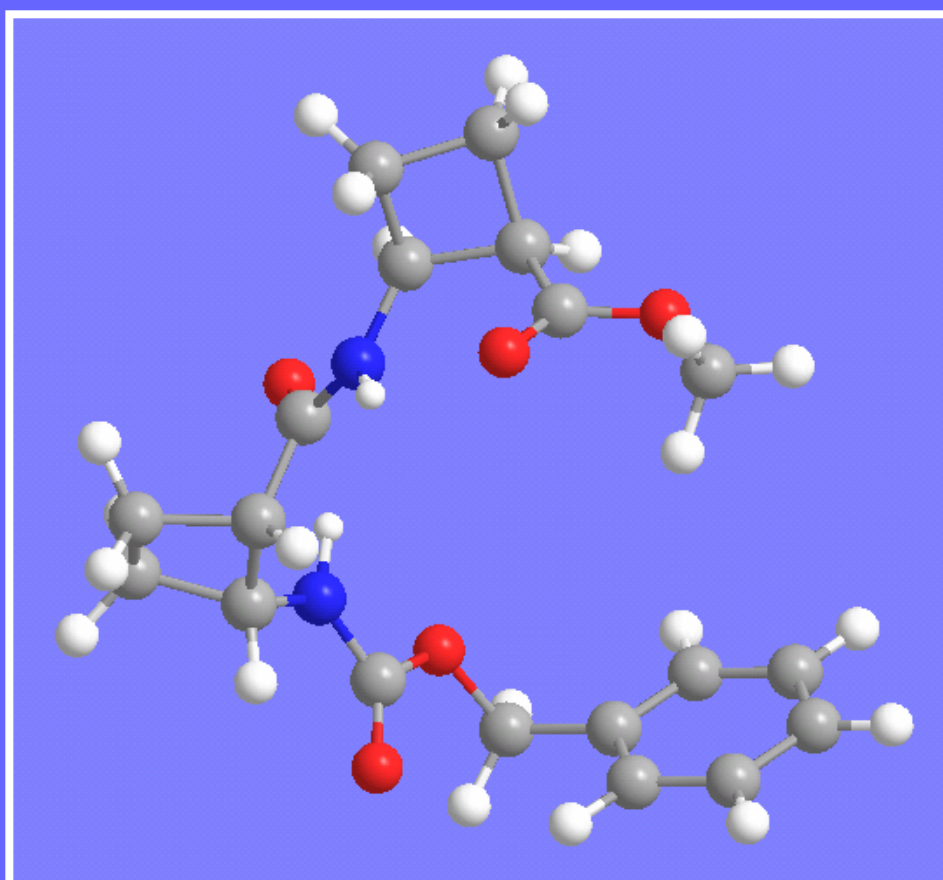


**ÀCIDS (+)- i (-)-2-AMINOCICLOBUTAN-1-CARBOXÍLICS
I LA SEVA INCORPORACIÓ EN β -PÈPTIDS.
ESTUDI SINTÈTIC I ESTRUCTURAL**



Sandra Izquierdo Salado

Octubre de 2005

UAB

Els β -aminoàcids ciclobutànics es troben a la natura tant aïllats com formant part de pèptids. A més, en moltes ocasions, la incorporació de l'anell ciclobutànic en peptidomimètics conformacionalment restringits ha permès la preparació de productes actius biològicament, que manifesten una major resistència en front la hidròlisi enzimàtica.

Així, en els últims anys, oligòmers compostos de β -aminoàcids carbocíclics han mostrat una gran tendència cap a la formació de conformacions preferents que condueixen a estructures secundàries.

En la present Tesi Doctoral es descriu la preparació de β -aminoàcids ciclobutànics enantiomèricament purs, així com la seva incorporació en diferents cadenes peptídiques. Amb els β -pèptids obtinguts es realitza un estudi estructural en solució i en estat sòlid, complementat per diferents tipus de càlculs. Així, hom pot considerar si els mateixos formen alguna conformació preferent que indueixi algun tipus de plegament.





Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Química

Àcids (+)- i (-)-2-aminociclobutan-1-carboxílics i la seva incorporació en β -pèptids. Estudi sintètic i estructural.

Memòria presentada a l'Escola de Postgrau de la Universitat Autònoma de Barcelona per optar al grau de Doctor en Química per na **Sandra Izquierdo Salado**.

Vist i plau,

Dra. Rosa M. Ortuño Mingarro

Dr. Vicenç Branchadell i Gallo

Bellaterra, Octubre de 2005.

Als meus pares

Al Félix

“No som sinó un foc que és precis encendre”

M'agradaria aprofitar aquesta oportunitat per donar les gràcies de tot cor a tothom que en un moment o altre m'ha ajudat en la realització d'aquesta Tesi Doctoral. Espero no deixar-me a ningú, i si així fos, demano disculpes per avançat i espero que sabreu perdonar-me.

En primer lloc, vull donar les gràcies als meus directors de Tesi, la Dra. Rosa M. Ortuño i el Dr. Vicenç Branchadell, per oferir-me l'oportunitat d'introduïr-me en el món de la recerca. Sens l'ajuda d'ambdós hauria estat impossible realitzar aquesta Tesi Doctoral.

També és just donar les gràcies a la Universitat Autònoma de Barcelona per la concessió, en el seu moment, d'una beca predoctoral per a la formació investigadora, sense la qual potser tot això no hauria estat possible.

M'agradaria també donar les gràcies al Professor Ernest Giralt per brindar-me la seva col·laboració en l'estudi conformacional dels β -pèptids, i al Dr. Marcelo J. Kogan per la seva bona disposició a ensenyar-me tot el que sé d'estudis conformacionals mitjançant càlculs de Dinàmica Molecular.

Aprofito l'ocasió per donar les gràcies als membres del Departament de Química, molt especialment als de la Unitat de Química Orgànica. També als membres dels Serveis que ens ajuden en el treball de cada dia, com ara l'Alba, del Servei d'Anàlisi Química, l'Àngel Álvarez, del Servei de Cristal·lografia i al personal del Servei de Ressonància Magnètica Nuclear, sobretot al Teo. En aquest sentit, m'agradaria tenir un record molt especial per a la Sra. Rosa Segura, que en pau descansi, a qui haig d'agraïr molts espectres d'urgència i algun espectre de caracterització *in extremis*.

També vull donar les gràcies als meus companys de laboratori per les bones estones i l'ajuda rebuda. Alguns ja han marxat, d'altres encara hi romandran un temps..., altres tot just comencen i ja som com vells coneguts..., gràcies a tots, us desitjo molta sort i espero que ens quedi molta feina a fer!

Com no podria ser d'una altra manera m'agradaria acabar donant les gràcies als meus pares i molt especialment al Félix. Sense el seu recolzament i la seva comprensió no sé si hauria pogut tirar endavant tantes coses alhora aquests últims mesos, però no em queixo i continuo demanant abans unes esqueses fortes que no pas una càrrega lleugera. Què us haig de dir, alguns ja em coneixeu...

Per acabar només dir-vos que, si en algun moment reviseu aquesta memòria i us serveix d'ajuda, encara que només sigui per mirar les condicions d'alguna reacció, ... si en algun moment aquesta memòria arriba a les vostres mans i aconseguix *encendre* la curiositat d'algú... em donaré per satisfeta totalment.

Els resultats de la present Tesi Doctoral han quedat recollits en les següents publicacions científiques,

“Stereodivergent synthesis of the first bis(cyclobutane)- β -peptides”. S. Izquierdo, M. Martin-Vilà, A.G. Moglioni, V. Branchadell, R.M. Ortuño; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, 13, 2403.

“14-Helical folding in a cyclobutane-containing β -tetrapeptide”. S. Izquierdo, M.J. Kogan, T. Parella, A.G. Moglioni, V. Branchadell, R.M. Ortuño; *Journal of Organic Chemistry*, **2004**, 69, 5093.

“(+) and (-)-2-aminocyclobutane-1-carboxylic acids and their incorporation into highly rigid β -peptides: Stereoselective synthesis and a structural study”. S. Izquierdo, F. Rua, A. Sbai, T. Parella, A. Álvarez-Larena, V. Branchadell, R.M. Ortuño; *Journal of Organic Chemistry*, **2005**, 70, 7963.

1.- INTRODUCCIÓ

1.1.- ELS β-AMINOÀCIDS	1
1.2.- ELS β-AMINOÀCIDS CARBOCÍCLICS.....	4
1.2.1.- ELS β-AMINOÀCIDS CICLOBUTÀNICS.....	6
• Aproximacions sintètiques als derivats de l'àcid 2-aminociclobutanocarboxílics.....	8
• Ús d'auxiliars quirals.....	8
• Ús de reaccions de cicloadició [2+2]	9
• Derivats dels aminoàcids ciclobutílics.....	10
• Ús de precursors ciclobutànics quirals.....	10
1.3.- ELS β-PÈPTIDS.....	13
1.3.1.- PROPIETATS CONFORMACIONALS.....	14
1.3.1.1.- CONFORMACIONS HELICOIDALS.....	16
• Conformació del tipus 14-HÈLIX.....	17
• Conformació del tipus 12-HÈLIX.....	22
• Conformació del tipus 10/12-HÈLIX.....	23
• Conformació del tipus 10-HÈLIX.....	25
1.3.1.2.- CONFORMACIONS LAMINARS: LÀMINES- β	29
1.3.1.3.- β -PÈPTIDS CÍCLICS.....	34
1.3.1.4.- "TWISTED STRANDS".....	35
1.3.2.- ESTUDIS CONFORMACIONALS TEÒRICS DE β -PÈPTIDS.....	36
1.4.- ANTECEDENTS EN EL GRUP D'INVESTIGACIÓ.....	37
2.- OBJECTIUS	
• OBJECTIUS.....	43

3.- RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1.- SÍNTESI DE β-AMINOÀCIDS CICLOBUTÀNICS.....	45
3.1.1.- Síntesi de 2-metoxicarbonil-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-ciclobutan-1-carboxilat de <i>tert</i> -butil, 4	46
3.1.2.- Síntesi de l'àcid 2- <i>tert</i> -butoxicarbonil-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-ciclobutan-1-carboxílic, 5	47
3.1.3.- Síntesi de 2-benziloxicarbonilamino-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-ciclobutan-1-carboxilat de <i>tert</i> -butil, 7 ...	48
3.1.4.- Síntesi de l'àcid 2-benziloxicarbonilamino-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-ciclobutan-1-carboxílic, 8	49
3.1.5.- Síntesi de 2-benziloxicarbonilamino-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, 9	50
3.1.6.- Síntesi de l'àcid 2-amino-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-ciclobutan-1-carboxílic, 13	53
3.1.7.- Síntesi de l'àcid 2-amino-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxílic, 14	54
3.2.- SÍNTESI DE β-PÈPTIDS.....	59
3.2.1.- SÍNTESI DELS β-PÈPTIDS DEL TIPUS A, ACOBLAMENT PEPTÍDIC.....	62
3.2.1.1.- Síntesi del β -dipèptid 17	62
3.2.1.2.- Síntesi del β -dipèptid 16	63
3.2.1.3.- Síntesi del β -tetrapèptid 20	64
3.2.2.- SÍNTESI DELS β-PÈPTIDS DEL TIPUS B, REACCIÓ DE TRANSPOSICIÓ DE CURTIUS I ADDICIÓ DE L'ISOCIANAT RESULTANT.....	66
3.2.2.1.- Síntesi del dipèptid 24	73
3.2.3.- SÍNTESI DELS β-δ-DIPÈPTIDS 26 i 27.....	74
3.3.- ESTUDI ESTRUCTURAL DE DERIVATS CICLOBUTÀNICS.....	77
3.3.1.- ESTUDI ESTRUCTURAL DEL β -AMINOÀCID 11 i DELS β -PÈPTIDS bisCICLOBUTÀNICS.....	77
3.3.1.1.- ESTUDI ESTRUCTURAL EN DISSOLUCIÓ.....	77
3.3.1.2.- CÀLCULS TEÒRICS.....	89

3.3.1.3.- ESTUDI EN ESTAT SÒLID.....	92
3.3.1.4.- CONCLUSIONS.....	98
3.3.2.- ESTUDI ESTRUCTURAL DEL β-DIPÈPTID 17.....	101
3.3.2.1.- ESTUDI ESTRUCTURAL EN DISSOLUCIÓ.....	102
3.3.2.2.- ESTUDI TEÒRIC DEL β -DIPÈPTID 17.....	109
3.3.2.3.- CONCLUSIONS.....	111
3.3.3.- ESTUDI ESTRUCTURAL DEL β-TETRAPÈPTID 20.....	113
3.3.3.1.- ESTUDI ESTRUCTURAL EN DISSOLUCIÓ.....	113
3.3.3.2.- ESTUDI CONFORMACIONAL TEÒRIC.....	123
3.3.3.3.- CONCLUSIONS.....	130

4.- RESUM I CONCLUSIONS

• RESUM I CONCLUSIONS.....	133
----------------------------	-----

5.- MÈTODE DE CàLCUL

• Mètodes Químico-quàntics.....	135
• Mètodes del Funcional de la Densitat.....	137
• Dinàmica Molecular.....	140
• El Tremp Simulat Iteratiu.....	142

6.- DESCRIPCIÓ ESPERIMENTAL

6.1.- OBSERVACIONS GENERALS.....	145
6.1.1.- Espectroscopia i Espectrometria.....	145
6.1.2.- Cromatografia.....	146
6.1.3.- Utillatges generals de laboratori.....	147
6.2.- SÍNTESI DE β-AMINOÀCIDS I β-PÈPTIDS CICLOBUTÀNICS.....	148

6.2.1.- Preparació del diazometà.....	151
6.2.2.- Preparació del 1,2-ciclobutandicarboxilat de dimetil, 2	152
6.2.3.- Síntesi de l'àcid 2-metoxicarbonil-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxílic, 3	153
6.2.4.- Síntesi del 2-metoxicarbonil-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-ciclobutan-1-carboxilat de <i>tert</i> -butil, 4	154
6.2.5.- Síntesi de l'àcid 2- <i>tert</i> -butiloxicarbonil-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1-ciclobutan-1-carboxílic, 5	155
6.2.6.- Síntesi del 2-azidocarbonil-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-ciclobutan-1-carboxilat de <i>tert</i> -butil, 6	156
6.2.7.- Síntesi de 2-benziloxicarbonilamino-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-ciclobutan-1-carboxilat de <i>tert</i> -butil, 7	157
6.2.8.- Síntesi de l'àcid 2-benziloxicarbonilamino-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-ciclobutan-1-carboxílic, 8	158
6.2.9.- Síntesi de 2-benziloxicarbonilamino-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, 9	159
6.2.10.- Síntesi de l'àcid 2-amino-(1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-ciclobutan-1-carboxílic, 13	160
6.2.11.- Síntesi de 2-azidocarbonil-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, 10	161
6.2.12.- Síntesi de 2-benziloxicarbonilamino-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, 11	162
6.2.13.- Síntesi de l'àcid 2-benziloxicarbonilamino-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxílic, 12	163
6.2.14.- Síntesi de l'àcid 2-amino-(1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxílic, 14	164
6.2.15.- Síntesi del β-dipèptid 16	165
6.2.16.- Síntesi del β-dipèptid 17	167
6.2.17.- Síntesi del β-dipèptid 18	169
6.2.18.- Síntesi del β-dipèptid 19	171
6.2.19.- Síntesi del β-tetrapèptid 20	172
6.2.20.- Síntesi del β-dipèptid 17b	174
6.2.21.- Síntesi del β-dipèptid bisciclobutànic 21	176
6.2.22.- Síntesi del β-dipèptid bisciclobutànic 22	178
6.2.23.- Síntesi del β-dipèptid 23	181
6.2.24.- Síntesi del β-dipèptid 24	182
6.2.25.- Síntesi del β-dipèptid bisciclobutànic 25	183
6.2.25.- Síntesi del β-δ-dipèptid 26	185
6.2.26.- Síntesi del β-δ-dipèptid 27	187

7.- ANNEX

7.1.- ESTUDIS ESTRUCTURALS PRELIMINARS EN SOLUCIÓ DEL β-DIPÈPTID 17

- Determinació de l'efecte de la dilució..... 189
- Experiments d'addició de DMSO-d₆..... 191

7.2.- DETERMINACIÓ DELS COEFICIENTS DE TEMPERATURA

- β-monòmer **11**..... 197

• β -dipèptid 18	199
• β -tetrapèptid 20	202
• β -dipèptid bisciclobutànic 21	205
• β -dipèptid bisciclobutànic 22	208
• β -dipèptid bisciclobutànic 25	211

7.3.- DADES CRISTAL·LOGRÀFIQUES

• β -monòmer 12	215
• β -dipèptid bisciclobutànic 21	222
• β -dipèptid bisciclobutànic 22	230
• urea 22b	241
• β -dipèptid bisciclobutànic 25	249

1.- INTRODUCCIÓ

1.1.- ELS β -AMINOÀCIDS

Els β -aminoàcids, tot i que són menys abundants que els seus anàlegs α , són un tipus d'aminoàcids no proteinogènics que es troben a la natura, tant aïllats com formant part de pèptids i heterocicles amb propietats farmacològiques de tipus antibiòtic, antifúngic ó citotòxic, entre d'altres.¹

Entre els compostos més rellevants derivats formals dels β -aminoàcids no peptídics es troben les β -lactames, que inclouen antibiòtics àmpliament coneguts com és el cas de les penicil·lines i les cefal·losporines, així com d'altres agents medicinals. Dintre d'aquests agents medicinals, per exemple, es troba l'àcid clavulànic, una substància amb una pobre capacitat antibiòtica però que es caracteritza per ésser un potent inhibidor de les β -lactamases. Aquesta característica fa que administrat conjuntament amb una penicil·lina potencii la seva activitat antibiòtica (**Figura 1**).²

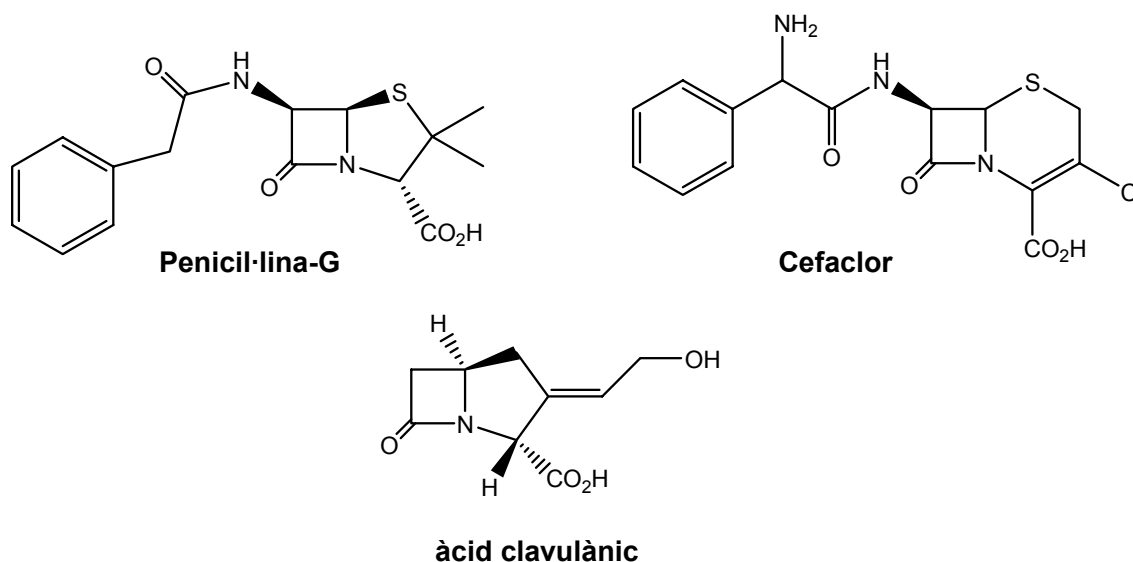


Figura 1. Exemples de compostos β -lactàmics amb propietats medicinals.

¹ T.C. Boge, G.I. Georg, J. Tamariz, en *Enantioselective Synthesis of β -aminoacids*; E. Juaristi; Ed. Wiley-VCH: N.Y., **1997**; pp1-45 i les referències aquí mencionades.

² (a) J. Mann; *Secondary Metabolism, Chapter 5: The secondary metabolism of amino acids*; Oxford University Press; U.K., **1993**. pp. 191-260. (b) K.B.G. Torssell, *A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism, Chapter 6: Amino acids, peptides and proteins*; John Wiley & Sons, N.Y., **1983**. pp. 226-263.

De la mateixa manera, s'ha constatat que els β -aminoàcids constitueixen unitats estructurals clau en productes importants, en els què s'ha comprovat que la cadena lateral de β -aminoàcid és necessària per a la seva activitat biològica. Com exemple d'això trobem algunes estatines^{3,4} o l'agent anticancerigen taxol - Paclitaxel® -. El taxol, que fou inicialment aïllat de les fulles de la *Taxus brevifolia*, actualment es considera un dels compostos més importants en la quimioteràpia contra el càncer.⁵ (Figures 2 i 3)

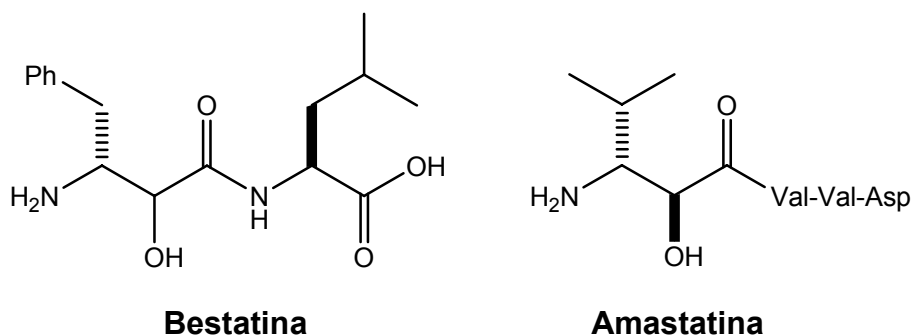


Figura 2. Exemples d'algunes estatines amb propietats immunoreguladores, antitumorals i antimicrobianes

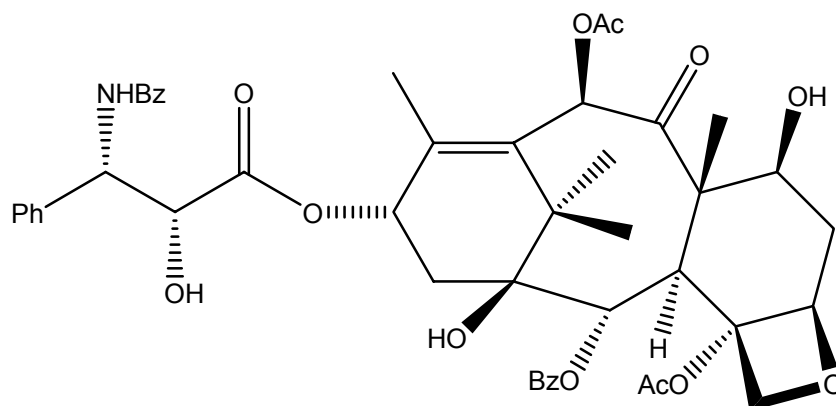


Figura 3. Estructura del taxol. Paclitaxel®.

Així mateix, s'ha comprovat que els oligòmers de β -aminoàcids són generalment força més estables farmacocinèticament que els α -pèptids, donat que són més resistents a la hidròlisi enzimàtica i a la degradació. Molt probablement aquesta estabilitat és deguda a la dificultat de les peptidases per trencar els enllaços amida adjacents als β -aminoàcids, la qual cosa fa

³ F. Gueritte-Voegelein, V. Senilh, B. David, D. Guenard, P. Potier; *Tetrahedron*, **1986**, 42, 4451.

⁴ K. Iizuka, T. Kamijo, H. Harada, K. Akahane, T. Kubota, H. Umeyama, Y. Kiso, *J. Am. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1989**, 1678.

⁵ Vegeu per exemple, M.C. Wani, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 2325.

que siguin molècules molt interessants des del punt de vista del disseny de peptidomimètics.⁶

Una altra característica molt important dels β -aminoàcids envers els α recau en el fet que s'ha comprovat que, en estructures anàlogues, són necessaris menys residus dels primers per formar una estructura secundària estable.⁷

Tot això, conjuntament amb la publicació dels treballs pioners dels Professors Seebach⁸ i Gellman⁹ en els que, de manera independent, descriuen que els β -pèptids, poden formar estructures secundàries de tipus helicoïdal anàlogues a les α -hèlixs en proteïnes, ha impulsat en els últims anys el desenvolupament tant de la síntesi com de l'estudi dels β -aminoàcids i els seus derivats peptídics.

Dintre del desenvolupament en l'estudi dels β -aminoàcids, aquells que presenten una llibertat conformacional restringida han assolit un paper fonamental. Aquest fet és degut a que la seva rigidesa intrínseca influeix directament en l'aparició d'una forta tendència cap a l'adopció de conformacions específiques, que condueixen a la formació d'estructures secundàries tals com hèlixs, girs i làmines.^{10,11} Aquests tipus de plegaments són els responsables, en última instància, de l'activitat biològica de la molècula.

Val a dir que, en la majoria dels casos, la rigidesa dels β -aminoàcids conformacionalment restringits vé induïda o bé per la presència d'un anell carbocíclic de mida petita o mitjana, o bé per la presència d'un substituent voluminós en les posicions α o β .

⁶ (a) T. Hintermann, D. Seebach; *Synlett*, **1997**, 437. (b) M. Rueping, Y. Mahajan, M. Sauer, D. Seebach; *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 257. (c) J.V. Scriber, J. Frackennpohl, F. Moser, T. Fleischmann, H.P. Köhler, D. Seebach; *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 424.

⁷ D. Apella, L.A. Christianson, D.A. Klein, M.R. Richards, D.R. Powell, S.H. Gellman; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *121*, 7574.

⁸ D. Seebach, M. Overhand, F.N.M. Kühnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widner; *Helv. Chim. Acta*, **1996**, *79*, 913.

⁹ D.H. Apella, L.A. Christianson, I.L. Karle, D.R. Powell, S.H. Gellman; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 13071.

¹⁰ W.F. De Grado, J.P. Schneider, Y. Hamuro, *J. Pept. Res.*, **1999**, *54*, 206, i les seves referències.

¹¹ J. Venkatraman, S.C. Shankaramma, P. Balaram; *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 3131.

Aquests β -pèptids conformacionalment restringits són de vital importància en els estudis biològics a l'hora d'investigar, per exemple, la topologia dels receptors; i també són grans candidats a tenir en compte en el disseny de nous fàrmacs. Recentment, el grup de Gellman ha preparat oligòmers formats per β -aminoàcids amfifílics que mimetitzen les propietats dels pèptids de les defenses, els quals han mostrat activitat en front d'un ampli espectre de bacteries, incloent aquelles que eren resistents als antibiòtics comuns.¹²

1.2.- ELS β -AMINOÀCIDS CARBOCÍCLICS

Els β -aminoàcids carbocíclics també es troben a la natura tant aïllats com formant part de molècules complexes. Concretament, en la dècada dels 90 dos grups japonesos van aïllar, independentment, del *Bacillus cereus* i del *Streptomyces setonii*, l'àcid 2-aminociclopentan-(1*R*,2*S*)-carboxílic, també conegut com el (1*R*,2*S*)-2-ACP o cispentacin, el qual presenta activitat biològica com a antibiòtic antifúngic i és també un component clau en l'estructura de l'antibiòtic amipurimicina. (**Figura 4**)^{13,14}

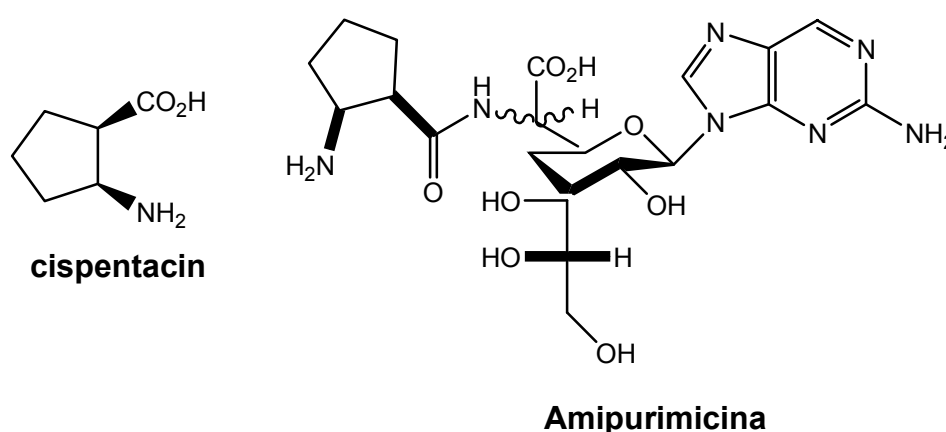


Figura 4. Productes que contenen en la seva estructura un anell carbocíclic de ciclopentà.

¹² E.A. Porter, B. Weisblum, S.H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 7324.

¹³ R.M. Ortuño, en *Enantioselective Synthesis of β -aminoacids*; *Second Edition*, Editat per E. Juaristi i V. A. Soloshonok; John Wiley&Sons, Inc., N.Y., **2005**; pp117-38 i les referències aquí mencionades.

¹⁴ F. Fülöp, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 2181.

A finals de la dècada dels 90, Gellman va estudiar els β -pèptids derivats de l'àcid 2-aminociclopentancarboxílic i de l'àcid 2-aminociclohexancarboxílic, quedant palesa la formació de plegaments helicoidals de 14 baules, que anomenà 14-hèlix.^{15,16} (Figura 5)

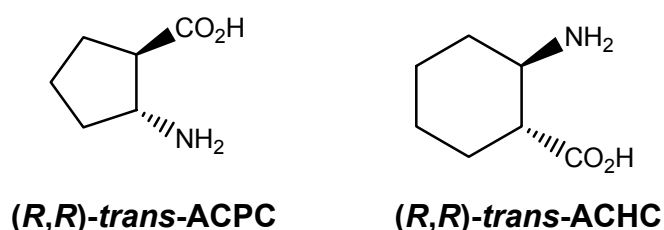


Figura 5. Monòmers utilitzats per Gellman en la síntesi de β -pèptids carbocíclics.

D'aquesta manera, β -aminoàcids conformacionalment restringits, degut a la presència d'un anell carbocíclic de ciclopropà,¹⁷ ciclopentà¹⁸ o ciclohexà¹⁹ en la seva estructura, han estat incorporats en cadenes peptídiques per tal d'ésser estudiades biomecanística i estructuralment, amb l'objectiu d'obtenir pèptids amb noves propietats biològiques. Val a dir, que aquest no ha estat el cas dels β -aminoàcids ciclobutànics, especialment els enantiomèricament purs, que han estat tan poc investigats que la majoria de publicacions relacionades amb la seva síntesi i estudi procedeixen del nostre propi grup d'investigació, i que, per tant, seran l'objectiu de la present Tesi Doctoral.

¹⁵ (a) D.H. Apella, L.A. Christianson, D.A. Klein, D.R. Powell, S.H. Gellman; *Nature*, **1997**, 387, 381. (b) J. Applequist, K.A. Bode, D.H. Apella, L.A. Christianson, S.H. Gellman; *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 4891.

¹⁶ (a) D.H. Apella, L.A. Christianson, I.L. Karle, D.R. Powell, S.H. Gellman; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 13071. (b) D.H. Apella, L.A. Christianson, I.L. Karle, D.R. Powell, S.H. Gellman; *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 6206.

¹⁷ Vegeu per exemple: (a) J. Voigt, M. Noltemeyer, O. Reiser, *Synlett*, **1997**, 202. (b) C. Bubert, C. Cabrele, O. Reiser, *Synlett*, **1997**, 827.

¹⁸ Entre d'altres: D. Apella, L.A. Christianson, D.A. Klein, M.R. Richards, D.R. Powell, S.H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 121, 7574.

¹⁹ D.H. Apella, L.A. Christianson, I. Karle, D.R. Powell, S.H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 13701.

1.2.1 - ELS AMINOÀCIDS CICLOBUTÀNICS

Els primers β -aminoàcids ciclobutànics naturals van ser aïllats el 1980 per Bell i col·laboradors.²⁰ Concretament van aïllar l'àcid 2,4-metanoglutàmic i la 2,4-metanoprolina de la planta *Atelia herbert smithii*, de la família de les lleguminoses. El 1987, Austin i col·laboradors²¹ van aïllar, de la mateixa planta, un altre aminoàcid no proteinogènic, concretament l'àcid *cis*-1-amino-3-hidroximetilciclobutan-1-carboxílic. (**Figura 6**)

Paral·lelament, Adlington i col·laboradors²² van descobrir l'any 1983 l'antibiòtic X-1092, que és un pèptid produït pels microorganismes *Streptomyces species X-1092* i que presenta activitat antimicrobiana en front de microorganismes *gram*-positius i *gram*-negatius. (**Figura 6**)

D'ençà que foren aïllats aquests compostos, els aminoàcids ciclobutànics han despertat l'interès dels investigadors degut a què molts d'ells han presentat activitat com antivírics, analgèsics, antimicrobians, antidepressius i neurotròfics; val a dir, que la incorporació de l'anell ciclobutànic en peptidomimètics conformacionalment restringits ha tingut com a resultat la preparació de derivats biològicament actius, tal com l'anàleg de la tuftsina Thr-[Mom²]-Pro-Arg, el qual presenta una gran resistència envers la hidròlisi enzimàtica en comparació amb la pròpia tuftsina.²³ (**Figura 6**)

²⁰ E.A. Bell, M.Y. Quareshi, R.J. Pryce, D.H. Janzen, P. Lemke, J. Clardy; *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 1409.

²¹ G.N. Austin, P.D. Baird, H.F. Chow, L.E. Fellows, G.W.J. Fleet, R.J. Nash, J.M. Peach, R.J. Pryce, C.H. Stirton; *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 1857.

²² R.M. Adlington, J.E. Baldwin, R.H. Jones, J.A. Murphy, M.F. Parisi; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1983**, 1479.

²³ E. Gershonov, R. Granoth, E. Tzeheval, Y. Gaoni, M. Fridkin; *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4833.

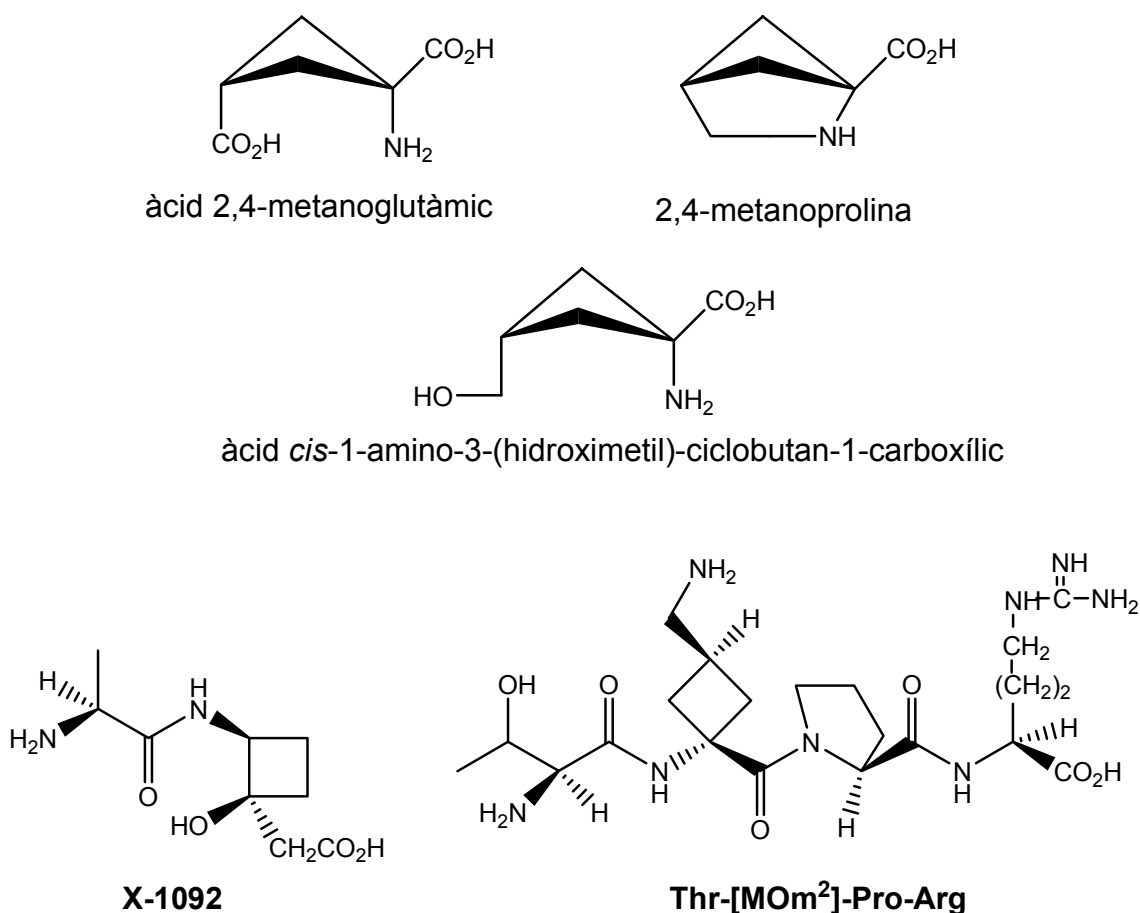


Figura 6. L'àcid 2,4-metanoglutàmic, la 2,4-metanoprolina i l'àcid *cis*-1-amino-3-hidroximetilciclobutan-1-carboxílic foren aïllats en la dècada dels 80 de la planta *Atelia herbert smithii*, el dipèptid X-1092 és produït pel microorganisme *Streptomyces species X-1092*,

El 1993, Avotins revisà tota la bibliografia disponible fins el moment per tal de sistematitzar els estudis realitzats sobre la síntesi, reactivitat i activitat biològica dels aminoàcids ciclobutànics. Des d'aquest moment els aminoàcids ciclobutànics es classifiquen en dos grans grups: a) els **àcids aminociclobutancarboxílics**, que tenen les funcions directament unides a l'anell ciclobutànic, i b) els **àcids carboxílics ciclobutil substituïts**, en que les funcions no es troben unides directament a l'anell, sinó a un enllaç de distància.²⁴ (Figura 7)

²⁴ F. Avotins, *Russ. Chem. Rev.*, **1993**, 62(9), 897, i les referències en ell mencionades. Vegeu per exemple: J.P. O'Donell, D.A. Johnson, A.J. Azzaro; *J. Med. Chem.*, **1980**, 23, 1142.

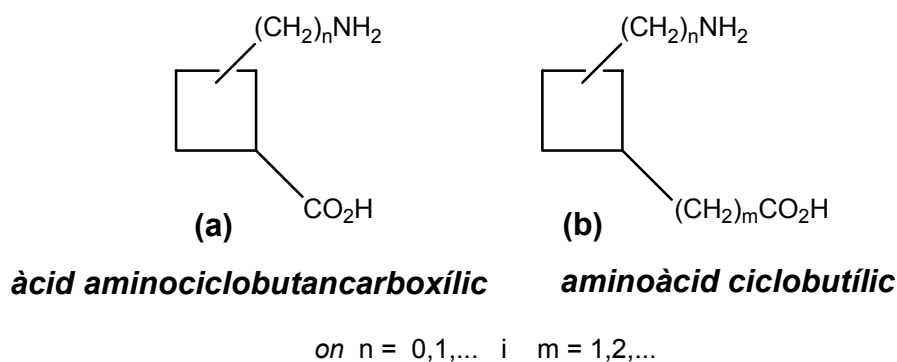


Figura 7. Estructures generals dels aminoàcids ciclobutànics.

Aquesta classificació permet comparar les propietats respectives i facilita l'estudi dels aminoàcids ciclobutànics. Dins del primer grup trobem α -aminoàcids, β -aminoàcids i γ -aminoàcids. En la present Tesi Doctoral ens centrarem en l'estudi concret dels β -aminoàcids del tipus ciclobutancarboxílics i la seva incorporació en cadenes peptídiques.

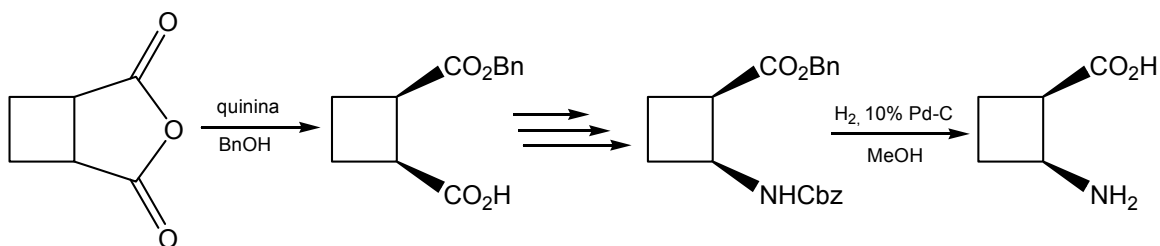
• Aproximacions sintètiques als derivats de l'àcid 2-aminociclobutancarboxílic

A continuació hom fa una breu aproximació als mètodes sintètics utilitzats en l'obtenció dels derivats de l'àcid 2-aminociclobutancarboxílic.

✓ Ús d'auxiliars quirals

Bolm²⁵ ha preparat β -aminoàcids ciclobutànics a partir de l'apertura del corresponent anhídrid *meso* amb alcohol benzílic usant la quinina com a auxiliar quiral. Aquesta apertura té lloc amb un 93% d'e.e.; hom continua la síntesi amb la reacció de transposició de Curtius i la desprotecció dels grups funcionals tal i com es mostra a l'**Esquema 1**.

²⁵ Vegeu per exemple: (a) C. Bolm, I. Schiffrers, I. Atodiresei, C.P.R. Hackenberger; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, *14*, 3455. (b) C. Bolm, *Synthesis*, **2001**, 1719. (c) C. Bolm, *Synthesis*, **2001**, 1875.

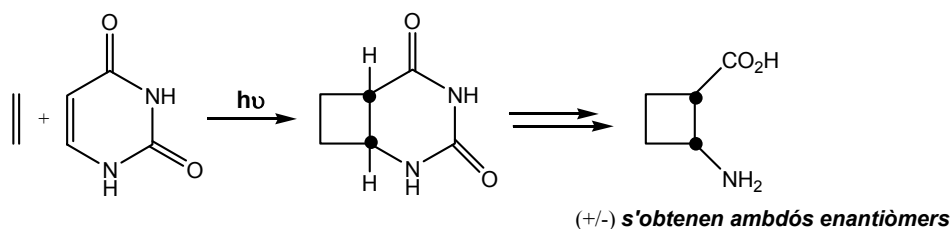


Esquema 1. Esquema de la ruta sintètica utilitzada per Bolm per preparar els β -aminoàcids.

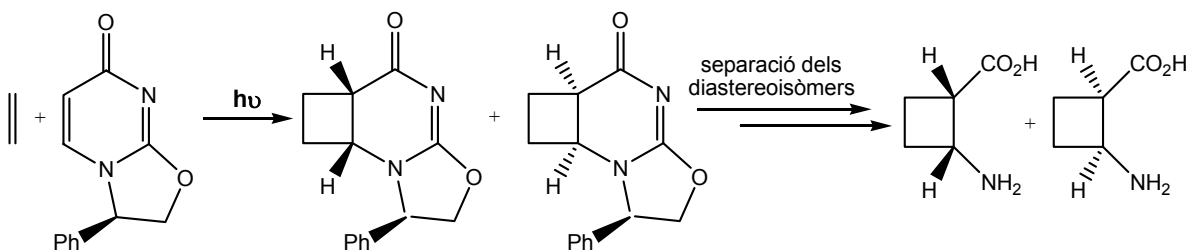
✓ Ús de reaccions de cicloadició [2+2]

Aitken²⁶ ha preparat β -aminoàcids ciclobutànics, en forma racèmica a partir d'una reacció de cicloadició [2+2] fotoquímica entre l'etilè i l'uracil, i en forma enantiòmerica, mitjançant la reacció entre l'etilè i un derivat quiral de l'uracil; seguidament té lloc la posterior degradació de l'anell heterocíclic per donar la funció aminoàcid. (**Esquema 2**)

Síntesi del racèmic



Síntesi dels enantiòmers



Esquema 2. Resum de les rutes sintètiques utilitzades per Aitken per obtenir els β -aminoàcids ciclobutànics.

²⁶ Vegeu per exemple: (a) D.J. Aitken, C. Gauzy, E. Pereira ; *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 2359. (b) C. Gauzy, E. Pereira, S. Faure, D.J. Aitken ; *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 7095. (c) D.J. Aitken, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 6177.

• Derivats dels aminoàcids ciclobutílics

✓ Ús de precursors ciclobutànics quirals

Un dels mètodes més emprats en l'obtenció de compostos ciclobutànics òpticament actius utilitza els terpens com a font de quiralitat. Concretament el α -pinè i la verbenona s'han utilitzat en els últims anys en el nostre grup d'investigació per tal de sintetitzar diferents aminoàcids ciclobutànics enantiomèricament purs.²⁷ La idea de l'ús de terpens en la síntesi d'aquests productes ve justificada per dues bones raons: d'una banda obre tot un ventall de possibilitats a la síntesi de diferents tipus d'aminoàcids i/o anàlegs de nucleòsids i, d'una altra banda, partint d'aquests precursors podem conèixer l'estereoquímica absoluta i relativa del derivat obtingut.²⁸

L'**Esquema 3** permet visualitzar aquesta gran versatilitat de la síntesi de derivats ciclobutílics utilitzant precursors ciclobutànics quirals. A partir de l'aldehid precursor derivat del pinè i/o la verbenona per reacció de Wittig-Horner hom pot condensar-los amb diferents fosfonats per tal d'obtenir els corresponents α -deshidroaminoàcids, que podem convertir en diferents tipus de productes com ara α -aminoàcids i α -pèptids.²⁹⁻³³

²⁷ A.G. Moglioni, E. García-Expósito, G.Y. Moltrasio, R.M. Ortuño, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 3593.

²⁸ R.M. Ortuño, A.G. Moglioni, G.Y. Moltrasio, *Curr. Org. Chem.*, **2005**, 9, 237.

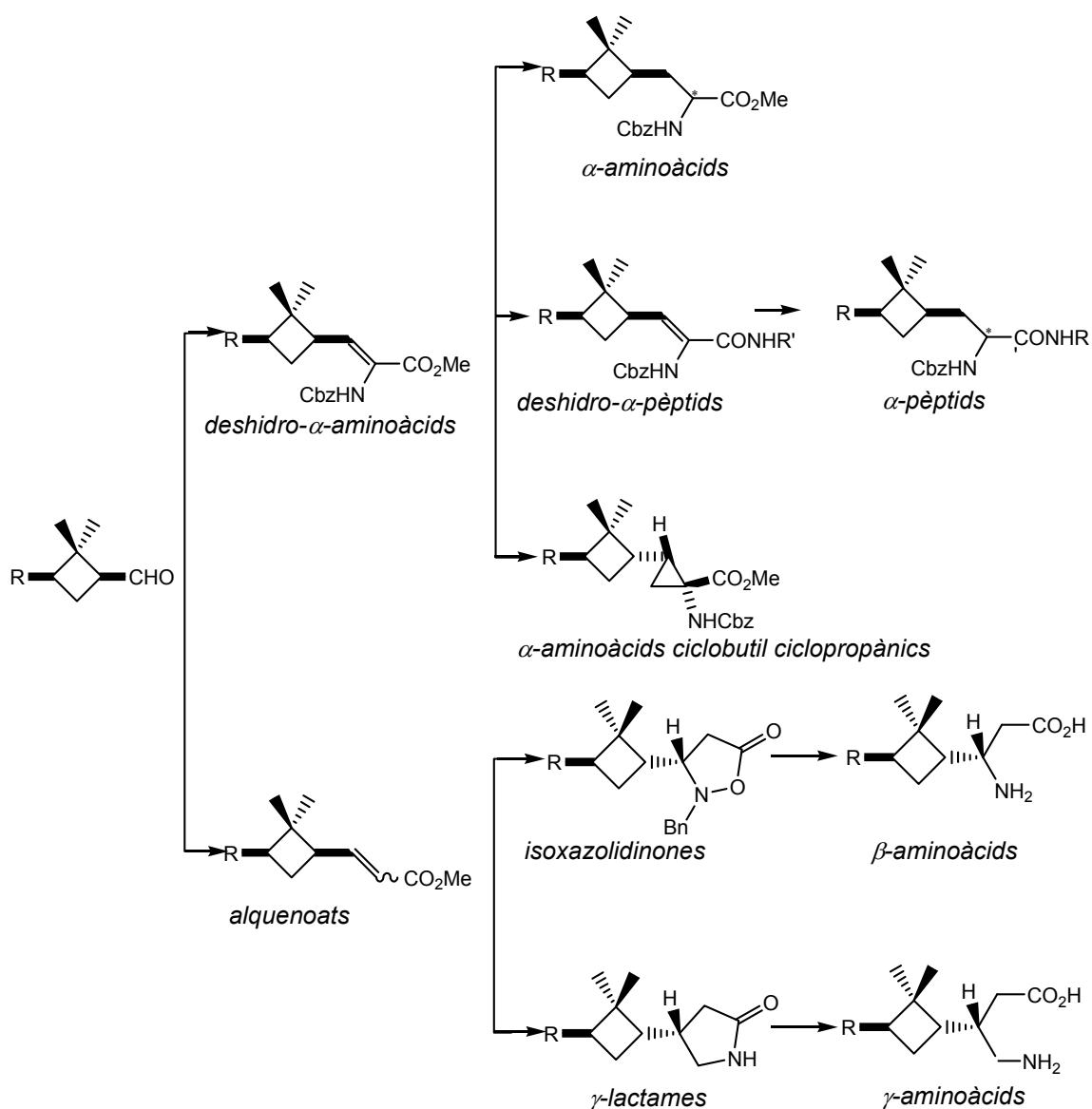
²⁹ A.G. Moglioni, E. Gràcia-Expósito, G.P. Aguado, T. Parella, V. Branchadell, G.Y. Moltrasio, R.M. Ortuño; *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 3934.

³⁰ G.P. Aguado, A.G. Moglioni, R.M. Ortuño; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 217.

³¹ G.P. Aguado, A.G. Moglioni, B.N. Brousse, R.M. Ortuño; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 2455.

³² G.P. Aguado, A. Álvarez-Larena, O. Illa, A.G. Moglioni, R.M. Ortuño; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, 12, 25.

³³ A.G. Moglioni, E. Gràcia-Expósito, A. Álvarez-Larena, V. Branchadell, G.Y. Moltrasio, R.M. Ortuño; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, 11, 4903.



Esquema 3. Rutes sintètiques desenvolupades a partir de l'intermedi clau de tipus aldehydic procedent del pinè o la verbenona. D'aquesta manera, hom pot accedir a les diferents famílies de compostos que es mostren, tals com α -aminoàcids, α -pèptids, β -aminoàcids, γ -aminoàcids i γ -lactames.

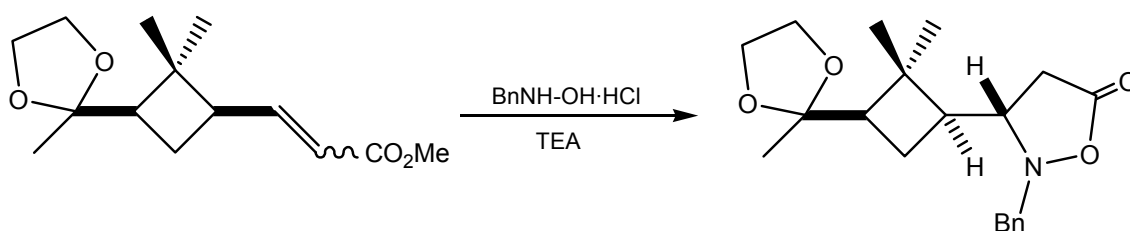
D'una altre banda, partint d'aquest mateix precursor aldehydic per condensació de tipus Wittig podem obtenir el corresponent alquenoat ciclobutílic que és un intermedi clau en la síntesi d'isoxazolidinones, γ -lactames, γ -aminoàcids i β -aminoàcids.^{34,35} (**Esquema 3**)

³⁴ A.G. Moglioni, E. Muray, J.A. Castillo, A. Álvarez-Larena, G.Y. Moltrasio, V. Branchadell, R.M. Ortuño; *J. Org. Chem*, **2002**, 67, 2402.

³⁵ A.G. Moglioni, B.N. Brousse, A. Álvarez-Larena, G.Y. Moltrasio, R.M. Ortuño; *Tetrahedron : Asymmetry*, **2002**, 13, 451.

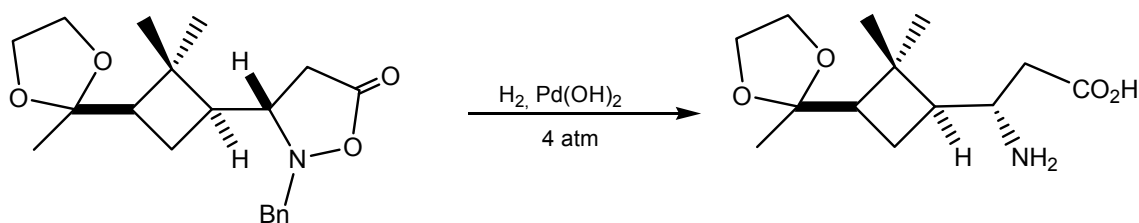
A continuació ens centrarem en la part de l'**Esquema 3** que condueix a l'obtenció de les isoxazolidinones i els β -aminoàcids ciclobutílics.

Els (*E*)-alquenoats ciclobutílics reaccionen més ràpidament amb la *N*-benzilhidroxilamina que els corresponents isòmers *Z*, però ambdós estereoisòmers convergeixen en la mateixa isoxazolidinona, la qual s'obté com un únic diestereoisòmer amb un 70% de rendiment. (**Esquema 4**)



Esquema 4. Reacció d'obtenció de la isoxazolidinona.

La isoxazolidinona preparada és precursora immediata del β -aminoàcid corresponent. Només resta la hidrogenòlisi de l'enllaç N-O amb $\text{Pd}(\text{OH})_2$, la qual és concomitant a la desbenzilació de l'amina. D'aquesta manera s'obté, de forma quantitativa, el corresponent β -aminoàcid en forma lliure. (**Esquema 5**)



Esquema 5. Reacció d'obtenció d'un β -aminoàcid per hidrogenòlisi de la isoxazolidinona precursora.

Totes aquestes aproximacions posen de manifest l'esforç dedicat, en els últims anys, a la síntesi enantioselectiva d'aquests tipus de compostos conformacionalment restringits degut a la presència de l'anell ciclobutànic, els derivats dels quals són candidats en potència pels fàrmacs dels propers anys.

1.3.- ELS β -PÈPTIDS

En els darrers anys, el nostre coneixement de l'estructura i la funció de les proteïnes ha avançat ràpidament, proveïnt-nos de la comprensió dels mecanismes d'una àmplia varietat de processos biològics.

Així mateix, paral·lelament a l'avenç en el coneixement dels pèptids s'ha anat incrementant l'ús dels mateixos en la recerca de nous fàrmacs, com a resposta a la gran demanda de diversificació dels blocs adequats per ésser incorporats en cadenes peptídiques, que permetin augmentar la seva activitat i selectivitat.

En general, els esforços van encaminats cap a una millora de l'estabilitat de les estructures bioactives i un augment de la resistència enfront de la proteolisi.

En aquest sentit han jugat un paper destacat els pèptids, molt especialment els derivats carbocíclics, donat que incorporen elements voluminosos capaços d'estrènyer la mobilitat i ésser responsables de l'adopció de plegaments molt concrets que impliquen la consegüent formació d'estructures secundàries molt més estables. Els derivats dels β -aminoàcids ciclobutànics, malgrat la manca de precedents, en serien un bon exemple d'això últim. És destacable també la presència a la bibliografia de pèptids que incorporen α -aminoàcids ciclobutànics³⁶ així com pèptids formats per β -aminoàcids ciclopentànics o ciclohexànics.

Els β -pèptids, de la mateixa manera que els α -pèptids, contenen grups amida capaços de formar enllaços d'hidrogen tant *inter* com *intramoleculares* que permeten estabilitzar fortament l'estructura secundària. Per tant, serà de vital importància conèixer els tipus d'interaccions que s'estableixen en l'estructura així com les raons que les motiven.

³⁶ M. Gatos, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, G.M. Bonora, Z. Benedetti, B. Di Blasio, R. Lacovino, A. Santini, M. Saviano, J. Kamphuis; *J. Peptide Sci.*, **1997**, 3, 110.

1.3.1.- PROPIETATS CONFORMACIONALS

Les conformacions dels β -pèptids poden ser analitzades en funció dels angles de torsió de la cadena principal o esquelet, designats pels angles ω , ϕ , θ , i ψ , segons la convenció de Balaram (**Figura 8**).^{37,38}

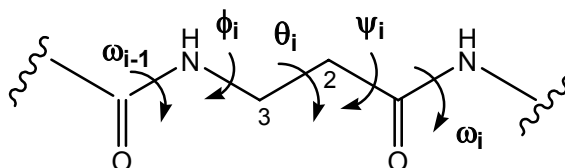


Figura 8. Angles de torsió de la cadena principal de la β -alanina segons la convenció de Balaram.

El plegament helicoidal o girat dels β -pèptids requereix d'una conformació *gauche* al voltant de l'angle θ definit per l'enllaç C_2-C_3 . Un rotàmer *trans* ens porta a una conformació totalment estesa sempre i quan els valors dels angles ϕ i ψ siguin els apropiats. Un substituent voluminós en la posició 2 ó 3 pot afavorir estèricament una disposició *gauche* enfront d'una conformació *trans*, forçant doncs, la formació d'una conformació determinada. (**Figura 9**)

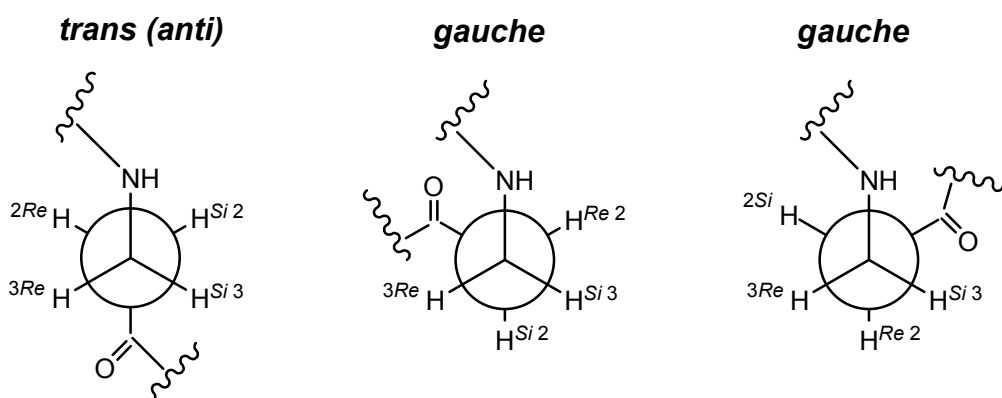


Figura 9. Rotàmers, a tall d'exemple, per a la β -alanina a través de l'angle de torsió θ .

Els efectes dels substituents en la conformació local del β -aminoàcid es resumeixen en la **Figura 10**.

³⁷ A. Barnejee, P. Balaram; *Science*, **1997**, 73, 1067.

³⁸ W.F. DeGrado, J.P. Schneider, Y. Hamuro; *J. Peptide Res.*, **1999**, 54, 206.

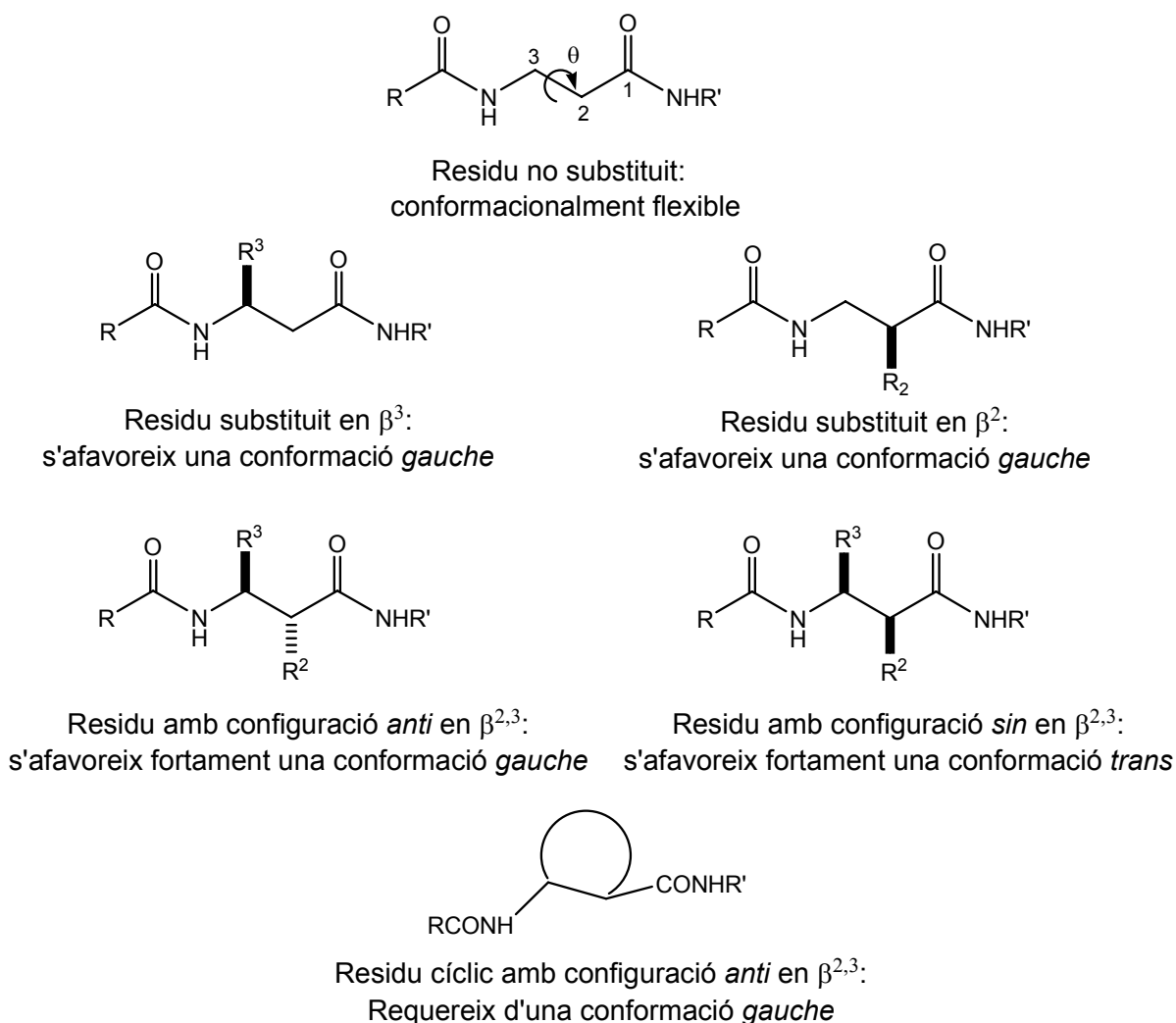


Figura 10. Efecte dels substituents en l'angle de torsió θ

El β -aminoàcid β -alanina, que no està substituït, és altament flexible, anàlogament a la glicina en els α -aminoàcids. La presència de substituents alquílics en les posicions C_2 i C_3 afavoreixen una conformació *gauche* al voltant de l'enllaç C_2-C_3 . De la mateixa manera, els β -aminoàcids disubstituïts en les posicions C_2 i C_3 estan encara més restringits conformacionalment i afavoreixen la conformació *gauche* quan els substituents estan en *anti* segons la convenció de Masamune. (**Figura 10**)

La conformació *gauche* és encara més fortament promoguda quan aquest enllaç C_2-C_3 es troba formant part d'un anell carbocíclic, com és el cas dels anells de ciclopentà i ciclohexà. (**Figura 10**) i que en la present Tesi Doctoral serà objecte d'estudi en relació a l'anell de ciclobutà.

La mida de l'anell carbocíclic determina concretament la preferència torsional de l'angle C_2-C_3 , que alhora serà qui determinarà el tipus d'hèlix formada pel β -pèptid.

D'altra banda, quan els substituents en C_2 i C_3 estan disposats en *sin*, està afavorida una conformació *trans* al voltant de l'enllaç C_2-C_3 , la qual cosa promou la formació d'estructures de tipus laminar.

1.3.1.1.- CONFORMACIONS HELICOÏDALS

Els pèptids formats per residus amb substituents en les posicions C_2 i/o C_3 adopten conformacions helicoïdals, la nomenclatura de les quals pot variar segons l'autor.

Seebach,³⁹ per exemple, utilitza una nomenclatura basada en la descripció de la simetria de l'hèlix, indicant amb la lletra P ó M l'orientació topològica cap a la dreta o l'esquerra.

En el nostre cas, hom adopta la convenció establerta per Gellman i què depèn del nombre d'àtoms que formen l'anell descrit per l'enllaç d'hidrogen. D'aquesta manera, comunment trobem β -pèptids que adopten conformacions del tipus de 14-hèlix, 12-hèlix i 10-hèlix, tal i com es mostra a la **Figura 11**.⁴⁰

³⁹ D. Seebach, P.E. Ciceri, M. Overhand, B. Jaun, D. Rigo; *Helv. Chim. Acta*, **1996**, 79, 2043.

⁴⁰ R.P. Cheng, S.H. Gellman, W.F. De Grado, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 3219.

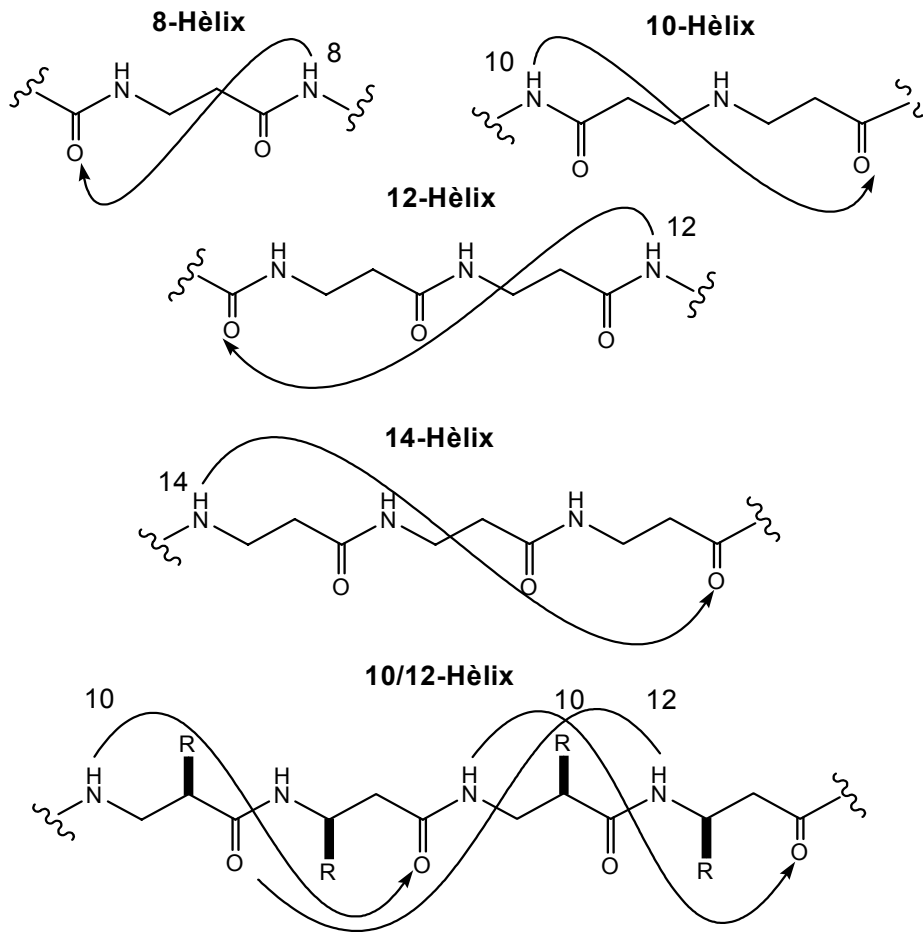


Figura 11. Nomenclatura de les hèlix dels β -pèptids basada en el patró d'enllaços d'hidrogen.

• **CONFORMACIÓ DEL TIPUS 14-HÈLIX**

La conformació de 14-hèlix ve establitzada per la presència d'un enllaç d'hidrogen entre el protó de l'amida en el residu i i el carbonil de la cadena principal en el residu $i+2$, formant una sèrie d'anells interconcatenats de 14 membres.

En la **Figura 12** es mostra el plegament de tipus 14-hèlix descrit pels diferents β -pèptids, basats en residus de *trans*-ACHC estudiats per Gellman.

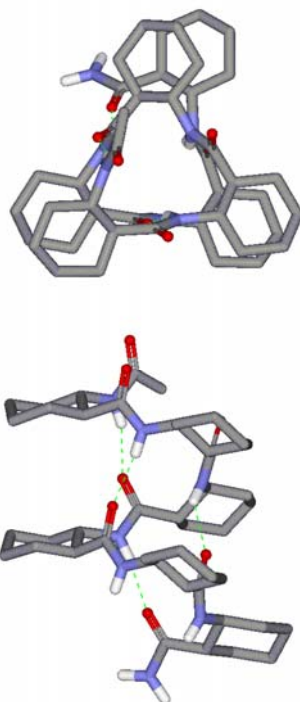


Figura 12. Plegament de tipus 14-hèlix adoptat pel β -hexapèptid de ACHC, descrit per Gellman.

El conjunt de l'estructura de la 14-hèlix difereix del de l' α -hèlix en molts aspectes. La 14-hèlix té un radi lleugerament més ample i més tendència a formar-se per a una longitud de cadena donada.^{41,42} Així, en l' α -hèlix són necessaris més residus per generar una volta que en la 14-hèlix.

La formació de la 14-hèlix ha estat corroborada per l'estudi mitjançant tècniques de IR, DC i diferents experiments de RMN ^1H .

⁴¹ K.A. Bode, J. Applequist, *Macromolecules*, **1997**, *30*, 2144.

⁴² J. Applequist, K.A. Bode, D.H. Apella, L.A. Christianson, S.H. Gellman; *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 4891.

Per exemple, Gellman utilitzà les tècniques de RMN, DC i cristal·lografia de raigs X, per tal de confirmar que els oligòmers compostos de sis unitats de l'àcid *trans*-2-aminociclohexancarboxílic formen 14-hèlixs ben definides en solució de metanol i en estat sòlid. (**Figura 13**)

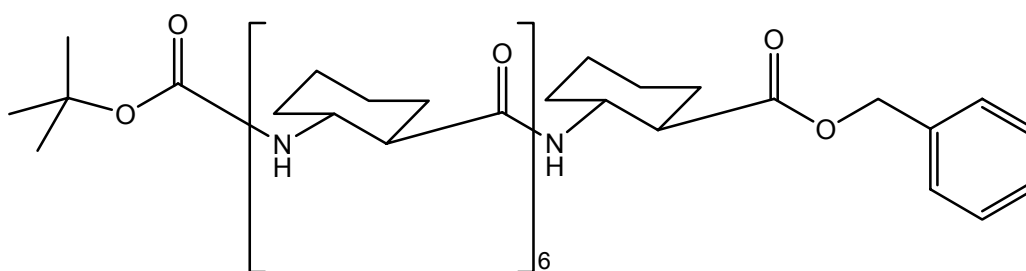


Figura 13. β -Pèptid format per residus de l'àcid *trans*-2-aminociclohexancarboxílic, el qual s'ha demostrat que forma una estructura de 14-hèlix.

Tal i com havia predit la simulació computacional,⁴³ s'observa que l'hèlix s'estabilitza per enllaços d'hidrogen entre cada tres residus i que, per tant, cada 14 àtoms estan units per enllaços d'hidrogen definint una 14-hèlix. Aquesta hèlix té una longitud de 5 Å per volta i conté 3 residus de β -aminoàcid ciclohexànic, mentre que una α -hèlix estàndard conté 3.6 residus i fa 5.6 Å per volta.^{44,45}

En aquests estudis s'utilitzà la RMN per mesurar el temps d'intercanvi dels protons amídics amb el dissolvent, quelcom conegut amb el nom de determinació de la difusió. Aquests experiments es basen en què els protons d'amida s'intercanvien en minuts sempre i quan no estiguin involucrats en la formació d'un enllaç d'hidrogen fort. Com més intercanviables amb l'aigua del dissolvent, això voldrà dir que són més accessibles al medi, deduïnt-se que es troben més lliures i que estaran menys involucrats en la formació d'un enllaç d'hidrogen.

⁴³ D. Seebach, M. Overhand, F.N.M. Kühnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer; *Helv. Chim. Acta*, **1996**, 79, 913.

⁴⁴ D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, G. Guichard, T. Hintermann, B. Jaun, J.L. Matthews, J.V. Schreiber, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer; *Helv. Chim. Acta*, **1998**, 81, 932.

⁴⁵ D.H. Apella, L.A. Christianson, I.L. Karle, D.R. Powell, S.H. Gellman; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 13071.

Els protons amídics ($\delta=7.9$ i 8.2 ppm) de la 14-hèlix de Gellman van intercanviar-se en dos dies, demostrant així l'estabilitat de l'estructura i la formació dels enllaços d'hidrogen. (**Figura 14**)

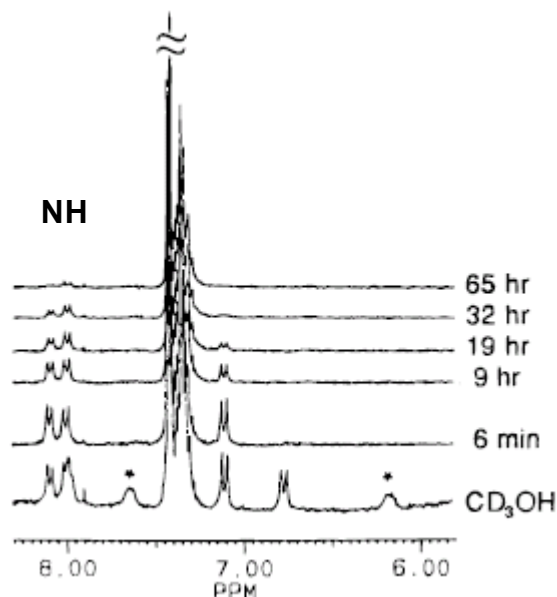


Figura 14. Exemple d'espectre de RMN ^1H en MeOD-d_4 d'un β -hexapèptid que mostra un plegament de tipus 14-hèlix.

Aquest fet és molt destacable si tenim en compte que els α -pèptids d'aquesta mida rarament presenten un plegament estable i molt menys un de tan definit.^{46,47}

Els anells de ciclohexà ajuden a estabilitzar l'estructura de 14-hèlix limitant la flexibilitat conformacional de les unitats individuals del β -aminoàcid. Els anells afavoreixen la formació dels tres aparellaments de la 14-hèlix i, addicionalment, són emplaçaments ideals per incorporar grups funcionals i aconseguir derivats de la 14-hèlix.

Gellman també ha utilitzat la tècnica de DC⁴⁸ per tal d'analitzar l'estructura secundària d'aquest β -pèptid (**Figura 15**).⁴⁹

⁴⁶ (a) J.J. Barchi, X.L. Huang, D.H. Apella, L.A. Christianson, A.R. Durrell, S.H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 2711. (b) Y.-D. Wu, D.-P. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 13485.

⁴⁷ (a) D. Seebach, P.E. Ciceri, M. Overhand, B. Jaun, D. Rigo, *Helv. Chim. Acta*, **1996**, 79, 2043. (b) D. Seebach, M. Overhand, F.N.M. Kuhnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta*, **1996**, 79, 913.

⁴⁸ R.W. Woody, *Circular Dichroism: Principles and Applications*; VCH, N.Y., **1994**; pp 24-38, 476-496.

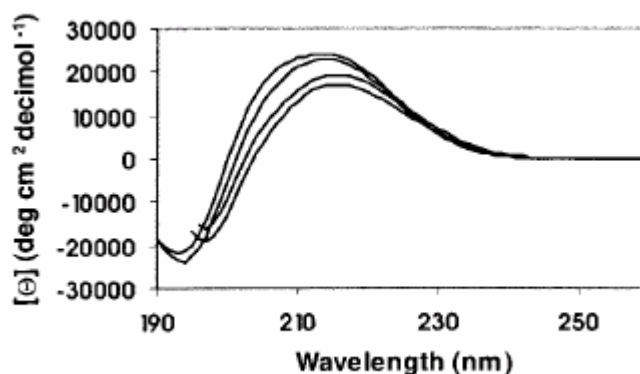


Figura 15. Espectre de DC en MeOH d'oligòmers de β -pèptids basats en residus de ACHC.

Si s'observa l'espectre de DC, es detecta la presència d'un màxim a aproximadament 215 nm i un mínim a aproximadament 195 nm, els quals poden invertir-se en funció de l'estereoquímica de l'hèlix. També es detecta la presència d'efecte Cotton.

Aquest màxim a 215 nm s'ha apuntat com característic de l'espectre de DC dels oligòmers que presenten un plegament de tipus 14-hèlix.^{50,51}

És important destacar que, curiosament, la presència del metilè adicional característic dels β -aminoàcids respecte dels α , no només no augmenta la flexibilitat conformacional del pèptid com hom podria pensar *a priori*, i que implicaria una entropia desfavorable associada a la formació de l'hèlix. Contràriament, la formació de l'enllaç d'hidrogen en el sentit β requereix de la restricció de 3 angles dihedres en front dels 2 de l' α . Aquest fet comporta que els β -pèptids formin estructures secundàries molt estables derivades de la presència d'enllaços d'hidrogen intramoleculars.

⁴⁹ D.H. Apella, L.A. Christianson, I.L. Karle, D.R. Powell, S.H. Gellman; *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 6206.

⁵⁰ D.H. Apella, L.A. Christianson, I.L. Karle, D.R. Powell, S.H. Gellman; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 13071.

⁵¹ T.L. Raguse, J.R. Lai, S.H. Gellman; *Helv. Chim. Acta*, **2002**, *85*, 4154.

- **CONFORMACIÓ DEL TIPUS 12-HÈLIX**

La conformació de tipus 12-hèlix ve estabilitzada per enllaços d'hidrogen entre el carbonil de l'amida del residu i i el protó de l'amida del residu $i+3$, formant una sèrie d'anells interconcatenats de 12 baules. (**Figura 16**)

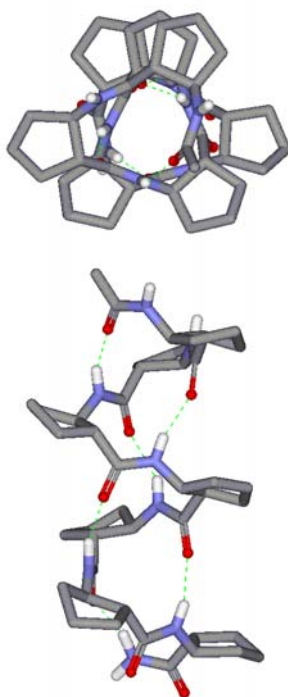


Figura 16. Plegament de tipus 12-hèlix adoptat per oligòmers de ACPC.

L'hèlix es repeteix aproximadament cada 2.5 residus i mostra la mateixa polaritat que l' α -hèlix.

S'han realitzat càlculs teòrics⁵² que indiquen que la contribució de la transició π - π^* a l'espectre de DC d'una 12-hèlix és similar al de la 14-hèlix, però de signe invers.

⁵² J. Applequist, K.A. Bode, D.H. Apella, L.A. Christianson, S.H. Gellman; *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 4891.

• **CONFORMACIÓ DEL TIPUS 10/12-HÈLIX**

Els β -pèptids que alternen residus monosubstituïts en les posicions 2 i 3 poden adoptar una conformació del tipus de 10/12-hèlix. (**Figura 17**)

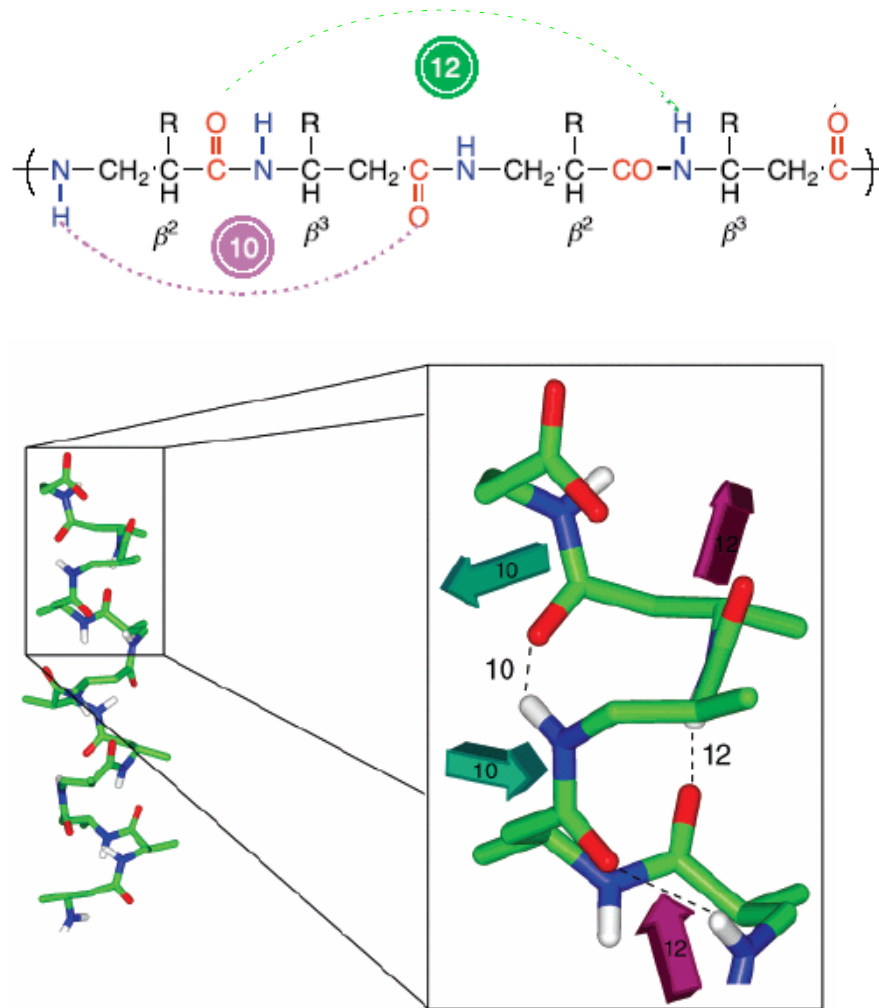


Figura 17. Representació esquemàtica de la 10/12-hèlix.

La característica principal d'aquesta hèlix és una combinació d'enllaços d'hidrogen que alternen la formació d'anells interconcatenats de 10 i 12 baules.

En aquest tipus d'hèlix els enllaços d'hidrogen que formen anells de 10 baules estarien formats pel carbonil del residu i i el protó de l'amida del residu $i+2$, mentre que els anells de 12 baules estarien descrits pel carbonil del residu i i el protó de l'amida $i+1$ i $i+3$, de forma alternada.

Al igual que en les anteriors conformacions helicoidals, la conformació de 10/12-hèlix també ve confirmada per l'espectre de DC, del qual se'n mostra un exemple a la **Figura 18**. Aquest es caracteritza per la presència d'un màxim a aproximadament 205 nm.

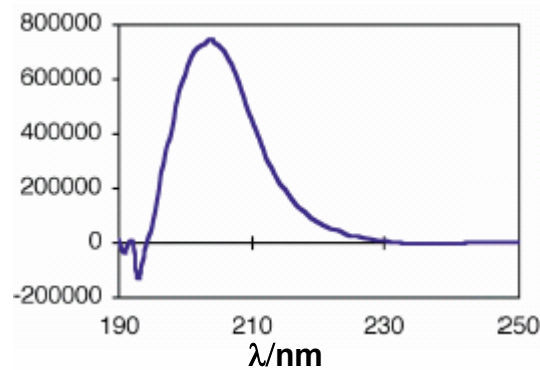


Figura 18. Exemple d'espectre de DC d'una 10/12-hèlix en metanol.

- CONFORMACIÓ DEL TIPUS 10-HÈLIX

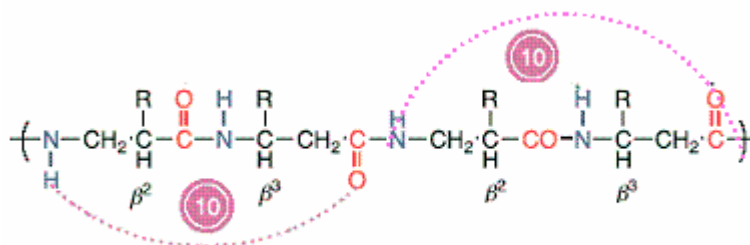


Figura 19. Representació esquemàtica de la 10-hèlix.

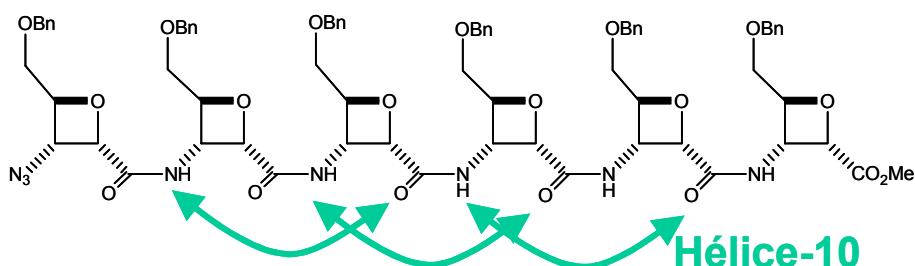


Figura 20. Representació del plegament de tipus 10-hèlix dels heptapèptids oxetànics de Fleet.

Fleet i col·laboradors han preparat recentment β -pèptids a partir de monòmers basats en anells oxetànics. El fet d'incloure β -pèptids formats formalment per anells de 4 baules aporta una gran rigidesa a l'estructura. Aquests pèptids s'ha vist que formen una estructura de tipus 10-hèlix, la qual ha estat corroborada per diferents experiments de RMN ^1H i que representa l'únic exemple d'aquest tipus d'hèlix conegut fins el moment. (**Figures 20 i 21**)

Els aminoàcids constituents contenen un anell d'oxetà i són derivats sintèticament de monosacàrids. Els substituents amino i carboxil estan en *cis* en l'anell de 4 baules a diferència dels casos dels anells de ciclopentà i ciclohexà, en els que els substituents sempre es troben en *trans*.^{53,54,55,56} (Figura 21)

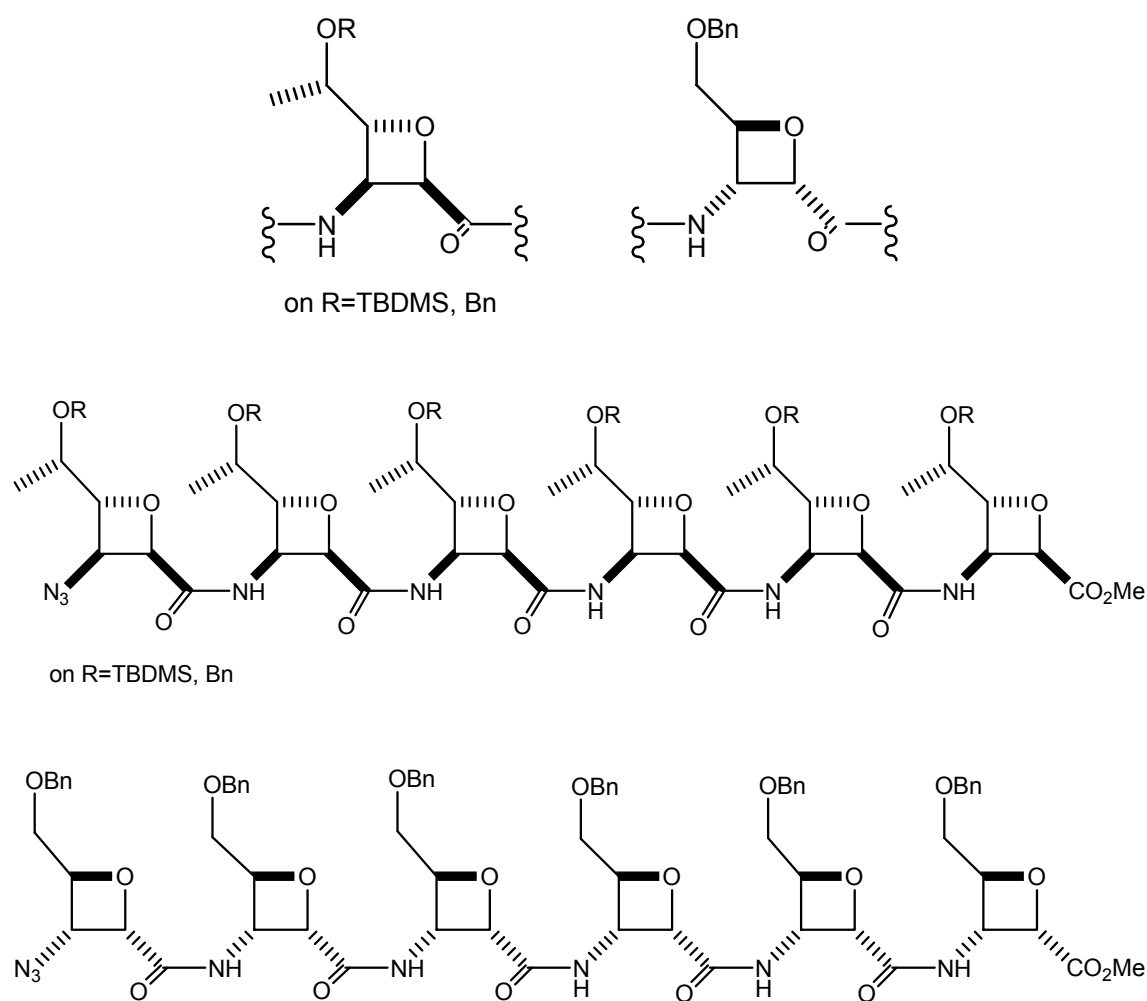


Figura 21. Monòmers oxetànics utilitzats per Fleet. Aquests són condensats donant lloc als dos tipus de β -hexapèptids mostrats a la Figura, que formen una estructura de tipus 10-hèlix, confirmada per experiments de 2D-RMN. Fins el moment no se'n coneixen més exemples.

⁵³ T.D.W. Claridge, J.M. Goodman, A. Moreno, D. Angus, S.F. Barker, C. Taillefumier, M.P. Watterson, G.W.J. Fleet, *Tet. Lett.*, **2001**, 42, 4251.

⁵⁴ S.W. Johnson, S.F. Jenkinson, D. Angus, J.H. Jones, D.J. Watkin, G.W.J. Fleet, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, 15, 2681.

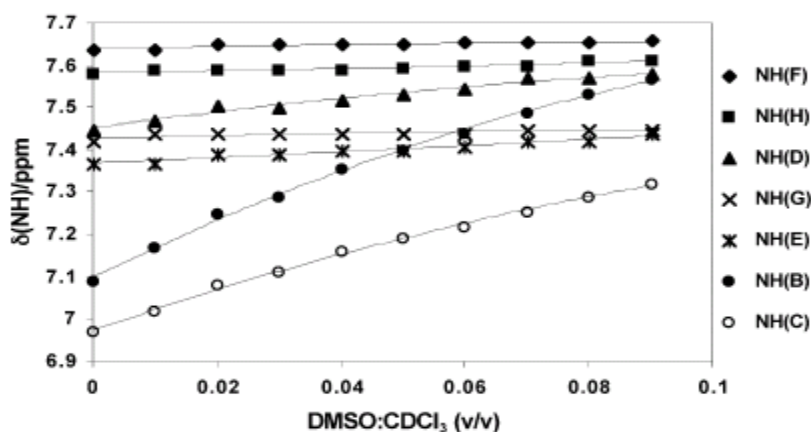
⁵⁵ S.W. Johnson, S.F. Jenkinson, D. Angus, J.H. Jones, D.J. Watkin, G.W.J. Fleet, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, 15, 3263

⁵⁶ T.D.W. Claridge, D.D. Long, C.M. Baker, B. Odell, G.H. Grant, A.A. Edwards, G.E. Tranter, G.W.J. Fleet; *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 2082.

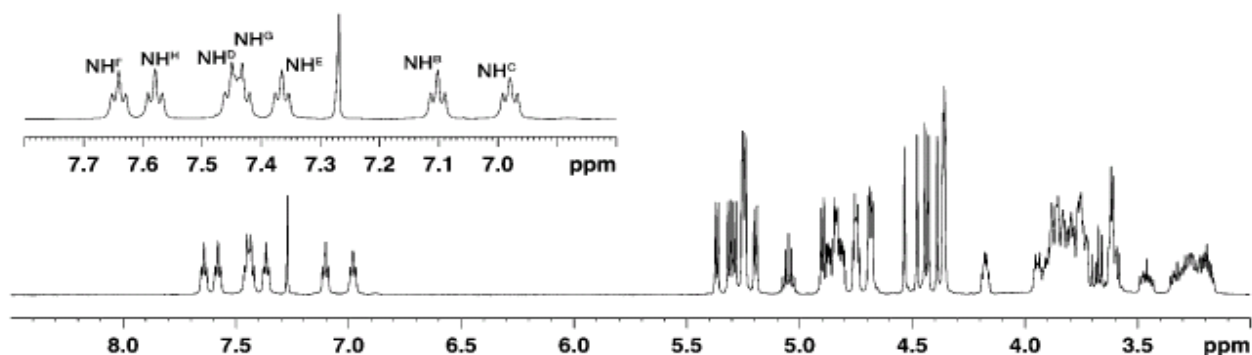
Fleet ha inclòs també en els seus treballs experiments de RMN ^1H amb la finalitat de correlacionar la presència dels enllaços d'hidrogen intramoleculars responsables del plegament de tipus 10-hèlix amb la inducció d'una determinada estructura secundària. En aquest cas, es realitza un tipus d'experiment que consisteix en anar afegint petits percentatges de DMSO- d_6 a una mostra de concentració definida del pèptid en un dissolvent apolar. Tenint en compte el canvi cap a δ superiors que acostuma a causar el DMSO- d_6 en els desplaçaments químics dels protons per efecte de la solvatació, el fet que els valors d'aquests en els protons amídics no es vegin afectats vol dir que estan fortament fixats, i doncs que estan formant un enllaç d'hidrogen.⁵⁷

Aquests resultats s'acostumen a mostrar de forma gràfica, tot representant el percentatge de DMSO- d_6 afegit a la mostra en funció del desplaçament químic dels protons amídics, tal i com es mostra a la **Figura 22**.

a)



b)



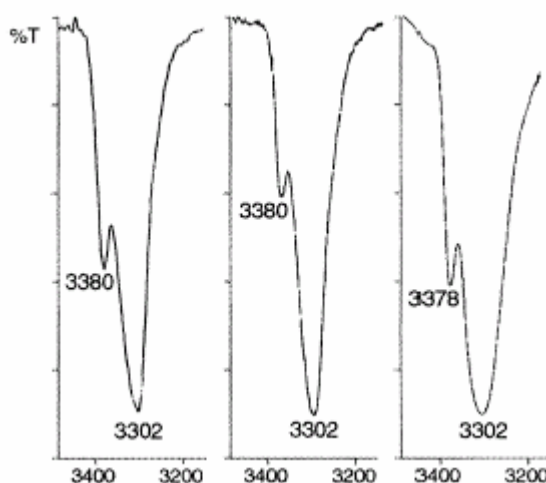
⁵⁷ Vegeu també : J.T. Blanck, D.J: Guerin, S.J. Miller, *Org. Lett.*, **2000**, 2, 1247.

Figura 22. a) Exemple de les representacions gràfiques utilitzades en els experiments d'addició de DMSO- d_6 ; b) exemple d'assignació de la regió dels protons amídics d'un aquests heptapèptids oxetànics.

En la representació gràfica de la **Figura 22 a)** es pot observar la presència de dos comportaments en els protons amídics. D'una banda n'hi ha que no varien de δ_{NH} en afegir DMSO- d_6 i n'hi ha que sí que experimenten variació. Aquells responsables de la formació de la 10-hèlix corresponen als que no presenten variació.

De la mateixa manera, la revisió de la regió de tensió N-H de l'espectre d'IR també dóna molta informació sobre la formació d'enllaços d'hidrogen en dissolvents apolars. Les bandes de tensió N-H corresponents a les amides que no formen part d'un enllaç d'hidrogen normalment apareixen entre 3400-3500 cm^{-1} . mentre que quan sí que el formen acostumen a aparèixer entre 3100-3300 cm^{-1} . Així mateix, experimentalment és conegut que la forma de la banda de tensió N-H també és important, donat que els protons amídics involucrats en la formació d'enllaços d'hidrogen donen bandes amples mentre que els no involucrats acostumen a presentar senyals molt més estrets.⁵⁸

Així, Fleet ha utilitzat l'espectroscopia d'IR per demostrar novament la presència d'aquests enllaços d'hidrogen causants del plegament dels oligòmers oxetànics. (**Figura 23**)



⁵⁸ T.S. Haque, J.C. Little, S.H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 4105.

Figura 23. Espectres d'IR en solució 2 mM de diferents β -hexapèptids en CHCl_3 . La banda de tensió a 3302 cm^{-1} s'atribueix a les amides que formen els enllaços d'hidrogen forts causants de la 10-hèlix, mentre que la banda a 3380 cm^{-1} s'associa amb la formació d'enllaços d'hidrogen més febles.

1.3.1.2.- CONFORMACIONS LAMINARS: LÀMINES- β

En principi, hi ha dos tipus d'estructura secundària laminar possible pels β -pèptids, una de paral·lela i altra d'antiparal·lela.⁵⁹ En la làmina- β paral·lela ambdues cadenes estan disposades en la mateixa direcció, des del **N**- al **C**-terminal. En la làmina- β antiparal·lela, una cadena respecte de l'altra estan col·locades en direccions oposades. (**Figura 24**)

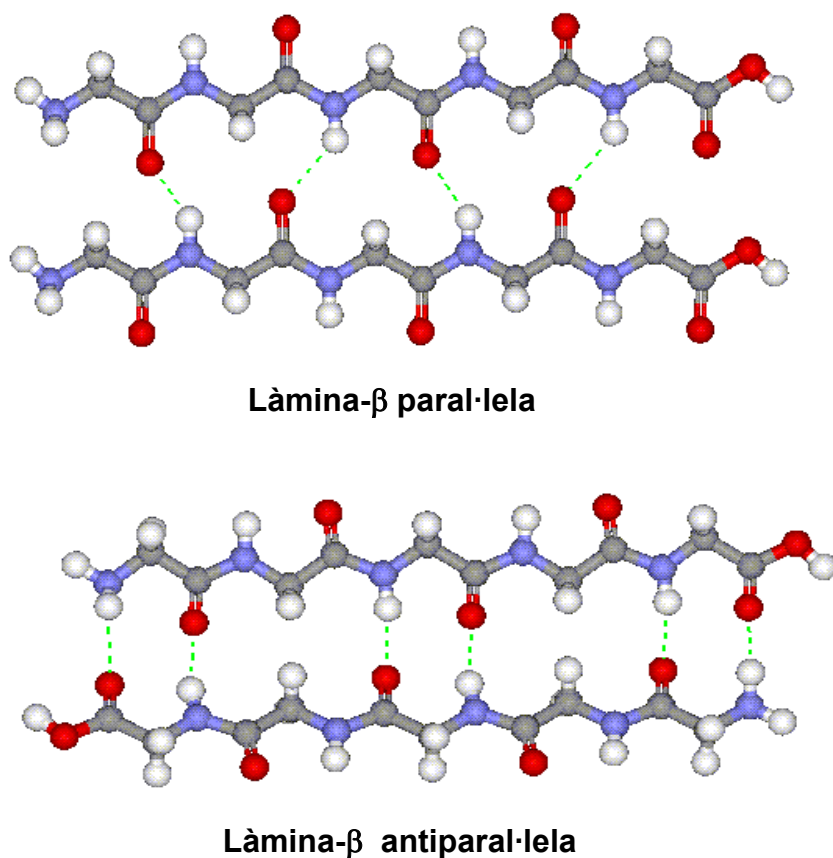


Figura 24. Representació dels possibles tipus de làmina- β .

⁵⁹ S. Krauthäuser, L.A. Christianson, D.R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 11720.

L'estructura de làmina- β antiparal·lela també té dues possibilitats, una en què cada residu té una disposició *anti* de l'angle de torsió C_2-C_3 , i una altra en què cada residu té una disposició *gauche* de l'angle de torsió C_2-C_3 . (**Figura 25**)

El **tipus I** de làmina es distingeix perquè tot l'esquelet està orientat aproximadament en la mateixa direcció, la qual cosa ens proporciona una làmina amb un dipol net, en canvi, el **tipus II** es caracteritza perquè l'esquelet alterna els carbonils en la direcció de cada cadena, fet que impedeix l'aparició d'un dipol net. (**Figura 25**) El **tipus I** de làmines són especialment interessants donada aquesta aparició d'un dipol en funció de la conformació. Així, la introducció de grups iònics pot influenciar l'estabilitat de la làmina.⁶⁰

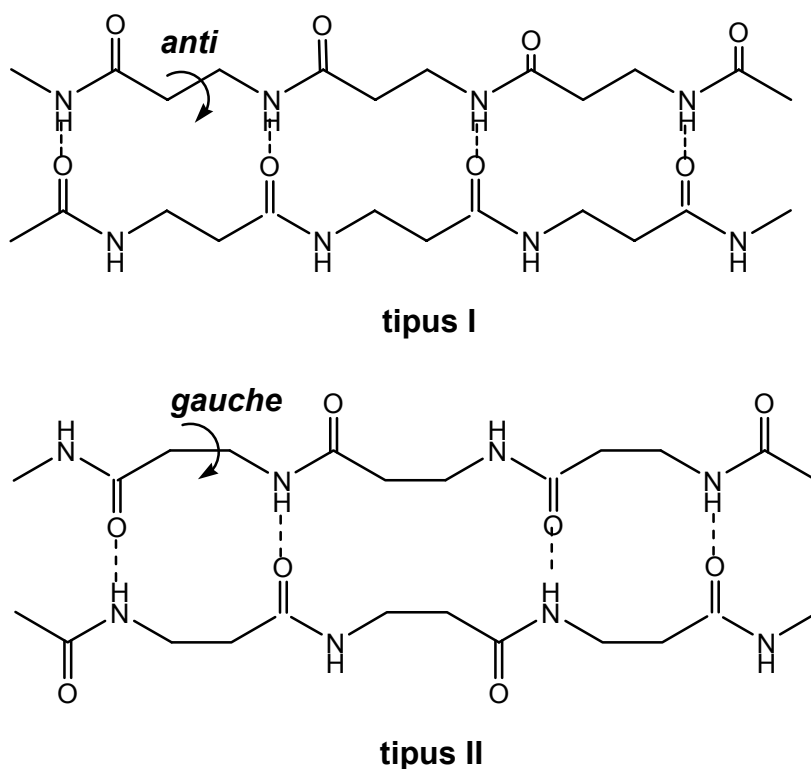


Figura 25. Esquema dels possibles tipus de làmina- β antiparal·lela.

Curiosament, els α -pèptids no tenen dipols nets degut a què presenten el segon tipus de làmina.

⁶⁰ E.A. Gallo, S.H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 11560.

En la **Figura 26** es mostren dos exemples de làmina- β antiparal·leles, del tipus I i II descrites per Gellman.⁶¹

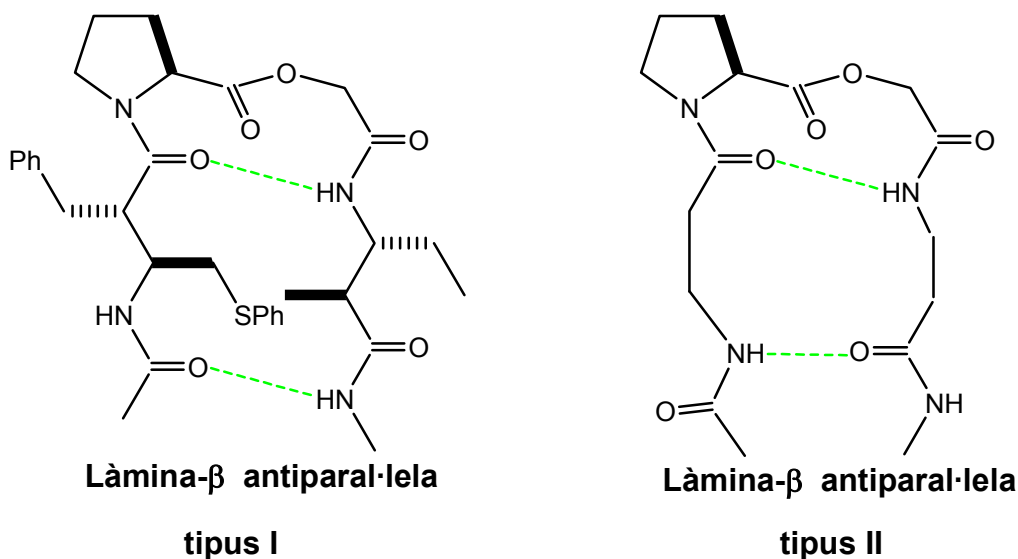
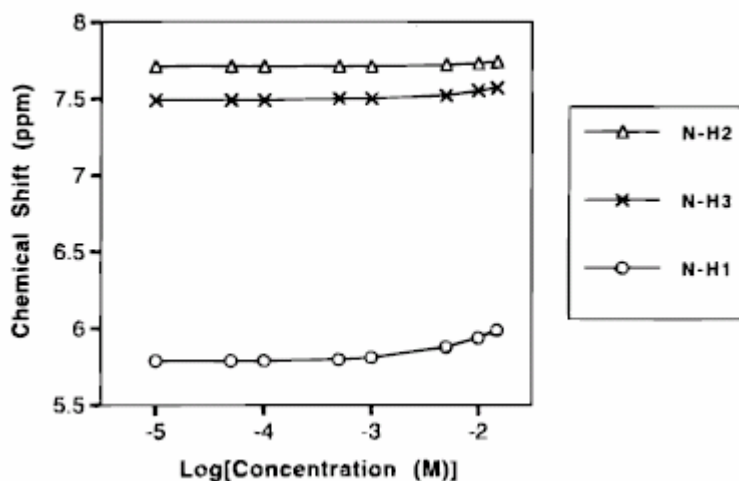


Figura 26. Exemples concrets d'estructures secundàries antiparal·leles de làmina- β del tipus I i II.

Amb les estructures de la **Figura 26** s'han realitzat estudis estructurals combinant les espectroscopies de RMN ^1H i d'IR. Aquests estudis tenen la finalitat de correlacionar la presència d'enllaços d'hidrogen intramoleculars amb la inducció d'una determinada estructura secundària. Alguns exemples d'aquests experiments es mostren a les **Figures 27 i 28**.



⁶¹ S. Krauthäuser

, 119, 11720.

Figura 27. Representació gràfica del desplaçament químic dels protons amídics de la molècula, làmina- β tipus I de la **Figura 26**, en funció del $\log[C]$.

Els experiments recollits en la **Figura 27** es basen en què el desplaçament químic dels protons amídics en dissolvents apolars com ara el CD_2Cl_2 és un clar indicador de la formació d'enllaços d'hidrogen. De fet, s'ha establert que els protons d'amida involucrats en un enllaç d'hidrogen apareixen desplaçats aproximadament en 2 ppm cap a camps més baixos, δ_{NH} més grans, que aquells que no en formen. Així doncs, si hom realitza experiments tot variant la concentració i només s'observa una petita variació en el δ_{NH} , es pot afirmar que no s'està formant enllaç d'hidrogen intermolecular. De la mateixa manera, si els experiments tenen lloc a una dilució suficient com per evitar aquests possibles efectes intermoleculars, la informació que hom extraurà correspondrà exclusivament als enllaços d'hidrogen intramoleculars.⁶²

Així, en els experiments recollits en la **Figura 27**, la no dependència dels desplaçaments químics dels protons amídics de la concentració indica clarament que els enllaços d'hidrogen formats són intramoleculars.

Aquests experiments de RMN 1H que determinen l'efecte de la dilució es combinen amb experiments d'IR. Aquests consisteixen en enregistrar l'espectre d'IR a una concentració suficientment diluïda com perquè només siguin considerades les interaccions intramoleculars. En funció d'on apareixen les bandes de tensió de les amides, se'n dedueix si estan involucrades o no en la formació d'un enllaç d'hidrogen.

A tall d'exemple, la **Figura 28** mostra l'espectre d'IR del mateix tipus de molècula emprada en els experiments de RMN 1H per determinar l'efecte de la

⁶² (a) Y.J. Chung, B.R. Huck, L.A. Christianson, H.E. Stanger, S. Krauthäuser, D.R. Powell, S.H. Gellman; *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 3995. (b) J. D. Fisk, D.R. Powell, S.H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 5443.

dilució. Si s'observa detingudament la regió de l'espectre on apareixen les tensions N-H s'evidencia la formació d'un enllaç d'hidrogen en l'estructura.

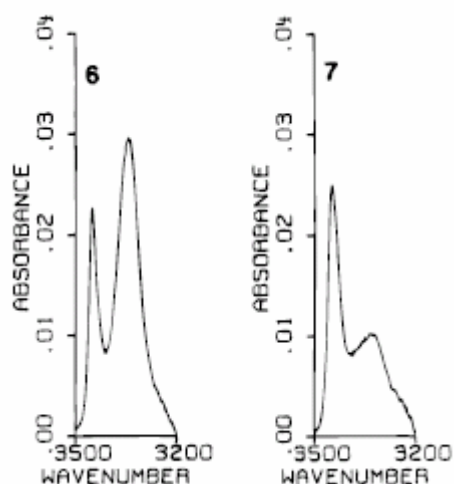
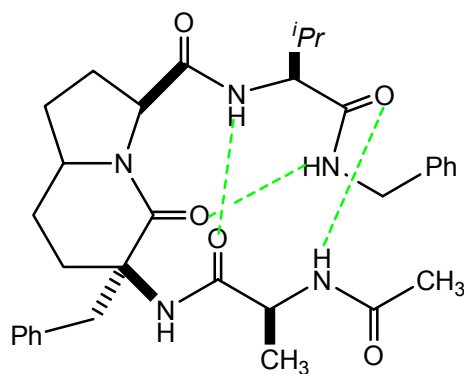


Figura 28. Espectres d'IR en solució 1 mM de diferents β -pèptids en CH_2Cl_2 . Les bandes de tensió sobre 3300 cm^{-1} s'atribueixen a les amides que formen els enllaços d'hidrogen mentre que la banda a 3400 cm^{-1} s'associa amb la no formació d'enllaços d'hidrogen.

Entre les variants de la làmina- β , destaca l'estructura *d'agulla de cabell*, un tipus d'estructura secundària molt freqüent, que consisteix en dues cadenes de làmines- β antiparal·leles connectades per un gir. L'estructura *d'agulla de cabell* normalment ve estabilitzada per la presència d'enllaços d'hidrogen *intramoleculars* entre ambdues cadenes antiparal·leles.⁶³ (**Figura 29**)



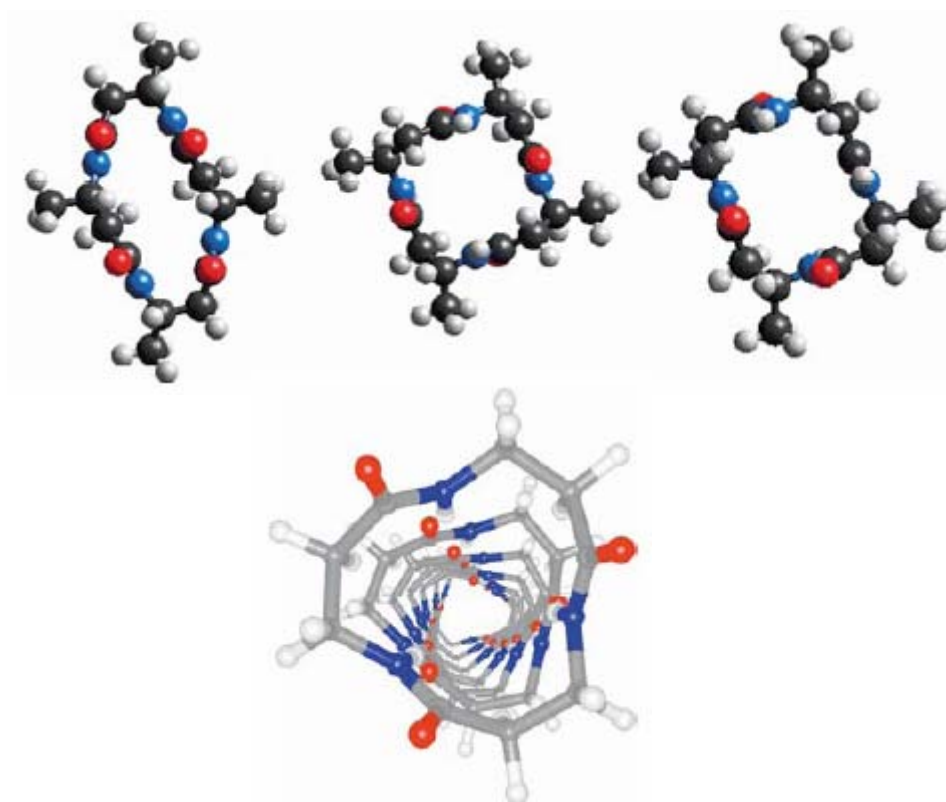
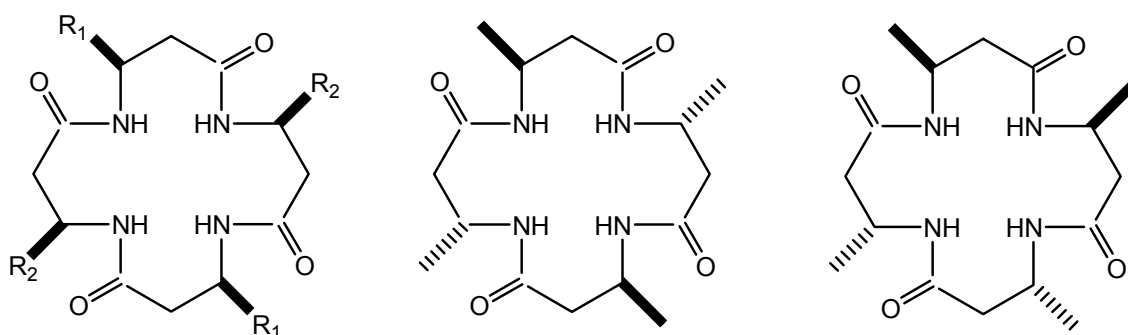
Làmina- β

⁶³ L. Belvisi, C. Gennari, A. Mielgo, D. Potenza, C. Scolastico; *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 389.

Figura 29. Exemple d'estructura de tipus *agulla de cabell*.

1.3.1.3.- β -PÈPTIDS CÍCLICS

Seebach^{64,65} ha preparat una sèrie de β -tetrapèptids cíclics que s'autoensemblen per formar estructures tubulars estabilitzades per enllaços d'hidrogen intermoleculars paral·lels a la direcció dels tubs. (**Figura 30**)



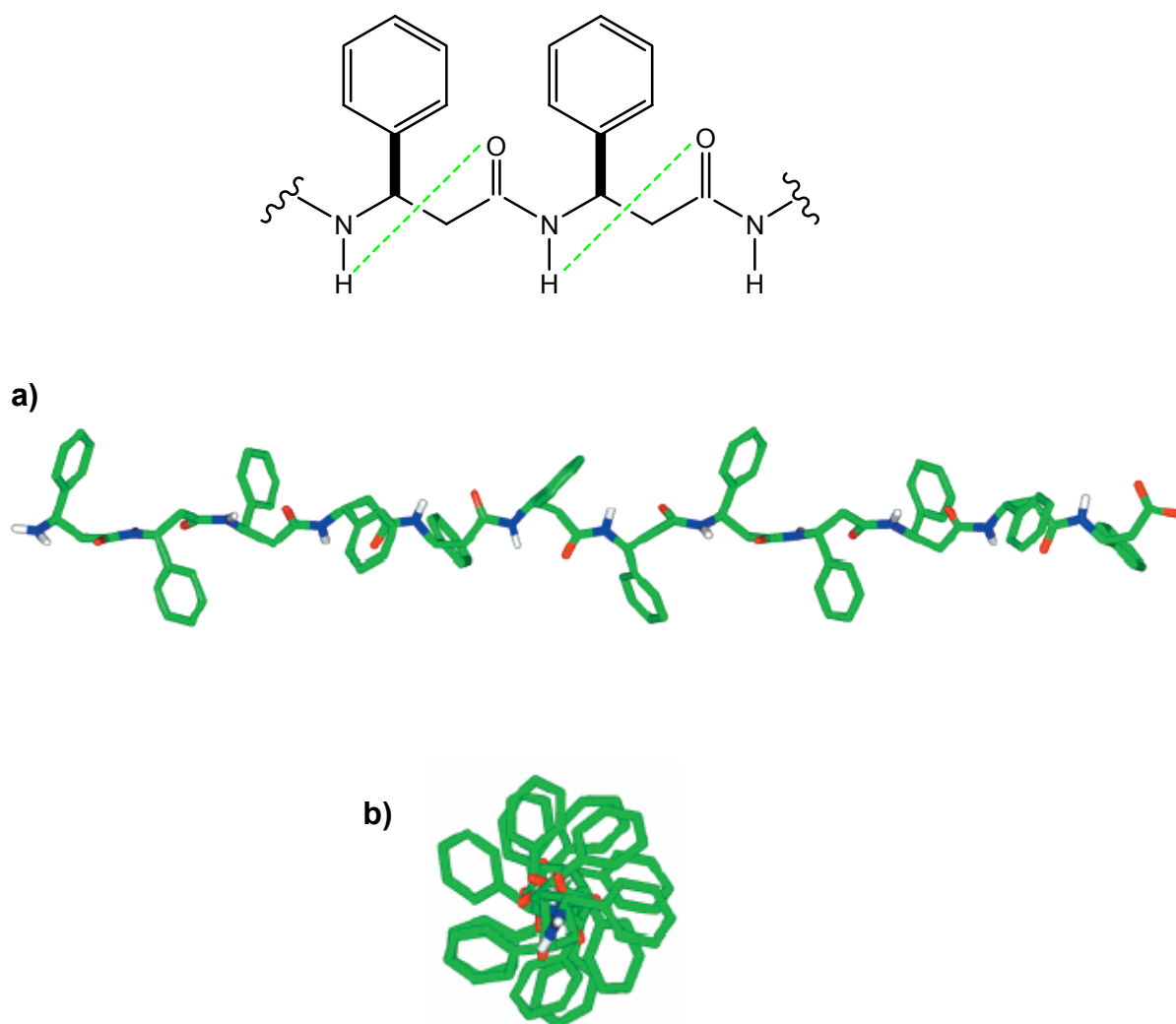
⁶⁴ D. Seebach, J.L. Matthews, A. Meden, T. Wessels, C. Baerlocher, L.B. McCusker; *Helv. Chim. Acta*, **1997**, *80*, 173.

⁶⁵ D. Seebach, A.K. Beck, D.J. Bierbaum; *Chemistry & Biodiversity*, **2004**, *1*, 1111.

Figura 30. Tetrapèptids cíclics preparats per Seebach.

1.3.1.4.- TRENES TORSIONADES O “TWISTED STRANDS”

Alguns *homooligòmers* com els de la **Figura 31** adopten una conformació de *trenes torsionades* o “twisted strands”, en solució de cloroform, tal i com revela l'estudi de RMN ^1H .⁶⁶



⁶⁶ I.A. Motorina, C. Huel, E. Quiniou, J. Mispelter, E. Adjadj, D.S. Grierson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 8.

Figura 31. Conformació de tipus *trena torsionada* o "twisted strand". **a)** mostra una vista lateral de la conformació mentre que **b)** mostra una vista frontal.

1.3.2.- ESTUDIS CONFORMACIONALS TEÒRICS DE β -PÈPTIDS

En els últims anys s'han publicat estudis de Dinàmica Molecular relacionats amb càlculs de l'energia conformacional de pèptids, que contenen anells carbocíclics en la seva estructura; a partir d'aquests estudis hom intenta avaluar l'estructura secundària que adopten aquests pèptids en solució, amb la fita d'avançar en el disseny de peptidomimètics.⁶⁷⁻⁷³

De la mateixa manera, hom ha començat a realitzar estudis de Dinàmica Molecular amb la finalitat d'explorar l'espai conformacional accessible d'un pèptid.

Aquests estudis permeten investigar les diferents conformacions preferents, així com el seu pes a la totalitat de la població. Els resultats d'aquests estudis poden utilitzar-se per corroborar les estructures tridimensionals determinades per estudis precedents de RMN ^1H , per refinar resultats de RMN com ara determinar entre quins grups es forma l'enllaç d'hidrogen o, fins i tot, per definir amb precisió els seus patrons de reconeixement farmacofòric al llarg del temps.

⁶⁷ S.N. Rao, V.N. Balaji, K. Ramnarayan, *Curr. Sci.*, **1993**, 64, 46.

⁶⁸ V.N. Balaji, K. Ramnarayan, M.F. Chan, S.N. Rao, *Pept. Res.*, **1995**, 8, 178.

⁶⁹ S.N. Rao, M.F. Chan, V.N. Balaji, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1997**, 70, 293.

⁷⁰ S.N. Rao, V.N. Balaji, *Protein Pep. Lett.*, **1998**, 5(1), 41.

⁷¹ S.N. Rao, S. Jr. Profeta, V.N. Balaji, *Protein Pep. Lett.*, **1998**, 5, 109.

⁷² D. Seebach, A.K. Beck, D.J. Bierbaum; *Chemistry & Biodiversity*, **2004**, 1, 1111.

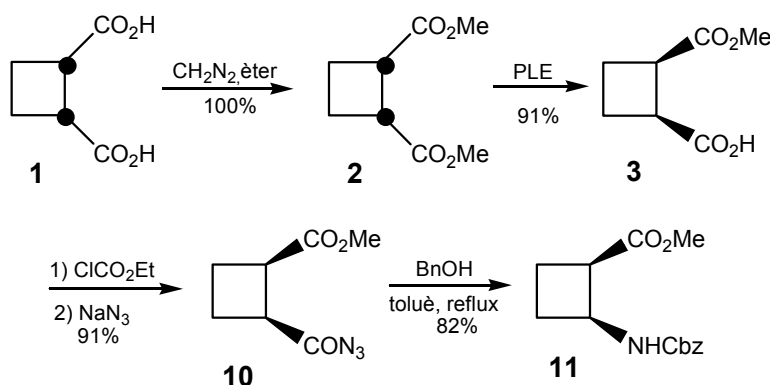
⁷³ B. Ma, R. Nussinov; *J. Mol. Biol.*, **2000**, 296, 1091.

1.4.- ANTECEDENTS EN EL GRUP D'INVESTIGACIÓ

En el nostre grup d'investigació vam constatar que, malgrat el renovat interès per l'estudi dels β -aminoàcids i β -pèptids d'ençà dels treballs de Seebach i Gellman, hi havia una clara mancança en quant a la síntesi i l'estudi estructural de β -aminoàcids ciclobutànics i els seus corresponents derivats β -peptídics.

D'aquesta manera, en el nostre laboratori s'inicià una línia de recerca per posar a punt la síntesi de β -aminoàcids i β -pèptids ciclobutànics enantiomèricament purs. La inducció d'asimetria, en el nostre cas, es realitzà mitjançant una reacció quimioenzimàtica amb l'enzim PLE.⁷⁴

La Dra. Marta Martín-Vilà, en la seva Tesi Doctoral,⁷⁵ va preparar el 2-benziloxicarbonilamino-(1*R*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, **11**, a partir del diàcid **1**, segons la ruta sintètica que es mostra a l'**Esquema 6**.⁷⁶



Esquema 6. Ruta sintètica utilitzada per la Dra. Marta Martín-Vilà en la seva Tesi Doctoral. Es mostren els principals intermedis així com la molècula objectiu: el β -aminoàcid **11**. La numeració de les estructures és la que s'utilitzarà en el capítol de **Resultats i Discussió**.

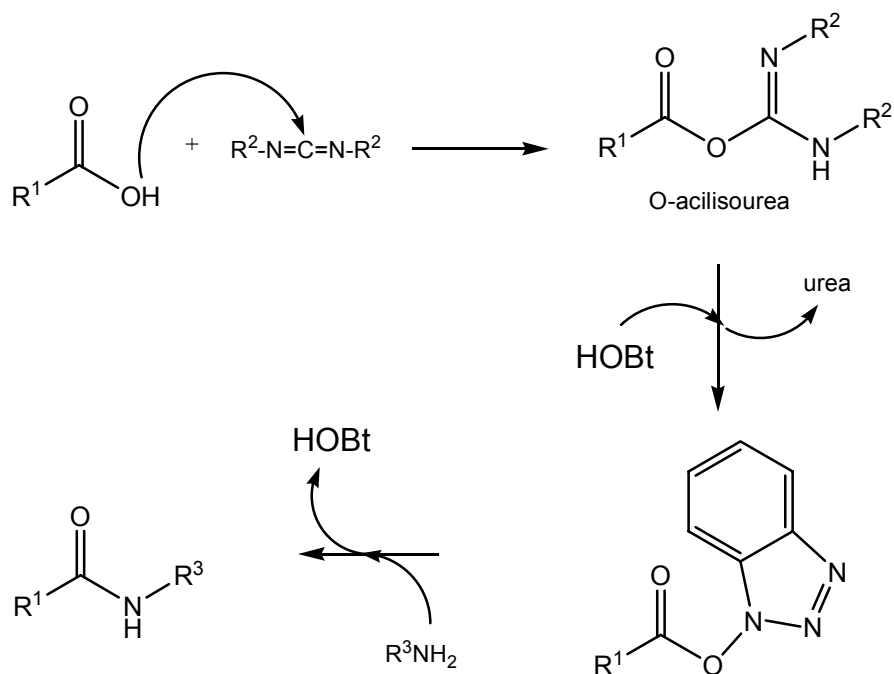
⁷⁴ G. Sabbioni, J.B. Jones, *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 4565.

⁷⁵ Marta Martín-Vilà, "Síntesi enantioselectiva de compostos carbocíclics ciclopropànics i ciclobutànics: γ -hidroxiàcids, β -aminoàcids i β -pèptids". Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. **1999**.

⁷⁶ M. Martín-Vilà, C. Minguillón and R.M. Ortuño, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 4291.

L'aminoàcid **11** presenta proteccions ortogonals pels grups amino i àcid carboxílic, adients per a la seva incorporació en pèptids. Així, hom també va preparar el β -dipèptid **17** (**Esquema 8**) utilitzant la metodologia habitual.⁷⁷

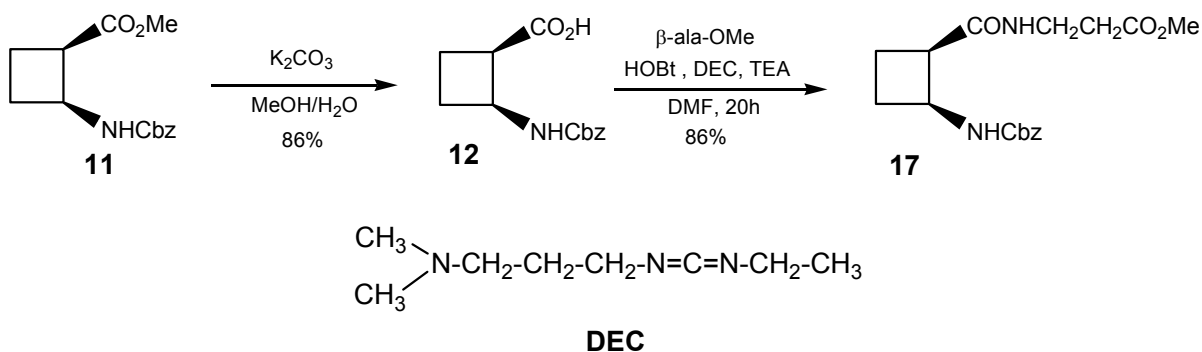
Aquesta metodologia es basa en controlar de manera efectiva la formació de l'enllaç amida, quelcom òbviament molt important dins de la síntesi de pèptids, i molt més quan es treballa amb productes que, per la seva naturalesa, requereixen de condicions de reacció suaus. Un dels reactius més utilitzats en la síntesi peptídica són les carbodiïmides, especialment la diciclohexilcarbodiïmida, DCC. En l'actualitat, però, s'utilitza una variant d'aquesta metodologia que combina l'agent deshidratant DEC i l'HOBt com a catalitzador. És una variant millorada respecte de la DCC puix la urea resultant és soluble en aigua i s'elimina fàcilment rentant, per la qual cosa el cru de reacció es purifica més fàcilment. Aquesta metodologia és vàlida tant si la síntesi del pèptid es realitza en fase sòlida com si és en dissolució. (**Esquema 7**)



Esquema 7. Mecanisme de la reacció de formació de l'enllaç peptídic, en presència d'una carbodiïmida i del HOBt.

⁷⁷ M. Martín-Vilà, E. Muray, G.P. Aguado, A. Álvarez-Larena, V. Branchadell, C. Minguillón, E. Giralt, R.M. Ortuño, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, *11*, 3569.

La Dra. Marta Martín-Vilà realitzà la condensació entre l'àcid **12** i l'èster metílic de la β -alanina, usant la metodologia descrita anteriorment. (**Esquema 8**)



Esquema 8. Síntesi del β -dipèptid **17**.

D'aquesta manera s'obtinguè el β -dipèptid **17** amb un rendiment del 86%. Aquest compost és un sòlid cristal·lí, fàcilment purificable pels mètodes cromatogràfics convencionals, del qual es mostra el difractograma de raigs X a la **Figura 32**.

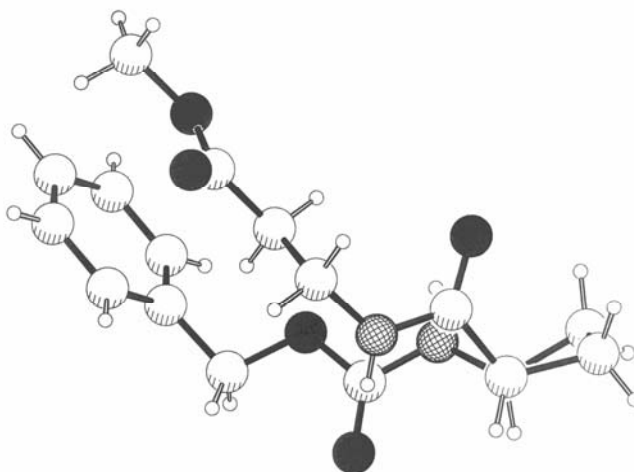


Figura 32. Estructura de raigs X del β -dipèptid **17**.

Com es pot observar a la **Figura 32**, en estat sòlid, el β -dipèptid **17** mostra una disposició d'ambdues cadenes unides al ciclobutà formant una estructura *d'agulla de cabell*, fet prou remarcable considerant que es tracta només d'un dipèptid. Aquest fet ens obre les portes a l'obtenció d'altres derivats de mida superior, que probablement manifestaran certs girs que no s'aprecien en el β -dipèptid **17**, donat el seu reduït tamany.

Si s'observa detingudament l'empaquetament cristal·lí a la **Figura 33**, s'aprecien les estructures compactes que adopta el dipèptid, amb enllaços intermoleculars entre els grups NH del carbamat i el carbonil de l'enllaç peptídic, així com entre el NH peptídic i el grup carbonil del carbamat. Els enllaços d'hidrogen, però, no són intramoleculars.

La Dra. Marta Martín-Vilà va abordar la síntesi dels β -pèptids a les acaballes de la seva Tesi Doctoral, per la qual cosa no es va poder realitzar un estudi exhaustiu del β -dipèptid **17**, sinó només alguns estudis preliminars.

De manera, que tant això com la preparació dels nous derivats ciclobutànics restaren com l'objectiu de la present Tesi Doctoral.

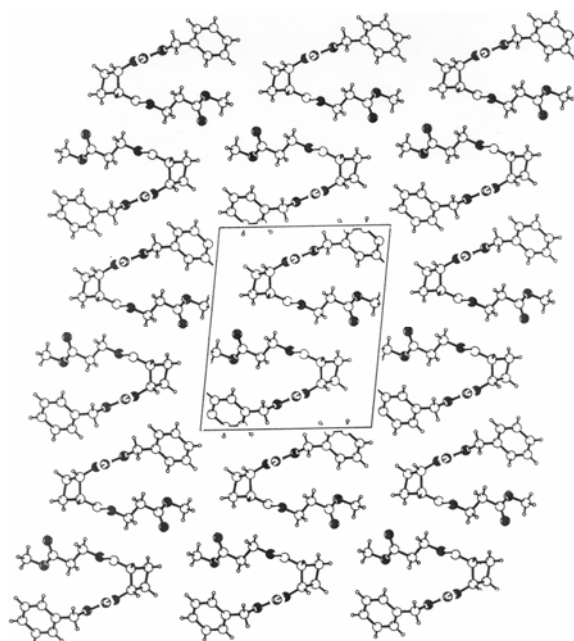
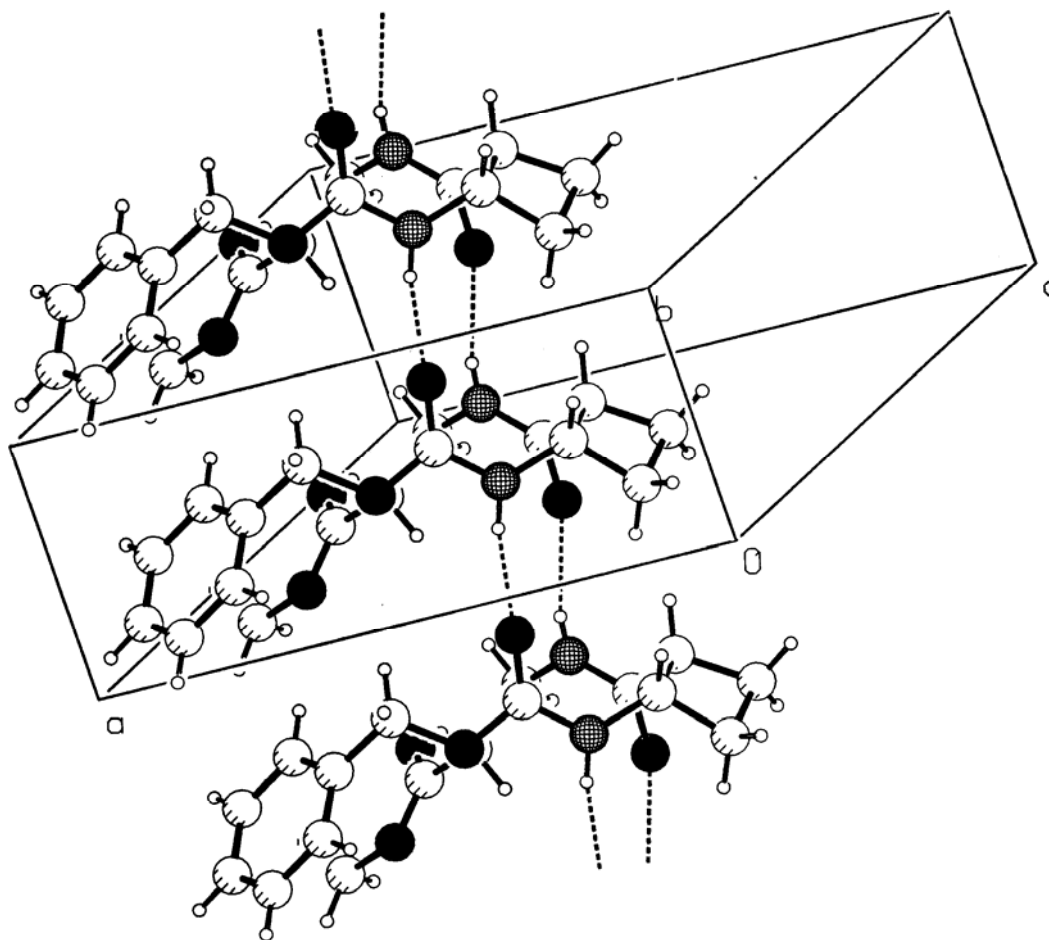


Figura 33. Diferents vistes parcials de l'empaquetament cristal·lí del β -dipèptid 17.

2.-OBJECTIUS

Donat l'elevat interès que han suscitat en els darrers anys tant els β -aminoàcids carbocíclics conformacionalment restringits així com la seva derivatització en diferents tipus de cadenes peptídiques, els objectius establerts per a la realització de la present Tesi Doctoral són:

- Desenvolupament de les estratègies adients per a la preparació dels diferents β -aminoàcids i β -pèptids.

Dins d'aquest objectiu, en una primera etapa s'abordarà la síntesi de 2-benziloxicarbonilamino-(1*S*, 2*R*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, **9**, l'enantiòmer del producte **11**, el qual ja havia estat sintetitzat prèviament en el nostre laboratori. (**Figura 34**)

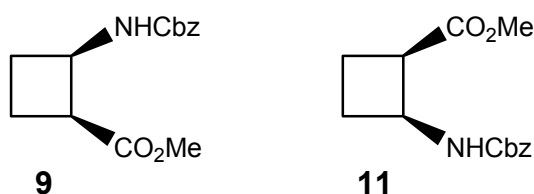


Figura 34. β -aminoàcids enantiòmers.

En una segona etapa, hom abordarà la síntesi de diferents β -pèptids derivats dels monòmers anteriors i que es representen a la **Figura 35**. Aquests procediran de la condensació de monòmers ciclobutànics amb residus lineals no quirals o de l'acoblament de residus ciclobutànics d'igual o diferent quiralitat.

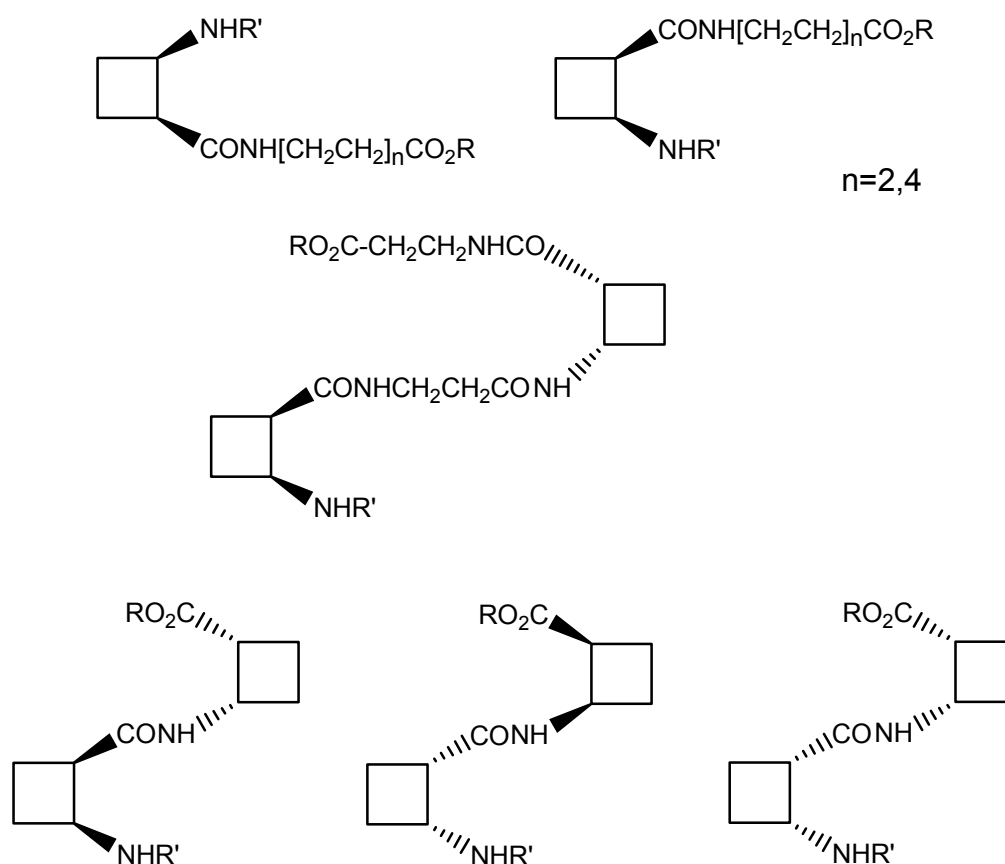


Figura 35. β -pèptids ciclobutànics.

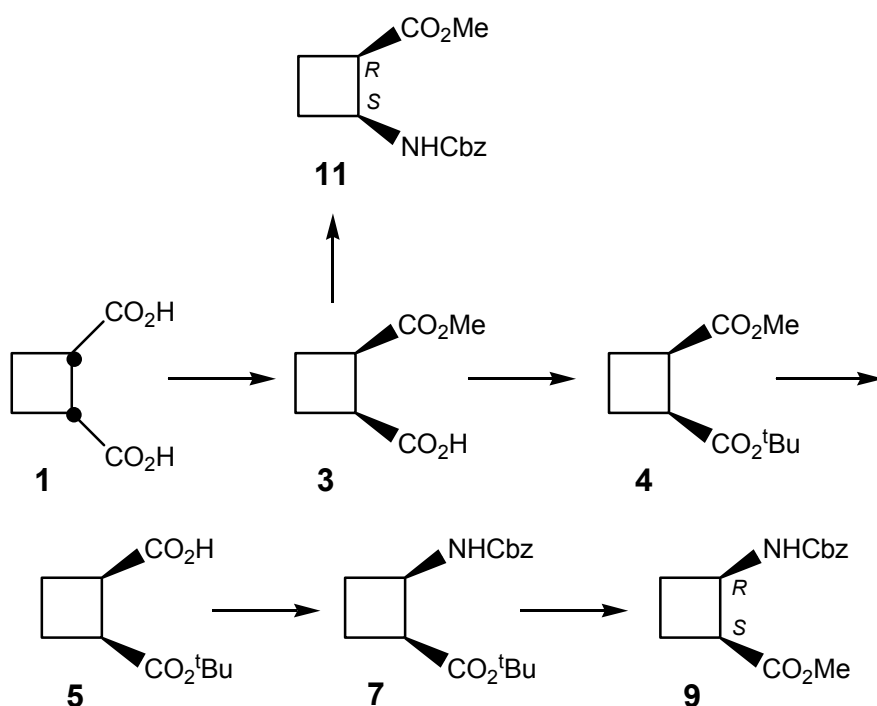
- Realització de l'estudi estructural del β -aminoàcid **11** i d'alguns exemples representatius dels β -pèptids. Aquest es farà tant en solució, utilitzant diferents tipus d'experiments de RMN, com en estat sòlid, en aquells casos en què sigui possible l'obtenció de cristalls adequats. Aquest estudi es complementarà amb càlculs DFT per aquells casos més senzills d'optimitzacions d'estructures, i estudis de Dinàmica Molecular en el cas de tenir molècules més complexes conformacionalment.

3.- RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1.- SÍNTESI DE β -AMINOÀCIDS

En aquesta primera part s'ha abordat la síntesi de 2-benziloxicarbonilamino-(1*S*,2*R*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, **9**, que és l'enantiòmer de l'aminoàcid **11**, el qual ja havia estat sintetitzat prèviament en el nostre grup de recerca.

Per tal de preparar el producte **9** es segueix la ruta sintètica que es mostra a l'**Esquema 9**.



Esquema 9. Intermedis clau en la ruta sintètica utilitzada per preparar l'aminoàcid **9**.

L'hemiestèr **3**, al qual s'arriba mitjançant una reacció de desimetrització amb l'enzim PLE,⁷⁸ és el punt de bifurcació per a l'obtenció d'un o altre enantiòmer. De fet, ambdues rutes sintètiques comparteixen les mateixes reaccions clau, tals com ara la transposició de Curtius, de manera que podríem dir que l'estratègia novedosa consisteix en emprar una protecció ortogonal pel dièster **4**, que permet la saponificació de l'èster metílic en presència de l'èster *tert*-butílic.

⁷⁸ G. Sabbioni, J.B. Jones; *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 4565.

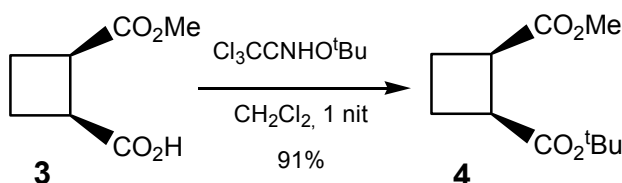
D'aquesta manera, en la posterior reacció de transposició de Curtius, s'aconsegueix la degradació quimiosselectiva del grup carboxil *pro-R*, (**Esquema 9**) que és transformat en amina.

A continuació ens centrarem en els passos de síntesi involucrats en la preparació de l'aminoàcid **9**, que és l'objectiu d'aquest apartat.

3.1.1.- Síntesi de 2-metoxicarbonil-(1*S*,2*R*)-ciclobutan-1-carboxilat de *tert*-butil, **4**

El primer pas diferenciat en les rutes sintètiques cap a **9** ó **11** és la protecció de l'àcid carboxílic de l'hemièster **3** en forma d'èster *tert*-butílic. Aquesta protecció té lloc per reacció de l'àcid 2-metoxicarbonil-(1*R*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxílic, **3**, amb tricloroacetimidat de *tert*-butil en el si de diclorometà i a temperatura ambient durant tota la nit.⁷⁹ (**Esquema 10**)

El cru de reacció es purifica per cromatografia en columna tal i com es descriu a la part experimental, obtenint-se així el 2-metoxicarbonil-(1*S*,2*R*)-ciclobutan-1-carboxilat de *tert*-butil, **4**, amb un rendiment del 91%.

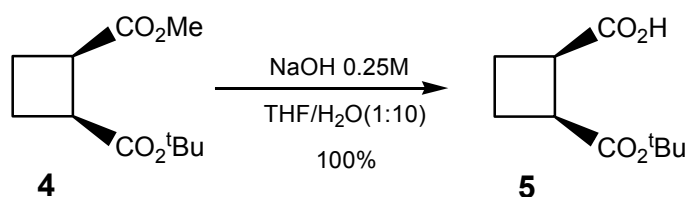


Esquema 10. Reacció de formació de l'èster *tert*-butílic, **4**.

⁷⁹ Vegeu preparació d'èsters *tert*-butílics: J.Thierry, C.Yue, P.Potier, *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39, 1557.

3.1.2.- Síntesi de l'àcid 2-*tert*-butoxicarbonil-(1*S*,2*R*)-ciclobutan-1-carboxílic, **5**

La introducció de la funcionalització èster *tert*-butílic en l'anterior pas de reacció ens proporciona una protecció ortogonal adequada per continuar l'esquema sintètic proposat. La hidròlisi quimioselectiva de l'èster metílic es realitza d'acord amb la bibliografia.⁸⁰ El dièster **4**, en presència d'una solució de NaOH 0.25 M i en el si d'una barreja de dissolvents de THF/H₂O en relació 1:10 a 0°C durant 1 hora, rendeix quantitativament l'àcid 2-*tert*-butoxicarbonil-(1*S*,2*R*)-ciclobutan-1-carboxílic **5**, tal i com es mostra a l'**Esquema 11**.



Esquema 11. Reacció de saponificació de l'èster metílic.

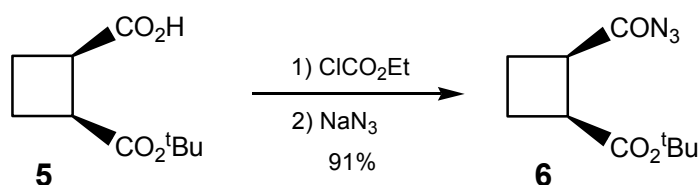
La reacció es porta a terme a 0°C per tal d'evitar la possible epimerització dels centres estereogènics de la molècula en el medi bàsic.

L'àcid **5** s'esdevé amb una puresa suficient com per continuar la ruta sintètica amb el cru de reacció sense que habitualment sigui necessària cap mena de purificació addicional.

⁸⁰ S.Niwayama, *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 5834.

3.1.3.- Síntesi de 2-benziloxicarbonilamino-(1*S*,2*R*)-ciclobutan-1-carboxilat de *tert*-butil, 7

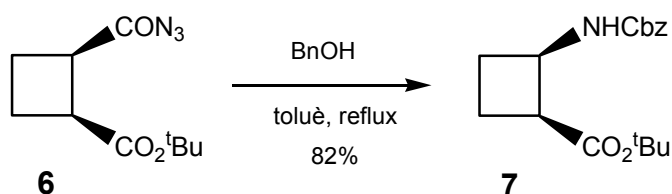
L'hemièster **5** es fa reaccionar amb cloroformat d'etil en el si d'acetona anhidra, i en presència de Et₃N per tal de captar el clorur d'hidrogen alliberat, a 0°C durant 3 hores (**Esquema 12**) i s'hi addiciona a continuació l'azida sòdica dissolta en aigua. Un cop transcorregudes 1-2 hores la reacció finalitza, de manera que es pot observar clarament per espectroscopia d'IR l'aparició d'un senyal a 2134 cm⁻¹, clar indicador de la presència del grup -N₃.



Esquema 12. Reacció de formació de l'azida.

La reacció s'esdevé amb un 91% de rendiment, obtenint-se un oli groguenc que per RMN ¹H s'identifica com l'azida **6**.

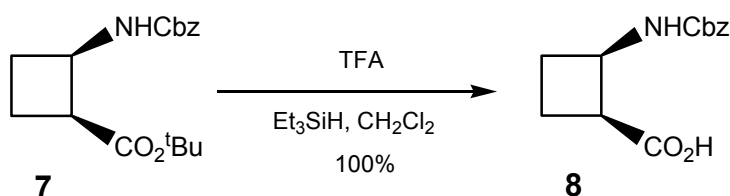
Degut a la inestabilitat intrínseca de les azides, i a la puresa suficient del cru de reacció del producte **6**, no té lloc cap purificació addicional a la pròpia del tractament de la reacció, i seguidament a la seva obtenció, **6** es dissol en toluè i s'hi addiciona alcohol benzílic; el sistema es deixa reaccionar a reflux durant 3.5 h, tot controlant l'evolució de la reacció per espectroscopia d'IR. S'observa la desaparició del senyal de l'azida, a 2134 cm⁻¹ i l'aparició de la banda corresponent al carbamat a 1738 cm⁻¹. El cru de reacció es purifica per cromatografia en columna, obtenint-se així el 2-benziloxicarbonilamino-(1*S*,2*R*)-ciclobutan-1-carboxilat de *tert*-butil, **7**, amb un rendiment del 82%. (**Esquema 13**)



Esquema 13. Reacció de transposició de Curtius.

3.1.4.- Síntesi de l'àcid 2-benziloxicarbonilamino-(1S,2R)-ciclobutan-1-carboxílic, 8

La desprotecció de l'èster *tert*-butílic té lloc fent reaccionar l'aminoàcid **7** amb TFA, en presència de Et_3SiH , en el si de diclorometà durant 2 hores a temperatura ambient.⁸¹ D'aquesta manera s'obté l'àcid 2-benziloxicarbonilamino-(1S,2R)-ciclobutan-1-carboxílic **8**, amb un rendiment quantitatiu. (**Esquema 14**)



Esquema 14. Reacció de desprotecció de l'èster *tert*-butílic.

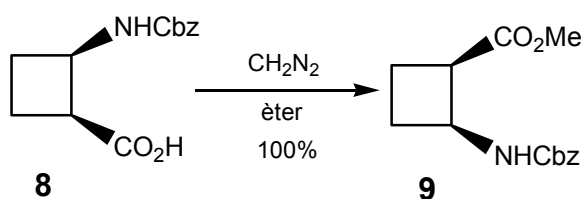
Aquest producte, **8**, és l'enantiòmer del producte **12**, procedent de la ruta que seguia la Dra. Marta Martín-Vilà en la seva Tesi Doctoral. Aquest producte, emperò, no s'utilitza per comparar la enantioisomeria donat que és més difícil de purificar tant per cromatografia en columna com per cristal·lització, en tractar-se d'un producte higroscòpic.

⁸¹ A.Mehta, R.Jaouhari, T.J.Benson and K.T.Douglas, *Tetrahedron Letters*, **1992**, 33, 5441.

Per aquest motiu, hom decidí continuar un pas més endavant i comparar els enantiòmers de 2-benziloxicarbonilaminociclobutan-1-carboxilat de metil, **9** i **11** respectivament, que són estables i fàcilment purificables.

3.1.5.- Síntesi de 2-benziloxicarbonilamino-(1*S*,2*R*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, **9**

L'obtenció de l'enantiòmer **9** té lloc metilant l'àcid **8**, prèviament liofilitzat per eliminar les possibles restes de TFA, per reacció amb diazometà en el si d'èter (**Esquema 15**). D'aquesta manera, s'obté l'èster metílic, que és fàcilment purificable per cromatografia en columna. Aquest producte s'identificà com l'enantiòmer de **11**, per la comparació de les rotacions òptiques específiques i els desplaçaments químics de protó en els espectres de RMN ^1H d'ambdós enantiòmers.



Esquema 15. Reacció de metilació de l'àcid carboxílic

La rotació òptica específica de **9** resulta de $[\alpha]_D = +83$ ($c=0.70$, CHCl_3) mentre que la trobada per la Dra. Marta Martín-Vilà per a **11** és $[\alpha]_D = -83$ ($c=2.05$, CHCl_3), la qual cosa indica clarament la relació enantiomèrica d'ambdós productes. (**Figura 36**)



$[\alpha]_D = +83$ (c=0.70, CHCl₃) $[\alpha]_D = -83$ (c=2.05, CHCl₃)

Figura 36. Enantiòmers de 2-benziloxicarbonilaminociclobutan-1-carboxilat de metil, **9** i **11**.

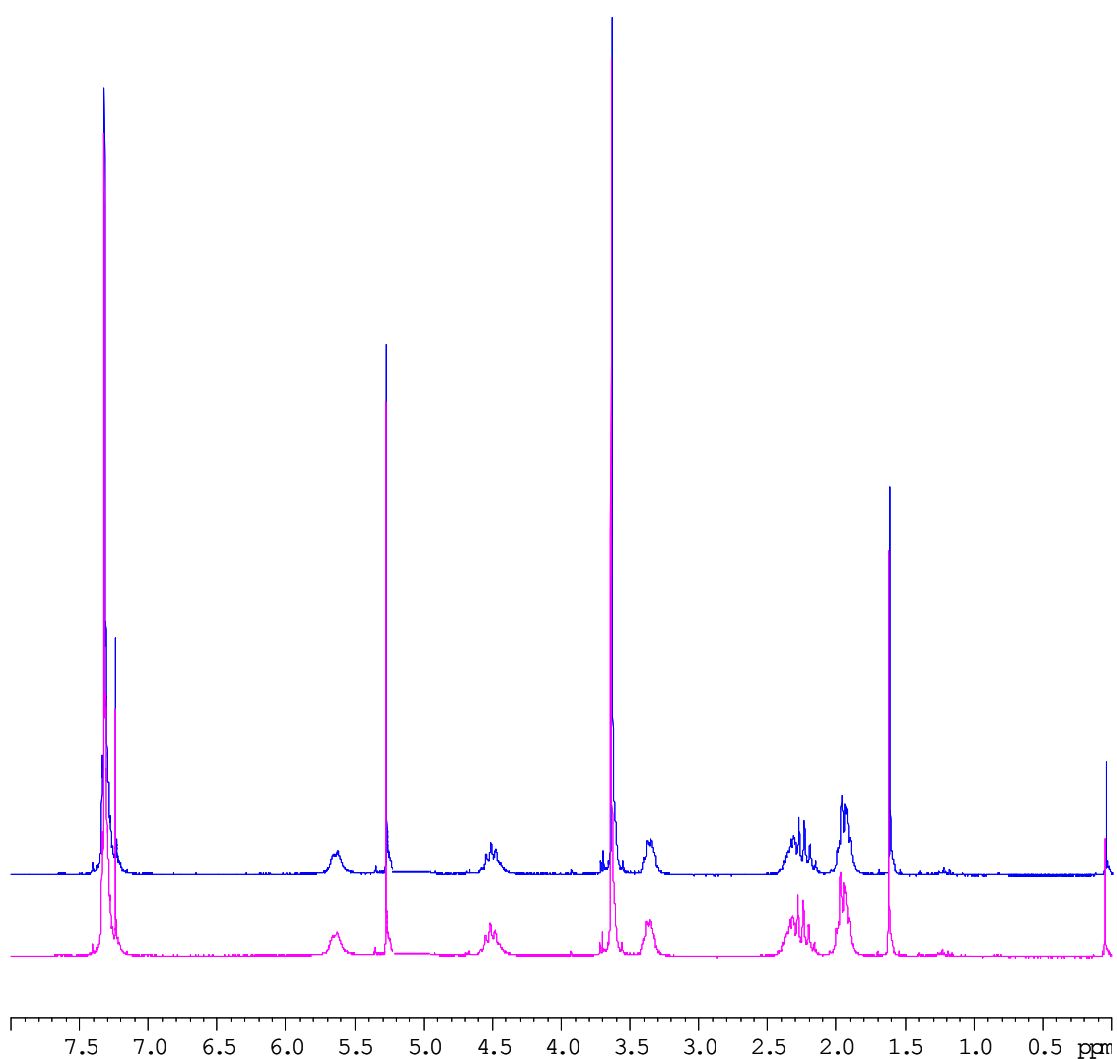
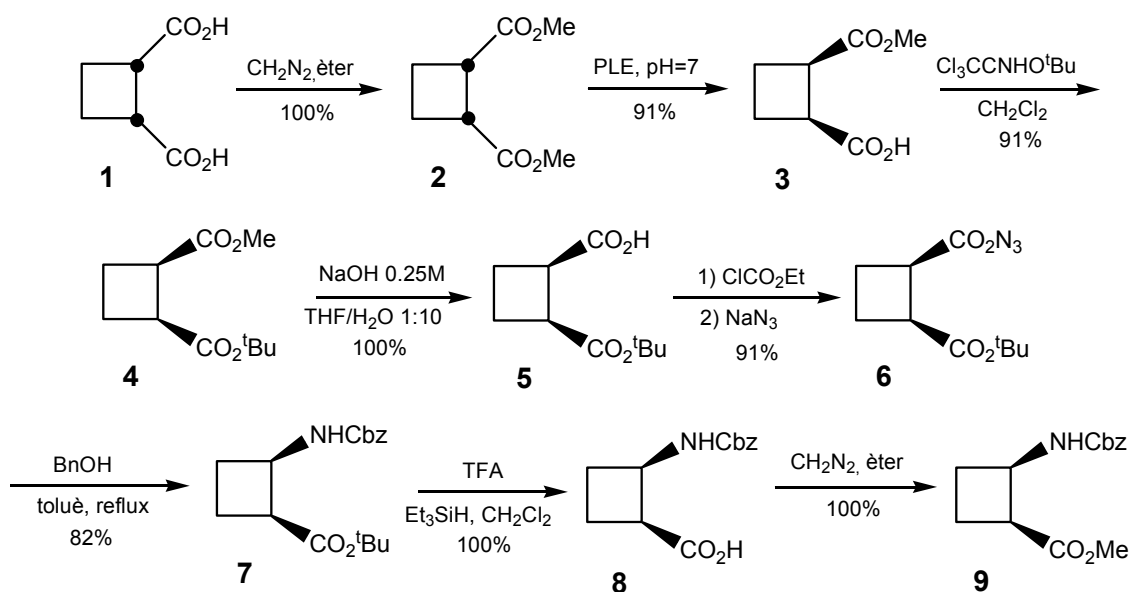


Figura 37. Superposició dels espectres de RMN ¹H dels enantiòmers de 2-benziloxicarbonilaminociclobutan-1-carboxilat de metil, **9** i **11**.

A la **Figura 37** es mostra els espectres de RMN ^1H dels enantiòmers **9** i **11**, es pot observar com els senyals d'un i l'altre coincideixen perfectament, com és d'esperar. Aquest fet, juntament amb la magnífica coincidència en el valor de la rotació òptica específica trobada per a **9**, demostra que s'ha assolit amb èxit la síntesi de la molècula objectiu **9**, enantiòmera de **11**. La seqüència sintètica global de la qual es descriu a l'**Esquema 16**.



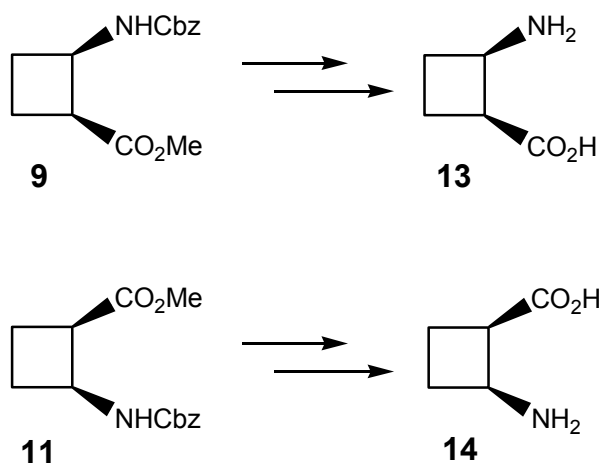
Esquema 16. Ruta sintètica utilitzada en la síntesi del producte **9**.

El rendiment global és del 62%.

Com ja s'ha comentat, aquesta ruta sintètica està basada en la manipulació selectiva dels grups funcionals presents en la molècula, essent el rendiment global per a l'obtenció del producte **9** del 62%.

Tot i haver comprovat la relació enantiomèrica d'ambdós productes **9** i **11** ens vam proposar l'obtenció dels dos aminoàcids completament desprotegits.

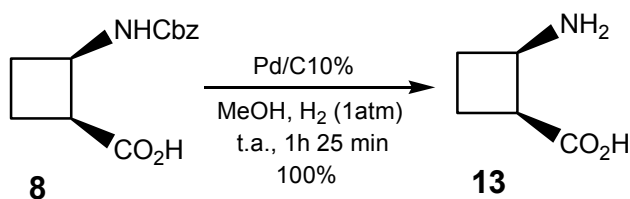
A continuació hom descriu els passos de reacció portats a terme per aconseguir tenir ambdós enantiòmers desprotegits. (**Esquema 17**)



Esquema 17. Obtenció dels enantiòmers completament desprotegits, **13** i **14**.

3.1.6.- Síntesi de l'àcid 2-amino-(1*S*,2*R*)-ciclobutan-1-carboxílic, **13**

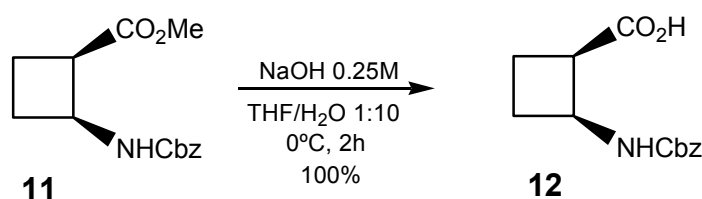
La preparació de **13**, enantiòmer de **9** és pràcticament immediata donat que per a la pròpia obtenció de **9** passem per l'intermedi àcid carboxílic, **8**, a partir del qual només ens cal desprotegir el grup carbamat de benzil. La reacció d'hidrogenòlisi es porta a terme en el si de MeOH i usant Pd/C al 10% com a catalitzador. La reacció té lloc a pressió atmosfèrica d'hidrogen i a temperatura ambient durant 1h 25 min, obtenint-se així, amb un rendiment quantitatiu, l'àcid 2-amino-(1*S*,2*R*)-ciclobutan-1-carboxílic, **13**. (**Esquema 18**)



Esquema 18. Reacció de desprotecció del grup carbamat de benzil.

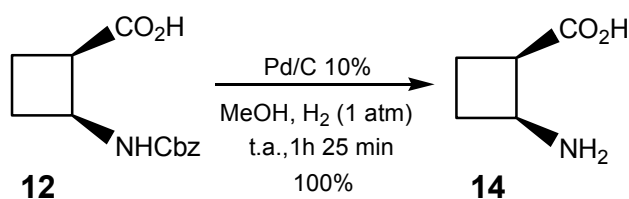
3.1.7.- Síntesi de l'àcid 2-amino-(1*R*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxílic, **14**

En el cas de l'enantiòmer de l'aminoàcid **11**, la seqüència és una mica més llarga donat que implica passar per l'intermedi de tipus àcid carboxílic **12**, al qual s'arriba mitjançant la saponificació de l'èster metílic. L'èster **11** en presència d'una solució de NaOH 0.25 M en el si d'una barreja de dissolvents THF/H₂O en proporcions 1:10 a 0°C, durant 2 hores, rendeix quantitativament l'àcid 2-benziloxicarbonilamino-(1*R*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxílic, **12**. (Esquema 19)



Esquema 19. Saponificació de l'èster metílic, **11**.

Arribats a aquest punt només resta la desprotecció del grup carbamat de benzil. La hidrogenòlisi del qual té lloc novament en el si de MeOH usant Pd/C al 10% com a catalitzador, a temperatura ambient i amb una pressió atmosfèrica d'hidrogen durant 1h 25 min. D'aquesta manera s'obté l'àcid 2-amino-(1*R*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxílic, **14**, amb un rendiment quantitatiu. (Esquema 20)



Esquema 20. Hidrogenòlisi del grup carbamat de benzil

En aquest punt podem comparar, al igual que ho vam fer amb els aminoàcids **9** i **11**, la relació d'enantioisomeria entre els aminoàcids **13** i **14**, centrant-nos novament en els valors de les rotacions òptiques específiques. (Figura 38)

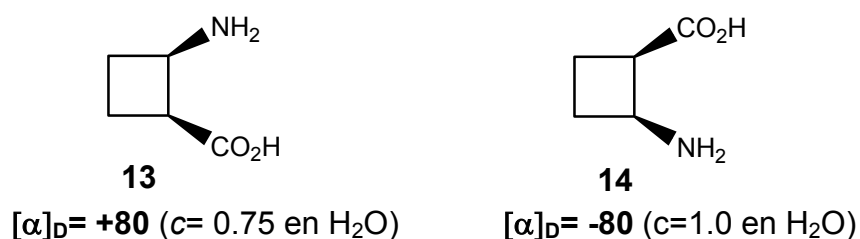


Figura 38. Enantiòmers de l'àcid 2-aminociclobutan-1-carboxílic.

Els valors de les rotacions òptiques específiques, que prenen valors de - 80 i +80 respectivament, coincideixen perfectament, la qual cosa indica clarament que s'ha assolit amb èxit també la síntesi dels aminoàcids completament desprotegits. Altres paràmetres que ho confirmen són la coincidència en els desplaçaments químics dels espectres de RMN, així com els valors dels punts de fusió que són de 130°C per a **14** i 131°C per a **13**. (Figura 39)

El fet d'haver obtingut ambdós enantiòmers és molt important no només des del punt de vista de l'èxit sintètic sinó perquè en el transcurs de l'obtenció dels mateixos s'ha evidenciat que la reacció d'hidrogenòlisi del grup carbamat de benzil no és reproduïble, en el cas de portar-la a terme en les condicions de temps i pressió d'hidrogen de 2 atm, i aquestes noves condicions ens han permès solventar aquest problema.

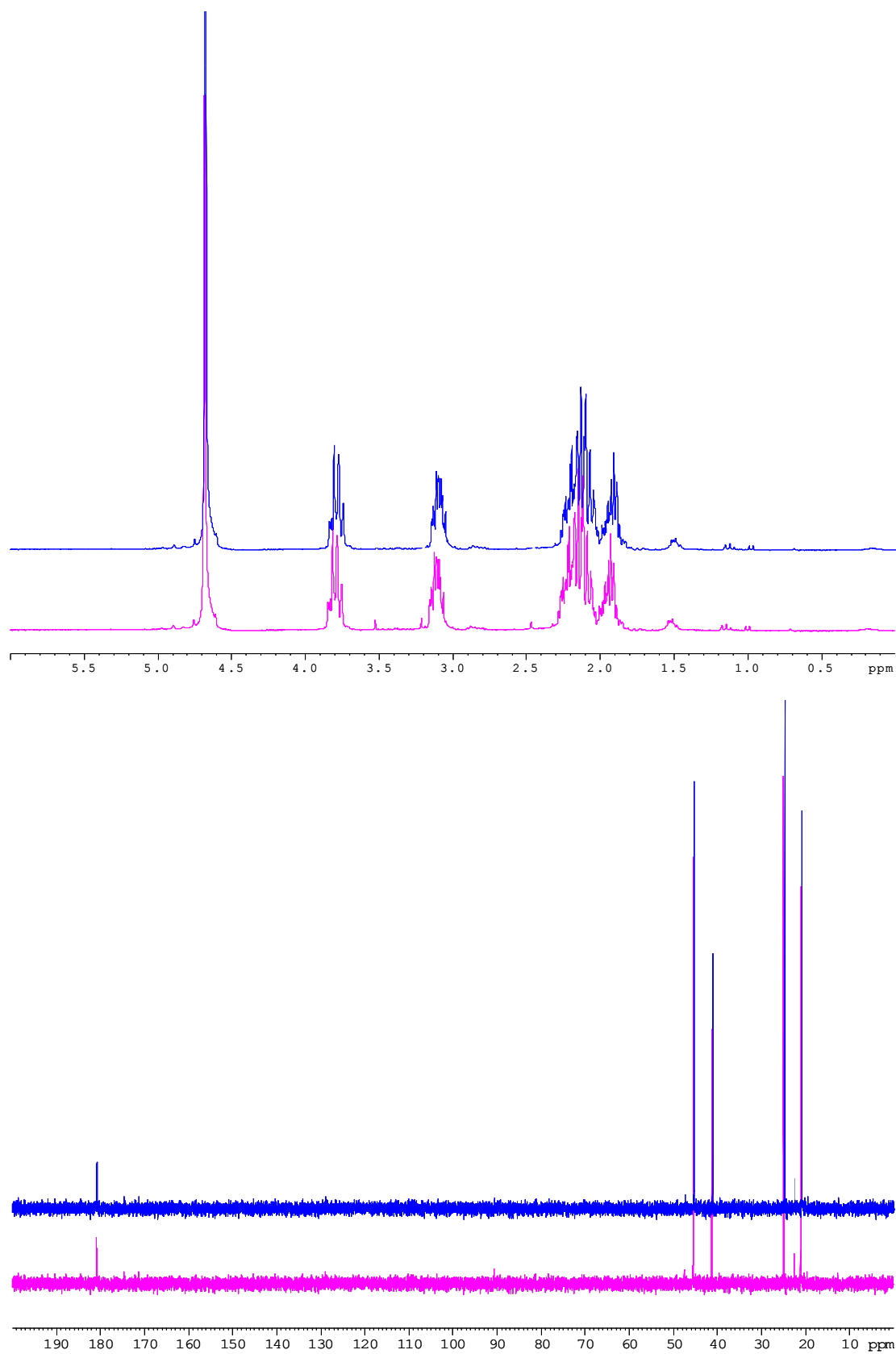
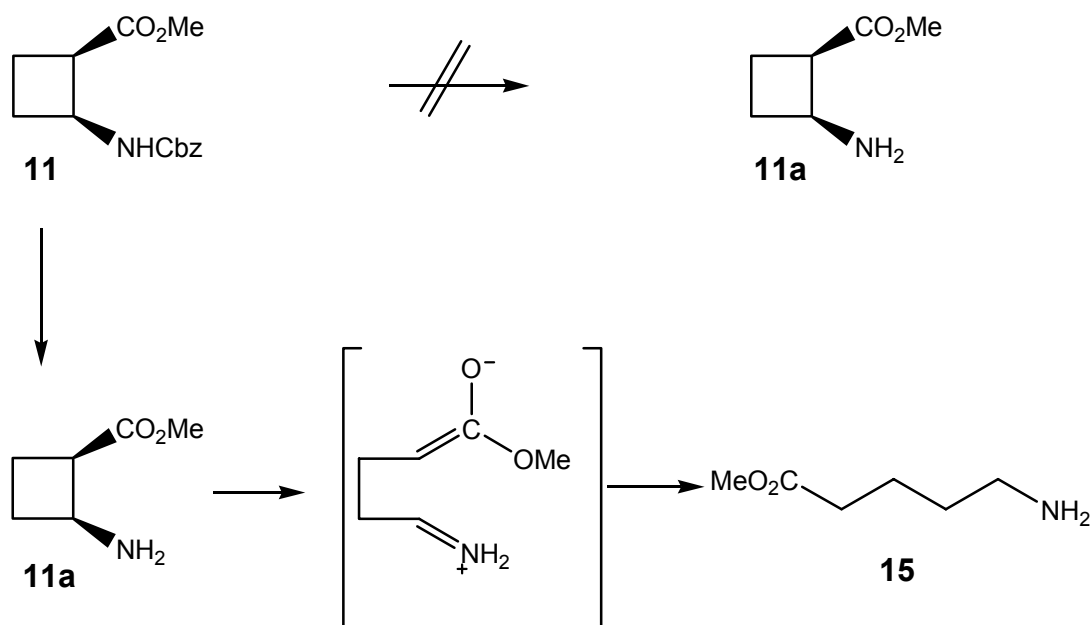


Figura 39. Espectres de RMN de ^1H i ^{13}C en CDCl_3 , enregistrats a 250 i 62.5 MHz respectivament, pels β -aminoàcids **13** i **14**.

A continuació hom intenta donar una explicació als problemes que han sorgit en dur a terme la reacció d'hidrogenòlisi del carbamat de benzil.

L'eliminació del grup carbamat de benzil té lloc habitualment usant un 10% de Pd/C en el si de MeOH i a $P_{H_2}=2$ atm durant tota la nit, i així fou com hom la va dur a terme en primera instància. Revisant els resultats, emperò, hom va detectar un seriós problema derivat de la inestabilitat de l'anell de ciclobutà en aquestes condicions de reacció.

L'amina resultant de la hidrogenació de **11** (Esquema **21**) és un sistema *push-pull* que esdevé una sal d'imini de cadena oberta, la qual en presència de l'hidrogen del medi de reacció és reduïda *in situ* donant lloc al δ -aminoàcid aquiral de cadena oberta **15**, independentment de l'enantiòmer de partida.



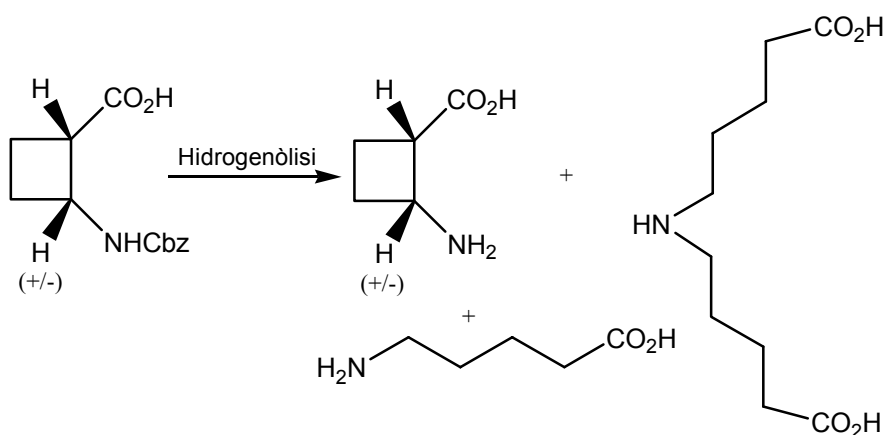
Esquema 21. Sistema push pull que deriva en una sal d'imini de cadena oberta, que en el medi de reacció dóna lloc al δ -aminoàcid aquiral de cadena oberta **15**. Aquesta reacció és independent de l'enantiòmer de partida.

Davant d'aquest fet, hom va estudiar la reacció d'hidrogenòlisi en diferents condicions, això és, variant el catalitzador i el temps. Hom trobà que les condicions per tal d'obtenir l'amina lliure en absència de l'apertura de l'anell són difícils de reproduir. Si s'utilitza $Pd(OH)_2/C$ en comptes de Pd/C

s'augmenta la reactivitat del sistema alhora que es disminueix el temps de reacció, arribant a conversions del 100% en aminoèster de cadena oberta en 12 minuts.

En general, però, s'obtenen barreges de material de partida, amina lliure i aminoèster lineal, demostrant-se així que la reducció de la sal d'imini competeix directament amb la hidrogenòlisi del carbamat de benzil. Òbviament els temps de reacció més llargs afavoreixen l'obtenció de l'aminoèster lineal.

D'altres autors⁸² també han descrit la facilitat d'alguns derivats ciclobutànics per tal de donar productes de cadena oberta sota diferents condicions de reacció d'hidrogenòlisi (**Esquema 22**).



Esquema 22. Estudi de l'estabilitat de l'anell ciclobutànic durant la reacció d'hidrogenòlisi del grup carbamat de benzil. El producte menys abundant és l'aminoàcid desprotegit.

L'apertura de l'anell no s'observa en sistemes que tenen un grup menys electròfil situat en posició veïnal, com és el cas de tenir una amida en comptes d'un èster, la qual cosa sí ens permet utilitzar aquestes condicions de reacció estàndar en d'altres derivats peptídics com seria el cas del β -dipètid **17**. (**Figura 40**)

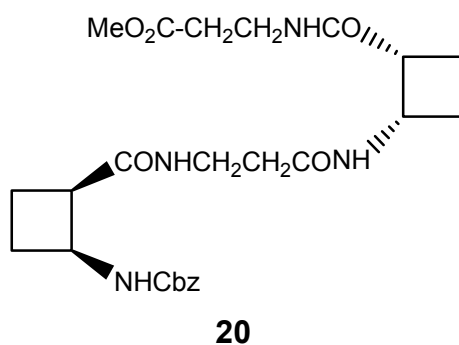
⁸² Aitken, D. J.; Gauzy, C.; Pereira, E. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2359.

3.2.- SÍNTESI DE β -PÈPTIDS

Un cop assolida amb èxit la síntesi d'ambdós enantiòmers, **9** i **11**, hom decidí preparar a partir dels mateixos, diferents β -pèptids per tal d'estudiar-los estructuralment *a posteriori*.

Aquests β -pèptids preparats es poden dividir en dos grups tant des del punt de vista estructural com des de l'estratègia sintètica. (Figura 40)

Tipus A



Tipus B

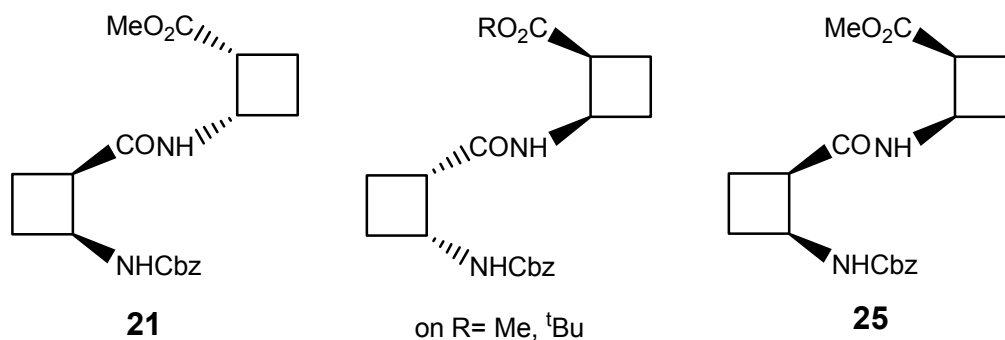


Figura 40. β -pèptids preparats.

Des del punt de vista estructural són diferents perquè tant els β -dipèptids, **16** i **17**, com el tretapèptid, **20**, són fruit de l'acoblament entre diferents unitats de β -aminoàcids ciclobutànics i residus de β -alanina, mentre que els β -dipèptids bisciclobutànics, **21-25**, són fruit formalment de l'acoblament directe entre diferents unitats de β -aminoàcids ciclobutànics entre sí, la qual cosa determinarà l'estereoquímica final del producte.

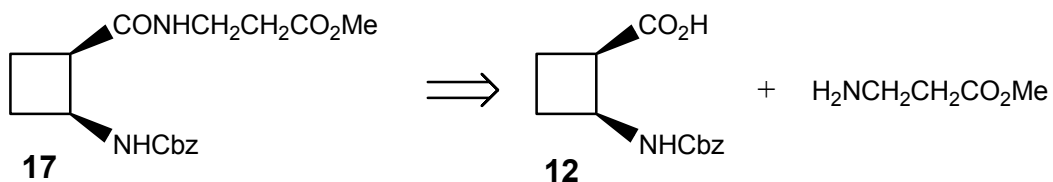
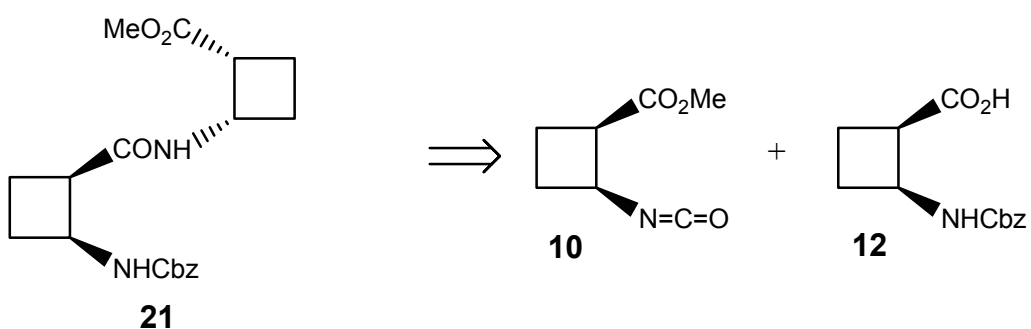
El primer cas, els β -pèptids procedents de la conjunció d'unitats de β -aminoàcids ciclobutànics i residus de β -alanina, ens permetrà, més endavant, determinar fins a quin punt i de quina manera la presència de l'anell de ciclobutà introdueix rigidesa al sistema i si aquesta és suficient com per induir algun tipus de plegament, donat que és conegut que els polímers de β -alanina⁸³ no tenen cap tendència al plegament i, per tant, si aquest existís seria inequívocament degut a la presència de l'anell de ciclobutà.

En el segon cas, es tracta d'unitats de β -aminoàcids ciclobutànics unides directament entre sí, la qual cosa implica que siguin estructures força rígides des del punt de vista estructural. Això ens permetrà, determinar si s'indueix algun tipus d'estructura secundària.

Des del punt de vista sintètic, la diferència fonamental entre ambdós tipus de β -pèptids prové de la reacció de preparació.

Els β -pèptids que contenen residus de β -alanina han estat sintetitzats mitjançant reaccions clàssiques d'acoblament peptídic. En el cas dels β -dipèptids bisciclobutànics la incorporació del segon monòmer ha tingut lloc mitjançant l'addició d'un àcid carboxílic a l'isocianat resultant d'una reacció de transposició de Curtius. La diferència en la preparació ens permetrà discutir la viabilitat dels mètodes així com l'eficàcia dels mateixos. (**Figura 41**)

⁸³ J. Applequist et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 3276.

Tipus A**Acoblament peptídic clàssic****Tipus B****Reacció de l'isocianat amb un àcid carboxílic****Figura 41.** Exemples de reaccions d'obtenció dels diferents tipus de β -pèptids.

Així doncs, un cop establertes aquestes premisses hom passarà a la discussió detallada de la síntesi dels esmentats β -pèptids.

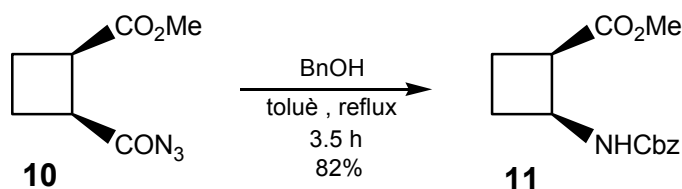
3.2.1.- SÍNTESI DELS β -PÈPTIDS DEL TIPUS A, ACOBLAMENT PEPTÍDIC

3.2.1.1.- Síntesi del β -dipèptid **17**

Com ja s'ha mencionat amb anterioritat, la Dra. Marta Martín-Vilà va obtenir el β -dipèptid **17** a les acaballes de la seva Tesi Doctoral, de tal forma que restà pendent l'optimització d'aquesta síntesi.

En aquest apartat, es descriuen, doncs, les millores que s'han efectuat sobre la ruta sintètica establerta inicialment.

✓ En la transposició de Curtius, s'ha demostrat que la reacció té lloc en 3.5 h, i que no cal deixar-la tota la nit com s'havia descrit inicialment. (**Esquema 23**)

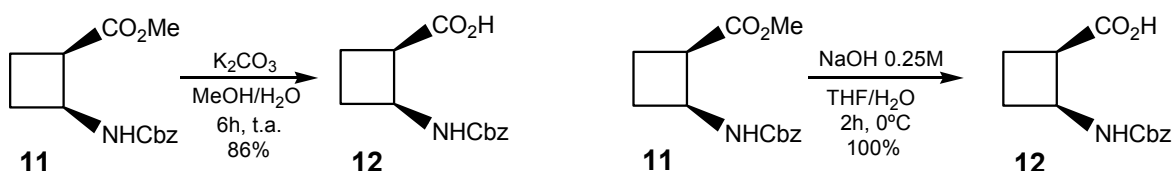


Esquema 23. Reacció de Curtius

✓ El següent pas de síntesi que s'ha optimitzat consisteix en canviar els reactius emprats en la reacció de saponificació de l'èster metílic.

En comptes de portar a terme la saponificació amb K_2CO_3 en el si d'una barreja de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ durant 6 h a temperatura ambient, com ja s'havia descrit anteriorment, hom va decidir portar a terme la reacció tractant l'aminoàcid **11** amb una solució de NaOH 0.25 M i amb una barreja de dissolvents $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ en

relació 1:10 durant 2 hores i a 0°C per tal d'evitar la possible epimerització dels centres estereogènics; com a resultat, s'ha aconseguit un rendiment quantitatiu enfront d'un 86%, i una rebaixa del temps de reacció en un 66%. (**Esquema 24**)

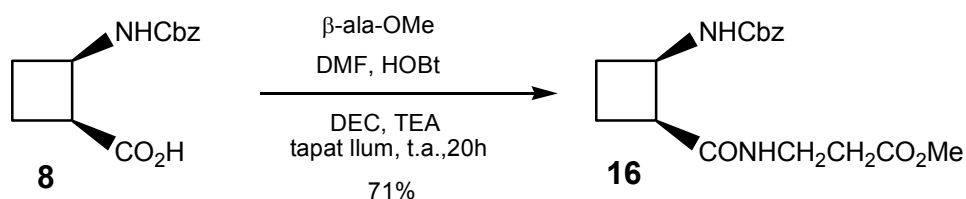


Esquema 24. Reaccions de saponificació.

Un cop preparat el producte **12**, aquest es fa reaccionar amb el β -alaninat de metil seguint la metodologia descrita per tal d'obtenir el β -dipèptid **17**.

3.2.1.2.- Síntesi del β -dipèptid **16**

Anàlogament, hom ha preparat el β -dipèptid **16** seguint la metodologia descrita però, en aquest cas, partint de l'aminoàcid **8**. (**Esquema 25**)



Esquema 25. Reacció d'obtenció del β -dipèptid **16**.

D'aquesta manera s'obté el β -dipèptid **16** amb un rendiment del 71%. Els valors de les rotacions òptiques específiques confirmen la relació d'enantioisomeria d'ambdós isòmers. (**Figura 42**)

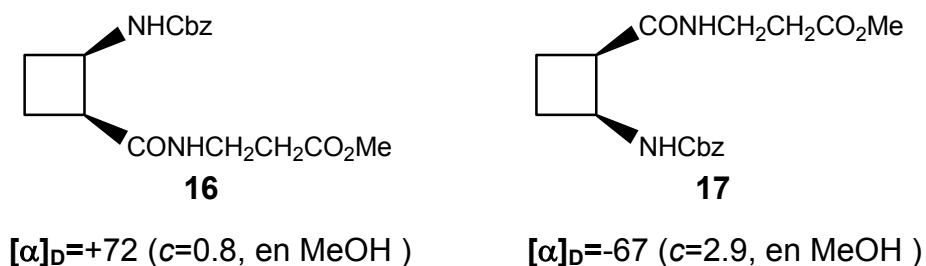


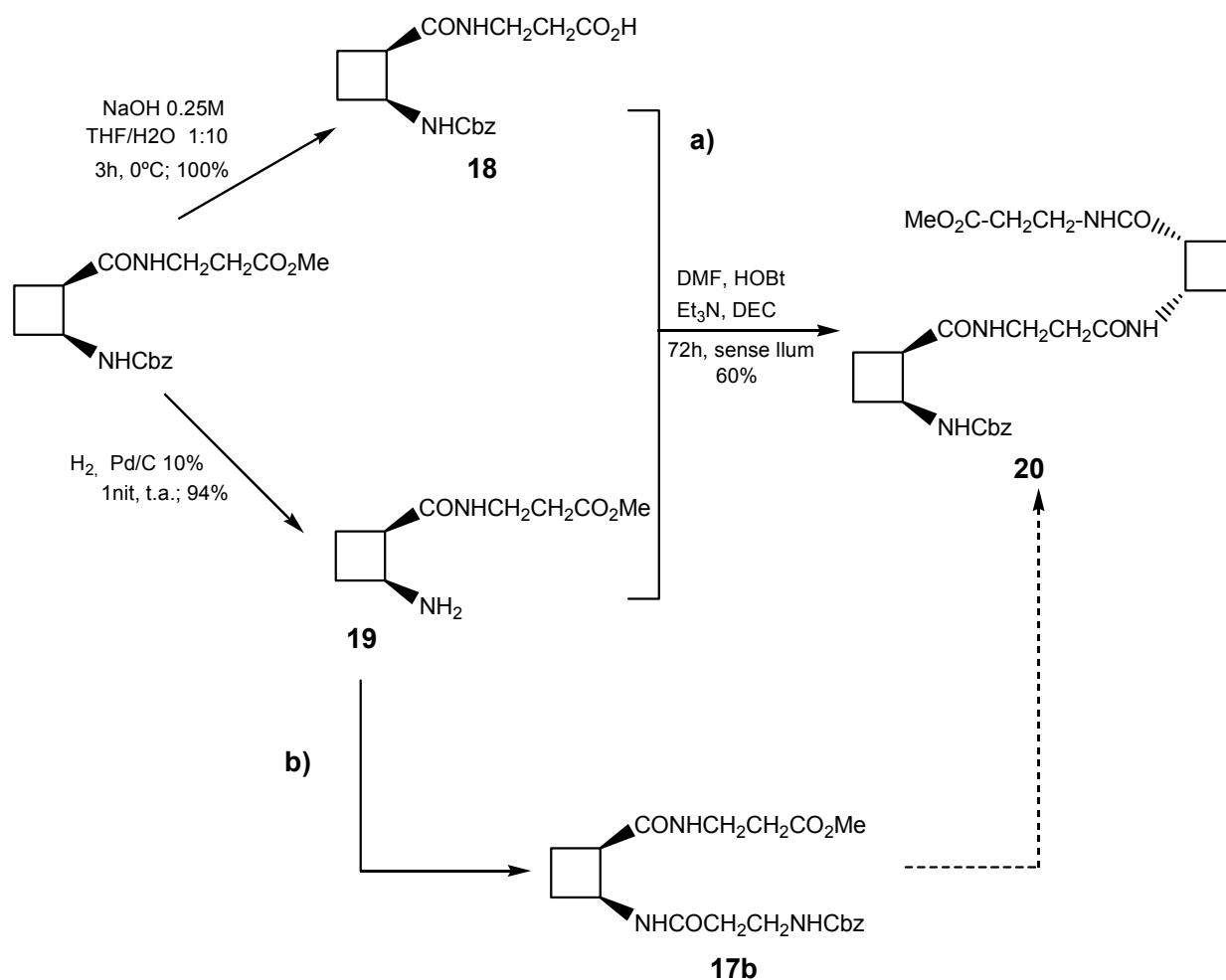
Figura 42. β -dipèptids enantiòmers **16** i **17**.

3.2.1.3.- Síntesi del β -tetrapètid **20**

La síntesi del β -tetrapètid **20** es pot afrontar de dues maneres diferents. La via **b** implicaria la síntesi per passos o, altrament dit, l'addició del segon residu de β -alanina, tot passant pel β -tripètid **17b** com a intermedi, i posteriorment l'addició d'un segon residu de β -aminoàcid ciclobutànic. (**Esquema 26**)

Aquesta via sintètica implica més etapes que la via **a**, la qual cosa ja és en sí mateix un primer desavantatge, més encara si va acompanyat, com és el cas, de la conseqüent disminució en el rendiment global de la reacció, ja que el rendiment de la reacció d'addició del segon residu de β -alanina per donar **17b** és només del 33%.

Tot això explica que s'abandonés aquesta ruta i s'optés per la síntesi del β -tetrapètid **20** per acoblament directe de **18** i **19**, procedents de les corresponents desproteccions selectives de **17**.



Esquema 26. Diferents rutes per tal d'obtenir el β -tetrapèptid **20**, la ruta que implica l'addició pas a pas de cadascun dels monòmers es descartà degut al baix rendiment que implicava.

D'aquesta manera s'obté un rendiment global més elevat degut a la disminució del nombre d'etapes i a un augment en el rendiment de la reacció d'acoblament peptídica, que en aquest cas és del 60%. A més, tant la saponificació de l'èster metílic com la hidrogenòlisi del grup carbamat de benzil tenen un rendiment pràcticament quantitatiu.

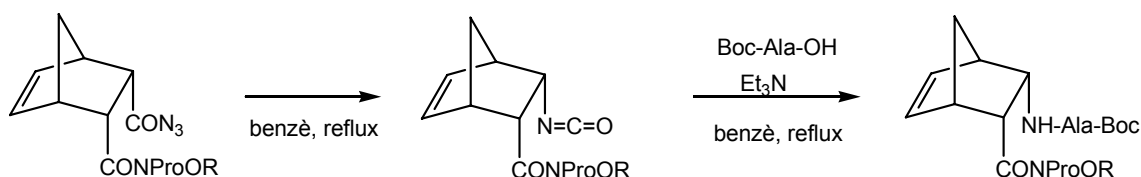
Finalment, doncs, la reacció d'acoblament peptídica per tal d'obtenir el β -tetrapèptid, **20**, té lloc seguint la metodologia habitual: en el si de DMF, en presència de DEC com a agent deshidratant i usant l'HOBt com a catalitzador, tapat de la llum i a temperatura ambient durant 72h (**Esquema 26**).

3.2.2.- SÍNTESI DELS β -PÈPTIDS DEL TIPUS B, REACCIÓ DE TRANSPOSICIÓ DE CURTIUS I ADDICIÓ DE L'ISOCIANAT RESULTANT

Com ja s'ha mencionat, tant en la introducció com en l'apartat de la síntesi dels β -aminoàcids, la reacció d'hidrogenòlisi del grup carbamat de benzil no és reproduïble al 100% en els monòmers.

Davant d'aquest problema, força greu per a les nostres expectatives, vam replantejar-nos el mètode d'obtenció d'aquests β -dipèptids bisciclobutànics.

En aquest moment vam decidir aplicar una metodologia similar a la que utilitzà North⁸⁴ per preparar pèptids basats en la incorporació de residus molt impeditos estèricament que contenen l'esquelet del *endo*-(2*S*,3*R*)-norborn-5-è. Segons aquesta, es podria obtenir el producte desitjat portant a terme la reacció de transposició de Curtius de l'azida en presència de l'aminoàcid en qüestió, en el si de toluè i en presència de Et₃N, tal i com es mostra a l'**Esquema 27**.



Esquema 27. Reacció de transposició de Curtius aplicada per North en la síntesi de pèptids i pseudopèptids basats en la incorporació de residus derivats del bicicle *endo*(2*S*,3*R*)-norborn-5-è com a inductor de certs tipus de gir en l'estructura secundària.

⁸⁴ D.E. Hibbs, M.B. Hursthouse, I.G. Jones, W. Jones, K.M. Abdul Malik, M. North; *J. Org. Chem.*; **1998**, *63*, 1496.

Aquesta reacció es pot portar a terme en dues etapes, preparant primer l'isocianat, el qual fins i tot es pot aïllar, o *in-one-pot*. A la **Figura 43** hom mostra el mecanisme de la reacció d'addició i posterior descarboxilació que porta a la formació dels β -dipèptids bisciclobutànics.

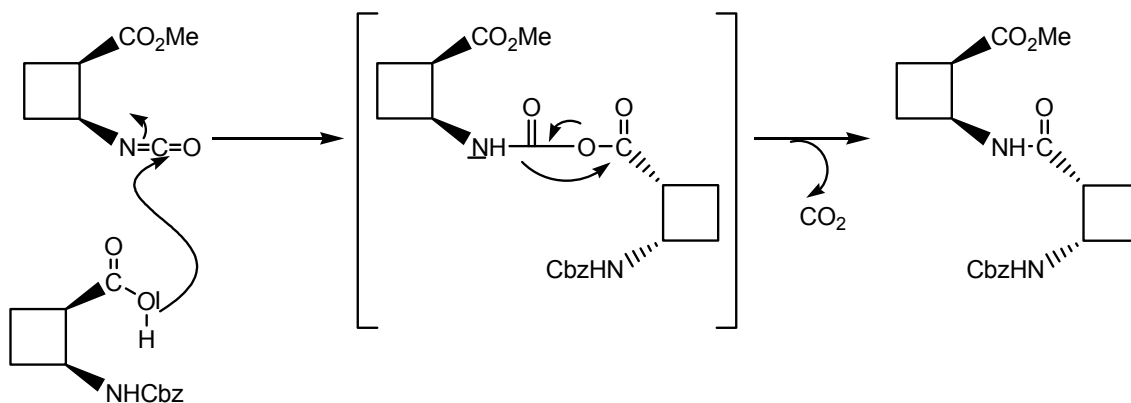


Figura 43. Mecanisme proposat per a la reacció utilitzada en l'obtenció dels β -dipèptids bisciclobutànics.

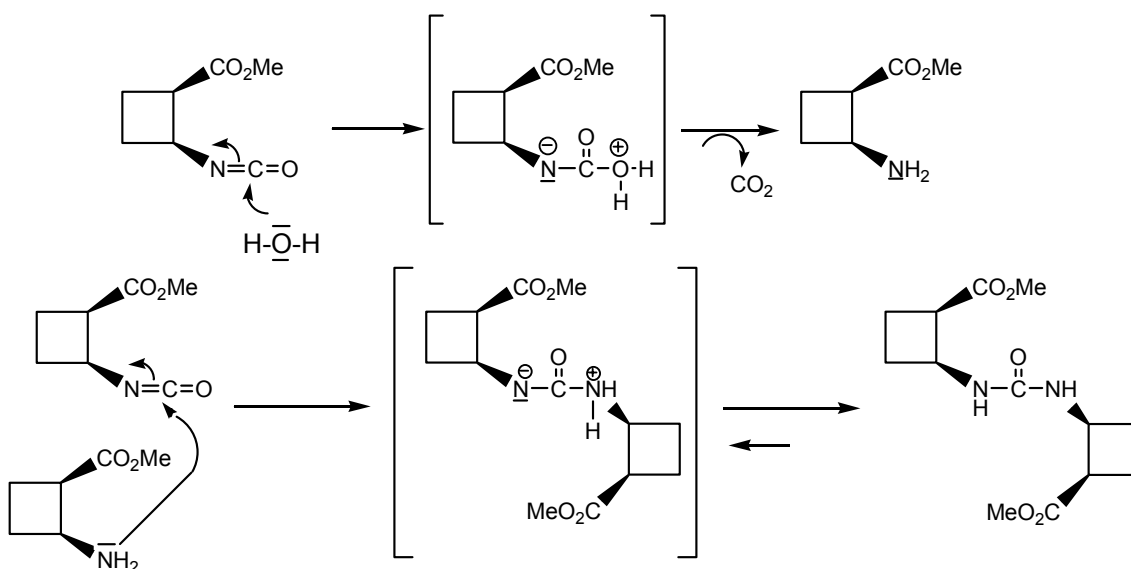
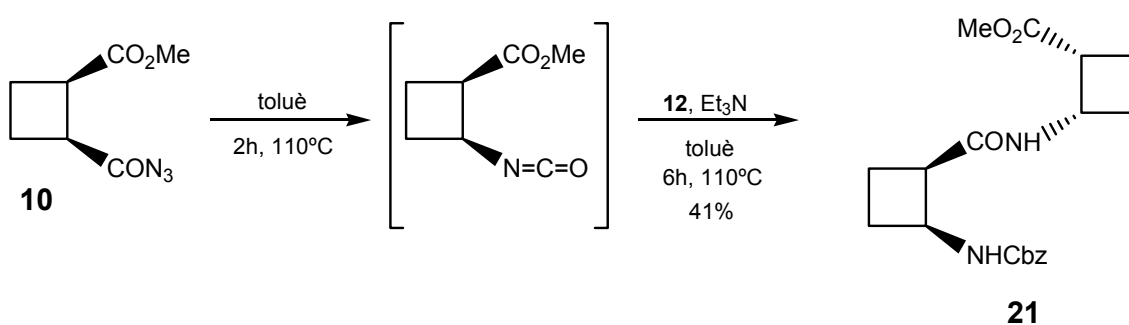


Figura 44. Mecanisme per explicar la formació del subproducte de tipus urea.

North descriu també la formació d'un producte secundari de tipus urea que procediria de l'atac de l'amina resultant de la hidròlisi d'una molècula d'isocianat, sobre una altra molècula d'isocianat (**Figura 44**); aquesta hidròlisi és inevitable tot i treballar amb dissolvents anhidres i en condicions de reacció que impliquen l'absència d'humitat. Així mateix, s'ha observat que en augmentar l'impediment estèric de la reacció s'agreuja aquest problema i que el mateix tampoc no es minimitza portant a terme la reacció a més baixa temperatura.

Amb aquests antecedents vam disposar-nos a portar a terme la transposició de **10** en presència del β -aminoàcid **12** i TEA a una temperatura de 110°C en toluè, tot controlant la reacció per espectroscopia d'Infraroig. D'aquesta manera, hom pot apreciar la desaparició primer del senyal de l'azida, que apareix a 2134 cm^{-1} , i posteriorment la desaparició del senyal de l'isocianat, que apareix a aproximadament 2275 cm^{-1} .

Així, es van realitzar diferents proves portant a terme la reacció en dues etapes, és a dir deixant primer formar l'isocianat partint de l'azida **10**, durant 2 hores a 110°C en toluè, i afegint-hi a continuació el β -aminoàcid **12** i TEA, tot deixant-ho reaccionar 6 hores més a 110°C. (**Esquema 28**).



Esquema 28. Condicions de reacció utilitzades primerament per obtenir els diferents β -dipèptids bisciclobutànics.

Totes aquestes proves van tenir lloc amb èxit però amb rendiments d'aproximadament el 41% del producte desitjat i d'aproximadament el 33% pel producte secundari de tipus urea. (**Figura 45**)

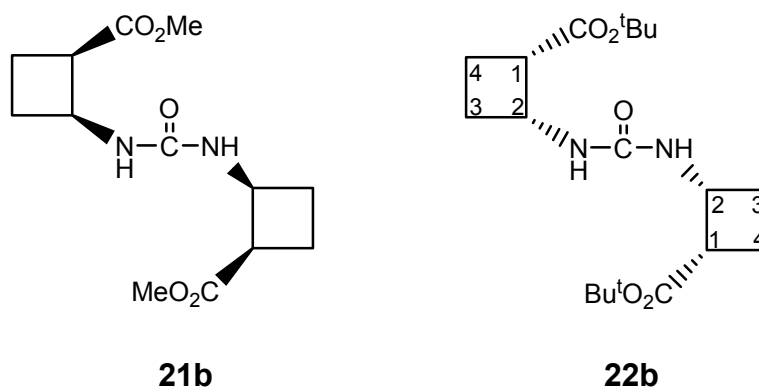


Figura 45. Productes secundaris de tipus urea obtinguts en la síntesi dels β -dipèptids bisciclobutànics per reacció de tranposició de Curtius i posterior addició de l'isocianat. S'obté l'un o l'altre depenent de si hom porta a terme la reacció amb l'azida **6** ó **10**.

La confirmació de l'obtenció del producte secundari de tipus urea, en el nostre cas, ve corroborada per la total caracterització del derivat *tert*-butílic **22b**, del qual hom mostra el difractograma de raigs X a la **Figura 46**, així com els espectres de RMN corresponents a la caracterització de **22b** a la **Figura 47**.

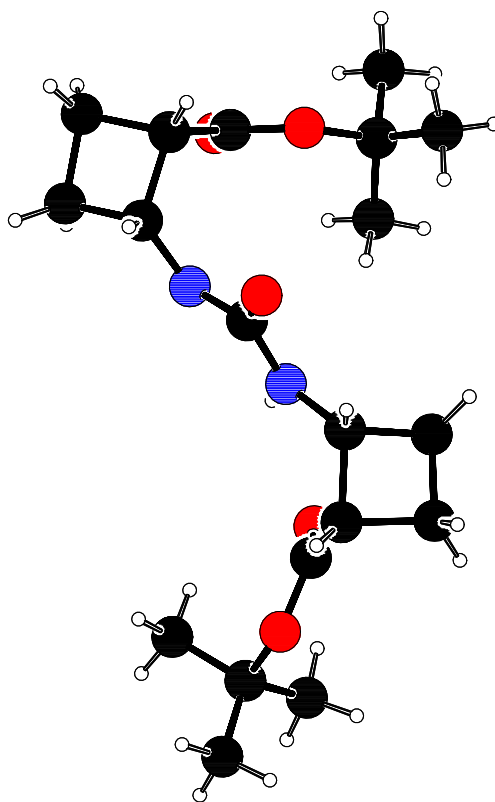


Figura 46. Difragtograma de Raigs X del subproducte de tipus urea-^tBu, **22b**.

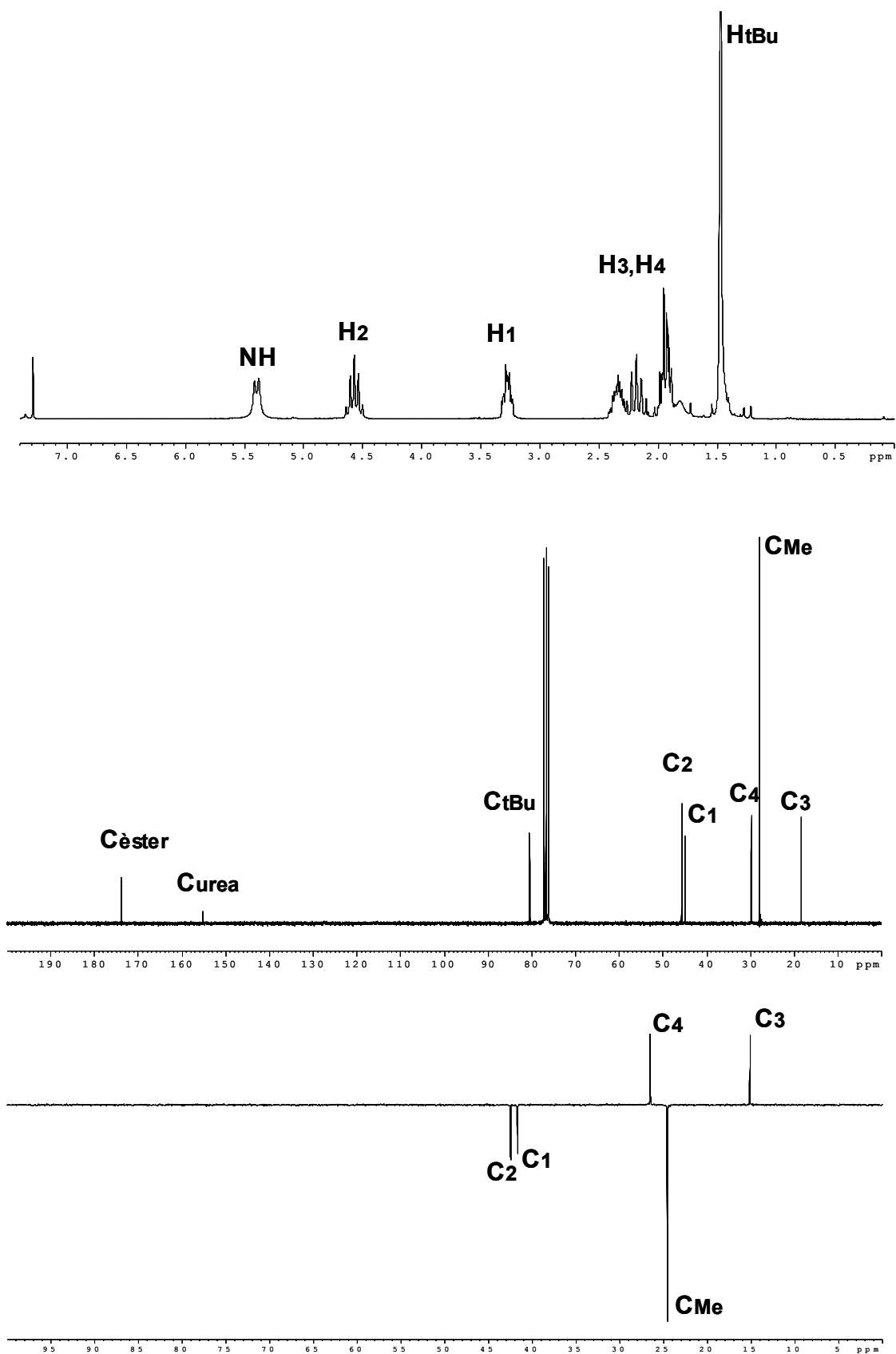
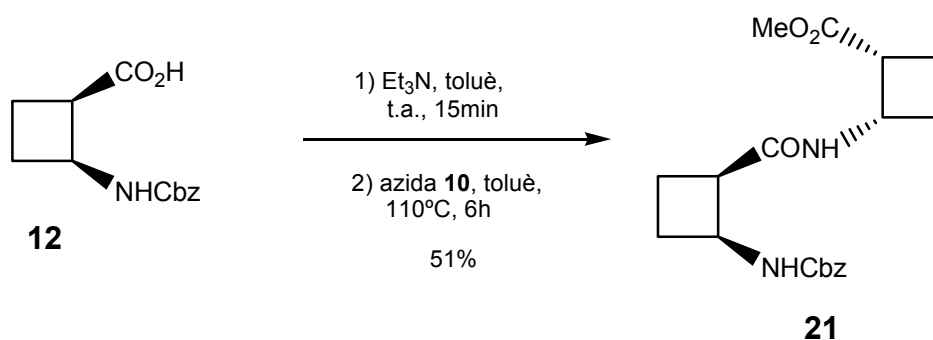


Figura 47. Espectres de RMN ¹H, ¹³C i DEPT, a 250 MHz i 62.5 MHz respectivament, en CDCl₃ del derivat **22b**. L'espectre DEPT mostra l'ampliació de la zona de l'espectre entre 0-95 ppm.

A la vista de l'elevat percentatge de producte secundari observat i del baix rendiment del producte desitjat hom va decidir provar la reacció *in-one-pot*.

D'aquesta manera hom ha aconseguit augmentar el rendiment, trobant com a les millors condicions aquelles en què la reacció té lloc addicionant l'azida **6** ó **10** sobre una solució del β -aminoàcid **8** ó **12** i TEA en toluè a temperatura ambient i deixant el sistema reaccionar durant 6 h a 110°C. S'han preparat així els diferents β -dipèptids bisciclobutànics, purificats per cromatografia en columna, amb un 51% de rendiment i en absència de producte secundari de tipus urea. (**Esquema 29**)



Esquema 29. Condicions de reacció establertes per a la reacció d'obtenció dels β -aminoàcids bisciclobutànics per reacció de transposició de Curtius i la posterior reacció d'addició de l'isocianat. La reacció te lloc utilitzant 1.5 eq. del β -aminoàcid corresponent i de TEA per 1 eq. de l'azida.

Donat que aquestes eren les millors condicions de reacció aconseguides, tots els β -dipèptids bisciclobutànics s'han preparat seguint aquesta metodologia. (**Figura 48**)

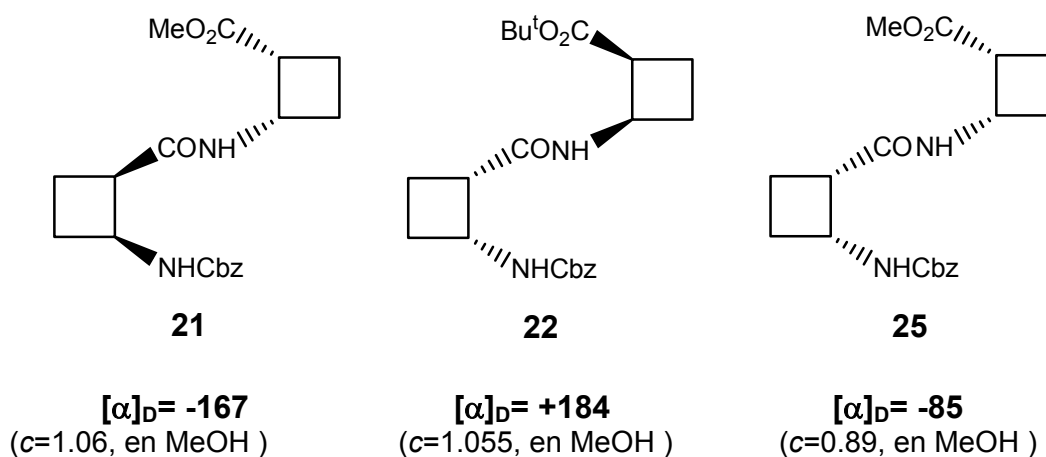


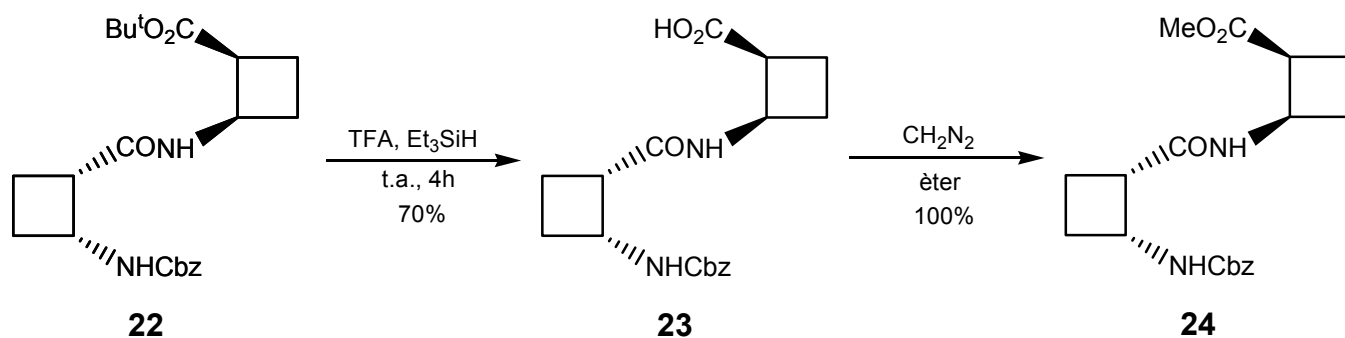
Figura 48. β -Dipèptids bisciclobutànics obtinguts mitjançant l'addició a un isocianat.

Els dos primers β -dipèptids de la **Figura 48**, això és, els productes **21** i **22**, tenen la quiralitat oposada però no són enantiòmers donat que tenen proteccions diferents pel grup carboxil, mentre que el tercer és un dels possibles diastereòmers. Per tal d'obtenir tots dos enantiòmers, el que hom ha fet és, a partir de **22**, i mitjançant la manipulació de les proteccions ortogonals del mateix, obtenir l'enantiòmer de manera similar a com es va dur a terme amb els β -aminoàcids **9** i **11**.

3.2.2.1.- Obtenció del dipèptid 24

El primer pas per aconseguir tenir l'enantiòmer passa per la desprotecció de l'èster *tert*-butílic. Aquesta reacció es duu a terme fent reaccionar el β -dipèptid **22** amb àcid trifluoroacètic en presència de Et_3SiH i en el si de diclorometà durant 4 h a temperatura ambient (**Esquema 30**). La reacció té lloc amb un 70% de rendiment.

Finalment el producte **23** es metila amb diazometà (**Esquema 30**) per tal de rendir quantitativament **24**, l'enantiòmer de **21**.



Esquema 30. Reacció d'obtenció del producte **24**.

Així, s'ha aconseguit sintetitzar també l'enantiòmer de **21**, fet confirmat per la coincidència en els valors de les rotacions òptiques específiques. (**Figura 49**)

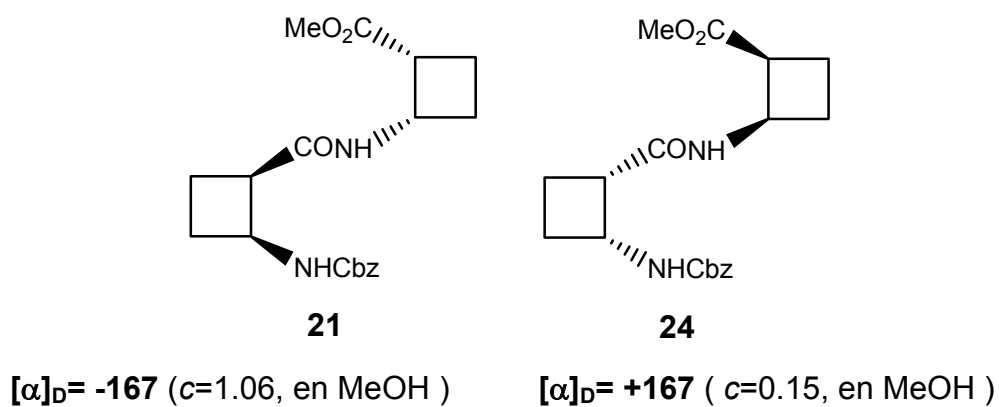
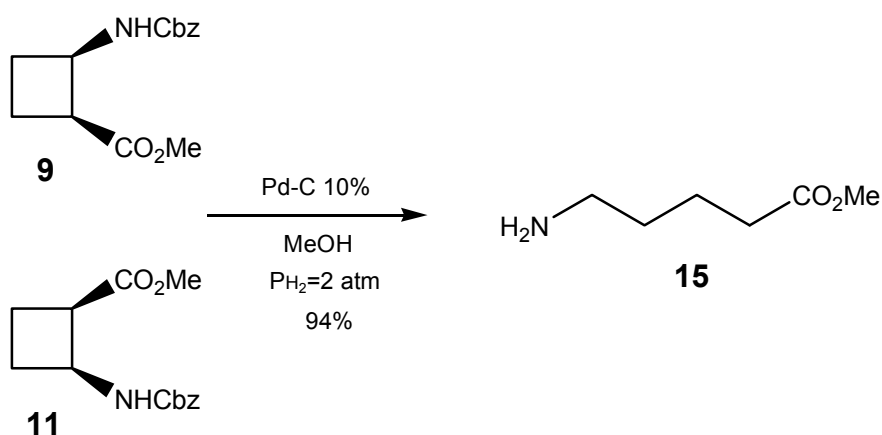


Figura 49. β -Dipèptids bisciclobutànics **21** i **24**.

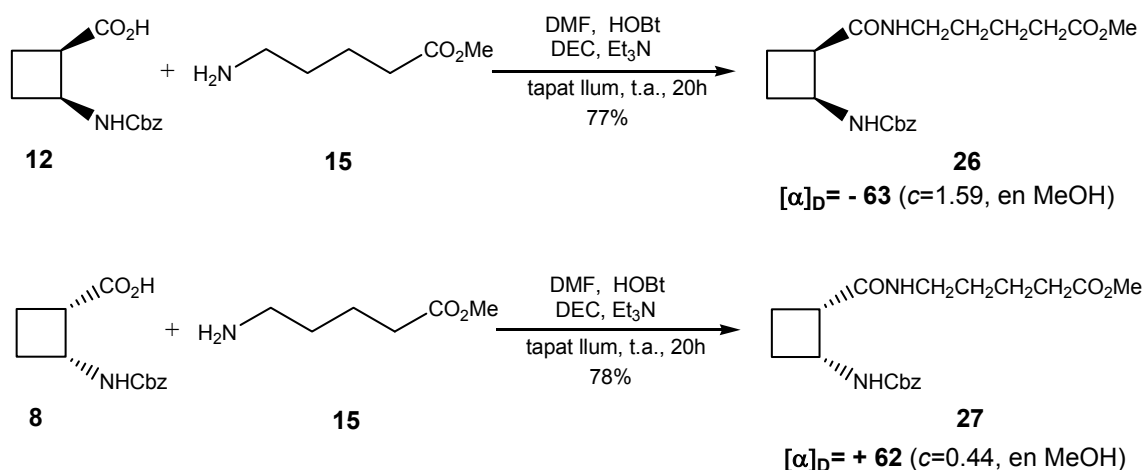
3.2.3.- SÍNTESI DELS β,δ -DIPÈPTIDS 26 I 27

En aquest punt, restaria mencionar que davant de l'obtenció inesperada del δ -aminoàcid aquiral **15**, quan es va produir l'apertura de l'anell de ciclobutà durant la reacció d'hidrogenòlisi del grup carbamat de benzil, hom va decidir portar a terme igualment la reacció d'acoblament peptídic amb l'altre residu de β -aminoàcid ciclobutànic de manera que s'obtingués el corresponent dipèptid, que és un β,δ -pèptid.

La reacció d'acoblament peptídic té lloc seguint la metodologia habitual, és a dir, en el si de DMF i usant DEC com a agent deshidratant i HOBT com a catalitzador, a temperatura ambient i tapant el sistema de la llum durant 20 h. S'obtenen així els β,δ -dipèptids amb un rendiment d'aproximadament el 78% en ambdós casos, després de la purificació per cromatografia en columna. (Esquemes 31 i 32)



Esquema 31. Apertura de l'anell de ciclobutà i pèrdua de quiralitat en les condicions d'hidrogenòlisi del grup carbamat de benzil a P_{H₂}=2 atm.



Esquema 33. Reaccions d'obtenció dels β,δ -dipèptids **26** i **27** per reacció d'acoblament peptídica.

Aquests productes s'han caracteritzat completament. La relació d'enantioisomeria dels mateixos ve confirmada pels valors de les rotacions òptiques específiques, la superposició dels espectres de RMN, i la coincidència del màxim i el mínim respectius en l'espectre de Dicroïsme Circular. (**Figures 50-51**)

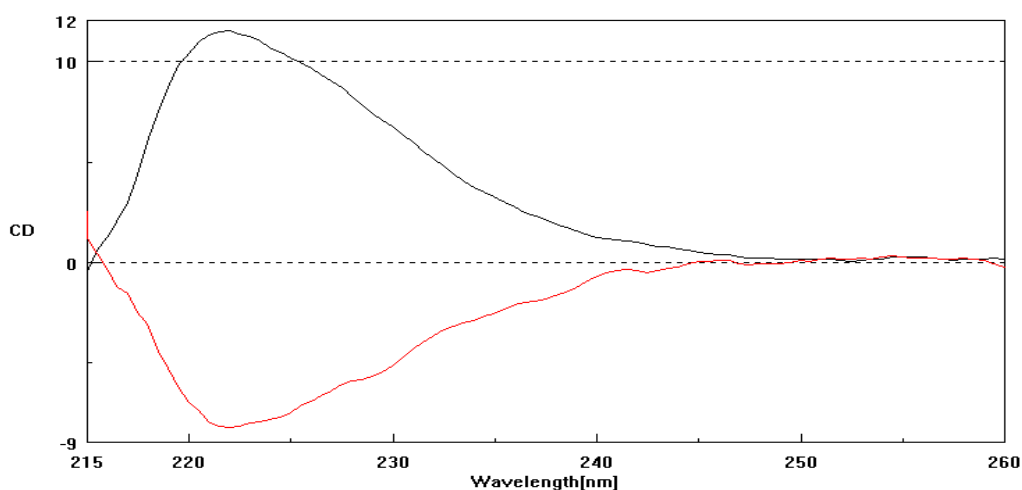


Figura 50. Espectre de Dicroïsme Circular dels β,δ -dipèptids **26** ($\lambda_{\min} = -222$ nm, c=9·10⁻⁴ M en MeOH) i **27** ($\lambda_{\max} = +222$ nm, c=1.07·10⁻³ M en MeOH).

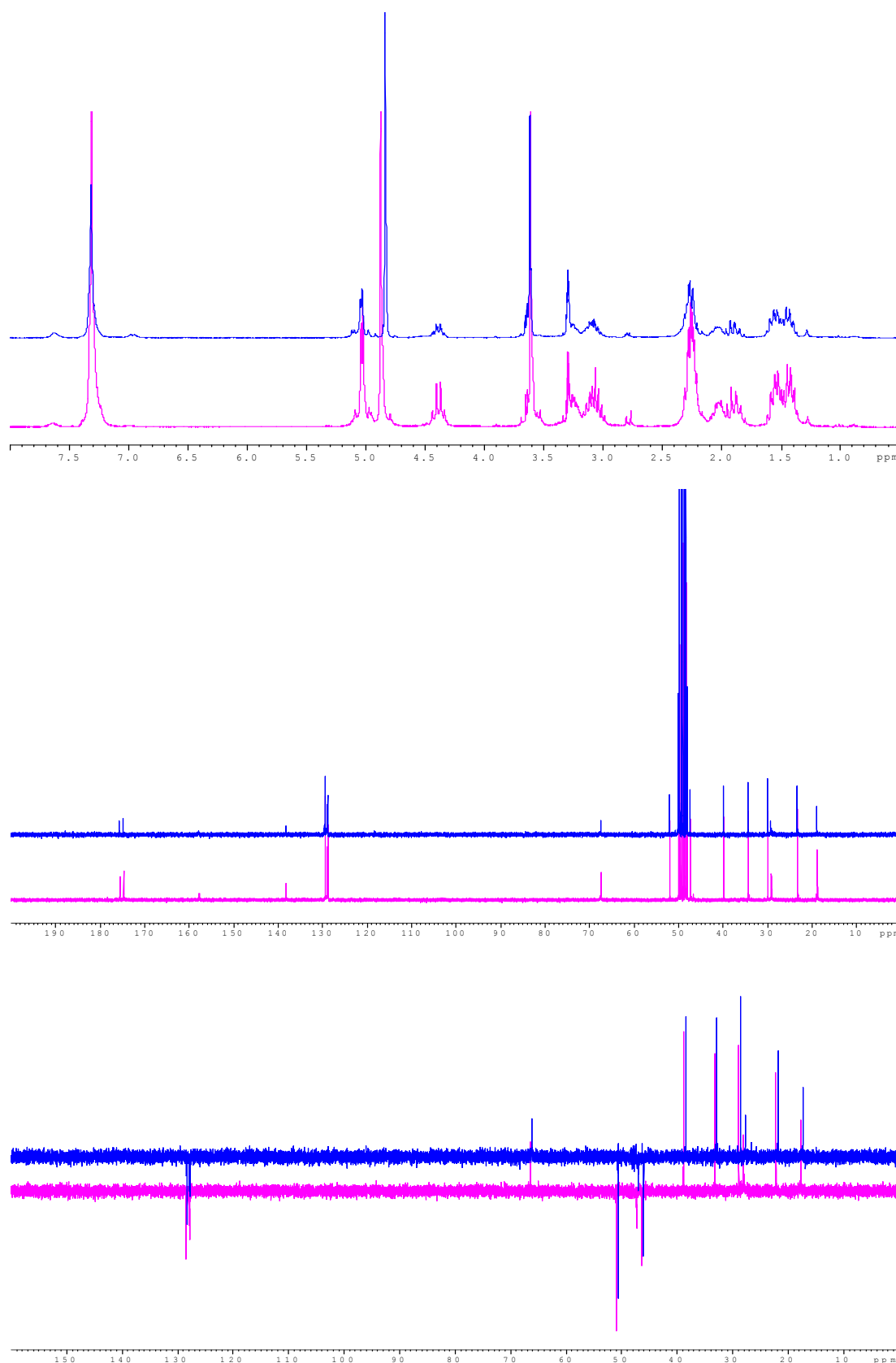


Figura 51. Espectres de RMN ^1H i ^{13}C i Dept, en MeOD- d_4 , dels productes 26 i 27, Espectres enregistrats a 250 i 62.5 MHz respectivament.

3.3.1.- ESTUDI ESTRUCTURAL DEL β -AMINOÀCID 11 **I DELS β -DIPÈPTIDS bisCICLOBUTÀNICS**

Tots els derivats peptídics descrits en l'apartat anterior, bé siguin del tipus **A** o del tipus **B**, tenen en comú la unitat de ciclobutà, la qual els caracteritza tant sintètica com estructuralment.

Així doncs, hom ha cregut que no podíem realitzar un estudi estructural d'aquestes molècules deixant de banda el punt de partida i nexa comú de totes elles i, per tant, la primera molècula estudiada ha estat el β -aminoàcid **11**. De la mateixa manera, hom ha cregut convenient presentar els resultats del β -aminoàcid **11** conjuntament amb els dels β -dipèptids bisciclobutànics donada la estreta similitud estructural.

L'estudi realitzat en tots els casos està basat fonamentalment en l'anàlisi en solució, utilitzant diferents experiments de RMN, i en estat sòlid, donat que hom va aconseguir disposar de monocristalls de cadascuna de les molècules per tal d'enregistrar el difractograma de raigs X. Així mateix, s'han realitzat càlculs teòrics per tal de complementar aquests experiments.

3.3.1.1.- ESTUDI ESTRUCTURAL EN DISSOLUCIÓ

El β -aminoàcid **11** és molt senzill estructuralment donada el seva mida. No obstant, conté un protó amídic en la seva estructura capaç de formar un enllaç d'hidrogen, el qual, si existís, podria promoure la formació incipient d'algun tipus d'estructura secundària en solució. (**Figura 53**)

L'estructura general dels β -dipèptids bisciclobutànics comparteix la mateixa possibilitat de formació de l'enllaç d'hidrogen intramolecular del monòmer **11**, i li'n suma una altra degut a la presència del segon residu. De tal manera que els β -dipèptids bisciclobutànics poden presentar fins a dos enllaços d'hidrogen intramoleculars. (**Figura 53**)

Així, aquest estudi pel fet de tractar-se d'unes estructures rígides i de mides reduïdes es simplifica molt, puix només existeixen unes possibilitats de formació d'enllaç d'hidrogen intramolecular molt concretes i, per tant, la feina es redueix a estudiar l'existència o no d'aquests tipus d'interaccions, que es mostren a la **Figura 53**.

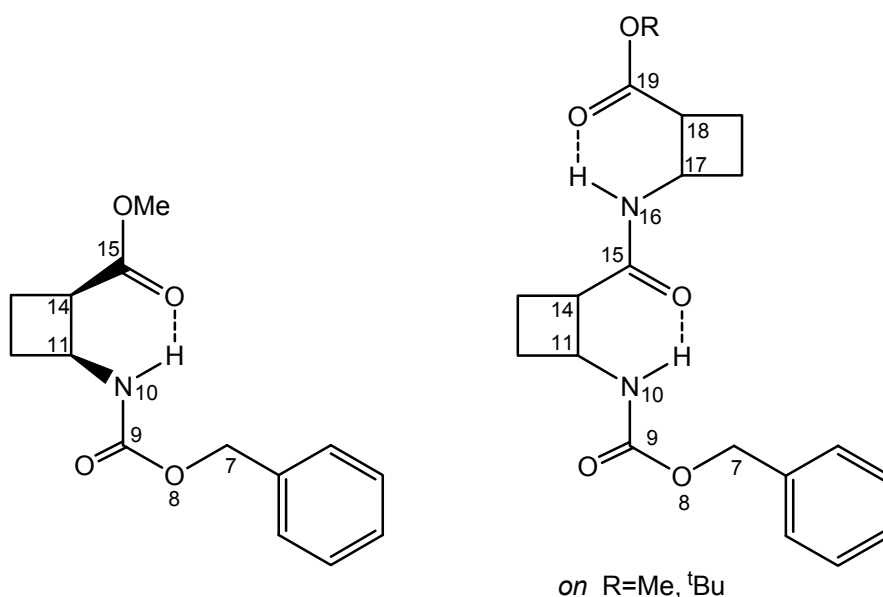


Figura 53. Possibles enllaços d'hidrogen intramoleculars, en les estructures del monòmer **11** i dels β -dipèptids bisciclobutànics.

Per tal d'establir si aquests protons amídics del monòmer **11** i els β -dipèptids bisciclobutànics estan o no involucrats en la formació d'enllaços d'hidrogen el què hom fa, primerament, és assignar completament l'espectre de RMN ¹H per tal de saber quin valor de desplaçament químic li correspon a cada protó amídic. Aquesta assignació es realitza mitjançant experiments en 1D i 2D, dels quals se'n mostren els més representatius per a **25** en les **Figures 54** i **55**.

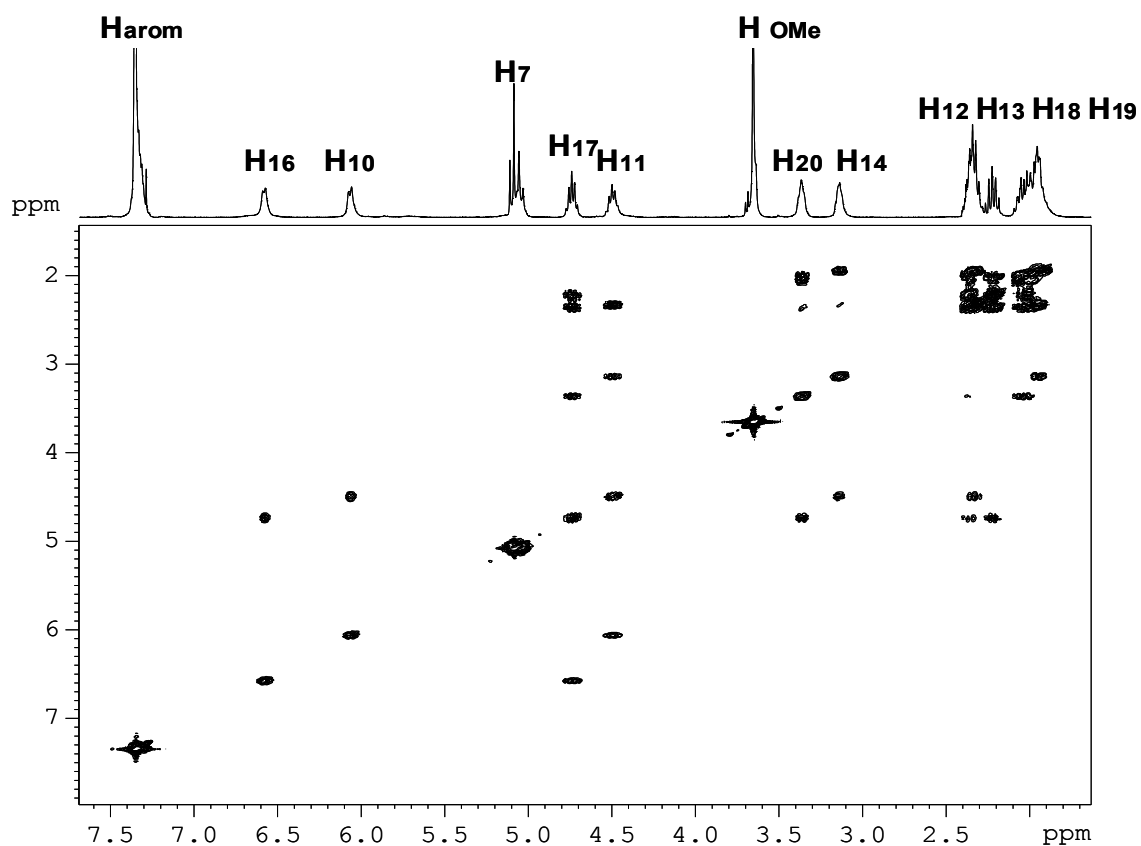


Figura 54. Espectre en 2D de ^1H - ^1H COSY en CDCl_3 a 298 K del β -dipèptid **25**.

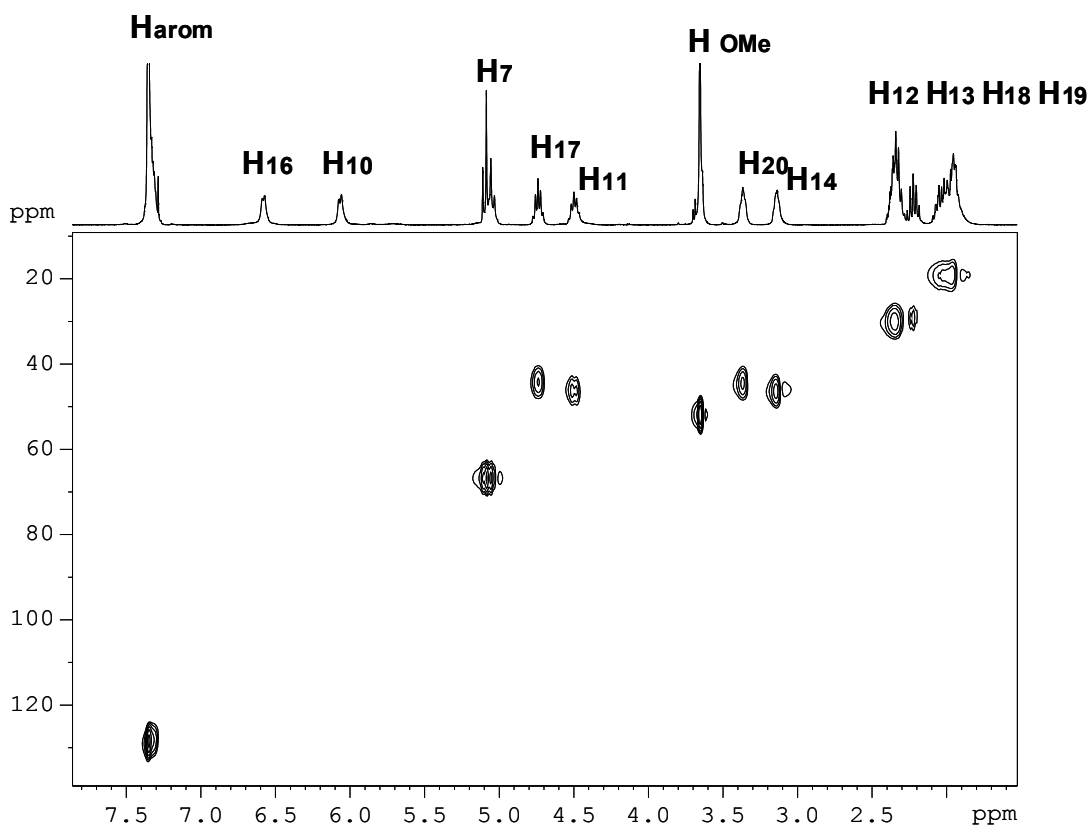


Figura 55. Espectre en 2D de ^1H - ^{13}C HSQC en CDCl_3 a 298 K del β -dipèptid **25**.

Per tal d'analitzar si els protons amídics del monòmer i dels β -dipèptids bisciclobutànics estan o no involucrats en la formació d'enllaços d'hidrogen s'utilitza una de les eines més valuoses que disposem en l'actualitat i que consisteix en la determinació dels coeficients de temperatura.

Els coeficients de temperatura ($\Delta\delta_{\text{NH}} / \Delta T$) són un paràmetre experimental que es determina enregistrant l'espectre de RMN ^1H d'una mostra de la molècula en qüestió a diferents temperatures. Amb els valors dels desplaçaments químics de cada protó amídic en funció de les diferents temperatures hom realitza la corresponent representació gràfica per a cada protó d'amida. Així, el pendent de la recta resultant en cada cas ens dona el valor del coeficient de temperatura per a cada protó amídic, les unitats dels quals són per definició $\text{ppb}\cdot\text{K}^{-1}$.

D'aquesta manera, els coeficients de temperatura, o el que és el mateix, els gradients de temperatura dels protons amídics poden ésser utilitzats per confirmar l'existència d'enllaços d'hidrogen en el refinament de l'estructura peptídica.

En general, la formació d'enllaços d'hidrogen intramoleculars causa que els protons amídics que hi estan involucrats es vegin menys afectats respecte dels canvis de temperatura que aquells que estan exposats al dissolvent. Com a conseqüència, doncs, hom pot afirmar que els valors de coeficients de temperatura de protons amídics més positius que $-4.6 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$ indiquen la presència d'enllaços d'hidrogen amb una predictibilitat que excedeix el 85%, i que, encara més, supera el 93% en aquells casos en que els valors dels coeficients de temperatura es troben en el rang de -4 i $-1 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$. D'altra banda, valors més negatius que $-4.6 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$ indiquen la no formació d'enllaços d'hidrogen per part dels protons amídics.^{85,86,87, 88,89}

⁸⁵ S. Rothermund, H. Weibhoff, M. Beyermann, E. Krause, E. Bienert, C. Mugge, B.D. Sykes, F.D. Sonnichsen; *J. Biomol. NMR*, **1996**, *8*, 93.

⁸⁶ N.J. Baxter, M.P. Williamson; *J. Biomol. NMR*, **1997**, *9*, 359.

⁸⁷ T. Cierpicki, J. Otlewski; *J. Biomol. NMR*, **2001**, *21*, 249.

Per tal de determinar els coeficients de temperatura el què hom fa primerament és enregistrar l'espectre de RMN ^1H del β -aminoàcid **11** i dels β -dipèptids bisciclobutànics a diferents temperatures. (Figures 56 i 57)

Val a dir que s'observen dos senyals pel protó amídic del monòmer **11** i 4 senyals en el cas dels protons amídics dels β -dipèptids bisciclobutànics, corresponents a dues espècies diferents en proporció 10:1. (Figures 56 i 57)

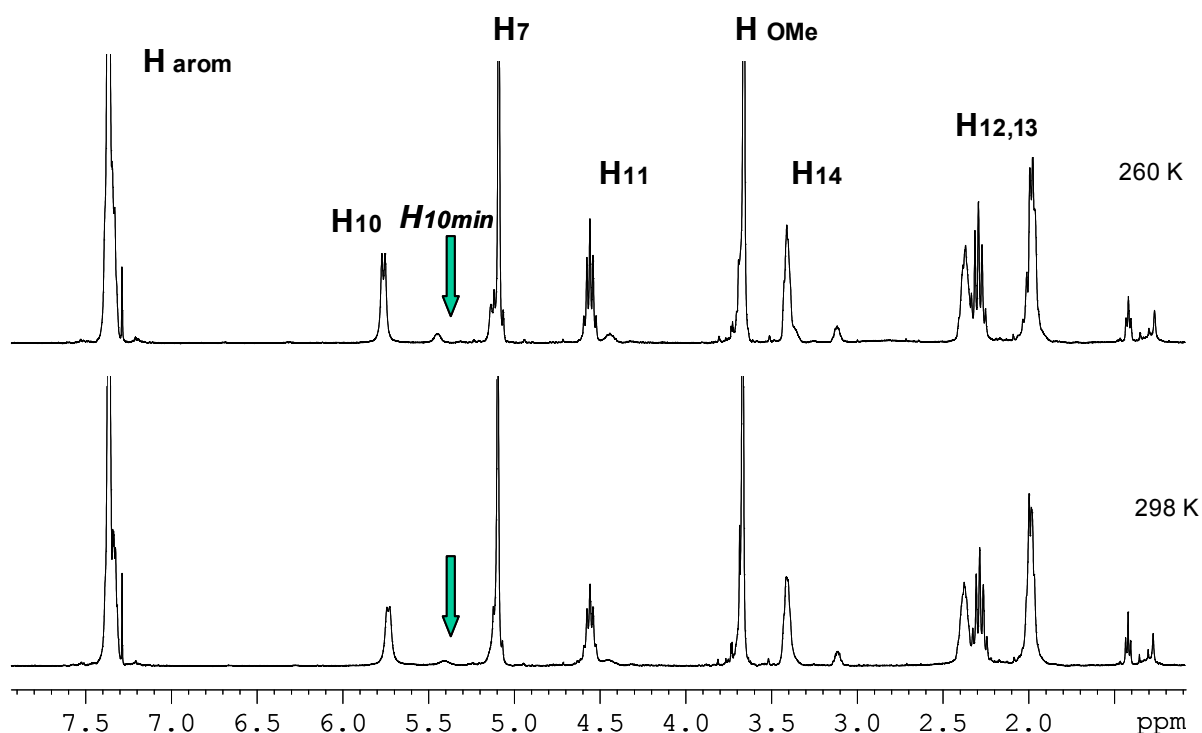


Figura 56. Superposició de l'espectre de RMN ^1H del β -aminoàcid **11** a 260 K i 298 K. *Hmin* indica el protó amídic de la conformació minoritària.

⁸⁸ T. Cierpicki, I. Zhukov, R.A. Byrd, J. Otlewski; *J. Magn. Reson.*, **2002**, 157, 178.

⁸⁹ L. Belvisi, C. Gennari, A. Mielgo, D. Potenza, C. Scolastico; *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 389

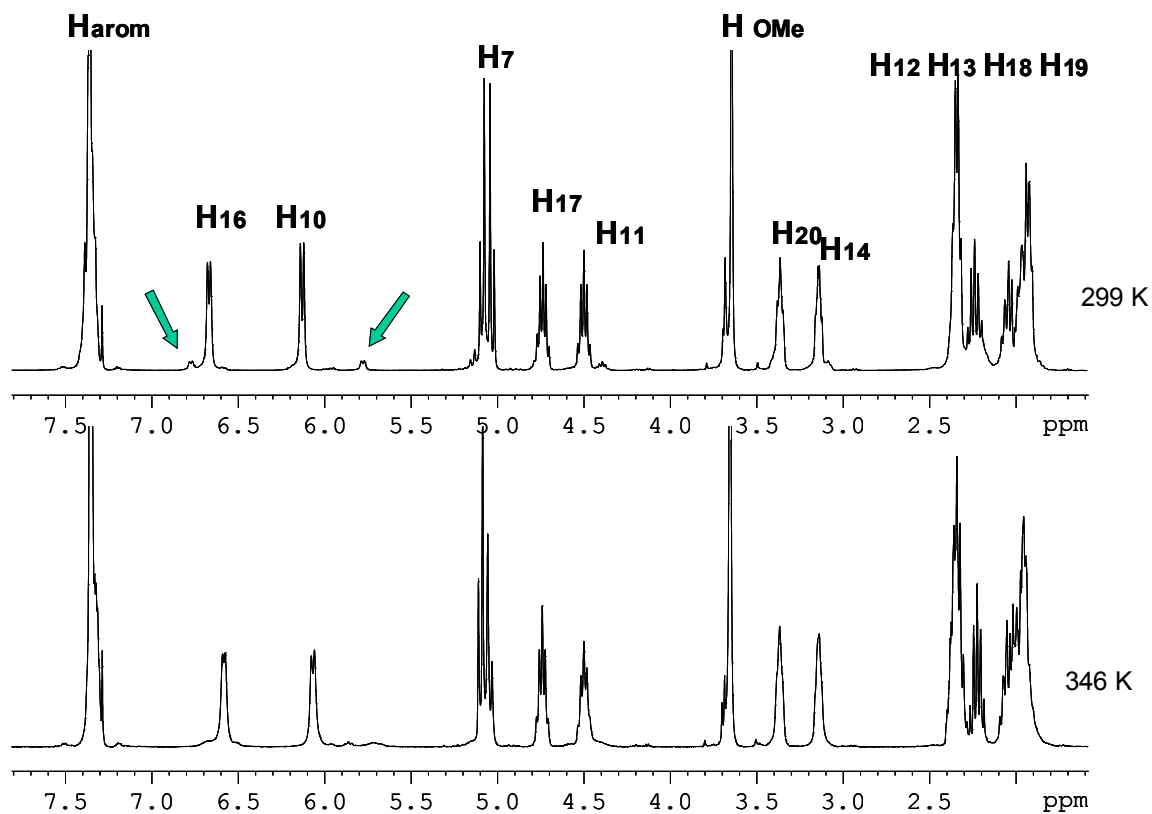


Figura 57. Superposició de l'espectre de RMN ^1H del β -dipèptid **25** a 299 K i 346 K. Les fletxes assenyalen els protons amídics de la conformació minoritària.

A continuació, a tall d'exemple, es mostra el desenvolupament de la determinació dels coeficients de temperatura en el cas del β -dipèptid **25**.¹⁰

A la **Taula 1** s'indiquen els valors dels desplaçaments químics dels protons amídics del β -dipèptid **25** a cadascuna de les temperatures de registre.

¹⁰ per a la resta de molècules, vegeu el desenvolupament de la determinació dels coeficients de temperatura a l'**Annex 7.2**.

Taula 1. Desplaçaments químics dels protons amídics NH_{10} i NH_{16} (ppm) del β -dipèptid bisciclobutànic **25** en funció de la temperatura (K).

T	NH_{10}	NH_{16}
346	5.7645	6.4215
341	5.7697	6.4246
336	5.7774	6.4307
331	5.7891	6.4338
326	5.7909	6.4389
322	5.7983	6.4424
317	5.7997	6.4455
312	5.8045	6.4497
306	5.8151	6.4523
299	5.8219	6.4571

Les dades de la **Taula 1** s'utilitzen per realitzar la representació gràfica de la variació dels desplaçaments químics de cada protó amídic en funció de la temperatura.

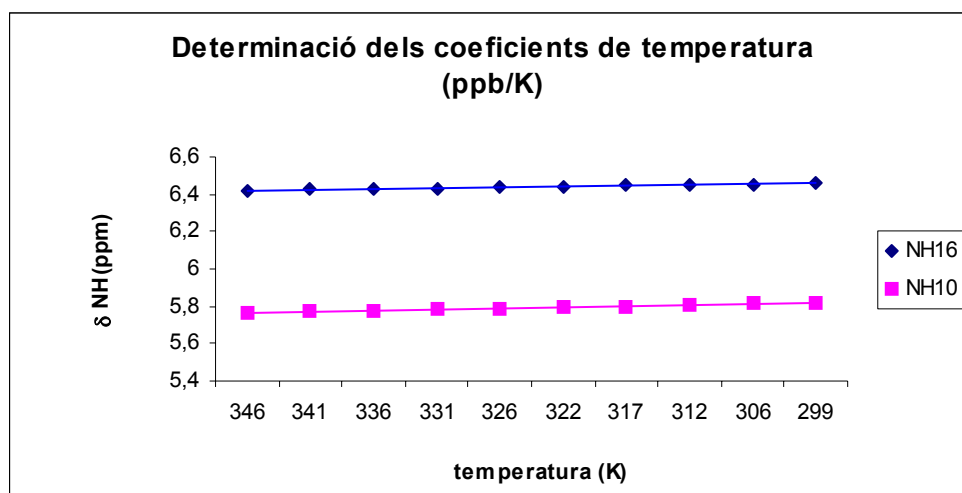


Figura 58. Variació dels desplaçaments químics dels protons amídics NH_{10} i NH_{16} del β -dipèptid bisciclobutànic **25** (ppm) en funció de la temperatura (K).

D'aquesta manera podem calcular l'equació de la recta resultant per a cada protó amídic. Com ja s'ha mencionat, el valor del coeficient de temperatura per a cadascun dels protons amídics, en aquest cas NH_{10} i NH_{16} , és el pendent de la recta corresponent. (**Taula 2**) El valor del coeficient de regressió de la recta verifica que la funció segueix una dependència lineal dels valors de δNH en funció de la temperatura.

Taula 2. Valor dels coeficients de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$ en $\text{ppb}\cdot\text{K}^{-1}$) per als protons amídics NH_{10} i NH_{16} del β -dipèptid bisciclobutànic **25**. També es dona l'equació de la recta descrita i el seu valor del coeficient de regressió.

	$\Delta\delta/\Delta T$	Equació de la recta	r
NH_{10}	-1.1	$6.2 - 1.1 \cdot 10^{-3}$	-0.99
NH_{16}	-0.7	$6.7 - 0.7 \cdot 10^{-3}$	-0.99

Així doncs, els resultats de la determinació dels coeficients de temperatura per al monòmer **11**, així com els β -dipèptids bisciclobutànics **21**, **22** i **25** es mostren a la **Taula 3**.

Taula 3. Valors dels desplaçaments químics dels protons amídics del monòmer **11** i dels β -dipèptids bisciclobutànics **21**, **22** i **25** (en ppm) i dels valors dels coeficients de temperatura (en $\text{ppb}\cdot\text{K}^{-1}$) determinats per a cada un d'ells.

Compost	NH10		NH16	
	δ	$\Delta\delta/\Delta T$	δ	$\Delta\delta/\Delta T$
11 <i>major</i>	5.76	-0.7	—	—
11 <i>minor</i>	5.43	-0.9	—	—
21	5.84	-2.2	6.48	-2.0
22	5.82	-1.3	6.58	-0.6
25	5.79	-1.1	6.42	-0.7

A la vista dels resultats, hom pot afirmar que el protó amídic **NH₁₀** del β -aminoàcid **11** molt probablement està formant un enllaç d'hidrogen amb el carbonil de l'èster metílic, l'única possibilitat existent.

Així mateix, els valors dels coeficients de temperatura dels β -dipèptids bisciclobutànics **21**, **22** i **25**, permeten afirmar que el més probable és que tots dos protons amídics, **NH₁₀** i **NH₁₆**, estiguin formant enllaços d'hidrogen.

Els resultats, doncs, tant en el cas del monòmer **11** com dels β -dipèptids bisciclobutànics apunten cap a la formació d'una estructura molt rígida. Aquesta estructura ve estabilitzada per la presència d'enllaços d'hidrogen intramoleculars, confirmats pels valors dels coeficients de temperatura.

Tal i com ja s'ha comentat, si mirem detalladament les **Figures 56 i 57**, tant a temperatura ambient com encara més a baixa temperatura, tant en el cas del monòmer **11** com del β -dipèptid **25** es pot apreciar la presència d'un altre confòrmer minoritari, del què només s'ha determinat el valor del coeficient de temperatura en el cas del monòmer **11**.

Així doncs, ens plantejem d'on pot provenir aquest equilibri conformacional i, en tractar-se de molècules petites, novament és senzill, puix aquest equilibri només pot s'explicar-se en base a l'equilibri conformacional *cis/trans* de l'amida del grup Cbz, què no s'havia considerat en un primer moment. (**Figura 59**)

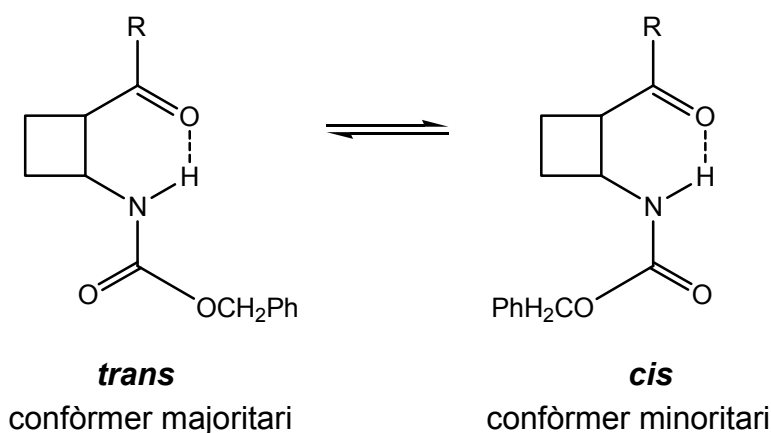


Figura 59. Confòrmers resultants de l'equilibri *cis/trans* de l'amida del grup carbamat de benzil en proporció 10 :1, en el monòmer **11** i els β -dipèptids bisciclobutànics.

L'existència d'aquest confòrmer minoritari en els diferents productes, en relació 10 :1, es veu molt bé a baixa temperatura. No obstant, no va ser possible arribar a congelar aquest equilibri i fins i tot a 260 K continuava havent intercanvi entre els protons amídics d'ambdues conformacions i l'aigua del dissolvent (**Figura 60**). Tot i així, en base als valors de les constants d'acoblament dels protons amídics del confòrmer majoritari, que prenen valors entre 8.5-9 Hz, podem afirmar que aquest correspon al rotàmer *trans*.

A més, el desplaçament cap a camps més alts del protó amídic del carbamat de benzil en el confòrmer minoritari, en aproximadament -0.4 ppm, molt probablement és degut als efectes anisotròpics del grup fenil.

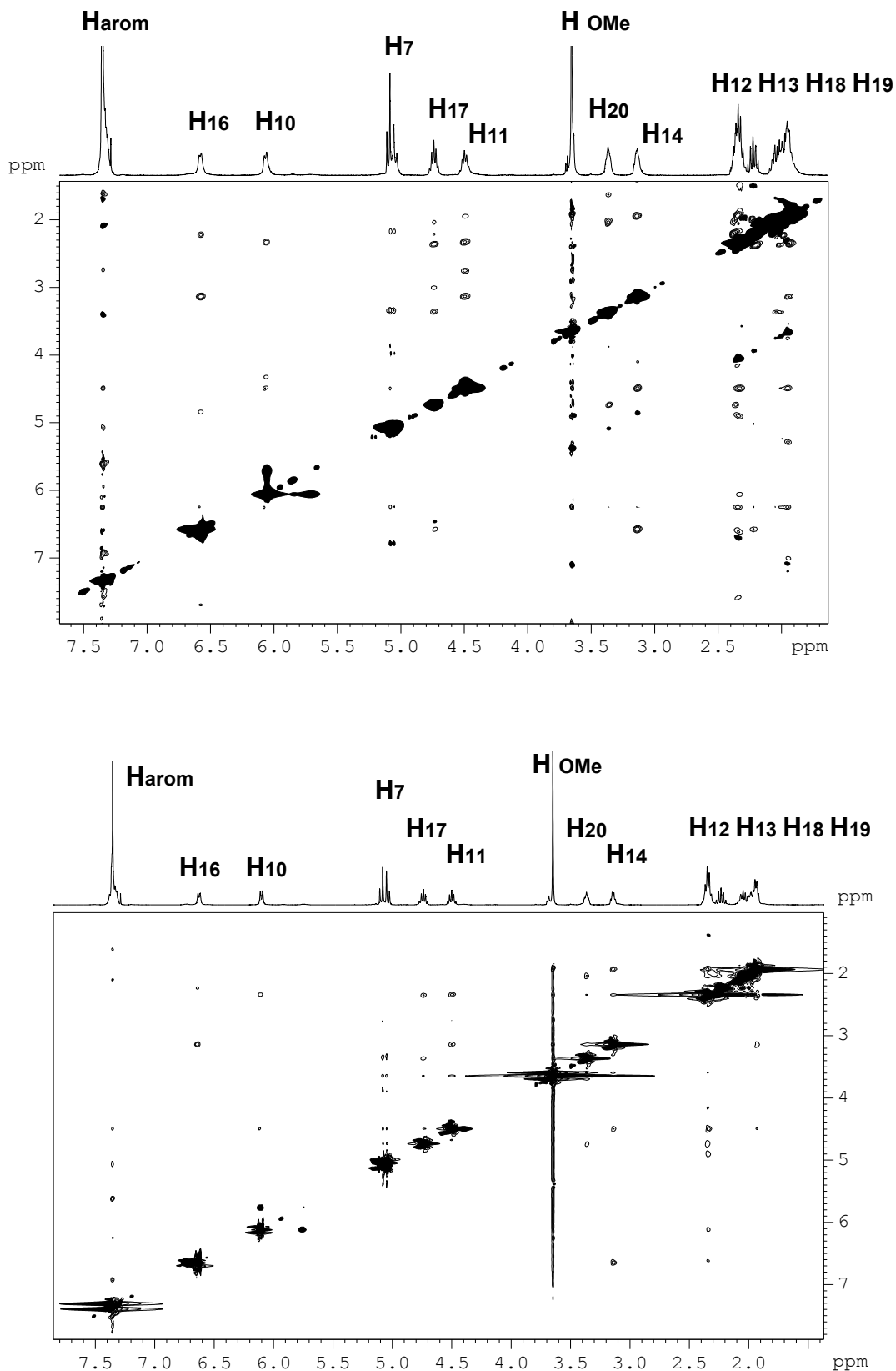


Figura 60. Espectres en 2D, ^1H - ^1H NOESY en CDCl_3 del β -dipèptid **25** a 298 K i 250 K, respectivament. Hom pot observar, com tot i la disminució en la temperatura de registre, continua havent pics d'intercanvi entre els conformers majoritari i minoritari. Aquest efecte també s'observa en els espectres anàlegs dels compostos **11**, **21** i **22**.

Així doncs, podríem enunciar que, de l'estudi estructural en dissolució es desprèn que tant el monòmer **11** com els β -dipèptids **21**, **22** i **25**, formen una estructura secundària en solució ben ordenada i definida per la presència d'enllaços d'hidrogen.

Aquests enllaços d'hidrogen, en el cas del monòmer **11**, involucren el parell $NH_{10} \cdots OC_{15}$, mentre que en el cas dels β -dipèptids bisciclobutànics estan formats pels parells $NH_{10} \cdots OC_{15}$ i $NH_{16} \cdots OC_{21}$. En tots els casos, la presència d'aquests enllaços d'hidrogen ve confirmada pels valors dels coeficients de temperatura. En el cas dels β -dipèptids bisciclobutànics, l'estructura també està confirmada per la presència d'efecte nOe entre el protó amídic NH_{16} i el protó veïnal del ciclobutà HC_{13} . (Figura 61)

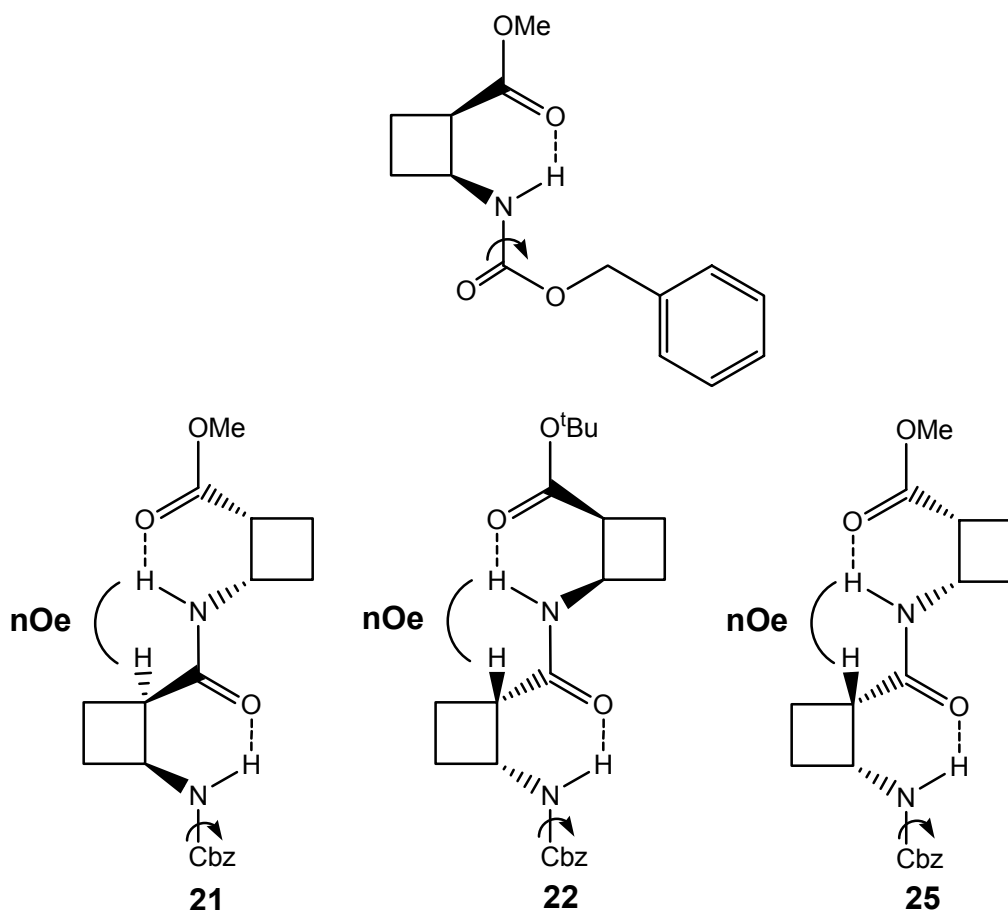


Figura 61. Estructura secundària en solució pel monòmer **11** i pels β -dipèptids bisciclobutànics estudiats.