

**Tesi Doctoral**

**NOVES ESTRUCTURES BASADES EN AMINOÀCIDS  
TRIFUNCIONALS: FOLDÀMERS I QUIMIOTEQUES  
BASADES EN DERIVATS DE PROLINA**

**Josep Maria Farrera Sinfreu**



**Departament de Química Orgànica  
Facultat de Química  
Universitat de Barcelona  
Barcelona, Maig 2006**



**Tesi Doctoral**

**NOVES ESTRUCTURES BASADES EN AMINOÀCIDS  
TRIFUNCIONALS: FOLDÀMERS I QUIMIOTEQUES  
BASADES EN DERIVATS DE PROLINA**

**Josep Maria Farrera Sinfreu**

**Programa de Doctorat: Química Orgànica**

**Bienni 2001-2003**

**Departament de Química Orgànica**

**Facultat de Química**

**Universitat de Barcelona**



Memòria presentada per  
Josep Maria Farrera Sinfreu  
Per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Josep Maria Farrera Sinfreu

Revisada per:

Dra. Miriam Royo Expósito  
Parc Científic de Barcelona  
Directora de Tesi

Dr. Fernando Albericio Palomera  
Universitat de Barcelona  
Director de Tesi

Barcelona, Maig 2006



*¿I com, sinó sabent-les i sentint-les,  
podria dir les coses que ara dic?*

*No parlo pas de saviesa, parlo  
de vida i de misteris,  
i els camins en són plens.*

*Tot giravolta  
i ens arrossega.*

*Ple de mi i de tot,  
alço la copa i bec.  
Per la finestra  
penetra a dolls l'aigua brogent dels somnis.*

Miquel Martí i Pol





# ÍNDIX

<b>ABREVIATURES, ACRÒNIMS I ANNEXOS</b>	<b>iii</b>
<b>INTRODUCCIÓ GENERAL</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUM</b>	<b>xv</b>
<b>CAPÍTOL 1. Els grups protectors en la síntesi de pèptids en fase sòlida. Síntesi en fase sòlida de pèptids cíclics</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Introducció</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1. Síntesi de pèptids en fase sòlida: els grups protectors</b>	<b>3</b>
<b>1.1.2. Síntesi en fase sòlida de pèptids cíclics</b>	<b>8</b>
<b>1.2. Objectius</b>	<b>13</b>
<b>1.3. Resultats</b>	<b>17</b>
<b>1.3.1. Undesired removal of the Fmoc group by the free <math>\epsilon</math>-amino function of a lysine residue</b>	<b>17</b>
<b>1.3.2. Four-dimensional orthogonal solid-phase synthesis of new scaffolds based on cyclic tetra-<math>\beta</math>-peptides</b>	<b>23</b>
<b>1.4. Discussió</b>	<b>29</b>
<b>1.4.1. Eliminació prematura del grup Fmoc durant l'eliminació del grup Alloc</b>	<b>29</b>
<b>1.4.2. Aplicació d'un sistema de protecció tetra-ortogonal en una síntesi complexa de <math>\beta</math>-pèptids cíclics</b>	<b>32</b>
<b>1.5. Conclusions</b>	<b>35</b>

---

<b>CAPÍTOL 2. Foldàmers: estructura i aplicacions</b>	<b>37</b>
<b>2.1. Introducció</b>	<b>39</b>
<b>2.1.1. Foldàmers</b>	<b>39</b>
2.1.1.1. Tipus de foldàmers	40
2.1.1.2. Foldàmers bioinspirats. Peptidomimètics	42
2.1.1.3. $\beta$ -Pèptids	43
2.1.1.4. $\alpha/\beta$ -Pèptids alternats	47
2.1.1.5. $\gamma$ -Pèptids	47
<b>2.1.2. Pèptids amb capacitat de travessar la membrana cel·lular</b>	<b>49</b>
2.1.2.1. Pèptids penetradors. Alternativa a altres sistemes de transport de fàrmacs	49
2.1.2.2. Tipus de pèptids amb capacitat de travessar la membrana cel·lular	50
2.1.2.3. Mecanismes d'acció, interacció pèptid-membrana i artefactes provinents de la fixació	51
2.1.2.4. Aplicacions generals: molècules transportades	54
2.1.2.5. Avantatges i inconvenients dels pèptids penetradors sobre altres sistemes d'administració de fàrmacs	55
<b>2.1.3. Activitat antimicrobiana en <math>\beta</math>-pèptids</b>	<b>57</b>
<b>2.2. Objectius</b>	<b>58</b>
<b>2.3. Resultats</b>	<b>79</b>
2.3.1. A new class of foldamers based on <i>cis</i> - $\gamma$ -amino-L-proline	79
2.3.2. Cell-penetrating <i>cis</i> - $\gamma$ -amino-L-proline-derived peptides	91
2.3.3. Conjugació del pèptid 4a a un PNA	107
2.3.4. Propietats antimicrobianes dels $\gamma$ -pèptids	108

---

<b>2.4. Discussió</b>	<b>111</b>
<b>2.4.1. Foldàmers <math>\gamma</math>-peptídics derivats de la cis-<math>\gamma</math>-amino-L-prolina: síntesis i estudis estructurals</b>	<b>111</b>
<b>2.4.2. Capacitat dels <math>\gamma</math>-pèptids de travessar la membrana cel·lular</b>	<b>115</b>
<b>2.4.3. Aplicacions dels <math>\gamma</math>-pèptids: transportadors de fàrmacs i activitat antimicrobiana</b>	<b>118</b>
<b>2.5. Conclusions</b>	<b>120</b>
<b>CAPÍTOL 3. Aminoacil-tRNA sintetasses com a dianes terapèutiques per al descobriment de nous agents antiinfecciosos</b>	<b>121</b>
<b>3.1. Introducció</b>	<b>123</b>
<b>3.2. Objectius</b>	<b>132</b>
<b>3.3. Resultats</b>	<b>137</b>
<b>3.3.1. Solid-phase synthesis of sulfamate peptidomimetics</b>	<b>137</b>
<b>3.3.2. Solid-phase combinatorial synthesis of a Lysyl-tRNA synthetase (LysRS) inhibitory library</b>	<b>149</b>
<b>3.4. Discussió</b>	<b>177</b>
<b>3.4.1. Síntesi de sulfamats en fase sòlida</b>	<b>177</b>
<b>3.4.2. Síntesi en fase sòlida d'una llibreria d'inhibidors de la lisil tRNA sintetassa (LysRS) de <i>Plasmodium falciparium</i></b>	<b>179</b>
<b>3.5. Conclusions</b>	<b>183</b>



## **ABREVIATURES, ACRÒNIMS I ANNEXOS**



## ABREVIATURES

aa	aminoàcid
AB	àcid 3-(4-hidroximetilfenoxi)propioníc
Ac	acetil
ACN	acetonitril
Ac <sub>2</sub> O	anhídrid acètic
Alloc	al·liloxicarbonil
AM	àcid <i>p</i> -[ <i>R,S</i> ]- $\alpha$ -[1-(9-fluorenil)metoxiformamido]-2,4-dimetoxibenzil]-fenoxiacètic
Amp	<i>cis</i> -4-amino-L-prolina
Bzl	benzil
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonil
CD	dicroïsmes circulars
CF	5(6)-carboxifluoresceïna
CPPs	<i>cell penetrating peptides</i> (pèptids amb capacitat de penetrar cèl·lules)
Dab	àcid $\alpha,\gamma$ -diaminobutíric
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	diclorometà
Ddz	$\alpha,\alpha$ -dimetil-3,5-dimetoxibenziloxicarbonil
DHB	àcid 2,5-dihidroxibenzoic
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DIPCDI	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida

Et <sub>3</sub> N	triètilamina
EtOAc	acetat d'etil
ESI	espectrometria de masses amb ionització per electroesprai
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonil
h	hora
HATU	hexafluorofosfat d' <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -{(dimetilamino)-1 <i>H</i> - 1,2,3 - triazolo - [4,5 - <i>b</i> ]piridin-1-il-metilen}- <i>N</i> -metilmetanamini
HEPES	àcid <i>N</i> -2-hidroxietilpiperazina- <i>N</i> '-2-etansulfònic
HIV	virus de la immunodeficiència humana
HOAc	àcid acètic
HOBt	1-hidroxi-1,2,3-benzotriazol
Hyp	L-hidroxiprolina
IRAA	aminoàcid de referència interna
<i>iV</i>	<i>iso</i> -valeril
MALDI-TOF	espectrometria de masses amb ionització per desorció amb làser sobre una matriu i anàlisi per temps de vol
MBHA	<i>p</i> -metilbenzidrilamina
MeCN	acetonitril
MeOH	metanol
MTT	bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
MPLC	cromatografia líquida de mitja pressió
RMN	ressonància magnètica nuclear
NOE	efecte Overhauser nuclear
NOESY	espectroscòpia per efecte Overhauser nuclear
PBS	tampó fosfat salí
PhAc	fenilacetil

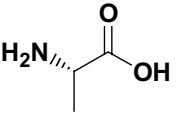
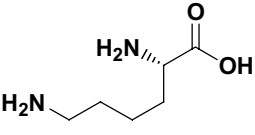
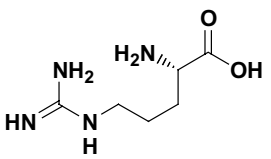
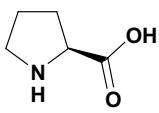
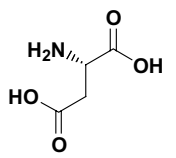
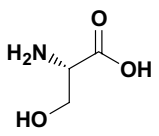
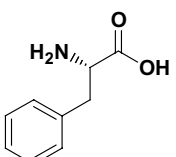
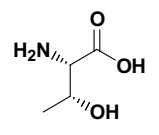
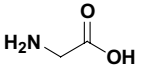


---

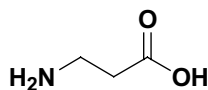
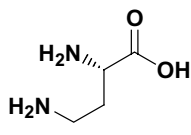
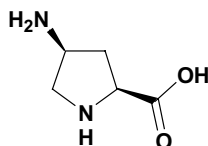
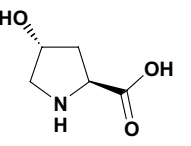
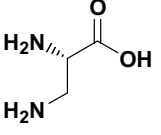
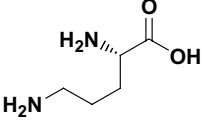
PS	poliestirè
PyAOP	hexafluorofosfat de 7-azabenzotriazol-1-il-oxitris(pirrolidino)-fosfoni
Rink	àcid 2-[4-aminometil-(2,4-dimetoxifenil)fenoxi]acètic
RP-HPLC	cromatografia líquida d'alta pressió en fase inversa
SPOS	síntesis orgànica en fase sòlida
SPPS	síntesis de pèptids en fase sòlida
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -butil
TBME	<i>tert</i> -butilmetil eter
TBTU	<i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metilen]- <i>N</i> -metilmetanamini tetrafluoroborat
TES	trietilsilà
TFA	àcid trifluoroacètic
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TOCSY	espectroscòpia de correlació total
TR-DX	Texas Red–Dextrà

## ANNEX I: AMINOÀCIDS

## AMINOÀCIDS PROTEINOGENICS

Nom	Estructura	Nom	Estructura
Alanina (Ala)		Lisina (Lys)	
Arginina (Arg)		Prolina (Pro)	
Àcid aspàrtic (Asp)		Serina (Ser)	
Fenilalanina (Phe)		Treonina (Thr)	
Glicina (Gly)			

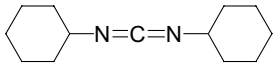
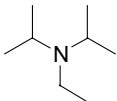
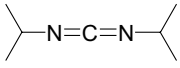
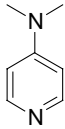
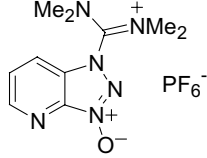
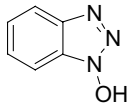
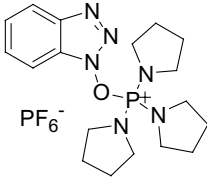
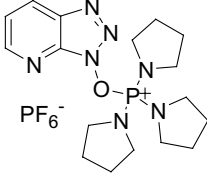
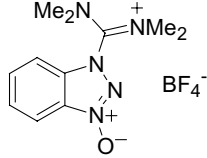
## AMINOÀCIDS NO PROTEINOGENICS

Nom	Estructura	Nom	Estructura
$\beta$ -Alanina		Àcid 2,4-diaminobutíric	
<i>cis</i> -4-Amino-L-prolina		<i>trans</i> -4-Hidroxi-L-prolina	
Àcid 2,4-diaminopropiònic		Ornitina	

## ANNEX II: GRUPS PROTECTORS

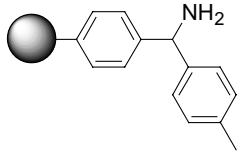
Abreviació	Nom	Estructura	Labilitat
Alloc	Aliloxycarbonil		Pd(0)
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonil		TFA
Bhoc	Benzidriloxycarbonil		TFA
Bzl	Benzyl		HF
Ddz	$\alpha,\alpha$ -dimetil-3,5-dimetoxibenziloxycarbonil		TFA
Fmoc	9-Fluorenilmetoxycarbonil		Piperidina
Mtt	4-Metiltritol		TFA
pNB	p-Nitrobenzil		Reductors
Trt	Tritil		TFA

## ANNEX III: AGENTS ACOBLANTS I ADDITIUS

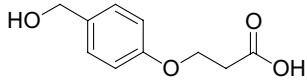
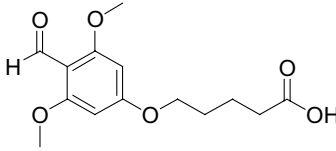
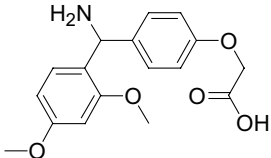
Abreviació	Nom	Estructura
DCC	Diciclohexilcarbodiimida	
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina	
DIPCDI	Diisopropilcarbodiimida	
DMAP	4-Dimetilaminopiridina	
HATU	<i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]-piridino-1-ilmetilene]- <i>N</i> -metilmetanami hexafluorofosfat	
HOBt	1-Hidroxibenzotriazole	
PyBOP	Hexafluorofosfat de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidinofosfoni	
PyAOP	Hexafluorofosfat de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidino)fosfoni	
TBTU	<i>N</i> -[(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metilene]- <i>N</i> -metilmetianami tetrafluoroborate <i>N</i> -òxid	

## ANNEX IV: RESINES I GRUPS ESPAIADORS

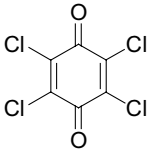
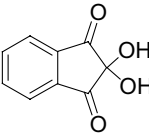
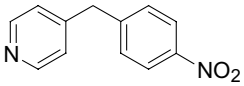
## SUPPORTS SÒLIDS

Abreviació	Nom	Estructura
MBHA	Resina 4-metilbenzhidrilamina	
Cl-Trt	Resina clortritil	
PEG		

## ESPAIADORS BIFUNCIONALS

Abreviació	Nom	Estructura
AB	Àcid 3-(4-hidroximetilfenoxi)propioníc	
BAL	Backbone Amide Linker	
Rink	Àcid 2-[4-aminometil-(2,4-dimetoxifenil)fenoxi]acètic	

**ANNEX V: REACTIUS PRINCIPALS DELS TESTS COLORIMÈTRICS**

Nom comú	Nom	Estructura
Cloranil	Tetraclorobenzoquinona	
Ninhidrina	Ninhidrina	
PNBP	4-(p-nitrobenzil)-piridina	

# **INTRODUCCIÓ GENERAL I RESUM**





## INTRODUCCIÓ GENERAL

La síntesi en fase sòlida ha esdevingut una eina fonamental en la síntesi de pèptids i oligonucleòtids. Tot i que en els darrers anys s'han desenvolupat en aquestes àrees un gran nombre de síntesis en fase sòlida, encara es fa difícil pensar en l'obtenció de qualsevol molècula orgànica utilitzant aquesta metodologia. Així, un dels problemes principals que presenta la síntesi en fase sòlida és el desenvolupament de noves estratègies de síntesi que permetin obtenir molècules amb una complexitat estructural important d'una forma ràpida i eficient. Per aconseguir-ho, es poden necessitar plataformes centrals ramificades. En aquest sentit i concretament en la síntesi de pèptids i petidomimètics, els aminoàcids trifuncionals hi juguen un paper fonamental.

Així, aquesta tesi es pot considerar un exemple de com emprar diferents plataformes trifuncionals en la síntesi d'estructures complexes com són els pèptids cíclics, els foldàmers o fins i tot en la síntesi de noves quimioteques.

Principalment hem treballat amb peptidomimètics basats en derivats trifuncionals de prolina, com són la *cis*- $\gamma$ -amino-L-prolina i la *trans*-4-hidroxi-L-prolina. La prolina és l'únic aminoàcid proteínogènic que té la cadena lateral unida covalentment a l'àtom de nitrogen de l'extrem *N*-terminal. Aquesta peculiaritat estructural la converteix en una unitat de construcció molt útil degut a les restriccions conformacionals que presenta. Així, els derivats trifuncionals de prolina abans esmentats presenten l'avantatge addicional de que els tres grups funcionals que decoren l'anell de cinc baules tenen una distribució en l'espai força atractiva per tal de ser utilitzats com a plataformes ramificadores centrals.

Així, en aquesta tesi doctoral hem treballat en tres projectes diferents, els quals tenen en comú l'ús de la síntesi en fase sòlida com a metodologia sintètica, així com la utilització d'aminoàcids trifuncionals com a blocs de construcció. Els diferents projectes s'han basat en: (i) estudi de grups protectors ortogonals en la síntesis de pèptids cíclics en fase sòlida; (ii) síntesi, estudis estructurals i aplicacions de fòldamers  $\gamma$ -peptídics derivats de la  $\gamma$ -amino-L-prolina; i (iii) síntesis en fase sòlida d'una llibreria de

compostos adreçats a inhibir la lisil-tRNA sintetasa (LysRS) de *Plasmodium falciparium*, paràsit causant de la malària.

Tanmateix, aquest es pot considerar un treball multidisciplinar, ja que a més a més de la síntesi en fase sòlida dels diferents compostos amb els que s'ha treballat, s'han dut a terme estudis d'estructura mitjançant tècniques de dicroïsm circular i ressonància magnètica nuclear i estudis biològics utilitzant tècniques com ara la fluorimetria de plaques, la citometria de flux o la microscopia confocal.

## RESUM

### **Capítol 1. Exploració de diversos grups protectors en la síntesis en fase sòlida de pèptids que contenen aminoàcids trifuncionals. Síntesi de pèptids cíclics.**

El fet de tenir a l'abast diferents sistemes de protecció per diversos grups funcionals obre la possibilitat de poder escollir la ruta sintètica més adequada per tal d'obtenir uns resultats satisfactoris a l'hora d'abordar una síntesis complexa en fase sòlida. Ara bé, molts cops, tot i disposar de sistemes de protecció ortogonals, no sempre s'arriba al resultat esperat. En el l'apartat **1.3.1.** de la present tesi doctoral descrivim els problemes derivats de treballar amb un d'aquests sistemes, concretament en el cas en el que els grups protectors d'amines Fmoc i Alloc estan continguts en el mateix bloc de construcció, com són els aminoàcids trifuncionals. Un dels problemes que s'ha detectat és l'eliminació prematura del grup Fmoc en les condicions d'eliminació dels grup Alloc. Així, vàrem observar que en alguns casos, en pèptids on havíem incorporat Fmoc-L-Lys(Alloc)-OH sobre un suport polimèric, al eliminar el grup Alloc en presència del grup Fmoc, aquest últim podia acabar també eliminant-se. Es va establir que l'origen del problema no radicava en les condicions emprades per a l'eliminació del grup Alloc, sinó que es produïa un cop aquest ja havia estat eliminat i era l'amina que restava lliure la causant de l'eliminació prematura del grup Fmoc. Els estudis realitzats van permetre trobar mètodes alternatius d'acoblament per tal d'evitar subproductes indesitjats derivats d'aquesta reacció secundària, com són: 1) un mètode tàndem de desprotecció-acoblament utilitzant espècies reactives com els fluorurs d'àcid; 2) la substitució del grup Alloc per un grup protector làbil al medi àcid (com és el 4-metiltriril (Mtt)), fent així la desprotecció en medi àcid per tal de mantenir l'amina protonada i fent el següent aacoblament amb neutralització *in situ*.

En el l'apartat **1.3.2.** es mostren els resultats de treballar amb un sistema de protecció més complex, de tipus tetraortogonal, el qual contenia aminoàcids trifuncionals que

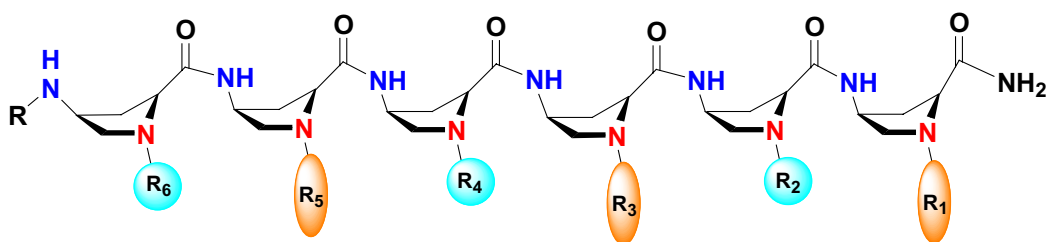
necessitaven tenir una funció temporalment bloquejada fins que s'hagués de modificar just abans de l'escissió del pèptid de la resina. L'aplicació inicial que es va explorar fou la síntesi de tetra- $\beta$ -pèptids cíclics en fase sòlida. Aquest treball ens va permetre demostrar la importància de tenir diferents sistemes de protecció ortogonals, que puguin donar una gran versatilitat a l'hora d'afrontar una síntesi complexa en fase sòlida, com són els  $\beta$ -pèptids cíclics que alternen la  $\beta$ -alanina i l'àcid 2,3-diaminopropiònic en la seqüència. El *p*-nitrobenzilester de la  $\beta$ -alanina fou ancorat a la resina BAL mitjançant una aminació reductiva i el pèptid fou allargat utilitzant química Fmoc, fent servir el grup Alloc com a protector dels grups  $\alpha$ -amino dels residus de l'àcid diaminopropiònic. Després d'eliminar el grup Fmoc de l'extrem *N*-terminal i el grup *p*NB de l'extrem *C*-terminal, el pèptid fou ciclat en fase sòlida. Finalment, els grups protectors de les cadenes laterals foren eliminats, aquestes posicions foren funcionalitzades amb motius tipus RGD i el pèptid ja ciclat fou escindit de la resina amb un tractament acidolític. Comparant la síntesi en fase sòlida amb una síntesi combinada en fase sòlida del pèptid lineal i fent la ciclació en solució, vàrem concloure que la síntesi en fase sòlida d'aquest tipus de sistemes era prou adient, obrint la possibilitat de sintetitzar llibreries d'aquest tipus de compostos en fase sòlida.

## **Capítol 2. Foldàmers $\gamma$ -peptídics derivats de la *cis*- $\gamma$ -amino-L-prolina: estructura i aplicacions**

Els  $\beta$ -pèptids són els foldàmers més ben estudiats fins al moment, ja que se n'ha descrit propietats força interessants com ara l'antimicrobiana o la seva capacitat per travessar la membrana cel·lular de cèl·lules eucariotes, fet que els converteix en bons candidats a transportadors de fàrmacs. La rellevància que estan adoptant aquests peptidomimètics respecte als pèptids naturals es deu bàsicament al fet que aquestes molècules no naturals poden millorar el que segurament és el pitjor inconvenient dels pèptids naturals, que és la baixa estabilitat en front a proteasses. En alguns treballs descrits a la literatura, anàlegs  $\beta$ -peptídics formats per  $\beta$ -aminoàcids homologats presenten una elevada estabilitat en front a proteasses i mantenen algunes propietats del pèptid model intactes, com ara la capacitat de penetració a través de la membrana

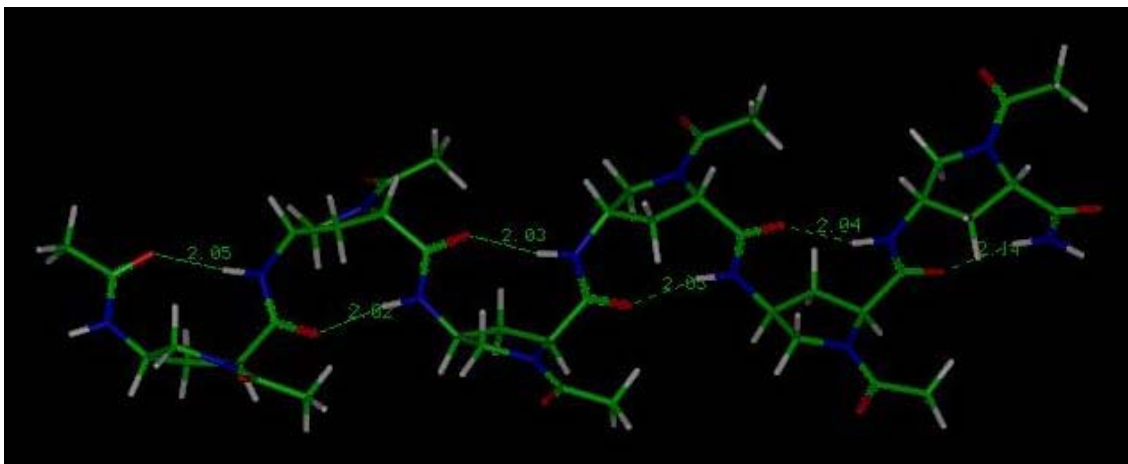
cel·lular. Els següents  $\omega$ -pèptids més estudiats són els  $\gamma$ -pèptids, encara que aquests no ho han estat tant com els seus anàlegs  $\beta$ .

En l'apartat 2.3.1. s'ha dut a terme la síntesi en fase sòlida de  $\gamma$ -pèptids derivats de la *cis*- $\gamma$ -amino-L-prolina, aprofitant un cop més la versatilitat dels grups protectors per tal d'obtenir una síntesi adequada. Es va escollir aquest bloc de construcció derivat de la prolina degut a les interessants propietats que tenen els compostos rics en prolina i a l'àmplia experiència del grup en aquest tipus de compostos. La síntesi d'aquests pèptids es va dur a terme allargant la cadena a través del grup  $\gamma$ -amino de l'aminoprolina, obtenint així l'esquelet  $\gamma$ -peptídic i tenint la possibilitat de funcionalitzar les posicions  $\alpha$  de la prolina amb diferents motius estructurals, obtenint així el que nosaltres anomenem cadenes laterals dels  $\gamma$ -pèptids (figura 1).



**Figura 1.** Esquema representatiu d'un  $\gamma$ -pèptid derivat de la *cis*- $\gamma$ -amino-L-prolina.

A més a més de descriure'n la síntesi, es va dur a terme estudis estructurals mitjançant l'ús de tècniques de dicroïsmo circular i ressonància magnètica nuclear per tal de veure quin tipus d'estructures adoptaven aquests compostos en  $H_2O$ . Les conclusions a les que vàrem arribar és que aquest tipus de compostos poden formar llaços  $C_9$ , donant com a resultat en una estructura regular una sèrie de girs concatenats d'aquest tipus, estructura que també es pot descriure com a hèlix 9 (figura 2). En aquesta estructura idealitzada de girs encadenats, els anells de prolina queden en el mateix pla, el qual és perpendicular al pla on queden disposats els enllaços amida.



**Figura 2.** Model estructural obtingut per als  $\gamma$ -pèptids deduït a partir de les dades d'RMN.

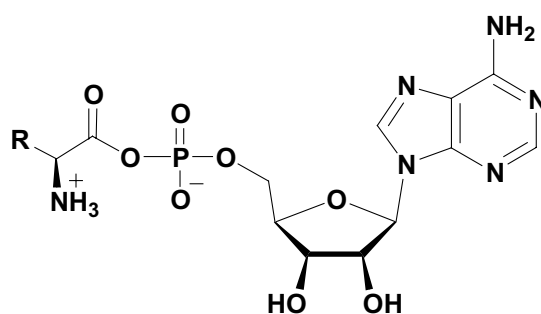
En l'apartat **2.3.2.** es varen assajar algunes propietats d'aquest tipus de compostos, com ara la seva capacitat de travessar membranes cel·lulars o l'activitat antimicrobiana. Així, un conjunt d'aquests  $\gamma$ -pèptids foren etiquetats amb una sonda fluorescent i les seves propietats de penetració a través de membranes cel·lulars en foren avaluades. L'entrada de cada pèptid fou quantificada mitjançant tècniques de fluorimetria de plaques i de citometria de flux i fou visualitzada al microscopi confocal. També es varen realitzar altres estudis complementaris de toxicitat i d'estabilitat en front a la degradació enzimàtica. Treballant amb cèl·lules de mico (COS-1) i humanes (HeLa), vàrem comprovar que els diferents  $\gamma$ -pèptids no es comportaven de la mateixa manera, el que indicava que la capacitat de travessar la membrana cel·lular depenia en bona part de les modificacions estructurals introduïdes a través de les cadenes laterals en la posició  $\alpha$  de la prolina. El fet que aquest tipus d'estructures mostressin una toxicitat baixa i una elevada estabilitat en front a les proteasses fa pensar en un futur ús com a transportadors de fàrmacs. Pèptids naturals amb aquesta capacitat normalment tenen toxicitats elevades, a més a més de ser metabolitzats ràpidament pels organismes vius. Aquesta ràpida degradació fa que per tal d'obtenir una resposta bona, s'hagi d'augmentar la dosi, augmentant així la toxicitat. Encara que l'eficàcia de penetració que mostren els nostres peptidomimètics no es troba al nivell dels  $\alpha$ -pèptids que tenen aquesta capacitat descrits a la literatura, la seva vàlua com a transportadors podria estar garantida al establir-se un balanç favorable entre la seva capacitat de penetració, la baixa toxicitat i l'elevada estabilitat enzimàtica.

Finalment, el millor candidat a transportador de fàrmac fou conjugat a un PNA (*peptide nucleic acid*) i les seves propietats com a transportador estan essent actualment analitzades al laboratori del Dr. Peter Nielsen de Copenhaghe. Estudis preliminars mostren que aquest  $\gamma$ -pèptid té la capacitat de transportar el PNA fins a l'interior de la cèl·lula.

Per altra banda, algun d'aquests  $\gamma$ -pèptids també han mostrat propietats microbicides en contra de la *Leishmania*, en els estudis que estan sent actualment duts a terme al laboratori del Dr. Luís Rivas de Madrid. Aquests estudis mostren que aquest pèptid no actuen a nivell de membrana i que semblen causar toxicitat a nivell de la mitocondria.

### **Capítol 3. Síntesi en fase sòlida d'una llibreria de potencials inhibidors de la lisil-tRNA sintetassa (LysRS) de *Plasmodium Falciparium***

En el tercer capítol de la present tesi doctoral s'ha treballat en la síntesis d'una llibreria de compostos derivats de la prolina amb la finalitat de cercar inhibidors de lisil-tRNA sintetassa (LysRS) del *Plasmodium Falciparium*, paràsit causant de la malària. Al llarg dels anys els microorganismes han desenvolupat resistències als antibiòtics convencionals, el que fa que el desenvolupament de nous fàrmacs antiinfecciosos sigui del tot imprescindible. En aquest sentit, una de les vies que s'està explorant actualment es basa en la cerca de noves dianes terapèutiques. S'ha vist que les aminoacil-tRNA sintetasses poden ser dianes terapèutiques força vàlides, ja que tot i ser enzims essencials en totes les espècies, aquestes es poden inhibir d'una forma espècie-específica, gràcies a que les sintetasses de les diferents espècies són diferents. És a dir, es pot actuar en contra de la sintetassa del microorganisme sense afectar a la humana. En la ruta biològica de la traducció en la que participen les tRNA sintetasses es forma un complex intermedi, l'aminoacil adenilat (figura 3), en el qual s'han basat molts autors per tal de dissenyar inhibidors d'aquests enzims. La quimioteca realitzada en aquesta part del treball també està inspirada en aquest complex intermedi. En el disseny, es va canviar el sucre de la ribosa per blocs de construcció trifuncionals derivats de la prolina, a partir de la qual es va introduir diferents modificacions que poguessin mimetitzar diverses parts d'aquest complex.



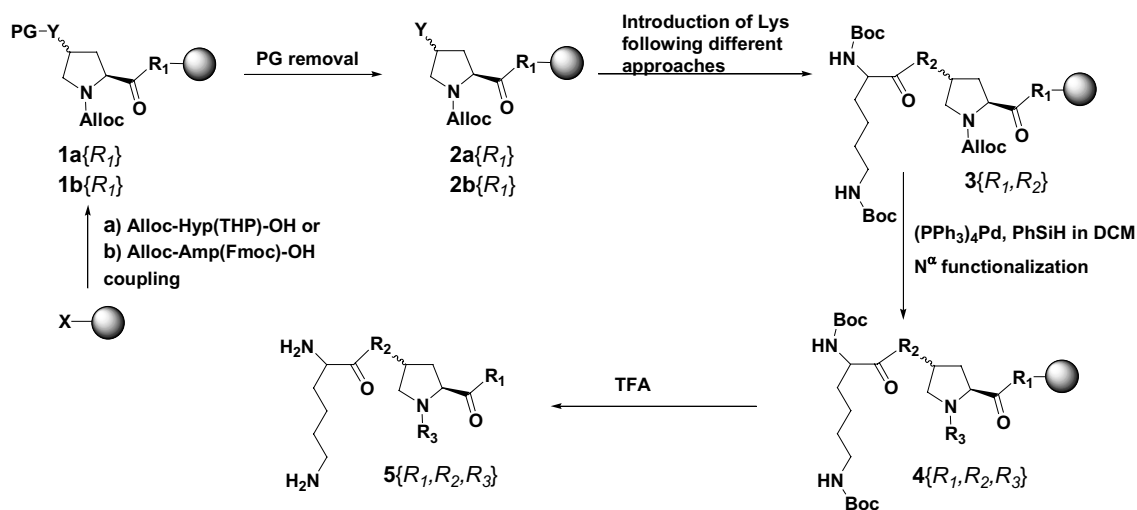
**Figura 3.** Complex aminoacil adenilat.

Abans de dur a terme la síntesi de la llibreria, fou necessari desenvolupar una síntesi eficient de sulfamats en fase sòlida, ja que aquests eren unes de les modificacions que volíem explorar i no havien estat sintetitzats abans utilitzant aquesta metodologia. Així, en l'apartat **3.3.1.** es descriu la síntesi de sulfamats en fase sòlida, obtenint-se unes condicions que ens permeten obtenir aquest tipus de compostos amb bons rendiments i pureses. Així, utilitzant aquest mètode es van sulfamoilar en fase sòlida alcohols de diferent origen, obtenint sulfamoilpeptidomimètics. La metodologia que vàrem descriure, sembla deixar la porta oberta a la síntesi d'oligo-sulfamats, podent així obtenir noves famílies de peptidomimètics amb propietats desconegudes.

Un cop posada a punt una metodologia que permetia la síntesi de sulfamats en fase sòlida, vàrem sintetitzar la llibreria objectiu. Com hem esmentat abans, per tal de dissenyar-la ens vàrem basar en el complex aminoacil adenilat, utilitzant plataformes trifuncionals derivades de la prolina, ja que aquests aminoàcids trifuncionals ens permetien tenir tres punts de diversitat. Un cop més, la disposició de sistemes de protecció adequats per als aminoàcids trifuncionals fou crucial per tal d'assolir els objectius marcats. L'estratègia general de síntesis (figura 4) tenia com a primer pas l'acoblament de la plataforma de prolina a la resina. Utilitzant diferents espaiadors i resines es va obtenir el primer punt de diversitat de la llibreria ( $R_1$ ). L'eliminació del grup protector que capava la posició  $\gamma$  de la prolina va permetre introduir la lisina, introduint el segon punt de diversitat en aquesta posició ( $R_2$ ). Aquest segon punt de diversitat era el tipus d'enllaç que unia els dos aminoàcids, el qual pretenia mimetitzar el grup fosfat del complex natural. Per últim, l'eliminació del grup protector del grup



$\alpha$ -amino va permetre introduir el tercer punt de diversitat, diferents grups aromàtics i heterocicles que havien de mimetitzar l'adenina del complex natural ( $R_3$ ).



**Figura 4.** Estratègia general de síntesis de la llibreria.

La llibreria fou sintetitzada amb èxit, encara que algunes combinacions de diversitat no foren possibles d'obtenir degut a la baixa estabilitat de la resina en les condicions de síntesi. Actualment, la seva capacitat d'inhibir l'aminoacil-tRNA sintetassa LysRS està essent avaluada al laboratori del Dr. Lluís Ribas de Pouplana al Parc Científic de Barcelona.



## **CAPÍTOL 1**

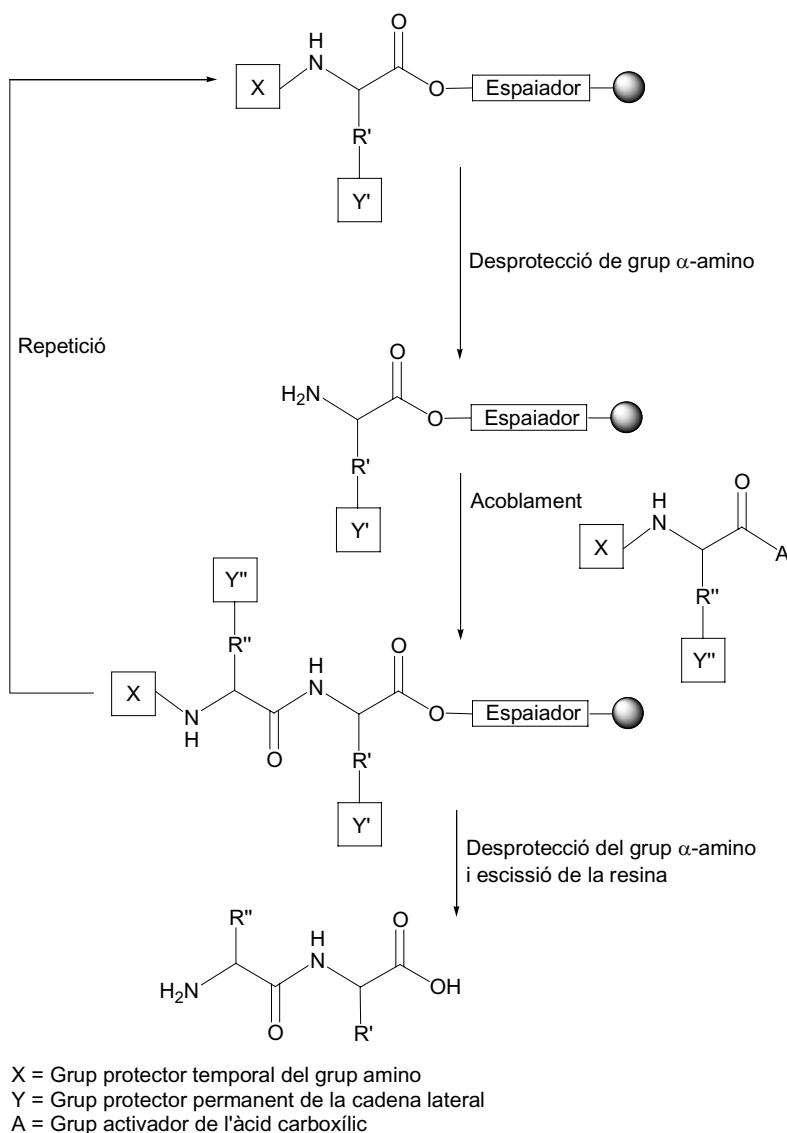
# **ELS GRUPS PROTECTORS EN LA SÍNTESI DE PÈPTIDS EN FASE SÒLIDA. SÍNTESI EN FASE SÒLIDA DE PÈPTIDS CÍCLICS**



## 1.1. INTRODUCCIÓ

### 1.1.1. Síntesis de pèptids en fase sòlida: els grups protectors

La síntesi d'un dipèptid en solució requereix que el grup amino de l'aminoàcid que estarà en l'extrem *N*-terminal i l'àcid carboxílic de l'aminoàcid que estarà en la posició *C*-terminal estiguin protegits amb un sistema de grups protectors adequats (1). Si es vol fer créixer més tard aquest dipèptid, un dels protectors s'ha d'eliminar per tal de poder acoblar el tercer aminoàcid, el qual també haurà de tenir protegit el grup funcional que no interressi que reaccioni. L'elevat nombre d'etapes d'acoblament-desprotecció que es requereixen per la síntesi de pèptids de talla mitja-llarga fa que sigui llarg i tediós sintetitzar-los en solució degut a que després de cada pas de reacció es necessita una etapa de purificació. Molt hàbilment, Merrifield desenvolupà la síntesis de pèptids en fase sòlida (*solid phase peptide synthesis, SPPS*) (2) (figura 1), en la qual sobre un suport polimèric funcionalitzat es pot acoblar un aminoàcid bloquejat en la seva funció  $\alpha$ -amino amb un grup protector adient. És fàcil adonar-se que en el fons el que en Merrifield va aconseguir quan va introduir el suport polimèric fou tenir un grup protector insoluble, la mateixa resina. El fet de tenir un suport polimèric, permet utilitzar excessos de reactiu a l'hora de fer l'acoblament, ja que aquest excés pot ésser fàcilment eliminat per filtració, sense la necessitat de fer cap etapa de purificació intermitja. Un cop l'acoblament ha estat complet, es pot eliminar el grup protector del nou aminoàcid incorporat i continuar l'allargament de la cadena amb repeticions d'aquestes dues etapes. Així, la síntesi de pèptids en fase sòlida es basa en la combinació apropiada de grups protectors junt a un mètode eficient per a l'activació del grup carboxílic abans de reaccionar amb el grup amino (3). L'èxit d'una síntesis més o menys complexa dependrà en bona mesura del sistema de protecció utilitzat.



**Figura 1.** Esquema general de síntesi de pèptids en fase sòlida.

A l'hora d'afrontar una síntesi de pèptids en fase sòlida, s'ha d'escollir bé l'estratègia a utilitzar. Donada una síntesi, els grups protectors es poden classificar segons la funció que realitzin al llarg d'aquesta. Així, si ens mirem la figura 1, l'àcid carboxílic del primer aminoàcid es troba unit al polímer insoluble, el qual es considera un grup protector **permanent** ja que es conserva al llarg de tota la síntesi. Els grups protectors de les cadenes laterals també acostumen a ser grups protectors permanents, ja que aquests solen ésser escollits de tal forma que siguin eliminats al final de la síntesi en les mateixes condicions d'escissió del pèptid. Tenen la propietat de no veure's afectats al llarg de la síntesi en les diferents etapes de reacció. Per altra banda, es considera grup protector **temporal** aquell que s'utilitza per a la protecció del grup  $\alpha$ -amino al

llarg de la síntesis per tal de fer l'allargament de la cadena, essent necessari eliminar-lo en cada pas de síntesi. Els grups protectors **semi-permanents** són aquells que aguanten perfectament les condicions de síntesis i que es poden eliminar en un moment determinat per tal de dur a terme alguna modificació en la síntesis, com pot ésser la ramificació en algun punt de la seqüència o un ciclació.

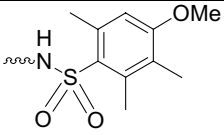
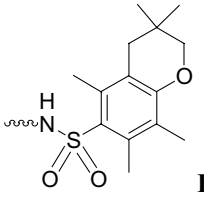
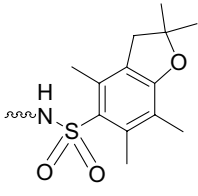
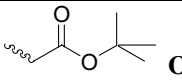
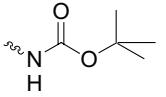
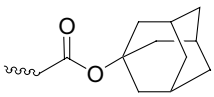
Entre els diversos esquemes de protecció que s'han desenvolupat n'hi ha dos que són els més emprats amb diferència. El primer d'aquests esquemes de protecció és l'estratègia que combina grups protectors del tipus **tert-butoxicarbonil (Boc) / benzil (Bzl)** i està basat en la diferent labilitat en medi àcid dels grups protectors emprats, la qual fa compatible la seva utilització (2). En aquesta estratègia, el grup Boc s'utilitza com a grup protector temporal del grup  $\alpha$ -amino i s'elimina a l'hora d'allargar la cadena peptídica amb àcid trifluoroacètic (TFA). El grup protector Bzl i relacionats s'utilitzen per protegir les funcions de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals i s'eliminen al final de la síntesis utilitzant àcids forts com per exemple l'àcid fluorhídric (HF) o el trifluorometansulfònic (TFMSA). Aquesta estratègia presenta alguns inconvenients, com és que els grups benzil s'acaben veient afectats durant l'exposició sistemàtica de la cadena peptídica al TFA en síntesis llargues, o que l'eliminació dels grups benzils sempre acaba produint l'eliminació dels grups Boc. A més a més, pèptids amb seqüències fràgils no són capaços d'aguantar les condicions d'eliminació dels grups Bzl en medi àcid fort, tot i que això es pot evitar amb la utilització de protocols d'escissió alternatius.

La segona estratègia més emprada és la que combina els grups protectors **9-fluorenimetoxicarbonil (Fmoc) / tert-butil (t-Bu)** (4,5), la qual es basa en el concepte d'ortogonalitat ja que els diferents grups de protectors pertanyen a classes independents i s'eliminen en diferents condicions. Així, mentre el grup Fmoc s'elimina en medi bàsic (6), normalment amb piperidina, mitjançant una reacció de  $\beta$ -eliminació, el grup t-Bu i relacionats s'eliminen en medi àcid, normalment amb TFA. Aquesta estratègia ha permès desenvolupar diferents grups espaiadors que s'uneixen a la resina i sobre els quals es fa créixer el pèptid. La unió d'aquests espaiadors amb el pèptid és en la majoria dels casos làbil al TFA, fent aquesta estratègia més versàtil per a la síntesis de pèptids ja que no es necessita utilitzar àcids tant forts com els que es requereixen en una estratègia Boc/Bzl. Com hem esmentat abans, la química Fmoc es basa en el concepte d'**ortogonalitat**. Dos grups protectors es consideren **ortogonals** quan pertanyen a

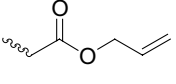
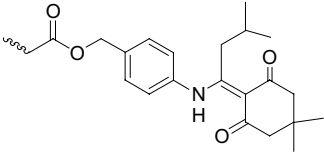
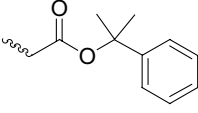
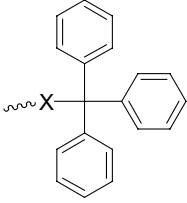
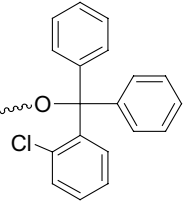
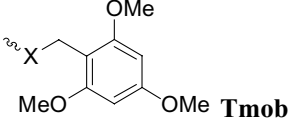
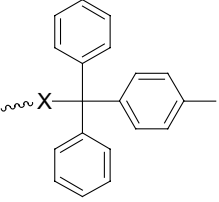
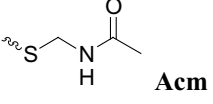
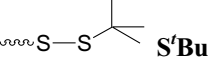
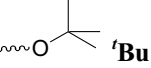
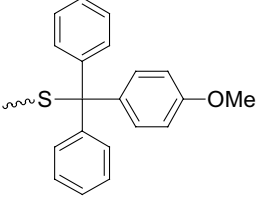
classes completament independents i on cada classe s'elimina mitjançant mecanismes completament diferents. Això implica que cada classe de grup protector pot ser eliminat en qualsevol ordre i en presència de qualsevol de les altres classes (7).

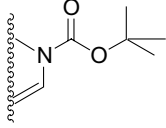
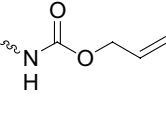
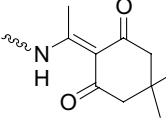
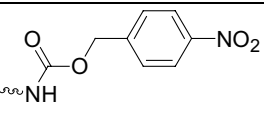
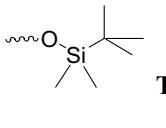
Això serà particularment important en la síntesi de molècules més complexes com per exemple pèptids cíclics o sistemes ramificats, on es necessiten varis tipus de grups protectors ortogonals (8). Per això és important disposar de diferents alternatives a l'hora d'emprendre una síntesi complexa per a poder avaluar quina podrà ser la més exitosa i tot això passa per tenir un ampli ventall de grups protectors que facilitin la síntesi.

Els grups protectors de les cadenes laterals poden ser molt variats (8). La taula 1 mostra exemples dels més habituals, utilitzats en una estratègia de síntesi Fmoc/*t*Bu per tal de bloquejar les funcions reactives de les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals, impedit així que aquestes reaccionin donant productes no desitjats.

Grup protector	Condicions d'eliminació	Aminoàcids en els quals s'usa
 <b>Mtr</b>	a) 90-95 % TFA, 4-6h b) TFA-anisol (9:1), 1h	Arg
 <b>Pmc</b>	a) 50% TFA en DCM, 1h b) TFA-anisol (9:1), 30 min c) TFA-anisol-EDT-EMS (95:3:1:1), 1.5h	Arg
 <b>Pbf</b>	a) 95% v/v TFA , 30 min	Arg
 <b>O'Bu</b>	a) 90% v/v TFA, 30 min	Asp, Glu
 <b>Boc</b>	a) 90% v/v TFA, 30 min	His, Lys, Orn, Trp
 <b>O1-Ada</b>	a) TFA	Asp, Glu



 <b>OAll</b>	a) Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> -AcOH-NMM b) Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> -PhSiH <sub>3</sub> en DCM, 10-30 min	Asp, Glu
 <b>ODmab</b>	a) 2% NH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O en DMF, 5-10 min	Asp, Glu
 <b>OPip</b>	a) 4% TFA en DCM, 15 min	Asp, Glu
 <b>Trt</b>	a) 90% v/v TFA, 30-60 min (per a Asn i Gln) b) 50% TFA en DCM, 30 min (per a His) c) 1-5% TFA en DCM, 2-5 min (per a Ser, Thr i Tyr)	Asn (X = NH) Gln (X = NH) Cys (X = S) His (X = N) Ser, Thr i Tyr (X = O)
 <b>ClTrt</b>	a) 1-5% TFA en DCM, 2-5 min	Ser Thr Tyr
 <b>Tmob</b>	a) 90% v/v TFA, 1h b) 5% TFA-3% TES en DCM (per Cys)	Asn (X = NH) Gln (X = NH) Cys (X = S)
 <b>Mtt</b>	a) 95% v/v TFA, 30 min (per a Cys) b) 1% TFA en DCM, 30 min (per a Lys i Orn) c) AcOH-TFE-DCM (1:2:7), 1h (per a Lys i Orn)	Cys (X = S) Lys (X = NH) Orn (X = NH)
 <b>AcM</b>	Hg(II), Ag(I), Tl(III), I <sub>2</sub> , R <sub>s</sub> Cl, Ph(SO)Ph-CH <sub>3</sub> SiCl <sub>3</sub>	Cys
 <b>S'Bu</b>	RSH, Bu <sub>3</sub> P Altres agents reductors	Cys
 <b>'Bu</b>	a) 90% v/v TFA, 30 min	Ser, Thr i Tyr
 <b>Mmt</b>	a) TFA 0.5-1% en DCM-TES (95:5), 30 min b) 3% v/v TFA, 5-10 min	Cys

 <p style="text-align: center;"><b>Bum</b></p>	a) 95% v/v TFA, 1-2 h	His
 <p style="text-align: center;"><b>Alloc</b></p>	a) Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (0.1eq)-PhSiH <sub>3</sub> (24eq) en DCM, 10 min	Lys Orn
 <p style="text-align: center;"><b>Dde</b></p>	a) 2% NH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O en DMF, 5-10 min	Lys Orn
 <p style="text-align: center;"><b>pNZ</b></p>	a) 6M SnCl <sub>2</sub> , 1.6 mM HCl/dioxà, 0.04 M fenol en DMF	Lys Orn
 <p style="text-align: center;"><b>Tbdms</b></p>	a) 0.1 M TBAF-DMF, 15 min (per a Tyr) b) TFA, 15 min (per a Ser i Thr)	Tyr Ser Thr

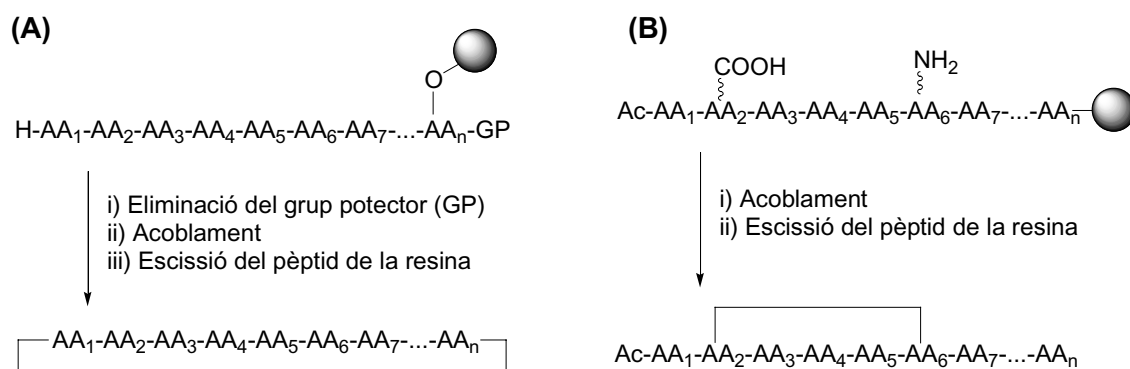
**Taula 1.** Grups protectors de les cadenes laterals utilitzats habitualment en síntesis de pèptids en fase sòlida utilitzant una estratègia Fmoc/*t*Bu.

### 1.1.2. Síntesis en fase sòlida de pèptids cíclics

El fet que els pèptids cíclics no tinguin ni un *C*- ni un *N*-terminal ionitzables i que puguin disposar d'un nombre elevat d'enllaços *cis* en la seqüència, els hi dona una forta resistència a proteases. La ciclació també redueix considerablement la flexibilitat conformacional de l'esquelet peptídic, el que pot fer augmentar la selectivitat en front a un receptor sempre i quan quedi fixada la conformació activa. De fet, la ciclació de pèptids és una estratègia força utilitzada per tal de modificar pèptids actius i trobar-ne anàlegs més selectius, més actius i amb una millor biodisponibilitat (9).

Per tal de sintetitzar pèptids cíclics s'han abordat diferents estratègies (9), tant en solució com en fase sòlida. Els procediments de ciclació en solució s'han centrat bàsicament en l'elecció correcta dels agents acoblants, buscant sempre bons rendiments de ciclació, però a la vegada intentant evitar subproductes secundaris com pot ser la racemització de l'extrem *C*-terminal, la formació de dímers o les polimeritzacions (9,10). Per tal d'evitar aquests productes secundaris, és crucial escollir bé el lloc de

desconnexió en el qual es ciclarà el pèptid. A més a més d'aquests factors, n'hi ha d'altres de molt importants, també crucials per tal d'aconseguir bons resultats com ara la concentració de treball, la temperatura, el temps de reacció, el dissolvent emprat, les bases utilitzades, els additius o la relació de substrats. Modificacions com pot ser canviar un dissolvent apolar per un de polar poden afectar dramàticament en els resultats, ja que dissolvents polars poden eliminar interaccions tipus pont d'hidrogen que afavoreixen la ciclació (11).

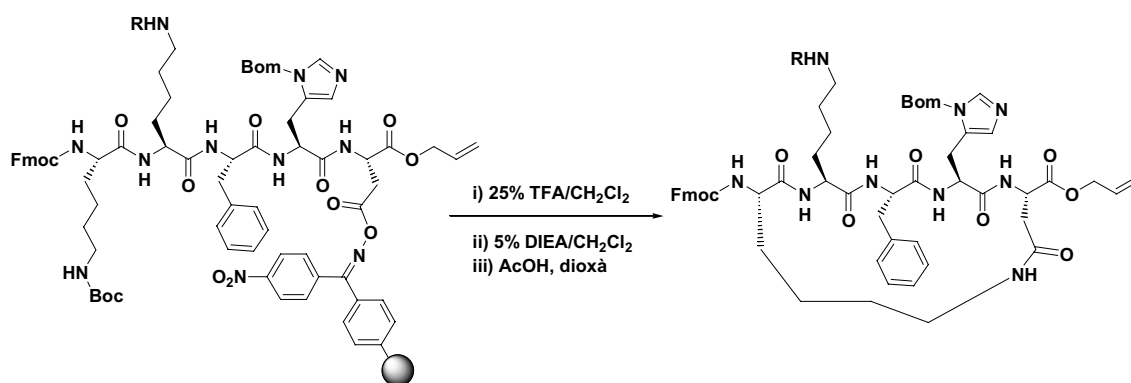


**Figura 2.** Ciclació de pèptids en fase sòlida. (A) Anorant una cadena lateral a la resina. (B) Anorant l'esquelet peptídic a la resina.

En les diferents estratègies de ciclació de pèptids en fase sòlida, la ciclació es sol fer de dues formes segons sigui la molècula objectiu. La primera es basa en fer la ciclació entre els aminoàcids de les posicions C-terminal i N-terminal (*head-to-tail cyclization*) (figura 2A). Aquest tipus de ciclació s'ha utilitzat molt ancorant les cadenes laterals de l'àcid aspàrtic, de l'àcid glutàmic, de la lisina, de la serina o de la tirosina (12,13,14,15,16). La segona es basa en fer la ciclació entre les cadenes laterals de dos aminoàcids trifuncionals presents en la seqüència (*side-chain to side-chain cyclization*) (figura 2B) (17,18,19).

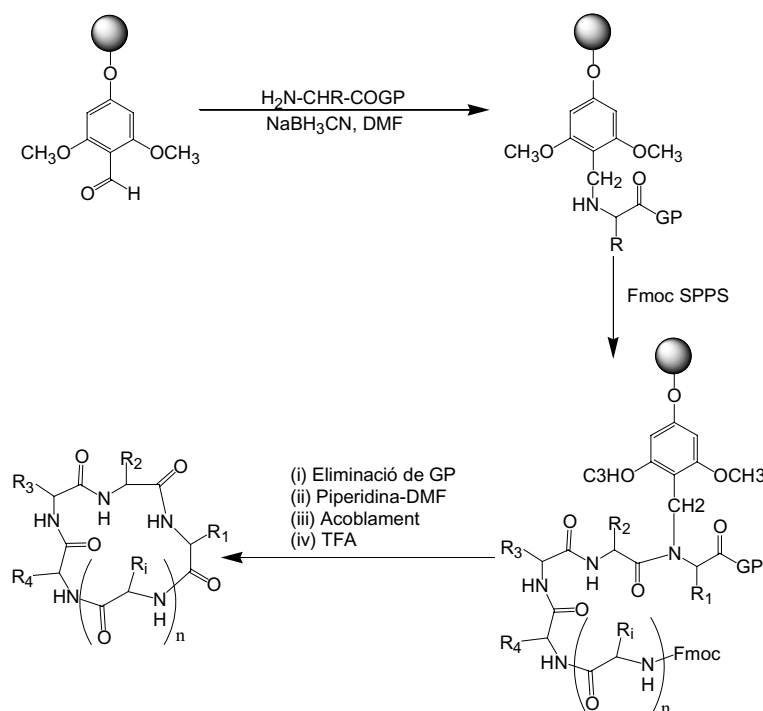
Una de les estratègies de ciclació de pèptids en fase sòlida es basa en aprofitar l'etapa d'escissió del pèptid de la resina per fer la ciclació, estratègia anomenada escissió amb ciclació (*cleavage-by-cyclization*) (figura 3). Aquesta estratègia requereix ancorar l'aminoàcid C-terminal de l'esquelet peptídic a una resina que tingui unes propietats determinades i fer la ciclació al final, fent abans alguna modificació química un cop sintetitzat el pèptid precursor lineal que afavoreixi l'escissió del pèptid i la ciclació final. L'espaiador que s'utilitza en aquesta aproximació ha de ser estable a les

condicions de síntesis del precursor lineal, capaç de suportar les condicions de desprotecció de les cadenes laterals en medi àcid i, després d'haver-lo activat, desplaçable pel grup amino *N*-terminal mitjançant un atac nucleofílic. Els espaiadors descrits amb aquesta aplicació acostumen a ser esters actius com ara pèptids sintetitzats sobre la resina oxima de Kaiser (**20**) o espaiadors desactivats, els quals són estables al llarg de la síntesi i s'activen en el moment de fer la ciclació (*safety-catch linkers*) (**21**). En la resina que conté l'oxima de Kaiser, el pèptid es fa créixer sobre aquesta oxima ancorada en fase sòlida, la qual, un cop sintetitzat el pèptid lineal i desprotegit l'extrem *N*-terminal, és atacada nucleofílicament per l'amina lliure, fent una ciclació *head-to-tail* i escindint-se a la vegada el pèptid de la resina (figura 3) (**22**).



**Figura 3.** Ciclació de pèptids en fase sòlida sobre la resina oxima de Kaiser, utilitzant una estratègia tàndem de ciclació-escissió.

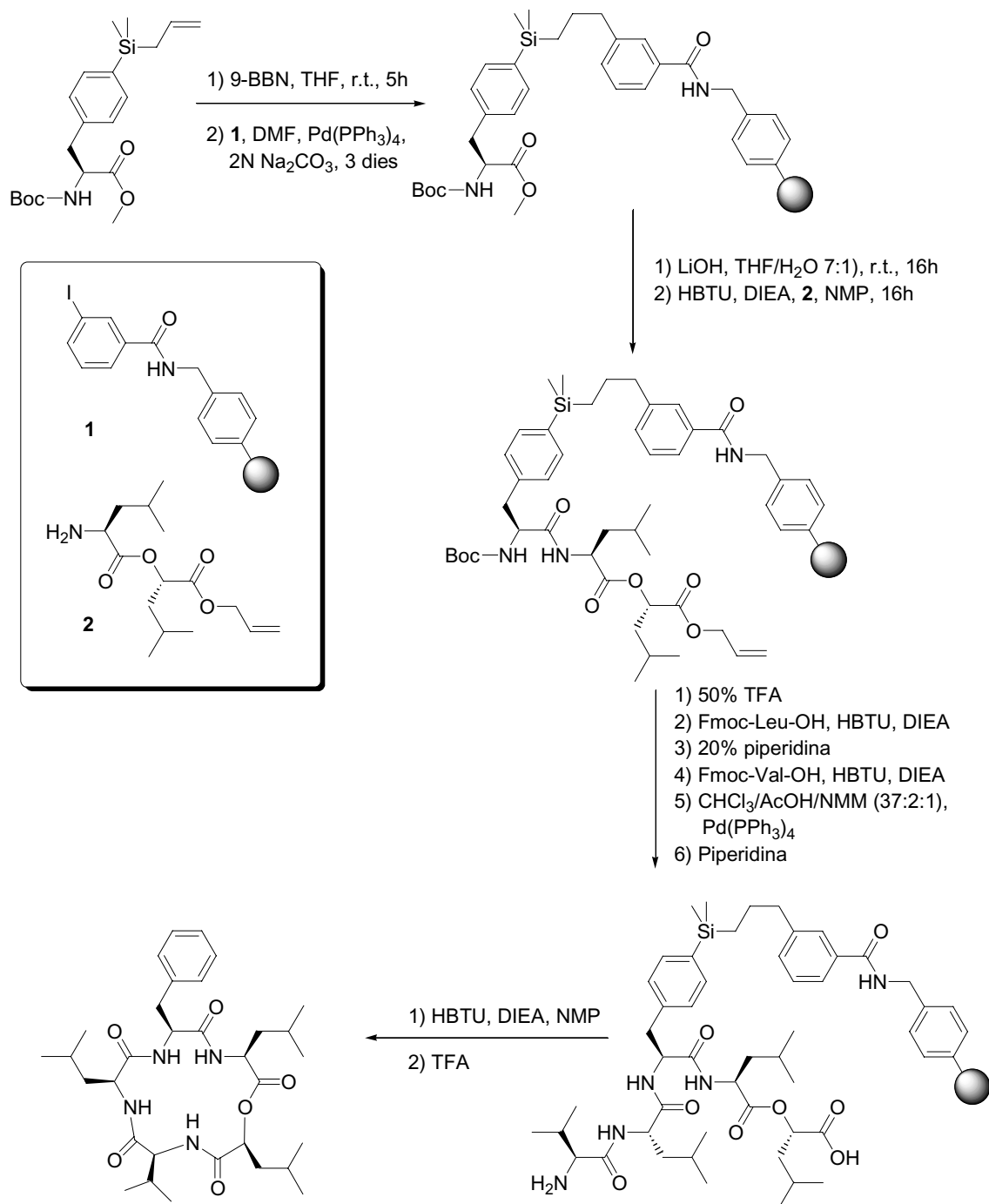
Un altra estratègia de síntesi de pèptids cíclics en fase sòlida es basa en utilitzar l'espaiador bifuncional BAL (*Backbone Amide Linker*), descrita per Albericio i Barany (**23**). Aquest espaiador conté un grup aldehid sobre el qual es pot ancorar el grup amino de l'aminoàcid de l'extrem *C*-terminal mitjançant una aminació reductiva, mantenint sempre l'àcid carboxílic d'aquest aminoàcid protegit (figura 5). La cadena peptídica es fa créixer sobre aquesta amina secundària que roman lliure i al final, després de desprotegir els extrems *N*- i *C*-terminals, es duu a terme la ciclació en fase sòlida. Finalment el pèptid s'escindeix de la resina en medi àcid.



**Figura 4.** Ciclació de pèptids en fase sòlida utilitzant l'espaiador bifuncional BAL.

Un altra estratègia força utilitzada per a fer ciclacions en fase sòlida fou descrita per Lee i Silverman, utilitzant un espaiador que no deixa rastre (*traceless linker*) basat en un arilsilà (24,25). S'anomenen *traceless linkers* aquells espaiadors bifuncionals que un cop escindit el compost de la resina, en aquest no queda rastre del punt d'unió a la resina. En el cas de Lee i col., van sintetitzar el depsipèptid sansalvamida ancorant la fenilalanina per la cadena lateral (figura 5), fent créixer el pèptid i ciclant-lo en fase sòlida mitjançant una ciclació *head-to-tail*. Un tractament final amb TFA escindí el pèptid de la resina.

A més a més d'aquestes estratègies, se n'ha explorat altres per tal de ciclar tant pèptids com peptidomimètics, com són les ciclacions mimetitzant els ponts disulfur via enllaços tipus tioeter (26), un tancament d'anell via metatesis (27), enllaços trisulfit (28) o metilenditioeters (29), ciclacions formant un enllaç tipus eter amb reaccions tipus Mitsunobu (30) o  $S_NAr$  (31), ciclacions formant un pont biarílic amb reaccions de Suzuki (32) o ciclacions via un enllaç ester formant el corresponent depsipèptid (33), entre d'altres.



**Figura 5.** Ciclació de pèptids en fase sòlida utilitzant un *traceless linker*.

## 1.2. OBJECTIUS

1. El primer objectiu d'aquest capítol fou l'estudi d'una reacció secundària derivada de la utilització de sistemes de protecció ortogonals en fase sòlida, com és l'eliminació prematura d'un grup Fmoc en presència d'una amina lliure en la peptidil-resina. Entendre el que passava ens va animar a buscar mètodes alternatius d'acoblament per tal d'evitar els subproductes indesitjats, com és un mètode tàndem de desprotecció-acoblament utilitzant espècies reactives com els fluorurs d'àcid o un canviar un dels grups protectors per altres d'alternatius.
2. El segon objectiu que ens vàrem proposar fou la síntesi en fase sòlida de tetra- $\beta$ -pèptids cíclics polifuncionalitzats utilitzant l'espaiador bifuncional BAL. La síntesi en solució d'aquest tipus de plataformes no s'havia mostrat prou eficient, mostrant la necessitat de desenvolupar noves estratègies sintètiques. Per dur a terme la síntesi en fase sòlida, ens vàrem proposar la utilització d'un sistema de protecció tetra-ortogonal, demostrant així la importància de tenir sistemes de protecció ortogonals capaços de donar una gran versatilitat a l'hora d'afrontar una síntesi complexa en fase sòlida.

## Referències

- 
1. Albericio, F. Orthogonal protecting groups for  $N\alpha$ -amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. *Biopolymers (Peptide Science)* **2000**, *55*, 123-139.
  2. Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1963**, *85*, 2149–2154.
  3. Albericio, F.; Chinchilla, R.; Dodsworth, D. J.; Najera, C. New trends in peptide coupling reagents. *Organic Preparations and Procedures International* **2001**, *33(3)*, 203–303.

4. Atherton, E.; Fox, H.; Harkiss, D.; Logan, C. J.; Sheppard, R. C. and Williams, B. J. A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonylamino-acids. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1978**, *13*, 537–539.
5. Meienhofer, J.; Waki, M.; Heimer, E. P.; Lambros, T. J. and Makofske, R. C. Solid phase synthesis without repetitive acidolysis. Preparation of leucyl-alanyl-glycyl-valine using 9-fluorenylmethoxycarbonylamino acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1979**, *13*, 35–42.
6. Carpino, L. A. and Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404–3409.
7. Barany, G. and Albericio, F. Three-dimensional orthogonal protection scheme for solid-phase peptide synthesis under mild conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4936–4942, i referències citades en aquest.
8. Wade, J. D. In *Solid-Phase Peptide Synthesis, a Practical Guide*, Kates, S. A., Albericio, F., Eds. Marcel Dekker: New York, 2000; pp 103-128.
9. Li, P.; Roller, P. P. and Xu, J. Current synthetic approaches to peptide and peptidomimetic cyclization. *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 411–440.
10. Humphrey, J. M. and Chamberlin, A. R. Chemical Synthesis of Natural Product Peptides: Coupling Methods for the Incorporation of Noncoded Amino Acids into Peptides. *Chem Rev.* **1997**, *97*, 2243–2266.
11. Kurome, T.; Inami, K.; Inoue, T.; ICAI, K.; Takesako, K.; Kato, I. and Shiba, T. Total synthesis of an antifungal cyclic depsipeptide aureobasidin A. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 4327–4346.
12. Spatola, A. F.; Darlak, K. and Romanovskis, P. An approach to cyclic peptide libraries: reducing epimerization in medium sized rings during solid-phase synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 591–594.
13. Romanovskis, P. and Spatola, A. F. Preparation of head-to-tail cyclic peptides via side-chain attachment: implications for library synthesis. *J. Pep. Res.* **1998**, *52*, 356–374.
14. Alsina, J.; Rabanal, F.; Giralt, E. and Albericio, F. Solid-phase synthesis of "head-to-tail" cyclic peptides via lysine side-chain anchoring. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9633–9635.
15. Alsina, J.; Chiva, C.; Ortiz, M.; Rabanal, F.; Giralt, E. and Albericio, F. Active carbonate resins for solid-phase synthesis through the anchoring of a hydroxyl



- function. Synthesis of cyclic and alcohol peptides. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 883–886.
16. Cabrele, C.; Langer, M. and Beck-Sickinger, A. G. Amino Acid Side Chain Attachment Approach and Its Application to the Synthesis of Tyrosine-Containing Cyclic Peptides. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4353–4361.
17. Zhang, W. T. and Taylor, J. W. Solid-phase synthesis of peptides with branched side-chain bridges and their conformational effects. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2173.
18. Mezo, G.; Majer, Z.; Valero, M.L.; Andreu, D. and Hudecz, F. Synthesis of cyclic Herpes simplex virus peptides containing 281-284 epitope of glycoprotein D-1 in endo- or exo-position. *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 272–282.
19. Cavallaro, V.; Thompson, P.E. and Hearn, M. T. Solid-phase synthesis of cyclic analogues related to the hypoglycaemic peptide hGH(6-13): comparison of two  $i \rightarrow i + 4$  lactam cyclization procedures. *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 529–536.
20. DeGrado, W. F.; Kaiser, E. T. Polymer-bound oxime esters as supports for solid-phase peptide synthesis. The preparation of protected peptide fragments. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295–1300.
21. Bourne, G. T.; Meutermans, W. D. F.; Alewood, P. F.; McGeary, R. P.; Scanlon, M.; Wastson, A. A. and Smythe, M.L. A Backbone Linker for BOC-Based Peptide Synthesis and On-Resin Cyclization: Synthesis of Stylostatin 1. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3095–3101.
22. Kapurniotu, A. and Taylor, J. W. Head-to-tail cyclization and use of C $\alpha$ -allyl ester protection improves the yield of cyclic peptides synthesized by the oxime resin method. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7031–7034.
23. Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vágner, J.; Albericio, F. And Barany, G. Backbone Amide Linker Strategy for Solid-Phase Synthesis of C-Terminal-Modified and Cyclic Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5441–5452.
24. Lee, Y. and Silverman, R. B. Traceless solid-phase synthesis of chiral 3-aryl beta-amino acid containing peptides using a side-chain-tethered beta-amino acid building block. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 303–306.
25. Lee, Y. and Silverman, R. B. Rapid, high-yield, solid-phase synthesis of the antitumor antibiotic sansalvamide A using a side-chain-tethered phenylalanine building block. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3743–3746.

- 
26. Fotouhi, N.; Joshi, P.; Fry, D.; Cook, C.; Tilley, J. W.; Kaplan, G.; Hanglow, A.; Rowan, K.; Schwinge, V. and Wolitzky, B. The design and synthesis of potent cyclic peptide VCAM-VLA-4 antagonists incorporating an achiral Asp-Pro mimetic. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1171–1173.
  27. Kazmaier, U. and Maier, S. Application of the peptide Claisen rearrangement toward the synthesis of cyclic peptides. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1763–1766.
  28. Lundin, R. H. L.; Noren, B. E. and Edlund, P. O. A convenient method for the synthesis of peptide trisulfides. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *34*, 6339–6342.
  29. Lindman, S.; Lindeberg, G.; Gogoll, A.; Nyberg, F.; Karlen, A. and Hallberg, A. Synthesis, receptor binding affinities and conformational properties of cyclic methylenedithioether analogues of angiotensin II. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 763–772.
  30. Steinman, D. H.; Curtin, M. L.; Garland, R. B.; Davidsen, S. K.; Heyman, H. B.; Holms, J. H.; Albert, D. H.; Magoc, T. J.; Nagy, I. B.; Marcotte, P. A.; Li, J. L.; Morgan, D. W.; Hutchins, C. and Summers, J. B. The design, synthesis, and structure-activity relationships of a series of macrocyclic MMP inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2087–2092.
  31. Laïb, T. and Zhu, J. P. An asymmetric total synthesis of sanjoinine G1. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 83–86.
  32. Carbonnelle, A.C. and Zhu, J. P. A Novel Synthesis of Biaryl-Containing Macrocycles by a Domino Miyaura Arylboronate Formation: Intramolecular Suzuki Reaction. *Org Lett.* **2000**, *2*, 3477–3480.
  33. Ward, D. E.; Vazquez, A.; Pedras, S. and Soledade, C. Probing host-selective phytotoxicity: synthesis and biological activity of phomalide, isophomalide, and dihydrophomalide. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1657–1666.

## **1.3. RESULTATS**

### **1.3.1. Undesired removal of the Fmoc group by the free $\epsilon$ -amino function of a lysine residue**

**Josep Farrera-Sinfreu, Miriam Royo and Fernando Albericio**

*Tetrahedron Letters* **43** (2002), 7813-7815





# Undesired removal of the Fmoc group by the free $\epsilon$ -amino function of a lysine residue

Josep Farrera-Sinfreu, Miriam Royo\* and Fernando Albericio\*

Barcelona Biomedical Research Institute at the Barcelona Science Park and Department of Organic Chemistry,  
University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

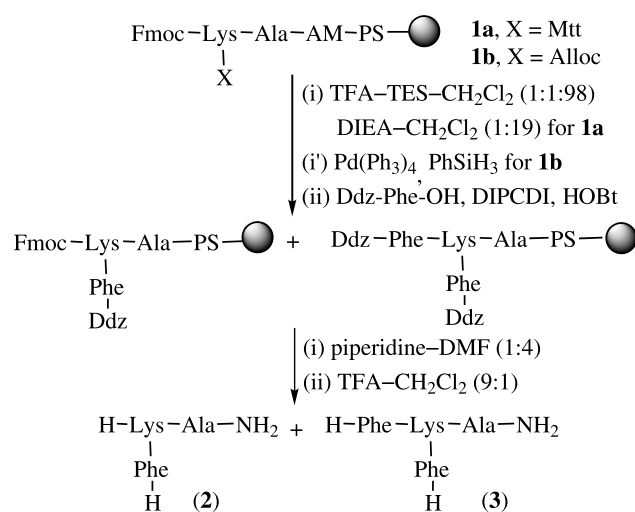
Received 15 July 2002; revised 26 July 2002; accepted 2 August 2002

**Abstract**—In solid-phase peptide synthesis, a side-reaction consisting of the premature and undesired removal of the Fmoc group has been detected. This can be caused by a primary amine of sufficient basicity, such as the  $\epsilon$ -amino of the Lys, present in the peptide resin. This side-reaction, which is not promoted by either the  $\beta$ -amino side-chain of the Dapa residue or the  $\alpha$ -amino group, can be prevented by a coupling/neutralization protocol in the case of Mtt protection or by a tandem deprotection–coupling reaction in the case of Alloc protection. The same kind of side-reaction has been detected when amino side-chain functions of Orn or Daba are free in the peptide resin. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Lysine is a key amino acid for the synthesis of complex peptides, such as cyclic,<sup>1</sup> branched,<sup>2</sup> and modified systems with labels or probe molecules.<sup>3</sup> Furthermore, it is a useful scaffold for the preparation of small molecules in drug discovery programs.<sup>4</sup> In all these cases, the two amino functions of Lys can be used for anchoring different building blocks. For this type of process it is necessary to have both amino functions protected with orthogonal groups.<sup>5,6</sup> In an Fmoc-based strategy, the most common orthogonal protecting groups are 4-methyltrityl (Mtt)<sup>7</sup> and allyloxycarbonyl (Alloc).<sup>8</sup> While Mtt is removed by low concentrations of TFA in the presence of a scavenger, Alloc is removed by an allyl transfer reaction to an allyl scavenger, usually  $\text{PhSiH}_3$ <sup>9</sup> or  $\text{H}_3\text{N}\cdot\text{BH}_3/\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$ ,<sup>10</sup> in the presence of  $\text{Pd}(0)$ .

In some of our programs, we have observed a double incorporation of an acyl compound in an  $N^\alpha$ -Fmoc,  $N^\epsilon$ -protected Lys-containing structure anchored to a

solid support after removal of the  $\epsilon$ -protecting group of the lysine and its subsequent reaction with an acylating reagent. This fact could indicate that the Fmoc group had also been removed.<sup>11</sup> In the case of the  $\epsilon$ -Alloc compound, the premature Fmoc removal could be interpreted in terms of the abstraction of the H of the Fmoc group by the hydride of the scavenger. However, this explanation does not apply in the case of Mtt. Thus, we decided to undertake a systematic study to investigate the scope of this side-reaction as well as methods to overcome it.



**Figure 1.** Strategy used for the determination of the extent of side-chain reaction for Lys-containing peptides.

**Abbreviations:** Ac, acetyl; AM, *p*-[*R,S*]- $\alpha$ -[1-(9-fluorenyl)methoxyformamido]-2,4-dimethoxybenzyl]phenoxyacetic acid; DIEA, *N,N*-diisopropylethylamine; Ddz,  $\alpha,\alpha$ -dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl; DIPCDI, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide; DMF, *N,N*-dimethylformamide; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl; HATU, *N*-(dimethylamino)-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5-*b*]pyridin-1-yl-methylene-*N*-methylmethanaminium hexafluorophosphate *N*-oxide; HOBT, hydroxybenzotriazole; PS, polystyrene; PyAOP, 7-azabenzotriazol-1-yl-oxytris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate; SPPS, solid-phase peptide synthesis; TFA, trifluoroacetic acid; amino acid symbols denote the L-configuration.

\* Corresponding authors. Tel.: 34 93 403 70 88; fax: 34 93 403 71 26; e-mail: royo@qo.ub.es; albericio@qo.ub.es

Firstly, Fmoc-Lys(X)-Ala-AM-PS-resin (X=Mtt, Alloc) was chosen as a model system and the protocol shown in Fig. 1 was followed. Treatment of the model peptide resin with the corresponding deprotection reagent, incorporation of Ddz-Phe-OH,<sup>12</sup> removal of the Fmoc group from the  $\alpha$ -amino function, and cleavage with TFA led to two possible peptides: H-Lys(Phe-H)-Ala-NH<sub>2</sub> (**2**) (no premature removal of the Fmoc group) and H-Phe-Lys(Phe-H)-Ala-NH<sub>2</sub> (**3**) (premature removal of the Fmoc group).<sup>13</sup> The ratio between these two peptides was calculated by amino acid analysis (AAA) and HPLC. The presence of **3** was corroborated by MALDI-TOF-MS.

In the case of **1a**, 80% of **2** and 20% of **3** were obtained but for **1b**, the results showed 65% of **2** and 35% of **3**.

A similar experiment was carried out with Fmoc-Ala-Lys(Alloc)-Ala-AM-PS-resin (**4**) to assess whether the side-reaction is dependent on the position of the Fmoc group with respect to the  $\epsilon$ -amino function. In this case, 14% premature removal of the Fmoc group [H-Phe-Ala-Lys(Phe-H)-Ala-NH<sub>2</sub>] was detected by HPLC and AAA, demonstrating that the side-reaction was not particularly dependent on the relative positions of the two groups.

A similar experiment was then carried out with Fmoc-Dapa(Alloc)-Ala-AM-PS-resin (**5**) and Alloc-Dapa(Fmoc)-Ala-AM-PS-resin (**6**). Compound **5** was similar to **1b**, where the Lys (4 methylene groups in the side-chain) was substituted by *N* <sup>$\alpha$</sup> -Fmoc-*N* <sup>$\beta$</sup> -Alloc-L-diaminopropionic acid (1 methylene group in the side-chain), and **6** was similar to **5**, where the two protecting groups of the Dapa residue had been switched. In neither case was premature elimination of the Fmoc group detected.

At that moment it was already clear that the premature removal of the Fmoc group was not related to either the protecting group or the method used to remove it, but was influenced by the basicity of the amino function liberated. It is well known that an  $\epsilon$ -amino group, when adjacent to a carbon containing both a carbox-amido and a carbamate function (as in **1**), is more basic than both a  $\beta$ -amino group, in the same environment as above (as in **5**), and an  $\alpha$ -amino group (as in **6**).

In order to assess the scope of the side-reaction, the test experiment was carried out with Fmoc-Daba(Alloc)-

Ala-AM-PS-resin (**7**) (Daba,  $\alpha,\beta$ -L-diaminobutyric acid; 2 methylene groups in the side-chain) and Fmoc-Orn(Alloc)-Ala-AM-PS-resin (**8**) (3 methylene groups in the side-chain). In the case of **7**, 19% of the peptide containing two residues of Phe was obtained, whereas for **8** 21% of the side-product was formed.

A further experiment was carried out to show that the side-reaction was caused by the presence of the free amino function. Thus, resin **1b** was treated with Pd(0) in the presence of the scavenger and then the resin containing the free amine function was shaken in DMF for 16 h. After this time, the incorporation of Ddz-Phe-OH resulted in 95% of double incorporation of Phe.

These results are consistent with the *pK<sub>a</sub>* values of these amino functions in the model compounds shown in Table 1. Thus, while the *pK<sub>a</sub>* values of the side-amino functions of Lys, Orn, and Daba are very close, the *pK<sub>a</sub>* of Dapa is lower by one unit, making this amino function less basic than the another derivatives. The same explanation applies for the  $\alpha$ -amino function.

Finally, alternative strategies were tested to circumvent this side-reaction. In order to achieve this goal, it is necessary to avoid the presence of the free  $\epsilon$ -amino group in a similar way to methods used to avoid other side-reactions, such as the formation of diketopiperazines (DKP).<sup>9,14,15</sup>

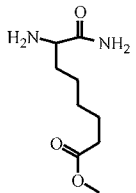
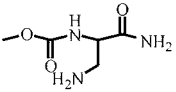
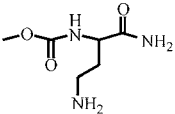
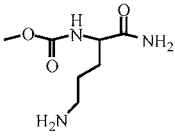
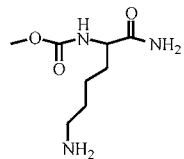
For the Mtt-containing peptides, the protecting group is removed with TFA/TEA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1:99) and then the incorporation of the Ddz-Phe-OH is carried out, without a prior neutralization step, using PyAOP as the coupling reagent in a similar way to the method used to avoid the formation of DKP's.<sup>15–17</sup>

For the Alloc-containing peptides, a tandem deprotection-coupling reaction, in which the removal of the Alloc group with Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>/PhSiH<sub>3</sub> is carried out in the presence of Ddz-Phe-F, avoids this side-reaction.<sup>9</sup>

In both cases, double incorporation was not detected neither by HPLC and MALDI-TOF-MS.

In conclusion, in the solid phase the *N* <sup>$\alpha$</sup> -Fmoc protecting group can be prematurely removed by a primary amine of sufficient basicity, such as the  $\epsilon$ -amino group of Lys, present in the peptide resin. This side-reaction,

**Table 1.** *pK<sub>a</sub>* of amino function according to the *pK<sub>alc</sub>* module (PALLAS version 2.0, CompuDrug)

				
<i>pK<sub>a</sub></i> : 8.04	<i>pK<sub>a</sub></i> : 8.49	<i>pK<sub>a</sub></i> : 9.45	<i>pK<sub>a</sub></i> : 10.00	<i>pK<sub>a</sub></i> : 10.09

which is not promoted by either the  $\beta$ -amino side-chain of the Dapa residue or the  $\alpha$ -amino group, can be prevented by a coupling/neutralization protocol in the case of Mtt protection or by a tandem deprotection–coupling reaction in the case of Alloc protection.

### Experimental protocols

#### Standard SPPS protocols

The Fmoc group was removed by treatment with piperidine/DMF (1:5) (2×15 min). Incorporation of protected amino acids (5 equiv.) was performed with DIPCDI (5 equiv.) and HOBt (5 equiv.) in DMF for 2 h.

Removal of the Mtt group was carried out with TFA/ TES/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1:98) (2×10 min).

Removal of the Alloc group was achieved with Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.1 equiv.) in the presence of PhSiH<sub>3</sub> (20 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> under Ar (2×20 min, 25°C).

Cleavage of peptides from the resin was carried out with TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:1) for 2 h at 25°C.

#### Circumventing premature removal of Fmoc

The Mtt-containing peptide resin was treated with TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99) (3×1 min), washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5×30 s), and the protected amino acid (10 equiv.), PyAOP (10 equiv.), and DIEA (20 equiv.) were sequentially added and the mixture left with occasional stirring for 2 h at 25°C.

The Alloc-containing peptide resin was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5×30 s) under Ar, and the active species of the protected amino acid (10 equiv.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.10 equiv.), and PhSiH<sub>3</sub> (10 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> were added and the mixture left with occasional stirring for 2 h at 25°C.

### Acknowledgements

We thank Dr. Victor Segarra from Almirall-Prodesfarma for the  $pK_a$  calculations. M.R. is a ‘Ramon y Cajal’ fellow (MCyT, Spain). This work was partially supported by CICYT (BQU2000-0235), Generalitat de Catalunya (Grup Consolidat, and Centre de Referència en Biotecnologia).

### References

1. For a review on cyclic peptides, see: Rovero, P. In *Practical Solid-Phase Synthesis: A Book Companion*; Kates, S. A.; Albericio, F., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2000; pp. 331–364.
2. Kates, S. A.; Daniels, S. B.; Albericio, F. *Anal. Biochem.* **1993**, *212*, 303–310.
3. Braunitzer, G.; Schrank, B.; Petersen, S.; Petersen, U. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1973**, *354*, 1563–1566.
4. For reviews on solid-phase chemistry, see: (a) *Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries*; Obrecht, D.; Villalgordo, J. M., Eds.; Pergamon: Oxford, 1998; (b) *Combinatorial Chemistry: A Practical Approach*; Bannwarth, W.; Felder, E., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2000; (c) *Practical Solid-Phase Synthesis: A Book Companion*; Kates, S. A.; Albericio, F., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2000; (d) Seneci, P. *Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Technologies*; John Wiley & Sons: New York, 2001.
5. An orthogonal system is defined as a set of completely independent classes of protecting groups, such that each class of groups can be removed in any order and in the presence of all other classes. See: Barany, G.; Albericio, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4936–4942 and references cited therein.
6. For a review on orthogonal protecting groups, see: Albericio, F. *Biopolymers (Peptide Sci.)* **2000**, *55*, 123–139.
7. Aletras, A.; Barlos, K.; Gatos, D.; Koutsogianni, S.; Mamos, P. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1995**, *45*, 488–496.
8. For reviews on allyl-based protecting groups, see: Guibé, F. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 13509–13556 and **1998**, *54*, 2967–3042.
9. Thieriet, N.; Alsina, J.; Giralt, E.; Guibé, F.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7275–7278.
10. Gómez-Martínez, P.; Dessolin, M.; Guibé, F.; Albericio, F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2871–2874.
11. Kumar and Aldrich have observed a similar phenomenon during the removal of the Alloc group from the side-chain amino function of Lys. See: Kumar, V.; Aldrich, J. V. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* (2000), 220th ORGN-226.
12. The Ddz group is completely stable to piperidine and can be removed with a minimum of 1% of TFA, and therefore is removed during the final cleavage of the peptide from the resin. See: Birr, C. In *Innovation and Perspectives in Solid-Phase Synthesis*; Epton, R., Ed.; SPCC (UK) Ltd: Birmingham, UK, 1990; pp. 155–181.
13. Samples of **2** and **3** were unequivocally prepared as standards.
14. Gairí, M.; Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7363–7366.
15. Alsina, J.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4195–4198.
16. Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4853–4856.
17. For coupling without preactivation of the protected amino acid, phosphonium salts such as PyAOP are preferred to aminium/uronium salts, such as HATU, because the latter can lead to guanidinium formation. See: Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678–9683.





**1.3.2. Four-dimensional orthogonal solid-phase  
synthesis of new scaffolds based on cyclic tetra- $\beta$ -  
peptides**

**Miriam Royo, Josep Farrera-Sinfreu, Laia Solé and Fernando Albericio**

*Tetrahedron Letters* 43 (2002), 2029-2032





## Four-dimensional orthogonal solid-phase synthesis of new scaffolds based on cyclic tetra- $\beta$ -peptides<sup>†</sup>

Miriam Royo,\* Josep Farrera-Sinfreu, Laia Solé and Fernando Albericio\*

*Departament of Organic Chemistry, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain*

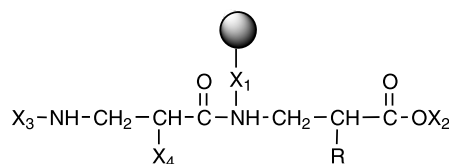
Received 13 January 2002; revised 23 January 2002; accepted 25 January 2002

**Abstract**—A four-dimensional orthogonal protecting scheme that involves the acid-labile BAL linker in conjunction with Fmoc, Alloc and *p*Nb protecting groups, which can be removed by  $\beta$ -elimination, allyl transfer, and reductive hydrolysis, respectively, allows the solid-phase preparation of scaffolds based on a cyclic tetra- $\beta$ -peptide with free amino side chains ready for further elaboration. © 2002 Published by Elsevier Science Ltd.

In medicinal chemistry, small cyclic peptides are excellent scaffolds for the incorporation of functional groups that can interact with the corresponding receptor.<sup>1</sup> Although the vast majority of cyclic peptides described in the literature are based on  $\alpha$ -amino acids, there is increasing interest in the design and synthesis of cyclic peptides derived from  $\beta$ -amino acids. For example, Seebach<sup>2</sup> and Gellman<sup>3</sup> have independently demonstrated that peptides based on  $\beta$ -amino acids have a well-defined secondary structure as well as excellent stability against degradation by proteases. Furthermore, Seebach has also shown that cyclic  $\beta$ -peptides are arranged in the solid state as tubular structures with a tight net of pleated-sheet-type hydrogen bonds.<sup>4</sup> That supposes that those type of cyclic peptides present secondary structure. Given the interest in these systems, it would be advantageous to have at our disposal a

versatile method for the preparation of cyclic  $\beta$ -peptides with protected functionalized side-chains that, after deprotection, could be further manipulated for the preparation of libraries based on the cyclic  $\beta$ -peptide scaffold. In order to gain maximum advantage from the synthetic effort, the ideal method would involve anchoring the cyclic peptide on a solid support.<sup>5,6</sup> We describe here the preparation of a solid-phase anchored cyclic  $\beta$ -peptide with protected side-chains and also report some examples of the modified scaffold.

The only valid strategy for the solid-phase preparation of cyclic peptides with protected side-chains is to anchor the peptide through the backbone amide nitrogen. In order to obtain a completely flexible system it is necessary to have at least a four-dimensional orthogonal protection scheme (Fig. 1).<sup>7,8</sup> More specifically, the scheme requires the following: a permanent protecting group to anchor the first amino acid to the support; two semi-permanent protecting groups, one for the protection of the *C*-terminal carboxylic acid group and the other for the side-chains; and finally a temporary protecting group for the protection of the  $\beta$ -amino function.



**Figure 1.** General protecting strategy for the solid-phase preparation of scaffolds based on cyclic tetra- $\beta$ -peptides.

**Abbreviations:** Alloc, allyloxycarbonyl; DIEA, *N,N*-diisopropylethylamine; DIPCDI, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide; DMF, *N,N*-dimethylformamide; EtOAc, ethyl acetate; HOAc, acetic acid; HOBt, hydroxybenzotriazole; IRAA, internal reference amino acid; PS, polystyrene; PyAOP, 7-azabenzotriazol-1-yl-oxytris(pyrrolidino)-phosphonium hexafluorophosphate; SPOS, solid-phase organic synthesis; SPPS, solid-phase peptide synthesis; TBTU, *N*-[(1*H*-benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylene]-*N*-methylmethanaminium tetrafluoroborate *N*-oxide; TFA, trifluoroacetic acid. Amino acid symbols denote L-configuration unless otherwise noted.

**Keywords:**  $\beta$ -amino acid; combinatorial chemistry; high-throughput synthesis; libraries; protecting groups.

\* Corresponding authors. Tel.: 34 93 402 90 58; fax: 34 93 339 78 78; e-mail: royo@qo.ub.es; albericio@qo.ub.es

<sup>†</sup> This paper is dedicated to Professor Joan A. Subirana on the occasion of his 65th birthday.

For the anchoring of the backbone, a backbone amide linker (BAL)<sup>9</sup> resin ( $X_1$ ) was chosen, which at the end of the process will liberate the peptide by treatment with acid. The protection of the  $\beta$ -amino function was performed with the fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)<sup>10</sup> group ( $X_3$ ), which is removed by a  $\beta$ -elimination reaction. The side-chains of the amino acids were protected with allyl-based groups<sup>11</sup> ( $X_4$ ), which can be removed by an allyl transfer reaction in the presence of Pd(0). Finally, the *p*-nitrobenzyl group (*p*Nb)<sup>12,13</sup> ( $X_2$ ), which is removed by reductive hydrolysis, was used for the protection of the carboxylic acid group.

As a key trifunctional  $\beta$ -amino acid, *N* $\alpha$ -Alloc-*N* $\beta$ -Fmoc-L-diaminopropionic acid (Dapa) was chosen and this was elongated through the  $\beta$ -amino function.<sup>14</sup> The first cyclic peptide to be synthesized was *c*(L-Dapa- $\beta$ Ala-L-Dapa- $\beta$ Ala), which has as side-chains the two  $\alpha$ -amino functions of the two Dapa residues.

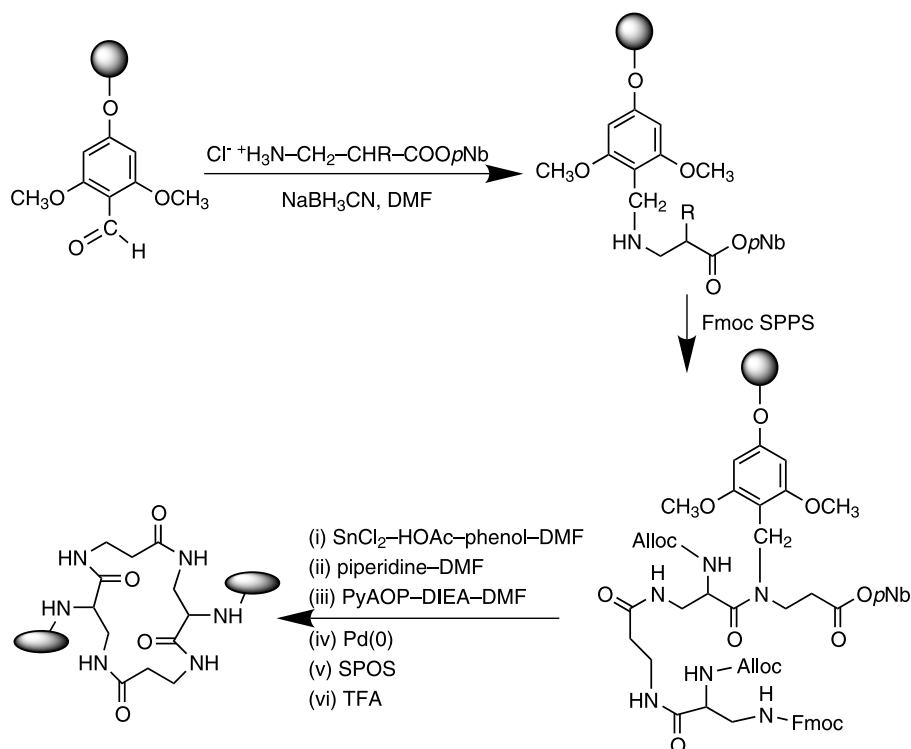
Our strategy started with the addition of 5-(4-formyl-3,5-dimethoxyphenoxy)valeric acid (PALdehyde) to an amino-functionalized PS solid support through TBTU/DIEA coupling. This step was followed by on-resin reductive amination using the appropriate amino acid (usually  $\beta$ -alanine), *p*Nb ester hydrochloride salt and NaBH<sub>3</sub>CN in DMF (Fig. 2). In the case where the  $\beta$ -amino group is attached to a BAL resin, the acylation of the secondary amine was found to be faster than the comparable reaction with  $\alpha$ -amino acids anchored to the same BAL resin.<sup>9</sup> Quantitative yields were obtained in the acylation of *N* $\alpha$ -Alloc-*N* $\beta$ -Fmoc-L-Dapa by using PyAOP/DIEA<sup>15</sup> in DMF. Deprotection of the  $\beta$ -amino function of the Dapa residue with piperidine

was followed by incorporation of Fmoc- $\beta$ -alanine and *N* $\alpha$ -Alloc-*N* $\beta$ -Fmoc-L-Dapa. After incorporation of the last residue, the removal of the *p*Nb group was accomplished by treatment with SnCl<sub>2</sub>/HOAc/phenol/DMF.<sup>12,13</sup> Subsequent removal of the Fmoc group was followed by cyclization with PyAOP/DIEA<sup>16</sup> to give the cyclic  $\beta$ -tetrapeptide in which the two  $\alpha$ -amino functions of the two Dapa residues were protected with the Alloc group. Removal of the Alloc group with Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>17</sup> in the presence PhSiH<sub>3</sub> left the two amino functions free for further manipulation.<sup>18</sup>

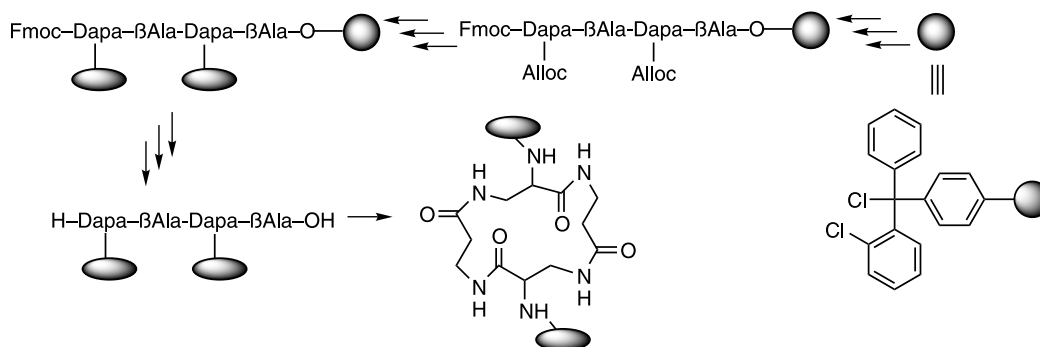
After removal of the Alloc group, different aliquots of the resin were derivatized separately. For example, phenylacetic acid (PhAcOH) was incorporated using DIPCDI/HOBt and the Arg-Gly-Asp (RGD)<sup>19</sup> receptor recognition motif was constructed using a stepwise Fmoc/*t*Bu strategy.

The same scheme was used to prepare BAL-*c*[L-Dapa(Boc)- $\beta$ Ala-L-Dapa(Boc)- $\beta$ Ala], which after treatment with TFA gave *c*(L-Dapa- $\beta$ Ala-L-Dapa- $\beta$ Ala) with the side-chain amino function of the Dapa residues free for subsequent functionalization in solution. Finally, the simplest cyclic tetra- $\beta$ -peptide, *c*( $\beta$ Ala)<sub>4</sub>, was also prepared in good yield and with excellent purity.<sup>20</sup>

In order to confirm any advantages inherent in our cyclization on-resin method, the linear peptide was prepared on a chloro-trityl-(Cl-Trt)-<sup>21</sup> resin by following the scheme shown in Fig. 3. Assembly of the peptide chain was followed by removal of the Alloc groups and PhAcOH was then incorporated as



**Figure 2.** General strategy for the solid-phase preparation of scaffolds based on cyclic tetra- $\beta$ -peptides containing Dapa residues.



**Figure 3.** General strategy for the preparation of scaffolds based on cyclic tetra-β-peptides using a Cl-Trt-resin.

described above. Cleavage of the peptide with TFA and subsequent cyclization in solution gave *c*[L-Dapa-(PhAc)-βAla-L-Dapa(PhAc)-βAla]. Comparison of the two methods shows that cyclization on solid-phase using a BAL resin, where the whole process was performed on the solid-phase, gave better results than cyclization in solution after synthesis of the linear peptide on a Cl-Trt-resin. Thus, while the linear peptide was never detected by HPLC in the crude cyclic peptides obtained in solid-phase after 2 h of reaction, in solution large amounts of the linear peptide were detected after 16 h of reaction (the ratio cyclic versus linear was 1:4).<sup>22</sup>

In conclusion, a solid-phase strategy has been developed that uses a tetra-orthogonal protecting scheme and allows the preparation of cyclic tetra-β-peptides with free amino side chains ready for further elaboration. Cyclic tetra-β-peptide libraries prepared in this way will be suitable for both on- and off-resin screening.

## 1. Experimental

**SPPS on BAL-resin.** PALdehyde (5 equiv.) and TBTU (5 equiv.) were dissolved in DMF and then DIEA (10 equiv.) was added. After 1 min preactivation, this solution was added to the amino-functionalized PS. Coupling was allowed to proceed at 25°C for 2 h, after which time the resin was negative to the Kaiser ninhydrin test.

Mixtures of β-alanine *p*Nb ester hydrochloride<sup>23</sup> (10 equiv.) and NaBH<sub>3</sub>CN (10 equiv.) in DMF were added to the PALdehyde-IRAA-resins (1 equiv.). The reactions were allowed to proceed for 1 h at 25°C. The resins were then washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and MeOH and finally dried.

*N*α-Alloc-*N*β-Fmoc-L-Dapa (5 equiv.), PyAOP (5 equiv.), and DIEA (10 equiv.) in DMF were added to amino acyl ester BAL-resins and the mixtures were allowed to react for 2 h at 25°C. After washing with DMF and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, the couplings were repeated for a further 2 h with fresh reagents.

The Fmoc group was removed using piperidine/DMF (1:4) (2×15 min). Incorporation of the rest of the protected amino acids and acids (10 equiv.) was performed with DIPCDI (10 equiv.) and HOBt (10 equiv.) in DMF for 2 h.

Removal of the *p*Nb group was carried out with 8 M SnCl<sub>2</sub> in DMF containing 1.6 mM HOAc and 0.2% phenol (2×30 min, 60°C).

Solid-phase cyclization was carried out with PyAOP (5 equiv.) and DIEA (10 equiv.) in DMF for 2 h at 25°C.

Removal of the Alloc group was achieved with Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.1 equiv.) in the presence of PhSiH<sub>3</sub> (24 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> under Ar (2×20 min, 25°C).

Cleavage of the cyclic peptide from the resin was carried out with TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:1) for 2 h at 25°C.

**SPPS on ClTrt-resin.** Fmoc-βAla-OH (0.5 equiv.)<sup>24</sup> and DIEA (2 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> were added to a Cl-TrtCl-resin (1.35 mmol/g) for 2 h at 25°C. The reaction was terminated by addition of MeOH and stirring for 15 min.

The rest of the manipulations were carried out in a similar way to those described above.

## Acknowledgements

M.R. is a ‘Ramon y Cajal’ fellow (MCyT, Spain). The excellent technical assistant of Mr. Miklos Winkler (Eötvös University, Budapest, Hungary) is especially acknowledged. This work was partially supported by CICYT (BQU2000-0235), Generalitat de Catalunya [Grup Consolidat, and Centre de Referència en Biotecnologia].

## References

- Royo, M.; Van Den Nest, W.; del Fresno, M.; Frieden, A.; Yahalom, D.; Rosenblatt, M.; Chorev, M.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7387–7391 and references cited therein.

2. Seebach, D.; Matthews, J. L. *Chem. Commun.* **1997**, 2015–2022.
3. (a) Appella, D. H.; Barchi, J. J., Jr.; Durell, S. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2309–2310; (b) Barchi, J. J., Jr.; Huang, X.; Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Durell, S. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2711–2718.
4. Seebach, D.; Matthews, J. L.; Meden, A.; Wessel, T.; Baerlocher, C.; McCusker, L. B. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 173–182.
5. For a review on cyclic peptides, see: Rovero, P. In *Practical Solid-Phase Synthesis: A Book Companion*; Kates, S. A.; Albericio, F., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2000; pp. 331–364.
6. For reviews on solid-phase chemistry, see: (a) *Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries*; Obrecht, D.; Villalgordo, J. M., Eds.; Pergamon, 1998; (b) *Combinatorial Chemistry: A Practical Approach*; Bannwarth, W.; Felder, E.; Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2000; (c) *Practical Solid-Phase Synthesis: A Book Companion*; Kates, S. A.; Albericio, F., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2000; (d) Seneci, P. *Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Technologies*; John Wiley & Sons: New York, 2001.
7. An orthogonal system is defined as a set of completely independent classes of protecting groups, such that each class of group can be removed in any order and in the presence of all other classes (Barany, G.; Albericio, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4936–4942, and references cited therein).
8. For a review of orthogonal protecting groups, see: Albericio, F. *Biopolymers (Peptide Sci.)* **2000**, *55*, 123–139.
9. (a) Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vágner, J.; Albericio, F.; Barany, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5441–5452; (b) Alsina, J.; Jensen, K. J.; Albericio, F.; Barany, G. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2787–2795.
10. Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404–3405.
11. For reviews on allyl-based protecting groups, see: Guibé, F. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 13509–13556 and **1998**, *54*, 2967–3042.
12. Hocker, M. D.; Caldwell, C. G.; Macsata, R. W.; Lyttle, M. H. *Peptide Res.* **1995**, *8*, 310–315.
13. Romanovskis, P.; Spatola, A. F. *J. Peptide Res.* **1998**, *52*, 356–374.
14. Subirana and co-workers were the first to show that  $\beta$ -amino acid polymers derived from aspartic acid adopt helical structures. Fernández-Santín, J. M.; Aymamí, J.; Rodríguez-Galán, A.; Muñoz-Guerra, S.; Subirana, J. A. *Nature* **1984**, *311*, 53–54. Dapa is the aminated analogue of Asp.
15. Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Minor, C. A.; Albericio, F. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201–203.
16. Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4853–4856.
17. Thieriet, N.; Alsina, J.; Giralt, E.; Guibé, F.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7275–7278.
18. If the Alloc groups are removed after the incorporation of the Dapa derivative and before the removal of the Fmoc group, different building blocks could be incorporated at each Dapa residue. Furthermore, the same results can be achieved if the Dapa residues are incorporated with different  $N\alpha$  protection, for instance Alloc and methyltrityl (Mtt), which is also compatible with this scheme.
19. (a) Rouslahti, E.; Pierschbacher, M. D. *Science* **1987**, *238*, 491–497; (b) Brooks, P. C.; Clark, C. F.; Cheresch, D. A. *Science* **1994**, *264*, 569–571; (c) Cox, D.; Aoki, T.; Seri, J.; Motoyama, Y.; Yoshida, K. *Med. Res. Rev.* **1994**, *14*, 194–195.
20. Solid-phase elongation of all linear peptides took place with essentially quantitative yields. All cyclic peptides were characterized by HPLC and MALDI-TOF-MS. *c*[L-Dapa(Alloc)- $\beta$ Ala-L-Dapa(Alloc)- $\beta$ Ala]: HPLC (78% purity); MS calcd for  $C_{20}H_{30}N_6O_8$  482.21, found 483.96 [M+H]<sup>+</sup>, 506.34 [M+Na]<sup>+</sup>, 522.32 [M+K]<sup>+</sup>; *c*[L-Dapa-(PhAc)- $\beta$ Ala-L-Dapa(PhAc)- $\beta$ Ala]: HPLC (72% purity); MS calcd for  $C_{28}H_{34}N_6O_6$  550.25, found 552.24 [M+H]<sup>+</sup>, 574.26 [M+Na]<sup>+</sup>, 590.24 [M+K]<sup>+</sup>; *c*[L-Dapa(RGD)- $\beta$ Ala-L-Dapa(RGD)- $\beta$ Ala]: HPLC (65% purity). MS calcd for  $C_{36}H_{62}N_{18}O_{14}$  970.47, found 973.06 [M+H]<sup>+</sup>, 995.06 [M+Na]<sup>+</sup>, 1011.06 [M+K]<sup>+</sup>. *c*[L-Dapa- $\beta$ Ala-L-Dapa- $\beta$ Ala]: HPLC (70% purity). MS calcd for  $C_{12}H_{22}N_6O_4$  314.17, found 315 [M+H]<sup>+</sup>, 338 [M+Na]<sup>+</sup>, 353 [M+K]<sup>+</sup>; *c*( $\beta$ Ala)<sub>4</sub>: HPLC (73% purity). MS calcd for  $C_{12}H_{20}N_4O_4$  284.15, found 284 [M+H]<sup>+</sup>, 307 [M+Na]<sup>+</sup>, 323 [M+K]<sup>+</sup>.
21. Barlos, K.; Gatos, D.; Schäfer, W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 590–593.
22. Even worse results were obtained when cyclization of the precursor H-L-Dapa(Alloc)- $\beta$ Ala-L-Dapa(Alloc)- $\beta$ Ala-OH was attempted.
23.  $\beta$ -Alanine *p*Nb ester hydrochloride was prepared by reaction of Boc- $\beta$ Ala-OH (1 equiv.) with *p*-nitrobenzyl alcohol (1 equiv.) in the presence of DIEA (1 equiv.) in  $CH_2Cl_2$  for 16 h at 25°C. The residue was suspended in EtOAc, washed with 10% aqueous  $Na_2CO_3$ , 0.1N aqueous HCl, brine, dried ( $MgSO_4$ ), and concentrated in vacuo. The Boc- $\beta$ Ala-*Op*Nb intermediate, a white solid, was dissolved in 4N HCl/dioxane and stirred at 25°C for 1 h. The homogeneous reaction mixture was concentrated in vacuo and washed with  $Et_2O$  to provide the product as a white solid (81% overall yield).
24. When Cl-Trt-resin of loading superior to 1 mmol/g is used, a limited incorporation of the first amino acid is advisable to avoid the formation of deletion peptides arising from interchain aggregation. Chiva, C.; Vilaseca, M.; Giralt, E.; Albericio, F. *J. Peptide Sci.* **1999**, *5*, 131–140.

## 1.4. DISCUSSIÓ

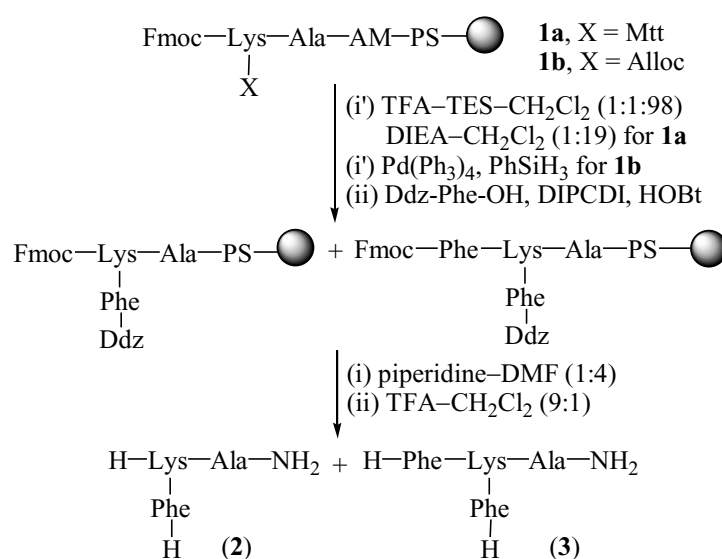
### 1.4.1. Eliminació prematura del grup Fmoc durant l'eliminació del grup Alloc (1)

En el primer capítol de la present tesi, vàrem estudiar l'estabilitat del grup Fmoc en una síntesi a l'hora d'eliminar un grup Alloc, grups en principi completament ortogonals. En el grup, vàrem detectar que en alguns casos, a l'hora d'eliminar un grup Alloc en presència d'un grup Fmoc, aquest últim no es mantenia completament estable. Així, treballant amb la lisina amb el grup  $\alpha$ -amino protegit amb el grup Fmoc i amb la posició  $\epsilon$ -amino protegida amb el grup Alloc, després d'eliminar-ne el grup Alloc i d'acilar-ne l'amina lliure, vàrem detectar doble incorporació de l'agent acilant. Aquest resultat indicava que el grup Fmoc també s'havia eliminat en l'etapa de desprotecció del grup  $\epsilon$ -amino. En un primer moment vàrem pensar que el que estava passant era que l'hidrur del grup captador de carbocacions que s'utilitzava ( $\text{PhSiH}_3$ ) estava capturant el protó del grup Fmoc, afavorint d'aquesta forma la  $\beta$ -eliminació i per tant alliberant el grup amino. Això es va descartar treballant amb Fmoc-Lys(Mtt)-OH, on es va detectar el mateix problema, és a dir, doble acilació un cop eliminat el grup Mtt.

En l'estudi que vàrem dur a terme (figura 1), una lisina protegida en la posició  $\alpha$  amb el grup Fmoc i en la posició  $\epsilon$  amb el grup Alloc o amb el Mtt fou ancorada a la resina Rink Amida MBHA, utilitzant una alanina com aminoàcid de referència interna. Després d'eliminar el grup protector de la cadena lateral, hi fou ancorada la Ddz-Phe-OH. Aquest pas es considera clau, ja que si a l'hora d'eliminar el grup protector de la

- 
1. Farrera-Sinfreu, J.; Royo, M., and Albericio, F. Undesired removal of the Fmoc group by the free  $\epsilon$ -amino function of a lysine residue. *Tetr. Lett.* **2002**, *43*, 7813–7815.

cadena lateral es desprotegeix també l'amina en posició  $\alpha$  explicaria l'obtenció del compost **3** degut a la doble incorporació de la fenilalanina. Un cop incorporada la fenilalanina, es va fer un tractament amb piperidina per tal de desprotegir el grup  $\alpha$ -amino de la lisina. Finalment el compost fou escindit de la resina amb TFA. El resultat fou que en el cas en que s'utilitzava el grup Mtt com a protector de la cadena lateral, el subproducte **3** s'obtenia amb un 20%, mentre que quan s'utilitzava el grup Fmoc l'extensió de la reacció secundària era força més dramàtica i es detectava fins un 35% de subproducte després de dues hores.



**Figura 1.** Estratègia utilitzada per a determinar l'extensió de la reacció secundària de pèptids que contenen lisina.

Semblava clar que el que estava passant era degut a que l'amina que quedava lliure un cop eliminat el grup protector de la cadena lateral era capaç d'eliminar el grup Fmoc en posició  $\alpha$ , el qual s'elimina mitjançant una  $\beta$ -eliminació en medi bàsic. L'extensió d'aquesta reacció secundària és més dramàtica quan s'utilitza el grup Alloc a la cadena lateral perquè l'amina corresponent es troba més temps desprotonada, essent capaç d'arrancar el protó del fluorenilmetoxicarbonil. En el cas d'estar eliminant el grup Mtt, l'amina lliure resultant es troba protonada durant la desprotecció, no podent en aquest cas eliminar el grup Fmoc. Un cop neutralitzada aquesta amina resultant, aquesta comença eliminar el grup Fmoc, però com el temps que es troba desprotonada és menor que en el cas de tenir el grup Alloc, es detecta menys producte secundari. Això es va



corroborar deixant la resina **1b** sense el grup Alloc un dia sencer agitant en DMF. Després de seguir l'esquema sintètic, el 95% del producte detectat per HPLC era el **3**, indicant inequívocament que el causant de l'eliminació del grup Fmoc era l'amina lliure de la cadena lateral, prou bàsica per arrancar el protó de l'Fmoc.

El mateix esquema de síntesi fou aplicat a l'ornitina, a l'àcid diaminobutíric i a l'àcid diaminopropiònic. Els diferents valors de pKa dels grups amino de les cadenes laterals expliquen els resultats obtinguts. En el cas de la lisina, l'ornitina i el diaminobutíric, la reacció secundària es dona degut a que els grups amino són prou bàsics per eliminar el grup Fmoc. En el cas del diaminopropiònic no es detecta producte secundari perquè l'amina no és prou bàsica.

Per tal d'evitar aquesta reacció secundària, es van buscar mètodes alternatius per no obtenir productes indesitjats. Així, en el cas d'utilitzar el grup Mtt, es va aplicar una etapa d'acoblament amb neutralització *in situ*, evitant així tenir l'amino lliure. En el cas de tenir el grup Alloc, es va optar per fer una reacció tàndem de desprotecció-acoblament, utilitzant una espècie activa durant l'etapa de desprotecció com són els fluorurs d'àcid.

Així, en aquest capítol de la tesis hem pogut detectar un problema d'estabilitat del grup Fmoc en front a amines i, el que és més important, hem pogut trobar solucions per tal d'evitar que aquest tipus de reaccions secundàries es donin. Actualment, aquest continua essent un problema d'interès, ja que recentment han aparegut a la literatura alternatives a la nostra solució (**2**), les quals es basen en la utilització de nous grups protectors en fase sòlida com ara el pNZ.

- 
2. Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M., and Albericio, F. Semipermanent p-nitrobenzyloxycarbonyl (pNZ) protection of Orn and Lys side chains: prevention of undesired  $\alpha$ -Fmoc removal and application to the synthesis of cyclic peptides. *Tetr. Lett.* **2005**, *46*, 7733–7736.

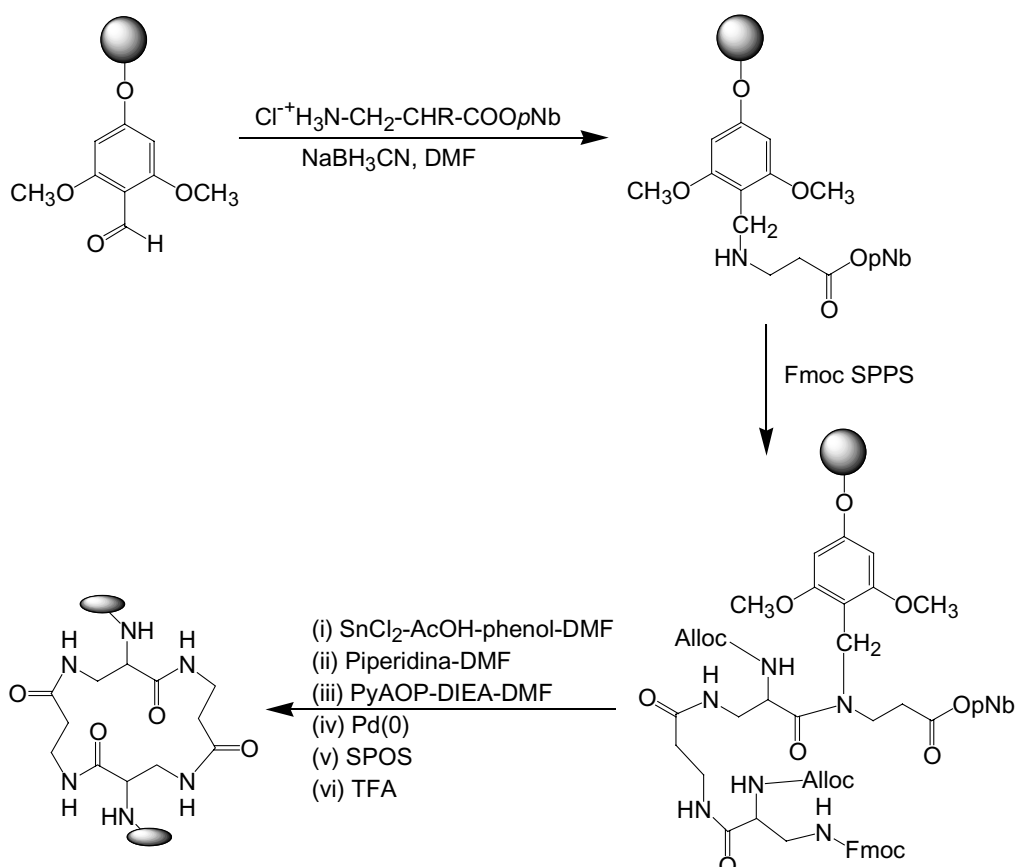
### 1.4.2. Aplicació d'un sistema de protecció tetra-ortogonal en una síntesis complexa de $\beta$ -pèptids cíclics (3)

Atesa la importància de tenir bons sistemes de protecció a l'hora d'afrontar una síntesis, aquest capítol s'ha centrat en la síntesis de tetra- $\beta$ -pèptids cíclics en fase sòlida utilitzant un sistema de protecció tetra-ortogonal (3). La síntesis d'aquests  $\beta$ -pèptids cíclics es va dur a terme utilitzant l'espaiador bifuncional **BAL** (*Backbone Amide Linker*) (4), estratègia que sembla ser una de les més adients per a la síntesis en fase sòlida de pèptids cíclics amb les cadenes laterals protegides. Per fer-ho, és necessari tenir com a mínim un sistema de protecció tetra-ortogonal (5), el qual es basa en: un grup protector permanent per ancorar el primer aminoàcid a la resina, un grup protector semipermanent per l'àcid carboxílic del C-terminal, un altre grup semipermanent per a la protecció de les cadenes laterals (grups  $\alpha$ -amino) i un últim grup protector temporal per al grup  $\beta$ -amino a través del qual es far créixer l'esquelet peptídic.

Com hem dit, per ancorar l'esquelet peptídic a la resina es va utilitzar l'espaiador bifuncional BAL (4), el qual al final de la síntesis permet alliberar el pèptid de la resina per tractament amb medi àcid. Els grups  $\beta$ -amino foren protegits amb el grup Fmoc (6). Les cadenes laterals dels  $\beta$ -aminoàcids (en aquest cas grups amino en la posició  $\alpha$ )

3. Royo, M.; Farrera-Sinfreu, J.; Sole, L., and Albericio, F. Four-dimensional orthogonal solid-phase synthesis of new scaffolds based on cyclic tetra- $\beta$ -peptides. *Tetr. Lett.* **2002**, *43*, 2029–2032.
4. (a) Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vágner, J.; Albericio, F., and Barany, G. Backbone Amide Linker strategy for solid-phase synthesis of C-terminal-modified and cyclic peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5441–5452  
(b) Alsina, J.; Jensen, K. J.; Albericio, F., and Barany, G. Solid-phase synthesis with tris(alkoxy)benzyl backbone amide linkage (BAL). *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2787–2795.
5. Per una revisió de grups protectors: Albericio, F. Orthogonal protecting groups for  $N\alpha$ -amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. *Biopolymers (Peptide Sci.)* **2000**, *55*, 123–139.
6. Carpino, L. A., and Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404–3405.

foren protegits amb grups Alloc (7), els quals s'eliminen mitjançant una reacció de transferència d'al·lil en presència de Pd(0). Finalment, el grup *p*-nitrobenzil (*p*Nb) (8,9) fou utilitzat per a la protecció del grup àcid carboxílic, el qual s'elimina mitjançant una hidròlisi reductiva.



**Figura 2.** Estratègia general per a la preparació en fase sòlida de plataformes basades en tetra-β-pèptids cíclics que contenen residus d'àcid diaminopropiònic i β-alanina.

7. Per una revisió sobre grups protectors alílics: Guibé, F. Allylic protecting groups and their use in a complex environment part I: Allylic protection of alcohols. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 13509–13556.
8. Hocker, M.D.; Caldwell, C.G.; Macsata, R.W., and Lyttle, M.H. *p*-Nitrobenzyl side-chain protection for solid-phase synthesis. *J. Peptide Res.* **1995**, *8*, 310–315.
9. Romanovskis, P., and Spatola, A. F. Preparation of head-to-tail cyclic peptides via side-chain attachment: implications for library synthesis. *J. Peptide Res.* **1998**, *52*, 356–374.

Així, el *p*-nitrobenzilester de la  $\beta$ -alanina fou ancorat a la resina BAL mitjançant una aminació reductiva. El tetra- $\beta$ -pèptid es va fer créixer utilitzant l'àcid diaminopropiònic i la  $\beta$ -alanina de forma alternada. Un cop tinguérem el pèptid lineal, el grup Fmoc de l'extrem *N*-terminal i el grup *p*NB de l'extrem *C*-terminal foren eliminats (amb piperidina i amb una solució de clorur d'estany 6M respectivament) i el pèptid fou ciclat en fase sòlida utilitzant PyAOP/DIEA en DMF com a sistema d'acoblament. La desprotecció dels grups  $\beta$ -amino dels àcids diaminopropiònics, seguit de la seva funcionalització amb el tripèptid Arg-Gly-Asp (RGD) o amb fenilacètic i final escissió de la resina donaren els compostos finals, amb pureses per HPLC del 72 i del 65% respectivament.

Aquesta síntesi fou comparada amb una síntesi descrita en el Màster Experimental realitzat per la Sra. Laia Solé i Feu, la qual es basava en sintetitzar el pèptid lineal en fase sòlida sobre la resina Cl-Trt, seguit de la funcionalització dels grups  $\beta$ -amino dels aminoàcids diaminopropiònic, desprotecció de l'extrem *N*-terminal i de l'escissió de la resina, fent finalment la ciclació en solució.

La ciclació en fase sòlida era total després de dues hores de reacció, mentre que en la ciclació en solució el pèptid lineal es detectava com a majoritari després de 16 hores de reacció.

En resum, en aquest capítol vàrem desenvolupar una síntesis eficaç en fase sòlida de  $\beta$ -pèptids cíclics, la qual es podria aprofitar per la síntesis de llibreries d'aquest tipus de compostos o fins i tot generalitzar-se per l'obtenció de pèptids cíclics modificats en les cadenes laterals. De fet, s'ha descrit que basant-se en aquesta síntesi es poden desenvolupar altres plataformes (10). Així, els autors d'aquest treball han sintetitzat una llibreria de compostos amb sucres en les cadenes laterals utilitzant la plataforma central  $\beta$ -peptídica descrita en aquesta tesi.

- 
10. Virta, P.; Karskela, M., and Lönnberg, H. Orthogonally protected cyclo- $\beta$ -tetrapeptides as solid-supported scaffolds for the synthesis of glycoclusters. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1989–1999.

## 1.5. CONCLUSIONS

1. S'ha determinat que l'eliminació prematura d'un grup Fmoc degut a la presència d'una amina lliure després de l'eliminació d'un grup Alloc es pot evitar. Per fer-ho, en comptes del grup Alloc es pot utilitzar un altre grup protector el qual s'elimini en condicions completament diferents com és en medi àcid, tenint així l'amina protonada i evitant que pugui actuar com a base. En aquest mètode, si es realitza l'acoblament amb neutralització *in situ*, s'aconsegueix disminuir l'extensió de la reacció secundària. Utilitzant el grup Alloc, es pot també evitar l'eliminació del grup Fmoc fent una reacció tàndem de desprotecció-acoblament, utilitzant espècies molt reactives com són els fluorurs d'àcid.
2. La síntesi en fase sòlida de tetra- $\beta$ -pèptids cíclics utilitzant un sistema de protecció tetra-ortogonal sobre l'espaiador bifuncional BAL és factible. Utilitzant aquesta síntesi es possible sintetitzar plataformes cícliques ramificades d'una forma ràpida i eficient.



## **CAPÍTOL 2**

# **FÒLDAMERS: ESTRUCTURA I APLICACIONS**





## 2.1. INTRODUCCIÓ

### 2.1.1. Foldàmers

Els biopolímers naturals més importants com són les proteïnes, els àcids nucleics i els polisacàrids poden adoptar una ampli rang d'estructures secundàries i estan involucrats en aspectes clau de la vida. Una característica rellevant dels polímers naturals és la immensa variabilitat que dona la combinació d'un nombre limitat de monòmers en una seqüència ben definida. En els últims anys s'han desenvolupat nous oligòmers que mimetitzen als polímers naturals, obtenint així nous compostos amb aplicacions en les ciències de la vida. En els últims anys, l'estudi d'oligòmers utilitzant molècules d'origen no natural ha esdevingut una font molt important de noves estructures amb la capacitat d'adoptar infinitat d'estructures secundàries (foldàmers) (1) i amb propietats aprofitables en el camp de la química mèdica i terapèutica.

A la dècada dels 80, el professor Juan A. Subirana i col. (2) varen trobar que polímers de  $\beta$ -aminoàcids derivats de l'àcid aspàrtic podien adoptar estructures helicoidals. L'any 1994, el professor Samuel H. Gellman (3) discuteix el concepte general d'oligòmers sintètics amb plegaments definits, especialment els  $\beta$ -pèptids i aporta estudis de modelat. El fet que aquest tipus de molècules poguessin adoptar estructures secundàries definides en solució, va fer que ell mateix els anomenés **foldàmers** per primer cop a l'any 1996 (4). En Gellman definia foldàmer com a totes aquelles estructures no naturals que es podien plegar en solució donant un estat conformacionalment ordenat. Més tard, Moore (1) va donar una definició més restrictiva, afegint a la definició d'en Gellman que aquestes estructures havien d'estar estabilitzades per una col·lecció d'interaccions no covalents entre monòmers no adjacents. La definició d'en Moore restringeix el terme foldàmer a tots aquells oligòmers amb un pes molecular que estigui en el rang de 500 a 5000 Da, ja que polímers de pes més gran com són totes les biomacromolècules presenten diversos dominis estructurats, ja sigui donant el mateix tipus d'estructura secundària o no. Això dona lloc a la formació d'estructures terciàries i quaternàries. El que pretén Moore és

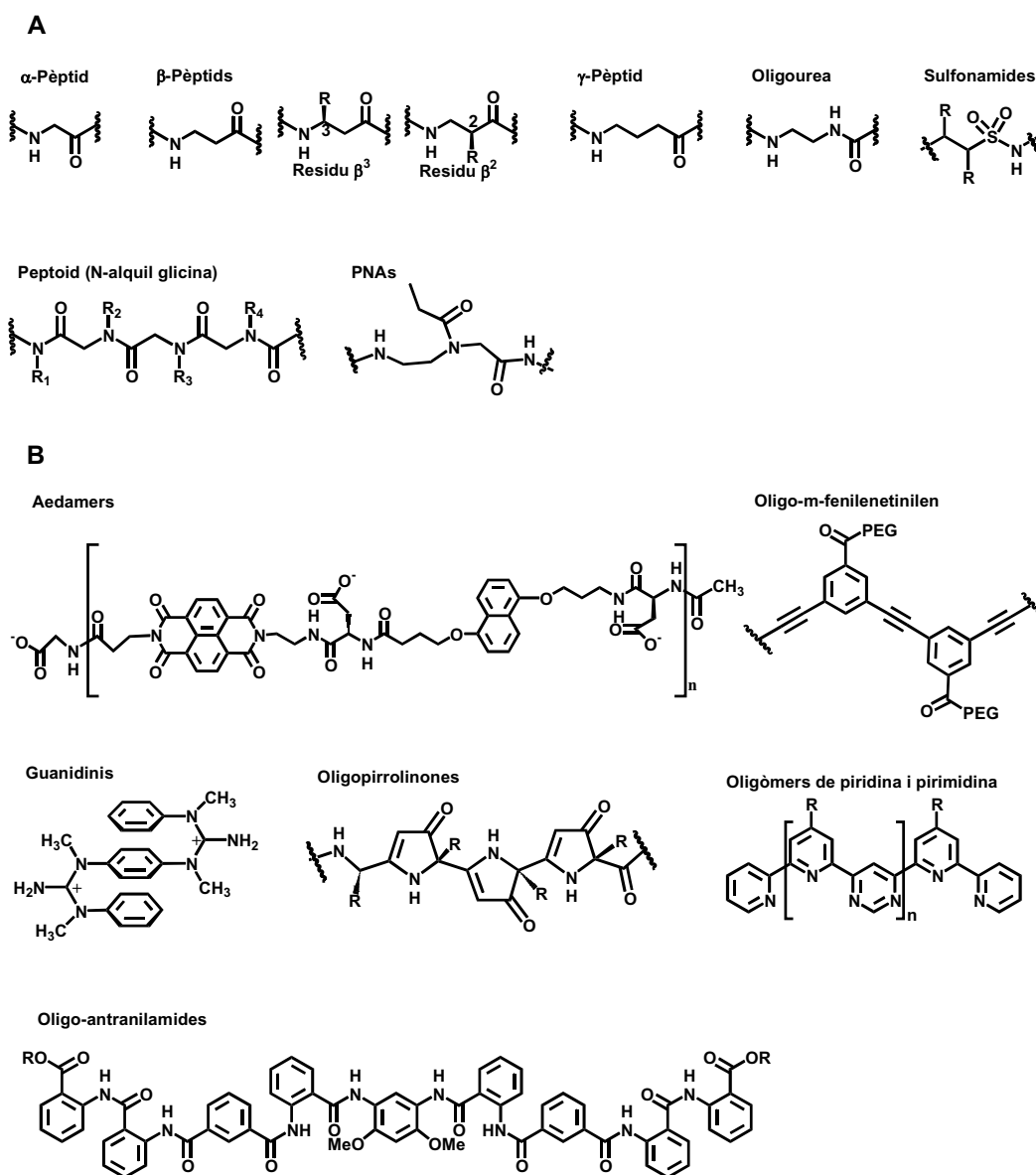
restringir el terme foldàmer només a la formació d'estructures secundàries, i proposa el terme **tyliger** per polímers que tinguin més d'una subunitat de foldàmers.

Els foldàmers poden desestructurar-se per formar un conjunt de conformacions desordenades i tornar-se a plegar. En canvi, aquelles molècules que presenten una estructura secundària definida, però sense flexibilitat conformacional com són els polímers rígids no es consideren foldàmers. Aquesta distinció és deguda a que la recerca en aquest camp va dirigida a conèixer profundament l'estructura i el funcionament de biomacromolècules i a identificar nous polímers que puguin mimetitzar la natura, essent capaços de realitzar alguna funció. Però la veritat és que com a conseqüència de la seva estructura molecular, els foldàmers mostren diferències importants en les seves propietats comparats amb les conformacions habituals dels polímers naturals ordenats. El procés de plegament resultant d'un nombre d'interaccions no covalents mostra **cooperativitat** i és proporcional al nombre d'unitats de repetició. Així, l'estabilitat relativa de les conformacions ordenades respecte les desordenades augmenta amb la llargada del polímer. A més a més, la flexibilitat inherent de l'esquelet polimèric i l'estabilització dels estats ordenats mitjançant interaccions no covalents dona un increment de resposta ambiental. Qualsevol paràmetre, per exemple el solvent, el pH o la força iònica, que moduli la natura o la força de les interaccions no covalents pot ser utilitzat per alterar la natura o l'estabilitat de la conformació preferida.

#### 2.1.1.1. Tipus de foldàmers

Donada la importància que han demostrat tenir aquest tipus d'estructures, se n'ha descrit de molts tipus i procedències molt variades. Així, els foldàmers es poden classificar tant segons l'estructura secundària que adopten (figura 1), com segons el tipus d'esquelet que els constitueix (**1**). Segons aquesta última classificació i comparant-los amb els biopolímers naturals coneguts, els foldàmers es poden classificar en dos grans grups: els **abiòtics** i els **bioinspirats**. Els abiòtics incorporen al seu esquelet anells aromàtics. Entre ells destaquen les **oligopirrolinones** (**5**), els **oligo(fenilen-etinilens)** (**6**), els **aedamers** (**7**) i els **guanidinis** (**8**), entre altres. Per altra banda, els bioinspirats s'assemblen químicament a les proteïnes i són bàsicament foldàmers de caràcter peptídic (peptidomimètics), com ara els **peptoids** (*N*-alquil glicines) (**9**), els

**vinilogopèptids** (*vinyllogous polypeptides*) (10), els **PNAs** (*peptide nucleic acids*) (11), les **oligourees** (12), els  **$\beta$ -pèptids** (4,13) o els  **$\gamma$ -pèptids** (14,15,16), entre altres. Els estudis dels foldàmers de caràcter peptídic s'han centrat en l'elucidació de l'especificitat de seqüència a l'hora d'adoptar una estructura secundària, aconseguint així estabilitzar aquestes estructures d'una manera racional en aigua i arribant fins i tot a crear estructures terciàries (**tyligomers**) com empaquetaments helicoïdals (*helical bundles*).

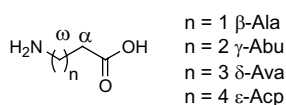


**Figura 1.** Exemples més representatius de foldàmers. (A) Foldàmers bioinspirats. (B) Foldàmers abiòtics.

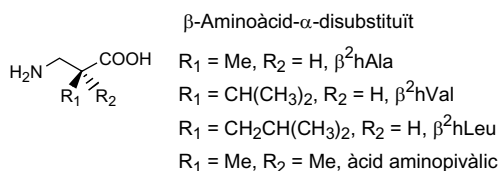
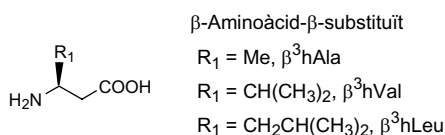
### 2.1.1.2. Foldàmers bioinspirats. Peptidomimètics

Dins la gran varietat de foldàmers descrits, els més estudiats sense cap mena de dubte són els bioinspirats. Entre aquests, els que més s'han estudiat són els  $\beta$ - (**4,13,17,18**) i  $\gamma$ -pèptids (**14**). S'entén com a  $\beta$ -pèptid aquell pèptid que està format per  $\beta$ -aminoàcids, els quals, respecte als  $\alpha$ -aminoàcids, estan formats per un carboni més entre el grup amino i el grup àcid carboxílic (figura 2). Els  $\gamma$ -pèptids estan formats per  $\gamma$ -aminoàcids, els quals tenen tres carbonis entre el grup amino i el grup àcid carboxílic. Això comporta un augment considerable de les molècules que es poden arribar a obtenir, ja que es poden tenir molts tipus de substitució en les posicions  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  dels  $\gamma$ -aminoàcids. S'ha demostrat que la natura i posició d'aquesta substitució és crucial a l'hora d'obtenir una estructura plegada.

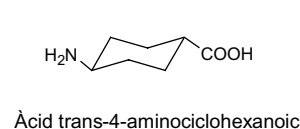
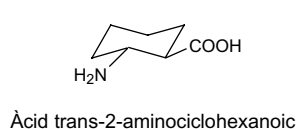
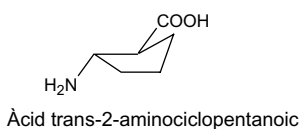
#### $\omega$ -Aminoàcids lineals aquirals (no substituïts)



#### $\beta$ -Aminoàcids lineals quirals substituïts



#### $\beta$ -Aminoàcids cíclics quirals



**Figura 2.** Estructures de  $\omega$ -aminoàcids lineals no substituïts (aquirals), de  $\beta$ -aminoàcids lineals substituïts (quirals) i de  $\omega$ -aminoàcids cíclics.

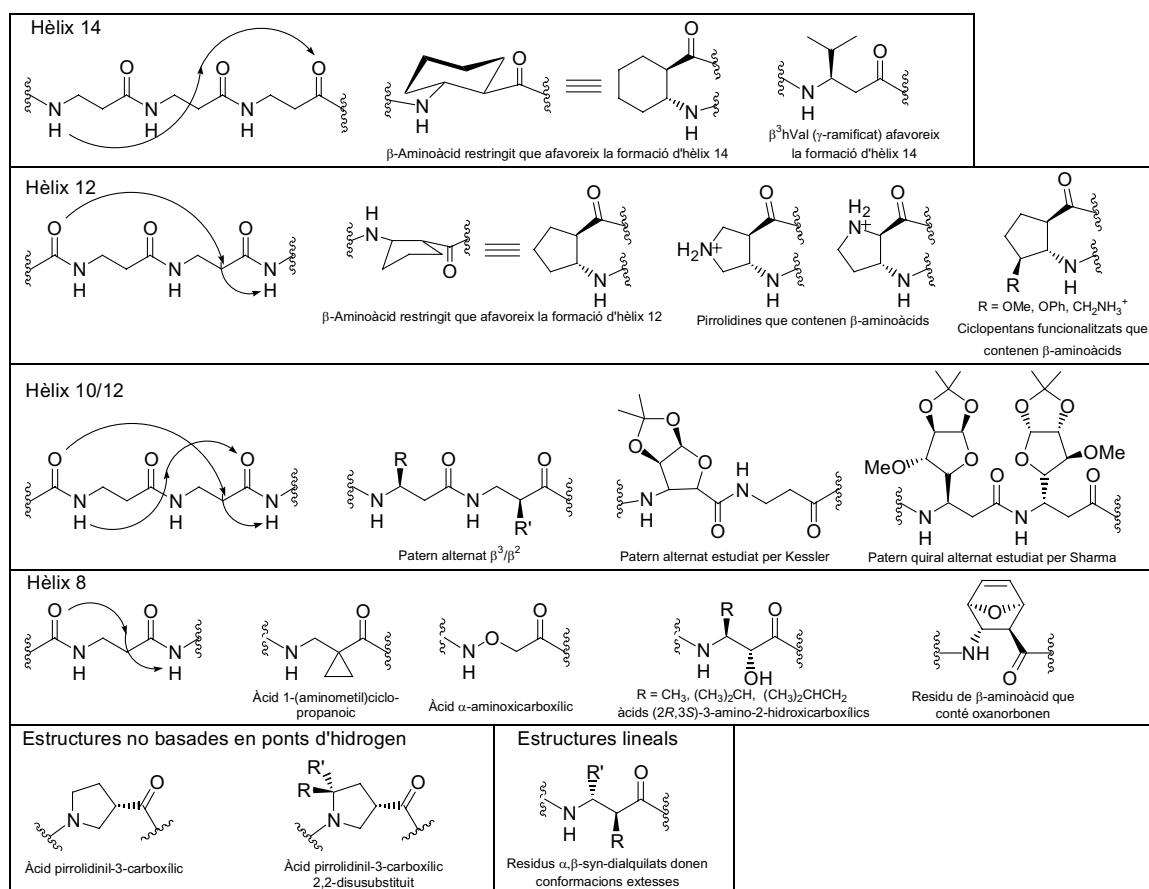
### 2.1.1.3. $\beta$ -Pèptids (13)

Els  $\beta$ -pèptids (oligo- $\beta$ -aminoàcids) són els foldàmers més estudiats fins al moment (13,19). L'interès que han merescut aquests pèptids és deu a diferents factors, tals com la seva gran semblança als  $\alpha$ -pèptids, l'ampli rang d'estructures secundàries estabilitzades que formen (4,20) o la gran varietat d'aplicacions que se n'ha descrit, com per exemple l'activitat antimicrobiana (21) o l'activitat com a Trojan carriers (22), entre altres (23). És conegut que diferents substitucions en les cadenes laterals poden canviar la preferència conformacional local de l'esquelet peptídic i per tant l'estructura secundària global (1,13) (figura 3). Tot i que les preferències estructurals dels  $\beta$ -pèptids són ben conegudes, fins ara la construcció d'estructures terciàries s'ha vist limitada degut a la dificultat sintètica que representa sintetitzar  $\beta$ -pèptids amb seqüències més llargues de 8 residus, ja que la forta estructuració que presenten dona problemes en la síntesi en fase sòlida. Aquests problemes s'han anat solucionant paulatinament utilitzant diferents estratègies sintètiques com ara fent acoblament de fragments (24) o més recentment amb l'ús de microones (25).

Les estructures secundàries que se n'han descrit són força variades i van des d'estructures helicoïdals fins esteses tipus làmina  $\beta$  o girs (figura 3). Si hom fa un repàs global a la literatura, és fàcil adonar-se que els  $\beta$ -pèptids serien fàcilment classificables en dues grans escoles, ja que bàsicament hi ha hagut dos grups que els han estudiat i ho han fet utilitzant dos tipus de monòmers ben diferents. Així, mentre que el grup d'en Dieter Seebach ha explorat estructures formades únicament per  $\beta$ -aminoàcids lineals el grup d'en Samuel Gellman ha estudiat oligo- $\beta$ -aminoàcids formats per  $\beta$ -aminoàcids cíclics, encara que en els últims temps també ha estudiat combinacions de tots dos tipus de  $\beta$ -aminoàcids, a més a més de pèptids que combinen  $\alpha$ - i  $\beta$ -aminoàcids.

Entre les conformacions secundàries dels  $\beta$ -pèptids, l'hèlix 14 és la més popular. L'hèlix 14 conté 14 àtoms en l'anell que forma el pont d'hidrogen  $N-H(i)\cdots O=C(i+2)$  i té aproximadament tres residus per volta. Aquesta hèlix es pot estabilitzar mitjançant interaccions electrostàtiques de residus carregats oposadament en voltes d'hèlix diferents (concretament en posicions  $i$  i  $i+3$ ). A més a més, s'ha vist que aquesta hèlix pot ser promoguda amb aminoàcids tipus  $\beta^3$ - $\gamma$ -ramificats, com són la  $\beta^3$ hVal o la  $\beta^3$ hIle (26). També és conegut que és suficient utilitzar únicament residus cíclics

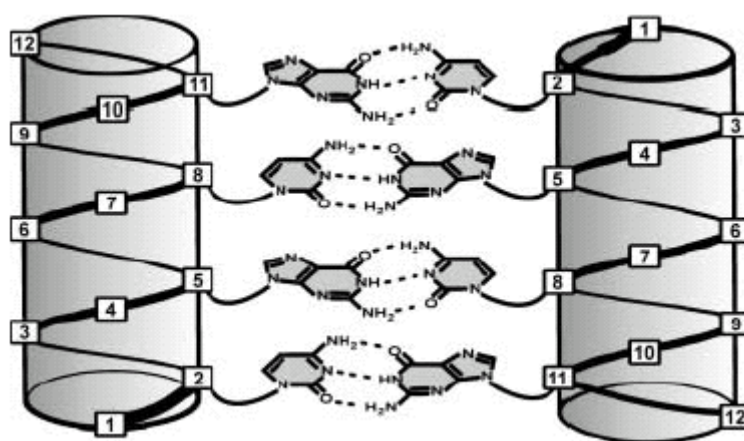
conformacionalment restringits en el centre d'una seqüència de 10 aminoàcids per què s'adopti aquesta hèlix (27). A més a més, per pèptids de 12 residus, essent quatre d'ells cíclics i distribuïts uniformement en la seqüència, és suficient per a estabilitzar l'hèlix 14 a pH's entre 2 i 12. També s'ha comprovat com una hèlix 14 monomèrica en metanol es pot desestructurar en afegir H<sub>2</sub>O (28). Aquesta desnaturalització sembla ser gradual, el que porta a pensar que l'hèlix 14 s'assembla a l'hèlix  $\alpha$  en quant a que tenen molts estats parcialment plegats en la transició de plegament/desplegament (28,29).



**Figura 3.** Principals estructures secundàries adoptades pels  $\beta$ -pèptids.

L'hèlix 14 que formen alguns  $\beta$ -pèptids ha estat aprofitada per diferents autors per a crear estructures terciàries tipus empaquetaments helicoidals utilitzant diferents estratègies. Per exemple, el grup d'en Gellman va dissenyar una hèlix 14 amfifílica utilitzant residus cíclics de sis membres i  $\beta^3$ hLys (30). Els residus cíclics estabilitzen l'hèlix 14 en H<sub>2</sub>O i la natura amfifílica d'aquesta promou l'associació. En tampons

TRIS i acetat, aquests  $\beta$ -pèptids exhibeixen empaquetaments helicoidals tetramèrics i hexamèrics respectivament. En un altre treball, aquest mateix grup va dissenyar  $\beta$ -pèptids que contenen nucleobases en les cadenes laterals per tal de mediar una dimerització antiparal·lela per parells de bases tipus Watson-Crick (figura 4) (31). La desnaturalització tèrmica d'aquestes estructures va mostrar una pèrdua entròpica menor per a la dimerització comparat amb la doble hèlix de DNA, el que suggereix que la preorganització de l'hèlix 14 facilita l'associació. El grup d'en Seebach també va dissenyar una hèlix 14 amfifílica formada per 20 residus, amb una  $\beta^3$ hCys a l'extrem *N*-terminal per formar una doble hèlix connectada mitjançant un pont disulfur (32). DeGrado i col. també han fet servir un pont disulfur per a dissenyar una doble hèlix basada en  $\beta$ -pèptids (29).



**Figura 4.** Model d'agregació de  $\beta$ -pèptids helicoidals a través d'aparellament de bases antiparal·lel seguint el model Watson-Crick (figura treta de la referència (31)).

Un altre tipus d'hèlix descrit per als  $\beta$ -pèptids ha estat l'**hèlix 12**, la qual també ha estat descrita per  $\beta$ -pèptids formats únicament per  $\beta$ -aminoàcids cíclics de cinc baules. Diversos pèptids formats per  $\beta$ -aminoàcids cíclics derivats de la pirrolidina i de ciclopentans funcionalitzats han estat incorporats a l'hèlix 12 per tal de millorar la seva solubilitat en  $H_2O$  i donar diversitat de seqüència (33). A més a més, heptàmers amb més de dos  $\beta^2$ - o  $\beta^3$ -residus continuen donant aquest tipus d'hèlix, donant encara més diversitat de seqüència (34).

Utilitzant  $\beta$ -pèptids formats per aminoàcids mono-substituïts tipus  $\beta^2$ - i  $\beta^3$ - de forma alternada es pot obtenir l'**hèlix 10/12**, una hèlix que consisteix en una xarxa entrelaçada de cicles que formen els ponts d'hidrogen de 10 i 12 membres (**1,13a,20d**). Així, seqüències alternades d'aminoàcids tipus  $\beta^2/\beta^3$  adopten hèlix 10/12, mentre que seqüències alternades d'aminoàcids tipus  $\beta^3/\beta^2$  adopten hèlix 12/10. Estructures en solució d'oligòmers tipus  $\beta^2/\beta^3$  de més de nou residus han estat àmpliament estudiades per tal de poder-ne dissenyar de noves en un futur. També s'ha vist que pèptids formats alternativament per  $\beta$ hGly i  $\beta$ -aminoàcids cíclics de cinc baules funcionalitzats amb carbohidrats poden formar aquest tipus d'hèlix en acetonitril (**35**). Sembla que els residus cíclics i la  $\beta$ hGly fan el paper dels residus  $\beta^3$  i  $\beta^2$  respectivament. Pèptids  $\beta^3$  amb la quiralitat alternada en cada residu també poden adoptar aquest tipus d'hèlix (**36**).

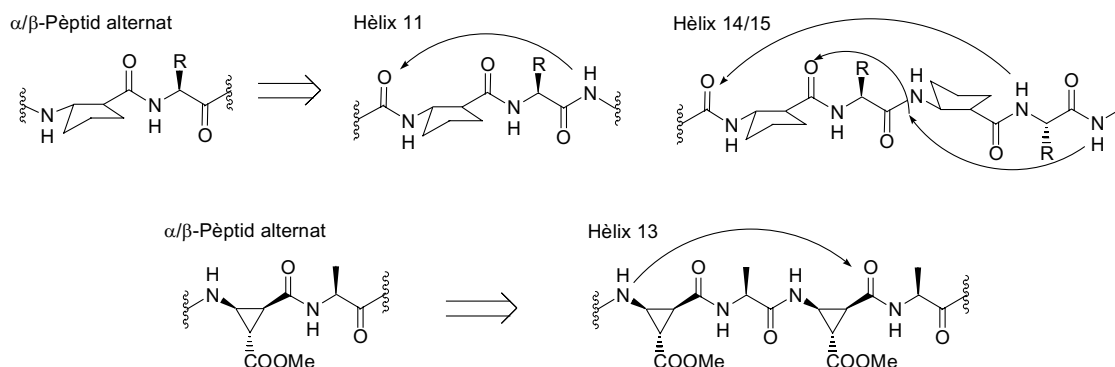
Estudis amb oligòmers derivats de l'àcid 1-(aminometil)ciclopropanoic i d'àcids  $\alpha$ -aminoxi carboxílics van donar com resultat la formació d'**hèlix 8** (**13a**). Estudis més recents utilitzant àcids (2*R*,3*S*)-3-amino-2-hidroxi funcionalitzats (**20e**) i  $\beta$ -aminoàcids derivats d'oxanorbonens cíclics (**37**) també han donat com a resultat la formació d'aquest tipus d'hèlix. Així, mentre  $\beta$ -pèptids derivats de l'àcid (2*R*,3*S*)-3-amino-2-hidroxanoic estableixen aquesta hèlix en metanol a través de ponts d'hidrogen entre els hidroxils de les cadenes laterals i els carbonils de l'esquelet peptídic, els derivats d'oxanorbonens cíclics ho fan en cloroform a través de la restricció conformacional que imposa el cicle.

També s'han descrit  $\beta$ -pèptids l'estructuració dels quals no està basada en una estabilització per ponts d'hidrogen, com és el cas dels homo-oligòmers de l'àcid 3-pirrolidinoic, els quals exhibeixen diversos rotàmers (**38**). Per a poder dissenyar estructures secundàries  $\beta$ -peptídiques que no tinguin ponts d'hidrogen, àcids pirrolidinil-3-carboxílics 2,2-disubstituïts, els quals adopten un únic rotàmer en cloroform foren estudiats. El dímer corresponent va donar una conformació *Z* de l'enllaç amida d'unió, anàleg al que es troba en una hèlix de poliprolina tipus I (**PPI**), estructura tampoc estabilitzada per ponts d'hidrogen. Tot i que per dicroïsmes circulars es va trobar que aquests formaven una estructura regular, per RMN es van detectar múltiples conformacions.



### 2.1.1.4. $\alpha/\beta$ -Pèptids alternats

Uns altres peptidomimètics força estudiats són els pèptids formats per  $\alpha$  i  $\beta$  aminoàcids (figura 5). El grup d'en Gellman ha estudiat les preferències conformacionals d'aquest tipus de pèptids, utilitzant  $\beta$ -aminoàcids cíclics de cinc membres restringits conformacionalment (39). Estudis per RMN en  $\text{CD}_3\text{OD}$  d'aquests tipus de pèptids que contenien per  $L$ - $\alpha$ -residus van mostrar NOEs a llarga distància, mentre que els seus  $D$ -anàlegs no en tenien, el que va suggerir la importància de l'estereoquímica a l'hora de formar estructures ben definides. Les dades obtingudes per RMN eren consistents tant amb una **hèlix 14/15** com amb una **hèlix 11** i per tant es necessiten més estudis per a determinar l'estructura predominant. Altres estudis d'aquest tipus de pèptids es varen fer utilitzant  $\beta$ -aminoàcids cíclics de tres membres (40). Per RMN es va veure que podien formar **hèlix 13** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ , però no en  $\text{H}_2\text{O}$ . Altres estudis introduint  $\beta$ -aminoàcids en el centre d'una forqueta (*hairpin*) formada per  $\alpha$ -aminoàcids ocupant posicions en el gir van confirmar el manteniment d'aquesta estructura, demostrant la compatibilitat dels  $\beta$ -aminoàcids en forquilles basades en  $\alpha$ -pèptids (41).

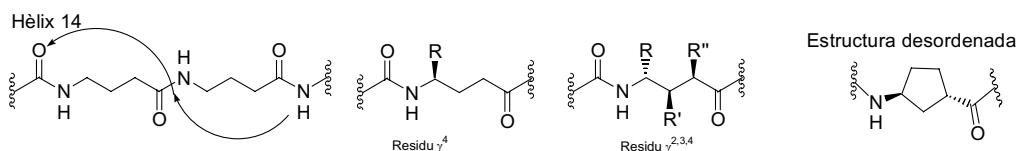


**Figura 5.** Possibles conformacions de  $\alpha/\beta$ -pèptids alternats.

### 2.1.1.5. $\gamma$ -Pèptids

Tot i que els  $\gamma$ -pèptids representen el següent esglaó per a una nova generació de foldàmers basats en esquelets peptídics, se n'han descrit pocs exemples a la literatura

(1,16,42), la majoria basats en aminoàcids lineals amb substituents en les diferents posicions ( $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ ) (14,15,43). De la mateixa manera que en els  $\beta$ -pèptids, les diferents substitucions en l'esquelet indueixen diferents tipus d'estructura secundària i per tant, en les seves possibles aplicacions (43,44). L'increment de graus de llibertat comparat amb els  $\alpha$ - i els  $\beta$ -pèptids es pot reduir utilitzant monòmers cíclics (45), els quals incrementen l'estabilitat d'estructures secundàries regulars. Els monòmers cíclics descrits fins al moment són menys diversos que els lineals i, de la mateixa manera que en una poliprolina, no hi ha distinció entre esquelet conservat i diversitat en les cadenes laterals (45,38). Així, s'ha vist que els diferents  $\gamma$ -pèptids descrits fins al moment poden adoptar estructures secundàries variades, com ara l'hèlix 2.6<sub>14</sub> (15,16), girs (42a,43b) o conformacions tipus làmina  $\beta$  (10,46).



**Figura 6.** Possibles conformacions de  $\gamma$ -pèptids alternats.

Així, mentre els  $\gamma$ -pèptids tipus  $\gamma^4$  formen hèlix 14 en solució,  $\gamma$ -pèptids formats per aminoàcids tipus  $\gamma^{2,4}$ -disubstituïts amb l'estereoquímica adequada formen un gir invers (*reverse turn*). El grup d'en Seebach va trobar que oligòmers formats per aminoàcids  $\gamma^{2,3,4}$ -trisubstituïts donaven un hèlix 14 en metanol (47). Per altra banda, el grup d'en Gellman va descriure que  $\gamma$ -pèptids formats per aminoàcids cíclics de cinc baules formaven làmines  $\beta$  paral·leles (48).

## 2.1.2. Pèptids amb capacitat de travessar la membrana cel·lular

L'ús de pèptids naturals com agents terapèutics en organismes vius s'ha vist molts cops restringit degut a la seva baixa estabilitat, sobretot en front a proteases. El fet que els  $\omega$ -pèptids poguessin adoptar estructures helicoïdals estables, girs o estructures tipus làmina  $\beta$  va donar el punt de partida al disseny de mimètics de pèptids naturals i proteïnes amb funcions rellevants. En particular, els  $\beta$ -pèptids són totalment estables en medi aquós i estables a la degradació enzimàtica *in vitro* i *in vivo* (49,50), el que sembla un avantatge important respecte als  $\alpha$ -pèptids naturals. Aquesta propietat té implicacions per al seu ús farmacèutic, ja que podrien ser actius per administració oral i podrien presentar una millor biodisponibilitat que els fàrmacs peptídics. Així, entre les propietats més rellevants descrites fins al moment per  $\beta$ -pèptids destaquen l'inhibició de l'absorció de greix i colesterol, l'activitat antimicrobiana i la capacitat de penetrar la membrana cel·lular (21-23).

### 2.1.2.1. Pèptids penetradors. Alternativa a altres sistemes de transport de fàrmacs

En els últims anys, l'ús de pèptids com a transportadors de fàrmacs ha estat una de les aplicacions més explorades. Així, s'han descrit diferents pèptids amb capacitat d'entrar en cèl·lules eucariotes (*cell penetrating peptides*, *CPPs*) (51). Aquesta propietat va fer pensar en el seu possible ús com a alternativa a altres sistemes transportadors de fàrmacs com són els **sistemes virals** (*viral delivery systems*) (52), els **liposomes** (53,54), l'**encapsulament en polímers** (55), l'**electroporació** (*electroporation*) (56), o l'**endocitosi mediada per receptor** (*receptor mediated endocytosis*) (57), que molts cops no han demostrat una eficiència prou bona, a més a més de causar toxicitats cel·lulars elevades en alguns casos.

Tanmateix, també s'han descrit diferents aspectes negatius que limiten l'ús de pèptids en organismes vius, com ara la ràpida degradació enzimàtica, alguns cops la baixa permeabilitat a la membrana cel·lular o l'elevada toxicitat d'algun d'aquests pèptids. El

fet que es degradin fàcilment fa que la dosis a administrar per tal d'obtenir una resposta positiva hagi de ser més alta, augmentant dramàticament la toxicitat. Així, mimètics peptídics amb una millor resistència a proteases com són els  $\beta$ -pèptids (22) o els peptoids (58) s'han avaluat com a transportadors de fàrmacs, amb la idea principal de millorar-ne l'estabilitat metabòlica.

### 2.1.2.2. Tipus de pèptids amb capacitat de travessar la membrana cel·lular

La majoria de CPPs descrits a la literatura són pèptids d'origen natural derivats de seqüències peptídiques responsables de la internalització cel·lular de proteïnes de membrana o de proteïnes que traspassen la membrana cel·lular. Així, al 1988 Green i col·laboradors (59) es van adonar que les proteïnes contenien seqüències responsables de la seva internalització en cèl·lules i van descriure un fragment de 86 aminoàcids de la proteïna HIV-1 Tat (Tat 86) que podia travessar la membrana cel·lular. Més tard, al 1991, Joliot i col·laboradors (60) van descriure que l'homeodomini de la proteïna *Antennapedia de Drosophila* també era capaç de penetrar en cèl·lules, fet que va portar a descobrir que només la tercera hèlix era necessària per a la penetració, donant com a resultat el pèptid penetrador penetratina o pAntp (61). Seguint el mateix raonament, al 1997 Vivès i col·laboradors descrigueren la seqüència bàsica de pèptid Tat (62) i durant els anys 1996 i 1997 es van descriure diferents pèptids amb la mateixa propietat basats en seqüències senyal (*signal-sequence-based peptides*), seqüències riques en aminoàcids bàsics com l'Arg o la Lys responsables de facilitar el transport al nucli (63,64,65). Al 1998 Pooga i col·laboradors (66) descrigueren el pèptid quimèric botinil-transportan i Oehlke i col·laboradors (67) descrigueren un pèptid sintètic model de 18 aminoàcids (FLUOS-KLALKLALKALKKAALKLA-NH<sub>2</sub>), ambdós amb capacitat penetradora. En la figura 7 es mostren els pèptids amb capacitat penetradora més importants descrits fins al moment.

Els pèptids capaços de travessar la membrana cel·lular solen seguir unes pautes estructurals definides: o bé són pèptids amb caràcter catiònic amb com a mínim sis aminoàcids carregats o bé són pèptids hidrofòbics. Ambdues característiques semblen ser la funció clau en la translocació dels pèptids penetradors a través de la membrana.

Els pèptids antimicrobians solen tenir al llarg de la seva estructura primària o secundària tant regions carregades com regions hidrofòbiques (68,69,70,71). Tot i això, no és gaire habitual trobar pèptids amb capacitat penetradora que tinguin alhora propietats antimicrobianes, ja que aquestes característiques estructurals estan involucrades tant en la permeabilització de la membrana com en la formació de porus, funcions que lideren els mecanismes de l'activitat antimicrobiana. Així, l'ús d'aquests pèptids com a penetradors es veu limitada, tot i que la modulació selectiva de l'activitat bactericida d'aquests compostos ha derivat en l'obtenció de nous carriers rics en prolina (72). Un dels avantatges més importants dels pèptids rics en prolina en sistemes biològics és l'alt grau de solubilitat en aigua i en condicions fisiològiques en general, propietat fonamental per a l'ús *in vivo*. En el nostre grup també s'han descrit altres pèptids rics en prolina (73,74), així com dendrímers de poliprolina (75,76,77,78,79) amb capacitat per penetrar en cèl·lules

Pèptid penetrador	Seqüència	Origen	Ref.
Tat 48-60	GRKKRRQRRRPPQ	HIV Tat	62
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	AntpHD	61
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Galanin and mastoparan	66
Amphipathic model peptide	KLALKLALKALKAAALKLA	NA	67
Signal sequence-based peptide	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKRKY	gp41 fusion protein-NLS	65
pVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	Murine vascular endothelial cadherine	80
Arg <sub>7</sub>	RRRRRRR	NA	81

La seqüència indicada correspon a la seqüència original. A més d'aquestes, s'han descrit varis anàlegs a la literatura. Abreviacions: AntpHD, Antennapedia protein homeodomain; NA, not available; NLS, nuclear localization signal; Tat, transactivator of transcription.

**Figura 7.** Principals pèptids penetradors.

### 2.1.2.3. Mecanismes d'acció, interacció pèptid-membrana i artefactes provinents de la fixació

El mecanisme exacte que segueixen els pèptids a l'hora d'entrar dins la cèl·lula continua sent un misteri, ja que existeixen a la literatura resultats contradictoris (82,83). El que sembla clar és que la primera etapa del mecanisme es produeix quan els pèptids transportadors catiónics o els conjugats pèptid-fàrmac interaccionen amb la membrana

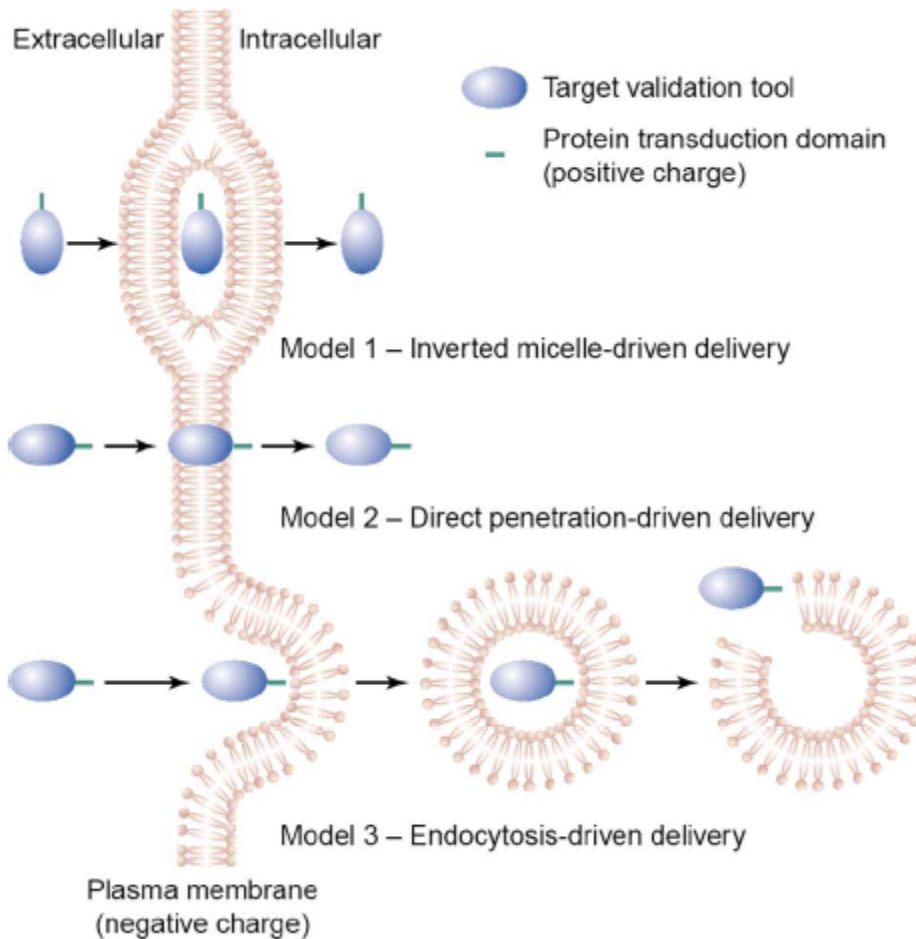
mitjançant una interacció electrostàtica. Un cop a la membrana, s'han proposat tres mecanismes principals que podrien permetre a aquests sistemes entrar dins la cèl·lula: (a) la **formació d'una miscel·la invertida**, (b) la **difusió passiva** a través de la membrana (alguns autors es refereixen a aquest mecanisme amb el nom de **penetració**) i (c) processos **endocitòtics** clàssics (figura 8). Els dos primers es consideren energia i receptor independents, al contrari que el tercer, que es considera energia i receptor dependent.

La difusió passiva a través de la membrana cel·lular permet un transport eficient de molècules tant fins al citoplasma com fins al nucli. En un primer moment, aquest fet va fer pensar que aquest mecanisme era independent del tipus de cèl·lula, donant un sistema universal per al transport de molècules hidrofíliques de l'exterior de la cèl·lula cap al citoplasma o al nucli (84,85). Tanmateix, més tard s'ha demostrat que el Tat(48–60) i la penetratina(42–58) veuen limitada la seva entrada en certes línies cel·lulars i que això depèn de la composició lipídica específica de cada membrana cel·lular (86).

L'endocitosis de molècules hidrofíliques necessita un receptor de membrana o una absorció en la membrana plasmàtica, la qual requereix energia per a la formació de les vesícules. Un cop les molècules han estat internalitzades, aquestes són classificades en diferents compartiments com són els lisosomes o els endosomes, per al seu reciclatge o destrucció, fet que molts cops entorpeix l'alliberament de la molècula transportada al citoplasma (87). Tot i això, s'ha demostrat que en alguns casos aquest alliberament es pot arribar a produir d'una forma eficient (88), a més d'induir-se utilitzant diferents aproximacions com ara tractaments amb  $\text{Ca}^{2+}$  (89), tractaments amb cloroquina (90), tractaments amb sucrosa (91) o tractaments fotoquímics (92).

Quan es va començar a descriure que alguns pèptids tenien la capacitat de traspasar la membrana cel·lular, es va pensar que el mecanisme que permetia aquesta internalització era un mecanisme endocitòtic clàssic, receptor-dependent o independent, tal i com se sabia que eren internalitzades molècules petites hidrofíliques. Tot i això, els primers estudis amb aquest tipus de molècules van suggerir que aquests pèptids creuaven la membrana cel·lular mitjançant una ruta energia-independent. Així, estudis sobre els mecanismes d'entrada de pAntp, pèptids derivats de Tat i VP22 van concloure que el mecanisme involucrat en la translocació no estava associat a cap receptor clàssic, transportador o endocitosis (61,62,93,94), suggerint un transport passiu d'aquests

pèptids a través de la membrana cel·lular. Tanmateix, re-evaluacions recents sobre el mecanisme de translocació d'aquests pèptids i pèptids-cargo suggereix que l'endocitosi és el mecanisme principal involucrat en aquest procés (95,96). Tot i això, sembla acceptat que el mecanisme que permet entrar aquests pèptids dins la cèl·lula no és únic i que depèn en part de les característiques estructurals del pèptid en si.



**Figura 8.** Representació esquemàtica dels diferents mecanismes proposats per a l'entrada cel·lular de pèptids penetradors (imatge de la referència (97)).

Així, la falsa idea inicial de que el principal mecanisme involucrat en la internalització era independent d'energia, pot ser atribuït, al menys en part, a diferents artefactes derivats de l'etapa de fixació de les cèl·lules que es realitza en els experiments de microscopia confocal i a fortes interaccions entre el pèptid i la membrana. S'han descrit problemes en l'etapa de fixació de les cèl·lules al utilitzar agents com l'etanol, el metanol o l'acetona (98,99,95,100). S'ha descrit que aquests produeixen una

permeabilització artefactual de la membrana al dissoldre'n els lípids, mentre que el *p*-formaldehid sembla mantenir-la intacta. Això acaba causant una reorganització artefactual dels pèptids a l'interior cel·lular. Aquest fet va forçar la reavaluació del mecanisme d'entrada de diferents CPPs (96). Així, alguns pèptids catiónics tendeixen a quedar retinguts en la membrana sense ser internalitzats, i tan sols una part acaba entrant a l'interior de la cèl·lula. En l'etapa de fixació, aquest pèptid retingut a la membrana acaba entrant al citoplasma degut a l'efecte de l'agent fixador, donant la impressió a l'hora de fer la visualització al microscopi confocal que un dels mecanismes involucrats és independent d'energia. Els pèptids enganxats a la membrana també poden donar falsos positius d'internalització a l'hora de fer quantificacions per fluorimetria de plaques, quantificant fluorescència de pèptid enganxat a membrana en comptes de pèptid internalitzat. S'han descrit diferents aproximacions per discriminar entre ambdues situacions, com és l'utilització de la citometria de flux (*fluorescence-activated cell sorting, FACS*) en comptes de la fluorimetria o l'aplicació de diferents protocols per eliminar el pèptid romanent a la membrana, com és la digestió amb tripsina just abans de la quantificació (100), així com altres mètodes alternatius (100,101).

#### 2.1.2.4. Aplicacions generals: molècules transportades

L'aplicació final dels CPPs ha de ser el transport de molècules amb una baixa biodisponibilitat deguda a una pobra permeabilització a la membrana cel·lular. Els principals treballs han estat duts a terme utilitzant els pèptids Tat i penetratina com a portadors. Pel que fa a les molècules transportades, les quals no són capaces de travessar la membrana cel·lular per si soles, són força més variades. Entre elles en destaquen alguns pèptids (102,103), àcids nucleics (104,105), proteïnes (106,107,108,109), drogues (110,111), anticossos (112), liposomes (113) o fins i tot nanopartícules (114). A més, proteïnes de fusió han estat internalitzades per altres CPPs com *VP22* (115,116) i *hCT* (117). Per tal d'unir el transportador al fàrmac, s'han avaluat diferents opcions com són la unió covalent obtenint la quimera CPP-fàrmac, sintetitzant el pèptid i el fàrmac de forma separada i fent al final la unió, o mitjançant interaccions físiques entre el pèptid i el fàrmac, normalment formant interaccions electrostàtiques entre el pèptid catiónic i una regió del fàrmac carregada negativament. La figura 9



resumeix quines han estat les molècules transportades i amb quins pèptids transportadors s'han realitzat alguns dels treballs publicats.

Molècula transportada	Pèptid	Línia cel·lular
<b>Pèptids</b>		
Inhibidor PKC	Penetratina	Neuronals
	Tat	Cor aïllat de ratolí
PCw3	Penetratina	Macròfags
Rab 1 i 2	Penetratina	Cèl·lules Prolactines
Inhibidors Cdk-4 i Cdk-6	Penetratina	Cèl·lules HaCa
Inhibidors de P16	Penetratina	Cèl·lules Pancreàtiques
VHL	Tat	<i>In vivo</i>
<b>Proteïnes</b>		
Grb2SH2	Signal sequence based peptides	NIH3T3
Rnasa A	Tat	<i>In vivo</i>
Bcl-xL	Tat	Neuronals i <i>in vivo</i>
Caspases 2 i 8	Tat	Cor aïllat de ratolí
Smac	Tat i penetratina	Cèl·lules MCF7
<b>Oligonucleòtids</b>		
SOD1	Penetratina	Neuronals
$\beta$ APP	Penetratina	Neuronals
MDR-1	Tat	Fibroblasts 3T3
26-mer As $\beta$ Com	Signal sequence based peptides	NIH3T3, HS68 i H9C2
<b>Partícules grans</b>		
PCMV-Luc	Tat	Cos-1, 9L, 3T3 i PtdCho-3
Nanopartícules Magnètiques	Tat	Cèl·lules progenitores i <i>in vivo</i>
Tatp-liposoma	Tat	NIH3T3 i H9C2

Abreviacions (de l'anglès):  $\beta$ APP,  $\beta$  amyloid precursor protein; CDK, cyclin-dependent kinase; MDR-1, multi-drug resistance type 1; PKC, protein kinase C; Smac, second mitochondria-derived activator of caspase; SOD1, superoxide dismutase 1; Tat, transactivator of transcription; VHL, Von Hippel–Lindau peptide.

Figura 9. Exemples de les principals molècules transportades.

### 2.1.2.5. Avantatges i inconvenients dels CPPs sobre altres sistemes d'administració de fàrmacs

Tot i que els pèptids tenen alguns inconvenients a l'hora d'utilitzar-se en sistemes biològics com pot ser la baixa resistència a proteases, la creença general de que poden oferir avantatges sobre altres sistemes de transport, com ara baixes toxicitats o eficiències altes envers diferents línies cel·lulars està força estesa. Ara bé, aquests

avantatges i inconvenients han de ser presos amb molta cura. En una revisió crítica del 2004, Tréhin i col·laboradors (118) recolliren els principals problemes que s'han descrit treballant amb aquest tipus de sistemes, com són les pobres internalitzacions obtingudes amb alguns pèptids, la variabilitat a l'hora d'utilitzar diferents línies cel·lulars, la baixa permeabilitat a les membranes biològiques, la degradació metabòlica, la toxicitat i la immunogenicitat.

Sens dubte, una de les limitacions més grans dels pèptids a l'hora de ser utilitzats en sistemes biològics és la baixa resistència a les proteases. Així, s'espera que el CPP conjugat amb el fàrmac entri dins la cèl·lula i un cop dins s'alliberi el fàrmac. Però la ràpida degradació metabòlica en el medi extracel·lular d'alguns CPPs d'origen natural pot arribar a impedir l'objectiu final del carrier (119,120,121). Tot i això, la degradació metabòlica del CPP i del conjugat CPP-fàrmac pot arribar a ser un requisit indispensable, tant per a l'alliberament del fàrmac un cop ha arribat al seu lloc d'acció com per a la seva eliminació del cos per tal d'evitar toxicitats cròniques.

En quant a toxicitats, s'ha observat que els pèptids derivats del Tat són neurotòxics i que el nivell de toxicitat depèn del temps d'exposició i de la llargada del pèptid, demostrant que Tat(31–61) produeix més neurotoxicitat que la proteïna sencera (122). Altres estudis demostren que alguns derivats del Tat disminueixen la viabilitat cel·lular de cèl·lules HeLa (62). Penetratina(43–58) també té alguns efectes nocius, ja que produeix neurotoxicitat arribant fins i tot a causar mort cel·lular (123), citotoxicitat en algunes línies cel·lulars (124), o fins i tot indueix lisis cel·lular (95). El tercer gran inconvenient dels CPPs és la baixa permeabilitat a la membrana. Fent un cop d'ull als resultats recollits a la literatura, es pot concloure que aquesta propietat és completament dependent del tipus de cèl·lula. Així, mentre en un principi semblava que els derivats de Tat eren capaços de travessar qualsevol tipus de membrana cel·lular (84,85), fins i tot la barrera hematoencefàlica (*blood brain barrier*, **BBB**) (106), estudis posteriors han demostrat que algunes línies cel·lulars no són permeables a derivats de Tat en condicions fisiològiques (125). Reforçant aquesta idea, altres autors han demostrat que l'entrada i alliberament del fàrmac a l'interior de la cèl·lula depèn del tipus de pèptid en si i de la composició lipídica de la membrana cel·lular, la qual canvia en cada línia cel·lular (126).

Per tal de millorar algun dels inconvenients que mostren els CPPs d'origen natural, s'han descrit algunes alternatives amb millors estabilitats a les proteases, com ara els

pèptids formats per D-aminoàcids (127) i altres peptidomimètics com els  $\beta$ -pèptids (22) i els peptoids (58). Aquestes molècules poden evitar la degradació enzimàtica ja que no són reconegudes per enzims.

### 2.1.3. Activitat antimicrobiana en $\beta$ -pèptids

$\alpha$ -Pèptids capaços d'adoptar hèlix  $\alpha$  amb activitat antimicrobiana formen part dels mecanismes de defensa d'organismes multicel·lulars i poden ser utilitzats en contra de bacteries resistents als antibiòtics convencionals. El fet que alguns  $\beta$ -pèptids poguessin adoptar diferents tipus d'hèlix va fer pensar en el seu possible ús com a nous agents antimicrobians.

A la literatura s'han descrit diferents  $\beta$ -pèptids capaços d'adoptar estructures helicoïdals amb propietats antimicrobianes (21). Però aquests pèptids capaços d'afectar la membrana bacteriana no poden tenir utilitat terapèutica a menys que deixin intactes les membranes de cèl·lules humanes. La susceptibilitat de les membranes de cèl·lules eucariotes al trencament físic s'avalua generalment mitjançant hemolisis (lisis de cèl·lules roges de la sang). Tanmateix, alguns dels  $\beta$ -pèptids descrits a la literatura amb activitat antimicrobiana tenen també propietats hemolítiques, el que fa que no puguin ser utilitzats amb finalitats terapèutiques. Malgrat això, la necessitat de trobar nous agents antimicrobians capaços d'esquivar les resistències desenvolupades pels microorganismes fa que qualsevol nou agent amb propietats antibiòtiques s'acabi avaluant.

## 2.2. OBJECTIUS

1. El primer objectiu que ens vàrem proposar en aquest capítol fou la síntesi en fase sòlida de  $\gamma$ -pèptids derivats de la *cis*- $\gamma$ -amino-L-prolina, treballant un cop més amb la versatilitat dels grups protectors per tal d'obtenir una síntesi eficient. A més a més de descriure'n la síntesi, vàrem dur a terme estudis estructurals per tal de veure quin tipus d'estructures en solució aquosa adoptaven aquests compostos, utilitzant tècniques de dicromisme circular i ressonància magnètica nuclear (RMN).
2. El segon objectiu fou validar algunes propietats dels  $\gamma$ -pèptids derivats de prolina, com ara la seva capacitat de travessar membranes cel·lulars. Pèptids naturals amb aquesta capacitat mostren deficiències importants en el seu ús *in vivo*, com ara toxicitats elevades i degradacions enzimàtiques ràpides. És per això que és necessari trobar sistemes alternatius. En aquest apartat, una sèrie d'aquests  $\gamma$ -pèptids foren marcats amb una sonda fluorescent i les seves propietats de penetració a través de membranes cel·lulars foren testades. L'entrada de cada pèptid fou quantificada mitjançant tècniques de fluorimetria de plaques i de citometria de flux i fou comprovada al microscopi confocal. Altres estudis complementaris de toxicitat i d'estabilitat en front a la degradació enzimàtica també foren duts a terme. A més a més, es presenten els resultats que ha donat el millor candidat a transportador de fàrmacs a l'hora d'internalitzar un PNA a l'interior de la cèl·lula. També es discutiran les propietats microbicides d'aquests  $\gamma$ -pèptids en front *Leishmania*.

## Referències

1. Hill, D. J.; Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore, J. S. A field guide to foldamers. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3893–4011.
2. Fernández-Santín, J. M.; Aymamí, J.; Rodríguez-Galán, A.; Muñoz-Guerra, S.; and Subirana, J. A. A pseudo  $\alpha$ -helix from poly( $\alpha$ -isobutyl-L-aspartate), a nylon-3 derivative. *Nature* **1984**, *311*, 53–54.
3. Dado, G. P.; Gellman, S. H. Intramolecular hydrogen bonding in derivatives of  $\beta$ -alanine and  $\gamma$ -amino butyric acid; model studies for the folding of unnatural polypeptide backbones. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1054–1062.
4. Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; and Gellman, S. H.  $\beta$ -Peptide foldamers: robust helix formation in a new family of  $\beta$ -amino acid oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071–13072.
5. Smith, A. B.; Favor, D. A.; Sprengeler, P. A.; Guzmán, M. C.; Carroll, P. J.; Furst, G. T.; Hirschmann, R. Molecular modeling, synthesis, and structures of N-methylated 3,5-linked pyrrolin-4-ones toward the creation of a privileged nonpeptide scaffold. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 9–22.
6. Prince, R. B.; Saven, J. G.; Wolynes, P. G.; Moore, J. S. Cooperative conformational transitions in phenylene ethynylene oligomers: chain-length dependence. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3114–3121.
7. Nguyen, J. Q.; Iverson, B. L. An amphiphilic folding molecule that undergoes an irreversible conformational change. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2639–2640.
8. (a) Tanatani, A.; Kagechika, H.; Azumaya, I.; Yamaguchi, K.; Shudo, K. (Cis)-preference of N,N'-dimethyl-N,N'-diphenylguanidine and the guanidinium salt. Construction of water-soluble aromatic layered structure. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 1135–1137.  
(b) Kagechika, H.; Azumaya, I.; Tanatani, A.; Yamaguchi, K.; Shudo, K. A layered artificial dinucleotide complex. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3423–3426.
9. (a) Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, S.; Rosenberg, S.; Marlow, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Bartlett, P. A. Peptoids: a

- modular approach to drug discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 9367–9371.
- (b) Armand, P.; Kirshenbaum, K.; Goldsmith, R. A.; Farr-Jones, S.; Barron, A. E.; Truong, K. T.; Dill, K. A.; Mierke, D. F.; Cohen, F. E.; Zuckermann, R. N.; Bradley, E. K. NMR determination of the major solution conformation of a peptoid pentamer with chiral side chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 4309–4314.
- (c) Kirshenbaum, K.; Barron, A. E.; Goldsmith, R. A.; Armand, P.; Bradley, E. K.; Truong, K. T.; Dill, K. A.; Cohen, F. E.; Zuckermann, R. N. Sequence-specific polypeptoids: a diverse family of heteropolymers with stable secondary structure *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 4303–4308.
10. Hagihara, M.; Anthony, N. J.; Stout, T. J.; Clardy, J.; Schreiber, S. L. Vinylogous polypeptides: an alternative peptide backbone. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *116*, 6568–6570.
11. (a) Nielsen, P. E. Peptide nucleic acid. A molecule with two identities. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 624–630.
- (b) Jordan, S.; Schwemler, C.; Kretschmer, A.; Schwenner, E.; Stropp, U., and Mielke, B. Synthesis of new building blocks for peptide nucleic acids containing monomers with variations in the backbone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 681–686.
- (c) Jordan, S.; Schwemler, C.; Kretschmer, A.; Stropp, U.; Schwenner, E., and Mielke, B. New hetero-oligomeric peptide nucleic acids with improved binding properties to complementary DNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 687–690.
12. (a) Burgess, K.; Linthicum, K. S., and Shin, H. Solid-phase syntheses of unnatural biopolymers containing repeating urea units. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 907–909.
- (b) Semetey, V.; Rognan, D.; Hemmerlin, C.; Briand, J.-P.; Marraud, M., and Guichard, G. Stable helical secondary structure in short-chain N,N'-linked oligoureas bearing proteinogenic side chains. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1893–1895.
13. (a) Cheng, R.P.; Gellman, S.H., and DeGrado, W.F.  $\beta$ -Peptides: from structure to function. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219–3232.

- (b) Cheng, R. P Beyond *de novo* protein design – *de novo* design of natural folded oligomers. *Curr. Opinion Struct. Biol.* **2004**, *14*, 512-520.
- (c) Seebach, D.; Beck, A. K., and Bierbaum, D. J. The world of  $\beta$ - and  $\gamma$ -peptides comprised of homologated proteinogenic amino acids and other components. **2004**, *1*, 1111-1239.
- (d) Seebach, D.; Hook, D.F., and Glättli, A. Helices and other secondary structures of  $\beta$ - and  $\gamma$ -peptides. *Biopolymers (Peptide Science)* **2006**, *84*, 23-37.
14. (a) Seebach, D., Schaeffer, L.; Brenner, M.; Hoyer, D. Design and synthesis of  $\gamma$ -dipeptide derivatives with submicromolar affinities for human somatostatin receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 776–778.
- (b) Seebach, D.; Beck, A.; Brenner, M.; Gaul, C.; Heckel, A.. From synthetic methods to  $\gamma$ -peptides: from chemistry to biology. *Chimia* **2001**, *55*, 831–838.
15. Hintermann, T.; Gademann, K.; Jaun, B., and Seebach, D.  $\gamma$ -Peptides forming more stable secondary structures than  $\alpha$ -peptides. Synthesis and helical NMR-resolution structure of the  $\gamma$ -hexapeptide analog of H-(Val-Ala-Leu)<sub>2</sub>-OH. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 983–1002.
16. Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R.; Michnick, S. Design of secondary structures in unnatural peptides: stable helical  $\gamma$ -tetra, hexa- and octapeptides and consequences of  $\alpha$ -substitution. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8569–8570.
17. Iverson, B. L. Chemical synthesis: betas are brought into the fold. *Nature* **1997**, *385*, 113-115.
18. DeGrado, W. F.; Schneider, J. P.; Hamuro, Y. The twists and turns of  $\beta$ -peptides. *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 206-217.
19. Gademann, K.; Hintermann, T.; Schreiber, J.V.  $\beta$ -peptides: twisting and turning. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 905-925.
20. (a) Seebach, D.; Ciceri, P. E.; Overhand, M.; Jaun, B.; Rigo, D.; Oberer, L. Hommel, U.; Amstutz, R.; Widmer H. Probing the helical secondary structure of short-chain  $\beta$ -peptides. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2043-2065.
- (b) Seebach, D.; Abele, S.; Gademann, K.; Jaun, B. Pleated sheets and turns of  $\beta$ -peptides with proteinogenic side chains. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1595-1597.
- (c) Seebach, D.; Abele, S.; Gademann, K.; Guichard, G.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Matthews, J. L.; Schreiber, J. V.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H.  $\beta^2$ - and

---

$\beta^3$ -peptides with proteinaceous side-chains. Synthesis and solution structures of constitutional isomers, a novel helical secondary structure, and the influence of solvation and hydrophobic interactions on folding. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 932-982.

(d) Rueping, M. Schreiber, J. V.; Lelais, G.; Jaun, B. Seebach, D. Mixed  $\beta^2/\beta^3$ -hexapeptides and  $\beta^2/\beta^3$ -nonapeptides folding to (P)-helices with alternating twelve- and ten-membered hydrogen-bonded rings. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 2577-2593.

(e) Gademann, K.; Häne, A.; Rueping, M.; Jaun, B.; Seebach, D. The fourth helical secondary structure of  $\beta$ -peptides: The (P)-28-helix of a  $\beta$ -hexapeptide consisting of (2R,3S)-3-amino-2-hydroxy acid residues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1534-1537.

(f) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. H.; Powell, D. R.; Huang, X. L.; Barchi, J. J.; Gellman, S. H. Residue-based control of helix shape in  $\beta$ -peptide oligomers. *Nature* **1997**, *387*, 381-384.

(g) Daura, X.; Gademann, K.; Schäfer, H.; Jaun, B.; Seebach, D. and van Gunsteren, W. F. The  $\beta$ -peptide hairpin in solution: conformational study of a  $\beta$ -hexapeptide in methanol by NMR spectroscopy and MD simulation. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2393-2404.

(h) Chung, Y. J.; Christianson, L. A.; Stanger, H.E.; Powell, D. R.; Gellman, S.H.  $\beta$ -Peptide reverse turn that promotes hairpin formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10555-10556.

(i) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Richards, M. R.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. Synthesis and structural characterization of helix-forming  $\beta$ -peptides: trans-2-aminocyclopentanecarboxylic acid oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7574-7581.

(j) Appella, D. H.; Barchi, Jr., J. J., Durell, S. R.; Gellman, S. H. Formation of short, stable helices in aqueous solution by  $\beta$ -amino acid hexamers. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2309-2310.

(k) Appella, D. H., Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. Synthesis and characterization of trans-2-aminocyclohexanecarboxylic acid oligomers: an unnatural helical secondary structure and implications for  $\beta$ -peptide tertiary structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6206-2212.



- (l) Motorina, I. A.; Huel, C.; Quiniou, E.; Mispelter, J.; Adjadj, E.; Grierson, D. S. henylisoserine: A versatile amino acid for the construction of novel  $\beta$ -peptide structures. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8-17.
- (m) Martinek, T. A.; Tóth, G. H.; Vass, E.; Hollósi, M.; Fülöp, F. cis-2-aminocyclopentanecarboxylic acid oligomers adopt a sheetlike structure: switch from helix to nonpolar strand. *Angew. Chem. Int Ed.* **2002**, *41*, 1718-1721.
- (n) Hart, S. A.; Bahadoor, A. B. F.; Matthews, E. E.; Qui, X. J.; Schepartz, A. helix macrodipole control of  $\beta$ -peptide 14-helix stability in water. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4022-4023.
21. (a) Hamuro, Y.; Schneider, J. P.; DeGrado, W. F. De Novo design of antibacterial  $\beta$ -peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12200-12201.
- (b) Porter, E.A.; Wang, X.; Lee, H.-S.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. Antibiotics: non-hemolytic  $\beta$ -amino-acid oligomers. *Nature* **2000**, *404*, 565-565.
- (c) Liu, D.; DeGrado, W. F. De Novo design, synthesis, and characterization of antimicrobial  $\beta$ -Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7553-7559.
- (d) Arvidsson, I.; Frackenpohl, J.; Ryder, N. S.; Liechty, B.; Petersen, F.; Zimmermann, H.; Camenisch, G. P.; Woessner, R.; Seebach, D. On the antimicrobial and hemolytic activities of amphiphilic  $\beta$ -peptides. *ChemBioChem* **2001**, *10*, 771-773.
- (e) Raguse, T. L.; Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. Structure-activity studies of 14-helical antimicrobial  $\beta$ -peptides: probing the relationship between conformational stability and antimicrobial potency. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12774-12785.
- (f) Epand, R. F.; Umezawa, N.; Porter, E. A.; Gellman, S. H.; Epand, R. M. Interactions of the antimicrobial  $\beta$ -peptide  $\beta$ -17 with phospholipid vesicles differ from membrane interactions of magainins. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1240-1248.
- (g) Arvidsson, P.I.; Ryder, N.S.; Weiss, H.M.; Gross, G.; Kretz, O.; Woessner, R., and Seebach, D. Antibiotic and hemolytic activity of a  $\beta^2/\beta^3$  peptide capable of folding into 12/10-helical secondary structure. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1345-1347.

- 
- (h) Geueke, B.; Namoto, K.; Agarkova, I.; Perriard, J.-C.; Kohler, H.-P. E., and Seebach, D. Bacterial cell penetration by  $\beta^3$ -oligohomoarginines: indications for passive transfer through the lipid bilayer. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 982–985.
- (i) Porter, E.A.; Weisblum, B., and Gellman, S.H. Use of parallel synthesis to probe structure-activity relationship among 12-helical  $\beta$ -peptides: evidence of a limit on antimicrobial activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11516–11529.
22. (a) Potocky, T. B., Menon, A. K., and Gellman, S. H., Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a  $\beta$ -peptide after endocytic uptake into HeLa cells, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 50188–50194.
- (b) Umezawa, N.; Gelman, M. A.; Haigis, M. C.; Raines, R. T.; Gellman, S.H. Translocation of a  $\beta$ -peptide across cell membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 368-369.
- (c) Rueping, M.; Mahajan, Y.; Sauer, M.; Seebach, D. Cellular uptake studies with  $\beta$ -peptides. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 257-259.
- (d) García-Echeverría, C.; Ruetz, S.  $\beta$ -Homolysine oligomers: a new class of Trojan carriers. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 247-251.
23. (a) Gademann, K.; Ernst, M.; Hoyer, D.; Seebach, D. Synthesis and biological evaluation of a cyclo- $\beta$ -tetrapeptide as a somatostatin analog. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1223-1226.
- (b) Werder, M.; Hauser, H.; Abele, S.; Seebach, D.  $\beta$ -Peptides as inhibitors of small-intestinal cholesterol and fat absorption. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1774-1783.
- (c) Gademann, K.; Ernst, M.; Seebach, D.; Hoyer, D. The cyclo- $\beta$ -tetrapeptide  $\beta$ -HPhe- $\beta$ -HThr- $\beta$ -HLys- $\beta$ -HTrp): synthesis, NMR structure in methanol solution, and affinity for human somatostatin receptors. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 16-33.
- (d) Gademann, K.; Kimmerlin, T.; Hoyer, D.; Seebach, D. Peptide folding induces high and selective affinity of a linear and small  $\beta$ -peptide to the human somatostatin receptor 4. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2460-2468.
- (e) Seebach, D.; Rueping, M.; Arvidsson, P. I.; Kimmerlin, T.; Micuch, P.; Noti, C.; Langenegger, D.; Hoyer, D. Linear, peptidase-resistant  $\beta^2/\beta^3$ -Di- and  $\alpha/\beta$ -3-tetrapeptide derivatives with nanomolar affinities to a human somatostatin receptor preliminary communication. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 3503-3510.

- (f) Gademann, K.; Seebach, D.; Synthesis of cyclo- $\beta$ -tripeptides and their biological in vitro evaluation as antiproliferatives against the growth of human cancer cell lines. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 2924-2937.
- (g) Gelman, M.A.; Richter, S.; Cao, H.; Umezawa, N.; Gellman, S.H.; Rana, T.M. Selective binding of TAR RNA by a Tat-derived  $\beta$ -peptide. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3563-3565.
- (h) Bruckner, A. M.; Garcia, M.; Marsh, A.; Gellman, S. H.; Diederichsen, U. Synthesis of novel nucleo- $\beta$ -amino acids and nucleobase-functionalized  $\beta$ -peptides. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3555-3561.
24. Arvidsson, P.I.; Frackenhohl, J., and Seebach D. Syntheses and CD-spectroscopic investigations of longer-chain  $\beta$ -peptides: preparation by solid-phase couplings of single amino acids, dipeptides, and tripeptides. *Helv. Chim. Acta.* **2003**, *86*, 1522-1553.
25. Murray, J. K., and Gellman, S. H. Microwave-assisted parallel synthesis of a 14-helical  $\beta$ -peptide library. *J. Comb. Chem.* **2006**, *8(1)*, 58-65.
26. (a) Arvidsson P.I.; Rueping, M., and Seebach D. Design, machine synthesis, and NMR-solution structure of a  $\beta$ -heptapeptide forming a salt-bridge stabilized  $3_{14}$ -helix in methanol and in water. *Chem. Commun.* **2001**, *7*, 649-650.
- (b) Cheng R.P., and DeGrado, W.F. De novo design of a monomeric helical  $\beta$ -peptide stabilized by electrostatic interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5162-5163.
- (c) Rueping, M.; Mahajan, Y.R.; Jaun, B., and Seebach, D. Design, synthesis and structural investigations of a  $\beta$ -peptide forming a  $3_{14}$ -helix stabilized by electrostatic interactions. *Chemistry* **2004**, *10*, 1607-1615.
27. Raguse, T.L.; Lai, J.R., and Gellman, S.H. Evidence that the  $\beta$ -peptide 14-helix is stabilized by  $\beta^3$ -residues with side-chain ranching adjacent to the  $\beta$ -carbon atom. *Helv. Chim. Acta.* **2002**, *85*, 4154-4164.
28. Etezady-Esfarjani, T.; Hilty, C.; Wüthrich, K.; Rueping, M.; Schreiber, J., and Seebach, D. NMR-structural investigations of a  $\beta^3$ -dodecapeptide with proteinogenic side chains in metanol and in aqueous solutions. *Helv. Chim. Acta.* **2002**, *85*, 1197-1209.
29. Cheng, R.P., and DeGrado, W.F. Long-range interactions stabilize the fold of a non-natural oligomer. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11564-11565.

30. Raguse, T.L.; Lai, J.R.; LePlae, P.R., and Gellman, S.H. Toward  $\beta$ -peptide tertiary structure: self-association of an amphiphilic 14-helix in aqueous solution. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3963-3966.
31. Brückner, A.M.; Chakraborty, P.; Gellman, S.H., and Diederichsen, U. Molecular architecture with functionalized  $\beta$ -peptide helices. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 4395-4399.
32. Kimmerlin, T., and Seebach, D. Solid-phase synthesis of a  $\beta^3$ -icosapeptide containing the homologs of the twenty common proteinaceous amino acids. *Helv. Chim. Acta.* **2003**, *86*, 2098-2103.
33. (a) Lee, H.-S.; Syud, F.A.; Wang, X., and Gellman, S.H. Diversity in short  $\beta$ -peptide 12-helices: high-resolution structural analysis in aqueous solution of a hexamer containing sulfonylated pyrrolidine residues. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7721-7722.  
(b) Porter, E.A.; Wang, X.; Schmitt, M.A., and Gellman, S.H. Synthesis and 12-helical secondary structure of  $\beta$ -peptides containing (2R,3R)-aminoproline. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3317-3319.  
(c) Woll, M.G.; Fisk, J.D.; LePlae, P.R., and Gellman, S.H. Stereoselective synthesis of 3-substituted 2-aminocyclopentanecarboxylic acid derivatives and their incorporation into short 12-helical  $\beta$ -peptides that fold in water. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12447-12452.
34. (a) LePlae, P.R.; Fisk, J.D.; Porter, E.A.; Weisblum, B., and Gellman, S.H. Tolerance of acyclic residues in the  $\beta$ -peptide 12-helix: access to diverse side-chain arrays for biological applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6820-6821.  
(b) Park, J.-S.; Lee, H.-S.; Lai, J.R.; Kim, B.M., and Gellman, S.H. Accommodation of  $\alpha$ -substituted residues in the  $\beta$ -peptide 12-helix: expanding the range of substitution patterns available to a foldamer scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8539-8545.
35. Gruner, S.A.W.; Truffault, V.; Voll, G.; Locardi, E.; Stöckle, M., and Kessler, H. Design, synthesis, and NMR structure of linear and cyclic oligomers containing novel furanoid sugar amino acids. *Chemistry* **2002**, *8*, 4365-4376.
36. Sharma, G.V.M.; Reddy, K.R.; Krishna, P.R.; Sankar, A.R.; Narsimulu, K.; Kumar, S.K.; Jayaprakash, P.; Jagannadh, B., and Kunwar, A.C. Robust mixed

- 10/12 helices promoted by “alternating chirality” in a new family of C-linked carbo- $\beta$ -peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13670-13671.
37. Doerksen, R.J.; Chen, B.; Yuan, J.; Winkler, J.D., and Klein, M.L. Novel conformationally-constrained  $\beta$ -peptides characterized by  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts. *Chem. Commun.* **2003**, 2534-2535.
38. Huck, B.R.; Fisk, J.D.; Guzei, I.A.; Carlson, H.A., and Gellman, S.H. Secondary structural preferences of 2,2-disubstituted pyrrolidine-4-carboxylic acid oligomers:  $\beta$ -peptide foldamers that cannot form internal hydrogen bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9035-9037.
39. Hayen, A.; Schmitt, M.A.; Ngassa, F.N.; Thomasson, K.A., and Gellman, S.H. Two helical conformations from a single foldamer backbone: “split personality” in short  $\alpha/\beta$ -peptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 505-510.
40. De Pol, S.; Zorn, C.; Klein, C.D.; Zerbe, O., and Reiser O. Surprisingly stable helical conformations in  $\alpha/\beta$ -peptides by incorporation of cis- $\beta$ -aminocyclopropane carboxylic acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 511-514.
41. Gopi, H.N.; Roy, R.S.; Raghothama, S.R.; Karle, I.L., and Balaram, P.  $\beta$ -Hairpins generated from hybrid peptide sequences containing both  $\alpha$ - and  $\beta$ -amino acids. *Helv. Chim. Acta.* **2002**, *85*, 3313-3330.
42. (a) Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R. Synthesis and folding preferences of  $\gamma$ -amino acid oligopeptides: stereochemical control in the formation of a reverse turn and a helix. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4925-4929.
- (b) Woll, M. G.; Lai, J. R.; Guzei, I. A.; Taylor, S. J. C.; Smith, M. E. B.; Gellman, S. H. Parallel sheet secondary structure in  $\gamma$ -peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11077-11078.
43. (a) Brenner, M., and Seebach, D. Synthesis and CD spectra in MeCN, MeOH, and H<sub>2</sub>O of  $\gamma$ -oligopeptides with hydroxy groups on the backbone. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1181-1189.
- (b) Brenner, M., and Seebach, D. Design, synthesis, NMR-solution and X-ray crystal structure of *N*-acyl- $\gamma$ -dipeptide amides that form a  $\beta\text{II}'$ -type turn. *Helv. Chim. Acta.* **2001**, *84*, 2155-2166.
- (c) Seebach, D.; Brenner, M.; Rueping, M.; Schweizer, B., and Jaun B. Preparation and determination of X-ray-crystal and NMR-solution structures of  $\gamma$ 2,3,4-peptides. *Chem. Commun.* **2001**, 207-208.

- (d) Seebach, D.; Brenner, M.; Rueping, M., and Jaun, B.  $\gamma^2$ -,  $\gamma^3$ -, and  $\gamma^{2,3,4}$ -amino acids, coupling to  $\gamma$ -hexapeptides: CD spectra, NMR solution and X-ray crystal structures of  $\gamma$ -peptides. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 573-584.
44. (a) Krauthäuser, S.; Christianson, L. A.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. Antiparallel sheet formation in  $\beta$ -peptide foldamers: effects of  $\beta$ -amino acid substitution on conformational preference. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11719-11720.
- (b) Abele, S.; Seiler, P.; Seebach, D. Synthesis, crystal structures, and modeling of  $\beta$ -oligopeptides consisting of 1-(aminomethyl)cyclopropanecarboxylic acid: ribbon-type arrangement of eight-membered H-bonded rings. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1559-1571.
- (c) Seebach, D.; Abele, S.; Sifferlen, T.; Hänggi, M.; Gruner, S.; Séller, P. Preparation and structure of  $\beta$ -peptides consisting of geminally disubstituted  $\beta^{2,2}$ - and  $\beta^{3,3}$ -amino acids. A turn motif for  $\beta$ -peptides. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 2218-2243.
- (d) Abele, S.; Guichard, G.; Seebach, D. (S)- $\beta^3$ -homolysine- and (S)- $\beta^3$ -homoserine-containing  $\beta$ -peptides. CD spectra in aqueous solution. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 2141-2155.
- (e) Abele, S.; Vöggtli, K.; Seebach, D. Oligomers of  $\beta^2$ - and of  $\beta^3$ -homoproline: what are the secondary structures of  $\beta$ -peptides lacking H-bonds? *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1539-1558.
- (f) Seebach, D.; Schreiber, J. V.; Abele, S.; Daura, X.; van Gunsteren, W. F. Structure and conformation of  $\beta$ -oligopeptide derivatives with simple proteinogenic side chains: circular dichroism and molecular dynamics investigations. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 34-57.
- (g) Schreiber, J. V.; Seebach, D. Solid-phase synthesis of a  $\beta$ -dodecapeptide with seven functionalized side chains and CD-spectroscopic evidence for a dramatic structural switch when going from water to methanol solution. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 3139-3151.
- (h) Seebach, D.; Schreiber, V.; Arvidsson, I.; Frackenpohl, J. The miraculous CD spectra (and secondary structures?) of  $\beta$ -peptides as they grow longer. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 271-279.

- (i) Glättli, A.; Daura, X.; Seebach, D.; van Gunsteren, W. F.; Can one derive the conformational preference of a  $\beta$ -peptide from its CD spectrum? *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12972-12978.
- (j) Langenhan, J. M.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. Parallel sheet secondary structure in  $\beta$ -peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2402-2405.
45. (a) Huck, B. R.; Langenhan, J. M.; Gellman, S. H. Non-hydrogen-bonded secondary structure in  $\beta$ -peptides: evidence from circular dichroism of (S)-pyrrolidine-3-carboxylic acid oligomers and (S)-nipecotic acid oligomers. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1717-1720.
- (b) Barchi, J. J.; Huang, X.; Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Durell, S. R.; Gellman, S. H. Solution conformations of helix-forming  $\beta$ -amino acid homooligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2711-2718.
- (c) Wang, X.; Espinosa, J. F.; Gellman, S. H. 12-Helix formation in aqueous solution with short  $\beta$ -peptides containing pyrrolidine-based residues. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4821-4822.
- (d) Huck, B. R.; Fisk, J. D.; Gellman, S. H. Promotion of sheet formation in  $\alpha$ -peptide strands by a  $\beta$ -peptide reverse turn. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2607-2610.
- (e) Chung, Y. J.; Huck, B. R.; Christianson, L. A.; Stanger, H. E.; Krauthäuser, S.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. Stereochemical control of hairpin formation in  $\beta$ -peptides containing dinipectic acid reverse turn segments. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3995-4004.
- (f) Porter, E. A.; Wang, X.; Schmitt, M. A.; Gellman, S. H. Synthesis and 12-helical secondary structure of  $\beta$ -peptides containing (2R,3R)-aminoproline. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3317-3319.
- (g) Park, J.-S.; Lee, H.-S.; Lai, J. R.; Kim, B. M.; Gellman, S. H. Accommodation of  $\alpha$ -substituted residues in the  $\beta$ -peptide 12-helix: expanding the range of substitution patterns available to a foldamer scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8539-8545.
46. Puiggalí, J.; Muñoz-Guerra, S.; Rodríguez-Galán, A.; Alegre, C.; Subirana, J. A. Helical and sheet structures in the nylon 4 derivatives poly( $\alpha$ -benzyl L-glutamate) and poly( $\alpha$ -methyl L-glutamate). *Makromol Chem. Macromol. Symp.* **1988**, *20/21*, 167.

47. Seebach, D.; Brenner, M.; Rueping, M., and Jaun, B.  $\gamma^2$ -,  $\gamma^3$ -, and  $\gamma^{2,3,4}$ -Amino acids, coupling to  $\gamma$ -hexapeptides: CD spectra, NMR solution and X-ray crystal structures of  $\gamma$ -peptides. *Chemistry* **2002**, *8*, 573-584
48. Woll, M.G.; Lai, J.R.; Guzei, I.A.; Taylor, S.J.C.; Smith, M.E.B., and Gellman, S.H. Parallel sheet secondary structure in  $\gamma$ -peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11077-11078.
49. Hintermann, T.; Seebach, D. The biological stability of  $\beta$ -peptides. No interactions between  $\alpha$ -and  $\beta$ -peptidic structures? *Chimia* **1997**, *50*, 244-247.
50. Seebach, D.; Abele, S.; Schreiber, J. V.; Martinoni, B.; Nassbaum, A. K.; Schild, H.; Hennecke, H.; Woessner; R; Bitsch, F. Biological and pharmacokinetic studies with  $\beta$ -peptides. *Chimia* **1998**, *52*, 734-739.
51. Langel, Ü. Cell-penetrating peptides in Processes and applications (2002). CRC Press Pharmacology and Toxicology Series. Boca Raton.
52. Davidson, B. L., and Breakefield, X. O. Neurological diseases: viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *4*, 353-364.
53. Connor, J., and Huang, L. Efficient cytoplasmatic delivery of a fluorescent dye by pH-sensitive immunoliposomes. *J. Cell. Bio.* **1985**, *101*, 582-589.
54. Foldvari, M., Mezei, C., and Mezei, M. Intracellular delivery of drugs by liposomes containing P0 glycoprotein from peripheral nerve myelin into human M21 melanoma cells. *J. Pharm. Sci.* **1991**, *80*, 1020-1028.
55. Gentile, F. T.; Doherty, E.J.; Rein, D.H.; Shoichet, M.S., and Winn, S.R. Polymer science for macroencapsulation of cells for central nervous system transplantation, *Reactive Polymers* **1995**, *25*, 207-227.
56. Chakrabarti, R., Wylie, D. E., and Schuster S. M. Transfer of monoclonal antibodies into mammalian cells by electroporation. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 15494-15500.
57. Leamon, C. P., and Low, P. S. Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5572-5576.
58. Wender, P. A.. et al., The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 13003-13008.



59. Green, M., and Loewenstein, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **1988**, *55*, 1179–1188.
60. Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 1864–1868.
61. Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444–10450.
62. Vivès, E., Brodin, P., and Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010–16017.
63. Lin, Y., Yao, S., and Hawiger, J. Role of the nuclear localization sequence in fibroblast growth factor–1–stimulated mitogenic pathways. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 5305–5308.
64. Liu, X., Timmons, S., Lin, Y., and Hawiger, J. Identification of a functionally important sequence in the cytoplasmic tail of integrin  $\beta^3$  by using cell-permeable peptide analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 11819–11824.
65. Morris, M. C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F., and Divita, G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2730–2736.
66. Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., and Langel, Ü. Cell penetration by transportan. *FASEB J.* **1998**, *12*, 67–77.
67. Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschenz, E., Melzig, M. Biernert, M. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1414*, 127–139.
68. Boman, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **1995**, *13*, 61–92.
69. Gallo, R. L., and Huttner, K. M. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J. Invest. Dermatol.* **1998**, *111*, 739–743.

70. Bulet, P.; Hetru, C.; Dimarcq, J. L., and Hoffmann, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comput. Immunol.* **1999**, *23*, 329–344.
71. Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta. (Biomembranes)* **1999**, *1462*, 55–70.
72. Sadler, K.; Eom, K. D.; Yang, J-L.; Dimitrova, Y., and Tam, J. P. Translocating proline-rich peptides from the antimicrobial peptide Bactenecin 7. *Biochemistry* **2002**, *41*, 14150–14157.
73. Fernández-Carneado, J.; Kogan, M. J.; Castel, S.; Pujals, S., and Giralt, E. Potential peptide carriers: Amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of  $\gamma$ -zein. *Ang. Chemie Int. Ed.* **2004**, *43*, 1811–1814.
74. Fernández-Carneado, J.; Kogan, M. J.; Pujals, S., and Giralt, E. Amphipathic peptides and drug delivery *Biopolymers* **2004**, *76(2)*, 196–203.
75. Crespo, L., Sanclimens, G., Montaner, B., Pérez-Tomás, R., Royo, M., Pons, M., Albericio, F., and Giralt, E. Peptide dendrimers based on polyproline helices. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8876–8883.
76. Crespo, L. et al., Branched poly(proline) peptides: an efficient new approach to the synthesis of repetitive branched peptides, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *11*, 1756,.
77. Sanclimens, G. et al., Solid-phase synthesis of second-generation polyproline dendrimers, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2004**, *76*, 283–297.
78. Sanclimens, G. et al., Preparation of De Novo globular proteins based on proline dendrimers, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6274–6281.
79. Sanclimens, G. et al., Synthesis and screening of a small library of proline based biodendrimers for use as delivery agents, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2005**, *80(6)*, 800–814.
80. Elmquist, A.; Lindgren, T.; Bartfai, T., and Langel, Ü. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp. Cell. Res.* **2001**, *269*, 237–244.
81. Rothbard, J.B.; Garlington, S.; Lin, Q.; Kirschberg, T.; Kreider, E.; McGrane, P.L.; Wender, P.A., and Khavari, P.A. Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1253–1257.

82. Thorén, E. G.; Persson, D.; Isakson, P.; Goksör, M.; Önfelt, A., and Nordén, B. Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *307*, 100–107.
83. Vives, E. Cellular uptake of the Tat peptide: An endocytosis mechanism following ionic interactions. *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 265–271.
84. Schwarze, S. R., Hruska, K. A., and Dowdy, S. F. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells?. *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 290–295.
85. Bogoyevitch, M. A., Kendrick, T. S., Ng, D. C., and Barr, R. K. Taking the cell by stealth or storm? Protein transduction domains (PTDs) as versatile vectors for delivery. *DNA Cell Biol.* **2002**, *21*, 879–894.
86. Koppelhus, U., Awasthi, S. K., Zachar, V., Holst, H. U., Ebbesen, P., and Nielsen, P. E. Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2002**, *12*, 51–63.
87. Mukherjee, S., Ghosh, R. N., and Maxfield, F. R. Endocytosis. *Physiological Reviews* **1997**, *77*, 759–803.
88. Sandgren, S.; Wittrup, A.; Cheng, F.; Jönsson, M.; Eklund, E.; Busch, S., and Belting, M. The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17951–17956.
89. Shiraishi, T.; Pankratova, S., and Nielsen, P. E.. Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic Tat and oligoarginine peptides. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 923–929.
90. Dalluge, R.; Haberland, A.; Zaitsev, S.; Schneider, M.; Zastrow, H.; Sukhorukov, G., and Bottger, M. Characterization of structure and mechanism of transfection-active peptide-DNA complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1576*, 45–52.
91. Ciftci, K., and Levy, R.J. Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts. *Int. J. Pharm.* **2001**, *218*, 81–92.
92. Maiolo, J.R., III; Ottinger, E.A., and Ferrer, M. Specific redistribution of cell-penetrating peptides from endosomes to the cytoplasm and nucleus upon laser illumination. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15376–15377.
93. Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., and Prochiantz, A. Cell internalization of the third helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18188–18193.

94. Elliott, G., and O'Hare, P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* **1997**, *88*, 223–233.
95. Drin, G., Cottin, S., Blanc, E., Rees, A. R. and Temsamani, J. Studies on the internalisation mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31192–31201.
96. Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., and Lebleu, B. Cell-penetrating peptides: a reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* **2003**, *30*, 585–590.
97. Green, I.; Christison, R.; Joyce, C.J.; Bundell, K.R., and Lindsay, M.A. Protein transduction domains: are they delivering? *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 213–215.
98. Lundberg, M., and Johansson, M. Is VP22 nuclear homing an artifact? *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 713–714.
99. Lundberg, M., and Johansson, M. Positively charged DNA-binding proteins cause apparent cell membrane translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *291*, 367–371.
100. Lundberg, M., Wikstrom, S., and Johansson, M. Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol. Ther.* **2003**, *8*, 143–150.
101. Drin, G., Mazel, M., Clair, P., Mathieu, D., Kaczorek, M., and Temsamani, J., Physico-chemical requirements for cellular uptake of pant peptide. Role of lipid-binding affinity. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 1304.
102. Gius, D. R., Ezhevsky, S. A., Becker-Hapak, M., Nagahara, H., Wei, M. C., and Dowdy, S. F. Transduced p16INK4a peptides inhibit hypophosphorylation of the retinoblastoma protein and cell cycle progression prior to activation of Cdk2 complexes in late G1. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2577–2580.
103. Bonfanti, M., Taverna, S., Salmons, M., D'Incalci, M., and Brogгинi, M. p21WAF1-derived peptides linked to an internalisation peptide inhibit human cancer cell growth. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1442–1446.
104. Astriab-Fisher, A., Sergueev, D. S., Fisher, M., Shaw, B. R., and Juliano, R. L. Antisense inhibition of P-glycoprotein expression using peptide-oligonucleotide conjugates. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 83–90.

105. Alliquant, B., Hantraye, P., Mailleux, P., Moya, K., Bouillot, C., and Prochiantz, A. Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J. Cell. Biol.* **1995**, *128*, 919–927.
106. Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., and Dowdy, S. F. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **1999**, *285*, 1569–1572.
107. Caron, N. J., Torrente, Y., Camirand, G., Bujold, M., Chapdelaine, P., Leriche, K., Bresolin, N., and Tremblay, J. P. Intracellular delivery of a Tat-eGFP fusion protein into muscle cells. *Mol. Ther.* **2001**, *3*, 310–318.
108. Stauber, R. H., and Pavlakis, G. N. Intracellular trafficking and interactions of the HIV-1 Tat protein. *Virology* **1998**, *252*, 126–136.
109. Han, K., Jeon, M. J., Kim, K. A., Park, J., and Choi, S. Y. Efficient intracellular delivery of GFP by homeodomains of *Drosophila* Fushi-tarazu and engrailed proteins. *Mol. Cells* **2000**, *10*, 728–732.
110. Rouselle, C., Clair, P., Lefauconnier, J. M., Kaczorek, M., Scherrmann, J. M., and Temsamani, J. New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 679–686.
111. Mazel, M., Clair, P., Rouselle, C., Vidal, P., Scherrmann, J. M., Mathieu, D., and Temsamani, J. Doxorubicin-peptide conjugates overcome multidrug resistance. *Anticancer Drugs* **2001**, *12*, 107–116.
112. Anderson, D. C., Nichols, E., Manger, R., Woodle, D., Barry, M., and Fritzberg, A. R. Tumor cell retention of antibody Fab fragments is enhanced by an attached HIV TAT protein-derived peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *194*, 876–884.
113. Tochilin, V. P., Rammohan, R., Weissig, V., and Levchenko, T. S. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperatures and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 8786–8791.
114. Lewin, M., Carlesso, N., Tung, C. H., Tang, X. W., Cory, D., Scadden, D. T., and Weissleder, R. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 410–414.

115. Fang, B., Xu, B., Koch, P., and Roth, J. A. Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins is not observed in cultured mammalian cells. *Gene Ther.* **1998**, *5*, 1420–1424.
116. Elliott, G., and O'Hare, P. Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins. *Gene Ther.* **1999**, *6*, 149–151.
117. Machova, Z., Muhle, C., Krauss, U., Trehin, R., Koch, A., Merkle, H. P., and Beck-Sickinger, A.G. Cellular internalisation of enhanced green fluorescent protein ligated to a human calcitonin-based carrier peptide. *Chembiochem* **2002**, *3*, 672–677.
118. Tréhin, R., and Merkle, H. P. Chances and pitfalls of cell penetrating peptides for cellular drug delivery. *Eur. J. Phar. Biophar.* **2004**, *58*, 209–223.
119. Elmquist, A. and Langel, U., In vitro uptake and stability study of pVEC and its all-D analog, *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 387.
120. Soomets, U. et al., Deletion analogues of transportan, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1467*, 165.
121. Lindgren, M. E. et al., Passage of cell-penetrating peptides across a human epithelial cell layer in vitro *Biochem. J.* **2004**, *377*, 69.
122. Nath, A., Psooy, K., Martin, C., Knudsen, B., Magnuson, D. S., Haughey, N., and Geiger, J. D. Identification of a human immunodeficiency virus type 1 Tat epitope that is neuroexcitatory and neurotoxic. *J. Virol.* **1996**, *70*, 1475–1480.
123. Bolton, S. J., Jones, D. N., Darker, J. G., Eggleston, D. S., Hunter, A. J., and Walsh, F. S. Cellular uptake and spread of the cell-permeable peptide penetratine in adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.* **2000**, *12*, 2847–2855.
124. Garcia-Echeverria, C., Jiang, L., Ramsey, T. M., Sharma, S. K., and Chen, Y. P. A new antennapedia-derived vector for intracellular delivery of exogenous compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1363–1366.
125. Violini, S., Sharma, V., Prior, J. L., Dyszlewski, M., and Piwnica-Worms, D. Evidence for a plasma membrane-mediated permeability barrier to Tat basic domain in well-differentiated epithelial cells: lack of correlation with heparan sulfate. *Biochemistry* **2002**, *41*, 12652–12661.
126. Hällbrink, M., Floren, A., Elmquist, A., Pooga, M., Bartfai, T., and Langel, U. Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1515*, 101–109.

127. Elmquist, E., Lindgren, M., Bartfai, T., and Langel, Ü. VE-cadherin-derived cell penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp. Cell Res.* **2001**, 269, 237–244.





## **2.3. RESULTATS**

### **2.3.1. A new class of foldamers based on *cis*- $\gamma$ -amino-L-proline**

**Josep Farrera-Sinfreu, Laura Zaccaro, David Vidal, Xavier Salvatella, Ernest Giralt, Miquel Pons, Fernando Albericio and Miriam Royo**

*Journal of the American Chemical Society* 126 (2004), 6048-6057



A New Class of Foldamers Based on *cis*- $\gamma$ -Amino-L-proline<sup>1,2</sup>Josep Farrera-Sinfreu,<sup>†,‡</sup> Laura Zaccaro,<sup>‡</sup> David Vidal,<sup>§</sup> Xavier Salvatella,<sup>†</sup>  
Ernest Giralt,<sup>†,||</sup> Miquel Pons,<sup>\*,§,||</sup> Fernando Albericio,<sup>\*,†,||</sup> and Miriam Royo<sup>\*,‡,||</sup>

Contribution from the Barcelona Biomedical Research Institute, Combinatorial Chemistry Unit, and Laboratory of Biomolecular NMR, Barcelona Science Park, University of Barcelona, Josep Samitier 1, 08028-Barcelona, Spain, and Department of Organic Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franqués 1, 08028-Barcelona, Spain

Received November 29, 2003; E-mail: mroyo@pcb.ub.es; albericio@pcb.ub.es; mpons@qo.ub.es

**Abstract:** A synthetic method for the preparation of conformationally constrained  $\gamma$ -peptides derived from  $\gamma$ -amino-L-proline is described. The methodology allows the independent buildup of the peptide backbone and the introduction of sequential variations by reactions with the  $\alpha$ -amino group of  $\gamma$ -aminoproline. Both alkyl- and acyl-substituted  $\gamma$ -peptides have been prepared and studied by CD and NMR. Conformational restrictions due to the cyclic structure of the monomer give rise to long-range interactions that are indicative of secondary structures even in aqueous solution. Interresidue NOEs suggest a concatenation of turns that, in a permissive solvent, could give rise to an isolated hydrogen bond ribbon, flanked and protected by proline rings.

## Introduction

Biopolymers encompass a broad range of structures and are involved in key aspects of our understanding of life. In nature, there are only three major biopolymer backbones, proteins, nucleic acids, and polysaccharides. Therefore, the development of new oligomers that mimic natural biopolymers should provide a powerful tool to obtain compounds with potential applications in life sciences. One particularly relevant aspect of natural biopolymers is the variability introduced by combining a limited set of monomers in a well-defined sequence. The foldamer field is directly inspired by this philosophy. The term foldamer, which was first coined by Gellman,<sup>3</sup> is used to describe those unnatural oligomers that in solution fold into a conformationally ordered state. Some authors have suggested a more rigid definition for

this term, adding the restriction that ordered structures formed by these compounds should be stabilized by a collection of noncovalent interactions between nonadjacent monomer units.<sup>4</sup> Foldamers can be classified either by their secondary structure<sup>4</sup> or by the backbone type. Various examples of foldamers of the latter type have been described in the literature, including peptoids,<sup>5</sup> vinyllogous polypeptides,<sup>6</sup> peptide nucleic acids,<sup>7</sup> oligoureas,<sup>8</sup> oligopyrrolinones,<sup>9</sup> oligo(phenylene ethylenes),<sup>10</sup> aedamers,<sup>11</sup> guanidines,<sup>12</sup> and  $\beta$ -<sup>3,13</sup> and  $\gamma$ -peptides.<sup>14</sup>  $\beta$ -Peptides are probably the most extensively studied foldamers.<sup>15</sup> The success of these compounds is a result of three factors: their resemblance to  $\alpha$ -peptides, the diverse range of

<sup>†</sup> Barcelona Biomedical Research Institute.<sup>‡</sup> Combinatorial Chemistry Unit.<sup>§</sup> Laboratory of Biomolecular NMR.<sup>||</sup> Department of Organic Chemistry.

- (1) A preliminary report describing part of this work was presented at the 17th American Peptide Symposium: Giralt, E.; Royo, M.; Kogan, M.; Crespo, L.; Sanclimens, G.; Farrera, J.; Pons, M.; Albericio, F. Proline: a key building block in "de novo" designed peptide molecules. In *Peptides Proceedings of the 17th American Peptide Symposium*; Houghten, R., Lebl, M., Eds.; American Peptide Society: San Diego, CA, 2001; pp 432–434.
- (2) Abbreviations: Ac, acetyl; MeCN, acetonitrile; Ac<sub>2</sub>O, acetic anhydride; Amp, *cis*-4-amino-L-proline or (2*S*,4*S*)-4-amino-pyrrolidine-2-carboxylic acid; Boc, *tert*-butoxycarbonyl; Dab,  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid; DCM, dichloromethane; DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid; DIEA, *N,N*-diisopropylethylamine; DIPCDI, *N,N*-diisopropylcarbodiimide; DMF, *N,N*-dimethylformamide; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl; (2*S*,4*S*)-Boc-Amp(Fmoc)-OH, (2*S*,4*S*)-Fmoc-4-amino-1-Boc-pyrrolidine-2-carboxylic acid; HOAc, acetic acid; HOBt, 1-hydroxy-1,2,3-benzotriazole; HR-ESI: high-resolution electro spray; *i*V, isovaleryl; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization, time-of-flight; MBHA, *p*-methylbenzhydrylamine; MeOH, methanol; MPLC, medium-pressure liquid chromatography; PhAc, phenylacetyl; RP-HPLC, reversed-phase high performance liquid chromatography; SPOS, solid-phase organic synthesis; SPPS, solid-phase peptide synthesis; TBME, *tert*-butylmethyl ether; TFA, trifluoroacetic acid; TFE, 2,2,2-trifluoroethanol; amino acid symbols denote the L-configuration.
- (3) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071–13072.

- (4) Hill, D. J.; Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore, J. S. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3893–4011.
- (5) (a) Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, S.; Rosenberg, S.; Marlow, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Bartlett, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 9367–9371. (b) Armand, P.; Kirshenbaum, K.; Goldsmith, R. A.; Farr-Jones, S.; Barron, A. E.; Truong, K. T.; Dill, K. A.; Mierke, D. F.; Cohen, F. E.; Zuckermann, R. N.; Bradley, E. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 4309. (c) Kirshenbaum, K.; Barron, A. E.; Goldsmith, R. A.; Armand, P.; Bradley, E. K.; Truong, K. T.; Dill, K. A.; Cohen, F. E.; Zuckermann, R. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 4303.
- (6) Hagihara, M.; Anthony, N. J.; Stout, T. J.; Clardy, J.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6568–6570.
- (7) (a) Nielsen, P. E. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 624–630. (b) Jordan, S.; Schwemler, C.; Kretschmer, A.; Schwenner, E.; Stropp, U.; Mielke, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 681–686. (c) Jordan, S.; Schwemler, C.; Kretschmer, A.; Stropp, U.; Schwenner, E.; Mielke, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 687–690.
- (8) (a) Burgess, K.; Linthicum, K. S.; Shin, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 907–909. (b) Semetey, V.; Rognan, D.; Hemmerlin, C.; Briand, J.-P.; Marraud, M.; Guichard, G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1893–1895.
- (9) Smith, A. B.; Favor, D. A.; Sprengeler, P. A.; Guzmán, M. C.; Carroll, P. J.; Furst, G. T.; Hirschmann, R. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 9–22.
- (10) Prince, R. B.; Saven, J. G.; Wolynes, P. G.; Moore, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3114–3121.
- (11) Nguyen, J. Q.; Iverson, B. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2639–2640.
- (12) (a) Tanatani, A.; Kagechika, H.; Azumaya, I.; Yamaguchi, K.; Shudo, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 1135–1137. (b) Kagechika, H.; Azumaya, I.; Tanatani, A.; Yamaguchi, K.; Shudo, K. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3423–3426.

stabilized secondary structures that they form,<sup>3,16</sup> and the different applications found (e.g., antimicrobials,<sup>17</sup> Trojan carriers,<sup>18</sup> or other biological activities<sup>19</sup>).

Even though  $\gamma$ -peptides represent the natural next step for the generation of a new family of foldamers based on the amide backbone, only a few examples of  $\gamma$ -peptides have been reported in the literature,<sup>20</sup> and these systems are based on linear amino acids with substituents at different backbone positions.<sup>14,21</sup> Different substitution patterns introduce diversity into the

different types of secondary structures induced and, as a result, in the possible applications of these materials.<sup>21,22</sup> The increased number of degrees of freedom in  $\gamma$ -peptides, as compared to  $\alpha$ - and  $\beta$ -peptides, can be reduced by the use of cyclic monomers,<sup>7b,c,23</sup> which increase the stability of regular secondary structures. The cyclic monomers described to date show less diversity than the linear ones, and there is not much distinction between a conserved backbone and a diversity-carrying side chain.<sup>13g,23g,h,24</sup>

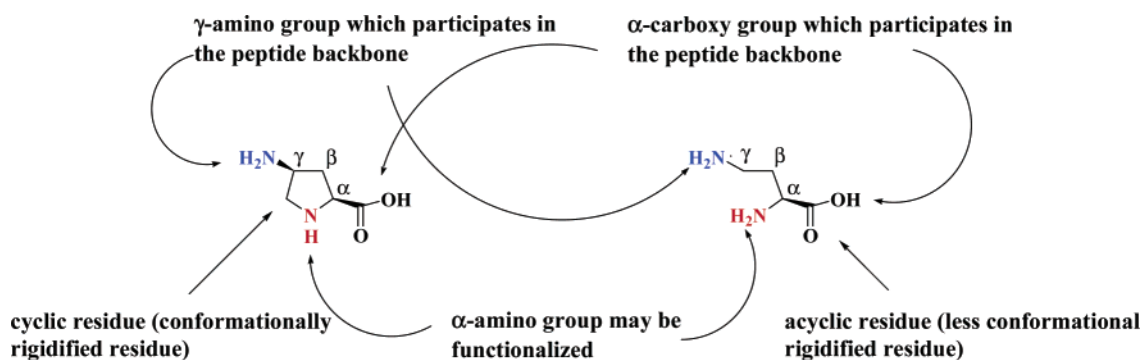
In the work described here, we developed a synthetic strategy to obtain two new families of  $\gamma$ -peptides formed by the cyclic monomer *cis*- $\gamma$ -amino-L-proline. The backbone in these peptides contains amide/peptide bonds between the carboxyl function and the  $\gamma$ -amino function of successive residues. The  $\alpha$ -amino group is left free for the introduction of different substituents, either during the synthesis of the oligomers (obtaining hetero-oligomers) or as a final functionalization step (obtaining homooligomers). The independent buildup of the backbone and side-chain sequences leads to a very high level of synthetic versatility. We explored both acylation and alkylation for the introduction of the side chains to give  $N^{\alpha}$ -acyl- $\gamma$ -peptides and  $N^{\alpha}$ -alkyl- $\gamma$ -peptides, respectively.

CD and NMR studies were used to elucidate the structural features of these new families of compounds in different solvents, and we compared these features with those of acyclic  $\gamma$ -peptides based on  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid (Figure 1).

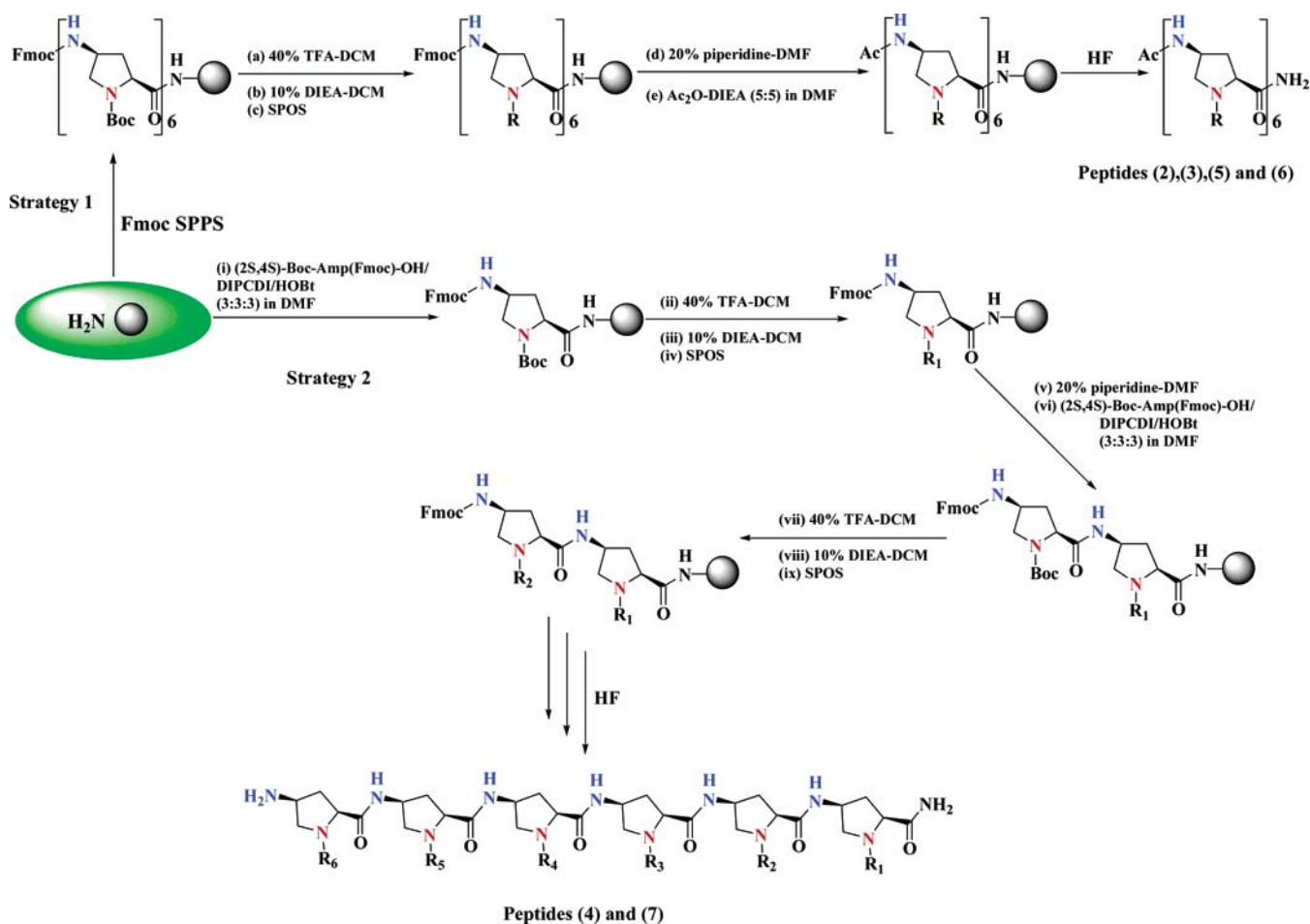
## Results and Discussion

**Synthesis and Characterization of  $\gamma$ -Hexapeptides.** To study the influence on the secondary structure of the different types of linkage between the side chain and the  $\gamma$ -peptide backbone, we prepared two families of  $\gamma$ -peptides:  $N^{\alpha}$ -acyl- $\gamma$ -peptides and  $N^{\alpha}$ -alkyl- $\gamma$ -peptides. An Fmoc/Boc combined solid-phase strategy was chosen, where Fmoc was the temporary protecting group for the  $\gamma$ -amino group of each monomer and Boc was the semipermanent protecting group for the  $\alpha$ -amino group through which the side chain was introduced.<sup>25</sup> The same

- (13) (a) Seebach, D.; Overhand, M.; Kuhnle, F. N. M.; Martinoni, B. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913–941. (b) Seebach, D.; Matthews, J. L. *Chem. Commun.* **1997**, 2015–2022. (c) Gellman, S. H. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173–180. (d) Gung, B. M.; Zou, D.; Stalcup, A. M.; Cottrell, C. E. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2176–2177. (e) Cheng, R. P.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5162–5163. (f) Arvidsson, P. I.; Frackenkohl, J.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 1522–1553. (g) Raguse, T. L.; Lai, J. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5592–5593.
- (14) (a) Seebach, D.; Schaeffer, L.; Brenner, M.; Hoyer, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 776–778. (b) Seebach, D.; Beck, A.; Brenner, M.; Gaul, C.; Heckel, A. *Chimia* **2001**, *55*, 831–838.
- (15) (a) Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219–3232. (b) Gademann, K.; Hintermann, T.; Schreiber, J. V. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 905–925.
- (16) (a) Seebach, D.; Ciceri, P. E.; Overhand, M.; Jaun, B.; Rigo, D.; Oberer, L.; Hommel, U.; Amstutz, R.; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2043–2065. (b) Seebach, D.; Abele, S.; Gademann, K.; Jaun, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1595–1597. (c) Seebach, D.; Abele, S.; Gademann, K.; Guichard, G.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Matthews, J. L.; Schreiber, J. V.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 932–982. (d) Rueping, M.; Schreiber, J. V.; Lelais, G.; Jaun, B.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 2577–2593. (e) Gademann, K.; Häne, A.; Rueping, M.; Jaun, B.; Seebach, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 1534–1537. (f) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. H.; Powell, D. R.; Huang, X. L.; Barchi, J. J.; Gellman, S. H. *Nature* **1997**, *387*, 381–384. (g) Daura, X.; Gademann, K.; Schäfer, H.; Jaun, B.; Seebach, D.; van Gunsteren, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2393–2404. (h) Chung, Y. J.; Christianson, L. A.; Stanger, H. E.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10555–10556. (i) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Richards, M. R.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7574–7581. (j) Appella, D. H.; Barchi, J. J., Jr.; Durell, S. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2309–2310. (k) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6206–2212. (l) Motorina, I. A.; Huel, C.; Quiniou, E.; Mispelter, J.; Adjadj, E.; Grierson, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8–17. (m) Martinek, T. A.; Tóth, G. H.; Vass, E.; Hollósi, M.; Fülöp, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1718–1721. (n) Hart, S. A.; Bahadoor, A. B. F.; Matthews, E. E.; Qui, X. J.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4022–4023. (o) Cheng, R. P.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11564–11565.
- (17) (a) Hamuro, Y.; Schneider, J. P.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12200–12201. (b) Porter, E. A.; Wang, X.; Lee, H.-S.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *Nature* **2000**, *404*, 565–565. (c) Liu, D.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7553–7559. (d) Arvidsson, I.; Frackenkohl, J.; Ryder, N. S.; Liechty, B.; Petersen, F.; Zimmermann, H.; Camenisch, G. P.; Woessner, R.; Seebach, D. *ChemBioChem* **2001**, *1*, 771–773. (e) Raguse, T. L.; Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12774–12785. (f) Epand, R. F.; Umezawa, N.; Porter, E. A.; Gellman, S. H.; Epand, R. M. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1240–1248.
- (18) (a) Umezawa, N.; Gelman, M. A.; Haigis, M. C.; Raines, R. T.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 368–369. (b) Rueping, M.; Mahajan, Y.; Sauer, M.; Seebach, D. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 257–259. (c) García-Echeverría, C.; Ruetz, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 247–251.
- (19) (a) Gademann, K.; Ernst, M.; Hoyer, D.; Seebach, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1223–1226. (b) Werder, M.; Hauser, H.; Abele, S.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1774–1783. (c) Gademann, K.; Ernst, M.; Seebach, D.; Hoyer, D. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 16–32. (d) Gademann, K.; Kimmerlin, T.; Hoyer, D.; Seebach, D. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2460–2468. (e) Seebach, D.; Rueping, M.; Arvidsson, P. I.; Kimmerlin, T.; Micuch, P.; Noti, C.; Langenegger, D.; Hoyer, D. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 3503–3510. (f) Gademann, K.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 2924–2937. (g) Gelman, M. A.; Richter, S.; Cao, H.; Umezawa, N.; Gellman, S. H.; Rana, T. M. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3563–3565. (h) Bruckner, A. M.; Garcia, M.; Marsh, A.; Gellman, S. H.; Diederichsen, U. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3555–3561.
- (20) (a) Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R.; Michnick, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8569. (b) Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4925–4929. (c) Woll, M. G.; Lai, J. R.; Guzei, I. A.; Taylor, S. J. C.; Smith, M. E. B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11077–11078.
- (21) (a) Hintermann, T.; Gademann, K.; Bernhard, J.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 983–1002. (b) Brenner, M.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1181–1189. (c) Brenner, M.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 2155–2166. (d) Seebach, D.; Brenner, M.; Rueping, M.; Schweizer, B.; Jaun, B. *Chem. Commun.* **2001**, 207–208. (e) Seebach, D.; Brenner, M.; Rueping, M.; Jaun, B. *Chem.-Eur. J.* **2002**, *8*, 573–584.
- (22) This effect is more extensively studied in the field of  $\beta$ -peptides; for examples, see: (a) Krauthäuser, S.; Christianson, L. A.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11719–11720. (b) Abele, S.; Seiler, P.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1559–1571. (c) Seebach, D.; Abele, S.; Sifferlen, T.; Hänggi, M.; Gruner, S.; Sélzer, P. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 2218–2243. (d) Abele, S.; Guichard, G.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 2141–2155. (e) Abele, S.; Vögli, K.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1539–1555. (f) Seebach, D.; Schreiber, J. V.; Abele, S.; Daura, X.; van Gunsteren, W. F. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 34–57. (g) Schreiber, J. V.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 3139–3151. (h) Seebach, D.; Schreiber, V.; Arvidsson, I.; Frackenkohl, J. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 271–279. (i) Glättli, A.; Daura, X.; Seebach, D.; van Gunsteren, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12972–12978. (j) Langenhan, J. M.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 2402–2405.
- (23) In  $\beta$ -peptides, S. H. Gellman has already proposed the use of cyclic monomers to reduce the degree of freedom. In addition to ref 16f,k,i,m, see: (a) Huck, B. R.; Langenhan, J. M.; Gellman, S. H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1717–1720. (b) Barchi, J. J., Jr.; Huang, X.; Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Durell, S. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2711–2718. (c) Wang, X.; Espinosa, J. F.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4821–4822. (d) Huck, B. R.; Fisk, J. D.; Gellman, S. H. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2607–2610. (e) Chung, Y. J.; Huck, B. R.; Christianson, L. A.; Stanger, H. E.; Krauthäuser, S.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3995–4004. (f) Porter, E. A.; Wang, X.; Schmitt, M. A.; Gellman, S. H. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3317–3319. (g) Le Plae, P. R.; Fisk, J. D.; Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6820–6821. (h) Park, J.-S.; Lee, H.-S.; Lai, J. R.; Kim, B. M.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8539–8545.
- (24) (a) Woll, M. G.; Fisk, J. D.; Le Plae, P. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12447–12452. (b) Raguse, T. L.; Lai, J. R.; LePlae, P. R.; Gellman, S. H. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3963–3966. (c) Huck, B. R.; Fisk, J. D.; Carlson, H. A.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9035–9037.



**Figure 1.** Monomers used in these studies: (left) *cis*- $\gamma$ -amino-L-proline and (right) L- $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid. Peptide synthesis was carried out through the  $\gamma$ -amino group, to give the  $\gamma$ -peptide backbone. The  $\alpha$ -amino group allows diversity to be introduced and mimics the protein  $\alpha$ -amino acid side chains.



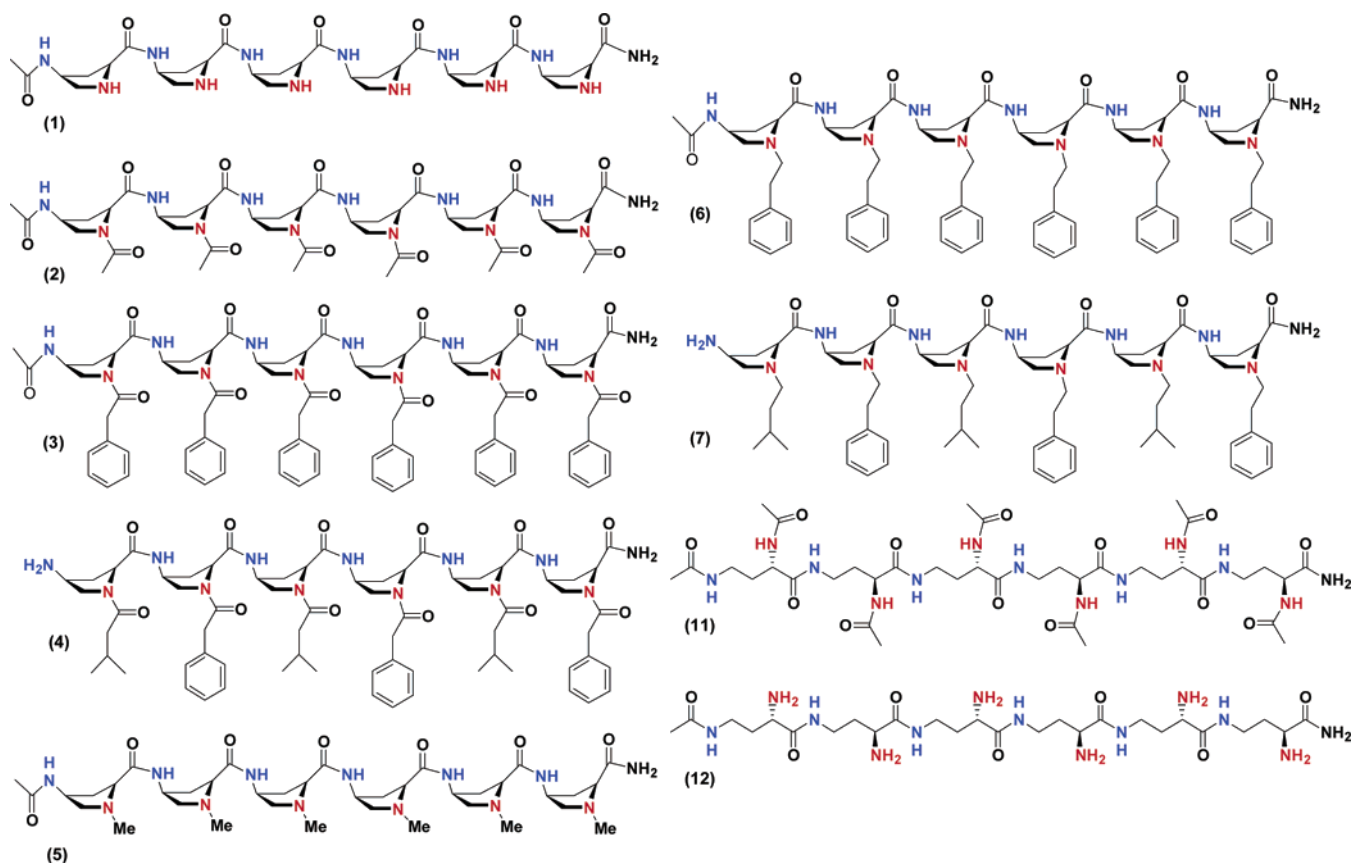
**Figure 2.** Synthesis of the  $N^\alpha$ -alkyl- $\gamma$ -hexapeptides and the  $N^\alpha$ -acyl- $\gamma$ -hexapeptides (synthesis of homooligomeric systems and of oligomers with different side chains for both cases). In the case of the homooligopeptides (strategy 1), we first synthesized the peptide backbone using the Fmoc strategy and functionalized the  $\alpha$ -amino groups at the end. In the case of the heterofunctionalized  $\gamma$ -hexapeptides (strategy 2), we introduced the corresponding side chain after each monomer coupling. For the acylation of the  $\alpha$ -amino groups to obtain  $N^\alpha$ -acyl- $\gamma$ -hexapeptides, we used the corresponding acid, DIPCPI, and HOBt in DMF (step c for strategy 1 and steps iv and ix for strategy 2). The  $N^\alpha$ -alkyl- $\gamma$ -hexapeptides were obtained by alkylation of the  $\alpha$ -amino group of each monomer, through a reductive amination reaction (step c for strategy 1 and steps iv and ix for strategy 2) with the corresponding aldehyde and  $\text{NaBH}_3\text{-CN}$  in 1% HOAc/DMF.

strategy allows the synthesis of either homooligomeric  $\gamma$ -peptides (identical side chains) or heterooligomeric  $\gamma$ -peptides (with different side chains). In the case of  $\gamma$ -peptide homooligomers, the backbone was synthesized first, and, after removal of all Boc protecting groups, all of the side chains were introduced at the same time. This strategy was carried out for  $N^\alpha$ -acyl- $\gamma$ -

peptides and  $N^\alpha$ -alkyl- $\gamma$ -peptides (Figure 2, strategy 1). In the case of the sequentially functionalized  $\gamma$ -peptides, different side chains were introduced after the coupling of each monomer (Figure 2, strategy 2).

The  $\gamma$ -peptide backbone was prepared from the protected amino acid (2*S*,4*S*)-Fmoc-4-amino-1-Boc-pyrrolidine-2-carboxylic acid [(2*S*,4*S*)-Boc-Amp(Fmoc)-OH] using DIPCPI with HOBt. The reaction was monitored by the ninhydrin test.<sup>26</sup> The

(25) Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*; CRC: Boca Raton, FL, 1997.



**Figure 3.** Chemical structures of the *cis*- $\gamma$ -aminoproline and  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid peptide oligomers synthesized in this work.

side chain of  $N^{\alpha}$ -acyl- $\gamma$ -peptides was introduced using the corresponding carboxylic acid and the coupling reagents described above. In this case, the reaction was followed either by the chloranil<sup>27</sup> or by the De Clercq<sup>28,29</sup> tests which detect secondary amines. For  $N^{\alpha}$ -alkyl- $\gamma$ -peptides, the alkyl group was introduced by reductive amination using the corresponding aldehyde and  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . This reaction also was monitored by the chloranil test.

The  $\gamma$ -peptide family based on  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid was prepared following the same synthetic strategy using  $N^{\alpha}$ -Boc- $N^{\gamma}$ -Fmoc-L-diaminobutyric acid.

At the end of the synthesis, and after removal of the Fmoc group, the N-terminal amino group was acetylated. However, in a few cases, the terminal amino group was kept free (**4**, **7**) to increase solubility in  $\text{H}_2\text{O}$ . Peptides were cleaved from the resin by acidolytic treatment with anhydrous HF. The purity of the crude  $\gamma$ -peptides ranged from 70% to 95% as determined by HPLC. Compounds were purified to >95% homogeneity by preparative reversed-phase HPLC prior to characterization by electrospray and/or MALDI-TOF mass spectrometry. All compounds gave results consistent with the desired products. The

chemical structures of the  $\gamma$ -hexapeptides prepared in this work (**1**–**7**, **11**, and **12**) are shown in Figure 3.

**Circular Dichroism.** The CD spectra of the  $\gamma$ -peptides reported here were obtained in different solvents:  $\text{H}_2\text{O}$ , MeOH, and TFE in the range 190–250 nm. Peptides were studied in the concentration range 100–1000  $\mu\text{M}$ . The CD spectra are independent of concentration, indicating that aggregation does not occur. The CD spectra of peptides **1**, **2**, **4**, **5**, **11**, and **12** are shown in Figure 4. The largest differences in CD spectra are between  $\gamma$ -peptides derived from  $\gamma$ -aminoproline with acyl or alkyl side chains. Compounds **2** and **4** belong to the  $N^{\alpha}$ -acyl- $\gamma$ -peptide family. The CD spectrum of compound **2** in  $\text{H}_2\text{O}$  shows two minima at 204 and 217 nm and a zero crossing at ca. 200 nm. The CD spectrum of **2** in TFE also shows two minima, but these are slightly shifted to 202 and 223 nm. In MeOH, the CD spectrum shows only one negative maxima at 204 nm. The CD spectrum of peptide **4** in  $\text{H}_2\text{O}$  shows only one negative maxima at 207 nm and a zero crossing at ca. 197 nm; this is similar to the spectrum obtained in MeOH. The CD spectrum in TFE shows a broad negative band with a negative maxima at 207 nm. By comparison with the CD spectrum of **2** in the same solvent, the wide band can be interpreted as resulting from the overlap of the two minima observed for this peptide.<sup>30</sup>

Peptides **1** and **5** are representative of the  $N^{\alpha}$ -alkyl- $\gamma$ -peptides derived from  $\gamma$ -aminoproline and show CD patterns that are markedly different from those of **2** and **4**. The CD spectra of **1** and **5** each show a positive maxima at ca. 200 nm in the three

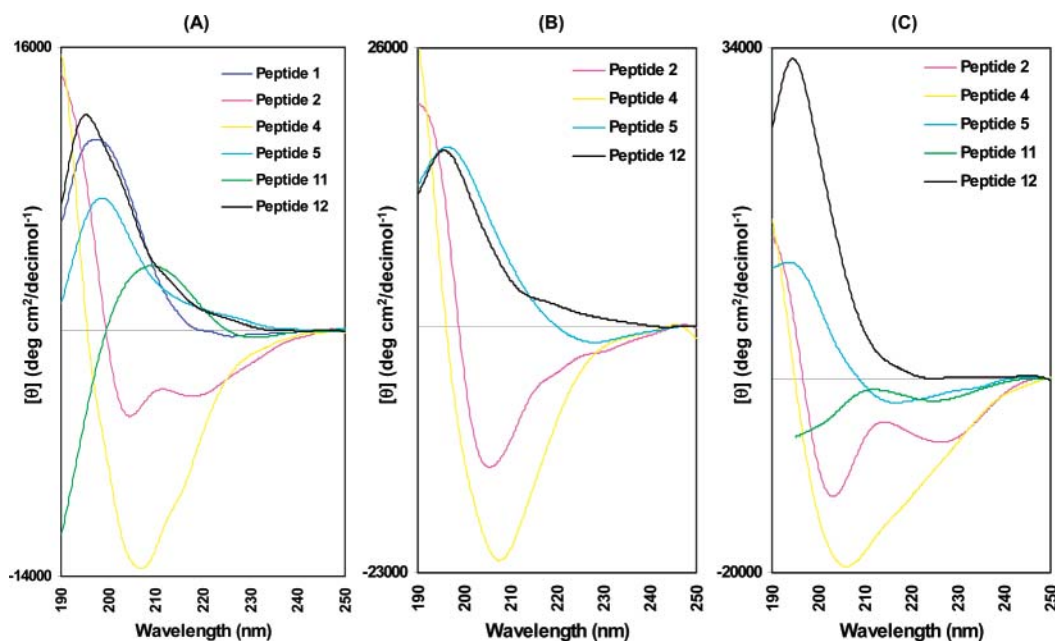
(26) The  $\gamma$ -amino functions of these building blocks anchored on the resin give a clear positive Kaiser ninhydrin test, so this test is useful in controlling the synthesis of this kind of peptide. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 594–598.

(27) Christensen, T. *Acta Chem. Scand.* **1979**, *33*, 760–766.

(28) Madder, A.; Farcy, N.; Hosten, N. G. C.; De Muynck, H.; De Clercq, P.; Barry, J.; Davis, A. P. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *11*, 2787–2791.

(29) Although the De Clercq test seems more sensitive than the chloranil test (De Clercq gives slightly positive when chloranil gives negative), the final product whose synthesis has been controlled by just the chloranil test is good to excellent.

(30) This different intensities of the CD bands between **2** and **4** could be related to the presence of an aromatic side chain in **4** or to the increased bulkiness of the substituents.



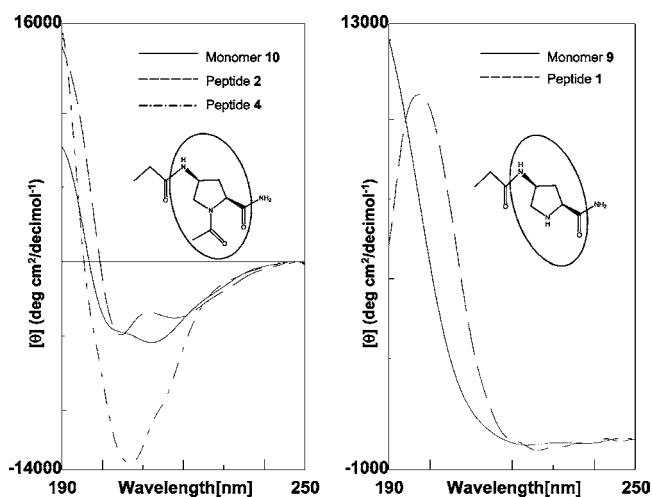
**Figure 4.** Circular dichroism spectra for peptide hexamers (1, 2, 4, 5, 11, and 12) in (A) H<sub>2</sub>O, (B) MeOH, and (C) TFE at 25 °C. Data were normalized for  $\gamma$ -peptide concentration and number of monomer groups.

solvents studied. Compound **1** in H<sub>2</sub>O at pH = 12.1 (results not shown) and compound **5** in methanol both show a weak negative maxima at ca. 220–230 nm. The CD spectrum of peptide **5** in TFE shows a more intense minimum at ca. 220 nm, thus giving a CD pattern more similar to that observed for the *N*<sup>α</sup>-acyl- $\gamma$ -peptide family.

Peptide **12** (derived from  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid, with a free  $\alpha$ -amino group) presents a CD pattern similar to that of the *N*<sup>α</sup>-alkyl- $\gamma$ -peptides derived from  $\gamma$ -aminoproline. The corresponding acylated form (peptide **11**) has completely different CD spectra in H<sub>2</sub>O and TFE. In TFE, peptide **11** gives rise to a CD spectrum resembling that of the acylated  $\gamma$ -peptides derived from  $\gamma$ -aminoproline. In H<sub>2</sub>O, on the other hand, **11** shows a completely different spectrum that is characterized by a maximum at ca. 210 nm.

The CD pattern in each family of  $\gamma$ -peptides was compared to those observed for monomeric model compounds that were representative of each class. The CD spectra in H<sub>2</sub>O of each  $\gamma$ -peptide family resemble that of its corresponding model compound when the data are normalized in terms of the number of amide chromophores. The CD spectral features observed for alkyl and acyl peptides should therefore be attributed mainly to interactions involving the additional amide chromophore in the second family (Figure 5). This situation is not unexpected given that interactions between chromophores responsible for the CD spectra are distance-dependent and the interactions between the backbone and side-chain amide bonds in the *N*<sup>α</sup>-acyl- $\gamma$ -peptides are equivalent to the interaction between adjacent backbone peptide bonds in  $\alpha$ -peptides. It is these latter interactions that give rise to the well-known CD spectra of natural peptides.

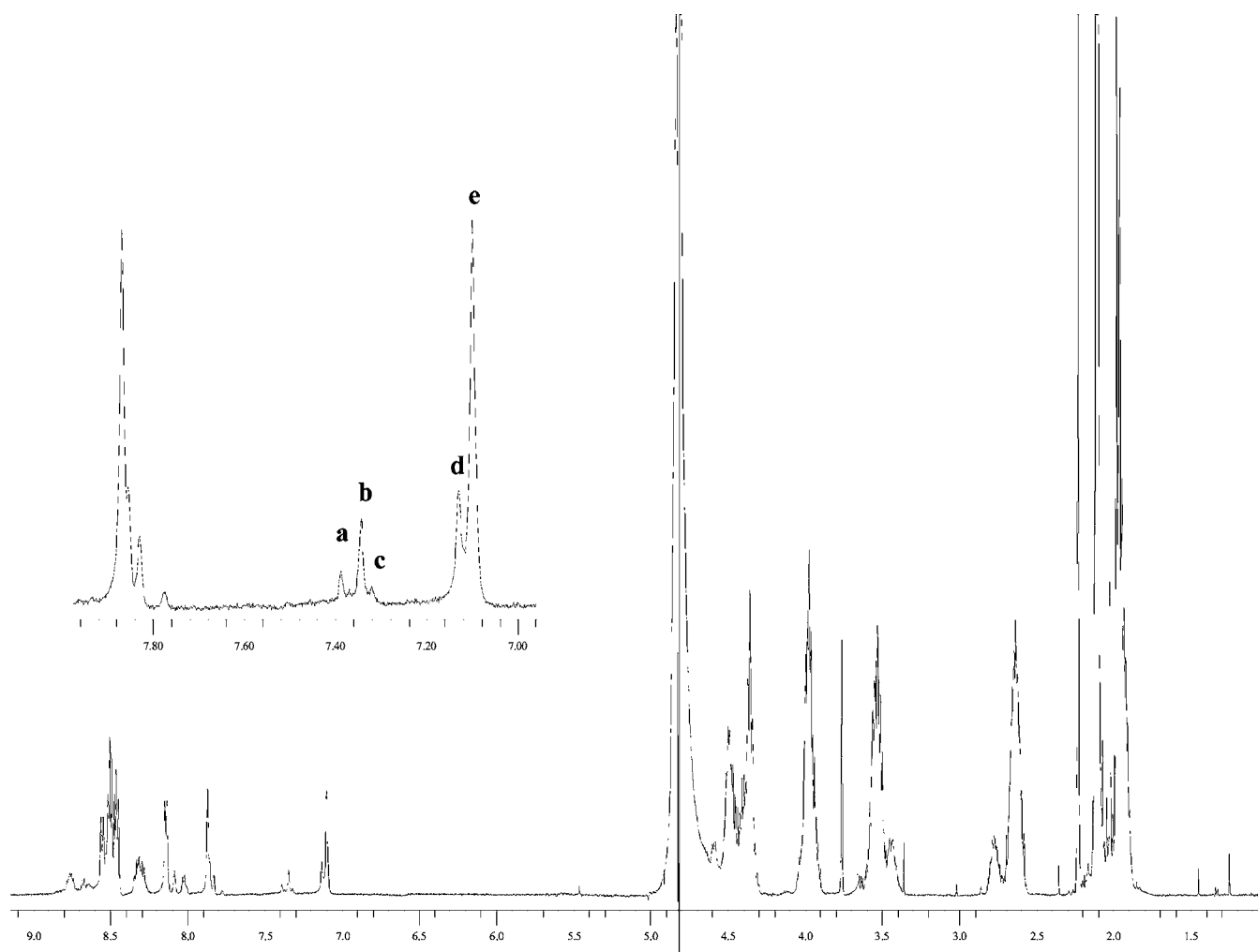
Within each family, the CD spectra show significant solvent dependency. In acylated peptide **2**, derived from  $\gamma$ -aminoproline, the long wavelength minimum is shifted from 217 to 225 nm on changing solvent from H<sub>2</sub>O to TFE. The corresponding peak appears as a shoulder in MeOH. More strikingly, in alkylated



**Figure 5.** Circular dichroism spectra for the different peptide oligomers in H<sub>2</sub>O at 25 °C. The data have been normalized for  $\gamma$ -peptide concentration and number of monomer groups.

$\gamma$ -aminoproline peptides, the CD signal at around 220 nm changes from positive (in H<sub>2</sub>O) to negative (in MeOH and TFE). Interestingly, the absence of amide chromophores in the side chains indicates that the observed changes in the CD spectra reflect a different conformation of the peptide backbone in H<sub>2</sub>O than in TFE or MeOH. Backbone cyclization has a major effect on the structure of  $\gamma$ -peptides, as deduced from the CD spectra of **11** and **2** in H<sub>2</sub>O and TFE. The CD spectrum of **11** changes from having a positive maximum in H<sub>2</sub>O to one characterized by two minima, while the spectra of **2** show two minima in all solvents studied. This behavior suggests that the spectra with two minima could correspond to a structural feature that is preserved in all solvents in the peptide with a cyclized backbone, but is only present in TFE when the backbone is not restrained.

The large differences in the CD spectra between alkylated and acylated peptides **11** and **12** suggest some structural role



**Figure 6.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of  $\gamma$ -peptide **2** in  $\text{H}_2\text{O}$  plus 10%  $\text{D}_2\text{O}$ . The inset shows an expansion of the carboxamide region. Labeled peaks correspond to different isomers. The relative intensities are (a)1:(b)2.8:(c)0.46:(d)3.4:(e)10.8.

for the amide group in the side chain, at least in the peptides formed by noncyclic  $\gamma$ -amino acids.

**Nuclear Magnetic Resonance.** The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of  $\gamma$ -peptide **2** in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1) is shown in Figure 6.<sup>31</sup> The presence of different sets of signals is evident, and this corresponds to different conformations in slow exchange. On considering the carboxamide signals (inset in Figure 6), it can be seen that at least five different conformations are present. The different conformations can be traced to the presence of possible side-chain *cis*–*trans* isomers for each of the side-chain amide groups. This situation was confirmed by the observation of two isomers in 3:1 relative populations in the model monomer **10**, which contains an acetyl side chain, and a single population for monomer **9** with a free  $\alpha$ -amino group (spectra not shown).

The number of possible isomers in the hexamer is 64 ( $2^6$ ). However, the chemical shift of the C-terminal carboxamide depends mainly on the conformation of the side chain of the last residues. The relative populations of the four major isomers observed in the carboxamide region are close to 9:3:3:1. These are the expected populations if we consider that the conformations of neighboring side chains are independent of each other

and the relative stabilities of the *trans* and *cis* isomers are the same as in the monomer (3:1).

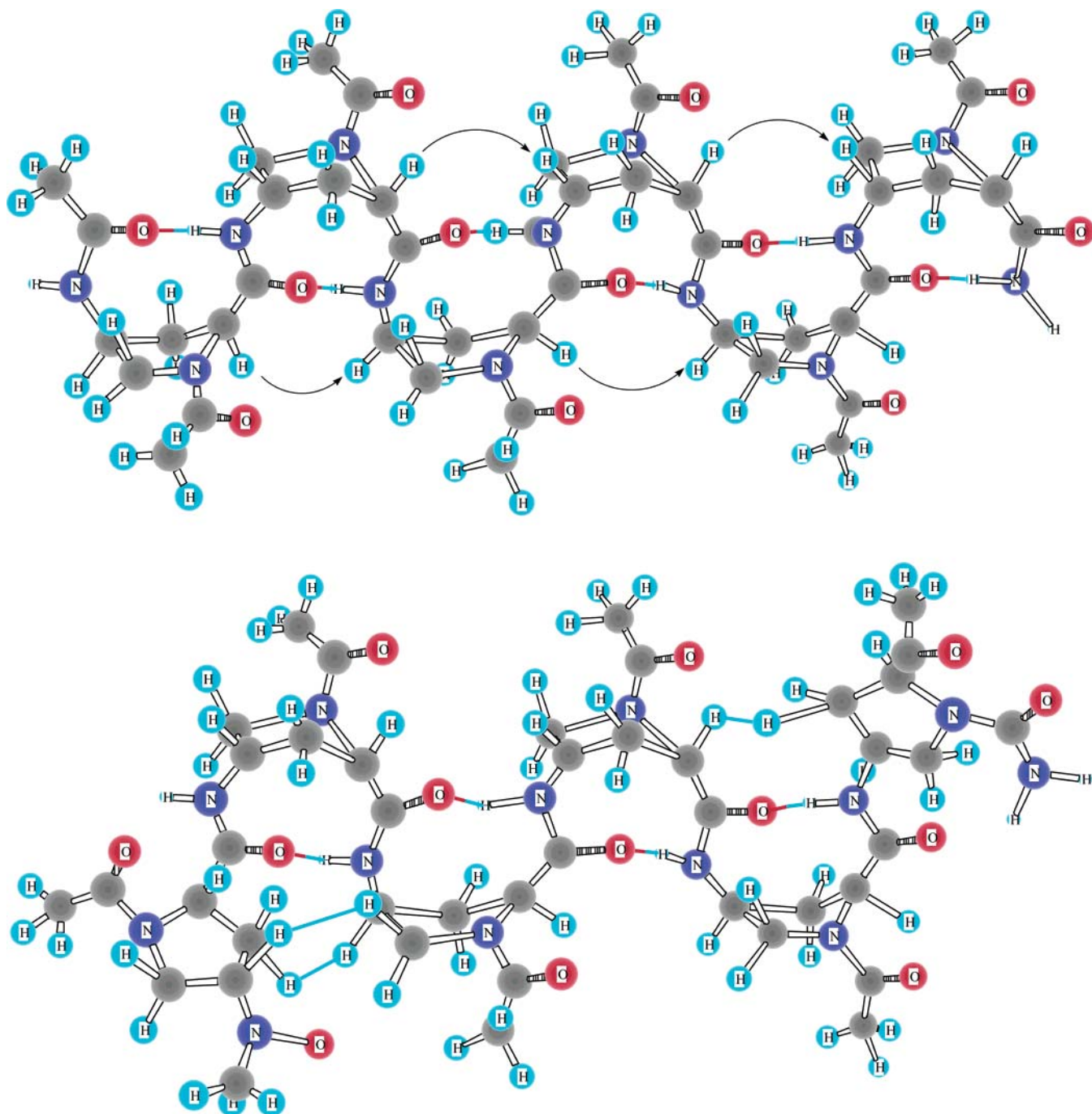
The presence of strong hydrogen bonds involving the main-chain amide groups can be ruled out on the basis of the observation of the same temperature coefficients ( $-6$  ppb  $\text{K}^{-1}$ ) for all of the observed amide protons, a fact that suggests a flexible structure.

However, the  $^3J_{\text{NH}-\gamma}$  couplings of all internal amide protons show values of around 7.5 Hz, which are slightly higher than the expected 6.5 Hz for a freely rotating group, as observed for the N-terminal amide proton. In addition, the presence of a number of interresidue NOEs suggests a preferred average conformation of proline  $\gamma$ -peptides.

NOE spectra were obtained in the rotating frame as the global correlation tune of the peptides studied gave only very weak NOEs in the laboratory frame. In addition, strong overlap due to the highly repetitive sequence of the peptides studied prevented complete sequential assignment of the backbone protons. However, the observation of an NOE in the  $N^\alpha$ -acyl family between protons located in opposite faces of the proline ring was interpreted as evidence of interresidue interactions. Indirect NOE (three-spin effects) can be ruled out in rotating frame experiments as the resulting cross-peaks would have

(31) Peptides were practically not soluble in  $\text{CDCl}_3$ , but were soluble in  $\text{H}_2\text{O}$ , and some of them were soluble in MeOH and TFE.





**Figure 7.** Top: structural model for peptide **2** deduced from NMR data. Bottom: related structure for peptide **2** derived by reorientation of the N- and C-terminal proline residues, with the observed NOE contacts indicated.

opposite signs. Interresidue NOEs are observed between protons  $\gamma$  and  $\beta'$ ,  $\alpha-\beta'$  and  $\gamma-\delta'$ , where the “prime” symbol denotes the proton trans to the  $\alpha$  proton of the proline ring.  $\gamma$ -Peptides containing a free or an alkylated  $\alpha$ -amino group show a slightly different pattern of interresidue NOEs. The  $\alpha-\beta'$  strong NOE is still observed. However, the  $\beta'-\gamma$  NOE is not observed in the free peptide **1** and is very weak in the methylated peptide **5**. Additional strong NOEs are observed between protons  $\beta$ ,  $\alpha$ , and  $\delta'$ .

The observed interresidue NOEs cannot be explained as interactions between consecutive residues. However, the NOEs are consistent with short distances between residues  $i$  and  $i+2$

in the structures shown in Figure 7 by rotation of the C- and N-terminal proline groups. Due to the evidence of flexibility, no attempt to derive a single structure using restrained minimization was attempted. The suggested structure for peptide **2** in  $\text{H}_2\text{O}$  is an idealized model for the folding of proline-derived  $\gamma$ -peptides. The structure can be described as a series of turns in which the two amide bonds connected to the  $\alpha$  and  $\gamma$  positions of each proline are in the same plane, which is perpendicular to the average plane of the proline rings. In aqueous solution, however, hydrogen bonds are not formed, a situation indicated by the temperature coefficients and the coupling constants measured on NH residues. In the minimized structure, protons

$\alpha$  and  $\gamma$  in prolines *i* and *i*+2 are at 5 Å. This structure also accounts for the observed coupling constant of 7.5 Hz  $^3J_{\text{NH}-\gamma}$  as the dihedral angle between the two bonds is close to 0°.

### Concluding Remarks

The  $\gamma$ -amino-L-proline is a very convenient building block for the preparation of  $\gamma$ -peptides. The use of two orthogonal protecting groups for both amino groups of the building block leads to a flexible synthesis strategy for alkyl- and acyl-substituted  $\gamma$ -peptides, allowing a convenient method for the preparation of both homo- and heterooligomers.

The CD spectra of alkylated peptides suggest that proline-containing  $\gamma$ -peptides show solvent-dependent secondary structures. In addition, comparison of the CD spectra of  $\gamma$ -peptides prepared from  $\gamma$ -amino-L-proline and  $\gamma$ -aminobutyric acid in different solvents indicates that the proline-derived  $\gamma$ -peptides retain in aqueous solutions a conformation that is present only in TFE solution in the linear analogues. NMR spectra in aqueous solution show interresidue NOEs that are consistent with a folded structure in which vectors perpendicular to the mean plane of adjacent proline rings are alternatively pointing up and down and, moreover, the peptide bonds are in a common plane perpendicular to those of the proline ring.

The turn-like conformation induced by the  $\gamma$ -aminoproline skeleton could stabilize one of the smallest conceivable  $\beta$ -meander structures, which could prove useful as a model for an isolated,  $\beta$ -sheet-like, hydrogen bond ribbon.

Work is in progress to characterize the biological properties of proline  $\gamma$ -peptides which, as shown in this work, are readily accessible from a synthetic point of view with a versatility that opens the way to a variety of applications.

### Experimental Section

**Materials and Equipment.** (2*S*,4*S*)-Fmoc-4-amino-1-Boc-pyrrolidine-2-carboxylic acid and *N*<sup>α</sup>-Boc-*N*<sup>γ</sup>-Fmoc-L-diaminobutyric acid were obtained from Neosystem (Strasbourg, France), and MBHA resin (0.7 mmol/g) was supplied by Calbiochem-Novabiochem AG. DIPCDI was obtained from Fluka Chemika (Buchs, Switzerland), and HOBt was from Albatross Chem, Inc. (Montreal, Canada). Solvents for peptide synthesis and RP-HPLC equipment were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). Trifluoroacetic acid was supplied by KaliChemie (Bad Wimpfen, Germany). Other chemicals were obtained from Aldrich (Milwaukee, WI) and were of the highest purity commercially available. All commercial reagents and solvents were used as received. HF was obtained from Air Products and Chemicals, Inc. (Allentown, Canada), and the equipment was from Peptide Institute Inc., Minoh, Osaka, Japan. Analytical RP-HPLC was performed using Shimadzu (Kyoto, Japan) or Waters (Milford, MA) chromatography systems with reversed-phase Kromasil C<sub>18</sub> (250 × 4 mm) 10 μm and Symmetry C<sub>18</sub> (150 × 4.6 mm) 5 μm columns with UV detection at 220 nm. Semipreparative RP-HPLC was performed on a Waters (Milford, MA) chromatography system using Vydac C<sub>8</sub> (1 × 25 cm, 10 μm) and Symmetry C<sub>8</sub> (3 × 10 cm, 5 μm) columns. Compounds were detected by UV absorption at 220 nm. Mass spectra were recorded on a MALDI Voyager DE RP time-of-flight (TOF) spectrometer (Applied Biosystems, Framingham). DHB was used as a matrix and was purchased from Aldrich.

**Circular Dichroism.** CD measurements were obtained using a Jasco model 720 spectropolarimeter at 25 °C. Spectra were obtained in fused quartz cells with path lengths in the range 0.1–1 mm. Peptide samples as TFA salts were dissolved in an appropriate amount of the selected solvent [(H<sub>2</sub>O (pH in all cases was in the 6.0–6.5 range), MeOH, and TFE)]. A baseline correction was measured with only solvent in the cell. Data are expressed in terms of mean residue ellipticity, [ $\theta$ ] (deg

cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>), calculated per mol of total amide groups (chromophores) present in the different molecules.

**NMR Spectroscopy.** NMR spectra were acquired on a Bruker 500 spectrometer.  $\gamma$ -Hexapeptides were dissolved in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1) at concentrations of ~3 mg/mL at 25 °C apart from the temperature experiments, which were collected between 5 and 30 °C under the control of a Eurotherm variable-temperature unit with an accuracy of 0.1 °C. Two-dimensional spectra (COSY, TOCSY, NOESY, and ROESY) were recorded employing standard pulse sequences with the number of acquisitions typically set to 64 for the COSY, NOESY, and ROESY and 32 for the TOCSY experiments. Presaturation was used to suppress the water resonance. TOCSY spectra were recorded with an isotropic mixing time of 70 ms. NOESY spectra were acquired with mixing times of 150 and 400 ms. ROESY spectra were collected with mixing times of 150 and 200 ms. The temperature coefficients of the amide protons for compound **2** were studied by acquiring monodimensional spectra at six different temperatures between 278 and 303 K in 5° increments and are reported in –ppb/K. All spectra were processed with VNMR on a PC computer.

**General Procedures. Solid-Phase Synthesis.** Peptide syntheses were performed manually in a polypropylene syringe fitted with a polyethylene porous disk. Solvents and soluble reagents were removed by suction. Washings between deprotection, coupling, and subsequent deprotection steps were carried out with DMF (5 × 1 min) and DCM (5 × 1 min) using 10 mL of solvent/g of resin each time.

**Fmoc Group Removal.** (i) DMF (5 × 1 min); (ii) piperidine/DMF (2:8) (1 × 1 min + 2 × 15 min); (iii) DMF (5 × 1 min).

**Boc Group Removal.** (i) DCM (5 × 1 min); (ii) TFA/DCM (4:6) (1 × 1 min + 1 × 30 min); (iii) DCM (5 × 1 min); (iv) DIEA/DCM (5:95) (3 × 3 min); (v) DCM (5 × 1 min).

**Solid-Phase  $\gamma$ -Peptide Backbone Elongation.** All syntheses were carried out with MBHA resin (1 g) by an Fmoc/Boc combined solid-phase strategy. Couplings of Boc-Amp(Fmoc)-OH (1.58 g, 5 equiv) and Fmoc-Dab-OH (1.53 g, 5 equiv) were carried out with DIPCDI (540 μL, 5 equiv) and HOBt (472 mg, 5 equiv) in DMF for 2 h at 25 °C. After the coupling, the resin was washed with DMF (5 × 1 min) and DCM (5 × 1 min). Couplings were monitored by the Kaiser test.

**Synthesis of Homo *N*<sup>α</sup>-Acyl- $\gamma$ -hexapeptides.** After the *N*<sup>α</sup>-Boc groups had been removed, acylation of the  $\alpha$ -amino groups was carried out using RCOOH (30 equiv, 5 equiv for each amine), DIPCDI (540 μL, 30 equiv), and HOBt (472 mg, 30 equiv) in DMF for 2 h at 25 °C. The resin was washed with DMF (5 × 1 min) and DCM (5 × 1 min). The acylation was monitored by the chloranil test.

**Synthesis of Hetero *N*<sup>α</sup>-Acyl- $\gamma$ -hexapeptides.** Once the monomer had been introduced by coupling of the corresponding protected monomer, the *N*<sup>α</sup>-Boc protecting group was removed and the acyl function was introduced as above. After removal of the *N*<sup>γ</sup>-Fmoc protecting group, the reactive sequence was repeated.

**Synthesis of Homo *N*<sup>α</sup>-Alkyl- $\gamma$ -hexapeptides.** After the Boc groups had been removed, alkylation of the  $\alpha$ -amino group was performed by on-resin reductive amination using RCHO (30 equiv, 5 equiv for each amine) and NaBH<sub>3</sub>CN (232 mg, 30 equiv) in 1% HOAc in DMF for 2 h. After the reductive amination, the resin was washed with DMF (5 × 1 min) and DCM (5 × 1 min). The alkylation was monitored by the chloranil test.

**Synthesis of Hetero *N*<sup>α</sup>-Alkyl- $\gamma$ -hexapeptides.** This transformation was carried out by the sequential acylation methodology, but in this case the alkylation conditions outlined above were used.

**Acetylation.** The end terminal *N*<sup>γ</sup>-amino Fmoc protecting group was removed and was terminated with Ac<sub>2</sub>O (337 μL, 5 equiv) and DIEA (607 μL, 5 equiv) in DMF for 2 h. The resin was washed with DMF (5 × 1 min) and DCM (5 × 1 min).

**Acidolytic Cleavage with HF.** The peptide resin was washed with MeOH (3 × 1 min), dried, and treated with HF in the presence of 10% anisole for 1 h at 0 °C. Peptides were precipitated with cold anhydrous TBME, dissolved in HOAc, and then lyophilized.

**Ac-( $\gamma$ Amp) $_6$ -NH $_2$  (1):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient of MeCN (containing 1% of TFA) and H $_2$ O (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed that the peptides were 95–99% pure.  $^1$ H NMR [H $_2$ O/D $_2$ O (9:1), 500 MHz]:  $\delta$  = 1.848–1.945 (m, 5H; 5H $\beta$ ); 1.962 (s, 3H; CH $_3$ ); 1.998–2.052 (m, 1H; H $\beta$ ); 2.587–2.647 (m, 5H; H $\beta$ ); 2.673–2.719 (m, 1H; H $\beta$ ); 3.017–3.057 (m, 4H; 4H $\delta$ ); 3.001 (dd,  $J_{\delta-\delta'}$  = 12.0 Hz and  $J_{\delta-\gamma}$  = 4.5 Hz; 1H, H $\delta$ ); 3.200 (dd,  $J_{\delta-\delta'}$  = 12.0 Hz and  $J_{\delta-\gamma}$  = 4.5 Hz; 1H, H $\delta$ ); 3.334–3.383 (m, 4H; H $\delta'$ ); 3.398–3.450 (m, 2H; H $\delta'$ ); 4.011 (t,  $J_{\alpha-\beta}$  = 7.5 Hz; 4H, 4H $\alpha$ ); 4.081 (t,  $J_{\alpha-\beta}$  = 7 Hz, 1H; H $\alpha$ ); 4.190 (dd,  $J_{\alpha-\beta}$  = 7 Hz and  $J_{\alpha-\beta'}$  = 9 Hz, 1H; H $\alpha$ ); 4.337–4.427 (m, 6H; 6H $\gamma$ ); 7.274 (s, 1H; carboxamide); 7.895 (s, 1H; carboxamide); 8.138 (d,  $J_{\text{NH}-\gamma}$  = 5.5 Hz, 1H; N-terminal amide); MS calcd for C $_{32}$ H $_{53}$ N $_{13}$ O $_7$ , [M + H] $^+$  732.4263; HR-ESI found, [M + H] $^+$  732.4239; MALDI-TOF found, 732.97 [M + H] $^+$ , 754.99 [M + Na] $^+$ , and 771.97 [M + K] $^+$ .

**Ac-[ $\gamma$ Amp(N $^{\alpha}$ -Ac)] $_6$ -NH $_2$  (2):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient of MeCN (containing 1% of TFA) and H $_2$ O (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed that the peptides were 95–99% pure.  $^1$ H NMR [H $_2$ O/D $_2$ O (9:1), 500 MHz]:

1.900–1.983 (m, 6H; H $\beta$ ); 1.973 (s, 3H; Nt methyl); 2.091–2.105 (m, 18H; side-chain methyls); 2.572–2.685 (m, 6H; H $\beta$ ); 3.490–3.570 (m, 6H; 6H $\delta$ ); 3.916–4.010 (m, 6H; 6H $\delta'$ ); 4.328–4.372 (m, 6H; 6H $\alpha$ ); 4.442–4.499 (m, 6H; 6H $\gamma$ ); 7.087 (s, 1H; carboxamide); 7.855 (s, 1H; carboxamide); 8.126 (d,  $J_{\text{NH}-\gamma}$  = 6.5 Hz, 1H; N-terminal amide); 8.499 (m,  $J_{\text{NH}-\gamma}$  around 7.5 Hz, 5H; central amides); these NMR data correspond to the majority species, although there are other minority species. MS calcd for C $_{44}$ H $_{65}$ N $_{13}$ O $_{13}$ , [M + Na] $^+$  1006.4717; HR-ESI found, [M + Na] $^+$  1006.4765; MALDI-TOF found, [M + H] $^+$  984.57, [M + Na] $^+$  1006.60, and [M + K] $^+$  1022.56.

**Ac-[ $\gamma$ Amp(N $^{\alpha}$ -PhAc)] $_6$ -NH $_2$  (3):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient of MeCN (containing 1% of TFA) and H $_2$ O (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed that the peptides were 95–99% pure. MALDI-TOF calcd for C $_{80}$ H $_{89}$ N $_{13}$ O $_{13}$ , [M + H] $^+$  1439.67; found, [M + H] $^+$  1440.28, [M + Na] $^+$  1464.61, and [M + K] $^+$  1479.57. This peptide could be synthesized, but it proved impossible to obtain the CD and NMR data for solubility reasons.

**H-[ $\gamma$ Amp(N $^{\alpha}$ -iV)- $\gamma$ Amp(N $^{\alpha}$ -PhAc)] $_3$ -NH $_2$  (4):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient of MeCN (containing 1% of TFA) and H $_2$ O (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed the peptides to be 95–99% pure.  $^1$ H NMR [H $_2$ O/D $_2$ O (9:1), 500 MHz]: 0.910–0.959 (m, 18H; isovaleric methyls); 1.270 (s, 1H; primary amine NH $_2$ ); 1.800–1.950 (m, 6H; 6H $\beta$ ); 2.037–2.087 (m, 3H; three isovaleric CH); 2.138–2.240 (m, 6H; three isovaleric methylenes CH $_2$ ); 2.452–2.567 (m, 6H; 6H $\beta$ ); 3.464–3.536 (m, 6H; 6H $\delta'$ ); 3.656–3.719 (m, 6H; three CH $_2$  linkage to phenyl); 3.799–3.896 (m, 6H; 6H $\delta$ ); 4.227–4.335 (m, 6H; 6H $\alpha$ ); 4.363–4.478 (m, 6H; 6H $\gamma$ ); 7.162 (s, 1H; carboxamide); 7.187–7.271 (m, 15H; aromatic protons); 7.811 (s, 1H; carboxamide); 8.561 (d,  $J_{\text{NH}-\gamma}$  = 7.5 Hz, 1H; amide); 8.616–8.679 (m, 4H; central backbone amides); 8.874 (d,  $J_{\text{NH}-\gamma}$  = 8 Hz, 1H; amide); these NMR data correspond to the major species, although there are other minor species. MALDI-TOF calcd for C $_{69}$ H $_{93}$ N $_{13}$ O $_{12}$ , [M + H] $^+$  1295.71; found, [M + H] $^+$  1296.88, [M + Na] $^+$  1318.88, and [M + K] $^+$  1334.85.

**Ac-[ $\gamma$ Amp(N $^{\alpha}$ -Me)] $_6$ -NH $_2$  (5):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient of MeCN (containing 1% of TFA) and H $_2$ O (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed the peptides to be 95–99% pure.  $^1$ H NMR [H $_2$ O/D $_2$ O (9:1), 500 MHz]: 1.986 (s, 3H, CH $_3$  acetyl); 2.053–2.141 (m, 4H, H $\beta$ ); 2.201–2.211 (m, 2H, H $\beta$ ); 2.824 (s, 9H, 3  $\times$  CH $_3$ ); 2.845 (s, 3H, CH $_3$ ); 2.901 (s, 3H, CH $_3$ ); 2.911–2.974 (m, 9H, 6 H $\beta$  and one CH $_3$ ); 3.402–3.569 (m, 6H, 6H $\delta$ ); 3.612–3.779 (m, 6H, 6H $\delta'$ ); 3.991–4.086 (m, 4H, 4H $\alpha$ );

4.160 (t,  $J_{\alpha-\beta,\beta'}$  = 9 Hz; 1H, H $\alpha$ ); 4.226 (t,  $J_{\alpha-\beta,\beta'}$  = 9 Hz; 1H, H $\alpha$ ); 4.450–4.511 (m, 1H, H $\gamma$ ); 4.570–4.645 (m, 5H, 5H $\gamma$ ); 7.525 (s, 1H, carboxamide); 8.054 (s, 1H, carboxamide); 8.300 (d,  $J_{\text{NH}-\gamma}$  = 5.5 Hz; 1H, amide Nt); 8.900 (bs.); MS calcd for C $_{38}$ H $_{65}$ N $_{13}$ O $_7$ , [M + H] $^+$  816.5202; HR-ESI found, [M + H] $^+$  816.5212; MALDI-TOF found, [M + 3H] $^+$  818.03, [M + Na] $^+$  840.08, and [M + K] $^+$  856.09.

**Ac-[ $\gamma$ Amp(N $^{\alpha}$ -CH $_2$ CH $_2$ Ph)] $_6$ -NH $_2$  (6):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient of MeCN (containing 1% of TFA) and H $_2$ O (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed the peptides to be 95–99% pure.  $^1$ H NMR (H $_2$ O–D $_2$ O (9:1), 500 MHz): 1.951–2.091 (m, 18H, 6H $\beta'$  and 6  $\times$  CH $_2$ ); 2.800–3.117 (m, 18H, 6H $\beta$  and 6  $\times$  CH $_2$ ); 3.268–3.780 (m, 12H, 6H $\delta$  and 6H $\delta'$ ); 4.088–4.427 (m, 12H, 6H $\alpha$  and 6H $\gamma$ ); 7.252–7.402 (m, 30H, aromatics); 7.464 (s, 1H, carboxamide); 8.007 (s, 1H, carboxamide); 8.264–8.276 (d,  $J_{\text{NH}-\gamma}$  = 6 Hz; 1H, Nt amide); MALDI-TOF calcd for C $_{80}$ H $_{101}$ N $_{13}$ O $_7$ , [M + H] $^+$  1355.79; found, [M + H] $^+$  1359.83, [M + Na] $^+$  1382.07, and [M + K] $^+$  1397.05.

**H-[ $\gamma$ Amp(N $^{\alpha}$ -CH $_2$ CH $_2$ CH(CH $_3$ ) $_2$ )- $\gamma$ Amp(N $^{\alpha}$ -CH $_2$ CH $_2$ Ph)] $_3$ -NH $_2$  (7):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient of MeCN (containing 1% of TFA) and H $_2$ O (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed the peptides to be 95–99% pure.  $^1$ H NMR (H $_2$ O–D $_2$ O (9:1), 600 MHz): 0.883–0.919 (m, 18H, 6  $\times$  CH $_3$  isopropyl); 1.494–1.598 (m, 6H, 3  $\times$  CH $_2$  isopropyl); 1.613–1.686 (m, 3H, 3  $\times$  CH isopropyl); 2.007–2.157 (m, 6H, 6H $\beta'$ ); 2.200–2.267 (m, 6H, 3  $\times$  CH $_2$  phenyl); 2.900–3.144 (m, 12H, 6H $\beta$  and 3  $\times$  CH $_2$  phenyl linkage to N); 3.172–3.315 (m, 6H, isopropyl 3  $\times$  CH $_2$  linkage to N); 3.404–3.659 (m, 6H, 6H $\delta$ ); 3.760–3.922 (m, 6H, 6H $\delta'$ ); 4.253–4.410 (m, 6H, 6H $\alpha$ ); 4.700–4.900 (m, 6H, 6H $\gamma$ ); 7.291–7.429 (m, 15H, aromatics); 7.554 (s, 1H, carboxamide); 8.060 (s, 1H, carboxamide); 8.963–8.973 (d,  $J_{\text{NH}-\gamma}$  = 6 Hz; 1H, amide); 9.016–9.039 (t,  $J_{\text{NH}-\gamma}$  = 7.2 Hz; 2H, central amides); 9.061–9.072 (d,  $J_{\text{NH}-\gamma}$  = 6.6 Hz; 1H, amide); 9.184 (bc., 1H, Nt amine); MALDI-TOF calcd for C $_{69}$ H $_{105}$ N $_{13}$ O $_6$ , [M + H] $^+$  1211.83; found, [M + H] $^+$  1212.79, [M + Na] $^+$  1234.76, and [M + K] $^+$  1250.37.

**H-[ $\gamma$ Amp(N $^{\alpha}$ -Ac)]-NH $_2$  (8):** This compound was synthesized in the solid phase using a Boc/Fmoc strategy. The synthesis was carried out on 350  $\mu$ mol of MBHA resin at a substitution level of 0.7 mmol/g. The Boc-Amp(Fmoc)-OH monomer was first coupled onto the resin by using the same Fmoc/*t*Bu strategy used above. When the monomer was coupled to the resin, the N $^{\alpha}$ -Boc protecting group was removed and the  $\alpha$ -amino group was acetylated using Ac $_2$ O (170  $\mu$ L, 5 equiv) and DIEA (305  $\mu$ L, 5 equiv) in DMF for 2 h. The Fmoc group was removed and the peptide cleaved from the resin. The crude peptide was precipitated with anhydrous diethyl ether, dissolved in HOAc, and lyophilized. The crude peptide was not purified by preparative HPLC because the product was obtained in good yield and with excellent purity. The purity of the sample was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF.  $^1$ H NMR [H $_2$ O/D $_2$ O (9:1), 500 MHz]: 2.010 (s, 3H, CH $_3$ ); 2.131 (s, 2H, NH $_2$ ); 2.175 (ddd,  $J_{\beta-\beta'}$  = 15 Hz,  $J_{\beta-\alpha}$  = 4.2 Hz,  $J_{\beta-\gamma}$  = 4.2 Hz; 1H, H $\beta$ ); 2.745 (ddd,  $J_{\beta-\beta'}$  = 15 Hz,  $J_{\beta-\alpha}$  = 9.6 Hz,  $J_{\beta-\gamma}$  = 6.6 Hz; 1H, H $\beta'$ ); 3.860 (dd,  $J_{\delta-\delta'}$  = 12 Hz,  $J_{\delta-\gamma}$  = 2.4 Hz; 1H, H $\delta$ ); 4.044 (dd,  $J_{\delta-\delta}$  = 12 Hz,  $J_{\delta-\gamma}$  = 6 Hz; 1H, H $\delta'$ ); 4.116 (dddd,  $J_{\gamma-\beta'}$  = 6.6 Hz,  $J_{\gamma-\delta}$  = 6 Hz,  $J_{\gamma-\beta}$  = 4.2 Hz,  $J_{\gamma-\delta}$  = 2.4 Hz; 1H, H $\gamma$ ); 4.521 (dd,  $J_{\alpha-\beta'}$  = 9.6 Hz,  $J_{\alpha-\beta}$  = 4.2 Hz; 1H, H $\alpha$ ); 7.291 (s, 1H, carboxamide); 8.017 (s, 1H, carboxamide); MS calcd for C $_7$ H $_{13}$ N $_3$ O $_2$ , [M + H] $^+$  172.1080; HR-ESI found, [M + H] $^+$  172.1073; MALDI-TOF found, [M + H] $^+$  171.96, [M + Na] $^+$  193.94, and [M + K] $^+$  209.90.

**CH $_3$ CH $_2$ CO-( $\gamma$ Amp)-NH $_2$  (9):** This compound was synthesized in the solid phase using a Boc/Fmoc strategy with 350  $\mu$ mol of MBHA resin at a substitution level of 0.7 mmol/g. The Boc-Amp(Fmoc)-OH monomer was first coupled onto the resin by a general Fmoc/*t*Bu strategy. The coupling of Boc-Amp(Fmoc)-OH (790 mg, 5 equiv) was carried out with the same protocol used above. When the monomer

had been coupled to the resin, the Fmoc group was removed and the acylation of the  $\gamma$ -amino group was carried out using  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$  (130  $\mu\text{L}$ , 5 equiv), DIPCDI (270  $\mu\text{L}$ , 5 equiv), and HOBt (236 mg, 5 equiv) in DMF for 2 h. After the coupling was complete, the  $N^\alpha$ -Boc protecting group was removed. Peptides were cleaved from the resin with anhydrous HF in the presence of 10% anisole for 1 h at 0 °C. The crude peptide was precipitated with anhydrous diethyl ether, dissolved in HOAc, and lyophilized. The crude peptide was not purified by preparative HPLC because the target compound was obtained in good yield and with excellent purity. The purity of the sample was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF.  $^1\text{H}$  NMR [ $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1), 500 MHz]: 1.075 (t,  $J_{\text{CH}_3-\text{CH}_2} = 7.8$  Hz; 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2.001 (s, 1H, NH); 2.161 (ddd,  $J_{\beta',\beta} = 14.4$  Hz,  $J_{\beta',\alpha} = 7.2$  Hz,  $J_{\beta',\gamma} = 7.2$  Hz; 1H,  $\text{H}\beta'$ ); 2.236 (q,  $J_{\text{CH}_2-\text{CH}_3} = 7.8$  Hz; 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2.800 (ddd,  $J_{\beta,\beta'} = 13.8$  Hz,  $J_{\beta,\alpha} = 7.2$  Hz,  $J_{\beta,\gamma} = 7.2$  Hz; 1H,  $\text{H}\beta$ ); 3.405 (dd,  $J_{\delta-\delta'} = 12$  Hz,  $J_{\delta-\gamma} = 5.4$  Hz; 1H,  $\text{H}\delta$ ); 3.657 (dd,  $J_{\delta-\delta} = 12$  Hz,  $J_{\delta-\gamma} = 7.2$  Hz; 1H,  $\text{H}\delta'$ ); 4.480–4.518 (m, 2H,  $\text{H}\alpha$  and  $\text{H}\gamma$ ); 7.407 (s, 1H, carboxamide); 7.952 (s, 1H, carboxamide); 8.110 (s, 1H, amide); MS calcd for  $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ ,  $[\text{M} + \text{H}]^+$  186.1237; HR-ESI found,  $[\text{M} + \text{H}]^+$  186.1232; MALDI-TOF found,  $[\text{M} + \text{H}]^+$  186.03,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  208.00, and  $[\text{M} + \text{K}]^+$  223.97.

**$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}-[\gamma\text{Amp}(N^\alpha\text{-Ac})]-\text{NH}_2$  (10):** This compound was synthesized in the solid phase using a Boc/Fmoc strategy. The synthesis was carried out on 350  $\mu\text{mol}$  of MBHA resin at a substitution level of 0.7 mmol/g. The coupling of Boc-Amp(Fmoc)-OH (790 mg, 5 equiv) was carried using the same protocol described above. The  $N^\alpha$ -Boc protecting group was removed, and the acylation of the  $\alpha$ -amino group was carried out using  $\text{Ac}_2\text{O}$  (84  $\mu\text{L}$ , 5 equiv) and DIEA (155  $\mu\text{L}$ , 5 equiv) in DMF for 2 h. The Fmoc group was removed, and the acylation of the  $\gamma$ -amino group was carried out using  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$  (130  $\mu\text{L}$ , 5 equiv), DIPCDI (270  $\mu\text{L}$ , 5 equiv), and HOBt (236 mg, 5 equiv) in DMF for 2 h. The peptide was cleaved from the resin with anhydrous HF in the presence of 10% anisole for 1 h at 0 °C. The crude peptide was precipitated with anhydrous diethyl ether, dissolved in HOAc, and lyophilized. The crude peptide was not purified by preparative HPLC because the compound was obtained in good yield and with excellent purity. The purity of the sample was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF.  $^1\text{H}$  NMR [ $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1), 500 MHz]: 1.081 (t,  $J_{\text{CH}_3-\text{CH}_2} = 7.8$  Hz; 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1.974–2.019 (m, 1H,  $\text{H}\beta$ ); 2.116 (s, 3H, methyl  $\text{N}\alpha$ ); 2.212–2.238 (q,  $J_{\text{CH}_2-\text{CH}_3} = 7.8$  Hz; 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2.618 (ddd,  $J_{\beta,\beta} = 13.8$  Hz,  $J_{\beta,\alpha} = 9$  Hz,  $J_{\beta,\gamma} = 6$  Hz; 1H,  $\text{H}\beta$ ); 3.527 (dd,  $J_{\delta-\delta'} = 11.1$  Hz,  $J_{\delta-\gamma} = 5.4$  Hz; 1H,  $\text{H}\delta$ ); 3.975 (dd,  $J_{\delta-\delta} = 11.1$  Hz,

$J_{\delta-\gamma} = 6.6$  Hz; 1H,  $\text{H}\delta'$ ); 4.401–4.449 (m, 2H,  $\text{H}\alpha$  and  $\text{H}\gamma$ ); 7.098 (s, 1H, carboxamide); 7.778 (s, 1H, carboxamide); 8.011 (d,  $J_{\text{NH}-\gamma} = 5$  Hz; 1H, amide). These NMR data correspond to the majority compound; in the NMR spectrum is observed another minority species corresponding to the *cis* isomer in the side chain with relative population 3:1. MS calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$ ,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  250.1162; HR-ESI found,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  250.1150; MALDI-TOF found,  $[\text{M} + \text{H}]^+$  227.92,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  249.94, and  $[\text{M} + \text{K}]^+$  265.86.

**Ac-[Dab( $N^\alpha$ -Ac)] $_6$ -NH $_2$  (11):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient of MeCN (containing 1% of TFA) and  $\text{H}_2\text{O}$  (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed the peptides to be 95–99% pure.  $^1\text{H}$  NMR [ $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1), 500 MHz]: 1.788–1.878 (m, 6H,  $\text{H}\beta$ ); 1.971–2.060 (m, 27H; 6H $\beta$ , 3H backbone methyls and 18H side-chain methyls); 3.236–3.325 (m, 12H,  $\text{H}\gamma$ ); 4.138–4.180 (m, 4H,  $\text{H}\alpha$ ); 4.196–4.238 (m, 2H,  $\text{H}\alpha$ ); 7.093 (s, 1H, carboxamide); 7.695 (s, 1H, carboxamide); 7.966 (t,  $J_{\text{NH}-\gamma} = 5.5$  Hz; 1H, amide Nt); 8.128–8.162 (m, 5H, backbone amides); 8.326–8.374 (m, 6H, side-chain amides); MS calcd for  $\text{C}_{38}\text{H}_{65}\text{N}_{13}\text{O}_{13}$ ,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  934.4717; HR-ESI found,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  934.4741; MALDI-TOF found,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  936.34 and  $[\text{M} + \text{K}]^+$  952.30.

**Ac-(Dab) $_6$ -NH $_2$  (12):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient of MeCN (containing 1% of TFA) and  $\text{H}_2\text{O}$  (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed the peptides to be 95–99% pure.  $^1\text{H}$  NMR [ $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1), 600 MHz]: 2.002 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  acetyl); 2.031–2.172 (m, 12H,  $\text{H}\beta$ ); 3.290–3.350 (m, 6H,  $\text{H}\gamma$ ); 3.399–3.485 (m, 6H,  $\text{H}\gamma$ ); 3.537–3.567 (m, 2H, amines); 3.631–3.658 (m, 2H, amines); 3.757–3.793 (m, 2H, amines); 3.959–4.056 (m, 6H,  $\text{H}\alpha$ ); 7.396 (s, 1H, carboxamide); 7.935 (s, 1H, carboxamide); 8.110 (t,  $J = 5$  Hz; 1H, amide Nt); 8.440–8.700 (m, 5H, backbone amides); MS calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{53}\text{N}_{13}\text{O}_7$ ,  $[\text{M} + \text{H}]^+$  660.4263; HR-ESI found,  $[\text{M} + \text{H}]^+$  660.4269; MALDI-TOF found,  $[\text{M} + \text{H}]^+$  661.87,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  683.88, and  $[\text{M} + \text{K}]^+$  699.88.

**Acknowledgment.** The work was partially supported by funds from CICYT (BQU2002-02047 and BQU2003-00089), Generalitat de Catalunya (Grup Consolidat and Centre de Referència en Biotecnología), and Barcelona Science Park.

JA0398621

### **2.3.2. Cell-penetrating *cis*- $\gamma$ -amino-L-proline-derived peptides**

**José Farrera-Sinfreu, Ernest Galt, Susanna Castel, Fernando Albericio and  
Miriam Royo**

*Journal of the American Chemical Society* 127 (2005), 9459-9468



Cell-Penetrating *cis*- $\gamma$ -Amino-L-Proline-Derived PeptidesJosep Farrera-Sinfreu,<sup>†,‡</sup> Ernest Giral,<sup>†,||</sup> Susanna Castel,<sup>§</sup>  
Fernando Albericio,<sup>\*,†,||</sup> and Miriam Royo<sup>\*,‡</sup>

Contribution from the Barcelona Biomedical Research Institute, Combinatorial Chemistry Unit, and Confocal Microscopy and Cellular Micromanipulation Facility, Barcelona Science Park, University of Barcelona, Josep Samitier 1, 08028-Barcelona, Spain, and Department of Organic Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franquès 1, 08028-Barcelona, Spain

Received March 15, 2005; E-mail: mroyo@pcb.ub.es; albericio@pcb.ub.es

**Abstract:** The synthesis of *cis*- $\gamma$ -amino-L-proline oligomers functionalized at the proline  $\alpha$ -amine with several groups that mimic the side chains of natural amino acids, including alanine, leucine, and phenylalanine, is herein described. These  $\gamma$ -peptides enter into different cell lines (COS-1 and HeLa) via an endocytic mechanism. The ability of these compounds to be taken up into cells was studied at 37 °C and 4 °C by plate fluorimetry, flow cytometry, and confocal microscopy. In addition to their capacity for cellular uptake, these unnatural short length oligomers offer advantages over the well-known penetrating TAT peptide, such as being less toxic than TAT and protease resistance.

## Introduction

In the past few years several peptides capable of crossing the cell membrane, namely cell-penetrating peptides (CPPs),<sup>1</sup> have been described in the literature.<sup>2</sup> This capacity suggests their potential application as new agents for cellular delivery of biomolecules. CPPs offer several advantages over other known cellular delivery systems,<sup>3,4</sup> including low toxicity, high efficiency toward different cell lines, and even inherent therapeutic potential. Peptides and proteins are nevertheless limited by low protease resistance and, sometimes, low membrane permeability.<sup>5,6</sup> Hence, compounds with greater proteolytic resistance, such as l oligomers,<sup>7,8</sup> as well as biomolecular mimetics, such as  $\beta$ -peptides<sup>9–12</sup> (nonnatural peptides, formed

by  $\beta$ -amino acids, that can adopt discrete and predictable well-defined secondary structures), have been evaluated as drug delivery agents.

Peptides capable of translocating the cell membrane can be classified into two groups: (i) cationic peptides with at least six charged amino acids (Lys or Arg) such as HIV-1, TAT peptide,<sup>13</sup> penetratin,<sup>14</sup> and chimeric transportan,<sup>15</sup> and (ii) hydrophobic peptides, such as those based on the H-region of signal-sequence proteins.<sup>16</sup> Bactericidal peptides are unusual in that they are both charged and contain hydrophobic regions in their primary or secondary structure.<sup>17–21</sup> As these features are implicated in both membrane permeabilization and pore-forming, functions which lead to microbicidal mechanisms, the

<sup>†</sup> Barcelona Biomedical Research Institute.<sup>‡</sup> Combinatorial Chemistry Unit.<sup>§</sup> Confocal Microscopy and Cellular Micromanipulation Facility.<sup>||</sup> Department of Organic Chemistry.

- (1) Abbreviations: Amp, *cis*-4-amino-L-proline or (2*S*,4*S*)-4-amino-pyrrolidine-2-carboxylic acid; Boc, *tert*-butoxycarbonyl; (2*S*,4*S*)-Boc-Amp(Fmoc)-OH, (2*S*,4*S*)-Fmoc-4-amino-1-Boc-pyrrolidine-2-carboxylic acid; CF, 5(6)-carboxyfluorescein; CPPs, cell-penetrating peptides; DCM, dichloromethane; DIEA, *N,N*-diisopropylethylamine; DIC, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide; DMF, *N,N*-dimethylformamide; Et<sub>3</sub>N, triethylamine; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl; HF, fluoridric acid; HIV, human immunodeficiency virus; HOAc, acetic acid; HOBt, 1-hydroxy-1,2,3-benzotriazole; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization, time-of-flight; MBHA, *p*-methylbenzhydrylamine resin; MeCN, acetonitrile; RP-HPLC, reversed-phase high performance liquid chromatography; TBME, *tert*-butylmethyl ether; TFA, trifluoroacetic acid; TR-DX, Texas Red-Dextran.
- (2) (a) Lindgren, M.; Hällbrink, M.; Prochiantz, A.; Langel, U. *TiPS* **2000**, *21*, 99–103. (b) Lundberg, P.; Langel, U. *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 227–233.
- (3) (a) Chakrabarti, R.; Wylie, D. E.; Schuster S. M. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 15494–15500. (b) Leamon, C. P.; Low, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 5572–5576. (c) Davidson, B. L.; Breakefield, X. O. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *4*, 353–364.
- (4) Cationic lipids have been also described to work quite well as delivery systems: (a) Connor, J.; Huang, L. *J. Cell. Biol.* **1985**, *101*, 582–589. (b) Foldvari, M.; Mezei, C.; Mezei, M. *J. Pharm. Sci.* **1991**, *80*, 1020–1028. (c) Simberg, D.; Weisman, Sarah; Talmon, Y.; Barenholz, Y. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2004**, *21*, 257–317. (d) Zhang, S.; Xu, Y.; Wang, B.; Qiao, W.; Liu, D.; Li, Z. *J. Controlled Release* **2004**, *100*, 165–180.

- (5) (a) Scheld, W. M. *Rev. Infect. Dis. Suppl.* **1989**, *7*, 1669–1690. (b) Egleton, R. D.; Davis, T. P. *Peptides* **1997**, *18*, 1431–1439. (c) Waterbeemd, H. Van de; Camenisch, G.; Folkers, G.; Chretien, J. R.; Raevsky, O. A. *J. Drug Targeting* **1998**, *6*, 151–165. (d) Schwarze, S. R.; Ho, A.; Vocero-Akbani, A.; Dowdy, S. F. *Science* **1999**, *285*, 1569–1572.
- (6) Tréhin, R.; Merkle, H. P. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 209–223.
- (7) Singh, D.; Kiarash, R.; Kawamura, K.; LaCasse, E. C.; Gariépy, J. *Biochemistry* **1998**, *37*, 5798–5809.
- (8) Broxk, R. D.; Bisland, S. K.; Gariépy, J. *J. Controlled Release* **2003**, *78*, 115–123.
- (9) Umezawa, N.; Gelman, M. A.; Haigis, M. C.; Raines, R. T.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (3), 368–369.
- (10) Rueping, M.; Mahajan, Y.; Sauer, M.; Seebach, D. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 257–259.
- (11) Garcia-Echeverria, C.; Ruetz, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (2), 247–251.
- (12) Potocky, T. B.; Menon, A. K.; Gellman, S. H. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 50188–50194.
- (13) Schwarze, P. M.; Dowdy, S. F. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 45–48.
- (14) Derossi, D.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 84–87.
- (15) Pooga, M.; Hallbrink, M.; Zorko, M.; Langel, U. *FASEB J.* **2000**, *12*, 67–77.
- (16) Hawiger, J. *Curr. Opin. Immunol.* **1997**, *9*, 189–194.
- (17) Boman, H. G. *Annu. Rev. Immunol.* **1995**, *13*, 61–92.
- (18) Gallo, R. L.; Huttner, K. M. *J. Invest. Dermatol.* **1998**, *111*, 739–743.
- (19) Bulet, P.; Hetru, C.; Dimarq, J. L.; Hoffmann, D. *Dev. Comput. Immunol.* **1999**, *23*, 329–344.
- (20) Shai, Y. *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)* **1999**, *1462*, 55–70.
- (21) Takeshima, K.; Chikushi, A.; Lee, K.-K.; Yonehara, S.; Matsuzaky, K. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1310–1315.

use of bactericidal peptides as delivery agents would appear to be limited. However, selective modulation of the bactericidal activity of these compounds has yielded new carriers.<sup>22</sup>

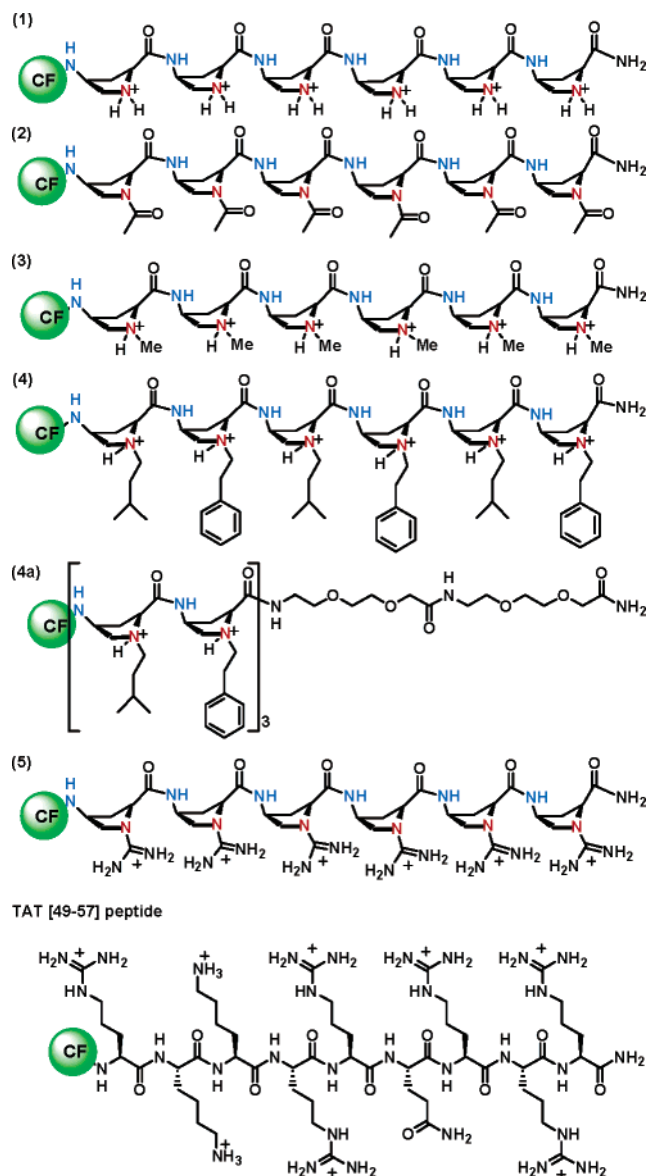
It has been reported that proline-rich peptides<sup>22–24</sup> and proline dendrimers<sup>25</sup> can be internalized by eukariotic cells. The most important advantage of proline-rich peptides in biological systems is their solubility in water. In this context, our group has described a nonnatural proline-derived  $\gamma$ -peptide, from *cis*- $\gamma$ -amino-L-proline, with the ability to adopt secondary structure in solution.<sup>26</sup> Three different  $\gamma$ -peptide families were synthesized,  $N^\alpha$ -acyl- $\gamma$ -peptides (polyamides on the side chains),  $N^\alpha$ -alkyl- $\gamma$ -peptides (polyamines on the side chains), and  $N^\alpha$ -guanidylated- $\gamma$ -peptides. In the present work, some of these peptide structures were selected to study their cell uptake properties (see Figure 1).

The amphipathic character of a compound determines its potential for internalization<sup>24,27</sup> and, in the case of the peptides at hand, varied with side chain structure. The modulation of this side chain structure offers a wide range of combinations that open the possibility of obtaining compounds with different hydrophobic/hydrophilic character and, consequently, with different properties as carriers. Hence acyl-peptides are more hydrophobic while other families are more hydrophilic or amphipathic. Additionally, the stability imparted by the  $\gamma$ -peptide skeleton of these compounds circumvents problems associated with protease liability, a major limitation of CPPs.<sup>28</sup> Cellular uptake studies for a new family of  $\gamma$ -peptides, utilizing plate fluorimetry and flow cytometry quantification techniques, confocal microscopy to determine subcellular localization, and the MTT assay to establish cytotoxicity are discussed herein.

## Results and Discussion

**Peptide Synthesis.** Various  $\gamma$ -peptides based on *cis*- $\gamma$ -amino-L-proline (see Figure 1) were synthesized to assay their cellular uptake properties. These oligomers have a common backbone and distinct side chains introduced with different linkage types through the  $\alpha$ -amino group of the proline monomer. Based on the linkage type, three different peptide families were obtained and evaluated:  $N^\alpha$ -acyl- $\gamma$ -peptides,  $N^\alpha$ -alkyl- $\gamma$ -peptides, and  $N^\alpha$ -guanidylated- $\gamma$ -peptides. The same Fmoc/Boc combined solid-phase strategy described in a previous work was used for the peptide synthesis.<sup>26</sup> Use of these two orthogonal protecting groups on solid phase for both amino functionalities of the *cis*- $\gamma$ -amino-L-proline leads to a flexible strategy enabling the synthesis of a large number of diversely modified  $\gamma$ -peptides.

The  $\gamma$ -peptide backbone was prepared from protected amino acid (2*S*,4*S*)-Fmoc-4-amino-1-Boc-pyrrolidine-2-carboxylic acid [(2*S*,4*S*)-Boc-Amp(Fmoc)-OH] using DIC and HOBt as coupling agents. For  $N^\alpha$ -acyl- $\gamma$ -peptides, the side chains were



**Figure 1.**  $\gamma$ -Aminoproline monomer based  $\gamma$ -peptides labeled with 5(6)-carboxyfluorescein.

introduced using the corresponding carboxylic acid and the same coupling reagents described above.  $N^\alpha$ -Alkyl- $\gamma$ -peptides were obtained via reductive amination using the corresponding aldehyde in 1% HOAc in DMF for 30 min followed by addition of NaBH<sub>3</sub>CN dissolved in MeOH. Substitution of DMF with MeOH as described previously yielded cleaner crude oligomers in higher yield, as determined by HPLC (70% for peptide **3**, 66% for peptide **4**, and 67% for peptide **4a**). For peptide **5**, the  $N^\alpha$ -guanidylated- $\gamma$ -peptide, the guanidinium group was introduced using *N,N'*-di-Boc-*N''*-trifluoromethanesulfonyl guanidine<sup>29</sup> in the presence of Et<sub>3</sub>N in DCM for 4 days. All reactions of the proline secondary amine were monitored by the chloranil test.

Taking into account that peptide **4** was not totally soluble in physiological media at high concentrations, peptide **4a**, containing two consecutive short polyethyleneglycol chains (8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid, Adoa) at its C-terminal, was synthesized

- (22) Sadler, K.; Eom, K. D.; Yang, J.-L.; Dimitrova, Y.; Tam, J. P. *Biochemistry* **2002**, *41*, 14150–14157.  
 (23) Fernández-Carreado, J.; Kogan, M. J.; Castel, S.; Pujals, S.; Giralt, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 1811–1814.  
 (24) Fernández-Carreado, J.; Kogan, M. J.; Pujals, S.; Giralt, E. *Biopolymers* **2004**, *76*, 196–203.  
 (25) Crespo, L.; Sanclimens, G.; Montaner, B.; Pérez-Tomás, R.; Royo, M.; Pons, M.; Albericio, F.; Giralt, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8876–8883.  
 (26) Farrera-Sinfreu, J.; Zaccaro, L.; Vidal, D.; Salvatella, X.; Giralt, E.; Pons, M.; Albericio, F.; Royo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6048–6057.  
 (27) Deshayes, S.; Plénat, T.; Aldrian-Herrada, G.; Divita, G.; LeGrimellec, C.; Heitz, F. *Biochemistry* **2004**, *43*, 7698–7706.  
 (28) (a) Elmquist, A.; Langel, U. *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 387–393. (b) Lindgren, M. E.; Hallbrink, M. M.; Elmquist, A.; Langel, U. *Biochem. J.* **2004**, *377*, 69–76.

- (29) Feichtinger, K.; Zapf, C.; Sings, H. L.; Goodman, M. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3804–3805.



as a more soluble analogue.<sup>30</sup> Peptide **4a** was obtained by coupling two molecules of Fmoc-8-amine-3,6-dioxoactanoic acid to MBHA resin using DIC/HOBt as coupling reagents, followed by the synthesis described above for peptide **4**.

At the end of the synthesis, after Fmoc removal, the fluorescent label 5(6)-carboxyfluorescein (CF) was introduced onto the *N*-terminal  $\gamma$ -amino group using DIC/HOBt as coupling reagents, followed by piperidine washes just before cleavage of the peptide from the resin. These washes were required in order to remove overincorporated carboxyfluorescein.<sup>31</sup> When these washings were not carried out, compounds containing two and three extra units of carboxyfluorescein were observed in the crude product.

Peptides were ultimately cleaved from the resin by acidolytic treatment with anhydrous HF. The purity of the CF- $\gamma$ -peptide crudes, as determined by HPLC, ranged from 65% to 90%. Compounds were purified to more than 95% homogeneity by preparative reverse-phase HPLC and characterized by electrospray and/or MALDI-TOF mass spectrometry.

**Enzymatic Stability.** Enzymatic stability was studied for peptide **4a** in trypsin and human serum and checked by HPLC, which showed total stability of the peptide, even during long incubation times (see Supporting Information). This result represents a major advantage of peptide **4a** over CPPs, which are labile to both trypsin and human serum and hence greatly limited for physiological applications. This precludes the use of trypsin for the removal of cell-surface-bound peptides before cytometry analysis (see below).

**Cellular Uptake of  $\gamma$ -Peptides.** The general idea that hydrophilic macromolecules penetrated cells by a classical endocytotic mechanism is extended.<sup>32,33</sup> These molecules are segregated into different endosomal compartments by the cell for their recycling or destruction, a fact that can hinder liberation of cargo in the cytoplasm.<sup>34</sup> In contrast, initial reports suggested that CPPs penetrate cells by an energy-independent route, and studies on the cellular entry of pAntp, Tat-derived peptides and VP22 reported that a nonclassical receptor, transporter, or endocytosis-mediated mechanism seemed to be involved.<sup>35–38</sup> These findings would suggest that the CPPs translocate membranes via an energy-independent mechanism. Nevertheless, recent reevaluations of the cellular translocation of some CPPs and cargo-conjugate CPPs suggest that endocytosis is indeed the primary internalization mechanism.<sup>39,40</sup> Thus, the exact nature of the mechanism of CPP across the cellular membrane remains unknown, as controversies exist among different studies

published in the literature.<sup>12,41,42</sup> Despite some common features of CPPs, particularly their cationic nature, their structural diversity has fuelled the idea that the mechanisms that allow them to cross the membrane are not the same for CPPs of different types.<sup>43</sup>

A preliminary evaluation of the cellular uptake of the different  $\gamma$ -peptides was carried out in COS-1 and HeLa cells using plate fluorimetry. Cells grown on 96-well plates were incubated with a range of 0.01 to 25  $\mu$ M of CF-peptide at 37 °C or 4 °C. After 2 h of incubation, CF-peptide containing medium was discarded and fluorescence was measured as described in the methods section. As shown in Figure 2A and B, peptide **4a** was the most efficient at crossing the cell membranes of COS-1 and HeLa cells at 37 °C. The fluorescence levels of cells incubated with peptide **4a** were significant in the case of HeLa cells and were higher for COS-1 cells. In addition, peptides **1**, **2**, **3**, and **5** were also taken up by both cell types, but the cells incubated with these CF-peptides fluoresced 6 to 10 times less than those incubated with peptide **4a**. Similar results were obtained when the uptake experiments were performed for 8 h (see Supporting Information). To determine if the uptake mechanism of these peptides was energy-dependent, the same experiments were carried out at 4 °C (Figure 2C). Under these conditions, only peptide **4a** and, to a lesser degree, peptide **5** were taken up at a significant rate by HeLa cells. This result seemed to indicate that peptides **4a** and **5** entered into the cells via an energy-independent mechanism, although the possibility of the peptide binding to the plastic surface or to the cell membrane was not totally excluded. Evidence for these phenomena was observed in control wells (wells devoid of cells) and has been described in other studies.<sup>44</sup> Similar results to those obtained with peptide **4a** were previously obtained with peptide **4** (see Supporting Information). Having completed the aforementioned experiments, flow cytometry was then used to differentiate peptide uptake from cell surface and/or plastic surface binding.

To get a more precise view of the behavior of the  $\gamma$ -peptide derivatives, new cell uptake experiments in COS-1 cells using flow cytometry were performed. In our opinion flow cytometry provides more reliable quantitative data than plate fluorimetry. The main source of imprecision in plate fluorimetry when measuring the cell uptake of highly hydrophobic compounds such as peptide **4a** is an artifactual increase in the apparent uptake caused by nonspecific binding of the ligand to the plastic surface of the plate.<sup>44</sup> Although the preliminary flow cytometry experiments were carried out using the entire set of  $\gamma$ -peptides, focus was ultimately shifted on the two most promising compounds, **4a** and **5**, employing the well-known cell-penetrating peptide TAT 49–57 (CF-RKKRRQRRR-NH<sub>2</sub>) as a positive control. Flow cytometry analysis can quantify cellular association of CF-tagged peptides excluding any unspecific binding of the peptides to the plastic surface of the plate. Although the uptake levels of peptides **4a** and **5** were lower than those found using plate fluorimetry, suggesting that they had been partially bound to the plate plastic, Figure 3A illustrates that the compounds were indeed internalized by COS-1 cells. Peptide **4a** was taken up very efficiently by COS-1 cells and even

(30) While PEG increased peptide solubility notably, the peptide precipitates at concentrations higher than 500  $\mu$ M.

(31) Fischer, R.; Mader, O.; Jung, G.; Brock, R. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 653–660.

(32) Mhukerjee, S.; Ghosh, R. N.; Maxfield, F. R. *Phys. Rev.* **1997**, *77*, 759–803.

(33) Fischer, R.; Köhler, K.; Fotin-Mleczek, M.; Brock, R. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 12625–12635.

(34) Maiolo, J. R., III.; Ottinger, E. A.; Ferrer, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15376–15377.

(35) Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444–10450.

(36) Vivès, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010–16017.

(37) Derossi, D.; Calvet, S.; Trembleau, A.; Brunissen, A.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18188–18193.

(38) Elliott, G.; O'Hare, P. *Cell* **1997**, *88*, 223–233.

(39) Drin, G.; Cottin, S.; Blanc, E.; Rees, A. R.; Tamsamani, J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31192–31201.

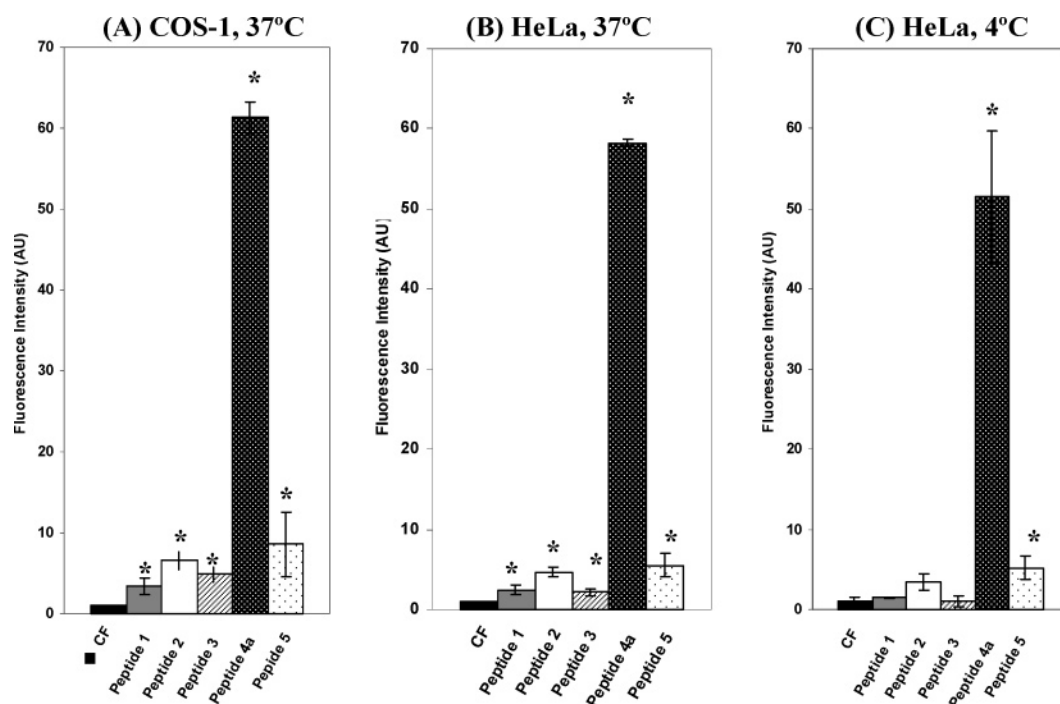
(40) Richard, J. P.; Melikov, K.; Vives, E.; Ramos, C.; Verbeure, B.; Gait, M. J.; Chernomordik, L. V.; Lebleu, B. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 585–590.

(41) Thorén, E. G.; Persson, D.; Isakson, P.; Goksör, M.; Önfelt, A.; Nordén, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *307*, 100–107.

(42) Vives, E. *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 265–271.

(43) Zorko, M.; Langel, Ü. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 529–545.

(44) Chico, D. E.; Given, R. L.; Miller, B. T. *Peptides* **2003**, *24*, 3–9.



**Figure 2.** Fluorimetry quantification of the cellular uptake of different peptides tested (A) in COS-1 cells and (B and C) in HeLa cells. Cells were incubated with the peptide at a final concentration of  $10 \mu\text{M}$  for 2 h at  $37^\circ\text{C}$  (A and B) and at  $4^\circ\text{C}$  (C). Results were normalized by subtracting the autofluorescence control value and dividing by the CF-fluorescence value for the same experiment. Error bars represent standard deviation (SD) from the mean value of three independent experiments of each condition. \*, significant  $p < 0.05$ .

seemed to be taken up at  $4^\circ\text{C}$ , while peptide **5** was internalized less, especially at  $4^\circ\text{C}$ . In comparison with **TAT** peptide, cells incubated with peptide **4a** fluoresced 3.5 times less than those incubated with **TAT**.

Flow cytometry does not, however, discriminate between extracellular membrane-bound and internalized CF-peptide. To determine if there was any contribution of surface-bound CF-peptides in the peptide uptake measurements, we performed additional flow cytometry experiments. The treatment of cells with trypsin in order to remove cell-surface-bound peptide before flow cytometry analysis has been reported.<sup>40</sup> However,  $\gamma$ -peptides are not trypsin-sensitive as discussed above; hence enzymatic digestion could not be employed. An alternative method based on the pH-dependence of 5(6)-carboxyfluorescein fluorescence emission in receptor-endocytosis studies has been previously described.<sup>45</sup> As shown for COS-1 cells incubated with CF-peptide **4a** (Figure 3B) or with **TAT** peptide (Figure 3C) for 2 h, flow cytometry analysis revealed that the amount of fluorescence was very similar at pH 7.4 and pH 6. Only a small decrease of the fluorescence was observed in both peptide **4a** and **TAT** peptide, indicating that the fluorescence detected by the cytometer was mainly due to internalized peptides.<sup>46</sup>

A cell uptake time-course experiment in COS-1 cells was also carried out for peptide **4a**. The progressive increase uptake of peptide **4a** demonstrated that it was endocytocized by the cells, as opposed to having attached to the membrane, a process

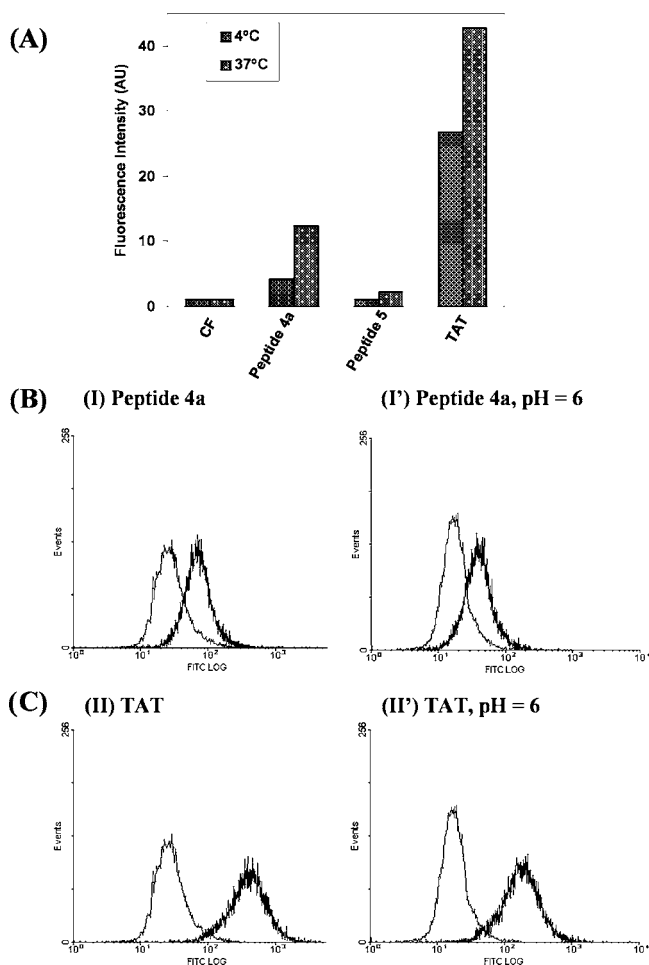
that occurs rapidly and is temperature-independent (see Supporting Information).

**Intracellular Distribution of  $\gamma$ -Peptides.** The intracellular distribution of CF-peptides was examined by confocal microscopy in both fixed and unfixed COS-1 cells recording optical sections that allowed 3D reconstruction of the cell. The carboxyfluoresceinated peptides were located inside the cells and were not attached to the membrane. Figure 4 shows the distribution of each CF-peptide tested in fixed COS-1 cells costained with the nucleic acid marker PI. In cells treated with peptides **1**, **2**, and **3** at  $37^\circ\text{C}$ , a slight vesicular distribution of the peptides was observed. No differences with the CF were observed when cells were incubated with these peptides at  $4^\circ\text{C}$  (data not shown). This vesicular distribution, similar to the localization of the endocytotic marker used (Figure 5), together with the results obtained at  $37^\circ\text{C}$  and  $4^\circ\text{C}$ , suggested that an endocytotic mechanism was involved. However, peptides **5** and **TAT** were found throughout the cytoplasm and in the nuclei of the cells with no punctuated pattern observed. Similar distribution of both peptides was found when cells were incubated at  $4^\circ\text{C}$  (data not shown). In those cells treated with peptide **4a**, a similar but more intense punctuated distribution was observed, as well as a diffuse distribution throughout the cytoplasm.

It has recently been reported that cellular distribution of **TAT** can vary for live or paraformaldehyde-fixed cells.<sup>12</sup> Confocal microscopy pictures of **TAT** internalized in paraformaldehyde-fixed cells show distribution in the nucleus and endocytotic vesicles of the cytoplasm, whereas live-cell pictures suggest that endocytosis is the predominant uptake mechanism of this peptide. The difference in cellular distribution can be attributed to fixation of the cells with paraformaldehyde. Arginine-rich

(45) Chambers, J. D.; Simon, S. I.; Berger, E. M.; Sklar, L. A.; Arfors, K. E. *J. Leukoc. Biol.* **1993**, *53*, 462–469.

(46) A minor contribution from any unquenched residual carboxyfluoresceinated peptide attached to the membrane at pH 6 could still exist (at pH 6 around the 80% of the carboxyfluorescein fluorescence is quenched), and as a consequence, only a small amount of fluorescence could be due to the cell-surface-bound peptides. These experiments could not be carried out at a pH lower than 5–5.5 (where carboxyfluorescein is completely quenched) because of the rapid cell death observed under our experimental conditions.



**Figure 3.** (A) Cell uptake quantification of peptides **4a**, **5**, and **TAT** with flow cytometry at 4 and 37 °C (10  $\mu$ M, 2 h). Although the uptake levels of **4a** and **5** peptides were lower than those found by plate fluorimetry, the results demonstrate that they were indeed taken up by COS-1 cells. (B and C) Flow cytometry analysis to quantify cellular association of CF-tagged peptides while avoiding nonspecific plastic surface binding of the peptide. To quantify plasmonic-membrane-attached peptide ((B) for peptide **4a** and (C) for **TAT** peptide), fluorescence of CF-peptide-incubated COS-1 cells (10  $\mu$ M, 2 h, 37 °C) was measured by flow cytometry before (I, II) and after (I', II') acidic buffer (pH = 6) quench of extracellular fluorescence. Graphics B and C have the peptide quantification and the corresponding CF negative control.

peptides such as **TAT** and (Arg)<sub>9</sub> arbitrarily redistribute in the nucleus in some common cell fixation protocols.<sup>12</sup>

To determine whether the CF-peptides were actually endocytosed or if they diffused across the cell membrane, time-course uptake experiments using the fluid-phase endocytotic marker Texas Red-Dextran (TR-DX) were performed. HeLa cells were simultaneously incubated with CF-peptides (10  $\mu$ M, 37 °C) and the endocytotic marker TR-DX. Figure 5 shows results obtained when cells were incubated with two distinct peptides (peptides **2** and **4a**) for 15 min or 2 h at 37 °C. To avoid formaldehyde-induced changes in their distribution, confocal images of live cells were obtained. As shown in the upper panel of Figure 5, even after 15 min of incubation, peptide **2** almost totally colocalized with TR-DX, indicating a fluid-phase endocytosis mechanism. In contrast, peptide **4a** had also colocalized in TR-DX-containing vesicles after 15 min of incubation, but it was also distributed in the nuclei and the cytoplasm. After 2 h of incubation, there were more vesicles

containing both peptide **4a** and TR-DX, but they were more concentrated in the perinuclear area of the cells. Cytoplasmic and punctuated or vesicular distribution of peptide **4a** was also observed. Similar results were obtained when the same experiments were carried out in COS-1 cells (see Supporting Information). Although peptide **4a** does not concentrate exclusively in vesicular structures, it cannot be stated that it translocates across the cell membrane. An alternative explanation could be that peptide **4a** was taken up by endocytosis and later released from the vesicles into the cytoplasm in a manner similar to that which has been demonstrated for the human antimicrobial peptide LL-37<sup>47</sup> and other cell-penetrating peptides.<sup>48</sup>

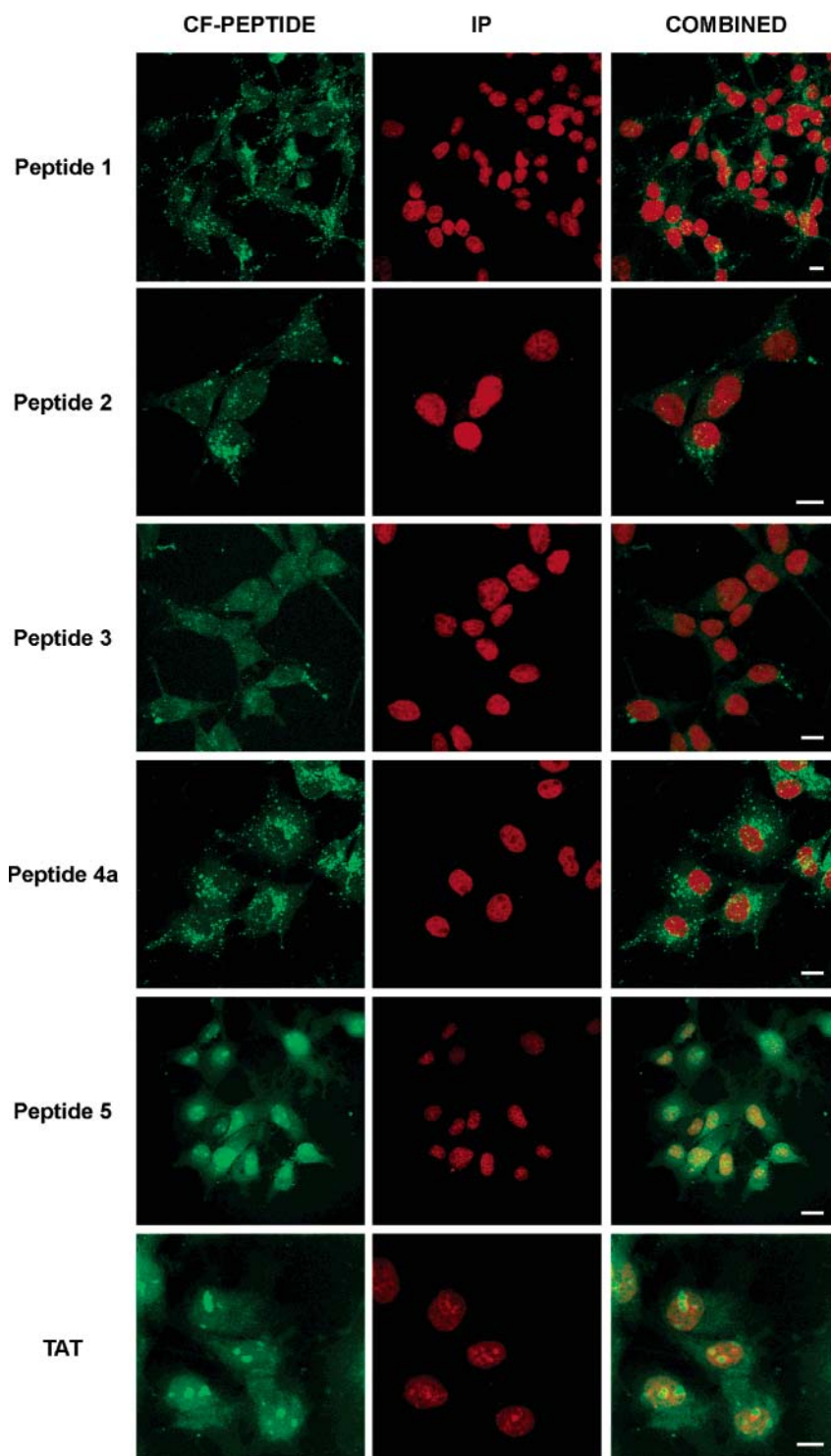
**Cytotoxicity of  $\gamma$ -Peptides.** Cell viability assays were performed to determine the toxicity of the proline derived  $\gamma$ -peptides (Figure 6). The toxicities of each of the peptides to COS-1 and HeLa cells were determined by MTT assays and estimated to be lower than that of **TAT** peptide at the same concentration. The viability of COS-1 cells after their treatment with  $\gamma$ -peptides for 24 h was always higher than 95%, even at the highest concentration used (25  $\mu$ M). Only peptide **5** exhibited slight cytotoxicity at 25  $\mu$ M (89–92%) in HeLa cells. The viability of COS-1 cells after 2 h of incubation with **TAT** peptide was reduced even when cells were treated at lower concentrations (viability at 1  $\mu$ M was 81  $\pm$  2% and at 25  $\mu$ M was 70  $\pm$  2%). Similar results were observed when cells were incubated at concentrations up to 500  $\mu$ M with  $\gamma$ -peptides **1**, **2**, **3**, and **4a** for 2 and 8 h (data not shown).

### Concluding Remarks

These results reveal that peptides with the same proline mimetic skeleton but distinct side chains are taken up into cells via different mechanisms. Although proline has a hydrophobic skeleton, proline-rich peptides are surprisingly soluble in water as well as a broad range of organic solvents.  $\gamma$ -Amino-L-proline has an extra amino group (in the  $\gamma$  position of the proline) which makes it more hydrophilic than the corresponding natural parent amino acid. While the different  $\gamma$ -peptide constructs share a common part (the cyclic proline backbone), they vary in the type and linkage of their side chains, which can be hydrophobic or hydrophilic. Hence the combination of skeleton, side chain type, and side chain linkage endows each peptide with a distinct hydrophobic or hydrophilic character. Peptide **2** is thus clearly hydrophobic due to the combination of a hydrophobic skeleton and the noncharged side chain linkage to its backbone. Peptides **1**, **3**, **4**, **4a**, and **5** can be considered special amphipathic peptides as a result of their backbone and their charged side chain linkages. In all cases, the side chain hydrophobicity determines the cell uptake properties. Hydrophobic peptides are typically associated with passive diffusion while hydrophilic and amphipathic peptides can move by both endocytosis and passive diffusion. Examples of the latter phenomena include the hydrophilic peptide **TAT** and the amphipathic peptide penetratin, which are endocytosed by the cell (a mechanism that is inhibited by peptide incubation at low temperature), while passive diffusion of these compounds through the lipid bilayer at a biologically meaningful rate seems unlikely (although an alternative mechanism cannot be totally excluded). The  $\gamma$ -pep-

(47) Sandgren, S.; Wittup, A.; Cheng, F.; Jönsson, M.; Eklund, E.; Busch, S.; Belting, M. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17951–17956.

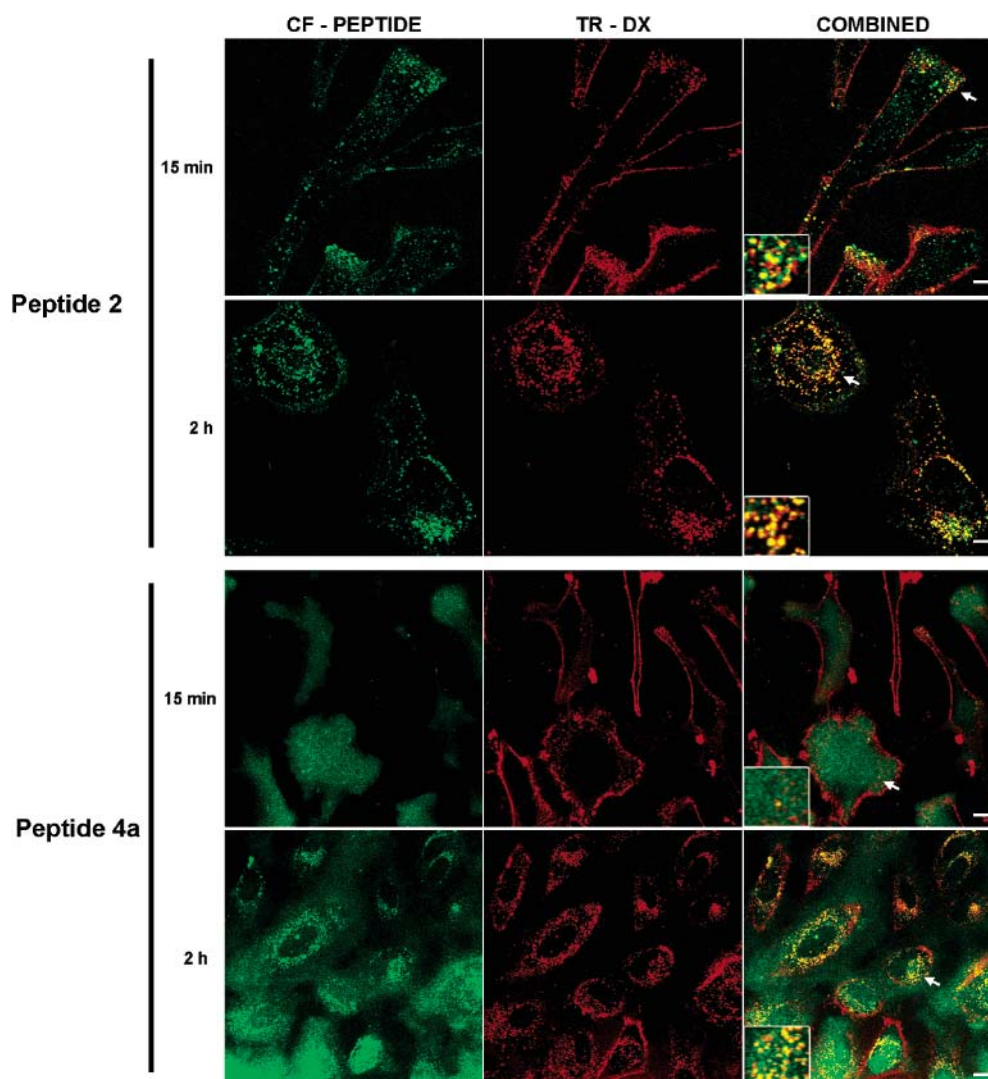
(48) Foerg, C.; Ziegler, U.; Fernandez-Carneado, J.; Giralt, E.; Rennert, R.; Beck-Sickingler, A. G.; Merkle, H. P. *Biochemistry* **2005**, *44*, 72–81.



**Figure 4.** Confocal images of COS-1 cells illustrating the internalization of all peptides tested. After 2 h of incubation with peptides (10  $\mu$ M), cells were fixed with 3% PF and nuclei were stained with IP. Scale bars, 10  $\mu$ m.

tides synthesized for this work are remarkably amphipathic; they can enter into the cell following both mechanisms depending on the contribution of the side chains to hydrophobicity in the secondary structure. Thus, CF-peptide incubation in both COS-1 and HeLa at 4 °C cells suggest that some of the  $\gamma$ -peptides (**4a**, and to a lesser degree, **5**) can translocate across the cell membrane, indicating that the internalization process of **4a** and **5** is not completely dependent on the endosomal pathway. A possible explanation for these results is that the  $\gamma$ -peptide family

is capable of cellular internalization via different mechanisms. While all of the compounds can be endocytocized by the cell, peptides **4a** and **5** can also translocate across the cell membrane (passive diffusion), suggesting that at least two different mechanisms are involved in the entry of these peptides. When peptide **4** was modified with a PEG tail in order to improve its solubility at physiological pH, the resulting analogue (peptide **4a**) exhibited increased solubility and conserved cellular uptake.



**Figure 5.** Live-cell imaging of CF-peptide uptake. Internalization experiments of CF-peptide ( $10 \mu\text{M}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) in HeLa cells were carried out with the fluid-phase (endocytotic) marker Texas Red-Dextran (TR-DX). xy confocal sections obtained from the middle part of cells. Scale bars,  $10 \mu\text{m}$ . Inserts:  $3.2\times$ .

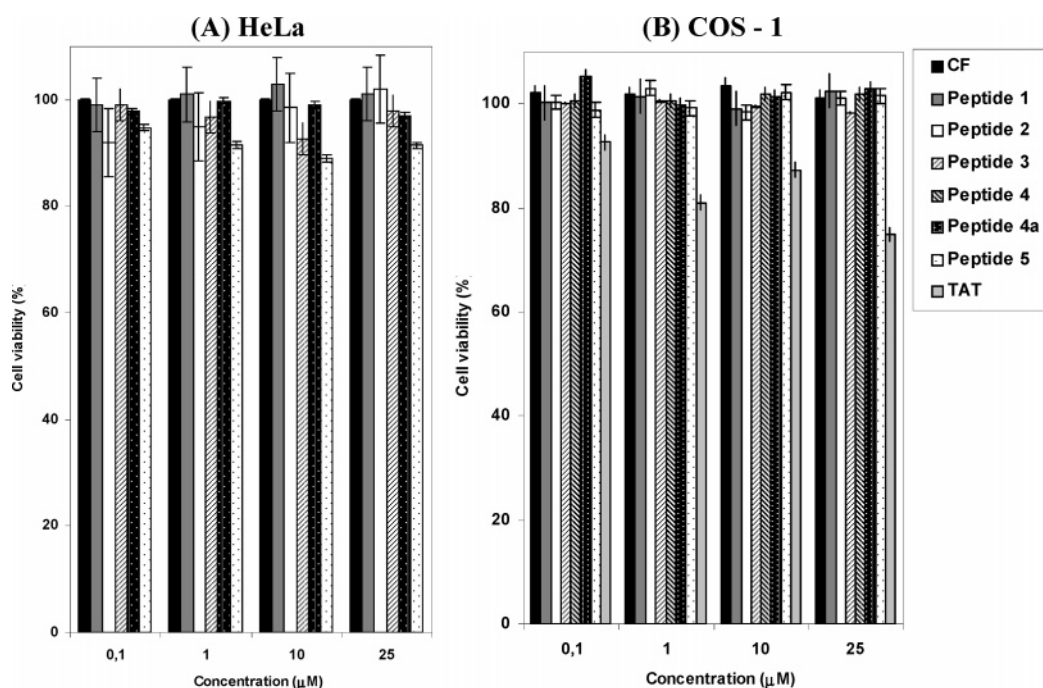
With respect to subcellular localization, confocal microscopy revealed that all of the peptides congregate in the cytoplasm, distribute throughout vesicles when incubated at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  (peptides **1**, **2**, **3**, **4a**, and **5**), or are widespread in the cytoplasm when they are incubated at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (peptides **4a** and **5**). This punctuated distribution implies that the  $\gamma$ -peptide family is endocytocized at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Furthermore, the widespread pattern found in the cytoplasm at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  for peptides **4a** and **5** suggests that either they translocate across the cell membrane or they are taken up by endocytosis and thereafter escape from the vesicles, being released to the cytoplasm. The translocation observed in the flow cytometry quantifications at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  reinforced the idea that peptide **4a** could translocate across the cell membrane. In conclusion, two different routes seem to be involved in the transduction mechanism of peptide **4a**, including endocytosis and another energy-independent mechanism. Nevertheless, the possibility that the  $\gamma$ -peptides enter into the cell via endocytosis and are thereafter released from the vesicles into the cytoplasm cannot be completely excluded.

Furthermore, peptides **4a** and **5** apparently reached the nucleus, suggesting that they could be used in the delivery of molecules that act in the nucleus. Even though these peptides

were not taken up in cells to the degree of TAT peptide, they offer certain advantages. While TAT peptide, as consistent with literature reports,<sup>49</sup> exhibited cytotoxicity even at low concentrations,  $\gamma$ -aminoproline oligomers were nontoxic at concentrations up to  $500 \mu\text{M}$  and only peptide **5** exhibited slight cytotoxicity. Furthermore,  $\gamma$ -peptide oligomers appear to be protease-resistant as deduced from the results of experiments in the presence and absence of serum proteases. This fact has been proven by analyzing the protease stability of peptide **4a** in human serum by HPLC.

Although various cell-membrane translocating peptidomimetics have been reported (e.g.,  $\beta$ -peptides), this is the first communication of a  $\gamma$ -peptide family with said capability. The aforementioned compounds are among the smallest cell-penetrating peptidomimetics described to date, and their low toxicity, proteolytic stability and, in general, good aqueous solubility suggest their potential utility as agents for drug delivery.  $\gamma$ -Amino-L-proline is a very convenient building block for the preparation of these cell-penetrating  $\gamma$ -peptides. The use

(49) Pooga, M.; Elmquist, A.; Langel, Ü. In *Cell-penetrating peptides, Processes and applications*; Langel, Ü., Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida, 2002; Chapter 11, pp 245–261.



**Figure 6.** Cytotoxicity of different  $\gamma$ -peptides as monitored in (A) HeLa and (B) COS-1 cell lines. Cell death was quantified using the MTT assay after 1 day of incubation using different peptide concentrations.

of two orthogonal protecting groups for both amino functionalities of the building block leads to a flexible synthetic strategy for diverse substituted  $\gamma$ -peptides, providing the possibility of incorporating a covalently linked drug in the last step of the synthesis. With the hope of gaining a better understanding of the translocation of peptides across cell membranes, the synthesis of new analogues employing a wide range of functional groups is in progress.

## Experimental Section

**Materials and Methods.** Protected amino acids were obtained from Neosystem (Strasbourg, France), and MBHA resin (0.7 mmol/g) was supplied by Calbiochem-Novabiochem AG. Diisopropylcarbodiimide (DIC) was obtained from Fluka Chemika (Buchs, Switzerland) and HOBt from Luxembourg (Tel Aviv, Israel). 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) was obtained from Acros (New Jersey, USA). Solvents for peptide synthesis and RP-HPLC equipment were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). Trifluoroacetic acid was supplied by KaliChemie (Bad Wimpfen, Germany). Other chemicals were obtained from Aldrich (Milwaukee, WI) and were of the highest commercially available purity. All commercial reagents and solvents were used as received. HF was obtained from Air Products and Chemicals, Inc. (Allentown, Canada), and related equipment was obtained from Peptide Institute Inc., Minoh, Osaka, Japan. Analytical RP-HPLC was performed using Waters (Milford, MA) chromatography systems with reversed-phase Symmetry C<sub>18</sub> (150 × 4.6 mm<sup>2</sup>) 5  $\mu$ m columns with UV detection at 220 nm. Semipreparative RP-HPLC was performed on a Waters (Milford, MA) chromatography system using Symmetry C<sub>8</sub> (3 × 10 cm<sup>2</sup>, 5  $\mu$ m) columns. Compounds were detected by UV absorption at 220 nm. Mass spectra were recorded on a MALDI Voyager DE RP time-of-flight (TOF) spectrometer (Applied Biosystems, Framingham). DHB was used as a matrix and was purchased from Aldrich.

**General Procedures. Solid-Phase Synthesis.** The synthesis of peptides for this work employed a combined Fmoc/Boc solid phase strategy on MBHA resin. Peptide syntheses were performed manually in a polypropylene syringe fitted with a polyethylene porous disk. Solvents and soluble reagents were removed by suction. Washings

between deprotection, coupling, and subsequent deprotection steps were carried out with DMF (5 × 1 min) and DCM (5 × 1 min) using 10 mL of solvent/g of resin for each wash.

**Fmoc Group Removal.** (i) DMF (5 × 1 min); (ii) piperidine/DMF (2:8) (1 × 1 min + 2 × 15 min); (iii) DMF (5 × 1 min).

**Boc Group Removal.** (i) DCM (5 × 1 min); (ii) TFA/DCM (4:6) (1 × 1 min + 1 × 30 min); (iii) DCM (5 × 1 min); (iv) DIEA/DCM (5:95) (3 × 3 min); (v) DCM (5 × 1 min).

**Solid-Phase  $\gamma$ -Peptide Backbone Elongation.** All syntheses were carried out with MBHA resin (1 g) by an Fmoc/Boc combined solid-phase strategy. Couplings of Boc-Amp(Fmoc)-OH (1.58 g, 5 equiv) were carried out with DIC (540  $\mu$ L, 5 equiv) and HOBt (472 mg, 5 equiv) in DMF for 2 h at 25 °C. The resin was washed with DMF (5 × 1 min) and DCM (5 × 1 min) after each coupling. Couplings were monitored by the Kaiser test.<sup>50</sup>

In the synthesis of peptide **4a**, 2 equiv of Fmoc-8-amine-3, 6-dioxaoctanoic acid were first coupled to the resin using the same coupling reagents mentioned above. Peptide synthesis then continued for **4a** as described for the other compounds.

**Synthesis of Homo  $N^{\alpha}$ -Acyl- $\gamma$ -hexapeptides.** After the  $N^{\alpha}$ -Boc groups had been removed, acylation of the  $\alpha$ -amino groups was carried out using RCOOH (30 equiv, 5 equiv for each amine), DIC (540  $\mu$ L, 30 equiv) and HOBt (472 mg, 30 equiv) in DMF for 2 h at 25 °C. The resin was washed with DMF (5 × 1 min) and DCM (5 × 1 min). The acylation was monitored by the chloranil test.<sup>51</sup>

**Synthesis of Homo  $N^{\alpha}$ -Alkyl- $\gamma$ -hexapeptides.** After the  $N^{\alpha}$ -Boc groups had been removed, alkylation of the  $\alpha$ -amino group was performed by on-resin reductive amination using RCHO (30 equiv, 5 equiv for each amine) in 1% HOAc in DMF for 30 min and then treating the resin with NaBH<sub>3</sub>CN (232 mg, 30 equiv) in MeOH for 2 h. After that, the resin was washed with DMF (5 × 1 min) and DCM (5 × 1 min). The alkylation was monitored by the chloranil test.

**Synthesis of Hetero  $N^{\alpha}$ -Alkyl- $\gamma$ -hexapeptides.** Once the monomer had been introduced by coupling of the corresponding protected

(50) The  $\gamma$ -amino functions of the resin-bound building blocks give a clear positive Kaiser ninhydrin test; hence the test is useful for controlling the synthesis of these kinds of peptides. Kaiser, E.; Colecott, R L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 594–598.

(51) Christensen, T. *Acta Chem. Scand.* **1979**, *33*, 760–766.

monomer, the  $N^{\alpha}$ -Boc protecting group was removed and the alkylation was performed as above. After removal of the  $N^{\gamma}$ -Fmoc protecting group, the reactive sequence was repeated.

**Synthesis of  $N^{\alpha}$ -Guanidyl- $\gamma$ -hexapeptide.** After the  $N^{\alpha}$ -Boc groups had been removed, peptide **5** was guanidylated using  $N,N'$ -di-Boc- $N''$ -trifluoromethanesulfonyl guanidine<sup>52</sup> (5 equiv) and Et<sub>3</sub>N (5 equiv) in DCM for 4 days at room temperature. After the reaction, the resin was washed with DCM (5  $\times$  1 min). The guanidilation was monitored by the chloranil test.

**5(6)-Carboxyfluorescein  $N^{\gamma}$ -Terminal Labeling.** CF was coupled to the  $N^{\gamma}$ -terminal group using DIC/HOBt (5 equiv/5 equiv) for 2 h. To avoid over incorporation of CF, two 30-min treatments with 20% piperidine–DMF were carried out before the cleavage of the peptide from the resin.<sup>31</sup>

**Acidolytic Cleavage with HF.** The peptide resin was washed with MeOH (3  $\times$  1 min), dried, and treated with HF in the presence of 10% anisole for 1 h at 0 °C. Peptides were precipitated with cold anhydrous MTBE, dissolved in HOAc, and then lyophilized.

**CF-( $\gamma$ Amp)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (1):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient (from 0 to 20% of MeCN in 30 min) of MeCN (containing 1% of TFA) and H<sub>2</sub>O (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed that the peptides were 99% pure. MS calcd for C<sub>51</sub>H<sub>61</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 1048.11. MALDI-TOF found: 1048.38 [M + H]<sup>+</sup>, 1070.45 [M + Na]<sup>+</sup>, and 1086.37 [M + K]<sup>+</sup>.

**CF-[ $\gamma$ Amp( $N^{\alpha}$ -Ac)]<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (2):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient (from 20 to 80% of MeCN in 30 min) of MeCN (containing 1% of TFA) and H<sub>2</sub>O (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed that the peptides were 96% pure. MS calcd for C<sub>63</sub>H<sub>73</sub>N<sub>13</sub>O<sub>18</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 1300.33. MALDI-TOF found: 1301.22 [M + H]<sup>+</sup>, 1322.23 [M + Na]<sup>+</sup>, and 1338.21 [M + K]<sup>+</sup>.

**CF-[ $\gamma$ Amp( $N^{\alpha}$ -Me)]<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (3):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient (from 0 to 20% of MeCN in 30 min) of MeCN (containing 1% of TFA) and H<sub>2</sub>O (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed that the peptides were 95% pure. MS calcd for C<sub>57</sub>H<sub>73</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 1132.26. MALDI-TOF found: 1131.60 [M + H]<sup>+</sup> and 1153.63 [M + Na]<sup>+</sup>.

**CF-[ $\gamma$ Amp( $N^{\alpha}$ -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)- $\gamma$ Amp( $N^{\alpha}$ -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph)]<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (4):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient (from 0 to 50% of MeCN in 30 min) of MeCN (containing 1% of TFA) and H<sub>2</sub>O (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed that the peptides were 99% pure. MS calcd for C<sub>90</sub>H<sub>115</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 1570.95. MALDI-TOF found: 1570.46 [M + H]<sup>+</sup> and 1592.91 [M + Na]<sup>+</sup>.

**CF-[ $\gamma$ Amp( $N^{\alpha}$ -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)- $\gamma$ Amp( $N^{\alpha}$ -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph)]<sub>3</sub>-PEG-NH<sub>2</sub> (4a):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient (from 0 to 40% of MeCN in 30 min) of MeCN (containing 1% of TFA) and H<sub>2</sub>O (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed that the peptides were 99% pure. MS calcd for C<sub>112</sub>H<sub>137</sub>N<sub>15</sub>O<sub>18</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 1861.26. MALDI-TOF found: 1863.18 [M + H]<sup>+</sup> and 1885.15 [M + Na]<sup>+</sup>.

**CF-[ $\gamma$ Amp( $N^{\alpha}$ -C(NH)(NH<sub>2</sub>))]<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (5):** The crude peptide was purified by preparative HPLC using a linear gradient (from 0 to 20% of MeCN in 30 min) of MeCN (containing 1% of TFA) and H<sub>2</sub>O (containing 1% of TFA). The purity of each fraction was verified by analytical HPLC and MALDI-TOF and showed that the peptides were 99% pure. MS calcd for C<sub>57</sub>H<sub>73</sub>N<sub>25</sub>O<sub>12</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 1300.35. MALDI-TOF found: 1302.01 [M + H]<sup>+</sup> and 1324.36 [M + Na]<sup>+</sup>.

**Cell Culture and Peptide Treatments.** HeLa and COS-1 cells were maintained in DMEM (1000 mg/mL glucose for HeLa and 4500 mg/mL for COS-1) culture medium (Biological Industries) containing 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, 50 u/mL penicillin, and 0.05 g/mL streptomycin. For all experiments, exponentially growing cells were detached from the culture flasks using a trypsin–0.25% EDTA solution, and the cell suspension was seeded at a concentration of 21.4  $\times$  10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup> onto plastic dishes, glass coverslips, 8-well Lab-Teck chambered coverglass or 96-well plates (Nalge Nunc International, Naperville, USA), depending on the experiment. Experiments were carried out 24 h later, at a confluence level of approximately 60%–70%. The carboxyfluoresceinated compounds were dissolved in PBS and sterilized with 0.22  $\mu$ m filters (Millex-GV, PVDF, Durapore, Millipore). The peptides and 5(6)-carboxyfluorescein stock solutions were diluted with the cell culture medium. Nonadherent cells were washed away and attached cells were incubated with the peptides in DMEM at 37 °C in CO<sub>2</sub> atmosphere or in 25 mM Hepes Buffered DMEM at 4 °C.

**Enzymatic Stability.** Enzymatic degradation using trypsin was carried out by incubation at 37 °C of peptide **4a** with the enzyme in 100 mM Tris-HCl at pH 8. The trypsin–peptide ratio was 1:100, using 3.43  $\mu$ L of a solution of trypsin from bovine pancreas E.C. 3.4.21.4 (Roche, Basel) in glycerol–H<sub>2</sub>O (1:1) (6.25 mg/mL). Aliquots (50  $\mu$ L) were periodically taken at 2 h to 120 h, 150  $\mu$ L of 1 N HCl were added, and the resulting solution cooled with ice. Degradation was monitored by HPLC.

Enzymatic degradation using human serum (Aldrich, Milwaukee) was carried out by incubation at 37 °C of peptide **4a** with the serum (diluted 9:1 in HBSS buffer). The ratio peptide–serum was 9, and peptide was used at a final concentration of 125  $\mu$ M (added to the serum dissolved). Aliquots (50  $\mu$ L) were periodically taken at 2 h to 120 h, poured into 200  $\mu$ L of MeOH to precipitate the proteins, and cooled on ice. After 30 min, the sample was centrifuged and the supernatant was analyzed by HPLC.

**Uptake Measurements by Plate Fluorimetry and Flow Cytometry.** COS-1 and HeLa cells were seeded onto 96-microwell plates at a concentration of 21.4  $\times$  10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup> for 24 h. The culture medium was discarded and replaced by new medium containing different CF-peptides concentrations (0.01  $\mu$ M, 0.05  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, and 25  $\mu$ M), using TAT peptide as a positive control and CF as a negative control. Cells were then incubated for 2 or 8 h at 4 °C and 37 °C. After incubation, cells were washed three times with PBS containing 1.1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, then lysed by adding 200  $\mu$ L of lysis buffer (0.1% Triton X-100 in 50 mM Tris, pH 8.5) to each well. Internalized peptides were quantified by measuring the fluorescence intensity of the supernatant using a FL600 microplate fluorescence reader (Bio-Tek). Fluorescence was measured at  $\lambda_{\text{excitation}} = 485/20$  nm and  $\lambda_{\text{emission}} = 530/25$  nm. Triplicates of each measurement were performed, and the fluorescence emitted from the blanks was subtracted.

To analyze the internalization of CF-peptides by flow cytometry, COS-1 and HeLa cells were seeded onto 35-mm plates at a concentration of 21.4  $\times$  10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>. After 24 h, cells were incubated with CF-peptides as previously described for fluorimetry assays. After various incubation times, cells were washed 3 times with PBS, detached with tripsine–EDTA 0.25%, centrifuged at 800  $\times$  g, and washed again. Finally, they were resuspended in PBS containing 0.1 mM of propidium iodide (PI). To remove fluorescence of CF or CF-peptides bound to the plasma membrane, the pH of the PBS/PI solution was brought down to 6 by the addition of 1 N HCl just before measuring fluorescence. At pH = 6, extracellular fluorescence of CF is quenched without altering cell mechanisms.<sup>45</sup>

Fluorescence analysis was performed with an Epics XL flow cytometer (Coulter). Cells stained with PI were excluded from further analysis. Triplicates of each sample were performed for each condition, and results from independent experiments were normalized by subtracting

(52) Feichtinger, K.; Zapf, C.; Sings, H. L.; Goodman, M. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3804–3805.

tion of the autofluorescence control value from each value and dividing by the fluorescence value obtained from the CF control under the same experimental conditions

**MTT Cytotoxicity Assay.**<sup>53</sup> The viability of COS-1 and HeLa cells in the presence of the peptides was tested using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. To avoid saturation in cell growth after 24 h of peptide incubation,  $7 \times 10^3$  cells/well were seeded on a 96-well plate (Nange Nunc) for each assay. After 24 h, the culture medium was discarded and replaced by a new medium containing different CF-peptide concentrations. Cells were incubated for 2 h, 8 h, and 24 h at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, and MTT (0.5 mg/mL) was added 2 h before the end of incubation. After 2 h of incubation with MTT, the medium was discarded by aspiration and 2-propanol was added to dissolve formazan, a dark blue colored crystal observed in the wells. Absorbance was measured at 570 nm in a spectrophotometric Elx800 Universal microplate reader (Bio-Tek), 30 min after the addition of 2-propanol. Cell viability is expressed as a percent ratio of cells treated with peptide to untreated cells, which were used as a control.

**Confocal Laser Scanning Microscopy.** COS-1 and HeLa cells were seeded onto glass coverslips at  $21.4 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> and, after 24 h, were incubated with CF-peptides as described above. For endocytosis experiments, Texas Red-Dextran (TR-DX, 3 mg/mL, MW = 10,000, Molecular Probes) was incubated together with CF-peptide. After

CF-peptide incubation, cells were washed 3 times with PBS and fixed in 3% para-formaldehyde–2% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 15 min, washed 3 times in PBS, and mounted in Mowiol with 2.5% DABCO. PI (1 µg/mL) staining was performed at room temperature for 15 min in the presence of RNAsa in PBS (1 mg/mL). As a fixation control, similar experiments were performed in cells plated onto glass bottom Lab-Tek chambers for live-cell imaging. After 2 h of incubation, cells were washed for 3 times with PBS containing 1.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, and 25 mM Hepes. Images were subsequently acquired within the next 30 min.

Confocal laser scanning microscopy was performed with an Olympus Fluoview 500 confocal microscope using a 60×/1.4 NA plan-apochromatic objective. The carboxyfluorescein fluorescence was excited with the 488-nm line of an argon laser, and its emission was detected in a range of 515–530 nm. The microscope settings were maintained identical for each peptide and dose. PI and TR-DX were excited at 543 nm and detected with a 560-nm long pass filter. To avoid crosstalk, the two-fluorescence scanning was performed in a sequential mode.

**Acknowledgment.** The work was partially supported by funds from CICYT (BQU2002-02047 and BQU2003-00089), the Generalitat de Catalunya (Grup Consolidat and Centre de Referència en Biotecnologia), and the Barcelona Science Park.

**Supporting Information Available:** HPLC chromatograms and supplemental confocal microscopy images. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acd.org> JA051648K

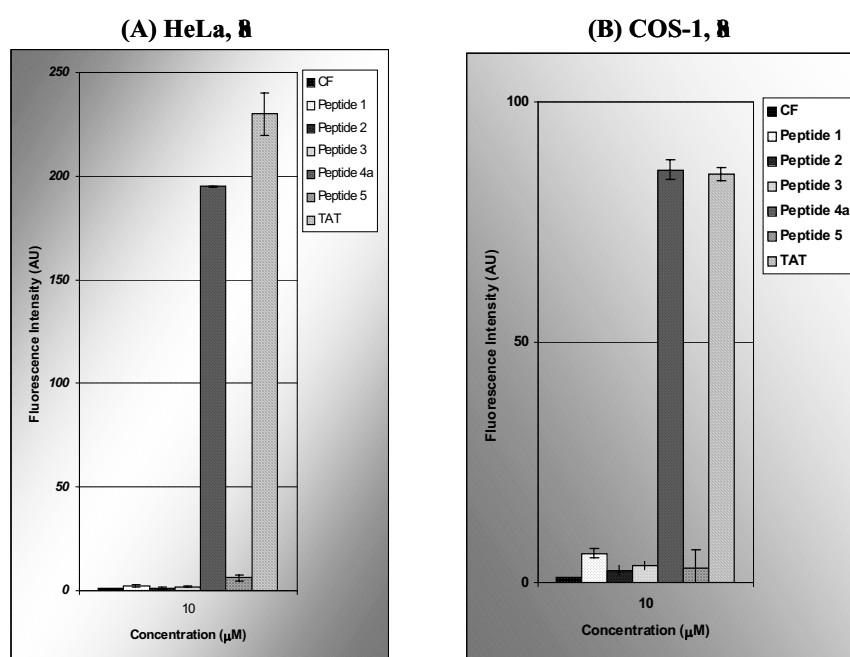
(53) (a) MTT-cell proliferation assay, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2nd ed.; Academic Press, 1998; Vol. 1. (b) Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction: Liu, Y.; Peterson, D. A.; Kimura, H.; Schubert, D. *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 581–593.



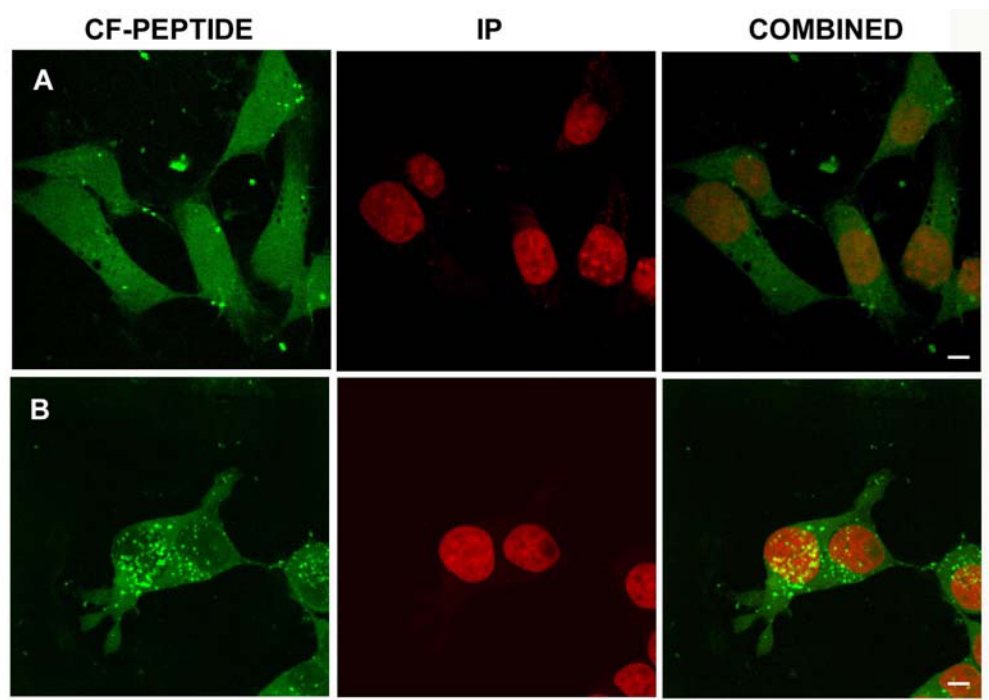
## Cell Penetrating *cis*- $\gamma$ -Amino-L-Proline Derived Peptides

Josep Farrera-Sinfreu, Ernest Giralt, Susanna Castel, Fernando Albericio, and Miriam Royo

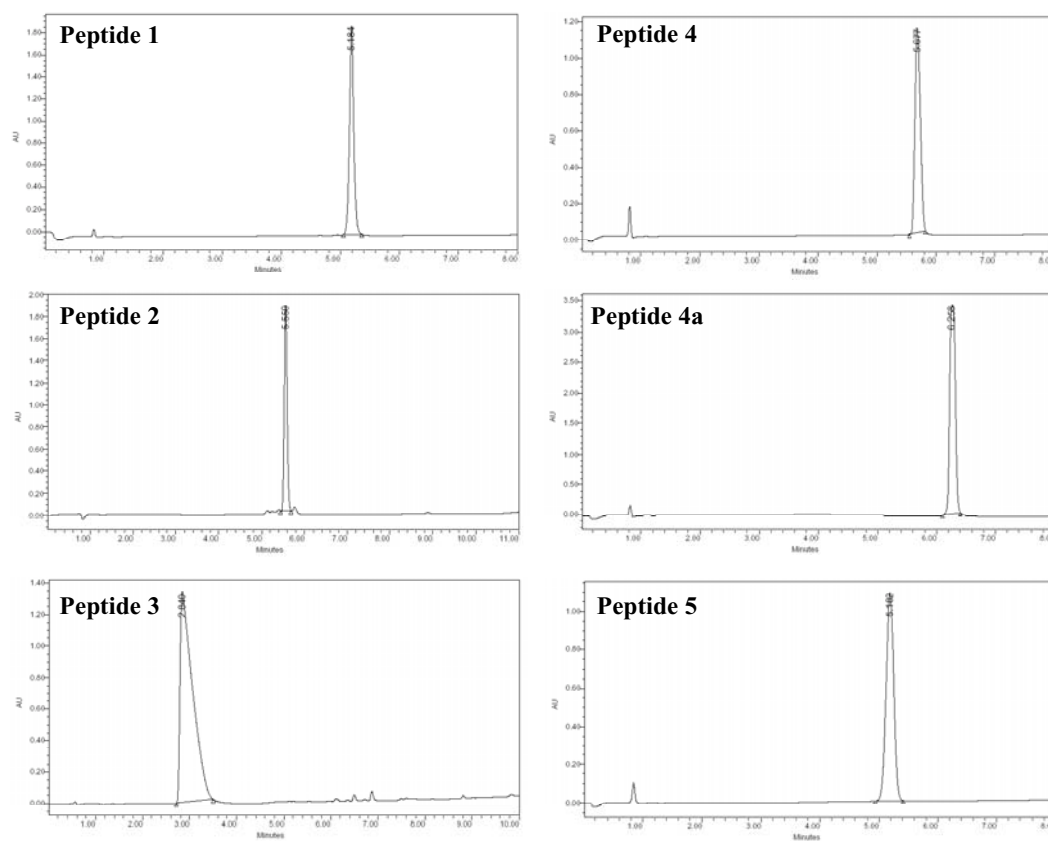
### Supporting Information



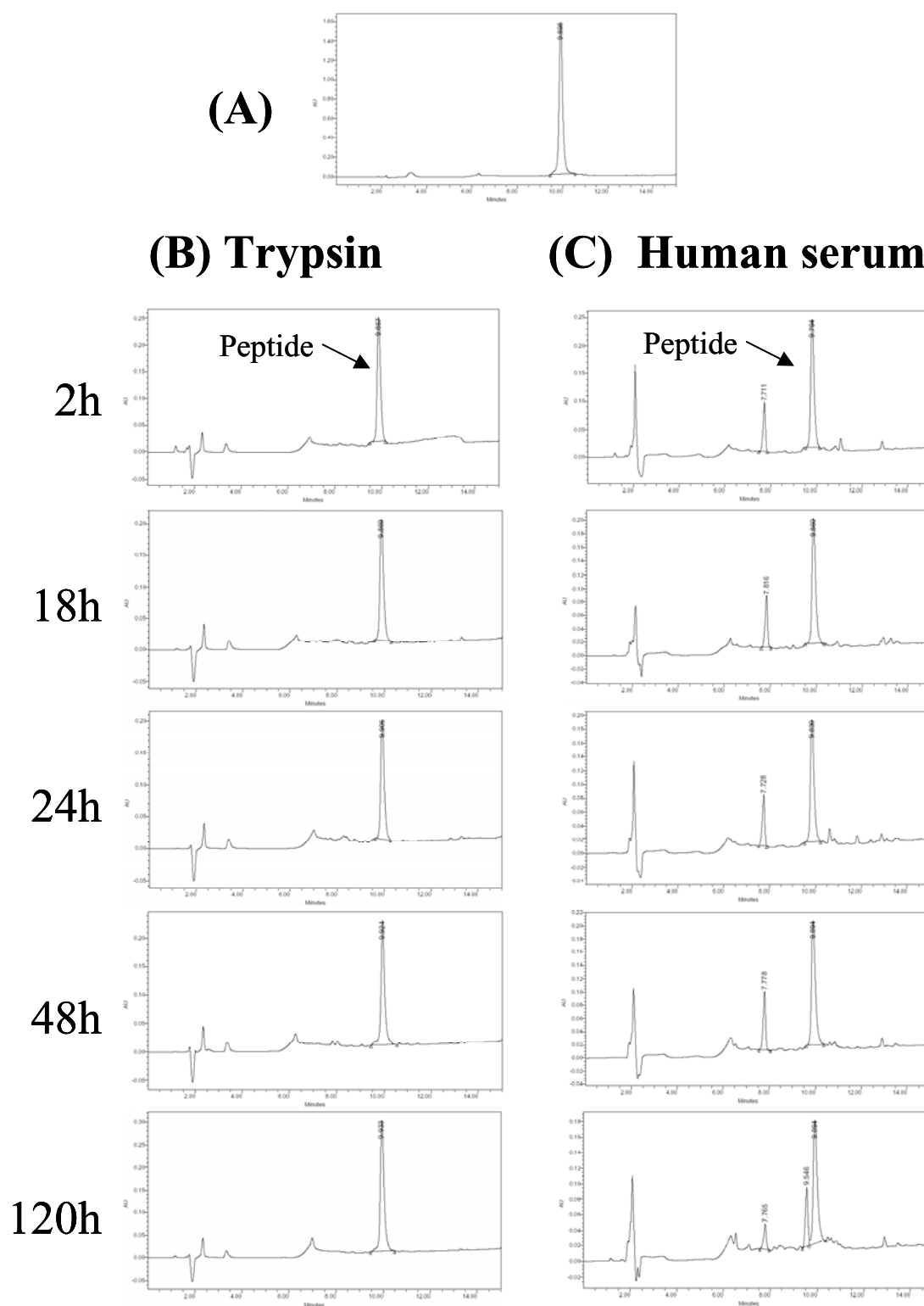
**Figure 1.** Fluorimetry quantification of the cellular uptake of different peptides tested (A) in HeLa cells and (B) in COS-1 cells at 37°C. Cells were incubated with the peptide at a final concentration of 10  $\mu\text{M}$  for 8 h. Results were normalized by subtracting the autofluorescence control value and dividing by the CF- fluorescence value for the same experiment. Error bars represent standard deviation (SD) from the mean value of three independent experiments of each condition.



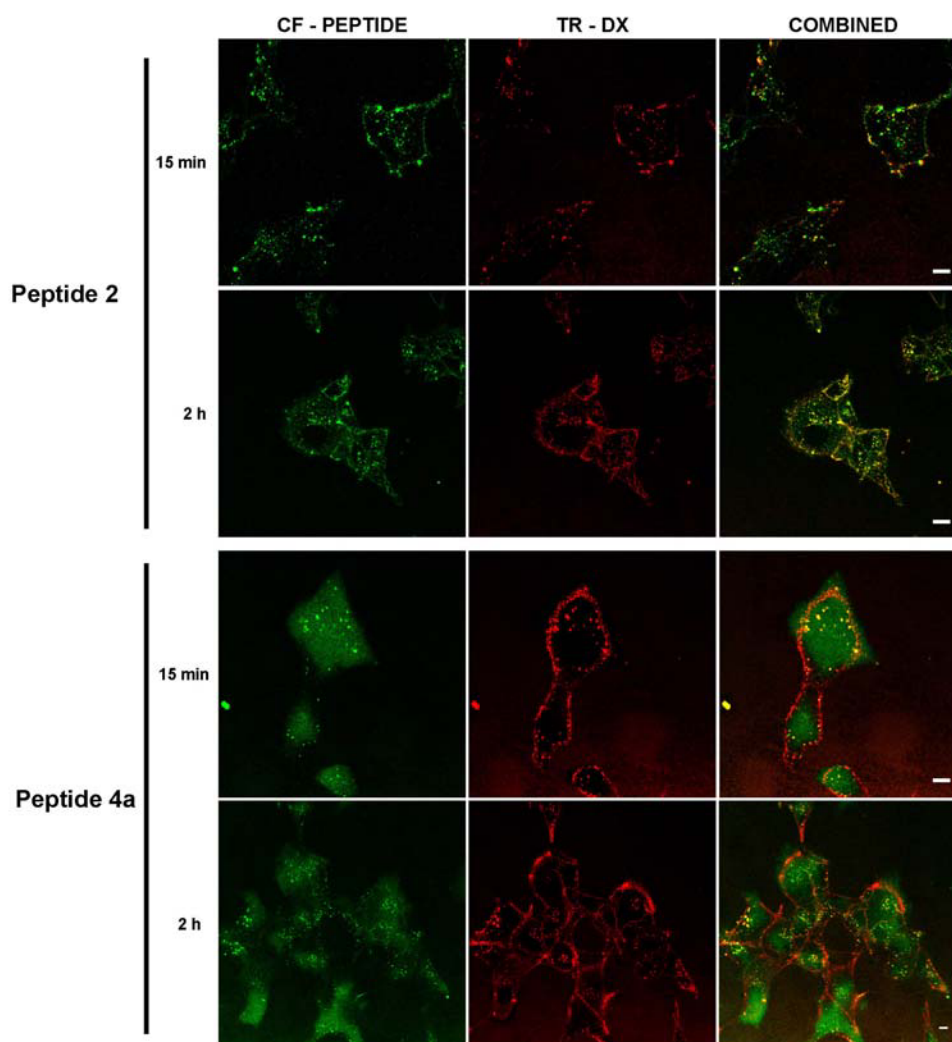
**Figure 2.** Confocal images of COS-1 cells illustrating the internalization of peptides (A) 4 and (B) 4a. After 2h of incubation with peptides (10  $\mu$ M), cells were fixed with 3% PF and nuclei were stained with IP. Scale bars, 10  $\mu$ m.



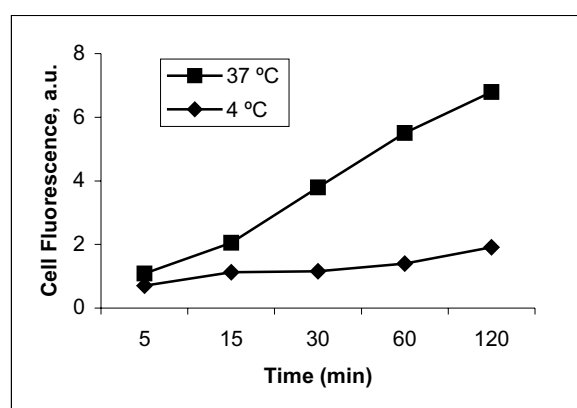
**Figure 3.** Chromatographic profiles of all the  $\gamma$ -peptides.



**Figure 4.** (A) Chromatographic profile of peptide **4a** using a linear gradient (from 0 to 100 % of MeCN in 15 min) of MeCN (containing 1% of TFA) and H<sub>2</sub>O (containing 1% of TFA). (B) and (C) chromatographic profiles of peptide **4a** after incubation with trypsin and serum at different times. Analysis were carried out using a linear gradient (from 0 to 100 % of MeCN in 15 min) of MeCN (containing 1% of TFA) and H<sub>2</sub>O (containing 1% of TFA) in a X-Terra 4.6 x 150 mm column.



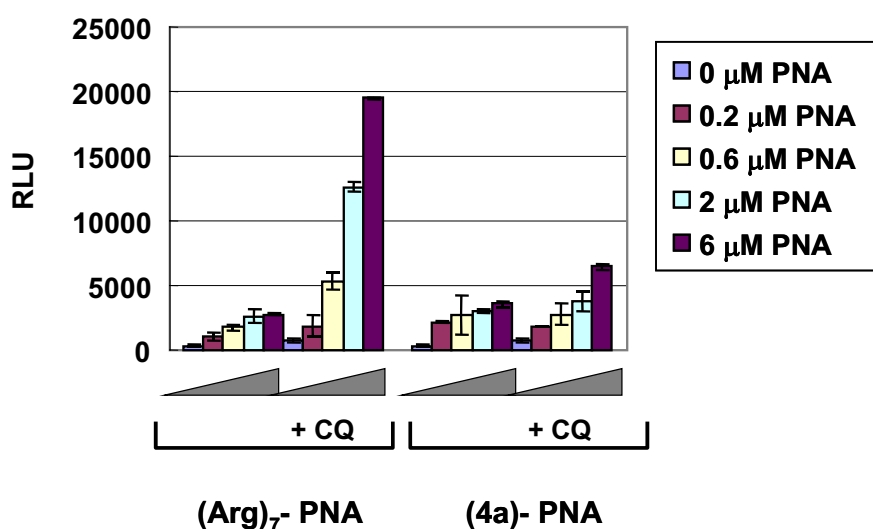
**Figure 5.** Live-cell imaging of CF-peptide uptake. Internalization experiments of CF-peptide ( $10 \mu\text{M}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ) in COS-1 cells were carried out with the fluid-phase (endocytotic) marker Texas Red-Dextran (TR-DX). xy confocal sections obtained from the middle part of cells. Scale bars,  $10 \mu\text{m}$ .



**Figure 6.** FACS kinetics of cell uptake of peptide **4a** at  $37^\circ\text{C}$  and  $4^\circ\text{C}$ . COS-1 cells were incubated in the presence of CF-peptide **4a** ( $10 \mu\text{M}$ ) for different periods of time.

### 2.3.3. Conjugació del pèptid **4a** a un PNA

El fet que aquests  $\gamma$ -pèptids tinguessin la capacitat de travessar la membrana cel·lular no deixava de ser res més que una propietat i la possible aplicació final com a transportador de fàrmacs quedava una mica en suspens. Per tal d'esbrinar si aquests compostos eren capaços de transportar un fàrmac fins a l'interior de les cèl·lules, el pèptid **4a**, el qual era el que havia demostrat tenir una capacitat de penetració més elevada, es va conjuguar a un PNA. Tant la conjugació del pèptid al PNA com els experiments cel·lulars es varen fer en el grup del Dr. Peter E. Nielsen, del Department of Medical Biochemistry and Genetics, The Panum Institute, University of Copenhagen (Dinamarca).



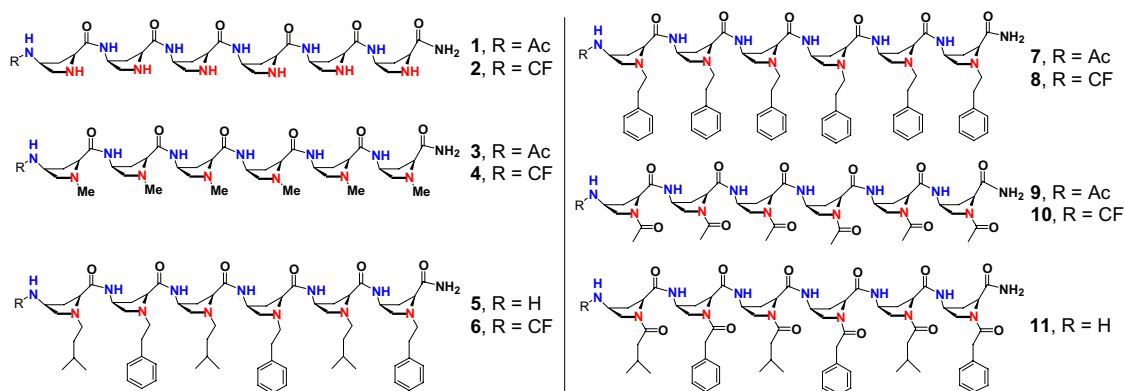
**Figura 1.** Estudi d'internalització del conjugat **4a**-PNA en cèl·lules HeLa pLuc705. Cèl·lules HeLa pLuc705 foren incubades amb una solució del PNA (en medi OPTI-MEM sense serum) durant 4 h i després foren incubades durant 24 hores més en medi amb un 10% de serum. En els experiments amb cloroquina, es va afegir cloroquina (CQ) 120 mM al medi OPTI-MEM. L'activitat luciferassa es va mesurar amb el reactiu Bright-Glo (Promega).

Per tal de poder fer la conjugació, el pèptid **4a** es va sintetitzar amb una cisteïna en l'extrem *N*-terminal a través de la qual es va conjuguar en solució al PNA a través del seu grup amino terminal utilitzant la química del maleïmido. L'entrada en cèl·lules HeLa es

va quantificar mitjançant l'activitat antisentit del conjugat **4a**-PNA amb un assaig de luciferassa en cèl·lules HeLa, utilitzant com a control positiu una poliarginina (**Arg<sub>7</sub>**-PNA). L'activitat del conjugat **4a**-PNA va mostrar ser més elevada que no pas el control positiu amb la poliarginina (figura 1). Tot i això, al afegir cloroquina a la mostra, l'activitat del nostre conjugat no va augmentar d'una manera significativa. Això semblava indicar que la major part del conjugat no havia entrat via endocitosi, el que implicaria la coexistència d'almenys dos mecanismes de translocació.

### 2.3.4. Propietats antimicrobianes dels $\gamma$ -pèptids

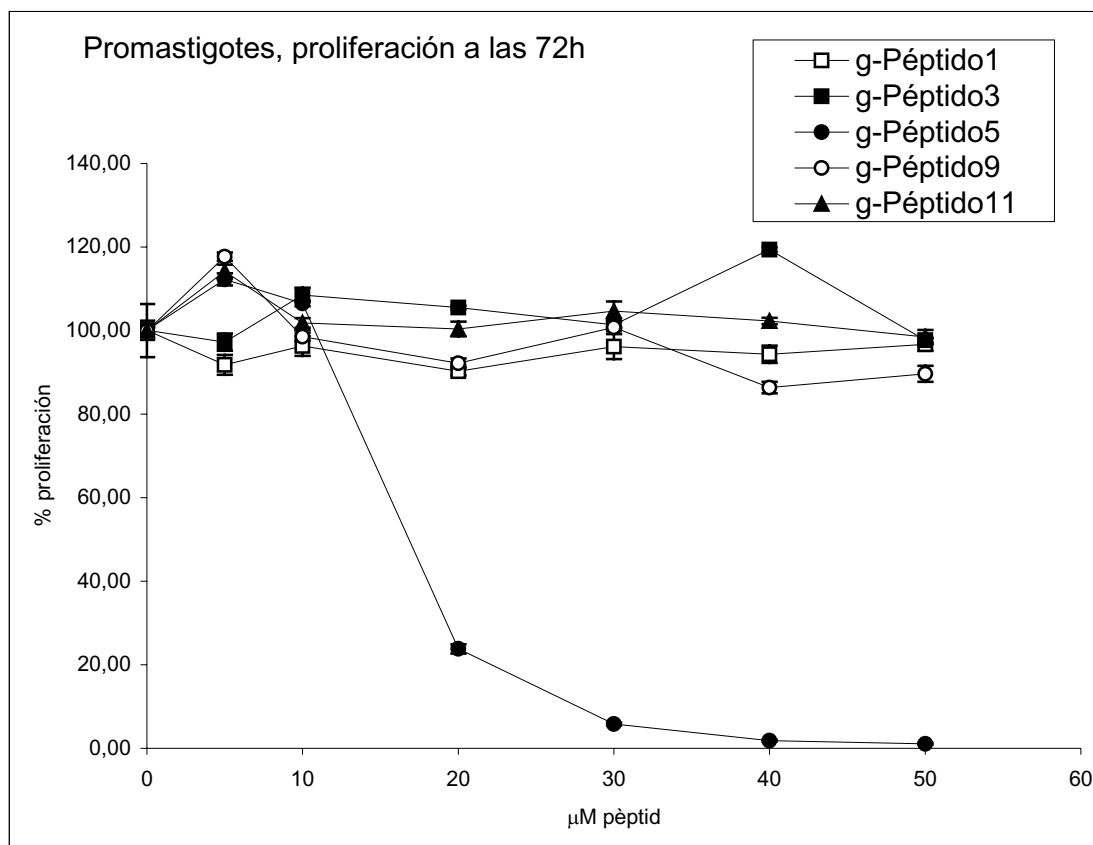
Una de les propietats que s'han descrit a la literatura per foldàmers de caràcter peptídic és l'antimicrobiana. Aquesta s'ha descrit per diferents  $\beta$ -pèptids, alguns dels quals han mostrat no tenir propietats hemolítiques. El fet d'afectar la membrana bacteriana deixant intactes les membranes de cèl·lules eucariotes els converteix en bons candidats a antibiòtics.



**Figura 2.** Estructures dels  $\gamma$ -pèptids derivats de la cis- $\gamma$ -aminoproline utilitzats en els assaigs antimicrobians.

Així, les propietats microbicides dels  $\gamma$ -pèptids derivats de l'aminoproline també estan sent explorades en *Leishmania* (figura 2), protozou paràsit humà causant de la leishmaniasis. El protozou paràsit humà *Leishmania* té dos formes principals, el promastigot, forma extracel·lular típica de l'insecte, i l'amastigot, aïllat de macròfags infectats de vertebrats, la forma responsable de la patologia humana. Aquests estudis

estan essent duts a terme al laboratori del Dr. Luis Rivas del “Departamento de Estructura y Función de Proteínas” al “Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC” de Madrid.



**Figura 3.** Efecte dels diferents  $\gamma$ -pèptids en la proliferació de promastigots de *Leishmania* a les 72h.

Els primers experiments es van centrar en l'assaig de la proliferació de promastigots de *Leishmania* en presència dels diferents  $\gamma$ -pèptids (figura 3). Aquests resultats varen mostrar que únicament el pèptid 5 inhibia totalment la proliferació amb un MIC de 30  $\mu$ M, mostrant així activitat leishmanicida. La resta d'experiments s'han centrat en aquest pèptid, l'únic que va donar activitat. Comparant l'inhibició del pèptid 5 en la proliferació en promastigots i amastigots de *Leishmania*, es va veure que en amastigots l'inhibició no era tant efectiva i que presentava un MIT de 60  $\mu$ M al cap de 48 hores. Estudis de viabilitat mitjançant un assaig d'MTT a temps curts van mostrar que al cap de 4 hores d'incubació i a una concentració 30  $\mu$ M els promastigots mostraven un 0% de supervivència, el que demostraria que el procés d'inhibició de la proliferació també

és complert a 4 hores. En amastigots, la concentració que causà un 0% de supervivència al cap de 4 hores fou de 40  $\mu$ M.

A més a més d'aquests assaigs de viabilitat i d'inhibició de la proliferació, s'han dut a terme experiments de despolarització de la membrana. L'únic  $\gamma$ -pèptid capaç de causar una despolarització de la membrana fou el **5**, sense afectar a la permeabilitat d'aquesta però causant mort cel·lular. Això significaria que el pèptid travessa la membrana sense formar porus i afecta interiorment altres estructures vitals, com podrien ser les mitocondries. Aquests estudis estan essent actualment acabats, el que fa que no sigui possible donar-ne els resultats finals.



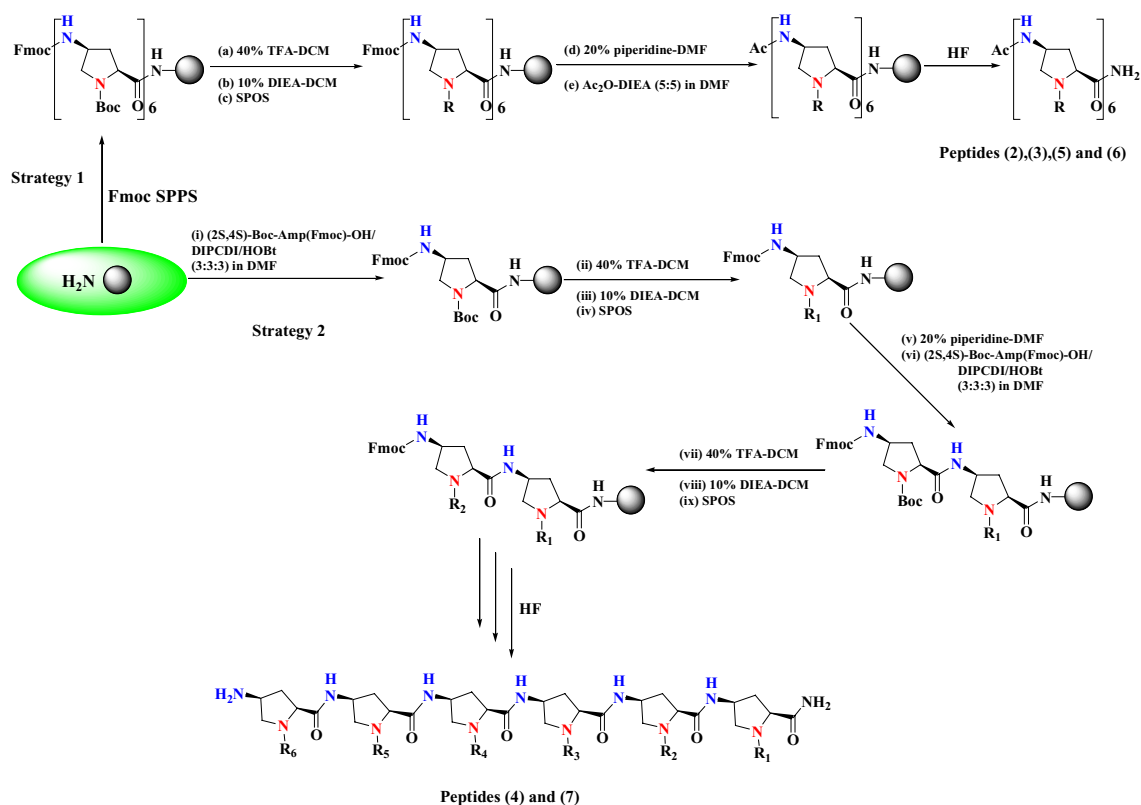
## 2.4. DISCUSSIÓ

### 2.4.1. Foldàmers $\gamma$ -peptídics derivats de la *cis*- $\gamma$ -amino-L-prolina: síntesis i estudis estructurals (I)

En aquest capítol s'ha descrit la síntesi en fase sòlida d'una família de  $\gamma$ -pèptids derivats de la *cis*- $\gamma$ -amino-L-prolina, així com les seves propietats estructurals. La síntesi d'aquests pèptids es va dur a terme sobre la resina MBHA, utilitzant com a aminoàcid la *cis*- $\gamma$ -amino-L-prolina i utilitzant una estratègia de síntesi combinada Fmoc/Boc. El grup Fmoc fou utilitzat com a protector del grup  $\gamma$ -amino i el grup Boc com a protector temporal dels grups  $\alpha$ -amino de la prolina, posicions que es van funcionalitzar amb diferents motius estructurals donant el què nosaltres anomenàvem cadenes laterals dels  $\gamma$ -pèptids.

Així, els  $\gamma$ -pèptids es van sintetitzar seguint l'esquema descrit en la figura 1. Seguint l'estratègia 1, es varen sintetitzar homo-oligomers, és a dir,  $\gamma$ -pèptids amb totes les cadenes laterals idèntiques. En aquest cas, es sintetitzava primer l'esquelet peptídic utilitzant química Fmoc per al creixement de l'esquelet peptídic i al final s'eliminaven els grups Boc dels grups  $\alpha$ -amino i s'introduïen els diferents motius. Aquestes posicions es varen acilar utilitzant diferents àcids carboxílics amb DIPCDI/HOBt com a agents acoblants i alquilar utilitzant diferents aldehids i NaBH<sub>3</sub>CN com a agent reductor.

- 
1. Farrera-Sinfreu, J.; Zaccaro, L.; Vidal, D.; Salvatella, X.; Giralt, E.; Pons, M.; Albericio, F., and Royo, M. A new class of foldamers based on the *cis*- $\gamma$ -amino-L-proline. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6048–6057.



**Figura 1.** Síntesis de  $N^\alpha$ -alquil- $\gamma$ -hexapèptids i de  $N^\alpha$ -acil- $\gamma$ -hexapèptids (síntesis d'homooligòmers i d'oligòmers amb diferents cadenes laterals en els dos casos).

Seguint l'estratègia 2 es varen sintetitzar hetero-oligòmers, on les cadenes laterals de cada residu eren diferents. Per fer-ho, després de l'acoblament de cada residu es funcionalitzava la posició  $\alpha$  de la prolina, utilitzant la mateixa estratègia descrita abans. Tot i que aquesta síntesi semblava molt llarga, la possibilitat de sintetitzar els derivats de prolina en solució i introduir-los en fase sòlida un cop ja funcionalitzats en les posicions  $\alpha$  es va descartar, ja que per futures síntesis de llibreries era més versàtil fer-ho en fase sòlida, permetent així la introducció d'un gran nombre de diversitat sense necessitat de fer química en solució per a cada tipus de monòmer.

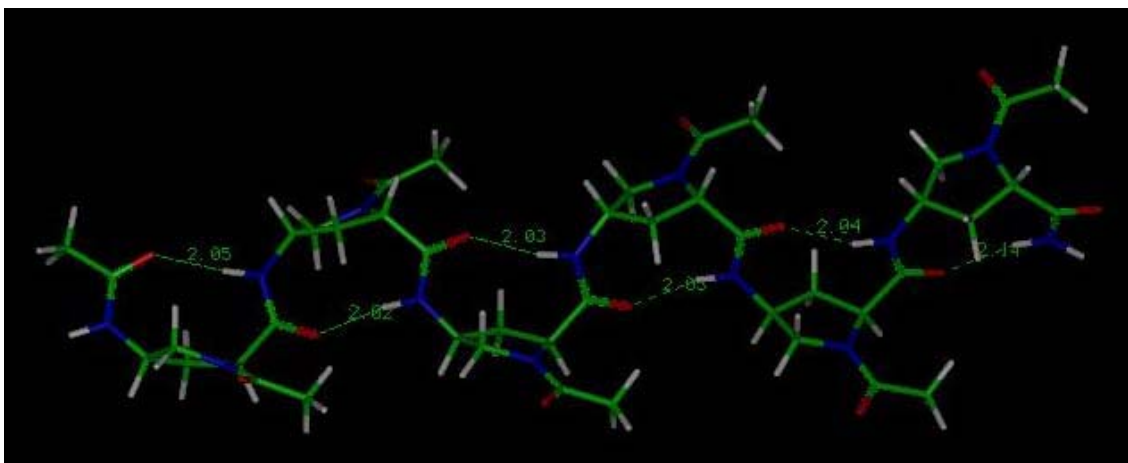
Les preferències estructurals d'aquests  $\gamma$ -pèptids foren estudiades mitjançant tècniques de dicroïsm circular i ressonància magnètica nuclear. En pèptids i proteïnes el dicroïsm circular s'utilitza per estudiar les estructures secundàries preferents. Els patrons de dicroïsm circular de les estructures secundàries més importants de  $\alpha$ -pèptids i proteïnes naturals són ben coneguts, el que fa que un cop obtingut l'espectre dicroïc d'una mostra es pugui tenir una idea de l'estructura o estructures secundàries presents en la mostra. Malauradament, per  $\beta$ - i  $\gamma$ -pèptids aquests patrons no estan ben

establerts ja que el nombre de mostres estudiades és limitat. Així, aquesta tècnica dóna una idea de si hi ha estructuració, però no permet extrapolar-ne una estructura concreta. És per això que per a l'estudi d'aquestes molècules el dicromisme circular s'empra com a primera aproximació per a saber si hi ha estructuració, i aquests estudis vénen acompanyats d'estudis de Raig X o d'RMN i modelat per tal d'elucidar-ne l'estructura.

Els estudis estructurals per dicromisme circular d'aquests  $\gamma$ -pèptids varen donar com a resultat dos comportaments ben diferenciats segons la família estudiada. Així, mentre els pèptids que tenien alquilats els grups  $\alpha$ -amino de la prolina donaven bàsicament un màxim al voltant de 195 nm tant en H<sub>2</sub>O, en MeOH o en TFE, els pèptids acilats en les posicions  $\alpha$  donaven dos mínims al voltant de 220 nm i de 205 nm i un màxim al voltant de 195 nm en H<sub>2</sub>O i TFE (en MeOH els dos mínims es convertien en un d'únic al voltant de 207 nm).

Per tal de fer els estudis per RMN ens vàrem centrar amb el  $\gamma$ -pèptid **2**. El fort solapament observat en l'espectre de <sup>1</sup>H no va permetre fer l'assignació seqüencial. Tot i això, a primera vista l'espectre de <sup>1</sup>H en H<sub>2</sub>O d'aquest pèptid va mostrar en la zona de les carboxamides diferents conformacions en equilibri, degudes a equilibris *cis-trans* de les amides de les cadenes laterals, essent la conformació més estable aquella en que tots els enllaços amida de les cadenes laterals es troben en disposició trans. Això es va poder confirmar amb l'espectre de <sup>1</sup>H de dos monòmers d'aminoprolina, l'un acetilat en la posició  $\alpha$  i l'altre amb el grup  $\alpha$ -amino lliure. El monòmer acetilat va donar com a resultat dues conformacions en equilibri amb una relació 1:3, essent la trans la més estable, mentre que el monòmer amb el grup  $\alpha$ -amino lliure només va mostrar una única conformació.

Els coeficients de temperatura calculats per als enllaços amida de l'esquelet peptídic van donar un valor únic de -6 ppb/K, el que indicaria absència de ponts d'hidrogen i per tant estaria a favor d'una estructura flexible. Tot i això, el fet que els experiments fossin duts a terme en H<sub>2</sub>O no exclou completament que existeixin ponts d'hidrogen intramoleculars ja que l'H<sub>2</sub>O té molta tendència a formar-ne i per tant no és el millor solvent per tal de fer aquest tipus d'experiments. El que sí que està a favor d'algun tipus d'estructuració són les constants d'acoblament <sup>3</sup>J<sub>NH- $\gamma$</sub> , que van resultar ser de 7.5 Hz en comptes de les esperades per una amida amb lliure rotació que haurien de ser de 6.5 Hz. A més a més, la presència de NOEs a llarga distància semblava recolzar aquesta hipòtesi, insinuant la presència d'alguna conformació preferida.



**Figura 2.** Model estructural obtingut per als  $\gamma$ -pèptids deduït a partir de les dades d'RMN.

Entre els NOEs observats, cal destacar-ne alguns entre protons localitzats en cares oposades de l'anell de prolina, els quals foren interpretats com a evidència de NOEs interresidu. Entre aquests, destaquen els NOEs entre els protons  $\gamma$ - $\beta'$ , els  $\alpha$ - $\beta'$  i els  $\gamma$ - $\delta'$ . Aquests NOEs no es poden explicar com a interaccions entre residus consecutius, però sí que són coherents amb interaccions entre els residus  $i$  i  $i+2$ . Tenint en compte això, l'estructura proposada capaç d'interpretar les dades d'RMN es pot considerar un gir estabilitzat per un pont d'hidrogen format per 9 àtoms o un llaç  $C_9$  ( $C_9$ -hydrogen-bonded structure o  $C_9$ -ribbon). L'extensió d'aquest tipus de girs al llarg de tot el pèptid i en una situació idealitzada donaria una sèrie de girs concatenats (figura 2), on els anells de prolina queden en un mateix pla, el qual és perpendicular al pla que ocupen els enllaços amida.

Aquest tipus de gir trobat per  $\gamma$ -pèptids es pot considerar anàleg al gir  $\gamma$  trobat en  $\alpha$ -pèptids (2), en el qual el pont d'hidrogen que estabilitza l'estructura està format per 7 àtoms entre els residus  $3 \rightarrow 1$  ( $\text{NH}(i+2) \cdots \text{C}=\text{O}(i)$ ). Per  $\alpha$ -pèptids, repeticions de girs  $\gamma$

- 
2. (a) Nemethy, G., and Printz, M.P. The  $\gamma$  turn, a possible folded conformation of the polypeptide chain. Comparison with the  $\beta$  turn. *Macromolecules* **1972**, 5, 755–758.
  - (b) Matthews, B. W. The  $\gamma$  turn. Evidence for a new folded conformation in proteins. *Macromolecules* **1972**, 5, 818–819.

s'havien descrit donant lloc a l'hèlix 2.2<sub>7</sub> (3) i recentment s'ha descrit l'estructura cristal·lina de dos girs  $\gamma$  consecutius (4). Així, el gir trobat en els  $\gamma$ -pèptids es defineix de la mateixa forma que els girs  $\gamma$ , passant però de ser un llaç C<sub>7</sub> a ser un llaç C<sub>9</sub>. Aquesta estructura estabilitzada per un pont d'hidrogen formant un cicle de 9 baules havia estat prèviament proposada per altres  $\gamma$ -pèptids lineals (5) i més tard també per  $\gamma$ -pèptids derivats de la gabapentina (6). Així doncs, tot i que sembla força factible l'obtenció de llaços C<sub>9</sub> concatenats trobats en oligòmers d'aminoprolina, alguns dels NOEs trobats experimentalment no es donen en aquesta estructura idealitzada, el que es pot interpretar com a flexibilitat conformacional en algun punt de la seqüència.

#### 2.4.2. Capacitat dels $\gamma$ -pèptids de travessar la membrana cel·lular (7)

En aquest capítol de la tesi es varen tornar a sintetitzar els  $\gamma$ -pèptids descrits en l'apartat anterior però marcant-los amb una sonda fluorescent a l'extrem *N*-terminal. L'estratègia de síntesi fou exactament la mateixa que la descrita anteriorment, canviant l'últim pas just abans de fer l'escissió del pèptid de la resina (l'acetilació) per la

- 
3. Donohue, J. Hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1953**, *39*, 470–478.
  4. Jimenez, A.I.; Ballano, G., and Cativiela, C. First observation of two consecutive  $\gamma$  turns in a crystalline linear dipeptide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 396–399.
  5. (a) Seebach, D.; Brenner, M.; Rueping, M., and Jaun, B.  $\gamma^2$ -,  $\gamma^3$ -, and  $\gamma^{2,3,4}$ -amino acids, coupling to  $\gamma$ -hexapeptides: CD spectra, NMR solution and X-ray crystal structures of  $\gamma$ -peptides. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 573–584.  
(b) Baldauf, C.; Guenther, R., and Hofmann, H.-J. Helix formation and folding in  $\gamma$ -peptides and their vinylogues. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2573–2588.
  6. Vasudev, P.G.; Shamala, N.; Ananda, K., and Balaram, P. C<sub>9</sub> helices and ribbons in  $\gamma$ -peptides: crystal structures of gabapentin oligomers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4972–4975.
  7. Farrera-Sinfreu, J.; Giralt, E.; Castel, S.; Albericio, F., and Royo, M. Cell penetrating *cis*- $\gamma$ -amino-L-proline-derived peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9459–9468.

introducció de 5(6)-carboxifluoresceïna, la qual fou acoblada utilitzant DIPCDI/HOBt com agents acoblants. En aquesta part del treball vàrem estudiar l'estabilitat enzimàtica dels  $\gamma$ -pèptids en front la tripsina i sèrum humà. La capacitat de penetració en cèl·lules d'aquests compostos fou provada utilitzant dues línies cel·lulars diferents, COS-1 i HeLa, mitjançant tècniques de fluorimetria de plaques i citometria de flux. La toxicitat d'aquests compostos també fou testada utilitzant l'assaig de MTT. Finalment, els pèptids foren visualitzats al microscopi confocal utilitzant tant cèl·lules fixades com cèl·lules vives.

L'estabilitat dels  $\gamma$ -pèptids en front a proteases fou estudiada utilitzant el pèptid **4a** com a model. Per fer-ho, aquest compost fou incubat en tripsina i en sèrum humà i es va anar seguint l'evolució de la degradació extraient alíquotes al llarg del temps i analitzant-les per HPLC. Els resultats semblaven força concloents: els  $\gamma$ -pèptids semblaven totalment estables en front a les proteases testades, el que els feien bons candidats per al seu ús en sistemes vius. A més a més dels estudis de degradació enzimàtica, també es van fer estudis de toxicitat utilitzant l'assaig de MTT, els quals mostraven que aquests compostos no tenien una toxicitat significativa en les dues línies cel·lulars testades.

En un primer moment, l'entrada dels pèptids a l'interior de cèl·lules eucariotes fou quantificada mitjançant fluorimetria de plaques. Per fer-ho, les cèl·lules foren sembrades en plaques de 96 pous i els pèptids hi foren incubats durant diferents temps i a diferents concentracions. Un cop passat el temps d'incubació, el medi dels diferents pous fou eliminat, les cèl·lules rentades tres cops amb tampó PBS i finalment lisades per tal d'alliberar el pèptid internalitzat al medi i poder-lo així quantificar. Aquestes quantificacions però, donaren errors grans, deguts bàsicament a que els pèptids, força hidrofòbics, quedaven enganxats al plàstic de la placa i no s'eliminaven en els rentats. Aquest pèptid residual que quedava enganxat a la placa donava com a resultat una lectura força esbiaixada de la realitat. Això i el fet que aquesta tècnica tampoc ens permetés diferenciar entre el pèptid que realment havia estat internalitzat i el que quedava retingut a la membrana cel·lular, ens van portar a utilitzar la citometria de flux, la qual dóna resultats força més fiables.

Tot i que des del nostre punt de vista els resultats són més fiables utilitzant la citometria de flux que no pas amb la fluorimetria de plaques, aquesta tècnica no la vàrem tenir en compte com a primera opció perquè és força més tediosa d'utilitzar, ja

que els protocols utilitzats són força més llargs i per tant el nombre de punts a quantificar en un dia és força més limitat. A més a més, per treballar amb citometria de flux es necessita una quantitat de cèl·lules important per tal de poder fer la lectura, amb la qual cosa també es requereix més mostra en cada assaig. Així, aquests experiments es varen dur a terme en plaques de 3.5 mm de diàmetre, sobre les quals s'hi varen sembrar les cèl·lules i incubar els pèptids a diferents concentracions durant diferents períodes de temps. Com a control positiu es va utilitzar el Tat(49-57).

A l'hora de fer quantificacions per citometria de flux, es pot distingir entre el senyal del pèptid marcat que ha estat internalitzat i el que ha quedat enganxat a la membrana cel·lular. Per tal de discernir entre ambdues situacions, en el cas de treballar amb pèptids d'origen natural, abans de fer la quantificació s'acostuma a fer un tractament amb tripsina per tal d'alliberar-lo de la membrana. Com hem esmentat abans, els  $\gamma$ -pèptids no són sensibles a la tripsina i per tant aquest protocol no es va poder utilitzar. Com a alternativa, vàrem tractar les cèl·lules amb una solució d'HCl fins a tenir un pH al voltant de 6, pH al qual la carboxifluoresceïna no és fluorescent i les cèl·lules romanen intactes, fet que permet quantificar exclusivament el marcatge de l'interior cel·lular discriminant així el de la superfície.

Així, vàrem comprovar que els diferents  $\gamma$ -pèptids no es comportaven de la mateixa manera, el que indicava que la capacitat de travessar la membrana cel·lular depenia en bona part de les modificacions estructurals introduïdes a través de les cadenes laterals en la posició  $\alpha$  de la prolina. Els resultats d'aquestes quantificacions també varen mostrar que l'entrada dels nostres  $\gamma$ -pèptids no era tant efectiva com la del Tat, però que com a primera aproximació era força vàlida. El pèptid **4a** fou el que mostrà una capacitat d'internalització més elevada.

Des d'un punt de vista aplicat, aquests estudis preliminars sobre el comportament d'aquests sistemes mostren que els  $\gamma$ -pèptids derivats de prolina poden ser uns bons candidats a transportadors de fàrmacs. Tot i que l'entrada en cèl·lules d'aquests compostos sembla ser menor que la del Tat, aquests peptidomimètics poden arribar a tenir algun avantatge. Així doncs, pèptids naturals amb la capacitat de travessar la membrana cel·lular tenen toxicitats elevades, a més a més de ser metabolitzats ràpidament per l'acció de les proteases. Aquesta ràpida degradació fa que per tal d'obtenir una resposta bona, s'hagi d'augmentar la dosi, augmentant així la toxicitat. El fet que els  $\gamma$ -pèptids mostrin una toxicitat baixa o nul·la i una elevada estabilitat en front

a les proteases, fa pensar en el seu ús com a transportadors de fàrmacs. Encara que l'eficàcia de penetració que mostren els nostres peptidomimètics no es troba al nivell dels pèptids descrits a la literatura, el fet de no degradar-se pot fer que la dosi efectiva a administrar per tal d'obtenir una resposta sigui inferior a la d'un compost que es degradi. Sembla ser que aquestes dues propietats, estabilitat enzimàtica i baixa toxicitat, poden arribar a jugar un paper clau en l'èxit d'aquests compostos a l'hora de ser utilitzats en organismes vius. La descripció d'aquests compostos obre el camí a la síntesi de nous anàlegs amb millors propietats penetradores i millors solubilitats, que ara per ara sembla ser el problema més gran a superar.

### **2.4.3. Aplicacions dels $\gamma$ -pèptids: transportadors de fàrmacs i activitat antimicrobiana**

Sembla doncs que la funció final d'aquests sistemes, el transport actiu de fàrmacs, pot arribar a ser una realitat, ja que el pèptid **4a** és capaç de portar a través de la membrana cel·lular una molècula que per si sola no és capaç de travessar-la. Amb aquests resultats, i tot i que l'entrada del conjugat **4a**-PNA no sembla ser comparable a l'esperat per **Arg<sub>9</sub>**, o pel pèptid transportan, pèptids que s'han mostrat més eficaços que **Arg<sub>7</sub>**, sembla ser que aquests  $\gamma$ -pèptids poden ser un bon punt de partida per al desenvolupament de nous anàlegs amb unes millors capacitats. A més a més, l'existència d'un segon mecanisme d'entrada que permet tenir directament el conjugat al citoplasma, sense haver de fer tractaments addicionals per tal d'alliberar-lo dels endosomes, podria ser un gran avantatge ja que n'evitaria la destrucció en els endosomes, augmentant-ne així l'activitat. Aquests experiments estan actualment essent acabats al laboratori del Prof. Peter Nielsen.

L'activitat microbicida dels  $\gamma$ -pèptids sintetitzats en aquest treball es va provar amb *Leishmania*. L'aparició de resistències contra els fàrmacs actuals ha fet créixer la necessitat de trobar nous fàrmacs per aquesta malaltia infecciosa. Assaigs preliminars de l'activitat leishmanicida dels  $\gamma$ -pèptids han mostrat que únicament el pèptid **5** inhibeix totalment la proliferació de promastigots de *Leishmania* amb un MIC de 30  $\mu$ M. L'únic  $\gamma$ -pèptid capaç de causar una despolarització de la membrana també fou el **5**, el qual no va afectar a la permeabilitat d'aquesta però sí que causà mort cel·lular.



Això significa que el pèptid travessa la membrana sense formar porus i afecta interiorment altres estructures vitals, com podrien ser les mitocondries. Aquests resultats obren la possibilitat de trobar anàlegs d'aquests  $\gamma$ -pèptids més actius contra la leishmaniasis.

## 2.5. CONCLUSIONS

1. S'ha dissenyat i optimitzat la síntesi en fase sòlida d'una nova família de  $\gamma$ -pèptids derivats de la cis- $\gamma$ -amino-L-prolina. Aquest procés permet la derivatització en fase sòlida d'aquest tipus de compostos, fent possible la síntesi d'un ampli rang d'estructures utilitzant la química combinatòria.
2. L'estudi estructural d'aquest tipus d'oligòmers per tècniques de diroïsmes circular i ressonància magnètica nuclear ha donat com a resultat que aquests oligòmers poden adoptar llaços  $C_9$ , donant en una estructura regular una sèrie de girs concatenats d'aquest tipus, estructura que també es pot descriure com a hèlix 9.
3. Els  $\gamma$ -pèptids derivats de la cis- $\gamma$ -amino-L-prolina tenen la capacitat de travessar la membrana cel·lular de cèl·lules eucariotes. L'eficàcia penetradora de cada  $\gamma$ -pèptid depèn de la naturalesa de les cadenes laterals introduïdes en les posicions  $\alpha$  de la prolina. Així, mentre per la família  $N^\alpha$ -acil el mecanisme principal de translocació sembla ser l'endocitosi, per la família  $N^\alpha$ -alquil hi semblen coexistir dos mecanismes de translocació diferents.
4. El  $\gamma$ -pèptid **4a** pot transportar fins a l'interior de cèl·lules eucariotes molècules amb una baixa permeabilitat a la membrana cel·lular, el que, juntament amb la seva baixa toxicitat i elevada estabilitat en front a proteases, el converteix en un bon candidat per ser utilitzat en aplicacions *in vivo*.
5. El  $\gamma$ -pèptid **4a** té propietats moderades anti-leishmanicides, el que obre la possibilitat de trobar nous anàlegs més actius.

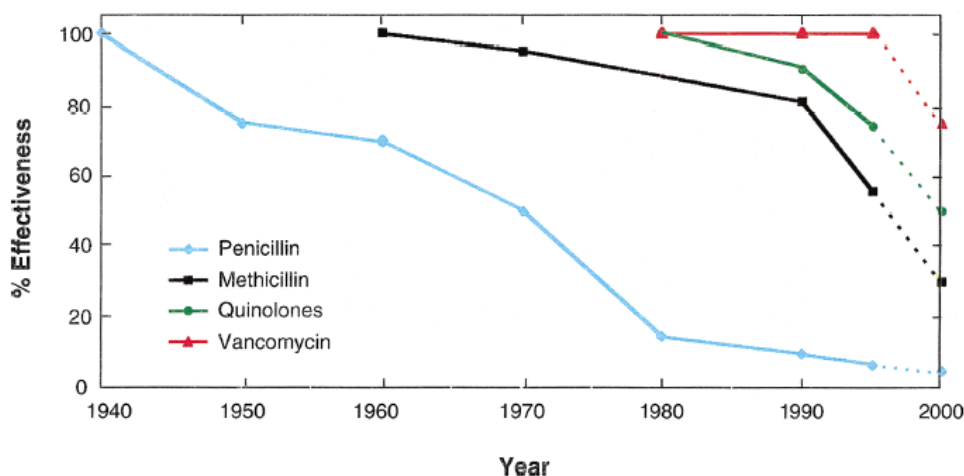
## **CAPÍTOL 3**

# **AMINOACIL-tRNA SINTETASSES COM A DIANES TERAPÈUTIQUES PER AL DESCOBRIMENT DE NOUS AGENTS ANTIINFECCIOSOS**



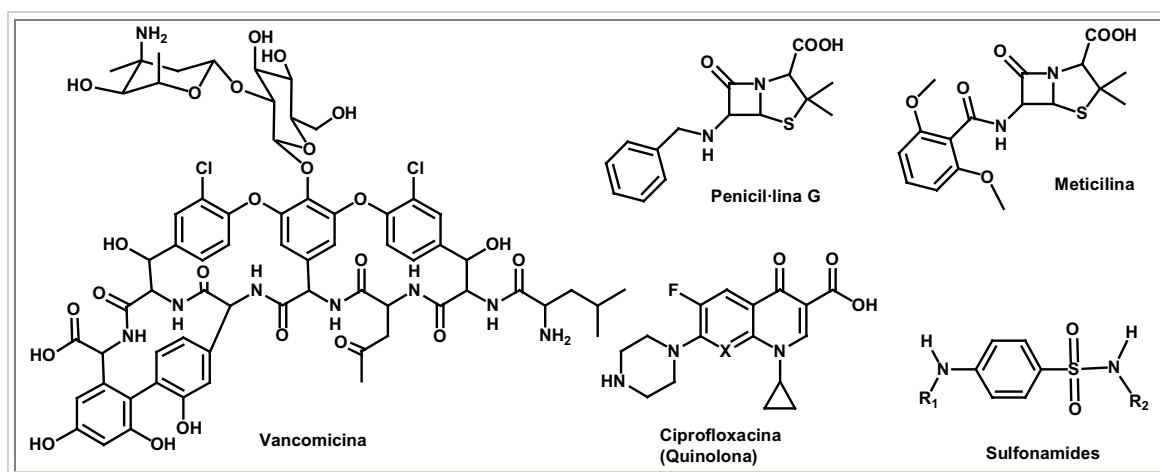
### 3.1. INTRODUCCIÓ

L'esperança de vida s'ha pràcticament doblat al llarg dels últims 70 anys. Són molts els factors que han intervingut en aquesta disminució de la mortalitat, però un dels més importants ha estat el desenvolupament d'antibiòtics, que començà Alexander Fleming al 1928 amb el descobriment de la penicil·lina. La penicil·lina bloqueja una etapa essencial de la transpeptidació durant la biosíntesi de la paret cel·lular en microorganismes com el *S. aureus* formant un intermedi penicínílic. Tot i l'efectivitat mostrada en un primer moment per aquest antibiòtic, al llarg dels anys els microorganismes han desenvolupat diferents mecanismes de resistència, com són l'hidrolisi de l'anell  $\beta$ -lactàmic mitjançant l'acció de les  $\beta$ -lactamases, l'alteració de l'unió de la penicil·lina a les proteïnes, la disminució de l'entrada a la cèl·lula o l'activació de l'eliminació del fàrmac (1). Les resistències desenvolupades contra la penicil·lina s'han anat repetint després del desenvolupament de cada nou antibiòtic, com les quinolones, la meticilina o la vancomicina (figura 1). Aquest últim és el fàrmac escollit per al tractament d'infeccions letals derivades de l'*S. Aureus* (2), tot i que tenint en compte la lliçó apresca amb la penicil·lina, sembla que l'aparició massiva d'organismes resistents a la vancomicina és només cosa de temps.



**Figura 1.** Evolució de l'efectivitat d'alguns antibiòtics al llarg del segle passat.

L'aparició de resistències ha motivat la necessitat de desenvolupar nous antibiòtics per tal de poder lluitar contra els microorganismes. Per aconseguir-ho, la tendència actual ha estat buscar noves dianes terapèutiques, la majoria involucrades en processos essencials per al creixement de la cèl·lula. Aquestes es poden dividir en dos grups, segons si la diana en qüestió és única del microorganisme i no té homòleg en cèl·lules eucariotes o si per al contrari sí que en té. La penicil·lina i la vancomicina són exemples que actuen en dianes del primer grup, ja que els dos inhibeixen una etapa de la biosíntesi de la paret bacteriana, que no es troba en les cèl·lules dels mamífers. La utilització d'aquests fàrmacs fa que la probabilitat d'interferir en alguna etapa bioquímica de les cèl·lules de mamífers sigui menor, disminuint-ne així la toxicitat (figura 2).



**Figura 2.** Principals tipus d'antibiòtics que actuen únicament contra algun procés únic en cèl·lules procariotes, com la biosíntesi de la paret bacteriana.

La resta d'antibiòtics actuen sobre funcions essencials que tant es troben en les cèl·lules del patògen com en les de l'hoste. Per tant, per tal d'evitar toxicitats, han de diferenciar entre la diana del patògen i la humana. El nombre de dianes en aquest cas és força més gran, ja que la majoria de funcions essencials s'han conservat al llarg de l'evolució. Algunes d'aquestes dianes terapèutiques pertanyen al sistema de traducció, sobre les quals hi actuen alguns antimicrobians com els aminoglicòsids, les macrolides o les tetraciclines (figura 3). Entre les dianes d'aquests antibiòtics hi ha les subunitats

ribosomals 30S i 50S, en les quals es busca inhibir la biosíntesi de proteïnes en els patògens sense inhibir la biosíntesi en l'hoste. Aquests antibiòtics es solen utilitzar contra microorganismes que són resistents o insensibles a les principals famílies d'antibiòtics com les penicil·lines, meticilines, etc.. Tot i això, aquests compostos presenten algun problema, com la baixa disponibilitat per via oral o toxicitats elevades en humans, a més de les resistències que han aparegut per a molts d'ells (3).

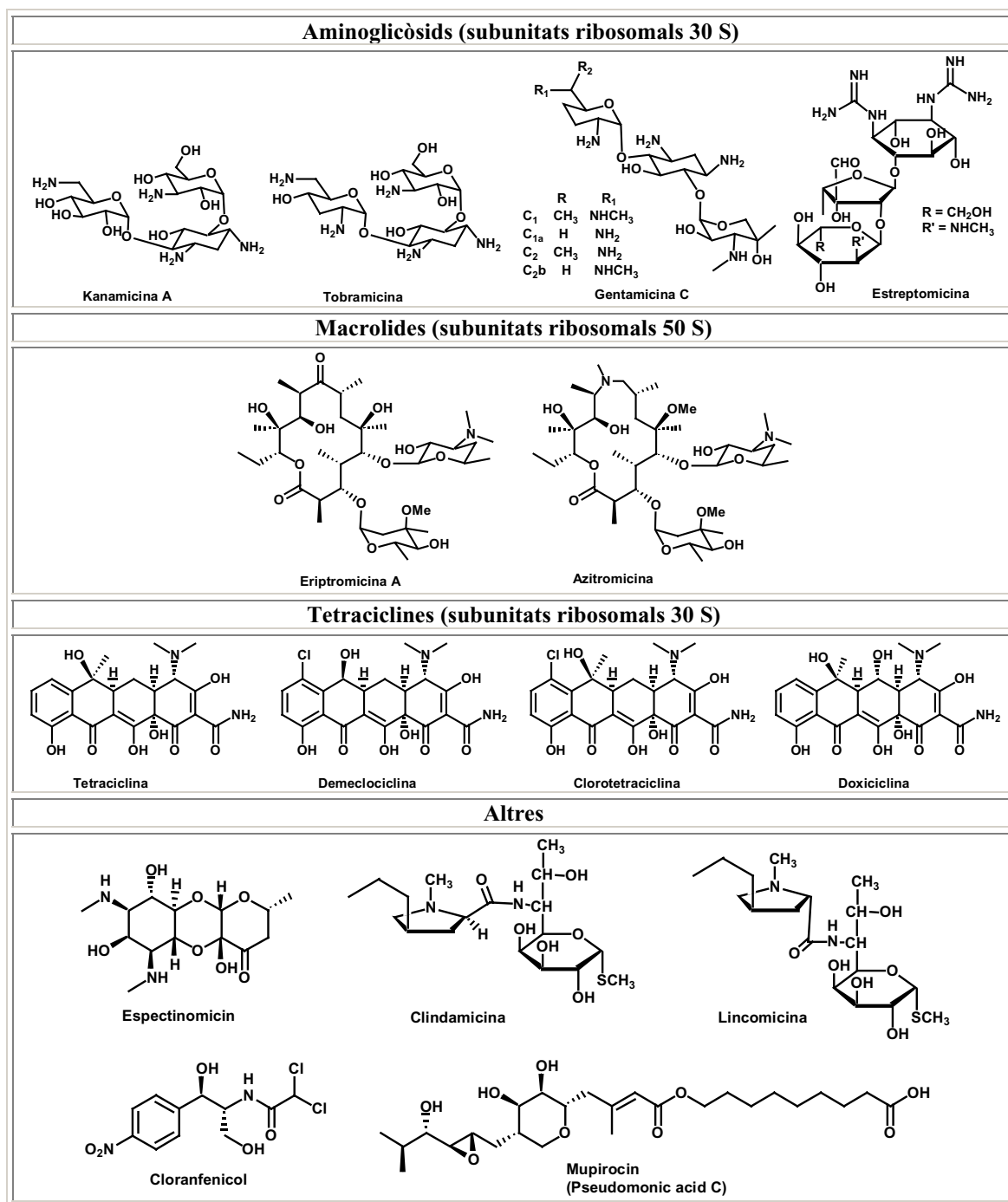
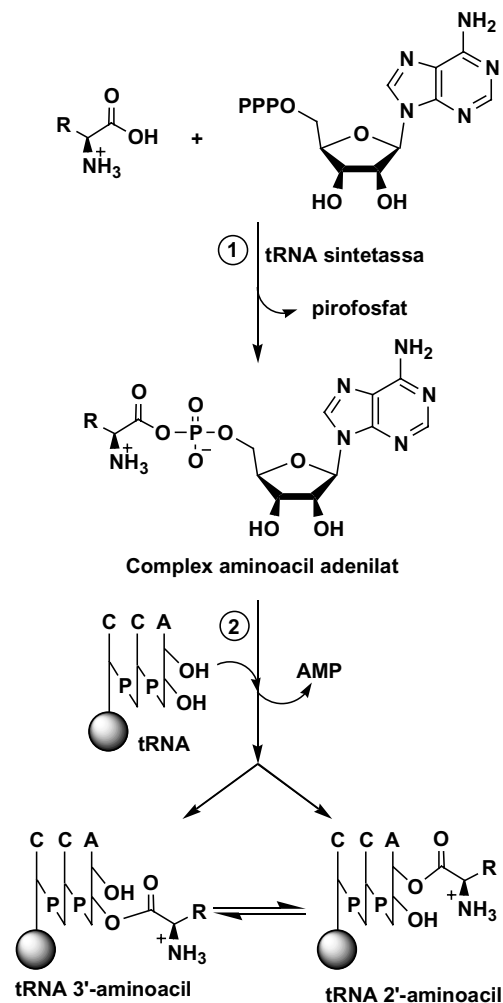


Figura 3. Principals antibiòtics que actuen en alguna etapa de la biosíntesi de proteïnes.

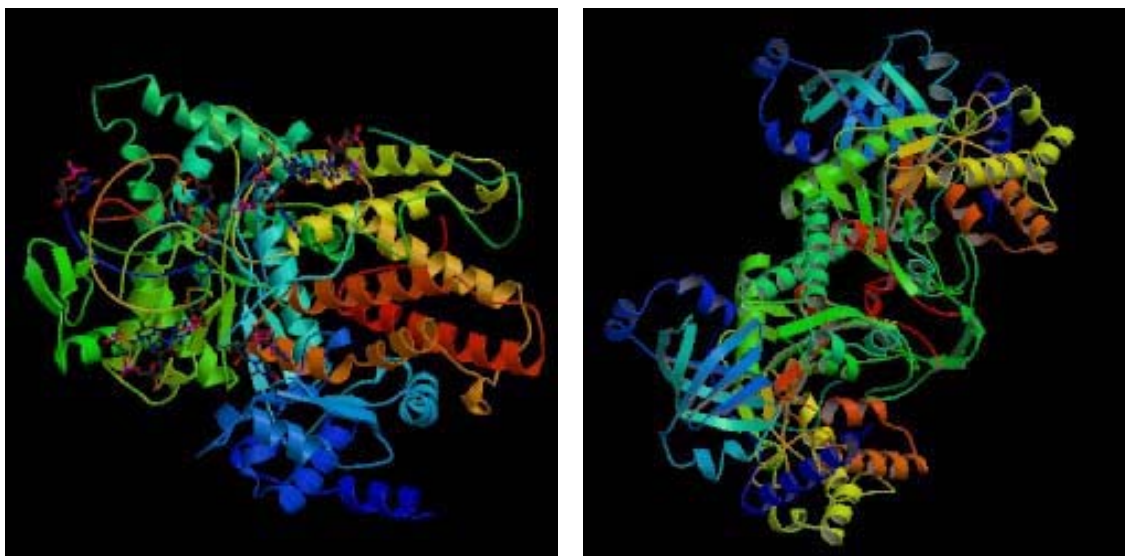
Entre les dianes del sistema de traducció sobre les que actuen alguns antibiòtics s'hi troben els ribosomes, algunes proteïnes específiques d'aquests o els RNAs ribosomals, a més de factors d'iniciació de cadena, d'elongació, de translocació o de terminació. Una de les dianes terapèutiques sobre les que en els últims anys s'ha mostrat molt interès són les aminoacil tRNA sintetasses (aaRS), enzims essencials en tots els organismes vius. Les aaRS catalitzen la transferència d'aminoàcids als seus corresponents tRNAs formant el complex aminoacil-tRNA, que forma part del procés de síntesi de proteïnes. La reacció d'aminoacilació procedeix en dues etapes (figura 4). En la primera etapa es condensa l'aminoàcid a una molècula d'ATP formant-se així el complex aminoacil adenilat i una molècula de pirofosfat. En la segona etapa, gràcies a la catàlisi de la tRNA sintetassa, es transfereix l'aminoàcid al tRNA. Aquest procés és essencial en tots els patògens cel·lulars, el que converteix aquests enzims en dianes terapèutiques força interessants en la cerca de nous compostos antiinfecciosos.



**Figura 4.** Reacció d'aminoacilació.



En general, en cèl·lules procariotes hi ha una sintetassa per a cada aminoàcid (4), i es troben dividides en dos grups de 10 enzims segons l'estructura del seu centre actiu. Així, les sintetasses de classe I són normalment enzims monomèrics i uneixen l'àcid carboxílic de l'aminoàcid a transferir a través de l'hidroxil 2' del seu corresponent tRNA. Els enzims de classe II són normalment dímers o tetràmers, i enganxen l'aminoàcid a l'hidroxil 3' terminal del seu corresponent tRNA, excepte la tRNA sintetassa PheRS que utilitza l'hidroxil 2' (figura 4). En la figura 5 es mostren les estructures de Raig X de dues sintetasses.



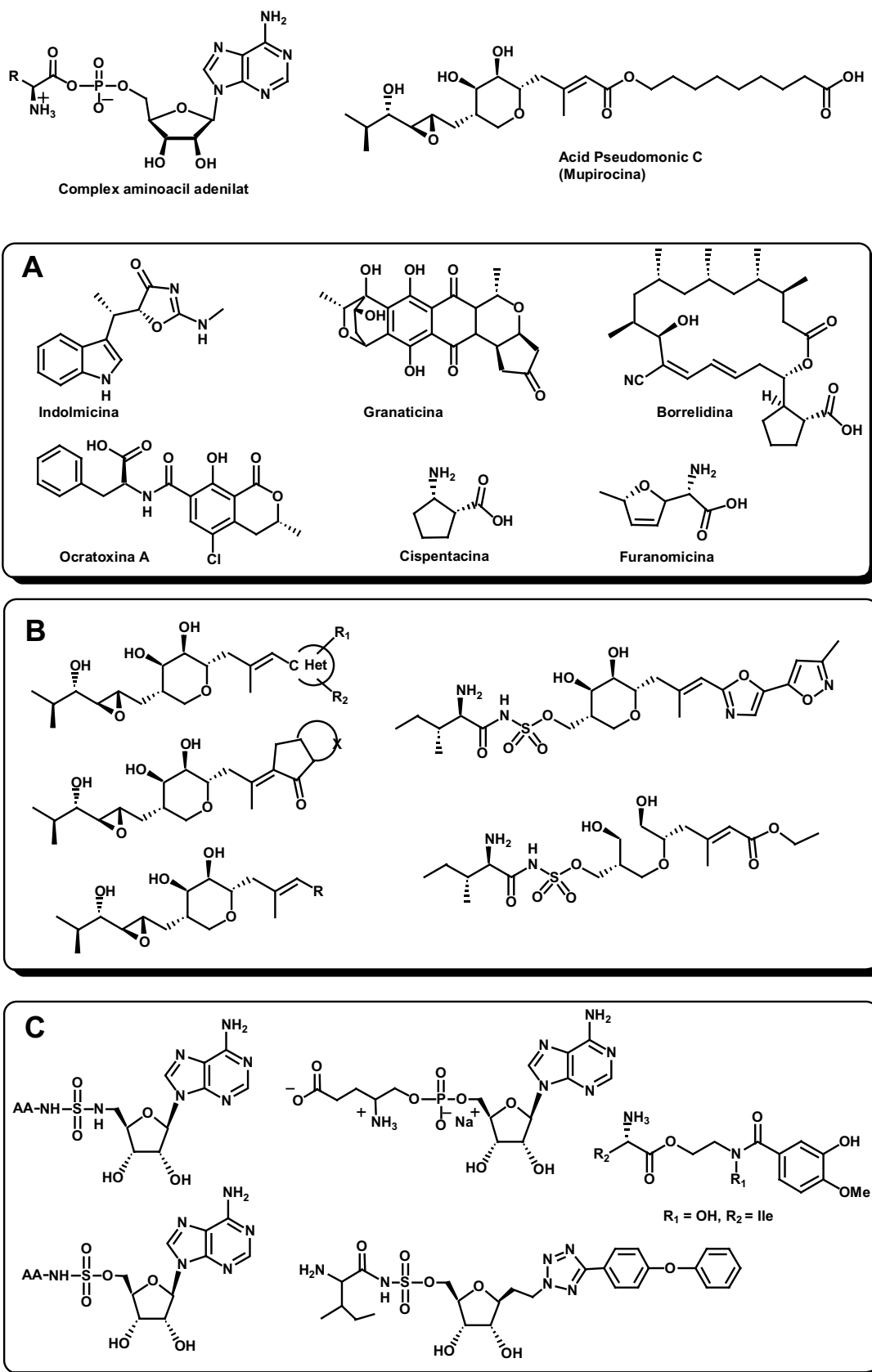
**Figura 5.** Estructura determinada per Raig X (A) d'una sintetassa de classe I, l'arginil-tRNA sintetassa complexada amb el tRNA-Arg (5) i (B) d'una sintetassa de classe II, la lisil-tRNA sintetassa formant un complex amb la lisina (6).

S'ha demostrat que algunes drogues poden inhibir la sintetassa del patògen sense afectar l'homòloga humana. L'inhibició d'aquests enzims en el patògen porta a una parada eventual de la síntesi de proteïnes i del creixement cel·lular, convertint-les en unes dianes força prometedores. L'àcid pseudomònic (mupirocina) (figura 3) és un producte natural sintetitzat per *Pseudomonas fluorescens* (7) que actua directament en la traducció, inhibint la isoleucil-tRNA sintetassa de patògens Gram positius, com *S. aureus*, *S. epidermidis* i *S. saprophyticus*, i contra microorganismes Gram negatius com

*Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* o *Neisseria meningitidis*. És actiu contra alguna soca d'*S. aureus* aïllada en hospitals resistent a la penicil·lina, a la meticil·lina i altres antibiòtics (8). La virtut d'aquest fàrmac és que és uns 8000 cops més actiu contra la isoleucil-tRNA sintetassa del patògen que no pas contra la humana (9), tot i que la seva nul·la biodisponibilitat sistèmica en limita l'ús a aplicacions externes com infeccions de la pell (10). A més a més de la mupirocina, s'han descrit altres productes naturals inhibidors de diverses sintetasses com ara la borrelidina (Thr) (11,12), la furanomicina (Ile) (13), la granaticina (Leu) (14), la indolmicina (Trp) (15), l'ocratoxina A (Phe) (16) o la cispentacina (Pro) (17) (figura 6A).

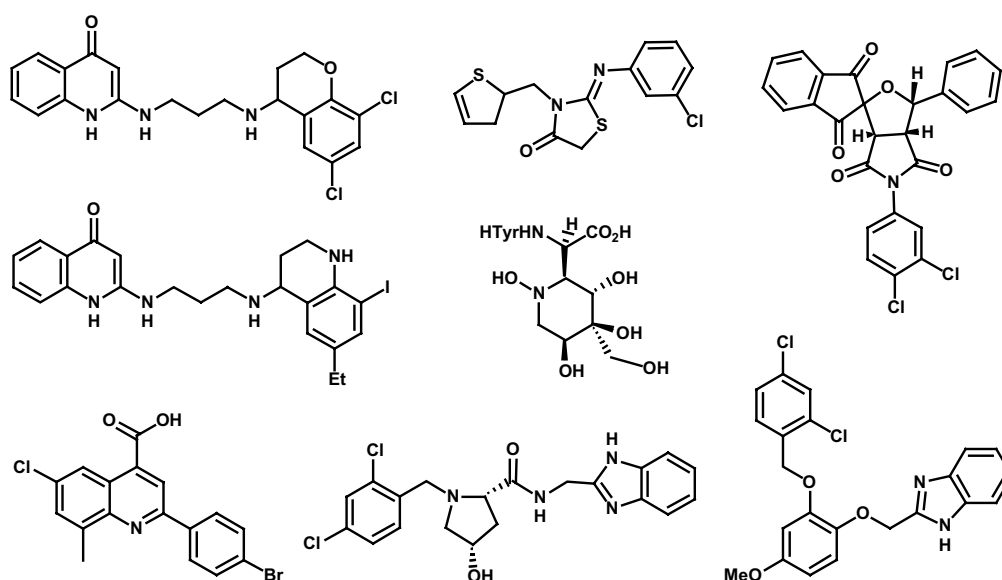
El fet de poder inhibir de forma espècie-específica les sintetasses ha fet pensar en el desenvolupament de nous fàrmacs que tinguin com a diana alguna de les tRNA sintetasses del patògen. Això pot ser realment factible ja que aquests enzims tenen característiques que permeten el seu estudi, com és una alta solubilitat, una estabilitat relativament elevada, són fàcils d'expressar, fàcils de purificar i es poden obtenir en quantitats raonables. A més a més, es coneix l'estructura de Raig X de moltes sintetasses soles o complexades (18), així com el seu mecanisme d'acció en la reacció d'aminoacilació. Amb aquesta informació, el disseny racional d'inhibidors d'aquests enzims sembla una realitat, obrint la possibilitat de trobar inhibidors menys complexos que els productes naturals, i per tant més assequibles sintèticament. Si bé aquests aspectes són força esperançadors de cara a trobar nous antibiòtics dirigits a aquestes dianes, s'ha d'anar amb compte ja que una insuficient selectivitat per la sintetassa del patògen respecte a la humana pot causar toxicitats elevades.

Amb la idea de millorar l'estabilitat *in vivo* de la mupirocina, se n'ha descrit força anàlegs (figura 6B) (19,20). Molts han donat bons resultats en assaigs *in vitro*, amb constants d'inhibició del mateix ordre que la mupirocina, tot i que no n'han millorat els resultats *in vivo*. Glaxo Smith Kline (GSK) ha descrit en diferents patents (21,22,23,24,25,26) noves famílies d'inhibidors basats en l'àcid pseudomònic que contenen sulfamats selectius de la isoleucil-tRNA sintetassa, tant de bacteries gram-positiu com gram-negatiu. Aquests sulfamats poden ser utilitzats en el tractament d'infeccions bacterianes, incloses algunes resistents a altres antibiòtics com la meticilina, les macrolides o fins i tot a la mupirocina.



**Figura 6.** Exemples representatius d'inhibidors d'alguna tRNA sintetassa, (A) productes d'origen natural, (B) derivats de l'àcid pseudomònic i (C) basats en el complex aminoacil adenilat.

Una altra estratègia utilitzada en la cerca d'inhibidors de les sintetasses ha estat inspirar el seu disseny en el complex aminoacil adenilat (figura 6C) (27,28,29,30). Les modificacions en aquest tipus de mimètics s'han centrat bàsicament en canviar l'enllaç fosfat del complex aminoacil adenilat per altres unions no hidrolitzables, com ara fer l'unió entre la ribosa i l'aminoàcid mitjançant un enllaç sulfamat o sulfamida o bé canviar el grup carbonil de l'aminoàcid unit al fosfat per un metilè. En altres dissenys s'ha canviat l'anell d'adenina per altres bases (purina, citosina, uridina o dihidrocitosina), no donant massa bons resultats i demostrant així la importància de l'adenina a l'hora d'unir-se a l'enzim (31). Alguns mimètics inspirats en el complex aminoacil adenilat presenten inhibició espècie-específica i activitat antimicrobiana, el que obre la possibilitat de desenvolupar fàrmacs que inhibeixin la sintetassa del patògen sense afectar-ne l'homòloga humana. Tot i això, aquests compostos solen mostrar una activitat cel·lular limitada, degut a la pobre penetració a través de la membrana cel·lular, i per tant sembla que encara s'està lluny de trobar candidats que arribin a fases clíniques (25). Tenint en compte l'homologia del centre actiu de les diferents sintetasses, és fàcil pensar en la possibilitat de desenvolupar inhibidors capaços d'actuar sobre diverses sintetasses a la vegada, el que amb molta probabilitat faria retardar l'aparició de resistències ja que es requeririen mutacions a múltiples dianes (19).



**Figura 7.** Exemples representatius de nous inhibidors de tRNA sintetasses obtinguts utilitzant tècniques de HTS.

A més a més d'aquestes estratègies, també s'han utilitzat tècniques de *high-throughput screening* (HTS) per tal de cercar nous agents antiinfectius basats en estructures *de novo* capaços d'inhibir les sintetasses (32,33,34) (figura 7). A pesar dels resultats prometedors obtinguts en el disseny de nous inhibidors de les tRNA sintetasses, encara queda millorar-ne la selectivitat abans no s'arribi a fàrmacs com la mupirocina, que té una selectivitat excel·lent per la isoleucil-tRNA sintetassa de cèl·lules procariotes. Tot i que s'han dissenyat bons candidats mitjançant models moleculars automatitzats utilitzant les diferències entre les sintetasses dels patògens i les humanes, s'ha vist que les bones inhibicions obtingudes *in vitro* no s'han acabat corresponent *in vivo*. Això s'atribueix a l'alta polaritat dels inhibidors, els quals són incapaços de travessar la paret bacteriana. Així, en el disseny racional d'inhibidors de les sintetasses s'ha de tenir en compte aspectes com aquest, tot i que el baix nombre de mimètics del complex aminoacil adenilat no permet fer encara prediccions de permeabilitat o altres propietats farmacològiques. Donat que ja s'han descrit algunes resistències per a la mupirocina (35,36,37), el descobriment de nous inhibidors és una necessitat cada cop més gran.

## 3.2. OBJECTIUS

En aquest capítol de la tesis ens vàrem plantejar la síntesi en fase sòlida d'una llibreria d'inhibidors de la lisil-tRNA sintetasa (LysRS) de *Plasmodium falciparium*. Per això tinguérem que posar a punt un mètode de sulfamoilació en fase sòlida, reacció que no havia estat descrita abans utilitzant aquesta metodologia sintètica. Així, en aquest capítol ens vàrem plantejar dos objectius:

1. El primer objectiu fou el desenvolupament d'una síntesi eficient de sulfamats en fase sòlida. En aquest capítol, vàrem provar diferents mètodes de sulfamoilació en fase sòlida, mètodes que havien estat prèviament descrits en solució. Un cop optimitzat el protocol de sulfamoilació treballant amb hidroxiprolina, vàrem sulfamoilar diferents alcohols per demostrar la versatilitat del mètode.
2. La resistència que han presentat al llarg dels anys els microorganismes desenvolupant sistemes de resistència als antibiòtics convencionals fa que el desenvolupament de nous fàrmacs sigui del tot imprescindible. Així, l'últim objectiu d'aquesta tesi fou la síntesi d'una llibreria de compostos amb la finalitat de cercar inhibidors de la lisil-tRNA sintetassa (LysRS) del *Plasmodium Falcipaium*, paràsit causant de la malària. La síntesi es féu un cop més en fase sòlida utilitzant plataformes trifuncionals derivades de prolina.

## Referències

- 
1. Hayes, J. D. And Wolf, C. R. Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem. J.* **1990**, 272, 281–295.
  2. Gruneberg, R. N. Anti-gram-positive agents. What we have and what we would like. *Drugs* **1997**, 54(6), 29–38
  3. Baquero, F. Gram-positive resistance: challenge for the development of new antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **1997**, 39, A1–6

4. Schimmel, P. R., and Söll, D. Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 601–648
5. Delagoutte, B., Moras, D., Cavarelli, J. tRNA aminoacylation by arginyl-tRNA synthetase: induced conformations during substrates binding *EMBO J.* **2000**, *19*, 5599–5610.
6. Onesti, S., Desogus, G., Brevet, A., Chen, J., Plateau, P., Blanquet, S., Brick, P. Structural studies of lysyl-tRNA synthetase: conformational changes induced by substrate binding. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12853–12861.
7. Fuller, A. T., Mellows, G., Woolford, M., Banks, G. T., Barrow, K. D., and Chain, E. B. Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature (London)* **1971**, *234*, 416–417.
8. Casewell, M. W., and Hill, R. L. R. *In vitro* activity of mupirocin (‘pseudomonic acid’) against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **1985**, *15*, 523–531.
9. Hughes, J., and Mellows, G. Interaction of pseudomonic acid A with *Escherichia coli* B isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochem. J.* **1980**, *191*, 209–219.
10. Blaines, P. J., Jackson, D., Mellows, G., Swaisland, A. J., and Tasker, T. C. G. (1984) Mupirocin: its chemistry and metabolism. In: Mupirocin—A Novel Topical Antibiotic (Wilkinson, D. S., and Price, J. D., eds) pp. 13–22, Royal Society of Medicine International Congress and Symposium Series Number 80
11. Nass, G., Poralla, K., and Zahner, H. Effect of the antibiotic Borrelidin on the regulation of threonine biosynthetic enzymes in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Acta* **1969**, *34*, 84–91.
12. Paetz, W., and Nass, G. Biochemical and immunological characterization of threonyl-tRNA synthetase of two borrelidin resistant mutants of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **1973**, *35*, 331–337.
13. Tanaka, K., Tamoki, M., and Watanabe, S. Effect of furnaomycin on the synthesis of isoleucyl-tRNA. *Biochem. Biophys. Acta* **1969**, *195*, 244–245.
14. Ogilvie, A., Wiebauer, K., and Kersten, W. Inhibition of leucyl-transfer ribonucleic acid synthetase in *Bacillus subtilis* by granaticin. *Biochem. J.* **1975**, *152*, 511–515.
15. Werner, R. G., Thorpe, L. F., Reuter, W., and Nierhaus, K. H. Indolmycin inhibits prokaryotic tryptophanyl-tRNA ligase. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *68*, 1–3.

16. Konrad, I., and Rosenthaler, R. Inhibition of phenylalanine tRNA synthetase from *Bacillus subtilis* by ochratoxin A. *FEBS Lett.* **1977**, *83*, 341–347.
17. Konishi, M., Nishio, M., Saitoh, K., Miyaki, T., Oki, T., and Kawaguchi, H. Cispentacin, a new antifungal antibiotic. I. Production, isolation, physico-chemical properties and structure. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1989**, *42*, 1749–1755.
18. Protein Data Bank ([Hwww.rcsb.org/pdb/Welcome.do](http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do)H).
19. Kim, S.; Lee, S. W.; Choi, E.-C., and Choi, S. Y. Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. (Review) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 278–288.
20. Klein L.L., Yeung C.M., Kurath P., Mao J.C., Fernandes P.B., Lartey P.A., and Pernet A.G. Synthesis and activity of nonhydrolyzable pseudomonic acid analogues. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 151–160.
21. SmithKline Beecham PLC (**1996a**) (Hetero)-aryl ketones derivatives with antibacterial properties. US patent 5536745.
22. SmithKline Beecham PLC (**1996b**) (Hetero)-aryl ketones derivatives with antibacterial properties. JP patent 9157269.
23. SmithKline Beecham PLC (**1997a**) Mupirocinsulfamates with antibacterial activity. WO 97/05126 P(1999)
24. SmithKline Beecham PLC (**1997b**) Compounds with a sulfamoyl group and pharmaceutical compositions containing them. WO 97/35859
25. SmithKline Beecham PLC (**1998a**) Sulfamate derivatives with t-RNA synthetase inhibiting activity. WO 98/32765
26. SmithKline Beecham PLC (**1998b**) Enzymatic preparation of monic acids. US patent 5726049.
27. Heacock D, Forsyth CJ, Shiba K, Musiter-Forsyth K Synthesis and aminoacyl-tRNA synthetase inhibitory of prolyl adenylate analogs. *Bioorg. Chem.* **1996**, *24*, 273–289
28. Cubist Pharmaceuticals Inc (**1998a**) Aminoacyl adenylate mimics as novel antimicrobial and antiparasitic agents. US patent 5726195.
29. Cubist Pharmaceuticals Inc (**1998b**) Aminoacyl sulfamides for the treatment of hyperproliferative disorders. WO 98/41215.
30. Jarvest RL, Berge JM, Houge-Frydrych CS, Janson C, Mensah LM, O’Hanlon PJ, Pope A, Saldanha A, Qiu X Interaction of tyrosyl aryl dipeptides with *S. aureus*



- tyrosyl tRNA synthetase: inhibition and crystal structure of a complex. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2859–2862.
31. Desjardins M, Garneau S, Desgagnes J, Lacoste L, Yang F, Lapointe J, Chenevert R  
Glutamyl adenylate analogues are inhibitors of glutamyl-tRNA synthetase. *Bioorg. Chem.* **1998**, *26*, 1–13
32. SmithKline Beecham PLC (**2000a**) 2-NH-Pyridones and pyrimidon131s as MRS inhibitors. WO 00/71524 A.
33. SmithKline Beecham PLC (**2000b**) Benzimidazole derivatives and their use as methionyl-tRNA synthetase inhibitors. WO 00/71522 A1
34. Merck & Co Inc (**2000a**) Novel prolines as antimicrobial agents. WO 00/66119
35. Cookson, B.D. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, *41*, 11–18.
36. Schmitz, F.J.; Lindenlauf, E.; Hofmann, A.C.; Fluit, A.C.; Verhoef, J.; Heinz, H.P., and Jones, M.E. The prevalence of low- and highlevel mupirocin resistance in staphylococci from 19 European hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, *42*, 489–495.
37. Yun, H.J.; Lee, S.W.; Yoon, G.M.; Kim, S.Y.; Choi, S.; Lee, Y.S.; Choi, E.C., and Kim, S. Prevalence and mechanisms of low- and high-level mupirocin resistance in staphylococci isolated from a Korean Hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 619–623.



## **3.3. RESULTATS**

### **3.3.1. Solid-phase synthesis of sulfamate peptidomimetics**

**Josep Farrera-Sinfreu, Fernando Albericio and Miriam Royo**

*Organic Letters*, submitted



# Solid-Phase Synthesis of Sulfamate Peptidomimetics

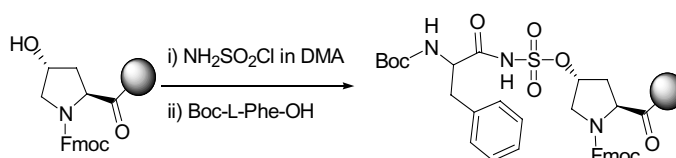
Josep Farrera-Sinfreu,<sup>†,§</sup> Fernando Albericio,<sup>\*,†,‡</sup> and Miriam Royo<sup>\*,§</sup>

Institute for Research in Biomedicine, and Combinatorial Chemistry Unit, Barcelona Science Park, University of Barcelona, Josep Samitier 1, 08028-Barcelona, Spain.

Department of Organic Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franqués 1, 08028-Barcelona, Spain.

[albericio@pcb.ub.es](mailto:albericio@pcb.ub.es); [miroyo@pcb.ub.es](mailto:miroyo@pcb.ub.es)

## ABSTRACT



A straightforward solid-phase synthesis of sulfamate peptidomimetics is described. Several structurally different hydroxy acids, with their corresponding alcohols protected, were coupled to the Rink Amide MBHA resin. After deprotection, sulfamylation occurred with sulfamoyl chloride in dimethylacetamide. Acylation with Boc-Phe-OH, as model amino acid, and standard solid-phase coupling reagents then rendered the sulfamate moiety. Further manipulation of these compounds, followed by acidolytic cleavage using TFA, led to the final sulfamate peptidomimetics.

Synthetic sulfamide- and sulfamate-based compounds play crucial roles in a broad range of biological processes. For example, a number of sulfamide analogues show therapeutic application as inhibitors of the HIV-protease,<sup>1,2</sup> such as carbonic anhydrase inhibitors,<sup>3</sup> or as

potent and selective  $\beta_3$ -adrenergic receptor agonists.<sup>4</sup> Furthermore, sulfamate derivatives show therapeutic properties as steroid sulfatase inhibitors,<sup>5</sup> or as aminoacyl-tRNA synthetases inhibitors.<sup>6</sup>

trifluoroacetic acid; THF, tetrahydrofuran; THP, tetrahydropyran; amino acid symbols denote L configuration.

(2) Stranix, B. R.; Sauvé, G.; Bouzide, A.; Coté, A.; Sévigny, G.; Yelle, J.; Perron, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3971.

(3) (a) Scozzafava, A.; Owa, T.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 925. (b) Casini, A.; Winum, J. Y.; Montero, J. L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 837. (c) Winum, J. Y.; Pastorekova, S.; Jakubickova, L.; Montero, J. L.; Scozzafava, A.; Pastorek, J.; Vullo, D.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 579 (d) Winum, J. Y.; Scozzafava, A.; Montero, J. L.; Supuran, C. T. *Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 186–228.

(4) Dow, R. L.; Paight, E. S.; Schneider, S. R.; Haddock, J. R.; Hargrove, D. M.; Martin, K. A.; Maurer, T. S.; Nardone, N. A.; Tess, D. A.; DaSilva-Jardine, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3235.

(5) (a) Howarth, N. M.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 219. (b) Woo, L. W. L.; Lightowler, M.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **1996**, *57*, 79. (c) Woo, L. W. L.; Howarth, N. M.; Purohit, A.; Hejaz, H. A. M.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1068. (d) Hejaz, H.

<sup>†</sup> Institute for Research in Biomedicine.

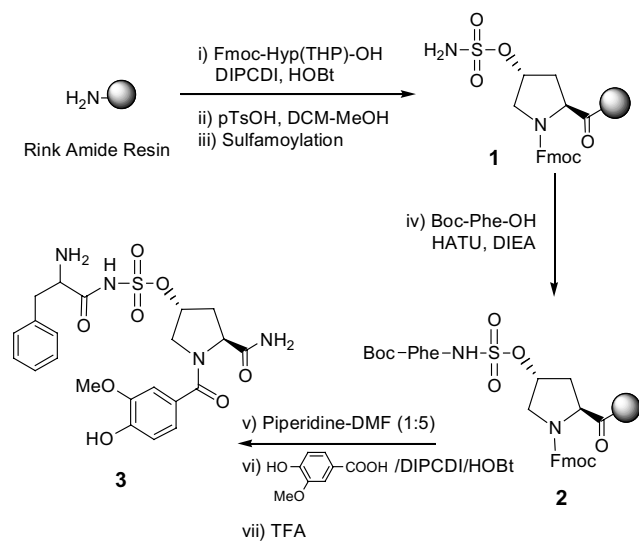
<sup>§</sup> Combinatorial Chemistry Unit.

<sup>‡</sup> Department of Organic Chemistry.

(1) Abbreviations: Alloc, allyloxycarbonyl; Boc, *tert*-butoxycarbonyl; DCM, dichloromethane; DHP, 3,4-dihydro-2*H*-pyrane; DIEA, *N,N*-diisopropylethylamine; DIPCPI, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide; DMA, *N,N*-dimethylacetamide; DMAP, *N,N*-4-dimethylaminopyridine; DME, ethylene glycol dimethyl ether; DMF, *N,N*-dimethylformamide; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl; HATU, *N*-{[(dimethylamino)-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5-*b*]pyridin-1-yl-methylene]-*N*-methylmethanaminiumhexafluorophosphate *N*-oxide}; HFA, hexafluoroacetone; HIV, human immunodeficiency virus; HOBt, 1-hydroxy-1,2,3-benzotriazole; MBHA, *p*-methylbenzhydrylamine; MeOH, methanol; *p*-TsOH, *p*-toluenesulfonic acid; RP-HPLC, reversed-phase high performance liquid chromatography; SPPS, solid-phase peptide synthesis; TFA,

Sulfamoyl chloride is a common reagent for the preparation of sulfamides and sulfamates in solution, and has been used for the preparation of sulfamides and sulfahydantoin on resin.<sup>7</sup> Although sulfamoylation has become a powerful strategy for the construction of many sulfamate and sulfamide analogues, to the best of our knowledge no solid-phase sulfamate synthesis has been described.<sup>8</sup>

**Scheme 1.** Synthesis of dipeptide analogues using Fmoc-*trans*-Hyp(THP)-OH.



Herein, several solid-phase sulfamoylation protocols were evaluated, working first with *trans*-hydroxyproline as alcohol source. This scaffold was chosen because it was stable under the sulfamoylation conditions and did not produce secondary reactions such as dehydration. Furthermore, the scaffold allowed us to check sulfamate stability in response to other reactions such as Fmoc and Alloc deprotection or acylation. A convenient protection system of the hydroxyl group was required to avoid on-resin polymerisations. Tetrahydropyran (THP) was a useful protecting group, orthogonal to Alloc and Fmoc

chemistry and even compatible with Boc chemistry.<sup>9</sup> Fmoc-Hyp(THP)-OH was coupled to the Rink Amide resin (see Scheme 1) using common coupling reagents in solid-phase peptide synthesis (SPPS), such as *N,N*-diisopropylcarbodiimide (DIPCPI)/1-hydroxybenzotriazole (HOBT). THP was then removed by treatment of the resin with *p*-TsOH (5 mg/mL) in DCM-MeOH (19:1), yielding the free alcohol in a quantitative yield. The sulfamoylation method was then optimised by working on the Fmoc-Hyp-Rink Amide resin.

### Sulfamoylation Optimisation

Several sulfamoylation protocols were tested using sulfamoyl chloride (10 eq) as a reagent. Given that sulfamoylation methods of aliphatic alcohols in solution require a strong base such as NaH (5 eq), the use of this base was assayed in solid-phase using ethylene glycol dimethyl ether (DME) as a solvent.<sup>10,11</sup> However, this method did not work properly when adapted to solid-phase. Although the desired product was detected by HPLC when a few mg (50 mg) of the resin was used, we did not attempt to optimise the strategy because this base was difficult to remove from the resin, even when MeOH and H<sub>2</sub>O washings were performed. This problem was aggravated when the reaction was scaled up to 1 g or more. Similar problems were obtained when we used K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq), alone or in the presence of 18-crown-6 (3 eq) in DCM. The use of weak bases such as NEt<sub>3</sub> (3 eq) or DIEA (10 eq) in DMF or DCM was abandoned because sulfamoylation didn't work, obtaining the starting material. This phenomena may arise from the destruction of sulfamoyl chloride in the presence of a base, as reported by Sigfrid et al.<sup>12</sup>

The use of other solvents which achieve good swelling of the resin, such as DCM, DMF, or THF without base, did not yield the sulfamoylated compound, even after heating the resin at 50 °C or using ultrasounds (data not shown). In these cases, in addition to the destruction of sulfamoyl chloride, premature cleavage of compounds from the resin was also detected.<sup>13</sup>

Bases, in addition to destroying sulfamoyl chloride, can produce over sulfamoylation. Sulfamoyl chloride can also react with solvents such as DMF through its formyl proton, with its consequent destruction. Okada et al.<sup>14</sup> described a method that circumvents all these problems,

A. M.; Purohit, A.; Mahon, M. F.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3188. (e) Nussbaumer, P.; Lehr, P.; Billich, A. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4310. (f) Schreiner, E. P.; Wolff, B.; Winiski, A. P.; Billich, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 4313. (g) Hejaz, H. A. M.; Woo, L. W. L.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2759.

(6) (a) Heacock, D.; Forsyth, C. J.; Shiba, K.; Musier-Forsyth, K. *Bioorg. Chem.* **1996**, *24*, 273. (b) Lee, J.; Kim, S. E.; Lee, J. Y.; Kim, S. Y.; Kang, S. U.; Seo, S. H.; Chun, M. W.; Kang, T.; Choi, S. Y.; Kim, H. O. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1087. (c) For reviews see: Kim, S.; Lee, S. W.; Choi, E.-C.; Choi, S. Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 278.

(7) Albericio, F.; Bryman, L. M.; Garcia, J.; Michelotti, E. L.; Nicolás, E.; Tice, C. M. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 290.

(8) On the other hand, sulfamate has been used as an anchor for solid-phase organic synthesis. (a) Ciobanu, L. C.; Maltais, R.; Poirier, D. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 445. (b) Poirier, D.; Ciobanu, L. C.; Bérubé, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2833. (c) Ciobanu, L. C.; Poirier, D. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 429.

(9) (a) Kuisle, O.; Quinoa, E.; Riguera, R. *J. Comb. Chem.* **1999**, *64*, 8063. (b) Vergnon, A. L.; Pottorf, R. S.; Player, M. R. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 91.

(10) Sulfamoyl chloride was obtained by reaction between chlorosulfonyl isocyanate (1 eq) and formic acid (1 eq) at 5 °C, followed by stirring at room temperature until gas evolution ceased and used immediately.

(11) Graf, R. *Chem. Ber.* **1959**, *92*, 509.

(12) Sigfrid, S.; Ina, T.; Margarit, R.; Bernd, U.; Harry, H.; Walter, E. *Steroids* **1996**, *61*, 710.

(13) Sulfamoylation in DCM in absence of base gave the total premature compound cleavage from the resin. Even when 5 eq of DIEA or Et<sub>3</sub>N were used as a base, the prematurely cleaved compound was detected in the washes collected.

(14) Okada, M.; Iwashita, S.; Koizumi, N. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7047.

using sulfamoyl chloride in DMA in the absence of base. Unlike DMF, DMA cannot react with sulfamoyl chloride and works as a moderate base, thereby avoiding the use of additional bases, and consequently, preventing both the decomposition of sulfamoyl chloride and the over sulfamoylation of the sulfamoyl group. Given that the main problem encountered in solid-phase sulfamoylations is the use of bases, the method not involving these bases was considered a good alternative and was therefore tested.

Fmoc-Hyp-Rink Amide resin was treated with sulfamoyl chloride (10 eq) in DMA for 3 h and gave the expected final sulfamoylated product in quantitative HPLC purity.<sup>15</sup> To test whether the Alloc protecting group is compatible with sulfamate synthesis, the same experiment was performed using Alloc-L-Hyp-Rink Amide resin. This experiment also gave the same result (>95% by HPLC). Furthermore, the beauty of this method is that it may also prevent epimerisation of the  $\alpha$ -carbon of the proline, which easily racemises in strong basic conditions, such as when using NaH.

### Optimisation of Sulfamate Elongation

Sulfamate elongation (Scheme 1, step iv) was then performed by the acylation of the sulfamoyl group with Boc-L-Phe-OH (5 eq) as amino acid model, using several coupling methods (see Table 1). HATU (5 eq) and DIEA (10 eq) for 2 h gave the best results as coupling method since the alternative one, which involves DIPCDDI/DMAP, favoured racemization of the incoming protected amino acid. Deprotection of the  $N^\alpha$  of hydroxyproline with piperidine, followed by the coupling of 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (5 eq) with DIPCDDI (5 eq) and HOBt (5 eq) and the final acyolytic cleavage with TFA-H<sub>2</sub>O (95:5) gave the expected product **3** with more than 95% purity, as shown by HPLC.

**Table 1.** Coupling of Boc-L-Phe-OH to the  $\gamma$ -sulfamoyl-Fmoc-proline Rink Amide resin.

Conditions	Solvent	Time (h)	% HPLC
DIPCDDI (5 eq), HOBt (5 eq)	DMF	2h	-
DIPCDDI (5 eq), DMAP (0.5 eq)	DCM	16h	50
DIPCDDI (5 eq), DMAP (1 eq)	DCM	2h	60
DIPCDDI (5 eq), DMAP (5 eq)	DCM	2h	>95
HATU (5 eq), DIEA (10 eq)	DMF	2h	>95

### Testing the sulfamoylation protocol in several alcohols

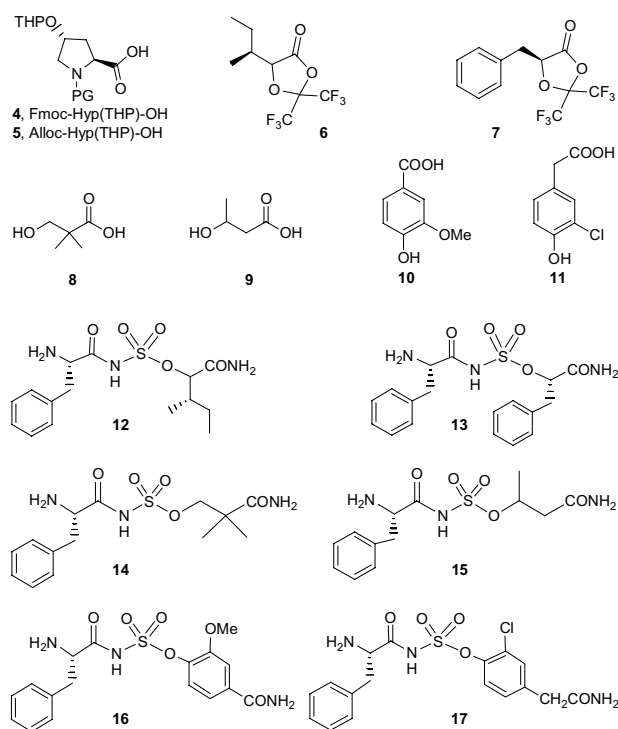
The same experiment was performed using Alloc-L-Hyp-Rink Amide resin. Sulfamoylation in DMA, followed by the Boc-Phe-OH coupling, removal of the

(15) General procedure for on-resin sulfamoylation in DMA: the resin (50 mg, 0.035 mmol) was pre-swollen in DMA (1.5 mL) for 30 min. A solution of sulfamoyl chloride (10 eq) in DMA was then added at 0 °C and the resin was stirred at room temperature for 3 h. The resin was then filtered, washed with DMA, DMF, and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The resin was finally treated once with 5% DIEA in DMF to remove possible traces of acid and then washed with DMF and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Alloc group with Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.1 eq) in PhSiH<sub>3</sub> (24 eq) followed by the coupling of 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (5 eq) with DIPCDDI (5 eq) and HOBt (5 eq) and the final acyolytic cleavage with TFA-H<sub>2</sub>O (95:5) rendered the expected product **3**, thereby demonstrating the versatility of Alloc chemistry in sulfamate synthesis.

Once sulfamoylation was demonstrated when working with Hyp, several kinds of alcohol were assayed.  $\alpha$ -Hydroxy acids (**6**) and (**7**) were also sulfamoylated, in this case working with an hexafluoroacetone (HFA) protecting/activating scheme (see Figure 1).<sup>16</sup> These compounds are easily accessible from their natural amino acid counterparts. Also the  $\beta$ -hydroxy acids 2,2-dimethyl-3-hydroxy-propionic acid (**8**) and 3-hydroxybutyric acid (**9**) were tested (Figure 1). Finally, sulfamoylation was also carried out with phenols (**10**) and (**11**) (see Figure 1).

**Figure 1.** The building blocks used in this study and the products obtained.



$\alpha$ -Sulfamate peptidomimetics were obtained by coupling of HFA- $\alpha$ -hydroxy acids derived from Ile (**6**) and Phe (**7**) to the resin in THF for 3h. Sulfamoylation was performed using the optimised protocol in DMA. Further functionalization with phenylalanine (Boc-Phe-OH) and cleavage with TFA-H<sub>2</sub>O (95:5) gave the

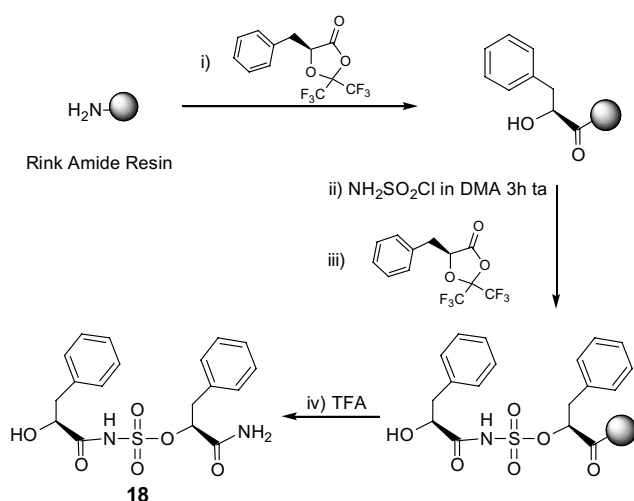
(16) Albericio, F.; Burger, K.; Ruíz-Rodríguez, J.; Spengler, J. *Organic Letters* **2005**, *7*, 597.

expected products with over 95% purity in both cases, as shown by HPLC.

$\beta$ -Sulfamate peptidomimetics were obtained starting from hydroxy acids **8** and **9**, following the same protocol stated above, but using DIPCDI (5 eq) and HOBT (5 eq) as coupling method to incorporate  $\beta$ -hydroxy acids to the resin.<sup>17</sup>

The viability of the sulfamoylation protocol was also tested using two commercially available phenols (**10** and **11**), which, after being coupled to the resin using DIPCDI/HOBT, were sulfamoylated and acylated with Boc-Phe-OH to give the expected products with more than 95% purity, as shown by HPLC.

**Scheme 2.** Solid-phase synthesis of sulfamate peptidomimetics comprising  $\alpha$ -hydroxy acids as monomer units.



**Table 3.** Conditions tested in the coupling of HFA-protected hydroxy acids (5 eq) to the  $\alpha$ -sulfamoyl Rink Amide resin.

Solvent	Base	Time (h)	% HPLC
DMSO	-	7	-
DMSO	DMAP (1 eq)	3	5
DMSO	DIEA (5 eq)	7	10
DMA	-	7	-
DMA	DMAP (1 eq)	3	2
DMA	DIEA (5 eq)	7	10
THF	-	7	-
THF	DMAP (1 eq)	3	15
THF	DIEA (5 eq)	7	40
THF	DIEA (5 eq)	24	60

Detection was by HPLC-MS of product **12** at 220 nm.

Working with the HFA-hydroxy acids **6** and **7**, sulfamate peptidomimetic oligomers were also obtained

(17) When serine and threonine were used as  $\beta$ -hydroxy amino acids, final products could not be isolated after sulfamoylation because  $\beta$ -elimination occurred.

as described in Scheme 2, by repeating the sequence of the  $\alpha$ -hydroxy acid protected/activated with HFA coupling followed by the sulfamoylation. Couplings of the HFA-hydroxy acids to the sulfamate moiety with THF proceeded with low yields after long reaction times because of the low reactivity of the sulfamoyl group. Thus, this group requires activation with a base, although the use of bases appears to destroy HFA-hydroxy acids. A range of solvents and bases were assayed. The best conditions for this elongation were obtained when DIEA in the THF was used (see Table 3). Compound **18** was prepared with 60% purity, as shown by HPLC, and was then characterised. The low conversion can be attributed to the destruction of HFA-hydroxy acid in the presence of bases, which jeopardizes the coupling.

In conclusion, here we developed a high-yield solid-phase synthesis of sulfamate derivatives. Alcohol-containing building blocks were incorporated on a Rink Amide through THP or HFA protection. The resin was stable to the conditions applied to remove THP. Sulfamoylation was performed effectively with sulfamoyl chloride in DMA. The presence of side-chain protected amino functions opens the possibility of adding more diversity. Our approach, which is compatible with Fmoc/Boc/Alloc protection, provides a useful and efficient tool for the preparation of new sulfamate peptidomimetics

**Acknowledgments.** The work was partially supported by funds from CICYT (BQU2002-02047, BQU2003-00089 and CTQ2005-0315), the *Generalitat de Catalunya (Grup Consolidat and Centre de Referència en Biotecnologia)*, and the Barcelona Science Park. The authors thank Javier Ruíz-Rodríguez and Dr. Jan Spengler for providing the HFA protected  $\alpha$ -hydroxy acids.

**Supporting Information Available:** Experimental procedures, spectroscopic data, and HPLC data for all compounds. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acd.org>.



## Solid-Phase Synthesis of Sulfamate Peptidomimetics

Josep Farrera-Sinfreu, Fernando Albericio, and Miriam Royo

### Supporting Information

#### **Experimental section**

**General Procedures. Solid-Phase Synthesis.** Manual SPS was carried out in polypropylene syringes (disposable reaction vessels) equipped with a porous polypropylene disk at the bottom. Syringes of variable volume were used depending on the initial dried resin quantity. Typically, resin was added to the syringe, and then the solvent used in the following reaction was added to create a slurry. The resin was washed with the solvent (3 mL of solvent per 1 mL of swollen resin). The mixture was stirred using a Teflon rod for a given time, and after finishing the treatment, the solvent was removed by suction. When about to carry out a reaction, the bottom part of the syringe was capped using a septum, and then the solvents and reagents were added. After manual stirring using a Teflon rod for 3 minutes, the mixture was allowed to react for a given time with a shaker agitation. Washings between deprotection, coupling and subsequent deprotection steps were carried out with DMF (5 × 1 min) and DCM (5 × 1 min) using 10 mL solvent/g resin each time.

**Fmoc group removal.** (i) DMF (5 × 1 min); (ii) piperidine/DMF (2:8) (1 × 1 min + 2 × 15 min); (iii) DMF (5 × 1 min).

**Alloc group removal.** Removal of the Alloc group was achieved with Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.1 eq) in the presence of PhSiH<sub>3</sub> (24 eq) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> under Ar (2 × 20 min, 25°C).

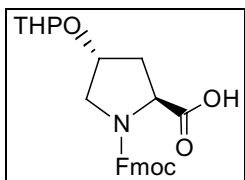
**THP group removal.** Removal of the THP group was achieved with a solution of *p*-TsOH (5 mg/mL) in DCM-MeOH (97:3) ( $2 \times 1$  h), preceded by a 3 min washings with the same solution.

**Solid-phase hydroxy acids coupling.** Syntheses were carried out Rink Amide MBHA resin. Couplings of different hydroxy acids (5 eq) were carried out with DIPCDI (5 eq) and HOBt (5 eq) in DMF for 2 h at 25 °C. After the coupling, the resin was washed with DMF ( $5 \times 1$  min) and DCM ( $5 \times 1$  min). Couplings were monitored by the Kaiser test.

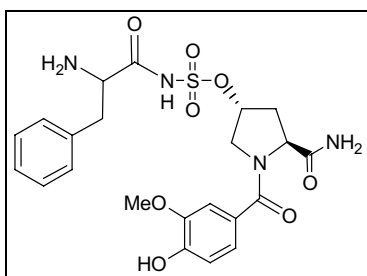
**Solid-phase HFA-protected hydroxy acid coupling.** Rink Amide MBHA resin was pre-swollen in THF. The HFA-hydroxy acid (5 eq) was then added and the resin was shaken for 3 h. After that, resin was washed with THF ( $5 \times 1$  min), DMF ( $5 \times 1$  min) and DCM ( $5 \times 1$  min). Couplings were monitored by the Kaiser test.

**General procedure for on-resin sulfamoylations.** (a) NaH in DME: the resin (50 mg, 0.035 mmol) was pre-swollen in DME (1.5 mL). A suspension of NaH (14 mg, 10 eq) in DME was then added and the resin was stirred for 2 hours at 50 °C. A solution of sulfamoyl chloride (10 eq) in DME was then added and the resin was stirred at room temperature for 15 hours. The resin was then treated with MeOH in order to remove the excess of hydride and washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH and DMF. (b) In DMA: the resin (50 mg, 0.035 mmol) was pre-swollen in DMA (1.5 mL) for 30 minutes. A solution of sulfamoyl chloride (10 eq) in DMA was then added at 0 °C and the resin was stirred at room temperature for 3 hours. The resin was then filtered, washed with DMA, DMF, and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The resin was then washed once with 5% DIEA in DMF to remove possible acid traces and finally with DMF and DCM.

**Acidolytic cleavage with TFA.** Resins were cleaved with TFA/H<sub>2</sub>O (95:5) for 2 h at 25°C. TFA was then evaporate, compounds were dissolved in H<sub>2</sub>O-MeCN and then lyophilised.

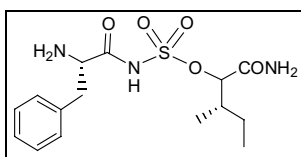


**Fmoc-*trans*-L-Hyp(THP)-OH (4):** 3,4-Dihydro-2*H*-pyrane (1.58 mL, 16.9 mmol) was added dropwise to a stirred solution of (2*S*,4*R*)-4-hydroxy-1-Fmoc-pyrrolidine-2-carboxylic acid (4 g, 11.3 mmol) and PPTS (0.29 g, 1.13 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) at 0°C. After 5 min, the ice bath was removed and the mixture was stirred overnight at r. t.. The solution was extracted with H<sub>2</sub>O (2 x 100 mL), dried with anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reducer pressure. Acid **2** (4.7 g, 95%) was obtained as a white solid and was used without purification. NMR data agree the one described at literature.



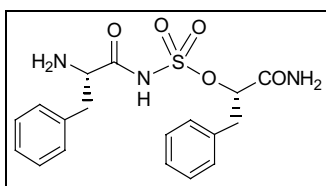
***N*-(2-Amino-3-phenyl-propionyl) (5-carbamoyl-1-(4-hydroxy-3-methoxy-benzoyl)-pyrrolidin-3-yl) sulfamate (3):** <sup>1</sup>H NMR [CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz]: 2.19-2.27 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.62 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>, *J* = 14.0 Hz, *J* = 7.8 Hz); 2.86 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>, *J* = 14.4 Hz, *J* = 8.8 Hz); 3.22 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>, *J* = 14.4 Hz, *J* = 4.4 Hz); 3.71 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>, *J* = 9.0 Hz, *J* = 4.4 Hz); 3.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.90 (bb, 1H, CH<sub>2</sub>); 4.000-4.120 (m, 1H, CH); 4.71 (t,

$^1\text{H}$  NMR [CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz]: 1.07 (t, 3H, CH<sub>3</sub>,  $J = 6.8$  Hz); 1.22-1.31 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 1.51-1.57 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.04-2.09 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.08 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 14.8$  Hz,  $J = 8.4$  Hz); 3.30-3.34 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.87 (dd, 1H, CH,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 4.8$  Hz); 4.67 (d, 1H, CH,  $J = 3.6$  Hz); 7.28-7.34 (m, 5H, 5 x CH).  $^{13}\text{C}$  NMR [CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz]: 11.0 (CH<sub>3</sub>); 14.8 (CH<sub>3</sub>); 23.6 (CH<sub>2</sub>); 37.3 (CH); 37.7 (CH<sub>2</sub>); 57.0 (CH); 81.7 (CH); 121.4 (CH); 128.8 (CH); 129.5 (CH).



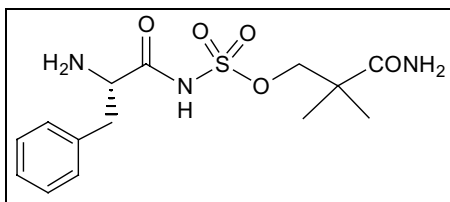
***N*-(2-Amino-3-phenyl-propionyl) (1-carbamoyl-2-methyl-butyl) sulfamate (12).**

$^1\text{H}$  NMR [CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz]: 0.94 (t, 3H, CH<sub>3</sub>,  $J = 7.2$  Hz); 1.07 (d, 3H, CH<sub>3</sub>,  $J = 6.8$  Hz); 1.22-1.31 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 1.51-1.57 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.04-2.09 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.08 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 14.8$  Hz,  $J = 8.4$  Hz); 3.30-3.34 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.87 (dd, 1H, CH,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 4.8$  Hz); 4.67 (d, 1H, CH,  $J = 3.6$  Hz); 7.28-7.34 (m, 5H, 5 x CH).  $^{13}\text{C}$  NMR [CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz]: 11.0 (CH<sub>3</sub>); 14.8 (CH<sub>3</sub>); 23.6 (CH<sub>2</sub>); 37.3 (CH); 37.7 (CH<sub>2</sub>); 57.0 (CH); 81.7 (CH); 121.4 (CH); 128.8 (CH); 129.5 (CH).



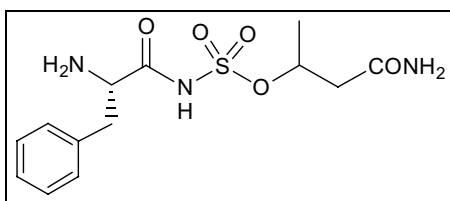
***N*-(2-Amino-3-phenyl-propionyl) (1-carbamoyl-2-phenyl-ethyl) sulfamate (13):**

$^1\text{H}$  NMR [DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz]: 3.08-3.12 (m, 2H, 2 x CH<sub>2</sub>); 3.28-3.36 (m, 2H, 2 x CH<sub>2</sub>); 3.73 (dd, 1H, CH,  $J = 6.8$  Hz,  $J = 5.2$  Hz); 4.817 (t, 1H, CH,  $J = 5.0$  Hz); 7.16-7.28 (m, 10H, 10 x CH); 7.74-7.76 (bb, NH<sub>2</sub>); 7.90 (bb, NH).



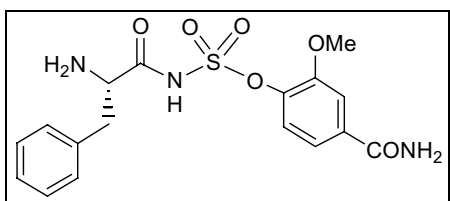
**N-(2-Amino-3-phenyl-propionyl) (2-carbamoyl-2-methyl-propyl) sulfamate (14):**

$^1\text{H}$  NMR [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz]: 1.21 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1.22 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 3.03 (dd, 1H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 14.4$  Hz,  $J = 8.6$  Hz); 3.31-3.35 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ); 3.86 (dd, 1H, CH,  $J = 8.6$  Hz,  $J = 5.2$  Hz); 4.01 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 7.28-7.35 (m, 5H, 5 x CH).  $^{13}\text{C}$  NMR [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz]: 23.0 ( $\text{CH}_3$ ); 23.1 ( $\text{CH}_3$ ); 38.5 ( $\text{CH}_2$ ); 43.5 (C); 58.3 (CH); 75.7 ( $\text{CH}_2$ ); 128.5 (CH); 130.0 (CH); 130.6 (CH); 136.7 (C).



**N-(2-Amino-3-phenyl-propionyl) (2-carbamoyl-1-methyl-ethyl) sulfamate (15):**

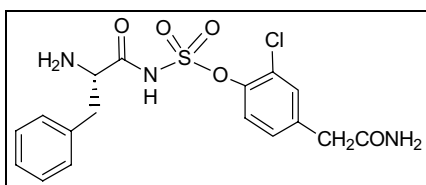
$^1\text{H}$  NMR [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz]: 1.20 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2.30-2.34 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2.98-3.10 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 4.08-4.20 (m, 1H, CH); 4.70-5.00 (m, 1H, CH); 7.28-7.40 (m, 5H, 5 x CH).  $^{13}\text{C}$  NMR [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz]: 22.1 ( $\text{CH}_3$ ); 39.0 ( $\text{CH}_2$ ); 44.1 ( $\text{CH}_2$ ); 54.5 (CH); 64.6 (CH); 127.6 (CH); 128.9 (CH); 129.3 (CH); 138.8 (C).



**N-(2-Amino-3-phenyl-propionyl) (4-carbamoyl-2-methoxy-phenyl) sulfamate**

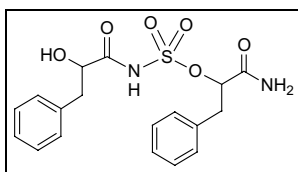
**(16):**  $^1\text{H}$  NMR [ $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz]: 2.41 (dd, 1H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 14.2$  Hz,  $J = 7.6$  Hz); 2.64 (dd, 1H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 14.2$  Hz,  $J = 5.2$  Hz); 3.21-3.27 (m, 1H, CH); 3.31 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 6.75

(m, 5H, 5 x CH); 6.92 (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz); 6.93 (s, 1H, CH); 6.01 (d, 1H, CH,  $J = 2.0$  Hz); 7.32 (bb, 4H, 2NH<sub>2</sub>); 7.43 (bb, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR [DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz]: 36.3 (CH<sub>2</sub>); 55.3 (CH<sub>3</sub>); 55.6 (CH); 111.5 (CH); 119.2 (CH); 120.7 (CH); 126.3 (CH); 127.9 (CH); 129.0 (CH); 130.2 (CH); 136.2 (C); 142.9 (C); 150.0 (C); 166.7 (C); 171.4 (C).



***N*-(2-Amino-3-phenyl-propionyl) (4-carbamoylmethyl-2-chloro-phenyl)**

**sulfamate (17):** <sup>1</sup>H NMR [CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz]: 1.70 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 14.8$  Hz,  $J = 8.8$  Hz); 2.02 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.20 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.61 (dd, 1H, CH,  $J_{\text{CH-CH}_2} = 8.8$  Hz,  $J_{\text{CH-CH}} = 4.8$  Hz); 5.93 (dd, 1H, CH,  $J_{\text{CH-CH}} = 8.4$  Hz,  $J_{\text{CH-CH}} = 2.0$  Hz); 6.03 (m, 5H, 5CH); 6.13 (d, 1H,  $J_{\text{CH-CH}} = 2.0$  Hz); 6.19 (d, 1H, CH,  $J_{\text{CH-CH}} = 8.4$  Hz). <sup>13</sup>C NMR [CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz]: 38.4 (CH<sub>2</sub>); 42.3 (CH<sub>2</sub>); 58.3 (CH); 124.6 (CH); 128.1 (CH); 128.5 (CH); 129.5 (CH); 130.0 (CH); 130.6 (CH); 132.0 (C); 135.8 (C); 136.5 (C); 147.9 (C); 174.6 (C); 176.0 (C).



**(1-Carbamoyl-2-phenyl-ethyl) *N*-(2-Hydroxy-3-phenyl-propionyl) sulfamate (18):**

<sup>1</sup>H NMR [DMSO, 400 MHz]: 2.81 (dd, CH<sub>2</sub>,  $J = 14.2$  Hz,  $J = 7.6$  Hz); 3.05 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 14.2$ ,  $J = 4.0$  Hz); 3.22 (dd, CH<sub>2</sub>,  $J = 5.8$  Hz,  $J = 3.0$  Hz); 3.57 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 5.8$ ,  $J = 1.6$  Hz); 4.18 (dd, 1H, CH,  $J = 7.6$ ,  $J = 4.0$  Hz); 5.21 (m, 1H, CH); 7.25-7.30 (m, 10H, 10 x CH).

### **3.3.2. Solid-phase combinatorial synthesis of a Lysyl-tRNA synthetase (LysRS) inhibitory library**

**Josep Farrera-Sinfreu, Fernando Albericio and Miriam Royo**

*Article en preparació*





# **Solid-Phase Combinatorial Synthesis of a Lysyl-tRNA Synthetase (LysRS)<sup>1</sup> Inhibitory Library**

## **INTRODUCTION**

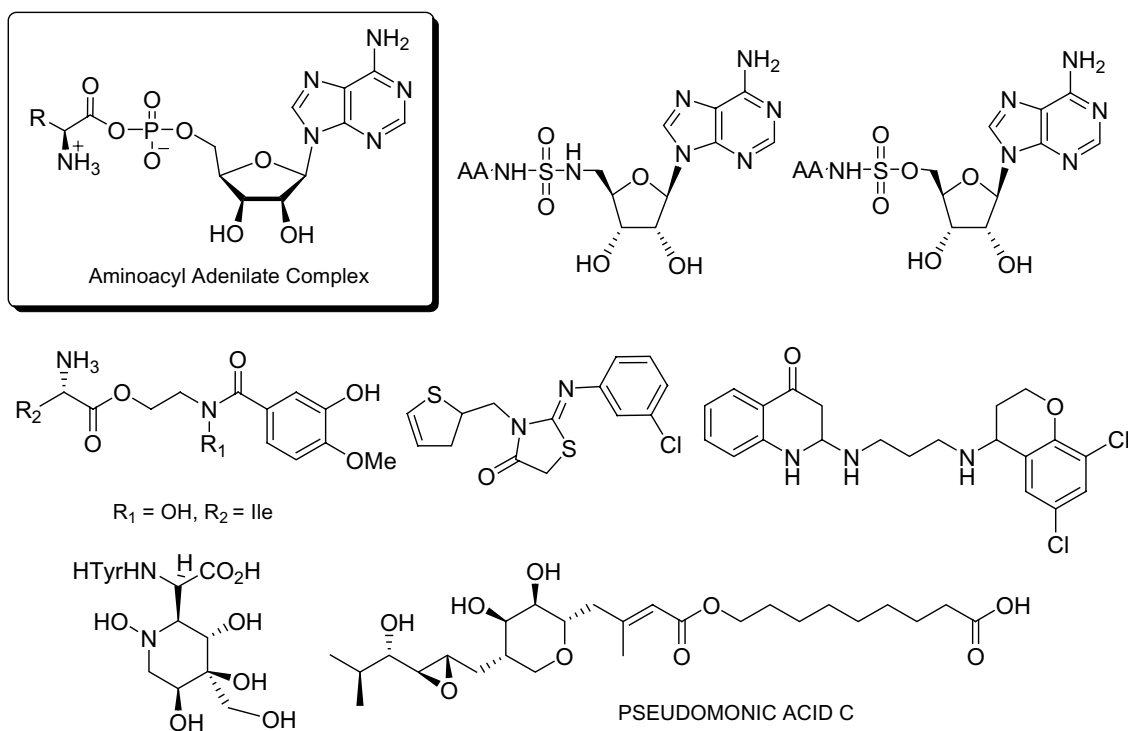
The continuous emergence of resistances to antibiotics has led to intensive search for new anti-infectives.<sup>2</sup> The main line antibiotics such as penicillin or vancomycin are addressed to targets located in prokaryotic cells and not in the eukaryotic ones. For example, these antibiotics inhibit a step in the cell wall synthesis. Other drugs are intended for cell growth essential functions that are common in prokaryotic and mammalian cells. However, this last strategy increase the likelihood of interfering with mammalian cells, increasing in this way the toxicity of the drugs due to the similarity of the targets of the pathogen and the host cells.

In the war against microorganisms, there are different targets of the translation apparatus, including the ribosomes, specific ribosomal proteins, ribosomal RNAs, and factors for chain initiation, elongation, translocation, and termination. Several antibiotics, such as aminoglycosids, macrolides or tetracyclines, can be used to treat infections by microorganisms that are insensitive or resistant to major antibiotics. These drugs interact with the 30S or 50S ribosomal subunits, thereby blocking protein synthesis in a specific pathogen but not in mammalian cells. Nevertheless, these therapeutic agents have a number of limitations, such as lack of oral availability, toxicity in humans, and even resistance.<sup>3</sup>

Thus, aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) comprise new targets that have been studied intensively in recent years.<sup>4</sup> These enzymes catalyze the transfer of specific amino acids to their corresponding tRNAs to form aminoacyl-tRNAs, which are used in protein biosynthesis. Since aminoacylation is essential in all living organisms, these enzymes have attracted much attention as promising antibacterial targets for the development of new drugs to overcome the resistance caused by mainline antibiotics. The discovery that pseudomonic acid (mupirocin) inhibits the isoleucyl-tRNA synthetase in a number of microorganisms, and shows 8000-fold selectivity vs. the mammalian (with species specificity),<sup>5</sup> opened up the possibility to use these targets for the design and search for new antiinfectives.

Taking mupirocin as a model, other synthetase inhibitors have been described. The design of these new drugs addressed to the tRNA synthetases has been inspired in the aminoacyl adenylate complex, the mixed anhydride intermediate generated during the aminoacylation reaction. Since this complex is bound more tightly to the enzyme than the substrates (amino acid and ATP), generally by two or three orders of magnitude, analogues based on the adenylate intermediate could potentially bind as tightly as inhibitors. This hypothesis has been explored by several groups with success, obtaining other tRNA synthetases inhibitors such as borrelidin (Thr),<sup>6,7</sup> furanomycin (Ile),<sup>8</sup> granaticin (Leu),<sup>9</sup> indolmycin (Trp),<sup>10</sup> ochratoxin A (Phe),<sup>11</sup> or cispentacin (Pro).<sup>12</sup>

Here we applied a modular combinatorial strategy to obtain new analogue families of the aminoacyl adenylate complex addressed to inhibit the LysRS of *Plasmodium falciparum* (figure 1).



**Figure 1.** Representative examples of tRNA synthetase inhibitors, some of them based on the aminoacyl adenylate complex.

## RESULTS

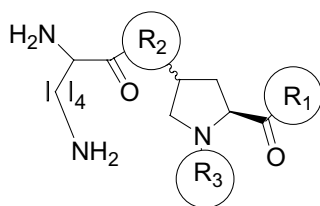
### Library Design

The solid-phase synthesis of a new library of compounds with potential inhibitory activity against LysRS of *Plasmodium* is described. The design of the library was based on the structure of the aminoacyl adenylate complex, formed by an amino acid linked to an adeninemonophosphate molecule (AMP) (see Figure 1).

The basic structure of this complex is divided into four modular parts, each modified with a set of suitable mimetics covering a predetermined diversity space. In the present design, the amino acid moiety was maintained as a lysine. The labile phosphate bond was stabilized by replacing it by stable non-hydrolyzable bioisosters such as amide, sulfamate, and hydroxamate bonds. The ribose was substituted by trifunctional proline derived cyclic bioisosters, and the adenine moiety was replaced by several aromatic

rings and heterocycles. The combination of these four modular parts of the complex produced distinct aaRS families.

The  $\gamma$ -substituted proline derivative (*cis*- $\gamma$ -amino-L-proline or *trans*- $\gamma$ -hydroxy-L-proline), which was the ribose replacement, was attached to the resin through its carboxylic acid. Since the synthesis was performed in solid-phase, the first point of diversity was the C-terminal of these peptidomimetics ( $R_1$ ), which were explored by using diverse linkers or supports, thereby obtaining hydroxamic acids, carboxamides and carboxylic acids. The library was designed against the synthetase LysRS, and therefore the amino acid (lysine) was maintained. This amino acid was coupled to the  $\gamma$ -amino position of the proline, thereby exploring several linkages ( $R_2$ ) which imitate the phosphate bond in the natural complex, including the amide, the sulfamate and the hydroxamate. The third point of diversity ( $R_3$ ) was the introduction at the  $\alpha$ -amino position of the proline of several aromatic rings, as well as two heterocycles, which include the natural adenine moiety (see Table 1).

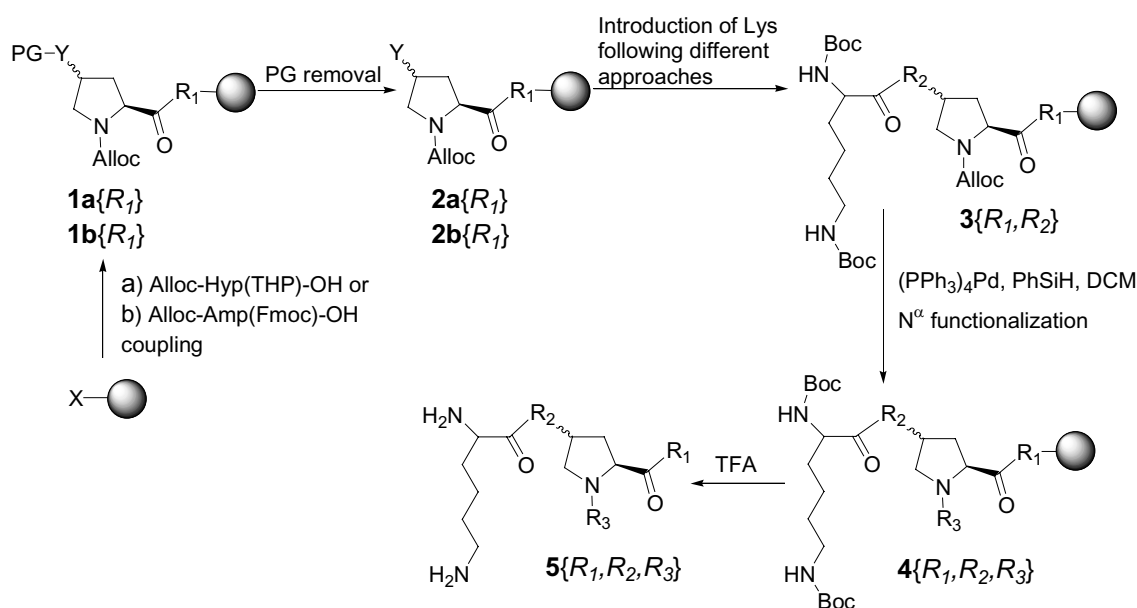


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R <sub>1</sub>	Hydroxamic Acid -NH-OH	Carboxamide -NH <sub>2</sub>	Carboxylic Acid -COOH	—	—	—	—	—	—	—
R <sub>2</sub>	Sulfamate -NH-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Amide -NH-	Hydroxamate -N(OH)-	—	—	—	—	—	—	—
R <sub>3</sub>										

**Table 1.** Library definition (H-Lys-R<sub>2</sub>-Hyp(R<sub>3</sub>)-R<sub>1</sub> or H-Lys-R<sub>2</sub>-Amp(R<sub>3</sub>)-R<sub>1</sub>).

### General strategy for the solid-phase synthesis

The general strategy for the preparation of the library varied depending on the resin and the  $\gamma$ -amino bond, but in general, it was that shown in Figure 2. Proline derivate (Alloc-L-Hyp(THP)-OH or Alloc-L-Amp(Fmoc)-OH) was coupled to the resin using common solid-phase reagents. After removal of the protecting group (PG) from the  $\gamma$ -position of the proline, lysine (protected with Boc in both amine positions) was introduced. The  $\alpha$ -amino position of the proline was then freed and the diversity was introduced at this point. Finally, compounds were cleaved from the resin in acidic conditions, which gave the final products defined as  $5\{R_1, R_2, R_3\}$ .



**Figure 2.** General synthetic strategy for library preparation

#### First point of diversity ( $R_1$ )

$R_1$  diversity was obtained using distinct linkers and resins. Carboxylic acids and carboxamides were obtained using MBHA resin with 3-(4-hydroxymethylphenoxy)propionic acid (AB) and Rink Amide handles respectively.

Hydroxamic acids were synthesised using the resin obtained by incorporation of Fmoc-NH-OH into the Cl-TrtCl resin in basic conditions.<sup>13</sup>

The first step of the synthesis was the coupling of the proline derivative to the resin. Two scaffolds were used for this purpose. The first was (2*S*,4*R*)-THP-4-hydroxy-1-Alloc-pyrrolidine-2-carboxylic acid [(2*S*,4*R*)-Alloc-Hyp(THP)-OH], which, after coupling to the resin, gave compounds **1a**{*R*<sub>1</sub>}. This scaffold was used in the synthesis of sulfamate and hydroxamate peptidomimetics (**5**{*R*<sub>1</sub>,1,*R*<sub>3</sub>} and **5**{*R*<sub>1</sub>,3,*R*<sub>3</sub>} respectively). The alcohol of hydroxyproline was protected in order to avoid polymerisations. THP was chosen as a protecting group because it is compatible with Boc chemistry and orthogonal to that of Alloc.<sup>14</sup>

The second scaffold was (2*S*,4*S*)-Fmoc-4-amino-1-Alloc-pyrrolidine-2-carboxylic acid [(2*S*,4*S*)-Alloc-Amp(Fmoc)-OH], which, after coupling to the resin, gave compounds **1b**{*R*<sub>1</sub>}. This scaffold was used in the synthesis of the amide-linked peptidomimetics (**5**{*R*<sub>1</sub>,2,*R*<sub>3</sub>}).

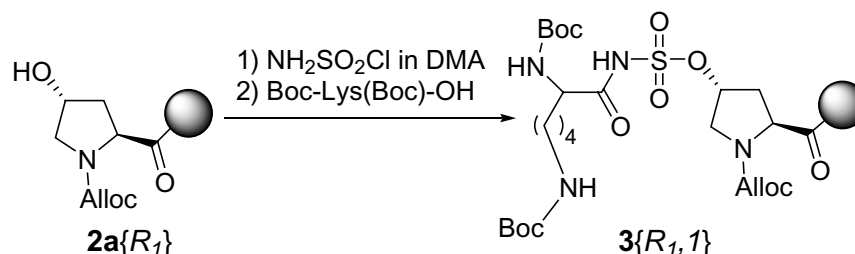
Hydroxamic acids were synthesized in solid phase by incorporation of the two proline derivatives onto the H<sub>2</sub>N-O-ClTrt-resin<sup>15</sup> using HATU (5 eq) and DIEA (10 eq) as coupling reagents. This procedure yielded peptidyl resins **1a**{*I*} and **1b**{*I*}.<sup>16</sup> The reaction was monitored by the ninhydrin test. After removing the protecting groups of the  $\gamma$ -positions, compounds **2a**{*I*} and **2b**{*I*} were obtained.

Carboxamides were obtained by coupling the proline derivative [(2*S*,4*R*)-Alloc-Hyp(THP)-OH or (2*S*,4*S*)-Alloc-Amp(Fmoc)-OH] (5 eq) to the Rink Amide resin using DIPCDI (5 eq) and HOBT (5 eq) as coupling reagents. The reaction was checked with the ninhydrin test. Finally, Fmoc and THP protecting groups were removed with piperidine or *p*-TsOH respectively, thereby yielding compounds **2a**{2} and **2b**{2}.

Carboxylic acids were obtained by incorporating [(2*S*,4*R*)-Alloc-Hyp(THP)-OH or (2*S*,4*S*)-Alloc-Amp(Fmoc)-OH] (5 eq) onto 3-(4-hidroximetilfenoxi)propionyl-MBHA resin using DIPCDCI (5 eq) and catalytic amounts of DMAP (0.5 eq). THP and Fmoc protecting groups were then removed as described above, furnishing compounds **2a**{3} and **2b**{3}.

### Solid-phase lysine introduction in the $\gamma$ -position of the proline ring

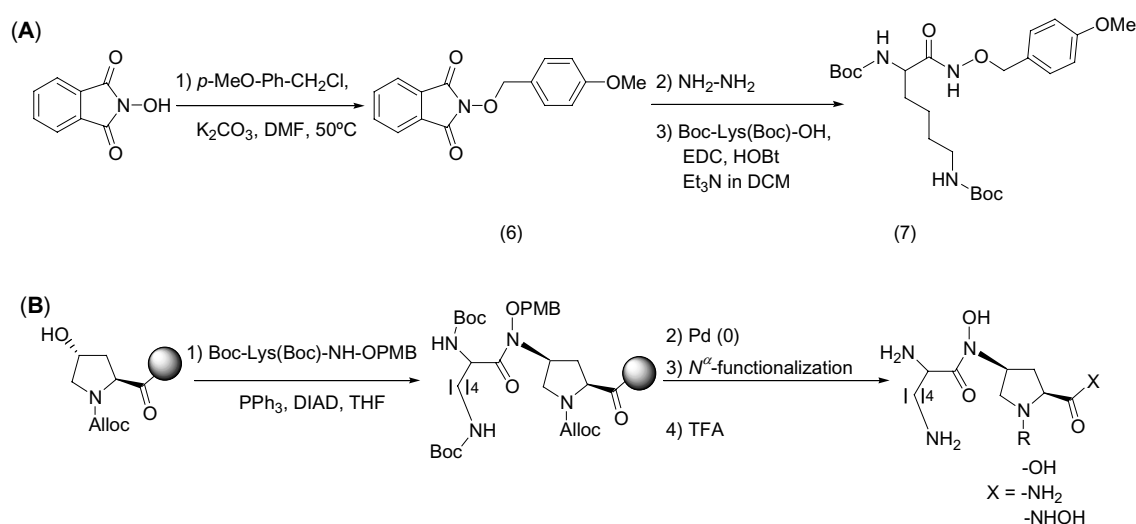
Sulfamoylation to render sulfamates was performed following the procedure optimised previously by our group (see scheme 1),<sup>17</sup> which involves the use of sulfamoyl chloride in DMA in the absence of base. The development of this reaction without base is crucial as the base can destroy the sulfamoyl chloride, which would prevent the total incorporation of the sulfamoyl moiety. Boc-Lys(Boc)-OH was then coupled to the resin using DIPCDCI and DMAP (10%) as coupling reagents. To check the extent of the reaction, a small amount of each resin was cleaved and compounds **3**{*R*<sub>1</sub>,1} were verified by analytical MS-HPLC. It was not possible to obtain the hydroxamic compounds **3**{1,1} because of premature cleavage of these compounds during sulfamoylation. This premature cleavage occurred because the acidic lability of Cl-Trt resin could not be solved.



**Scheme 1.** Solid-phase synthesis of sulfamates.

The second linkage evaluated was the amide bond, which was obtained simply by using common solid-phase peptide synthesis protocols to render compounds **3**{*R*<sub>1</sub>,**2**}.

For the hydroxamate derivatives, Boc-L-Lys(Boc)-NH-OPMB was required, which was prepared in solution following the strategy described in scheme 2A. *N*-Hydroxyphthalimide was protected with *p*-methoxybenzyl chloride and after treating the product with hydrazine, Boc-L-Lys(Boc)-OH was coupled, thereby affording the final protected hydroxamic acid **7**. Hydroxamates were then prepared by incorporation of Boc-L-Lys(Boc)-NH-OPMB, using Mitsunobu conditions (DIAD, Ph<sub>3</sub>P), to the hydroxyproline-containing peptidyl resin **2a**{*R*<sub>1</sub>}, which rendered products **3**{*R*<sub>1</sub>,**3**}.



**Scheme 2.** (A) Synthesis of Boc-Lys(Boc)-NH-OPMB. (B) General strategy for the hydroxamate synthesis on solid phase.

### Side chain introduction and cleavage

Once the protected lysine was attached to the resin, syntheses continued by the deprotection of the  $\alpha$ -amino group of the proline using Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>/Ph<sub>3</sub>SiH. The aromatic moieties were then introduced via a reductive amination using several aldehydes or via acylation using distinct carboxylic acids (see Table 1). Alkylations and acylations were performed on resin using the same conditions as reported in a previous study.<sup>18,19</sup>



Adenine and guanine derivatives were used with their amines protected with benzhydryloxycarbonyl (Bhoc), which were removed during the cleavage with TFA. Alkylations and acylations were monitored with the chloranil test.

Compounds were finally cleaved from the resin. Products from the Cl-Trt resin were cleaved by a two-step process, first with TFA-DCM (3:97) to remove the peptidomimetic from the resin and then with TFA-H<sub>2</sub>O (95:5) to remove the Boc protecting groups of the lysine. Products **5**{1,3,R<sub>3</sub>} were subjected to an extended final TFA treatment (6 h) in order to remove the *p*-methoxybenzyl *N*-hydroxy protecting group.

R <sub>1</sub> and R <sub>2</sub>	Side Chain (R <sub>3</sub> )									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>5</b> {1,1,R <sub>3</sub> }	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>5</b> {1,2,R <sub>3</sub> }	24/88	33/99	10/91	42/97	10/97	52/87	48/82	39/96	75/97	51/95
<b>5</b> {1,3,R <sub>3</sub> }	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>5</b> {2,1,R <sub>3</sub> }	1/94	5/76	2/85	3/88	1/82	-	4/80	6/91	19/96	8/49
<b>5</b> {2,2,R <sub>3</sub> }	9/61	13/81	4/99	6/84	9/99	59/97	15/88	33/99	65/40	43/90
<b>5</b> {2,3,R <sub>3</sub> }	-	3/99	-	1/93	3/88	46/89	36/81	53/84	88/93	52/99
<b>5</b> {3,1,R <sub>3</sub> }	-	3/80	3/83	8/81	-	1/45	3/81	4/93	32/36	9/58
<b>5</b> {3,2,R <sub>3</sub> }	26/92	26/96	28/99	23/83	15/99	36/92	32/92	18/92	46/87	15/95
<b>5</b> {3,3,R <sub>3</sub> }	5/71	12/71	14/88	15/84	16/48	17/94	19/90	21/89	29/81	27/89

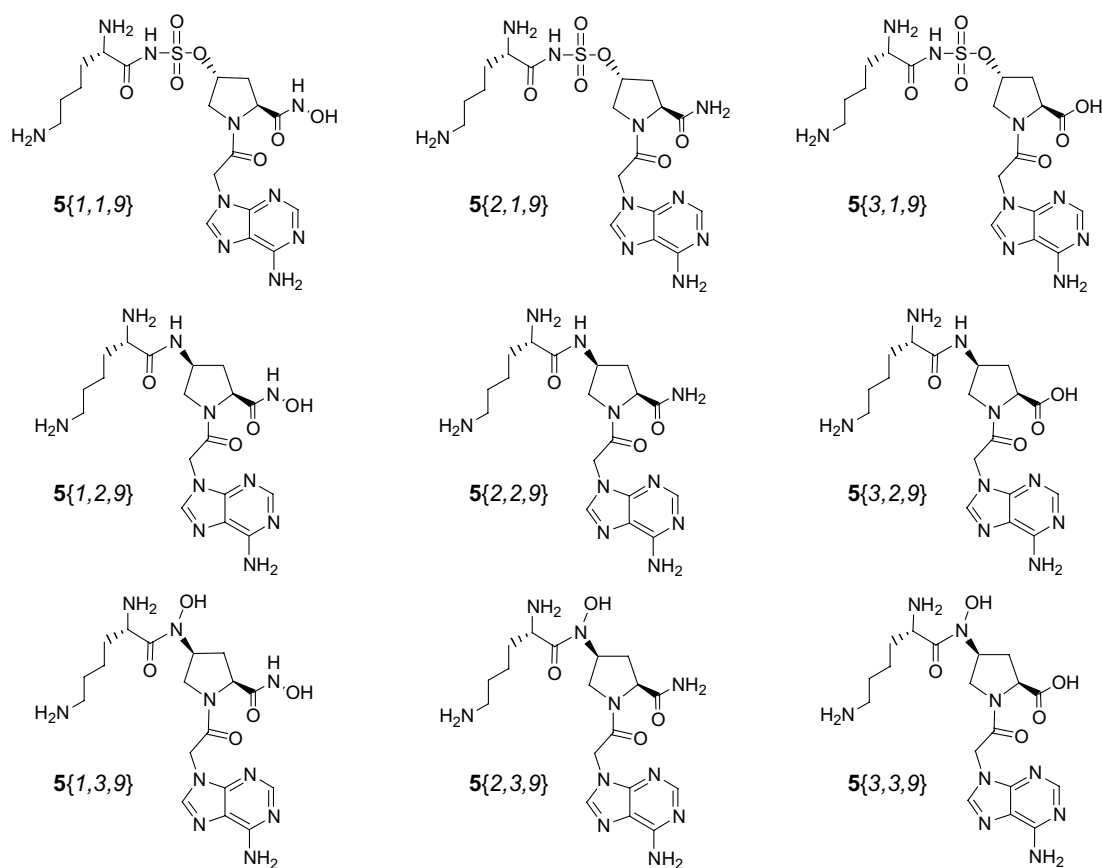
**Table 2.** Library yields<sup>a</sup> and purities<sup>b</sup> after purification. <sup>a</sup>Yields were calculated on the basis of the weight of product and the initial functionalization of the resin and are shown in the upper left part of each cell. <sup>b</sup>Purities were calculated on the basis of integration of the 220 nm UV absorption of the peak of the expected molecular ion. Purities are shown in the lower right part of each cell.

Products from Rink amide and AB resins were cleaved using TFA-H<sub>2</sub>O (95:5) for 2 h. Total removal of *p*-methoxybenzyl *N*-hydroxy protecting group from products **5**{2-3,3,R<sub>1</sub>} also required longer treatment with TFA (total 6 h). Compounds (a total of 70) were finally purified by a semi-preparative HPLC-MS, which gave the target compounds with purities of 80% for more than 80% of the library, as determined by

HPLC (see Table 2). Compounds were characterised by an HPLC equipped with a PDA, ELSD, and MS detectors. 20% of the library was also characterised by  $^1\text{H}$  NMR, 50% of these compounds were also checked by  $^{13}\text{C}$ .

## DISCUSSION

Using the AMP as a model, here performed the solid-phase synthesis of a library of proline derivatives with potential inhibitory capacity against LysRS. The synthetic strategy developed allowed three points of diversity.



**Figure 3.** Representative scheme of final compounds  $5\{R_1, R_2, 9\}$  containing the adenine moiety.

$R_1$  (C-terminal function) was easily obtained in all the families through the choice of the solid support (hydroxamic acid, carboxylamide, and carboxylic acid).

**R<sub>2</sub>** (sulfamate, hydroxamate or amide linker) was also obtained for carboxylamide and carboxylic acid (Rink and AB-MBHA-resin, respectively). With these resins, the solid-phase synthesis of the sulfamate, described previously by our group, worked well. The synthesis of hydroxamate analogues using Mitsunobu conditions also performed well, and was even improved over other similar syntheses described in the literature, as the excess of reagents could be significantly reduced.<sup>14b</sup> However, sulfamates and hydroxamates were not obtained on Cl-Trt resin (*C*-terminal hydroxamic acids). In the former case, the compound was prematurely cleaved because of the lability of the resin in the strong conditions used for the synthesis. For hydroxamates, the problem may have been steric hindrance, which may lead to poor reactivity of the alcohol near the *C*-terminus, as reported by others in the *N*-methylation of a first residue directly attached to the resin.<sup>20,21</sup>

For **R<sub>3</sub>**, no difficulties were encountered for the introduction of the distinct moieties. Acylations and alkylations of the  $\alpha$ -amino group of the proline, described previously by our group, worked well. Finally, cleavage of the compounds from the distinct resin batches furnished the final compounds. Products from the Cl-Trt resin were treated with TFA in solution in order to remove the Boc-protecting groups. Products **5**{2-3,3,*R<sub>1</sub>*} were also exposed to TFA for longer in order to remove the *p*-methoxybenzyl *N*-hydroxy protecting group.

In general, products were obtained in good purities after purification. The worse results were obtained for the syntheses performed in Rink amide resin as the compounds had a free amine at the  $\alpha$ -position of the proline (compounds **5**{2,*R<sub>2</sub>*,1-5}). The main problem in these syntheses may be the removal of the linker during final cleavage of the product because of the proximity of a basic point, as described by Yraola et al.<sup>22</sup>

The inhibitory properties of this library are currently being tested against LysRS of *Plasmodium* .

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Procedures. Solid-Phase Synthesis.** Peptide syntheses were performed manually in polypropylene syringes, each fitted with a polyethylene porous disc. Solvents and soluble reagents were removed by suction. Washings between deprotection, coupling and subsequent deprotection steps were carried out with DMF (5 × 1 min) and DCM (5 × 1 min) using 10 mL solvent/g resin each time.

**Fmoc Group removal.** (i) DMF (5 × 1 min); (ii) piperidine/DMF (2:8) (1 × 1 min + 2 × 15 min); (iii) DMF (5 × 1 min).

**Alloc Group Removal.** Removal of the Alloc group was achieved with Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.1 equiv) in the presence of PhSiH<sub>3</sub> (10 eq) in DCM under Ar (2×20 min, 25°C).

**THP Group Removal.** Removal of the THP group was achieved with a solution of *p*-TsOH (5 mg/mL) in DCM-MeOH (97:3) 2 x 1 h, preceded by a 3-min washing with the same solution.

**Sulfamoylations.** Sulfamoyl chloride was obtained *in situ* by adding formic acid (270 μL, 10 eq) to neat chlorosulfonyl isocyanate (620 μL, 10 eq) at 0°C with rapid stirring. Vigorous gas evolution was observed during the addition. DMA was then added (2 mL) and the mixture was stirred at room temperature for one hour. Meanwhile, resins **2a**{*R*<sub>1</sub>} (1 g, 1 eq) were preswollen in DMA (5 mL) and stirred at room temperature for 30 min. The solution of sulfamoyl chloride (10 eq) in DMA was then added dropwise and resins were stirred at room temperature for 3 h. Finally, resins were filtered and washed with DMA (3 × 1 min), DMF (3 × 1 min), and DCM (3 × 1 min).

**General Method for Hydroxamate Synthesis using the Mitsunobu Reaction.** PPh<sub>3</sub> (7 equiv) and Boc-L-Lys(Boc)-OPMB (7 equiv) were added to the peptidyl resins **2a**{*R*<sub>1</sub>} (1 g) pre-swollen in anhydrous DCM (5 mL). Mixtures were shaken until the

reagents were completely dissolved. DIAD (7 eq) was then added dropwise at 0°C and the mixture was shaken overnight at room temperature. After that, the solvent was removed by suction, resins were washed with DCM (5 x 1 min) and then twice with DMF, DCM, methanol, and finally with DCM.

***N*<sup>α</sup>-Acylation.** After removal of the *N*<sup>α</sup>-Alloc group, the α-amino group was acylated using RCOOH (5 eq), DIPCDI (5 eq) and HOBt (5 eq) in DMF for 2 h at 25 °C. Resins were washed with DMF (5 × 1 min) and DCM (5 × 1 min). Acylations were monitored by the chloranil test.

***N*<sup>α</sup>-Alkylation.** After removal of the Alloc group, the α-amino group was alkylated by on-resin reductive amination using RCHO (5 eq) and NaBH<sub>3</sub>CN (5 equiv) in 1% HOAc in DMF for 2 h. After the reductive amination, resins were washed with DMF (5 × 1 min) and DCM (5 × 1 min). The reactions were monitored by the chloranil test.

**Acidolytic Cleavage with TFA.** Cl-Trt resins were cleaved by five 30-sec washes with TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99). Crude products were then evaporate and treated with TFA/H<sub>2</sub>O (95:5) for 2 h at room temperature to remove the protecting groups. Rink amide and MBHA with handle AB resins were cleaved with TFA/H<sub>2</sub>O (95:5) for 2 h at room temperature. TFA was evaporated, and compounds were then dissolved in H<sub>2</sub>O-MeCN and lyophilised.

**HPLC-PDA-ELSD-ESMS Analysis.** HPLC analyses were carried out in a Waters instrument. Sample was injected to the system with a Waters Alliance 2696 system, which supplied the HPLC gradient, maintaining the column heater set at 40°C. Flow proceeded from the column through a Waters 996 photodiode array (PDA) detector, which monitored wavelengths from 210 to 400 nm. A wavelength of 220 nm was selected for the analysis of purity. From the PDA, the 1mL/min flow was redirected to a Waters 2420 ELS detector (ELSD) and an electrospray Waters Micromass ZQ MS

detector by means of a flow splitter (0.5 mL/min each). In the ELSD detector, the nitrogen pressure was set at 25 psi, the temperature at 40°C, and the gain 135. The system was controlled by a Micromass Masslynx 4.0. data system. The first analysis was performed using a gradient with water (containing 0.1% formic acid) and acetonitrile (containing 0.07% formic acid) and another gradient using the same solvents containing 0.1% of TFA. The gradient used in the analysis was from 0% to 40% of ACN in 10 min. The column used was a X-Terra C<sub>18</sub> of 3.5 µm (4.6 x 100 mm).

**Purification.** All the products were purified in a Waters semi-preparative HPLC system. Samples were injected automatically using a Waters 2767 sample Manager, which was also used for collection. The HPLC gradient was supplied by a Waters 600 Controller System. Sample passed through a Symmetry C<sub>18</sub> 5 µm (30 x 100 mm) column and, in a make up pump, flux was split and only 0.1% was directed to the Waters 2487 Dual detector and to the electrospray Waters Micromass ZQ MS detector. The other flux went to the collector, which accumulated the samples when detected. Purifications were done using a range of gradients with water (containing 0.1% formic acid) and acetonitrile (containing 0.1% formic acid). The system was controlled by a Micromass Masslynx 4.0. data system. Fractions were finally lyophilised.

**NMR Spectroscopy.** NMR spectra were acquired on a Mercury 400 spectrometer. Compounds were characterized in CD<sub>3</sub>OD or D<sub>2</sub>O at 25 °C. One-dimensional spectra were recorded using several scans, depending on the sample concentration (from 16 to 128 scans in the <sup>1</sup>H experiments and between 2000 and 5000 scans for the <sup>13</sup>C experiments). Two dimensional spectra, gCOSY and gHSQC, were recorded using standard pulse sequences. Spectra were processed with VNMR software on a computer.

**(2S,4R)-THP-4-hydroxy-1-Alloc-pyrrolidine-2-carboxylic acid:** 3,4-Dihydro-2H-pyran (3.48 mL, 36.6 mmol) was added dropwise to a stirred solution of (2S,4R)-4-

hydroxy-1-Alloc-pyrrolidine-2-carboxylic acid (5.25 g, 24.4 mmol) and *p*-TsOH (0.47 g, 2.4 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) at 0 °C. After 5 min, the ice bath was removed and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. Next, the solvent was evaporated and the solid was dissolved in EtOAc (60 mL) and then extracted with aqueous 0.2 N KOH (2 x 50 mL). The combined aqueous layers were acidified with 6N HCl to pH 3–4 and extracted with EtOAc (3 x 50 mL), maintaining the pH between 3–4. The combined organic extracts were washed with water, dried with anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduce pressure. The crude product was purified by flash chromatography to give the final product (6.6 g, 92%) as a colourless oil.

***N*-Hydroxyphthalimide *p*-methoxybenzylether (6).** *p*-Methoxybenzyl chloride (17.43 mL, 126 mmol) was added dropwise to a solution of *N*-hydroxyphthalimide (10.00 g, 63 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6.69 g, 48 mmol) in DMSO (70 mL). The reaction was stirred at 24 h, poured into 200 mL of cold water, and kept in ice. Crystals were collected in a Buchner funnel, washed twice with cold water and dried in vacuum. Product **6** (17.36 g), without purification or characterization, was used in the next step.

**Boc-Lys(Boc)-NH-OPMB (7).** Hydrazine (3.31 mL, 67.0 mmol) was added to a suspension of compound **6** (17.36 g, 61.3 mmol) in 200 mL of EtOH. The mixture was stirred overnight. Hydrochloric acid (1.1 eq) was then added, the precipitate was filtered off and washed with EtOH (3 x 50 mL) and H<sub>2</sub>O (100 mL). EtOH was then removed under vacuum, H<sub>2</sub>O (250 mL) was added, the mixture was basified, extracted with Et<sub>2</sub>O (4 x 200 mL), dried with MgSO<sub>4</sub>, and evaporated. *O*-(4-Methoxy-benzyl)-hydroxylamine (7.25 g, 78%) was obtained as colorless crystals and was used in the next step without prior purification.

HOBt (6.76 g, 50.0 mmol) and EDC (11.73 g, 169 mmol) were added to a stirring solution of Boc-Lys(Boc)-OH (15.90 g, 104 mmol) at room temperature in anhydrous



DCM (200 mL). After 30 min, compound *O*-(4-Methoxy-benzyl)-hydroxylamine (7.00 g, 104 mmol) was added. The organic phase was stirred at room temperature overnight and the mixture was then washed with aqueous 0.1 M HCl, washed with saturate aqueous NaHCO<sub>3</sub> (100 mL), dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography to give the protected hydroxamic acid **7** (18.53 g, 85%) as a white solid. <sup>1</sup>H NMR [DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz]: 1.10-1.40 (m, 22H, 2 x CH<sub>2</sub> and 6 x CH<sub>3</sub>); 1.44-1.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.84-2.88 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.752 (m, 4H, CH<sub>3</sub> and CH); 4.678 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.745 (t, 1H, NH); 6.920 (d, 2H, 2 x CH, *J* = 8.8 Hz); 7.307 (d, 2H, 2 x CH, *J* = 8.8 Hz); 11.056 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR [DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz]: 22.7 (CH<sub>2</sub>); 28.1 (CH<sub>3</sub>); 28.2 (CH<sub>3</sub>); 29.1 (CH<sub>2</sub>); 31.5 (CH<sub>2</sub>); 40.0 (CH<sub>2</sub>); 52.1 (CH); 55.1 (CH<sub>3</sub>); 76.3 (CH<sub>2</sub>); 77.3 (C); 77.9 (C); 113.6 (CH); 127.8 (CH); 130.6 (C); 155.2 (C); 155.5 (C); 159.3 (C); 169.0 (C).

**5**{1,2,2}. <sup>1</sup>H NMR [CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz]: 1.43-1.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.65-1.70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.77-1.90 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.04-2.01 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.78-2.85 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.94 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, *J* = 7.6 Hz); 3.52-3.53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.82 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH); 4.03-4.06 (m, 1H, CH); 4.12 (d, 1H, CH<sub>2</sub>, *J* = 12.8 Hz); 4.25 (d, 1H, CH<sub>2</sub>, *J* = 12.8 Hz); 4.43-4.52 (m, 1H, CH); 6.89-6.98 (m, 3H, 3 x CH).

**5**{1,2,9}. <sup>1</sup>H NMR [CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz]: 1.52-1.58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.68-1.93 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>); 2.55-2.62 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.95-2.99 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.13 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>); 3.71-3.73 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.87 (bb, 1H, CH); 4.12 (bb, 1H, CH<sub>2</sub>); 4.42 (bb, 1H, CH); 4.59 (bb, 1H, CH); 8.07 (s, 1H, CH); 8.19 (s, 1H, CH).

**5**{2,1,9}. <sup>1</sup>H NMR [D<sub>2</sub>O, 400 MHz]: 1.31-1.43 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.54-1.64 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 1.76-1.87 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.13-2.19 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.55-2.61 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.89 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, *J* = 7.6 Hz); 3.73 (t, 1H, CH, *J* = 6.4 Hz); 3.94 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>, *J* = 12.0 Hz, *J* = 4.0 Hz); 4.05 (d, 1H, CH<sub>2</sub>, *J* = 12.0 Hz); 4.43 (d, 1H, CH, *J* = 8.4 Hz); 5.03-5.20 (m,

3H, CH<sub>2</sub> and CH); 7.94 (s, 1H, CH); 8.05 (s, 1H, CH); 8.32 (NH). <sup>13</sup>C NMR [D<sub>2</sub>O, 100 MHz]: 21.4 (CH<sub>2</sub>); 26.5 (CH<sub>2</sub>); 30.5 (CH<sub>2</sub>); 35.5 (CH<sub>2</sub>); 39.2 (CH<sub>2</sub>); 45.6 (CH<sub>2</sub>); 52.8 (CH); 55.4 (CH); 59.2 (CH); 79.4 (CH); 118.2 (C); 143.0 (C); 149.4 (CH); 152.8 (CH); 155.7 (C); 167.6 (C); 175.6 (C); 175.8 (C).

**5{2,2,5}**. <sup>1</sup>H NMR [CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz]: 1.19-1.28 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.44-1.67 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>); 1.81-1.86 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.57-2.64 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.79-2.78 (m, 3H, CH<sub>2</sub> and CH); 2.84 (d, 1H, CH<sub>2</sub>, *J* = 10.4); 3.24-3.31 (m, 1H, CH); 3.47 (bb, 1H, CH); 3.90 (d, 1H, CH<sub>2</sub>, *J* = 12.4); 3.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.22 (d, 1H, CH<sub>2</sub>, *J* = 12.4); 4.29 (bb, 1H, CH); 6.82 (d, 1H, CH, *J* = 7.6 Hz); 7.36 (d, 1H, CH, *J* = 7.6 Hz); 7.47 (t, 1H, CH, *J* = 8.0 Hz); 7.56 (t, 1H, CH, *J* = 8.0 Hz); 8.25 (d, 1H, CH, *J* = 8.4 Hz); 8.30 (d, 1H, CH, *J* = 8.4 Hz); 8.49 (bb, 1H).

**5{2,2,7}**. <sup>1</sup>H NMR [CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz]: 1.40 (bb, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.69 (bb, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.78 (bb, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.96-2.02 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.63-2.67 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.90 (bb, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.53 (bb, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.67 (bb, 1H, CH); 3.89 (bb, 4H, CH<sub>3</sub> and CH<sub>2</sub>); 4.35 (bb, 1H, CH); 4.61 (bb, 1H, CH); 6.98 (d, 1H, CH, *J* = 8.0 Hz); 7.05 (s, 1H, CH); 7.08 (d, 1H, CH, *J* = 8.0 Hz).

**5{2,3,5}**. <sup>1</sup>H NMR [D<sub>2</sub>O, 400 MHz]. 1.32-1.40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.54-1.66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.70-1.83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.00-2.06 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.67-2.74 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.90-2.95 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.01-3.06 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.42-3.48 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.70-3.75 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 4.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.10-4.14 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 4.27-4.42 (m, 1H, CH); 4.64 (t, 1H, CH, *J* = 7.6 Hz); 5.13 (bb, 1H, CH); 6.97 (d, 1H, CH, *J* = 7.8 Hz); 7.48 (d, 1H, CH, *J* = 7.8 Hz); 7.61 (t, 1H, CH, *J* = 7.4 Hz); 7.69 (t, 1H, CH, *J* = 7.4 Hz); 8.24-8.32 (m, 2H, 2 x CH).

**5{2,3,8}**. <sup>1</sup>H NMR [CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz]. The NMR spectrum corresponds to a mixture of two conformers, in a relative ratio (3:4). 1.41-1.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.66-1.75

(m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.79-2.01 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 1.93 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.34 (d, 0.6H, CH<sub>2</sub>,  $J = 14.5$  Hz); 2.48 (d, 0.4H, CH<sub>2</sub>,  $J = 14.5$  Hz); 2.53-2.61 (m, 0.6H, CH<sub>2</sub>); 2.68-2.76 (m, 0.4H, CH<sub>2</sub>); 2.92-2.98 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.50 (d, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 12.4$  Hz); 3.65 (s, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.69-3.81 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.93-4.03 (m, 2H, CH and CH<sub>2</sub>); 4.64 (d, 0.6H, CH,  $J = 10.0$  Hz); 4.72 (d, 0.4H, CH,  $J = 10.0$  Hz); 5.40-5.44 (m, 1H, CH); 6.84 (d, 0.4H, CH,  $J = 8.4$  Hz); 6.86 (d, 0.6H, CH,  $J = 8.4$  Hz); 6.98 (dd, 0.4H, CH,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 2.0$  Hz); 7.03 (dd, 0.6H, CH,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 2.0$  Hz); 7.19 (d, 0.4H, CH,  $J = 2.0$  Hz); 7.24 (d, 0.6H, CH,  $J = 2.0$  Hz). <sup>13</sup>C NMR [CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz]. 21.6-21.9 (CH<sub>2</sub>); 26.7 (CH<sub>2</sub>); 29.4-29.5 (CH<sub>2</sub>); 34.7-37.2 (CH<sub>2</sub>); 39.0-39.1 (CH<sub>2</sub>); 39.5-39.8 (CH<sub>2</sub>); 52.5 (CH); 52.6-53.1 (CH<sub>2</sub>); 58.8-59.3 (CH); 74.4-76.1 (CH); 116.3-116.4 (CH); 120.3-120.4 (C); 126.4-126.7 (C); 128.8-130.6 (CH); 152.1 (CH); 161.7-162.1 (C); 168.7-168.8 (C); 171.6-172.2 (C); 174.6-174.8 (C).

**5{2,3,10}**. <sup>1</sup>H NMR [CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz]. The NMR spectrum corresponds to a mixture of two conformers. 1.50-1.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.69-1.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.89-2.01 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 1.83-2.01 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.32 (d, 0.5H, CH<sub>2</sub>,  $J = 14.4$  Hz); 2.56-2.63 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.75-2.83 (m, 0.5H, CH<sub>2</sub>); 2.95-3.01 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.72 (d, 0.5H, CH<sub>2</sub>,  $J = 14.4$  Hz); 3.90 (d, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 14.4$  Hz); 4.00-4.04 (m, 1H, CH); 4.16 (dd, 0.5H, CH<sub>2</sub>,  $J = 12.2$  Hz,  $J = 5.2$  Hz); 4.67 (d, 1H, CH,  $J = 8.4$  Hz); 4.78-5.02 (m, 3H, CH<sub>2</sub> and CH); 5.44 and 5.53 (two d, 1H, CH,  $J = 4.4$  Hz); 7.97 (s, 1H, CH). <sup>13</sup>C NMR [CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz]. 21.6-21.9 (CH<sub>2</sub>); 26.7-26.8 (CH<sub>2</sub>); 29.34-29.5 (CH<sub>2</sub>); 34.6-37.2 (CH<sub>2</sub>); 39.1 (CH<sub>2</sub>); 44.9 (CH<sub>2</sub>); 52.1-53.3 (CH<sub>2</sub>); 52.5 (CH); 58.9-59.2 (CH); 74.2-76.1 (CH); 139.2 (C); 154.5 (C); 157.9 (CH); 161.6-167.3 (C); 166.8-167.3 (C); 168.7-168.8 (C); 174.0 (C); 174.5 (C).

**5{3,1,6}**. <sup>1</sup>H NMR [CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz]: The NMR spectrum corresponds to mixture of two conformers. 1.40-1.48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.56-1.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.75-1.84 (m, 2H,

CH<sub>2</sub>); 2.31-2.37 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.61-2.67 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.83-2.87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.03-3.08 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.59-3.64 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.98-4.02 (m, 1H, CH); 4.37-4.42 (m, 1H, CH); 5.39-5.48 (m, 1H, CH); 6.87 (d, 1H, CH,  $J = 7.6$  Hz); 8.00 (d, 1H, CH,  $J = 7.6$  Hz); 7.38 (s, 1H, CH).

**5{3,2,2}**. The <sup>1</sup>H NMR spectrum corresponds to a mixture of two conformers in a relative ratio (4:3) <sup>1</sup>H NMR [CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz]. 1.43-1.49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.65-1.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.79-1.90 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.22-2.28 (m, 0.5H, CH<sub>2</sub>); 2.45 (t, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.78-2.86 (m, 0.5H, CH<sub>2</sub>); 2.91-2.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.18-3.23 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.70-3.79 (m, 2H, CH<sub>2</sub> and CH); 3.86 and 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.04-4.08 (m, 0.5H, CH); 4.15-4.22 (m, 1.5H, 0.5CH and CH<sub>2</sub>); 4.33-4.48 (m, 2H, CH and CH<sub>2</sub>); 6.95-6.99 (m, 3H, 3 x CH). <sup>13</sup>C NMR [CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz]. 21.7–21.8 (CH<sub>2</sub>); 26.9 (CH<sub>2</sub>); 30.7–30.8 (CH<sub>2</sub>); 34.3–34.7 (CH<sub>2</sub>); 39.0 (CH<sub>2</sub>); 49.3 (CH); 52.6–53.0 (CH); 55.2-55.2 (CH<sub>3</sub>); 56.2–57.6 (CH<sub>2</sub>); 58.3 (CH<sub>2</sub>); 66.6–67.0 (CH); 111.6 (CH); 116.8–117.1 (CH); 121.9–122.1 (CH); 122.9–123.1 (C); 147.1–149.3 (C); 161.7–162.1 (C); 169.1–169.5 (C); 170.7–171.3 (C).

**5{3,2,7}**. <sup>1</sup>H NMR [CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz]: 1.40-1.450 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.67 (bb, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.80-1.88 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.99-2.05 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.67-2.74 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.91 (t, 2H, CH<sub>2</sub>,  $J = 7.6$  Hz); 3.55 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 10.8$  Hz,  $J = 6.8$  Hz); 3.78-3.83 (m, 1H, CH); 3.86-3.94 (m, 4H, CH<sub>3</sub> and CH<sub>2</sub>); 4.35 (t, 1H, CH,  $J = 6.4$  Hz); 4.58 (t, 1H, CH,  $J = 7.6$  Hz); 6.97 (d, CH,  $J = 8.4$  Hz); 7.04 (s, 1H, CH) 7.01 (d, CH,  $J = 8.4$  Hz). <sup>13</sup>C NMR [CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz]. 21.7 (CH<sub>2</sub>); 26.8 (CH<sub>2</sub>); 30.6 (CH<sub>2</sub>); 33.9 (CH<sub>2</sub>); 39.052 (CH<sub>2</sub>); 49.3 (CH); 52.9 (CH); 54.7 (CH<sub>3</sub>); 55.2 (CH<sub>2</sub>); 59.2 (CH); 110.9 (CH); 114.5 (CH); 119.494 (CH); 128.2 (C); 146.4 (C); 150.0 (C); 168.7 (C); 170.4 (C).

**5{3,3,3}**. <sup>1</sup>H NMR [CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz]: 1.44-1.53 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 1.55-1.63 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 1.66-1.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.78-1.87 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 1.93-2.00 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.39

(d, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 14.8$  Hz); 2.75-2.83 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.91-2.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.28-3.33 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.69 (d, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 12.8$  Hz); 3.85 (dd, 1H, CH,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 4.0$  Hz); 3.98 (t, 1H, CH,  $J = 6.4$  Hz); 4.29 (d, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 13.2$  Hz); 4.36 (d, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 13.2$  Hz); 5.40 (t, 1H, CH,  $J = 5.2$  Hz); 7.77 (d, 1H, CH,  $J = 8.4$  Hz); 8.25 (d, 1H, CH,  $J = 8.4$  Hz). <sup>13</sup>C NMR [CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz]: 22.1 (CH<sub>2</sub>); 26.7 (CH<sub>2</sub>); 29.6 (CH<sub>2</sub>); 35.0 (CH<sub>2</sub>); 38.9 (CH<sub>2</sub>); 52.6 (CH); 57.6 (CH<sub>2</sub>); 59.4 (CH<sub>2</sub>); 65.3 (CH); 75.5 (CH); 123.6 (CH); 131.1 (CH); 140.9 (C); 148.4 (C); 168.6 (C); 172.9 (C).

**5{3,3,4}**. <sup>1</sup>H NMR [CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz]: 1.45-1.53 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 1.55-1.63 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 1.66-1.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.78-1.84 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 1.93-2.03 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.54 (d, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 14.8$  Hz); 2.73-2.80 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.93-3.00 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.58 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 13.2$  Hz,  $J = 4.4$  Hz); 3.95-3.99 (m, 2H, CH and CH<sub>2</sub>); 4.08 (dd, 1H, CH,  $J = 10$  Hz,  $J = 2.0$  Hz); 4.21 (d, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 12.8$  Hz); 4.41 (d, 1H, CH<sub>2</sub>,  $J = 12.8$  Hz); 5.43 (t, 1H, CH,  $J = 4$  Hz); 6.92 (d, 1H, ,  $J = 8.4$  Hz); 7.35 (dd, 1H, CH,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 2.4$  Hz); 7.72 (d, 1H, CH,  $J = 2.0$  Hz). <sup>13</sup>C NMR [CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz]: 23.3 (CH<sub>2</sub>); 27.9 (CH<sub>2</sub>); 30.8 (CH<sub>2</sub>); 35.6 (CH<sub>2</sub>); 40.1 (CH<sub>2</sub>); 53.9 (CH); 59.2 (CH<sub>2</sub>); 60.6 (CH<sub>2</sub>); 67.0 (CH); 76.8 (CH); 111.3 (C); 117.5 (CH); 124.3 (C); 132.3 (CH); 136.7 (CH); 157.1 (C); 169.7 (C); 173.1 (C).

**5{3,3,7}**. <sup>1</sup>H NMR [CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz]: The <sup>1</sup>H NMR spectrum corresponds to a mixture of two conformers. 1.47 (bb, 1H, CH<sub>2</sub>); 1.56-1.62 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 1.67-1.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.84-1.96 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.41-2.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.96-3.02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.75-3.80 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.94-3.99 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 4.14 (dd, 1H, CH,  $J = 14.8$  Hz,  $J = 6.0$  Hz); 4.48 (d, 1H, CH,  $J = 8.0$  Hz); 5.41 (t, 1H, CH,  $J = 4.4$  Hz); 6.91-7.06 (m, 3H, CH). <sup>13</sup>C NMR [CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz]: 21.7 (CH<sub>2</sub>); 26.8 (CH<sub>2</sub>); 29.6 (CH<sub>2</sub>); 36.8 (CH<sub>2</sub>); 38.8 (CH<sub>2</sub>); 52.7 (CH); 55.2 (CH<sub>2</sub>); 62.6 (CH);

75.3 (CH); 110.7 (CH); 114.3 (CH); 118.9 (CH); 129.2 (C); 146.3 (C); 149.6 (C); 162.1 (C); 168.7 (C); 171.7 (C).

## References

1. *Abbreviations* : Ac, acetyl; Ac<sub>2</sub>O, acetic anhydride; Amp, *cis*-4-amino-L-proline or (2*S*,4*S*)-4-amino-pyrrolidine-2-carboxylic acid; Boc, *tert*-butoxycarbonyl; Dab,  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid; DCM, dichloromethane; DHP, 3,4-dihydro-2H-pyran; DIEA, *N,N*-diisopropylethylamine; DIPCDI, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide; DMF, *N,N*-dimethylformamide; EDC, 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimide hydrochloride; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl; (2*S*,4*S*)-Boc-Amp(Fmoc)-OH, (2*S*,4*S*)-Fmoc-4-amino-1-Boc-pyrrolidine-2-carboxylic acid; HOAc, acetic acid; HOBt, 1-hydroxy-1,2,3-benzotriazole; HR-ESI: high resolution electro spray; *iV*, *iso*-valeryl; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization, time of flight; MBHA, *p*-methylbenzhydrylamine; MeCN, acetonitrile; MeOH, methanol; MPLC, medium pressure liquid chromatography; PhAc, phenylacetyl; RP-HPLC, reversed-phase high performance liquid chromatography; SPOS, solid-phase organic synthesis; SPPS, solid-phase peptide synthesis; TBME, *t*-butylmethyl ether; TFA, trifluoroacetic acid; TFE, 2,2,2-trifluoroethanol; THP, tetrahydropyran. Amino acid symbols denote the L-configuration.

2. Hayes, J. D. And Wolf, C. R. Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem. J.* **1990**, 272, 281–295.

3. Baquero, F. Gram-positive resistance: challenge for the development of new antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **1997**, 39, A1–6.

4. (a) Schimmel, P.; Tao, J., and Hill, J. Aminoacyl tRNA synthetases as targets for new anti-infectives. *FASEB J.* **1998**, 12, 1599–1609. (b) Kim, S.; Lee, S. W.; Choi, E.-

C., and Choi, S. Y. Aminoacyl tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 278–288.

5. (a) Fuller, A. T., Mellows, G., Woolford, M., Banks, G. T., Barrow, K. D., and Chain, E. B. Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature (London)* **1971**, *234*, 416–417. (b) Casewell, M. W., and Hill, R. L. R. *In vitro* activity of mupirocin ('pseudomonic acid') against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **1985**, *15*, 523–531. (c) Hughes, J., and Mellows, G. Interaction of pseudomonic acid A with *Escherichia coli* B isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochem. J.* **1980**, *191*, 209–219.

6. Nass, G., Poralla, K., and Zahner, H. Effect of the antibiotic Borrelidin on the regulation of threonine biosynthetic enzymes in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Acta* **1969**, *34*, 84–91.

7. Paetz, W., and Nass, G. Biochemical and immunological characterization of threonyl-tRNA synthetase of two borrelidinresistant mutants of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **1973**, *35*, 331–337.

8. Tanaka, K., Tamoki, M., and Watanabe, S. Effect of furanomycin on the synthesis of isoleucyl-tRNA. *Biochem. Biophys. Acta* **1969**, *195*, 244–245.

9. Ogilvie, A., Wiebauer, K., and Kersten, W. Inhibition of leucyl-transfer ribonucleic acid synthetase in *Bacillus subtilis* by granaticin. *Biochem. J.* **1975**, *152*, 511–515.

10. Werner, R. G., Thorpe, L. F., Reuter, W., and Nierhaus, K. H. Indolmycin inhibits prokaryotic tryptophanyl-tRNA ligase. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *68*, 1–3.

11. Konrad, I., and Roschenthaler, R. Inhibition of phenylalanine tRNA synthetase from *Bacillus subtilis* by ochratoxin A. *FEBS Lett.* **1977**, *83*, 341–347.

- 
12. Konishi, M., Nishio, M., Saitoh, K., Miyaki, T., Oki, T., and Kawaguchi, H. Cispentacin, a new antifungal antibiotic. I. Production, isolation, physico-chemical properties and structure. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1989**, *42*, 1749–1755.
13. Chan, W. C.; Mellor, S. L., and Atkinson, G. E. *N*-Fmoc-aminoxy-2-chlorotriptyl polystyrene resin for high throughput synthesis of hydroxamic acids. In *Solid-Phase Organic Syntheses*, John Wiley and Sons by Anthony W. Czarnik, **2001**, 85–99.
14. (a) Kuisle, O.; Quinoa, E., and Riguera, R. A general methodology for automated solid-phase synthesis of depsides and depsipeptides. Preparation of a valinomycin analog. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8063–8075. (b) Vergnon, A. L.; Pottorf, R. S., and Player, M. R. Solid-phase synthesis of a library of hydroxyproline derivatives. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 91–98.
15. Mellor, S. L.; McGuire, C., and Chan, W. C. *N*-Fmoc-aminoxy-2-chlorotriptyl polystyrene resin: a facile solid-phase methodology for the synthesis of hydroxamic acids. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3311–3314.
16. In the case of hydroxyproline, the hydroxyl group was maintained free. The use of the alcohol-protected hydroxyproline with this resin was discarded because in a control cleavage after deprotection of THP with *p*-toluenesulfonic acid, the target compound **1b**{*I*} was not detected, probably because of premature cleavage of the compound.
17. Farrera-Sinfreu, J.; Albericio, F., and Royo, M. *Org. Lett.* **2006**, *submitted*.
18. Farrera-Sinfreu, J.; Zaccaro, L.; Vidal, D.; Salvatella, X.; Giralt, E.; Pons, M.; Albericio, F., and Royo, M. A new class of foldamers based on *cis*- $\gamma$ -amino-L-proline, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6048–6057.



19. Farrera-Sinfreu, J.; Giralt, E.; Castel, S.; Albericio, F., and Royo, M. Cell penetrating *cis*- $\gamma$ -amino-L-proline-derived peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9459–9468.
20. Rajeswaran, W. G.; Hocart, S. J.; Murphy, W. A.; Taylor, J. E., and Coy, D. H. N-Methyl scan of somatostatin octapeptide agonists produces interesting effects on receptor subtype specificity. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1416–1421.
21. Erchegeyi, J.; Hoeger, C. A.; Low, W.; Hoyer, D.; Waser, B.; Eltschinger, V.; Schaer, J.-C.; Cescato, R.; Reubi, J. C., and Rivier, J. E. Somatostatin receptor 1 selective analogues: 2. N $\alpha$ -methylated scan. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 507–514.
22. Yraola, F.; Ventura, R.; Vendrell, M.; Colombo, A.; Fernandez, J.-C.; De La Figuera, N.; Fernandez-Fornier, D.; Royo, M.; Forns, P., and Albericio, F. A re-evaluation of the use of Rink, BAL, and PAL resins and linkers. *QSAR, Comb. Sci.* **2004**, *23*, 145–152.



## 3.4. DISCUSSIÓ

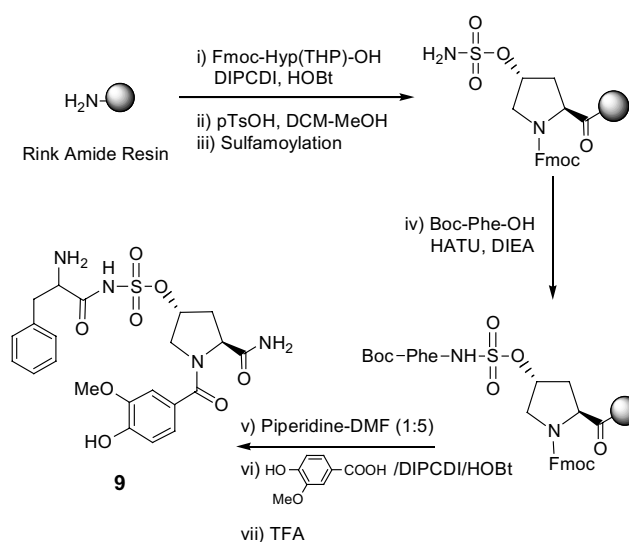
### 3.4.1. Síntesi de sulfamats en fase sòlida

En aquest capítol de la tesi hem desenvolupat una síntesi eficient de sulfamats en fase sòlida. Aquests compostos han demostrat tenir propietats interessants en diferents camps de la biomedicina, el que n'ha despertat un gran interès. La síntesi d'aquest tipus de molècules ha estat descrita àmpliament en solució utilitzant diferents protocols. En canvi la síntesi d'aquests compostos en fase sòlida no havia estat descrita, el que ens va animar a desenvolupar-ne una d'efectiva per tal de, més tard, aplicar-la en la síntesi d'una quimioteca de potencials inhibidors de la lisil-tRNA sintetassa (LysRS) de *Plasmodium*, síntesi que es descriu en el següent apartat (3.4.2.).

Molts dels protocols utilitzats per a la síntesi en solució de sulfamats utilitzen clorur de sulfamoïl com a agent de sulfamoïlació. En general en aquests tipus de processos sintètics es forma prèviament l'alcòxid amb l'ajuda de bases, el qual es prou reactiu per atacar nucleofílicament al clorur de sulfamoïl. Les bases utilitzades solen ser fortes per tal que siguin capaces de desprotonar l'alcohol. Així, per tal de posar a punt el mètode de sulfamoïlació en fase sòlida es varen provar diferents protocols descrits prèviament en solució sobre la peptidil resina Fmoc-Hyp-Rink Amida MBHA (figura 1). Sobre aquesta es varen optimitzar tant la sulfamoïlació del pas (iii), com la posterior funcionalització en el pas (iv).

Les primeres condicions de sulfamoïlació que vàrem testar fou l'utilització d'hidrur de sodi com a base en DME. Aquest protocol, tot i donar el producte sulfamoïlat treballant a petita escala, no es va mostrar prou adequat a l'hora d'escalar la reacció ja que donava emulsions de la resina amb la sal inorgànica totalment intractables, impossibles de filtrar fins i tot després de rentats amb aigua o metanol. Utilitzant altres bases inorgàniques com el carbonat de potassi es varen trobar problemes similars. Mètodes que involucraven la utilització de bases més febles com la Et<sub>3</sub>N o DIEA tampoc varen donar el producte esperat, possiblement degut a la destrucció del clorur de sulfamoïl en presència d'aquestes bases. Semblava doncs que la utilització de bases era

el principal problema per tal que la sulfamoïlació funcionés adequadament. Per tant, vàrem buscar mètodes alternatius que no involucressin la seva utilització. Les sulfamoïlacions amb solvents com el THF, DMF o DCM sense bases no varen funcionar. A la literatura havia estat descrit un mètode alternatiu de síntesi de sulfamats en solució que utilitzava dimetilacetamida (DMA) com a dissolvent. Els autors postulaven que la DMA actuava com una base feble. Es va assajar aquest mètode en fase sòlida i es va obtenir el producte sulfamoïlat d'una manera quantitativa. Aquest protocol de sulfamoïlació va ser provat amb altres alcohols,  $\alpha$ - i  $\beta$ -hidroxiàcids i fenols. En general es van obtenir els productes esperats. En el cas d'utilitzar  $\beta$ -hidroxiaminoàcids com a font d'alcohols, concretament la Ser i la Thr, es va obtenir el producte de  $\beta$ -eliminació com a majoritari. El problema en aquest cas no prové de la sulfamoïlació en si, sinó de la pròpia naturalesa del reactiu de partida.



**Figura 1.** Esquema sintètic seguit en la posada a punt de les sulfamoïlacions en fase sòlida.

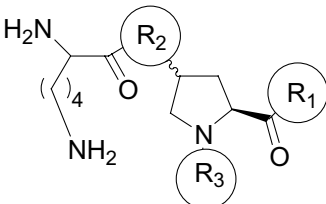
El següent pas que vàrem optimitzar fou l'acilació del grup sulfamoïl per donar el sulfamat. Després de provar diferents mètodes d'acoblament, els que van donar millors resultats foren DIPCPI/DMAP i HATU/DIEA, mostrant-se aquest últim més versàtil ja que evita l'epimerització del residu entrant.

Finalment, es va sintetitzar oligo-sulfamats acoblant  $\alpha$ -hidroxiàcids protegits amb l'hexafluoroacetona sobre el grup sulfamoïl. Així, utilitzant aquest dos passos de reacció optimitzats, la sulfamoïlació i la seva posterior acilació, es va poder arribar a

sintetitzar oligo-sulfamats en fase sòlida, obrint així la porta a la síntesi de nous anàlegs peptídics.

### **3.4.2. Síntesi en fase sòlida d'una llibreria d'inhibidors de la lisil-tRNA sintetassa (LysRS) de *Plasmodium***

En aquest apartat de la tesi vàrem sintetitzar una quimioteca de 90 compostos potencials inhibidors de la lisil-tRNA sintetassa (LysRS) de *Plasmodium falciparium*. En aquesta síntesi es varen aplicar les condicions d'obtenció de sulfamats obtingudes en el capítol anterior. El disseny de la quimioteca es va basar en el complex aminoaciladenilat format per una molècula d'AMP i l'aminoàcid a transferir. Sobre la base estructural d'aquest complex es varen definir quatre punts de diversitat diferents. En el nostre disseny vàrem canviar la ribosa del complex natural per un derivat trifuncional de prolina (trans-4-hidroxi prolina i cis-4-aminoprolina), a partir del qual vàrem introduir tres punts de diversitat diferents descrits en la figura 2. L'aminoàcid es va mantenir fix com a lisina ja que els inhibidors anaven adreçats a una sintetassa de lisina. El primer punt de diversitat va venir donat per l'extrem C-terminal dels peptidomimètics, el qual es va obtenir treballant amb diferents espaiadors o resines. El segon punt de diversitat fou l'enllaç que unia la funció en posició 4 de la prolina amb la lisina i que pretenia mimetitzar l'enllaç fosfat. Per últim, el tercer punt de diversitat foren els grups aromàtics i heterocicles que pretenen mimetitzar l'adenina introduïts a través de la posició  $\alpha$  de la prolina.



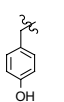
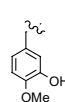
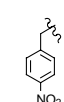
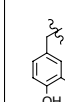
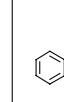
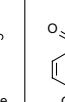
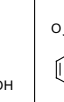
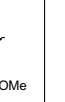
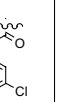
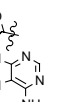
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>R<sub>1</sub></b>	Hydroxamic Acid -NH-OH	Carboxamide -NH <sub>2</sub>	Carboxylic Acid -COOH	—	—	—	—	—	—	—
<b>R<sub>2</sub></b>	Sulfamate -NH-SO <sub>3</sub> -	Amide -NH-	Hydroxamate -N(OH)-	—	—	—	—	—	—	—
<b>R<sub>3</sub></b>										

Figura 2. Definició dels diferents punts de diversitat de la quimioteca.

L'estratègia general de síntesi es mostra en la figura 3. Així, partint d'una resina apropiada s'hi va acoblar el derivat de prolina protegit adientment. Després de desbloquejar la posició  $\gamma$ , es va introduir la lisina mitjançant diverses unions (amida, hidroxamat o sulfamat). Posteriorment es va eliminar el grup Alloc que protegia l'amina en posició  $\alpha$  de la prolina, s'hi va introduir els diferents grups aromàtics i finalment els compostos foren escindits de les resines mitjançant un tractament acidolític.

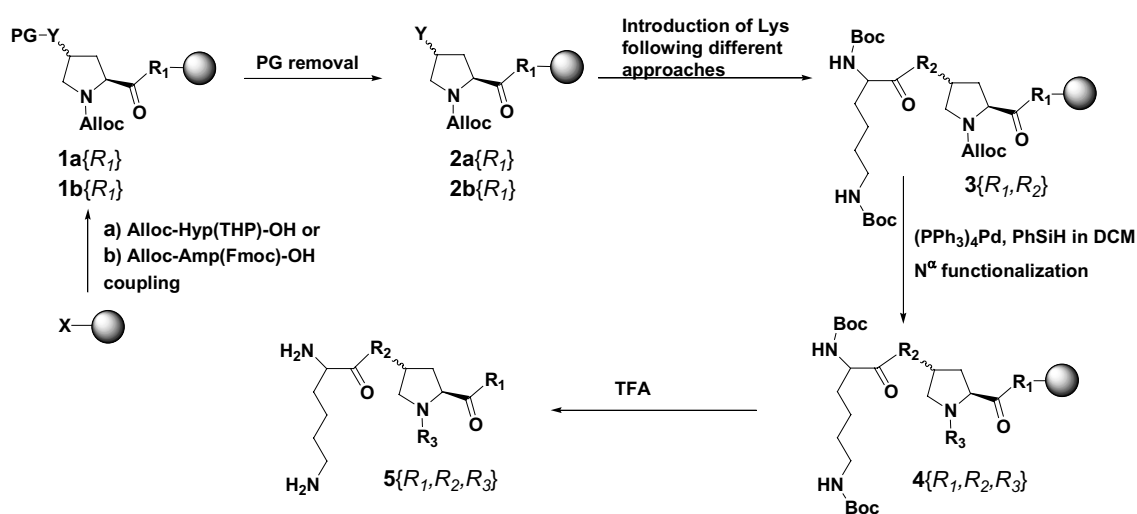


Figura 3. Estratègia general de síntesi de la quimioteca.

L'obtenció del primer punt de diversitat ( $R_1$ ) es va dur a terme treballant amb els espaiadors bifuncionals Rink Amida i AB incorporats a la resina MBHA, els quals van donar carboxamides i àcids carboxílics respectivament. Per tal d'obtenir els àcids hidroxàmics es va utilitzar la resina Cl-Trt, sobre la qual s'hi va ancorar Fmoc-NH-OH en medi bàsic. Després de la desprotecció de l'hidroxilamina amb piperidina es van acoblar els derivats de prolina utilitzant HATU i DIEA com a agents acoblants. Un cop acoblats els derivats de prolina, les posicions  $\gamma$  foren desbloquejades i la lisina fou introduïda mitjançant diferents enllaços donant el segon punt de diversitat ( $R_2$ ).

La síntesi dels dipèptids es va dur a terme sobre la resina **2b**{ $R_1$ } utilitzant Boc-Lys(Boc)-OH i DIPCDI i HOBt com a agents acoblants. Per tal de sintetitzar els hidroxamats, partint de la peptidil resina **2a**{ $R_1$ }, es va introduir la lisina en condicions de Mitsunobu utilitzant Boc-Lys(Boc)-NH-OPMB en presència de PPh<sub>3</sub> i DIAD en DCM. Per a la síntesi dels sulfamats, es van utilitzar les condicions optimitzades en l'apartat anterior, utilitzant 5 eq de clorur de sulfamoïl en DMA durant 3 hores i acoblant la Boc-Lys(Boc)-OH utilitzant HATU i DIEA com a agents acoblants.

Els diferents grups aromàtics i heterocicles foren introduïts en el grup  $\alpha$ -amino de la prolina un cop eliminat l'Alloc, obtenint el tercer punt de diversitat ( $R_3$ ). En aquest cas, també es varen estudiar dos tipus d'unió. Així, aquesta amina fou tant alquilada com acilada. Per tal de fer les acilacions s'utilitzà el corresponent àcid carboxílic i DIPCDI i HOBt com a agents acoblants. Per a les alquilacions es va utilitzar una reducció aminativa a partir dels corresponents aldehids. Finalment els compostos foren escindits de la resina amb un tractament amb trifluoroacètic.

Algunes sèries de compostos amb resina Cl-Trt no es va aconseguir sintetitzar-les. En el cas dels sulfamats el problema principal fou l'escissió prematura dels compostos en les condicions de sulfamoïlació. En el cas dels hidroxamats no es van detectar els productes finals, possiblement degut a la baixa reactivitat deguda a impediment estèrics de l'alcohol al estar prop del  $C_t$ , tal i com s'ha descrit en casos similars (**1,2**).

- 
1. Rajeswaran, W. G.; Hocart, S. J.; Murphy, W. A.; Taylor, J. E., and Coy, D. H. N-Methyl scan of somatostatin octapeptide agonists produces interesting effects on receptor subtype specificity. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1416–1421.

Finalment, els productes foren purificats per HPLC-MS semipreparatiu en fase reversa. Tant les pureses com el rendiment final després de purificar es mostren en la taula 1. Les pureses per HPLC a 220 nm foren força elevades en tots els casos. Els rendiments després de purificar varien segons la sèrie. Els rendiments més baixos foren obtinguts en resina Rink Amida MBHA quan les cadenes laterals eren les **1-5**, el que disposa una càrrega positiva al primer aminoàcid ancorat a la resina. S'ha descrit que aquesta disposició dóna problemes en les escissions dels productes de la resina, obtenint en aquests casos baixos rendiments de síntesis degut a l'escissió del grup espaiador unit al compost (**3**).

R <sub>1</sub> i R <sub>2</sub>	Cadena lateral (R <sub>3</sub> )									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>5</b> {1,1,R <sub>3</sub> }	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>5</b> {1,2,R <sub>3</sub> }	24/88	33/99	10/91	42/97	10/97	52/87	48/82	39/96	75/97	51/95
<b>5</b> {1,3,R <sub>3</sub> }	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>5</b> {2,1,R <sub>3</sub> }	1/94	5/76	2/85	3/88	1/82	-	4/80	6/91	19/96	8/49
<b>5</b> {2,2,R <sub>3</sub> }	9/61	13/81	4/99	6/84	9/99	59/97	15/88	33/99	65/40	43/90
<b>5</b> {2,3,R <sub>3</sub> }	-	3/99	-	1/93	3/88	46/89	36/81	53/84	88/93	52/99
<b>5</b> {3,1,R <sub>3</sub> }	-	3/80	3/83	8/81	-	1/45	3/81	4/93	32/36	9/58
<b>5</b> {3,2,R <sub>3</sub> }	26/92	26/96	28/99	23/83	15/99	36/92	32/92	18/92	46/87	15/95
<b>5</b> {3,3,R <sub>3</sub> }	5/71	12/71	14/88	15/84	16/48	17/94	19/90	21/89	29/81	27/89

**Taula 1.** Rendiments<sup>a</sup> i Pureses<sup>b</sup> després de purificar. Els <sup>a</sup>rendiments foren calculats segons el pes molecular del producte i la funcionalització inicial de la resina i es mostren en el superíndex esquerra de cada casella. Les <sup>b</sup>pureses foren calculades mitjançant HPLC segons la integració a 220 nm del pic que contenia el pes molecular. Les pureses es mostren com a subíndex a la part dreta de cada casella.

- Erchegyi, J.; Hoeger, C. A.; Low, W.; Hoyer, D.; Waser, B.; Eltschinger, V.; Schaer, J.-C.; Cascato, R.; Reubi, J. C., and Rivier, J. E. Somatostatin receptor 1 selective analogues: 2. N<sup>α</sup>-methylated scan. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5075-14.
- Yraola, F.; Ventura, R.; Vendrell, M.; Colombo, A.; Fernandez, J.-C.; De La Figuera, N.; Fernandez-Forner, D.; Royo, M.; Forns, P., and Albericio, F. A re-evaluation of the use of Rink, BAL, and PAL resins and linkers. *QSAR, Comb. Sci.* **2004**, *23*, 145-152.



### 3.5. CONCLUSIONS

1. La síntesi de sulfamats en fase sòlida no és trivial. Després d'un estudi exhaustiu en fase sòlida de les diferents condicions de sulfamoïlació descrites en solució, la seva aplicació a la fase sòlida va donar força problemes, com són l'impossibilitat d'eliminar bases inorgàniques, la destrucció del reactiu o l'escissió prematura dels compostos. Així, sembla que el protocol més adient per a la preparació d'aquests compostos és el tractament de l'alcohol amb clorur de sulfamoïl en DMA, sense la necessitat d'emprar cap base.
2. Els derivats trifuncionals derivats de la prolina són unes plataformes força adients per a la síntesi de quimiotèques amb molta diversitat. Utilitzant aquests compostos, s'ha sintetitzat en fase sòlida una quimioteca de peptidomimètics. Durant la síntesi d'aquesta llibreria s'ha pogut aplicar la síntesi de sulfamats optimitzada anteriorment. Tot i això, no ha estat possible sintetitzar sulfamats sobre la resina clortritil degut a l'escissió prematura dels compostos.

