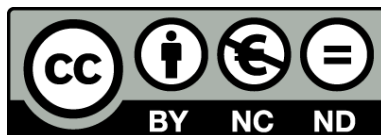




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Síntesis del fragmento 1-4 de la toxina II del escorpión
"Androctonus australis hector". Estudio de la n-
benzhdiril-(4-brometil-3-nitro) benzoilamida como
modelo monimérico del α -(4-bromometil-3-
nitrobenzamido)benzilpoliestireno**

Ernesto Nicolás Galindo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

SINTESIS DEL FRAGMENTO 1-4 DE LA TOXINA II DEL ESCORPION
"ANDROCTONUS AUSTRALIS HECTOR". ESTUDIO DE LA N-BENZHIDRIL-
(4-BROMOMETIL-3-NITRO)BENZOILAMIDA COMO MODELO MONOMERICO
DEL α -(4-BROMOMETIL-3-NITROBENZAMIDO)BENZILPOLIESTIRENO

ERNESTO NICOLAS GALINDO

Departamento de Química Orgánica
División de Ciencias Experimentales y Matemáticas
Universidad de Barcelona

Tesis Doctoral presentada por
Ernesto Nicolás Galindo para optar
al grado de Doctor en Química

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ernesto', with a long, sweeping horizontal stroke extending to the right.

Fdo. : Ernesto Nicolás Galindo

Revisada por:

Dr. Ernest Giralt Lledó

Barcelona, Octubre de 1988

Esta Tesis ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Barcelona, Departamento del que es director el Dr. Josep Castells Guardiola, a quien quiero expresar mi más profundo agradecimiento por la confianza que ha depositado en mí durante todos estos años.

Sería muy extenso mencionar a todas las personas que han contribuido de alguna forma, desde los puntos de vista humano y profesional, a convertir mi estancia en este Departamento en una de las épocas mejores de mi vida. En particular, quisiera agradecer especialmente al Dr. Ernest Giralt Lledó, director de esta Tesis, su ayuda y apoyo constantes para llevar a término este trabajo, así como expresar mi más sincero reconocimiento como persona e investigador.

Deseo expresar también mi agradecimiento a los Drs. Enrique Pedroso, Jurphaas Van Rietschoten, Fernando Albericio, Miquel Pons y Miguel Feliz, por un lado, y a Francisco Cárdenas, María Pilar Navarro, Carlos Celma, Angels Manuel, Miriam Royo y Fina Parejo, por otro, por sus distintas aportaciones. De una forma muy especial, quisiera destacar a Margarita Perelló por su contribución primordial al Capítulo 3 de esta Tesis durante la realización de su Tesina.

Finalmente, quisiera mostrar mi más cordial agradecimiento a los Drs. David Andreu, Anna Grandas y Ramón Eritja, Josep Rizo, becarios y tesinandos pertenecientes al Grupo de Péptidos por haber creado en el laboratorio un ambiente de convivencia inolvidable.

INDICE

PARTE TEORICA

OBJETVOS	1
1. SINTESIS DEL FRAGMENTO (1-4) DE LA TOXINA II DEL ESCORPION	
"Androctonus auatralis Hector"	3
1.1. Introducción	4
1.2. Consideraciones sintéticas preliminares	6
1.3. Síntesis de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-OH	8
1.3.1. Síntesis del ester hidroxisuccinimídico de la N ^ε - bencilo xicarbonil-N ^α -fluorenilmetoxycarbonilisina	8
1.3.2. Síntesis de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-OH	10
1.4. Síntesis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-O-CH ₂ -Nbb	10
1.4.1. Acoplamiento del primer aminoácido	12
1.4.2. Acoplamiento de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-OH	14
1.4.3. Introducción de la N- <u>terc</u> -butoxicarbonilvalina. Efecto de la piperidina sobre la tripeptidil-resina	15
1.5. Fotólisis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-O-CH ₂ -Nbb	18
1.6. Purificación de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-OH	22
1.6.1. Intento de prepurificación del crudo fotolítico	23
1.6.2. Condiciones cromatográficas analíticas utilizadas	25
1.6.3. Cromatografía semipreparativa	28
1.6.3.1. Cromatografía de alta presión	28
1.6.3.2. Cromatografía de media presión	34
1.6.4. Cromatografía de exclusión molecular	39
1.7. Evaluación del grado de epimerización durante el acoplamiento de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-OH sobre la H-Gly-O-CH ₂ -Nbb	40
1.7.1. Planteamiento del problema	40
1.7.2. Diseño de una nueva síntesis del tetrapéptido protegido para obtener péptido libre epimerizado	42

1.7.3. Análisis por gases/masas de los 2 péptidos	45
1.8. Acoplamiento de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-OH sobre la (5-64) -peptidil-resina	46
2. ESTUDIO DE LA FORMACION DE PEPTIDO-IMIDA EN LA SECUENCIA Asp-Gly DE LA H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH, FRAGMENTO 1-6 DE LA TOXINA II DEL ESCORPION "Androctonus australis Hector".....	47
2.1. Introducción	48
2.2. Elección del grupo protector	51
2.3. Preparación de la Boc-Val-Lys(OC1Z)-Asp(cHex)-Gly-Tyr(cHex)- Ile-O-CH ₂ -Pam, la Boc-Val-Lys(OC1Z)-Asp(Bzl)-Gly-Tyr(cHex)- Ile-O-CH ₂ -Pam y la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-Tyr(cHex)-Ile- O-CH ₂ -Pam	54
2.3.1. Soporte polimérico	54
2.3.2. Síntesis de derivados de aminoácidos	56
2.3.2.1. Síntesis del Fmoc-Asp(Bu ^t)-OH	56
2.3.2.2. Preparación del ácido <u>para</u> -(<u>terc</u> -butoxicarbonili- soleuciloximetil)fenilacético	57
2.3.3. Síntesis de las distintas peptidil-resinas	58
2.4. Obtención del péptido y la peptidil-imida libres	60
2.4.1. Desprotección y liberación del péptido de la resina	60
2.4.2. Síntesis de la imida a partir de la peptidil-resina <u>18</u> ..	60
2.5. Comportamiento cromatográfico de los péptidos estudiados	61
2.5.1. Cromatografía analítica	61
2.5.2. cromatografía preparativa	68
2.6. Caracterización del péptido y de la imida	68
2.6.1. Hidrólisis enzimática	68
2.6.2. Caracterización por métodos espectroscópicos	70
2.6.2.1. Resonancia magnética de protón	70
2.6.2.2. Espectroscopía infraroja	76
2.7. Estudio de la formación de peptidil-imida	76
2.7.1. Condiciones cromatográficas utilizadas	76
2.7.2. Influencia del medio ácido	78
2.7.2.1. Condiciones normales(fluoruro de hidrógeno,"High")	78
2.7.2.2. Distintas condiciones ácidas	80
2.7.3. Influencia del medio básico	82

2.7.3.1. En presencia de DIEA	82
2.7.3.2. En presencia de piperidina	84
2.8. Planteamiento de una nueva estrategia de síntesis. Utilización de un grupo protector estable al fluoruro de hidrógeno	88
2.8.1. Planteamiento de la estrategia	88
2.8.2. Preparación del β -ester de fluorenilmetilo del ácido N- <u>terc</u> -butoxicarbonilaspártico del Boc-Asp(^t Bu)-OH	90
2.8.2.1. Intentos de obtención del ester por el método del complejo de cobre	90
2.8.2.2. Obtención del ester por el método del complejo de boro	93
2.8.2.3. H-Val-Lys-Asp(Fm)-Gly-Tyr-Ile-OH. Obtención y estudio de formación de imida	95
2.8.2.4. Ensayos preliminares sobre el comportamiento de los grupos 3-picolilo y 4-picolilo en la formación de péptido-imida	96
3. ESTUDIO DE LA N-Benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)-benzoilamida COMO MODELO MONOMERICO DEL α -(4-bromometil-3-nitrobenzamido)-bencilpoliestireno	99
3.1. Introducción	100
3.2. Planteamiento del método	102
3.2.1. El análogo monomérico de la resina 4-bromometil-Nbb. La N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida	102
3.2.2. Elección de análogos	102
3.3. Síntesis de los derivados monoméricos	105
3.3.1. N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida	105
3.3.2. Preparación de los distintos análogos	107
3.4. Búsqueda de condiciones cromatográficas de trabajo	109
3.5. Estabilidad de la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida en dimetilformamida y dimetilacetamida	113
3.6. Estudio de la reacción entre el <u>terc</u> -butoxicarbonilglicinato de cesio y la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida	116
3.6.1. Ensayos previos	116
3.6.2. Cinética y mecanismo del acoplamiento	120
3.6.2.1. Condiciones utilizadas	120

3.6.2.2. Estudio cinético	120
3.6.3. Intentos de acoplamiento en Dioxano, cloruro de metileno y acetato de etilo	127
3.6.3.1. En presencia de DIEA	127
3.6.3.2. En presencia de éter 18-crown-6	129
3.7. Ensayos realizados de cara a una aplicación más general del método del éter corona	131
3.7.1. Ensayos con distintos aminoácidos	131
3.7.2. Nueva síntesis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-O-CH ₂ - Nbb	135
3.7.2.1. Acoplamiento del primer aminoácido	135
3.7.2.2. Incorporación del resto de aminoácidos	136
3.8. Aplicación del modelo monomérico al estudio de la liberación del péptido de la resina	137
3.8.1. El proceso fotoquímico	137
3.8.1.1. Metodología utilizada para la obtención de resul- tados	140
3.8.1.2. Ensayos en fase homogénea	142
3.8.1.3. Ensayos realizados en fase sólida	145
3.8.2. Hidrólisis básica del enlace ester	146
3.8.2.1. Mecanismo del ataque nucleófilo del alcoholato sobre la resina	149
3.8.3. Utilización de nucleófilos como reactivos para la libera- ción del péptido de la resina	150

PARTE EXPERIMENTAL

ABREVIATURAS	161
MATERIALES Y METODOS	
- Instrumentación	166
- Disolventes y reactivos	168

Métodos analíticos	
- Métodos analíticos en solución	171
- Análisis sobre la resina	172
- Análisis de aminoácidos	174
- fotólisis en fase homogénea y heterogénea	176
- Metodología de síntesis en fase solida	178
CROMATOGRAFIA LIQUIDA	
- Cromatografía de alta presión	182
- Instrumentación	182
- Columnas utilizadas	182
- Eluyentes y detección	183
- Cromatografía de media presión	184
- Instrumentación	184
- Columnas utilizadas	184
- Eluyentes y detección	185
1. SINTESIS DEL FRAGMENTO 1-4 DE LA TOXINA II DEL ESCORPION	
"Androctonus australis Hector"	
1.1. síntesis de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-OH	187
1.1.1. Intentos de síntesis del β -ester <u>terc</u> -butílico del ácido aspártico	187
1.1.1.1. A partir del complejo de cobre	188
1.1.1.2. Intento de síntesis a partir del complejo de boro del ácido aspártico	192
1.1.2. Síntesis de la Fmoc-Lys(Z)-OSu	194
1.1.3. Síntesis de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-OH	195
1.2. Síntesis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-O-CH ₂ -Nbb	196
1.2.1. Síntesis de la resina 4-bromometil-Nbb	196
1.2.2. Acoplamiento de la Boc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-OH y la Boc-Val-OH	197
1.3. Fotólisis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-O-CH ₂ -Nbb	198
1.4. Purificación del crudo fotolítico	199
1.5. Nueva síntesis del tetrapéptido protegido. eliminación del grupo amino con piperidina al 50 % en DCM	200
1.6. estabilidad del enlace aminoácido-resina en presencia de piperidina	201

1.6.1.	Evaluación de H-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-X (X: OH o piridilo) liberado durante el tratamiento de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-O-CH ₂ -Nbb con piperidina	202
1.7.	Formación de dicetopiperazinas en el acoplamiento del Fmoc-Asp(Bu ^t)-OH sobre la H-Gly-O-CH ₂ -Nbb	203
1.8.	Evaluación del grado de epimerización durante el acoplamiento de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-OH sobre la H-Gly-O-CH ₂ -Nbb	203
1.8.1.	Utilización del HOOBt como agente acoplante	203
1.8.2.	Acoplamiento del dipéptido protegido en ausencia de catalizador	204
1.8.3.	Acoplamiento de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-OH en presencia de DMAP	205
1.8.3.1.	Síntesis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-OH	205
1.8.3.2.	Identificación de los estereoisómeros por gases/masas.....	207
1.9.	Acoplamiento de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-OH sobre el fragmento 5-64 de la toxina	207
2.	ESTUDIO DE LA FORMACION DE PEPTIDO-IMIDA EN LA SECUENCIA Asp-Gly de la H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH, FRAGMENTO 1-6 DE LA TOXINA II DEL ESCORPION "Androctonus australis Hector"	
2.1.	Síntesis de derivados de aminoácidos	210
2.1.1.	Síntesis del ácido 4-(N- <u>terc</u> -butoxicarbonilisoleuciloximetil)fenilacético	210
2.1.1.1.	Acido 4-bromometilfenilacético	210
2.1.1.2.	4-bromometilfenilacetato de fenacilo	210
2.1.1.3.	Preparación del ácido 4-(N- <u>terc</u> -butoxicarbonilisoleuciloximetil)fenilacético	211
2.1.2.	Síntesis del Fmoc-Asp(Bu ^t)-OH	212
2.1.2.1.	Preparación de la fluorenilmetoxycarbonilazida ...	212
2.1.2.2.	Síntesis del Fmoc-Asp(Bu ^t)-OH	213
2.2.	Preparación de las distintas peptidil-resinas	214
2.2.1.	Incorporación de la Boc-Phe-OH a la resina aminometilada	214
2.2.2.	Síntesis de la Boc-Val-Lys(OC1Z)-Asp(Bz)-Gly-Tyr(cHex)-ILE-O-R (18) y la Boc-Val-Lys(OC1Z)-Asp(cHex)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-R (16)	215

2.2.3. Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-R (17)	216
2.3. H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH y H-Val-Lys-Asu-Gly-Tyr-Ile-OH .	216
2.4. Evaluación de la formación de péptido-imida en las distintas condiciones	218
2.4.1. Consideraciones generales y experimentos preliminares .	218
2.4.1.1. Comprobación de la equivalencia entre las relaciones area/nmol del péptido y la imida	218
2.4.1.2. Ensayo de la estabilidad de la imida en solución acuosa de AcOH	219
2.4.1.3. Obtención de los péptidos "α" y "β" a partir de la imida	219
2.4.2. Ensayos realizados en medio ácido antes de la liberación del péptido de la resina	220
2.4.2.1. Tratamiento de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-)-CH ₂ -Pam con Boc-Val-OH	220
2.4.2.2. Desprotección de la cadena lateral del ácido aspártico en la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-Tyr-Ile-O-CH ₂ -Pam	220
2.4.3. Métodos utilizados para la liberación del péptido de la resina	220
2.4.3.1. tratamiento con fluoruro de hidrógeno (High)	221
2.4.3.2. Tratamiento con fluoruro de hidrógeno (Low-High)...	221
2.4.3.3. tratamiento con TFMSA	221
2.4.4. Ensayos realizados en medio básico	222
2.4.4.1. Tratamiento de las tres hexapeptidil-resinas con DIEA	222
2.4.4.2. Tratamiento de las tres hexapeptidil-resinas con piperidina	223
2.4.4.3. Obtención e identificación de las dos piperididas a partir de la imida	222
2.4.4.4. Tratamiento de la peptidil-resina 18 con TEA	223
2.5. síntesis del Boc-Asp(Fm)-OH	223
2.5.1. Intentos de síntesis del H-Asp(Fm)-OH	223
2.5.1.1. A partir del complejo de cobre del ácido aspártico	223
2.5.1.2. A partir del complejo de boro del ácido aspártico.	226

2.5.2. Preparación del Boc-Asp(Fm)-OH	228
2.6. Utilización de los grupos fluorenilmetilo, 3-picolilo y 4-picolilo para la síntesis de H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH. Ensayos realizados para minimizar la formación de succinimida	230
2.6.1. Boc-Val-Lys(OC1Z)-Asp(Fm)-Gly-Tyr(OBrZ)-Ile-O-R, Boc-Val-Lys(OC1Z)-Asp(3-Pic)-Gly-Tyr(OBrZ)-Ile-O-R y Boc-Val-Lys(OC1Z)-Asp(4-Pic)-Gly-Tyr-Ile-O-R. Síntesis	230
2.6.2. Ensayos de desprotección realizados	231
2.6.2.1. Eliminación del grupo fluorenilo	232
2.6.2.2. Eliminación de los grupos picolilo	232
3. ESTUDIO DE LA N-Benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida COMO MODELO MONOMERICO DEL α -(4-bromometil-3-nitrobenzamido)-bencilpoliestireno	
3.1. Síntesis de los derivados estudiados	234
3.1.1. N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida	234
3.1.1.1. Preparación de la N-benzhidrilformamida	234
3.1.1.2. Obtención del hidrocloruro de benzhidrilamina	235
3.1.1.3. N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida (29).....	236
3.1.2. N-benzhidril-(4- <u>terc</u> -butoxicarbonilgliciloximetil-3-nitro)benzoilamida	237
3.1.3. N-benzhidril-(4- <u>terc</u> -butoxicarbonilproliloximetil-3-nitro)benzoilamida	238
3.1.4. N-benzhidril-(4-formiloximetil-3-nitro)benzoilamida	239
3.1.5. N-benzhidril-(4-acetoximetil-3-nitro)benzoilamida	240
3.1.6. N-benzhidril-(4-hidroximetil-3-nitro)benzoilamida	241
3.1.7. N-benzhidril-(4-metoximetil-3-nitro)benzoilamida	242
3.1.8. N-benzhidril-(4-dimetilaminometil-3-nitro)benzoilamida .	243
3.1.9. N-benzhidril-(4-N-piperidinometil-3-nitro)benzoilamida .	244
3.1.10. N-benzhidril-(4-etiltiometil-3-nitro)benzoilamida	245
3.1.10.1. Intento de síntesis en presencia de TEA	246
3.1.10.2. Caracterización de la sal de tetraalquilamonio ..	247
3.2. Ensayos de estabilidad de la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida en DMF y DMA	248
3.3. Ensayos previos de la reacción entre la N-benzhidril-(4-	

bromometil-3-nitro)benzoilamida y la sal de cesio de la Boc-Gly-OH. Estudio comparativo entre ésta y las sales de cesio del ácido acético, ácido fórmico y la Boc-Pro-OH	248
3.4. Estudio cinético de la reacción de acoplamiento	250
3.4.1. Determinaciones cinéticas realizadas en DMF	250
3.4.1.1. Evaluación de las constantes de velocidad	250
3.4.1.2. Medición de la absorbancia de la mezcla de reacción	251
3.4.1.3. Caracterización de la N-benzhidril-(4-formilmetil-3-nitro)-benzoilamida	251
3.4.2. Determinaciones cinéticas realizadas en DCM, AcOEt y dioxano	252
3.4.2.1. Acoplamiento en presencia de DIEA	252
3.4.2.2. Acoplamiento en presencia de eter 18-crown-6	253
3.4.2.3. Acoplamiento de distintos aminoácidos por el método del éter corona	254
3.5. Síntesis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-OH por el método del éter corona	255
3.5.1. Síntesis de la Boc-Gly-O-CH ₂ -Nbb	255
3.5.2. Obtención del tetrapéptido protegido	256
3.6. Experimentos de fotólisis	256
3.6.1. Fotólisis en solución	256
3.6.2. Ensayos realizados en fase sólida	257
3.7. Hidrólisis básica del enlace ester	258
3.7.1. Preparación de la Boc-Gly-O-Me y la Boc-Pro-O-Me	258
3.7.1.1. Boc-Gly-O-Me	258
3.7.1.2. Boc-Pro-O-Me	259
3.7.2. Ensayos de hidrólisis básica	260
3.7.3. Ensayos de liberación de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu ^t)-Gly-OH	261
3.8. Reactividad del enlace ester frente a distintos nucleófilos ..	261
3.8.1. Ensayos preliminares de estabilidad del enlace ester ...	261
3.8.2. Estudio de la liberación de Boc-Gly-OH y Boc-Pro-OH con distintos nucleófilos de la	262
CONCLUSIONES	264

BIBLIOGRAFIA 272

OBJETIVOS

Como se puede comprobar por la cantidad de ejemplos que se han descrito y siguen describiéndose en la literatura, la síntesis en fase sólida se ha erigido como un método extremadamente eficaz para la obtención de péptidos en el laboratorio. No es difícil de imaginar, sin embargo, que su aplicación conlleva problemas de diversa índole.

Por un lado, desde el punto de vista de la molécula a sintetizar, si tenemos en cuenta que de la veintena aproximada de aminoácidos que podemos encontrar en la naturaleza, la mayor parte poseen cadenas laterales funcionalizadas ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, etc.), resulta evidente la utilización de un esquema de protectores cuya estabilidad sea lo suficientemente elevada durante la síntesis como para evitar la desprotección prematura de los grupos funcionales y, como resultado, la aparición de reacciones secundarias provocadas por éstos. Con respecto al soporte polimérico, el acoplamiento del primer aminoácido puede no ser cuantitativo, debido a procesos competitivos que pueden dar lugar a otro tipo de centros, susceptibles, en algunos casos, de provocar posteriores reacciones de acoplamiento, para obtener cadenas de menor tamaño, supproductos que pueden interferir seriamente en la purificación del péptido deseado. Por otro lado, no hay que olvidar la estabilidad del enlace péptido-resina durante el proceso sintético, especialmente en la obtención de péptidos de gran tamaño.

Un ejemplo al que se le pueden aplicar todas estas consideraciones lo constituye el tetrapéptido H-Val-Lys-Asp-Gly-OH, correspondiente a un fragmento perteneciente a la toxina II del escorpión *Androctonus australis* Hector, molécula sintetizada recientemente en nuestro laboratorio por el método de condensación de fragmentos. Dicho frag-

mento presenta el doblete Asp-Gly, el cual da lugar a la formación de una imida cíclica entre la cadena lateral del ácido aspártico y el átomo de nitrógeno de la glicina. Esta secuencia se ha mostrado como una de las más sensibles a dicha reacción secundaria, por lo que se le ha dedicado numerosos estudios, obteniéndose como conclusión principal una dependencia de la ciclación con el grupo protector utilizado para el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido aspártico. Debido a la estrategia empleada para la síntesis de la toxina antes mencionada, la obtención del fragmento requería la utilización de un soporte polimérico que permitiera la síntesis del tetrapéptido totalmente protegido; en este caso concreto se hizo uso del α -4(bromometil-3-nitrobenzamido)bencilpoliestireno (de forma abreviada, resina Nbb), el cual permite la liberación del péptido mediante fotólisis. Su aplicación no ha estado exenta de problemas; así, en numerosos casos se han obtenido funcionalizaciones diferentes para un mismo aminoácido y condiciones similares de reacción. Por otro lado, la incorporación del tercer aminoácido requiere la utilización de metodologías especiales de acoplamiento para evitar una pérdida importante de producto, debido a la formación de dipéptidos cíclicos, acompañada de la rotura del enlace péptido-resina.

No cabe duda de que un conocimiento profundo del polímero y una elección adecuada de los grupos protectores para los diferentes aminoácidos funcionalizados resultan indispensables para alcanzar la meta deseada. La aplicación de estas premisas al péptido anteriormente citado, en un intento de buscar una solución a los problemas planteados más arriba, quedan reflejadas en la presente Tesis Doctoral, cuyos objetivos han consistido en la síntesis del tetrapéptido en cuestión (fragmento 1-4 de la toxina), el estudio de la formación de péptido-imida en la secuencia Asp-Gly para este caso concreto y el estudio de la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)-benzoilamida como modelo monomérico de la resina Nbb, de cara a su aplicación en solución y poder acceder, de esta forma, a un conocimiento más exhaustivo de este soporte polimérico (reactividad, estabilidad, etc.). En el momento en que se pase a discutir cada uno de los 3 objetivos, se hará una breve introducción sobre el tema en cuestión.

1. SINTESIS DEL FRAGMENTO 1-4 DE LA TOXINA II DEL ESCORPION
"Androctonus australis Hectór"

1.1. Introducción

Una de las líneas más importantes que se han venido desarrollando en nuestro laboratorio desde sus comienzos ha sido el estudio y aplicación de la síntesis en fase sólida por condensación de fragmentos^{1,2} para la obtención de proteínas. Esta metodología, ya sugerida por Marshall en 1965³, supone la síntesis de fragmentos peptídicos protegidos, su purificación y posterior acoplamiento para formar el péptido deseado; dicho proceso, como es natural, facilita la purificación final del péptido, cosa que no ocurre en la síntesis convencional etapa por etapa. Con este objetivo se ha desarrollado un nuevo soporte polimérico, el α -(4-bromometil-3-nitrobenzamido)benzilpoliestireno (**1**) (denominado de forma abreviada resina 4-bromometil-Nbb) (figura 1-1)¹, al cual queda unido el primer aminoácido a través de un enlace

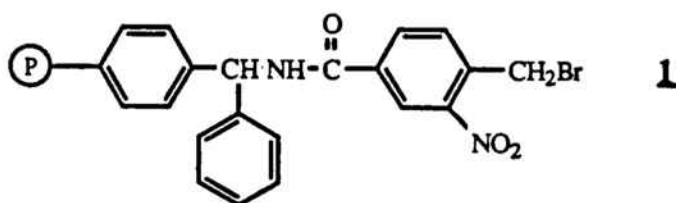


figura 1-1

éster; de esta forma, el péptido puede ser liberado del soporte polimérico irradiando a 350 nm, quedando de esta forma los grupos protectores inalterados. Esta estrategia se ha aplicado a la síntesis de la toxina II del escorpión *Androctonus australis* Hector, la cual se ha dividido en ocho fragmentos cuya elección ha venido determinada por la

naturaleza del aminoácido carboxilo terminal (prolina o glicina) con objeto de evitar posibles problemas de racemización a la hora de acoplar los fragmentos peptídicos⁴. En la figura 1-2 aparecen indicados dichos fragmentos, cuya síntesis en todos los casos ya ha sido concluida en estos momentos ((1-4)⁴, (32-34), (53-59)⁵; (44-52)⁶; (35-43)⁷; (5-17), (18-31)⁸; (59-64) pendiente de publicación).

Uno de los objetivos de la presente tesis ha sido la síntesis del fragmento amino terminal (1-4) H-Val-Lys-Asp-Gly-OH, la cual va a ser comentada en este Capítulo.

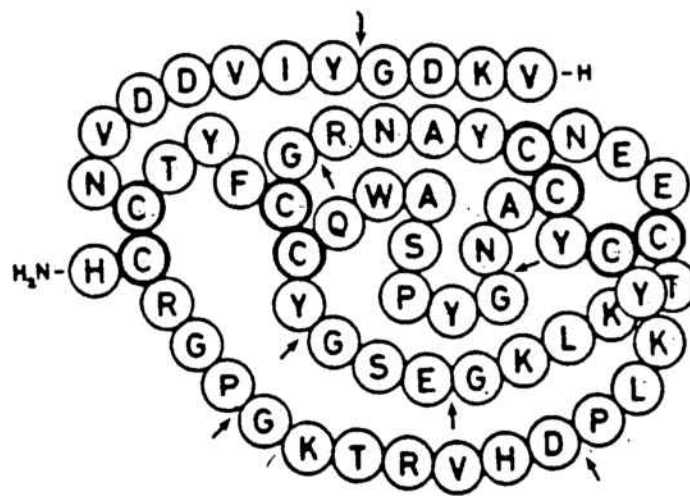


figura 1-2

1.2. Consideraciones sintéticas preliminares

Antes de proceder a la síntesis de este tetrapéptido convenientemente protegido (10) es necesario realizar algunas consideraciones sobre la resina y el propio péptido con objeto de intentar minimizar la formación de subproductos que se puedan formar debido a la elevada reactividad del átomo de carbono metilénico del grupo 4-bromometil-3-nitrobenzoilo y a la facilidad con que este sistema puede actuar como grupo saliente en reacciones de sustitución (sobre el primer punto se discutirá ampliamente en el Capítulo 3).

Con respecto al péptido que se va a sintetizar, hay que destacar la presencia de la secuencia Asp-Gly, la cual es susceptible, como se discutirá extensamente en el Capítulo 2, de dar lugar a la formación de imidas cíclicas entre estos dos aminoácidos, lo cual puede provocar una disminución considerable en el rendimiento de la síntesis. Se han descrito en la literatura numerosos grupos protectores para la cadena lateral del ácido aspártico; de los estudios realizados hasta ahora se ha podido comprobar que la posible solución a este problema sería la desprotección de la cadena lateral de este aminoácido, como paso previo al tratamiento ácido de la peptidil-resina (fluoruro de hidrógeno normalmente) para llevar a cabo la liberación del péptido del soporte polimérico y la eliminación de los grupos protectores. Por ello, en el presente trabajo, se ha elegido el grupo terc-butilo como protector, ya que puede ser eliminado fácilmente con ácido trifluoroacético. La introducción de esta variante conlleva a utilizar una estrategia de grupos fluorenilmetoxicarbonilo, lábiles a las bases, en la posición amino terminal para abordar la síntesis del tetrapéptido. Este procedimiento plantea el primer problema grave con respecto a la

resina 4-oximetil-Nbb debido a la gran facilidad que posee de formar dicetopiperacinas como productos secundarios.

Este subproducto se forma con facilidad al desproteger la posición amino terminal del segundo aminoácido, proceso que se ve acompañado por una ciclación intramolecular (figura 1-3), con la rotura

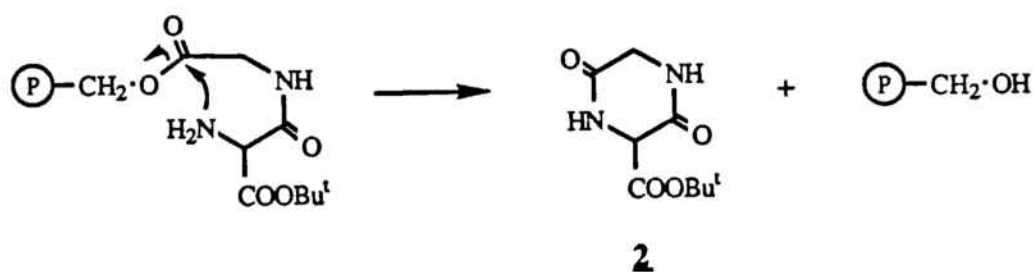


figura 1-3

simultanea del enlace péptido-resina, para dar lugar a la dicetopiperacina correspondiente al dipéptido unido a la resina (2) y, de esta forma, provocar una pérdida elevada de cadenas peptídicas⁹. Así, los ensayos realizados sobre la resina Fmoc-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb han dado como resultado entre un 40 y un 45% de pérdida de funcionalización al desproteger con una solución del 20% de piperidina en dimetilformamida durante 10 min (condiciones normalmente utilizadas). En 1975, Suzuki¹⁰ describió un método para minimizar esta reacción secundaria durante la síntesis peptídica sobre una resina O-CH₂-poliestireno-(co-2%-divinilbenceno), siguiendo una estrategia de terc-butoxicarbonilaminoácidos, por el cual se mantenía en condiciones ácidas (ácido clorhídrico 4 N) el grupo amino terminal protonado. En el caso que nos ocupa, esto no se puede llevar a cabo ya que el tratamiento con base es inevitable, lo que hace necesaria la aplicación de otra metodología. Puesto que la introducción del tercer aminoácido no es factible, se planteó la síntesis del péptido protegido en tres etapas, es decir, H-Gly-OH, Fmoc-Lys(Z)-Asp-(Bu^t)-OH y Boc-Val-OH. Por lo tanto, con este objetivo, se ha llevado a cabo la síntesis en solución del fragmento dipéptidico protegido antes mencionado, como paso previo a la síntesis del tetrapéptido 10.

1.3. Síntesis del Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH

El β -éster de terc-butilo del ácido aspártico es un producto comercial pero de precio muy elevado, debido a que el método clásico de obtención, dejando de lado la propia síntesis de un éster de terc-butilo, la cual no está exenta de dificultades, implica numerosas etapas, ya que se basa en la protección selectiva previa del aminoácido y posterior esterificación, seguida, en muchos casos, de la eliminación de grupos protectores introducidos desde un principio, por requerirlo así la utilización posterior del derivado del aminoácido.

En el presente trabajo se han llevado a cabo varios intentos de obtención de dicho producto, utilizando distintos procedimientos para la protección temporal de los grupos funcionales amino y carboxilo en " α " que pudieran simplificar la síntesis; en este sentido, se ha ensayado la utilización de complejos de cobre y boro. Ninguno de estos intentos ha permitido el aislamiento de cantidades significativas del producto deseado. En la parte experimental se ha realizado una breve introducción sobre los métodos de esterificación utilizados; la aplicación de los complejos de cobre y boro se desarrollará más extensamente a la hora de comentar la síntesis del β -éster de fluorenilmetilo del ácido aspártico (ver Capítulo 2).

1.3.1. *Síntesis del éster hidroxisuccinimídico de la N ϵ -benciloxycarbonil-N α -fluorenilmetoxycarbonil-lisina*

El acoplamiento de la N ϵ -benciloxycarbonil-N α -fluorenilmetoxycarbonil-lisina sobre el β -éster terc-butílico del ácido aspártico para dar lugar al dipéptido protegido **4** (figura 1-4) se ha realizado por el método del éster activo. Para ello se ha elegido como reactivo la N-hidroxisuccinimida^{11,12}, a través de la cual se ha obtenido el éster correspondiente^{13,14} al derivado de la lisina mencionado ante-

riormente (3), siendo la dicitclohexilcarbodiimida el agente deshidra-
tante.

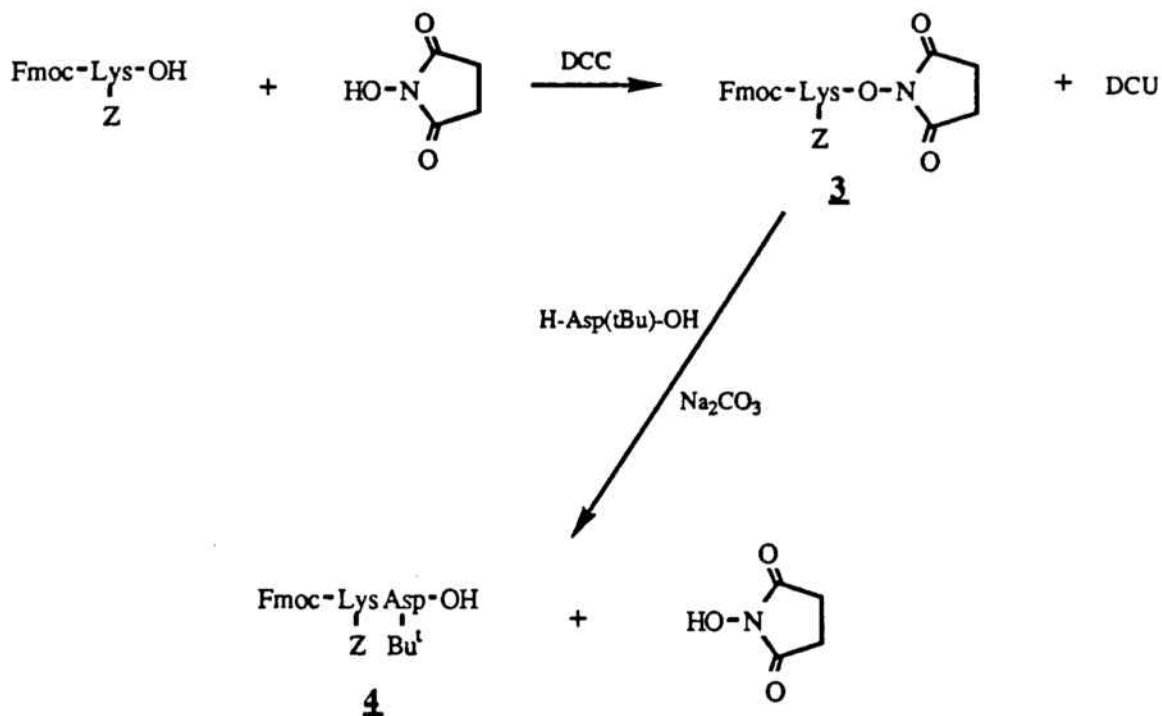


figura 1-4

Junto con el N-hidroxibenzotriazol (del cual se hablará más adelante al comentar la posibilidad de racemización durante el acoplamiento del dipéptido protegido 4 sobre la aminoacil-resina 7 (figura 1-8), la N-hidroxisuccinimida es uno de los reactivos más utilizados en este tipo de reacciones debido a que minimiza los procesos de formación de N-acilureas y racemización. Weygand y col.¹⁵ encontraron que la utilización de 2 eq de reactivo a -20°C en tetrahidrofurano reducía la epimerización a niveles por debajo del 1%; Zimmermann y col.¹⁶, por otro lado, hallaron que con 1.1 eq y a temperatura ambiente no se detectaba la formación del epímero. Por este motivo, la síntesis del ester activo 3 se llevó a cabo con 1 eq de N-hidroxisuccinimida y manteniendo la temperatura entre 0°C y 4 °C. En estas condiciones, una vez cristalizado el producto, se obtuvo con un rendi-

miento del 75% (Figura 1-4).

1.3.2. Síntesis de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH

El dipéptido protegido se preparó a partir del ester activo 3, cuya síntesis se ha descrito en el apartado anterior, en presencia de carbonato sódico y utilizando como disolvente una mezcla de dioxano y agua, obteniéndose el producto con un rendimiento del 82% (Figura 1-4). En este caso concreto, la obtención del producto se ve facilitada por el hecho de utilizar N-hidroxisuccinimida, ya que este producto, el cual se libera durante la formación del enlace peptídico, es soluble en agua, con lo que puede ser extraído fácilmente.

1.4. síntesis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb

Para la realización de todos los ensayos descritos en esta Tesis, así como la síntesis de la tetrapeptidil-resina 10 (figura 1-8), se han utilizado dos lotes de resina 4-bromometil-Nbb de distinta funcionalización. Estos dos soportes poliméricos se han obtenido a partir de resinas benzhidrilamina en forma de clorhidrato (5, figura 1-5) de funcionalización 0.72 meq/g y 1.1 meq/g, las cuales, una vez neutralizada la amina, se han hecho reaccionar con anhídrido 4-bromometil-3-nitrobenzoico¹⁷, previamente preparado a partir del correspondiente ácido (6) en presencia de dicitclohexilcarbodiimida. La funcionalizaciones teóricas de las resinas así obtenidas son 0.59 meq/g y 0.86 meq/g. Con objeto de bloquear los posibles grupos amino que no hubieran reaccionado, se ha acetilado, previamente a la incorporación de la terc-butoxicarbonilglicina, con anhídrido acético en presencia de

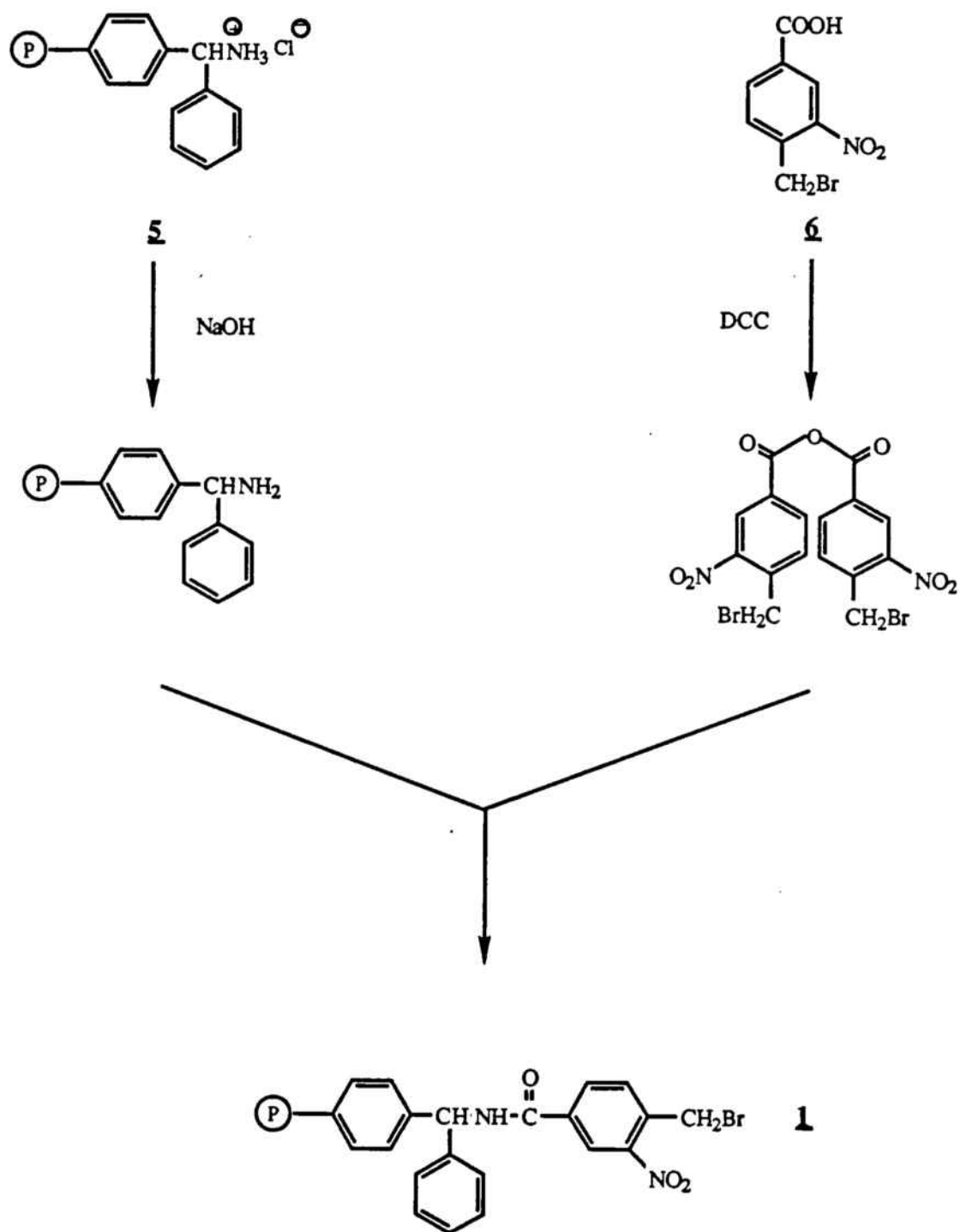


figura 1-5

diisopropiletilamina. No obstante, los valores de funcionalización anteriormente mencionados se han utilizado como referencia para evaluar los distintos grados de incorporación para todos los experimentos que se han llevado a cabo.

1.4.1. *Acoplamiento del primer aminoácido*

El método más comunmente utilizado para la introducción del primer aminoácido sobre la resina 4-bromometil-Nbb es el de la sal de cesio. Este procedimiento supone la formación previa de dicha sal por reacción del correspondiente aminoácido con carbonato de cesio, seguida de reacción sobre el polímero para dar lugar al ester, liberando bromuro de cesio, el cual se separa del medio de reacción mediante sucesivos lavados con dimetilformamida. Gisin y col.^{18,19} introdujeron este método argumentando que la voluminosidad del catión daba un carácter más lipófilo a la sal, de tal manera que aumentaba su compatibilidad con la resina; por otro lado, la disociación de la sal en un disolvente polar como la dimetilformamida estaría más favorecida. Esta última hipótesis ha sido demostrada recientemente²⁰ a través de estudios realizados por resonancia magnética nuclear de ^{133}Cs , los cuales han demostrado que el catión está solvatado por completo en disolventes polares apróticos como la dimetilformamida o el dimetilsulfóxido, favoreciéndose de esta manera el ataque del ión carboxilato sobre el carbono bencílico de la resina.

Desde un punto de vista de rendimiento en el acoplamiento, la presencia de otros nucleófilos en el medio podría competir con el proceso deseado, debido a la especial reactividad de la posición anteriormente mencionada, (grupos nitro y amida en las posiciones orto y para del anillo aromático; en el Capítulo 3 se hace un estudio más detallado de este problema). La dimetilformamida, en este sentido, puede resultar perjudicial debido a la dificultad que supone llevar a cabo su purificación por su baja estabilidad. De forma preliminar, para comprobar

este resultado, se realizó la síntesis de distintos lotes de resinas Boc-Gly-O-CH₂-Nbb en dimetilformamida cuyo ensayo de aminas²¹ osciló entre 0.05 y 0.06 (normalmente se recomienda utilizar este disolvente para la síntesis de péptidos con un valor de dicho análisis por debajo de 0.15). En la Tabla 1 se muestran algunos de los valores obtenidos.

Por otro lado, la consecución de todas estas reacciones fué confirmada por la ausencia "de centros reactivos" a las 16 h de exposición de la resina a la sal de cesio²², al no detectarse la presencia de iones bromuro por el método de Volhard²³.

DMF		DMA	
funcionalización final (meq/g)	rdto (%) (a)	funcionalización final (meq/g)	rdto (%) (a)
0.31 (b)	53	0.43 (c)	67
0.38 (b)	64	0.66 (d)	77
0.29 (c)	49	0.63 (e)	74
0.57 (d)	67		

(a) todos los rendimientos se han obtenido a partir de la funcionalización teórica de la resina Boc-Gly-OCH₂-Nbb, calculada, a su vez, tomando como dato base la funcionalización de la resina benzhidrilamina de partida; dichos valores han sido 0.72 meq/g ((b) y (c)) y 1.10 meq/g ((d) y (e)). Las condiciones de reacción han sido las siguientes: 30 min a 50°C + 19 h a temperatura ambiente ((b)), 16 h a temperatura ambiente ((c) y (d)) y 24 h a temperatura ambiente ((e)). En todos los casos, se han utilizado 1.2 eq de sal de cesio.

TABLA 1.- Distintos ensayos de acoplamiento de la Boc-Gly-OH sobre la resina 4-bromometil-Nbb en DMF y DMA por el método de la sal de cesio

Los resultados recogidos en la Tabla 1 sugieren, a priori, la posibilidad de dos factores que puedan influir en el descenso de la funcionalización. Por un lado, la reacción con el anhídrido 4-bromometil-3-nitrobenzoico podría no ser cuantitativa; por otro, los produc-

tos de descomposición de la dimetilformamida, como ya se ha comentado con anterioridad, podrían competir con el anión carboxilato como nucleófilos. Desde este punto de vista, una alternativa que podría resultar adecuada para minimizar este problema podría ser la utilización de la dimetilacetamida como disolvente, la cual posee una mayor estabilidad con respecto a la dimetilformamida²⁴. Como se puede comprobar en la Tabla 1, se han obtenido niveles de funcionalización comparables o más elevados con este disolvente frente a los alcanzados con dimetilformamida. En la misma Tabla se presenta el resultado obtenido para un tratamiento de 24 h con objeto de ensayar la estabilidad del enlace aminoácido-resina en el disolvente; como se puede observar al comparar este valor con el obtenido a las 16 h, hay una disminución del 4% aproximadamente en el grado de funcionalización, lo cual podría ser explicado de la misma manera que para el caso de la resina 4-bromometil-Nbb si tenemos en cuenta la susceptibilidad que puedan tener el aminoácido o péptido protegidos a ser liberados de la resina a través de un ataque nucleófilo. Sobre esta posibilidad se volverá a insistir más adelante.

A la vista de los resultados obtenidos y de cara a evitar posibles problemas, se ha utilizado la Boc-Gly-O-CH₂-Nbb obtenida en condiciones más suaves (24 h a temperatura ambiente y empleando como disolvente dimetilacetamida) para la síntesis de la tetrapeptidil-resina 10. Esta aminoacil-resina ha resultado tener una funcionalización de 0.63 meq/g. Posteriormente a su obtención, se ha acetilado para bloquear los posibles centros reactivos que hubieran permanecido inalterados.

1.4.2. Acoplamiento de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH

El acoplamiento del dipéptido protegido 4 sobre la aminoacil-resina 7 se ha llevado a cabo con diciclohexilcarbodiimida en presencia de N-hidroxibenotriazol, utilizando como disolvente dimetilformamida. El N-

hidroxibenzotriazol, introducido por König y Geiger en 1970²⁵⁻²⁷, se ha utilizado, al igual que la N-hidroxisuccinimida para la síntesis del dipéptido protegido en solución, con objeto de evitar la recemización y la formación de N-acilurea. El proceso transcurre a través del éster de hidroxibenzotriacilo, el cual es objeto de ataque nucleófilo por parte del grupo amino del aminoácido unido a la resina.

En este caso concreto, la reacción de acoplamiento se siguió por el ensayo de la ninhidrina (ver parte experimental). Puesto que al cabo de 24 h el test siguió dando debilmente positivo, no observándose una diferencia significativa con respecto al ensayo anterior realizado a las 14 h, se filtró y lavó la resina para evaluar el acoplamiento por cuantificación de grupos fluorenilmetoxicarbonilo, dando como resultado un 98% de rendimiento. Dado que el ensayo de la ninhidrina no fué lo suficientemente claro, se aprovechó la síntesis de un nuevo lote de tetrapeptidil-resina 10 (con objeto de ser usado para buscar unas buenas condiciones de purificación y realizar distintas pruebas) para seguir la reacción de acoplamiento mediante hidrólisis y análisis de aminoácidos de la peptidil-resina, encontrándose un rendimiento del 100% a las 12 h de tratamiento. La funcionalización del producto final (9, figura 1-8), calculada a través de estas determinaciones, fué de 0.50 meq/g.

1.4.3. *Introducción de la N-terc-butoxicarbonilvalina. Efecto de la piperidina sobre la peptidil-resina*

La utilización de piperidina para la desprotección de la posición amino terminal de una fluorenilmetoxicarbonilpeptidil-resina se fundamenta en el carácter básico del reactivo, el cual extrae el protón de la posición metínica del grupo fluorenilmetilo para dar lugar a la formación de dibenzofulveno, que, a su vez, sufre un ataque posterior del mismo reactivo, obteniéndose finalmente fluorenilmetilpiperidina.

Este comportamiento ambivalente de la piperidina podría repercutir también en la peptidil-resina ya que el enlace éster con el

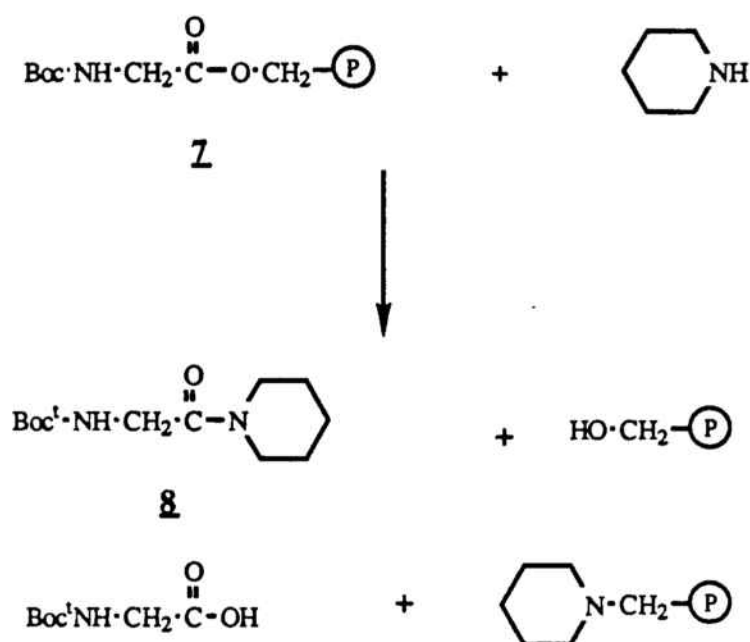


figura 1-6

polímero podría no ser lo suficientemente estable, situación que provocaría una liberación prematura de cadenas peptídicas en detrimento del rendimiento final de la síntesis. Basándose en estas consideraciones, se realizó un ensayo preliminar con Boc-Gly-O-CH₂-Nbb (f: 0.38 meq/g), la cual se trató con piperidina/dimetilformamida (1:1) durante 24 h, encontrándose por hidrólisis y análisis de aminoácidos la pérdida total de funcionalización después de realizar una hidrólisis directa con ácido clorhídrico 6 N. Una muestra del filtrado de la reacción se trató con ácido trifluoroacético y se sometió a análisis de aminoácidos, obteniéndose un 14% de aminoácido con respecto al total, lo cual indica un ataque predominante de la piperidina sobre el grupo carbonilo de la función amida para dar lugar a la N-terc-butoxicarbonylglicilpiperidina 8 (Figura 1-6).

Este resultado hizo plantear el estudio de la cinética de liberación del aminoácido en las condiciones usuales de desprotección de la posición amino terminal. Así, una aminoacil-resina de 0.43 meq/g de funcionalización se trató con piperidina al 20% en dimetilformamida

durante distintos tiempos y el filtrado resultante se sometió a análisis de aminoácidos, previo tratamiento con ácido trifluoroacético para liberar el grupo amino del aminoácido, obteniéndose los valores que se representan en la Figura 1-7.

De los resultados obtenidos se deduce que, si tenemos en cuenta los 10 min de tratamiento con piperidina por ciclo de desprotección, puede haber una pérdida de funcionalización del 0.5%. Con objeto de averiguar si la naturaleza de la molécula unida al polímero podía influir frente a esta reacción secundaria, se llevó a cabo la cinética de liberación de H-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-X (X: OH o piperidina) durante el tratamiento con piperidina de la tripeptidil-O-CH₂-Nbb correspondiente(9), obteniéndose un 3% aproximadamente de péptido liberado a los 10 min, lo que supone unas seis veces más que para la Boc-Gly-O-

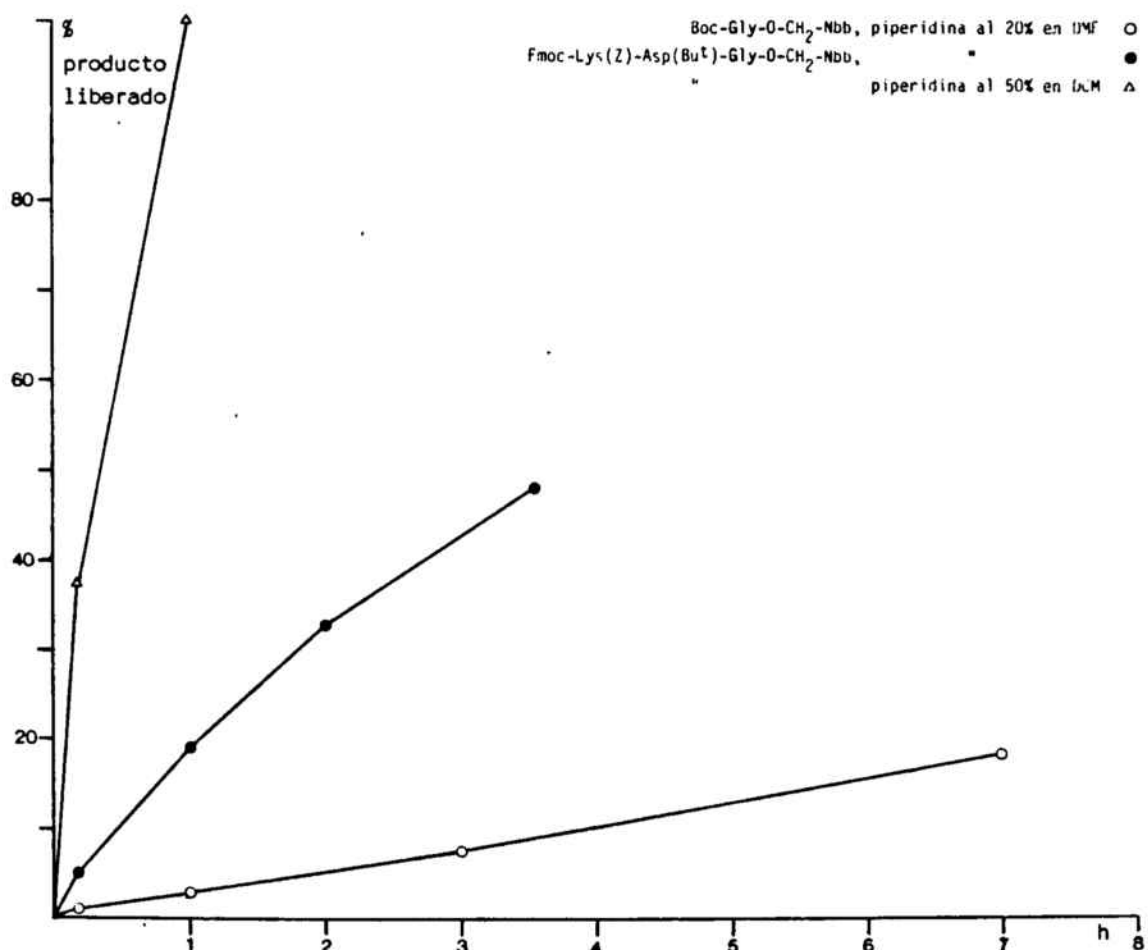


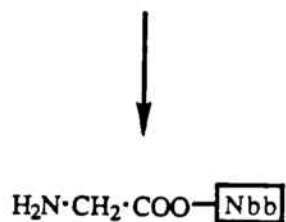
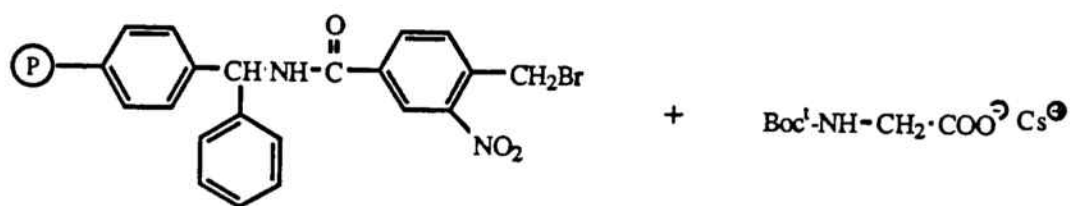
figura 1-7

CH₂-Nbb ($k_{obs} = 4.04 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ y $2.91 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, para la aminoacil-resina y para la tripeptidil-resina respectivamente). Hasta estos momentos no se ha encontrado una explicación convincente a este fenómeno, pudiendo ser una de las posibles causas la participación del grupo amino terminal del tripéptido protegido como catalizador del proceso. De cara a intentar minimizar este efecto, se ensayó la desprotección del grupo amino con piperidina al 50% en cloruro de metileno, en cuyas condiciones sólo son necesarios 2 min para liberar el grupo fluorenilmetoxicarbonilo. Los resultados obtenidos (Figura 1-7) muestran un considerable aumento en la pérdida de funcionalización, siendo el tiempo de semireacción de unos 16 min ($k_{obs} = 7.09 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$), lo que supone una pérdida de un 8% aproximadamente a los 2 min, muy probablemente debido a un efecto de concentración de reactivo. Estas condiciones, por lo tanto, son incompatibles con la utilización de una resina de las características de la estudiada aquí. Las primeras condiciones citadas son mucho más aceptables (piperidina al 20% en DMF), aunque su empleo para la síntesis de péptidos largos puede ser problemática.

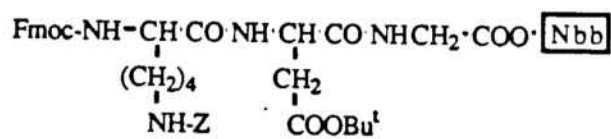
Volviendo a la síntesis de la tetrapeptidil-resina, una vez desprotegido el grupo amino terminal de ésta con piperidina al 20% en dimetilformamida, se acopló la terc-butoxicarbonilvalina por el método convencional para obtener el producto deseado, cuya funcionalización resultó ser de 0.45 meq/g (determinada por hidrólisis y análisis de aminoácidos) (Figura 1-8).

1.5. Fotólisis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb

La tetrapeptidil-resina se fotolizó dividiendo la cantidad total obtenida (2.2 g) en seis porciones distintas de peso comprendido entre 300 y 400 mg en casi todos los casos. Como fuente de irradiación se utilizaron dos o tres lámparas, según los casos, de luz negra de 125 W

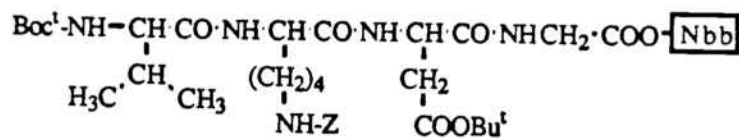


- 1) TFA
- 2) DIEA
- 3) Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH / DCC / HOBt



2

- 1) piperidina / DMF
- 2) Boc^t-Val-OH



10

figura 1-8

en el sistema diseñado en nuestro laboratorio que se describe en la parte experimental y que permite trabajar a distintas temperaturas. Con objeto de optimizar los resultados del proceso, las seis fotólisis se llevaron a cabo en distintas condiciones (Tabla 2). En todos los casos el contenido peptídico de los crudos de fotólisis fué superior al 90%.

Uno de los factores más importantes a tener en cuenta de cara a obtener buenos rendimientos de fotólisis es el hinchamiento de la resina en el disolvente utilizado⁷; desde este punto de vista, a través de investigaciones realizadas en nuestro laboratorio con anterioridad, se encontraron como condiciones más adecuadas una mezcla de 20% de trifluoroetanol en cloruro de metileno, resultado que se ha explicado por un efecto cooperativo entre los dos disolventes, es decir, el primero solvatando al péptido por la formación de puentes de hidrógeno y el segundo favoreciendo el hinchamiento de la trama polimérica. Otro de los factores que hay que tener en cuenta a la hora de mejorar el rendimiento es el efecto de la temperatura, hecho que podría tener como contrapartida la posible aparición de reacciones secundarias, especialmente en sistemas aromáticos tales como el de la tirosina y el triptófano, lo cual no nos afecta en nuestro caso. A este respecto, se realizaron dos fotólisis por encima de los 10°C (la temperatura que se ha utilizado normalmente ha oscilado entre 0°C y 10°C). Como podemos observar en la Tabla 2, si comparamos la tercera y la quinta fotólisis con la sexta, se observa una relación directa entre el rendimiento y la temperatura. La posible presencia de productos contaminantes con la elevación de la temperatura se analizó mediante cromatografía de alta presión (HPLC); los cromatogramas 1-1 y 1-2 se obtuvieron de los crudos fotolíticos de la primera y tercera fotólisis, observándose la presencia de un nuevo producto no peptídico, el cual no pudo ser identificado, con un tiempo de retención de aproximadamente 12 min (a lo largo de toda la Tesis, cada una de las representaciones cromatográficas vendrá identificada por la abreviatura c.n., donde "n" es el número de cada una de ellas). A pesar de esta dificultad adicional se consiguió la purificación del péptido con relativa facilidad, como se discutirá más adelante.

<u>lote(nº)</u>	<u>mg de resina/ml(a)</u>	<u>temperatura(°C)</u>	<u>tiempo(h)</u>	<u>rdto(%) (d)</u>	<u>mg de crudo</u>	<u>mg de resina fotolizada</u>
1(b)	4.1	0-10	8.5	51	90	319
2(c)	5.0	0-10	7.0	49	95	406
3(c)	4.1	25	16.0	82	127	287
4(c)	2.6	0-10	6.0	63	24	75
5(c)	4.0	12-13	16.0	75	96	291
6(c)	4.0	0-10	16.0	71	102	297

(a) 20% de trifluoroetanol en cloruro de metileno; la funcionalización de la tetrapeptidil-resina utilizada ha sido de 0.45 meq/g .
 (b) experimento realizado con 2 lámparas. (c) experimentos realizados con 3 lámparas. (d) los resultados han sido obtenidos por hidrólisis y análisis de aminoácidos.

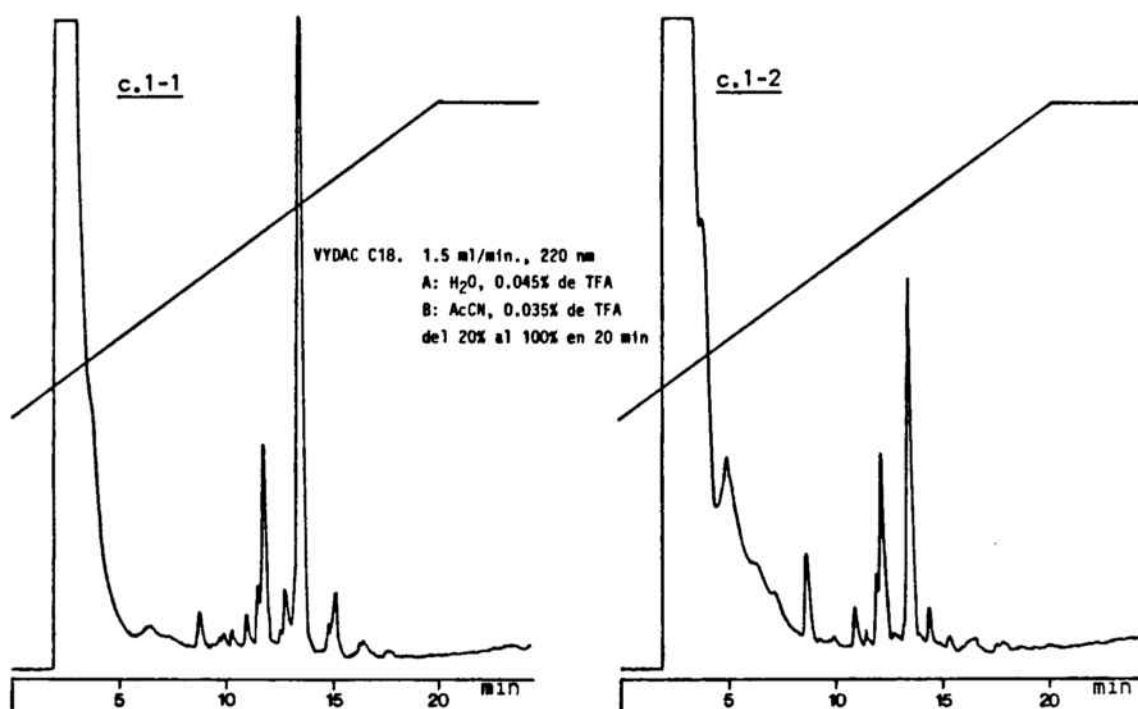
TABLA 2.- Condiciones utilizadas en la fotólisis de la resina Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb

La dependencia del rendimiento con la cantidad de resina a fotolizar quedó puesta de manifiesto en las fotólisis segunda y cuarta, de tal manera que, en este caso, un aumento de la concentración de resina dió lugar a una disminución en el rendimiento, explicable por un incremento en el grado de reticulación del polímero debido a la formación de compuestos azoicos y por su comportamiento como filtros de luz, disminuyendo así la intensidad de irradiación efectiva.

Otra de las modificaciones que se introdujeron es la utilización de una tercera lámpara para aumentar el nivel de irradiación; como se muestra en la Tabla 2 para los dos primeros experimentos, se obtuvieron rendimientos similares con tres lámparas empleando, por un lado, un tiempo de irradiación menor, y, por otro, utilizando un 25% más de tetrapeptidil-resina.

1.6. purificación de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH

La purificación de un péptido protegido puede abordarse de distintas maneras. Normalmente, la gran hidrofobicidad del producto hace que la cromatografía en fase reversa sea el método primordial a tener en cuenta, aunque la introducción de grupos protectores polares adecuados como el 3-picolilo o el 4-picolilo²⁸⁻²⁹ puedan hacer factible la utilización de la cromatografía de intercambio iónico, como se ha comprobado recientemente en nuestro laboratorio³⁰. Las investigaciones en el campo de la purificación de péptidos protegidos han tenido su principal objetivo en la cromatografía analítica de alta resolución (o de alta presión) (HPLC), siendo de más reciente utilización la cromatografía de media presión, a través de la cual se pueden abordar purificaciones a gran escala. En nuestro laboratorio, se están aplicando indistintamente estas dos metodologías (alta presión^{5,8,31}, media presión³²). Con respecto al estudio concreto que se ha llevado a



cabo en este trabajo, se han ensayado también estos dos métodos.

Desde otra filosofía muy distinta, la cromatografía de filtración molecular puede resultar muy conveniente. Esta se realiza por medio de geles compatibles con disolventes orgánicos tales como el metanol. Desde este punto de vista, los geles de Sephadex suelen dar buenos resultados, existiendo una amplia gama de éstos para ser utilizados en fase acuosa (G10, G25, etc.) y únicamente dos para eluyentes orgánicos (LH-20 y LH-60); la diferencia existente entre los miembros de cada categoría radica en su volumen de exclusión molecular. Para este estudio concreto se ha utilizado el LH 20³³⁻³⁵, cuyo volúmen de exclusión está situado sobre las 1000 unidades, ya que el peso del producto a purificar es de 707 g/mol.

1.6.1. intento de prepurificación del crudo fotolítico

Antes de llevar a cabo los diferentes ensayos de purificación con los distintos métodos cromatográficos mencionados más arriba, se in-

tentó realizar una prepurificación mediante el tratamiento del crudo fotolítico con distintos disolventes de cara a proceder a la separación del máximo número de impurezas al aprovechar su distinta solubilidad con respecto al fragmento peptídico. Estas pruebas se realizaron con los 90 mg de crudo peptídico obtenido en la primera fotólisis. Los resultados obtenidos con los distintos disolventes utilizados se muestran en la Tabla 3; la cuantificación del producto peptídico en cada fracción se llevó a cabo mediante hidrólisis y análisis de aminoácidos.

Por los resultados que se muestran en la Tabla 3 y los cromato-

disolvente	mg recuperados (a)	contenido en aminoácidos del crudo peptídico				% de péptido (b)
		Asp	Gly	Val	Lys	
hexano	--		--			--
eter(c)	13	0.79	1.03	0.94	1.25	9
DMF/H ₂ O(d)	40	1.01	1.03	0.94	1.03	42
DMF/H ₂ O(e)	36	0.96	1.19	0.89	0.98	49
DMF	90	1.11	1.04	0.89	0.95	100
MeOH	90			"		100

(a) resultados obtenidos con el crudo fotolítico del lote 1 (Tabla 1). (b) Estos valores han sido obtenidos mediante hidrólisis y análisis de aminoácidos de las distintas fracciones separadas de crudo peptídico, y están referidos a la cantidad total de péptido liberado en la fotólisis. (c) 15 ml. (d) precipitado al tratar el crudo con 10 ml de mezcla de disolventes (1:5). (e) producto disuelto en las mismas condiciones de (d).

**TABLA 3.- Intentos de prepurificación del
Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH**

gramas de HPLC obtenidos podemos concluir que en este caso concreto no resulta factible la prepurificación desde este punto de vista ya que el péptido estuvo presente en todas las fracciones; además, según se comprobó por HPLC, siguió impurificado con los principales componentes o subproductos resultantes del proceso de fotólisis.

1.6.2. condiciones cromatográficas analíticas utilizadas

Para el estudio por HPLC del tetrapéptido protegido se utilizaron tres columnas analíticas de fase reversa en función de la reproducibilidad de las condiciones utilizadas en cada una de ellas; esto se debió a que en determinados momentos de este estudio se observó una variación en los tiempos de retención y en la resolución lo suficientemente importantes como para seguir el proceso de purificación con otra columna. En cualquier caso, se obtuvo una gran similitud en el aspecto de los cromatogramas obtenidos con las tres columnas.

La detección del producto se realizó indistintamente a 220 nm (enlace peptídico) y 254 nm (grupo bencilo). A pesar de la poca absorción de este péptido en la segunda longitud de onda frente a la primera, se utilizó también ésta debido a que en todas las fotólisis apareció un subproducto, generalmente el mayoritario del cromatograma, visible en esta zona del espectro y de absorción nula a 220 nm; un ejemplo de este resultado se muestra en el cromatograma 1-3, que procede del crudo de la primera fotólisis (254 nm). Como se puede observar, aparecen dos picos mayoritarios, de los cuales el primero de ellos es peptídico ya que muestra un análisis de aminoácidos correcto (Asp(0.99), Gly(1.15), Val(0.98), Lys(0.88)). Los cromatogramas 1-4 y 1-5 se obtuvieron en un intento de mejorar las condiciones cromatográficas de separación; en el ensayo correspondiente al segundo de ellos se utilizó dimetilformamida en la mezcla de eluyentes, obteniéndose una mayor separación entre los dos picos.

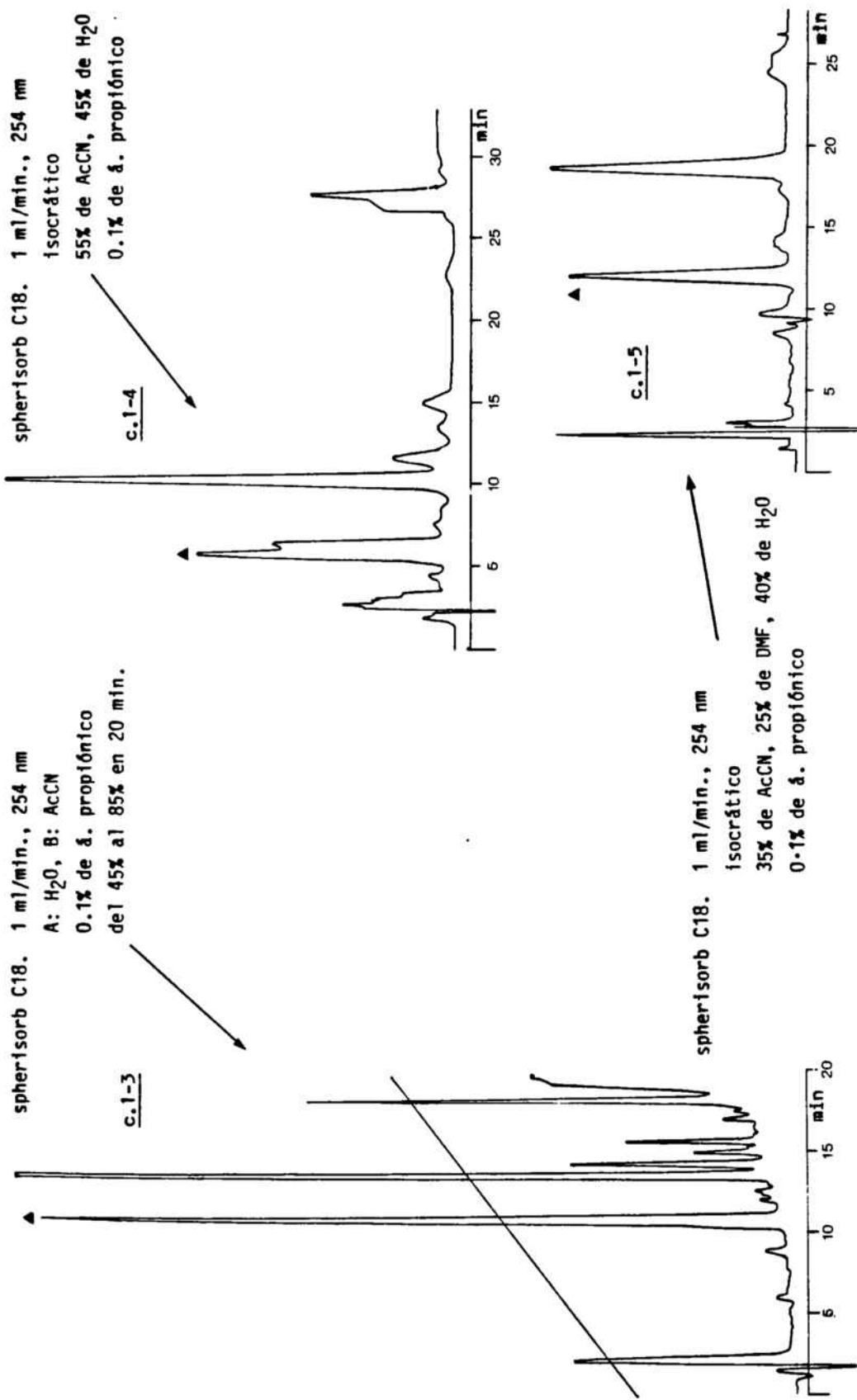
El crudo analizado hasta ahora se obtuvo de una fotólisis llevada

spherisorb C18. 1 ml/min., 254 nm
A: H₂O, B: AcCN
0.1% de á. propiónico
del 45% al 85% en 20 min.

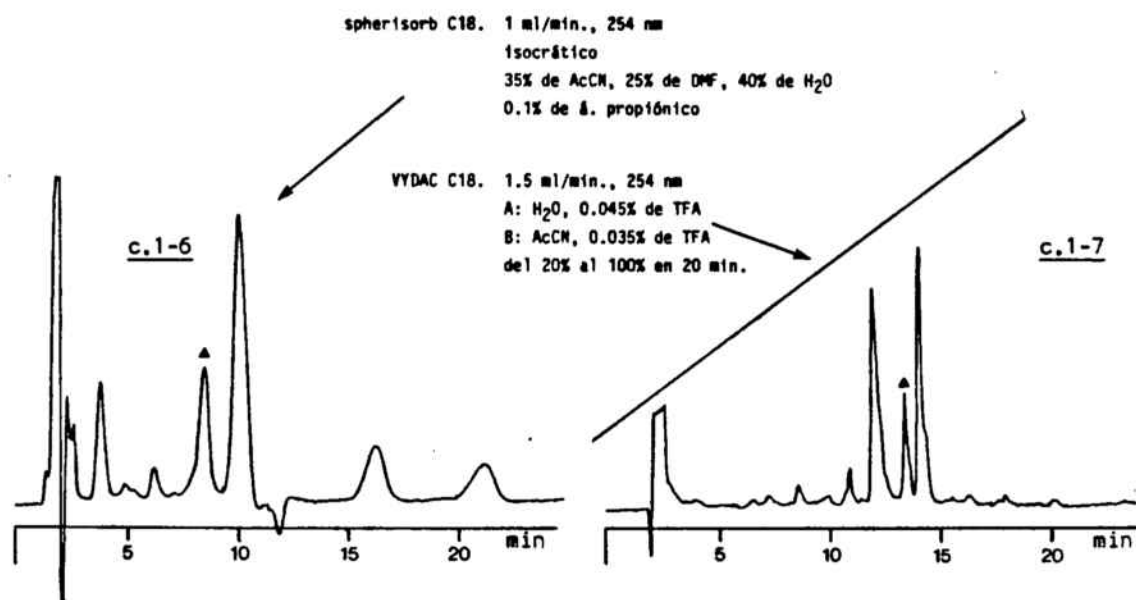
c.1-3

spherisorb C18. 1 ml/min., 254 nm
isocrático
55% de AcCN, 45% de H₂O
0.1% de á. propiónico

c.1-4



a cabo con dos lámparas y a baja temperatura. La utilización de una lámpara adicional y temperaturas más elevadas (segunda y tercera fotólisis) dieron lugar a crudos fotolíticos cuyos análisis registrados a 254 nm están representados por los cromatogramas 1-6 y 1-7 respectivamente. En el primero de ellos, a diferencia de los anteriores, aparecen nuevas impurezas de tiempos de retención menores y de naturaleza no peptídica; el segundo aparece mucho más impurificado (ver cromatograma 1-2, registrado a 220 nm), siendo el pico mayoritario y de tiempo de retención mayor el subproducto ya comentado con anterioridad. Los cromatogramas analíticos para el resto de fotólisis poseen aspectos similares.



La aparición de un subproducto con tiempo de retención mayor que el del péptido y en cantidades irregulares con respecto a éste nos llevó a plantear su posible procedencia, más aún teniendo en cuenta que en algunos casos su absorbancia era superior en unas diez veces a la del producto. Puesto que su tiempo de retención era bastante superior al del tetrapéptido protegido, fué colectado con facilidad por cromatografía de exclusión molecular durante la purificación del péptido (cromatograma 1-27), encontrándose una relación en peso con respecto a éste de 1 a 30 (impureza:péptido). La resonancia magnética nuclear de campo alto y la espectrometría de masas (ésta última prin-

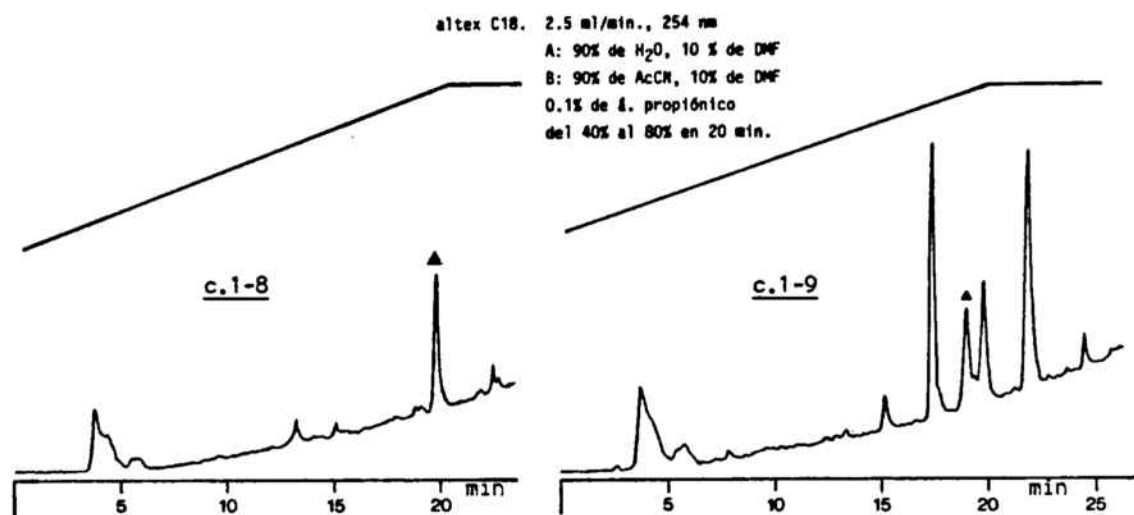
principalmente) dieron lugar a la identificación de la impureza como el ftalato de dioctilo, cuyo origen no ha sido posible determinar, aunque muy probablemente proceda de alguno de los disolventes utilizados en la purificación.

1.6.3. *cromatografía semipreparativa*

Una de las principales dificultades que surge al estudiar la purificación de un fragmento peptídico protegido es su solubilidad, de cara a conseguir cargas y detecciones aceptables. Así, normalmente es necesario hacer uso de determinadas cantidades de dimetilformamida, lo cual implica trabajar a longitudes de onda suficientemente elevadas para evitar la fuerte absorción de este disolvente al ultravioleta. Este problema queda solventado cuando el péptido posee grupos fuertemente cromóforos, como el fenólico de la tirosina o el fluorenilmetilol. En nuestro caso, la ausencia de tales grupos dificulta el problema ya que el producto posee únicamente un grupo bencilo. Por otro lado, la utilización de gradientes puede plantear dificultades debido a la variación de la absorción de la dimetilformamida con el eluyente, obteniéndose derivas importantes en las líneas de base. Todas estas consideraciones se tuvieron en cuenta a la hora de abordar la purificación del tetrapéptido protegido. En este sentido, cuando se utilizó dimetilformamida se buscaron condiciones isocráticas; en cualquier otro caso, se ensayó la utilización de gradientes.

1.6.3.1. *Cromatografía de alta presión*

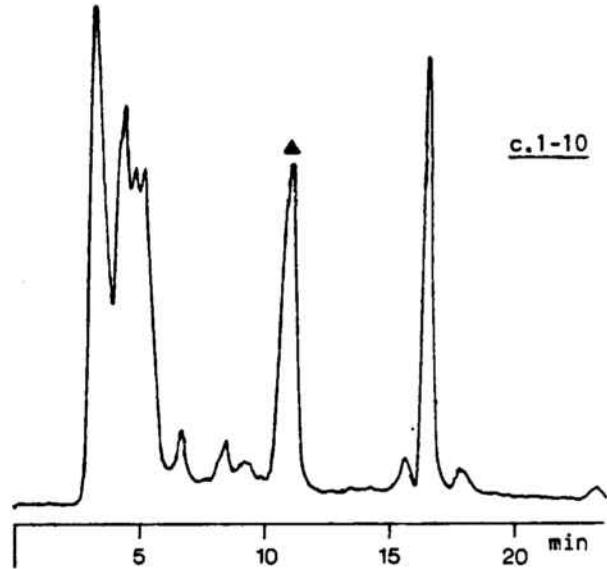
Con respecto a la cromatografía de alta presión, se utilizó una columna Altex semipreparativa C18. Los primeros ensayos realizados se llevaron a cabo utilizando un determinado porcentaje de dimetilformamida para facilitar la disolución del péptido, por lo que fué



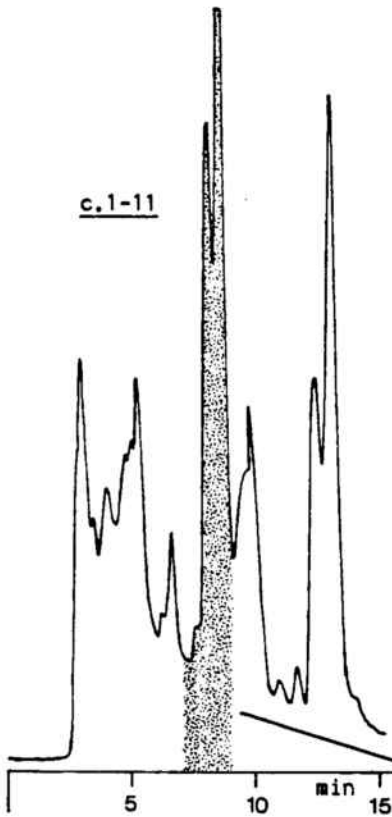
necesario trabajar a 254 nm. Los cromatogramas 1-8 y 1-9 fueron obtenidos a esta longitud de onda para la primera y tercera fotólisis en condiciones de gradiente y con un 10% fijo de dimetilformamida con objeto de obtener una información preliminar, siendo el péptido el pico con un tiempo de retención situado entre los 19 min y 20 min; las cantidades inyectadas oscilaron entre 1.5 mg y 2.0 mg. En base a estos resultados se buscaron unas condiciones isocráticas adecuadas; así, dado que con el gradiente utilizado los tiempos de retención eran muy elevados, se eligió como valor de partida una mezcla de porcentaje medio (54% de acetonitrilo) entre los dos valores utilizados en el gradiente (36 y 72% de acetonitrilo), obteniéndose el cromatograma 1-10 para el crudo de la primera fotólisis (2 mg de muestra). Con objeto de evaluar la capacidad de carga de la columna se inyectaron 4 mg del crudo de la tercera fotólisis ya que es el que posee mayor complejidad, resultando el cromatograma 1-11, en el que se puede comprobar por análisis de aminoácidos la presencia del péptido en los picos a 8.4 min y 8.9 min; el análisis mostrado en el cromatograma 1-12 se realizó con una columna analítica (220 nm) y corresponde a la fracción peptídica procedente del análisis correspondiente al cromatograma 1-11 que, como se puede observar, está impurificada con uno de los subproductos mayoritarios.

En el cromatograma 1-11 se puede comprobar la aparición de picos

altex C18. 3 ml/min., 254 nm
 isocrático
 54% de AcCN, 36% de H₂O, 10% de DMF
 0.1% de á. propiónico



c.1-11



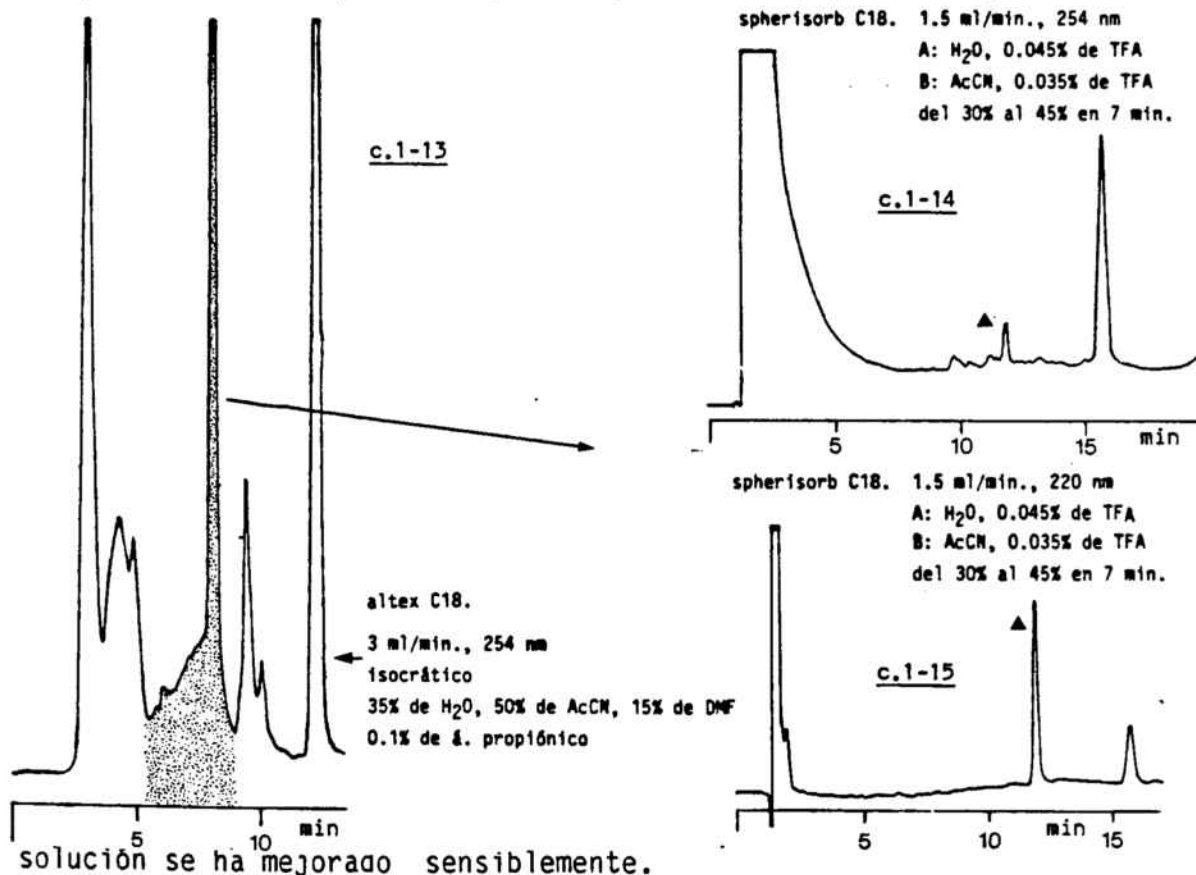
altex C18. 3 ml/min., 254 nm
 54% de AcCN, 36% de H₂O, 10% de DMF
 0.1% de á. propiónico
 isocrático

c.1-12

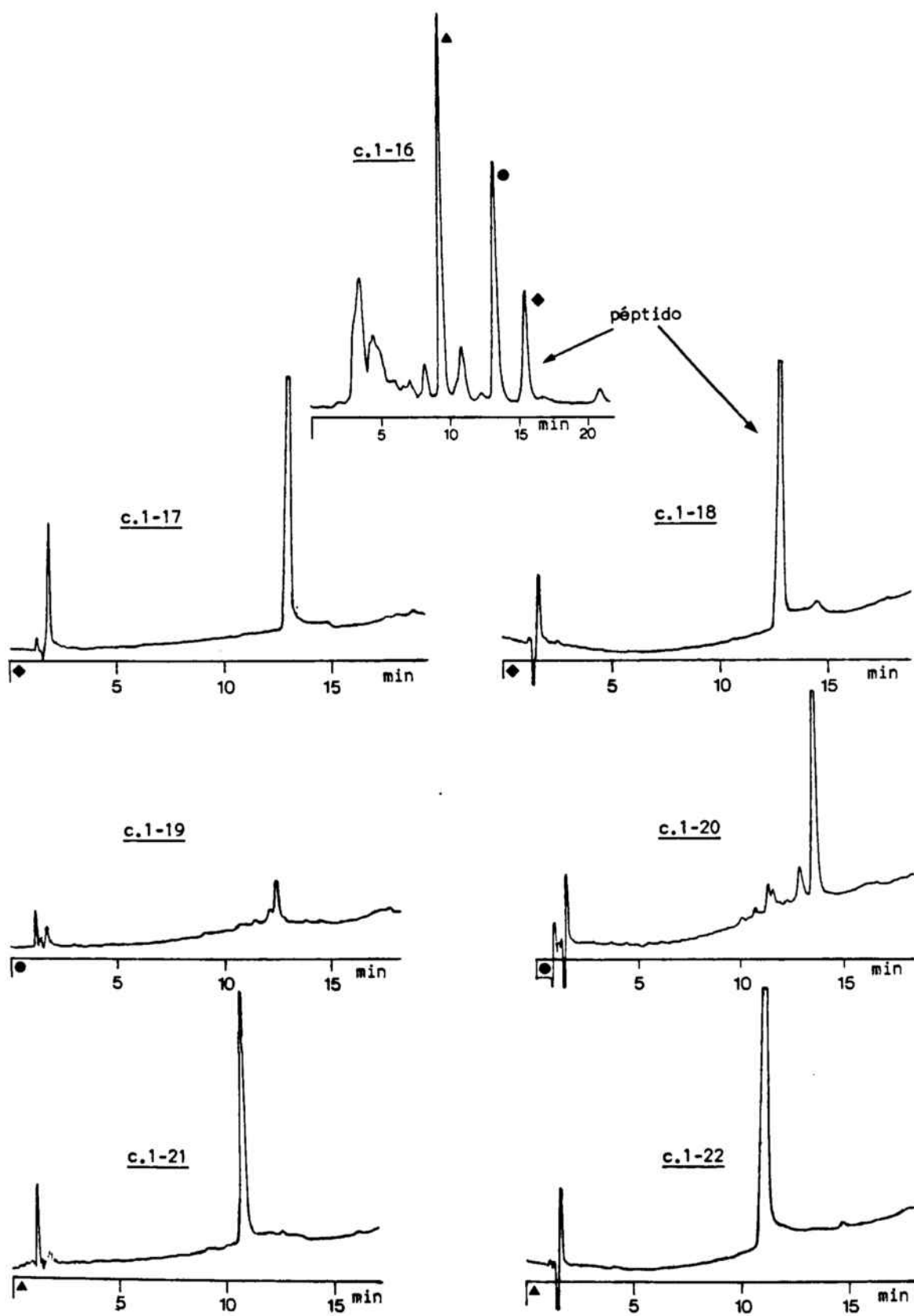


VYDAC C18. 1.5 ml/min., 220 nm
 A: H₂O, 0.045% de TFA
 B: AcCN, 0.035% de TFA
 del 40% al 100% en 30 min.

bífidos, hecho probablemente debido al aumento de carga. Sin embargo, existe también una variación apreciable en los tiempos de retención, todo ello acompañado de una pérdida apreciable de la resolución. Este resultado nos condujo a pensar en una posible variación de las condiciones cromatográficas de la columna, por lo que fué sustituida por otra de las mismas características. Por otro lado, se aumentó la proporción de dimetilformamida a un 15% en detrimento del acetonitrilo para evitar posibles problemas de solubilidad. En el cromatograma 1-13 se muestra el resultado obtenido al cargar 6 mg de crudo de fotólisis. Los cromatogramas 1-14 y 1-15 fueron los obtenidos en condiciones analíticas a 220 nm y 254 nm para la fracción peptídica (pico a 8.2 min); de la misma manera que se puede observar para el cromatograma 1-12, la misma impureza sigue acompañando al péptido aunque la re-

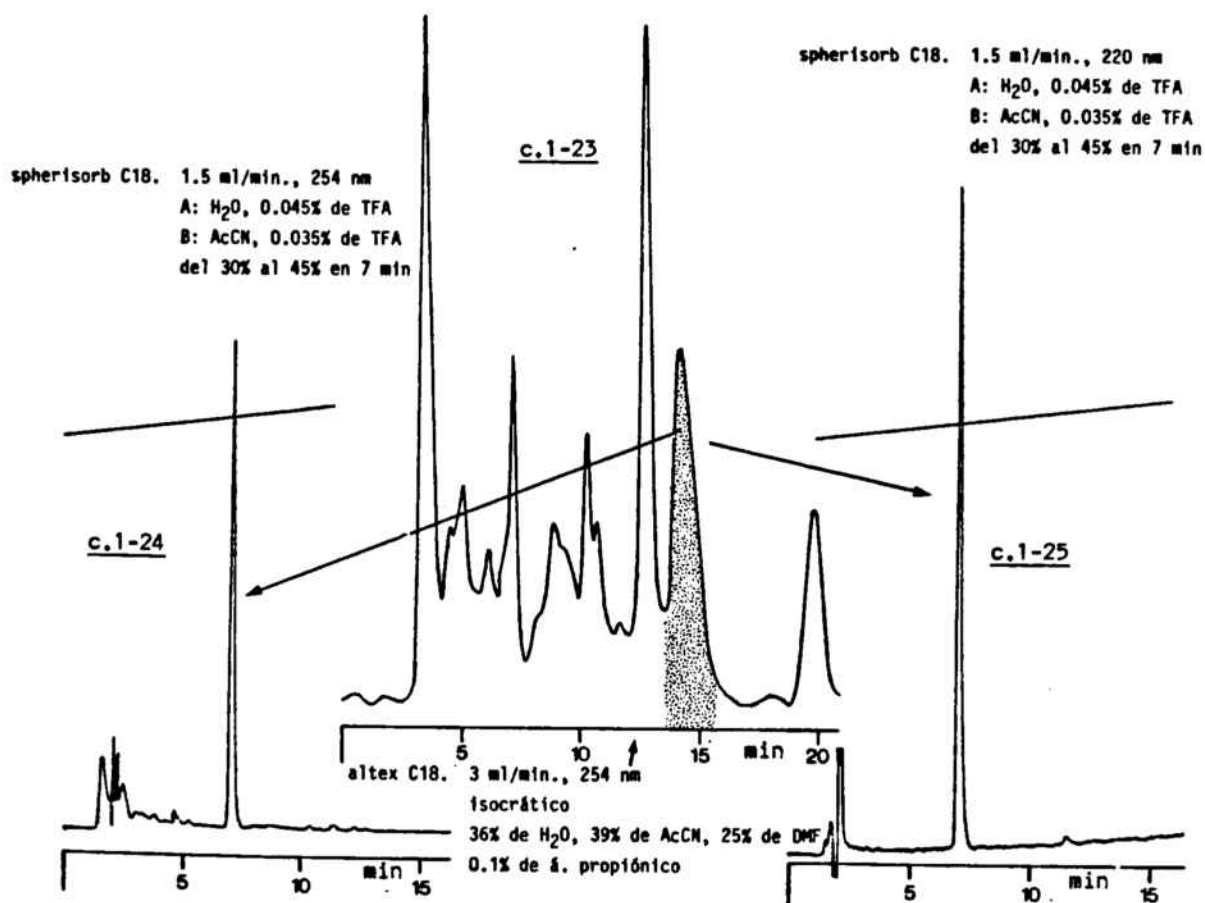


A la vista de los resultados obtenidos, un mayor porcentaje de dimetilformamida podría resolver el problema si tenemos en cuenta el efecto que puede producir al ser adicionada. Si observamos el cromatograma 1-5 podemos comprobar como la presencia de este disolvente



provocó una retención sensible del péptido, lo cual se tradujo en una mayor diferencia entre los tiempos de elución del producto y el subproducto responsable de la máxima absorción. Cabría esperar, por lo tanto, que este comportamiento fuera similar en las condiciones utilizadas en la purificación a escala semipreparativa.

Aplicando este criterio, se aumentó a un 25% la cantidad de dimetilformamida, manteniendo el porcentaje de agua, y se analizó el crudo de la tercera fotólisis, obteniéndose el cromatograma 1-16 al realizar una inyección de 0.6 mg de crudo fotolítico. Los tres picos mayoritarios se analizaron por una columna analítica (cromatogramas 1-17 a 1-22), siendo el péptido el producto de mayor tiempo de retención (15.5 min) y el ftalato de dioctilo el de tiempo de retención de 13.3 min. Estos resultados se consideraron adecuados, por lo que todos los crudos fotolíticos se unieron, y se procedió a la purificación del



péptido protegido en estas condiciones. Las cantidades inyectadas fueron en aumento hasta alcanzar los 17 mg (cromatograma 1-23), momento en el que se empezó a observar la pérdida de resolución. Los resultados de la purificación se muestran en los cromatogramas 1-24 y 1-25, siendo el rendimiento global del 40%.

En la figura 1-9 se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de protón de campo alto del péptido purificado en las condiciones anteriormente citadas.

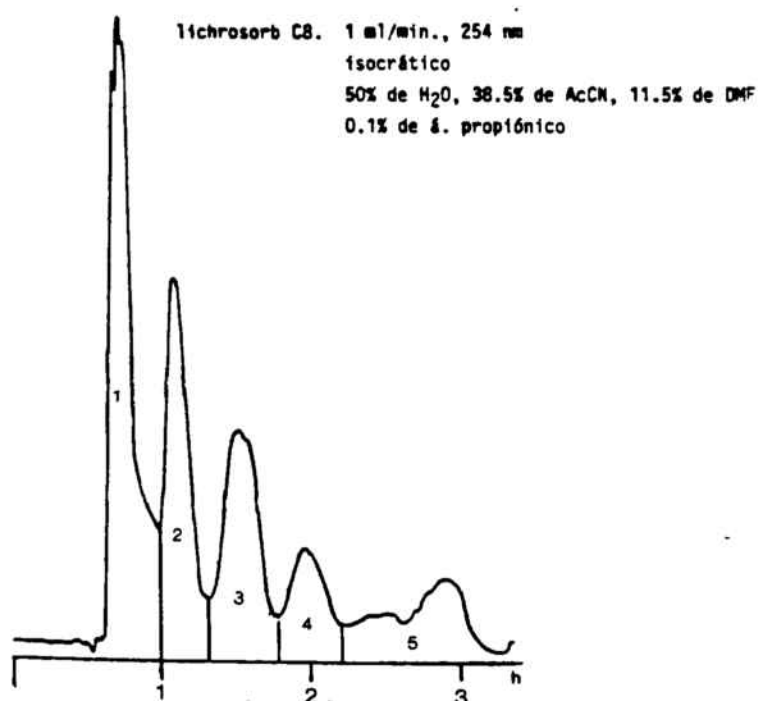
Teniendo en cuenta la pureza del crudo fotolítico, el bajo rendimiento de la purificación resulta sorprendente, más aún habiéndose conseguido una separación cromatográfica como la ya comentada. Un comportamiento similar se observó previamente en nuestro laboratorio al purificar otros péptidos, indicando una posible retención del producto a lo largo de toda la columna; concretamente, este hecho se comprobó durante la purificación de un péptido marcado, encontrándose radiactividad en las distintas fracciones recogidas, las cuales cubrieron todo el cromatograma.

Con objeto de mejorar el rendimiento de purificación, se ensayaron otros sistemas cromatográficos.

1.6.3.2. *Cromatografía de media presión*

La purificación de fragmentos protegidos por cromatografía de media presión se viene llevando a cabo en nuestro laboratorio desde hace algunos años. Debido a la reciente implantación de esta técnica, los péptidos estudiados hasta ahora son pocos, aunque paulatinamente se va teniendo un conocimiento más claro sobre las condiciones cromatográficas que deben ser utilizadas según el problema a resolver. Con respecto al caso que nos ocupa, esta técnica ha sido aplicada con objeto de intentar mejorar el rendimiento de purificación del tetrapéptido protegido, utilizando en todo momento el crudo de la tercera fotólisis, al igual que en el estudio de la búsqueda de condiciones en la metodología de alta presión. Los primeros ensayos se realizaron con una columna C8, partiéndose de un porcentaje del 35% de agua (similar

al utilizado para la purificación por cromatografía semipreparativa) y sólo un 5% de dimetilformamida. En estas condiciones, todo el crudo fotolítico se eluyó antes de una hora, obteniéndose un gran solapamiento de picos (7 mg inyectados). Siguiendo el mismo planteamiento que el aplicado en el estudio anterior, el porcentaje de dimetilformamida se aumentó a un 15% y la cantidad a inyectar se incrementó a 15 mg, no observándose mejora alguna. Debido a la mínima retención de los productos en estas condiciones y el efecto nulo, en este caso, del disolvente anteriormente mencionado, el porcentaje de agua se aumentó a un 50%, llevándose el de componente orgánico al 11%, y se volvieron a inyectar los 15 mg anteriores, obteniéndose el cromatograma 1-26. Puesto que por HPLC hubo problemas en la detección del pico peptídico y teniendo en cuenta el posible origen del descenso en el rendimiento de purificación (retención en la columna), se dividió el cromatograma en cinco zonas y se cuantificó cada una de ellas mediante hidrólisis y análisis de aminoácidos, recogiendo los resultados obtenidos en la Tabla 4. Como se puede observar, aunque el tetrapéptido eluyó mayoritariamente con el frente, se difundió a lo largo de la columna, lo que hizo inviable su purificación. A la vista de la baja capacidad de



c.1-26

retención de la columna, se optó por cambiar de sistema y se pasó a utilizar fase reversa C18.

Con esta nueva columna se sustituyó la dimetilformamida y el acetonitrilo por metanol, eluyente que también disuelve bien el péptido, para poder trabajar con gradientes y acceder así con mayor facilidad a las condiciones cromatográficas. El ensanchamiento del pico correspondiente al producto en todas las condiciones utilizadas, a lo que hay que añadir su ya comentada baja absorción a 254 nm, obligó al empleo de sensibilidades elevadas, por lo que las líneas de base en la mayoría de los casos fueron deficientes. Con objeto de mejorar la resolución, se aumentó el porcentaje de componente ácido hasta un 2% (ácido propiónico), sin conseguirse una variación apreciable en la morfología del pico.

fracción	contenido en aminoácidos de las fracciones colectadas ^(a)				cantidad (mg) (b)
	Asp	Gly	Val	Lys	
1	0.99	8.48	1.01	1.00	4.1
2	0.98	1.49	1.01	1.01	3.0
3	0.68	1.28	1.00	1.03	1.6
4	1.04	1.89	0.96	1.00	1.4
5	0.98	1.06	1.07	0.89	3.6

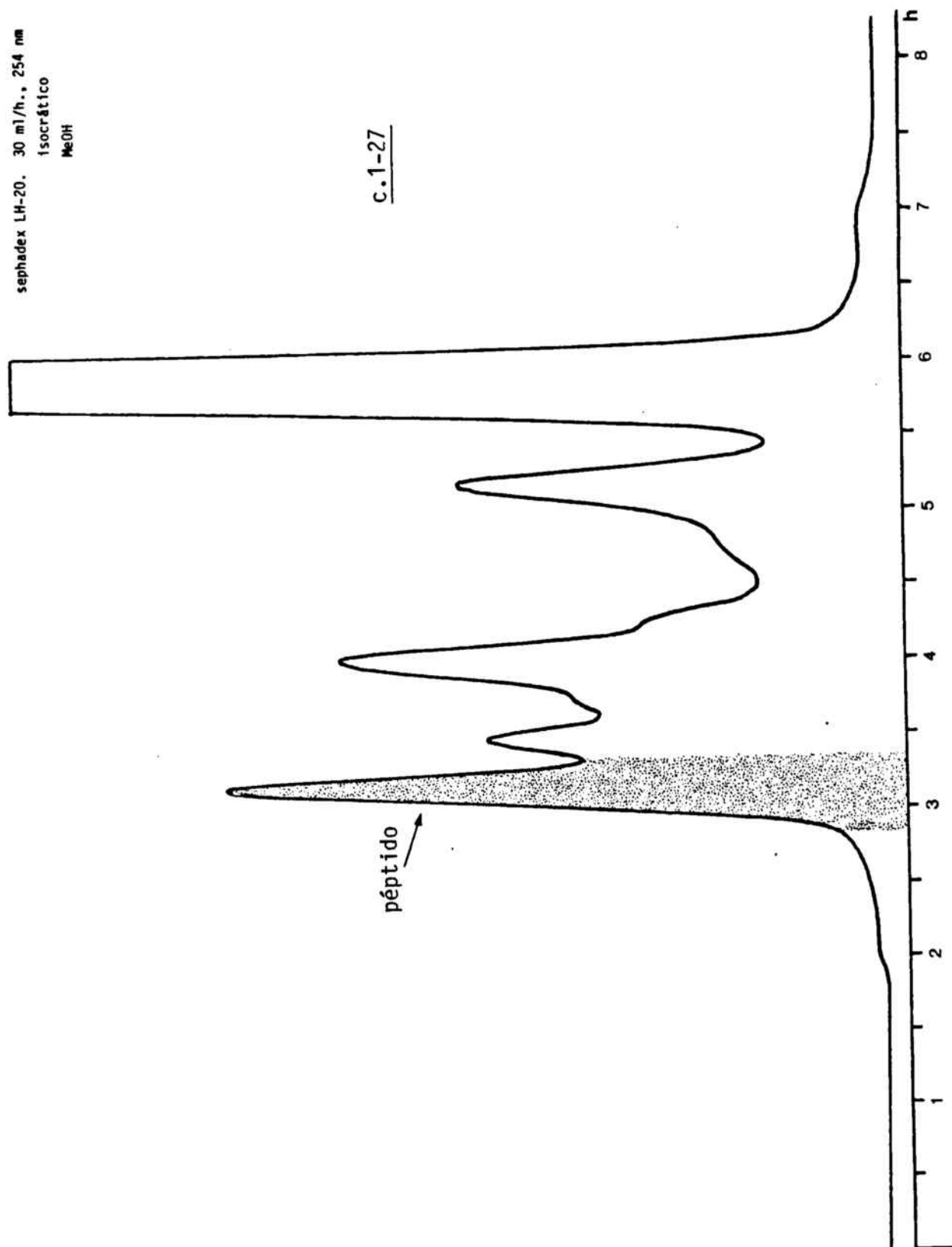
(a) Las distintas fracciones, así como las condiciones cromatográficas utilizadas, están indicadas en la figura correspondiente al cromatograma 3-26. (b) La cantidad total inyectada de crudo peptídico ha sido de 15 mg.

TABLA 4.- Intento de purificación del Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH por cromatografía de media presión (fase reversa C-8)

Antes de seguir adelante con esta técnica, cuyos resultados preliminares hacían presagiar numerosos problemas para hallar unas condiciones idóneas para el tetrapéptido protegido, se planteó la posibilidad de utilizar otros sistemas cromatográficos, como la cromatografía de intercambio iónico.

sephadex LH-20. 30 ml/h., 254 nm
Isocrático
MeOH

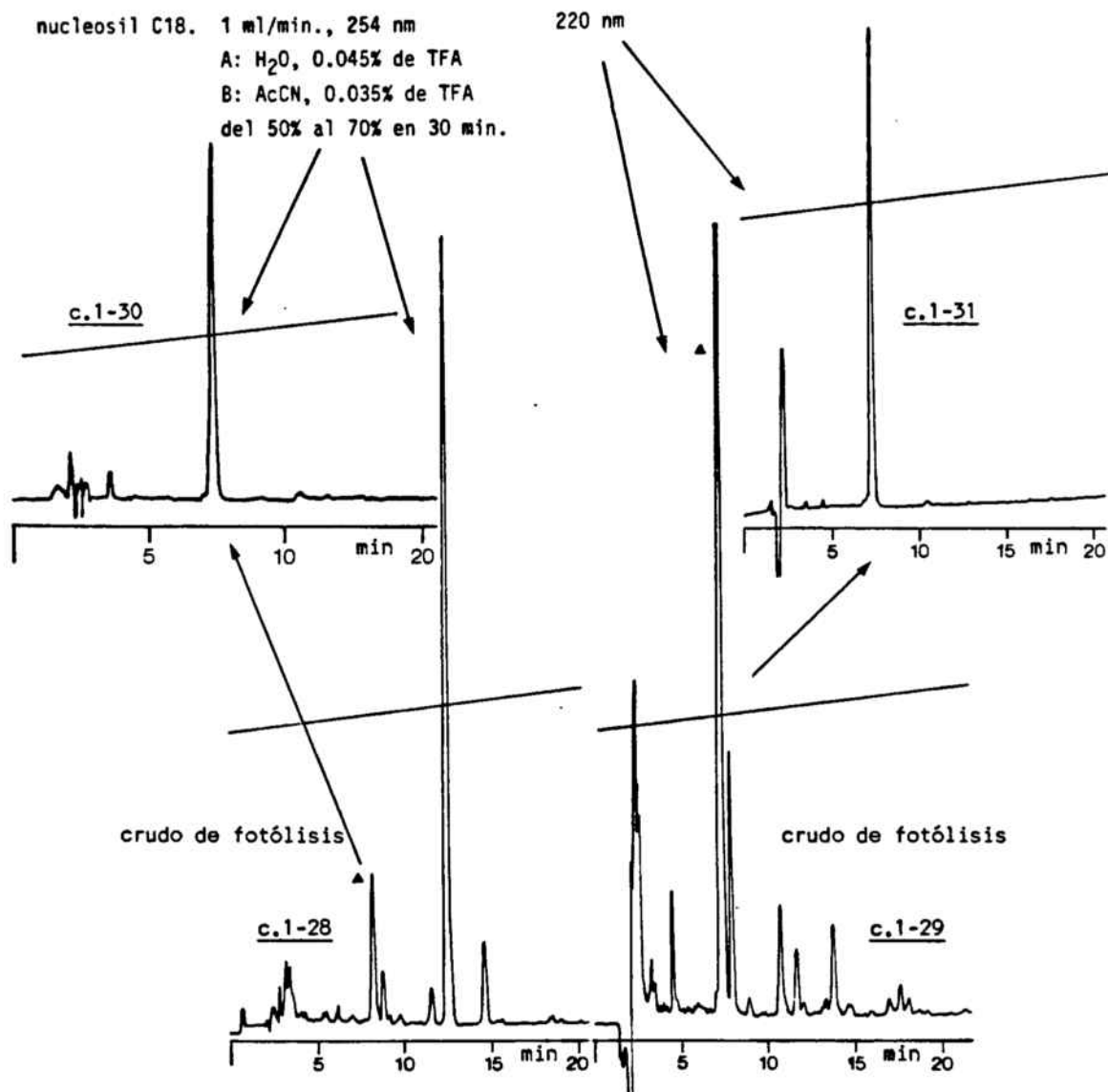
c.1-27



tografía de exclusión molecular.

1.6.4. cromatografía de exclusión molecular

Con este objetivo, se utilizó una columna Sephadex LH 20 y metanol como eluyente, por lo que los problemas de solubilidad quedaban eliminados. Puesto que no se poseía más crudo peptídico, se llevó a cabo una nueva síntesis del tetrapéptido. 36.8 mg de crudo obtenidos de ésta se inyectaron en la columna, obteniéndose el cromatograma 1-27.



Los resultados obtenidos fueron francamente mejores que los de la cromatografía utilizando columnas de HPLC semipreparativas. Así, el cromatograma se dividió en las tres zonas que se indican, las cuales se cuantificaron por hidrólisis y análisis de aminoácidos, encontrándose que el primer pico correspondía al producto deseado, siendo la cantidad recuperada de 31 mg y pureza del 100% por análisis de aminoácidos. Con respecto a la segunda fracción, el análisis dió como resultado de un 3% a un 4% de contenido peptídico y, finalmente, no se detectó péptido en la tercera (esta última correspondiente al fualto de dioctilo). Esto representa un rendimiento en la purificación del 91% aproximadamente, frente al 40% obtenido por el otro método. Los cromatogramas 1-28 y 1-29 corresponden a los análisis realizados a 220 y 254 nm tras la purificación y se pueden comparar con los obtenidos para el crudo de fotólisis (cromatogramas 1-30 y 1-31).

1.7. Evaluación del grado de epimerización durante el acoplamiento de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH sobre la H-Gly-O-CH₂-Nbb

1.7.1. Planteamiento del problema

Uno de los principales problemas que pueden surgir durante la formación del enlace peptídico es el de la racemización del aminoácido carboxilo terminal (como tal o formando parte de un fragmento peptídico) que va a ser acoplado directamente sobre la peptidil-resina. La magnitud de este proceso puede depender de muchos factores, tales como el disolvente, los aditivos utilizados para llevar a cabo la reacción o la naturaleza del aminoácido o fragmento peptídico empleados.

El mecanismo del proceso fué establecido por Bergmann y Zervas³⁶ (figura 1-10), los cuales postularon que la epimerización transcurría a través de un intermedio tipo oxazolona, estando catalizada la con-

versión por bases (catálisis específica en disolventes polares apróticos³⁷).

Con respecto a la síntesis del tetrapéptido protegido 10, apoyándonos en la información obtenida en la literatura, durante el acoplamiento del dipéptido protegido 4 sobre la aminoacil-resina 7, podría tener lugar este proceso sobre el ácido aspártico ya que la formación

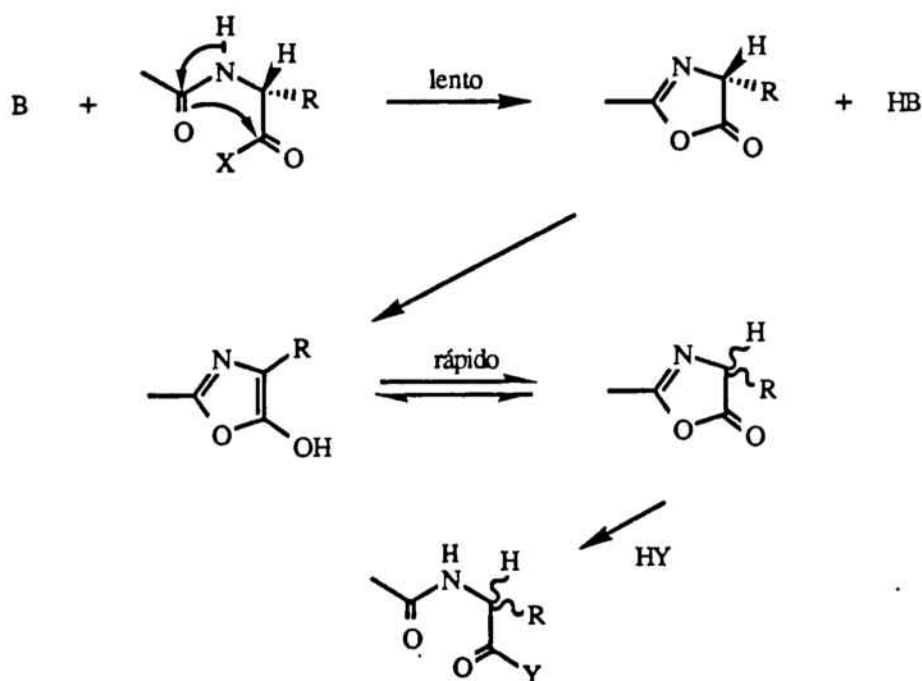


figura 1-10

del enlace peptídico se realiza en dimetilformamida, uno de los disolventes con mayor susceptibilidad de provocar epimerización³⁸⁻⁴⁰. Por otro lado, el protector del grupo amino terminal del aminoácido implicado juega un papel muy importante, como se ha demostrado, al influir sensiblemente en la formación de la oxazolona, según su carácter electroatrayente de electrones^{41,42}; así, un protector tipo acilo facilita la formación de ésta frente a un grupo tipo uretano, lo cual explica la importancia que puede tener la racemización durante el acoplamiento de un fragmento peptídico. Con respecto al aditivo, como se ha comentado con anterioridad, el N-hidroxibenzotriazol, general-

mente, minimiza el proceso, aunque depende del aminoácido y secuencia estudiados; en el caso que nos ocupa, el aminoácido implicado es el ácido aspártico, del cual no se han encontrado datos en la literatura a este respecto.

Dado que el péptido sintetizado es de pequeño tamaño, cabe esperar que la resolución cromatográfica de los dos epímeros sea relativamente fácil, por lo que se ha considerado que un método analítico adecuado para este estudio podría ser al HPLC, el cual se ha aplicado ya en otros casos con este objetivo⁴³⁻⁴⁶. Normalmente, para realizar estos estudios, se preparan los modelos correspondientes por los métodos convencionales de síntesis. En nuestro caso, se provocó la formación del péptido epímero y se analizó el producto final por cromatografía de gases y espectrofotometría de masas.

1.7.2. *Diseño de una nueva síntesis de Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH para obtener péptido epimerizado*

Con objeto de obtener más información sobre esta reacción secundaria, se realizó una nueva síntesis a pequeña escala (100 mg de resina) del tetrapéptido protegido, llevando a cabo la incorporación del dipéptido protegido 4 en presencia de N-hidroxibenzotriazina²⁷, la cual, así como el N-hidroxibenzotriazol, muestra una especial eficacia en la supresión de esta reacción secundaria. Una vez se llevó a cabo la fotólisis, el análisis mediante HPLC indicó la presencia del péptido en forma de pico único, situación que no cambió pese a introducir numerosos cambios en el tipo de columna o condiciones cromatográficas. Al objeto de disponer de una muestra de péptido epimerizado, se realizó una nueva síntesis a pequeña escala del tetrapéptido protegido, no utilizando catalizador durante el acoplamiento del dipéptido protegido, temperatura moderadamente elevada y una dilución mayor para favorecer la formación del epímero. Así, otros 100 mg de resina se sometieron a la misma serie de tratamientos, obteniendo tras la fotólisis un crudo peptídico cuyo análisis por HPLC mostraba la presencia de un

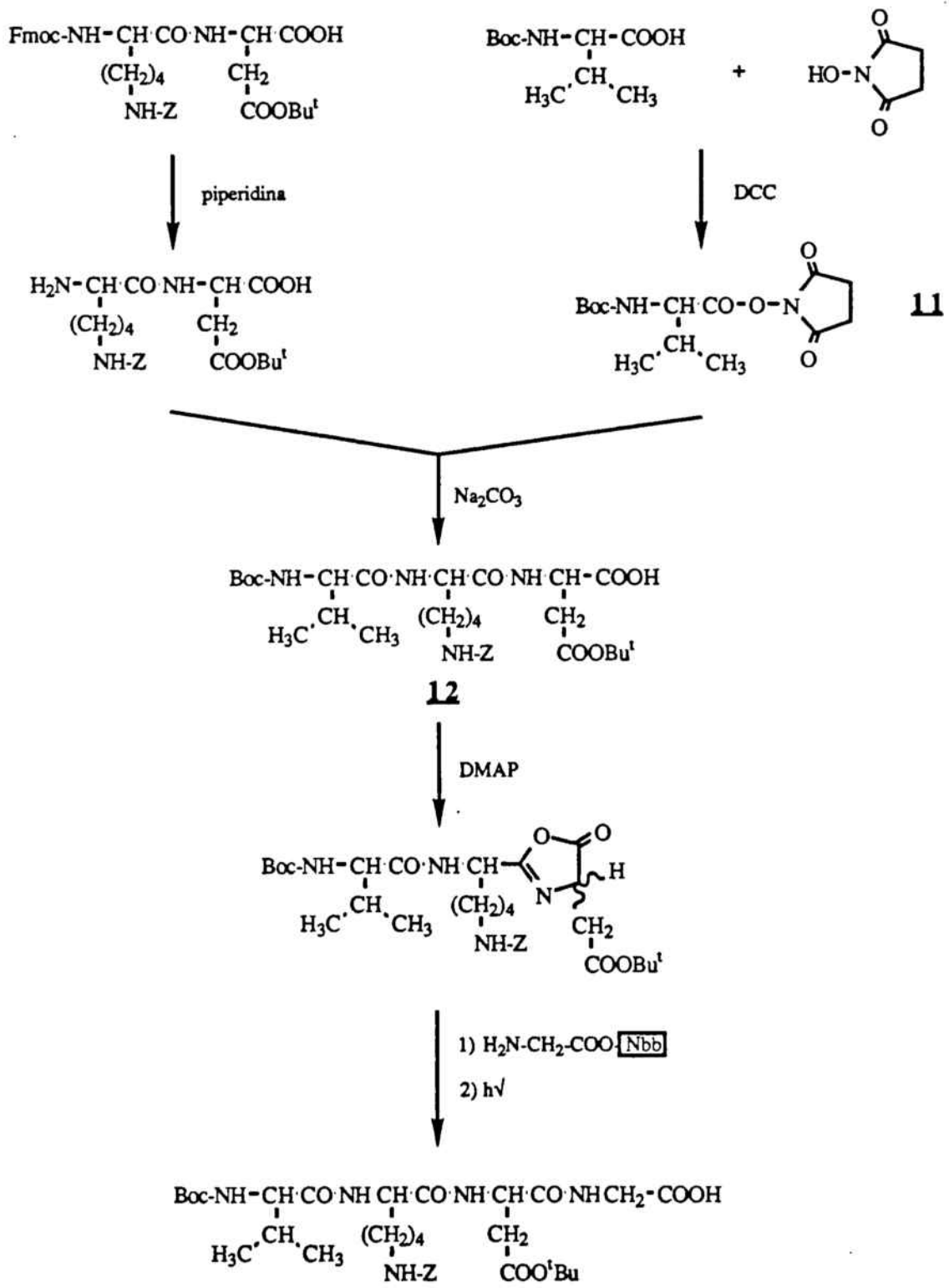
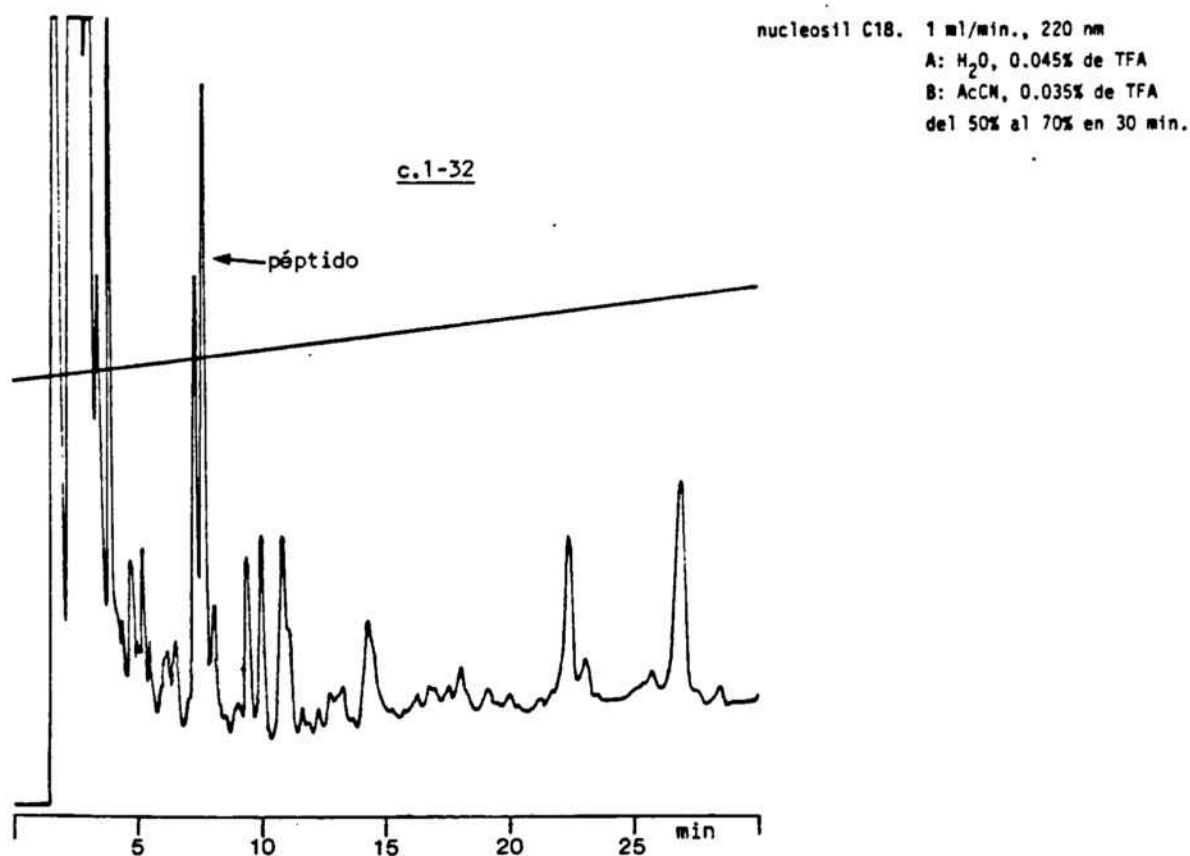


figura 1-11

pico vecinal que absorbía tanto a 220 nm como a 245 nm y cuya capa fina (cloroformo/metanol/ácido acético, 73:25:2; positivo a la ninhidrina y al clorax) indicaba la presencia de péptido (Rf similar al del péptido). Al intentar separar este producto por cromatografía semipreparativa surgieron problemas con la columna, no pudiéndose recuperar éste, por lo que se realizó una última síntesis. En este caso concreto, para favorecer al máximo posible la formación de la oxazolona durante el acoplamiento del dipéptido protegido sobre la aminoacil-resina, se utilizó como aditivo dimetilaminopiridina, la cual, como se ha comprobado, cataliza la formación de ésta⁴⁷.

La formación del enlace peptídico en medio básico plantea un problema adicional en esta síntesis debido a la presencia de un grupo fluorenilmetoxicarbonilo en el dipéptido protegido, ya que experimentos realizados con distintas aminas terciarias han evidenciado la



desprotección paulatina de la posición amino terminal⁴⁸. Esto obliga a cambiar la estrategia de síntesis en el sentido de que no podemos utilizar el dipéptido 4. Como alternativa se sintetizó en solución el tripéptido Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH (12, figura 1-11), utilizando la misma metodología que la aplicada en la primera síntesis, y, a continuación, se acopló sobre la aminoacil-resina 7. Con objeto de obtener la mayor cantidad posible de epímero, se dejó el tripéptido 12 en dimetilformamida y en presencia de dimetilaminopiridina y dicitclohexilcarbodiimida durante tres horas, tras lo cual la mezcla fué adicionada sobre el polímero. Una vez realizadas la síntesis y la fotólisis de la peptidil-resina se analizó el crudo fotolítico por HPLC (cromatograma 1-32), siendo el pico indicado el péptido obtenido en la síntesis convencional. El otro pico de tiempo de retención ligeramente menor podría ser el péptido epímero ya que posee un contenido en aminoácidos (determinado por hidrólisis y análisis de aminoá-

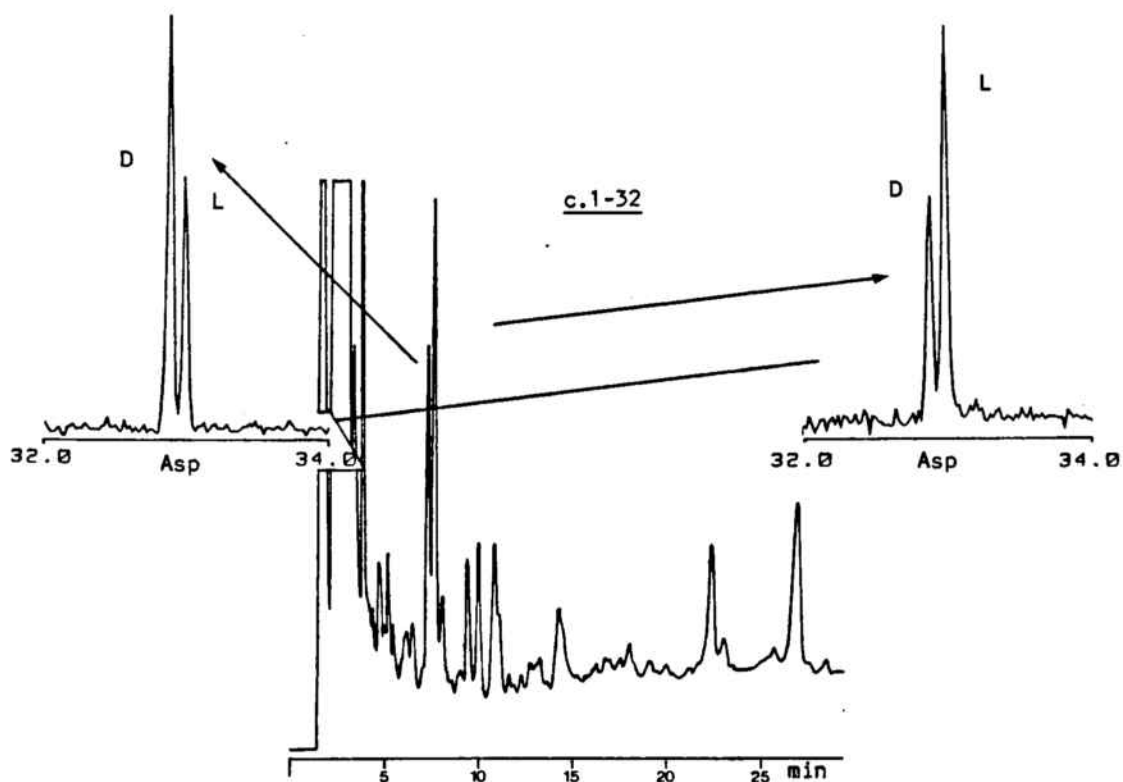


figura 1-12

cidos) correcto; si esto es así, el resultado obtenido de la relación entre los dos péptidos mediante esta técnica es de 3 a 5 (38 % del isómero LLDL).

Para realizar el análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas, todo el crudo peptídico se inyectó en el cromatógrafo líquido en diferentes fracciones, colectándose los dos productos peptídicos. Una vez derivatizados convenientemente los aminoácidos tras la hidrólisis de los péptidos, se inyectaron en el cromatógrafo de gases (figura 1-12), observándose para el producto con menor tiempo de retención el pico correspondiente al isómero D del ácido aspártico de forma mayoritaria y, para el péptido de tiempo de retención mayor, el isómero L como aminoácido predominante. A través de estos resultados podemos concluir que el acoplamiento del dipéptido protegido ha transcurrido sin racemización ya que las condiciones cromatográficas que se han utilizado permiten una resolución de los dos epímeros lo suficientemente buena como para poder identificarlos.

1.8. Acoplamiento de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH sobre la (5-64)-peptidil-resina

Una vez comprobada la pureza del tetrapéptido obtenido, se ha procedido a su incorporación sobre el fragmento 5-64 de la toxina II del escorpión *Androctonus australis* Hector, ya sintetizado sobre una resina benzhidrilamina. El análisis mediante secuenciación de Edman⁴⁹ de la peptidil-resina final indica que el acoplamiento ha transcurrido con un rendimiento del del 99%. El acoplamiento se llevó a cabo en dimetilformamida durante 24 h con dicitclohexilcarbodiimida, en presencia de N-hidroxibenzotriazol y dimetilmorfolina.

2. ESTUDIO DE LA FORMACION DE PEPTIDO-IMIDA EN LA SECUENCIA Asp-Gly DE LA H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH, FRAGMENTO 1-6 DE LA TOXINA II DEL ESCORPION "Androctonus australis Hector"

2.1. Introducción

Uno de los problemas principales que plantea la síntesis de péptidos es la elección adecuada de grupos protectores para aquellos aminoácidos que poseen la cadena lateral funcionalizada; como es lógico, los requisitos primordiales que deben cumplir son su estabilidad frente a los reactivos utilizados durante la síntesis y su fácil eliminación al final de ésta para obtener el péptido libre. Es fácil imaginar también el hecho de que no exista hasta ahora un modelo perfecto a utilizar y que sean numerosas las reacciones secundarias descritas en la literatura⁵⁰. Al aminoácido del cual es objeto su estudio en este capítulo, aspártico, se le pueden aplicar perfectamente estas consideraciones y, concretamente, la reacción secundaria que

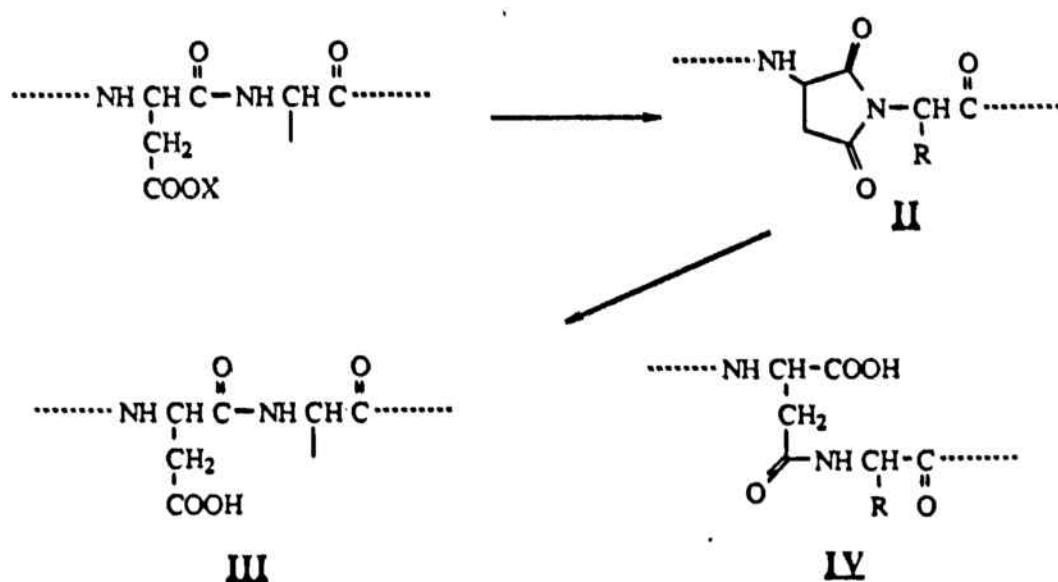


figura 2-1

aparece con su utilización es una de las más estudiadas en el campo de la síntesis peptídica. Dicha reacción supone la formación de un derivado peptídico tipo succinimida cíclica (II, figura 2-1) el cual, en condiciones que discutiremos más adelante, puede sufrir apertura para dar lugar al péptido deseado (III) y la cadena peptídica muchas veces denominada " β " (IV), en la que el átomo de nitrógeno del aminoácido vecinal está unido al grupo carbonilo de la cadena lateral del ácido aspártico.

La detección de esta reacción secundaria se remonta al año 1954 cuando Sondheimer y Holley⁵¹, en sus investigaciones sobre la síntesis de péptidos de asparagina y glutamina (la figura 2-2 muestra el esquema para la primera, (V)), aislaron los primeros derivados succinimídicos (VII) de los ácidos aspártico y glutámico al intentar saponificar los esteres metílicos de la N^{α} -benciloxicarbonilasparagina y la N^{α} -benciloicarbonylglutamina.

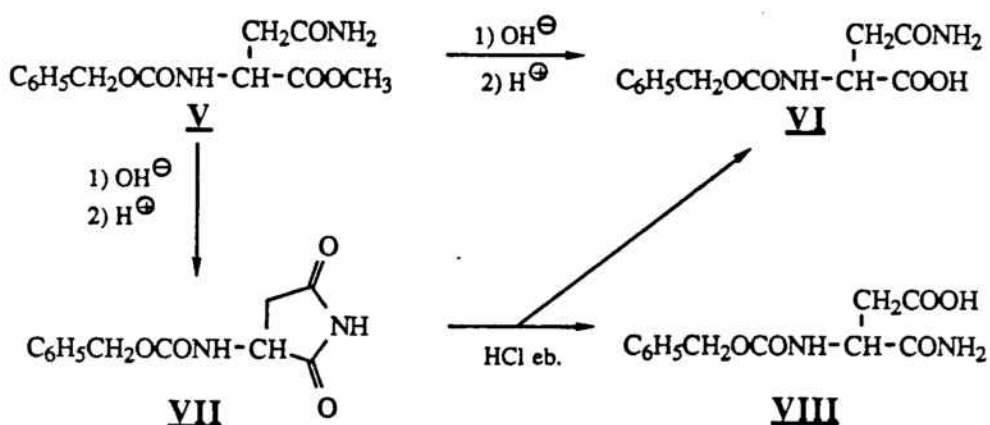


figura 2-2

Puesto que este producto se obtenía mayoritariamente se procedió a un estudio más profundo de sus propiedades químicas, encontrándose que por hidrólisis acuosa o tratamiento ácido en condiciones enérgicas (ácido clorhídrico a ebullición) el anillo se abría para dar lugar a las amidas correspondientes en las posiciones " α " y " β " (VI y VIII respectivamente).

Un año más tarde, Battersby y Robinson⁵², aprovechando esta reacción de ciclación para otros objetivos, encontraron que la aper-

tura del anillo daba lugar de forma mayoritaria al derivado " β ", resultado que se atribuyó a la diferencia de electrofilia de los dos grupos carbonilo.

El interés por el establecimiento de los mecanismos biológicos que tienen lugar en los procesos enzimáticos aportó nuevos datos sobre esta reacción; así, la secuencia Asp-Ser ha sido una de las más estudiadas debido a las fundadas evidencias de su participación en estos procesos. Estos estudios se dirigieron principalmente hacia la hidrólisis de β -ésteres, encontrándose concretamente para el ester bencilico (uno de los más estudiados en los inicios de estos trabajos) que la hidrólisis no sólo tenía lugar rápidamente en piridina/agua^{53,54} o dioxano/agua⁵⁵ sino que el proceso pasaba por la formación de un intermedio tipo succinimida ya que en todos los casos se obtenían proporciones importantes de cadena " β " (esta misma idea ha servido para explicar la presencia de proteínas naturales con estas características en el cuerpo humano⁵⁶).

La importancia de esta reacción fue en aumento con la aparición de nuevos resultados tales como la formación de estos derivados en péptidos libres a altas temperaturas³ y en presencia de agua⁵⁷ o alcohol⁵⁸.

Al mismo tiempo que se fueron desarrollando todas estas experiencias se realizaron estudios sobre la implicación del aminoácido vecinal en el proceso. Así, Bernhard⁵⁵, en 1962, observó en un estudio comparativo entre las β -bencil-N-carbobenzoxiaspartilaminoacilamidas de la glicina y serina con respecto a la hidrólisis del grupo bencilo que la segunda poseía un efecto superior desde el punto de vista cinético explicable por la contribución del grupo hidroxilo de la cadena lateral de la serina. En un intento de generalizar estos resultados Bodanszky⁵⁹ llevó a cabo en 1978 una investigación exhaustiva de todos los aminoácidos naturales en la serie de sus derivados terc-butoxicarbonil- β -bencilaspartilaminoacil- β -naftilamida frente a la trietilamina en dimetilformamida, encontrando que tanto el impedimento estérico (cadenas laterales voluminosas) como la presencia de cargas en la cadena lateral (disminución en la formación de succinimida en los aminoácidos que poseen una cadena de carácter ácido) pueden jugar

un papel importante en este proceso. Así, para la glicina, aminoácido implicado en nuestro estudio, se encontró uno de los valores más elevados.

A raíz de todos estos resultados fué desarrollándose un interés especial por la importancia que podía tener esta reacción secundaria durante la síntesis peptídica, es decir, con los sucesivos tratamientos ácidos y básicos para llevar a cabo los distintos acoplamiento y en las condiciones enérgicas utilizadas para eliminar los grupos protectores y liberar el péptido de la resina. Así, se estudió la utilización de aditivos (hidroxibenzotriazol, pentafluorofenol, etc)⁶⁰ para eliminar la catálisis básica; sin embargo, no se evitó en ningún caso la formación del subproducto aunque se redujo la extensión de la reacción en algunos. Por otro lado, tratamientos típicos de desprotección como HBr/TFA⁵⁸, HBr/AcOH⁶¹, o HF^{62,63} dieron lugar a péptidos succinimídicos (siempre utilizando el grupo bencilo como grupo protector) en una mayor o menor extensión según los casos.

En la figura 2-3 se muestra un esquema mecanístico del proceso que puede explicar la mayoría de los resultados obtenidos.

2.2. Elección del grupo protector

El primer grupo que fué utilizado como protector de la cadena lateral del ácido aspártico fué el bencilo. Sin embargo, debido a la facilidad de formación de productos secundarios a que daba lugar, se dirigieron numerosos trabajos hacia la búsqueda de un protector adecuado que eliminara esta importante reacción secundaria.

Las investigaciones sobre diferentes grupos protectores se han dirigido hacia dos objetivos primordiales: la utilización de grupos lo suficientemente voluminosos como para evitar el ataque nucleófilo y otros que, en condiciones específicas, pueden ser eliminados fácilmente.

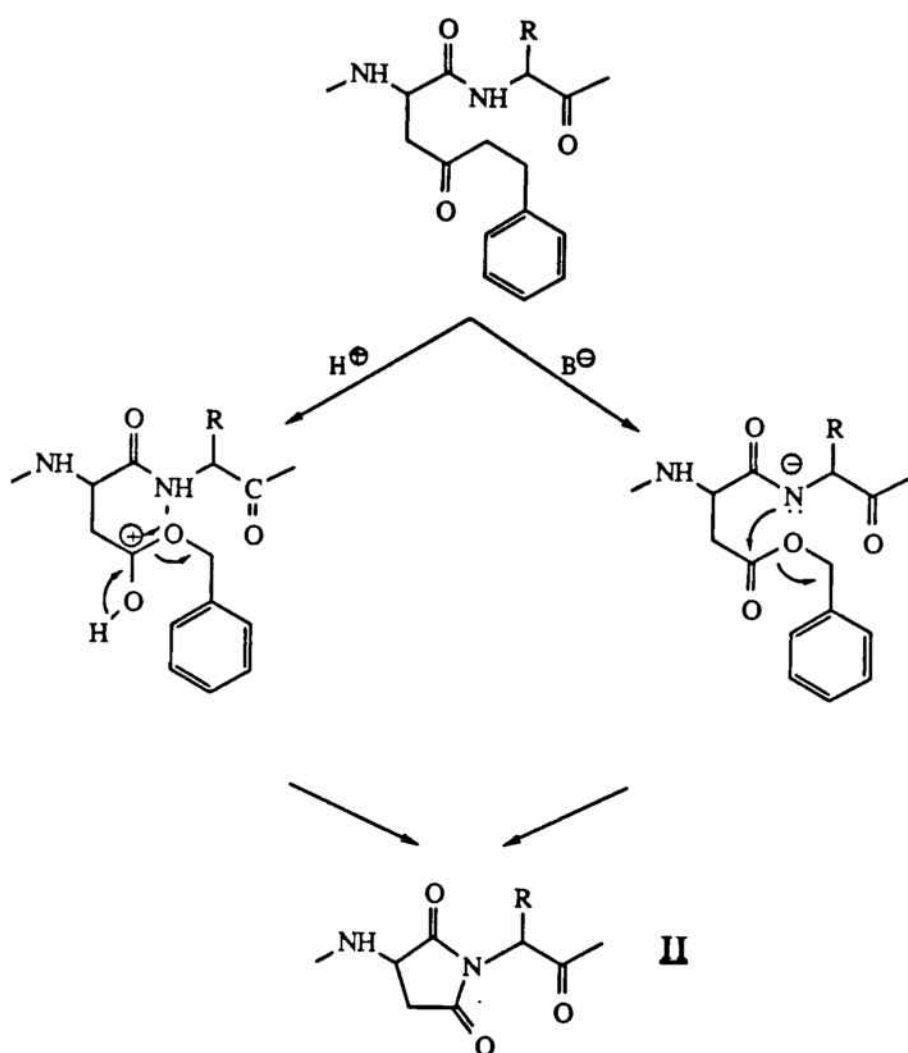


figura 2-3

te antes de proceder a la liberación del péptido, momento en el que se suelen utilizar las condiciones más drásticas.

Con respecto al primer caso se han utilizado los ésteres de ciclopentilo⁶⁴, ciclohexilo⁶⁵, cicloheptilo y ciclooctilo⁶⁶⁻⁶⁷ y terc-butilo⁶⁸; en todos los casos se ha encontrado una estabilidad superior a la del grupo bencilo en las condiciones sintéticas y una reducción en la formación de succinimida. Con respecto a la utilización de un protector temporal, el grupo bencilo ha sido usado con este objetivo debido a que puede ser eliminado por hidrogenólisis⁶⁹⁻⁷¹ aunque recientemente se ha comprobado que dicho proceso puede provocar la

formación de succinimida⁷²; este mismo grupo se ha utilizado también con objeto de llevar a cabo únicamente el acoplamiento del aminoácido, para proceder seguidamente a la desprotección de la cadena lateral; sin embargo, se han detectado grandes cantidades de péptido succinimídico debido a procesos de transesterificación durante la síntesis^{73,74}. Otros grupos empleados han sido el fenilacetilo, el cual puede ser eliminado fácilmente con tiofenóxido sódico⁶² o por hidrogenolisis⁷⁵ pero para el que se ha comprobado la formación del subproducto mediante catálisis básica⁷⁶; el grupo p-nitrofenilo, el cual se puede eliminar por hidrogenolisis^{75,77} y el grupo terc-butilo. En este último caso se ha conseguido la supresión total de la reacción secundaria utilizando ácido trifluoroacético al 50% en cloruro de metileno para eliminar este grupo y liberar el péptido de la resina al mismo tiempo⁷⁸, aunque el posterior tratamiento del péptido con ácido fluorhídrico para eliminar el resto de los grupos protectores dió lugar a la formación de pequeñas cantidades de succinimida.

Sin lugar a dudas, la hipótesis de llegar al tratamiento con fluoruro de hidrógeno teniendo la cadena lateral del ácido aspártico desprotegida podría ser la clave que condujera a la solución del problema. Por otro lado, el grupo terc-butilo parece ser el más adecuado en este sentido debido a su fácil eliminación en condiciones relativamente suaves. Por este motivo, el objetivo de los estudios que se discuten en este Capítulo ha sido la comprobación de la validez de esta hipótesis aplicada a la síntesis del péptido 13 (figura 2-4), el

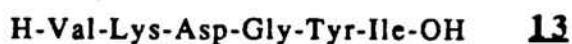


figura 2-4

cual corresponde a un fragmento N-terminal de la toxina comentada en el Capítulo 1 y cuya elección ha estado motivada por un intento de simulación del entorno de la secuencia Asp-Gly en la toxina, de cara a la posible aplicación de esta metodología a la proteína unida a la resina si los resultados lo aconsejaran así. Por otro lado, ya que la utilización del grupo terc-butilo supone un cambio de estrategia sintética (ver Capítulo 1), se ha considerado también conveniente

llevar a cabo un estudio de la estabilidad de este grupo protector en las condiciones de síntesis utilizadas. De cara a evaluar la aplicabilidad del grupo terc-butilo como alternativa a la metodología convencional de síntesis, se ha completado este estudio llevando a cabo una comparación del comportamiento de este grupo protector frente a la formación de péptido-imida con el de los grupos bencilo y ciclohexilo, quizás los dos grupos protectores más estudiados en este terreno.

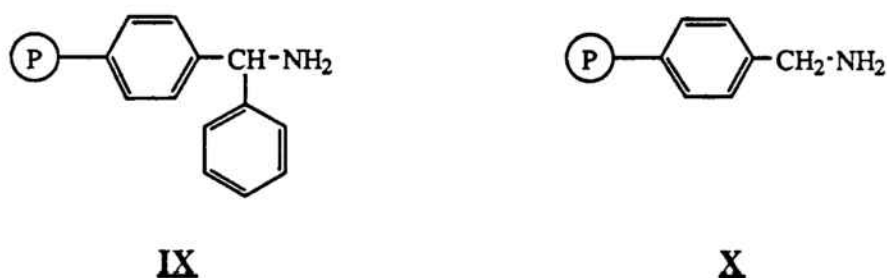


figura 2-5

2.3. Preparación de la Boc-Val-lys(OC1Z)-Asp(cHex)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-CH₂-Pam, la Boc-Val-Lys(OC1Z)-Asp(Bz)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-CH₂-Pam y la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-CH₂-Pam

2.3.1. Soporte polimérico

La síntesis de la toxina II del escorpión *Androctonus australis* Hector, la cual se ha concluido recientemente en su fase de condensación de fragmentos en nuestro laboratorio, se ha llevado a cabo sobre una resina benzhidrilamina⁷⁹ (IX, figura 2-5) debido a su naturaleza carboxamídica en su extremo carboxilo terminal, siendo el reactivo a utilizar para la liberación del péptido de la resina y eliminación de grupos protectores el fluoruro de hidrógeno^{80,81}. Puesto que en el

estudio que se desarrolla en este Capítulo sólo está implicado un fragmento del extremo amino terminal de esta toxina, se ha elegido como soporte polimérico para la síntesis de las tres hexapeptidil-resinas una resina aminometilada (X figura 2-5) (la utilizada para este estudio fué de 1.1 meq/g de funcionalización, determinada por el método de Gisin), variante de la resina clorometilada comunmente utilizada desde los orígenes de la síntesis de péptidos en fase sólida, como precursora de la resina 4-(oximetil)fenilacetamidometilada⁸²

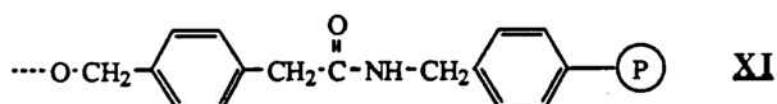


figura 2-6

(resina Pam, XI, figura 2-6), la cual proporciona un enlace ester entre ésta y el aminoácido que puede romperse en las condiciones antes reseñadas para la resina benzhidrilamina. El objeto de la elección de este soporte polimérico radica en la estabilidad del enlace antes mencionado frente a las condiciones ácidas a las que se somete la resina durante la síntesis peptídica. De cara a facilitar la cuantificación por hidrólisis y análisis de aminoácidos se ha incorporado al soporte polimérico fenilalanina como patrón interno. Este proceso se realiza directamente sobre la resina aminometilada utilizando N-terc-butoxicarbonilfenilalanina como aminoácido protegido⁸³ y dicitclohexilcarbodiimida como agente acoplante. El fragmento que nos queda para configurar la resina Pam se acopla directamente con el primer aminoácido del fragmento a estudiar, método que reduce, como se ha comprobado⁸², los problemas sintéticos. Ello se realiza liberando previamente la sal de dicitclohexilamonio del ácido para-(N-terc-butoxicarbonilaminoaciloximetil)fenilacético con ácido clorhídrico 1N (en el apartado siguiente se discute la síntesis de este derivado) y llevando a cabo el acoplamiento sobre la resina, previamente desprotegido el grupo amino de la fenilalanina con ácido trifluoroacético, en presencia de dicitclohexilcarbodiimida (metodología normalmente utilizada en una estrategia de terc-butoxicarbonilaminoácidos^{84,85}.

2.3.2. Síntesis de derivados de aminoácidos

2.3.2.1. Síntesis del Fmoc-Asp(Bu^t)-OH

Todos los derivados de aminoácidos utilizados en estas síntesis

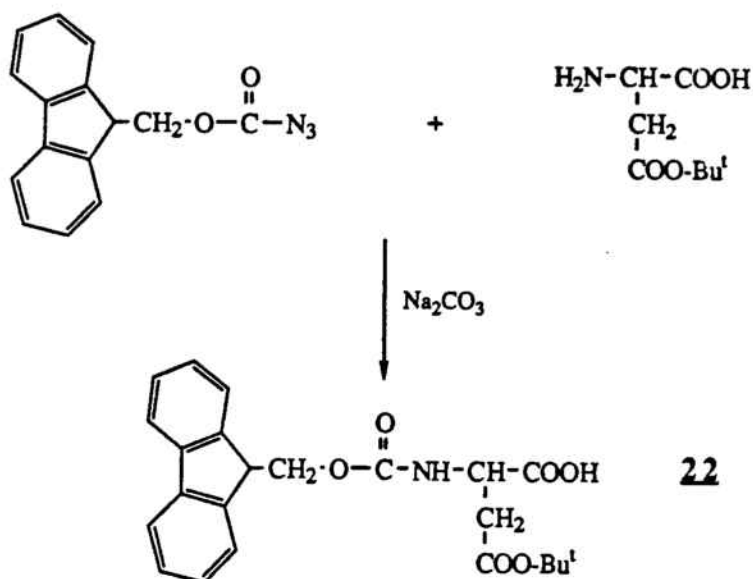


figura 2-7

han estado disponibles en nuestro laboratorio salvo para los casos del β -ester de terc-butilo del ácido N-terc-butoxicarbonilaspártico (**22**) y el ácido para-(terc-butoxicarbonilisoleucil)fenilacético (**14**) (ver siguiente subapartado).

El primer producto se sintetizó a partir del ester correspondiente y de la fluorenilmetoxicarbonilazida (figura 2-7), obtenida, a su vez, a partir del cloroformiato de fluorenilmetilo. La obtención del derivado **22** fué descrita por Chang y col.⁸⁶, los cuales utilizaron cloruro de fluorenilmetoxicarbonilo como reactivo de partida, no citando en ningún momento el rendimiento del proceso. Recientemente⁸⁷ se ha procedido a la síntesis de estos derivados a partir de la fluorenilmetoxicarbonilazida, método que ha proporcionado mejores rendimientos que el primero. Por este motivo, se ha procedido a la síntesis de este producto utilizando esta última metodología, obte-

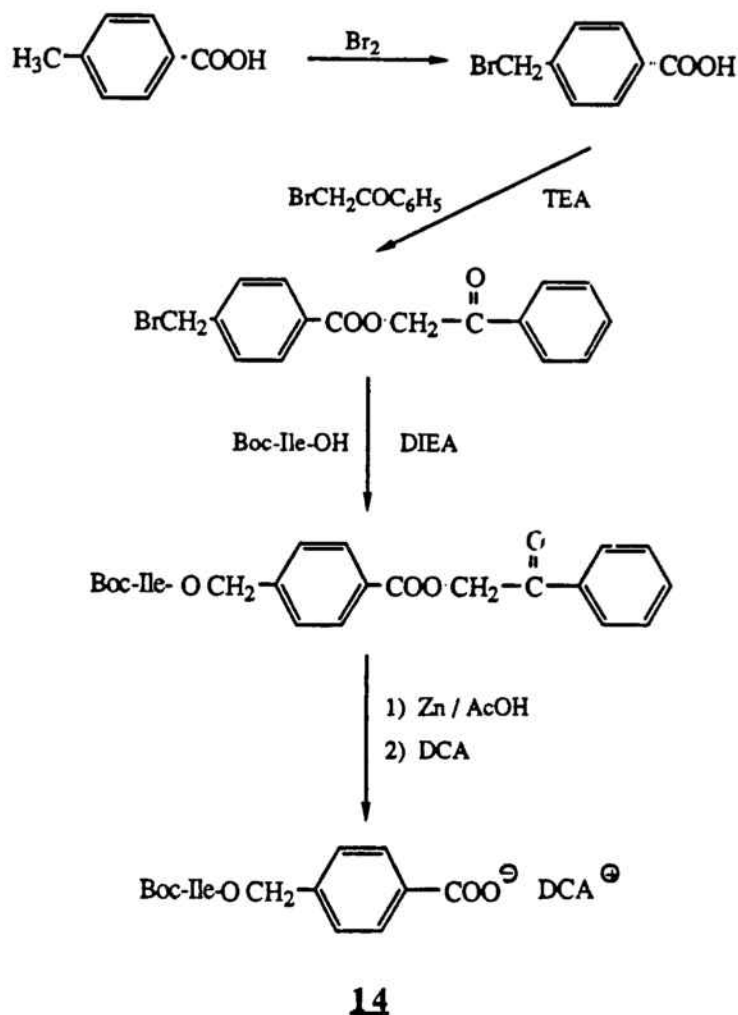


figura 2-8

niéndose un rendimiento del 71% después de cristalizar el acetato de etilo/hexano, y un poder rotatorio de -24 ($c=1$, dimetilformamida) (el descrito en la literatura es -20).

2.3.2.2. Preparación del ácido para-(terc-butoxicarbonilisoleuciloximetil)fenilacético

El método que se utilizó para la síntesis del derivado 14 es el

descrito por Mitchell y col.⁸² para la obtención de derivados similares de otros terc-butoxicarbonilaminoácidos (figura 2-8). Para preparar este producto partimos del ácido para-toluico para obtener como intermedio el ácido para-bromometilfenilacético por bromación en presencia de luz⁸⁸. A continuación, se procede a la síntesis del ester de fenacilo utilizando para ello bromoacetofenona en presencia de trietilamina, para seguir con la adición del terc-butoxicarbonilaminoácido en medio también básico de dicitclohexilamina. La reducción del ester de fenacilo anterior en medio ácido (ácido acético) nos proporciona el derivado deseado.

2.3.3. Síntesis de las distintas peptidil-resinas

La figura 2-9 muestra la síntesis de las tres peptidil-resinas. La estrategia sintética a seguir para la obtención de estos productos depende del tipo de grupo protector que se vaya a utilizar para el ácido aspártico. Tanto para el péptido que contiene Asp(Bz)⁸⁹ (18) como para el que posee Asp(cHex)⁶⁵ (16) se sigue el procedimiento habitual para terc-butoxicarbonilaminoácidos. Con respecto al péptido que contiene Asp(Bu^t)²³⁸ (17) la estrategia es sensiblemente diferente ya que el grupo terc-butilo es lábil a los ácidos, por lo que su presencia es incompatible con la utilización de terc-butoxicarbonilaminoácidos. Este problema queda solventado con el uso del grupo fluorenilmtoxycarbonilo⁹⁰ como protector del grupo amino del aminoácido. Dicho grupo, como ya se comentó en el Capítulo 1, es eliminado con piperidina en dimetilformamida al 20% en 10 minutos. Como grupos protectores de cadenas laterales para el resto de aminoácidos han sido utilizados el orto-clorobenciloxycarbonilo⁹¹ y el benciloxycarbonilo⁹² indistintamente para la lisina (el primero para la síntesis de las hexapeptidil-resinas 16 y 18, y el segundo para la hexapeptidil-resina 17) y el ciclohexilo para la tirosina⁹³. Para la obtención de los tres productos, se preparó un lote de tripeptidil-resina 15, de la cual se separaron diferentes alícuotas para la obtención de las tres

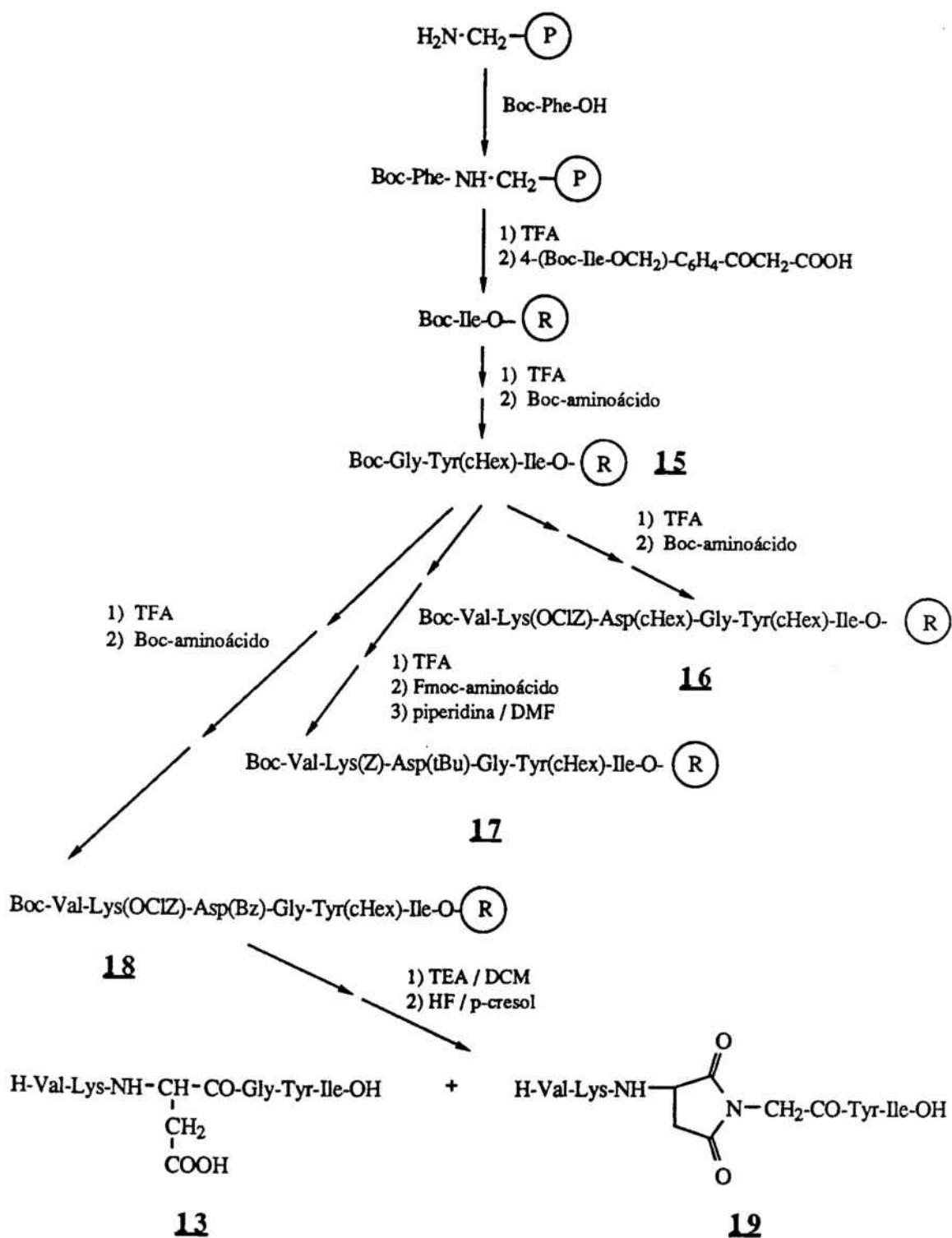


figura 2-9

hexapeptidil-resinas.

2.4. Obtención del péptido y la peptidil-imida libres

2.4.1. *Desprotección y liberación del péptido de la resina*

En la literatura se han descrito numerosos métodos para la eliminación de grupos protectores y liberación del péptido de la resina (los de más corriente utilización se pasarán a comentar más adelante cuando se expongan las consecuencias de su utilización en la formación de péptido succinimídico para nuestro caso particular). Uno de ellos, el del fluoruro de hidrógeno^{80,81} es el que se ha utilizado para obtener péptido e imida suficientes para su caracterización. Este, también llamado "High", supone el tratamiento de la resina con el ácido anteriormente mencionado a baja temperatura. Uno de los problemas importantes que supone este procedimiento es el hecho de que puede dar lugar a procesos de C-alkilación sobre aminoácidos como la tirosina debido a la formación de carbocationes procedentes de los grupos protectores (mecanismo S_N1). Para evitar esto se suele adicionar una determinada cantidad de un denominado capturador de cationes o "scavenger" (anisol, para-cresol, tioanisol, etc.). Las condiciones que se han utilizado aquí han sido fluoruro de hidrógeno/para-cresol (9/1, v/v) durante una hora a 0°C. Los rendimientos han sido en todos los casos superiores al 80%.

2.4.2. *Síntesis de la imida a partir de la peptidil-resina 18*

La obtención de estos dos péptidos a gran escala para su caracte-

rización se llevó a cabo a partir de la peptidil-resina 18. De entre los métodos que se encuentran descritos en la literatura para la formación de imidas cíclicas peptídicas se ha elegido el que hace uso de la trietilamina como base ⁶⁵, por ser el que mayores rendimientos ha producido (figura 2-9). Sin embargo, en nuestro caso, no se consiguió pasar del 60 %, incluso con largos tiempos de tratamiento (65 h); este resultado se aprovechó para obtener de un mismo lote de resina los dos péptidos, ya que, como se comentará más adelante, se pudo acceder fácilmente a la separación de éstos por cromatografía de intercambio iónico. Así, la resina 18 se trató con trietilamina al 10 % en cloruro de metileno durante 24 h, obteniéndose, tras haber realizado el tratamiento con fluoruro de hidrógeno y el cromatografiado del crudo peptídico, aproximadamente la misma cantidad molar de cada uno de ellos. Las técnicas espectroscópicas (de las cuales se hablará más adelante) utilizadas para su identificación confirmaron la identidad del péptido 13 y de la imida 19.

2.5. Comportamiento cromatográfico de los péptidos estudiados

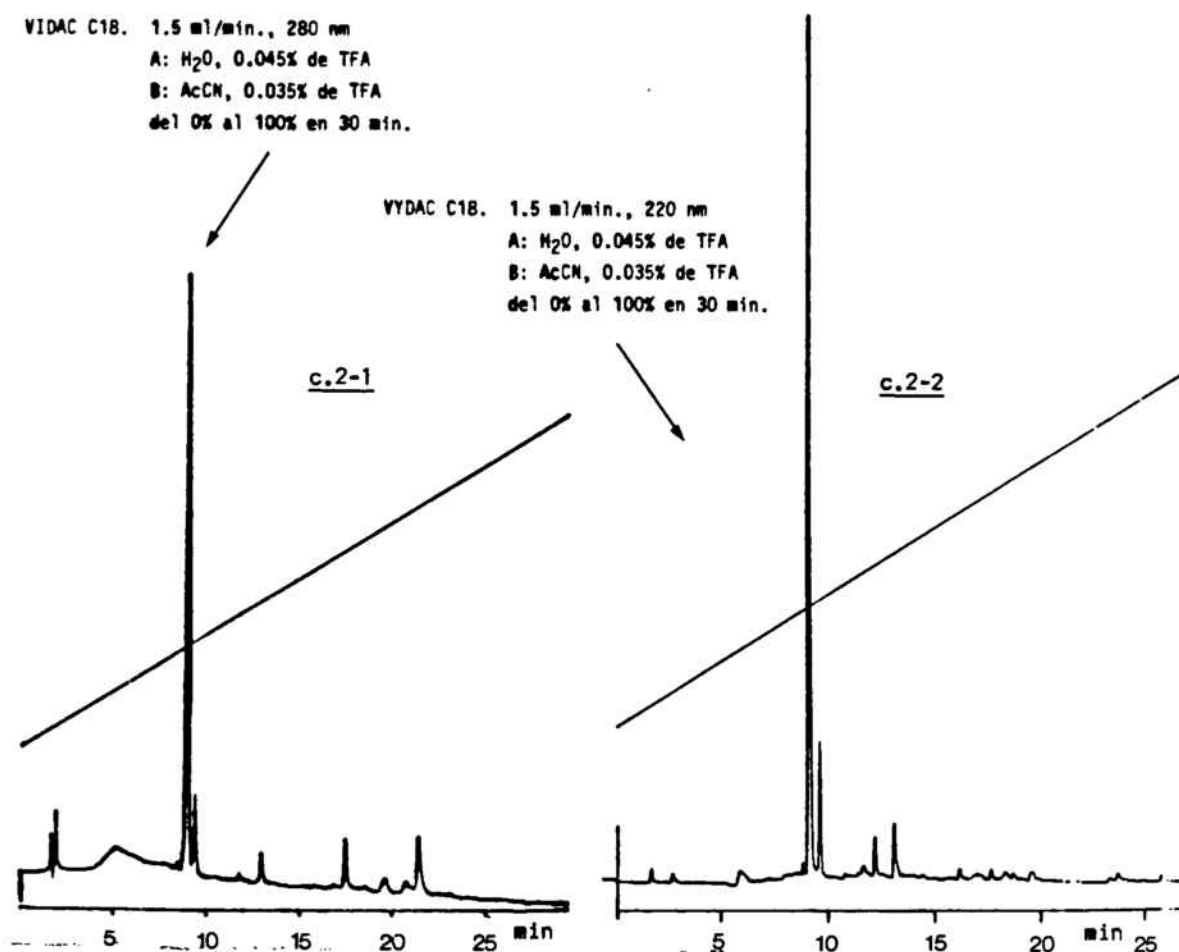
2.5.1. *Cromatografía analítica*

La peptidil-resina utilizada para la caracterización del péptido y del subproducto de reacción fué la 18, ya que, como se ha comentado en la introducción y en el subapartado anterior, el grupo bencilo es especialmente sensible a las bases, lo cual se puede aprovechar para la obtención de péptidil-imida a gran escala.

Previamente a ello se llevó a cabo el estudio cromatográfico del problema. Una vez tratada la resina con fluoruro de hidrógeno anhidro durante una hora a 0°C en presencia de para-cresol se obtuvo un crudo

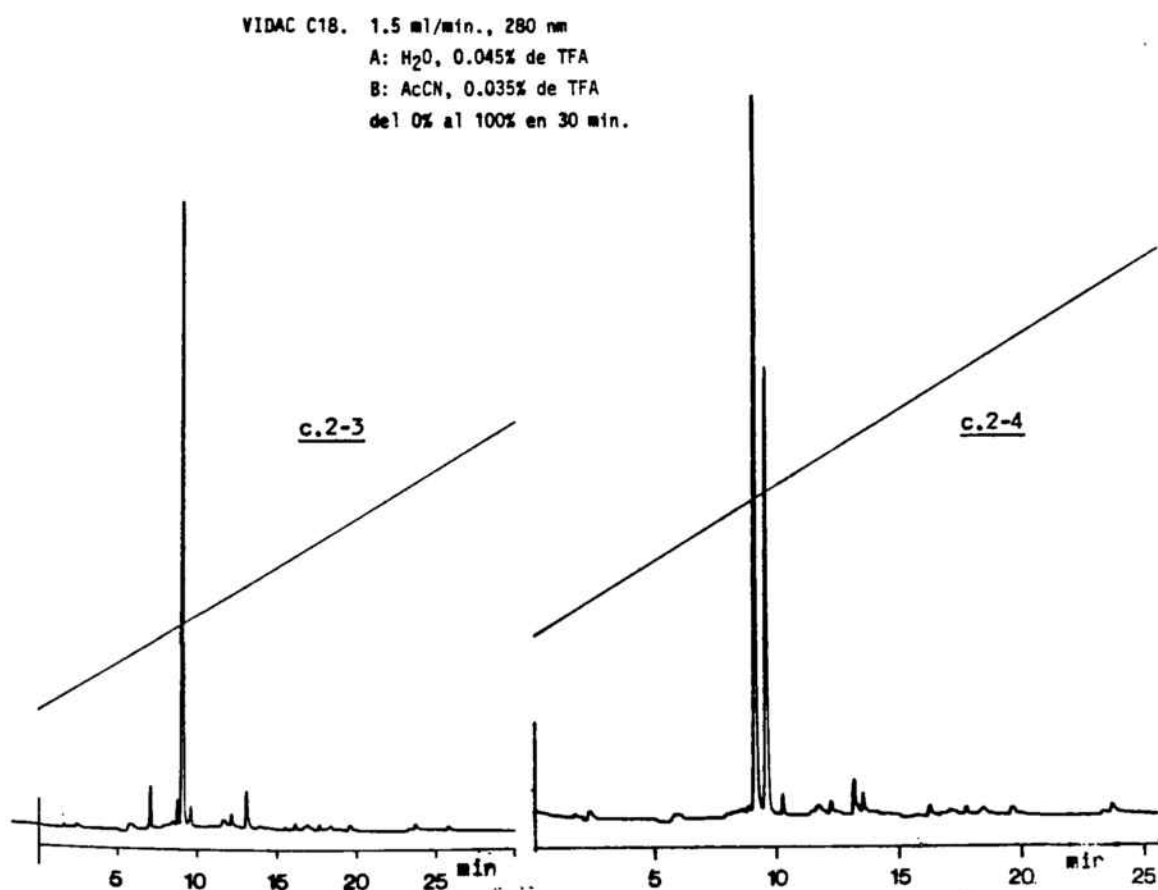
peptídico que analizado por HPLC analítico mostró la presencia de un pico mayoritario cuya absorción tenía lugar tanto a 220 nm (enlace peptídico) como a 280 nm (grupo fenol de la tirosina); los cromatogramas 2-1 y 2-2 muestran este resultado.

El tratamiento de este crudo peptídico con una base en medio

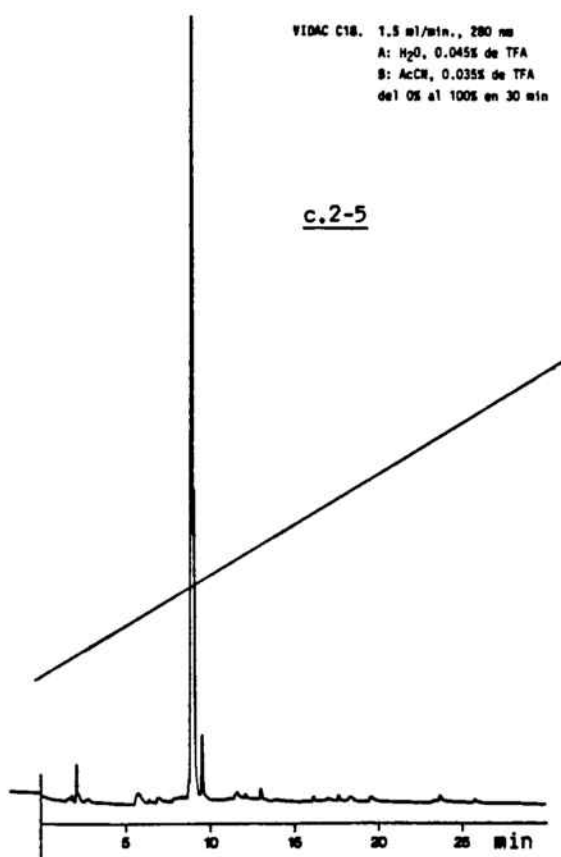


acuoso nos podía dar una idea sobre la identidad del péptido-imida debido a que el comportamiento cromatográfico de alguno de los picos del cromatograma anterior (suponiendo que se haya formado este subproducto, lo cual es factible) debería verse modificado debido a la apertura del anillo para dar lugar a los péptidos " α " y " β ". Si tratamos la muestra anterior con trietilamina acuosa al 5% durante doce horas a temperatura ambiente, podemos observar (cromatograma 2-3) la desaparición de un pico con un tiempo de retención algo mayor que el del pico mayoritario, el cual parece no verse modificado por el

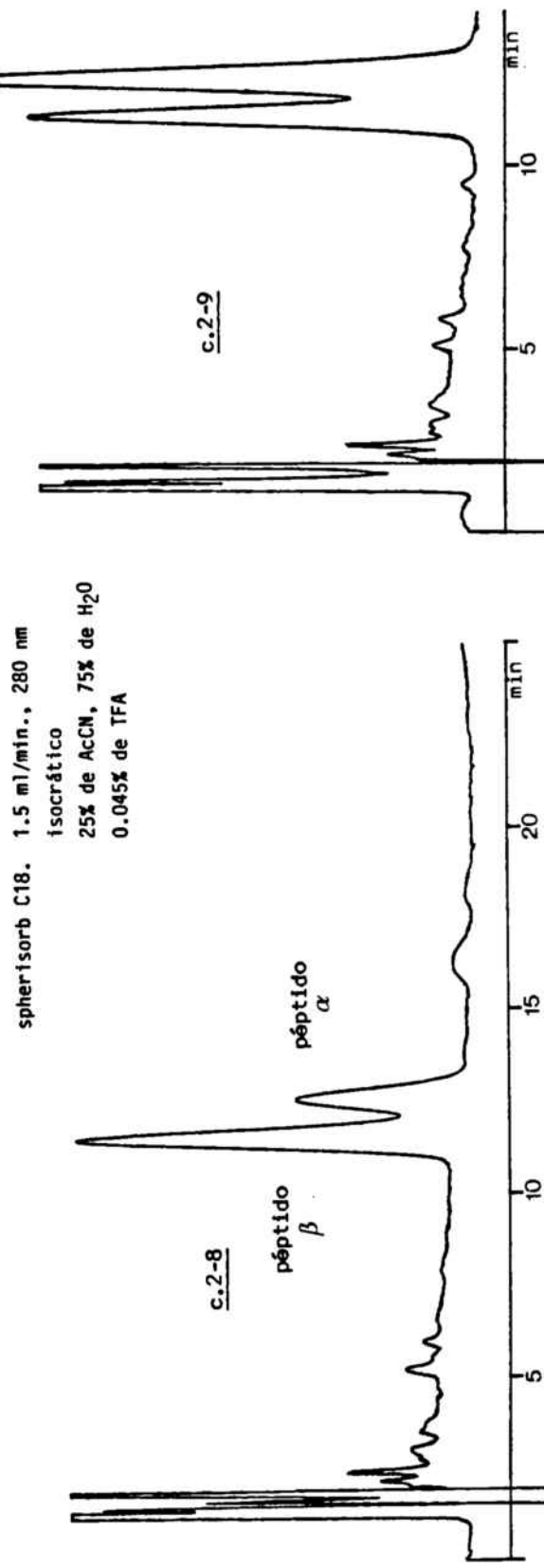
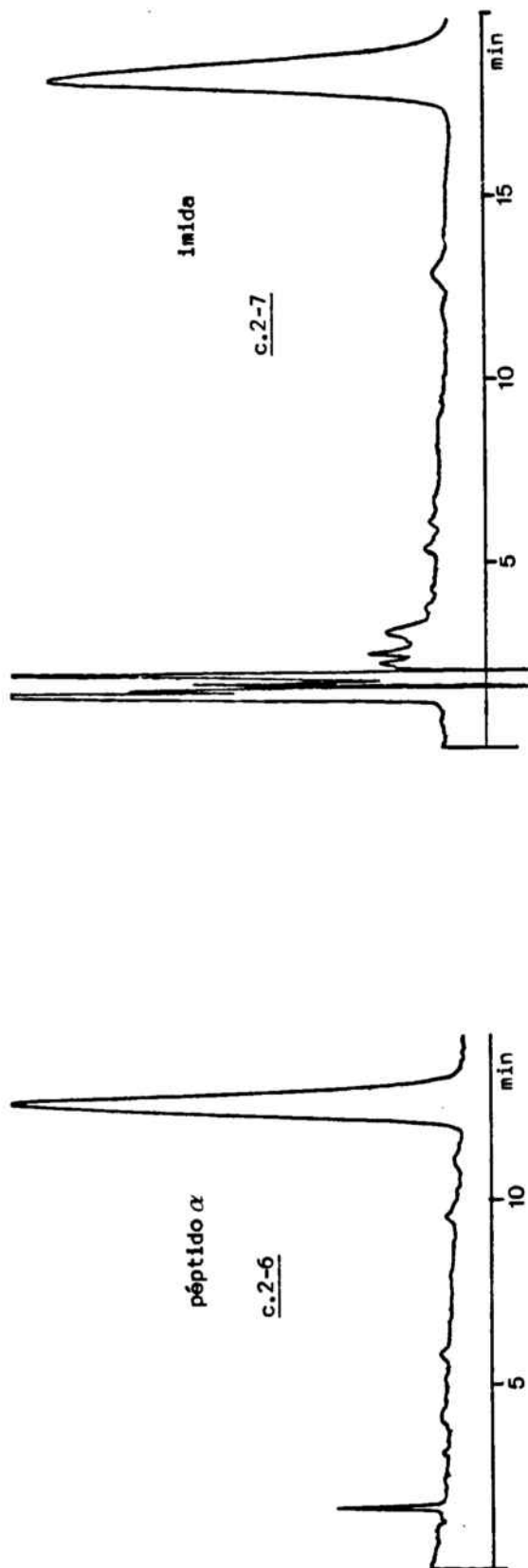
proceso; tanto el uno como el otro mostraron un análisis de aminoácidos correcto. El problema puede ser abordado desde el punto de vista opuesto, es decir, podemos provocar la formación de subproducto con extrema facilidad como ya se ha señalado; así, se procedió al tratamiento de la peptidilresina con trietilamina al 50% en cloruro de metileno durante 65 horas a temperatura ambiente, dando como resultado un crudo peptídico (una vez realizada la aplicación del fluoruro de hidrógeno) que analizado por HPLC mostró el cromatograma 2-4. Como vemos, el cromatograma 2-2 puede ser relacionado con este último debido a la coincidencia en tiempos de retención del producto que desaparece en el primer experimento y del que aparece en una gran extensión en el segundo. La presencia de la imida puede quedar confirmada con un último ensayo, la detección del péptido " β ". Con este objetivo se procedió a separar una pequeña cantidad del producto aparecido (supuesto péptido-imida) en el segundo experimento por cromatografía semipreparativa.



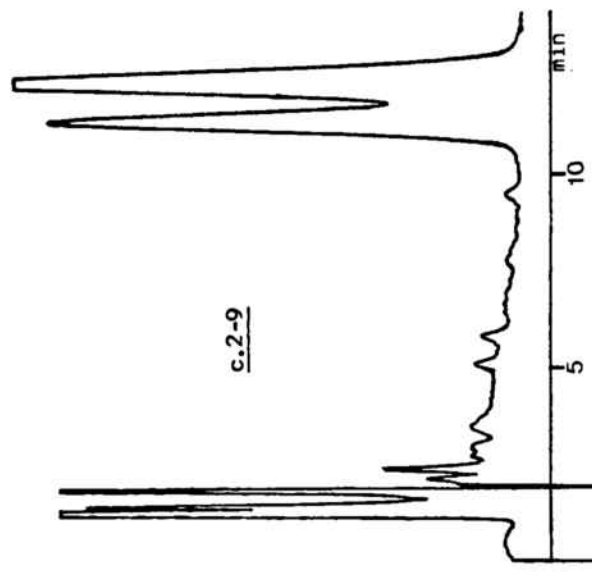
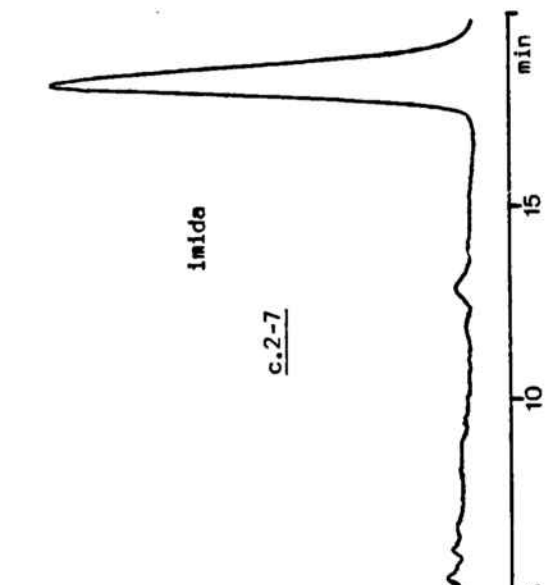
Cabe esperar que en las condiciones cromatográficas utilizadas hasta ahora la separación entre los péptidos " α " y " β " sea muy pobre debido a la gran similitud entre ellos. En la literatura podemos encontrar métodos cromatográficos a aplicar para este tipo de problemas, los cuales han conducido a resultados satisfactorios⁹⁴. Recientemente, Gozzini y col.⁹⁵ han descrito unas condiciones cromatográficas basadas en los distintos pKs de los grupos carboxilo " α " y " β " del ácido aspártico; éstas suponen la utilización de una fase móvil tamponada a un pH ácido adecuado (3.5 en su caso), consiguiendo así mejores resultados. Estas consideraciones también se aplicaron a este estudio. Primeramente, la imida obtenida por cromatografía semipreparativa se trató con trietilamina acuosa, obteniéndose, tras la reacción con fluoruro de hidrógeno, un crudo cuyo análisis está representado en el cromatograma 2-5. Podemos observar en él la aparición de un producto



de forma mayoritaria con un tiempo de retención ligeramente inferior al del obtenido desde un principio con tratamiento directo de fluoruro de hidrógeno; también se hace visible la aparición de otro producto



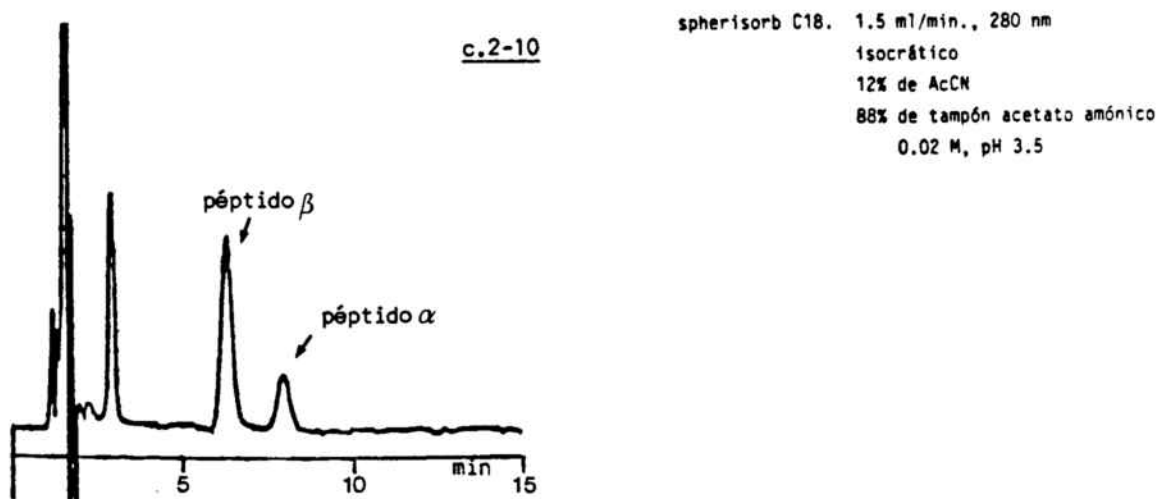
spherisorb C18. 1.5 ml/min., 280 nm
isocrático
25% de AcCN, 75% de H₂O
0.045% de TFA



cuyo tiempo de retención es idéntico al asignado como péptido " α ". Si tenemos en cuenta los resultados obtenidos por Battersby⁵² el pico mayoritario debería ser el péptido " β "; por otro lado, se comprobó también que éste suele eluir antes que el " α "^{94,95}.

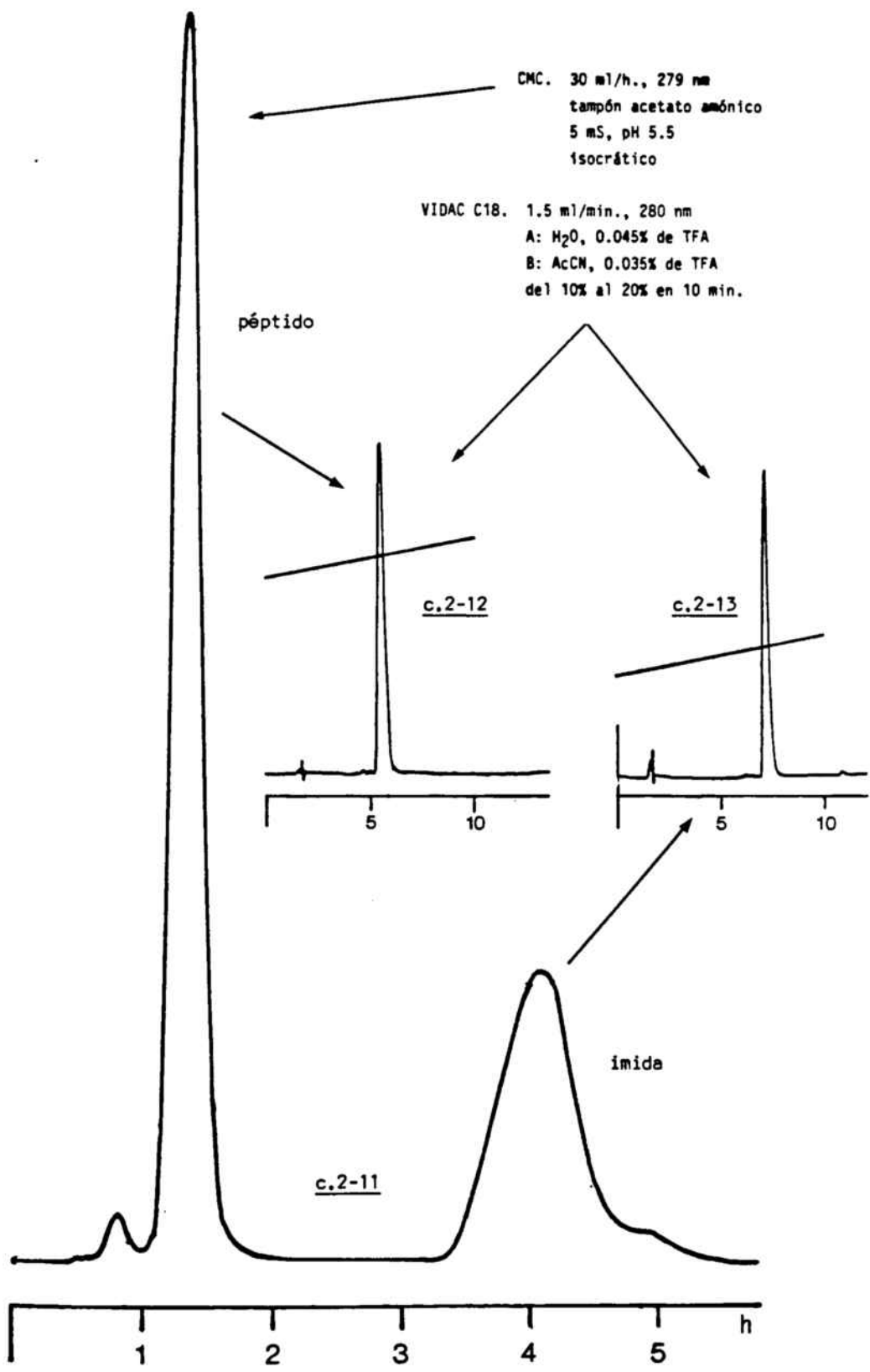
Puesto que las condiciones deseables para abordar la separación de estos dos péptidos son incompatibles con la columna utilizada hasta ahora, se hizo uso de otra, cuyos análisis para los péptidos " α " e imida están representados en los cromatogramas 2-6 y 2-7, utilizando condiciones isocráticas. El resultado del tratamiento con trietilamina acuosa al 5% se muestra en el cromatograma 2-8. Si se realiza una coinyección de los productos del tratamiento anterior y del supuesto péptido " α " obtenido por tratamiento con fluoruro de hidrógeno directo podemos comprobar la identidad del producto minoritario del primero con el producto mayoritario del segundo, lo cual concuerda con lo esperado (cromatograma 2-9). Aplicando las consideraciones de Gozzini, se consiguió una separación completa de los dos péptidos utilizando como eluyente una solución tamponada 0.02 M de acetato amónico a pH 3.5 con un 12% de acetonitrilo (cromatograma 2-10).

Una vez se detectaron los péptidos por cromatografía analítica, se procedió a su separación a gran escala.



2.5.2. Cromatografía preparativa

Para separar el péptido " α " del péptido-imida se hizo uso de la



cromatografía de intercambio iónico. Este método resulta ser muy adecuado en este caso particular debido a que el péptido posee una carga más (negativa) que la imida, característica que puede ser aprovechada para su separación a una fuerza iónica y pH adecuados. Este objetivo se consiguió con una columna de carboximetilcelulosa a pH 5.5 y una fuerza iónica de 5 mS. En estas condiciones la imida quedó mucho más retenida que el péptido (cromatograma 2-11).

Es conveniente, antes y después de la utilización de esta columna, hacer uso de una columna de exclusión molecular; en primer lugar para proceder a una prepurificación del crudo peptídico y, después, para cada uno de los péptidos, para llevar a cabo un desalado completo. Los cromatogramas 2-12 y 2-13 muestran al péptido " α " y a la imida una vez purificados de esta manera. Las condiciones cromatográficas utilizadas para la realización de estos dos últimos análisis se discutirán más adelante.

2.6. Caracterización del péptido y la imida

2.6.1. *Hidrólisis enzimática*

El método preliminar que se utilizó para la caracterización cromatográfica de los péptidos " α " e imida fué la determinación del contenido en aminoácidos por la técnica de hidrólisis y análisis de aminoácidos, mediante la cual se obtuvo un resultado idéntico para las dos sustancias debido a su mismo comportamiento químico frente a este ensayo. Este procedimiento también se puede aplicar al péptido designado como " β ", dando como resultado un contenido similar en aminoácidos.

Estos resultados, los cuales se han obtenido mediante una hidró-

aminoácido	hidrólisis enzimática(a)		hidrólisis ácida(b)	
	" α "	" β "	" α "	" β "
Asp	0.49	0.14	1.17	0.99
Gly	0.45	0.31	1.22	1.04
Val	1.00	1.00	0.83	0.94
Ile	0.62	0.18	0.93	1.00
Tyr	0.48	0.21	0.93	0.88
Lys	1.13	1.09	0.89	0.99

(a) leucinoaminopeptidasa, pH 8.5, 40°C, 24 h. (b) ácido clorhídrico 6 N, 110°C, 24 h.

TABLA 5.- Contenido en aminoácidos resultante de las hidrólisis ácida y enzimática del H-Val-Lys-Asp(CH₂-COOH)-Gly-Tyr-Ile-OH ("13") y del H-Val-Lys-Asp(COOH)-Gly-Tyr-Ile-OH (" β ")

lisis ácida a alta temperatura, no permiten, como es lógico, la diferenciación entre los tres productos, motivo por el cual se hace necesaria la utilización de otras técnicas para poder llevar a cabo su caracterización. Una de ellas podría ser la hidrólisis enzimática⁹⁶ ya que, a diferencia del péptido que podríamos llamar natural (" α "), los otros dos poseen una diferenciación estructural en un punto determinado de la cadena (enlace β entre dos aminoácidos y anillo interno tipo imida). Estas características estructurales provocarían una degradación incompleta enzimática. Para nuestro caso particular esto se comprobó con la L-leucinoaminopeptidasa, enzima hidrolítico que actúa sobre el extremo amino terminal del péptido. Cabe esperar, por lo tanto, para el péptido " β ", por ejemplo (la imida quedaría indirectamente caracterizada si el resultado es positivo) un análisis

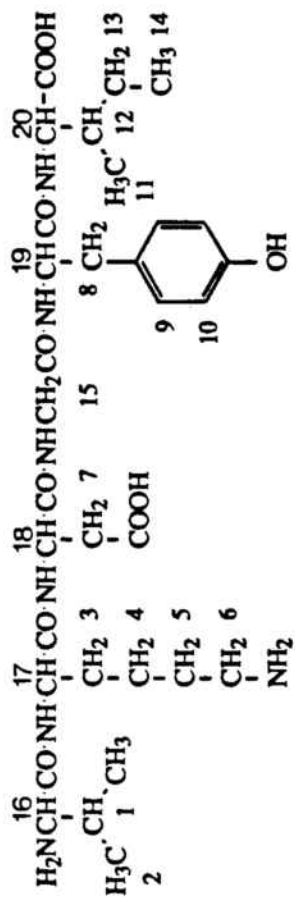
correcto para la lisina y la valina y valores anormalmente bajos para el resto de aminoácidos. Los resultados se muestran en la Tabla 5 (los valores tabulados corresponden a las 24 h de reacción).

De los resultados tabulados es necesario señalar que los valores obtenidos en la hidrólisis enzimática del péptido " α " son más bajos de lo normal para el ácido aspártico, la glicina, la tirosina y la isoleucina, ya que cabría esperar una relación próxima a la unidad entre todos ellos. Esta anomalía se debe a que se ha utilizado la columna Vydac para la separación de los dos péptidos, los cuales, en las condiciones utilizadas, se han separado deficientemente, por lo que se han colectado las espaldas de los picos principalmente. A pesar de todo, la diferencia entre los valores obtenidos para las dos hidrólisis es clara.

2.6.2. Caracterización por métodos espectroscópicos

2.6.2.1. Resonancia magnética de protón

En las figuras 2-10 y 2-11 se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear de protón, realizados con un aparato de 200 Mz, del péptido " α " y de la imida, los cuales pueden ser interpretados con relativa facilidad con la ayuda de tablas⁹⁷ y experimentos de doble resonancia. Los sistemas más interesantes a analizar son el ABX del ácido aspártico y el sistema AB de la glicina, ya que son los aminoácidos implicados en la formación del anillo de imida, por lo que cabe esperar diferencias apreciables para éstos entre los dos péptidos; para el resto de protones, los desplazamientos químicos son similares en los dos casos. La primera diferencia importante entre los dos espectros la encontramos en la zona comprendida entre δ 2.5 y 3.5 (protones AB de los sistemas ABX del aspártico y la tirosina). Por otro lado, si observamos la zona de los protones " α " podemos encontrar la segunda gran diferencia correspondiente al sistema AB de la



H₂O

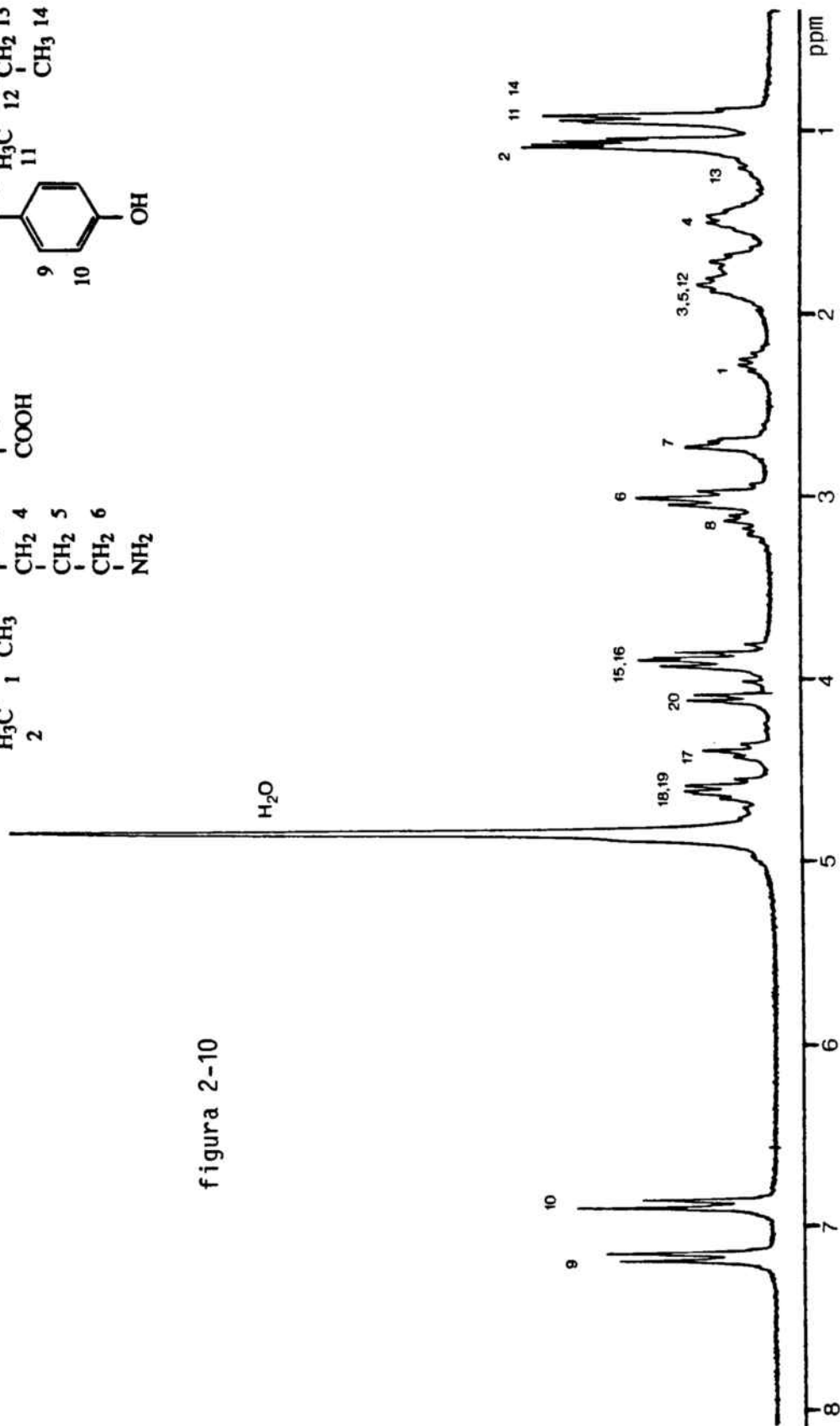


figura 2-10

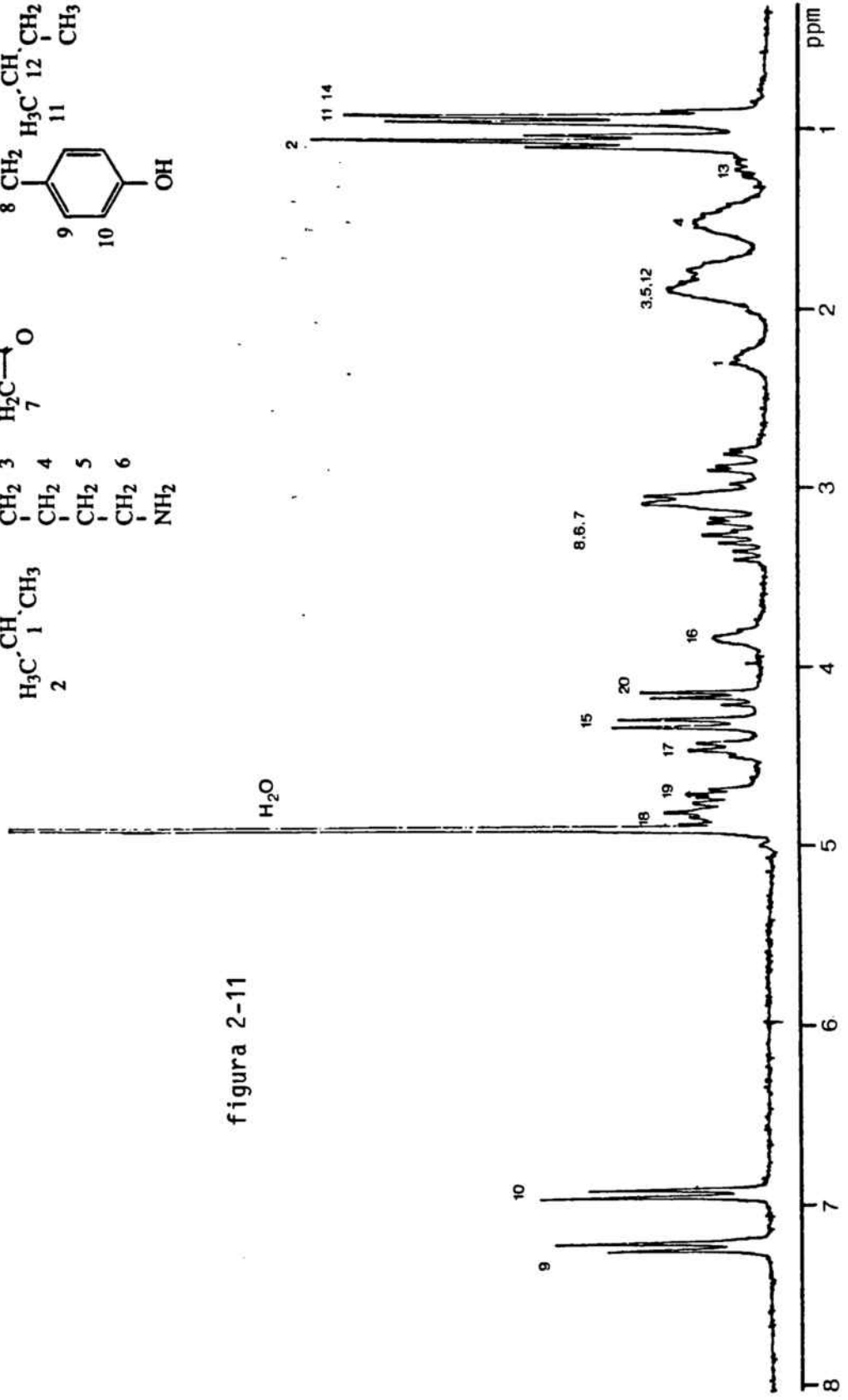
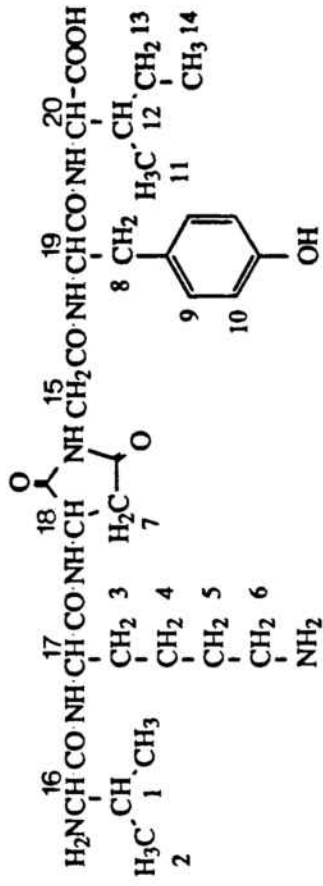


figura 2-11

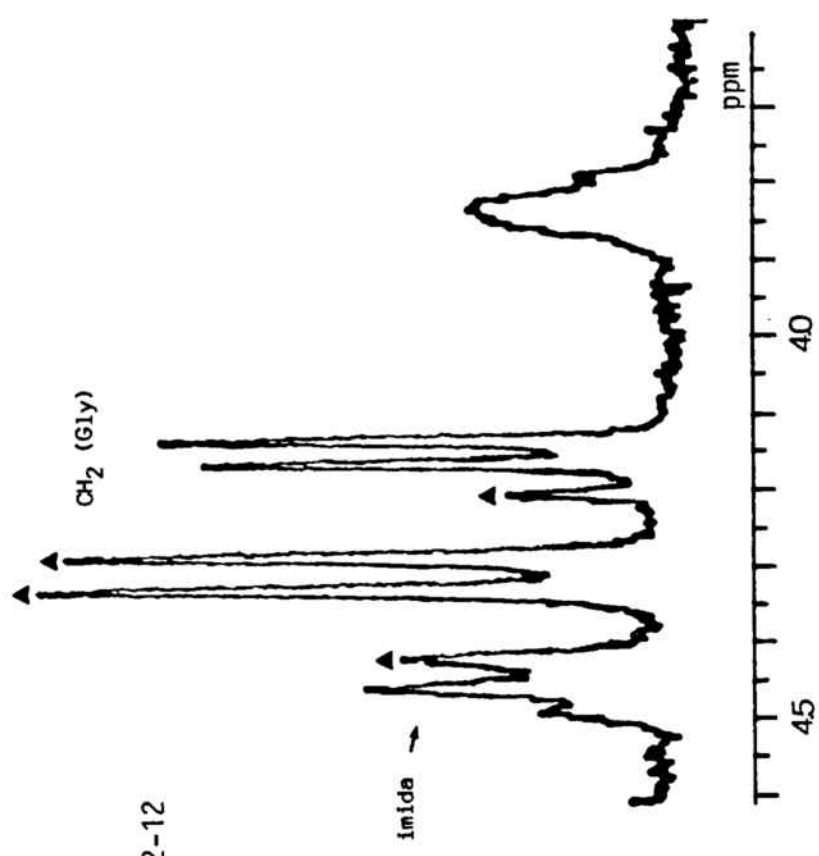
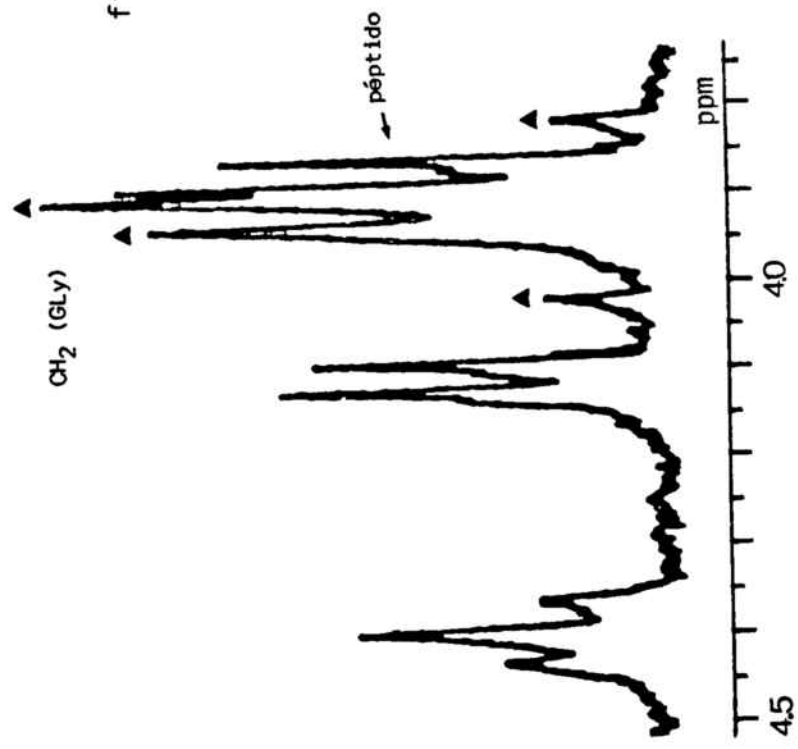


figura 2-12



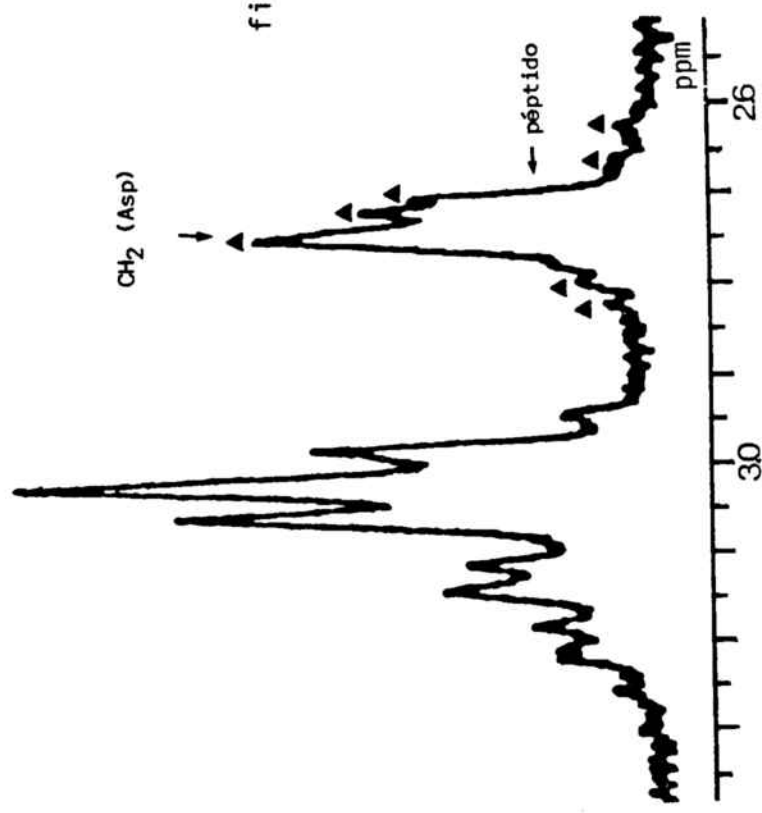
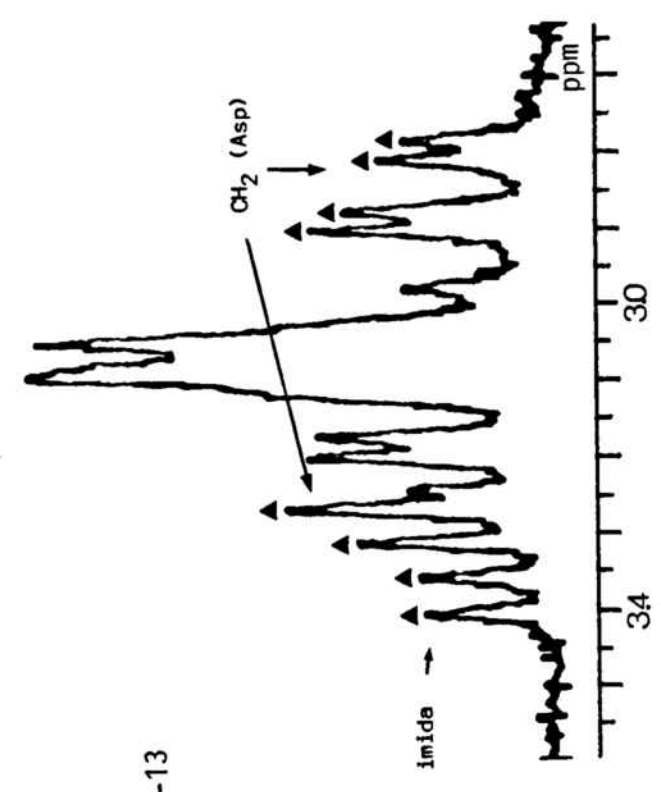


figura 2-13



glicina, el cual sufre un desplazamiento hacia campos más bajos del orden de 0.4 ppm en el caso de la imida, fácilmente explicable por el mayor desapantallamiento producido por el grupo imido frente al amido (figura 2-12). Con respecto a los protones unidos al carbono "α" del ácido aspártico y la tirosina, estos han sido asignados en la zona entre δ 4.5 y 4.8 ; estos átomos aparecen en el péptido con desplazamientos químicos muy parecidos, en cambio, en la imida se produce una diferenciación apreciable entre los dos protones (de 0.1 a 0.2 ppm). Los resultados obtenidos a través de experimentos de irradiación realizados sobre los protones de la cadena lateral pertenecientes al sistema ABX los dos aminoácidos son interesantes. Así como en el péptido los sistemas AB de la tirosina y el ácido aspártico son claramente diferenciables (aproximadamente δ 3.1 y 2.8 respectivamente), en la imida las señales correspondientes al último aminoácido citado sufren un gran ensanchamiento en su distribución (δ 2.7 y 3.3 para los desplazamientos de los protones AB), permaneciendo prácticamente inalterado el sistema de la tirosina (figura 2-13). Es evidente que la restricción en la movilidad de la cadena lateral del ácido aspártico al formar parte de un ciclo de cinco eslabones tipo imida queda reflejada en este resultado. Por otro lado, la rigidez del sistema puede permitir la determinación de la conformación anular y la asignación de los protones pro-R y pro-S de la cadena lateral del aminoácido mediante la aplicación de la ecuación de Karplus-Altona ⁹⁸ modificada con la introducción de las correcciones para los sustituyentes en posición β. Los resultados obtenidos para las constantes de acoplamiento son 9.8 y 5.0 Hz (resultados experimentales de 8.8 y 5.3 respectivamente), los cuales corresponden a la conformación eclipsada, resultado que podría

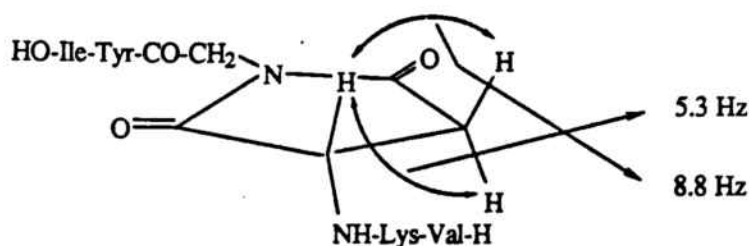


figura 2-14

explicarse por la extensión de conjugación entre los grupos carbonilo, favoreciendo así la planaridad del anillo heterocíclico (figura 2-14).

2.6.2.2. *Espectroscopia infraroja*

Las imidas pueden ser identificadas por espectroscopia infraroja por su fuerte absorción entre 1670 cm^{-1} y 1740 cm^{-1} debida a la vibración de tensión del grupo carbonilo⁹⁹. En el caso de las imidas cíclicas, se pueden observar dos bandas a 1700 cm^{-1} y alrededor de 1750 cm^{-1} . En la figura 1-15 se muestran los espectros de infrarojo del péptido y de la imida. Para este último producto, las dos bandas son perfectamente distinguibles (1710 cm^{-1} y 1780 cm^{-1}), a pesar de ser la segunda de intensidad mucho más débil.

2.7. Estudio de la formación de péptidil-imida

2.7.1. *Condiciones cromatográficas utilizadas*

Todos los resultados que se van a exponer a partir de ahora fueron obtenidos por cuantificación directa de los análisis de las muestras realizados por cromatografía analítica. La detección se realizó a 279 nm para evitar problemas de distinta absorción para el péptido y la imida; en cualquier caso, se comprobó por análisis de aminoácidos la equivalencia en la relación area/nmol entre los dos péptidos estudiados.

Con objeto de facilitar el estudio se buscó una relación separación cromatográfica/tiempo de elución más aceptable, encontrándose unas buenas condiciones utilizando un gradiente en 10 minutos del 10%

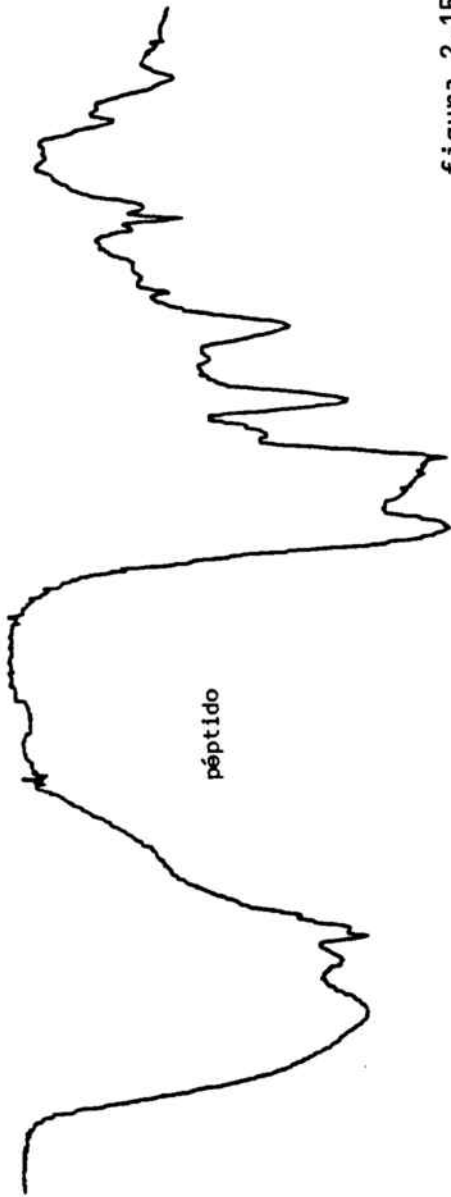
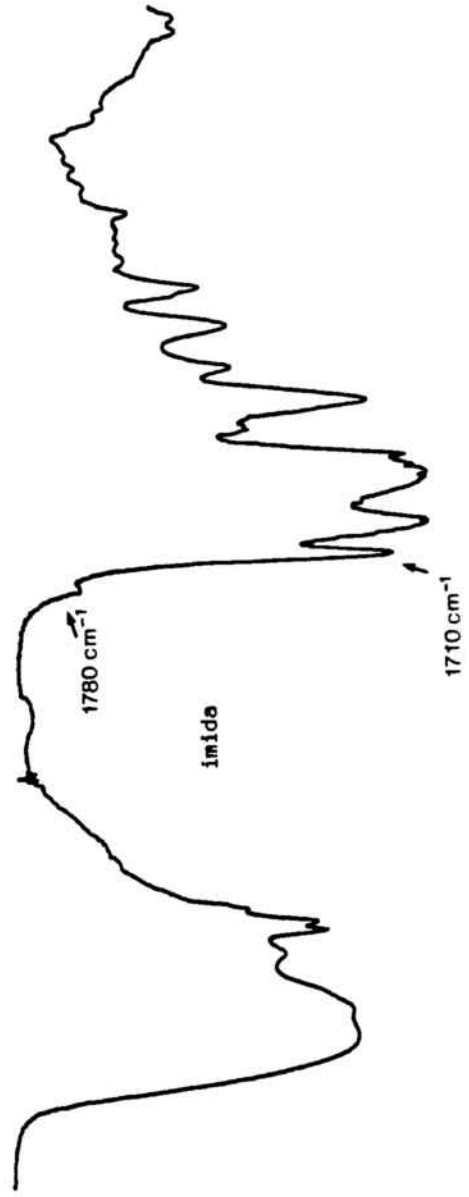
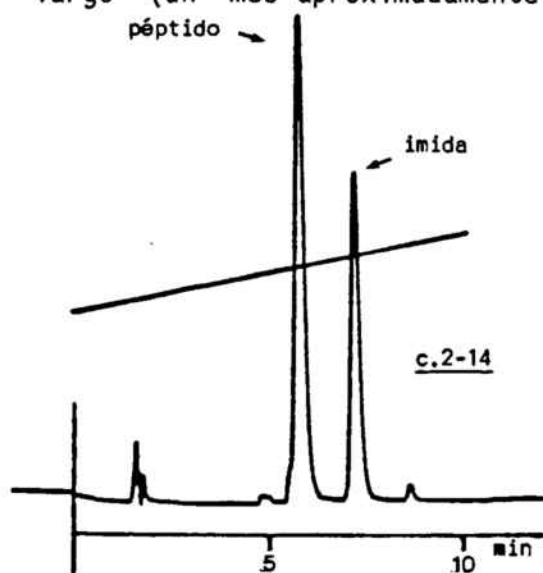


figura 2-15



de acetonitrilo al 20% del mismo (cromatograma 2-14).

Antes de pasar a comentar los datos obtenidos, es necesario tener en cuenta una posible fuente de error. Como se desprende de resultados encontrados en la literatura¹⁰⁰, se ha detectado la formación espontánea de péptido-imida en solución acuosa. Con objeto de corroborar este resultado en nuestro caso particular se encontró que una solución acuosa peptídica mantenida durante un periodo de tiempo relativamente largo (un mes aproximadamente) dió lugar a pequeñas cantidades de



VIDAC C18. 1.5 ml/min., 280 nm
A: H₂O, 0.045% de TFA
B: AcCN, 0.035% de TFA
del 10% al 20% en 10 min.

imida (menos de un 5%). Por otro lado, se comprobó que la imida sufría apertura (aproximadamente un 1% a las 4 h) en solución acuosa de ácido acético al 10% (condiciones de elución en la columna G-10 para desalado). Para evitar esto, los análisis se realizaron directamente del crudo peptídico obtenido tras el tratamiento con ácido fuerte, no interfiriendo en las condiciones cromatográficas utilizadas el para-cresol o el anisol empleados.

2.7.2. Influencia del medio ácido

2.7.2.1. Condiciones normales (fluoruro de hidrógeno, "High")

En una síntesis peptídica el medio ácido es utilizado, por un

lado, para la desprotección de los grupos α -amino (cuando se utiliza una estrategia de grupos protectores lábiles a los ácidos) y, por otro, al final de la síntesis, cuando hay que obtener el péptido totalmente desprotegido. Con respecto al primer caso, las condiciones son lo suficientemente suaves como para que no tenga lugar la reacción secundaria, o dicho de otro modo, los grupos protectores que se han estudiado aquí son estables en estas condiciones, más aún teniendo en cuenta que el péptido estudiado es de pequeño tamaño, lo que supone un corto número de ciclos de tratamiento con ácido trifluoroacético al 30% en cloruro de metileno^{64,65,101}. Quizás, quedaría por comprobar si la presencia del propio aminoácido durante el acoplamiento podría ser perjudicial si tenemos en cuenta que se utiliza en exceso y durante periodos de tiempo relativamente largos. Los resultados obtenidos con terc-butoxicarbonilvalina indican la no influencia de éste en condiciones similares a las utilizadas en síntesis de péptidos y durante un tiempo que supone 24 ciclos de dos horas cada uno (el comunmente utilizado en los acoplamientos).

<i>tipo de protección en el ácido aspártico</i>	<u>13</u>	<u>19</u>
<i>ciclohexilo^a</i>	94.5	5.5
<i>bencilo^a</i>	94.0	6.0
<i><u>terc</u>-butilo^a</i>	94.7	5.3
<i><u>terc</u>-butilo^b</i>	94.8	5.2

(a) fluoruro de hidrógeno/10% de p-cresol, 0°C, 1 h. (b) Desprotección previa de la cadena lateral del ácido aspártico con ácido trifluoroacético, seguida de las condiciones practicadas en (a).

TABLA 6.- *Formación de imida durante el tratamiento de las resinas Boc-Val-Lys(x)-Asp(y)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-CH₂-Pam (x: 2ClZ, y: Bz o cHex; x: Z, y: Bu^t) con fluoruro de hidrógeno en condiciones "High"*

Con respecto a la desprotección y liberación del péptido de la resina, los resultados obtenidos para las tres peptidil-resinas están recogidos en la Tabla 6. El primer resultado importante a tener en cuenta es la práctica no influencia del grupo protector en la etapa de tratamiento con fluoruro de hidrógeno. Merrifield y col.⁶², para el caso del grupo bencilo, estudiando el péptido Boc-Glu(Bz)-Asp(Bz)-Gly-Thr(Bz)-OH en condiciones similares a las aquí utilizadas, encontraron una formación de imida de un 99%. Los resultados de Tam y col.⁶⁵ con respecto al mismo péptido protegido, también indicaron una proporción elevada de subproducto. Sin embargo, se obtuvieron valores más concordantes a los aquí encontrados (7%)⁶⁶ para el péptido Boc-Ala-Asp(Bz)-Gly-OH, lo cual puede evidenciar una dependencia de este proceso no deseado con la secuencia del péptido. Por otro lado, los valores descritos en la literatura para el grupo ciclohexilo son del mismo orden que los encontrados aquí (4.4%)⁶⁵ y 4.7%)⁶⁶.

El resultado obtenido para el grupo terc-butilo también es interesante. Wang y col.⁷⁸, utilizando una estrategia parecida para el péptido Z-Arg(NO₂)-Glu(Bz)-Leu-Glu(Bz)-Asp(Bu^t)-Gly-Thr(Bz)-Pro-Arg(NO₂)-OH, aunque liberando al mismo tiempo el péptido de la resina, no detectaron la formación de péptidil-imida; sin embargo, tras la etapa posterior de desprotección del resto de aminoácidos con fluoruro de hidrógeno encontraron pequeñas cantidades de subproducto. Para corroborar este resultado se trató la peptidil-resina 17 con ácido trifluoroacético al 30% en cloruro de metileno durante 30 min, previa a la desprotección con fluoruro de hidrógeno; el resultado que muestra la Tabla 6 indica también que la aparición de imida tiene lugar durante la etapa de desprotección global. Para terminar de confirmar este resultado se procedió al tratamiento del péptido puro con fluoruro de hidrógeno en las mismas condiciones, encontrándose un 5.9% de imida, valor similar al anterior.

2.7.2.2. *Distintas condiciones ácidas*

Se han desarrollado varios métodos para la desprotección de

péptidos, los cuales incluyen un tratamiento con ácido fuerte. Dichos métodos están dirigidos hacia un intento de supresión de los procesos de C-alquilación que puedan tener lugar (mecanismo S_N1), haciendo uso para ello de sustancias nucleófilas adecuadas (sulfuro de dimetilo, etanoditiol, etc) (mecanismo S_N2) en diferentes condiciones. Aquí, se han elegido los dos métodos más comúnmente utilizados, junto con el

<i>reactivo</i>	<u>13</u>	<u>19</u>
<i>fluoruro de hidrógeno (High)^a</i>	94.7	5.3
" <i>b</i>	94.1	5.9
<i>fluoruro de hidrógeno (Low-High)^c</i>	88.0	12.0
<i>ácido trifluorometanosulfónico^d</i>	91.4	8.6

(a) 10% de p-cresol, 0°C, 1 h. (b) 10% de anisol, 0°C, 1 h. (c) Acido/sulfuro de dimetilo/p-cresol (6.5:2.5:1), 0°C, 2 h; seguido de condiciones similares a las de (a). (d) Acido/ácido trifluoroacético/sulfuro de dimetilo/p-cresol (10:50:30:10), 0°C, 4 h.

TABLA 7.- *Formación de imida durante el tratamiento de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-CH₂-Pam con diferentes condiciones ácidas*

empleado hasta ahora. Uno de ellos supone un primer tratamiento con fluoruro de hidrógeno en presencia de sulfuro de dimetilo, para seguir con otro tratamiento con el mismo ácido en condiciones normales¹⁰³ (método también llamado "Low-High"). El otro método supone la sustitución del fluoruro de hidrógeno por ácido trifluorometanosulfónico en presencia del mismo nucleófilo¹⁰². Los experimentos se realizaron sobre la peptidil-resina 17, mostrándose los resultados obtenidos en la Tabla 7. Como podemos observar, todo parece indicar una relación entre la cantidad de imida formada y el tiempo de reacción; así, el valor más elevado se encontró para el método "Low-High", el cual supone tres horas de tratamiento. Con ácido trifluorometanosulfónico

(condiciones más suaves) para un tratamiento de cuatro horas, se obtuvo un valor intermedio; este resultado es algo superior a los valores obtenidos por Fujii y col.⁶⁶ al estudiar la serie de péptidos Z(OMe)-Ala-Asp(OR)-Gly-OBz, donde R es bencilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo, los cuales oscilan entre el 1.4% para el grupo ciclopentilo y el 3.2% para el grupo ciclooctilo, para un tratamiento de dos horas y una concentración 1M en ácido trifluorometanosulfónico (4.5 M la utilizada aquí).

2.7.3. *Influencia del medio básico*

2.7.3.1. *En presencia de DIEA*

La utilización de una determinada base en la síntesis de péptidos tiene como objetivo normalmente la neutralización del medio tras la desprotección del grupo amino terminal llevada a cabo con ácido trifluoroacético; por otro lado, ciertos grupos protectores, como el grupo fluorenilmetoxicarbonilo, hacen también necesaria su utilización para proceder a su eliminación (piperidina en este caso concreto).

Para las etapas de neutralización desde un principio se utilizó la trietilamina, pero con el tiempo fué sustituida por la diisopropil-etilamina por diversos motivos (estabilidad de los grupos protectores, reacciones secundarias debidas a su caracter nucleófilo, etc.). Por esta razón, nuestro estudio se centró en esta última, aunque la trietilamina se utilizó con objeto de obtener péptido-imida en cantidades apreciables a partir de la peptidil-resina 18⁶⁵ para su caracterización. Hay que destacar, sin embargo, que en un primer intento se realizó un tratamiento con trietilamina al 5% en cloruro de metileno durante 60 h y temperatura ambiente, obteniéndose un 54% de imida; en un segundo intento, con objeto de obtener una cantidad mayor, se llevó a cabo un tratamiento con la misma base al 50% durante 65 h a la misma temperatura, obteniéndose, en este caso, sólo el 39% de imida. Este

resultado podría explicarse por una disminución en el hinchamiento de la resina provocada por un aumento en la concentración de base. Por otro lado, Tam⁶⁵, en las primeras condiciones citadas y para el péptido mencionado en el apartado anterior, obtuvo un 100% de imida a las 24 horas, lo cual sugiere nuevamente una dependencia con la secuencia peptídica.

<i>tipo de protección en el ácido aspártico^a</i>	<u>13</u>	<u>19</u>
<i>ciclohexilo</i>	93.6	6.4
<i>bencilo</i>	93.5	6.5
<u><i>terc-butilo</i></u>	93.6	6.4

(a) 5% de diisopropiletilamina en cloruro de metileno, temperatura ambiente, 10 h. (b) Los valores tabulados corresponden a la suma de la cantidad de imida formada durante el tratamiento con base y la obtenida durante la etapa posterior de desprotección y liberación del péptido de la resina con fluoruro de hidrógeno en condiciones "High" (ver Tabla 6).

TABLA 8.- *Influencia de la diisopropiletilamina sobre las tres peptidil-resinas estudiadas (ver Tabla 6)*

La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos tras un tratamiento con diisopropiletilamina para las tres peptidil-resinas. Las condiciones utilizadas son las que se aplican normalmente en síntesis de péptidos en fase sólida, salvo en el tiempo empleado, el cual viene a representar 50 ciclos de acoplamiento. Como podemos observar, los resultados obtenidos en los tres casos son similares y ligeramente superiores a los encontrados para la etapa de desprotección, siendo las diferencias de alrededor el 1%. Si tenemos en cuenta las condiciones utilizadas para evaluar estos resultados, podemos concluir que la diisopropiletilamina no influye prácticamente en la formación de imida con la utilización de los tres protectores estudiados. En la literatura podemos encontrar resultados sorprendentes para el grupo bencilo como los de Blake⁶⁴, quien obtuvo un 88% a las 22 horas al estudiar el

péptido Boc-Ala-Asp(Bz)-Gly-OH, o Tam⁶⁵, el cual describe en sus estudios un 51% de subproducto a las 24 horas en condiciones muy parecidas. Aquí nos encontramos otra vez una probable dependencia de la magnitud del proceso con la secuencia peptídica.

2.7.3.2. En presencia de piperidina

En la síntesis de la peptidil-resina 17, a parte de la diisopropiletilamina, también fué necesaria la utilización de piperidina para eliminar los grupos fluorenilmtoxycarbonilo de dos aminoácidos. Esto llevó a realizar también un estudio del efecto de esta base sobre las tres peptidil-resinas en la formación de subproducto. Desde este punto de vista, la piperidina ha sido poco estudiada, encontrando como única referencia en la literatura a Colombo ¹⁰⁴, el cual estudió la estabi-

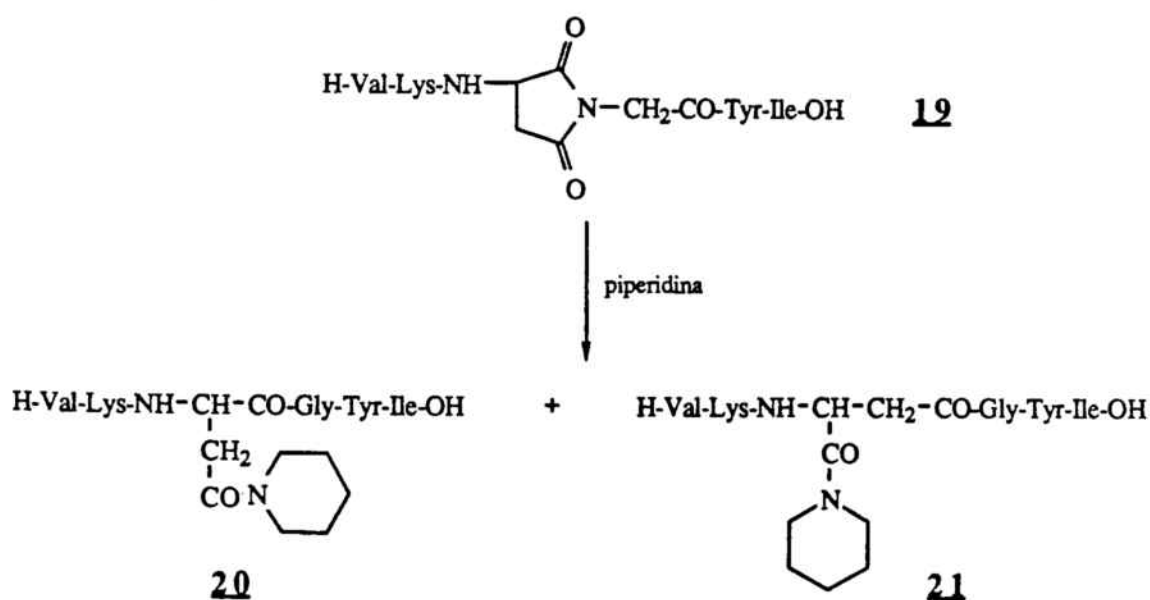
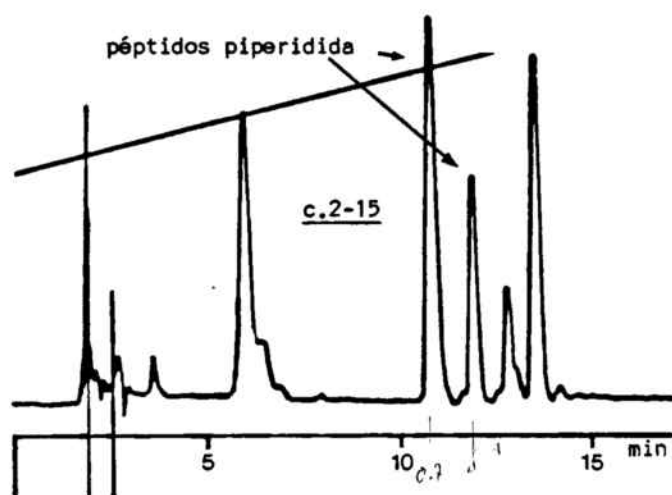


figura 2-15

lidad del grupo bencilo frente a esta base, encontrando unos elevados índices de formación de succinimida (100% a los 60 min).

La piperidina, frente a este proceso, se muestra especialmente reactiva, de tal manera que sigue reaccionando para dar lugar a una mezcla de péptidos amida en la cadena lateral del ácido aspártico (20,



nucleosil C18. 1 ml/min., 280 nm
 A: H₂O, 0.045% de TFA
 B: AcCN, 0.035% de TFA
 del 15% al 35% en 15 min.

21, figura 2-15). Este resultado hace necesaria una caracterización de estos dos nuevos péptidos desde el punto de vista cromatográfico para poder evaluar la cantidad global de subproductos que se puedan formar. Para ello, se trató una muestra de imida con piperidina al 50% en dimetilformamida durante una hora a temperatura ambiente. El resultado obtenido se muestra en el cromatograma 2-15. Los análisis de aminoácidos realizados tras hidrólisis ácida mostraron que el segundo y tercer picos eran peptídicos. Aquí, la hidrólisis enzimática también puede acabar de confirmar la existencia de estos dos nuevos subproductos. Los resultados obtenidos para las dos hidrólisis se muestran en la Tabla 9.

Las condiciones que se utilizaron para la evaluación de la formación de imida fueron piperidina al 20% en dimetilformamida (método usual) y un tiempo equivalente a unos 24 ciclos sintéticos de acoplamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 10. El caso más dramático es el del grupo bencilo, quedando a los 10 min sólo un 4.8% de péptido. Es de destacar que la velocidad de reacción es incluso superior a la encontrada por Colombo para el péptido Boc-Asp(Bz)-Phe-NH₂ al ser tratado con piperidina al 55% en dimetilformamida; en este caso, muy probablemente el factor predominante será el aminoácido vecinal, explicando así una mayor facilidad de formación de la imida para la secuencia Asp-Gly que para la secuencia Asp-Phe debido al impedimento estérico que proporciona la fenilalanina con su cadena

aminoácido	hidrólisis enzimática ^a		hidrólisis ácida ^b	
	piperidida1	piperidida2	piperidida1	piperidida2
Asp	0.05	0.09	1.02	1.00
Gly	0.15	0.34	1.14	1.15
Val	1.00	1.00	0.91	0.91
Ile	0.09	0.16	0.96	0.95
Tyr	0.16	0.11	0.80	0.90
Lys	1.18	0.99	0.97	0.99

(a) leucinoaminopeptidasa, pH 8.5, 40°C, 24 h. (b) ácido clorhídrico 6 N, 110°C, 24 h.

TABLA 9.- Contenido en aminoácidos resultante de las hidrólisis ácida y enzimática correspondientes a los péptidos piperidida (ver Tabla 5)

lateral bencílica⁵⁹.

Aunque la formación de imida es mucho más lenta, el resultado obtenido para el grupo ciclohexilo es también sorprendente ya que representa una pérdida de péptido del 2.8% por ciclo si suponemos una desaparición lineal. Los resultados descritos en la literatura sobre la estabilidad de este grupo protector en presencia de bases, a parte de la diisopropiletilamina, están referidos a la trietilamina y ni mucho menos son tan drásticos; así, Tam⁶⁵ describe un 14% de imida con un tratamiento con trietilamina al 5% en cloruro de metileno durante 24 h y Fujii⁶⁶ un 3.2% en 20 h en dimetilformamida.

También se ha detectado la formación de imida, aunque en mucha menor extensión, al realizar el mismo tratamiento con piperidina sobre el derivado 18 (un 5% si no tenemos en cuenta la formada durante el proceso de desprotección). La desprotección en medio básico de la

<i>tipo de protección en el ácido aspártico</i>	<u>13</u>	<u>19^c</u>	<i>piperididas^d</i>
<i>ciclohexilo^a</i>	32.5	44.0	23.5
<i>bencilo^a</i>	--	44.4	55.6
<i>bencilo^b</i>	4.8	95.2	--
<i>terc-butilo^a</i>	89.0	8.1	2.9

(a) 20% de piperidina en DMF, temperatura ambiente, 4 h. (b) Como (a), pero 10 min de tratamiento. (c) Mismas consideraciones que las realizadas en (b) de la Tabla 8. (d) Los resultados tabulados corresponden a la suma de las 2 piperididas.

TABLA 10.- Resultados obtenidos al tratar las 3 peptidil-resinas estudiadas (ver Tabla 6) con piperidina

cadena lateral del ácido aspártico cuando éste está protegido en forma de éster terc-butílico para dar lugar a la formación de imidas ya había sido detectada por Schwyzer¹⁰⁵ en medio acuoso con hidróxido sódico 1 N; por otro lado, Roeske¹⁶⁰, al tratar el éster terc-butílico de la N^α-benciloxicarbonilasparagina con un equivalente de hidróxido sódico en metanol, obtuvo un 40 % de imida.

Por los resultados obtenidos, no cabe duda que la piperidina es lo suficientemente básica como para ser utilizada con cautela en la síntesis de péptidos en fase sólida; por otro lado, si hacemos una comparación entre los tres grupos protectores podemos comprobar la importancia que pueden tener los efectos estéricos ya que observamos una disminución en la formación de subproductos al pasar del grupo menos voluminoso al que ofrece mayor impedimento estérico (terc-butilo).

2.8. Planteamiento de una nueva estrategia de síntesis. utilización de un grupo protector estable al fluoruro de hidrógeno

2.8.1. Planteamiento de la estrategia

Por los resultados que se han obtenido con respecto a la utilización del grupo terc-butilo como protector temporal de cara a evitar la formación de peptidil-imida, podemos concluir que la hipótesis planteada desde un principio no es totalmente satisfactoria, al menos en este caso concreto, debido a que el tratamiento de la peptidil-resina con fluoruro de hidrógeno es uno de los responsables de la consecución de la reacción secundaria. Desde este punto de vista, la utilización de un grupo protector que fuera estable a este medio ácido podría solventar el problema a este nivel. Si, además, este grupo pudiera ser eliminado rápidamente tras esta etapa en condiciones relativamente suaves, podría constituir una alternativa muy factible de cara a solventar el problema. Esta filosofía es totalmente opuesta a la que ha sido objeto de estudio en este Capítulo y no ha sido ensayada hasta ahora en ningún péptido, por lo que se va a desarrollar su viabilidad en los siguientes apartados.

El grupo protector que puede cumplir perfectamente con este cometido es el grupo fluorenilmetilo¹⁰⁶⁻¹⁰⁸, el cual es estable al fluoruro de hidrógeno y puede ser eliminado con relativa facilidad con piperidina, a través de un mecanismo similar al del grupo fluorenilmetoxicarbonilo (figura 2-16), es decir, dando lugar a dibenzofulveno. No cabe duda que la competencia de este proceso frente al de abstracción de un protón unido al nitrógeno de la glicina para dar lugar a la imida (proceso que daría una molécula de fluorenilmetanol) será la que nos dará la respuesta de la posible solución a este problema. A priori, podría esperarse que el dibenzofulveno fuese un mejor grupo saliente que el alcohol, ya que el primero está altamente conjugado; sin embargo, un protón de amida también es relativamente ácido, por lo que resulta arriesgado predecir cual será el camino más probable. En

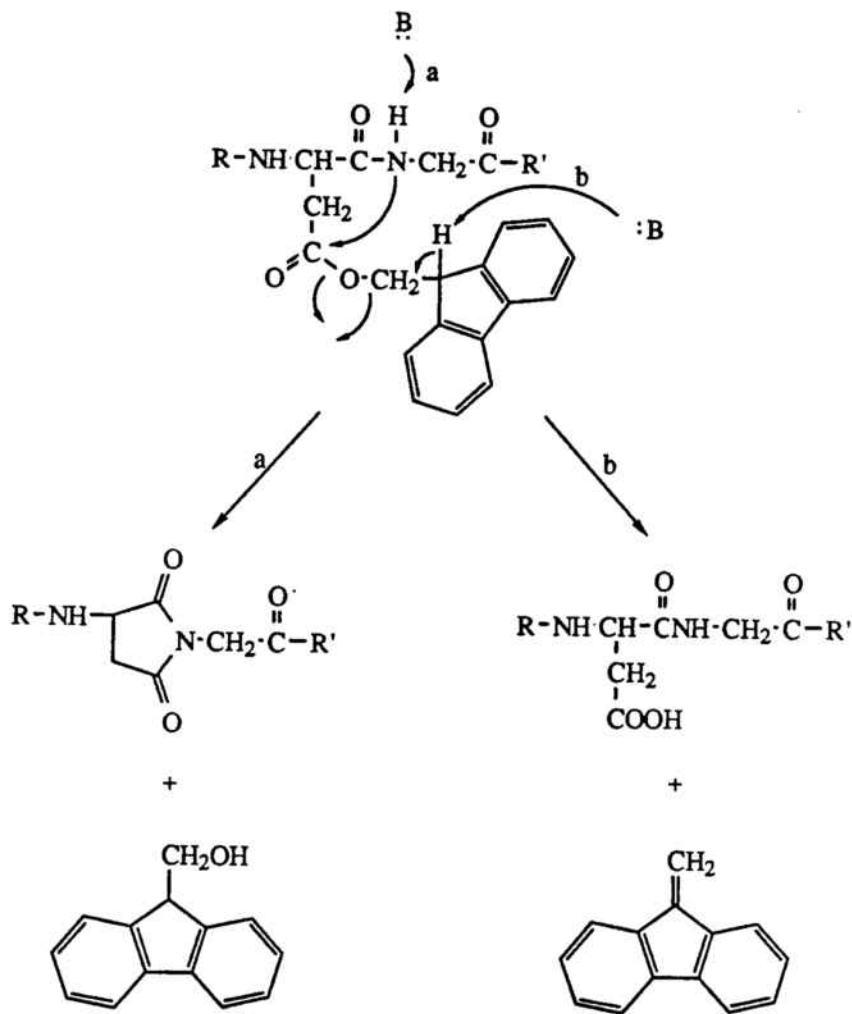


figura 2-16

nuestro laboratorio se han realizado una serie de ensayos para probar la viabilidad de este grupo protector para su utilización en síntesis de fragmentos protegidos, empleando como modelo el tetrapéptido protegido estudiado en el Capítulo 1, el cual se ha sintetizado con éxito utilizando como grupo protector para la lisina el fluorenilmetoxicarbonilo y para el ácido aspártico el fluorenilmetilo (Boc-Val-Lys(Fmoc)-Asp(Fm)-Gly-OH). El péptido obtenido de esta forma se trató con ácido trifluoroacético para eliminar el grupo terc-butoxicarbonilo de la valina y, a continuación, con piperidina para eliminar los dos

grupos de naturaleza fluorenílica, no detectándose péptido-imida, ni por cromatografía analítica ni por estudio de los espectros de resonancia magnética de protón del crudo de reacción una vez prepurificado por cromatografía de exclusión molecular; sin embargo, hay que tomar este resultado con cautela ya que el péptido elufa prácticamente con el frente debido a su pequeño tamaño y el número de cargas que posee, pudiendo no llegar a resolverse éste y la imida en las condiciones cromatográficas utilizadas.

2.8.2. *Preparación del β -ester de fluorenilmetilo del ácido N-terc-butoxicarbonilaspártico*

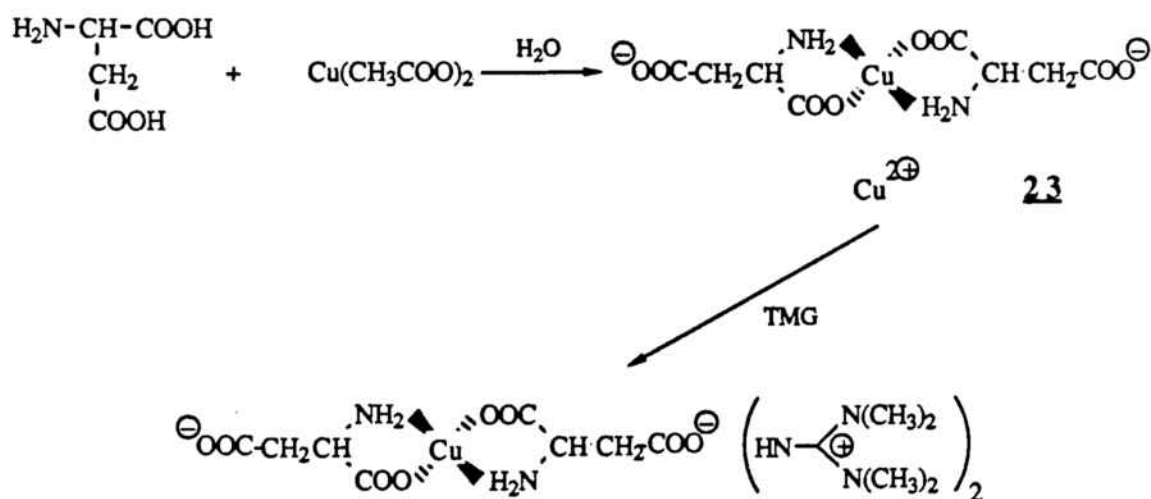
2.8.2.1. *Intentos de obtención del ester por el método del complejo de cobre*

Cuando aparece un nuevo grupo de cara a ser utilizado para proteger la cadena lateral de un aminoácido, y cuya aplicación en síntesis peptídica se desea estudiar, la obtención del derivado correspondiente al aminoácido objeto de investigación puede llegar a suponer un gran reto debido a la elevada funcionalización de la molécula a preparar, lo cual implica el diseño de estrategias que permitan la protección selectiva de los distintos grupos funcionales y evitar, de esta forma, interferencias que pudieran impedir la consecución del objetivo deseado. Como ejemplo, podemos citar al grupo bencilo, uno de los primeros en aparecer y el más estudiado de todos, cuyos derivados para el ácido aspártico (aminoácido objeto del presente estudio) y el ácido glutámico se prepararon por dos vías diferentes: mediante protección simultánea de los dos grupos carboxilo y posterior hidrólisis selectiva del grupo en " α "¹⁰⁹⁻¹¹¹ y por obtención de forma directa y selectiva del ester deseado^{112,113}. No cabe duda de que estos dos caminos no son los únicos, sino que se han descrito numerosas alternativas, las cuales se han aplicado con mayor o menor éxito según los casos.

De entre todos los posibles caminos estudiados, muy probablemente

el más atractivo sea el de la protección simultánea de los grupos amino y ácido en "α" del aminoácido. En este sentido, la utilización de complejos de cobre se ha consolidado como uno de los métodos más empleados y con resultados, en general, excelentes para los grupos protectores a los que se ha aplicado (acilo para la lisina ¹¹⁴, benciloxycarbonilo para la lisina¹¹⁵ y ornitina¹¹⁶, urea para la ornitina^{117,118}, bencilo para los ácidos aspártico y glutámico^{89,119}, picolilo para el ácido aspártico³⁰, etc.).

La obtención de estos complejos se llevaba a cabo inicialmente a partir del aminoácido y carbonato de cobre^{115,116,118} u óxido de cobre ¹¹⁷ en medio acuoso a ebullición; estos compuestos se han venido sustituyendo desde hace algunos años por el acetato de cobre^{89,119}. El producto que se obtiene con todos estos reactivos es una sal de cobre del complejo de cobre con el aminoácido, el cual contiene dos moléculas de éste (23, figura 2-17) y una cantidad de agua de hidratación



24

figura 2-17

(ocho moléculas para el ácido aspártico), la cual puede ser determinada por diferencia al evaluar la cantidad de cobre por espectrofotometría visible (absorción del catión diamin-cobre a 640 nm¹²⁰). El complejo así obtenido se solubiliza en medio básico al formarse la sal

correspondiente (normalmente la sal sódica¹²¹), haciéndose reaccionar, a continuación, con el reactivo adecuado (cloruro de benciloxycarbonylo, bromuro de bencilo, urea, etc.), el cual se solubiliza en una pequeña cantidad de dimetilformamida. Puesto que la presencia de agua provocaba la hidrólisis prematura de ciertos esteres²⁰, recientemente se ha introducido como modificación la utilización de sales de tetrametilguanidinio¹¹⁹ (24), las cuales permiten la utilización de una proporción de dimetilformamida de nueve a uno frente al agua. Una vez obtenido el complejo esterificado, el derivado del aminoácido se puede liberar con ácido sulfhídrico o la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, siendo este último el más utilizado en estos momentos 114,119.

Teniendo en cuenta que hasta ahora no se ha descrito la preparación de ningún derivado del ácido aspártico con la cadena lateral protegida con el grupo fluorenilmetilo, se ha aplicado la metodología anteriormente descrita como ensayo inicial para la síntesis del correspondiente -éster para este aminoácido.

Los métodos que se han descrito hasta ahora para la formación de esteres de fluorenilmetilo de aminoácidos se basan en procesos de transesterificación en presencia de imidazol sobre esteres activos (esteres de p-nitrofenilo principalmente^{122,123}), esterificación de aminoácidos protegidos a partir de fluorenilmetanol en presencia de dimetilaminopiridina y dicitclohexilcarbodiimida¹²⁴ y en la utilización del método del pirocarbonato¹²⁵, a partir del aminoácido protegido, piridina, fluorenilmetanol y carbonato de di-terc-butilo ¹²⁶.

La obtención de bajos rendimientos en la síntesis de esteres de picolilo del ácido aspártico por el método del complejo de cobre, llevada a cabo en nuestro laboratorio, puso de manifiesto la posibilidad de hidrólisis del producto en el medio acuoso de reacción (aspecto ya comentado con anterioridad). Por otro lado, es bien conocida la gran insolubilidad de los derivados de fluorenilmetilo. Con objeto de solventar estos dos problemas, se buscó una sal lo suficientemente soluble en dimetilformamida como para poder prescindir del agua. Así, se obtuvieron las sales de cesio, piridinio, dimetilaminopiridinio, diisopropilneopentilamonio y dicitclohexilamonio, siendo esta última

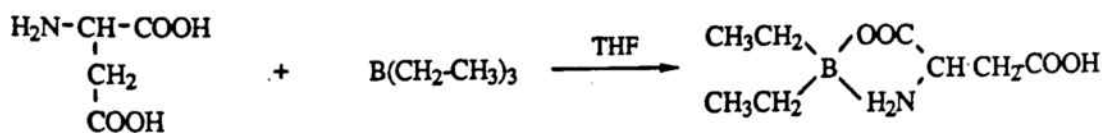
extremadamente soluble en el disolvente orgánico (un gramo en 10 ml). Como comprobación de su efectividad, ésta se utilizó en la síntesis del β -ester bencílico del ácido aspártico, derivado comunmente obtenido por este método, observándose la precipitación casi instantánea del ester complejo, el cual se obtuvo cuantitativamente.

Una vez comprobada la solubilidad de la sal de dicitclohexilamónio, se ensayaron para la síntesis del β -ester los métodos de la dicitclohexilcarbodiimida/dimetilaminopiridina y el del pirocarbonato, no consiguiéndose en ningún caso la formación de producto.

Por otro lado, haciendo uso de una distinta filosofía, se intentó la sustitución nucleófila sobre derivados fluorenilméticos. En nuestro laboratorio se ha venido utilizando con éxito este método para la síntesis de la S-fluorenilmetil-N-terc-butoxicarbonilcisteína a partir del tosilato de fluorenilmetilo¹²⁷, en presencia de diisopropiletilamina¹²⁸. Por este motivo, se ensayó su aplicabilidad para la obtención del ester de fluorenilmetilo, pudiéndose detectar únicamente el producto de eliminación, es decir, dibenzofulveno. En esta misma línea, se realizó otro intento con bromuro de fluorenilmetilo, obteniéndose los mismos resultados.

2.8.2.2. Obtención del ester por el método del complejo de boro

Una estrategia similar a la anteriormente descrita es la de la formación de complejos de boro¹²⁹ (25, figura 2-18). Estos compuestos



25

figura 2-18

se preparan a partir del aminoácido y un trialquilborano en tetrahydrofurano a temperatura ambiente, llevándose a cabo la desprotección

final con cloruro de hidrógeno o con metanol a ebullición. A diferencia de los complejos de cobre, el grupo carboxilo de la cadena lateral del aminoácido está protonado en los complejos de boro, con lo que la aplicación del método de la dicitclohexilcarbodiimida es más factible que para el caso anterior. De ensayos previos de formación de esteres de fluorenilmétilo realizados en nuestro laboratorio se dedujo que la reacción era extremadamente lenta en presencia de imida; sin embargo, la adición de un pequeño porcentaje de dimetilaminopiridina (10%) aceleraba la velocidad de reacción, siendo cuantitativa a las dos horas (26, figura 2-19). Desde el punto de vista de desprotección del complejo, no existe incompatibilidad con el ester formado debido a su estabilidad en las condiciones empleadas (cloruro de hidrógeno). De esta forma, se obtuvo el ester deseado, precipitando instantaneamente en el medio de reacción, con un rendimiento superior al 80% (27).

La introducción del grupo terc-butoxicarbonilo se llevó a cabo con 2-terc-butoxicarboniloxiimino-2-fenil-acetonitrilo (figura 2-19) 130, el cual es altamente reactivo, con lo que permite la utilización

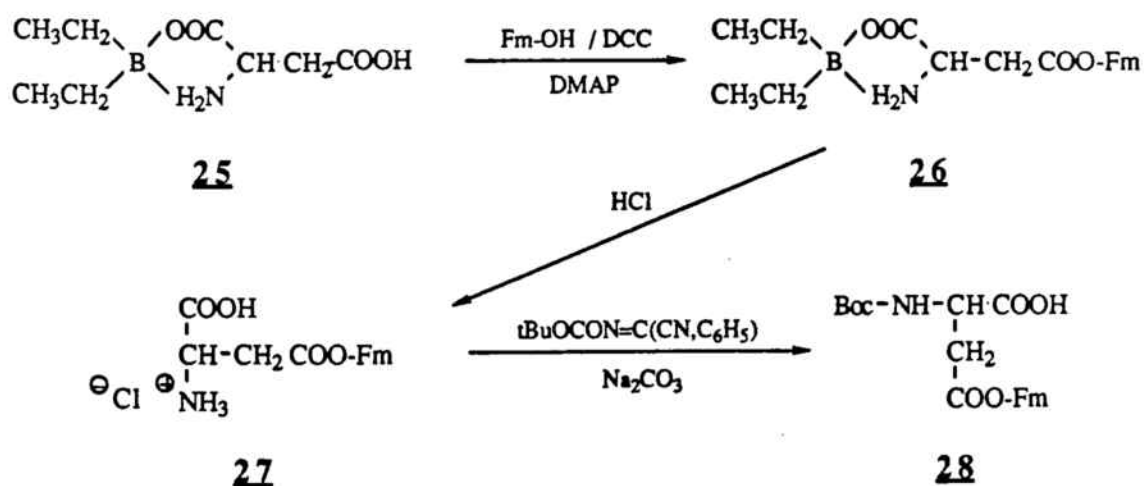


figura 2-19

de bases débiles, disminuyendo así el riesgo de descomposición del producto final. De esta forma, el rendimiento de la reacción fué superior al 80% (28).

Este método también se aplicó con éxito para la síntesis del

derivado análogo al ácido glutámico, obteniéndose también rendimientos superiores al 80 %, salvo para la última etapa, en la que se obtuvo un rendimiento de un 79 %.

2.8.2.3. *H-Val-Lys-Asp(Fm)-Gly-Tyr-Ile-OH*. Obtención y estudio de formación de imida

Una vez obtenido el β -ester de fluorenilmetilo del ácido aspártico, se procedió a la síntesis de la hexapeptidil-resina correspondiente siguiendo el mismo protocolo que para los derivados 16, 17 y 18. En este caso concreto, se utilizó la orto-2-bromobenciloxicarbonil-N-terc-butoxicarboniltirosina¹³¹ en lugar del derivado 0-ciclohexilado por no disponer de éste en aquellos momentos. Una vez obtenida la hexapeptidil-resina, se llevó a cabo la liberación del péptido con fluoruro de hidrógeno en condiciones "High", obteniéndose un crudo peptídico cuyo análisis por HPLC mostraba la presencia de péptido libre y de imida (Tabla 11), acompañados de un producto con un tiempo de retención muy superior (6 min, 8 min y 28 min respectivamente; de 10% a 40% en 30 min; A: agua/0.045% de ácido trifluoroacético, B: acetónitrilo/0.035% de ácido trifluoroacético); 1.5 ml/min); este mismo producto absorbía fuertemente tanto a 220 nm como a 280 nm y el análisis por espectrofotometría ultravioleta presentaba las absorciones características del grupo fluorenilmetilo. El tratamiento con piperidina del crudo de reacción daba lugar a un incremento en las cantidades de péptido libre e imida, con desaparición del producto de tiempo de retención a 28 min. Todos estos ensayos confirmaron la identidad de éste como el β -ester de fluorenilmetilo del hexapéptido.

Los resultados obtenidos indican, al contrario de las suposiciones iniciales, una baja estabilidad del ester de fluorenilmetilo en las condiciones ácidas utilizadas, ya que se obtuvo un 26% de péptido libre y entre un 3% y un 4% de péptido-imida. El tratamiento posterior del crudo peptídico con piperidina al 20% en dimetilformamida durante 2 min provocó la desprotección completa del péptido, observándose un incremento en la proporción de imida superior al obtenido en condi-

ciones normales (β -éster bencílico, "High"; entre un 5 y un 6%). En un intento de reducir la cantidad de subproducto, se utilizó como reactivo el fluoruro de tetrabutilamonio, cuya eficacia para la hidrólisis de ésteres de fluorenilmetilo ya había sido demostrada¹³². En este sentido, se trató el crudo peptídico con una solución 0.05 M del fluoruro en dimetilformamida durante dos minutos, siendo la desprotección cuantitativa. En el análisis cromatográfico de la mezcla final no se detectó imida; sin embargo, se pudo comprobar la presencia de un 27% de péptido " β ". Este resultado se puede explicar si tenemos en cuenta la basicidad del anión fluoruro, de tal manera que puede provocar la hidrólisis de la amida (el reactivo utilizado posee tres moléculas de agua) para dar lugar a los péptidos " α " y " β ". Si tenemos en cuenta que la apertura del anillo proporciona una relación de péptido " β " frente a péptido " α " de 3 a 1 (suponiendo similar a la encontrada al tratar la amida con trietilamina acuosa), el porcentaje de imida inicial formada debería ser de un 30% aproximadamente, lo cual hace inviable la utilización de este reactivo.

2.8.2.4. *Ensayos preliminares sobre el comportamiento de los grupos 3-picolilo y 4-picolilo en la formación de péptido-imida*

En los últimos años, se han venido utilizando en nuestro laboratorio los β -ésteres de 3-picolilo y 4-picolilo del ácido aspártico con objeto de aumentar la solubilidad de los péptidos protegidos y facilitar, de esta forma, su purificación³⁰. Estos ésteres poseen una gran estabilidad, incluso en condiciones ácidas (45% de bromuro de hidrógeno en ácido acético durante 24 h, a temperatura ambiente)²⁸, siendo fácilmente reducibles por hidrogenación catalítica. Estas características pueden hacer factible su utilización en la síntesis de péptidos de cara a *minimizar* la formación de péptido-imida. Por ello, se ha ensayado de forma preliminar su influencia sobre la reacción secundaria estudiada en este Capítulo en la síntesis del hexapéptido 13.

La utilización de estos ésteres como grupos protectores del ácido aspártico, cuya síntesis ya ha sido descrita en la literatura^{30,133}, ha sido, hasta ahora, muy limitada, por lo que se poseen pocos datos

al respecto. Desde el punto de vista de formación de imidas cíclicas, Perseo y col⁷² estudiaron el comportamiento del grupo bencilo durante el proceso de hidrogenación catalítica, encontrando que la formación de subproducto dependía de factores como la secuencia o el disolvente, incrementando drásticamente la formación de subproducto la presencia de trazas de base y siendo, por el contrario, eliminada con la adición de ácido acético o ácido fórmico cuando se utilizaba como agente reductor formiato amónico/paladio/carbono.

Los resultados obtenidos en nuestro caso particular se muestran en la Tabla 11. Los análisis por HPLC de los dos crudos peptídicos, una vez realizado el tratamiento con fluoruro de hidrógeno, mostraron la presencia de sendos productos con tiempos de retención similares al del péptido libre. Para el caso del péptido 3-picolilo, la diferencia fué tan pequeña que no fué posible su cuantificación con respecto al péptido libre, apareciendo este último como una espalda del pico principal. Estos dos productos fueron asignados como los respectivos péptidos protegidos dado que el tratamiento del crudo peptídico con paladio/carbono y formiato amónico provocaba su desaparición, la cual iba acompañada con un aumento del pico correspondiente al péptido libre. Con respecto a la estabilidad de los dos productos frente al tratamiento con fluoruro de hidrógeno, se observó, en los dos casos, un comportamiento parecido al encontrado en el péptido estudiado en el apartado anterior, en el sentido de poseer una baja estabilidad en las condiciones ácidas estudiadas, lo cual contrasta con los ensayos realizados en nuestro laboratorio con los derivados del ácido aspártico como tal, para los que no se ha detectado aminoácido libre por análisis de aminoácidos una vez sometidos a las mismas condiciones.

Desde el punto de vista de formación de péptido-imida, se observa un comportamiento bien diferenciado entre los dos grupos protectores. Para el caso del grupo 3-picolilo, se ha detectado un porcentaje de imida similar al obtenido en condiciones normales, el cual no ha variado prácticamente tras el tratamiento con paladio/carbono/formiato amónico. No ocurre lo mismo para el péptido 4-picolilo, ya que la cantidad de imida obtenida es superior, siendo aproximadamente el doble que para el caso anterior (también se forma durante la

desprotección), probablemente por ser este grupo mejor grupo saliente.

El resultado obtenido para el grupo 3-picolilo es esperanzador, siendo el siguiente objetivo la búsqueda de unas condiciones más suaves que garanticen la estabilidad del grupo protector durante a etapa de liberación del péptido de la resina.

reactivo	$\frac{13}{(\%)} $	$\frac{13(x)}{(\%)} $	$\frac{19}{(\%)} $
		<u>13(Fm)</u>	
HF ^a	26.3	70.2	3.5
piperidina ^b	88.7	--	11.3
Bu ₄ N ⁺ F ^{-c}	100.0 ^e	--	--
		<u>13(3Pic)</u>	
HF ^a		94.8 ^f	5.2
Pd/C ^d	50.2	45.3	4.5
		<u>13(4Pic)</u>	
HF	37.7	50.8	11.5
Pd/C	61.0	20.4	18.6

Salvo los experimentos con fluoruro de hidrógeno, los cuales se han efectuado sobre la resina, los demás se han realizado con los respectivos crudos peptídicos. (a) 10% de p-cresol, 0°C, 1 h ("High"). (b) Solución al 20% en dimetilformamida, temperatura ambiente, 2 min. (c) Solución 0.05 M en dimetilformamida, temperatura ambiente, 2 min. (d) 0.5 mg de crudo peptídico, 0.8 mg de Pd/C, 0.5 mg de formiato amónico, 0.5 ml de metanol y 20 µl de ácido acético; temperatura ambiente, 5 min para el péptido-Asp(3Pip) y 10 min para el péptido-Asp(4Pip). (e) En este experimento se ha detectado un 27.5% de péptido "β". (f) El péptido desprotegido ha aparecido como una espalda, no habiendo sido posible su cuantificación.

TABLA 11.- Estabilidad de los grupos fluorenilmetilo (Fm) y picolilo (3Pic y 4Pic) en distintas condiciones

3. ESTUDIO DE LA N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida COMO MODELO MONOMERICO DE LA RESINA 4-bromometil-Nbb

3.1 Introducción

En el Capítulo 1 de esta Tesis se planteó la posibilidad de una disminución en el rendimiento de acoplamiento de un determinado aminoácido sobre la resina 4-bromometil-Nbb debido al incremento de reactividad frente a nucleófilos motivado por la presencia de un grupo nitro fuertemente atrayente de electrones en el anillo aromático. En principio, esto podría tener dos implicaciones de distinto signo; por un lado, la competencia entre distintas especies y nuestro aminoácido puede provocar una disminución en el rendimiento de acoplamiento; por el otro, se podría aprovechar esta reactividad para llevar a cabo la liberación del péptido de la resina con una mayor facilidad y tener así un método alternativo a la fotólisis. Este estudio se hace especialmente difícil si se lleva a cabo sobre la resina ya que resultaría interesante conocer cómo queda modificado el polímero tras la reacción de cara a tener una idea acerca de qué productos han sido los responsables del bloqueo prematuro de los centros de acoplamiento. Para poder acceder de una forma más directa a esta información se estudió la viabilidad de un modelo de trabajo que permitiera simular todo este tipo de procesos en fase homogénea; de esta forma, podría realizarse un estudio analítico del problema por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), pudiendo obtener así de una manera sencilla una respuesta bastante exacta acerca de lo que sucede en el medio de reacción.

Con este objetivo, se ha llevado a cabo la síntesis de una serie de análogos (los cuales podrían ser denominados análogos monoméricos) de la resina 4-bromometil-Nbb, para ser utilizados en solución. En esta misma línea, se ha puesto a punto un método analítico que, como

se ha mencionado más arriba, ha permitido la utilización de la HPLC como técnica analítica para seguir distintos procesos que se han aplicado ya en fase heterogénea con distintos objetivos. Los diferentes estudios realizados con este modelo de trabajo han permitido, entre otras cosas, la búsqueda de unas condiciones de acoplamiento del aminoácido carboxilo terminal alternativas, la obtención de datos sobre posibles mecanismos de reacción y el ensayo de diferentes métodos para liberar el péptido de la resina.

3.2. Planteamiento del método

3.2.1. El análogo monomérico de la resina 4-bromometil-Nbb: la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida

El primer paso a efectuar para desarrollar esta metodología es la obtención del análogo monomérico de la resina correspondiente. No cabe duda que el fragmento más adecuado para realizar este estudio es el que se muestra en la figura 3-1, es decir, la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida (29), el cual está compuesto de lo que podríamos denominar centro activo de la resina y el eslabón que lo une al poliestireno; de esta manera se intenta simular lo mejor posible el entorno de la posición bencílica involucrada en las distintas reacciones que puedan tener lugar sobre el polímero.

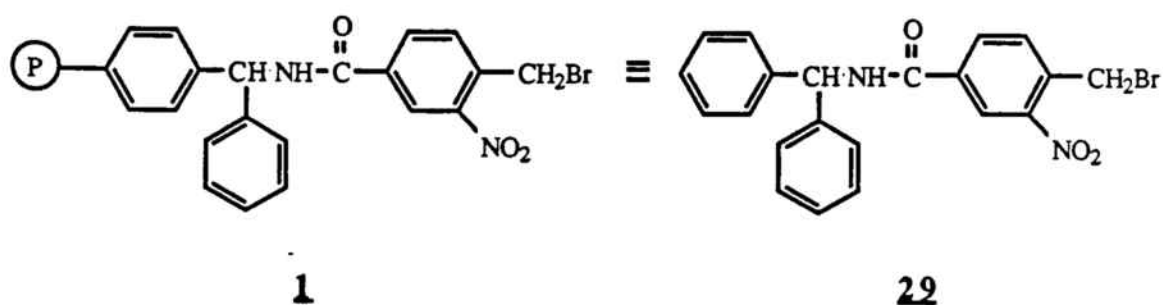
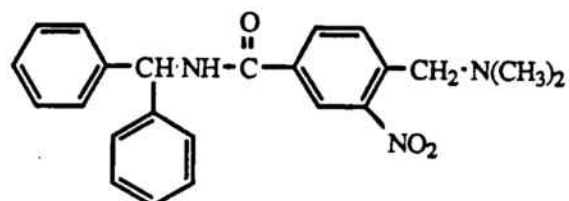


figura 3-1

3.2.2. Elección de análogos

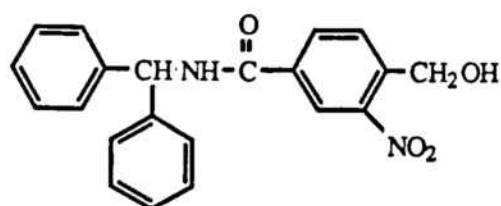
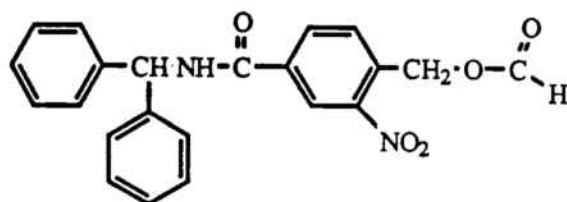
Es evidente que todos los derivados que se han utilizado no han

sido estudiados al mismo tiempo, ya que, sobre la marcha, viendo las posibilidades que podía tener el método analítico, se fueron sintetizando paulatinamente según el objeto del estudio en un momento determinado.



30

31



32

33

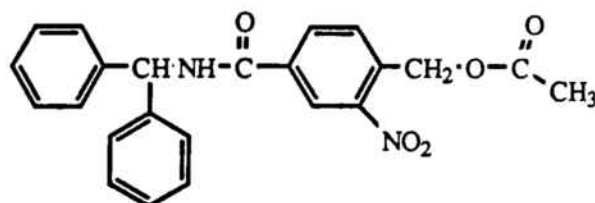


figura 3-2

El primer objetivo a abordar fué el establecer qué tipo de productos podían competir en la reacción de acoplamiento del primer aminoá-

cido. Como ya se discutió de manera introductoria, este proceso se lleva a cabo utilizando como disolvente la dimetilformamida ya que solubiliza muy bien las sales de cesio, solvatando con una gran efectividad este catión. Este disolvente es sensible a la luz e higroscópico, lo cual hace difícil su conservación, siendo necesaria su destilación bastante a menudo. La baja estabilidad de la dimetilformamida puede acarrear problemas debido a la presencia de productos de descomposición en el medio de reacción, como pueden ser la dimetilamina y el ácido fórmico; incluso la misma presencia de agua podría resultar perjudicial, ya que todas estas sustancias podrían actuar como nucleófilos. Estas consideraciones plantean la posibilidad de formación de tres productos, la N-benzhidril-(4-dimetilaminometil-3-nitro)benzoilamida (30, figura 3-2), la N-benzhidril-(4-formiloximetil-3-nitro)benzoilamida (31) y la N-benzhidril-(4-hidroximetil-3-nitro)benzoilamida (32), de los cuales, los dos primeros citados bloquearían la entrada del aminoácido, y el tercero podría dar lugar con posterioridad a la formación de nuevas cadenas peptídicas que impurificarían el péptido final (la formación de un enlace ester puede tener lugar también con el aminoácido y el alcohol en presencia de dicitclohexilcarbodiimida).

Para mejorar los rendimientos de acoplamiento del primer aminoácido se utilizó (ver Capítulo 1) la dimetilacetamida como disolvente aprovechando su mayor estabilidad, siendo los resultados obtenidos como mínimo comparables a los de la dimetilformamida. Además, también se tuvo en cuenta para hacer un estudio comparativo entre los dos disolventes. En este sentido, se consideró la posible formación del análogo correspondiente procedente del ataque del ácido acético sobre la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida, la N-benzhidril-(4-acetoximetil-3-nitro)benzoilamida (33).

En el Capítulo 1 se estudió el efecto de la piperidina sobre la resina una vez introducido el primer aminoácido, indicando los resultados obtenidos una liberación paulatina del aminoácido con el tiempo. En este sentido se pensó que nuestro modelo podría ser utilizado a este respecto, incluso de cara a establecer el mecanismo del proceso, ya que uno de los posibles productos de reacción podría ser el derivado del ataque de la piperidina a la posición bencílica de la resina 4-

bromometil-Nbb. En esta misma línea se planteó la posibilidad de utilizar este resultado, aplicado a otros nucleófilos, para realizar un estudio preliminar sobre métodos alternativos a la fotoquímica para liberar el péptido de la resina, utilizando el modelo monomérico para el seguimiento de los distintos procesos. Por este motivo también se sintetizaron la N-benzhidril-(4-metoximetil-3-nitro)benzoilamida (34), la N-benzhidril-(4-N-piperidinometil-3-nitro) benzoilamida (35) y la N-benzhidril-(4-etiltiometil-3-nitro)benzoilamida (36) (figura 3-3).

Para poder llevar a cabo todos estos estudios fué necesario caracterizar también el análogo de la aminoacil-resina correspondiente, que en este caso fué el obtenido a partir de la N-terc-butoxicarbonilglicina, es decir, la N-benzhidril-(4-N-terc-butoxicarbonilgliciloximetil-3-nitro)benzoilamida (37).

Se consideró también interesante estudiar el efecto que pudiera tener el tipo de aminoácido implicado en algunos de los procesos planteados más arriba; en este sentido, se eligió la N-terc-butoxicarbonilprolina por ser el aminoácido que puede dar lugar a los efectos más drásticos debido a factores de tipo estérico. Por este motivo, se procedió a sí mismo a la síntesis del análogo correspondiente, la N-benzhidril-(4-N-terc-butoxicarbonilproliloximetil-3-nitro)benzoilamida (38).

3.3. Síntesis de los derivados monoméricos

3.3.1. *N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida*

Para llevar a cabo la obtención de la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida se siguió de forma paralela el método utilizado para la síntesis de la resina 4-bromometil-Nbb, con la diferencia de

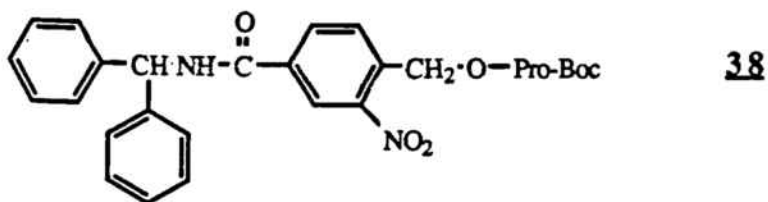
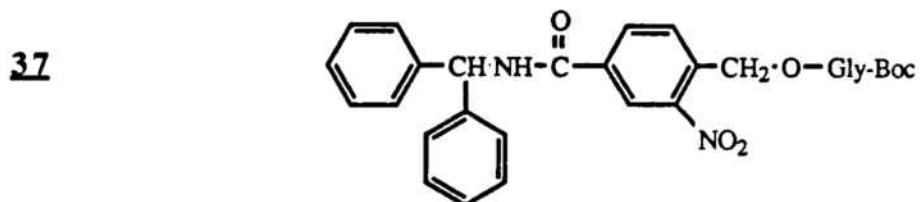
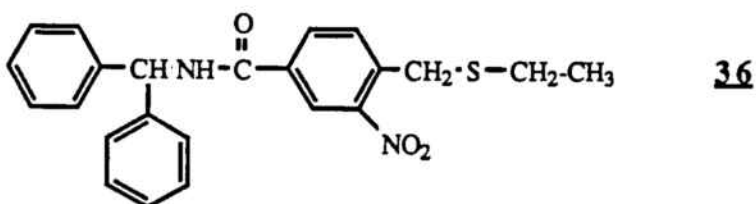
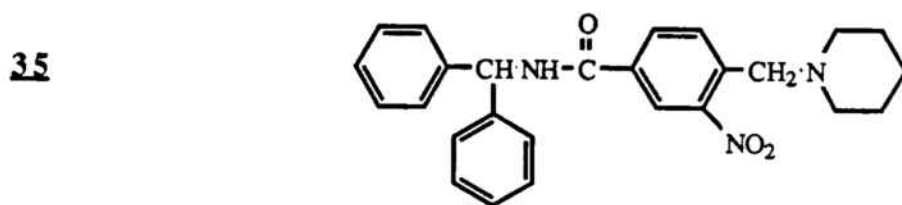
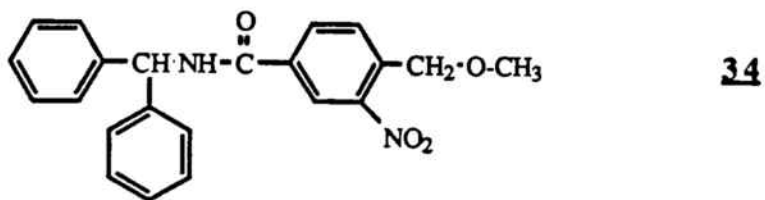


figura 3-3

que, en este caso, el producto de partida fué la benzofenona, sobre la cual se llevó a cabo una reacción de Leuckard para obtener la benzhidrilamina¹³⁴, la cual, a su vez, dió lugar al producto deseado con buenos rendimientos, haciéndola reaccionar con el anhídrido del ácido 4-bromometil-3-nitrobenzoico¹⁷, previamente preparado a partir de éste (figura 3-4).

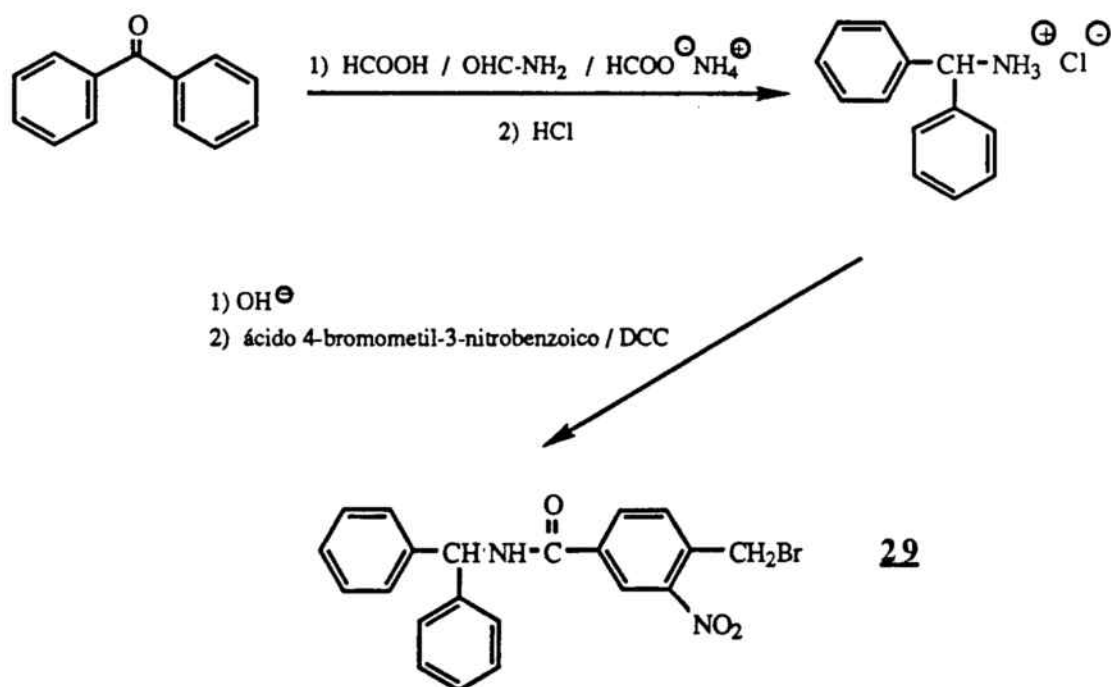


figura 3-4

3.3.2. preparación de los distintos an\u00e1logos

La s\u00edntesis de los nueve an\u00e1logos de la N-benzhidril-(4-bromome-

til-3-nitro)benzoilamida (figura 3-5) se llevó a cabo por métodos convencionales. De manera similar a las aminoacil-resinas, los ésteres 31, 33, 37 y 38 fueron obtenidos a través de las sales de cesio correspondientes, encontrándose problemas de solubilidad especialmente para el formiato de cesio y el acetato de cesio, lo cual no fué inconveniente dada la gran reactividad de estas sales. El derivado hidroxilado 32 se obtuvo en presencia de agua¹³⁵, utilizando yoduro potásico como catalizador de la reacción. El derivado metoxilado 34 se preparó a partir del metóxido de plata en solución metanólica anhidra. Las aminas trisustituidas 30 y 35 se sintetizaron a partir de la

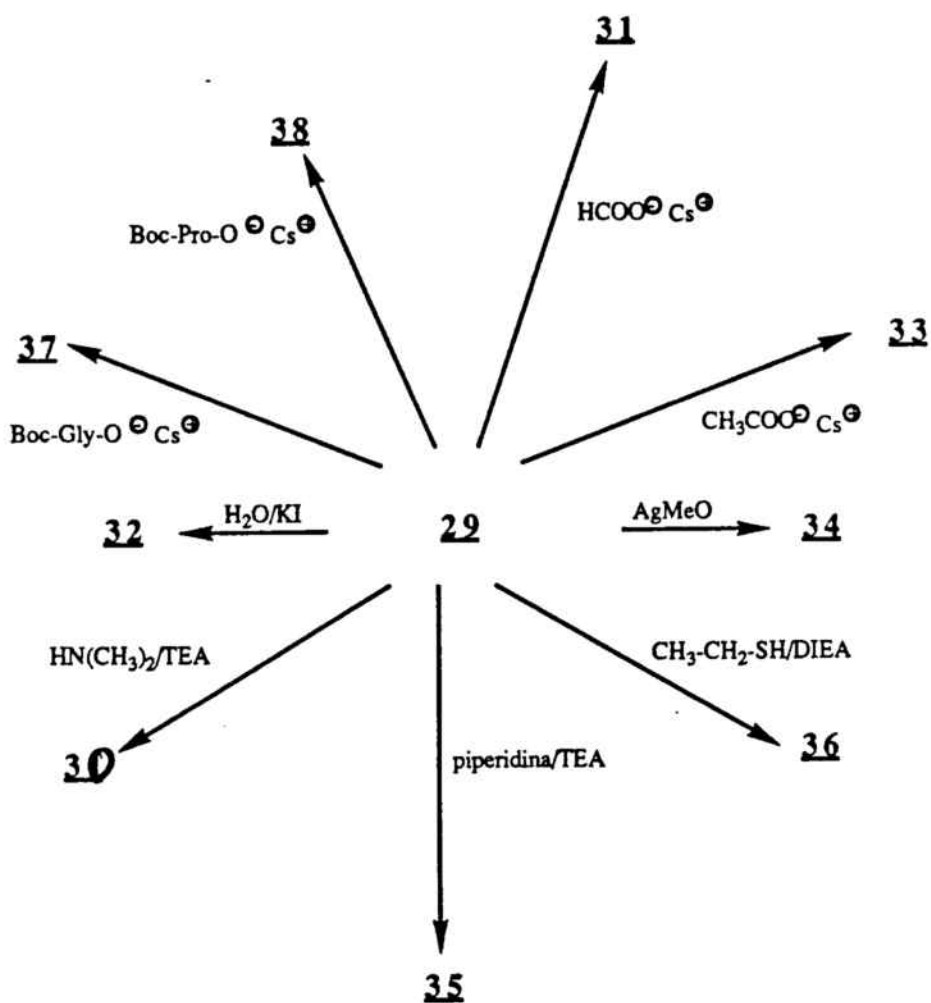


figura 3-5

dimetilamina y la piperidina¹³⁶ en presencia de trietilamina. El tioeter 36 se obtuvo de forma similar, aunque en este caso hubo que utilizar diisopropiletilamina como base ya que la reacción en presencia de trietilamina no tuvo lugar hacia el producto deseado por competir esta última con la formación de un producto, cuya presencia se pudo detectar por HPLC y cuya zona de elución correspondía a la de las sales de amonio (ver en el apartado siguiente la discusión sobre la búsqueda de condiciones cromatográficas). Finalmente este compuesto se caracterizó por resonancia magnética nuclear de protón, resultando ser el bromuro de tetraalquilamonio correspondiente (figura 3-6).

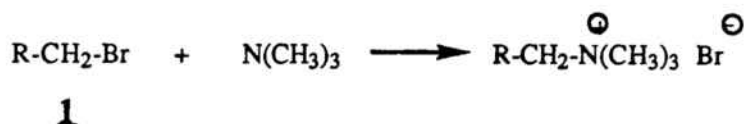


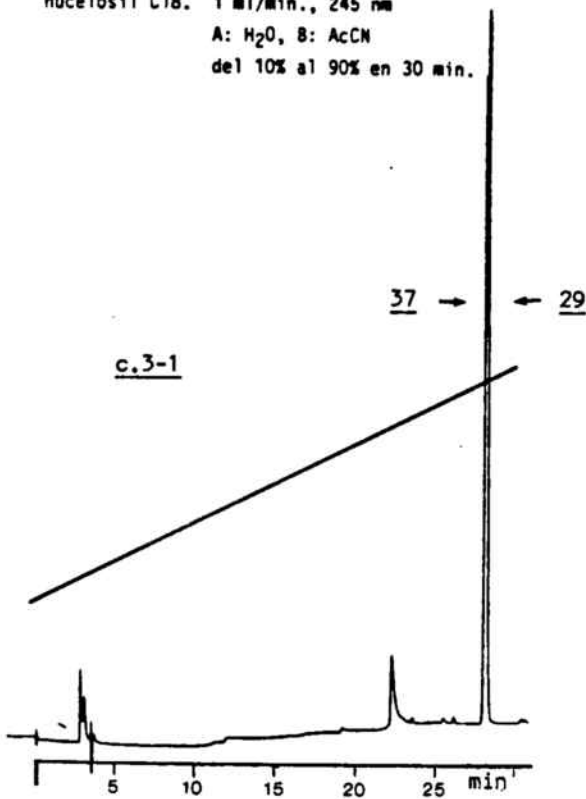
figura 3-6

3.4. Búsqueda de condiciones cromatográficas de trabajo

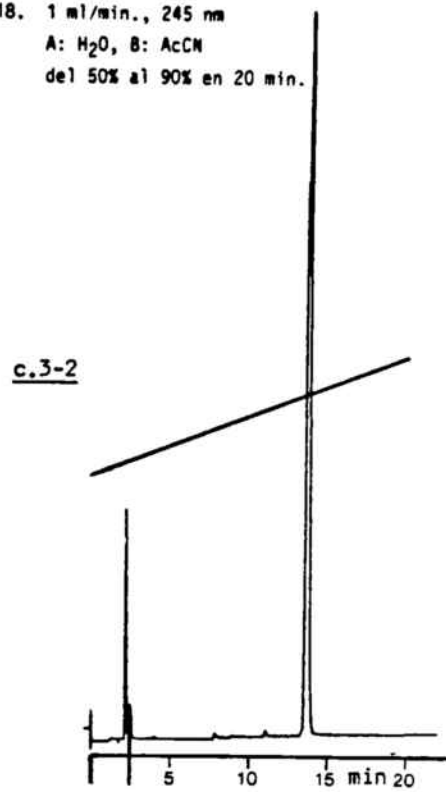
A la hora de estudiar el comportamiento cromatográfico de los 10 análogos, se planteó como objetivo la búsqueda de unas condiciones isocráticas para facilitar el trabajo. En lugar de analizar en conjunto todos los derivados de los que se disponía desde un principio (29, 30, 31, 34, 37 y 38), se eligieron dos de ellos para buscar sus condiciones más idóneas de separación y, a continuación, éstas se aplicaron al resto de productos para acabar de perfilar dichas condiciones. Hay que señalar que la consecución de un cromatograma con todos los análogos separados no es necesaria ya que, dependiendo del estudio a realizar, sólo se necesitarán algunos de estos derivados.

Puesto que el principal proceso que se iba a estudiar era la

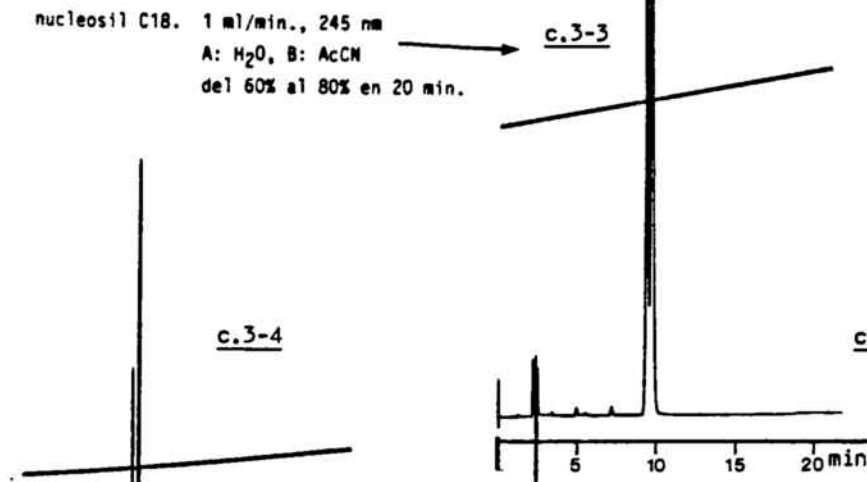
nucleosil C18. 1 ml/min., 245 nm
A: H₂O, B: AcCN
del 10% al 90% en 30 min.



nucleosil C18. 1 ml/min., 245 nm
A: H₂O, B: AcCN
del 50% al 90% en 20 min.

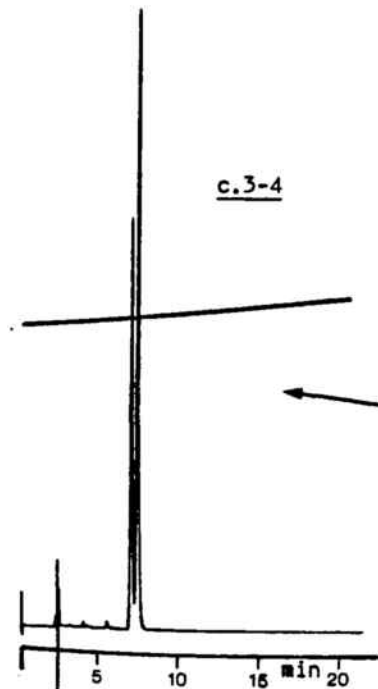


nucleosil C18. 1 ml/min., 245 nm
A: H₂O, B: AcCN
del 60% al 80% en 20 min. → c.3-3



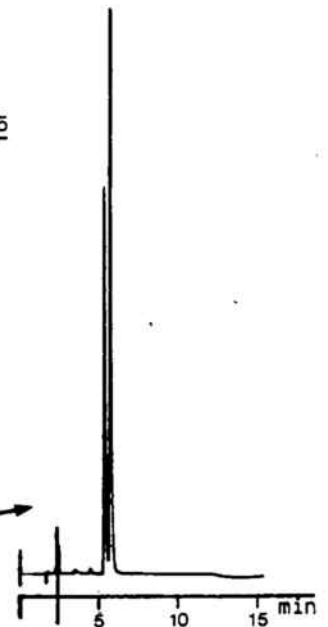
c.3-4

c.3-5



nucleosil C18. 1 ml/min., 245 nm
A: H₂O, B: AcCN
del 65% al 75% en 20 min.

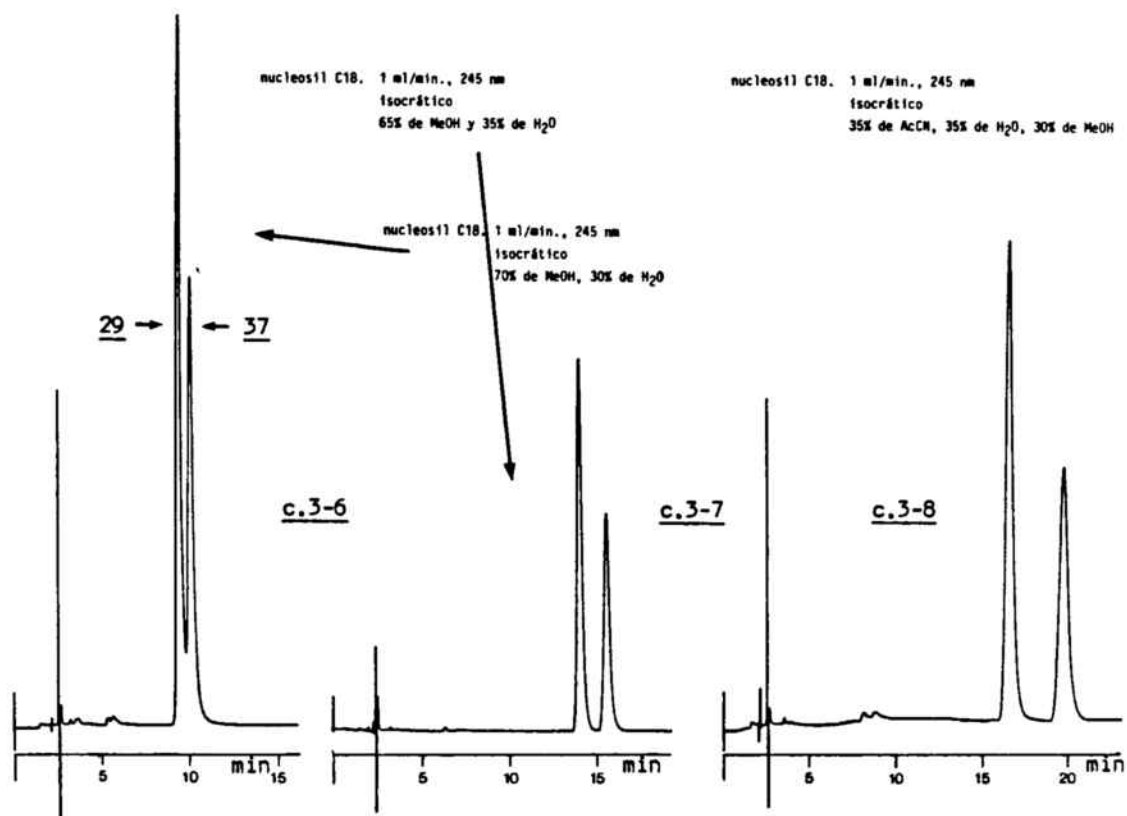
nucleosil C18. 1 ml/min., 245 nm
isocrático
70% de AcCN, 30% de H₂O



reacción entre la N-terc-butoxicarbonilglicina y el análogo monomérico 29, se consideró conveniente iniciar el análisis cromatográfico con este último y el derivado aminoacilado 37, por ser el producto de la reacción. Todos los cromatogramas comentados en este Capítulo fueron obtenidos con una columna Nucleosil-C18. Después de registrar los distintos espectros ultravioleta en metanol de los productos estudiados se eligió como longitud de onda de detección 245 nm, ya que el derivado aminoacilado 37 posee un máximo en esta longitud de onda con un coeficiente de extinción de 8.4×10^3 , inferior al del resto de derivados, para los cuales oscila su máximo entre 240 y 245 nm.

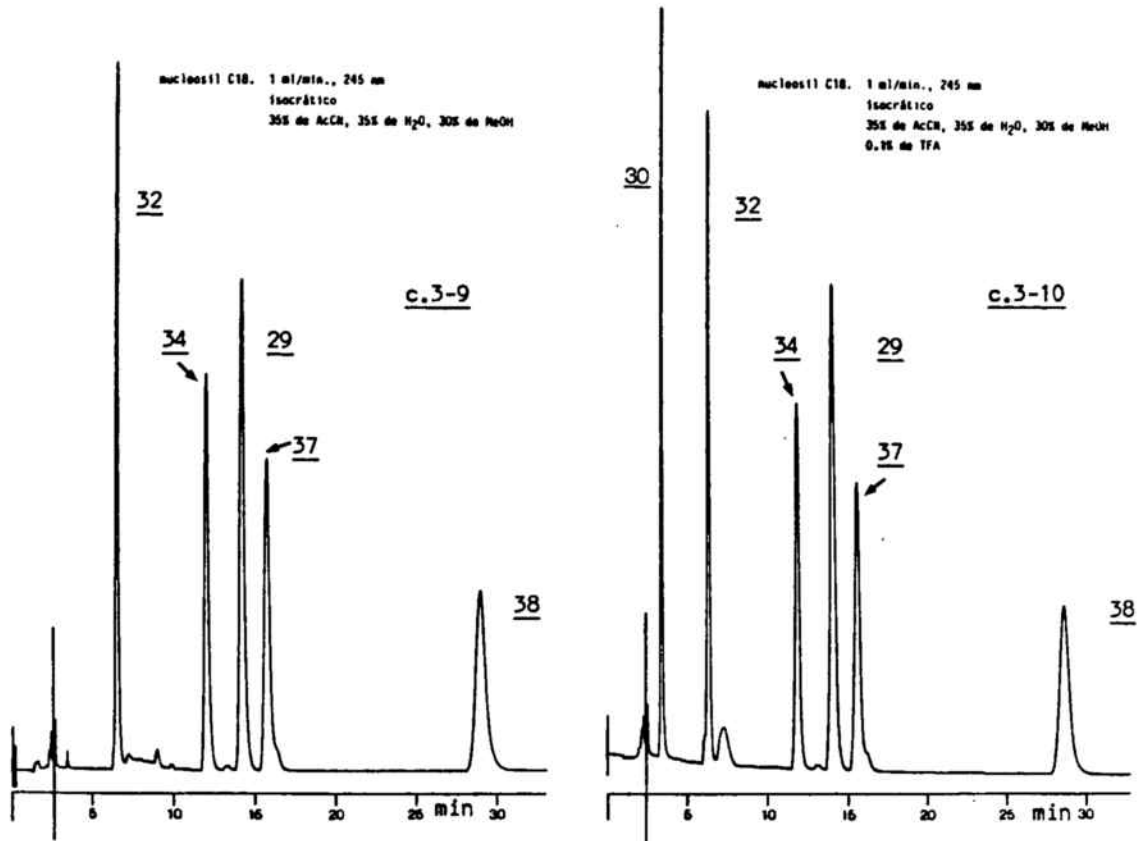
Como ensayo preliminar se realizó un gradiente en agua/acetonitrilo entre el 10% y el 90 % del segundo en 30 min, cuyo análisis corresponde al cromatograma 3-1, en el que se pueden comprobar elevados tiempos de retención y una pobre resolución. Con objeto de mejorar en estos dos aspectos, es decir, una elución más rápida de los productos y una mejor separación entre ellos, se bajó el gradiente subiendo a un 50 % de acetonitrilo y llegando hasta el 90 % en 20 min, obteniéndose el cromatograma 3-2, en el que se puede observar un empeoramiento en la resolución. Una separación bastante correcta de los dos derivados se obtuvo al disminuir la pendiente del gradiente y llegar a un isocrático del 70 %, aunque los tiempos de retención resultaron ser muy bajos, por lo que se creyó conveniente buscar otras condiciones (cromatogramas 3-3, 3-4 y 3-5).

En este sentido, Se pensó que el cambio de disolvente podría resultar adecuado; así, se sustituyó el acetonitrilo por metanol, el cual tiene un poder de elución menor, aunque, como contrapartida, provoca presiones más elevadas debido a una mayor viscosidad. De esta forma, se obtuvo el cromatograma 3-6 en las mismas condiciones que el cromatograma 3-5, observándose una mayor retención y un cambio en la elución relativa de los dos derivados, pasando a tener un mayor tiempo de retención el análogo aminoacilado. Con objeto de aumentar la retención de los productos se disminuyó en un 5 % el porcentaje de metanol, obteniéndose el cromatograma 3-7, con una sensible mejora en la separación. En cambio, como ya se señaló más arriba, la presión aumentó ostensiblemente hasta valores de 3900 psi, lo cual hacía poco aconse-



jable utilizar esta mezcla de eluyentes. Para solventar este problema se sustituyó una parte del metanol por acetonitrilo, concretamente en un 35 %, obteniéndose el cromatograma 3-8, en el que la separación sigue siendo completa, consiguiéndose, por otro lado, una disminución de la presión por debajo de 3000 psi, y unos tiempos de retención razonables.

En las condiciones del cromatograma anterior se inyectaron, además de los dos derivados estudiados hasta ahora, los análogos 30, 32, 34 y 38, observándose la ausencia de uno de ellos (cromatograma 3-9). Una vez se inyectaron individualmente, se comprobó que el primero de ellos no elufa en las condiciones utilizadas. Puesto que la mezcla de eluyentes no contenía componente ácido, se pensó que la presencia de éste podría solucionar el problema al protonarse el grupo amino, aumentando la polaridad del producto, efecto que haría disminuir la retención de éste. Como se puede observar en el cromatograma 3-10, el problema quedó resuelto al añadir un 0.1 % de trifluoroacético, poseyendo este producto, en estas condiciones, el menor tiempo de retención de los



seis derivados analizados hasta ahora.

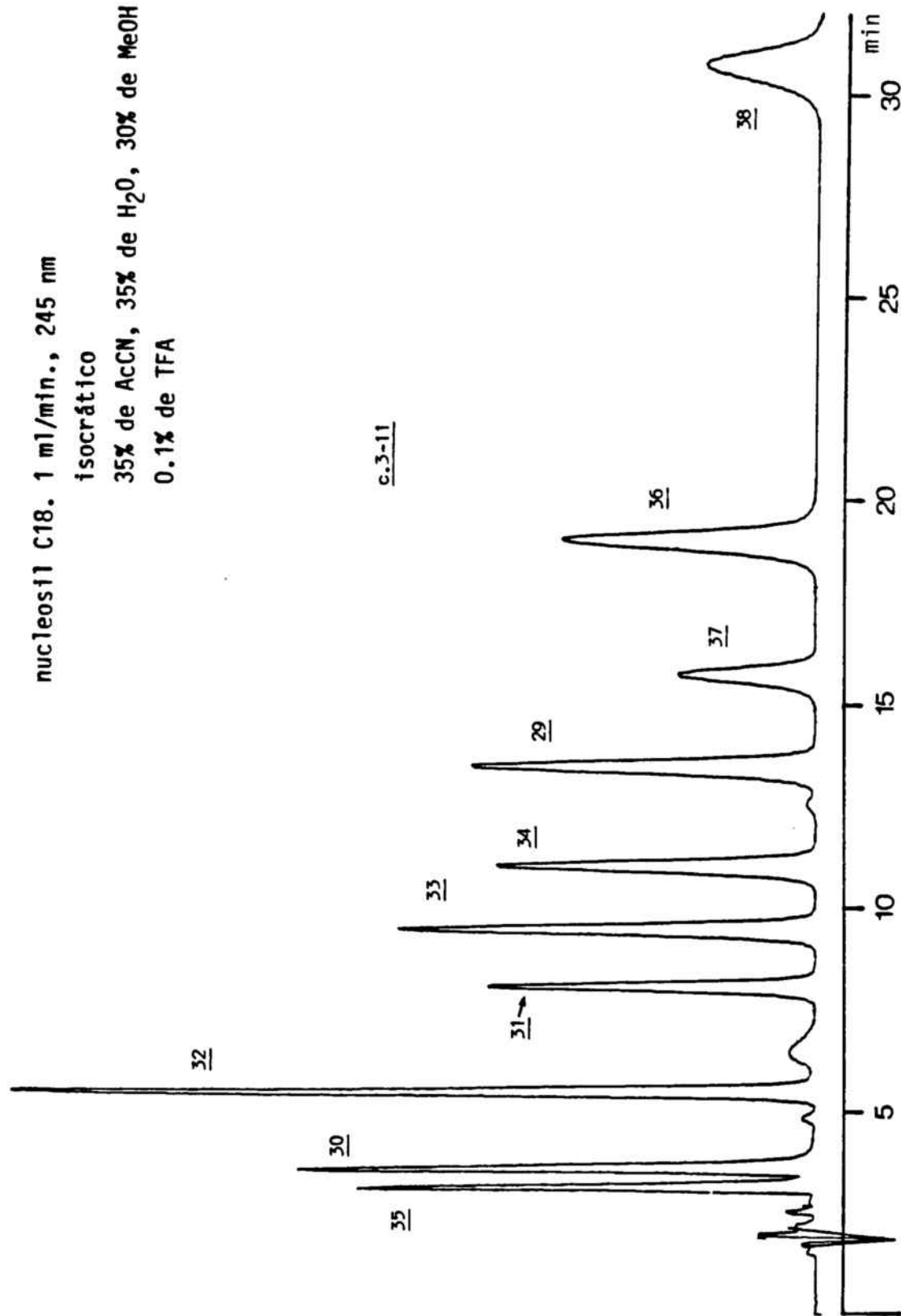
En estas últimas condiciones se inyectaron todos los derivados estudiados, consiguiéndose una buena resolución entre todos ellos, como se puede comprobar en el cromatograma 3-11. Por este motivo, éstas se consideraron adecuadas para llevar a cabo los diferentes estudios.

3.5. Estabilidad de la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida en dimetilformamida y dimetilacetamida

Una vez fijadas las condiciones cromatográficas y antes de proceder al estudio del acoplamiento del primer aminoácido, se ensayó la estabilidad del análogo monomérico 29 en presencia de dimetilformamida y dimetilacetamida, como paso preliminar para comprobar las conside-

nucleosí1 C18. 1 ml/min., 245 nm
isocrático

35% de AcCN, 35% de H₂O, 30% de MeOH
0.1% de TFA



raciones que se realizaron en los apartados anteriores con respecto a la posibilidad de formación de productos no deseados debido a la presencia de sustancias procedentes de la descomposición del disolvente y la extensión con que estos subproductos se formaban. Para llevar a cabo este estudio se utilizó dimetilacetamida sin destilar, dimetilformamida sin destilar y dimetilformamida destilada. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 12.

Como se puede observar, las suposiciones realizadas en el planteamiento previo del problema resultaron ser ciertas ya que todos los productos esperados aparecieron, en mayor o menor cantidad según los casos.

El primer resultado a destacar es que la diferencia entre los dos disolventes es manifiesta, siendo el derivado estudiado más estable en dimetilacetamida, lo cual puede tener una relación directa con el

<i>producto obtenido^a</i>	<i>dimetilformamida^b</i>		<i>dimetilformamida^c</i>		<i>dimetilacetamida^d</i>	
	<i>20 °C</i>	<i>40 °C</i>	<i>20 °C</i>	<i>40 °C</i>	<i>20 °C</i>	<i>40 °C</i>
<u>32^e</u>	0.3	0.8	0.2	2.5	--	0.5
<u>30^e</u>	1.2	2.0	1.1	13.9	--	--
<u>31^e</u>	2.7	15.0	3.0	10.0	--	--
<u>33^e</u>	--	--	--	--	--	1.8

(a) La concentración de N-benzhidril(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida ha sido de 6.4×10^{-3} M. (b) dimetilformamida comercial. (c) dimetilformamida destilada. (d) dimetilacetamida comercial. Los resultados tabulados corresponden a: 2h para (b), a las 2 temperaturas estudiadas; 2 h 25 min y 2 h 55 min para (c), a 20°C y 40°C respectivamente; 2h 40 min y 3h 30 min para (d), a 20°C y 40°C respectivamente. (e) 32: N-benzhidril(4-hidroximetil-3-nitro)benzoilamida; 30: N-benzhidril(4-dimetilaminometil-3-nitro)benzoilamida; 31: N-benzhidril(4-forniloximetil-3-nitro)benzoilamida; 33: N-benzhidril(4-acetiloximetil-3-nitro)benzoilamida.

TABLA 12.- Estabilidad de la N-benzhidril(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida en dimetilformamida y dimetilacetamida

hecho de que en fase sólida se obtuvieran mayores índices de acoplamiento con este disolvente en algunos casos (ver Capítulo 1). El hecho de haber realizado los ensayos a 20°C y 40°C obedece a que desde que se puso en práctica la utilización de la resina 4-bromometil-Nbb, la primera media hora de reacción se llevaba a cabo a 40°C, por lo que se consideró también interesante evaluar el grado de descomposición a esta temperatura. Como es lógico, un incremento en la temperatura favorece la formación de los distintos subproductos, lo cual puede repercutir negativamente el proceso de acoplamiento, si tenemos en cuenta que como paso previo a la realización de éste se suspende la resina en el disolvente y se calienta hasta alcanzar la temperatura deseada.

Volviendo a los resultados obtenidos, podemos destacar un marcado aumento en la formación del derivado 30 con la temperatura cuando se utilizó dimetilformamida destilada como disolvente, lo cual podría deberse a la presencia de una mayor cantidad de este producto, probablemente por una destilación defectuosa del disolvente. Durante este mismo experimento se realizó un nuevo análisis a las seis horas, encontrándose un 27% del producto 30 frente a un 17 % del ester 31. No obstante, la relación de subproductos encontrada en el experimento realizado a 20°C con dimetilformamida destilada es similar a la del ensayo llevado a cabo con dimetilformamida comercial a la misma temperatura, resultados que no tienen una explicación sencilla si los comparamos con los respectivos ensayos realizados a 40°C.

3.6. estudio de la reacción entre el terc-butoxicarbonilglicinato de cesio y la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida

3.6.1. ensayos previos

Antes de proceder al estudio de la reacción entre la sal de cesio

de la terc-butoxicarbonilglicina y la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida, se realizaron unos ensayos previos en dimetilformamida y dimetilacetamida para tener una idea sobre la velocidad de reacción y la pureza del producto final.

Las concentraciones de reactivos utilizadas oscilaron entre 1.61×10^{-3} M y 1.65×10^{-3} M para la sal de cesio y 1.74×10^{-3} M y 1.91×10^{-3} M para el derivado 29; los disolventes empleados ya habían sido destilados previamente (ver parte experimental). En la mayoría de los casos, la extensión de la reacción fué superior al 90% en los 10 primeros minutos para los dos disolventes, no observándose una diferencia apreciable entre éstos (Tabla 13). Con respecto a la pureza del producto obtenido, para el caso de la dimetilformamida, un 5% aproximadamente de la mezcla de reacción correspondía a una serie de subproductos entre los que se podía detectar la presencia del derivado hidroxilado 32 y del formiato 31, entre otros. Los resultados obtenidos para la dimetilacetamida fueron poco satisfactorios en un principio, debido a la presencia de un alto porcentaje del acetato 33 en la mezcla de reacción (aproximadamente un 40%). Este resultado se consideró lo suficientemente importante como para buscarle una expli-

disolvente	temperatura(°C)	<u>37</u> ^a (%)	<u>29</u> ^b (%)	otros (%)
DMF ^c	20	86	8	6
	40	91	3	6
DMA ^d	20	86	10	4
	40	89	7	4

Todos los resultados tabulados se han obtenido a los 10 min. (a) 37: N-benzhidril(4-terc-butoxicarbonil-gliciloximetil-3-nitro)benzoilamida. (b) Las concentraciones de N-benzhidril(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida utilizadas han oscilado entre 1.61×10^{-3} M y 1.65×10^{-3} M; las concentraciones de sal de cesio han oscilado entre 1.76×10^{-3} M y 1.91×10^{-3} M. (c) dimetilformamida destilada. (d) dimetilacetamida destilada.

TABLA 13.- Reacción entre el análogo monomérico 29 y la sal de cesio de la Boc-Gly-OH en distintas condiciones

cación satisfactoria. Puesto que la dimetilacetamida utilizada no era de reciente destilación, se pensó en la posibilidad de la presencia de ácido acético como producto de descomposición; debido a ello, se ensayó el mismo experimento con dimetilacetamida comercial para síntesis, la cual dió lugar también a una importante cantidad del derivado 33 (alrededor de un 20%). A la vista de estos resultados, se destiló sobre hidruro cálcico y se recogió sobre tamiz molecular, utilizándose inmediatamente para realizar un nuevo ensayo. El HPLC mostró un producto final de elevada pureza, encontrándose únicamente un 1% de

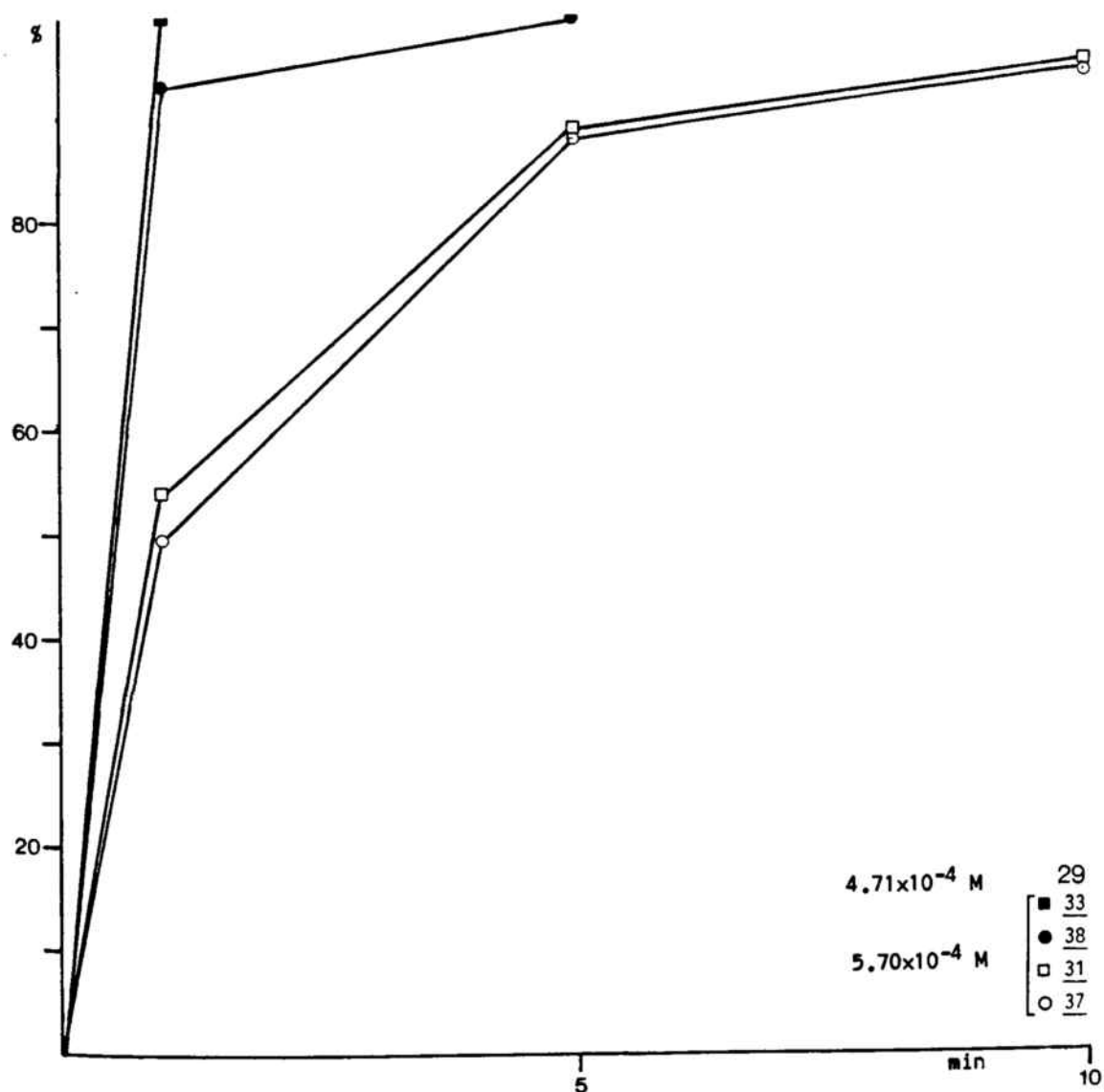


figura 3-7

acetato. La presencia de una elevada cantidad de este subproducto en los últimos ensayos que se han descrito pone en evidencia la importancia que tiene la pureza del disolvente, debido a que los principales productos de descomposición de éste se pueden comportar como nucleófilos en el medio de reacción; así, con respecto al ácido acético, debido a la presencia de la sal de cesio, se establecen sendos equilibrios de formación de carboxilatos, los cuales compiten en el medio para dar los respectivos productos de sustitución. En la Figura 3-7 se representa la formación de este tipo de productos para las sales de cesio de la terc-butoxicarbonilglicina, la terc-butoxicarbonilprolina y los ácidos acético y fórmico con el tiempo, siendo los procesos cuantitativos a los 10 min en las condiciones de reacción utilizadas.

Con objeto de evaluar la influencia de la temperatura, las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y a 40°C (ver Tabla 13), siendo esta última la utilizada normalmente en síntesis de péptidos en fase sólida. En todos los casos se encontró una pureza similar para el producto final.

Por todo lo comentado hasta ahora, podemos deducir que la reacción de sustitución nucleófila tiene lugar con una gran rapidez, no siendo necesario trabajar a temperatura superior a la ambiente; sin embargo, la pureza del disolvente a utilizar es de extrema importancia.

Con objeto de llevar a cabo un estudio más exhaustivo de la cinética de esta reacción, se aprovecharon los resultados obtenidos en los experimentos que se han comentado más arriba para obtener unas condiciones idóneas para el seguimiento de la reacción por HPLC. En este sentido, puesto que no se apreciaron diferencias significativas con respecto a la dimetilacetamida, se optó por utilizar dimetilformamida como disolvente por ser el comúnmente empleado con la resina 4-bromometil-Nbb en síntesis de péptidos en fase sólida.

3.6.2. *Cinética y mecanismo del acoplamiento*

3.6.2.1. *Condiciones utilizadas*

Uno de los problemas que hubo que afrontar para estudiar la cinética del proceso fué la extremada rapidez con que tenía lugar, como se ha comentado en el apartado anterior, por lo que la inyección directa al analizador no fué posible. Para ello, se tuvieron que buscar unas condiciones que permitieran detener el proceso a diferentes tiempos. En este sentido, se probaron diferentes reactivos, encontrándose que mezclas de ácido clorhídrico/dioxano resultaban idóneas a este respecto. En todos los ensayos realizados, las concentraciones de ácido utilizadas fueron tales que la cantidad final de éste (en moles), una vez adicionado a la mezcla de reacción, era similar a la cantidad de sal de cesio equivalente a la que habría en el inicio de la reacción. El medio débilmente ácido final de cada una de las muestras no dió lugar a la desprotección del grupo amino del derivado aminoacilado 37. Para comprobar esto, una muestra de este derivado se trató con ácido trifluoroacético al 30% en cloruro de metileno y se analizó en las condiciones cromatográficas utilizadas para llevar a cabo los estudios descritos en este Capítulo. El tiempo de retención del derivado desprotegido fué similar al de los análogos 30 y 35.

Con objeto de obtener los resultados con la mayor exactitud posible, se utilizó naftaleno como patrón interno, comprobándose que éste no interfería en las condiciones cromatográficas analíticas utilizadas con ninguno de los derivados estudiados.

3.6.2.2. *Estudio cinético*

Para llevar a cabo el estudio de la cinética de formación del derivado aminoacilado 37, las cantidades de reactivos utilizadas fueron de $5.24 \times 10^{-4} \text{ M}$ para el análogo monomérico 29 y $1.42 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $2.56 \times 10^{-3} \text{ M}$ para la sal de cesio de la terc-butoxicarbonilglicina. Con

respecto a este último subproducto, debido a su elevada higroscopicidad,

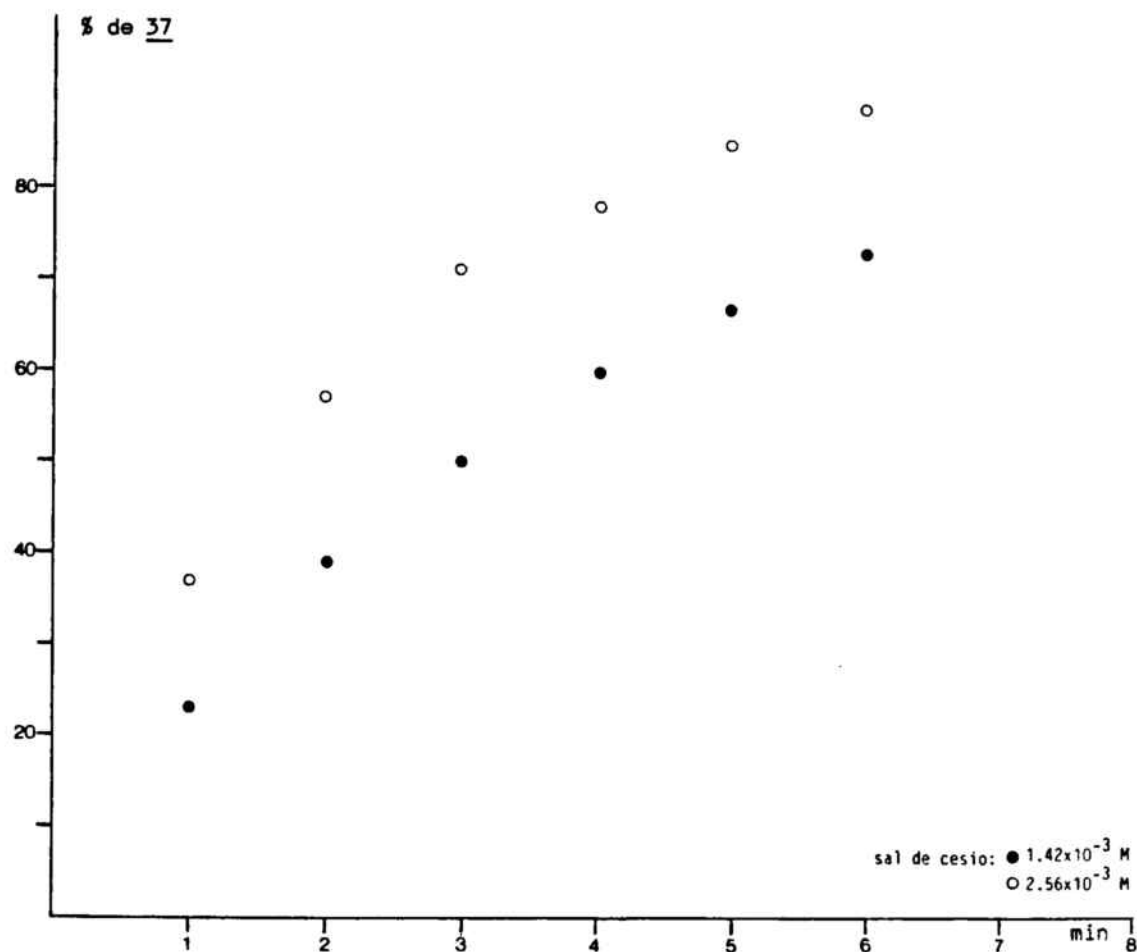


figura 3-8

dad, fué necesario llevar a cabo su cuantificación por análisis de aminoácidos, previa desprotección del grupo amino con ácido trifluoroacético al 30% en cloruro de metileno.

En la figura 3-8 están representadas las dos cinéticas obtenidas con los valores anteriormente mencionados. Como se puede observar, hay una clara dependencia con la concentración de la sal de cesio. Para obtener los valores de las constantes de velocidad se partió del supuesto de que se tratara de una reacción de primer orden con respecto a los dos reactivos, por lo que se aplicó la ecuación correspondiente, obteniéndose coeficientes de correlación excelentes y unos valores para la constante de velocidad observada de $2.90 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y

$5.67 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (o lo que es lo mismo unos tiempos de semireacción de 2.9 min y 1.8 min respectivamente) y valores para la constante de velocidad específica de $3.24 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $2.74 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente.

Si se va siguiendo la aparición de producto de reacción se puede comprobar como la suma total de producto inicial y producto final va disminuyendo con el tiempo (alrededor de un 95% de rendimiento final en los dos casos), no concordando esta diferencia con la aparición de los productos que ya conocemos, lo cual podría estar relacionado con procesos laterales, como ya se había señalado en el apartado anterior. Otro hecho importante que tiene lugar en el transcurso de la reacción es

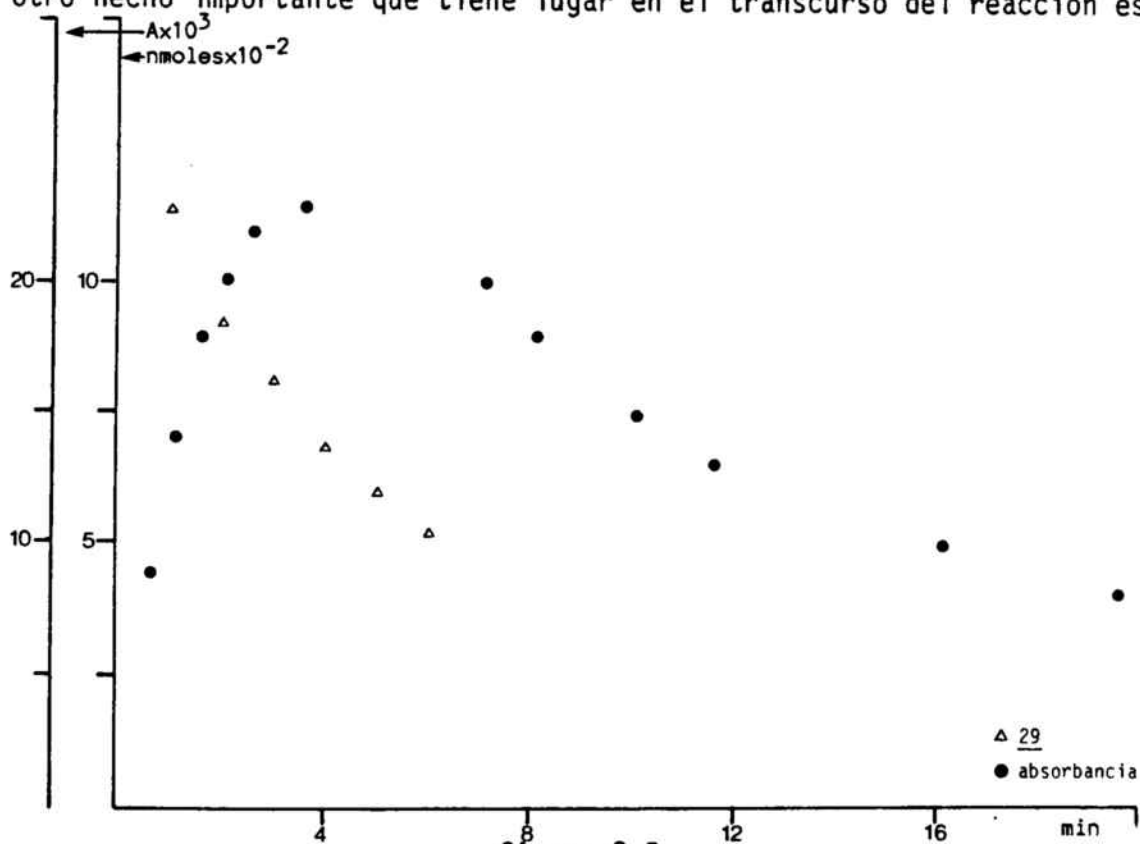


figura 3-9

la aparición de una coloración roja que desaparece con el tiempo para dar lugar a solución de color pardo; en la figura 3-9 se muestra la variación de esta absorción con el tiempo, registrada a 520 nm, junto con la desaparición del producto de partida. Ya que esta situación se daba con la utilización de distintos nucleófilos, se pensó en la posibilidad de la formación de algún complejo de transferencia de carga o la de una sal de Meisenheimer debido al carácter electroatra-

yente del anillo aromático y a la estabilidad comprobada de estas sales en disolventes polares apróticos¹³⁷ y cuando poseen cationes voluminosos como en el caso que nos ocupa¹³⁸. Esto planteó la posibilidad de dos mecanismos posibles, cinéticamente indistinguibles, los cuales se muestran en la figura 3-10. Según el mecanismo "a", el



figura 3-10

producto final se obtendría a través del intermedio "C" que estaría en equilibrio rápido con los reactivos iniciales (ver la representación para la absorbancia en la figura 3-9). Por el mecanismo "b", el producto final se obtendría directamente de los productos iniciales, estableciéndose, de forma lateral, un equilibrio con la posible sal o complejo de transferencia de carga, el cual no daría lugar al producto final.

Puesto que en cualquiera de los dos intermedios postulados el sistema de protones aromáticos quedaría afectado con respecto a sus desplazamientos químicos, se intentó seguir por resonancia magnética nuclear de protón la reacción de acoplamiento, no detectándose variación alguna en el espectro, salvo que la de la formación del producto final. Para intentar congelar de alguna manera este intermedio, se utilizó el derivado metoxilado 34, al cual se le añadió, una vez disuelto en dimetilformamida, una determinada cantidad de sal de cesio de la terc-butoxicarbonilglicina. Aunque la resonancia magnética nuclear de carbono-13 es muy sensible a los cambios estructurales, al realizar el correspondiente espectro, no se observó cambio alguno; por otro lado, no se detectó la aparición de ningún tipo de coloración. Estos resultados, junto con el hecho de que la presencia de nucleófilos en soluciones de otros derivados del análogo monomérico 29 en dimetilformamida no daba lugar a dicha coloración, hicieron pensar en la posibilidad de otro tipo de intermedios, los cuales podrían estar relacionados con los procesos laterales que ya se habían mencionado

con anterioridad. En este sentido, el carácter básico del medio podría contribuir al desarrollo de éstos, por ejemplo, a través de la formación de aniones en la posición bencílica altamente conjugados, los cuales podrían evolucionar para dar productos de adición intermolecular (figura 3-11). Esto vendría apoyado por el hecho de que uno de los productos aislados tras columnar la mezcla de la reacción entre el derivado 29 y la sal de cesio del aminoácido estudiado presentaba un espectro de masas, obtenido por impacto electrónico, en el que se podía comprobar la presencia de los picos correspondientes a la pérdida consecutiva de dos fragmentos del tipo $\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$.

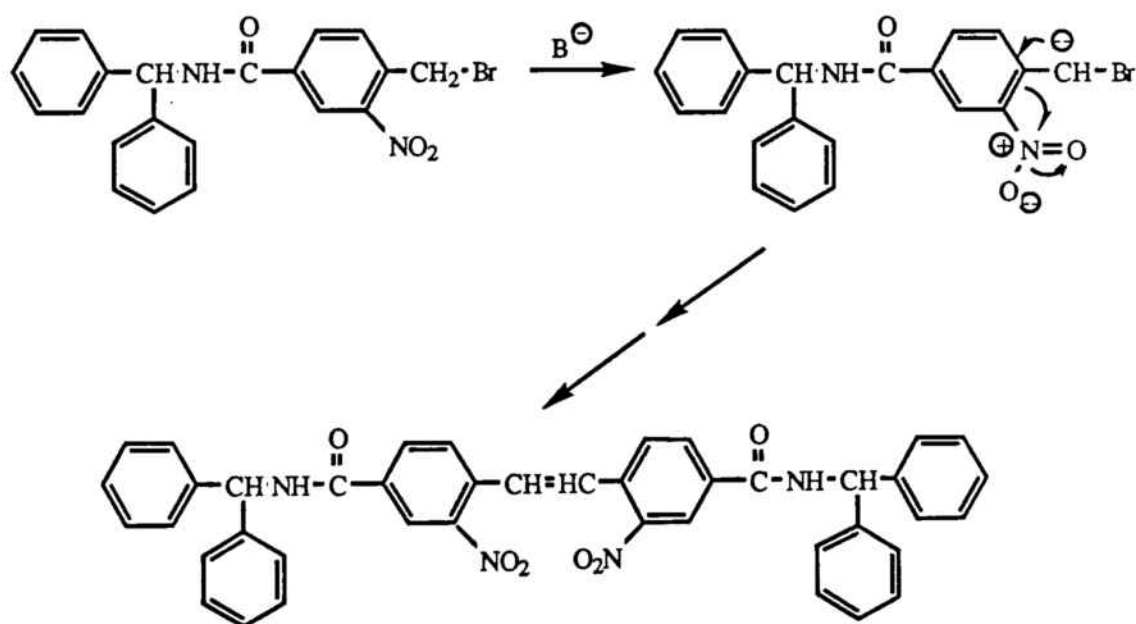


figura 3-11

Otra posible evidencia relacionada con todo lo anteriormente expuesto podría ser el hecho de que la presencia de bases, como la diisopropiletilamina e incluso el carbonato de cesio, en soluciones del compuesto 29 en dimetilformamida daba lugar a la aparición de coloración, roja en el primer caso y violeta en el segundo, para desaparecer con el tiempo y obtenerse una solución de color pardo. Sin embargo, de la misma manera que para el caso de los nucleófilos, la presencia de estas bases en soluciones de otros análogos no evidencia-

ba ningún tipo de coloración. Todos estos resultados hacen poco probable la hipótesis planteada inicialmente con respecto a la formación de los intermedios tipo sal de Meisenheimer o transferencia de carga.

Otra de las posibilidades, también relacionada con este medio básico, podría ser la oxidación de la posición bencílica, proceso muy conocido y que ha sido aprovechado en numerosas ocasiones desde el punto de vista sintético¹³⁹. Dickinson ¹⁴⁰, al hacer reaccionar el 2-nitrobenzohidrol (figura 3-12) con cloruro de tosilo en presencia de piridina, pudo aislar la 2-nitrosobenzofenona.

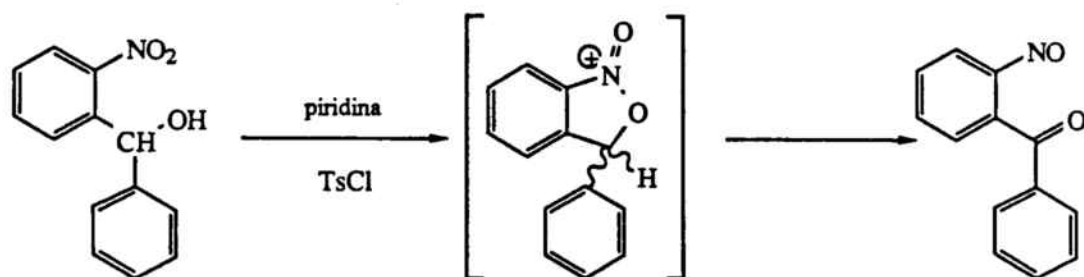


figura 3-12

Este resultado podría estar muy relacionado con el caso que nos ocupa debido a la analogía del 2-nitrobenzohidrol con el estudiado aquí; con respecto al primero, se lleva a cabo la tosilación del grupo hidroxilo, convirtiéndolo en un buen grupo saliente y dando lugar, por lo tanto, al producto final por medio de una catálisis básica a través del intermedio de la figura 3-12. Por otro lado, Hass y col.¹⁴¹ encontraron al estudiar la reacción de distintos cloruros de bencilo frente a la sal sódica del 2-nitropropano que el proceso predominante era la oxidación bencílica a aldehído, salvo en el caso de que el anillo aromático tuviera grupos nitro en las posiciones orto y/o para, en cuyo caso se obtenía el producto de sustitución de forma mayoritaria. Esta reacción de oxidación puede tener lugar también con gran facilidad cuando el disolvente utilizado es dimetilsulfóxido, siendo, en este caso, el agente oxidante este mismo (también es

necesario el medio básico)¹⁴². Para obtener evidencias en este sentido, se ensayó la estabilidad del análogo monomérico 29 en dimetilformamida y dimetilsulfóxido en presencia de diisopropiletilamina. La descomposición del producto en dimetilsulfóxido resultó ser mucho más rápida, obteniéndose como producto mayoritario el derivado hidroxilado 32, muy probablemente debido a la elevada presencia de agua en el disolvente, hecho que podría explicar los rendimientos más bajos que se obtenían al llevar a cabo la reacción de acoplamiento en fase sólida con este disolvente. Esta suposición quedó corroborada al hacer el mismo tratamiento en hexametilfosforotriamida anhidra, encontrándose en el análisis de la mezcla un producto de absorción mayoritaria cuya presencia se hizo también patente pero en menor grado en los análisis correspondientes a los otros dos experimentos. Por otro lado, en los tres ensayos realizados se pudo apreciar la aparición del color rojo característico.

El producto desconocido aparecido en el ensayo realizado con hexametilfosforotriamida pudo detectarse en todos los análisis que se realizaron para el estudio de la reacción de acoplamiento. Para proceder a su identificación, la mezcla de reacción obtenida al tratar el producto 29 con diisopropiletilamina en dimetilformamida se eluyó por una columna de gel de sílice; la fracción correspondiente al producto se analizó por resonancia magnética nuclear de protón y espectrometría de masas, resultando ser la N-benzhidril-(4-formil-3-nitro)benzoilamida (39, figura 3-13), lo cual confirma nuestras suposiciones. Este producto proviene de la reacción de oxidación intermolecular; su presencia no excluye que también tenga lugar el proceso intramole-

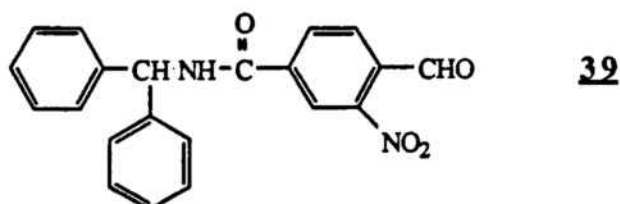


figura 3-13

cular, el producto del cual no se pudo aislar. Por otro lado, no hay que olvidar la posible formación de productos de reducción del grupo nitro en medio básico, cuya mezcla puede ser compleja (derivados azoxi, azo e hidrazo principalmente).

3.6.3. *Intentos de acoplamiento en dioxano, cloruro de metileno y acetato de etilo*

3.6.3.1. *En presencia de DIEA*

Uno de los métodos que se utilizó desde un principio para el acoplamiento del primer aminoácido fué el uso de aminas terciarias como bases, siendo la trietilamina y la diisopropiletilamina las que fueron objeto de mayor número de estudios. La primera de ellas se usó con la resina clorometilada, obteniéndose rendimientos bajos de acoplamiento¹⁴³, lo cual podía acarrear problemas durante la síntesis del péptido debido a la presencia de grupos clorometilo durante su síntesis¹⁴⁴; por otro lado, aparecía una dificultad adicional debido a la formación de sales de amonio cuaternario, las cuales conferían a la resina características de intercambiadora de iones¹⁴⁵, problema que intentó solucionarse con la utilización de aminas terciarias voluminosas o las sales de tetraalquilamonio de aminoácidos^{91,146,147}.

Cabe esperar que todos estos efectos observados para una resina clorometilada se acentúen frente a una resina tipo 4-bromometil-Nbb debido a su mayor reactividad; de esta manera, el comportamiento de la trietilamina frente al análogo monomérico 29 resultó ser especialmente drástico, ya que su presencia en soluciones de este compuesto en dimetilsulfóxido y dimetilformamida dió lugar a la formación casi instantánea de la correspondiente sal de tetraalquilamonio de forma prácticamente cuantitativa, producto que resultó ser muy higroscópico y altamente soluble en agua (en los mismos disolventes, la descomposición es más lenta con diisopropiletilamina, dando lugar a otros productos, como se ha comentado en el apartado anterior).

La reactividad de la trietilamina hizo plantear la utilización de la diisopropiletilamina, base de baja nucleofilia, para la reacción de acoplamiento, llegándose a obtener resultados cuantitativos 17; sin embargo, los ensayos realizados en nuestro laboratorio con anterioridad dieron lugar a rendimientos de acoplamiento relativamente bajos (entre el 39 y el 57 %¹⁴⁸). Esta reacción se lleva a cabo normalmente a reflujo y durante 48 h, no habiéndose detectado racemización en ninguno de los casos estudiados¹⁴⁹. En vista de la ambigüedad de estos resultados, se buscó un método alternativo, el cual se discutirá en el apartado siguiente, de cara a minimizar el tiempo de reacción y conseguir al mismo tiempo porcentajes elevados de acoplamiento. Con objeto de poder establecer comparaciones, se realizaron unos ensayos preliminares con diisopropiletilamina en cloruro de metileno, dioxano y acetato de etilo, para intentar al mismo tiempo mejorar el rendimiento del proceso. Los resultados obtenidos a los 30 min de reacción se muestran en la Tabla 14.

<i>disolvente</i>	<i>temperatura(°C)</i>	<u><i>37^a</i></u>
<i>dioxano</i>	<i>80-82</i>	<i>3</i>
<i>cloruro de metileno</i>	<i>39-40</i>	<i>1</i>
<i>acetato de etilo</i>	<i>80-82</i>	<i>3</i>

(a) Las concentraciones de reactivos utilizadas han sido las siguientes: 29 , 1.38×10^{-2} M; sal de cesio de la Boc-Gly-OH, 2.76×10^{-2} M; diisopropiletilamina, 2.76×10^{-2} M.

TABLA 14.- Obtención del derivado aminoacilado 37 por el método de la etildiisopropilamina en distintos disolventes

Los valores representados en dicha Tabla corresponden a los tantos por ciento de derivado aminoacilado 37 formados en cada caso, los cuales denotan una extremada lentitud de la reacción en los tres disolventes.

3.6.3.2. En presencia de éter 18-crown-6

Uno de los procedimientos que desde un principio se aplicó para realizar el acoplamiento del primer aminoácido sobre una resina clorometilada fué la utilización de la sal potásica de éste, la cual se generaba in situ con terc-butóxido potásico, consiguiéndose, de esta forma rendimientos cuantitativos en algunos casos¹⁵⁰. Posteriormente, con objeto de aumentar la solubilidad de estas sales en el medio de reacción, se utilizaron éteres corona¹⁵¹, obteniéndose también en muchos casos muy buenos resultados. Este último método, el cual no ha sido aplicado todavía a la resina 4-bromometil-Nbb, podría resultar una alternativa idónea para llevar a cabo la reacción de acoplamiento. Con este propósito, se ensayó la viabilidad de este método en los tres disolventes utilizados con el método de la diisopropiletilamina. Las condiciones empleadas fueron exactamente las mismas que las reseñadas en el apartado anterior, siendo el éter corona empleado el 18-crown-6, en un 10% (en moles) con respecto a la sal potásica del aminoácido protegido. Las cinéticas de la reacción para los tres disolventes utilizados se muestran en la figura 3-14, en la que se ha representado la aparición del derivado aminoacilado 37 con el tiempo. Como se puede comprobar, el proceso es mucho más rápido en dioxano y acetato de etilo, siendo los valores de las constantes de velocidad, determinados suponiendo una reacción de pseudoprimer orden con respecto al análogo monomérico 29, de $2.37 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y $2.43 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ respectivamente. El resultado obtenido cuando se utilizó cloruro de metileno fué sensiblemente inferior ($k_{\text{obs}} = 1.34 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), probablemente debido a un efecto de temperatura.

Es interesante destacar que en los tres casos se observó la aparición de color, siendo la más intensa para el acetato de etilo y muy débil cuando se utilizó dioxano, lo cual parece tener una relación directa con la polaridad del disolvente, como ya se había discutido en el apartado anterior. En este sentido, el producto final más puro se obtuvo para el dioxano caso, para el cual no se detectaron subproductos en el análisis cromatográfico de la mezcla de reacción. Con respecto a los otros dos disolventes, se pudo determinar la pre-

sencia de entre un 90% y un 95% de subproductos de reacción.

Una vez se comprobó que el mejor disolvente para esta reacción

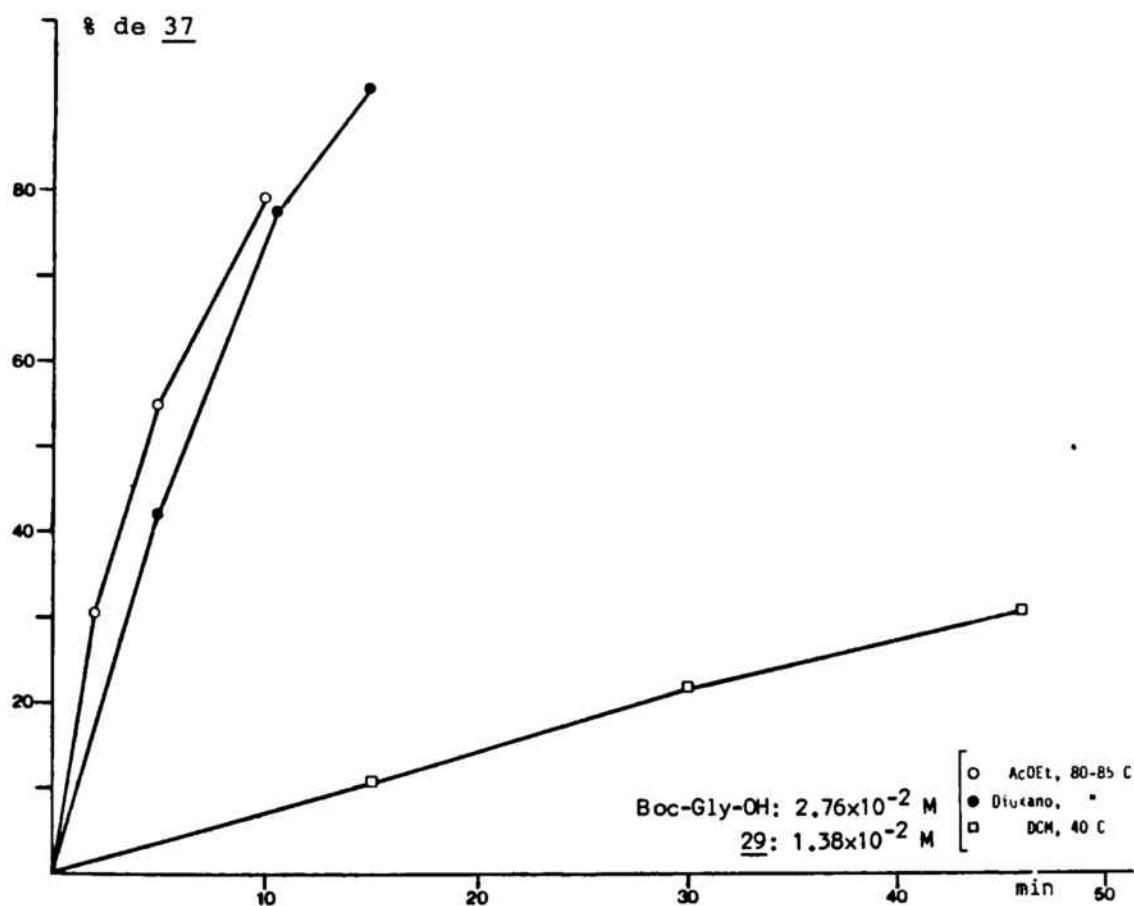


figura 3-14

era el dioxano, se ensayó la aplicabilidad del método del éter corona en estas condiciones al resto de aminoácidos y a la síntesis de un nuevo lote de la tetrapeptidil-resina 10.

En la Tabla 15 se recogen los resultados obtenidos con los cuatro disolventes utilizados. Como se puede observar, la reacción llevada a cabo en dimetilformamida es más rápida; sin embargo, como ya se ha comentado más arriba, el porcentaje de producto final obtenido en estas condiciones es menor que el de la reacción llevada a cabo en

dioxano.

<i>disolvente</i>	<i>temperatura(°C)</i>	<i>tiempo(min)</i>	<u>37</u> (%)
<i>DMF^a</i>	21-22	5	62
<i>dioxano^b</i>	78-81	5	45
<i>AcOEt^b</i>	78-82	5	58
<i>DCM^b</i>	39-40	15	12

Concentraciones de reactivos utilizadas: (a) 29, 5.24×10^{-4} M; sal de cesio, 1.41×10^{-3} M; (b) 29, 1.38×10^{-2} M; Boc-Gly-OH, 2.76×10^{-2} M; 18-crown-6, 2.76×10^{-3} M.

TABLA 15.- Comparación del método de la sal de cesio con el del eter corona

3.7. Ensayos realizados de cara a una aplicación más general del método del eter corona

3.7.1. Ensayos con distintos aminoácidos

Desde un punto de vista más general, se ensayó la viabilidad del método del éter corona para el anclaje sobre la 4-bromometil-Nbb (en forma polimérica) con los aminoácidos más comunmente utilizados en la síntesis de péptidos en fase sólida. Todos los derivados elegidos posefan el grupo terc-butoxicarbonilo como protector del grupo amino en la posición " α "; con respecto a los que contenfan cadenas laterales funcionalizadas, se hizo uso de los derivados cuyos grupos protectores para dichas cadenas eran los más corrientes: bencilo para los ácidos

aspártico y glutámico^{89,112}, serina¹⁵² y treonina¹⁵³; tosilo para la arginina¹⁵⁴ y la histidina¹⁵⁵; acetamidometilo para la cisteína¹⁵⁶; formilo para el triptófano¹⁵⁷; orto-clorobenciloxycarbonilo para la lisina¹⁵⁸ y orto-bromobenciloxycarbonilo para la tirosina¹³¹. Tanto la metionina⁹², como la asparagina y la glutamina¹⁵⁹, se utilizaron sin proteger.

Como se puede observar en la Tabla 16, la funcionalización más alta obtenida transcurrida una hora de reacción fué similar a la encontrada por el método de la sal de cesio en dimetilacetamida, oscilando los valores obtenidos (salvo en tres casos que se discutirán a continuación) entre 0.29 meq/g y 0.41 meq/g. Los resultados más sorprendentes fueron para la arginina, la asparagina y la glutamina, para los cuales no se detectó acoplamiento. Esta circunstancia podría ser explicada fácilmente desde el punto de vista de estabilidad del enlace aminoácido-resina.

En la literatura se hallan descritas importantes reacciones secundarias tanto para la asparagina como para la glutamina, el origen de las cuales se debe a la nucleofilia del grupo funcional de la cadena lateral del aminoácido (amida). Entre estos procesos, podemos destacar la formación de imidas cíclicas^{53,160-164} y la deshidratación a nitrilo¹⁶⁵. En el primer caso, tiene lugar el ataque nucleófilo del nitrógeno amídico al grupo carbonilo en " α ", con desplazamiento del grupo al que está unido (a, figura 3-15). Esta reacción puede tener lugar con enorme facilidad, de tal manera que se han encontrado importantes cantidades de glutarimida durante reacciones de acoplamiento en presencia de dicitclohexilcarbodiimida y hidroxisuccinimida^{162,163} y en procesos de ruptura del enlace péptido-resina con fluoruros¹⁶⁴; incluso la presencia de un grupo terc-butilo esterificando en " α " al aminoácido no ha sido impedimento para la formación de estos productos^{92,160}. La deshidratación a nitrilo, menos probable en el ácido glutámico, tiene lugar a través de una ciclación interna por ataque del átomo de oxígeno del grupo carbonilo de la cadena lateral sobre el otro grupo carbonilo en " α " (b, figura 3-15). Por último, el tratamiento con ácido trifluoroacético para desproteger el grupo amino terminal del ácido glutámico puede dar lugar a la formación de ácido

<i>aminoácido protegido</i>	<i>funcionalización final^a</i>	<i>acoplamiento(%)^b</i>
<i>Boc-Asp(Bz)-OH</i>	0.31	76
<i>Boc-Asn-OH</i>	0.01	0
<i>Boc-Arg(Tos)-OH</i>	0.02	0
<i>Boc-Ala-OH</i>	0.37	90
<i>Boc-Cys(Acm)-OH</i>	0.35	85
<i>Boc-Glu(Bz)-OH</i>	0.35	85
<i>Boc-Gln-OH</i>	0.00	0
<i>Boc-Gly-OH</i>	0.41	100
<i>Boc-His(Tos)-OH</i>	0.39	95
<i>Boc-Ile-OH</i>	0.36	88
<i>Boc-Leu-OH</i>	0.40	98
<i>Boc-Lys(2ClZ)-OH</i>	0.39	95
<i>Boc-Met-OH</i>	0.33	80
<i>Boc-Phe-OH</i>	0.37	90
<i>Boc-Pro-OH</i>	0.41	100
<i>Boc-Ser(Bz)-OH</i>	0.39	95
<i>Boc-Thr(Bz)-OH</i>	0.31	76
<i>Boc-Trp(CHO)-OH</i>	0.40	98
<i>Boc-Tyr(2BrZ)-OH</i>	0.29	71
<i>Boc-Val-OH</i>	0.36	88
<i>Boc-Gly-OH^c</i>	0.41	

(a) Todas las funcionalizaciones se han determinado por el método de Gisin. (b) Los valores tabulados están referidos a la funcionalización de la Boc-Gly-O-CH₂-Nbb obtenida por el método convencional. (c) Obtenida por el método de la sal de cesio, utilizando como disolvente dimetilacetamida.

TABLA 16.- Aplicación del método del éter corona a los distintos aminoácidos

piroglutámico por reacción intramolecular entre el grupo amino en "α" y el grupo carbonilo de la cadena lateral¹⁶⁶.

Las dos primeras reacciones secundarias producen la rotura del enlace péptido-resina, por lo que explicarían perfectamente la ausencia de funcionalización, más aún si consideramos que la reacción se lleva a cabo a 80°C, existiendo, además, un exceso de carboxilato en el medio que puede actuar como base. Todo ello, si lo unimos a la ya

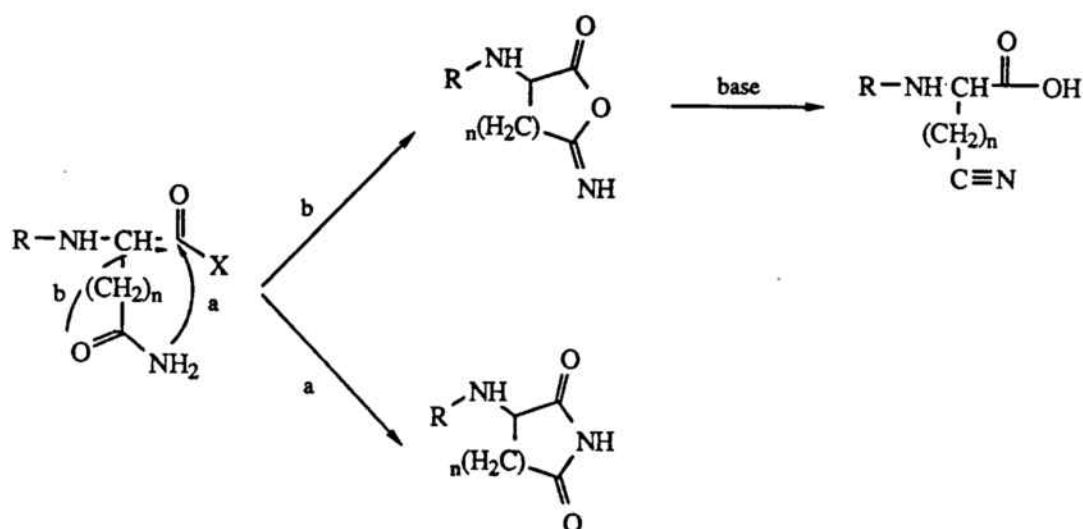


figura 3-15

extensamente comentada reactividad del ester nitrobenílico, puede configurar el marco idoneo para hacer fracasar el acoplamiento.

De manera similar a la formación de imidas en la glutamina y la asparagina, la arginina puede sufrir una ciclación parecida por ataque nucleófilo del nitrógeno "δ" del grupo guanidino para dar lugar a una δ-lactama^{167,168} (figura 3-16). Este proceso, en las condiciones de reacción utilizadas, es suficientemente factible si nos basamos en los mismos razonamientos empleados más arriba.

Sin lugar a dudas, para estos tres aminoácidos resulta evidente la utilización de otros métodos de acoplamiento^{169,170}, como pueden ser el de la sal de cesio, en el que las condiciones de reacción son más suaves.

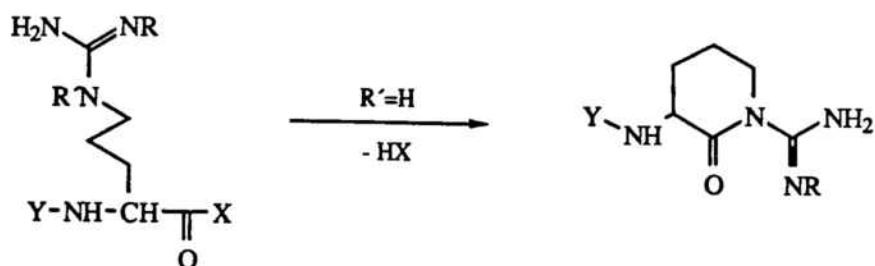


figura 3-16

Los distintos porcentajes obtenidos con el resto de aminoácidos pueden estar en función de la distinta solubilidad de las respectivas sales y del impedimento estérico que pueda ejercer la cadena lateral de cada uno de ellos. En algún caso, el acoplamiento del aminoácido podría competir con determinadas reacciones secundarias, como puede suceder en la metionina¹⁷¹, cuyo átomo de azufre es susceptible de alquilarse por reacción con centros reactivos de la propia resina (en nuestro caso, 4-bromometil-3-nitrobenzoilo).

3.7.2. Nueva síntesis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb

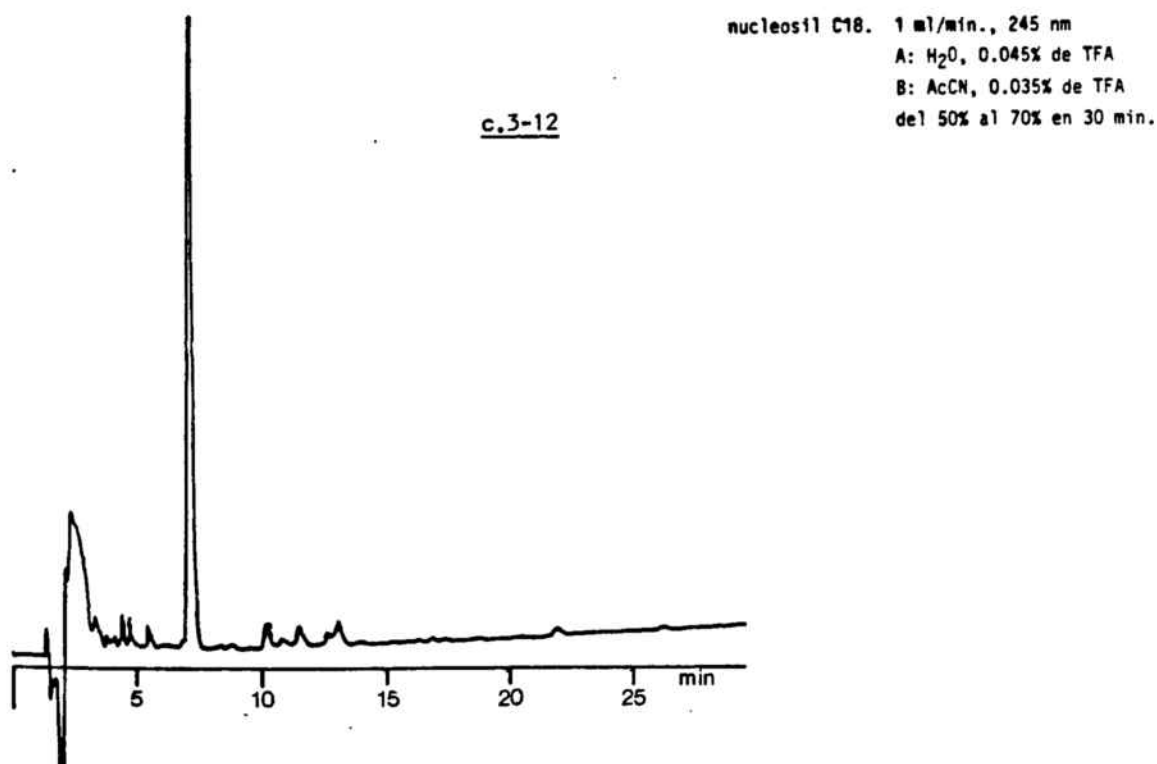
3.7.2.1. Acoplamiento del primer aminoácido

Para ensayar la efectividad en el acoplamiento del primer aminoácido por este método, se llevó a cabo una nueva síntesis del fragmento protegido de la toxina II del escorpión *Androctonus australis* Hector, ya comentada en el Capítulo 1. El acoplamiento del primer aminoácido se realizó en las mismas condiciones de reacción y concentración de reactivos que las utilizadas en fase homogénea. Paralelamente, se ensayó el acoplamiento de la terc-butoxicarbonilprolina sobre la 4-bromometil-Nbb, de cara a comprobar una posible dependencia del proceso con el aminoácido. En los dos casos la reacción se siguió por hidrólisis y análisis de aminoácidos sobre la resina, recogién dose

alícuotas a diferentes tiempos. Para los dos aminoácidos estudiados el máximo nivel de funcionalización se alcanzó durante la primera hora de reacción, siendo el valor encontrado para los dos aminoácidos de 0.41 meq/g, resultado similar al que se obtuvo para el acoplamiento a temperatura ambiente, utilizando como disolvente dimetilacetamida.

3.7.2.2. Incorporación del resto de aminoácidos

Parte de la aminoacil-resina obtenida en el apartado anterior (39 mg aproximadamente) se utilizó para la síntesis de la H-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH, la cual se llevó a cabo haciendo uso del mismo proto-



colo que el comentado en el Capítulo 1, es decir, acoplado sucesivamente la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH y la terc-butoxicarbonilvalina. De la misma manera que en las otras síntesis, la ninhidrina fué negativa una vez se llevaron a cabo los tratamientos correspondientes en los tiempos utilizados, obteniéndose una funcionalización final similar. Tras llevar a cabo la fotólisis por el procedimiento normal, el

análisis por HPLC del crudo de reacción dió lugar al cromatograma 3-12.

3.8. Aplicación del modelo monomérico al estudio de la liberación del péptido de la resina

De la misma manera que el modelo estudiado en este Capítulo nos ha sido útil para comprender mejor el proceso de acoplamiento, así como para la búsqueda de nuevas condiciones para llevar a cabo éste, puede ser también interesante su aplicación para el estudio de la liberación del péptido de la resina. En este sentido, se utilizaron los derivados aminoacilados 37 y 38 para llevar a cabo un estudio preliminar del proceso de fotólisis y la utilización de otros métodos alternativos, como pueden ser la hidrólisis básica y el uso de distintos nucleófilos.

3.8.1. *El proceso fotoquímico*

La irradiación de compuestos aromáticos con átomos de hidrógeno en una posición orto bencílica con respecto a un grupo nitro, numerosos ejemplos de la cual han sido descritos en la literatura, da lugar a un proceso de oxidación-reducción por el cual el grupo nitro se reduce a nitroso y la posición bencílica se oxida para dar lugar a un producto intermedio¹⁷², el cual puede evolucionar, a continuación, en el mismo medio de reacción para formar, dependiendo de la presencia de sustituyentes o no y de las características de éstos en dicha posición (figura 3-17). Así, se pueden obtener compuestos aldehídicos a partir de esteres bencílicos y alcoholes bencílicos^{173,174}, o feno-

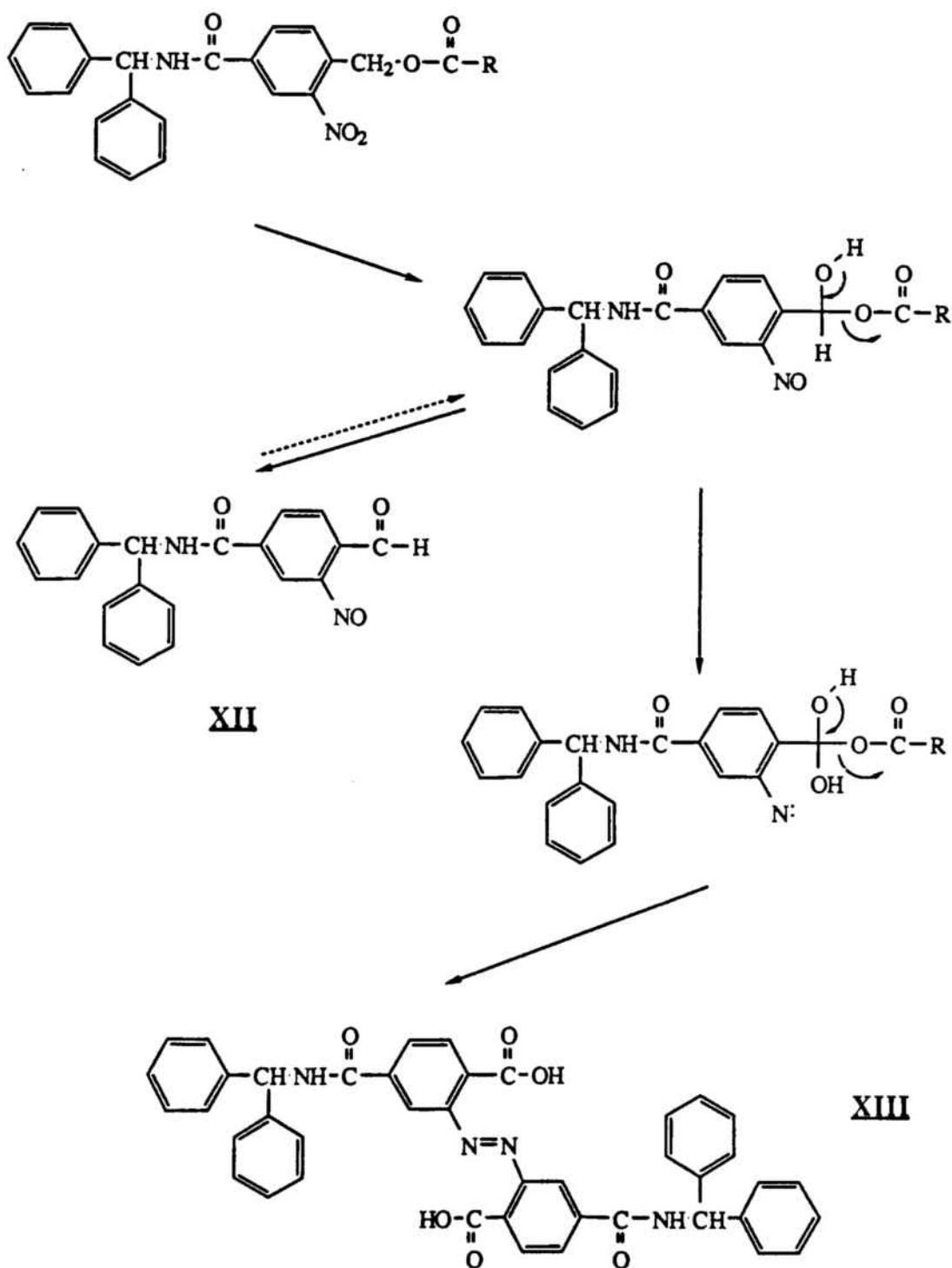


figura 3-17

nas si hay un sustituyente adicional en la posición bencflica¹⁷⁵. En el caso de que el compuesto obtenido sea un nitrosoaldehido (**XII**),

éste puede sufrir una segunda reacción de oxidación-reducción para dar lugar a compuestos azo (XIII) de carácter ácido resultantes del acoplamiento de dos moléculas del primero^{176,177}, las cuales poseen una fuerte coloración parda debido a la extensión de conjugación entre los dos anillos aromáticos a través del grupo azo. Estos compuestos, cuyo mecanismo de formación fué propuesto por Amit y col.¹⁷⁸, pueden actuar de filtros de luz, haciendo bajar el rendimiento del proceso de fotólisis¹⁷⁹.

La primera aplicación de este método con buenos resultados para liberar un péptido de una trama polimérica fué descrita por Rich y Gurwara¹⁷ utilizando una resina similar a la 4-bromometil-Nbb, obtenida a partir de una resina aminometilada. Este hecho motivó el desarrollo posterior de toda una serie de resinas fotolábiles para ser utilizadas con el mismo objetivo¹⁸⁰⁻¹⁸². La resina diseñada a este respecto más recientemente es la descrita por Ajayaghosh y col. ¹⁸² (figura 3-18), la cual da lugar tras la irradiación a un compuesto nitrosocarboxílico que, en principio, no puede evolucionar al correspondiente producto azo, de tal manera que los rendimientos de desacoplamiento deberían ser mayores debido a la supresión de los efectos de filtración de luz inducidos por estos compuestos. Sin embargo, los autores obtuvieron rendimientos de entre el 50 y 60 % de liberación peptídica en 20 h de irradiación, lo que puede indicar la contribución de otros efectos relacionados con la trama polimérica, si bien, el disolvente que se utiliza es etanol, el cual hincha muy mal la resina.

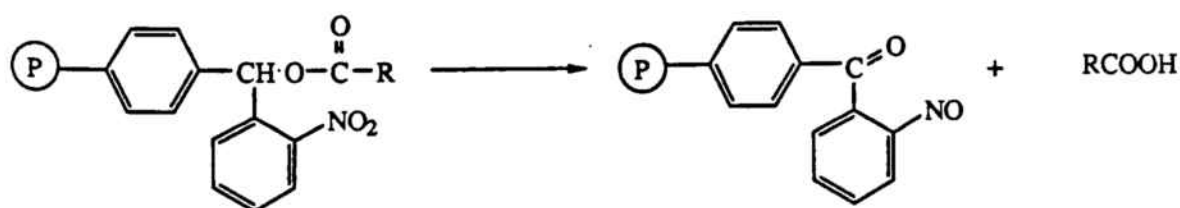


figura 3-18

En un intento de obtener más datos sobre este proceso se realizaron diversos ensayos en fase monomérica con los derivados aminoacilados 37 y 38, comparándose los resultados obtenidos con los de pruebas

análogas realizadas con la tetrapeptidil-resina cuya síntesis se ha comentado en el Capítulo 1 y otra peptidil-resina sintetizada en nuestro laboratorio.

3.8.1.1. Metodología utilizada para la obtención de resultados

Para llevar a cabo el estudio en fase homogénea se utilizó la técnica de análisis de aminoácidos, la cual se complementó con el HPLC en todos los casos para intentar obtener información sobre aspectos mecanísticos del proceso. La razón de ello se debió a que no se podían seguir por cromatografía la aparición de la terc-butoxicarbo-nilglicina y la terc-butoxicarbonilprolina, ya que no poseen buenos cromóforos para poder ser detectados por espectrofotometría ultravio-

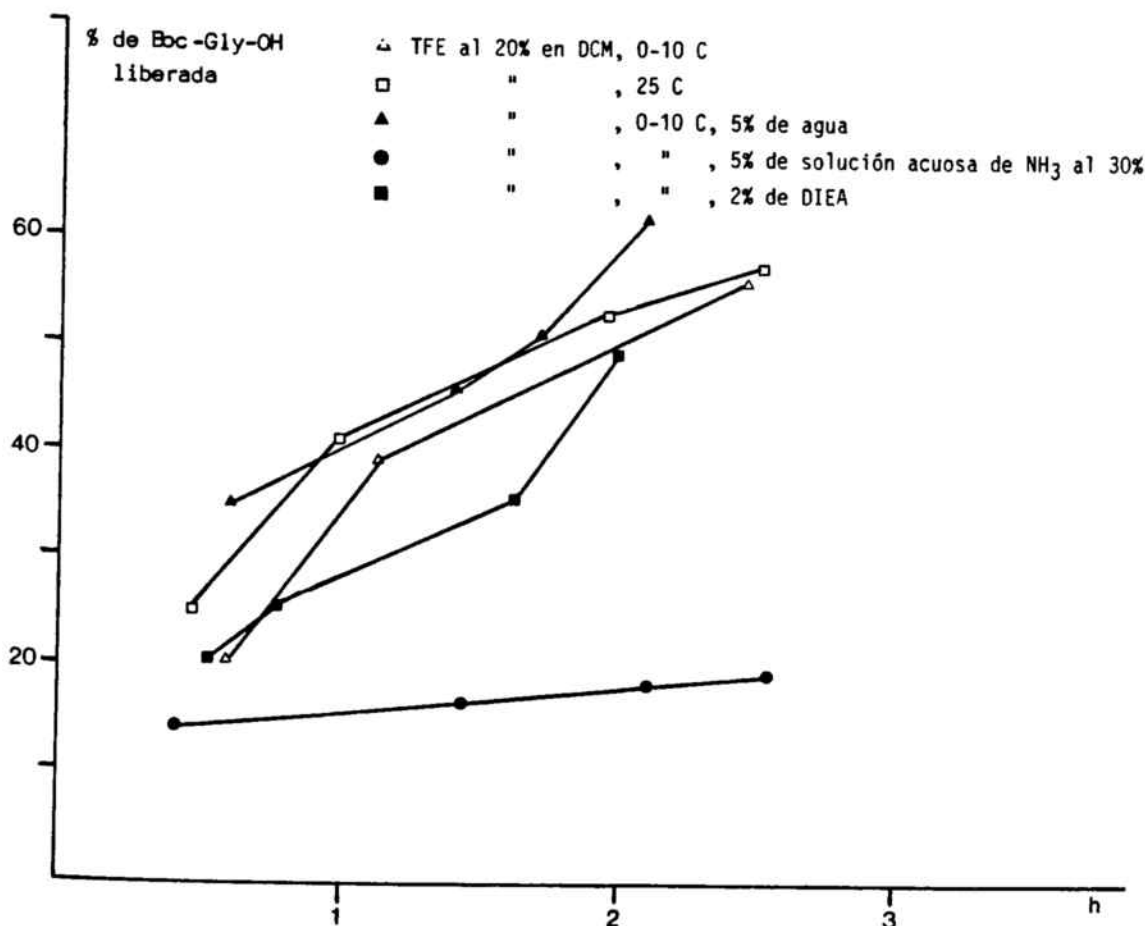


figura 19

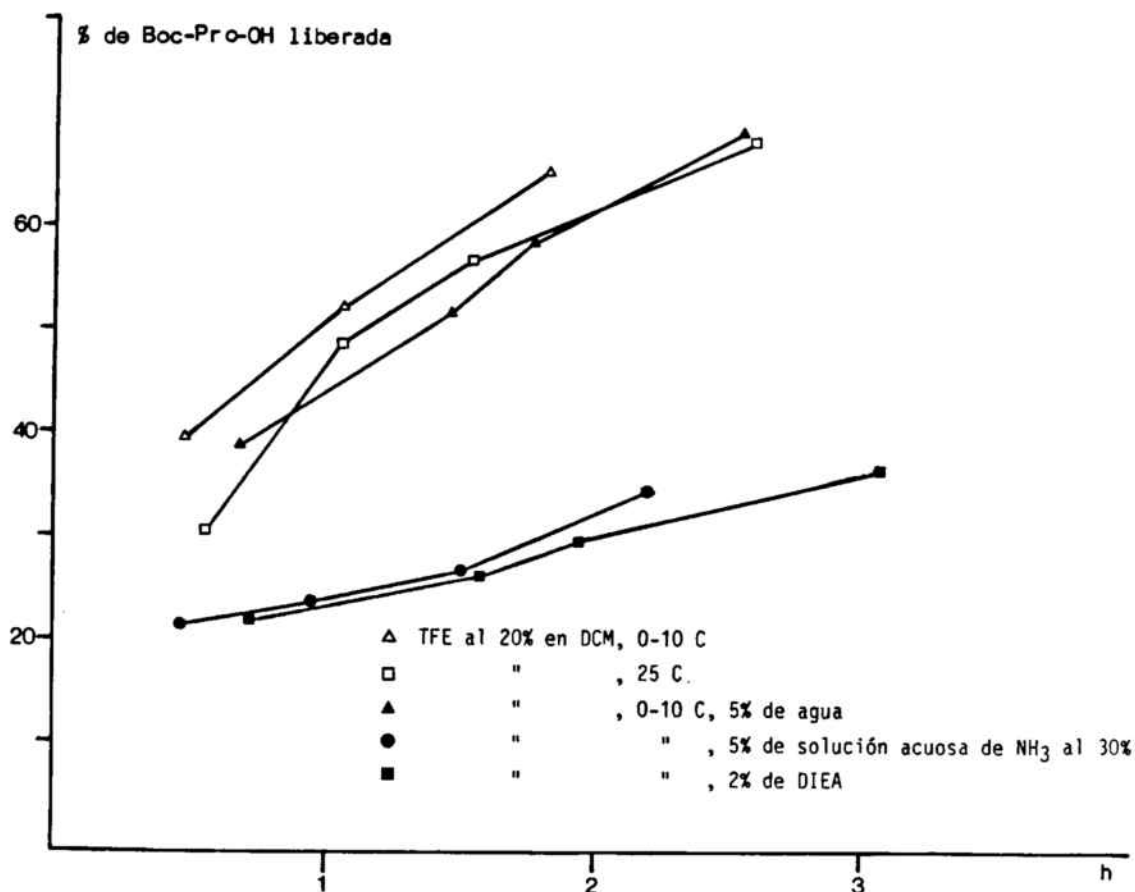


figura 3-20

leta. Por otro lado, se consideró conveniente no seguir la desaparición de los derivados aminoacilados 37 y 38 por si tenían lugar reacciones laterales que provocaran la formación de subproductos que contuvieran aminoácido, lo cual provocaría la obtención de resultados erróneos.

A pesar de no ser necesaria en fase homogénea la presencia del trifluoroetanol, todos los ensayos se realizaron con un 20 % de este disolvente para simular perfectamente las condiciones en fase heterogénea. La posibilidad de la intervención de este disolvente en el proceso de fotólisis se comprobó por HPLC, analizándose una solución del derivado 37 en ausencia de alcohol, una vez irradiada; los resultados indican la no influencia de este producto en las condiciones utilizadas.

Para facilitar este estudio desde el punto de vista de análisis

de aminoácidos se utilizó como patrón interno para todas las mediciones isoleucina.

3.8.1.2. *Ensayos en fase homogénea*

Las dos representaciones de las figuras 3-19 y 3-20 muestran la evolución en la aparición de glicina y prolina en todas las condiciones utilizadas.

La elección de los ensayos realizados de cara a mejorar el rendimiento se realizó tomando como base el mecanismo que se ha postulado para este proceso (figura 3-17).

La primera tentativa que se llevó a cabo tuvo como objeto el favorecer la reacción induciendo la descomposición de los intermedios de reacción mediante un proceso hidrolítico. En esta línea, se introdujo en el medio de reacción un 5 % de agua, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 17 a las 9 h de irradiación. Como se puede observar, la influencia del disolvente es prácticamente nula, tanto para la glicina como para la prolina, salvo para el valor obtenido a baja temperatura en el caso del primer aminoácido, resultado que se considera dudoso ya que corresponde a un valor anormalmente bajo si se compara con el resto de valores obtenidos a tiempos más bajos.

Debido a que, según el mecanismo postulado, tiene lugar la pérdida de un protón para generar el compuesto carbonílico o el ácido carboxílico, se pensó que la presencia de una base podría influir positivamente al favorecer la eliminación, en este caso, del aminoácido. De cara a facilitar la comprensión de los resultados se eligió como base la diisopropiletilamina, ya que su carácter nucleófilo es muy débil, lo cual evita la posible aparición de otros procesos que podrían complicar la interpretación de los datos. Como se puede ver en la Tabla 17, el rendimiento aumenta sensiblemente para el caso de la glicina, resultado opuesto al obtenido para la prolina. El hecho de que por HPLC se obtengan toda una serie de subproductos de reacción de forma mayoritaria diferentes a los obtenidos en ausencia de base,

<i>reactivos</i>	<i>glicina liberada(%)^f</i>	<i>prolina liberada(%)^f</i>
-- <i>a</i>	64	93
-- <i>b</i>	80	93
<i>agua^c</i>	80	97
<i>DIEA^d</i>	96	52
<i>amoniac^e</i>	21	56

En todos los casos, el disolvente ha contenido un 20% de trifluoroetanol, completándose la solución con el reactivo correspondiente y cloruro de metileno. (a) 0-10°C. (b) Temperatura ambiente. (c) 5% de agua. (d) 2% de diisopropiletilamina. (e) 5% de una solución acuosa de amoníaco al 30%. (f) Los resultados tabulados, correspondientes a 9 h de irradiación, se han obtenido por análisis de aminoácidos, previa desprotección del grupo amino del aminoácido con ácido trifluoroacético. Las concentraciones utilizadas de 37 y 38 han oscilado entre 1.90×10^{-3} M y 1.96×10^{-3} M.

TABLA 17.- Fotólisis de 37 y 38 en distintas condiciones

(incluso no se detecta la coloración parda en ninguno de los dos casos), indica que la liberación del aminoácido se lleva a cabo por un mecanismo distinto, produciendo la base, al mismo tiempo, la inhibición del que conlleva a la formación del compuesto azo. Si comparamos el bajo rendimiento encontrado para la prolina con el obtenido para la glicina, la gran diferencia entre los dos aminoácidos podría indicar una influencia importante de los factores estéricos en el proceso. Este distinto proceder de la reacción podría ser debido a que la base catalizara el ataque nucleófilo del trifluoroetanol sobre el derivado aminoacilado, obteniéndose el producto de transesterificación correspondiente a cada aminoácido, lo cual explicaría el hecho de que la reacción fuera más rápida para la glicina. Sin embargo, la ausencia del derivado hidroxilado 32 en la la mezcla de reacción hace poco

probable este mecanismo, a no ser que el ataque tenga lugar en el carbono bencílico. Para comprobar esta hipótesis, se simularon las condiciones de reacción en ausencia de irradiación, observándose la aparición con el tiempo del derivado 32 como único producto de reacción. Este resultado indica que el ataque, si lo hiciera, debería tener lugar sobre el carbono carbonílico. En cualquier caso, los factores estéricos parecen jugar un papel importante en el proceso de fotólisis en presencia de base.

Con respecto a las consideraciones que se han realizado sobre el posible efecto de nucleófilos sobre el mecanismo de la reacción, se ensayó la fotólisis en presencia de un 5 % de una solución acuosa de amoniaco al 33 %. En la Tabla 17 se puede comprobar una disminución acusada en la cantidad de glicina frente a un ligero aumento de la de prolina con respecto al ensayo realizado con diisopropiletilamina. El análisis de la mezcla de reacción correspondiente a la glicina mostró la presencia del derivado hidroxilado 32, siendo además el pico mayoritario del cromatograma, lo cual indica indirectamente la formación de una importante cantidad de glicilamida; esta afirmación se comprobó por análisis de aminoácidos, detectándose este último compuesto, el cual ya había sido caracterizado con anterioridad con relación a otros estudios. Estos resultados indican la existencia de una reacción de adición-eliminación en competencia con la reacción de fotólisis (el primer proceso conduce a la formación de glicilamida y el segundo a la de glicina). Con respecto a la prolina, no se observó la presencia por HPLC del análogo hidroxilado 32, lo que podría ser explicable por los efectos estéricos inducidos por este aminoácido (ver apartado siguiente); por otro lado, la cantidad de prolina fué sensiblemente inferior a la obtenida en condiciones normales, debido muy probablemente a un efecto similar al de la diisopropiletilamina, pudiéndose comprobar por HPLC la presencia de los productos correspondientes a los dos procesos (solución parda).

Como se puede comprobar en la tabla 17, se realizó un quinto experimento en ausencia de aditivos y a temperatura ambiente, no observándose variación en el rendimiento. El hecho de que en fase sólida (ver Capítulo 1) se encontrara una relación directa entre el

rendimiento y la temperatura podría explicarse por un aumento en el hinchamiento de la resina, lo cual facilitaría el paso de luz, y de esta forma su mejor aprovechamiento, a través de la trama polimérica.

Los rendimientos de fotólisis a baja temperatura, temperatura ambiente o en presencia de agua son más elevados en el caso de la prolina que en el de la glicina. Este comportamiento es análogo al encontrado en fase sólida sin que se disponga hasta el momento de una explicación lógica.

3.8.1.3. *Ensayos realizados en fase sólida*

De cara a comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos en fase homogénea, se realizaron los mismos ensayos en fase heterogénea con dos peptidil-resinas cuyo aminoácido unido directamente al polímero era la glicina. Una de ellas es la que ha sido objeto de estudio en el Capítulo 1, es decir, la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb, y la otra, la Boc-Asp(Bz)-His(Tos)-Val-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-Gly-O-CH₂-Nbb, cuyo péptido unido al soporte polimérico corresponde al fragmento 53-59 de la toxina II del escorpión *Androctonus australis Hector*, preparada con anterioridad en nuestro laboratorio.

En la Tabla 18 se representan los resultados obtenidos para los distintos experimentos, realizados a las 7 h de irradiación. Como puede apreciarse, hay una marcada diferencia entre las dos peptidil-resinas cuando se utiliza diisopropiletilamina, obteniéndose el mayor rendimiento de fotólisis para la tetrapeptidil-resina, probablemente relacionado con las características del péptido, pero que no posee una explicación sencilla al desconocer el mecanismo del proceso (ver apartado anterior).

La presencia de amoníaco dió lugar a una cantidad de tetrapéptido protegido sensiblemente más baja, en comparación con el experimento anterior. Si tenemos en cuenta que los valores tabulados han sido obtenidos por hidrólisis y análisis de aminoácidos, éstos no nos pueden indicar la cantidad de imida formada durante el proceso, cosa que no ocurría para los experimentos realizados en fase homogénea.

reactivos	heptapéptido liberado(%) ^e	tetrapéptido liberado(%) ^f
-- a	68	70
agua ^b	63	64
DIEA ^c	35	87
amoníaco ^d	35	49

Las condiciones utilizadas para (a), (b), (c) y (d) son similares a las descritas en la Tabla 16. (e) Boc-Asp(Bz)-His(Tos)-Val-Arg(Tos)-Thr(Bz)-Lys(Z)-Gly-O-CH₂-Nbb, funcionalización: 0.22 meq/g. (f) Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb, funcionalización: 0.35 meq/g. Los resultados tabulados se han obtenido por hidrólisis y análisis de aminoácidos tanto del péptido liberado como de la resina una vez fotolizada.

TABLA 18.- Fotólisis de las dos peptidil-resinas estudiadas en distintas condiciones

Esto quiere decir que la diferencia encontrada entre el experimento realizado en presencia de diisopropiletilamina y el llevado a cabo en presencia de amoníaco responde a otros factores, muy probablemente relacionados con el soporte polimérico. Por otro lado, la cantidad liberada de tetrapéptido sigue siendo superior, aunque de una forma bastante menos acentuada, a la de heptapéptido.

La presencia de agua, en este caso, influye negativamente en las dos peptidil-resinas, obteniéndose cantidades menores de péptido liberado, lo cual podría estar relacionado con la matriz polimérica, al producir este disolvente un hinchamiento menos eficaz.

3.8.2. Hidrólisis básica del enlace ester

Uno de los métodos alternativos al proceso fotoquímico que se ha

utilizado para liberar el péptido de la resina ha sido la hidrólisis básica. Para poder llevar a cabo esta reacción es necesaria la presencia de un alcohol, de tal manera que se puede obtener el péptido libre y el producto de transesterificación, el cual se hidroliza con el tiempo en el medio de reacción para dar lugar al primero¹⁸³. Los reactivos que se han utilizado normalmente han sido mezclas de dioxano/metanol/hidróxido sódico 4 N (30:9:1)^{22,183}, dioxano/dimetilaminoetanol/hidróxido sódico 4 N (30:9:1)²² y dimetilaminoetanol en dimetilformamida¹⁸⁴. Los primeros ensayos se realizaron con el último reactivo sobre una resina tipo Merrifield, obteniéndose resultados satisfactorios, salvo para el caso de la prolina, para la cual se utilizaron sales de talio como catalizadores. El primer método citado se aplicó sobre una resina sulfonada¹⁸³, consiguiéndose el producto final tras prolongar el tiempo de reacción para que tuviera lugar la hidrólisis del ester.

Las pruebas realizadas en nuestro laboratorio con este reactivo sobre la Boc-Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro-O-CH₂-Nbb²³ mostraron una resistencia considerable a la hidrólisis del ester (a las 2 h no se detectó por capa fina una variación apreciable en la composición de la mezcla de reacción). Debido a esto, se sustituyó el metanol por el dimetilaminoetanol (condiciones más suaves), obteniéndose el producto final cuantitativamente en 30 min.

Puesto que la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb, descrita en el Capítulo 1, posee un aminoácido unido a la resina mucho menos impedido estéricamente, la hidrólisis básica podría ser un método adecuado a aplicar en este caso concreto. Para corroborar esto, se realizaron ensayos de hidrólisis sobre los derivados aminoacilados 37 y 38 en condiciones similares. Para ello, se sintetizaron los ésteres metílicos de la terc-butoxicarbonilglicina y la terc-butoxicarbonilprolina para utilizarlos como patrones y poder seguir el proceso por capa fina. Muestras de estos dos productos se trataron con dioxano/metanol/hidróxido sódico 4 N (30:9:1), no detectándose, al cabo de 1 h, la presencia de ester metílico de la glicina y siendo mayoritaria, en el caso de la prolina, la presencia de dicho ester frente al aminoácido libre. Aprovechando el seguimiento de esta reacción en fase

homogénea con objeto de establecer el mecanismo del proceso (ver subapartado siguiente), se determinó el contenido en prolina por análisis de aminoácidos, pudiéndose comprobar que el proceso hidrolítico era prácticamente cuantitativo a las 12 h. Este resultado, junto con los obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio, podrían indicar una especial dificultad en la hidrólisis del péptido esterificado debido a su voluminosidad; facilitándose el proceso para el caso del ester dimetilaminoetilico, por catálisis asistida por el grupo amino del dimetilaminoetanol.

Preveyendo una mayor facilidad en la consecución del proceso hidrolítico, estos ensayos también se llevaron a cabo con la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb, aplicando las condiciones utilizadas en nuestro laboratorio, es decir, dos tratamientos de tres minutos cada uno cuando se utilizó metanol, encontrándose por análisis de aminoácidos la liberación completa del péptido, pero no detectándose éste por HPLC, en cuyo análisis aparecieron otros productos, lo que hizo pensar en una baja estabilidad de los grupos protectores frente a las condiciones básicas utilizadas. Para intentar solventar este problema, se utilizó la mezcla de dioxano/dimetilaminoetanol/hidróxido sódico 4 N (30:9:1) para tratar la tetrapeptidilresina dos veces durante 15 min; también en este caso, se reprodujeron los mismos resultados, muy probablemente por el mismo motivo que para el caso anterior, es decir, una baja estabilidad del péptido protegido en estas condiciones, lo que hace inviable la aplicabilidad de este método en este caso concreto.

En esta misma línea, se realizaron una serie de ensayos sustituyendo el alcohol de la mezcla reactiva por un tiol, ya que se pensó que se podría acceder con mayor facilidad al producto final, al ser los esteres de tiol más fácilmente hidrolizables¹⁸⁵. Las pruebas realizados con los derivados aminoacilados 37 y 38 no dieron ningún resultados positivos, ya que el análisis de la mezcla de reacción mostraba gran número de subproductos de reacción, no detectándose en ningún caso la presencia de derivado 36. Como explicación a este resultado, se pensó que podían haber tenido lugar procesos de oxidación-reducción en los que estuvieran implicados el grupo nitro y el

sulfuro presente en el medio¹⁸⁶⁻¹⁸⁷.

3.8.2.1. Mecanismo del ataque nucleófilo del alcoholato sobre la resina

Como introducción a la discusión que se llevará a cabo en el apartado siguiente, se va a comentar brevemente la aplicación del modelo monomérico al estudio del mecanismo del ataque nucleófilo del alcoholato sobre la resina.

El hecho de encontrar en el medio de reacción producto libre y producto esterificado hace pensar que el ataque del alcóxido puede tener lugar sobre el grupo carbonilo del aminoácido o sobre el carbono bencílico (figura 3-21), lo cual no ha sido comprobado hasta ahora

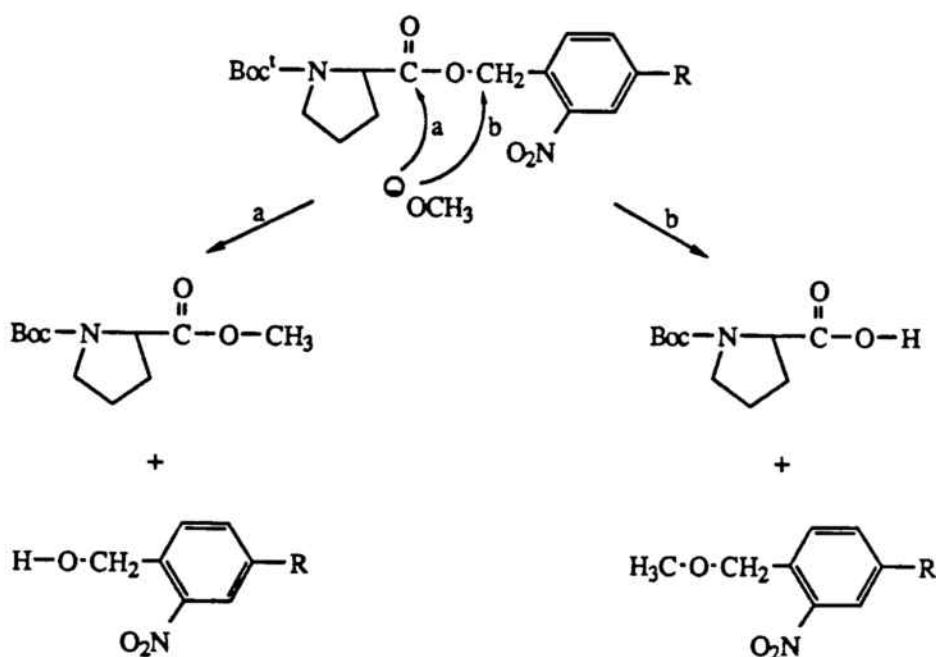


figura 3-21

para el caso que nos ocupa. El impedimento estérico que pueda inducir el aminoácido, como en el caso de la prolina, puede hacer cambiar el mecanismo de la reacción debido a la mayor accesibilidad que puede tener el anión sobre la posición bencílica. En la bibliografía se encuentran pocos ejemplos de reacciones que transcurran por un meca-

nismo de este tipo ($B_{A1}2$), siendo los ejemplos que se han encontrado hasta ahora aquellos en que tiene lugar una importante liberación de tensión estérica¹⁸⁸⁻¹⁹⁰, en situaciones de gran impedimento estérico¹⁹¹ y en la hidrólisis de benzoatos de metilo^{192,193}.

Para obtener una respuesta sobre esta disyuntiva para el caso de la 4-oximetil-Nbb, se utilizó el modelo monomérico, ya que pueden ser identificados con facilidad los dos subproductos del ataque nucleófilo, es decir, los derivados hidroxilado y metoxilado 32 y 34 (figura 3-21). El tratamiento de los compuestos 37 y 38 con dioxano/metanol/hidróxido sódico 4 N (30:9:1) condujo a una liberación cuantitativa del correspondiente aminoácido a los cinco min, siendo el único subproducto de reacción el derivado hidroxilado 32, lo cual indica que la reacción transcurre por un mecanismo $B_{AC}2$.

3.8.3. Utilización de nucleófilos como reactivos para la liberación del péptido de la resina

Como hemos visto hasta ahora, para la liberación del péptido de la resina la hidrólisis básica puede resultar una alternativa adecuada, en algunos casos, al proceso de fotólisis, proceso que transcurre generalmente con rendimientos no cuantitativos. Otra posibilidad a tener en cuenta para abordar este problema es la utilización de distintos nucleófilos, aprovechando, como se ha hecho hasta ahora, la mayor reactividad del sustrato estudiado frente a la de los soportes poliméricos que se vienen usando normalmente. Esta metodología se ha venido aplicando desde hace mucho tiempo por varios motivos, entre los cuales podríamos citar la rotura del enlace péptido-resina en condiciones más suaves a las utilizadas normalmente (fluoruro de hidrógeno) y la obtención de derivados peptídicos modificados en la posición carboxílica terminal (productos naturales con estructura de péptido-amida o compuestos modelo para estudios estructurales).

Una de las primeras aplicaciones en este sentido fué la utilización de procesos de transesterificación para la liberación del péptido

194,195, de tal manera que éste se obtenía en medio básico (trietilamina, N-metilpiperidina, etc) esterificado en el grupo carboxilo terminal, procediendo, a continuación, a su hidrólisis por diferentes métodos. En esta misma línea se ha descrito la utilización de resinas de intercambio aniónico^{196,197}, obteniéndose altos rendimientos de producto esterificado en cortos espacios de tiempo. Los estudios sobre este tema se fueron extendiendo paulatinamente a los distintos aminoácidos unidos a la resina, encontrándose una marcada influencia de los efectos estéricos del aminoácido utilizado en la evolución de la reacción, cuya velocidad decrecía considerablemente en el caso de la prolina^{184,198}, problema que se solventó con la utilización de alcóxido de talio II, como ya se ha comentado en el apartado anterior. Por otro lado, se encontró una dependencia de la cinética del proceso con la longitud del péptido ¹⁹⁵ y se puso de manifiesto la influencia que podía ejercer el disolvente, concluyéndose que la dimetilformamida favorecía la reacción en los casos estudiados.

Los experimentos realizados no se limitaron sólo a la utilización de aminas terciarias como catalizadores sino que aniones como el cianuro, el más estudiado, fueron ensayados desde este punto de vista. Los resultados obtenidos^{199,200} indican una gran similitud con los encontrados en los procesos de transesterificación (importancia de los efectos estéricos o formación del ester en presencia de un alcohol). En esta misma línea se comprobó que la reacción realizada en alcohol y una pequeña cantidad de agua daba lugar al aminoácido libre, debido a la hidrólisis posterior del ester.

Otros reactivos que han sido utilizados para la liberación del péptido de la resina han sido los tiolatos. En este sentido, el anión tiofenóxido se ensayó con un nuevo tipo de resinas denominadas "multi-funcionales", a las cuales se les podía aplicar distintas condiciones para obtener el péptido de diferentes formas (totalmente desprotegido, protegido, etc)²⁰¹; los resultados obtenidos con este nucleófilo fueron aceptables con una de las dos resinas utilizadas, obteniéndose también en este caso el péptido en su forma ácida.

Los métodos descritos hasta ahora dan lugar al péptido como tal o esterificado. Otra variante que se ha aplicado en muchos casos es la

utilización de otros reactivos de cara a obtener péptidos modificados con distintos objetivos (estudios de correlación estructura-actividad biológica); en este sentido, se han sintetizado péptidos metilamida, hidrazida e hidroxilamida a partir de los nucleófilos correspondientes²⁰². La aplicación más interesante de esta metodología es la obtención de péptidos amida, de los que existen un gran número en la naturaleza con importantes funciones biológicas²⁰³⁻²⁰⁹. Este proceso, basado en un método de obtención de amidas de aminoácidos a partir de sus ésteres y de amoníaco líquido²¹⁰, se lleva a cabo esencialmente en presencia de metanol²¹¹, formándose en primer lugar el correspondiente éster, el cual, en el medio, evoluciona para dar la amida²¹².

Como se puede comprobar por lo expuesto hasta ahora, son numerosos los intentos que se han realizado de cara a encontrar unas condiciones lo más suaves posible para eliminar el péptido de la resina, habiéndose conseguido este propósito en numerosas ocasiones, si bien, hay que tener en cuenta a la hora de aplicar estos métodos sobre un péptido protegido la posibilidad de interferencia con determinados grupos protectores debido a su posible poca estabilidad en las condiciones utilizadas. Sin ir más lejos, en el caso de la hidrólisis básica en presencia de un alcohol estudiada en el apartado anterior, que consistía en un proceso de transesterificación donde el anión metóxido actuaba de nucleófilo, se pudo comprobar su incompatibilidad con la tetrapeptidil-resina estudiada.

La mayoría de los estudios a los que se ha hecho referencia más arriba han sido realizados sobre péptidos unidos a través de un enlace éster sobre una resina tipo Merrifield, es decir, el éster formado es de tipo bencílico. Hasta ahora, en este Capítulo se ha intentado sacar partido de la reactividad del grupo 3-nitrobencilo, acentuada por la presencia de un grupo fuertemente atrayente de electrones. Sin lugar a dudas, una vez más, se puede intentar sacar provecho de esta circunstancia en este caso concreto. Por otro lado, al igual que en los ejemplos comentados más arriba, el modelo monomérico puede llegar a ser de gran utilidad. En este sentido, se hizo una revisión de los métodos más importantes que se han utilizado hasta ahora de cara a su posible aplicación posterior sobre una resina peptidil-O-CH₂-Nbb, no

sólo para acceder al péptido como tal, sino de cara a obtenerlo convenientemente funcionalizado para usos específicos posteriores. Los ensayos realizados a este respecto se encuentran recogidos en la Tabla 19 y se irán comentando sobre la marcha.

Como se puede observar en dicha Tabla, los valores que se deta-

reactivo	<u>37a</u>			<u>38a</u>		
	derivado (%) ^b	<u>32</u> (%) ^b	t(h)	derivado (%) ^b	<u>32</u> (%) ^b	t(h)
<i>piperidina al 20%</i> ^c	99	1	0.17	100	—	1.1
<i>piperidina al 50%</i> ^d	79	21	0.17	100	—	1.0
<i>amoníaco 9.2 M</i> ^e	—	100	1.0	43	57	1.0
<i>amoníaco 2.6 M</i> ^f	—	100	1.0	100	—	4.0
<i>DIEA al 20%</i> ^g	62	38	7.0	100	—	12.0
<i>DIEA al 20%</i> ^h	—	—	—	—	—	—
<i>KCN 1.5x10⁻¹ M</i> ⁱ	45	27	7.0	42	—	7.0
<i>KCN 1.5x10⁻¹ M</i> ^j	—	100	7.0	—	100	7.0
<i>Bu₄N⁺ F⁻ 5x10⁻² M</i> ^k	—	16	0.17	2	10	0.17

(a) Las concentraciones de 37 y 38 han oscilado entre 2.62×10^{-3} M y 4.28×10^{-3} M, salvo para el último experimento registrado en la tabla, en el que las concentraciones han sido de 9.69×10^{-3} M y 8.94×10^{-3} M respectivamente. (b) Los resultados tabulados corresponden a la cantidad de derivado aminoacilado que queda y la cantidad formada de 32. Los disolventes utilizados han sido los siguientes: (c) dimetilformamida, (d) cloruro de metileno, (e) metanol, (f) dimetilformamida, (g) metanol, (h) tioetanol, (i) dimetilformamida/agua (9:1), (j) metanol/agua (95/5), (k) dimetilformamida.

TABLA 19.- Reactividad de 37 y 38 frente a nucleófilos

llan para cada derivado aminoacilado son la cantidad de éste que queda tras el tratamiento correspondiente en cada caso y la cantidad de

derivado hidroxilado 32 encontrada en la mezcla de reacción, lo cual puede aportar información sobre el mecanismo del proceso.

De la misma manera que uno de los primeros estudios que se realizó en este Capítulo fué el de la estabilidad del análogo monomérico 29 en las condiciones de reacción de acoplamiento, en este caso concreto también se comprobó de forma preliminar la estabilidad del enlace ester frente a determinados reactivos, como la piperidina, de la que ya se comentó su influencia en determinadas condiciones en el Capítulo 1, o la diisopropiletilamina, la cual es de uso corriente en una síntesis peptídica. En este sentido, se realizaron experimentos con las dos bases mencionadas anteriormente y la dimetilamina tanto en dimetilformamida como en cloruro de metileno, utilizando un 5 % de exceso de cada uno de estos reactivos. Los análisis realizados a los 30 min de haber preparado las mezclas no mostraron ningún producto de descomposición, lo cual puede dar una idea del grado de estabilidad de este enlace. Sin embargo, a pesar de que a este nivel no se detectaron reacciones secundarias, hay que tener en cuenta que se suele trabajar en concentraciones más elevadas, como las que se muestran en la Tabla 19. Como podemos observar, comienzan a ponerse de manifiesto los efectos del nucleófilo con piperidina al 21 % en dimetilformamida, condiciones normalmente utilizadas en fase sólida para eliminar un grupo fluorenilmtoxycarbonilo (Capítulo 1); este resultado es más drástico cuando se pasa a un 50 % de reactivo en cloruro de metileno (otra de las condiciones empleadas), encontrándose un 20 % de desaparición de producto inicial, cantidad, por otro lado, que se transformó en su totalidad en el derivado hidroxilado, no detectándose ningún otro producto, lo cual indica un ataque integral del reactivo sobre el grupo carbonilo, al igual que para el caso del metanol en el apartado anterior.

En el Capítulo 1 se describe la formación de un 14% de terc-butoxicarbonilglicina al tratar Boc-Gly-O-CH₂-Nbb con piperidina al 50% en dimetilformamida. Inicialmente se interpretó este resultado en base a un ataque nucleófilo sobre la posición bencflica de la resina; los resultados obtenidos con el modelo monomérico permiten descartar esta hipótesis (suponiendo que el paso de fase heterogénea a homogénea

no implique un cambio apreciable a este respecto) y sugieren que el aminoácido se forma por hidrólisis con catálisis básica. Esta hipótesis alternativa quedó confirmada al detectarse por capa fina (cloroformo/metanol, 9:1) la presencia de terc-butoxicarbonilglicina en el experimento realizado en piperidina al 20% en dimetilformamida (Tabla 19), cosa que no sucedió en el llevado a cabo utilizando como disolvente cloruro de metileno, lo que indica un ataque del agua presente en el disolvente dimetilformamida catalizado por la misma piperidina.

Otro resultado que hay que destacar con respecto a la susceptibilidad del enlace ester a ser atacado por la piperidina es el hecho de que para el caso del derivado aminoacilado 38 no se detectó reacción alguna, lo cual pone de manifiesto la importancia de los efectos estéricos, incrementando, en este caso, la estabilidad de dicho enlace. Este resultado, por un lado, indica que la utilización de la piperidina en la eliminación de un grupo fluorenilmtoxycarbonilo no resultaría tan problemática como en el caso de que el aminoácido unido directamente al polímero fuera la glicina; sin embargo, desde otro punto de vista, a la hora de plantear la posibilidad de la eliminación de un péptido cuyo aminoácido carboxilo terminal fuera prolina habría que buscar mejores nucleófilos para poder llevar a cabo la reacción.

En la línea de lo comentado en el párrafo anterior, se pensó que el ión cianuro podría ser un candidato adecuado para resolver el problema estérico que plantea la prolina. En este sentido, se realizaron dos ensayos, uno siguiendo las condiciones descritas en la literatura^{199,200} para reacciones similares y otro utilizando como disolvente una mezcla de dimetilformamida/agua (9:1), ya que este disolvente podría favorecer el proceso en fase sólida desde un punto de vista de hinchamiento de la resina si resultara factible su aplicación en este medio; además, se ha encontrado en algunos casos que la dimetilformamida favorece el proceso. Sin embargo, los resultados obtenidos para los dos derivados aminoacilados en los ensayos realizados con esta mezcla de disolventes fueron poco satisfactorios, ya que para 37 sólo se encontró un 49 % de derivado hidroxilado a las 7 h, y para 38 no se detectó, a pesar de haber desaparecido entre un 55 % y un 60 % de producto inicial. Esto podría indicar un ataque parcial o total a

la posición bencílica para dar lugar al producto de sustitución correspondiente, el cual no ha podido ser identificado por carecer de patrón. No obstante, hay que tener en cuenta la aparición de otros productos no identificados en la mezcla de reacción, los cuales pueden atribuirse a un ataque del ión cianuro sobre el anillo aromático trisustituido²¹³, proceso que podría también tener lugar en el derivado 32, provocando un descenso en la cantidad de dicho compuesto detectado por HPLC.

El cromatograma resultante del análisis de la mezcla de reacción para el ensayo en metanol/agua (95:2) no sólo mostró únicamente derivado hidroxilado 32, sino que además correspondió a un 100 % de liberación del aminoácido transcurrido el mismo tiempo que para el ensayo anterior. Este resultado no sólo se obtuvo para la glicina, sino que también se observó en la prolina, lo cual confirma las suposiciones realizadas al elegir el cianuro como nucleófilo. Llegado a este punto, puede resultar interesante comprobar como queda el aminoácido tras el tratamiento que acabamos de discutir.

El mecanismo de la hidrólisis de un ester bencílico con cianuro en presencia de un alcohol ha sido estudiado en profundidad, comprobándose que en una primera etapa de la reacción se forma el ester correspondiente a través de un proceso de transesterificación. Puesto que el resultado obtenido con este nucleófilo ha sido prometedor y, por lo tanto, se considera factible su aplicación en fase sólida (concretamente, se aplicaría a la tetrapeptidil-resina descrita en el Capítulo 1), se planteó la posibilidad de una hidrólisis lenta del ester metílico del péptido correspondiente, por lo que sería interesante tener caracterizado por HPLC dicho producto para poder seguir la reacción hidrolítica. De cara a plantear su síntesis para utilizarlo como patrón, se realizó un ensayo previo en fase homogénea. Así, se procedió a la transesterificación de los derivados aminoacilados 37 y 38, en presencia de metanol/diisopropiletilamina (Tabla 19). Una vez más, el derivado correspondiente a la prolina se mostró especialmente estable, no detectándose derivado hidroxilado 32, incluso a las 12 h de tratamiento. Por otro lado, corroborando otros resultados obtenidos hasta ahora, para el caso de la glicina la reac-

tividad fué superior, encontrándose un 38 % de liberación de aminoácido a las 7 h.

La posibilidad de obtención de péptidos imida a partir de una resina peptidil-O-CH₂-Nbb también fué contemplada en este estudio. De la misma manera que para el caso del ión cianuro, se realizaron dos experimentos con vistas a su posible utilización en fase sólida, es decir, metanol/amoníaco y dimetilformamida/amoníaco. Los resultados obtenidos pueden relacionarse muy bien con los comentados hasta ahora. En las dos condiciones ensayadas (Tabla 19), el derivado aminoacilado 37 fué más reactivo ya que al cabo de una hora no se detectó producto de partida, el cual se convirtió íntegramente en el derivado hidroxilado 32. Sin embargo, para el caso del derivado 38, en dimetilformamida no se observó la formación de derivado hidroxilado 32 tras cuatro horas de tratamiento; en metanol, el producto se mostró mucho más reactivo (57 % al cabo de una hora), lo cual puede corresponder a un posible efecto de disolvente y/o al hecho de trabajar con una concentración mucho más baja de nucleófilo en dimetilformamida. Con respecto a la glicina en este último disolvente, se volvió a detectar por capa fina la presencia de terc-butoxicarbonilglicina libre, atribuible, de la misma forma que para el caso de piperidina, al agua presente en la dimetilformamida.

Siguiendo la línea de búsqueda de nuevos métodos de liberación del péptido de la resina, también se ensayó la utilización del fluoruro de tetrabutilamonio y del tioetanol, reactivos de aplicación más reciente.

La utilización de aniones fluoruro para la liberación de péptidos de soportes poliméricos a los que están unidos mediante un enlace ester, surgió como método alternativo para la obtención de fragmentos protegidos, ya que las condiciones utilizadas eran lo suficientemente suaves y el proceso lo suficientemente rápido como para garantizar la estabilidad de los grupos protectores ^{214,215}. Posteriormente, ensayos realizados con una resina análoga a la descrita en el Capítulo ²¹³² condujeron al establecimiento del mecanismo, el cual consistía en una hidrólisis catalizada por el ión fluoruro. En este último trabajo, el grupo 2-bromobenciloxycarbonilo utilizado para un residuo de tirosina

no fué estable en las condiciones utilizadas (temperatura ambiente, 0.05 M de reactivo en dimetilformamida, 1 h).

En nuestro caso concreto, estas mismas condiciones se ensayaron con los derivados aminoacilados 37 y 38, no detectándose prácticamente producto de partida a los 10 min en ninguno de los dos casos (Tabla 19). Con respecto a los productos finales, la mezcla de reacción mostraba un bajo porcentaje de derivado hidroxilado 32 y la presencia mayoritaria de productos de oxidación, los cuales ya se habían observado con anterioridad en otros procesos (producto 39, entre otros). Este resultado es comprensible si tenemos en cuenta la basicidad del reactivo, el cual puede catalizar procesos de oxidación-reducción en los que está implicada la posición bencílica. A pesar de no observar por el método analítico utilizado la liberación del aminoácido, cabe esperar que ésta tenga lugar debido a lo comentado más arriba. A pesar de ello, se realizó un ensayo con la tetrapeptidil-resina estudiada en el Capítulo 1 utilizando las mismas condiciones, no encontrándose péptido por hidrólisis y análisis de aminoácidos de la resina, una vez tratada durante 10 min. Sin embargo, no se pudo detectar la presencia de péptido en el análisis cromatográfico del filtrado, muy probablemente por la baja estabilidad del grupo benciloxycarbonilo en estas condiciones, ya que apareció un nuevo producto con una absorción superior a 254 nm que a 220 nm (naturaleza no peptídica). El ensayo realizado en las mismas condiciones sobre el péptido protegido mostró la presencia de este mismo producto.

Otra de las posibles aplicaciones de la resina 4-bromometil-Nbb puede ser la de la obtención de tioesteres de péptidos protegidos. Recientemente, se vienen utilizando estos derivados como sustratos activos para la condensación de fragmentos protegidos²¹⁶⁻²¹⁸, como alternativa al método empleado habitualmente. De forma similar a lo que se ha visto hasta ahora, podría accederse fácilmente al producto deseado mediante un proceso de transesterificación. En este sentido, se pensó que el modelo monomérico podría también resultar de utilidad para este estudio; sin embargo, de forma similar a lo ocurrido al estudiar la hidrólisis básica en presencia de tioles, los ensayos realizados no fueron satisfactorios, debido a la formación de diversos

productos no identificados, resultando inviable en todos los casos la evaluación de la formación de tioester a través del modelo monomérico.

Desde un punto de vista general, los resultados descritos en este apartado de la Tesis demuestran la utilidad del modelo monomérico de la resina 4-bromometil-Nbb a la hora de plantear nuevas posibilidades de eliminación del péptido de la resina.

PARTE EXPERIMENTAL

ABREVIATURAS

Disolventes y Reactivos

AcCN	acetonitrilo
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
Boc ₂ O	carbonato de di- <u>terc</u> -tbutilo
BuOH	n-butanol
tBuOH	<u>terc</u> -butanol
DCC	diciclohexilcarbodiimida
DCHA	diciclohexilamina
DCM	cloruro de metileno
DCU	diciclohexilurea
DIEA	diisopropiletilamina
DMA	dimetilacetamida
DMAE	dimetilaminoetanol
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	dimetilformamida
Et ₂ O	eter dietílico
SDM	sulfuro de dimetilo
FDNB	fluorodinitrobenceno
FmOH	fluorenilmetanol
HOBt	N-hidroxibenzotriazol
HOObt	N-hidroxibenzotriazina
HOSu	N-hidroxisuccinimida
iPrOH	isopropanol
MeOH	metanol
TEA	triethylamina
TFA	ácido trifluoroacético

TFE	trifluoroetanol
TFMSA	ácido trifluorometanosulfónico
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano

Aminoácidos

Ala	alanina
Asp	ácido aspártico
Asn	asparagina
Arg	arginina
Asu	aspartimida
Cys	cisteina
Glu	ácido glutámico
Gln	glutamina
Gly	glicina
His	histidina
Ile	isoleucina
Leu	leucina
Lys	lisina
Met	metionina
Phe	fenilalanina
Pro	prolina
Ser	serina
Thr	treonina
Trp	triptófano
Tyr	tirosina
Val	valina

Grupos Protectores

Acm	acetamidometilo
Boc	<u>terc</u> -butoxicarbonilo
Bu ^t	<u>terc</u> -butilo
Bz	bencilo
cHex	ciclohexilo
CHO	formilo
Fm	fluorenilmetilo
Fmoc	fluorenilmetoxicarbonilo
OBz	<u>orto</u> -bromobenciloxicarbonilo
OClZ	<u>orto</u> -clorobenciloxicarbonilo
3Pic	3-picolilo
4Pic	4-picolilo
Tos	<u>para</u> -toluensulfonilo
Z	benciloxicarbonilo

Otros

BHA	benzhidrilamina
CMC	carboximetilcelulosa
DEAE	dimetilaminoetilo
DCU	diciclohexilurea
DKP	dicetopiperazina
FAB	bombardeo con átomos rápidos
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
Nbb	2-nitrobenzamidobencil-resina
P	poliestireno-(co-1%-divinilbenceno)
PAM	paraacetamidometil-resina
R	fenilalaniloximetil-Pam-resina

MATERIALES Y METODOS

Instrumentación

- Los puntos de fusión han sido determinados en un aparato Buchi
- Las mediciones conductimétricas se han realizado en un conductímetro Radiometer (mod. CDM 3)
- Las determinaciones de pH se han llevado a cabo en un aparato Radiometer (mod. 51)
- Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón se han registrado, según los casos, en un aparato Hitachi Perkin-Elmer de 60 MHz (mod. R-24B) y en un espectrofotómetro Varian de 200 MHz (mod. XL-200). Los espectros de carbono-13 se han realizado en el último citado
- Los espectros de infrarrojo se han obtenido en un aparato Perkin-Elmer (mod. 681)
- Los registros de ultravioleta-visible se han llevado a cabo en un aparato Perkin-Elmer (mod. Lambda 5)
- Los espectros de masas de impacto electrónico e ionización química se han efectuado en un espectrómetro Hewlett-Packard (mod. 5988 A); los de bombardeo con átomos rápidos (FAB) han sido obtenidos en el Instituto de Química Aplicada de Cataluña con un espectrómetro VG (mod. MS9), en el ULIRS (University of London Intercollegiate Research Service of Mass Spectrometry (School of Pharmacy)) con un espectrómetro de la misma marca (mod. ZAB-SE), y en la propia Facultad de Química con el aparato mencionado en primer

lugar

- Las determinaciones de poder rotatorio se han obtenido de un polarímetro Perkin-Elmer (mod. 141)
- Los análisis elementales se han llevado a cabo en el Instituto de Química aplicada de Cataluña, en un analizador Perkin-Elmer (mod.240)
- Los análisis de aminoácidos se han realizado en un autoanalizador Biotronic (mod. LC-6001), utilizando como reactivo para su detección la ninhidrina. Las muestras, cuando no se han filtrado, se han centrifugado en un aparato de la marca ALC (mod. 4224)
- Para eliminar pequeñas cantidades de disolvente (muestras de análisis de aminoácidos, muestras de cinéticas, etc.) se ha utilizado una centrifugadora de vacío con calentador de la marca SAVANT
- El tratamiento de las distintas peptidil-resinas con HF se ha llevado a cabo en un reactor especial de teflón y Kel-F Toho-Kasei Ltd. (Tokio, Japón)
- Las liofilizaciones han sido realizadas indistintamente en un liofilizador Virtis Freezemobile de 6 litros (QD mod. 6201-6240), provisto de congelador, una bomba General Electrics (mod. 5KC36PN359K) y 16 entradas de liofilización, y otro de la misma marca en su modalidad de tambor con 12 entradas, enfriado externamente con un dedo frío CryCool (Neslab mod. CC-100-II) y asistido por una bomba de vacío Edwards (mod. E2M5)
- El acoplamiento del fragmento protegido 61-64 sobre la peptidil(1-60)-resina se ha puesto de manifiesto con un secuenciador automático Applied Biosystems del Servicio de Secuenciación de Proteínas y Péptidos de la Universidad de Barcelona
- La columna capilar utilizada para la determinación de epímeros ha sido suministrada por Alltech (Chirasil-Val III, 50 m, 0.35 mm de diámetro. El cromatógrafo de gases utilizado ha sido de la marca

HP (mod. 5890)

- Las muestras para llevar a cabo los distintos estudios cinéticos realizados en esta Tesis se han pesado en una balanza de precisión Sartorius (mod. 2004 MP). Cuando las concentraciones a utilizar de estos productos en un determinado disolvente lo han requerido, los volúmenes utilizados se han medido con cuatro micropipetas de precisión (25, 100, 250 y 1000 l) de la marca Brand

Disolventes y Reactivos

- El acetato de etilo, previamente secado sobre cloruro cálcico, ha sido destilado sobre carbonato potásico.
- El cloruro de metileno se ha destilado sobre carbonato potásico, habiendo sido necesario en algunas ocasiones columnar el disolvente a través de alúmina para eliminar el ácido clorhídrico presente tras la destilación.
- Tanto el eter dietílico como el hexano y el cloruro de metileno (estos dos últimos una vez destilados) se han conservado sobre sodio.
- El dioxano se ha destilado sobre carbonato potásico y conservado sobre alúmina
- La dimetilformamida se ha destilado a presión reducida sobre pentóxido de fósforo y ninhidrina, en atmósfera de nitrógeno, dejándose, a continuación, sobre tamiz molecular de 3-4 . En algunas ocasiones

ha sido necesario burbujear el disolvente con nitrógeno durante uno o dos días para acabar de eliminar las aminas

- La dimetilacetamida ha sido destilada a presión reducida, sobre hidruro cálcico y se ha recogido sobre tamiz molecular de 3-4
- La dicitclohexilamina ha sido destilada a presión reducida.
- La trietilamina ha sido destilada sobre ninhidrina.
- El metanol y el acetonitrilo que se han utilizado como eluyentes en los distintos métodos cromatográficos han sido suministrados por las casas Merck y Carlo-Erba indistintamente. El agua ha sido desionizada y pasada por un sistema de filtración Millipore. La dimetilformamida, tras ser purificada por el procedimiento mencionado más arriba, también ha sido filtrada en el mismo sistema. El ácido trifluoroacético ha sido suministrado por Kali Chem y el ácido propiónico por Scharlau.
- El 1,4,7,10,13,16-hexaoxaciclooctadecano (18-CROWN-6) utilizado en el Capítulo 3 se ha purificado según el procedimiento descrito por Gokel y Col.²¹⁹. mediante su cristalización en acetonitrilo y conservación en atmósfera de nitrógeno.
- Todos los disolventes que se han utilizado para los diferentes estudios cinéticos han sido de pureza analítica.
- Los aminoácidos protegidos utilizados en la presente Tesis Doctoral han sido suministrados por Peptides International y Nova Biochem (H-Asp(Bu^t)-OH, Boc-His(Tos)-OH y Fmoc-Lys(Z)-OH), salvo para el caso de la sal de DCHA de la Boc-Tyr(cHex)-OH, la cual ha sido sintetizada en nuestro laboratorio, y el Fmoc-Asp(Bu^t)-OH, Boc-Asp(Fm)-OH y Boc-Gly-OMe y Boc-Pro-OMe, los cuales han sido sintetizados para su utilización en este trabajo; la glicina y la prolina empleadas para la síntesis de estos dos últimos derivados ha sido suministrada por Advanced Chemtech. Con respecto al resto de aminoácidos libres usados, los ácidos aspártico, glutámico, la

leucina y la isoleucina que se han utilizado indistintamente como patrones internos en los análisis de aminoácidos han sido adquiridos de la firma Pierce y el ácido aspártico empleado para la preparación de las sales de cobre ha sido suministrado por Scharlau.

- El cloruro de hidrógeno que se ha utilizado para desproteger el ácido aspártico de su complejo de boro ha sido suministrado por Union Carbide, en una bombona con 225 g de reactivo.
- La aminometil-resina utilizada en la síntesis de los hexapéptidil-resinas ha sido suministrada por Peptides International. La obtención de la resina 4-bromometil-Nbb se ha realizado a partir de una resina benzihidrilamina, sintetizada ésta a su vez en nuestro laboratorio según la metodología descrita en la literatura²²⁰.

Métodos analíticos

Análisis en solución

Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se ha realizado en placas de gel de sílice 60 (Merck) de un espesor de 0.2mm, con indicador ultravioleta. Los distintos eluyentes que se han utilizado se indican durante el desarrollo de esta parte experimental. Los reveladores que se han empleado han sido los siguientes:

reactivo de la ninhidrina.-

Mediante este reactivo se detectan las aminas primarias (coloración violeta) y las secundarias (coloración amarilla). Este indicador se utiliza a través de una disolución del 0.3% de éste en 10 ml de - colidina, 33 ml de ácido acético y 290 ml de etanol²²¹, pulverizándose la placa con ésta y manteniéndola durante 3 min en la estufa a 110°C. También se ha utilizado este reactivo en solución del 0.1 % preparada en recipientes especiales a presión suministrados por la casa Merk.

reactivo de hipoclorito-tolidina (clorax).-

Este reactivo nos permite la detección de enlaces amida, dando una coloración azul-violeta inestable^{222,223}.

Previamente a su utilización, se deja la capa fina en atmósfera de cloro (la cual puede ser creada con hipoclorito sódico en presencia de ácido clorhídrico) durante un tiempo de 10 a 15 min; a continuación, se seca en la estufa y se rocía con el reactivo preparado con 1

g de orto-tolidina, 5 g de ioduro potásico, 30 ml de ácido acético glacial y 970 ml de agua.

Ensayo del FDNB para evaluar la presencia de aminas en la DMF.-

La nucleofilia de las aminas, especialmente la dimetilamina en este caso, es aprovechada frente al FDNB para evaluar su presencia mediante la espectroscopía visible²¹). Para ello, se mezclan iguales volúmenes de una solución de 1 mg del reactivo en etanol del 95 % y DMF, dejándose 30 min; a continuación se lee la absorbancia del producto formado a 381 nm. Se ha comprobado que una DMF correcta para ser utilizada en síntesis peptídica no debe poseer una absorbancia superior a 0.15 con respecto al blanco.

Análisis sobre la resina

Para analizar la resina se han utilizado tres métodos indistintamente: la ninhidrina, el Gisin y el análisis de aminoácidos. Este último se discutirá más adelante.

Ensayo de la ninhidrina

Para utilizar este reactivo sobre la resina se preparan tres soluciones²²⁴:

- a) 500 mg de ninhidrina en 10 ml de etanol
- b) 80 g de fenol en 20 ml de etanol
- c) 2 ml de solución acuosa 1mM de cianuro sódico, diluidos en 100 ml de piridina

Normalmente, para facilitar el proceso, se suelen emplear las

soluciones B y C mezcladas (1/1, v/v).

Se coloca una pequeña alícuota de resina (5 mg más o menos) en una jeringa de polipropileno de 1 ml provista de un fritado de polietileno poroso y se lava varias veces con DCM, DMF y metanol, pasándose, a continuación, la resina ya seca a un tubo de ensayo pequeño. Acto seguido, se colocan 3 gotas de cada una de las soluciones (6 gotas de B+C), en orden de A a C, y se calienta durante 3 min a 100-110 C. La presencia de aminas primarias en cantidades superiores a 1 mol/g de polímero se pone de manifiesto por la aparición de una coloración azul sobre la resina o en el sobrenadante.

Método de Gisin

Mediante este método podemos determinar cuantitativamente la cantidad de aminas libres existentes sobre la resina²²⁵.

Se coloca una alícuota de resina (entre 15 y 25 mg) en una jeringa de polipropileno de 10 ml provista de una placa filtrante de polietileno poroso, se seca a peso constante y se somete al siguiente programa de tratamientos:

reactivo	num. tratamientos	tiempo(min)
DCM	2	1
5% de DIEA en DCM	4	1
DCM	4	1
ác. pícrico 0.01 M en DCM	6	1
5% de DIEA en DCM	4	1
DCM	6	1

El tratamiento con ácido pícrico, en presencia de grupos amino libres, da lugar al correspondiente picrato que, después de un lavado exhaustivo, es liberado en presencia de DIEA, recogién dose en un aforado y enrasándose con etanol. Tras realizar las diluciones oport-

tunas para ajustar la absorbancia entre 0.5 y 1 se lee ésta a 358 nm, donde el coeficiente de extinción molar para el picrato de diisopropil-etilamonio es de 14500, refiriéndose el contenido en aminas libres encontrado al peso de la resina que se ha utilizado para realizar el ensayo.

Determinación del grado de incorporación peptídica sobre una Fmoc-peptidil-resina

Este método, aplicado en la síntesis de péptidos a partir de Fmoc-aminoácidos, nos permite determinar la cantidad de cadenas peptídicas unidas a la resina mediante la evaluación de la fluorenilmetilpiperidina formada al tratar la resina con piperidina⁷. De manera similar al método de Gisin, mediante la espectroscopía ultravioleta podemos evaluar la cantidad de subproducto formado teniendo en cuenta que a 301 nm posee un máximo de absorción cuyo coeficiente de extinción molar es de 7800. Para ello, tras realizar una serie de tratamientos que se discutirán más adelante (ver metodología de síntesis en fase sólida) sobre la totalidad de la resina utilizada, se recogen todos los lavados realizados desde el tratamiento con piperidina en un aforado y se enrasa con cloruro de metileno, ajustándose la absorbancia entre 0.5 y 1.0 mediante las diluciones adecuadas.

Análisis de aminoácidos

Hidrólisis de péptidos

Para realizar la hidrólisis de los distintos péptidos²²⁶ se han pesado de 2 a 3 mg de éstos y se ha enrasado en un aforado a 10 ml de MeOH (si el péptido es protegido) o agua (si el péptido está desprotegido). De esta solución se ha tomado 1 ml y, tras eliminar el disolvente a

presión reducida, se han añadido 1 ml de agua y 1 ml de HCl 12N (o de una solución de esta misma normalidad y de concentración conocida de un aminoácido como patrón interno), desgasándose todo ello por congelación y al vacío. A continuación, se cierra el tubo y se lleva a 110°C durante 22 h o 160°C en 2 h. Una vez eliminado el disolvente a presión reducida, se ha disuelto la muestra en un tampón adecuado y se ha pasado por un filtro Millipore o se ha centrifugado, inyectando en el analizador, acto seguido, la cantidad equivalente a unos 20 nmoles.

Hidrólisis de peptidil-resinas

La hidrólisis de las peptidil-resinas se ha llevado a cabo siguiendo una metodología similar a la descrita más arriba. Para este caso concreto²²⁷, se han pesado entre 3 y 5 mg de resina y se han suspendido en una mezcla de 1 ml de ácido propiónico y 1 ml de HCl 12N (normalmente se ha utilizado directamente esta solución ya preparada previamente con el patrón interno). En todos los casos se ha pasado por un filtro Millipore para eliminar la resina, tras la hidrólisis.

Hidrólisis enzimáticas

Para las hidrólisis enzimáticas de los péptidos " α " y " β " y las piperididas correspondientes, estudiados en el Capítulo 3, se ha utilizado la leucinoaminopeptidasa (EC 3.4.11.1) (enzima hidrolítico que rompe los enlaces amida secuencialmente a partir del extremo amino terminal del péptido)⁹⁶. Este producto ha sido suministrado por SIGMA, en una concentración de 2 mg/ml de una solución 2.9 M de sulfato amónico, 0.1 M de tampón Tris y 5 mM de cloruro magnésico a pH 8, siendo su capacidad hidrolítica de 200 unidades por mg (1 unidad hidroliza un μ mol de L-leucina-amida a L-leucina y amoniaco por min. a pH 8.5 y 25°C). Previamente a su utilización, ha sido necesario preparar una solución de cloruro magnésico 5 mM y una solución tampón de Tris 0.1 M y cloruro magmésico 5 mM. Para ello, se han disuelto 1.2

g de Tris en 100 ml de una solución de la sal magnésica hexahidratada preparada a partir de 508 mg de ésta y 500 ml de agua desionizada; el pH inicial obtenido (10.5) se ha llevado a 8.5 mediante la adición de HCl concentrado. 0.5 ml de la solución enzimática se han diluido a 5 ml de la solución tamponada preparada anteriormente; a continuación, se han tomado de ésta 0.5 ml y se han llevado a 40°C durante 3 h con objeto de activar el enzima.

Por otro lado, se han tratado 2.1 g de imida purificada con 1 ml de TEA acuosa al 5 % durante una noche, recogiendo por HPLC, a continuación, tras liofilizar la solución, entre 130 y 140 nmoles de péptido " α " y péptido " β ", a los que se les ha adicionado 0.5 ml de una solución de L-leucina 0.267 mM (patrón interno, 133 nmoles). Una vez liofilizadas las dos mezclas, se han adicionado a cada una de ellas 0.2 ml de la solución enzimática activada y 0.3 ml de solución tampón, dejándose todo ello a 40°C durante 24 h. El enzima se ha desactivado llevando las soluciones a 100°C durante 2 min y se ha filtrado por Millipore, tras liofilizar y diluir las muestras en el tampón adecuado, para proceder a su inyección en el analizador (unos 20 nmoles).

Con respecto a los dos péptidos piperidida, se han tratado 2 mg de imida con 1 ml de piperidina al 50 % en DMF durante 1 h, siguiendo, a continuación, la misma metódica que la descrita para los péptidos " α " y " β ".

Fotólisis en fase homogénea y en fase heterogénea

Las distintas fotólisis llevadas a cabo en este trabajo han sido realizadas en un sistema diseñado en nuestro laboratorio con objeto de poder acceder a las distintas temperaturas a las que se ha estudiado el proceso. El recipiente de fotólisis se coloca en un baño de MeOH constantemente refrigerado a través de un circuito y mediante una

pequeña bomba, el cual se hace pasar por un vaso Dewar cuyo contenido en acetona ha sido enfriado con nieve carbónica o con un dedo frío, según los casos. Por otro lado, se ha instalado un ventilador por debajo del recipiente de reacción con objeto de generar una corriente continua de aire a través del recinto donde tiene lugar la irradiación. De esta manera, la utilización de la nieve carbónica ha permitido mantener la temperatura por debajo de los 10°C, con el dedo frío y el ventilador se ha conseguido mantenerla entre los 12°C y los 13°C y, únicamente con este último, se han alcanzado los 25°C. La irradiación se ha llevado a cabo utilizando dos o tres lámparas de mercurio de luz negra de 125 watts de potencia (Philips o Tugnsam), las cuales suministran un máximo de irradiación para la longitud de onda de 360 nm.

Fotólisis en fase sólida

Las fotólisis se han llevado a cabo en dos recipientes distintos, uno de 100 y otro de 25 ml, según la cantidad de producto que se ha fotolizado. El primero de ellos posee tres bocas con objeto de poder controlar la temperatura en el interior, desgasar al vacío para eliminar el oxígeno de la mezcla de reacción y mantener una atmósfera de argón. Puesto que el recipiente de 25 ml sólo tenía dos bocas, la temperatura se controló desde el baño exterior. En el recipiente más grande se fotolizaron lotes de resina entre 100 y 500 mg, las cuales se suspendieron en 50 o 100 ml de disolvente según los casos; para cantidades inferiores a los 100 mg se utilizó el otro recipiente, siendo el volumen de disolvente utilizado de 10 o 20 ml. En todas las fotólisis el disolvente empleado fué DCM con un 20 % de TFE, salvo en algunos experimentos que serán comentados más adelante. Con objeto de evitar que la resina se adhiriera a las paredes del recipiente, éste fué tratado con una solución de dimetildiclorosilano al 10 % en tolueno; a continuación, antes de proceder a la irradiación, la suspensión de la resina se sometió a ultrasonidos durante 30 min a intervalos de

2 min, manteniendo la temperatura con un baño de hielo.

Fotólisis en solución

Todas las fotólisis en fase homogénea se han llevado a cabo en el recipiente de 25 ml, diseñado especialmente para llevar a cabo estos experimentos, siendo las cantidades utilizadas de producto a fotolizar entre los 10 y los 25 mg (ver Capítulo 3) y el volúmen de disolvente de 20 ml (mismas condiciones que las utilizadas para la fase sólida).

Metodología de síntesis en fase sólida

Para todas las reacciones de acoplamiento de aminoácidos que se han llevado a cabo, se ha hecho uso de Boc-aminoácidos y Fmoc-aminoácidos. El protocolo utilizado para la desprotección de los primeros ha sido el siguiente:

reactivo	num. tratamientos	tiempo(min)
DCM	4	2
30 % de TFA en DCM	1	2
"	1	30
DCM	4	2
5 % de DIEA en DCM	4	3
DCM	4	2

Con respecto a los aminoácidos protegidos con un grupo Fmoc en su

posición α -amino, se ha seguido el siguiente esquema de tratamientos para su eliminación:

reactivo	num. de tratamientos	tiempo(min)
DMF	2	2
20 % de piperidina en DMF	1	2
"	1	8
DMF	2	2
DCM	2	2
iPrOH	2	2
DMF	3	2
DCM	4	2

Las condiciones de acoplamiento de los distintos aminoácidos protegidos se irán mencionando durante la discusión de cada uno de los casos particulares, así como determinadas condiciones y protocolos sintéticos de aplicación más concreta.

Antes y después de llevar a cabo el acoplamiento del primer aminoácido sobre la resina 4-bromometil-Nbb, se ha acetilado para bloquear los posibles grupos amino libres que pudieran quedar. El protocolo que se ha seguido es el siguiente:

reactivo	num. de tratamientos	tiempo(min)
DCM	3	2
DMF	1	2
Ac ₂ O (5 eq) en DMF	1	10
DIEA (5 eq) en DMF	1	10
DMF	3	2
DCM	3	2
iPrOH	3	2

El número de equivalentes añadidos de Ac_2O y DIEA corresponden al exceso calculado sobre la cantidad inicial de grupos reactivos, de tal manera que los dos productos anteriores están en un gran exceso sobre la pequeña cantidad de grupos reactivos que pudieran haber quedado sin reaccionar.

Salvo en algún caso particular que se discutirá en su momento, todos los procesos de síntesis en fase sólida se han llevado a cabo en jeringas de polipropileno provistas de un fritado de polietileno poroso, filtrándose el disolvente a través de un sistema conectado a una trompa de agua.

Cromatografía de alta presión

Instrumentación

Tanto para la cromatografía analítica de alta resolución como para la semipreparativa se han utilizado tres sistemas de trabajo, uno de ellos de la marca Beckman y los otros dos de la marca Waters. El primero de ellos consta de un inyector marca Altex, dos bombas (mod. 110B y 114M), detector de longitud de onda variable (mod. 163) y programador (mod. 420); los cromatogramas obtenidos con este sistema han sido registrados en un registrador Omniscrite marca Houston Instrument y la cuantificación de los productos analizados se ha realizado en un integrador Hewlett Packard mod. 3390A. Con respecto a los sistemas Waters, uno de ellos consta de un inyector marca Rheodyne, detector de longitud de onda variable (mod. 450), dos bombas (mod. M45 y 6000A), programador (mod. 660) y un registrador-integrador Datamodule; el otro sistema, asistido por un ordenador IBM AT, está compuesto por un inyector automático Wisp (mod. 712), detector de longitud de onda programable (mod. 490), dos bombas (mod. 510) y una impresora Epson SX-800.

Columnas utilizadas

Los estudios llevados a cabo en condiciones analíticas se han

realizado con tres columnas indistintamente, siendo sus tamaños de 25x0.6 cm, 30x0.6 cm y 25x0.4 cm; la fase estacionaria de todas ellas ha sido fase reversa C18, siendo, para el primer caso, relleno de 10 μm de tamaño de partícula, suministrado por Vydac, Spherisorb ODS-2 del mismo tamaño de partícula, Nucleosil de 5 μm suministrados por Tracer Analítica o Scharlau indistintamente para el segundo caso y, para el tercero, el último mencionado. El flujos de trabajo empleados han sido de 1.5 ml/min para las dos primeras columnas y 1 ml/min para la segunda en todos los casos estudiados. A escala semipreparativa se ha utilizado una columna con unas dimensiones de 1x25 cm, siendo la fase estacionaria del tipo C18 (al igual que en los casos anteriormente citados) de la marca Ultrasphere ODS (Altex-Beckman) de 5 μm de tamaño de partícula; el flujo empleado ha sido de 3 ml/min.

Eluyentes y detección

Los eluyentes que se han utilizado normalmente han sido agua, acetonitrilo o mezclas de estos dos con metanol; en condiciones analíticas semipreparativas, además de los dos primeros, se ha empleado también DMF. Como componentes ácidos se han usado TFA y ácido propiónico. el primero se ha aplicado en todas las condiciones analíticas utilizadas, en unas cantidades del 0.045 % para el agua, 0.035 % para el acetonitrilo y 0.1 % cuando se han utilizado mezclas de agua, acetonitrilo y metanol como eluyente; el ácido propiónico se ha usado en la cromatografía analítica semipreparativa al 0.1 %. En algunos casos se ha empleado HCl en unos porcentajes que han oscilado entre el 0.04 % y el 0.1 %, con objeto de evitar bruscos aumentos de absorción a 220 nm; sin embargo, se ha podido observar con el tiempo una degradación paulatina de la columna, por lo que se desestimó su uso.

Las longitudes de onda de detección han sido de 220 nm y 254 nm para el estudio de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH, 280 nm para la H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH, la H-Val-Lys-Asu-Gly-Tyr-Ile-OH, la H-

Val-Lys-Asp(Fm)-Gly-Tyr-Ile-OH, la H-Val-Lys-Asp(3Pic)-Gly-Tyr-Ile-OH y la H-Val-Lys-Asp(4Pic)-Gly-Tyr-Ile-OH, y 245 nm para toda la serie de derivados de la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida.

Cromatografía de media presión

Instrumentación

La cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular se ha llevado a cabo en un sistema de la marca LKB compuesto por una bomba peristáltica Microperpex (mod. 2132), detector Uvicord SD (mod. 2158), colector de fracciones Ultrorak (mod. 7000) y registrador. Para la cromatografía en fase reversa se ha utilizado un sistema formado por una bomba monopistón (mod. MINA GEAR) de General Electric (indistintamente también se ha utilizado otra bomba de características similares (mod. NSI-33R) de LDC/Milton Roy), un detector similar al del primer sistema, colector de fracciones Ultrorak (mod. 2070) de LKB y un registrador Servoscribe-1S.

Columnas utilizadas

La cromatografía de exclusión molecular se ha realizado en dos columnas de 2.5x100 cm cuyas fases estacionarias han sido Sephadex G10 de 40-120 μ m y LH 20 de 25-100 μ m, las dos suministradas por Pharmacia Fine Chemicals. Para la cromatografía de intercambio iónico se ha utilizado una columna de 2.0x16 cm de carboximetilcelulosa (CM52) de

la marca Whatman Ltd. Los flujos de trabajo han sido de 40 ml/h para las dos primeras columnas y 30 ml/h para la tercera.

Para la cromatografía en fase reversa se han usado dos columnas de dimensiones 1.2x20 cm y 2.5x12 cm, siendo sus fases estacionarias Lichroprep RP-C8 de 40-63 μ m de la marca Merck y C18 de 10-20 μ m suministrada por Vydac, respectivamente. Los flujos de trabajo han sido de 60 ml/h y 120 ml/h.

Eluyentes y detección

Los eluyentes que se han usado para las columnas Sephadex G10 y LH20 han sido ácido acético al 5 % en agua y metanol respectivamente. Para la cromatografía de intercambio iónico (CMC) se ha empleado una solución tamponada de acetato amónico de pH 5.5-5.6 y fuerza iónica 5 mS.

Con respecto a la cromatografía en fase reversa, los eluyentes han sido mezclas de agua, acetonitrilo y DMF con un 0.1 % de ácido propiónico para la primera columna, y agua y metanol con porcentajes que han oscilado entre el 0.1 y el 2 % del mismo ácido, para la segunda.

Las longitudes de onda utilizadas con estos sistemas han sido de 254 nm para la detección de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH y 279 nm para la de la H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH y la H-Val-Lys-Asu-Gly-Tyr-Ile-OH.

1. SINTESIS DEL FRAGMENTO 1-4 DE LA TOXINA II DEL ESCORPION
"Androctonus australis Hector"

1.1. Síntesis de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH

1.1.1. *Intentos de síntesis del β-ester terc-butílico del ácido aspártico*

La síntesis de ésteres terc-butílicos de los ácidos aspártico y glutámico se ha llevado a cabo en la mayor parte de los casos con isobutileno en presencia de ácido sulfúrico concentrado o ácido toluensulfónico^{86,160,228-231}, o por un proceso de transesterificación, a partir de acetato de terc-butilo en presencia de ácido perclórico concentrado²³²⁻²³⁵. En una menor extensión, se han utilizado otros métodos, como el de esterificación directa a partir del alcohol en presencia de didiclohexilcarbodiimida²³⁶ u oxicloruro de fósforo y piridina²³⁷, y a partir de la sal de plata del aminoácido y yoduro de terc-butilo²³⁸.

Puesto que la estrategia que se iba a ensayar para la síntesis del β-ester del ácido aspártico suponía la protección simultánea de los grupos carboxilo y amino en "α" mediante la formación de complejos de cobre y boro (ver Capítulo 2 para detalles concretos sobre esta metodología) fué necesario tener en cuenta una serie de factores a la hora de elegir el método más adecuado de esterificación.

Las condiciones fuertemente ácidas de los dos primeros procedimientos descritos son incompatibles con la utilización de los dos complejos, ya que son inestables en este medio.

El método del oxicloruro de fósforo tampoco es aplicable por problemas de solubilidad de los derivados correspondientes.

Con respecto a la utilización de la diciclohexilcarbodiimida para la obtención de ésteres de terc-butilo, los resultados descritos en la

literatura son poco satisfactorios, debido a los elevados porcentajes de recemización que se han detectado (ver apartado correspondiente al estudio de la epimerización durante el acoplamiento del Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH sobre la H-Gly-O-CH₂-Nbb)²³⁹, ya que para que el proceso tenga lugar con una relativa rapidez es necesaria la presencia de un pequeño porcentaje de una aminopiridina, producto que cataliza la formación de epímero debido a su carácter básico. En nuestro caso, este problema no existe, ya que el grupo amino del aminoácido no está protegido en forma de amida, situación favorable para que tenga lugar este proceso. A diferencia del complejo de boro, en el cual la cadena lateral del aminoácido está protonada, los complejos de cobre que se conocen son compuestos salinos, no pudiéndose preparar el derivado protonado por descomposición del producto; este hecho, puede representar, a priori, una dificultad adicional para el método de la dicitclohexilcarbodiimida, la cual se podría solventar con la presencia de un dador de protones.

Desde el punto de vista de liberación del aminoácido del complejo, hay que puntualizar que el método habitual de desprotección para el complejo de boro (cloruro de hidrógeno) no se puede aplicar, pudiéndose utilizar como método alternativo la ebullición a reflujo en metanol.

Por último, el método de la sal de plata, junto con el de la dicitclohexilcarbodiimida, parecen ser los más adecuados, ya que son los que se realizan en condiciones más suaves. A continuación se describen los ensayos realizados a este respecto.

1.1.1.1. *A partir del complejo de cobre*

Preparación del complejo de cobre del ácido aspártico (Asp₂Cu₂).-

Se suspendieron 3 g de ácido aspártico en 124 ml de agua (22.5 mmoles). A continuación, se colocó un embudo de adición y se adicionaron manteniendo agitación intensa 4.2 g de acetato de cobre (II) (23.2 mmoles) disueltos en 125 ml de agua gota a gota; la mezcla se mantuvo

en todo momento a 70°C, dejándose 1 h tras la adición a esta temperatura. Tras ello se dejó un día en reposo para completar la cristalización del producto, filtrándose después, y lavándose con tres fracciones de 100 ml de agua. Una vez secado el complejo se obtienen 5.3 g de cristales azules (88.4 % de rendimiento).

Determinación del contenido en agua del complejo por espectrofotometría visible.-

Para la determinación del contenido de agua del complejo se evaluó previamente el coeficiente de extinción molar del catión tetraamincobre (II), cuya absorción tiene lugar alrededor de los 640 nm. Para ello se pesaron en una balanza de precisión las cantidades correspondientes de sulfato de cobre pentahidratado para preparar dos soluciones, 2 mM y 20 mM, en agua con un contenido de un 50 % de una solución de amoniaco al 33 %. Tras realizar 5 mediciones para cada caso se obtuvieron unos valores de coeficiente de extinción molar de 71.1 y 70.5 respectivamente, utilizándose el valor medio para las posteriores mediciones.

Por otro lado, se pesaron 81.5 mg de complejo de cobre y se disolvieron en 10 ml de agua al 50 % de una solución de amoniaco del 33 %. A continuación se tomaron 5 ml de esta solución y se diluyeron a otros 10 ml, determinándose la absorbancia de la nueva disolución 5 veces. Una vez se determinó la concentración correspondiente al valor medio de las 5 mediciones, se obtuvo una cantidad de 19.3 mg de cobre. Teniendo en cuenta que hay una molécula de ácido aspártico por átomo de cobre, la cantidad del primero resultó ser de 39.8 mg, lo cual implica una cantidad de agua de 22.4 mg. La relación molar resultante de Cu/Asp/agua fué de 1:1:4, es decir, 8 moléculas de agua por molécula de complejo, resultado que está de acuerdo con el obtenido en la literatura por otros métodos.

IR (KBr, cm^{-1}):

3300, 1630, 1590, 1410

Ensayo realizado por el método de la DCC/DMAP.-

Se mezclaron en 25 ml de DMF, 500 mg de sal de cobre (0.94 mmoles), 250 mg de ácido aspártico (1.9 mmoles) y 467 μ l de tetrametilguanidina (3.8 mmoles, 1 eq de base con respecto a la cantidad total de ácido aspártico), obteniéndose la sal de tetrametilguanidinio correspondiente, la cual sólo se disuolvía parcialmente en el disolvente. A continuación se adicionaron 560 mg (7.5 mmoles, 2 veces de exceso) de tBuOH, 870 mg (4.1 mmoles, 1.1 de exceso) de DCC y el 10 % con respecto al ácido aspártico de DMAP, dejándose durante una noche a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se eliminó el disolvente a presión reducida, y al sólido obtenido se le añadieron 1.9 mmoles de la sal disódica del EDTA, preparada a partir de 315 mg de bicarbonato sódico y 548 mg de EDTA en 5 ml de agua. Tras 1 h de agitación intensa, apareció un precipitado de ácido aspártico, el cual se pudo identificar por IR y capa fina. Por este último método no se detectó la presencia de producto final (BuOH/AcOH/agua, 4:1:1). En un ensayo posterior, se adicionó resina Dowex (de grupos sulfónico) para aportar protones al medio de reacción, sin lograrse detectar tampoco en este caso el producto final.

Síntesis de la sal de plata del complejo de cobre del ácido aspártico.-

Se suspendieron en 40 ml de agua 1 g de complejo de cobre (1.9 mmoles) y 499 mg de ácido aspártico (3.7 mmoles). A continuación, se añadió gota a gota una solución de hidróxido sódico 0.1 N colocada en un embudo de adición hasta pH 7, tras lo cual se filtró la pequeña cantidad de sólido que quedó (exceso de complejo de cobre). Por otro lado, en el mismo embudo de adición se colocaron 2.6 g de nitrato de plata (15 mmoles, 2 veces de exceso con respecto al ácido aspártico) en 20 ml de agua. Manteniendo agitación magnética, se adicionó lentamente esta disolución sobre la de la sal sódica del complejo, apareciendo al poco tiempo un precipitado violáceo. Una vez se dejó la suspensión de la sal de plata durante toda la noche, se filtró y se

lavó con 3 fracciones de 50 ml de agua, 3 fracciones de 50 ml de EtOH y otras tres fracciones de 50 ml de Et₂O. Una vez seco el producto se obtuvieron 1.9 g de éste como polvo violeta (93.6 % de rendimiento).

Análisis de la sal de plata.-

Se pesaron 335 mg de sal de plata, a los que se adicionaron 10 ml de una solución de yoduro potásico 1 M. La suspensión se centrifugó varias veces, extrayéndose en fracciones de 10 ml de agua la sal potásica del complejo de cobre. Todo ello se enrasó en un aforado a 100 ml, utilizando la mitad de volumen de una solución de amoníaco del 33 %. Una vez se determinó su concentración a través de su absorbancia en el visible, la cantidad de cobre obtenida resultó ser de 37.6 mg. Aplicando las relaciones correspondientes, se obtuvo una cantidad total de 321 mg de complejo frente a los 335 mg pesados. Por otro lado, se determinó la cantidad de plata por gravimetría, obteniéndose 130.5 mg, lo que supone, teniendo en cuenta una estequiometría de Ag/Cu/Asp de 2/1/1, 328 mg de producto (335 mg pesados). La pequeña diferencia entre los dos valores podría deberse a una molécula de agua de cristalización.

Ensayo con yoduro de terc-tbutilo en DMF.-

Se tomaron 120 mg de sal de plata (0.22 mmoles) y se suspendieron en 5 ml de DMF. A continuación se añadieron 52 μ l de yoduro de terc-butilo (0.44 mmoles) y se dejó toda la noche. Al no observarse cambio alguno al transcurrir este tiempo se adicionó un exceso de haluro, observándose una variación en el color de la suspensión, pasando a verde oscuro. Al cabo de unas horas se filtró y se trató el sólido con una solución saturada de sal disódica de EDTA, formada con 0.73 mg de EDTA (0.25 mmoles) y 42 mg de bicarbonato sódico (0.5 mmoles), durante una hora y con agitación intensa. Transcurrido este tiempo se pudo comprobar la aparición de un precipitado blanco de ácido aspártico (identificado por RMN). En la fase acuosa tampoco se detectó el producto (capa fina, BuOH/AcOH/Agua, 4:1:1).

Ensayo con yoduro de terc-butilo en Et₂O.-

200 mg de sal de plata (0.37 mmoles) se suspendieron en 2 ml de Et₂O anhidro, adicionándose, a continuación, 106 µl de yoduro de terc-butilo (0.89 mmoles, 20 % de exceso con respecto al ácido aspártico). La suspensión se dejó toda la noche con agitación intensa. Transcurrido este tiempo se filtró y se lavó con eter, ennegreciéndose el sólido al contacto con la humedad del aire, lo que indicaba la no total consecución de la reacción. A la vista de este resultado, se realizó un nuevo ensayo, dejándose la mezcla de reacción durante una semana. Una vez filtrada la suspensión, se trató con 137 mg de sal disódica de EDTA en solución saturada (0.74 mmoles) durante 1 h, manteniendo agitación intensa. La solución azul obtenida se cromatografió en capa fina (BuOH/AcOH/agua, 4:1:1), apareciendo una mancha debil de producto (Rf conocido a través del producto comercial) (ninhidrina positiva) y otra especialmente intensa de ácido aspártico. El producto se intentó aislar utilizando una columna de gel de sílice y como eluyente el empleado en la capa fina, no detectándose su presencia en las fracciones recogidas tras realizar este proceso.

Con objeto de determinar la cantidad formada de ester, se llevó a cabo un nuevo ensayo en las mismas condiciones que el anterior. Una vez se realizó el tratamiento con EDTA, se liofilizó la solución y se eluyó el sólido obtenido en una columna de Sephadex-DEAE (2.5x20 cm, 30 ml/h), utilizando como eluyente tampón 0.1 M de carbonato de trietilamonio (pH 8). La columna se siguió por capa fina, comprobándose la elucion rápida del aminoácido y el ester, prácticamente juntos. La mezcla se liofilizó y se analizó por resonancia magnética nuclear de protón, detectándose entre un 10% y un 15% de ester (en forma de sal de trietilamonio), el cual no se aisló.

1.1.1.2. *Intento de síntesis partir del complejo de boro del ácido aspártico*

Síntesis de la B,B-dietilborooxazolidona del ácido aspártico.-

Se suspendieron 1.3 g (10 mmoles) de ácido aspártico finamente

dividido en 10 ml de THF, adicionándose, a continuación, 12 ml de una solución 1 M de trietilborano (12 mmoles). Una vez alcanzada la disolución prácticamente completa de la mezcla (2 días) se filtró la pequeña cantidad de sólido que quedó en suspensión y se eliminó el disolvente al vacío. El sólido obtenido se lavó con pentano y se secó, obteniéndose 1.9 g de producto (95 % de rendimiento).

En estas mismas condiciones se realizó la síntesis del análogo correspondiente al ácido glutámico, con la única diferencia de que se necesitaron 4 días para llevar a cabo la reacción. El rendimiento también fué prácticamente cuantitativo (ver experimental del Capítulo 3).

RMN de ^1H (CDCl_3 , ppm):

0.45 (m, CH_2 etilo); 0.81 (m, CH_3 etilo); 2.93 (m, CH_2 Asp);
3.85 (m, CH_α Asp); 5.45 (m, NH_2 Asp)

Intento de síntesis del ester terc-butílico por el método de la DCC/DMAP.-

En 3 ml de THF se disolvieron 100 mg (0.5 mmoles) del complejo de boro, 17.7 mg de DMAP (0.15 mmoles) y 95 μl de tBuOH (1 mmol). A continuación, se adicionaron 124 mg de DCC (0.6 mmoles), dejándose la mezcla con agitación magnética a temperatura ambiente. La reacción se siguió por capa fina, no consiguiéndose en ningún momento la desaparición total del producto inicial, incluso con la adición de 124 mg más de DCC y 95 μl de tBuOH a las 25 h de reacción. Se dejó reaccionar dos días más y se filtró la DCU formada. Una vez eliminado el disolvente a presión reducida, el residuo se disolvió en 20 ml de AcOEt y se lavó con dos porciones de 20 ml de solución de HCl 1 N, dos porciones de 20 ml de solución de carbonato potásico y dos porciones más de solución de cloruro sódico saturado. Una vez se secó con sulfato magnésico y se eliminó el disolvente, el aceite obtenido se disolvió en 20 ml de MeOH y se llevó a 60 C durante 8 h. A continuación, se filtró más DCU y se eliminó el disolvente. El RMN del residuo final no mostró la presencia del ester deseado.

Este mismo ensayo se realizó también con el complejo del ácido

glutámico, obteniéndose el mismo resultado que para el caso anterior.

1.1.2. Síntesis de la Fmoc-Lys(Z)-OSu

5 g (10.2 mmoles) de Fmoc-Lys(Z)-OH se hicieron reaccionar con 1.2 g (10.2 mmoles) de N-hidroxisuccinimida en 200 ml de dioxano y en presencia de 2.1 g de DCC (10.2 mmoles) durante una noche a temperatura ambiente y con agitación magnética. A continuación se filtró la dicitclohexilurea formada y se eliminó el disolvente a presión reducida, cristalizándose el residuo así obtenido en acetato de AcOEt/hexano. Se obtuvieron de esta manera 4.1 g (70 % de rendimiento).

pf 115°C; Rf 0.80, CHCl₃/MeOH/AcOH (73:25:2)

$[\alpha]_D = -21.9$ (c = 1, MeOH)

análisis elemental: calc. C, 66.10 H, 5.55 N, 7.01
hall. C, 65.27 H, 5.47 N. 6.79

RMN de ¹H (DMSO-d₆, ppm):

1.3-1.9 (m, CH₂ β γ δ); 2.8 (s, CH₂ succinimida); 2.9-3.1 (m, CH₂ Lys); 4.1-4.5 (m, CH Lys y fluorenilmetilo); 5.0 (s, CH₂ bencílico); 7.1-7.5 (m, CH aromáticos fenilo); 7.1-7.9 (m, CH aromáticos fluorenilo); 8.1 (d, NH)

RMN de ¹³C (CDCl₃, ppm):

21.8 (C metileno γ Lys), 25.6 (C metilenos succinimida); 29.2 (C metileno β Lys); 31.9 (C metileno δ Lys); 40.3 (C metileno ε Lys); 47.2 (C metino fluorenilmetilo); 52.3 (C metino α Lys); 66.7, 67.0 (C metilenos grupos protectores); 120.0, 125.1, 127.4, 128.1 (C metinos aromáticos fluorenilo); 142.4, 143.9 (C cuaternarios fluorenilo); 127.2, 127.8, 136.0 y 143.9 (C aromáticos fenilo); 155.0 y 156.3 (CO carbamatos); 168.2 (CO ester); 168.7 (CO succinimida).

IR (KBr, cm⁻¹):

3350, 2940, 1830, 1790, 1750, 1730, 1700, 1690, 1535, 1255,

1210

Masas (FAB, m/e):

622 ([M + 23])

1.1.3. Síntesis de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH

Se disolvieron 3.6 g (6 mmoles) del producto anterior en 50 ml de dioxano y se adicionaron a una solución de 1.1 g (6 mmoles) de H-Asp(Bu^t)-OH y 0.5 g de bicarbonato sódico (6 mmoles) en 65 ml de agua, dejándose toda la noche con agitación magnética. A continuación, se filtró la N-hidroxisuccinimida formada, se diluyó con 30 ml de agua y se ajustó a pH 3-4 con HCl 6N, extrayéndose con tres porciones de 50 ml de AcOEt. Las fases orgánicas, una vez combinadas, se lavaron con dos porciones de 50 ml de cloruro sódico, se secó sobre sulfato magnésico y se eliminó el disolvente a presión reducida. Una vez se ha recristalizado el residuo en MeOH/agua se obtuvieron 3.3 g (82 % de rendimiento).

Pf 90°C; Rf 0.60, CHCl₃/MeOH/AcOH (73:25:2)

[α]_D = +2.8 (c = 1, MeOH)

análisis elemental: calc. C, 65.96 H, 6.43 N, 6.24
Hall. C, 65.63 H, 6.40 N, 6.25

RMN de ¹H (DMSO, d₆, ppm):

1.1-1.9 (m, CH₂ β γ δ Lys); 1.4 (s, terc-butilo); 2.5-2.8 (m, CH₂ Asp); 3.0-3.2 (m, CH₂ ε Lys); 4.0-4.5 (m, CH Lys, Asp, fluorenilmetilo); 5.0 (s, CH₂ bencilo); 7.1-7.5 (m, CH aromáticos); 7.1-7.8 (m, CH aromáticos fluorenilo)

RMN de ¹³C (CDCl₃, ppm):

22.2 (C metileno γ Lys); 28.0 (C metilo terc-butilo); 29.3 (C metileno β Lys); 32.0 metileno δ Lys); 37.1 (C metileno β Asp); 40.6 (C metileno ε Lys); 47.1 (C metino fluorenilmetilo); 48.8 (C metino α Asp); 54.6 (C meti no α Lys); 66.7,

67.1 (C metileno grupos protectores); 82.0 (C cuaternario terc-butilo); 119.9, 125.1, 127.7, 128.5 (C metino aromáticos fluorenilo); 141.3, 143.8 (C cuaternario aromáticos fluorenilo); 127.1, 128.1, 136.0 y 143.8 (C fenilo); 156.3, 156.8 (CO carbamatos); 170.4 (CO ester); 172.2 (CO amida); 173.2 (CO ácido)

IR (KBr, cm^{-1}):

3320, 2960, 1730, 1700 1660, 1545, 1270 y 1165

Masas (FAB, m/e):

696 ($[M^+]$)

1.2. Síntesis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb

1.2.1. Síntesis de la resina 4-bromometil-Nbb

Para la obtención de la resina 4-bromometil-Nbb que se utilizó para la síntesis del tetrapéptido protegido se emplearon 3 g de resina BHA en forma de clorhidrato, de funcionalización 1.1 meq/g de resina, la cual se neutralizó siguiendo el siguiente protocolo de tratamientos: DCM, 4x2 min; DIEA al 5 % en DCM, 1x4 min; DIEA al 5 % en DCM, 1x15 min y DCM, 1x4 min. Por otro lado, se disolvieron en 25 ml de DCM 2.2 g (8.5 mmoles, 2.5 de exceso) de ácido 4-bromometil-3-nitrobenzoico, a los que se le añadieron a continuación 1.7 g (3.6 mmoles) de DCC, llevándose a 0-4°C y dejándose 1 h. Pasado este tiempo se filtró la diciclohexilurea formada y se adicionó la solución a la resina previamente filtrada. A las 2 h de haber iniciado el proceso, la ninhidrina fué negativa. A continuación, se filtró, se lavó 4 veces con DCM, 2 veces con MeOH y se llevó al desecador. El peso de la resina final fué de 3.6 g, y el rendimiento calculado por aumento de

peso del 86 %.

1.2.2. Acoplamiento de la *Boc-Gly-OH*, *Fmoc-lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH* y la *Boc-Val-OH*

Los 3.6 g de resina 4-bromometil-Nbb obtenidos en el apartado anterior (3.2 mmoles de Br) se adicionaron a una suspensión en 30 ml de DMA de una cantidad equivalente a 4 mmoles de Boc-glicinato de cesio, el cual se preparó a partir de 700 mg de Boc-Gly-OH disueltos en 25 ml de EtOH/agua (4:1) y 630 mg de carbonato de cesio disueltos en 5 ml de agua, adicionando esta última solución gota a gota sobre la de aminoácido hasta neutralización y eliminando el disolvente a presión reducida. Tras haber dejado la mezcla a temperatura ambiente durante 24 h con agitación mecánica, se colocó la resina en una jeringa de polipropileno, provista de un fritado de polietileno poroso, se filtró y se lavó cuidadosamente con 4x20 ml de DMF, 4x20 ml de DCM y 4x20 ml de MeOH. Una vez seca se determinó su funcionalización por el método de Gisin, tras eliminar el grupo amino de la glicina con TFA al 30 % en DCM, resultando ser de 0.63 mmoles de grupos amino/g de resina, lo cual representa una incorporación del 74 % (obtenido a partir de la funcionalización teórica de la resina de partida). El peso final de la resina fué de 3.7 g.

2.7 g (1.7 mmoles) de la resina anterior se sometieron a la serie de tratamientos ya descritos para proceder a la desprotección del grupo amino de la glicina (ver apartado correspondiente a materiales y métodos) y, acto seguido, se le añadieron 2.2 g (3.2 mmoles) de Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH y 0.43 g (3.2 mmoles) de HOBt, todo ello disuelto en la mínima cantidad de DMA (volumen final de 9 ml). La mezcla se enfrió a 0°C y se dejó 10 min, tras lo cual se adicionaron 0.66 g (3.2 mmoles) de DCC disueltos en 3 ml de DMF. A continuación, se dejó con agitación magnética la mezcla durante 2 h a la temperatura anteriormente citada y 16 h a temperatura ambiente. Acto seguido se filtró la resina y se lavó según la metódica mencionada más arriba. Puesto que

el ensayo de la ninhidrina realizado para este tiempo de reacción planteaba dudas sobre la total consecución del acoplamiento, se sometió la resina a un proceso de acetilación para bloquear los grupos amino libres que podían quedar; para ello se trató la resina con 870 mg de anhídrido acético (8.5 mmoles) y 1.1 g de DIEA (8.5 mmoles) durante un tiempo global de 20 min (10 min para el primer reactivo y 10 min para el segundo), lavando la resina, a continuación, siguiendo el método habitual. Acto seguido, tras secar el polímero y separar 100 mg de éste para realizar diferentes ensayos, se procedió a la desprotección del grupo amino siguiendo el protocolo ya comentado en el apartado de metodología de síntesis en fase sólida para Fmoc-aminoácidos. A este nivel se determinó la cantidad de cadenas peptídicas unidas al polímero mediante cuantificación de la fluorenilmetilpiperidina formada en el tratamiento con piperidina, siendo el valor encontrado de 1.63 mmoles (1.65 mmoles teóricos). Las pérdidas de péptido debidas a este tratamiento, evaluadas por hidrólisis y análisis de aminoácidos del filtrado, fueron del 5 %.

A la resina ya desprotegida se le añadieron 884 mg (4.1 mmoles, 2.5 de exceso) de Boc-Val-OH y, a los 10 min, 850 mg (4.1 mmoles) de DCC. A las 2 h, una vez se comprobó que la ninhidrina era negativa, se lavó la peptidil-resina con DCM (4x2 min) y MeOH (4x2 min). Una vez seca, dió un peso de 3.1 g, obteniéndose un ensayo de Gisin tras la desprotección del grupo amino terminal de 0.48 mmoles/g de resina. El análisis de aminoácidos realizado sobre ésta dió el siguiente resultado:

Asp (0.99) Gly (1.36) Lys (1.00) Val (0.94)

1.3. Fotólisis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OCH₂-Nbb

Todas las fotólisis se llevaron a cabo según el procedimiento

descrito en el apartado de materiales y métodos. De esta manera se fotolizaron 1.53 g de resina (0.74 mmoles) en lotes cuyas cantidades que oscilaban entre los 300 y 400 mg (399, 399, 403 y 330 mg), siendo el tiempo de irradiación de 16 h (tres lámparas) y manteniéndose la temperatura entre 0°C y 10°C en todos los casos salvo en uno, en el que la temperatura fué de 12-13°C. Una vez transcurrido este tiempo, se filtró la suspensión de resina a través de un sistema millipore para eliminar el máximo posible de partículas finas de polímero y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose 338 mg de crudo. El rendimiento global del proceso, determinado por análisis de aminoácidos, fué del 72% aproximadamente. Dicho análisis resultó ser el siguiente:

Asp (1.00) Gly (1.11) Val (0.98) Lys (1.00)

1.4. Purificación del crudo fotolítico

El crudo fotolítico obtenido anteriormente fué purificado por HPLC semipreparativo, utilizando una columna de fase reversa Ultrasphere ODS C18. El eluyente que se empleó fué DMF/AcCN/agua/ácido propiónico en unas proporciones de 25/39/36/0.1, con un flujo de 3 ml/min. Para llevar dicha purificación, el crudo de fotólisis se disolvió en 2 ml de DMF y se inyectó en fracciones de 100 μ l (26.6 μ moles), obteniéndose 218 μ moles de tetrapéptido protegido (cantidad determinada por análisis de aminoácidos), lo cual representa un rendimiento de purificación del 41% aproximadamente, y un rendimiento global, teniendo en cuenta la etapa fotolítica, del 30 %. El resultado obtenido por hidrólisis y análisis de aminoácidos para el producto así obtenido fué el siguiente:

Asp (1.00) Gly (1.02) Lys (1.00) Val (0.96)

$Pf = 158-160^{\circ}C$; $Rf 0.6$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$, 73:25:2)

$[\alpha]_D = -18.0$ ($c = 1$, DMF).

Masas (FAB, m/e):

730 ($[M + 23]$), 708 ($[M + 1]$), 552, 129 (100 %)

La purificación por cromatografía de exclusión molecular se comenta en el siguiente apartado.

1.5. Nueva síntesis del tetrapéptido protegido. Desprotección del grupo amino con piperidina al 50 % en DCM

Para la síntesis de este nuevo lote de tetrapeptidil-resina se partió de una resina 4-bromometil-Nbb de funcionalización 0.63 meq/g (funcionalización de la resina BHA de partida 0.72 meq/g). El acoplamiento de la Boc-Gly-OH se llevó a cabo también en DMA y a temperatura ambiente, aunque, en este caso, se dejó la mezcla durante 14 h. La funcionalización final de la resina, determinada por Gisin, fué de 0.45 meq/g (78 % de rendimiento, calculado a partir de la funcionalización teórica). El acoplamiento de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH se realizó en las mismas condiciones, siguiendo el proceso, en este caso, por análisis de aminoácidos. El rendimiento de acoplamiento a las 12 h fué prácticamente cuantitativo. La eliminación del grupo Fmoc se llevó a cabo con dos tratamientos de piperidina al 50 % en DCM, cada uno de ellos de 1 min. La hidrólisis y análisis de aminoácidos del filtrado mostró la presencia de alrededor de un 8% de péptido.

Una vez se llevó a cabo la fotólisis de la peptidil-resina en condiciones similares a las de la primera síntesis, una fracción de crudo fotolítico obtenido se purificó en una columna Sephadex LH-20. 36.8 mg de este crudo (38μ moles, cantidad determinada por hidrólisis y análisis de aminoácidos) se eluyeron de una sóla vez, recuperándose 36.5μ moles de péptido (96 %). El resultado de la hidrólisis y análi-

sis de aminoácidos del producto purificado fué el siguiente:

Asp (1.07) Gly (1.07) Lys (0.92) Val (0.94)

1.6. Estabilidad del enlace aminoácido-resina en presencia de piperidina

La determinación de la N-piperidil-terc-butoxicarbonilglicilamida formada al tratar Boc-Gly-OCH₂-resina con piperidina se llevó a cabo con una resina de funcionalización 0.38 meq/g. 60 mg de ésta se trataron con 2 ml de piperidina al 50 % en DMF durante 24 horas; a continuación, el filtrado y los lavados subsiguientes se reunieron y todo ello se aforó a 10 ml con DMF, solución de la que se separaron dos fracciones de 1 ml, eliminándose el disolvente de éstas a presión reducida. Una de ellas fué tratada con TFA al 30 % en DCM durante 30 min. y la otra con 2 ml de HCl 6 N a 110°C durante 24 horas en un tubo cerrado al vacío. Una vez realizado ésto se eliminó el disolvente y se procedió al análisis de aminoácidos, obteniéndose como resultados un 14 % de aminoácilamida y una eliminación cuantitativa del aminoácido de la resina.

La determinación de la cinética de liberación de glicina se llevó a cabo tratando distintas muestras de 50 mg de Boc-Gly-O-CH₂-Nbb de una funcionalización de 0.52 meq/g de resina con piperidina al 20% en DMF y determinándose, a continuación, por análisis de aminoácidos el contenido en glicina de los distintos filtrados, trás tratar un volúmen conocido de cada uno de ellos, de forma similar al caso anterior, con 250 μ l de TFA al 30% en DCM. Cada una de las muestras se introdujo en un tubo provisto de rosca, adicionándose a continuación el reactivo y agitándose vigorosamente. Una vez transcurrido el tiempo designado para cada muestra, se ha filtró en una jeringa de polipropileno provista de un fritado de polietileno poroso, lavándose rápida-

mente con DMF y recogién dose todo ello en un aforado de 10 ml, del cual se ha tomó 1 ml en cada caso para determinar la cantidad de glicina liberada. Los resultados obtenidos para cada uno de los tiempos estudiados se han representaron suponiendo una cinética de pseudo-primer orden ya que la piperidina se hallaba en gran exceso. Así, se utilizó la Ecuación 1, donde Gly_{∞} representa la cantidad total de Boc-Gly-OH que se obtendría suponiendo una liberación del 100% y Gly_t la cantidad de aminoácido protegido liberado en un tiempo t.

$$\ln \frac{Gly_{\infty}}{Gly_{\infty} - Gly_t} = kobst \quad \text{Ecuación 1}$$

1.6.1. Evaluación de H-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-X (X: OH o piperidilo) liberado durante el tratamiento de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb con piperidina

De una forma similar a la descrita para la aminoacil-resina, se determinó la magnitud del efecto de la piperidina sobre la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb. Para ello, se utilizó una tetrapeptidil-resina de funcionalización 0.35 meq/g. Dos lotes de muestras cuyas pesadas oscilaron entre 24 mg y 27 mg se trataron con 1 ml de solución de piperidina al 20% en DMF y una solución del mismo reactivo al 50% en DCM. Una vez transcurridos los diferentes tiempos, se filtró en jeringa y se enrasó a 10 ml en un aforado. Con respecto a las muestras tratadas con piperidina en DCM, los lavados de la resina y el enrase se llevaron a cabo con DMF para evitar al máximo la cristalización del cloruro de piperidinio formado a partir del cloruro de hidrógeno presente en el disolvente. A continuación, se tomó 1 ml de cada una de las soluciones, se eliminó el disolvente a presión reducida, y se procedió a la hidrólisis y análisis de aminoácidos de cada muestra.

Al igual que en el caso anterior, se supuso una reacción de

pseudoprimer order, por lo que se utilizó la Ecuación 1 para determinar las constantes de velocidad.

1.7. Formación de dicetopiperazinas en el acoplamiento del Fmoc-Asp(Bu^t)-OH sobre la H-Gly-O-CH₂-Nbb

Se han tratado 20 mg de Boc-Gly-O-CH₂-Nbb ($f = 0.63$ meq/g de resina) con TFA al 30 % en DCM según el procedimiento habitual para desproteger la posición amino terminal. A continuación, una vez lavada la resina, se adicionaron 13 mg (32.5 μ moles, 2.5 de exceso) de Fmoc-Asp(Bu^t)-OH disueltos en la mínima cantidad de DMF y, a los 10 min, 7 mg (32.5 μ moles) de DCC, dejándose la mezcla durante 2 h (ninhidrina negativa). Una vez lavada la resina con DMF, DCM y DMF sucesivamente (4x2 min), se trató con piperidina al 20 % en DMF siguiendo el protocolo utilizado normalmente para la liberación del grupo Fmoc. Todos los lavados se recogieron en un aforado de 100 ml y se llevó a enrase con DCM, encontrándose, por un lado, por cuantificación de la fluorenilmetilpiperidina formada, un acoplamiento del aminoácido protegido del 100 % y, por otro, una cantidad de DKP que supone el 38 % con respecto a la cantidad global de dipéptido, resultado obtenido por hidrólisis y análisis de aminoácidos.

1.8. Evaluación del grado de epimerización durante el acoplamiento de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH sobre la H-Gly-O-CH₂-Nbb

1.8.1. Utilización del HOObt como agente acoplante

A 100 mg de Boc-Gly-O-CH₂-Nbb (0.063 meq) ($f: 0.63$ meq/g) se

adicionaron, una vez desprotegido el grupo amino de la glicina, 84.8 mg de Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH (0.13 meq) y 20.6 mg de HOOBt (0.13 meq) disueltos en 500 l de DMF, llevándose a 0-4°C. A los 10 min se añadieron 26.0 mg de DCC disueltos en 250 µl de DMF y se dejaron durante toda la noche con agitación, siendo la ninhidrina negativa tras este periodo de tiempo. Una vez realizados los lavados correspondientes y la desprotección del grupo amino de la lisina con piperidina (ver metodología de síntesis en fase sólida), se adicionaron 34.2 mg de Boc-Val-OH (0.16 meq) y 33 mg (0.16 meq) de DCC, todo ello disuelto en 1.5 ml de DCM, siendo la ninhidrina negativa al cabo de 1 h.

La fotólisis se llevó a cabo con 3 lámparas, manteniendo la temperatura entre 0°C y 10°C. La tetrapeptidil-resina se ha suspendió en 50 ml de una solución al 20 % de TFE en DCM, se ha sonicó e irradiado durante 6 h. Una vez se ha filtró y eliminó el disolvente a presión reducida, se obtuvieron 23.9 mg de crudo peptídico (63 % de rendimiento de fotólisis y 91 % de pureza del crudo fotolítico).

1.8.2. Acoplamiento del dipéptido protegido en ausencia de catalizador

A 100 mg de la aminoacil-resina utilizada en la síntesis anterior se le añadieron las mismas cantidades de Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH y DCC disueltas en un volumen total de 2 ml de DMF. La mezcla de reacción se dejó, a continuación, durante una noche entre 30°C y 40°C. Puesto que la ninhidrina ha sido positiva al cabo de este tiempo, se realizó un segundo acoplamiento con las mismas cantidades disueltas en 500 µl de DMF, dejándose a temperatura ambiente durante 5 h. Una vez se ha filtró, lavó y eliminó el grupo protector, se adicionaron cantidades similares de Boc-Val-OH y DCC a las utilizadas en la síntesis anterior, siendo necesarias 2 h para conseguir una ninhidrina negativa.

La fotólisis se llevó a cabo en condiciones idénticas a las descritas en el apartado anterior, es decir, 3 lámparas, 0-10°C, 50 ml de disolvente y 6 h de irradiación, obteniéndose 28.4 mg de crudo

fotolítico. El análisis por HPLC del péptido obtenido en esta síntesis mostró la presencia de un subproducto peptídico en un 10 % (identificado por capa fina; R_f similar al del péptido, positivo a la ninhidrina y al clorax), con un tiempo de retención ligeramente inferior al del tetrapéptido protegido.

1.8.3. Acoplamiento de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH en presencia de DMAP

1.8.3.1. Síntesis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH

La síntesis de la Boc-Val-OSu se llevó a cabo de la misma manera que para la obtención de la Fmoc-Lys(Z)-OSu, siendo las cantidades de reactivos utilizadas de 500 mg (2.3 mmoles) para el aminoácido protegido, 264 mg (2.3 mmoles) de DCC y 309 mg de N-hidroxisuccinimida. Después de cristalizar en AcOEt/hexano se obtuvieron 402 mg de producto (56 % de rendimiento).

PF 128-129°C; *Rf* 0.76 (CHCl₃/MeOH/AcOH, 73:25:2).

RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, ppm):

1.06 (m, CH₃ Val); 1.46 (s, CH₃ terc-butilo); 1.90 (d, CH Val); 2.85 (s, CH₂ succinimida); 4.60 (dd, CH Val)

RMN de ¹³C (CDCl₃, ppm):

17.4 (C metilo Val); 25.6 (C metileno succinimida); 28.3 (C metilo terc-butilo); 31.6 (C metino Val); 57.0 (C metino Val); 81.5 (C cuaternario terc-butilo); 155.0 (CO carbamato); 168.0 y 168.7 (CO ester y succinimida)

100 mg de Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH, disueltos en 20 ml de Et₂O, se hicieron reaccionar con 0.28 ml de piperidina (20 veces de exceso) durante 10 min. Una vez transcurrido este tiempo se filtró la suspensión formada de dipéptido desprotegido y se lavó con tres porciones de 10 ml de Et₂O para eliminar por completo la fluorenilmetilpiperidina formada en el proceso. Una vez seco el producto, se utilizó directa-

mente para la síntesis del tripéptido.

Una vez obtenido el dipéptido desprotegido en su posición amino terminal, la preparación del tripéptido se llevó a cabo según lo descrito para la síntesis de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH, habiendo utilizado en este caso 37 mg de dipéptido (82 μmoles) disueltos en 2 ml de dioxano, 25.7 mg (82 μmoles) de Boc-Val-OSu y 15.4 mg (82 μmoles) de bicarbonato sódico, estos dos últimos disueltos conjuntamente en 2 ml de agua. La purificación del producto obtenido se llevó a cabo en una columna de 2x2.5 cm, utilizando como fase estacionaria sílica gel (kieselgel 60, 70-230 mesh) y como eluyente CHCl₃/MeOH (50:50) (detección del producto por el ensayo de clorax). Una vez eliminado el disolvente a presión reducida, se obtuvieron 28.9 mg de producto (56 % de rendimiento).

Rf 0.60 (CHCl₃/MeOH, 50:50)

RMN de ¹H (DMSO-d₆, ppm):

0.8 (m, CH₃ Val); 1.3 (s, CH₃ terc-Butilo Val); 1.4 (s, CH₃ terc-Butilo Asp); 1.2-1.8 (m, CH₂ β γ δ Lys); 1.9 (m, CH_β Val) 2.5 (m, CH₂ Asp); 2.9 (m, CH₂ ε Lys); 3.8 (m, CH_α Val); 4.1, 4.2 (m, CH α Asp, Lys); 5.0 (s, CH₂ bencilo); 7.3 (m, CH aromáticos fenilo)

A una solución de 14.5 mg de Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH en 1 ml de DCM (23.6 μmoles) se adicionaron 2.9 mg de DMAP (23.6 moles) y 4.9 mg de DCC (23.6 μmoles), dejándose la solución durante 3 h con agitación. A continuación, la suspensión de dicitclohexilurea formada se adicionó a la H-Gly-O-CH₂-Nbb obtenida a partir de 15 mg de Boc-Gly-O-CH₂-Nbb según la metodología de desprotección ya comentada (f = 0.63 meq/g de resina, lo que supone un exceso de 2.5 veces de reactivos) y se dejó toda la noche. El rendimiento obtenido por hidrólisis y análisis de aminoácidos del polímero, una vez lavado y secado, fué del 36%.

La tetrapeptidil-resina así obtenida se ha fotolizó según el procedimiento ya descrito, detectándose por HPLC (nucleosil C-18, gradiente del 50 al 70 % de B; A: agua con un 0.045 % de TFA, B: AcCN con un 0.035 % de TFA) la presencia del tetrapéptido protegido sintetizado

con anterioridad a través del dipéptido protegido y la de otro tetrapéptido con un tiempo de retención ligeramente menor que el del anterior y que representa un 37 % del producto global (determinado por hidrólisis y análisis de aminoácidos de los picos colectados por HPLC).

1.8.3.2. *Identificación de los estereoisómeros por gases/masas*

El crudo fotolítico obtenido en el apartado anterior se disolvió en 500 μl de MeOH y se inyectaron alícuotas de 20 μl en el cromatógrafo líquido, colectándose los 2 productos peptídicos. Una vez se eliminó el disolvente de cada una de las soluciones, se trataron los sólidos obtenidos con 200 μl de una solución de HCl en isobutanol 3 N durante 1 h a 110°C en un tubo cerrado. A continuación, se eliminó el disolvente por corriente de nitrógeno y se han adicionaron 100 μl de AcCN y 70 μl de anhídrido trifluoroacético, dejándose a 110°C durante 10 min en tubo cerrado. Tras eliminar el disolvente con corriente de nitrógeno, se disolvió el producto obtenido en 10 μl de AcCN, inyectándose 1 μl de cada solución en el cromatógrafo de gases.

1.9. Acoplamiento de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH sobre el fragmento 5-64 de la toxina

60 mg (85 μmoles , 5 veces de exceso) de tetrapéptido protegido se disolvieron en la mínima cantidad de DMF y se adicionaron sobre la resina. A continuación, se añadió 1 eq de HOBt disuelto en 50 μl de DMF, dejándose todo ello durante 2 min a 0°C. Tras ello, se adicionó 1 eq de DCC disuelta en otros 50 μl de DMF, manteniéndose la misma temperatura durante 2 h y a temperatura ambiente durante 22 h con agitación constante. Transcurrido este tiempo, la ninhidrina fué ne-

gativa. Una vez se ha lavado y secó la resina, se procedió a la secuenciación de la tetrapeptidil-resina obtenida, determinándose un rendimiento del 99 % de acoplamiento.

2. ESTUDIO DE LA FORMACION DE PEPTIDO-IMIDA EN LA SECUENCIA Asp-Gly DE LA H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH, FRAGMENTO 1-6 DE LA TOXINA II DEL ESCOPION "Androctonus australis Ector"

2.1. Síntesis de derivados de aminoácidos

2.1.1. Síntesis del ácido 4-(terc-butoxiisoleuciloximetil)fenilacético

2.1.1.1. Acido 4-bromometilfenilacético

Se disolvieron 15 g (0.1 mmoles) de ácido p-toluilacético en 200 ml de tetracloruro de carbono en un balón de tres bocas de dos litros con embudo de adición y refrigerante. Tras llevar a reflujo con agitación magnética, se adicionaron 7.5 ml (0.6 mmoles) de bromo disueltos en 70 ml de tetracloruro de carbono durante 2 h, irradiando con luz suministrada por una bombilla de 150 W, y se dejó toda la noche en estas mismas condiciones. A continuación, se filtró el producto precipitado y se lavó con 100 ml del mismo disolvente seis veces, obteniéndose 11.9 g de producto bromado (52 % de rendimiento).

Pf: 174-177°C

RMN de ¹H (CDCl₃, ppm):

3.6 (s, CH₂-Br); 4.5 (s, CH₂-COOH); 6.9 (dd, CH aromáticos);
9.7 (s, COOH)

2.1.1.2. 4-bromometilfenilacetato de fenacilo

Se disolvieron 10.3 g (0.05 mmoles) de bromoacetofenona en 400 ml de AcOEt, a los que se añadieron 5.3 g (0.05 mmoles) de TEA, llevándose dicha solución a unos 45°C. A continuación, se adicionó el producto obtenido anteriormente en pequeñas fracciones durante unas 3 h,

tras lo cual se siguió manteniendo la misma temperatura durante 2 h más con agitación magnética en todo momento. Se filtró el precipitado formado de bromuro de trietilamonio y se lavó con 4x50 ml de ácido cítrico al 50 %, 4x50 ml de solución saturada de cloruro sódico, 4x50 ml de solución saturada de bicarbonato sódico y 4x50 ml de la misma solución anterior de cloruro sódico. A continuación, se secó con sulfato magnésico y se eliminó el disolvente a presión reducida. Una vez se ha cristalizado en DCM/hexano, se obtuvieron 4.1 g de producto (22.6 % de rendimiento).

Pf: 85-87°C

RMN de ¹H (CDCl₃, ppm):

3.4 (s, CH₂-Br); 4.2 (s, CH₂-COO-); 5.0 (s, CH₂-O); 7.0 (s, CH aromáticos fenilacetato); 7.0-7.7 (m, CH aromáticos fenacetilo)

2.1.1.3. Preparación del ácido 4-terc-butoxicarbonilsoleuciloximetil-fenilacético (sal de dicitclohexilamonio)

Se disolvieron 3 g (8.7 mmoles) del producto anterior en 60 ml de DMF, a los que se añadieron 2.9 ml (17.4 mmoles) de DIEA y 4.0 g (17.4 mmoles) de Boc-Ile-OH, llevándose la solución formada a 50°C durante 4 h y luego a temperatura ambiente durante una noche. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y se llevaron a cabo los mismos lavados que para el caso anterior. Tras secar con sulfato magnésico y eliminar el disolvente se obtuvo un aceite amarillento al que se le adicionaron 90 ml AcOH/agua (85/15, v/v) y 11.3 g (173 mmoles) de cinc en polvo, dejándose con agitación intensa durante 5 h (la reacción puede seguirse por resonancia magnética nuclear). Una vez filtrada la suspensión, se lavó con 15 ml de la solución ácida anterior y se añadieron 200 ml de Et₂O y 170 ml de agua, llevándose a pH 1-1.5 con HCl 6N; la fase orgánica se lavó con otras dos porciones de 100 ml de eter y éstas con cinco porciones de agua, eliminándose, a continuación, el disolvente a presión reducida. Tras dejar en el desecador una noche se disolvió el aceite en 50 ml de eter y se llevó a pH 8 con DCA, cristalizando una primera fracción de 1.4 g (pf. 125-

127°C); una posterior cristalización en eter/hexano permitió obtener 0.7 g más de producto (rendimiento global del 43 %).

Pf 124-126°C; *Rf* 0.16, Tolueno/ácido acético (95/5)

$[\alpha]_D^{25} = -8.3$ ($c = 1$, DMF).

Análisis elemental: calc. C, 68.54 H, 9.35 N, 5.00
hall. C, 68.56 H, 9.46 N, 5.34

RMN de 1H ($CDCl_3$, ppm):

1.00-2.00 (m, CH β y CH₂ Ile; CH₂ ciclohexilo); 0.88 (m, CH₃ Ile); 1.44 (s, CH₃ terc-butilo); 2.82 (CH ciclohexilo); 3.51 (s, CH₂ fenilacetilo); 4.28 (s, CH α Ile); 5.14 (s, CH₂ ester bencílico); 7.30 (dd, CH aromáticos fenilo)

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, ppm):

11.6 (C metilo γ Ile); 15.6 (C metilo δ Ile); 24.8 (C3 metileno ciclohexilo); 25.0 (C4 metileno ciclohexilo); 25.1 (C2 metileno ciclohexilo); 28.3 (C metilo terc-butilo); 29.2 (C metileno Ile); 38.2 (C metino Ile); 52.5 (C1 metino ciclohexilo); 45.4 (C metileno fenilacetilo); 58.0 (C α Ile); 66.8 (C metileno ester bencílico); 76.0 (C cuaternario terc-butilo) 128.8, 129.6 (CH aromáticos fenilo); 132.7, 138.9 (C cuaternarios aromáticos fenilo); 155.0 (CO carbamato); 172.0 (CO ester); 176.3 (CO carboxilato)

IR (KBr, cm^{-1}):

3380, 2950, 2870, 1750, 1745, 1720, 1630, 1380 y 1165

Masas (FAB, m/e):

182 (catión dicitclohexilamonio); 402 (anión + 23).

2.1.2. Síntesis del Fmoc-Asp(Bu^t)-OH

2.1.2.1. Preparación de la fluorenilmetoxycarbonilazida

Se disolvieron 2.8 g de azida sódica (42.4 mmoles, 1.5 de exceso)

en 11 ml de agua, llevándose esta solución, a continuación, a un baño de hielo. Tras ello, se añadió lentamente con agitación magnética una solución de 17.3 g (28.2 mmoles) de cloroformiato de fluorenilmetilo en 14 ml de acetona. Una vez realizado esto, se dejó durante 2 h en el baño de hielo y 2 h más a temperatura ambiente, observándose la aparición de un aceite. Una vez eliminado el disolvente a presión reducida se dejó en la nevera durante un fin de semana. El precipitado que apareció se lavó, a continuación, con agua y se recristalizó en hexano, obteniéndose 6.3 g de producto (84.7 % de rendimiento).

Pf: 86-87°C; *Rf*: 0.6 (CHCl₃/MeOH/AcOH, 73:25:2)

RMN de ¹H (CDCl₃, ppm):

4.20-4.70 (m, CH y CH₂ fluorenilmetilo); 7.20-7.90 (m, CH aromáticos luorenilmetilo)

RMN de ¹³C (CDCl₃, ppm):

46.5 (C metino); 70.3 (C metileno); 120.2, 125.0, 127.3 y 128.1 (C metinos aromáticos); 141.3 y 142.9 (C cuaternarios aromáticos); 157.5 (CO)

IR (KBr, cm⁻¹):

2200, 2160, 1730, 1725, 1260, 1250 y 1240

Masas (impacto electrónico, m/e):

265 ([M⁺]); 192; 178 (100 %) y 165

2.1.2.2. Síntesis del Fmoc-Asp(Bu^t)-OH

A una solución acuosa de 1 g (5.3 mmoles) del β-ester de terc-butilo del ácido aspártico en 11 ml de carbonato sódico al 10% y 7 ml de dioxano, colocada en un baño de hielo, se añadieron gota a gota 1.4 g (5.3 mmoles) de fluorenilmetoxicarbonilazida disueltos en 9 ml del anterior y se dejó toda la noche. A continuación, se adicionaron 150 g de agua y hielo y se lavó la fase orgánica con tres porciones de 50 ml de Et₂O, tras lo cual, la fase acuosa se llevó a pH 2 y se extrajo con tres porciones de AcOEt. Una vez secada la fase orgánica con sulfato magnésico y eliminado el disolvente a presión reducida se

cristalizó en AcOEt/hexano, obteniéndose 1.5 g de producto (71% de rendimiento).

Pf: 149-150°C

$[\alpha]_D = -0.24$ ($c = 1$, DMF)

RMN de 1H (DMSO- d_6 , ppm):

1.35 (s, CH₃ terc-butilo); 2.53 (m, CH₂ Asp); 4.18 (m, CH α Asp; CH₂ y CH fluorenilmetilo) 7.34, 7.68, 7.87 (m, CH aromáticos fluorenilmetilo)

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , ppm):

27.6 (C metilo terc-butilo); 37.2 (C metileno Asp); 46.6 (C metino fluorenilmetilo); 50.6 (C α Asp); 65.7 (C metileno fluorenilmetilo); 80.3 (C cuaternario terc-butilo); 120.1, 125.1, 127.0, 127.6, (C metino aromáticos fluorenil); 140.7, 143.8 (C cuaternario aromáticos fluorenil); 155.8 (CO carbamato); 169.2 (CO ácido); 172.5 (CO ester).

IR (KBr, cm^{-1}):

3410, 3200, 2990, 1775, 1760, 1740, 1700, 1540 y 1175

Masas (ionización química, m/e):

429 ([M + 18]); 250 (100%)

2.2. Preparación de las distintas peptidil-resinas

2.2.1. Incorporación de la Boc-Phe-OH a la resina aminometilada

Para la síntesis de las 3 peptidil-resinas se utilizó como producto de partida una resina aminometilada de 1.1 meq/g de funcionalización (determinada por el método de Gisin). 5 g de este polímero, previamente a su uso, se sometieron a la siguiente serie de lavados:

2x2 min. de TFA al 30% en DCM, 2x2 min. de DCM, 2x2 min. de DIEA al 5% en DCM y 3x2 min. de DCM. A continuación, se adicionaron 3.7 g (13.9 mmoles, 2.5 veces de exceso) de Boc-Phe-OH y, pasados 10 min., 2.9 g (13.9 mmoles) de DCC, todo ello en la mínima cantidad en volumen de disolvente. A las 2 h (el ensayo de la ninhidrina dió negativo) se lavó el polímero con DCM (4x2 min.) y MeOH (2x2 min.). La hidrólisis y el análisis de aminoácidos de la resina final mostró una funcionalización de 0.59 meq/g.

2.2.2. *Síntesis de la Boc-Val-Lys(OC1Z)-Asp(Bz)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-R(18) y la Boc-Val-Lys(OC1Z)-Asp(cHex)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-R(16)*

Dos alícuotas de 250 mg cada una de la resina preparada en el apartado anterior (H-R) se sometieron, por separado, al protocolo de tratamientos ya descrito para eliminar el grupo terc-butoxicarbonilo. Por otro lado, se trataron 207 mg (0.37 mmoles, 2.5 veces de exceso) de 4-(terc-butoxicarbonilisoleuciloximetil)fenilacetato de dicitclohexilamonio con 30 ml de una solución de HCl 0.1 N; el ácido liberado se extrajo con tres porciones de 20 ml de AcOEt y éstas, una vez reunidas, se lavaron con 30 ml de agua, secándose, a continuación, con sulfato magnésico. Una vez se eliminó el disolvente a presión reducida, se utilizó directamente el aceite obtenido en la síntesis de la peptidil-resina. Este procedimiento se aplicó de forma muy similar a la sal de dicitclohexilamonio de la Boc-Tyr(cHex)-OH (202 mg). Los acoplamientos de los seis Boc-aminoácidos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo habitual y utilizando un exceso de 2.5 veces en todos los casos (65 mg de Boc-Gly-OH, 116 mg de Boc-Asp(cHex)-OH, 119 mg de Boc-Asp(Bz)-OH, 153 mg de Boc-Lys(OC1Z)-OH, 80 mg de Boc-Val-OH y 76 mg de DCC). Prácticamente en todos los casos el acoplamiento finalizó a las 2 h. Los rendimientos obtenidos por hidrólisis y análisis de aminoácidos sobre las resinas fueron del 100% para 16 y del 86% para 18. El contenido en aminoácidos determinado a partir de estos análisis fué el siguiente:

	Asp	Gly	Val	Ile	Tyr	Lys
<u>16</u>	1.05	1.05	0.94	1.02	0.95	0.98
<u>18</u>	1.05	1.05	0.90	0.99	0.96	1.05

2.2.3. Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-R (17)

La síntesis de esta hexapeptidilresina (250 mg) fué idéntica a las anteriores hasta la incorporación del cuarto aminoácido. Sobre la tripeptidil-resina así formada y una vez eliminado el grupo terc-butoxicarbonilo de la tirosina, se incorporó el Fmoc-Asp(Bu^t)-OH (152 mg, 2.5 veces de exceso) disuelto en la mínima cantidad de DCM/DMF, haciendo uso del procedimiento habitual. Una vez el ensayo de la ninhidrina fué negativo (2h 30 min.) se eliminó el grupo Fmoc en las condiciones habituales y se procedió al acoplamiento de la Fmoc-Lys(Z)-OH (185 mg), finalizando la síntesis con la incorporación de la Boc-Val-OH (misma cantidad que la utilizada en las 2 síntesis anteriores). La hidrólisis y análisis de aminoácidos ha dieron un rendimiento del 93% y el siguiente contenido en aminoácidos:

Asp(1.07) Gly(1.06) Val(0.90) Ile(1.01) Tyr(0.95) Lys(1.01)

2.3. H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH y H-Val-Lys-Asu-Gly-Tyr-Ile-OH

Para la obtención del péptido y de la imida en cantidades apreciables para su caracterización se partió de 18. 90 mg de esta peptidil-resina se trataron con TEA al 10 % en DCM (2 ml) durante 24 h a temperatura ambiente, filtrándose y lavándose el polímero, a continua-

ción, con DCM y MeOH. Una vez seca, se colocó en el recipiente de Kel-F (ver más adelante procedimiento general de tratamiento con HF) y se hizo reaccionar con 4.5 ml de HF anhidro en presencia de 0.5 ml de para-cresol a 0°C durante 1 h, obteniéndose 18.6 mg de crudo peptidico con el siguiente análisis de aminoácidos:

Asp(1.09) Gly(1.19) Val(0.86) Ile(1.02) Tyr(0.88) Lys(0.95)

El rendimiento de esta última etapa, calculado por análisis de aminoácidos, es de un 88 %.

16.6 mg de este crudo se prepurificaron con una columna de exclusión molecular sephadex G-10, utilizando como eluyente AcOH al 10 % en agua. Una vez liofilizada la mezcla peptídica, se hizo eluir en una columna de CMC, empleando como eluyente una solución de acetato amónico de pH 5.5-5.6 y una fuerza iónica de 5 mS. El desalado de las fracciones peptídicas, una vez liofilizadas, se llevó a cabo en la misma columna sephadex G-10 que se utilizó con anterioridad. Tras liofilizar los dos péptidos se obtuvieron éstos como sólidos blancos (7.8 mg para cada uno de ellos), con un rendimiento de purificación cromatográfica del 93 % y los siguientes análisis de aminoácidos:

	Asp	Gly	Val	Ile	Tyr	Lys
péptido	1.02	1.05	0.95	0.98	0.98	1.00
imida	1.00	1.08	0.96	0.97	0.97	1.00

La caracterización de los péptidos se ha realizado por RMN de proton, IR y Masas (FAB), observándose para el péptido el pico $[M - 1]$ y para la amida los picos $[M - 1 + 23]$, $[M - 2 + 46]$, $[M - 2 + 23 + 49]$ y $[M^{+}]$

2.4. Evaluación de la formación de péptido-imida en las distintas condiciones estudiadas

2.4.1. Consideraciones generales y experimentos preliminares

Todos los experimentos realizados antes de proceder al tratamiento ácido de la resina se llevaron a cabo en jeringas de 5 ml de polipropileno con fritado de polietileno poroso. La agitación durante los tiempos largos de exposición de la resina al reactivo se realizó magnéticamente. Una vez obtenidos los crudos peptídicos haciendo uso de la metodología expuesta más arriba, se han preparado soluciones acuosas de concentraciones que oscilaron entre 1 mg/ml hasta 2 mg/ml, inyectándose directamente de éstas en el cromatógrafo líquido; en ningún caso de los estudiados hubo interferencias con el p-cresol o el anisol.

Para asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos, se comprobó la solubilidad de los dos péptidos en eter, el cual se utiliza para lavar la resina una vez realizado el tratamiento con HF. En uno de los ensayos realizados con TEA en el que se obtuvieron cantidades similares de péptido e imida, se inyectó la fase orgánica en el cromatógrafo, no detectándose la presencia de producto peptídico.

Todas las cuantificaciones se realizaron por HPLC.

2.4.1.1. Comprobación de la equivalencia entre las relaciones *area/nmol* del péptido y la imida

Para poder realizar una comparación directa entre el péptido y la imida del resultado obtenido por HPLC se evaluó la relación *area/nmol* para cada uno de los productos. Para ello, se pesaron 0.5 mg de imida y 2.72 mg de péptido, los cuales se disolvieron en 0.25 ml y 1 ml de agua respectivamente. Con respecto a la imida, se midieron volúmenes de 5, 10 y 20 μ l, los cuales se inyectaron en el cromatógrafo líquido,

colectándose el producto para realizar una hidrólisis ácida y posterior análisis de aminoácidos; los volúmenes medidos para el péptido fueron de 3.5, 7.5 y 15 μ l, llevando a cabo el mismo procedimiento que el comentado para la imida. Para obtener unos resultados más exactos, se utilizó leucina como patrón interno para los análisis de aminoácidos. Una vez se calcularon los nmoles inyectados en cada muestra por esta técnica, se compararon con las áreas determinadas por HPLC, obteniéndose una relación entre los dos productos del 99 %.

2.4.1.2. *Ensayo de la estabilidad de la imida en solución acuosa de AcOH*

Se ha trató 1 mg de imida con 1 ml de una solución acuosa del AcOH al 10 % durante 4 h (tiempo aproximado de elución en la columna sephadex G-10) a temperatura ambiente, detectándose un 0.8 % de descomposición. Otra muestra de la misma cantidad de este producto fué tratada con 1 ml de una solución acuosa de AcOH al 50 % durante 40 h a temperatura ambiente, encontrándose, en este caso, un 19 % de mezcla de péptido " α " y péptido " β ".

2.4.1.3. *Obtención de los péptidos " α " y " β " a partir de la imida*

1 mg de imida se disolvió en 1 ml de una solución acuosa al 5 % de TEA, dejándose a temperatura ambiente durante 12 h. A continuación, se añadió 1 ml más de agua y se liofilizó. El sólido obtenido se disolvió en 1 ml de agua, inyectándose, tras ello, en el cromatógrafo, cuyo análisis mostró un 72% de péptido " β " y un 28% de péptido " α ", identificándose este último por coinyección de una muestra pura. La digestión enzimática de los dos péptidos, ya comentada más arriba, corroboró este resultado.

2.4.2. *Ensayos realizados en medio ácido antes de la liberación del péptido de la resina*

2.4.2.1. *Tratamiento de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu_t)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-CH₂-Pam con Boc-Val-OH*

25 mg de 17 (f: 0.35 meq/g) se trataron con una solución de 4.8 mg de Boc-Val-OH disueltos en 1 ml de DCM y se dejó durante 48 h a temperatura ambiente. Acto seguido, se filtró la resina y se lavó con DCM y MeOH, secándose con corriente de aire. Una vez realizado esto, se colocó en el recipiente de Kel-F y se le adicionaron 0.5 ml de para-cresol y 4.5 ml de HF, dejándose 1 h a 0°C. A continuación, el crudo peptídico obtenido se aisló según el procedimiento que se describe en el apartado 2.4.3 y se procedió a su análisis por HPLC.

2.4.2.2. *Desprotección de la cadena lateral del ácido aspártico en la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu_t)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-CH₂-Pam*

25 mg de la peptidil-resina 17 se trataron con la siguiente secuencia de reactivos y lavados: 1x2 min de TFA al 30 % en DCM, 1x40 min de TFA al 30 % en DCM, 4x2 min de DCM, 4x3 min de DIEA al 5 % en DCM y 4x2 min de DCM. A continuación, se secó la resina tras lavarla con MeOH mediante corriente de aire y se trató con HF por el método habitual.

2.4.3. *Métodos utilizados para liberación del péptido de la resina*

Tratamiento con fluoruro de hidrógeno (High)

Alícuotas que oscilaron entre los 20 y 400 mg de las tres peptidil-resinas se trataron con HF y p-cresol (9:1) (5 ml) en todos los casos, salvo en uno en el que se utilizó anisol como "scavenger"; el tiempo de reacción fué de 1 h y la temperatura de 0°C para todos ellos. Una vez eliminado el ácido al vacío, se suspendió la resina en 10 ml de Et₂O, se filtró y lavó con dos porciones del mismo volumen de

este disolvente. El crudo peptídico se extrajo de la resina con 10 ml de solución acuosa de AcOH al 10 %, lavándose, a continuación, dos veces más con la misma cantidad de esta solución. Tras liofilizar dicha solución, se obtuvo prácticamente en todos los casos un sólido blanco cuya pureza, en las ocasiones en las que se determinó, fué superior al 90 % y el rendimiento de desprotección entre el 80% y el 90 %, resultados siempre obtenidos por hidrólisis y análisis de aminoácidos.

2.4.3.2. *Tratamiento con fluoruro de hidrógeno (Low-High)*

A una suspensión de 25 mg de la peptidilresina 17 en 1.25 ml de DMS y 0.5 ml de p-cresol se añadieron 3.3 ml de HF y se dejó a 0°C durante 2 h. A continuación, se ha evaporó a sequedad al vacío para eliminar el DMS y se añadieron 4.5 ml de HF, manteniéndose a 0°C durante 1 h más. Llegado a este punto, se procedió de la misma manera que para el caso anterior, obteniéndose al final del proceso un rendimiento del 90%.

2.4.3.3. *Tratamiento con TFMSA*

En una jeringa de 5 ml de capacidad de polipropileno provista de un fritado de polietileno poroso se suspendieron 32.2 mg de la peptidil-resina 17 (0.35 meq/g) en 1 ml de una mezcla de proporción en volumen 10:50:30:10 de TFMSA, TFA, DMS y p-cresol respectivamente (4.5 M en TFMSA), llevándose a 0°C y manteniéndose a esta temperatura durante 4 h. Tras ello se filtró sobre 10 ml de Et₂O anhidro y se lavó la resina con otros 10 ml del mismo disolvente. La solución eterea con el péptido ya precipitado se centrifugó y decantó, tras lo cual se añadieron 10 ml más de disolvente, repitiendo 5 veces todo este proceso para secar finalmente al vacío. El rendimiento obtenido por hidrólisis y análisis de aminoácidos fué del 90 %.

2.4.4. Ensayos realizados en medio básico

2.4.4.1. Tratamiento de las tres hexapeptidil-resinas con DIEA

25 mg de cada una de las tres resinas se trataron con 1 ml de una solución de DIEA al 5 % en DCM durante 576 min a temperatura ambiente. A continuación, se filtró y lavó con DCM y MeOH. Una vez se secó la resina por corriente de aire, se procedió al tratamiento con HF en las condiciones habituales.

2.4.4.2. Tratamiento de las tres hexapeptidil-resinas con piperidina

25 mg de cada una de las resinas se trataron con 1 ml de una solución de piperidina al 20 % en DMF durante 4 h. A continuación, se lavó el polímero con DMF, DCM y MeOH. Tras ello, se procedió de forma similar a los ensayos anteriores.

Además de este ensayo común a las 3 resinas, se realizó uno más para el polímero 18 y otro para el 17. Con respecto al primero, se pesó otra alícuota de 25 mg y se trató con el mismo reactivo, siendo el tiempo de exposición, en este caso, de 10 min.; por otro lado, la peptidil-resina 17 (25 mg) fué desprotegida previamente en la cadena lateral del ácido aspártico según el protocolo ya comentado y se trató, previo lavado con DMF, con 1 ml de piperidina al 20 % de DMF durante 14 h, lavándose, a continuación, con DMF, DCM y MeOH. Acto seguido, se procedió de la forma habitual.

2.4.4.3. Obtención e identificación de las dos piperididas a partir de la imida

1 mg de péptido-imida se trató con 1 ml de una solución al 50 % de piperidina en DMF durante 1 h. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se disolvió en 1 ml de agua. El análisis realizado por HPLC mostró la presencia de dos productos

peptídicos, como se comprobó por hidrólisis y análisis de aminoácidos, cuyas digestiones enzimáticas fueron incompletas (ver procedimiento más detallado en el apartado de materiales y métodos). La caracterización de cada producto (α -imida o β -imida) no se llevó a cabo.

2.4.4.4. Tratamiento de la peptidil-resina 18 con TEA

Muestras de 85 mg, 100 mg y 85 mg de la peptidil-resina 18 fueron tratadas con 2 ml de TEA al 5 %, 10 % y 50 % durante 60 h, 96 h y 65 h respectivamente a temperatura ambiente. A continuación, se filtraron las tres soluciones y se lavaron las resinas con DCM y MeOH. Una vez se realizaron los respectivos tratamientos con HF, se obtuvieron las siguientes cantidades de péptido e imida:

	péptido(%)	imida(%)
TEA/DCM (5%)	45.9	54.1
TEA/DCM (10%)	31.1	68.9
TEA/DCM (50%)	61.1	38.9

Los péptidos obtenidos en estos ensayos fueron separados por cromatografía de intercambio iónico (CMC) (tampón acetato amónico, pH 5.5, 5 mS) y utilizados con distintos objetivos.

2.5. Síntesis del Boc-Asp(Fm)-OH

2.5.1. Intentos de síntesis del H-Asp(Fm)-OH

2.5.1.1. A partir del complejo de cobre del ácido aspártico

Preparación de las distintas sales del complejo de cobre.-

250 mg de complejo de cobre (0.47 mmoles) se suspendieron en 25 ml de agua, añadiéndose, a continuación, 0.13 g de ácido aspártico (0.94 mmoles). La mezcla así formada se neutralizó con distintas soluciones de las diferentes bases utilizadas. Para la sal de cesio se hizo uso de una solución acuosa de carbonato de cesio 1.5 N; para el resto de bases (DMAP, DCEA, piperidina y diisopropilpentilamina) se empleó una solución etanólica de cada una de ellas 1.5 N. Una vez llevada a cabo la neutralización, se filtró la pequeña cantidad de residuo sólido que quedaba y se liofilizó, obteniéndose en todos los casos un sólido de aspecto vitreo. A continuación, se comprobó la solubilidad en DMF de todas ellas, dando muy buenos resultados la sal de dicitclohexilamonio (1 g en 10 ml).

Síntesis del tosilato de fluorenilmétilo. Intento de preparación del H-Asp(Fm)-OH.-

Se disolvieron 2 g (10.2 mmoles) de fluorenilmétanol en 5 ml de cloroformo anhidro, añadiéndose, a continuación, 2.3 g de cloruro de tosilo (12.2 mmoles). El matraz de reacción se colocó en un baño de hielo y, a través de un "septung" se inyectaron lentamente 1.6 ml de piridina anhidra durante 1 h. Una vez se dejó con agitación magnética durante 3 h más, la solución se lavó con cinco fracciones de 20 ml de HCl al 5 %, cinco fracciones de 20 ml de bicarbonato sódico al 5 % y dos fracciones de 20 ml de agua. Una vez se secó con sulfato magnésico, se cristalizó en cloroformo/hexano, obteniéndose 1.7 g de cristales (48.7 % de rendimiento).

Pf 115°C

análisis elemental: calc. C, 71.98 H, 5.17 S, 9.14
hall. C, 71.93 H, 5.34 S, 8.77

RMN de ¹H (CDCl₃, ppm):

2.38 (s, CH₃ tosilato); 4.14-4.28 (m, CH y CH₂ fluorenilmétilo); 7.20-7.76 (m, CH aromáticos fluorenilo)

RMN de ¹³C (CDCl₃, ppm):

21.6 (C metilo tosilato); 46.6 (C metino fluorenilmétilo); 71.8 (C metileno fluorenilmétilo); 120.0, 125.1, 127.2,

127.8 (C metinos aromáticos fluorenilo); 128.0, 129.8 (C metinos aromáticos tosilo); 142.4, 145.0 (C cuaternarios aromáticos fluoreno); 133.0, 141.2 (C cuaternarios aromáticos tosilo)

IR (KBr, cm^{-1}):

3060, 3040, 1600, 1450, 1360, 1190, 1180 y 960

Masas (impacto electrónico, m/e):

334 ($[\text{M}^{\dagger}]$); 177 (100%)

En 5 ml de DMF se disolvieron 500 mg de sal de DCEA (0.73 mmoles). A continuación, se añadieron 508 mg (1.5 mmoles) de tosionato de fluorenilmetilo y se dejó a temperatura ambiente. Rápidamente se pudo detectar por capa fina la aparición del producto de eliminación (dibenzofulveno; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1), el cual ya fué caracterizado con anterioridad durante la síntesis de otros derivados de fluorenilmetilo, no observándose en ningún momento la aparición de producto final.

Método del Boc_2O .-

Se disolvieron 509 mg de sal de cobre (0.74 mmoles) en 13 ml de DMF, a los que se añadieron 342 mg de fluorenilmetanol (1.8 mmoles, 1.5 de exceso con respecto al ácido aspártico) y 18 mg de DMAP (0.14 mmoles, 10 % de exceso). A continuación, se adicionaron 388 mg de Boc_2O (1.8 mmol, 1.5 veces de exceso) y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Tras la eliminación del disolvente a presión reducida, se adicionaron 59 mg (0.18 mmoles) de la sal disódica del EDTA (solución sobresaturada) y se mantuvo con agitación enérgica durante 1 h. Una vez se ha liofilizó, no se detectó producto final por IR.

Método de la DCC/DMAP.-

Se disolvieron 486 mg (0.71 mmoles) de sal de cobre en 13 ml de DMF, junto con 326 mg (1.7 mmoles) de fluorenilmetanol. A continuación, se adicionaron 339 mg (1.6 mmoles) de DCC y 17 mg (0.14 mmoles) de DMAP, dejándose toda la noche. Transcurrido este tiempo, se eliminó

el disolvente a presión reducida y el sólido obtenido se trató con una solución sobresaturada formada con 263 mg de la sal disódica de EDTA (0.7 mmoles) durante 1 h. Una vez liofilizada la solución no se detectó producto por IR.

2.5.1.2. A partir del complejo de boro del ácido aspártico

En 40 ml de THF se disolvieron 1.40 g (7.2 mmoles) de fluorenilmetanol y 1.3 g (6.5 mmoles) del complejo de boro del ácido aspártico. A continuación, se adicionaron 1.47 g de DCC (7.2 mmoles) y 79.3 mg de DMAP (0.65 mmoles), observándose inmediatamente la aparición de un precipitado de DCU. A las 2 h de reacción (desaparición de producto inicial por capa fina; DCM/AcOH, 9:1, revelado con ninhidrina) se eliminó el disolvente a presión reducida y se añadieron 125 ml de AcOEt. A la suspensión formada se le hizo burbujear cloruro de hidrógeno durante 10 min y se dejó durante 30 min más para que acabara de precipitar el clorhidrato. Tras ello, se filtró y lavó con tres fracciones de 50 ml de AcOEt. Una vez seco el producto se obtuvieron 1.9 g de sólido blanco.

Pf 220-222°C; *Rf* 0.3 (BuOH/AcOH/Agua 8:1:1)

análisis elemental: calc. C, 61.18 H, 4.83 N, 4.20 Cl, 10.62
Hall. C, 61.13 H, 4.66 N, 4.03 Cl, 10.20

RMN de 1H (CD_3OD , ppm):

3.30 (d, $CH_2 \beta$ Asp); 4.47 (t, CH α Asp); 4.52 (t, CH fluorenilmetilo); 4.70 (m, CH_2 fluorenilmetilo); 7.50-8.04 (m, CH aromáticos fluorenilmetilo)

RMN de ^{13}C (CD_3OD , ppm):

34.2 (C metileno β Asp); 46.1 (C metino fluorenilmetilo); 48.5 (C metino α Asp); 66.5 (C metileno fluorenilmetilo); 120.2, 125.3, 127.3, 127.9 (C metino aromáticos fluorenilmetilo); 140.7, 143.5 (C cuaternarios aromáticos fluorenilmetilo); 169.5, 169.6 (CO ácido y ester)

Masas (ionización química, m/e):

329 ([M + 18 - 36]), 312, 268 (100 %), 213, 196, 151 y 107

preparación del H-Glu(Fm)-OH.-

1.6 g (11 mmoles) de H-Glu-OH se suspendieron en 20 ml de THF, adicionándose, a continuación, 13 ml de una solución 1 M de trietilborano (13 mmoles). La mezcla se dejó con agitación magnética a temperatura ambiente durante 4 días, tiempo para el que se observó la disolución completa del sólido. Acto seguido, se filtró, adicionándose, tras ello, 2.4 g (12 mmoles) de FmOH, 2.5 g (12 mmoles) de DCC y 0.15 g (1.2 mmoles) de DMAP, siendo el volumen final de 32 ml. A las 2 h se pudo comprobar por capa fina (CHCl₃/AcOH, 9:1) la consecución de la reacción. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y se adicionaron 25 ml de AcOEt, a través de cuya solución se burbujeó HCl durante 10 min. El producto precipitado se filtró y lavó dos veces con 10 ml de AcOEt, obteniéndose, una vez secado, 3.3 g de éste (83 % de rendimiento).

Pf 155-156°C; *Rf*: 0.3 (BuOH/AcOH/agua, 4:1:1)

análisis elemental: calc. C, 62.16 H, 5.22 N, 4.03 Cl, 10.19
hall. C, 61.56 H, 5.57 N, 3.81 Cl, 10.13

RMN de ¹H (CD₃OD, ppm):

2.36 (m, CH₂ β Glu); 2.81 (dt, CH₂ γ Glu); 4.19 (t, CH fluorenilmetilo); 4.40 (t, CH α Glu); 4.63 (dq, CH₂ fluorenilmetilo); 7.40-8.00 (m, CH aromáticos fluorenilo)

RMN de ¹³C (DMSO-d₆, ppm):

26.6 (C metileno β Glu); 30.6 (C metileno γ Glu); 48.1 (C metino fluorenilmetilo); 53.0 (C metino Glu); 67.5 (C metileno fluorenilmetilo); 121.0, 126.0, 128.2, 128.9 (C metinos aromáticos fluorenilo); 142.5, 145.0 (C cuaternarios aromáticos fluorenilo); 172.0 (CO ácido); 173.5 (CO ester)

Masas (ionización química, m/e):

343 ([M + 18 - 36]), 308, 282, 231, 214, 164 (100 %) y 147

2.5.2. Preparación del Boc-Asp(Fm)-OH

Se disolvió 1 g de H-Asp(Fm)-OH (clorhidrato) en 15 ml de DMF/agua (2:1) (2.9 mmoles). A la suspensión formada se le añadió, a continuación, 918 mg de 2-terc-butoxicarboniloxiimino-2-fenilacetnitrilo (3.7 mmoles) disueltos en la mínima cantidad de DMF, llevándose la disolución, tras ello, a pH 9-9.5 con una solución de carbonato sódico al 10 %. La reacción se dejó en baño de hielo durante una noche (desaparición de producto por capa fina, DCM/MeOH/AcOH 18:1:0.1) y, a continuación, se extrajo con cuatro fracciones de 50 ml de Et₂O para eliminar el reactivo sobrante y el subproducto de reacción. Una vez realizado esto, se añadieron 50 ml más de agua y 100 ml de AcOEt y se llevó todo ello a pH 2 con una solución de HCl 1 N. La fase orgánica se secó con sulfato magnésico y se eliminó el disolvente al vacío obteniéndose un aceite que no se logró cristalizar. De cara a evitar este problema se realizó una nueva síntesis, utilizando como disolvente THF/Agua (1:1)(0.6 g (1.7 mmoles) en 15 ml). Con esta modificación se obtuvieron 0.58 g de producto (83 % de rendimiento), una vez se cristalizó en AcOEt/hexano.

Pf 137-138°C; Rf 0.2 (CHCl₃/MeOH/AcOH, 18:1:0.1)

$[\alpha]_D = +26.9$ (C=1, CHCl₃)

análisis elemental: calc. C, 66.49 H, 5.83 N, 3.52
hall. C, 66.61 H, 6.20 N, 3.08

RMN de ¹H (CDCl₃, ppm):

1.41 (s, CH₃, terc-butilo); 2.96 (dd,dd; CH₂ β Asp); 4.15 (t, CH fluorenilmetilo); 4.37 (dd,dd; CH₂ fluorenilmetilo); 4.58 (m, CH α Asp); 5.42 (d, NH); 7.21-7.75 (m, CH aromáticos fluorenilo)

RMN de ¹³C (CDCl₃, ppm):

28.3 (C metilo terc-butilo); 36.5 (C metileno Asp); 46.6 (C metino fluorenilmetilo); 81.0 (C cuaternario terc-butilo); 120.1, 125.0, 127.2, 127.8 (C metinos aromáticos fluorenilo); 141.3, 143.5 (C cuaternarios aromáticos fluorenilmeti-

(m, CH₂ γ Glu); 4.22 (m, CH α Glu y CH fluorenilmetilo); 4.34 (m, CH₂ fluorenilmetilo); 5.78 (d, NH); 7.28-7.79 (CH aromáticos fluorenilo)

RMN de ¹³C (CDCl₃, ppm):

27.3 (C metileno β Glu); 28.3 (C metilo terc-butilo); 30.4 (C metileno γ Glu); 46.7 (C metino fluorenilmetilo); 52.9 (C metino Glu); 66.7 (C metileno fluorenilmetilo); 80.0 (C cuaternario terc-butilo); 120.0, 125.0, 127.1, 127.8 (C metinos aromáticos fluorenilo); 141.3, 143.7 (C cuaternarios aromáticos); 156.0 (CO carbamato); 173.0 (CO ácido); 176.0 (CO ester)

IR (KBr, cm⁻¹):

3360, 1740, 1715, 1695, 1520 y 1180

Masas (ionización química, m/e):

443 ([M + 18]), 399, 343, 231, 214, 164 (100 %) y 147

2.6. Utilización de los grupos fluorenilmetilo, 3-picolilo y 4-picolilo para la síntesis de H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH. Ensayos realizados para minimizar la formación de succinimida

2.6.1. *Boc-Val-Lys(OClZ)-Asp(Fm)-Gly-Tyr(OBrZ)-Ile-O-R, Boc-Val-Lys(OClZ)-Asp(3-Pic)-Gly-Tyr(OBrZ)-Ile-O-R y Boc-Val-Lys(OClZ)-Asp(4-Pic)-Gly-Tyr(OBrZ)-Ile-O-R. Síntesis*

Para la obtención de estas tres hexapeptidil-resinas se utilizó el mismo protocolo que el empleado para la preparación de los polímeros 16, 17 y 18. Para este caso concreto, se preparó un nuevo lote de tripeptidil-resina a partir de 1 g de Boc-Phe-O-R (289 mg de ácido 4-(terc-butoxicarbonilisoleuciloximetil)fenilacético, 730 mg de Boc-Tyr(OBrZ)-OH, 259 mg de Boc-Gly-OH y 305 mg de DCC para cada acoplamiento). En todos los casos, la ninhidrina fué negativa a las 2 h. A

continuación, se separaron tres alícuotas de 200 mg cada una para llevar a cabo la síntesis de las tres nuevas hexapeptidil-resinas. Las cantidades utilizadas de reactivos fueron las siguientes: 100 mg de Boc-Asp(Fm)-OH, 76.4 mg de Boc-Asp(3-Pic)-OH y Boc-Asp(4-Pic)-OH, 96.4 mg de Boc-Lys(OC1Z)-OH, 51 mg de Boc-Val-OH y 49 mg de DCC para cada acoplamiento. También en esta segunda parte de la síntesis todos los ensayos de ninhidrina fueron negativos. La composición en aminoácidos de las tres peptidil-resinas, determinada por hidrólisis y análisis de aminoácidos, fué la siguiente:

	Asp	Gly	Val	Ile	Tyr	Lys
hexapéptido-Fm	0.97	1.04	1.14	0.97	0.83	1.06
hexapéptido-3-Pic	0.86	1.14	1.05	0.94	0.94	1.07
hexapéptido-4-Pic	1.01	1.12	0.96	0.99	0.93	0.99

2.6.2. Ensayos de desprotección realizados

Previamente a la realización de los ensayos de desprotección de los grupos carboxilo de las tres tripeptidil-resinas, éstas fueron tratadas con HF en condiciones "high" (0.5 ml de p-cresol, 4.5 ml de ácido, 0°C, 1 h). El crudo peptídico obtenido en los tres casos se sometió directamente a los distintos ensayos de desprotección.

Las condiciones cromatográficas utilizadas para la detección de los distintos productos fueron similares a las descritas en el Capítulo 2 para llevar a cabo las cuantificaciones. Sin embargo, fué necesario utilizar un gradiente más amplio (del 10% al 40% de AcCN), dado que el péptido protegido con el grupo fluorenilmetilo mostraba un tiempo de retención muy superior (28 min, frente a 6 min y 8 min para el péptido libre y la imida).

2.6.2.1. *Eliminación del grupo fluorenilo*

Para la eliminación del grupo fluorenilo se utilizaron dos métodos, los tratamientos con piperidina y fluoruro de tetrabutilamonio.

Con respecto al primero, 0.5 mg de crudo peptídico se trataron con 200 μ l de una solución de piperidina al 20% en DMF, a temperatura ambiente. A los 2 min, se adicionaron 50 μ l de HCl 12 N para neutralizar la base y se inyectó directamente al cromatógrafo líquido, una vez se adicionaron 250 μ l de agua a la mezcla de reacción.

Por otro lado, 0.2 mg de crudo peptídico fueron tratados con 100 μ l de solución de fluoruro de tetrabutilamonio 0.05 M en DMF. A los 2 min de reacción, se inyectó directamente al cromatógrafo líquido.

Puesto que los resultados se obtuvieron de análisis realizados a 280 nm, la cuantificación directa no podía llevarse a cabo, ya que a relación area/mol no es la misma para los dos péptidos (péptido libre y protegido, al absorber fuertemente el grupo protector a esa longitud de onda. Puesto que no se cuantificaron los crudos procedentes del tratamiento con HF al tratarse de ensayos preliminares, los distintos resultados se obtuvieron al calcular la cantidad de péptido libre e imida totales, una vez tratada la muestra con piperidina (reacción cuantitativa a los 2 min).

2.6.2.2. *Eliminación de los grupos picolilo*

Para eliminar los dos grupos picolilo estudiados, se trataron alícuotas de las dos hexapeptidil-resinas (0.5 mg) con 1 mg de paladio/carbono, y 0.5 mg de formiato amónico, todo ello en una solución de 20 l de AcOH en 0.5 ml de MeOH. Una vez transcurrido el tiempo adecuado, se centrifugó e inyectó directamente al cromatógrafo líquido. La cuantificación de los resultados también se realizó de análisis obtenidos a 280 nm. En este caso concreto, al no poseer prácticamente absorción el grupo protector, las determinaciones se realizaron directamente.

3. ESTUDIO DE LA N-BENZHIDRIL-(4-BROMOMETIL-3-NITRO)BENZOILAMIDA COMO MODELO MONOMERICO DE LA RESINA 4-BROMOMETIL-NBB

A continuación, se van a describir las síntesis de todos los derivados estudiados en este Capítulo. Para facilitar la comprensión de los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono-13, en la figura 3-22 se muestran las abreviaturas que se han utilizado para la asignación de todos los átomos. La numeración que se indica está relacionada únicamente con los espectros de carbono-13.

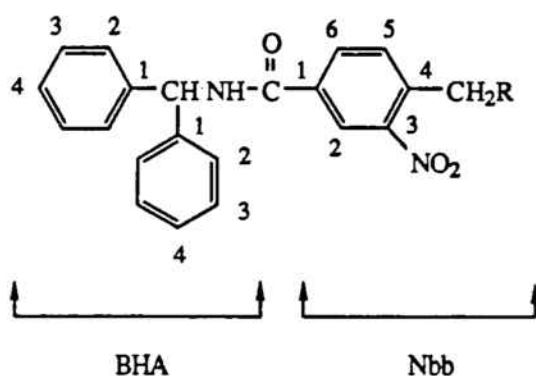


figura 3-22

3.1. Síntesis de los derivados estudiados

3.1.1. *N*-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida

3.1.1.1. Preparación de la *N*-benzhidrilformamida

En un matraz de tres bocas provisto de un sistema de agitación

mecánica, termómetro y Dean-Stark se mezclaron 24.9 g (0.1 moles) de benzofenona, 30.2 ml (0.7 moles) de ácido fórmico (solución acuosa al 85 %) y 27.2 ml (0.7 moles) de formamida, llevándose, a continuación, a 160-170°C (una vez iniciada la reacción se adicionó una pequeña cantidad de formiato amónico para catalizar el proceso). Con el transcurso del tiempo fué necesaria la adición de pequeñas cantidades de ácido fórmico para compensar las pérdidas de éste al destilar junto con el agua que se separa de la mezcla de reacción. A las 8 h, tras comprobar por espectroscopía infraroja la consecución de la reacción, se dejó enfriar, solidificando la mezcla, y se lavó tres veces con 100 ml de agua. Una vez se secó el producto final, se obtuvieron 20 g de éste en forma de cristales blancos, lo que representa un rendimiento del 96%.

Pf 129-130°C

RMN de ¹H (DMSO-d₆, ppm):

5.9 (d, CH bencilo); 6.9 (m, CH aromáticos); 7.8 (s, CH formilo); 8.8 (d, NH)

IR (KBr, cm⁻¹):

3250, 2600, 1680 y 1650

3.1.1.2. Obtención del hidrocloreuro de benzhidrilamina

Se disolvieron 4 g (0.02 moles) de N-benzhidrilformamida en 100 ml de dioxano, a los que se añadieron 4 ml de HCl concentrado, dejándose 1 h a reflujo. En el medio, precipitó un sólido blanco cristalino, el cual se filtró y lavó tres veces con 50 ml de Et₂O, obteniéndose 5.9 g de producto (72 % de rendimiento).

Pf 312°C

RMN de ¹H (CD₃OD, ppm):

5.3 (s, CH bencilo), 7.1 (s, CH aromáticos)

IR (KBr, cm⁻¹):

3000 y 1680

3.1.1.3. *N*-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida (29)

Se suspendieron 500 mg (2.3 mmoles) de clorhidrato de benzhidrilamina en 20 ml de DCM y 20 ml de solución de NaOH 0.1 M y se dejó la mezcla con agitación magnética durante 2 h. La fase orgánica se separó, a continuación, una vez se había comprobado por capa fina la neutralización de la amina (DCM), y la fase acuosa se lavó con 20 ml de DCM. Una vez se unieron las fases orgánicas y se secaron con sulfato magnésico, se utilizó directamente la solución de amina para la obtención de la 4-bromometil-Nbb.

Por otro lado, a una solución de 1.2 g (4.6 mmoles) de ácido 4-bromometil-3-nitrobenzoico en 40 ml de DCM se adicionaron 0.3 g (2.3 mmoles) de DCC disueltos en 10 ml del mismo disolvente, se colocó un tubo de cloruro cálcico y se dejó con agitación magnética durante 1 h a 0°C. Acto seguido, se filtró la DCU formada sobre un matraz, al que se le colocó un embudo de adición que contenía la amina disuelta en el doble de volumen que el de la solución de anhídrido. A continuación, la primera solución se fué adicionando gota a gota sobre la segunda, manteniendo la temperatura por debajo de 5°C. Una vez transcurrida la reacción (se dejó una noche; por capa fina, ninhidrina negativa) se eliminó el disolvente a presión reducida y se eluyó con DCM por una columna de sílica gel (5x10 cm). Una vez eliminado el disolvente se obtuvieron 0.9 g de producto (sólido blanco cristalino) (94 % de rendimiento).

Pf 200-201°C; *Rf* 0.5 (DCM)

análisis elemental: calc. C, 59.24 H, 4.00 N, 7.08 Br, 18.82
hall. C, 59.59 H, 4.14 N, 6.94 Br, 18.40

RMN de ¹H (DMSO-d₆, ppm):

4.96 (s, CH₂ bencílico Nbb), 6.38 (d, CH bencílico BHA),
7.30 (m, CH aromáticos BHA), 7.87 (d, CH aromático meta-
NO₂), 8.26 (dd, CH aromático para-NO₂), 8.60 (d, CH aromático
orto-NO₂), 9.64 (d, NH)

RMN de ¹³C (DMSO-d₆, ppm):

29.0 (C metileno Nbb); 56.6 (C metino BHA); 124.2 (C₂ aromá-

tico Nbb); 127.5, 127.7, 128.8 (C2,3,4 aromático BHA); 132.8(2), 135.1, 135.5 (C1,4,5,6 aromático Nbb); 141.7 (C1 aromático BHA); 147.3 (C3 aromático Nbb); 163.3 (CO amida)

IR (KBr, cm^{-1}):

3500, 3300, 2900, 2750, 1650, 1625, 1525, 1490, 1350, 1320, 800 y 700

Masas (impacto electrónico, m/e):

424-426 ($[M^+]$, $[M + 2]$), 345, 242-244, 165, 104 (100%) y 77

3.1.2. Síntesis de la *N*-benzhidril-(4-terc-butoxicarbonilgliciloximetil-3-nitro)benzoilamida

Se disolvieron 82 mg de Boc-gly-OH en 5 ml de una mezcla de Etanol/agua (4:1) y se neutralizaron con una solución 1.5 N de carbonato de cesio. A continuación, se eliminó el disolvente orgánico a presión reducida y el agua restante se liofilizó, obteniéndose la sal de cesio como un sólido blanco cristalino.

En el mismo recipiente que contiene dicho producto, se adicionó una solución de 200 mg del análogo monomérico 29 (0.47 mmoles) en 12 ml de DMF. La suspensión formada se dejó durante 5 min a 40°C, eliminándose, a continuación, el disolvente a presión reducida. El sólido blanquecino obtenido se trató con 20 ml AcOEt para separar el producto del bromuro de cesio formado, se filtró y se lavó la fase orgánica con tres fracciones de agua. Una vez secado el producto con sulfato magnésico, se cristalizó en MeOH/agua, obteniéndose 177 mg de un sólido debilmente pardo (91% de rendimiento). La purificación total del producto se realizó en una columna de gel de sílice (2.5x40 cm), utilizando como eluyente DCM/AcOEt (95:5).

PF 114-115°C; Rf 0.18 (DCM/AcOEt, 95:5)

análisis elemental:	calc.	C, 64.74	H, 5.59	N, 8.09
	hall.	C, 64.35	H, 5.60	N, 7.34

RMN de ^1H (DMSO- d_6 , ppm):

1.31 (s, CH₃ terc-butilo), 3.81 (d, CH₂ glicina), 5.53 (s, CH₂ bencílico Nbb), 6.42 (d, CH bencílico BHA), 7.30 (m, CH aromáticos BHA), 7.80 (d, CH aromático meta-NO₂), 8.28 (dd, CH aromático para-NO₂), 8.69 (d, CH aromático orto-NO₂), 9.60 (d, NH).

RMN de ¹³C (DMSO-d₆, ppm):

28.1 (C metílicos terc-butilo); 56.7 (C metino BHA); 59.9 (C metileno glicina); 62.5 (C metileno Nbb); 78.4 (C cuaternario terc-butilo); 123.9 (C2 aromático Nbb); 127.2, 127.7, 128.4 (C2, 3, 4 aromático BHA); 129.0, 132.9, 134.6, 134.7 (C1, 4, 5, 6 Nbb); 141.8 (C1 aromático BHA); 146.9 (C3 aromático Nbb); 155.8 (CO carbamato); 163.5 (CO amida); 170.1 (CO ester)

IR (KBr, cm⁻¹):

3400-3300, 2950-2900, 1750, 1710, 1640, 1530, 1350, 1160, 1050-1030 y 700

Masas (ionización química, m/e):

537 ([M + 18], 100 %), 193

3.1.3. Síntesis de la N-benzhidril-(4-terc-butoxicarbonilproliloximetil-3-nitro)benzoilamida

En un matraz se hicieron reaccionar 500 mg del análogo monomérico 29 (1.18 mmoles) disueltos en 16 ml de DMF con la cantidad equivalente de N-terc-butoxicarbonilprolinato de cesio, obtenido a partir de 253 mg de Boc-Pro-OH, disueltos en 10 ml de EtOH/agua (4:1) y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. Una vez se dejó la suspensión 5 min a 40°C, se eliminó el disolvente al vacío y se extrajo el producto con AcOEt. Siguiendo un protocolo similar al caso anterior, se obtuvieron 555 mg de producto tras cristalizar en MeOH/agua (86 % de rendimiento).

PF 162-163°C; Rf 0.18 (DCM/AcOEt, 95:5)

análisis elemental: calc. C, 66.53 H, 5.94 N, 7.51
 hall. C, 66.39 H, 5.88 N, 7.79

RMN de ¹H (CDCl₃, ppm):

1.38, 1.45 (s, s, CH₃ terc-butilo); 1.95 (m, CH₂ γ Pro);
2.05, 2.30 (m, m, CH₂ β Pro); 3.50 (m, CH₂ δ Pro), 4.40 (m,
CH α Pro); 5.60 (m, CH₂ bencílico Nbb); 6.45 (d, CH bencfli-
co BHA); 6.95 (m, NH); 7.40 (m, CH aromáticos BHA); 7.71,
7.83 (d, CH aromático meta-NO₂); 8.15 (m, CH aromático para-
NO₂); 8.51 (m, CH aromático orto-NO₂)

RMN de ¹³C (CDCl₃, ppm):

23.7, 24.4 (C γ metileno Pro); 28.4 (C metílicos terc-buti-
lo); 30.0, 30.9 (C β metileno Pro); 46.4, 46.6 (C δ metileno
Pro); 57.9 (C metino BHA); 58.9, 59.1 (C α metino Pro); 63.1
(C metileno Nbb); 80.1, 80.2 (C cuaternario terc-butilo);
123.5, 123.6 (C2 aromático Nbb); 127.5, 127.8, 128.8 (C2, 3,
4 aromáticos BHA); 129.3, 132.3, (134.9, 135.0), (135.0,
135.5) (C1, 4, 5, 6 aromáticos Nbb); 140.8, 140.9 (C1 aromá-
tico BHA); 146.8, 147.2 (C3 aromático Nbb); 153.6, 154.4 (CO
carbamato); 164.4, 164.6 (CO éster); 172.4 (CO amida)

IR (KBr, cm⁻¹):

3250, 2990, 1770, 1710, 1640, 1540, 1400 y 1180

Masas (ionización química, m/e):

577 ([M + 18]) (100 %), 233, 194, 117

3.1.4. *Síntesis de la N-benzhidril-(4-formiloximetil-3-nitro)benzoi- lamida*

Se tomaron 25.6 l de una solución de ácido fórmico al 85 % en peso (0.6 mmoles) y se añadieron a 5 ml de agua para proceder, a continuación, a su neutralización con una solución 1.5 N de carbonato de cesio. Una vez se realizó esto, se liofilizó y añadió una disolución de 200 mg del análogo monomérico 29 (0.47 mmoles) y se dejó 1 h a

temperatura ambiente con fuerte agitación para disgregar la sal de cesio, poco soluble en este disolvente. Tras su eliminación al vacío, se suspendió la mezcla en 20 ml de agua y se extrajo con 20 ml de DCM, lavándose la fase orgánica con otras dos fracciones de 20 ml de agua y secando con sulfato magnésico. La solución de DCM se concentró y se columnó directamente, sin cristalizar, en gel de sílice (40x2.5 cm), utilizando como disolvente DCM. Se obtuvieron 123 mg de producto como sólido blanco (67% de rendimiento).

Pf 142-144°C; *R_f* 0.42 (DCM/AcOEt, 95:5)

análisis elemental:

calc.	C, 67.68	H, 4.65	N, 7.18
hall.	C, 68.02	H, 4.67	N, 7.34

RMN de ¹H (CDCl₃, ppm):

5.66 (s, CH₂ bencílico Nbb); 6.45 (d, CH bencílico BHA); 6.79 (d, NH); 7.30 (d, CH aromáticos BHA); 7.75 (CH aromático meta-NO₂); 8.14 (dd, CH aromático para NO₂); 8.22 (t, CH aldehído); 8.54 (d, aromático orto-NO₂)

RMN de ¹³C (CDCl₃, ppm):

57.8 (C metino BHA); 62.1 (C metileno Nbb); 124.1 (C₂ aromático Nbb); 127.5, 127.8, 128.6 (C₂, 3, 4, aromáticos BHA); 129.1, 133.1, 134.2, 135.4 (C₁, 4, 5, 6, aromáticos Nbb); 147.0 (C₃ aromático Nbb); 160.0 (CO ester); 163.9 (CO amida)

IR (KBr, cm⁻¹):

3320, 1730, 1640, 1540 y 1160

Masas (impacto electrónico, m/e):

390 ([M⁺]), 373, 208, 182, 165, 104 (100 %), 77

3.1.5. Síntesis de la *N*-benzhidril-(4-acetoximetil-3-nitro)benzoilamida

32.4 μl de AcOH se adicionaron a 5 ml de agua y se neutralizaron con carbonato de cesio (solución 1.5 N), liofilizándose, a continuación. Sobre el sólido blanco obtenido se adicionó una solución de 200 mg del análogo monomérico 29 (0.47 mmoles), necesitando también,

en este caso, agitación magnética intensa por problemas de solubilidad. Transcurrida 1 h se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el caso anterior, obteniéndose 121 mg de producto tras la purificación cromatográfica (63.6 % de rendimiento).

Pf 184-186°C; *Rf* 0.42 (DCM/AcOEt, 95:5)

análisis elemental:

calc.	C, 68.30	H, 4.99	N, 6.93
hall.	C, 68.49	H, 4.83	N, 7.27

RMN de ¹H (CDCl₃, ppm):

2.18 (s, CH₃); 5.55 (s, CH₂ bencílico Nbb); 6.45 (d, CH bencílico BHA); 6.78 (d, NH); 7.25 (m, CH aromáticos BHA); 7.70 (d, CH aromático meta-NO₂); 8.10 (dd, CH aromático para-NO₂); 8.51 (d, CH aromático orto-NO₂)

RMN de ¹³C (CDCl₃, ppm):

20.7 (C metilo); 57.5 (C metino BHA); 62.7 (C metileno Nbb); 124.0 (C2 aromático Nbb); 127.5, 127.9, 128.6 (C2, 3, 4, aromáticos BHA); 128.9, 133.1, 135.0, 135.2 (C1, 4, 5, 6, aromáticos Nbb); 141.3 (C1 aromático BHA); 147.3 (C3 aromático Nbb); 164.0 (CO ester); 170.2 (CO amida)

IR (KBr, cm⁻¹):

3320, 1760, 1640, 1540, 1240 y 1050

Masas (impacto electrónico, m/e):

404 ([M⁺]), 222, 182, 165 (100 %), 152, 135, 104, 77 y 43

3.1.6. Síntesis de la *N*-benzhidril-(4-hidroximetil-3-nitro)benzoilamida

A una solución de 200 mg (0.47 mmoles) del análogo monomérico 29 en 50 ml de dioxano se adicionaron 80 mg (0.5 mmoles) de yoduro potásico disueltos en 50 ml de agua, dejándose la mezcla durante una noche con agitación magnética a 90°C. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y se suspendió el sólido blanco obtenido en 20 ml de agua, extrayéndose el producto con 20 ml de DCM y laván-

dose la fase orgánica con tres porciones de 20 ml de agua. Una vez se secó con DCM, se cristalizó en MeOH /agua, obteniéndose 75 mg de sólido cristalino blanco (90% de rendimiento). Finalmente, el producto se columnó en gel de sílice (2.5x40 cm), utilizando como eluyente DCM/AcOEt (95:5).

Pf 190-192°C; *Rf* 0.11 (DCM/AcOEt, 95:5)

análisis elemental:

calc.	C, 69.60	H, 5.00	N, 7.73
hall.	C, 68.43	H, 4.88	N, 7.76

RMN de ¹H (DMSO d₆, ppm):

4.89 (d, CH₂ bencílico Nbb); 5.58 (t, OH); 6.44 (d, CH bencílico BHA); 7.30 (m, CH aromáticos BHA); 7.94 (d, CH aromático meta-NO₂); 8.31 (dd, CH aromático para-NO₂); 8.69 (d, CH aromático orto-NO₂); 9.57 (d, NH)

RMN de ¹³C (DMSO d₆, ppm):

56.6 (C metino BHA); 59.9 (C metileno Nbb); 123.4 (C2 aromático Nbb); 127.1, 127.8, 128.3 (C2, 3, 4, aromáticos BHA); 128.3, 132.6, 133.6, 141.4 (C1, 4, 5, 6, aromáticos Nbb); 141.9 (C1 aromático BHA); 146.5 (C3 aromático Nbb); 163.7 (CO amida)

IR (KBr, cm⁻¹):

3600, 3300, 2900, 1630, 1530, 1450, 1380, 1050, 750 y 700

Masas (impacto electrónico, m/e):

362 ([M⁺], 100 %), 345, 182, 180, 165, 104 y 77

3.1.7. Síntesis de la *N*-benzhidril-(4-metoximetil-3-nitro)benzoilamida

En un matraz provisto de refrigerante y tubo de cloruro cálcico y al que previamente se habían introducido 25 ml de MeOH, se adicionaron 371 mg (12 mmoles) de sodio, dejándose en baño de hielo hasta su completa disolución. A la solución formada se le adicionaron, a continuación, otra de 500 mg (1.2 mmoles) del análogo monomérico 29 en 100

ml de MeOH, añadiéndose inmediatamente 2 g (12 mmoles) de nitrato de plata. La suspensión se dejó con agitación magnética durante 2 días, tras lo cual se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El sólido blanco así obtenido se disolvió en 20 ml de cloroformo y se lavó con tres fracciones de agua, secándose finalmente con sulfato magnésico. El producto se cristalizó en MeOH/agua, obteniéndose 386 mg de cristales blancos (82% de rendimiento). La purificación final se llevó a cabo cromatografiando el producto en una columna de gel de sílice (2.5x40 cm), utilizando como eluyente DCM.

PF 165-167°C; Rf 0.56 (DCM/AcOEt, 95:5)

Análisis elemental: calc. C, 70.20 H, 5.36 N, 7.44
 hall. C, 70.23 H, 5.40 N, 7.44

RMN de ^1H (DMSO d_6 , ppm):

3.40 (s, CH₃); 4.82 (s, CH₂ bencílico Nbb); 6.44 (d, CH bencílico BHA); 7.30 (m, CH aromáticos BHA); 7.82 (d, CH aromático meta-NO₂); 8.31 (dd, aromático para-NO₂); 8.64 (d, CH aromático orto-NO₂); 9.64 (d, NH)

RMN de ^{13}C (DMSO d_6 , ppm):

56.6 (C metino BHA); 58.2 (C metilo); 70.1 (C metileno Nbb); 123.5 (C2 aromático Nbb); 127.1, 127.6, 128.3 (C2, 3, 4, aromáticos BHA); 128.7, 132.6, 134.2, 137.0 (C1, 4, 5, 6, aromáticos Nbb); 141.8 (C1 aromático BHA); 148.1 (C3 aromático Nbb); 163.6 (CO amida)

IR (KBr, cm^{-1}):

3300, 3000, 2900-2800, 1625, 1525, 1440-1420, 1100, 750, 700

Masas (impacto electrónico, m/e):

376 ([M⁺]), 359, 194, 182, 165 (100 %), 104, 77

3.1.8. Síntesis de la N-benzhidril-(4-dimetilamino-3-nitro)benzoilamida

A una solución de 200 mg del análogo monomérico 29 (0.47 mmoles)

en 50 ml de dioxano se añadieron 125 l (1.2 mmoles) de una solución de dimetilamina en agua del 40 % en peso y 150 l (1.2 mmoles) de TEA. Una vez se dejó la mezcla durante una noche a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente al vacío y se suspendió el sólido en 20 ml de agua, extrayéndose, acto seguido, con 20 ml de cloroformo. A continuación, se lavó tres veces con 20 ml de HCl 0.1 N y otras tres con 20 ml de agua. Tras secar con sulfato magnésico y cristalizar en MeOH/agua se obtuvieron 71.8 mg de cristales amarillos de producto (69% de rendimiento).

Pf 194°C; *Rf* 0.05 (DCM/AcOEt, 95:5).

Análisis elemental:

calc.	C, 70.93	H, 5.95	N, 10.79
hall.	C, 70.91	H, 6.14	N, 10.99

RMN de ¹H (DMSO-d₆, ppm):

2.10 (s, CH₃); 3.63 (s, CH₂ bencílico Nbb); 6.44 (d, CH bencílico BHA); 7.32 (m, CH aromáticos BHA); 7.70 (d, CH aromático meta-NO₂); 8.21 (dd, CH aromático para-NO₂); 8.47 (d, CH aromático orto-NO₂); 9.61 (d, NH)

RMN de ¹³C (DMSO d₆, ppm):

45.1 (C metilos); 56.6 (C metino BHA); 59.4 (C metileno Nbb); 123.2 (C2 aromático Nbb); 127.1, 127.6, 128.3 (C2, 3, 4, aromáticos BHA); 131.2, 131.6, 134.2, 136.4 (C1, 4, 5, 6, aromáticos Nbb); 141.9 (C1 aromático BHA); 149.2 (C3 aromático Nbb); 163.6 (CO amida)

IR (KBr, cm⁻¹):

3300, 1630, 1525, 1490, 1450, 1350, 1240, 1030 y 700

Masas (impacto electrónico, m/e):

389 ([M⁺]), 372, 341, 182, 175, 167 (100 %), 165, 132, 104, 77, 58

3.1.9. Síntesis de la N-benzhidril-(4-N-piperidilmetil-3-nitro)benzoilamida

A una solución de 200 mg del análogo monomérico 29 (0.47 mmoles)

en 2 ml de DMF se adicionaron 49.4 μ l (0.5 mmoles) de piperidina y 69.4 μ l (0.5 mmoles) de TEA. La mezcla de reacción se dejó durante 15 min. a 40 C, tras lo cual se eliminó el disolvente a presión reducida. Una vez se extrajo el producto con 20 ml de cloroformo y se avó éste con tres porciones de HCl 0.1 N, se cristalizó en MeOH, obteniéndose en una primera fase 120 mg de cristales amarillos; concentrando las aguas madres se obtuvieron 27 mg más (68.5 % de rendimiento).

Pf 186-188°C; *Rf* 0.12 (DCM/AcOEt, 95:5)

análisis elemental:

calc.	C, 72.70	H, 6.34	N, 9.78
hall.	C, 72.60	H, 6.35	N, 9.59

RMN de ¹H (CDCl₃, ppm):

1.50 (m, CH₂ (3, 4, 5) piperidina); 2.37 (m, CH₂ (2, 6) piperidina); 3.77 (s, CH₂ bencílico Nbb); 6.44 (d, CH bencílico BHA); 6.70 (d, NH); 7.35 (m, CH aromáticos BHA); 7.78 (d, CH aromático meta-NO₂); 8.00 (dd, CH aromático para-NO₂); 8.23 (d, CH aromático orto-NO₂)

RMN de ¹³C (CDCl₃, ppm):

24.1 (C4 metileno piperidina); 26.0 (C3, 5 metilenos piperidina); 54.6 (C2, 6 metilenos piperidina); 57.8 (C metino BHA); 59.5 (C metileno Nbb); 122.8 (C2 aromático Nbb); 127.5, 127.7, 128.8 (C2, 3, 4, aromáticos BHA); 130.8, 131.4, 133.9, 138.0 (C1, 4, 5, 6, aromáticos Nbb); 141.0 (C1 aromático BHA); 149.3 (C3 aromático Nbb); 164.0 (CO amida)

IR (KBr, cm⁻¹):

3340, 2950, 1640 y 1540

Masas (impacto electrónico, m/e):

429 ([M⁺]), 412, 215, 167, 165, 104 y 84 (100 %)

3.1.10. *Síntesis de la N-benzhidril-(4-etiltioetil-3-nitro)benzoilamida*

100 ml de tioetanol (1.4 mmoles) y 85 ml de DIEA (1.4 mmoles)

fueron añadidos a una solución de 200 mg (0.47 mmoles) del análogo monomérico 29 en 4 ml de DMF, dejándose la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min. Tras la eliminación del disolvente, se extrajo el producto en cloroformo y se lavó con tres porciones de 20 ml de HCl 0.1 N. Una vez se secó con sulfato magnésico y se cristalizó en MeOH, se obtuvieron 90.8 mg de un sólido cristalino amarillo verdoso. Tras la adición de una pequeña cantidad de agua se separaron 71.7 mg más (80 % de rendimiento).

Pf 130-132°C; *Rf* 0.26 (DCM)

análisis elemental: calc. C, 67.96 H, 5.46 N, 6.89 S, 7.87
hall. C, 67.93 H, 5.35 N, 6.80 S, 7.94

RMN de ¹H (CDCl₃, ppm):

1.21 (t, CH₃); 2.44 (q, CH₂ etilo); 4.09 (s, CH₂ bencílico Nbb); 6.44 (d, CH bencílico BHA); 6.73 (d, NH); 7.34 (m, CH aromáticos BHA); 7.57 (d, CH aromático meta-NO₂); 8.03 (dd, CH aromático para-NO₂); 8.36 (d, CH aromático orto-NO₂)

RMN de ¹³C (CDCl₃, ppm):

14.4 (C metilo); 26.1 (C metileno etilo); 32.9 (C metileno Nbb); 57.8 (C metino BHA); 123.7 (C2 aromático Nbb); 127.5, 127.8, 128.8 (C2, 3, 4 aromáticos BHA); 131.4, 132.4, 134.2, 137.9 (C1, 4, 5, 6 aromáticos Nbb); 140.9 (C1 aromático BHA); 148.7 (C3 aromático Nbb); 163.9 (CO amida)

IR (KBr, cm⁻¹):

3200, 1630 y 1530

Masas (impacto electrónico, m/e):

406 ([M⁺]), 345, 224, 182, 167, 165 (100 %), 152, 148, 104, 77

3.1.10.1. Intento de síntesis en presencia de TEA

En 1 ml de DMF se disolvieron 10 mg (24 mmoles) del análogo monomérico 29 y se añadieron, a continuación, 2 μl de tioetanol (27 mmoles, 0.15 de exceso) y 3.8 μl de TEA (27 mmoles). Una vez se dejó

toda la noche se analizó por HPLC la mezcla de reacción, ya que se obtuvo un producto muy impurificado por cristalización. En dicho análisis se observó un pico mayoritario con tiempo de retención de 4 min. El RMN de esta mezcla de reacción, una vez eliminado el disolvente, mostró la presencia de dos productos, siendo uno de ellos (el minoritario) el deseado (identificado por los protones del grupo etilo del tioeter).

3.1.10.2. Caracterización de la sal de tetraalquilamonio

Se disolvieron 200 mg del análogo monomérico 29 (0.47 mmoles) en 2 ml de DMF y se adicionaron, a continuación, 654 μ l (4.7 mmoles) de TEA, dejando la mezcla de reacción con agitación magnética durante 15 min a temperatura ambiente. Acto seguido, se eliminó el disolvente al vacío y al aceite obtenido se le añadieron 5 ml de agua, observándose la disolución prácticamente completa del producto. La pequeña cantidad de residuo sólido que quedaba se filtró y liofilizó, obteniéndose un producto amarillo que en contacto con la humedad fundía rápidamente. A causa de su alta higroscopicidad no se pudo cuantificar con exactitud; sin embargo, la ausencia de producto inicial y la pureza de la sal puesta de manifiesto por RMN de protón indicaron un rendimiento prácticamente cuantitativo.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 , ppm):

1.22 (t, CH₃ etilo); 3.25 (q, CH₂ etilo); 4.87 (s, CH₂ bencilo); 6.42 (d, CH BHA); 7.20-7.40 (m, CH aromáticos fenilo); 7.93 (d, CH aromático meta-NO₂); 8.37 (dd, CH aromático para-NO₂); 8.67 (d, CH aromático orto-NO₂); 9.70 (d, NH)

3.2. Ensayos de estabilidad de la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)-benzoilamida en DMF y DMA

Para la determinación de la estabilidad de la N-benzhidril-(4bromometil-3-nitro)benzoilamida en estos dos disolventes, se prepararon tres soluciones de la misma concentración (6.4×10^{-3} M) en DMF comercial, DMF destilada y DMA comercial (2.7 mg en 1 ml, 2.3 mg en 0.83 ml y 2.1 mg en 0.76 ml respectivamente). Una vez se adicionó el producto a los distintos disolventes, se dejaron a temperatura ambiente o a 40°C (en un baño de agua), según los casos, inyectándose directamente al cromatógrafo a distintos tiempos hasta las 6 h.

Para cuantificar los distintos productos formados, se utilizaron análisis de una mezcla patrón, obtenidos con cantidades conocidas de todos los posibles derivados que se pudieran obtener como subproductos de descomposición del disolvente.

3.3. Ensayos previos de la reacción entre la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida y la sal de cesio de la Boc-Gly-OH. Estudio comparativo entre ésta y las sales de cesio del ácido acético, el ácido fórmico y la Boc-Pro-OH

Estos ensayos se realizaron con DMF destilada y DMA destilada.

Con objeto de obtener sal de cesio suficiente para llevar a cabo todas las experiencias descritas en el Capítulo 3, se preparó 1 g de este producto por el método ya descrito (ver preparación de los derivados aminoacilados 37 y 38). Para realizar las distintas pruebas se prepararon soluciones patrón del análogo monomérico 29 y de la sal de cesio en los respectivos disolventes, cuyas concentraciones finales fueron las siguientes: 29: 5.76×10^{-3} M (2.45 mg en 1 ml de DMF) y 5.90×10^{-3} M (2.23 mg en 0.89 ml de DMA) para los ensayos realizados a 20 C; 5.77×10^{-3} M (1.72 mg en 0.70 ml de DMF) y 5.84×10^{-3} M (2.48 mg

en 1 ml de DMA) para los ensayos realizados a 40°C; sal de cesio, 2.61×10^{-2} M (8.0 mg en 10 ml de DMF) y 2.68×10^{-2} M (8.2 mg en 10 ml de DMA).

Para llevar a cabo la reacción, se tomaron 200 μ l de las soluciones anteriormente mencionadas y se añadieron 500 μ l de las respectivas soluciones de la sal de cesio, resultando así unas concentraciones finales para la primera que oscilaron entre 1.61×10^{-3} M y 1.65×10^{-3} M, y 1.76×10^{-3} M y 1.91×10^{-3} M para la segunda (entre 1.1 y 1.2 de exceso).

Previamente al análisis por HPLC, se tomaron 200 μ l de la mezcla de reacción y les fueron adicionados una cantidad equivalente de una solución de HCl 2 mM en dioxano, para detener la reacción.

El estudio comparativo entre las sales de cesio de la Boc-Gly-OH, la Boc-Pro-OH, el ácido fórmico y el ácido acético se llevó a cabo a partir de una solución patrón de 10 mg del análogo monomérico 29 en 10 ml de DMF (2.35×10^{-3} M) y la cantidad correspondiente de cada reactivo equivalente a un 20 % de exceso con respecto al primer producto. Para la obtención de las distintas sales de cesio se partió de 4.9 mg de Boc-Gly-OH, 6.1 mg de Boc-Pro-OH, 1.6 μ l de ácido acético glacial y 1.2 μ l de una solución acuosa al 85 % de ácido fórmico. Estas sales, una vez obtenidas como sólidos, les fueron adicionados 4 ml de DMF, siendo necesaria la sonicación para disgregar los sólidos formados a partir de la Boc-Pro-OH, ácido acético y ácido fórmico. A continuación, se adicionó a cada una de estas soluciones 1 ml de la solución patrón del producto 29, obteniéndose unas concentraciones finales de 5.70×10^{-4} M y 4.71×10^{-4} M respectivamente. Antes de proceder al análisis de cada muestra se detuvo la reacción de forma similar a la del caso anterior, adicionando 10 μ l de la mezcla de reacción a 573 μ l de esta solución ácida; estas cantidades se consideraron idóneas para realizar distintas cuantificaciones en las condiciones cromatográficas utilizadas. Con estos experimentos, se ensayó por primera vez la utilización de naftaleno como patrón interno, el cual se adicionó a las soluciones patrón del producto de partida en una cantidad equivalente a una concentración entre unas cuatro y cinco veces superior a la de dicho producto, debido a la baja absorción que posee con respec-

to al análogo monomérico 29 a la longitud de onda utilizada para llevar a cabo los análisis por HPLC (245 nm).

3.4. Estudio cinético de la reacción de acoplamiento

3.4.1. Determinaciones cinéticas realizadas en DMF

3.4.1.1. Evaluación de las constantes de velocidad

Para llevar a cabo este estudio se preparó una solución patrón 7.34×10^{-3} M del análogo monomérico 29 y 3.34×10^{-2} M de naftaleno (3.12 mg y 4.28 mg en 1 ml de disolvente).

Con respecto a la sal de cesio, se realizaron distintas pesadas y se prepararon soluciones en 10 ml de DMF. Debido a la gran higroscopicidad de estas sales, fué necesario realizar análisis de aminoácidos de cada solución para determinar las concentraciones exactas de sal de cesio; para llevar a cabo esto, se han tomaron $250 \mu\text{l}$ de cada una de ellas y se trataron, una vez eliminado el disolvente al vacío, con $250 \mu\text{l}$ de una solución del 30 % de TFA en DCM durante 30 min para desproteger el grupo amino. Una vez obtenidas las concentraciones de dichas soluciones, se eligieron dos para llevar a cabo el estudio cinético (1.53×10^{-3} M y 2.75×10^{-3} M). Para iniciar la reacción, se tomaron $50 \mu\text{l}$ de la solución patrón del análogo monomérico 29 y naftaleno, y $650 \mu\text{l}$ de las soluciones de sal de cesio, siendo las concentraciones finales de 5.24×10^{-4} M para el producto de partida, y 1.42×10^{-3} M y 5.24×10^{-3} M para la sal de cesio. La temperatura se mantuvo en todo momento a 22°C , llevando a cabo la reacción en una cámara termostatzada. Para detener la reacción a los distintos tiempos se tomaron $30 \mu\text{l}$ de la mezcla, a los que se adicionaron $90 \mu\text{l}$ de

una solución de 2 mM de HCl en dioxano.

Para la determinación de las constantes de velocidad, se supuso una reacción de primer orden para los dos productos de partida, ya que en los dos experimentos realizados la sal de cesio no estaba en un gran exceso. La expresión que se utilizó está representada por la Ecuación 2, en donde C_{st} y C_{s0} son las concentraciones a un tiempo t de reacción y a inicio de ésta, y Br_t y Br_0 son las concentraciones respectivas de análogo monomérico 29.

$$\ln \frac{C_{st} / C_{s0}}{Br_t / Br_0} = k_{obs}t \quad \text{Ecuación 2}$$

3.4.1.2. Medición de la absorbancia de la mezcla de reacción

Para la determinación de la absorbancia del posible intermedio de reacción se utilizaron concentraciones más elevadas de reactivos para facilitar la lectura de la absorción. Paralelamente, se siguió la evolución de ésta por HPLC. Para llevar a cabo el experimento, se partió de una solución del análogo monomérico 29 y naftaleno de concentraciones 6.28×10^{-3} M y 3.28×10^{-2} M respectivamente (2.67 mg y 4.20 mg en 1 ml de DMF). Con respecto a la sal de cesio, se utilizó una solución de 10 ml de DMF de concentración 2.74×10^{-3} M. Para iniciar la reacción se han tomaron 200 μ l de la primera solución y se colocaron en la cubeta del espectrofotómetro. A continuación, le fueron añadidos 500 μ l de la solución de sal de cesio, siendo las concentraciones resultantes de 1.79×10^{-3} M y 1.96×10^{-3} M respectivamente. Alternativamente, se fueron extrayendo muestras para analizarlas por HPLC y registrando medidas de absorción. Para la determinación de las concentraciones de reactivos y productos se procedió de la misma forma que la descrita en el apartado anterior, es decir, se detuvo la reacción de la forma ya indicada y se cuantificó por HPLC.

3.4.1.3. Caracterización de la *N*-benzhidril-(4-formil-3-nitro)benzoilamida

100 mg del análogo monomérico 29 se trataron con 100 μ l de DIEA

en 2 ml de DMF, dejándose a temperatura ambiente durante una semana. Una vez eliminado el disolvente a presión reducida, se eluyó la mezcla de reacción en una columna de gel de sílice (26x2.5 cm), utilizando la siguiente secuencia de eluyentes: CHCl₃/hexano (95:5) (1 h), CHCl₃/AcOEt (95:5) (3 h), CHCl₃/MeOH (98:2) (2 h) y CHCl₃/MeOH (95:5) (120 ml/h, detección a 254 nm). La fracción de mayor absorción, la cual ha eluyó con la segunda mezcla de disolventes, fué analizada por RMN de protón y espectrometría de masas, encontrándose como producto mayoritario la N-benzhidril-(4-formilmetil-3-nitro)benzoilamida. Una vez se analizó por HPLC en las condiciones normales de trabajo (MeOH:AcCN:H₂O, 30/35/30, 0.1 % de TFA) en este tipo de estudios, se identificó como uno de los subproductos de la reacción de acoplamiento.

RMN de ¹H (CDCl₃, ppm):

6.45 (d, CH bencilo); 6.88 (d, NH); 7.20-7.44 (m, CH aromáticos fenilo); 8.00 (d, CH aromático meta-NO₂); 8.20 (dd, CH aromático para-NO₂); 8.53 (d, CH aromático orto-NO₂); 10.45 (s, CH aldehido)

IR (KBr, cm⁻¹):

3260, 1700, 1630, 1520 y 1340

Masas (impacto electrónico, m/e):

360 ([M⁺]); 343, 283, 182, 178, 165, 104 (100 %) y 77

3.4.2. Determinaciones cinéticas realizadas en DCM, AcOEt y Dioxano

3.4.2.1. Acoplamiento en presencia de DIEA

Para el estudio de la evolución del proceso de acoplamiento en los tres disolventes indicados, se pesaron tres muestras de 29.2 mg de análogo monomérico (0.069 mmoles) y se dispusieron en un matraz de dos bocas en las que se colocaron un "septung", para poder extraer muestras con una jeringa, y un globo para mantener el sistema aislado del

exterior y evitar, de esta forma, problemas de evaporación de disolvente. Por otro lado, se pesaron 23.7 mg de Boc-Gly-OH (0.135 mmoles) y se colocaron en el matraz junto con el otro producto. A esta mezcla se le ha añadido entre 22 y 25 mg (según los casos) de naftaleno. A todo ello se le adicionaron 5 ml de disolvente, llevándose, a continuación, a la temperatura deseada en cada caso colocando el matraz en un baño de agua; éstas oscilaron entre 80°C y 82°C cuando se utilizaron dioxano y AcOEt, y entre 39.5°C y 40.5°C para DCM. Para iniciar el proceso, se ha introdujo a través del "septum" 22.9 μ l de DIEA (0.135 mmoles). Las concentraciones finales de los productos de partida fueron 1.38×10^{-2} M para el análogo monomérico 29 y 2.76×10^{-2} M para la Boc-Gly-OH. Para parar la reacción se fueron tomando muestras a diferentes tiempos y se ha neutralizó tal como ya se ha explicado en los otros casos.

3.4.2.2. Acoplamiento en presencia de eter 18-crown-6

Para llevar a cabo los tres procesos anteriores en eter corona se purificó previamente éste, cristalizándolo en AcCN. Por otro lado, se pesaron tres muestras de 23.1 mg de Boc-Gly-OH (0.135 mmoles) y se colocaron en el matraz de dos bocas utilizado con anterioridad. A continuación, se adicionaron 5 ml de agua y se neutralizó con 13.5 mg de bicarbonato potásico (0.135 mmoles). Una vez se liofilizó, se obtuvo la sal potásica del aminoácido como un sólido blanco en los tres casos. Una vez realizado esto, se añadieron 29.2 mg del análogo monomérico y una determinada cantidad de naftaleno que ha osciló entre 22 mg y 25 mg, adicionándose, a continuación, 4 ml de cada uno de los disolventes. Paralelamente, se prepararon tres soluciones patrón del eter corona en los tres disolventes a partir de 6.55 mg de este producto en 1.84 ml de DCM, 9.51 mg en 2.67 ml de AcOEt y 4.37 mg en 4.37 ml de Dioxano (1.35×10^{-2} M en los tres casos). Una vez se alcanzó la temperatura deseada (entre 78°C y 81°C para el Dioxano, entre 78°C y 82°C para el AcOEt, y entre 39.5°C y 40°C para el DCM) se inició la reacción inyectando 1 ml de cada una de las soluciones de eter corona.

En todo momento se mantuvo una agitación intensa para homogeneizar al máximo la suspensión. Para parar la reacción y cuantificar se procedió por el método habitual.

Con respecto a la determinación de las constantes de velocidad, en este caso concreto se ha considerado una cinética de pseudoprimer orden como aproximación, ya que se ha supuesto que la concentración de la sal potásica en solución era baja con respecto a la del otro producto, por lo que se ha utilizado la Ecuación 3 para determinar dichas constantes. En esta expresión, Br_t y Br_0 son las concentraciones de análogo monomérico a un tiempo t de reacción y al inicio de ésta.

$$\ln \frac{Br_t}{Br_0} = - k_{obs}t \quad \text{Ecuación 3}$$

3.4.2.3. *Acoplamiento de distintos aminoácidos por el método del éter corona*

Para realizar estos ensayos, se utilizaron 40 mg de resina para cada uno de ellos, siendo la funcionalización teórica de ésta de 0.63 meq/g (calculada a partir de la resina inicial. Con respecto a los aminoácidos utilizados, se pesaron entre 9 mg y 18 mg, según los casos, lo que equivalió aproximadamente a dos veces de exceso con respecto al número de meq teóricos de centros activos (en este caso, 0.050 meq).

Antes de llevar a cabo la reacción, se prepararon las correspondientes sales potásicas, para lo cual se utilizó una solución acuosa 0.1 M de bicarbonato sódico, la cual se fué adicionando gota a gota hasta neutralización. Los pHs finales oscilaron entre 6.8 y 7.3. Antes de proceder a la neutralización, se colocaron todos los aminoácidos en recipientes de polipropileno de 5 ml de capacidad y se suspendieron en un ml de agua. Una vez alcanzado el pH deseado, las distintas soluciones se llevaron al liofilizador, obteniéndose en todos los casos sólidos blancos.

Por otro lado, se preparó una solución 2 mM de éter 18-crown-6 en dioxano, disolviendo 26.6 mg de este producto en 5 ml de dioxano. A

continuación, una vez se suspendieron las sales potásicas en 1 ml de dioxano y se llevaron a 80-85°C, se adicionaron a través de un "septun" mediante jeringa 250 μ l de la solución de eter corona y se dejó con agitación mecánica durante 1 h. Una vez transcurrido este tiempo, la resina se colocó en una jeringa de polipropileno provista de fritado de polietileno poroso y se filtró y se procedió al siguiente programa de lavados: dioxano, 3x1 min; agua, 3x1 min; DMF, 3x1 min; DCM, 3x1 min y MeOH, 3x1 min. Finalmente, se procedió a la determinación de las funcionalizaciones finales por el ensayo de Gisin.

En los primeros ensayos que se realizaron (Gly y Pro), se utilizó agitación magnética durante la reacción, apareciendo problemas a la hora de filtrar la resina, muy probablemente por degradación de ésta. Por este motivo, el resto de experimentos se realizaron con agitación mecánica, no encontrándose este inconveniente.

3.5. Síntesis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH por el método del eter corona

3.5.1. Síntesis de la Boc-Gly-O-CH₂-Nbb

En un recipiente idéntico al utilizado en el apartado anterior se introdujeron 23.6 mg de Boc-Gly-OH (0.135 mmoles) y 109.5 mg de resina 4-bromometil-Nbb de funcionalización 0.63 meq/g (0.069 mmoles teóricos). A continuación, se adicionaron 5 ml de dioxano, llevándose la suspensión formada a 80°C (finalmente la temperatura osciló entre este valor y los 85°C). Llegado a este punto, se adicionó mediante una jeringa, a través de un "septun", 109 μ l de una solución de eter 18-crown-6 en dioxano (0.0135 mmoles) formada a partir de 32.8 mg del primero en 1 ml del segundo. A distintos tiempos se fueron extrayendo muestras, las cuales se trataron según lo descrito en el apartado anterior. A continuación, se ha pesó una cantidad exacta de polímero y

se determinó su funcionalización por hidrólisis y análisis de aminoácidos, resultando ser de 0.41 meq/g.

3.5.2. Obtención del tetrapéptido protegido

En una jeringa de polipropileno de 5 ml provista de un fritado de polietileno poroso se colocaron 38.6 mg de la Boc-Gly-O-CH₂-Nbb sintetizada en el apartado anterior (0.028 mmoles). A continuación, tras desproteger el grupo amino del aminoácido con TFA al 30% en DCM, procedió como en las otras dos síntesis realizadas. Para el acoplamiento del dipéptido protegido se utilizaron 6.3 mg de HOBt (2.5 de exceso), 31.2 mg de dipéptido protegido (2.5 de exceso) y 9.5 mg de DCC (2.5 de exceso), llevando a cabo la reacción en la mínima cantidad de DMF y dejándose toda la noche. Para el acoplamiento de la Boc-Val-OH se emplearon 9.8 mg de este aminoácido (2.5 de exceso) y 9.3 mg de DCC (2.5 de exceso), dejándose la mezcla durante 2 h. La funcionalización final obtenida fué similar a la encontrada para la peptidil-resina preparada por el método convencional.

La fotólisis se llevó cabo en el recipiente pequeño (25 ml), ya utilizado para los ensayos de distintas condiciones de fotólisis; la resina se suspendió en 5 ml de una solución de TFE al 20 % en DCM y se dejó durante 9 h. El rendimiento final fué del 59 %, determinado por hidrólisis y análisis de aminoácidos sobre la resina fotolizada.

3.6. Experimentos de fotólisis

3.6.1. Fotólisis en solución

Los ensayos de fotólisis en las distintas condiciones se llevaron

a cabo en el recipiente de dos bocas ya mencionado en el apartado correspondiente a la descripción del método fotolítico utilizado. Las cantidades de aminoácido que se emplearon oscilaron entre 19.9 mg y 20.3 mg para la Boc-Gly-O-CH₂-Nbb (entre 1.92×10^{-3} M y 1.95×10^{-3} M, 20 ml de disolvente), y 21.2 mg y 22.0 mg para la Boc-Pro-O-CH₂-Nbb (entre 1.90×10^{-3} M y 1.96×10^{-3} M, 20 ml de disolvente). En la solución formada por cada una de estas muestras se adicionaron cantidades que oscilaban entre los 8.8 mg y 9.9 mg de Boc-Ile-OH como patrón interno para llevar a cabo la cuantificación posterior por análisis de aminoácidos (entre 1.91×10^{-3} M y 2.13×10^{-3} M). La mezcla de disolventes utilizada contuvo siempre un 20 % de TFE; además, según el caso particular estudiado, se adicionó un 5 % (1 ml) de una solución de amoniaco en agua al 30 %, un 5 % (1 ml) de agua y un 2 % (0.4 ml) de DIEA. La mezcla final se llevó a 20 ml con DCM. La temperatura se mantuvo en todo momento entre 0°C y 10°C por el sistema ya comentado. Las muestras a diferentes tiempos se tomaron con una jeringa (50 μ l) y se colocaron en distintos "ependorf" (puesto que cada vez que se realizó esto hubo que habir el recipiente al exterior, se pasó argon durante unos pocos segundos tras la toma de muestra). A continuación, se eliminó el disolvente de todas ellas y se adicionaron 250 μ l de una solución de TFA al 30 % en DCM para desproteger el grupo amino del aminoácido. Tras ello, se volvió a eliminar el disolvente, se diluyó en un tampón adecuado y se inyectó en el analizador de aminoácidos.

3.6.2. Ensayos realizados en fase sólida

Los ensayos se realizaron con las resinas Boc-Val-Lys(Z)-Asp-(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb y la Boc-Asp(Bz)-His(Tos)-Val-Arg(Tos)-Thr(Bz)-Lys(Z)-Gly-O-CH₂-Nbb, siendo similares a los descritos en el apartado anterior. Las cantidades pesadas de la heptapeptidil-resina oscilaron entre 80.8 mg y 97.0 mg (17.6 μ moles y 21.3 μ moles respectivamente), y las correspondientes a la tetrapeptidil-resina oscilaron entre los

34.1 mg y 41.2 mg (11.6 μ moles y 14.0 μ moles). En cada experimento, el polímero se suspendió en 20 ml de disolvente cuya composición fué idéntica en cada caso a la empleada en el apartado anterior. En este estudio sólo se realizó una determinación de funcionalización para cada experimento (a las 7 h de irradiación). Una vez se filtró, lavó y secó la resina, se pesó una cantidad exacta y se realizó la correspondiente hidrólisis y posterior análisis de aminoácidos. Por otro lado, se determinó el contenido de péptido en solución, siendo el valor indicado en cada caso en la parte teórica un promedio de los dos anteriores.

3.7. hidrólisis básica del enlace ester

3.7.1. Preparación de la Boc-Gly-OMe y la Boc-Pro-OMe

3.7.1.1. Boc-Gly-OMe

Se suspendió 1 g de H-Gly-OH (13.3 mmoles) en 10 ml de HCl/MeOH (2.5 M) y se dejó durante una noche con agitación magnética, eliminándose, a continuación, el disolvente a presión reducida. El sólido que quedó se disolvió en 20 ml de dioxano y se le añadieron 10 ml de una solución preparada previamente con 5.3 g de NaOH en 100 ml de agua (13.3 mmoles). Acto seguido, se adicionaron 2.9 g (13.3 mmoles) de Boc₂O y, gota a gota, 10 ml más de la solución básica preparada anteriormente, dejándose la mezcla durante 8 h con agitación magnética. Tras ello, se eliminó el dioxano al vacío y se extrajo el producto con tres fracciones de 20 ml de AcOEt, lavándose la fase orgánica con tres fracciones de HCl 0.1 N (20 ml) y tres fracciones más de la misma cantidad de agua. Una vez secado el producto y eliminado el disolvente

a presión reducida, se purificó el éster en una columna de gel de sílice (2x2.6 cm), utilizándose como eluyente DCM/Hexano (95:5). Una vez realizado esto se obtuvieron 1.74 g de producto final como un aceite (67.6 % de rendimiento).

Rf: 0.84 (CHCl₃/MeOH/AcOH, 73:25:2)

RMN de ¹H (CDCl₃, ppm):

1.45 (s, CH₃ terc-butilo); 3.75 (s, CH₃ ester); 3.91 (d, CH₂ α); 5.15 (d, NH).

RMN de ¹³C (CDCl₃, ppm):

28.2 (C metilo, terc-butilo); 42.2 (C metileno); 52.1 (C metilo, ester); 79.8 (C cuaternario terc-butilo); 155.5 (CO carbamato); 170.7 (CO ester)

IR (film, cm⁻¹):

3460, 2980, 1750, 1700, 1520, 1200 y 1150

Masas (ionización química, e/m):

207 (M + 18 , 100 %), 190 (M + 1)

3.7.1.2. Boc-Pro-OMe

La síntesis de la Boc-Pro-OMe se realizó por el mismo procedimiento que la Boc-Gly-OMe. Se suspendió 1 g de aminoácido (8.7 mmoles) en 10 ml de HCl/MeOH (2.5 M) y se dejó una noche en agitación magnética. Una vez eliminado el disolvente a presión reducida se disolvió el sólido obtenido en 12 ml de dioxano, añadiéndose a continuación 6.5 ml de solución básica (ver apartado anterior). Acto seguido, se adicionaron 2.8 g de Boc₂O (1.5 de exceso) y otros 6.5 ml de solución básica, gota a gota. A las 3 h de reacción (una vez se comprobó por capa fina la ausencia de producto inicial), se eliminó el dioxano al vacío y el aceite obtenido se trató de la misma manera que en el caso anterior. Tras la purificación del producto final por columna, se obtuvieron 940 mg de un aceite (mancha única por capa fina, 47 % de rendimiento).

Rf: 0.89 (CHCl₃/MeOH/AcOH, 73:25:2)

RMN de ^1H (CDCl_3 , ppm):

1.41, 1.46 (s, CH_3 terc-butilo); 2.04 (m, CH_2 β γ); 3.48 (m, CH_2 δ); 3.73 (s, CH_3 metilo ester); 4.22, 4.32 (dd, CH α)

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , ppm):

23.7, 24.4 (C metileno γ); 28.3, 28.4 (C metilo terc-butilo); 29.9, 30.9 (C metileno β); 46.3, 46.6 (C metileno δ); 51.9, 52.0 (C metilo ester); 58.7, 59.1 (C metino α); 79.8 (C cuaternario terc-butilo); 154.8, 155.2 (CO carbamato); 173.6, 173.7 (CO ester)

IR (film, cm^{-1}):

2960, 1740, 1700, 1390, 1200 y 1150

Masas (ionización química, e/m):

247 (M + 18, 100 %), 230 (M + 1)

3.7.2. Ensayos de hidrólisis básica

Para estos ensayos se utilizaron mezclas de dioxano/MeOH/NaOH 4 N y dioxano/Tioetanol/NaOH 4 N. De la misma manera que para las pruebas realizadas para comprobar la estabilidad del enlace ester (ver más adelante), la concentración de los derivados de los dos aminoácidos estudiados fué de 6.53×10^{-3} M (1.41 mg/416 l y 1.04 mg/307 μl para la Boc-Gly-O- CH_2 -Nbb; 1.79 mg/490 μl y 1.75 mg/479 μl para la Boc-Pro-O- CH_2 -Nbb). Las soluciones básicas utilizadas se prepararon a partir de 7.4 ml de dioxano, 2.4 ml de MeOH y 0.24 ml de NaOH 4 N (30:9:1) en un caso, y 7.4 ml de dioxano, 2.36 ml de tioetanol y 0.24 ml de NaOH 4 N, en el otro; las cantidades de base utilizada en la hidrólisis fueron equivalentes a 15 veces de exceso con respecto a los productos a hidrolizar. Las determinaciones se realizaron a los 5 min de haber adicionado la solución básica, tomándose 14.4 μl de ésta y adicionándolos a 300 μl de una solución de HCl 2 mM en dioxano para neutrali-

zarla.

3.7.3. Ensayos de liberación de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH en medio básico

Para realizar estos ensayos se utilizaron 50 mg de tetrapeptidil-resina de funcionalización 0.48 meq/g (0.024 mmoles). A cada una de las resinas se les adicionaron 3.6 ml de una mezcla de dioxano, MeOH o DMAE, e hidróxido sódico 4 N (30:9:1), lo que equivalía a un exceso de 15 veces de base sobre el péptido. En el caso que se utilizó MeOH, se llevaron cabo dos tratamientos de 3 min y cuando se empleó DMAE se realizaron dos de 15 min. A continuación, se adicionaron 360 μ l de una solución de AcOH 1 M para neutralizar el filtrado. Por hidrólisis y análisis de aminoácidos pudo comprobarse la ausencia de péptido sobre la resina en los dos casos. Sin embargo, no se detectó la presencia de péptido por HPLC, apareciendo otros productos no identificados.

3.8. Reactividad del enlace éster frente a distintos nucleófilos

3.8.1. Ensayos preliminares de estabilidad del enlace ester

Para llevar a cabo estas pruebas se utilizaron como reactivos TEA, piperidina, dimetilamina, DIEA y tioetanol. Se pesaron cantidades comprendidas entre 1.0 mg y 1.3 mg del derivado aminoacilado 37, y 1.5 mg y 2.2 mg del derivado aminoacilado 38, colocándose las muestras en diferentes "ependorfs". A continuación, se adicionaron cantidades

equivalentes de disolvente (entre 211 μl y 272 μl para el primer éster, y 298 μl y 422 μl para el segundo), siendo la concentración en todos los casos de 9.41×10^{-3} M. Los diferentes reactivos se utilizaron en cinco veces de exceso, llevándose a cabo su preparación de la forma siguiente: tioetanol: 34.8 μl de éste, 80 μl de DIEA, llevándose todo ello a 10 ml de DMF o DCM; TEA: 65.5 μl en 10 ml de DMF o DCM; piperidina: 46.6 μl en 10 ml de DMF o DCM; dimetilacetamida: 78 μl en 10 ml de DMF o DCM; DIEA: 80 μl en 10 ml de DMF o DCM. Una vez ha transcurrido el tiempo deseado se tomaron 10 μl de cada muestra y se diluyeron en 300 μl de una solución 2 mM de HCl en dioxano para neutralizar la base. Todas las determinaciones se realizaron a los 30 min de haber preparado la disolución del producto en las distintas soluciones de reactivos. Llegado a este punto, se analizó y cuantificado por HPLC.

3.8.2. Estudio de la liberación de Boc-Gly-OH y Boc-Pro-OH con distintos nucleófilos

Puesto que las cantidades de nucleófilos que se utilizaron para este estudio fueron enormemente elevadas con respecto al éster, se tomó una cantidad fija de cada solución de reactivo y se utilizaron cantidades de éster similares, pero no iguales, por lo que las concentraciones de éste no fueron idénticas en todos los casos. Con respecto al derivado aminoacilado 37, las concentraciones de trabajo han oscilaron entre 2.62×10^{-3} M y 3.56×10^{-3} M (entre 1.4 mg y 1.9 mg pesados); para el caso del derivado aminoacilado 38, las concentraciones empleadas estuvieron entre 2.92×10^{-3} M y 4.28×10^{-3} M (entre 1.6 mg y 2.4 mg pesados). Con respecto a las distintas soluciones de nucleófilos, se tomó 1 ml de cada una de ellas, se obtuvieron de la siguiente manera: KCN: 100 mg en 10 ml de una solución al 90 % de DMF en agua, 100 mg en 10 ml de una solución acuosa al 95 % en MeOH; piperidina: 10 ml de dos soluciones, una al 20 % en DMF y otra al 50 % en DCM; NH_3 : para obtener las dos soluciones que se utilizaron, se

hizo burbujear éste en 100 ml de DMF y 100 ml de MeOH, colocados en un baño de hielo durante 12 h, siendo la concentración final de dichas soluciones de 2.6 M y 9.2 M respectivamente (determinadas por diferencia de peso); DIEA: se prepararon dos soluciones, una al 20 % en MeOH y otra al 20 % en tioetanol. Para el paso del $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$, se utilizó una solución 0.05 M en DMF, de la cual se emplearon 370 μl (cinco veces de exceso). Antes de adicionar cada una de estas soluciones al éster, se añadió a cada muestra de derivado aminoacilado una cantidad de naftaleno como patrón interno, la cual osciló entre 2.8 mg y 4.3 mg (2.19×10^{-2} M y 3.33×10^{-2} M respectivamente).

Para cada experimento se realizaron dos determinaciones, utilizando para detener la reacción 20 μl de cada solución y diluyéndolos en la cantidad equivalente de solución de HCl en dioxano para neutralizar el medio (en este caso, se emplearon dos soluciones de este ácido, cuyas concentraciones fueron 2 mM y 0.11 M, según la cantidad a neutralizar). Acto seguido, se realizó el análisis de la muestra por HPLC.

CONCLUSIONES

- Se ha procedido a la síntesis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH, fragmento 1-4 de la toxina II del escorpión "Androctonus australis Hector". Como protector de la cadena lateral del ácido aspártico se ha utilizado el grupo terc-butilo, por lo cual ha sido necesario el uso de una estrategia de terc-butoxicarbonilaminoácidos. De cara a evitar la formación de dicetopiperazinas se ha introducido el ácido aspártico como integrante del dipéptido Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH. Dicho dipéptido se ha sintetizado en solución utilizando como intermedio de síntesis el ester succinimídico de la N -fluorenilmetoxicarbonil-N-benciloxicarbonil-lisina.

- Se ha investigado la posibilidad de síntesis del β -ester terc-butílico del ácido aspártico utilizando métodos de protección simultánea de los grupos funcionales de la posición " α " (amino y carboxilo). En este sentido, se han sintetizado los complejos de cobre y de boro de este aminoácido, no obteniéndose ningún resultado positivo con los métodos que se han aplicado.

- Se ha estudiado el efecto de la piperidina sobre la Boc-Gly-O-CH₂-Nbb y la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb. Mientras que en el primer caso, utilizando piperidina al 20 % en dimetilformamida, se ha detectado únicamente un 0.5% de liberación de aminoácido al cabo de 10 min (tiempo normalmente utilizado para la desprotección del grupo fluorenilmetoxicarbonilo), en el segundo se ha encontrado un 3% aproximadamente de liberación de tripéptido protegido con un tratamiento similar. Alternativamente, el tratamiento de la peptidil-resina durante 2 min con piperidina al 50% en cloruro de metileno, condiciones en las que la desprotección del grupo amino terminal es total, da como resultado una cantidad sensiblemente superior de péptido liberado (aproximadamente 8%).

Para el caso de la aminoacil-resina se ha podido comprobar que un 82 % del producto liberado es glicilamida, siendo el 18 % restante aminoácido libre.

- La Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb se ha fotolizado utilizando diferentes condiciones experimentales. Así, se ha introducido una nueva lámpara en el sistema fotoquímico y se ha incrementado la temperatura, obteniéndose mejores resultados que en las condiciones habituales de trabajo. Sin embargo, el estudio por HPLC del crudo peptídico muestra mayor presencia de impurezas, lo cual no ha sido impedimento para acceder a la purificación del péptido. Una de las impurezas que ha acompañado al producto en prácticamente todos los crudos fotolíticos ha sido identificada como ftalato de dioctilo, compuesto que se puede encontrar en disolventes como el metanol.

- Para la purificación de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH se han ensayado 3 métodos cromatográficos, HPLC semopreparativo, cromatografía de media presión y cromatografía de exclusión molecular, con resultados diversos. Con respecto al primer método, se han conseguido encontrar unas condiciones isocráticas de separación aceptables (36% de agua, 39% de AcCN, 25% de DMF, 0.1% de ácido propiónico; 3 ml/min; ALTEX-C18), llegándose a cargar hasta 17 mg de crudo de pureza superior al 90 %. Sin embargo, el rendimiento de purificación ha sido sólo del 40 %, resultado que se ha atribuido a la adsorción irreversible del producto sobre la columna. La cromatografía de media presión se ha mostrado ineficaz para resolver este problema particular. La cromatografía de exclusión molecular ha sido la que ha dado los mejores resultados, pudiéndose recuperar más del 95 % de péptido de elevada pureza, inyectando 37 mg de crudo procedente de fotólisis (Sephadex LH-20, metanol, 30 ml/h).

- Se ha ensayado el acoplamiento de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH sobre el fragmento 5-64 de la toxina (unido a una resina benzhidrilamina), encontrándose unas condiciones con las que se ha conseguido un 99 % de rendimiento (5 veces de exceso de péptido, diciclohe-

xilcarbodiimida/hidroxibenzotriazol, dimetilmorfolina; 24 h).

- Se ha estudiado la posible formación de péptido epímero durante el acoplamiento de la Fmoc-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH sobre la H-Gly-O-CH₂-Nbb. Para ello, se ha diseñado una nueva síntesis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb, a partir de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-OH y de la aminoacil-resina en presencia de dimetilaminopiridina. Una vez realizada la fotólisis, se ha podido detectar por HPLC un nuevo producto peptídico que se ha podido identificar por cromatografía de gases en columna capilar quiral acoplada a espectrometría de masas como el tetrapéptido correspondiente epimerizado en el ácido aspártico. La cuantificación de este producto por hidrólisis y análisis de aminoácidos ha dado un valor de un 38 % con respecto a la cantidad total. Una vez se ha identificado el epímero, se ha podido comprobar por HPLC la ausencia de éste en los crudos de las diferentes fotólisis que se han realizado.

- Para el estudio de la formación de péptido-imida en distintas condiciones se han sintetizado la Boc-Val-Lys(OC1Z)-Asp(cHex)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-CH₂-Pam, la Boc-Val-Lys(OC1Z)-Asp(Bz)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-CH₂-Pam y la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-CH₂-Pam (péptido correspondiente al fragmento 1-6 de la toxina II del escorpión "Androctonus australis Hector"). Para las 2 primeras peptidil-resinas se ha seguido la metodología habitual de Boc-aminoácidos; con respecto a la tercera peptidil-resina, se ha aplicado una estrategia de Fmoc-aminoácidos a partir de la introducción del ácido aspártico.

- A partir de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-CH₂-Pam, por tratamiento con trietilamina al 10 % en diclorometano, se ha preparado la correspondiente péptido-imida. La separación del péptido libre y la imida se ha conseguido mediante cromatografía de intercambio iónico (carboximetilcelulosa), con un rendimiento de purificación del 93 %. La caracterización de ambos productos se ha llevado a cabo por RMN de ¹H, IR y masas (FAB). El tratamiento de la imida con trietilamina al 5 % en agua da lugar a los péptidos "α" y

" β " en una proporción de 1 a 3 (cuantificado mediante HPLC), los cuales se han caracterizado con la ayuda de la digestión enzimática con Leucinoaminopeptidasa. Se ha puesto a punto un método analítico basado en el HPLC para estudiar la formación de imida en las diferentes condiciones utilizadas (A: agua, 0.045 % de TFA; B: AcCN, 0.035 % de TFA; del 10% al 20% en 10 min; 1.5 ml/min; 280 nm; VYDAC C-18).

- El tratamiento con fluoruro de hidrógeno de las 3 hexapeptidil-resinas (0°C, 10 % de para-cresol; condiciones "High") ha dado lugar a cantidades similares de imida (entre el 5 y el 6%). Por otro lado, se han ensayado diferentes tratamientos ácidos sobre la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-CH₂-PAM, encontrándose el valor más elevado (12% de imida) cuando se ha utilizado fluoruro de hidrógeno en condiciones "Low-High". Con respecto al "scavenger" utilizado, no se ha detectado diferencia alguna entre la utilización de p-cresol y anisol.

- El tratamiento de las tres hexapeptidil-resinas con diisopropiletilamina previamente a la rotura con fluoruro de hidrógeno, no tiene efectos apreciables en la formación de péptido-imida (6%). La piperidina muestra un efecto mucho más drástico, siendo la formación de imida prácticamente cuantitativa a los 10 min cuando la cadena lateral del ácido aspártico ha estado protegida con el grupo bencilo. Cuando el grupo protector ha sido el ciclohexilo se ha encontrado un 2.5 % de subproducto en el mismo tiempo (correspondiente a un ciclo de desprotección de un grupo fluorenilmetoxicarbonilo). Para el grupo terc-butilo como protector, se ha encontrado un 0.3 % de imida en las mismas condiciones. Los valores obtenidos con respecto a la piperidina se han obtenido teniendo en cuenta la formación de los péptidos-piperidida " α " y " β " a partir de la imida, los cuales se han identificado por hidrólisis y análisis de aminoácidos e hidrólisis enzimática con Leucinoaminopeptidasa. La separación de los dos productos en las condiciones cromatográficas utilizadas ha sido perfecta.

- Se ha estudiado la síntesis del Boc-Asp(Fm)-OH de cara a su

utilización en la síntesis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Fm)-Gly-Tyr(cHex)-Ile-O-CH₂-Pam. En este sentido, se han ensayado los métodos utilizados en los intentos de síntesis del H-Asp(Bu^t)-OH. Mientras que los resultados obtenidos con el complejo de cobre han sido negativos, la utilización del complejo de boro se ha mostrado especialmente útil para la síntesis de este derivado. Así, utilizando como productos de partida el fluorenilmetanol y la dicitclohexilcarbodiimida, en presencia de DMAP, se han conseguido rendimientos superiores al 80 % en todas las etapas de síntesis.

- Se ha realizado un estudio preliminar de la utilización de los esteres de fluorenilmetilo, 3-picolilo y 4-picolilo para la síntesis de H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH, de cara a minimizar la formación de succinimida. Los tres grupos protectores se han mostrado poco estables en las condiciones ácidas utilizadas para la liberación del péptido de la resina (HF, 10% de para-cresol, 10°C, 1 h; entre un 25% y un 40% de desprotección), detectándose en todos los casos la presencia de péptido-imida (entre un 3% para el ester de fluorenilmetilo y un 12% para el ester de 4-picolilo). Con respecto al ester de fluorenilmetilo, los resultados obtenidos en los ensayos realizados con piperidina y fluoruro de tetrabutilamonio muestran que la desprotección ha sido cuantitativa en las condiciones utilizadas (piperidina al 20% en DMF; solución de fluoruro de tetrabutilamonio 0.05 M en DMF). Para los esteres de picolilo, la reducción con paladio/carbono/formiato amónico ha sido cuantitativa a los 10 min. Salvo para el caso del ester de 3-picolilo, se ha detectado un aumento en la formación de péptido-imida durante la reacción de desprotección (un 30% aproximadamente para el ester de fluorenilmetilo y un 7% para el ester de 4-picolilo).

- Se ha ensayado en solución un modelo del α -(4-bromometil-3-nitro-4-benzamido)encilpoliestireno para su aplicación en el estudio del acoplamiento del primer aminoácido y en la búsqueda de nuevas condiciones de reacción. En este sentido, se han sintetizado la N-benzhidril-(4-bromometil-3-nitro)benzoilamida, la N-benzhidril-(4-terc-butoxicarbonilgliciloximetil-3-nitro)benzoilamida y la N-benzhi-

dril-(4-terc-butoxicarbonilproliloximetil-3-nitro)benzoilamida, siguiendo una metodología similar a la utilizada en fase sólida.

- Los primeros resultados obtenidos han puesto en evidencia la relativa estabilidad del derivado halogenado en DMF o DMA, dependiendo de la pureza del disolvente. En este sentido, el agua, la dimetilamina, el ácido fórmico y el ácido acético pueden reaccionar con este producto para dar los productos de sustitución nucleófila, hecho que se ha confirmado mediante la síntesis de éstos en solución, es decir, la N-benzhidril-(4-hidroximetil-3-nitro)benzoilamida, la N-benzhidril-(4-dimetilaminometil-3-nitro)benzoilamida, la N-benzhidril-(4-formiloximetil-3-nitro)benzoilamida y la N-benzhidril-(4-acetoximetil-3-nitro)benzoilamida.

- Durante el acoplamiento de la Boc-Gly-OH sobre el derivado halogenado se han detectado procesos de oxidación-reducción, pudiéndose aislar uno de los productos resultantes, la N-benzhidril-(4-formilmetil-3-nitro)benzoilamida, de ensayos realizados en medio básico. Este producto se ha caracterizado por HPLC, por lo que se ha podido comprobar su presencia en la mezcla de la reacción de acoplamiento. En conjunto, todas estas reacciones competitivas han hecho descender entre un 5 % y un 10 % el rendimiento de acoplamiento.

- Se han realizado ensayos de acoplamiento en diclorometano, dioxano y acetato de etilo, en presencia de diisopropiletilamina y la sal potásica del aminoácido con eter 18-crown-6. Mientras que en el primer caso la reacción ha sido extremadamente lenta (del 1% al 3% en 30 min), el segundo método ha dado resultados satisfactorios, encontrándose los porcentajes más elevados para el acetato de etilo y el dioxano (más del 70 % de rendimiento a los 15 min. en los 2 casos); sin embargo, la pureza del producto final ha sido superior para el segundo disolvente (95% aproximadamente) que para el primero (90% aproximadamente). Este método se ha aplicado en fase sólida con los aminoácidos más usuales, encontrándose los valores de funcionalización más elevados para la Boc-Gly-OH y la Boc-Pro-OH (1 h de reacción), los

cuales han sido similares al valor obtenido para el primero por el método de la sal de cesio, utilizando como disolvente dimetilacetamida. Por otro lado, se han obtenido resultados negativos para la asparagina, glutamina y arginina, no detectándose prácticamente acoplamiento. En estas mismas condiciones se ha realizado la síntesis de la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-OH, obteniéndose por hidrólisis y análisis de aminoácidos una funcionalización similar que la encontrada en la síntesis de este péptido en las condiciones habituales.

- Se ha ensayado la aplicabilidad del modelo monomérico al estudio de la liberación del péptido de la resina por distintos métodos: fotólisis, hidrólisis básica y nucleófilos. Con respecto al primer caso, se ha comprobado que la diisopropiletilamina puede mejorar los rendimientos tanto en fase heterogénea como en fase homogénea, así como el nulo efecto de la presencia de agua en el medio. Se ha puesto también en evidencia una competencia frente al propio mecanismo de fotólisis del ataque nucleófilo sobre el grupo carbonilo del aminoácido cuando se realiza la reacción en presencia de amoníaco. Este mismo mecanismo se ha observado en la hidrólisis básica en presencia de un alcohol, en la que se obtiene en una primera etapa el correspondiente ester del aminoácido utilizado. Este último método se ha mostrado ineficaz a la hora de aplicarlo sobre la Boc-Val-Lys(Z)-Asp(Bu^t)-Gly-O-CH₂-Nbb por descomposición del péptido. Con respecto a la utilización de nucleófilos, tanto el ión cianuro como el fluoruro han dado buenos resultados con los dos aminoácidos estudiados (95% de MeOH, 10 eq de KCN, 7 h, 100%; solución de fluoruro de tetrabutilamonio 0.05 M en DMF, 5 eq, 10 min, 100%).

BIBLIOGRAFIA

- (1) E. Giralt, F. Albericio, E. Pedroso, C. Granier y J. Van Rietschoten; *Tetrahedron*, 38, 1193 (1982)
- (2) E. Pedroso, A. Grandas, M. Saralegui, E. Giralt, C. Granier y J. Van Rietschoten; *Tetrahedron*, 38, 1183 (1982)
- (3) G. R. Marshall y R. B. Merrifield; *Biochemistry*, 4, 2394 (1965)
- (4) M. Bodanszky y A. M. Ondetti; *Peptide Synthesis*. New York, Interscience (1965)
- (5) F. Albericio, E. Nicolás, J. Josa, A. Grandas, E. Pedroso, E. Giralt, C. Granier y J. Van Rietschoten; *Tetrahedron*, 43, 5961 (1987)
- (6) E. Giralt, R. Eritja, E. Pedroso, C. Granier y J. Van Rietschoten; *Tetrahedron*, 42, 691 (1986)
- (7) A. Grandas, E. Pedroso, E. Giralt, C. Granier y J. Van Rietschoten; *Tetrahedron*, 42, 6703 (1986)
- (8) J. M. Sabatier, M. Tessier-Rochat, C. Granier, J. Van Rietschoten, E. Pedroso, A. Grandas, F. Albericio y E. Giralt; *Tetrahedron*, 43, 5973 (1987)
- (9) E. Giralt, R. Eritja y E. Pedroso; *Tetrahedron Letters*, 22, 3779 (1981)
- (10) K. Suzuki, K. Nitta y N. Endo; *Chem. Pharm. Bull.*, 23, 222 (1975)
- (11) G. W. Anderson, J. E. Zimmerman y F. M. Callahan; *J. Amer. Chem. Soc.*, 85, 3039 (1963)
- (12) W. Anderson, J. E. Zimmerman y F. M. Callahan; *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 1839 (1964)

- (13) E. Wünsch y F. Drees; Chem. Ber., 99, 110 (1966)
- (14) F. Weygand, D. Hoffmann y E. Wünsch; Z. Naturforsch., Teil B 21, 426 (1966)
- (15) F. Weygand, D. Hoffmann y A. Prox; Z. Naturforsch., Teil B 23, 279 (1968)
- (16) J. E. Zimmerman y G. W. Anderson; J. Amer. Chem. Soc., 89, 7151 (1967)
- (17) D. H. Rich y S. K. Gurwara; J. Amer. Chem. Soc., 97, 1575 (1975)
- (18) B. F. Gisin; Helvetica Chimica Acta, 56, 1476 (1973)
- (19) Su-S. Wang, B. F. Gisin, D. P. Winter, R. Makofske, I. D. Kulesha, C. Tzongraki y J. Meienhofer; J. Org. Chem., 42, 1286 (1977)
- (20) G. Dijkstra, W. H. Kruizinja y R. M. Kellogg; J. Org. Chem., 52, 4230 (1987)
- (21) J. M. Stewart y J. D. Young; " Solid Phase Peptide Synthesis " W. H. Freeman and Co., San Francisco, 70 (1984)
- (22) E. Giralt, C. Celma, M. D. Ludevid y E. Pedroso; Int. J. Peptide Protein Res., 29, 647 (1987)
- (23) J. M. Stewart y J. D. Young; Solid Phase Peptide Synthesis, 16, 27, 55-56, 62-63; W.H. Freeman and Company, San Francisco (1984)
- (24) J. Riddick y W. B. Bunger; Techniques of chemistry (II), ORGANIC SOLVENTS (physical properties and methods of purification); Wiley-Interscience, 837, 844 (1970)
- (25) W. König y R. Geiger; Chem. Ber., 103, 788 (1970)
- (26) Idem; 2024 (1970)
- (27) Idem; 2034 (1970)
- (28) R. Camble, R. Garner y G. T. Young; J. Chem. Soc., (c), 1911 (1969)

- (29) R. Camble, R. Garner y G. T. Young; *Nature*, 217, 247 (1968)
- (30) J. Rizo, F. Albericio, G. Romero, C. García-Echeverría, J. Clavet, C. Muller, E. Giralt y E. Pedroso; *J. Org. Chem.*, (1988), en prensa
- (31) E. Pedroso, A. Grandas, J. C. Amor y E. Giralt; *J. of Chrom.*, 409, 281 (1987)
- (32) F. Albericio, M. Pons, E. Pedroso y E. Giralt; enviado para publicación (1987)
- (33) H. A. Billiet; *Overdrunknit de Medelingen von de Vlaamse Chemische Vereniging*, 33, 103 (1971)
- (34) I. J. Galpin, G. W. Kenner, S. R. Ohlsen y R. Ramage; *J. Chrom.*, 106, 125 (1975)
- (35) U. V. Ulyashin, V. I. Deigin, V. T. Ivanov y Y. A. Ovchinnikov; *J. Chrom.*, 215, 263 (1981)
- (36) M. Bergmann y L. Zervas; *Biochem. Z.*, 203, 280 (1928)
- (37) J.R. McDermott y N.L. Benoiton; *Can. J. Chem.*, 51, 2562 (1973)
- (38) M. Bodanszky y A. Bodanszky; *Chem. Commun.*, 591 (1967)
- (39) M.W. Williams y G.T. Young; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1194 (1972)
- (40) J. Covacs, R. Cover, G. Jham, Y. Hsieh y T. Kalas; "Peptides: Chemistry. structure and Biology" (R. Walter and J. Meienhofer, eds.), 317. Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor
- (41) G.W. Anderson, F.M. Callahan y J.E. Zimmerman; *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, 44, 51 (1965)
- (42) M. Bodanszky y C.A. Birkhimer; *Chimia*, 14, 368 (1960)
- (43) J. Rivier, R. Wolbers y R. Burgus; "Peptides, Proceedings of the Fifth American Peptide Symposium", 52 (1977)
- (44) J. Rivier y R. Burgus; "Peptides, Proceedings of the Fourteenth European Peptide Symposium", 235. North-Holland Publ. Amsterdam (1976)

- (45) R. Steinauer, F.M.F. Chen y N.L. Benoiton; *J. of Chromatography*, 325, 111 (1985)
- (46) Y. Kiso, M. Satomi, T. Miyazaki, H. Hiraiwa y T. Akita; *Pep. Chem.*, 71 (1980)
- (47) J.P. Gamet, R. Jacquier y J. Verducci; *Tetrahedron*, 40, 1995 (1984)
- (48) G. Barany y R.B. Merrifield; "Peptides: Chemistry, structure and Biology" (E. Gross and J. Meienhofer, eds.), 113. Academic Press Publ., New York (1979)
- (49) P. Edman; *Acta Chem. Scand.*, 4, 277 (1950)
- (50) M. Bodanszky; *Synthesis*, 333 (1981)
- (51) E. Sondheim y R. W. Holley; *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 2467 (1954)
- (52) A. R. Battersby y J. C. Robinson; *J. Chem. Soc.*, 259 (1955)
- (53) R. W. Hanson y H. N. Rydon; *J. Chem. Soc.*, 836 (1964)
- (54) G. Fölsh; *Acta Chem. Scand.*, 20, 459 (1966)
- (55) S. A. Bernhard, A. Berger, J. H. Carter, E. Katchalski, M. Sela y Y. Shalitin; *J. Amer. Chem. Soc.*, 84, 2421 (1962)
- (56) E. E. Haley, B. J. Corcoran, F. E. Dorer y D. L. Buchanan; *Biochemistry*, 5, 3229 (1966)
- (57) M. Bodanszky, G. F. Sigler y A. Bodanszky; *J. Amer. Chem. Soc.*, 95, 2352 (1973)
- (58) M. A. Ondetti, A. Deer, J. T. Sheehan, J. Plusec y O. Koey; *Biochemistry*, 7, 4069 (1968)
- (59) M. Bodanszky y J. Z. Kwei; *Int. J. Peptide. Protein Res.*, 12, 69 (1978)
- (60) J. Martinez M. Bodanszky; *Int. J. Peptide Protein Res.*, 12, 277 (1978)
- (61) M. Bodanszky, J. C. Tolle, S.S. Desmane y A. Bodanszky; *Int.*

- J. Protein Res., 12, 57 (1978)
- (62) C.C. Yang y R. B. Merrifield; J. Org. Chem., 41, 1032 (1976)
- (63) T. Baba, H. Sujiyama y S. S. Seto; Chem. Pharm. Bull., 21-1, 207 (1973)
- (64) J. Blake; Int. J. Peptide Protein Res., 13, 418 (1979)
- (65) J. P. Tam, T. W. Wang, M. K. Riemen, F. S. Tjoeng y R. B. Merrifield; Tetrahedron Letters, 42, 4033 (1979)
- (66) M. Fujii, M. Nomizu, S. Futaki, A. Ojaka, S. Funakoshi, K. Akaji, K. Watanabe y H. Yajima; Chem. Pharm. Bull., 34, 864 (1986)
- (67) S. Kiyama, Y. Ooi, K. Kitagawa, T. Nakamura, T. Akita, M. Kogire, R. Hosotani, K. Inoue, T. Tobe y H. Yahima; Int. J. Peptide Protein Res., 29, 533 (1987)
- (68) G. W. Kenner y J. H. Seely; J. Amer. Chem. Soc., 94, 3259 (1972)
- (69) N. Mitsuyasu, M. Waki, T. Kato y N. Izumiya; Mem. Fac. Sci. Kyushu Univ. Ser., C 1970, 97; C. A., 73, 88154 (1970)
- (70) M. A. Ondetti, J. Pluscec, F. S. Sabo, J. T. Sheehan y N. Williams; J. Amer. Chem. Soc., 92, 195 (1970)
- (71) J. C. Anderson, G. W. Kenner, J. K. Macleod y R. C. Sheppard; Tetrahedron, Suppl. 8, Part I, 39 (1966)
- (72) G. Perseo, R. Forino, H. Galantino, B. Gioia, V. Malatesta y R. De Castiglione; Int. J. Peptide Protein Res., 27, 51 (1986)
- (73) M. Bodanszky y S. Natarajan; J. Org. Chem., 40, 2495 (1975)
- (74) S. Natarajan y M. Bodanszky; J. Org. Chem., 41, 1269 (1976)
- (75) R. L. Prestidge, D. R. K. Harding y W. S. Hancock; J. Org. Chem., 41, 2579 (1976)
- (76) M. Bodanszky y J. Martinez; J. Org. Chem., 43, 3071 (1978)
- (77) K. Suzuki, K. Nitta y Y. Sasaki; Chem. Pharm. Bull., 24, 3025 (1976)

- (78) S. S. Wang, C. C. Yang, I. D. Kulesha, M. Sonenberg y R. B. Merrifield; *Int. J. Peptide Protein Res.*, 6, 103 (1974)
- (79) P.G. Pietta y G.R. Marshall; *J. Chem. Soc.*, D, 65 (1970)
- (80) S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada y H. Sugihara; *Bull. Chem. Soc. Japan*, 40, 2164 (1967)
- (81) J. Lenar y A. B. Robinson; *J. Amer. Chem. Soc.*, 89, 181 (1967)
(patente Toho Kagei Co. LTD 476 Ina, Minoh-Shi, Osaka, Japan)
- (82) A. R. Mitchell, S. B. H. Kent, H. Engelhard y R. B. Merrifield; *J. Org. Chem.*, 43, 2845 (1978)
- (83) L. A. Carpino; *J. Amer. Chem. Soc.*, 79, 4427 (1957)
- (84) S. S. Wang y R. B. Merrifield; *J. Amer. Chem. Soc.*, 91, 6488 (1969)
- (85) J. M. Stewart y J. D. Young; *Solid phase peptide synthesis* (2 edition); Pierce Chemical Company (Rockford, Illinois) 3, (1984)
- (86) C. D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Zundell y J. D. Hang; *Int. J. Peptide Protein Res.*, 15, 5966 (1980)
- (87) M. Tessier, F. Albericio, E. Pedroso, A. Grandas, R. Eritja, F. Giralt, C. Granier y J. Van Rietschoten; *Int. J. Peptide Protein Res.*, 22, 125 (1983)
- (88) L. Chauffe, L. J. Andrews y R. M. Keefer; *J. Org. Chem.*, 31, 3758 (1966)
- (89) R. Ledger y F. H. C. Stewart; *Aus. J. Chem.*, 18, 1477 (1965)
- (90) L. A. Carpino y G. Y. Han; *J. Org. Chem.*, 37, 3404 (1972)
- (91) D. Yamashiro y C. H. Li; *J. Amer. Chem. Soc.*, 95, 1310 (1973)
- (92) R. B. Merrifield; *J. Org. Chem.*, 29, 3100 (1964)
- (93) H. Engelhard y R. B. Merrifield; *J. Amer. Chem. Soc.*, 100, 3559 (1978)
- (94) H. L. Jin, Y. Lin, C. Xi Li, Y. H. Yieh, Ai H. Chi, Y. Lu, C. Zhao, H. Z. Jin y C. Y. Hsing; *Chromatographia*, 17(4), 205

- (1983)
- (95) L. Gozzoni y P. C. Montecucchi; *J. of Chromatography*, 362, 138 (1986)
- (96) K. Hofmann, H. Yajima, T. Lin, H. Yanaihara, C. Yanaihara y J. Humes; *J. Amer. Chem. Soc.*, 84, 4481 (1962)
- (97) Kurt Wüthrich; *NMR in biological research: peptides and proteines*, (North Holland Publishing Company), 46-47 (1976)
- (98) C. A. G. Haashoot, F. A. A. M. De Leeuw y C. Altona; *Tetrahedron*, 36, 2783 (1980)
- (99) E. Pretch, T. Clerc, J. Seibl y W. Simon; *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*, Vertix, ed. Alhambra, 207 (1980)
- (100) J. P. Tam, W. F. Heath y R. B. Merrifield; *J. Amer. Chem. Soc.*, 108, 5242 (1986)
- (101) B. W. Erickson y R. B. Merrifield; *J. Amer. Chem. Soc.*, 95, 3750 (1973)
- (102) H. Irie, N. Fujii, H. Ogawa, H. Yajima, H. Fujino y C. Shinagawa; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 922 (1976)
- (103) P. Tam, W. F. Heath y R. B. Merrifield; *J. Amer. Chem. Soc.*, 105, 6442 (1983)
- (104) I Schön, R. Colombo y A. Csehi; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 505 (1983)
- (105) R. Schwyzer, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, W. Rittel y H. Zuber; *Helv. Chim. Acta*, 46, 1975 (1963)
- (106) M. Bodansky, M. Bednarek, A. Bodanszky y J. C. Tolle; "Peptides, Proc. 16 Eur. Pept. Simp." (K. Brunfeld, ed.), Scriptor, Copenhagen, 93 (1981)
- (107) M. A. Bednarek y M. Bodanszky; *Int. J. Peptide Protein Res.*, 21, 196 (1983)
- (108) H. Kessler; *Tetrahedron letters*, 24, 281 (1983)

- (109) A. Berger y E. Katchlaski; J. Amer. Chem. Soc., 73, 4084 (1951)
- (110) P. M. Bryant, R. M. Moore, P. J. Pimlott y G. T. Young; J. Chem. Soc., 3868 (1959)
- (111) W. E. Hanby, S. G. Waley y J. Watson; J. Chem. Soc., 3239 (1950)
- (112) St. Guttman y R. A. Boissonas; Helv. Chim. Acta, 41, 1852 (1958)
- (113) T. Hayakawa, H. Nishi, J. Noguchi, S. Ikeda, T. Yamashita y T. Isemura; Nippon Kagaku Zasshi, 82, 597 (1961)
- (114) R. Ledger y F. H. C. Stewart; Aus. J. Chem., 18, 333 (1965)
- (115) A. Neuberger y F. Sanger; Biochem. J., 37, 515 (1943)
- (116) R. L. M. Singe; Biochem. J., 42, 99 (1948)
- (117) A. C. Kurtz; J. Biol. Chem., 122, 422 (1938)
- (118) A. C. Kurtz; J. Biol. Chem., 180, 1253 (1949)
- (119) W. A. R. Van Heeswijk, M. J. D. Eenink y J. Feijen; Synthesis, 744 (1982)
- (120) N. A. Ramaiah, Vishnu; Anal. Chem. Acta, 16, 569 (1957)
- (121) P. Pfeiffer y H. Werner; Z. Physiol. Chem., 246, 212 (1937)
- (122) F. H. C. Stewart; Aust. J. Chem., 21, 1639 (1968)
- (123) M. Bodanszky y D. T. Fagan; Int. J. Peptide Protein Res., 10, 375 (1977)
- (124) B. Neises y W. Steglich; Angew. Chem., 90, 556 (1978)
- (125) V. F. Pozdnev; Bioorg. Khim., 10, 912 (1984)
- (126) A. Kozhich y A. Ostrovsky; "Peptides, Proc. 19 Eur. Pept. Symp." (D. Theodoropoulos, ed.), Chalkidiki, Greece, 75 (1986)
- (127) G. W. Kabalka, M. Varma y R. S. Varma; J. Org. Chem., 51, 2386 (1986)
- (128) M. Ruiz-Gayo, F. Albericio, E. Pedroso y E. Giralt; J. Chem.

- Soc., Chem. Commun., 1501 (1986)
- (129) G. H. L. Nefkens y B. Zwanenburg; *Tetrahedron*, 39, 2995 (1983)
- (130) M. Itoh, D. Hagiwara y T. Kamiya; *Bull. Chem. Soc. of Japan*, 50, 718 (1977)
- (131) D. Yamashiro y C. H. Li; *J. Org. Chem.*, 38, 591 (1973)
- (132) M. Ueki, K. Kai, M. Amemiya, H. Horino y H. Oyamada; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 414 (1988)
- (133) R. Garner y G. T. Young; *J. Chem. Soc. (C)*, 50 (1971)
- (134) P. Rivaille, A. Robinson, M. Kanen y G. Milhaud; *Helvetica Chimica Acta*, 54, 296 (1971)
- (135) Herry March; "Advanced Organic Chemistry. Reactions, mechanisms
- (136) Gibson in Patai, "The chemistry of the amino group", Interscience, 45, New York (1968)
- (137) F. Terrier; *Chem. Rev.*, 82, 2 (1982)
- (138) Fendler y col.; *J. Amer. Chem. Soc.*, 88, 1237 (1966)
- (139) P. N. Preston y G. Tennant; *Chem. Rev.*, 72, 627 (1972)
- (140) W. B. Dickinson; *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 3580 (1964)
- (141) H. B. Hass y M. L. Bender; *J. Amer. Chem. Soc.*, 71, 1767 (1949)
- (142) Kornblum, Jones and Anderson; *J. Amer. Chem. Soc.*, 81, 4113 (1959)
- (143) R. B. Merrifield; *Biochemistry*, 3, 1385 (1964)
- (144) O. Schou, D. Bucher y E. Nebelin; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, V357, 103 (1976)
- (145) B. Amit, E. Hazum, M. Fridkin y A. Patchornik; *Int. J. Peptide Protein Res.*, 9, 91 (1977)
- (146) A. Loffet y C. Dremier; *Experientia*, 27, 1003 (1971)
- (147) K. Suzuki y N. Endo; *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 1143 (1977)
- (148) F. Albericio; Tesis Doctoral (1981)

- (149) D. H. Rich y S. K. Gurwara; Chem. Commun., 610 (1973)
- (150) M. W. Monahan y C. Gilon; Biopolymers, 12, 2513 (1973)
- (151) R. Roeske y P. D. Gesellchen; Tetrahedron Lett., 3369 (1976)
- (152) K. Okawa; Bull. Chem. Soc. Jpn., 29, 486 (1956)
- (153) T. Mizoguchi, G. Levin y D. W. Woolly; J. Org. Chem., 33, 903 (1968)
- (154) J. Ramachandran y C. H. Li; J. Org. Chem., 27, 4006 (1962)
- (155) T. Fujii y S. Sakakibara; Bull. Chem. Soc. Jpn., 43, 3954 (1970)
- (156) D. F. Veber, J. D. Milkowski, S. L. Varga, R. G. Denkewalter y R. Hirschmann; J. Amer. Chem. Soc., 94, 5456 (1972)
- (157) A. Previero, M. A. Coletti-Previero y J. C. Cavadore; Biochem. BIOPHYS. ACTA, 147, 453 (1967)
- (158) B. W. Erickson y R. B. Merrifield; J. Amer. Chem. Soc., 95, 3757 (1973)
- (159) A. Marglin y R. B. Merrifield; J. Amer. Chem. Soc., 88, 5051 (1966)
- (160) R. W. Roeske; J. Org. Chem., 28, 1251 (1963)
- (161) W. König y A. Volk; Chem. Ber., 110, 1 (1977)
- (162) C. A. Meyers, R. T. Havran, I. L. Shwartz y R. Walter; Chem. Ind. (London), 5, 136 (1969)
- (163) H. Zahn y E. T. Fölsche; Chem. Ber., 102, 2158 (1969)
- (164) P. Sieber; Helv. Chim. Acta, 60, 2711 (1977)
- (165) L. Kisfaludy, I. Schön, M. Rényer y S. Görög; J. Amer. Chem. Soc., 97, 5588 (1975)
- (166) W. König y R. Geiger; Chem. Ber., 105, 2872 (1972)
- (167) G. Jaeger y R. Geiger; Chem. Ber., 103, 1727 (1970)
- (168) M. Bodanszky y J. T. Sheehan; Chem. Ind. (London); 1268 (1960)

- (169) A. Marglin; Tetrahedron Lett., 3145 (1971)
- (170) D. Yamashiro y C. H. Li; Biochim. Biophys., 451, 124 (1976)
- (171) P. Sieber y B. Iselin; Helv. Chim. Acta, 51, 622 (1968)
- (172) F. Sachs y S Hilpert; Chem. Ber., 37, 3425 (1904)
- (173) G. Ciamician y P. Silber; Chem. Ber., 34, 2040 (1901)
- (174) Y. L. Chow; "Photochemistry of nitro and nitroso groups" (Fieser ed.), 185, John Willey and Sons, New York (1970)
- (175) B. Amit, U. Zehavi y A. Patchornik; Isr. J. Chem., 12, 103 (1974)
- (176) W. Reid y M. Wilk; Justus Liebigs Ann. Chem., 590, 91 (1954)
- (177) A. Patchornik, B. Amit y R. B. Woodward; J. Amer. Chem. Soc., 92, 6333 (1970)
- (178) B. Amit, E. Hazum, M. Fridkin y A. Patchornick; Int. J. Peptide Prot. Res., 9, 91 (19)
- (179) E. Atherton, E. Brown, G. Priestley, R. C. Sheppard y B. J. Williams; "Peptides, Synthesis-Structure-Function (Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium)", D. H. Rich and E. Gross eds., 163, Pierce Chemical Company-Rockford (Illinois) (1981)
- (180) D. Yamashiro y C. H. Li; Int. J. Peptide Protein Res., 16, 70 (1980)
- (181) F. S. Tjoeng, W. Staines y R. S. S. St-Pierre; Biochem. Biophys. Acta, 490, 489 (1977)
- (182) A. Ajayaghosh y V. N. Rajasekharan Pillai; J. Org. Chem., 52, 5714 (1987)
- (183) J. T. Buis, G. I. Tesser y R. J. Nivard; Tetrahedron, 32, 2321 (1976)
- (184) M. A. Barton, R. V. Leumeux and J. Y. Savoie; J. Amer. Chem. Soc., 95, 4501 (1973)

- (185) P. N. Rylander y D.S. Tarbell; J. Amer. Chem. Soc., 72, 3021 (1950)
- (186) F. J. Smentowski; J. Amer. Chem. Soc., 85, 3036 (1963)
- (187) T. J. Wallace, J. M. Miller, H. Pobiner y A. Schriesheim; Proc. Chem. Soc., 384 (1962)
- (188) A. R. Olson y R. J. Miller; J. Amer. Chem. Soc., 60, 2687 (1938)
- (189) Cowdney, Hughes, Ingold, Masterman y Scott; J. Chem. Soc., 1264 (1937)
- (190) Long y Purchase; J. Amer. Chem. Soc., 73, 3267 (1950)
- (191) L. R. Barday, N. D. Halland y G. A. Cooke; Can. J. Chem., 40, 1981 (1962)
- (192) Sneen y Rosenberg; J. Org. Chem., 26, 2099 (1961)
- (193) Muller y Siegfried; Helv. Chim. Acta, 57, 987 (1974)
- (194) H. C. Beyerman, H. Hindriks y E. W. B. De Leer; Chem. Commun., 1668 (1968)
- (195) B. Calas, J.-P. Gilbert, J. Mery, J. Parello y C. Tisse; C. R. Acad. Sc. Paris, 288-C, 449 (1979)
- (196) B. Halpern, L. Chew, V. Close y W. Patton; Tetrahedron Let., 49, 5163 (1968)
- (197) W. Pereira, V. Close, W. Patton y B. Halpern; J. Org. Chem., 34, 2032 (1969)
- (198) J. Y. Savoie y M. A. Barton; Can. J. Chem., 52, 2832 (1974)
- (199) G. Moore y D. McMaster; Int. J. Peptide Protein Res., 11, 140 (1978)
- (200) G. J. Moore y Y. C. Knok; Can. J. Biochem., 58, 641 (1980)
- (201) J. P. Tam, F. S. Tjoeng y R. B. Merrifield; Tetrahedron Let., 51, 4935 (1979)
- (202) H. C. Beyerman y H. Maasen Van Den Brink-Zimmermannová; Recueil, 87, 1196 (1968)

- (203) H. C. Beyerman, C. A. M. Boers-Boonekamp y H. Maassen Van Den Brink-Zimmermannová; *Recueil*, 87, 257 (1968)
- (204) E. Bayer y H. Hagenmaier; *Tetrahedron Lett.*, 17, 2037 (1968)
- (205) J. Meienhofer y Y. Sano; *J. Amer. Chem. Soc.*, 90, 2996 (1968)
- (206) P. Gaudreau, J. L. Morell y E. Gross; "Peptides: Synthesis, Structure and Function" (D. H. Rich y E. Gross, eds.) *Proc. Seventh American Peptide Symposium*, Wisconsin, 193 (1981)
- (207) Ch. Ressler y V. Du Vigneaud; *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 3107 (1954)
- (208) H. Takashima, V. Du Vigneaud y R. B. Merrifield; *J. Amer. Chem. Soc.*, 90, 1323 (1968)
- (209) M. Manning; *J. Amer. Chem. Soc.*, 90, 1348 (1968)
- (210) E. Koenigs y B. Mylo; *Ber.*, 41, 4427 (1908)
- (211) P. S. Yang y M. S. Rising; *J. Amer. Chem. Soc.*, 53, 3183 (1931)
- (212) M. Bodanzsky y J. T. Sheehan; *Chem. and Ind.*, 1597 (1966)
- (213) M. Roseblum; *J. Amer. Chem. Soc.*, 82, 3793 (1960)
- (214) R. Ramage, C. A. Barron, S. Bielecki y D. W. Thomas; *Tetrahedron Lett.*, 28, 4105 (1987)
- (215) D. G. Mullen y G. Barany; *Tetrahedron Lett.*, 28, 491 (1987)
- (216) J. Blake, D. Yamashiro, K. Ramasharma y C. H. Li; *Int. J. Peptide Protein Res.*, 28, 468 (1986)
- (217) D. Yamashiro y C. H. Li; *Int. J. Peptide Protein Res.*, 31, 322 (1988)
- (218) D. Yamashiro; "Peptides: Structure and Function" (C. M. Deber, V. J. Hruby and K. D. Kopple; eds.), *Proc. Ninth American Peptide Symposium*, Toronto, 213 (1985)
- (219) G. W. Gokel, D. J. Cram, C. L. Liotta, H. P. Harris y F. L. Cook.; *Organic Syntheses*, 57, 30 (1974)
- (220) R. C. Orłowski, R. Walter y D. Winkler; *J. Org. Chem.*, 41, 3701

(1976)

- (221) E. Schiltz, K. D. Schnackerz y R. W. Gracy; *Anal. Biochem.*, 79, 33 (1977)
- (222) J. M. Stewart y J. D. Young; "Solid Phase Peptide Synthesis " W. H. Freeman and Co., San Francisco, 119 (1984)
- (223) F. Reindel y W. Hoppe; *Chem. Ber.*, 87, 1103 (1954)
- (224) E. Kaiser, E. L. Colescott, C. D. Bossinger y P. I. Cook; *Anal. Biochem.*, 34, 595 (1970)
- (225) B. F. Gisin; *Anal. Chim. Acta*, 58, 148 (1972)
- (226) J. M. Stewart y J. D. Young; "Solid Phase Peptide Synthesis", Pierce Chemical Company, Rockford (Illinois), 109 (1984)
- (227) J. W. Scotchler, R. Lozier y A. B. Robinson; *J. Org. Chem.*, 35, 3151 (1970)
- (228) I. VolSKUyl-Holtkamp y C. Schattenkerk; *Int. J. Peptide Protein Res.*, 10, 60 (1977)
- (229) R. Schwyzer y H. Dietrich; *Helv. Chim. Acta*, 44, 2003 (1961)
- (230) E. Wuensch y A. Zwick; *Z. Physiol. Chem.*, 333, 108 (1963)
- (231) R. W. Roeske; *Chem. Ind. (London)*, 1121 (1959)
- (232) E. Schnabel y H. Schüssler; *Liebigs Ann. Chem.*, 686, 229 (1965)
- (233) E. Taschner, A. Chimiak, B. Bator y T. Sokolowska; *Ann.*, 646, 134 (1961)
- (234) E. Taschner, C. Wasielewski y J. Biernat; *Ann.*, 646, 119 (1961)
- (235) E. Taschner, C. Wasielewski, T. Sokolowska y J. F. Biernat; *Ann.*, 646, 127 (1961)
- (236) A. Hassner y V. Alexanian; *Tetrahedron Letters*, 4475 (1978)
- (237) J. F. Biernat, B. Rzeszotarska y C. Wasielewski; *Ann.*, 646, 123 (1961)

- (238) G. W. Anderson y F. M. Callahan; J. Amer. Chem. Soc., 82, 3359
(1960)
- (239) M. K. Dhaon, R. K. Olsen y K. Ramasamy; J. Org. Chem., 47,
1962 (1982)