

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE PUENTES DE HIDRÓGENO INTERMOLECULARES E INTRAMOLECULARES COMO HERRAMIENTA PARA LA SOLUBILIZACIÓN Y CONTROL CONFORMACIONAL DE PÉPTIDOS Y COMPUESTOS AMÍDICOS

**Departamento de Química Orgánica I de la
Universidad del País Vasco – Euskal Herriko Unibertsitatea**

Iraida Loinaz Bordonabe, 2004

Agradecimientos

El trabajo descrito en la presente memoria ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica I de la Universidad del País Vasco, en su sede de San Sebastián, bajo la dirección de los doctores Jesús Mari Aizpurua Iparraguirre y Claudio Palomo Nicolau, a quienes expreso mi más sincero agradecimiento por la dedicación que han prestado en todo momento a la dirección del mismo.

También deseo agradecer al Gobierno Vasco la concesión de la beca predoctoral durante los años 1999-2003 que ha hecho posible la realización de este trabajo.

Muchas gracias a todos los profesores y compañeros de laboratorio que me han prestado su ayuda durante estos años.

Gracias a Maria José Fernández-Berridi y a Lourdes Irusta por su colaboración.

Un agradecimiento muy especial a mi familia, a Kepa y a mis aitas por su apoyo.

Iraida Loinaz Bordonabe

Abreviaturas y Acrónimos

^{13}C -RMN	Espectro de carbono de resonancia magnética nuclear
^1H -RMN	Espectro de protón de resonancia magnética nuclear
Aib	Ácido α -amino isobutírico
Ala	Alanina
Aliquat® 336	Cloruro de tridecilmetilamonio
Aq.	Disolución acuosa
Arg	Arginina
Asp	Ácido Aspártico
BINOL	2,2'-Dihidroxy-1,1'-dinaftilo
BINAP	1,1'-(Binaftalen-2,2'-diil)bis(difenilfosfina)
Boc	<i>Terc</i> -butoxicarbonil
(Boc) ₂ O	Di-carbonato de di- <i>terc</i> -butilo
BOP-Cl	Cloruro de bis(2-oxoxazolidil)fosfato
^t Bu	<i>Terc</i> -butilo
nBuLi	n-Butil litio
c	concentración
CAN	Nitrato de Cerio (IV) y amonio
Cat.	catalítica
Cbz	Benciloxycarbonilo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
C ₆ F ₁₄	Perfluorohexano
CHA	Ciclohexilamonio
D	L-Ácido Aspártico
D	Distancia interprotónica en Daltons
d ₆ -acetona	Acetona deuterada
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DIC	Di- <i>iso</i> -propilcarbodiimida
DDQ	2,3-dicloro-5,6-dicianbenzoquinona
DIPA	Diisopropilamina
DIPEA (ⁱ PrNEt)	Diisopropiletilamina
dis.	disolvente
DMAP	4-(N,N-dimetilamino)piridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DODCI	Diocadecilcarbodiimida
DPPA	difosforazidato de difenilo
EDC, EDCI	Clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida
EFFS	Extracción fluorosa en fase sólida
Exp.	Experimental
eV	Electrón voltios
F	L-Fenilalanina
FBS	Fluorous biphasic systems
FC-72	Mezcla de hexanos fluorosos
fs	femtosegundos
FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
G	Glicina

GCMS	Cromatografía gaseosa – Espectrometría de Masas
Gly	Glicina
HATU	Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,NN',N'-tetrametiluronio
HBTU	Hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,NN',N'-tetrametiluronio
HMPA	Hexametilfosforamida
HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hidroxi-1H-benzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IC ₅₀	Parametro de medición de actividad de los ligandos
L	Leucina
LDA	Diisopropilamiduro de litio
Lit.	Valor encontrado en la literatura
Me	Metilo (grupo)
MIDAS	Metal-ion-dependent adhesion site
mM	milimolar
ms	milisegundos
NCA	N-carboxianhidrido
NMM	N-metilmorfolina
NMP	N-metilpirrolidinona
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement, Efecto Nuclear Overhauser
OAT	Bis-(2-etil-hexil)sulfocianato sódico
OBn	Benciloxilo
O ^t Bu	<i>Terc</i> -butoxilo
P	Prolina
PLG	Prolina-Leucina-Glicinamida
Pbf-	2,2,4,6,7-Pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo
Pbf-Cl	Cloruro de 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo
Pd/C	Paladio sobre carbono
P. E.	Puntode ebullición
Phe	Fenilalanina
Pmc-	2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo
PMP	p-metoxifenilo
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
ps	picosegundos
R	L-Arginina
Rdto.	Rendimiento
Rf	Cadena perfluorada lineal
Rf-BINOL	Molécula de BINOL que contiene cadenas perfluoradas
Rf-COOH	Ácido carboxílico de cadena lineal perfluorada
s _a	Singlete ancho
SAA	Sugar aminoácidos
sat.	saturada
TBTU	Tetrafluoroborato de hidroxibenzotriazolil-N,N,N',N'-tetrametiluronio
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC	Cromatografía de capa fina
TMEDA	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina

V	L-Valina
Val	Valina
Xurea	Fracción molar de urea
β -lac.	β -lactama
$\Delta\delta/\Delta T$	Variación del desplazamiento químico frente a la variación de la temperatura

1- “Scavenging of Fluorinated N,N’-Dialkylureas by Hydrogen Binding: A Novel Separation Method for Fluorous Síntesis”

Claudio Palomo, Jesús M. Aizpurua, Iraida Loinaz, María José Fernández-Berridi, Lourdes Irusta

Organic Letters, **2001**, 3 (15), 2361-2364.

2- “Compound Name: N,N’-bis-(1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyl) carbodiimide”

Claudio Palomo, Jesús M. Aizpurua, Iraida Loinaz.

The Handbook on Fluorous Chemistry, Wiley VCH, pp.160-163.

3- “Compound Name: *tert*-Butoxycarbonyl- α -aminoisobutyryl- α -aminoisobutyric Acid Benzyl Ester (Boc-Aib-Aib-OBn). Peptide Synthesis with a Fluorous Carbodiimide Reagent.

Claudio Palomo, Jesús M. Aizpurua, Iraida Loinaz.

The Handbook on Fluorous Chemistry, Wiley VCH, pp.164-166.

INDICE

Prólogo	XI
Capítulo 1: MODULACIÓN DE PUENTES DE HIDRÓGENO AMÍDICOS INTERMOLECULARES EN MEDIOS FLUOROSOS MEDIANTE ÁCIDOS PERFLUOROALCANÓICOS: APLICACIÓN A LA SOLUBILIZACIÓN Y SÍNTESIS PEPTÍDICAS	
1.1	Introducción, Hipótesis y Objetivos
1.1.1	Introducción 5
1.1.1.1	Reacciones en sistemas bifásicos fluorosos 5
1.1.1.2	Reacciones catalíticas (“Catálisis Fluorosa”) y reacciones estequiométricas (“Síntesis Fluorosa”) 9
1.1.1.3	Síntesis fluorosa con marcadores perfluorados grandes y pequeños; economía de átomo 13
1.1.1.4	Cromatografía Fluorosa 15
1.1.2	Hipótesis 18
1.1.2.1	Puentes de hidrógeno amida-ácido perfluorocarboxílico como vía de solubilización en fases fluorosas 18
1.1.3	Objetivos 21
1.2	Resultados y Discusión
1.2.1	Solubilización de compuestos amídicos, aminoácidos y péptidos en medios fluorosos mediante puentes de hidrógeno 27
1.2.1.1	Antecedentes y planteamiento 27
1.2.1.2	Síntesis de compuestos amídicos polifluorados 29
1.2.1.3	Estudios de solubilidad de compuestos amídicos y peptídicos en medios fluorosos 32
1.2.1.3.1	Determinación gravimétrica 32
1.2.1.3.2	Verificación espectroscópica (RMN) de formación de disoluciones verdaderas 39
1.2.2	Síntesis peptídica fluorosa asistida por la formación de complejos amida-ácido perfluoroalcanóico 45
1.2.2.1	Antecedentes y planteamiento 45
1.2.2.2	Síntesis de ureas y ácidos perfluoroalcanóicos 50

1.2.2.3	Coeficientes de reparto de los complejos urea-ácido	53
1.2.2.4	Síntesis peptídica con purificación extractiva fluorosa	57
1.2.3	Estudio estructural espectroscópico de los complejos amida-ácido perfluoroalcanóico en medios fluorosos	64
1.2.3.1	Estudio de los puentes de hidrógeno amida-ácido perfluoroalcanóico en medios fluorosos mediante espectroscopia IR	64
1.2.3.2	Estudios por RMN del complejo urea-ácido	73
1.3	Parte Experimental del Capítulo 1	81
1.3.1	Técnicas analíticas	81
1.3.2	Parte experimental	83
1.3.2.1	Síntesis de precursores	83
1.3.2.2	Síntesis de ácidos carboxílicos polifluorados	85
1.3.2.3	Productos sintetizados para los estudios de solubilidad	89
1.3.2.4	Síntesis de Ureas polifluoradas	103
1.3.2.5	Síntesis de N,N'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctil) carbodiimida 32	105
1.3.3	Síntesis de péptidos	112
1.3.3.1	Acoplamiento peptídico	112
1.3.3.2	Síntesis de ésteres <i>tert</i> -butílicos	113
1.3.3.3	Recuperación de la N,N'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctil) urea 4	113
1.3.3.4	Determinación cromatográfica (GC-MS) de N,N'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctil)urea en crudos de reacción	113
1.3.3.5	Estudios FTIR de formación de puentes de hidrógeno en los compuestos 4 , 40 , 41 , 42 y 15	115
1.4	Anexos Capítulo 1	119
	Anexo 1: Estudios de los complejos 9·5a, 10·5a y 11·5a mediante espectroscopía infrarroja FTIR	119
	Anexo 2: Estudio por IR del complejo 4·15 en perfluorohexano y diclorometano	121
	Anexo 3: Espectros de urea y ácido 4·15 a diferentes fracciones molares	126

Anexo 4: Medida de la Curva de JOB para el complejo urea-ácido en perfluorohexano	128
-----------------------------------------------------------------------------------	-----

Capítulo 2: MODULACIÓN DE PUENTES DE HIDRÓGENO INTRAMOLECULARES EN CICLOPEPTAPÉPTIDOS RGD MEDIANTE MIMÉTICOS β -LACTÁMICOS: DISEÑO Y SÍNTESIS DE UN LIGANDO DE INTEGRINA $\alpha_v\beta_3$

2.1	Introducción, Hipótesis y Objetivos	133
2.1.1	Introducción	133
2.1.1.1	Adhesión celular controlada por integrinas y procesos patológicos	133
2.1.1.2	Diseño de inhibidores de RGD como inhibidores selectivos de integrinas $\alpha_v\beta_3$	136
2.1.1.3	Control de los puentes de hidrógeno en peptidomiméticos cíclicos de RGD	143
2.1.1.4	Las β -lactamas como elementos de restricción conformacional en ciclopéptidos RGD	153
2.1.2	Objetivos	159
2.2	Resultados y Discusión	163
2.2.1	Síntesis del Ciclo(Arg-Asp- β -Lac-Gly)	163
2.2.1.1	Antecedentes y planteamiento	163
2.2.1.2	Primera desconexión (Ruta A)	168
2.2.1.2.1	Planteamiento	168
2.2.1.2.2	Síntesis de la β -lactama	169
2.2.1.3	Segunda desconexión (Ruta A)	176
2.2.1.3.1	Síntesis de la β -lactama	176
2.2.1.3.2	Síntesis de los aminoácidos	182
2.2.1.3.3	Ensamblaje del peptidomimético lineal	185
2.2.1.4	Tercera desconexión (Ruta B)	190
2.2.1.4.1	Síntesis de la β -lactama	192
2.2.1.4.2	Síntesis de los aminoácidos	193

2.2.1.4.3	Ensamblaje del peptidomimético lineal	196
2.2.1.4.4	Ciclación y desprotección final	198
2.2.2	Estudios espectroscópicos	202
2.2.2.1	Estudio conformacional del compuesto 81	205
2.2.2.2	Estudio conformacional del compuesto 92	213
2.2.2.3	Estudio conformacional del compuesto 43	219
2.2.3	Actividad Biológica	227
2.2.3.1	Ensayo de Inhibición de Adhesión Celular	228
2.2.3.2	Ensayo de Inhibición de Crecimiento Celular	229
2.3	Parte Experimental del Capítulo 2	235
2.3.1	Primera desconexión (Ruta A)	235
2.3.1.1	Síntesis del clorhidrato de (S)-3-amino-3-bencil-1- [(metoxicarbonil)metil]-azetidín-2-ona 54	235
2.3.1.1.1	Síntesis de N-metiliden-bis(trimetilsililmetilamina) 45	235
2.3.1.1.2	Síntesis del ácido [(4R)-4-fenil-2-oxo-oxazolidín-3-il] acético 58	237
2.3.1.1.3	Síntesis del clorhidrato de (3S)-3-amino-3-bencil-1- [(metiloxicarbonil)metil]-azetidín-2-ona 54	239
2.3.2	Segunda desconexión (Ruta A)	251
2.3.2.1	Síntesis de (3S) 3-bencil-3-(4R,5S)-difeníl-1,3-oxazolidín-2-oxo-3- il]-1-carboximetilazetidín-2-ona 65	251
2.3.2.1.1	Síntesis del ácido [(4R,5S)-4,5-difeníl-2-oxo-oxazolidín-3- il]acético 68	251
2.3.2.1.2	Síntesis de la (3S)-3-Bencil-3-[(4R,5S)-difeníl-1,3-oxazolidín- 2-oxo-3-il]-1-carboximetil-azetidín-2-ona 65	253
2.3.2.2	Protección y síntesis de los aminoácidos	257
2.3.2.2.1	Síntesis del cloruro de 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidro- benzofuran-5-sulfonilo 74	257
2.3.2.2.2	Síntesis del Cbz-Arg(Pbf)-Gly-O ^t Bu 53	259
2.3.2.3	Ensamblaje del peptidomimético lineal	261
2.3.2.3.1	Síntesis de Boc-Asp(OBn)-[(3S)-3-amino-3-bencil-azetidín-2- on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O ^t Bu 50	261
2.3.2.3.2	Síntesis de Boc-Arg(Pbf)-Gly-O ^t Bu 80	264

2.3.3 Tercera desconexión (Ruta B)	275
2.3.3.1 Síntesis de la β -lactama	275
2.3.3.1.1 Síntesis de la (3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-ona 84	275
2.3.3.2 Protección y síntesis de los aminoácidos	276
2.3.3.2.1 Síntesis de Boc-Arg(Pbf)-Gly-OBn 89	276
2.3.3.3 Ensamblaje del peptidomimético lineal	277
2.3.3.3.1 Cbz-Asp(O ^t Bu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn 81	277
2.3.3.4 Ciclación y desprotección	281
2.3.3.4.1 Síntesis de trifluoroacetato de ciclo{ Asp-[(3S)-3-amino-3-bencil-azetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg-Gly } 43	281
2.3.4 Ensayos de Actividad Biológica	289
2.3.4.1 Ensayo de inhibición de adhesión celular	289
2.3.4.2 Ensayo de inhibición de crecimiento celular	289
2.4 Anexos Capítulo 2	293
Anexo 1: Cbz-Arg(Pbf)-Gly-O ^t Bu 53	293
Anexo 2: {(3S)-3-Bencil-3-[(4R,5S)-difeníl-1,3-oxazolidín-2-oxo-3-il]-azetidín-2-on-1-il}-Gly-Arg(Pbf)-Gly-tBu 64	294
Anexo 3: Boc-Asp(OBn)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O ^t Bu 50	296
Anexo 4: Boc-Arg(Pbf)-Gly-OBn 89	298
Anexo 5: Cbz-Asp(O ^t Bu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn 81	299
Anexo 6: Espectros realizados en DMSO-d ₆ para el estudio conformacional del compuesto 81 Cbz-Asp(O ^t Bu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn	301
Anexo 7: Espectros realizados en DMSO-d ₆ para el estudio conformacional del compuesto 92 c{ Asp(O ^t Bu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly }	304

Anexo 8: Espectros realizados en D ₂ O/H ₂ O (10:90) para el estudio conformacional del compuesto 43 sal de trifluoroacetato de c{ Asp-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg-Gly}	309
Conclusiones	315
Espectros Capítulo 1	
Espectros Capítulo 2	

PROLOGO

La comprensión detallada de la estructura y propiedades de los puentes de hidrógeno inter- e intramoleculares en péptidos constituye una de las aproximaciones fundamentales para abordar importantes problemas, tales como el plegamiento protéico o las interacciones proteína-proteína, entre otros. Los puentes de hidrógeno¹ se conocen desde hace casi 100 años² y, más concretamente, su participación en la estabilización de conformaciones peptídicas de tipo α -hélice, lámina- β , giro- β , etc... al igual que en el control de los procesos de autoagregación o solubilización de las mismas, se halla ampliamente documentada desde mediados de los años cincuenta.³

Sin embargo, existen áreas de la Química Orgánica de reciente creación, tales como la síntesis en medios “fluorosos”,⁴ en los que apenas se ha explorado el potencial de los puentes de hidrógeno para la solubilización, inmovilización o purificación de péptidos. En el primer capítulo de esta memoria se aborda esta cuestión desde la hipótesis novedosa de la potenciación en medios fluorosos de los puentes de hidrógeno heteromoleculares frente a los homomoleculares durante las interacciones entre compuestos amídicos (amidas, péptidos, ureas, etc...) y ácidos carboxílicos perfluorados.

En una segunda parte se aborda una cuestión más conocida que la anterior y de interés farmacológico mucho más directo: la formación selectiva de puentes de hidrógeno intramoleculares en miméticos de ciclopéptidos para regular su potencia biológica. En concreto, se describe el diseño y síntesis de un nuevo inhibidor de adhesión celular mediante integrina $\alpha_v\beta_3$, basado en el efecto gammágeno ejercido por fragmentos de α -alquil- α -amino- β -lactámicos insertados en ciclopéptidos conteniendo la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD).

¹ Una definición propuesta por Pimentel y McClellan establece que *existe un puente de hidrógeno si hay evidencia de 1) que existe un enlace y 2) que este enlace involucra a un átomo de hidrógeno ya enlazado a otro átomo*. Los puentes de hidrógeno pueden llegar a ser en algunos casos casi tan fuertes como los enlaces covalentes, mientras que en otros son casi tan débiles como las interacciones de Van der Waals. Por esta razón, su definición debe ser general de modo que abarque toda su complejidad.

² Para una revisión detallada de los aspectos estructurales que definen los puentes de hidrógeno, ver: T. Steiner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**,41, 48-76.

³ Houben-Weyl, *Methods of Organic Chemistry*, Vol. E22c, *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, pp.693-694, *Peptides Incorporating Secondary Structure Inducers and Mimetics* (C. Toniolo). Ed. Thieme, **2003**.

⁴ Para definiciones y detalles, ver el Capítulo 1 de la presente memoria (pag. 1-).

**CAPÍTULO 1: MODULACIÓN DE PUENTES DE
HIDRÓGENO AMÍDICOS INTERMOLECULARES EN
MEDIOS FLUOROSOS MEDIANTE ÁCIDOS
PERFLUOROALCANÓICOS: APLICACIÓN A LA
SOLUBILIZACIÓN Y SÍNTESIS PEPTÍDICAS**

Introducción, Hipótesis y Objetivos

1.1 INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.1.1 Introducción

1.1.1.1 Reacciones en Sistemas bifásicos fluorosos (BFS)

Desde que en 1991 un estudiante de la Universidad de Aquisgran llamado Vogt defendiera la tesis titulada “Zur Anwendung Perfluorierter Polyeter bei der Immobilisierung homogener Katalysatoren” (Aplicación de poliéteres perfluorados para la inmovilización de catalizadores homogéneos) se abrió un nuevo campo en las metodologías de síntesis química. Vogt utilizó éteres fluorados como los mostrados en la Figura 1.1 como disolventes de reacción para llevar a cabo la oligomerización de eteno mediante catálisis homogénea con un catalizador de níquel polifluorado.⁵

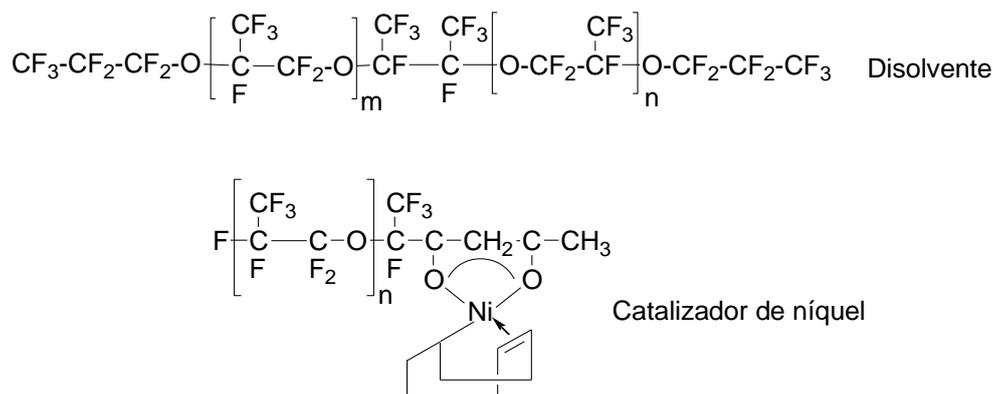


Figura 1.1: Disolvente y catalizador polifluorado empleados en la primera reacción efectuada en medio fluoroso.

Dos años más tarde, Zhu,⁶ publicó un trabajo en el que utilizaba disolventes fluorados para eliminar agua del medio de reacción. No obstante, fueron Horváth y Rabai⁷ quienes acuñaron el concepto “fluoroso”. Ellos lo definieron por analogía al

⁵ Aunque la tesis de Vogt no condujo a publicaciones inmediatas, su contribución pionera ha sido reconocida posteriormente, ver: a) B. Cornils, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1997**, 36, 2057-2059. b) W. Keim, M. Vogt, P. Wasserscheid, B. Drießen-Hölscher, *J. Mol. Cat. A: Chem.*, **1999**, 139, 171-175.

⁶ D. W. Zhu, *Synthesis*, **1993**, 953-954.

⁷ I. T. Horváth, J. Rabai, *Science*, **1994**, 266, 72-75.

término “acuoso” enfatizando el hecho de la afinidad de reactivos o catalizadores por fases compuestas por disolventes perfluorados o polifluorados.

La idea básica que sustenta el interés por emplear disolventes fluorados en síntesis orgánica consiste en la posibilidad de simplificar los procesos de purificación sustituyendo las separaciones cromatográficas por simples extracciones líquido-líquido en sistemas bifásicos fluorosos.

Un sistema bifásico fluoroso (BFS) consiste en una fase fluorosa en la que se disuelve algún reactivo, catalizador, sustrato, producto o subproducto, y una segunda fase orgánica o inorgánica no soluble (o muy poco soluble) en la fase fluorosa. Los disolventes fluorosos son compuestos fluorocarbonados (todos los átomos de H han sido reemplazados por átomos de F) o compuestos fluorohidrocarbonados (en los que al menos un átomo de H no ha sido reemplazado por átomos de F) y suelen ser alcanos, éteres, aminas terciarias o compuestos aromáticos. Estos últimos, al tener más interacciones dipolo-dipolo son menos compatibles que los fluoroalcanos para sistemas bifásicos fluorosos. Al ser extremadamente apolares, son inmiscibles con el agua y muy poco miscibles con la mayoría de disolventes orgánicos como THF, acetona, tolueno, diclorometano o alcoholes).

La separación de las fases es además de rápida, eficiente. En la Figura 1.2 se muestran unas fotografías de una mezcla de 3mL de n-hexano, 1mL de tolueno y 3mL de perfluorometilciclohexano. En la fase perfluorada se disuelve un complejo perfluoroalquilado de cobalto y ftalocianina (similar al complejo de cobre utilizado para teñir teflón) que le da un color azul a la disolución perfluorada. Después de agitar a temperatura ambiente, en nueve segundos las dos fases vuelven a estar completamente separadas. La fase orgánica superior tiene un ligero color azulado que es debido al reflejo.

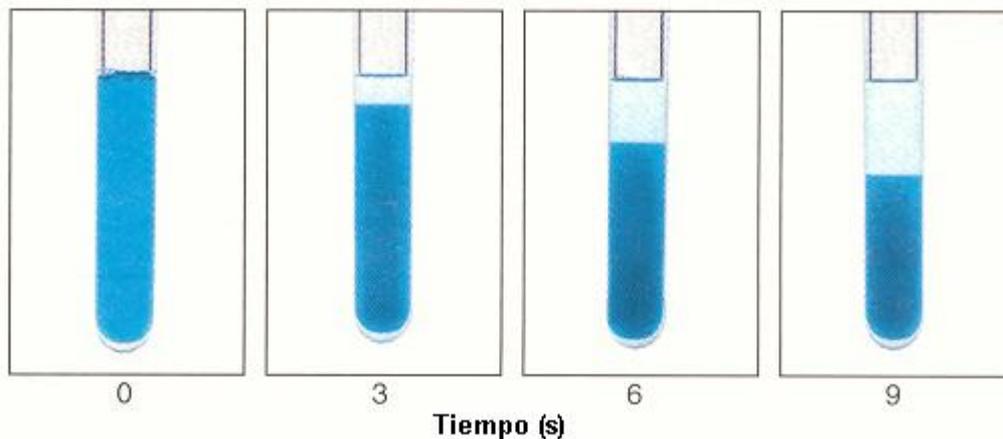


Figura 1.2: Separación de fases de n-hexano (3mL), tolueno (1mL) y perfluorometilciclohexano (3mL).

La miscibilidad de los disolventes orgánicos y fluorosos es muy dependiente de la temperatura. Al variar un poco la temperatura, la solubilidad cambia drásticamente pudiendo pasar en ciertos casos de un sistema homogéneo a un sistema bifásico. El mismo ejemplo (Figura 1.3) del n-hexano/tolueno/perfluorometilciclohexano sirve para demostrar cómo el simple hecho de calentar la disolución con la mano a 36.5°C es suficiente para que el medio sea completamente homogéneo. En este caso en unos pocos minutos, al pasar el sistema a temperatura ambiente la mezcla vuelve a ser heterogénea separándose así las dos fases (minuto 10). Esta vez también es fácil observar la nula solubilidad del complejo de cobalto en la fase orgánica.

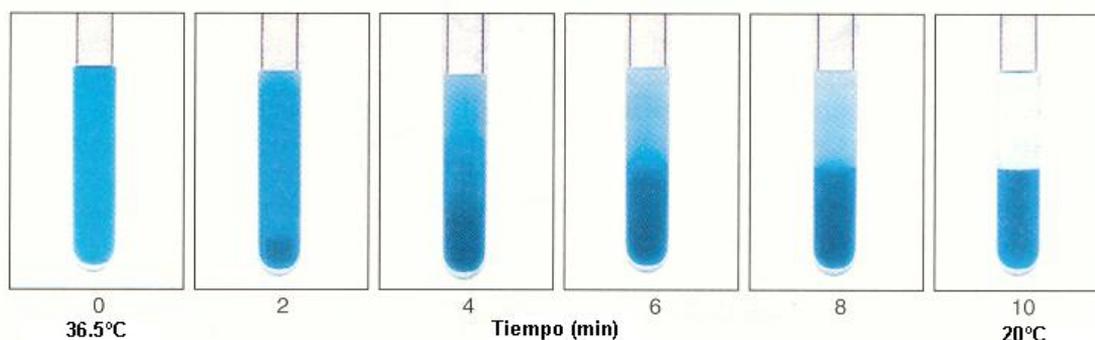


Figura 1.3: Separación de fases de n-hexano (3mL), tolueno (1mL) y perfluorometilciclohexano (3mL) en función de la temperatura.

Para que los reactivos o sustratos orgánicos sean solubles en los disolventes perfluorados apolares, es necesario compensar la polaridad de los grupos funcionales que interaccionan con los disolventes orgánicos no-fluorosos. Unas estructuras muy efectivas son las cadenas perfluoroalquiladas lineales o ramificadas que contengan un número alto de átomos de carbono. A este tipo de cadenas se las denomina “ponytails”. Normalmente se suelen insertar dos o tres metilenos entre las cadenas perfluoradas (“ponytails”) y los grupos funcionales para disminuir el efecto electroatrayente de dichas cadenas y que no afecten a la reactividad de los grupos funcionales. Un ejemplo de este tipo de reactivos es la fosfina $P[CH_2CH_2(CF_2)_5CF_3]_3$ que constituye el equivalente fluoroso de la trifenilfosfina o la tributilfosfina (Figura 1. 4).

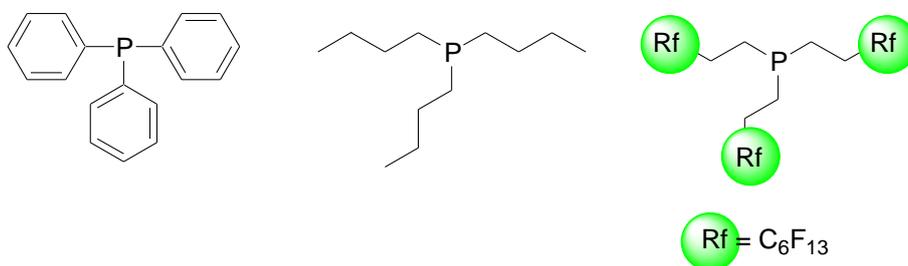


Figura 1. 4: Estructura de una fosfina fluorosa con cadenas tipo “ponytail” en la que los grupos perfluorados Rf proporcionan afinidad por el disolvente perfluorado y los espaciadores etileno mantienen la capacidad ligante del átomo de fósforo.

Las reacciones FBS⁸ realizadas marcando fluorosamente (“fluorous labeling” o “phase tagging”) alguno de los reactivos, productos o catalizadores de una reacción, permiten que, al término de la misma dicho componente fluoroso pueda ser separado fácilmente del resto de sustratos. El producto marcado queda inmovilizado en la fase fluorosa facilitando la purificación del crudo de reacción (ver Figura 1.5).

⁸ Para consultar revisiones relacionadas con el tema: a) B. Collins, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1997**, 36, 2057-2059. b) D. P. Curran, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 1174-1196. c) I. T. Horváth, *Acc. Chem. Res.*, **1998**, 31, 641-650. d) E. de Wolf, G. van Koten, B. -J. Deelman, *Chem. Soc. Rev.*, **1999**, 28, 37-41.

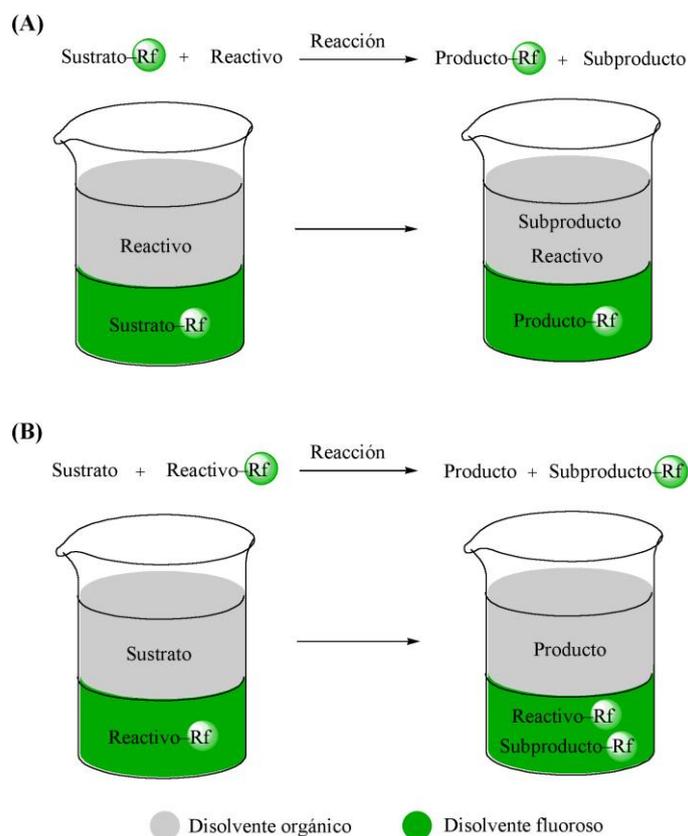


Figura 1.5: Esquema de purificación de productos mediante la técnica de marcadores de fase.

Si además se añade el hecho de que utilizando algunas mezclas concretas de disolventes a ciertas temperaturas la disolución es homogénea, nos encontramos frente de un sistema que tiene las ventajas de las reacciones sobre soporte sólido en cuanto a purificación de productos se refiere, y que tiene la misma reactividad que un sistema homogéneo. Además como los sustratos no están atrapados en fase sólida, se facilita mucho el análisis de la reacción.

1.1.1.2 Reacciones catalíticas (“Catálisis Fluorosa”) y reacciones estequiométricas (“Síntesis Fluorosa”)

Tanto Vogt en su tesis doctoral, como Horváth y Rabai describieron reacciones catalíticas (ver Figura 1.6). El reactivo marcado fluorosamente era el catalizador de la reacción y una vez terminada ésta, quedaba inmovilizado en la fase fluorosa pudiendo ser separado de los productos con una simple extracción. El catalizador era reutilizado simplemente añadiendo más disolvente orgánico con los productos de partida.

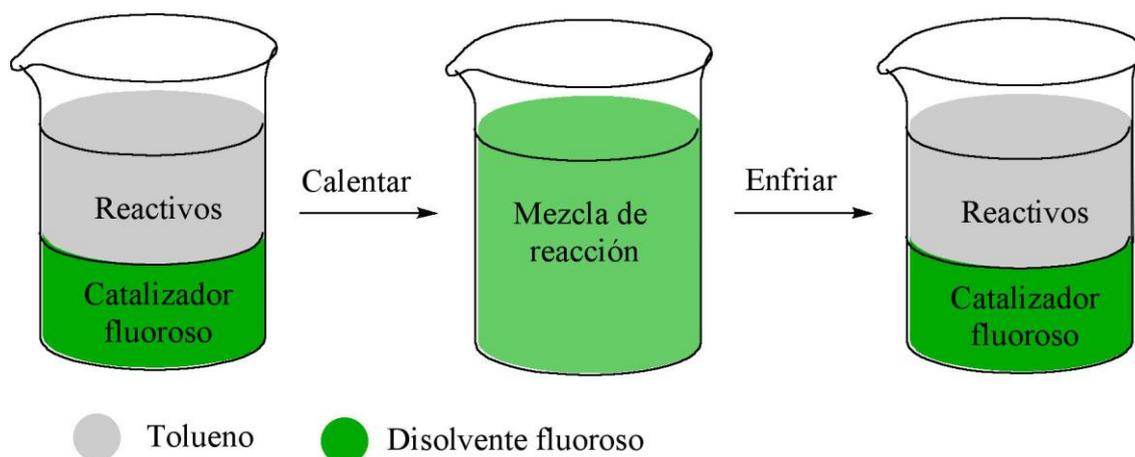
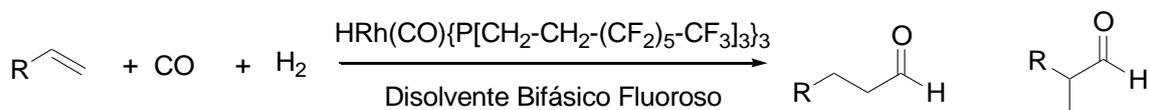


Figura 1.6: Principio de la catálisis fluorosa bifásica

Horváth y Rabai desarrollaron una reacción de hidroformilación⁹ mediante catalizador de rodio perfluorado de fórmula: $\text{HRh}(\text{CO})\{\text{P}[(\text{CH}_2)_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3]_3\}_3$. El medio fluoroso es idóneo para esta reacción en la que tanto los productos de partida como los productos finales son muy apolares.



Catalizadores similares han sido descritos (ver Figura 1.7) en reacciones de hidroboración,¹⁰ en la que se utilizaba el equivalente fluorado del catalizador de Wilkinson ($\text{CIRh}\{\text{P}[\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3]_3\}_3$). O catalizadores fluorosos de Zn para la formación de enlaces C-C,¹¹ incluso los análogos fluorados del BINOL para sintetizar catalizadores de $\text{Ti}(\text{IV})$ ¹² utilizados en alilaciones de benzaldehídos con

⁹ I. T. Horváth, G. Kiss, R. A. Cook, J. E. Bond, P. A. Stevens, J. Rábai, E. M. Mozeleski, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 3133-3143.

¹⁰ J. J. Juliette, I. T. Horváth, J. A. Gladysz, *Angew., Chem., Int., Ed., Engl.*, **1997**, 36, 1610-1612.

¹¹ H. Kleijn, E. Rijnberg, J. T. B. H. Jastrzebski, G. van Koten, *Org. Lett.*, **1999**, 1, 853-855.

¹² Y-Y Yin, G. Zhao, Z-S Qian, W-X Yin, *J. Fluorine Chem.*, **2003**, 120, 117-120.

aliltributilestaño. Nakamura¹³ también describió un ligando similar al BINOL que utilizaba para formar un complejo de Ti que cataliza adiciones de dietilzinc a aldehídos aromáticos. En el mismo artículo describe los ligandos análogos de BINAP que utiliza en la reacción de Heck formando el correspondiente complejo de Pd.

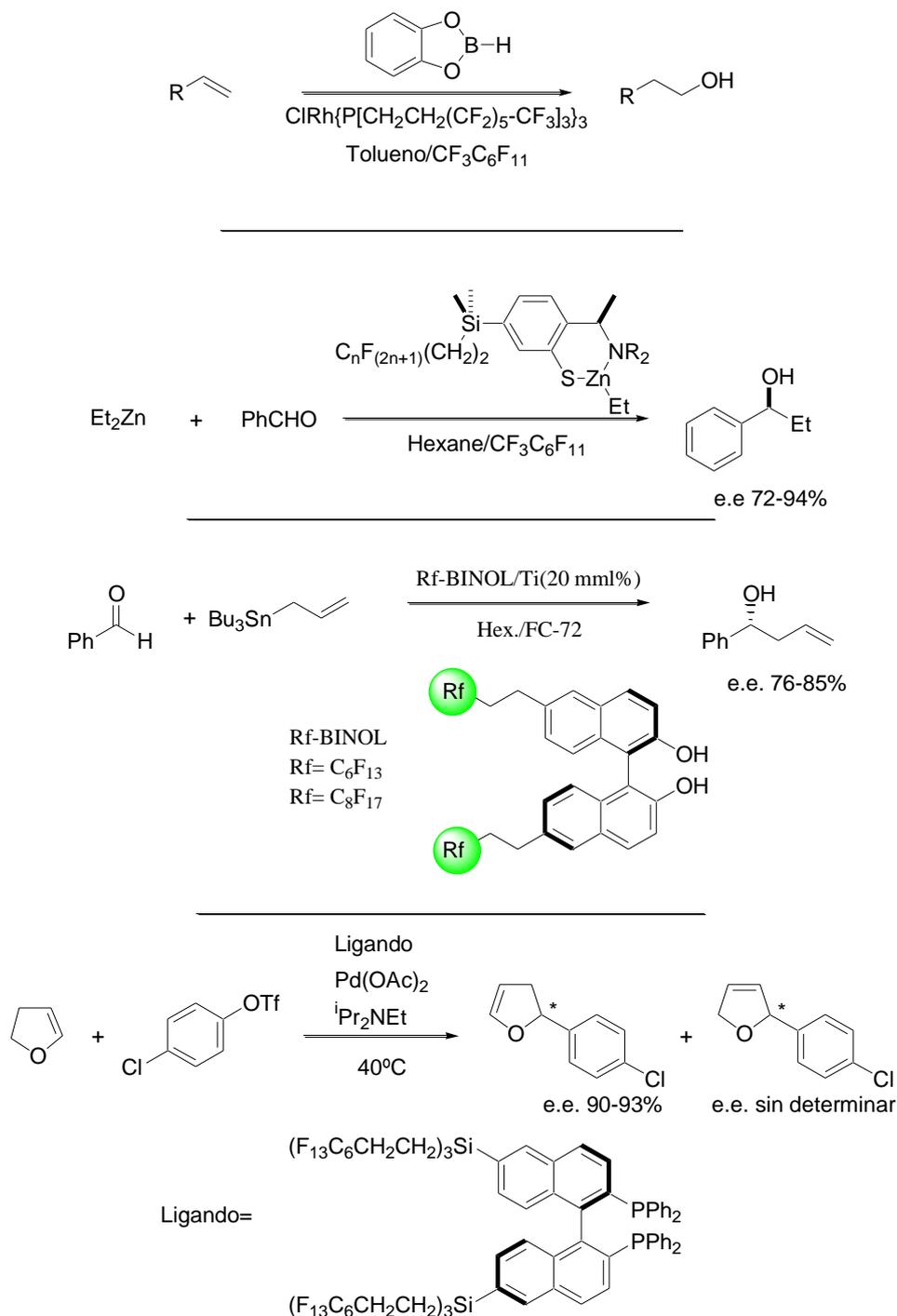


Figura 1.7: Algunos ejemplos de reacciones catalíticas fluorosas.

¹³ Y. Nakamura, S. Takeuchi, Y. Ohgo, *J. Fluorine Chem.*, **2003**, 120, 121-129.

En todas estas reacciones, los reactivos eran compuestos apolares compatibles con los catalizadores fluorosos (muy apolares). Sin embargo cuando el catalizador es polar como el catalizador de Wilkinson se necesitan 117 átomos de flúor para su solubilización. Éste es un número demasiado elevado de cadenas fluorosas si el reactivo no es recuperado completamente.

Los primeros ejemplos de reacciones estequiométricas descritas en medios fluorosos también se llevaron a cabo con compuestos apolares que no necesitaban un número excesivo de átomos de flúor para su solubilización, como es el caso de la cicloadición de nitroderivados a alquenos descrita por Curran.¹⁴ Cuando esta reacción se lleva a cabo sin marcadores fluorosos generalmente requiere procesos cromatográficos para la purificación del producto. Sin embargo, marcando el alcohol alílico de partida, (ver Figura 1.8) la purificación se realiza mediante extracciones consecutivas.

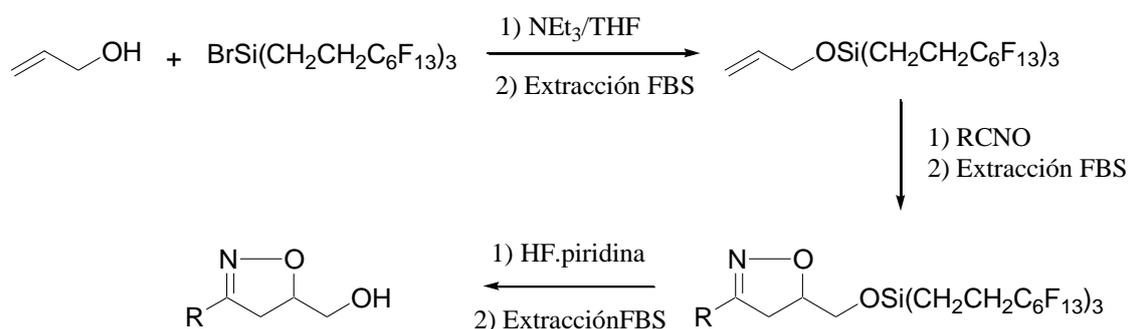


Figura 1.8: Esquema de una reacción de síntesis fluorosa.

En otro ejemplo similar se describe la adición de un reactivo de Grignard sobre un aldehído. (ver Figura 1.9). En este caso, las extracciones se realizan en sistema trifásico orgánico/acuosos/fluoroso.

¹⁴ A. Studer, S. Hadida, R. Ferrito, S-Y Kim, P. Jeger, P. Wipf, D. P. Curran, *Science*, **1997**, 275, 823-826.

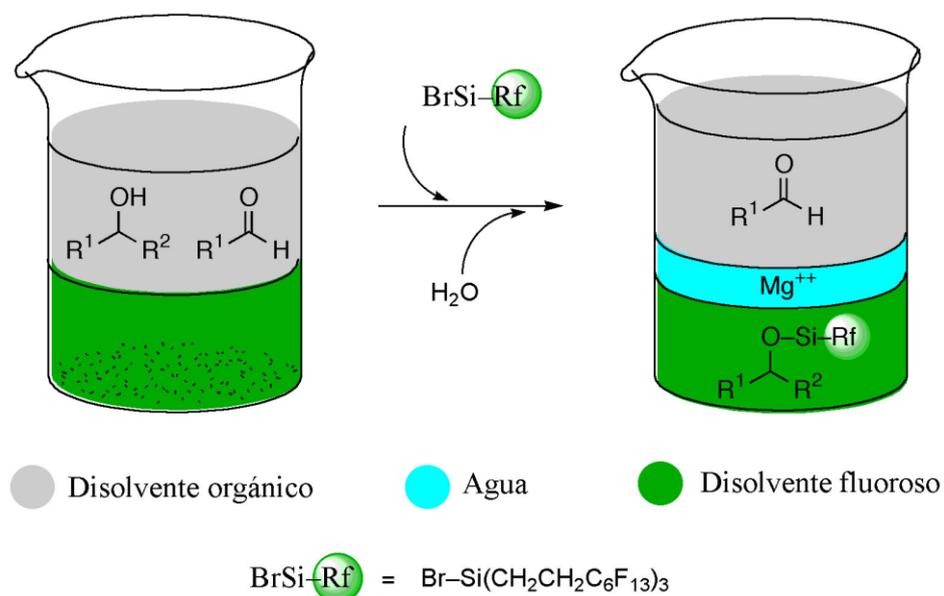
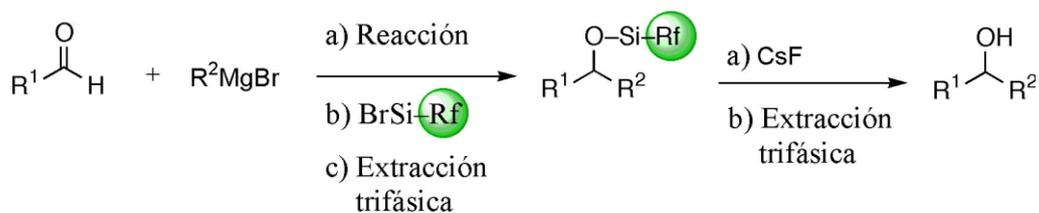


Figura 1.9: Ejemplo de una reacción con extracción trifásica orgánica/acuosa/fluorosa.

1.1.1.3 Síntesis fluorosa con marcadores perfluorados grandes y pequeños; economía de átomo

Conforme se iban explorando reacciones estequiométricas fluorosas con sustratos o reactivos cada vez más polares se observó, que al igual que ocurría con la síntesis de catalizadores polares, el número de átomos de flúor necesarios para lograr la solubilidad en medios fluorosos se volvía inaceptablemente elevado.

Un ejemplo de ello es la extracción fluorosa de las ureas resultantes de la reacción de aminas con exceso de isocianato “fluorous scavenging”. La estrategia descrita por Curran¹⁵ consiste en atrapar el isocianato sobrante con aminas fluorosas conteniendo 39 y 78 átomos de flúor, respectivamente (Ver Figura 1.10).

¹⁵ B. Linclau, A. K. Sing, D. P. Curran, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 2835-2842.

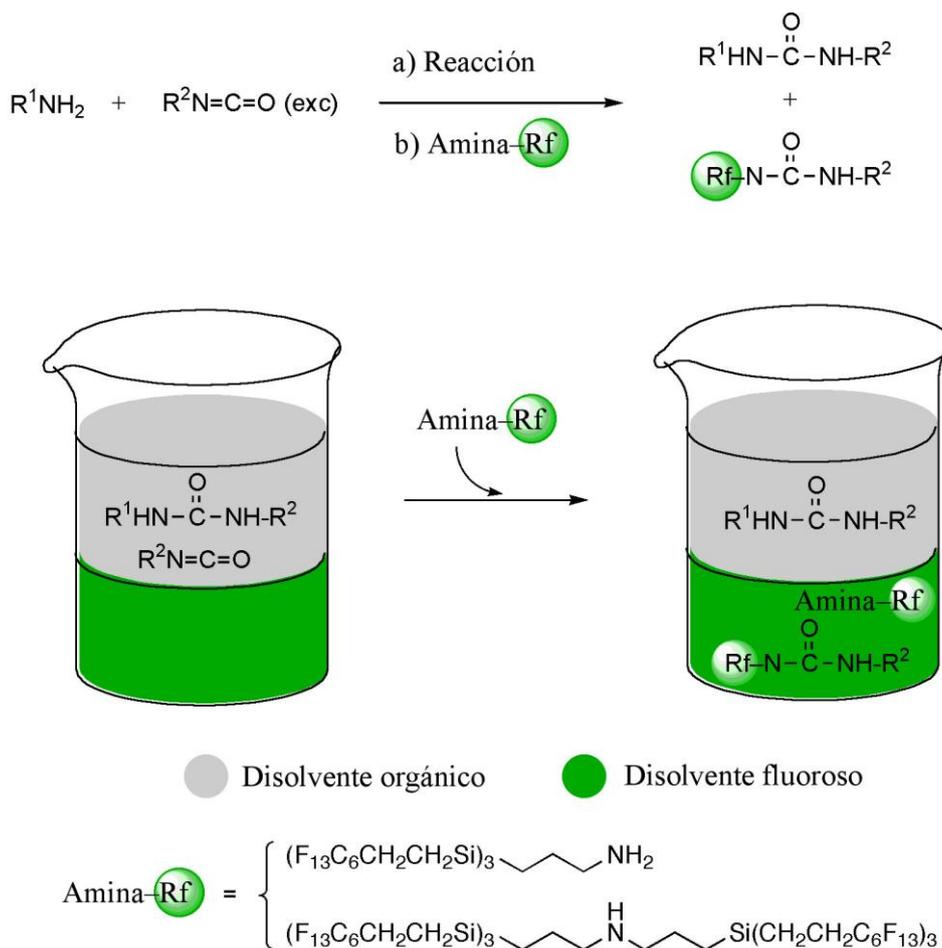


Figura 1.10: Purificación de ureas por extracción fluorosa mediante atrapamiento del isocianato sobrante con aminas fluorosas.

Al intentar separar por extracción las ureas resultantes, sólo las de 6 cadenas fluorosas (78 átomos de flúor por molécula) daban buenos coeficientes de reparto. Aunque este método sólo marca los excesos de reactivos necesita una gran cantidad de cadenas fluorosas para ser eficiente. Además, en reacciones de varios pasos, se necesitaría ir marcando fluorosamente los subproductos en cada etapa.

Como puede verse, el empleo de derivados fluorosos para llevar a cabo reacciones estequiométricas con compuestos polares supone un gran desperdicio de átomos de flúor y, además, la preparación de los propios reactivos fluorosos no era una tarea fácil. Al fin y al cabo, la introducción de un número tan alto de cadenas fluorosas asemeja este método a la síntesis en fase sólida.

Este conjunto de hechos conduce a lo que podríamos denominar como la contraposición inmovilización/reactividad (ver Figura 1.11). Cuando se realizan

reacciones FBS con reactivos fluorosos poco fluorados (“light fluorous tags”) se facilita la síntesis. Estos reactivos son más solubles en los disolventes orgánicos habituales y por lo tanto su reactividad también es mayor en comparación a la de los reactivos muy fluorados(**A**); la reacción tenderá a darse en la fase orgánica, pareciéndose así más a un sistema homogéneo. Sin embargo, a la hora de la purificación, el coeficiente de reparto es bajo, y es muy probable (**B**) que parte de los subproductos fluorosos (sub-Rf) queden en la fase orgánica.

Para obtener coeficientes de reparto lo suficientemente altos que permitan una buena purificación (**D**), es necesario que el número de cadenas perfluoradas sea mayor. Pero al ser la solubilidad de estos compuestos en los disolventes orgánicos polares mucho menor, la reacción (**C**) tenderá a darse en la interfase entre los dos disolventes, asemejándose la reacción a una en fase sólida y será más lenta.

Obviamente, resultaría de gran interés el desarrollo de una metodología que permitiese emplear reactivos de cadena fluorosa ligera que reaccionasen rápidamente (como en **A**) y, al mismo tiempo, diesen subproductos que se separasen eficientemente (como en **D**).

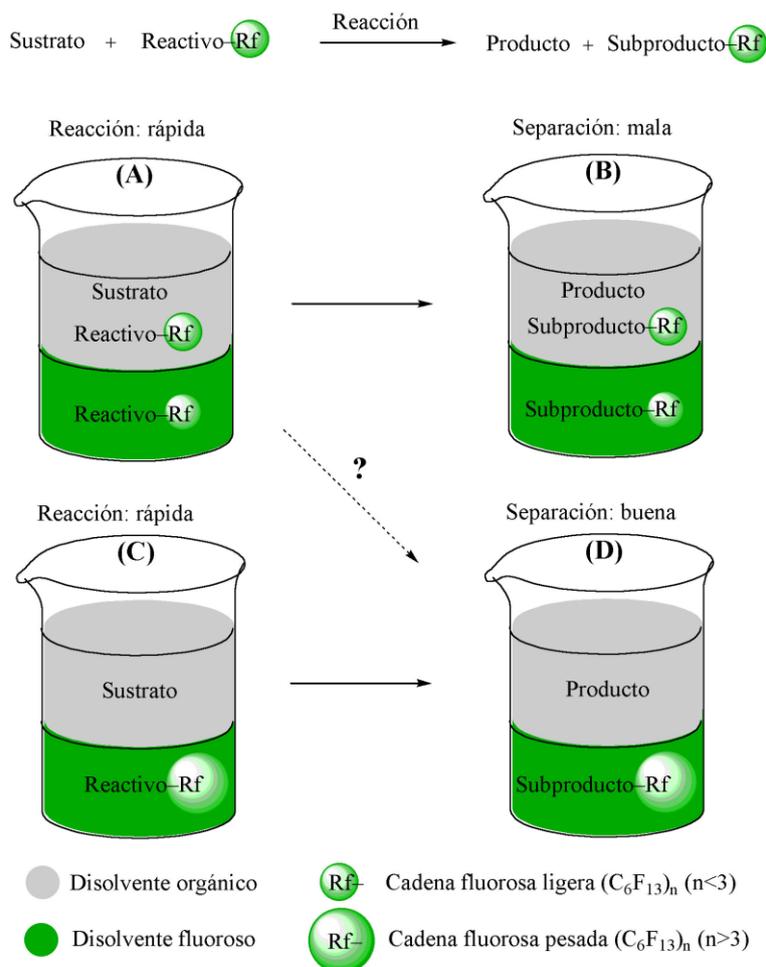


Figura 1.11: Al aumentar el número de cadenas fluorosas se mejora la separación del subproducto pero disminuye la velocidad de reacción.

1.1.1.4 Cromatografía fluorosa

Una posible solución al problema anterior consiste en extracciones sobre fase sólida de gel de sílice fluorosa.¹⁶ El gel de sílice fluoroso se describió en los años 80 y se utiliza ocasionalmente para separaciones de compuestos polares y apolares que contengan átomos de flúor. A mayor número de átomos de flúor la retención en la columna aumenta. No es necesario que los productos sean solubles en disolventes fluorosos. El simple hecho de contener una cadena fluorosa es suficiente para que la retención en la columna sea completamente diferente a los compuestos no fluorosos.

¹⁶ a) D. P. Curran, S. Hadida, M. He, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 6714-6715. b) D. P. Curran, Z. Luo, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 9069-9072. c) D. P. Curran, *Synlett*, **2001**, 1488-1496.

Para ilustrar la aplicación de este método de purificación, Curran^{16b} sintetizó amidas conteniendo una única cadena perfluorada de diferentes longitudes y las separó por columna de fase reversa fluorosa. Estos compuestos con una única cadena fluorosa son tan polares que no se disuelven en absoluto en disolventes como el perfluorohexano, y al intentar medir sus coeficientes de reparto entre CH₂Cl₂ y FC-72 (mezcla de hexanos perfluorados), no se observan trazas de los compuestos perfluorados en el FC-72. Sin embargo, a la hora de separar estos compuestos mediante una columna fluorosa utilizando un gradiente de disolvente MeOH/H₂O a MeOH, es posible separar aminoácidos de cadenas perfluoradas de fórmula CH₂CH₂C_nF_{2n+1} (n=3-10).

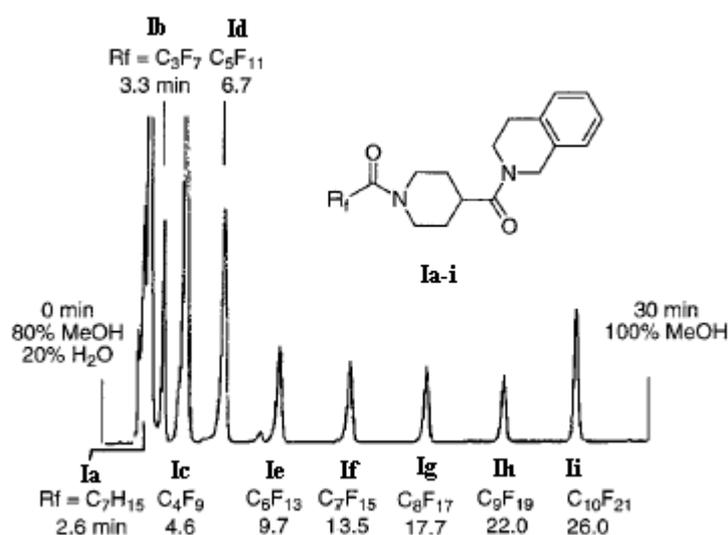


Figura 1. 12: Separación cromatográfica de la mezcla de amidas **Ia-i** en una columna Fluofix 120E.

En trabajos posteriores se han descrito diferentes “scavengers” fluorosos útiles en síntesis peptídica tales como tioles (F₁₃C₆-CH₂-CH₂SH),¹⁷ análogos de la Cbz (C₆F₁₃-CH₂-CH₂-C₆H₄-CH₂-O-CO-)¹⁸ y del Boc (C₈F₁₇-CH₂-CH₂-C(CH₃)₂-O-CO-)¹⁹ u otros para atrapar no sólo electrófilos, sino nucleófilos.²⁰

¹⁷ W. Zhang, D. P. Curran, C. H-T Chen, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 3871-3875.

¹⁸ D. P. Curran, M. Amatore, D. Guthrie, M. Campbell, E. Go, Z. Luo, *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 4643-4647.

¹⁹ Z. Lou, J. Williams, R. W. Read, D. P. Curran, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 4261-4266.

²⁰ C. W. Lindsley, Z. Zhao, W. H. Leister, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 4225-4228.

Por último, en un intento de adaptar la síntesis fluorosa a la química combinatoria, Curran ha descrito una síntesis paralela denominada “fluorous mixture synthesis” (o síntesis fluorosa de mezclas).²¹ (Ver Figura 1.13) La técnica consiste en el marcado fluoroso de una colección de sustratos, llevar a cabo las reacciones, separar los productos marcados mediante cromatografía fluorosa inversa y, por último, liberarlos. Esto permite hacer quimiotecas de hasta 100 productos de una sola vez.

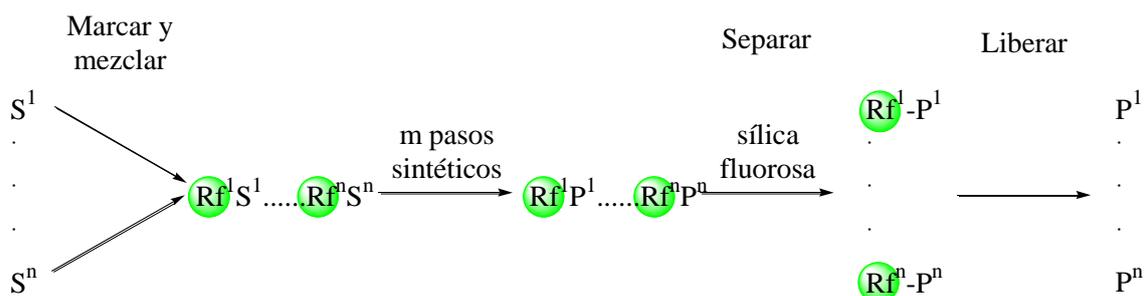


Figura 1.13: Síntesis fluorosa de mezclas. n sustratos son marcados y mezclados. Se llevan a cabo m pasos sintéticos (en lugar de m X n pasos). Los productos marcados son separados mediante sílica fluorosa. Por último se liberan los productos puros.

A pesar de los indudables avances logrados, estos métodos no cumplen la filosofía inicial de facilitar la purificación evitando el empleo de cromatografía. Al contrario, no sólo complican la síntesis por necesitar más reacciones para poder marcar los reactivos con el marcador de fase, sino que al final se vuelve a emplear cromatografía para la purificación.

1.1.2 Hipótesis

1.1.2.1 Puentes de hidrógeno amida-ácido perfluorocarboxílico como vía de solubilización en fases fluorosas

Está descrito en la bibliografía²² que la urea forma estructuras cristalinas mediante puentes de hidrógeno con diferentes ácidos carboxílicos aromáticos y

²¹ d) Z. Luo, Q. Zhang, Y. Oderaotshi, D. P. Curran, *Science*, **2001**, 291, 1766-1769.

²² G. Smith, K. E. Baldry, K. A. Byriel, C. H. L. Kennard, *Aust. J. Chem.*, **1997**, 50, 727-736.

alifáticos insaturados en estado sólido.²³ En estas condiciones, la urea forma diversos puentes de hidrógeno cíclicos de ocho eslabones que pueden ser diméricos, triméricos y tetraméricos (ver Figura 1.14).

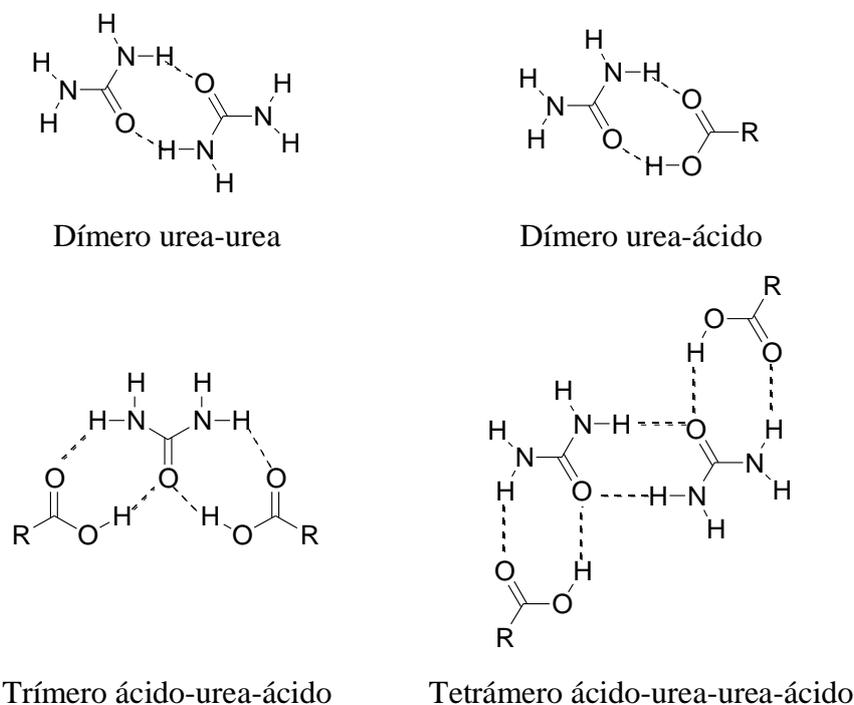


Figura 1.14: Interacciones de puentes de hidrógeno entre moléculas de urea y ácidos carboxílicos.

También se han descrito interacciones de este tipo entre ácidos perfluorados y poliamidas, como el Nylon.²⁴ Es conocido que la autoagregación que sufren compuestos polares como ureas, poliamidas o péptidos es lo que los hace insolubles en medios apolares. El Nylon, por ejemplo, que es soluble en trifluoroetanol, cristaliza al añadir ácido perfluoroglutarico debido a que éste es capaz de romper la interacción amida-amida homomolecular mediante los grupos carboxílicos dando una especie cristalina. Al añadir ácido glutárico sin embargo, no se forma el aducto. Esto significa que la interacción de puentes de hidrógeno es especialmente fuerte cuando el ácido es perfluorado y el disolvente también lo es.

²³ G. Smith, K. E. Baldry, K. A. Byriel, C. H. L. Kennard, *Aust. J. Chem.*, **1997**, 50, 1021-1025.

²⁴ S. M. Aharoni, E. Wasserman, *Macromolecules*, **1982**, 15, 20-25.

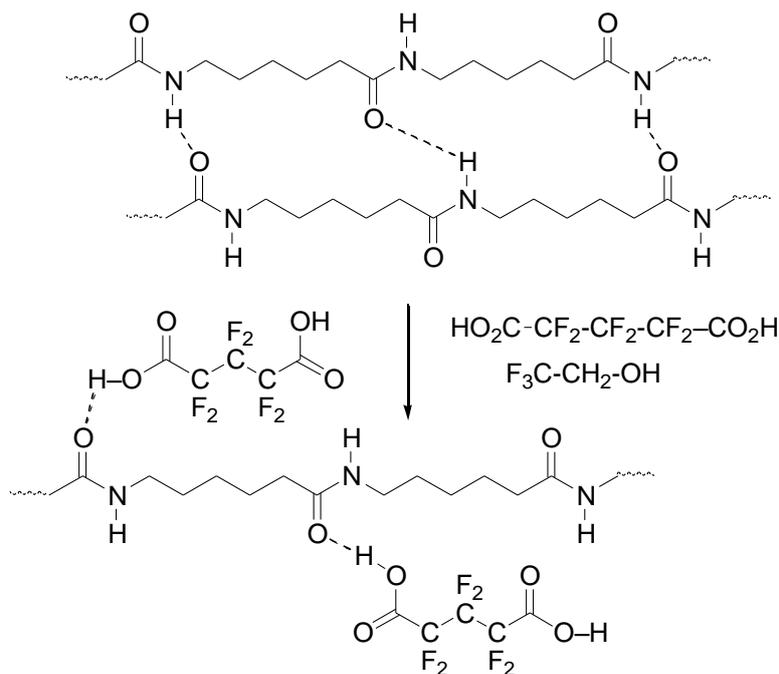


Figura 1.15: Interacción de moléculas de poliamida con ácido perfluoroglutarico

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados y constatando la inexistencia de métodos para incorporar moléculas con enlaces amida (y más particularmente péptidos) a los medios fluorosos sin recurrir a la formación de derivados covalentes altamente fluorados, nosotros pensamos que la formación de puentes de hidrógeno amida/ácido carboxílico podría ser una estrategia útil para lograr dicha incorporación de manera mucho más sencilla.

Nuestra aproximación se basa en la hipótesis de que la presencia de una cadena perfluorada en el ácido carboxílico (RfCO_2H) podría favorecer la formación de puentes de hidrógeno heteromoleculares amida/ácido (Figura 1. 16, ruta A) frente a los homomoleculares amida/amida ó ácido/ácido (ruta B) cuando los equilibrios entre dichos compuestos tienen lugar en un disolvente fluoroso. Si, además, las interacciones de Van der Waals entre las cadenas perfluoradas de dichos complejos amida/ácido y el disolvente fluoroso fueran lo suficientemente intensas, podría esperarse una disolución del complejo resultante (ruta A) frente a la autoagregación (ruta B) que conduce a la insolubilidad de las amidas.

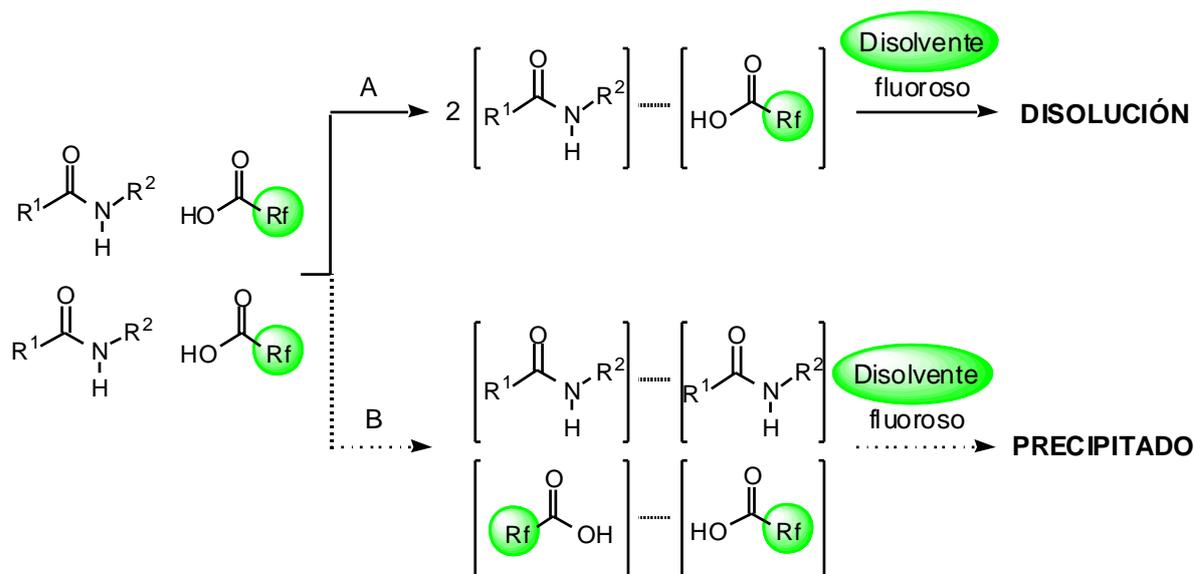


Figura 1. 16: Representación esquemática de la interacción amida/ácido en un medio fluoroso. A: la interacción combinada de un ácido perfluorado y un disolvente fluoroso ayudan a disolver el complejo amida/ácido. B: cuando sólo se producen interacciones homomoleculares, se favorece la autoagregación de la amida.

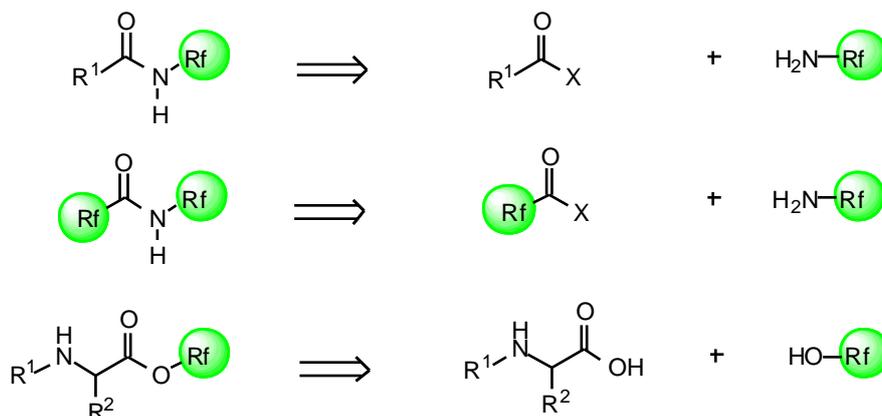
De confirmarse esta hipótesis, sería posible provocar la migración de un compuesto amídico (amida, péptido, urea, etc...) a una fase líquida fluorosa desde una fase sólida o incluso desde una disolución orgánica convencional no fluorosa mediante la simple adición de un ácido carboxílico perfluorado, sin recurrir a la formación de derivados covalentes marcados con largas cadenas fluoradas. También podría permitir realizar operaciones similares empleando compuestos amídicos con marcadores fluorosos covalentes mucho más reducidos que los empleados hasta la fecha. Finalmente, sería esperable que compuestos amídicos marcados con diferentes grados de fluoración tuviesen un comportamiento diferente frente a los ácidos perfluorados en medio fluoroso, abriendo el camino al desarrollo de procedimientos de purificación de amidas, péptidos, etc... mediante sencillas técnicas extractivas no cromatográficas.

1.1.3 Objetivos

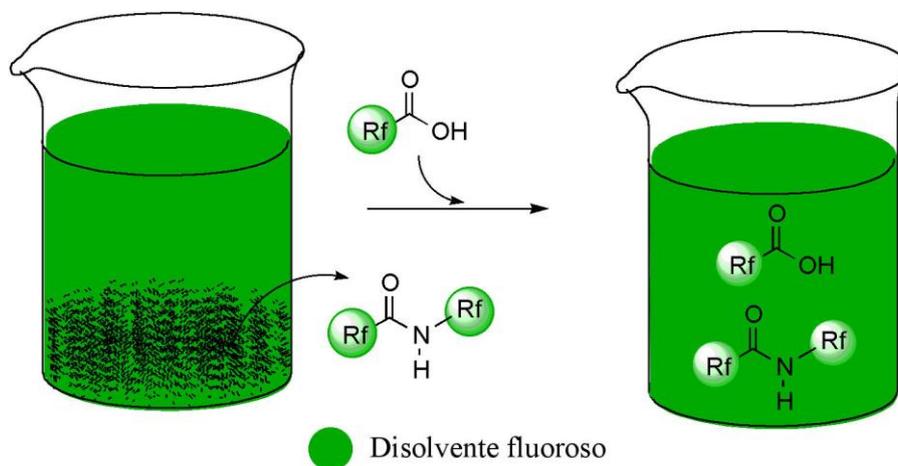
Para intentar confirmar experimentalmente la hipótesis antedicha e ilustrar su aplicabilidad como técnica de purificación extractiva en la síntesis de péptidos, nos

propusimos alcanzar los siguientes objetivos:

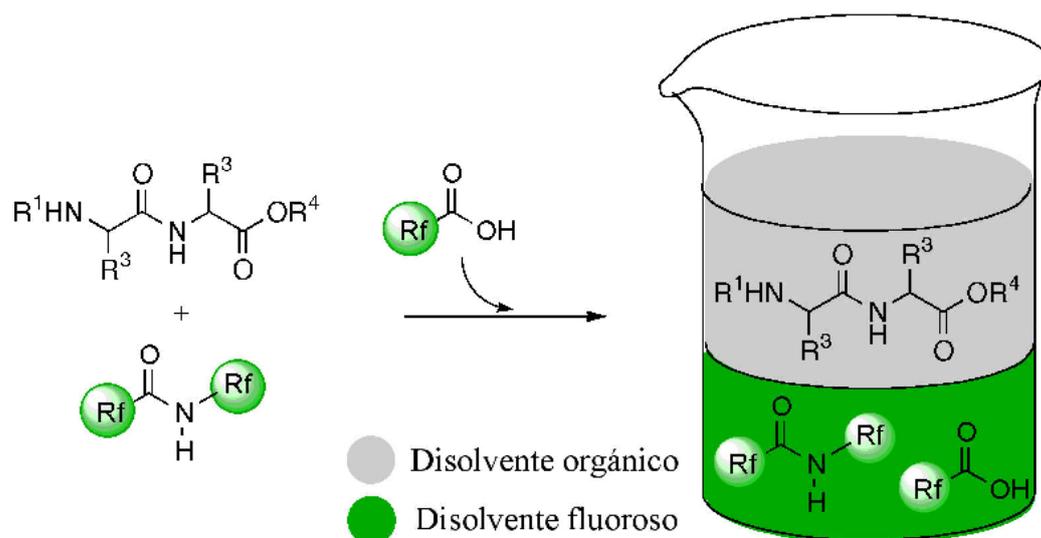
1.- Preparar una serie de amidas, aminoésteres, ureas y carbamatos de diferentes grados de fluoración mediante la introducción de una o dos cadenas fluorosas empleando reacciones sencillas de acilación de aminas o alcoholes perfluorados.



2.- Determinar gravimétricamente las solubilidades de los compuestos amídicos preparados en disolventes perfluorados tras la adición de cantidades variables de ácidos carboxílicos perfluorados. Asimismo, identificar los pares amida/ácido que presenten interacciones más estables y los grados de fluoración mínimos de los compuestos amídicos necesarios para que tengan lugar extracciones sólido/líquido y líquido/líquido de manera eficiente.



3.- Desarrollar un método de separación extractiva de los productos de una síntesis peptídica para ilustrar la formación de puentes de hidrógeno selectivos entre ácidos carboxílicos perfluorados y compuestos amídicos de diferente grado de fluoración.



4.- Llevar a cabo un estudio espectroscópico mediante técnicas de IR y RMN para intentar establecer con la mayor precisión posible la naturaleza de los puentes de hidrógeno amida/ácido en disoluciones fluorosas y orgánicas.

Resultados y Discusión

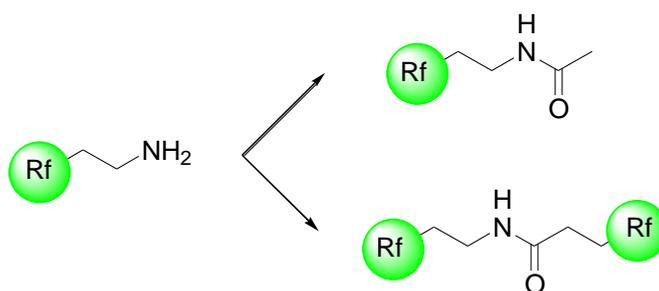
1.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.1 SOLUBILIZACIÓN DE COMPUESTOS AMÍDICOS, AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS EN MEDIOS FLUOROSOS MEDIANTE PUENTES DE HIDRÓGENO

1.2.1.1 Antecedentes y planteamiento

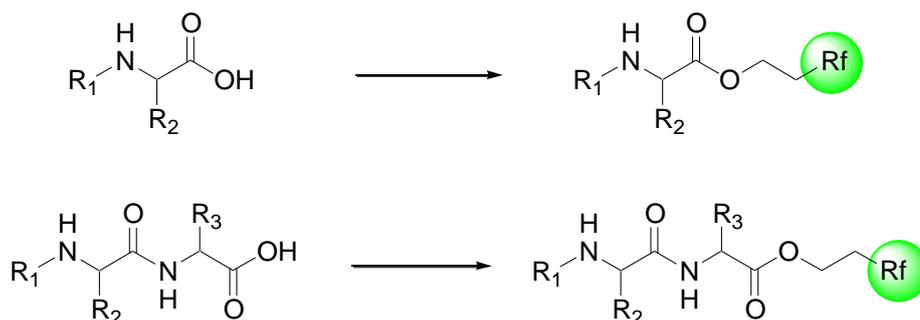
Para estudiar las posibles interacciones de puentes de hidrógeno entre un ácido carboxílico fluoroso y compuestos polares amídicos en medios apolares era necesario sintetizar compuestos modelos sencillos de diferente grado de fluoración y con distintos tipos de enlaces amida de forma que nos dieran una información clara y rápida de las interacciones estudiadas.

Primeramente planteamos sintetizar compuestos con un único enlace amídico, con una o dos cadenas fluoradas. Para ello pesamos acetilar una amina fluorada, o formar un enlace amídico entre un ácido fluoroso y una amina fluorada. Seleccionamos para ello la octilamina con 6 átomos de carbono perfluorados descrita por Cambon,²⁵ y acetilarla con anhídrido acético, o bien hacerla reaccionar con un ácido fluoroso con al menos dos metilenos espaciadores.

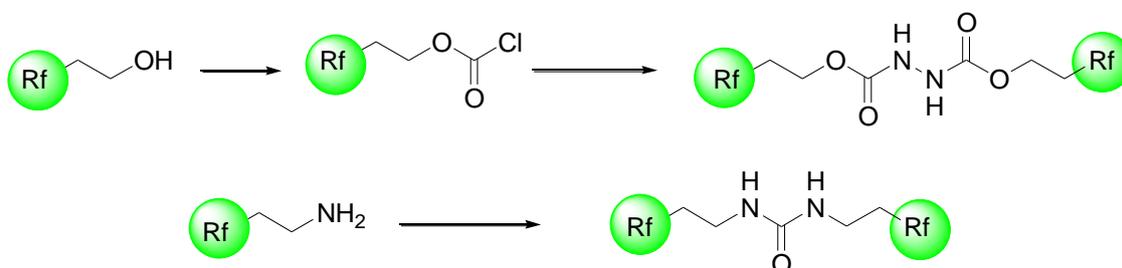


También planteamos la síntesis de aminoácidos con una cadena fluorosa mediante simple esterificación con un alcohol fluoroso comercial, o de un dipéptido para poder estudiar compuestos con más de un enlace amídico:

²⁵ H. Trabelsi, F. Szönyi, N. Michelangeli, A. Cambon, *J. Fluorine Chem.*, **1994**, 69, 115-117.



Por último nos planteamos sintetizar un derivado fluoroso de la hidracina a partir del cloroformiato correspondiente y una urea con dos cadenas fluorosas haciendo reaccionar una amina fluorosa con trifosgeno.



En todos los casos nos propusimos emplear cadenas fluorosas de tipo “ponytail” de 6 u 8 átomos de carbono fluorados con dos metilenos espaciadores para evitar una alteración excesiva de la electronegatividad de los grupos amida estudiados.

Por otra parte los criterios seguidos para seleccionar los ácidos carboxílicos fueron: a) la longitud de la cadena perfluorada para regular la afinidad por el medio fluoroso y b) la presencia o ausencia de espaciadores de metileno para regular la acidez del grupo carboxilo.



Finalmente, el disolvente fluoroso seleccionado fue el perfluorohexano.

Con este conjunto de amidas, péptidos y ácidos fluorosos pasaríamos a realizar los experimentos de solubilización de diferentes pares amida-ácido para evaluar cualitativamente mediante gravimetría el número mínimo de átomos de flúor necesarios para arrastrar los diferentes tipos de compuestos a la fase fluorosa, y de este modo

seleccionar aquellos susceptibles de tener aplicaciones prácticas en metodologías de purificación por extracción FBS.

1.2.1.2 Síntesis de compuestos amídicos polifluorados

Los diferentes compuestos amídicos indicados anteriormente fueron preparados de acuerdo con las reacciones mostradas en la Figura 1. 17:

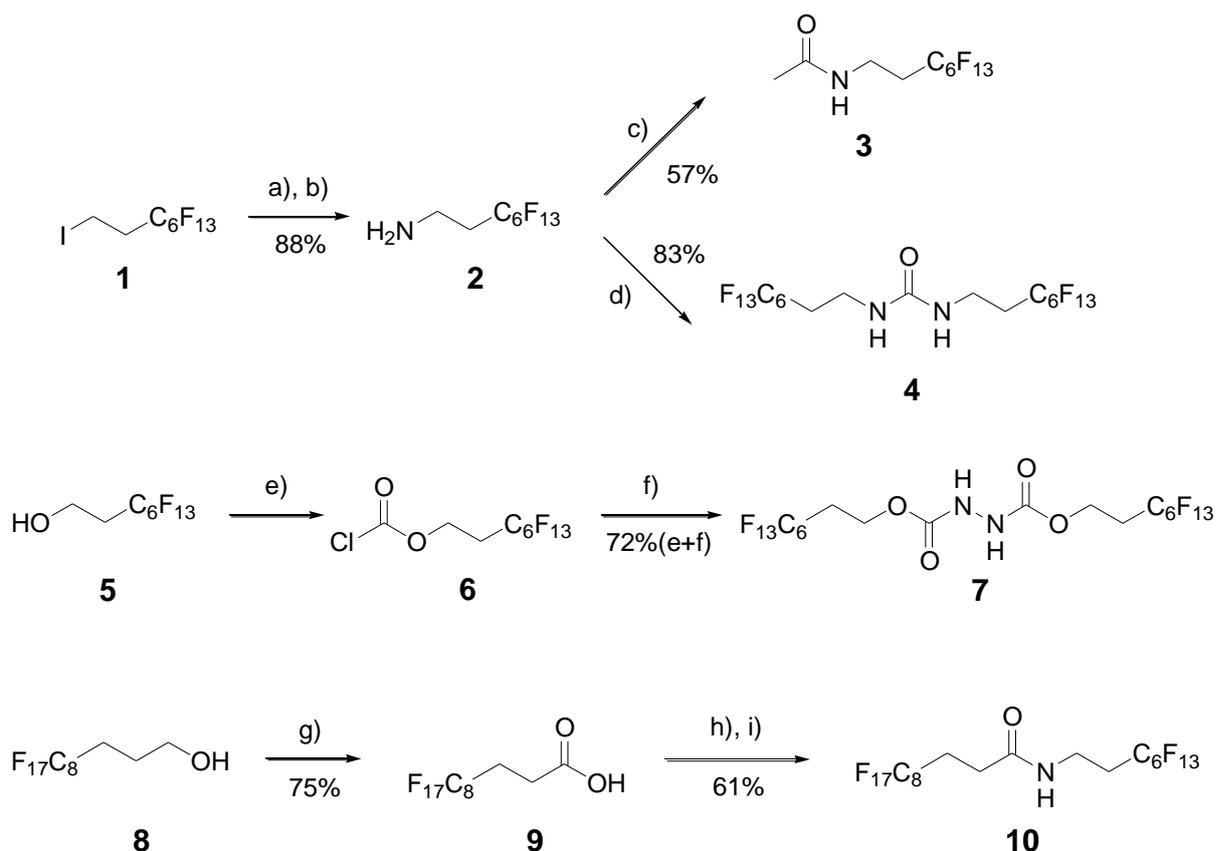


Figura 1. 17: a) NaN_3 (2 eq.), Aliquat 336 (0.05 eq.), H_2O , 90°C , 16h, b) Pd/C (20%), 10 atm., H_2 , Et_2O , 16h, c) Ac_2O (1.5 eq.), CH_2Cl_2 , t. a., 2h, d) $(\text{Cl}_3\text{CO})_2\text{CO}$ (2 eq.), NaOH (6 eq.), CH_2Cl_2 , 5 h, e) $(\text{Cl}_3\text{CO})_2\text{CO}$ (1.2 eq.), Piridina (1.07 eq.), CH_2Cl_2 , f) $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1 eq.), piridina (2 eq.), CH_2Cl_2 , 0°C -t.a., 16h g) NaIO_4 (4.1 eq.), $\text{RuCl}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ (cat.), $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{EtOAc}$, t.a., 2h h) $(\text{COCl})_2$ (1.4 eq.), DMF (cat.), CH_2Cl_2 , 0° - 20°C , 14h, i) $\text{F}_{13}\text{C}_6\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (1) (1 eq.), Et_3N (1.5 eq.), CH_2Cl_2 , 0°C - t.a., 16h.,

La síntesis de la amida **3** y de la urea **4** portadoras respectivamente de uno y dos grupos fluorados se llevaron a cabo a partir de la 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilamina **2**. Partiendo del yoduro de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo **1** se preparó en primer lugar la

correspondiente azida perfluorada con azida sódica y un agente de transferencia de fase mediante el método descrito por Cambron²⁵ y ésta se redujo con Pd sobre carbono en atmósfera de H₂. Una vez formada la amina perfluorada ésta se acetiló con anhídrido acético para dar el compuesto **3** con un rendimiento del 57% (cuyo espectro se muestra en la Figura 1. 18), o bien hacerla reaccionar con trifosgeno en medio básico para formar la urea **4**²⁶ cuyo espectro de masas dio un pico másico correcto de m/z = 753 (Peso molecular 752.24 Dalton).

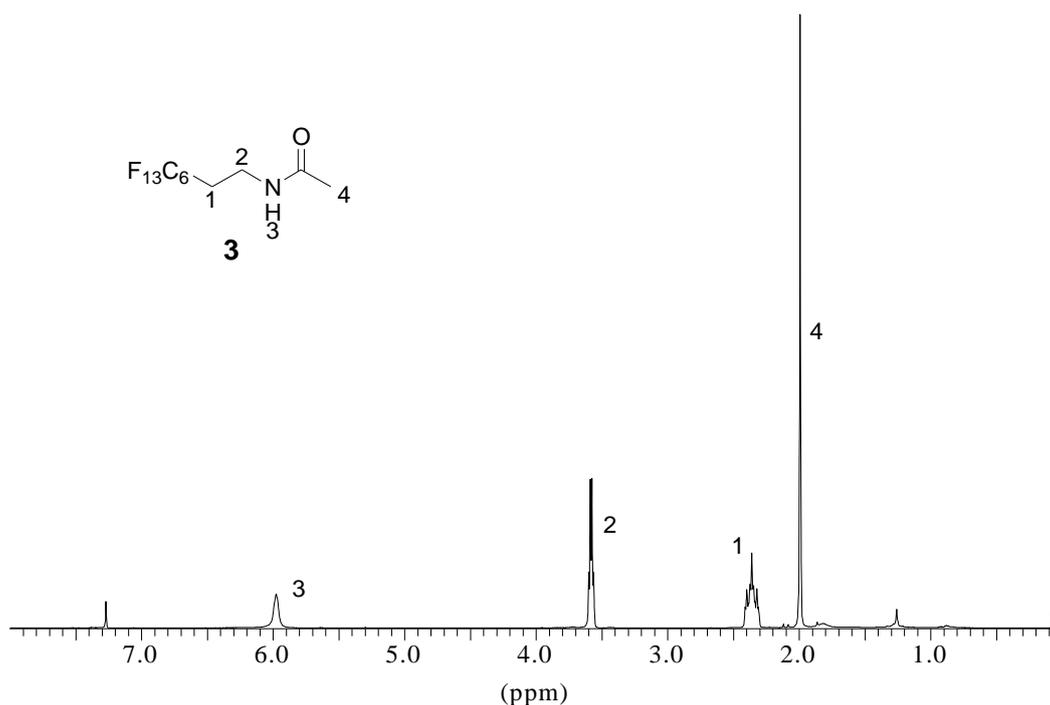


Figura 1. 18: Espectro de ¹H-RMN de la acetamida fluorosa **3** en CDCl₃.

El derivado de la hidracina **7** (cuyo espectro de ¹H-RMN en CDCl₃ se muestra en la Figura 1. 19, y cuyo espectro de masas dio el pico másico esperado m/z =812) se sintetizó con un rendimiento global del 72% formando el cloroformiato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo y haciéndolo reaccionar con hidracina.

Para poder sintetizar la amida con dos cadenas fluorosas fue necesario preparar un ácido fluoroso no comercial que tuviera metilenos espaciadores entre la cadena

²⁶ A. Correa, J-N Denis, A. E. Greene, *Synth. Commun.*, **1991**, 21, 1-9.

fluorosa y el ácido carboxílico **9**. Para ello se oxidó el alcohol **8** con peryodato sódico y tricloruro de rutenio, siguiendo el método descrito por Prashad.²⁷ De este modo se preparó el compuesto **10** haciendo reaccionar el cloruro del ácido 2H,2H,3H,3H-perfluoroundecanóico y la 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilamina en presencia de trietilamina. El espectro de ¹H-RMN en CDCl₃ mostró señales similares a los casos anteriores, apareciendo los dos multipletes correspondientes a los metilenos contiguos a las cadenas fluorosas a 2,4 y 2,5 ppm, un triplete a 2,5 ppm correspondiente al metileno situado junto al NH, y un cuadruplete a 3,62 ppm correspondiente al metileno unido al grupo carbonilo. El NH dio una señal a 5.9 ppm y en este caso también el pico másico obtenido en el espectro de masas fue el esperado (m/z = 837)

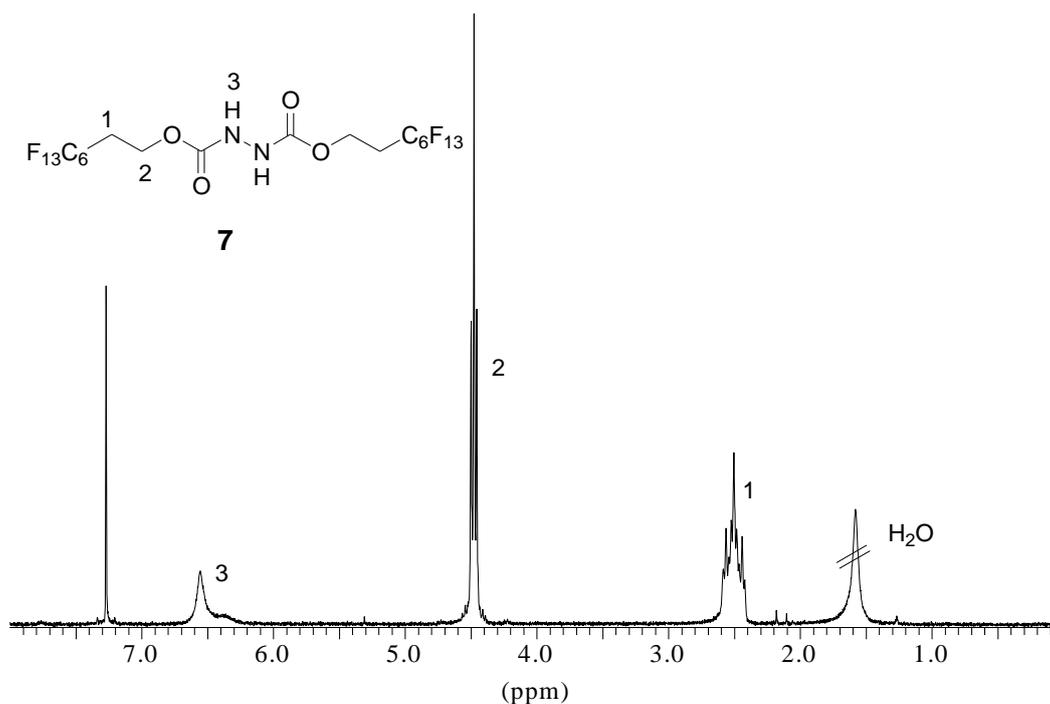


Figura 1. 19: Espectro de ¹H-RMN de la N,N'-dialcoxycarbonyl hidracina fluorosa **7** en CDCl₃.

²⁷ a) P. H. J. Carlsen, T. Katsuki, V. S. Martin, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 3936, b) M. T. Núñez, V. S. Martin, *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 1928-1932. c) M. Prashad, *Synth. Commun.*, **1999**, 29, 2937-2942.

Una vez preparados los compuestos amídicos más sencillos, pasamos a sintetizar los derivados de aminoácidos conteniendo una cadena fluorosa. En concreto, se seleccionaron la N-acetil-(L)-fenilalanina **13** y el dipéptido protegido N-acetil-(L)-valina-(L)-fenilalanina **14**.

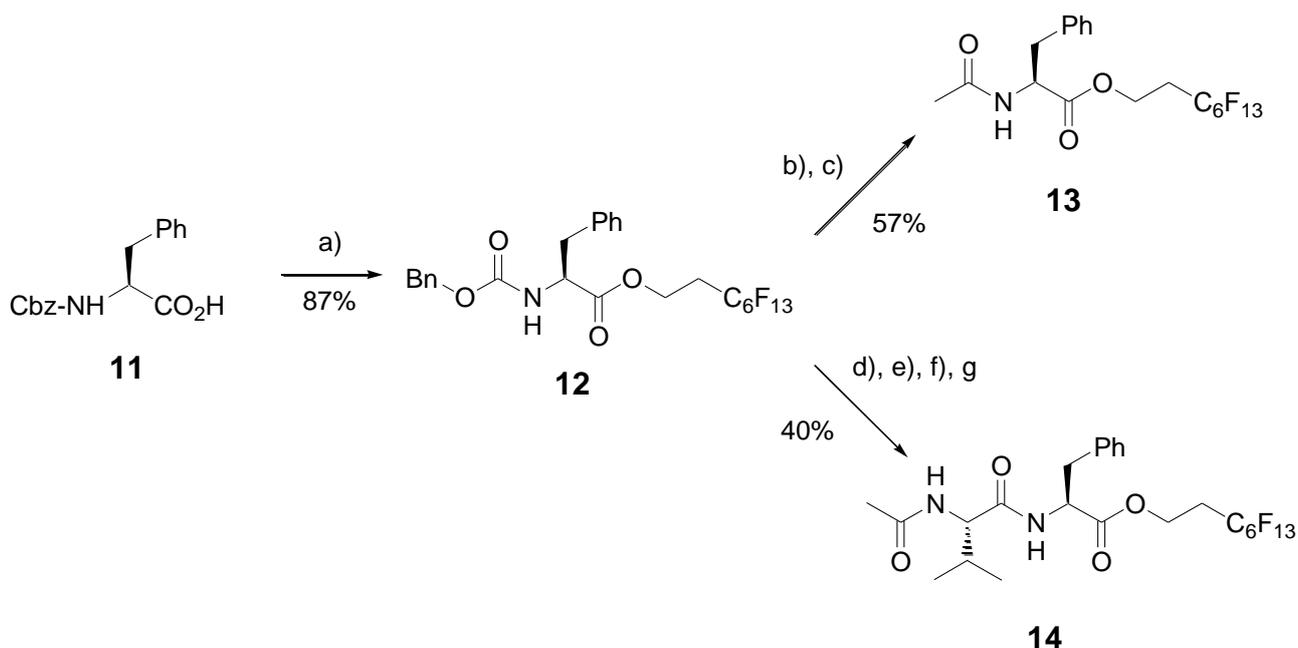


Figura 1. 20: a) EDC (1.4 eq.), HOBT (1 eq.), F₁₃C₆-C₂H₄-OH (1.1 eq.), CH₂Cl₂/DMF, t.a., 18h, b) H₂, 10% Pd/C, EtOH, t.a., 16h, c) AcCl (1.5 eq.), Et₃N (2 eq.), CH₂Cl₂, 0°C, 2h, d) H₂, 10% Pd/c, EtOH, t.a., 16h, e) Cbz-Val-OH (1 eq.), EDC (1.4 eq.), HOBT (1 eq.), CH₂Cl₂/DMF, t.a., 16h, f) H₂, 10% Pd/C, EtOH, t.a., 16h, g) Ac₂O (2 eq.), CH₂Cl₂, t.a., 2h.

Primeramente se esterificó la Cbz-(L)-fenilalanina **11** con 1H,1H,2H,2H-perfluorooctanol **5** utilizando el sistema clásico EDC/HOBT obteniéndose el éster fluoroso **12** con un 87% de rendimiento. Una vez desprotegido el carbamato bencílico por hidrogenolisis se obtuvo el aminoéster intermedio de modo cuantitativo. Su acetilación con cloruro de acetilo en medio básico dio lugar al producto **13** (cuyo espectro de ¹H-RMN se muestra a continuación), con un rendimiento del 57%, y su acoplamiento con Cbz-Val-OH proporcionó el dipéptido intermedio con un rendimiento del 91%, que tras una hidrogenolisis seguida de acetilación con anhídrido acético,

proporcionó el dipéptido deseado **14** con un rendimiento no optimizado del 44% (rendimiento global del 40%) (ver Figura 1. 22).

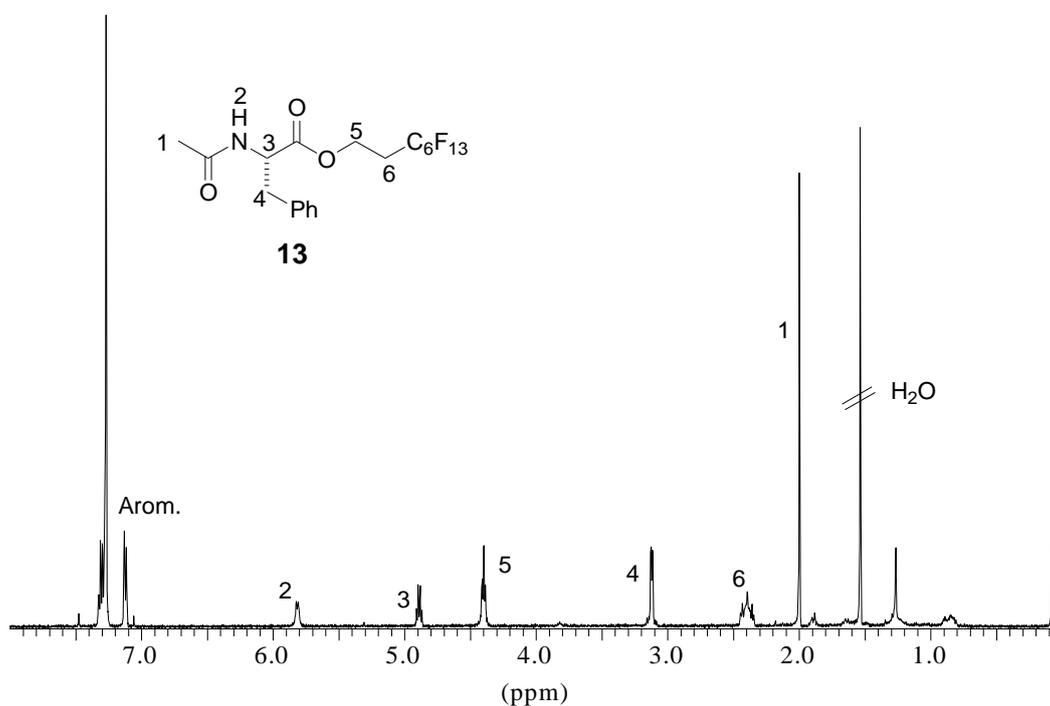


Figura 1. 21: Espectro de ¹H-RMN del éster fluoroso de la N-acetil-fenilalanina **13** en CDCl₃.

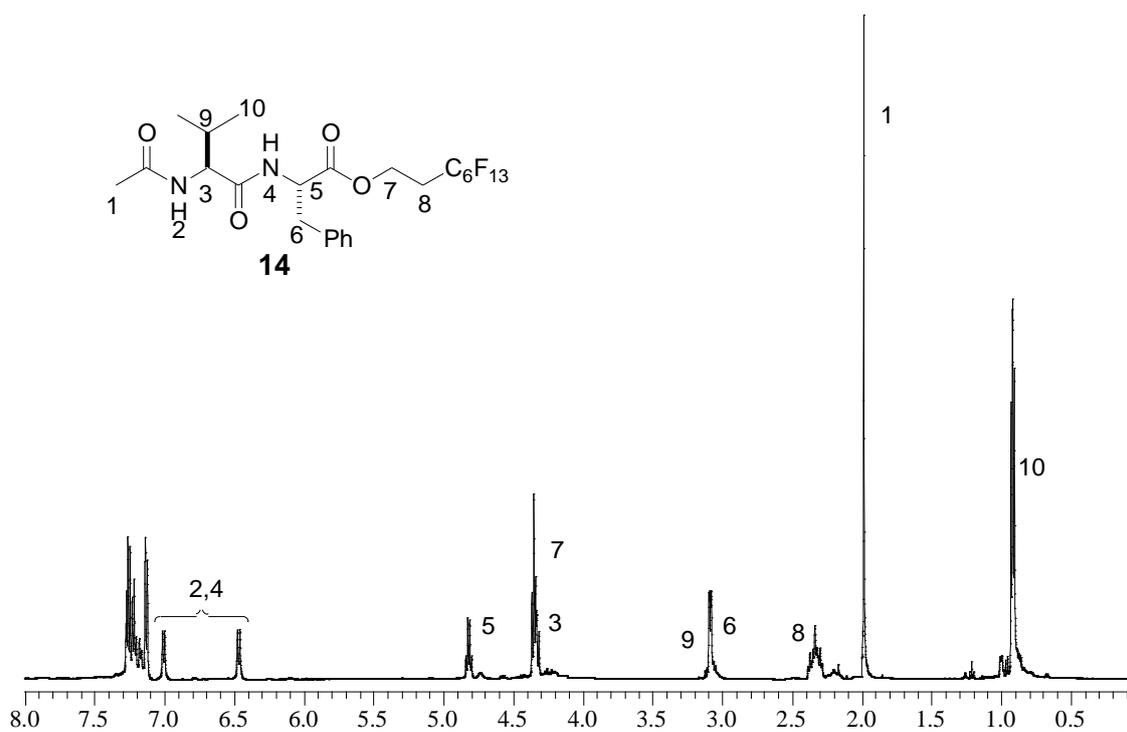


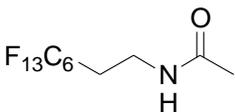
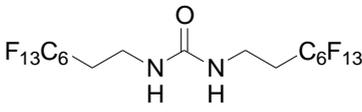
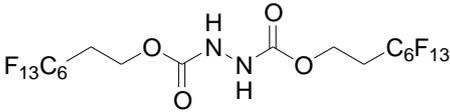
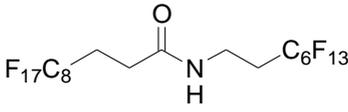
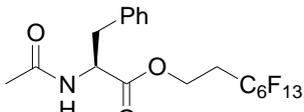
Figura 1. 22: Espectro de ¹H-RMN del dipéptido fluoroso **14** en CDCl₃.

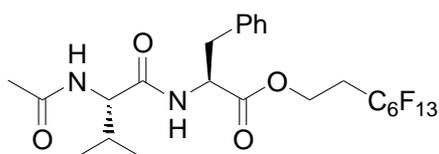
1.2.1.3 Estudios de solubilidad de compuestos amídicos y peptídicos en medios fluorosos

1.2.1.3.1 Determinación gravimétrica

Una vez sintetizados todos los compuestos se compararon sus solubilidades a 25°C en perfluorohexano y en diclorometano. La determinación se realizó por gravimetría de los residuos sólidos resultantes de evaporar volúmenes conocidos de disolución.

Tabla 1. 1 Solubilidad de los compuestos amídicos y péptidos

Compuesto	Disolvente	Solubilidad (%)	Solubilidad (M)
 <p style="text-align: center;">3</p>	C ₆ F ₁₄	0.8 %	3.2 x 10 ⁻² M
	CH ₂ Cl ₂	>20 %	> 7.0 x 10 ⁻¹ M
 <p style="text-align: center;">4</p>	C ₆ F ₁₄	0.1 %	2.2 x 10 ⁻³ M
	CH ₂ Cl ₂ ^a	0.3 %	6.6 x 10 ⁻³ M
 <p style="text-align: center;">7</p>	C ₆ F ₁₄	0.01 %	< 10 ⁻⁴ M
	CH ₂ Cl ₂	0.1 %	2.5 x 10 ⁻³ M
 <p style="text-align: center;">10</p>	C ₆ F ₁₄	1.4 %	2.8 x 10 ⁻² M
	CH ₂ Cl ₂	1.3 %	2.2 x 10 ⁻² M
 <p style="text-align: center;">13</p>	C ₆ F ₁₄	0.06 %	1.8 x 10 ⁻³ M
	CH ₂ Cl ₂	>28 %	7.0 x 10 ⁻¹ M

	C ₆ F ₁₄	0.01 %	< 10 ⁻⁴ M
	CH ₂ Cl ₂	> 26 %	> 7.7 x 10 ⁻¹ M

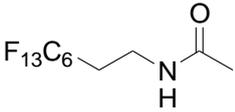
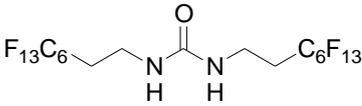
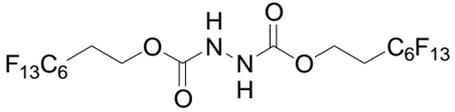
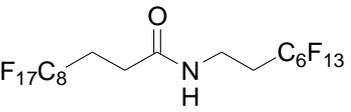
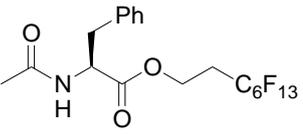
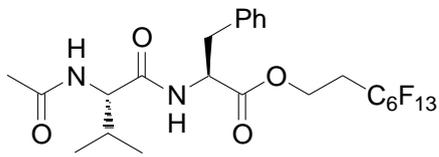
14

a) Sorprendentemente, la urea **4** resultó ser soluble en éter etílico y en un disolvente tan polar como el metanol, estas medidas no fueron cuantificadas.

Los compuestos con una única cadena fluorosa resultan ser unas 100 veces más solubles en diclorometano que en perfluorohexano (**3**, **13** y **14**). Sorprendentemente, los compuestos polares con dos cadenas fluorosas (**4**, **7** y **10**) resultaron ser muy insolubles en ambos disolventes. La escasa solubilidad de las amidas y péptidos fluorosos en perfluorohexano supuso una confirmación de la gran tendencia a la autoagregación que presentan dichas moléculas en medio fluoroso. En diclorometano, la autoagregación es mucho menor, y así, compuestos con una cadena fluorosa son completamente solubles. Compuestos con dos cadenas son lo suficientemente apolares como para no disolverse en diclorometano.

Para poder probar si nuestra hipótesis era cierta; es decir, si un ácido carboxílico perfluorado podía ser capaz de romper esta autoagregación y favorecer la solubilidad de compuestos con dos cadenas fluorosas en perfluorohexano, utilizamos un ácido carboxílico comercial: el ácido perfluoroheptanóico **15**. Seleccionamos este ácido ya que al no tener espaciadores, podría ser lo suficientemente fuerte como para poder dar puentes de hidrógeno con el grupo amida. Se midió por lo tanto la solubilidad de los mismos compuestos **3,4,7,10,13** y **14** en perfluorohexano añadiendo tantos equivalentes de ácido como grupos amida contuviera el compuesto en cuestión.

Tabla 1. 2: Solubilidad de los compuestos 3,4,7,10,13 y 14 en perfluorohexano en presencia de ácido perfluoroheptanóico (C₆F₁₃-CO₂H)

Compuesto	Eq. de ácido	Solubilidad en C ₆ F ₁₄ (M)
 <p style="text-align: center;">3</p>	1	> 0.1 M
 <p style="text-align: center;">4</p>	1	> 0.1 M
 <p style="text-align: center;">7</p>	2	0.08 M
 <p style="text-align: center;">10</p>	1	> 0.1 M
 <p style="text-align: center;">13</p>	1	> 0.1 M
 <p style="text-align: center;">14</p>	2	> 0.1 M

Los resultados obtenidos fueron asombrosos ya que una cantidad estequiométrica de ácido perfluoroheptanóico aumentó la solubilidad de las amidas, ureas, carbamatos y péptidos en todos los casos hasta en 1000 veces. Está claro que el

ácido perfluoroheptanóico es capaz de romper la autoagregación por completo, presumiblemente promoviendo puentes de hidrógeno heteromoleculares amida fluorosa/ácido fluoroso en lugar de los puentes homomoleculares responsables de la autoagregación e insolubilidad en medio fluoroso.

Visto que la inclusión de una única cadena fluorosa era suficiente para disolver aminoácidos en perfluorohexano, exploramos cualitativamente la solubilidad de diversos compuestos polares y próticos carentes de cualquier grupo fluoroso en perfluorohexano únicamente mediante la adición de tantos equivalentes de ácido perfluoroheptanóico como protones tuviese el aminoácido o péptido.

Tabla 1. 3: Ensayos de solubilización de derivados no fluorosos de aminoácidos y péptidos en perfluorohexano mediante adición de ácido perfluoroheptanóico^a

Compuesto	Eq. de ácido	Aspecto de la disolución
BOC-Phe-OMe ^b	0	Dispersión del producto por el tubo
	1	Disolución parcial
	2	Disolución total
	4	Disolución total
	10	Disolución total
H-Phe-OH	0	No se observan señales en el espectro
	2	Disolución parcial, se pueden ver señales en el espectro.
BOC-Phe-OH	0	No hay disolución
	2	Disolución parcial que da señales en el espectro.
H-Phe-OMe	0	El producto se dispersa por el tubo dando señales en el espectro, la disolución es turbia.
	2	Disolución total

CBZ-Ala-Phe-OMe	0	No se disuelve nada de producto
	3	Disolución parcial suficiente para adquirir espectro.
CBZ-Ala-Val-OMe	0	No se disuelve nada de producto
	3	Disolución total.
Pro-Leu-Gly-NH ₂	0	No se disuelve nada de producto
	4	Disolución total.

a) En todos los casos se intentó disolver 3 mg de aminoácido y ácido perfluoroheptanoico en 0.5 mL de disolvente. Los ensayos se efectuaron en un tubo de RMN y la solubilización se verificó por registro del espectro de ¹H-RMN. b) En el caso del éster metílico de la Boc-fenilalanina se fue aumentando la concentración del complejo con dos equivalentes de ácido y se llegó hasta una concentración 0.2 M del complejo.

En la tabla podemos ver cómo productos tan polares como los aminoácidos libres se disuelven en perfluorohexano con la adición de ácido perfluoroheptanoico. Para verificar la formación de disoluciones verdaderas se registraron espectros de ¹H-RMN empleando perfluorohexano como disolvente (ver apartado 1.2.1.3.2, pag. 41). Es tal la coordinación del ácido con los grupos amida que incluso compuestos tan polares como el neuropéptido melanostatina (Prolina-Leucina-Glicina) se llega a disolver en perfluorohexano, aunque en este caso fue necesario aplicar ultrasonidos durante 30 min.

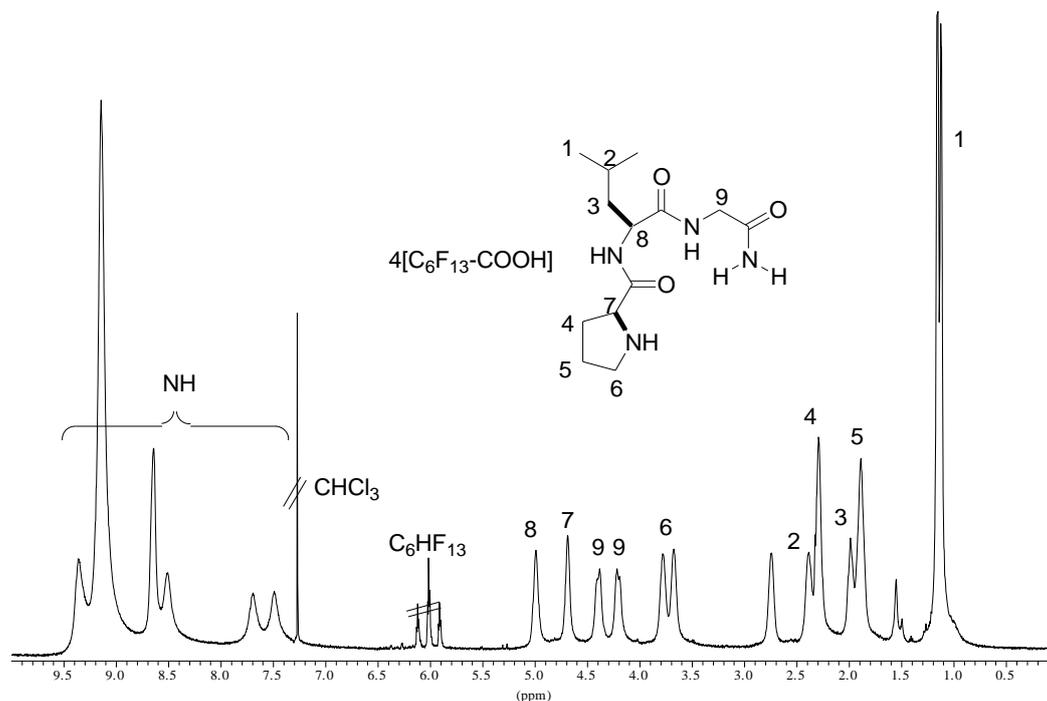


Figura 1. 23: Espectro ^1H -RMN de la melanostatina Pro-Leu-Gly-NH₂ (3 mg) en perfluorohexano con 4 eq. de ácido perfluoroheptanoico.

Vistos los resultados obtenidos, quisimos comprobar si la coordinación de compuestos amídicos con el ácido perfluoroheptanoico en perfluorohexano se mantenía al añadir un disolvente polar como el acetonitrilo o diclorometano. Para ello, se disolvieron las mezclas de amida y ácido perfluoroheptanoico en perfluorohexano y acetonitrilo y tras separar las dos fases y evaporar los disolventes a presión reducida, se adquirieron espectros de ^1H -RMN del residuo de cada fase. En los tres últimos casos de la tabla, al añadir acetonitrilo, tanto el péptido como el ácido pasaban completamente a la fase del acetonitrilo. Tras evaporar el perfluorohexano, no quedaba residuo alguno de péptido en la fase fluorosa. Para el caso del dipéptido de la alanina-valina, se realizó la misma prueba entre diclorometano y perfluorohexano. En la fase del diclorometano se encontró una mezcla de dipéptido y ácido. En la fase fluorosa sólo se detectó parte del ácido. Cuando se hizo la prueba en diclorometano y perfluorohexano con el derivado de hidracina **7**, el coeficiente de reparto entre ambas fases era de 90:10 (perfluorohexano: diclorometano) y para el caso de la urea el coeficiente de reparto entre perfluorohexano y diclorometano era de 99:1. En el caso de la urea también se midieron los coeficientes de reparto en otros disolventes, pero ninguno de ellos dio tan buenos resultados como con el diclorometano.

Tabla 1. 4: Coeficientes de reparto de la urea **4 y la hidracina **7** entre perfluorohexano y diferentes disolventes orgánicos en presencia de ácido perfluoroheptanóico**

<p>4</p>	<p>7</p>
[C ₆ F ₁₃ -CO ₂ H]	2 [C ₆ F ₁₃ -CO ₂ H]
P (C ₆ F ₁₄ /disolvente)	P (C ₆ F ₁₄ /disolvente)
99/1 (CH ₂ Cl ₂)	90/10 (CH ₂ Cl ₂)
83/17 (CHCl ₃)	
50/50 (THF (t.a.))	
66/34 (THF (0°C))	
90/10 (CH ₃ CN)	
Emulsión (DMF)	

Así pues, como conclusión de estos ensayos puede afirmarse que la coordinación del ácido perfluoroheptanóico con los compuestos amídicos sólo se da en un disolvente altamente apolar como es el perfluorohexano. Cuando se añade un disolvente polar, esta coordinación se rompe, a no ser que el compuesto amídico posea un gran número de grupos fluorosos.

Por último, se intentó extender el método de solubilización en medios fluorosos de moléculas polares mediante adición de ácido perfluoroheptanóico a compuestos no amídicos y para ello se ensayó la solubilidad de algunos compuestos carbonílicos y hidroxílicos sencillos en condiciones idénticas a las empleadas anteriormente con amidas y péptidos (Figura 1. 24).

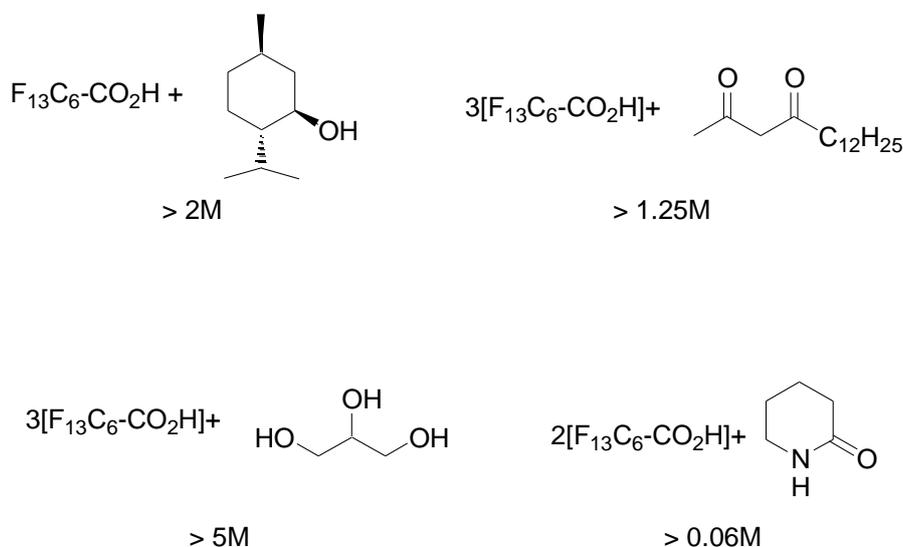


Figura 1. 24: Solubilidades de complejos de algunos compuestos comerciales con ácido perfluoroheptanóico en perfluorohexano.

En algunos de los casos estudiados se consiguieron concentraciones sorprendentes. El complejo formado por la glicerina y el ácido por ejemplo, era prácticamente miscible en perfluorohexano.

Aunque se estudiaron más ejemplos el estudio no fue lo suficientemente extenso como para obtener una regla general de la solubilización de los compuestos. Así, por ejemplo, la trietilamina se disuelve en perfluorohexano sin ácido a una concentración 0.06M, pero al añadir el ácido se forma la correspondiente sal que es totalmente insoluble en perfluorohexano. Por otra parte, mientras la glicerina es completamente soluble al añadir el ácido, los azúcares como la glucosa no lo son.

1.2.1.3.2 Verificación espectroscópica (RMN) de formación de disoluciones verdaderas

Para explorar cualitativamente las interacciones amida-ácido perfluoroheptanóico en perfluorohexano y poderlas comparar con los otros disolventes orgánicos, se pensó en realizar espectros de RMN en ambos medios. Como disolvente orgánico se seleccionó el cloroformo deuterado, por su similitud con el diclorometano, y perfluorohexano.

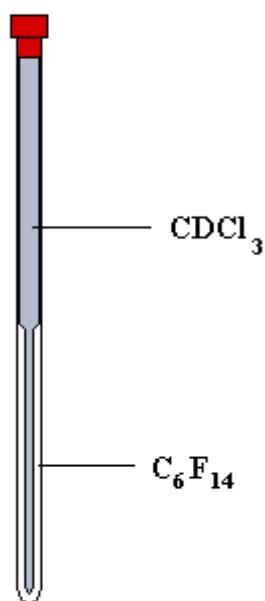


Figura 1. 25: Tubo doble utilizado para registrar los espectros ^1H -RMN en C_6F_{14}

Al ser el perfluorohexano un disolvente exento de deuterio se utilizaron tubos dobles (ver Figura 1. 25) para poder adquirir los espectros. El CDCl_3 servía simultáneamente para tener lock de deuterio y actuaba como referencia externa por la cantidad de CHCl_3 residual contenido en el disolvente deuterado comercial. De esta forma fue posible adquirir espectros en perfluorohexano sin la influencia de ningún otro disolvente.

A continuación se comparan los espectros ^1H -RMN del derivado de la fenilalanina (**13**) en cloroformo deuterado y perfluorohexano, tanto puros como tras la adición de ácido perfluoroheptanóico.

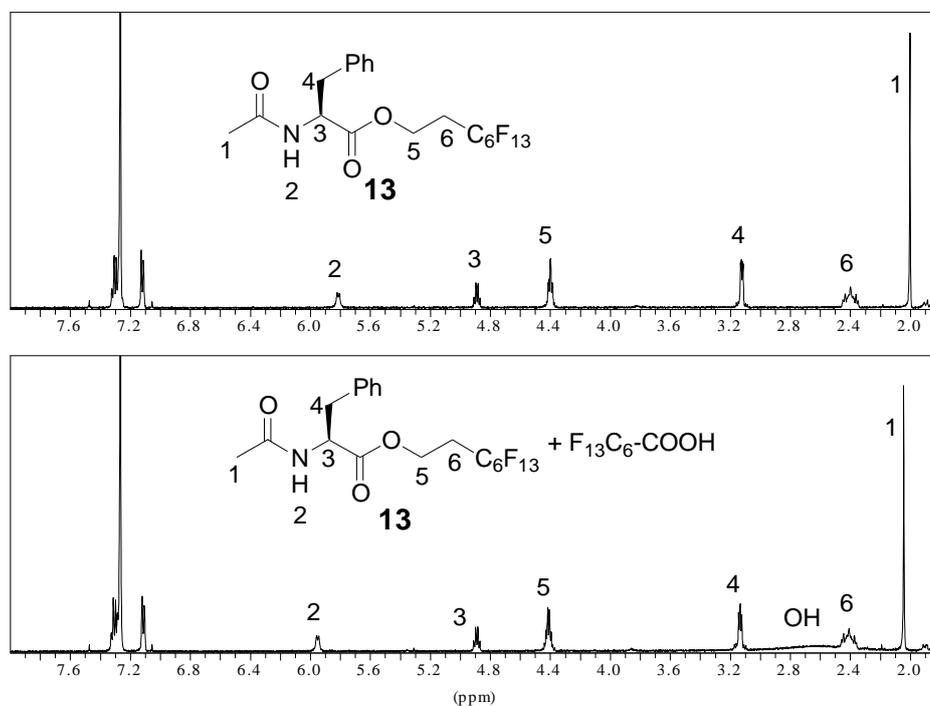


Figura 1. 26: Espectros del compuesto **13** sin y con ácido perfluoroheptanóico en CDCl_3 a concentración 1 mM.

Como se aprecia en los espectros, en cloroformo deuterado prácticamente no hay cambio al añadir el ácido. Sólo se desplaza ligeramente la señal del NH, y un poco también el metilo.

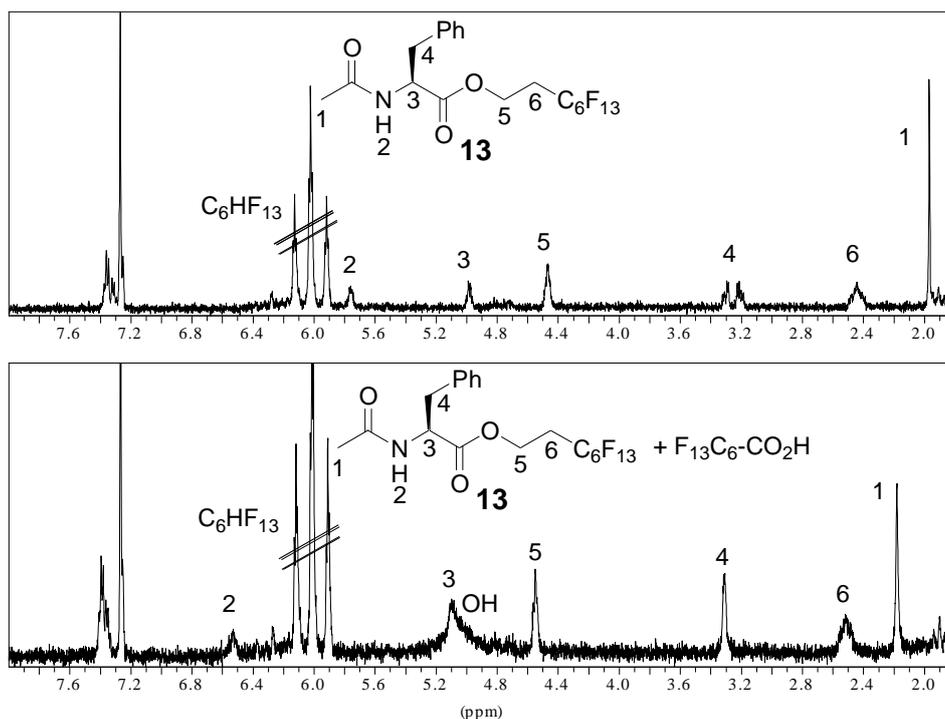


Figura 1. 27: Espectros del compuesto **13** con y sin ácido perfluoroheptanóico en perfluorohexano a concentración 1 mM. Como el perfluorohexano no es de grado espectroscópico contiene trazas de 1H-perfluorohexano que da un triplete a 6 ppm.

Cuando el mismo experimento se adquiere en perfluorohexano, el NH se desplaza de 5.8 ppm a 6.6 ppm, las señales del metileno bencílico de la fenilalanina se desdoblán sin ácido y colapsan con ácido. El metilo también se desplaza en 0.2 ppm. Así pues, todo parece indicar que la asociación de **13** con el ácido es dependiente del disolvente y que es más intensa en perfluorohexano.

Para intentar esclarecer si el NH amídico de **13** tenía un efecto determinante en la solubilidad por interacción con ácido perfluoroheptanóico, preparamos el análogo N-metilado **20** (Figura 1. 28). Además, al comparar estos dos compuestos pensamos que podríamos distinguir si la coordinación que se daba era doble o no.

El compuesto **20** se sintetizó de acuerdo con la secuencia de la Figura 1. 28:

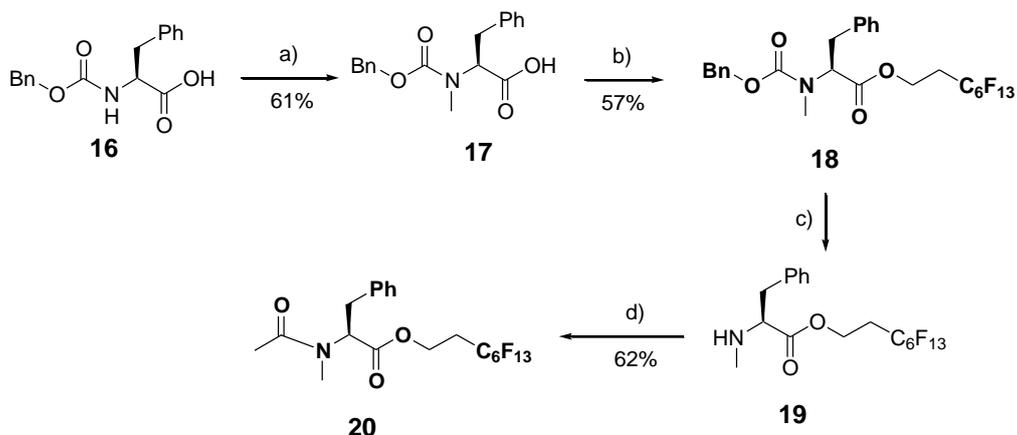


Figura 1. 28: Esquema sintético del (S)-2-(N-acetil-N-metilamino)-3-fenilpropionato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo **20**. a) MeI (8 eq.), NaH (3 eq.), THF, 0°C-t.a., 24h, b) EDC (1.4 eq.), HOBT (1 eq.), F₁₃C₆-CH₂-CH₂-OH (1.1 eq.), CH₂Cl₂, DMF, t.a., 18h, c) Pd/C (10%), H₂, EtOH, t.a., 3h, d) Ac₂O (2 eq.), CH₂Cl₂, 0°C, 2h

Primero se adquirieron los espectros de disoluciones 3 mM del N-metilaminoéster **20** en cloroformo deuterado, tanto puro como conteniendo un equivalente de ácido perfluoroheptanóico.

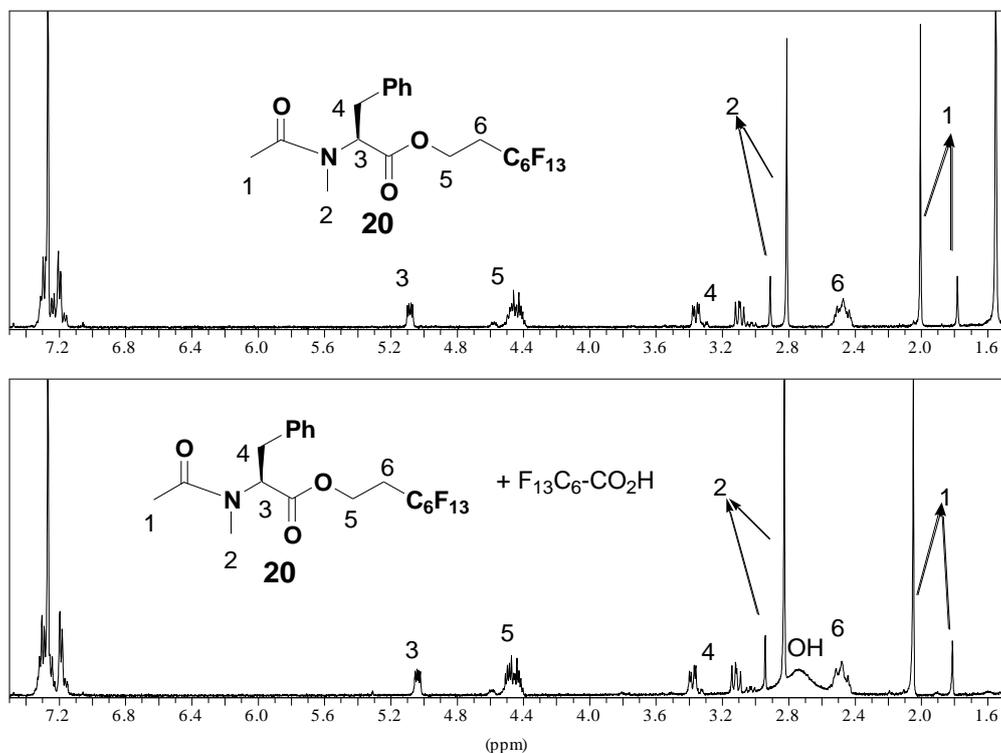


Figura 1. 29: Espectro del compuesto **20** con y sin ácido perfluoroheptanóico en CDCl₃, la concentración en ambos tubos es 3mM.

En ambos espectros se aprecian los dos conformeros de **20** en torno al enlace amídico en una proporción aproximada de 6:1. Como la concentración de uno de ellos es baja sólo se observan bien los dos metilos, aunque el resto de las señales también se llegan a apreciar. El hecho de añadir ácido perfluoroheptanóico no perturba en nada la forma del espectro y no parece que interaccionen el ácido y el N-metilaminoéster.

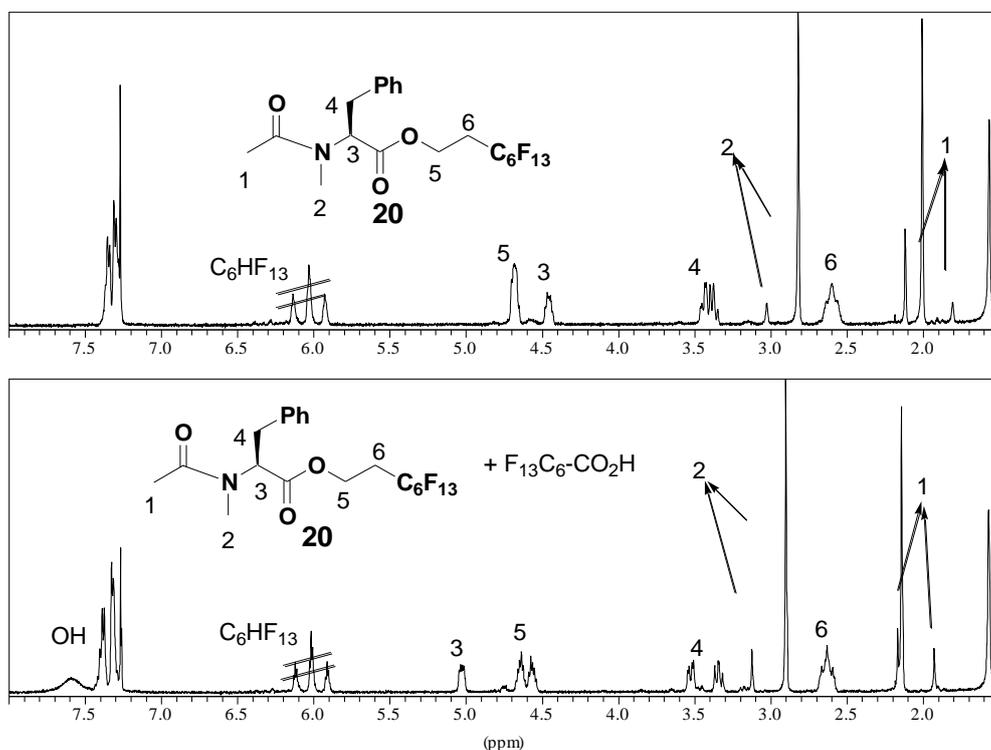


Figura 1. 30: Espectro ^1H -RMN del compuesto **20** con y sin ácido perfluoroheptanóico en perfluorohexano (3mM).

Cuando se registraron los espectros en perfluorohexano se apreció una diferencia entre el compuesto **13** y el compuesto **20**. Como era de esperar en perfluorohexano la solubilidad del compuesto **20** era mucho mayor puesto que al estar el nitrógeno amídico alquilado se impide la autoagregación.

El cambio observado en el espectro ^1H -RMN al añadir el ácido perfluoroheptanóico resultó hasta cierto punto inesperado. En especial el cambio experimentado por las señales del metino (H-3) y del metileno (H-4) de la fenilalanina. El metino se desapantalla 0.5 ppm, y las señales del metileno al contrario que en el espectro del compuesto **13**, se separan más (Figura 1. 27). Está claro que en este caso también hay coordinación con el ácido. Teniendo en cuenta las señales perturbadas,

parece que la coordinación en este caso se da por el carbonilo del éster. En el caso del compuesto **13**, la señal del metino se desplaza mucho menos (menos de 0.2 ppm) y el metileno colapsa. En ese caso parece que la coordinación se da por el carbonilo amídico.

Estas primeras aproximaciones, aunque sólo sea cualitativamente, nos dieron una idea clara de lo fuerte que podían llegar a ser las interacciones de puentes de hidrógeno en medios fluorosos. En el caso de compuestos con dos cadenas fluorosas, sobre todo en el caso de la urea perfluorada **4**, el compuesto pasaba de ser prácticamente insoluble en perfluorohexano a disolverse en concentraciones superiores a 0.1M. Además, la interacción era suficiente para poder arrastrar la urea por completo a la fase fluorosa en una extracción líquido-líquido con diclorometano como disolvente orgánico.

1.2.2 SÍNTESIS PEPTÍDICA FLUOROSA ASISTIDA POR LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS AMIDA-ÁCIDO PERFLUORO-ALCANÓICO

1.2.2.1 Antecedentes y plantamiento

Dados los resultados obtenidos en las pruebas de solubilización, pensamos aplicar el método para la purificación de productos en la síntesis de compuestos polares en medios fluorosos. Nosotros optamos por un tipo de reacción en la que el reactivo pudiera ser reutilizado y que no fuera tan nefasto en términos de economía de átomo. Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos en la extracción de la urea con ácido perfluoroheptanóico en perfluorohexano podríamos aplicarlo como método de extracción en síntesis peptídica en medios fluorosos utilizando la carbodiimida fluorosa correspondiente como reactivo.

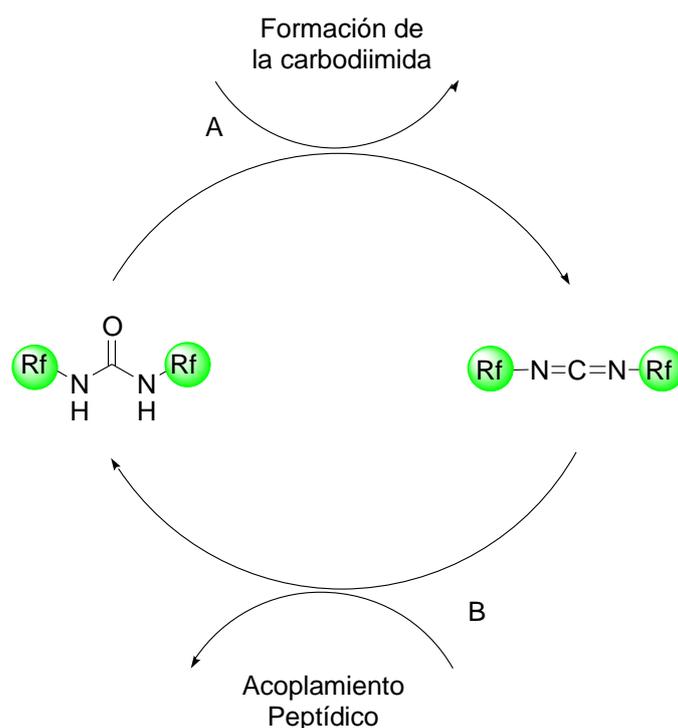


Figura 1. 31: A) Transformación de una urea fluorosa en carbodiimida, B) Utilización de la carbodiimida en síntesis peptídica

Las carbodiimidas son reactivos muy versátiles que se utilizan en gran variedad de reacciones²⁸ como agentes deshidratantes. En estas ocasiones la urea generada tras la reacción no es fácil de purificar y es necesario utilizar cromatografía para separarla de los productos de reacción. Este es el caso de la dicitclohexilcarbodiimida (DCC) o la diisopropilcarbodiimida (DIC). En síntesis peptídica, por ejemplo, al utilizar la DCC, una vez terminada la reacción se forma dicitclohexilurea. Aunque ésta es insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos y se elimina mediante filtración, siempre suelen quedar restos de urea que es necesario purificar por cromatografía.²⁹

²⁸ Algunas revisiones sobre carbodiimidas: a) R. Kurzer, K. Douraghi-Zadeh, *Chem. Rev.*, **1967**, 67, 107-152. b) A. Williams, I. T. Ibrahim, *Chem. Rev.*, **1981**, 81, 589-636. c) M. Mikolajczyk, P. Kielbasinski, *Tetrahedron*, **1981**, 37, 233-284.

²⁹a) Durante las últimas décadas se han comercializado carbodiimidas cuyas ureas permiten ser purificadas mediante lavado acuoso: J. C. Sheehan, J. J. Hlavka, *J. Org. Chem.*, **1956**, 21, 439-441. b) Rapoport sintetizó una carbodiimida cuya urea se hidroliza en medios ligeramente ácidos: F. S. Gibson, M. S. Park, H. Rapoport, *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 7503-7507.

Nosotros planteamos utilizar medios fluorosos donde inmovilizar la urea una vez terminada la reacción. Además, en este caso, al recuperar la urea se podía volver a transformar en carbodiimida.³⁰ La reacción aun no siendo catalítica, permite la reutilización del sustrato fluoroso, con lo que no tenemos que sintetizar los sustratos fluorosos para cada reacción.

En cuanto a la reactividad se refiere, está descrito que la reactividad de las carbodiimidas en la formación de enlaces peptídicos aumenta si se lleva a cabo en micelas.³¹ Así Ranganathan ha descrito reacciones de acoplamiento peptídico en isooctano, añadiendo una pequeña cantidad de agua (2%) y un tensoactivo para formar micelas (ver Figura 1. 32). Al formar micelas de agua en el medio de reacción, se favorece la orientación de las cadenas apolares de los reactivos hacia el disolvente orgánico, en la parte exterior de la micela, y los grupos polares quedan en la interfase entre el isooctano y el agua. Como se muestra en la Tabla 1. 5, el efecto produce un aumento de la reactividad y de los rendimientos.

Tabla 1. 5: Comparación de rendimiento obtenidos en síntesis peptídica en condiciones micelares con condiciones normales de reacción

Dipéptido	Reactivo de condensación	Rdto. Condiciones micelares	Rdto. Condiciones normales
Cbz-Phe-Leu-OMe	DODCI ^a	64	14
Cbz-Trp-Trp-OMe	DCC ^b	60	11

a) Dioctadecil carbodiimida b) dicitclohexilcarbodiimida

³⁰ C. Palomo, R. Mestres, *Synthesis*, **1981**, 373-374.

³¹ R. Ranganathan, G. P. Singh, S. Ranganathan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 1144-1145.

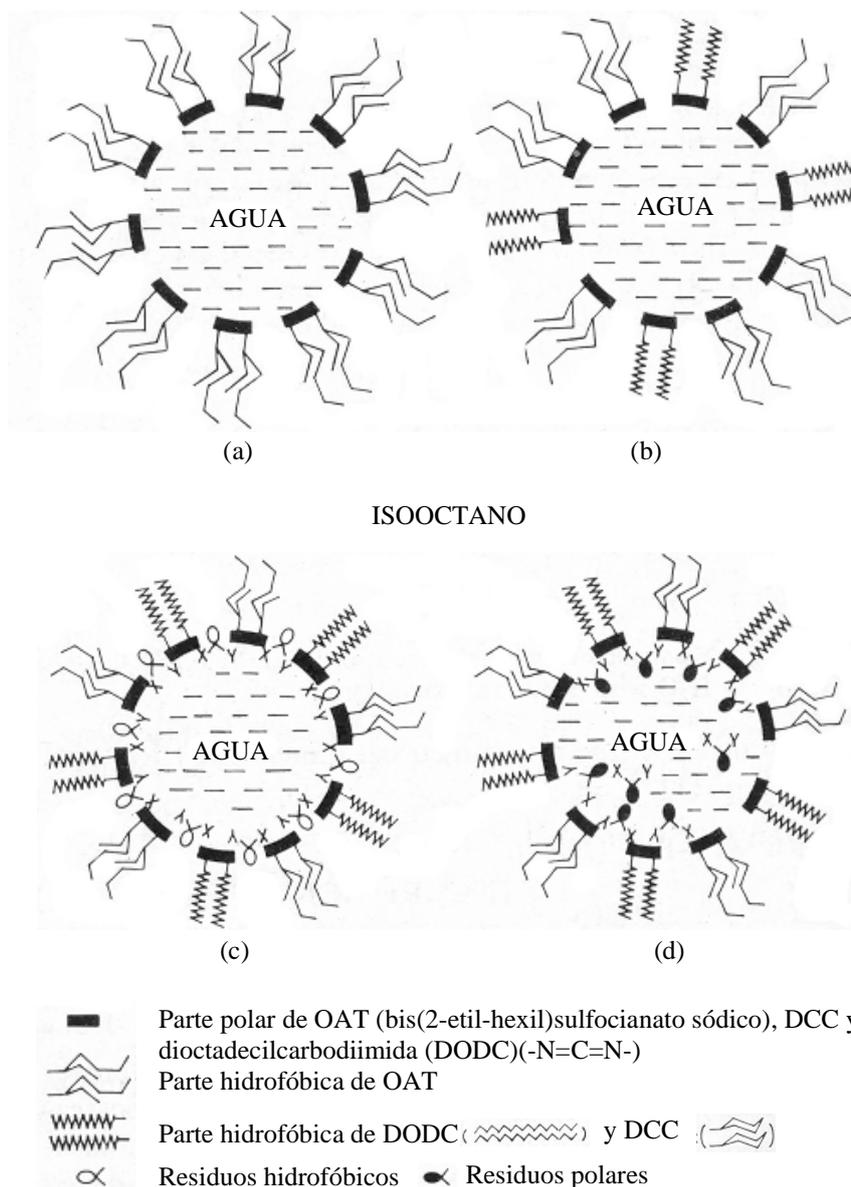


Figura 1. 32: Ilustración esquemática del posible estado de micelas en la síntesis peptídica. a) Orientación del tensoactivo, b) Orientación de la carbodiimida alrededor de las micelas, c) reacción con aminoácidos apolares, d) reacción con aminoácidos polares.

Nosotros pensamos que puede ocurrir algo similar entre los disolventes fluorosos y orgánicos. Aunque no se lleguen a formar micelas, si la reacción se produce en la interfase, las cadenas fluorosas de la carbodiimida pueden favorecer que la parte reactiva de la molécula quede más expuesta. Por otro lado, al ser un medio muy apolar, pensamos que la parte polar de las moléculas puede agruparse, y así ser un medio conveniente para este tipo de reacciones.

Nuestro planteamiento consistió en emplear una carbodiimida fluorosa (Rf-NH-CO-NH-Rf) y realizar reacciones de deshidratación (por ejemplo, síntesis peptídica) en

sistemas bifásicos de acuerdo al esquema de la Figura 1. 33. La adición de ácido carboxílico fluoroso tras la reacción podría permitir una mejor separación de los subproductos fluorosos (urea, etc.) debido al incremento de cadenas perfluoradas al formarse un complejo urea-ácido.

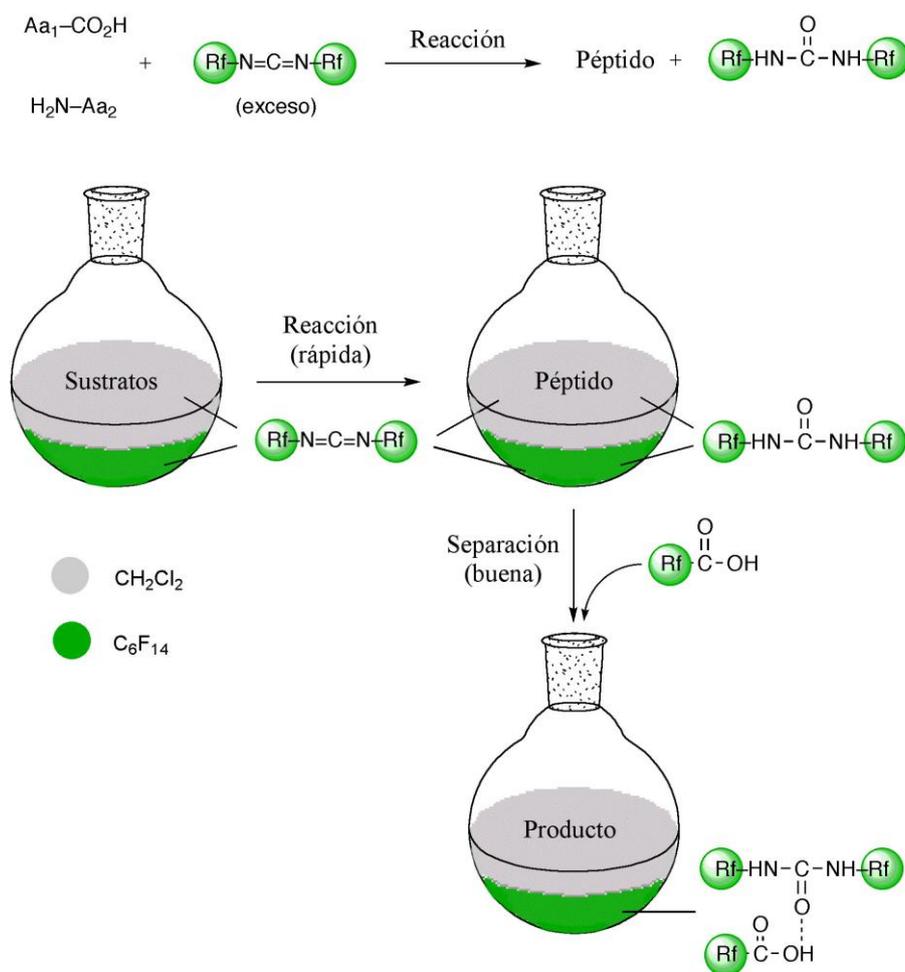


Figura 1. 33: Síntesis peptídica con carbodiimida fluorosa. La purificación asistida mediante formación de complejos con ácido perfluorado permite llevar a cabo la reacción de acoplamiento peptídico de forma rápida con un reactivo fluoroso “ligero” manteniendo al mismo tiempo una buena separación.

Antes de sintetizar la carbodiimida idónea y probar la reactividad de ésta, pensamos sintetizar diferentes ureas con mayor y menor número de átomos de flúor, y probar también la solubilidad y coeficientes de partición de éstas con diferentes ácidos perfluorados de cadena más larga y con metilenos espaciadores entre la cadena fluorosa y el grupo ácido.

1.2.2.2 Síntesis de ureas y ácidos perfluoroalcanóicos

Vistos los resultados obtenidos en la solubilización de compuestos amídicos y péptidos con ácido perfluoroheptanóico en perfluorohexano no parecía obvia la determinación del número mínimo de átomos de flúor que debía tener una urea polifluorada para poder ser arrastrada por completo a la fase fluorosa. Para realizar un optimización de este factor sintetizamos la ureas **26**, **27**, **28** y **29** (Figura 1. 34) conteniendo un número variable de cadenas fluorosas y grados de fluoración. También se consideró estudiar el efecto de ácidos carboxílicos polifluorados diferentes del ácido perfluoroheptanóico en la formación de complejo urea/ácido. Con estos datos se seleccionaría el par idóneo y se sintetizaría la carbodiimida fluorosa correspondiente. La síntesis de ureas fluorosas se llevó a cabo a partir de los yoduros **21** y **22**. En el caso de la urea **28** el yoduro de partida no es comercial y hay que prepararlo a partir del alcohol correspondiente con el complejo formado por el trifenilfosfito y yoduro de metilo.³² Además, el yoduro que se obtiene así como el resto de derivados son muy volátiles y es difícil obtener buenos rendimientos. En el caso de la urea **27**, se sintetizó a partir de la amina comercial, cuyo punto de ebullición era inferior a 40° C.

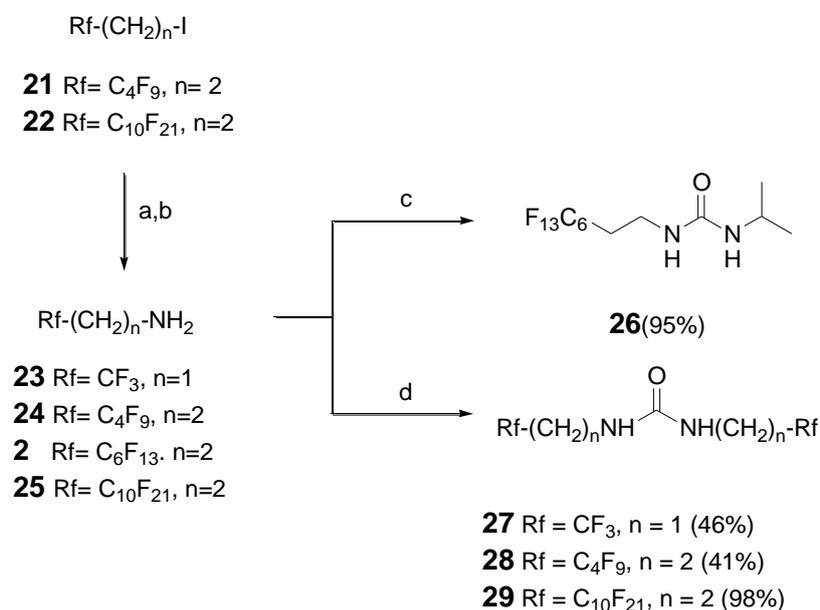


Figura 1. 34: a) NaN₃ (2 eq.). Aliquat 336 (0.05 eq.), H₂O, 90° C, 16h. b) Pd/C (20%), 10 atm. H₂, Et₂O, 16h. c) ⁱPrN=C=O (0.9 eq.), CH₂Cl₂. d) (Cl₃CO)₂C=O (2 eq.), NaOH (6N), CH₂Cl₂, 5h.

³² J. P. H. Verheiden, J. G. Moffatt, *J. Org. Chem.*, **1970**, 35, 2319-2326.

La urea asimétrica **26**, se sintetizó a partir de la amina **2** e isocianato de isopropilo. Las ureas simétricas al igual que la **4**, se sintetizaron con trifosgeno en medio básico de NaOH (6M, aq.) y diclorometano. Los espectros de las ureas **28** y **29** eran muy similares a los de la urea **4**. La urea de cadena larga **29** no pudo ser purificada correctamente debido a su insolubilidad en todos los disolventes probados (MeOH, éter etílico, diclorometano, tolueno, trifluorotolueno, perfluorohexano, perfluorooctano...) por esta razón sólo pudo ser analizado por ^1H -RMN en MeOD en el que se disolvían trazas del compuesto. El resto de las ureas, además de dar espectros coherentes de ^1H -RMN, proporcionaron el pico másico esperado en sus espectros de masas.

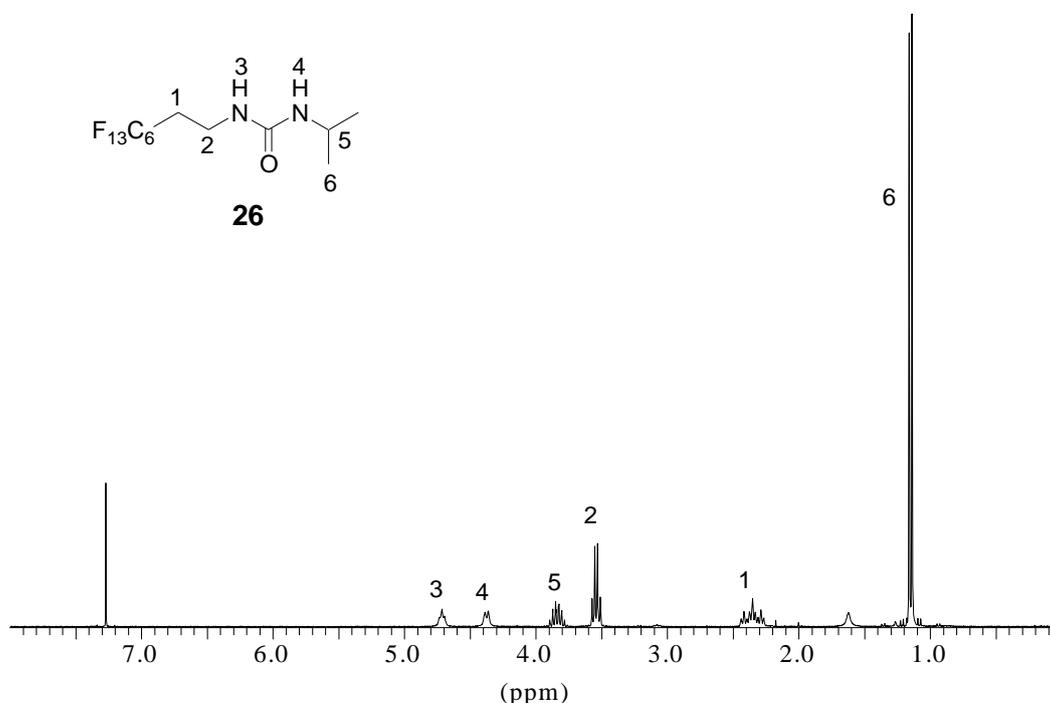


Figura 1. 35: Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) de la urea fluorosa **26**.

En cuanto a los ácidos se estudiaron dos completamente perfluorados y comercialmente asequibles, el ácido perfluoroheptanóico **15** y el ácido perfluorooctadecanóico **30**. También se estudiaron otros dos con espaciadores de metileno, el ácido 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanóico **9** que ya había sido sintetizado

anteriormente, y el ácido 1H,1H-perfluorooctanóico **31**, que al igual que el ácido **9** también se obtuvo mediante oxidación del alcohol comercial correspondiente.

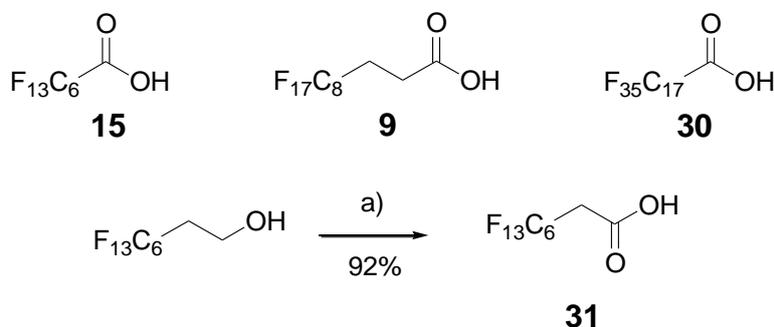
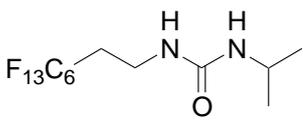
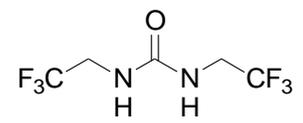
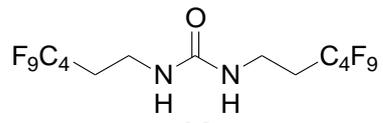
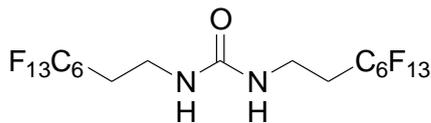
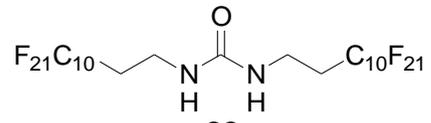


Figura 1. 36: Ácidos fluorosos empleados en los ensayos de formación de complejos urea/ácido carboxílico: a) NaIO₄ (4.1 eq.), RuCl₃·H₂O (cat.), H₂O/CH₃CN/EtOAc, t.a., 2h

1.2.2.3 Coeficientes de reparto de los complejos urea-ácido

Las solubilidades y coeficientes de reparto de las ureas con los ácidos se midieron por gravimetría siguiendo los mismos procedimientos que los descritos en el apartado 1.2.1.3 (pag. 32). En todos los casos, excepto en el de la N,N'-bis(1H,1H,2H,2H-perfluorohexil) urea, la urea no se llegaba a disolver completamente, así que las mezclas se filtraron, se separaron las fases, y se determinó la concentración en cada fase una vez evaporado el disolvente. Fue sorprendente la alta solubilidad de la urea **28** en perfluorohexano que teniendo menos átomos de flúor superaba el valor de la urea **4**. Al contrario de las otras, la urea **28** presentaba un aspecto mucho más cristalino.

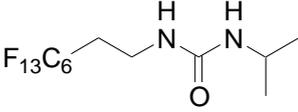
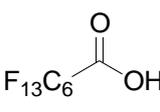
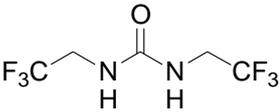
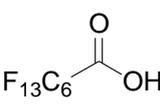
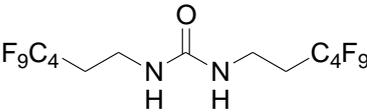
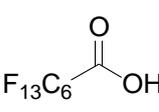
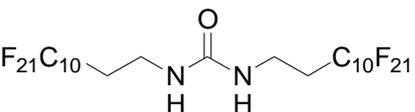
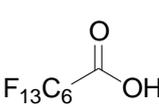
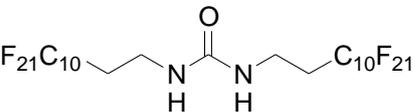
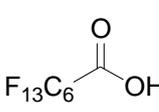
Tabla 1. 6: Solubilidad de las ureas sintetizadas en diclorometano y perfluorohexano

Urea	Solubilidad en CH ₂ Cl ₂ (mg/mL)	Solubilidad en C ₆ F ₁₄ (mg/mL)
 <p>26</p>	30	4
 <p>27</p>	2	0
 <p>28</p>	16	123
 <p>4</p>	5	1.5
 <p>29</p>	4	8

a) Como en los anteriores, se preparó una disolución de 0.5 mmol en 2 mL de diclorometano y 2 mL de perfluorohexano, no se comprobó si su solubilidad era mayor.

Comenzamos el estudio con diferentes ureas empleando el ácido perfluoroheptanóico **15**, como coordinante (ver Tabla 1. 7).

Tabla 1. 7: Coeficiente de reparto de las ureas con ácido perfluoroheptanoico entre C_6F_{14} y CH_2Cl_2

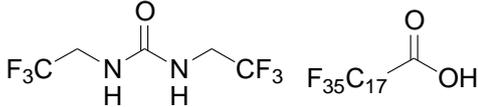
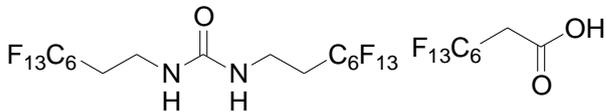
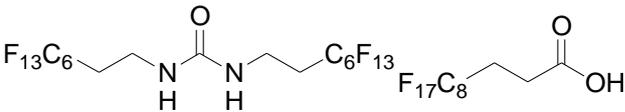
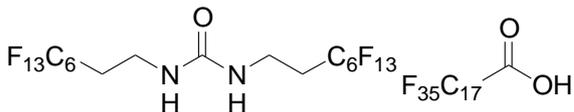
Urea + 15	Coeficiente de reparto (C_6F_{14}/CH_2Cl_2)
 26-15	 60/40
 27-15	 77/23 ^a
 28-15	 96/4
 29-15	 Emulsión ^b
 4-15	 99/1

a) 0.5 mmol de complejo se solubilizaron en 4mL de cada disolvente. b) Se forma una emulsión porque la urea no se llegó a disolver y no se pudo medir el coeficiente de reparto.

En el caso de la urea asimétrica **26**, se observó que una única cadena fluorosa no era suficiente para llevar el complejo **26·15** a la fase fluorosa. Sin embargo el efecto del ácido perfluoroheptanóico **15** resultaba evidente ya que la urea **26**, prácticamente insoluble en perfluorohexano, se solubiliza por completo al añadir el ácido y con un reparto mayor en la fase fluorosa. La solubilidad de la N,N'-bis(2,2,2-trifluoroetil)urea **27** también aumenta al añadir el ácido perfluoroheptanóico y el complejo resultante **27·15** se disuelve preferiblemente en la fase fluorosa, pese a que la urea sólo tiene 6 átomos de flúor. Los mejores resultados se obtuvieron con las ureas de 8 y 12 carbonos perfluorados. Vista la solubilidad de la urea **28** (Tabla 1. 6) sin añadir ácido esperábamos que proporcionara mejores resultados que la **4**; sin embargo, su coeficiente de reparto resultó ser ligeramente menor. Por último, en el caso de la urea de cadena larga **29**, se formó una emulsión entre las dos fases, probablemente porque la urea no se llegó a solubilizar completamente.

Así pues, seleccionamos la urea **4** como idónea para formar complejos urea-ácido perfluorocarboxílico estables en perfluorohexano y pasamos a estudiar diferentes ácidos para ver el efecto de los espaciadores y de la longitud de las cadenas fluorosas sobre dicha estabilidad (ver Tabla 1. 8).

Tabla 1. 8: Coeficientes de reparto entre C₆F₁₄ y CH₂Cl₂ de las ureas **27 y **4** con diferentes ácidos carboxílicos fluorosos**

Urea + ácido	Coeficiente de reparto (C ₆ F ₁₄ /CH ₂ Cl ₂)
 <p style="text-align: center;">27-30</p>	83/17 ^a
 <p style="text-align: center;">4-31</p>	98/2
 <p style="text-align: center;">4-9</p>	95/5
 <p style="text-align: center;">4-30</p>	Emulsión

a) Pese a que el coeficiente de reparto es bueno, la solubilidad de la urea **27** en ambas fases es muy baja, alrededor de 10mg/mL en la fase fluorosa.

En el caso del ácido de cadena larga **30**, la solubilidad no era buena y el complejo tendía a formar emulsiones. Este resultado fue similar al observado cuando se utilizó la urea de cadena larga **29** (Tabla 1. 7). En cuanto al efecto de los espaciadores se refiere, el coeficiente de reparto bajaba con su presencia, aunque no demasiado.

Entre todos los casos estudiados, nos pareció que el par formado por la urea **4** y el ácido perfluoroheptanóico **15** era el que mejores coeficientes de reparto daba y por esta razón se seleccionó la urea **4** para la síntesis de la correspondiente carbodiimida.

Aunque la urea **28** también proporcionó buenos coeficientes de reparto, su síntesis daba peores rendimientos, probablemente debido a su volatilidad (PE). El ácido perfluoroheptanóico **15** tenía la ventaja adicional de ser comercial.

1.2.2.4 Síntesis peptídica con purificación extractiva fluorosa

Para verificar experimentalmente la propuesta de síntesis peptídica “fluorosa” indicada en el apartado 1.2.2.1 (Figura 1. 33; pag. 50) pasamos a sintetizar la N,N'-bis(1H,1H,2H,2H-perfluorooctil)carbodiimida **32** derivada de la urea **4** (Figura 1. 37) y a emplearla como agente deshidratante en reacciones de acoplamiento peptídico y esterificación. El hecho de que la carbodiimida **32** pueda obtenerse a partir de la urea **4** es particularmente interesante porque permite su reutilización. La carbodiimida se preparó de manera cuantitativa mediante el método de Palomo y Mestres (ref. 30, pag. 48) y se purificó mediante extracción FBS directamente de la mezcla de reacción.

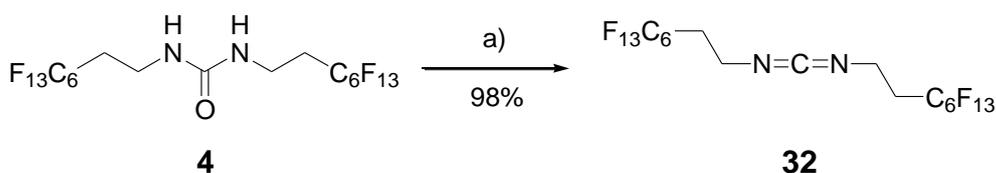


Figura 1. 37: a) $\text{PPh}_3 \cdot \text{Br}_2$, Et_3N , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_6\text{F}_{14}$, 16h, t.a.

La carbodiimida **32** mostró un espectro de ^1H -RMN muy similar al de la urea **4**, pero el triplete correspondiente a los metilenos unidos al nitrógeno aparecía ligeramente desplazado y desaparecía la señal del NH. El espectro de masas dio un pico de masa atómica 735, correspondiente a $[\text{M}+1]$, y el espectro de infrarrojo mostró la banda característica de carbodiimida a 2134 cm^{-1} .

La reactividad de la carbodiimida bajo condiciones FBS con extracción posterior de urea con ácido perfluoroheptanóico se ensayó en dos reacciones: a) la síntesis de péptidos y b) la formación de ésteres *terc*-butílicos (ver tablas 1.8 y 1.9).

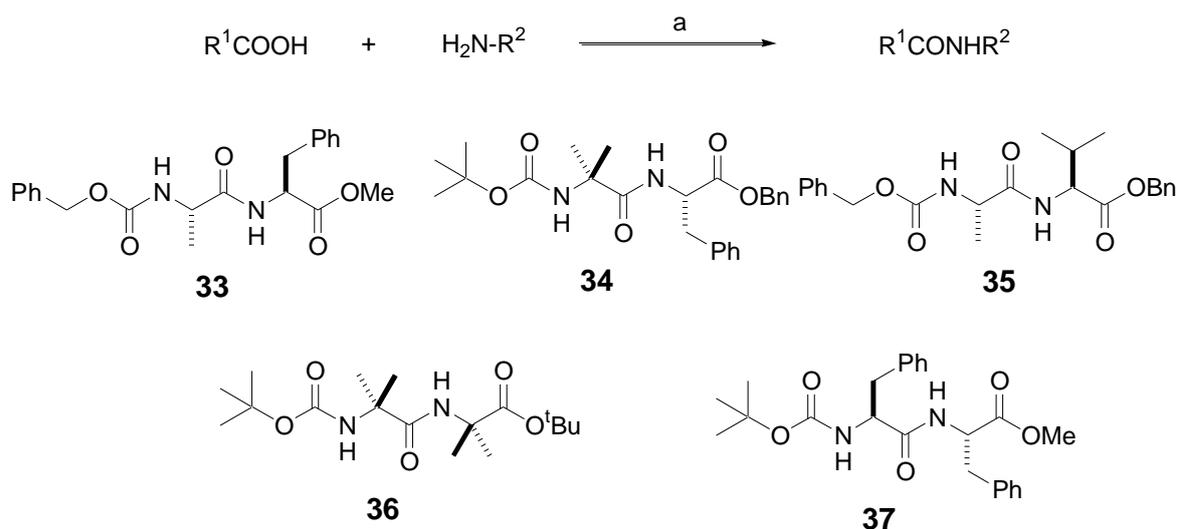


Figura 1. 38: a) $F_{13}C_6CH_2CH_2N=C=NCH_2CH_2C_6F_{13}$ (1.2 eq.), CH_2Cl_2 , C_6F_{14} , $20^\circ C$, 24 h. En algunos casos se han utilizado HOAT o DMAP como aditivo.

Tanto los dipéptido **33-37** como los ésteres **38** y **39** fueron seleccionados por el impedimento estérico relativamente importante que presentan. En particular, resultó destacable la obtención del péptido Boc-Aib-Aib- O^tBu **36** con un 73% de rendimiento, cuando es conocido que bajo condiciones habituales péptidos análogos proporcionan rendimientos mucho menores³³

Tabla 1.8: Reacciones de acoplamiento peptídico promovidas por la carbodiimida **32 en condiciones FBS**

Producto	Rdto. (%)	Aditivos	P. F. ($^\circ C$)	$[\alpha]^{25}$	
				Exp. (dis.)	Lit.
33	81		100-101	-9.0 (EtOH)	-8.3 ³⁴
34	85		94-95	+5.1 (CH_2Cl_2)	
35	85		82-84	-27.9 ($CHCl_3$)	-30.8 ³⁵

³³ E. Frerot, J. Coste, A. Pantaloni, M. N. Dufour, P. Jouin, *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 259-270.

³⁴ F. G. Gibson, M. S. Park, H. J. Rapoport, *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 7503-7507.

36	50		Aceite	-	-
36	73	0.2 eq. DMAP	Aceite	-	-
36	46	1 eq. HOBT	Aceite	-	-
37	40		121-123	-11(MeOH C=0.88)	-13.7 (MeOH, 27) ³⁶
37	76	1 eq. HOBT	121-123		

Todas las reacciones de acoplamiento se llevaron a cabo con 1 eq. de amina y 1 eq. de carbodiimida **32**.

En algunos casos, se observó un incremento del rendimiento mediante la adición de aditivos tales como 4-(N,N-dimetilamino)piridina (DMAP) ó 1-hidroxibenzotriazol (HOBT).

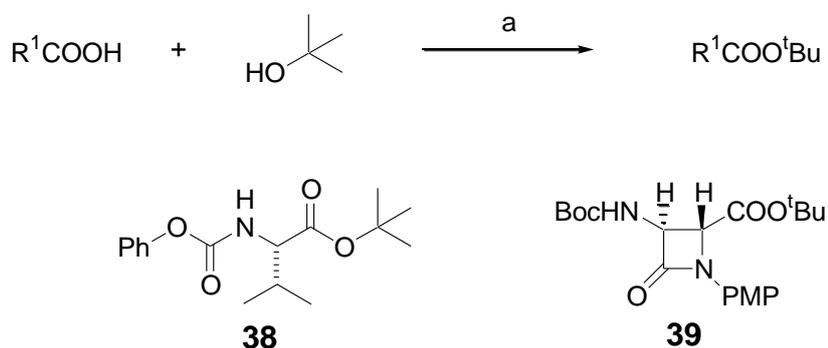


Figura 1. 39: a) HO^tBu (1.1 eq.), DMAP (0.1 eq.), **6** (1.1eq)

Tabla 1.9: Reacciones de formación de ésteres *tert*-butílicos promovidas por la carbodiimida **32**

³⁵ J. Dudash, J. Jiang, S. C. Mayer, M. M. Joullié, *Synth. Commun.*, **1993**, 23, 349-356.

³⁶ S. Chen, J. Xu, *Tetrahedron. Lett.*, **1992**, 33, 647-650.

Producto	Rdto. (%)	Aditivos	P. F. (°C)	[α] ²⁵	
				Exp. (dis.)	Lit.
38	85	0.1 eq. DMAP	Aceite	-21.5 (EtOH)	-23 ³⁷
39	95	0.1 eq. DMAP	55-56	+37.2 (CH ₂ Cl ₂)	

Las reacciones de formación de ésteres *terc*-butílicos se realizaron con 1.1 eq. de *terc*-butanol y 1.1 eq. de carbodiimida **32**, el resto de aditivos es indican en la tabla.

Los crudos de las reacciones de acoplamiento peptídico se purificaron mediante lavados con una disolución de ácido perfluoroheptanóico en perfluorohexano, y una tercera vez con perfluorohexano para eliminar la urea, y con lavados ácidos y básicos acuosos para eliminar los excesos de amina y ácido que no habían reaccionado Figura 1. 40).

³⁷ P. Chavallet, P. Garrouste, B. Malawska, J. Martínez, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 7409-7412.

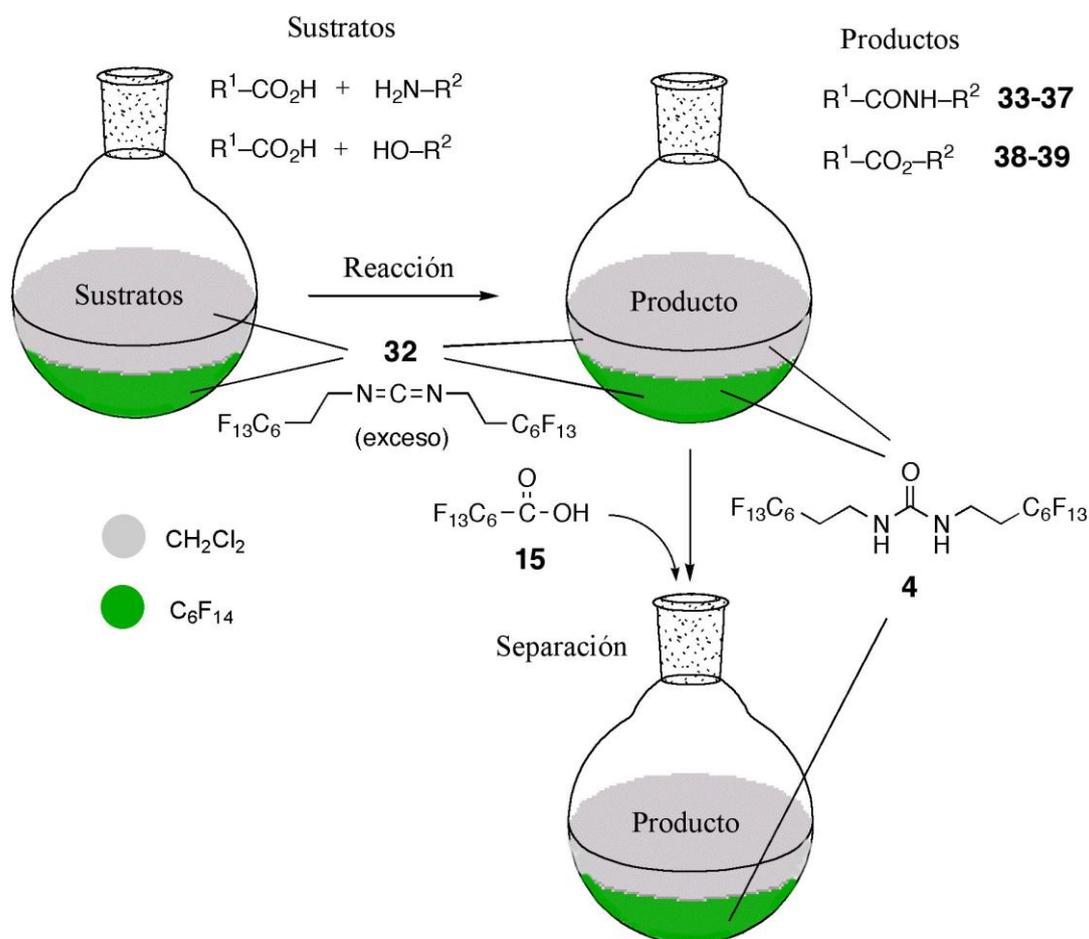


Figura 1. 40: Esquema de síntesis y purificación de los compuestos **33-39**.

En el caso de haber utilizado algún aditivo como la 4-(N,N-dimetilamino)piridina (DMAP), o el HOBT (1-hidroxibenzotriazol) se adicionó simultáneamente la disolución fluorosa y la acuosa ácida, para evitar que los aditivos pasaran a la fase fluorosa por reaccionar con el ácido perfluoroheptanóico. En el caso de la formación de los ésteres *tert*-butílicos para eliminar la DMAP se trataba la reacción mediante una extracción trifásica. Para poder separar la urea **4** del ácido perfluoroheptanóico de cara a reutilizar la primera, se intentó primeramente lavado con una disolución saturada en bicarbonato que no dio buenos resultados ya que no se obtenía la urea completamente pura. Por ello se optó por destilar el ácido a presión reducida desde una mezcla de **4** y **15** (ver Figura 1. 41). De este modo se consiguió recuperar un 98% del ácido perfluoroheptanóico **15** mediante destilación a 90°C bajo presión reducida (10^{-4} Torr) del residuo sólido también se recuperó la urea **4** de forma cuantitativa.

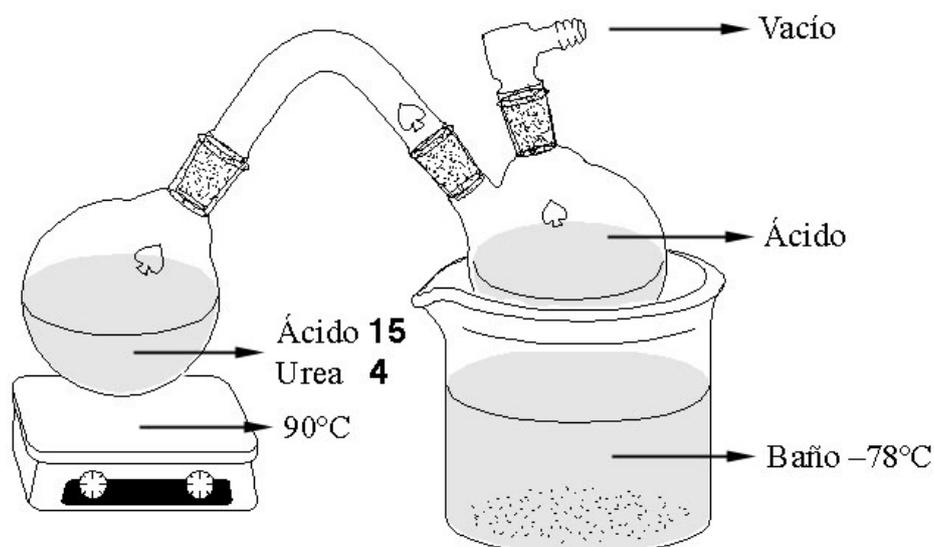


Figura 1. 41: Esquema del sistema de separación de la urea **4** y del ácido perfluoroheptanóico **15** por destilación a presión reducida.

Otro aspecto importante del método era la pureza de los péptidos obtenidos tras la purificación por extracción fluorosa. Por ello procedimos a analizar los compuestos **33-39** mediante cromatografía de gases-masas. Así mismo se verificó la ausencia de epimerización empleando HPLC.

Para comprobar si los aminoácidos sintetizados contenían urea **4**, se hizo una curva de calibrado con fenantreno, y luego se analizaron los compuestos **33-39** con fenantreno como patrón interno. El límite de detección de la urea **4** resultó ser de 0.04ppm, correspondiente a un 0.1% en peso de urea **4** en la muestra.

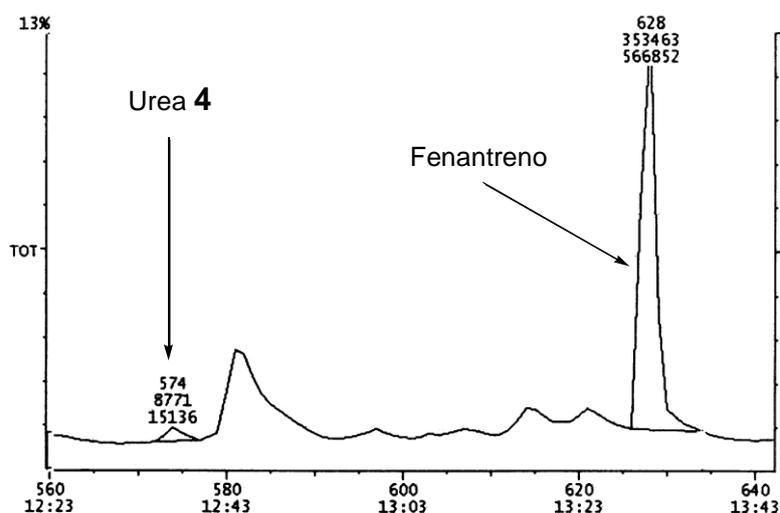


Figura 1. 42: Fragmento del cromatograma correspondiente al crudo del péptido Cbz-Ala-Phe-OMe **33**. El pico de fenantreno corresponde a 1ppm, el de urea a 0.08ppm (0.2% en del crudo).

Mediante este método se obtuvieron las concentraciones de urea en las muestras obteniéndose los valores que se muestran a continuación:

Tabla 1.10: Pureza de los compuestos

33-39

Compuesto	Concentración de urea 4 (%)
33	0.2
34	0.2
35	<0.1
36	<0.1
38	<0.1
39	0.3

También se analizaron dos de los dipéptidos obtenidos mediante HPLC analítico por comparación con la mezcla de diastereoisómeros para comprobar que los productos no habían epimerizado. En la imagen (ver Figura 1. 43) se muestra el cromatograma correspondiente a Cbz-L-Ala-L-Val-OBn (a) y la mezcla diastereoisómera del la Cbz-L-Ala-LD-Val-OBn (b). Como muestra la comparación de los cromatogramas, no se observó epimeración alguna. En el caso de Cbz-L-Ala-L-Phe-OMe **33** tampoco se apreció epimerización.

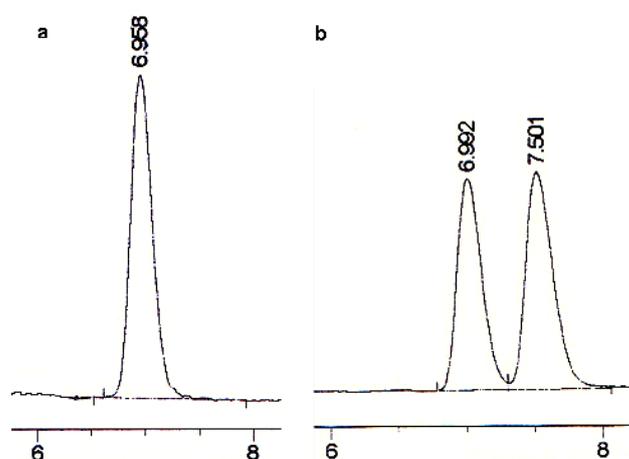


Figura 1. 43: Cromatogramas de HPLC de la Cbz-L-Ala-L-Val-OBn **35** y de la Cbz-L-Ala-LD-Val-OBn.

1.2.3 ESTUDIO ESTRUCTURAL ESPECTROSCÓPICO DE LOS COMPLEJOS AMIDA-ÁCIDO PERFLUOROALCANÓICO EN MEDIOS FLUOROSOS

1.2.3.1 Estudio de los puentes de hidrógeno amida-ácido perfluoroalcanóico en medios fluorosos mediante espectroscopia IR

Para determinar la naturaleza de los puentes de hidrógeno péptido/ácido perfluoroheptanóico y urea/ácido perfluoroheptanóico en perfluorohexano y diclorometano, se pensó estudiar mediante IR diferentes disoluciones diluidas de Boc-Phe-OMe **42** en ambos disolvente, tanto en presencia como en ausencia de ácido

perfluoroheptanóico. El desplazamiento a frecuencias menores de las bandas de tensión N-H, O-H y C=O se consideró como evidencia de la participación de las correspondientes especies en puentes de hidrógeno. Adicionalmente, para distinguir más fácilmente la interacción de los carbonilos de amida y éster en **42** con ácido perfluoroheptanóico, se seleccionaron los modelos **40** y **41** conteniendo, respectivamente los grupos éster y amida (Figura 1. 44):

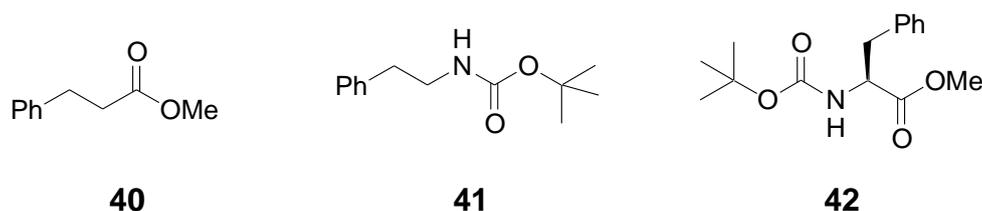


Figura 1. 44: Moléculas modelo para el estudio FTIR.

Mediante el estudio de **40**, **41** y **42** y las mezclas de ellas con el ácido perfluoroheptanóico **15**, se confirmó claramente que en los tres casos había interacción, y además que así como en el compuesto **40**, al no haber grupo NH de amida la interacción sólo podía darse por el carbonilo. En el compuesto **41**, al haber un enlace amida, la interacción era diferente, y se producía simultáneamente por el carbonilo y por el NH, como quedaba patente por el desplazamiento del carbonilo del ácido en el complejo **41·15** que era bastante mayor que en el complejo **40·15**.

En las figuras Figura 1. 45 y Figura 1. 46 se muestran respectivamente las zonas de carbonilo y de NH del espectro en perfluorohexano del 3-fenilpropanoato de metilo **40** de la mezcla 1:1 de ácido perfluoroheptanóico y el compuesto **40**, y del ácido **15**.

De las dos zonas representadas, la que más información da es la del carbonilo, ya que es la más sencilla y muy representativa. En perfluorohexano, el ácido está prácticamente dimerizado. La zona del carbonilo presenta dos bandas, la del carbonilo libre a 1814cm^{-1} y la del carbonilo asociado a 1775cm^{-1} . Estas bandas también se observan en la zona de los NH, en la que hay una banda muy fina para los OH libres a 3560cm^{-1} y otra ancha a 3100cm^{-1} . Para el 3-fenilpropanoato de metilo **40**, en la zona del carbonilo se observa una única banda a 1756cm^{-1} . Al añadir el ácido, en la zona de los carbonilos, además de observarse las señales ya existentes, aparecen dos nuevas

bandas. Una de ellas a 1718cm^{-1} corresponde al carbonilo del éster asociado al ácido. La otra a 1791cm^{-1} corresponde al ácido asociado al éster. El hecho de que esta última banda salga a frecuencias más altas que la del ácido asociado consigo mismo, indica que es una interacción más débil.

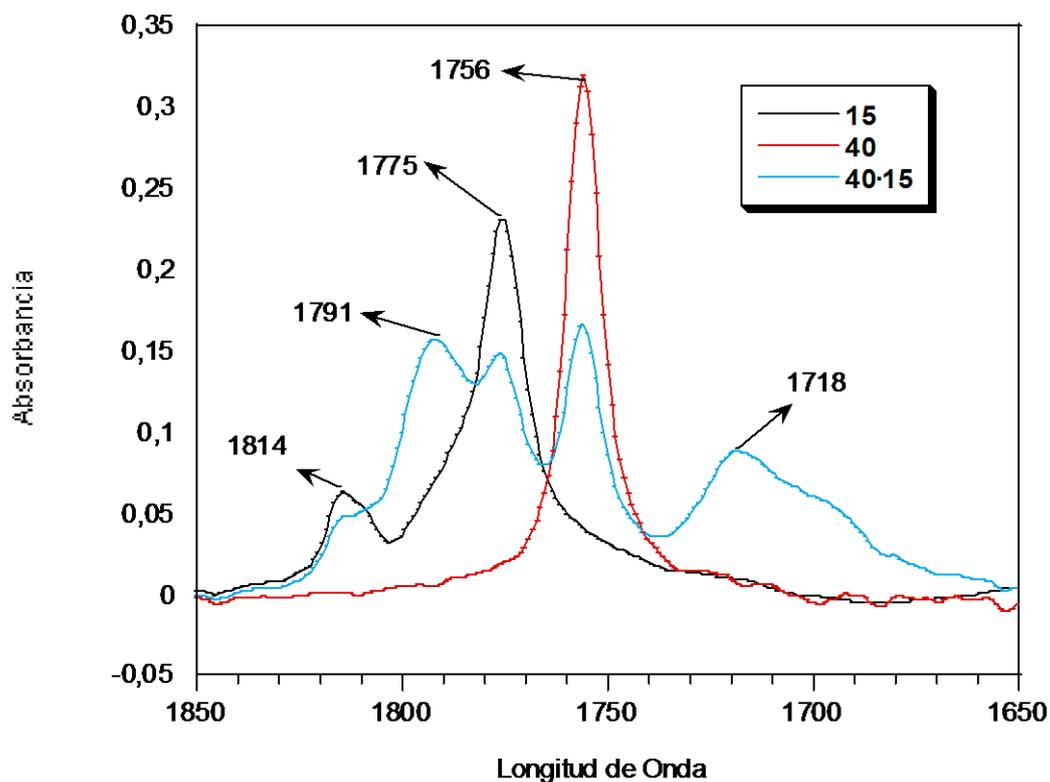


Figura 1. 45: Zona de carbonilo de los espectros de IR del ácido **15** (5mM), **40** (5mM en perfluorohexano) y **40·15** (5 mM), registrados en perfluorohexano.

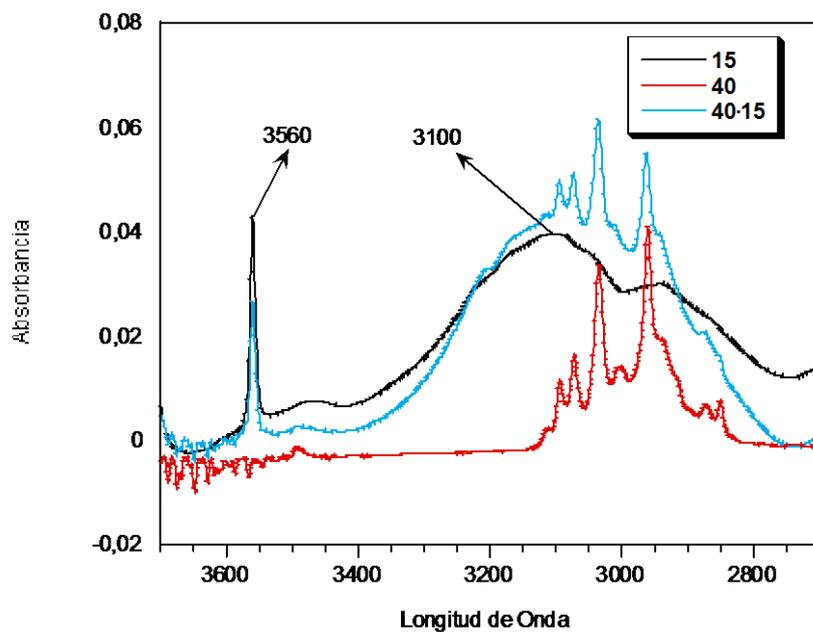


Figura 1. 46: Zona de NH y OH de los espectros de IR del ácido **15** (5mM), **40** (5mM) y **40-15** (5 mM), registrados en perfluorohexano.

A continuación se muestra un esquema en que están representadas las bandas correspondientes a cada especie.

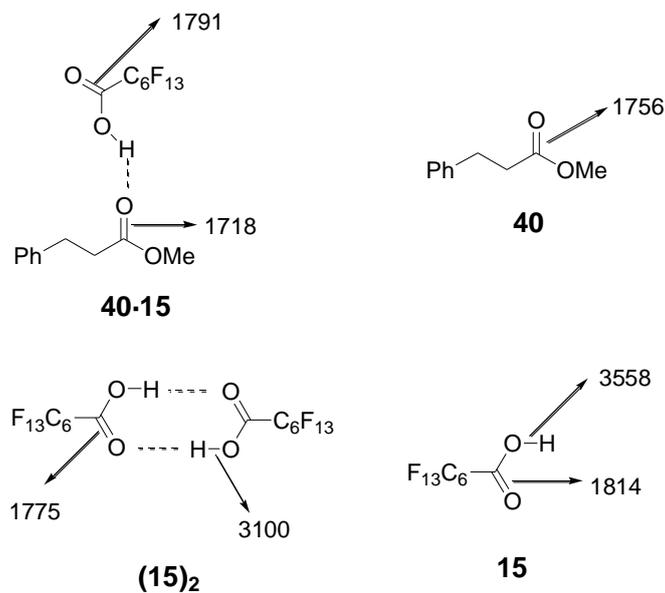


Figura 1. 47: Asignación de las bandas cm^{-1} correspondientes a los puentes de hidrógeno detectados en la interacción del ácido perfluoroheptanóico **15** y el 3-fenilpropanoato de metilo **40** en perfluorohexano.

Los espectros IR de la Boc-2-feniletilamina **41** en perfluorohexano bajo condiciones idénticas a las anteriores se muestran en las figuras Figura 1. 48 y Figura 1. 49:

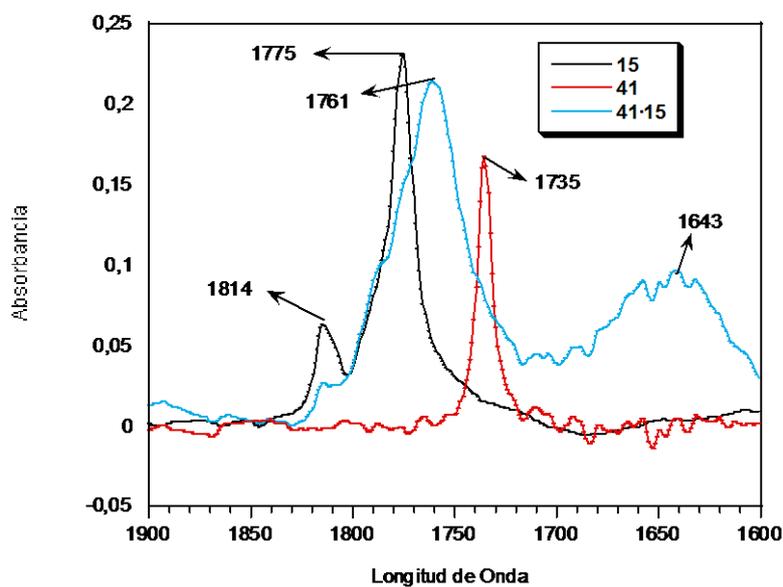


Figura 1. 48: Zona de carbonilo de los espectros de IR del ácido **15** (5mM), **41** (5mM) y **15·41** (5 mM), en perfluorohexano.

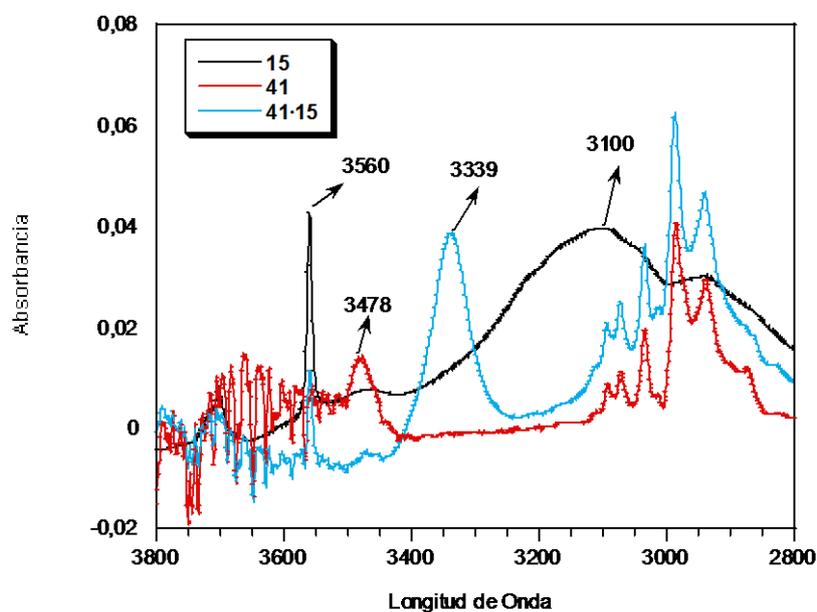


Figura 1. 49: Zona de N-H y O-H de los espectros de IR del ácido **15** (5mM), **41** (5mM) y **15·41** (5 mM), en perfluorohexano.

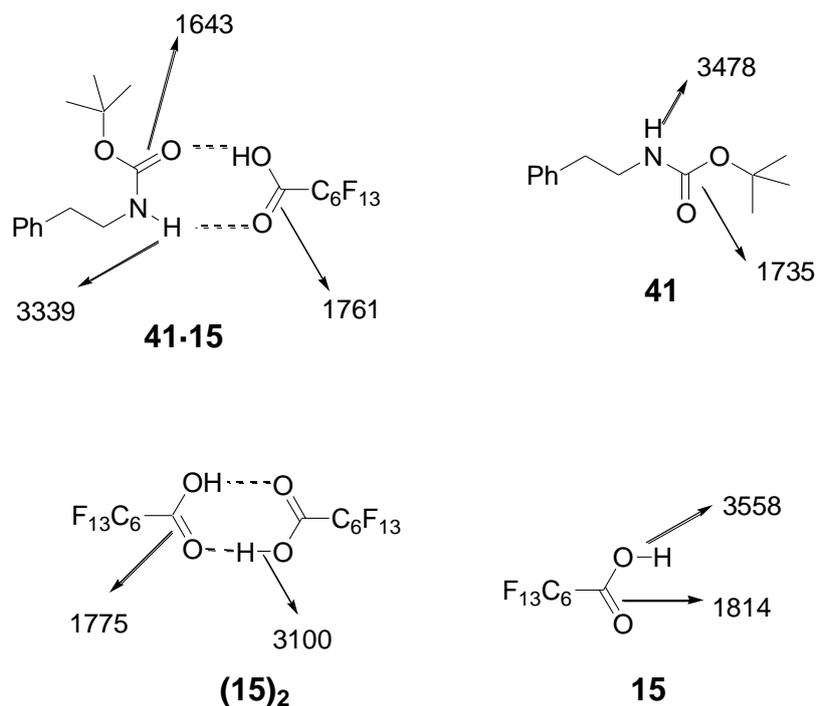


Figura 1. 50: Asignación de las bandas correspondientes a los puentes de hidrógeno detectados en la interacción de la N-Boc-2-fenilamina **41** con ácido perfluoroheptanoico **15** en perfluorohexano.

En este caso, además de las bandas del ácido ya conocidas, aparecen dos nuevas bandas en la zona de carbonilo al añadir el ácido perfluoroheptanoico **15**, una a 1643 cm^{-1} correspondiente al carbamato asociado y otra al ácido coordinado 1761 cm^{-1} . Ahora, el carbonilo del ácido asociado al carbamato, sale a una frecuencia menor que el dímero, lo que significa que la coordinación es más fuerte que la que existía entre dos moléculas de ácido. En el caso del éster **40**, esta banda quedaba a 1791 cm^{-1} entre las señales del ácido libre y el asociado. En el espectro de la mezcla **41-15**, se ve el desplazamiento que sufre la señal del NH, que pasa de 3478 cm^{-1} a 3339 cm^{-1} , por lo tanto no está libre. Con un único equivalente de ácido desaparecen por completo las señales correspondientes al NH y el carbonilo del compuesto **41** por completo. Esto significa que la asociación debe darse simultáneamente por el NH del compuesto **41** y el carbonilo del ácido y por el carbonilo del carbamato y el OH del ácido, y no se asocia sólo por el carbonilo; por eso, el carbonilo del ácido también experimenta un desplazamiento mayor que el complejo **40-15**.

Finalmente, en las figuras Figura 1. 51 y Figura 1. 52 se muestran los espectros de IR de disoluciones diluidas de Boc-Phe-OMe **42** en perfluorohexano tanto en presencia como en ausencia del ácido perfluoroheptanóico **15**.

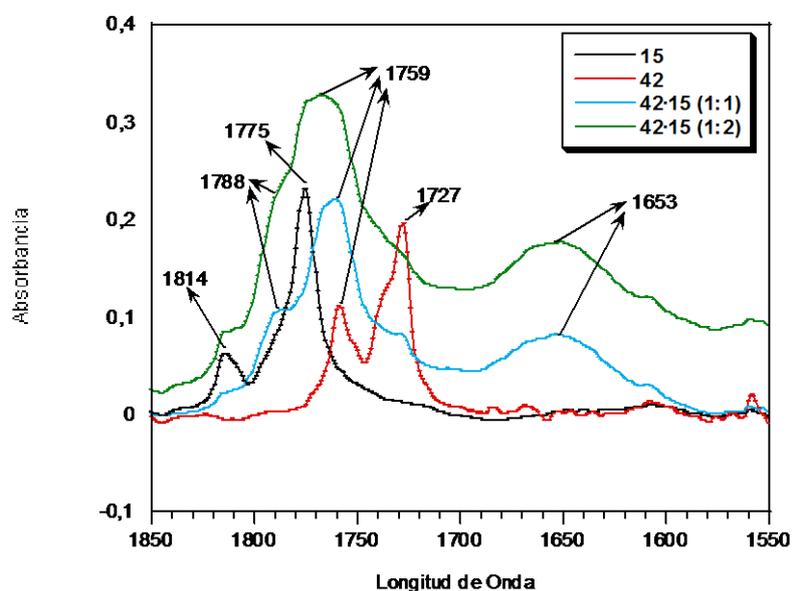


Figura 1. 51: Zona del carbonilo de los espectros de IR del ácido **15** (5mM), **42** (5mM) **42·15** (5 mM), y **15** (10 mM) **42** (5mM) en perfluorohexano.

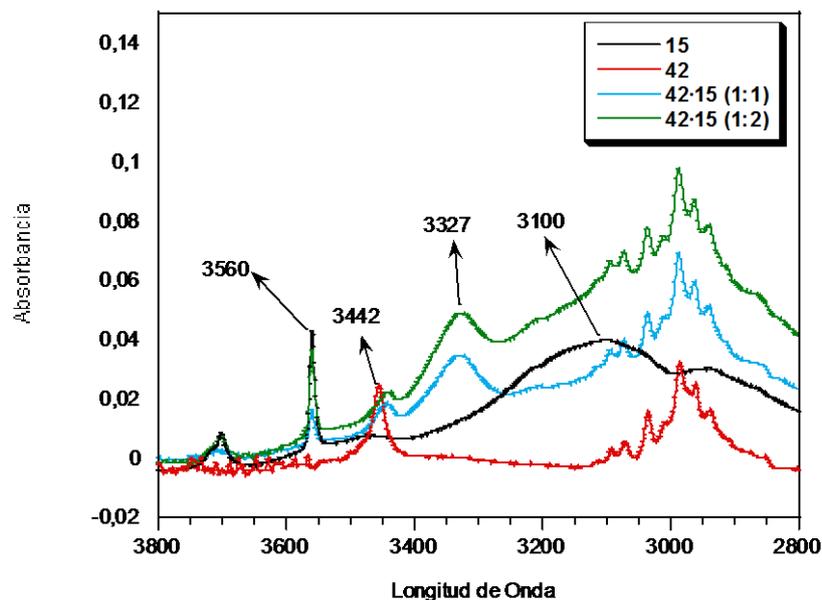


Figura 1. 52: Zona de NH y OH de los espectros de IR del ácido **15** (5mM), **42** (5mM), **15·42** (5 mM), y **15** (10 mM) en perfluorohexano.

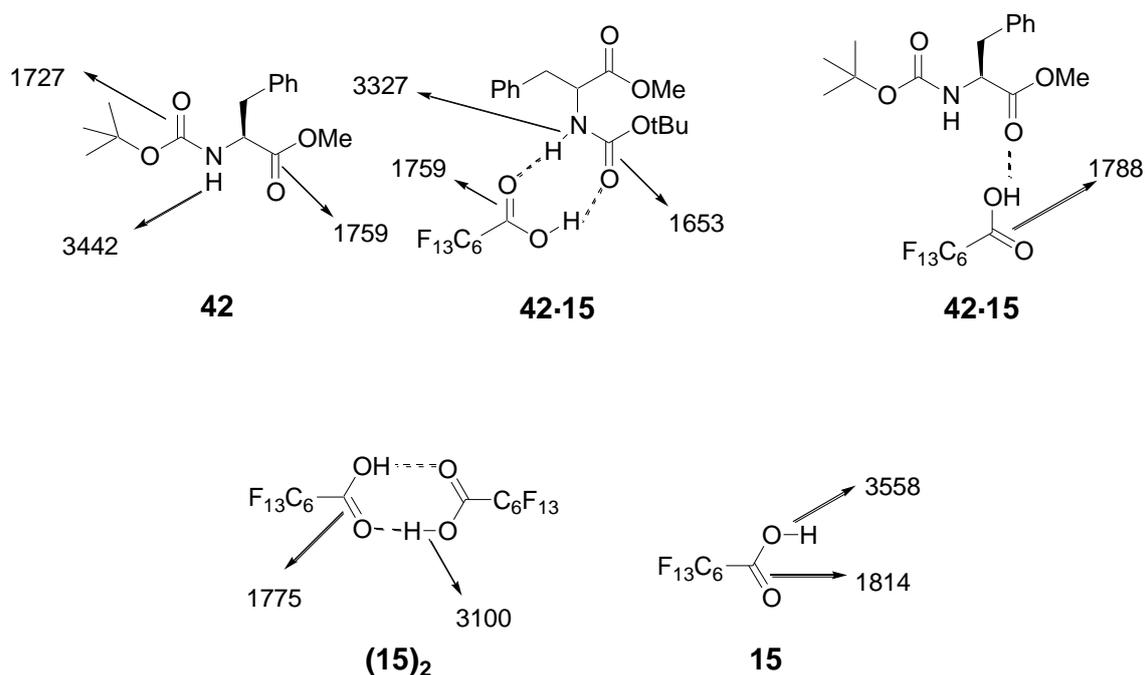


Figura 1. 53: Asignación de las bandas (cm^{-1}) correspondientes a los puentes de hidrógeno detectados en la interacción de la Boc-Phe-OMe **42** con ácido perfluoroheptanoico **15** en perfluorohexano.

En este caso, tras añadir el ácido perfluoroheptanoico **15**, se ve la formación de una nueva banda a 3327cm^{-1} , correspondiente al NH asociado, aunque siempre queda algo del NH sin coordinar a 3442cm^{-1} . En la zona del carbonilo, se forman dos bandas intensas a 1653cm^{-1} y a 1759cm^{-1} , correspondientes al carbamato y al ácido asociados respectivamente. Pero también se ve que se forma una banda menos intensa a 1788cm^{-1} que correspondería al ácido asociado al carbonilo del éster, más débil que la del carbamato. El carbonilo del éster aparecería debajo de la banda de 1653cm^{-1} pero no se observa. Cuando aumenta la concentración de ácido, no parece que se forme ninguna especie nueva.

Este conjunto de datos indica claramente que la interacción del ácido perfluoroheptanoico **15** con el enlace amídico (carbamato) de Boc-aminoéster **42** es más fuerte que con el carbonilo del éster de la misma molécula (ver Figura 1. 54). Además, en el primer caso parece clara la existencia de una interacción tipo quelato donde el carbonilo del uretano actúa como aceptor y el NH como dador.

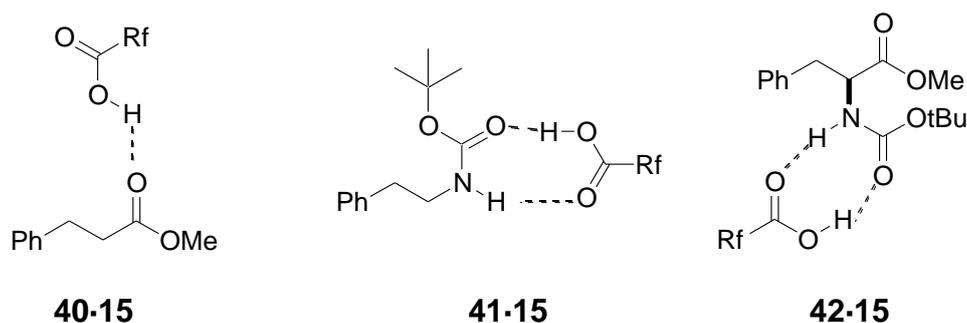


Figura 1. 54: Tipos de interacciones más probables entre el ácido perfluoroheptanoico **15** y las moléculas modelo **40**, **41** y **42**.

Para poner en evidencia si el empleo de un disolvente fluoroso (perfluorohexano) tenía alguna influencia sobre la naturaleza y la intensidad de los puentes de hidrógeno formados, decidimos comparar las interacciones en diclorometano registrando los espectros de IR de mezclas de Boc-Phe-OMe **42** y ácido perfluoroheptanoico **15** en este último disolvente. Sin embargo, al añadir el ácido **15**, los espectros obtenidos correspondían a la suma de las señales ya existentes, sin que se formase ninguna especie nueva. (Ver ANEXO 1)

Tras establecer los sistemas de puentes de hidrógeno posibles entre los grupos polares de modelos peptídico y el ácido perfluoroheptanoico **15**, pasamos a estudiar mediante la misma técnica los puentes de hidrógeno entre la urea **4** y el ácido **15** (ver Figura 1. 55 y ANEXO 2). La urea presenta dos frecuencias de tensión para el carbonilo, una de amida I y la otra amida II. En la zona de NH, también se observan estas dos frecuencias. Estudiando las frecuencias de la urea en perfluorohexano y diclorometano, se observó que en perfluorohexano la urea se encontraba completamente agregada y no se detectaba urea libre. En diclorometano, la urea era muy poco soluble y sólo se disolvían trazas, pero la especie se encontraba sin agregar (las frecuencias del carbonilo amida I y NH eran más altas). En los dos casos, en perfluorohexano y en diclorometano, se forman especies nuevas que dan bandas a frecuencias más bajas para los carbonilos del ácido y de la urea, y una banda a frecuencias más altas para la amida II. Mientras en diclorometano, al añadir un equivalente de ácido no desaparecían completamente las señales de la urea sin coordinar, en perfluorohexano, al añadir un equivalente de ácido perfluoroheptanoico **15** toda la urea se coordinaba al ácido perfluoroheptanoico **15**. Cualitativamente al menos, podemos pensar que la coordinación es bastante más fuerte en perfluorohexano. Además, en este caso, el

desplazamiento del carbonilo del ácido asociado a la urea (a 1752 cm^{-1}) indica que la formación de puentes de hidrógeno se da simultáneamente por el carbonilo y el NH de la urea **4**.

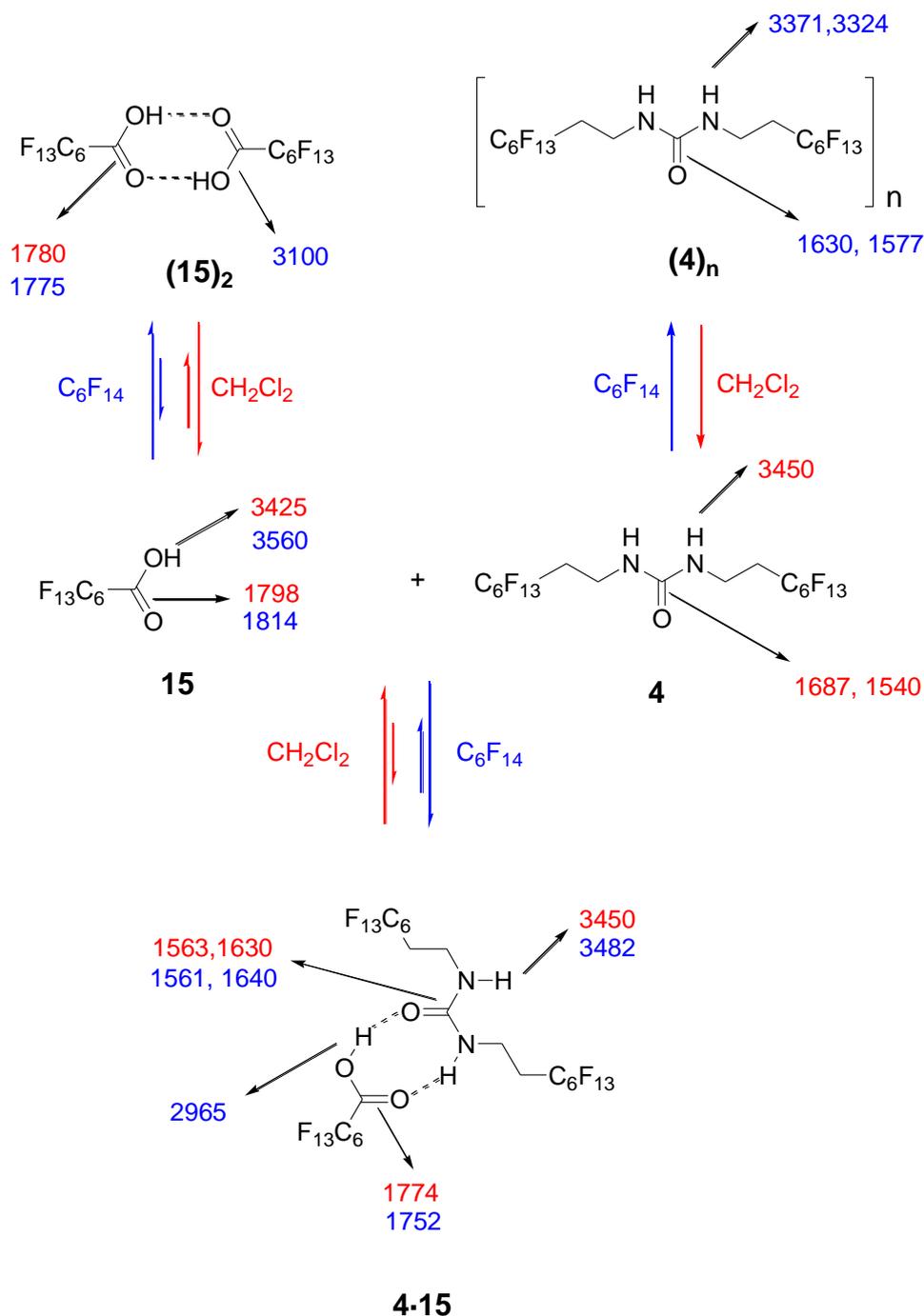


Figura 1. 55: Asignación de las bandas (cm^{-1}) de los puentes de hidrógeno observados durante la interacción entre la urea **4** y el ácido perfluoroheptanóico **15**. Los valores en color azul corresponden a los datos obtenidos en perfluorohexano, los valores en rojo, a los datos obtenidos en diclorometano.

Por último se adquirieron espectros en perfluorohexano de relación urea ácido diferentes ($X_{\text{urea}} = 0-1$ con variaciones de 0.1). Se quería comprobar si entraba otra molécula de ácido en el complejo, coordinándose tres moléculas dos de ácido con una de urea (ANEXO 3). En estos espectros se observa que la señal del NH libre del complejo a 3482 cm^{-1} no desaparece aunque haya exceso de ácido, por lo que se cree que la urea sólo se coordina con una molécula de ácido.

1.2.3.2 Estudios por RMN del complejo urea **4**/ ácido perfluoroheptanóico **15**

Por último se estudió el complejo de urea y ácido por RMN con una doble finalidad. Por un lado se querían corroborar los resultados obtenidos en los estudios de infrarrojo relativos a una complejación doble de la urea con el ácido, y por otro calcular la constante de asociación de la urea **4** y el ácido **15** en perfluorohexano.³⁸

Los espectros en perfluorohexano se adquirieron en los tubos dobles utilizados anteriormente con CDCl_3 como patrón externo (ver apartado 1.2.1.3.2 pag 41). En primer lugar se llevó a cabo una deriva térmica para establecer el comportamiento de los protones amídicos y carboxílicos. A temperatura ambiente sólo se observaba un único tipo de NH. Quisimos comprobar que sólo se distinguía un tipo de protones por estar encima de la temperatura de coalescencia, y no porque la interacción sólo se diera por el carbonilo de la urea.

Se pensó en tres posibles sistemas de puentes de hidrógeno (ver Figura 1. 56). La primera de ellas, una complejación simple en la que la interacción se daba únicamente por el carbonilo de la urea. Una segunda complejación doble, por interacción simultánea con el carbonilo y por el NH de la urea **4**. Una tercera posibilidad era que entraran dos cadenas de ácido dando complejación doble del tipo **4**·(**15**)₂.

³⁸Para una revisión de los métodos de RMN para determinar constantes de asociación, ver: L. Fielding, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 6151-6170.

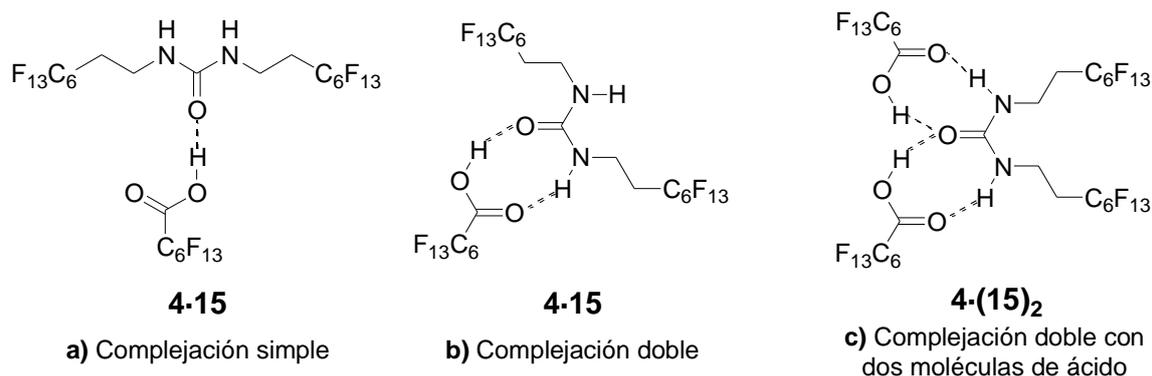


Figura 1. 56: Tipos de posibles interacciones del ácido perfluoroheptanoico **15** y la N,N'-bis(1H,1H,2H,2H-perfluorooctil)urea **4**; a) Complejación simple, sólo se forma puente de hidrógeno por el carbonilo de la urea, b) Complejación doble, una única molécula de ácido forma puentes de hidrógeno por el carbonilo y el NH simultáneamente, c) Complejación doble con dos moléculas de ácido.

Al bajar por debajo del punto de coalescencia, si la interacción que se daba era la del tipo **a**, sólo distinguiríamos un tipo de NH con desplazamiento químico similar al de la urea, y un único tipo de cadenas fluorosas. Si la interacción era doble, del tipo **b**, se podrían distinguir dos tipos de NH, uno libre a campos más altos, y uno asociado al ácido a campos más bajos, y probablemente también se distinguirían los dos tipos de cadenas fluorosas. Por último un tipo de interacción con dos moléculas de ácido, interacción **c**, volvería a dar un único tipo de NH, pero a campo más bajo que el de la urea sin ácido, y un único tipo de cadenas fluorosas. Primero se intentó hacer una deriva térmica de la urea sin ácido, pero la urea apenas se disuelve a temperatura ambiente, y a 275° K sólo se podían ver unas pequeñas trazas, porque la urea había precipitado por completo. Al bajar más la temperatura, ya no se observaba ninguna señal. Al realizar la deriva térmica del ácido, se pudo bajar la temperatura hasta 225° K sin que el ácido precipitara. Al hacer la deriva del complejo urea-ácido perfluoroheptanoico (**4·15**), se pudieron adquirir espectros hasta 225° K (-48°C). Damos por hecho que toda la urea que se encontraba disuelta a dicha temperatura tenía que estar interaccionando con el ácido, porque si no hubiera precipitado.

Cualitativamente al menos, podíamos pensar que la interacción no podía ser de tipo **c**, porque un único equivalente de ácido era suficiente para disolver toda la urea.

La deriva se llevó a cabo entre 295° K y 225° K, y se adquirieron espectros con $\Delta T = 10^\circ$ K. Los espectros más significativos obtenidos se muestran a continuación (Figura 1. 57):

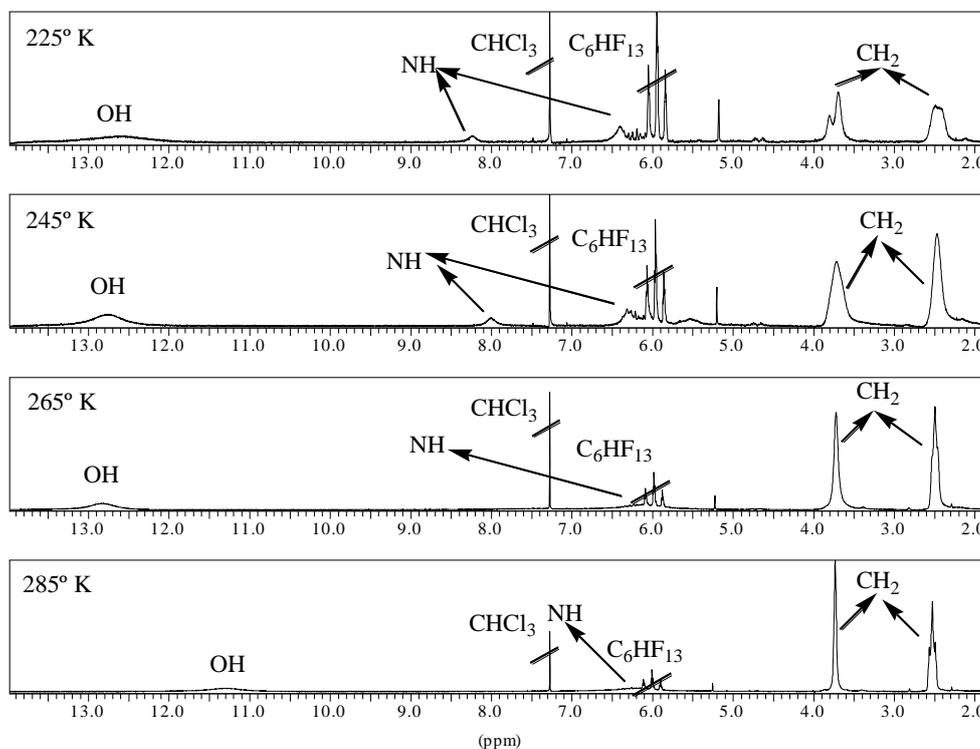


Figura 1. 57: Espectros $^1\text{H-RMN}$ del complejo de urea **4**/ ácido perfluoroheptanóico **15** en perfluorohexano a diferentes temperaturas.

En todos los espectros se observa la señal de referencia correspondiente al cloroformo a 7.27 ppm y un triplete correspondiente a parte del perfluorohexano parcialmente protonado que contiene el perfluorohexano comercial. Comparando la intensidad relativa entre las señales de la urea **4** con las de C_6HF_{13} se ve como las de la urea disminuyen al bajar la temperatura, como el disolvente no varía, esto significa que la urea va precipitando a medida que baja la temperatura. Esto significa que aunque la relación inicial urea-ácido era de 1:1, en el espectro a 225° K al haber precipitado parte de la urea, había exceso de ácido, ya que no parecía que el ácido precipitara de la misma manera.

En lo que a los espectros se refiere, la temperatura de coalescencia de la señal del NH se encuentra entre 265 y 255°K. La temperatura de coalescencia para las

cadena $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{F}_{13}$ se encuentra a temperaturas más bajas, entre 235 y 245° K. En el espectro a 225°K, se diferencian claramente los dos tipos de NH, y las dos cadenas fluorosas. La relación de las integrales de los NH son de 1:1.8. La señal a 8.2 ppm corresponde a los NH asociados al ácido y las señales a 6.4 ppm a los NH sin asociar. Esto significaría que no hay un único tipo de interacción, porque si sólo se diera el tipo **b**, las integrales debieran ser 1:1. Tampoco es probable que entren dos cadenas fluorosas, porque de ser así, la intensidad del NH a 8.2 ppm debería ser la señal mayoritaria. Estos resultados son consistentes si se acepta que se dan los tipos de interacción **a** y **b** simultáneamente, y según las integrales, la relación es de 5:2 (b:a) (la señal a 6.4 ppm corresponde a tres protones, los dos de la especie **a** y uno de la especie **b**, y la señal a 8.2 ppm corresponde a un único protón, el asociado al ácido de la especie **b**).

Para realizar experimentos equivalentes en CD_2Cl_2 se prepararon tres disoluciones y se estudiaron bajo las siguientes condiciones: a) disolución de urea 0.005 M, con registro entre 295°K y 265°K b) ácido perfluoroheptanóico 0.005M con registro entre 295°K y 205°K, y c) urea (0.005M) y ácido (0.005M) se realizaron espectros entre 295°K y 265°K. Por debajo de 265° K la urea **4** precipitaba, confirmando la falta de interacción con el ácido **15** en diclorometano.

Finalmente para intentar medir la constante de asociación de **40·15** en perfluorohexano se aplicaron los métodos gráficos de Benesi-Hildebrand y Scatchard³⁹ pero, debido a la autoagregación de la urea **4** y a su baja solubilidad no se lograron resultados aceptables. Cuando se intentó medir la curva de Job (ANEXO 4) los valores obtenidos tampoco fueron fiables por la misma razón.

A modo de conclusión podemos afirmar que tanto los resultados obtenidos por RMN como por IR demuestran que la urea **4** sólo se coordina con una molécula de ácido perfluoroheptanóico **15** y que la coordinación se da únicamente en disolventes fluoroso. También se ha probado que estos puentes de hidrógeno en medio fluoroso son

³⁹ a) Ref. 38 b) B. H. M. Snellink-Ruël, M. M. G. Antonisse, J. F. J. Engbersen, P. Timmerman, D. N. Reinhoudt, *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 165-170. c) T. R. Kelly, M. H. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 7072-7980.

más fuertes en compuestos amídicos que en ésteres debido a una interacción doble de tipo quelato.

Por último, hemos descubierto que los puentes de hidrógeno en medios fluorosos entre compuestos amídicos polares no derivatizados o muy poco derivatizados permitan un “marcado fluoroso” con ácido perfluoroalcanóicos que hacen posible su solubilización sin necesidad de contener un alto número de átomos de flúor. Este hecho permite por vez primera realizar síntesis fluorosa de compuestos polares con reactivos fluorosos “ligeros”y purificar los productos por separación FBS sin recurrir a técnicas cromatográficas.

Experimental Capítulo 1

1.3 PARTE EXPERIMENTAL CAPÍTULO 1

1.3.1 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Disolventes

Los disolventes utilizados como eluyentes en cromatografía fueron purificados por destilación. El tetrahidrofurano y el éter dietílico se anhidrizaron mediante calefacción a reflujo sobre sodio y benzofenona instantes antes de su utilización. El diclorometano se secó mediante destilación sobre pentóxido de fósforo y se almacenó sobre tamiz molecular de 4 Å. El acetonitrilo fue purificado mediante destilación sobre hidruro cálcico instantes antes de su utilización. El tolueno, benceno y hexano se secaron mediante destilación sobre sodio y se almacenaron sobre sodio hilado. El metanol y el etanol se secaron mediante destilación sobre magnesio y yodo y se almacenaron sobre tamiz molecular de 3 Å. La diisopropilamina (DIPA) se secó mediante destilación a vacío sobre hidróxido sódico y se almacenó sobre tamiz molecular de 3 Å. Se utilizó perfluorohexano comercial de la marca Fluorochem sin purificación previa como disolvente tanto para las reacciones como para registrar los espectros de RMN.

IR

Los espectros de IR se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu IR-435 al que se adosó in cartucho de programas CIR-1, empleando pastillas de bromuro potásico (para los sólidos) o ventanas de bromuro potásico con espaciador (para los líquidos). Las absorciones están expresadas en unidades v cm^{-1} .

RMN

Los espectros de ^1H -RMN con observación de protones a 200 y 300 MHz fueron registrados en espectrómetros Varian Gemini 200, Varian VXR 300 y Bruker 300 y los de ^{13}C -RMN en los mismos espectrómetros a 50 y 75 MHz respectivamente. Los espectros de ^1H -RMN con observación de protones a 500 MHz fueron registrados en un espectrómetro Bruker UltrashieldTM 500. El disolvente empleado fue cloroformo deuterado (CDCl_3) salvo que se especifique lo contrario; los valores de los

desplazamientos químicos se expresan en unidades δ (ppm) respecto a una referencia interna de tetrametilsilano. Los de ^{13}C -RMN respecto al CDCl_3 ($\delta = 77.0$ ppm).

EM

Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro Finnigan MAT GCQTM operando a 70 eV. Los fragmentos detectados están expresados en m/e (intensidad relativa).

Cromatografía

La cromatografía en capa fina se realizó sobre placas de gel de sílice (Merck Kiesselgel 60 F-254). La cromatografía de columna se realizó bajo presión empleando gel de sílice Merck 230-400 mesh (0.040-0.063 mm) como fase estacionaria y mezclas de disolventes en proporciones adecuadas (EtOAc, hexano, etc.) como eluyentes. La cromatografía líquida preparativa de alta resolución (HPLC) se efectuó en un cromatógrafo Shimadzu LC-8A con autoinyector, detector de ultravioleta con lámpara de deuterio ($\lambda = 254$ nm) modelo SPD-6AV, y una columna Merck Hibar[®] Lichrosorb[®] Si 60 (7 μm) de 25 cm x 2.5 cm (Supelco). La cromatografía líquida analítica de alta resolución (HPLC) se realizó en un cromatógrafo Hewlett Packard 1050 con un detector de matriz de diodos (DAD). La columna empleada fue Merck Hibar[®] Lichrosorb[®] Si 60 (5 μm) de 25 cm x 4 mm (Supelco). La cromatografía gaseosa se realizó en un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas Finnigan MAT GCQTM, utilizando una columna Tracer TRB-5 de 15m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno.

Polarimetría

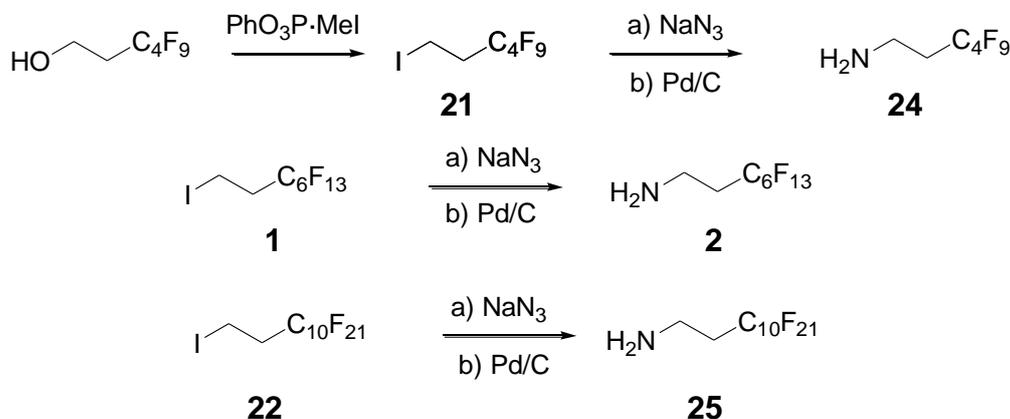
Las rotaciones ópticas fueron medidas en un polarímetro Perkin-Helmer 243-B con un baño termostático Frigiterm 6000382.

Varios

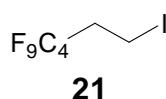
Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Büchi SMP-20. Las microdestilaciones se llevaron a cabo en un destilador de bolas Kügelrohr Büchi GKR-50. Las reacciones con organometálicos se llevaron a cabo en atmósfera inerte de nitrógeno usando técnicas convencionales de transferencia con jeringa. Los productos de partida comerciales (Aldrich, Acros, Merck, Sigma, Fluka, etc.) se utilizaron sin purificación, a no ser que se especifique lo contrario.

1.3.2 PARTE EXPERIMENTAL

1.3.2.1 Síntesis de Precursores



Yoduro de 1H,1H,2H,2H-perfluorohexilo (Ref. 32, pag. 49)



Formación de yoduro de metiltrifenoxifosfonio: Un matraz de 100 mL de tres bocas provisto de condensador, termómetro y agitación magnética se cargó con fosfito de trifenilo (6.6 g, 20 mmol) y yoduro de metilo (1.62 mL, 26 mmol). El matraz se calentó a 90° C mediante un baño de aceite, y durante 8h se fue aumentando la temperatura del baño hasta 125°C. Se mantuvo a esta temperatura durante 12-14h. Pasado ese tiempo, se enfrió la mezcla a temperatura ambiente. El termómetro y el condensador fueron reemplazados por tapones, y el producto con aspecto de caramelo marrón se lavó con éter dietílico (seco). El éter se decantó y el complejo se secó en la bomba.

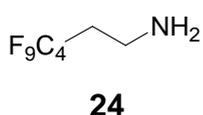
Sobre el complejo se añadió una mezcla de N,N-dimetil formamida (10 mL), de perfluorohexano (10 mL) y 1H,1H,2H,2H-perfluorohexanol (2,64g, 10mmol). La mezcla se agitó durante 5h tras la cuales la fase fluorosa se decantó y la fase de DMF se lavó con perfluorohexano (2 x 2 mL). Se combinaron las fases fluorosas y el disolvente fue evaporado controlando que la temperatura del horno fuera menor de 70°C en un microdestilador de bolas, quedando el producto puro en el calderín con un 60 % de rendimiento.

2,2,2-Trifluoroetilamina 23 es comercial (Flurochem).

Procedimiento general para la síntesis de aminas 2, 24 y 25 (Ref. 25, pag. 27)

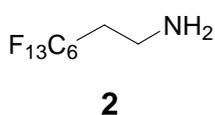
En un matraz equipado con condensador y agitador magnético se adicionó una disolución acuosa al 30% de NaN_3 (2.6g, 40 mmol), el yoduro correspondiente **1**, **21** y **22** (20 mmol) y un 5% de cloruro de metiltridecilaonio (Aliquat® 336) (404 mg, 1 mmol). La mezcla se agitó a 90-100°C durante toda la noche. Posteriormente se enfrió a 0° C y la fase inferior, que consistía en la azida de 1H,1H,2H,2H-perfluoroalquilo, fue separada por decantación y disuelta en Et_2O seco (150 mL). Sobre la disolución se adicionó Pd-C del 10% (150 mg), y la suspensión se hidrogenó a temperatura ambiente, 100 psi de presión y agitación mecánica en un hidrogenador de 300 mL. Después de 1h, los gases se purgaron del medio de reacción para eliminar el N_2 desprendido durante la reacción. El reactor fue cargado nuevamente con H_2 y la reacción se prolongó durante 16h. Pasado ese tiempo, se despresurizó la mezcla y se filtró sobre celita. El disolvente fue evaporado cuidadosamente en el rotavapor y el crudo se purificó mediante destilación.

1H,1H,2H,2H-Perfluorohexilamina 24



Se siguió el procedimiento general partiendo de yoduro de 1H,1H,2H,2H-perfluorohexilo **21** (2,63 g, 10 mmol), pero no fueron aislados ni la azida de 1H,1H,2H,2H-perfluorohexilo intermedia, ni la 1H,1H,2H,2H-perfluorohexilamina ya que se arrastraban con el disolvente al evaporarlo. La disolución etérea de **24** resultante de la hidrogenación, una vez filtrada, fue utilizada directamente para la síntesis de la urea **28**. El rendimiento de la reacción no fue determinado.

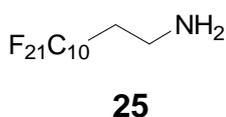
1H,1H,2H,2H-Perfluorooctilamina 2



Se siguió el procedimiento general partiendo de yoduro de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo **1** (9.48 g, 20 mmol). Se obtuvo la azida de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo de forma

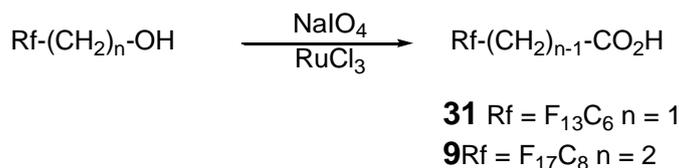
cuantitativa [$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 δ ppm): 3.62 (t, 2H, $J=7$ Hz), 2.5-2.3 (m, 2H)], y la amina **2** se aisló como un líquido incoloro con un rendimiento del 88% (9.59g). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 δ ppm): 3.04 (t, 2H, $J=7$ Hz), 2.34-2.17 (m, 2H), 1.30-1.21 (s_a , 2H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 δ ppm): 125-140 (m), 34.7 (t, $J_{\text{C-F}}=21$ Hz), 34.3 (s_a).

1H,1H,2H,2H-Perfluorododecilamina **25**



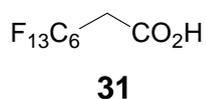
Se siguió el procedimiento general partiendo de yoduro de 1H,1H,2H,2H-perfluorododecilo **22** (1.15 g, 2 mmol). Se obtuvo la azida de 1H,1H,2H,2H-perfluorododecilo con un rendimiento del 87% [$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 δ ppm): 3.62 (t, 2H, $J=7$ Hz), 2.40 (m, 2H)] y la amina **25** se aisló como un sólido blanco con un rendimiento del 64 % (0.62 g, rendimiento global a partiendo del yoduro **22**). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 δ ppm): 3.08 (t, 2H, $J=7$ Hz), 2.27 (m, 2H), 1.6 (s_a , 2H).

1.3.2.2 Síntesis de ácidos carboxílicos polifluorados (Ref. 27, pag. 31)



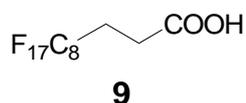
Procedimiento general:

Sobre una mezcla del polifluoroalcohol correspondiente (3 mmol), acetonitrilo (6 mL), agua (9 mL) y EtOAc (6 mL) se adicionó peryodato sódico (2,63 g, 12.3 mmol) y $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (15 mg, 0.072 mmol) consecutivamente. La reacción se agitó durante 2h tras las cuales, fue filtrada. Se separaron las dos fases y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 5 mL). Tras secar la fase orgánica sobre MgSO_4 y evaporar el disolvente a presión reducida, el producto fue purificado mediante filtración sobre gel de sílice y lavado con EtOAc.

Ácido 2H,2H-perfluorooctanóico 31

Se siguió el procedimiento general partiendo de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctanol (3,25 mL, 15 mmol) y se obtuvo el producto puro con un rendimiento del 92% (5.24

g).

Ácido 2H,2H,3H,3H-perfluoroundecanóico 9

Se siguió el procedimiento general utilizando 1H,1H,2H,2H,3H,3H-perfluoroundecanol (1.43 g, 3 mmol). El producto se obtuvo con un 75 % de

rendimiento (1.11 g). ¹H-RMN (CD₃COd₆, δ □ ppm) 2.57 (2H, m), 2.69 (2H, t, J= 8.1 Hz), 11.0 (1H, s_a).

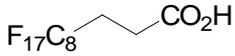
Ácido 2H,2H-perfluorooctánico <div style="text-align: center;"> $\text{F}_{13}\text{C}_6\text{---CO}_2\text{H}$ </div>		Nº Referencia 31
		P. M. (g/mol) 378.09
		P. E. (°C) 55° C
		$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, CH ₂ Cl ₂)

Formula Empírica C₈H₃F₁₃O₂	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental		
	C	H	N	C	H	N

IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3500-2800 (CO ₂ H); 1739 (C=O); 1350-1100 (CF)
MS m/z	377, 361 (100), 319, 181, 131, 95, 69.

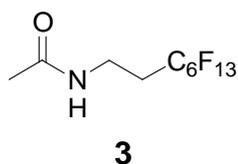
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃ 3.21 (2H, t, J= 17 Hz) 8.5 (1H, s _a , OH)	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃ 139.0 (1C, s) -N=C-N- 125-105 (26C, m) -C ₆ F ₁₃ 38.5 (2C, s) =N-CH ₂ - 32.3 (2C, t, J= 21 Hz) -CH ₂ -CF ₂ -
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<u>Observaciones:</u>

Ácido 2H,2H,3H3H-perfluoroundecanóico <div style="text-align: center;">  </div>		Nº Referencia 9												
		P. M. (g/mol) 492.13												
		P. F. (°C) 91-91°C												
		$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, CH ₂ Cl ₂)												
Formula Empírica C₈H₃F₁₃O₂	Microanálisis													
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="3" style="padding: 2px;">Teórico (%)</th> <th colspan="3" style="padding: 2px;">Experimental</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">C 26.85</td> <td style="padding: 2px;">H 1.024</td> <td style="padding: 2px;">N 0.0</td> <td style="padding: 2px;">C 27.27</td> <td style="padding: 2px;">H 1.129</td> <td style="padding: 2px;">N 0.1</td> </tr> </tbody> </table>		Teórico (%)			Experimental			C 26.85	H 1.024	N 0.0	C 27.27	H 1.129	N 0.1
Teórico (%)			Experimental											
C 26.85	H 1.024	N 0.0	C 27.27	H 1.129	N 0.1									
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	2978, 1715, 1447, 1220, 1141													
MS m/z	491 (1); 475 (11); 453 (10); 408 (11); 281 (9); 139 (89); 109 (100); 55 (57)													
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃													
2.71 (2H, t, J= 7.33, 7.83 Hz) CH₂-CH₂-CF₂ 2.54-2.46 (2H, m) CH₂-CH₂-CF₂	175.3 121-108 (m, CF) 26.5 (t, J=22, 23 Hz) 25.1													
Observaciones:														

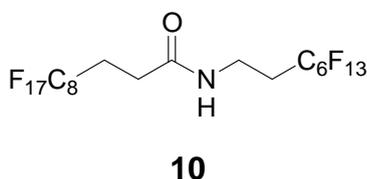
1.3.2.3 Productos sintetizados para los estudios de solubilidad.

N-1H,1H,2H,2H-Perfluorooctilacetamida **3**

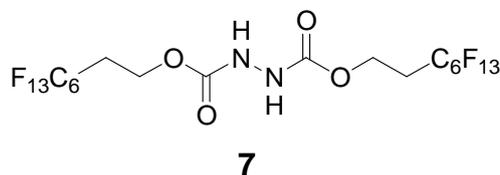


Sobre una disolución de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilamina **2** (0.25g, 0.69 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL) seco a 0°C se añadió anhídrido acético (0.132 mL, 1.39 mmol). La disolución se agitó durante 2h y después se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto así obtenido mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/EtOAc 1:1) obteniendo el producto puro con un rendimiento del 57% (0.16g).

N-(1H,1H,2H,2H-Perfluorooctil)-2H,2H,3H,3H-perfluoroundecanamida **10**



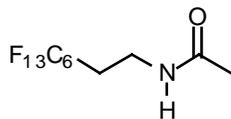
En un matraz seco, bajo atmósfera de N₂ y provisto de desecador y agitación magnética se enfrió a 0°C una disolución de ácido 1H,1H,2H,2H-perfluoroundecánico **9** (492 mg, 1 mmol) en diclorometano (5 mL) y perfluorohexano (5 mL). Sobre ella se goteó cloruro de oxalilo (0.061 mL, 0.7 mmol), y una gota de N,N-dimetilformamida. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4h tras las cuales se evaporó el disolvente a presión reducida. El cloruro de ácido así obtenido se volvió a disolver en diclorometano seco (5 mL) y perfluorohexano (5 mL) y tras enfriarlo a 0° C bajo atmósfera de N₂, se le adicionó trietilamina seca (0.21 mL, 1.5 mmol) y 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilamina **2** (363 mg, 1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16h, se evaporaron los disolventes a presión reducida, y el residuo resultante se disolvió en éter etílico (20 mL) y se lavó sucesivamente con HCl (1 M, 2 x 10 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 10 mL). El producto se cristalizó en CH₂Cl₂ y se obtuvo con un rendimiento de 61 % (0.51 g).

N,N'-Bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctiloxycarbonil)hidracina 7

En un matraz seco bajo atmósfera de N₂ se disolvió 1H,1H,2H,2H-perfluorooctanol **5** (728 mg, 2 mmol) en diclorometano seco (10

mL). En otro matraz aparte también seco y bajo atmósfera de N₂ a 0°C, se preparó una disolución de trifosgeno (593 mg, 2 mmol) y piridina seca (0.289 mL, 4 mmol) en diclorometano (2 mL). Esta disolución fue añadida sobre la del alcohol y la mezcla se agitó durante 1h a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se añadió EtOAc seco (10 mL), y se filtró el precipitado blanco formado. Una vez evaporada la disolución a presión reducida, se obtuvo cloroformiato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo **6** (de forma cuantitativa) que se empleó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Sobre una disolución de monohidrato de la hidracina (0.048 mL, 1 mmol) en diclorometano seco (10 mL) enfriada a 0°C bajo atmósfera de N₂ se añadieron consecutivamente piridina (0.290 mL, 4 mmol) y una disolución del cloroformiato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo **6** (0.85 g, 2mmol) en diclorometano seco (10 mL). La reacción se agitó durante toda la noche y se dejó que alcanzara temperatura ambiente lentamente. Por la mañana, se filtró el precipitado que se había formado y se obtuvo una primera fracción de producto (252 mg, 0.31 mmol, 31 %). La disolución restante se lavó sucesivamente con una disolución de HCl (1M, 3 x 5 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (5 mL). De esta fracción se obtuvo un 47 % adicional de producto (382 mg, 0.47 mmol). Una muestra analítica se obtuvo cristalizando la primera fracción en diclorometano.

N-(1H,1H,2H,2H-Perfluorooctil)acetamida

**N° Referencia**
3

P. M. (g/mol)

405.17

Pto. Fusión (°C)

 $[\alpha]_D^{25}$

Fórmula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C₁₀H₈F₁₃NO	C 29.64	H 1.99	N 3.46	C 29.95	H 1.88

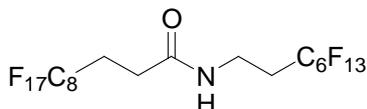
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3297, 1649, 1560, 1240, 1202, 1150.
---------------------------	-------------------------------------

MS m/z	406 (30); 405 (99); 386(50); 769(43); 324(23); 136(46); 86(79); 49(68); 44(100)
--------	---------------------------------------------------------------------------------

¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
5.97 (1H, bs, NH) 3.58 (2H, dd, J= 3.6, 12.7Hz, -CH ₂ -CH ₂ -CF ₂ -) 2.36 (2H, m, -CH ₂ -CH ₂ -CF ₂ -) 1.99 (3H, s, -OCH ₃)	170.7 123-105 (6C, m) 31.9 30.7 (1C, t, J=21.2Hz) 22.8

Comentarios: Soluble in Et₂O y metanol.

N-(1H,1H,2H,2H-Perfluorooctil)-2H,2H,3H,3H-perfluoroundecanamida



N° Referencia
10

P. M. (g/mol)

837,24

Pto. Fusión (°C)

62-63°C

$[\alpha]_D^{25}$ (c= , CH₂Cl₂)

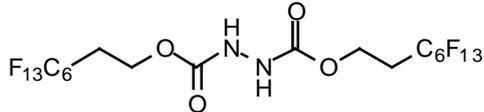
Fórmula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C₁₉H₉F₃₀NO	C 27.26	H 1.08	N 1.76	C 28.09	H 1.12

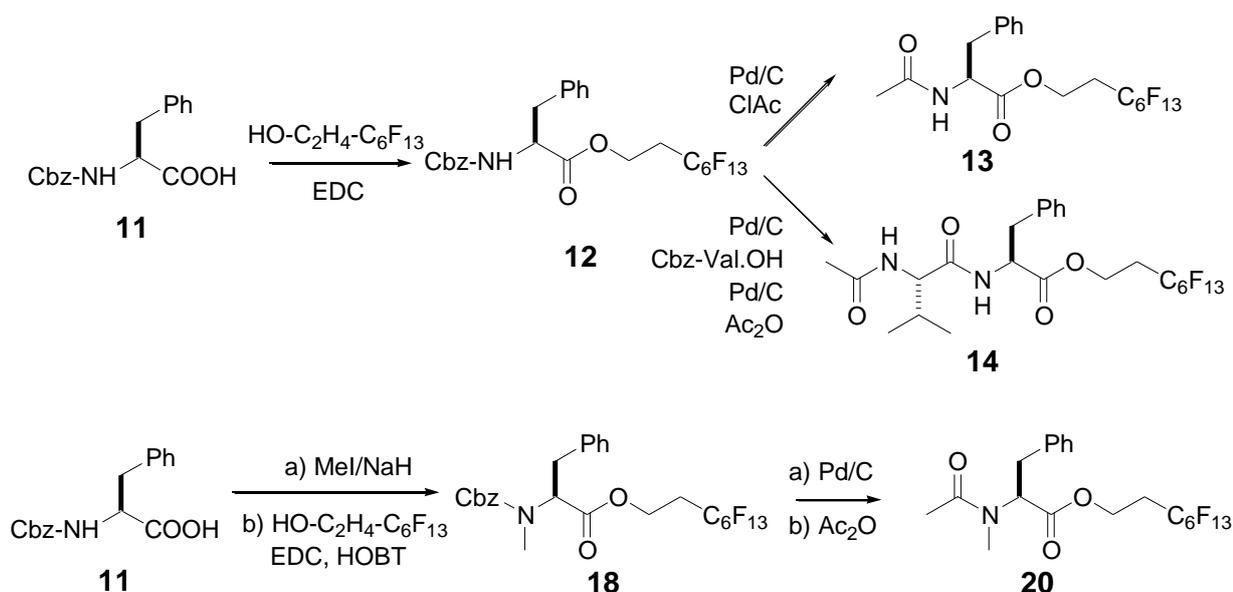
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3325, 1654 (C=O), 1560, 1207, 1141
---------------------------	------------------------------------

MS m/z	837 (10); 818 (11); 568 (34); 518 (26); 468 (59); 418 (100); 390 (26); 362 (14);
--------	----------------------------------------------------------------------------------

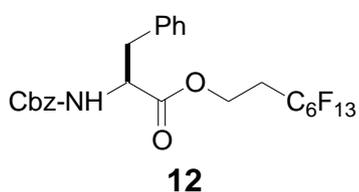
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
5.9 (1H, s) NH 3.63 (2H, q, J=6.4 Hz) F ₁₇ C ₈ -CH ₂ -CH ₂ 2.56-2.49 (4H, m) F ₁₇ C ₈ -CH ₂ -CH ₂ ; NH-CH ₂ 2.43-2.32 (2H, m) NH-CH ₂ -CH ₂	170 122-108 (m, CF) 32.3 30.7 (t, J=21, 22Hz) 27.1 26.7 (t, J=21, 22Hz)

Comentarios:

N,N'-Bis(1H,1H,2H,2H-perfluorooctiloxycarbonil) hidrazina		Nº Referencia 7				
		P. M. (g/mol)				
		812.246				
		P. F. (°C)				
		106-107				
		[α] _D ²⁵ (c= 1.0, CH ₂ Cl ₂)				
Formula Empírica C₁₈H₁₀F₂₆N₂O₄	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental		
	C 26.62	H 1.241	N 3.45	C 26.78	H 1.813	N 3.969
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3278, 1729 (C=O), 1550, 1362, 1145.					
MS m/z	812; 543; 448; 422; 362; 104;					
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃					
6.55 (2H, b.s., NH) 4.48 (4H, t, J= 6Hz, -O-CH ₂ -CH ₂ -) 2.50 (4H, m, CH ₂ -CH ₂ -CF ₂ -)						
<u>Observaciones:</u> No fue posible adquirir el espectro de ¹³ C-RMN debido a la baja solubilidad.						

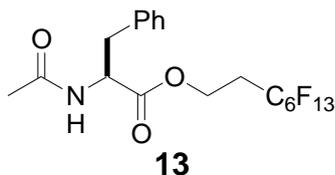


(S)-2-Benciloxycarbonilamino-3-fenil-propanoato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo 13



Sobre una disolución de (L)-Cbz-fenilalanina **11** (1.20 g, 4 mmol) y 1H,1H,2H,2H-perfluorooctanol **5** (0.95 mL, 4.4 mmol) en diclorometano seco (30 mL) y DMF (0.9 mL) a 0°C y bajo N₂, se adicionaron 1-hidroxibenzotriazol (0.54 g, 4 mmol) y EDC (1.07 g, 5.6 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, después se lavó con HCl (0.1M) (2 x 25 mL) y con una disolución saturada en NaHCO₃ (2 x 15 mL). El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/EtOAc 10:1). Se obtuvo el producto puro con un 87% de rendimiento (2.24 g).

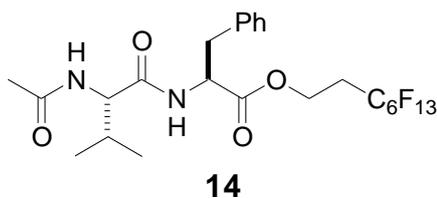
(S)-2-Acetilamino-3-fenil-propanoato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo 13



Se agitó una suspensión de (S)-2-benciloxycarbonilamino-3-fenil-propionato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo **12** (0.32 g, 0.5 mmol) y un 10% de Pd-C (0.032 g) en etanol (2 mL) a 1 atmósfera de H₂ y temperatura ambiente

durante 16h. Pasado ese tiempo, la mezcla se filtró sobre celita y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo resultante, consistente en el (S)-2-amino-3-fenilpropionato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo intermedio (rendimiento cuantitativo) se disolvió en diclorometano (5 mL) y se enfrió a 0° C. Sobre la disolución se adicionó trietilamina (0.103 mL, 0.74 mmol), se goteó cloruro de acetilo (0.040 mL, 0.56 mmol) y se agitó bajo atmósfera de N₂ durante 2h a 0° C. La disolución resultante se diluyó con CH₂Cl₂ (10 mL) y se lavó sucesivamente con HCl (0.1 M) (3 x 5 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 5 mL). El crudo se purificó mediante HPLC preparativo (columna Lichrosorb 60 μm, Hex/EtOAc 1:1). Rendimiento 57 % (0.158 mg).

(2S)-2-[(2S)-2-Acetilamino-3-metil-butanoilamino]-3-fenil-propionato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo 14

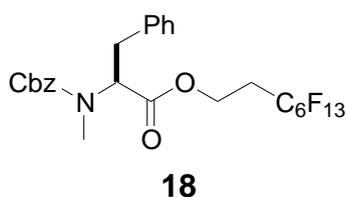


Sobre una disolución de (2S)-2-amino-3-fenilpropionato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo (0.672 mg, 1.31 mmol) y ácido (2S)-2-benciloxycarbonilamino-3-metilbutanóico (0.33 g, 1.31 mmol) en

diclorometano seco (10 mL) y DMF (0.34 mL) bajo atmósfera de N₂ a 0°C, se adicionó 1-hidroxibenzotriazol (178 mg, 1.31 mmol) y EDC (353 mg, 1.84 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16h, después se lavó con HCl (0.1M) (2 x 5 mL) y con una disolución saturada en NaHCO₃ (2 x 5 mL). El crudo obtenido (0.887 mg, 91% de rendimiento) se disolvió en etanol (10 mL) y sobre la disolución se adicionó un 10% de Pd-C (87 mg). La suspensión se agitó a temperatura ambiente y presión atmosférica de H₂ durante 6h, luego se filtró sobre celita y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo se volvió a disolver en diclorometano (15 mL) y se añadieron 2 eq.

de anhídrido acético (0.227 mL, 2.38 mmol); la disolución se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se evaporó el disolvente a presión reducida. El producto así obtenido se utilizó sin purificación adicional. Rendimiento 40% (0.34 g).

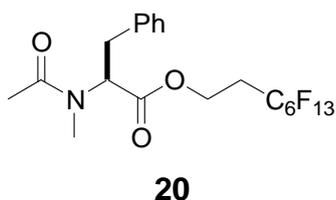
(S)-2-(N-Benciloxycarbonil-N-metilamino)-3-fenilpropionato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo 18



En un matraz seco bajo atmósfera de N₂ provisto de desecador y agitación magnética se adicionó una disolución de (L)-Cbz-fenilalanina **11** (0.900 mg, 3.0 mmol) y yoduro de metilo (1.5 mL, 24 mmol) en THF seco (7 mL). La disolución se agitó a 0° C y se le adicionó una suspensión de NaH (60 % en aceite mineral) (0.36 mg, 9 mmol) en THF seco (2 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24h. Pasado ese tiempo se adicionó EtOAc (5 mL) y agua (1 mL), la disolución se evaporó a presión reducida y el residuo se disolvió en Et₂O (20 mL) y se extrajo con HCl (0.1M, 10 mL x 3). El ácido (S)-2-(N-benciloxycarbonil-N-metilamino)-3-fenilpropiónico así obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/EtOAc 1:1) con un rendimiento de 61% (0.575 g).⁴⁰ Éste se disolvió en diclorometano seco (14 mL) y DMF (0.460 mL) y bajo atmósfera de N₂ se adicionó 1H,1H,2H,2H-perfluorooctanol (0.436 mL, 2.01 mmol) y HOBT (0.247 g, 1.83 mmol). La mezcla se enfrió a 0° C y sobre ella se adicionó EDC (0.491 g, 2.56 mmol); se agitó a temperatura ambiente durante 18h y se extrajo sucesivamente con HCl (0.1 M, 2 x 10 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃. El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/EtOAc 5:1). Rendimiento (57%, 0.688 mg) (Rendimiento global de los dos pasos 35%).

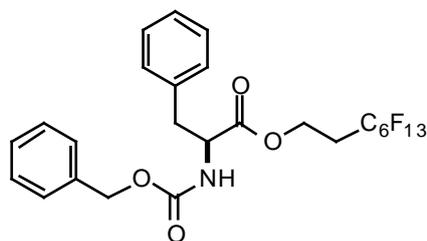
⁴⁰ J. R. McDermot, N. L. Benoiton, *Can. J. Chem.*, **1973**, 51, 1915-1919.

(S)-2-(N-Acetil-N-metilamino)-3-fenilpropionato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo 20



Se agitó una suspensión de (S)-2-(N-benciloxycarbonil-N-metilamino)-3-fenilpropionato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo **18** (0.18 g, 0.27 mmol) y Pd-C (10%, 18 mg) en etanol (2 mL) a presión atmosférica de H₂ y temperatura ambiente durante 3h (la reacción se siguió por TLC, Hex/EtOAc 5:1). Cuando la desprotección del carbamato de bencilo ya había finalizado, se filtró sobre celita y se evaporó el disolvente en el rotavapor para proporcionar el N-metilaminoéster intermedio. El crudo (140 mg, 95%) se disolvió en diclorometano (2 mL) y tras enfriar la reacción a 0° C, se adicionó anhídrido acético (0.05 mL, 0.52 mmol). La mezcla se agitó a dicha temperatura durante 2h y tras comprobar que la reacción había finalizado (TLC Hex/EtOAc 2:1) se evaporó el disolvente y el exceso de anhídrido acético a presión reducida. El producto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/EtOAc 2:1) y se obtuvo con un rendimiento del 62% (147 mg).

(S) -2-Benciloxicarbonilamino-3-fenilpropanoato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo



N° Referencia
12

P. M. (g/mol)

645.41

Pto. Furs. (°C)

Aceite

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1, CH₂Cl₂)

+14.3

Fórmula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C	H	N	C	H	N
C₂₅H₂₀F₁₃NO₄						

IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3330 (NH); 1742 (CO); 1734 (CO); 1526 (C-C arom); 1050-1400 (CF)
---------------------------	------------------------------------------------------------------

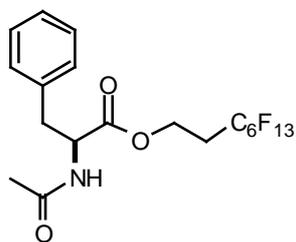
MS m/z	
--------	--

¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
7.33-7.07 (10H, m, -Ph)	171.3
5.24 (1H, d, J= 7.6 Hz, NH)	155.6
5.06 (2H, s, -O-CH ₂ -Ph)	136.2
4.64-4.61 (1H, m, -CH-CH ₂ -Ph)	135.5
4.33 (2H, t, J= 6.3, -CH ₂ -CH ₂ -CF ₂ -)	129.2
3.05 (2H, m, -CH-CH ₂ -Ph)	128.6
2.38-2.26 (2H, m, -CH ₂ -CH ₂ -CF ₂ -)	128.5
	128.2
	128.1
	127.2
	125-105 (6C, m)
	67.0
	57.1
	54.9
	38.1
	30.3 (t, J= 21.8 Hz)

Comentarios:

Al pinchar una muestra en el cromatógrafo GS-MS el producto se descomponía durante la separación cromatográfica, por lo que no fue posible conseguir su espectro de masas.

(S)-2-Acetamido-3-fenilpropionato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo

**Nº Referencia**
13

P. M. (g/mol)

553.32

Pto. Fusión (°C)

Aceite

 $[\alpha]_D^{25}$ (c= 1, CH₂Cl₂)

+21.8

Fórmula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C	H	N	C	H	N
C₁₉H₁₆F₁₃NO₃						

IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3270 (NH); 1746 (CO); 1655 (C-C arom); 1100-1300 (C-F)
---------------------------	--------------------------------------------------------

MS m/z	554 (2); 494 (10); 449 (11); 420 (27); 327 (12); 235 (6); 148 (79); 131 (100); 120 (67); 104 (34); 91 (61); 43(55)
--------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

¹H-NMR (δ, ppm) CDCl₃

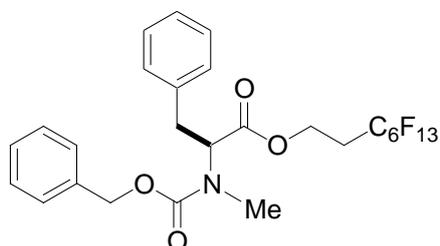
7.33-7.13 (5H, m, -Ph)
 6.01 (1H, d, J= 6.8 Hz, NH)
 4.89 (1H, dd, J= 6.4, 14.2 Hz, NH-CH-COO-)
 4.40 (2H, m, O-CH₂-CH₂-CF₂-)
 3.12(2, m, CH-CH₂-Ph)
 2.39 (2H, m, O-CH₂-CH₂-CF₂-)
 2.00 (3H, s, -OMe)

¹³C-NMR (δ, ppm) CDCl₃

170.4
 169.7
 135.6
 129.1
 128.6
 127.2
 125-105 (6C, m)
 57.1
 53.2
 37.8
 30.3 (t, J= 21.8Hz)
 22.9

Comentarios: La muestra, a pesar de haberse purificado por HPLC preparativo, no llegó a dar un microanálisis satisfactorio.

(S)-2-(N-Benciloxycarbonyl-N-metilamino)-3-fenilpropionato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo



Nº Referencia
18

P. M. (g/mol)

659.44

Pto. Fusión (°C)

Aceite

$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1, CH₂Cl₂)

Fórmula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C	H	N	C	H	N
C₂₆H₂₂F₁₃NO₄						

IR(cm ⁻¹ ,KBr)	1744 (b, CO); 1700 (C-C arom); 1050-1300 (C-F)
---------------------------	------------------------------------------------

MS m/z	
--------	--

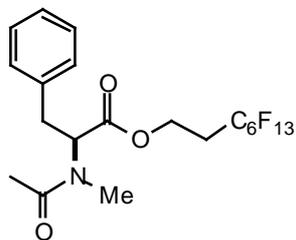
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
7.34-7.10 (10H, m, Ph)	170.6
5.07 (2H, s, Ph-CH ₂ -O-)	67.3
5.02 (2H, s, Ph-CH ₂ -O-) conf.	170.5 (conf)
4.84 (1H, dd, J= 10.5, 5.4 Hz, NMe-CH-COO)	60.8
4.73 (1H, dd, J= 10.2, 4.8 Hz, NMe-CH-COO)c	156.4
4.41- 4.26 (2H, m, -CH ₂ -CH ₂ -CF ₂ -)	57.0
3.35- 3.23 (1H, m, -CH-CH ₂ -Ph)	155.7
3.09- 2.95 (1H, m, -CH-CH ₂ -Ph)	35.3 (conf)
2.81 (3H, s, N-Me)	136.9
2.77 (3H, s, N-Me) conf.	34.8
2.47- 2.27 (2H, m, -CH ₂ -CH ₂ -CF ₂ -)	136.6 (conf)
	32.4
	136.3
	32.3
	129.2
	30.4 (t, J= 21.7Hz)
	128.6
	128.5
	128.4
	128.1
	127.9
	127.6
	126.8
	120-105 (CF)
	67.5

Observaciones:

Los espectros de ¹H-NMR y ¹³C-RMN muestran una mezcla de conformeros en una relación de 3:2.

Al pinchar una muestra en el cromatógrafo GS-MS el producto se descomponía durante la separación cromatográfica, por lo que no fue posible conseguir su espectro de masas.

(S)-2-(N-Acetil-N-metilamino)-3-fenilpropionato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo



Nº Referencia
20

P. M. (g/mol)

567.34

Pto. Fusión (°C)

Aceite

$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1, CH₂Cl₂)

-36.4

Fórmula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C	H	N	C	H	N
C₂₀H₁₈F₁₃NO₃	42.34	3.20	2.47			

IR(cm ⁻¹ ,KBr)	1742 (CO); 1655 (C-C arom); 1050-1300 (C-F)
---------------------------	---------------------------------------------

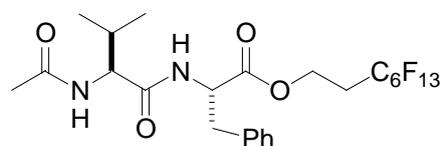
MS m/z	569 (3);494 (8); 435 (56); 176 (27); 134 (100); 88 (54); 42 (49);
--------	-------------------------------------------------------------------

¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	
7.31-7.12 (5H, m, -Ph)	171.2	29.7
5.04 (1H, dd, J= 5.5, 10.6 Hz, CH -CH ₂ -Ph)	170.5	29.0
4.50-4.34 (2H, m, - CH ₂ -CH ₂ -CF ₂ -)	169.7	21.6
3.33 (1H, dd, J= 5.5, 14.4 Hz, CH - CH ₂ -Ph)	137.0	21.0
3.06 (1H, dd, J= 10.6, 14.4 Hz, CH - CH ₂ -Ph)	136.4	
2.78 (3H, s, N- Me)	128.9	
2.54-2.35 (2H, m, - CH ₂ - CH ₂ -CF ₂ -)	128.8	
1.97 (3H, s, Me -CO)	128.6	
	127.3	
	126.8	
	125.105 (6C, m)	
	62.6	
	59.1	
	57.5	
	56.9	
	35.22	
	34.63	
	34.4	
	30.5 (t, J= 21.8Hz)	

Comentarios:

Los espectros de ¹H y ¹³C-muestran una relación de conformeros de 4:1.

(2S)-2-[(2S)-2-Acetilamino-3-metil-butanoilamino]-3-fenil-propanoato de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilo



Nº Referencia
14

P. M. (g/mol)
652,45

Pto. Fusión (°C)

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1, CH₂Cl₂)
+4,2

Fórmula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C	H	N	C	H	N
C₂₄H₂₅F₁₃N₂O₄	44.18	3.86	4.29	44.58	3.56	4.59

IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3287, 2969, 1748, 1644, 1541, 1244, 1202
---------------------------	------------------------------------------

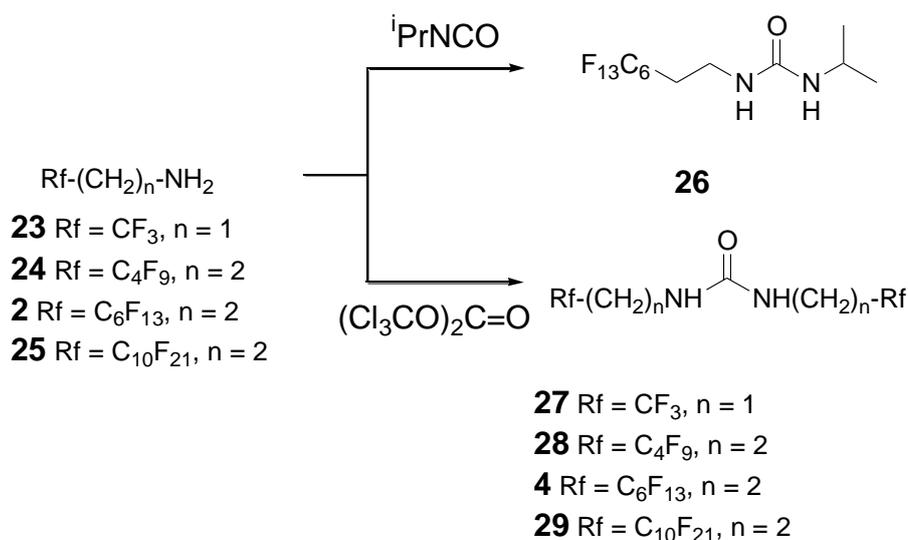
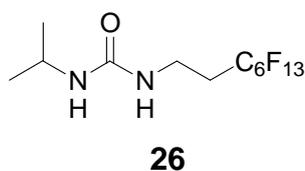
MS m/z	652 (0.9); 512 (4.0); 494 (29.2); 449 (4.7); 114 (100); 72 (48.3)
--------	-------------------------------------------------------------------

¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
7.3-7.1 (5H, m, Ph)
7.0 (1H, d, J= 7.8 Hz) NH
6.5 (1H, d, J= 8.8 Hz) NH
4.8 (1H, dd, J= 14.2, 6.8 Hz) CH
4.36-4.31 (1H, m) CH, CH ₂ -CH ₂ -CF ₂
3.1 (1H, dd, J= 6.36, 6.85, 13.7, 13.9 Hz, CH ₂ Ph)
3.07 (1H, d, J= 6.85, 13.69 Hz) CH ₂ Ph
2.4-2.3 (2H, m) CH ₂ -CF
2.02 (1H, dd, J= 5.87, 6.84, 12.72, 13.69 Hz) CH-(CH ₃) ₂
1.98 (3H, s) CH ₃
0.92 (3H, d, J= 6.85 Hz) CH(CH ₃) ₂
0.91 (3H, d, J= 6.85 Hz) CH(CH ₃) ₂

¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
171.4
170.9
170.4
135.5
129.1
128.6
127.2
119-108 (m, CF)
58.4
57.1
53.4
37.8
31.1
30.2 (t, J= 21Hz)
23.0
18.9
18.2

Comentarios:

1.3.2.4 Síntesis de ureas polifluoradas

N-Isopropil-N'-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctil)urea **26**

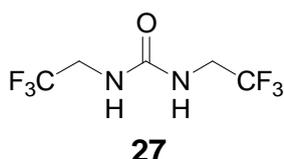
Sobre una disolución de 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilamina **2** (399 mg, 1.1 mmol) en diclorometano (5 mL) bajo atmósfera de N_2 se goteó lentamente isocianato de isopropilo (0.098 mL, 85 mg, 1 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. y pasado ese tiempo se formó un gel. El disolvente se evaporó a presión reducida y se obtuvo directamente el producto puro con un rendimiento del 95% (425 mg).

Procedimiento general para la síntesis de las ureas **4, **27**, **28** y **28** (Ref. **26**, pag. **30**)**

Sobre una disolución de la perfluoroalquilamina correspondiente **2**, **23**, **24** y **25** (25.6 mmol) en diclorometano (64 mL) y NaOH 6M (25 mL) enfriada a 0°C , se goteó una disolución de trifosgeno (2.53 g, 8.53 mmol) en diclorometano (12 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5h, observándose la precipitación de urea conforme se formaba. El diclorometano fue evaporado directamente de la mezcla a presión reducida (rotavapor) y el sólido se disolvió en éter etílico (200 mL). La fase orgánica se decantó y fue lavada con una disolución saturada en cloruro sódico (5 x 100

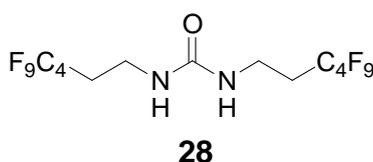
mL) hasta que las aguas del lavado tuvieran pH neutro. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico y, tras evaporar el disolvente a presión reducida, el producto fue cristalizado en metanol.

N,N'-Bis-(2,2,2-trifluoroetil)urea **27**



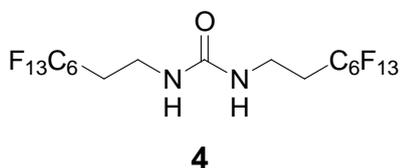
Se siguió el procedimiento general partiendo de 2,2,2-trifluoroetilamina **23** (0.6 mL, 6 mmol). Se obtuvo la urea deseada con un 46 % de rendimiento (0.34 g).

N,N'-Bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorohexil)urea **28**

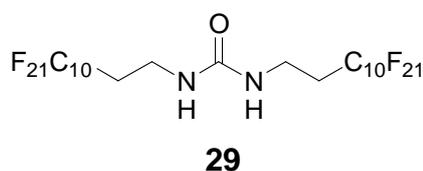


Se siguió el procedimiento general partiendo de una disolución en perfluorooctano de la 1H,1H,2H,2H-perfluorohexilamina **24**. El producto, un sólido blanco, se obtuvo por cristalización en cloroformo (40%, 1.1 g, rendimiento global partiendo del yoduro **21**).

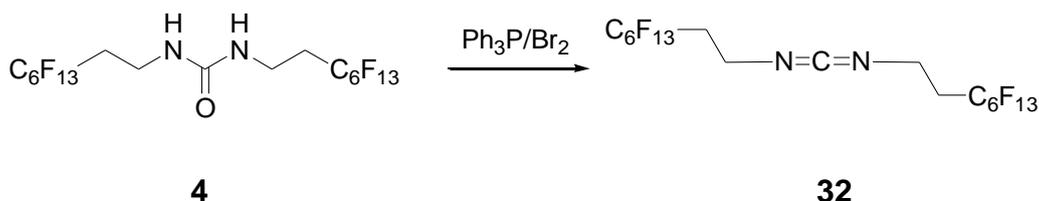
N,N'-Bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctil)urea **4**



Se siguió el procedimiento general partiendo de la 1H,1H,2H,2H-perfluorooctilamina **2** (9.3 g, 25.6 mmol). Rendimiento: 83% (7.89 g).

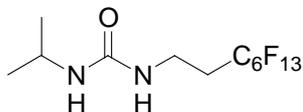
N,N'-Bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorododecil)urea 29

Se siguió el procedimiento general partiendo de la 1H,1H,2H,2H-perfluorododecilamina **25** (0.56 g, 1 mmol). Se obtuvo el producto deseado con un rendimiento del 98 % (0.574 g). El producto resultó ser muy insoluble en la mayoría de los disolventes, aunque se disolvía ligeramente en metanol.

1.3.2.5 Síntesis de N,N'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctil)carbodiimida 32

Sobre una suspensión de N,N'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctil)urea **4** (2.26 g, 3 mmol) en perfluorohexano (15 mL) bajo atmósfera de N₂ a 0° C, se adicionó una disolución de trifetilfosfina (2.36 g, 9.0 mmol) en diclorometano (30 mL). Después se goteó bromo (0.45 mL, 1.44 g, 9 mmol) hasta que la mezcla adquiriese un color amarillo, trietilamina (2.0 mL, 15 mmol) y la reacción se agitó durante 15 min. a 0° C y 16 h a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se obtuvieron dos fases de las que se decantó la fase fluorosa inferior homogénea y se separó mediante una jeringa. La disolución fluorosa se introdujo en un matraz seco bajo atmósfera de N₂ y la fase de diclorometano se extrajo con perfluorohexano (2 x 2.5 mL). Las fases fluorosas combinadas se evaporaron en el rotavapor para dar la carbodiimida **32** pura que fue almacenada a -20° C bajo atmósfera de N₂. Rendimiento: 2.1 g, (98%).

N-Isopropil-N'-(1H1H,2H,2H-perfluorooctil)urea

N° Referencia
26

P. M. (g/mol)

448.23

P. F. (°C)

65-66

 $[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, CH₂Cl₂)

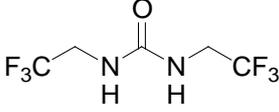
Formula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental		
	C₁₂H₁₃F₁₃N₂O	C 32.13	H 2.92	N 6.25	C 32.06	H 3.04

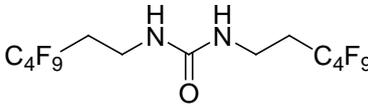
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3350 (NH); 1631 (CO)
---------------------------	----------------------

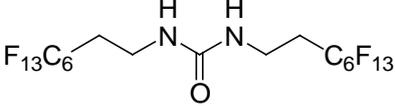
MS m/z	449 (100); 434 (4.9); 388 (35.4); 363 (21.9); 345 (19.0); 44 (87.1)
--------	---------------------------------------------------------------------

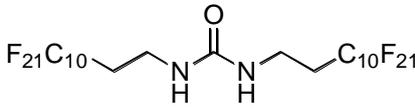
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
4.71 (1H, t J = 5.7Hz) CH ₂ -CH ₂ -NH- 4.54 (1H, d J=7.7Hz) NH-CH-(CH ₃) ₂ 3.84 (1H, m) NH-CH-(CH ₃) ₂ 3.60 (2H, q J= 6.4Hz) NH-CH ₂ -CH ₂ 2.35 (2H, m) CH ₂ -CH ₂ -CF ₂ - 1.15 (2H, d J= 6.6Hz) CH-(CH ₃) ₂	157.16 (1C, s) C=O 105-125 (6C,m) C-F 42.34 (1C, s) CH(CH ₃) ₂ 32.70 (1C, s) NH-CH ₂ -CH ₂ 31.68 (1C, t J= 21 Hz) CH ₂ -CF ₂ 23.35 (2C, s) CH-(CH ₃) ₂

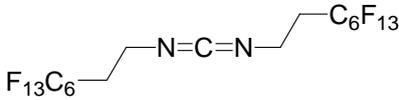
Observaciones:

N,N'-Bis-(2,2,2-trifluoroetil)urea		N° Referencia 27				
		P. M. (g/mol)				
		224.11				
		P. F. (°C)				
		155-156				
		[α] _D ²⁵ (c= 1.0, CH ₂ Cl ₂)				
Formula Empírica C₅H₆F₆N₂O	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental		
	C 26.80	H 2.69	N 12.50	C 27.40	H 2.67	N 12.55
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3356.5(NH); 3320.6 (NH); 1643.8 (C=O); 1600					
MS m/z	225 (41); 197 (17); 161 (13); 109 (25); 95 (46); 91 (100); 67(22).					
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			
4.82 (2H, s) NH 3.83 (4H, q J= 9 Hz) -CH₂-CF₃			159.55 (1C, s) C=O 126.12 (2C, q J= 278 Hz) -CH₂-CF₃ 42.25 (2C, q J= 34.5 Hz) -CH₂-CF₃			
<u>Observaciones:</u> Soluble en éter dietílico y metanol						

N,N'-Bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorohexil)urea		N° Referencia 28				
		P. M. (g/mol)				
		552.205				
		P. F. (°C)				
		65-66				
		$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, CH ₂ Cl ₂)				
Formula Empírica C₅H₆F₆N₂O	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental		
	C 28.28	H 1.82	N 5.07	C 28.62	H 1.90	N 5.24
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3365 (NH); 1638.8 (C=O)					
MS m/z	552 (100); 534 (21); 333 (11.5); 264 (15); 244 (20); 44 (24)					
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			
4.81 (2H, b.s) NH 3.55 (4H, m) NH-CH₂-CH₂ 2.35 (4H, m) CH₂-CH₂-CF₂-			157.33 (1C, s) C=O 105-125 (8C, m) -CF 32.77 (2C, s) NH-CH₂-CH₂- 31.38 (2C, t J= 21 Hz) -CH₂-CH₂-CF₂-			
<u>Observaciones:</u> Soluble en éter dietílico y metanol						

N,N'-Bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorohexil)urea		N° Referencia 4				
		P. M. (g/mol)				
		752.24				
		P. F. (°C)				
		95				
		$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, CH ₂ Cl ₂)				
Formula Empírica C₁₇H₁₀F₂₆N₂O	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental		
	C 27.14	H 1.34	N 3.72	C 27.53	H 1.40	N 3.86
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	1100,1300 (CF),1581.2 (amida 2), 1637.5 (C=O), 3333.3, 3380.2 (NH)					
MS m/z	753 (16); 752 (100); 734 (48); 362 (11.3); 344 (14); 44 (26)					
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			
2.48 (4H, m) -CF ₃ -CH ₂ -CH ₂ - 3.70 (4H, b.s) -CH ₂ CH ₂ NH- 6.48 (2H, b.s) NH			159.0 (1C, s) C=O 33.98 (1C, s) NH-CH ₂ -CH ₂ - 32.8 (1C, t J= 21Hz) CH ₂ -CH ₂ -CF ₂ -			
<u>Observaciones:</u> Soluble en éter dietílico y metanol						

N,N'-Bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorododecil)urea		Nº Referencia 29				
		P. M. (g/mol) 1152.30				
		P. F. (°C)				
		$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, CH ₂ Cl ₂)				
Formula Empírica C₂₅H₁₀F₄₂N₂O	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental		
	C 26.06	H 0.85	N 2.43	C 23.81	H 0.631	N 2.323
IR(cm ⁻¹ ,KBr)						
MS m/z						
¹ H-NMR (δ, ppm) MeOD			¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			
2.96 (4H, t, J= 7.4Hz, CH ₂ -CH ₂ -NH) 2.35 (4H, m, CF-CH ₂ -CH ₂)						
Observaciones: Sólido blanco imposible de purificar mediante cromatografía o cristalización por su baja solubilidad. Microanálisis no satisfactorio. El espectro de ¹³ C-NMR adquirido en MeOD a 40° C no dio señal alguna, el espectro de ¹ H-NMR se adquirió en ese disolvente a 40° C. La señal del NH colapsa con la del MeOD.						

N,N'-Bis-(1H1H,2H,2H-perfluorooctil)carbodiimida		N° Referencia 32				
		P. M. (g/mol)				
		734.22				
		P. F. (°C)				
		[α] _D ²⁵ (c= 1.0, CH ₂ Cl ₂)				
Formula Empírica C₁₇H₈F₂₆N₂	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental		
	C	H	N	C	H	N
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	2134, 1248, 1235					
MS m/z	735 (3.5); 402 (100); 370 (11.2); 55 (22.4)					
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			
3.59 (2H, t, J= 7Hz) =N-CH ₂ - 2.29 (2H, m) -CH ₂ -CF ₂ -			139.0 (1C, s) -N=C-N- 125-105 (26C, m) -C ₆ F ₁₃ 38.5 (2C,s) =N-CH ₂ - 32.3 (2C, t, J= 21 Hz) -CH ₂ -CF ₂ -			
Observaciones: Líquido incoloro que es almacenado bajo atmósfera de N ₂ a -20° C. El crudo se utilizaba en ls siguientes reacciones sin destilar.						

1.3.3 Síntesis de péptidos

1.3.3.1 Acoplamiento peptídico

Método A: En un matraz seco y bajo atmósfera de N₂ se disolvió el correspondiente ácido o aminoácido con el grupo amino protegido (0.25 mmol) y la amina o aminoéster (0.25 mmol) en CH₂Cl₂ (1 mL) y sobre la mezcla se añadió una disolución de la carbodiimida **32** (0.2 g, 0.27 mmol) en perfluorohexano (1 mL). La reacción se agitó enérgicamente durante 24 h., tras la cual se observó un precipitado de urea. Se adicionó ácido perfluoroheptanóico (91 mg, 0.25 mmol), y tras agitar durante 2 min. y haberse disuelto la urea por completo, se extrajo la fase inferior fluorosa mediante una jeringa. La fase superior de diclorometano se lavó sucesivamente con una disolución de ácido perfluoroheptanóico (91 mg, 0.25 mmol) en perfluorohexano (1 mL), perfluorohexano (1 mL), una disolución 0.1M de HCl (1 mL) y una disolución saturada en NaHCO₃ (1 mL). Una vez secado el disolvente sobre MgSO₄ y evaporado a presión reducida se obtuvo el producto puro.

Método B: En un matraz seco y bajo atmósfera de N₂ se disolvieron el ácido o aminoácido con el grupo amino protegido (0.25 mmol) y la amina o aminoéster (0.25 mmol) en CH₂Cl₂ (1 mL) y sobre la disolución se añadió una disolución de la carbodiimida **32** (0.2 g, 0.27 mmol) en perfluorohexano (1 mL) y 4-N,N-dimetilaminopiridina (6 mg, 0.05 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h tras las cuales se le adicionó ácido perfluoroheptanóico (91 mg, 0.25 mmol), se agitó durante 2 min. y tras haberse disuelto la urea por completo, se adicionó una disolución de HCl (0.1M, 1 mL). Se separaron las tres fases, y la fase del diclorometano se lavó consecutivamente con una disolución de ácido perfluoroheptanóico (91 mg, 0.25 mmol) en perfluorohexano (1 mL), perfluorohexano (1 mL) y una disolución saturada en NaHCO₃ (1 mL). Una vez secada la disolución sobre MgSO₄ y evaporada a presión reducida se obtuvo el producto puro.

1.3.3.2 Síntesis de ésteres *terc*-butílicos

En un matraz seco y bajo atmósfera de N₂ se adicionó una disolución del correspondiente ácido (0.5 mmol) y *terc*-butanol (1.1 mmol) en diclorometano (2.5 mL) y sobre ella una disolución de N,N'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctil)carbodiimida **32** (0.808 g, 1.1 mmol) en perfluorohexano (2.5 mL). Por último, se adicionó una cantidad catalítica de 4-N,N-dimetilaminopiridina (12 mg, 0.1 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18h. Pasado ese tiempo se adicionó ácido perfluoroheptanóico (0.4 g, 1.1 mmol) y una disolución de HCl (0.1M, 2 mL). Se separaron las tres fases y la fase del diclorometano se lavó consecutivamente con una disolución de ácido perfluoroheptanóico (0.4 g, 1.1 mmol) en perfluorohexano (2 mL), perfluorohexano (2mL) y una disolución saturada en NaHCO₃ (2 mL). Una vez secada la disolución sobre MgSO₄ y evaporada a presión reducida se obtuvo el producto puro.

1.3.3.3 Recuperación de la N,N'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctil)urea **4**

Una vez evaporado el perfluorohexano de las extracciones se obtuvo un aceite consistente en la mezcla de ácido perfluoroheptanóico y N,N'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctil)urea. El ácido fue sublimado a vacío (0.04 torr) utilizando un colector de tipo góndola enfriado con un baño de acetona/CO₂ (-78° C). La mezcla se calentó durante 4h a 90°C, recuperándose el 91 % del ácido. La urea remanente en el matraz se cristalizó en metanol obteniendo urea pura con un 87% de rendimiento.

1.3.3.4 Determinación cromatográfica (GC-MS) de N,N'-bis-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)urea en crudos de reacción

La cromatografía gaseosa se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Finnigan MAT GCQTM, utilizando una columna Tracer TRB-5 de 15m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno.

En todos los casos se inyectó 1 μ L de disolución. La temperatura de inyección era de 250°C, y se realizó la pinchada a 50°C, manteniendo esta temperatura durante 5 min. y aumentando la temperatura hasta 300°C con una velocidad de 15°C/min. La temperatura se mantenía durante otros 5 min. a 300°C.

Todas las muestras se disolvieron en metanol seco por ser un disolvente en el que eran solubles tanto la urea como los productos obtenidos en las reacciones de acoplamiento y formación de ésteres terc-butílicos. Inicialmente se realizó una curva de calibrado para la urea y el fenantreno (patrón interno). Se inyectaron muestras con una concentración de 2×10^{-3} % (en peso) de fenantreno y una concentración variable de urea desde 2×10^{-4} % hasta 2×10^{-3} obteniéndose una línea recta con regresión lineal del $R^2 = 0.9985$.

Se prepararon después las disoluciones de los compuestos sintetizados en metanol a concentraciones de 0.2 % para el crudo y de 2×10^{-3} % para el fenantreno. Una vez integradas las áreas de los picos de la urea a 12.37 min. y de fenantreno a 13.31 min., se estimó la cantidad de urea en la muestra.

1.3.3.5 Estudios FTIR de formación de puentes de hidrógeno en los compuestos 4, 40, 41, 42 y 15.

Los espectros se registraron en un espectrómetro Nicolet Magna-560 FTIR equipado con una celda de líquidos de KBr con ventana (specac) de espesor 1 mm. Los espectros se adquirieron a 25° C (64 scans, 4 cm^{-1} de resolución) y se restó la señal del disolvente. Se utilizaron disoluciones de concentración 5×10^{-3} M en diclorometano y perfluorohexano (Fluorochem) secos y desgasificados.

Anexos del Capítulo 1

ANEXOS CAPÍTULO 1

ANEXO 1- Estudios del complejo 42·15 mediante espectroscopía infrarroja FTIR.

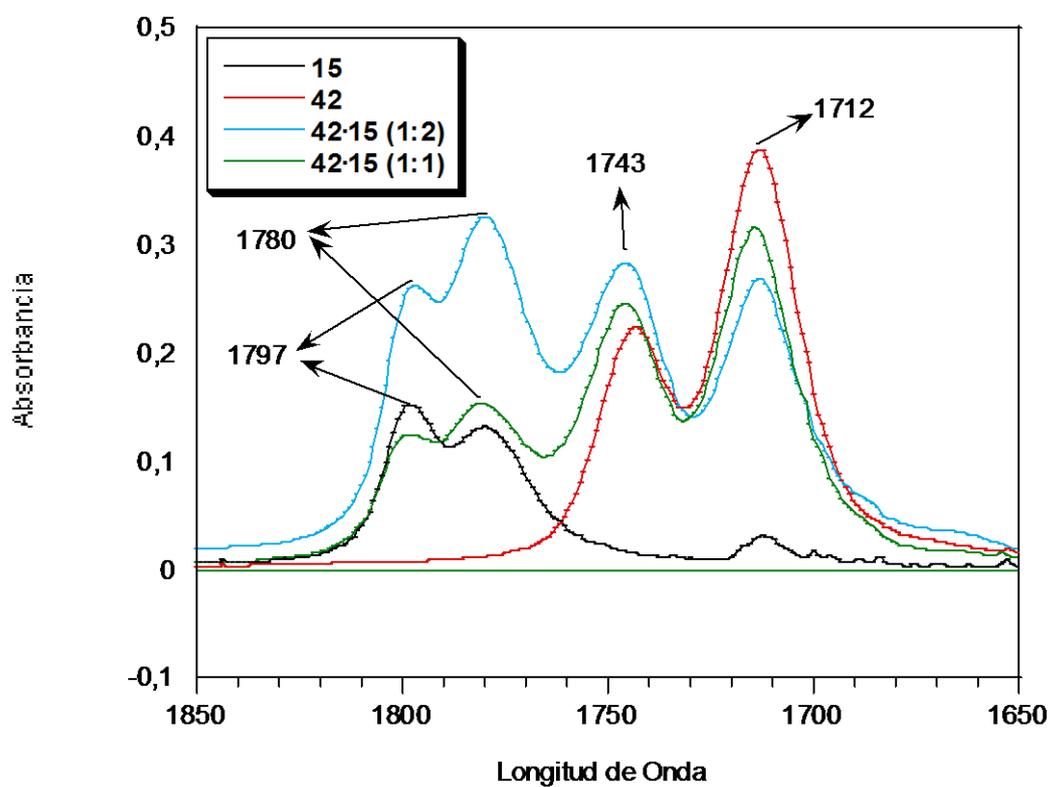
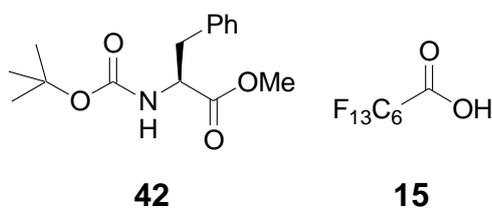


Figura 1. 58: Zona del carbonilo de los espectros de IR del ácido 15 (5mM), 42 (5mM), 15·42 (5 mM), y 15 (10 mM) 42 (5mM) registrados en diclorometano.

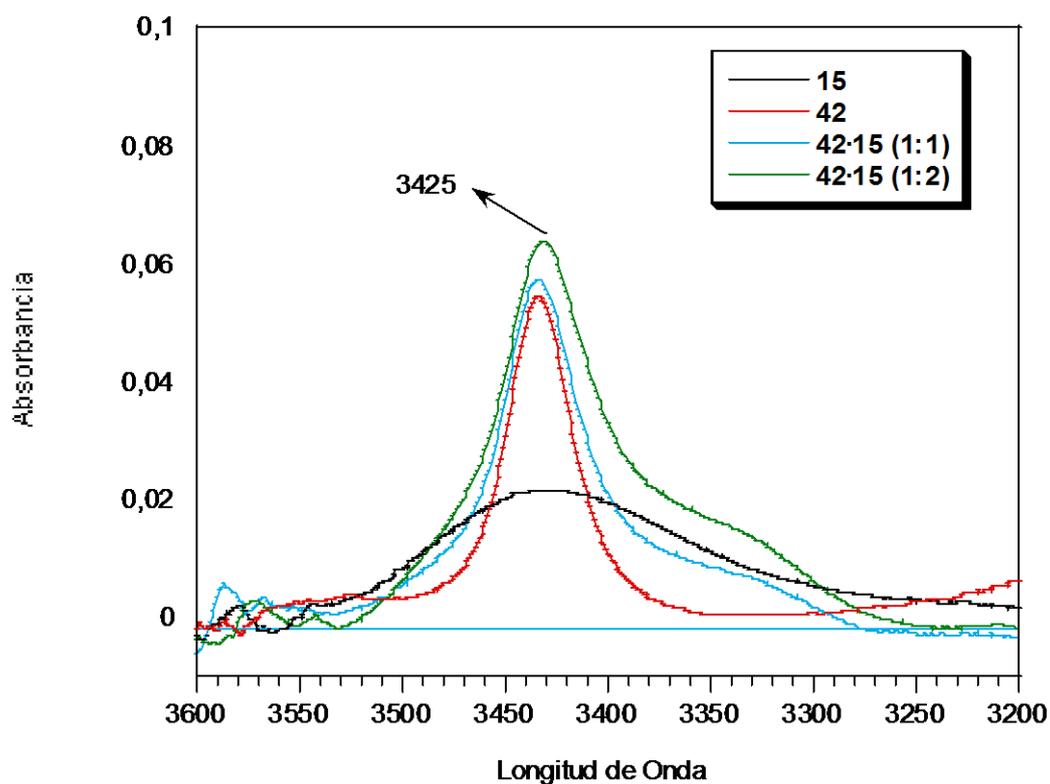
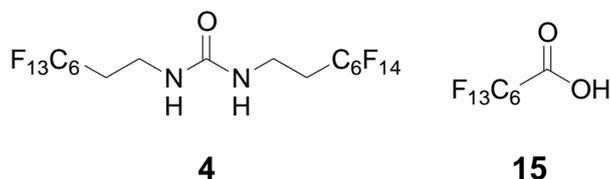


Figura 1. 59: Zona de NH y OH de los espectros de IR del ácido **15** (5mM), **42** (5mM), **15·42** (5 mM), y **15** (10 mM) **42** (5mM) registrados en diclorometano.

ANEXO 2- Estudio por IR del complejo **4·15** en perfluorohexano y diclorometano



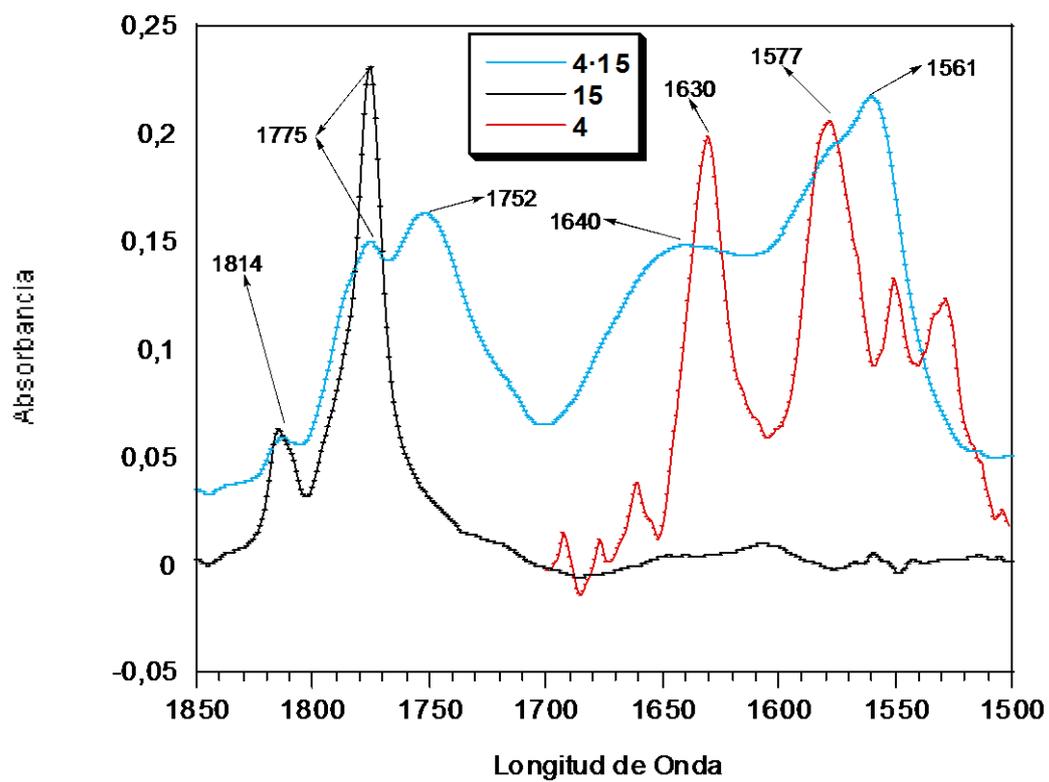


Figura 1. 60: Zona de carbonilo de los espectros de IR del ácido **15** (5mM), **4** (1mM) y **4-15** (5 mM), registrados en perfluorohexano.

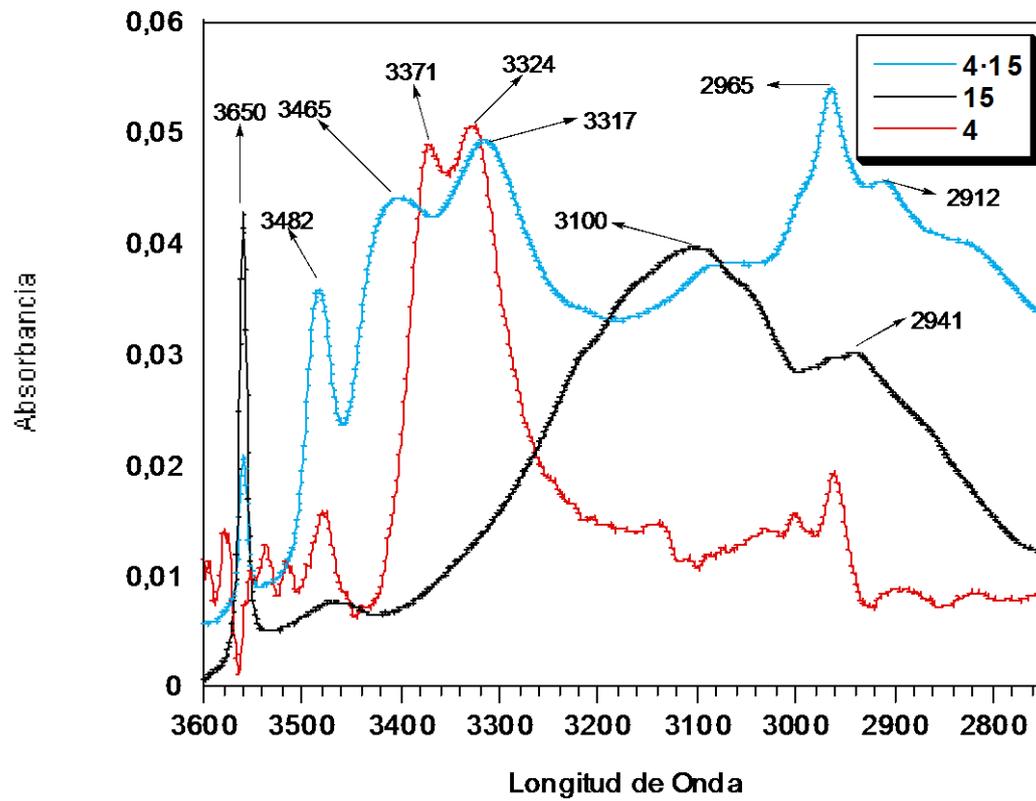


Figura 1. 61: Zona de NH y OH de los espectros de IR del ácido 15 (5mM), 4 (1mM) y 4·15 (5 mM), registrados en perfluorohexano.

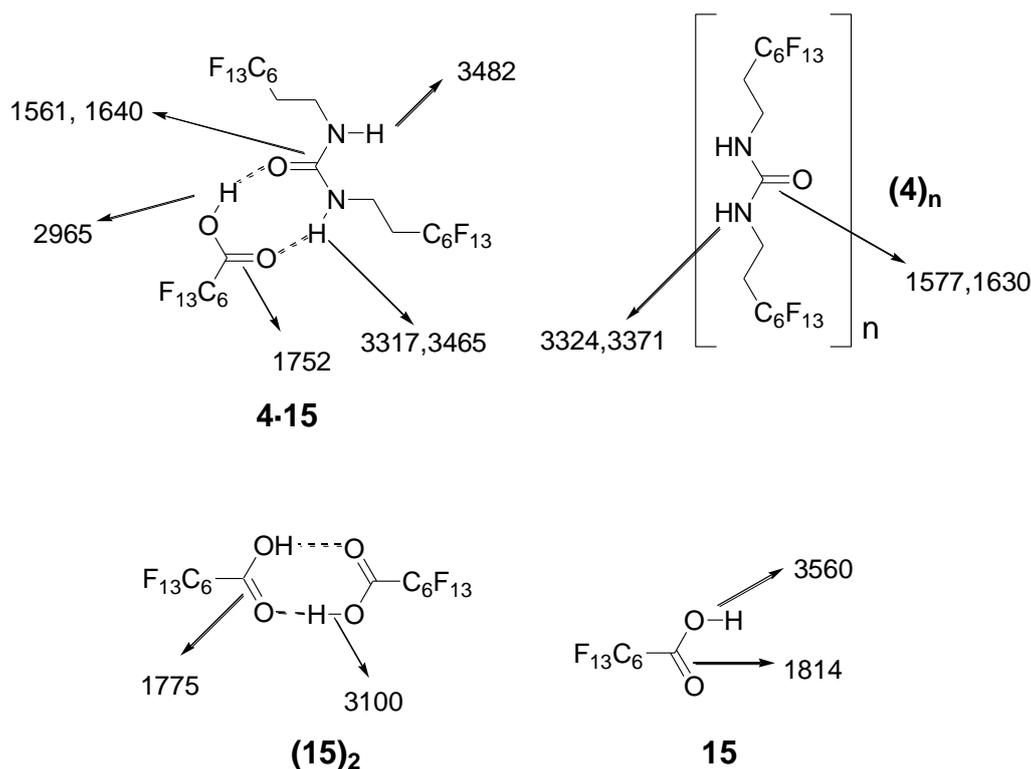


Figura 1. 62: Asignación de las bandas correspondientes a las especies formadas por la urea **4** y el ácido **15** en perfluorohexano.

En ambos disolventes urea **4** da dos bandas en la zona del carbonilo correspondientes a las vibraciones de amida I y amida II (se trata de una frecuencia de tensión combinada entre el enlace C-N y el enlace N-H). En perfluorohexano las moléculas de urea **4** se encuentran autoagregadas (la frecuencia de la banda del carbonilo a 1630 cm^{-1} es muy baja para que la especie esté libre y la frecuencia de amida II es de 1577 cm^{-1}). La mayoría del ácido se encuentra como dímero pues aparecen dos frecuencias de vibración una débil correspondiente al ácido libre a 1814 cm^{-1} y una segunda más intensa a frecuencia más baja a 1775 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del ácido dimérico. Lo mismo se observa en la zona de los OH donde el ácido da una banda muy ancha a 3100 cm^{-1} correspondiente al dímero (**5**)₂ y una banda a 3569 cm^{-1} correspondiente al ácido libre. Las dos bandas de vibración de los NH de la urea **4**, incluso a una concentración 1 mM , indican que ésta se halla completamente autoagregada. Los espectros del complejo **4·15**, en perfluorohexano indican la formación de especies nuevas (ver Figuras Figura 1. 60 y Figura 1. 62). En la zona del carbonilo, las dos bandas del carbonilo correspondiente a la urea se desplazan a 1561 y 1640 cm^{-1} , y aparece una banda para el carbonilo del ácido asociado a 1752 cm^{-1} que

al estar tan desplazada, indica la formación de sistema doble de puentes de hidrógeno. Adicionalmente, las bandas de NH se desplazan, y aparece una nueva a 3482 cm^{-1} que al ser una frecuencia tan alta, se asigna al NH sin coordinar. En cambio la señal del OH del ácido se desplaza a frecuencias más bajas, indicando que está fuertemente coordinado (a 2965 cm^{-1}).

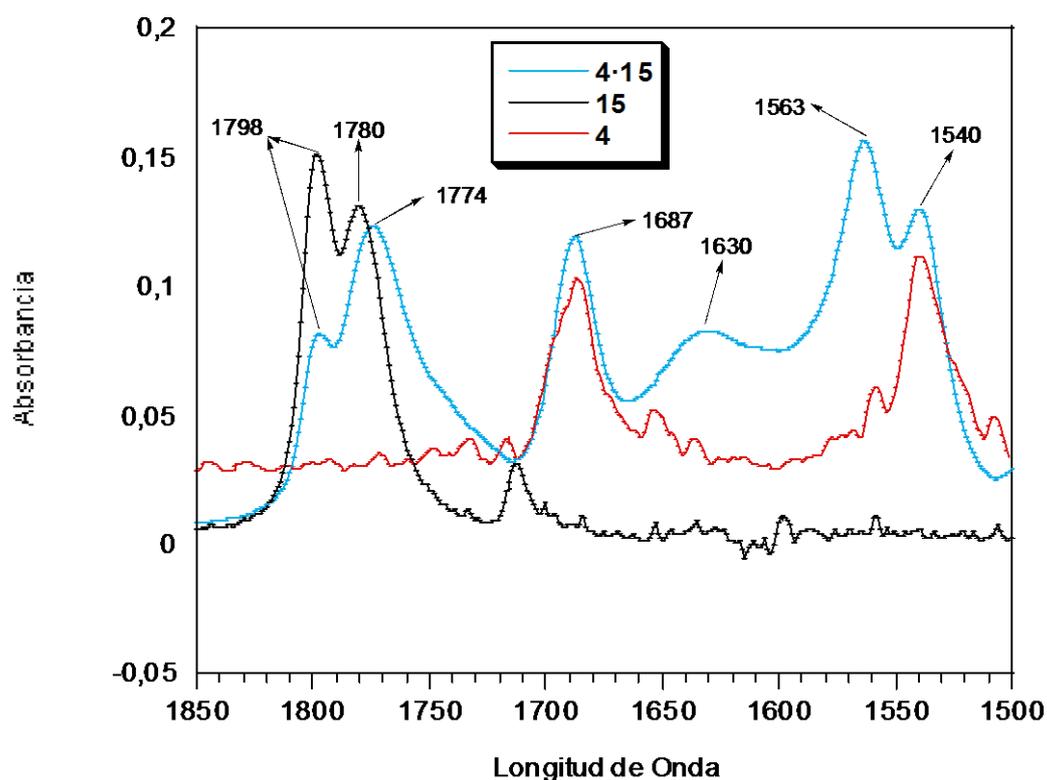


Figura 1. 63: Zona del carbonilo de los espectros de IR del ácido **15** (5mM), **4** (trazas) y **4·15** (5 mM), registrados en diclorometano.

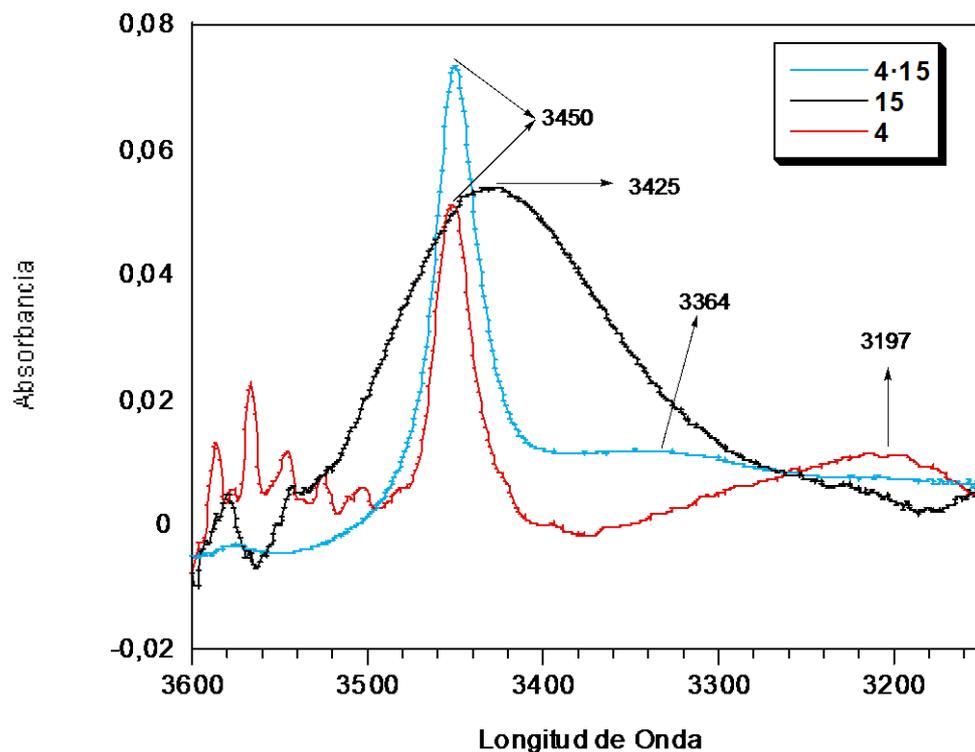


Figura 1. 64: Zona de NH y OH de los espectros de IR del ácido **15** (5mM), **4** (trazas) y **4·15** (5 mM), registrados en diclorometano.

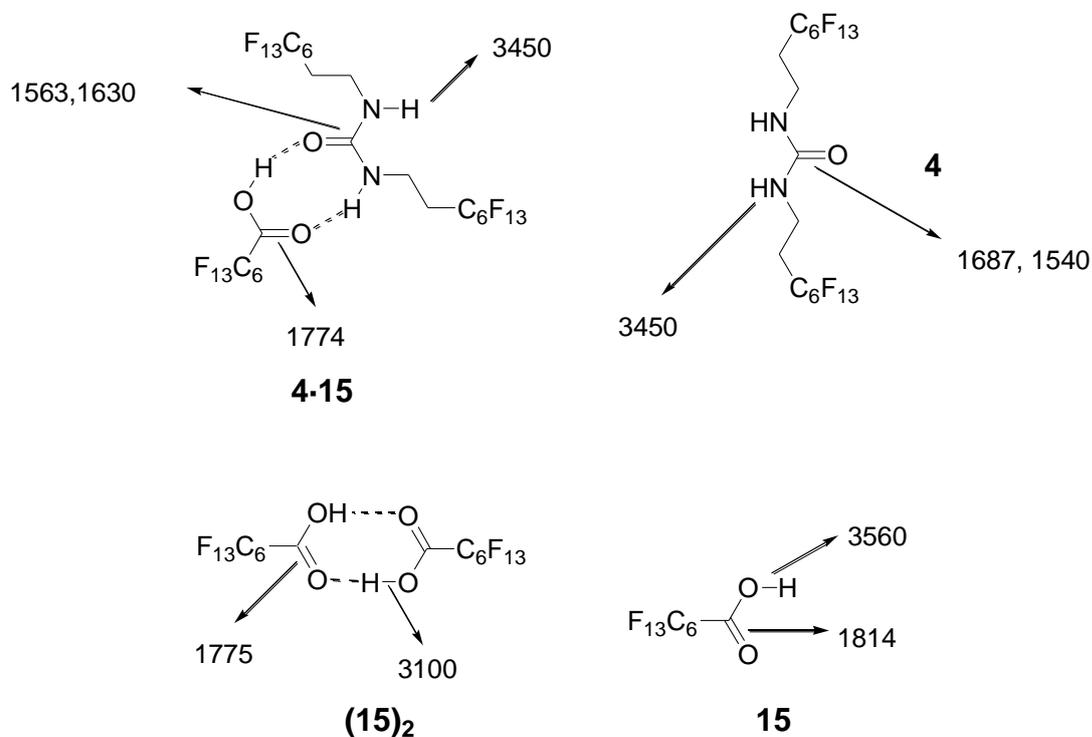


Figura 1. 65: Asignación de las bandas correspondientes a las especies formadas por la urea **4** y el ácido perfluoroheptanóico **15** en diclorometano.

En diclorometano la urea **4** se encuentra disociada (NH a 3450 cm^{-1} y 1686 cm^{-1} el carbonilo)

En este caso también se forman especies nuevas al añadir el ácido **15** a la urea **4**, apareciendo tres bandas nuevas, dos correspondientes al carbonilo de la urea a 1563 cm^{-1} y 1630 cm^{-1} y otra correspondiente al carbonilo del ácido asociado a la urea a 1774 cm^{-1} . Así como en el diclorometano se siguen viendo las señales del carbonilo de la urea sin asociarse al ácido (banda a 1540 cm^{-1}), en el caso del perfluorohexano las bandas de la urea sin asociar desaparecen por completo.

ANEXO 3- Espectros de urea y ácido 4·15 a diferentes fracciones molares.

Se adquirieron espectros del complejo urea ácido **4·15** a diferentes fracciones molares, desde Xurea 0 hasta 1 con variaciones de 0.1. Parecía que no se formaban especies nuevas aunque se añadiera más ácido. Una señal muy representativa es la del NH no asociado en el complejo. Esta señal que aparece a 3482 cm^{-1} , no desaparece aunque haya exceso de ácido, lo que significa que la especie sólo tiene una molécula de ácido perfluoroheptanóico.

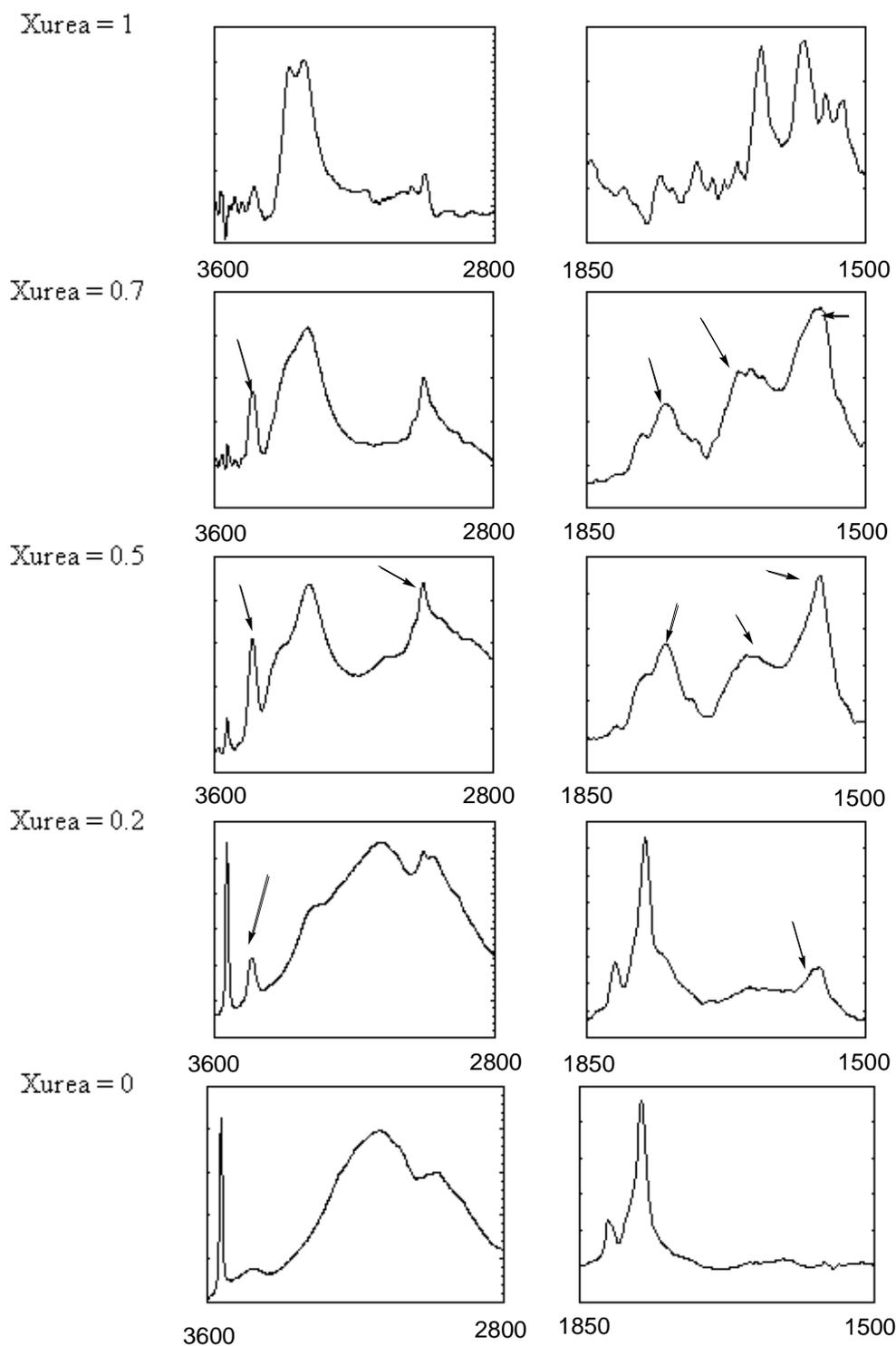


Figura 1. 66: Espectros de FTIR del complejo **4·15** de la zona del carbonilo y amina, a diferentes fracciones molares de urea.

ANEXO 4-Medida de la Curva de Job para el complejo urea-ácido en perfluorohexano.

Los espectros se midieron a concentraciones de $[urea]+[ácido]=0.005M$ en perfluorohexano con $CDCl_3$ como patrón externo. Como no era posible observar en todo momento el protón correspondiente a los NH se midieron los protones correspondientes a los metilenos de la cadena fluorosa (CH_2 1 y CH_2 2)

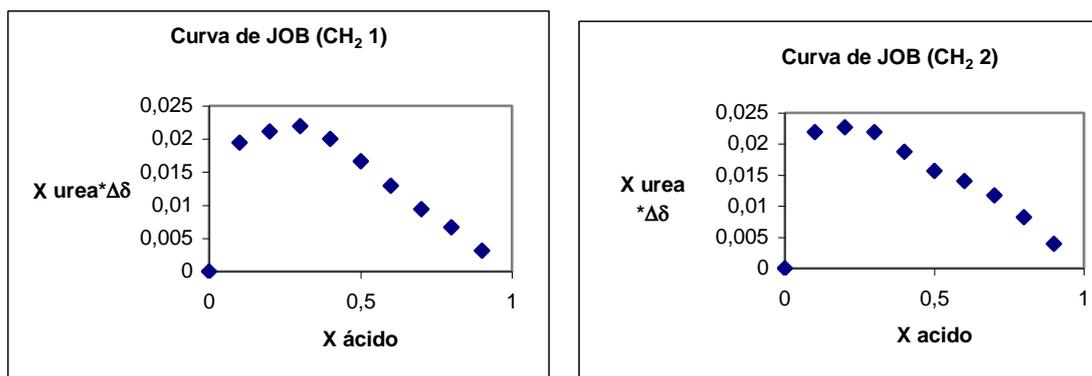
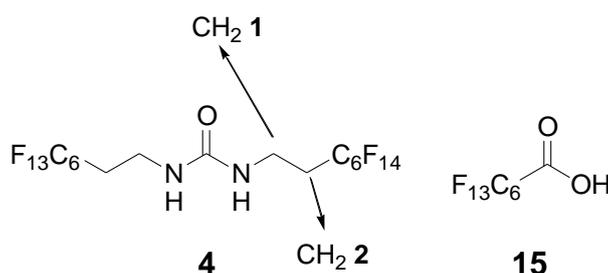


Figura 1. 67: Curva de Job determinadas para el complejo urea-ácido **4·15** observando los protones correspondientes a los metilenos de la cadena fluorosa de la urea.

Los máximos de la curva se dan en el primer caso a una fracción de ácido de 0.3 (relación $[urea]:[ácido]$ 2.3:1), y en el segundo caso a una fracción de ácido de 0.2 (relación $[urea]:[ácido]$ 4:1). Este resultado no es congruente con un equilibrio entre especies completamente solubles en el disolvente y es ello debido a la gran tendencia a autoagregarse de la urea **4** en perfluorohexano. No se obtienen valores reales de los desplazamientos químicos porque la urea se encuentra agregada y al precipitar, la concentración que creemos tener no es la real.

**CAPÍTULO 2: MODULACIÓN DE PUENTES DE
HIDRÓGENO INTRAMOLECULARES EN
CICLOPEPTAPÉPTIDOS RGD MEDIANTE MIMÉTICOS β -
LACTÁMICOS: DISEÑO Y SÍNTESIS DE UN LIGANDO
DE INTEGRINA $\alpha_v\beta_3$**

Introducción Hipótesis Y Objetivos

2.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

2.1.1 Introducción

2.1.1.1 Adhesión celular controlada por integrinas y procesos patológicos

Los fenómenos de adhesión son procesos clave del desarrollo celular que controlan la formación de órganos y tejidos en los organismos pluricelulares así como su muerte controlada o apoptosis. La adhesión celular tiene lugar a través de diferentes proteínas situadas en la membrana⁴¹ tales como receptores de citocinas, los receptores asociados a proteínas G (GPCR) o los receptores de factores de crecimiento pero, sobre todo, a través de las integrinas.

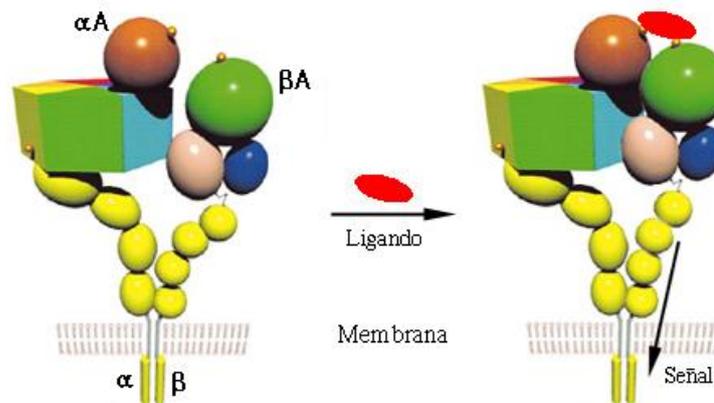


Figura 2.1: Representación esquemática de la interacción de un ligando con los dominios αA (pardo) y βA (verde) de una integrina.

Las integrinas⁴² Figura 2.1 son receptores α, β -heterodiméricos compuestos por varios dominios extracelulares extensos, una hélice transmembrana y unos dominios

⁴¹ C. Marshall, *Nature Cell Biology*, **2000**, E185-187.

⁴² Para una revisión acerca de la estructura de las integrinas, ver: a) M. J. Humphries, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 311-339. b) R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.*

intracelulares reducidos. Se conocen 25 integrinas presentes en las células de los mamíferos que se pueden clasificar de acuerdo con la estructura de las ramas α y β . Además, es conocido que sólo los dominios αA y βA , correspondientes a los extremos más externos de dichas ramas, participan en la interacción con ligandos y, por tanto, desencadenan la transducción de señal. Las sobreexpresiones de las integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_V\beta_3$ ó $\alpha_5\beta_1$ están asociadas al desencadenamiento de importantes mecanismos biológicos. Así, por ejemplo, la primera está implicada en la agregación plaquetaria⁴³, la segunda regula la angiogénesis,⁴⁴ o la migración celular en músculo blando vascular⁴⁵ y las dos últimas están implicadas en la adhesión de osteoclastos en la matriz ósea.⁴⁶ Por ello, no es de extrañar que diferentes ligandos capaces de interferir selectivamente estos procesos de adhesión sean considerados como dianas terapéuticas para patologías tales como la trombosis, la metástasis de tumores sólidos cancerígenos, la restenosis posterior a la angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA) o la osteoporosis.

Existen diferentes proteínas naturales que actúan como ligandos selectivos de integrina. Así, la vitronectina procedente del suero sanguíneo se asocia únicamente a la integrina $\alpha_V\beta_3$,⁴⁷ la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ muestra elevada afinidad por el fibrinógeno de las

Engl., **1997**, 36, 1374-1389.

⁴³ Wityak, J.; Sielecki, T. M. *Exp. Opin. Ther. Patents* **1996**, *6*, 1175-1194.

⁴⁴ Eliceiri, B. P.; Cheresch, D. A. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 1227-1230.

⁴⁵ a) Matsuno, H.; Stassen, J. M.; Vermynen, J.; Deckmyn, H. *Circulation* **1994**, *90*, 2203-2206. b) Choi, E. T.; Engel, L.; Callow, A. D.; Sun, S.; Trachtenberg, J.; Santoro, S.; Ryan, U. S. *J. Vasc. Surgery* **1994**, *19*, 125-134. c) Liaw, L.; Almeida, M.; Hart, C. E.; Schwartz, S. M.; Giachelli, C. M. *Circ. Res.* **1994**, *74*, 214-224.

⁴⁶ a) Van der Pluijm, G.; Mouthaan, H.; Baas, C.; de Groot, H.; Papapoulos, S.; Löwik, C. *J. Bone Miner. Res.* **1994**, *9*, 1021-1028. b) Helfrich, M. H.; Nesbitt, S. A.; Horton, M. A. *J. Bone Miner. Res.* **1992**, *7*, 345-351. c) Helfrich, M. H.; Nesbitt, S. A.; Dorey, E. L.; Horton, M. A. *J. Bone Miner. Res.* **1992**, *7*, 335-343. d) Horton, M. A.; Taylor, M. L.; Arnett, T. R.; Helfrich, M. H. *Exp. Cell Res.* **1991**, *195*, 368-375.

⁴⁷ Para revisiones acerca de la integrina $\alpha_V\beta_3$, ver: a) Samanen, J.; Jonak, Z.; Rieman, D.; Yue, T.-L. *Curr. Pharm. Des.* **1997**, *3*, 545-584. b) Horton, M. A. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1997**, *29*, 721-725.

plaquetas sanguíneas o el veneno de alacrán eristostatina,⁴⁸ mientras que la proteína equistatina,⁴⁹ presente en el veneno de víbora, es reconocida indistintamente por las integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$. En todas las proteínas antes mencionadas existe una secuencia peptídica mínima común directamente implicada en el reconocimiento de las integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$: la tríada Arg-Gly-Asp (RGD en la nomenclatura abreviada).⁵⁰ Esta tríada además actúa en el reconocimiento de otras integrinas como son, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_8\beta_1$. Consecuentemente, durante los últimos años han sido sintetizados decenas de pseudopéptidos de bajo peso molecular miméticos de RGD para poder desarrollar compuestos de potencial interés farmacológico en los ámbitos enumerados más arriba. Estas moléculas, además de actuar como buenos ligandos de las correspondientes integrinas, deben tener las buenas propiedades farmacodinámicas y estabilidad proteolítica de las que carecen las proteínas naturales.

Sin embargo, el problema es más complejo de lo que a primera vista puede parecer. En efecto, un ligando muy potente con respecto a –por ejemplo– la integrina $\alpha_v\beta_3$ pierde inmediatamente todo su posible potencial farmacológico como anticancerígeno si también es muy potente frente a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, puesto que podría generar reacciones adversas tales como hemorragias, etc... Así pues, la cuestión clave que hay que resolver para disponer de ligandos eficaces es la de cómo conseguir la máxima potencia⁵¹ y selectividad frente a las diferentes integrinas mimetizando *la*

⁴⁸ Gould, R. J., Polokoff, M. A., Friedman, P. A., Huang, T. F., Holt, J. C., Cook, J. J. & Niewiarowski, S. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1990**, *95*, 168–171.

⁴⁹ I. Wierzbicka-Patynowski; S. Niewiarowski; C. Marcinkiewicz; J. J. Calvete; M. M. Marcinkiewicz, M. A. McLane, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 37809-37814.

⁵⁰ IUPAC-IUB Comisión on Biochemical Nomenclature (CBN), A One-Letter Notation for Amino Acid Sequences, **1968**, a) *Arch. Biochem. Biophys.*, **1968**, *125* (3), i-v ; b) *Biochem. J.*, **1969**, *113*, 1-4; c) *Biochemistry*, **1968**, *7*, 2703-2705; d) *Biochim. Biophys Acta*, **1968**, *168*, 6-10; e) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **1968**, *50*, 1577-1582; f) *Eur. J. Biochem.*, **1968**, *5*, 151-153.

⁵¹ La potencia de un ligando de integrinas se expresa en valores IC₅₀, correspondientes a la concentración de ligando necesaria para desplazar el 50% de alguna de las proteínas naturales antes mencionadas adheridas a la integrina estudiada. Por ejemplo, cuando se quiere medir la actividad frente a la integrina $\alpha_v\beta_3$ se suele utilizar la vitronectina que es la proteína natural selectiva de esta integrina, cuando la actividad a medir es la de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ la proteína a desplazar suele ser la fibrinógeno.

misma secuencia RGD. La clave para resolver el problema de la selectividad reside en la identificación y fijación de las diferentes conformaciones bioactivas de la triada RGD mediante la estabilización de determinados tipos de puentes de hidrógeno amídicos con la imposición de restricciones a dicha secuencia o sus miméticos equivalentes.⁵²

2.1.1.2 Diseño de inhibidores de RGD como inhibidores selectivos de integrinas $\alpha_v\beta_3$

Básicamente, existen dos estrategias para el diseño de peptidomiméticos de RGD conformacionalmente restringidos: a) los pseudopéptidos de β -amino- β -arilaminoácidos (RG- β Aa) y b) los ciclopéptidos de RGD (ver Figura 2.2).

Los ligandos resultantes de la primera aproximación se denominan miméticos “abiertos”. En esta aproximación el ácido aspártico es generalmente sustituido por un β -aminoácido que contenga anillos aromáticos⁵³ y también se puede modificar la parte central de la glicina dando rigidez a la cadena RGD e intentando dirigir las cadenas laterales para obtener la conformación activa. La segunda posibilidad, la de los “ciclopéptidos RGD”, es la de dejar el tripéptido activo intacto e inducir la conformación deseada mediante un mimético externo unido a la cadena formando una estructura cíclica.⁵⁴

En ambos casos existen al menos tres zonas de interacción entre mimético RGD y los dominios αA y βA de la integrina (ver Figura 2.2). En primer lugar un bolsillo ácido de αA que protona el grupo guanidino de la arginina. En segundo lugar un bolsillo básico dependiente del ión metálico (MIDAS: Metal Ion-Dependent Adhesion Site) y finalmente, un bolsillo hidrofóbico⁵⁵ del dominio βA que es cubierto generalmente por un grupo aromático.

⁵² Müller, M. Gurrath, H. Kessler, R. Timpl; *Ang. Chem. Int. Ed. Eng.*, **1992**, 31, 326-328.

⁵³ R. M. Scarborough, *Curr. Med. Chem.*, **1999**, 6, 971-981.

⁵⁴ C. E. Peishoff, F. E. Ali, J. W. Bean, R. Calvo, C. A. D'Ambrosio, D. S. Eggleston, S. M. Hwang, T. P. Kline, P. F. Koster, A. Nichols, D. Powers, T. Romoff, J. M. Samanen, J. Stadel, J. A. Vasko, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 3962-3969.

⁵⁵ a) G. Gibson, G. A. G. Sulyok, D. Hahn, S. L. Goodman, G. Hölzemann, H. Kessler, *Ang. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 165-169., b) S. L. Goodman, G. Hölzemann, G. A. G. Sulyok, H.

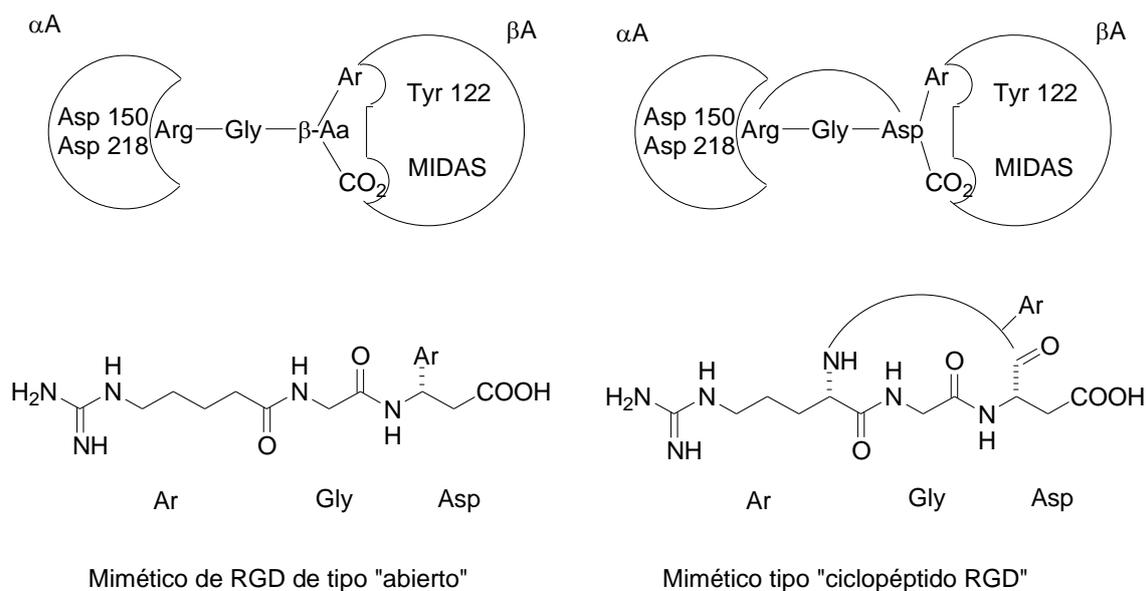


Figura 2.2: Representación esquemática de las estrategias de diseño de peptidomiméticos RGD conformacionalmente restringidos de la integrina $\alpha_v\beta_3$: a) peptidomiméticos abiertos RG- β Aa y b) peptidomiméticos cíclicos c(R-G-D-X-Y).

A continuación se muestran sendos ejemplos de los dos tipos de peptidomiméticos mencionados que, aunque muestran estructuras aparentemente muy diferentes, contienen los tres grupos que interactúan con los diferentes bolsillos de los receptores de integrina:

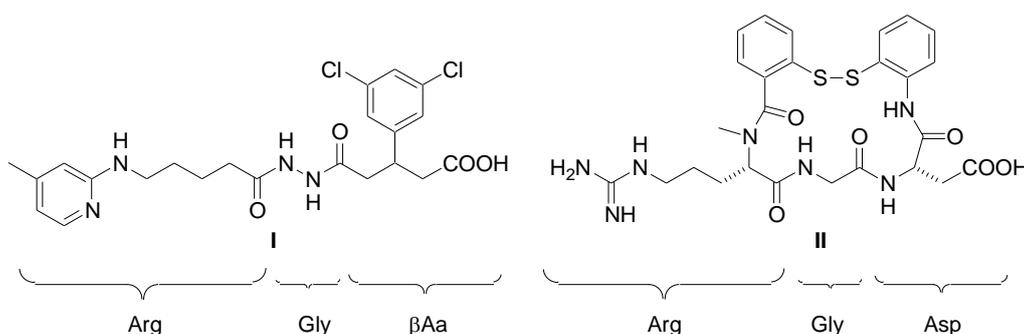


Figura 2.3: Ejemplos de miméticos de RGD: el compuesto **I**^{55b} (un mimético abierto) contiene un fragmento tanto de la arginina como del aspártico modificados. El compuesto **II**⁵⁶ (un mimético ciclopeptídico) mantiene el tripéptido RGD invariable.

Kessler, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1045-1051. c) G. A. G. Sulyok, C. Gibson, S. L. Goodmann, G. Hölzemann, M. Wiesner, H. Kessler, *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 1938-1950.

⁵⁶ a) K. D. Kopple, P. W. Baures, J. W. Bean, C. A. D'Ambrosio, J. L. Hughes, C. E. Peishoff, D. S. Eggleston, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 9615-9623. b) ref. 54, pag. 136.

En los últimos años, son muchos los grupos de investigación que han diseñado miméticos abiertos no peptídicos de la RGD, cuyas principales ventajas son su mayor resistencia a las proteasas y la posibilidad de administración oral.⁵⁷

Las características estructurales comunes de este tipo de compuestos son: 1) Los átomos de carbono del ácido carboxílico y del mimético de la guanidina están separados

⁵⁷ **a) Derivados de la α -metil-D-manopiranososa:** K. C. Nicolau, J. I. Trujillo, K. Chibale, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 8751-8778. **b) derivados de la benzodiazepina:** R. M. Keenan, J. F. Callahan, J. M. Samanen, W. E. Bondinell, R. R. Calvo, L. Chen, C. DeBrosse, D. S. Eggleston, R. C. Haltiwanger, S. M. Hwang, D. R. Jakas, T. W. Ku, W. H. Miller, K. A. Newlander, A. Nichols, M. F. Parker, L. S. Southhall, I. Uzinskas, J. A. Vasko-Moser, J. W. Venslavsky, A. S. Wong, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 545-559. **c) derivados de la 2-benzacepina:** W. H. Miller, D. P. Alberts, P. K. Bhatnagar, W. E. Bondinell, J. F. Callahan, R. R. Calvo, R. D. Cousins, K. F. Erhard, D. A. Heering, R. M. Keenan, C. Kwon, P. J. Manley, K. A. Newlander, S. T. Ross, J. M. Samanen, I. N. Uzinskas, J. W. Venslavsky, C. C.-K. Yuan, R. C. Haltiwanger, M. Gowen, S.-M. Hwang, I. E. James, M. W. lark, D. J. Rieman, G. B. Stroup, L. M. Azzarano, K. L. Salyers, B. R. Smith, K. W. Ward, K. O. Johanson, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 22-26. **d) para consultar ejemplos de isoxazolinas:** W. J. Pitts, J. Wityak, J. M. Smallheer, A. E. Tobin, J. W. Jetter, J. S. Buynitsky, P. P. Harlow, K. A. Solomos, M. H. Corjay, S. A. Mousa, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 27-40. **e) derivados de la hidantoína:** A. Peyman, V. Werner, J. Knolle, H. U. Stilz, G. Breipohl, K.-H. Scheunemann, D. Carniato, J.-M. Ruxer, J.-F. Gourvest, T. R. Gadek, S. Bodary, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 179-182. **f) utilizando lactamas bicíclicas como elementos de restricción:** E. Bourguet, J.-L. Banères, J. Parello, X. Lusinchi, J.-P. Girard, J.-P. Vidal, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 1561-1564. **g) derivados de la piridona:** M. J. Breslin, M. E. Duggan, W. Halczenko, C. Fernández-Meltzler, C. A. Hunt, C.-T. Leu, K. M. Merkle, A. M. Naylor-Olsen, T. Prueksaritanont, G. Stump, A. Wallace, S. B. Rodan, J. H. Hutchinson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 1809-1812. **h) Ejemplos de miméticos no peptídicos más cortos antagonistas de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ con capacidad inhibitoria de los osteoclastos:** P. J. Coleman, B. C. Askew, J. H. Hutchinson, D. B. Whitman, J. J. Perkins, G. D. Hartman, G. A. Rodan, C.-T. Leu, T. Prueksaritanont, C. Fernández-Metzler, K. M. Merkle, R. Lynch, J. J. Lynch, S. B. Rodan, M. E. Duggan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 2463-2465. **i)** K. M. Brashear, C. A. Hunt, B. T. Kucer, M. E. Duggan, G. D. Hartman, G. A. Rodan, S. B. Rodan, C.-T. Leu, T. Prueksaritanont, C. Fernández-Metzler, A. BArrish, C. F. Homnick, J. H. Hutchinson, P. J. Coleman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 3483-3486. **j)** J. J. Perkins, L. T. Duong, C. Fernández-Metzler, G. D. Hartman, D. B. Kimmel, C.-T. Leu, J. J. Lynch, T. Prueksaritanont, G. A. Rodan, S. B. Rodan, M. E. Duggan, R. S. Meissner., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 4285-4288.

por 12 enlaces, 2) contienen grupos hidrofóbicos cercanos al ácido carboxílico, y 3) uno de los factores que determina la selectividad y la actividad de estas moléculas viene determinada por la conformación que adoptan las cadenas laterales que mimetizan el aspártico y la arginina, esta conformación se fija mediante grupos restrictivos insertados en la cadena.

En la segunda estrategia, la que emplea ciclopéptidos como miméticos, el tripéptido activo se mantiene intacto y la conformación deseada es inducida mediante un fragmento de restricción externo. Éste tiene como función principal la de facilitar la aproximación del segmento RGD a la integrina $\alpha_V\beta_3$ de modo similar a como lo hace, por ejemplo, el inhibidor natural vitronectina. En este proceso, la eficacia del ciclopéptido para estabilizar las conformaciones bioactivas viene determinada por la existencia de varios puentes de hidrógeno intramoleculares entre los grupos dadores NH de amida y los grupos aceptores carbonilo del ciclo.

Un análisis pormenorizado de los motivos estructurales básicos que pueden aparecer en los ciclopentapéptidos⁵⁸ o sus miméticos demuestra que, en última instancia, son combinaciones de giros- β de tipo II' ó II y de giros- γ (ver Figura 2.4).

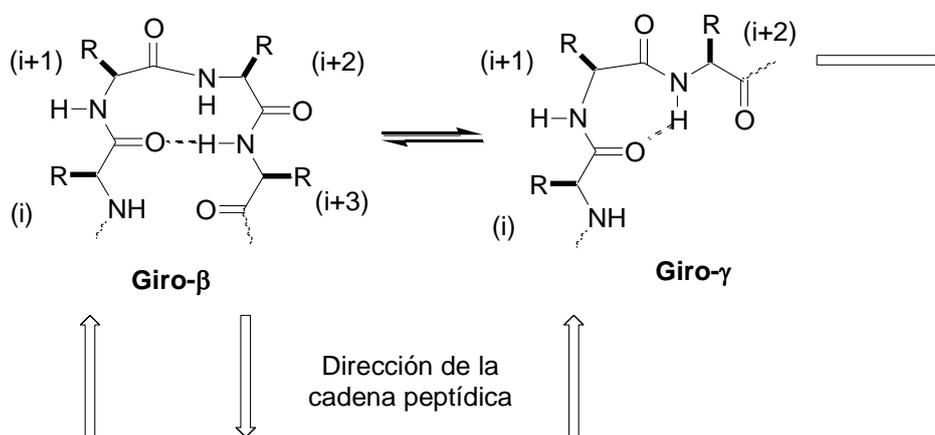


Figura 2.4: Representación de un giro- β y un giro- γ .

El giro- β fue reconocido por primera vez por Vencatachalam⁵⁹ en 1968 y se da (ver Figura 2.5) cuando una cadena peptídica cambia de dirección. En este cambio

⁵⁸ HOUBEN-WEYL, *Methods of Organic Chemistry*, Vol. E 22 b, *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, pp.461-542 (Synthesis of Cyclic peptides; C. Gilon, C. Mang, E. Lohof, A. Friedler, H. Kessler), Ed. Thieme. 2003.

toman parte cuatro residuos; el oxígeno del carbonilo del primer residuo (i) y el NH de la amida del cuarto residuo (i+3) se aproximan quedando a una distancia de 1.8-2.5 Å (para la distancia H···O) y de 2.6-3.2 Å (para la distancia N···O) formando así un puente de hidrógeno. Además, la distancia entre los C_α de los residuos (i) e (i+3) debe ser menor de 7 Å. Los residuos centrales del giro no deben presentar estructura helicoidal. Cuando se da este tipo de giro, se genera una estructura pseudocíclica de 10 átomos.⁶⁰

Para simplificar las representaciones de los puentes de hidrógeno en péptidos se puede dibujar la cadena de una forma esquemática (Figura 2.5) en la que cada aminoácido está representado como una esfera, y el puente de hidrógeno entre los fragmentos (i+3) e (i), es esquematizado con una flecha que parte desde el residuo que contiene el NH dador (i+3) hasta el aminoácido con el grupo CO aceptor (i). Además, el tipo de trazo de la flecha indica si el puente de hidrógeno se sitúa en la cara anterior (trazo continuo) o posterior (trazo discontinuo) del plano de la cadena peptídica cuando ésta se representa orientada desde el fragmento N-terminal al C-terminal.

Son muchas las conformaciones que puede adoptar un tetrapéptido lineal que se amolden a la definición de giro-β. Los giros-β se clasifican en función del valor de unos ángulos diedros en concreto, que son los ángulos φ (el ángulo formado entorno al enlace N-C_α) y ψ (ángulo formado entorno al enlace C_α-C=O) de los residuos (i+1) e (i+2).

⁵⁹ C. M. Vencatachalam, *Biopolymers*, **1968**, 6, 1425-1436.

⁶⁰ Distintas clasificaciones de giros-β: a) G. D. Rose, L. M. Gierasch, J. A. Smith, *Adv. Protein Chem.*, **1985**, 37, 1-109. b) C. M. Wilmot, J. M. Thomson, *Protein Engineering*, **1990**, 3, 479-493. c) J. B. Ball, R. A. Hughes, P. F. Alewood, P. R. Andres, *Tetrahedron*, **1993**, 49, 3467-3478.

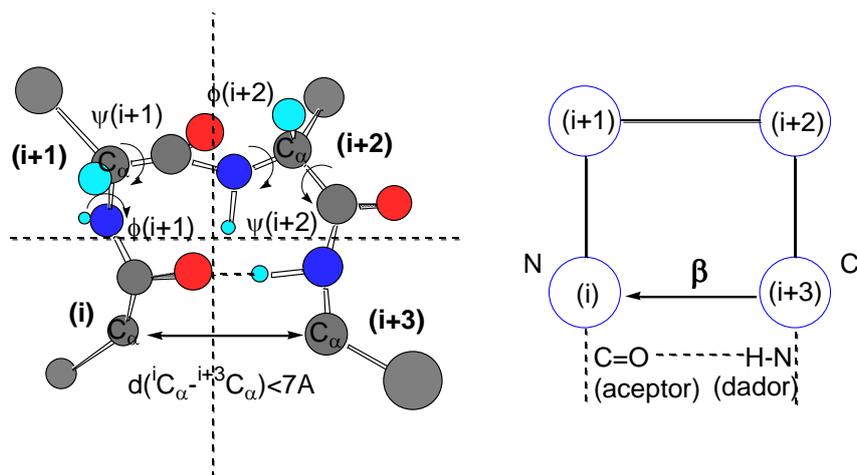


Figura 2.5: Representación desarrollada y esquemática de un giro β y su clasificación en función de los ángulos diedros de los residuos (i+1) e (i+2).

Giro- β tipo	ϕ (i+1)	ψ (i+1)	ϕ (i+2)	ψ (i+2)
I	-60	-30	-90	0
I'	+60	+30	+90	0
II	-60	+120	+80	0
II'	+60	-120	-80	0
III	-60	-30	-60	-30
III'	+60	+30	+60	+30
V	-80	+80	+80	-80
V'	+80	-80	-80	+80
VIa	-60	+120	-90	0
VIb	-120	+120	-60	+150
VII	-60	-30	-120	+120

En el caso de los giros- γ el cambio de sentido sólo se da entre tres aminoácidos y el pseudociclo que se forma es de 7 átomos. En este caso sólo hay dos tipos de giros, el normal y el inverso y están definidos por dos ángulos diedros únicamente.

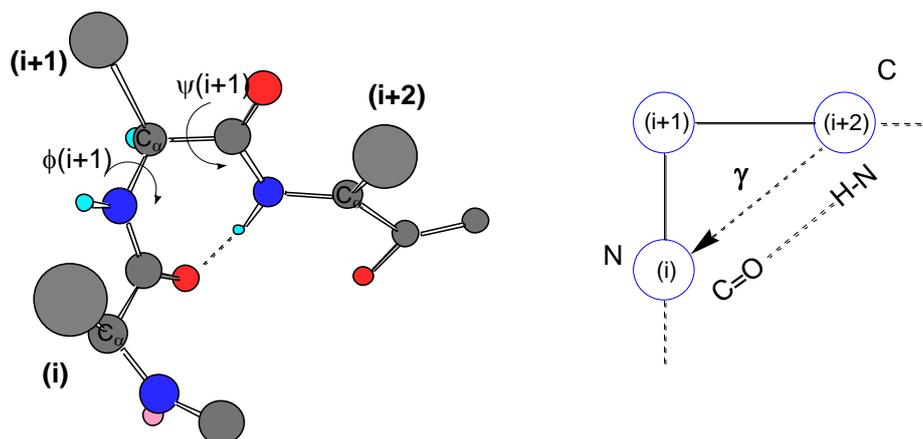


Figura 2.6: Representación desarrollada y esquemática de un giro- γ .

La representación de forma esquemática, al igual que en el caso anterior indica que el puente de hidrógeno se da entre el resto (i+2), que además es el dador en el puente, y el resto (i) que actúa como aceptor. En este caso se ha representado la flecha de forma discontinua porque el puente de hidrógeno en el ejemplo representado se da por la parte posterior al plano.

Giro- γ tipo	ϕ (i+1)	ψ (i+1)
normal	de +70 a +85	de -60 a -70
inverso	de -70 a -85	de +60 a +70

Aquellos giros, β ó γ , en los que no existen enlaces de puentes de hidrógeno intramoleculares y los ángulos ϕ y ψ se desvían más de $\pm 30^\circ$ de los valores ideales se conocen como giros *abiertos*.

2.1.1.3. Control de los puentes de hidrógeno en peptidomiméticos cíclicos de RGD

Horst Kessler (ref.52, pag. 136) fue uno de los primeros autores en sintetizar diversos pentapéptidos cíclicos que contenían una triada RGD (Arg-Gly-Asp) en la que se buscaba que el resto central de glicina se dispusiera adoptando un giro γ . Para ello, y con el fin de estabilizar dicho giro, Kessler procedió a realizar una serie de

modificaciones estructurales (Figura 2.7.) en los aminoácidos de las posiciones (4) y (5) de varios ciclopentapéptidos RGD "todo-L".

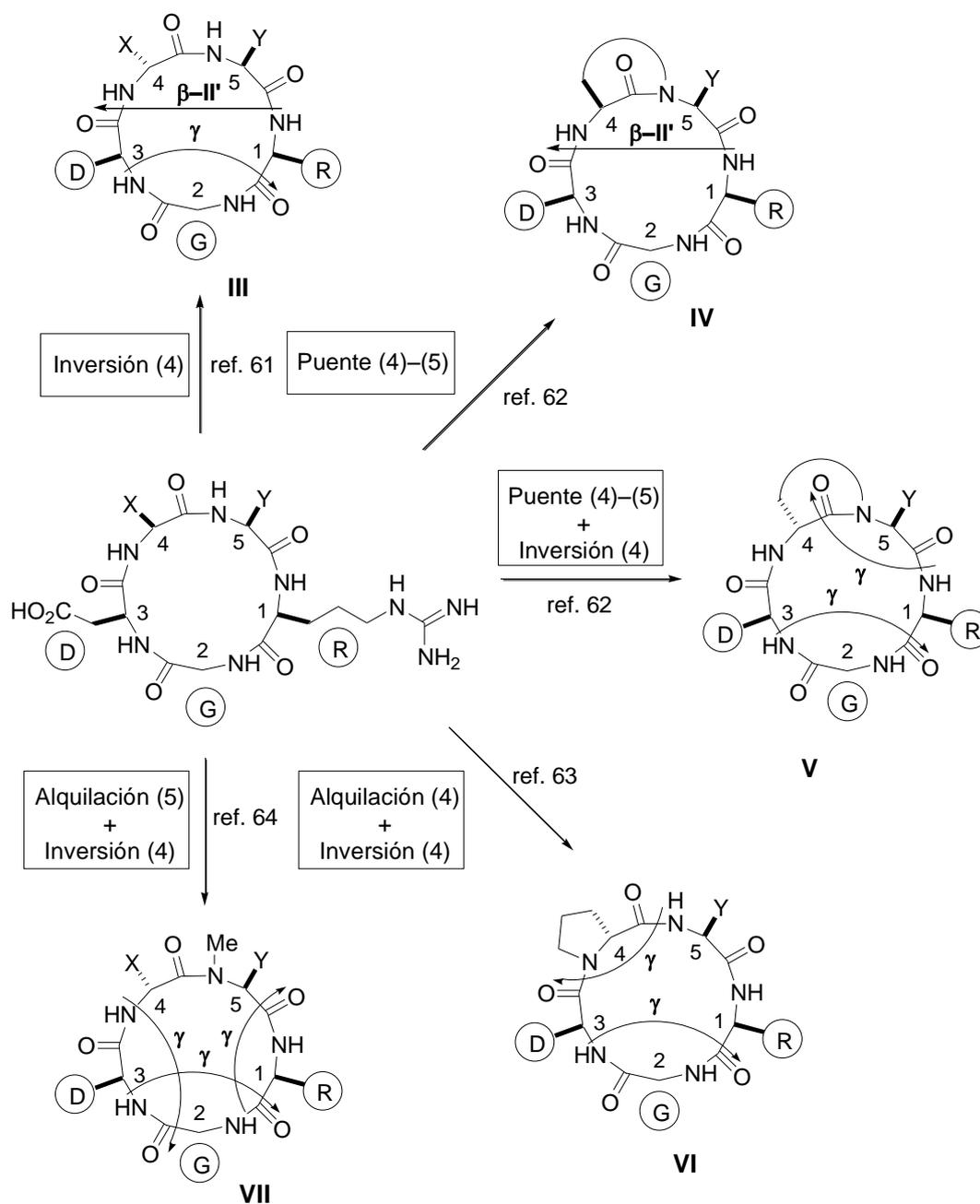


Figura 2.7: Variación del sistema de puentes de hidrógeno intramoleculares en ciclopentapéptidos RGD en función de las modificaciones estructurales efectuadas en los residuos (4) y (5). Ejemplos concretos se muestran a continuación a lo largo de la introducción: a) La estructura **III** corresponde al ejemplo **VIII**⁶¹

⁶¹ M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.*, **1991**, 291, 50-54.

b) Estructuras **IV-V**: Compuestos **X** y **XI**⁶² c) Estructura **VI**: Compuesto **XIV**⁶³ d) Estructura **VI**: Compuesto **XV**.⁶⁴

La inversión de la configuración del residuo (4) (ver estructura **III**) resulta esencial para inducir giros γ entre el ácido aspártico (3) y la arginina (1) y dicho giro γ se puede estabilizar de tres modos: a) con puentes lactámicos entre las posiciones C α y N de los residuos (4) y (5) (ver estructura **V**), b) con la introducción de la (D)-Prolina en la posición (4) (ver estructura **VI**) y c) con la N-alkilación de la posición (5) (ver estructura **VII**).

Para poner de manifiesto el efecto de un (D)-aminoácido en las posiciones (4) y (5), Kessler estudió los ciclos c(Arg-Gly-Asp-**D-Phe**-Val) (**VIII**) y c(Arg-Gly-Asp-**Phe-D-Val**) (**IX**), representados como c(RGDfV) y c(RGDFv) en la nomenclatura abreviada, observando que inhibían la adhesión de células tumorales mediada por el fragmento P1 de la laminina.⁶¹ Al medir la adhesión celular mediada por la vitronectina, el primer ciclopéptido era más selectivo. Según los datos obtenidos en los estudios conformacionales de RMN y Dinámica Molecular realizados en DMSO-d₆, en ambas estructuras (ver Figura 2.8) se forma un giro β II' y un giro γ .⁶³ En el primer caso, que es el más selectivo de los dos frente a la integrina $\alpha_v\beta_3$, se forma un giro β II' en el que la D-fenilalanina y la valina ocupan las posiciones (i +1) e (i +2) respectivamente. Esto provoca un giro γ bastante fuerte en la otra parte del ciclo, en el que la glicina ocupa la posición central del giro.

A raíz de los resultados obtenidos en este trabajo, Kessler amplió el estudio conformacional también en DMSO-d₆ a ciclopentapéptidos del tipo c(Arg-Gly-Asp-X-Y) donde X e Y eran diferentes aminoácidos donde se alternaba un D-aminoácido para inducir giros- β II' en el ciclo, averiguando que eran más activos los ciclopentapéptidos con grupos hidrofóbicos en la posición 4 (X), y que la sustitución del resto 5 (Y) sin

⁶² R. Haubner, W. Schmit, G. Hölzemann, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 7881-7891.

⁶³ R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 7461-7472.

⁶⁴ M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 3033-3040.

embargo no era importante. Además, aunque los ciclopentapéptidos con un D-aminoácido en la posición 4 fueran más activos, en general no eran demasiado selectivos frente a las integrinas $\alpha_V\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$, probablemente debido a que las estructuras son bastante flexibles.

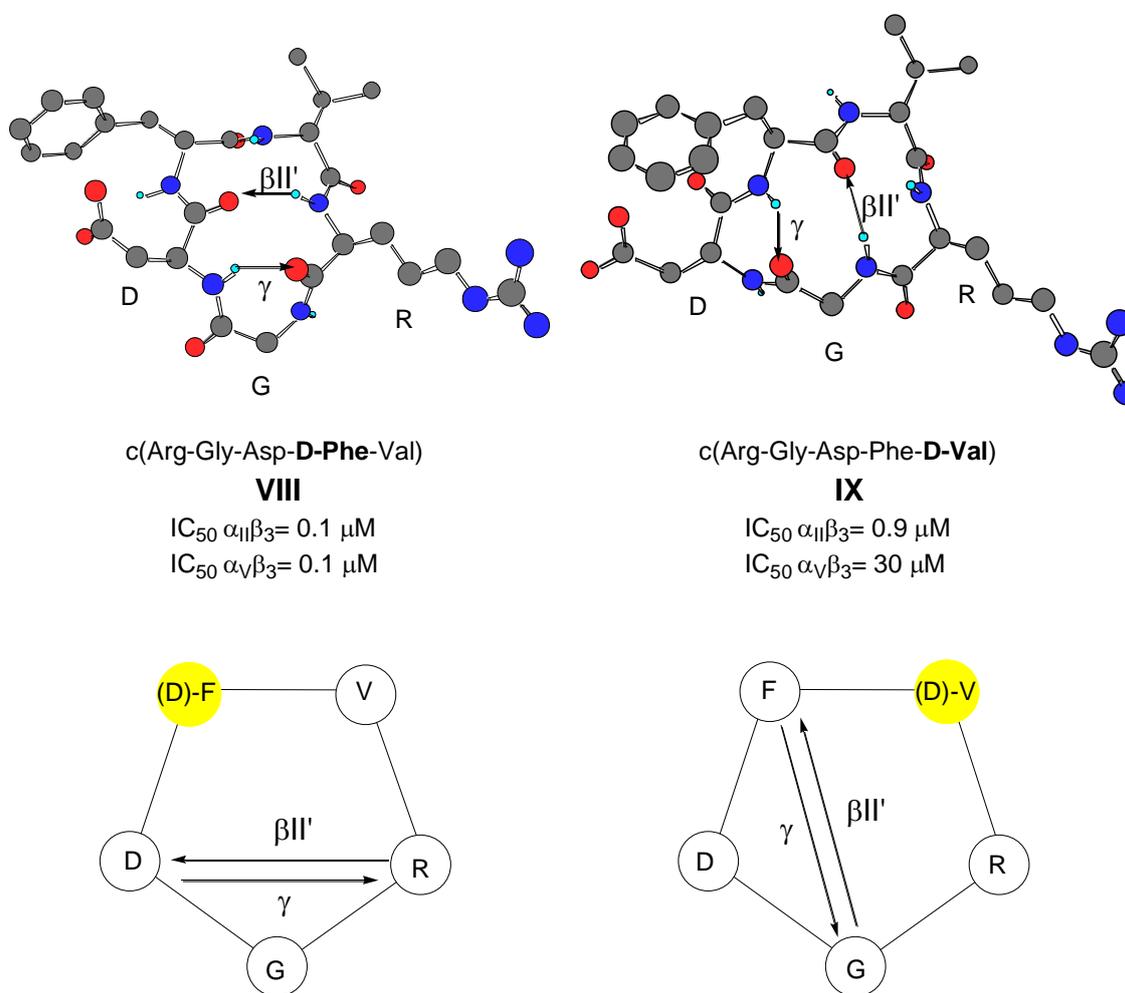


Figura 2.8: Conformaciones más probables obtenidas mediante estudios de RMN y dinámica molecular en DMSO- d_6 a) Conformación del ciclopéptido c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) (**VIII**). Se forma un puente de hidrógeno entre el carbonilo del residuo (i) (Asp) y el NH del residuo (i+3) (Arg) y otro entre el carbonilo de la Arg y el NH del Asp. b) Conformación del c(Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val) (**IX**) en este caso el giro- β y el giro γ se dan entre otros aminoácidos. Se forma un puente de hidrógeno entre el carbonilo de la Phe y el NH de la glicina y otro puente entre el carbonilo de la glicina y el NH de la Phe.

La introducción de puentes γ -lactámicos entre los residuos (4) y (5) o el empleo de la (D)-Prolina en la posición (4) también fueron estudiados por Kessler con la intención de formar peptidomiméticos cíclicos de RGD de conformación más

restringida que los precedentes⁶² (Figura 2.9). Las estructuras **X** y **XI** fueron diseñadas para fijar un único ángulo diedro (el ángulo $\psi(i+1)$), mientras que los miméticos utilizados en las estructuras **XII** y **XIII** fijaban dos de los ángulos diedros (**XII**: $\psi(i+1)$ y $\phi(i+2)$; **XIII**: $\phi(i+1)$ y $\psi(i+1)$). Los compuestos **X**, **XI** y **XII** presentan un giro β con la glicina en la posición (i+1) del giro (en el caso del compuesto **XI**, la conformación no es estable y adopta varias conformaciones entre ellas una en la que se forma un giro γ entre el NH de la arginina y el carbonilo de la γ -lactama). El mimético **XIII** mantiene el giro β de tipo II' con el mimético en la posición (i+1) e (i+2) aunque no presentaba actividad alguna. El compuesto **XI** era el que mayor actividad inhibitoria tenía frente a la integrina $\alpha_v\beta_3$ ($IC_{50}(\text{vitronectina})= 0.8 \text{ nM}$) y el compuesto **X** era el más selectivo ($IC_{50}(\text{vitronectina})= 40 \text{ nM}$; $IC_{50}(\text{fibrinógeno})= 2.8 \text{ }\mu\text{M}$). En estos ejemplos quedaba patente que la conformación de giro β de tipo II' induciendo un giro de tipo γ no es suficiente para asegurar actividad; probablemente el impedimento estérico del mimético dificulta la interacción con la integrina.

Otro ejemplo en el que aun habiendo giro γ con la glicina en la posición (i+1) no existe actividad es el caso del ciclopentapéptido c(Arg-Gly-Asp-D-Pro-Val) **XIV**.⁶³ En este caso se forman dos giros γ , el primero de ellos entre la valina y el ácido aspártico, y el segundo entre el aspártico y la arginina.

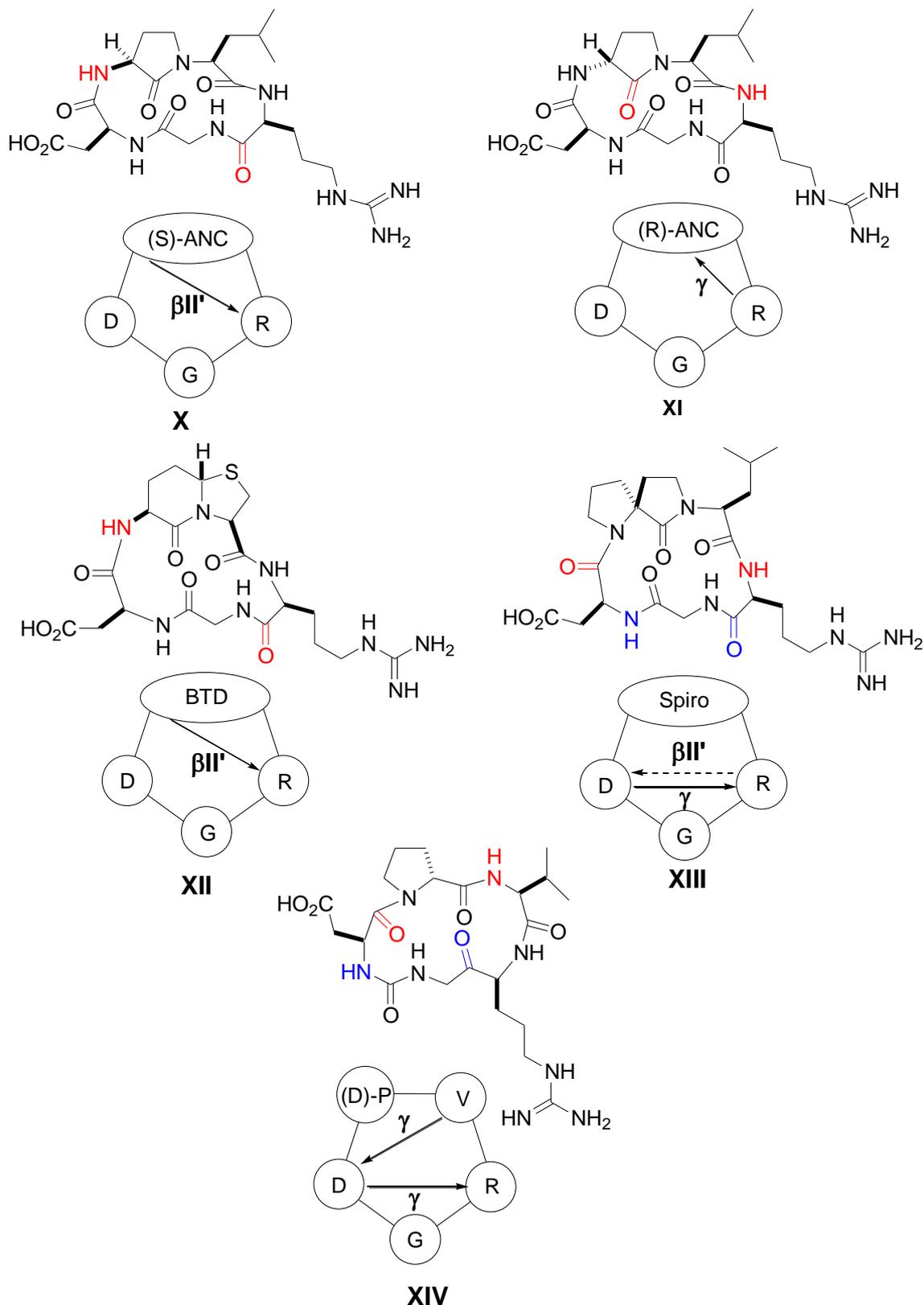


Figura 2.9: Efecto de la adición de puentes lactámicos y ciclos en los residuos (4) y (5) de ciclopentapéptidos RGD sobre el sistema de puentes de hidrógeno intramolecular. En los compuestos X y XI, sólo se fija uno de los ángulos diedros, en los compuestos XII y XIII se fijan dos ángulos diedros. En el compuesto XIV la restricción la introduce la (D)-prolina. Están marcados en color rojo y azul los grupos que forman puentes de hidrógeno.

Por último, Kessler también investigó el efecto de la N-alquilación del residuo (5) combinada con la inversión del residuo (4) sobre la estabilización del giro γ entre los residuos (1) y (3) en ciclopentapéptidos RGD. Así obtuvo un mimético de gran selectividad y actividad frente a la integrina $\alpha_v\beta_3$, a partir de un screening en el que se sintetizaron cinco ciclopentapéptidos en los que un N-metilaminoácido ocupaba consecutivamente cada posición del ciclo.⁶⁴ El ciclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-N(Me)-Val) (**XV**) así obtenido resultó ser un compuesto con un sistema de puentes de hidrógeno muy diferentes a los del ciclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-Val) (**VIII**). En efecto, según los estudios de RMN y dinámica molecular realizados en DMSO-d₆, el ciclopéptido (**XV**) no forma giro beta del tipo II' como se formaba en el caso del compuesto (**VIII**) (ver Figura 2.10), sino que muestra dos giros γ inversos con la arginina y el aspártico en la posición (i+1), y un giro γ con la glicina en la posición (i+1). Esta molécula, que recibe el nombre comercial de Cilengitide® es una de las sustancias inhibitoras de integrinas $\alpha_v\beta_3$ más potentes y selectivas que se conocen y se encuentra actualmente en fase clínica II de varias terapias antitumorales.

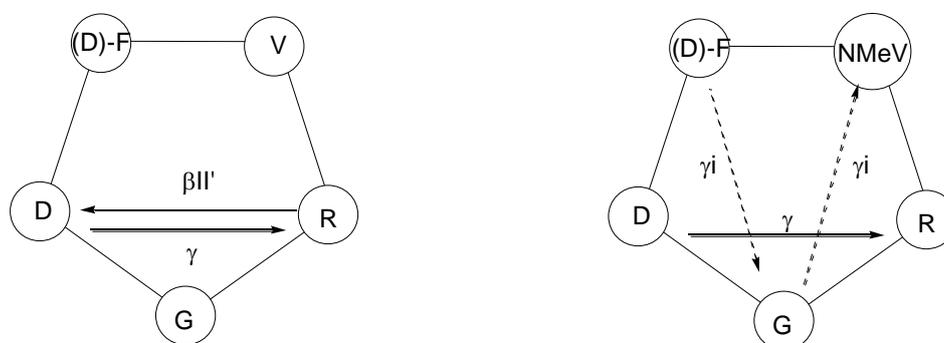
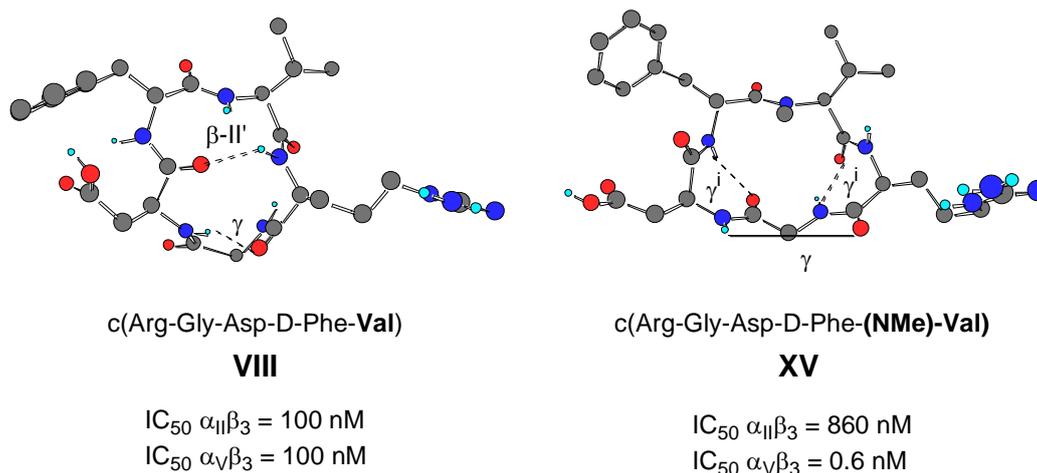


Figura 2.10: Comparación de las conformaciones adoptadas por los compuestos c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) (**VIII**) y Cilengitida® c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-(NMe)-Val) (**XV**) en disolución. En el primero hay una interacción de puente de hidrógeno entre el carbonilo del ácido aspártico y el NH de la arginina, que se ha roto en la segunda probablemente debido al impedimento estérico del metilo introducido en el NH de la valina.

A raíz de la reciente obtención de la estructura de rayos X del segmento extracelular de la integrina α_Vβ₃⁶⁵ y del complejo de éste con la Cilengitida⁶⁶ ha sido posible una definición más precisa de los centros activos de los dominios αA y βA de las integrinas α_Vβ₃. Las modelizaciones llevadas a cabo con la Cilengitida (Figura 2.11)

⁶⁵ J.-P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science*, **2001**, 294, 339-345.

⁶⁶ J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science*, **2002**, 296, 151-155.

y otros ligandos llevaron a establecer cinco centros⁶⁷ de interacción posibles, uno de ellos en el dominio α A y otros cuatro en el dominio β A.

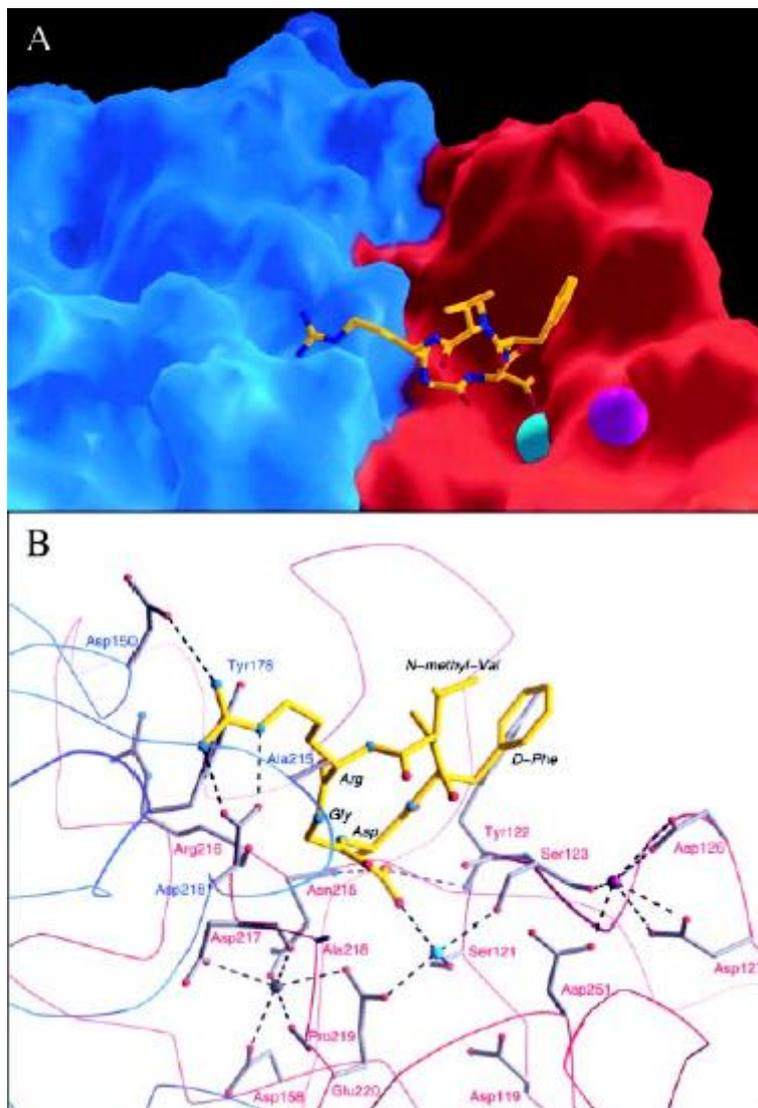


Figura 2.11: A) Representación de la superficie de los dominios de la integrina $\alpha_v\beta_3$ y la Cilengitida (XV) en el lugar de interacción, B) Representación esquemática de la Cilengitida (XV) y la serie de aminoácidos de la integrina $\alpha_v\beta_3$ que interacciona con la misma.

Tal y como se muestra en la Figura 2.12 las cadenas de arginina y ácido aspártico de la Cilengitida complejada con la integrina $\alpha_v\beta_3$ están situadas en direcciones opuestas y la interacción se da por la guanidina (en el bolsillo ácido A del

⁶⁷ a) Marinelli, L.; Lavecchia, A.; Gottschalk, K.-E.; Novellino, E.; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **2003**, *43*, 4393-4404.

dominio αA) y por el aspártico (bolsillo básico-MIDAS C, del dominio βA). Además, en este mismo dominio, el anillo aromático bencílico de la (D)-fenilalanina da una interacción de tipo T con una tirosina (bolsillo hidrofóbico H),⁶⁸ y tanto el NH como el carbonilo del ácido aspártico forman sendos puentes de hidrógeno (HB1 y HB2).

Por su parte, la glicina se sitúa entre las unidades αA y βA de la integrina dando interacciones hidrofóbicas y la N-metilvalina no presenta interacciones por ninguno de los dominios de la integrina.

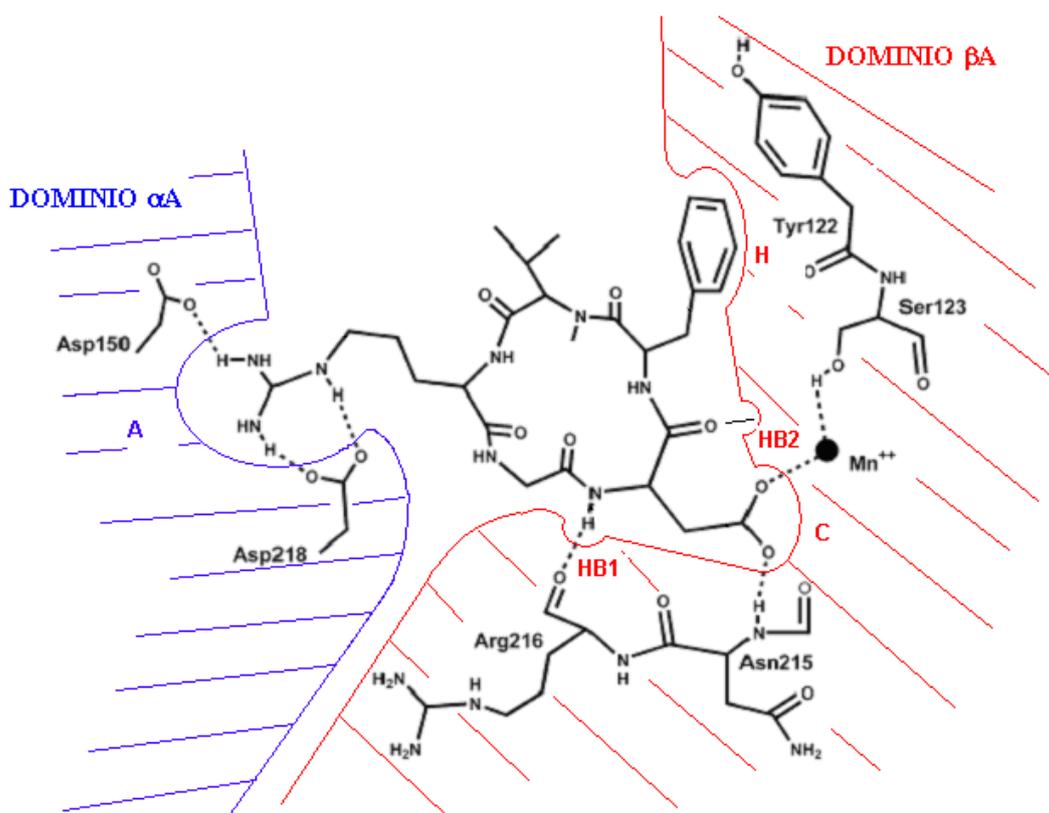


Figura 2.12: Representación de los cinco centros de interacción de la Cilengitide® con el receptor de la integrina $\alpha_V\beta_3$. Dominio αA : bolsillo ácido (A); Dominio βA : bolsillo básico-MIDAS (C), bolsillo hidrofóbico (H) y puentes de hidrógeno de los grupos NH (HB1) y C=O (HB2) del ácido aspártico.

2.1.2 Hipótesis

⁶⁸ Artículos de interacciones tipo T: a) G. B. McGaughey, M. Gagné, A. Rappé, *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 15458-15463. b) R. Chelli, F. L. Gervasio, P. Procacci, V. Schettino, *J. Am. Chem. Sc.*, **2002**, *124*, 6133-6143.

2.1.2.1 Las β -lactamas como elementos de restricción conformacional en ciclopentapéptidos RGD

En nuestro laboratorio hemos descubierto recientemente⁶⁹ (ver Figura 2.13) que la inserción de un puente metileno entre el $C\alpha(i+1)$ y el $N(i+2)$ de una cadena peptídica provoca en el mimético resultante una fuerte estabilización de la conformación beta-girada de tipo β -II o β -II', según la configuración del estereocentro α . De entre todos los tipos de peptidomiméticos conocidos actualmente, los peptidomiméticos β -lactámicos son los que presentan una mínima variación estructural con respecto a los péptidos nativos, ya que se diferencian de ellos en la adición formal de un único átomo de carbono.

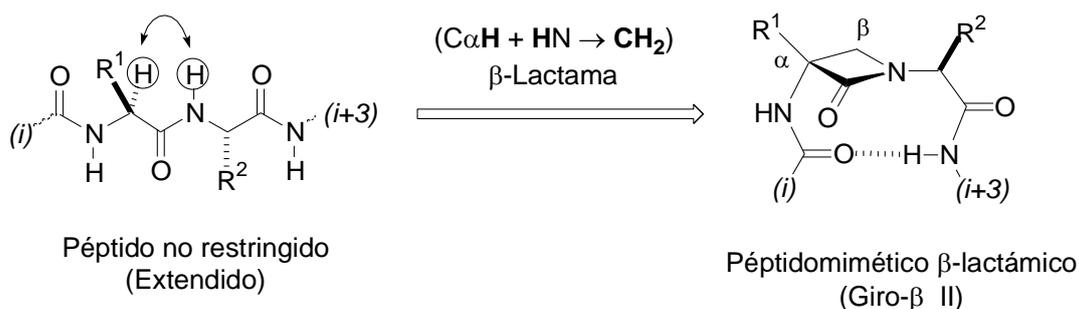


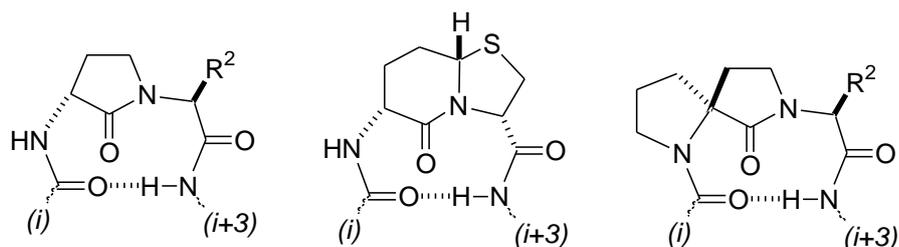
Figura 2.13: Peptidomiméticos β -lactámicos beta girados a partir de péptidos. La mimetización simultánea de los protones $C\alpha$ -H y NH de dos aminoácidos contiguos por un grupo CH_2 provoca la formación de un giro β -II.

Otra de las características que distingue a los peptidomiméticos β -lactámicos de otros miméticos betágenos convencionales es la posibilidad de diferenciar los elementos de restricción y de reconocimiento (Figura 2.14). El reducido volumen del grupo metileno permite una mimetización simultánea de los protones $C\alpha$ -H y NH, por lo que

⁶⁹ a) A. Benito, Tesis Doctoral, UPV-EHU. "Nuevos peptidomiméticos β -lactámicos: diseño, síntesis y análisis estructural" **2003**. b) C. Palomo, J. M. Aizpurua, A. Benito, J. I. Miranda R. M. Fratila, C. Matute, M. Domercq, F. Gago, S. Martín-Santamaría, A. Linden, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 16243-16260.

dicho grupo puede actuar exclusivamente como elemento de restricción conformacional sin perturbar las interacciones de reconocimiento con el receptor del grupo R^1 . A diferencia de lo que ocurre en los peptidomiméticos betágenos convencionales, el hecho de poder retener o modificar de manera sencilla el grupo R^1 facilita enormemente la creación de familias de compuestos estructuralmente homogéneas y simplifica la interpretación de las variaciones de actividad biológica resultantes.

Peptidomiméticos betágenos convencionales:



Peptidomiméticos betágenos β -lactámicos:

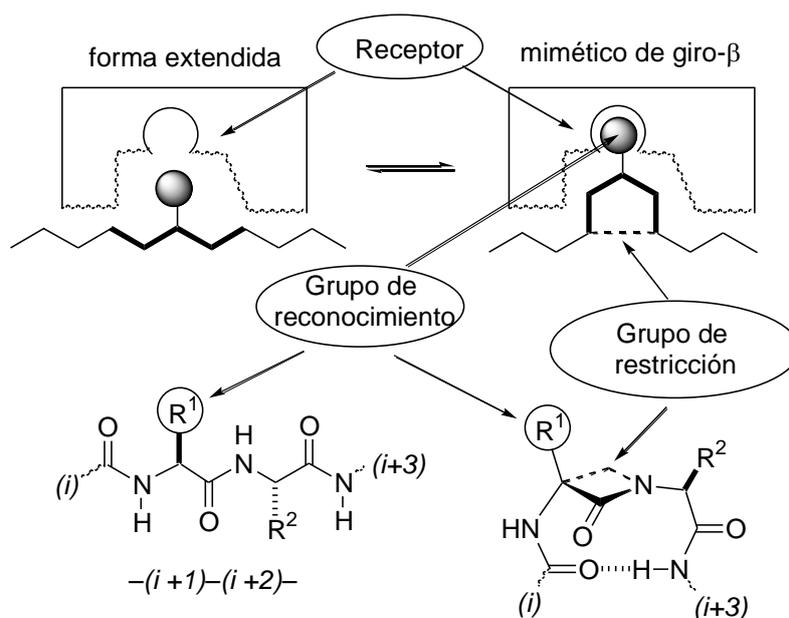


Figura 2.14: Principio de separación de elementos de restricción y reconocimiento mediante peptidomiméticos β -lactámicos. El grupo metileno genera un fuerte impedimento en la flexibilidad de la cadena peptídica pero, debido a su reducido tamaño, no provoca interacciones con el receptor. Dichas interacciones son creadas exclusivamente por el grupo original R^1 .

Con estos antecedentes nos planteamos aplicar esta hipótesis al diseño de un ciclopentapéptido β -lactámico de RGD que contuviese, por una parte, todos los

elementos de reconocimiento necesarios (ref. 67, parg.150) para acceder a los bolsillos de la integrina $\alpha_v\beta_3$ y, por otra, se hallase bloqueado conformacionalmente mediante el anillo de β -lactama creando un sistema de puentes de hidrógeno que contuviese al menos un giro γ entre los restos (3) del ácido aspártico y (1) de la arginina. Tras analizar los grupos de reconocimiento de los diversos ciclopentapéptidos de RGD descritos (**VIII** – **XV**), se llegó a las siguientes conclusiones (Figura 2.15): a) el ciclopéptido-base debía contener un grupo hidrofóbico de reconocimiento (por ejemplo, un grupo bencilo) en el aminoácido (4), b) dicho aminoácido debía tener configuración D, y c) puesto que los restos del aminoácido (5) no participan en el reconocimiento con el receptor, dicho residuo podía ser reemplazado por glicina.

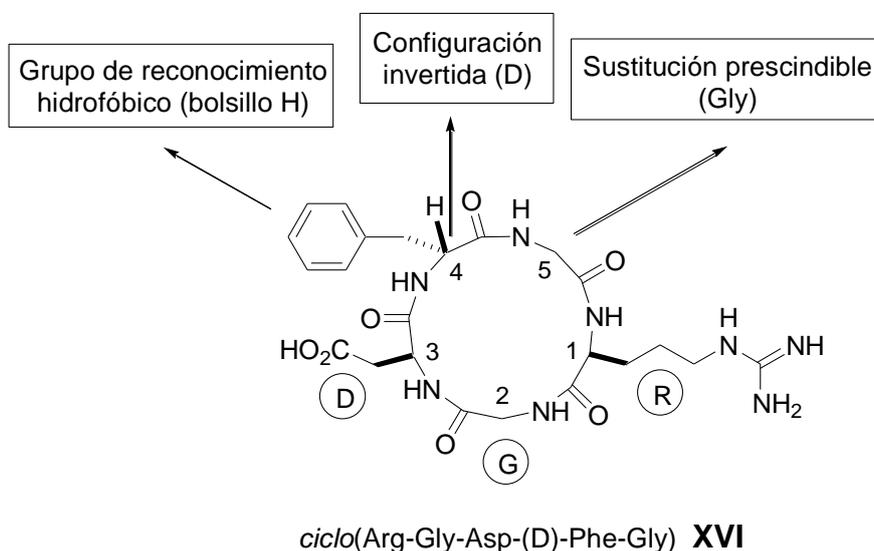


Figura 2.15: Características de los elementos estructurales de reconocimiento necesarios para el diseño de un ciclopentapéptido inhibidor de integrina $\alpha_v\beta_3$.

En principio, no existían elementos para poder anticipar una conformación claramente preferida por el peptidomimético β -lactámico *ciclo*(Arg-Gly-Asp- β -Lactam-Gly) derivado del ciclopéptido *ciclo*(Arg-Gly-Asp-(D)-Phe-Gly) **XVI**. Como se indica en el análisis de la Figura 2.16, el puente β -lactámico interresidual podría estabilizar un sistema de puentes de hidrógeno del tipo β -II \prime / γ **XVII**, similar al observado en los péptidos β -lactámicos acíclicos. Por otra parte, también sería lógico obtener ciclopéptidos con un único giro del tipo β -II \prime , similar a los peptidomiméticos **X** y **XII** (Figura 2.9, pag 147). Finalmente, en la medida en el que es residuo (5) dispone de un átomo de nitrógeno N-alkilado por la β -lactama, tampoco es descartable un sistema del

tipo ($\gamma_i/\gamma/\gamma_i$) similar al de la Cilengitida que se representa en la conformación **XIX**. En cualquier caso, la presencia de α -disustitución en la β -lactama también podría tener efectos conformacionales insospechados que precisarán ser estudiados.

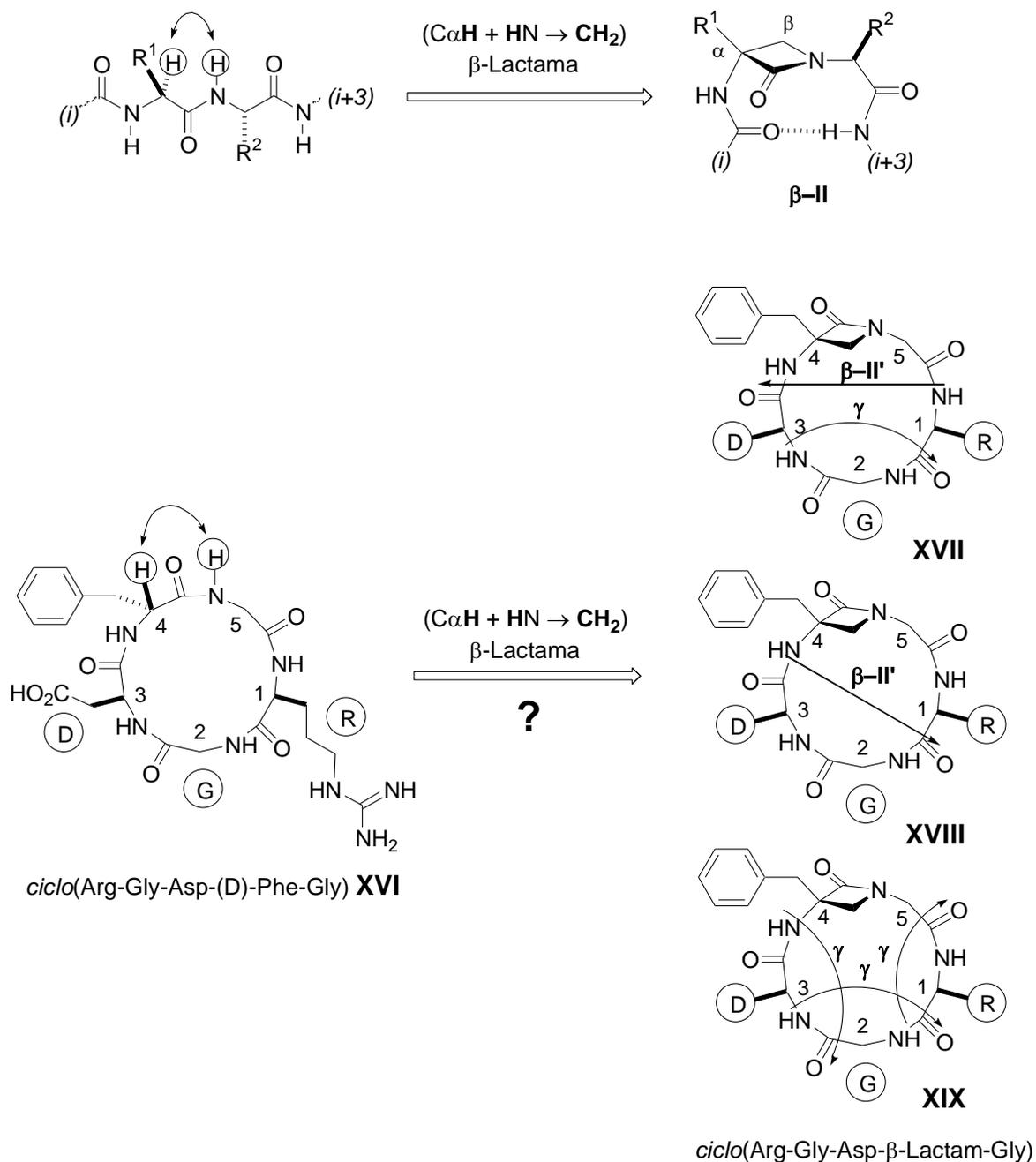


Figura 2.16: Posibles inducción de sistemas de puentes de hidrógeno β -II'/ γ o β -II' o γ en un ciclopentapéptido *ciclo*(Arg-Gly-Asp-(D)-Phe-Gly) mediante la inserción de un puente metileno interresidual (β -lactama) entre los restos (4) y (5).

Con independencia del sistema de puentes de hidrógeno que pueda formar el mimético *ciclo*(Arg-Gly-Asp- β -Lactam-Gly), los peptidomiméticos β -lactámicos también podrían resultar ventajosos a la hora de sintetizar ciclopéptidos asistiendo el proceso de ciclación. En efecto, los bajos rendimientos obtenidos habitualmente durante la formación de pequeños ciclopéptidos⁷⁰ a partir de péptidos extendidos, podrían ser subsanados (Figura 2.17) si se consiguiesen estabilizar estructuras giradas preorganizadas del tipo **XXI**. Puesto que las conformaciones β -giradas inducidas por las α -alquil- β -lactamas son estables incluso en disolventes tan coordinantes como DMSO,^{77b} parece una hipótesis plausible que dichas conformaciones puedan ser mayoritarias y promover la ciclación aproximando entre sí los grupos amino y carboxilo terminales.

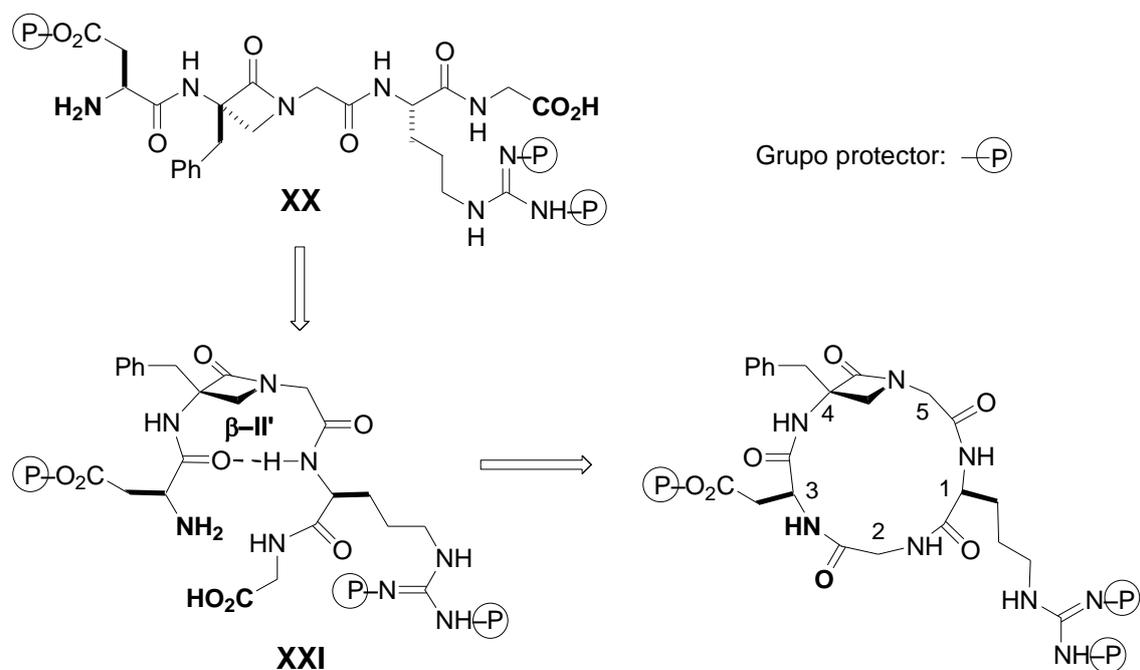


Figura 2.17: Hipótesis de la macrociclación asistida mediante preorganización en peptidomiméticos β -lactámicos: el anillo de β -lactama en el péptido extendido **XX** estabiliza una conformación **XXI** que aproxima entre sí los grupos amino y carboxilo favoreciendo la formación del ciclopéptido *ciclo*(Arg-Gly-Asp- β -Lactam-Gly).

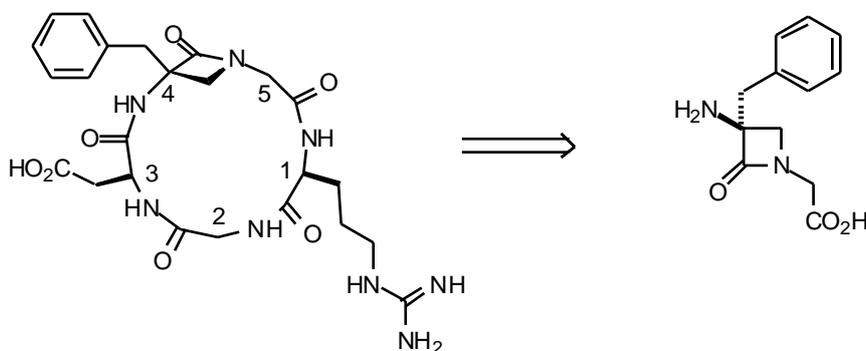
⁷⁰Estudio del efecto que la preorganización ejerce sobre los rendimientos en reacciones de ciclación de pequeños péptidos: P. Foros, J. Piró, C. Cuevas, M. García, M. Rubiralta, E. Giralt, A. Díez, *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 5825-5833.

2.1.3 Objetivos

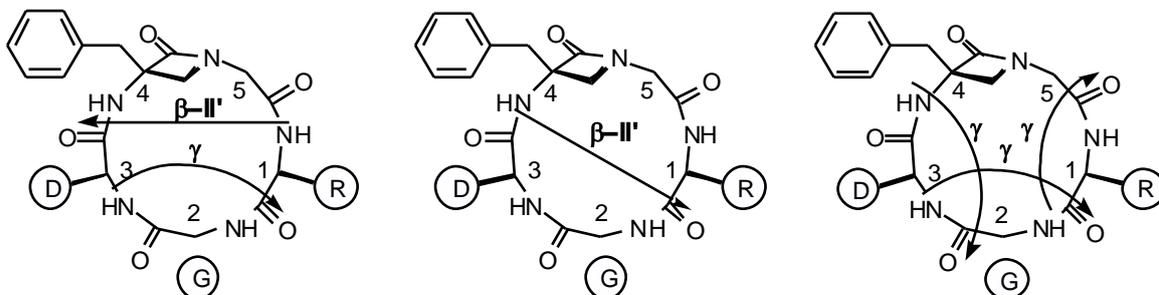
Con fundamento en las consideraciones y antecedentes comentados anteriormente, nos propusimos confirmar experimentalmente las hipótesis formuladas; es decir: a) determinar si la introducción de un puente metileno interresidual (4)–(5) formando un anillo de β -lactama en un ciclopentapéptido de RGD puede estabilizar puentes de hidrógeno intramoleculares que incluyan un giro γ entre los aminoácidos ácido aspártico (3) y arginina (1); b) establecer si el principio de separación de elementos de restricción conformacional y de reconocimiento en péptidos β -lactámicos lineales es extensible a los ciclopentapéptidos RGD en sus interacciones con integrina $\alpha_v\beta_3$ y, c) confirmar si los pentapéptidos β -lactámicos son capaces de formar estructuras preorganizadas con giros- β asistiendo la ciclación a los ciclopéptidos correspondientes.

Para poder responder a estas cuestiones establecimos los siguientes objetivos:

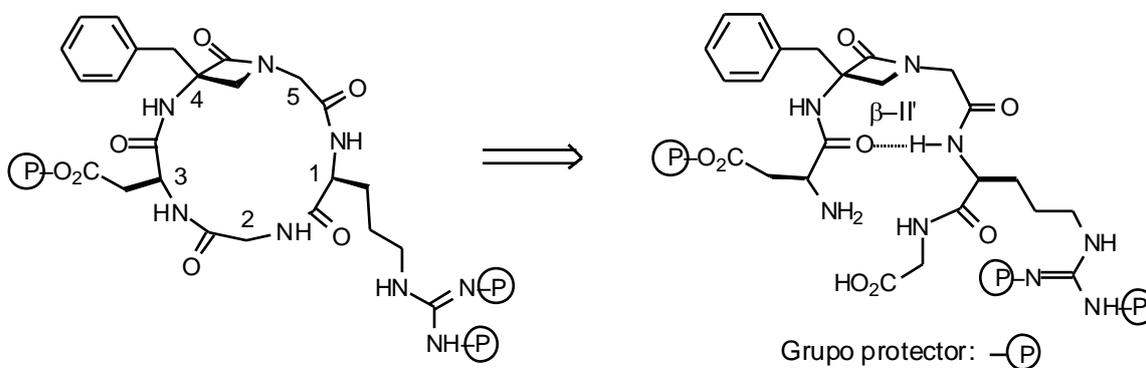
1. Sintetizar a partir de una α -amino- α -bencil-N-carboximetil- β -lactama enantiopura el primer ciclopéptido RGD β -lactámico conteniendo todos los elementos estructurales necesarios (ver Figura 2.15) para ser reconocido por receptores de integrina $\alpha_v\beta_3$:



2. Efectuar un estudio conformacional de Dinámica Molecular restringida mediante RMN (NOESY-ROESY) en agua para establecer el sistema de puentes de hidrógeno intramolecular existente en el ciclopéptido β -lactámico *ciclo*(Arg-Gly-Asp- β -Lactam-Gly).



3- Realizar un estudio conformacional de RMN en disolución del precursor lineal de ciclación (H-Asp- β -Lactam-Gly-Arg-Gly-OH) para establecer la posible existencia de estructuras β -giradas preorganizadas para la ciclación.



4- Llevar a cabo la evaluación biológica del ciclopéptido β -lactámico *ciclo*(Arg-Gly-Asp- β -Lactam-Gly) frente a integrina $\alpha_v\beta_3$ mediante: a) ensayo “in vitro” de inhibición de adhesión celular con células endoteliales humanas HUVEC; b) ensayo “in vitro” de inhibición de crecimiento celular con células endoteliales humanas HUVEC.

Un resultado positivo en estos ensayos supondría una confirmación de la hipótesis de separación de grupos de reconocimiento y restricción formulada en nuestro laboratorio y, además la apertura de una nueva vía de acceso a moléculas de interés

farmacéutico.

Resultados y Discusión

2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los sucesivos apartados de este capítulo se pasará a describir la síntesis del peptidomimético β -lactámico de RGD **43**, así como a realizar su estudio conformacional en disolución y, finalmente, explorar su actividad como inhibidor de adhesión celular y antiangiogénico.

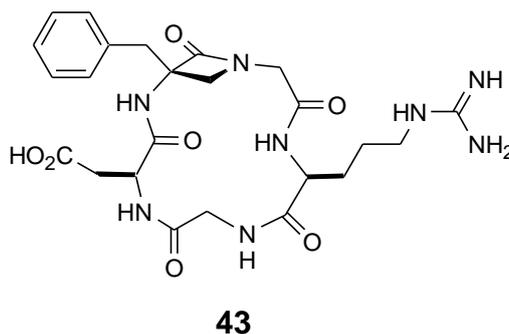


Figura 2.18: Estructura del peptidomimético de RGD *ciclo*(Arg-Gly-Asp- β -Lactam-Gly) **43**.

2.2.1 SÍNTESIS DEL *ciclo*(Arg-Gly-Asp- β -Lac-Gly)

2.2.1.1 Antecedentes y planteamiento

De acuerdo con la hipótesis de preorganización β -girada de los precursores de tipo **XXII** formulada en la Introducción de esta Memoria, nos planteamos la síntesis de **43** (ver Figura 2.19) exclusivamente a partir de la ciclación por formación de enlace peptídico entre el grupo carboxilo de la Gly (2) y el grupo amino del ácido aspártico (3). La síntesis de **XXII** se planteó a su vez a través del acoplamiento peptídico de los fragmentos **XXIV**, **XXV** y **XXVI** haciendo crecer la cadena en el sentido (C \rightarrow N).

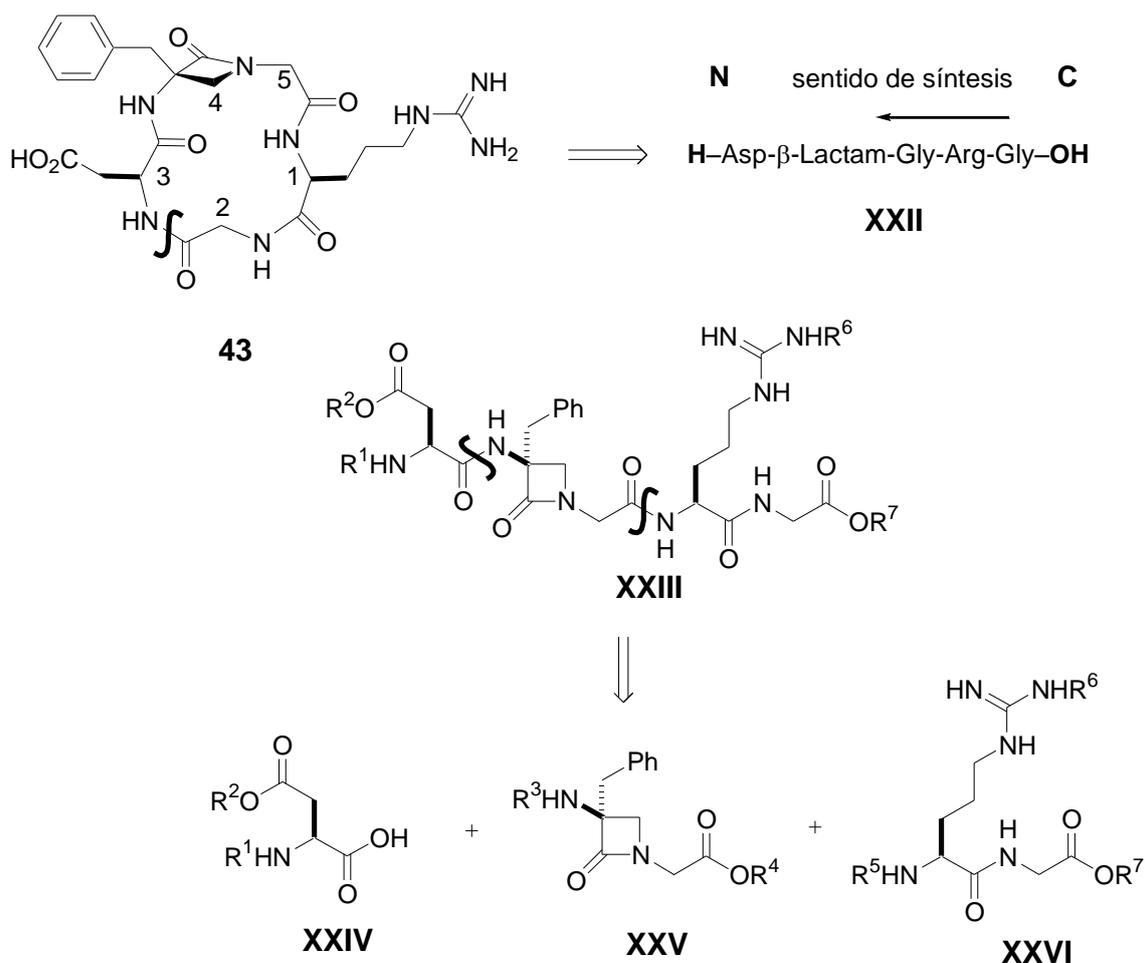


Figura 2.19: Estrategia de ciclación y acoplamiento peptídico para la preparación de *ciclo*(Arg-Gly-Asp- β -Lactam-Gly) **43**.

Una vez establecida la estrategia de síntesis se tuvieron que definir cuestiones metodológicas tales como: a) efectuar la síntesis en disolución o sobre soporte polimérico, b) seleccionar el sistema de grupos protectores ($R^1 \dots R^7$) compatibles con la secuencia, c) estudiar los métodos idóneos de preparación del único resto no α -peptídico de la secuencia (la N-carboximetil- β -lactama **XXV**) y, d) seleccionar los reactivos de acoplamiento peptídico específicos para llevar a cabo las reacciones presumiblemente más difíciles; es decir, por un lado el acoplamiento entre el grupo amino impedido de la β -lactama **XXV** y el ácido aspártico protegido **XXIV** y, por otro, la propia ciclación de **XXII** a **43**.

En relación al tipo de síntesis bien en disolución o sobre soporte polimérico, estimamos que la primera tenía la ventaja de poder fijar en la resina uno de los aminoácidos terminales de **XXIII**, evitando introducir un grupo protector. Sin embargo,

consideramos que era el fragmento β -lactámico **XXV** el que más pasos de síntesis requeriría para su preparación y que en la mayoría de los casos descritos en la literatura la ciclación de péptidos se lleva a cabo en disolución. Por ello, decidimos utilizar exclusivamente las reacciones en fase líquida para la preparación de **43** y **XXIII**.

Uno de los principales problemas que presentaba esta síntesis residía en la elección correcta de los grupos protectores debido a que tanto la cadena lateral del ácido aspártico (R^2) como de la arginina (R^6) debían permanecer protegidas durante la ciclación y ser desprotegidas en la última etapa. Por esta razón debíamos utilizar dos pares de grupos protectores ortogonales basados en los grupos *tert*-butoxicarbonilo (Boc) / éster *tert*butílico por un lado, y benciloxicarbonilo (Cbz) / éster bencílico por otro (Figura 2.20).

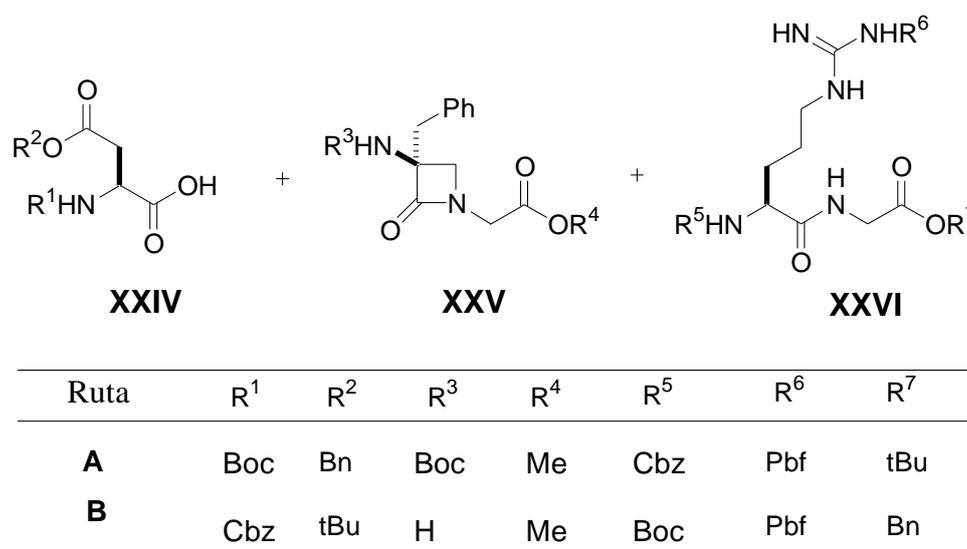
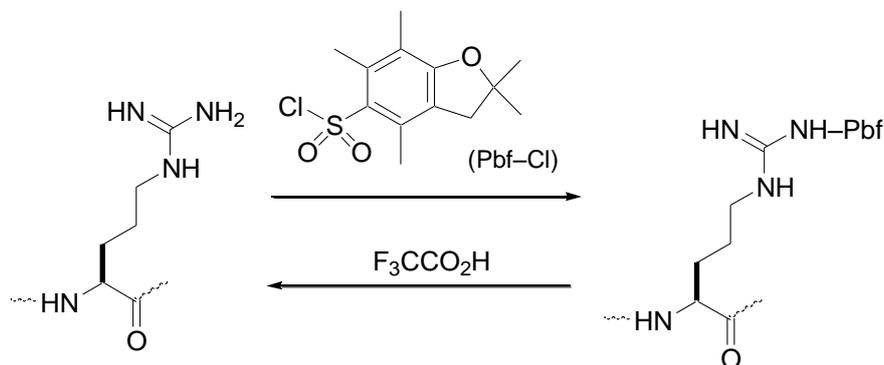


Figura 2.20: Síntesis de grupo protectores proyectados para la preparación de *ciclo*(Arg-Gly-Asp- β -Lactam-Gly) **43**. En la Ruta **A** la preparación del péptido **XXII** se realizaría por desprotección en medio ácido (HCO_2H) de los grupos *tert*-butilo terminales mientras que en la ruta **B** se efectuaría por hidrogenolisis de los ésteres bencílicos equivalentes.

Para la protección de la guanidina en la arginina se ha descrito el grupo 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf-)⁷¹ que se elimina con

⁷¹ L. A. Carpino, H. Shroff, S. A. Triolo, E-S. M. E. Mansour, H. Wenschuh, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7829-7832.

ácido trifluoroacético, aunque soporta el tratamiento con ácido fórmico que, a su vez, desprotege los grupos Boc y ésteres *terc*-butílicos.



De esta manera pensamos que, de acuerdo con la Ruta **A**, se podría preparar **Boc-Asp(OBn)- β -Lactam-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu (XXIII ruta A)**, desprotegerlo con ácido fórmico a **H-Asp(OBn)- β -Lactam-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OH (XXII ruta A)**, ciclarlo y eliminar primeramente el éster bencílico del ácido aspártico por hidrogenolisis y después el Pbf con ácido trifluoroacético. Alternativamente, según la Ruta **B**, se podría preparar el péptido **Cbz-Asp(O^tBu)- β -Lactam-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn (XXIII ruta B)**, que proporcionaría el precursor desprotegido **H-Asp(OBn)- β -Lactam-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OH (XXII ruta B)** por hidrogenolisis, el cual tras la ciclación sería transformado en **43** por tratamiento con ácido trifluoroacético.

La síntesis de las β -lactamas **XXV** se pensó llevar a cabo mediante el método descrito en nuestro laboratorio,⁷² empleando la N-[bis(trimetilsilil)metil]- β -lactama **47**. Su α -bencilación estereoselectiva a **46** y posterior elaboración química proporciona el compuesto deseado **44**.

⁷² a) C. Palomo, J. M. Aizpurua, M. Legido, A. Mielgo, R. Galarza, *Chem. Eur. J.*, **1997**, 3, 1432-1441. b) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Galarza, R.; Benito, A.; Khamrai, U.K.; Eikeseth, U.; Linden, A. *Tetrahedron* **2000**, 56, 5563-5570. c) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Benito, A.; Galarza, R.; Khamrai, U.K.; Vazquez, J.; DePascual-Teresa, B.; Nieto, P. M.; Linden, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, 38, 3056-3058. d) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Legido, M.; Galarza, R. *Chem. Commun.* **1997**, 233-234. e) ref. 69b, pag. 152.

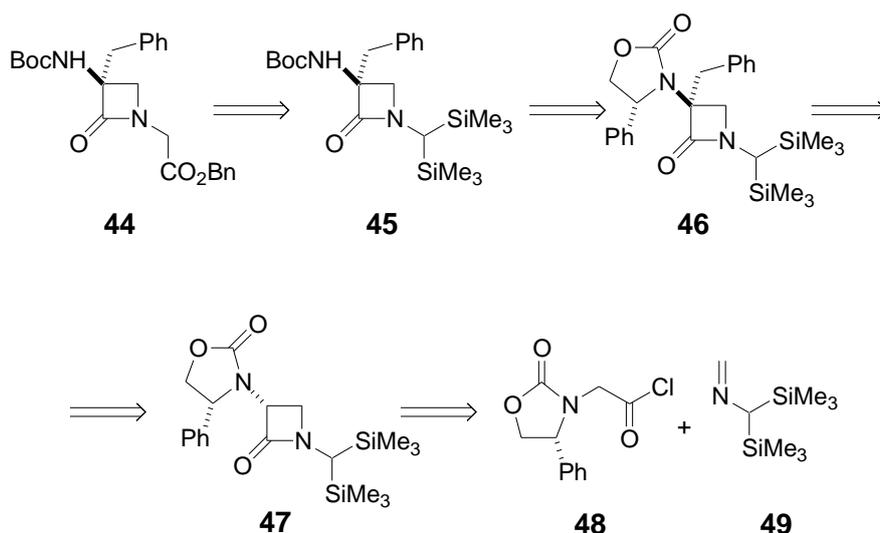


Figura 2.21: Esquema retrosintético de la β -lactama **44**.

Para llevar a cabo la síntesis proyectada quedaban por definir los reactivos a emplear, tanto en la etapa de acoplamiento (**XXIV** + **XXV**) con la α -amino- β -lactama estéricamente impedida como en la etapa de ciclación. Los reactivos más utilizados para reacciones similares son los derivados de sales de uronio⁷³ con los aditivos correspondientes TBTU/HOBt, HBTU/HOBt y HATU/HOAt, y con una gran variedad de bases, DIPEA (diisopropiletilamina), DMAP(N,N-dimetilaminopiridina), 2,4,6-colidina, o los derivados de fósforo DPPA (difosforazidato de difenilo) con NaHCO₃ como base. Es conocido que las ciclaciones deben llevarse a cabo en condiciones de alta dilución para evitar que la reacción de acoplamiento sea intermolecular en vez de intramolecular. Como la variedad de reactivos era muy amplia, se estudiaron los casos descritos en la bibliografía para ciclaciones de miméticos de conformación restringida de RGD. En los casos concretos enumerados en la introducción pudimos observar que no había una pauta determinada a la hora de elegir los reactivos. Es más, en los casos donde se llevaba a cabo un screening de diferentes ciclopéptidos, los reactivos eran diferentes en cada caso. Esto nos llevó a pensar que probablemente habría que probar muchas combinaciones hasta dar con el sistema y condiciones idóneas.

En los sucesivos apartados de este capítulo se describen los resultados de las diferentes aproximaciones a la síntesis de los intermedios de tipo **XXIII** (Figura 2.19)

⁷³ Revisiones sobre el tema: a) J. N.Lambert, J. P. Mitchell, K. D. Roberts, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2001**, 471-484., b) P. Li, P. P. Roller, J. Xu, *Curr. Org. Chem.*, **2002**, 6, 411-440.

siguiendo dos desconexiones que implican los grupos protectores de la Ruta A y una tercera desconexión según la Ruta B.

2.2.1.2 Primera desconexión (Ruta A)

2.2.1.2.1 Planteamiento

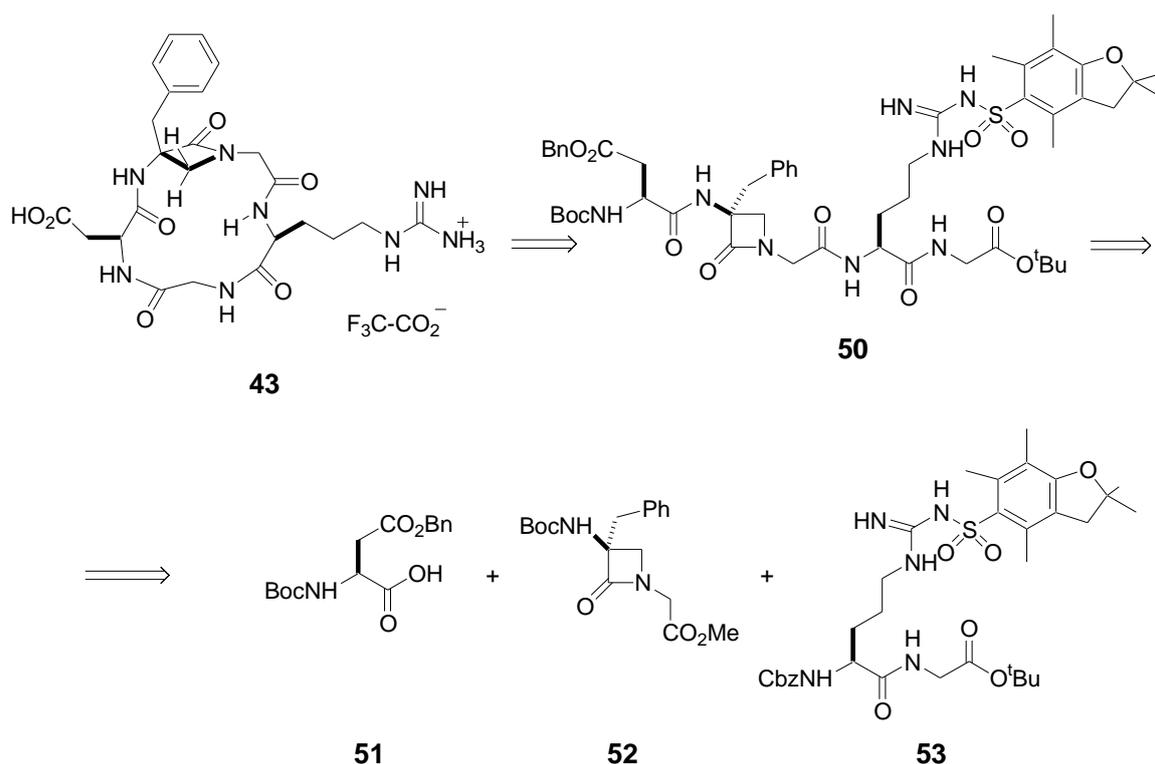


Figura 2.22: Esquema retrosintético del peptidomimético conformacionalmente restringido **43**.

La síntesis se pensó llevar a cabo a partir del ensamblaje de la N-metoxicarbonilmetil-β-lactama **52**, (S)-BocNH-Asp(OBn)-OH **51** y del dipéptido Cbz-Arg(Pbf)-Gly-OtBu **53**. La secuencia de reacciones prevista para la obtención del intermedio **50**, consistió en: a) desprotección del grupo α-amino de la β-lactama **52**, b) acoplamiento de la misma con el ácido aspártico⁷⁴ protegido **51**, c) hidrólisis del éster

⁷⁴ Ensayos realizados en nuestro laboratorio para acoplar una β-lactama similar a **52** con la N-Boc-prolina mostraban que debido al impedimento estérico del grupo amino en esta posición, la

metílico de **51-52**, d) hidrogenolisis de la Cbz-Arginina **53** y e) acoplamiento peptídico bajo condiciones normales (EDC-HOBT) para formar **50**.

Una vez desprotegidos los grupos *tert*-butoxicarbonilo y el éster *tert*-butílico del peptidomimético lineal **50** mediante ácido fórmico⁷⁵ se podría llevar a cabo la ciclación. Por último, se liberarían la guanidina y la cadena lateral del ácido aspártico mediante hidrogenolisis con Pd/C y ácido trifluoroacético.

Seguidamente se mostrarán los resultados alcanzados al ejecutar nuestro plan de trabajo que tenía como primer objetivo la síntesis de la β -lactama **52**.

2.2.1.2.2 Síntesis de la α -amino- α -bencil-*N*-metoxicarbonilmetil- β -lactama **52**

La síntesis de la β -lactama se pensó realizar mediante el método descrito en nuestro laboratorio⁷⁶ (ver Figura 2.23) consistente en la desprotección doble de los protones BocHN- y CH(SiMe₃)₂ de la bis(trimetilsilil)metil- β -lactama **45** con nBuLi/TMDA a -100°C y reacción del carbanión resultante con CO₂. La forma *N*-desprotegida **54** estaría lista para ser ensamblada con el ácido aspártico **51** y continuar así la síntesis.

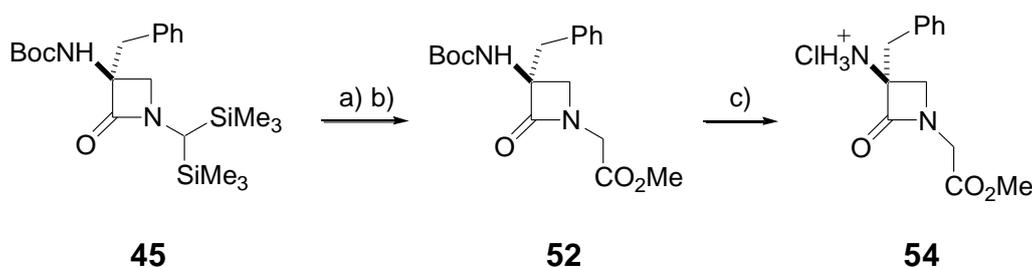


Figura 2.23: a) ⁿBuLi/TMEDA, CO₂ (g), -100°C. b) MeLi, DBU, CH₃CN, t.a., 16h, 45% los dos pasos c) 4N HCl dioxano, t.a., 16h.

La secuencia completa seguida para preparar la β -lactama precursora **45** se describe a continuación. Primeramente se sintetizaron el cloruro [(*R*)-4-fenil-2-oxo-

reacción daba bajos rendimientos salvo cuando se empleaba fluoruro de ácido de la prolina: ref. 69b, pag. 152.

⁷⁵ A. Jonczyk, World Patent n° WO-0053627, 2000.

⁷⁶ a) Galarza R. Tesis Doctoral, UPV-EHU. "Nuevas aproximaciones a carbapenems, monolactamas, aminoácidos no proteinogénicos y péptidos mediante sintones 4-alkil- β -lactámicos enantioméricamente puros" 1998. b) ref. 69a, pag. 152.

oxazolidin-3-il]acetilo **48** a partir de la (R)-fenilglicina **55** y la N-metilidenbis(trimetilsilil)metilamina **59**⁷⁷ a partir de N,N-dimetilcianamida, siguiendo la secuencia descrita en la Figura 2.24.

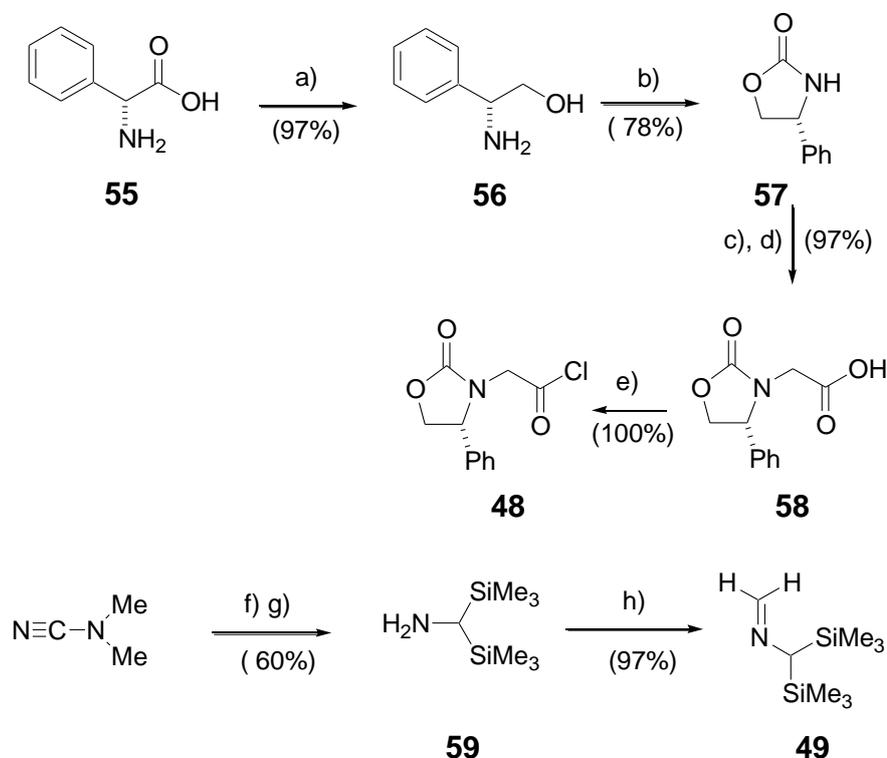


Figura 2.24: a) LiBH₄, ClSiMe₃, THF, t.a., 24h, MeOH/KOH, b) (MeO)₂C=O, K₂CO₃, KOH cat., reflujo, 30 min., c) NaH, BrCH₂-CO₂Me, THF, 0°C, 2h, d) NaOH aq., THF, t.a., 2h, e) ClCOC(=O)Cl, DMF (cat.), CH₂Cl₂, 1h, t.a. f) Li, ClSiMe₃, HMPA, THF, 0°C 2h, t.a. 16h, g) ClSiMe₃, MeOH, t.a., 1h, h) HCHO (30% aq.), 0°C, 2h.

La cicloadición [2+2] tipo Standinger entre la cetena derivada de **48** y la imina **49** para formar la β-lactama **47** se llevó a cabo en cloroformo con trietilamina como base y sobre tamiz molecular previamente activado. Después, la β-lactama **47** se alquiló con bromuro de bencilo tras la formación del enolato correspondiente con LDA a -78°C (Figura 2.25). Se obtuvo así la β-lactama α-bencilada **46**, cuyo espectro se muestra en la Figura 2.26.

⁷⁷ a) J. P. Picard, S. Grelier, T. Constantieux, J. Dunoguès, J. M. Aizpurua, C. Palomo, M. Petraud, B. Barbe, L. Lunnazi, J. M. Leger, *Organometallics*, **1993**, 12, 1378. b) ref. 72d, pag. 166.

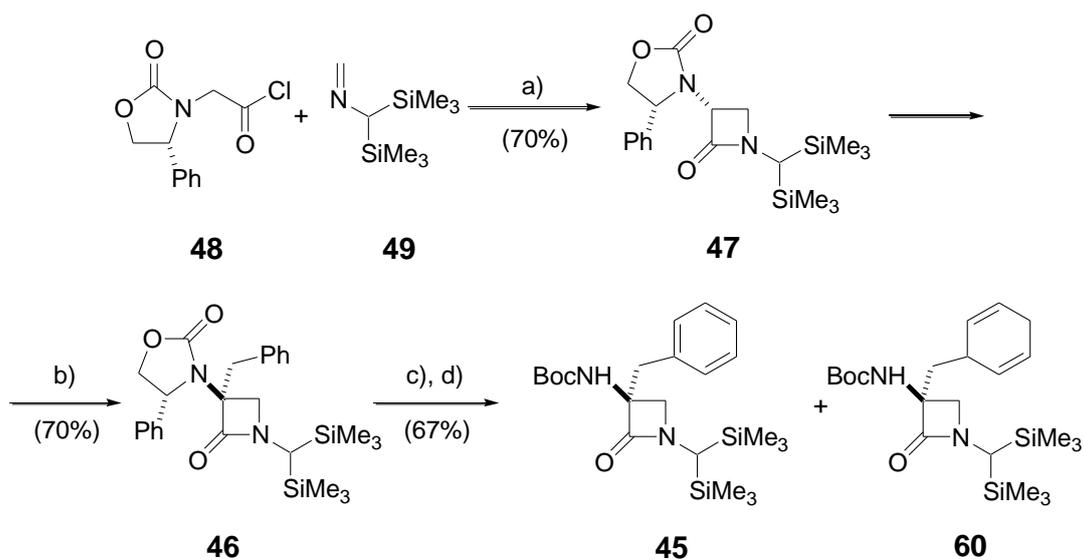


Figura 2.25: a) Et_3N , CHCl_3 , b) LDA, THF, -78°C , 30 min.; luego, BnBr (5 eq.), -78°C - 20°C , 16h, c) Li, NH_3 (liq.), d) Boc_2O

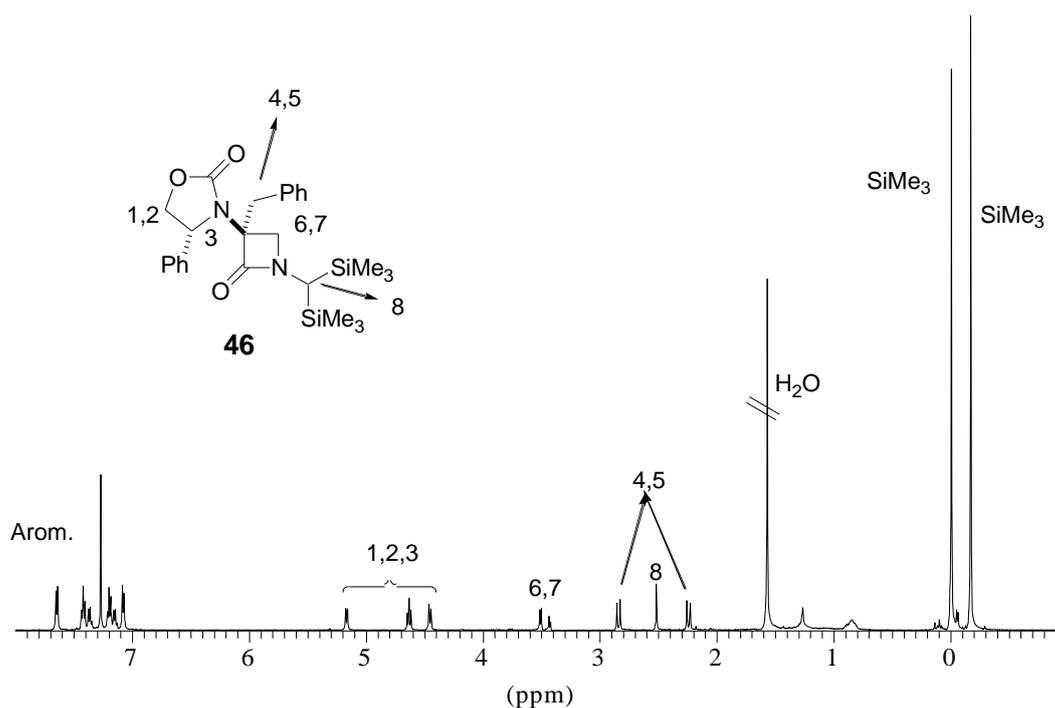


Figura 2.26: Espectro ^1H -RMN (500 MHz) de la α -bencil- β -lactama **46** en CDCl_3 .

Aunque en nuestro laboratorio se había descrito previamente la desprotección de la oxazolidinona en el enantiómero de la β -lactama **46** empleando litio en amoníaco líquido, observamos que al efectuar la reacción a mayor escala se formaban cantidades

variables del subproducto **60** en el que el grupo bencilo de la β -lactama se encuentra desaromatizado. Además de la asignación por RMN del compuesto **60** (Figura 2.27) la estructura de **60** se confirmó haciendo reaccionar la mezcla **45** + **60** con DDQ (2,3-dicloro-5,6-dicianbenzoquinona) en tolueno a reflujo y viendo que se obtenía únicamente el producto **45** puro (ver Figura 2.28)

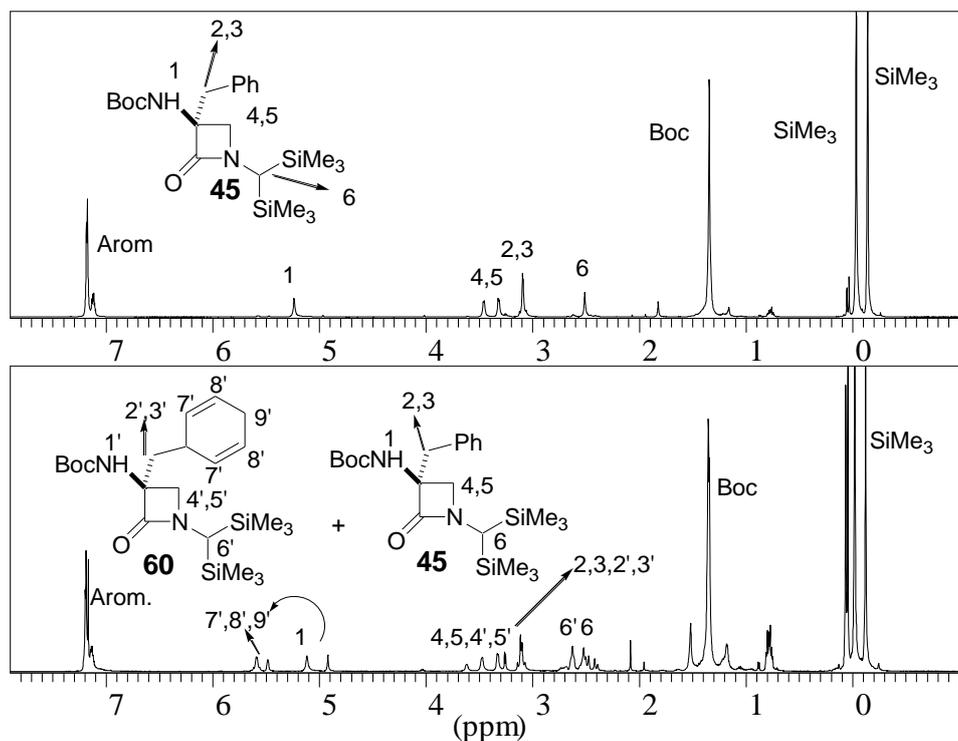


Figura 2.27: Espectro de ¹H-RMN en CDCl₃ de la mezcla de compuestos **45** y **60** y del compuesto puro **45** por otro lado.

En un principio se pensó que la reducción parcial del grupo fenilo se había producido por haber aumentado la temperatura de reacción o quizás por haber superado el tiempo de reacción habitual (5 minutos). Aunque se controlaran los dos parámetros exactamente, no se pudo evitar completamente la formación del producto no deseado. Además, la reacción no era reproducible ya que la cantidad de subproducto formado era muy variable llegando a obtener en algunos casos una relación de 1:1 entre producto **45** y subproducto **60**.

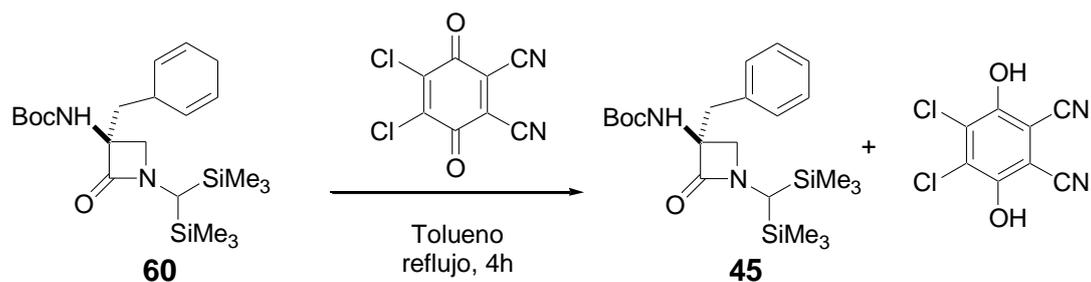


Figura 2.28: Reacción de aromatización del subproducto **60**, llevada a cabo para confirmar su estructura.

Una vez obtenida la β -lactama **45** se estudió su carboxilación desililativa a la *N*-carboximetil- β -lactama **61**. Esta reacción se llevó a cabo desprotonando simultáneamente los protones NH y CH(SiMe₃)₂ con 2 equivalentes de *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (TMEDA), *n*BuLi, y añadiendo CO₂ gas como electrófilo. En la Figura 2.29 se muestra una propuesta del mecanismo de la reacción.

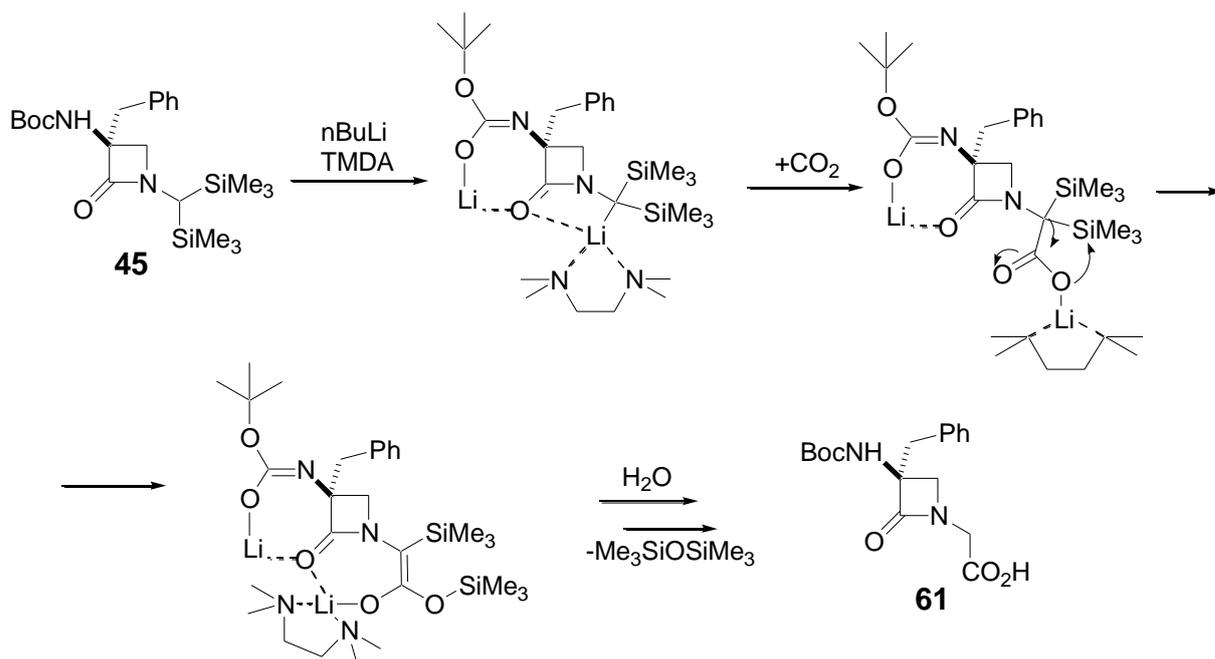


Figura 2.29: Propuesta del mecanismo de desililación carboxilativa de la β -lactama **45** a **61**.

Aunque la reacción tenía lugar con un 60% de rendimiento, presentaba dos problemas. Primeramente, la sistemática conversión parcial a pesar de añadir un exceso de *n*BuLi y, en segundo lugar, la contaminación del producto con cantidades variables

de ácido caprónico proveniente de la carboxilación directa del nBuLi, que no era posible separar por cromatografía en columna. El primero de los problemas se pudo paliar en parte, ya que la extracción básica del crudo de reacción dejaba un 40% de producto de partida intacto que podía ser reutilizado. En lo que respecta al ácido caprónico, éste sólo se pudo eliminar de la mezcla de reacción en el rotavapor formado el éster metílico volátil. En la Figura 2.30 se muestra el espectro ^1H -RMN de una crudo de reacción típico donde se observan las señales de la cadena alifática del ácido caprónico dando un triplete a 0.9 ppm, otro triplete a 2.4 ppm y varios multipletes entre 1.2 y 1.5 ppm.

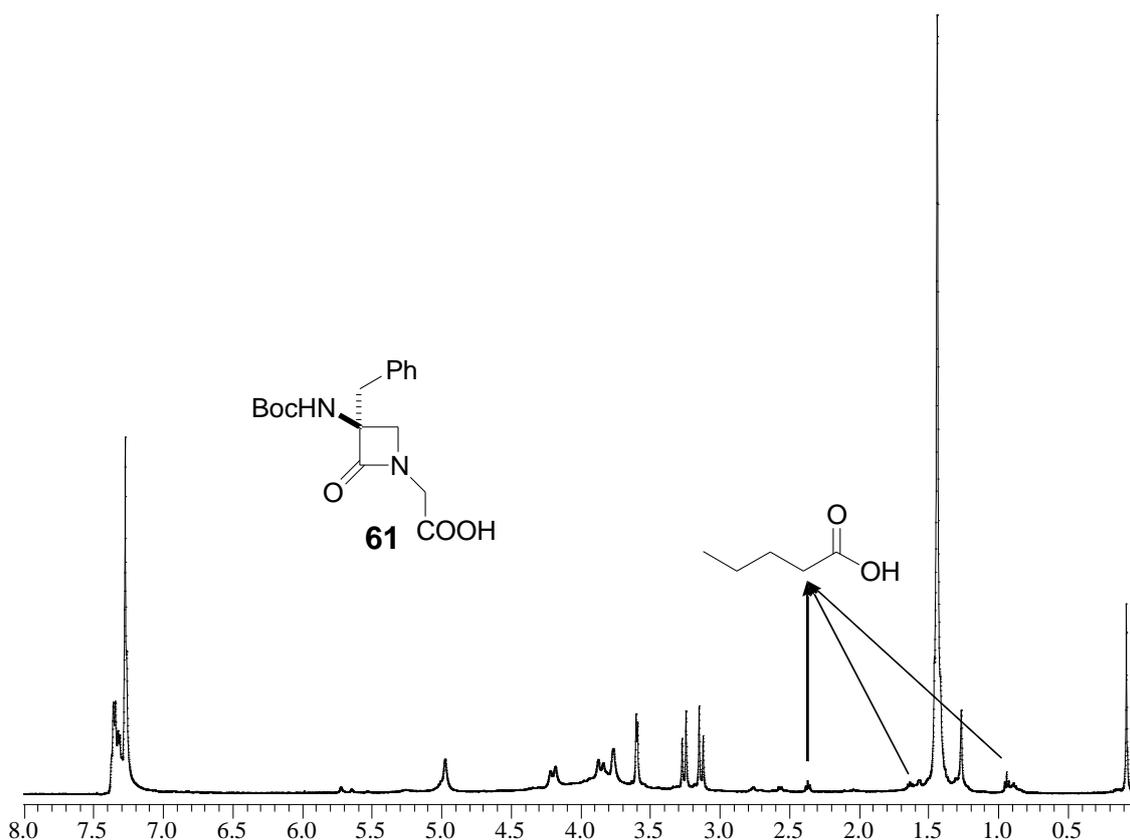


Figura 2.30: Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) del crudo de reacción del ácido β -lactámico **61**, donde se aprecian trazas de ácido caprónico.

Una vez obtenido el ácido **61**, éste se transformó en el éster metílico **62** con DBU como base y yoduro de metilo en acetonitrilo y por último se desprotegió el grupo Boc por reacción con una disolución de cloruro de hidrógeno en dioxano a temperatura ambiente durante 16h.⁷⁸

⁷⁸ M. C. Evans, A. Pradhan, S. Vencatraman, W. H. Ojala, W. B. Gleason, R. K. Mishra, R. L. Johnson, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 1441-1447.

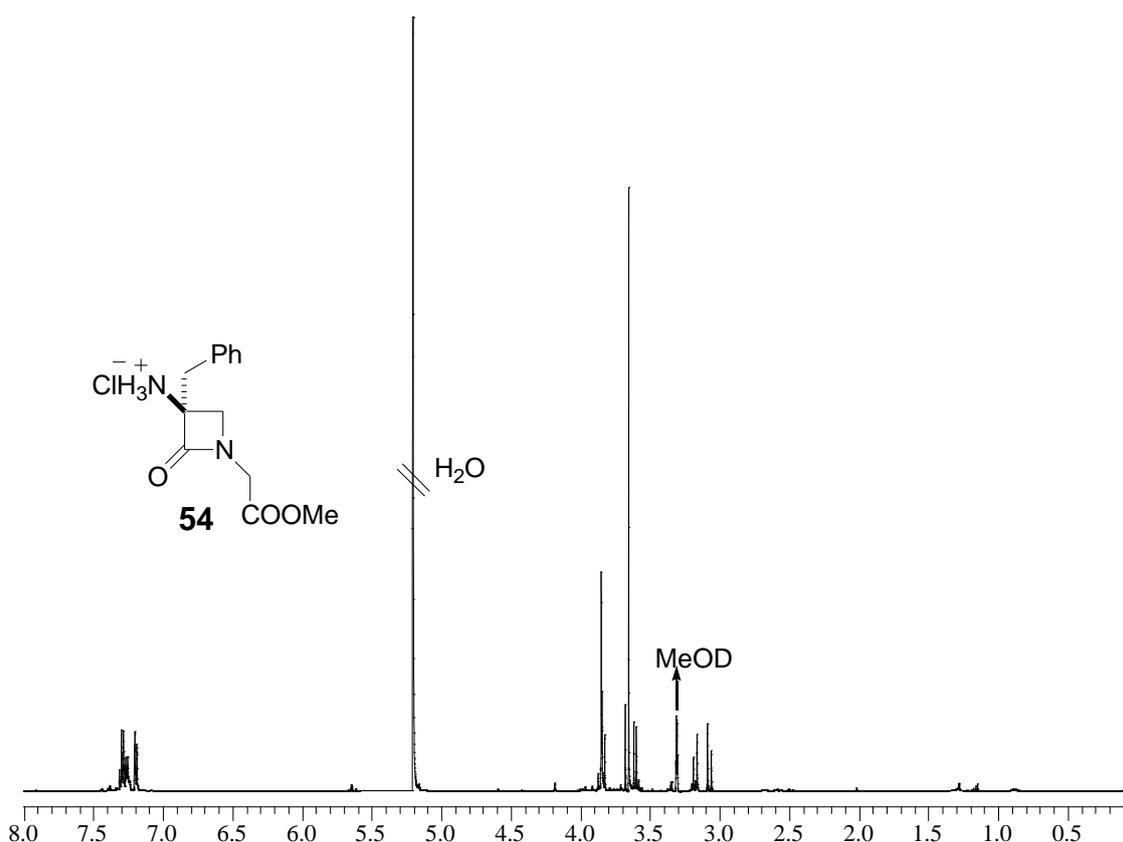


Figura 2.31: Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) del clorhidrato de la β -lactama **54** en CD_3OD .

Debido a los problemas encontrados en las últimas reacciones y, sobre todo, a su escasa reproducibilidad se optó por plantear una síntesis alternativa de la β -lactama **54** sustituyendo la feniloxazolidinona por otro grupo equivalente que se eliminase en condiciones más suaves.

2.2.1.3 Segunda desconexión (Ruta A)

2.2.1.3.1 Planteamiento

En nuestro laboratorio ya se había descrito la preparación de α -amino- β -lactamas N-bis(trimetilsilil)metiladas conteniendo una oxazolidinona 4,5-difenilada, (ref. 72a, pag. 166) aunque no se preparó el compuesto **63** no sustituido en la posición β (Figura 2.32).

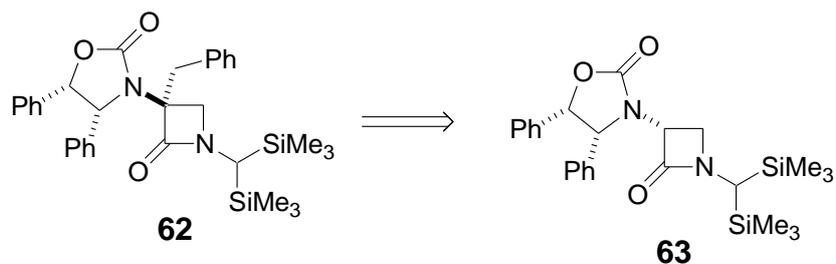


Figura 2.32: Preparación de la α -bencil- α -difenoioxazolidin- β -lactama **62** susceptible de ser desprotegida mediante hidrogenolisis.

Nosotros pensamos que la α -bencilación de **63** debería transcurrir de modo similar al de la β -lactama homóloga monofenilada para dar **62**. Sin embargo, en este caso el grupo 4,5-difeniloxazolidinilo podría ser aprovechado como grupo protector de la función α -amino de la β -lactama para proceder a su liberación mediante hidrogenolisis en el momento oportuno.

De acuerdo con estas consideraciones, se planteó la variante retrosintética de la Ruta A recogida en la Figura 2.33.

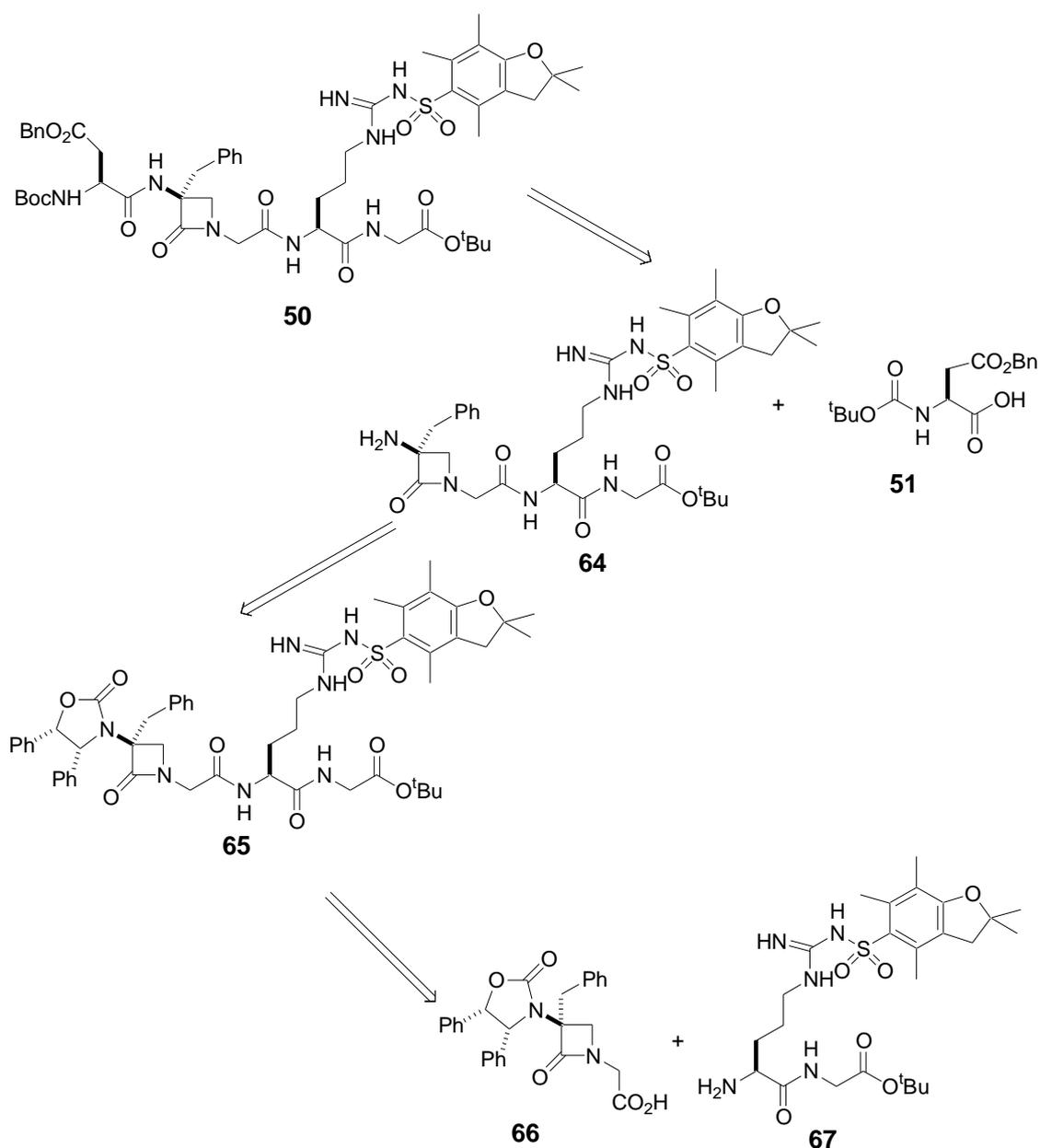


Figura 2.33: Esquema retrosintético para la preparación del pseudopéptido lineal **50** a partir de la α -(4,5-difeniloxazolidinil)- β -lactama **66**.

2.2.1.3.2 Síntesis de la α -amino- α -bencil- N -carboximetil- β -lactama **66**

Primeramente se sintetizó la 4,5-difenil oxazolidinona **68**⁷⁹ a partir del (R)-2-amino-2-fenil-(S)-1-feniletanol,⁸⁰ mediante ciclación en medio básico con trifosgeno.

⁷⁹ a) Ref. 76a, pag. 169 b) Y. Ito, A. Sasaki, K. Tamoto, M. Sunagawa, S. Terashima, *Tetrahedron*, **1991**, 47, 2801. c) E. Nicolás, K. C. Russell, V. J. Hruby, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 766-770.

⁸⁰ Este aminoalcohol es comercial, aunque se puede sintetizar a partir de trans-estilbeno, H.-T. Chang, K. B. Sharpless, *Tetrahedron*, **1996**, 37, 3219-3222.

Su posterior elaboración hasta el cloruro de ácido **70** se llevó a cabo igual que en el caso de la monofeniloxazolidinona **48** descrita en la Figura 2.24 (pag 170).

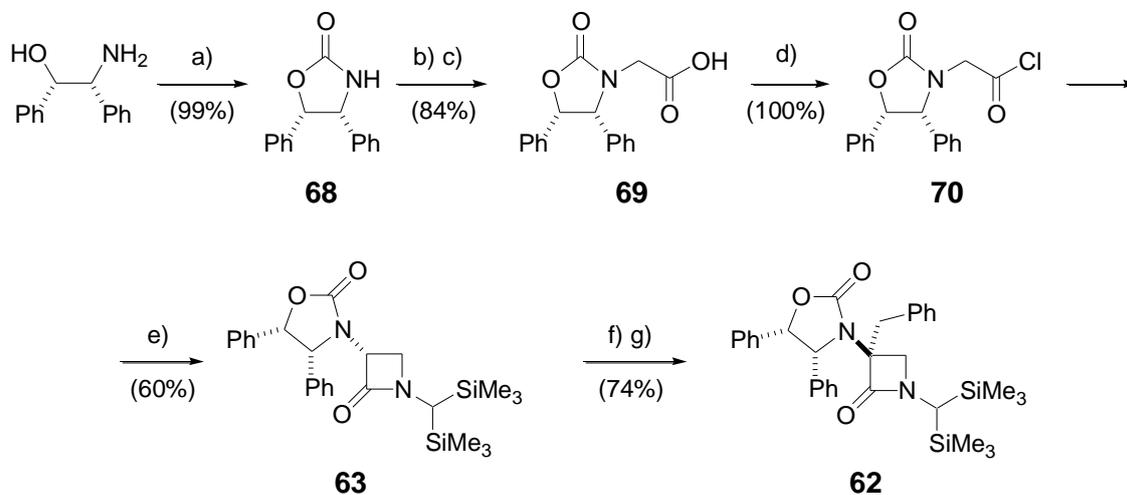


Figura 2.34: a) Trifosgeno, NaOH (6N), CH₂Cl₂, 0°C-t.a., 5h, b) NaH, BrCH₂-CO₂Me, THF, 0°C, 2h, c) NaOH aq., THF, t.a., 2h, d) ClCOCOCi, DMF (cat.), CH₂Cl₂, 1h, t.a. e) CH₂=N-CH(SiMe₃)₂, Et₃N, CHCl₃, reflujo, 16h; f) LDA, THF, -78°C, 10 min.; g) BnBr, THF, -78°C-20°C, 16h.

Tanto la síntesis de la β-lactama **63** como la β-bencilación de ésta para dar la N-bis(trimetilsilil)metil-β-lactama **62** de forma totalmente estereoselectiva se llevaron a cabo mediante el mismo método utilizado para la síntesis de la β-lactama **46**. A continuación se muestra un espectro de ¹H-RMN de la β-lactama **62**:

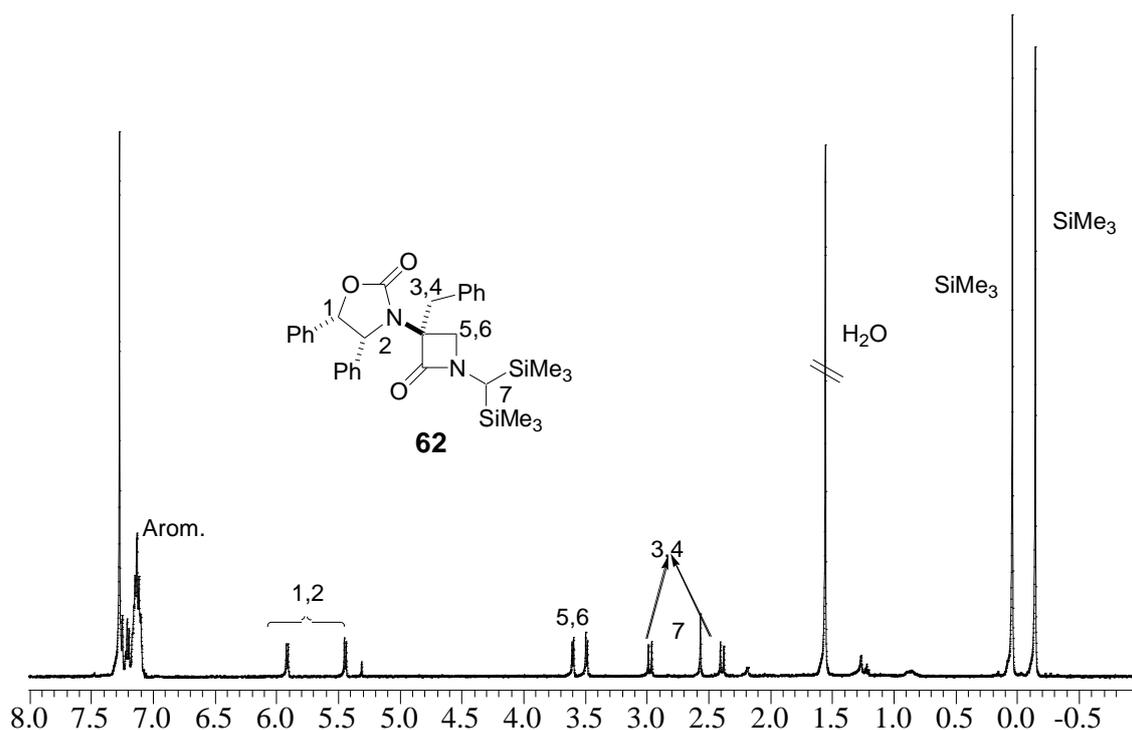


Figura 2.35: Espectro ^1H -RMN (500 MHz) en CDCl_3 de la α -(4,5-difeniloxazolidinil)- β -lactama **62**.

Al llevar a cabo la decarboxilación desililativa de la β -lactama, en este caso también se formaba una cantidad variable de ácido caprónico. Pero además aparecían más impurezas, quizás porque la base utilizada ($n\text{BuLi/TMEDA}$) atacara en parte a la oxazolidinona. Por esta razón se pensó transformar la β -lactama **62** en el N-carboximetil derivado **65** en dos pasos (Figura 2.36), según el método descrito en nuestro laboratorio.⁸¹ Primeramente se oxidó el grupo bis(trimetilsilil)metilo mediante nitrato de Cerio (IV) y amonio para dar una N-formil- β -lactama intermedia que fue desformilada inmediatamente a la NH- β -lactama **71** por tratamiento básico suave ($\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$). Dicha β -lactama fue alquilada con bromoacetato de metilo en presencia de carbonato de cesio en acetonitrilo a reflujo y tras la hidrólisis del éster se obtuvo el ácido β -lactámico deseado **66**.

⁸¹ a) Ref. 72a y 72d pag. 166 b) P. R. Guzzo, M. J. Miller, *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 4862-4867. c) D. Gala, M. Steinman, R. S. Jaret, *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 4488. d) V. M. Girijavallabhan, A. K. Ganguly, P. Pinto, R. Versace, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1983**, 908.

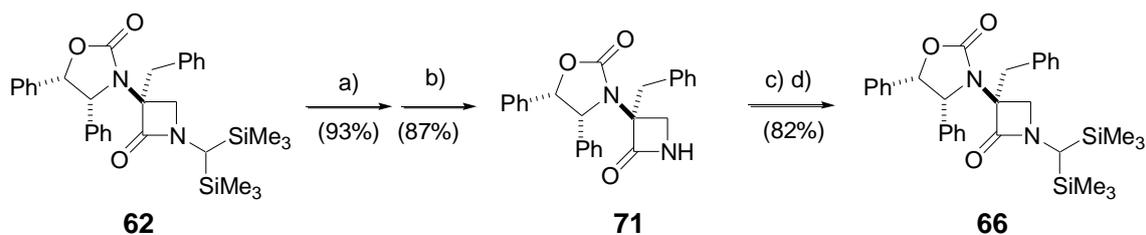


Figura 2.36: a) CAN, CH₃CN/H₂O, t.a., 1h, b) Na₂CO₃, NaHCO₃ sat. aq., MeOH, t.a., 2h, c) Cs₂CO₃, BrCH₂CO₂Me, CH₃CN, reflujo, 1.5h. d) NaOH, H₂O/THF.

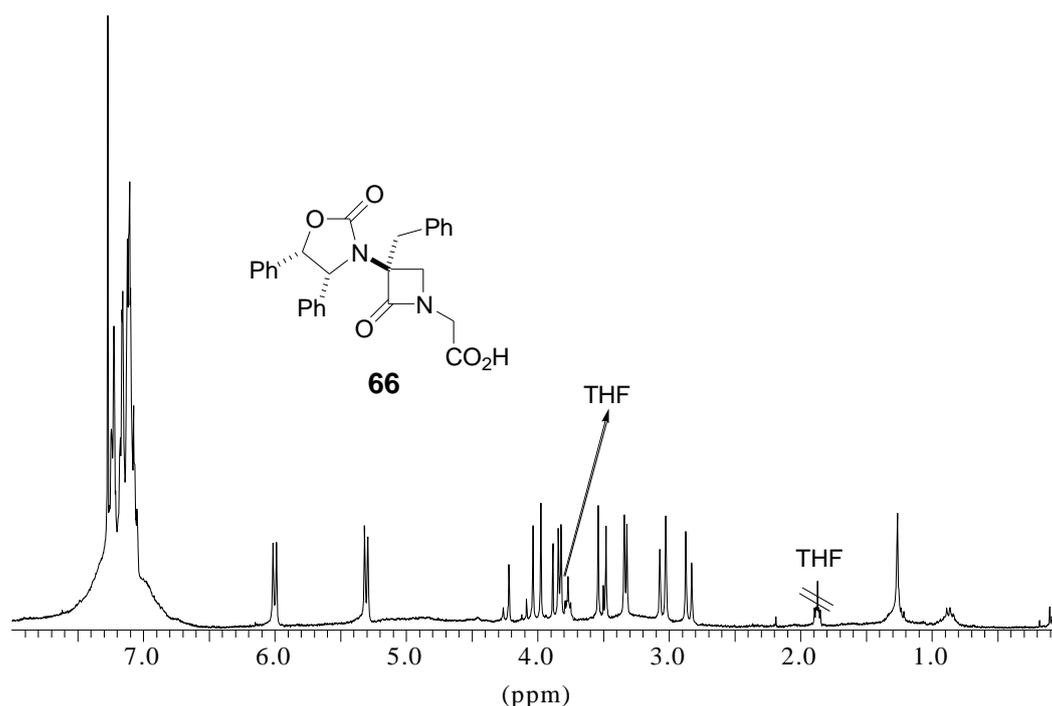


Figura 2.37: Espectro ¹H-RMN en CDCl₃ de la N-carboximetil-β-lactama **66** (crudo de reacción).

2.2.1.3.3 Síntesis de Cbz-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu

A la hora de sintetizar los aminoácidos necesarios para obtener el pseudopéptido lineal **50** (Figura 2.33, pag. 177), primeramente se llevó a cabo la síntesis del dipéptido compuesto por la arginina y la glicina. El Pbf-Cl aun siendo comercial se sintetizó en el laboratorio de la forma que se muestra en la figura Figura 2.38.⁸² El éter de metalilo de trimetilfenol **72**, se preparó por reacción del fenol con 3-cloro-2-metilpropeno en

⁸² K. M. Kim, H. R. Kim, E. K. Ryu, *Heterocycles*, **1993**, 36, 497-505.

presencia de carbonato potásico y una cantidad catalítica de yoduro potásico en una mezcla de acetona y DMF. Seguidamente, se cicló al dihidrobenzofurano **73** por tratamiento con AlCl_3 y, finalmente, la formación del cloruro de sulfonilo **74** se realizó con ácido clorosulfónico en diclorometano a -10°C .⁸³

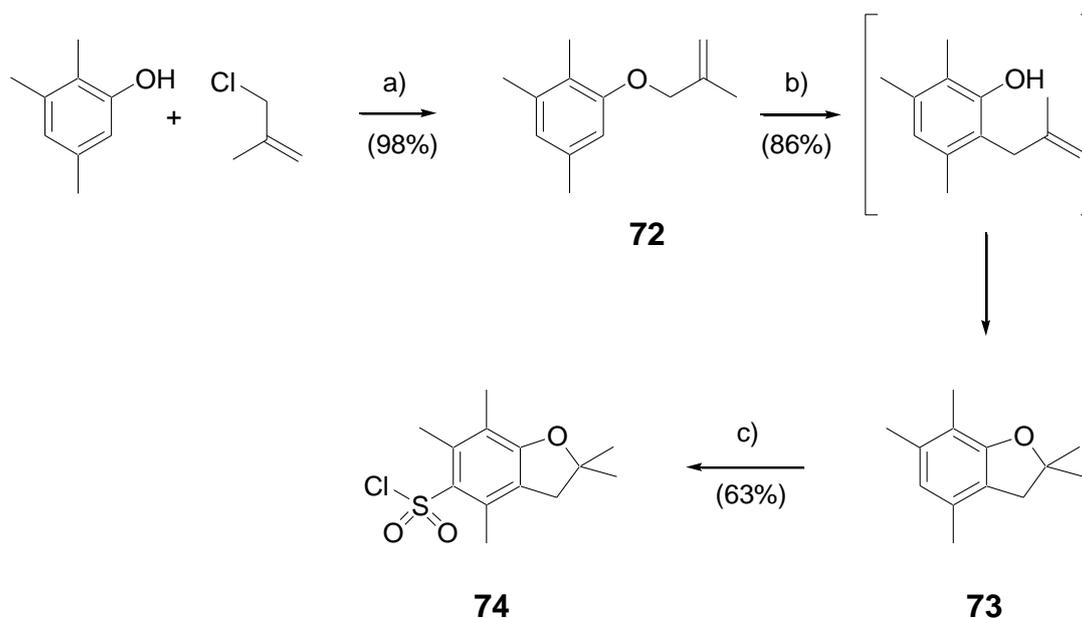


Figura 2.38: a) K_2CO_3 , KI (cat.), Me_2CO , DMF, reflujo, 16h, b) AlCl_3 , -70°C - t.a., 16h, c) ClSO_3H , CH_2Cl_2 , -10°C -1h, t.a., 4h.

La síntesis del dipéptido Cbz-Arg(Pbf)-Gly- O^tBu se llevó a cabo a partir de la Cbz-Arginina. Primero se protegió con Cl-Pbf en medio básico y se purificó mediante cristalización en éter etílico de su sal de ciclohexilamonio (CHA en la Figura 2.39).⁸³ La sal presentó un aspecto gomoso y fue necesario tenerla en el congelador durante una noche para que solidificara, aunque volvía a tomar el aspecto gomoso a temperatura ambiente. Tras desproteger el ácido se acopló al éster *tert*-butílico de la glicina utilizando TBTU y diisopropiletilamina como base. Pese a que la purificación de este producto se hizo mediante cromatografía en gel de sílice, fue difícil conseguir eliminar completamente la tetrametilurea producida como subproducto mediante la reacción con la TBTU; no obstante, este producto no interfiere en las posteriores reacciones y se eliminó por completo en sucesivas purificaciones. Por último, el intermedio estable **53** se desprotegió mediante una hidrogenólisis dejando el grupo amino del compuesto **67**

⁸³ R. Ramaje, J. Green, A. J. Blake, *Tetrahedron*, **1991**, 47, 6353-6370.

listo para poder ser acoplado al fragmento β -lactámico preparado en el apartado anterior.

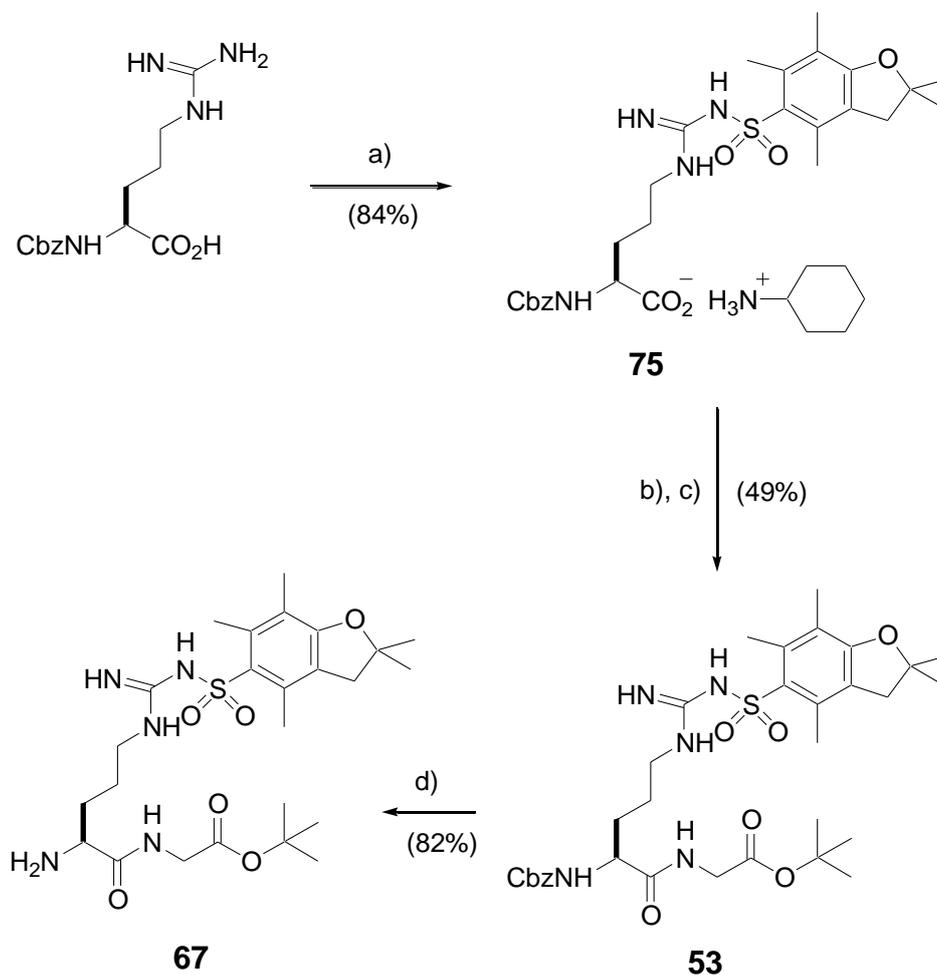


Figura 2.39: a) Cl-Pbf, NaOH 3.2M en H₂O, Me₂CO, 0°C-2h, t.a.-4h, ciclohexilamina (CHA= sal de ciclohexilamonio) b) Ácido cítrico, EtOAc, c) H₂N-Gly-OtBu, DIPEA, TBTU, CH₂Cl₂, 0°C-1h/ t.a.- 16h, d) Pd/C, H₂, EtOH, t.a., 16h.

El espectro ¹H-RMN del compuesto **53** en CDCl₃ se muestra en la Figura 2.40. Son característicos en él los cuatro singletes del grupo protector de la arginina. La asignación de las diferentes señales se efectuó aplicando el método de correlaciones sucesivas a partir de un espectro COSY (ANEXO 1)

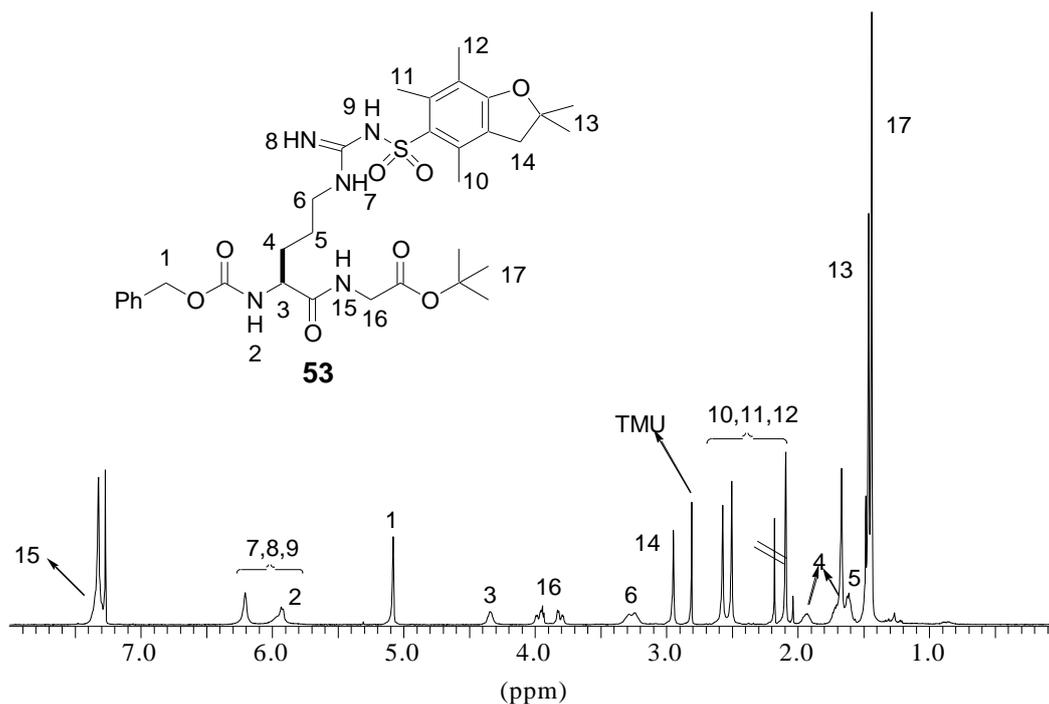


Figura 2.40: Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) del compuesto **53**. El producto contiene una pequeña cantidad de tetrametilurea marcada en el espectro como TMU.

2.2.1.3.4 Síntesis del pseudopéptido *Boc-Asp(OBn)-(β -Lactam)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu 50*

Como ya se anticipó en el planteamiento general de la síntesis del ciclopéptido RGD β -lactámico **43** (ver Figura 2.19, pag. 164) una de las dificultades previsibles de nuestra estrategia consistía en el acoplamiento peptídico de ácidos aspárticos protegidos de tipo **XXIV** con las α -amino- β -lactamas impedidas **XXV**. Por ello, decidimos realizar primeramente una serie de ensayos de acoplamiento peptídico empleando como modelos las α -amino- β -lactamas **54** y **76**, en lugar del compuesto **64** más elaborado (ver Figura 2.33, pag. 177). La α -amino- β -lactama sililada **76** se obtuvo por hidrogenolisis a presión atmosférica de la α -(4,5-difeniloxazodinil)- β -lactama **62** con $\text{Pd}(\text{OH})_2$ sobre carbono en etanol. En cuanto a los derivados del ácido aspártico se utilizaron los que se indican sobre la Tabla 2.1. De ellos, los compuestos **51** y **77** fueron accesibles comercialmente, el NCA (N-carboxianhidrido) **78** se sintetizó siguiendo los métodos

descritos en la bibliografía⁸⁴ y, por último, el fluoruro de ácido **79** se preparó a partir de Boc-Asp(O^tBu)-OH según el método descrito por Carpino.⁸⁵

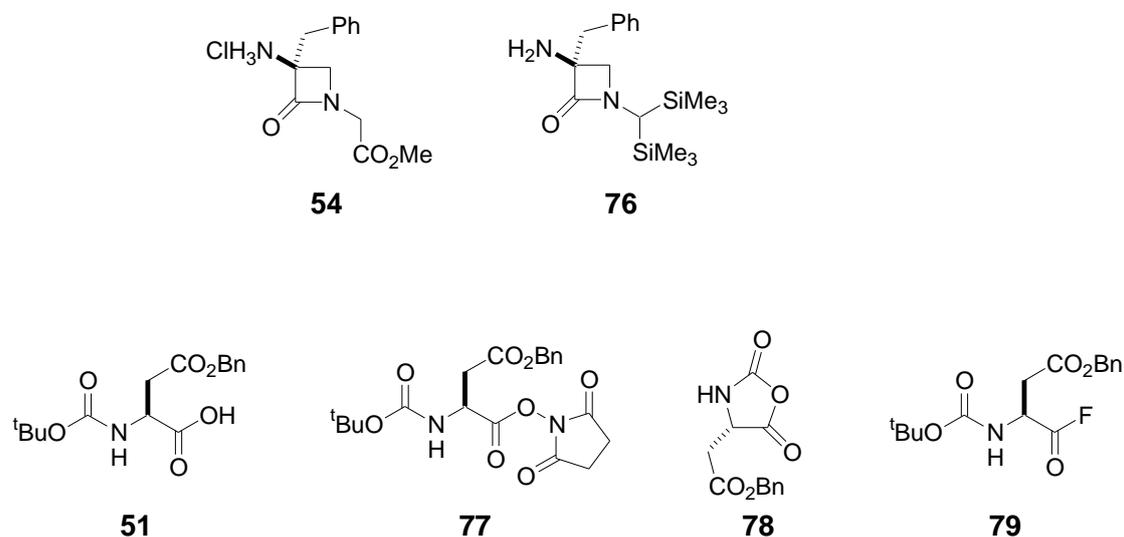


Tabla 2.1: Ensayo de acoplamiento peptídico entre el ácido aspártico **51** y sus derivados activados **77-79** y las α-amino-β-lactamas impedidas **54** y **76**.

β-Lactama	Derivado del ácido aspártico	Condiciones de reacción	Rendimiento
54	51	TBTU (1 eq.), DIPEA (2 eq.), CH ₂ Cl ₂	No hay reacción
54	51	EDC (1.5 eq.), HOAt (1.5 eq.), DIPEA (2.5 eq.)	No hay reacción
54	77	Et ₃ N (2.1 eq.) THF	No hay reacción
54	77	NaOH (1 eq.), Et ₃ N (1 eq.), THF/H ₂ O	No hay reacción
76	78	KCN (1.1 eq.), DMF	No hay reacción
76	79	N-metilmorfolina (2 eq.) CH ₂ Cl ₂	31%

⁸⁴ S. Mobashery, M. Johnston, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 2200-2202.

⁸⁵ A. Carpino, E.-S. M. E. Mansour, D. Sadat-Aalae, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 2611-2614.

Debido a los resultados obtenidos, se decidió utilizar el fluoruro de ácido **79** para acoplar el ácido aspártico, según la secuencia de reacciones que se muestra a continuación:

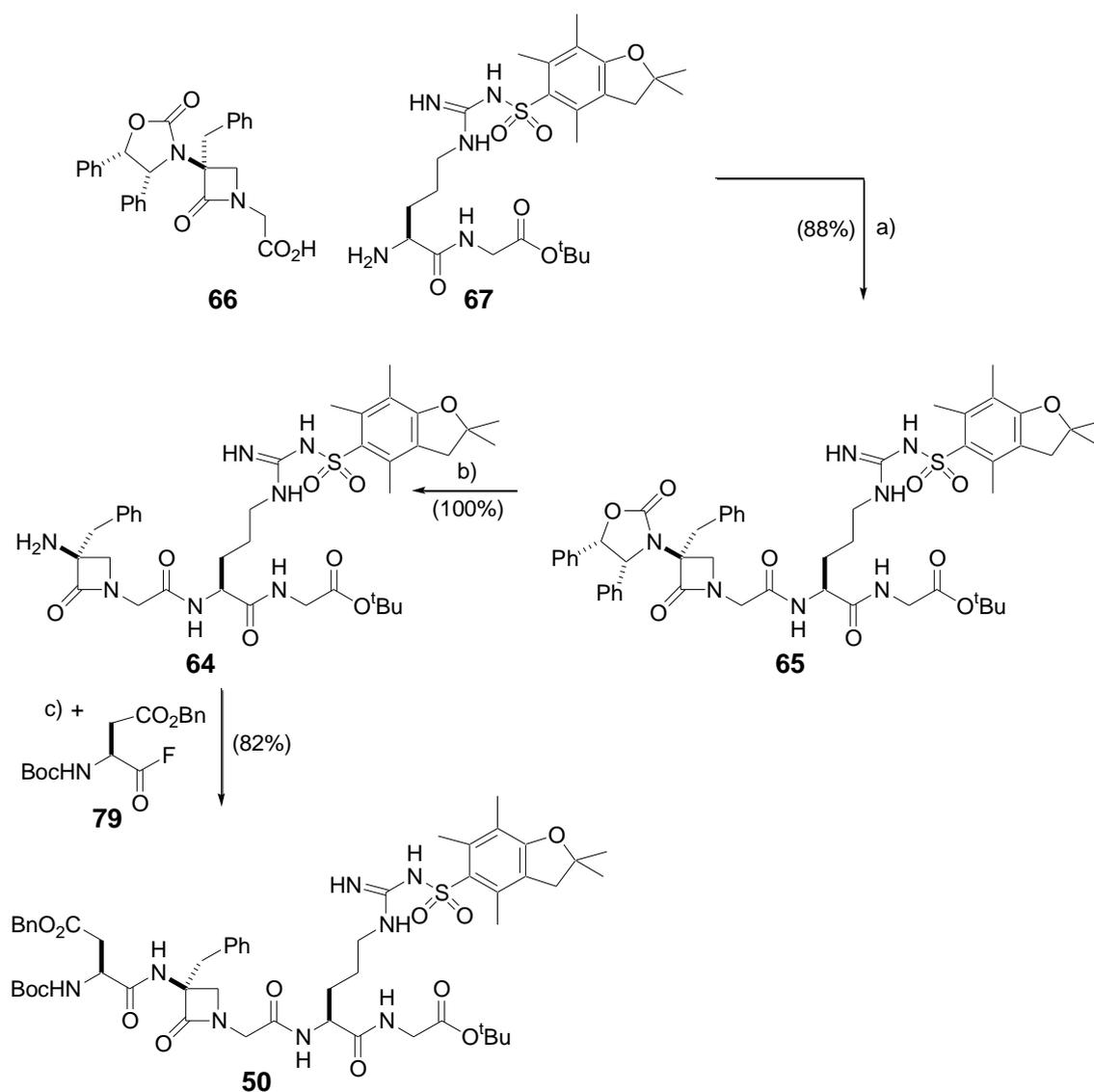


Figura 2.41: a) EDCI (1.4 eq.), HOBt (1.2 eq.), CH₂Cl₂, t.a / 16h, b) Pd/C (20%), H₂ (150 psi.), EtOH, 40°C, 24h, c) **79** (1.7 eq.), NMM (2.5 eq.), CH₂Cl₂, t.a. 6h.

El acoplamiento del dipéptido H-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu **67** con la β-lactama **66** se realizó utilizando condiciones convencionales (EDC, y HOBt). La formación del pseudopéptido **65** se confirmó mediante ¹H-RMN y la asignación de las señales se realizó a partir del espectro COSY (ANEXO 2):

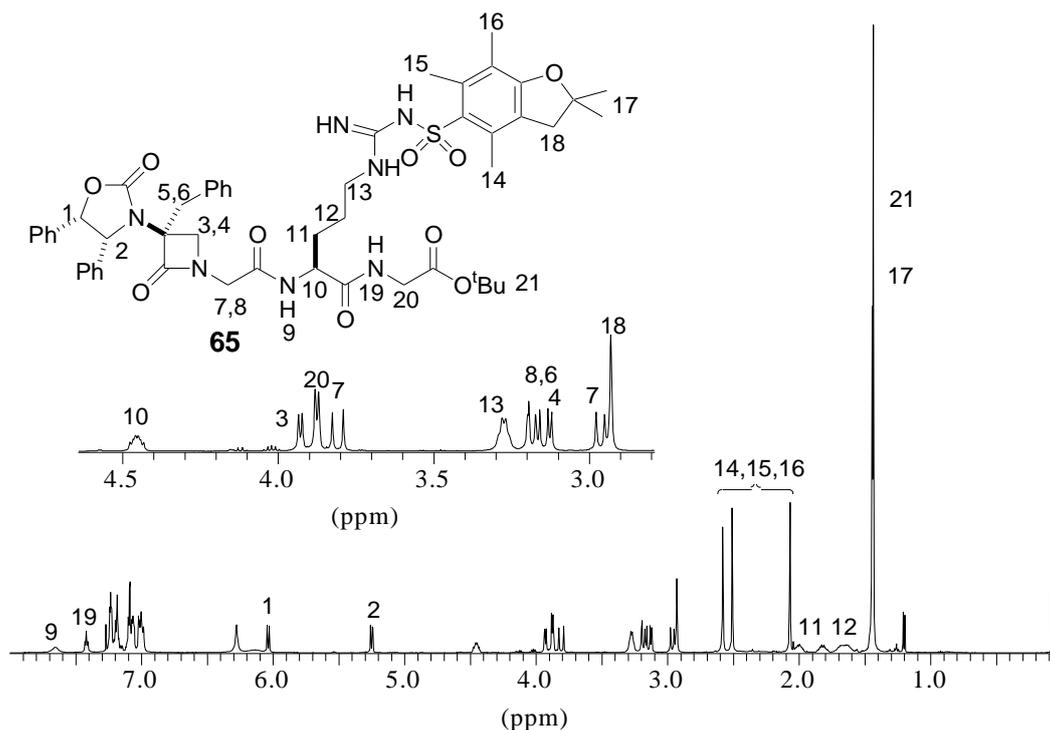


Figura 2.42: Espectro ^1H -RMN del pseudopéptido β -lactámico **65** en CDCl_3 .

Posteriormente, se llevó a cabo la hidrogenolisis de la oxazolidinona catalizada por $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, aplicando 150 psi. de presión y una temperatura de 40°C durante 24 h. Tras formar el fluoruro de ácido **79** mediante el método de Carpino anteriormente mencionado (ver Figura 2.43), éste se hizo reaccionar con la amina **64** para dar el pseudopéptido lineal **50** deseado con un 82% de rendimiento tras purificación cromatográfica. En la Figura 2.44 se muestra su espectro de ^1H -RMN con la asignación de protones obtenida a partir de las señales de cruce de un experimento bidimensional COSY (ANEXO 3).

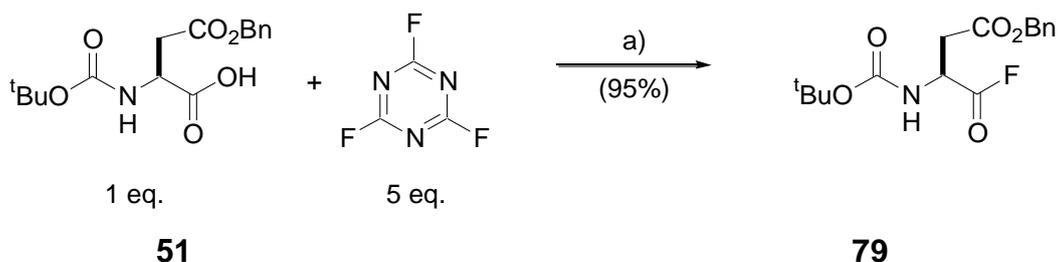


Figura 2.43: a) Piridina (1 eq.), CH_2Cl_2 , -20°C , 1.5 h.

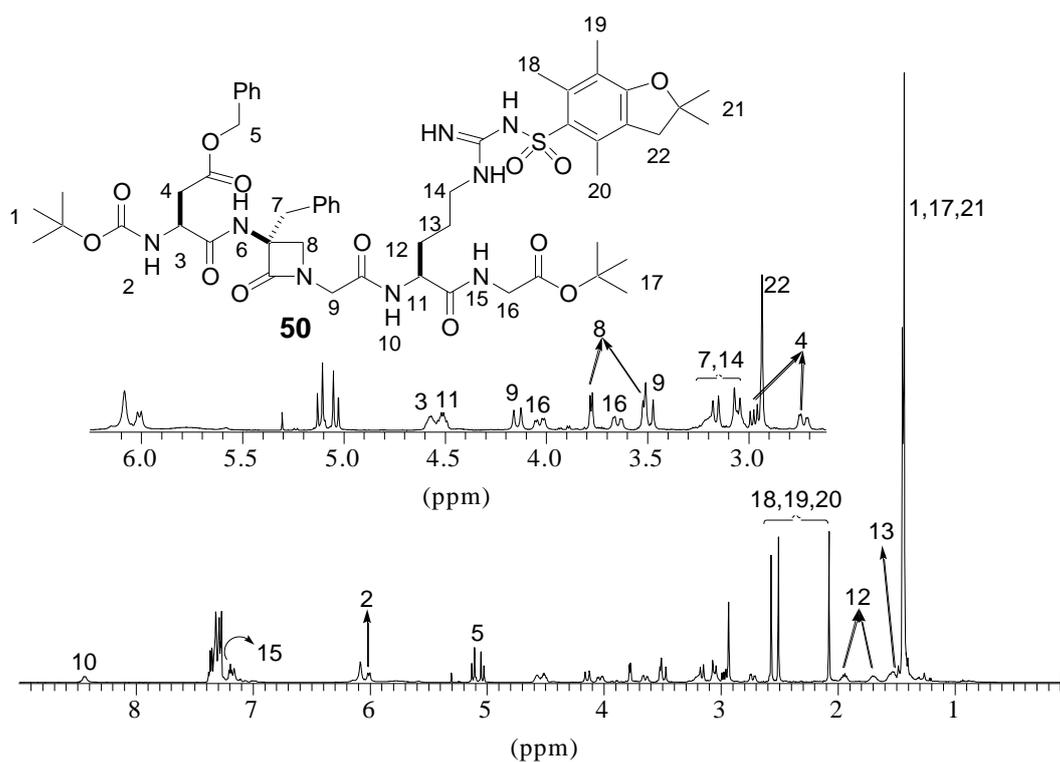


Figura 2.44: Espectro ^1H -RMN (500MHz) del pseudopéptido lineal β -lactámico **50** en CDCl_3 .

De acuerdo con la retrosíntesis de la Ruta A (ver Figura 2.22, pag. 168), para llevar a cabo la ciclación del péptido **50** a ciclopéptido RGD **43**, debían desprotegerse previamente con ácido fórmico los grupos N- y C- terminales (Boc y $-\text{O}^t\text{Bu}$, respectivamente) manteniendo el grupo Pbf de la Arginina. Al igual que hicimos en la etapa previa, decidimos realizar algunos ensayos con un modelo fácilmente asequible para buscar las combinaciones de reacción. Así, se preparó de modo cuantitativo el dipéptido Boc-Arg(Pbf)-Gly- O^tBu **80** (ver Figura 2.45) a partir de H-Arg(Pbf)-Gly- O^tBu **67**.

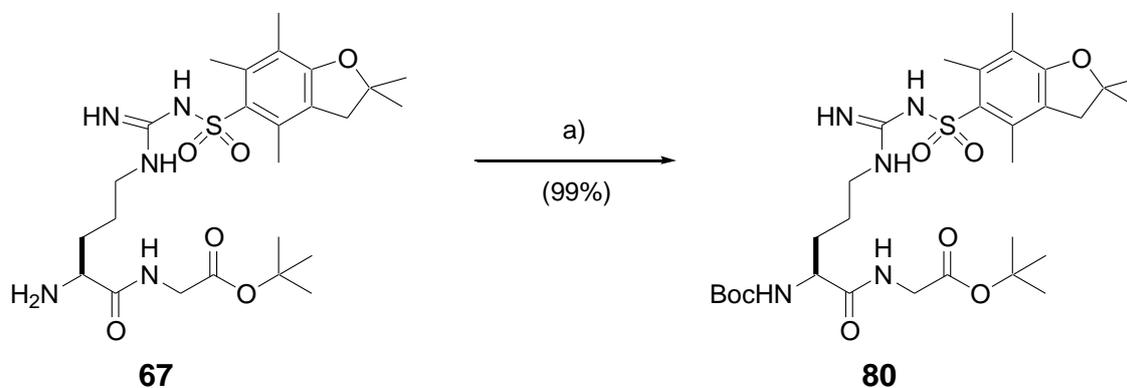


Figura 2.45: Preparación del péptido modelo Boc-Arg(Pbf)-Gly- O^tBu **80**. a) Boc_2O (1.5 eq.), CH_2Cl_2 , 20°C , 16h.

Al disolver el dipéptido **67** en ácido fórmico a temperatura ambiente durante 24h, se recuperaba el producto de partida. Sin embargo, al calentar la reacción a 40°C durante 5h el dipéptido se desprotegía selectivamente para dar de modo cuantitativo el compuesto H-Arg(Pbf)-Gly-OH.

Adoptando estas condiciones de desprotección, se llevó a cabo la reacción con el compuesto **50**. Sin embargo, la reacción resultó sucia y el espectro de ^1H -RMN, tanto en CDCl_3 como en DMSO, indicaba que el compuesto se había degradado a juzgar por la aparición de bandas anchas colapsadas. A pesar de repetir la reacción variando la concentración de ácido fórmico, la temperatura y el tiempo de reacción, no se llegó a obtener el producto deseado. Por un lado, no quedaba producto de partida, pero el espectro del producto obtenido indicaba la presencia de mezclas complejas. Así pues, pensamos sustituir los grupos protectores N- y C- terminales por otros que se pudieran desproteger mediante hidrogenación cambiando la ruta A por la Ruta B (ver Figura 2.20, pag. 165).

2.2.1.4 Tercera desconexión (Ruta B)

Para efectuar esta aproximación los grupos protectores terminales Boc y éster *tert*-butílico debían ser intercambiados por el Cbz y éster bencílico, respectivamente para formar el péptido **81**. Aunque la cadena lateral de la arginina podía mantenerse protegida con el grupo Pbf, el ácido aspártico debía protegerse ahora como éster *tert*-butílico. Asimismo, los grupos protectores de todos los intermedios también debían ser intercambiados. La síntesis por lo tanto se planteó de la forma que se muestra en la Figura 2.46:

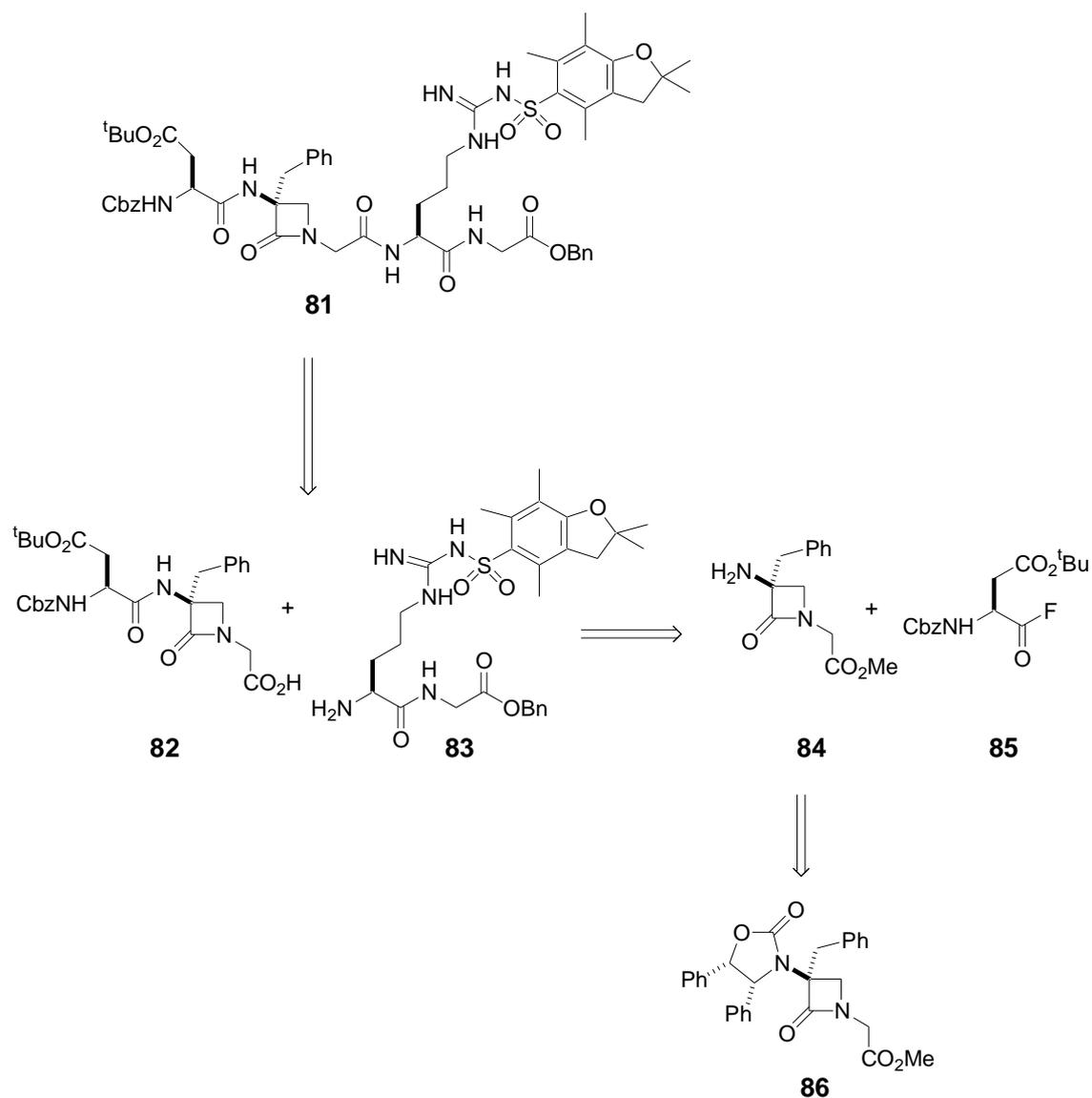


Figura 2.46: Esquema retrosintético del pseudopéptido β -lactámico lineal **81** portador de algunos grupos terminales eliminables por hidrogenolisis (Ruta B).

2.2.1.4.1 Síntesis de la α -amino- β -lactama **84**.

La síntesis de la α -amino- β -lactama **86** se planteó de modo similar al de la N-carboximetil- β -lactama **65** (ver Figura 2.36), sólo que mientras en aquel caso se llevaba a cabo la hidrólisis del éster metílico al ácido carboxílico, en este se desprotegía la oxazolidinona mediante hidrogenolisis con Pd manteniendo el éster metílico. El 1,2-difeniletano formado en la reacción resultó ser de difícil separación por cromatografía o lavados ácido-básicos, por lo que se separó tras el acoplamiento con el fragmento del ácido aspártico protegido.

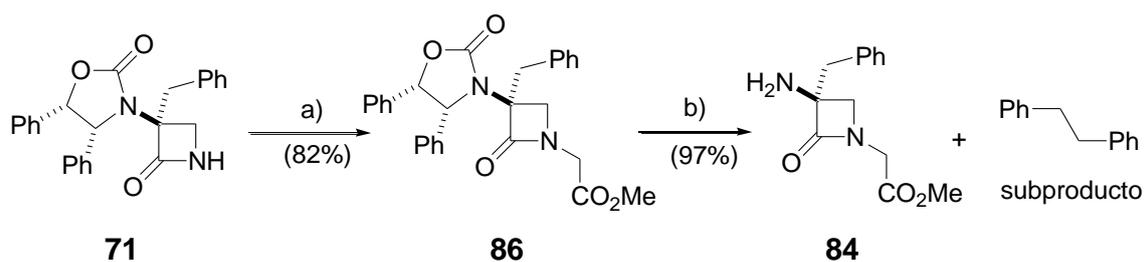


Figura 2.47: a) Cs_2CO_3 , $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$, CH_3CN , reflujo, 1.5h. b) Pd/C (20%), H_2 (150 psi.), EtOH , 40°C , 24h.

A continuación se muestran los espectros de ^1H -RMN correspondientes a los ésteres metílicos β -lactámicos **86** y **84**. En el caso de éste último, al tratarse de un crudo de reacción, se aprecia un singlete a 2.9 ppm correspondiente a los metilenos del 1,2-difeniletano.

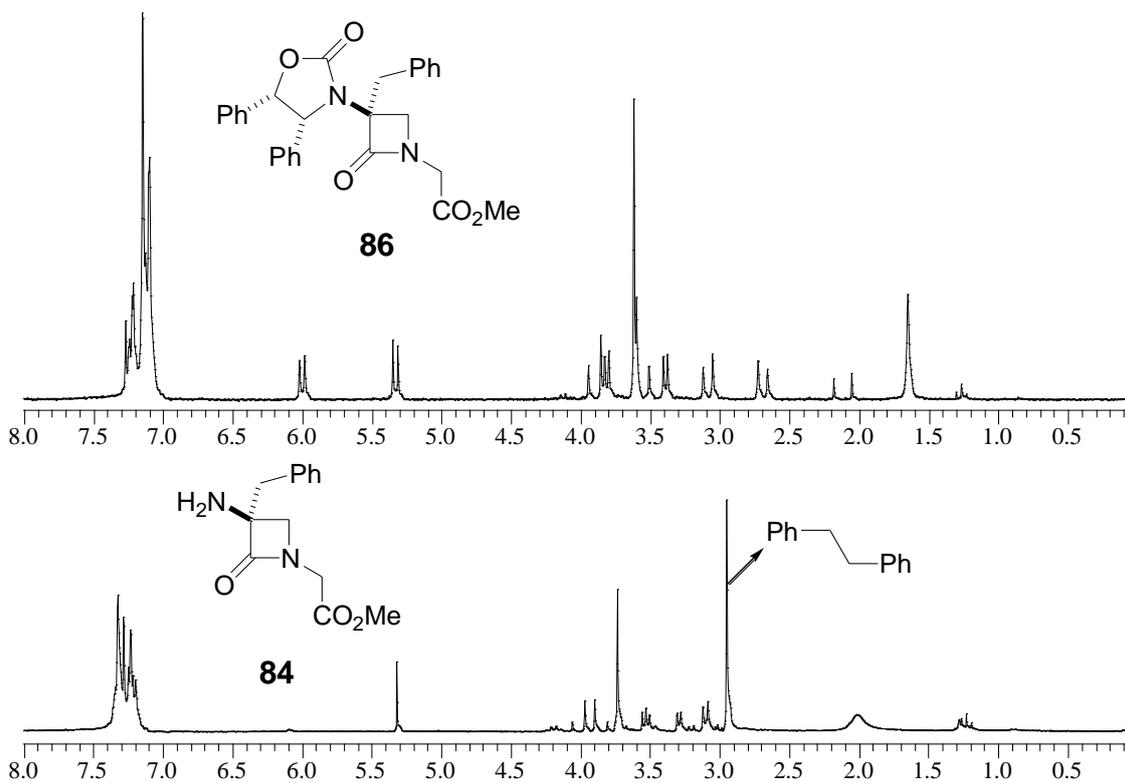


Figura 2.48: Espectros de ^1H -RMN (200 MHz) en CDCl_3 de las β -lactamas **86** y **84**.

2.2.1.4.2 Síntesis del pseudopéptido Boc-Arg(Pbf)-Gly-OBn **89**

Para la preparación del fragmento H-Arg(Pbf)-Gly-OBn **83** necesario según la retrosíntesis de la Ruta B (Figura 2.46) se siguió la secuencia mostrada en la Figura 2.49. A partir de la sal de ciclohexilamonio (CHA) de la Cbz-Arg(Pbf)-OH **75**, sintetizada según las aproximaciones anteriores, se efectuó un intercambio de grupos N-protectores para obtener la arginina **88** correctamente protegida para su posterior acoplamiento con el éster bencílico de la glicina. De esta forma se obtuvo el dipéptido **89** que fue desprotegido al producto **83** con ácido fórmico.

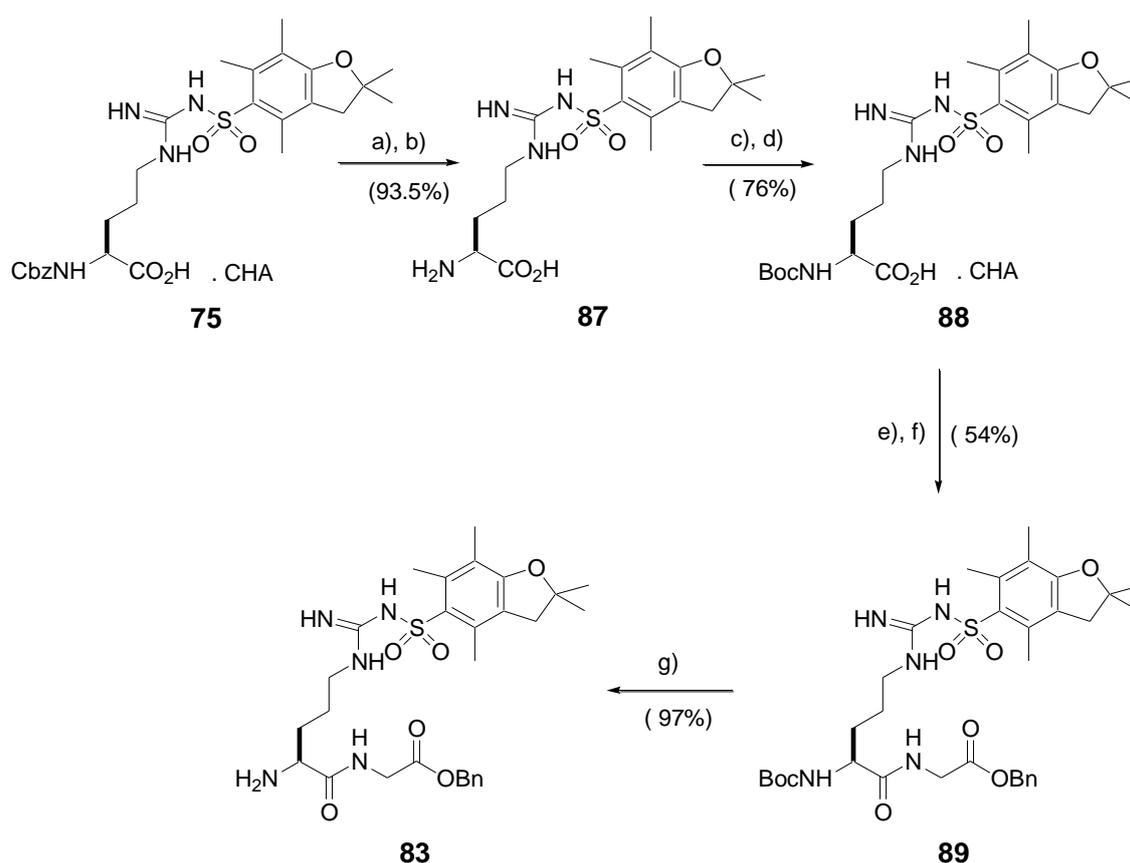


Figura 2.49: a) Acido cítrico 5%/ EtOAc, b) Pd /C, H₂ (1atm.), MeOH, 16h. /t.a., c) NaOH, Boc₂O, t-BuOH, t.a., 16h, d) Ciclohexilamina, e) Acido cítrico 5%/ EtOAc, f) H-Gly-OBn, EDC, HOBt, CH₂Cl₂, t.a., 16h, g) HCO₂H, t.a., 2h.

En la Figura 2.50 se muestra el espectro ^1H -RMN del compuesto **89** en CDCl_3 . Este espectro que es muy similar al obtenido para el dipéptido formado por Cbz-Arg(Pbf)-Gly-OtBu **53**, cuenta con una asignación de señales realizada con la ayuda de un experimento bidimensional de COSY (ANEXO 4):

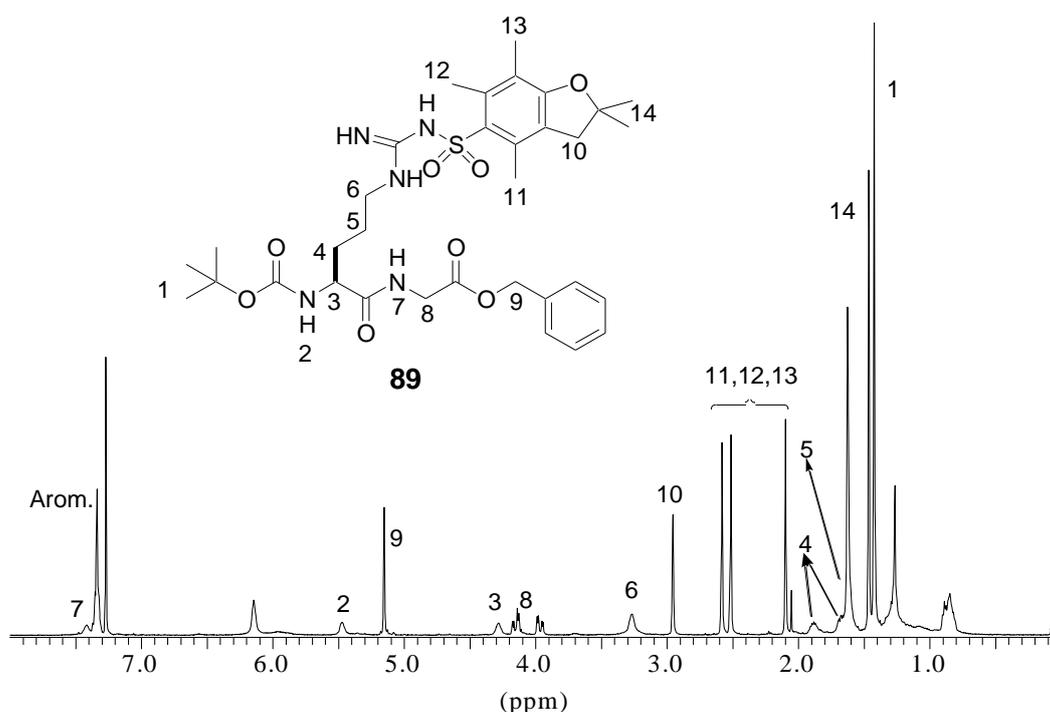


Figura 2.50: Espectro ^1H -RMN (500 MHz) del dipéptido Boc-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu **89** en CDCl_3 .

2.2.1.4.3 Síntesis del pseudopéptido lineal H-Asp(O^tBu)-(β-Lactam)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OH **91**

Una vez preparados el péptido H-Arg(Pbf)-Gly-OBn **83** y la α-amino-β-lactama **84**, se sintetizó el peptidomimético lineal **81** de acuerdo con la secuencia de la Figura 2.51. Para ello primero se acopló el fluoruro del ácido **85** preparado a partir de Cbz-Asp(O^tBu)-OH por el método de Carpino, con la β-lactama **84**.

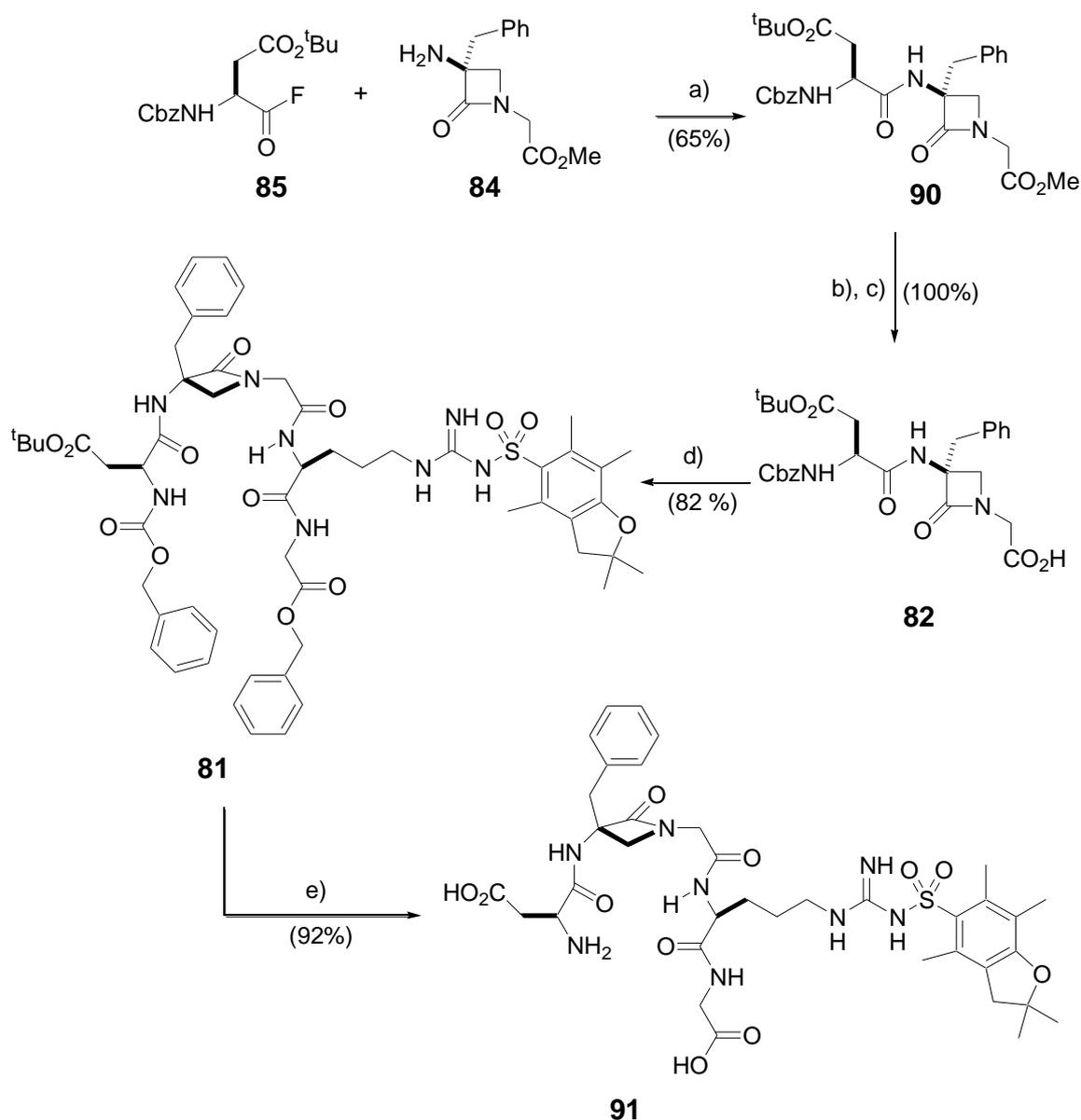


Figura 2.51: a) NMM, CH₂Cl₂, 0°C- t.a., 16h, b) LiOH, THF/H₂O (2:1), t.a., 1h, c) Ácido cítrico 5%/CH₂Cl₂, d) **83**, EDC, HOBt, Et₃N, t.a., 20h. e) Pd/C (10%), 1 atm. H₂, EtOH, t.a., 16h.

Una vez purificado el compuesto **90**, se hidrolizó el éster metílico con hidróxido de litio, en una mezcla de THF/H₂O a temperatura ambiente durante 1h. Tras liberar el grupo carboxílico con una disolución al 5% de ácido cítrico y extraer el producto con CH₂Cl₂, se registró un espectro ¹H-RMN que presentó un único juego de señales confirmando que el compuesto **82** no había epimerizado. Por último, se llevó a cabo el acoplamiento del ácido **82** con la amina **83** empleando un método convencional (EDC y HOBt). Así se obtuvo con excelente rendimiento el compuesto **81** listo para su desprotección.

Las Figura 2.52 y Figura 2.53 muestran los espectros ^1H -RMN de los compuestos **82** y **81** respectivamente. En este último la asignación de los protones se realizó a partir de un espectro COSY (ANEXO 5).

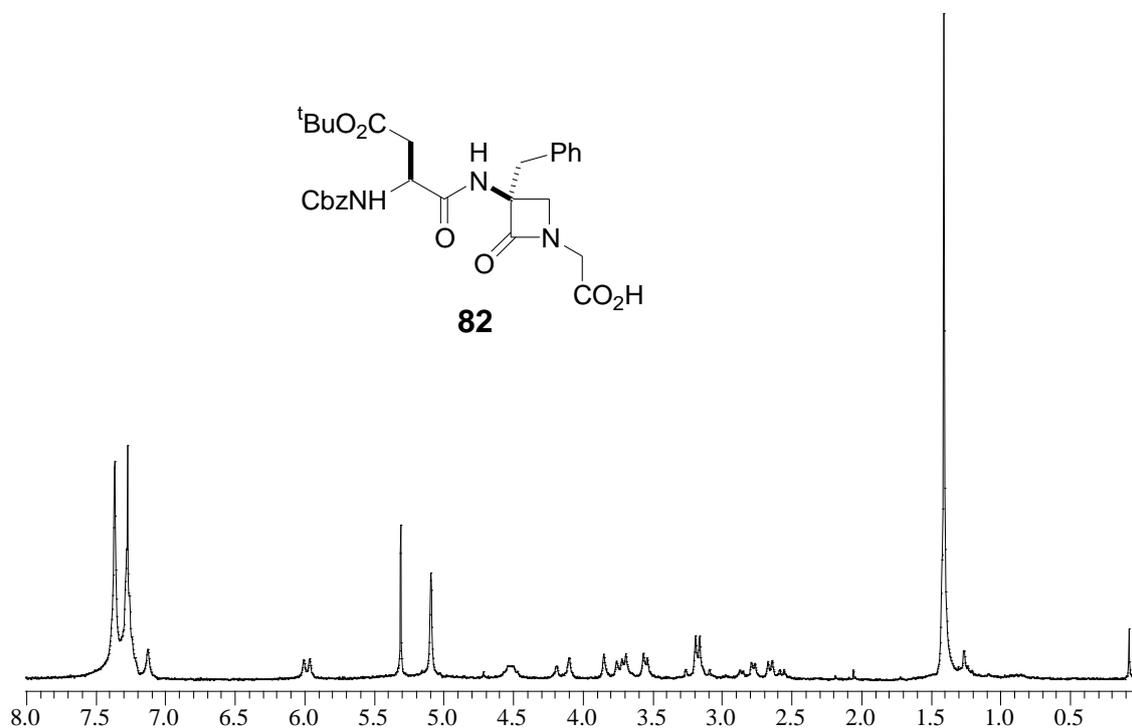


Figura 2.52: Espectro ^1H -RMN (200 MHz) del dipéptido β -lactámico **82** en CDCl_3 .

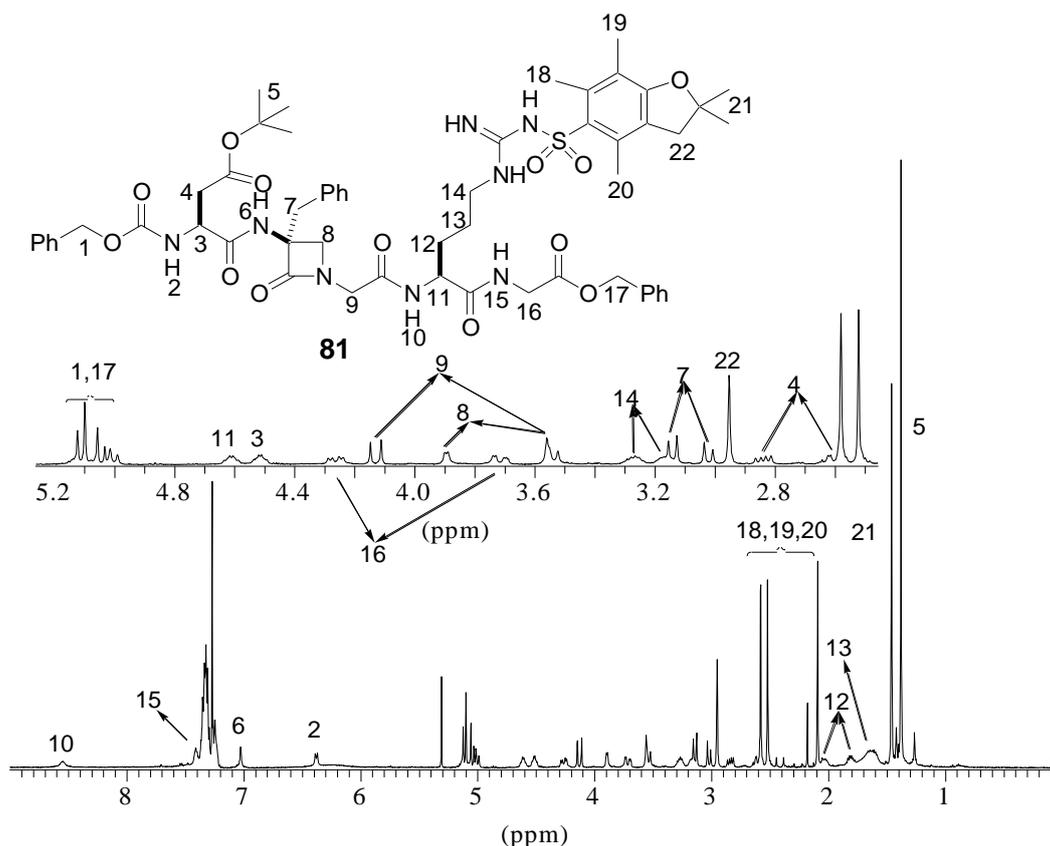


Figura 2.53: Espectro ^1H -RMN (500 MHz) del pseudopéptido Cbz-Asp(O^tBu)-(β-lactam)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn **81** en CDCl_3 .

La desbencilación de los grupos protectores N- y C- terminales mediante hidrogenólisis catalizada por paladio/carbono en etanol a temperatura ambiente y presión atmosférica condujo de modo prácticamente cuantitativo al pseudopéptido lineal H-Asp(O^tBu)-(β-Lactam)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OH **91** puro, que fue empleado inmediatamente en la etapa de macrociclación.

2.2.1.4.4 Síntesis del ciclo-[Arg-Gly-Asp-β-Lactam-Gly]

La ciclación del péptido **91** y la desprotección del intermedio protegido **92** para dar el ciclopéptido **43** se efectuaron de acuerdo con las reacciones de la Figura 2.54:

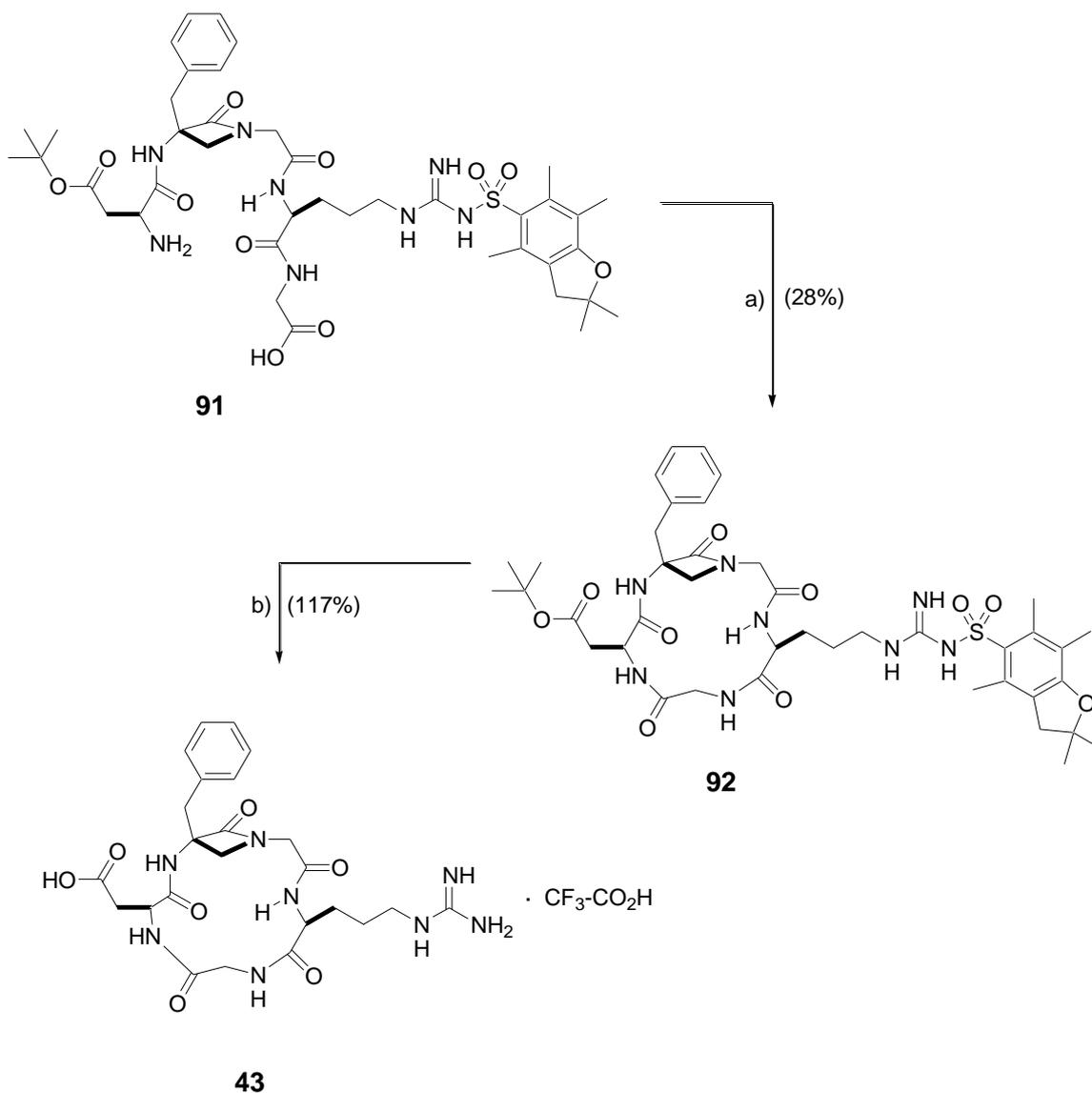


Figura 2.54: a) HATU, HOAt, DIPEA, DMF, t.a., 24h, b) F_3CCO_2H , 35°C, 1h.

Como se ha comentado en el apartado introductorio de esta memoria, la formación de ciclopéptidos macrolactámicos como **92** transcurre generalmente con bajos rendimientos, incluso operando en condiciones de alta dilución. Para estimar la eficacia de diferentes combinaciones de reactivos de acoplamiento peptídico y disolventes de reacción como promotores de ciclación realizamos un breve estudio encaminado a buscar las condiciones más adecuadas para efectuar dicha reacción con el pseudopéptido **91**. En la Tabla 2.2 se recogen los principales resultados.

Tabla 2.2: Ensayos de ciclación del pseudopéptido β -lactámico **91** con diferentes reactivos de acoplamiento peptídico

REACTIVOS	DISOLVENTE	RENDIMIENTO
TBTU (1.5 eq.), DIPEA (2 eq.)	CH_2Cl_2	No se formó producto; crudo muy sucio
BOP-Cl (5 eq.), DMAP (9 eq.) ⁸⁶	CH_2Cl_2	No se formó producto; crudo muy sucio
TBTU (1.5 eq.), NMM (2 eq.) ⁸⁷	NMP	9% rendimiento
HATU (3 eq.), HOAt (3 eq.), DIPEA (3 eq.) ⁸⁸	DMF	10% rendimiento
HATU (1.6 eq.), HOAt (1.4 eq.), DIPEA (7 eq.)	DMF	28 % rendimiento
$(\text{F}_{13}\text{C}_6\text{-C}_2\text{H}_4\text{-N})_2\text{=C}$ (2.7 eq.), DIPEA (6 eq.)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{C}_6\text{F}_{14}$	Se recuperó el producto de partida

a) En todos los casos la concentración de **91** fue 4 mM, y las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 24h.

Inicialmente la reacción se llevó a cabo a alta dilución (4 mM) en un disolvente apolar como es el diclorometano, ya que a esa concentración el producto **91** era soluble. Sin embargo, no se observó la ciclación esperada utilizando ninguno de los reactivos más habituales. Seguidamente, el diclorometano fue sustituido por N-metil pirrolidiona (NMP) o DMF⁸⁹ y se alcanzó así un 9 % de rendimiento. Al hacer la reacción con 3

⁸⁶ A. K. Ghosh, C. Liu, *Org. Lett.*, **2001**, 3, 635-638.

⁸⁷ H. M. M. Bastiaans, J. L. Van der Baan, H. C. J. Ottenheijm, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 3880-3889.

⁸⁸ a) L. Belvisi, A. Bernardi, A. Checchia, L. Manzini, D. Potenza, C. Scolastico, M. Castorina, A. Cupelli, G. Giannini, P. Carminati, C. Pisano, *Org. Lett.*, **2001**, 3, 1001-1005. b) L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 2279-2282.

⁸⁹ Los espectros posteriores del ciclopéptido **92** nos demostraron que el compuesto se encuentra completamente autoagregado en CDCl_3 . Cuando se realizó su espectro de ^1H -RMN en este disolvente, únicamente se observaron bandas anchas sin resolución de sistemas de spin, aunque

equivalentes de HATU, HOAt y DIPEA respectivamente observamos que el pH de la reacción se iba acidificando espontáneamente conforme avanzaba la reacción. Por esa razón realizamos la reacción con más equivalentes de DIPEA manteniendo en todo momento el pH de la reacción entre 8-9, y así se logró aumentar el rendimiento hasta el 28%.

Por último, también pusimos a prueba la carbodiimida perfluorada sintetizada en el primer capítulo de la tesis, aunque no observamos reacción alguna y se recuperó el péptido **91** inalterado. La reacción se intentó a temperatura ambiente durante 48h en un sistema bifásico de diclorometano/perfluorohexano, en el que se añadieron 2.7 equivalentes de di-N,N'-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctil) carbodiimida y 6 equivalentes de DIPEA.

El crudo de reacción obtenido mediante la ciclación con HATU/HOAt resultó ser bastante sucio y hubo que purificarlo mediante cromatografía de capa fina preparativa para obtener el ciclopéptido pretegido **92**, el cual dio un espectro de masas coherente con la estructura (MALDI-TOF Mw= 853.01).

Por último la desprotección de los grupos *tert*-butilo y Pbf del compuesto **92** se llevó a cabo con ácido trifluoroacético puro, sin emplear aditivos tales con tioanisól recomendados en la bibliografía.⁹⁰ El producto final **43** se obtuvo puro en forma de sal de trifluoroacetilo tras hacerlo precipitar en éter etílico. El rendimiento obtenido fue algo mayor del 100% probablemente debido a una complejación múltiple con el ácido trifluoroacético. El espectro ¹H-RMN se adquirió en agua empleando una secuencia de saturación de disolvente (WATERGATE) y dio un espectro consistente con la estructura esperada (ver Figura 2.66, pag. 217)

el producto ciclado fuese completamente soluble. Al registrar el mismo espectro en un disolvente polar, como MeOD o DMSO-d₆ la multiplicidad de las señales se apreciaba por completo. Esto nos llevó a pensar “a posteriori” que el aminoácido libre, aunque soluble en CH₂Cl₂, probablemente se encontraría agregado facilitando así los acoplamientos peptídicos intermoleculares en vez de intramoleculares, y que por lo tanto en este caso los disolventes apolares no eran indicados para este tipo reacción.

⁹⁰ M. Koppitz, M. Huenges, R. Gratias, H. Kessler, *Helv. Chim. Act.*, **1997**, 80, 1280-1300.

2.2.2 ANÁLISIS CONFORMACIONAL EN DISOLUCIÓN MEDIANTE RMN

Una vez obtenido el ciclopéptido RGD β -lactámico **43** pasamos a realizar su estudio conformacional en disolución mediante técnicas de RMN junto con la del ciclopéptido protegido **92** y las del pseudopéptido lineal **81**. El objetivo de estos estudios fue doble: por una parte establecer el sistema de puentes de hidrógeno que presenta **43** en medio acuoso, biológicamente significativo, y por otra establecer la posible existencia de giros- β en **81** disuelto en un disolvente altamente coordinante como DMSO que presenta razonablemente la DMF utilizada durante la reacción de ciclación **81** \rightarrow **92**.

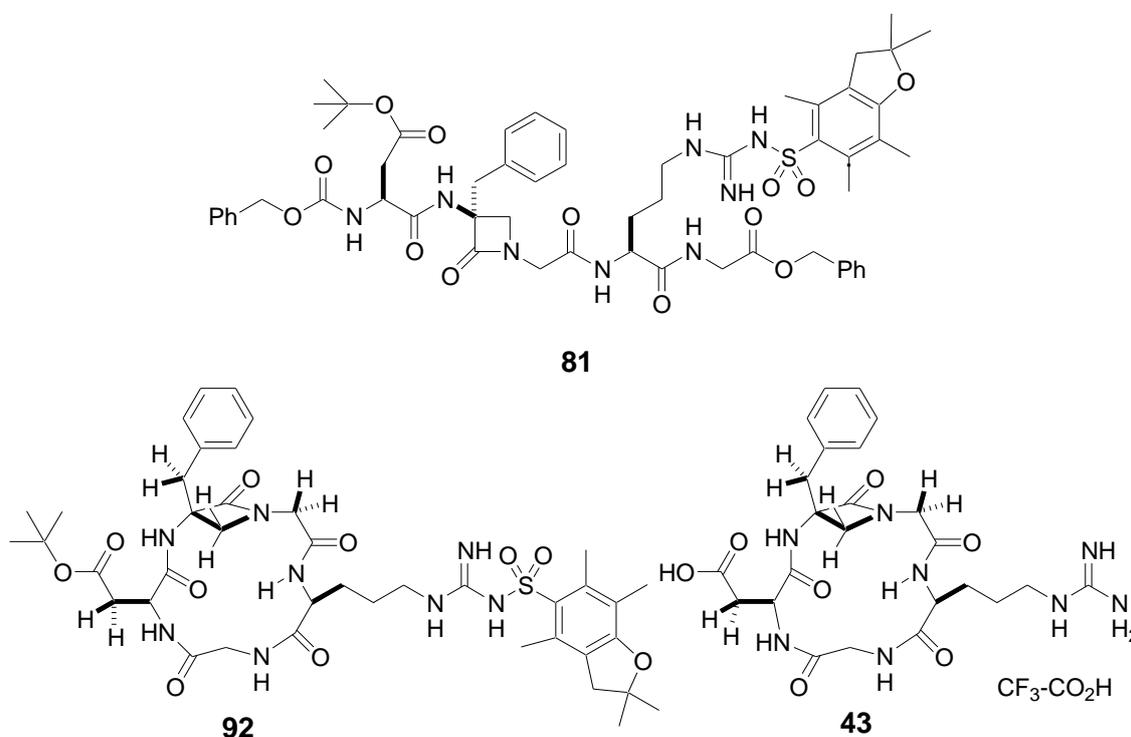


Figura 2.55: Estructura de los compuestos estudiados (análisis conformacional) mediante RMN.

En los tres casos se utilizó la misma nomenclatura posicional para la asignación de los protones. Utilizando la nomenclatura general de aminoácidos (α , β , γ , etc...) cada resto según el aminoácido, excepto el fragmento de β -lactama que se indicó como “ β -Lact”. Los restos de glicina unidos al anillo de β -lactama y el perteneciente a la triada RGD se nombraron como “Gly1” y “Gly2” respectivamente (Figura 2.56).

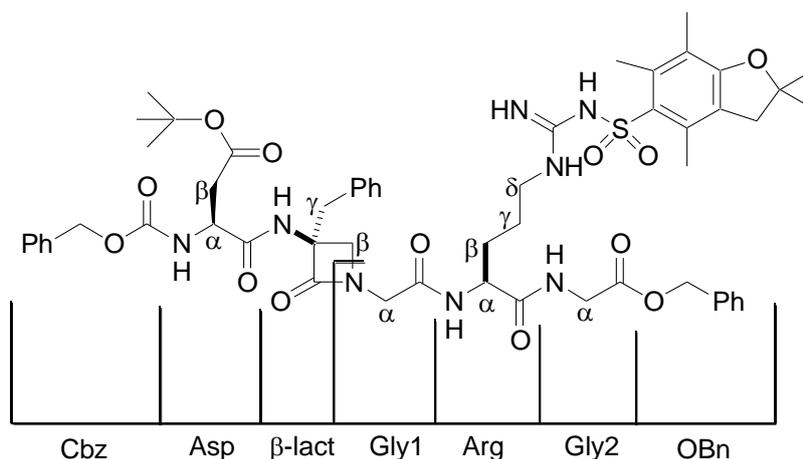


Figura 2.56: Nomenclatura posicional utilizada en la asignación de las señales de los pseudopéptidos RGD **81**, **92** y **43**.

En los tres casos los estudios se realizaron con diluciones de concentración 10 mM a 300 °K en DMSO- d_6 para los compuestos **81** y **92** y en H₂O/D₂O (90:10) en el caso del compuesto **43**. El disolvente más comúnmente empleado en la bibliografía para los estudios conformacionales de ciclopéptidos RGD es el DMSO, ya que en él se aprecian claramente todas las señales correspondientes a los NH, y los valores de los coeficientes térmicos para NH formando puentes de hidrógeno son bien conocidos. Sin embargo, en el caso del compuesto **43** nos pareció más interesante realizar los estudios en agua para disponer de información más similar a posibles conformaciones bioactivas. El análisis conformacional se realizó utilizando el método de Dinámica Molecular Restringida (también denominada *simulated annealing*).⁹¹ Las restricciones empleadas fueron las distancias interprotónicas, obtenidas mediante integración de los espectros de NOESY y ROESY. En algún caso también se utilizaron restricciones de ángulos diedros calculados mediante la ecuación de Karplus.⁹²

$$J^3\text{HN}\alpha = 6.4 * \cos^2(\phi - 60) - 1.4 * \cos(\phi - 60) + 1.9 \quad J^3\text{H}\alpha\text{H}\beta = 9.5 * \cos^2(\phi) - 1 * \cos(\phi) + 1.4.$$

2.2.2.1 Estudio conformacional del compuesto **81**

⁹¹ Daura, X.; Gademmann, K.; Schäfer, H.; Jaun, B.; Seebach, D.; van Gusteren, W.F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2393-2404.

⁹² Günter, P.; W. Braun, W.; Billeter, M.; Wüthrich, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3997-4004.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (ref. 69b, pag. 152) demostraron que la α -bencil- β -lactama **XIII** es capaz de inducir un giro β estable en DMSO conteniendo un puente de hidrógeno entre NH(Aib) y el C=O(Boc). Sin embargo, cuando los grupos unidos a la β -lactama son aminoácidos flexibles tales como la glicina en el compuesto **XV** de la Figura 2.57, el giro β se debilita formando un equilibrio con el péptido extendido y el giro- β abierto.

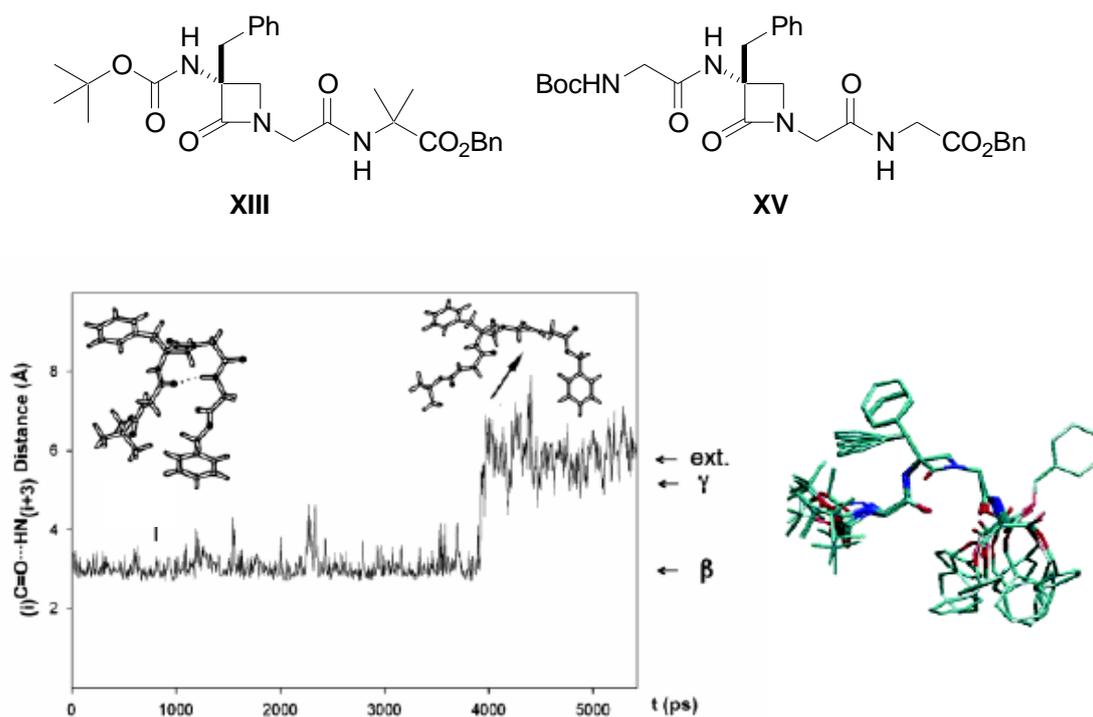


Figura 2.57: Análisis conformacional del compuesto **XV** en DMSO. Izquierda: Dinámica Molecular a 300°K en DMSO; Derecha: Superposición de 10 estructuras de mínima energía obtenidas por Dinámica Molecular restringida mediante distancias interprotónicas obtenidas por RMN (NOESY).

En el caso del pseudopéptido RGD **81**, nosotros pensamos que el comportamiento conformacional más probable pudiera ser similar al del compuesto **XV**, mostrando un equilibrio entre la forma extendida y el giro- β abierto.

El estudio conformacional se comenzó realizando la asignación de todas las señales a partir de los espectros ^1H , COSY, NOESY y ROESY aplicando el método de asignaciones sucesivas.⁹³ En la Tabla 2.3 se recogen los desplazamientos químicos, las

⁹³ Günter, P. *Quart. Rev. Biophys.* **1998**, 31, 142-237.

constantes de acoplamiento NH-H α y los coeficientes térmicos de los protones más significativos.

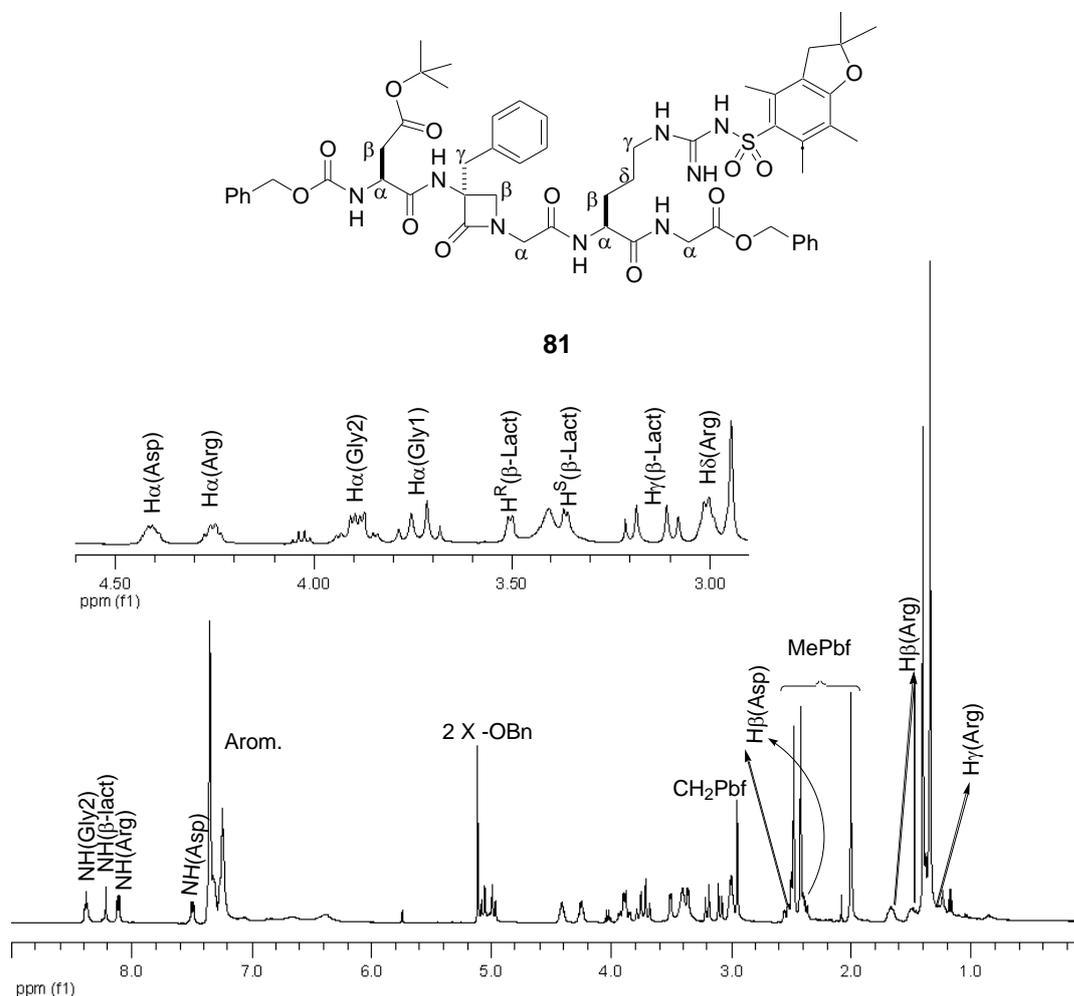


Figura 2. 58: Asignación de las señales de $^1\text{H-RMN}$ del pseudopéptido lineal Cbz-Asp(O^tBu)- β -Lact-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn **81** en DMSO-d_6 registrado a 300°K.

Tabla 2.3: Desplazamientos químicos, constantes de acoplamiento NH-H α y coeficientes térmicos de los protones más significativos del pseudopéptido RGD **81** en DMSO

	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ	$^3J_{NH\alpha}$ [Hz]	$\Delta\delta/\Delta T / H^N$ [ppb/K]
Asp	4.40	2.53/2.39				7.48	8.02	-6.19
β -lact		3.50/3.35		3.18/3.08		8.21		-7.39
Gly1	3.87							
Arg	4.25	1.48	1.64	2.99	6.38	8.10	8.19	-5.20
Gly2	3.92/3.85					8.38	5.7	-6.72

El análisis del espectro NOESY (ver ANEXO 6) permitió diferenciar los protones proR y proS de la posición β - del anillo β -lactámico. En efecto, sólo el protón proS dio señales de cruce con los CH₂ bencílicos H γ (β Lactam) y, por otra parte, el NH (β Lactam) dio señales de NOE mucho más intensas con el protón β -lactámico proR (Figura 2.59). Para determinar cualitativamente si el fragmento Gly1-Arg(Pbf)-Gly2-OBn se disponía en la cara superior o inferior del anillo β -lactámico, se estudiaron las señales NOE del protón amídico NH(Arg), puesto que no se detectaron señales de cruce a larga distancia entre los metilenos de los grupos Cbz y OBn.

En nuestro caso el NH(Arg) presentaba dos señales NOE con los protones β -lactámicos proR y proS, al igual que el protón amídico NH(β -Lactam). Las interacciones marcadas con un círculo en el espectro que se muestra en la Figura 2.59, son las más intensas e indican una mayor proximidad de los protones NH(Arg) y NH(β lact) con el protón proR. Por su parte, la señal de cruce marcada con el rectángulo corresponde al protón pro S, en la parte superior del anillo

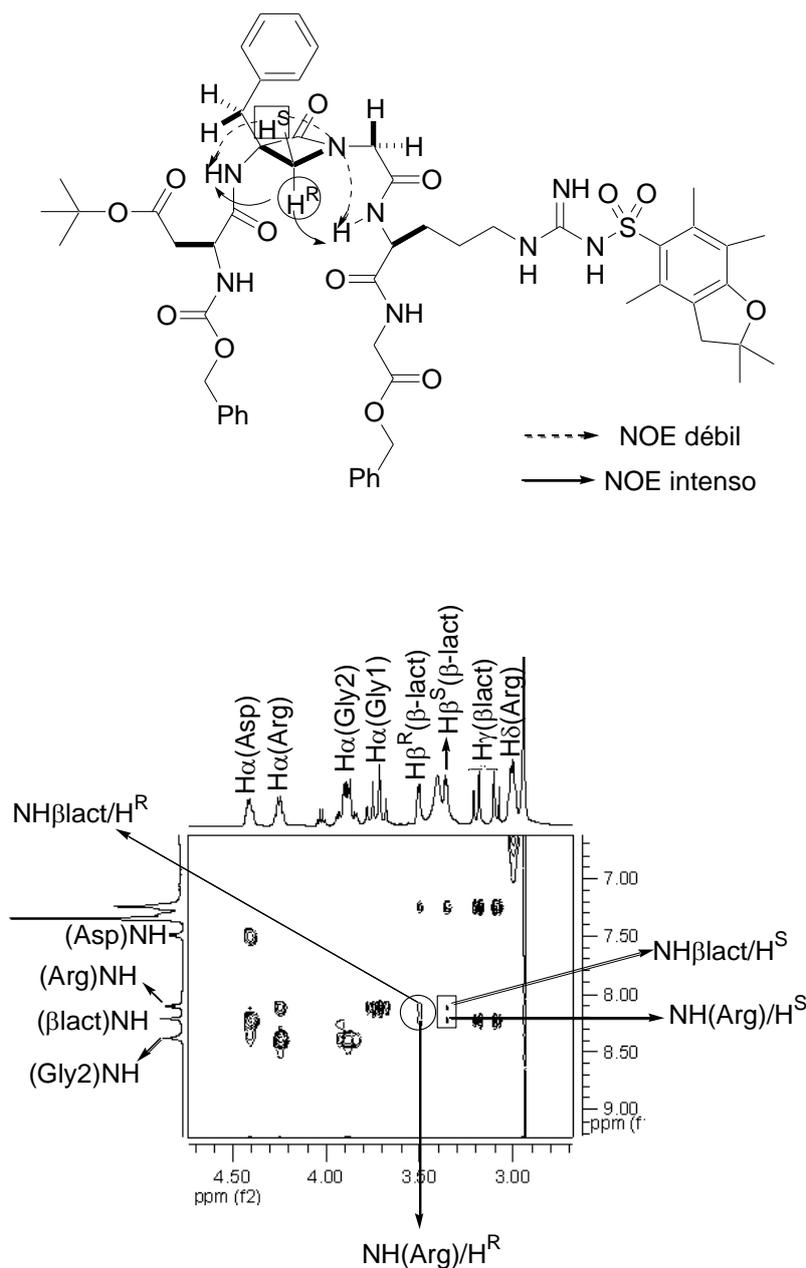


Figura 2.59: Ampliación del espectro NOESY del compuesto **81** a tiempo de mezcla 400ms.

A la vista de las interacciones relativas observadas, parecía claro que la rama Gly1-Arg(Pbf)-Gly2-OBn se halla preferentemente debajo del anillo β -lactámico en el compuesto **81**, aunque el hecho de que aparezcan las dos señales en el espectro puede indicar que el giro- β sea algo débil y que, probablemente, la conformación de giro β esté en equilibrio con la extendida.

Una vez asignadas todas las señales en el espectro de ^1H -RMN, se realizó una deriva térmica para comprobar si los NH amídicos formaban algún tipo de puente de

hidrógeno intramolecular. Las derivas se llevaron a cabo también en DMSO₆ entre 300-325° K con intervalos de 5°K.

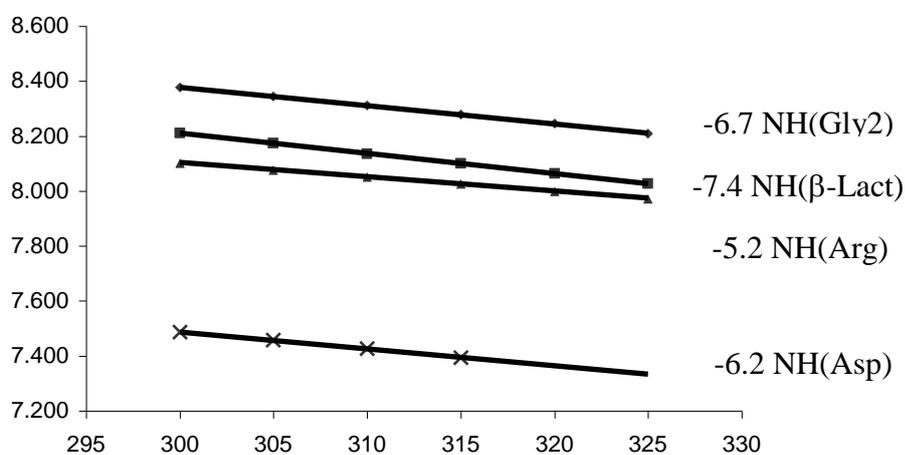
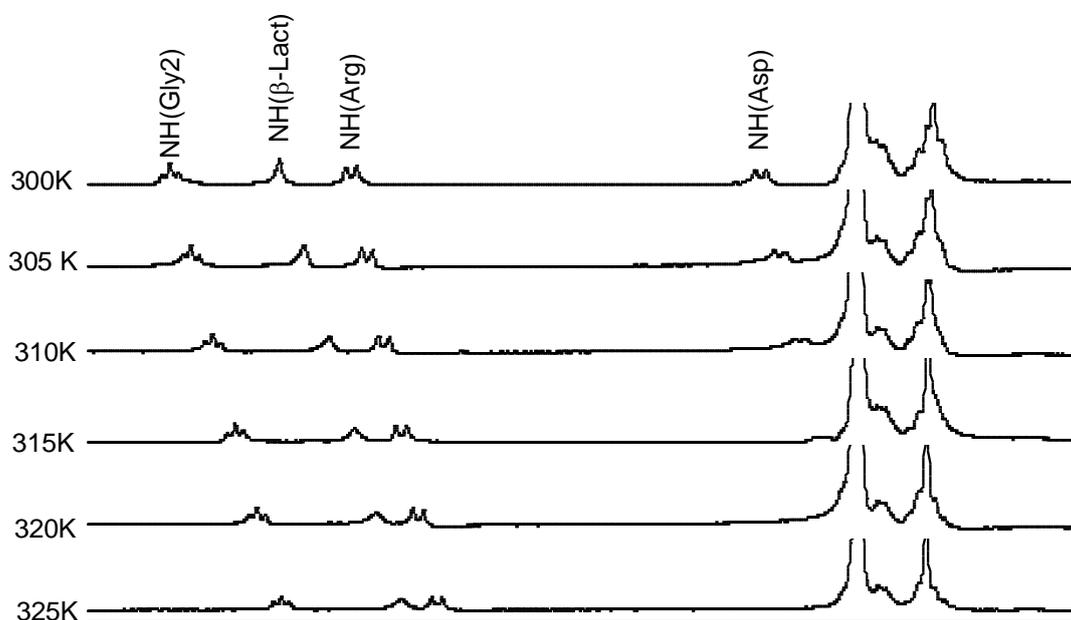


Figura 2.60: Derivas y coeficientes térmicos (ppb/K) de las señales correspondientes a los NH amídicos del pseudopéptido lineal Cbz-Asp(O^tBu)-β-Lactam-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn **81** en DMSO-d₆.

Para todos los NH amídicos los valores de los coeficientes térmicos ($\Delta\delta/\Delta T$) resultaron ser superiores a -3ppb/K, que es considerado como límite⁹⁴ para la formación

⁹⁴ H. Kessler, *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1982**, 21, 512-523.

de puentes de hidrógeno intramoleculares estables en DMSO_{d6}. Por lo tanto, aunque el pseudopéptido estuviese β-girado en torno al segmento -(β-lactam)-(Gly1)-, no parecía existir un puente de hidrógeno entre el NH(Arg) y el CO(Asp).

A pesar de que el análisis conformacional cualitativo ofrecía una idea aproximada de la estructura del pseudopéptido **81** en disolución, pasamos seguidamente a realizar un análisis de Dinámica Molecular restringida empleando el método del análisis de grupos “cluster analysis” propuesto Seebach y Gustaren.⁹¹

Para ello, pasamos a definir las restricciones que constaron de los ángulos diedros calculados mediante la ecuación de Karplus y las distancias interprotónicas determinadas mediante integración de las señales de NOE obtenidas del espectro de ROESY registrado a 400 ms de tiempo de mezcla (ANEXO 6, Figura 2. 84).

A continuación se muestran dos tablas que recogen los valores de las constantes ³J_{HN-Hα} y los ángulos diedros por un lado, y los rangos de longitudes interprotónicas por otro.

Residuo	³ J _{HNHα} (Hz)	Ángulo diedro	
Asp	9.49	-115	-145
Arg	7.91	-135	-165
Gly2	6.09	-150	-175

Tabla 2.4: Distancias interprotónicas (pm) del pseudopéptido **81** a partir de datos ROESY (tiempo de mezcla 400ms)

Protones		D _{mayor}	D _{menor}
Arg H ^N	Arg H ^α	348	288
Arg H ^N	Arg H ^β	369	269
Arg H ^N	Gly1 H ^α	305	245
Arg H ^N	Gly1 H ^α	313	253
Gly2 H ^N	Gly2 H ^α	287	237
Gly2 H ^N	Arg H ^α	285	235
Asp H ^N	Asp H ^α	355	295
Asp H ^N	Asp H ^β	331	271
Asp H ^N	Asp H ^β	438	358
β-Lact H ^N	Asp H ^α	305	245

Los cálculos mediante Dinámica Molecular se llevaron a cabo modelizando el enfriamiento de 100 estructuras del pseudopéptido β -lactámico **81** desde 700K hasta 300K. El margen aplicado a cada distancia fue de $\pm 10\%$ y las simulaciones se efectuaron en ausencia de disolvente empleando el programa X-PLOR-NIH 2.9.2⁹⁵

De las 100 estructuras calculadas, 77 no violaban ninguna restricción de distancia experimental. Se obtuvieron 4 tipos de estructuras que fueron asignadas a dos grupos o *clusters* en función del ángulo pseudodiedro,⁹⁶ aunque no presentaban una uniformidad completa en los en ángulos diedros (ϕ y ψ). En la Figura 2.61 se muestran cuatro estructuras representativas correspondientes a una molécula de cada uno de los dos *cluster* o grupos.

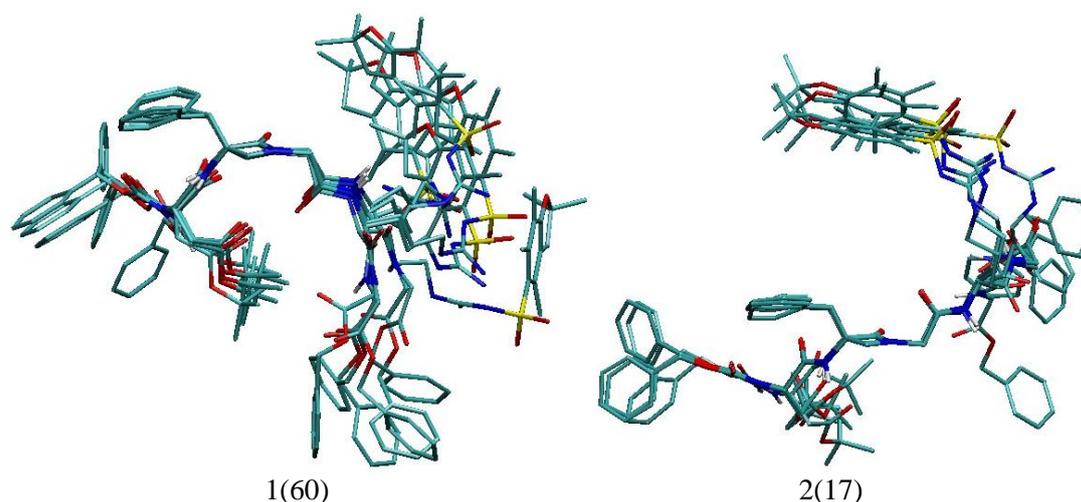


Figura 2.61: Representación de los grupos conformacionales “clusters” del pseudopéptido β -lactámico **81**. La primera figura corresponde a la superposición de 6 estructuras de mínima energía correspondientes al cluster 1 de conformación β -girada que no presenta puente de hidrógeno entre NH(arg) y CO(Asp). La segunda figura corresponde a la superposición de 5 estructuras de mínima energía de conformación

⁹⁵ Schwieters, C.D.; Kuszewski, J.; Tjandra, N.; Clore, G. M. *J. Magn. Reson.* **2003**, *160*, 66-74

⁹⁶ **Ángulo pseudodiedro δ** es el que forman los cuatro C_{α} consecutivos de los aminoácidos (i) e (i+3) en giro β . Este parámetro mide la orientación con la que entra la cadena al giro y sale de él. Los valores del ángulo pseudodiedro para un giro- β de tipo I es de 49° (el del tipo I' es de -49°) y el valor de δ para un giro- β de tipo II y II' es prácticamente 0° . a) G. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, *35*, 2767. b) A. C. Bach, J. R. Espina, S. A. Jackson, P. F. W. Stouten, J. L. Duke, A. M. Shaker, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 293-294.

abierta (cluster 2). Los números entre paréntesis indican la población relativa de cada grupo sobre las 77 estructuras que no violan ninguna restricción.

Como conclusión del análisis conformacional de grupos se puede afirmar que, según se aprecia en las estructuras del cluster 1, la cadena Gly1-Arg(Pbf)-Gly2-OBn unida al nitrógeno β -lactámico se sitúa en todos los casos adoptando una disposición β -girada con respecto del plano de la β -lactama, aunque el enlace peptídico Gly1-Arg se halla orientado de forma contraria a la de un giro- β canónico. Ello hace que la distancia (Asp) C=O \cdots H-N(Arg) oscile entre 6.4 y 7.1 Å, cuando en un giro- β normal con puente de hidrógeno estable dicha distancia debe variar entre 1.8-2.5 Å.

Tabla 2. 5: Parámetros estructurales promedio del compuesto **81** calculados a partir de las 77 estructuras de Dinámica Molecular restringida que cumplen todas las restricciones de distancias y ángulos

Cluster (n) ^a		Tipo	$\langle_{(Asp)}C=O\cdots HN_{(Arg)}\rangle$ (Å) ^b	$\langle\phi, \psi_{(\beta-lact)}\rangle$ (grados)	$\langle\phi, \psi_{(Gly2)}\rangle$ (grados)	$\langle C\alpha(Asp)\cdots C\alpha(Arg)\rangle$ (Å)	δ (grados) ^c
1	60	Giro- β ^d	7.4 (6.8)	-46 ; -115	- 84 ; - 172	8.3	15
2	17	extendido	8.1 (7.6)	-72; -115	68 ; 161	10.0	152

^a Número de moléculas que no violan las restricciones interprotónicas de NOE y pertenecen a dicho cluster de las 100 estructuras generadas inicialmente. ^b Distancia interprotónica O \cdots N; los valores entre paréntesis corresponden a las distancias O \cdots H. ^c Ángulo pseudodiedro formado por los cuatro C α del péptido modelo. ^d Giro- β distorsionado.

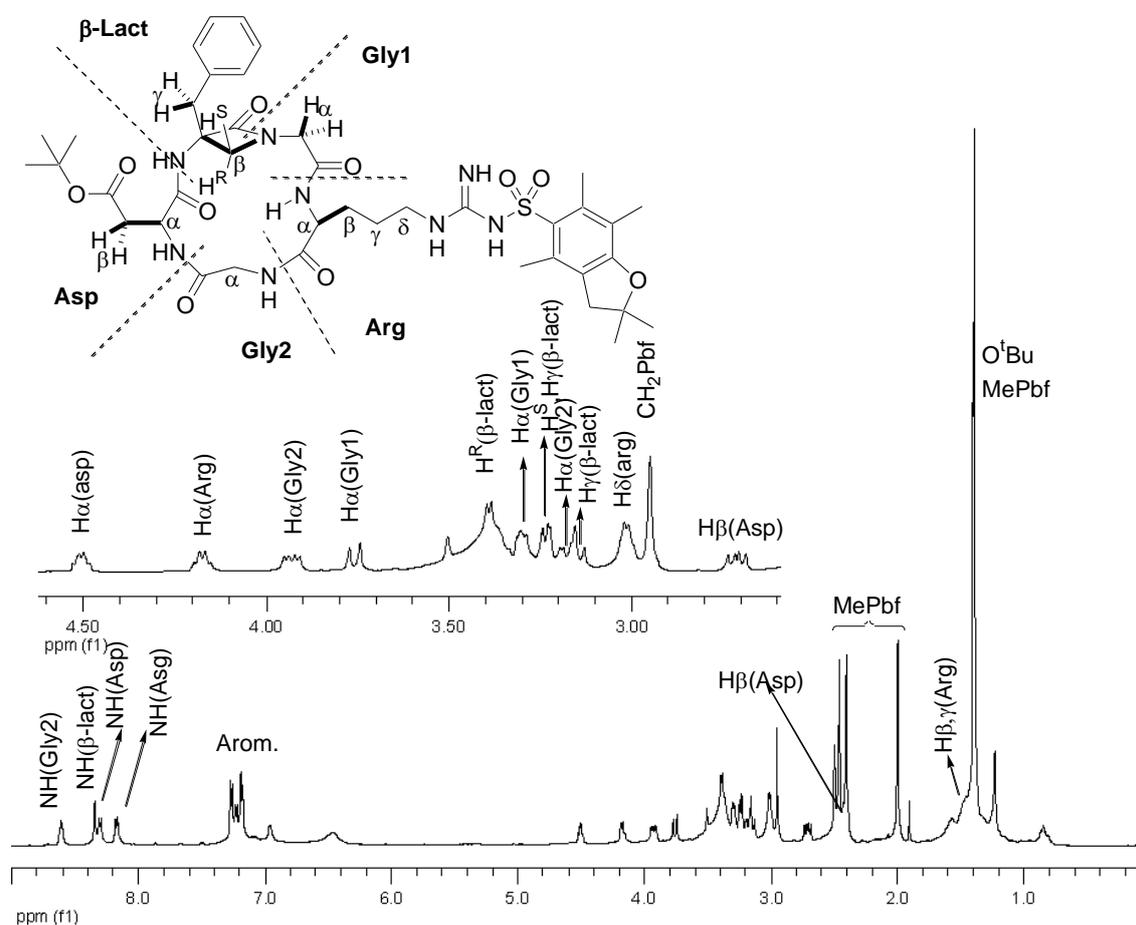
En el segundo cluster la cadena peptídica adquiere la forma extendida y no hay giro de ningún tipo. Lógicamente, presenta un ángulo pseudodiedro (δ) próximo a 180° y una distancia promedio entre los C α (Asp) y C α (Arg) próximo a los 10 Å.

Estos resultados son totalmente coherentes con el análisis por RMN cualitativo previo y confirman sólo parcialmente la segunda de las hipótesis de trabajo que nos planteábamos inicialmente: es decir, la macrociclación de pseudopéptidos β -lactámicos asistida mediante una estructura preorganizada como giro β . Al parecer, en el caso del compuesto **81**, existe dicha estructura, aunque no se halla estabilizada mediante puentes

de hidrógeno interno, lo cual es también consistente con el rendimiento del 28% obtenido durante la ciclación.

2.2.2.2 Estudio conformacional del ciclopéptido β -lactámico **92**

El análisis conformacional del compuesto **92** se llevó a cabo siguiendo el mismo método que su homólogo abierto **81**. En este caso también se asignaron en primer lugar todas las señales del espectro de ^1H -RMN registrado en DMSO-d_6 (ver ANEXO 7).



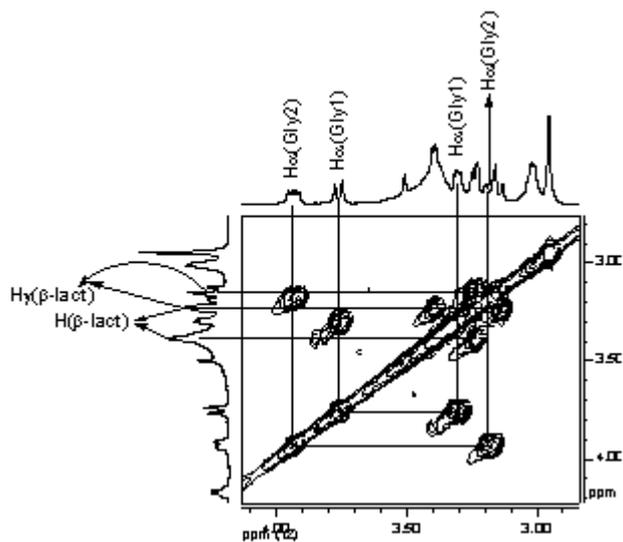


Figura 2.62: Asignación de las señales de ^1H -RMN del compuesto **92** y ampliación del espectro COSY del mismo compuesto.

El espectro ROESY sirvió primeramente para comprobar que, efectivamente, la molécula correspondía al ciclo, ya que se observaban las señales de cruce entre en NH(Asp) y los H α (Gly2) (marcados con un círculo en la Figura 2. 63).

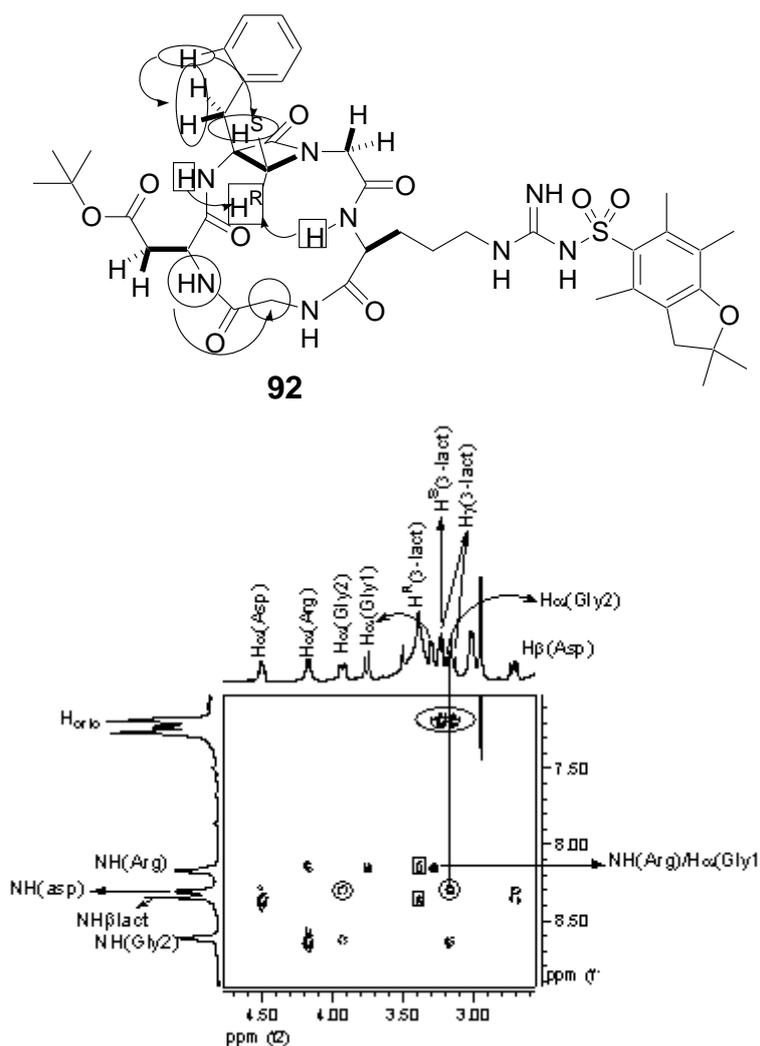


Figura 2. 63: Ampliación del espectro de NOESY del compuesto **92** en DMSO con un tiempo de mezcla de 400 ms.

En la Figura 2. 63 se presentan enmarcadas con un cuadro las señales correspondientes a los picos de cruce entre el $NH(Asp)/H^R(\beta-lact)$ y $NH(Arg)/H^R(\beta-Lact)$. Por ultimo, se han enmarcado en una elipse los picos de cruce entre las señales de los protones orto del anillo aromático tanto con los protones bencílicos $H^{\gamma}(\beta-Lact)$ como con el protón $H^S(\beta-Lact)$. Finalmente también se constató la ausencia de señal de cruce entre los protones orto del anillo aromático y el protón $H^R(\beta-Lact)$.

Seguidamente se realizó la deriva térmica y se calcularon los coeficientes térmicos y los ángulos diedros $NH-H\alpha$ de la misma manera que se hizo anteriormente con el pseudopéptido abierto **81**.

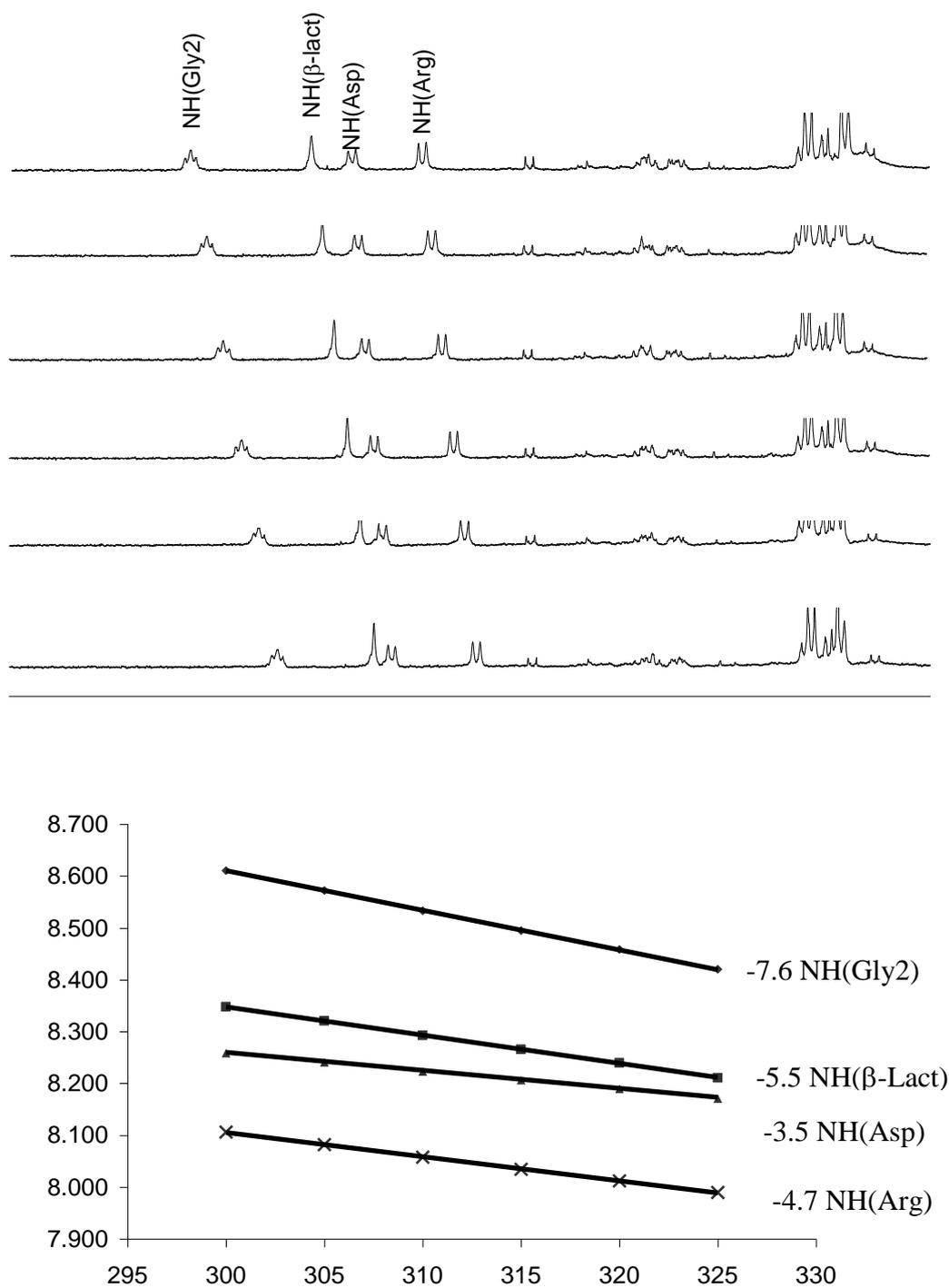


Figura 2.64: Derivas y coeficientes térmicos (ppb/K) de las señales correspondientes a los NH amídicos en DMSO-d₆ del pseudopéptidomimético cíclico ciclo[Arg(Pbf)-Gly-(β-Lact)-Gly-Asp(O^tBu)]

En la Tabla 2.6 aparecen los desplazamientos químicos, los coeficientes térmicos y los ángulos diedros correspondientes a los protones más significativos del ciclopéptido **92**.

Tabla 2.6: Desplazamientos químicos, constantes de acoplamiento NH-H α y coeficientes térmicos de los protones más significativos del ciclopéptido **92** en DMSO d_6

	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	H $^{\delta}$	H $^{\epsilon}$	H N	$^3J_{NH\alpha}$ [Hz]	$\Delta\delta/\Delta T/H^N$ [ppb/K]
Asp	4.50	2.72 / 2.42				8.30	6.28	-3.46
β -Lact		3.40		3.23 / 3.15 ⁺	7.28-7.11*	8.34		-5.47
Gly1	3.76 / 3.30						6.35	
Arg	4.19	1.98	1.64	3.02	6.95 / 6.46	8.16	3.19	-4.68
Gly2	3.95 / 3.18					8.60		-7.62

* Desplazamiento químico del anillo aromático.

Los valores obtenidos en las derivas térmicas indican que no existen puentes de hidrógeno estables salvo para el protón amídico NH(Asp), que forma uno no excesivamente fuerte en DMSO d_6 .

Para poder detectar al aceptor de dicho puente se calcularon las distancias interprotónicas mediante la integración de las señales del espectro ROESY con un tiempo de mezcla de 400 ms (Tabla 2.7) y se sometieron a una Dinámica Molecular restringida utilizando el programa XPLOR-NIH 2.9.2. Todos los parámetros fueron ajustados del mismo modo que en el caso del pseudopéptido lineal **81**.

Tabla 2.7: Distancias interprotónicas (pm) del ciclopéptido **92** a partir de datos ROESY (400ms) en DMSO d_6

Protones		D menor	D mayor
Arg H N	Arg H $^{\alpha}$	315	255
Arg H N	Arg H $^{\gamma}$	289	229
Arg H N	Gly H $^{\alpha}$	290	260
Gly2 H N	Gly2 H $^{\alpha_{proR}}$	313	253
Gly2 H N	Gly2 H $^{\alpha_{proS}}$	286	226
Gly2 H N	Arg H $^{\alpha}$	240	180
Asp H N	Asp H $^{\alpha}$	300	240

Asp H ^N	Asp H ^β	304	234
Asp H ^N	Gly H ^α	286	226
β-Lact H ^N	β-Lact H ^{βproR}	351	271
β-Lact H ^N	Asp H ^β	250	330

De las 58 estructuras que cumplían las restricciones de distancias interprotónicas se pudieron crear dos clusters diferentes. El primero de ellos con una población de 12 estructuras, y el segundo con una población mayoritaria de 46 estructuras (Figura 2. 65).

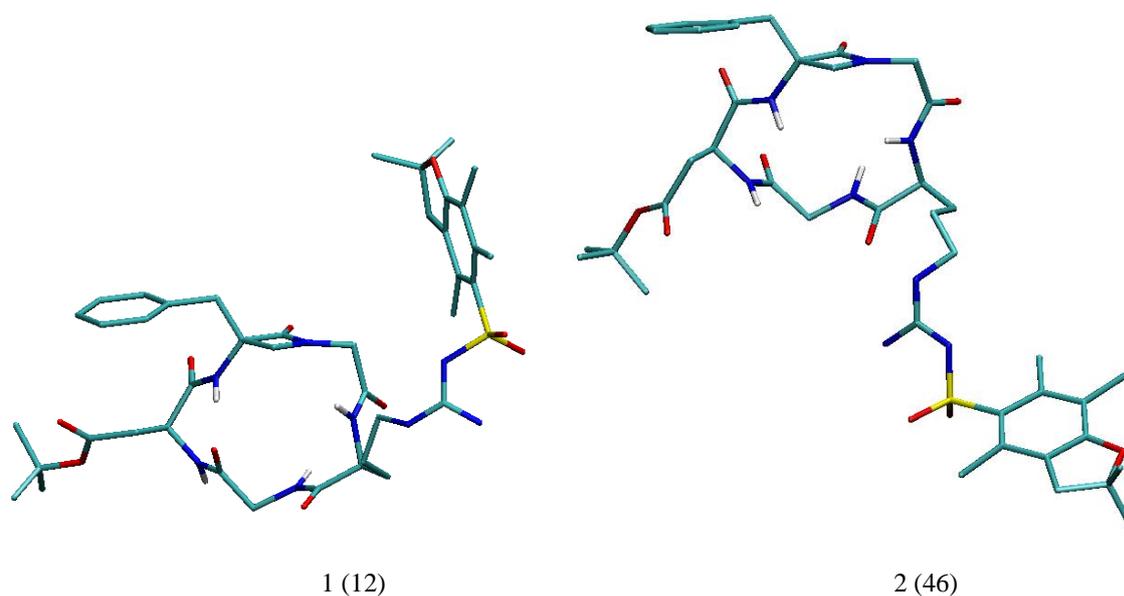


Figura 2. 65: Representación de dos configuraciones de los dos grupos conformacionales “clusters” que presenta el ciclopéptido β-lactámico **92**.

A diferencia del pseudopéptido lineal **81** en el que se seleccionó el ángulo pseudodiedro δ para diferenciar entre sí los diferentes clusters, en el caso del ciclopéptido **92** se estudiaron las distancias $C=O \cdots H-N$ de los diferentes puentes de hidrógeno posibles dentro del ciclo. Concretamente tal y como se recoge en la Tabla 2.8, seleccionamos los 3 giros $\gamma(\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3)$ y el giro β .

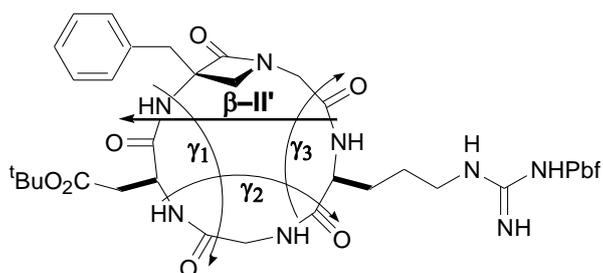


Tabla 2.8: Parámetros estructurales promedio de las distancias O...H en puentes de hidrógeno del compuesto **92** calculados a partir de las 65 estructuras de Dinámica Molecular restringida que cumplen todas las restricciones de distancias y ángulos

Cluster (n) ^a	<(Gly2)C=O... HN(β-Lac)> (Å) γ 1	<(Arg)C=O... HN(Asp)> (Å) γ 2	<(Gly1)C=O... HN(Gly2)> (Å) γ 3	<(Asp)C=O...HN(Arg)> (Å) β 2
1 (12)	1.6	4.8	3.0	6.4
2 (46)	3.8	3.7	3.5	5.6

^aNúmero de estructuras que cumplen las restricciones de NOESY de las 100 estructuras generadas.

Como conclusión del estudio de Dinámica Molecular restringida del ciclopeptido **92** en DMSO₆, puede afirmarse que no se forma ninguno de los puentes de hidrógeno posibles en ambos clusters, excepto un giro γ inverso entre el NH(Asp) y el CO(Gly2) en el cluster 1. Dicho giro se sitúa en la cara posterior del ciclopeptido distorsionando ostensiblemente al mismo y concuerda plenamente con los valores medidos para los coeficientes térmicos de los protones amídicos. Por último, llama poderosamente la atención la ausencia de giros- β entre NH(Arg) y CO(Asp).

De la comparación de las estructuras secundarias del pseudopéptido lineal **81** y del ciclopeptido **92** se concluyó que las α -amino- β -lactamas poseen un comportamiento restrictor claramente diferente cuando se encuentran en péptidos lineales, en los que son betágenos, o en ciclopeptidos, en los que se comportan como gammágenos.

2.2.2.3 Estudio conformacional del compuesto **43**

Como se ha indicado anteriormente, a diferencia de los precursores **81** y **92**, en el caso del ciclopéptido RGD β -lactámico **43** nos interesamos en la conformación que esta molécula pudiese adoptar en un medio biológicamente significativo. Por ello, su estudio conformacional mediante RMN se llevó a cabo en D₂O/H₂O (10:90) a temperatura ambiente (300°K). Este hecho implicó que todos pulsos empleados tuvieron que ser combinados con secuencias de eliminación de señal de agua (WATERGATE).

Como en los casos anteriores, primero se realizó la asignación de las señales en el espectro ¹H-RMN, mediante experimento bidimensionales COSY y TOCSY (Anexo 8).

En el espectro de ¹H-RMN se apreció un conjunto de señales de baja intensidad que no pudo ser asignado de forma inequívoca a otra conformación.

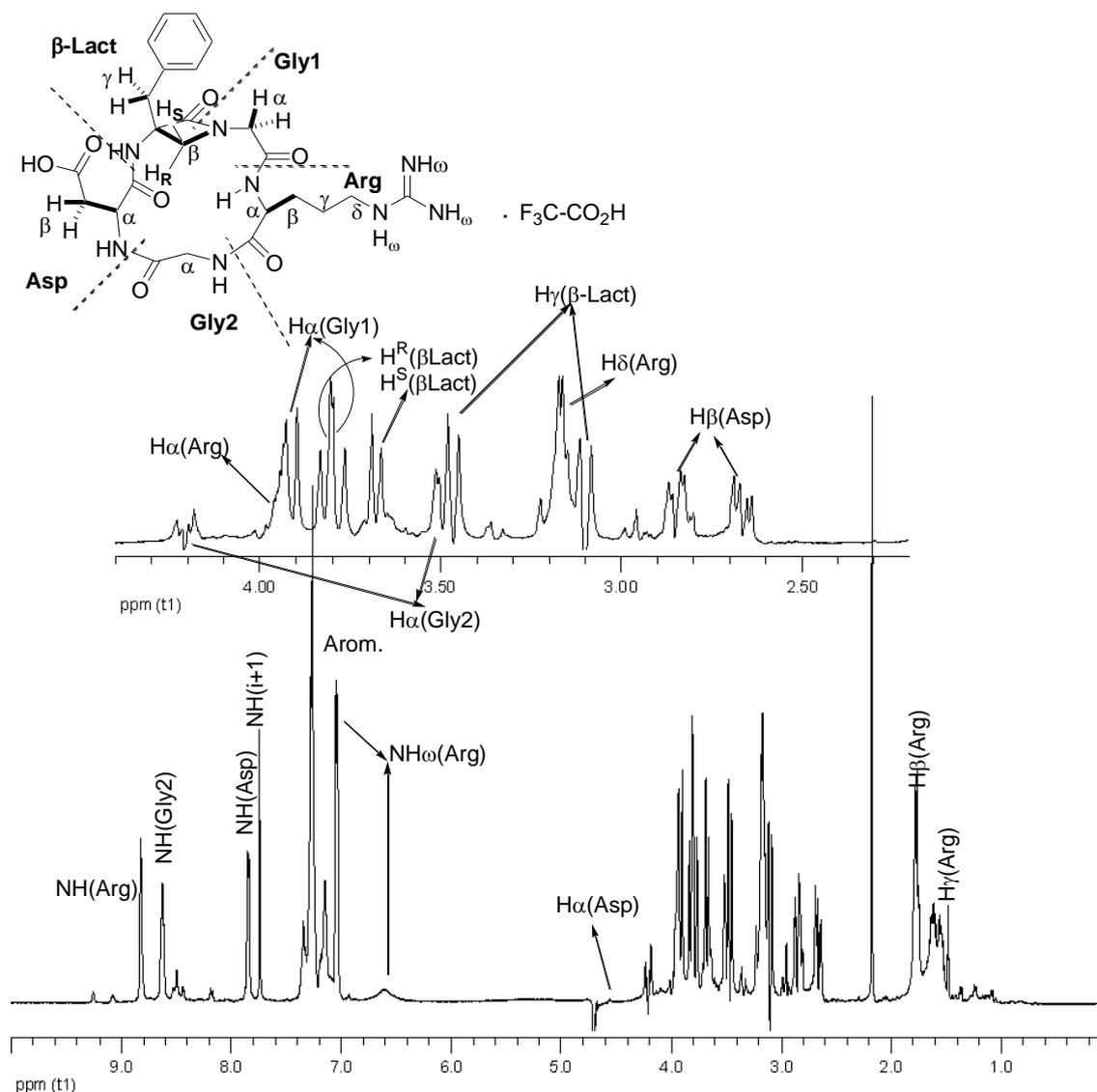


Figura 2.66: Asignación de las señales de $^1\text{H-RMN}$ en $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (10:90) del compuesto 43.

Una vez asignados los protones, se realizó la deriva térmica y se calcularon los coeficientes de temperatura (ver Figura 2.67 y Tabla 2.9).

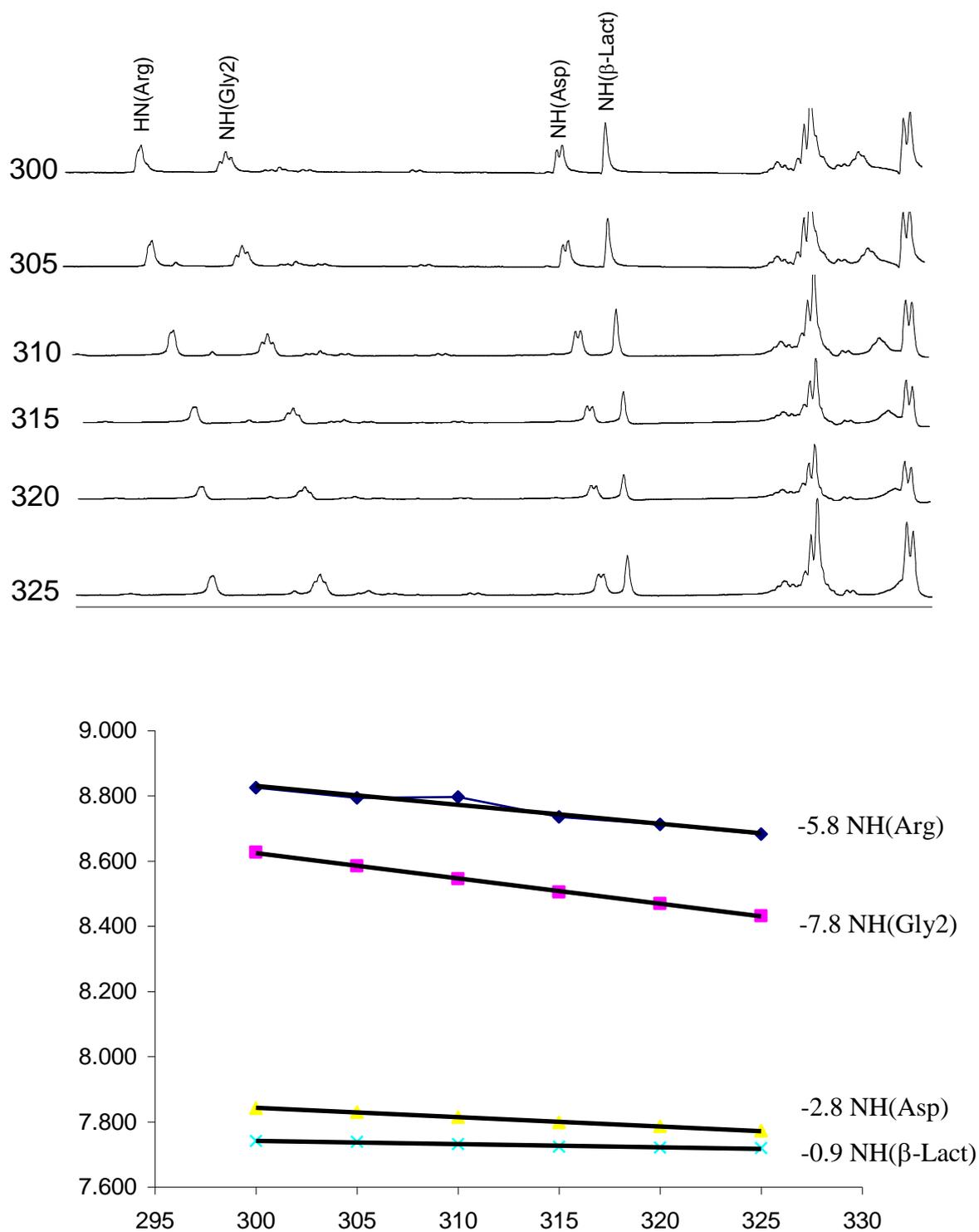


Figura 2.67: Deriva térmica y coeficientes de temperatura de los protones NH amídicos del compuesto **43** en D_2O/H_2O (10:90).

En este caso, al contrario que los dos anteriores, se apreció la formación clara de dos puentes de hidrógeno intramoleculares en los que participan como dadores los

protones amídicos NH(β -Lact) y NH(Asp) que presentan coeficientes de temperatura inferiores a 5 ppb/K, considerado como umbral en agua.⁹⁷

Tabla 2.9: Desplazamientos químicos, constantes de acoplamiento NH-H α y coeficientes térmicos de los protones significativos del ciclopéptido RGD **43** en H₂O/D₂O.

Rest o	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	H $^{\gamma}$	H $^{\delta}$	H $^{\epsilon}$	H N	$^3J_{NH\alpha}$ [Hz]	$\Delta\delta/\Delta T / H^N$ [ppb/K]
Asp	4.55	2.85/2.67				7.8 5	5.4	-2.82
β -Lact		3.83 /3.63	3.47/3.10 ⁺		7.34- 7.03*	7.7 3		-0.97
Gly1	3.92/3.77							
Arg	3.94	1.62/1.54	1.72	3.1 2	7.15	8.8 3		-5.79
Gly	4.23/3.50					8.6 2		-7.78

Para establecer los carbonilos aceptores de puentes de hidrógeno, se procedió del mismo modo que en los casos anteriores, determinando las distancias interprotónicas mediante la integración de las señales de NOE del espectro de ROESY realizado con un tiempo de mezcla de 200 ms (Tabla 2.10) y modelizando después mediante dinámica molecular restringida (simulated annealing) los grupos conformacionales o clusters.

Tabla 2.10: Distancias interprotónicas (pm) del ciclopéptido **43** a partir de datos ROESY en H₂O/D₂O

Protones		D ^{mayor}	D ^{menor}
Arg H ^N	β -Lact H ^{pro R}	260	320
Arg H ^N	Gly1 H $^{\alpha}$	276	306
Arg H ^N	Arg H $^{\beta}$	258	318

⁹⁷ a) T. Cierpicki, J. Otlewski, *J. Biomolec. NMR*, **2001**, 21, 249-261.

Gly2 H ^N	Arg H ^α	223	283
Gly2 H ^N	Arg H ^β	323	383
Asp H ^N	Gly2 H ^α	203	266
Arg H ^N	Arg H ^β	258	318
β-Lact H ^{proS}	β-Lact H ^{Ben}	279	349

Como resultado del estudio de Dinámica Molecular/RMN se generaron 100 estructuras del ciclopéptido RGD **43** que fueron calentadas con movimiento libre a 500K durante 20ps y sometidas a saltos de enfriamiento de 50K hasta 300K aplicando las restricciones de distancia de la Tabla 2.10. De todas las estructuras resultantes se seleccionaron las 87 que no violaban ninguna restricción y fueron agrupadas aplicando los valores de las distancias CO...HN de los cuatro giros posibles (γ_1 , γ_2 , γ_3 y β), resultando dos clusters cuyos parámetros promedio se recogen en la Tabla 2.11

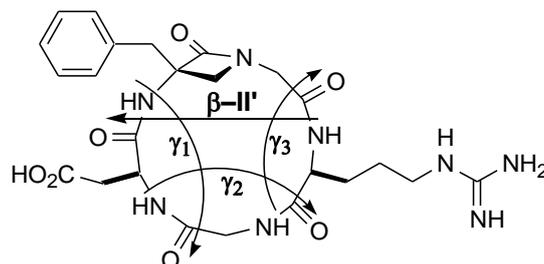


Tabla 2.11: Distancias promedio (O...H) de los puentes de hidrógeno del compuesto **43** calculadas a partir de 87 estructuras de Dinámica Molecular restringida mediante RMN

Cluster (n) ^a	<(Gly2)C=O... HN(β-lac)> (Å) γ_1	<(Arg)C=O... HN(Asp)> (Å) γ_2	<(Gly1)C=O... HN(Gly2)> (Å) γ_3	<(Asp)C=O... HN(Arg)> (Å) β
1 (22)	1.8	4.5	4.0	5.1
2 (65)	3.3	4.6	3.7	5.1

^a Número de estructuras que no violan ninguna restricción de distancia interprotónica (NOESY) o ángulo diedro experimental (RMN).

En la Figura 2. 68 se muestran sendas conformaciones representativas de cada uno de los clusters anteriormente mencionados. En el primero de ellos, poblado por 22

estructuras, únicamente se forma un giro γ inverso entre NH(β -Lact) y C=O(Gly2) que presenta una distancia (O...H) de puente de hidrógeno de 1.8Å. Este valor tan corto se halla en buena concordancia con el bajísimo coeficiente de temperatura (-0.9 ppb/K) observado para el protón NH(β -Lact). El segundo cluster, poblado por 65 estructuras, se diferencia del primero en la orientación opuesta del enlace peptídico (β -Lact)NH-CO(Asp) dentro del ciclo. En efecto, la disposición de NH(β -Lact) en la cara anterior del ciclo péptido rompe ahora en giro γ_1 y hace que las conformaciones del cluster 2 no presenten ningún giro γ estable. Además, al igual que se observó anteriormente para el ciclo péptido protegido **92** en DMSO (pag 216) se verificó nuevamente la inexistencia de un giro β entre NH(Arg) y CO(Asp), confirmándose la generalidad del carácter gammágeno y no betágeno del anillo β -lactámico en los ciclo péptidos RGD.

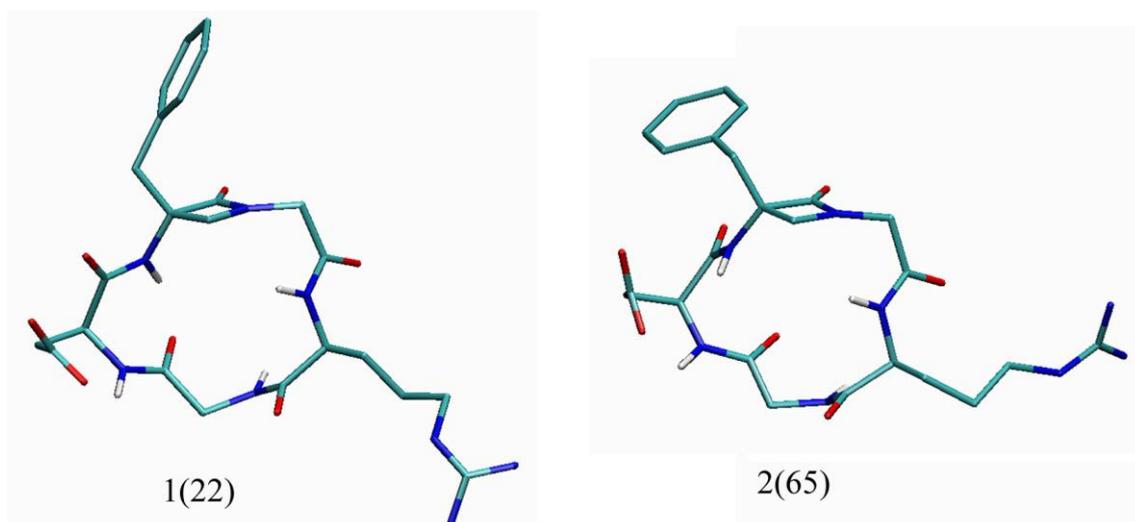


Figura 2. 68 Conformaciones representativas de dos “clusters” del ciclo péptido β -lactámico **43** en disolución acuosa determinados mediante Dinámica Molecular restringida mediante RMN.

A pesar de ofrecer una aceptable concordancia con los valores experimentales de RMN, los clusters obtenidos no explicaban suficientemente la fortaleza de un segundo puente de hidrógeno entre NH(Asp) y CO(Gly2) incluido en el giro γ_2 , al que correspondía un coeficiente de temperatura de -2.8 ppb/K. Nosotros pensamos que el hecho de que la Dinámica Molecular restringida se efectuase en ausencia de disolvente podría tener alguna influencia sobre los resultados obtenidos, por lo que decidimos realizar una Dinámica Molecular no restringida a 300K en condiciones adiabáticas, incluyendo una caja cúbica de 30Å de lado llena de moléculas de agua. Los cálculos se

llevaron a cabo a partir de la estructura minimizada del cluster 1 efectuando registros cada 100 fs durante un tiempo de 4ns. En la Figura 2. 69 se muestran las trayectorias de las distancias $O\cdots H$ de los puentes de hidrógeno involucrados en los cuatro posibles giros (γ_1 , γ_2 , γ_3 y β) internos del ciclopéptido **43**. Como puede apreciarse, el ciclopéptido presenta una gran rigidez en agua a temperatura ambiente, sin que se llegue a observar el cambio de orientación del enlace peptídico (β -Lact)NH–CO(Asp) representado en el cluster 2. Asimismo, los valores promedio de las distancias en los giros (ver Tabla 2. 12) presentan una mejor concordancia con los coeficientes de temperatura experimentales, confirmando la existencia de dos giros γ estabilizados. Uno muy fuerte (γ_1) entre NH(β -Lact)/CO(Gly2) y otro más débil (γ_2) entre NH(Asp)/CO(Arg).

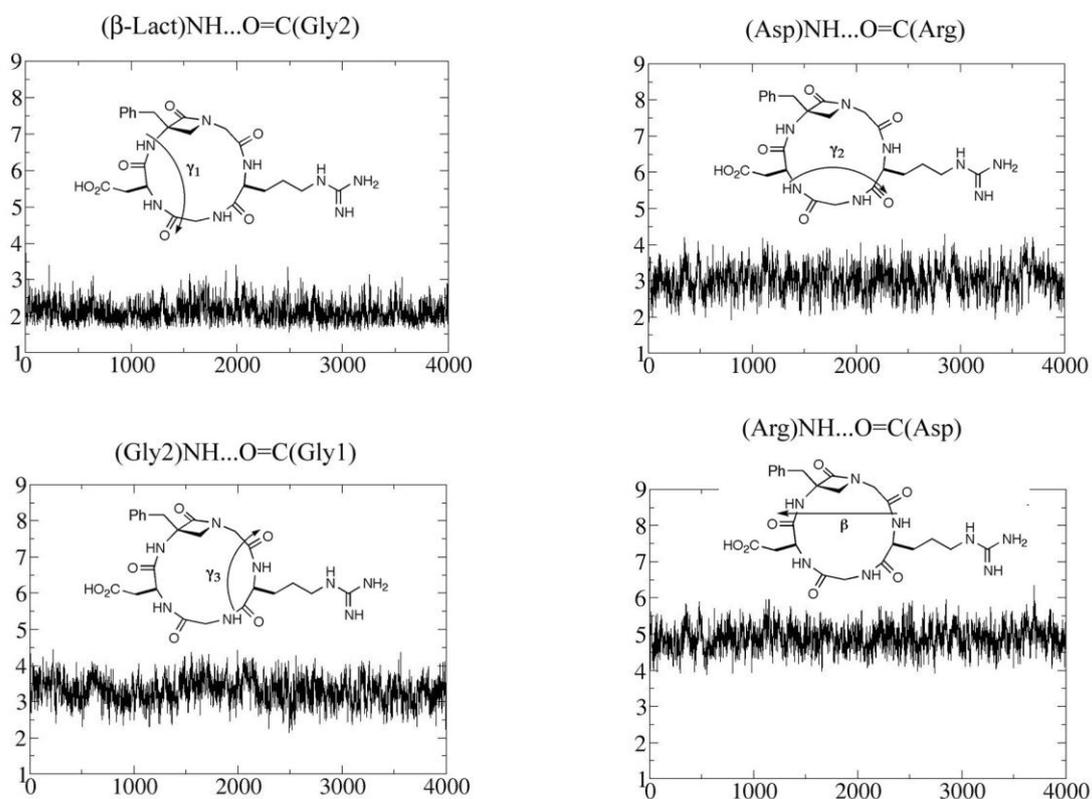


Figura 2. 69: Trayectorias (4 pns) de las distancias $O\cdots H$ de los puentes de hidrógeno (γ_1 , γ_2 , γ_3 y β) del ciclopéptido β -lactámico **43** en disolución acuosa calculadas mediante Dinámica Molecular no restringida.

Tabla 2. 12: Distancias promedio (O···H) de los puentes de hidrógeno del compuesto **43** estimadas a partir de cálculos Dinámica Molecular no restringida en agua a 300K.

<Gly2CO...HNβLact>	<ArgCO...HNAsp>	<Gly1CO...HNGly2>	<AspCO...HNArg>
γ_1 (Å)	γ_2 (Å)	γ_3 (Å)	β (Å)
2.13	3.02	3.31	4.88

Una vez finalizados los estudios estructurales del nuevo ciclopeptido RGD β -lactámico **43** en disolución y confirmada la existencia de un sistema de puentes de hidrógeno diferente de los descritos hasta la fecha para otros ciclopeptidos RGD, nos interesamos por la verificación del principio de “separación de elementos de restricción conformacional y de reconocimiento” formulado como hipótesis principal de nuestro trabajo (ver Figura 2.15, pag 154). Para ello, procedimos a evaluar su actividad biológica frente a células sobreexpresadas en integrina $\alpha_v\beta_3$ como se describe en el siguiente apartado de este capítulo.

2.2.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA

Tanto el diseño como la ejecución de los ensayos de actividad biológica corrieron a cargo del Dr. José Luis Castrillo y fueron realizados en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" de Madrid, siendo financiados por la empresa Litaphar S.A. Se realizaron dos tipos de estudios “in vitro” consistentes en la inhibición de la adhesión y el crecimiento celular,⁹⁸ ambos con células endoteliales humanas HUVEC.

⁹⁸ M. Kauraguchi, R. Hosotani, S. Ohishi, N. Fujii, S.S. Tulachan, M. Koizumi, E. Toyoda, T. Masui, S. Nakajima, S. Tsuji, J. Ida, K. Fujimoto, M. Wada, R. Doi, M. Imamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, 288, 711-717.

2.2.3.1 Ensayo de Inhibición de la Adhesión Celular

Los ensayos consistieron en cultivar células endoteliales humanas HUVEC (células con integrinas $\alpha_v\beta_3$ sobre-expresadas) en condiciones atmosféricas, de pH y temperatura adecuadas en placas de superficie funcionalizada con vitronectina. Al cultivar las células éstas interaccionan con la vitronectina quedando adheridas a la superficie hasta obtener una capa homogénea. Seguidamente, se aplicó tripsina (una enzima proteolítica) para romper la interacción de los receptores celulares con la vitronectina, permitiendo la liberación de la capa celular. Las células fueron colocadas entonces en una placa de cultivo que contenía el ciclopéptido β -lactámico **43** y se volvieron a cultivar en condiciones idénticas durante 20 min. Las células así tratadas se colocaron en una placa idéntica a la inicial de tal forma que sólo las células cuyos receptores no habían sido bloqueados por el ciclopéptido β -lactámico **43** podían adherirse a la placa funcionalizada con vitronectina.

La capa celular fue cultivada en idénticas condiciones durante 1h y pasado ese tiempo las placas fueron lavadas con una disolución salina. La comparación del número de células adheridas inicialmente frente a las adheridas tras ser tratadas con el ciclopéptido β -lactámico **43** da el valor de inhibición celular. Esto se realizó a distintas concentraciones. A concentraciones muy bajas, la adhesión a la placa sería del 100% por no haber suficiente producto para bloquear las integrinas. Y por el contrario a concentraciones muy altas la inhibición sería prácticamente completa. La concentración más interesante es a la que se produce el cambio. La comparación del número de células adheridas inicialmente frente a las adheridas tras ser tratadas con el ciclopéptido β -lactámico **43** da el valor de inhibición celular. Esto se realizó a distintas concentraciones. A concentraciones muy bajas, la adhesión a la placa sería del 100% por no haber suficiente producto para bloquear las integrinas. Y por el contrario a concentraciones muy altas la inhibición sería prácticamente completa. De este modo, se pudo establecer una concentración inhibitoria mínima de 10^{-6}M para conseguir una adhesión del 50% de las células. A concentraciones superiores (10^{-5}M) la tasa de adhesión media fue de tan sólo del 17%.

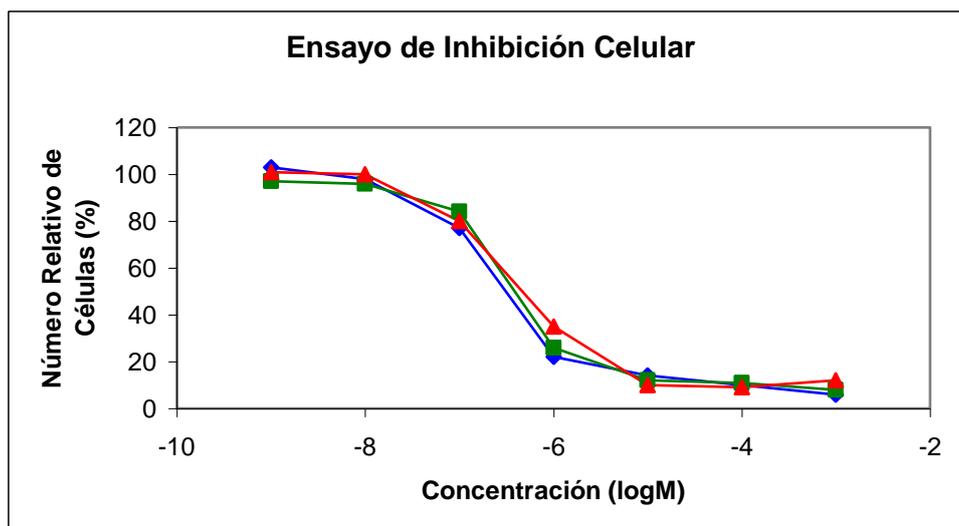


Figura 2. 70: Gráfica de inhibición de adhesión de células HUVEC sobreexpresadas en integrina $\alpha_v\beta_3$ con el ciclopéptido **43**. En ordenadas se representa el porcentaje de células adheridas a una superficie de vitronectina en presencia del inhibidor RGD β -lactámico. Los ensayos se efectuaron por triplicado.

2.2.3.2 Ensayo de inhibición del Crecimiento Celular

Los ensayos de inhibición del crecimiento celular intentan determinar si el crecimiento celular es afectado por el bloqueo de los receptores celulares. Cuando se produce la interacción de un inhibidor con una integrina en la pared celular, la conformación de ésta cambia. Mediante el estudio de inhibición del crecimiento celular se puede detectar si este cambio de conformación afecta en la replicación celular, constituyendo un ensayo modelo de crecimiento de células tumorales.

Los ensayos de inhibición del crecimiento celular se realizaron con células endoteliales HUVEC. El experimento se realizó cultivando células durante 1h en condiciones atmosféricas, de pH, temperatura adecuadas sobre dos placas de cultivo. Pasado ese tiempo se aplicó el ciclopéptido β -lactámico **43** a una de las placas y se prosiguió el cultivo. Contando el número de células pasadas 48, 72 y 96h comparándolo con el control se pudo determinar la diferencia del crecimiento en cada caso. Los experimentos se realizaron por quintuplicado a diferentes concentraciones y los resultados se recogen en los gráficos de la .

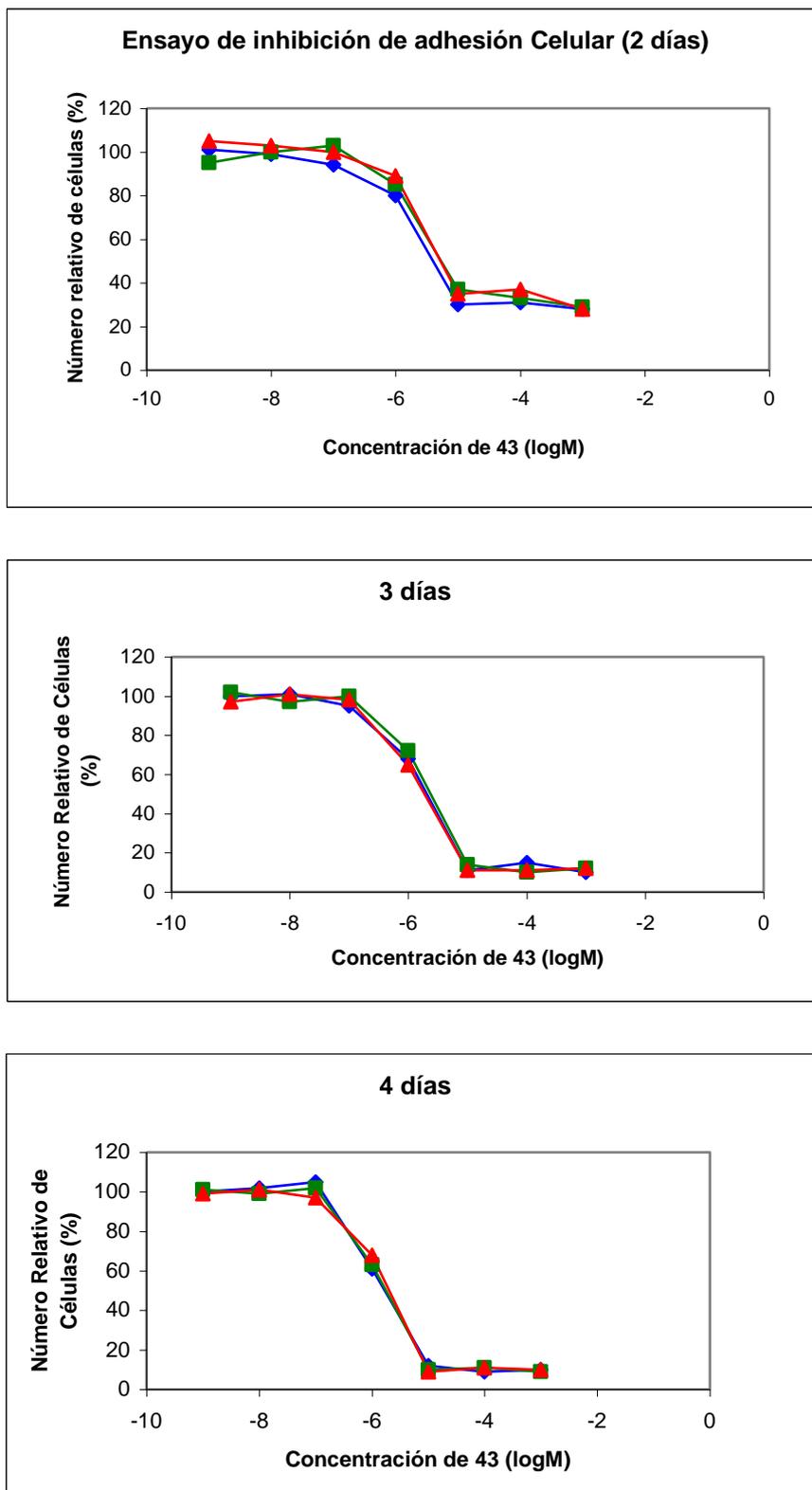


Figura 2. 71: Gráfica de inhibición de crecimiento de células HUVEC sobreexpresadas en integrina $\alpha_v\beta_3$ con el ciclopéptido 43 durante 4 días. En ordenadas se representa el porcentaje de células adheridas a una superficie de vitronectina en presencia del inhibidor RGD β -lactámico. Los ensayos se efectuaron por quintuplicado.

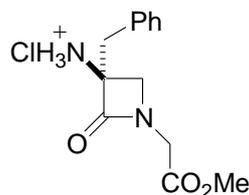
Se observa que la inhibición se mantuvo a lo largo de los cuatro días. La inhibición fue total a una concentración de 10^{-5}M y luego comenzó a decaer a una concentración de 10^{-6}M , indicando que el ciclopéptido β -lactámico **43** además de afectar en la adhesión celular impide el correcto crecimiento de las células.

Parte Experimental Capítulo 2

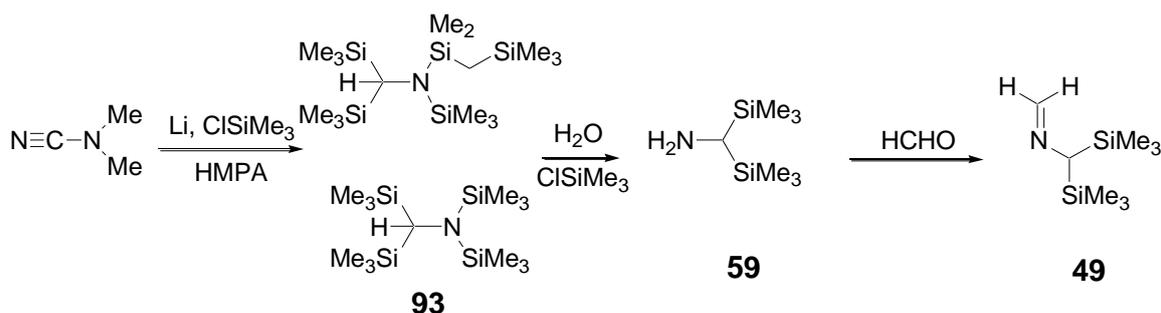
2.3: PARTE EXPERIMENTAL DEL CAPÍTULO 2

2.3.1 PRIMERA DESCONEXIÓN

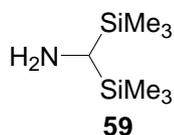
2.3.1.1 Síntesis de clorhidrato de (S)-3-amino-3-bencil-1-[(metoxicarbonil)metil]-azetidín-2-ona **54**

**54**

2.3.1.1.1 Síntesis de *N*-metiliden-bis(trimetilsililmetililamina) **49**

**93****59****49**

N,*C*-Bis(trimetilsilil)metilamina **59** (Ref. 77, pag. 170)

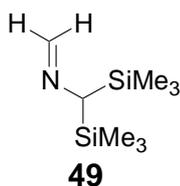
**59**

En un matraz flameado en atmósfera de N_2 y provisto de embudo de adición, se introdujo THF seco (200 mL) e hilo de litio cortado en pedazos pequeños (7 g, 1 mol). La mezcla se enfrió a $0^\circ C$ (baño de agua/hielo/sal) y se añadió $ClSiMe_3$ (300 mL, 2.37 mol) y *N,N*-dimetilcianamida (8.1 mL, 100 mmol). En un embudo de adición se introdujo una mezcla de HMPA (140 mL, 0.80 mol) y THF (50 mL), se goteó lentamente durante 2 h sin que la temperatura de la reacción superara los de $5^\circ C$. Una vez terminada la adición se permitió que la mezcla de reacción alcanzase lentamente la temperatura ambiente y se mantuvo en agitación durante toda la noche.

La mezcla presentó una coloración verde-azulada, observándose la desaparición del litio. Se evaporan los disolventes y se obtuvo un sólido blanco (complejo de Li-HMPA) que se extrajo con hexano (4 X 100 mL). La disolución de hexano obtenida se lavó con H₂O (100 mL), se decantó la fase orgánica y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se evaporó y se obtuvo un aceite amarillo-naranja (aprox. 30g), compuesto **93**.

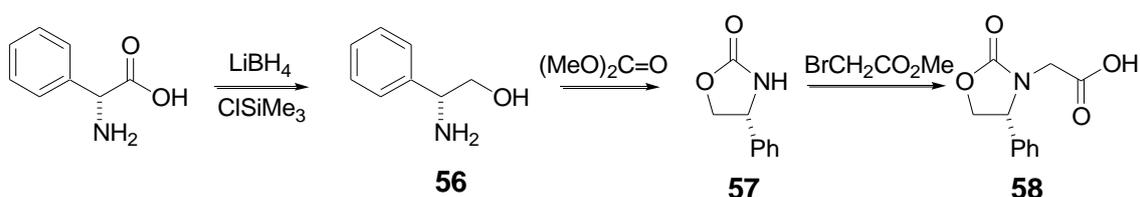
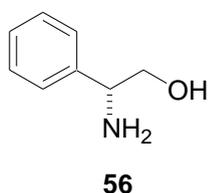
Dicho aceite se disolvió en MeOH (15 mL), la disolución se enfrió a 0°C y se goteó ClSiMe₃ (18 mL, 142 mmol). Terminada la adición se retiró el baño de refrigeración y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h. Se eliminó el disolvente en el rotavapor quedando un sólido anaranjado que se disgregó en H₂O (30 mL) y se extrajo con éter etílico (15 mL). La fase acuosa se basificó con NaOH 40% hasta un pH fuertemente básico. La amina se extrajo de la disolución con éter etílico (3 X 25 mL). Las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄ y se evaporó el disolvente con mucho cuidado ya que el producto es volátil. El producto se purificó mediante destilación con trompa de agua (10.52g, 60 %).

N-Metiliden-bis(trimetilsililmetilamina) **49** (Ref. 72d, pag. 166)

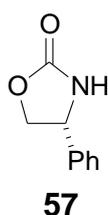


Se agitó a 0°C durante 2h una disolución de bis(trimetilsilil)metilamina (8.77g, 50 mmol) y formaldehído acuoso al 30% (5 mL, 55 mmol) exento de metanol estabilizante. Pasado ese tiempo, el producto se extrajo con CH₂Cl₂ (3 X 25 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto obtenido (9.07g, 97%) su utilizó en la siguiente reacción sin mayor purificación.

2.3.1.1.2 Síntesis del ácido [(4R)-4-fenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]acético 58

**(R)-2-Amino-2-fenilpropanol 56 (ref. 79c, pag. 177)**

Sobre una suspensión de LiBH_4 (17.4 g, 800 mmol) en THF seco (400 mL) enfriada a 0°C se adicionó ClSiMe_3 (200 mL, 1.6 mol) bajo atmósfera de nitrógeno. Se observó la formación de un precipitado de LiCl . A continuación, sobre la mezcla se adicionó la (R)-fenilglicina (60.72 g, 400 mmol) en porciones. Terminada la adición, se retiró el baño de hielo y la mezcla se agitó durante 24h a temperatura ambiente. Tras ese tiempo, la reacción fue enfriada de nuevo a 0°C y se adicionó lentamente metanol (600 mL). El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se trató con una solución de KOH al 20% y fue extraído con CH_2Cl_2 (3 X 200 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 . La evaporación del disolvente condujo al aminoalcohol deseado (49.4 g, 97% rendimiento) el cual fue utilizado en la reacción posterior sin previa purificación.

(R)-4-Feniloxazolidin-2-ona⁹⁹ 57

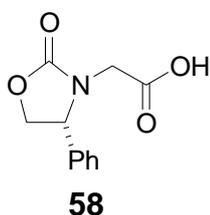
Se calentó a reflujo una mezcla de (R)-2-amino-2-fenilpropanol (53.36 g, 389 mmol), carbonato de dimetilo (70 mL, 821 mmol), carbonato potásico (8.15g, 59 mmol) e hidróxido potásico (0.27 mg, 4.81 mmol) durante 30 min. Pasado ese tiempo, se cambió el

⁹⁹ D. A. Evans, E. B. Sjögren, *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 32, 3783-3786.

condensador por un sistema de destilación y se destilaron aproximadamente 60 mL de MeOH. Se dejó que la reacción alcanzara temperatura ambiente y se añadió EtOAc (70 mL). Se filtró la disolución sobre celita, y se lavó sucesivamente la fase orgánica con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 X 40 mL) y con una disolución saturada de NaCl (2 X 40 mL).

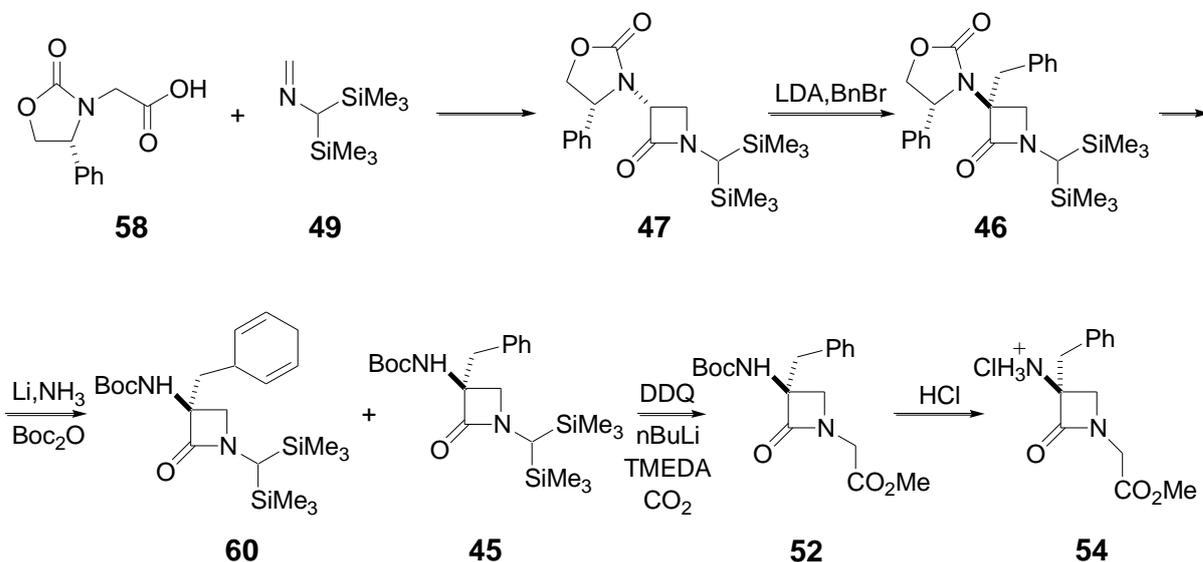
El crudo se cristalizó en una mezcla de CH₂Cl₂/Hex. (52 g, 82 %).

Ácido [(4R)-4-fenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]acético **58**

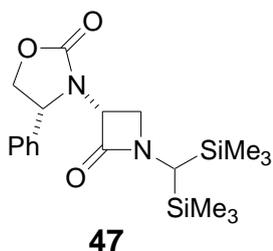


En un matraz flameado y bajo atmósfera de nitrógeno se introdujeron el NaH (2.4g, 100 mmol) y el THF (75 mL). La mezcla se enfrió a 0°C y con buena agitación se goteó sobre ella una disolución de (R)-4-fenilxazolidin-2-ona (16.32 g, 100 mmol) en THF seco (75 mL). Durante la adición se se observó el desprendimiento de H₂). Sobre la suspensión lechosa resultante se adicionó bromoacetato de metilo (9.47 mL, 100 mmol) y la reacción se agitó durante 2 h a 0°C. Una vez comprobado que la reacción ya había finalizado (mediante análisis de una alícuota por RMN), se adicionó una disolución de NaOH (20g, 0.5 mol) en H₂O (200 mL), se diluyó con más THF (250 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Pasado ese tiempo se acidificó a pH menor de 3 con una disolución de HCl 6N y el producto se extrajo con CH₂Cl₂ (3 X 70 mL). Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ y se evaporó el disolvente a presión reducida. El producto se utilizó en la siguiente reacción sin ser purificado (20.5 g, 93%).

2.3.1.1.3 Síntesis del clorhidrato de(3*S*)-3-amino-3-bencil-1-[(metiloxicarbonil)metil]-azetidín-2-ona **54**



(3*S*)-3-Bencil-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4*R*)-4-fenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]azetidín-2-ona **47**



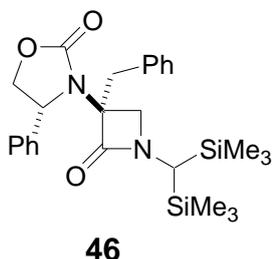
Sobre una disolución de ácido [(4*R*)-4-fenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]acético **58** (10.7g, 48 mmol; secado mediante destilación azeotrópica con tolueno) en CH_2Cl_2 anhidro (120 mL), se adicionaron tres gotas de DMF (seca) y cloruro de oxalilo (6.37 mL, 73 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en un matraz provisto de desecador (ya que la reacción desprende CO y CO_2) durante 90 min. Después de eliminar los disolventes a presión reducida, el aceite amarillo resultante se disolvió en CHCl_3 (45 mL).

En un matraz de tres bocas, flameado, provisto de termómetro, embudo de adición, y condensador¹⁰⁰, se adicionó bajo atmósfera de nitrógeno una disolución de N-

¹⁰⁰ El embudo de adición debe ser colocado por encima del condensador tipo Liebig.

metiliden-bis(trimetilsilil)metil imina **49** (5.88 g, 31.4 mmol) en CHCl_3 ¹⁰¹ (90 mL) y tamiz molecular activado (8 g). La mezcla se enfrió a 0°C , y se adicionó Et_3N (17.5 mL, 125.6 mmol). Posteriormente se goteó lentamente la disolución del cloruro de ácido (11.48 g, 48 mmol) en CHCl_3 (45 mL) mediante embudo de adición compensada (a través del condensador) durante 15 min. Por último, se cambió el embudo de adición por un desecador de gel de sílice,¹⁰² se retiró el baño de hielo y la reacción se agitó a reflujo durante 16 h. Una vez terminada la reacción, la mezcla se filtró sobre celita y la fase acuosa fue lavada sucesivamente con H_2O (50 mL), HCl (1M) (3 X 30 mL) y una disolución saturada de NaHCO_3 (30 mL). El crudo obtenido después de secar la fase orgánica sobre MgSO_4 y evaporar el disolvente a presión reducida se purificó mediante columna cromatográfica de gel de sílice (eluyente: EtOAc/Hex 1:2) (7.36 g, 60%).

(3S)-3-Bencil-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4R)-4-fenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-azetidín-2-ona **46**



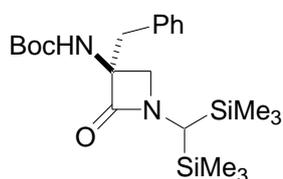
Sobre un matraz de tres bocas seco, provisto de termómetro y bajo atmósfera de nitrógeno, se adicionó THF seco (30 mL) y uno o dos cristales de fenantrolina. El matraz se enfrió a -78°C (mediante un baño de acetona/ CO_2) y se añadieron unas gotas de $n\text{BuLi}$ hasta que la disolución tomó un color anaranjado tenue. Entonces se añadió DIPA seca (3.15 mL, 22.5 mmol) y se goteó $n\text{BuLi}$ (2.5M en hexano) (9 mL, 22.5 mmol). La disolución se agitó durante 30 min. a la misma temperatura. Sobre esta mezcla se goteó una disolución de (3S)-3-bencil-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4R)-4-fenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]azetidín-2-ona **47** (5.86 g, 15 mmol) en THF (seco) (30 mL) durante unos 5min, manteniendo la temperatura de la

¹⁰¹ El cloroformo utilizado se obtuvo del cloroformo comercial estabilizado con etanol por destilación sobre pentóxido de fósforo. El embudo de adición debe ser colocado por encima del condensador tipo Liebig.

¹⁰² Una vez que la reacción alcanzó la ebullición el desecador se cambió por un septum y un globo de nitrógeno.

rección por debajo de -70°C . La mezcla se agitó otros 30 min. a la misma temperatura y se añadió bromuro de bencilo (8.97 mL, 75 mmol) recién destilado. La reacción se agitó durante 20h dejando que alcanzara lentamente temperatura ambiente y, pasado ese tiempo, se adicionó una disolución saturada de NH_4Cl (30 mL) y CH_2Cl_2 (60 mL). Se separó la fase orgánica, se lavó sucesivamente con HCl 1M (30 mL) y con una disolución saturada de NaHCO_3 (30 mL), se secó sobre MgSO_4 y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo se purificó mediante columna de gel de sílice (EtOAc/Hexano 1:5). (4.93 g, 69 %).

(3S)-3-Bencil-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-*terc*-butoxicarbonilaminoazetidina 2-ona 45

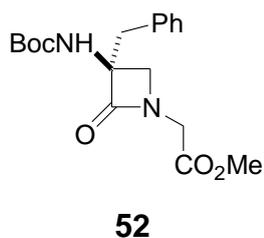


45

A un matraz de tres bocas flameado, provisto de entrada de nitrógeno y dedo frío, se adicionó litio (150 mg, 21.5 mmol). El matraz se enfrió a -78°C y en él se condensó amoníaco gaseoso (aprox. 60 mL). La mezcla se agitó a dicha temperatura durante 5 min. y sobre ella se adicionó con una cánula una disolución de (3S)-3-bencil-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4R)-4-fenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]azetidina 2-ona **46** (1.72 g, 3.58 mmol) en una mezcla de THF/^tBuOH (20:2 mL). La adición duró 15 min. y una vez terminada se agitó -78°C durante 5 min. más, tras los cuales la reacción se trató con una disolución de acetato amónico en agua (1.66g en 5 mL). Se dejó que la mezcla alcanzara lentamente la temperatura ambiente evaporándose el amoníaco y ajustando el pH a 7. A continuación, se adicionó el carbonato de di-*terc*-butilo (1.17g, 5.37 mmol) y agitando la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h. Pasado ese tiempo se diluyó en H_2O (20 mL) y se extrajo con éter etílico (30 mL X 3). El crudo se purificó en una columna de gel de sílice con Hexano/EtOAc (9:1) como disolvente y se obtuvo una mezcla de **45** y **60** (1.05 g, 67%). La mezcla se disolvió en tolueno (10 mL) y se añadió DDQ (2,3-dicloro-5,6-dicianobezoquinona) (274 mg, 1.21 mmol) y se agitó a reflujo durante 3h hasta que todo el compuesto **60** se aromatisó por completo. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/EtOAc) (9:1) Rendimiento: 75%, rendimiento global: 50%. $^1\text{H-RMN}$ (δ , ppm, CDCl_3): 7.28-7.20 (m, 5H, arom), 5.34 (s, 2H, OBn), 3.55 (d, 1H, $J=5.0$ Hz) N- $\text{CH}_2\text{-C}$, 3.42 (d, 1H, $J=5.4$ Hz) N- $\text{CH}_2\text{-C}$, 3.21 (d, 1H, $J=13.7$ Hz) $\text{CH}_2\text{-Ph}$, 3.17 (d, 1H, $J=$

14.2 Hz) $\text{CH}_2\text{-Ph}$, 2.61 (s, 1H) CH-Si , 1.44 (s, 9H) Boc, 0.06 (s, 9H) SiMe_3 , 0.05 (s, 9H) SiMe_3 .

(3S)-3-Bencil-3-*tert*-butoxicarbonilamino-1-[(metoxicarbonil)metil]-azetidín-2-ona 52

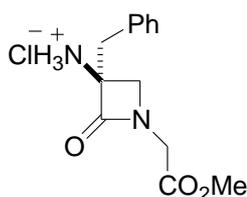


Sobre una disolución de (3S)3-bencil-1[bis(trimetilsilil)metil]-3-*tert*-butoxicarbonilamin-azetidín-2-ona **45** (1.86 mmol, 0.807 mg) en THF (10 mL) y bajo atmósfera de nitrógeno se adicionó una disolución de n-BuLi (2,5M en hexano, 1.86 mL, 4.64 mmol) y TMEDA (0.7 mL, 4.64 mmol) en THF (10 mL). La reacción se agitó a -100°C (MeOH/ N_2 liq.) durante 30 min. Pasado ese tiempo se borboteó CO_2 desde un globo a través de un tubo de tamiz molecular. La reacción perdió el color rápidamente. Se agitó a -100°C durante 10 min., y posteriormente se dejó que alcanzara la temperatura de $0\text{-}5^\circ\text{C}$ mediante la colocación de un baño de hielo/ H_2O . Transcurridos 10 min. la reacción se trató con una disolución saturada de NH_4Cl (5mL). Se separaron las dos fases, la fase acuosa se acidificó con una disolución de HCl 0.1M, y se extrajo con CH_2Cl_2 (15 mL X 3). La fase orgánica se extrajo a su vez con una disolución de NaOH (0.1M) (3 X 10 mL) y se volvió a acidificar con una disolución de HCl (1M). El producto de partida, **45**, que había quedado sin reaccionar se pudo recuperar tras secar la fase orgánica con MgSO_4 y evaporar el disolvente a presión reducida (177 mg, 30%).

El ácido final se extrajo de la fase acuosa con CH_2Cl_2 (3 X 15 mL) (0.434 mg) aunque contaminado con ácido caprónico. Para eliminarlo, el extracto crudo se esterificó disolviéndolo en CH_2Cl_2 (9 mL) y añadiendo DBU (0.583 mL, 3.9 mmol) y yoduro de metilo (0.203 mL, 3.25 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16h, tras las cuales la mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 (10 mL) y se lavó sucesivamente con una disolución de HCl (0.1 M) (2 X 10 mL) y una disolución saturada en NaCl (2 X 10 mL). El pentoato de metilo se evaporó conjuntamente con el disolvente obteniendo así el producto **52** puro (0.291 g, 64%).

$^1\text{H-RMN}$ (200MHz, CDCl_3) 7.35-7.21 (m, 5H, Ph), 4.92 (sa, NH), 4.14 (1H, d, $J=18.1$ Hz), 3.76 (1H, d, $J=18.1\text{Hz}$), 3.72 (1H, m), 3.68 (s, 3H, OMe), 3.61 (1H, d, $J=5.2$ Hz), 3.28 (1H, d, $J=14.1$ Hz), 3.15 (1H, d, $J=14.1\text{Hz}$), 1.40 (9H, s, Boc).

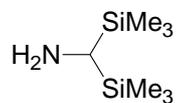
Clorhidrato de (3S)-3-amino-3-bencil-1-[(metoxicarbonil)metil]-azetidín-2-ona 54 (ref. 78, pag. 174)



54

Se disolvió la (3S) β -bencil-3-terc-butoxicarbonilamino-1-[(metoxicarbonil)-metil]-azetidín-2-ona **52** (53 mg, 0.15 mmol) en una disolución de HCl 4N en dioxano seco (1.5 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche bajo atmósfera de nitrógeno. Tras evaporar el disolvente a presión reducida utilizando CH_2Cl_2 para arrastrar todo resto de dioxano, se obtuvo el producto (43 mg, 100%). $^1\text{H-RMN}$ (δ MeOD) 7.31-7.24 (m, 5H, Arom.), 3.85 (2H), 3.67 (d, 1H, $J=12.72$ Hz), 3.65 (s, 3H), 3.61 (d, 1H, $J=9.29$ Hz), 3.18 (d, 1H, $J=13.21\text{Hz}$), 3.07 (d, 1H, $J=13.21$ Hz).

Bis(trimetilsilil)metil amina

**N° Referencia**
59

P. M. (g/mol)

175,42

P. E. (°C)

70°/25mmHg

 $[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, Cl₂CH₂)

Formula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental		
	C	H	N	C	H	N
C₇H₂₁NSi₂						

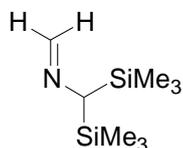
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3339, 3260 (NH ₂)
---------------------------	-------------------------------

MS m/z	160 (9.3); 102 (60); 73 (100)
--------	-------------------------------

¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
1.82 (s, 1H, CH) 1.10 (s, 2H, NH ₂) 0.02 (s, 18H, SiMe ₃)	

--

N-Metiliden-bis(trimetilsilil)metilamina



Nº Referencia
49

P. M. (g/mol)

187.43

P. E. (°C)

110°C/ 15 mmHg

$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, Cl₂CH₂)

Formula Empírica C₈H₂₁NSi₂	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental		
	C	H	N	C	H	N

IR(cm ⁻¹ ,KBr)	1618 (C=N) cm ⁻¹
---------------------------	-----------------------------

MS m/z	187(0.9), 186(5), 172(100), 114(99), 86(46), 73(98)
--------	-----------------------------------------------------

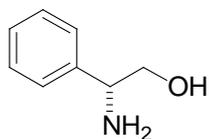
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	
7.20 (d, 1H, <u>H</u> CH)	J=17.1Hz
7.02 (d, 1H, H <u>C</u> H)	J=17.1Hz
2.67 (s, 1H, HCSi)	
- 0.03 (s, 18H, (SiMe ₃) ₂)	

¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
148.2
61.9
- 1.6

Observaciones:

El crudo se utilizó sin posterior purificación

(R)-2-Amino-2-fenilpropanol

**Nº Referencia**
56

P. M. (g/mol)

137.18

P. Fusión (°C)

75-77

 $[\alpha]_D^{25}$ (c=0.76, HCl1N)

- 31.7

Formula Empírica C₈H₁₁NO	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C 70.4	H 8.10	N 10.20	C	H	N

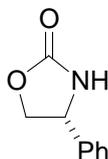
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3645-2300 (banda ancha, OH, NH ₂)
---------------------------	-----------------------------------------------

MS m/z	137 (3.5), 83 (100), 57 (54.3), 41 (50.8)
--------	-------------------------------------------

¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
7.35 (5H, m) arom. 4.03 (1H, dd, J= 4.3, 8.3 Hz) CHPh 3.72 (1H, dd, J= 4.3, 10.8 Hz) CH₂OH 3.53 (1H, dd, J= 8.33, 10.8 Hz) CH₂OH	142.0 128.4 127.3 126.5 67.4 57.3

Observaciones: E. Nicolas, K. C. Russell, V. J. Hruby, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 766.

(S)-4-Feniloxazolidin-2-ona

N° Referencia
57

P. M. (g/mol)

163.18

P. F. (°C)

130-132

 $[\alpha]_D^{25}$ (c= 2.0, CHCl₃)
- 50.0

Formula Empírica C₉H₉NO₂	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C 66.24	H 5.56	N 8.58	C 65.77	H 5.49	N 8.61

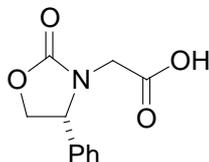
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3410-3050 (banda ancha NH), 1736 (CO) cm ⁻¹
---------------------------	--------------------------------------------------------

MS m/z	163 (29), 133 (57), 104 (100), 91 (79)
--------	----------------------------------------

¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
7.45- 7.33 (5H, m) arom.	160.2
6.37 (1H, s _a) NH	139.6
4.99 (1H, t) J= 7.7 Hz) CH -Ph	129.6
4.76 (1H, t, j= 8.6 Hz) HCH -O-CO	128.6
4.20 (1H, dd, J= 8.6, 6.9 Hz) HCH -O-CO	125.8
	72.4
	56.2

Observaciones:*D. A. Evans, E. B. Sjögren, *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 32, 3783

Ácido (4R)-4-fenil-2-oxo-oxazolidin-3-il-acético

**Nº Referencia**
58

P. M. (g/mol)

221.21

P. F. (°C)

107-108

 $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (c= 1.0, Cl₂CH₂)
-169.0

Formula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C	H	N	C	H	N
C₁₁H₁₁NO₄						

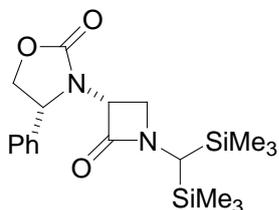
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	2924 (NH), 1752 (CO), 1654 (CO) cm ⁻¹
---------------------------	--------------------------------------------------

MS m/z	220 (0.6), 132 (45), 105 (49), 91 (100), 77 (38)
--------	--------------------------------------------------

¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
8.93-8.73 (1H, s _a) COOH	173.1
7.46-7.24 (5H, m) arom.	159.1
5.04 (1H, t, J= 8.6 Hz) CH -Ph	136.5
4.70 (1H, t, J= 8.6 Hz) H CHOCO	129.6
4.28 (1H, d, J= 18.2 Hz) H CH-COOH	126.5
4.14 (1H, t, J= 8.6 Hz) H CH OCO	127.4
3.86 (1H, d, J=18.2 Hz) H CH -COOH	70.4
	60.0
	42.7

Observaciones:

(3S)-1-[Bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4R)-4-fenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-azetidín-2-ona



Nº Referencia
47

P.M. (g/mol)

390.68

Punto de fusión (°C)

150-151

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.0, Cl₂CH₂)
-89.6

Formula Empírica	Análisis elemental					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
C₁₉H₃₀N₂O₃Si₂						
	C 58.41	H 7.75	N 7.17	C 58.50	H 7.72	N 7.20

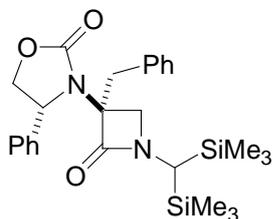
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	1740 (CO)
---------------------------	-----------

MS m/z	375 (2), 262 (18), 104 (38), 73 (100)
--------	---------------------------------------

¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
7.43-7.27 (5H, m) arom.	164.3
5.06 (1H, dd, J= 2.6, 5.5 Hz) HCHOCO	157.9
4.99 (1H, dd, J= 6.0, 8.8 Hz) HCPH	138.7
4.67 (1H, t, J= 8.8 Hz) HCH	129.4
4.05 (1H, dd, J= 8.8, 6.0 Hz) HCH	129.2
3.32 (1H, t, J=5.5 Hz) HCH	127.3
3.09 (1H, dd, J= 2.6, 5.5 Hz) HCH	126.6
2.63 (1H, s) HCSi	71.0
0.53 (9H, s) SiMe₃	58.9
0.43 (9H, s) SiMe₃	57.8
	48.8
	37.6
	-0.3
	-0.5

Comentarios: Cristalizado en hexano.

(3S)-3-Bencil-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4R)-4-fenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-azetidín-2-ona



Nº Referencia
46

P.M. (g/mol)

480.62

Punto de fusión (°C)

168-169

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.0, Cl₂CH₂)
-21.5

Formula Empírica	Análisis elemental					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
C₂₆H₃₆N₂O₃Si₂	C 64.97	H 7.56	N 5.83	C 64.89	H 7.60	N 5.92

IR(cm ⁻¹ ,KBr)	1737 (CO), 1730 (CO), 846 (C-Si)
---------------------------	----------------------------------

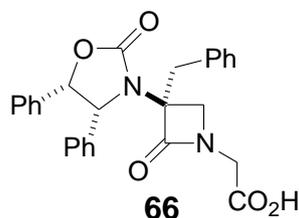
MS m/z	279 (13), 172 (3), 104 (25), 91 (19), 73 (100)
--------	------------------------------------------------

¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
7.70- 7.17 (10 H, m) arom.	164.0
5.18 (1H, dd, J= 1.8, 8.1 Hz) H CPh	156.7
4.64 (1H, t, J= 8.5 Hz) H CHO	140.1
4.43 (1H, dd, J= 1.9 , 8.7 Hz) H CHO	134.8
3.52 (1H, d, J= 6.6 Hz) H CH	130.5
3.44 (1H, d, J= 6.4 Hz) H CH	129.0
2.85 (1H, d, J= 13.7 Hz) H CHPh	128.5
2.52 (1H, s) CH Si	127.7
2.24 (1H, d, J=13.7 Hz) H CHPh	126.9
0.00 (9H, s) SiMe₃	72.0
-0.12 (9H, s) SiMe₃	71.1
	59.7
	52.1
	37.4
	37.2
	-0.6
	-0.8

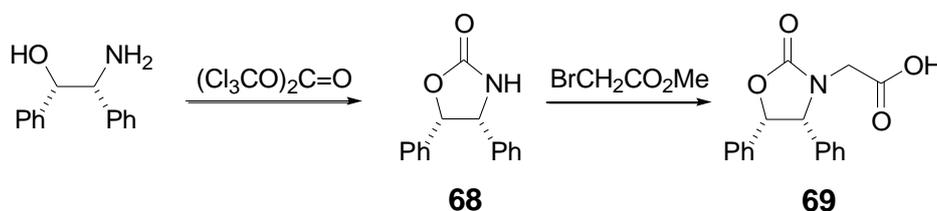
Comentarios: Cristalizado en hexano.

2.3.2 SEGUNDA DESCONEXIÓN

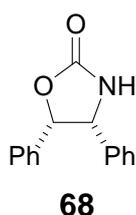
2.3.2.1 Síntesis de (3S) 3-bencil-3-[(4R,5S)-difeníl-1,3-oxazolidin-2-oxo-3-il]-1-carboximetilazetidín-2-ona **66**



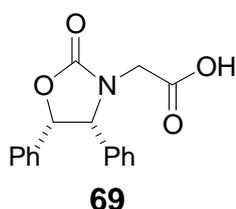
2.3.2.1.1 Síntesis del ácido [(4R,5S)-4,5-difeníl-2-oxo-oxazolidin-3-il]acético



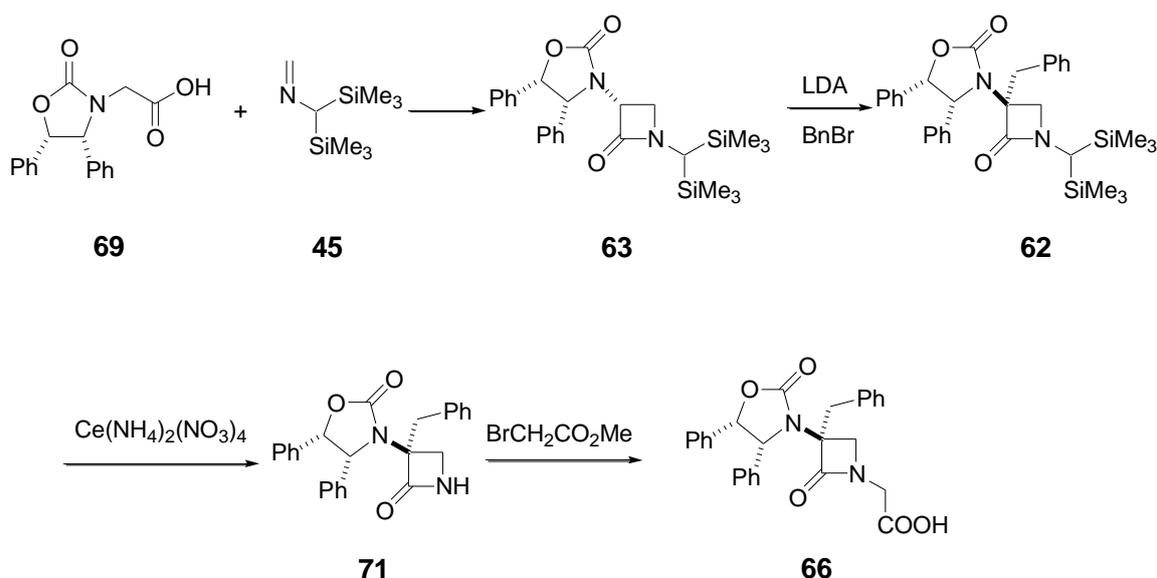
(4S,5R)-4,5-difeníl-2-oxazolidinona **68**



Sobre una suspensión de (1S,2R) 2-amino-1,2-difeniletanol (21.3g, 100 mmol) en CH_2Cl_2 (500 mL) se añadieron 75 mL de NaOH 6M. La mezcla se enfrió a 0°C y se le añadió una disolución de trifosgeno (11.27g, 38 mmol) en CH_2Cl_2 (85 mL) gota a gota durante 1h. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4.5h y tras comprobar que había finalizado (se analizó una alícuota por RMN) se decantó la fase orgánica y se lavó con una disolución saturada de NH_4Cl (80 mL). Al lavar la fase orgánica el producto empezó a precipitar en forma de pequeños cristales y fue necesario adicionar gran cantidad de CH_2Cl_2 (aprox. 2L) para poder disolver todo el producto. Tras secar la fase orgánica con Mg SO_4 y eliminar el disolvente a presión reducida se obtuvo el producto puro (23.63g, 99%).

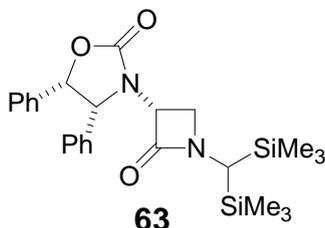
Ácido (4R,5S)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il-acético¹⁰³ 69

En un matraz flameado y bajo atmósfera de nitrógeno se suspendió NaH (2.64g, 110 mmol) en THF (75 mL). La mezcla se enfrió a 0°C y con buena agitación se goteó sobre ella una disolución de (4S,5R)-4,5-difenil-2-oxazolidinona **68** (23.9g, 100 mmol) en THF seco (225 mL) (observándose desprendimiento de hidrógeno durante la adición). Sobre la suspensión lechosa resultante se adicionó el bromoacetato de metilo (9.47 mL, 100 mmol) y la reacción se agitó durante 2 h a 0°C. Una vez comprobado que la reacción ya había finalizado mediante análisis de una alícuota por RMN, se adicionó una disolución de NaOH (20g, 0.5 mol) en H₂O (200 mL), se diluyó con más THF (250 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Pasado ese tiempo se acidificó hasta un pH menor de 3 con una disolución de HCl 6N y el producto se extrajo con CH₂Cl₂ (3 X 70 mL). Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ y se evaporó el disolvente a presión reducida. El producto se utilizó sin ser purificado en la siguiente reacción (28.24g, 95%).

2.3.2.1.2 Síntesis de la (3S)-3-Bencil-3-[(4R,5S)-difenil-1,3-oxazolidin-2-oxo-3-il]-1-carboximetil-azetidina-2-ona 66

¹⁰³ a) Ref. 72a, pag. 166 b) Ref. 76a (pag. 186 de la tesis), pag. 169.

(3S)-1-[Bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4R,5S)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-azetidín-2-ona¹⁰³ **63**



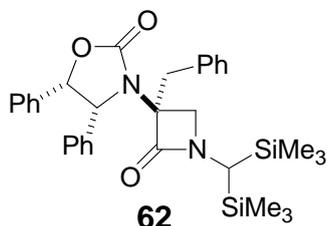
Sobre una disolución del ácido (4R,5S)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il-acético **69** (6 g, 20 mmol, (secado mediante arrastre de vapor con tolueno) en CH₂Cl₂ anhidro (52 mL), se adicionaron 3 gotas de DMF (seca) y cloruro de oxalilo (2.6 mL, 30 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en un matraz provisto de desecador (ya que la reacción desprende CO y CO₂) durante 90 min. Después de eliminar los disolventes a presión reducida, el aceite amarillo resultante se disolvió en CHCl₃ (16 mL).

En un matraz de tres bocas flameado bajo atmósfera de nitrógeno, provisto de termómetro, embudo de adición y condensador, se adicionó una disolución de N-metiliden-bis(trimetilsilil)metilimina **49** (2.81 g, 15 mmol) en CHCl₃ (45 mL) y tamiz molecular activado (8 g).¹⁰⁴ La mezcla se enfrió a 0°C, y se adicionó la Et₃N (5.6 mL, 40 mmol). Posteriormente se goteó lentamente la disolución del cloruro de (4R,5S)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il-acetilo (20 mmol) en CHCl₃ (16 mL)¹⁰⁵ desde el embudo de adición y a través del condensador, durante 15 min. Por último, se substituyó el embudo de adición por un desecador de gel de sílice;¹⁰⁶ se retiró el baño se hielo y la reacción se agitó a reflujo durante 16 h. Una vez terminada la reacción, la mezcla se filtró sobre celita y la fase acuosa fue lavada sucesivamente con H₂O (30 mL), HCl (1M) (3 X 30 mL) y una disolución saturada de NaHCO₃ (30 mL). El crudo obtenido después de secar la fase orgánica sobre MgSO₄ y evaporar el disolvente a presión reducida se purificó mediante columna cromatográfica de gel de sílice (eluyente: Hex/EtOAc 3:1) (4.20 g, 60%).

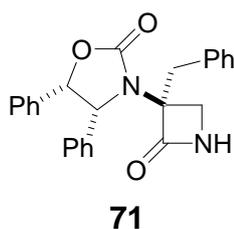
¹⁰⁴ El embudo de adición se debe colocar por encima del condensador tipo Liebig.

¹⁰⁵ El cloruro de ácido debe ser completamente soluble en CHCl₃, la presencia de algún precipitado indica la existencia de ácido sin reaccionar.

¹⁰⁶ Una vez que la reacción esté en ebullición puede cambiarse el desecador por un septum y un globo de N₂.

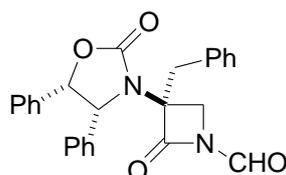
(3R)-3-Bencil-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4S,5R)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-azetidín-2-ona 62

A un matraz flameado de tres bocas provisto de termómetro, se adicionó con THF (seco) (47 mL) y uno o dos cristales de fenantrolina, bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se enfrió a -78°C (mediante baño de acetona/ CO_2) y se añadieron unas gotas de nBuLi hasta que la disolución tomó un color anaranjado tenue. Entonces se añadió DIPA (seca) (1.57 mL, 11.19 mmol) y nBuLi (2.5M en hexano) (4.48 mL, 11.2 mmol) gota a gota, agitándose la disolución durante 30 min. a dicha temperatura. Posteriormente se goteó una disolución de (3S)-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4S,5R)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]azetidín-2-ona **63** (4.75 g, 10.18 mmol) en THF (seco) (63 mL) durante aproximadamente 5 min. manteniendo la temperatura de reacción por debajo de los -70°C . Se agitó otros 30 min. a -78°C y se añadió lentamente bromuro de bencilo (6.10 mL, 50.88 mmol) recién destilado. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 20h, dejando que alcanzara lentamente temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se adicionó una disolución saturada de NH_4Cl (20 mL) y CH_2Cl_2 (40 mL). La fase orgánica se decantó y se lavó sucesivamente con HCl 1M (20 mL) y con una disolución saturada de NaHCO_3 (20 mL), se secó sobre MgSO_4 y se evaporó a presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílica (Hexano/EtOAc 5:1). (4.18 g, 74%).

(3S)-3-Bencil-3-[(4R,5S)-difenil-1,3-oxazolidin-2-oxo-3-il]-azetidín-2-ona¹⁰³ 71

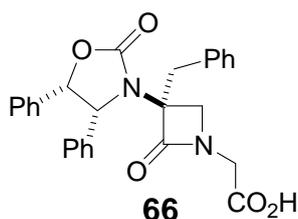
Se enfrió una disolución de (3R) 3-bencil-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4S,5R)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]azetidín-2-ona **63** (1.78 g, 3.2 mmol) en acetonitrilo (20 mL) a 0°C y sobre ella se añadió una disolución de $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_4$ (8.77 g, 16 mmol) en H_2O (8 mL). La mezcla se agitó a 0°C durante 10 min. y 1h a temperatura ambiente.

Una vez terminada la reacción, que se siguió por TLC, se añadieron H₂O (20 mL) y EtOAc (40 mL). La fase orgánica se decantó y se lavó con una disolución acuosa saturada en NaHCO₃ (30 mL), se secó sobre MgSO₄ y se evaporó a presión reducida obteniendo así (3R)-3-bencil-3-[(4S,5R)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-1-formilazetidín-2-ona intermedia (C₂₆H₂₂N₂O₄). ¹H-RMN (δ, ppm, CDCl₃): 8.56 (s, 1H, CHO), 7.30-7.06 (m, 5H) Ph, 6.01 (d, 1H, J=7.1 Hz) CHPh, 5.16 (d, 1H, J=7.4 Hz) CHPh, 3.98 (d, 1H, J= 8.1 Hz) N-CH₂-C, 3.49 (d, 1H, J=8.2 Hz) N-CH₂-C, 3.15 (d, 1H, J= 12.9 Hz) CH₂- Ph, 3.05 (d, 1H, J= 13.5 Hz) CH₂- Ph.



El crudo de dicho compuesto se disolvió en MeOH (10.5 mL) y sobre ella se adicionó una disolución saturada de NaHCO₃ (10.5 mL) y Na₂CO₃ (65 mg, 0.62 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 90 min., se filtró el sólido y se lavó con MeOH. La disolución resultante se añadió sobre H₂O (100 mL) y CH₂Cl₂ (50 mL) se decantó la fase orgánica y la fase acuosa fue extraída con más CH₂Cl₂ (25 mL X 3). El extracto orgánico se secó sobre MgSO₄, se evaporó a presión reducida y el crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice de (silicagel-60, eluyente Hex/EtOAc 3:1). (1.03 g, 81%). ¹H-RMN (δ, ppm, CDCl₃) 7.27-7.10 (m, 5H) arom., 6.00 (d, 1H, J= 7.4 Hz) CH-Ph, 5.53 (sa, 1H) NH, 5.37 (d, 1H, J=8.0 Hz) CH-Ph, 3.72 (d, 1H, J= 6.1 Hz) CH₂-N, 3.29 (d, 1H, J= 6.6 Hz) CH₂-N, 3.03 (d, 1H, J= 13.4 Hz) CH₂-Ph, 2.707 (d, 1H, J= 14.0 Hz) CH₂-Ph.

Síntesis de (3S)-3-bencil-3-[(4R,5S)-difenil-1,3-oxazolidin-2-oxo-3-il]-1-carboximetil-azetidín-2-ona **66**



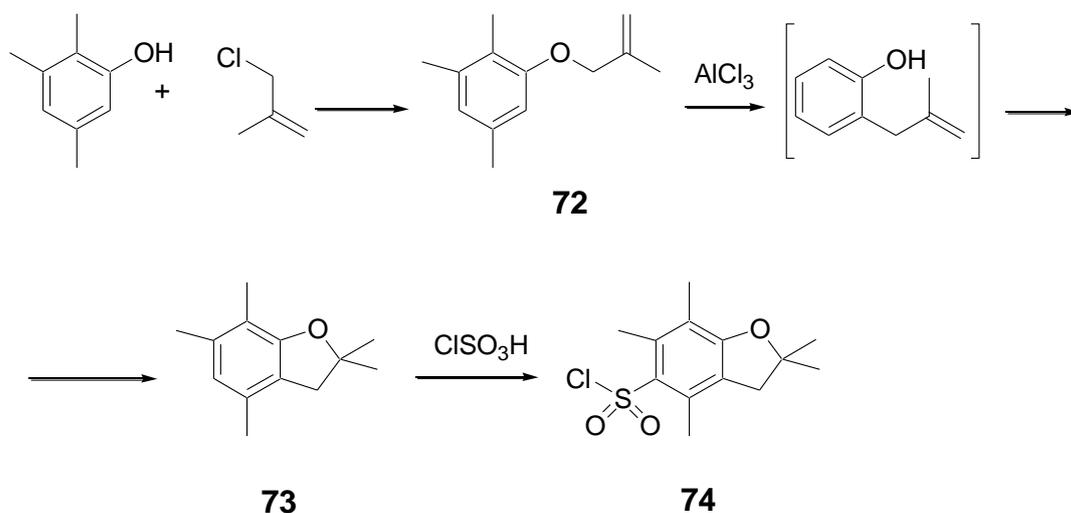
Sobre una disolución de (3S)-3-Bencil-3-[(4R,5S)-difenil-1,3-oxazolidin-2-oxo-3-il]-azetidín-2-ona¹⁰³ **62** (0.91 g, 2.29 mmol) en acetonitrilo seco (34 mL) se adicionó Cs₂CO₃ (0.82g, 2.52 mmol) (la suspensión tomó un color anaranjado) y

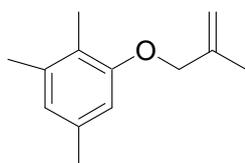
bromoacetato de metilo (0.33 mL, 3.44 mmol) (la suspensión volvió a tomar el color amarillo inicial). La reacción se calentó a 70°C y se agitó durante 3.5h. Tras comprobar que no quedaba producto de partida (se analizó una alícuota por RMN), se filtró la suspensión sobre celita, se lavó la celita con EtOAc (50 mL) y la fase orgánica se trató con H₂O (2 X 30 mL). El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice con Hexano/EtOAc (1:1) como eluyente. Rendimiento del éster metílico intermedio (0.88 g) 82%. El éster metílico se disolvió en H₂O/THF (4: 5 mL), se le añadió NaOH (0.38 g, 9.35 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 min., hasta comprobar que no quedaba producto de partida (Hex./EtOAc 1:1). La mezcla se acidificó con HCl 6N y el producto se extrajo con CH₂Cl₂ obteniendo el compuesto final puro con un rendimiento del 100% (0.854 g). ¹H-RMN (δ, ppm, CDCl₃) 7.23-7.05 (m, 5H) Ph, 5.97 (d, 1H, J= 7.55 Hz) CH oxaz., 5.32 (d, 1H, J= 7.69 Hz) CH oxaz., 3.97 (d, 1H, J= 18.1 Hz) CH₂-COOH, 3.87 (d, 1H, J=5.9 Hz) CH₂-N, 3.44 (d, 1H, J=18.1 Hz) CH₂-COOH, 3.32 (d, 1H, J= 5.9 Hz) CH₂-N,, 3.08 (d, 1H, J= 13.6 Hz) CH₂-Ph, 2.82 (d, 1H, J= 13.6 Hz) CH₂-Ph.

2.3.2.2 Protección y síntesis de los aminoácidos

2.3.2.2.1 Síntesis del cloruro de 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidro-benzofuran-5-sulfonilo 74

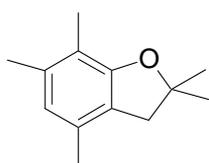
Este compuesto es comercial, sin embargo al no ser demasiado complejo el proceso de síntesis se preparó en el laboratorio.



Metalil 2,3,5-trimetilfenil éter 72¹⁰⁷**72**

Una mezcla del 2,3,5-trimetilfenol (68 g, 500 mmol), K_2CO_3 (500 mmol, 69.10 g) y 3-cloro-2-metilpropeno (750 mmol, 74 mL) en acetona/DMF (200:40 mL) se agitó a reflujo en presencia de una cantidad catalítica de yoduro potásico (1 g, 6mmol) hasta la completa desaparición del fenol (tlc Hex/EtOAc 5:1).

Pasadas 16h y tras comprobar que no quedaba producto de partida, la mezcla se vertió sobre agua fría (300 mL) y se extrajo con 300 mL de éter etílico. La fase etérea se lavó sucesivamente con una disolución de NaOH al 10% (150 mL), agua y una disolución saturada de cloruro sódico (150 mL). La fase orgánica se secó con $MgSO_4$ y se concentró dando lugar a un aceite que se destiló (0.5 mm Hg, 74°C) obteniendo así el producto puro (93.47 g, 98% rendimiento). 1H -RMN (δ , ppm, $CDCl_3$) 1.86 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.25 (s,3H), 2.29 (s, 3H), 4.40 (s,2H), 4.98 (s, 1H), 5.13 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.62 (s, 1H); ^{13}C -RMN (δ , ppm, $CDCl_3$) 11.2, 19.4, 19.9, 21.2, 110.0, 111.9, 122.0, 123.0, 135.2 137.4, 141.3, 156.5. **MS m/z** 190 (M^+ , 69.3), 175 (71.8), 91 (100), 79 (62.1)

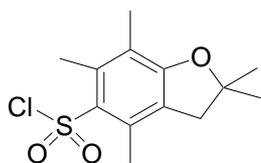
2,2,4,6,7-Pentametil-2,3-dihidro-benzofurano 73¹⁰⁷**73**

Se enfrió a $-78^\circ C$ una suspensión de $AlCl_3$ (1 mmol, 133 mg) en CH_2Cl_2 anhidro (5 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. Sobre la misma se añadió lentamente el metalil 2,3,5-trimetilfenil éter (1.9g, 10 mmol) en CH_2Cl_2 (2.5 mL). El resto del $AlCl_3$ (1 mmol, 133mg) se fue añadiendo en porciones en un sistema cerrado. La suspensión se agitó durante toda la noche dejando que alcanzara lentamente temperatura ambiente. Pasadas 16h la mezcla de reacción se vertió sobre agua preenfriada con hielo y con buena

¹⁰⁷ a) Ref. 82, pag. 180. b) C.G. Fields, G.B. Fields, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 6661. c) Ref. 71, pag. 165.

agitación. Se separó la fase orgánica y ésta fue lavada con una disolución saturada de NaCl, secada con MgSO_4 y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo así obtenido fue purificado mediante cromatografía en columna de gel de sílice con una mezcla n-hexano/EtOAc (30:1) obteniéndose el producto puro con un rendimiento del 86% (1.64g). $^1\text{H-RMN}$ (δ , ppm, CDCl_3) 1.47 (s, 6H), 2.08 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.91 (s, 2H), 6.49 (s, 1H), $^{13}\text{C-RMN}$ (δ , ppm, CDCl_3) 11.5, 18.5, 19.3, 28.6, 42.2, 85.8, 115.2, 122.1, 122.6, 131.1, 136.3, 157.2. **MS m/z** (190 (M^+), 69.3), 175 (71.8), 91 (100), 79 (62.1).

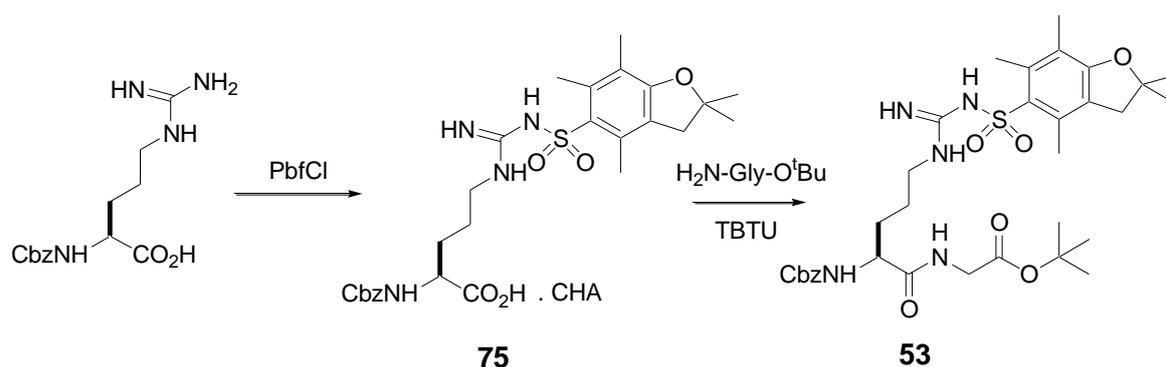
Cloruro de 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidro-2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidro-benzofuran-5-sulfonilo (74)¹⁰⁷



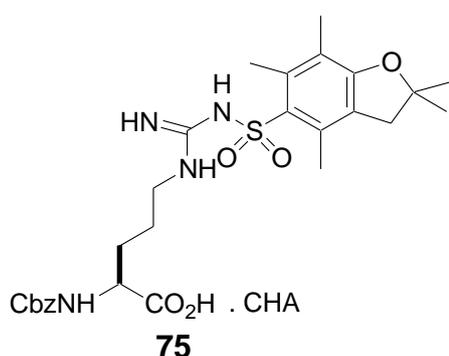
74

Se enfrió a -10°C una disolución del 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidro-benzofurano **73** (5.7g, 30 mmol) en CH_2Cl_2 seco (120 mL) mediante un baño de $\text{H}_2\text{O}/\text{hielo}/\text{NaCl}$. Sobre la misma se adicionó lentamente una disolución de ClSO_3H (8.37 mL, 126 mmol) en CH_2Cl_2 (100 mL)

usando un embudo de adición compensada. La mezcla se agitó durante una hora a dicha temperatura. Luego se retiró el baño de hielo y se dejó agitando durante 4h más. La reacción se controló por tlc, ya que en algún caso fue necesario volver a repetir el proceso por haber obtenido una conversión parcial (tlc Hex/EtOAc 30/1). Una vez terminada la reacción, la disolución se vertió sobre hielo con buena agitación. Se separó la fase orgánica, se lavó sucesivamente con Na_2CO_3 5% (180 ml), NaHCO_3 sat.(180 ml), agua (180 mL) y una disolución saturada de NaCl (180 ml), se secó sobre MgSO_4 y se concentró en el rotavapor. El producto así obtenido se utilizó en la siguiente reacción sin purificaciones posteriores (5.42g, 63%). $^1\text{H-RMN}$ (δ , ppm, CDCl_3) 3.02 (s, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.52 (s, 6H); $^{13}\text{C-RMN}$ (δ , ppm, CDCl_3), 12.4, 18.1, 19.4, 28.5, 42.74, 88.0, 118.7, 122.1, 125.6, 134.5, 140.9, 161,7.

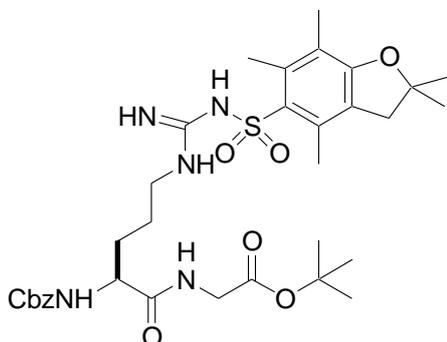
2.3.2.2.2 Síntesis del Cbz-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu (53)

Cbz-Arg(Pbf)-OH·CHA 75 (Ref. 83, pag. 181)



Sobre una mezcla de Cbz-Arg-OH (2.32g, 7.53 mmol) en acetona (20 mL) y una disolución 3.2M de NaOH (1.24g, 31.1 mmol) en agua (9.7mL) a 0°C se goteó una disolución de cloruro de 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidrobencofuran-5-sulfonilo (**74**) (PbfCl) (3.48g, 12

mmol) en acetona (17 mL). La disolución se agitó a 0°C durante 2h y 4h más a temperatura ambiente. Después se acidificó la reacción a pH 6.5 con una disolución saturada de ácido cítrico, y se evaporó la acetona a presión reducida. El crudo resultante se acidificó a pH 3 añadiendo más ácido cítrico concentrado, y el producto fue extraído con EtOAc (3 X 10mL). La fase orgánica fue lavada sucesivamente con H₂O (2 X 15 mL) y con una disolución saturada de NaCl (2 X 15mL), se secó sobre MgSO₄ y se concentró a presión reducida hasta un volumen de 5 mL aproximadamente. Sobre la disolución se añadió la ciclohexilamina (7.5 mmol, 0.761 mL). Por último, al adicionar éter etílico precipitó el producto dando un sólido con aspecto gomoso (4.96 g, 84%).

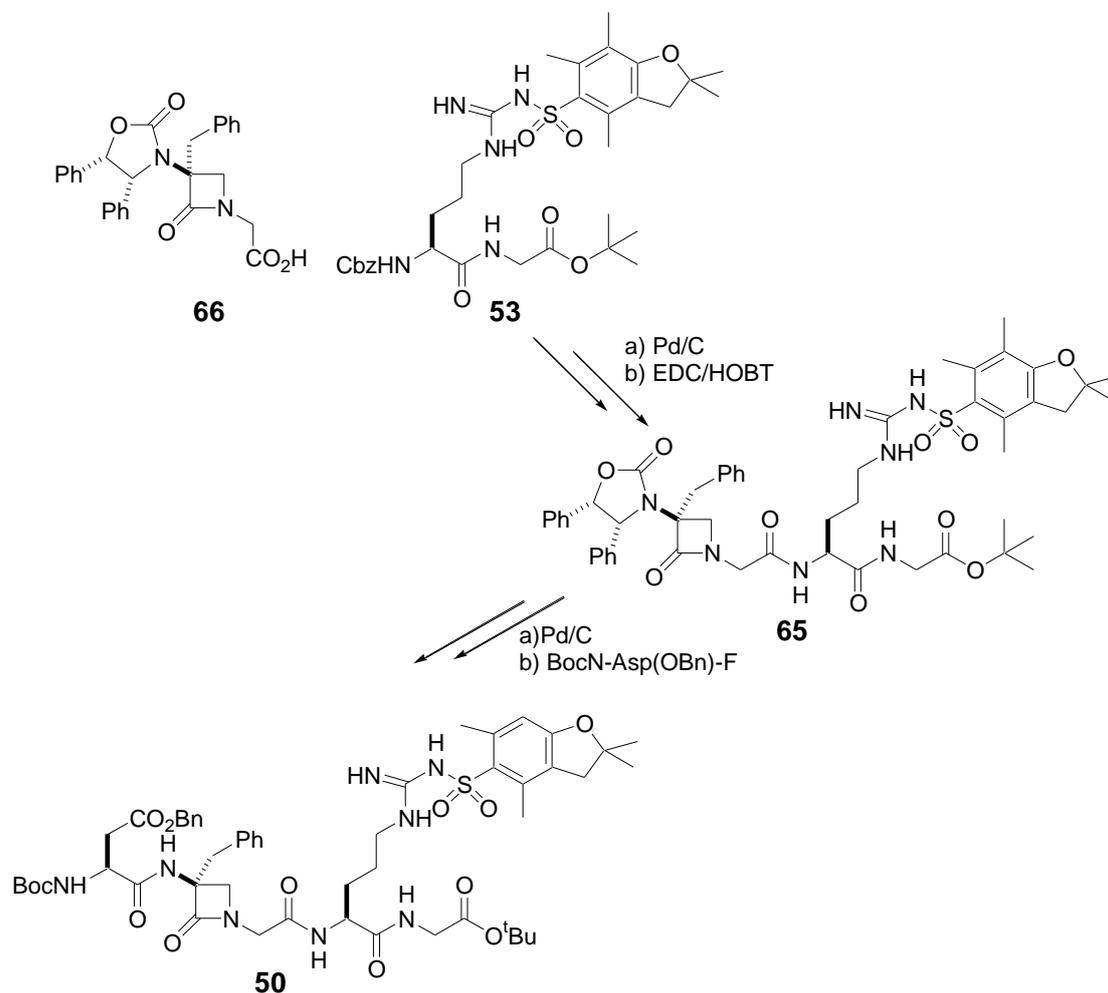
Cbz-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu 53**53**

Se disolvió la sal de ciclohexilamonio de la arginina protegida Cbz-Arg(Pbf)-H·CHA **75** (2.45 g, 3.7 mmol) en EtOAc (22 mL) y H₃PO₄ (100%) (22 mL), se separó la fase orgánica y la fase acuosa se lavó con EtOAc (2 X 11 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron a presión

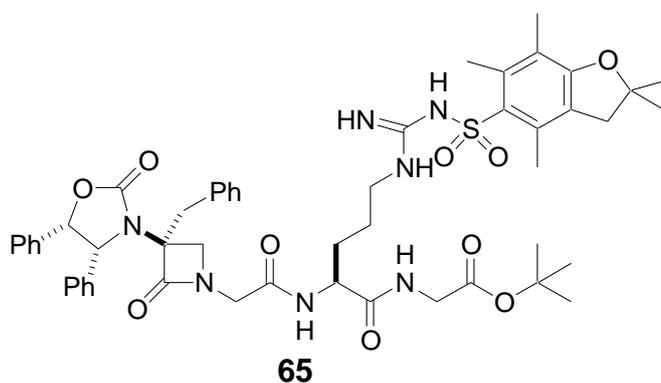
reducida. El ácido libre así obtenido (1.76 g, 3.15 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (18.5 mL) y sobre la disolución se añadió el clorhidrato del éster terc-butílico de la glicina (0.62 g, 3.7 mmol). La suspensión se enfrió a 0° C y sobre ella se añadió la DIPEA (1.3 mL, 7.41 mmol) y la TBTU (1.19 g, 3.7 mmol). La mezcla resultante se agitó a 0° C durante 1h y a temperatura ambiente durante 16 h. Pasado ese tiempo se evaporó el disolvente a presión reducida y se sustituyó por EtOAc (18 mL). La fase orgánica se lavó sucesivamente con una disolución de Na₂CO₃ (5%) (10 mL), H₂O (10 mL) y una disolución saturada de NaCl (10 mL), se secó sobre MgSO₄ y se evaporó nuevamente a presión reducida. El crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH 25:1). El producto obtenido (1.22g, 49%) contenía una pequeña cantidad de tetrametilurea.

2.3.2.3 Ensamblaje del peptidomimético lineal

2.3.2.3.1 Síntesis de Boc-Asp(OBn)-[(3S)-3-amino-3-bencil-azetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu (50)



[(3S)-3-Bencil-3-[(4R,5S)-difenil-1,3-oxazolidín-2-oxo-3-il]azetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu **65**

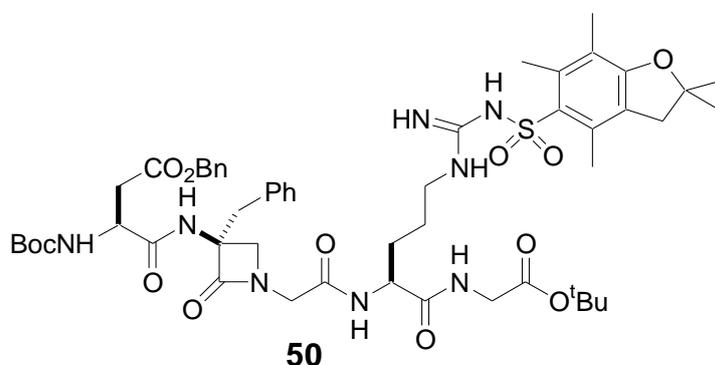


Sobre una disolución del dipéptido Cbz-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu **53** (135 mg, 0.2 mmol) en etanol anhidro (3 mL) se añadió Pd sobre carbono (26 mg). La

suspensión se agitó a temperatura ambiente y presión atmosférica de H₂ durante 16h. Pasado ese tiempo la mezcla se filtró sobre celita y se evaporó el disolvente a presión reducida obteniéndose la amina H-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu con un rendimiento del 86%. Las posibles trazas de etanol del crudo resultante se eliminaron mediante evaporación azeotrópica con tolueno seco (2 X 5 mL).

Se preparó una disolución de la amina **67** (93 mg, 0.17 mmol) y (3S)-3-bencil-3-[[4S,5R)-4,5-difenil-1,3-oxazolidin-2-oxo-3-il]-1-carboximetilazetidín-2-ona **66** (78 mg, 0.17 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se enfrió a 0° C y sobre ella se adicionó EDC (46 mg, 0.238 mmol) y HOBT (28 mg, 0.204 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 30 min. a 0° C y 16 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se lavó con HCl (0.1M) (1 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (1mL). Tras secar la fase orgánica sobre MgSO₄ y evaporarla a presión reducida, se obtuvo un crudo que se purificó en una placa fina preparativa (CH₂Cl₂:ⁱPrOH 10:1). El producto puro dió un rendimiento del 88% (0.146 g).

Boc-Asp(OBn)-[(3S)-3-amino-3-bencil-azetidín-2-ona]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu **50**

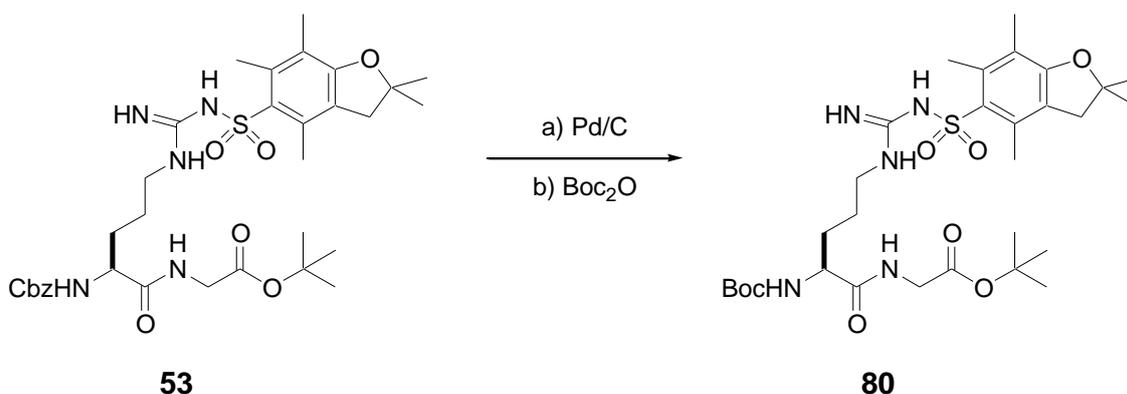


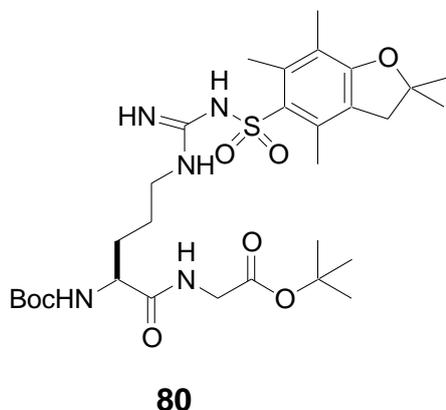
Desprotección de la oxazolidinona: Se agitó una suspensión de la ((3S)-3-bencil-3-[[4S,5R)-4,5-difenil-1,3-oxazolidin-2-oxo-3-il]azetidín-2-on-1-il)Gly-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu **65** (0.465 g, 0.48 mmol) y Pd/C (93 mg, 20 %) en etanol (20 mL) a 40° C y con una presión de H₂ de 150 psi, durante 24h. Pasado ese tiempo se filtró sobre celita y se evaporó la mezcla a presión reducida. El crudo obtenido contenía 1 eq. de 1,2-difeniletano, pero se utilizó sin purificar en la siguiente reacción. (0.36 g, 100%).

Formación del fluoruro de ácido: Se enfrió, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; y bajo atmósfera de N_2 una disolución de Boc-Asp(OBn)-OH (0.323 g, 1 mmol) en CH_2Cl_2 (seco) (5 mL) y se le añadió piridina (0.081 mL, 1 mmol), y por último se goteó fluoruro de cianurilo (0.432 mL, 5 mmol) sobre la disolución. La reacción se agitó durante 1.5h a dicha temperatura y se vertió sobre agua y hielo. Se decantó la fase orgánica y la fase acuosa se lavó con CH_2Cl_2 (2 X 2.5 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y se evaporó el disolvente a presión reducida. El producto obtenido (0.311g, 95 % rendimiento) se utilizó en la siguiente reacción sin ulterior purificación. $^1\text{H-RMN}$ (δ , ppm, CDCl_3): 7.39-7.34 (m, 5H) Ph, 5.50 (d, 1H, $J= 8.3$ Hz) BocNH, 5.18 (s, 2H) -OBn, 4.82 (m, 1H) CH-CH₂-, 3.10 (dd, 1H, $J= 4.4, 4.9, 17.6, 18.1$ Hz) CH-CH₂-CO₂Bn, 2.94 (dd, 1H, $J= 4.4, 17.6$ Hz) CH-CH₂-CO₂Bn, 1.46 (s, 9H) ^tBu.

Acoplamiento peptídico: Sobre una disolución de [(3S)—3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]Gly-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu **64** (0.36 g, 0.477 mmol) en CH_2Cl_2 seco (2.5 mL) enfriada a 0°C y bajo atmósfera de N_2 , se adicionó N-metilmorfolina (0.131 mL, 1.19 mmol) y una disolución de Boc-Asp(OBn)-F **79** (0.311 g, 0.955 mmol) en CH_2Cl_2 seco (2.5 mL). La mezcla se agitó durante 16h dejando que alcanzara lentamente la temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se adicionó CH_2Cl_2 (15 mL) y la disolución se lavó sucesivamente con H_2O (10 mL), HCl (1M) (10 mL), y una disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL). La fase orgánica se decantó y se secó con MgSO_4 . Una vez evaporado el disolvente el crudo fue purificado mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice, eluyente utilizado: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5). El producto se obtuvo como sólido (0.415 g, 82%).

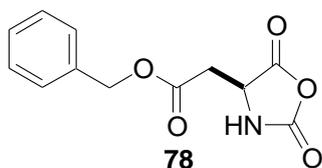
2.3.2.3.2 Síntesis de Boc-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu **80**



Boc-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu 80

Se agitó, durante 16 h a temperatura ambiente y presión atmosférica de H₂ una suspensión de Pd sobre carbono (116 mg) y el dipéptido Cbz-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu **53** (581 mg, 0.87 mmol) disuelto en etanol (9mL). Pasado ese tiempo la suspensión se filtró sobre celita y se evaporó el disolvente a presión reducida.

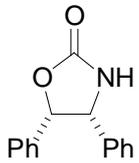
El crudo así obtenido (400 mg, 0.741 mmol, 86%), se diluyó en CH₂Cl₂ (15 mL) y sobre la disolución se añadió dicarbonato de di-*tert*-butilo (1.11 mmol, 243 mg) bajo atmósfera de nitrógeno. La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, se evaporó el disolvente a presión reducida y se purificó el crudo mediante cromatografía en una columna de gel de sílice (EtOAc). Se obtuvo el producto puro con un rendimiento del 99% (469 mg).

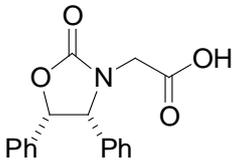
(S)-(2,5-Dioxo-1,3-oxazolidin-4-il)-acetato de bencilo 78 (Ref. 84, pag. 184)

Sobre una disolución de Boc-Asp(OBn)OH (0.5 g, 1.55 mmol) y ClSiMe₂^tBu (0.245g, 1.62 mmol) en EtOAc (1.7 mL) a 0°C se añadió Et₃N (0.215 mL, 1.55 mmol), observándose

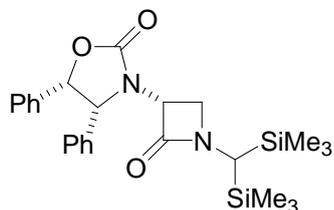
inmediatamente un precipitado de clorhidrato de trietilamina. Tras agitar la mezcla durante 30 min. a 0°C, la suspensión se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniéndose así un aceite (0.58 mg). Dicho crudo se disolvió en CH₂Cl₂ (2.5 mL), se enfrió la mezcla a 0°C, se añadió cloruro de oxalilo (0.169 mL, 1.93 mmol) y dos gotas de DMF, al finalizar la emisión de gases (10 min.) se añadió otra gota de DMF y la disolución se agitó durante 2 h. Una vez pasado este tiempo, se añadió THF (10 mL) y el disolvente se evaporó a presión reducida, de esta forma se evaporó todo el cloruro de oxalilo restante y el crudo se secó mediante una bomba de

vacío. El producto se purificó por cristalización en CH_2Cl_2 /hexano, obteniéndose el producto deseado con un rendimiento del 99% (0.382 g). $^1\text{H-RMN}$ (δ , ppm, CDCl_3) 7.40-7.34 (m, 5H) arom., 6.08 (sa, 1H) NH, 5.20 (s, 2H) CH_2 -Ph, 4.61(ddd, 1H, $J=1.0, 2.9, 9.8$ Hz) CH-CH_2 -, 3.11 (dd, 1H, $J=2.9, 17.6$ Hz) $\text{CH-CH}_2\text{-CO}_2\text{Bn}$, 2.84 (dd, 1H, $J=9.8, 17.6$ Hz) $\text{CH-CH}_2\text{-CO}_2\text{Bn}$. $^{13}\text{C-RMN}$ (δ , ppm, CDCl_3) 169.3, 168.3, 151.4, 134.6, 128.8, 128.7, 128.5, 67.8, 53.8, 36.0.

(4R,5S)-4,5-Difenil-1,3-oxazolidin-2-ona		Nº Referencia 68				
		P. M. (g/mol)				
		239,27				
		P. F. (°C)				
		226-227(EtOAc)				
		$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, Cl ₂ CH ₂) + 59.7				
Formula Empírica C₁₅H₁₃NO₂	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C 75.29	H 5.49	N 5.85	C 75.43	H 5.35	N 6.00
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3580, 1765, 1540					
MS m/z	79, 107(100), 239					
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			
7.15-6.92 (m, 10H, Ph) 5.95 (d, 1H, OCHPh) J =8.2 Hz 5.84 (s, 1H, NH) 5.19 (d, 1H, NCHPh) J =8.2 Hz			159.5 136.0 134.3 128.2 128.1 127.9 126.9 126.1 82.3 61.4			
Observaciones:						

Ácido (4R,5S)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il-acético		Nº Referencia 69
		P. M. (g/mol) 297,31
		P. F. (°C) 152-153(EtOAc)
		$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, Cl ₂ CH ₂) -124.5
Formula Empírica C₁₇H₁₅NO₄	Microanálisis	
	Teórico (%)	
	C 68.67	H 5.09
	N 4.71	C 68.88
	H 5.15	N 4.56
IR(cm ⁻¹ ,KBr)		
MS m/z	68(100); 73(100); 104(100); 118(39.1); 204(100); 205(40.9); 246(36.9)	
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	
7.11-6.80 (m, 11H, 10 Ph, CO ₂ H) 5.94 (d, 1H, <u>CH</u> Ph) J =8.3 Hz 5.35 (d, 1H, <u>H</u> CPh) J =8.6 Hz 4.53 (d, 1H, <u>CH</u> ₂ CO ₂ H) J =18.1 Hz 3.45 (d, 1H, <u>CH</u> ₂ CO ₂ H) J =18.2 Hz	172.7 158.8 134.3 133.0 128.6 128.5 128.3 128.0 127.9 127.8 80.0 64.7 43.6	
Observaciones:		

(3S)-1-[Bis(trimetilsilil)metil]-3-[(4S,5R)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]-azetidín-2-ona



Nº Referencia
63

P.M. (g/mol)

466.74

Punto de fusión (°C)

132

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.0, Cl₂CH₂)
+ 6.9

Formula Empírica	Análisis elemental					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C₂₅H₃₄N₂O₃Si₂	C 64.34	H 7.34	N 6.00	C 64.59	H 7.37

IR(cm⁻¹,KBr)

MS m/z

94(29.6); 129(31.8); 164(77.3); 166(100); 168(48.2)

¹H-NMR (δ, ppm) CDCl₃

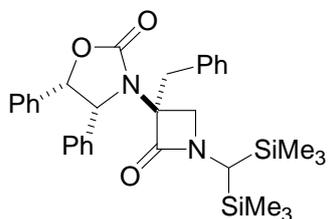
7.12-6.93ppm (m, 10H, Ar)
 5.96ppm (d, 1H, OCHPhCHPh) J=8.1 Hz
 5.27ppm (dd, 1H, NCH₂C) J=2.5; 5.3 Hz
 5.16ppm (d, 1H, OCHPhCHPh) J=8.1 Hz
 3.35ppm (t, 1H, NCH(CO)C) J=5.6 Hz
 3.07ppm (dd, 1H, NCH₂C) J=2.5; 5.9 Hz
 2.63ppm (s, 1H, CH(SiMe₃)₂)
 0.02ppm (s, 9H, Si(CH₃)₂)
 -0.11ppm (s, 9H, Si(CH₃)₂)

¹³C-NMR (δ, ppm) CDCl₃

164.4 -0.36
 157.5 -0.60
 134.8
 133.6
 128.6
 128.4
 128.3
 128.0
 127.8
 127.5
 126.0
 125.9
 81.0
 63.3
 59.3
 48.7
 37.6

Comentarios: Cristalizado en hexano.

(3S)-3-Bencil-1-[bis(trimetilsilil)metil]-3-
[[4S,5R)-4,5-difenil-2-oxo-oxazolidin-3-il]azetidina-2-ona



Nº Referencia
62

P. M.(g/mol)

556.84

Punto de fusion (°C)

212-214

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.0, Cl₂CH₂)
- 2.9

Formula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C₃₂H₄₀N₂O₃Si₂	C 69.02	H 7.24	N 5.03	C 68.74	H 7.23

IR(cm⁻¹,KBr)

MS m/z

¹H-NMR (δ, ppm) CDCl₃

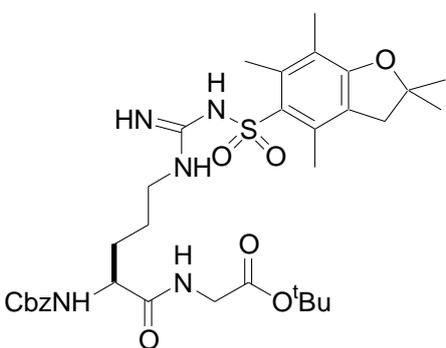
7.26-7.08 (m, 15 H, Arom.)
 5.91 (d, 1 H, OCHPh) J= 7.3 Hz
 5.44 (d, 1 H, NCHPh) J= 7.3 Hz
 3.59 (d, 1 H, NCHC) J= 6.4 Hz
 3.49 (d, 1 H, NCHC) J= 6.4 Hz
 2.97 (d, 1 H, CONCHH) J= 13.7 Hz
 2.56 (s, 1 H, CHSi)
 2.39 (d, 1 H, CONCHH) J= 13.7 Hz
 0.04 (s, 9H, SiMe₃)
 -0.15 (s, 9H, SiMe₃)

¹³C-NMR (δ, ppm) CDCl₃

164.3 52.4
 156.7 37.7
 135.6 37.4
 135.0 -0.4
 133. -0.6
 130.6
 128.9
 128.6
 128.5
 128.2
 128.0
 127.7
 127.0
 125.7
 81.2
 72.3
 72.2
 65.3

Comentarios:

Cbz-Arg(Pbf)O·CHA		N° Referencia 75				
		P. M. (g/mol) 659.34				
		P. F. (°C) Sólido gomoso				
		[α] _D ²⁵ (c= 1.0, Cl ₂ CH ₂)				
Formula Empírica C₃₃H₄₉N₅O₇S	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C 60.07	H 7.49	N 10.61	C	H	N
IR(cm ⁻¹ ,KBr)						
MS m/z						
¹ H-NMR (δ, ppm) MeOD	¹³ C-NMR (δ, ppm) MeOD					
7.33-7.27 (5H, m) arom.	176.1 25.7					
5.06 (2H, s) -Obn	156.9 23.8					
4.01 (1H, m) CH-(CH ₂) ₃ -	155.2 22.9					
3.16 (2H, m) CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	136.4 22.4					
3.04 (1H, m) NCH CHA	135.4 16.6					
2.98 (2H, s) CH ₂ (Pbf)	131.4 15.4					
2.57 (3H, s) Me(Pbf)	130.5 9.5					
2.50 (3H, s) Me(Pbf)	126.5					
2.07 (3H, s) Me(Pbf)	125.8					
2.02-1.2 (14H, m) CH-CH ₂ -CH ₂ -CH + CHA	123.0					
1.44 (6H, s) 2X Me Pbf	115.5					
	84.6					
	64.4					
	54.2					
	48.5					
	41.0					
	38.8					
	29.0					
	28.5					
<u>Observaciones:</u> Cristalizado en EtOAc y Et ₂ O. Con el tiempo deja de ser sólido con aspecto gomoso y pasa a ser un aceite.						

Cbz-Arg(Pbf)-Gly-O ^t Bu		N° Referencia 53	
		P. M. (g/mol) 673,82	
		P. F. (°C)	
		$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, Cl ₂ CH ₂)	

Formula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C₃₃H₄₇N₅O₈S	C 58.82	H 7.030	N 10.39	C	H

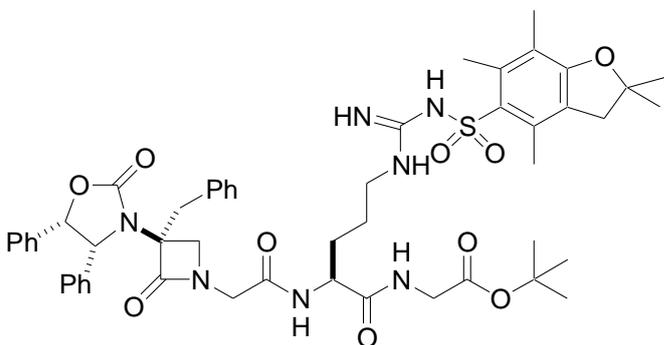
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3440, 3342, 1749, 1680, 1624, 1392
---------------------------	------------------------------------

HPLC-MS Tipo de fuente iónica: ESI*	MS: 674.3 MS2 (614.0): 620.1, 619.2, 618.2, 428.1, 350.2, 349.1, 348.2, 320.2, 291.2, 240.1 MS3 (348.0): 331.1, 320.1, 291.2, 273.2, 263.2, 249.1, 240.1, 205.2, 182.9, 125.1
-------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃	¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃
7.39 (sa, 1H) NH amida 7.32 (m, 5H) arom 6.26 (sa, 2H) NH guanidina 6.07 (sa, 1H) NH guanidina 5.96 (d, 1H) Cbz-NH 5.07 (s, 2H) -OBn 4.33 (sa, 1H) CH -CH ₂ -CH ₂ - 3.97 (dd, 1H, J= 5.4, 7.3, 17.6, 19.5 Hz) NH- CH₂ 3.81 (dd, 1H, J= 4.4, 4.8, 17.6, 18.1 Hz) NH- CH₂ 3.26 (m, 2H) CH ₂ -CH ₂ - CH₂ 2.95 (s, 2H) CH ₂ Pbf 2.57 (s, 3H) 2.50 (s, 3H) 2.09 (s, 3H) 1.93 (m, 1H) CH- CH₂ -CH ₂ -CH ₂ 1.72(m, 1H) CH- CH₂ -CH ₂ -CH ₂ 1.61 (m, 2H) CH- CH ₂ - CH₂ -CH ₂ 1.46 (s, 6H) 2XMe 1.44 (s, 9H) tBu	172.5 28.0 169.2 25.2 158.7 19.2 156.4 17.8 138.3 12.4 136.2 132.7 128.0 127.8 124.6 117.5 86.3 82.1 66.9 54.2 42.1 41.9 30.0 28.5

<u>Observaciones:</u> * MeOH/HCO ₂ H polaridad positiva.

((3S)-3-Bencil-3-[(4S,5R)-difeníl-1,3-oxazolidin-2-oxo-3-il]azetidín-2-on-1-il]Gly-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu



Nº Referencia
65

P. M. (g/mol)

978,16

Punto de fusión (°C)

$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, Cl₂CH₂)
+ 29.9

Formula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C	H	N	C	H	N
C₅₂H₆₃N₇O₁₀S	63,85	6,49	10,02			

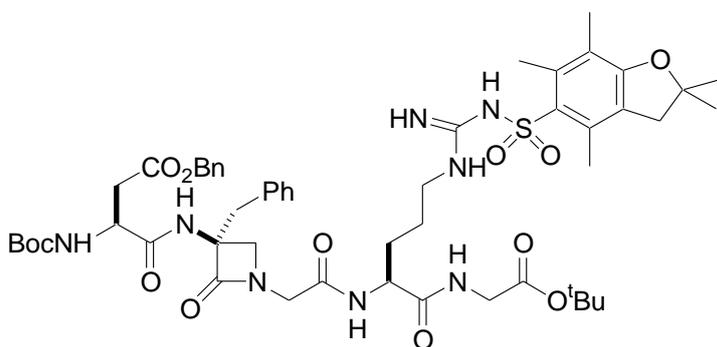
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3465, 3343, 1743, 1668
---------------------------	------------------------

MS m/z	
--------	--

¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃		¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃		
7.65 (1H, s) NH Arg	2.93 (2H, s) CH ₂ Pbf	172.0	127.7	25.3
7.42c(1H, t, J=5.4 Hz) NH Gly	2.58 (3H, s) Me Pbf	168.7	127.3	19.2
7.24- 6.98 (15H, m) arom.	2.51(3H, s) Me Pbf	167.2	125.9	17.9
6.28 (1s) NH guanidina	2.07(3H, s) Me Pbf	167.1	124,5	12.4
6.04 (1H, d, J= 7.3 Hz) CH oxaz.	2.00 (1H, m) CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	158.5	117.3	
5.25 (1H, d, J= 7.8 Hz) CH oxaz.	1.82 (1H, m) CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	157.3	86.2	
4.45 (1H, m) Hα Arg	1.64 (2H, m) CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂	156.2	81.4	
3.93 (1H, d, J=5.9 Hz) CH ₂ β-lact	1.44 (6H, s) 2 X Me Pbf	138.3	81.5	
3.87 (2H, d, J=5.9 Hz) CH ₂ -COOtBu	1.42 (9H, s) tBu	134.8	70.8	
3.80 (1H, d, J= 17.6 Hz) CH ₂ -CO-NH-Arg		133.1	53.3	
3.27 (2H, m) CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -		133.0	51.6	
3.19 (1H, d, J= 13.2 Hz) CH ₂ -Ph		132.9	45.2	
3.18 (1H, d, J= 17.6 Hz) CH ₂ -CO-NH-Arg		132.2	43.2	
3.13 (1H, d, J=5.9 Hz) CH ₂ β-lact		130.0	42.1	
2.96 (1H, d, J= 13.7 Hz) CH ₂ -Ph		128.0	40.6	
		128.8	37.1	
		128.4	29.0	
		128.2	28.5	
		128.0	28.0	

Observaciones:

Boc-Asp(OBn)-[(3S)-3-amino-3-bencil-azetidin-2-o-1-ila]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OtBu



N° Referencia
50

P. M. (g/mol)

1061.25

Punto de fusión (°C)

111-115

$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, Cl₂CH₂)

- 66.7

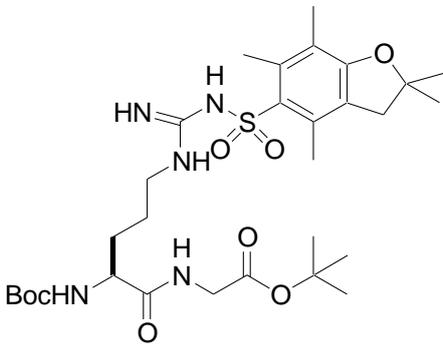
Formula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C₅₃H₇₂N₈O₁₃S	C 59.89	H 6.838	N 10.56	C 60.31	H 6.836

IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3435, 3344, 1748, 1664, 1550.
---------------------------	-------------------------------

HPLC-MS Tipo de fuente iónica: ESI*	MS: 1061.4 MS2 (1061.0): 1083.4, 1068.3, 106.4, 1005.2, 961.2, 905.2, 715.1, 679.2, 635.2 MS3 (905.0): 905.5, 904.6, 833.7, 715.0, 636.2, 567.1, 501.5, 436.3, 283.1
----------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃		¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃		
8.44 (1H, d, J= 7.3 Hz) NH i+3	3.16 (1H, d, J= 14.2 Hz) Hβ' i+1	172.2	124.4	25.5
7.3-7.28 (10H, m) arom	3.06 (1H, m) Hγ i+3	171.9	117.3	19.2
7.19 (1H, t, J= 5.9, 5.4 Hz)NH i+4	3.06 (1H, d, J= 13.7 Hz) Hβ' i+1	170.9	86.2	17.8
7.16 (1H, s) NH i+ 1	2.97 (1H, dd, J= 8.3, 16.6 Hz)Hβi	169.2	82.0	12.4
6.08 (s) NH guanidine	2.93 (2H, s) CH ₂ Pbf	168.6	80.8	
6.01 (1H, d, J= 8.8 Hz) NH i	2.73 (1H, dd, J= 4.4, 3.9, 7.11, 16.6 Hz) Hβi	167.7	68.4	
5.12 (1H, d, J= 12.2 Hz) OBn	2.57 (3H, s) Me Pbf	158.5	66.8	
5.04 (1H, d, J= 12.2 Hz) OBn	2.51 (3H, s) Me Pbf	156.1	53.0	
4.56 (1H, m) Hα i	2.08 (3H, s) Me Pbf	138.2	51.7	
4.51 (1H, m) Hα i+3	1.95 (1H, m) Hβ i+3	135.2	50.4	
4.14 (1H, d, J= 18.1 Hz) Hα i+2	1.70 (1H, m) Hβ i+3	133.3	45.4	
4.03(1H, dd, J=5.9, 17.6 Hz) Hα i+4	1.53 (2H, m) Hδ i+3	133.1	43.1	
3.78 (1H, d, J= 5.4 Hz) Hβ i+1	1.45 (9H, s) tBu	132.1	41.9	
3.65 (1H, dd, J= 4.4, 17.6 Hz) Hα i+4	1.44 (6H, s) 2 X eMe Pbf	129.7	40.4	
3.51 (1H, d, J= 6.8 Hz) Hβ i+1	1.43 (H, s) tBu	128.9	38.8	
3.49 (1H, d, J= 18.6 Hz) Hα i+2		128.5	35.1	
3.19 (1H, m) Hγ i+3		128.4	28.8	
		128.3	28.5	
		128.2	28.2	
		127.7	28.0	

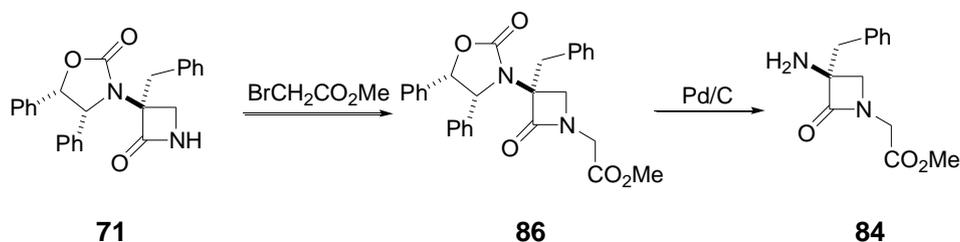
Observaciones: * MeOH/HCO₂H polaridad positiva.

Boc-Arg(Pbf)-Gly-O ^t Bu		N° Referencia 80				
		P. M. (g/mol)				
		639.80				
		P. F. (°C)				
		[α] _D ²⁵ (c= 1.0, Cl ₂ CH ₂)				
Formula Empírica C₃₀H₄₉N₅O₈S	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C	H	N	C	H	N
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3465, 3362, 1720, 1677,1625, 1560, 1456, 1367.					
HPLC-MS Tipo de fuente iónica: ESI*	MS: 640. 3 MS2 (640.0): 584.2, 540.2, 528.2, 484.2, 338.1, 294.1, 258.0, 241.1, 214.1, 197.0 MS3 (584.2): 484.1, 214. 1					
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			
7.32 (sa, 1H) NH amida			172.8	30.0		
6.31 (sa, 3H) NH guanidina			169.0	28.5		
5.56 (d, 1H, J= 8.1Hz) NHBoc			158.6	28.2		
4.26 (sa, 1H) CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂			156.4	27.9		
3.98 (dd, 1H, J= 5.8, 17. Hz) Gly			155.8	25.2		
3.81 (dd, 1H, J= 5.2, 5.9, 17.6, 18.2 Hz)			138.2	19.2		
Gly			132.7	17.8		
3.26 (m, 2H) CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂			132.1	12.3		
2.96 (s, 2H) CH ₂ Pbf			124.5			
2,57 (s, 3H) Me			117.4			
2.51 (s, 3H) Me			86.3			
2.09 (s, 3H) Me			81.9			
1.89 (sa, 1H) CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂			79.7			
1.64 (sa, 3H) CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂			53.7			
1.46 (s, 6H) 2 X Me			43.1			
1.44 (s, 9H) ^t Bu			41.8			
1.42 (s, 9H) ^t Bu			40.3			
Observaciones: * MeOH/HCO ₂ H polaridad positiva.						

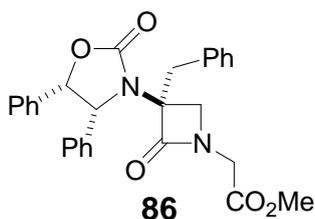
2.3.3 TERCERA DESCONEXIÓN (Ruta B)

2.3.3.1 Síntesis de la β -lactama

2.3.3.1.1 Síntesis de la (3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-ona (84).



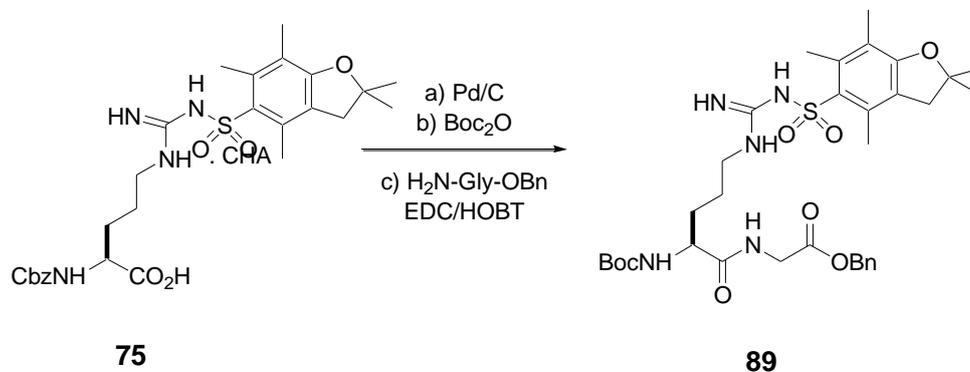
(3S)-3-Bencil-3-[(4R,5S)-difeníl-1,3-oxazolidín-2-oxo-3-il]-1-[metoxicarbonil]azetidín-2-ona **86**



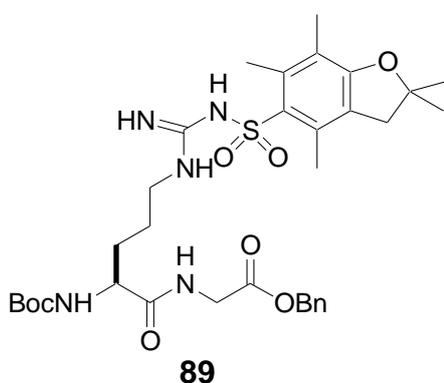
Sobre una disolución de (3S)-3-Bencil-3-[(4R,5S)-difeníl-1,3-oxazolidín-2-oxo-3-il]azetidín-2-ona **71** (0.91 g, 2.29 mmol), en acetonitrilo seco (34 mL) se adicionó el Cs_2CO_3 (0.82g, 2.52 mmol) (la suspensión tomó un color anaranjado) y bromoacetato de metilo (0.325 mL, 3.44 mmol) (la suspensión volvió a tomar el color amarillo inicial). La reacción se calentó a 70°C y se agitó durante 3.5h. Tras comprobar que no quedaba producto de partida (se analizó una alícuota por RMN), se filtró la suspensión sobre celita y se lavó la celita con EtOAc (50 mL). La fase orgánica se trató con H_2O (2 X 30 mL). El crudo se purificó mediante cromatografía en columna con gel de sílice con Hexano/EtOAc (1:1) como eluyente. Rendimiento 82% (0.88 g).

2.3.3.2 Protección y síntesis de los aminoácidos

2.3.3.2.1 Síntesis de Boc-Arg(Pbf)-Gly-OBn 89



Boc-Arg(Pbf)-Gly-OBn 89



Se disolvieron (5.0g, 7.58 mmol) de Z-Arg(Pbf)-OH.CHA en una mezcla de EtOAc (35 mL) y ácido cítrico al 5% (25 mL). La fase orgánica se decantó y se lavó sucesivamente con H₂O (25 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (25 mL), se secó sobre MgSO₄ y se evaporó el disolvente a presión reducida.

Así se obtuvo el ácido libre con un rendimiento del 90% (3.83 g, 6.84 mmol). Posteriormente se hidrogenó en metanol (40 mL) con Pd/C (0.383 g) a presión atmosférica de H₂ y temperatura ambiente, durante 16h. Pasado ese tiempo, la suspensión fue filtrada sobre celita y la disolución obtenida fue evaporada a presión reducida. (2.71g, 93% en la hidrogenación, 84% global).

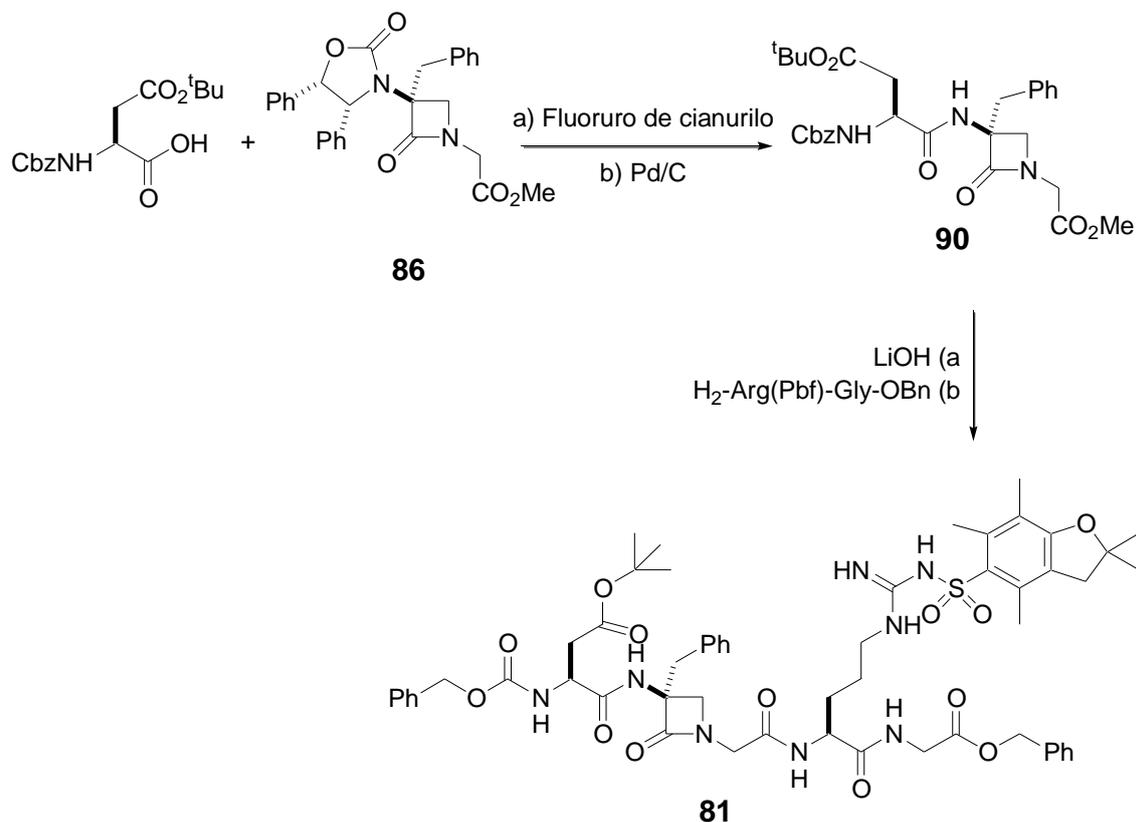
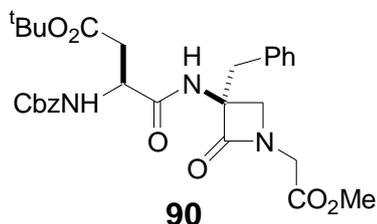
Se disolvió el aminoácido libre (2.71g, 6.37 mmol) en una mezcla de 7 mL de H₂O, que contiene NaOH (0.28 g, 7.02 mmol) y ^tBuOH (4.78 mL). Sobre la disolución resultante se añadió bicarbonato de di-*terc*-butilo (1.53 g, 7.02 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16h. Pasado ese tiempo se acidificó con una

disolución de KHSO_4 (1M) hasta pH 1-1.5 (se observó formación de CO_2) y el producto se extrajo con EtOAc (3 X 20mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y se diluyó hasta un volumen de 5mL aproximadamente y se añadió ciclohexilamina (0.644 mL, 6.37 mmol). Sobre la disolución resultante se añadió éter etílico, para hacer precipitar la sal pura (3.03 g, 76%).

El tosilato del éster bencílico de la glicina (1,96 g, 5.80 mmol) en se disolvió 20 mL de CH_2Cl_2 y sobre la solución se adicionó una disolución saturada de NaHCO_3 (15 mL). Se decantó la fase orgánica y la fase acuosa se volvió a lavar con CH_2Cl_2 (2 X 15 mL). Las fases orgánicas se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron en el rotavapor para dar la amina libre (0.96 g, 100%) que se utilizó en la siguiente reacción sin mayor purificación.

Se disolvieron entonces la Boc-Arg(Pbf)-OH (2.55 g, 4.84 mmol) y el éster bencílico de la glicina (0.96 g, 5.80 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (50 mL). La mezcla se enfrió a 0°C y sobre ella se añadió EDCI (1.30 g, 6.78 mmol) y HOBT (0.785 g, 5.81 mmol) y la reacción se agitó bajo atmósfera de N_2 durante 16h y se lavó sucesivamente con HCl (0.1M) (2 X 10 mL) y una disolución saturada en NaHCO_3 (2 X 10 mL). Tras secar la fase orgánica sobre MgSO_4 y evaporar el disolvente a presión reducida, el producto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1) como eluyente obteniéndose el producto **89** puro (1.73 g, 54%).

2.3.3.3 Ensamblaje del peptidomimético lineal

2.3.3.3.1 *Cbz-Asp(O^tBu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn 81****Cbz-Asp(O^tBu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-OMe 90***

Formación del fluoruro de ácido:(Ref. 85, pag. 184) Se enfrió, a -20°C y bajo atmósfera de N_2 , una disolución de *Cbz-Asp(O^tBu)* (1.61 g, 4.99 mmol) en CH_2Cl_2 seco (40 mL). Se añadió la piridina (0.403 mL, 4.99 mmol),

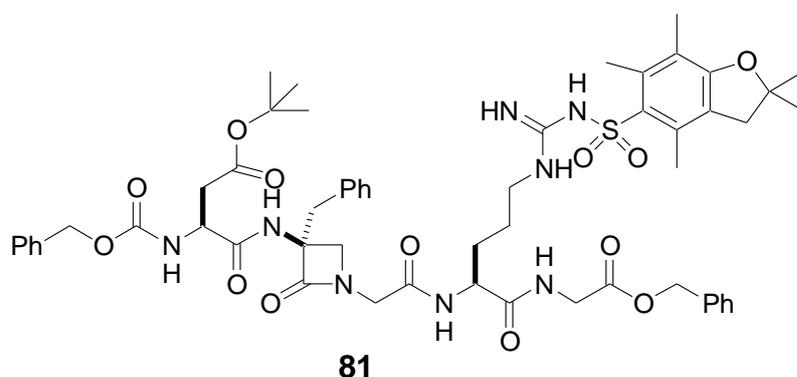
y por último se goteó el fluoruro de cianurilo (2.16 mL, 24.95 mmol). La reacción se agitó durante 1.5h a dicha temperatura y se vertió sobre agua y hielo. Se decantó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 X 15 mL). Las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 y se evaporó el disolvente a presión reducida. Obtuvimos el

producto **90** (1.62g, 100%) y se utilizó en la siguiente reacción sin mayor purificación. $^1\text{H-RMN}$ (δ , ppm, CDCl_3): 7.37 (m, 5H) Ph, 5.76 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz) CbzNH, 5.16 (s, 2H) OBn, 4.84 (m, 1H) CH-CH₂, 3.01 (dd, 1H, $J = 4.4, 17.6$ Hz) CH-CH₂-CO₂^tBu, 2.79 (dd, 1H, $J = 3.9, 4.6, 17.6, 16.9$) CH-CH₂-CO₂^tBu, 1.45 (s, 9H) -O^tBu.

Formación de la amina: Una suspensión de la ((3S)-3-bencil-3-[(4R,5S)-difeníl-1,3-oxazolidin-2-oxo-3-il]-1-[(metoxicarbonil)metil]-azetidín-2-ona **86** (1.48 g, 3.14 mmol) y Pd sobre carbono (295 mg) en etanol se agitó durante 24h a una presión de 150 psi. de H₂ y 40° C. Pasado ese tiempo la mezcla se filtró sobre celita y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo (1.30 g, 97%), que contenía un equivalente de 1,2-difeniletano, se utilizó sin purificar en la reacción de acoplamiento peptídico.

Acoplamiento peptídico: Sobre una disolución de ((3S)-3-amino-3-bencil-1-[(metoxicarbonil)metil]azetidín-2-ona conteniendo 1 equivalente de 1,2-difeniletano como subproducto (1.30g, 3.02mmol, peso de la mezcla) y N-metilmorfolina destilada (0.83 mL, 7.55 mmol) en diclorometano seco (20 mL) a 0°C, se goteo una disolución de Cbz-Asp(O^tBu)-F (1.62g, 4.99 mmol) en diclorometano seco (20 mL). La reacción se agitó durante 16h dejando que alcanzara lentamente la temperatura ambiente. Una vez terminada, se lavó consecutivamente con HCl (0.1M) (2 X 20 mL) y con una disolución saturada en NaHCO₃ (2 X 20mL). El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando una mezcla de Hexano/EtOAc (1:1) como eluyente. Rendimiento (1.08g, 65%).

Cbz-Asp(O^tBu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn **81**



Formación del ácido: Sobre una disolución de Cbz-Asp(O^tBu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-OMe **90** (0.3 g, 0.54 mmol)

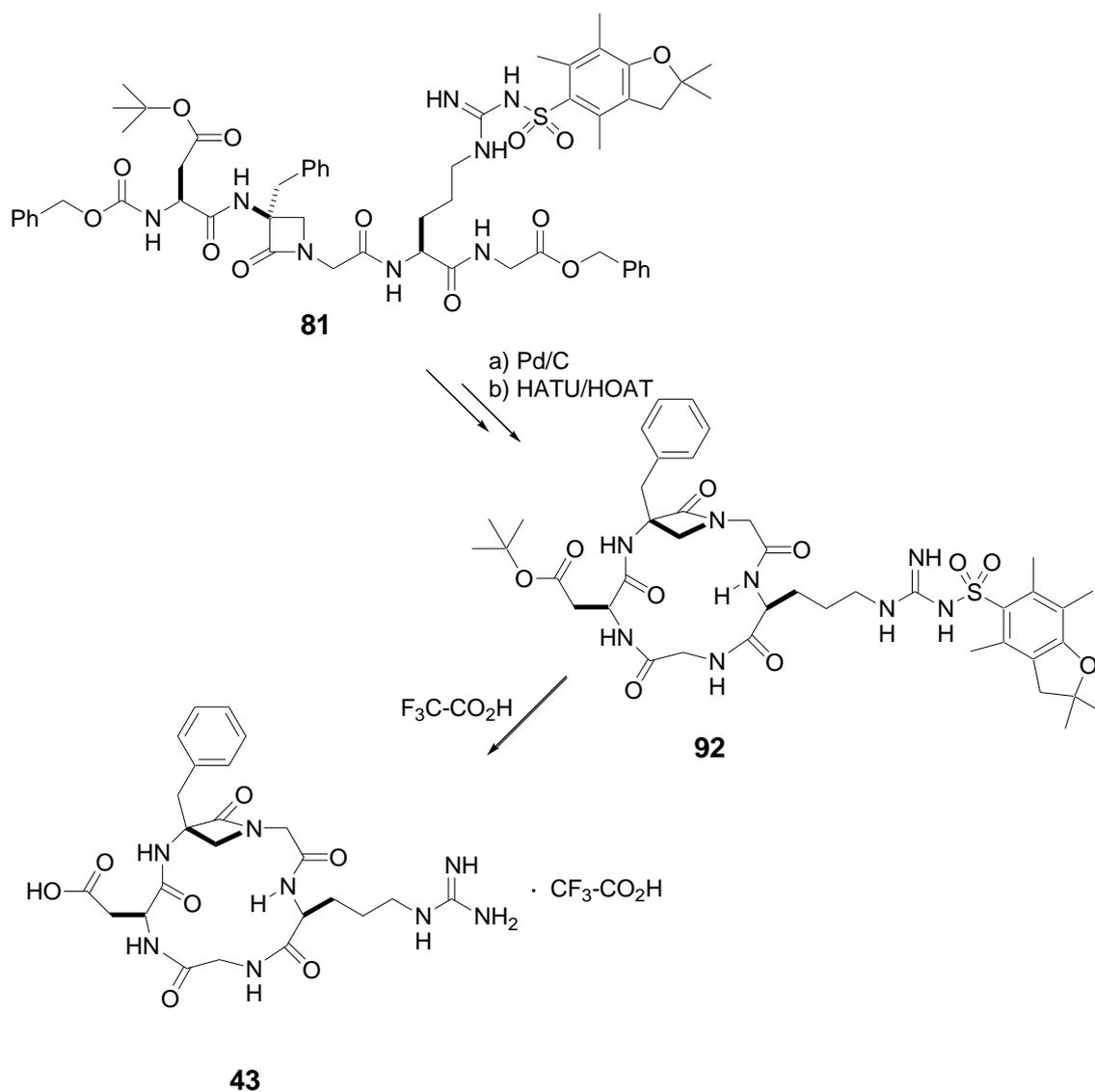
en THF (10 mL) a 0°C se añadió una disolución de LiOH.H₂O (34 mg, 0.81 mmol) en H₂O (5 mL). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 1h. Tras comprobar que la reacción ya había finalizado (TLC Hexano/EtOAc (1:1)) la mezcla se acidificó con ácido cítrico al 5%, se evaporó el THF a presión reducida, y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (3 X 5 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se evaporó a presión reducida. (0.291 g, 100%).

Formación de la amina: Una disolución del dipéptido Boc-Arg(Pbf)-Gly-OBn **89** (0.357g, 0.54 mmol) en ácido fórmico del 97% (3.5 mL) se agitó a temperatura ambiente y bajo atmósfera de N₂. Pasadas 2h y tras comprobar que no quedaba producto de partida (TLC, CH₂Cl₂/MeOH (20:1)) se evaporó el ácido fórmico en el rotavapor. El crudo se disolvió en CH₂Cl₂ (5 mL) y una disolución saturada de NaHCO₃ (5 mL), se decantó la fase acuosa que, además fue extraída con CH₂Cl₂ (2 X 5 mL). Tras secar las fases orgánicas combinadas con MgSO₄ y evaporar el disolvente a presión reducida (0.293 g, 95.5 %), el H-Arg(Pbf)-Gly-OBn crudo obtenido se utilizó directamente en la siguiente reacción.

Acoplamiento peptídico: En un matraz flameado bajo atmósfera de nitrógeno, se vertió con una disolución del ácido Cbz-Asp(O^tBu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-OH (0.54 mmol, 0.291 g) y la amina H-Arg(Pbf)-Gly-OBn (0.52 mmol, 0.293g) en CH₂Cl₂ (20 mL). Sobre la disolución se adicionaron consecutivamente trietilamina (1.04 mmol, 0.145 mL), EDC (0.16 g, 0.835 mmol) y HOBT (0.99 g, 0.73 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 20h. Transcurrido este tiempo se lavó la mezcla con una disolución 0.1 M de HCl (2 X 10 mL) y con una disolución saturada NaHCO₃ (2 X 10 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄ y se evaporó a presión reducida obteniéndose un crudo que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con una mezcla de MeOH: CH₂Cl₂ (1:25) (0.569 g, 82%). Una pequeña fracción fue purificada por HPLC preparativo para su caracterización. (Columna cromatográfica Licrhosorb-Si60, eluyente CH₂Cl₂/ ⁱPrOH 20:1).

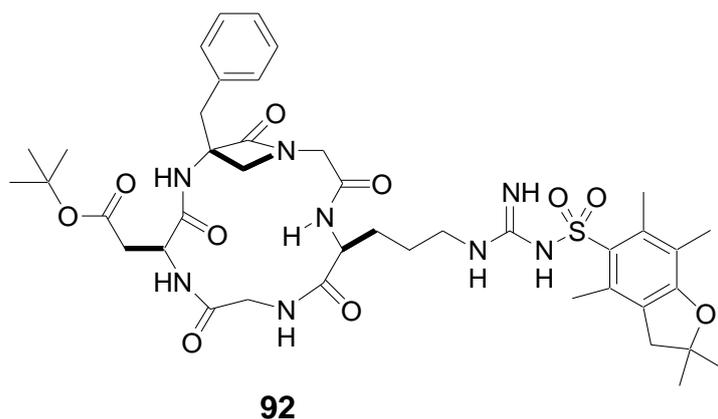
2.3.3.4 Ciclación y desprotección

2.3.3.4.1 Síntesis de trifluoroacetato de ciclo{Asp-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg-Gly} 43



Ciclo{Asp(O^tBu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly} **92**¹⁰⁸

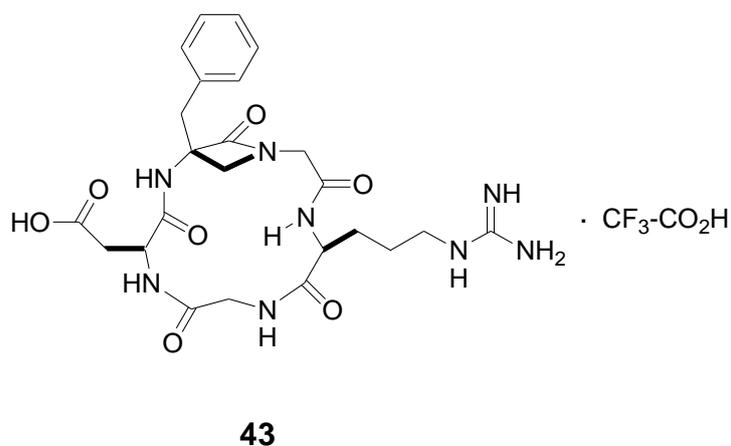
¹⁰⁸ L. Belvisi, A. Bernardi, A. Checchia, L. Manzini, D. Potenza, C. Scolastico, M. Castorina, A. Cupelli, G. Giannini, P. Carminati, C. Pisano, *Org. Lett.*, **2001**, 3, 1001-1004.



Se agitó una suspensión de la Cbz-Asp(O^tBu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn **81** (86 mg, 0.08 mmol), y Pd sobre carbono (9 mg) en etanol (5 mL) bajo presión atmosférica de H₂ durante

16h. Pasado ese tiempo y tras analizar una alícuota por RMN (DMSO-d₆) para comprobar que la reacción había finalizado, se filtró la mezcla a través de celita y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo así obtenido (70 mg, 0.073 mmol, 92 % rendimiento) se disolvió en DMF (seca) (20 mL) a 0°C y, bajo atmósfera de N₂, se le adicionaron consecutivamente HATU (44 mg, 0.073 mol), HOAT (14 mg, 0.102 mmol) y DIPEA (0.076 ml, 0.44 mmol, 6 eq.). La reacción se agitó durante 30 min. a 0°C, tras los cuales se midió el pH de reacción cada hora humedeciendo una tira de papel pH y añadiendo una gota de la reacción sobre ella. Pasadas 6h y siendo el pH=7-8 se añadió otro equivalente de DIPEA (0.013 mL, 0.073 mmol) para mantener la reacción a pH = 8-9. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente un total de 20h, se evaporó el disolvente a presión reducida, a una temperatura inferior a los 50 °C. El crudo se disolvió en EtOAc (5 mL) y se lavó con una disolución de NaHCO₃ al 5%. El producto obtenido por evaporación del EtAcO se purificó mediante cromatografía en placa fina eluyendo con MeOH/CH₂Cl₂ (1:10) (17.4 mg, 28%).

Trifluoroacetato de ciclo{Asp-[(3S)-3-amino-3-bencil-azetidín-2-ona]-Gly-Arg-Gly} **43**

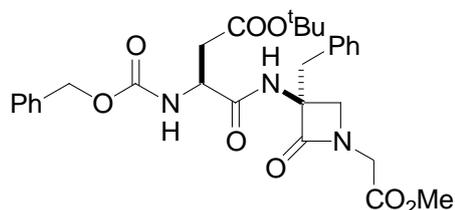


Se agitó una disolución de ciclo{Asp(O^tBu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-

on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly} **92** (17.7 mg, 0.02 mmol) en ácido trifluoroacético (0.3 mL) a 35 °C y durante 1h. Pasado ese tiempo, se adicionó diisopropiléter (10 mL) para hacer precipitar el producto final y la suspensión se centrifugó. El residuo se lavó con más diisopropiléter (2 X 5mL) y el producto se secó a presión reducida. Se obtuvieron 16 mg de producto, rendimiento calculado con un equivalente de ácido trifluoroacético: 117 %.

Boc-Arg(Pbf)-Gly-OBn		N° Referencia 89				
		P. M. (g/mol)				
		673,82				
		P. F. (°C)				
		85-87				
		[α] _D ²⁵ (c= 1.0, Cl ₂ CH ₂)				
Formula Empírica C₃₃H₄₇N₅O₈S	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C 58.82	H 7.030	N 10.39	C 54.61	H 5.961	N 9.424
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3446, 3343, 1752, 1682, 1555, 1456, 1390 cm ⁻¹					
HPLC-MS Tipo de fuente iónica: ESI*	MS: 674.2 MS2: (674.0): 675.2, 618.1, 574.2, 453.1, 428.1, 384.1, 367.0, 348.1, 304.2					
¹ H-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			¹³ C-NMR (δ, ppm) CDCl ₃			
7.42 (1H, b.s.) Boc-NH-Arg			173.0	43.2		
7.33 (5H, m) Arom.			170.0	41.2		
6.14 (3H, b.s) NH-guanidina)			158.8	40.4		
5.46 (1H, b.s) NH amida			156.4	34.3		
5.15 (2H, s) -OCH ₂ Bn			155.9	30.3		
4.28 (1H, m) CH-(CH ₂) ₃			138.3	29.6		
4.15 (1H, dd, J=5.9, 17.6 Hz) NH-CH ₂ -CO			135.2	28.5		
3.97 (1H, dd, J= 5.9, 5.4, 17.6, 18.1 Hz) NH-CH ₂ -CO			132.7	28.3		
3.27 (2H, m) CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -			132.2	25.1		
2.95 (2H, s) CH ₂ (Pbf)			128.6	19.2		
2.58 (3H, s) Me(Pbf)			128.4	17.9		
2.51(3H, s) Me(Pbf)			124.6	12.4		
2.10(3H, s) Me(Pbf)			117.5			
1.90 (2H, m) CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂			86.4			
1.68(2H, m) CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂			79.9			
1.46 (6H, s) 2X Me(Pbf)			76.6			
1.42 (9H, s) Boc			67.1			
			53.6			
Observaciones: * MeOH/HCO ₂ H, polaridad positiva.						

Cbz-Asp(O^tBu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-OMe



Nº Referencia
90

P. M (g/mol)

553.60

Punto de Fusión (°C)

sirupo

$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, Cl₂CH₂)

Fórmula Empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C	H	N	C	H	N
	62.92	6.37	7.59			

IR (KBr, cm⁻¹)

HPLC-MS

Fuente de iones

tipo: ESI*

MS : 554.1

MS2 (554.0) : 554.1, 526.1, 498.1, 453.2, 397.1

MS3 (498.0) : 470.1, 397.1

¹H-NMR (δ, ppm) CDCl₃

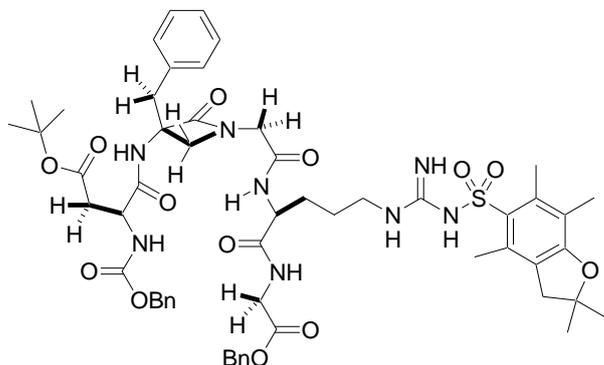
7.37- 7.26 (m, 10H, 2 X Ph)
 6.96 (s, 1H, **NH** amide)
 5.84 (d, 1H, J= 8.31 Hz, Cbz-**NH**)
 5.12 (d, 1H, J= 12.2 Hz, -O-**CH**₂-Ph)
 5.08 (d, 1H, J= 12.2 Hz, -O-**CH**₂-Ph)
 4.49 (m, 1H, **CH**-CH₂-COO^tBu)
 4.12 (d, 1H, J= 17.6Hz, **CH**₂-COOMe)
 3.78 (d, 1H, J= 18.1Hz, **CH**₂-COOMe)
 3.69 (s, 3H, COOMe)
 3.67 (d, 1H, J= collapsed, CH₂, β-lactam)
 3.62 (d, 1H, J= 4.9 Hz, CH₂, β-lactam)
 3.26 (d, 1H, J= 14.2 Hz, Bn)
 3.20 (d, 1H, J= 12.7 Hz, Bn)
 2.86 (dd, 1H, J= 17.1, 4.4 Hz, **CH**₂-COO^tBu)
 2.58 (dd, 1H, J= 17.1, 16.6, 6.3, 5.9 Hz, **CH**₂-COO^tBu)
 1.41 (s, 9H, **t**Bu)

¹³C-NMR (δ, ppm) CDCl₃

170.6 52.2
 170.5 52.1
 168.3 51.2
 167.9 42.7
 155.9 39.0
 135.9 37.1
 134.5 27.9
 130.0
 128.6
 128.5
 128.3
 128.1
 127.3
 82.0
 68.4
 67.3

Observaciones: * MeOH/HCO₂H, polaridad positiva.

Cbz-Asp(OtBu)-[(3S)-3-amino-3-bencil-azetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn

N° Referencia
81

P. M. (g/mol)

1095.27

Punto de Fusión (°C)

 $[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, Cl₂CH₂)

Fórmula empírica	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimental (%)		
	C₅₆H₇₀N₈O₁₃S	C 61.41	H 6.44	N 10.23	C	H

IR(cm⁻¹,KBr)

3456, 3343, 1757 (bs), 1663, 1550, 1461

HPLC-MS

Fuente de iones
tipo: ESI*

MS : 1095.3

MS2 (1095.3) : 1119.2, 1117.2, 1098.2, 1097.3, 1096.2, 1095.3, 1029.3, 674.3

MS3 (1095.0) : 1095.2, 1039.2, 825.1, 769.2, 741.3, 643.2.

¹H-NMR (δ, ppm) DMSO

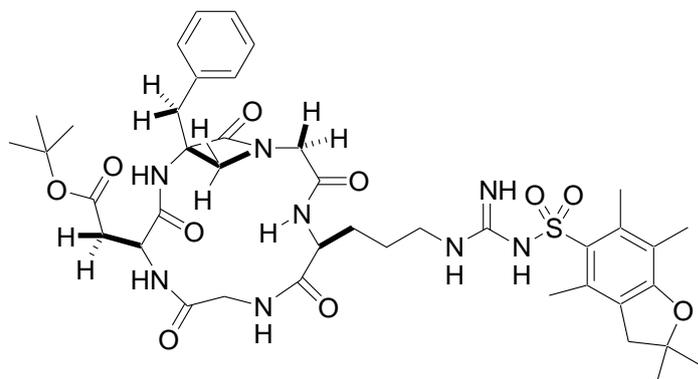
8.38 (1H, t, J=5.87Hz) NH (i+4)	3.50 (1H, d, J= 5.38Hz) (αi+1)
8.23 (1H, s) NH (i+1)	3.36 (1H, d, J=5.38Hz) (αi+2)
8.12 (1H, d, J=7.82Hz)NH (i+3)	3.20(1H, d, J= 14.18Hz) (βi+1)
8.50 (1H, d, J= 8.31Hz) NH (i)	3.09 (1H, d, J= 14.18Hz)(βi+1)
7.35-7.22 (m, 15H) arom	3.00 (2H, m, γi+3)
5.12 (2H, s) -OBn	2.92 (2H, s, Pbf)
5.06 (1H, d, J=12Hz) -OBn	2.53(1H, dd,J=
4.98 (1H, d, J=12Hz)-OBn	4.89,16.14Hz)(βi)
4.41 (1H, m) (αi)	2.48 (3H, s) MePbf
4.25 (1H, m) (αi+3)	2.42 (3H, s) MePbf
3.92 (1H, dd, J=5.87, 17.61Hz)	2.39(1H,dd,J=9.3,J=16.14Hz)(β
(αi+4)	i)
3.85(1H, dd, J=5.87, 17.61Hz)	1.99 (3H, s) MePbf
(αi+4)	1.66 (2H, m) (βi+3)
3.77 (1H, d, J= 17.11Hz) (αi+2)	1.49 (2H, m) (δi+3)
3.70 (1H, d, J= 17.11Hz) (αi+2)	1.40 (6H, s) 2 X Me Pbf
	1.34 (9H, s) ¹ Bu

¹³C-NMR (δ, ppm) CDCl₃

172.2	128.9	52.2
171.4	128.8	51.7
170.0	128.6	44.3
169.5	128.5	42.9
168.0	128.4	41.2
167.2	128.3	40.3
157.9	128.2	38.5
156.5	127.2	38.1
156.1	124.8	29.8
137.8	116.7	28.8
137.3	86.3	28.1
136.3	80.6	25.9
135.9	68.5	19.4
134.7	66.3	18.1
131.9	66.1	12.7
130.4	52.5	

Observaciones: * MeOH/HCO₂H, polaridad positiva

Ciclo{ Asp(OtBu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly }



Nº Referencia
92

P. M. (g/mol)

853,00

P. de Fusión (°C)

$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, Cl₂CH₂)

Formula Experimental	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimenta (%)		
	C	H	N	C	H	N
C₄₁H₅₆N₈O₁₀S	57,73	6,62	13,14			

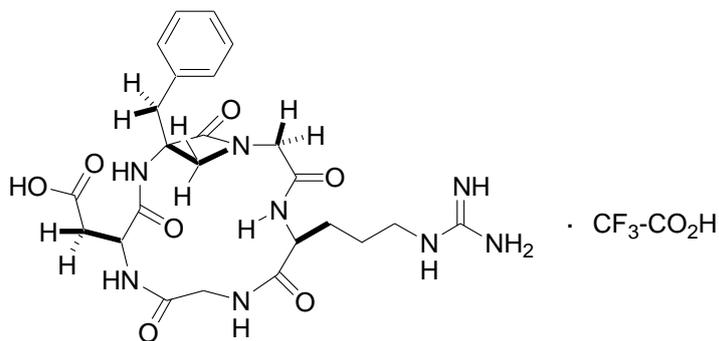
IR(cm ⁻¹ ,KBr)	3446, 3386, 1752, 1730, 1663, 1550, 1259, 1160, 1130
---------------------------	------------------------------------------------------

MS m/z	MALDI-TOF (M+K ⁺) 891.03, (M+Na ⁺) 875.05, M 853.02, 601.08
--------	-------------------------------------------------------------------------------------

¹ H-NMR (δ, ppm) DMSO		¹³ C-NMR (δ, ppm) DMSO		
8.62 (1H; t, J= 5.4 5.9) NH i+4 Gly	3.00 (2H, m) H _γ 1+3 Arg	172.2	128.6	41.2
8.35 (1H, s) NH i+1 β-lactama	2.85 (2H, s) CH ₂ Pbf	171.4	128.5	40.3
8.26 (1H, d, J= 7.8 Hz) NH i Asp	2.70 (1H, dd, J= 9.3, 16.1 Hz) H _β	170.0	128.4	38.5
8.11 (1H, d, J= 8.8 Hz) NH i+3 Arg	2.45 (3H, m) Me Pbf	169.5	128.3	38.1
7.28 – 7.11 (5H, m) Arom.	2.43 (1H, colapsada) H _β i	168.0	128.2	29.8
4.50 (1H; m) H _α i Asp	2.40 (3H, s) Me Pbf	167.2	127.2	28.8
4.17 (1H, m) H _α i+3 Arg	1.54 (1H, m) H _β i+3	157.9	124.8	28.1
3.93 (1H, dd, J= 6.3, 13.7 Hz) H _α i+4 Gly	1.46 (3H, m) H _β , δ i+3	156.5	116.7	25.9
3.75 (1H, d, J= 14.2 Hz) H _α i+2 Gly	1.40 (6H, s) 2 X Me Pbf	156.1	86.3	19.4
3.50 (1H, s) H ^β _R i+1	1.38 (9H, s) ^t Bu	137.8	80.6	18.1
3.50-3.11 (5H, m) H _α i+4, H _α i+2, H ^β _S i+1, -Bn		137.3	68.5	12.7
		136.3	66.3	
		135.9	66.1	
		134.7	52.5	
		131.9	52.2	
		130.4	51.7	
		128.9	44.3	
		128.8	42.9	

Comentarios:

Trifluoroacetato de ciclo{ Asp-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg-Gly }



Nº Referencia
43

P. M. (g/mol)

658,58

P. de Fusión (°C)

$[\alpha]_D^{25}$ (c= 1.0, Cl₂CH₂)

Formula Experimental	Microanálisis					
	Teórico (%)			Experimenta (%)		
	C	H	N	C	H	N
C₂₆H₃₃F₃N₈O₉	C 47.42	H 5.05	N 17.01			

IR(cm ⁻¹ ,KBr)	
---------------------------	--

MS m/z	
--------	--

¹ H-NMR (δ, ppm) D ₂ O	¹³ C-NMR (δ, ppm) D ₂ O ref. con acetona	
1.60 (m,2H,CH ₂) (γ i+3)	174.9	41.1
1.78 (dd,2H,CH ₂) (β i+3)	174.4	38.7
2.67 (dd,1H,CH ₂) (α i)	173.4	36.2
2.86 (dd,1H,CH ₂) (α i)	172.0	30.9
3,11 (d,1H,CH ₂) (β' i+1)	171.7	27.0
3.17 (t,2H,CH ₂) (δ i+3)	166.6	24.9
3.47 (d,1H,CH) (β' i+1)	157.4	
3.51 (d,1H,CH ₂) (α i+4), (α i+2)	135.5	
3,77 (d,1H,CH ₂) (α i+4), (α i+2)	130.3	
3.87 (d,1H,CH ₂) (α i+4), (α i+2)	129.2	
4.22 (d,1H,CH ₂) (α i+4), (α i+2)	128.1	
3.68 (d,1H,CH ₂) (β i+1)	65.2	
3.81 (d,1H,CH ₂) (β i+1)	56.2	
3.95 (dd,1H,CH ₂) (α i+3)	52.7	
4.54 (dd,1H,CH) (α i)	51.8	
7.03-7.28 (m,5H,arom.)	48.6	
	44.1	

Comentarios:

2.3.4 ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

2.3.4.1 Ensayo de Inhibición de la Adhesión Celular

Células endoteliales humanas HUVEC (ATCC Cat.No. EC304) fueron cultivadas hasta una confluencia del 80% y resuspendidas rápidamente utilizando 0.025% tripsina/EDTA (Sigma, USA). Las células fueron incubadas durante 20 minutos en medio DMEM (Gibco-BRL, USA) con el péptido cRGD **43**, a las concentraciones indicadas. Los experimentos se realizaron por triplicado en tres experimentos diferentes.

4×10^4 células pretratadas, fueron subcultivadas en 100 μ l de medio DMEM completo/pocillo sobre placas de cultivo con 96 multipocillos recubiertas de vitronectina durante 1 hora, e incubadas a 37°C y 5%-CO₂/96%-humedad, para permitir su adhesión. A continuación, los pocillos se lavaron tres veces con PBS para remover las células no adheridas. La determinación del número de células adheridas se realizó mediante tinción con el colorante fluorescente DAPI y contaje utilizando citometría de flujo (Becton Dickinson Co.). El porcentaje de células adheridas relativo al control sin tratar con el compuesto, se representó con la desviación estandar estadística en cada punto.

En este caso las células crecen adheridas a los pocillos recubiertos de vitronectina hasta una confluencia del 80% (recubrir el 80% de la superficie), luego se despegan con tripsina y quedan flotando. Después se transfieren a un tubo, donde se mezcla con el péptido y se les mantiene ahí durante 20 min. A continuación se les vuelve a transferir a los pocillos y se observa si se vuelven a adherir o no, de esa manera se mide la capacidad de bloqueo del péptido sobre los receptores. Los ensayos se realizan por triplicado, a cada concentración y en tres experimentos distintos (concentraciones de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9}).

2.3.4.2 Ensayo de inhibición del Crecimiento Celular

Células endoteliales humanas HUVEC (ATCC Cat.No. EC304) fueron subcultivadas sobre placas de cultivo con 96 multipocillos recubiertas de vitronectina durante 1 hora, e incubadas a 37°C y 5%-CO₂/96%-humedad, con medio DMEM

completo y suplementado con 10% de suero fetal. Una vez que las células se adhirieron se añadió el péptido RGD en un rango de concentraciones variable entre 10^{-4} M y 10^{-8} M.

Las células fueron cultivadas en las mismas condiciones de temperatura, CO₂ y humedad anteriores, durante 48, 72 y 96 horas. Los experimentos se realizaron por quintuplicado en dos experimentos diferentes.

A los tiempos indicados, las células se lavaron tres veces con solución salina (PBS) y a continuación se cuantificó el número de células de una manera idéntica a la descrita previamente en el Ensayo de Inhibición de la Adhesión Celular. El porcentaje de células relativo al control sin tratar con el compuesto **43**, se representó con la desviación estandar estadística en cada punto.

Este ensayo es de crecimiento celular, es un modelo de crecimiento que trata de simular el crecimiento de las paredes capilares durante el proceso de angiogénesis. Las células crecen inicialmente unidas a las paredes de las placas debido a que estas están recubiertas de vitronectina y las células sobreexpresan el receptor de esta proteína. De alguna forma el crecimiento celular está ligado a esta unión entre el receptor y la proteína, si perturbamos esta unión, mediante la introducción de una proteína que desplace a la vitronectina, el crecimiento se inhibe y las células dejan de crecer o su crecimiento se ralentiza. Algo similar a lo que ocurre con la inhibición de la angiogénesis en un organismo vivo.

Las células se cultivan, en cada pocillo, durante 1h y crecen adheridas al fondo ya que está recubierto de vitronectina, luego se les añade el tetrapéptido y se observa la mayor lentitud en la división, con respecto a los controles, donde no se ha adicionado el péptido. Cada experimento se hace por quintuplicado, para cada concentración (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) y luego se duplica todo para evitar, en lo posible, el error experimental.

Anexos del Capítulo 2

2.4: ANEXOS DEL CAPÍTULO 2

ANEXO 1: Cbz-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu 53

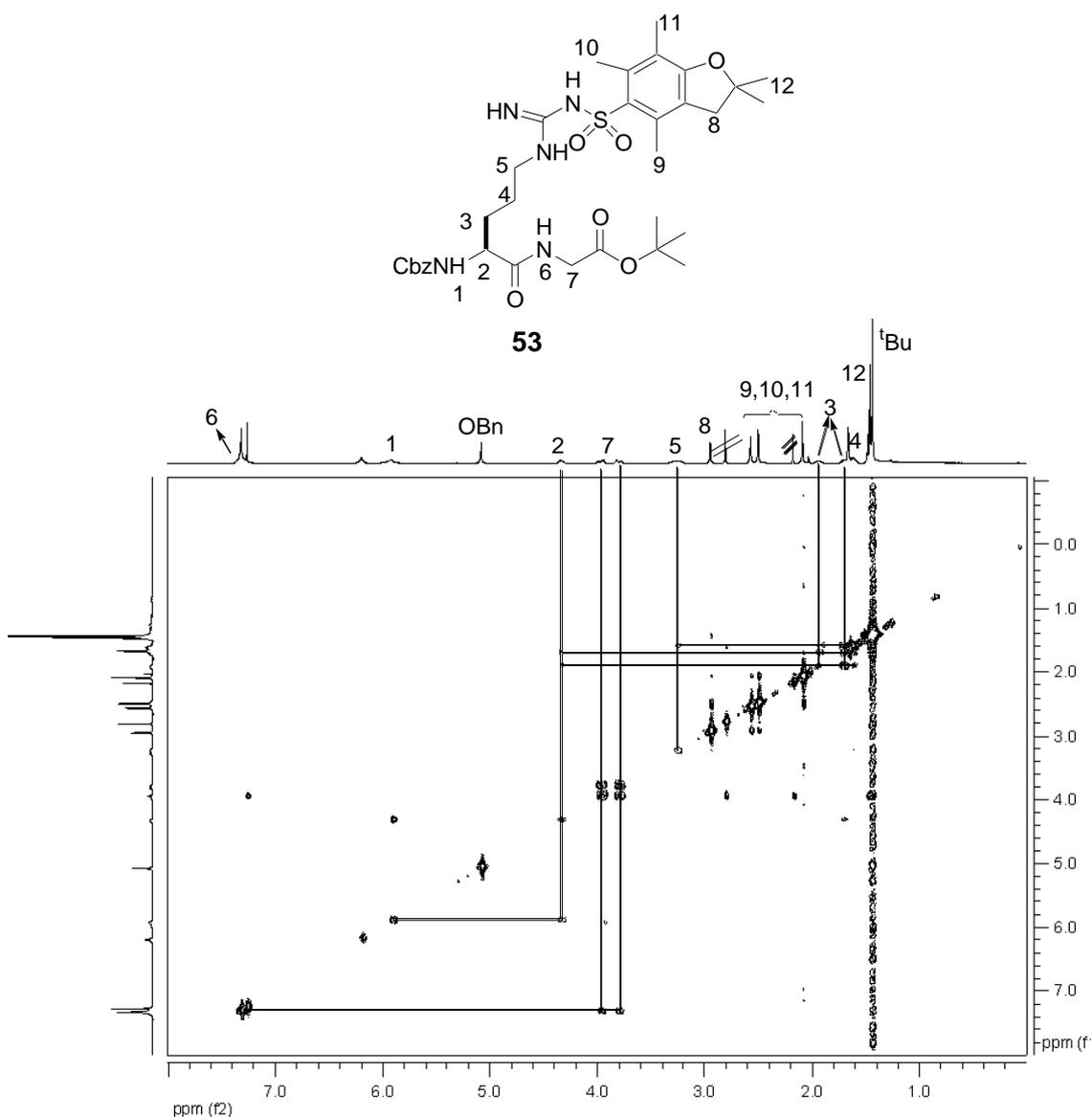


Figura 2. 72: Espectro COSY del compuesto 53 registrado en CDCl₃.

ANEXO 2: {(3S)-3-Bencil-3-[(4R,5S)-difeníl-1,3-oxazolidin-2-oxo-3-il]-azetidín-2-on-1-il}-Gly-Arg(Pbf)-Gly-tBu 64

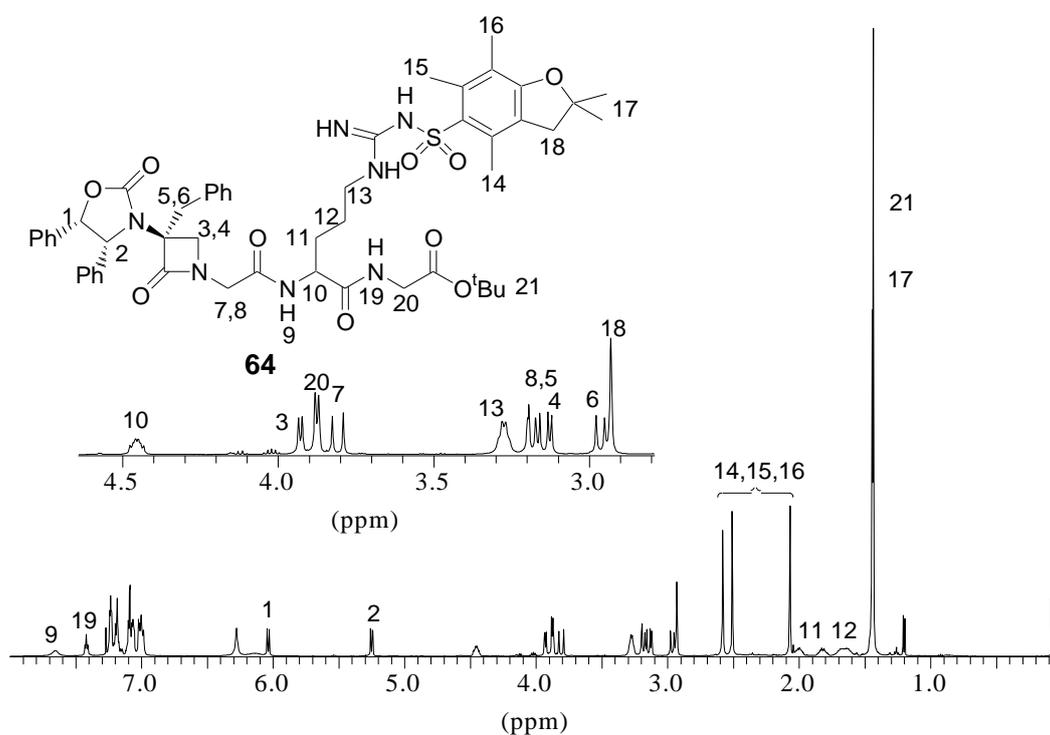


Figura 2. 73: ^1H -RMN del compuesto **64** y la correspondiente asignación de las señales.

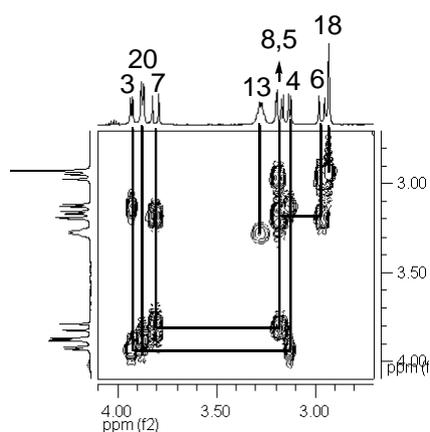


Figura 2. 74 Ampliación del espectro COSY del compuesto **64** realizado en CDCl_3 .

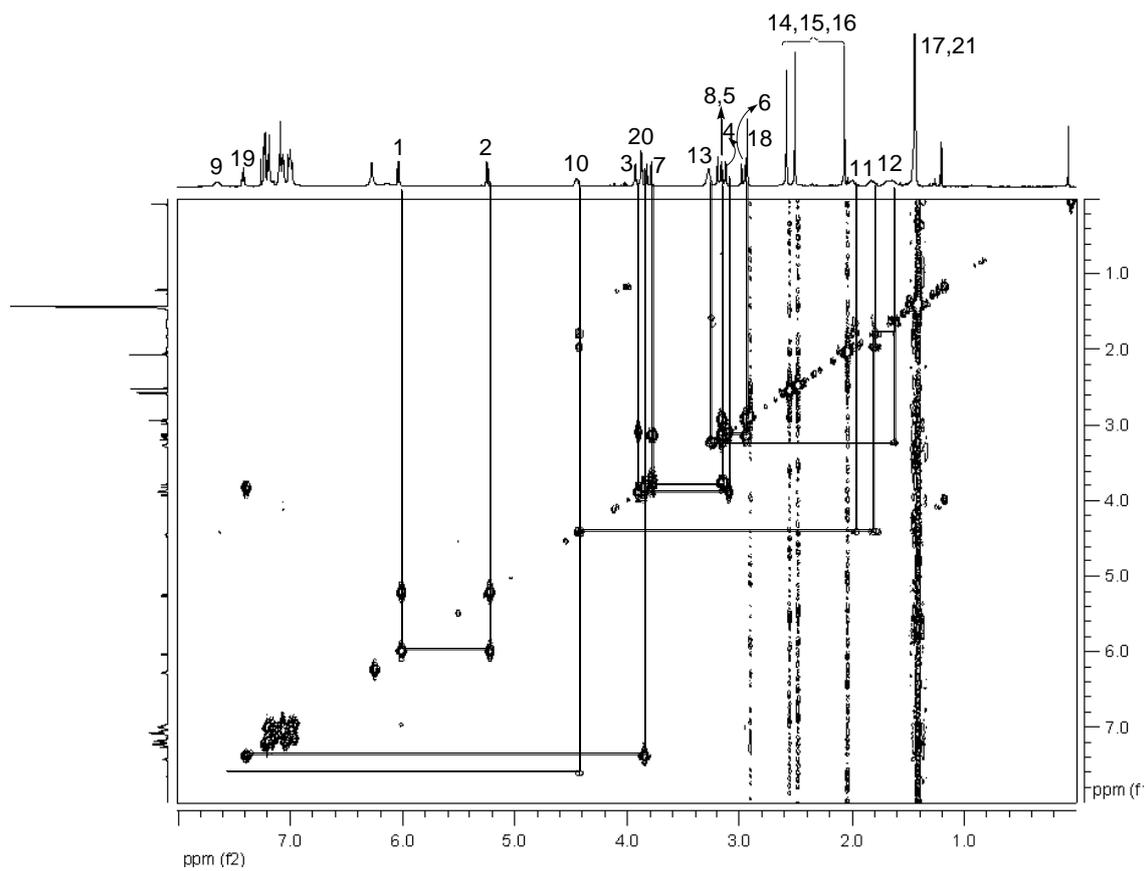


Figura 2. 75: Espectro COSY del compuesto **64** realizado en CDCl_3 .

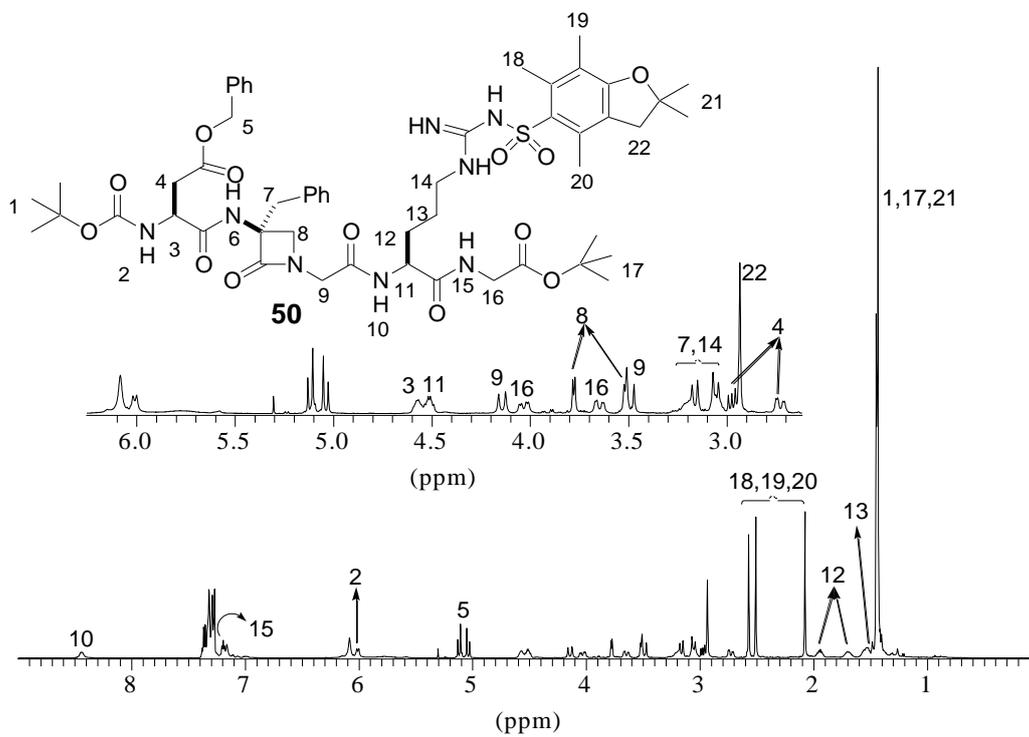
ANEXO 3: Boc-Asp(OBn)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O^tBu 50

Figura 2. 76: ¹H-RMN del compuesto **50** en CDCl₃

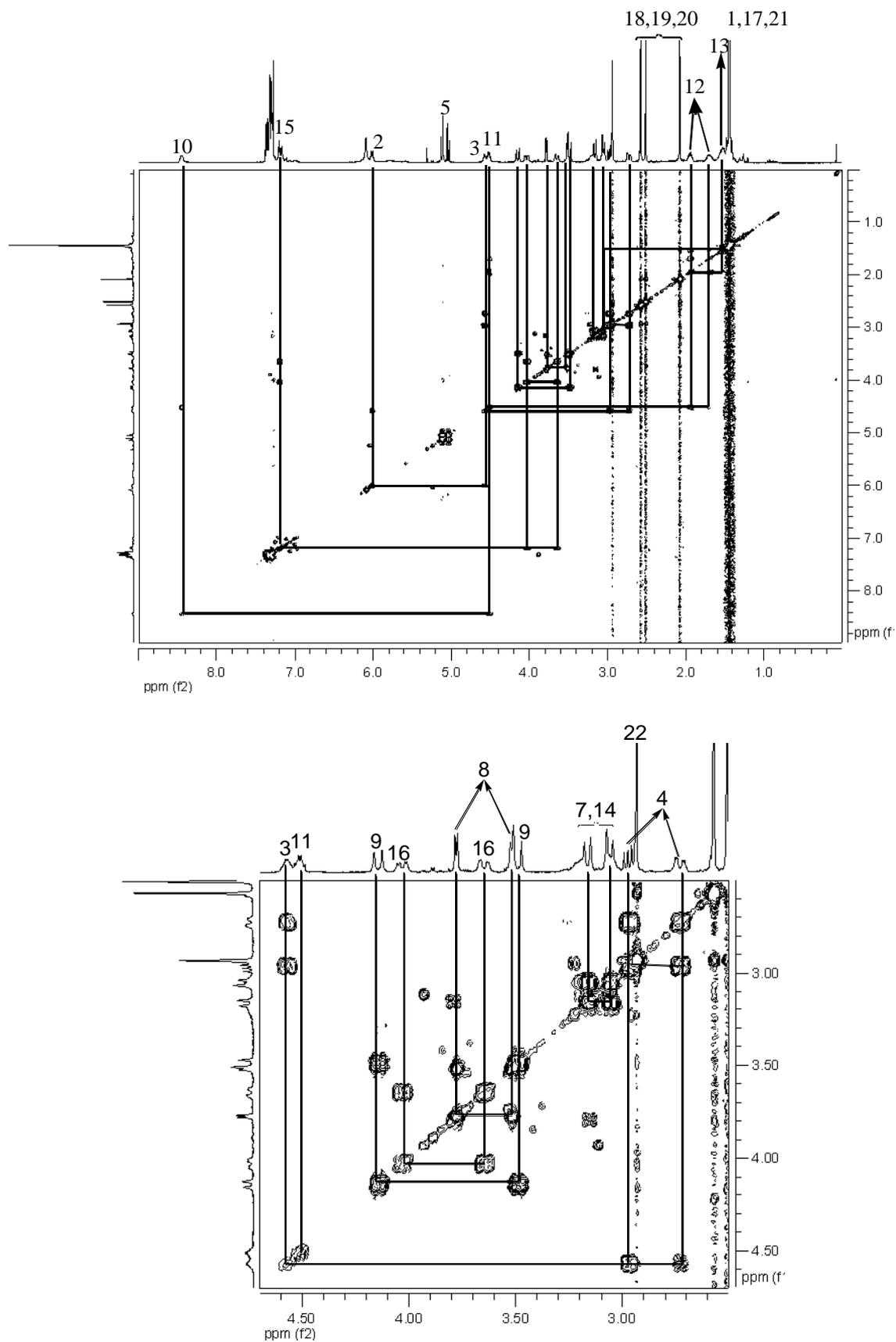
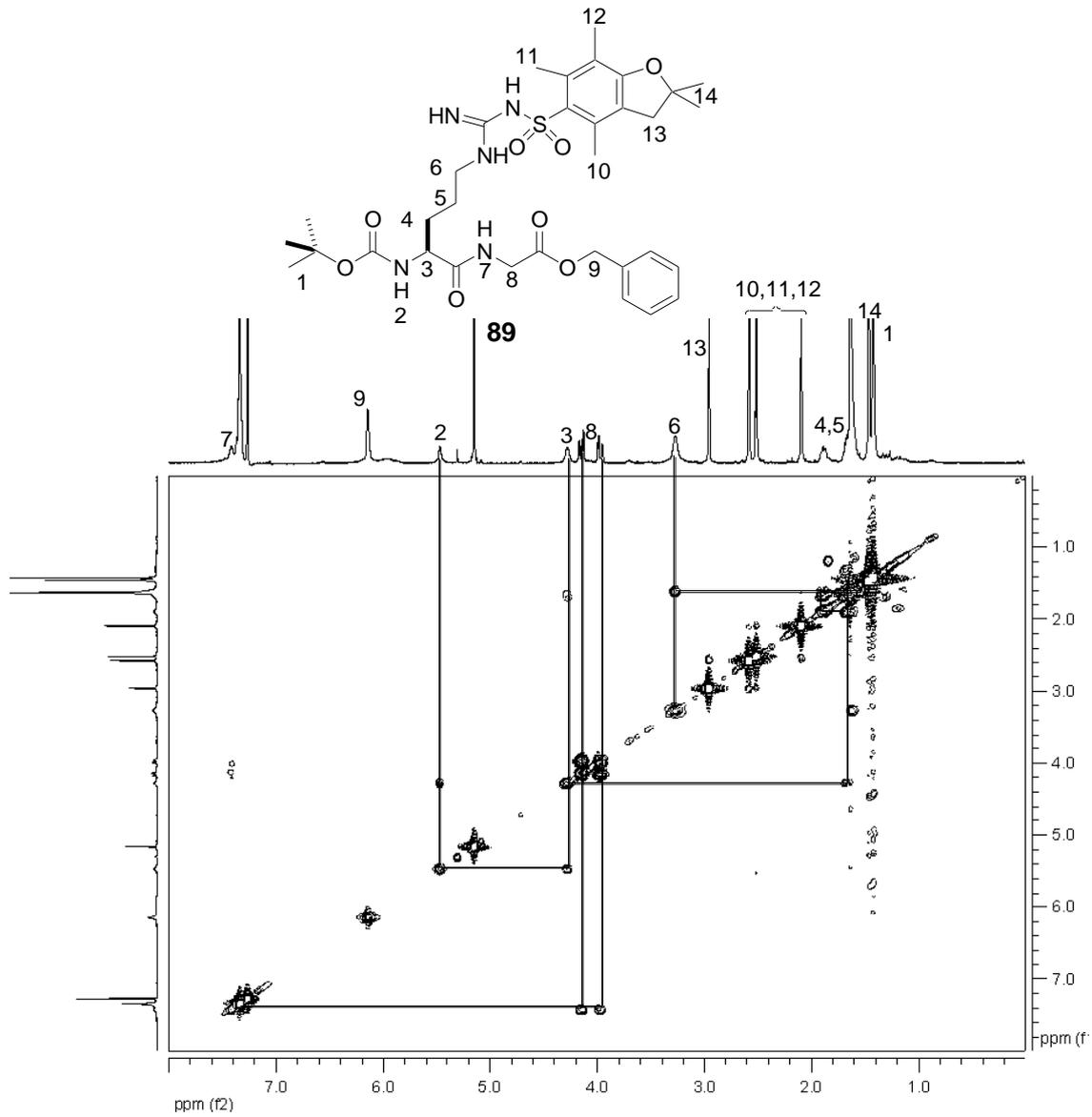


Figura 2. 77: Espectro de COSY y ampliación del espectro de COSY del compuesto 50

ANEXO 4: Boc-Arg(Pbf)-Gly-OBn 89**Figura 2. 78:** Espectro de COSY del compuesto **89**.

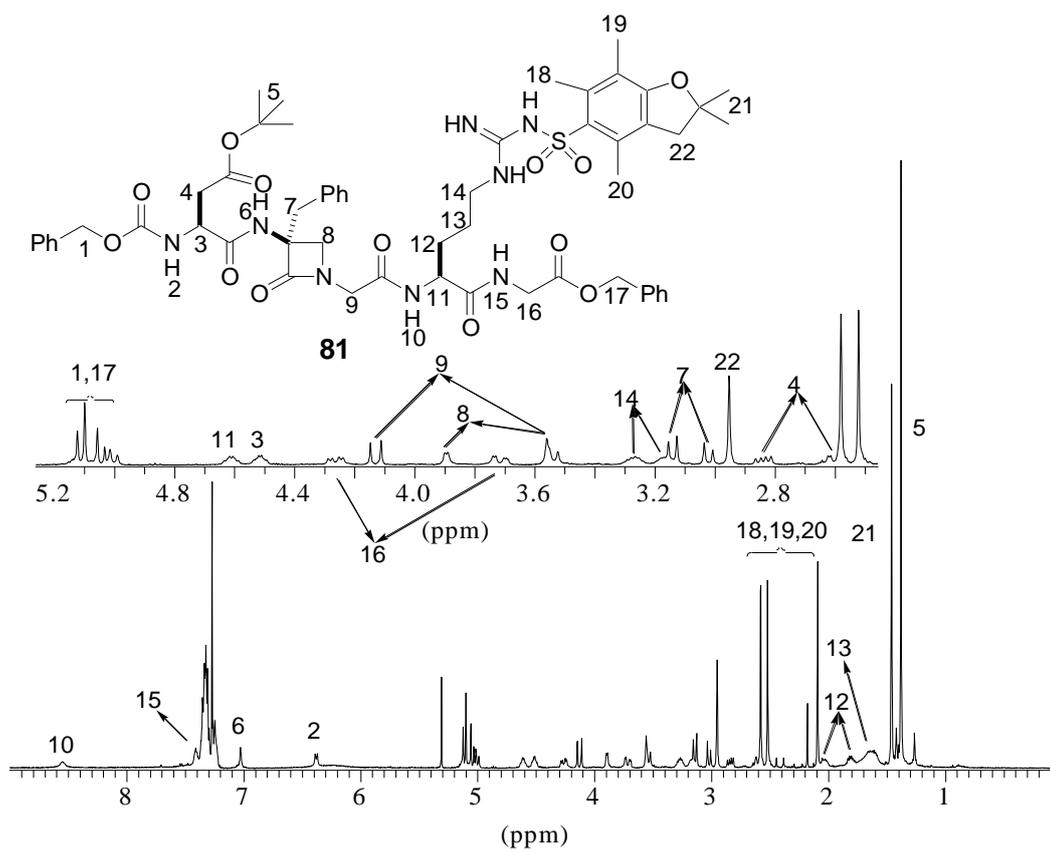
ANEXO 5: Cbz-Asp(O^tBu)-βLactam-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn 81

Figura 2. 79: Espectro ¹H-RMN y asignación de las señales correspondientes al compuesto **81** registrado en CDCl₃.

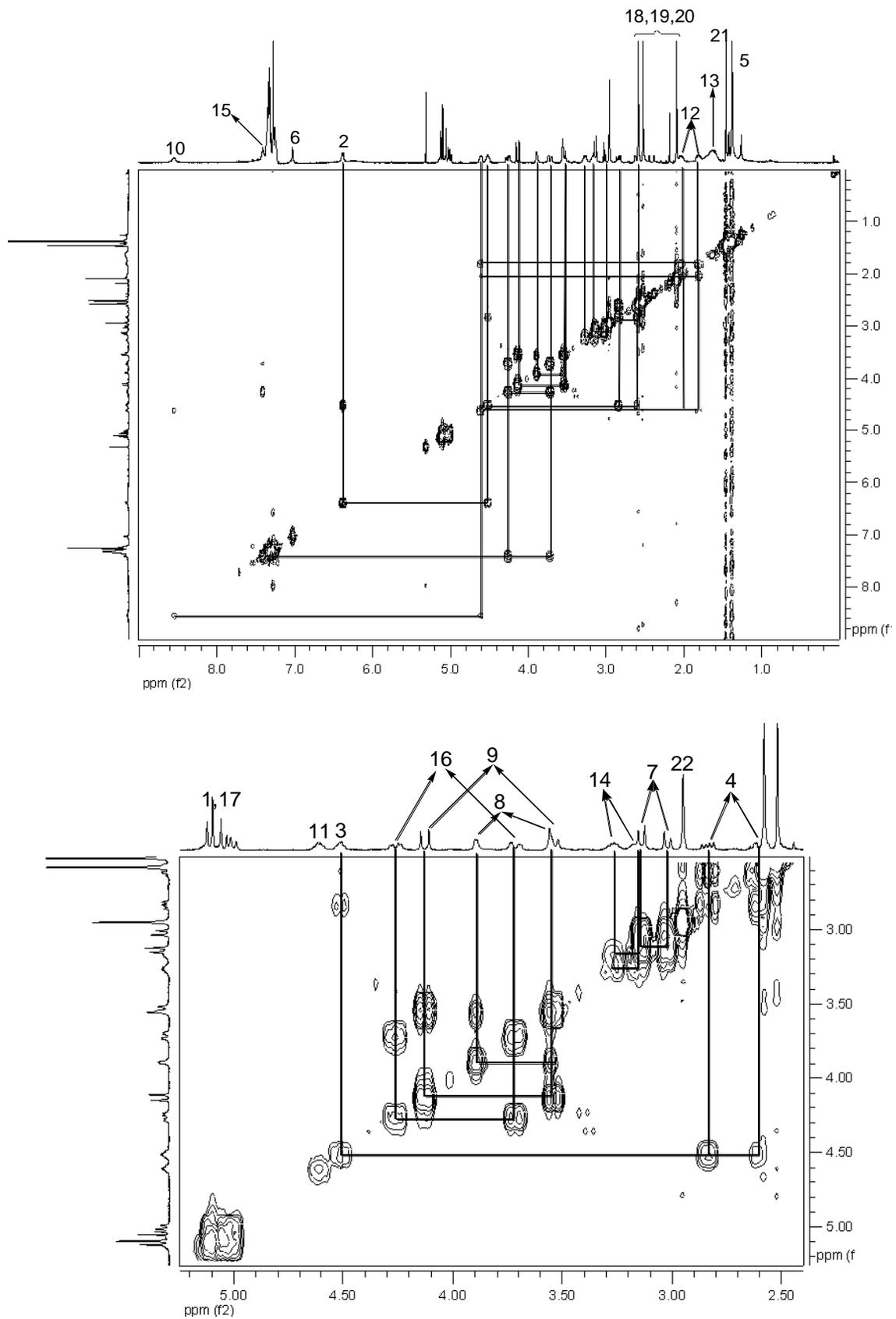


Figura 2. 80: Espectro de COSY y ampliación del espectro de COSY del compuesto 81

ANEXO 6: Espectros realizados en DMSO-d6 para el estudio conformacional del compuesto **81** Cbz-Asp(O^tBu)-β-Lactam-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn

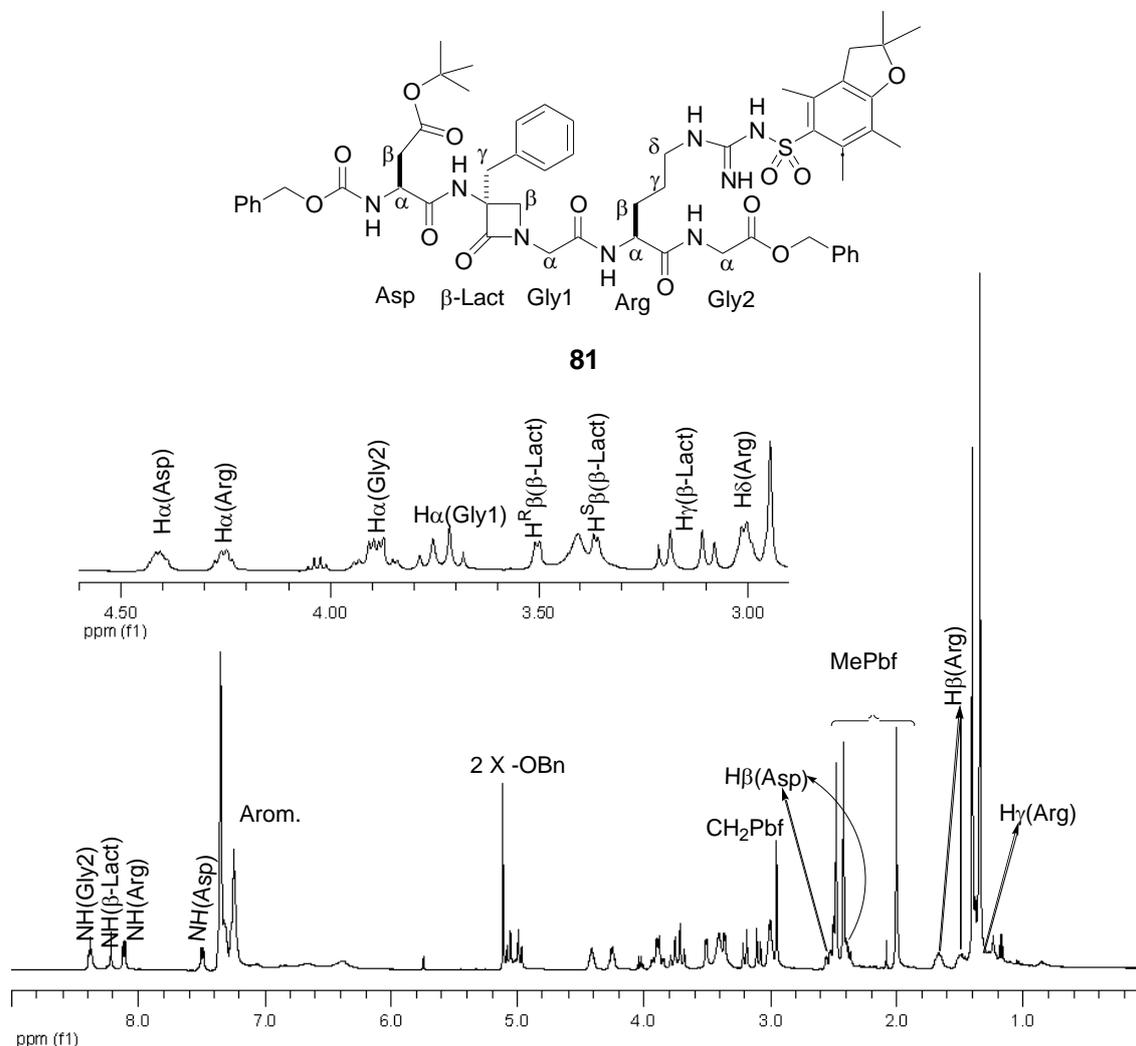
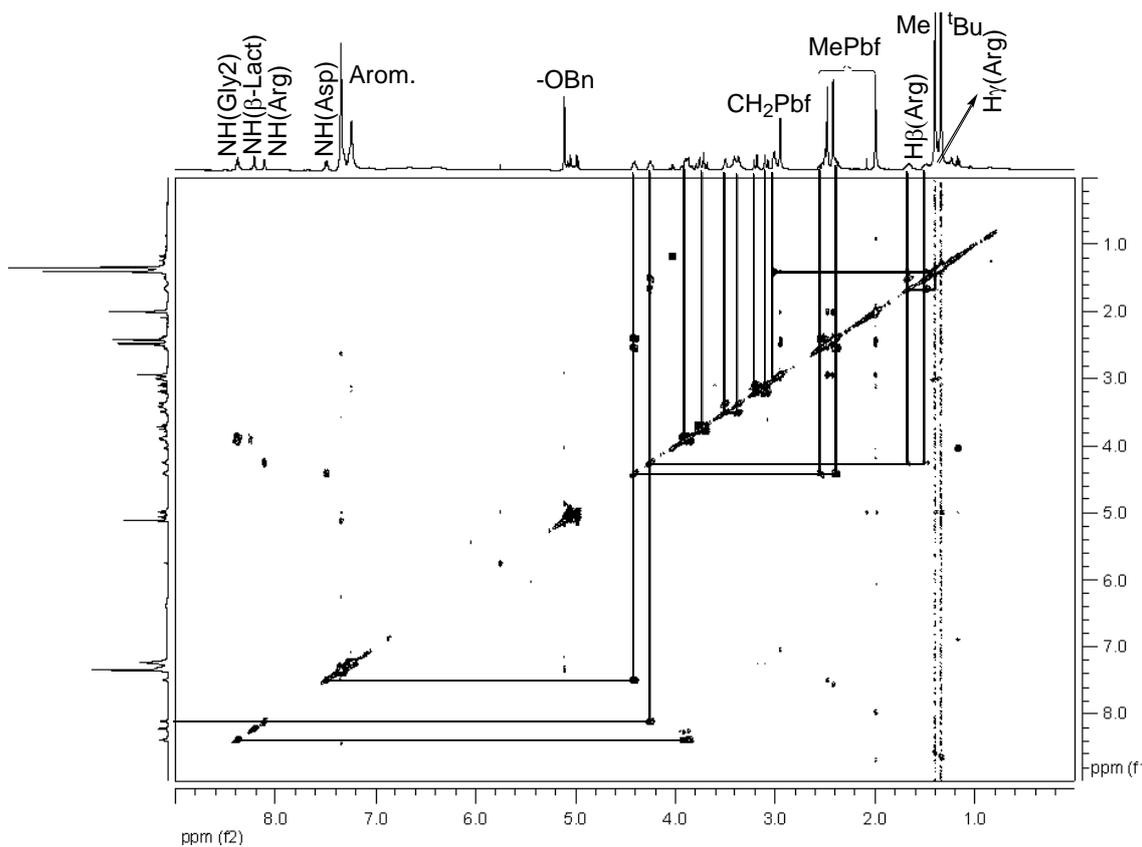


Figura 2. 81: Asignación de las señales del espectro ^1H -RMN del compuesto **81** en DMSO-d₆.

^1H -RMN (δ , ppm, DMSO) (asignación ordenada por aminoácidos)		^{13}C -RMN (δ , ppm, DMSO)		
7.48 (1H, d, J=9.49 Hz) NH (Asp)	8.10 (1H, d, J=7.91 Hz) NH (Arg)	172.2	128.6	41.2
5.05 (d, 1H, J=12.6Hz) (Asp)	6.38 HN ω (Arg)	171.4	128.5	40.3
4.97 (d, 1H, J=12.6 Hz) (Asp)	4.25 (m, 1H) H α (Arg)	170.0	128.4	38.5
4.40 (m, 1H) H α (Asp)	1.48 (m, 2H) H β (Arg)	169.5	128.3	38.1
2.52 (m, 2H) H β (Asp)	1.64 (m, 2H) H γ (Arg)	168.0	128.2	29.8
1.33 (s, 9H) ^t But (Asp)	2.99 (m, 2H) H δ (Arg)	167.2	127.2	28.8

	2.94 (s, 2H) CH ₂ Pbf	157.9	124.8	28.1
8.21 (1H, s) NH (β-Lact)	2.47 (s, 3H) Me-Pbf	156.5	116.7	25.9
3.50 (d, 1H, J=5.06 Hz) H _β (β-Lact)	2.41 (s, 3H) Me-Pbf	156.1	86.3	19.4
3.35 (d, 1H, J=5.06 Hz) H _β (β-Lact)	2.00 (s, 3H) Me-Pbf	137.8	80.6	18.1
3.18 (d, 1H, J=14.1 Hz) H _γ (β-Lact)	1.37 (s, 6H) 2*CH ₃ Pbf	137.3	68.5	12.7
		136.3	66.3	
3.08 (d, 1H, J=14.1 Hz) H _γ (β-Lact)	8.38 (1H, dd, J=6.09 Hz) NH (Gly2)	135.9	66.1	
	3.92 (1H, dd, J= 5.9, 5.3, 17.5, 17.17.2 Hz) H _α (Gly2)	134.7	52.5	
3.76 (d, 1H, J=16.8 Hz) H _α (Gly1)	3.87(dd,2H,J=5.6,17.33 Hz) H _α (Gly2)	130.4	51.7	
3.68 (d, 1H, J=16.8 Hz) H _α (Gly1)	5.1 (2H, s) CH ₂ (Gly2)	128.9	44.3	
		128.8	42.9	
	7.32 (9H, arom.)			
	7.27 (6H, arom.)			



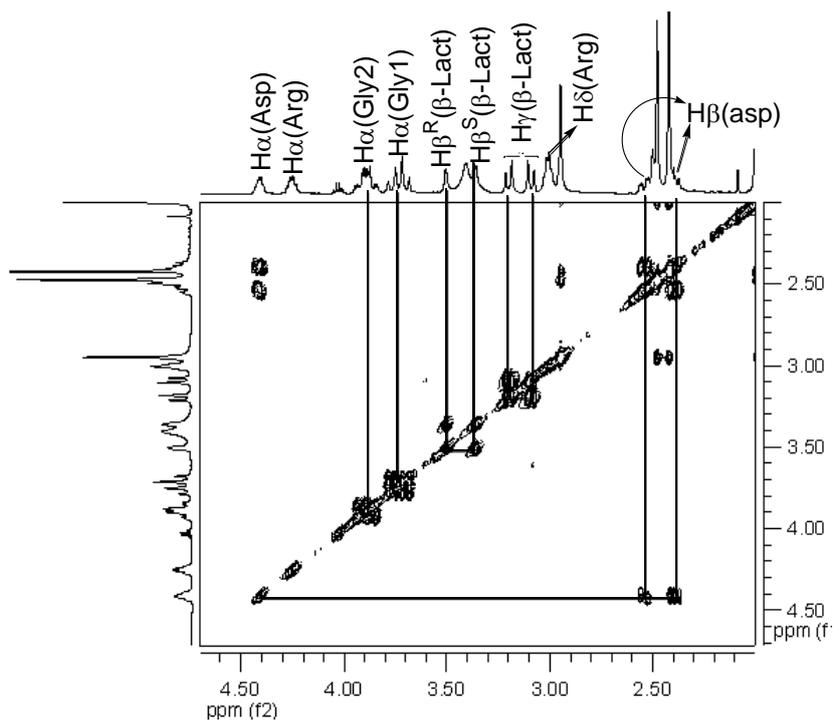


Figura 2. 82: Espectro COSY del compuesto **81** realizado en DMSO-d₆

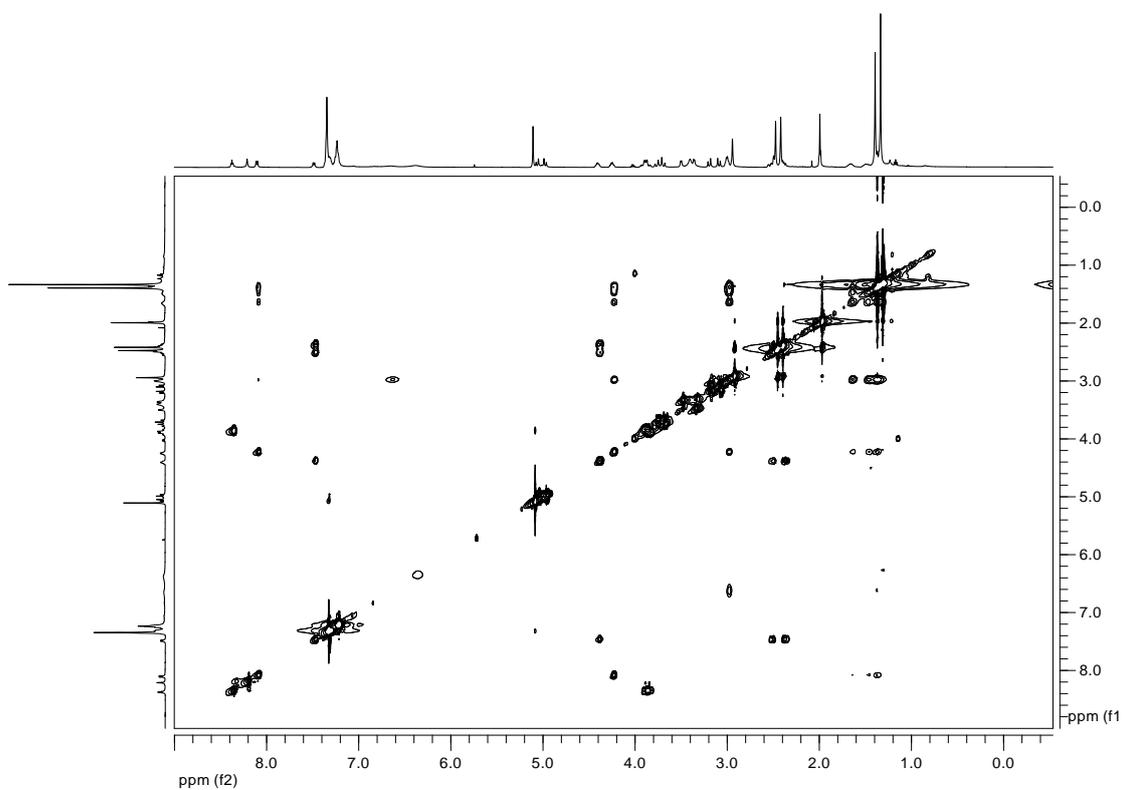


Figura 2. 83: TOCSY del compuesto **81** en DMSO-d₆

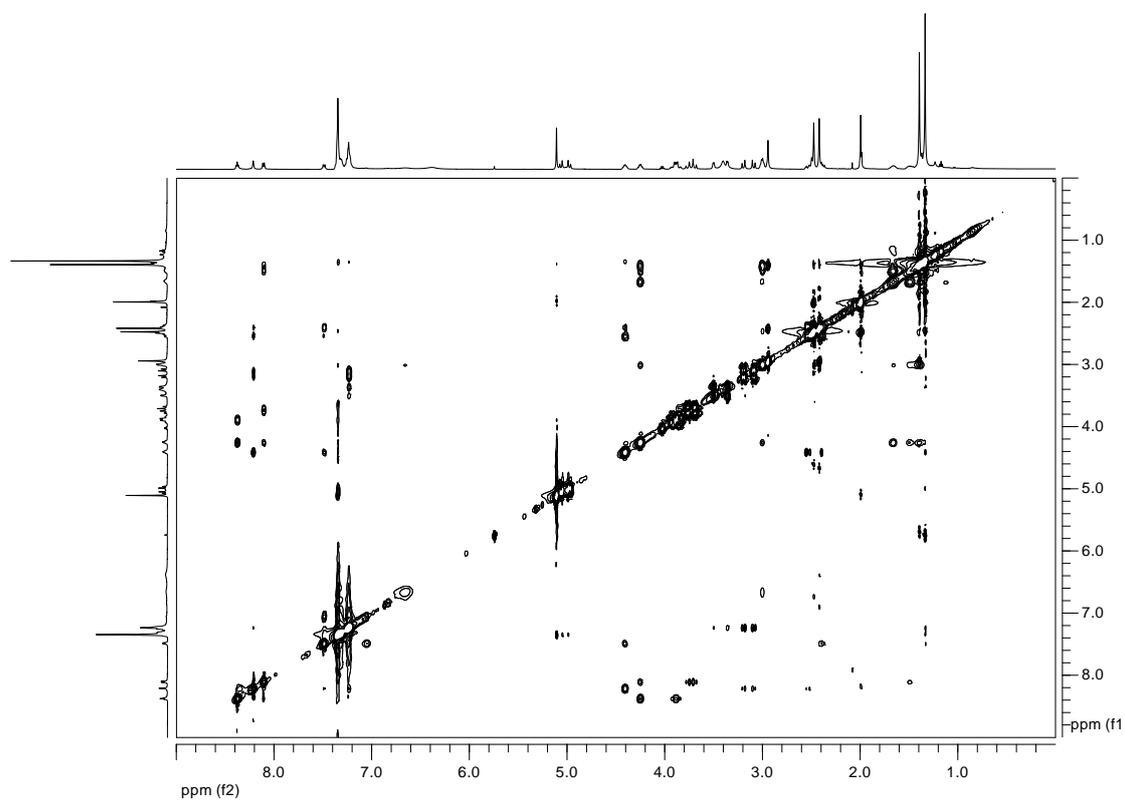


Figura 2. 84: ROESY del compuesto **81** realizado con 400ms de tiempo de mezcla en DMSO-d₆.

ANEXO 7: Espectros realizados en DMSO-d₆ para el estudio conformacional del compuesto 92 c{Asp(O^tBu)-β-Lactam-Gly-Arg(Pbf)-Gly}

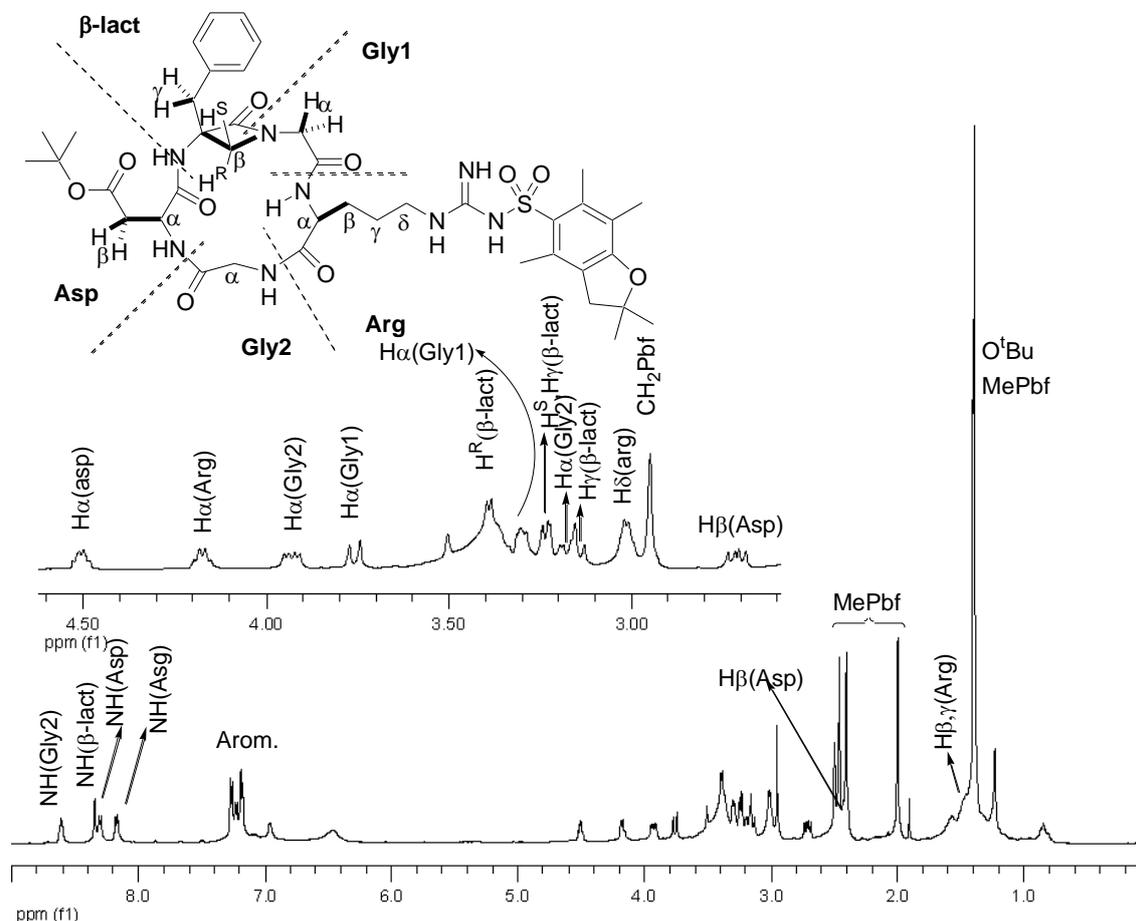
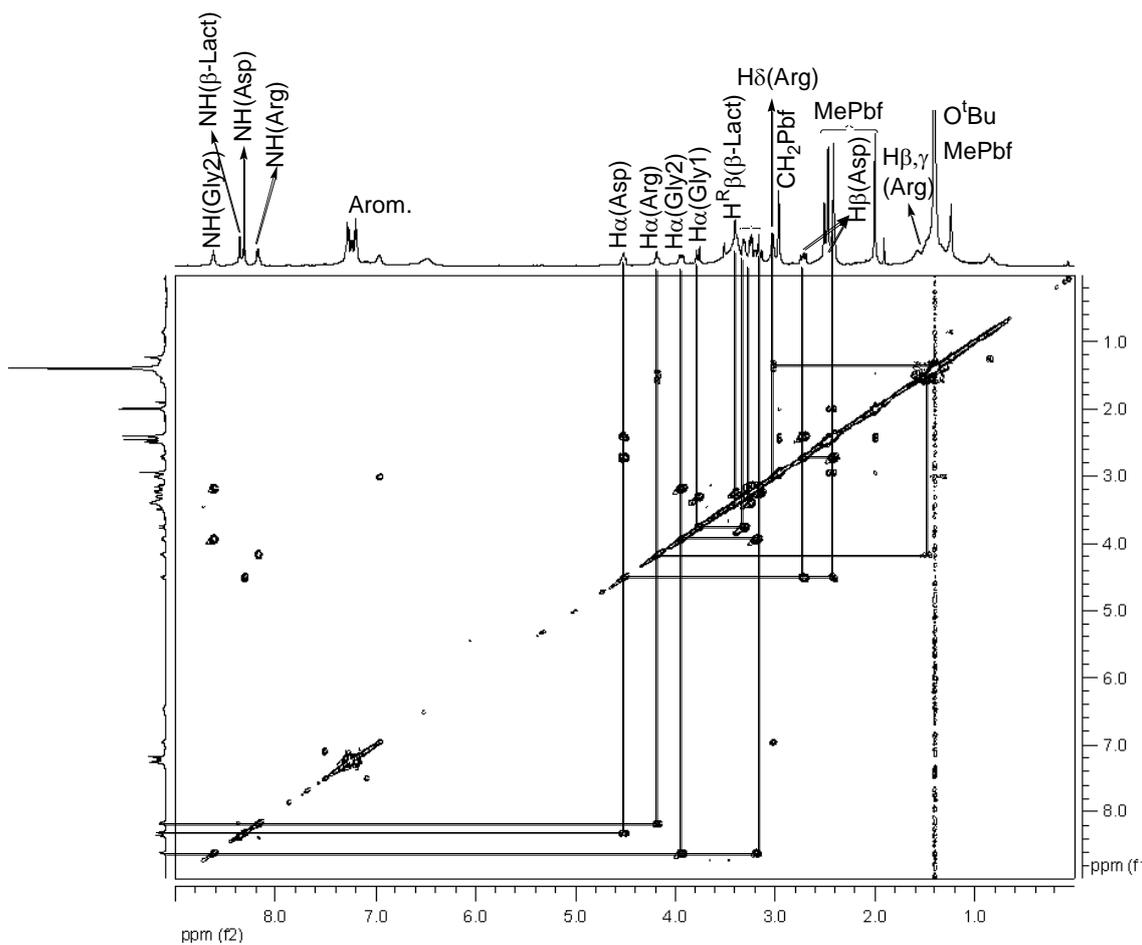


Figura 2. 85: Espectro de ¹H-RMN y asignación de las señales correspondientes en DMSO

¹ H-RMN: δ (ppm) DMSO-d ₆ Temp= 300K		¹³ C-RMN: δ (ppm) DMSO-d ₆		
8.30 (1H, d, J=8.19 Hz) NH (Asp)	8.16 (1H, d, J=8.02 Hz) NH (Arg)	172.2	128.6	41.2
4.50 (1H, s) Hα (Asp)	6.95 HN ω (Arg)	171.4	128.5	40.3
2.72 (m, 2H) Hβ (Asp)	6.46 HNω (Arg)	170.0	128.4	38.5
2.42 (m, 2H) Hβ (Asp)	4.19 (m, 1H) Hα (Arg)	169.5	128.3	38.1
1.33 (s, 9H) ^t But (Asp)	3.02 (m, 2H) Hδ (Arg)	168.0	128.2	29.8
	1.98 (m, 2H) Hβ (Arg)	167.2	127.2	28.8
8.34 (1H, s) NH (β-Lact)	1.64 (m, 2H) Hγ (Arg)	157.9	124.8	28.1
3.40 (s, 1H,) Hβ (β-Lact)	2.94 (s, 2H) CH ₂ Pbf	156.5	116.7	25.9
3.23 (d, 1H, J=14.1 Hz) Hδ (β-Lact)	2.47 (s, 3H) Me-Pbf	156.1	86.3	19.4
		137.8	80.6	18.1

3.15 (d, 1H, J=14.1 Hz) H δ (β -Lact)	2.41 (s, 3H) Me-Pbf	137.3	68.5	12.7
	2.00 (s, 3H) Me-Pbf	136.3	66.3	
3.76 (d, 1H, J=14.0 Hz) H α (Gly1)	1.37 (s, 6H) 2*CH ₃ Pbf	135.9	66.1	
3.30 (d, 1H, J=14.0 Hz) H α (Gly1)		134.7	52.5	
	8.60 (1H, dd, J=5.7 Hz) NH (Gly2)	131.9	52.2	
	3.95 (dd, 1H, J=6.3, 14.2) H α (Gly2)	130.4	51.7	
	3.18 (dd, 1H, J=6.3, 14.2) H α (Gly2)	128.9	44.3	
		128.8	42.9	
	7.27-7.18 (5H, arom)			



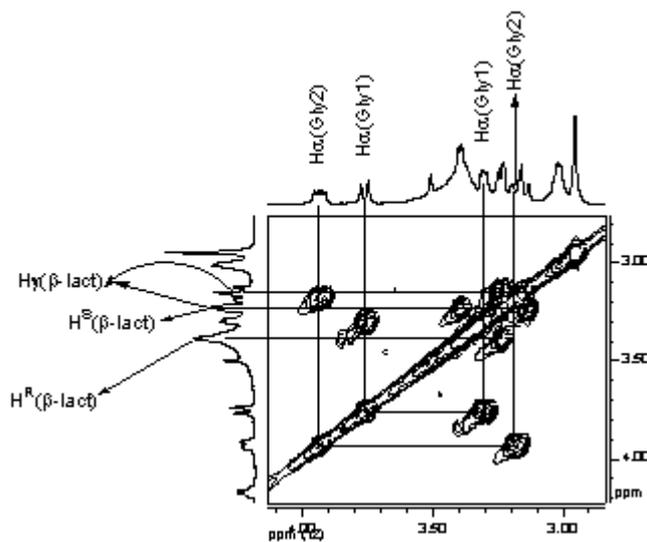


Figura 2. 86: Espectros COSY del compuesto **92**. Arriba: espectro completo. Abajo: ampliación

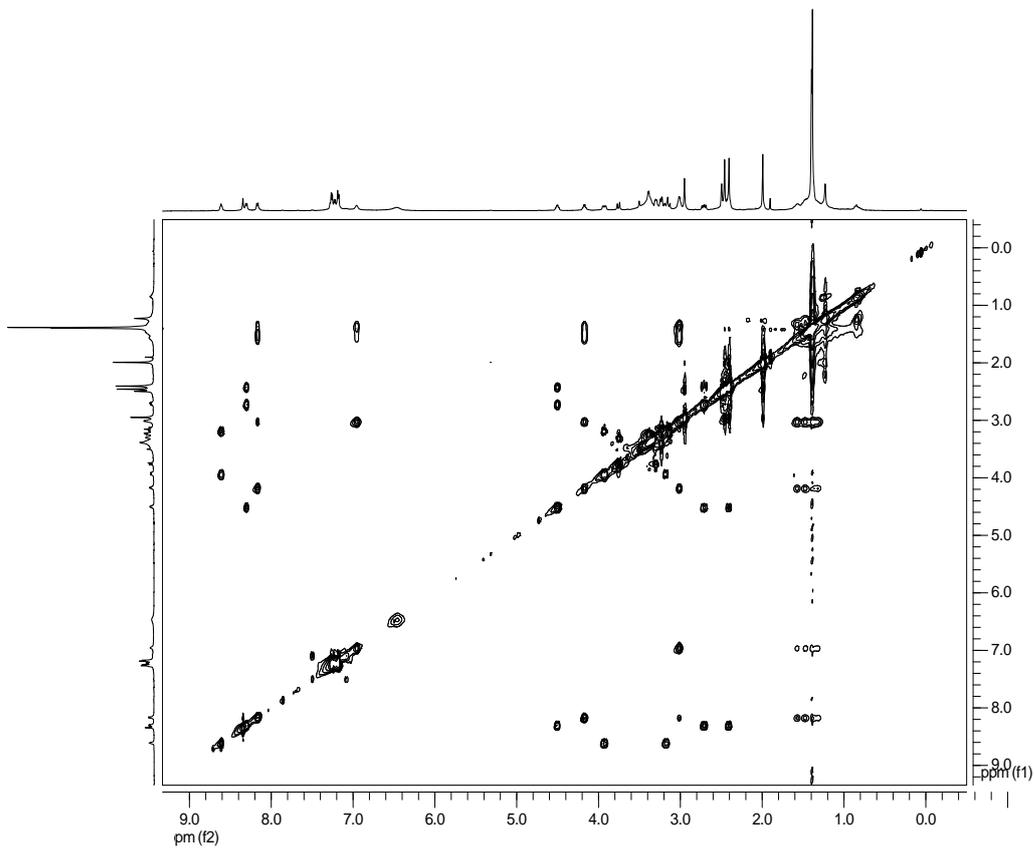


Figura 2. 87: Espectros TOCSY del compuesto **92**.

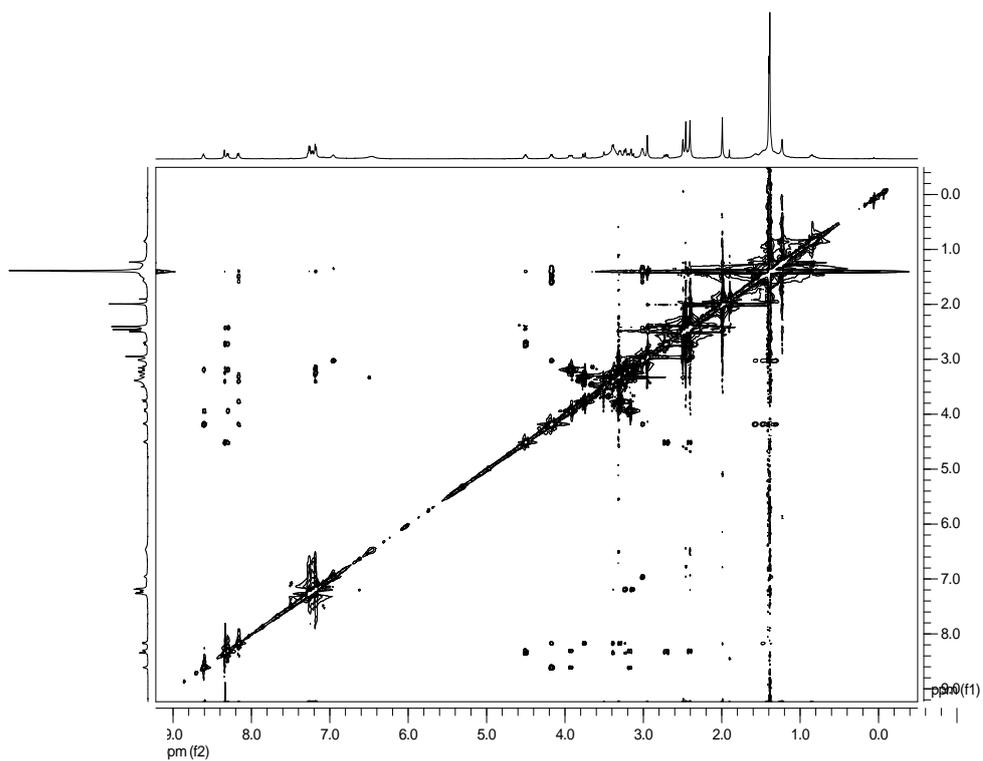


Figura 2. 88: ROESY del compuesto **92** con un tiempo de mezcla de 400 ms.

ANEXO 8: Espectros realizados en D₂O/H₂O (10:90) para el estudio conformacional del compuesto **43** sal de trifluoroacetato de c{Asp-β-Lact-Gly-Arg-Gly}

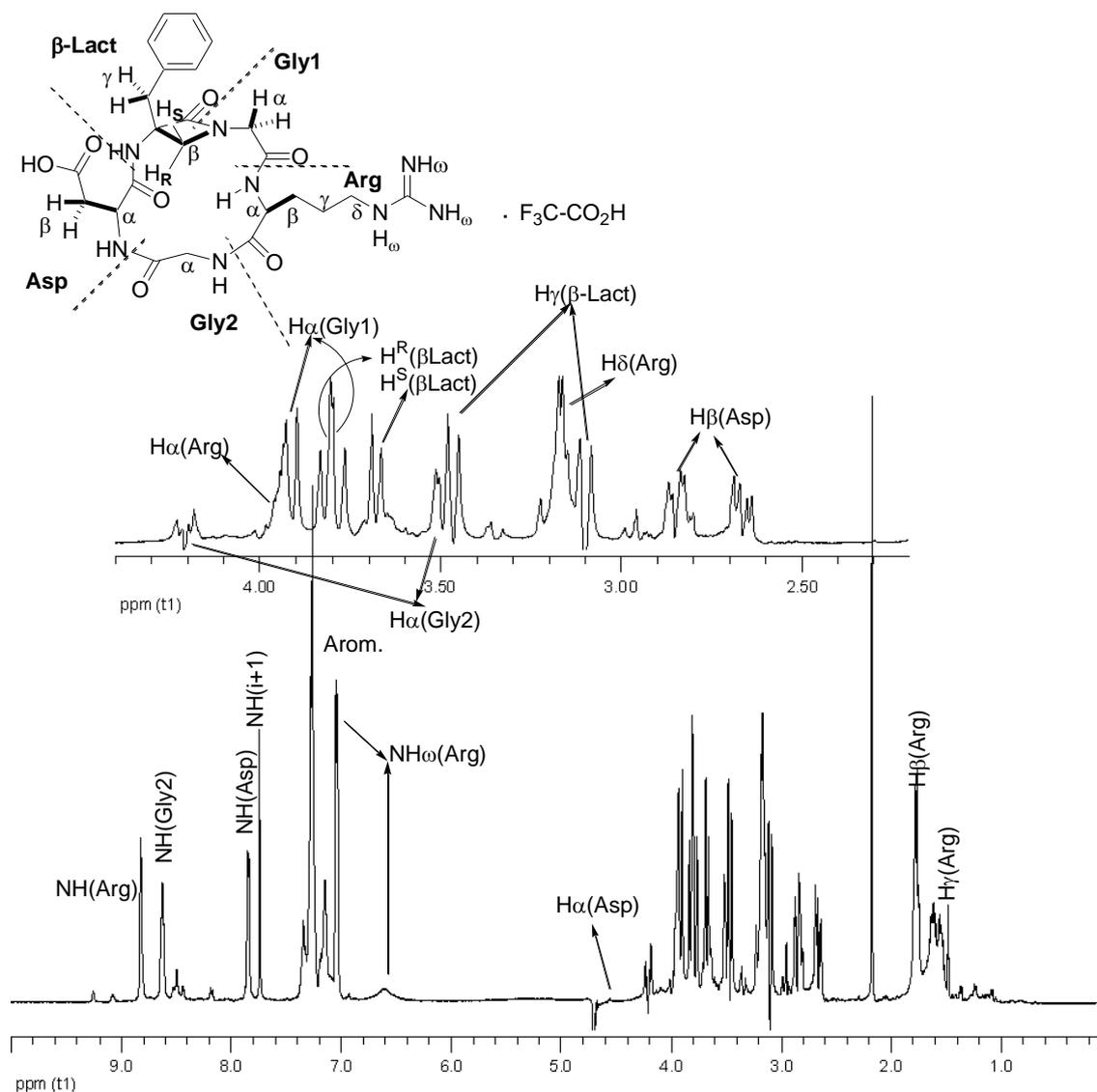


Figura 2. 89: Espectro de ¹H-RMN del compuesto **43** en H₂O/D₂O (90:10) y la asignación de las señales correspondientes.

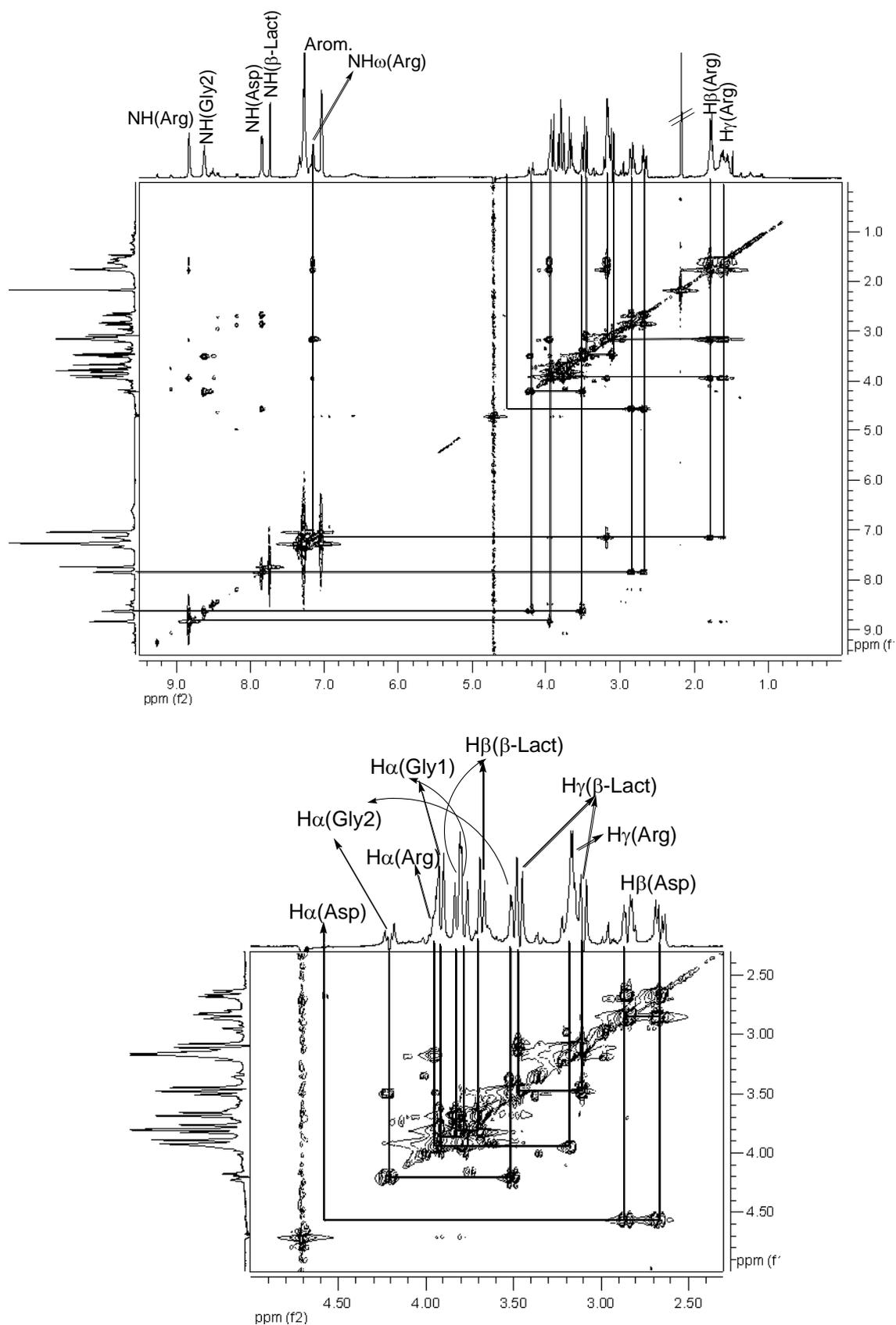


Figura 2. 90: Espectro TOCSY del compuesto 43 en $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (10:90).

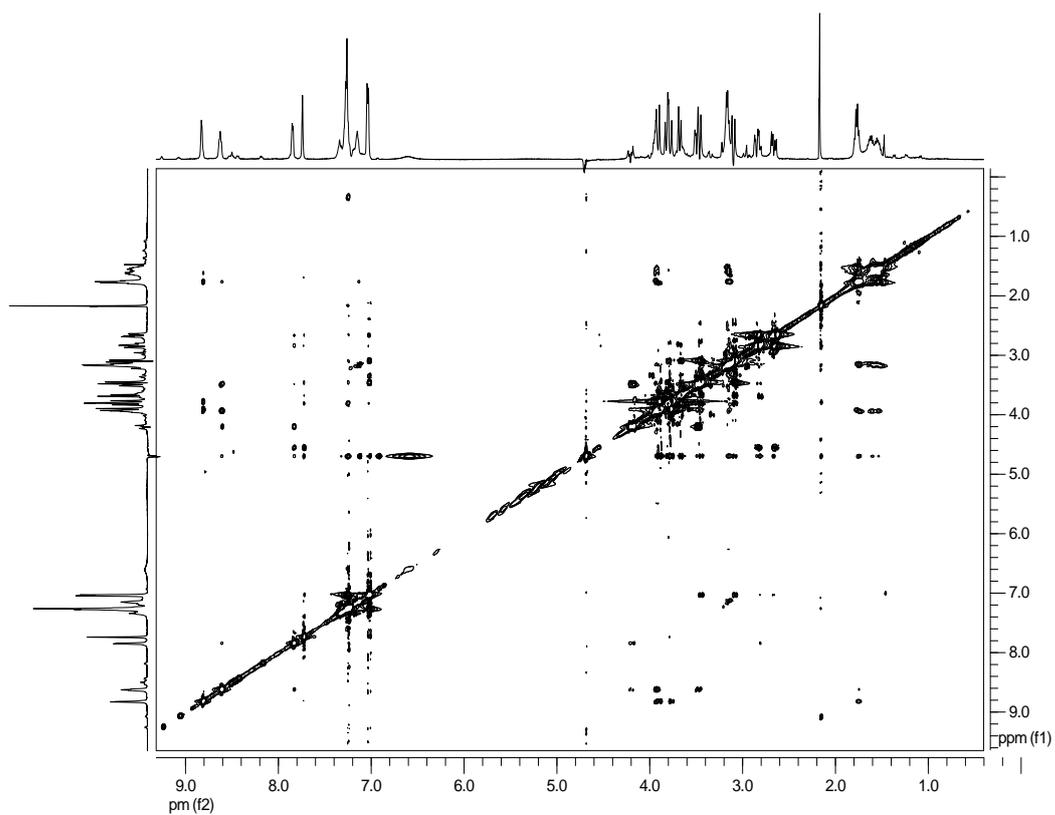


Figura 2. 91: Espectro ROESY del compuesto **43** en D₂O/H₂O (10:90) con un tiempo de mezcla de 200 ms.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1- Se ha comprobado que en medios fluorosos la autoagregación impide la solubilización de compuestos amídicos polares. Esta autoagregación puede romperse mediante la formación de puentes de hidrógeno entre ácidos carboxílicos perfluorados y los grupos amida dando lugar así a la solubilización de amidas, carbamatos, ureas, aminoácidos, y algunos péptidos en disolventes fluorosos.

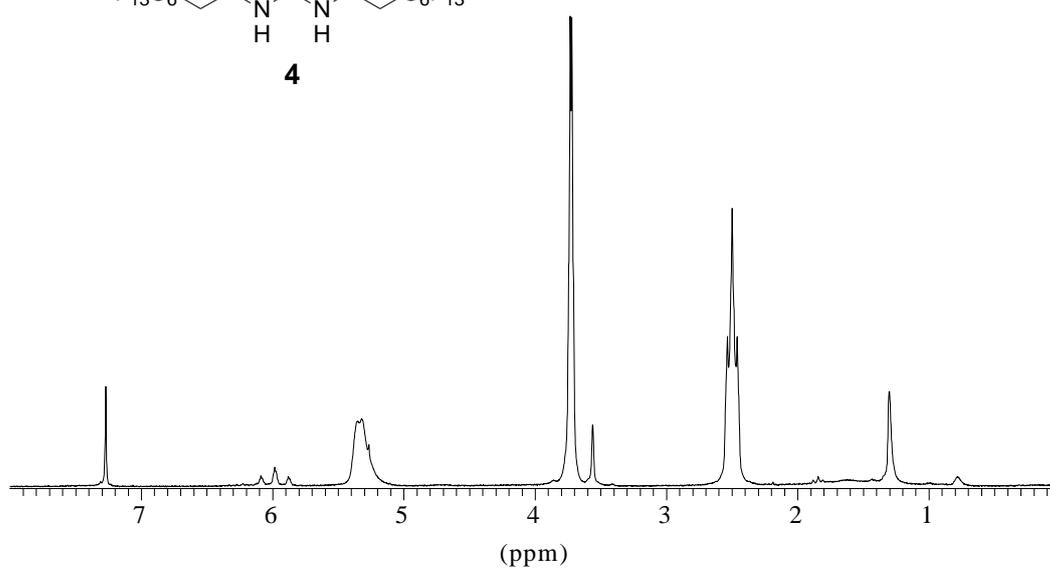
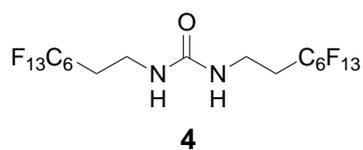
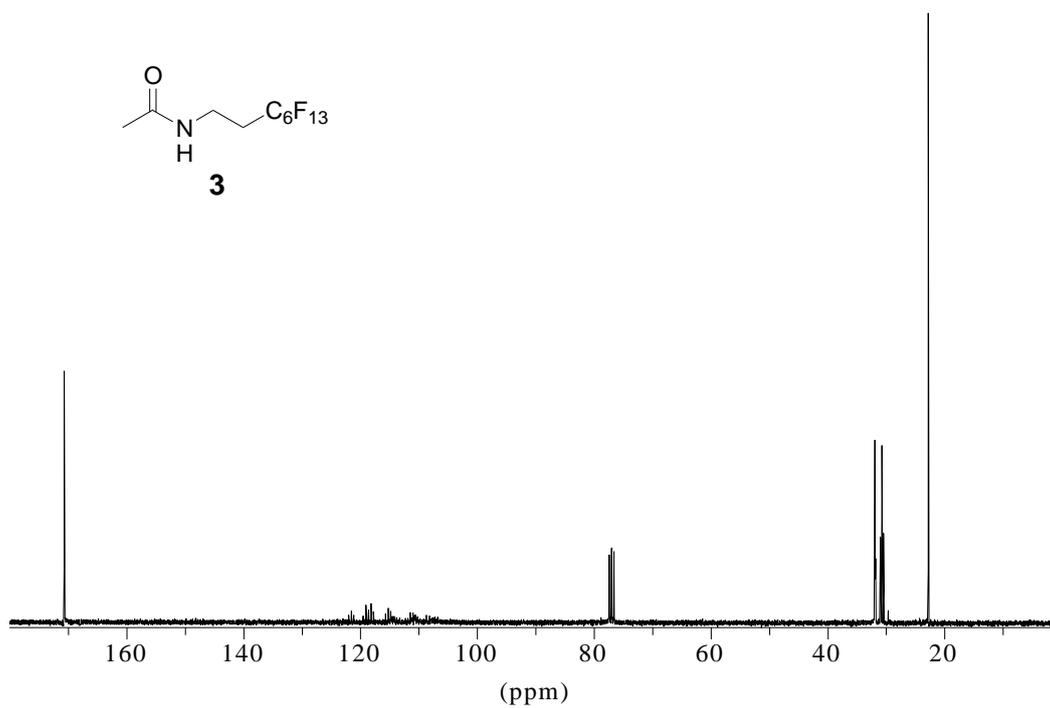
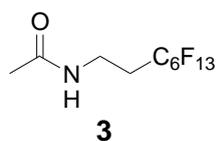
2- Es posible aplicar este efecto de formación de puentes de hidrógeno en la síntesis en medios fluorosos. Cuando se lleva a cabo síntesis en medios fluorosos con compuestos polares, el número de átomos de flúor debe ser muy elevado. Las interacciones de puentes de hidrógeno son lo suficientemente fuertes como para formar complejos no covalentes con un gran número de átomos de flúor solubles preferentemente en medios fluorosos. De este modo se purifican los compuestos polares de los medios de reacción y se evita la síntesis no fácil de compuestos altamente fluorados.

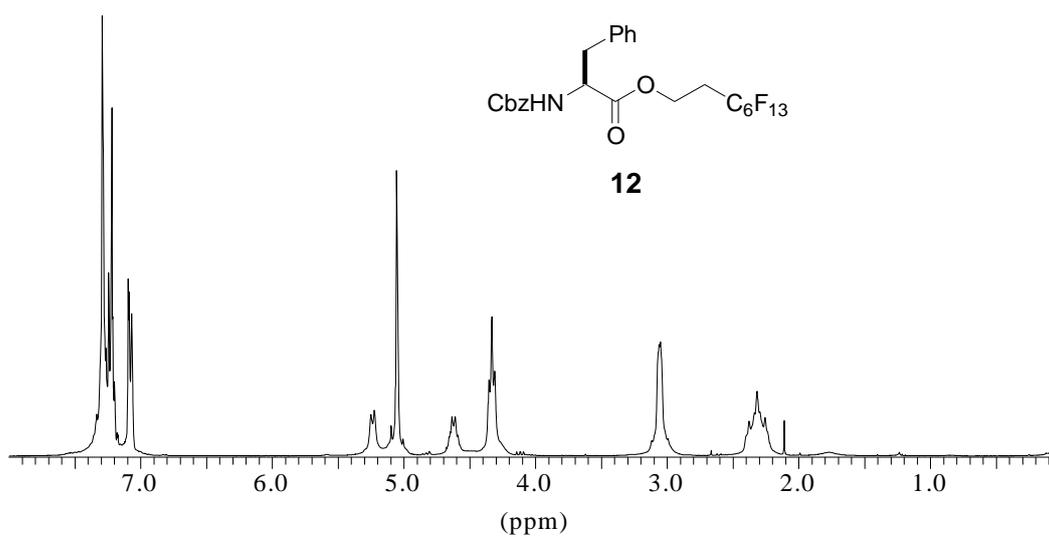
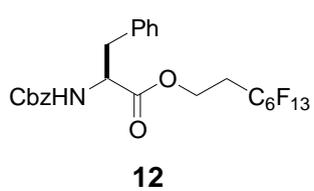
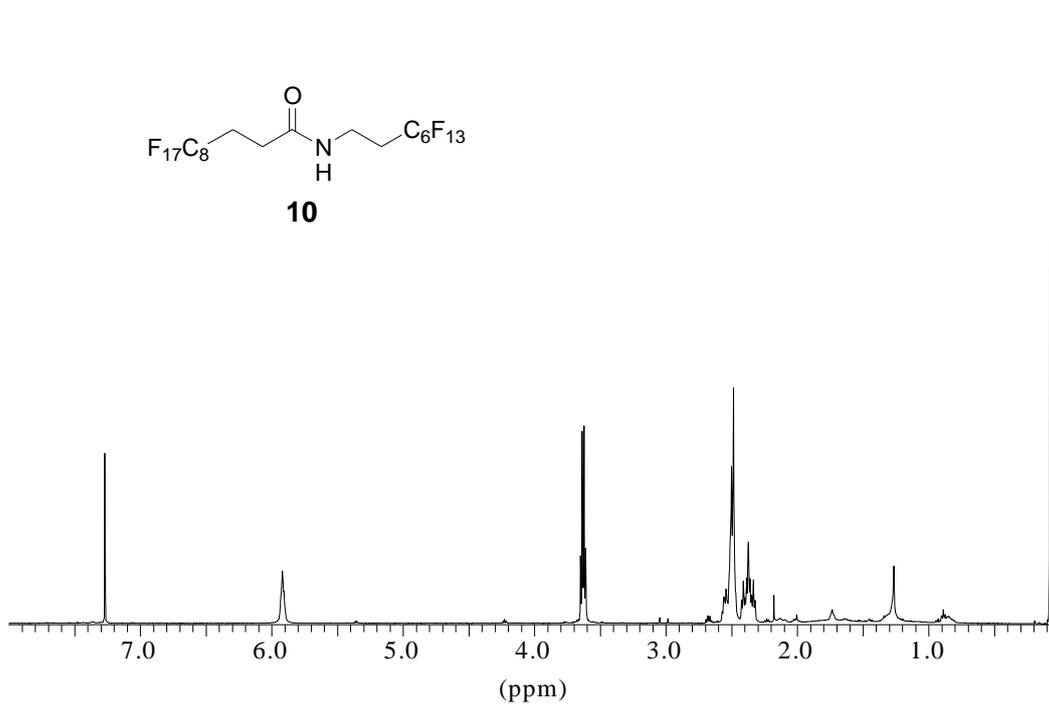
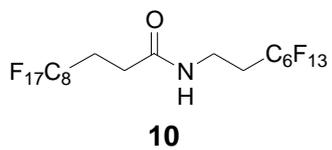
3- Cuando el número de átomos de flúor no es elevado, las interacciones de puentes de hidrógeno son lo suficientemente fuertes como para disolver los compuestos en medios fluorosos, pero no cuando se lleva a cabo una extracción entre un disolvente orgánico y un disolvente fluoroso. En ese caso el número de átomos de flúor debe ser mayor.

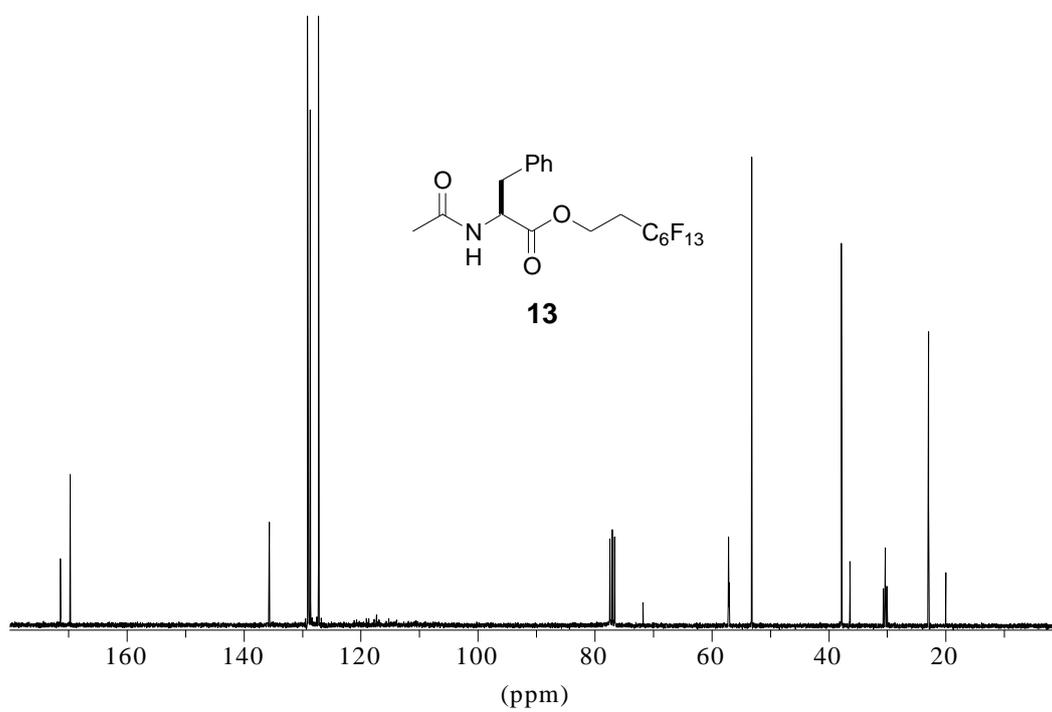
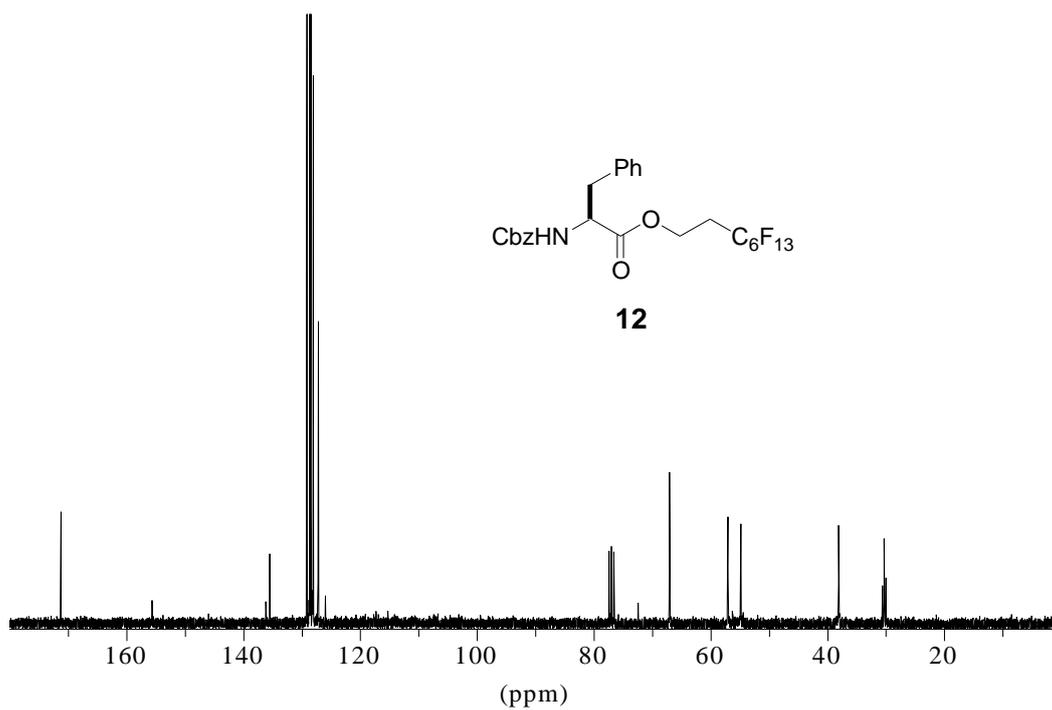
4- El compuesto Cbz-Asp(O^tBu)-[(3S)-3-amino-3-bencilazetidín-2-on-1-il]-Gly-Arg(Pbf)-Gly-OBn **81** se encuentra en DMSO en un equilibrio entre la forma extendida y la conformación de giro- β abierto (siendo el aspártico el resto (i)). Esta conformación no es lo suficientemente estable como para facilitar la ciclación del compuesto, siendo el rendimiento en esta etapa más bajo de lo esperado.

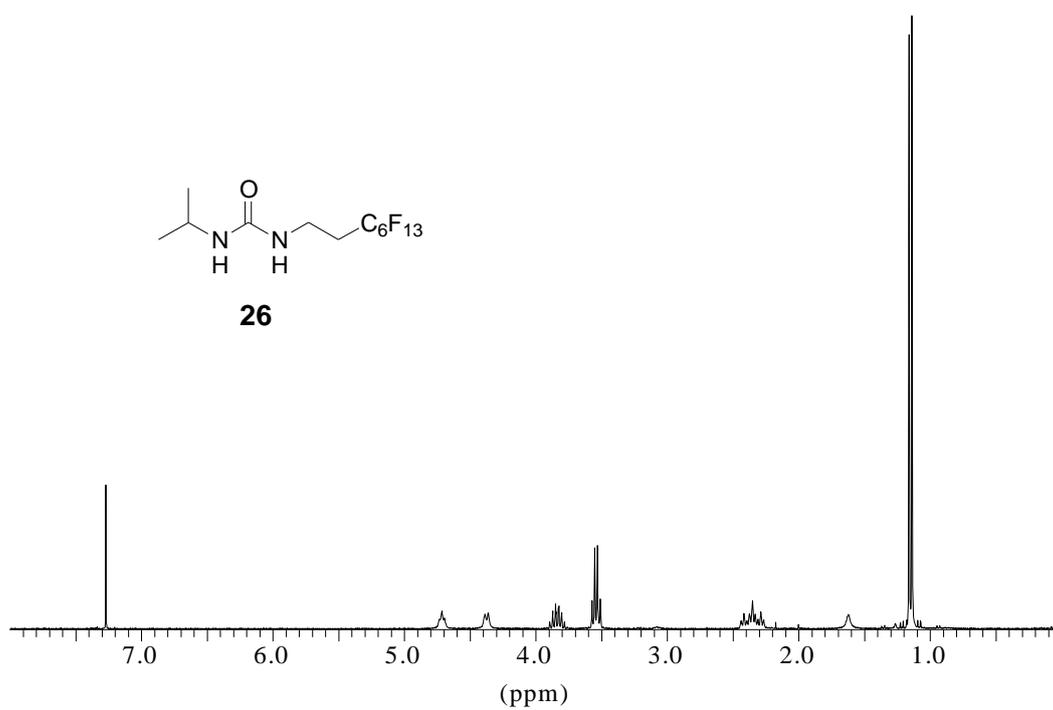
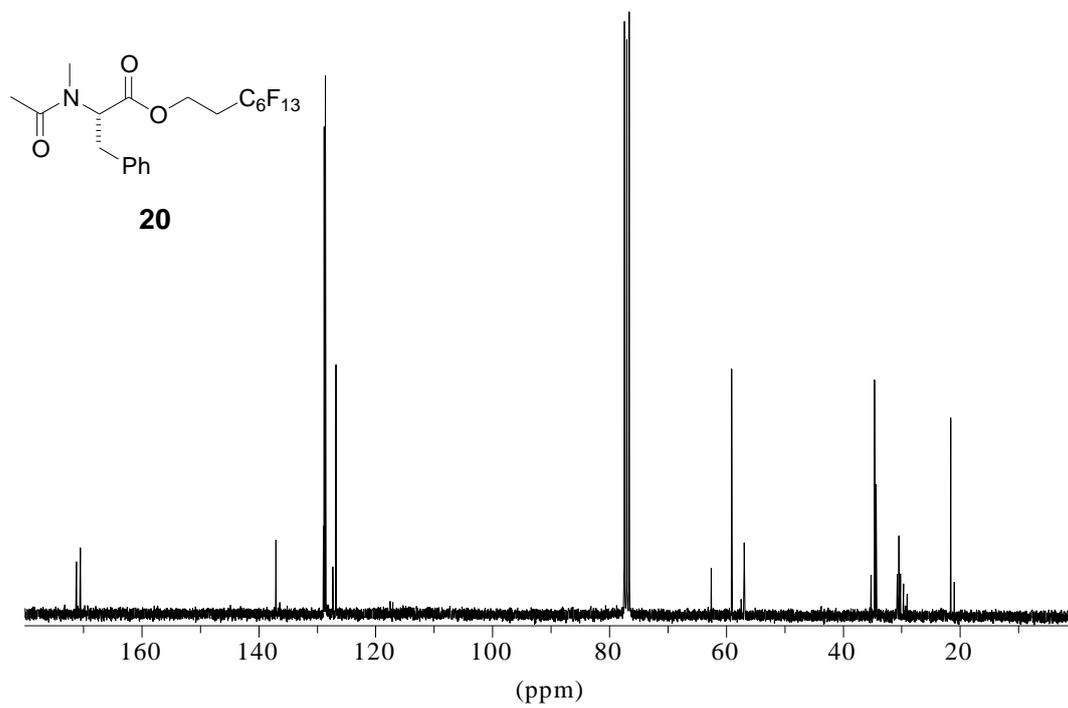
5- El giro abierto se rompe al ciclar la molécula y se forma una estructura estable con dos giros γ muy activa en la inhibición de integrinas del tipo $\alpha_v\beta_3$.

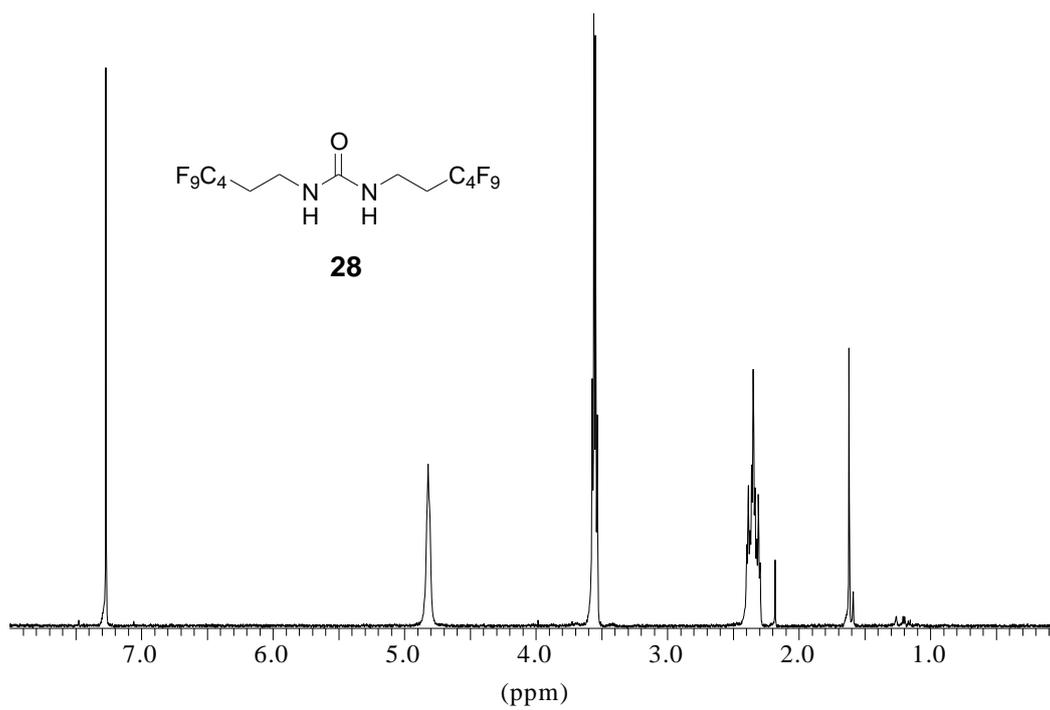
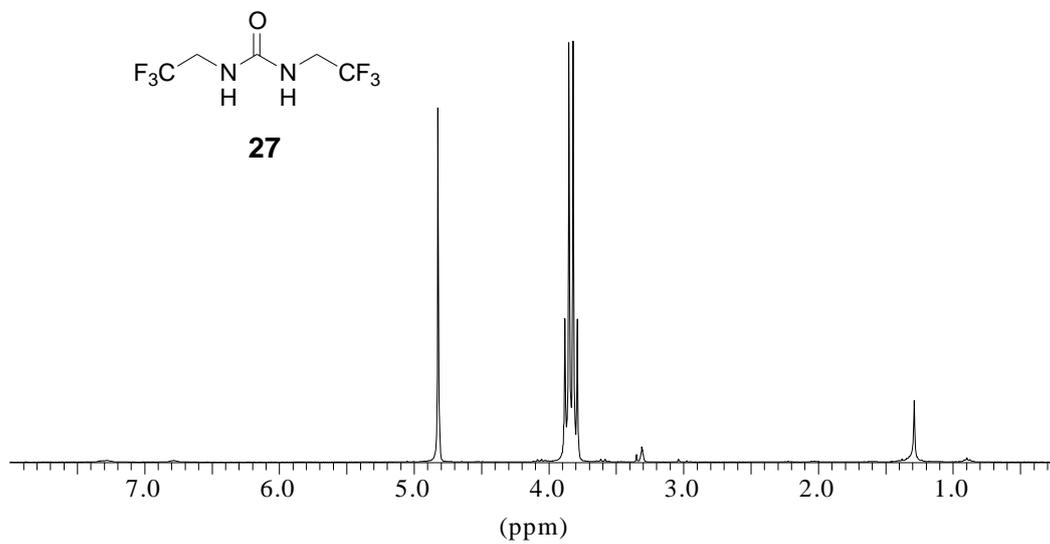
Espectros de RMN

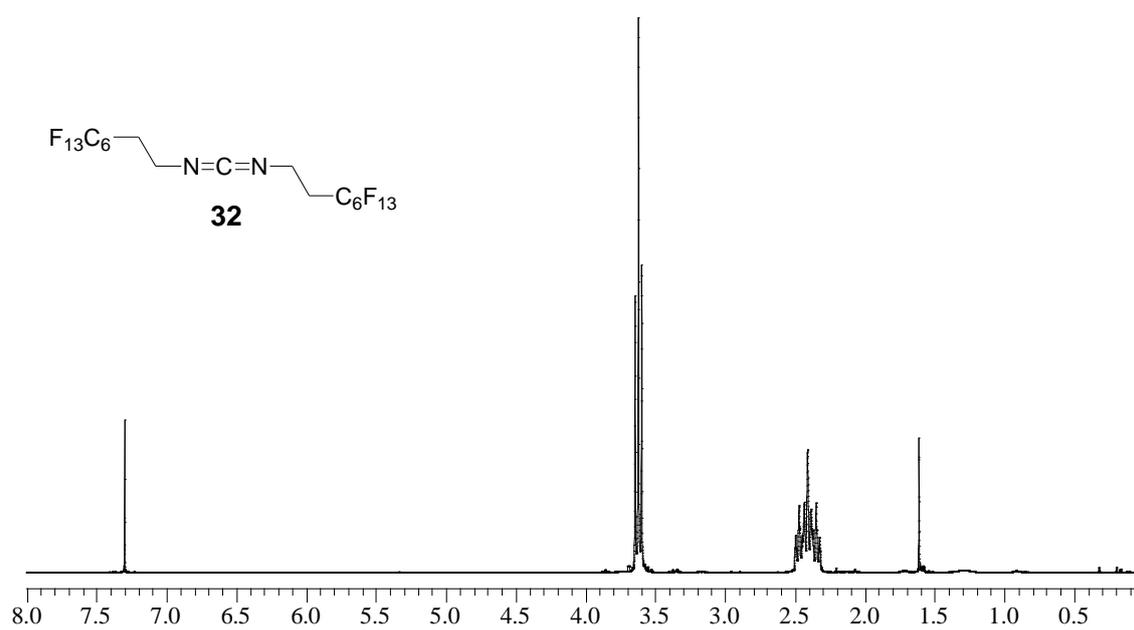
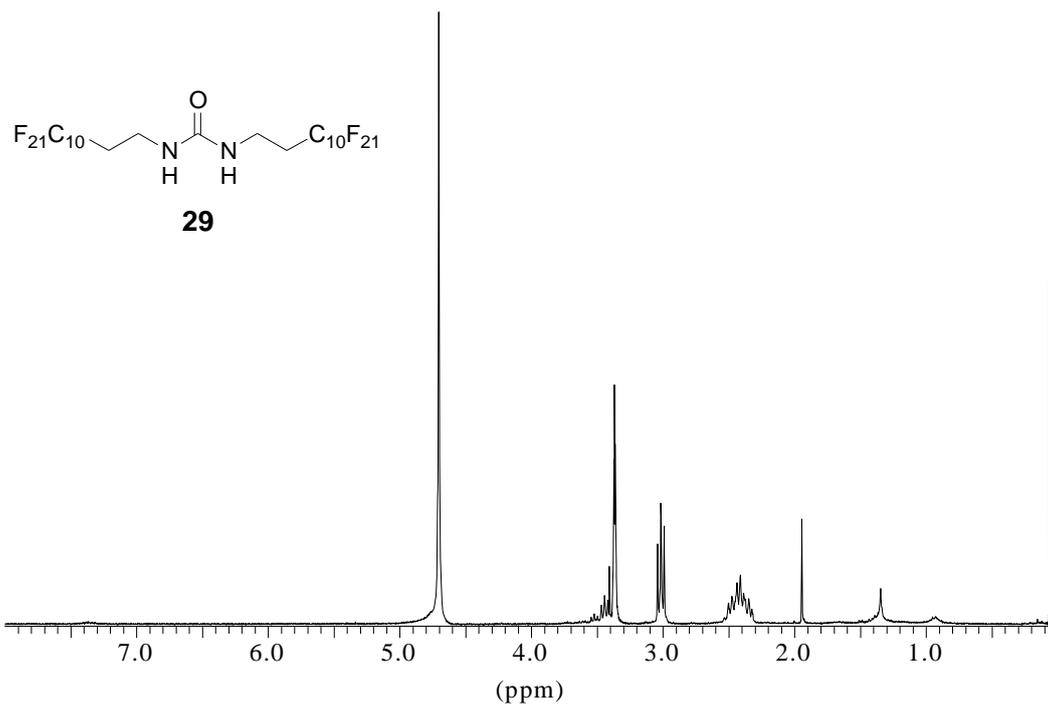
ESPECTROS CAPÍTULO 1

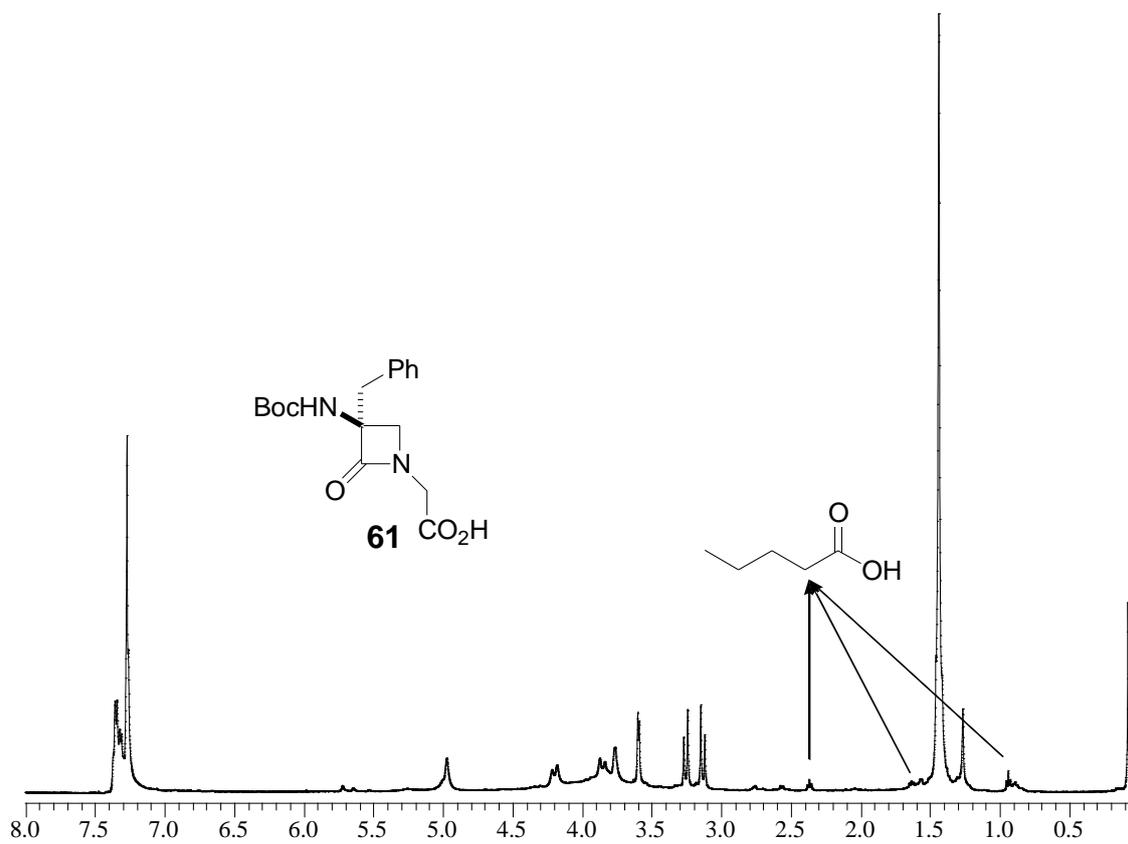
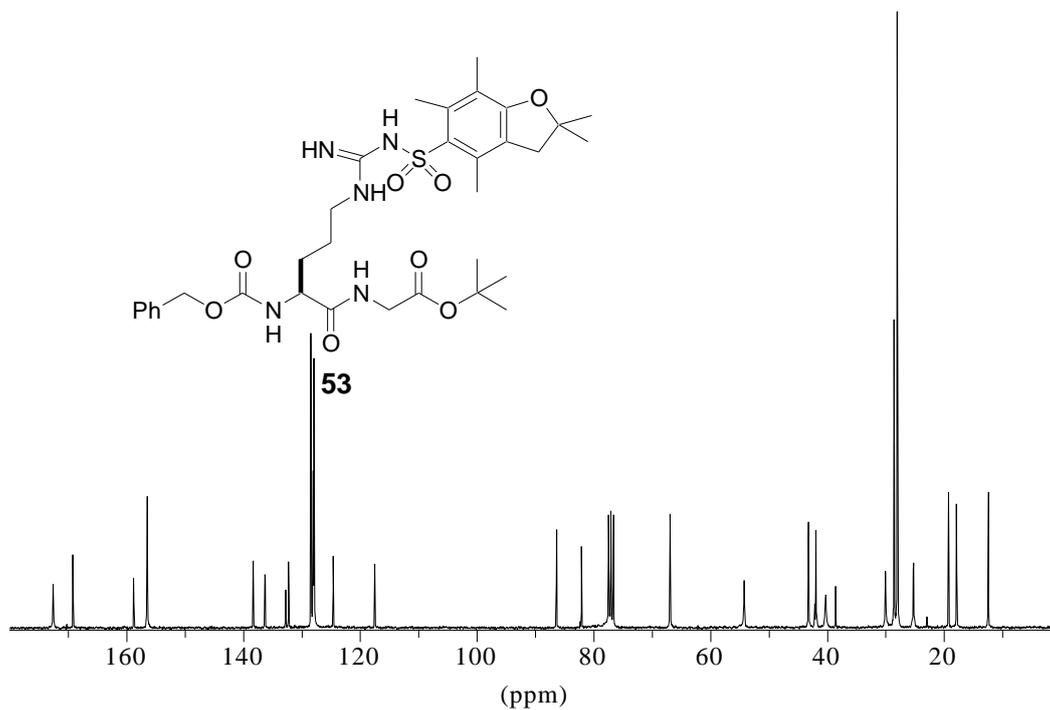


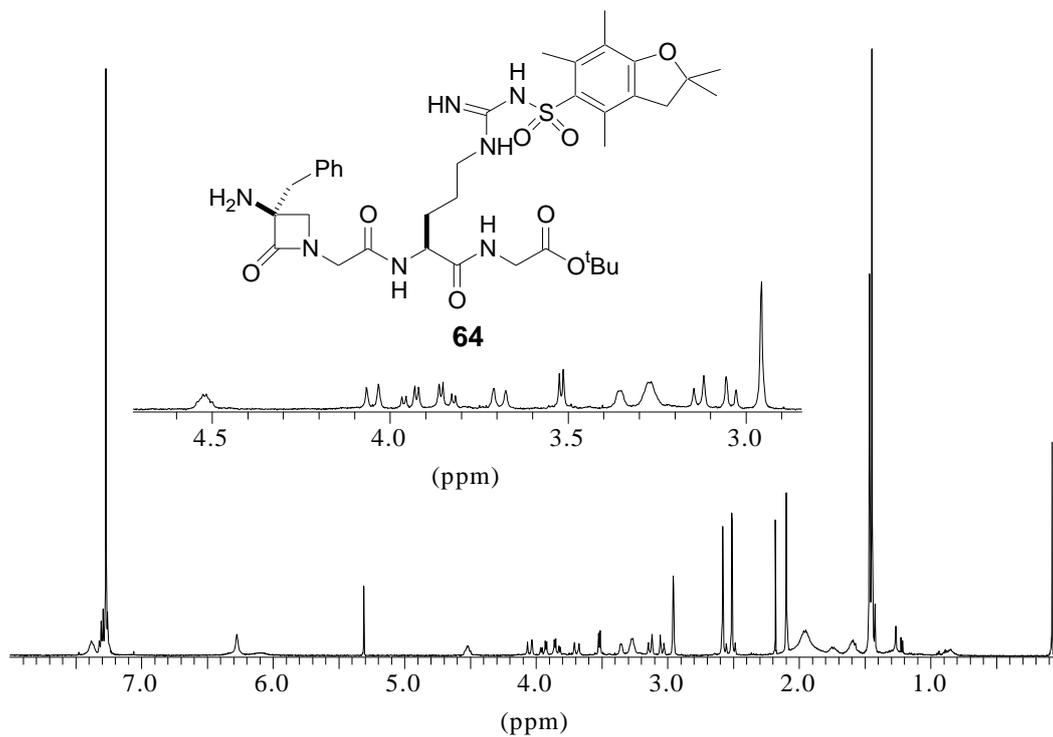
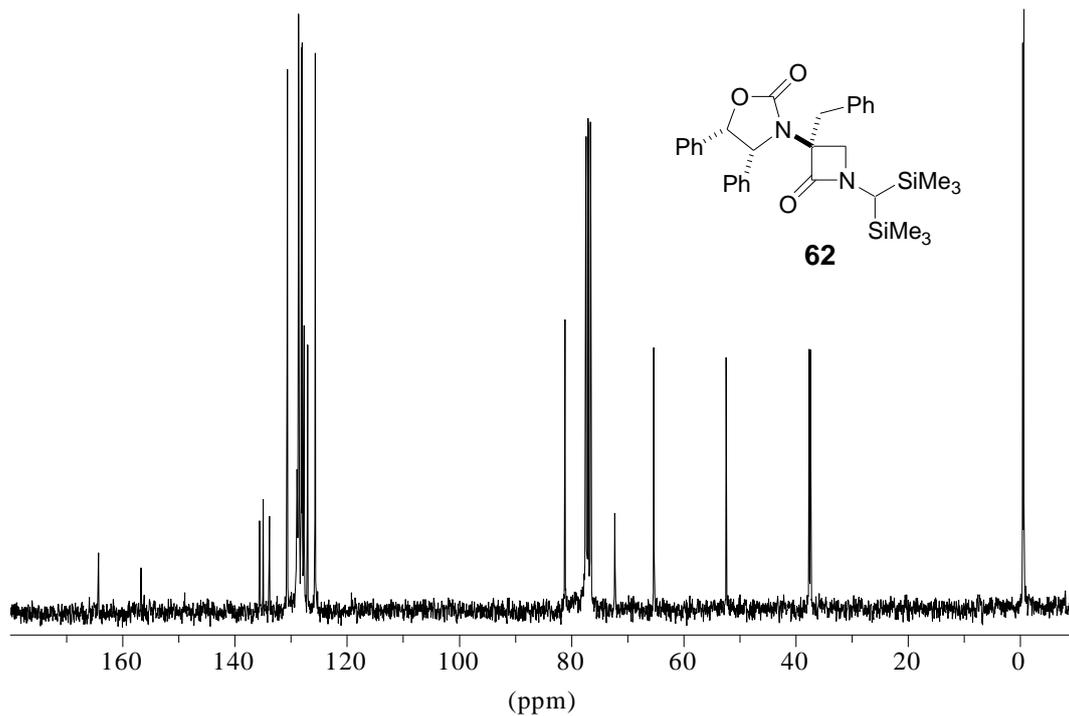


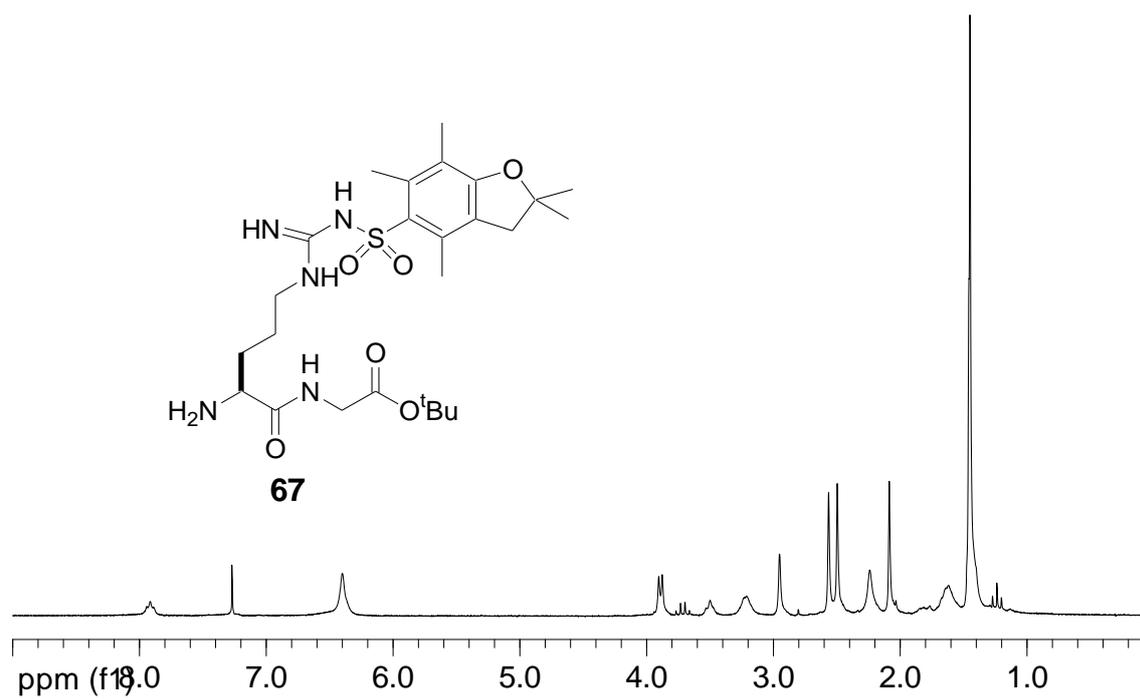
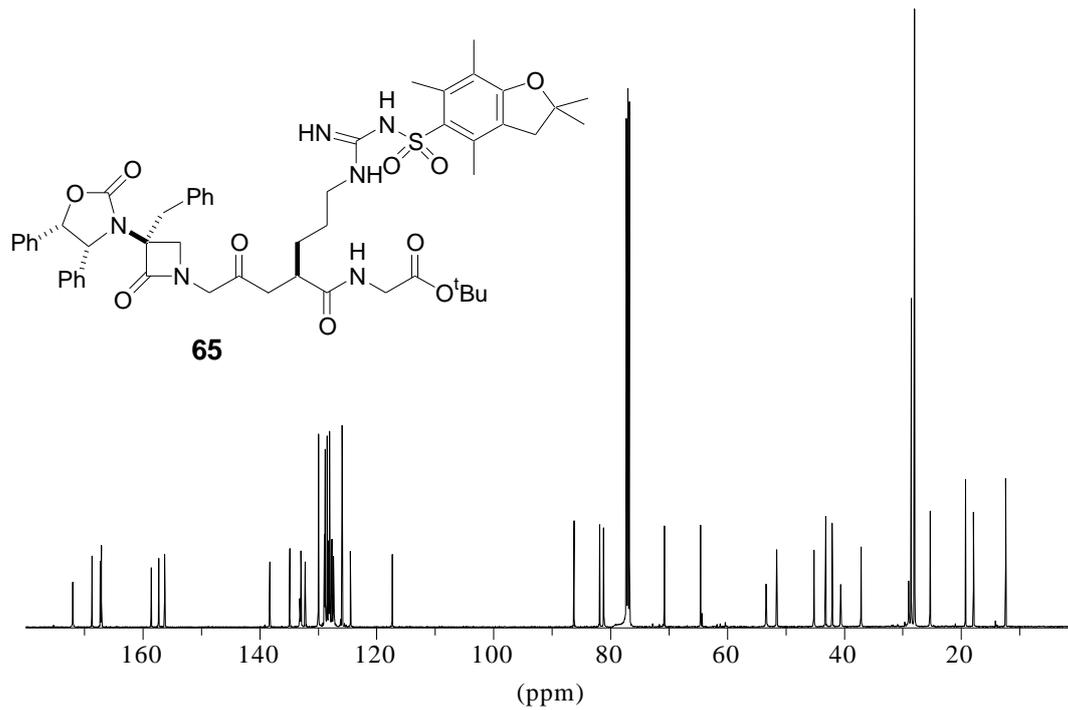


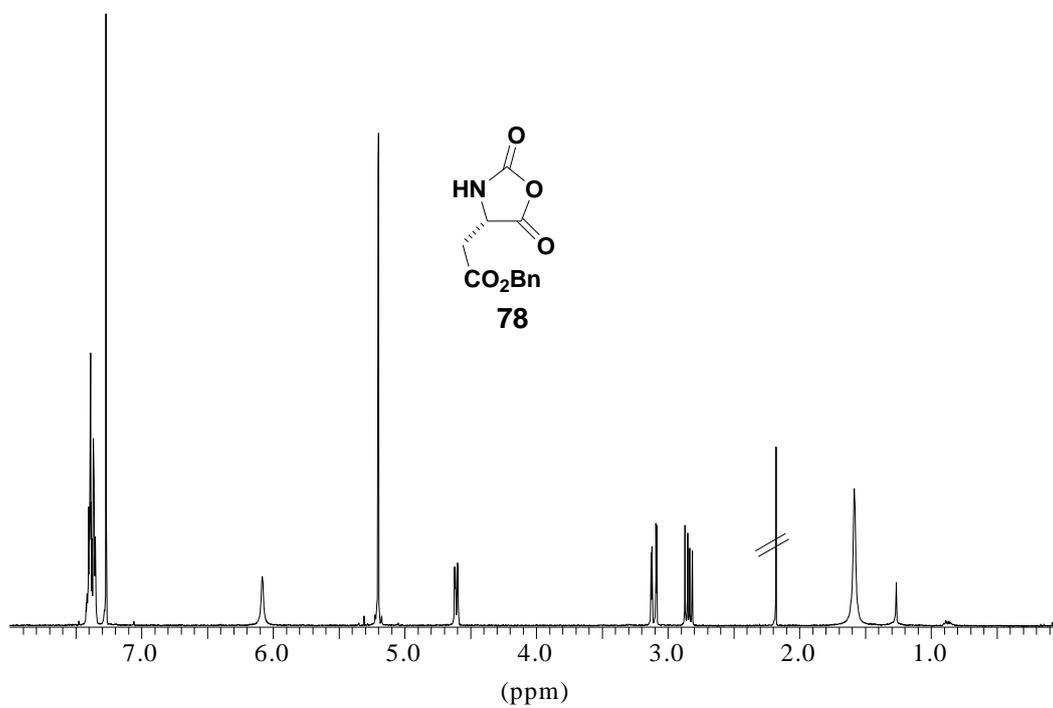
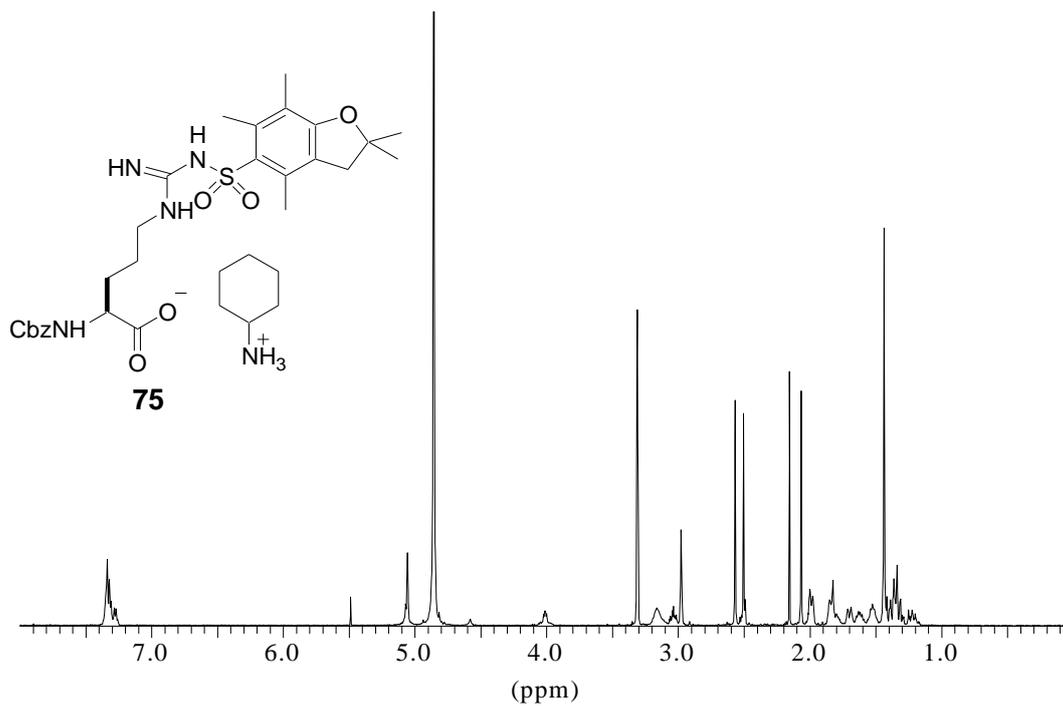


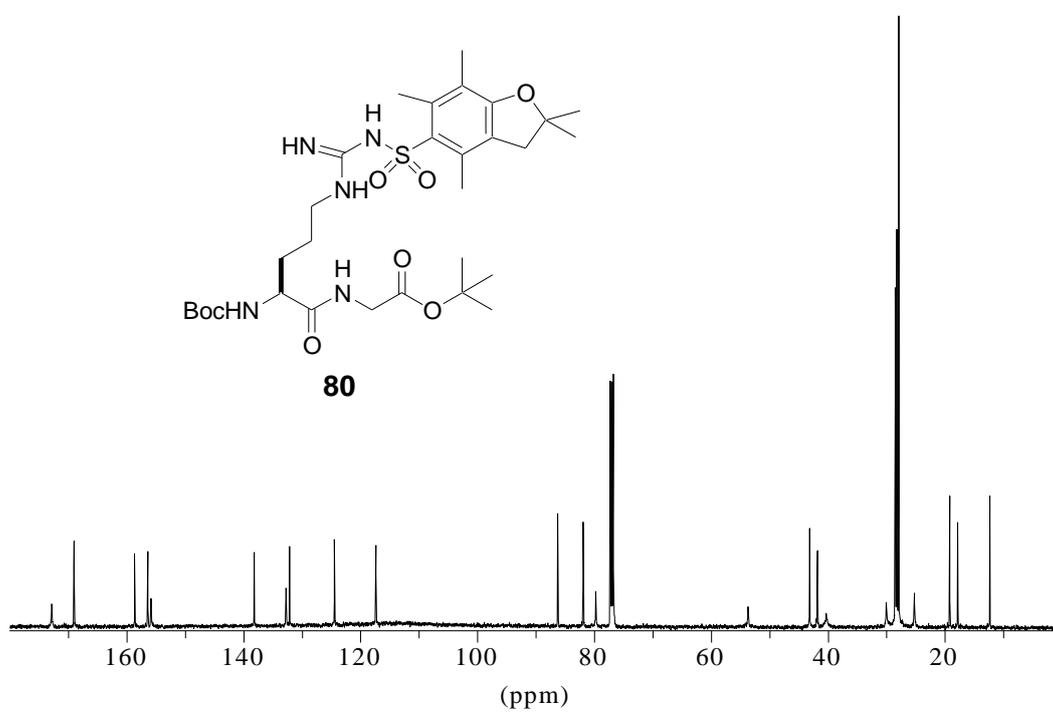
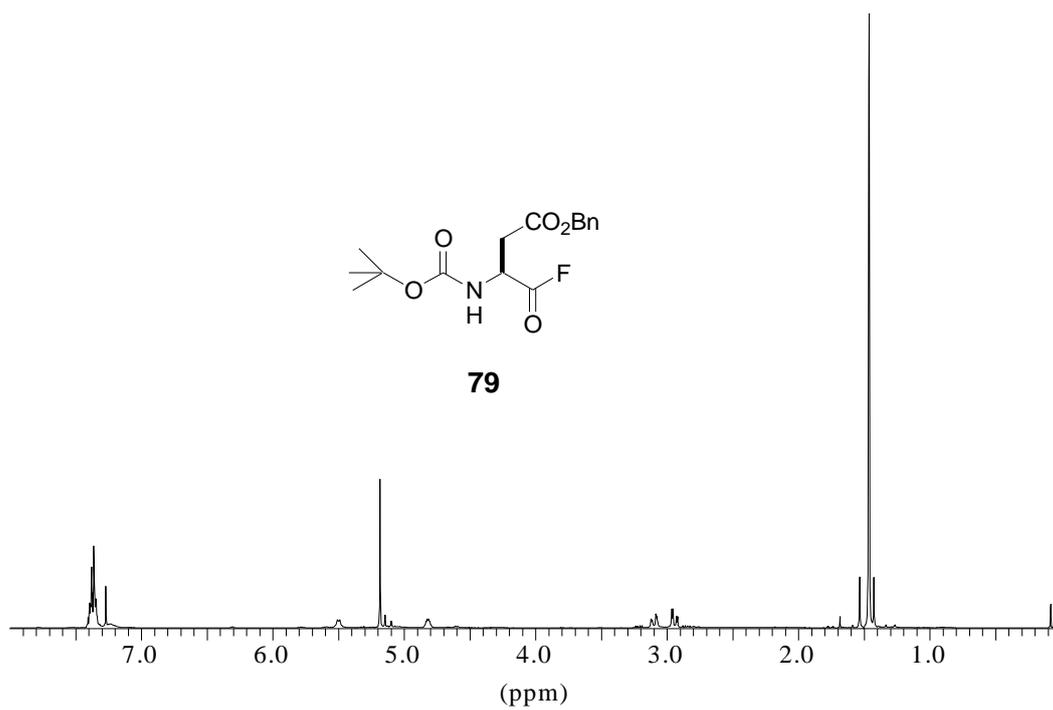


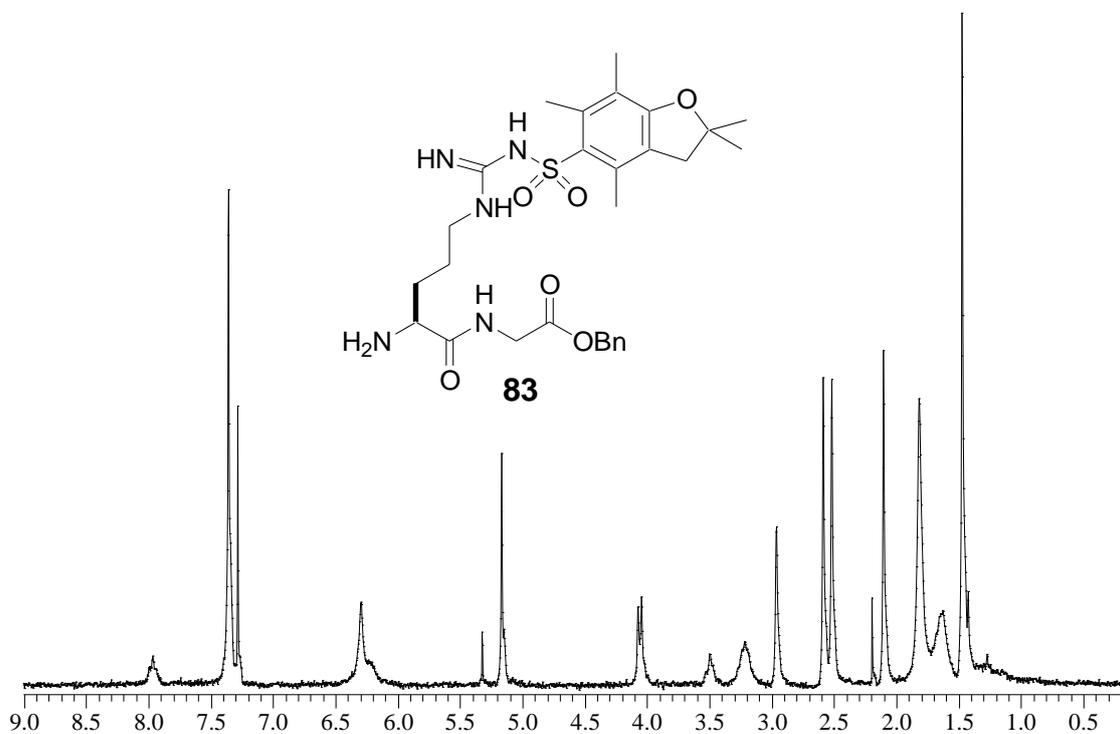
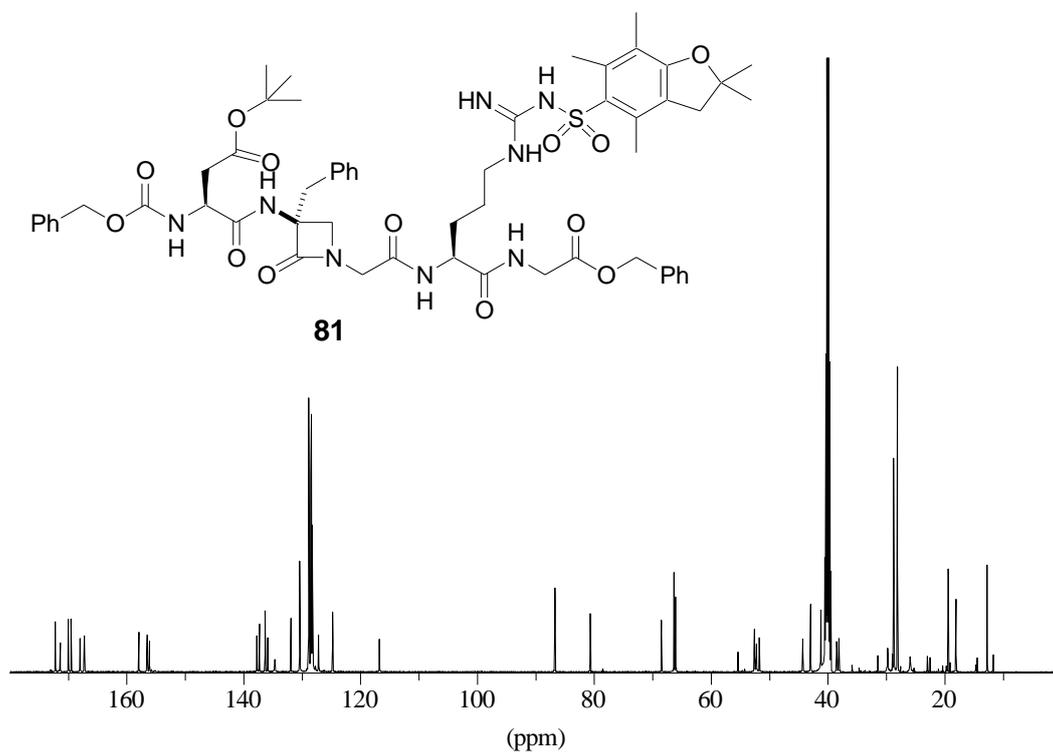


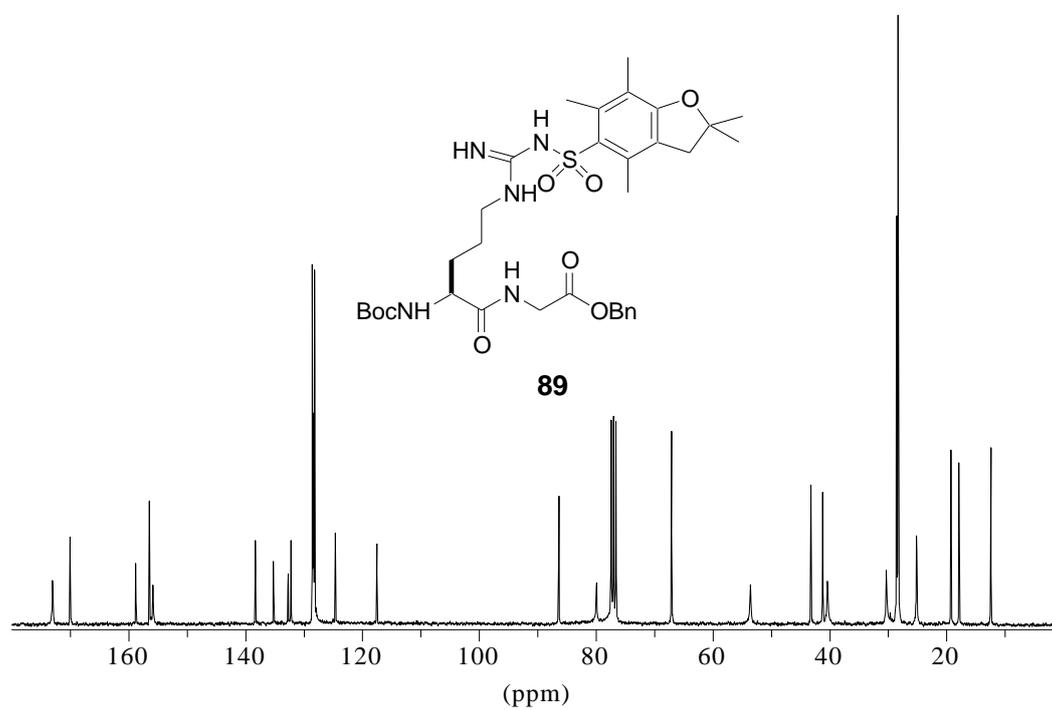
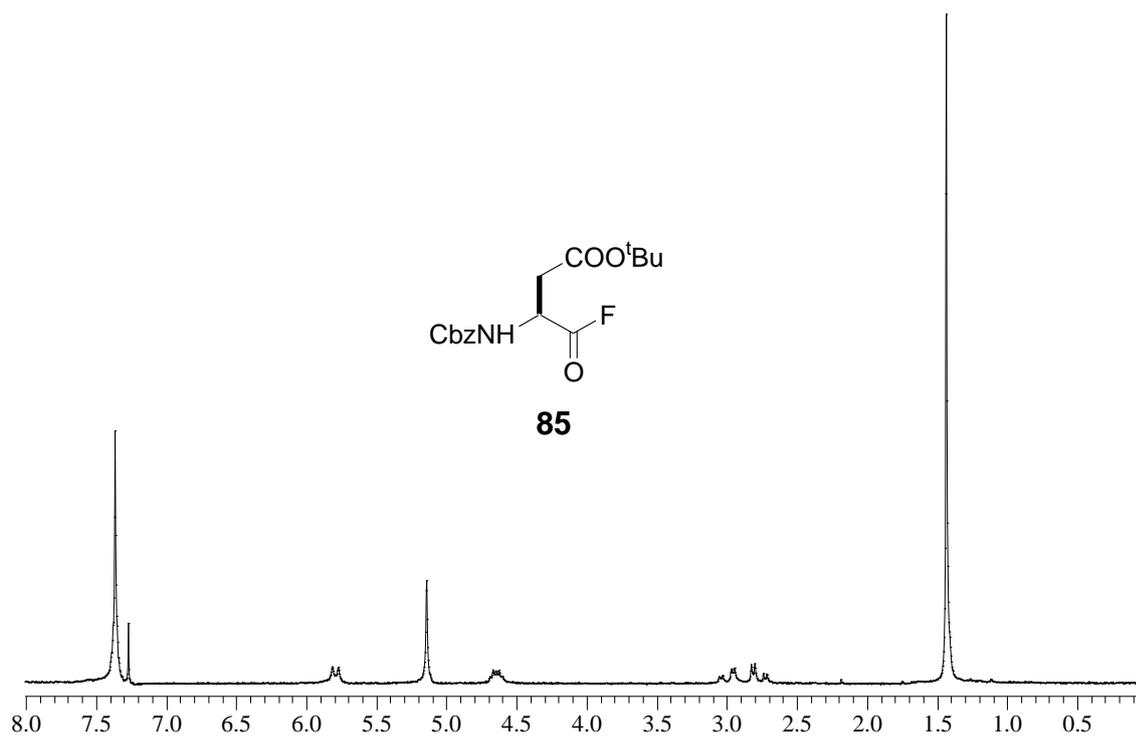












Publicaciones

Scavenging of Fluorinated *N,N*-Dialkylureas by Hydrogen Bonding: A Novel Separation Method for Fluorous Synthesis

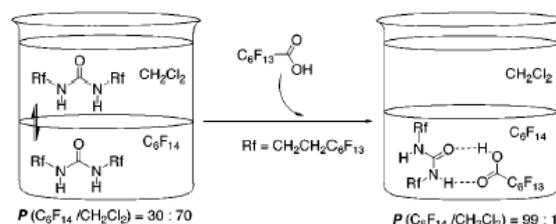
Claudio Palomo,* Jesus M. Aizpurua,* Iraida Loinaz, Maria Jose Fernandez-Berridi, and Lourdes Irusta

Departamento de Química Orgánica-I, Universidad del País Vasco, Facultad de Química, Apdo 1072, 20080 San Sebastián, Spain

appaipj@sc.ehu.es

Received May 24, 2001

ABSTRACT



A dramatic solubility increase in fluorous solvents is observed for *N,N*-di(perfluoroalkyl)ureas when hydrogen bonding complexes are formed with commercially available perfluoroalkanoic acid scavengers. As a case example, analytically pure peptides and esters are obtained using this novel separation method.

Fluorous Biphasic Catalysis¹ and Fluorous Synthesis² are ensembles of synthetic techniques based on the selective partition of perfluorinated catalysts, substrates, reagents, products, or reagent byproducts in bilayer systems consisting of an organic solvent and a “fluorous” fluid.³ The success of such approaches relies on the efficient establishment of different phase behavior at the reaction and purification stages,^{3b} which, under ideal conditions, should allow the reaction to be conducted in a homogeneous liquid phase and the purification in a multiphase (two or three) liquid system by simple separation. This criterion is fulfilled to a great

extent by catalytic processes involving hydroformylation,⁴ hydroboration,⁵ C–C coupling,⁶ and oxidations,⁷ but its application to *stoichiometric* fluorous syntheses, based on phase-labeled substrates or reagents, is not trivial. Reagents labeled with “light” fluorine tags⁸ (Figure 1), bearing one or two perfluorinated medium-sized chains (e.g., C₆F₁₃), are highly desirable when compared to “heavy” fluorine tags, because of their lower molecular weight and their higher solubility in polar organic solvents (A). However, the purification stage for “light”-tagged fluorous byproducts results in a poor separation from products (B). The introduc-

(1) Horvath, I. T.; Rabai, J. *Science* **1994**, *266*, 72–75.
(2) Suder, A.; Hadida, S.; Ferritto, R.; Kim, S. Y.; Jeger, P.; Wipf, P.; Curran, D. P. *Science* **1997**, *275*, 823–826.
(3) For reviews on this subject, see: (a) Cornils, B. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2057–2059. (b) Curran, D. P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1174–1196. (c) Horváth, I. T. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 641–650. (d) de Wolf, E.; van Koten, G.; Deelman, B.-J. *Chem. Soc. Rev.* **1999**, *28*, 37–41.

(4) Horvath, I. T.; Kiss, G.; Cook, R. A.; Bond, J. E.; Stevens, P. A.; Rabai, J.; Mozelski, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3133–3143.
(5) Juliette, J. J.; Horvath, I. T.; Gladysz, J. A. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1610–1612.
(6) Kleijn, H.; Rijnberg, E.; Jastrzebski, J. T. B. H.; van Koten, G. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 853–855.
(7) Klement, I.; Lütjens, H.; Knochel, P. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1454–1456.
(8) Curran, D. P.; Luo, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9069–9072.

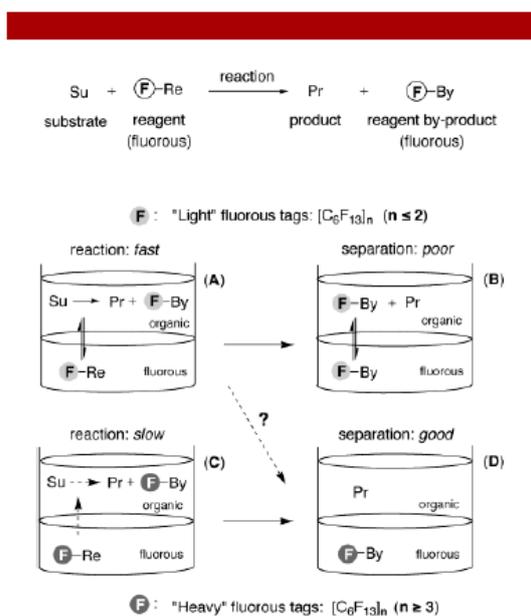


Figure 1. The reaction/separation antagonism for the stoichiometric reaction of a fluoruous-labeled reagent (F-Re): increasing the number of perfluorinated chains improves separation but hampers the reaction.

tion of more heavily fluorinated labels is only an apparent solution to this problem, because the large number of fluorine atoms required to ensure efficient byproduct purification (D)⁹ has liabilities in the reaction step (C) which becomes very slow (or does not take place at all) because it is difficult for the fluoruous reagent to cross the phase boundary.¹⁰

Herein we report on a novel scavenging method¹¹ based upon the unprecedented concept of intermolecular hydrogen-binding interaction in fluoruous medium¹² that improves the liquid-liquid separation step (B) for "light" fluoruous tags. To describe the "proof-of-principle" of our strategy, we devised hydrogen acceptor/donor systems formed by *N,N'*-dialkylureas and perfluoroalkanoic acids. This choice was supported by the following facts: (a) *N,N'*-dialkylureas (i.e., *N,N'*-dicyclohexylurea) are the prototypical reaction byproducts of carbodiimide-promoted reactions, including the very important peptide synthesis;¹³ (b) perfluoroalkanoic acids have superior hydrogen-binding capabilities than their alkyl or aryl homologues toward amide-like hydrogen acceptors;¹⁴

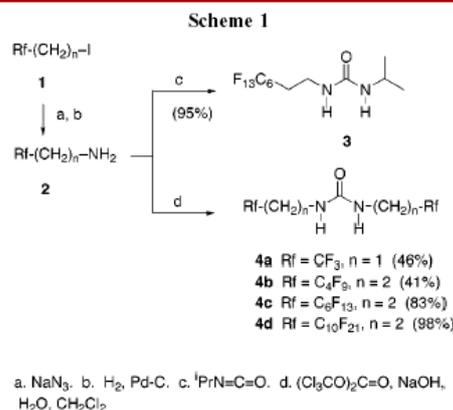
(9) Hughes, R. P.; Trujillo, H. A. *Organometallics* **1996**, *15*, 286–294.

(10) Three methods have been proposed to attain a homogeneous reaction medium able to dissolve slightly polar organic substrates and fluoruous reactants bearing three or more perfluorinated chains: (a) Temperature-promoted fusion of toluene/perfluorohexane or similar biphasic systems; see ref 1. (b) Supercritical CO₂; see: Kainz, S.; Koch, D.; Baumann, W.; Leitner, W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1628–1630. (c) Partially fluorinated solvents, such as benzotrifluoride (BTF); see: Ogawa, A.; Curran, D. P. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 450–451.

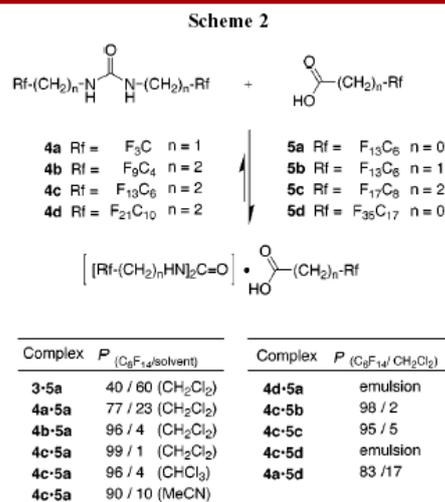
(11) The fluoruous amine $[(\text{C}_6\text{F}_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2]_2\text{NH}$ has been used for an automated urea synthesis as isocyanate scavenger by covalent bond formation. Linclau, B.; Sing, A. K.; Curran, D. P. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2835–2842.

and (c) perfluoroalkanoic acids are commercially available compounds.

Thus, *N,N'*-dialkylureas **3** and **4** bearing, respectively, one and two fluoruous tags were readily prepared from amines **2**¹⁵ (Scheme 1) by addition to alkyl isocyanates or by

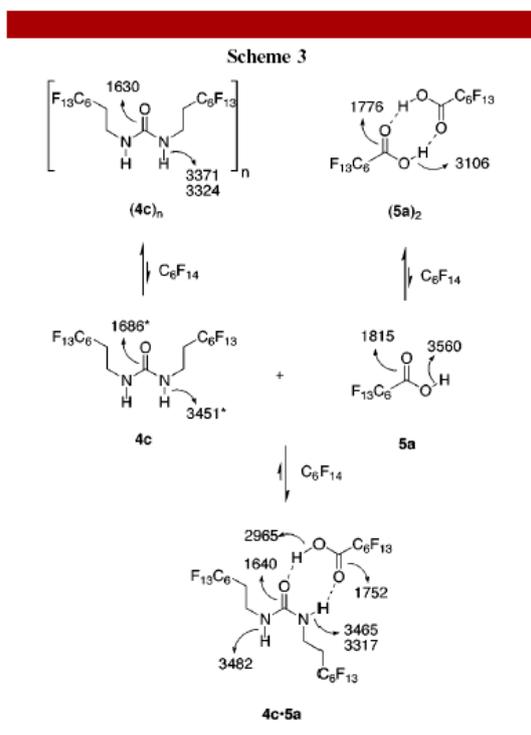


carbonylation with triphosgene¹⁶ in overall yields ranging from 41% to 98%. Polyfluorinated *N,N'*-dialkylureas **4a–d** were colorless or white solid compounds sparingly soluble in CH₂Cl₂ (typically, 0.3–0.6% at 25 °C) and, surprisingly, still less soluble in C₆F₁₄ (<0.1%). Our finding was that ureas **4a–d** dissolved immediately upon the addition of 1 equiv of most of the polyfluoroalkanoic acids **5a–d** in a biphasic CH₂Cl₂/C₆F₁₄ system (Scheme 2). The gravimetric determination of the partition coefficients *P*_{C₆F₁₄/CH₂Cl₂} at 25 °C revealed ratios as high as 99/1 for complex **4c·5a**, bearing medium-size fluorinated chains (Rf = C₆F₁₃).



Replacement of dichloromethane by more coordinating solvents, such as acetonitrile, gave moderately lower partition coefficients. Experiments to determine the minimum number of fluorine atoms in the urea component to attain an efficient partition indicated that less fluorinated ureas **4a** and **4b** gave unsatisfactory values with either medium-sized (complex **4a·5a**) or long-sized perfluoroalkanoic acids (complex **4a·5d**). On the other hand, perfluoroheptanoic acid **5a** was also more efficient than their pony-tailed counterparts **5b** or **5c** bearing, respectively, one or two methylene spacers and also than long-sized acid **5d**. Urea/acid 1:1 complexes were isolable waxy solids or viscous liquids. For instance, **4c·5a** was a stable noncrystalline solid at room temperature but dissociated slowly on heating under vacuum ($90\text{ }^{\circ}\text{C}/10^{-4}$ Torr; 4 h) allowing the quantitative recovery of the pure urea **4c** (98%) and the sublimated perfluoroheptanoic acid **5a** (96%).

Even though the precise nature of the urea–acid hydrogen bindings is not fully clear at present, a FTIR comparative analysis (Scheme 3) of 5×10^{-3} M solutions of **4c**, **5a**, and



1:1 mixtures of **4c** and **5a** showed that changing the solvent from CH_2Cl_2 to C_6F_{14} dramatically enhanced the dimerization

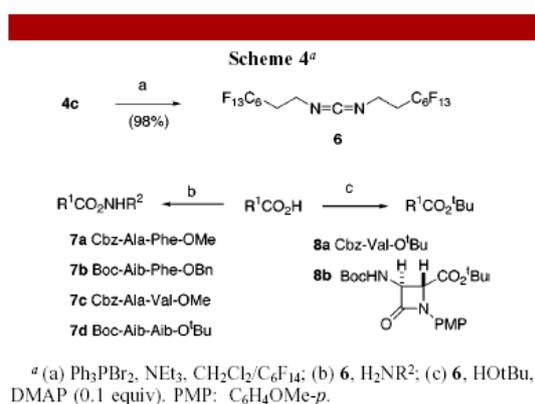
(12) Fully fluorocarbon-soluble coordination complexes of Mn(II) perfluorocarboxylates and perfluorinated triamines have been described recently. See: Vincent, J.-M.; Rabion, A.; Yachandra, V. K.; Fish, R. H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2346–2349.

(13) For reviews, see: (a) Mikolajczyk, M.; Kielbasinski, P. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 233–284. (b) Williams, A.; Ibrahim, I. T. *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 589–636.

of the acid **5a**, the autoaggregation of urea **4c**, and the formation of complex **4c·5a**. Urea **4c** was present in CH_2Cl_2 essentially as a nonassociated species [3451 cm^{-1} (N–H); 1686 cm^{-1} (CONH amide-I); 1540 cm^{-1} (CONH amide-II)]. In C_6F_{14} , however, no free urea could be detected and the N–H and C=O amide-I bands shifted to lower frequencies [3371 cm^{-1} and 3324 cm^{-1} (N–H); 1630 cm^{-1} (CONH amide-I)], while the CONH amide-II band appeared at higher frequencies (1575 cm^{-1}), consistent with the formation of $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ autoaggregation bindings.

A 1:1 mixture of **4c** and **5a** in CH_2Cl_2 showed, in addition to the peaks previously mentioned, three strong bands in the carbonyl region [1752 cm^{-1} (C=O of **5a**, associated with the urea NH); 1640 cm^{-1} (CONH amide-I), 1563 cm^{-1} (CONH amide-II)], assigned to **4c·5a**. In C_6F_{14} a similar behavior was observed, but the free **4c** carbonyl band could not be detected, indicating that the equilibrium was completely shifted to **4c·5a**. Furthermore, a new band at 3482 cm^{-1} appeared, which was consistent with the free N–H stretching band present in **4c·5a**.¹⁷

To check the efficiency of this new separation technique for “fluorous synthesis”, some exploratory reactions based on the use of the dehydrated carbodiimide counterpart of the urea **4c** were investigated (Scheme 4). Carbodiimide **6**¹⁸



was a stable and storable liquid, conveniently prepared by the reaction of urea **4c** with triphenylbromophosphonium bromide and triethylamine¹⁹ in a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_6\text{F}_{14}$ biphasic

(14) Crystalline adducts of linear oligomers of Nylon-6 precipitated from trifluoroethanol solution with perfluoroglutaric acid, but not with nonfluorinated diacids. See: Aharoni, S. M.; Wasserman, E. *Macromolecules* **1982**, *15*, 20–25.

(15) Trabelsi, H.; Szönyi, F.; Michelangeli, N.; Cambon, A. *J. Fluorine Chem.* **1994**, *69*, 115–117. None of ureas **4a–d** has been described yet.

(16) Correa, A.; Denis, J.-N.; Greene, A. E. *Synth. Commun.* **1991**, *21*, 1–9.

(17) Application of the NMR titration method allowed the estimation of a weak association constant ($K_a = 37\text{ M}^{-1}$; $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) for **4c·5a** in CD_2Cl_2 observing the shift of the NH protons in fast dynamic exchange [$\delta(\mathbf{4c}) = 4.53\text{ ppm}$; $\delta(\mathbf{4c}\cdot\mathbf{5a}) = 5.01\text{ ppm}$], whereas the autoaggregated nature of **4c** in C_6F_{14} (CDCl_3 as external standard) prevented from a reliable determination of K_a for **4c·5a**. In both solvents, no formation of complexes of higher stoichiometry than 1:1 could be detected when an excess of **5a** was added. For methods of determination of association constants by NMR, see: Fielding, L. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6151–6170.

solvent medium. Simple separation and evaporation of the fluoros phase afforded the pure product **6** in 98% isolated yield, thus setting the stage for the efficient recycling of urea **4c**.

Condensation reactions carried out in a biphasic CH₂Cl₂/C₆F₁₄ medium proceeded to give good yields of dipeptides **7a–d** after being washed twice with a solution of perfluoroheptanoic acid in perfluorohexane and once again with perfluorohexane.²⁰ This isolation technique was also compatible with ternary systems, including acidic aqueous solutions, to separate basic compounds (i.e., 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridine), as illustrated in the case of *tert*-butyl esters **8a,b**. The ¹H NMR (500 MHz) spectra of crude products showed essentially epimerization-free pure products with no traces of fluoros byproducts, whereas a more accurate determination of fluoros urea **4c** by GC-MS analysis, using phenanthrene as internal standard, gave concentrations in the range 0.1–0.3% (Table 1).

(18) For another synthesis of carbodiimide **6**, see: Trabelsi, H.; Bollens, E.; Jouani, M. A.; Gaysinski, M.; Szönyi, F.; Cambon, A. *Phosphorus, Sulfur Silicon* **1994**, *90*, 185–191.

(19) Palomo, C.; Mestres, R. *Synthesis* **1981**, 373–374.

(20) **Preparation of peptides 7a–d**: equimolar amounts of *N*-protected amino acid, α -amino ester and **6** (3×10^{-4} mol each) in CH₂Cl₂ (1 mL), and C₆F₁₄ (1 mL) were stirred at room temperature for 16 h. The mixture was washed successively with perfluoroheptanoic acid (0.4 M in C₆F₁₄, 0.5 mL \times 2) and C₆F₁₄ (0.5 mL), and the CH₂Cl₂ phase was separated and evaporated. **Preparation of *tert*-butyl esters 8a,b**: a biphasic mixture (CH₂Cl₂/C₆F₁₄: 1.5/1.5 mL) of carboxylic acid (4.6×10^{-4} mol), *tert*-butyl alcohol (5×10^{-4} mol), 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridine (5×10^{-5} mol), and **6** (5×10^{-4} mol) was stirred at room temperature for 18 h. Aqueous HCl (1 M, 1 mL) and perfluoroheptanoic acid (5×10^{-4} mol) were added, and the central CH₂Cl₂ phase was washed successively with perfluoroheptanoic acid (0.5 M in C₆F₁₄, 1 mL) and C₆F₁₄ (0.5 mL). Evaporation of the CH₂Cl₂ phase gave the product.

(21) Gibson, F. G.; Park, M. S.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7503–7507.

(22) Dudash, J.; Jiang, J.; Mayer, S. C.; Joullie, M. M. *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 349–356.

(23) Chevallet, P.; Garrouste, P.; Malawska, B.; Martinez, J. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7409–7412.

Table 1. Condensation Reactions Promoted by Carbodiimide **6** [see ref 20]

	yield (%)	residual 4c (%) ^a	mp (°C)	[α] ²⁵	
				exp. (solvent)	lit.
7a	81	0.2	100–101	–9.0 (EtOH)	–8.3 ²¹
7b	85	0.2	94–95	+5.1 (CH ₂ Cl ₂)	
7c	85	<0.1	82–84	–27.9 (CHCl ₃)	–30.8 ²²
7d	73	<0.1	oil		
8a	85	<0.1	oil	–21.5 (EtOH)	–23 ²³
8b	95	0.3	55–56	+37.2 (CH ₂ Cl ₂)	

^a Determined by GC-MS analysis of the reaction crude.

In conclusion, the examples described here illustrate a novel solution to the reactivity/separation problem of stoichiometric “fluorous synthesis” and set the basis for further strategies based upon the new concept of fluoros chain multiplication through hydrogen binding interactions.

Acknowledgment. This work was supported by CICYT (Project: SAF 98-0159-C02-01), Universidad del País Vasco (UPV: 170.215-G47/98), and Diputación Foral de Gipuzkoa. A grant from Gobierno Vasco to L. L. is gratefully acknowledged.

Supporting Information Available: Preparation procedures and physical and spectroscopic data for compounds **3**, **4a–d**, and **6**, FTIR spectra of **4c**, **5a**, and **4c·5a**, and analytical methods to determine the purity of **7a–d** and **8a,b**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

OL016165+

July 31, 2003

Draft “Preparations” from:

The Handbook on Fluorous Chemistry

Wiley-VCH, in press

Editors: John Gladysz, István Horváth and Dennis P. Curran

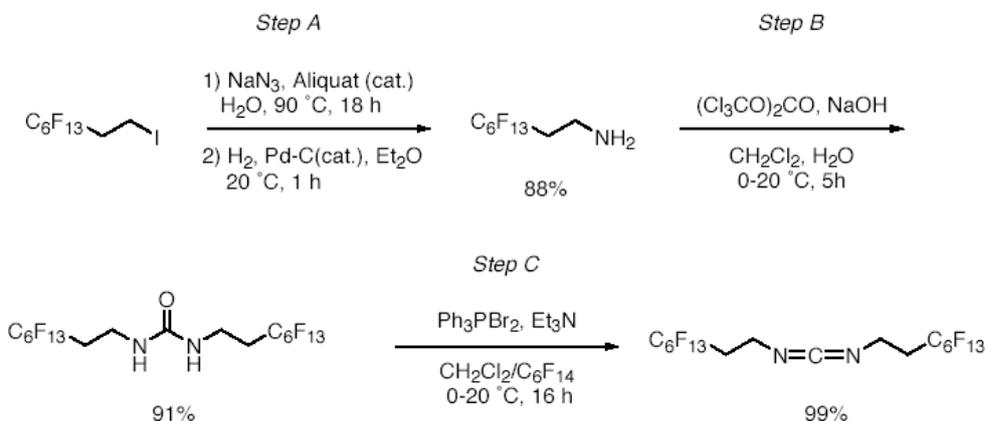
Contact editor for preparations is Dennis P. Curran, curran@pitt.edu,
1-412-624-8240

These copyrighted preparations are intended only for the use of the authors and
their groups and are not for general distribution

41 Aizpurua prep.doc

COMPOUND NAME. *N,N'*-bis-(1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-Perfluorooctyl)carbodiimide

Authors: Claudio Palomo, Jesús M. Aizpurua and Iraida Loinaz, Departamento de Química Orgánica-I, Universidad del País Vasco, San Sebastián 20018, Spain; email: qppaiipj@sc.ehu.es

Reaction:

Reagents: 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-Perfluorooctyl iodide [2043-57-4] was purchased from Fluka A.G. and perfluorohexane [355-42-0] from Fluorochem Ltd. Methyltrioctylammonium chloride (Aliquat[®] 336)¹ [5137-55-3] was available from Acros Chemical Company. Triethylamine was distilled over calcium hydride prior to use. All reagents and solvents were used without purification.

Experimental Procedures:

Step A. 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyl amine: A 50-mL, three-necked, round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer, thermometer and reflux condenser is charged with sodium azide (2.60 g, 40 mmol), water (6.00 mL), 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorooctyl iodide (4.89 mL, 20 mmol) and methyltridecylammonium chloride (Aliquat[®] 336) (0.40 g, 1 mmol). The mixture is heated overnight to 90-100°C (oil bath) under stirring and then is cooled to 0°C. The lower

41 Aizpurua prep.doc

phase, consisting of pure *1H,1H,2H,2H*-perfluorooctyl azide, is separated by decantation using a pipette (7.70 g, 99 %)² and used without purification in the next step. A high pressure hydrogenator³ equipped with a mechanical stirrer and temperature controller is charged with diethyl ether (150 mL), 10% Pd-C (150 mg) and *1H,1H,2H,2H*-perfluorooctyl azide (7.70 g, 19.8 mmol). Hydrogen pressure is set at 150 psi and the mixture is hydrogenated over 1 h at 25°C. The hydrogenator is slowly depressurized, purged with fresh hydrogen⁴ and the hydrogenation is continued at 150 psi and 25°C for 16 h. The reactor is depressurized again and the resulting ethereal solution is filtered through a pad of celite in a funnel. The celite is washed with dried diethyl ether (20 mL) and the solvent is carefully evaporated under reduced pressure (20°C/20mmHg) to afford the product as a colorless liquid; yield, 9.59 g (88%): ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.30-1.21 (s_b, 2 H), 2.34-2.17 (m, 2 H), 3.04 (t, 2 H, J = 7Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 34.3 (s_b), 34.7 (t, J_{C-F} = 21 Hz), 125-140 (m).

Step B. N,N'-bis(1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyl)urea: A solution of triphosgene (2.60 g, 8.80 mmol) in CH₂Cl₂ (13 mL) is added dropwise to a stirred cold (0°C) mixture of the corresponding 2,2,2-trifluoroethylamine (9.59 g, 26.4 mmol), CH₂Cl₂ (20 mL) and 6M NaOH (26 mL). Stirring of the mixture to room temperature is continued for 5 h, while a white precipitate is observed. The CH₂Cl₂ is evaporated directly from the mixture (rotavapor, carefully because of the foam) and the solid is dissolved in diethyl ether (30 mL) and washed with brine (5 x 35 mL) until neutrality. The organic layer is dried (MgSO₄), evaporated and the product crystallized from methanol (50 mL); yield, 9.03 g (91%): ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.48 (m, 4 H), 3.70 (s_b, 4 H), 6.48 (s_b, 2 H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 32.8 (t, J_{C-F} = 21 Hz), 33.9, 159.

Step C. N,N'-bis-(1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyl)carbodiimide: A suspension of *N,N'*-bis-(*1H,1H,2H,2H*-perfluorooctyl)urea (9.03 g, 12.0 mmol) in perfluorohexane (45 mL) is stirred in a dried flask under nitrogen at 0°C and a solution of triphenylphosphine (9.44 g, 36.0 mmol) in CH₂Cl₂ (90 mL) is added. Then, bromine (1.84 mL, 5.75 g, 36.0 mmol) is added dropwise until

41 Aizpurua prep.doc

a drop gives a persistent yellow color to the upper CH₂Cl₂ solution. Finally, triethylamine (8.36 mL, 60 mmol) is added dropwise and the reaction is vigorously stirred at 0°C for 15 min and at room temperature for 16 h. The lower fluoruous colorless solution is separated with a syringe and placed in another flask under nitrogen. The remaining CH₂Cl₂ brown suspension is extracted twice with perfluorohexane (8 mL x 2) and the combined fluoruous solution is evaporated in the rotavapor to afford pure carbodiimide as a colorless liquid;⁵ yield, 8.72 g (99%): ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.29-2.5 (m, 2 H), 3.59 (t, 2 H, J = 7 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 32.3 (t, J_{C-F} = 21 Hz), 38.5 (s), 105-125 (m), 139.0 (s).

Discussion:

N, N'-Dialkylcarbodiimides are among the most popular dehydrating reagents, widely used in despite the purification difficulties often met to separate by product *N, N'*-dialkylureas from polar reaction products (typically, peptides). A chromatography-free fluoruous version of the peptide synthesis, based on the use of *N, N'*-bis-(1*H, 1H, 2H, 2H*-perfluorooctyl)carbodiimide, has been described recently as an alternative to the existing methods.⁶

Though a different synthesis of *N, N'*-bis-(1*H, 1H, 2H, 2H*-perfluorooctyl)carbodiimide has been reported^{7,8} to take place in 86 % yield from 1*H, 1H, 2H, 2H*-perfluorooctyl azide and 1*H, 1H, 2H, 2H*-perfluorooctyl isocyanate by means of triphenyliminophosphorane intermediates, the method requires a careful final distillation to purify the product. The use of *N, N'*-bis(1*H, 1H, 2H, 2H*-perfluorooctyl)urea as carbodiimide source,⁹ combined with a fluoruous protocol consisting of phase separation and evaporation, circumvents such a problem and ensures the reuse of spent fluoruous materials.¹⁰

References:

41 Aizpurua prep.doc

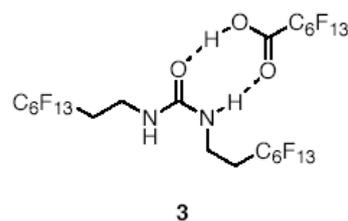
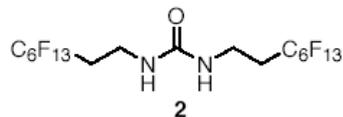
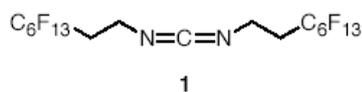
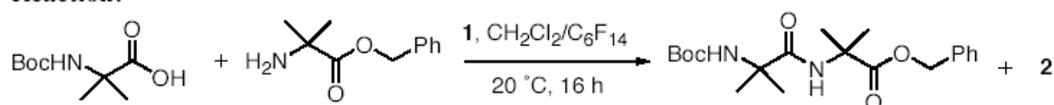
1. Phase transfer-catalyst presented as a liquid mixture of C₈ and C₁₀ chains with C₈ predominant.
2. ¹H NMR(CDCl₃): 3.62 (t, 2H, J= 7.0), 2.5-2.3 (m, 2H). The presence of trace amounts of Aliquat[®] 336 in the product is irrelevant for subsequent reactions.
3. Model Parr-4842 from Parr Instrument Company. Volume: 350 mL, max. pressure 3000 psi.
4. An increase of pressure may be observed due to the nitrogen evolved during the reaction. To attain a complete transformation to the amine it is necessary to purge periodically the nitrogen formed during the reaction.
5. Storable under nitrogen for several months at -20°C.
6. C. Palomo, J. M. Aizpurua, I. Loinaz, M. J. Fernandez-Berridi, L. Irusta, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2361-2364. See also the accompanying procedure.
7. a) H. Trabelsi, E. Bollens, M. A. Jouani, M. Gaysinski, F. Szönyi, A. Cambon, *Phosphorous, Sulfur Silicon* **1994**, *90*, 185-191. b) E. Bollens, F. Szonyl, A. Cambon, *German Patent*, 1990, DE 4016071.
8. H. Trabelsi, F. Szönyi, N. Michelangeli, A. Cambon, *J. Fluorine Chem.* **1994**, *69*, 115-117. 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-Perfluorooctyl amine has been previously prepared in 83% yield by reduction of 1-1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorooctyl azide with 98% hydrazine and Raney nickel at 60°C.
9. C. Palomo, R. Mestres, *Synthesis* **1981**, 373-374.
10. Several runs of reaction C using recovered *N,N'*-bis(1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorooctyl)urea afforded carbodiimide yields above 95%.

42 Aizpurua prep.doc

COMPOUND NAME. *tert*-Butoxycarbonyl- α -aminoisobutyryl- α -aminoisobutyric Acid Benzyl Ester (Boc-Aib-Aib-OBn). Peptide Synthesis with a Fluorous Carbodiimide Reagent.

Authors: Claudio Palomo, Jesús M. Aizpurua and Iraida Loinaz, Departamento de Química Orgánica-I, Universidad del País Vasco, San Sebastián 20018, Spain; email: qppaiipj@sc.ehu.es

Reaction:



Reagents:

N,N'-bis-(1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorooctyl)carbodiimide [133600-23-4] is prepared from urea **2** following the method described in the accompanying procedure and α -aminoisobutyric acid benzyl ester (H-Aib-OBn) [55456-01-1] is prepared according to the literature procedure.¹ Perfluoroheptanoic acid [375-85-9] and perfluorohexane [355-42-0] are commercially available from Fluorochem Ltd. All compounds are used without purification.

Experimental Procedure:

A flame-dried 50-mL round-bottomed flask equipped with a magnetic stirrer is charged with dry CH_2Cl_2 (10 mL), benzyl α -aminoisobutyrate (0.48 g, 2.5 mmol) and α -*tert*-

42 Aizpurua prep.doc

butoxycarbonylamino-isobutyric acid (0.51 g, 2.5 mmol) under nitrogen atmosphere. A solution of bis-(1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorooctyl)carbodiimide **1** (1.97 g, 2.7 mmol) in perfluorohexane (10 mL) is added and the biphasic mixture is vigorously stirred for 24 h at room temperature. Perfluoroheptanoic acid (0.91 g, 2.5 mmol) is added to the resulting suspension, the mixture is stirred for 5 min,² and the fluorous phase (lower) is separated with a syringe. The washing is repeated using successively a solution of perfluoroheptanoic acid (0.36 g, 1.0 mmol) in perfluorohexane (5 mL) and perfluorohexane (5 mL). Evaporation of the dichloromethane solution provides the pure product, yield: 0.70 g (74%): ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.42 (s, 12H), 1.55 (s, 9H), 4.97 (s, 1H), 5.15 (s, 2H), 7.33 (m, 5H). ¹³C NMR(CDCl₃): 24.5, 25.4, 28.2, 56.2, 56.7, 67.0, 72.1, 128.0, 128.1, 128.4, 135.7, 154.8, 173.8, 174.3.

Recovery of urea 2: The fluorous solutions are combined and evaporated in a 20 mL flask to give a syrup consisting of the impure urea/perfluorohexanoic complex **3**. Kugelrohr distillation is carried out cooling the collecting bulb tubes with an acetone/dry ice bath (-78°C). After 3 h heating at 110°C/0.02 torr, perfluoroheptanoic acid is separated (1.16 g, 91% recovery). The solid residue in the oven flask is crystallized from methanol to afford pure urea, yield: 1.76 g (87 % recovery).

Discussion: The noncoded peptide sequence -Aib-Aib- occurring, for example, in peptaibol antibiotics³ is a prototypical case of difficult coupling between hindered α,α -disubstituted α -amino acids.⁴

Dehydration reactions using fluorous carbodiimide **1**⁵ are conducted under standard peptide synthesis conditions, as exemplified by the preparation of building block Boc-Aib-Aib-OBn.^{4,6} An important advantage of the method is the easy removal of urea **2** byproduct by simple addition of perfluoroheptanoic acid to the reaction mixture, followed by perfluorohexane/dichloromethane phase separation. Under these conditions, hydrogen bonded

42 Aizpurua prep.doc

complex **3** and eventual traces of the starting carbodiimide partition very preferably to the fluoruous phase, leaving almost pure peptide in the dichloromethane layer.

References:

1. D. Leibfritz, E. Haupt, N. Dubischar, H. Lachmann, R. Oekonomopu, G. Jung, *Tetrahedron*, **1982**, 38, 2165-2168.
2. A white precipitate of *N,N*-bis(1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorooctyl)urea **2** is gradually formed during the reaction which dissolves immediately in the presence of perfluoroheptanoic acid to form the fluoruous-soluble complex **3**.
3. A. Wiest, D. Grzegorski, B.-W. Xu, C. Goulard, S. Rebuffat, D. J. Ebole, B. Bodo, C. Kenerley, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 20862-20868.
4. E. Frerot, J. Coste, A. Pantaloni, M. N. Dufour, P. Jouin, *Tetrahedron*, **1991**, 47, 259-270.
5. C. Palomo, J. M. Aizpurua, I. Loinaz, M. J. Fernandez-Berridi L. Irusta, *Org. Lett.* **2001**, 3, 2361-2364.
6. P. Van Roey, G. D. Smith, *Acta Cryst.* **1983**, C39, 894-896.