carboxílico) en el farmacóforo es la que gobierna la elección del punto de unión al espaciador. Por otra parte, los farmacóforos contienen normalmente más de un grupo reactivo que podría ser relevante en la actividad biológica de los mismos. Además, tanto el punto de unión como las reacciones químicas implicadas en la introducción del espaciador deben de mantener la quiralidad del farmacóforo, ya que la actividad biológica puede variar con la racemización. Por ello, como se ha comentado, el punto de unión más adecuado se selecciona preferentemente en base a datos de relación estructura-función.

Uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta con respecto a la habilidad del ligando bivalente para hacer de puente entre receptores diméricos es la longitud del espaciador. Si el espaciador es de talla muy corta, la probabilidad de que los dos farmacóforos se unan simultáneamente a los dos monómeros que forman el dímero GPRC es muy baja. Por otra parte, la utilización de espaciadores de talla muy larga podría reducir la ganancia de entropía que supone la unión de ligandos bivalentes. Así, la talla óptima del espaciador debe determinarse empíricamente en cada caso, a través de la evaluación de varios ligandos bivalentes incrementando el número de átomos del espaciador.³² La composición química del espaciador también es otro factor importante a tener en cuenta.³³ La flexibilidad del espaciador es esencial para permitir la correcta disposición de cada farmacóforo en los dos monómeros del dímero. Además, los espaciadores deberán favorecer la solubilidad de los ligandos bivalentes en agua; por ello, es muy habitual el uso de unidades de polietilenglicol o cadenas peptídicas.³⁴

Hasta la fecha se han descrito numerosos ejemplos de ligandos bivalentes que actúan sobre receptores de serotonina,³⁵ opioides,³⁴ muscarínicos³⁶ y de la hormona liberadora de gonadopina.

2.3. Estructuras privilegiadas

El concepto de estructura privilegiada fue utilizado por primera vez por Evans y colaboradores³⁷ y, posteriormente ha sido revisado por Patchett y colaboradores.³⁸ Ambos autores describen las estructuras privilegiadas como aquellos esqueletos o fragmentos, generalmente heterocíclicos, presentes en ligandos con capacidad de interacción para un conjunto de receptores o proteínas de una misma familia. En este sentido, el uso de estructuras privilegiadas resulta muy útil en química combinatoria para la síntesis de ligandos selectivos a uno o más receptores, en especial para receptores de los cuales se dispone de poca información estructural como los GPCRs.³⁹

En la Figura 9 se muestran algunos ejemplos de fármacos actualmente comercializados o posibles candidatos a fármacos que contienen estructuras privilegiadas.

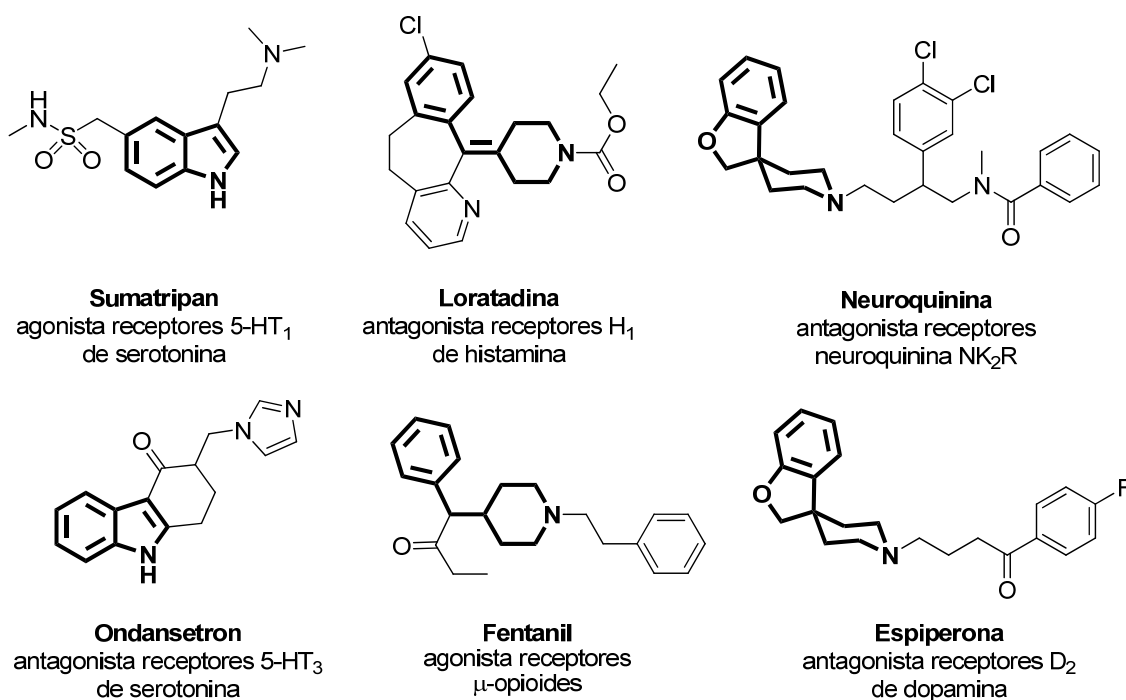


Figura 9. Ejemplos de ligandos que contienen estructuras privilegiadas (indicadas en negrita)

Las características de las estructuras privilegiadas las convierten en un buen punto de partida para el desarrollo de ligandos múltiples. En el presente trabajo, se plantea la utilización de estructuras privilegiadas en el diseño y evaluación biológica de posibles ligandos bivalentes con capacidad de interacción en GPCRs.

3. LIGANDOS BIVALENTES BASADOS EN ESTRUCTURAS PRIVILEGIADAS

3.1. Introducción

Un buen punto de partida para el desarrollo de ligandos bivalentes es considerar estructuras que estén presentes en compuestos con capacidad de interactuar sobre un conjunto de receptores de una misma familia (estructuras privilegiadas). En el caso concreto de los receptores acoplados a proteína G, la familia de los alcaloides *ergot* (también llamados *ergots*) presenta un potencial interés debido a la diversidad de la actividad farmacológica de sus miembros. Los alcaloides *ergots*, aislados de hongos del género *Claviceps*, constituyen una gran familia de compuestos caracterizados por la existencia del sistema tetracíclico de ergoleno, correspondiente a la estructura de indolo[4,3-fg]quinolina parcialmente hidrogenada (Figura 10).

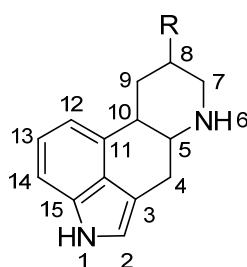


Figura 10. Estructura general de los derivados de ergoleno

En los *ergots* de origen natural, el C₈ es el principal punto de diversidad, el nitrógeno de la posición 6 se encuentra generalmente metilado y la mayoría de ellos presentan un doble enlace situado entre los C₉ y C₁₀. Considerando la naturaleza de los sustituyentes del C₈, los *ergots* de origen natural se pueden clasificar en cuatro grupos (Figura 11):

- Alcaloides clavinos, donde R corresponde a un grupo metil o hidroximetil.
- Derivados del ácido lisérgico, donde R contiene un ácido carboxílico.
- Amidas del ácido lisérgico, que contienen sustituyentes de pequeño tamaño y de naturaleza no peptídica.
- Ergopeptinas o alcaloides peptídicos, derivados de la unión mediante un enlace amida entre una molécula de ácido D-lisérgico y entidades cíclicas formadas por tres aminoácidos de secuencia conservada conocidas como peptinas.

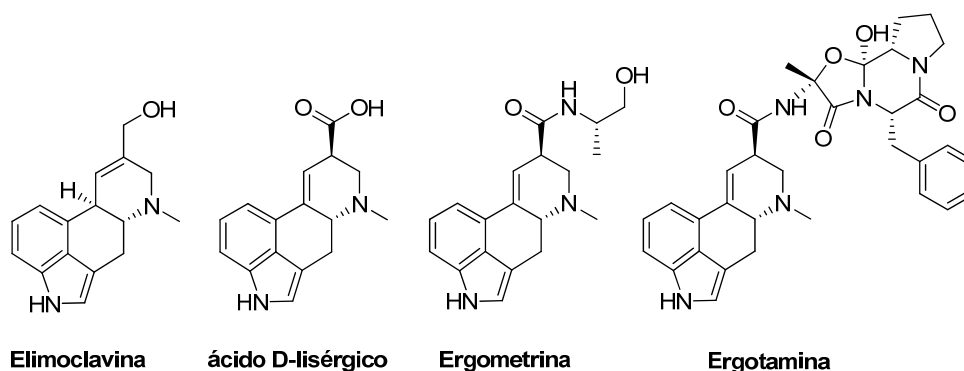


Figura 11. Estructuras representativas de los cuatro grupos de *ergots* de origen natural

3.2. Ergopeptinas y ergopéptidos

Teniendo en cuenta la amplia variedad de productos naturales que contienen el sistema de ergoleno en su estructura, los *ergots* con carácter peptídico conocidos como ergopeptinas, se caracterizan por tener un amplio espectro de actividades biológicas debido a la capacidad que tienen de interactuar con numerosos receptores. Desde el punto de vista estructural, las ergopeptinas contienen una molécula de ácido D-lisérgico unida mediante un enlace amida a una estructura tricíclica de tipo ciclol de naturaleza peptídica, llamada peptina (Figura 12, A).

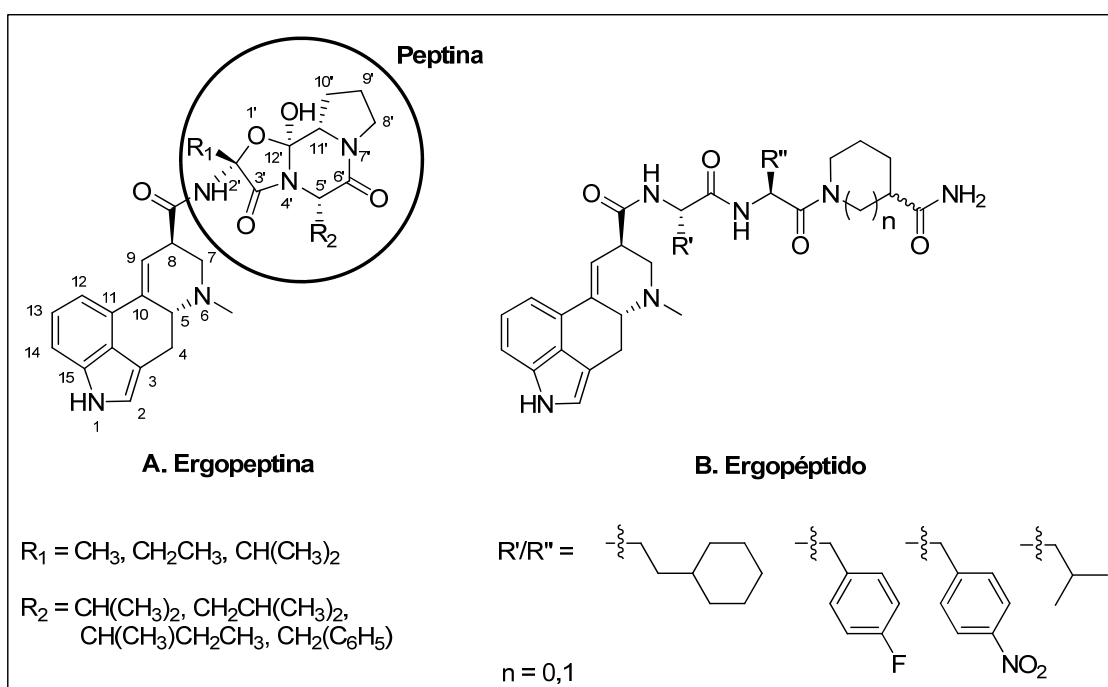


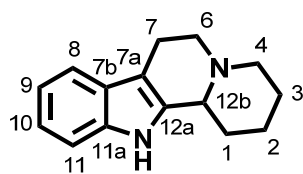
Figura 12. Estructura general de las ergopeptinas naturales (A) y ergopeptidos diseñados y sintetizados por nuestro grupo de investigación (B)

Hasta el momento, únicamente se han aislado siete ergopeptinas de origen natural. El motivo de la escasa diversidad se encuentra en la conservación de la secuencia peptídica de los diferentes derivados, los cuales contienen una L-prolina en el aminoácido del extremo carboxilo, y dos aminoácidos hidrofóbicos en las otras posiciones. Considerando la posibilidad que ofrecen los *ergots* de interactuar con distintos GPCRs y, teniendo en cuenta que estudios sobre la biosíntesis de estos compuestos han revelado la presencia de intermedios en los que la parte peptídica de las ergopeptinas es parcial o completamente lineal, en nuestro grupo de investigación el Dr. Marc Vendrell y colaboradores⁴⁰ diseñaron librerías de ergopéptidos como ligandos bivalentes en la búsqueda de agentes terapéuticos contra el síndrome de Parkinson (Figura 12, B). Estos derivados son de mayor simplicidad sintética que las ergopeptinas, por lo que permiten realizar una evaluación más rápida del tipo de modificaciones que proporcionaban la selectividad deseada. Se observó que la incorporación de tripéptidos lineales en la estructura privilegiada de ergoleno mejoraba la afinidad del heterociclo por los receptores de adenosina y dopamina. Los resultados biológicos mostraron que la afinidad y selectividad de los ergopéptidos en estos receptores dependían de la secuencia del tripéptido. No obstante, los tripéptidos por sí solos no interactuaban en el centro de unión de los receptores. Estos hechos podrían sugerir que el modo de unión de los ergopéptidos supondría la interacción del esqueleto de ergoleno en el sitio de unión del receptor mientras que la parte peptídica interactuaría con los residuos de aminoácidos cercanos. De esta manera, una mejor interacción de los tripéptidos permitiría una mejor acomodación del heterociclo en el sitio de unión del receptor.

3.3. Indoloquinolicidinas como estructuras privilegiadas

Respecto a los estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación por el Dr. Marc Vendrell, se observó que los derivados de ergopéptidos presentaban baja solubilidad y poca afinidad en receptores de adenosina, por lo que se creyó conveniente la sustitución del ácido D-lisérgico por otras estructuras privilegiadas. Así, se planteó la síntesis de indolo[2,3-*a*]quinolicidinas convenientemente funcionalizadas para preparar quimiotecas de híbridos indoloquinolicidina-péptido como posibles ligandos bivalentes de receptores de dopamina y adenosina (Figura 13).^{41, 42, 43} Los

nuevos análogos sintetizados presentaron mejores propiedades como ligandos bivalentes que los correspondientes análogos con ácido D-lisérgico.⁴⁰



indolo[2,3-a]quinolidina

Figura 13. Estructura general de las indolo[2,3-a]quinolidinas

3.3.1. Aspectos estructurales

Al igual que la estructura de ergoleno, las indolo[2,3-a]quinolidinas se caracterizan por contener cuatro ciclos que incluyen un sistema indólico. Ambos esqueletos poseen otras características comunes como la presencia de una amina terciaria, que puede actuar como aceptor de puentes de hidrógeno. La similitud entre ambas estructuras plantea la posibilidad de que los derivados peptídicos correspondientes presenten un comportamiento biológico similar.

En la Figura 14 se muestran las estructuras del esqueleto de ergoleno y de indoloquinolidina por separado junto con una superposición de las mismas. En la imagen superpuesta se indican los puntos de incorporación de los péptidos en el ergoleno natural y en la indoloquinolidina sintética y se observa que la posición relativa de los péptidos respecto al anillo de indol es diferente para cada una de las estructuras, por lo que las interacciones derivadas para un mismo derivado peptídico pueden ser distintas en función del esqueleto al que se encuentren unidos.

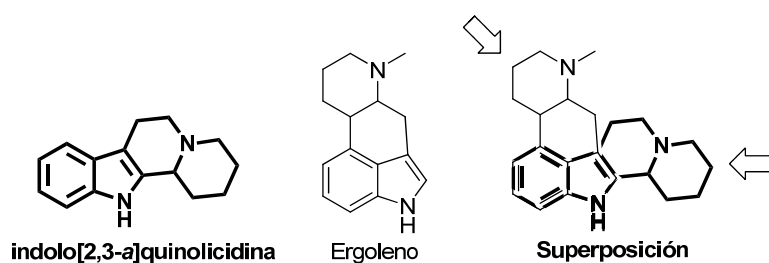


Figura 14. Estructuras generales de los esqueletos de indolo[2,3-a]quinolidina y de ergoleno. A la derecha se presenta la superposición de ambas y las flechas indican los respectivos puntos de derivatización.

3.3.2. Indoloquinolicidinas como fuente de diversidad. Ejemplos de indolo[2,3-*a*]quinolicidinas con actividad biológica

La estructura de indolo[2,3-*a*]quinolicidina se encuentra en numerosos sistemas alcaloides de origen natural que presentan un rango amplio de actividades biológicas. Algunos ejemplos de este tipo de alcaloides policíclicos son la eburnamina,⁴⁴ corinanteidina,⁴⁵ yohimbina⁴⁶ y reserpina,⁴⁷ que median en una gran variedad de efectos fisiológicos y se utilizan desde el punto de vista farmacéutico como agentes antiparásitos, antihipertensivos, antivirales y analgésicos (Figura 15).

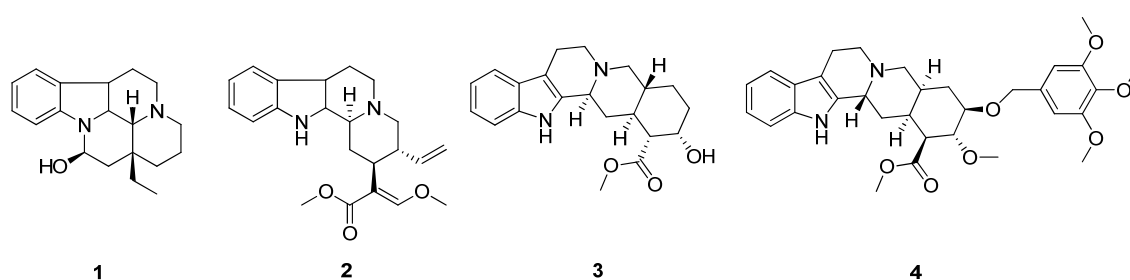


Figura 15. Alcaloides naturales derivados de indolo[2,3-*a*]quinolicidinas: eburnamina **1**, corinanteidina **2**, yohimbina **3** y reserpina **4**

Hay pocas referencias bibliográficas respecto a la interacción de indolo[2,3-*a*]quinolicidinas con GPCRs. Uno de los primeros ejemplos descritos en la literatura es el de Lounasmaa y colaboradores, los cuales estudiaron la capacidad de interacción de indolo[2,3-*a*]quinolicidinas en receptores de serotonina.⁴⁸ Por otra parte, existen trabajos recientes que describen la obtención de ligandos en receptores de dopamina y/o serotonina utilizando estructuras similares como las β -carbolinas⁴⁹ o las indoloacecinas.⁵⁰

3.4. (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol como estructura privilegiada

El esqueleto de indano está presente en la estructura de un amplio rango de productos naturales biológicamente activos (Figura 16). En concreto, los aminoindanoles son particularmente importantes dentro de la familia de productos que contienen dicho esqueleto. Estas estructuras se encuentran en numerosos compuestos activos presentes en fármacos como inhibidores de la proteasa del VIH (Indinavir),⁵¹ derivados con actividad antiparkinsoniana (Rasagilina),⁵² o inhibidores de la acetilcolinesterasa prescrito para el tratamiento del Alzheimer (Donepezil).⁵³

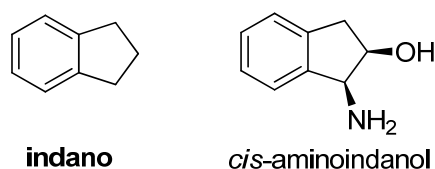


Figura 16. Estructura química del indano y del *cis*-aminoindanol

A nivel estructural, el *cis*-1-amino-2-indanol⁵⁴ también se ha utilizado como un análogo de conformación restringida del fenilglicinol para incrementar la selectividad en la interacción con potenciales dianas biológicas como consecuencia de estas restricciones estructurales.

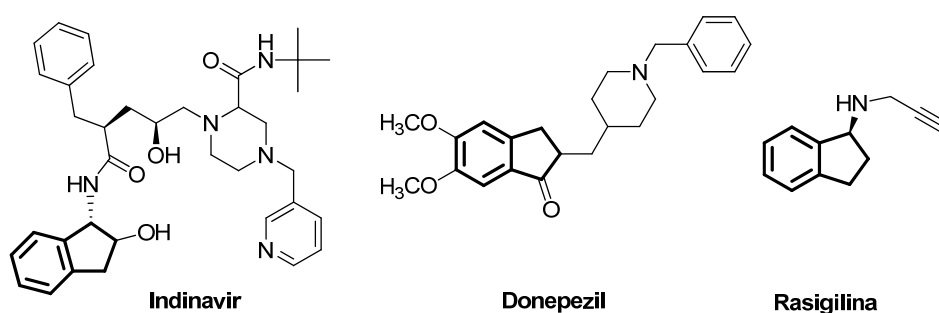


Figura 17. Estructura de los compuestos Indinavir, Donepezil y Rasigilina

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la derivatización del esqueleto de indolo[2,3-*a*]quinolidina y (1*S*, 2*R*)-1-amino-indanol puede considerarse un buen punto de partida para la síntesis de ligandos bivalentes de GPCRs.

4. PEPTINAS

4.1.1. Características estructurales

Las peptinas son derivados cíclicos de tripéptidos que, junto con el anillo de ergoleno, están presentes en muchos productos naturales^{55, 56} y contribuyen a la afinidad de las ergopeptinas hacia diversos receptores de neurotransmisores, modulando sus propiedades farmacocinéticas.⁵⁷

La peptina presenta una estructura compleja formada por cuatro centros quirales (Figura 18). Como se ha comentado anteriormente, las ergopeptinas de origen natural se caracterizan por tener una secuencia peptídica conservada, con el aminoácido L-prolina en el extremo carboxilo y dos aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones 1 y 2. En el extremo amino se han encontrado L-aminoácidos como la alanina, el ácido

aminobutírico (Abu) o la valina, mientras que en la posición intermedia se han encontrado aminoácidos como la fenilalanina, leucina, isoleucina o valina. El grupo hidroxilo libre situado en el C_{12'} y los residuos de α -hidroxi- α -aminoácidos es otra de las características de las ergopeptinas naturales.

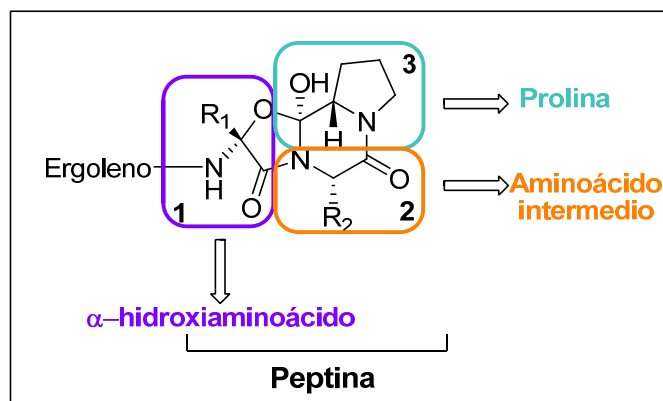


Figura 18. Estructura general de las peptinas. En las ergopeptinas de origen natural la posición 1 contiene Ala, Val o Abu, la posición 2: Phe, Val, Leu o Ile y la posición 3: Pro

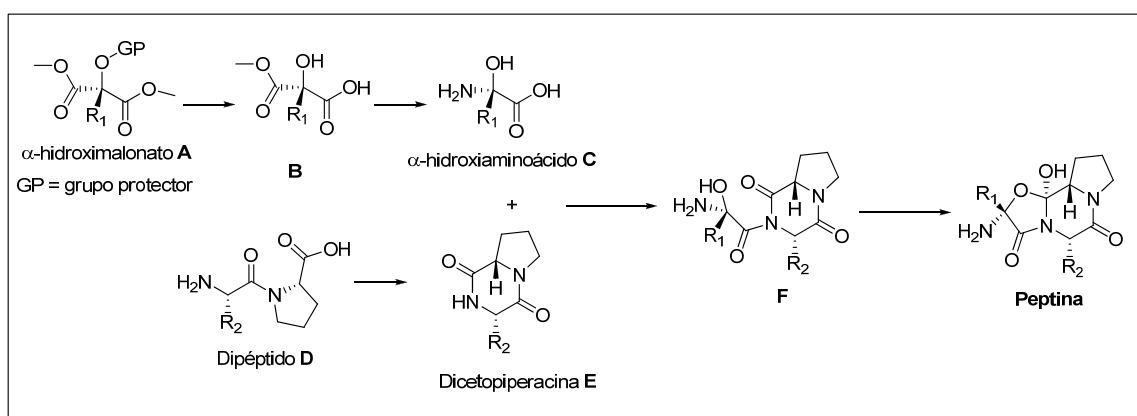
Tal y como se observa en la Figura 18 en el sistema tricíclico está incluido un anillo de dicetopiperacina que, como se ha comentado en el Capítulo 1 (apartado 1.5.1), forman parte del núcleo de muchos productos naturales y presentan un amplio espectro de actividades biológicas. Muchos de ellos inhiben la actividad de diversas enzimas y son capaces de reconocer, modular y controlar la actividad de una gran variedad de receptores; de ahí el amplio abanico de aplicaciones terapéuticas que presentan.^{58, 59} Además, se han utilizado como estructuras privilegiadas para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos. Una de las propiedades más importantes que presentan algunas dicetopiperacinas es su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica,⁶⁰ por lo que la presencia de éstas en el núcleo de peptina hace pensar que la estructura ciclólica pueda constituir una nueva familia de sistemas de liberación de fármacos en el cerebro.

4.1.2. Antecedentes sintéticos

4.1.2.1. Síntesis de peptinas en solución

Hasta la fecha, las metodologías utilizadas para la preparación de peptinas son escasas y, en general, se basan en un protocolo descrito en el año 1969 por A. Hofmann,⁶¹ publicado por el grupo de investigación de la empresa farmacéutica Sandoz. El sistema

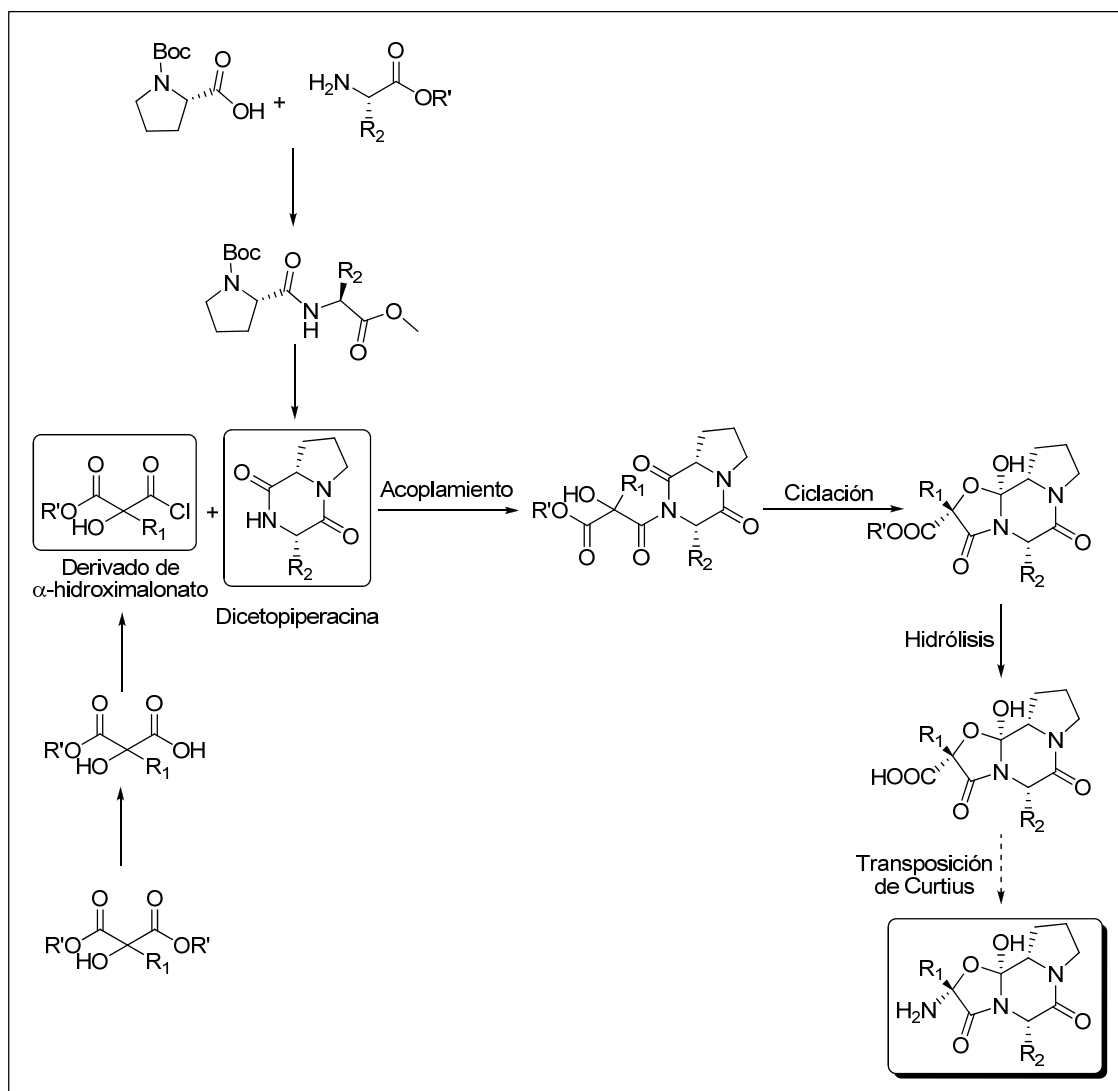
tricíclico de la peptina se obtiene a partir de una dicetopiperacina **E** y un α -hidroxiaminoácido **C**, tal y como se indica en el Esquema 1. En primer lugar se forma el enlace amida entre ambos compuestos y, seguidamente, se produce la ciclación del compuesto **F** para formar el tercer ciclo del sistema ciclol. La dicetopiperacina **E** se obtiene a partir de los aminoácidos de las posiciones **2** y **3** de la cadena tripeptídica (dipéptido **D**), mientras que el α -hidroxiaminoácido (**C**) de la posición 1 proviene del α -hidroximalonato **A**.



Esquema 1. Síntesis del esqueleto de peptina siguiendo la metodología desarrollada por A. Hofmann

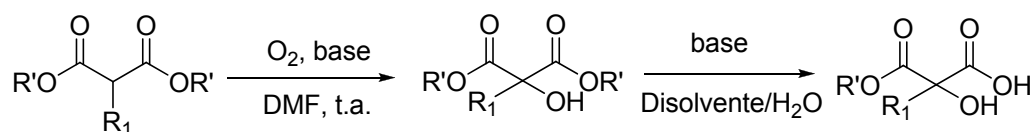
Los α -hidroxiaminoácidos son aminoácidos no naturales cuya síntesis resulta complicada. No obstante, un precursor de este tipo de aminoácidos puede ser el α -hidroximalonato monohidrolizado **B**, si se piensa en una posterior transposición de Curtius para generar el α -hidroxiaminoácido deseado.

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos en la literatura, en nuestro grupo de investigación, la Dra. Anabel Molero estudió la síntesis del sistema tricíclico de peptina con objeto de desarrollar un método eficiente para la síntesis de peptinas que permitiera introducir diversidad estructural y poder estudiar el espectro de actividades biológicas de estos compuestos en GPCRs.⁶² En primer lugar, se llevó a cabo un estudio en solución desarrollando una metodología inspirada en la inicialmente propuesta por Sandoz.⁶¹ Esta estrategia permitía introducir modificaciones a través del anillo de dicetopiperacina y del alquilmalonato, pudiendo dar lugar a derivados con elevada diversidad estructural (Esquema 2).



Esquema 2. Síntesis en solución de peptinas inspirada en la metodología de Sandoz

En todos los estudios sintéticos realizados, la presencia del α -hidroxiaminoácido en el esqueleto de peptina es un punto clave, dado que este tipo de aminoácidos no naturales no están disponibles comercialmente. Por ello, es necesario disponer de una síntesis robusta y eficaz para estos compuestos. En este sentido, la Dra. Anabel Molero desarrolló una estrategia que permite obtener el α -hidroxialquilmalonato monohidrolizado (precursor del α -hidroxiaminoácido) en dos etapas sintéticas fácilmente escalables con elevados rendimientos (Esquema 3).



Esquema 3. Síntesis de α -hidroxialquilmalonatos monohidrolizados

En el estudio de la síntesis de α -hidroxialquilmalonatos, para la primera reacción se utilizaron diferentes bases, obteniéndose los mejores resultados con sales de cesio. La utilización de CsF daba lugar a rendimientos más elevados pero la reacción era más lenta, a diferencia del Cs_2CO_3 , que a pesar de dar lugar a reacciones más rápidas, los rendimientos eran más bajos, observándose incluso la formación del producto hidrolizado. Por otro lado, se comprobó que a medida que aumentaba el volumen del sustituyente R_1 se requerían tiempos de reacción más largos, necesiándose varios días para el caso de los grupos bencilo o isopropilo en esta posición.

Respecto a la hidrólisis de α -hidroxialquilmalonatos para obtener el correspondiente producto monohidrolizado, los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó THF como disolvente y bases como el KOH o el LiOH, siendo los rendimientos de moderados a altos (49-67 %) dependiendo del tipo de sustituyente R_1 .

La hidrólisis del α -hidroximalonato en estas condiciones proporciona una mezcla racémica. Con objeto de disponer del producto ópticamente puro se optó, tras varios estudios al respecto, por la utilización de la enzima HLAP (*horse liver acetone powder*), descrita para hidrolizar diésteres con elevados rendimientos y estereoselectividad.⁶³ Esta enzima proporciona el estereoisómero de configuración *R*, es decir, con la misma estereoquímica de las peptinas de origen natural. El análisis por RMN de los ensayos realizados utilizando (-)-efedrina permitió comprobar este hecho.

La obtención de las dicetopiperacinas derivadas de prolina se llevó a cabo fácilmente en sólo tres etapas y con elevados rendimientos. La formación del dipéptido inicial tuvo lugar con rendimientos cuantitativos y, a continuación, la eliminación del grupo Boc en condiciones ácidas y posterior neutralización dio lugar a la ciclación espontánea del dipéptido para dar la dicetopiperacina final con buenos rendimientos.

Con objeto de llevar a cabo la acilación de la dicetopiperacina con el α -hidroxialquilmalonato monohidrolizado, éste se activó previamente como cloruro de ácido, utilizando cloruro de oxalilo. Los ensayos de acilación que se realizaron con diferentes bases concluyeron que se requería una base fuerte (con un pka superior a 30) y condiciones anhidras muy estrictas para llevar a cabo este proceso. El uso de NaH como base, dio lugar a rendimientos moderados, sin embargo, la reacción no fue

reproducibles. Finalmente, tras probar diferentes tipos de bases, la utilización de la base no nucleófila *tert*-butilimino-tri(pirrolidino)fosforano (BTPP), permitió llevar a cabo la reacción con rendimientos moderados pero con resultados reproducibles.

La identidad del sistema tricíclico sintetizado quedó demostrada por ^{13}C -RMN monodimensional al mostrar el espectro las 3 señales correspondientes a los grupos carbonilo de la molécula (4 grupos carbonilo en el precursor lineal) y una señal entre 100-110 ppm correspondiente al carbono cuaternario generado en la formación del ciclol. El hecho de detectarse un único juego de señales para los grupos carbonilo y una única señal para el carbono cuaternario, ponía de manifiesto que el proceso era estereoespecífico, pudiéndose determinar la configuración relativa del nuevo estereocentro mediante experimentos NOESY, al detectarse, por ejemplo, interacciones entre el grupo metilo del éster y el grupo hidroxilo, o entre el grupo fenilo de la fenilalanina con el hidroxilo. Estos resultados confirmaban que el ataque se había producido por la cara *Si* del grupo carbonilo de la dicetopiperacina, generando un nuevo estereocentro de configuración *S*, la misma que se encuentra en todas las peptinas naturales.⁶⁴ La Figura 19 muestra la estructura propuesta para la peptina sintetizada, donde la configuración del ciclol es *cis* si se tiene en cuenta la distribución espacial de los grupos hidroxilo y del éster metílico.

Cuando se partió de una mezcla racémica del α -hidroximalonato monohidrolizado, se obtuvo una mezcla peptinas con cicloles *cis* y *trans* (Figura 19) que pudieron separarse por métodos cromatográficos, gracias a la diferencia de polaridad de las dos moléculas atribuible a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre los grupos hidroxilo y éster en el ciclol *cis*. Por las razones que se comentarán más adelante, en el presente trabajo se ha utilizado la mezcla racémica de α -hidroximalonatos monohidrolizados para la preparación de peptinas en fase sólida.

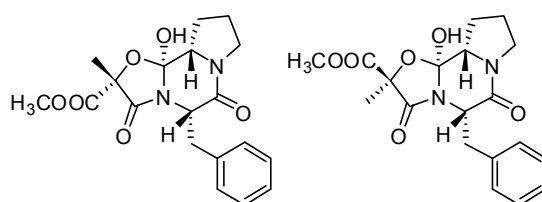


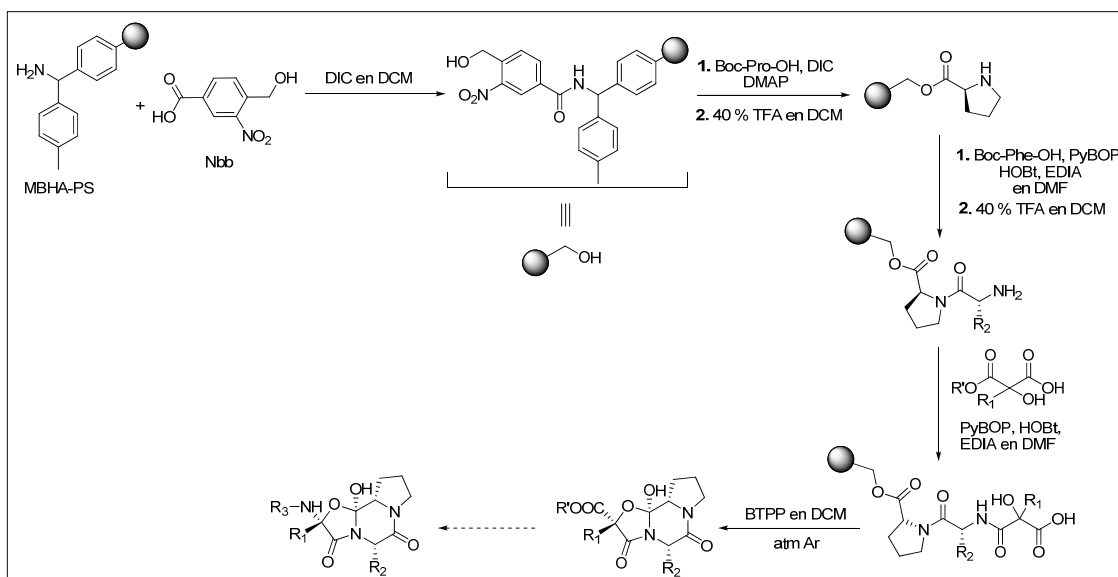
Figura 19. Estructuras de la peptina sintetizada *cis* y del diastereoisómero *trans*

Una vez obtenida la peptina, el éster se saponificó en medio básico de NaOH (2N) para dar el correspondiente ácido carboxílico. Desafortunadamente, los ensayos realizados para transformar el grupo ácido en una amina a través de una de transposición de Curtius fueron infructuosos, al obtenerse en todos los casos productos de descomposición.

4.1.2.2. Síntesis de peptinas en fase sólida

La síntesis de peptinas en solución conllevó un elevado número de etapas sintéticas y rendimientos de reacción muy bajos, lo cual dificultaba enormemente la obtención de librerías de peptinas. Por ello, se optó por diseñar una nueva estrategia para obtener estos compuestos en fase sólida como método alternativo.

Hasta la fecha, no se había descrito ninguna estrategia en fase sólida para sintetizar este tipo de compuestos. La Dra. Anabel Molero,⁶² durante su Tesis Doctoral desarrolló una metodología basada en la utilización del espaciador ácido 4-hidroxietil-3-nitrobenceno (Nbb) ya que, en condiciones básicas, favorece la formación de dicetopiperacinas con la liberación simultánea de la molécula sintetizada del soporte polimérico (Esquema 4).



Esquema 4. Síntesis de peptinas en fase sólida utilizando la metodología desarrollada previamente en nuestro laboratorio

La metodología descrita puede resultar interesante desde el punto de vista de la química combinatoria, ya que permite introducir modificaciones en tres puntos de la peptina, es decir, en R₁ y R₂ y en la prolina.

El análisis por HPLC-MS de los crudos de reacción obtenidos a partir de esta metodología sintética puso de manifiesto la obtención de las peptinas deseadas, además del correspondiente derivado hidrolizado (lineal) en una proporción aproximada 1: 1. Un estudio exhaustivo de la formación del ciclol permitió concluir que las condiciones experimentales tenían que ser estrictamente anhidras y que los tiempos de reacción debían de reducirse al máximo para evitar un contacto prolongado de la base con el ciclol, de cara a minimizar así el producto de hidrólisis. Con las mejores condiciones, que implicaban el secado de la peptidil-resina en una estufa de vacío, la destilación exhaustiva de disolventes, 20 min de tratamiento en medio básico, se sintetizaron derivados con modificaciones en la posición R₂ y utilizando diferentes derivados de prolina, sin llegar a evitar en ningún caso la formación de los correspondientes productos hidrolizados en altas proporciones. Los rendimientos de reacción fueron del 2-5 % y, además, los resultados no fueron reproducibles.

En vista a los resultados obtenidos con anterioridad en nuestro grupo de investigación, era evidente la necesidad de desarrollar una nueva metodología en fase sólida que permitiera acceder al esqueleto tricíclico de las peptinas, de forma reproducible y con mejores rendimientos a los obtenidos hasta el momento.

Con objeto de extender el abanico de aplicaciones sintéticas de la estrategia basada en la función triaceno como punto de unión de la cadena lateral de la fenilalanina a la matriz polimérica, se consideró que la estructura ciclólica de la peptina constituía un ejemplo relevante para confirmar el potencial que la metodología ya había puesto de manifiesto en estudios precedentes realizados en el marco de la presente Tesis (Capítulo 1). En este sentido, se quiso aprovechar el hecho de que uno de los aminoácidos que se suele encontrar en la posición 2 del esqueleto de algunas peptinas de origen natural es la fenilalanina para diseñar una nueva estrategia sintética como vía de acceso a análogos de peptinas. Estos argumentos se consideraban

suficientemente razonables como para plantear la construcción del precursor tricíclico de la peptina a partir de la unión de la fenilalanina al polímero a través de la cadena lateral y, además, aprovechar la opción de creación de diversidad que aporta la metodología para intentar introducir distintas funcionalizaciones en el anillo aromático de la fenilalanina.

OBJETIVOS

Con objeto de desarrollar y validar la síntesis de peptinas en fase sólida mediante la metodología desarrollada para la fenilalanina, se plantearon los siguientes objetivos:

- Sintetizar en fase sólida los precursores lineales de peptina, modificando el derivado de fenilalanina correspondiente con un derivado de α -hidroximalonato en el extremo amino y con un derivado de prolina en el extremo carboxilo.
- Estudiar en fase sólida la reacción de ciclación de los derivados lineales para obtener el sistema tricíclico de peptina.
- Sintetizar en fase sólida híbridos de análogos de peptina y estructuras privilegiadas como la indoloquinolicidina y el (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol.
- Llevar a cabo estudios biológicos con receptores GPCRs (adenosina, dopamina y serotonina) de los compuestos obtenidos.

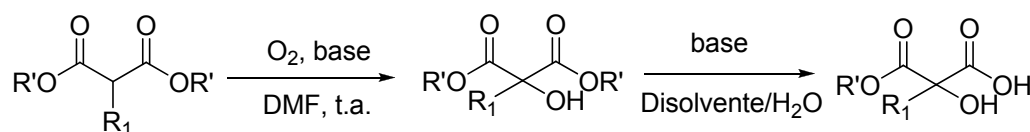
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. QUIMIOTECA DE ANÁLOGOS DE PEPTINAS

1.1. Precursores sintéticos de peptinas: Síntesis del α -hidroxialquilmalonato monohidrolizado

1.1.1. Introducción

Como paso previo a la síntesis del esqueleto de peptina, se procedió a preparar el α -hidroxialquilmalonato monohidrolizado siguiendo la estrategia sintética desarrollada por la Dra. Anabel Molero durante su Tesis Doctoral.⁶² Este protocolo conlleva la oxidación del malonato comercial en presencia de atmósfera de O₂ y una base, seguida de la monohidrólisis del α -hidroxialquilmalonato resultante (Esquema 5).

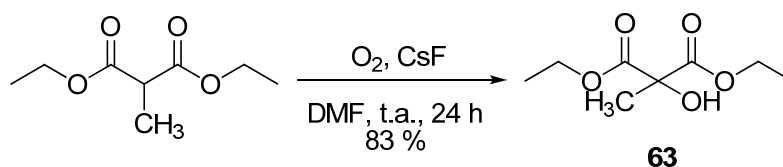


Esquema 5. Formación del α -hidroxialquilmalonato monohidrolizado

La quimioteca de peptinas objeto de estudio en este trabajo se diseñó a partir del derivado α -hidroxi- α -metilmalonato, donde R₁ es metilo. Para este derivado, los mejores resultados obtenidos en nuestro laboratorio hasta el momento, implicaban la utilización de CsF como base durante el proceso de oxidación y KOH como base en THF/H₂O (1:10, V/V) para la hidrólisis parcial.

1.1.2. Preparación de 2-hidroxi-2-metilmalonato de dietilo (**63**)

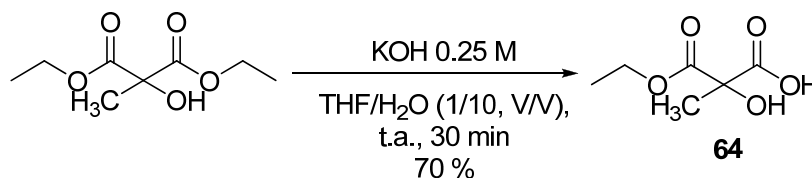
La síntesis del 2-hidroxi-2-metilmalonato de dietilo **63** se realizó a partir del derivado comercial 2-metilmalonato de dietilo, según se indica en el Esquema 6. Este producto se hizo reaccionar con CsF en atmósfera de oxígeno y la posterior purificación cromatográfica del crudo de reacción resultante en gel de sílice permitió obtener el producto deseado con elevados rendimientos (83 %).



Esquema 6. Síntesis del 2-hidroxi-2-metilmalonato **63**

1.1.3. Preparación del ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico (**64**)

La hidrólisis parcial del α -hidroxi- α -malonato **63** se llevó a cabo utilizando una disolución acuosa de KOH 0.25 M en una mezcla THF/H₂O (1:10, V/V) (Esquema 7). La purificación cromatográfica del crudo de reacción obtenido en gel de sílice permitió obtener el 2-hidroxi-2-metilmalonato monohidrolizado **64** con elevados rendimientos (70 %).



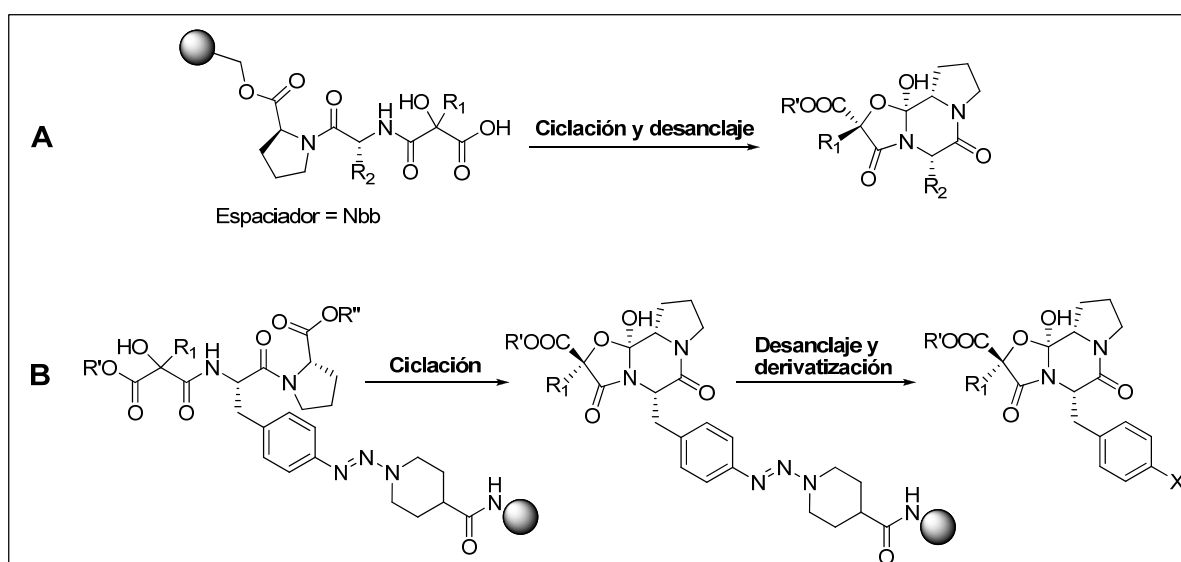
Esquema 7. Monohidrólisis del α -hidroxi- α -malonato **63**

La reacción de hidrólisis da lugar a un nuevo centro estereogénico y, por tanto, el producto **64** se obtiene como mezcla racémica. Como se ha comentado en la introducción del capítulo, anteriormente se había utilizado la hidrólisis enzimática para obtener un único estereoisómero, obteniéndose los mejores resultados con la enzima hidrolítica HLAP (*horse liver acetone powder*). Desafortunadamente, esta enzima dejó de comercializarse y, tras llevar a cabo algunas pruebas preliminares utilizando otras enzimas, como la enzima hidrolítica PLE (*Pig liver esterase*), se abandonó esta vía al obtenerse resultados no deseados en todos los casos. Se optó entonces por preparar la librería de análogos de peptina y derivados a partir de la mezcla racémica obtenida **64** y proceder, tras la síntesis, a separar los diastereoisómeros obtenidos por purificación cromatográfica.

1.2. Síntesis en fase sólida de análogos de peptinas

1.2.1. Introducción

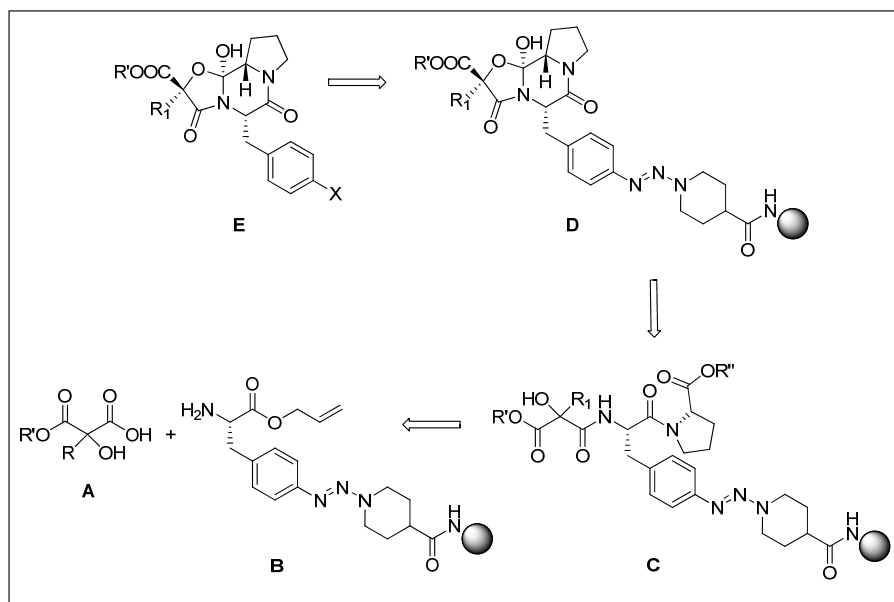
Considerando los inconvenientes descritos, encontrados en la síntesis en fase sólida de análogos de peptinas utilizando uniones al polímero lábiles al medio básico, una de las alternativas que se consideró más prometedoras para solucionar el problema fue la utilización de la metodología basada en la unión vía triaceno de la cadena peptídica al soporte polimérico, lábil al medio ácido. La ventaja principal que ofrece esta aproximación es el hecho de llevar a cabo la reacción de ciclación (que implica la utilización de condiciones básicas) y desanclaje de la peptina del soporte polimérico (que conlleva la utilización de condiciones ácidas) en dos etapas distintas, dado que las condiciones de reacción para llevar a cabo estos procesos son ortogonales (Esquema 8, B), a diferencia de la metodología desarrollada anteriormente en nuestro laboratorio (Esquema 8, A). Este hecho permite, por un lado, controlar y poder realizar un seguimiento de ambas reacciones y, por otro, disminuir el tiempo de exposición de la peptina al medio básico fuerte, reduciendo de esta manera la posibilidad de reacciones secundarias como la hidrólisis.



Esquema 8. (A) Aproximación a la síntesis de análogos de peptinas a través de la metodología desarrollada por la Dra. Molero y mediante la metodología que implica la unión de la cadena peptídica a la resina a través de un enlace triaceno (B)

El Esquema 9 muestra el camino retrosintético que se planteó para preparar los análogos de peptina. Se trata de acoplar el α -hidroximalonato monohidrolizado **A** a la

aminoacil-resina **B** en el extremo amino de la fenilalanina para, posteriormente, introducir la prolina en el extremo carboxilo (**C**), proceder a continuación a la formación del sistema tricíclico (**D**) y finalizar con la liberación del derivado de peptina (**E**) del soporte polimérico.

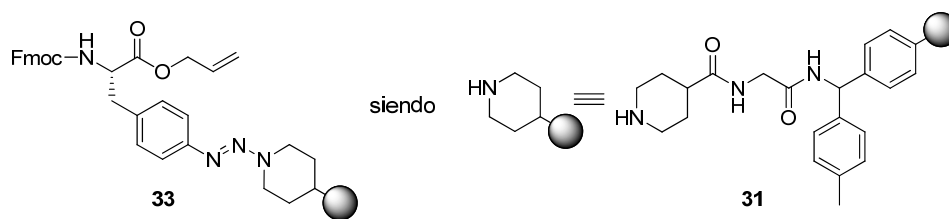


Esquema 9. Análisis retrosintético para la obtención de análogos de peptina

Por otro lado, a pesar de que la metodología basada en la unión triaceno implica únicamente la síntesis de peptinas derivadas de fenilalanina, la versatilidad del método permite, además, obtener funcionalizaciones de distinta naturaleza en el anillo aromático. En este sentido, es importante comprobar la estabilidad del anillo de ciclor (peptina) frente a las condiciones requeridas para llevar a cabo estas derivatizaciones.

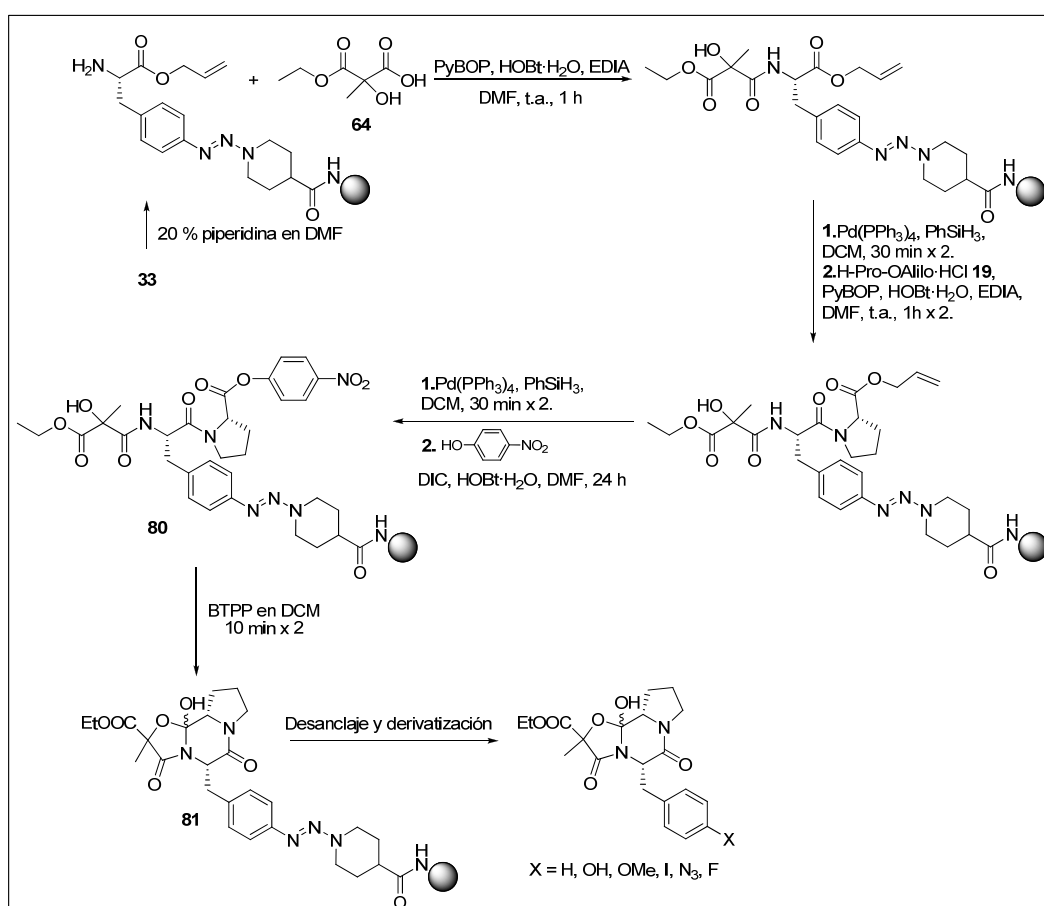
1.2.2. Síntesis en fase sólida de la quimioteca de análogos de peptina

La síntesis de la quimioteca de análogos peptinas se realizó utilizando la aminoacil-resina **33** cuya síntesis se describió en el apartado 2.2.2 (Capítulo 1). En este caso, el rendimiento de incorporación del derivado de fenilalanina Fmoc-(S)-Phe(*p*NH₂)-OAlilo **27** a la resina fue del 72 %, determinado por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc (72 %) (Esquema 10).



Esquema 10. Estructura de la aminoacil-resina **33**

En base al esquema retrosintético planteado (Esquema 9) se propuso llevar a cabo la siguiente ruta sintética (Esquema 11).



Esquema 11. Síntesis en fase sólida de análogos de peptinas utilizando la unión triaceno

En primer lugar, se eliminó el grupo protector Fmoc de la aminoacil-resina **33** en condiciones básicas (piperidina) y se incorporó el ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico **64**, previamente sintetizado, utilizando una sal de fosfonio (PyBOP) como agente de acoplamiento en presencia de HOBT·H₂O como aditivo, EDIA y DMF como disolvente. Seguidamente, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo con Pd(PPh₃)₄ en presencia de PhSiH₃. Finalmente, se utilizó la peptidil-resina resultante para incorporar la prolina a través del extremo carboxilo. La incorporación

de un derivado adecuado de prolina es clave para la formación del anillo de ciclol. En este sentido, es necesario escoger un derivado que favorezca la reacción de ciclación que dará lugar al sistema tricíclico de la peptina. Una de las opciones que se planteó inicialmente fue la utilización del éster de *p*-nitrofenol de la prolina que, en presencia de una base, favorecería la ciclación del sistema al ser el fenóxido un buen grupo saliente. La incorporación sobre la resina del derivado de prolina en forma de éster de *p*-nitrofenol se llevó a cabo en dos etapas. En la primera, se adicionó el derivado H-Pro-OAlilo·HCl **19**, previamente sintetizado (Esquema 39, Capítulo 1), utilizando una sal de fosfonio como agente de acoplamiento (PyBOP) y HOBT·H₂O como aditivo, EDIA y DMF como disolvente. En la segunda etapa, tras eliminar el grupo protector alilo con el complejo Pd(PPh₃)₄ en presencia de PhSiH₃, se formó el éster de *p*-nitrofenol, utilizando un gran exceso de *p*-nitrofenol (20 equiv) y una carbodiimida (DIC) como agente de acoplamiento en presencia de HOBT·H₂O como aditivo y DMF como disolvente. Éste último procedimiento implicó tiempos de reacción largos, llevándose a cabo inicialmente un tratamiento de 3 h y posteriormente otro de 16 h. El seguimiento de la reacción se realizó por HPLC-MS tras el desanclaje de pequeñas alícuotas de resina durante la reacción. La peptidil-resina resultante **80** se utilizó para formar el sistema tricíclico de la peptina.

Los estudios realizados con anterioridad en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto la necesidad de utilizar condiciones estrictamente anhidras durante la reacción de ciclación para formar el sistema ciclol, obteniéndose los mejores resultados utilizando una base orgánica de tipo fosfaceno como la BTPP. Considerando estos precedentes, se optó por llevar a cabo la reacción de ciclación de la peptidil-resina **80** utilizando esta base y adoptando una serie de precauciones para conseguir las mejores condiciones anhidras, teniendo en cuenta las dificultades asociadas al trabajar en fase sólida. En este sentido, la peptidil-resina **80** se secó en una estufa de vacío a 37 °C durante 24 h, se utilizaron disolventes (DMF y DCM) previamente destilados y la reacción se llevó a cabo en un reactor de fase sólida específico para realizar reacciones en condiciones anhidras (Figura 20). Así, la reacción de ciclación se realizó tratando la peptidil-resina **80** con una disolución de BTPP en la mínima cantidad de DCM anhidro y atmósfera de argón. Se realizaron dos tratamientos de 10 min cada uno de ellos. Tras los

tratamientos, se lavó la peptidil-resina resultante **81** en repetidas ocasiones con DMF, DCM anhidros y finalmente con hexano.

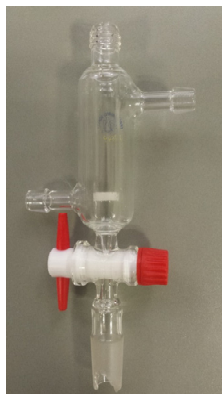
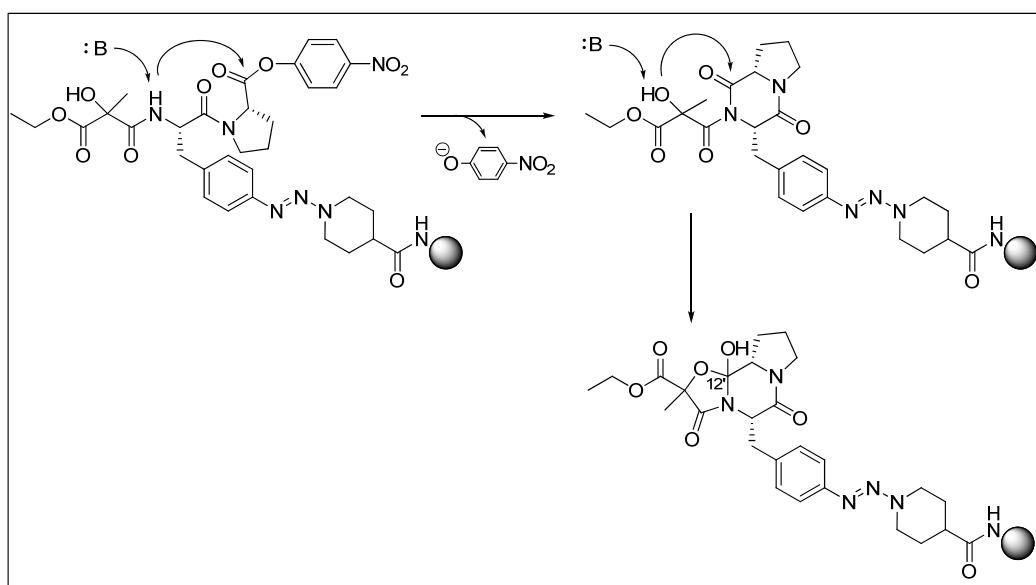


Figura 20. Reactor de fase sólida específico para llevar a cabo reacciones en condiciones anhidras

El Esquema 12 muestra uno de los mecanismos sugeridos para la reacción de ciclación que da lugar al sistema tricíclico de la peptina:

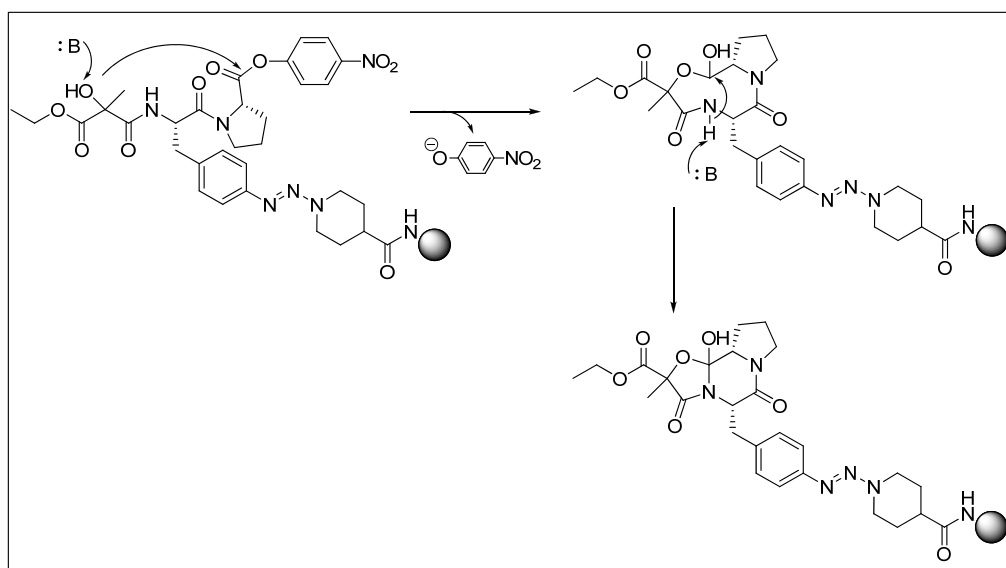


Esquema 12. Mecanismo propuesto para la formación del sistema tricíclico de la peptina en fase sólida

El proceso intramolecular da lugar a la formación de dos nuevos ciclos y de un nuevo estereocentro en el carbono cuaternario al que está unido el grupo hidroxilo ($C_{12'}$, Figura 12). En primer lugar, se generaría la dicetopiperacina, resultante de la ciclación que tiene lugar entre la prolina y la fenilalanina, con liberación simultánea del *p*-nitrofenóxido. A continuación, el grupo hidroxilo atacaría al grupo carbonilo del enlace

amida para formar el segundo ciclo de cinco miembros. Las dos ciclaciones están catalizadas por la base y dan lugar a una mezcla de diastereoisómeros como productos finales a partir de la mezcla racémica del α -hidroxi- α -malonato.

También cabe la posibilidad de que el grupo hidroxilo ataque inicialmente al éster de *p*-nitrofenol dando lugar a una lactona de nueve miembros, que podría recibir posteriormente el ataque nucleófilo del nitrógeno del enlace amida, generando de esta manera los dos ciclos de cinco y seis miembros respectivamente (Esquema 13). *A priori*, este segundo mecanismo parecería menos favorable desde el punto de vista termodinámico, ya que implica la formación de un anillo de nueve miembros; sin embargo, desde el punto de vista estructural podría estar favorecido porque supone la preestructuración del intermedio hacia el sistema tricíclico final.



Esquema

13. Mecanismo alternativo propuesto para la formación del sistema tricíclico de la peptina en fase sólida

Tras la formación del sistema tricíclico se procedió al desanclaje del análogo de peptina de la resina, utilizando diferentes condiciones de reacción en función del derivado de fenilalanina a obtener. En primer lugar, se optó por tratar la peptidil-resina **81** con las condiciones acidolíticas habituales (TFA/DCM (5: 95, V/V, 3 × 2 min)) y la sal de diazonio resultante se redujo con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en DMF para obtener de esta forma la peptina no modificada. El análisis por cromatografía líquida del crudo obtenido (Figura 21) permitió detectar el producto deseado, observándose dos picos a $t_R = 2.37$ min (33 %) y $t_R = 2.52$ min (34 %) correspondientes a los dos posibles diastereoisómeros, y un

tercer pico a $t_R = 2.10$ min (15 %) en el que se identificó la base (BTPP) en exceso que no se había eliminado por completo con los lavados y también el producto hidrolizado.

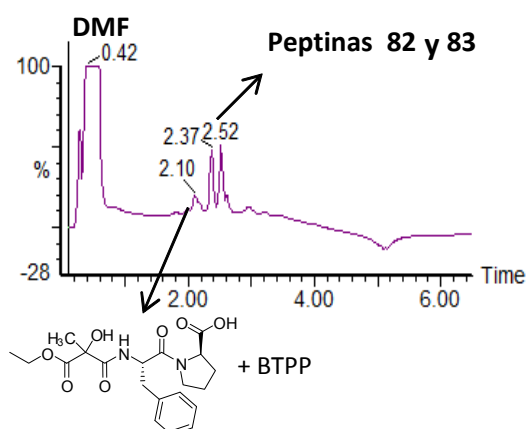


Figura 21. Análisis cromatográfico del crudo de reacción de la formación de las peptinas diastereoméricas **82** y **83**. Condiciones cromatográficas: (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH, flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

Inicialmente, se intentó purificar una alícuota del crudo de reacción directamente por HPLC semipreparativo en fase inversa, sin embargo, no se consiguió eliminar la BTPP en exceso, a pesar de lograr separar los diastereoisómeros **82** y **83**. Por ello, fue necesaria una purificación previa del crudo por cromatografía en gel de sílice y, una vez eliminada la base del crudo de reacción, se procedió a purificar el crudo resultante por HPLC semipreparativo en fase inversa, obteniéndose los productos deseados **82** y **83** con un 11 % y 12 % de rendimiento, y una purezas del 89 % y 99 %, respectivamente, determinadas por integración de las áreas de los picos cromatográficos.

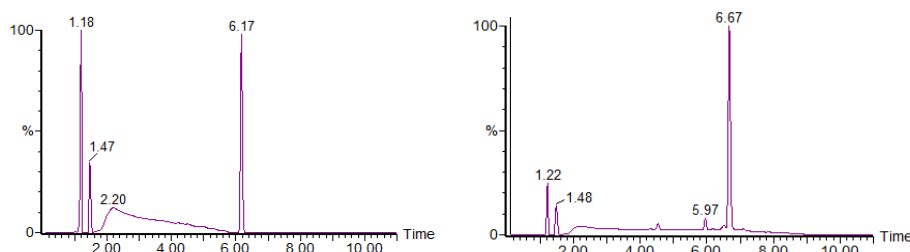


Figura 22. Análisis cromatográfico de las peptinas **82** y **83** tras la purificación cromatográfica. Condiciones cromatográficas: (XBridge BEH C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH, flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm).

Según los estudios de RMN realizados previamente en nuestro laboratorio, los diastereoisómeros obtenidos son los que se muestran en la Figura 23:

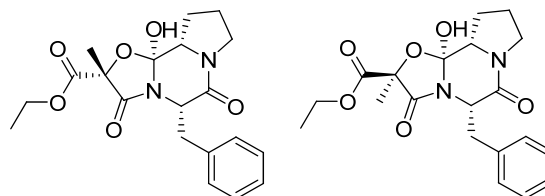
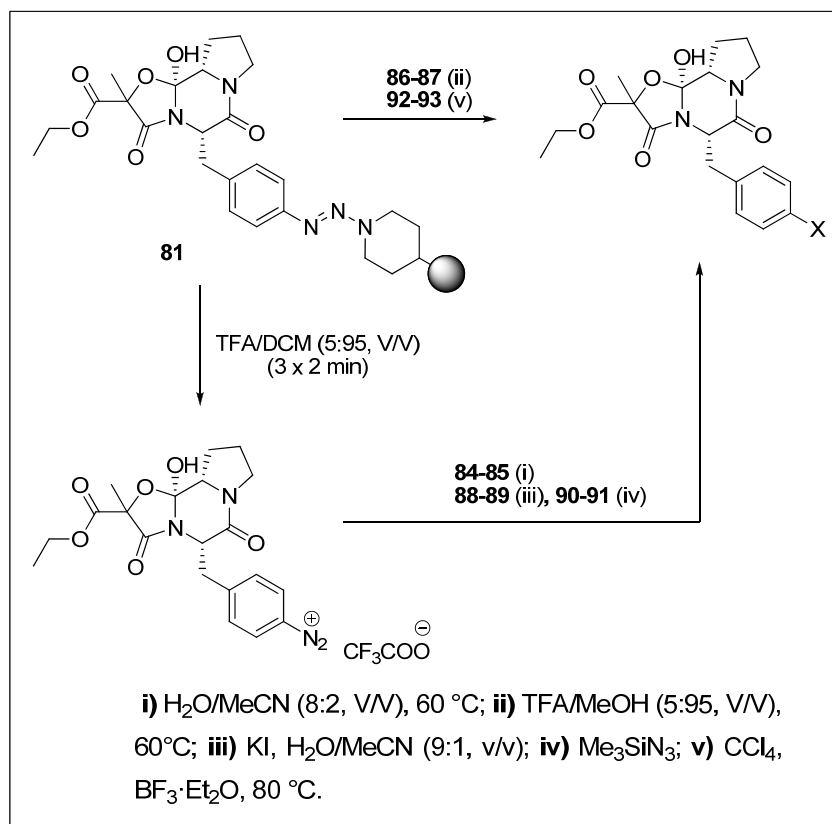


Figura 23. Diastereoisómeros **82** y **83**

La obtención de los análogos de peptina **82** y **83** era un resultado prometedor, ya que abría las puertas a la posibilidad de introducir modificaciones en el anillo aromático de la fenilalanina, a través de la transformación de la sal de diazonio resultante del tratamiento acidolítico, tal como se describe en el Capítulo 1 de la memoria. Así, se procedió a explorar la viabilidad de esta metodología en una estructura más compleja, como es la peptina, utilizando las mismas condiciones de reacción que las empleadas para derivatizar el depsipéptido Zigosporamida (Esquema 14).



Esquema 14. Síntesis de la quimioteca de peptinas. Reacciones de desanclaje y derivatización

En todos los casos, las condiciones experimentales utilizadas para las diversas derivatizaciones fueron compatibles con la estabilidad de la estructura de peptina, ya que el análisis por HPLC-MS de los crudos de reacción mostró dos picos con la misma masa, que se correspondían con los dos diastereoisómeros.

Al igual que se hizo con el ensayo preliminar, en cada caso, se eliminó el exceso de base (BTPP) mediante una purificación del crudo por cromatografía en gel de sílice. A continuación, se llevó a cabo la separación de los diastereoisómeros por cromatografía líquida en fase inversa y los productos obtenidos se analizaron por HPLC-MS.

Con objeto de confirmar la identidad del ciclol, se realizó un análisis exhaustivo por RMN monodimensional (^1H y ^{13}C) y bidimensional (COSY, HSQC y NOESY) de los análogos hidroxilados de peptina **84** y **85**. Así, el espectro monodimensional de ^{13}C mostró, para los dos productos, la presencia de tres señales correspondientes a grupos carbonilo y la señal del nuevo carbono cuaternario que se genera al formarse el ciclol como evidencias de la estructura tricíclica ciclólica. Por otro lado, se detectó por NOESY de **85** una señal de correlación entre el protón α de la prolina y los protones del grupo metilo del malonato que demostraban que este grupo metilo y el grupo hidroxilo tenían una relación opuesta (Figura 24). El hecho de conocerse la estereoquímica del carbono α de la prolina (*S*) y, asumiendo que su protón α y el grupo metilo del malonato están en la misma cara de la molécula, se pudo establecer la configuración absoluta del carbono cuaternario del malonato como *R*. En base a los resultados obtenidos con análogos similares en estudios precedentes en nuestro laboratorio, en los que se confirmó que el carbono cuaternario del ciclol tenía configuración *S*, quedaba demostrado que el grupo metilo del malonato y el grupo hidroxilo tenían una relación opuesta. Por lo tanto, la configuración absoluta de los centros quirales de **84** quedó también establecida (Figura 24).

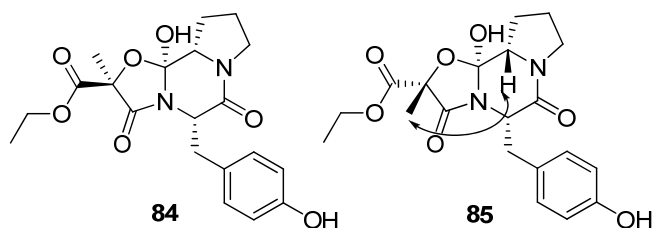
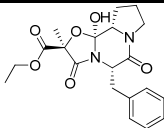
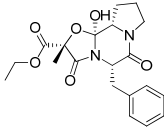
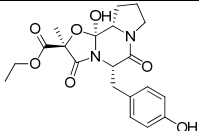
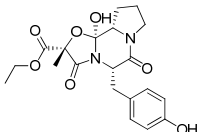
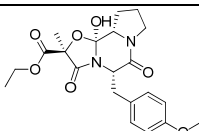
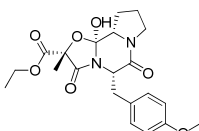
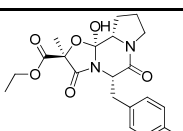


Figura 24. Estructura de los diastereoisómeros **84** y **85**

El análogo **85** tiene un tiempo de retención por cromatografía analítica de fase inversa superior al del análogo **84**, atribuible a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular en el primero entre el grupo hidroxilo unido al carbono cuaternario y el grupo carbonilo del éster. Este puente de hidrógeno, similar al observado en los alcaloides de *ergot*⁶⁴ afectaría a la interacción de la molécula con el eluyente a través de la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares, explicando de esta forma una retención mayor por parte de la fase estacionaria.⁶⁵ Este argumento se podría utilizar para el resto de análogos de peptina sintetizados y asignar a los estereoisómeros *trans* (éster/hidroxilo) como **84** los análogos que poseen los tiempos de retención más cortos, al no ser posible la formación del puente de hidrógeno intramolecular, y a los estereoisómeros *cis* (éster/ hidroxilo) como **85** los de tiempo de retención más elevados (Tabla 2).

Compuesto	t _R (min)*	Estructura	Pureza (%)	Rendimiento (%)
82	6.17		90	11
83	6.67		99	12
84	5.15		>99	20
85	5.42		96	21
86	5.97		>99	14
87	6.17		91	10
88	2.83		86	12

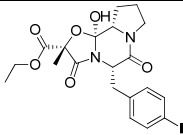
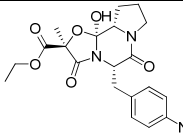
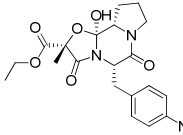
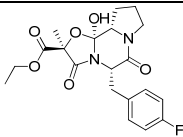
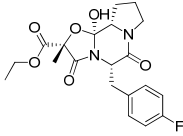
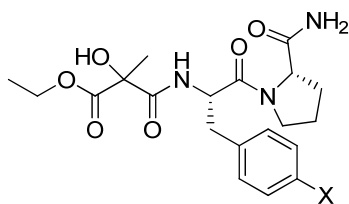
89	2.97		>99	11
90	2.67		97	5
91	2.80		94	11
92	6.42		90	9
93	6.87		98	10

Tabla 2. Rendimientos y purezas de la quimioteca de análogos de peptinas. Purezas determinadas por integración de los picos en el análisis cromatográfico a 220 nm. (*Las condiciones cromatográficas utilizadas se muestran en el apartado 2.3 de la parte experimental)

1.3. Síntesis en fase sólida de precursores lineales de peptinas

Es bien sabido que la estructura ciclólica presente en la peptina tiene una estabilidad limitada, ya que puede dar lugar a la cadena lineal por hidrólisis. En este sentido, estas estructuras de origen peptídico podrían estar presentes en el medio fisiológico como consecuencia de la prematura descomposición de la peptina y, por lo tanto, ejercer también cierta actividad biológica. Por otro lado, desde un punto de vista sintético, la cadena peptídica lineal se puede considerar como un precursor del sistema tricíclico. Estas consideraciones motivaron realizar la síntesis en fase sólida de la cadena lineal que permite acceder al ciclo, explorando la posibilidad de modificar el anillo aromático de la fenilalanina mediante la estrategia de anclaje al polímero a través de la función triaceno. Así, se planteó la síntesis de una pequeña quimioteca basada en las estructuras que se muestran en la Figura 25.

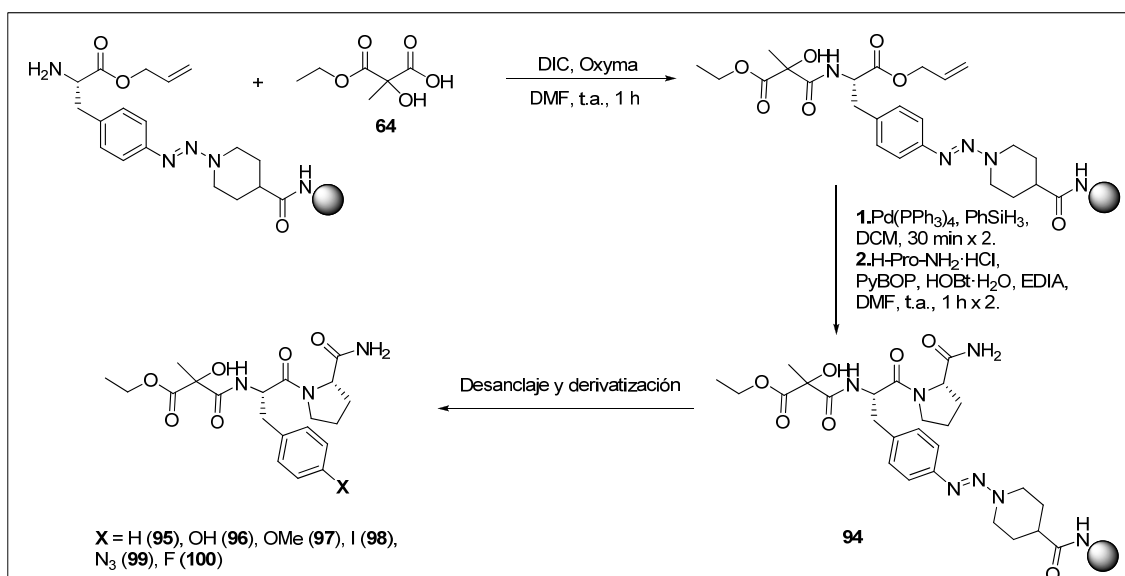


X = H (**95**), OH (**96**), OMe (**97**), I (**98**), N₃ (**99**), F (**100**)

Figura 25. Estructura de los compuestos de la quimioteca de precursores lineales de peptinas

En este caso, se decidió incorporar la prolina en forma de carboxamida para simplificar la síntesis. Las derivatizaciones del anillo de fenilalanina eran las mismas que las que se utilizaron en la quimioteca de análogos de peptina, de manera que se podía establecer una comparativa de resultados desde el punto de vista biológico.

La síntesis de cada uno de los derivados de la quimioteca se realizó utilizando protocolos convencionales de síntesis en fase sólida (Esquema 15). Primeramente, se sintetizó la aminoacil-resina **33** siguiendo el procedimiento habitual, con un rendimiento de incorporación de la fenilalanina del 70 %, determinado por cuantificación de grupos Fmoc. La elongación de la cadena peptídica tuvo lugar a través del extremo amino, tras eliminar el grupo protector Fmoc de la fenilalanina en medio básico, incorporando el ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico racémico **64** haciendo uso de una carbodiimida (DIC) como agente de acoplamiento, en presencia de Oxyma[®] como aditivo y DMF como disolvente. A continuación, tras eliminar el grupo protector alilo de la fenilalanina con el complejo Pd(PPh₃)₄ en presencia de PhSiH₃, se incorporó el derivado de prolina comercial H-Pro-NH₂·HCl en el extremo carboxilo. El acoplamiento del aminoácido H-Pro-NH₂·HCl se realizó utilizando la sal de fosfonio PyBOP como agente de acoplamiento, en presencia de HOBT·H₂O como aditivo, EDIA y DMF como disolvente. La peptidil-resina resultante **94** se utilizó para obtener los diferentes compuestos de la quimioteca, siguiendo los procedimientos anteriormente descritos.


Esquema 15. Síntesis de los precursores lineales de peptina

En la Tabla 3 se exponen los rendimientos globales y la pureza cromatográfica de cada uno de los derivados obtenidos. La pureza de los diferentes crudos se determinó por HPLC-MS mientras que el rendimiento de global se determinó tras la purificación por HPLC semipreparativo en fase inversa.

Compuesto	t _R (min)*	Estructura	Pureza (%)	Rendimiento (%)
95	1.83		94	69
96	1.47		>99	52
97	1.85		>99	51
98	2.28		92	41
99	2.10		92	70
100	1.98		94	67

Tabla 3. Rendimientos y purezas de la quimioteca de precursores lineales de peptinas. Purezas determinadas por integración de los picos en el análisis cromatográfico a 220 nm. (*Las condiciones cromatográficas utilizadas se muestran en el apartado 3.3 de la parte experimental)

A continuación, se muestran, a modo de ejemplo, los crudos de reacción de los derivados **97** y **99**:

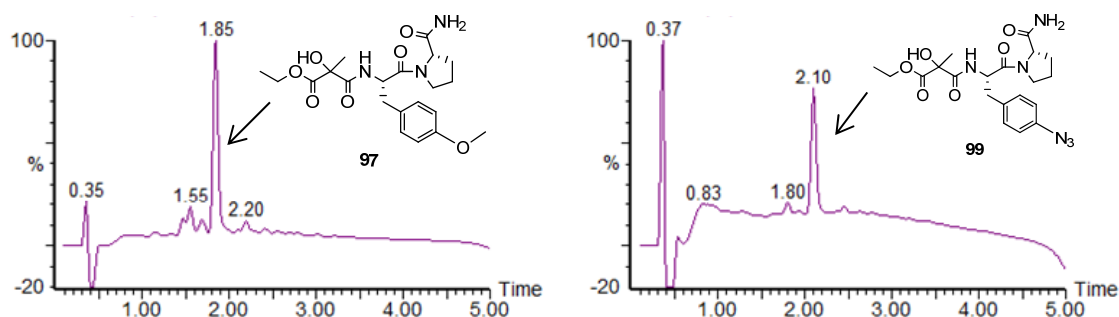


Figura 26. Análisis cromatográfico del crudo de reacción de la síntesis de **97** y **99**. Condiciones cromatográficas: (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

A diferencia de lo ocurrido en los crudos de reacción de la quimioteca de análogos de peptina, en este caso no fue posible separar los diastereoisómeros de cada uno de los derivados lineales. Por lo tanto, los resultados que se exponen en la Tabla 3 hacen referencia a la mezcla de los dos diastereoisómeros, que se indican en la Figura 27:

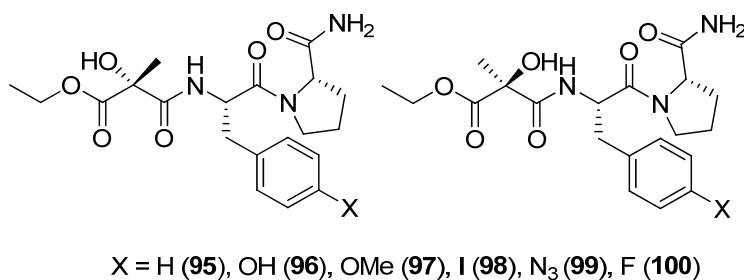


Figura 27

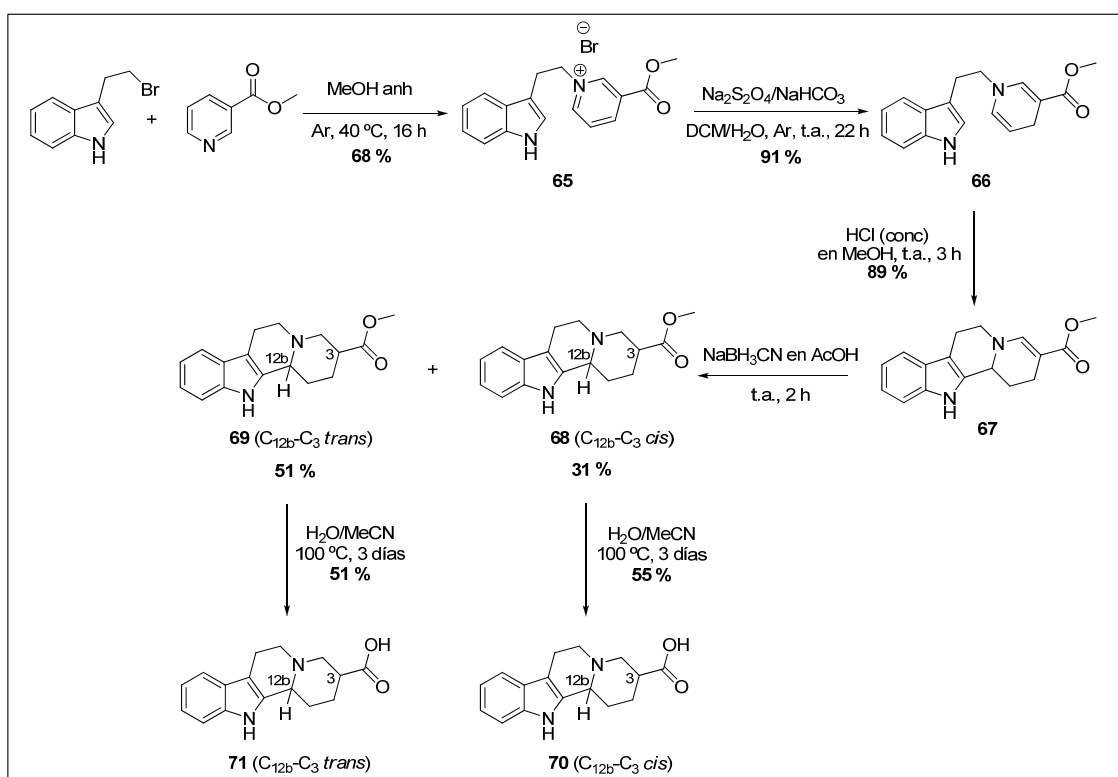
La caracterización de cada uno de los péptidos se llevó a cabo por HPLC-MS y espectrometría de masas exactas. En el caso de los derivados **97** y **99**, también se procedió al análisis por RMN de ¹H y ¹³C y mediante experimentos de COSY y HSQC que permitieron asignar cada una de las señales obtenidas y confirmar la identidad de los compuestos.

2. QUIMIOTECA DE HÍBRIDOS CON INDOLOQUINOLICIDINA

2.1. Síntesis de indoloquinolicidinas y derivados

2.1.1. Síntesis del ácido 1,2,3,4,6,7,12,12b-octahidroindolo[2,3-*a*]quinolicin-3-carboxílico

La síntesis en solución del derivado de indoloquinolicidina ácido 1,2,3,4,6,7,12,12b-octahidroindolo[2,3-*a*]quinolicin-3-carboxílico se llevó a cabo en cinco etapas, siguiendo el procedimiento descrito por el Dr. Marc Vendrell,⁴⁰ con algunas modificaciones (Esquema 16).



Esquema 16. Síntesis de los ácidos carboxílicos **70** y **71**. Se muestra uno de los enantiómeros de **68**, **69**, **70** y **71**

2.1.1.1. Síntesis de bromuro de 1-[2-(indol-3-il)etil]-3-metoxycarbonilpiridinio (**65**)

El primer paso de la síntesis supone la formación de la sal cuaternaria de piridinio **65**, que se llevó a cabo a partir de 3-(2-bromoetil)indol y del éster metílico del ácido nicotínico, ambos disponibles comercialmente. La formación de la sal se realizó en condiciones anhidras debido a la labilidad del 3-(2-bromoetil)indol, utilizando metanol anhidro como disolvente. En el procedimiento inicial, la reacción se llevó a cabo

durante 48 h a temperatura ambiente; sin embargo, se decidió aumentar la temperatura hasta 40 °C, lo cual permitió reducir el tiempo de reacción a 16 h. El bromuro de 1-[2-(indol-3-il)etil]-3-metoxicarbonilpiridinio **65** se obtuvo como un precipitado con un 68 % de rendimiento y una pureza del 98 % determinada por integración de las áreas de los picos cromatográficos por HPLC.

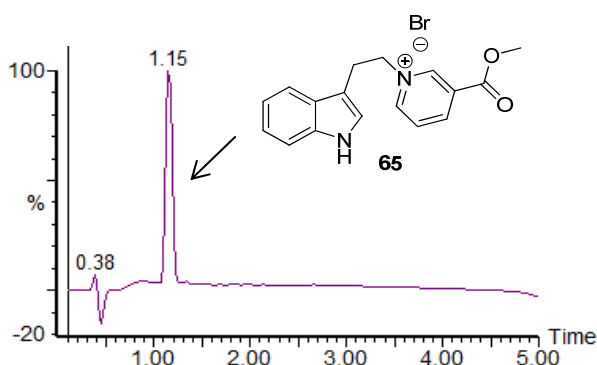


Figura 28. Análisis cromatográfico del crudo de reacción de la síntesis de **65**. Condiciones cromatográficas: (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

2.1.1.2. Obtención del éster metílico del ácido 1-[2-(indol-3-il)etil]-1,4-dihidropiridina-3-carboxílico (**66**)

Una vez obtenida la sal de piridinio, se procedió a la obtención del éster metílico del ácido 1-[2-(indol-3-il)etil]-1,4-dihidropiridina-3-carboxílico **66**. La reducción de sales cuaternarias de piridinio da lugar a diferentes dihidropiridinas, dependiendo de las condiciones de reacción utilizadas. Así, la reducción con borohidruro sódico en medio básico da lugar a 1,2-dihidropiridinas,⁶⁶ mientras que el uso de ditionito sódico permite obtener las correspondientes 1,4-dihidropiridinas.⁶⁷ Por lo tanto, la obtención del producto **66** se llevó a cabo utilizando ditionito sódico y bicarbonato sódico en una mezcla H₂O/DCM (2:1, V/V) y atmósfera de argón para evitar reacciones secundarias de oxidación. Tras 22 h de reacción, el producto deseado **66** se obtuvo con un 91 % de rendimiento y una pureza del 94 %, determinada por integración de las áreas de los picos cromatográficos. El producto así obtenido se utilizó en la siguiente reacción sin previa purificación cromatográfica.

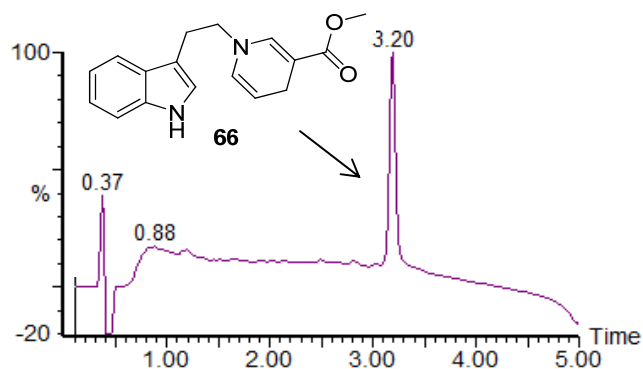


Figura 29. Análisis cromatográfico del crudo de reacción de la síntesis de **66**. Condiciones cromatográficas: (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

En la literatura se ha descrito la obtención de 1,2 y 1,6-dihidropiridinas en la reducción de sales de piridinio con ditionito sódico,⁶⁸ sin embargo, el análisis por ¹H-RMN del producto obtenido permitió confirmar la formación inequívoca de la 1,4-dihidropiridina deseada.

2.1.1.3. Síntesis del éster metílico del ácido 1,2,6,7,12,12b-hexahidroindolo[2,3-*a*]quinolicin-3-carboxílico (**67**)

Las indolo[2,3-*a*]quinolicidinas se pueden obtener por ciclación intramolecular de 1,4-dihidropiridinas. La obtención del éster metílico del ácido 1,2,6,7,12,12b-hexahidroindolo[2,3-*a*]quinolicin-3-carboxílico **67** se llevó a cabo por tratamiento de la 1,4-dihidropiridina **66** con una mezcla de HCl concentrado y metanol, durante 3 h a temperatura ambiente, obteniéndose el producto deseado con un rendimiento del 89 % y una pureza del 88 %, determinada por integración de las áreas de los picos cromatográficos (Figura 30). La reacción de ciclación tuvo lugar de manera regioespecífica ya que, a pesar de la existencia de dos enaminas, la enamina sustituida no da lugar al producto de ciclación correspondiente **67b** (Figura 31). Por otra parte, la existencia de un grupo electroatrayente en la posición 3 de la 1,4-dihidropiridina estabiliza una de las enaminas, evitando reacciones de condensación no deseadas catalizadas por ácido, como la que daría lugar al producto **67a**.⁴⁶ El análisis por ¹H-RMN del producto obtenido confirmó la identidad de **67**, el cual se obtuvo como una mezcla racémica como consecuencia del nuevo carbono cuaternario quiral formado durante la ciclación.

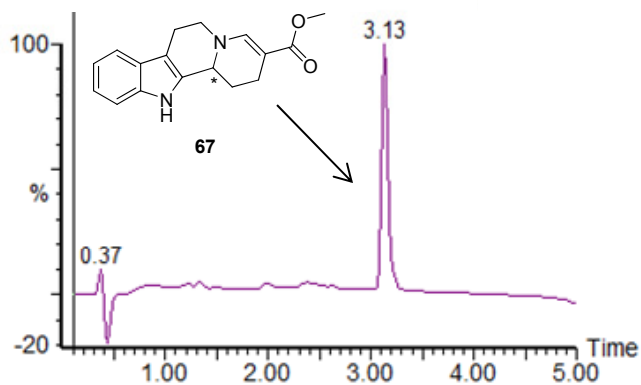


Figura 30. Análisis cromatográfico del crudo de reacción de la síntesis de **67**. Condiciones cromatográficas: (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH, flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

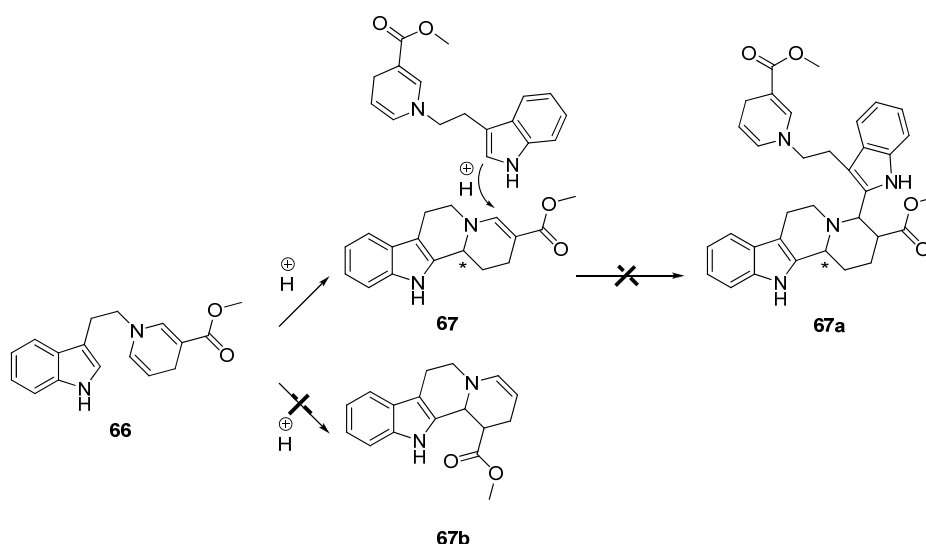


Figura 31. Formación de la indolo[2,3-a]quinolizidina en medio ácido y posibles reacciones secundarias

El producto obtenido se utilizó en la siguiente reacción sin previa purificación cromatográfica.

2.1.1.4. Síntesis del éster metílico del ácido (3*RS*, 12*bRS*)-1,2,3,4,6,7,12,12*b*-octahidroindolo[2,3-*a*]quinolizina-3-carboxílico (**68**) y del éster metílico del ácido (3*RS*, 12*bSR*)-1,2,3,4,6,7,12,12*b*-octahidroindolo[2,3-*a*]quinolizina-3-carboxílico (**69**)

La reducción del doble enlace del éster **67** supone la formación de un nuevo centro quiral. Con objeto de obtener los dos diastereoisómeros resultantes de la reducción en

una proporción similar y así poder utilizar ambos en la preparación de híbridos, la reacción se llevó a cabo utilizando cianoborohidruro sódico (NaBH_3CN). Estudios preliminares, realizados en nuestro laboratorio, permitieron comprobar que la utilización de hidrógeno como agente reductor daba lugar a una reacción más estereoselectiva, al obtenerse principalmente la pareja de enantiómeros con los carbonos C_{12b} y C_3 en configuración relativa *trans*, dado que la hidrogenación tiene lugar preferentemente por la cara menos impedida.

La reducción se llevó a cabo con cianoborohidruro sódico en ácido acético, durante 2 h a temperatura ambiente, obteniéndose los diastereoisómeros **68** (configuración relativa C_{12b} - C_3 *cis*) y **69** (configuración relativa C_{12b} - C_3 *trans*) con un rendimiento del 31 % y del 51 %, respectivamente, tras la purificación del crudo de reacción por cromatografía en gel de sílice. Cabe indicar que tanto **68** como **69** se obtuvieron en forma de una mezcla de enantiómeros. La Figura 32 muestra el análisis cromatográfico del crudo de reacción.

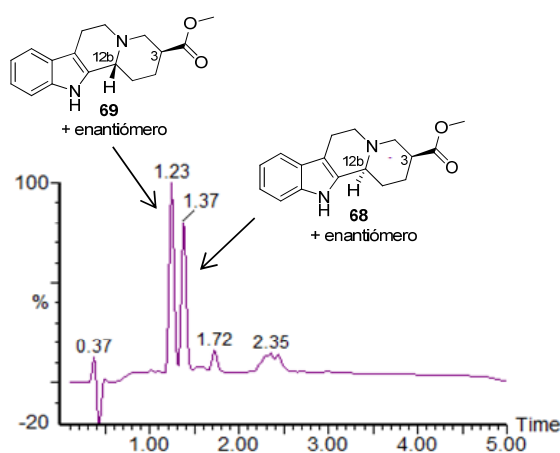


Figura 32. Análisis cromatográfico del crudo de reacción de la reducción de **67** que da lugar a los diastereoisómeros **68** y **69**. Condiciones cromatográficas: (XBridge C_{18} , 4.6×50 mm, $3.5 \mu\text{m}$, $5 \rightarrow 100$ % B en 4.5 min (A: H_2O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH), flujo 2 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm).

2.1.1.5. Obtención del ácido (3*RS*, 12*bRS*)-1,2,3,4,6,7,12,12*b*-octahidroindolo[2,3-*a*]quinolicin-3-carboxílico (**70**) y del ácido (3*RS*, 12*bSR*)-1,2,3,4,6,7,12,12*b*-octahidroindolo[2,3-*a*]quinolicin-3-carboxílico (**71**)

El último paso de la síntesis consistió en la hidrólisis de los ésteres metílicos **68** y **69** para dar lugar a los correspondientes ácidos carboxílicos **70** y **71**, obtenidos como mezclas enantioméricas. Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo con una solución de H₂O/MeCN a 100 °C durante 3 días (**70**) y 5 días (**71**), obteniéndose los productos deseados **70** y **71** con un rendimiento del 55 % y del 51 %, respectivamente. Estos productos se utilizaron posteriormente sin previa purificación cromatográfica.

El análisis por RMN de los productos obtenidos permitió confirmar la configuración relativa de los ésteres (**68** y **69**) de los que provenían y se comprobó que, tras la reacción de hidrólisis, se mantenía la misma configuración relativa (C_{12b}-C₃) en los correspondientes ácidos carboxílicos **70** y **71**. Además, el análisis por HPLC-MS mostró que la hidrólisis de cada uno de los ésteres daba lugar a un solo ácido y que tales ácidos no coelúan, de modo que se confirmaba también que la configuración relativa determinada para los ésteres se mantenía en los respectivos ácidos.

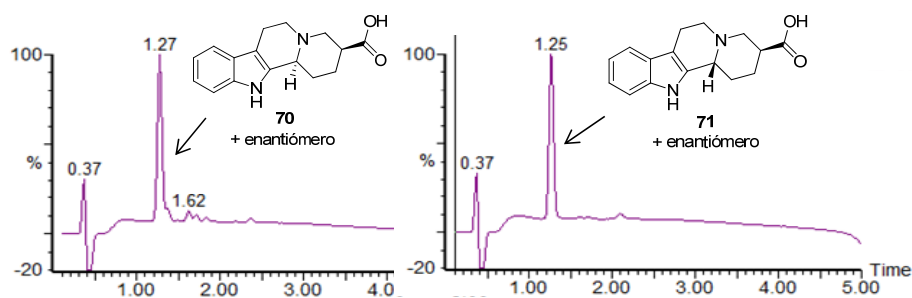


Figura 33. Análisis cromatográfico del crudo de reacción de la formación de los ácidos **70** y **71**. Condiciones cromatográficas: (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

2.2. Síntesis de la quimioteca de híbridos indoloquinolidina y análogos de peptinas

2.2.1. Diseño de la quimioteca de híbridos indoloquinolidina y análogos de peptinas

Teniendo en cuenta la estructura de la peptina y de la indoloquinolidina, la conjugación de las moléculas podría tener lugar a través del grupo amino de la primera y el ácido carboxílico de la segunda. No obstante, la imposibilidad de llevar a cabo la transposición de Curtius en fase sólida, tras numerosos intentos en estudios precedentes en nuestro laboratorio, hizo plantear la posibilidad de utilizar el ácido carboxílico precursor de la peptina para incorporar un espaciador bifuncional, que permitiera unir las dos moléculas a través de dos enlaces amida (Figura 34)

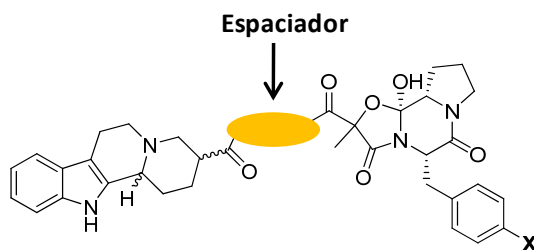
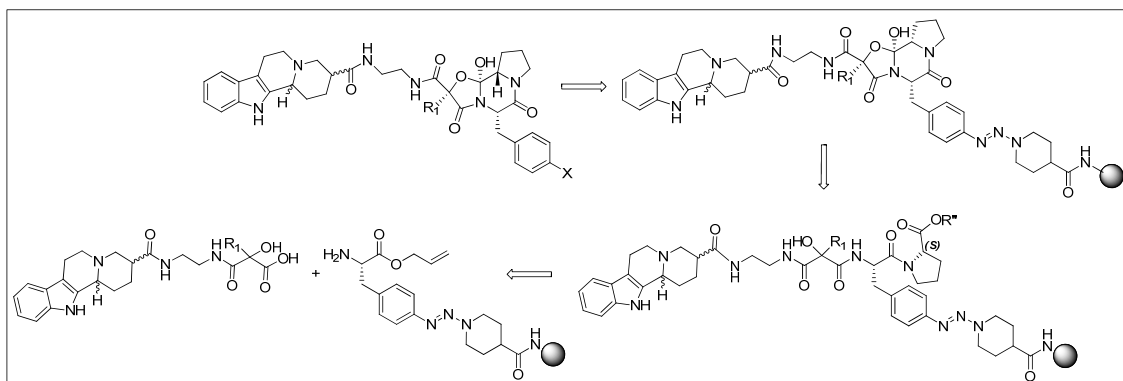


Figura 34. Diseño de los híbridos indoloquinolidina y análogos de peptina

De acuerdo con la estrategia planteada para la síntesis de análogos de peptina, una de las posibilidades más factibles desde el punto de vista sintético sería la incorporación de una diamina como espaciador.

A nivel retrosintético, los híbridos de indoloquinolidina y análogos de peptina se obtendrían tal como se indica en el Esquema 17, válido para las dos mezclas de diastereoisómeros de indoloquinolidina **70** y **71**. En ambos casos, tanto **70** como **71** se utilizaron como mezcla de enantiómeros.

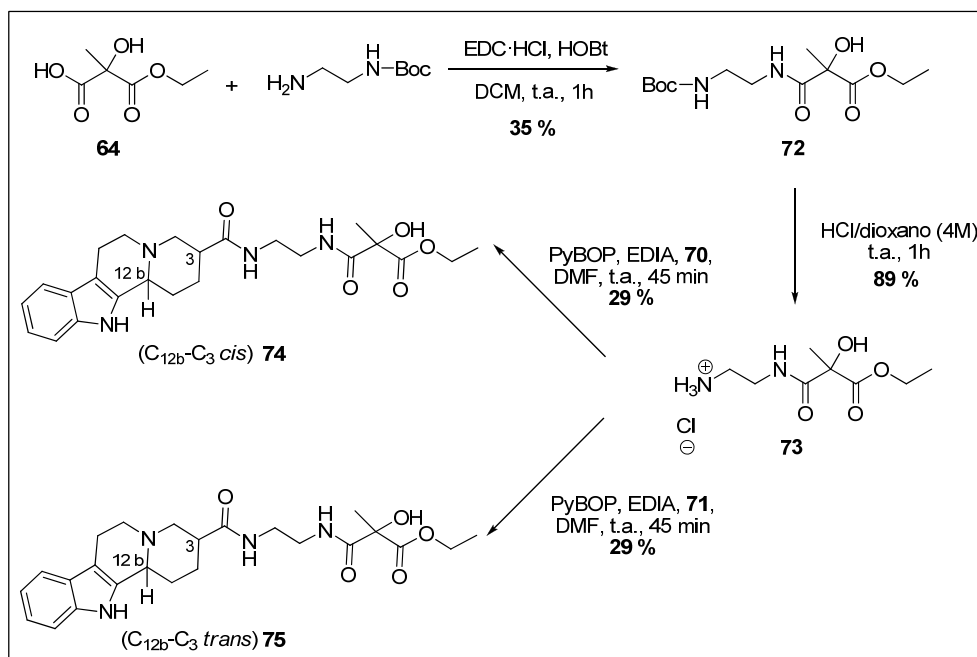


Esquema 17. Análisis retrosintético para la formación de los híbridos indoloquinolidina y análogos de peptina

La estrategia diseñada considera la síntesis en solución del conjugado indoloquinolidina-malonato a través del espaciador diamino y la posterior incorporación del mismo al soporte polimérico.

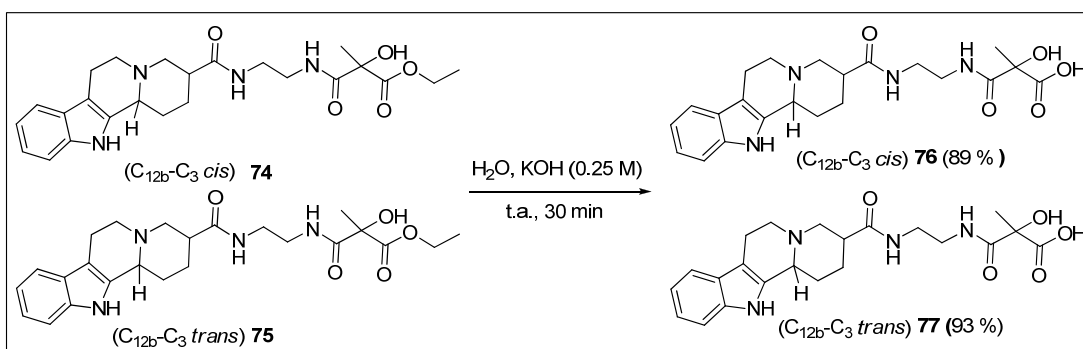
2.2.2. Síntesis en solución de los derivados indoloquinolidina- α -hidroxi- α -malonato

En primer lugar (Esquema 18), se hizo reaccionar el ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico racémico **64** con etilendiamina monoprottegida con el grupo Boc (*N*-Boc-etilendiamina), utilizando EDC·HCl como agente de acoplamiento y HOBT como aditivo en DCM. Tras 1 h de reacción se obtuvo el producto deseado **72** con un 35 % de rendimiento tras la purificación cromatográfica. A continuación, se eliminó el grupo protector Boc utilizando una disolución de HCl en dioxano (4 M) para obtener el correspondiente derivado desprotegido **73** con un 89 % de rendimiento. Finalmente, se incorporaron sobre **73** los ácidos diastereoméricos 1,2,3,4,6,7,12,12b-octahidroindolo[2,3-*a*]quinolicin-3-carboxílicos **70** y **71** (una mezcla racémica en cada caso) mediante la formación de un enlace amida utilizando una sal de fosfonio (PyBOP) como agente deshidratante, en presencia de EDIA y DMF como disolvente. Tras 45 min de reacción se obtuvieron los derivados **74** y **75** respectivamente con un 29 % de rendimiento en ambos casos tras purificación cromatográfica. Teniendo en cuenta que tanto **64**, como **70** y **71** son mezclas racémicas, en los productos finales se pueden obtener cuatro estereoisómeros diferentes.



Esquema 18. Síntesis de los derivados de indoloquinolidina **74** y **75**

Para poder incorporar los derivados **74** y **75** a la resina a través del grupo α -amino de la fenilalanina era necesario liberar el ácido carboxílico protegido en forma de éster. Para ello, se hidrolizaron los ésteres en medio básico utilizando una disolución de KOH , tal y como se muestra en el Esquema 19. Tras 30 min de reacción se obtuvieron los correspondientes ácidos carboxílicos **76** y **77** con un 89 % y un 93 % de rendimiento, respectivamente.



Esquema 19. Síntesis de los ácidos carboxílicos **76** y **77**

El análisis por HPLC-MS de los crudos de reacción permitió confirmar la presencia de los productos deseados.

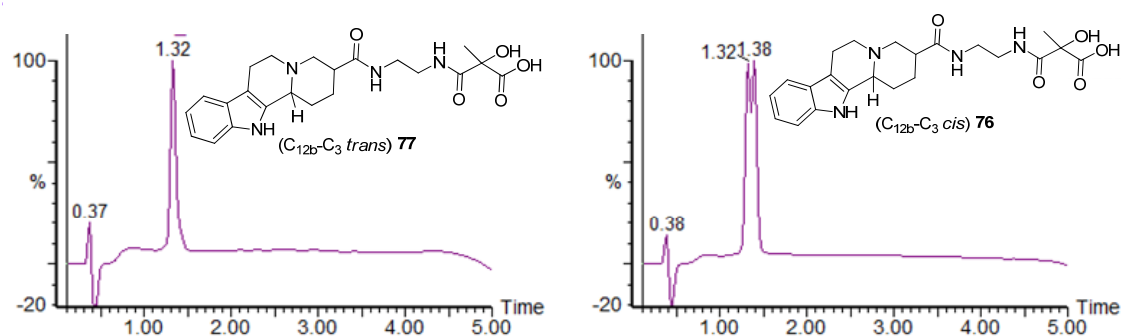


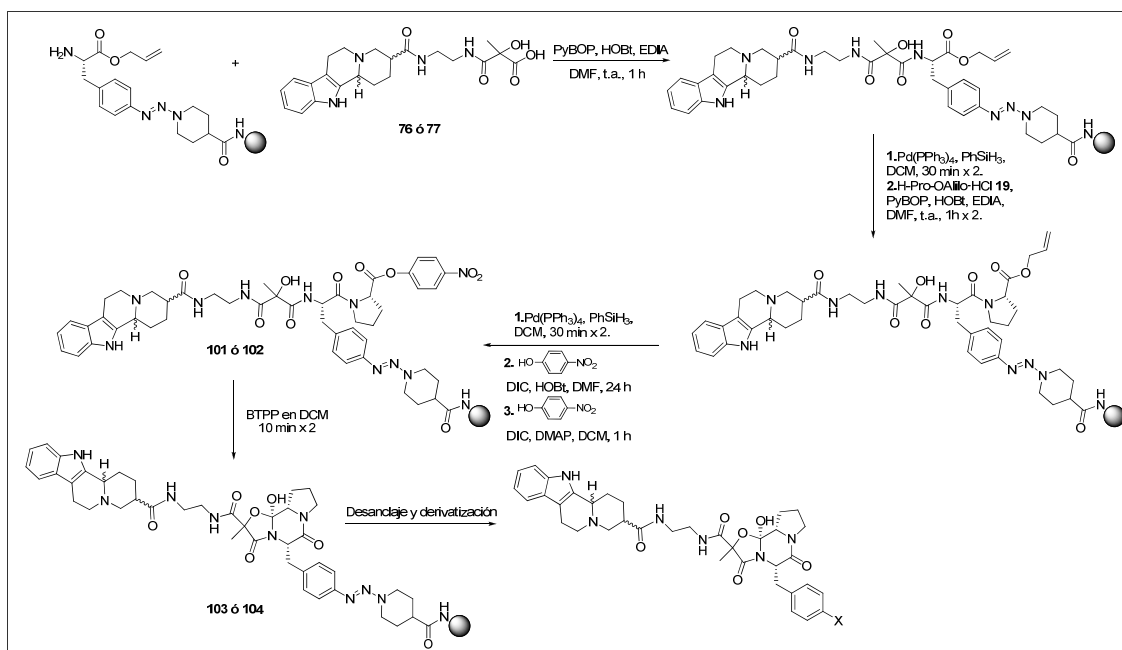
Figura 35. Análisis cromatográfico del crudo obtenido en la preparación de los ácidos diastereoisómeros **76** y **77**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

Como se puede observar en el cromatograma de **76**, se llegaron a detectar dos picos correspondientes a las dos mezclas racémicas de diastereoisómeros, lo cual no fue posible en el caso de **77**.

2.2.3. Quimioteca de híbridos indoloquinolidina y análogos de peptinas

La síntesis de la quimioteca se realizó utilizando la aminoacil-resina **33**, cuya síntesis se ha descrito con anterioridad en el apartado 2.2.2 (Capítulo 1). En este caso, el rendimiento de incorporación del derivado Fmoc-(S)-Phe(*p*NH₂)-OAlilo **27** fue del 75 %. La aminoacil-resina resultante **33** se dividió en dos lotes para preparar la quimioteca de híbridos indoloquinolidina y análogos de peptina con los diastereoisómeros **76** y **77**.

El Esquema 20 muestra la preparación en fase sólida de los híbridos. Dado que **76** y **77** son mezclas de diastereoisómeros y que al formar el anillo tricíclico de la peptina la configuración de los centros estereogénicos, tanto del anillo de dicetopiperacina como del carbono cuaternario del ciclol es *S*, se pueden obtener 4 estereoisómeros, es decir dos mezclas racémicas de diastereoisómeros.



Esquema 20. Síntesis en fase sólida de los híbridos indoloquinolizidina y análogos de peptina

En ambos casos, una vez eliminado el grupo protector Fmoc del derivado de fenilalanina utilizando piperidina en DMF (20 %, V/V), se incorporó en cada lote el derivado de indoloquinolizidina **76** ó **77** utilizando una sal de fosfonio (PyBOP) como agente de acoplamiento, HOBT·H₂O como aditivo y EDIA en DMF como disolvente. Seguidamente, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo siguiendo el protocolo habitual (Pd(PPh₃)₄ y PhSiH₃ en DCM) y se incorporó el derivado de prolina H-Pro-OAlilo·HCl **19** utilizando las mismas condiciones que las empleadas para acoplar **76** y **77**. En este caso, fueron necesarios dos tratamientos para conseguir que el acoplamiento fuera cuantitativo. Acto seguido, se eliminó el grupo protector alilo de la prolina incorporada y se preparó el éster de *p*-nitrofenol utilizando DIC como agente de acoplamiento y HOBT·H₂O como aditivo en DCM durante 24 h. A continuación, se realizó un segundo tratamiento con DIC en presencia de DMAP, en DCM y durante 1 h para asegurar la completa formación del éster de *p*-nitrofenol.

Las peptidil-resinas resultantes **101** y **102** se sometieron a las condiciones descritas en el apartado 1.2.2 para formar el sistema tricíclico de la peptina. Así, se secaron las peptidil-resinas en una estufa de vacío a 37 °C durante 24 h y se trataron dos veces con la base BTTPP, en condiciones anhidras utilizando DCM como disolvente en atmósfera de argón. A continuación, se lavaron las resinas con DCM, DMF y hexano para eliminar

el *p*-nitrofenol resultante de la reacción de ciclación. Alícuotas de las peptidil-resinas **103** y **104** así obtenidas se trataron con TFA/DCM (5: 95, V/V, 3 × 2 min) y, a continuación, las sales de diazonio obtenidas se redujeron utilizando FeSO₄·7H₂O en DMF.

El análisis por HPLC-MS de los crudos de reacción obtenidos permitió detectar los productos deseados, acompañados de los correspondientes productos hidrolizados y otras impurezas. La Figura 36 muestra el perfil cromatográfico del producto derivado de la mezcla racémica del diastereoisómero de la indoloquinolicidina *trans* **77**.

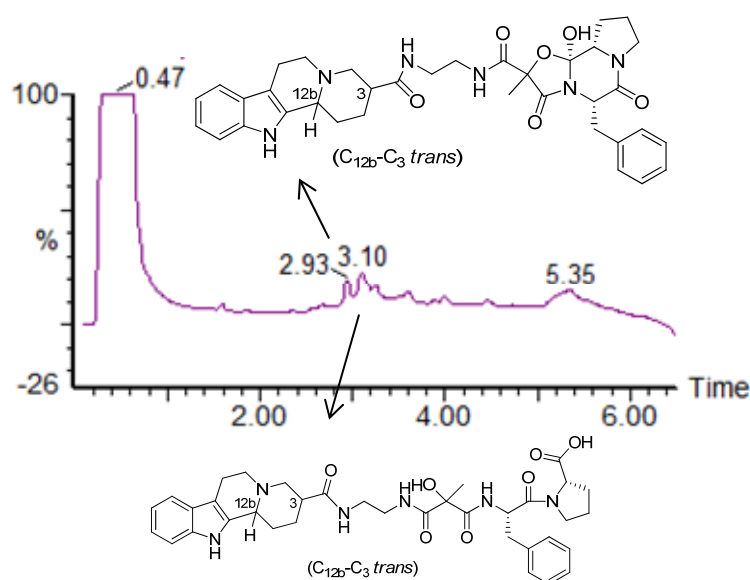


Figura 36. Análisis cromatográfico del crudo de reacción de la formación de los híbridos indoloquinolicidina (*trans*)-peptina diastereoméricas **108** y **109**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→40 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

A pesar de tomar las precauciones necesarias para el trabajo en medio anhidro se pudo comprobar en el cromatograma que el porcentaje de producto hidrolizado era superior al del producto deseado. Además, dada la complejidad del perfil cromatográfico del crudo de reacción, no fue posible diferenciar las dos mezclas racémicas de diastereoisómeros **108** y **109**.

Tras comprobar que el producto deseado se había formado y, siguiendo el mismo procedimiento descrito que en la síntesis de la quimioteca de análogos de peptina, se procedió a eliminar el exceso de BTTP a través de la purificación del crudo obtenido

por cromatografía en gel de sílice. El análisis por HPLC-MS del crudo obtenido tras la purificación se muestra en la Figura 37.

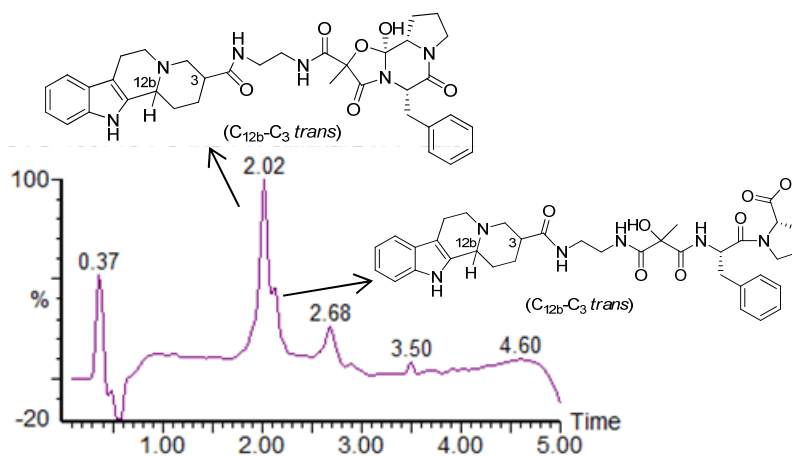


Figura 37. Análisis cromatográfico de los híbridos indoloquinolidina (*trans*) y análogos de peptina diastereoméricas **108** y **109** tras la purificación del crudo en cromatografía en gel de sílice. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm).

A continuación, la purificación cromatográfica por HPLC semipreparativo permitió separar las mezclas racémicas de diastereoisómeros **108** y **109**, obteniéndose cada una de las mezclas con un rendimiento del 5 % en ambos casos.

El mismo procedimiento se realizó para obtener los diastereoisómeros que contienen el derivado de indoloquinolidina **76**, de estereoquímica *cis*. En este caso, no obstante, no fue posible separar por HPLC la mezcla de estereoisómeros, que se obtuvo con un rendimiento global del 1 % tras la purificación.

La complejidad estructural de los compuestos de la quimioteca de híbridos indoloquinolidina y análogos de peptina obligó a limitar, en este estudio preliminar, la quimioteca de compuestos a los derivados con los sustituyentes H, OMe y OH en la posición *para* del anillo de Phe, la formación de los cuales requiere condiciones de reacción más suaves que en el resto de casos. Así, se utilizaron las resinas **103** y **104** para preparar esta serie de derivados, empleando las mismas condiciones que en la síntesis de la quimioteca de análogos de peptina (Esquema 14).

En la Tabla 4 se presentan los rendimientos de reacción y pureza de los productos de cada uno de los derivados, obtenidos tras eliminar el exceso de BTPP por cromatografía en gel de sílice y la purificación mediante HPLC semipreparativo.

Únicamente fue posible separar los correspondientes diastereoisómeros cuando el sustituyente fue H y OMe en los híbridos con el derivado de indoloquinolicidina *trans*, en el resto de casos se obtuvo la mezcla de diastereoisómeros.

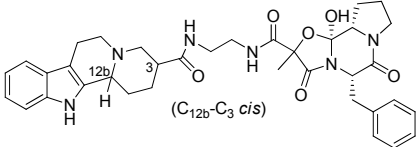
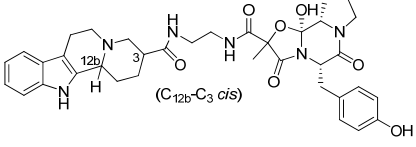
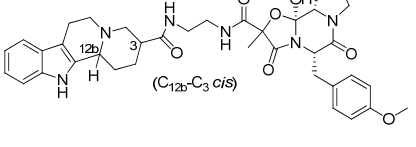
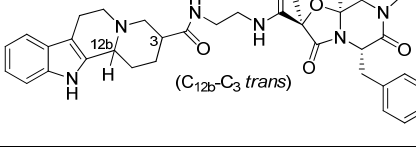
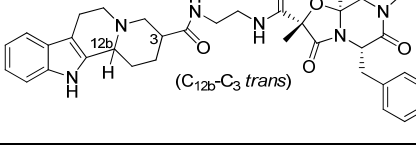
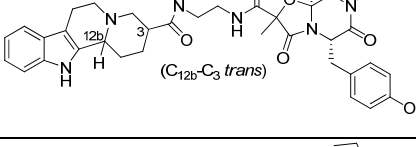
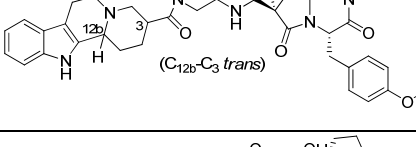
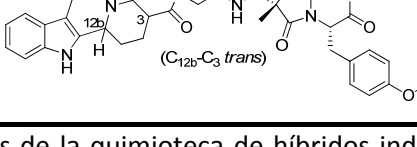
Compuesto	t_R (min)*	Estructura	Rendimiento (%)
105	1.80	 (C _{12b} -C ₃ <i>cis</i>)	1
106	1.55	 (C _{12b} -C ₃ <i>cis</i>)	13
107	1.83	 (C _{12b} -C ₃ <i>cis</i>)	4
108	4.95	 (C _{12b} -C ₃ <i>trans</i>)	5
109	5.10	 (C _{12b} -C ₃ <i>trans</i>)	5
110	4.43	 (C _{12b} -C ₃ <i>trans</i>)	1
111	5.03	 (C _{12b} -C ₃ <i>trans</i>)	2
112	5.12	 (C _{12b} -C ₃ <i>trans</i>)	6

Tabla 4. Rendimientos y purezas de la quimioteca de híbridos indoloquinolicidina y análogos de peptinas. Purezas determinadas por integración de los picos en el análisis cromatográfico a 220 nm. (*Las condiciones cromatográficas utilizadas se muestran en el apartado 4.1.3 de la parte experimental)

El análisis por HPLC-MS de cada uno de los productos obtenidos permitió confirmar la identidad de los compuestos, aunque en todos los casos se detectó también producto hidrolizado a tiempos de retención muy similares al de los híbridos indoloquinolicidina y análogo de peptina. Por lo tanto, no fue posible determinar la pureza cromatográfica de los productos con exactitud.

2.3. Síntesis de la quimioteca de híbridos de indoloquinolicidina y precursores lineales de peptinas

De la misma manera que se hizo para los análogos de peptinas, también se preparó una quimioteca de híbridos a partir de la mezcla racémica de diastereoisómeros de indoloquinolicidina **70** y **71** y los precursores lineales de peptinas, con objeto de compararlos desde el punto de vista biológico con los híbridos indoloquinolicidina y análogos de peptina (Figura 42).

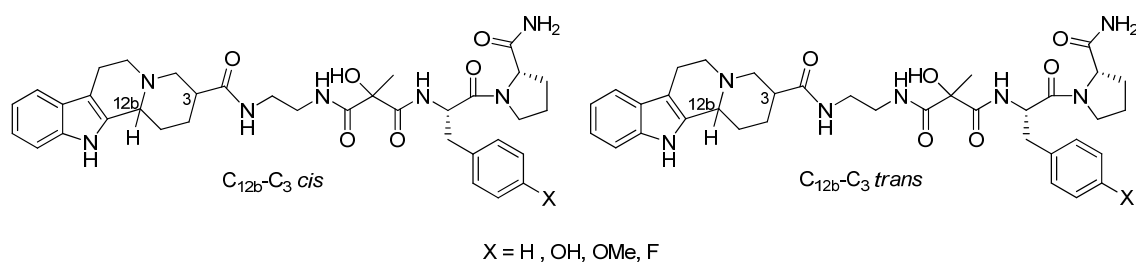
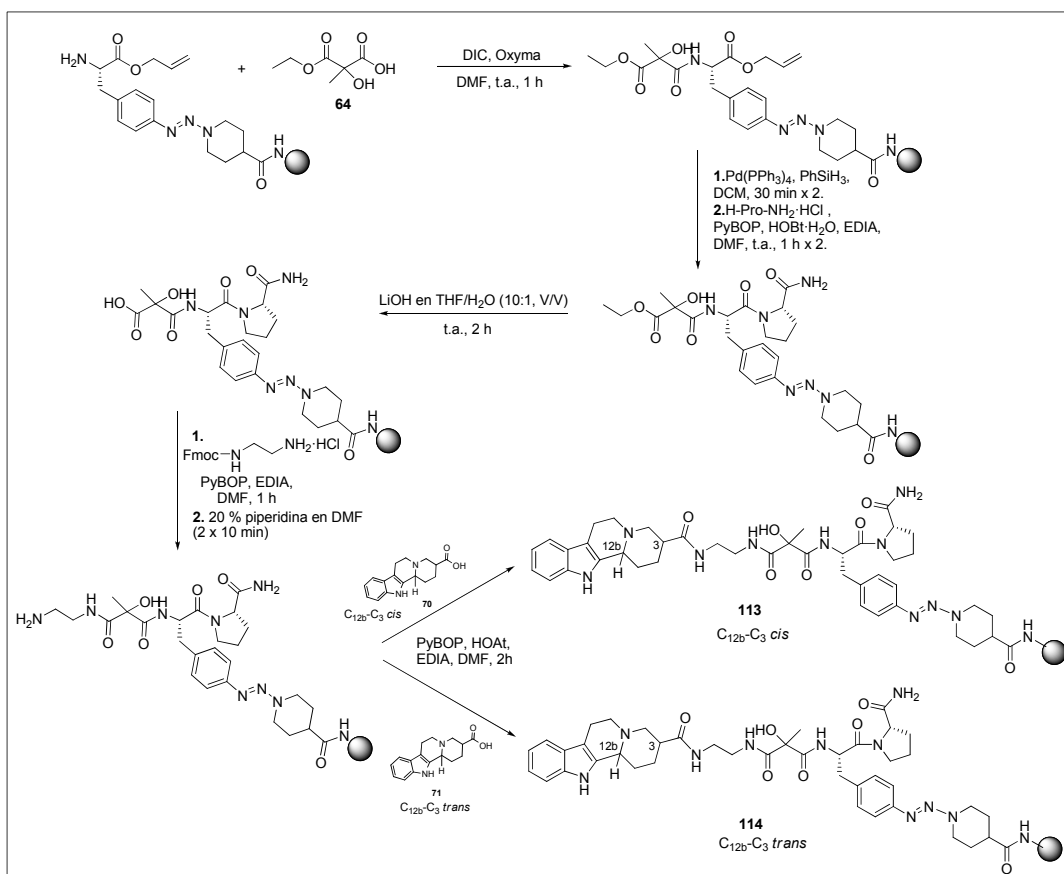


Figura 38. Estructura química de los derivados de la quimioteca de híbridos indoloquinolicidina y precursores lineales de peptina

La síntesis de esta quimioteca se llevó a cabo siguiendo un procedimiento experimental similar al utilizado en la síntesis de los precursores lineales (apartado 1.3) con la salvedad de que en este caso había que incluir el sistema tetracíclico de la indoloquinolicidina. Como en el caso de los híbridos indoloquinolicidina y análogo de peptina, se incorporó un espaciador etilendiamino para conjugar la indoloquinolicidina con la cadena peptídica lineal. Sin embargo, dado que en el caso anterior la síntesis en solución de los ácidos carboxílicos **76** y **77** tuvo lugar con bajos rendimientos, se decidió en esta ocasión cambiar de estrategia e incorporar, por el extremo amino, primero el derivado **64**, después el espaciador diamino y finalmente la indoloquinolicidina, todos ellos en fase sólida, evitando así la parte de la síntesis en solución (Esquema 21).



Esquema 21. Síntesis en fase sólida de los híbridos indoloquinolidina y precursores lineales de peptina

Así, la síntesis de cada uno de los derivados de la quimioteca se realizó partiendo de la aminoacil-resina **33**, consiguiendo en esta ocasión un rendimiento de incorporación de la fenilalanina fue del 73 %. La elongación de la cadena peptídica tuvo lugar a través del extremo amino tras eliminar el grupo protector Fmoc de la fenilalanina en medio básico siguiendo el procedimiento habitual. A continuación, se incorporó el ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico racémico **64** utilizando una carbodiimida (DIC) como agente de acoplamiento, en presencia de Oxyma[®] como aditivo y DMF como disolvente. Tras eliminar el grupo protector alilo del extremo carboxilo de la fenilalanina con Pd(PPh₃)₄ en presencia de PhSiH₃, se incorporó el derivado de prolina comercial H-Pro-NH₂·HCl utilizando la sal de fosfonio PyBOP como agente de acoplamiento, en presencia de HOBT·H₂O como aditivo, EDIA y DMF como disolvente. Seguidamente, se hidrolizó el éster con LiOH en THF:H₂O (10:1, V/V) y, sobre el ácido carboxílico formado, se adicionó el espaciador etilendiamino en forma de hidrocloreuro monoprotegido con el grupo Fmoc, en condiciones similares a las utilizadas para incorporar el derivado de prolina. Una vez acoplado el espaciador, se eliminó el grupo

protector Fmoc en medio básico con una disolución de piperidina en DMF y la peptidil-resina resultante se dividió en dos lotes. En uno de ellos se incorporó el derivado de indoloquinolicidina **70 cis** (mezcla racémica) y en el otro, el derivado de indoloquinolicidina **71 trans** (mezcla racémica). En ambos casos, el sistema tetracíclico de indoloquinolicidina se acopló a la peptidil-resina utilizando PyBOP como agente de acoplamiento, HOAt como aditivo y EDIA. Las reacciones en ambos casos tuvieron lugar en 2 h, utilizando la mezcla de disolventes DCM/DMF (1:1, V/V). Tras comprobar mediante el test de ninhidrina que los acoplamientos habían sido cuantitativos, las peptidil-resinas obtenidas **113** y **114** se utilizaron para obtener los diferentes compuestos de la quimioteca, derivatizando el anillo aromático de la fenilalanina siguiendo los procedimientos descritos con anterioridad (Capítulo 1).

Tras aplicar las condiciones de desanclaje y derivatización para obtener cada uno de los derivados, los crudos de reacción se analizaron por HPLC-MS, detectándose en cada caso el producto deseado. La Figura 39 muestra como ejemplo los cromatogramas de los crudos de reacción de los derivados fluorado e hidroxilado **118** y **120**.

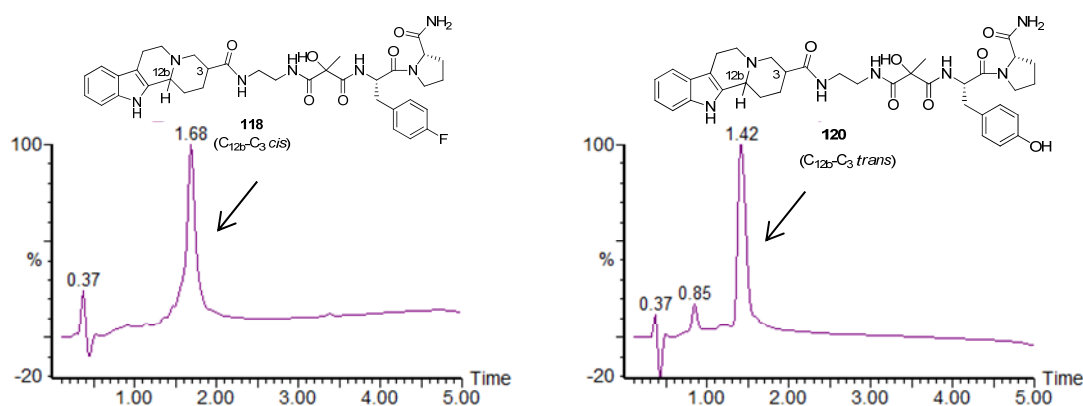


Figura 39. Análisis cromatográfico del crudo de reacción de la formación de los híbridos indoloquinolicidina –precursor lineal de peptina **118** y **120**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈ (**118**) y XBridge C₁₈ (**120**), 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

Seguidamente, los crudos se purificaron por HPLC semipreparativo y como en el caso de los precursores lineales de peptina, no fue posible separar las mezclas de diastereoisómeros en ningún caso. Se obtuvieron los compuestos deseados con elevados rendimientos y elevada pureza (Tabla 5). La identidad de los derivados se confirmó por espectrometría de masas.

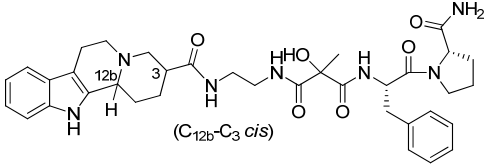
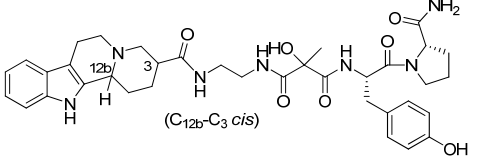
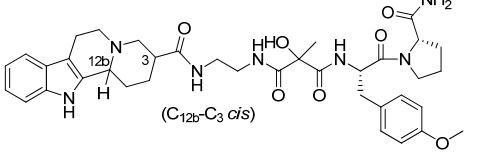
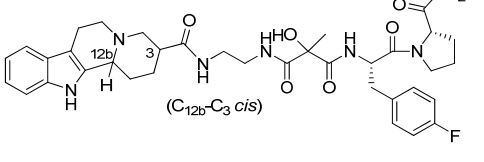
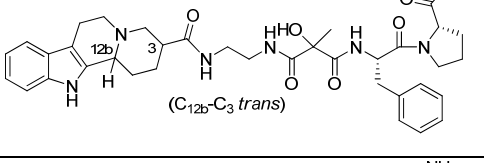
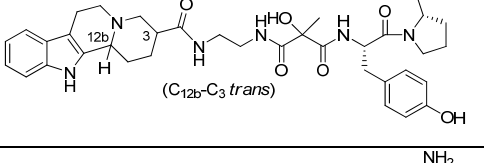
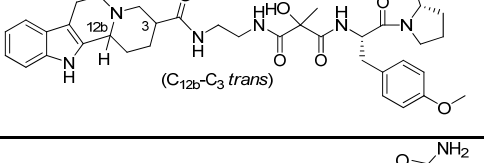
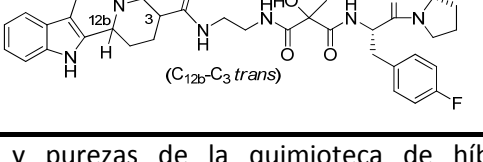
Compuesto	t_R (min)*	Estructura	Pureza (%)	Rendimiento (%)
115	5.08	 (C _{12b} -C ₃ cis)	>99	57
116	4.55	 (C _{12b} -C ₃ cis)	96	73
117	5.15	 (C _{12b} -C ₃ cis)	97	54
118	5.00	 (C _{12b} -C ₃ cis)	94	55
119	5.08	 (C _{12b} -C ₃ trans)	>99	50
120	4.48	 (C _{12b} -C ₃ trans)	99	71
121	5.07	 (C _{12b} -C ₃ trans)	100	54
122	1.62	 (C _{12b} -C ₃ trans)	89	63

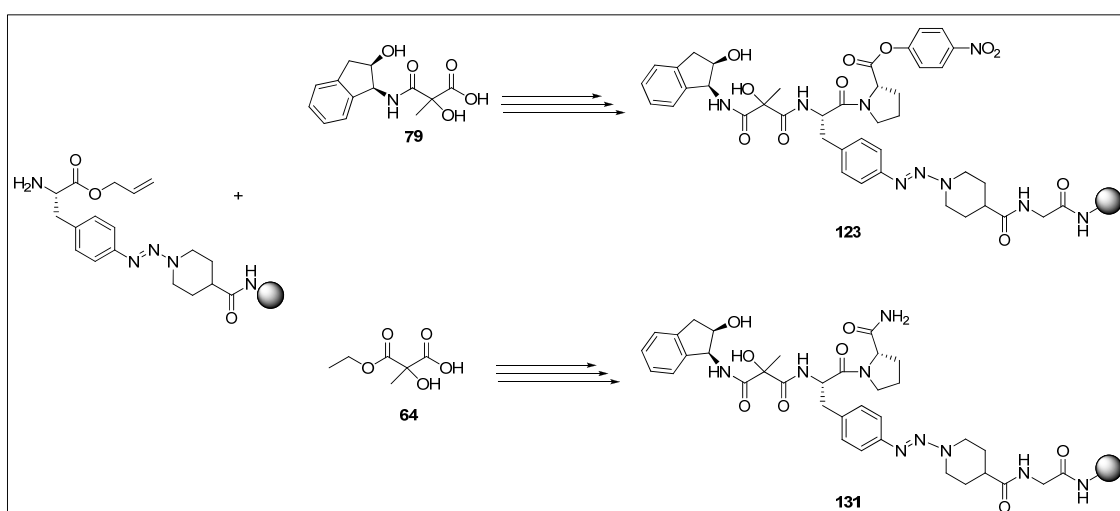
Tabla 5. Rendimientos y purzas de la quimioteca de híbridos indoloquinolizidina y precursores lineales de peptinas. Purzas determinadas por integración de los picos en el análisis cromatográfico a 220 nm. (*Las condiciones cromatográficas utilizadas se muestran en el apartado 4.2.3 de la parte experimental)

3. QUIMIOTECA DE HÍBRIDOS CON (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol

En la misma línea de preparar ligandos bivalentes basados en estructuras privilegiadas, que ha llevado a la síntesis de quimiotecas de híbridos de indoloquinolicidina y análogos de peptina, se planteó que otra opción interesante a explorar sería la utilización de (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol en los híbridos como alternativa a la indoloquinolicidina. De la misma manera que la indoloquinolicidina, el sistema indanólico se considera una estructura privilegiada, dado su potencial desde un punto de vista biológico. Es por ello, que se consideró oportuno incluir en este estudio una quimioteca de péptidos que incluyeran esta estructura.

El sistema bicíclico de (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol, a diferencia de la indoloquinolicidina, contiene un grupo amino en su estructura que permite incorporar directamente la estructura de peptina o del precursor peptídico lineal, sin necesidad de utilizar un espaciador bifuncional. Además, el derivado de indanol es comercial y no es necesaria su síntesis. Estos hechos permiten simplificar la metodología de síntesis de los híbridos.

Desde el punto de vista sintético, se plantearon dos aproximaciones sintéticas diferentes para obtener los híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol con peptinas y con precursores peptídicos lineales (Esquema 22):



Esquema 22. Aproximaciones sintéticas planteadas para la síntesis de los híbridos con (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol

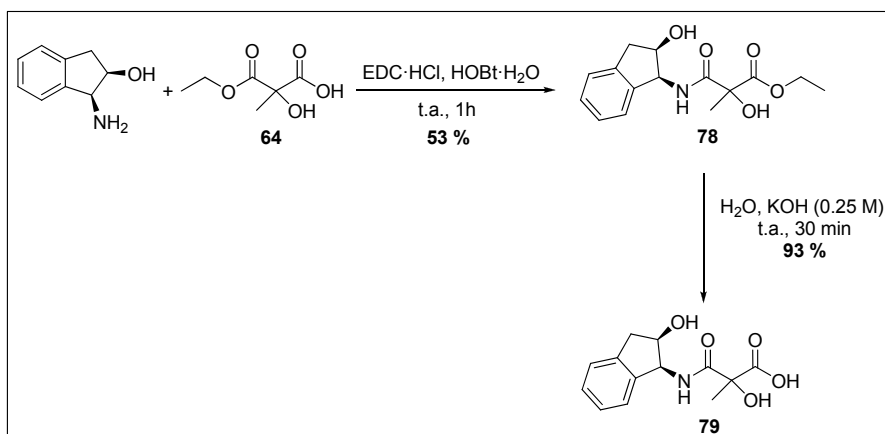
En el caso de la síntesis de los híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y análogos de peptina, se escogió la aproximación consistente en incorporar el conjugado (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol- α -hidroximalonato **79**, previamente sintetizado en solución, a la aminoacil-resina **33** por el extremo amino y, a continuación, elongar el resto de la cadena peptídica a partir del extremo carboxilo del aminoácido. Por otra parte, en relación a la síntesis de los híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y precursor peptídico lineal, se optó por variar la estrategia y realizar la incorporación secuencial a la fenilalanina, por su extremo amino, del α -hidroxi- α -malonato monohidrolizado **64** y de (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol en fase sólida.

A *priori*, no hay ningún factor que apunte que alguna de las aproximaciones planteadas sea más adecuada, así pues, se decidió ensayar ambas y comparar resultados.

3.1. Síntesis de la quimioteca de híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y análogos de peptinas

La síntesis de la quimioteca de híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y análogos de peptinas se realizó utilizando la aminoacil-resina **33**, cuya síntesis se ha descrito anteriormente (apartado 2.2.2, Capítulo 1). En este caso, la incorporación del derivado Fmoc-(*S*)-Phe(*p*NH₂)-OAlilo **27** sobre la resina tuvo lugar con un rendimiento del 81 %, determinado por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc con piperidina.

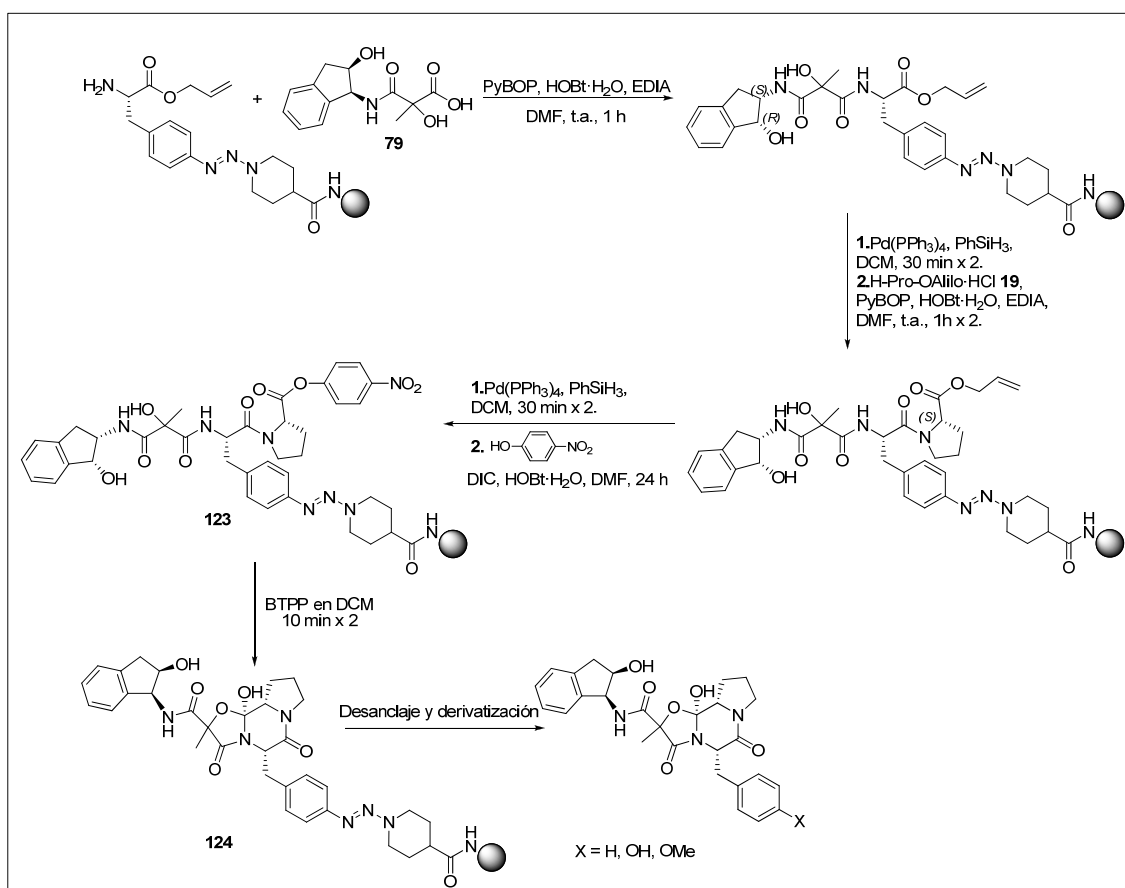
Paralelamente, se llevó a cabo la síntesis en solución del derivado **79**, obtenido como una mezcla de diastereoisómeros (Esquema 23).



Esquema 23. Síntesis del derivado **79**

Primeramente, se formó el enlace amida entre el (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol comercial y el ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico **64** utilizando la carbodiimida soluble EDC·HCl y HOBt·H₂O. Tras una hora de reacción a temperatura ambiente se obtuvo el intermedio **78** con un 53 % de rendimiento. La mezcla de diastereoisómeros **79** se obtuvo tras hidrolizar el éster en condiciones básicas con un 93 % de rendimiento.

Teniendo en cuenta las estrategias sintéticas planteadas para la obtención de los diferentes híbridos, en este caso el esquema sintético para la preparación de los híbridos indanol y peptina es el siguiente:



Esquema 24. Síntesis en fase sólida de híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y peptina

Tras la eliminación del grupo protector Fmoc del derivado de fenilalanina de la resina **33**, se incorporó la mezcla diastereomérica **79**. La formación del enlace amida se realizó utilizando una sal de fosonio (PyBOP) como agente de acoplamiento, HOBt·H₂O como aditivo y EDIA en DMF. Seguidamente, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo siguiendo el protocolo habitual (Pd(PPh₃)₄ y PhSiH₃ en DCM)

y se incorporó el derivado de prolina H-Pro-OAlilo·HCl **19** utilizando PyBOP, HOBT·H₂O y EDIA en DMF. Este procedimiento se realizó dos veces para asegurar que el acoplamiento fuera cuantitativo. Acto seguido, el grupo protector alilo de la prolina se eliminó siguiendo el procedimiento estándar y, a continuación, se esterificó el extremo carboxilo con *p*-nitrofenol, utilizando DIC como agente de acoplamiento y HOBT·H₂O como aditivo durante 24 h. A continuación, para asegurar la completa formación del éster de *p*-nitrofenol se realizó un segundo tratamiento con DIC, DMAP en DCM durante 1 h. La peptidil-resina **123** así obtenida se utilizó para formar el sistema tricíclico de la peptina, empleando las condiciones habituales de tratamiento con BTPP. A continuación, se lavó la resina resultante **124** con DCM, DMF y hexano para eliminar, a través de la filtración, el *p*-nitrofenol resultante de la reacción de ciclación y la mayor parte de BTPP. Dicha resina se utilizó para obtener los híbridos de la quimioteca.

De forma similar a la quimioteca de híbridos con indoloquinolicidina se sintetizaron los derivados con los sustituyentes H, OH, OMe en la posición *para* del anillo aromático de la fenilalanina, utilizando las condiciones de reacción descritas con anterioridad para obtener cada uno de ellos (Esquema 14).

Los crudos de reacción se analizaron por HPLC-MS, detectándose en todos los casos los productos diastereoméricos deseados para cada derivado y el exceso de base BTPP que no se había eliminado con los lavados previos. Como ejemplo, se muestra el perfil cromatográfico del crudo de reacción obtenido tras tratar la peptidil-resina **124** con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5: 95, V/V, 3 × 2 min) y, a continuación, con FeSO₄·7H₂O en DMF para reducir la sal de diazonio resultante (Figura 40). De la misma manera que se hizo para los híbridos indoloquinolicidina y análogos de peptina, los productos se purificaron mediante cromatografía en gel de sílice y, a continuación, se separaron los derivados diastereoméricos por HPLC semipreparativo.

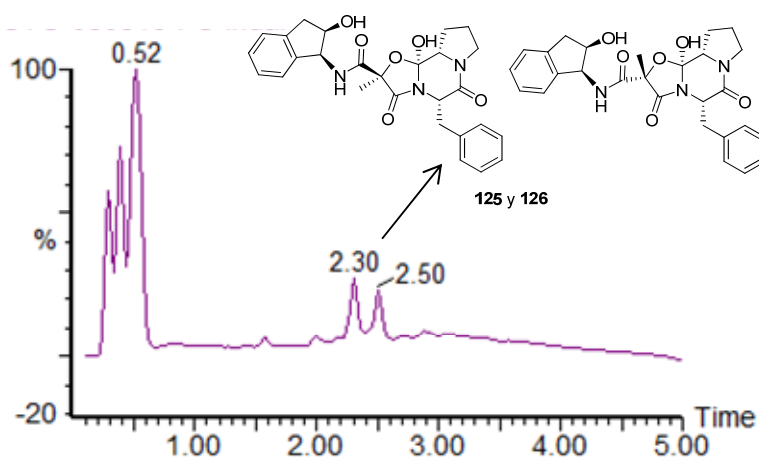


Figura 40. Análisis cromatográfico del crudo correspondiente a los híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol-peptina **125** y **126**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

A diferencia de los híbridos con indoloquinolicidina, los crudos de reacción obtenidos en este caso para los tres derivados (X = H, OH y OMe) fueron más limpios, probablemente debido a la menor dificultad sintética y estructural de este tipo de compuestos.

Tras purificar y separar los diastereoisómeros, se llevó a cabo el análisis por RMN de los compuestos **125** y **126** mediante experimentos de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, los cuales permitieron confirmar que se trataba de los productos deseados. Sin embargo, no se pudo identificar cada uno de los diastereoisómeros de manera inequívoca. En la Tabla 6 se indican los rendimientos de reacción finales y la pureza cromatográfica de los derivados obtenidos tras la purificación. En todos los casos, fue posible separar los correspondientes diastereoisómeros.

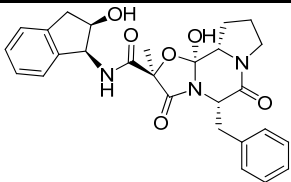
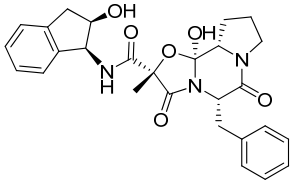
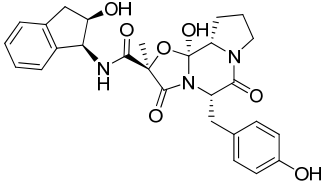
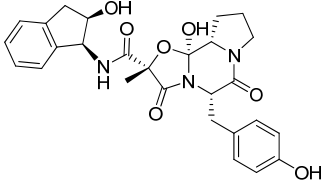
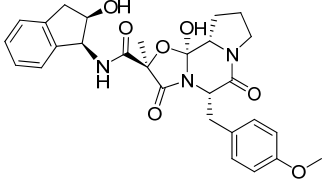
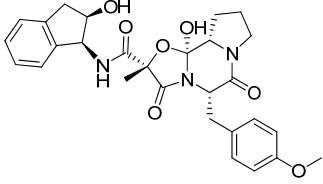
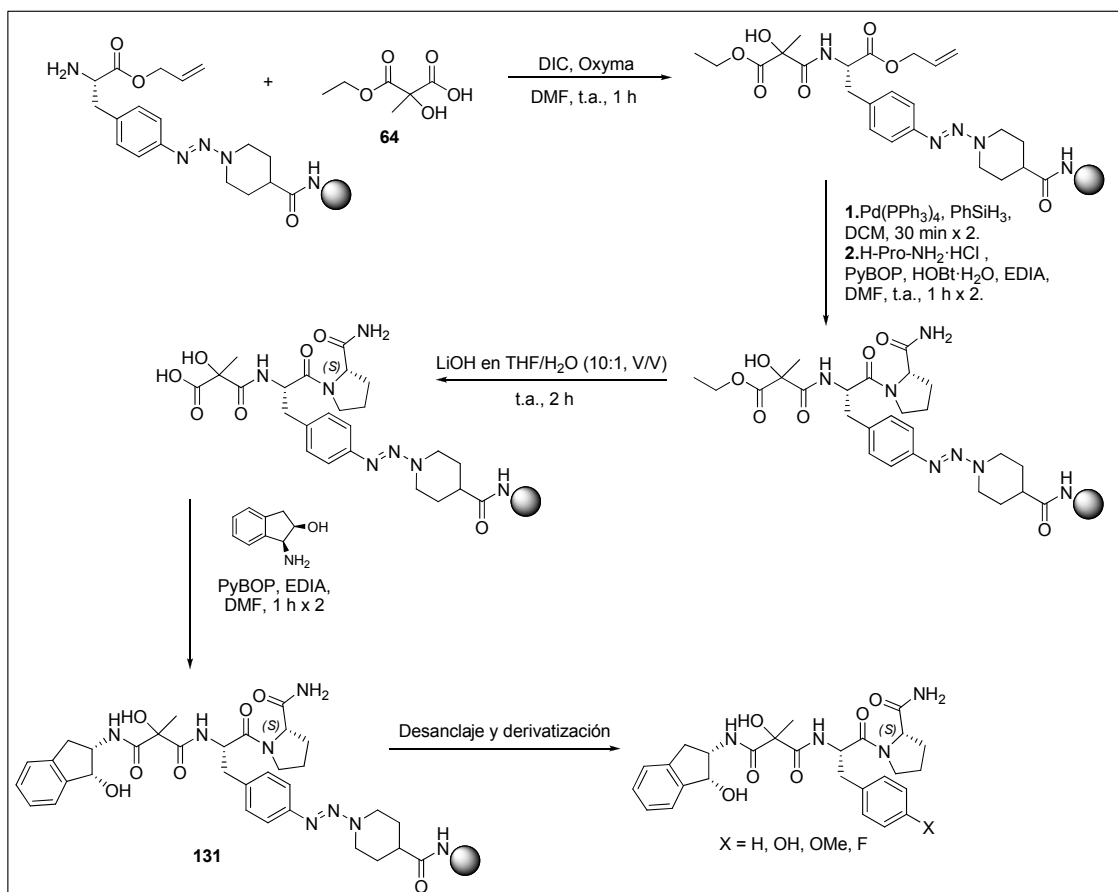
Compuesto	t _R (min)*	Estructura	Pureza (%)	Rendimiento (%)
125	2.30		99	10
126	2.50		94	13
127	1.98		93	4
128	2.17		98	2
129	2.30		98	9
130	2.50		93	4

Tabla 6. Rendimientos y purezas de la quimioteca de híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y análogos de peptinas. Purezas determinadas por integración de los picos en el análisis cromatográfico a 220 nm. (*Las condiciones cromatográficas utilizadas se muestran en el apartado 5.1.3 de la parte experimental)

3.2. Síntesis de la quimioteca de híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptinas

La síntesis de la quimioteca de híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptinas se llevó a cabo según el siguiente esquema sintético.



Esquema 25. Síntesis en fase sólida de híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y precursor lineal de peptina

La síntesis de cada uno de los derivados de la quimioteca se realizó partiendo de la aminoacil-resina **33**, con un rendimiento de incorporación de la fenilalanina del 75 %, determinado por cuantificación de grupos Fmoc. En primer lugar, se eliminó el grupo protector Fmoc de la fenilalanina en medio básico, utilizando piperidina en DMF (20%, V/V) y a continuación, se incorporó el ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico racémico **64** previamente sintetizado, utilizando una carbodiimida (DIC) como agente de acoplamiento, en presencia de Oxyma[®] como aditivo y DMF como disolvente. Seguidamente, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo de la fenilalanina con el complejo Pd(PPh₃)₄ en presencia de PhSiH₃ y, tras esta etapa, se

incorporó el derivado de prolina comercial H-Pro-NH₂·HCl utilizando la sal de fosfonio PyBOP como agente de acoplamiento, en presencia de HOBt·H₂O como aditivo, EDIA y DMF como disolvente. Para acoplar el (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol fue necesario hidrolizar primero el éster del malonato incorporado, proceso que se llevó a cabo utilizando LiOH en THF:H₂O (10:1, V/V) durante 2 h de reacción. Acto seguido, se incorporó el (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol comercial utilizando la sal de fosfonio PyBOP, HOBt·H₂O y EDIA en DMF. Este procedimiento se llevó a cabo dos veces para asegurar que el acoplamiento fuera cuantitativo. La peptidil-resina resultante **131** se utilizó para sintetizar los diferentes híbridos de la quimioteca.

De la misma manera que se hizo en el caso de los híbridos de indoloquinolidina, la quimioteca de híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptina estuvo formada por cuatro derivados, los correspondientes a la fenilalanina no modificada y los que contenían las funcionalizaciones OH, OMe y F en la posición *para* del anillo aromático, para poder comparar así la actividad biológica en receptores de adenosina, serotonina y dopamina con la de los correspondientes híbridos de análogos de peptinas. La obtención de cada uno de los derivados se realizó siguiendo las mismas condiciones de reacción descritas con anterioridad para obtener cada tipo de funcionalización (Esquema 14).

Una vez obtenidos, los crudos de reacción se analizaron por HPLC-MS, detectándose en todos los casos el producto deseado. En la Figura 41 se muestra como ejemplo el cromatograma del crudo de reacción del derivado fluorado **135**.

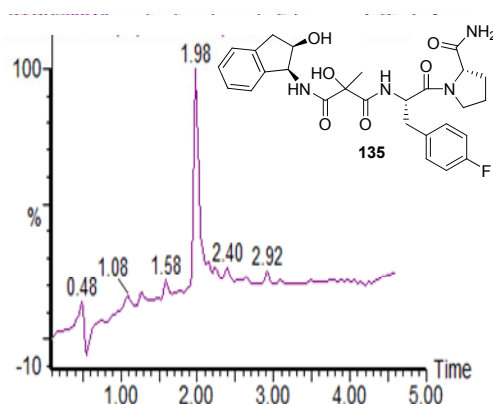


Figura 41. Análisis cromatográfico del crudo de reacción de la síntesis del derivado fluorado **135**. Condiciones cromatográficas: (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm).

Cada uno de los crudos obtenidos se purificó por HPLC semipreparativo y los productos resultantes se caracterizaron por HPLC-MS. Además, se llevó a cabo el análisis por RMN del derivado fluorado **135** para confirmar la identidad del producto, detectándose señales de ^1H y ^{13}C dobles para un mismo núcleo, correspondientes a los diastereoisómeros resultantes de la utilización del α -hidroximalonato monohidrolizado **64** racémico. De la misma forma que para el resto de precursores lineales sintetizados, los diastereoisómeros no pudieron separarse y se utilizaron como mezclas para la determinación de la actividad biológica de los diferentes derivados.

En la Tabla 7 se muestran los rendimientos globales de síntesis y la pureza cromatográfica de cada una de las mezclas de diastereoisómeros.

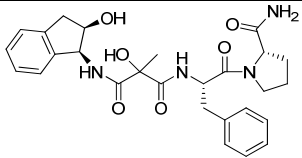
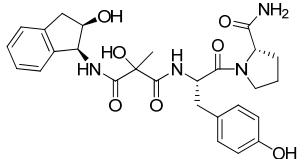
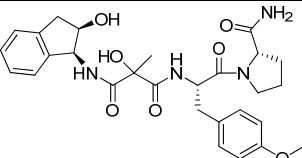
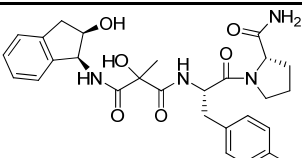
Compuesto	t_R (min)*	Estructura	Pureza (%)	Rendimiento (%)
132	2.22		100	82
133	1.88		97	66
134	2.22		96	48
135	2.27		94	42

Tabla 7. Rendimientos y purezas de la quimioteca de híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptinas. Purezas determinadas por integración de los picos en el análisis cromatográfico a 220 nm. (*Las condiciones cromatográficas utilizadas se muestran en el apartado 5.2.4 de la parte experimental)

4. ENSAYOS BIOLÓGICOS

Las afinidades de los 44 compuestos de las quimiotecas en receptores de adenosina, dopamina y serotonina se evaluaron mediante ensayos de competición con ligandos radioactivos en la Plataforma de Screening de Fármacos USEF, de la Universidad de Santiago de Compostela, dirigida por la Dra. Mabel Loza. Estos experimentos se realizaron utilizando membranas procedentes de distintas líneas celulares, donde todos los receptores a estudiar se encuentran expresados. Se realizó la evaluación de los diferentes compuestos con el objetivo de valorar los efectos relacionados con la estructura de los mismos (cíclica o lineal) y la presencia de distintas estructuras privilegiadas (indoloquinolicidinas **70** y **71** y el (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol) en su actividad biológica.

Las membranas procedentes de diferentes líneas celulares se incubaron en presencia de 47 compuestos (los 44 compuestos de las quimiotecas sintetizadas y las correspondientes estructuras privilegiadas como controles: las indoloquinolicidinas **70** y **71** y el (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol) a una concentración determinada del ligando radioactivo correspondiente según el subtipo de receptor analizado.

Las afinidades de los compuestos se evaluaron en los receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, en el receptor de dopamina D₂ y en los receptores de serotonina 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆ y 5-HT₇, y en el transportador de serotonina hSERT, todos ellos humanos. Las condiciones de los ensayos de competición con ligando radioactivo se muestran en la Tabla 8.

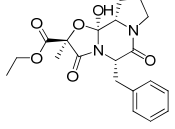
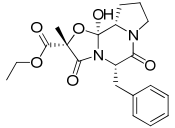
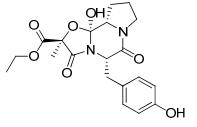
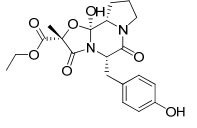
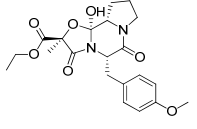
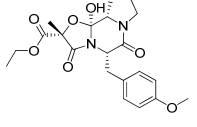
Receptor	Línea celular	Ligando radioactivo	Unión inespecífica	t _{incub} (min)
A ₁	Euroscreen	[³ H]-DPCPX (2 nM)	R-PIA 10 μM	60
A _{2A}	Hela	[³ H]-ZM241385 (3 nM)	NECA 50 μM	30
A _{2B}	Euroscreen	[³ H]-DPCPX (25 nM)	NECA 1000 μM	30
A ₃	Hela	[³ H]-NECA (30 nM)	R-PIA 100 μM	180
D ₂	CHO-D ₂ #S20	[³ H]-Spiperona (0.2	Sulpirida 10 μM	120

		nM)		
5-HT_{1A}	HEK-5-HT _{1A}	[³ H]-8-Hydroxy-DPAT (2 nM)	Serotonina 10 μM	120
5-HT_{1B}	Hela 5-HT _{1B}	[³ H]-GBR125743 (1.5 nM)	GR 55562 10 μM	90
5-HT_{2A}	CHO 5-HT _{2A}	[³ H]-Ketanserina (1 nM)	Metisergida 1 μM	30
5-HT_{2B}	CHO 5-HT _{2B}	[³ H]-LSD (1 nM)	5-HT 50 μM	30
5-HT_{2C}	Hela 5-HT _{2C}	[³ H]-Mesulergina (2 nM)	Mianserina 10 μM	60
5-HT₆	HEK-5-HT ₆	[³ H]-LSD (2 nM)	Serotonin 100 μM	60
5-HT₇	HEK-5-HT ₇	[³ H]-SB269970 (2 nM)	Clozapine 25 μM	60
hSERT	Human Serotonine Transporter	[³ H]-Imipramine (4 nM)	Imipramine 200 μM	30

Tabla 8. Condiciones de los ensayos de competición con ligando radioactivos

A continuación, se adjuntan las tablas donde se muestran los resultados obtenidos de los ensayos de competición de radioligando de los compuestos de las quimiotecas sintetizadas en los diferentes receptores estudiados.

4.1. Quimioteca de análogos de peptinas

Compuesto	t _R (min)	Estructura	% inhibición (10 μM)											
			A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃	D ₂	5-HT _{1A}	5-HT _{1B}	5-HT _{2B}	5-HT _{2C}	5-HT ₆	5-HT ₇	hSERT
82	6.17		15±4	1±1	3±3	1±1	4±2	4±1	7±4	3±1	2±2	3±2	19±1	2±2
83	6.67		2±1	2±2	7±4	13±4	4±3	2±1	3±1	1±1	22±4	2±2	20±3	1±1
84	5.15		2±2	3±2	11±2	1±1	3±1	1±1	3±1	1±1	3±2	1±1	1±1	1±1
85	5.42		1±1	2±2	2±2	2±2	1±1	1±1	2±1	1±1	1±1	2±1	3±2	1±1
86	5.97		3±1	1±1	1±1	7±3	1±1	1±1	3±2	1±1	5±1	2±2	15±3	2±1
87	6.17		1±1	1±1	13±1	26±1	2±2	3±2	2±2	2±1	2±2	1±1	2±1	1±1

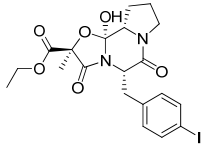
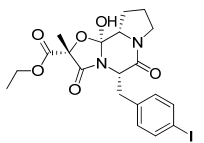
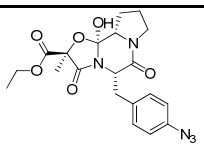
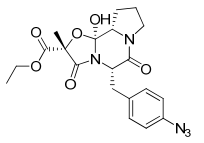
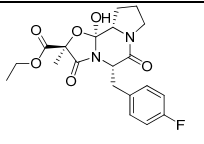
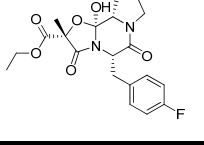
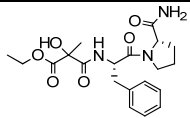
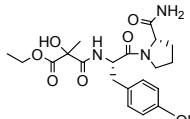
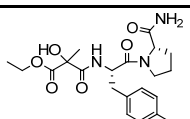
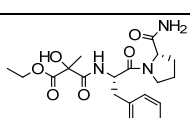
88	2.83		3±2	1±1	13±1	3±2	2±1	3±1	15±4	1±1	11±4	1±1	19±3	3±1
89	2.97		1±1	1±1	10±3	2±2	2±1	1±1	3±2	2±2	10±2	3±1	2±2	2±1
90	2.67		7±3	1±1	9±4	1±1	3±3	2±1	4±3	1±1	2±1	6±3	15±1	4±2
91	2.80		7±4	2±1	8±2	1±1	1±1	2±2	1±1	3±2	5±3	4±3	7±4	2±2
92	6.42		2±2	2±2	3±3	2±2	3±1	1±1	1±1	2±1	4±3	4±2	14±4	3±2
93	6.87		1±1	3±2	1±1	1±1	3±2	1±1	2±1	1±1	2±2	10±4	3±1	1±1

Tabla 9. Porcentajes de inhibición de los análogos de peptinas con los receptores estudiados a una concentración de 10 μ M de ligando

En líneas generales, y tal y como se muestra en la Tabla 9, se ha encontrado que, a una concentración de 10 μ M de ligando, los análogos de peptina no dan lugar a desplazamientos de radioligando relevantes, siendo los porcentajes de inhibición menor del 50 % en todos los casos. Los

mejores resultados se han observado con el análogo de peptina metoxilado **87** con el receptor de adenosina A₃, que presenta un porcentaje de inhibición del 26 % y con el derivado no modificado **83** con los receptores de serotonina 5-HT_{2C} y 5-HT₇, con unos porcentajes de inhibición del 22 y 20 % respectivamente.

4.2. Quimioteca de precursores lineales de peptinas

Compuesto	t _R (min)	Estructura	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃	D ₂	5-HT _{1A}	5-HT _{1B}	5-HT _{2B}	5-HT _{2C}	5-HT ₆	5-HT ₇	hSERT
			% inhibición (10 μM)											
95	1.83		35±4	1±1	24±2	1±1	3±2	3±1	1±1	5±3	14±4	2±2	6±3	1±1
96	1.47		1±1	2±2	19±2	1±1	1±1	1±1	3±2	1±1	17±3	1±1	9±4	1±1
97	1.85		3±2	2±1	25±2	11±4	2±1	1±1	2±2	1±1	1±1	2±1	20±4	1±1
98	2.28		2±2	3±1	18±3	3±2	2±1	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	2±2	2±1

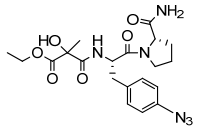
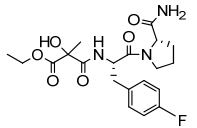
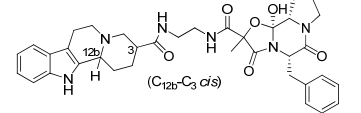
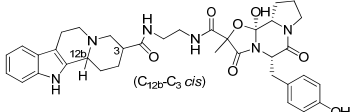
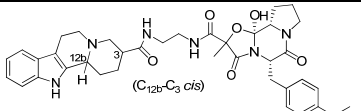
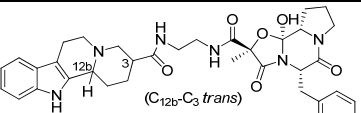
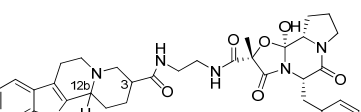
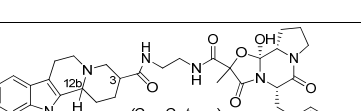
99	2.10		2±2	1±1	18±3	2±2	1±1	1±1	2±1	2±1	4±4	2±1	1±1	1±1
100	1.98		1±1	1±1	15±4	1±1	1±1	2±2	1±1	2±2	5±2	1±1	1±1	1±1

Tabla 10. Porcentajes de inhibición de los precursores lineales de peptinas con los receptores estudiados a una concentración de 10 μ M de ligando

Considerando los resultados que se muestran en la Tabla 10, a una concentración de 10 μ M de ligando, los precursores lineales de peptinas no muestran una actividad biológica relevante ante los receptores estudiados, siendo el mayor porcentaje de inhibición del 35 % en el caso de la mezcla diastereomérica **95** con el receptor A_1 y del 25 y 20 % para el derivado metoxilado **97** con los receptores A_{2A} y 5-HT₇, respectivamente. Como en el caso de los análogos de peptinas, a pesar de que los resultados obtenidos no son muy significativos, los porcentajes de inhibición más elevados corresponden a los derivados no modificados y al derivado metoxilado con receptores de adenosina y serotonina.

4.3. Quimioteca de híbridos indoloquinolidina y análogos de peptinas

t _R (min)	Estructura	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃	D ₂	5-HT _{1A}	5-HT _{1B}	5-HT _{2B}	5-HT _{2C}	5-HT ₆	5-HT ₇	hSERT	
		% inhibición (10 μM)												
105	1.80		3±3	3±3	14±4	14±4	16±2	< 80	6±1	13±4	27±1	< 80	9±3	32±1
106	1.55		10±1	1±1	2±2	1±1	13±2	42±2	12±4	22±3	23±1	42±1	16±2	36±3
107	1.83		5±1	1±1	3±1	11±2	1±1	< 80	1±1	18±1	10±4	40±4	4±4	34±4
108*	4.95		5±1	1±1	29±4	14±2	40±4	3±3	48±4	< 80	44±2	33±4	23±3	45±4
109*	5.10		6±3	12±2	5±3	4±2	17±1	< 80	27±3	< 80	15±3	< 80	29±3	37±4
110	4.43		6±3	44±4	10±4	3±3	13±2	< 80	15±1	35±2	15±2	54±3	39±3	2±2

111*	5.03		5±3	20±1	24±1	1±1	3±2	< 80	30±4	34±1	26±3	57±1	43±4	9±3
112*	5.12		1±1	3±2	5±1	3±2	2±1	< 80	14±4	21±2	2±2	5±1	35±4	1±1
70			13±1	21±3	7±4	1±1	4±3	20±4	31±4	48±1	30±4	5±3	32±3	20±4
71			9±2	2±1	2±2	2±2	2±2	6±1	19±4	26±3	4±3	4±4	29±1	6±1

*No se logró identificar inequívocamente qué mezcla de diastereoisómeros correspondía a cada t_R (**108** y **109** entre sí y **111** y **112** entre sí)

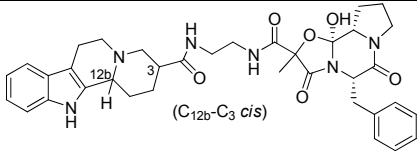
Tabla 11. Porcentajes de inhibición de los híbridos indoloquinolicidina y análogos de peptinas con los receptores estudiados a una concentración de 10 μ M de ligando

En líneas generales, los resultados de los ensayos de competición con ligandos radioactivos obtenidos para los híbridos indoloquinolicidina y análogos de peptina con los diferentes receptores de adenosina, dopamina y serotonina son mejores que los obtenidos para los análogos de peptinas, lo cual indica la influencia de la presencia de la indoloquinolicidina como estructura privilegiada favoreciendo la actividad biológica de los mismos.

A una concentración 10 μM de ligando, los compuestos ensayados no muestran desplazamientos de radioligando relevantes con los receptores de adenosina. Los mejores resultados se han observado con el receptor A_{2A} , obteniéndose porcentajes de inhibición del 44 % en el caso del compuesto hidroxilado **110** y del 20 % en el compuesto metoxilado **111**, ambos con indoloquinolicidina con configuración relativa *trans*. Por lo que respecta al receptor A_{2B} los mejores resultados se han observado con el híbrido no modificado **108** (29%) y con el derivado metoxilado **111** (24 %), también con indoloquinolicidina con configuración relativa *trans*.

Por lo que respecta a los resultados obtenidos para el receptor de dopamina D_2 éstos no son muy relevantes, observándose porcentajes de inhibición, en general, bajos (>20 %), a excepción del derivado no modificado con indoloquinolicidina *trans* **108**, que fue del 40 %.

En el caso de los receptores de serotonina, a una concentración 10 μM de ligando, se obtuvieron porcentajes de inhibición superiores al 80 % con los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₆, en estos casos se calculó la K_i (Tabla 12), sin embargo, los resultados obtenidos no son del todo satisfactorios. Los mejores resultados se obtuvieron con los compuestos **108** ($K_i = 3133.5$ nM) con el receptor 5-HT_{2B} y **105** ($K_i = 2487.9$ nM) con el receptor 5-HT₆ y el compuesto 109 ($K_i = 1919.8$ y 1585.8 nM) con los receptores 5-HT_{2B} y 5-HT₆ respectivamente. En líneas generales, los híbridos con indoloquinolicidina con configuración relativa *trans* son más activos con estos receptores que los que tienen indoloquinolicidina con configuración relativa *cis*.

Compuesto	Estructura	5-HT _{1A}	5-HT _{2B}	5-HT ₆
105	 (C _{12b} -C ₃ <i>cis</i>)	297.9	-	2487.9

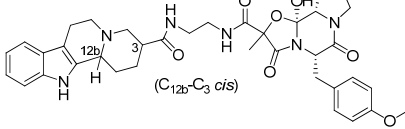
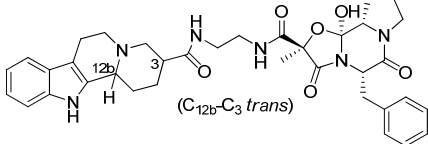
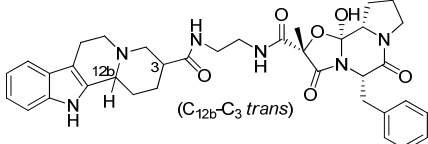
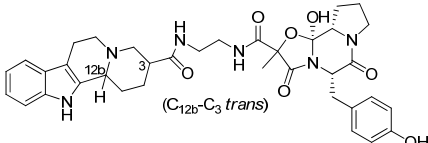
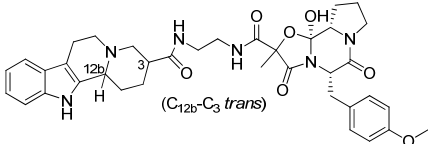
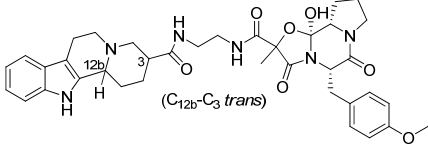
107	 (C _{12b} -C ₃ cis)	1099	-	-
108	 (C _{12b} -C ₃ trans)	-	3133.5	-
109	 (C _{12b} -C ₃ trans)	109.8	1919.8	1585.8
110	 (C _{12b} -C ₃ trans)	213.1	-	-
111	 (C _{12b} -C ₃ trans)	214.6	-	-
112	 (C _{12b} -C ₃ trans)	2261.5	-	-

Tabla 12. Valores de K_i (nM) en los híbridos indoloquinolizidina y análogos de peptinas con los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₆

Para el transportador de serotonina hSERT, se observaron porcentajes de inhibición del 32-45 %, siendo el mejor resultado el obtenido para el derivado no modificado **108** (45 %).

Por tanto, cabe señalar que los híbridos indoloquinolidina y análogos de peptina son algo más activos, especialmente con los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₆ y el transportador hSERT, que sus correspondientes análogos sin indoloquinolidina, obteniéndose mejores porcentajes de inhibición, en general, cuando la indoloquinolidina tenía configuración relativa *trans*. Por otra parte, se ha observado que, en líneas generales, la presencia de modificaciones en el anillo de fenilalanina no mejora notablemente la actividad de los híbridos en los receptores estudiados.

4.4. Quimioteca de híbridos indoloquinolidina y precursores lineales de peptinas

Compuesto	t _R (min)	Estructura	% inhibición (10 μM)											
			A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃	D ₂	5-HT _{1A}	5-HT _{1B}	5-HT _{2B}	5-HT _{2C}	5-HT ₆	5-HT ₇	hSERT
115	1.80		1±1	2±2	1±1	2±1	2±2	1±1	6±3	13±1	8±3	1±1	23±3	43±3
116	1.55		2±1	35±4	15±3	1±1	1±1	6±1	26±4	12±3	2±2	1±1	16±3	31±4
117	1.83		1±1	13±4	11±4	4±1	1±1	4±2	3±3	4±4	1±1	2±1	29±3	46±2

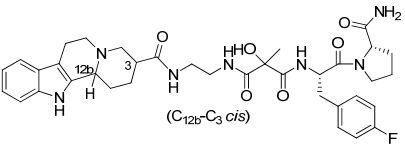
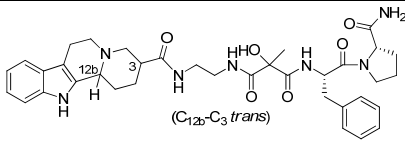
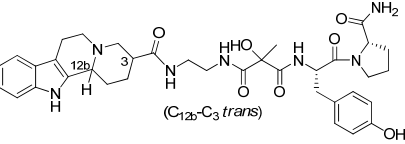
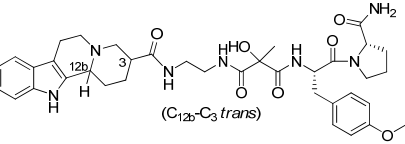
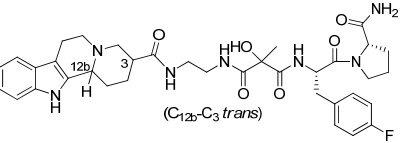
118	4.95		3±1	15±3	12±4	2±2	3±2	25±1	34±4	23±1	1±1	1±1	52±3	38±4
119	5.10		6±3	3±1	6±1	1±1	11±1	< 80	61±4	67±1	12±4	4±1	< 80	5±1
120	4.43		3±3	22±4	14±3	1±1	12±1	51±3	39±4	37±1	12±2	1±1	< 80	31±4
121	5.03		1±1	36±2	4±1	3±2	7±4	49±3	55±2	57±1	11±1	7±3	< 80	3±1
122	5.12		4±3	28±3	16±4	2±1	1±1	13±1	24±4	20±4	17±1	2±1	43±1	4±3

Tabla 13. Porcentajes de inhibición de los híbridos indoloquinolidina y precursores lineales de peptinas con los receptores estudiados a una concentración de 10 µM de ligando

Primeramente, cabe destacar que, como en el caso anterior, la presencia del anillo de indoloquinolicidina en los precursores lineales de peptinas da lugar, en general, a compuestos más activos e los receptores estudiados que sus correspondientes análogos sin indoloquinolicidina.

Por lo que respecta a los receptores de adenosina, a una concentración 10 μ M de ligando, los resultados obtenidos no han sido muy relevantes, siendo los porcentajes de inhibición más elevados del orden del 36 % (productos **121** y **116**) en el receptor A_{2A}.

En el caso del receptor de dopamina D₂, se han observado porcentajes de inhibición bajos (>20 %), por lo que estos compuestos no son activos con este receptor.

Por otra parte, se han obtenido mejores resultados para los receptores de serotonina, observándose, en algunos casos, porcentajes de inhibición superiores al 80 %. Los productos **119**, **120** y **121**, todos ellos con indoloquinolicidina con configuración relativa *trans* han mostrado ser los más activos, a excepción del derivado fluorado **122**, que da lugar a porcentajes de inhibición alrededor del 20 % en estos tres receptores. Por lo que respecta al receptor 5-HT₆, los resultados han sido muy poco relevantes en todos los casos, con porcentajes de inhibición > 20 %. En el caso del receptor 5-HT₇ se han observado porcentajes de inhibición alrededor del 50 % con los compuestos fluorados **118** (con indoloquinolicidina *cis*, 52 %) y **122** (con indoloquinolicidina *trans*, 47 %). Por tanto, en este caso, la presencia de flúor en el anillo de fenilalanina sí que ha sido relevante en este caso, a diferencia del tipo de diastereoisómero de indoloquinolicidina presente, dado que en ambos casos, los porcentajes de inhibición son similares.

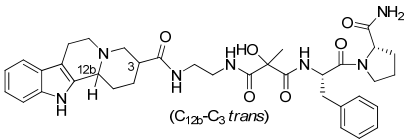
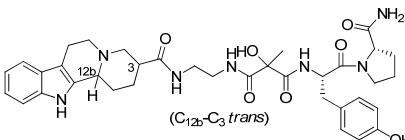
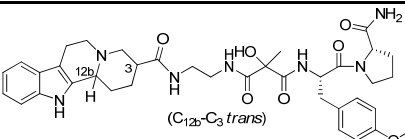
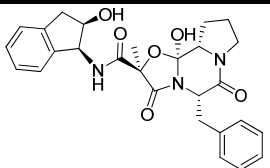
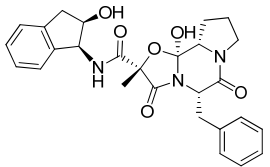
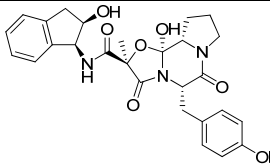
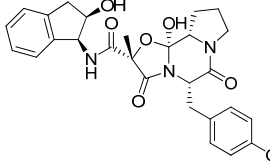
Compuesto	Estructura	5-HT _{1A}	5-HT ₇
119	 (C _{12b} -C ₃ trans)	1450.8	1657.7
120	 (C _{12b} -C ₃ trans)	-	1756.8
121	 (C _{12b} -C ₃ trans)	-	2152.6

Tabla 14. Valores de K_i (nM) en los híbridos indoloquinolidina y precursores lineales de peptinas con los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇

Por último, y de la misma manera que para los correspondientes análogos cíclicos, estos compuestos parecen ser más activos con el transportador hSERT que con otros receptores, obteniéndose porcentajes de inhibición del 46-31 %, siendo los más elevados los obtenidos para los análogos con indoloquinolidina con configuración *cis* (**117** (46 %) y **115** (43 %)).

4.5. Quimioteca de híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y análogos de peptinas

Compuesto	t_R (min)	Estructura	% inhibición (10 μ M)											
			A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃	D ₂	5-HT _{1A}	5-HT _{1B}	5-HT _{2B}	5-HT _{2C}	5-HT ₆	5-HT ₇	hSERT
125	2.30		2±2	49±3	17±2	1±1	1±1	3±3	2±2	15±1	8±1	4±3	16±3	1±1
126	2.50		5±2	2±2	9±2	1±1	1±1	1±1	1±1	6±3	2±2	3±3	14±3	1±1
127	1.98		7±4	8±3	1±1	16±4	2±1	2±2	3±2	16±3	12±2	10±3	20±4	3±2
128	2.17		10±1	30±4	13±4	9±2	1±1	2±1	27±4	16±3	47±4	3±2	36±3	4±2

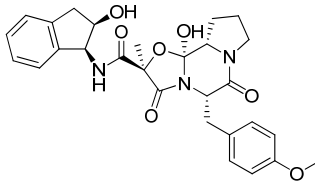
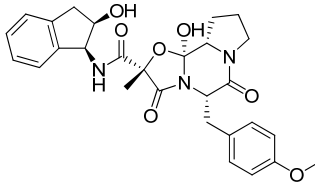
129	2.30		1±1	3±2	10±2	2±1	2±1	2±1	2±1	3±3	4±1	1±1	11±2	1±1
130	2.50		4±1	11±4	7±1	1±1	3±3	3±1	1±1	3±1	11±4	1±1	26±4	3±3

Tabla 15. Porcentajes de inhibición de los híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y análogos de peptinas con los receptores estudiados a una concentración de 10 μ M de ligando

En líneas generales, en el caso de los híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y peptinas se ha encontrado que, a una concentración 10 μ M de ligando, estos compuestos no presentan desplazamientos de radioligando relevantes en todos los receptores estudiados dado que los porcentajes de inhibición obtenidos han sido inferiores al 50 %.

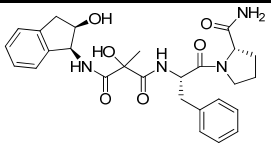
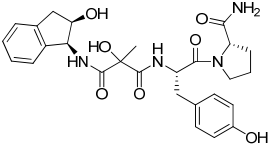
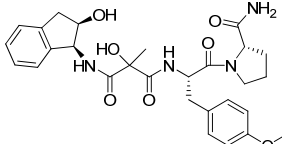
Los mejores resultados se han obtenido con el receptor de adenosina A_{2A}, donde se han observado unos porcentajes de inhibición del 49 % en el híbrido no modificado **125** y del 30 % en el caso del híbrido hidroxilado **128**.

Respecto a los receptores de serotonina, los mejores resultados se han obtenido con el diastereoisómero hidroxilado **128**, que ha presentado un porcentaje de inhibición del 47 % con el receptor 5-HT_{2C}, 36 % para 5-HT₇ y del 27 % con 5-HT_{1B}. Por lo tanto, la presencia de la modificación en el anillo de fenilalanina, es importante en la actividad biológica de este derivado.

En el resto de receptores estudiados, los resultados obtenidos han sido poco relevantes, obteniéndose porcentajes de inhibición de cómo máximo el 20 %.

Llegados a este punto y, a diferencia de los híbridos análogos con indoloquinolidina, cabe indicar que la presencia de la estructura privilegiada de indanol no favorece notablemente la actividad de los compuestos ensayados en los receptores estudiados. No obstante, en general, los porcentajes de inhibición encontrados son más elevados que los obtenidos en los análogos de peptina correspondientes.

4.6. Quimioteca de híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptinas

Compuesto	t_R (min)	Estructura	% inhibición (10 μ M)											
			A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃	D ₂	5-HT _{1A}	5-HT _{1B}	5-HT _{2B}	5-HT _{2C}	5-HT ₆	5-HT ₇	hSERT
132	2.22		6±1	47±4	17±2	1±1	4±2	3±2	17±3	1±1	2±1	1±1	3±2	2±2
133	1.88		1±1	1±1	18±4	6±4	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	2±2	7±1	3±2
134	2.22		2±2	46±2	17±4	1±1	2±2	2±2	1±1	3±2	2±2	4±2	2±2	1±1

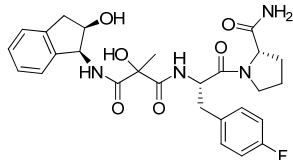
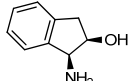
135	2.27		3±2	2±2	15±3	2±2	1±1	1±1	3±2	3±1	3±1	1±1	1±1	1±1
			8±1	32±1	1±1	1±1	2±1	3±1	2±2	1±1	1±1	7±4	44±1	1±1

Tabla 16. Porcentajes de inhibición de los híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptinas con los receptores estudiados a una concentración de 10 μ M de ligando

Considerando los resultados obtenidos para los híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptinas en los ensayos de competición de radioligando en los diferentes receptores estudiados se puede concluir que, de la misma manera que ocurre con los análogos cíclicos correspondientes, los productos presentan porcentajes de inhibición inferiores al 50 %, por lo que no son especialmente activos en estos receptores.

Sin embargo, cabe indicar que los mejores resultados se han obtenido con el receptor de adenosina A_{2A} , siendo el porcentaje de inhibición para el híbrido no modificado **132** del 47 % y del 46 % para el producto metoxilado **134**. Comparando estos resultados con los obtenidos para los correspondientes análogos cíclicos, es preciso indicar que la estructura lineal de estos compuestos favorece la actividad biológica de los mismos respecto a la estructura cíclica.

Por lo que respecta al resto de receptores, los productos **132-135** han mostrado tener una baja capacidad de inhibición, dado que los porcentajes de inhibición son inferiores al 20 %.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Lagerstrom, M. C.; Schioth, H. B. Structural diversity of G-protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Disc.*, **2008**, *7*, 339-357.
- ² Pierce, K. L.; Premont, R. T.; Lefkowitz, R. J. Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2002**, *3*, 639-650.
- ³ Clare, E. The estate of GPCR research in 2004. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2004**, *3*, 577-626.
- ⁴ George, S. R.; O'Dowd, B. F.; Lee, S. P. G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Disc.*, **2002**, *1*, 808-820.
- ⁵ Bridges, T. M.; Lindsley, C. W. G-Protein-Coupled Receptors: From Classical Modes of Modulation to Allosteric Mechanisms. *ACS Chem. Biol.*, **2008**, *3*, 530-541.
- ⁶ Levoye, A.; Dam, J.; Ayoub, M.A.; Guillaume J. L.; Jockers, R. Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO Reports*, **2006**, *7*, 1094-1098.
- ⁷ Milligan G. G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance. *Drug Discovery Today*, **2006**, *11*, 541-549.
- ⁸ Bernstein, K. E. Views of the renin-angiotensin system: brillling, mimsy and slithy tove. *Hypertension*, **2006**, *47*, 509-514.
- ⁹ Gomes, I.; Gupta, A.; Filipovska, J.; Szeto, H. H.; Pintar, J. E.; Devi, L. A. A role for heterodimerization of μ - and δ - opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **2004**, *101*, 5135-5139.
- ¹⁰ Vassilatis, D. K.; Hohmann, J.G. ; Zeng, H.; Li, F.; Ranchalis, J. E.; Mortrud, M. T.; Brown, A.; Rodríguez, S. S.; Weller, J. R.; Wright, A. C.; Bergmann, J. E.; Gaitanaris, G. A. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 4903-4908.
- ¹¹ Ribeiro, J. A.; Sebastiao, A. M.; de Mendonça, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Progress in Neurobiology*, **2003**, *68*, 377-392.
- ¹² Munshi, R.; Pang, I. H.; Sternweis, P. C.; Linden, J. A₁ adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins G_{i1}, G_{i2}, and G_o. *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 22285-22289.

- ¹³ Londos, C.; Cooper, D. M.; Wolff, J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **2000**, *77*, 2551-2554.
- ¹⁴ Ferré, S.; Fredholm, B. B.; Morelli, M.; Popoli, P.; Fuxe, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends in Neuroscience*, **1997**, *20*, 482-487.
- ¹⁵ Kull, B.; Svenningsson, P.; Fedholm, B. B. Adenosine A_{2A} receptors are colocalized with and activate G_{olf} in rat stratum. *Mol. Pharm.*, **2000**, *58*, 771-777.
- ¹⁶ Jacobson, K. A.; Gao, Z-G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Disc.*, **2006**, *5*, 247-264.
- ¹⁷ Missale, C.; Nash, S. R.; Robinson, S. W.; Jaber, M.; Caron, M. G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, **1998**, *78*, 189-225.
- ¹⁸ Wise, R. A. Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2004**, *5*, 1-12.
- ¹⁹ Nicola, S. M.; Surmeier, J.; Malenka, R. C. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the stratum and nucleus accumbens. *Annual Reviews Neurosci.*, **2000**, *23*, 185-215.
- ²⁰ Nichols, D. E.; Nichols, C. D. Serotonin Receptors. *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 1614-1641.
- ²¹ Jacoby, E.; Bouhelal, R.; Gerspacher, M.; Seuwen, K. The 7 TM G-Protein-Coupled Receptor Target Family. *ChemMedChem*, **2006**, *1*, 760-782.
- ²² Morphy, R.; Rankovic, Z. Designing multiple ligands-medicinal chemistry strategies and challenges. *Curr. Pharm. Des.*, **2009**, *15*, 587-600.
- ²³ Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 6523-6543.
- ²⁴ Morphy, R.; Kay, C.; Rankovic, Z. From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discovery Today*, **2004**, *9*, 641-651.
- ²⁵ Sorbera, L. A.; Castaner, J.; del Fresno, M.; Silvestre, J. Netoglitazone-Antidiabetic-PPAR alpha/PPAR gamma agonist. *Drug Future*, **2002**, *27*, 132-139.
- ²⁶ Jones, H. M.; Pilowsky, L. S. New targets for antipsychotics. *Expert. Rev. Neurother*, **2002**, *2*, 61-68.
- ²⁷ Eisen, S. A.; Miller, D. K.; Woodward, R. S.; Spitznagel, E.; Przy, T. R. The Effect of Prescribed Daily Dose Frequency on Patient Medication Compliance. *Arch. Int. Med.*, **1990**, *150*, 1881-1884.

- ²⁸ Frishman, W.H.; Zuckerman, A. L.; Amlopidine/atorvastatin: the first cross risk factor polypill for the prevention and treatment of cardiovascular diseases. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, **2004**, *2*, 675-681.
- ²⁹ Flores, N. A.; Ezetimibe + simvastatin (Merck/Schering-Plough). *Current Opinion in Investigational Drugs*, **2004**, *5*, 984-992.
- ³⁰ Wang, Z.; Vince, R. Synthesis of pyrimidine and quinolone conjugates as a scaffold for dual inhibitors of HIV reverse transcriptase and integrase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 1293-1296.
- ³¹ Liu, Z.; Chen, X.; Sun, P.; Yu, L.; Zhen, X.; Zhang, A. N-Propylnoraporphin-11-O-yl carboxylic esters as potent dopamine D₍₂₎ and serotonin 5-HT_(1A) receptor dual ligands. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 8335-8338.
- ³² Berque-Bestel, I.; Lezoualc'h, F.; Jockers, R. Bivalent ligands as specific pharmacological tools for G protein-coupled receptor dimmers. *Curr. Drug. Discov. Tech.*, **2008**, *5*, 312-318.
- ³³ Bhushan, R. G.; Sharma, S. K.; Xie, Z.; Daniels, D. J.; Portoghese, P. S. A bivalent ligand (KDN-21) reveals spinal delta and kappa opioid receptors are organized as heterodimers that give rise to delta(1) and kappa(2) phenotypes. Selective targeting of delta-kappa heterodimers. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 2969-2972.
- ³⁴ Portoghese, P.S. From models to molecules: opioid receptor dimers, bivalent ligands, and selective opioid receptors probes. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 2259-2269.
- ³⁵ Halazy, S.; Perez, M.; Fourier, C.; Pallard, I.; Pauwels, P.J.; Palmier, C.; John, G.W.; Valentin, J.P.; Bonnafous, R.; Martinez, J. Serotonin dimmers: application of the bivalent ligand approach to the design of new potent and selective 5-HT(1B/1D) agonists. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4920-4927.
- ³⁶ Moser, U.; Gubitza, C.; Galvan, M.; Immel-Sehr, A.; Lambrecht, G.; Mutschler, E. Aliphatic and heterocyclic analogues of arecaidine propargyl ester. Structure-activity relationships of mono- and bivalent ligands at muscarinic M₁, (M₄), M₂ and M₃ receptor subtypes. *Arzneimittelforschung*, **1995**, *45*, 449-455.
- ³⁷ Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; DiPardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S. Methods for drug discovery:

development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J. Med. Chem.*, **1988**, *31*, 2235-2246.

³⁸ Patchett, A. A.; Nargund, R. P. Privileged structures-An update. *Ann. Rep. Med. Chem.*, **2000**, *35*, 289-298.

³⁹ Klabunde, T.; Hessler, G. Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 929-944.

⁴⁰ Vendrell, M. Ligandos duales, una nueva estrategia para el desarrollo de agentes terapéuticos que interaccionen con GPCRs (Tesis doctoral), *Universitat de Barcelona*, **2007**.

⁴¹ Vendrell, M.; Soriano, A.; Casadó, V.; Díaz, J. L.; Lavilla, R.; Canela, E. I.; Lluís, C.; Franco, R.; Albericio, F.; Royo, M. Indoloquinolizidine-Peptide Hybrids as Multiple Agonists for D₁ and D₂ Dopamine Receptors. *ChemMedChem*, **2009**, *4*, 1514-1522.

⁴² Soriano, A.; Vendrell, M.; González, S.; Mallol, J.; Albericio, F.; Royo, M.; Lluís, C.; Canela, E.I.; Franco, R.; Cortés, A.; Casadó, V. A Hybrid Indoloquinolizidine Peptide as Allosteric Modulator of Dopamine D₁ Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2010**, *332*, 876-885.

⁴³ Molero, A.; Vendrell, M.; Bonaventura, J.; Zachmann, J.; López, L.; Pardo, L.; Lluís, C.; Cortés, A.; Albericio, F.; Casadó, V.; Royo, M. A solid-phase combinatorial approach for indoloquinolizidine-peptides with high affinity at D₁ and D₂ dopamine receptors. *Eur.J.Med.Chem.*, **2015**, *97*, 173-180.

⁴⁴ Vas, A.; Gulyas, B. Eburnamine derivatives and the brain. *Med.Res.Rev.*, **2005**, *25*, 737-757.

⁴⁵ Lounasmaa, M.; Tolvanen, A. The corynantheine-heteroyohimbine group. *Chemistry of heterocyclic compounds*, **1994**, *25* (Pt. 4, Suppl.), 57-159.

⁴⁶ Wenkert, E.; Chang, C. J.; Chawla, H. P. S.; Cochran, D. W.; Hagaman, E. W.; King, J. C.; Orito, K. General methods of synthesis of indole alkaloids. 14. Short routes of construction of yohimbooid and ajmalicinoid alkaloid systems and their carbon-13 nuclear magnetic resonance spectral analysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 3645.

⁴⁷ Dorfman, L.; Furlenmeier, A.; Huebner, C. F.; Lucas, R.; MacPhillamy, H. B.; Mueller, J. M.; Schlittler, E.; Schwyzer, R.; St. André, A. F.; Rauwolfia alkaloids. 8. The constitution of reserpine. *Helv. Chim. Acta*, **1954**, *37*, 59-75.

- ⁴⁸ Lounasmaa, M.; Saano, V.; Airaksinen, M. M.; Jokela, R.; Huhtikangas, A. Indoloquinolizidines, formal derivatives of tetrahydro- β -carboline, show selective affinity for benzodiazepine, truptamine and serotonin binding sites in rat brain. *Neuropharmacology*, **1986**, *25*, 915-918.
- ⁴⁹ Ward, T.; Crossley, R. Preparation of tetrahydrospiro(β -carboline-1,4-piperidine) derivatives and related compounds to form a chem.screening library for identification of ligands capable of binding to G-protein coupled receptors. *PCT Int.Appl.*, **2004**, WO 2004058263.
- ⁵⁰ Hoefgen, B.; Decker, M.; Mohr, P.; Schramm, A. M.; Rostom, S. A. F.; El-Subbagh, H.; Schweikert, P.M.; Rudolf, D.R.; Kassack, M.U.; Lehmann, J. Dopamine/serotonin receptor ligands. 10: SAR studies on azecine-type dopamine receptor ligands by functional screening at human cloned D₁, D_{2L} and D₅ receptors with a microplate reader based calcium assay lead to a novel potent D₁/D₅ selective antagonist. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 760-769.
- ⁵¹ Lin, J. H. Role of pharmacokinetics in the discovery and development of indinavir. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **1999**, *39*, 33-49.
- ⁵² Oldfield, V.; Keating, G. M.; Perry, C. M. Rasagiline: a review of its use in the management of Parkinson's disease. *Drugs*, **2007**, *67*, 1725-1747.
- ⁵³ Jelic, V.; Darreh-Shori, T. Donepezil: a Review of Pharmacological Characteristics and Role in the Management of Alzheimer Disease. *Clin. Med. Ins. Ther.*, **2010**, *2*, 771.
- ⁵⁴ Senanayake, C. H.; Gallou, I. cis-1-Amino-2-indanol in Drug Design and Applications to Asymmetric Processes. *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 2843-2874.
- ⁵⁵ Garner, G. B.; Rottinghaus, G. E.; Cornell, C. N.; Testereci, H. Chemistry of Compounds Associated with Endophyte Grass Interaction-Ergovaline-Related and Ergopeptine-Related Alkaloids. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **1993**, *44* (1-4), 65-80.
- ⁵⁶ Berde, B. Ergot compounds: a sinopsis. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **1980**, *23*, 3-23.
- ⁵⁷ Trabucchi, M.; Hofmann, M.; Montefusco, O.; Spano, P. F. Ergot alkaloids and cyclic nucleotides in the CNS. *Pharmacology*, **1978**, *24*, 150-155.
- ⁵⁸ Prasad, C. Bioactive Cyclic Dipeptides. *Peptides*, **1995**, *16*, 151-164.

- ⁵⁹ Baures, P.W.; Ojala, W. H.; Costain, W. J.; Ott, M. C.; Pradhan, A.; Gleason, W. B.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L. Design, synthesis and dopamine receptor modulating activity of diketopiperazine peptidomimetics of L-prolyl-L-leucylglycinamide. *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 3594-3600.
- ⁶⁰ Teixido, M.; Zurita, E.; Malakoutikhah, M.; Tarragó, T.; Giralt, E. Diketopiperazines as a tool for the study of transport across the blood-brain barrier (BBB) and their potential use as BBB-shuttles. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 11802-11813.
- ⁶¹ Stadler, P.A.; Guttman, S.; Hauth, H.; Huguenin, R. L.; Sandrin, E.; Wersin, G.; Willems, H.; Hofmann, A. The synthesis of alkaloids of the ergotoxin group.70. Section on ergot alkaloids. *Helv. Chim. Acta.*; **1969**, *52*, 1549-1564.
- ⁶² Molero, A. Multivalent Ligands as new pharmacological tools to study GPCRs interactions. The case of Adenosine and Dopamine Receptors (Tesis Doctoral). *Universitat de Barcelona*, Julio **2011**.
- ⁶³ Coriani, S.; Forzato, C.; Furlan, G.; Nitti, P.; Pitacco, G.; Ringholm, M.; Ruud, K. Synthesis, characterization and assignment of the absolute configuration of 4,4-dimethyl-5-oxo-tetrahydrofuran-3-carboxylic acid and its esters: a combined experimental and theoretical investigation. *Tetrahedron-Asymm.*, **2009**, *20*, 1459-1467.
- ⁶⁴ Komarova, E. L.; Tolkachev, O. N. Medicinal Plants. The chemistry of peptide ergot alkaloids. Part 1. Classification and chemistry of ergot peptides. *Pharm. Chem. J.*, **2001**, *35*, 504-513.
- ⁶⁵ Clark, C. R.; Wells, M. J. M.; Sanson, R. T.; Humerick, J. L.; Brown, W. B.; Commander, B. J. Effects of Intramolecular Hydrogen Bonding on Solute Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography. Elution Characteristics of Some Isomeric Benzamides. *J. Chromatogr. Sci.*, **1984**, *22*, 75-79.
- ⁶⁶ Wenkert, E.; Wickberg, J. General methods of synthesis of indole alkaloids. A synthesis of d,l-eburnamina. *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, *87*, 1580.
- ⁶⁷ Brewster, M.E.; Simay, A.; Czako, K.; Winwood, D.; Farag, H.; Bodor, N. Reactivity of biologically important reduced pyridines.4. Effect of substitution on ferricyanide-mediated oxidation rates of various 1,4-dihidropyridines. *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 3721-3726.
- ⁶⁸ Eisner, U.; Kuthan, J. Chemistry of dihydropyridines. *Chem. Rev.*, **1972**, *72*, 1-42.

CONCLUSIONES GENERALES

Se ha desarrollado una nueva metodología en fase sólida basada en la unión del aminoácido triptófano a un soporte polimérico a través de su cadena lateral mediante la formación de un enlace hemiaminal. Para formar el enlace hemiaminal se ha necesitado disponer del derivado Fmoc-Trp-OAlilo y de una resina funcionalizada con grupos dihidropiraniolo. Los mejores resultados se han obtenido utilizando la resina con base de poliestireno MBHA funcionalizada con grupos dihidropiraniolo.

La formación del enlace hemiaminal tiene lugar en presencia del ácido *p*-toluensulfónico y calefacción, obteniéndose mejores resultados utilizando condiciones convencionales de calefacción (80 °C, 16 h) que microondas (120 °C, 3 h). Si bien en ambos casos se han obtenido elevados porcentajes de incorporación del derivado de triptófano al soporte polimérico (75-83 %), la calefacción por microondas ha dado lugar a una unión inespecífica del triptófano a la resina, ya que en este caso se han obtenido porcentajes muy bajos de liberación del aminoácido.

Para demostrar su validez, la metodología desarrollada se ha utilizado para preparar la dicetopiperacina Brevianamida F, el octapéptido cíclico Axinelina B y el heptapéptido cíclico Unguisina A.

El paso clave para la preparación, tanto de la Brevianamida F como de la Axinelina B, ha sido la incorporación de uno de los aminoácidos de la secuencia peptídica (prolina) a través del extremo carboxilo del triptófano, para evitar que la etapa de ciclación tuviera lugar a través de una amina secundaria.

A diferencia del precursor lineal (que se obtuvo con un rendimiento de liberación cuantitativo), la liberación de la Axinelina B del soporte polimérico ha tenido lugar con bajos rendimientos (7-39 %). Sin embargo, los resultados han sido mucho mejores para la Unguisina A (52-71 %).

Se ha puesto a punto una nueva metodología basada en la unión de la cadena lateral de la fenilalanina al soporte polimérico mediante un enlace triaceno. Los mejores resultados de incorporación del aminoácido a la resina se han obtenido utilizando la resina MBHA funcionalizada con un espaciador de tipo piperacino (70-93 %), a

diferencia de la resina comercial piperacinetilpoliestireno, la cual ha dado lugar a rendimientos más bajos (10-64 %).

La formación del enlace triaceno ha tenido lugar entre el derivado de fenilalanina Fmoc-Phe(*p*NH₂)-OAlilo y el soporte polimérico por tratamiento con nitrito de *tert*-butilo y BF₃·Et₂O en presencia de piridina. De esta manera se han obtenido rendimientos de incorporación del aminoácido en un rango entre el 70 % y el 93 %.

La liberación del péptido de la resina se ha llevado a cabo con muy buenos rendimientos (74 %) utilizando ácido trifluoroacético a bajas concentraciones (2-5 %), y sulfato de hierro para reducir la sal de diazonio resultante del tratamiento acidolítico, obteniéndose de esta manera el producto deseado sin dejar traza en el punto de unión de la fenilalanina al soporte polimérico. La posible presencia de hierro en los crudos peptídicos se ha evaluado mediante un ensayo colorimétrico con tiocianato de amonio y cuando el ensayo ha sido positivo el metal se ha eliminado por tratamiento del crudo con una resina de intercambio iónico (Amberlite® IRC748).

La metodología desarrollada se ha utilizado para preparar derivados peptídicos de distinta naturaleza con buenos rendimientos que incluyen, la dicetopiperacina Esquizandroquina B (67 %), péptidos modificados en el extremo carboxilo (Ac-AAPF-pNA (19 %), el péptido biotinilado Ac-AAPF (32 %) y la Endomorfin-2 (38 %)), el heptapéptido cíclico Unguisina A (30 %) y derivados del péptido Hemorfina-7 protegidos en los extremos (35 y 32 %), que podrían ser útiles para síntesis convergente.

El depsipéptido cíclico Zigosporamida se ha escogido como péptido modelo para demostrar la utilidad del enlace triaceno como espaciador multifuncional, preparándose diferentes análogos con funcionalidades diversas en la posición *para* de la fenilalanina (H, OH, OMe, N₃, I y F). Estas modificaciones se han podido introducir en una única etapa, con desanclaje y derivatización simultáneas (F, OMe y N₃), o bien en dos etapas, es decir, desanclaje y derivatización (OH, H y I). La Zigosporamida y el resto de derivados se han sintetizado de manera satisfactoria con buenos rendimientos (H, (44 %), OH (34 %), OMe (25 %), N₃ (69 %), I (35 %) y F (50 %)) demostrando la

versatilidad de la estrategia y la compatibilidad de la misma con la presencia de funcionalidades químicas de carácter lábil, como puede ser un éster.

Se ha desarrollado una metodología en fase sólida para la síntesis de análogos de peptinas utilizando la cadena lateral de la fenilalanina como punto de unión reversible al soporte polimérico mediante una unión de tipo triaceno. La etapa clave de la síntesis ha sido la ciclación del derivado peptídico lineal para formar el sistema tricíclico de peptina. Para ello, se han llevado a cabo dos tratamientos con la base de tipo fosfaceno terc-butiliminio-tri(pirrolidino)fosforano (BTTP). La principal ventaja de la metodología sintética desarrollada ha sido que, tras el tratamiento básico, el compuesto de interés permanece anclado a la resina, por lo que se puede eliminar la mayor parte del exceso de base con sucesivos lavados y minimizar así el tiempo de interacción de ésta con el sistema tricíclico, inestable en estas condiciones.

Se ha podido comprobar por resonancia magnética nuclear que, tras la formación del sistema tricíclico, los centros quirales en el ciclo de la dicetopiperacina y en el carbono cuaternario del ciclo tienen configuración *S*, como ocurre en las peptinas naturales. Además, se han obtenido diferentes diastereoisómeros de los análogos de peptinas como consecuencia de utilizar una mezcla racémica del α -hidroximalonato como precursor del α -hidroxiaminoácido, que en algunos casos se han podido separar por cromatografía analítica.

El carácter multifuncional del enlace triaceno se ha aprovechado para generar mayor diversidad estructural. En este sentido, se ha podido preparar una quimioteca de análogos de peptina con diferentes funcionalizaciones en la posición *para* del anillo de fenilalanina. Las condiciones experimentales utilizadas para obtener todos los derivados, que incluyen los sustituyentes H, OH, OMe, N₃, I y F, han permitido mantener la integridad del sistema ciclólico, mostrando la compatibilidad de la metodología sintética desarrollada con este tipo de compuestos de estructura compleja.

Con objeto de evaluar la influencia del sistema tricíclico desde el punto de vista de la actividad biológica, se ha preparado una quimioteca de precursores lineales de los

análogos de peptina utilizando la estrategia sintética en fase sólida basada en el enlace triaceno.

En base a la misma estrategia sintética en fase sólida basada en el enlace triaceno, se ha abordado la preparación de ligandos bivalentes en los que se han incluido dos tipos de estructuras privilegiadas: la indoloquinolicidina y el (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol. Así, se han desarrollado metodologías para preparar híbridos indoloquinolicidina o (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y análogos de peptina. Además, se han considerado los precursores sintéticos del sistema tricíclico y se han preparado quimiotecas de indoloquinolicidina o (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptinas.

Se ha evaluado la actividad de los compuestos estimando su unión a diferentes GPCRs mediante ensayos de competición de radioligando, concretamente con los receptores de adenosina (A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃), dopamina (D₂), serotonina (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆ y 5-HT₇) y el transportador de serotonina hSERT. En general, ninguno de los compuestos evaluados ha mostrado una capacidad de unión elevada a los receptores ensayados. No se han observado en ningún caso grandes diferencias entre los análogos de peptinas cíclicos y los correspondientes precursores lineales, obteniéndose en ambos casos actividades poco relevantes. Por otra parte, la presencia de indoloquinolicidina en los híbridos con análogos de peptinas y con precursores lineales de peptinas, ha dado lugar a porcentajes de inhibición más elevados (en algunos casos superiores al 80 %), especialmente en los receptores de serotonina (5-HT_{1A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₆ y 5-HT₇) y en el transportador hSERT. Sin embargo, los valores de las K_i obtenidas han sido bajos. La interacción con los receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} ha mostrado una dependencia respecto a la configuración relativa del heterociclo, obteniéndose mejores resultados para los derivados de tipo *trans*. En líneas generales, los derivados con modificaciones OMe y OH y el derivado no modificado han mostrado mayor capacidad de interacción con los diferentes receptores estudiados, a excepción de los híbridos lineales fluorados con indoloquinolicidina, que han mostrado mayor actividad para el receptor 5-HT₇ que el resto. Finalmente, la presencia de (1*S*,2*R*)-1-amino-2-indanol en la estructura de los híbridos con análogos de peptinas y con precursores lineales de peptinas, no ha mejorado notablemente la actividad de los mismos respecto a los correspondientes análogos sin indanol en la mayoría de

receptores, a excepción del receptor de adenosina A_{2A} , para el que los híbridos con indanol, tanto lineales como cíclicos han presentando un porcentaje de inhibición más elevado que el resto de productos.

MATERIALES Y MÉTODOS

A.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS

A.1.1. Disolventes

AcOEt	Calidad síntesis	Scharlau
Acetona	Calidad síntesis	Panreac
ACN	Calidad HPLC	Scharlau
H ₂ O ¹	Milli-Q	
CHCl ₃	Calidad síntesis	Sigma-Aldrich
DCE	Calidad 99.5 % PS	Panreac
DCM	Calidad síntesis	Scharlau
DCM ²	Calidad síntesis	Sigma-Aldrich
DMF	Calidad síntesis de péptidos	SDS
DMSO	Calidad 99.5 % PS	Panreac
Et ₂ O	Calidad síntesis	Panreac
EtOH	Calidad 99.5 % PS	Panreac
n-heptano	Calidad HPLC, IR, UV	Panreac
Hexano	Calidad síntesis	Sharlau
MeOH	Calidad HPLC	Sharlau
NMP	Calidad síntesis	Scharlau
THF ³	Calidad síntesis	Panreac

¹El agua desionizada se ha filtrado con un sistema *Milli-Q Plus* (Millipore) para obtenerla con una resistividad superior a 18 MΩ·cm⁻¹

²Para las reacciones en las que ha sido necesario utilizar DCM anhidro, el disolvente comercial se ha destilado sobre CaH₂.

³Para las reacciones en las que ha sido necesario utilizar THF anhidro, el disolvente comercial se ha destilado sobre sodio metálico, en presencia de benzofenona y bajo atmósfera de nitrógeno. Previamente, se han eliminado las trazas de peróxidos haciéndolo pasar por una columna de Al₂O₃ básica.

A.1.2. Reactivos (síntesis química)

Resinas y aminoácidos	Iris Biotech Novabiochem Polypeptide Bachem
Ácido Boc-isonipecótico	Novabiochem
Ac ₂ O	Acros Organics
AcOH	Scharlau
Anisol	Merck
Cloranilo	Fluka
BF ₃ ·Et ₂ O	Acros Organics
BTPP	Aldrich
DMB	Aldrich
DBU	Fluka
DIC	Fluka
DMAP	Sigma-Aldrich
DMSO	Acros Organics
EDC·HCl	Iris Biotech
EDIA	Sigma-Aldrich
Et ₃ N	Sigma-Aldrich
HCl	Scharlau
HOAt	Fluorochem
HOBt	Fluka
Ninhidrina	Merck
Oxyma [®]	Iris Biotech
Pd(PPh ₃) ₄	Strem Chemicals
PhSiH ₃	Fluka
Piperidina	Sigma-Aldrich
Piridina	Panreac
PyAOP	Novabiochem
PyBOP	Novabiochem

TFA	Fluorochem
TIS	Sigma-Aldrich

A.2. INSTRUMENTACIÓN

A.2.1. Instrumentación general

- **Agitador orbitálico:** *Advanced ChemTech PLS*
- **Balanzas:** *Mettler Toledo PB303-S*
Sartorius CP224S
- **Centrífuga:** *Beckman Coulter Allegra 21R*
- **Espectrofotómetro IR:** *FT-IR Nicolet 6700*
- **Espectrofotómetro UV-VIS:** *UVIKON XS Secoman*
- **Espectrómetro de masas:** *PerSeptive Biosystems Voyager-DE™ RP (Applied Biosystems)*, con láser de nitrógeno de 337 nm (MALDI-TOF)
- **Evaporadores:** *Rotavapor Heidolph Laborota 400B*
- **Estufa de vacío:** *P SELECTA Vaciotem*
- **Liofilizador:** *Genesis 12EL*
Christ Alpha 1-4 LD
- **Microondas:** *Biotage Initiator™ 2.0*
- **Puntos de fusión:** Microscopio Eclipse de Nikon con una fuente de alimentación Linkam THMS 600 y un controlador de temperatura programable Linkam CI93
- **Sonicador:** *LabSupplies G112SPIT*

A.3. TÉCNICAS GENERALES

A.3.1. Técnicas espectroscópicas

A.3.1.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C se han realizado en los instrumentos Bruker DMX 500 MHz, Varian Inova 500 MHz, Varian Mercury 400 MHz y Varian Gemini 200 MHz de la Unidad de RMN de Campo Alto de los Servicios

Científico-Técnicos de la UB. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm respecto a la señal de referencia del tetrametilsilano (TMS, $\delta=0$). Las constantes de acoplamiento (J) en Hz, indicando la multiplicidad de las señales de la siguiente manera: s (singulete), sa (singulete amplio), d (doblete), t (triplete), q (cuadruplete), m (multiplete).

A.3.1.2. Espectroscopia ultravioleta (UV)

Los espectros de absorción ultravioleta se han registrado en un espectrofotómetro *UVIKON XS Secoman*, con cubetas de cuarzo de volumen variable en función de la muestra a analizar.

A.3.1.3. Espectroscopia de infrarrojo (IR)

Los espectros de infrarrojo se han adquirido en un espectrofotómetro *FT-IR Nicolet 6700* (con adaptador *Smart Orbit*).

A.3.2. Espectrometría de masas (EM)

Se ha realizado en el Servicio de Espectrometría de Masas de los Servicios Científico-Técnicos de la UB.

A.3.2.1. ESI

Se ha utilizado un instrumento *VG-Quattro* con un voltaje del capilar de 3.5 KV y 10 KV.

A.3.2.2. MALDI-TOF

Los espectros de masas adquiridos mediante la técnica de desorción iónica provocada por láser, asistida por matriz, y con detección de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) se han obtenido en un instrumento de *PerSeptive Biosystems Voyager-DETM RP (Applied Biosystems)*, con un láser de N₂ de 337 nm y pulsos de 3 ns.

La preparación de la muestra se realiza de la siguiente manera: Se mezcla 1 μ L de una disolución del producto en MeCN/H₂O (1:1) con 1 μ L de una disolución de matriz DHB o ACH (10 mg/mL de matriz en MeCN/H₂O (1:1, V/V con un 0.1% TFA)). Se homogeneiza la mezcla y se toma 1 μ L que se deposita en la placa metálica de MALDI-

TOF, dejando evaporar los disolventes antes de realizar el análisis. Los espectros de masas se han obtenido en el modo de ionización positivo.

A.3.3. Técnicas cromatográficas

A.3.3.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina se ha realizado sobre cromatofolios de gel de sílice con soporte de aluminio (60 F, 0.2 mm, Merck). Las mezclas de elución dependen de la naturaleza del producto y se indican en cada caso particular. Se han utilizado diferentes tipos de revelado para las capas finas dependiendo del tipo de muestra:

- Revelado por UV: Detección de grupos aromáticos/cromóforos. Se realiza colocando directamente la placa bajo la lámpara de ultravioleta.
- Revelado con ninhidrina: Detección de grupos amino. El revelador consiste en una disolución de ninhidrina al 0.5 % en acetona. La placa se pulveriza con esta disolución y se calienta a 110°C durante 3 minutos. La presencia de grupos amino se manifiesta por la aparición de una mancha oscura.

A.3.3.2. Cromatografía en columna

La cromatografía en columna se ha realizado sobre gel de sílice (Chromatogel 60 Å CC, 35-70 micrones, SDS). Cuando los intermedios y/o productos finales son propensos a descomponerse en medio ácido, se utiliza gel de sílice previamente neutralizado, que se prepara suspendiéndolo (400 g) en DCM (500 mL) y adicionando Et₃N (10 mL). La mezcla se homogeneiza y se eliminan el DCM y la Et₃N a presión reducida. Los eluyentes empleados se indican en cada caso concreto.

A.3.3.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia se ha llevado a cabo tanto a nivel analítico como a nivel semipreparativo en diferentes equipos cromatográficos. La pureza de los crudos de reacción y productos puros se han analizado por cromatografía líquida de alta eficacia a **escala analítica** utilizando los siguientes equipos:

Cromatógrafo 1: Sistema Shimadzu constituido por una bomba cuaternaria LC-20 AD, inyector automático SIL-10Dvp, desgasificador DGU-20A5 y detector de longitud de onda variable modelo SPD-20A.

Cromatógrafo 2: Módulo Waters Alliance 2695 (integrado por dos bombas, un mezclador de alta presión y un autoinyector), con un detector UV-visible multicanal *Photodiode Array Detector 996*.

Cromatógrafo 3 (HPLC-MS): Módulo Waters Alliance 2795 con detector UV-visible multicanal *Photodiode Array Detector 2996* y espectrómetro de masas *Micromass ZQ 4000*.

Las columnas analíticas que se han utilizado en el presente trabajo son las siguientes:

- *Nucleosil C₁₈* (Scharlau) de 4 × 250 mm con tamaño de partícula de 10 µm
- *Jupiter 5u C₁₈* (Phenomenex) de 4 × 250 mm con tamaño de partícula de 5 µm
- *Symmetry 300TM C₄* (Waters) de 4.6 × 250 mm con tamaño de partícula de 5 µm
- *XSelectTM CSHTM C₁₈* (Waters) de 4.6 × 50 mm con tamaño de partícula de 3.5 µm
- *XBridgeTM BEH130 C₁₈* (Waters) de 4.6 × 100 mm con tamaño de partícula de 3.5 µm
- *XBridgeTM C₁₈* (Waters) de 4.6 × 50 mm con tamaño de partícula de 3.5 µm

Los flujos de trabajo han sido de 1 mL/min (cromatógrafo 1) y 2 mL/min (cromatógrafo 2 y 3), con sistemas de elución basados en gradientes lineales de dos disolventes. El gradiente específico para cada muestra se indica en cada caso.

Las muestras se analizan utilizando gradientes lineales compuestos por las siguientes fases móviles:

- Cromatógrafo 1: A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)
- Cromatógrafo 2: A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)
- Cromatógrafo 3: A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)

La purificación de los productos a **escala semipreparativa** se ha llevado a cabo utilizando un cromatógrafo que consta de un módulo *Waters 600 Controller* formado por dos bombas, un mezclador de alta presión y un módulo *Waters Alliance 2767 Sample Manager* con un inyector y un colector de fracciones. La detección se realiza mediante un detector UV-visible *Dual λ Absorbance Detector 2487* y un espectrómetro de masas *Micromass ZQ*. El flujo de trabajo ha sido constante de 16 mL/min utilizando gradientes lineales de dos eluyentes:

- A: H₂O (0.1 % TFA) y B: MeCN (0.1 % TFA)
- A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)

Se han empleado diferentes columnas dependiendo de la muestra a purificar:

- *SunFire™ Prep C₁₈ OBD™ 5 μ m 19 × 100 mm*
- *XBridge™ Prep BEH 130 C₁₈ 5 μ m OBD™ 19 × 100 mm*
- *XBridge™ Prep C₁₈ 5 μ m OBD™ 19 × 100 mm*

A.3.4. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de fase normal quiral

La cromatografía líquida de alta eficacia de fase normal quiral se ha llevado a cabo con un sistema *Shimadzu* constituido por dos bombas *LC-9A*, inyector automático *SIL-10ADvp*, un mezclador de alta presión, detector de longitud de onda variable modelo *SPD-6A*, un controlador del sistema modelo *SCL-6B* y un registrador modelo *C-R6A*.

Se han utilizado tres tipos de columnas de 4.6 × 250 mm y 50 μ m de tamaño de partícula, suministradas por *CHIRAL Technologies Europe*:

- *CHIRALCEL OD-H* con relleno de tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulosa sobre gel de sílice
- *CHIRALPAK AD-H* con relleno de tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilosa sobre gel de sílice
- *CHIRALPAK AS-H* con relleno de tris-[(S)- α -metilbencilcarbamato]] de amilosa sobre gel de sílice

Las muestras se han analizado en condiciones isocráticas utilizando como eluyentes mezclas de hexano y 2-propanol a flujos de 0.5 y 1 mL/min y detección a $\lambda = 220$ nm.

A.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

A.4.1. Ensayo cualitativo de ninhidrina (Test de Kaiser)

Este ensayo permite evaluar cualitativamente la eficiencia de los acoplamientos de los aminoácidos en la síntesis de péptidos en fase sólida mediante la detección colorimétrica de grupos amino primarios libres de la cadena peptídica en crecimiento. Para llevar a cabo este ensayo se utilizan dos disoluciones diferentes de reactivos:

- Reactivo A: Por un lado se prepara una disolución de fenol (40 g) en EtOH absoluto (10 mL) (solución 1). Paralelamente, se disuelve KCN 10 mM acuoso (2mL) en piridina (100 mL) recién destilada sobre ninhidrina (solución 2). Ambas disoluciones (1 y 2) se agitan por separado con 4 g de resina Amberlite MB-3 durante 45 min. Seguidamente se filtran y se mezclan.
- Reactivo B: Se prepara una disolución de ninhidrina (2,5 g) en EtOH absoluto (50 mL). La solución se conserva en un recipiente cerrado y protegido de la luz.

Para llevar a cabo el ensayo se introduce en un tubo pequeño de vidrio una alícuota de peptidil-resina seca (0.5-2 mg), previamente lavada con DCM. A continuación, se añaden 6 gotas del reactivo A y 2 gotas del reactivo B, calentando a continuación el tubo durante 3 min a 110 °C. Pasado este tiempo, se enfría el tubo y se observa el color que ha aparecido. Una coloración azulada de la disolución y de la resina indica la presencia de grupos amino primarios libres (ensayo positivo), es decir, un acoplamiento incompleto; un color amarillo indica la ausencia de aminas primarias (ensayo negativo) y asegura que la incorporación del aminoácido ha sido superior al 99.5%.

A.4.2. Ensayo cualitativo de cloranilo

El ensayo con cloranilo permite detectar aminas secundarias en un polímero. El procedimiento consiste en preparar una disolución saturada de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloranilo, 75 mg) en tolueno (25 mL). Sobre una alícuota de resina se añaden 5 gotas de la disolución de cloranilo y 20 gotas de acetona. Se agita la muestra a temperatura ambiente durante 5 min y se observa el color de la resina. Una coloración amarilla de la resina indica la ausencia de aminas secundarias (ensayo

negativo), mientras que una coloración azulada o verdosa indica la existencia de aminas secundarias (ensayo positivo). La sensibilidad de este método es menor que la del ensayo de ninhidrina.

A.4.3. Ensayo cualitativo para la detección de hierro

La detección de hierro (III) en péptidos y derivados obtenidos al reducir la sal de diazonio procedente de la descomposición acidolítica de la función triaceno, se realiza disolviendo el péptido o el derivado puro (1-4 mg) en una disolución de HCl acuoso (5 %, V/V) (4 mL) y MeCN (4 mL). Una gota de la disolución así obtenida se mezcla con una disolución acuosa saturada de tiocianato amónico y se mantiene la mezcla durante 15 min. Una coloración rojiza indica la presencia de hierro (III), el cual se elimina mediante tratamiento con la resina de intercambio iónico *Amberlite® IRC748*.

A.4.4. Hidrólisis y análisis de aminoácidos

Este método permite cuantificar el contenido en aminoácidos de un péptido en solución o en fase sólida y, por lo tanto, establecer rendimientos de síntesis. Inicialmente, se lleva a cabo la hidrólisis ácida del péptido con objeto de liberar todos los aminoácidos y, a continuación, se analiza la muestra obtenida por HPLC.

A.4.4.1. Hidrólisis de péptidos unidos a resina

Se pesan 5-15 mg de peptidil-resina seca en un tubo de vidrio (70 × 150 mm) y se adicionan 400 µL de una mezcla (1:1) de HCl (12 N) y ácido propiónico. Se cierra el tubo herméticamente y se calienta la muestra durante 3 h a 155 °C. Pasado este tiempo, se abre el tubo y se elimina la mezcla de ácidos a presión reducida hasta sequedad.

A.4.4.2. Hidrólisis de péptidos libres

Se toma un volumen conocido de una disolución de péptido en agua y se introduce en un tubo de vidrio (70 × 150 mm). A continuación, se adiciona un volumen conocido de una solución acuosa de ácido 2-aminobutírico 2.5 mM (estándar interno) con objeto de obtener una concentración final 0.1 mM. Finalmente, se adicionan 400 µL de una mezcla (1:1) de HCl (12 N) y H₂O, se cierra el tubo herméticamente y se calienta a 155

°C durante 1 h. Posteriormente, se trata la muestra hidrolizada como se describe en el apartado A.4.4.1.

Con esta metodología, los aminoácidos tirosina, triptófano, metionina, serina, treonina y cisteína son destruidos total o parcialmente durante la hidrólisis; además, asparagina y glutamina se convierten en ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente.

A.4.4.3. Análisis por HPLC de muestras hidrolizadas

La mezcla de aminoácidos se disuelve en HCl 20 mM de manera que la concentración promedio final de cada aminoácido sea aproximadamente de 0.1 mM. Esta solución se filtra a través de un filtro de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro y se procede a derivatizar los aminoácidos y a analizar la mezcla mediante HPLC utilizando el método *AccQ-Tag*[®] de *Waters*. La derivatización se lleva a cabo con 6-aminoquinolilcarbamato de *N*-hidroxisuccinimidilo (AccQ) y el análisis por HPLC con un sistema que consta de un controlador modelo *Waters 600*, una bomba modelo *Waters Delta 600*, un detector de doble longitud de onda de absorción UV modelo *Waters 2487* y un inyector automático modelo *Waters 717*. La columna (NovaPak C₁₈ de 3.9 \times 150 mm y 4 μm de tamaño de partícula) se mantiene a 37 °C con de un horno para columnas con termostato modelo *Waters temperatura control module II*. Las muestras se eluyen con un flujo de 1 mL/min utilizando diferentes gradientes lineales de eluyentes A y B, donde A es una solución tampón comercial de fosfato y acetato (*Waters*) y B, es acetonitrilo. La detección se realiza a 254 nm.

A.4.5. Determinación de la funcionalización del soporte polimérico por cuantificación de grupos Fmoc

Este ensayo permite determinar rendimientos de incorporación a un soporte polimérico de aminoácidos protegidos con el grupo Fmoc, controlar el grado de desprotección de un aminoácido y comprobar la funcionalización de la resina al inicio, durante la síntesis del péptido y al final. Para ello, se determina la cantidad de grupos Fmoc liberados del aminoácido al tratarlo con piperidina, midiendo la absorbancia del aducto dibenzofulveno-piperidina que se forma al eliminar el grupo protector con la base.

Para realizar este ensayo, se lava previamente la resina con DMF (5 × 30 s) y se trata con piperidina, siguiendo el protocolo descrito en la Tabla 1:

Reactivo	Operación	Tiempo	Repeticiones
20 % Piperidina en DMF (V/V)	Desprotección	1 min	1
20 % Piperidina en DMF (V/V)	Desprotección	10 min	2
DMF	Lavado	1 min	4

Tabla 1. Protocolo de eliminación de grupos Fmoc.

Los filtrados generados se recogen en un matraz aforado de 250 mL y se enrasa con DCM. A continuación, se calcula la concentración del producto necesaria para obtener una unidad de absorbancia mediante la ecuación de Lambert-Beer ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 301 nm y $l = 1 \text{ cm}$), suponiendo que la desprotección es completa. Este valor de concentración se utiliza como referencia para llevar a cabo diluciones apropiadas a partir de la solución de 250 mL inicial. La cuantificación de grupos Fmoc se realiza mediante análisis espectrofotométrico de la disolución resultante a λ : 301 nm.

PARTE EXPERIMENTAL

PROTOCOLOS GENERALES DE SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA

B.1. CONSIDERACIONES GENERALES

La síntesis en fase sólida de los péptidos y derivados estudiados en el presente trabajo se ha llevado a cabo manualmente, utilizando jeringas de polipropileno (de volumen variable en función de la cantidad de resina utilizada en cada caso), equipadas con una placa filtrante de polietileno poroso. La agitación manual se ha realizado con una varilla de teflón y la agitación mecánica mediante un agitador orbitálico. Después de cada ciclo de síntesis, los excesos de reactivos, disolventes y posibles subproductos disueltos se han eliminado por filtración a presión reducida.

B.2. SOPORTES POLIMÉRICOS

En el presente trabajo se han utilizado soportes poliméricos de distinta naturaleza, dependiendo de la estrategia de síntesis y la naturaleza del compuesto deseado. Así, se han empleado resinas comerciales de poliestireno reticulado con un 1 % de divinilbenzeno, funcionalizadas con grupos *p*-metilbencidrilamina (MBHA-PS), aminometilo (AM-PS), dihidropiraniolo (DHP-PS) y piperacinometilpoliestireno, así como la resina de polietilenglicol funcionalizada con grupos aminometilo ChemMatrix (AM-CM).

B.3. PROTOCOLOS SINTÉTICOS

B.3.1. Acondicionamiento del soporte polimérico

Antes de iniciar una síntesis en fase sólida, es recomendable acondicionar la resina con objeto de hincharla adecuadamente y eliminar posibles impurezas. Todos los soportes poliméricos utilizados en el presente trabajo han sido acondicionados siguiendo el protocolo que se indica en la Tabla 2, exceptuando las resinas comerciales DHP-PS y piperacinometilpoliestireno, que se lavaron con DCM (5 × 30 s) y DMF (5 × 30 s).

Reactivo	Operación	Tiempo	Repeticiones
DCM	Solvatación	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5
TFA 40 % en DCM	Lavado	1 min	1
		10 min	2
DCM	Lavado	30 s	5
EDIA 5 % en DCM	Neutralización	2 min	5
DCM	Lavado	30 s	5
DMF	Lavado	30 s	5

Tabla 2. Protocolo de acondicionamiento del soporte polimérico

B.3.2. Incorporación del patrón interno

La Tabla 3 muestra el protocolo seguido para la incorporación del aminoácido que se utiliza como patrón interno. Este aminoácido se utiliza para la determinación de rendimientos en fase sólida mediante hidrólisis y análisis de aminoácidos y, por tanto, no debe estar presente en la secuencia peptídica de interés. En este trabajo se han utilizado glicina o alanina como patrón interno, dependiendo del péptido a sintetizar.

Reactivo	Operación	Tiempo	Repeticiones
DMF	Lavado	30 s	5
1. Fmoc-Ala-OH o Fmoc-Gly-OH (3 eq)	Acoplamiento	1 h	1
2. DIC (3 eq)			
3. HOBt (o HOBt·H ₂ O) o Oxyrna [®] (3 eq)			
4. DMF			
DMF	Lavado	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5
MeOH	Lavado	30 s	5

DCM	Lavado	30 s	5
-----	--------	------	---

Tabla 3. Protocolo de incorporación del patrón interno

Una vez finalizado este proceso se lleva a cabo un ensayo de ninhidrina. Si el ensayo resulta positivo se repiten las operaciones que se indican en la tabla 3 hasta obtener finalmente un resultado negativo en el ensayo de ninhidrina.

B.3.3. Eliminación del grupo protector Fmoc

Las peptidil-resinas con funciones amino protegidas con el grupo Fmoc se han tratado con disoluciones de piperidina para su eliminación, tal y como se indica en la Tabla 4. Sin embargo, en ocasiones, la desprotección puede estar más dificultada por problemas estéricos, siendo necesaria la utilización de mezclas de piperidina y DBU (Tabla 5). Además, como paso previo a una ciclación intramolecular en fase sólida, el grupo Fmoc del extremo amino se ha eliminado con la base no nucleófila DBU, con objeto de evitar la formación de derivados de piperidina en el extremo carboxilo de la cadena peptídica durante el tratamiento con el agente de acoplamiento para llevar a cabo la ciclación (Tabla 6).

○ **Tratamiento básico con piperidina**

Reactivo	Operación	Tiempo	Repeticiones
DMF	Solvatación	30 s	5
20 % Piperidina en DMF (V/V)	Desprotección	1	1
20 % Piperidina en DMF (V/V)	Desprotección	10 min	2
DMF	Lavado	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5

Tabla 4. Protocolo de eliminación de grupos Fmoc utilizando piperidina

○ **Tratamiento básico con piperidina/DBU**

Reactivo	Operación	Tiempo	Repeticiones
DMF	Solvatación	30 s	5
10 % Piperidina/ 10 % DBU en DMF (V/V)	Desprotección	1	1
10 % Piperidina/ 10 % DBU en DMF (V/V)	Desprotección	10 min	2
DMF	Lavado	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5

Tabla 5. Protocolo de eliminación de grupos Fmoc utilizando piperidina/DBU

○ **Tratamiento básico con DBU**

Reactivo	Operación	Tiempo	Repeticiones
DMF	Solvatación	30 s	5
3 % DBU en DMF (V/V)	Desprotección	1	1
3 % DBU en DMF (V/V)	Desprotección	10 min	2
DMF	Lavado	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5

Tabla 6. Protocolo de eliminación de grupos Fmoc utilizando DBU

B.3.4. Eliminación del grupo protector Boc

La Tabla 7 resume las condiciones utilizadas para eliminar el grupo protector Boc.

Reactivo	Operación	Tiempo	Repeticiones
DCM	Solvatación	30 s	5
40 % TFA en DCM (V/V)	Desprotección	1	1
40 % TFA en DCM (V/V)	Desprotección	10 min	2
DCM	Lavado	30 s	5

DMF	Lavado	30 s	5
-----	--------	------	---

Tabla 7. Protocolo de eliminación de grupos Boc utilizando TFA

B.3.5. Incorporación del espaciador bifuncional

Para poder unir los aminoácidos triptófano o fenilalanina al soporte polimérico a través de la cadena lateral, éste se ha funcionalizado con los ácidos 4-[(3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxi]benzoico (**3**) (Tabla 8) o Boc-isonipecótico (Tabla 9), respectivamente.

Reactivo	Operación	Tiempo	Repeticiones
DMF	Lavado	30 s	5
1. Espaciador bifuncional 3 (3 eq)	Acoplamiento	3 h	1
2. DIC (3 eq)			
3. Oxyma® o HOBt(3 eq)			
4. DMF			
DMF	Lavado	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5

Tabla 8. Unión del triptófano a través de su cadena lateral al soporte polimérico: Incorporación de ácido 4-[(3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxi]benzoico (**3**)

Reactivo	Operación	Tiempo	Repeticiones
DMF	Lavado	30 s	5
1. Ácido Boc-isonipecótico (3 eq)	Acoplamiento	1 h	1
2. DIC (3 eq)			
3. Oxyma® (3 eq)			
4. DMF			
DMF	Lavado	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5

Tabla 9. Unión de la fenilalanina a través de su cadena lateral al soporte polimérico: Incorporación del ácido Boc-isonipecótico

Una vez realizado un test de ninhidrina para comprobar que la reacción de acoplamiento se ha completado, se lleva a cabo la eliminación del grupo protector Boc siguiendo el protocolo descrito en el apartado B.3.4.

B.3.6. Incorporación del aminoácido al soporte polimérico a través de su cadena lateral

La incorporación del primer aminoácido (triptófano o fenilalanina) de la secuencia peptídica se ha realizado siguiendo dos metodologías distintas en función del tipo de unión que se establece con el espaciador bifuncional, utilizado **3** en el caso del triptófano y ácido isonipecótico para la fenilalanina. La formación de la unión hemiaminal que se establece entre el grupo indol de la cadena lateral del triptófano y el espaciador **3** se describe en el apartado 1.3.3 (Capítulo 1), mientras que la formación de la unión triaceno que tiene lugar entre la fenilalanina y el espaciador ácido isonipecótico se detalla en el apartado 2.2.2 (Capítulo 1).

B.3.7. Protocolo de bloqueo de centros activos de la resina

El bloqueo mediante acetilación de los grupos amino que no han reaccionado en un acoplamiento se ha realizado según el protocolo descrito en la Tabla 10:

Reactivo	Operación	Tiempo	Repeticiones
DMF	Lavado	30 s	5
1. Ac ₂ O (3 eq)		30 min	1
2. Piridina (6 eq)	Bloqueo		
3. DMF			
DMF	Lavado	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5
MeOH	Lavado	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5

Tabla 10. Acetilación de los centros activos de la resina

B.3.8. Elongación de la cadena peptídica

Se han utilizado distintos agentes de acoplamiento (DIC, PyBOP o PyAOP) y aditivos (Oxyma® o HOBt o (HOBt·H₂O)) en función de la naturaleza de los aminoácidos a incorporar (Tablas 11 y 12). Si los ensayos de ninhidrina o cloranilo han sido positivos, se ha repetido el protocolo de acoplamiento y si no se ha llegado a un ensayo negativo, se ha realizado una acetilación de las aminas libres remanentes, tratando la peptidil-resina tal y como se detalla en el apartado B.3.7.

○ **Protocolo de síntesis utilizando DIC/HOBt o Oxyma®**

Reactivo	Operación	Tiempo	Repeticiones
DMF	Lavado	30 s	5
1. Fmoc-aa-OH (3 eq)			
2. DIC (3 eq)	Acoplamiento	1 h	1
3. HOBt o Oxyma® (3 eq)			
4. DMF			
DMF	Lavado	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5
MeOH	Lavado	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5

Tabla 11. Protocolo de síntesis utilizando DIC/HOBt o Oxyma®

○ **Protocolo de síntesis utilizando PyBOP/HOBt o PyAOP/HOAt**

Reactivo	Operación	Tiempo	Repeticiones
DMF	Lavado	30	5
1. Fmoc-aa-OH (3 eq)			
2. PyBOP o PyAOP (3 eq)			
5. HOBt o HOAt (3 eq)	Acoplamiento	1 h	1
6. EDIA (6 eq)			
7. DMF			
DMF	Lavado	30 s	5

DCM	Lavado	30 s	5
MeOH	Lavado	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5

Tabla 12. Protocolo de síntesis utilizando PyBOP/HOBt o PyAOP/HOAt

B.3.9. Eliminación del grupo protector alilo en fase sólida

El grupo protector alilo se ha eliminado en fase sólida aplicando el protocolo descrito en la Tabla 13:

Reactivo	Operación	Tiempo	Repeticiones
DMF	Lavado	30 s	5
DCM (atm. Ar)	Lavado	30 s	5
1. Pd[(PPh ₃) ₄] (0.4 eq)			
2. PhSiH ₃ (48 eq)	Desprotección	30 min	2
3. DCM anh (atm. Ar)			
DCM	Lavado	30 s	5
DMF	Lavado	30 s	5
0.5% <i>N,N</i> -dietilditio-carbamato de sodio en DMF	Lavado	5 min	2
DMF	Lavado	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5

Tabla 13. Protocolo de eliminación del grupo protector alilo

B.3.10. Hidrólisis del éster metílico en fase sólida

La eliminación del éster metílico utilizado como grupo protector del extremo carboxilo se ha realizado según la metódica que se muestra en la Tabla 14:

Reactivo	Operación	Tiempo	Repeticiones
DCM	Lavado	30 s	5
LiOH (5 eq) en THF:H ₂ O (7:1, V/V)	Hidrólisis	16 h	1

THF:H ₂ O (7:1, V/V)	Lavado	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5
MeOH	Lavado	30 s	5
DCM	Lavado	30 s	5
DMF	Lavado	30 s	5

Tabla 14. Protocolo de hidrólisis del éster metílico en fase sólida

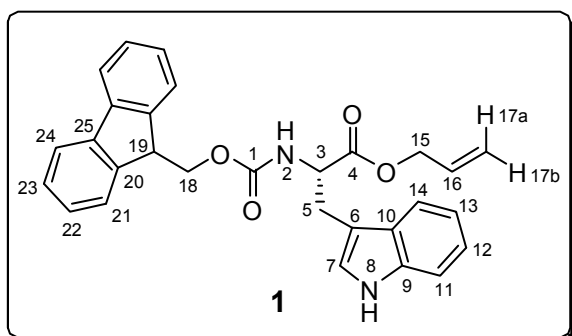
PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL CAPÍTULO 1

1. SÍNTESIS DE DERIVADOS PROTEGIDOS DE TRIPTÓFANO

1.1. Fmoc-(S)-Trp-OAlilo (1)

Se suspendió Fmoc-(S)-Trp-OH (3.04 g, 7.13 mmol) y NaHCO_3 (2.7 g, 32.14 mmol) en 60 mL de DMF. A continuación, se adicionó bromuro de alilo (1.9 mL, 0.02 mmol) y la mezcla resultante se mantuvo en agitación constante durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción del crudo de reacción con H_2O (3 × 60 mL) y una disolución acuosa al 5% de HCl (3 × 60 mL). Seguidamente, se secó la fase orgánica con MgSO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida obteniéndose el producto deseado como un sólido blanco espumoso (2.40 g, 73 %).



Caracterización

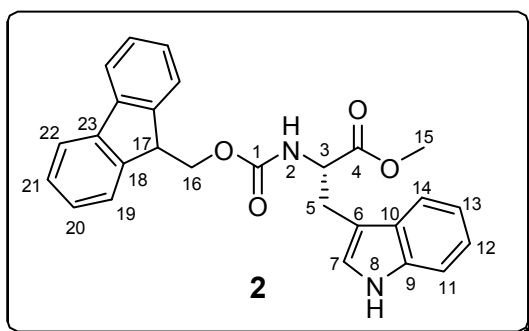
R_f [Hexano/AcOEt (3:1)] = 0.18; P_f (MOP, 3 °C/min) 134-136 °C; **HPLC** (Nucleosil C_{18} , 4 × 250 mm, 10 μm , 40→100 % B en 30 min (A: H_2O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1

mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 22.0$ min; $[\alpha_D] = +11.4$ (CHCl_3 , c 1.15); **IR** (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3317, 3051, 2912, 1736, 1699, 1522, 1221 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.90 (bs, 1H, H_8), 7.89 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H_2), 7.87 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H_{24}), 7.65 (m, 2H, H_{21}), 7.53 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{14}), 7.40 (m, 2H, H_{23}), 7.35 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H_{11}), 7.29 (m, 2H, H_{22}), 7.17 (bd, $J = 2.2$ Hz, 1H, H_7), 7.06 (td, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 0.8$ Hz, 1H, H_{12}), 6.98 (td, $J_1 = 7.4$ Hz, $J_2 = 0.7$ Hz, 1H, H_{13}), 5.81 (m, 1H, H_{16}), 5.24 (da, $J = 17.6$ Hz, 1H, H_{17a}), 5.15 (da, $J = 10.8$ Hz, 1H, H_{17b}), 4.54 (m, 2H, H_{15}), 4.33 (m, 1H, H_3), 4.22 (m, 2H, H_{18}), 4.17 (m, 1H, H_{19}), 3.21 (dd, $J_1 = 14.7$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, 1H, H_5), 3.08 (dd, $J_1 = 14.7$ Hz, $J_2 = 9.4$ Hz, 1H, H_5) ppm; **$^{13}\text{C-RMN}$** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.2 (C_4), 156.2 (C_1), 143.9 (C_{20}), 140.9 (C_{25}), 136.3 (C_9), 132.5 (C_{16}), 127.8 (C_{23}), 127.2 (C_{10} y C_{22}), 125.4 (C_{21}), 124.0 (C_7), 121.1 (C_{12}), 120.3 (C_{24}), 118.6 (C_{13}), 118.1 (C_{14}), 117.8 (C_{17}), 111.6 (C_{11}), 109.8 (C_6), 65.9 (C_{18}), 65.0

(C₁₅), 55.2 (C₃), 46.7 (C₁₉), 27.1 (C₅) ppm; **HRMS** *m/z* calculada para C₂₉H₂₇N₂O₄ [M+H]⁺ 467.1965, encontrada 467.1962.

1.2. Fmoc-(S)-Trp-OMe (2)

Se disolvió H-(S)-Trp-OMe·HCl (0.99 g, 3.90 mmol) en una mezcla de disolución acuosa de Na₂CO₃ al 10 % en H₂O y THF (2:1, 45 mL) y se enfrió a 0 °C. Seguidamente, se adicionó gota a gota una disolución de Fmoc-OSu (1.45 g, 4.30 mmol) en THF (15 mL) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante 30 min a 0 °C y durante 7 h a temperatura ambiente. A continuación, se realizó la extracción del crudo de reacción con AcOEt (3 × 30 mL), se secó la fase orgánica con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. Finalmente, el sólido amarillento obtenido se purificó por columna cromatográfica [gel de sílice, Hexano/AcOEt (3:1)], obteniéndose el producto deseado como un sólido blanco espumoso (1.64 g, 96 %).



Caracterización

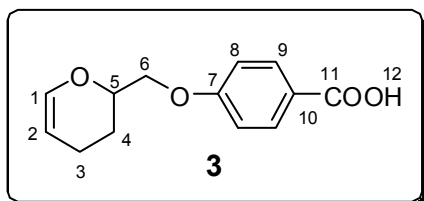
R_f [Hexano/AcOEt (3:1)] = 0.12; **P_f** (MOP, 3 °C/min) 118-120 °C; **HPLC** (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 40→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220

nm) *t_R* = 20.3 min; [**α_D**] = + 27.8 (CHCl₃, *c* 1.10); **IR** (KBr) *v*_{máx} 3385, 3057, 2951, 1741, 1688, 1535, 1218 cm⁻¹; **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.90 (bs, 1H, H₈), 7.90 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H₂), 7.86 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H₂₂), 7.64 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H₁₉), 7.52 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H₁₄), 7.39 (m, 2H, H₂₁), 7.34 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H₁₁), 7.28 (m, 2H, H₂₀), 7.17 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₇), 7.06 (td, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 0.7 Hz, 1H, H₁₂), 6.98 (td, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 0.8 Hz, 1H, H₁₃), 4.30 (m, 1H, H₃), 4.20 (m, 2H, H₁₆), 4.17 (m, 1H, H₁₇), 3.60 (s, 3H, H₁₅), 3.17 (dd, *J*₁ = 14.3 Hz, *J*₂ = 9.4 Hz, 1H, H₅), 3.05 (dd, *J*₁ = 14.6 Hz, *J*₂ = 5.4 Hz, 1H, H₅) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 174.5 (C₄), 157.7 (C₁), 145.5 (C₁₈), 142.5 (C₂₃), 137.9 (C₉), 129.4 (C₂₁), 128.8 (C₁₀ y C₂₀), 127.0 (C₁₉), 125.6 (C₇), 122.8 (C₁₂), 121.9 (C₂₂), 120.2 (C₁₃), 119.8 (C₁₄), 113.3 (C₁₁), 111.5 (C₆), 67.5 (C₁₆), 56.8 (C₃), 53.7 (C₁₅), 48.4 (C₁₇), 28.7 (C₅) ppm; **HRMS** *m/z* calculada para C₂₇H₂₅N₂O₄ [M+H]⁺ 441.1809, encontrada 441.1807.

2. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 3,4-dihidro-2H-pirano

2.1. Ácido 4-[(3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxi]benzoico (**3**)

Se disolvieron 4-hidroxibenzoato de metilo (2.51 g, 24.2 mmol) y trifenilfosfina (7.68 g, 29.0 mmol) en THF anhidro en atmósfera de argón. Tras agitar la disolución resultante durante 30 min a temperatura ambiente, se adicionaron (3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metanol (2.51 mL, 24.2 mmol) y DIPAD (6.25 mL, 29.0 mmol). La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 48 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, se eliminó el disolvente y se adicionó LiOH (2.66 g, 109 mmol) en H₂O/MeOH (2:1, 75 mL). La mezcla así obtenida se calentó a reflujo y se mantuvo en agitación a esta temperatura durante 48 h. A continuación, tras atemperar la mezcla, se lavó con DCM (5 × 60 mL) y la fase acuosa se introdujo en un baño de hielo para precipitar el producto deseado por adición de una disolución acuosa de HCl 2 M hasta conseguir un pH de 2. Finalmente, el sólido blanco formado se aisló por filtración a vacío, se lavó repetidas veces con H₂O y se secó (4.06 g, 72 %).



Caracterización

R_f [DCM] = 0.02; **P_f** (MOP, 3 °C/min) 141-143 °C;

HPLC (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 40→100 %

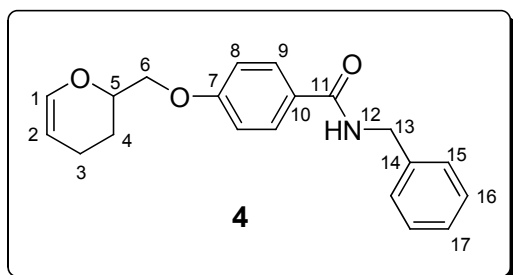
B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036

% TFA)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 18.2 min; **IR** (KBr) ν_{máx} 3420-2554, 1683, 1606, 1428, 1257, 1170 cm⁻¹; **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.87 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H₉), 7.02 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H₈), 6.39 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H₁), 4.70 (m, 1H, H₂), 4.13 (m, 3H, H₅ y H₆), 2.08 (m, 1H, H₃), 1.98 (m, 1H, H₃), 1.93 (m, 1H, H₄), 1.70 (m, 1H, H₄) ppm; **¹³C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.9 (C₁₁), 164.8 (C₇), 145.9 (C₁), 134.0 (C₉), 126.1 (C₁₀), 116.9 (C₈), 103.3 (C₂), 75.5 (C₅), 72.7 (C₆), 26.3 (C₄), 21.5 (C₃) ppm; **HRMS** *m/z* calculada para C₁₃H₁₅O₄ [M+H]⁺ 235.0964, encontrada 235.0969.

2.2. *N*-bencil-4-[(3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxi]benzamida (**4**)

A una disolución de ácido 4-[(3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metoxi]benzoico **3** (234 mg, 1 mmol) en DCM (7 mL) se adicionaron EDC·HCl (232 mg, 1.2 mmol), HOBT (186 mg, 1.2 mmol) y bencilamina (134 μL, 1.2 mmol). La mezcla resultante se mantuvo en agitación constante durante 22 h a temperatura ambiente, tras lo cual, se lavó con HCl 0.1 N (3 ×

5 mL), 10 % NaHCO₃ (3 × 5 mL), una disolución saturada de NaCl (3 × 5 mL) y H₂O (3 × 5 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose un aceite amarillento que se purificó por columna cromatográfica [gel de sílice neutralizada, DCM/MeOH (99.5:5)]. El producto deseado se aisló como un aceite amarillento (143 mg, 44 %).



Caracterización

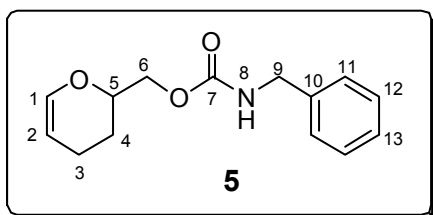
R_f [DCM/MeOH (9.9:1)] = 0.32; **P_f** (MOP, 3 °C/min) 173-175 °C; **HPLC** (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 40→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R=

16.2 min; **IR** (KBr) ν_{máx} 3310, 3052, 2923, 1634, 1607 cm⁻¹; **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, H₉), 7.30 (m, 5H, H₁₅, H₁₆ y H₁₇), 6.94 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, H₈), 6.42 (sa, 1H, H₁₂), 6.41 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H₁), 4.74 (m, 1H, H₂), 4.62 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, H₁₃), 4.21 (m, 1H, H₅), 4.13 (dd, *J*₁ = 9.8 Hz, *J*₂ = 6.1 Hz, 1H, H₆), 4.04 (dd, *J*₁ = 9.8 Hz, *J*₂ = 4.4 Hz, 1H, H₆), 2.16 (m, 1H, H₃), 2.06 (m, 1H, H₃), 1.98 (m, 1H, H₄), 1.83 (m, 1H, H₄) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ 167.3 (C₁₁), 161.8 (C₁₀), 143.9 (C₁), 138.9 (C₁₄), 129.3 (C₉), 129.2 (C₁₆), 128.4 (C₁₅), 128.0 (C₁₇), 127.4 (C₇), 114.9 (C₈), 101.2 (C₂), 73.5 (C₅), 70.7 (C₆), 44.6 (C₁₃), 24.9 (C₄), 19.7 (C₃) ppm; **HRMS** *m/z* calculada para C₂₀H₂₂NO₃ [M+H]⁺ 324.1594, encontrada 324.1597.

2.3. N-bencilcarbamato de (3,4-dihidro-2H-2-il)metilo (5)

Se disolvió (3,4-dihidro-2H-piran-2-il)metanol (441 μL, 4.14 mmol) en DCM (8 mL) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante bajo atmósfera de argón. A continuación, se adicionaron vía cánula disoluciones de DSC (8 mL) en MeCN (10 mL) y DMAP (52 mg, 0.42 mmol) en DCM (1 mL) bajo atmósfera de argón. La mezcla de resultante se mantuvo con agitación durante 4 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se adicionaron bencilamina (102 μL, 0.93 mmol) y DMAP (22 mg, 0.18 mmol). Tras 20 h en agitación a temperatura ambiente, se lavó la fase orgánica con una disolución acuosa del 10 % de HCl (3 × 10 mL), una disolución saturada de NaCl (3 × 10 mL) y H₂O (3 × 10 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró, se eliminó el disolvente a presión reducida y finalmente, el aceite incoloro resultante se

purificó por columna cromatográfica [gel de sílice neutralizada, Hexano/AcOEt (1:3)], obteniéndose el producto deseado como un sólido blanco (185 mg, 79 %).



Caracterización

R_f [hexano/AcOEt (1:3)] = 0.30; P_f (MOP, 3 °C/min) 44-45 °C; **HPLC** (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 10→90 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B:

MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 17.6 min; **IR** (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3306, 3059, 2885, 1681, 1651, 1532, 1238, 1051, 694 cm⁻¹; **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.30 (m, 5H, H₁₁-H₁₃), 6.38 (d, J = 6.2 Hz, 1H, H₁), 5.12 (sa, 1H, H₈), 4.70 (bs, 1H, H₂), 4.38 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H₉), 4.26 (dd, J_1 = 11.4 Hz, J_2 = 3.6 Hz, 1H, H₆), 4.16 (dd, J_1 = 11.4 Hz, J_2 = 7.0 Hz, 1H, H₆), 4.04 (m, 1H, H₅), 2.10 (m, 1H, H₃), 1.99 (m, 1H, H₃), 1.85 (m, 1H, H₄), 1.68 (m, 1H, H₄) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ 156.6 (C₇), 143.5 (C₁), 138.6 (C₁₀), 129.0 (C_{ar}), 127.7 (2 × C_{ar}), 100.9 (C₂), 73.3 (C₅), 67.1 (C₆), 45.4 (C₉), 24.3 (C₄), 19.3 (C₃) ppm; **HRMS** m/z calculada para C₁₄H₁₈NO₃ [M+H]⁺ 248.1281, encontrada 248.1289.

3. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DEL ENLACE HEMIAMINAL

3.1. Acoplamiento en solución

3.1.1. Fmoc-(S)-Trp(2-THP)-OAlilo (6)

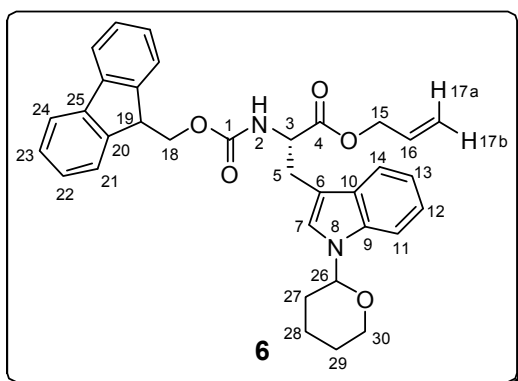
3.1.1.1. Síntesis en condiciones de calefacción por microondas

En un vial para microondas se preparó una disolución de Fmoc-(S)-Trp-OAlilo **1** (200 mg, 0.43 mmol) en DCE (5 mL) y se adicionaron DHP (40 μL, 0.43 mmol) y PPTS (181 mg, 0.68 mmol). La mezcla resultante se irradió con microondas a 120 °C durante 30 min. Tras atemperar la disolución obtenida, se lavó con H₂O (3 × 5 mL), se secó con MgSO₄ anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. El aceite amarronado resultante se purificó por columna cromatográfica [gel de sílice, Hexano/AcOEt (2:1)], obteniéndose **6** como un sólido blanco espumoso (149 mg, 63 %).

3.1.1.2. Síntesis en condiciones de calefacción convencional

En un vial de 2 mL (Wheaton) se preparó una disolución de Fmoc-(S)-Trp-OAlilo **1** (76.2 mg, 0.16 mmol) en DCE (1.5 mL) y se adicionaron DHP (9.5 μL, 0.10 mmol) y PPTS (60.5

mg, 0.24 mmol). El protocolo experimental seguido para la síntesis de **6** en condiciones de calefacción convencional fue el mismo que el utilizado en el apartado anterior con la diferencia de que la mezcla inicial se agitó a 70 °C durante 16 h. El producto deseado se obtuvo tras cromatografiar el crudo obtenido en condiciones similares a las descritas en el apartado anterior (61 mg, 68 %)



Caracterización

R_f [Hexano/AcOEt (3:1)] = 0.30; **P_f** (MOP, 3 °C/min) 58-60 °C; **HPLC** (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 40→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 25.3 min; **IR** (KBr) ν_{máx} 3341, 2943, 1721, 1510, 1461, 1450, 1337, 1232, 1202, 1078, 1036, 758, 739 cm⁻¹; **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.94 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H₂), 7.87 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H₂₄), 7.67 (m, 2H, H₂₁), 7.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₄), 7.50 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₁), 7.40 (m, 2H, H₂₃), 7.34 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H₇), 7.28 (m, 2H, H₂₂), 7.14 (t, *J*₁ = 7.7 Hz, *J*₂ = 7.6 Hz, 1H, H₁₂), 7.05 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₁₃), 5.82 (m, 1H, H₁₆), 5.53 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, H₂₆), 5.25 (dd, *J*₁ = 17.3 Hz, *J*₂ = 11.0 Hz, 1H, H_{17a}), 5.16 (dd, *J*₁ = 10.2 Hz, *J*₂ = 4.2 Hz, 1H, H_{17b}), 4.54 (m, 2H, H₁₅), 4.32 (m, 1H, H₃), 4.22 (m, 2H, H₁₈), 4.17 (m, 1H, H₁₉), 3.88 (m, 1H, H₃₀), 3.69 (m, 1H, H₃₀), 3.17 (dd, *J*₁ = 14.6 Hz, *J*₂ = 5.1 Hz, 1H, H₅), 3.05 (m, 1H, H₅), 1.99 (m, 1H, H₂₇), 1.91 (m, 1H, H₂₈), 1.82 (m, 1H, H₂₇), 1.71 (m, 1H, H₂₈), 1.51 (m, 2H, H₂₉) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.0(C₄), 156.2 (C₁), 144.1 (C₂₀), 141.1 (C₂₅), 136.3 (C₉), 132.5 (C₁₆), 128.2 (C₁₀), 128.0 (C₂₃), 127.5 (C₂₂), 125.7 (C₂₁), 124.1 (C₇), 121.8 (C₁₂), 120.4 (C₂₄), 119.8 (C₁₃), 118.6 (C₁₄), 117.9 (C₁₇), 111.0 (C₁₁), 110.9 (C₆), 82.5 (C₂₆), 67.2 (C₃₀), 65.9 (C₁₈), 65.0 (C₁₅) (55.1 (C₃), 46.8 (C₁₉), 30.4 (C₂₇), 26.9 (C₅), 25.0 (C₂₉), 22.9 (C₂₈) ppm; **HRMS** *m/z* calculada para C₃₄H₃₅N₂O₅ [M+H]⁺ 551.2540, encontrada 551.2534.

3.1.2. Fmoc-(S)-Trp(2-THP)-OMe (7)

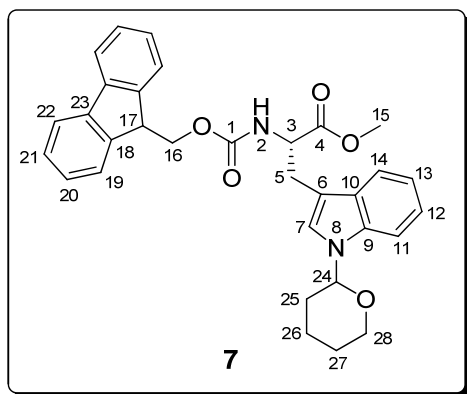
3.1.2.1. Síntesis en condiciones de calefacción por microondas

En un vial para microondas se preparó una disolución de Fmoc-(S)-Trp-OMe **2** (100 mg, 0.22 mmol) en DCE (4 mL) y se adicionaron DHP (14 μL, 0.16 mmol) y PPTS (91 mg, 0.36

mmol). Se siguió el mismo procedimiento experimental que el descrito en el apartado 3.1.1.1 obteniéndose el producto deseado como un sólido blanco espumoso (80 mg, 70 %).

3.1.2.2. Síntesis en condiciones de calefacción convencional

En un vial de 2 mL (Wheaton) se preparó una disolución de Fmoc-(S)-Trp-OMe **2** (72.3 mg, 0.16 mmol) en DCE (1.5 mL) y se adicionaron DHP (9.5 μ L, 0.10 mmol) y PPTS (60.5 mg, 0.24 mmol). El protocolo experimental seguido para la síntesis de **7** en condiciones de calefacción convencional fue el mismo que el utilizado en la síntesis de **6** (apartado 3.1.1.2) obteniéndose el producto deseado como un sólido blanco espumoso (58 mg, 67 %).



Caracterización

R_f [Hexano/AcOEt (2:1)] = 0.20; **P_f** (MOP, 3 °C/min) 62.6-65.3 °C; **HPLC** (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μ m, 40→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) **t_R** = 23.7 min; **IR** (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3321, 2921, 2850, 1715, 1511, 1462, 1203, 1033, 736 cm^{-1} ; **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.91 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H₂), 7.87 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H₂₂), 7.67 (m, 2H, H₁₉), 7.54 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₄), 7.50 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₁₁), 7.40 (m, 2H, H₂₁), 7.33 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, H₇), 7.29 (m, 2H, H₂₁), 7.14 (t, *J*₁ = 7.7 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz, 1H, H₁₂), 7.05 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H₁₃), 5.53 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, H₂₄), 4.28 (m, 1H, H₃), 4.21 (m, 2H, H₁₆), 4.17 (m, 1H, H₁₇), 3.88 (m, 1H, H₂₈), 3.68 (m, 1H, H₂₈), 3.61 (s, 3H, H₁₅), 3.16 (dd, *J*₁ = 14.7 Hz, *J*₂ = 5.0 Hz, 1H, H₅), 3.03 (dd, *J*₁ = 14.4 Hz, *J*₂ = 9.4 Hz, 1H, H₅), 1.99 (m, 1H, H₂₅), 1.90 (m, 1H, H₂₆), 1.82 (m, 1H, H₂₅), 1.70 (m, 1H, H₂₆), 1.51 (m, 2H, H₂₇) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.6 (C₄), 156.0 (C₁), 143.7 (C₁₈), 140.7 (C₂₃), 135.8 (C₉), 127.7 (C₂₁), 127.7 (C₁₀), 127.0 (C₂₀), 125.2 (C₁₉), 123.6 (C₇), 121.5 (C₁₂), 120.1 (C₂₂), 119.4 (C₁₃), 118.3 (C₁₄), 110.5 (C₆), 110.6 (C₁₁), 82.4 (C₂₄), 67.0 (C₂₈), 65.8 (C₁₆), 54.8 (C₃), 52.0 (C₁₅), 46.6 (C₁₇), 30.2 (C₂₅), 26.8 (C₅), 24.8 (C₂₇), 22.7 (C₂₆) ppm; **HRMS** *m/z* calculada para C₃₂H₃₃N₂O₅ [M+H]⁺ 525.2384, encontrada 525.2381.

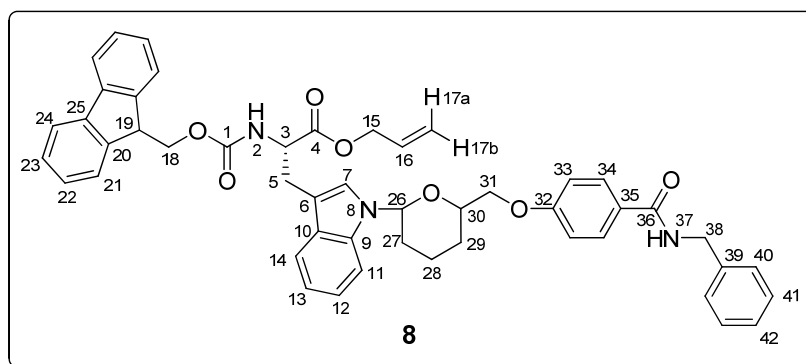
3.1.3. Éster alílico de N^α - {6-[4-(*N*-bencilcarbamoil)fenoximetil]tetrahidropiran-2-il}- N^α -(9-fluorenilmetoxicarbonil)triptófano (**8**)

3.1.3.1. Síntesis en condiciones de calefacción por microondas

En un vial de 5 mL para microondas provisto de un núcleo magnético se introdujo Fmoc-(*S*)-Trp-OAlilo **1** (150 mg, 0.32 mmol) y se disolvió en 4 mL de DCE. Seguidamente, se adicionaron *N*-bencil-4-[(3,4-dihidro-2*H*-piran-2-il)metoxi]benzamida **4** (74 mg, 0.23 mmol) y PPTS (132 mg, 0.51 mmol), se cerró el vial y se irradió con microondas a 120 °C durante 30 y 150 min con agitación constante. Acto seguido, se lavó la solución con H₂O (3 × 5 mL), se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El aceite amarronado resultante se purificó por columna cromatográfica [gel de sílice neutralizada, Hexano/AcOEt (1:1)], obteniéndose el producto deseado como un sólido blanco espumoso (203 mg, 80 % (30 min de reacción) y 251 mg, 99 % (150 min de reacción)).

3.1.3.2. Síntesis en condiciones de calefacción convencional

En un vial de 2 mL (Wheaton) se preparó una disolución de Fmoc-(*S*)-Trp-OAlilo **1** (45.3 mg, 92.6 μmol) en DCE (1 mL) y se adicionaron *N*-bencil-4-[(3,4-dihidro-2*H*-piran-2-il)metoxi]benzamida **4** (20 mg, 61.7 μmol) y PPTS (35.7 mg, 0.14 mmol). El protocolo experimental seguido para la síntesis de **8** en condiciones clásicas fue el mismo que el utilizado en el apartado 3.1.1.2 (74 mg, 96 %).



Caracterización

HPLC (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 40→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 26.9 min; **¹H-RMN**

(400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.88 (m, 1H, H₃₇), 7.97 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₂), 7.89 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, H₂₄), 7.83-7.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H₃₄), 7.68 (m, 2H, H₂₁), 7.56 (m, 2H, H₁₁ y H₁₄), 7.41 (m, 2H, H₂₃), 7.36 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, H₇), 7.31 (m, 4H, H₄₀ y H₄₁), 7.30 (m, 2H, H₂₂), 7.22 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, H₄₂), 7.17 (m, 1H, H₁₂), 7.08 (m, 1H, H₁₃), 6.92-6.97 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H₃₃), 5.83 (m, 1H, H₁₆), 5.70 (bt, $J = 9.8$ Hz, 1H, H₂₆), 5.26 (m, 1H, H_{17a} o H_{17b}), 5.17 (m, 1H, H_{17a} o H_{17b}), 4.55 (m, 2H, H₁₅), 4.45 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, H₃₈), 4.33 (m, 1H, H₃), 4.22 (m, 2H, H₁₈), 4.17 (m, 1H, H₁₉), 4.14 (m, 1H, H₃₀), 4.02 (m, 1H, H₃₁), 3.93 (m, 1H, H₃₁), 3.19 (dd, $J_1 = 14.1$ Hz, $J_2 = 9.5$ Hz, 1H, H₅), 3.07 (dd, $J_1 = 14.7$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, 1H, H₅), 1.98 (m, 1H, H₂₈), 1.86 (m, 1H, H₂₇), 1.81 (m, 1H, H₂₈), 1.72 (m, 1H, H₂₉), 1.38 (m, 1H, H₂₉), 1.20 (m, 1H, H₂₇) ppm; ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ 171.8 (C₄), 165.6 (C₃₆), 160.7 (C₃₂), 156.0 (C₁), 143.7 (C₂₀), 140.7 (C₂₅), 139.9 (C₃₉), 135.8 (C₉), 132.3 (C₁₆), 132.3 (C₃₄), 128.2 (C₄₁), 127.8 (C₁₀), 127.1 (C₄₀), 127.1 (C₄₂), 127.0 (C₃₅), 127.6 (C₂₃), 126.6 (C₂₂), 125.2 (C₂₁), 123.5 (C₇), 121.5 (C₁₂), 120.1 (C₂₄), 119.5 (C₁₃), 118.4 (C₁₄), 117.7 (C_{17a}), 117.7 (C_{17b}), 114.0 (C₃₃), 110.8 (C₁₁), 110.6 (C₆), 82.8 (C₂₆), 75.3 (C₃₀), 70.5 (C₃₁), 65.7 (C₁₈), 64.9 (C₁₅), 54.9 (C₃), 46.6 (C₁₉), 42.5 (C₃₈), 29.8 (C₂₇), 26.8 (C₅), 26.5 (C₂₉), 22.2 (C₂₈) ppm; HRMS m/z calculada para C₄₉H₄₈N₃O₇ [M+H]⁺ 790.3485, encontrada 790.3486.

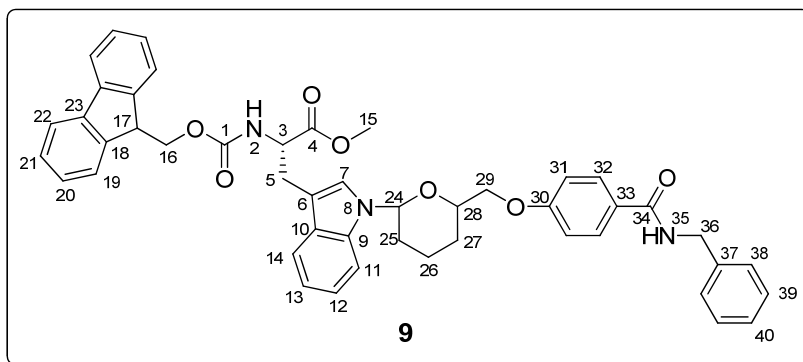
3.1.4. Éster metílico de *N*^α-{6-[4-(*N*-bencilcarbamoil)fenoximetil]tetrahidropiran-2-il}-*N*^α-(9-fluorenilmetoxicarbonil)triptófano (*S*) (9)

3.1.4.1. Síntesis en condiciones de calefacción por microondas

En un vial de 10 mL para microondas provisto de un núcleo magnético se introdujo Fmoc-(*S*)-Trp-OMe **2** (500 mg, 1.07 mmol) y se disolvió en 4 mL de DCE. Seguidamente, se adicionaron *N*-bencil-4-[(3,4-dihidro-2*H*-piran-2-il)metoxi]benzamida **4** (250 mg, 0.77 mmol) y PPTS (446 mg, 1.72 mmol), se cerró el vial y se calentó a 120 °C durante 30 y 150 min con agitación constante. A continuación, se lavó la solución orgánica con H₂O (3 × 5 mL), se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El aceite amarronado resultante se purificó por columna cromatográfica [gel de sílice neutralizada, Hexano/AcOEt (1:1)], obteniéndose el producto deseado como un sólido blanco (351 mg, 81 % (30 min de reacción) y 420 mg, 97 % (150 min de reacción)).

3.1.4.2. Síntesis en condiciones de calefacción convencional

En un vial de 2 mL (Wheaton) se preparó una disolución de Fmoc-(*S*)-Trp-OMe **2** (42.9 mg, 92.6 μmol) en DCE (1 mL) y se adicionaron *N*-bencil-4-[(3,4-dihidro-2*H*-piran-2-il)metoxi]benzamida **4** (20 mg, 61.7 μmol) y PPTS (35.7 mg, 0.14 mmol). El protocolo experimental seguido para la síntesis de **9** en condiciones clásicas fue el mismo que el utilizado para el derivado **8** (71 mg, 95 %).



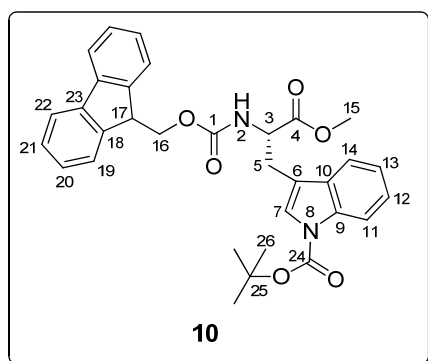
Caracterización

R_f [Hexano/AcOEt (1:1)] = 0.32; **HPLC** (Nucleosil C_{18} , 4 \times 250 mm, 10 μm , 40 \rightarrow 100 % B en 30 min (A: H_2O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 25.8$ min; **IR** (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3302, 2948, 2873, 1734, 1699, 1538 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.86 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.75 (m, 2H), 7.53 (m, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.34 (m, 4H), 7.26 (m, 3H), 7.22 (m, 1H), 7.13 (m, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.27 (bs, 1H), 5.54 (dd, $J_1 = 2.9$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz, 1H), 5.36 (m, 1H), 4.62 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 4.74 (m, 1H), 4.36 (m, 2H), 4.19 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 4.07 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.29 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 2.12 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 1.56 (m, 2H) ppm; **HRMS** m/z calculada para $C_{47}H_{45}N_3O_7$ $[M+H]^+$ 764.3330, encontrada 764.3337.

3.1.5. Fmoc-(*S*)-Trp(Boc)-OMe (**10**)

A una solución de Fmoc-(*S*)-Trp-OMe **2** (143 mg, 0.32 mmol) en MeCN anhidro (3 mL) preparada en atmósfera de nitrógeno, se adicionaron vía cánula una solución de DMAP (4 mg, 0.033 mmol) y Boc_2O (87.0 mg, 0.39 mmol) en MeCN anhidro (1 mL). La mezcla resultante se mantuvo en agitación magnética durante 6 h a temperatura ambiente, se

diluyó con H₂O (5 mL) y la suspensión resultante se lavó con Et₂O (2 × 20 mL). Posteriormente, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de KHSO₄ 1M (3 × 20 mL), una disolución saturada de NaHCO₃ (3 × 20 mL) y una disolución saturada de NaCl (3 × 20 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose un sólido amarillo que se purificó por columna cromatográfica [gel de sílice, Hexano/AcOEt (4:1)]. El producto deseado se obtuvo como un sólido blanco espumoso (96 mg, 55 %).



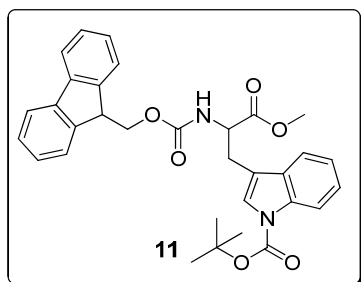
Caracterización

R_f [Hexano/AcOEt (4:1)] = 0.29; **P_f** (MOP, 3 °C/min) 51.3-53.5 °C; **HPLC** (fase estacionaria quiral) t_{R} = 18.2 min; **IR** (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ 3369, 3066, 2951, 1729, 1256 cm⁻¹; **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (bd, J = 7.4 Hz, 1H, H₇), 7.76 (d, J = 7.4 Hz,

2H, H₂₂), 7.55 (m, 2H, H₁₉), 7.51 (m, 1H, H₁₄), 7.43 (m, 1H, H₁₁), 7.39 (m, 2H, H₂₁), 7.31 (td, J_1 = 7.7 Hz, J_2 = 1.1 Hz, 1H, H₁₂), 7.29 (m, 2H, H₂₀), 7.22 (td, J_1 = 7.4 Hz, J_2 = 1.0 Hz, 1H, H₁₃), 5.4 (d, J = 8 Hz, 1H, H₂), 4.76 (m, 1H, H₃), 4.38 (m, 2H, H₁₆), 4.21 (t, J = 7 Hz, 1H, H₁₇), 3.71 (s, 3H, H₁₅), 3.27 (m, 2H, H₅), 1.65 (s, 9H, H₂₆) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ 172.2 (C₄), 155.9 (C₁), 149.7 (C₂₄), 143.9 (C₁₈), 141.5 (C₂₃), 135.5 (C₉), 130.7 (C₇), 127.9 (C₂₁), 127.3 (C₂₀), 125.3 (C₁₉), 124.8 (C₁₂), 124.4 (C₁₁), 122.9 (C₁₃), 120.2 (C₂₂), 119.0 (C₁₄), 115.5 (C₇), 115.0 (C₁₀), 84.1 (C₂₅), 67.5 (C₁₆), 54.2 (C₃), 52.7 (C₁₅), 47.4 (C₁₇), 28.4 (C₂₆), 28.1 (C₅) ppm; **HRMS** m/z calculada para C₃₂H₃₃N₂O₆ [M+H]⁺ 541.2333, encontrada 541.2338.

3.1.6. Fmoc-(S, R)-Trp(Boc)-OMe (11)

El protocolo experimental utilizado para la síntesis de **11** fue el mismo que para la síntesis de **10** pero utilizando Fmoc-Trp-OMe racémico (300 mg, 0.68 mmol). El producto obtenido fue un aceite amarillento (154 mg, 41 %).



Caracterización

HPLC (fase estacionaria quiral) $t_R = 13.8$ min (enantiómero *R*), 18.2 min (enantiómero *S*).

3.2. Acoplamiento en fase sólida

El estudio de la unión entre el triptófano y el soporte polimérico se llevó a cabo utilizando soportes poliméricos de distinta naturaleza tales como las resinas con base de poliestireno AM-PS ($f = 0.37$ y 1.21 $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$), MBHA-PS ($f = 0.92$ y 1.00 $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) y la resina comercial DHP-PS ($f = 0.90$ y 0.94 $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$), y la resina con base de polietilenglicol AM-CM ($f = 0.46$ y 0.53 $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$). Como paso previo a la incorporación del derivado de triptófano a los diferentes soportes poliméricos, éstos se acondicionaron siguiendo el protocolo experimental descrito en el apartado B.3.1 (protocolos generales de síntesis en fase sólida). Exceptuando la resina comercial DHP-PS, en el resto de soportes poliméricos se incorporó Ala o Gly como patrón interno y seguidamente se funcionalizaron con el espaciador bifuncional **3** (apartado B.3.5).

3.2.1. Síntesis en condiciones de calefacción por microondas

Los ensayos de unión del triptófano a diferentes soportes poliméricos se llevaron a cabo en un tubo específico para irradiación con microondas (Biotage) de 5-10 mL en el cual se introdujeron el soporte polimérico (100-350 mg) previamente lavado con DCM (5×30 s), Fmoc-(*S*)-Trp-OAlilo **1** (3 eq) y la cantidad de DCE anhidro necesaria para disolver el aminoácido. Posteriormente, se adicionó PPTS (1.6 eq) y la mínima cantidad de DCE anhidro para suspender la resina en el disolvente y poder agitar la mezcla resultante. Tras irradiar durante 3 h a 120 °C, se trasvasó la mezcla a una jeringa donde se lavó con DCM (5×30 s), MeOH (5×30 s), DCM (5×30 s) y DMF (5×30 s). El rendimiento de reacción se determinó por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc siguiendo el protocolo descrito en el apartado A.4.5 (Materiales y Métodos).

3.2.1.1. Unión del triptófano a distintos soportes poliméricos

Resina	f_{inicial} (mmol/g)	f_{final} (mmol/g)	Condiciones de calefacción	Rendimiento (%)
DHP-PS	0.94	0.30	MW	32
AM-PS	1.21	0.68	MW	56
MBHA-PS	0.92	0.53	MW	58
AM-CM	0.46	0.14	MW	31

Tabla 15. Rendimientos de formación del enlace hemiaminal utilizando soportes poliméricos de distinta naturaleza en condiciones de calefacción por microondas

3.2.2. Síntesis en condiciones de calefacción convencional

Para el estudio de la incorporación en fase sólida del triptófano en condiciones de calefacción convencional, se llevaron a cabo diferentes ensayos variando la temperatura, el volumen de disolvente (DCE), la cantidad de catalizador ácido (PPTS) o la cantidad de aminoácido protegido **1**. En todos los ensayos se utilizó un vial de vidrio sellado con tapón de rosca (*Wheaton*) de 2-5 mL en el cual se introdujeron el soporte polimérico (60-70 mg) previamente lavado con DCM (5 × 30 s), Fmoc-(S)-Trp-OAlilo **1**, PPTS y DCE anhidro. A continuación, el tubo se selló y se llevó a la temperatura deseada (70-90 °C) con agitación mecánica en un sintetizador orgánico Advanced Chemtech PLS 4×4. La calefacción óptima de los viales se consiguió utilizando adaptadores de aluminio de tamaño adecuado. La aminoacil-resina resultante se trasvasó a una jeringa donde se lavó con DCM (5 × 30 s), MeOH (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s) y DMF (5 × 30 s). El rendimiento de reacción se determinó por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc siguiendo el protocolo descrito en el apartado A.4.5 (Materiales y Métodos).

3.2.2.1. Unión del triptófano a distintos soportes poliméricos

	Entrada	f_i (mmol/g)	f_f (mmol/g)	Rendimiento (%)
DHP-PS	1	0.90	0.12	19
AM-PS	2	0.93	0.28	49
MBHA-PS	3	1.00	0.42	71
AM-CM	4	0.53	0.02	5

Fmoc-(S)-Trp-OAlilo: 1.5 eq

PPTS: 2.3 eq

DCE: 1 mL

70 °C, 16 h de reacción

Tabla 16. Rendimientos de formación del enlace hemiaminal utilizando distintos soportes poliméricos

3.2.2.2. Unión del triptófano al soporte polimérico a distintas temperaturas

	Entrada	Temperatura (°C)	mmoles i	f_i (mmol/g)	f_f (mmol/g)	Rendimiento (%)
DHP-PS	1	70	0.10	0.90	0.12	19
	2	80	0.05	0.90	0.11	17
	3	90	0.05	0.90	0.11	17
AM-PS	4	70	0.02	0.37	0.24	84
	5	80	0.02	0.37	0.26	91
	6	90	0.02	0.37	0.28	96
MBHA- PS	7	70	0.07	1.00	0.45	75
	8	80	0.07	1.00	0.48	81
	9	90	0.06	1.00	0.50	84

Fmoc-(S)-Trp-OAlilo: 1.5 eq

PPTS: 2.3 eq

DCE: 1 mL (1), 0.5 mL (2,3),

150 μ L (4-6), 140 μ L (7-9)

Tabla 17. Rendimientos de formación del enlace hemiaminal utilizando distintas temperaturas

3.2.2.3. Unión del triptófano al soporte polimérico a distintas concentraciones de PPTS

	Entrada	PPTS (eq)	mmoles i	f _i (mmol/g)	f _f (mmol/g)	Rendimiento (%)
DHP-PS	1	0.5	0.03	0.90	0.12	18
	2	1.0	0.03	0.90	0.15	23
	3	1.5	0.02	0.90	0.15	23
	4	2.0	0.02	0.90	0.12	20
	5	2.5	0.02	0.90	0.13	20
AM-PS	6	1.0	0.02	0.37	0.18	59
	7	2.0	0.02	0.37	0.22	74
	8	3.0	0.02	0.37	0.20	67
MBHA-PS	9	1.0	0.07	1.00	0.45	69
	10	2.0	0.07	1.00	0.48	68
	11	3.0	0.07	1.00	0.50	73

Fmoc-(S)-Trp-OAlilo: 1.5 eq
DCE: 150 µL
Temperatura: 70°C (1-5),
80°C(6-11)

Tabla 18. Rendimientos de formación del enlace hemiaminal utilizando diferentes concentraciones de PPTS

3.2.2.4. Unión del triptófano al soporte polimérico en función del volumen de disolvente (DCE)

	Entrada	DCE (µL)	mmoles i	f _i (mmol/g)	f _f (mmol/g)	Rendimiento (%)
DHP-PS	1	100	0.07	0.90	0.20	32
	2	150	0.08	0.90	0.17	26
	3	200	0.07	0.90	0.19	29
	4	250	0.07	0.90	0.19	30
	5	300	0.07	0.90	0.16	26

AM-PS	6	100	0.02	0.37	0.22	74
	7	200	0.02	0.37	0.26	85
	8	300	0.02	0.37	0.20	67
MBHA-PS	9	100	0.07	1.00	0.38	64
	10	200	0.07	1.00	0.42	71
	11	300	0.07	1.00	0.42	71

Fmoc-(S)-Trp-OAlilo: 1.5 eq
 PPTS: 1 eq (2-5), 2 eq (6-11)
 Temperatura: 70°C (1-5),
 80°C(6-11)

Tabla 19. Rendimientos de formación del enlace hemiaminal utilizando diferentes volúmenes de DCE

3.2.2.5. Unión del triptófano al soporte polimérico a distintas concentraciones de Fmoc-(S)-Trp-OAlilo (1)

	Entrada	(1) (eq)	mmoles i	f _i (mmol/g)	f _f (mmol/g)	Rendimiento (%)
DHP-PS	1	1.5	0.06	0.90	0.18	28
	2	3.0	0.06	0.90	0.18	28
AM-PS	3	1.5	0.02	0.37	0.25	84
	4	3.0	0.02	0.37	0.27	90
MBHA-PS	5	1.5	0.07	1.00	0.44	73
	6	3.0	0.07	1.00	0.48	81

PPTS: 1 eq (1,2), 2 eq (3-6)
 DCE: 90 µl (1,2), 200 µl (3,4), 250 µl (5,6)
 Temperatura: 70 °C (1,2), 80°C (3-6)

Tabla 20. Rendimientos de formación del enlace hemiaminal utilizando diferentes concentraciones de Fmoc-(S)-Trp-OAlilo 1

3.2.2.6. Reproducibilidad de la unión del triptófano al soporte polimérico

	Entrada	mmoles i	f _i (mmol/g)	f _r (mmol/g)	Rendimiento (%)
AM-PS	1	0.02	0.37	0.14	48
	2	0.02	0.37	0.25	85
	3	0.02	0.37	0.28	95
	4	0.02	0.37	0.26	91
MBHA-PS	5	0.06	1.00	0.22	78
	6	0.06	1.00	0.26	83
	7	0.06	1.00	0.20	75
	8	0.07	1.00	0.48	81

Fmoc-(S)-Trp-Alilo: 1.5 eq

PPTS: 2.3 eq

DCE: 150 µL (**1-4**), 140 µL (**5-8**)

Temperatura: 80°C

Tabla 21. Rendimientos de formación del enlace hemiaminal utilizando las resinas AM-PS y MBHA-PS. Estudio de la reproducibilidad

4. ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DEL TRIPTÓFANO

4.1. En disolución

Los ensayos en solución de liberación del triptófano del modelo monomérico se llevaron a cabo a pequeña escala utilizando alícuotas de 4.5-5.5 mg del compuesto **8** (modelo monomérico). Cada una de estas alícuotas se disolvieron en 1 mL de la mezcla acidolítica correspondiente en viales provistos de núcleo magnético. Los diferentes ensayos se realizaron a temperatura ambiente y diferentes tiempos de reacción tal y como se muestra en la Tabla 22. Finalizadas las reacciones, se eliminaron los productos volátiles con corriente de nitrógeno y se analizaron los crudos resultantes por HPLC con objeto de determinar los porcentajes de productos y subproductos obtenidos por integración de áreas de picos cromatográficos (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 µm, 40→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm).

Ensayo	Mezcla acidolítica	Tiempo (min)	% 8 ¹	% 1
1	TFA/ DCM (90:10)	30	50	14
2	TFA/DCM (10:90)	30	65 (41) ²	21 (16) ²
3	TFA/TIS/DCM (10:10:80)	60	-	13
4	TFA/H ₂ O (90:10)	60	34	8
5	TFA/mDMB/DCM (2:10:88)	60	75	17
6	TFA/mDMB/DCM (5:10:85)	30	-	90 ³
7	TFA/mDMB/DCM (10:2:88)	15	-	68 (56) ⁴
8	TFA/mDMB/DCM (10:10:80)	60	-	72
9	TFA/mDMB/DCM (40:10:50)	60	-	40
10	TFA/mDMB (90:10)	60	-	17
11	TFA/mDMB/THF (40:50:10)	60	34 (25) ⁵	21 (7) ⁵

¹Porcentaje de producto de partida sin reaccionar.

²Después de 60 min de reacción.

³ Se obtuvo un resultado similar a 1h de reacción.

⁴Después de 30 min de reacción.

⁵Después de 3 h de reacción.

Tabla 22. Ensayos de liberación del derivado de triptófano **1** del modelo monomérico **8**

4.2. En fase sólida

Los ensayos de escisión del triptófano del soporte polimérico en fase sólida se realizaron utilizando alícuotas de aminoacil-resinas preparadas según se describe en el apartado 3.2. La síntesis de las aminoacil-resinas se llevó a cabo utilizando como soportes poliméricos las resinas AM-PS y MBHA-PS, las cuales se acondicionaron en las condiciones descritas en el apartado B.3.1. Para incorporar el aminoácido Ala como patrón interno se siguió el procedimiento descrito en el apartado B.3.2. A continuación, se llevó a cabo la cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc (apartado A.3.5, Materiales y Métodos) para conocer la funcionalización real de la resina tras el acoplamiento. Seguidamente, se incorporó el espaciador bifuncional **3** utilizando las condiciones de acoplamiento que se exponen en el apartado B.3.5 y el acoplamiento de Fmoc-(S)-Trp-OAlilo **1** en condiciones de calefacción convencional y por microondas (apartado 3.2.).

Se emplearon aminoacil-resinas procedentes de los soportes poliméricos AM-PS ($f=0.55 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) y MBHA-PS ($f=0.37 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$). Se introdujeron alícuotas de 5-10 mg en jeringas de polipropileno provistas de filtros de polietileno poroso y cada una de ellas se trató con la mezcla acidolítica correspondiente (5 mL). En la tabla 23 se muestran los distintos ensayos realizados.

Resina	Condiciones		Rendimiento de liberación	
	de calefacción	Mezcla acidolítica	Tiempo	(%)
AM-PS	MW	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:10:85)	6 × 10 min	30
AM-PS	MW	TFA/ <i>m</i> DMB/TIS/H ₂ O/DCM (5:10:3:2:80)	6 × 10 min	48
MBHA-PS	Convencional	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:10:85)	6 × 10 min	80

Tabla 23. Rendimientos de liberación del derivado de triptófano **1** en fase sólida

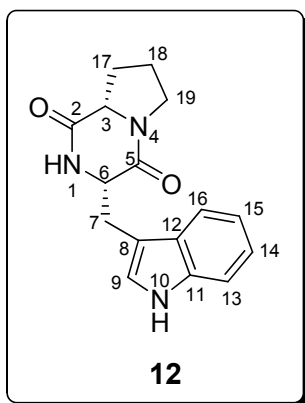
5. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA A LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

5.1. Brevianamida F (**12**)

5.1.1. Síntesis en solución

En un matraz de fondo redondo de 50 mL, se disolvieron Z-(*S*)-Trp-OH (0.51 g, 1.48 mmol), H-(*S*)-Pro-OMe·HCl (257 mg, 1.48 mmol), HOBT (231 mg, 1.48 mmol) y EDC·HCl (284 mg, 1.48 mmol) en 20 mL de MeCN. A continuación, se adicionó EDIA (383 μL , 2.22 mmol) y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación magnética durante toda la noche en atmósfera de N₂. Seguidamente, se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo resultante se disolvió en AcOEt (20 mL). La solución orgánica se lavó sucesivamente con H₂O (2 × 20 mL), una disolución acuosa de Na₂CO₃ al 10 % (2 × 20 mL), H₂O (2 × 20 mL), una disolución acuosa de HCl 0.1 M (2 × 20 mL) y una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en MeOH anhidro (50 mL), se adicionó 10 % Pd/C (54 mg, 10 mol %) y la solución resultante se mantuvo en agitación magnética bajo atmósfera de H₂ (1 atm) durante toda la noche. Acto seguido,

se filtró el catalizador con celite y se eliminó el disolvente a presión reducida obteniéndose un sólido blanco espumoso que se purificó por columna cromatográfica [gel de sílice neutralizada, Hexano/Et₂O (2:8)]. El producto deseado se recuperó como un sólido blanco espumoso (285 mg, 68 %).



Caracterización

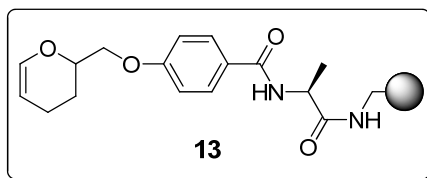
R_f [DCM/AcOEt (2:1)] = 0.30; **P_f** (MOP, 3 °C/min) 166-168 °C; **HPLC** (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 40→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 15.8 min; **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.9 (s, 1H, H₁₀), 7.72 (s, 1H, H₁), 7.56 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₆), 7.32 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₃), 7.18 (d, *J* = 2.1

Hz, 1H, H₉), 7.05 (bt, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₁₄), 6.95 (bt, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₁₅), 4.29 (bt, *J* = 4.9 Hz, 1H, H₆), 4.04 (bt, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₃), 3.39 (m, 1H, H₁₉), 3.26 (m, 1H, H₁₉), 3.26 (m, 1H, H₇), 3.08 (dd, *J*₁ = 14.9 Hz, *J*₂ = 5.7 Hz, 1H, H₇), 1.95 (m, 1H, H₁₇), 1.64 (m, 1H, H₁₈), 1.37 (m, 1H, H₁₇) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.1 (C₅), 165.5 (C₂), 136.0 (C₁₁), 127.4 (C₁₂), 124.4 (C₉), 120.9 (C₁₄), 118.7 (C₁₆), 118.2 (C₁₅), 111.2 (C₁₃), 109.3 (C₈), 58.4 (C₃), 55.3 (C₆), 44.6 (C₁₉), 27.7 (C₁₇), 25.8 (C₇), 21.9 (C₁₈) ppm; **HRMS** *m/z* calculada para C₁₆H₁₈N₃O₂ [M+H]⁺ 284.1399, encontrada 284.1391.

5.1.2. Síntesis en fase sólida

5.1.2.1. Preparación del soporte polimérico (13)

El estudio de la síntesis en fase sólida de la Brevianamida F se realizó utilizando 64.5 mg (0.02 mmol) de resina AM-PS (*f* = 0.37 mmol·g⁻¹). En primer lugar, se acondicionó la resina siguiendo el protocolo general descrito en el apartado B.3.1. Seguidamente, se incorporó Fmoc-Ala-OH (3 eq) como patrón interno utilizando DIC (3 eq) y Oxyma® (3 eq) en DMF (protocolo general B.3.2). A continuación, se eliminó el grupo protector Fmoc utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo general B.3.3.) y se acopló el espaciador bifuncional **3** (3 eq), utilizando DIC (3 eq) y HOBT (3 eq) en DCM (protocolo general B.3.5). Finalmente, la resina **13** así obtenida se lavó con DCM (5 × 30 s) y DMF (5 × 30 s).



5.1.2.2. Síntesis de la Brevianamida F (12) siguiendo una estrategia convencional en fase sólida: Elongación de la cadena peptídica por el extremo amino

A la peptidil-resina **13** se incorporó el derivado protegido de triptófano **1** siguiendo el protocolo experimental 3.2.2. Así, se adicionaron Fmoc-(S)-Trp-OAlilo **1** (17 mg, 0.04 mmol) y PPTS (12 mg, 0.05 mmol) en un vial de vidrio *Wheaton* y, a continuación, se añadió DCE anhidro (0.3 mL). Tras disolver completamente la mezcla, se adicionó la resina **13** y la suspensión resultante se mantuvo durante 16 h a 80 °C con agitación mecánica. Seguidamente, se lavó la peptidil-resina con DCM (5 × 30 s), DMF (5 × 30 s) y MeOH (5 × 30 s), y se determinó espectrofotométricamente el grado de incorporación del aminoácido (64 %) tratando la resina con una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo general B.3.5). La resina resultante se lavó con DMF (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s), y acopló Fmoc-Pro-OH (20 mg, 0.06 mmol) utilizando DIC (12 µL, 0.08 mmol) y Oxyma[®] (10 mg, 0.07 mmol) en DMF (3 mL). Acto seguido, se lavó la peptidil-resina con DMF (5 × 30 s) y se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo utilizando Pd (PPh₃)₄ (10 mg, 0.01 mmol) y PhSiH₃ (118 µL, 0.96 mmol) según el protocolo general B.3.9. Tras lavar la peptidil-resina resultante con DCM (5 × 30 s) y DMF (5 × 30 s), se eliminó el grupo protector Fmoc con una disolución de DBU (3 %, V/V) (protocolo B.3.3). A continuación, se cicló la cadena peptídica utilizando PyBOP (12 µL, 0.08 mmol), HOBt (10 mg, 0.07 mmol) y EDIA en DMF (3 mL). Este mismo procedimiento se repitió 3 veces con objeto de asegurar que la reacción de ciclación fuera completa, tal como se comprobó posteriormente con el test de cloranilo. A continuación, se escindió el dipéptido cíclico de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/*m*DMB/DCM (5:10:85, V/V/V) (6 × 10 min) y el crudo resultante se precipitó con Et₂O, se centrifugó (10 min a 6000 rpm) y se filtró. El crudo obtenido se analizó por HPLC resultando un rendimiento inferior al 5 % determinado por integración de áreas de los picos cromatográficos.

Caracterización

HPLC (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 40→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 15.7 min.

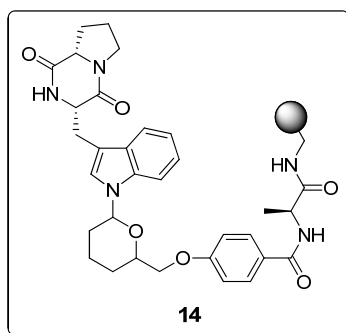
5.1.2.3. Estudio de la estabilidad de la Brevianamida F (**12**) en las condiciones acidolíticas de escisión del soporte polimérico

5.1.2.3.1. Ensayo en solución

10 mg de la Brevianamida F **12** sintetizada en solución se introdujeron en un vial de vidrio y se llevaron a cabo 3 tratamientos de 30 min cada uno con la mezcla acidolítica TFA/*m*DMB/DCM (5:10:85, V/V/V). A continuación, se eliminó el TFA por corriente de N₂ y se analizó el crudo por HPLC confirmándose la formación del producto deseado.

5.1.2.3.2. Ensayos en fase sólida

La dicetopiperacina **12** se incorporó a la resina funcionalizada con grupos dihidropiraniolo **13** en disolución. Para ello, se adicionaron Brevianamida F **12** (40 mg, 0.14 mmol) y PPTS (54 mg, 0.21 mmol) en un vial de vidrio Wheaton de 2 mL de capacidad y, a continuación, se añadió DCE anhidro (1 mL). Tras disolver completamente la mezcla, se adicionó la resina **13** y la suspensión resultante se mantuvo durante 16 h a 80 °C con agitación mecánica. Seguidamente, se lavó la peptidil-resina con DCM (5 × 30 s), DMF (5 × 30 s) y MeOH (5 × 30 s). La determinación espectrofotométrica de grupos Fmoc (protocolo A.3.5, Materiales y Métodos) proporcionó un rendimiento de incorporación del 50 %. La peptidil-resina así obtenida **14** se utilizó para los ensayos de escisión de la Brevianamida F del soporte polimérico.



- **Análisis de la escisión de la Brevianamida F-resina (14) con distintas mezclas acidolíticas**

La peptidil-resina **14** (50-57 mg) se introdujo en un vial de vidrio y se realizaron ensayos con las siguientes mezclas acidolíticas (1 mL): TFA/DCM (10:90, V/V), TFA/TIS/DCM (10:5:85, V/V/V) y TFA/*m*DMB/DCM (5:10:85, V/V/V). En todos los casos los tratamientos realizados fueron de 30 min y se llevaron a cabo 3 veces. A continuación, se eliminó el TFA por corriente de N₂ y se analizaron los crudos por HPLC. En todos los casos, se detectó el producto deseado.

5.1.2.4. Síntesis de la Brevianamida F (12) elongando la cadena peptídica a través del extremo carboxilo

La resina AM-PS (249 mg, 0.09 mmol) se acondicionó siguiendo el protocolo general descrito en el apartado B.3.1 y se incorporó Fmoc-Ala-OH como patrón interno (protocolo B.3.2). A continuación, se acopló el espaciador bifuncional **3** (65 mg, 0.28 mmol) utilizando DIC (43 µL, 0.28 mmol) y Oxyma® (39 mg, 0.28 mmol) en DCM (1 mL) (protocolo general B.3.5). La peptidil-resina obtenida se lavó con DCM (5 × 30 s) y se incorporó el derivado protegido de triptófano **1** siguiendo el protocolo experimental 3.2.2. Para ello, se adicionaron Fmoc-(*S*)-Trp-OAlilo **1** (64 mg, 0.14 mmol), PPTS (53 mg, 0.21 mmol) y DCE anhidro (0.5 mL) en un vial de vidrio Wheaton de 2 mL de capacidad. Tras disolver completamente la mezcla, se adicionó la resina obtenida y la suspensión resultante se mantuvo durante 16 h a 80 °C con agitación mecánica. Seguidamente, se lavó la peptidil-resina con DCM (5 × 30 s), DMF (5 × 30 s) y MeOH (5 × 30 s) y se determinó el rendimiento de incorporación del aminoácido por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc siguiendo el protocolo general A.3.5 (76 %). A continuación, se lavó la peptidil-resina con DMF (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s) y se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo (protocolo general B.3.9) utilizando Pd (PPh₃)₄ (43 mg, 0.037 mmol) y PhSiH₃ (544 µL, 4.4 mmol). Acto seguido, se acopló el derivado de prolina comercial H-(*S*)-Pro-OMe·HCl (19 mg, 0.28 mmol) utilizando PyBOP (76 mg, 0.28 mmol) y EDIA (77 µL, 0.83 mmol) en DMF (0.5 mL). La suspensión resultante se mantuvo con agitación manual ocasional durante 1 h a temperatura ambiente, realizando este mismo procedimiento 3 veces con objeto de asegurar que el

acoplamiento fuera completo. A continuación, la peptidil-resina resultante se trató con piperidina en DMF (20 %, V/V) (2 × 10 min) y se lavó con DMF (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s) (protocolo B.3.3). La peptidil-resina sintetizada **15** (el producto es el mismo que la peptidil-resina **14**) se trató con la mezcla acidolítica TFA/*m*DMB/DCM (5: 5: 90, V/V/V) (3 × 10 min). Se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo resultante se precipitó con hexano, se centrifugó (10 min a 6000 rpm) y se filtró, obteniéndose el producto deseado como un sólido blanco espumoso (14 mg, 74 %).

Caracterización

HRMS *m/z* calculada para C₁₆H₁₈N₃O₂ [M+H]⁺ 284.1399, encontrada 284.1394.

5.1.2.5. Estudio de la liberación de la Brevianamida F (**12**) del soporte polimérico

Los diferentes ensayos de liberación de la Brevianamida F del soporte polimérico se llevaron a cabo en jeringas con alícuotas de peptidil-resina **14** (50-70 mg). Una vez realizados los tratamientos acidolíticos (Tabla 24), se filtró, se eliminó el TFA por corriente de N₂, se precipitó con hexano, se centrifugó (10 min a 6000 rpm) y se filtró. Los crudos obtenidos se analizaron por HPLC y se determinó el rendimiento de liberación de la dicetopiperacina por análisis de aminoácidos de la resina resultante.

Ensayo	Mezcla acidolítica	Tiempo (min)	Rendimiento de liberación (%)
1	TFA/DCM (10:90)	2 × 15 min	59
2	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:5:90)	3 × 10 min	74
3	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:5:90)	6 × 10 min	89
4	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (10:5:85)	6 × 10 min	88
5	TFA/tioanisol /DCM (10:5:85)	6 × 10 min	73

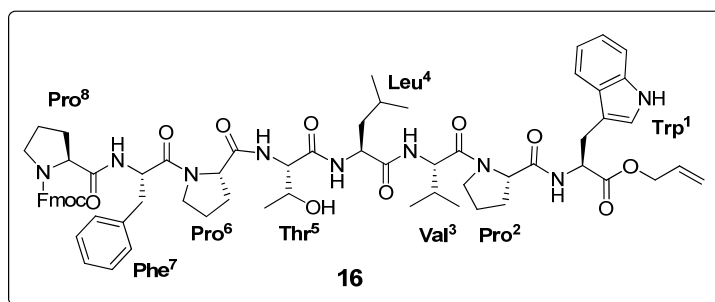
Tabla 24. Rendimientos de liberación de la Brevianamida F **12** de la resina utilizando diferentes mezclas acidolíticas

5.2. Aproximaciones a la síntesis de la Axinelina B (20)

5.2.1. Estrategia sintética 1

5.2.1.1. Ensamblaje del péptido sobre la resina

Los ensayos de síntesis del precursor lineal **16** se realizaron utilizando las resinas AM-PS (305 mg, $f = 0.93 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) y MBHA-PS (315 mg, $f = 0.37 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$). En primer lugar, se acondicionaron las resinas siguiendo el protocolo general B.3.1 y, a continuación, se incorporó Fmoc-(S)-Ala-OH como patrón interno según el protocolo general descrito en el apartado B.3.2. Tras eliminar el grupo protector Fmoc utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3), se procedió a acoplar el espaciador bifuncional **3** siguiendo las condiciones generales descritas en el apartado B.3.5. Acto seguido, se disolvieron en un vial *Wheaton* de 2 mL el derivado de triptófano **1** (200 mg (AM-PS), 82 mg (MBHA-PS), 1.5 eq) y PPTS (164 mg (AM-PS), 68 mg (MBHA-PS), 2.3 eq) en la mínima cantidad de DCE anhidro y, a continuación, se adicionaron las aminoacil-resinas obtenidas. La suspensión resultante se calentó a 80 °C durante 16 h, con agitación mecánica y se determinaron los rendimientos de incorporación del derivado de triptófano **1** que fueron del 84 % para AM-PS y 80 % para MBHA-PS, determinados por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc (protocolo general A.3.5). La elongación de la cadena peptídica se realizó utilizando DIC (132 μL para AM-PS, 55 μL para MBHA-PS, 3 eq) y HOBt (115 mg para AM-PS, 47 mg para MBHA-PS, 3 eq) en DMF (5-8 mL) (protocolo general B.3.8). Se incorporaron sucesivamente los aminoácidos protegidos: Fmoc-Pro²-OH (287 mg para AM-PS y 118 mg para MBHA-PS; 3 eq), Fmoc-Val³-OH (289 mg para AM-PS y 119 mg para MBHA-PS; 3eq), Fmoc-Leu⁴-OH (301 mg para AM-PS y 124 mg para MBHA-PS; 3eq), Fmoc-Thr(^tBu)⁵-OH (339 mg para AM-PS, 3 eq) o Fmoc-Thr(Trt)-OH (205 mg para MBHA-PS, 3 eq), Fmoc-Pro⁶-OH (287 mg para AM-PS y 118 mg para MBHA-PS; 3eq), Fmoc-Phe⁷-OH (330 mg para AM-PS y 136 mg para MBHA-PS; 3eq) y Fmoc-Pro⁸-OH (287 mg para AM-PS y 118 mg para MBHA-PS; 3eq). Las peptidil-resinas obtenidas se utilizaron para ensayos de liberación de la cadena peptídica de la resina (apartado 4.3.1.3).



Caracterización

HPLC (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 40→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 23.1 min; **ESI (+)** m/z calculada para C₆₈H₈₄N₉O₁₂ [M+H]⁺1218.6, encontrada 1218.6; **MALDI-TOF** m/z calculada para C₆₈H₈₂N₉O₁₂Na [M+Na]⁺1240.6 encontrada 1240.6 ([M+Na]⁺), 1257.1 ([M+K]⁺).

5.2.1.2. Ensayos de ciclación en fase sólida

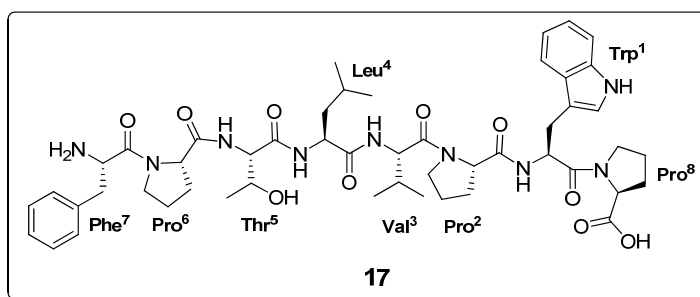
- Ensayo 1

La peptidil-resina sintetizada utilizando el soporte polimérico AM-PS se trató con Pd(PPh₃)₄ (131 mg, 0.11 mmol) y PhSiH₃ (1.68 mL, 13.63 mmol) en las condiciones descritas en el protocolo general B.3.9. A continuación, se llevó cabo la eliminación de Fmoc del extremo amino utilizando una disolución de DBU en DMF (3 %, V/V), según el protocolo general descrito en el apartado B.3.3. La peptidil-resina resultante se trató dos veces con DIC (0.18 mL, 1.13 mmol) y HOBt (307 mg, 2.27 mmol) en DMF durante 16 h. A continuación, la peptidil-resina obtenida se trató con la mezcla acidolítica TFA/*m*DMB/TIS/DCM (85: 3: 2: 10) durante 1 h, se filtró y se recogió la disolución en un vial de vidrio y se eliminó el TFA por corriente de N₂. El crudo peptídico obtenido se analizó por MALDI.

- Ensayo 2

La peptidil-resina sintetizada utilizando el soporte polimérico MBHA-PS se trató con Pd(PPh₃)₄ (54 mg, 0.05 mmol) y PhSiH₃ (0.69 mL, 5.62 mmol) en las condiciones descritas en el protocolo general B.3.9. A continuación, se llevó cabo la eliminación de Fmoc del extremo amino utilizando una disolución de DBU en DMF (3 %, V/V), según el

protocolo general descrito en el apartado B.3.3. La peptidil-resina resultante se trató dos veces con PyBOP (183 mg, 0.35 mmol), HOBT (47 mg, 0.35 mmol) y EDIA (0.12 mL, 0.70 mmol) en DMF durante 1 h 30 min en dos ocasiones y, a continuación, con PyAOP (183 mg, 0.35 mmol), HOAt (47 mg, 0.35 mmol) y EDIA (0.12 mL, 0.70 mmol) durante 1 h 30 min en dos ocasiones (protocolo general B.3.8). A continuación, la peptidil-resina obtenida se trató con la mezcla acidolítica TFA/TIS/DCM (1:5:94, V/V/V) (1 min + 15 min). Los filtrados se recogieron en un cial de vidrio. Seguidamente, se trató con la mezcla acidolítica TFA/*m*DMB/DCM (5: 5: 90, 6 × 10 min), se filtró y se recogió la disolución en otro vial de vidrio y se eliminó el TFA por corriente de N₂. El crudo peptídico **17** obtenido se analizó por HPLC-MS.



Caracterización

HPLC (Symmetry C₄, 4.6 × 250 mm, 5 μm, 5→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 10.6 min; **ESI (+)** *m/z* calculada para C₅₀H₇₀N₉O₁₀ [M+H]⁺956.5, encontrada 956.6; **MALDI-TOF** *m/z* calculada para C₅₀H₇₀N₉O₁₀ [M+H]⁺956.5 encontrada 956.6 ([M+H]⁺), 978.6 ([M+Na]⁺), 994.6 ([M+K]⁺); **HRMS** *m/z* calculada para C₅₀H₇₀N₉O₁₀ [M+H]⁺ 956.5232, encontrada 956.5240.

5.2.1.3. Liberación de la cadena peptídica del soporte polimérico

- **Estudio de la liberación del precursor lineal protegido (16) del soporte polimérico**

Los ensayos de liberación del precursor lineal protegido **16** se realizaron con alícuotas de 10-30 mg de la peptidil-resina en una jeringa. Se adicionaron las mezclas acidolíticas (tabla 26), se filtraron las soluciones y se recogieron en viales de vidrio. Se eliminó el

TFA por corriente de N₂, los crudos peptídicos se trataron con Et₂O y los sólidos obtenidos se centrifugaron (10 min a 6000 rpm) y se decantaron. La pureza de los precipitados se analizó por HPLC-MS y se determinaron los rendimientos de liberación por análisis de aminoácidos de la resina.

Ensayo	Mezcla acidolítica	Tiempo (min)	Rendimiento de liberación (%)
1	TFA/DCM (90:10)	30	71
3	TFA/ <i>m</i> DMB/TIS/DCM (85:3:2:10)	60	90
4	TFA/INDOL/DCM (70:2:28)	60	98

Tabla 26. Rendimientos de liberación del precursor lineal protegido **16** de la Axinelina B de la resina utilizando diferentes mezclas acidolíticas

- **Estudio de la liberación del precursor lineal desprotegido en los extremos (17) del soporte polimérico**

Los ensayos de liberación del precursor lineal protegido **17** se realizaron con alícuotas de 10-30 mg de la peptidil-resina en una jeringa. Se adicionaron las mezclas acidolíticas (tabla 27), se filtraron las soluciones y se recogieron en viales de vidrio. Se eliminó el TFA por corriente de N₂, los crudos peptídicos se trataron con Et₂O y los sólidos obtenidos se centrifugaron (10 min a 6000 rpm) y se decantaron. La pureza de los precipitados se analizó por HPLC-MS y se determinaron los rendimientos de liberación por análisis de aminoácidos de la resina.

Ensayo	Mezcla acidolítica	Tiempo (min)	Rendimiento de liberación (%)
1	TFA/DCM (10:90)	2 × 15 min	59
2	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:5:90)	6 × 10 min	Cuantitativo

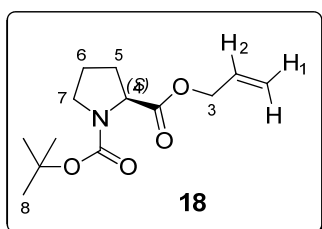
Tabla 27. Rendimientos de liberación del precursor lineal de la Axinelina B de la resina utilizando diferentes mezclas acidolíticas

5.2.2. Estrategia sintética 2

5.2.2.1. Síntesis de H-(S)-Pro-OAlilo-HCl (19)

- Boc-(S)-Pro-OAlilo (18)

A una disolución de Boc-(S)-Pro-OH (2.03 g, 9.41 mmol) en DMF (60 mL) se adicionaron NaHCO₃ (3.58 g, 42.61 mmol) y bromuro de alilo (1 mL, 11.56 mmol). La mezcla resultante se mantuvo en agitación constante durante 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución orgánica se lavó con H₂O (3 × 50 mL) y una solución acuosa de HCl (5 %, V/V) (3 × 50 mL). Seguidamente, se secó la fase orgánica con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose el producto deseado como un aceite amarillento (1.90 g, 79 %).

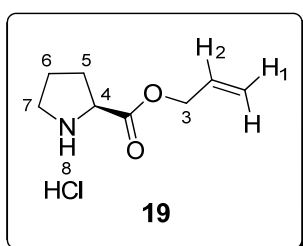


Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 3.0 min; **ESI** (+) m/z calculada para C₁₃H₂₂NO₄ [M+H]⁺ 256.2, encontrada 256.2, 200.1, 156.0; **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 5.95-5.82 (m, 1H, H₂), 5.36-5.15 (m, 2H, H₁), 4.69-4.50 (m, 2H, H₃), 4.35-4.19 (m, 1H, H₄), 3.59-3.29 (m, 2H, H₇), 2.29-2.10 (m, 1H, H₅), 2.01-1.78 (m, 3H, H₅ y H₆), 1.45-1.36 (m, 9H, H₃); **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ 173.0 (C₄), 154.5 (C₉), 132.1 (C₂), 118.7 (C₁), 80.0 (C₁₀), 65.6 (C₃), 59.3 (C₅), 46.7 (C₈), 31.0 (C₆) 28.5 (C₁₁), 24.4 (C₇).

- H-(S)-Pro-OAlilo-HCl (19)

Se disolvió el producto **17** en una disolución de HCl 4M en dioxano (1 mL) y la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 1h con agitación vigorosa. Seguidamente, se eliminó el disolvente a presión reducida y se realizaron coevaporaciones con Et₂O. El aceite amarronado obtenido se disolvió en H₂O (8 mL) y se liofilizó obteniéndose el producto deseado como un aceite amarronado (1.60 g, 94 %).



Caracterización

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 10.54 (bs, 1H, H₈), 9.21 (bs, 1H, H₈), 6.00 – 5.87 (m, 1H, H₂), 5.42 – 5.25 (m, 2H, H₁), 4.78 –

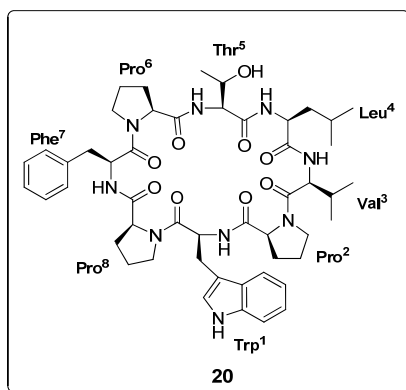
4.66 (m, 2H, H₃), 4.59 – 4.48 (m, 1H, H₄), 3.69 – 3.42 (m, 2H, H₇), 2.52 – 2.37 (m, 1H, H₅), 2.26 – 2.00 (m, 3H, H₅ y H₆); ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 168.6 (C₄), 130.9 (C₂), 119.7 (C₁), 67.1 (C₃), 59.2 (C₅), 45.9 (C₈), 28.7 (C₆), 23.5 (C₇).

5.2.2.2. Ensamblaje del péptido sobre la resina

La síntesis del precursor lineal **17** se realizó utilizando como soporte polimérico la resina MBHA-PS (155 mg, f = 1.00 mmol·g⁻¹) y como derivado protegido de treonina Fmoc-Thr(Trt)-OH. La elongación de la cadena peptídica se realizó utilizando DIC (72 μL, 0.46 mmol) y HOBt (63 mg, 0.46 mmol) en DMF (5-8 mL) (protocolo general B.3.8). Se incorporaron sucesivamente los aminoácidos protegidos: Fmoc-Pro²-OH (157 mg, 0.47 mmol), Fmoc-Val³-OH (158 mg, 0.47 mmol), Fmoc-Leu⁴-OH (164 mg, 0.47 mmol), Fmoc-Thr (tBu)⁵-OH (271 mg, 0.47 mmol), Fmoc-Pro⁶-OH (157 mg, 0.47 mmol) y Fmoc-Phe⁷-OH (180 mg, 0.47 mmol). Seguidamente, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo (protocolo general B.3.9.) utilizando Pd (PPh₃)₄ (72 mg, 0.06 mmol) y PhSiH₃ (917 μL, 7.44 mmol). A continuación, se incorporó H-(S)-Pro-OAlilo **18** (106 mg, 0.47 mmol) utilizando PyBOP (242 mg, 0.47 mmol), EDIA (162 μL, 0.93 mmol) y HOBt (63 mg, 0.46 mmol) (protocolo general B.3.8). El procedimiento se llevó a cabo en 3 ocasiones para asegurar que le acoplamiento fuese cuantitativo. Tras eliminar el grupo protector alilo del extremo carboxilo (protocolo general B.3.9), se eliminó el grupo protector Fmoc del extremo amino utilizando una disolución de DBU en DMF (3 %, V/V), siguiendo el protocolo general descrito en B.3.3. La peptidil-resina así obtenida se utilizó en ensayos de liberación del péptido lineal **19** del soporte polimérico.

5.2.2.3. Estudio de la ciclación en fase sólida

La peptidil-resina **19** se trató con PyBOP (4 eq), HOBt (8 eq) y EDIA (8 eq) en DMF. Fueron necesarios dos tratamientos de 1 h 30 min para obtener un ensayo de ninhidrina negativo. La peptidil-resina obtenida se utilizó en ensayos de liberación del péptido cíclico del soporte polimérico (apartado 4.3.2.4).



Caracterización

HPLC (Symmetry C₄, 4.6 × 250 mm, 5 μm, 5→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 21.2 min; **ESI (+)** *m/z* calculada para C₅₀H₆₉N₉O₉ [M+H]⁺ 938.5, encontrada 938.5; **MALDI-TOF** *m/z* calculada para C₅₀H₆₉N₉O₉ [M+H]⁺ 938.5 encontrada 938.4 ([M+H]⁺), 960.4 ([M+Na]⁺); **HRMS** *m/z* calculada para C₅₀H₆₈N₉O₉ [M+H]⁺ 938.5144, encontrada 938.5135.

5.2.2.4. Liberación de la cadena peptídica del soporte polimérico

Se utilizaron alícuotas de 10-15 mg de peptidil-resina que fueron tratadas previamente en jeringas con la mezcla acidolítica TFA/TIS/DCM (1:5:94, V/V/V) (1 min + 15 min). Las disoluciones resultantes se filtraron y se recogieron en viales de vidrio para tratar seguidamente, las resinas con las mezclas acidolíticas que se recogen en la tabla 28. Se filtraron los crudos en viales de vidrio, se eliminó el TFA por corriente de N₂, se adicionó Et₂O y los precipitados resultantes se centrifugaron (10 min a 6000 rpm) y se decantaron. Los crudos peptídicos se analizaron por HPLC-MS y se determinaron los rendimientos de liberación por análisis de aminoácidos de las resinas (Tabla 29).

Ensayo	Mezcla acidolítica	Tiempo (min)	Rendimiento de liberación (%)
1	TFA/DCM (90:10)	10 min	7
2	TFA/DCM (10:90)	2 × 15 min	14

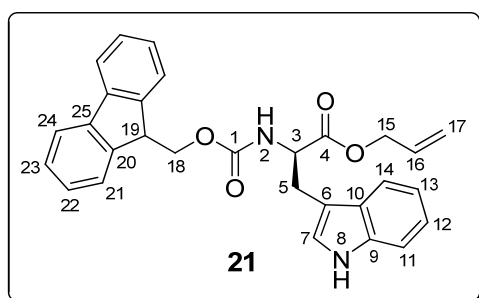
3	TFA/DCM (10:90) 45°C	30 min	11
4	TFA/ <i>m</i> DMB/DCE (5:5:90) 45°C	30 min	15
5	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:5:90)	6 × 10 min	24
6	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (10:20:70)	6 × 10 min	39
7	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (85:5:10)	10 min	9
8	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (85:5:10)	120 min	6
9	TFA/tioanisol /DCM (85:5:10)	10 min	8
10	TFA/tioanisol /DCM (10:5:85)	6 × 10 min	14

Tabla 28. Rendimientos de liberación de la Axinelina B **20** de la resina utilizando diferentes mezclas acidolíticas

5.3. Síntesis del péptido cíclico Unguisina A (**23**)

5.3.1. Fmoc-(*R*)-Trp-OAlilo (**21**)

Se disolvieron Fmoc-(*R*)-Trp-OH (0.14 g, 0.33 mmol) y NaHCO₃ (0.12 g, 1.43 mmol) en 20 mL de DMF. A continuación, se adicionó bromuro de alilo (0.2 mL, 2.24 mmol) y la mezcla resultante se mantuvo en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se lavó con H₂O (3 × 20 mL) y una disolución acuosa de HCl (5 %, V/V) (3 × 20 mL). Seguidamente, se secó la fase orgánica con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash [gel de sílice, DCM/ AcOEt], obteniéndose el producto deseado como un sólido blanco espumoso (0.12 g, 80 %).



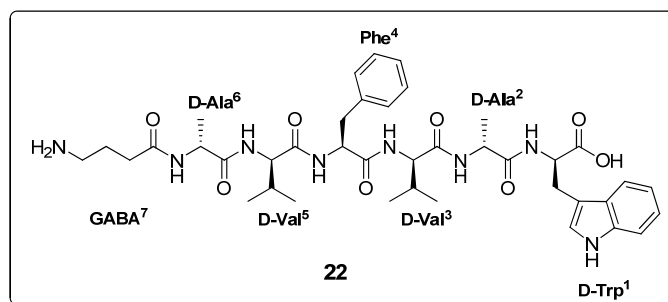
Caracterización

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.70 (bs, 1H, H₈), 7.89 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₂), 7.85 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H₂₄), 7.60 (m, 2H, H₂₁), 7.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₁₄), 7.40 (m, 2H, H₂₃), 7.35 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₁), 7.30 (m, 2H, H₂₂), 7.17 (bd, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₇), 7.06 (td, *J*₁ = 7.6 Hz, *J*₂ = 0.8

Hz, 1H, H₁₂), 6.98 (td, $J_1 = 7.4$ Hz, $J_2 = 0.7$ Hz, 1H, H₁₃), 5.75 (m, 1H, H₁₆), 5.24 (da, $J = 17.6$ Hz, 1H, H_{17a}), 5.15 (da, $J = 10.8$ Hz, 1H, H_{17b}), 4.54 (m, 2H, H₁₅), 4.30 (m, 1H, H₃), 4.21 (m, 2H, H₁₈), 4.15 (m, 1H, H₁₉), 3.18 (dd, $J_1 = 14.7$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, 1H, H₅), 3.08 (dd, $J_1 = 14.7$ Hz, $J_2 = 9.4$ Hz, 1H, H₅) ppm.

5.3.2. Síntesis del precursor lineal desprotegido (22) de Unguisina A

La síntesis del precursor lineal **22** se realizó utilizando MBHA-PS como soporte polimérico (163 mg, 0.108 mmol) ($f = 0.66$ mmol·g⁻¹). Se acondicionó la resina siguiendo el protocolo general B.3.1 y se incorporó Fmoc-Gly-OH (0.01 g, 0.03 mmol) como estándar interno utilizando DIC (51 µL, 0.33 mmol) y Oxyma[®] (46 mg, 0.32 mmol) en DMF (5 mL) (protocolo general B.3.2). A continuación, se acopló el espaciador bifuncional **3** (76 mg, 0.32 mmol (protocolo general B.3.5) y se lavó la resina obtenida con DCM (5 × 30 s). Seguidamente, se incorporó el derivado protegido de triptófano (protocolo experimental 3.2.2) utilizando Fmoc-(R)-Trp¹-OAlilo **21** (76 mg, 0.16 mmol), PPTS (62 mg, 0.25 mmol) en DCE anhidro (1.4 mL). A continuación, se lavó la aminoacil-resina con DCM (5 × 30 s), DMF (5 × 30 s) y MeOH (5 × 30 s) y se determinó el rendimiento de acoplamiento del aminoácido a la resina (70 %) por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc (protocolo A.3.5). Tras lavar la peptidil-resina con DMF (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s), se ensambló la cadena peptídica utilizando DIC (51 µL, 0.33 mmol) y Oxyma[®] (46 mg, 0.32 mmol) (protocolo general B.3.8). Así, se acoplaron sucesivamente Fmoc-D-Ala²-OH (0.11 g, 0.33 mmol), Fmoc-D-Val³-OH (0.11 g, 0.32 mmol), Fmoc-Phe⁴-OH (0.13 g, 0.34 mmol), Fmoc-D-Val⁵-OH (0.11 g, 0.32 mmol), Fmoc-D-Ala⁶-OH (0.11 g, 0.33 mmol) y Fmoc-GABA⁷-OH (0.11 g, 0.34 mmol). La eliminación del grupo Fmoc después de cada acoplamiento (a excepción de Fmoc-GABA-OH) se realizó utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) siguiendo el protocolo general B.3.3. Tras llevar a cabo el acoplamiento de GABA⁷, se determinaron por este orden, el grupo protector alilo del extremo carboxilo (protocolo general B.3.9) con Pd (PPh₃)₄ (50 mg, 0.04 mmol) y PhSiH₃ (640 µL, 5.19 mmol) y, el grupo Fmoc del extremo amino utilizando una disolución de DBU en DMF (3 %, V/V) siguiendo el protocolo general B.3.3. La peptidil-resina obtenida se lavó con DMF (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s) y se utilizó en ensayos de liberación del péptido del soporte polimérico.

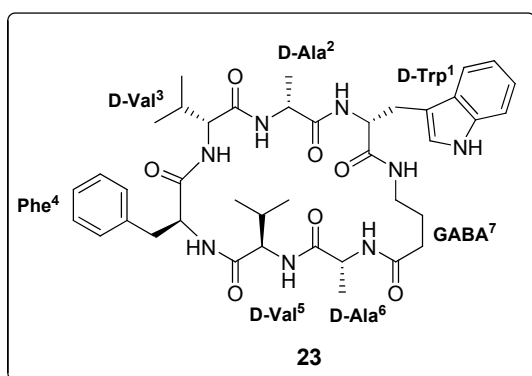


Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 1.88 min; **ESI (+) m/z** calculada para C₄₀H₅₇N₈O₈ [M+H]⁺777.4, encontrada 777.4.

5.3.3. Síntesis del péptido cíclico Unguisina A (23)

La ciclación del precursor lineal **22** se llevó a cabo utilizando dos agentes de acoplamiento. En primer lugar, se trató la peptidil-resina con DIC (51 μL, 0.33 mmol) y Oxyma® (46 mg, 0.32 mmol) en DMF (6-8 mL) durante 16 h y, a continuación, se trató con PyBOP (0.17 g, 0.33 mmol), HOBT (0.04g, 0.30 mmol) y EDIA (0.11 mL, 0.63 mmol) en DMF (6-8 mL). La mezcla se mantuvo en este caso durante 2 h a temperatura ambiente con agitación mecánica. Este tratamiento se tuvo que repetir hasta cuatro veces para conseguir un ensayo de ninhidrina negativo. La peptidil-resina obtenida se utilizó en pruebas posteriores de liberación del péptido del soporte polimérico.



Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 2.40 min; **ESI (+) m/z** calculada para C₄₀H₅₅N₈O₇ [M+H]⁺759.4, encontrada 759.4.

5.3.4. Estudio de la liberación de la Unguisina A (23) y su precursor lineal del soporte polimérico

Los ensayos de liberación se llevaron a cabo con 8-15 mg de las peptidil-resinas. Se introdujeron las muestras en jeringas y se adicionaron las mezclas acidolíticas que se muestran en la tablas 29 y 30. En cada ensayo, se filtró y se recogió la disolución en un vial de vidrio, se eliminó el TFA por corriente de N₂, se precipitó el crudo peptídico con Et₂O, se centrifugó (10 min a 6000 rpm) y se filtró. Los crudos obtenidos se analizaron por HPLC-MS y se determinaron los rendimientos de liberación del péptido de la resina por análisis de aminoácidos de las resinas.

5.3.4.1. Estudio de la liberación del precursor lineal desprotegido (22)

Ensayo	Mezcla acidolítica	Tiempo (min)	Rendimiento de liberación (%)
1	TFA/DCM (10: 90)	6 × 10 min	57
2	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:5:90)	6 × 10 min	65

Tabla 29. Rendimientos de liberación del precursor lineal de la Unguisina A utilizando diferentes mezclas acidolíticas

5.3.4.2. Estudio de la liberación del péptido cíclico Unguisina A (23)

Ensayo	Mezcla acidolítica	Tiempo (min)	Rendimiento de liberación (%)
1	TFA/DCM (10:90)	6 × 10 min	52
2	TFA/ <i>m</i> DMB/DCM (5:5:90)	6 × 10 min	71

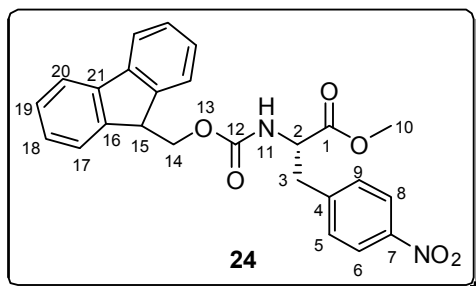
Tabla 30. Rendimientos de liberación de la Unguisina A 23 utilizando diferentes mezclas acidolíticas

6. SÍNTESIS DE DERIVADOS PROTEGIDOS DE FENILALANINA

6.1. Fmoc-(S)-Phe(*p*NO₂)-OMe (24)

Se disolvió Fmoc-Phe(*p*NO₂)-OH (0.98 g, 2.2 mmol) en 20 mL de una solución HCl en MeOH (2.9 M). A continuación, la mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante a 0 °C durante 1 h. Pasado este tiempo, se dejó atemperar la mezcla de

reacción y se mantuvo en agitación durante 14 h. Tras eliminar el disolvente a presión reducida, el residuo obtenido se disolvió en AcOEt (40 mL) y se lavó la fase orgánica con una solución saturada de NaHCO₃ (2 × 40 mL) y H₂O (2 × 40 mL). Finalmente, se secó la fase orgánica con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose **24** como un sólido blanco (0.979 g, 97 %) que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación.



Caracterización

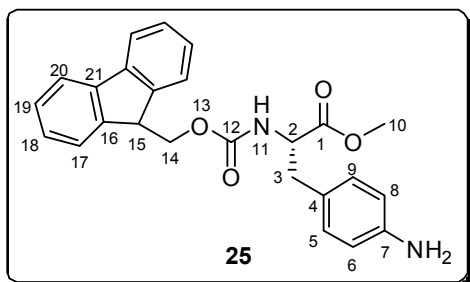
R_f [Hexano/^tBuOMe (2:1)] = 0.26; **P_f** (MOP, 3 °C/min) 173-175 °C; **[α_D]** = + 34.7 (CHCl₃, c = 1); **IR** (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ 3303, 2950, 1741, 1686, 1516, 1349, 1269, 1217 cm⁻¹; **¹H-RMN** (400 MHz,

CDCl₃) δ 8.13 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H₆ y H₈), 7.79 (m, 2H, H₂₀), 7.56 (m, 2H, H₁₇), 7.42 (m, 2H, H₁₉), 7.32 (m, 2H, H₁₈), 7.21 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H₅ y H₉), 5.25 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H₁₁), 4.69 (dd, J_1 = 13.2 Hz, J_2 = 6.0 Hz, 1H, H₂), 4.53 (dd, J_1 = 10.5 Hz, J_2 = 6.8 Hz, 1H, H₁₄), 4.42 (dd, J_1 = 10.6 Hz, J_2 = 6.5 Hz, 1H, H₁₄), 4.20 (ta, J = 6.3 Hz, 1H, H₁₅), 3.74 (s, 3H, H₁₀), 3.26 (dd, J_1 = 13.7 Hz, J_2 = 5.6 Hz, 1H, H₃), 3.15 (dd, J_1 = 13.7 Hz, J_2 = 5.8 Hz, 1H, H₃) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ 171.3 (C₁), 155.6 (C₁₂), 147.3 (C₇), 143.9 (C₄), 143.7 (C₁₆), 141.5 (C₂₁), 130.4 (C₅ y C₉), 128.0 (C₁₈), 127.2 (C₁₇), 125.0 (C₆ y C₈), 123.9 (C₂₀), 120.2 (C₁₈), 66.9 (C₁₄), 54.6 (C₂), 52.6 (C₁₀), 47.3 (C₁₅), 38.2 (C₃) ppm; **HRMS** m/z calculada para C₂₅H₂₂N₂O₆ [M+Na]⁺ 469.1370, encontrada 469.1372.

6.2. Fmoc-(S)-Phe(pNH₂)-OMe (25)

Se disolvió Fmoc-Phe(pNO₂)-OMe **24** (0.98 g, 2.1 mmol) y SnCl₂·2H₂O (2.51 g, 11.1 mmol) en 40 mL de MeOH. La mezcla resultante se calentó a 70 °C durante 16 h, se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se disolvió en AcOEt (40 mL), se adicionó H₂O (40 mL) y se llevó a pH 6 con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃. La mezcla resultante se mantuvo durante 15 min en agitación con objeto de que precipitasen las sales de estaño y se filtró en *celite*. Seguidamente, se separó la fase acuosa y la fase orgánica se lavó con H₂O (2 × 40 mL) y una disolución saturada de NaCl (2 × 40 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el

disolvente a presión reducida, obteniéndose el producto deseado como un sólido espumoso blanco (0.75 g, 82 %).

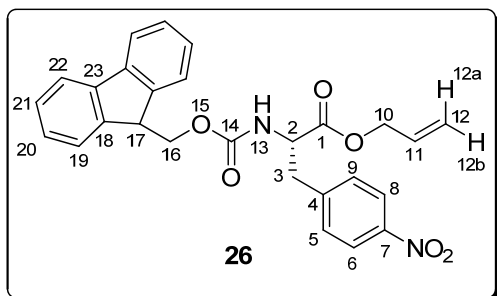


Caracterización

R_f [Hexano/^tBuOMe (1:2)] = 0.13; P_f (MOP, 3 °C/min) 59-61 °C; $[\alpha_D]$ = + 26.9 (CHCl₃, c = 1); **IR** (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ 3463, 3373, 2956 (C-H st), 1728, 1634, 1225 cm⁻¹; **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.87 (m, 2H, H₂₀), 7.77 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H₁₁), 7.64 (m, 2H, H₁₇), 7.40 (m, 2H, H₁₉), 7.30 (m, 2H, H₁₈), 6.86 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H₅ y H₉), 6.48 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H₆ y H₈), 4.18 (m, 3H, H₁₄ y H₁₅), 4.09 (m, 1H, H₂), 3.30 (s, 3H, H₁₀), 2.83 (dd, J_1 = 13.8 Hz, J_2 = 5.2 Hz, 1H, H₃), 2.69 (dd, J_1 = 13.8 Hz, J_2 = 9.8 Hz, 1H, H₃), ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-d₆) δ 173.2 (C₁), 156.5 (C₁₂), 147.8 (C₇), 144.3 (C₁₆), 141.3 (C₂₁), 130.1 (C₅ y C₉), 128.2 (C₁₈), 127.7 (C₁₉), 125.9 (C₂₀), 124.7 (C₄), 120.7 (C₁₇), 114.4 (C₆ y C₈), 66.2 (C₁₄), 56.7 (C₂), 52.4 (C₁₀), 47.2 (C₁₅), 36.5 (C₃) ppm; **HRMS** m/z calculada para C₂₅H₂₅N₂O₄ [M+H]⁺ 417.1808, encontrada 417.1816.

6.3. Fmoc-(S)-Phe(pNO₂)-OAlilo (26)

Se disolvió Fmoc-Phe(pNO₂)-OH (3.07 g, 7.63 mmol) en DMF (60 mL) y se adicionaron NaHCO₃ (2.69 g, 32.02 mmol) y bromuro de alilo (1.5 mL, 17.20 mmol). La mezcla resultante se mantuvo en agitación durante 16 h a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo sólido obtenido se disolvió en AcOEt (60 mL). La suspensión resultante se lavó con H₂O (2 × 60 mL) y con una disolución del 5 % de HCl (2 × 60 mL), la fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida obteniéndose **26** como un sólido blanco (3.52 g, 98 %) que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación.



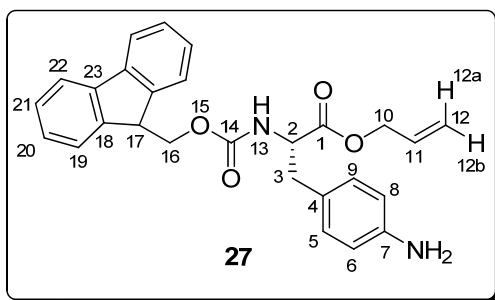
Caracterización

R_f [Hexano/^tBuOMe (1:1)] = 0.47; P_f (MOP, 3 °C/min) 143-146 °C; $[\alpha_D]$ = + 15.6 (CHCl₃, c = 1); **IR** (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ 3329, 1749, 1687, 1516, 1338, 1263, 1213 cm⁻¹; **¹H-RMN** (400 MHz,

CDCl_3) δ 8.11 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_6 y H_8), 7.77 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H_{22}), 7.56 (m, 2H, H_{19}), 7.41 (m, 2H, H_{21}), 7.30 (m, 2H, H_{20}), 7.22 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H_5 y H_9), 5.86 (m, 1H, H_{10}), 5.32 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, H_{13}), 5.29 (m, 2H, H_{12}), 4.70 (m, 1H, H_2), 4.62 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, H_{10}), 4.51 (dd, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 6.9$ Hz, 1H, H_{16}), 4.40 (dd, $J_1 = 10.7$ Hz, $J_2 = 6.4$ Hz, 1H, H_{16}), 4.19 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, H_{17}), 3.27 (dd, $J_1 = 13.9$ Hz, $J_2 = 5.8$ Hz, 1H, H_3), 3.16 (dd, $J_1 = 13.8$ Hz, $J_2 = 5.9$ Hz, 1H, H_3) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 170.5 (C_1), 155.4 (C_{14}), 147.2 (C_4), 143.6 (C_{18}), 143.5 (C_{23}), 141.4 (C_{11}), 131.0 (C_5 y C_9), 130.3 (C_{21}), 127.8 (C_{20}), 127.1 (C_{19}), 124.9 (C_8), 123.7 (C_6), 120.0 (C_{22}), 119.7 (C_{12}), 66.8 (C_{10}), 66.5 (C_{16}), 54.4 (C_2), 47.2 (C_{17}), 38.1 (C_3) ppm; **HRMS** m/z calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 495.1526, encontrada 495.1527.

6.4. Fmoc-(S)-Phe(pNH₂)-OAlilo (27)

Se disolvió Fmoc-Phe(pNO₂)-OAlilo **26** (1.91 g, 4.04 mmol) y Zn (en polvo) (1.29 g, 19.73 mmol) en EtOH absoluto (50 mL). A continuación, se adicionó AcOH glacial (50 mL) a la suspensión resultante y se mantuvo en agitación durante 1 h a 60 °C. Seguidamente, se eliminó el disolvente a presión reducida, el residuo obtenido se disolvió en DCM (50 mL) y se filtró en *celite*. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía *flash* [sílica gel, DCM/AcOEt], obteniéndose el producto deseado como un sólido blanco (1.24 g, 70 %).



Caracterización

R_f [DCM/AcOEt (9:1)] = 0.41; **P_f** (MOP, 3 °C/min) 124-127 °C; **[α_D]** = + 15.2 (CHCl_3 , $c = 1$); **IR** (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ 3389, 2931, 1740, 1692, 1260 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H_{22}), 7.56 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, H_{19}), 7.39 (m, 2H, H_{21}), 7.30 (tt, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 3.7$ Hz, 2H, H_{20}), 6.89 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H_5 y H_9), 6.59 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H_6 y H_8), 5.89 (m, 1H, H_{11}), 5.30 (m, 3H, H_{12}), 4.61 (m, 3H, H_2 y H_{10}), 4.41 (dd, $J_1 = 10.5$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, 1H, H_{16}), 4.32 (dd, $J_1 = 10.7$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, 1H, H_{16}), 4.20 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_{17}), 3.51 (sa, 2H, H_7), 3.02 (m, 2H, H_3) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 171.4 (C_1), 155.6 (C_{14}), 145.4 (C_4), 143.8 (C_{18}), 141.3 (C_{23}), 131.5 (C_{11}), 130.2 (C_5 y C_9), 127.7 (C_{21}), 127.0 (C_{20}), 125.3 (C_7), 125.2 (C_{19}), 120.0 (C_{22}), 119.0 (C_{12}), 115.3 (C_6 y C_8), 67.0 (C_{16}), 66.0 (C_{10}),

55.0 (C₂), 47.2 (C₁₇), 37.4 (C₃) ppm; **HRMS** *m/z* calculada para C₂₇H₂₆N₂O₄ [M+H]⁺443.1965, encontrada 443.1962.

7. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DEL ENLACE TRIACENO

7.1. Estudio en solución

7.1.1. Protocolo experimental de los ensayos realizados

En un matraz de fondo redondo de 2 bocas (100 mL) provisto de un *séptum*, termómetro y núcleo magnético, se adicionó Fmoc-Phe(*p*NH₂)-OMe **25**, se purgó con argón y se añadieron 30 mL del disolvente anhidro (THF o DCM, según el ensayo). La solución resultante se llevó a -10 °C con un baño de hielo y sal, momento en el que se adicionaron BF₃·Et₂O (500 µL, 2 eq) y ^tBuONO (500 µL, 2eq). Tras dejar la mezcla a -10 °C con agitación magnética durante 1/1.5 h (Tabla 31), se adicionó 1-bencilpiperacina (0.6 eq) y la base (piridina o EDIA), si la prueba lo requirió (ensayos 4 y 6). Se mantuvo la agitación durante 15-30 min manteniendo la temperatura a -10°C, excepto en el ensayo 6, que se dejó pasados los 30 min a -10 °C a temperatura ambiente hasta 3 h. A continuación, se lavó la fase orgánica con NaHCO₃ (3 × 30 mL) y una solución saturada de NaCl (3 × 30 mL), se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El producto obtenido se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, Hexano/^tBuOMe (1:1)], obteniéndose en general un sólido espumoso anaranjado.

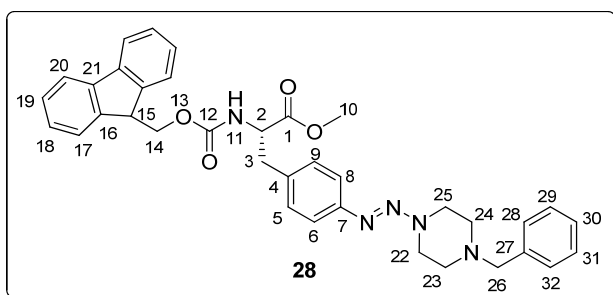
Ensayo	Disolvente	Base	t.r.1	t.r.2	Rendimiento (%)
1	THF	-	1.5 h	30 min	22
2	THF	Piridina (3 eq)	1 h	30 min	22
3	DCM	-	1.5 h	30 min	59
4	DCM	Piridina (60 eq)	1.5 h	3 h*	62

Tabla 31. Rendimientos de formación del enlace triaceno en solución

7.1.2. Síntesis del modelo monomérico (28)

Se disolvió Fmoc-Phe(*p*NH₂)-OMe **25** (0.206 g, 0.5 mmol) en 30 mL de DCM anhidro en atmósfera de argón. La disolución resultante se llevó a -10 °C con un baño de sal y hielo, adicionándose a continuación BF₃·Et₂O (130 µL, 1.0 mmol) y ^tBuONO (140 µL, 1.0

mmol). La mezcla resultante se mantuvo a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación durante 1.5 h y se adicionó 1-bencilpiperacina (60 μL , 0.3 mmol) en piridina (1.5 mL, 18.6 mmol). La mezcla de reacción se dejó con agitación magnética a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min y a temperatura ambiente durante 3 h. Seguidamente, se lavó la fase orgánica con una disolución de NaHCO_3 (3 \times 30 mL), se secó con MgSO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El aceite anaranjado resultante se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, Hexano/ $^t\text{BuOMe}$ (1:1)], obteniéndose **25** como un sólido espumoso anaranjado (0.14 g, 47 %).



Caracterización

R_f [Hexano/ $^t\text{BuOMe}$ (1:1)] = 0.29; P_f (MOP, 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 55-58 $^{\circ}\text{C}$; **HPLC** (Nucleosil C_{18} , 4 \times 250 mm, 10 μm , 40 \rightarrow 100 % B en 30 min (A: H_2O

(0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, $\lambda = 220\text{ nm}$) $t_R = 26.95\text{ min}$; $[\alpha_D] = +49.3$ (CHCl_3 , $c = 1$); **IR** (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ 3421, 2948, 1730, 1634, 1448 cm^{-1} ; **$^1\text{H-RMN}$** (400 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (m, 2H, H_{20}), 7.56 (m, 2H, H_{17}), 7.42-7.24 (m, 11H, $\text{H}_{19}, \text{H}_{5-6}, \text{H}_{8-9}, \text{H}_{28-32}$), 7.06 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$, 2H, H_{18}), 5.23 (d, $J = 8.2\text{ Hz}$, 1H, H_{11}), 4.67 (m, 1H, H_2), 4.42 (dd, $J_1 = 10.6\text{ Hz}$, $J_2 = 7.1\text{ Hz}$, 1H, H_{14}), 4.34 (dd, $J_1 = 10.4\text{ Hz}$, $J_2 = 7.2\text{ Hz}$, 1H, H_{14}), 4.22 (t, $J = 7.1\text{ Hz}$, 1H, H_{15}), 3.79 (t, $J = 5.2\text{ Hz}$, 4H, $\text{H}_{22}, \text{H}_{25}$), 3.72 (s, 3H, H_{10}), 3.58 (s, 2H, H_{26}), 3.11 (m, 2H, H_3), 2.61 (t, $J = 5.2\text{ Hz}$, 4H, $\text{H}_{23}, \text{H}_{24}$) ppm; **$^{13}\text{C-RMN}$** (100 MHz, CDCl_3) δ 172.1 (C_1), 155.7 (C_{12}), 149.8 (C_7), 144.1 (C_{16}), 141.5 (C_{21}), 138.8 (C_4), 133.5 (C_{27}), 130.0 (CH ar), 129.3 (CH ar), 128.5 (CH ar), 127.9 (CH ar), 127.5 (CH ar), 127.3 (CH ar), 125.3 (CH ar), 121.0 (CH ar), 120.1 (CH ar), 67.2 (C_{14}), 63.0 (C_{26}), 55.0 (C_2), 52.5 (C_{10}), 52.5 ($\text{C}_{23}, \text{C}_{24}$), 47.3 (C_{15}), 47.3 ($\text{C}_{22}, \text{C}_{25}$), 38.0 (C_3) ppm; **HRMS** m/z calculada para $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ 604.2918$, encontrada 604.2912.

7.2. Estudio en fase sólida

7.2.1. Formación de la unión triaceno sobre el soporte polimérico comercial piperacinometilpoliestireno

El estudio de la unión de la fenilalanina al soporte polimérico se llevó a cabo utilizando el derivado de fenilalanina **25** y la resina comercial piperacinometilpoliestireno ($f = 1.1$

mmol·g⁻¹), la cual se acondicionó previamente siguiendo el protocolo experimental que se indica en el apartado B.3.1 (Protocolos generales de síntesis en fase sólida). La Tabla 32 recoge los ensayos realizados, donde la formación de la sal de diazonio tuvo lugar durante 1 h y el tiempo 2 es el tiempo de reacción de la formación del enlace triaceno. Los ensayos de formación del enlace triaceno se llevaron a cabo en presencia y con ausencia de base (piridina).

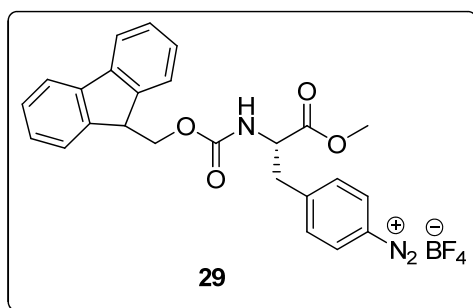
Ensayo	Base	t.r.2 (h)	f _{final} (mmol·g ⁻¹)	Rendimiento de liberación (%)
1	-	2	-	No detectado
2	Piridina (15 eq)	16	0.11	10
3	Piridina (30 eq)	3	0.64	64
4	Piridina (80 eq)	3	0.52	64

Tabla 32. Ensayos en fase sólida de formación del enlace triaceno

A continuación se detalla una de las pruebas realizadas, la cual se puede utilizar como protocolo experimental modelo de los ensayos realizados.

7.2.1.1. Formación de la sal de diazonio (29)

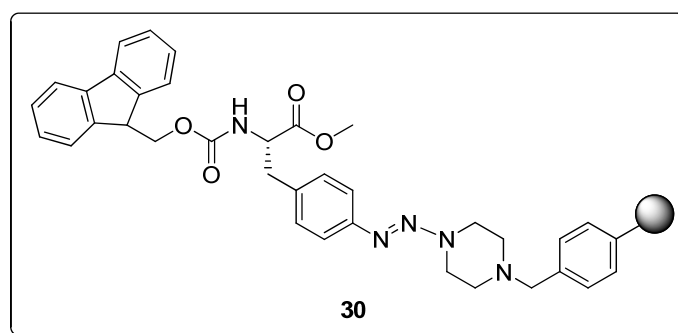
Se disolvió Fmoc-Phe(*p*NH₂)-OMe **25** (0.228 g, 0.5 mmol) en DCM anhidro (3 mL) bajo atmósfera de argón. La solución resultante se llevó a -10 °C con un baño de hielo y sal, adicionándose a continuación BF₃·Et₂O (140 μL, 1.0 mmol) y ^tBuONO (150 μL, 1.0 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a -10 °C con agitación durante 1 h.



7.2.1.2. Formación de la unión triaceno

Tras acondicionar la resina comercial piperacinetilpoliestireno, se introdujo en un vial y se adicionó piridina (1.5 mL, 18.6 mmol). A continuación, se selló el vial con un

séptum y la suspensión se llevó a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ manteniéndose en atmósfera de argón. Seguidamente, se adicionó vía cánula la solución de la sal de diazonio **29** sintetizada previamente sobre la resina y se mantuvo con agitación mecánica a temperatura ambiente durante 3 h bajo atmósfera de argón. Finalmente, la aminoacil-resina resultante **30** se lavó con DMF ($5 \times 30\text{ s}$) y DCM ($5 \times 30\text{ s}$). El rendimiento de acoplamiento de la fenilalanina fue del 64 % determinado por cuantificación de grupos Fmoc siguiendo el protocolo descrito en el apartado A.4.5 (Materiales y Métodos).



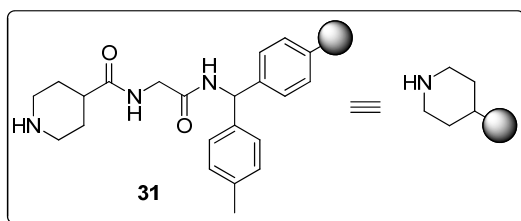
7.2.2. Formación de la unión triaceno sobre un soporte polimérico comercial funcionalizado con grupos amino

El estudio se realizó con la resina MBHA-PS ($f = 0.63\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) y el derivado de fenilalanina **27**.

7.2.2.1. Funcionalización del soporte polimérico

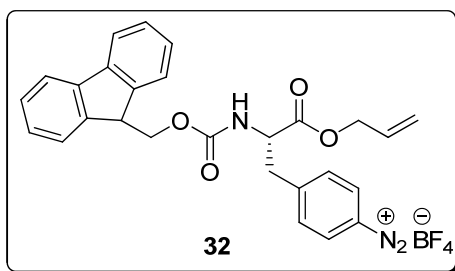
Tras acondicionar 1.57 g de resina MBHA-PS (0.99 mmol) siguiendo el protocolo experimental B.3.1 se llevó a cabo el acoplamiento de Fmoc-Gly-OH (0.88 g, 2.97 mmol) utilizando DIC (460 μL , 2.97 mmol) y HOBt (0.40 g, 2.97 mmol) en DMF (8 mL) (Protocolo general B.3.2). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación manual durante 1 h a temperatura ambiente y, la aminoacil-resina obtenida se lavó con DMF ($5 \times 30\text{ s}$), DCM ($5 \times 30\text{ s}$), MeOH ($5 \times 30\text{ s}$) y DCM ($5 \times 30\text{ s}$). A continuación, se eliminó el grupo protector Fmoc utilizando un tratamiento básico con piperidina (Protocolo general B.3.3) y se acopló el espaciador bifuncional ácido Boc-isonipecótico (0.68 g, 2.97 mmol) utilizando DIC (460 μL , 2.97 mmol) y HOBt (0.40 g, 2.97 mmol), en DMF (8 mL) (Protocolo general B.3.5) durante 1 h. La peptidil-resina resultante **31** se lavó con

DMF (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s), MeOH (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s), tras lo cual, se eliminó el grupo protector Boc siguiendo el procedimiento general B.3.4.



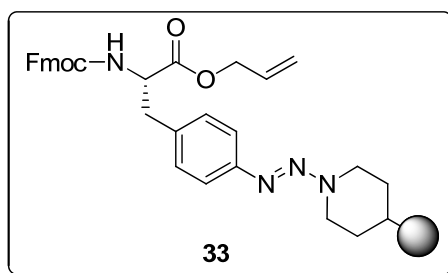
7.2.2.2. Formación de la sal de diazonio (32)

Se disolvió Fmoc-Phe(*p*NH₂)-OAlilo **27** (1.24 g, 2.80 mmol) en DCM anhidro (35 mL) bajo atmósfera de argón. La solución resultante se llevó a -10 °C con un baño de hielo y sal, adicionándose BF₃·Et₂O (1.80 mL, 14.20 mmol) y ^tBuONO (1.85 mL, 14.00 mmol). La mezcla resultante se mantuvo a -10 °C con agitación constante durante 1 h.



7.2.2.3. Formación de la unión triaceno

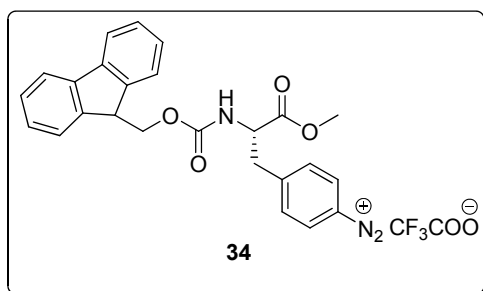
La aminoacil-resina **31** se introdujo en un vial y se adicionó piridina (18 mL). A continuación, se selló el vial con un *séptum* y se llevó a -10 °C en atmósfera de argón. Seguidamente, se adicionó vía cánula la solución de la sal de diazonio **32** y la suspensión resultante se mantuvo con agitación mecánica a temperatura ambiente durante 3 h bajo atmósfera de argón. La resina resultante **33** se lavó con DCM (5 × 30 s), MeOH (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s) y DMF (5 × 30 s). El rendimiento de acoplamiento fue del 91 % que se determinó por cuantificación de grupos Fmoc siguiendo el protocolo descrito en el apartado A.4.5 (Materiales y Métodos).



8. LIBERACIÓN DE LA FENILALANINA DEL SOPORTE POLIMÉRICO

8.1. En solución

En un vial provisto de núcleo magnético, se adicionaron el derivado de triaceno **28** (5.1 mg, $8.4 \cdot 10^{-3}$ mmol) y la mezcla acidolítica TFA/DCM (5: 95, V/V) (1 mL). La mezcla de reacción se mantuvo durante 1 h a temperatura ambiente y, se evaporó el disolvente con corriente de nitrógeno. Posteriormente, se adicionó Et₂O anhidro, se centrifugó el precipitado resultante durante 10 min a 10 °C (4800 rpm) y se decantó. Esta operación se realizó en dos ocasiones, obteniéndose la sal de diazonio **34** como un sólido anaranjado.



27.0 min, $t_{R4} = 28.5$ min.

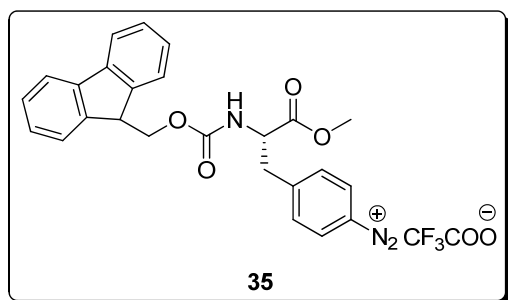
Caracterización

HPLC (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 40→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) $t_{R1} = 22.1$ min, $t_{R2} = 25.8$ min, $t_{R3} =$

8.2. En fase sólida

La aminoacil-resina **33** se trató con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5: 95, V/V) (3 × 2 min) y la suspensión resultante se mantuvo a temperatura ambiente con agitación manual esporádica. Seguidamente, se filtró y se lavó la resina con TFA (4 × 30 s), los filtrados se recogieron sobre un mismo vial y se evaporó el disolvente con corriente de nitrógeno. Posteriormente, se adicionó al residuo resultante Et₂O anhidro, se centrifugó durante 10 min a 10 °C (4800 rpm) y se decantó el sólido obtenido. Esta operación se realizó en dos ocasiones, obteniéndose el producto deseado como un sólido anaranjado. El rendimiento de liberación del aminoácido fue del 98 % que se

determinó por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc siguiendo el protocolo descrito en el apartado A.4.5 (Materiales y Métodos).



Caracterización

HPLC (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 40→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) t_{R1} = 22.1 min, t_{R2} =

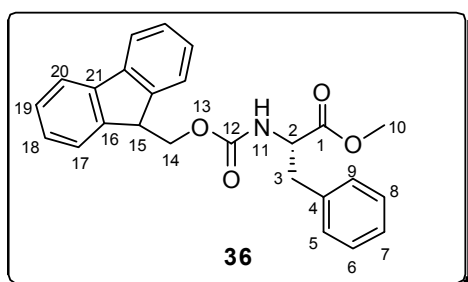
25.7 min, t_{R3} = 28.9 min

9. EL ENLACE TRIACENO COMO UNIÓN QUE NO DEJA TRAZAS: APLICACIÓN A LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

El estudio de la derivatización de la unión triaceno se realizó utilizando el derivado Fmoc-Phe(*p*NH₂)-OAlilo **27** (2.56 g, 5.10 mmol) sintetizado previamente. Primeramente, la síntesis de la sal de diazonio **32** se llevó a cabo siguiendo el protocolo experimental descrito en el apartado 6.3.2.2 utilizando BF₃·Et₂O (1.30 mL, 10.26 mmol) y ^tBuONO (1.40 mL, 10.59 mmol) en DCM anhidro (40 mL) bajo atmósfera de argón. La mezcla resultante se mantuvo a -10 °C con agitación magnética durante 1 h y, la solución resultante se adicionó vía canula a la mezcla de la resina MBHA-PS (f = 0.63 mmol·g⁻¹) funcionalizada con ácido isonipecótico **31** y piridina anhidra (12 mL, 0.15 mol) a -10 °C (apartado 6.3.2.3). La suspensión así obtenida se mantuvo con agitación mecánica a temperatura ambiente durante 3h bajo atmósfera de argón, se filtró y la resina resultante se lavó con DCM (5 × 30 s), MeOH (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s) y DMF (5 × 30 s). El rendimiento de reacción fue del 80 %, que se determinó por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc (apartado A.4.5, Materiales y Métodos). A continuación, se bloquearon las aminas secundarias que no habían reaccionado utilizando Ac₂O (3.22 mL, 34.06 mmol) y EDIA (5.90 mL, 33.87 mmol) en DMF (6 mL) durante 30 min, siguiendo el protocolo experimental B.3.7. A continuación, la resina se lavó con DMF (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s), MeOH (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s).

9.1. Fmoc-(S)-Phe-OMe (36)

Se disolvió Fmoc-(S)-Phe-OH (0.22 g, 0.5 mmol) en 5 mL de una solución de HCl en MeOH (2.9 M). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación magnética durante 1 h a 0 °C y durante 18 h a temperatura ambiente. Acto seguido, se eliminó el disolvente a presión reducida, el residuo obtenido se disolvió en AcOEt (10 mL) y la fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaHCO₃ (3 × 10 mL). A continuación, la fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose el producto deseado **36** como un sólido blanco (0.20 g, 91 %).

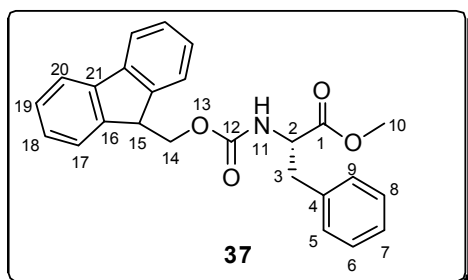


Caracterización

R_f [Hexano/^tBuOMe (1:1)] = 0.36; **HPLC** (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 40→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 29.2 min; **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (m, 2H, H₂₀), 7.56 (m, 2H, H₁₇), 7.40 (m, 2H, H₁₉), 7.28 (m, 5H, H₅₋₉), 7.09 (m, 2H, H₁₈), 5.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₁₁), 4.67 (dd a, *J*₁ = 14.0 Hz, *J*₂ = 6.0 Hz, 1H, H₂), 4.44 (dd, *J*₁ = 10.6 Hz, *J*₂ = 6.8 Hz, 1H, H₁₄), 4.34 (dd a, *J*₁ = 10.6 Hz, *J*₂ = 6.8 Hz, 1H, H₁₄), 4.20 (ta, *J* = 6.8 Hz, 1H, H₁₅), 3.73 (s, 3H, H₁₀), 3.15 (dd, *J*₁ = 14.0 Hz, *J*₂ = 5.6 Hz, 1H, H₃), 3.09 (dd, *J*₁ = 14.0 Hz, *J*₂ = 6.0 Hz, 1H, H₃) ppm.

9.2. Fmoc-(R)-Phe-OMe (37)

Se partió de Fmoc-(R)-Phe-OH (0.15 g, 0.4 mmol) y se siguió un procedimiento similar al descrito en el apartado 8.1 obteniéndose el producto deseado **37** como un sólido blanco (0.15 g, 93 %).



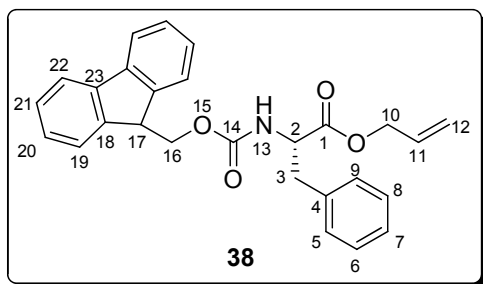
Caracterización

R_f [Hexano/^tBuOMe (1:1)] = 0.30; **HPLC** (Nucleosil C₁₈, 4 × 250 mm, 10 μm, 40→100 % B en 30 min (A: H₂O (0.045 % TFA) y B: MeCN (0.036 % TFA)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 28.9 min; **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (m, 2H, H₂₀), 7.56 (m, 2H, H₁₇), 7.40 (m, 2H,

H₁₉), 7.30 (m, 5H, H₅₋₉), 7.09 (m, 2H, H₁₈), 5.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₁₁), 4.67 (dd a, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, 1H, H₂), 4.44 (dd, $J_1 = 10.4$ Hz, $J_2 = 6.8$ Hz, 1H, H₁₄), 4.34 (dd a, $J_1 = 10.8$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, 1H, H₁₄), 4.20 (ta, $J = 7.2$ Hz, 1H, H₁₅), 3.73 (s, 3H, H₁₀), 3.15 (dd, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz, 1H, H₃), 3.09 (dd, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz, 1H, H₃) ppm.

9.3. Fmoc-Phe-OAlilo (38)

161 mg (0.10 mmol) de aminoacil-resina **33** se trató con TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), los filtrados obtenidos se recogieron sobre el mismo vial y se eliminó el disolvente a presión reducida en ausencia de luz. La sal de diazonio resultante se disolvió en DMF (5 mL) y se adicionó FeSO₄·7H₂O (0.04 g, 0.14 mmol). La mezcla resultante se mantuvo con agitación mecánica a temperatura ambiente durante 5 min y se eliminó el disolvente a presión reducida obteniéndose el producto deseado con un 84 % de pureza determinada por HPLC). El producto obtenido se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 % → 65 % B en 1 min y 65 % → 83 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm, $t_R = 6.0$ min) obteniéndose 15 mg de derivado **38** como un sólido blanco (66 % de rendimiento global).



Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μ m, 5 → 100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, $\lambda = 220$ nm) $t_R = 4.00$ min; **¹H-NMR** (400 MHz,

CDCl₃) δ 7.77 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₂₂), 7.59 – 7.52 (m, 2H, H₁₉), 7.40 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H₂₁), 7.34 – 7.24 (m, 5H, H₂₀ y H₆₋₈), 7.11 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H, H₅ y H₉), 5.93 – 5.81 (m, 1H, H₁₁), 5.33 (bs, 1H, H₁₃), 5.30 – 5.21 (m, 2H, H₁₂), 4.74 – 4.66 (m, 1H, H₂), 4.62 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, H₁₀), 4.44 (dd, $J = 10.6, 7.1$ Hz, 1H, H₁₆), 4.34 (dd, $J = 10.6, 7.0$ Hz, 1H, H₁₆), 4.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H₁₇), 3.20 – 3.07 (m, 2H, H₃); **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 171.3 (C₁), 155.7 (C₁₄), 144.0 (C₁₈), 141.5 (C₂₃), 135.8 (C₁₁), 131.5 (C₄), 129.5 (C₅ y C₉), 128.8 (C₂₀), 127.9 (C₂₁), 127.3 (C₇), 127.2 (C₆ y C₈), 125.3 (C₁₉), 120.1 (C₂₂), 119.31 (C₁₂), 67.1 (C₁₆), 66.3 (C₁₀), 55.0 (C₂), 47.3 (C₁₇), 38.4 (C₃) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₇H₂₅NO₄ [M+H]⁺ 428.2, encontrada 428.2; **HRMS** m/z calculada para C₂₇H₂₅NO₄ [M+H]⁺ 428.1856, encontrada 428.1862.

9.4. Síntesis de péptidos modelo

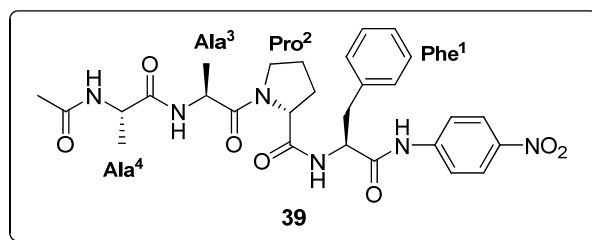
La síntesis de los péptidos modelo se realizó utilizando el derivado Fmoc-Phe(*p*NH₂)-OAlilo **27** (1.24 g, 2.80 mmol) a partir del cual se preparó la correspondiente sal de diazonio **32** utilizando BF₃·Et₂O (0.63 mL, 4.94 mmol) y ^tBuONO (0.60 mL, 5.24 mmol) en DCM anhidro (35 mL) bajo atmósfera de argón (apartado 6.3.2.2). La solución resultante se mantuvo a -10 °C con agitación magnética durante 1 h y se adicionó vía canula a la mezcla de la resina MBHA (f = 0.63 mmol·g⁻¹) funcionalizada con ácido isonipecótico previamente preparada **31** y piridina anhidra (18 mL) a -10 °C (apartado 6.3.2.3). La suspensión resultante se mantuvo con agitación mecánica a temperatura ambiente durante 3 h bajo atmósfera de argón, se filtró y se lavó la resina con DCM (5 × 30 s), MeOH (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s) y DMF (5 × 30 s). El rendimiento de acoplamiento fue del 90 %, que se determinó por cuantificación espectrofotométrica de grupos Fmoc (protocolo A.4.5, Materiales y Métodos). A continuación, se bloquearon las aminas secundarias que no habían reaccionado utilizando Ac₂O (0.85 mL, 8.81 mmol) y EDIA (1.50 mL, 8.61 mmol) en DMF (6 mL) durante 30 min (protocolo B.3.7). A continuación, la resina se lavó con DMF (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s), MeOH (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s).

9.4.1. Síntesis de péptidos modificados en el extremo carboxilo

9.4.1.1. Síntesis del péptido Ac-AAPF-pNA (**39**)

El péptido modelo **39** se sintetizó a partir de 310 mg (0.195 mmol) de aminoacil-resina **33**. Tras eliminar el grupo protector alilo del extremo carboxilo de la fenilalanina utilizando Pd(PPh₃)₄ (0.09 g, 0.08 mmol) y PhSiH₃ (1.15 mL, 9.33 mmol) en DCM (20 mL) (protocolo experimental B.3.9), se procedió al acoplamiento de *p*-nitroanilina (0.3 g, 2.17 mmol) utilizando PyAOP (0.3 g, 0.58 mmol), HOBt (0.08 g, 0.59 mmol) y EDIA (200 µL, 1.15 mmol) en DMF (8 mL). La mezcla resultante se mantuvo con agitación mecánica durante 1 h a temperatura ambiente. El procedimiento se repitió cuatro veces más y la peptidil-resina se lavó con DMF (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s), MeOH (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s). A continuación, se eliminó el grupo protector Fmoc de la fenilalanina utilizando una disolución de 20 % de piperidina en DMF (protocolo experimental B.3.3) y se acoplaron el resto de aminoácidos de la secuencia peptídica

(Fmoc-Pro²-OH, Fmoc-Ala³-OH, Fmoc-Ala⁴-OH) utilizando DIC (91 μ L, 0.59 mmol) y HOBt (0.08 g, 0.59 mmol) en DMF (8 mL) según el protocolo experimental que se describe en el apartado B.3.8. Acto seguido, se desprotegió el extremo amino de la cadena peptídica utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3) y se acetiló dicho extremo utilizando Ac₂O (0.17 mL, 1.76 mmol) y EDIA (0.3 mL, 1.72 mmol) en DMF (10 mL) (apartado B.3.7). A continuación, se escindió el péptido de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (con un 96 % de rendimiento determinado por análisis de aminoácidos de la peptidil-resina) y se redujo la sal de diazonio resultante utilizando FeSO₄·7H₂O (0.08 g, 0.29 mmol) en DMF (8 mL). El crudo resultante (con un 86 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 %→35 % B en 1 min y 35 %→53 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm, t_R = 4.92 min) obteniendo 12.8 mg de péptido **39** como un sólido blanco (19 % de rendimiento global).



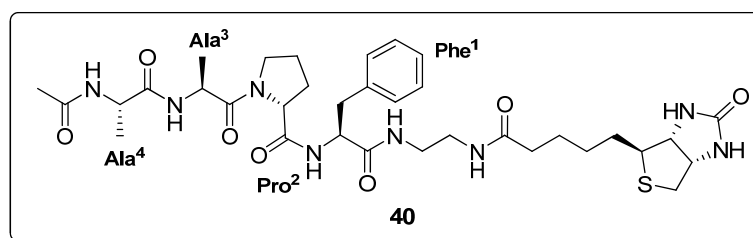
Caracterización

HPLC (XBridge BEH C₁₈, 19 × 100 mm, 5 μ m, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 6.33 min; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₈H₃₅N₆O₇ [M+H]⁺567.3, encontrada 567.2; **HRMS** m/z calculada para C₂₈H₃₅N₆O₇ [M+H]⁺567.2567, encontrada 567.2586.

9.4.1.2. Síntesis del péptido Ac-AAPF biotinilado (**40**)

El péptido modelo **40** se sintetizó a partir de 301 mg (0.190 mmol) de la aminoacil-resina **33**. Según el protocolo experimental B.3.3 se eliminó el grupo protector Fmoc utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) y el acoplamiento del resto de aminoácidos de la secuencia peptídica (Fmoc-Pro²-OH, Fmoc-Ala³-OH, Fmoc-Ala⁴-OH) se realizó utilizando DIC (91 μ L, 0.59 mmol) y HOBt (0.08 g, 0.59 mmol) en DMF (8 mL) (protocolo experimental B.3.8). A continuación, se eliminó el grupo protector

Fmoc del extremo amino de la cadena peptídica utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3) y se acetilaron los grupos amino resultantes utilizando Ac_2O (0.15 mL, 1.56 mmol) y EDIA (0.3 mL, 1.72 mmol) en DMF (10 mL) (protocolo B.3.7). Seguidamente, se eliminó el grupo protector alilo de la fenilalanina utilizando $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.09 g, 0.08 mmol) y PhSiH_3 (1.12 mL, 9.09 mmol) en DCM (20 mL) (procedimiento experimental B.3.9) y se incorporó el espaciador *N*-Fmoc-etilendiamina como hidrocloreuro (0.30 g, 0.95 mmol) utilizando DIC (90 μL , 0.58 mmol), Oxyma[®] (0.08 g, 0.57 mmol) y EDIA (165 μL , 0.95 mmol) en DMF/DCM (1:1, V/V) (8 mL). La mezcla resultante se mantuvo durante 1 h con agitación mecánica y se lavó la peptidil-resina resultante con DMF (5 \times 30 s), DCM (5 \times 30 s) y DMF (5 \times 30 s). Acto seguido, se eliminó el grupo Fmoc del espaciador utilizando una disolución de DBU en DMF (3 %, V/V) (protocolo B.3.3) y se acopló la biotina (0.14 g, 0.57 mmol) utilizando PyAOP (0.3 g, 0.58 mmol), HOAt (0.08 g, 0.59 mmol) y EDIA (200 μL , 1.15 mmol) en DMF/DCM (1:1, V/V) (8 mL). La mezcla se mantuvo en agitación durante 1 h y la resina se lavó con DMF (5 \times 30 s), DCM (5 \times 30 s), MeOH (5 \times 30 s) y DCM (5 \times 30 s). A continuación, se trató la resina con TFA/DCM (5:95, V/V) (apartado 3.2) y se redujo la sal de diazonio utilizando $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.08 g, 0.29 mmol) en DMF (8 mL). La liberación del péptido tuvo lugar con un 97 % de rendimiento determinado por análisis de aminoácidos de la peptidil-resina resultante y el producto deseado se obtuvo con un 94 % de pureza determinada por HPLC. Una vez purificado el péptido por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 % \rightarrow 20 % B en 1 min y 20 % \rightarrow 33 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm, $t_R = 4.35$ min) se obtuvieron 26.9 mg de péptido **40** como un sólido blanco (32 % de rendimiento global).



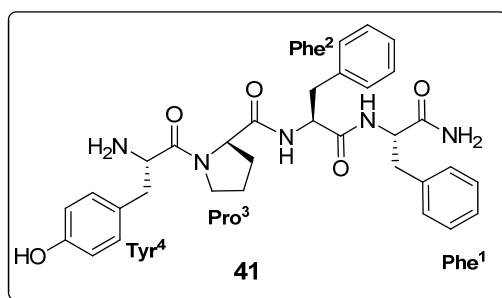
Caracterización

HPLC (XBridge BEH C_{18} , 19 \times 100 mm, 5 μm , 5 \rightarrow 100 % B en 11 min (A: H_2O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, $\lambda = 220$ nm) $t_R = 4.45$ min; **ESI(+)**

m/z calculada para $C_{34}H_{51}N_8O_7S [M+H]^+$ 715.4, encontrada 715.4; **HRMS** m/z calculada para $C_{34}H_{51}N_8O_7S [M+H]^+$ 715.3601, encontrada 715.3587.

9.4.1.3. Síntesis del péptido Endomorfina-2 (41)

El péptido modelo **41** se sintetizó a partir de 308 mg (0.194 mmol) de la aminoácil-resina **33**. La elongación de la cadena peptídica se llevó a cabo acoplado los aminoácidos de la secuencia peptídica (Fmoc-Pro³-OH y Fmoc-Tyr(^tBu)⁴-OH) utilizando DIC (91 μ L, 0.59 mmol) y HOBt (0.08 g, 0.59 mmol) en DMF (8 mL). A continuación, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo de la fenilalanina² utilizando Pd(PPh₃)₄ (0.09 g, 0.08 mmol) y PhSiH₃ (1.15 mL, 9.33 mmol) en DCM (20 mL) (protocolo experimental B.3.9) y se acopló H-Phe¹-NH₂ (0.10 g, 0.61 mmol) utilizando DIC (91 μ L, 0.59 mmol) y Oxyma[®] como aditivo (0.08 g, 0.58 mmol) en DMF (8 mL). La mezcla resultante se mantuvo con agitación mecánica durante 1 h a temperatura ambiente. Tras repetir el acoplamiento una vez más, se eliminó el grupo protector Fmoc del extremo amino de la cadena utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo general B.3.3) y se escindió el péptido de la resina con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) con un 98 % de rendimiento determinado por análisis de aminoácidos de la peptidil-resina. Acto seguido, se redujo la sal de diazonio resultante utilizando FeSO₄·7H₂O (0.08 g, 0.29 mmol) en DMF (8 mL), lo que proporcionó un crudo peptídico con un 73 % de pureza determinada por HPLC, que se trató con la mezcla acidolítica TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5, V/V/V) durante 3 h a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó la mayor parte de la mezcla acidolítica por evaporación y se precipitó el producto con Et₂O, se centrifugó durante 10 min a 4 °C (3500 rpm) y se decantó. La operación de precipitación se llevó a cabo dos veces más y el crudo resultante se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 %→15 % B en 1 min y 15 %→23 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm, t_R = 4.90 min) obteniéndose 26.1 mg de péptido **41** como un sólido blanco (38 % de rendimiento global).



Caracterización

HPLC (XBridge BEH C₁₈, 19 × 100 mm, 5 μm, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 4.65 min; **ESI(+)** m/z calculada para C₃₂H₃₈N₅O₅ [M+H]⁺572.3, encontrada 572.2; **HRMS** m/z calculada para C₃₂H₃₈N₅O₅ [M+H]⁺572.2873, encontrada 572.2861.

9.4.1.4. Estudio de la racemización

9.4.1.4.1. Síntesis del péptido modelo Ac-L-Phe-L-Phe-NH₂ (42) utilizando la unión triaceno

- Estrategia A: Síntesis de (42a)

El péptido modelo **42a** se sintetizó a partir de 142 mg (0.09 mmol) de aminoacil-resina **33**. Tras eliminar el grupo protector Fmoc utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3), se llevó a cabo la acetilación del residuo de fenilalanina utilizando Ac₂O (78 μL, 0.81 mmol) y EDIA (0.14 mL, 0.81 mmol) en DMF (6 mL) (apartado B.3.7). A continuación, se procedió a la eliminación del grupo protector alilo del extremo carboxilo utilizando Pd(PPh₃)₄ (0.04 g, 0.04 mmol) y PhSiH₃ (0.53 mL, 4.32 mmol) en DCM (10 mL) (protocolo experimental B.3.9). Una vez, se lavó la aminoacil-resina con DMF (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s), MeOH (3 × 30 s) y DCM (5 × 30 s) se acopló H-Phe-NH₂·HCl (0.05 g, 0.27 mmol) utilizando DIC (40 μL, 0.26 mmol) y Oxyma[®] (0.03 g, 0.27 mmol) en DMF (6 mL) manteniéndose la mezcla de reacción durante 1 h a temperatura ambiente con agitación manual esporádica (el procedimiento se repitió en dos ocasiones para asegurar que el acoplamiento fuese cuantitativo). Acto seguido, se desancló el péptido de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) y se redujo la sal de diazonio correspondiente con

FeSO₄·7H₂O (0.04 g, 0.14 mmol) en DMF (4 mL) (apartado 4.1). El crudo peptídico resultante se analizó por HPLC.

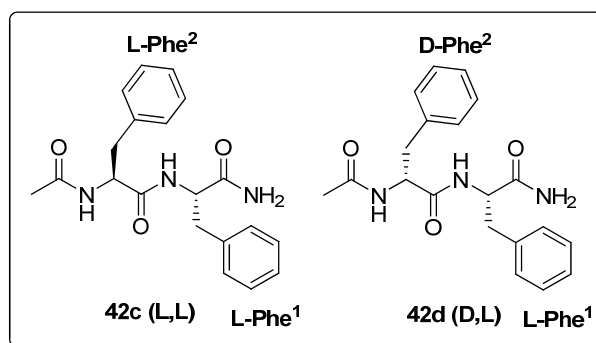
- **Estrategia B: Síntesis de (42b)**

El péptido modelo **42b** se sintetizó a partir de 153 mg (0.1 mmol) de aminoacil-resina **33**. Tras eliminar el grupo protector alilo del extremo carboxilo utilizando Pd(PPh₃)₄ (0.04 g, 0.04 mmol) y PhSiH₃ (0.53 mL, 4.32 mmol) en DCM (10 mL) (protocolo experimental B.3.9), se acopló H-Phe-NH₂·HCl (0.06 g, 0.30 mmol) utilizando DIC (46 µL, 0.30 mmol) y Oxyma® (0.04 g, 0.32 mmol) en DMF (8 mL) manteniendo la mezcla de reacción durante 1 h a temperatura ambiente con agitación manual esporádica. El procedimiento se repitió para asegurar que el acoplamiento fuese cuantitativo. Seguidamente, se eliminó el grupo protector Fmoc del extremo amino de la cadena utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3) y se acetiló con Ac₂O (78 µL, 0.81 mmol) y EDIA (0.14 mL, 0.81 mmol) en DMF (6 mL) (apartado B.3.7). A continuación, se desancló el péptido de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) y se redujo la sal de diazonio correspondiente con FeSO₄·7H₂O (0.04 g, 0.14 mmol) en DMF (4 mL) (apartado 4.1). El crudo peptídico resultante se analizó por HPLC.

9.4.1.4.2. Síntesis de los péptidos modelo Ac-L-Phe-L-Phe-NH₂ (42c) y Ac-D-Phe-L-Phe-NH₂ (42d) utilizando la resina MBHA-PS con el espaciador Rink (Estrategia C)

Los péptidos modelo **42a** y **42b** se sintetizaron partiendo de 1 g ($f = 0.73 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) de resina MBHA modificada con el espaciador Rink incorporado para la síntesis de péptidos carboxamida (resina Fmoc-Rink amida MBHA). Tras lavar la resina con DCM (10 × 30 s) y DMF (10 × 30 s), se eliminó el grupo protector Fmoc utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3). A continuación, se incorporó Fmoc-L-Phe-OH (0.85 g, 2.19 mmol) a la resina utilizando DIC (0.34 mL, 2.20 mmol) y Oxyma® (0.28 g, 2.19 mmol) en DMF (15 mL). La suspensión se mantuvo durante 1 h a temperatura ambiente con agitación manual esporádica. Acto seguido, se eliminó el grupo protector Fmoc del aminoácido incorporado utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3) y la aminoacil-resina se

dividió en dos lotes para incorporar, a continuación Fmoc-L-Phe-OH (lote **42a**) y Fmoc-D-Phe-OH (lote **42b**) utilizando DIC (0.17 mL, 1.10 mmol) y Oxyma[®] (0.16 g, 1.13 mmol) en DMF (15 mL) (protocolo general B.3.8). Tras 1 h de reacción con agitación manual esporádica a temperatura ambiente, se eliminó el grupo protector Fmoc de las peptidil-resinas de ambos lotes utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3) y se acetiló el extremo amino con Ac₂O (0.32 mL, 3.28 mmol) y EDIA (0.60 mL, 3.44 mmol) en DMF (15 mL) (apartado B.3.7). Los dipéptidos se liberaron de las resinas utilizando una mezcla acidolítica de TFA/TIS/DCM (95:2.5:2.5, V/V/V) durante 2 h, los crudos peptídicos obtenidos se precipitaron con hexano y los residuos sólidos así obtenidos se centrifugaron (5 min a 3500 rpm), se filtraron y se analizaron por HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 1.87 min (Ac-L-Phe-L-Phe-NH₂, **42c**) y t_R = 2.23 min (Ac-D-Phe-L-Phe-NH₂, **42d**).



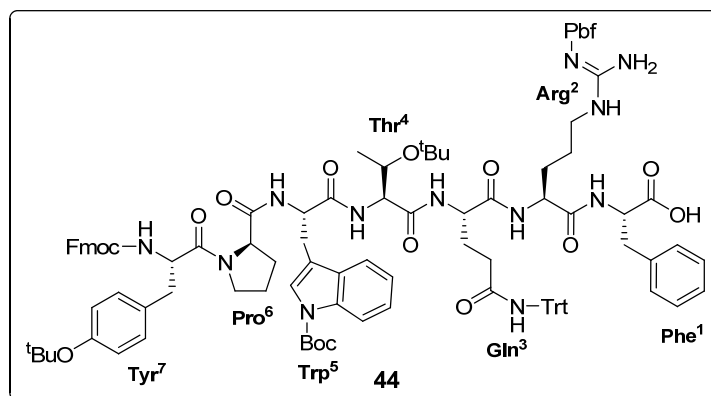
9.4.2. Síntesis de péptidos protegidos

9.4.2.1. Síntesis de derivados protegidos del péptido Hemorfina-7

Estos derivados se sintetizaron partiendo de 800 mg (0.504 mmol) de aminoacil-resina **33**. Tras eliminar el grupo protector Fmoc del extremo amino de la Phe¹ utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo general B.3.3), se acoplaron el resto de aminoácidos de la secuencia peptídica (Fmoc-Arg(Pbf)²-OH, Fmoc-Gln(Trt)³-OH, Fmoc-Thr(^tBu)⁴-OH, Fmoc-Trp(Boc)⁵-OH, Fmoc-Pro⁶-OH, Fmoc-Tyr(^tBu)⁷-OH) utilizando DIC (0.23 mL, 1.49 mmol) y HOBt (0.20 g, 1.48 mmol) en DMF (15 mL) (protocolo B.3.8). La peptidil-resina resultante **43** se utilizó para la preparación de los derivados de Hemorfina-7.

9.4.2.2.1. Síntesis del derivado protegido (44)

El péptido modelo **44** se sintetizó partiendo de 250 mg (0.158 mmol) de la peptidil-resina **43** que se lavó con DMF (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s) y DMF (5 × 30 s). A continuación, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo de la Phe¹ utilizando Pd(PPh₃)₄ (0.07 g, 0.06 mmol) y PhSiH₃ (0.93 mL, 7.54 mmol) en DCM (20 mL) (protocolo experimental B.3.9). Tras lavar la peptidil-resina con DMF (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s), MeOH (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s), se desancló el péptido de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (con un 98 % de rendimiento, determinado por análisis de aminoácidos de la peptidil-resina) y se redujo la sal de diazonio resultante utilizando FeSO₄·7H₂O (0.07 g, 0.25 mmol) en DMF (8 mL) obteniéndose el producto deseado con un 93 % de pureza determinada por HPLC. La purificación de **44** por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 % → 95 % B en 1 min y 95 % → 100 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm, t_R = 6.60 min) dio lugar a 106.4 mg de péptido **44** que se obtuvo como un sólido blanco (35 % de rendimiento global).

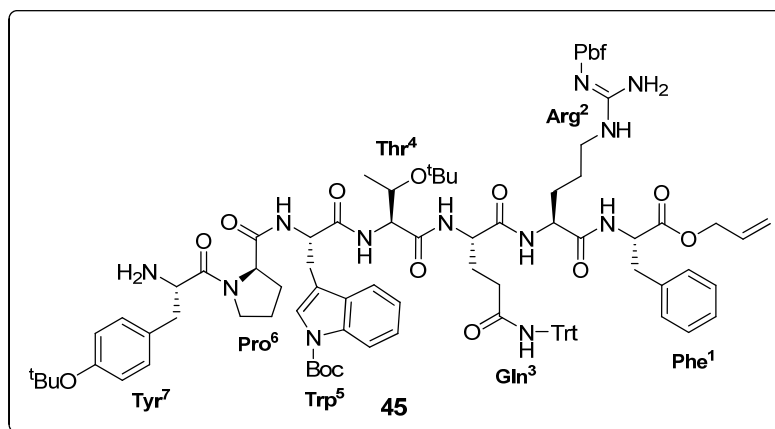


Caracterización

HPLC (XBridge BEH C₁₈, 19 × 100 mm, 5 μm, 5 → 100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 10.57 min;
ESI(+) *m/z* calculada para C₉₇H₁₂₃N₁₂O₁₆S [M+H]⁺ 1925.9262, encontrada 1925.9248;
HRMS *m/z* calculada para C₉₇H₁₂₃N₁₂O₁₆S [M+H]⁺ 1925.9269, encontrada 1925.9248.

9.4.2.1.2. Síntesis del derivado protegido (45)

El péptido modelo **45** se sintetizó partiendo de 250 mg (0.158 mmol) de peptidil-resina **43**. La peptidil-resina se lavó con DMF (5 × 30 s), se eliminó el grupo protector Fmoc del extremo amino utilizando una disolución de DBU en DMF (3%, V/V) (8 mL) (protocolo general B.3.3) y se lavó la peptidil-resina resultante con DMF (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s), MeOH (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s). A continuación, se escindió el péptido de la resina con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (con un 98 % de rendimiento, determinado por análisis de aminoácidos de la peptidil-resina) y se redujo la sal de diazonio resultante utilizando $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.07 g, 0.25 mmol) en DMF (8 mL). El crudo peptídico resultante que se obtuvo con un 94 % de pureza determinada por HPLC, se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 % → 10 % B en 1 min y 10 % → 25 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm, $t_R = 4.30$ min) obteniéndose 88.1 mg de péptido **45** como un sólido blanco (32 % de rendimiento global).



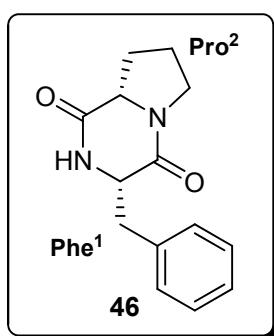
Caracterización

HPLC (XBridge BEH C_{18} , 19×100 mm, $5 \mu\text{m}$, 5 → 100 % B en 11 min (A: H_2O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, $\lambda = 220$ nm) $t_R = 9.87$ min; **ESI(+)** m/z calculada para $\text{C}_{97}\text{H}_{123}\text{N}_{12}\text{O}_{16}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1743.8901, encontrada 1743.8860; **HRMS** m/z calculada para $\text{C}_{97}\text{H}_{123}\text{N}_{12}\text{O}_{16}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1743.8901, encontrada 1743.8860.

9.4.3. Síntesis de péptidos cíclicos

9.4.3.1. Síntesis de Esquizondroquina B (46)

El péptido modelo **46** se sintetizó a partir de 270 mg (0.170 mmol) de aminoacil-resina **33**. Tras eliminar el grupo protector alilo del extremo carboxilo utilizando $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.08 g, 0.07 mmol) y PhSiH_3 (1.00 mL, 8.11 mmol) en DCM (20 mL) (protocolo experimental B.3.9), se incorporó el derivado de prolina H-Pro²-OMe-HCl (0.07 g, 0.54 mmol) tratando la resina con PyAOP (0.26 g, 0.50 mmol), HOAt (0.07g, 0.51 mmol) y EDIA (265 μL , 1.52 mmol) en DMF (8 mL) durante 1 h con agitación manual esporádica (protocolo general B.3.8). A continuación, se eliminó el grupo protector Fmoc del extremo amino utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (4 \times 10 min) (protocolo general B.3.3) y la peptidil-resina se lavó con DMF (5 \times 30 s), DCM (5 \times 30 s), MeOH (5 \times 30 s) y DCM (5 \times 30 s). Acto seguido, se escindió el péptido de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (con un >99 % de rendimiento, determinado por análisis de aminoácidos de la peptidil-resina) y se redujo la sal de diazonio resultante con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.07 g, 0.25 mmol) en DMF (8 mL). El producto deseado se obtuvo con un 79 % de pureza determinada por HPLC y se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 % \rightarrow 20 % B en 1 min y 20 % \rightarrow 33 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm, $t_R = 4.62$ min) resultando 17.1 mg de péptido **46** como un sólido blanco (67 % de rendimiento global).



Caracterización

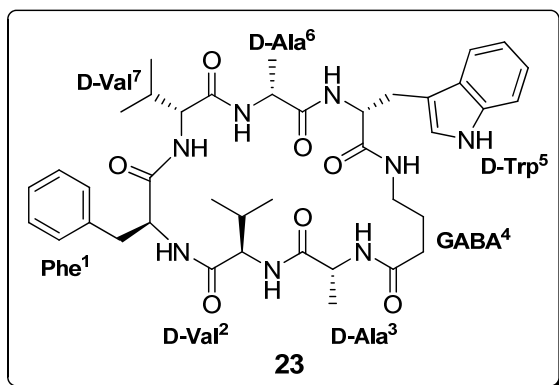
HPLC (XBridge BEH C_{18} , 19 \times 100 mm, 5 μm , 5 \rightarrow 100 % B en 11 min (A: H_2O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, $\lambda = 220$ nm) $t_R = 4.45$ min; **ESI(+)** m/z calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 245.1290, encontrada 245.1287; **HRMS** m/z calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 245.1290, encontrada

245.1287.

9.4.3.2. Síntesis Unguisina A (23)

El péptido modelo **23** se sintetizó a partir de 320 mg (0.202 mmol) de la aminoacil-resina **33**. Se eliminó el grupo protector Fmoc del aminoácido fenilalanina utilizando

una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3.) y se acoplaron el resto de aminoácidos de la secuencia peptídica (Fmoc-D-Val²-OH, Fmoc-D-Ala³-OH, Fmoc-GABA⁴-OH, Fmoc-D-Trp⁵-OH, Fmoc-D-Ala⁶-OH, Fmoc-D-Val⁷-OH) utilizando DIC (0.1 mL, 0.65 mmol) y HOBt (0.08 g, 0.59 mmol) en DMF (8 mL) (protocolo experimental B.3.8). La eliminación de grupos Fmoc de los aminoácidos acoplados se realizó utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) exceptuando la eliminación de grupos Fmoc de los aminoácidos acoplados tras el Fmoc-GABA⁴-OH donde se utilizó una mezcla de DBU y piperidina (10 %: 10%, V/V) en DMF (1 × 1 min y 2 × 10 min) (protocolo general B.3.3). Una vez eliminado el grupo protector Fmoc del extremo amino con una disolución de DBU en DMF (3 %, V/V) (protocolo B.3.3), se eliminó el grupo alilo del extremo carboxilo utilizando Pd(PPh₃)₄ (0.09 g, 0.08 mmol) y PhSiH₃ (1.2 mL, 9.74 mmol) en DCM (20 mL) (protocolo B.3.9). Tras lavar la peptidil-resina resultante con DCM (5 × 30 s), DMF (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s), se cicló la cadena peptídica utilizando PyAOP (0.32 g, 0.61 mmol), HOAt (0.08 g, 0.59 mmol) y EDIA (212 µL, 1.22 mmol) en DMF (8 mL) durante 1 h a temperatura ambiente (se realizaron dos tratamientos). La peptidil-resina se lavó con DMF (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s), MeOH (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s). A continuación, se escindió el péptido de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (con un 76 % de rendimiento, determinado por análisis de aminoácidos de la peptidil-resina) y la sal de diazonio resultante se redujo utilizando FeSO₄·7H₂O (0.08 g, 0.29 mmol) en DMF (8 mL) obteniéndose el producto deseado con un 84 % de pureza determinada por HPLC. El crudo peptídico se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 %→35 % B en 1 min y 35 %→48 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm, t_R = 4.90 min), resultando 28.7 mg de péptido **23** como un sólido blanco (30 % de rendimiento global).



Caracterización

HPLC (XBridge BEH C₁₈, 19 × 100 mm, 5 µm, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 6.23 min; **ESI(+)** m/z calculada para

$C_{40}H_{55}N_8O_7$ $[M+H]^+$ 759.4194, encontrada 759.4180; **HRMS** m/z calculada para $C_{40}H_{55}N_8O_7$ $[M+H]^+$ 759.4194, encontrada 759.4180.

10. EL ENLACE TRIACENO COMO ESPACIADOR MULTIFUNCIONAL: APLICACIÓN A LA SÍNTESIS DEL DEPSIPÉPTIDO ZIGOSPORAMIDA Y DERIVADOS

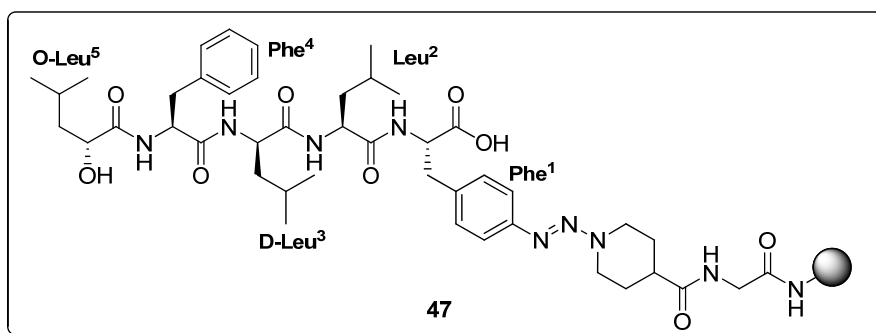
10.1. Estudio de la síntesis de la Zigosporamida

La Zigosporamida y derivados se sintetizaron utilizando la resina MBHA-PS (2.60 g, 1.64 mmol) (f: $0.63 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$). Se acopló a la resina la resina el ácido Boc-isonipecótico (1.13 g, 4.92 mmol) utilizando DIC (762 μL , 4.92 mmol) y HOBt (665 mg, 4.92 mmol) en DMF (protocolo B.3.5). A continuación, se eliminó el grupo Boc con TFA en DMF (protocolo B.3.4). Por otra parte, el derivado de aminoácido Fmoc-Phe($p\text{NH}_2$)-OAlilo **27** (2.58 g, 5.39 mmol) se trató en un balón de 250 mL provisto de núcleo magnético con $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (1.30 mL, 10.3 mmol) y $^t\text{BuONO}$ (1.40 mL, 10.6 mmol) en DCM anhidro (40 mL) bajo atmósfera de argón (apartado 6.3.2.2) y, la sal de diazonio resultante se adicionó vía canula a resina funcionalizada con ácido isonipecótico en presencia de piridina anhidra (12 mL, 0.15 mmol) (apartado 6.3.2.3). La suspensión resultante se mantuvo con agitación mecánica a temperatura ambiente durante 3 h bajo atmósfera de argón, se filtró la resina y se lavó con DCM (5 \times 30 s), MeOH (5 \times 30 s), DCM (5 \times 30 s) y DMF (5 \times 30 s). A continuación, se bloquearon los grupos amino libres tratando la resina con Ac_2O (3.22 mL, 34.1 mmol) y EDIA (5.90 mL, 33.9 mmol) en DMF (6 mL) durante 30 min (protocolo B.3.7). Seguidamente, la resina se lavó con DMF (5 \times 30 s), DCM (5 \times 30 s), MeOH (5 \times 30 s) y DCM (5 \times 30 s). El acoplamiento de fenilalanina al soporte polimérico fue del 80 % (apartado 3.5.). La aminoacil-resina así obtenida **33** se utilizó para preparar la Zigosporamida y derivados.

10.1.1. Estrategia sintética 1

El precursor lineal de la Zigosporamida se sintetizó a partir de 390 mg (0.25 mmol) de aminoacil-resina **33**. Tras eliminar el grupo protector Fmoc del extremo amino utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3), se llevó a cabo la elongación de la cadena peptídica utilizando DIC (0.12 mL, 0.77 mmol) como agente de acoplamiento y Oxyma[®] (0.11 g, 0.77 mmol) como aditivo, en DMF (8 mL).

Así, se acoplaron sucesivamente los siguientes aminoácidos: Fmoc -Leu²-OH (265 mg, 0.75 mmol), Fmoc-D-Leu³-OH (265 mg, 0.75 mmol), Fmoc-Phe⁴-OH (97 mg, 0.25 mmol) y ácido (S)-2-hidroxicaproico (99 mg, 0.75 mmol) (protocolo general B.3.8). A continuación, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo utilizando Pd (PPh₃)₄ (119 mg, 0.10 mmol) y PhSiH₃ (1.50 mL, 12.17 mmol) (protocolo B.3.9). La peptidil-resina **47** obtenida la utilizamos en pruebas posteriores de ciclación (formación del enlace éster) del péptido sobre el soporte polimérico.



10.1.1.1. Estudio de la ciclación del precursor lineal (**47**): Formación del enlace éster

- Ensayo A: Se partió de 53 mg (0.02 mmol) de peptidil-resina **47**. El intento de ciclación se llevó a cabo utilizando PyBOP (0.04 g, 0.08 mmol), HOAt (0.01 g, 0.07 mmol) y EDIA (25 μ L, 0.14 mmol) en DMF (5 mL) durante 3 h a temperatura ambiente y con agitación manual esporádica. A continuación, una alícuota (10 mg) de la peptidil-resina resultante se trató con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 \times 2 min). Las soluciones orgánicas de los tratamientos se recogieron en un mismo vial y se eliminó el disolvente a presión reducida. Seguidamente, se redujo la sal de diazonio obtenida utilizando FeSO₄·7H₂O (0.01 g, 0.04 mmol) en DMF (3 mL) durante 5 min a temperatura ambiente, con agitación esporádica y se eliminó el disolvente a presión reducida. El análisis del crudo obtenido por HPLC-MS, sin embargo, dio un resultado negativo. El tratamiento de la peptidil-resina con las mismas condiciones durante 24 h a temperatura ambiente dio el mismo resultado analítico.
- Ensayo B: Se partió de 42 mg (0.02 mmol) de peptidil-resina **47**. El intento de ciclación se llevó a cabo con DIC (11 μ L, 0.07 mmol) y DMAP (0.5 mg, 0.04 mmol) en DCM (5 mL) durante 3 h a temperatura ambiente y con agitación manual esporádica. A continuación, la resina se lavó con DCM (5 \times 30 s), DMF (5 \times 30 s) y

DCM (5 × 30 s) y, una alícuota (10 mg) se trató con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min). Las soluciones orgánicas de los tratamientos se recogieron en un mismo vial y se eliminó el disolvente a presión reducida. Seguidamente, se redujo la sal de diazonio obtenida utilizando FeSO₄·7H₂O (0.01 g, 0.04 mmol) en DMF (3 mL) durante 5 min con agitación constante se eliminó el disolvente a presión reducida. El análisis del crudo así obtenido por HPLC-MS no reveló la presencia del depsipéptido cíclico deseado.

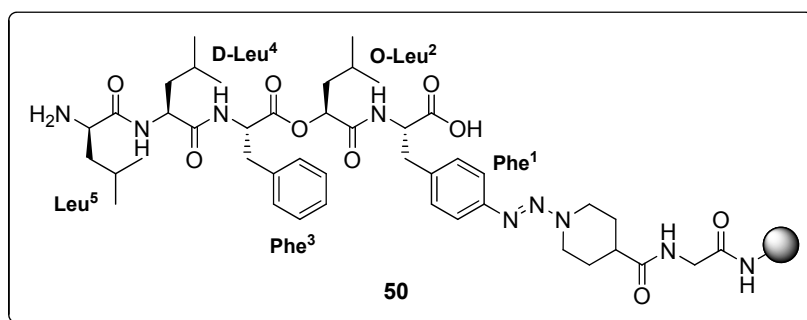
10.1.2. Estrategia sintética 2

La aminoacil-resina **33** (1.39 g, 0.91 mmol) se trató con una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3) y se acopló el ácido (S)-2-hidroxipropoico (361 mg, 2.73 mmol) utilizando DIC (0.45 mL, 2.91 mmol) y HOBt·H₂O (0.37 g, 2.42 mmol) en DMF (15 mL). La peptidil-resina así obtenida **48** se utilizó para el estudio de la formación del enlace éster con el aminoácido Fmoc-Phe²-OH, para lo cual se llevaron a cabo diferentes ensayos con distintas condiciones de reacción:

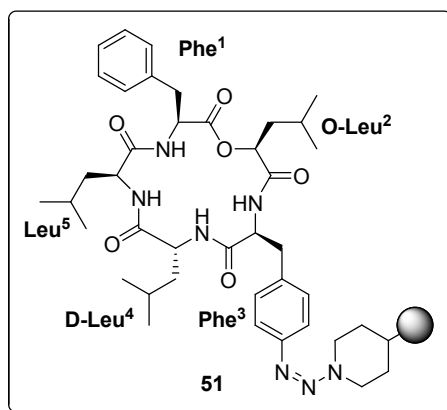
- Ensayo 1: Se realizó utilizando 53 mg (0.02 mmol) de peptidil-resina **48**. La resina se trató con Fmoc-Phe²-OH (0.07 g, 0.18 mmol), DIC (29 µL, 0.19 mmol) y HOBt·H₂O (0.03 g, 0.18 mmol) como aditivo en DCM (5 mL) durante 5 h y se lavó la peptidil-resina con DCM (5 × 30 s), DMF (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s). Una alícuota (10 mg) de la resina se trató con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), los filtrados se recogieron en un mismo vial y se evaporó el disolvente a presión reducida. Seguidamente, se redujo la sal de diazonio obtenida con FeSO₄·7H₂O (0.01 g, 0.04 mmol) en DMF (3 mL) manteniendo la suspensión obtenida en agitación a temperatura ambiente durante 5 min, y se eliminó el disolvente a presión reducida. El análisis cromatográfico (HPLC-MS) del crudo obtenido no mostró el tripéptido deseado.
- Ensayo 2: Se realizó utilizando 58 mg (0.02 mmol) de peptidil-resina **48**. La resina se trató con Fmoc-Phe²-OH (0.06 g, 0.15 mmol), DIC (25 µL, 0.16 mmol) y DMAP (1 mg, 0.008 mmol) en DCM (5 mL) durante 2 h y se lavó con DCM (5 × 30 s), DMF (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s). Una alícuota (10 mg) de la resina resultante se trató con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5: 95, V/V) (3 × 2 min), los filtrados se recogieron en un mismo vial y se evaporó el disolvente a presión

- reducida. Seguidamente, se redujo la sal de diazonio obtenida con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.01 g, 0.04 mmol) en DMF (3 mL) a temperatura ambiente durante 5 min y se eliminó el disolvente a presión reducida. El análisis por HPLC-MS del crudo mostró un 77 % de tripéptido deseado y un 23 % de producto epimerizado (rendimientos obtenidos por integración de áreas de los picos cromatográficos).
- Ensayo 3: Se realizó utilizando 57 mg (0.02 mmol) de peptidil-resina **48**. La resina se trató con Fmoc-Phe²-OH (0.06 g, 0.15 mmol), DIC (25 μL , 0.16 mmol) y DMAP (1 mg, 0.008 mmol) en DCM (5 mL) durante 1 h y se lavó con DCM (5 \times 30 s), DMF (5 \times 30 s) y DCM (5 \times 30 s). Una alícuota (10 mg) de la resina resultante se trató con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5: 95, V/V) (3 \times 2 min), los filtrados se recogieron en un mismo vial y se evaporó el disolvente a presión reducida. Seguidamente, se redujo la sal de diazonio obtenida con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.01 g, 0.04 mmol) en DMF (3 mL) a temperatura ambiente durante 5 min y se eliminó el disolvente a presión reducida. El análisis por HPLC-MS del crudo mostró un 94 % de tripéptido deseado y un 6 % de producto epimerizado (rendimientos obtenidos por integración de áreas de los picos cromatográficos).
 - Ensayo 4: Se realizó utilizando 57 mg (0.02 mmol) de peptidil-resina **48**. La resina se trató con Fmoc-Phe²-OH (0.06 g, 0.15 mmol), DIC (25 μL , 0.16 mmol) y DMAP (0.2 mg, 0.002 mmol) en DCM (5 mL) durante 1 h y se lavó con DCM (5 \times 30s), DMF (5 \times 30 s) y DCM (5 \times 30 s). Una alícuota (10 mg) de la resina resultante se trató con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 \times 2 min), los filtrados se recogieron en un mismo vial y se eliminó el disolvente a presión reducida. Seguidamente, se redujo la sal de diazonio obtenida con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.01 g, 0.04 mmol) en DMF (3 mL) a temperatura ambiente durante 5 min y se eliminó el disolvente a presión reducida. El análisis por HPLC-MS del crudo peptídico obtenido mostró un 95 % de tripéptido deseado y un 5 % de producto epimerizado (rendimientos obtenidos por integración de áreas de los picos cromatográficos).

La formación del enlace éster con el resto de la peptidil-resina **48** (1.17 g, 0.74 mmol) se llevó a cabo utilizando las condiciones descritas en el Ensayo 4. Tras eliminar el grupo protector Fmoc del extremo amino utilizando una disolución de DBU en DMF (3 %, V/V) (protocolo B.3.3), se elongó la cadena peptídica utilizando DIC (344 μ L, 2.22 mmol) como y HOBt \cdot H₂O (340 mg, 2.22 mmol), en DMF (8 mL). Así, se acoplaron sucesivamente los siguientes aminoácidos: Fmoc-Phe³-OH (860 mg, 2.22 mmol), Fmoc-D-Leu⁴-OH (785 mg, 2.22 mmol) y Fmoc-Leu⁵-OH (785 mg, 2.22 mmol) (protocolo B.3.8). La eliminación de Fmoc después del acoplamiento de los aminoácidos se realizó utilizando una disolución de DBU en DMF (3 %, V/V) (protocolo general B.3.3.). A continuación, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo (protocolo general B.3.9) utilizando Pd (PPh₃)₄ (342 mg, 0.30 mmol) y PhSiH₃ (4.40 mL, 35.70 mmol) y, seguidamente, se eliminó el grupo protector Fmoc utilizando una disolución de DBU en DMF (3 %, V/V) (protocolo B.3.3) obteniéndose el correspondiente precursor lineal desprotegido.

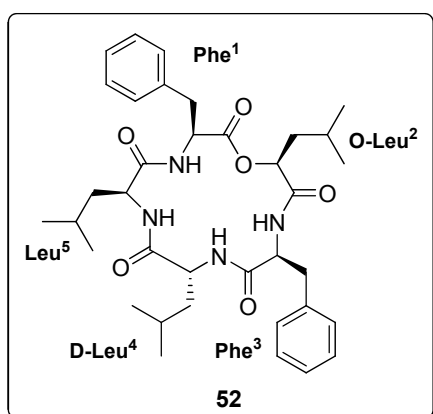


La reacción de ciclación se llevó a cabo utilizando PyBOP (1.90 g, 3.65 mmol), HOAt (0.5 g, 3.67 mmol) y EDIA (1.3 mL, 7.46 mmol) en DMF (15 mL) durante 2 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavó la peptidil-resina resultante con DCM (5 \times 30 s), DMF (5 \times 30 s) y DCM (5 \times 30 s). La peptidil-resina **51** obtenida se utilizó para obtener diferentes derivados de Zigosporamida.



10.2. Zigosporamida (52)

El péptido Zigosporamida **52** se sintetizó utilizando 270 mg (0.09 mmol) de peptidil-resina **51**. La peptidil-resina se trató con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5: 95, V/V) (3 × 2 min), los lavados resultantes de cada uno de los tratamientos se recogieron en un mismo vial y se evaporó el disolvente a presión reducida. Seguidamente, se llevó a cabo la reducción de la sal de diazonio obtenida con FeSO₄·7H₂O (0.04 g, 0.14 mmol) en DMF (5 mL). La suspensión obtenida se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 5 min y se eliminó el disolvente a presión reducida obteniéndose el crudo peptídico (con un 55 % de pureza determinada por HPLC) que se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 %→65 % B en 1 min y 65 %→76 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y λ= 214 nm, t_R = 5.8 min) obteniendo 25 mg de péptido **58** (44 % de rendimiento global).



Caracterización

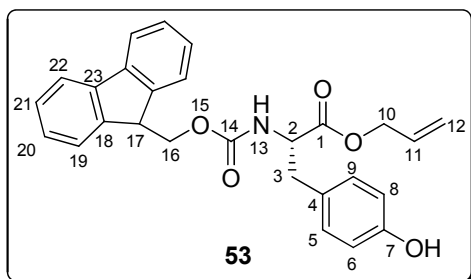
HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 3.83 min; **¹H-NMR** (500 MHz, CD₃CN) δ 7.61 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.35-7.18 (m, 11H), 7.12 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 4.84 (ddd, J₁ = 11.0 Hz, J₂ = 10.0 Hz, J₃ = 5.0 Hz, 1H), 4.74 (dd, J₁ = 9.3 Hz, J₂ = 5.1 Hz, 1H), 4.63-4.57 (m, 1H), 4.16-4.05 (m, 2H), 3.33 (dd, J₁ = 14.0 Hz, J₂ = 4.9 Hz, 1H), 3.11 (dd, J₁ = 14.0 Hz, J₂ = 11.1 Hz, 1H), 3.05 (dd, J₁ = 13.6 Hz, J₂ = 5.8 Hz, 1H), 2.85 (dd, J₁ = 13.6 Hz, J₂ = 9.2 Hz,

1H), 1.76-1.68 (m, 1H), 1.59-1.35 (m, 6H), 1.27-1.21 (m, 2H), 0.91 (dd, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 6.5$ Hz, 6H), 0.88-0.83 (m, 9H), 0.77 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H) ppm. **HRMS** m/z calculada para $C_{36}H_{51}N_4O_6$ $[M+H]^+$, 635.3903; encontrada, 635.3798.

10.3. Estudio de la derivatización de Fmoc-Phe-OAlilo

10.3.1. Fmoc-Phe(*p*OH)-OAlilo (53)

El derivado de fenilalanina **53** se sintetizó a partir de 213 mg (0.13 mmol) de aminoácido-resina **33**. Se desancló el aminoácido de la resina utilizando TFA/DCM (5: 95, V/V) (3 × 2 min). Los filtrados de los tres tratamientos se recogieron sobre el mismo vial y se eliminó el disolvente a presión reducida. La sal de diazonio obtenida se disolvió en una mezcla H_2O/ACN (8: 2, V/V), la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 2.5 h y se eliminó el disolvente a presión reducida. El producto deseado se obtuvo con un 71 % de pureza determinada por HPLC y se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 %→65 % B en 1 min y 65 %→78 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm, $t_R = 4.27$ min), obteniéndose 19 mg de derivado **53** como un sólido blanco (61 % de rendimiento global).



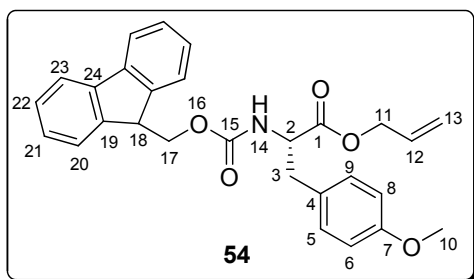
Caracterización

HPLC (XSelect C_{18} , 4.6 × 50 mm, 3.5 μ m, 5→100 % B en 4.5 min (A: H_2O (0.1 % $HCOOH$) y B: $MeCN$ (0.07 % $HCOOH$)), flujo 1 mL/min, $\lambda = 220$ nm) $t_R = 3.52$ min; **1H -NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ

7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_{22}), 7.56 (dd, $J_1 = 7.1$ Hz, $J_2 = 3.9$ Hz, 2H, H_{19}), 7.39 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H_{21}), 7.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_{20}), 6.95 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H_5 y H_9), 6.72 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H_6 y H_8), 5.93-5.80 (m, 1H, H_{11}), 5.34 (s, 1H, H_{13}), 5.31-5.21 (m, 2H, H_{12}), 4.69-4.63 (m, 1H, H_2), 4.62 (d, $J = 5.8$, 2H, H_{10}), 4.47-4.31 (m, 2H, H_{16}), 4.20 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, H_{17}), 3.12-2.98 (m, 2H, H_3) ppm; **^{13}C -NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 171.5 (C_1), 155.8 (C_7), 155.1 (C_{14}), 143.8 (C_{18}), 141.5 (C_{23}), 131.5 (C_4), 130.7 (C_5 y C_9), 127.9 (C_{21}), 127.6 (C_{11}), 127.2 (C_{20}), 125.2 (C_{19}), 120.1 (C_{22}), 119.4 (C_{12}), 115.6 (C_6 y C_8), 67.2 (C_{16}), 66.3 (C_{10}), 55.1 (C_2), 47.3 (C_{17}), 37.6 (C_3) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para $C_{27}H_{26}NO_5$ $[M+H]^+$ 444.2, encontrada 444.3; **HRMS** m/z calculada para $C_{27}H_{26}NO_5$ $[M+H]^+$ 444.1805, encontrada 444.1806.

10.3.2. Fmoc-Phe(*p*OMe)-OAlilo (54)

El derivado de fenilalanina **54** se sintetizó a partir de 250 mg (0.17 mmol) de aminoacil-resina **33**. La aminoacil-resina se trató con la mezcla acidolítica TFA/MeOH (5: 95, V/V) y la suspensión resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 1 h. A continuación, se filtró la aminoacil-resina, se lavó con MeOH y se eliminaron los disolventes a presión reducida. El producto deseado se obtuvo con un 77 % de pureza determinada por HPLC y se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 %→65 % B en 1 min y 65 %→87 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm, $t_R = 5.65$ min) obteniéndose 21 mg de derivado **54** como un sólido blanco (55 % de rendimiento global).



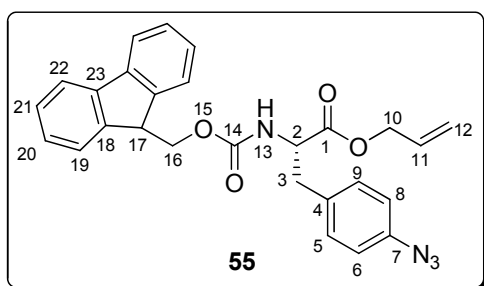
Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, $\lambda = 220$ nm) $t_R = 3.93$ min; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₂₃), 7.56 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, H₂₀), 7.40 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H₂₂), 7.31 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₂₁), 7.01 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H₅ y H₉), 6.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H₆ y H₈), 5.94-5.82 (m, 1H, H₁₂), 5.34 (s, 1H, H₁₄), 5.31-5.20 (m, 2H, H₁₃), 4.69-4.64 (m, 1H, H₂), 4.62 (d, $J = 5.7$, 2H, H₁₁), 4.44 (dd, $J_1 = 10.6$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz, 1H, H₁₇), 4.34 (dd, $J_1 = 10.5$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, 1H, H₁₇), 4.21 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, H₁₈), 3.77 (s, 3H, H₁₀), 3.14-3.01 (m, 2H, H₃) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 171.4 (C₁), 158.9 (C₇), 155.7 (C₁₅), 144.0 (C₁₉), 141.5 (C₂₄), 131.6 (C₄), 130.5 (C₅ y C₉), 127.9 (C₂₂), 127.7 (C₁₂), 127.2 (C₂₁), 125.2 (C₂₀), 120.1 (C₂₃), 119.3 (C₁₃), 114.2 (C₆ y C₈), 67.1 (C₁₇), 66.2 (C₁₁), 55.4 (C₂), 55.06 (C₁₀), 47.3 (C₁₈), 37.5 (C₃) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₈H₂₈NO₅ [M+H]⁺ 458.2, encontrada 458.3; **HRMS** m/z calculada para C₂₈H₂₈NO₅ [M+H]⁺ 458.1962, encontrada 458.1967.

10.3.3. Fmoc-Phe(*p*N₃)-OAlilo (55)

El derivado de fenilalanina **55** se sintetizó a partir de 110 mg (0.17 mmol) de aminoacil-resina **33**. Se escindió el aminoácido de la resina utilizando TFA/DCM (5: 95, V/V) (10 min) y se adicionó Me₃SiN₃ (40 μL, 0.29 mmol). La mezcla resultante se mantuvo a

temperatura ambiente durante 1 h con agitación manual esporádica. Seguidamente, se filtró la aminoacil-resina y se lavó con DCM. Tras eliminar los disolventes a presión reducida, se obtuvo el producto deseado con un 94 % de pureza determinada por HPLC, el cual se purificó por HPLC semipreparativo de fase inversa (5 %-70 % B en 1 min y 70 %-84 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm, $t_R = 6.0$ min), obteniéndose 13 mg de derivado **55** como un sólido blanco (78 % de rendimiento global).



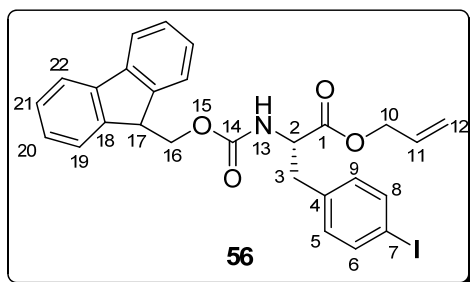
Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5 → 100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, $\lambda = 220$ nm) $t_R = 4.12$ min; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₂₂), 7.60-7.52 (m, 2H, H₁₉), 7.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H₂₁), 7.31 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H₂₀), 7.06 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H₅ y H₉), 6.93 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H₆ y H₈), 5.94-5.82 (m, 1H, H₁₁), 5.34 (s, 1H, H₁₃), 5.32-5.20 (m, 2H, H₁₂), 4.71-4.64 (m, 1H, H₂), 4.62 (d, $J = 5.8$, 2H, H₁₀), 4.47 (dd, $J_1 = 10.6$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz, 1H, H₁₆), 4.37 (dd, $J_1 = 10.5$ Hz, $J_2 = 6.8$ Hz, 1H, H₁₆), 4.20 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, H₁₇), 3.18-3.02 (m, 2H, H₃) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 171.1 (C₁), 155.6 (C₁₄), 144.0 (C₁₈), 143.8 (C₁₈), 141.5 (C₂₃), 139.1 (C₇), 132.5 (C₄), 131.4 (C₁₁), 130.9 (C₅ y C₉), 127.9 (C₂₁), 127.2 (C₂₀), 125.2 (C₁₉), 125.1 (C₁₉), 120.2 (C₂₂), 120.2 (C₂₂), 119.5 (C₁₂), 119.3 (C₆ y C₈), 67.0 (C₁₆), 66.4 (C₁₀), 54.9 (C₂), 47.3 (C₁₇), 37.8 (C₃) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₇H₂₅N₄O₄ [M+H]⁺ 469.2, encontrada 469.3; **HRMS** calculada para C₂₇H₂₅N₄O₄ [M+H]⁺ 469.1870, encontrada 469.1877.

10.3.4. Fmoc-Phe(PI)-OAlilo (56)

El derivado de fenilalanina **56** se sintetizó a partir de 130 mg (0.08 mmol) de aminoacil-resina **33**. El aminoácido se desancló de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5: 95, V/V) (3 × 2 min). Los filtrados se recogieron sobre el mismo vial y se eliminó el disolvente a presión reducida. La sal de diazonio obtenida se trató con una mezcla H₂O/ACN (9: 1, V/V) y KI (0.03 g, 0.22 mmol). La disolución resultante se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se eliminó

el disolvente a presión reducida. El crudo se obtuvo con un 53 % de pureza determinada por HPLC, y se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 %→65 % B en 1 min y 65 %→93 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm, $t_R = 6.92$ min), obteniéndose 10 mg de derivado **56** como un sólido blanco (44 % de rendimiento global).



Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μ m, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, $\lambda = 220$ nm) $t_R = 4.28$ min; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₂₂), 7.63-7.53 (m, 4H, H₁₉, H₅ y H₉), 7.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H₂₁), 7.32 (m, 2H, H₂₀), 6.83 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H₆ y H₈), 5.93-5.79 (m, 1H, H₁₁), 5.34 (s, 1H, H₁₃), 5.30-5.20 (m, 2H, H₁₂), 4.70-4.64 (m, 1H, H₂), 4.61 (d, $J = 5.6$, 2H, H₁₀), 4.47 (dd, $J_1 = 10.7$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz, 1H, H₁₆), 4.37 (dd, $J_1 = 10.6$ Hz, $J_2 = 6.5$ Hz, 1H, H₁₆), 4.21 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, H₁₇), 3.14-3.00 (m, 2H, H₃) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 171.0 (C₁), 155.7 (C₁₄), 143.8 (C₁₈), 141.5 (C₂₃), 137.8 (C₅ y C₉), 135.4 (C₄), 131.6 (C₆ y C₈), 131.4 (C₁₁), 127.9 (C₂₁), 127.3 (C₂₀), 125.2 (C₁₉), 125.2 (C₁₉), 120.2 (C₂₂), 120.2 (C₂₂), 119.6 (C₁₂), 92.7 (C₇), 67.2 (C₁₆), 66.4 (C₁₀), 54.8 (C₂), 47.4 (C₁₇), 37.9 (C₃) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₇H₂₅INO₄ [M+H]⁺ 554.1, encontrada 554.1; **HRMS** m/z calculada para C₂₇H₂₅INO₄ [M+H]⁺ 554.0823, encontrada 554.0817.

10.3.5. Estudio de la síntesis de Fmoc-Phe(*p*F)-OAlilo (**57**)

10.3.5.1. Ensayos de síntesis de Fmoc-Phe(*p*F)-OAlilo (**57**)

El estudio de la síntesis del derivado fluorado de la fenilalanina **57** se realizó utilizando la peptidil-resina **33**. Los ensayos se llevaron a cabo a pequeña escala utilizando alícuotas de 10-20 mg de aminoacil-resina. Cada una de estas alícuotas se introdujo en un tubo *kimax*, y se trató con los reactivos que se recogen en la Tabla 33. Las reacciones se realizaron en condiciones anhidras (atmósfera de argón) sellando el tubo *kimax* adecuadamente. Finalizadas las reacciones, se filtraron las aminoacil-resinas y los crudos de reacción se aislaron tras concentrar las mezclas de reacción bajo presión reducida. Los crudos de reacción se analizaron por HPLC-MS con objeto de determinar

los porcentajes de productos y subproductos obtenidos por integración de áreas de picos cromatográficos (columna (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), 1 mL/min, λ = 220 nm).

Ensayo	Condiciones de Reacción ¹	35 (%) ²	53 (%) ²	57 (%) ²
1	CsF, TFA, C ₆ F ₁₂ , 90 °C, 30 min	6	62	24
2	CsF, TFA, C ₆ F ₁₂ , 90 °C, 16 h	6	65	24
3	CsF, TfOH, C ₆ F ₁₂ , 90°C, 30 min	48	7	7
4	CsF, TfOH, TFE, 90°C, 30 min	4	-	34
5	CsF, TfOH, HFIP 90°C, 30 min	-	-	*54

¹En todos los casos se utilizaron 0.2 eq de CsF y 2.5 eq de ácido.

²Los porcentajes de los productos se determinaron por integración de las áreas de los picos cromatográficos.

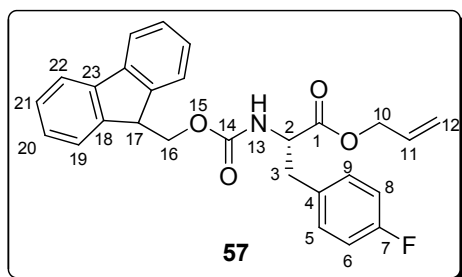
*El producto obtenido incorpora únicamente HFIP en el anillo aromático

Tabla 33

10.3.5.2. Síntesis de Fmoc-Phe(pF)-OAlilo(57)

El derivado de fenilalanina **57** se sintetizó a partir de 185 mg (0.12 mmol) de aminoacil-resina **33**. Se introdujo la aminoacil-resina en un tubo *Kimax* y se adicionaron CCl₄ (3 mL) y BF₃·Et₂O (0.1 mL, 0.75 mmol) bajo atmósfera de argón. Se selló el tubo *Kimax* adecuadamente y la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 min y a 80 °C durante 1.5 h. A continuación, se filtró la aminoacil-resina resultante, se lavó con MeCN y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante (con un 90 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 %→65 % B en 1 min y 65 %→90 % B en 5 min con un flujo de 16

mL/min y $\lambda = 214$ nm, $t_R = 3.85$ min) obteniendo 28 mg de derivado **57** como un sólido blanco (67 % de rendimiento global).



Caracterización

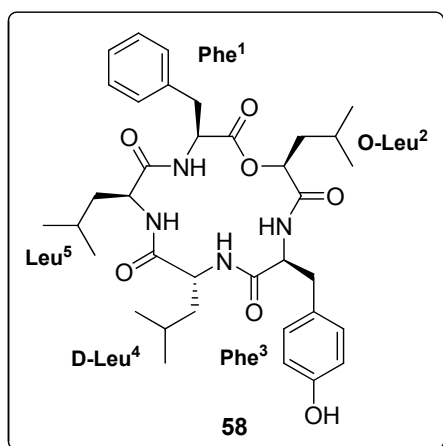
HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, $\lambda = 220$ nm) $t_R = 3.98$ min; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ

7.77 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₂₂), 7.59-7.52 (m, 2H, H₁₉), 7.40 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H₂₁), 7.31 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₂₀), 7.09-7.01 (m, 2H, H₅ y H₉), 7.00-6.89 (m, 2H, H₆ y H₈), 5.92-5.81 (m, 1H, H₁₁), 5.26 (dd, $J_1 = 15.8$ Hz, $J_2 = 5.7$ Hz, 2H, H₁₂), 4.66 (dd, $J_1 = 14.1$ Hz, $J_2 = 6.3$ Hz, 1H, H₂), 4.61 (d, $J = 5.8$, 2H, H₁₀), 4.47 (dd, $J_1 = 10.6$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, 1H, H₁₆), 4.37 (dd, $J_1 = 10.5$ Hz, $J_2 = 6.8$ Hz, 1H, H₁₆), 4.20 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, H₁₇), 3.17-3.01 (m, 2H, H₃) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 171.5 (C₁), 162.5 ($J_{C-F} = 245.5$ Hz) (C₇), 155.9 (C₁₄), 144.3 (C₁₈), 141.8 (C₂₃), 131.8 (C₄), 131.7 (C₁₁), 131.4 (C₅ o C₉), 131.3 (C₅ o C₉), 128.2 (C₂₁), 127.5 (C₂₀), 125.5 (C₁₉), 125.4 (C₁₉), 120.5 (C₁₉), 120.5 (C₂₂), 119.8 (C₁₂), 116.0 (C₆ o C₈), 115.8 (C₆ o C₈), 67.3 (C₁₆), 66.7 (C₁₀), 55.3 (C₂), 47.6 (C₁₇), 37.9 (C₃); **¹⁹F** (376 MHz, CDCl₃) δ -115.6 ppm; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₇H₂₅FNO₄ [M+H]⁺ 446.2, encontrada 446.3; **HRMS** m/z calculada para C₂₇H₂₅FNO₄ [M+H]⁺ 446.1762, encontrada 446.1769.

10.4. Síntesis de derivados del depsipéptido Zigosporamida

10.4.1. Zigosporamida-[Phe³(pOH)] (58)

El péptido Zigosporamida-[Phe³(pOH)] **58** se sintetizó a partir de 280 mg (0.10 mmol) de peptidil resina **51**. La peptidil-resina se trató con la mezcla acidolítica TFA/DCM (5: 95, V/V) (3 × 2 min) (apartado 3.2), los filtrados se recogieron en un mismo vial y se eliminó el disolvente a presión reducida. La sal de diazonio obtenida se disolvió en una mezcla H₂O/ACN (8: 2, V/V), la disolución resultante se mantuvo en agitación a 60 °C durante 2 h y se eliminó el disolvente a presión reducida obteniéndose un crudo peptídico (con un 64 % de pureza determinada por HPLC) que se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 %→60 % B en 1 min y 60 %→62 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm, $t_R = 4.65$ min). Se obtuvieron 21 mg de derivado **58** como un sólido blanco (34 % de rendimiento global).



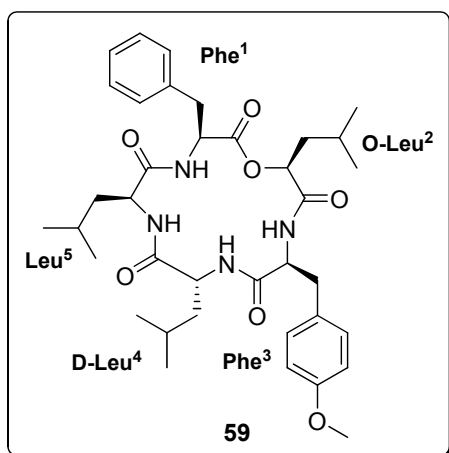
Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 3.38 min; **¹H-NMR** (500 MHz, CD₃CN) δ 7.57 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 7.33-7.25 (m, 4H), 7.25-7.20 (m, 1H), 7.15 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.09-7.02 (m, 3H), 6.87 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 6.74-6.70 (m, 2H), 4.83 (ddd, J₁ =

11.0 Hz, J₂ = 9.8 Hz, J₃ = 5.0 Hz, 1H), 4.74 (dd, J₁ = 9.4 Hz, J₂ = 5.1 Hz, 1H), 4.50 (td, J₁ = 9.1 Hz, J₂ = 6.2 Hz, 1H), 4.14-4.02 (m, 2H), 3.33 (dd, J₁ = 14.0 Hz, J₂ = 5.0 Hz, 1H), 3.10 (dd, J₁ = 14.0 Hz, J₂ = 11.1 Hz, 1H), 2.92 (dd, J₁ = 13.7 Hz, J₂ = 6.2 Hz, 1H), 2.75 (dd, J₁ = 13.7 Hz, J₂ = 8.9 Hz, 1H), 1.73 (ddd, J₁ = 13.4 Hz, J₂ = 9.4 Hz, J₃ = 5.5 Hz, 1H), 1.59-1.45 (m, 4H), 1.45-1.35 (m, 2H), 1.25-1.20 (m, 2H), 0.92 (dd, J₁ = 6.4 Hz, J₂ = 1.4 Hz, 6H), 0.89-0.82 (m, 9H), 0.76 (d, J = 6.6 Hz, 3H) ppm. **HRMS** m/z calculada para C₃₆H₅₁N₄O₇ [M+H]⁺, 651.3752; encontrada, 651.3743.

10.4.2. Zigosporamida-[Phe³ (pOMe)] (59)

El péptido Zigosporamida-[Phe³ (pOMe)] **59** se sintetizó a partir 290 mg (0.10 mmol) de peptidil-resina **51**. La peptidil-resina se trató con la mezcla acidolítica TFA/MeOH (5: 95 V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación a 60 °C durante 1 h. A continuación, se filtró, se lavó la resina con MeOH y se eliminaron los disolventes a presión reducida. El crudo peptídico resultante (con un 57 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 %→65 % B en 1 min y 65 %→73 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y λ= 214 nm, t_R = 5.60 min), obteniéndose 23 mg de derivado **59** como un sólido blanco (35 % de rendimiento global).

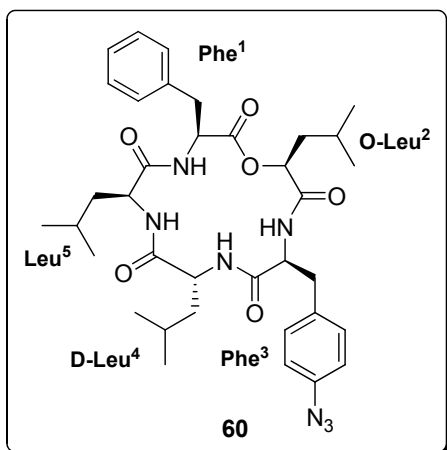


Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) *t_R* = 3.78 min; **¹H-NMR** (500 MHz, CD₃CN) δ 7.76 (bs, 1H), 7.39 (bs, 1H), 7.34-7.25 (m, 4H), 7.25-7.20 (m, 1H), 7.20-7.11 (m, 4H), 6.87-6.81 (m, 2H), 4.81 (bs, 1H), 4.77 (dd, *J*₁ = 9.1 Hz, *J*₂ = 5.1 Hz, 1H), 4.62-4.52 (m, 1H), 4.17 (dd, *J*₁ = 13.4 Hz, *J*₂ = 6.6 Hz, 1H), 4.11 (ddd, *J*₁ = 10.6 Hz, *J*₂ = 8.4 Hz, *J*₃ = 4.9 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.30 (dd, *J*₁ = 14.0 Hz, *J*₂ = 5.0 Hz, 1H), 3.17-3.07 (m, 1H), 3.02 (dd, *J*₁ = 13.5 Hz, *J*₂ = 5.5 Hz, 1H), 2.85-2.73 (m, 1H), 1.73-1.62 (m, 1H), 1.58-1.18 (m, 8H), 0.93-0.81 (m, 15H), 0.76 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H) ppm. **HRMS** *m/z* calculada para C₃₇H₅₂N₄O₇ [M+H]⁺, 665.3909; encontrada, 665.3906.

10.4.3. Zigosporamida-[Phe³(pN₃)] (60)

El péptido Zigosporamida-[Phe³(pN₃)] **60** se sintetizó a partir de 175 mg (0.06 mmol) de peptidil-resina **51**. El depsipéptido se escindió de la resina utilizando TFA/DCM (5: 95, V/V) (10 min) y a continuación se trató con Me₃SiN₃ (68 μL, 0.55 mmol). La mezcla resultante se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h con agitación manual esporádica, se filtró la peptidil-resina y se lavó con DCM. Tras eliminar el disolvente a presión reducida, se obtuvo el crudo peptídico (con un 71 % de pureza determinada por HPLC) que se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (30 %→65 % B en 1 min y 65 %→77 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y λ= 214 nm, *t_R* = 6.43 min), obteniéndose 27 mg de derivado **60** como un sólido blanco (69 % de rendimiento global).



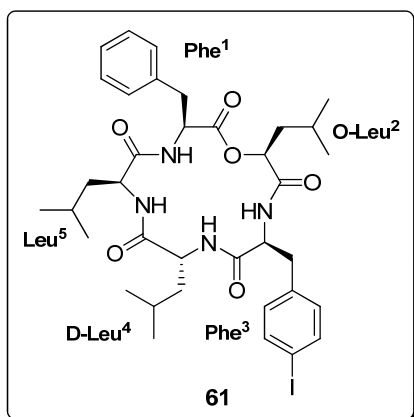
Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) *t_R* = 3.98 min; **¹H-NMR** (500 MHz, CD₃CN) δ 7.59 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 7.34-7.19 (m, 8H), 7.15 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 7.03-6.99 (m, 2H), 6.98 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 4.83 (ddd, *J*₁ = 10.9 Hz, *J*₂ = 9.9 Hz, *J*₃ = 5.0

Hz, 1H), 4.74 (dd, *J*₁ = 9.3 Hz, *J*₂ = 5.1 Hz, 1H), 4.59 (td, *J*₁ = 9.4 Hz, *J*₂ = 5.9 Hz, 1H), 4.17-4.02 (m, 2H), 3.33 (dd, *J*₁ = 14.0 Hz, *J*₂ = 5.0 Hz, 1H), 3.11 (dd, *J*₁ = 14.0 Hz, *J*₂ = 11.1 Hz, 1H), 3.03 (dd, *J*₁ = 13.6 Hz, *J*₂ = 5.9 Hz, 1H), 2.83 (dd, *J*₁ = 13.6 Hz, *J*₂ = 9.4 Hz, 1H), 1.76-1.68 (m, 1H), 1.57-1.35 (m, 6H), 1.28 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 1.26-1.21 (m, 2H), 0.95-0.89 (m, 6H), 0.89-0.82 (m, 9H), 0.76 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H) ppm. **HRMS** *m/z* calculada para C₃₆H₅₀N₇O₆ [M+H]⁺, 676.3817; encontrada, 676.3815.

10.4.4. Zigosporamida-[Phe³(pI)] (61)

El péptido Zigosporamida-[Phe³(pI)] **61** se sintetizó a partir de 125 mg (0.05 mmol) de peptidil-resina **57**. El depsipéptido se escindió de la resina utilizando TFA/DCM (5:9 5, V/V) (3 × 2 min), los filtrados se recogieron en un vial y se eliminó el disolvente a presión reducida. La sal de diazonio así obtenida se disolvió en una mezcla H₂O/ACN (9: 1, V/V) y KI (0.04 g, 0.30 mmol) y la disolución resultante se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Tras eliminar el disolvente a presión reducida, se obtuvo el crudo peptídico (con un 53 % de pureza determinada por HPLC) que se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 %→70 % B en 1 min y 70 %→82 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y λ= 214 nm, *t_R* = 6.08 min), obteniéndose 8 mg de derivado **61** como un sólido blanco (25 % de rendimiento global).



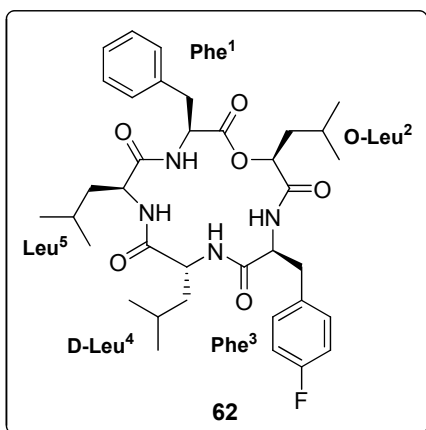
Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 4.12 min; **¹H-NMR** (500 MHz, CD₃CN) δ 7.66 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.62 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.33-7.19 (m, 6H), 7.10-7.04 (m, 3H), 7.02 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 4.85-4.73 (m, 2H), 4.61-4.53 (m, 1H), 4.18-4.06 (m, 2H), 3.30 (dd,

J₁ = 14.0 Hz, J₂ = 5.0 Hz, 1H), 3.10 (dd, J₁ = 14.0 Hz, J₂ = 11.1 Hz, 1H), 3.02 (dd, J₁ = 13.5 Hz, J₂ = 6.0 Hz, 1H), 2.80 (dd, J₁ = 13.6 Hz, J₂ = 9.4 Hz, 1H), 1.72-1.62 (m, 1H), 1.58-1.32 (m, 6H), 1.32-1.17 (m, 2H), 0.91 (dd, J₁ = 11.5 Hz, J₂ = 6.3 Hz, 6H), 0.88-0.82 (m, 9H), 0.76 (d, J = 6.6 Hz, 3H) ppm. **HRMS** m/z calculada para C₃₆H₅₀I_N₄O₆ [M+H]⁺, 761.2770; encontrada, 761.2771.

10.4.5. Zigosporamida-[Phe³ (pF)] (62)

El péptido Zigosporamida-[Phe³ (pF)] **62** se sintetizó a partir de 230 mg (0.08 mmol) de peptidil-resina **51**. La peptidil-resina se introdujo en un tubo *Kimax* y se adicionaron CCl₄ (4 mL) y BF₃·Et₂O (0.4 mL, 1.51 mmol) bajo atmósfera de argón. Se selló el tubo *Kimax* adecuadamente, la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 min y se calentó a 80 °C durante 1.5 h. La peptidil-resina resultante se filtró, se lavó con MeOH y el disolvente se eliminó a presión reducida obteniéndose un crudo peptídico (73 % de pureza determinada por HPLC) que se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 %→65 % B en 1 min y 65 %→73 % B en 5 min con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm, t_R = 5.92 min). Se obtuvieron 25 mg de derivado **63** como un sólido blanco (50 % de rendimiento global).



Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 3.83 min; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃CN) δ 7.76 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.32-7.24 (m, 6H), 7.24-7.20 (m, 1H), 7.18 (bs, 1H), 7.08 (bs, 1H), 7.06-7.00 (m, 2H), 4.85-4.75 (m, 2H), 4.63-4.55 (m, 1H),

4.23-4.15 (m, 1H), 4.12 (ddd, J₁ = 10.8 Hz, J₂ = 8.5 Hz, J₃ = 4.9, 1H), 3.29 (dd, J₁ = 14.0 Hz, J₂ = 5.1 Hz, 1H), 3.15-3.05 (m, 2H), 2.83 (dd, J₁ = 13.7 Hz, J₂ = 9.8 Hz, 1H), 1.70-1.61 (m, 1H), 1.60-1.18 (m, 8H), 0.92 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.90-0.86 (m, 6H), 0.86-0.82 (m, 6H), 0.76 (d, J = 6.6 Hz, 3H) ppm. **HRMS** m/z calculada para C₃₆H₅₀FN₄O₆ [M+H]⁺, 653.3709; encontrada, 653.3705.

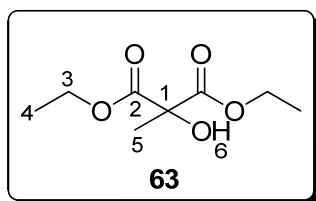
PARTE EXPERIMENTAL CAPÍTULO 2

1. SÍNTESIS DE PRECURSORES DE ANÁLOGOS DE PEPTINAS

1.1. Ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico (64)

1.1.1. 2-hidroxi-2-metilmalonato de dietilo (63)

En un matraz de fondo redondo de 250 mL se adicionó 2-metilmalonato de dietilo (10 mL, 58.67 mmol) y se disolvió en DMF (70 mL). Seguidamente, se adicionó CsF (18 g, 118.5 mmol) y se burbujeó oxígeno durante 30 min. La suspensión resultante se mantuvo en agitación constante con atmósfera de oxígeno durante 24 h. A continuación, se eliminó la mayor parte de disolvente a presión reducida, el aceite obtenido se disolvió en H₂O (70 mL), y se adicionó una disolución acuosa de HCl (5 %, V/V) hasta pH 2. Posteriormente, se realizaron extracciones con DCM (3 × 70 mL) y la fase orgánica se lavó con H₂O (3 × 70 mL) y una disolución saturada de NaCl (70 mL), se secó con MgSO₄ anhidro y se filtró. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y el aceite obtenido se purificó por cromatografía *flash* [sílica gel, Hexano/MTBE], obteniéndose el producto deseado como un aceite incoloro (9.31 g, 83 %).



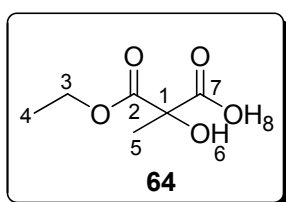
Caracterización

HPLC (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 1.80 min; **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 4.22 (q, J = 7.1 Hz, 4H, H₃), 3.82 (sa, 1H, H₆), 1.58 (s, 3H, H₅), 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 6H, H₄) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ 171.01 (C₂), 76.13 (C₁), 62.47 (C₃), 21.64 (C₅), 14.03 (C₄) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para C₈H₁₅O₅ [M+H]⁺ 191.2, encontrada 191.1.

1.1.2. Ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico (64)

En un matraz de fondo redondo de 500 mL se adicionó 2-hidroxi-2-metilmalonato de dietilo **63** (9.31 g, 48.98 mmol), se disolvió en THF (10 mL) y, seguidamente, se

adicionó H₂O (100 mL). A continuación, la disolución resultante se enfrió en un baño de hielo y se adicionaron 235 mL de una disolución de KOH (0.25 M). La disolución resultante se mantuvo durante 30 min con agitación vigorosa a temperatura ambiente y, seguidamente, se acidificó con HCl (1M) hasta alcanzar pH 2. El crudo así obtenido se extrajo con AcOEt (4 × 70 mL), se secó con MgSO₄ anhidro y se filtró. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida y el aceite obtenido se purificó por cromatografía *flash* [sílica gel, Hexano/ MTBE], obteniéndose el producto deseado como un sólido blanco (5.55 g, 70 %).



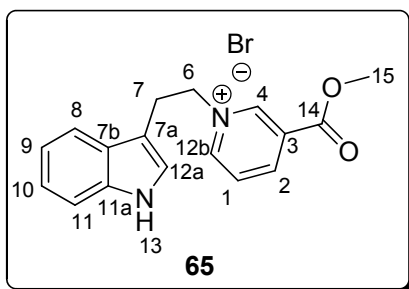
Caracterización

HPLC (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) *t_R* = 1.10 min; **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 4.22 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₃), 1.64 (s, 3H, H₅), 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H₄) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ 174.19 (C₇), 171.21 (C₂), 76.37 (C₁), 63.27 (C₃), 22.13 (C₅), 14.08 (C₄) ppm; **ESI(+)** *m/z* calculada para C₈H₁₁O₅ [M+H]⁺ 163.1, encontrada 163.0.

1.2. Síntesis de indoloquinolidinas

1.2.1. Bromuro de 1-[2-(indol-3-il)etil]-3-metoxicarbonilpiridinio (65)

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se adicionó 3-(2-bromoetil)indol (5.01 g, 22.36 mmol) y nicotinato de metilo (2.76 g, 20.13 mmol). Los reactivos se disolvieron en MeOH anhidro (25 mL) y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente a 40 °C en atmósfera de argón, monitorizando la formación de la sal de piridinio **65** por HPLC-MS. Tras 16 h de reacción, se filtró el crudo y se lavó con MTBE (20 mL) y DCM (20 mL). A continuación, se eliminó el disolvente restante con un sistema de vacío, obteniéndose el producto deseado como un sólido amarillo (4.90 g, 68 %).

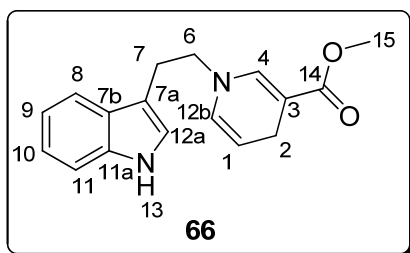


Caracterización

R_f [Hexano/MeOH (2:1)] = 0.41; **HPLC** (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 1.15 min; **IR(ATR)** 3195, 1734 cm⁻¹; **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.01 (s, 1H, H₁₃), 9.44 (s, 1H, H₄), 9.16 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, H_{12b}), 8.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₂), 8.26-8.16 (m, 1H, H₁), 7.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₁₁), 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₈), 7.09 (m, 2H, H_{12a} y (H₉ o H₁₀)), 6.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H₉ o H₁₀), 5.00 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H₆), 3.94 (s, 3H, H₁₅), 3.40 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H₇) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ 162.05 (C₁₄), 147.93 (C₄), 145.77 (C_{12b}), 144.96 (C₁₇), 136.13 (C_{11a}), 129.34 (C₁₈), 127.95 (C_{7b}), 126.65 (C₁), 124.23 (C_{12a}), 121.28 (C₁₀), 118.59 (C₉), 118.09 (C₈), 111.55 (C₁₁), 108.18 (C_{7a}), 61.68 (C₆), 53.43 (C₁₅), 26.80 (C₇) ppm; **ESI(+)** *m/z* calculada para C₁₇H₁₇N₂O₂⁺ 281.1, encontrada 281.1.

1.2.2. Éster metílico del ácido 1-[2-(indol-3-il)etil]-1,4-dihidropiridina-3-carboxílico (66)

En un matraz de fondo de 500 mL se adicionó **65** (4.42 g, 12.27 mmol) y se disolvió en 300 mL de H₂O/DCM (2:1, V/V). La suspensión resultante se agitó vigorosamente en atmósfera de argón y se enfrió en un baño de hielo. A continuación, se adicionó lentamente NaHCO₃ (8.25 g, 98.21 mmol) y Na₂S₂O₄ (21.38 g, 122.80 mmol). Tras la adición de los reactivos, se retiró el baño de hielo y se agitó vigorosamente la reacción a temperatura ambiente en atmósfera de argón. La desaparición de la sal se monitorizó por HPLC-MS. Tras 22 h de reacción, se extrajo la fase orgánica y se lavó con una disolución saturada de Na₂CO₃ (3 × 200 mL). Posteriormente, se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad a presión reducida obteniéndose el producto deseado como un sólido amarillo (3.14 g, 91 %).

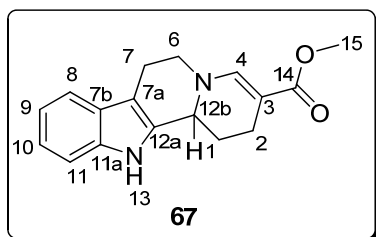


Caracterización

R_f [Hexano/AcOEt/EDIA (6:4:0.1)] = 0.33; **HPLC** (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R= 3.18 min; **IR(ATR)** 3299, 1681, 1600 cm⁻¹; **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 8.15 (s, 1H, H₁₃), 7.59-7.55 (m, 1H, H₈), 7.38-7.34 (m, 1H, H₁₁), 7.21 (ddd, J₁= 8.1 Hz, J₂= 7.1 Hz, J₃= 1.2 Hz, 1H, H₁₀), 7.14 (ddd, J₁= 8.0 Hz, J₂= 7.1 Hz, J₃= 1.1 Hz, 1H, H₉), 7.02 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H_{12a}), 6.97 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H₄), 5.66 (m, 1H, H_{12b}), 4.73 (dt, J₁= 8.0 Hz, J₂= 3.5 Hz, 1H, H₁), 3.66 (s, 3H, H₁₅), 3.38 (t, J = 8.0 Hz, 2H, H₆), 3.11 (dd, J₁= 3.4 Hz, J₂= 1.6 Hz, 2H, H₂), 2.99 (t, J = 7.2 Hz, 2H, H₇) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ 169.03 (C₁₄), 141.92 (C₄), 136.42 (C_{11a}), 128.56 (C_{12b}), 127.21 (C_{7b}), 122.55 (C_{12a}), 122.28 (C₁₀), 119.63 (C₉), 118.56 (C₈), 112.10 (C_{7a}), 111.43 (C₁₁), 104.66 (C₁), 96.65 (C₃), 54.65 (C₆), 51.00 (C₁₅), 26.27 (C₇), 22.20 (C₂) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para C₁₇H₁₉N₂O₂ [M+H]⁺ 283.1, encontrada 283.2.

1.2.3. Éster metílico del ácido 1,2,6,7,12,12b-hexahidroindolo[2,3-a]quinolin-3-carboxílico (67)

En un matraz de fondo redondo de 250 mL se adicionó **66** (3.14 g, 11.13 mmol) y se disolvió en MeOH anhidro (40 mL) en atmósfera de argón. A continuación, se adicionaron 3 mL (39.85 mmol) de una disolución de HCl concentrado (37 %) y la mezcla se mantuvo con agitación constante a temperatura ambiente. Tras 3 h de reacción, se eliminó el disolvente a presión reducida y se neutralizó el crudo con una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ hasta alcanzar pH 10. Posteriormente, se extrajo el producto de reacción con DCM (70 mL) y se lavó con una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ (3 × 70 mL). A continuación, se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida obteniéndose el producto deseado como un sólido amarillo (2.80 g, 89 %).

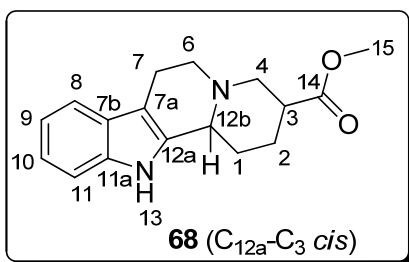


Caracterización

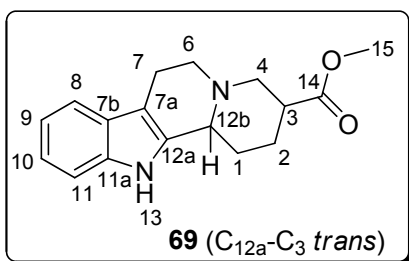
R_f [Hexano/AcOEt/EDIA (2:8:0.1)] = 0.50; **HPLC** (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 3.13 min; **IR(ATR)** 3291, 1734 cm⁻¹; **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 8.00 (s, 1H, H₁₃), 7.51 (s, 1H, H₄), 7.49 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H₈), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H₁₁), 7.21-7.16 (m, 1H, H₁₀), 7.15-7.10 (m, 1H, H₉), 4.48 (d, J = 10.5 Hz, 1H, H_{12b}), 3.70 (s, 3H, H₁₅), 3.67-3.49 (m, 2H, H₆), 2.98-2.86 (m, 1H, H₂), 2.81-2.75 (m, 1H, H₂), 2.58 (dd, J₁ = 13.8 Hz, J₂ = 5.3 Hz, 1H, H₇), 2.45-2.35 (m, 2H, H₇ y H₁), 1.88-1.74 (m, 1H, H₁) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ 168.95 (C₁₄), 146.40 (C₄), 136.17 (C_{11a}), 132.84 (C_{12a}), 126.84 (C_{7b}), 122.07 (C₁₀), 119.77 (C₉), 118.18 (C₈), 110.94 (C₁₁), 108.46 (C_{7a}), 94.74 (C₁₈), 51.84 (C_{12b}), 50.82 (C₁₅), 50.69 (C₆), 28.40 (C₁), 21.98 (C₂), 20.40 (C₇) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para C₁₇H₁₉N₂O₂ [M+H]⁺ 283.1, encontrada 283.2.

1.2.4. Ésteres metílicos de los ácidos (3*RS*,12*BR*S)-1,2,3,4,6,7,12,12*b*-octahidroindolo[2,3-*a*]quinolicin-3-carboxílico (68) y (3*RS*, 12*bSR*)-1,2,3,4,6,7,12,12*b*-octahidroindolo[2,3-*a*]quinolicin-3-carboxílico (69)

En un matraz de fondo redondo de 500 mL se adicionó el producto **67** (3.14 g, 11.13 mmol), se disolvió en 140 mL de AcOH y la disolución resultante se agitó durante 15 minutos. Tras poner el matraz en un baño de hielo, se adicionó NaBH₃CN (5.24 g, 83.39 mmol) y la disolución final se mantuvo con agitación constante a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y se neutralizó con una disolución acuosa concentrada de NH₃ hasta alcanzar pH 10. Seguidamente, se extrajo el producto con DCM (100 mL), se lavó la fase orgánica con una disolución saturada de Na₂CO₃ (3 × 100 mL), se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El sólido amarillo resultante se purificó por cromatografía *flash* en fase normal [sílica *gold*, hexano/EtOH] para separar los diastereoisómeros **68** y **69**, obteniéndose los productos como sólidos blancos (980 mg, 31 %) y (1.61 g, 51 %) respectivamente.

Caracterización

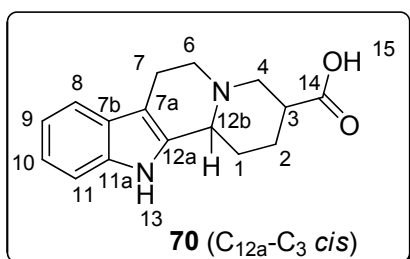
R_f [Hexano/AcOEt/EDIA (2:3:0.02)] = 0.23; **HPLC** (XBridge C_{18} , 4.6×50 mm, $3.5 \mu m$, 5→100 % B en 4.5 min (A: H_2O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 1.37$ min; **IR(ATR)** 3360, 1715 cm^{-1} ; **1H -RMN** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.76 (s, 1H, H_{13}), 7.46 (da, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_8), 7.32-7.27 (m, 1H, H_{11}), 7.14-7.09 (td, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 1.2$ Hz, 1H, H_{10}), 7.07 (td, $J_1 = 7.4$ Hz, $J_2 = 1.2$ Hz, 1H, H_9), 3.66 (s, 3H, H_{15}), 3.46 (m, 1H, H_{12b}), 3.33 (dd, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 3.4$ Hz, 1H, H_4), 3.07 (dd, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, 1H, H_6), 3.01-2.88 (m, 1H, H_7), 2.77-2.60 (m, 4H, H_7 , H_6 , H_3 , H_4), 2.22-2.08 (m, 1H, H_2), 2.01-1.83 (m, 2H, H_1), 1.72-1.62 (m, 1H, H_2) ppm; **^{13}C -RMN** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 174.33 (C_{14}), 136.04 (C_{12a} ó C_{11a}), 134.44 (C_{12a} ó C_{11a}), 127.58 (C_{7b}), 121.48 (C_{10}), 119.54 (C_9), 118.21 (C_8), 110.88 (C_{11}), 108.41 (C_{7a}), 58.70 (C_{12b}), 54.92 (C_4), 53.07 (C_6), 51.93 (C_{15}), 40.55 (C_3), 27.28 (C_1), 24.63 (C_2), 20.82 (C_7) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para $C_{17}H_{21}N_2O_2[M+H]^+$ 285.2, encontrada 285.1.

Caracterización

R_f [Hexano/AcOEt/EDIA (2:3:0.02)] = 0.59; **HPLC** (XBridge C_{18} , 4.6×50 mm, $3.5 \mu m$, 5→100 % B en 4.5 min (A: H_2O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 1.23$ min; **IR(ATR)** 3368, 1713 cm^{-1} ; **1H -RMN** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.81 (s, 1H, H_{13}), 7.46 (da, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_8), 7.29-7.25 (m, 1H, H_{11}), 7.14-7.09 (td, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 1.2$ Hz, 1H, H_{10}), 7.09-7.05 (td, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz, 1H, H_9), 3.69 (s, 3H, H_{15}), 3.27 (m, 1H, H_4), 3.21 (m, 1H, H_{12b}), 3.11-3.05 (m, 1H, H_6), 3.02-2.92 (m, 1H, H_7), 2.79 (tt, $J_1 = 11.8$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, 1H, H_3), 2.75-2.72 (m, 1H, H_7), 2.71-2.62 (m, 1H, H_6), 2.49 (t, $J = 11.4$ Hz, 1H, H_4), 2.24-2.17 (m, 1H, H_2), 2.14-2.08 (m, 1H, H_1), 1.70-1.53 (m, 2H, H_1 y H_2) ppm; **^{13}C -RMN** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 174.29 (C_{14}), 136.05 (C_{12a} ó C_{11a}), 134.40 (C_{12a} ó C_{11a}), 127.32 (C_{7b}), 121.43 (C_{10}), 119.43 (C_9), 118.15 (C_8), 110.77 (C_{11}), 108.24 (C_{7a}), 59.46 (C_{12b}), 57.03 (C_4), 53.20 (C_6), 51.75 (C_{15}), 41.77 (C_3), 29.11 (C_1), 27.11 (C_2), 21.70 (C_7) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para $C_{17}H_{21}N_2O_2[M+H]^+$ 285.2, encontrada 285.1.

1.2.5. Ácido (3*RS*, 12*bRS*)-1,2,3,4,6,7,12,12*b*-octahidroindolo[2,3-*a*]quinolicin-3-carboxílico (70)

En un matraz de fondo redondo de 500 mL se disolvió el producto **68** (410 mg, 1.4 mmol) en MeCN (15 mL) y H₂O (250 mL). La disolución resultante se agitó vigorosamente a 100 °C y tras 3 días de reacción, se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y se liofilizó. El producto deseado se obtuvo como un sólido amarillo (213 mg, 55 %).



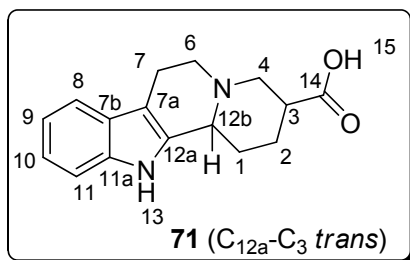
Caracterización

R_f [AcOEt/MeOH (2:1)] = 0.60; **HPLC** (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 1.27 min; **IR(ATR)**

3240, 3153, 1598 cm⁻¹; **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.75 (s, 1H, H₁₃), 7.35 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H₈), 7.28 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₁), 7.01 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₁₀), 6.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H₉), 3.19-3.10 (m, 2H, H_{12b} y H₄), 3.06-2.94 (m, 1H, H₆), 2.83-2.70 (m, 1H, H₇), 2.64-2.52 (m, 3H, H₇, H₃ y H₆), 2.40-2.29 (m, 2H, H₄ y H₁), 2.13-2.01 (m, 1H, H₂), 1.56-1.45 (m, 1H, H₂), 1.43-1.33 (m, 1H, H₁) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.07 (C₁₄), 135.99 (C_{12a} ó C_{11a}), 135.52 (C_{12a} ó C_{11a}), 126.62 (C_{7b}), 120.33 (C₁₀), 118.28 (C₉), 117.46 (C₈), 110.98 (C₁₁), 106.23 (C_{7a}), 59.38 (C_{12b}), 56.93 (C₄), 52.64 (C₆), 41.55 (C₃), 28.72 (C₁), 27.09 (C₂), 21.51 (C₇) ppm; **ESI(+)** *m/z* calculada para C₁₆H₁₉N₂O₂ [M+H]⁺ 271.1, encontrada 271.2.

1.2.6. Ácido (3*RS*, 12*bSR*)-1,2,3,4,6,7,12,12*b*-octahidroindolo[2,3-*a*]quinolicin-3-carboxílico (71)

En un matraz de fondo redondo de 500 mL se disolvió el producto **69** (610 mg, 2.1 mmol) en MeCN (20 mL) y H₂O (300 mL). La disolución resultante se agitó vigorosamente a 100 °C y tras 5 días de reacción, se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y se liofilizó. El producto deseado se obtuvo como un sólido amarillo (289 mg, 51 %).



Caracterización

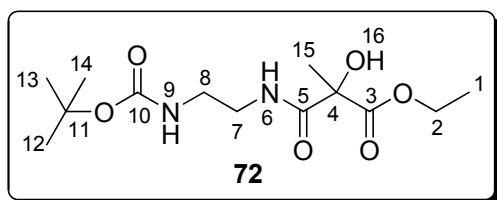
R_f [AcOEt/MeOH (2:1)] = 0.74; **HPLC** (XBrigde C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 1.25 min; **IR(ATR)**

3240, 3153, 1598 cm⁻¹; **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.72 (s, 1H, H₁₃), 7.35 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H₈), 7.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₁₁), 7.05-6.99 (m, 1H, H₁₀), 6.97-6.91 (m, 1H, H₉), 3.32 (m, 1H, H_{12b}), 3.27 (m, 1H, H₄), 3.03-2.95 (m, 1H, H₆), 2.84-2.72 (m, 1H, H₇), 2.65-2.52 (m, 4H, H₇, H₆, H₃ y H₄), 2.22-2.12 (m, 1H, H₁), 2.09-1.99 (m, 1H, H₂), 1.71-1.54 (m, 2H, H₁ y H₂) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.06 (C₁₄), 135.98 (C_{12a} ó C_{11a}), 135.22 (C_{12a} ó C_{11a}), 126.61 (C_{7b}), 120.40 (C₁₀), 118.33 (C₉), 117.46 (C₈), 111.00 (C₁₁), 106.05 (C_{7a}), 59.25 (C_{12b}), 55.62 (C₄), 52.60 (C₆), 41.40 (C₃), 26.45 (C₁), 24.48 (C₂), 20.93 (C₇) ppm; **ESI(+)** *m/z* calculada para C₁₁H₁₉N₂O₂[M+H]⁺ 271.1, encontrada 271.1.

1.3. Unión del α-hidroxi-α-malonato al espaciador

1.3.1. Síntesis de (72)

En un matraz de fondo redondo de 250 mL se disolvieron en DCM (80 mL) el producto **64** (5.60 g, 34.54 mmol), EDC·HCl (7.94 g, 41.42 mmol) y HOBt (5.60 g, 41.42 mmol). A continuación, se adicionó *N*-Boc-etilendiamina (5.53 g, 34.54 mmol) y se mantuvo la disolución resultante en agitación durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la fase orgánica con una disolución acuosa de NaHCO₃ (3 × 80 mL), H₂O (2 × 80 mL) y una disolución acuosa de ácido cítrico al 0.5 % (3 × 80 mL), se secó con MgSO₄ anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. El aceite amarillento resultante se purificó por cromatografía *flash* en fase normal [sílica *gold*, DCM/MeOH], obteniéndose el producto deseado como un aceite incoloro (3.70 g, 35%).



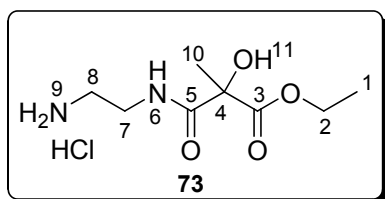
Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min,

detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 2.02$ min; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.55 (m, 1H, H₆), 5.35 (m, 1H, H₉), 4.75 (sa, 1H, H₁₆), 4.27 (m, 2H, H₂), 3.39 (m, 2H, H₇), 3.29 (m, 2H, H₈), 1.64 (s, 3H, H₁₅), 1.46 (s, 9H, H₁₂-H₁₄), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H₁) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 172.25 (C₅), 171.21 (C₃), 156.61 (C₁₀), 79.47 (C₁₁), 76.68 (C₄), 62.61 (C₂), 40.25 (C₇), 40.01 (C₈), 28.31 (C₁₂-C₁₄), 23.59 (C₁₅), 13.93 (C₁) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 305.2, encontrada 305.3.

1.3.2. Síntesis de (73)

En un matraz de fondo redondo de 250 mL se adicionó el producto **72** (2.95 g, 9.69 mmol) y se disolvió en 10 mL de HCl en dioxano (4M). La disolución resultante se mantuvo en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se evaporó la mayor parte del disolvente a presión reducida y se eliminó el resto por co-evaporación. El crudo resultante se liofilizó, obteniéndose el producto deseado como un aceite incoloro (2.09 g, 89 %).



Caracterización

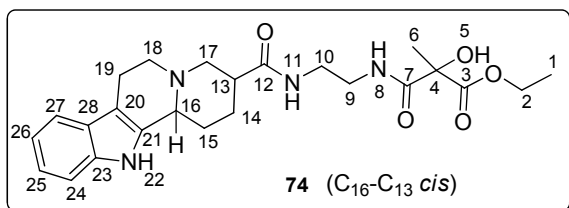
HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm , 5 → 100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 0.35$ min; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.23 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, H₆), 8.10 (sa, 2H, H₉), 4.08 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H₂), 3.43-3.25 (m, 2H, H₇), 2.84 (m, 2H, H₈), 1.44 (s, 3H, H₁₀), 1.16 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H₁) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 171.66 (C₅), 171.04 (C₃), 76.47 (C₄), 60.77 (C₂), 38.17 (C₈), 36.35 (C₇), 23.28 (C₁₀), 13.93 (C₁) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 205.1, encontrada 205.1.

1.4. Unión del α -hidroxi- α -malonato con los derivados de indoloquinolicidina (70) y (71)

1.4.1. Síntesis de (74)

En un matraz de fondo redondo de 250 mL se disolvieron en DMF (30 mL) el producto **70** (0.22 g, 0.81 mmol), PyBOP (0.41 g, 0.79 mmol) y EDIA (0.41 mL, 2.35 mmol). A continuación, se adicionó el producto **73** (0.19 g, 0.93 mmol) y la mezcla resultante se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 45 min.

Seguidamente, se eliminó la mayor parte del disolvente a presión reducida, se adicionó H₂O (30 mL) y se llevaron cabo extracciones con DCM (5 × 30 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el crudo a presión reducida hasta sequedad. Por último, el crudo obtenido se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 %→10 % B en 1 min y 10 %→40 % B en 7 min con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm), obteniéndose 110 mg de derivado **74** como un sólido amarillo (29 %).



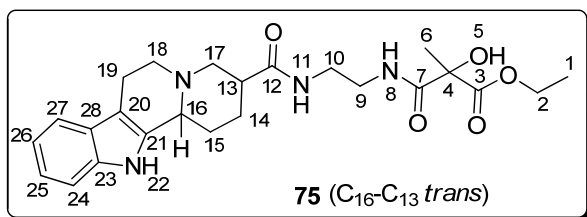
Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μ m, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)),

flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 1.33 min; **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.50 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H₂₇), 7.41 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H₂₄), 7.15 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H₂₅), 7.06 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H₂₆), 5.11 (sa, 1H, H₁₆), 4.13-3.98 (m, 2H, H₂), 3.74-3.58 (m, 2H, H₁₇), 3.44-3.31 (m, 1H, H₁₈), 3.30-2.90 (m, 7H, H₉, H₁₀, H₁₈ y H₁₉), 2.76-2.62 (m, 2H, H₁₃ y H₁₅), 2.19-2.03 (m, 1H, H₁₅), 1.87-1.76 (m, 1H, H₁₄), 1.48-1.34 (m, 3H, H₆), 1.20-1.07 (m, 4H, H₁ y H₁₄) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.41 (C₇), 171.21 (C₃), 170.70 (C₁₂), 136.50 (C₂₈), 126.81 (C₂₁ ó C₂₃), 126.08 (C₂₁ ó C₂₃), 121.98 (C₂₅), 119.27 (C₂₆), 118.24 (C₂₇), 111.56 (C₂₄), 104.80 (C₂₀), 76.30 (C₄), 60.70 (C₂), 54.27 (C₁₆), 49.96 (C₁₇), 45.94 (C₁₈), 39.60 (C₁₃), 39.30 (C₉ ó C₁₀), 38.10 (C₉ ó C₁₀), 24.28 (C₁₅), 23.27 (C₆), 21.79 (C₁₄), 15.55 (C₁₉), 13.90 (C₁) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₄H₃₃N₄O₅ [M+H]⁺ 457.2, encontrada 457.3.

1.4.2. Síntesis de (75)

En un matraz de fondo redondo de 250 mL se disolvieron en DMF (30 mL) el producto **71** (0.31 g, 1.15 mmol), PyBOP (0.60 g, 1.15 mmol) y EDIA (0.60 mL, 3.44 mmol). A continuación, se adicionó el producto **73** (0.28 g, 1.37 mmol) y la mezcla resultante se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente. A continuación, se siguió un procedimiento experimental similar al que se describe en el apartado 1.4.1. Finalmente, el crudo obtenido se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (5 %→20 % B en 1 min y 20 %→30 % B en 7 min con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm), obteniéndose 150 mg de derivado **75** como un sólido amarillo (29 %).



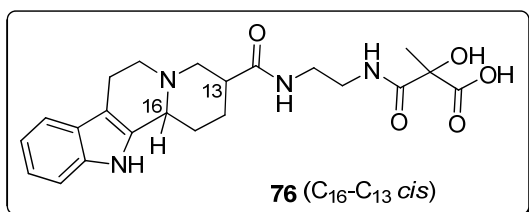
Caracterización

HPLC XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH))

flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 1.43 min; **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.49 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₂₇), 7.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H₂₄), 7.15 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₂₅), 7.06 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H₂₆), 5.11 (sa, 1H, H₁₆), 4.12-3.99 (m, 2H, H₂), 3.73-3.59 (m, 2H, H₁₇), 3.36 (m, 1H, H₁₈), 3.28-2.89 (m, 7H, H₉, H₁₀, H₁₈ y H₁₉), 2.74-2.63 (m, 2H, H₁₃ y H₁₅), 2.17-2.03 (m, 1H, H₁₅), 1.85-1.77 (m, 1H, H₁₄), 1.47-1.35 (m, 3H, H₆), 1.26-1.08 (m, 4H, H₁ y H₁₄) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.42 (C₇), 171.22 (C₃), 170.72 (C₁₂), 136.51 (C₂₈), 126.82 (C₂₁ ó C₂₃), 126.09 (C₂₁ ó C₂₃), 121.99 (C₂₅), 119.28 (C₂₆), 118.25 (C₂₇), 111.57 (C₂₄), 104.81 (C₂₀), 76.31 (C₄), 60.71 (C₂), 54.28 (C₁₆), 49.97 (C₁₇), 45.94 (C₁₈), 39.98 (C₁₃), 38.89 (C₉ ó C₁₀), 38.11 (C₉ ó C₁₀), 24.30 (C₁₅), 23.27 (C₆), 21.80 (C₁₄), 15.55 (C₁₉), 13.91 (C₁) ppm; **ESI(+)** *m/z* calculada para C₂₄H₃₃N₄O₅ [M+H]⁺ 457.2, encontrada 457.3.

1.4.3. Hidrólisis de los productos (74) y (75): Obtención de (76) y (77)

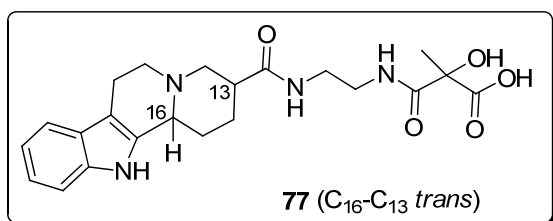
En un matraz de fondo redondo de 100 mL se adicionó el éster (**74** ó **75**) y se disolvió en 6-8 mL de H₂O. Tras enfriar la disolución con un baño de hielo a 0 °C, se adicionó gota a gota 1.2 eq de una disolución de KOH (0.25 M) y la disolución resultante se mantuvo con agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se acidificó la disolución con HCl 1M hasta alcanzar pH 2, se evaporó el disolvente a presión reducida y el crudo obtenido se disolvió en EtOH. Finalmente, la suspensión resultante se centrifugó y se decantó. Los productos deseados se obtuvieron como sólidos amarillos ((82 mg, 89 % de **76**) y (90 mg, 93 % de **77**)).



Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH))), flujo

2 mL/min, $\lambda = 220$ nm) $t_R = 1.30$ min; **ESI(+)** m/z calculada para $C_{22}H_{29}N_4O_5$ $[M+H]^+$ 429.2, encontrada 429.3.



Caracterización

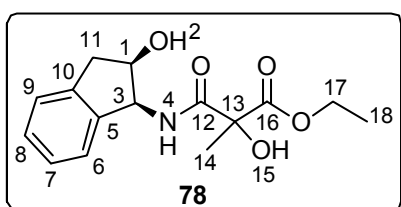
HPLC (XSelect C_{18} , 4.6×50 mm, $3.5 \mu\text{m}$, $5 \rightarrow 100$ % B en 4.5 min (A: H_2O (0.1 % $HCOOH$) y B: MeCN (0.07 % $HCOOH$)),

flujo 2 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 1.32$ min, $t_R = 1.32$ min; **ESI(+)** m/z calculada para $C_{22}H_{29}N_4O_5$ $[M+H]^+$ 429.2, encontrada 429.3.

1.5. Unión del α -hidroxi- α -malonato con el derivado de (1*S*, 2*R*) -1-amino-2-indanol

1.5.1. Síntesis de (78)

En un matraz de fondo redondo de 250 mL, se adicionaron el malonato **64** (1.20 g, 7.40 mmol), EDC·HCl (1.43 g, 7.46 mmol) y HOBt· H_2O (1.00 g, 7.40 mmol) y se disolvieron en DCM (50 mL) y DMF (2 mL). La disolución resultante se mantuvo durante 15 min a 0°C en un baño de hielo. A continuación, se adicionó (1*S*, 2*R*) -1-amino-2-indanol (0.93 g, 6.23 mmol) y se mantuvo la disolución resultante en agitación durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de $NaHCO_3$ (3×50 mL), H_2O (2×50 mL) y una disolución acuosa de HCl al 5 % (3×80 mL), se secó con $MgSO_4$ anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. El aceite incoloro resultante se purificó por cromatografía *flash* en fase normal [sílica *gold*, DCM/MeOH], obteniéndose el producto deseado como un aceite incoloro (1.15 g, 53 %).



Caracterización

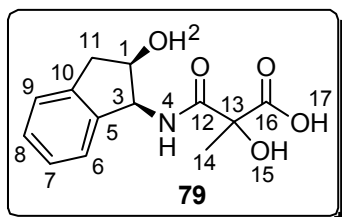
HPLC (XSelect C_{18} , 4.6×50 mm, $3.5 \mu\text{m}$, $5 \rightarrow 100$ % B en 4.5 min (A: H_2O (0.1 % $HCOOH$) y B: MeCN (0.07 % $HCOOH$)), flujo 2 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R =$

1.93 min; **1H -RMN** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.42 (m, 1H, H_4), 7.26 (m, 4H, H_6 - H_9), 5.34 (m, 1H, H_3), 4.65 (td, $J_1 = 5.2$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H, H_1), 4.31 (m, 2H, H_{17}), 4.24 (s, 1H, H_{15}), 3.19 (m, 1H, H_{11}), 2.96 (m, 1H, H_{11}), 2.10 (m, 1H, H_2), 1.74 (s, 3H, H_{14}), 1.35 (m, 3H, H_{18})

ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 172.92 (C_{16}), 171.10 (C_{12}), 140.29 (C_5), 140.03 (C_{10}), 128.61 (C_7 ó C_8), 127.49 (C_7 ó C_8), 125.56 (C_9), 124.62 (C_6), 76.98 (C_{13}), 73.70 (C_1), 63.30 (C_{17}), 57.89 (C_3), 39.91 (C_{11}), 24.46 (C_{14}), 14.19 (C_{18}) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 294.3, encontrada 294.2.

1.5.2. Síntesis de (79)

En un matraz de fondo redondo de 250 mL, se adicionó el producto **78** (1.15 g, 3.92 mmol), se disolvió en THF (10 mL) y se adicionó H_2O (50 mL). A continuación, la disolución resultante se enfrió a 0 °C en un baño de hielo y se adicionaron 7.5 mL de una disolución acuosa de KOH (0.25 M). La disolución resultante se mantuvo durante 30 min con agitación vigorosa a temperatura ambiente. Seguidamente, se acidificó con HCl 1M hasta alcanzar pH 2, el crudo obtenido se extrajo con AcOEt (4 × 50 mL), se secó con MgSO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El producto deseado se obtuvo como un aceite incoloro (0.97 g, 93 %).



Caracterización

HPLC (XSelect C_{18} , 4.6 × 50 mm, 3.5 μm , 5 → 100 % B en 4.5 min (A: H_2O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_{\text{R}} = 1.58$, $t_{\text{R}} = 1.72$ min; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.82 (m, 1H, H_4), 7.25 (m, 4H, H_6 - H_9), 5.28 (m, 1H, H_3), 4.61 (m, 1H, H_1), 3.15 (m, 1H, H_{11}), 2.94 (dd, $J_1 = 15.8$ Hz, $J_2 = 4.4$ Hz, 1H, H_{11}), 1.70 (s, 3H, H_{14}) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 174.17 (C_{16}), 140.22 (C_5), 139.48 (C_{10}), 128.80 (C_7 ó C_8), 127.58 (C_7 ó C_8), 125.58 (C_9), 124.65 (C_6), 75.43 (C_{13}), 73.20 (C_1), 58.00 (C_3), 39.93 (C_{11}), 27.43 (C_{14}) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 266.3, encontrada 266.2.

2. QUIMIOTECA DE ANÁLOGOS DE PEPTINAS

2.1. Preparación de la aminoacil-resina (33)

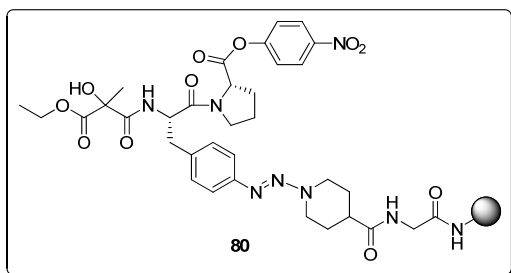
La quimioteca de peptinas se llevó a cabo utilizando la resina MBHA-PS ($f = 0.63$ mmol·g $^{-1}$) como soporte polimérico, la cual se acondicionó y se funcionalizó con el ácido Boc-isonipecótico tal y como se detalla en los protocolos generales B.3.1 y B.3.5 utilizando el aminoácido Fmoc-Gly-OH como patrón interno (protocolo general B.3.2).

La unión del derivado de fenilalanina **27** a la resina mediante la unión triaceno se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.2.2 (parte experimental, Capítulo 1) con un rendimiento del 72 % obtenido tras la cuantificación de grupos Fmoc. Finalmente, tras la acetilación de las aminas (protocolo B.3.7) se obtuvo la aminoacil-resina **33**.

2.2. Elongación de la cadena peptídica lineal y ciclación intramolecular

Cada una de las peptinas se preparó a partir de 300-350 mg de aminoacil-resina **33** obtenida según el apartado 2.1. Tras eliminar el grupo Fmoc utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3), se incorporó el ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico **64** (3 eq) utilizando DIC (3 eq) y Oxyma® (3 eq) en DMF (8 -10 mL) (protocolo B.3.8). A continuación, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo con Pd(PPh₃)₄ (0.4 eq) y PhSiH₃ (48 eq), siguiendo el protocolo experimental descrito en el apartado B.3.9. Seguidamente, se incorporó el derivado de prolina H-Pro-OAlilo·HCl **19** utilizando PyBOP (3eq), HOBt·H₂O (3 eq) y EDIA (9 eq) en DMF (8-10 mL). Este procedimiento se repitió en dos ocasiones para asegurar que el acoplamiento fuera cuantitativo. Tras eliminar el grupo protector alilo del derivado de prolina (protocolo B.3.9), se formó el éster de *p*-nitrofenol utilizando *p*-nitrofenol (20 eq), DIC (3 eq) y HOBt·H₂O (3eq) en DMF (10 mL). La reacción se llevó a cabo en dos ocasiones, la primera durante 3 h y la siguiente durante 16 h para asegurar que la formación del éster fuera cuantitativa y de esta manera obtener la peptidil-resina **80**.

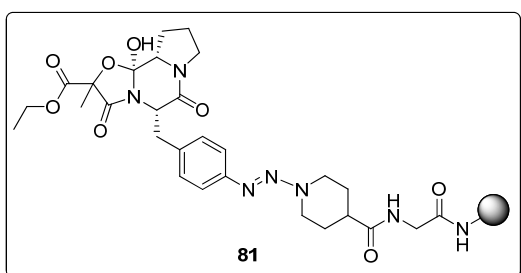
La peptidil-resina **80** se lavó con DMF (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s) y se introdujo en un reactor específico para llevar a cabo reacciones en fase sólida en condiciones anhidras. Tras secar la peptidil-resina **80** (máximo 650 mg) en una estufa de vacío a 37 °C durante 24 h, se lavó con DCM anhidro (5 × 30 s) en atmósfera de argón. Seguidamente, se adicionó BTPP (1.5 eq) disuelto previamente en la mínima cantidad de DCM anhidro y la mezcla de reacción se mantuvo durante 10 minutos con agitación mecánica en atmósfera de argón. Este procedimiento se llevó a cabo en dos ocasiones. A continuación, se lavó la peptidil-resina resultante **81** con DCM anhidro (10 × 30 s). Finalmente, la peptidil-resina **81** se lavó de nuevo con DCM (5 × 30 s), DMF (5 × 30 s), hexano (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s).



Caracterización (del producto desanclado de la resina y tratado con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

HPLC (XSelect C_{18} , 5-100 % MeCN, 4.5 min, 2 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 3.07$ min (62 % pureza); **ESI(+)** m/z calculada para

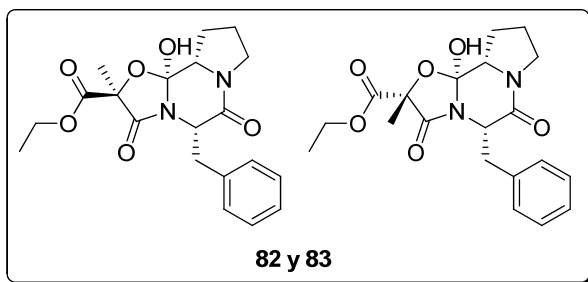
$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_9[\text{M}+\text{H}]^+$ 528.1, encontrada 528.2.



2.3. Derivatización de la fenilalanina en los análogos de peptinas

2.3.1. Síntesis de los análogos de peptina no modificados (82) y (83)

Los análogos **82** y **83** se sintetizaron a partir de 605 mg (0.38 mmol) de peptidil-resina **81** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **38** (apartado 9.3, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo el desanclaje de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3×2 min), la sal de diazonio obtenida se redujo con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.07 g, 0.25 mmol) en DMF (15 mL) durante 5 min. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por columna cromatografía en gel de sílice [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. Finalmente, el producto se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 % \rightarrow 30 % B en 1 min y 30 % \rightarrow 39 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H_2O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose 7.4 mg del diastereoisómero **82** (11 % de rendimiento global) y 7.5 mg del diastereoisómero **83** (12 % de rendimiento global).

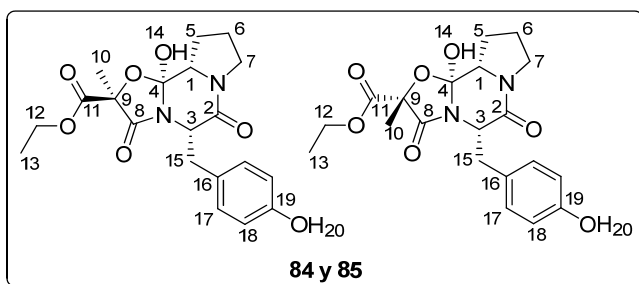


Caracterización

HPLC (XBridge BEH C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 6.17 min (Pureza 90 %) **82** y t_R = 6.67 min (Pureza 99 %) **83**; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₀H₂₅N₂O₆[M+H]⁺ 389.16, encontrada 389.15 **82** y 389.21 **83**; **HRMS** m/z calculada para C₂₀H₂₅N₂O₆[M+H]⁺ 389.1699, encontrada 389.1707 **82** y 389.1707 **83**.

2.3.2. Síntesis de los análogos de hidroxipeptinas (**84**) y (**85**)

Los análogos **84** y **85** se sintetizaron a partir de 459 mg (0.29 mmol) de peptidil-resina **81** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **53** (apartado 10.3.1, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo el desanclaje de la de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), la sal de diazonio obtenida se redujo con H₂O/MeCN (8:2, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 2 h. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida, el crudo obtenido se purificó por cromatografía en gel de sílice [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. Finalmente, el producto se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→32 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm), obteniéndose 10.5 mg del diastereoisómero **84** (20 % de rendimiento global) y 11.2 mg del diastereoisómero **85** (21 % de rendimiento global).



Caracterización

HPLC (XBridge BEH C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 5.15 min (Pureza 100 %) **84** y t_R = 5.42 min (Pureza 99 %) **85**;
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃)

Diastereoisómero 84: δ 7.09-7.05 (m, 2H, H₁₇), 6.80-6.76 (m, 2H, H₁₈), 4.71 (dd, $J_1 = 6.2$ Hz, $J_2 = 3.7$ Hz, 1H, H₃), 4.27-4.20 (m, 2H, H₁₂), 3.97-3.90 (m, 1H, H₁), 3.60-3.52 (m, 3H, 2H₇ y H₁₅), 3.26-3.19 (m, 1H, H₁₅), 2.10-2.03 (m, 2H, H₅), 2.01-1.86 (m, 1H, H₆), 1.85-1.70 (m, 1H, H₆), 1.68 (s, 3H, H₁₀), 1.29 (t, $J = X$ Hz, 3H, H₁₃) ppm.

Diastereoisómero 85: δ 7.03-6.99 (m, 2H, H₁₇), 6.70-6.66 (m, 2H, H₁₈), 4.69 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, H₃), 4.35-4.22 (m, 2H, H₁₂), 3.64-3.54 (m, 3H, H₁ y H₇), 3.35 (dd, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, 1H, H₁₅), 3.26 (dd, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 6.4$ Hz, 1H, H₁₅), 2.14-2.08 (m, 2H, H₅), 2.06-1.98 (m, 1H, H₆), 1.84-1.74 (m, 1H, H₆), 1.59 (s, 3H, H₁₀), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H₁₃) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃)

Diastereoisómero 84: δ 167.89 (C₁₁), 164.17 (C₂), 155.21 (C₁₉), 155.15 (C₈), 131.68 (C₁₇), 129.14 (C₁₆), 115.76 (C₁₈), 105.51 (C₄), 83.57 (C₉), 63.93 (C₁), 62.88 (C₁₂), 56.58 (C₃), 46.84 (C₇), 34.25 (C₁₅), 26.37 (C₅ ó C₆), 22.62 (C₅ y C₆), 22.47 (C₁₀), 14.14 (C₁₃) ppm.

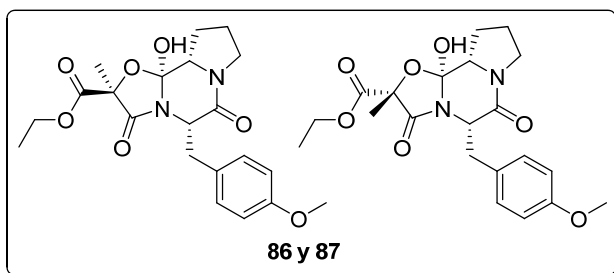
Diastereoisómero 85: δ 170.71 (C₁₁), 166.22 (C₂), 164.53 (C₁₉), 154.90 (C₈), 131.53 (C₁₇), 138.83 (C₁₇), 128.67 (C₁₆), 115.26 (C₁₈), 104.64 (C₄), 83.64 (C₉), 65.34 (C₁), 63.87 (C₁₂), 56.72 (C₃), 46.55 (C₇), 36.22 (C₁₅), 26.65 (C₅), 22.45 (C₆), 19.43 (C₁₀), 14.13 (C₁₃) ppm.

ESI(+) m/z calculada para C₂₀H₂₅N₂O₇ [M+H]⁺ 405.16, encontrada 405.09; **HRMS** m/z calculada para C₂₀H₂₅N₂O₇ [M+H]⁺ 405.1656, encontrada 405.1654 **84** y 405.1656 **85**.

2.3.3. Síntesis de los análogos de metoxipeptinas (86) y (87)

Los análogos **86** y **87** se prepararon a partir de 609 mg (0.38 mmol) de peptidil-resina **80** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **54** (apartado 10.3.2, parte experimental, Capítulo 1). La peptidil-resina se trató con la mezcla acidolítica TFA/MeOH (5:95, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 1 h. Se filtró y tras eliminar el disolvente a presión reducida, el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. Finalmente, el producto se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→32 % B en 1 min y 32 %→51 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda =$

214 nm), obteniéndose 9.4 mg del diastereoisómero **86** (14 % de rendimiento global) y 6.8 mg del diastereoisómero **87** (10 % de rendimiento global).



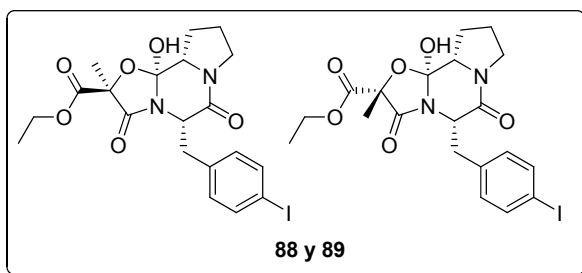
Caracterización

HPLC (XBridge BEH C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH))), flujo 1 mL/min,

detección λ = 220 nm) t_R = 5.97 min (Pureza 100 %) **86** y t_R = 6.17 min (Pureza 99 %) **87**; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₀H₂₇N₂O₇ [M+H]⁺ 419.17, encontrada 419.16.

2.3.4. Síntesis de los análogos de yodopeptinas (88) y (89)

Los análogos **88** y **89** se sintetizaron partir de 421 mg (0.27 mmol) de la peptidil-resina **80** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **56** (apartado 10.3.4, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo la escisión de la resina utilizando TFA/DCM (5:95 V/V) (10 min), la sal de diazonio obtenida se trató con una mezcla H₂O/MeCN (9:1, V/V) y KI (63 mg, 0.36 mmol) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida, el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. Finalmente, el producto se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→37 % B en 1 min y 37 %→60 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm), obteniéndose 4.0 mg del diastereoisómero **88** (12 % de rendimiento global) y 3.6 mg del diastereoisómero **89** (11 % de rendimiento global).



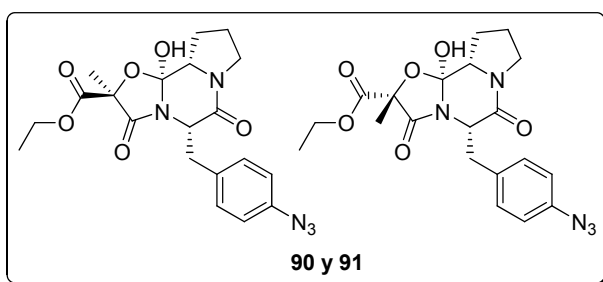
Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH))), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm)

t_R = 2.85 min (Pureza 98 %) **88** y t_R = 2.98 min (Pureza 98 %) **89**; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₀H₂₄I₂N₂O₆ [M+H]⁺ 515.06, encontrada 515.0 **88** y 515.0 **89**.

2.3.5. Síntesis de los análogos de azidopeptinas (90) y (91)

Los análogos **90** y **91** se sintetizaron a partir de 601 mg (0.38 mmol) de la peptidil-resina **80** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **55** (apartado 10.3.3, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo la escisión del derivado peptídico de la resina utilizando TFA/DCM (5:95, V/V) (10 min), se adicionó Me_3SiN_3 (0.1 mL, 0.72 mmol). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida, el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. Por último, el producto se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→35 % B en 1 min y 35 %→55 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H_2O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose 3.5 mg del diastereoisómero **90** (5 % de rendimiento global) y 7.9 mg del diastereoisómero **91** (11 % de rendimiento global).



Caracterización

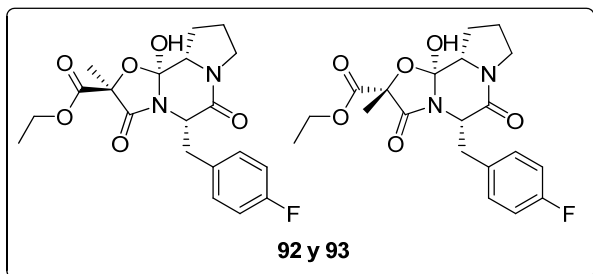
HPLC (XSelect C_{18} , 4.6 × 50 mm, 3.5 μm , 5→100 % B en 4.5 min (A: H_2O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_{\text{R}} = 2.67$ min (Pureza 97 %) **90** y $t_{\text{R}} = 2.80$ min (Pureza 94 %) **91**; **ESI(+)** m/z calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 430.16, encontrada 430.2 **90** y 430.2 **91**.

2.3.6. Síntesis de los análogos de fluoropectinas (92) y (93)

Los análogos **92** y **93** se sintetizaron a partir de 318 mg (0.20 mmol) de la peptidil-resina **80** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **57** (apartado 10.3.5, parte experimental, Capítulo 1). La peptidil-resina se introdujo en un tubo *kimax* y se trató con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0.17 mL, 0.64 mmol) y CCl_4 (3 mL) en atmósfera de argón durante 1.5 h. La peptidil-resina resultante se filtró, se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. El producto obtenido se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→38 % B en 1 min y 38 %→44

% B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose 3.3 mg del diastereoisómero **92** (9 % de rendimiento global) y 3.5 mg del diastereoisómero **93** (10 % de rendimiento global).

Caracterización



HPLC (XBridge BEH C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μ m, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 6.42$ min (Pureza 90 %)

92 y $t_R = 6.87$ min (Pureza 98 %) **93**; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₀H₂₄FN₂O₆ [M+H]⁺ 407.10, encontrada 407.10 **92** y 407.10 **93**.

3. QUIMIOTECA DE PRECURSORES PEPTÍDICOS LINEALES

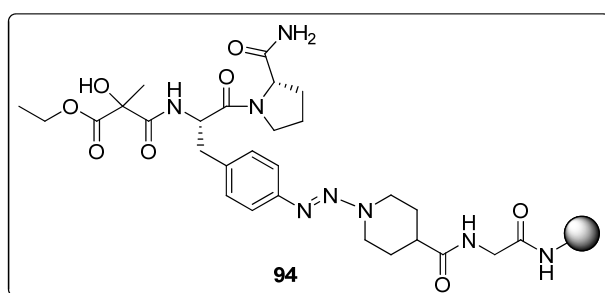
3.1. Preparación de la aminoacil-resina (**33**)

La quimioteca de precursores peptídicos lineales se preparó utilizando la resina MBHA-PS ($f = 0.63$ mmol·g⁻¹). Se acondicionaron 2.01 g de resina (1.30 mmol) siguiendo el protocolo descrito en el apartado B.3.1 y, a continuación, se acopló Fmoc-Gly-OH (1.16 g, 3.91 mmol) utilizando DIC (0.60 mL, 3.91 mmol) y Oxyma® (0.55 g, 3.90 mmol) en DMF (15 mL) (protocolo B.3.2). Tras eliminar el grupo protector Fmoc con una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3), se incorporó el espaciador bifuncional ácido Boc-isonipecótico (0.89 g, 3.90 mmol) siguiendo el protocolo B.3.5 y se eliminó el grupo protector Boc (protocolo B.3.4). Posteriormente, la formación de la unión triaceno se llevó a cabo utilizando el derivado Fmoc-Phe(*p*NH₂)-OAlilo **27** (2.00 g, 3.98 mmol) que se trató para formar la correspondiente sal de diazonio **33** siguiendo el protocolo experimental descrito en el apartado 7.2.2 (parte experimental, Capítulo 1) utilizando BF₃·Et₂O (1.75 mL, 6.63 mmol) y ^tBuONO (0.90 mL, 6.81 mmol) en DCM anhidro (40 mL) bajo atmósfera de argón. La mezcla resultante se mantuvo a -10 °C con agitación constante durante 1 h. A continuación, la solución de la sal de diazonio obtenida se adicionó vía canula a la mezcla de la resina MBHA-PS funcionalizada con ácido isonipecótico y piridina anhidra (9 mL) a -10 °C. La suspensión resultante se mantuvo con agitación mecánica a temperatura ambiente

durante 3 h en atmósfera de argón y, tras filtrar la resina, se lavó con DCM (5 × 30 s), MeOH (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s) y DMF (5 × 30 s). El rendimiento de reacción (70 %) se determinó por cuantificación de grupos Fmoc siguiendo el protocolo descrito en el apartado A.4.5 (Materiales y Métodos). Finalmente, se bloquearon las aminas secundarias que no habían reaccionado siguiendo el protocolo experimental descrito en el apartado B.3.7, utilizando Ac₂O (2.50 mL, 26.45 mmol) y EDIA (4.62 mL, 26.52 mmol) en DMF (15 mL) durante 30 min y la aminoacil-resina se lavó con DMF (5 × 30 s), DCM (5 × 30 s), MeOH (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s).

3.2. Elongación de la cadena peptídica

Cada uno de los derivados peptídicos se preparó a partir de 250-560 mg de aminoacil-resina **33**. Tras eliminar el grupo Fmoc con una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3), se incorporó el ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico racémico **64** (3 eq) utilizando DIC (3 eq) y Oxyma® (3 eq) en DMF (8 -10 mL). A continuación, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo utilizando Pd(PPh₃)₄ (0.4 eq) y PhSiH₃ (48 eq), siguiendo el protocolo experimental descrito en el apartado B.3.9. Finalmente, se incorporó el derivado de prolina comercial H-Pro-NH₂·HCl utilizando PyBOP (3eq), HOBT·H₂O (3 eq) y EDIA (9 eq) en DMF (8-10 mL) según el protocolo B.3.8. Este procedimiento se repitió en dos ocasiones para asegurar que el acoplamiento fuera cuantitativo. La peptidil-resina así obtenida **94** se utilizó posteriormente para preparar los diferentes derivados peptídicos.

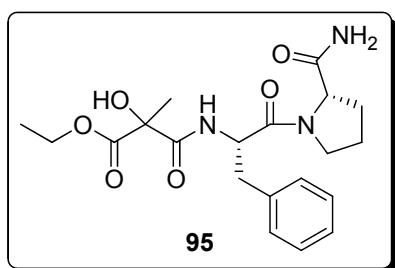


3.3. Obtención de los precursores peptídicos lineales

3.3.1. Síntesis del precursor peptídico lineal no modificado (95)

El derivado peptídico **95** se sintetizó a partir de 304 mg (0.19 mmol) de peptidil-resina **94** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **38**

(apartado 9.3, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo el desanclaje del derivado peptídico de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), la reducción de la sal de diazonio obtenida se realizó con FeSO₄·7H₂O (29 mg, 0.10 mmol) en DMF (10 mL) durante 5 min, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. Finalmente, el crudo obtenido (con un 78 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→26 % B en 1 min y 26 %→30 % B en 7 min, siendo A: 0.1% HCOOH en H₂O y B: 0.07% HCOOH en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ= 214 nm), obteniéndose 24 mg de producto **94** como un sólido blanco (69 % de rendimiento global).



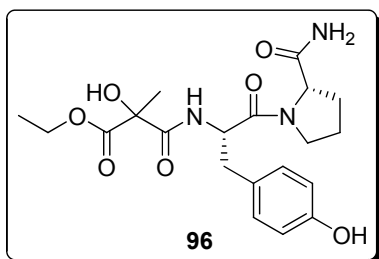
Caracterización

HPLC (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R= 1.83 min (Pureza 94 %); **ESI(+)** m/z calculada para

C₂₀H₂₈N₃O₆ [M+H]⁺ 406.17, encontrada 406.20; **HRMS** m/z calculada para C₂₀H₂₈N₃O₆ [M+H]⁺ 406.1973, encontrada 406.1969.

3.3.2. Síntesis del precursor peptídico lineal hidroxilado (96)

El derivado peptídico **96** se sintetizó a partir de 250 mg (0.16 mmol) de peptidil-resina **94** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **53** (apartado 10.3.1, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo el desanclaje del derivado peptídico de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), la sal de diazonio obtenida se disolvió en una mezcla H₂O/MeCN (8:2, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 2 h. Tras eliminar el disolvente a presión reducida, el crudo obtenido (con un 64 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→15 % B en 1 min y 15 %→23 % B en 7 min, siendo A: 0.1% HCOOH en H₂O y B: 0.07% HCOOH en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ= 214 nm), obteniéndose 16 mg de derivado **96** como un sólido blanco (52 % de rendimiento global).

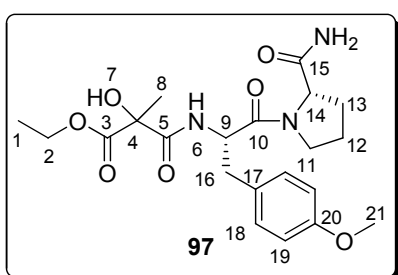


Caracterización

HPLC (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 1.47 min (Pureza 100 %); **ESI(+)** m/z calculada para C₂₀H₂₈N₃O₇[M+H]⁺ 422.17, encontrada 422.20; **HRMS** m/z calculada para C₂₀H₂₈N₃O₇[M+H]⁺ 422.1922, encontrada 422.1915.

3.3.3. Síntesis del precursor peptídico lineal metoxilado (97)

El derivado peptídico **97** se sintetizó a partir de 277 mg (0.17 mmol) de peptidil-resina **94** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **54** (apartado 10.3.2, parte experimental, Capítulo 1). La peptidil-resina se suspendió en la mezcla acidolítica TFA/MeOH (5:95, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 1 h, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido (con un 70 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→25 % B en 1 min y 25 %→37 % B en 7 min, siendo A: 0.1% HCOOH en H₂O y B: 0.07% HCOOH en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm), obteniéndose 18 mg de derivado **97** como un sólido blanco (51 % de rendimiento global).



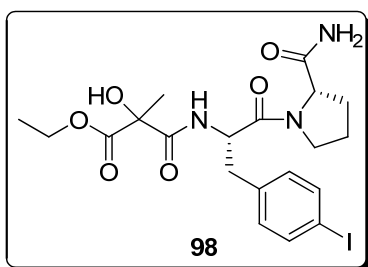
Caracterización

HPLC (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 1.85 min (Pureza 100 %); **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.10 (t, J = 8.6 Hz, 2H, H₁₈), 6.83-6.77 (m, 2H, H₁₉), 4.94-4.81 (m, 1H, H₉), 4.57 (dd, J = 9.7 Hz, 4.4 Hz, 1H, H₁₄), 4.37-4.21 (m, 2H, H₂), 3.77 (s, 3H, H₂₁), 3.64-3.42 (m, 1H, H₁₁), 3.19-3.06 (m, 1H, H₁₁), 3.06-2.89 (m, 2H, H₁₆), 2.38-2.28 (m, 1H, H₁₃), 2.01-1.79 (m, 3H, 2H₁₂ y H₁₃), 1.61 (s, 3H, H₈), 1.31 (m, 3H, H₁) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ 174.89 (C₃), 174.79 (C₁₅), 172.66 (C₅), 171.10 (C₁₀), 158.98 (C₂₀), 130.69 (C₁₇), 129.62 (C₁₈), 114.56 (C₁₉), 70.40 (C₄), 63.31 (C₂), 59.77 (C₁₄), 55.41 (C₂₁), 52.53 (C₉), 47.55 (C₁₁), 38.12

(C₁₆), 27.15 (C₁₃), 25.15 (C₁₂), 24.24 (C₈), 14.18 (C₁) ppm; **ESI(+)** *m/z* calculada para C₂₁H₃₀N₃O₇ [M+H]⁺ 436.18, encontrada 436.18; **HRMS** *m/z* calculada para C₂₁H₃₀N₃O₇ [M+H]⁺ 436.2078, encontrada 436.2073.

3.3.4. Síntesis del precursor peptídico lineal yodado (98)

El derivado peptídico **98** se sintetizó a partir de 539 mg (0.34 mmol) de peptidil-resina **94** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **56** (apartado 10.3.4, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo la escisión del derivado peptídico de la resina utilizando TFA/DCM (5:95, V/V) (10 min), la sal de diazonio obtenida se trató con una mezcla H₂O/MeCN (9:1, V/V) y KI (57 mg, 0.34 mmol) durante 1 h de reacción a temperatura ambiente. Tras eliminar el disolvente a presión reducida, el crudo obtenido (con un 76 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→35 % B en 1 min y 35 %→50 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ= 214 nm) obteniendo 34 mg de derivado **98** como un sólido blanco (41 % de rendimiento global).



Caracterización

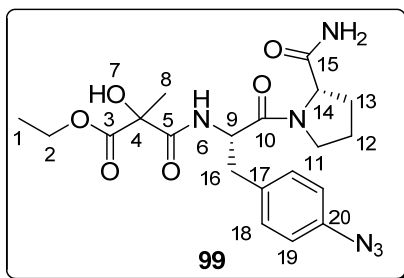
HPLC (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R= 2.28 min (Pureza 92 %); **ESI(+)** *m/z* calculada para

C₂₀H₂₇IN₃O₆ [M+H]⁺ 532.07, encontrada 532.07; **HRMS** *m/z* calculada para C₂₀H₂₇IN₃O₆ [M+H]⁺ 532.0939, encontrada 532.0929.

3.3.5. Síntesis del precursor peptídico lineal azida (99)

El derivado peptídico **99** se sintetizó a partir de 560 mg (0.35 mmol) de peptidil-resina **94** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **55** (apartado 10.3.3, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo la escisión del derivado peptídico de la resina utilizando TFA/DCM (5:95, V/V) (10 min), se adicionó Me₃SiN₃ (83 μL, 0.59 mmol) y la reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo obtenido (con un 82 % de

pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→37 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose 50 mg de derivado **99** como un sólido blanco (70 % de rendimiento global).

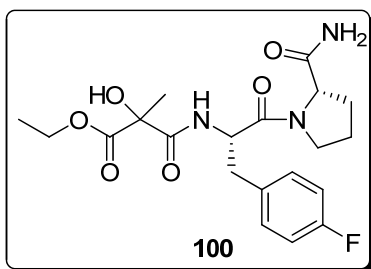


Caracterización

HPLC (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μ m, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 2.10$ min (Pureza 92 %); **¹H-RMN** (400 MHz, CD₃OD) δ 7.29 (m, 2H, H₁₉), 6.97 (dd, $J_1 = 8.6$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz, 2H, H₁₈), 4.94-4.88 (m, 1H, H₉), 4.46-4.41 (m, 1H, H₁₄), 4.22-4.06 (m, 2H, H₂), 3.76 (tt, $J_1 = 9.7$ Hz, $J_2 = 6.8$ Hz, 1H, H₁₁), 3.63-3.54 (m, 1H, H₁₁), 3.18 (m, H₁₆), 3.02-2.91 (m, 1H, H₁₆), 2.26-2.13 (m, 1H, H₁₃), 2.09-1.91 (m, 3H, 2H₁₂ y H₁₃), 1.50 (s, 3H, H₈), 1.21 (m, 3H, H₁) ppm; **¹³C-RMN** (100 MHz, CD₃OD) δ 176.77 (C₃), 173.13 (C₁₅), 172.61 (C₅), 171.52 (C₁₀), 140.03 (C₂₀), 134.77 (C₁₇), 132.19 (C₁₉), 119.98 (C₁₈), 77.95 (C₄), 62.96 (C₂), 61.44 (C₁₄), 53.43 (C₉), 48.69 (C₁₁), 37.72 (C₁₆), 30.75 (C₁₃), 25.90 (C₁₂), 23.87 (C₈), 14.30 (C₁) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₀H₂₇N₆O₆ [M+H]⁺ 447.18, encontrada 447.23; **HRMS** m/z calculada para C₂₀H₂₇N₆O₆ [M+H]⁺ 447.1987, encontrada 447.1985.

3.3.6. Síntesis del precursor peptídico lineal fluorado (100)

El derivado peptídico **100** se sintetizó a partir de 346 mg (0.21 mmol) de peptidil-resina **94** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **57** (apartado 10.3.5, parte experimental, Capítulo 1). La peptidil-resina se introdujo en un tubo *kimax* y se trató con CCl₄ (3 mL) y BF₃·Et₂O (0.1 mL, 0.75 mmol) en atmósfera de argón durante 1.5 h. El crudo obtenido (con un 94 % de pureza determinada por HPLC) tras eliminar el disolvente a presión reducida, se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→36 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose 28 mg de derivado **100** (67 % de rendimiento global).



Caracterización

HPLC (XBridge C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, λ = detección 220 nm) t_R= 1.98 min (Pureza 94 %); **ESI(+)** m/z calculada para

C₂₀H₂₇N₃O₆ [M+H]⁺ 424.16, encontrada 424.12.

4. QUIMIOTECA DE HÍBRIDOS CON INDOLOQUINOLICIDINA

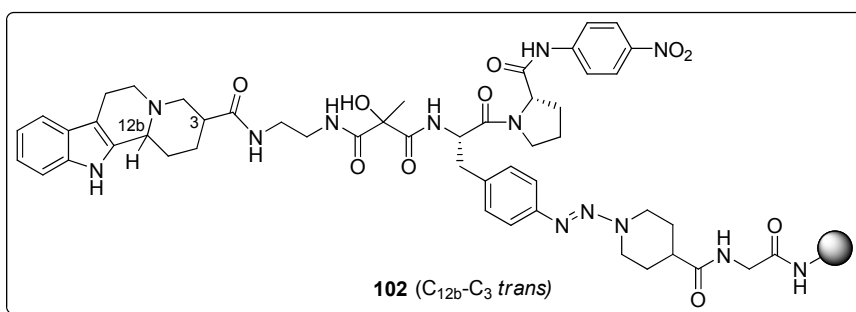
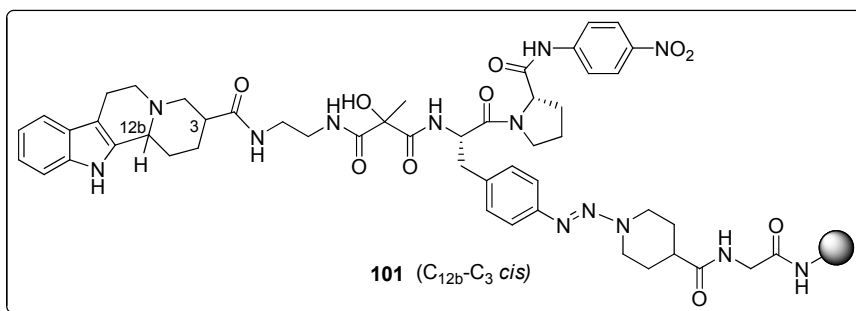
4.1. Quimioteca de híbridos indoloquinolicidina-peptina

4.1.1. Preparación de la aminoacil-resina (**33**)

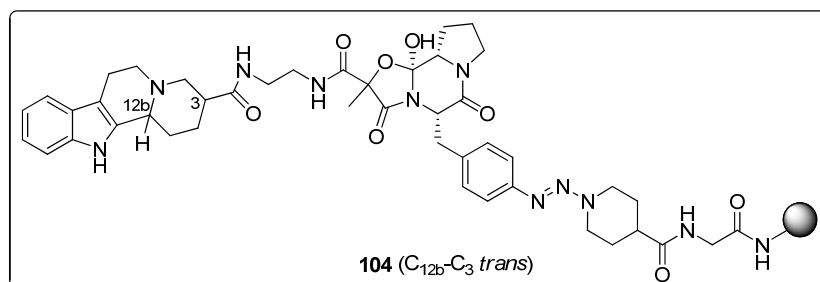
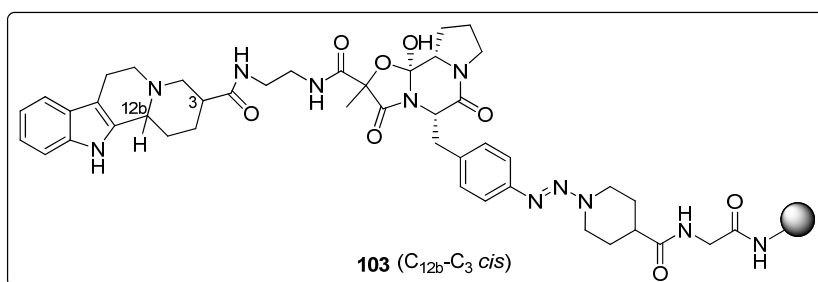
La síntesis de la aminoacil-resina **33** se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en el apartado 7.2.2 (parte experimental, Capítulo 1). El rendimiento de formación del enlace triaceno fue del 75 % determinado por cuantificación de grupos Fmoc (protocolo A.4.5).

4.1.2. Formación del esqueleto de peptina

La aminoacil-resina **33** se trató con una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) para eliminar el grupo Fmoc (protocolo B.3.3) y se incorporó el derivado de indoloquinolicidina **76** ó **77** (3 eq) según el caso, utilizando PyBOP (3 eq), HOBT (3 eq) y EDIA (6 eq) en DMF (8 -10 mL) según el protocolo B.3.8. A continuación, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo de la fenilalanina con Pd(PPh₃)₄ (0.4 eq) y PhSiH₃ (48 eq), siguiendo el protocolo experimental descrito en el apartado B.3.9 y, se incorporó el derivado de prolina H-Pro-OAlilo·HCl **19** mediante dos tratamientos con PyBOP (3 eq), HOBT (3 eq) y EDIA (3 eq) en DMF (8-10 mL). Tras eliminar el grupo protector alilo del derivado de prolina (protocolo B.3.9), se formó el éster de *p*-nitrofenol llevando a cabo un tratamiento con *p*-nitrofenol (20 eq), DIC (3 eq) y HOBT (3 eq) en DMF (8 -10 mL) durante 24 h y otro con *p*-nitrofenol (8 eq), DIC (8 eq) y DMAP (0.1 eq) en DCM (8-10 mL) durante 1 h. Las peptidil-resinas así obtenidas **101** y **102** se lavaron con DMF (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s) y se introdujeron en un reactor específico para llevar a cabo reacciones en fase sólida en condiciones anhidras.



Tras secar las peptidil-resinas **101** y **102** con una bomba de vacío conectada al reactor, se lavó con DCM anhidro (5 × 30 s) en atmósfera de argón. A continuación, se adicionó BTTP (1.5 eq) disuelta en la mínima cantidad de DCM anhidro y la mezcla de reacción se mantuvo durante 10 min con agitación mecánica en atmósfera de argón. Este procedimiento se llevó a cabo en dos ocasiones. Seguidamente, se lavaron las peptidil-resinas resultantes **103** y **104** con DCM anhidro (10 × 30 s) y se trasladaron a las jeringas para lavarlas con DCM (5 × 30 s), DMF (5 × 30 s), hexano (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s).

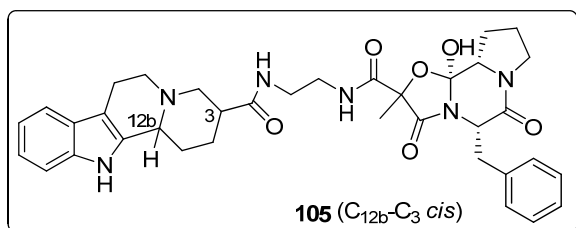


4.1.3. Derivatización de la fenilalanina en los híbridos indoloquinolidina y análogo de peptina

4.1.3.1. Quimioteca de híbridos indoloquinolidina (76) y análogo de peptina

4.1.3.1.1. Síntesis del híbrido no modificado (105)

El híbrido **105** se sintetizó a partir de 307 mg (0.10 mmol) de peptidil-resina **103** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **38** (apartado 9.3, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo el desanclaje de la peptina de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), la reducción de la sal de diazonio obtenida se realizó con FeSO₄·7H₂O (0.04 g, 0.14 mmol) en DMF (10 mL). A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. Finalmente, el producto se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→20% B en 1 min y 20 %→60 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ= 214 nm), obteniéndose 0.61 mg del producto **105** (1 % de rendimiento global) como un sólido blanco.



Caracterización

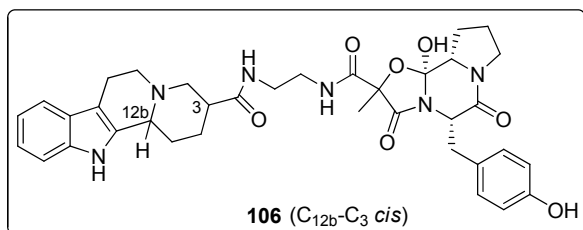
HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)),

flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R= 1.80 min; **ESI(+)** m/z calculada para C₃₆H₄₃N₆O₆ [M+H]⁺ 655.3, encontrada 655.3. (La pureza no se determinó dado que el producto **105** coeluyó con el producto hidrolizado).

4.1.3.1.2. Síntesis del híbrido hidroxilado (106)

El híbrido **106** se sintetizó a partir de 285 mg (0.10 mmol) de peptidil-resina **103** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **53** (apartado 10.3.1, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo el desanclaje de la peptina de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), la sal de diazonio obtenida se disolvió en una mezcla H₂O/MeCN (8:2, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 2 h. A continuación, se

eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. Finalmente, el producto se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→15 % B en 1 min y 15 %→25 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose 8.35 mg del producto **106** como un sólido blanco (13 % de rendimiento global).

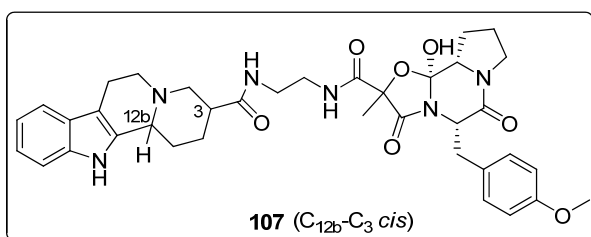


Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μ m, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 1.55$ min; **ESI(+)** m/z calculada para C₃₆H₄₃N₆O₇[M+H]⁺ 671.3, encontrada 671.3. (La pureza no se determinó dado que el producto **106** coeluyó con el producto hidrolizado).

4.1.3.1.3. Síntesis del híbrido metoxilado (**107**)

El híbrido **107** se sintetizó a partir de 300 mg (0.10 mmol) de peptidil-resina **103** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **54** (apartado 10.3.2, parte experimental, Capítulo 1). La peptidil-resina se disolvió en la mezcla acidolítica TFA/MeOH (5:95, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 1 h. Tras eliminar el disolvente a presión reducida, el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. Finalmente, el producto se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→20 % B en 1 min y 20 %→55 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose 3.86 mg del producto **107** como un sólido blanco (4 % de rendimiento global).



Caracterización

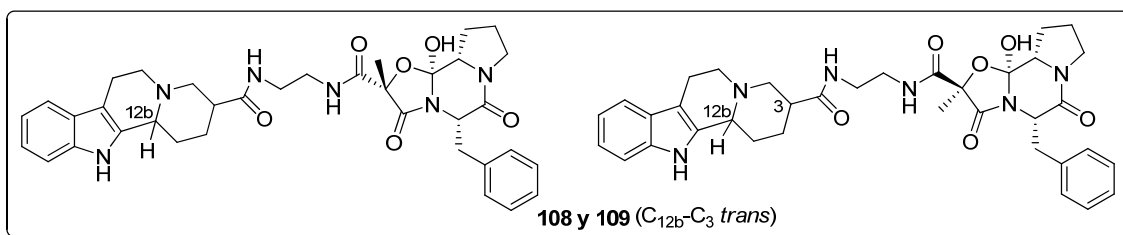
HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μ m, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O

(0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 1.83$ min; **ESI(+)** m/z calculada para $C_{37}H_{45}N_6O_7$ $[M+H]^+$ 685.3, encontrada 685.5. (La pureza no se determinó dado que el producto **107** coeluyó con el producto hidrolizado).

4.1.3.2. Quimioteca de híbridos indoloquinolidina (**77**) y análogo de peptina

4.1.3.2.1. Síntesis de los híbridos no modificados (**108**) y (**109**)

Los híbridos **108** y **109** se sintetizaron a partir de 284 mg (0.10 mmol) de peptidil-resina **104** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **38** (apartado 9.3, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo el desanclaje del híbrido de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3×2 min), la reducción de la sal de diazonio obtenida se realizó con $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.04 g, 0.14 mmol) en DMF (10 mL). A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. Finalmente, el producto se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 % \rightarrow 20 % B en 1 min y 20 % \rightarrow 60 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H_2O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose la mezcla racémica de diastereoisómeros 1.63 mg de **108** (5 % de rendimiento global) y 1.53 mg de **109** (5 % de rendimiento global) como sólidos blancos.



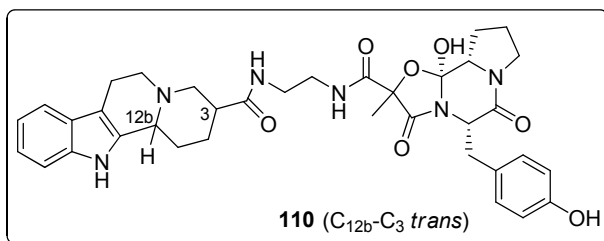
Caracterización

HPLC (XBridge BEH C_{18} , 4.6×50 mm, $3.5 \mu m$, 5 \rightarrow 100 % B en 11 min (A: H_2O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 4.95$ min **108** y $t_R = 5.10$ min **109**; **ESI(+)** m/z calculada para $C_{36}H_{43}N_6O_6$ $[M+H]^+$ 655.3, encontrada 655.3 **108** y 655.3 **109**. (La pureza de los diastereoisómeros no se

determinó dado que **108** y **109** coeluyeron con los correspondientes productos hidrolizados).

4.1.3.2.2. Síntesis del híbrido hidroxilado (**110**)

El híbrido **110** se sintetizó a partir de 284 mg (0.10 mmol) de peptidil-resina **104** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **53** (apartado 10.3.1, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo el desanclaje de la peptina de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), la sal de diazonio obtenida se disolvió en una mezcla H₂O/MeCN (8:2, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 2 h. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. Finalmente, el producto se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %-30 % B en 1 min y 30 %→40 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm) obteniéndose 1.65 mg del producto **110** (1 % de rendimiento global).



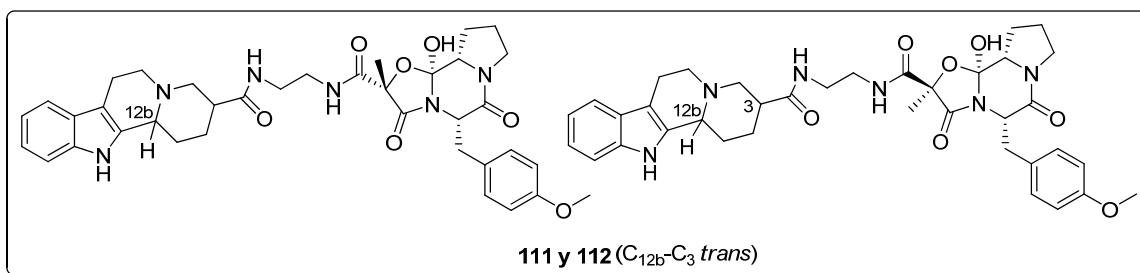
Caracterización

HPLC (XBridge BEH C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 4.43 min; **ESI(+)** m/z calculada para C₃₆H₄₃N₆O₇ [M+H]⁺ 671.3, encontrada 671.4. (La pureza de los diastereoisómeros no se determinó dado que **110** coeluyó con los correspondientes productos hidrolizados).

4.1.3.2.3. Síntesis de los híbridos metoxilados (**111**) y (**112**)

Los híbridos **111** y **112** se sintetizaron a partir de 264 mg (0.09 mmol) de peptidil-resina **101** siguiendo el mismo protocolo sintético descrito para la obtención del producto **54** (apartado 10.3.2, parte experimental, Capítulo 1). La peptidil-resina se suspendió en la mezcla acidolítica TFA/MeOH (5:95, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 1 h. Tras eliminar el disolvente a presión reducida,

el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. Finalmente, el producto se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→20 % B en 1 min y 20 %→55 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose 0.65 mg de la mezcla racémica de diastereoisómeros **111** (2.13 % de rendimiento global) y 1.83 mg de la mezcla racémica de diastereoisómeros **112** (6 % de rendimiento global) como sólidos blancos.



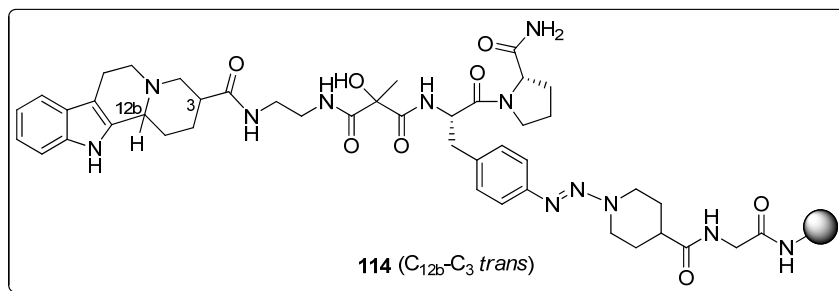
Caracterización

HPLC (XBridge BEH C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μ m, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_{R} = 5.03$ min **111** y $t_{R} = 5.12$ min **112**; **ESI(+)** m/z calculada para C₃₇H₄₅N₆O₇ [M+H]⁺ 685.3, encontrada 685.4 **111** y 685.4 **112**. (La pureza de los diastereoisómeros no se determinó dado que **111** y **112** coeluyeron con los correspondientes productos hidrolizados).

4.2. Quimioteca de híbridos de indoloquinolidina y precursores peptídicos lineales de peptina

4.2.1. Preparación de la peptidil-resina (33)

La quimioteca de híbridos con indoloquinolidina y precursores peptídicos lineales de peptina se realizó utilizando la resina MBHA-PS ($f = 0.63$ mmol·g⁻¹) como soporte polimérico. La resina se acondicionó (protocolo B.3.1), se adicionó Fmoc-Gly-OH como patrón interno (protocolo B.3.2) y se funcionalizó con el espaciador bifuncional comercial ácido Boc-isonipecótico siguiendo el protocolo experimental B.3.5. La unión del derivado Fmoc-Phe(*p*NH₂)-OAlilo **27** a la resina a través del enlace triaceno se

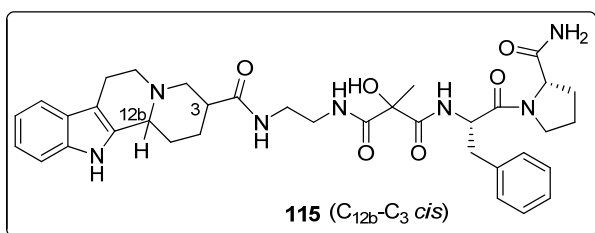


4.2.3. Derivatización de la cadena lateral de la fenilalanina de los híbridos de precursores peptídicos lineales de peptinas con indoloquinolicidina

4.2.3.1. Quimioteca de híbridos lineales con la indoloquinolicidina (70)

4.2.3.1.1. Síntesis del híbrido no modificado (115)

El derivado peptídico **115** se sintetizó a partir de 290 mg (0.10 mmol) de peptidil-resina **113** siguiendo el procedimiento experimental descrito para la obtención del producto **38** (apartado 9.3, parte experimental, Capítulo 1). Tras realizar el desanclaje del derivado peptídico del soporte polimérico utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), se redujo la sal de diazonio obtenida con FeSO₄·7H₂O (40 mg, 0.15 mmol) en DMF (12 mL) durante 5 min. El crudo resultante (con un 98 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→35 % en 7 min, siendo A: 0.1 % TFA en H₂O y B: 0.1 % TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm), obteniéndose 37 mg de producto **115** como un sólido blanco (57 % de rendimiento global).



Caracterización

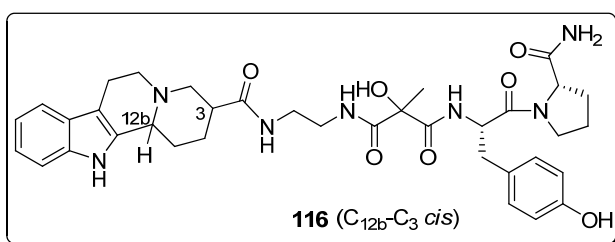
HPLC (XBridge BEH C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 %

HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 5.08 min (Pureza 100 %); **ESI(+)** m/z calculada para C₃₆H₄₆N₇O₆ [M+H]⁺ 672.3, encontrada 672.4.

4.2.3.1.2. Síntesis del híbrido lineal hidroxilado (116)

El derivado peptídico **116** se sintetizó a partir de 310 mg (0.10 mmol) de peptidil-resina **113** siguiendo el mismo protocolo descrito para la obtención del producto **53** (apartado 10.3.1, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo el desanclaje del

derivado peptídico de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), la sal de diazonio obtenida se disolvió en una mezcla H₂O/MeCN (8:2, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 2 h. El crudo así obtenido (con un 98 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→32 % B en 7 min, siendo A: 0.1 % TFA en H₂O y B: 0.1 % TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm), obteniéndose 52 mg de derivado **116** como un sólido blanco (73 % de rendimiento global).



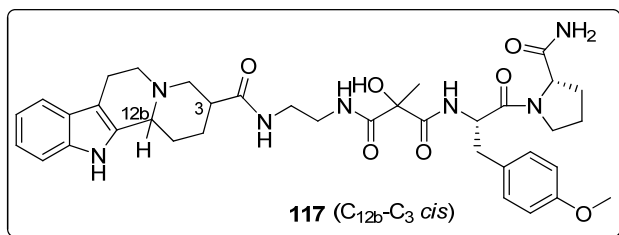
Caracterización

HPLC (XBridge BEH C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μ m, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min,

detección λ = 220 nm) t_R = 4.55 min (Pureza 98 %); **ESI(+)** m/z calculada para C₃₆H₄₆N₇O₇ [M+H]⁺ 688.3, encontrada 688.4.

4.2.3.1.3. Síntesis del híbrido lineal metoxilado (117)

El derivado peptídico **117** se sintetizó a partir de 287 mg (0.10 mmol) de la peptidil-resina **113** siguiendo el mismo protocolo descrito para la obtención del producto **54** (apartado 10.3.2, parte experimental, Capítulo 1). La peptidil-resina se suspendió en la mezcla acidolítica TFA/MeOH (5: 95, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 1 h. Tras eliminar el disolvente a presión reducida, el crudo resultante (con un 81 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→34 % B en 7 min, siendo A: 0.1 % TFA en H₂O y B: 0.1 % TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm), obteniéndose 37 mg de derivado **117** como un sólido blanco (54 % de rendimiento global).

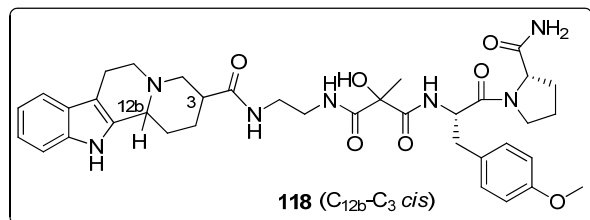


Caracterización

HPLC (XBridge BEH C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 5.15 min (Pureza 96 %); **ESI(+)** m/z calculada para C₃₇H₄₈N₇O₇ [M+H]⁺ 702.4, encontrada 702.4.

4.2.3.1.4 Síntesis del híbrido lineal fluorado (118)

El derivado peptídico **118** se sintetizó a partir de 226 mg (0.08 mmol) de la peptidil-resina **113** siguiendo el mismo protocolo descrito para la obtención del producto **57** (apartado 10.3.5, parte experimental, Capítulo 1). La peptidil-resina se introdujo en un tubo *kimax* y se adicionó CCl₄ (2 mL) y BF₃·Et₂O (63 μL, 0.50 mmol) en atmósfera de argón durante 1.5 h. El crudo así obtenido (con un 92 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→34 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm), obteniéndose 29 mg de derivado **118** como un sólido blanco (55 % de rendimiento global).



Caracterización

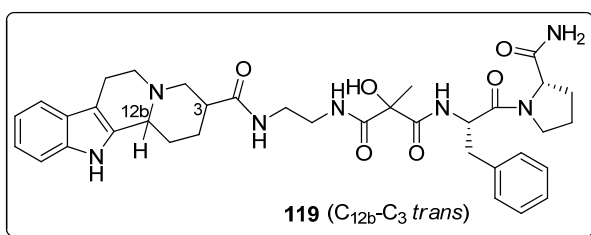
HPLC (XBridge BEH C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 5.00 min (Pureza 100 %); **ESI(+)** m/z calculada para C₃₆H₄₄FN₇O₆ [M+H]⁺ 690.3, encontrada 690.4.

4.2.3.2. Quimioteca de híbridos lineales con la indoloquinolidina (71)

4.2.3.2.1. Síntesis del híbrido lineal no modificado (119)

El derivado peptídico **119** se sintetizó a partir de 263 mg (0.09 mmol) de la peptidil-resina **114** siguiendo el procedimiento experimental descrito para la obtención del producto **38** (apartado 9.3, parte experimental, Capítulo 1). Tras realizar el desanclaje del derivado peptídico del soporte polimérico utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM

(5:95, V/V) (3 × 2 min), la reducción de la sal de diazonio obtenida se llevó a cabo con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (37 mg, 0.13 mmol) en DMF (10 mL) durante 5 min. El crudo resultante (con un 97 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→35 % en 7 min, siendo A: 0.1 % TFA en H_2O y B: 0.1 % TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose 30 mg de producto **119** como un sólido blanco (50 % de rendimiento global).

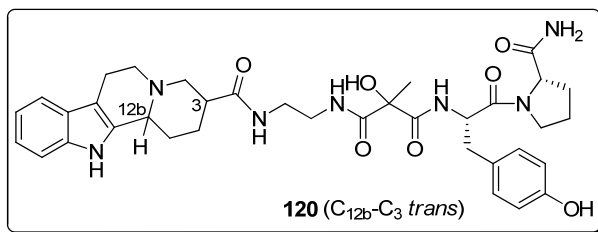


Caracterización

HPLC (XBridge BEH C_{18} , 4.6 × 50 mm, 3.5 μm , 5→100 % B en 11 min (A: H_2O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_{\text{R}} = 5.08$ min (Pureza 100 %); **ESI(+)** m/z calculada para $\text{C}_{36}\text{H}_{46}\text{N}_7\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 672.3, encontrada 672.4.

4.2.3.2.2. Síntesis del híbrido lineal hidroxilado (120)

El derivado peptídico **120** se sintetizó a partir de 236 mg (0.08 mmol) de la peptidil-resina **114** siguiendo el mismo protocolo descrito para la obtención del producto **53** (apartado 10.3.1, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo el desanclaje del derivado peptídico de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), la sal de diazonio obtenida se disolvió en una mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (8:2, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 2 h. El crudo resultante (con un 92 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→32 % B en 7 min, siendo A: 0.1 % TFA en H_2O y B: 0.1 % TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose 39 mg de derivado **120** como un sólido blanco (71 % de rendimiento global).

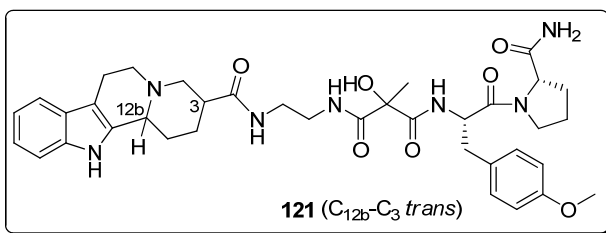


Caracterización

HPLC (XBridge BEH C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, λ = 220 nm) t_R = 4.48 min (Pureza 100 %); **ESI(+)** *m/z* calculada para C₃₆H₄₆N₇O₇ [M+H]⁺ 688.3, encontrada 688.5.

4.2.3.2.3. Síntesis del híbrido lineal metoxilado (**121**)

El derivado peptídico **121** se sintetizó a partir de 254 mg (0.10 mmol) de la peptidil-resina **114** siguiendo el mismo protocolo descrito para la obtención del producto **54** (apartado 10.3.2, parte experimental, Capítulo 1). La peptidil-resina se suspendió en la mezcla acidolítica TFA/MeOH (5: 95, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 1 h. Tras eliminar el disolvente a presión reducida, el crudo resultante (con un 82 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→35 % B en 7 min, siendo A: 0.1 % TFA en H₂O y B: 0.1 % TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ= 214 nm), obteniéndose 32 mg de derivado **121** como un sólido blanco (54 % de rendimiento global).



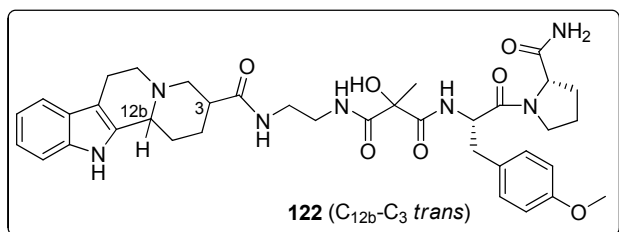
Caracterización

HPLC (XBridge BEH C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 11 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 1 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 5.07 min (Pureza 99 %); **ESI(+)** *m/z* calculada para C₃₇H₄₈N₇O₇ [M+H]⁺ 702.4, encontrada 702.5.

4.2.3.2.4. Síntesis del híbrido lineal fluorado (**122**)

El derivado peptídico **122** se sintetizó a partir de 226 mg (0.08 mmol) de la peptidil-resina **114** siguiendo el mismo protocolo descrito para la obtención del producto **57** (apartado 10.3.5, parte experimental, Capítulo 1). La peptidil-resina se introdujo en un tubo *kimax* y se adicionó CCl₄ (2 mL) y BF₃·Et₂O (80 μL, 0.63 mmol) en atmósfera de argón durante 1.5 h. El crudo obtenido (con un 95 % de pureza determinada por HPLC)

se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→34 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose 44 mg de derivado **122** como un sólido blanco (63 % de rendimiento global).



Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μ m, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección

$\lambda = 220$ nm) $t_R = 1.62$ min (Pureza 100 %); **ESI(+)** m/z calculada para C₃₆H₄₄FN₇O₆ [M+H]⁺ 690.3, encontrada 690.4.

5. SÍNTESIS DE QUIMIOTECAS DE HÍBRIDOS CON (1S, 2R)-1-amino-2-indanol

5.1. Quimioteca de híbridos (1S, 2R) -1-amino-2-indanol y análogos de peptinas

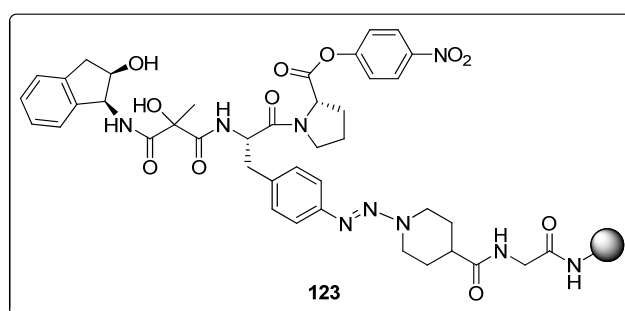
5.1.1. Preparación de la peptidil-resina (**33**)

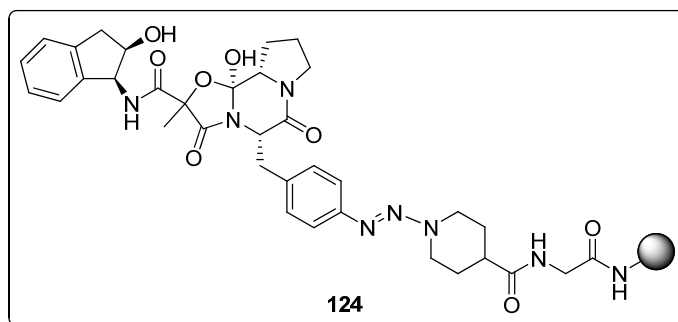
La quimioteca de híbridos con (1S, 2R)-1-amino-2-indanol y análogos de peptinas se llevó a cabo utilizando la resina MBHA-PS ($f = 0.63$ mmol·g⁻¹) como soporte polimérico, la cual se acondicionó y se funcionalizó con el derivado ácido Boc-isonipecótico tal y como se detalla en los protocolos B.3.1 y B.3.3 tras acoplar Fmoc-Gly-OH como patrón interno (protocolo B.3.2). La unión del derivado de fenilalanina **27** a la resina mediante la unión triaceno se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.2.2 (parte experimental, Capítulo 1) con un rendimiento del 81 % obtenido tras la cuantificación de grupos Fmoc (protocolo A.4.5). Finalmente, tras la acetilación de las aminas libres que no habían reaccionado (protocolo B.3.7) se obtuvo la peptidil-resina **33** deseada.

5.1.2. Elongación de la cadena peptídica lineal y ciclación

Cada uno de los híbridos se preparó a partir de 273-344 mg de aminoacil-resina **33** obtenida según el apartado 5.1.1. Tras eliminar el grupo Fmoc con una disolución de

piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3), se incorporó el producto **79** (4 eq) previamente sintetizado utilizando PyBOP (4 eq), HOBT·H₂O (4 eq) y EDIA (8 eq) en DMF (8 -10 mL) según el protocolo B.3.8. Acto seguido, se eliminó el grupo protector alilo del extremo carboxilo de la fenilalanina utilizando Pd(PPh₃)₄ (0.4 eq) y PhSiH₃ (48 eq), siguiendo el protocolo experimental descrito en el apartado B.3.9 y, se incorporó el derivado de prolina H-Pro-OAlilo·HCl **19** utilizando PyBOP (3 eq), HOBT·H₂O (3 eq) y EDIA (3 eq) en DMF (8-10 mL). Este procedimiento se repitió en dos ocasiones para asegurar que el acoplamiento fuera cuantitativo. Tras eliminar el grupo protector alilo del extremo carboxilo (protocolo B.3.9), se formó el éster de *p*-nitrofenol llevando a cabo un tratamiento con *p*-nitrofenol (20 eq), DIC (3 eq) y HOBT·H₂O (3 eq) en DMF (8 - 10 mL) durante 24 h y otro utilizando *p*-nitrofenol (8 eq), DIC (8 eq) y DMAP (0.1 eq) en DCM (8-10 mL) durante 1 h. La peptidil-resina así obtenida **123** se lavó con DMF (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s) y se introdujo en un reactor específico para llevar a cabo reacciones en fase sólida en condiciones anhidras. Tras secar la peptidil-resina **123** con una bomba de vacío conectada al reactor, se lavó con DCM anhidro (5 × 30 s) en atmósfera de argón y, a continuación, se adicionó BTTPP (1.5 eq) disuelta en la mínima cantidad de DCM anhidro. La mezcla de reacción se mantuvo durante 10 min con agitación mecánica en atmósfera de argón. Este procedimiento se llevó a cabo en dos ocasiones. Seguidamente, se lavó la peptidil-resina resultante **124** con DCM anhidro (10 × 30 s) y, una vez abierto el reactor, la peptidil-resina se lavó de nuevo con DCM (5 × 30 s), DMF (5 × 30 s), *n*-heptano (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s).

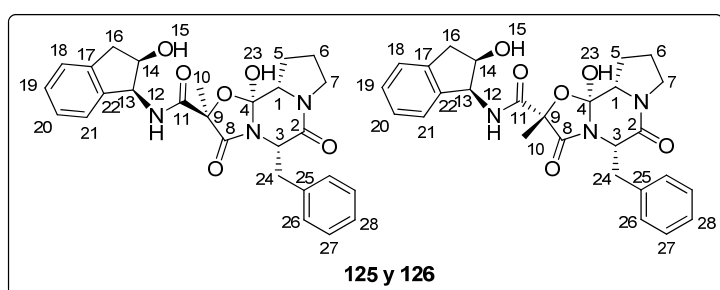




5.1.3. Derivatización de la fenilalanina de los híbridos (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y análogos de peptinas

5.1.3.1. Síntesis de los híbridos no modificados (125) y (126)

Los análogos de peptina **125** y **126** se sintetizaron a partir de 274 mg (0.17 mmol) de peptidil-resina **123** siguiendo el mismo protocolo descrito para la obtención del producto **38** (apartado 9.3, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo el desanclaje del híbrido de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), la sal de diazonio obtenida se redujo con FeSO₄·7H₂O (0.04 g, 0.14 mmol) en DMF (8 mL) durante 5 min. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. Finalmente, el producto se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 % → 35 % B en 1 min y 35 % → 44 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm), obteniéndose 2.32 mg del diastereoisómero **125** (10 % de rendimiento global) y 2.90 mg del diastereoisómero **126** (13 % de rendimiento global) como sólidos blancos.



Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5 → 100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 %

HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 2.30 min (Pureza 99 %) **125** y t_R = 2.50 min (Pureza 94.0 %) **126**;

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃)

Diastereoisómero 125: δ 7.34 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, Car), 7.28-7.12 (m, 7H, Car), 5.20 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H₁₃), 4.67 (dd, $J_1 = 10.1$ Hz, $J_2 = 4.3$ Hz, 1H, H₃), 4.52 (td, $J_1 = 5.2$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, 1H, H₁₄), 3.76-3.69 (m, 1H, H₁), 3.50 (dd, $J_1 = 9.5$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, 2H, H₇), 3.43 (dd, $J_1 = 13.6$ Hz, $J_2 = 4.4$ Hz, 1H, H₂₄), 3.16 (dd, $J_1 = 16.5$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H₁₆), 2.97-2.88 (m, 2H, H₁₆ y H₂₄), 2.11-2.02 (m, 2H, H₅), 2.02-1.95 (m, 2H, H₆), 1.66 (s, 3H, H₁₀) ppm.

Diastereoisómero 126: δ 7.31-7.11 (m, 9H, Car), 5.33 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H₁₃), 4.68 (td, $J_1 = 5.0$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz, 1H, H₁₄), 4.64 (dd, $J_1 = 8.9$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, 1H, H₃), 3.79 (dd, $J_1 = 9.7$ Hz, $J_2 = 5.9$ Hz, 1H, H₁), 3.55 (m, 2H, H₇), 3.37 (dd, $J_1 = 13.6$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz, 1H, H₂₄), 3.22 (m, 2H, H₁₆), 3.05-2.95 (m, 1H, H₂₄), 2.19-2.10 (m, 1H, H₅), 2.10-2.01 (m, 2H, H₅ y H₆), 1.92-1.81 (m, 1H, H₆), 1.63 (s, 3H, H₁₀) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃)

Diastereoisómero 125: δ 169.99 (C₁₁), 168.31 (C₂), 166.82 (C₈), 142.12 (C₂₂), 141.71 (C₁₇), 138.82 (Car), 130.96 (Car), 129.22 (Car), 127.97 (Car), 127.65 (Car), 126.31 (Car), 125.18 (Car), 106.58 (C₄), 84.46 (C₉), 73.46 (C₁₄), 66.35 (C₁), 58.44 (C₁₃), 57.70 (C₃), 47.45 (C₇), 40.95 (C₁₆), 40.28 (C₂₄), 27.29 (C₅), 24.61 (C₁₀), 23.02 (C₆) ppm.

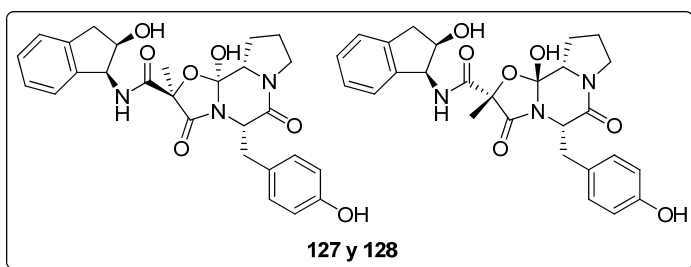
Diastereoisómero 126: δ 170.52 (C₁₁), 168.14 (C₂), 166.84 (C₈), 141.86-141.70 (C₂₂ diastereoisómeros), 138.83 (C₁₇), 130.88 (Car), 129.30 (Car), 129.20 (Car), 127.98 (Car), 127.63 (Car), 126.30 (Car), 125.24 (Car), 106.15 (C₄), 84.96 (C₉), 74.02 (C₁₄), 66.98 (C₁), 58.88 (C₁₃), 57.98 (C₃), 47.45 (C₇), 41.09 (C₁₆), 40.00 (C₂₄), 27.42 (C₅), 23.11 (C₆), 22.44 (C₁₀) ppm.

ESI(+) m/z calculada para C₂₇H₃₀N₃O₆ [M+H]⁺ 492.2, encontrada 492.3; **HRMS** m/z calculada C₂₇H₃₀N₃O₆ para [M+H]⁺ 492.2129, encontrada 492.2129 **125** y 492.2129 **126**.

5.1.3.2. Síntesis de los híbridos hidroxilados (127) y (128)

Los híbridos **127** y **128** se sintetizaron a partir de 273 mg (0.17 mmol) de peptidil-resina **123** siguiendo el mismo protocolo descrito para la obtención del producto **53** (apartado 10.3.1, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo el desanclaje del

híbrido de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), la sal de diazonio obtenida se disolvió en una mezcla H₂O/MeCN (8:2, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 2 h. Tras eliminar el disolvente a presión reducida, el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. Finalmente, el producto se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→25 % B en 1 min y 25 %→34 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose 0.83 mg del diastereoisómero **127** (4 % de rendimiento global) y 0.39 mg del diastereoisómero **128** (2 % de rendimiento global) como sólidos blancos.



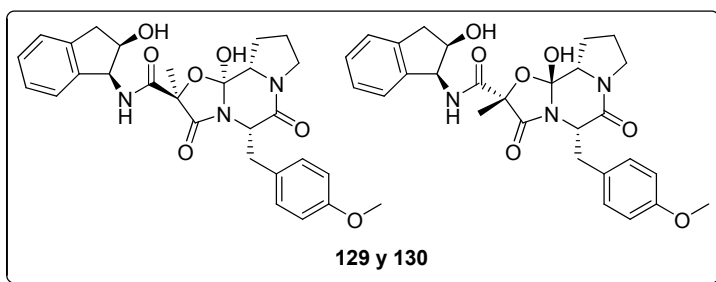
Caracterización

HPLC (XSelect, 4.6 × 50 mm, 3.5 μ m, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2

mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 1.98$ min (Pureza 93 %) **127** y $t_R = 2.17$ min (Pureza 98 %) **128**; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₇H₃₀N₃O₇ [M+H]⁺ 508.2, encontrada 508.3.

5.1.3.3. Síntesis de los híbridos metoxilados (129) y (130)

Los híbridos **129** y **130** se sintetizaron a partir de 318 mg (0.20 mmol) de peptidil-resina **123** siguiendo el mismo protocolo descrito para la obtención del producto **54** (apartado 10.3.2, parte experimental, Capítulo 1). La peptidil-resina se suspendió en la mezcla acidolítica TFA/MeOH (5:95, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 1 h. Tras eliminar el disolvente a presión reducida, el crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica [sílica gel, DCM/EtOH (98.5:1.5)]. Finalmente, el crudo producto se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→35 % B en 1 min y 35 %→39 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose 2.34 mg del diastereoisómero **129** (9 % de rendimiento global) y 1.11 mg del diastereoisómero **130** (4 % de rendimiento global) como sólidos blancos.



Caracterización

HPLC (XSelect, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)),

flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 2.30 min (Pureza 98 %) **129** y t_R = 2.50 min (Pureza 93 %) **130**; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm; ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ ppm; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₈H₃₂N₃O₇ [M+H]⁺ 522.2, encontrada 522.4.

5.2. Quimioteca de híbridos de (1S, 2R)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptinas

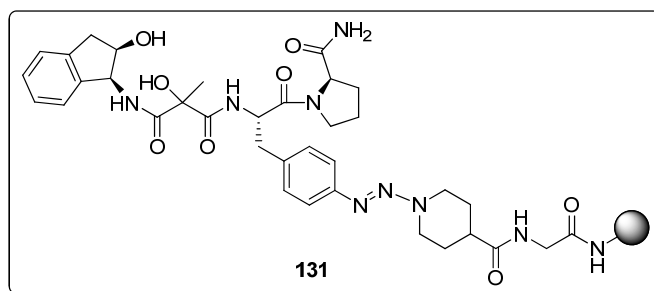
5.2.1. Preparación de la aminoacil-resina (33)

La quimioteca de híbridos con (1S, 2R)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptinas se llevó a cabo utilizando la resina MBHA-PS (f = 0.63 mmol·g⁻¹) como soporte polimérico, la cual se acondicionó y se funcionalizó con el derivado ácido Boc-isonipecótico tal y como se detalla en el apartado B.3.5 utilizando el aminoácido Fmoc-Gly-OH como patrón interno (protocolo B.3.2). La unión del derivado de fenilalanina **27** a la resina mediante la unión triaceno se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 7.2.2 (parte experimental, Capítulo 1) con un rendimiento del 75 % obtenido tras la cuantificación de grupos Fmoc (protocolo A.4.5). Finalmente, tras la acetilación de las aminas (protocolo B.3.7) se obtuvo la aminoacil-resina **33** deseada.

5.2.2. Elongación de la cadena peptídica lineal

Los híbridos lineales de (1S, 2R)-1-amino-2-indanol se prepararon a partir de 200-290 mg de peptidil-resina **33** obtenida según el apartado 5.2.1. Tras eliminar el grupo Fmoc utilizando una disolución de piperidina en DMF (20 %, V/V) (protocolo B.3.3), se incorporó el ácido 3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-3-oxopropanoico **64** (3 eq) utilizando DIC (3 eq) y Oxyma® (3 eq) en DMF (8 -10 mL) durante 1 h (protocolo B.3.8). A continuación, se eliminó el grupo protector alilo con Pd(PPh₃)₄ (0.4 eq) y PhSiH₃ (48 eq), siguiendo el protocolo experimental descrito en el apartado B.3.9 y se incorporó el

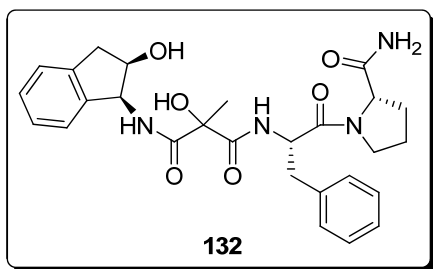
derivado de prolina comercial H-Pro-NH₂·HCl mediante dos tratamientos con PyBOP (3eq), HOBt·H₂O (3 eq) y EDIA (9 eq) en DMF (8-10 mL). Tras realizar la hidrólisis del éster etílico utilizando LiOH (5 eq) en THF:H₂O (10:1, V/V) durante 2 h (protocolo B.3.10), se incorporó el producto comercial (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol (2.5 eq) con PyBOP (3eq), HOAt (3 eq) y EDIA (6 eq) en DMF (8-10 mL) durante 1 h (protocolo B.3.8). La peptidil-resina así obtenida **131** se lavó con DCM (5 × 30 s), DMF (5 × 30 s) y DCM (5 × 30 s).



5.2.3. Derivatización de la fenilalanina de los híbridos de (1*S*, 2*R*)-1-amino-2-indanol y precursores lineales de peptinas

5.2.3.1. Síntesis del híbrido lineal no modificado (**132**)

El derivado peptídico **132** se sintetizó a partir de 200 mg (0.13 mmol) de peptidil-resina **131** siguiendo el mismo protocolo descrito para la obtención del producto **38** (apartado 9.3, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo el desanclaje del derivado peptídico de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), la sal de diazonio obtenida se redujo con FeSO₄·7H₂O (30 mg, 0.10 mmol) en DMF (10 mL) durante 5 min. Finalmente, el crudo resultante (con un 81 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→38 % B en 7 min, siendo A: 0.1% HCOOH en H₂O y B: 0.07% HCOOH en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ= 214 nm), obteniéndose 28 mg de producto **132** (82 % de rendimiento global) como un sólido blanco.

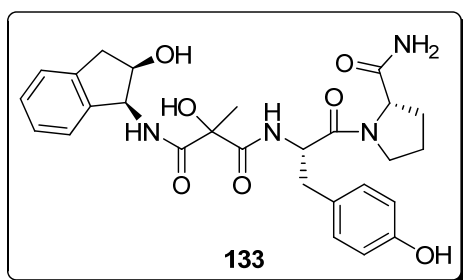
Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 2.22 min (Pureza 100 %); **ESI(+)** m/z

calculada para C₂₇H₃₃N₄O₆ [M+H]⁺ 509.2, encontrada 509.2.

5.2.3.2. Síntesis del híbrido lineal hidroxilado (133)

El derivado peptídico **133** se sintetizó a partir de 289 mg (0.19 mmol) de peptidil-resina **131** siguiendo el mismo protocolo descrito para la obtención del producto **53** (apartado 10.3.1, parte experimental, Capítulo 1). Tras llevar a cabo el desanclaje del derivado peptídico de la resina utilizando la mezcla acidolítica TFA/DCM (5:95, V/V) (3 × 2 min), la sal de diazonio obtenida se disolvió en una mezcla H₂O/MeCN (8:2, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 2 h. El crudo obtenido (con un 87 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→38 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y λ = 214 nm), obteniéndose 29 mg de derivado **133** (66 % de rendimiento global) como un sólido blanco.

Caracterización

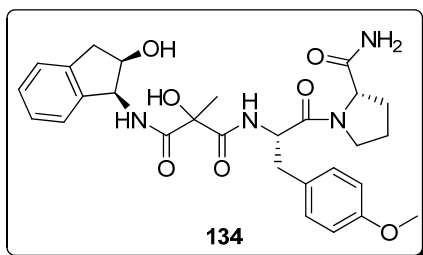
HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección λ = 220 nm) t_R = 1.88 min (Pureza 97

%); **ESI(+)** m/z calculada para C₂₇H₃₃N₄O₇ [M+H]⁺ 525.2, encontrada 525.2.

5.2.3.3. Síntesis del híbrido lineal metoxilado (134)

El derivado peptídico **134** se sintetizó a partir de 286 mg (0.19 mmol) de peptidil-resina **131** siguiendo el mismo protocolo descrito para la obtención del producto **54** (apartado 10.3.2, parte experimental, Capítulo 1). La peptidil-resina se suspendió en la

mezcla acidolítica TFA/MeOH (5:95, V/V) y la disolución resultante se mantuvo en agitación constante a 60 °C durante 1 h. El crudo obtenido (con un 78 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→38 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm), obteniéndose 21 mg de derivado **134** (48 % de rendimiento global) como un sólido blanco.



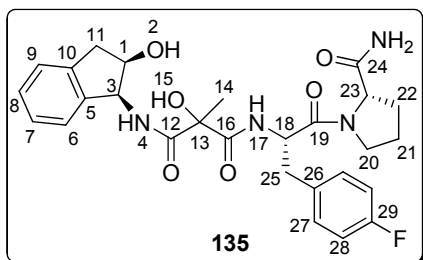
Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μ m, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, detección $\lambda = 220$ nm) $t_R = 2.22$ min (Pureza 96 %); **ESI(+)** m/z calculada

para C₂₈H₃₅N₄O₇ [M+H]⁺ 539.2, encontrada 539.2.

5.2.3.4. Síntesis del híbrido lineal fluorado (135)

El derivado peptídico **135** se sintetizó a partir de 249 mg (0.16 mmol) de peptidil-resina **131** siguiendo el mismo protocolo descrito para la obtención del producto **57** (apartado 10.3.5, parte experimental, Capítulo 1). La peptidil-resina se introdujo en un tubo *kimax* y se adicionó CCl₄ (3 mL) y BF₃·Et₂O (51 μ L, 0.41 mmol) en atmósfera de argón durante 1.5 h. El crudo obtenido (con un 83 % de pureza determinada por HPLC) se purificó por HPLC semipreparativo en fase inversa (XBridge BEH, 5 %→30 % B en 1 min y 30 %→37 % B en 7 min, siendo A: 0.1% TFA en H₂O y B: 0.1% TFA en MeCN, con un flujo de 16 mL/min y $\lambda = 214$ nm) obteniendo 16 mg de derivado **135** (42 % de rendimiento global) como un sólido blanco.



Caracterización

HPLC (XSelect C₁₈, 4.6 × 50 mm, 3.5 μ m, 5→100 % B en 4.5 min (A: H₂O (0.1 % HCOOH) y B: MeCN (0.07 % HCOOH)), flujo 2 mL/min, $\lambda = 220$ nm) $t_R = 2.27$ min (Pureza 94 %); **¹H-RMN** (500 MHz, CD₃OD) δ

8.12 (m, NH amida), 8.01 (m, NH amida), 7.32-7.15 (m, 6H, Car), 7.11-6.95 (m, 2H, Car), 5.24-5.20 (m, 1H, H₃), 4.94-4.86 (m, 1H, H₁₈), 4.56 (m, 1H, H₂₃), 4.53 (td, $J_1 = 5.0$ Hz, J_2

= 1.4 Hz, 1H, H₁), 3.81-3.71 (m, 1H, H₂₀), 3.60-3.54 (m, 1H, H₂₀), 3.23-3.12 (m, 2H, H₁₁ y H₂₅), 3.05-2.89 (m, 2H, H₁₁ y H₂₅), 2.24-2.11 (m, 1H, H₂₂), 2.09-1.89 (m, 3H, 2H₂₁ y H₂₂), 1.58 (s, 3H, H₁₄) ppm; ¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD) δ 176.77 (C₁₆), 173.81 (C₂₄), 173.52 (C₁₉), 171.66 (C₁₂), 164.31 (C₂₉), 142.23 (C₅), 141.66 (C₁₀), 133.67 (C₂₆), 132.57 (Car), 127.89 (Car), 126.24 (Car), 125.25 (Car), 116.19 (Car), 73.82 (C₁), 61.46 (C₂₃), 58.67 (C₃), 53.77 (C₁₈), 47.00 (C₂₀), 40.97 (C₁₁), 37.51 (C₂₅), 30.70 (C₂₂), 25.93 (C₂₁), 25.65 (C₁₄) ppm; **ESI(+)** m/z calculada para C₂₇H₃₂FN₄O₆[M+H]⁺ 527.2, encontrada 527.3; **HRMS** m/z calculada C₂₇H₃₂FN₄O₆ para [M+H]⁺ 527.2298, encontrada 527.2300.