



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

JAIME VASCONCELOS, MIGUEL ÁNGEL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

RODRÍGUEZ LEAL, CARLOS ALBERTO

ASESOR: CÁRDENAS PÉREZ, RICARDO JORGE

MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

Índice	i
Acrónimos	ii
Introducción	1
Antecedentes	3
Objetivos	28
Estrategia y diseño de síntesis	29
Parte experimental	34
Análisis de resultados	45
Conclusiones	75
Espectros	76

ACRÓNIMOS

AcOH	ácido acético
AOMP	hexafluoroantimoniato de 5-(-azabenzotriazol-1-iloxi)-3,4-dihidro-1-metil-2 <i>H</i> -pirrolio
AOP	hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-il)oxitris-(dimetilamino)fosfonio
BDMP	hexafluoroantimoniato de 5-(1- <i>H</i> -benzotriazol-1-iloxi)-3,4-dihidro-1-metil-2 <i>H</i> -pirrolio
BEMT	tetrafluoroborato de 2-bromo-3-etil-4-metil-tiazolio
BMTB	bromuro de 2-bromo-3-metil-4-metil-tiazolio
BOC	<i>ter</i> -butoxicarbonil
BOI	hexafluorofosfato de 2-(benzotriazol-1-il)oxi-1,3-dimetilimidazolio
BOMI	hexafluoroantimoniato de benzotriazol-1-iloxi- <i>N,N</i> -dimetilmetaniminio
BOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(<i>N,N</i> -dimetilamino)fosfonio
BOP-Cl	cloruro de <i>N,N'</i> -bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfoniilo
BPMP	hexafluoroantimoniato de 1-(1- <i>H</i> -benzotriazol-1-iloxi)fenilmetileno-pirrolio
BroP	hexafluorofosfato de tris(<i>N,N</i> -dimetil)bromofosfonio
BTC	bis(triclorometil)carbonato
BTFFH	hexafluorofosfato de bis(tetrametilen)fluoroformamidinio
CBMIT	triflato de 1,1'-carbonilbis(3-metilimidazolio)
CDI	1-1'-carbonildiimidazol
CDMT	2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina
CF₃BOP	hexafluorofosfato de 6-trifluorometilbenzotriazol-1-iloxi-tris(<i>N,N</i> -dimetilamino)fosfonio
CF₃NO₂PyBOP	hexafluorofosfato de 6-trifluorometil-4-nitrobenzotriazol-1-iloxitri(pirrolidino)fosfonio
CF₃PyBOP	hexafluorofosfato de 6-trifluorometilbenzotriazol-1-iloxitri(pirrolidino)fosfonio
CIC	<i>N</i> -ciclohexil- <i>N'</i> -isopropilcarbodiimida
CIP	hexafluorofosfato de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolidinio
ClOP	hexafluorofosfato de tris(<i>N,N</i> -dimetil)clorofosfonio
CMBI	hexafluorofosfato de 2-cloro-1,3-dimetil-1 <i>H</i> benzimidazolio
DBDMAP	2,6-di- <i>t</i> -butil-4-(dimetilamino)piridina
DCC	diciclohexilcarbodiimida

DCM	diclorometano
DCU	diciclohexilurea
DECP	dietilcianofosfato
DEPB	dietilfosfobromidato
DEPBO	<i>N</i> -dietoxifosforil benzoxazolona
DEPBT	3-(dietoxyfosforiloxi)-1,2,3 benzotriazin-4(3 <i>H</i>)-ona
DEPC	dietilfosfocloridato
DFIH	hexafluorofosfato de 1,3-dimetil-2-fluoro-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazolio
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIEA	Diisopropiletilamina
DMAP	2,6-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMPU	1,3-dimetilpropilenurea
DOMP	hexacloroantimoniato de 5-(3',4'-dihidro-4'-oxo-1',2',3'-benzotriazin-3'-iloxi)-3,4-dihidro-1-metil 2 <i>H</i> pirrolio
DOPBO	<i>N</i> -(2-oxo-1,3-dioxafosforinil)-benzoxazolona
DOPBT	3-[<i>O</i> -(2-oxo-1,3,2-dioxafosforinalil-oxi)-1,2,3-benzotriazin-4(3 <i>H</i>)-ona
DPPA	difenilfosforilazida
DPP-Cl	cloruro de difenilfosfiniilo
EDC	clorhidrato de la 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil-carbodiimimida
FDPP	difenilfosfinato de pentafluorofenilo
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonil
FOMP	hexacloroantimoniato de 5-(pentafluorofeniloxi)-3,4-dihidro-1-metil 2 <i>H</i> pirrolidinio
Gly	glicina
HAPipU	hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-aza-benzotriazol-1il)-1,1,3,3-bis(pentameten)uronio
HAPyU	hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)oxibis(pirrolidino)uronio
HATU	hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HBPpyU	hexafluorofosfato de <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)oxibis-(pirrolidino)uronio
HBTU	hexafluorofosfato de <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HMPA	hexametilfosforamida
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol

HOBT	1-hidroxibenzotriazol
HOct	etil-1-hidroxi-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carboxilato
HODhbt	3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina
HODT	hexafluorofosfato de S-(1-oxido-2-piridinil)-1,3-dimetil-1,3-trimetilentiuronio
HOTT	hexafluorofosfato de S-(1-oxido-2-piridinil)-1,1,3,3-tetrametiltiuronio
HPyOPfp	hexafluorofosfato de <i>N,N,N',N'</i> -bis(tetrametilen)- <i>O</i> -pentafluorofeniluronio
HPySPfp	hexafluorofosfato de <i>N,N,N',N'</i> -bis(tetrametilen)- <i>S</i> -pentafluorofeniluronio
IBCF	cloroformiato de isobutilo
MeOH	metanol
MPTA	dimetilfosfinotioilazida
MPTO	3-dimetilfosfinotioil-2-(3 <i>H</i>)-oxazolona
NMM	<i>N</i> -metilmorfolina
Phe	fenilalanina
ppm	Partes por millón
Pro	Prolina
PyAOP	hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-il)oxitris-(pirrolidino)fosfonio
PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitri(pirrolidino)fosfonio
PyBroP	hexafluorofosfato de bromotri(pirrolidino)fosfonio
PyClOP	hexafluorofosfato de clorotri(pirrolidino)fosfonio
PyCIU	hexafluorofosfato de cloro-1,1,3,3-bis(tetrametilen)-formamidinio
PyDOP	hexafluorofosfato de [(3,4-dihidro-4oxo-1,2,3-benzotriazin-3 il)oxi]tris(pirrolidino)fosfonio
PyTOP	hexafluorofosfato de (pirridil-2-tio)tris(pirrolidino)fosfonio
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN-¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
SOMP	hexacloroantimoniato de 5-(succinimidiloxi)-3,4-dihidro-1-metil 2 <i>H</i> pirrolio
TAPipU	tetrafluoroborato de <i>O</i> -(7-aza-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-bis(pentametilen)uronio
TATU	tetrafluoroborato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
TBAF	tetrafluoroborato de tetrabutilamonio
TBTU	tetrafluoroborato de <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)-1.1.3.3-

	tetrametiluronio
TDBTU	tetrafluoroborato de 2-(3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
TEMP	2,3,5,6-tetrametilpiridina
TES	Trietilsilano
TFFH	hexafluorofosfato de tetrametilfluoroformamidinio
THF	tetrahidrofurano
Thr	Treonina
TMU	1,1,3,3-tetrametilurea
TNTU	tetrafluoroborato de 2-(5-norborneno-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetrametiluronio
TODT	tetrafluoroborato de S-(1-oxido-2-pirridinil)-1,3-dimetil-1,3-trimetilentiuronio
TOTT	tetrafluoroborato de S-(1-oxido-2-pirridinil)-1,1,3,3-tetrametiltiuronio
TOTU	tetrafluoroborato de <i>O</i> -[ciano(etoxicarbonil)metilnamino]- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
Trp	triptofano
TSTU	tetrafluoroborato de 2-succinimido-1,1,3,3-tetrametiluronio
Val	Valina

INTRODUCCIÓN

La síntesis de péptidos, con una secuencia bien definida de aminoácidos, resulta ser una tarea poco convencional a pesar de que pudiera resultar simple pensar solo en la formación de una serie de enlaces C-N de amida para construir la secuencia peptídica deseada. La mayor complejidad en la síntesis radica en otros aspectos como en la protección adecuada de los grupos funcionales que no intervienen en la formación del enlace peptídico y en la prevención de reacciones secundarias no deseadas.

Por otra parte, energéticamente la formación de una amida es un proceso que requiere temperaturas y condiciones de reacción que resultan inadecuadas para muchos péptidos por lo que la formación del enlace peptídico requiere de otras opciones para llevarse a cabo. De esta manera, se propone el uso de compuestos derivados de los ácidos carboxílicos, que desde un punto de vista energético son compuestos más apropiados para acceder al estado de transición generador del enlace peptídico. Dentro de éste grupo de compuestos se encuentran halogenuros de acilo, anhídridos, ésteres y agentes acoplantes.

A nivel estratégico general, la formación del enlace peptídico requiere de la protección del grupo amino de uno de los aminoácidos y la protección del grupo carboxilo del otro. En consecuencia quedan disponibles para reaccionar el extremo amino libre de uno de ellos con el extremo carboxilo libre del otro. Como producto de la reacción se tiene una molécula protegida en sus extremos amino y carboxilo, de modo que para continuar con la secuencia peptídica deseada sea necesario realizar la desprotección de alguno de los extremos. Esta desprotección requiere el uso de otra reacción química adicional, la cuál no debe afectar a la unión peptídica y debe lograr al mismo tiempo una eficiente eliminación del grupo protector. Además, en el caso de que alguno o ambos aminoácidos tengan cadenas funcionalizadas protegidas previamente, la reacción de desprotección no deberá afectar tampoco a alguno de estos últimos grupos protectores. De este modo, la elección de los grupos protectores, tanto en las cadenas laterales como en los grupos funcionales potencialmente formadores del enlace peptídico, es un aspecto importante que debe hacerse previamente de manera cuidadosa.

Otro punto importante a considerar en la síntesis de péptidos es el que se refiere a la pureza quiral de los productos obtenidos. La epimerización o racemización es una reacción secundaria que suele presentarse en la posición α del extremo carboxilo de un aminoácido activado durante una reacción de acoplamiento peptídico y en la que ocurre la pérdida de la quiralidad como consecuencia de la abstracción del protón ubicado en la posición mencionada. El producto de la reacción, al perder su pureza quiral, conduce a una mezcla racémica o bien a una mezcla de epímeros en el caso de la existencia de otro centro asimétrico. De este modo, se busca también evitar hasta donde sea posible ésta reacción secundaria.

Así, lo que parecía ser una simple formación de un enlace amida se convierte en una tarea bastante minuciosa y creativa que en algunas ocasiones resulta ser todo un reto intelectual.

Es así como a pesar de que ya existen metodologías establecidas para la síntesis, el tópico no se encuentra agotado. La utilización de materias primas costosas o bien el uso de condiciones especiales de reacción son aspectos que también es necesario considerar y que en algunas ocasiones, sobretodo a nivel industrial, no son fácilmente accesibles.

En el presente trabajo se propone una metodología alternativa para formar el enlace peptídico a partir de un aminoácido protegido en su extremo amino y un aminoácido no protegido; como resultado de la reacción se tendría un producto que no requiere de un paso adicional de desprotección para continuar con la construcción de la secuencia. Asimismo, se pretende hacer uso de condiciones de reacción no anhidras para lograr el acoplamiento, por lo que también se pretende eliminar el uso de disolventes anhidros y atmósferas inertes junto con sus inconvenientes técnicos y económicos.

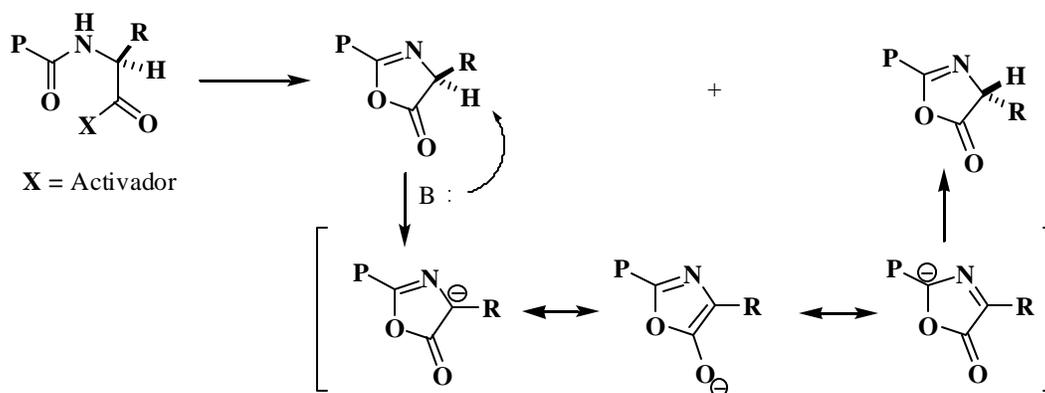
ANTECEDENTES

La síntesis de péptidos es un campo de estudio cuya importancia resulta considerable no solo para la síntesis orgánica, ya que actualmente es también una herramienta útil en otras áreas del conocimiento como la biología, la bioquímica, la genética y la medicina. Particularmente en la síntesis orgánica, se ha buscado el desarrollo de nuevas metodologías, el desarrollo de nuevos agentes acoplantes, la utilización de sustancias menos agresivas al ambiente, entre otros objetivos.

En sus inicios la síntesis de péptidos se vió impulsada por un objetivo bastante ambicioso pues se intentaba recrear el trabajo realizado por la naturaleza. Con el tiempo, este objetivo ha sido sustituido por metas más pragmáticas; sin embargo, subsiste la necesidad de llegar a conseguir la perfección observada en la naturaleza, sobretodo cuando se habla de conservar las características estereoquímicas y quirales de una molécula en un proceso de síntesis no natural.

Actualmente en la síntesis no natural de péptidos la formación del enlace peptídico, como ya se describió, involucra el uso de compuestos derivados de ácidos carboxílicos que son energéticamente más reactivos y que permiten la obtención del enlace en condiciones de reacción menos drásticas, esto favorece y garantiza en cierto modo la pureza quiral de los compuestos que se desean obtener; sin embargo, es importante tener en cuenta otro parámetro para garantizar la mencionada pureza quiral; este parámetro consiste en evitar la presencia de la racemización (epimerización) como reacción secundaria durante un proceso de formación de enlace peptídico.

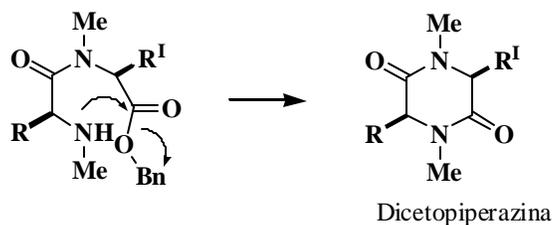
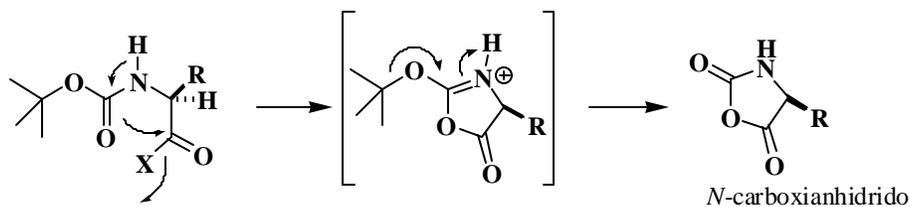
Como se mencionó anteriormente, la racemización es un proceso que puede ocurrir en el extremo carboxílico terminal de una secuencia peptídica durante el transcurso de una reacción de acoplamiento y es debida a la abstracción por una base, del hidrógeno en posición α al grupo carboxilo activado; para explicar el proceso de racemización se han propuesto dos mecanismos principales que se aplican de manera general y que son: la abstracción directa del hidrógeno α y la formación de oxazolonas, siendo este último el mecanismo más estudiado y aceptado (Esquema 1).



Esquema 1. Esquema del proceso general de racemización

Es importante señalar que con el uso de un reactivo supresor de la racemización es posible evitar esta reacción, así como algunas otras reacciones secundarias, y minimizar así la pérdida de la integridad óptica del compuesto¹.

Algunas otras reacciones secundarias que se presentan comúnmente y que dependen en buena medida de los grupos protectores utilizados son la formación de *N*-carboxianhídridos y la formación de dicetopiperazinas (Esquema 2).



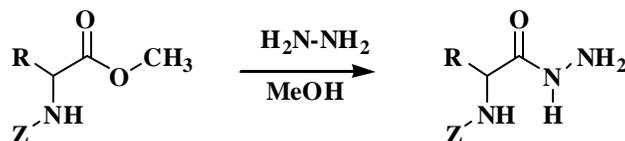
Esquema 2. Formación de *N*-carboxianhídridos y dicetopiperazinas

¹ Romoff, T. T.; Goodman, M. *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 281-292.

Por otro lado, en la síntesis de péptidos es común utilizar aminoácidos protegidos como ésteres por su extremo carboxilo y en forma de clorhidratos en su extremo amino, de tal manera que para realizar la formación del enlace peptídico es necesario liberar al grupo amino mediante el uso de una base. En este sentido, la elección de la base es también un aspecto importante a considerar en las reacciones de acoplamiento de péptidos. Las aminas terciarias como la DIEA y la NMM se han considerado como bases útiles en la síntesis de péptidos debido a sus propiedades poco nucleofílicas. Actualmente, se usan como bases la colidina, la TEMP y la DBDMAP.²

Finalmente, de los métodos más comúnmente utilizados para la formación del enlace peptídico mencionaremos los siguientes.

Método de Curtius³. Es el método más antiguo que ha sobrevivido y suele ser utilizado aún hasta nuestros días. Una de las razones de su uso es la estabilidad hacia la racemización que presentan las acilazidas derivadas de los aminoácidos y péptidos involucrados. Sin embargo, pueden perder su pureza óptica cuando se encuentran en presencia de un exceso de base. El método consiste en la formación de acilazidas de un aminoácido o un péptido a partir de hidracidas, las cuales a su vez se pueden obtener por hidrazinólisis de los ésteres correspondientes (Esquema 3).



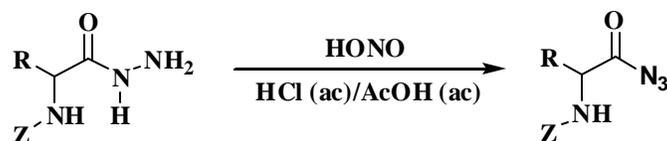
Esquema 3. Método general para la hidrazinólisis.

El proceso general de formación de la acilazida se lleva a cabo al hacer reaccionar la correspondiente hidracida con ácido nitroso y una mezcla acuosa de ácido clorhídrico y ácido acético a baja temperatura o bien con un nitrito alquílico en condiciones ácidas y anhidras (Esquema 4)⁴.

² Carpino, L. A.; Ionescu, D.; El-Faham, A. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2460-2465.

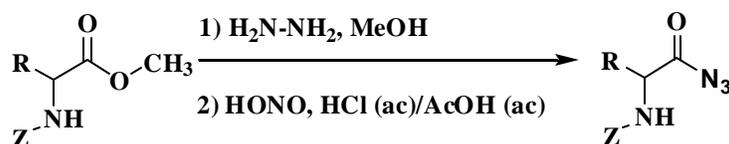
³ Bodanszky, M. *Principles Of Peptide Synthesis* **1993**, 2nd edition, Springer-Verlag, Berlin, *chapter II*.

⁴ Jones, J. *The Chemical Synthesis Of Peptides* **1994**, *Int. Series of monographs on chemistry* 23, Clarendon Press, Oxford. *Chapter 5*.



Esquema 4. Método general para la formación de acilazidas a partir de una hidracida

Este procedimiento ofrece como ventaja la transformación directa de un éster metílico a la acilazida correspondiente, realizándose la transformación de un grupo protector a un grupo activador (Esquema 5).

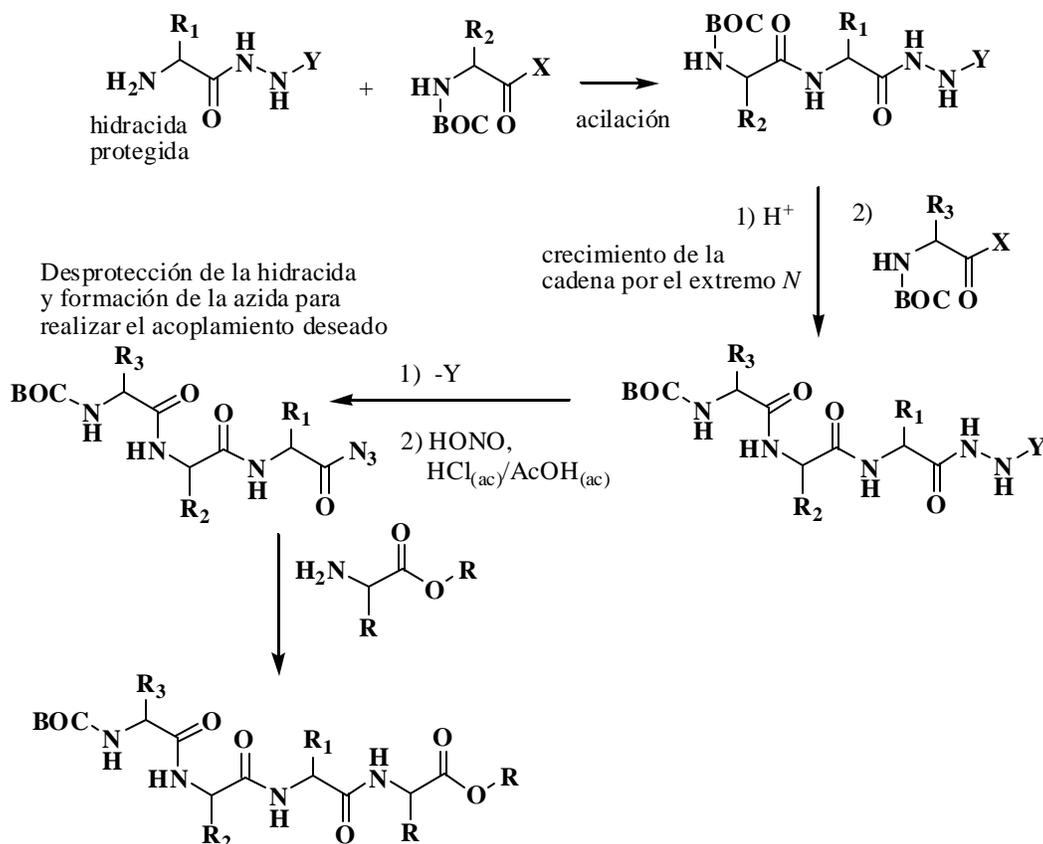


Esquema 5. Transformación de un éster metílico a una azida.

Sin embargo, una de las desventajas más importantes de éste método radica en la posibilidad de obtención de isocianatos intermediarios a través de la transposición de Curtius. Para evitar ésta transposición, es necesario trabajar a baja temperatura y con altas concentraciones de reactivos, lo que favorece la formación del enlace peptídico y disminuye la probabilidad de que se presente la transposición cuya cinética es independiente de la concentración. Una dificultad adicional es la formación tan lenta del enlace peptídico ya que los acoplamiento pueden requerir un tiempo considerable, incluso varios días, sobretodo si la reacción se lleva a cabo a baja temperatura.

En algunas ocasiones, las condiciones de hidrazinólisis utilizadas para obtener la hidracida a partir de un éster metílico suelen resultar bastante fuertes para algunos péptidos; de esta manera, se suele usar un procedimiento alternativo a la hidrazinólisis que consiste en el uso de hidracidas protegidas, las cuáles se acilan con un aminoácido *N*-protegido para posteriormente hacer crecer la cadena peptídica por el extremo opuesto (extremo *N*) al de la hidracida protegida, acoplado los correspondientes aminoácidos *N*-protegidos mediante sucesivos pasos de acoplamiento-desprotección-acoplamiento. Finalmente, se libera el

grupo protector de la hidracida, se genera la acilazida y se realiza el acoplamiento deseado (Esquema 6).



Esquema 6. Uso de hidracidas protegidas.

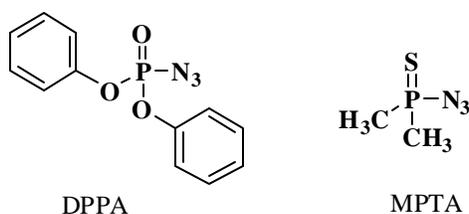
En 1972 Yamada⁵ introdujo el uso de la DPPA (difenílfosforazida) como reactivo de acoplamiento en la síntesis de péptidos; el reactivo genera como intermediario la acilazida correspondiente en buen rendimiento y en condiciones de reacción suaves. La DPPA se usa por lo regular de manera conjunta con una base orgánica como la trietilamina; sin embargo, se ha utilizado también con buenos resultados en presencia de bicarbonato de sodio⁶.

Asimismo, la modificación estructural del DPPA ha llevado al desarrollo de reactivos de tipo tiofosfínico como el MPTA (Esquema 7)⁷.

⁵ Shioiri, T.; Ninomiya, K.; Yamada, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6203-6205.

⁶ Brady, S. F.; Freidinger, R. M.; Paleveda, W. J.; Colton, C. D.; Homnick, C. F.; Whitter, W. L.; Curley, P.; Nutt, R. F. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 764-769.

⁷ Han, S; Kim, Y. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.



Esquema 7. Estructuras del DPPA y MPTA.

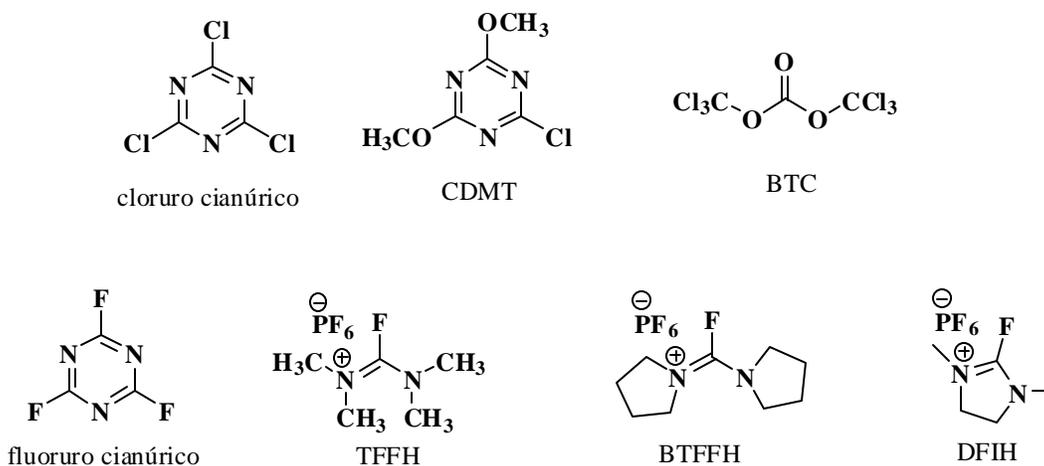
b) Método de Fischer^{3, 8}. Una de las aproximaciones más obvias para formar el enlace peptídico es realizar la activación de la función carboxílica a través de la formación del correspondiente cloruro de acilo, seguida de la reacción con una amina (función amino) bajo las condiciones de Schotten-Baumann^{4, 9}.

Los reactivos que se usan tradicionalmente para llevar a cabo la formación de cloruros de acilo, son bastante agresivos como para ser compatibles con sustratos complejos o sensibles, además muchos cloruros de acilo de aminoácidos se ciclizan espontáneamente para dar oxazolonas y como consecuencia de esto, péptidos racémicos.

El método es usado solo en casos especiales como en el acoplamiento de aminoácidos extremadamente impedidos. La formación de cloruros de acilo de aminoácidos se ha realizado con varios reactivos como el cloruro de pivaloilo, el bicloruro de ftaloilo, el cloruro de tionilo, el cloruro de oxalilo, el cloruro cianúrico, la CDMT (2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina) y en la síntesis en fase sólida se ha usado el BTC (bis(triclorometil)carbonato) (Esquema 8). De forma alternativa al uso de cloruros de ácido se han utilizado fluoruros de ácido, los cuales son más estables frente a la humedad y frente a grupos funcionales que son lábiles en condiciones ácidas. Entre los reactivos utilizados para la fluorinación tenemos al fluoruro cianúrico, al TFFH, al BTFFH y al DFIH⁷ (Esquema 8). El método del fluoruro del ácido se ha utilizado con buenos resultados en reacciones de acoplamiento que involucran a aminoácidos impedidos estéricamente.

⁸ Fisher, E. *Ber. Dtsch Chem Ges* **1903**, 36, 2094.

⁹ Sheehan, J.C.; Frank, V. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 1856-1861.



Esquema 8. Algunos reactivos generadores de halogenuros de acilo.

c) **Uso de anhídridos.** Resulta notable que la idea de utilizar anhídridos no haya sido utilizada en varias décadas, no fue sino hasta 1947 que apareció el primer informe del uso de anhídridos mixtos para la síntesis de péptidos^{3, 10}. Estos primeros experimentos enfocados hacia la utilización de anhídridos mixtos fueron inspirados por analogías bioquímicas y se realizaron con anhídridos mixtos de aminoácidos protegidos y ésteres de ácido fosfórico. Poco después, Wieland y sus colaboradores iniciaron una investigación sistemática de la aplicación de los anhídridos mixtos en la síntesis de péptidos^{3, 11}. Sus estudios, determinaron la dirección a seguir en el desarrollo de agentes acilantes poderosos que produjeran un mínimo de subproductos. Para garantizar que la reacción de acilación proceda como se desea, es necesario que exista una diferencia considerable entre las densidades electrónicas de ambos grupos carbonilo que conforman el anhídrido mixto y que el grupo carbonilo del aminoácido o péptido *N*-protegido sea el centro electrofílico más fuerte. Como los aminoácidos y los péptidos protegidos no pueden ser modificados, el segundo ácido usado para la activación ha de ser elegido teniendo en mente lo anterior. Es así como se han usado los anhídridos mixtos de los ácidos isovalérico y piválico.

Asimismo, se han utilizado anhídridos mixtos del ácido carbónico, que son producidos mediante el uso de cloroformatos, en presencia de una base terciaria y el péptido o aminoácido *N*-protegido. En estos intermediarios la electrofilia del grupo carbonilo

¹⁰ Chantrenne, H. *Nature* **1947**, *160*, 603.

¹¹ (a) Wieland, T., Kern, W., Sehring, R. *Liebigs Ann Chem* **1950**, *569*, 117.(b) Wieland T., Sehring R. *Liebigs Ann Chem* **1950**, *569*, 122.

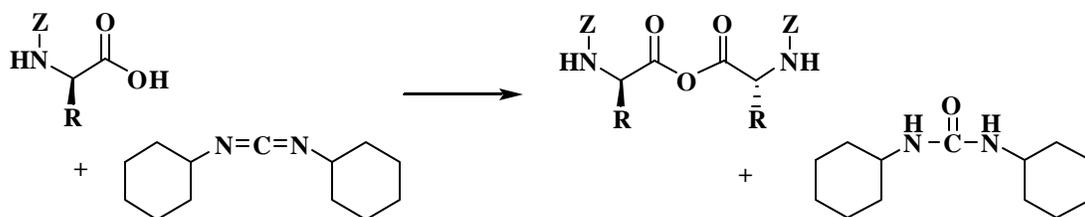
correspondiente a la parte del ácido carbónico se encuentra reducida por efecto de los dos átomos de oxígeno unidos directamente a él. El reactivo más utilizado para formar los anhídridos del ácido carbónico es el IBCF (cloroformiato de isobutilo) (Esquema 9).



Esquema 9. Anhídridos del piválico y el isovalérico y del IBCF

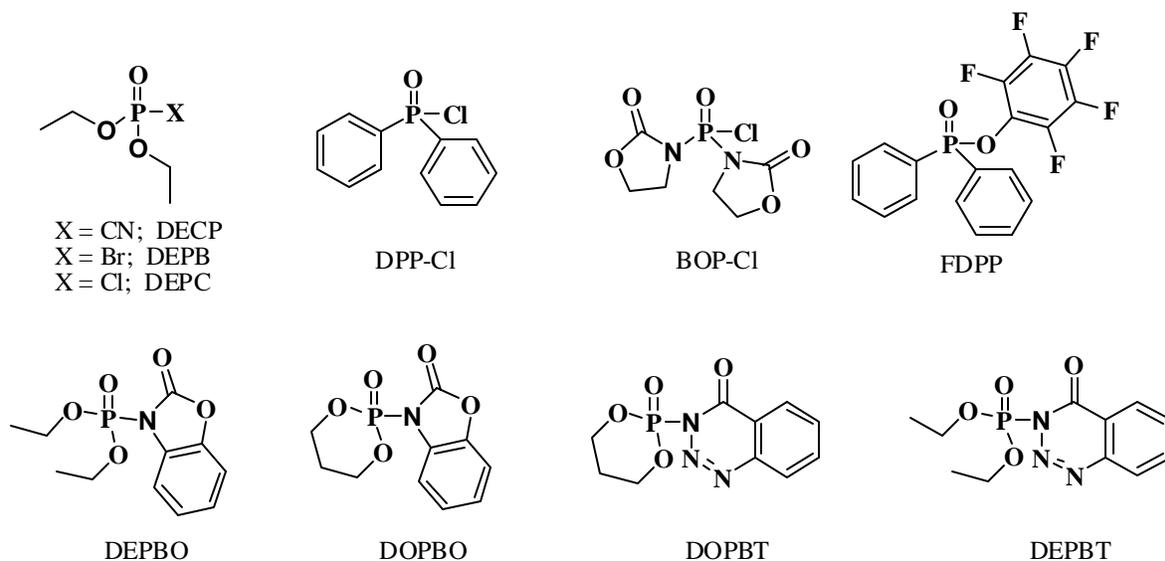
El problema más obvio relacionado con los anhídridos mixtos es la formación de un segundo producto de acilación no deseado. Una solución igualmente obvia para este problema fue la utilización de anhídridos simétricos, los cuales al reaccionar con un grupo amino generan un solo tipo de amida. Sin embargo, la pérdida de un mol del aminoácido o péptido protegido, que necesariamente ocurre en esta reacción, pareció ser inaceptable por un largo periodo de tiempo. El trabajo y el costo relacionados con la preparación del aminoácido o péptido protegido y su conversión a un anhídrido simétrico eran demasiado grandes como para permitir tal sacrificio. Por tanto, los primeros estudios en los que se prepararon estos anhídridos y se utilizaron en la formación del enlace peptídico no hicieron mucho eco.

Sin embargo, la idea de la utilización de anhídridos simétricos renació cuando se usó la dicitohexilcarbodiimida para formar anhídridos simétricos de aminoácidos protegidos³, en este caso se utilizan dos moles del ácido carboxílico y un mol de carbodiimida, estas condiciones favorecen la formación de los anhídridos simétricos que se convierten en las especies predominantes en la mezcla de reacción usada para realizar la correspondiente acilación sin necesidad de aislar el anhídrido (Esquema 10).



Esquema 10. Anhídridos simétricos obtenidos con DCC.

El método de la DPPA propuesto por Yamada en 1972 constituye también el inicio del uso de anhídridos mixtos carboxílico-fosfóricos como intermediarios reactivos. Desde entonces hasta la actualidad se han desarrollado compuestos organofosforados para generar tales intermediarios en la síntesis de péptidos. Como ejemplo de estos compuestos tenemos al DECP (fosfonato de dietilo), al DEPBr (fosforobromidato de dietilo) y al DEPC (fosforocloridato de dietilo). También se han usado derivados del ácido fosfínico como el DPP-Cl, el BOP-Cl, y el FDPP. Otros reactivos de organofósforo utilizados son: DEPBO, el DOPBO, el DOPBT y el DEPBT (esquema 11).⁷



Esquema 11. Algunos reactivos de organofósforo

d) Uso de ésteres activados. Una estrategia alternativa para llevar a cabo la activación del grupo carboxilo es la transformación de la función carboxílica en una función éster. En este

caso, se tiene la ventaja de que no existe un segundo agente acilante, pues solo existe un centro electrofílico a diferencia de cuando se usan anhídridos mixtos.

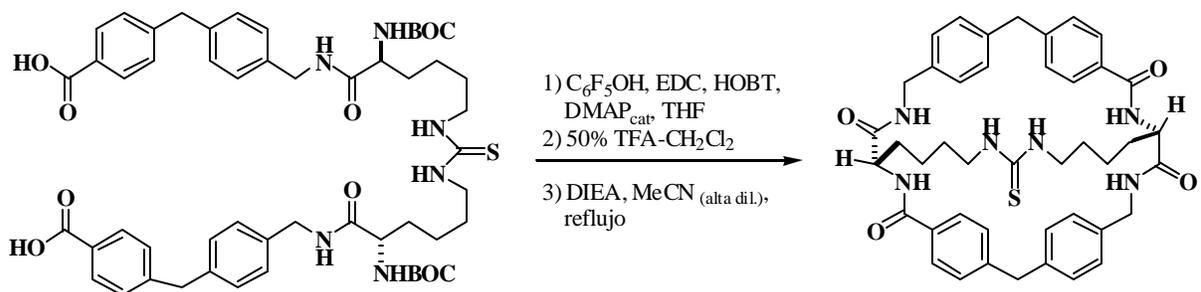
En el uso de ésteres para activar un ácido carboxílico existen diferentes propuestas; una de ellas parte de un modelo muy simple en el que un éster metílico se activa mediante la adición de un grupo electroattractor, es así como surgen los ésteres de cianometilo¹². Sin embargo, la activación de los ésteres metílicos por el grupo ciano es a menudo insuficiente y cuando el acoplamiento se realiza en soluciones diluidas la velocidad de reacción se torna lenta. Otra propuesta alternativa para el uso de ésteres activados se relaciona con una analogía bioquímica: el grupo acetilo presente en la forma de tioéster en la coenzima A. Esta propuesta fue establecida por Gordon, Miller y Day^{13, 14} y establece que los ésteres de tiofenilo de aminoácidos protegidos deben solo una parte de su reactividad al hecho de que sean tioésteres, en mayor grado la habilidad que presentan para formar amidas bajo condiciones relativamente suaves se debe al hecho de que sean ésteres de arilo. Como un paso lógico se introdujo el uso de estos compuestos a los cuales, para incrementar su reactividad, se adicionaron grupos electroattractores al anillo aromático. Como ejemplo tenemos el uso de ésteres de *p*-nitrofenol, los ésteres de pentaclorofenilo y los ésteres de pentafluorofenilo. Los ésteres activados de pentafluorofenilo son en general más reactivos que los ésteres de pentaclorofenilo, lo que se explica por el mayor impedimento estérico de los átomos de cloro presentes en éstos últimos. De este modo, el uso de ésteres de pentafluorofenilo se ha popularizado bastante en macrolactamizaciones, en donde por lo general es necesario aislarlos y purificarlos antes de ser utilizados como agentes acilantes⁷. Sin embargo, también se ha descrito la formación *in situ* de estos ésteres en presencia de EDC y HOBT (Esquema 12)¹⁵.

¹² Schwyzer R, Feurer M, Iselin B, Kägi H. *Helv Chim Acta* **1955**, 38, 80.

¹³ Gordon, M.; Miller, J.G.; Day, A. R. *J Am Chem Soc* **1948**, 70, 1946.

¹⁴ Gordon, M.; Miller, J.G.; Day, A.R. *J Am Chem Soc* **1949**, 71, 1245.

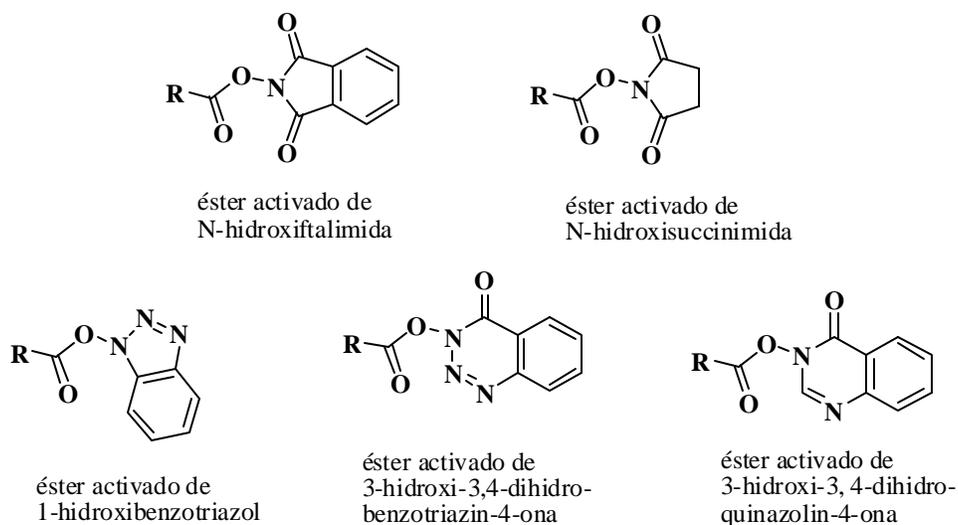
¹⁵ Pernía, G. L.; Kilburn, J.D.; Essex, J. W.; Mortishire-Smith, R. J.; Rowley, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10220-10227.



Esquema 12. Síntesis de un macrobicio mediante ésteres de pentafluorofenilo formados *in situ*.

Como ésteres activados se han utilizado también a los derivados *O*-acilados de las hidroxilaminas sustituidas, el uso de estos compuestos fue descrito por primera vez en 1961 por Nefkens y Tesser, usando como modelo los ésteres de *N*-hidroxiftalimida. También se han utilizado los ésteres de *N*-hidroxisuccinimida, propuestos en 1963 (Esquema 13).³

Dentro de este grupo de ésteres activados, es importante mencionar el uso de *O*-acilderivados del 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), de la 3-hidroxi-3,4-dihidrobenzotriazin-4-ona y de la 3-hidroxi-3,4-dihidroquinazolin-4-ona¹⁶, cuyos ésteres no se preparan de manera aislada la mayor parte de las veces, pues por lo regular se generan *in situ* cuando se adicionan estos compuestos, ya sea para suprimir la racemización, cuando se realizan acoplamientos con carbodiimidas o para catalizar la activación de otros ésteres (Esquema 13).



Esquema 13. Derivados *O*-acilados usados comunmente como ésteres activados.

¹⁶ Köning, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788. (Ibidem) 2024.

e) Uso de agentes acoplantes. Es tal vez la estrategia más utilizada en la actualidad para llevar a cabo la formación del enlace peptídico, en años recientes las reacciones de acoplamiento de péptidos han avanzado a la par del desarrollo de nuevos agentes acoplantes⁷. Entre muchas otras cosas, estos agentes son responsables de la generación de intermediarios que incluyen anhídridos mixtos, azidas y haluros de acilo, especies químicas usadas como intermediarios reactivos en las reacciones de acoplamiento de péptidos.

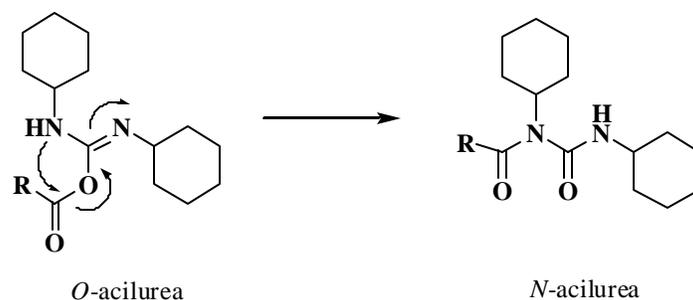
En 1955 fueron propuestos dos compuestos como reactivos que realizaban la formación del enlace peptídico: el etoxiacetileno propuesto por Arens y la dicitclohexilcarbodiimida (DCC o DCCI) propuesta por Sheehan y Hess^{3, 17}. En ambos casos, la activación del grupo carboxilo ocurre a través de la adición del reactivo en cuestión hacia el triple enlace en el caso del etoxiacetileno y hacia el enlace doble N=C en las carbodiimidias. En la actualidad el uso de la DCC se ha extendido mucho más, y su uso constituye una de las principales estrategias de formación del enlace peptídico.

No obstante, existen varias limitaciones al usar la DCC. Por una parte, el subproducto, la *N,N'*-dicitclohexilurea aunque resulta ser casi insoluble en muchos disolventes orgánicos (excepto en los alcoholes) y es fácil de remover por filtración, suele contaminar los productos de acoplamiento. Para remediar esta situación Sheehan propuso el uso de carbodiimidias solubles en agua¹⁸. En cambio, en la síntesis en fase sólida se prefiere usar carbodiimidias que generen como subproductos ureas solubles en disolventes orgánicos como es el caso de la DIC (*N,N'*-diisopropilcarbodiimida) y la CIC (*N*-ciclohexil-*N'*-isopropilcarbodiimida) que son relativamente solubles en cloroformo⁷.

Por otra parte, una reacción colateral no deseada que suele presentarse con todas las carbodiimidias es la transposición intramolecular del derivado de *O*-acilurea para generar un derivado de *N*-acilurea. La transposición ocurre cuando se da el ataque nucleofílico intramolecular del átomo de nitrógeno hacia el grupo carbonilo en la *O*-acilurea (Esquema 14).

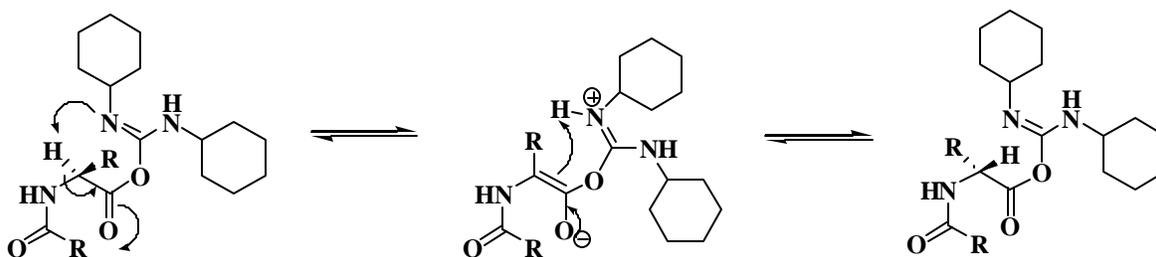
¹⁷ Sheehan, J.C.; Hess, G.P. *J. Amer. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.

¹⁸ Sheehan, J.C.; Hlavka, J.J. *J. Org. Chem.*, **1956**, *21*, 439-441



Esquema 14. Formación del derivado de *N*-acilurea.

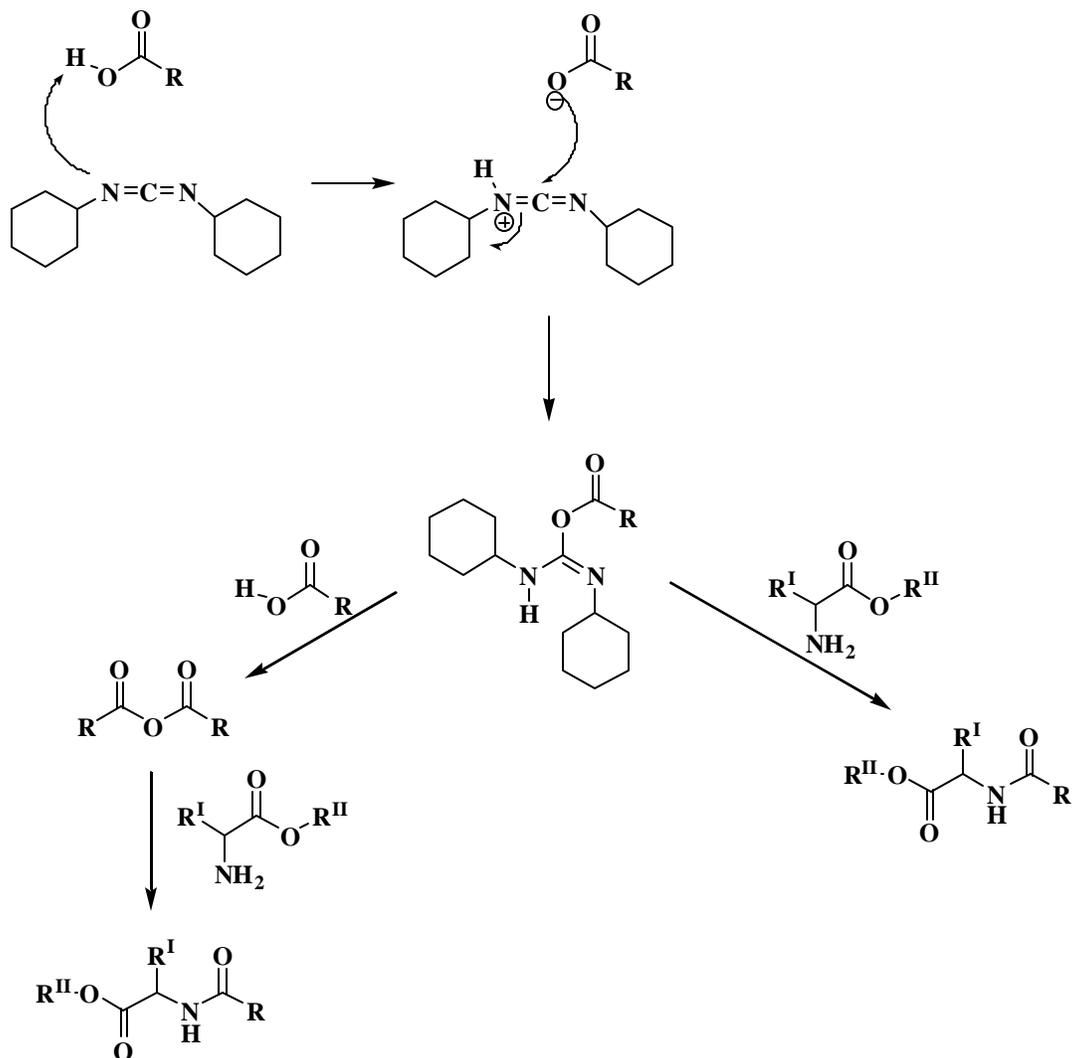
Por último, y no menos importante, es el hecho de que la activación con DCC provoca la racemización del residuo terminal carboxílico mediante abstracción intramolecular del hidrógeno alfa por el nitrógeno básico en la *O*-acilurea. En este proceso, la estabilización por puente de hidrógeno de la forma enólica del intermediario juega un papel importante (Esquema 15).



Esquema 15. Mecanismo propuesto para la racemización en el intermediario de *O*-acilurea.

Sin embargo, estos problemas no han disuadido a los químicos para dejar de utilizar carbodiimidas como agentes acoplantes, sino que más bien han estimulado la investigación para eliminar tales limitaciones. La formación del enlace peptídico mediante el uso de carbodiimidas puede explicarse a través de dos rutas: una, en la que el componente amino ataca nucleofílicamente el intermediario de *O*-acilurea y la otra en donde la *O*-acilurea reacciona con otra molécula del componente carboxilo para generar un anhídrido simétrico³. Si el componente carboxílico es un aminoácido protegido es posible y a menudo deseable usar dos moles del aminoácido por cada mol de carbodiimida, por tanto se favorecería la formación de anhídridos simétricos y disminuiría la concentración de *O*-acilurea libre, de este modo se reduce la probabilidad de que ocurra la transposición que

genera la *N*-acilurea y por lo tanto la producción de compuestos ureidos se verá suprimida (Esquema 16).

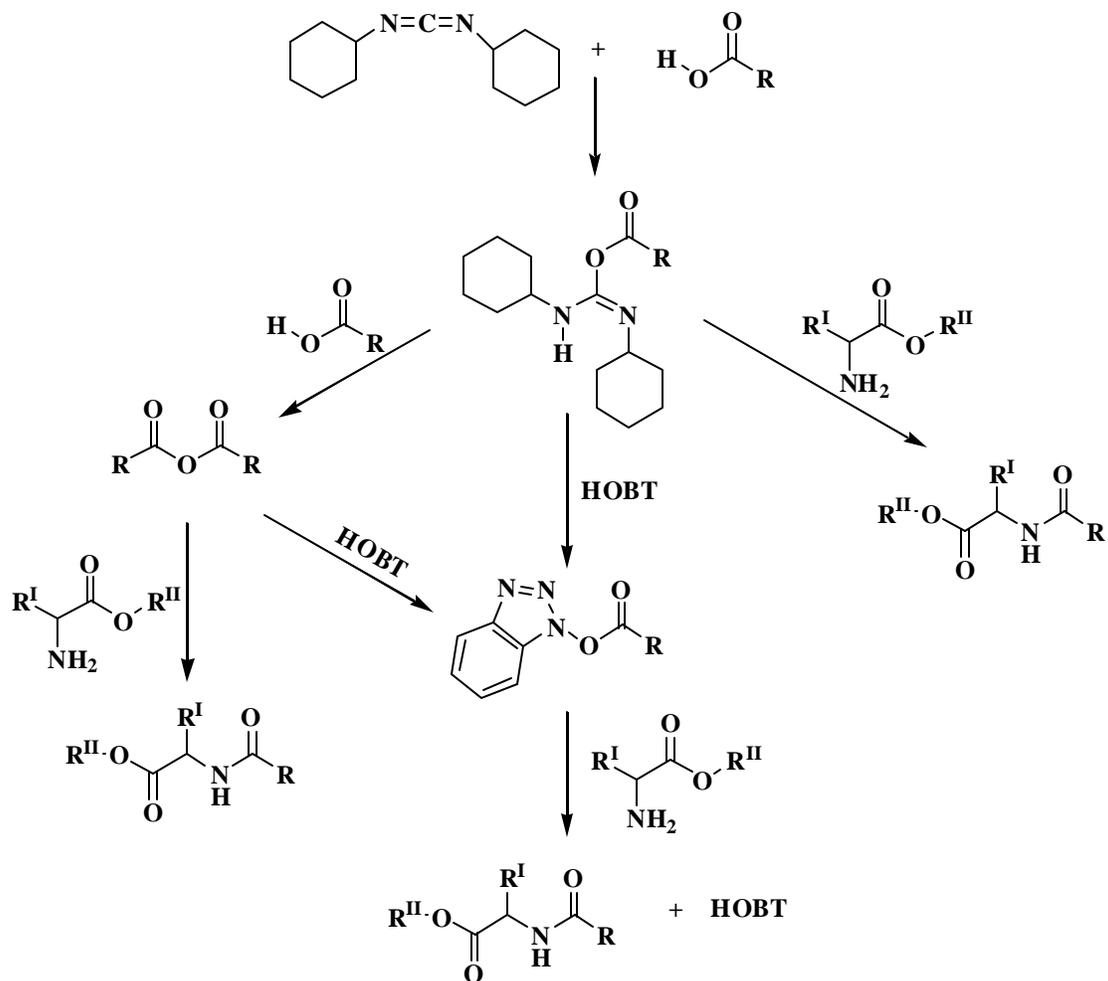


Esquema 16. Rutas posibles para la formación del enlace peptídico usando carbodiimidas.

Algunos inconvenientes del uso de carbodiimidas se pueden eliminar a través del uso de aditivos como el 1-hidroxibenzotriazol¹⁶, la *N*-hidroxisuccinimida y la HODhbt. Algunos otros aditivos que se utilizan con buenos resultados en la actualidad son el el HOAt y el HOCT⁷.

Aunque el principal objetivo en la introducción de estos aditivos ha sido la supresión de la racemización en la formación del enlace peptídico, su aplicación como nucleófilos auxiliares produce también un cambio importante en la cinética de la reacción, pues genera

rutas alternas para llegar a un mismo objetivo: la formación del enlace peptídico (Esquema 17).



Esquema 17. Uso simultáneo de un aditivo, como el HOBT, con una carbodiimida.

Una de las principales ventajas del uso conjunto de estos aditivos con las carbodiimidas es que los intermediarios generados por la carbodiimida: las *O*-acilureas y los anhídridos simétricos, cuya reactividad es considerable, reducen su tiempo de vida y su lugar es ocupado por los ésteres activados correspondientes, los cuales son intermediarios comparativamente menos reactivos que los primeros, pero aún lo suficientemente adecuados para asegurar velocidades de reacción satisfactorias.

Aunque las carbodiimidas han sido reactivos tradicionalmente usados en la síntesis de moléculas complejas, se han desarrollado también otros reactivos de acoplamiento como las

sales de uronio, fosfonio, imonio e imidazolio, los cuales han permitido la incorporación de aminoácidos no convencionales o estéricamente impedidos en una secuencia peptídica. A continuación se mencionan algunos ejemplos y aplicaciones de estos agentes.

Sales de fosfonio como agentes acoplantes

A comienzo de la década de los años setenta, Castro introdujo como agentes acoplantes las sales de fosfonio conocidas como CloP¹⁹ (hexafluorofosfato de tris-(*N,N*-dimetil)clorofosfonio) y BroP²⁰ (hexafluorofosfato de tris-(*N,N*-dimetil)bromofosfonio) cuyo uso presentaba una considerable racemización de los productos de acoplamiento de acuerdo con la prueba de Young. Después del descubrimiento del HOBt como agente supresor de la racemización se introdujo en 1975²¹ un reactivo acoplante combinado, conocido como BOP (hexafluorofosfato de benzotriazo-1-iloxi-tris(*N,N*-dimetil-amino)fosfonio), que además de no ser higroscópico es un compuesto cristalino de fácil preparación. Sin embargo, una de las desventajas de usar el BOP como reactivo de acoplamiento, reside en que como subproducto de reacción se obtiene la hexametilfosforamida (HMPA) que es un compuesto bastante tóxico. Por tal motivo se han realizado modificaciones estructurales y se ha remplazado la dimetilamina por un anillo de pirrolidina, dando lugar a los reactivos acoplantes PyBOP²², PyCloP, y PyBroP.

El PyBroP se ha utilizado con buenos resultados en el acoplamiento de aminoácidos *N*-metilados, como en la síntesis de la Destruixina B²³ (Esquema 18).

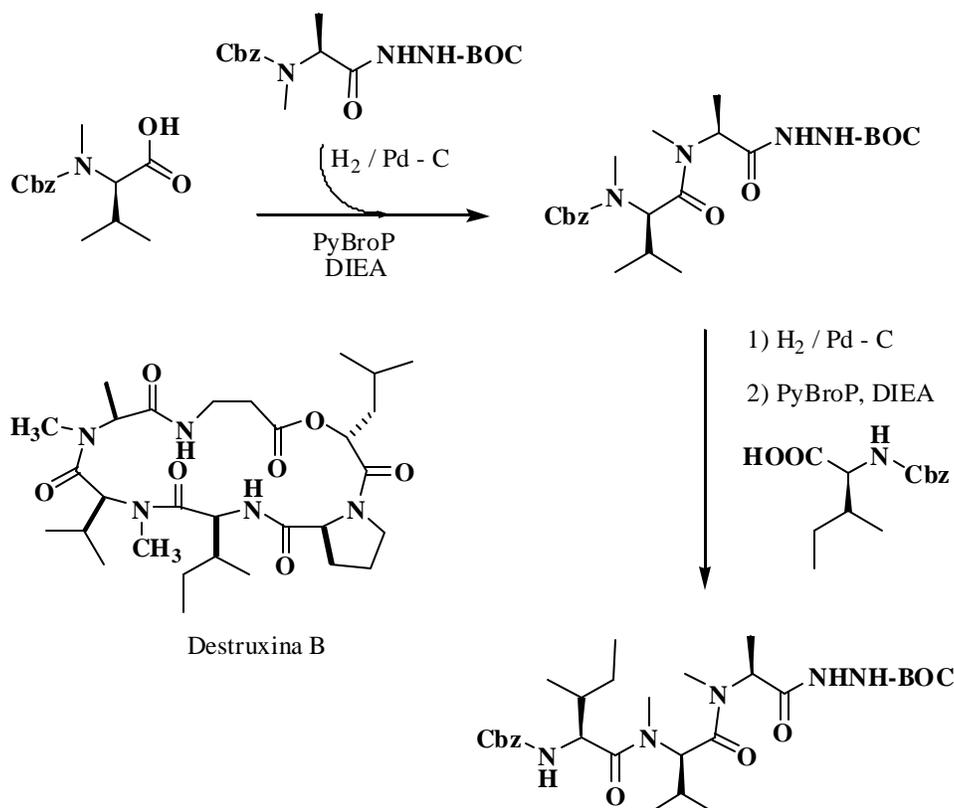
¹⁹ Castro, B.; Dormoy, J. R. *Tetrahedron Lett.* **1972**, 4747-4750.

²⁰ (a) Castro, B.; Dormoy, J. R. *Tetrahedron Lett.* **1973**, 3243-3246. (b) Coste, J.; Dufour, M. N.; Pantaloni, A.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 669-672.

²¹ Castro, B.; Dormoy, J.R.; Evin, G.; Selve, G. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1219-1222

²² (a) Coste, J. ; Le Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208. (b) Hæg-Jensen, T.; Jakobsen, M.H.; Holm, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6387-6390. (c) Frérot, E.; Coste, J.; Pantaloni, A.; Dufour, M.-N.; Jouin P. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 259-270.

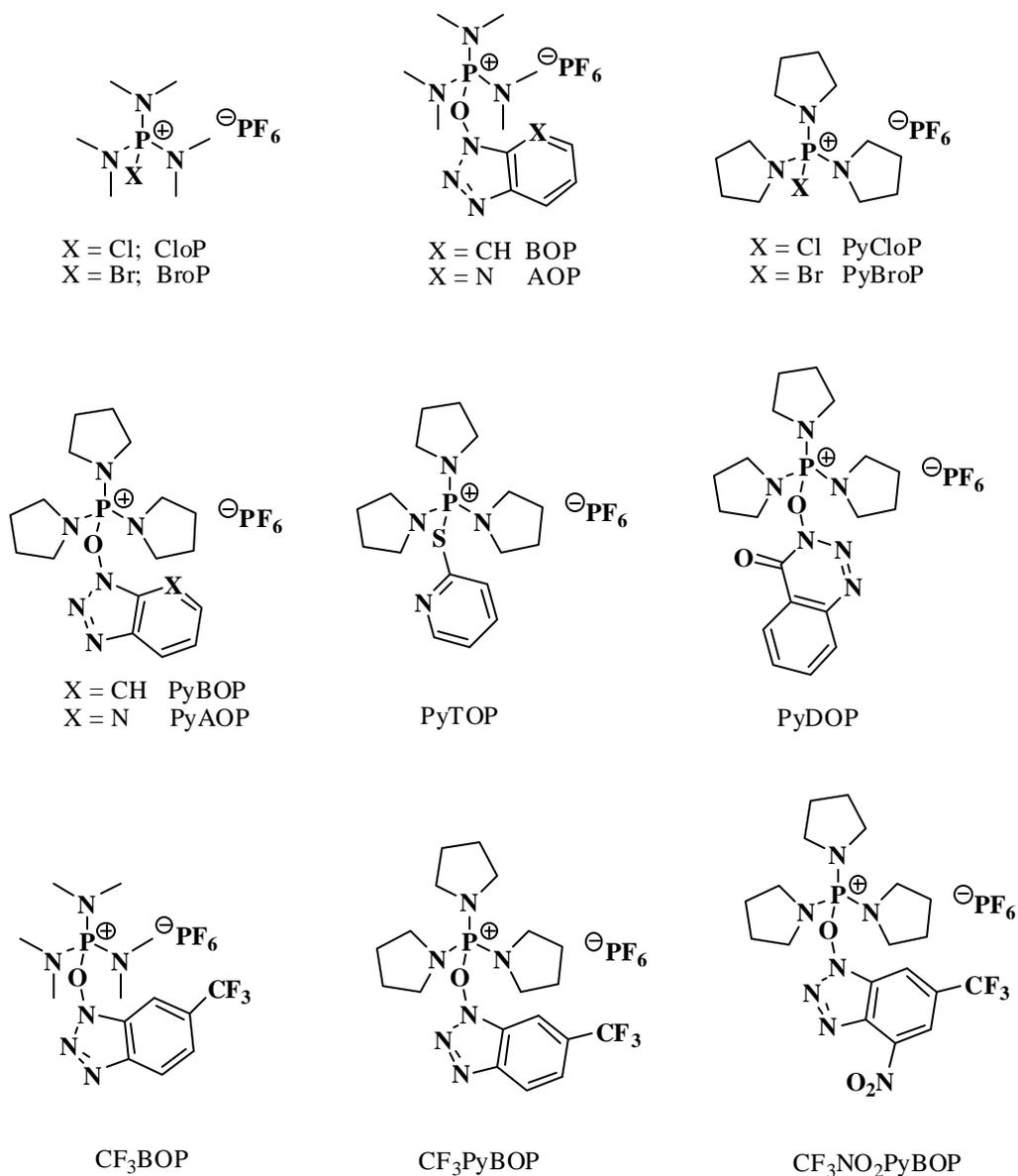
²³ Ward, D. E.; Gai, Y; Lazny, R.; Piedras, M. S. C. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7832-7840.



Esquema 18. Uso de PyBroP en el acoplamiento de aminoácidos *N*-metilados en la síntesis de Destruxina B

Desde el descubrimiento de agentes acoplantes unidos a una unidad de HOBT, se han utilizado muchos otros agentes supresores de la racemización como parte constitutiva de los nuevos agentes acoplantes. Así se han generado reactivos el AOP, el PyAOP, el PyTOP y el PyDOP⁷. Asimismo, se han hecho modificaciones estructurales al anillo de benzotriazol en este grupo de reactivos, dando lugar a agentes como el CF₃-BOP, el CF₃-PyBOP y el CF₃-NO₂-PyBOP, que han sido usados con éxito en la síntesis de dipéptidos que contienen aminoácidos *N*-metilados²⁴. Sin embargo, se ha descrito que en el acoplamiento de aminoácidos *N*-metilados los reactivos de halogenofosfonio a menudo suelen producir mejores resultados que los reactivos de fosfonio derivados del HOBT⁷ (Esquema 19).

²⁴ Wijkmans, J.C.H.M.; Blok, F. A. A.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; Bloemhoff, W. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 4643-4646.



Esquema 19. Algunas sales de fosfonio utilizadas en la síntesis de péptidos.

Sales de uronio como agentes acoplantes

Gross introdujo el HBTU como la primera sal de uronio usada como reactivo acoplante en 1978²⁵. Desde entonces Knorr ha preparado y realizado investigaciones sobre varios análogos del HBTU²⁶. Como contraiones de las sales de uronio se han utilizado el hexafluorofosfato (HBTU) y el tetrafluoroborato (TBTU); estudios comparativos entre el HBTU y el TBTU muestran que el contraion no tiene influencia significativa sobre la

²⁵ Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269-1272.

²⁶ Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillesen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927-1930

velocidad a la cual ocurre el acoplamiento o sobre la racemización⁷. Por otra parte, la estructura activa del HBTU fue descubierta por Carpino²⁷, quien en sus estudios demostró que se trata de una sal de *N*-guanidinio y no como se creía, por analogía con las sales de fosfonio, de una sal de *O*-uronio.

Otras sales de uronio usadas como reactivos de acoplamiento son el TSTU, el TNTU y el TDBTU⁷. Las modificaciones estructurales del HBTU han dado lugar a nuevos reactivos de acoplamiento. Así, la alteración de la parte correspondiente al HOBt ha generado reactivos como el HATU, el TATU y el TOTU, mientras que la alteración de la parte correspondiente a la parte de la sal de *O*-uronio ha dado lugar al HBPyU y al HAPyU. Finalmente, la alteración sobre ambas partes ha generado reactivos como el PyCIU, el HAPyU, el HpyOPfp, el HPySPfp, el HAPipU y el TAPipU⁷.

El HATU se ha utilizado en reacciones de macrociclización de moléculas complejas como por ejemplo en la síntesis de la himastatina realizada por Danishefsky (Esquema 20)²⁸.

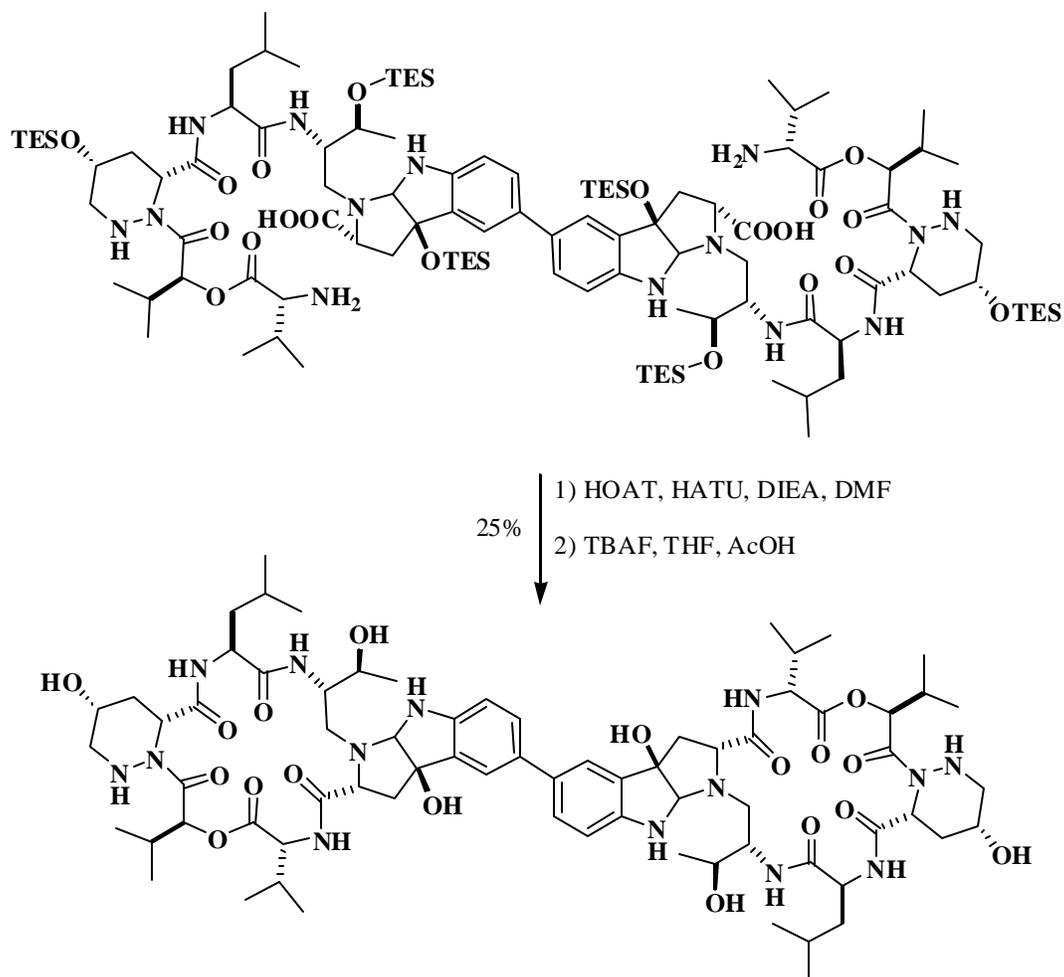
Otros reactivos que han sido empleados recientemente son los nuevos reactivos de tiouronio introducidos por Nájera^{29, 30} que contienen una unidad del 1-óxido de la 2-mercaptopiridina que funciona como agente supresor de la racemización. A su vez, el HOTT y el TOTT se derivan estructuralmente de la TMU (1,1,3,3-tetrametilurea) mientras que el HODT y el TODT lo hacen de la DMPU (1,3-dimetilpropilenurea)⁷ (Esquema 21).

²⁷ Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F. J.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B. M.; Henklein, P.; Hannay, C.; Mügge, C.; Wenschunch, H.; Klose, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 441-445.

²⁸ Kamenecka, T. M.; Danishefsky, S. J. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 41-63.

²⁹ Bailén, M. A.; Chinchilla, R.; Dodsworth, D. J.; Nájera, C. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8936-8939.

³⁰ Albericio, F.; Bailén, M.A.; Chinchilla, R.; Dodsworth, D. J.; Nájera, C. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9607-9613.

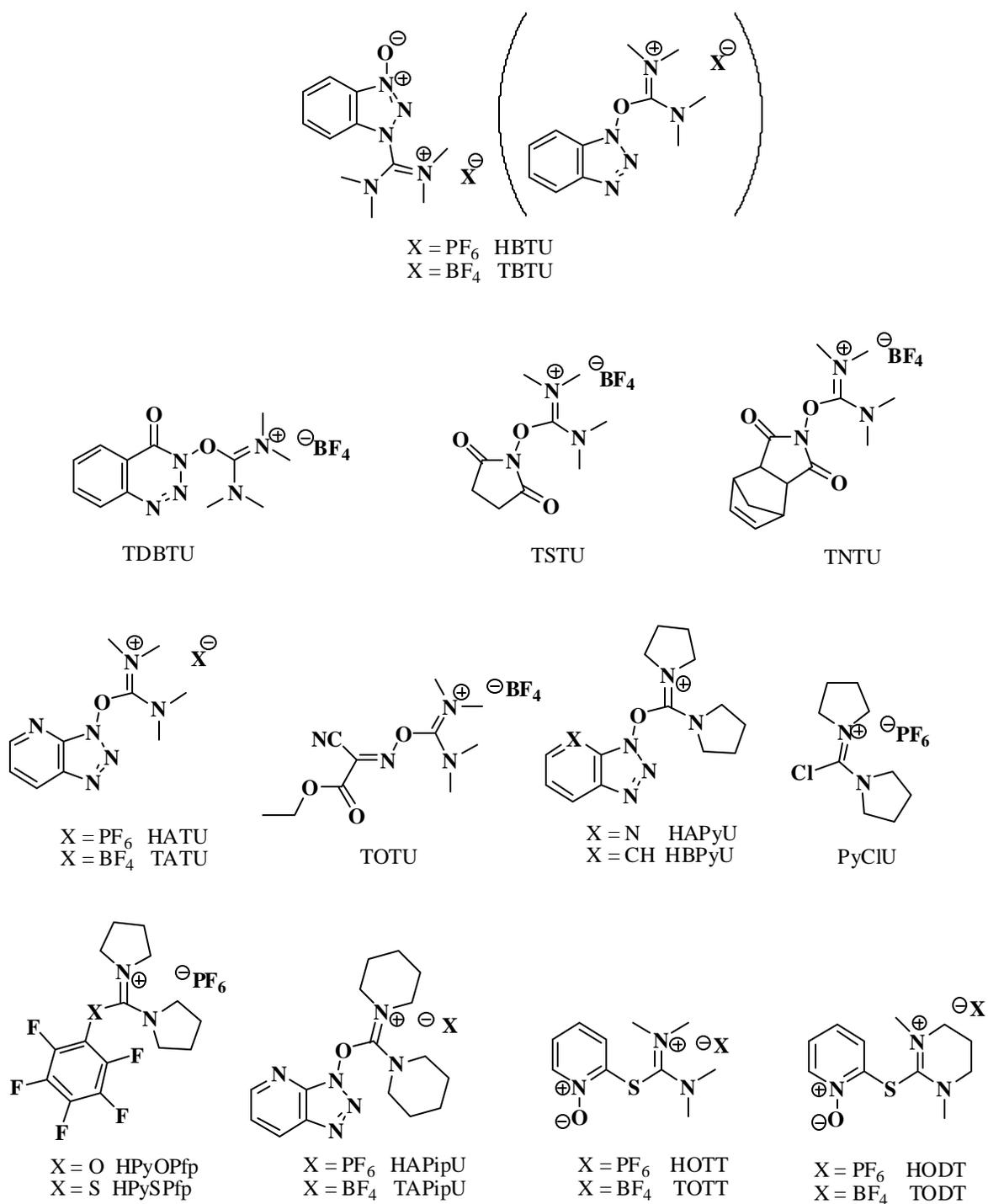


Esquema 20. Macrociclización en la síntesis de la himastatina usando HATU.

En general, las sales de uronio, son más estables que las sales de fosfonio, aunque en presencia de una base las sales de fosfonio son más estables. Por otra parte, es interesante hacer notar que los reactivos de uronio y fosfonio derivados del HOAt resultan ser más eficientes que los correspondientes reactivos derivados del HOBT. La diferencia en actividades entre estos dos grupos de compuestos puede explicarse por la posibilidad de formación de un enlace de hidrógeno debida a la presencia del átomo de nitrógeno en el HOAt, lo que estabilizaría al éster intermediario a través de una asistencia anquimérica³¹.

Por otra parte, generalmente se usa DIEA, en vez de NMM o colidina, como base cuando se realizan acoplamiento con sales de uronio⁷. Por último, una de las reacciones colaterales que se observan al usar sales de uronio es la formación de guanidinas.

³¹ Carpino, L. A. *J. Amer. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398



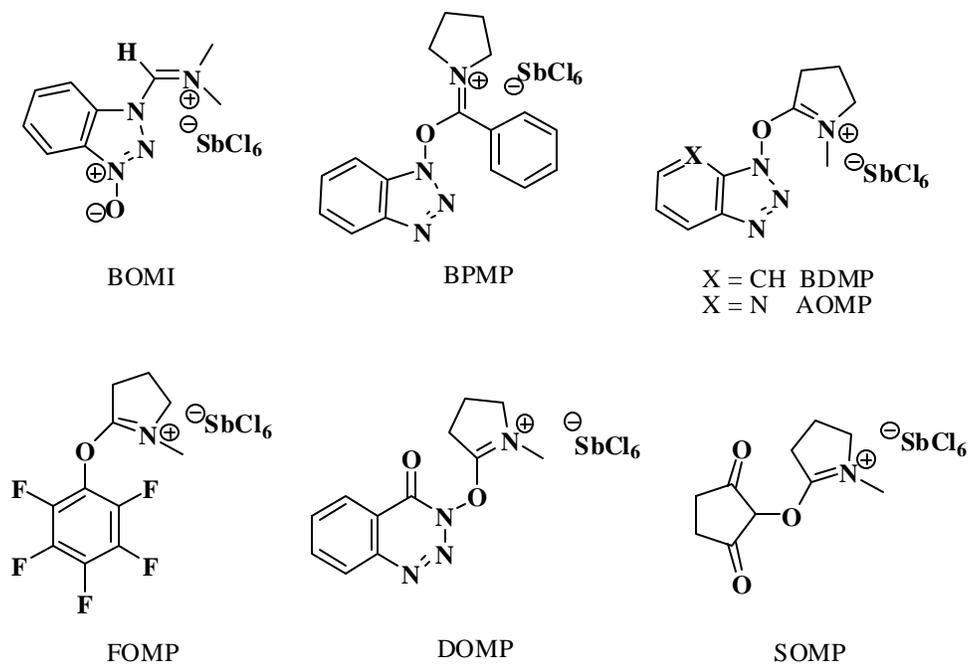
Esquema 21. Algunas sales de uronio y tiouronio usadas como reactivos acoplantes.

Sales de Imonio como reactivos acoplantes

Fueron diseñadas por modificación de los reactivos de uronio³², estructuralmente se diferencian de estos últimos en el reemplazo del grupo amino por un grupo alquilo, arilo o hidrógeno. Algunas de las sales de imonio más representativas son el BOMI, el BPMP, el AOMP, el FOMP, el DOMP, el BPMP y el SOMP (Esquema 22).

Es interesante mencionar que los reactivos de imonio dan mejores resultados que algunas sales de uronio como el HAPyU y el HBPpyU, esto se explica por la estabilización por resonancia que sufre el grupo carbonilo de las sales de uronio y que es debida al átomo de nitrógeno unido directamente a él, como consecuencia se observa una disminución en la reactividad. En cambio, en las sales de imonio, el átomo de nitrógeno causante de la estabilización está ausente.

Por otro lado, en los acoplamientos realizados con sales de amonio se recomienda usar como base la 2,6-lutidina y como disolvente THF o acetonitrilo⁷.

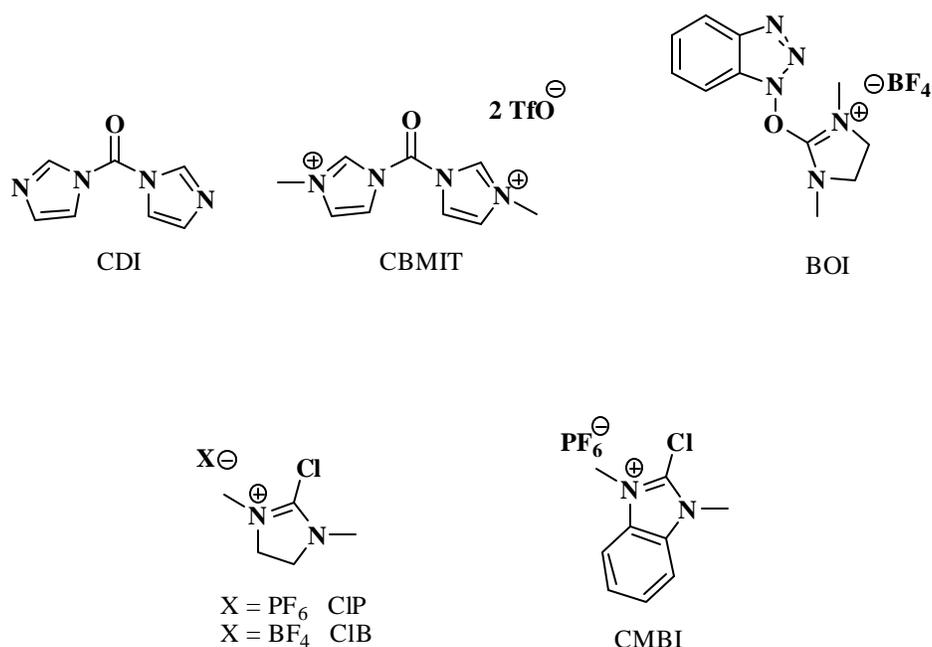


Esquema 22. Algunas sales de amonio usadas como reactivos de acoplamiento

³² Li, P.; Xu, J. C. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 721-724.

Sales de Imidazolio como agentes acoplantes

La búsqueda de mejores agentes acoplantes derivados de la DCC llevó en 1958 a desarrollar el 1,1'-carbonildiimidazol (CDI)³³ y la bis-metilación de este producto con triflato de metilo generó a su vez el CBMIT³⁴ que es un agente particularmente útil en la síntesis de péptidos con aminoácidos impedidos estéricamente. Otras sales de imidazolio usadas como agentes acoplantes en la síntesis de péptidos son el BOI y su precursor el CIP. (Esquema 23) De manera particular el CIP se ha utilizado en el acoplamiento de aminoácidos dialquilados en la posición α y en combinación con HOAt⁷.



Esquema 23. CDI y sales de imidazolio.

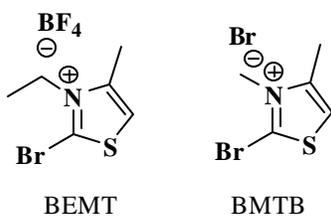
Otro agente acoplante es el CMBI que estructuralmente es análogo del CIP y que ha sido usado en el acoplamiento de *N*-metilaminoácidos, como en la síntesis de un pentadepsipéptido precursor de la actinomicina D³⁵ (Esquemas 23 y 25).

También se han introducido como agentes acoplantes sales de tioazolio como el BEMT y el BMTB⁷ (Esquema 24).

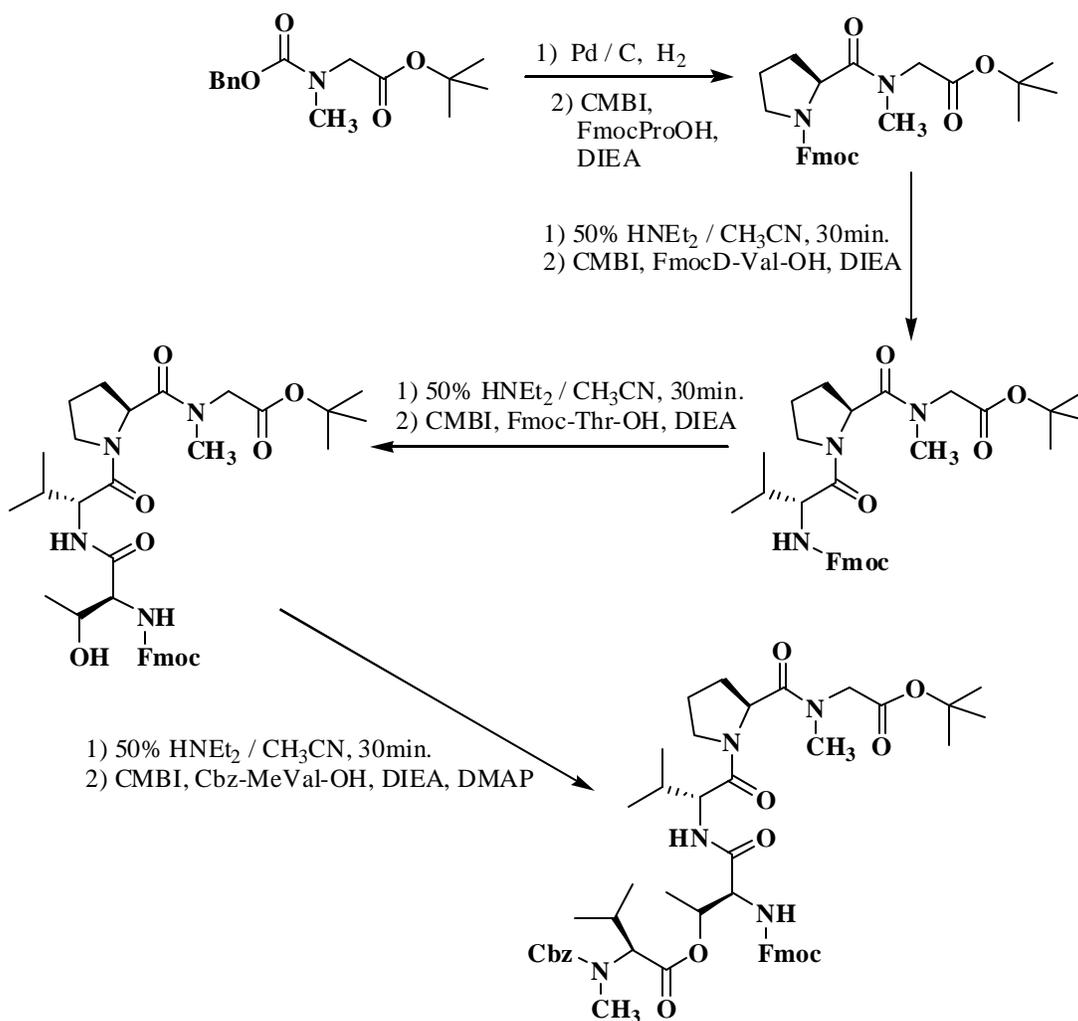
³³ Anderson, G. W.; Paul, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4423

³⁴ Saha, A. K.; Schultz, P.; Rapoport, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4856-4859.

³⁵ Li, P.; Xu, J. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9949-9955.



Esquema 24. Sales de tioazolio.



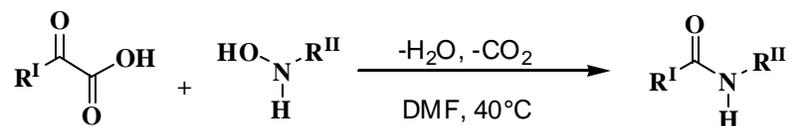
Esquema 25. Uso del CMBI en la síntesis de un ciclopentadepsipéptido.

Otros métodos de síntesis.

A partir de α -cetoácidos y *N*-alquilhidroxilaminas.

Recientemente se ha descrito un nuevo método de síntesis de enlace peptídico a partir de α -cetoácidos y *N*-alquilhidroxilaminas³⁶. El método consiste en el empleo de una reacción de condensación descarboxilante. La reacción se puede llevar a cabo en disolventes polares próticos y apróticos, no requiere el uso de catalizadores, como subproductos se obtienen CO₂ y H₂O y puede realizarse sin la necesidad de proteger grupos funcionales (Esquema 26).

En vista de que las *N*-hidroxilaminas son inestables como bases libres, se utilizan en forma de oxalatos.



Esquema 26. Formación del enlace peptídico a partir de α -cetoácidos y *N*-alquilhidroxilaminas

Por otro lado, con los estudios realizados se ha demostrado que el método no produce epimerización. Por estas razones, es posible que éste sea uno de los métodos más usados en el futuro.

³⁶ Bode, J. W.; Fox, R. M.; Baucom, K. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248-1252

OBJETIVOS

- Desarrollar una metodología alternativa para la formación del enlace peptídico utilizando un aminoácido *N*-BOC protegido y otro aminoácido en su forma de ion zwitter.
- Construir una secuencia peptídica de manera lineal sin aislar productos intermedios.
- Realizar la síntesis de la Phakellistatina-13.

ESTRATEGIA Y DISEÑO DE LA METODOLOGÍA DE SÍNTESIS

Formación del enlace peptídico

La formación del enlace peptídico en condiciones cada vez más accesibles, tanto desde el punto de vista químico como económico, es uno de los objetivos principales que se persiguen en el campo de la síntesis de péptidos. Teniendo ésto como premisa, se han desarrollado nuevas metodologías y nuevos agentes acoplantes, tanto en la síntesis por fase sólida como por fase líquida.

En la síntesis por fase líquida, la formación del enlace peptídico procede de manera general a través de pasos sucesivos de acoplamiento-desprotección, por lo que cada paso de acoplamiento consta en la práctica de dos pasos, uno de acoplamiento y otro de desprotección.

De esta manera, surge la idea de proponer una metodología en fase líquida que sea alternativa a las ya existentes y en la que a través de un solo paso, se llegue a la formación del enlace peptídico, en otras palabras, se busca la eliminación del paso tradicional de desprotección. Como consecuencia de la eliminación de éste paso, la formación del enlace peptídico daría lugar a un producto que sería directamente la materia prima del siguiente acoplamiento, de tal manera que no sería necesario aislar el producto de cada acoplamiento y la construcción de una secuencia peptídica se haría de manera lineal y directa, de un modo parecido a lo que ocurre en la síntesis por fase sólida, en la que tampoco se aíslan los productos intermedios de la síntesis.

Para darle forma a la metodología propuesta es necesario, en principio, establecer una estrategia de síntesis lineal. Dentro de la síntesis lineal de secuencias peptídicas existen dos estrategias principales en lo referente a la dirección que sigue el acoplamiento de los aminoácidos involucrados. La primera estrategia consiste en seguir la dirección observada en la naturaleza para la síntesis de proteínas, en ella se hace crecer la secuencia desde el extremo amino hacia el extremo carboxilo (estrategia $N \rightarrow C$) mediante acoplamientos sucesivos realizados en los extremos carboxílicos correspondientes. La otra estrategia, más

difundida en la síntesis por fase sólida, consiste en hacer crecer la secuencia del extremo carboxilo al extremo amino (estrategia C→N) mediante acoplamientos sucesivos realizados en los extremos amino correspondientes. En ambos casos, los acoplamientos van precedidos de un paso de desprotección. En la metodología que se propone se elige como estrategia de síntesis lineal la dirección N→C para construir la cadena, la elección de esta estrategia permite cumplir con el objetivo de realizar la formación de la secuencia de manera lineal y directa.

Otro aspecto a considerar es que en la formación del enlace peptídico mediante el uso de DCC y HOBT, se proponen como intermediarios reactivos a los ésteres activados de benzotriazol (especies 1 y 2- Figura 1), los cuales se suelen formar *in situ* durante una reacción de acoplamiento. Sin embargo, también es posible formar de manera aislada dichos intermediarios y utilizarlos como especies altamente reactivas en presencia de especies nucleofílicas¹. Para esto es necesario obtenerlos de manera cuantitativa en un disolvente que garantice su formación y permanencia, de este modo, el disolvente no deberá tener propiedades nucleofílicas considerables. Los disolventes más adecuados para formar los ésteres de benzotriazol, en diferentes modelos, son los disolventes clorados como el CH₂Cl₂ y el CHCl₃². En la metodología propuesta se elige al CH₂Cl₂ como disolvente para la formación de los ésteres activados durante la síntesis.

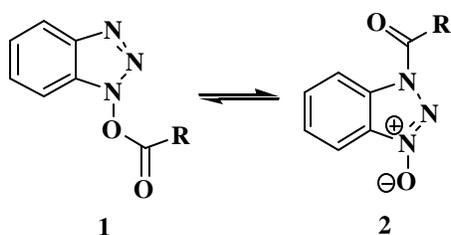


Figura 1. Intermediarios reactivos derivados del HOBT.

Para cumplir con el objetivo de formar el enlace peptídico en un solo paso, es necesario, entre otras cosas, que el aminoácido que se desee acoplar no se encuentre protegido. Por lo tanto, la idea más obvia es utilizar el aminoácido en cuestión como zwitterion. El zwitterion

¹ García Ríos, Eréndira. *Reducción de ácidos carboxílicos con borohidruro de sodio.*, Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. **2005**

² Morales Serna, José Antonio *Nuevos métodos de macrolactonización. Síntesis de sansalvamida A.*, Tesis de grado, Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, **2003**.

de un aminoácido es una especie que contiene su función amino protonada y su función carboxilo libre. Si el zwitterion se coloca en solución acuosa, se tiene un equilibrio entre las especies protonadas y no protonadas de cada uno de los grupos funcionales y dependiendo del valor de pH de la disolución, es posible lograr que una especie predomine sobre otras. De esta manera, si a una disolución del zwitterion de un aminoácido se le adiciona una cantidad equimolar de NaOH, la especie predominante del zwitterion será aquella que tenga “libre” su grupo amino y su grupo carboxilo como carboxilato. En estas condiciones, el zwitterion contiene dos grupos funcionales con potencial capacidad nucleofílica, sin embargo, es el grupo amino el que posee un mayor carácter nucleofílico. Teniendo esto como antecedente, se explica la elección de la estrategia N→C como estrategia lineal de construcción de la cadena peptídica.

De esta manera, es necesario partir de un aminoácido protegido por su extremo amino para realizar los acoplamientos por el extremo carboxilo.

Una vez establecida la estrategia lineal de acoplamiento, el siguiente paso consiste en establecer de manera general la forma en que se realizará el primer acoplamiento. Para esto hay que considerar que el aminoácido *N*-protegido es el modelo usado para generar los ésteres de benzotriazol en diclorometano y que nuestra especie nucleofílica es el zwitterion liberado con una cantidad equimolar de NaOH, en la cual se aprovecha la mayor capacidad nucleofílica del grupo amino.

A continuación, es necesario establecer bajo que condiciones se llevará a cabo la reacción. Para esto es importante considerar que el zwitterion requiere ser liberado y disuelto en un medio acuoso (con una solución equimolar de NaOH). Por tanto, la elección del medio de reacción debe tomar en cuenta lo anterior y el disolvente orgánico propuesto debe ser miscible con la fase acuosa en cuestión. Es así como se elige el uso de THF como disolvente orgánico para llevar a cabo el acoplamiento. De este modo, la reacción se lleva a cabo en un medio no anhidro, lo que constituye también una diferencia con algunos de los métodos más tradicionales usados en la síntesis de péptidos. Así, queda establecido que la reacción de acoplamiento planteada consiste en dos pasos: la activación del aminoácido *N*-protegido, que se realiza en diclorometano, y el acoplamiento que se realiza en THF-agua.

Como modelo del aminoácido *N*-protegido se elige a la *N*-BOC-Prolina (*N*-BOCPro) y como zwitterion se elige al zwitterion de fenilalanina (Phe). Así, el modelo para probar las condiciones de la reacción del acoplamiento es el dipéptido *N*-BOCProPhe.

Síntesis de la secuencia *N*-BOCProPheGlyProThrLeuTrp y Síntesis de la Phakellistatina 13.

Las esponjas marinas son una gran fuente de metabolitos secundarios con estructuras poco usuales y con una considerable actividad biológica. Muchos de ellos son péptidos pequeños que poseen estructuras particulares así como propiedades fisiológicas interesantes que los colocan como potenciales medicamentos. La phakellistatina 13 es un cicloheptapéptido aislado de la esponja naranja *Phakellia fusca* Thiele y se ha descrito que posee fuerte actividad citotóxica contra la línea celular BEL-7404 de hematoma humano pero es inactiva frente a la línea celular de leucemia HL-60³.

La síntesis total de la phakellistatina 13 se ha llevado a cabo en fase sólida y se reporta en la literatura química⁴. En el presente trabajo, se propone una metodología alternativa para realizar la síntesis en solución.

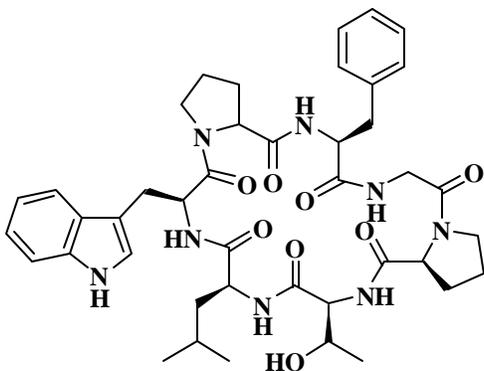


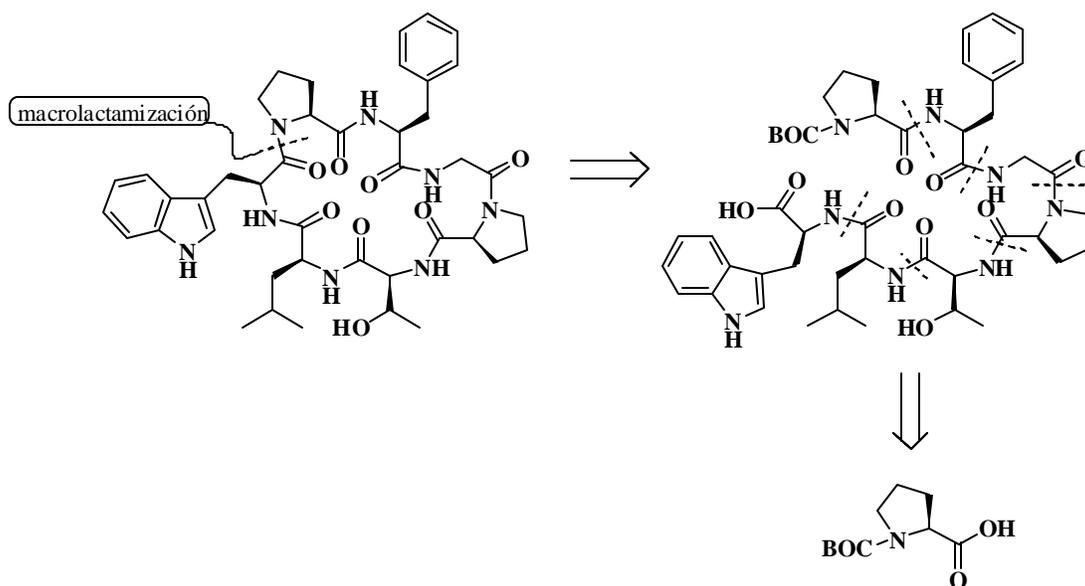
Figura 2. Phakellistatina 13

³ Li, W.-L.; Yi, Y.-H.; Wu, H.-M.; Xu, Q.-Z.; Tang, H.-F.; Zhou, D.-Z.; Lin, H.-W.; Wang, Z.-H. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 146-148.

⁴ Greenman, K. L.; Hach, D. M.; Van Vranken, D. L. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1713-1716.

El análisis retrosintético realizado para el compuesto, toma en cuenta que en el método propuesto no se llevarán a cabo reacciones consecutivas de desprotección (hidrólisis) y que por lo tanto no se aislarán los productos intermedios de la síntesis; de este modo, se propone realizar lineal y secuencialmente la construcción de la cadena peptídica tal y como se hace en la síntesis en fase sólida. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la síntesis en fase sólida, en donde se suele construir la secuencia partiendo del extremo *C*-terminal hacia el extremo *N*-terminal, en el método propuesto la dirección de construcción de la secuencia parte desde el extremo *N*-terminal al extremo *C*-terminal.

Por otra parte, la elección del punto de formación del ciclo de Phakellistatina-13 tiene como consecuencia el establecimiento del orden en que se acoplan los aminoácidos de la secuencia. Como punto de cierre se elige al enlace peptídico entre el residuo de *L*-triptofano y el residuo de *L*-prolina, por lo que el orden de acoplamiento de los aminoácidos queda como ProPheGlyProThrLeuTrp.



Esquema 27. Diagrama general de la retrosíntesis.

PARTE EXPERIMENTAL

La separación de los productos de reacción se realizó por cromatografía en columna “flash” y por cromatografía en columna al vacío, usando como fase estacionaria sílica gel marca Merck.

La pureza de los productos así como el seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina utilizando cromatofolios Macherey-Nagel, usando como reveladores: una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N y una solución de ninhidrina al 0.1% en agua/isopropanol.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos.

Los reactivos empleados son de marca Aldrich y los disolventes empleados en las reacciones y en la purificación de los productos se destilaron y secaron de acuerdo a lo descrito en la literatura¹.

Los espectros de IR fueron determinados en pastilla en un espectrofotómetro Bruker Tensor-27 y solo se describen las señales de diagnóstico en cm^{-1} .

Las rotaciones ópticas específicas fueron determinadas en un polarímetro Jasco modelo DIP-360.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C se obtuvieron en los siguientes equipos: Bruker-Avance de 300 MHz, Varian Unity de 300 MHz y Varian-Gemini de 200 MHz. Los desplazamientos químicos están dados en ppm con respecto al TMS y los de RMN- ^{13}C con respecto al CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$. Las constantes de acoplamiento se indican en Hz.

Los espectros de masas fueron obtenidos en un equipo Jeol AX505HA y solo se describe el ion molecular.

El análisis por HPLC se realizó en un cromatografo Waters 1525 acoplado a un detector de masas Bruker.

Obtención de BOC-Prolina. Se pesó L-Prolina en su forma de ion zwitter (2.67 g, 23.23 mmol), se agregó agua (23.2 mL), NaOH 1M (23.2 mL) y dioxano (20 mL). Esta mezcla

¹ Perrin, D. D.; Amergo, F. L. W. *Purification of Laboratory Chemicals*. 1994, 3rd edition, Pergamon Press, Great Britain.

se mantuvo en baño de hielo-agua en agitación. En otro matraz se pesó de pirocarbonato de ditertbutilo (5.57 g, 25.52 mmol) que se disolvió con dioxano (23 mL). Esta última disolución se adicionó lentamente en frío a la disolución de Prolina.

La mezcla de reacción se agitó por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se evaporó el disolvente (mezcla dioxano-agua) a presión reducida hasta dejar un residuo de unos 15 mL, se agregó agua destilada hasta completar 50 mL a 60 mL.

A continuación, se agregó ácido cítrico sólido hasta alcanzar un pH de 3 a 4.

La disolución ácida resultante se extrajo exhaustivamente con acetato de etilo, la fases orgánicas se lavaron con salmuera por duplicado, se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida.

Se obtiene un sólido blanco (92% rendimiento) de punto de fusión 130-132°C.

Datos espectroscópicos

Rotación óptica: $[\alpha]_D^{25} -59$ (c = 5.1 mg/mL, metanol)

IR (pastilla KBr) $1/\lambda$ (cm⁻¹): 2974, 2934, 2897, 1740, 1644, 1430.

RMN-¹H: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (\int , multiplicidad, J): 8.3 (1, s), 2 señales dd a 4.30 ppm (1, 2dd), 3.45 ppm (4, m), 2.2-1.8 (4, m), 2 señales s (9, 3s): 1.48 (s), 1.42 (s).

RMN-¹³C: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (DEPT): 178.6 (C_{cuat.}), 174.6 (C_{cuat.}), 156.6 (C_{cuat.}), 153.8 (C_{cuat.}), 81.5 (C_{cuat.}), 80.3 (C_{cuat.}), 59.1 (CH), 58.9 (CH), 47.0 (CH₂), 46.4 (CH₂), 30.8 (CH₂), 28.3 (CH₃), 24.3 (CH₂), 23.6 (CH₂).

EM: (m/z): 214 [M⁺-1].

Método general del acoplamiento BOC-ProPhe

Se pesaron BOC-Pro (100 mg, 0.46 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) (107 mg, 0.69 mmol) junto con dicitclohexilcarbodiimida (DCC) (133 mg, 0.69 mmol). Se adicionaron 50 mL de diclorometano, la mezcla se agitó por una hora a temperatura ambiente, después se evaporó el diclorometano a presión reducida para finalmente adicionar THF.

Para encontrar la cantidad adecuada de ion zwitter necesaria en la formación del dipéptido, se realizaron ensayos con 1.1 equivalentes (90.3 mg, 0.54 mmol), 2 equivalentes (153.5 mg,

0.92 mmol), 3 equivalentes (230.2 mg, 1.39 mmol), así como 4 equivalentes (307 mg, 1.85 mmol). Para cada ensayo, se pesó la cantidad correspondiente del zwitterion de fenilalanina y se le agregó una cantidad equimolar de una solución de NaOH de concentración 1M. A esta última disolución, se le agregó el doble de volumen de THF para adicionarse por goteo lento a la disolución de los ésteres activados de la BOC-Prolina en THF. Una vez terminada la adición la mezcla de reacción se agitó por veinte horas a temperatura ambiente.

El trabajo de la reacción se realizó de la siguiente manera:

Se evaporó el THF a presión reducida. Al residuo obtenido se le adicionó acetato de etilo (15 mL) junto con una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 7% (10 mL). La mezcla se transfirió a un embudo de separación, la fase acuosa se separó mientras que la fase orgánica se filtró para eliminar la dicitclohexilurea (DCU), ésta fase se extrajo por segunda vez con la solución al 7% de NaHCO₃ (10 mL). Las fases acuosas básicas se reunieron para cambiar el pH a un valor de 4 mediante la adición de ácido cítrico. La solución acuosa ácida obtenida se extrajo con 15mL de AcOEt en tres ocasiones. Se reunieron los extractos orgánicos, la fase orgánica resultante se lavó con salmuera hasta pH neutro, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, para finalmente evaporar el disolvente a presión reducida. Como producto de reacción se obtuvo una mezcla del dipéptido BOC-ProPhe y HOBT.

Separación de la mezcla de BOC-ProPhe e HOBT

a) Preparación de diazometano.

Se agregaron 250 mg de *N*-nitroso-*N*-metilurea a éter etílico (20 mL) suspendido sobre una solución acuosa de KOH al 50% (6 mL). La adición se realizó a 0°C, la mezcla de reacción se agitó durante veinte minutos, se transfirió a un embudo de separación, se separaron las fases y la fase etérea se secó sobre lentejas de KOH.

b) Metilación de la mezcla

La mezcla de BOC-ProPhe y HOBT se disolvió en una mezcla 1:1 de éter etílico-diclorometano para adicionar por decantación la disolución etérea de diazometano a una temperatura de 0°C. La mezcla de reacción se agitó por 15 minutos, finalmente se dejó a temperatura ambiente por veinte horas.

c) Separación de la mezcla.

La mezcla de reacción se separó por cromatografía en columna. El producto de metilación del dipéptido se obtuvo de la mezcla de elusión AcOEt/hexano 20:80.

El producto se recrystalizó en el sistema éter etílico-hexano. Se obtuvo un producto blanco de punto de fusión 67-69°C.

Datos espectroscópicos del compuesto BOCProPheOMe

Rotación óptica: $[\alpha]_D^{25} -53.8$ (c = 3.4 mg/mL, metanol). Lit²: $[\alpha]_D^{25} -50.4$

IR: (pastilla KBr) $1/\lambda$ (cm⁻¹): 3283, 3080, 2974, 2935, 2880, 1748, 1695, 1554.

RMN-¹H: (300 MHz, CDCl₃, 25°C) δ (ppm) (J, multiplicidad, J): 7.24 (3H, m), 7.09 (2H, m), 6.46 (no def., s), 4.86 (1H, s), 4.23 (1H, s), 3.72 (3H, s), 3.28 (2H, m), 3.19 (1H, dd, 14.1, 5.7 Hz), 3.00 (1H, dd, 14.1, 6.9 Hz), 1.5-2.4 (4H, m), 1.42 (9H, s).

RMN-¹H: (300 MHz, CDCl₃, 50°C) δ (ppm) (J, multiplicidad, J): 7.24 (3H, m), 7.09 (2H, m), 4.85 (1H, c, 6.9 Hz), 4.23 (1H, m), 3.7 (3H, s), 3.28 (2H, m), 3.18 (1H, dd, 14.1, 5.7 Hz), 3.00 (1H, dd, 14.1, 6.9 Hz), 1.5-2.2 (4H, m), 1.42 (9H, s).

RMN-¹³C: (300MHz CDCl₃) δ (ppm): 171.9, 171.7, 136.0, 129.2, 128.5, 127.0, 80.7, 60.4, 52.9, 52.2, 46.9, 38.2, 30.3, 28.3, 23.9.

EM:(m/z): 376 (M⁺)

Método general para la formación de dipéptidos con BOC-Prolina

Se pesaron BOCPro (200 mg, 0.93 mmol), HOBT (213mg, 1.39 mmol), DCC (287 mg, 1.39 mmol) y se agregó diclorometano (50 mL), la mezcla de reacción se agitó durante una hora a temperatura ambiente para obtener los ésteres activados de benzotriazol. La formación de los ésteres se monitoreó por cromatografía en capa fina. Una vez formados los intermediarios reactivos, se evaporó el diclorometano a presión reducida para posteriormente adicionar THF como disolvente. Simultáneamente a la evaporación, en otro matraz bola se pesó la cantidad correspondiente a cuatro equivalentes (3.71 mmol) del zwitterion del aminoácido respectivo que se usó en cada caso, añadiendo posteriormente

² (a) Carpino, L. A.; Mansour, E.S. M. E.; Sadat-Aalae, D. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2611-2614. (b) *Ind. J. Chem sect. B* **2004**, *43B*, 2708-2712.

una cantidad equimolar de NaOH 1M (3.7 mL) más el doble de volumen de THF (8 mL). Posteriormente, esta disolución se transfirió a un embudo de adición para ser adicionada lentamente a la disolución que contenía a los ésteres activados de BOC-Prolina. Al término de la adición, la reacción se dejó en agitación durante veinte horas a temperatura ambiente.

El trabajo de reacción en cada uno de los casos se realizó de la siguiente manera:

Se evaporó el THF a presión reducida. Al residuo obtenido se le adicionó acetato de etilo (15 mL) junto con una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 7% (10 mL). La mezcla se transfirió a un embudo de separación, la fase acuosa se separó mientras que la fase orgánica se filtró para eliminar la dicitclohexilurea (DCU), ésta fase se extrajo por segunda vez con la solución al 7% de NaHCO₃ (10 mL). Las fases acuosas básicas se reunieron para cambiar el pH a un valor de 4 mediante la adición de ácido cítrico. La solución acuosa ácida obtenida se extrajo con 15mL de AcOEt en tres ocasiones. Se reunieron los extractos orgánicos, la fase orgánica resultante se lavó con salmuera hasta pH neutro, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, para finalmente evaporar el disolvente a presión reducida. Como producto de reacción se obtuvo una mezcla del dipéptido correspondiente y HOBt.

Las mezclas obtenidas se analizaron por RMN-¹H (200 MHz) con dos objetivos: identificar a los productos de cada reacción y obtener los rendimientos respectivos. Para el cálculo de rendimiento se tomaron en cuenta señales específicas de cada uno de los productos así como su respectivo valor de integral.

Dipéptido BOC-ProGly

Se utilizaron 279 mg (3.71 mmol, 4 equivalentes) del zwitterion de glicina para realizar el acoplamiento.

Se obtuvieron 252 mg de la mezcla HOBt:BOCProGly, la proporción HOBt:dipéptido fue de 2.5:1. En RMN-¹H se observan las siguientes señales:

Para el 1-hidroxibenzotriazol:

RMN-¹H: (200 MHz, CDCl₃-DMSO-d₆): δ (ppm) (J, multiplicidad, J): 10.05 (1, s), 7.90 (1, d, 8.2 Hz), 7.68 (1, d, 7.6 Hz), 7.43 (2, 2dd (no primer orden))

Para el dipéptido BOC-ProGly:

RMN-¹H: (200 MHz, CDCl₃-DMSO-d₆): δ (ppm) (J, multiplicidad, J): 10.05 ppm (1, s), 7.20 (s), 6.80 (s), 4.20 (1, s), 3.99 (2, 2d (sist. AB)), 3.86, 3.47 (2, 2s), 2.30-1.70 (4, m), 1.45 (9, s).

Las señales utilizadas para evaluar la proporción HOBT:dipéptido fueron: la señal a 7.9 ppm para el HOBT y la señal a 4.2 ppm para el dipéptido.

Dipéptido BOCProPro

Se utilizaron 428 mg (3.71 mmol, 4 equivalentes) del zwitterion de L-prolina para realizar el acoplamiento. Se obtuvieron 341 mg de la mezcla HOBT:BOCProPro, la proporción HOBT:dipéptido fue de 1.49:1. En RMN-¹H se observan las siguientes señales:

Para el 1-hidroxibenzotriazol:

RMN-¹H: (200 MHz, CDCl₃-DMSO-d₆): δ (ppm) (J, multiplicidad, J): 9.02 (1, s), 7.90 (1, d, 8.2 Hz), 7.68 (1, d, 7.6 Hz), 7.43 (2, 2dd (no primer orden))

Para el dipéptido BOC-ProPro:

RMN-¹H: (200 MHz, CDCl₃ DMSO-d₆): δ (ppm) (J, multiplicidad, J): 9.02 (1, s), 4.50 (2, m), 3.50 (4, m), 2.00 (8, m), 1.44, 1.38 (9, 2s).

Las señales utilizadas para evaluar la proporción HOBT:dipéptido fueron: la señal a 7.9 ppm así como la señal a 4.50 ppm para el dipéptido.

Dipéptido BOCProThr

Se utilizaron 442 mg (3.71 mmol, 4 equivalentes) del zwitterion de L-treonina para realizar el acoplamiento. Se obtuvieron 234 mg de la mezcla HOBT:BOCProThr, la proporción HOBT:dipéptido fue de 1.6:1. En RMN-¹H se observan las siguientes señales:

Para el 1-hidroxibenzotriazol:

RMN-¹H: (200 MHz, CDCl₃-DMSO-d₆): δ (ppm) (J, multiplicidad, J): 7.90 (1, d, 8.2 Hz), 7.67 (1, d, 7.6 Hz), 7.42 (2, 2dd (no primer orden)), 4.97 (1, s).

Para el dipéptido BOC-ProThr:

RMN-¹H: (200 MHz, CDCl₃ DMSO-d₆): δ (ppm) (J, multiplicidad, J): 7.15 (no det., d), 4.97 (no det., s), 4.51 (1, d), 4.29 (2, m), 3.50 (2, m), 2.0 (4, m), 1.45 (9, s), 1.17 (3, d, 6.4Hz).

Las señales utilizadas para evaluar la proporción HOBT:dipéptido fueron: la señal a 7.9 ppm y la señal a 1.17 ppm para el dipéptido.

Dipéptido BOC-ProLeu

Se utilizaron 487 mg (3.71 mmol, 4 equivalentes) del zwitterion de L-leucina para realizar el acoplamiento. Se obtuvieron 376 mg de la mezcla HOBT:BOCProLeu, la proporción HOBT:dipéptido fue de 1.25:1. En RMN-¹H se observan las siguientes señales:

Para el 1-hidroxibenzotriazol:

RMN-¹H: (200 MHz, CDCl₃-DMSO-*d*₆): δ (ppm) (J, multiplicidad, J): 7.90 (1, d, 8.2 Hz), 7.68 (1, d, 7.6 Hz), 7.43 (2, 2dd (no primer orden)).

Para el dipéptido BOCProLeu:

RMN-¹H: (200 MHz, CDCl₃ DMSO-d₆): δ (ppm) (J, multiplicidad, J): 8.16 (1, s), 6.68, 7.30 (no det., 2s), 4.52 (1, s), 4.26 (1, s), 3.44 (2, s), 2.40-1.30 (16, m), 0.90 (6, d, 4.8Hz).

Las señales utilizadas para evaluar la proporción HOBT:dipéptido fueron: la señal a 7.90 ppm y las señales a 3.44 ppm y así como la señal a 0.90 ppm para el dipéptido.

Dipéptido BOC-ProTrp

Se utilizaron 759 mg (3.71 mmol, 4 equivalentes) del zwitterion de L-triptofano para realizar el acoplamiento. Se obtuvieron 452 mg de la mezcla HOBT:BOCProTrp, la proporción HOBT:dipéptido fue de 1.87:1. En RMN-¹H se observan las siguientes señales:

Para el 1-hidroxibenzotriazol:

RMN-¹H: (200 MHz, CDCl₃-DMSO-d₆): δ (ppm) (J, multiplicidad, J): 7.90 (1, d, 8.2 Hz), 7.69 (1, d, 7.6 Hz), 7.42 (2, 2dd (no primer orden)).

Para el dipéptido BOCProTrp:

RMN-¹H: (200 MHz, CDCl₃ DMSO-d₆): δ (ppm) (J, multiplicidad, J): 9.00 (1, s), 7.59 (1, d, 7.2Hz), 7.33 (1, d, no det.), 7.13 (1, ddd, 7.0, 1.4Hz), 7.05 (1, ddd, 7.0, 1.2Hz), 7.05 (1, s), 4.83 (1, c (ddd)), 4.17 (1,s), 3.38 (1, dd, 14.8, 5.2Hz), 3.28 (1, dd, 14.8, 5.8Hz), 3.24 (2, s), 2.20-1.40 (4, m), 1.35 (9, s).

Las señales utilizadas para evaluar la proporción HOBT:dipéptido fueron: la señal a 7.90 ppm y la señal a 4.83 ppm para el dipéptido.

Método general de acoplamiento lineal.

Se pesaron BOC-Pro (1 g, 4.64 mmol), HOBt (1.07 g, 6.97 mmol), DCC (1.33 g, 6.97 mmol) y se añadió diclorometano (100 mL), la reacción se agitó durante una hora a temperatura ambiente, para formar los ésteres activados de BOC-Pro. Una vez formados los ésteres activados, se evaporó el diclorometano a presión reducida para adicionar THF. De manera simultánea, se pesaron 3.07 g (4 equivalentes) del zwitterion de fenilalanina que se disolvieron en 18 mL de una solución 1M de NaOH junto con 40mL de THF. La mezcla se transfirió a un embudo de adición para ser agregada lentamente a la disolución de los ésteres activados. Una vez terminada la adición la mezcla de reacción se agitó por veinte horas a temperatura ambiente.

El trabajo de la reacción se realizó de la siguiente manera:

Se evaporó el THF a presión reducida. Al residuo obtenido se le adicionó acetato de etilo (15 mL) junto con una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 7% (10 mL). La mezcla se transfirió a un embudo de separación, la fase acuosa se separó mientras que la fase orgánica se filtró para eliminar la dicitclohexilurea (DCU), ésta fase se extrajo por segunda vez con la solución al 7% de NaHCO₃ (10 mL). Las fases acuosas básicas se reunieron para cambiar el pH a un valor de 4 mediante la adición de ácido cítrico. La solución acuosa ácida obtenida se extrajo con 15mL de AcOEt en tres ocasiones. Se reunieron los extractos orgánicos, la fase orgánica resultante se lavó con salmuera hasta pH neutro, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, para finalmente evaporar el disolvente a presión reducida. Como producto de reacción se obtuvo una mezcla del dipéptido BOC-ProPhe y HOBt.

A esta mezcla se le adicionaron 1.294 g de DCC (1.35 eq) además de diclorometano (100 mL). La mezcla se agitó por una hora a temperatura ambiente para formar los ésteres activados correspondientes. Posteriormente se evaporó el diclorometano a presión reducida para agregar THF. Se pesaron 4 equivalentes del siguiente aminoácido que se disolvieron en una cantidad equimolar de una solución 1M de NaOH y THF (1:2). Esta disolución se adicionó lentamente a la solución correspondiente de los ésteres activados, la mezcla final de reacción se agitó por veinte horas a temperatura ambiente. La reacción se trabajó de la

misma manera que la reacción de formación del dipéptido BOC-Pro-Phe. Los acoplamientos siguientes se realizaron siguiendo los pasos ya descritos.

Evaluación de la cantidad del producto BOC-ProPheGlyProThrLeuTrp.

La mezcla del producto lineal BOC-ProPheGlyProThrLeuTrp y el HOBT se separó mediante cromatografía en columna al vacío. De las fracciones eluidas con AcOEt/MeOH (95:5 y 90:10) se obtuvieron 1.763 g de un sólido blanco amorfo que se descompone antes de fundir a partir de los 130°C. El sólido se analizó por HPLC-UV y HPLC-masas, donde se observó que el sólido era una mezcla de productos en donde la secuencia deseada solo correspondía al 48.4% del total.

Datos espectroscópicos.

IR: (pastilla KBr) $1/\lambda$ (cm⁻¹): 3308, 3061, 2973, 2933, 1651, 1526.

EM: (m/z): 917.5 (M⁺+1).

Metilación de la secuencia BOC-ProPheGlyProThrLeuTrp.

Se pesaron 100 mg del producto sólido anterior que se disolvieron en una mezcla diclorometano-éter dietílico 1:1 (10 mL). La disolución se colocó en un baño de hielo a 0°C para adicionar una disolución etérea de diazometano (20 mL). La reacción se agitó durante quince minutos en baño de hielo, finalmente se dejó veinte horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción resultante se separó por cromatografía en columna relámpago usando como fase estacionaria sílica gel.

De las fracciones eluidas con acetato de etilo se obtuvieron 89 mg de un sólido blanco que se analizó por HPLC-UV, HPLC-masas.

Se observó que el 49.9% del sólido corresponde a la secuencia lineal BOC-ProPheGlyProThrLeuTrp-OMe.

EM: (m/z): 931.7 (M⁺+1).

Macrolactamización. Síntesis de la Phakellistatina-13

Capacidad de epimerización del soporte sólido catalítico tipo hidrotalcita (hidrotalcita Aldrich[®]).

Se pesó BOC-ProPheOMe (56 mg) junto con 250 mg de hidrotalcita Aldrich[®] y se agregó diclorometano seco (50 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante a reflujo durante veinticuatro horas. Al término de este tiempo, la mezcla de reacción se filtró sobre celita para eliminar la hidrotalcita, el filtrado se evaporó a presión reducida para eliminar el disolvente. El residuo sólido se recristalizó de éter-hexano. Se obtuvo un sólido blanco con punto de fusión de 67-68°C.

Datos espectroscópicos:

Rotación óptica: $[\alpha]_D^{25} -48.8$ (c = 3.3 mg/mL, metanol)

RMN-¹H: (300 MHz, CDCl₃, 50 °C) δ (ppm) (J, multiplicidad, J): 7.24 (3H, m), 7.09 (2H, m), 4.85 (1H, c, 6.9 Hz), 4.23 (1H, d_{ancho}, 7.3Hz), 3.7 (3H, s), 3.28 (2H, m), 3.18 (1H, dd, 13.9, 5.7 Hz), 3.00 (1H, dd, 13.9, 6.9 Hz), 1.7-2.4 (4H, m), 1.42 (9H, s).

Macrolactamización

Para realizar la desprotección del grupo BOC, se pesaron 150 mg de la muestra que contenía la secuencia lineal BOC-ProPheGlyProThrLeuTrp que se disolvieron en diclorometano seco (50 mL). La solución obtenida se colocó en baño de hielo para burbujear cloruro de hidrógeno seco durante 10 minutos. Al término de este proceso se observó la formación de un sólido blanco insoluble. Posteriormente se evaporó el disolvente a presión reducida, el sólido obtenido se resuspendió en diclorometano, se filtró y se lavó.

De este sólido se pesaron 121 mg junto con HOBT (32.5 mg, 0.21 mmol, 1.5 equivalentes[‡]) y 300 mg de hidrotalcita Aldrich[®], se adicionó diclorometano seco (150 mL), la suspensión obtenida se colocó en un baño de hielo bajo atmósfera inerte a 0°C. Posteriormente se adicionó una disolución (50 mL) de EDC en diclorometano seco (40.7 mg de EDC, 0.21

mmol, 1.5 equivalentes[‡]). La reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante cinco días. Al término de este tiempo, se trabajó la reacción de acuerdo con el siguiente procedimiento.

En primer lugar se evaporó el disolvente a presión reducida, una vez eliminado éste, el residuo sólido se redisolvió en metanol para finalmente filtrarlo sobre celita para eliminar la hidrotalcita. El filtrado se evaporó nuevamente a presión reducida, el residuo sólido se redisolvió en una mezcla acetato de etilo-solución acuosa al 7% de NaHCO₃, se colocó en un embudo de separación al que se adicionó una disolución de salmuera; a continuación, se realizó la extracción correspondiente separando la fase acuosa y añadiendo a la fase orgánica una mezcla de disoluciones de NaHCO₃ al 7%-salmuera. Una vez realizado este segundo proceso de extracción, a la fase orgánica se adicionó una mezcla de disoluciones de ácido cítrico al 10%-salmuera para realizar un lavado ácido a dicha fase, este procedimiento se realizó por duplicado. Posteriormente, se adicionó una disolución de carbonato de potasio mezclada con una disolución de salmuera a la fase orgánica, este proceso se realizó también por duplicado. La fase orgánica obtenida, se lava finalmente con una disolución de salmuera hasta obtener un pH neutro en los lavados. Por último, la fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Como resultado se obtuvo un sólido amorfo con ligera coloración amarilla (91 mg). El residuo sólido obtenido (91 mg) se separó por cromatografía en columna relámpago usando como fase estacionaria sílica gel. Se obtuvieron 61mg de un sólido amorfo de color blanco de las fracciones eluidas con CH₂Cl₂:metanol (95:5) y CH₂Cl₂:metanol (90:10). El sólido se analizó por HPLC-masas, HPLC-UV en donde se determinó que el 37.6% corresponde al compuesto cíclico, la Phakellistatina 13, cuyo ion molecular tiene una relación m/z de 799.4 (M⁺+1).

Datos espectroscópicos

IR: (pastilla KBr) 1/λ (cm⁻¹):

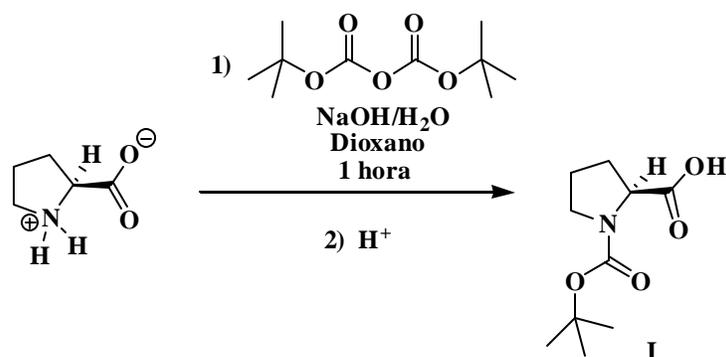
RMN-¹H:

EM: (m/z): 799.4 (M⁺+1).

[‡] Se consideró que la muestra solo contiene al clorhidrato del heptapéptido lineal (0.14 mmol).

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El primer paso en el desarrollo de la metodología propuesta consistió en la protección de la prolina a partir de la reacción entre el zwitterion de la prolina con el pirocarbonato de dterbutilo en una mezcla dioxano-H₂O de acuerdo con lo descrito en la literatura química (Esquema 28)³.



Esquema 28. Reacción de protección del zwitterion de Prolina.

Como producto de la reacción de protección se obtiene un sólido blanco amorfo con punto de fusión de 130-132°C con un 92% de rendimiento y rotación óptica $[\alpha]_D^{25}$ de -59 . En el espectro de infrarrojo (espectro 1) se observan bandas a 2974, 2934, 2897 y 1430 cm^{-1} correspondientes a vibraciones C-H de sistemas saturados, en 1740 cm^{-1} se tiene una banda intensa que corresponde a la vibración C=O de un ácido carboxílico. Finalmente, a 1644 cm^{-1} aparece una banda que se asocia a la vibración C=O del grupo carbamato.

En el espectro de resonancia magnética de hidrógeno (RMN ¹H) (espectro 2) se tienen las siguientes señales: En 8.3 ppm hay una señal ancha que integra para un protón y que se asigna al hidrógeno del grupo carboxilo de la *N*-BOC-Prolina. A continuación, hacia campo alto se observa un par de señales a 4.35 y 4.25 ppm respectivamente, ambas señales integran para un protón y pertenecen al hidrógeno en posición alfa al grupo carboxilo ubicado en el anillo de pirrolidina. Se observan dos señales como resultado de la existencia de dos confórmeros de la molécula de *N*-BOC-Prolina, de esta manera cada señal corresponde a una población de protones asociada a un confórmero. Ambas señales

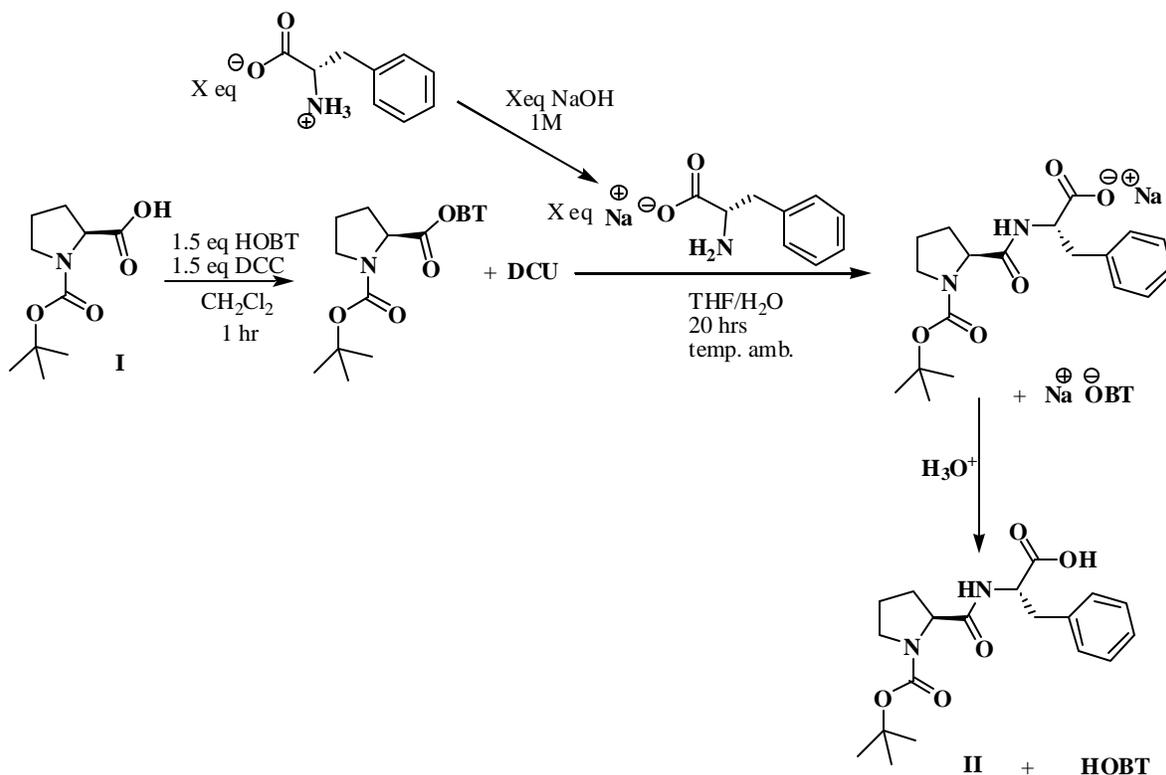
³ M. Bodanszky, A. Bodanszki. *The practice of peptide synthesis* 1994, 2nd edition, Springer-Verlag, Berlin, p. 17

adquieren la forma de un doble de doble, la señal a 4.35 ppm presenta constantes de acoplamiento de 8.4 y 2.7 Hz mientras que la señal a 4.25 ppm presenta constantes de acoplamiento de 8.4 y 4.2 Hz. En 3.45 ppm se tiene un conjunto de señales (multiplete) que integra para dos protones y que corresponde a los hidrógenos del grupo metileno de la posición cinco del anillo de pirrolidina. Hacia campo alto, alrededor de 2.1 ppm aparece un conjunto de señales que integra para cuatro protones y que se asocia con los hidrógenos de los grupos CH₂ de las posiciones tres y cuatro del anillo de pirrolidina. Finalmente, a 1.48 ppm y a 1.42 ppm hay un par de señales singulete que integran de manera conjunta para nueve protones y que corresponden a los CH₃ del grupo *ter*-butilo, las dos señales se explican como resultado de la existencia de dos conformaciones en la molécula.

En la resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN-¹³C) (espectros 3 a 6), también es posible observar la presencia de señales dobles debidas a las conformaciones de la molécula. Así, a 178.6 ppm y a 174.6 ppm hay dos señales de carbono cuaternario que se asignan al átomo de carbono del grupo carboxilo; a 156.6 ppm y 153.8 ppm se tiene otro par de señales de carbono cuaternario que pertenecen al átomo de carbono del grupo uretano; a 81.5 ppm y 80.3 ppm se observa un par de señales que se asocian al átomo de carbono cuaternario sp³ base de oxígeno del grupo *ter*-butilo; a 59.1 ppm y 58.9 ppm se presenta un par de señales que en el espectro DEPT (espectro 6) corresponden a CH y que se asignan al carbono alfa al grupo carboxilo en el anillo de pirrolidina (CH de la posición 2 del anillo); asimismo, a 47 ppm y a 46.4 ppm se ven dos señales que corresponden a CH₂ y que se propone son del carbono del grupo CH₂ de la posición cinco del anillo de pirrolidina; a 30.8 ppm hay una señal que corresponde a CH₂ y que se vincula al átomo de carbono de la posición tres del anillo de pirrolidina; a continuación en 28.3 ppm aparece una señal muy intensa que se relaciona con los átomos de carbono de los CH₃ del grupo *ter*-butilo. Finalmente a 24.3 ppm y 23.6 ppm se tiene un par de señales que en el espectro DEPT se asocian a carbonos de CH₂ y que pertenecen al átomo de carbono de la posición cuatro en el anillo de pirrolidina.

En la espectrometría de masas por impacto electrónico (espectro 7), se observa el ion molecular a m/z 214 [M⁺-1].

Una vez obtenido la *N*-BOC-Prolina (**I**), el siguiente paso consistió en ensayar la reacción de acoplamiento variando la cantidad del zwitterion de fenilalanina. Para esto, se realizaron reacciones de formación del dipéptido *N*-BOCProPhe (**II**) con 1.1, 2, 3 y 4 equivalentes del zwitterion.

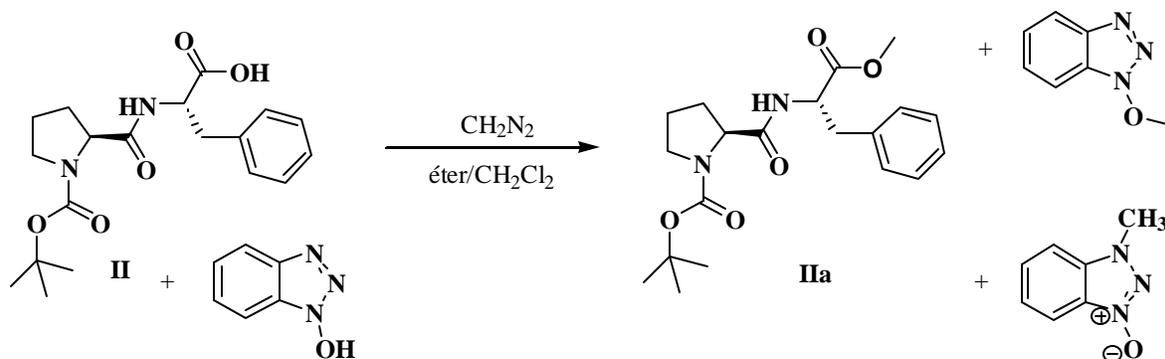


Esquema 29. Reacción de formación del dipéptido BOCProPhe **II**

En primer lugar se realizó la activación de la *N*-BOC-Prolina (**I**) en diclorometano usando DCC y HOBT para obtener los ésteres activados; en este punto es importante señalar que a diferencia de lo que ocurre en los métodos más tradicionales de síntesis de péptidos en los que se usa HOBT, en la estrategia propuesta, los ésteres de benzotriazol no se generan *in situ*, sino que son generados de manera separada para posteriormente ser expuestos a la presencia del nucleófilo. La formación de los ésteres activados se verificó por cromatografía en capa fina, de tal manera que una vez formados se evaporó el diclorometano y se cambió el disolvente por THF. Finalmente, se adicionó la cantidad correspondiente de zwitterion liberado como sal de sodio a los ésteres activados de benzotriazol disueltos en THF. El tiempo de reacción considerado para los cuatro ensayos fue de 20 horas. Al término de la reacción se obtiene el producto deseado en forma de sal

de sodio mezclado con la sal de sodio del HOBT, HOBT, DCU (formada en el proceso de la activación), fenilalanina en su forma de zwitterion y otros subproductos. La reacción se trabajó de acuerdo con lo descrito en la parte experimental y al final se obtuvo como producto de la reacción una mezcla del dipéptido *N*-BOCProPhe (**II**) y HOBT (Esquema 29).

Para evaluar la cantidad obtenida de producto en las condiciones propuestas y determinar la cantidad óptima de zwitterion de fenilalanina necesaria para realizar el acoplamiento, era preciso realizar una separación de ambos compuestos; para facilitar la separación se utilizó una reacción de metilación (Esquema 30) que permitiera obtener los derivados metilados de benzotriazol y del dipéptido. La reacción de metilación se llevó a cabo utilizando diazometano como agente metilante. La elección tanto de la reacción como del reactivo se fundamenta en el hecho de que la metilación de ácidos carboxílicos con diazometano es una reacción que procede con altos rendimientos y es selectiva en presencia de otros grupos funcionales. Para generar el diazometano se utilizó *N*-nitroso-*N*-metilurea de acuerdo a lo descrito en la literatura química⁴.



Esquema 30. Reacción de metilación.

La mezcla de reacción de la metilación se separó por cromatografía en columna. En las fracciones eluidas con AcOEt/hexano (20:80) se obtuvo el éster metílico *N*-BOCProPheOMe (**IIa**), que fue recristalizado de un sistema éter-hexano como un sólido blanco amorfo de punto de fusión de 67-69°C.

⁴ (a) Arndt, F. *Organic Syntheses* **1935**, XV, 3-5. (b) Black, T.H. *Aldrichimica Acta* **1983**, 16, 3-9.

Este procedimiento de separación se realizó para los cuatro ensayos realizados. El producto obtenido en cada uno de los casos se pesó y se determinó comparativamente el rendimiento obtenido para la reacción de acoplamiento.

Los resultados obtenidos se resumen en el gráfico 1.

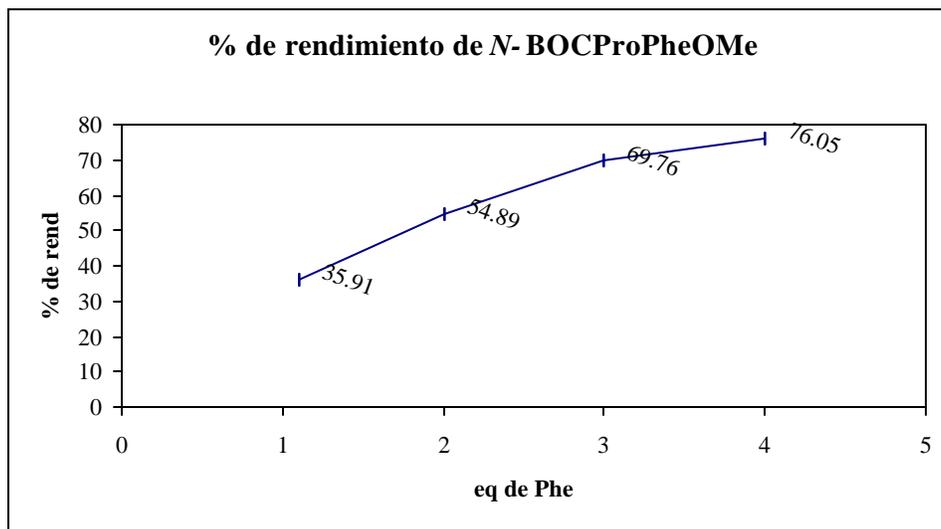


Gráfico 1. Comparación del rendimiento del dipéptido *N*-BOCProPheOMe para 1.1, 2, 3 y 4 equivalentes de zwitterion de Phe

La cantidad óptima estimada de zwitterion de fenilalanina para lograr un rendimiento considerable fue de cuatro equivalentes por cada equivalente de *N*-BOC Prolina.

Una vez establecida ésta cantidad, se generalizó el uso de cuatro equivalentes para cada uno de los aminoácidos que se requerían acoplar de manera lineal para formar la secuencia deseada.

Los resultados demuestran que es posible realizar el acoplamiento de dos aminoácidos usando uno de ellos como zwitterion (especie no protegida) en un medio no anhidro, aprovechando la reactividad de los ésteres de benzotriazol, los cuales no se forman *in situ*, sino que son formados por separado. Por otra parte, la cuestión referente a la epimerización de los centros fue también un aspecto importante a considerar, para ello se consultaron valores de rotación óptica reportados en la literatura química del éster metílico del dipéptido *N*-BOCProPhe (**II**)⁴². El valor de rotación óptica descrito para el compuesto en

metanol es de -50.4 ($\lambda = 589.3$ nm). El valor de rotación óptica obtenido experimentalmente para el compuesto sintetizado por la estrategia propuesta a 25°C en metanol es de -53.8 ($\lambda = 589$ nm).

Por otro lado, para verificar la ausencia de epímeros se obtuvo el espectro de RMN- ^1H en cloroformo a 25°C y a 50°C en un equipo de 300 MHz (espectros 8 a 10). En el espectro de RMN- ^1H obtenido a 50°C (espectros 9 y 10) se observa una señal múltiple a 7.24 ppm que integra para tres protones correspondientes a los protones en posición *meta* y *para* del anillo de fenilo de la fenilalanina; en 7.09 ppm aparece una señal multiplete (no primer orden) que integra para dos protones y que se asigna a los protones en posición *orto* en el mismo anillo aromático. En 4.85 ppm se tiene una señal cuadruple ancha (ddd) que integra para un protón y que constituye la parte X de un sistema ABXY; la señal se vincula al hidrógeno en posición α del residuo de fenilalanina, la constante de acoplamiento asociada es de 6.9 Hz. En 4.23 ppm hay una señal doble ancha que integra para un protón cuya constante de acoplamiento es de 7.3 Hz que pertenece al hidrógeno en posición α del residuo de *N*-BOCProlina. En 3.7 ppm aparece una señal singulete que integra para tres protones y que se asigna al grupo CH_3 del éster metílico. En 3.28 ppm se encuentra un conjunto de señales que integran para dos protones y que por desplazamiento químico se asocia a los protones del CH_2 de la posición cinco del anillo de pirrolidina en el residuo de *N*-BOC-Prolina. Hacia campo bajo aparecen las señales de la parte AB del sistema ABXY descrito anteriormente por lo que en 3.18 ppm se tiene una señal dd con constantes de acoplamiento de 14.1 y 5.7 Hz que integra para un hidrógeno y que se propone pertenece a uno de los hidrógenos diastereotópicos de la posición bencílica en el residuo de fenilalanina. A continuación, en 3.00 ppm aparece la señal restante de la parte AB del sistema como un dd con constantes de acoplamiento de 14.1 y 6.9 Hz, que a su vez integra para un protón y que corresponde al otro hidrógeno diastereotópico de la posición bencílica. Entre 1.7 a 2.4 ppm hay un conjunto de señales no muy bien definidas que integran para cuatro protones y que por desplazamiento químico se asocian a los hidrógenos de los CH_2 de las posiciones tres y cuatro del anillo de pirrolidina en el residuo de *N*-BOCProlina. Finalmente a 1.42 ppm aparece una señal singulete que integra para nueve protones y que se asigna a los hidrógenos de los CH_3 del grupo *ter*-butilo..

En los espectros de RMN- ^{13}C obtenidos a 25°C (espectros 11 y 12) se observan 15 señales. En la región de los carbonos sp^2 se tiene una señal en 171.9 ppm de carbono cuaternario, la señal corresponde al átomo de carbono del carbonilo del grupo amida del enlace peptídico. En 171.7 ppm hay otra señal de carbono cuaternario que se asocia al átomo de carbono del carbonilo del éster metílico. En 136 ppm se aprecia una señal más de carbono cuaternario, que se asigna al átomo de carbono *ipso* del anillo aromático en el residuo de fenilalanina. A campo ligeramente más alto, a 129.2 ppm se tiene una señal que en el experimento DEPT (espectro 12) se relaciona con un CH y que se propone pertenece a los átomos de carbono en posición *meta* del mismo anillo aromático; asimismo, la señal a 128.5 ppm es también de un CH y se asigna a los átomos de carbono en posición *orto* del mismo anillo aromático. En 127 ppm hay una señal que en el experimento DEPT se vincula a un CH y que se asocia al átomo de carbono en posición *para* en el mismo anillo aromático. En la región de los carbonos sp^3 a 80.7 ppm, se tiene una señal de carbono cuaternario que por su valor de desplazamiento químico corresponde a un carbono base de oxígeno; considerando esto, se propone que la señal es del átomo de carbono base de oxígeno del grupo *ter*-butilo. En 60.4 ppm se observa una señal de CH que pertenece al carbono de la posición dos del anillo de pirrolidina. En 52.9 ppm hay una señal de CH que se asocia al átomo de carbono a al grupo carboxilo del éster metílico en el residuo de fenilalanina. En 52.2 ppm aparece una señal de CH_3 que por desplazamiento químico pertenece a un carbono primario base de oxígeno de éster por lo que se asigna al grupo metilo del éster metílico. A campo más alto encontramos en 46.9 ppm una señal de carbono secundario (CH_2) base de nitrógeno que se asocia al átomo de carbono de CH_2 de la posición cinco en el anillo de pirrolidina. En 38.2 ppm hay una señal que en DEPT corresponde a un CH_2 y que se propone es del carbono CH_2 de la posición bencílica del residuo de fenilalanina. A continuación, a 30.3 ppm se muestra otra señal de CH_2 que se vincula al átomo de carbono de la posición tres del anillo de pirrolidina. A un lado se puede observar una señal intensa de CH_3 a 28.3 ppm que se asocia a los átomos de carbono de los CH_3 del grupo *ter*-butilo. Finalmente, a 23.9 ppm, aparece una señal de CH_2 que pertenece al átomo de carbono de la posición cuatro del anillo de pirrolidina.

En el espectro de infrarrojo (espectro 13) obtenido en pastilla de KBr se observa una banda a 3283 cm^{-1} correspondiente a la vibración N-H de una amida secundaria, en 3080 cm^{-1} se

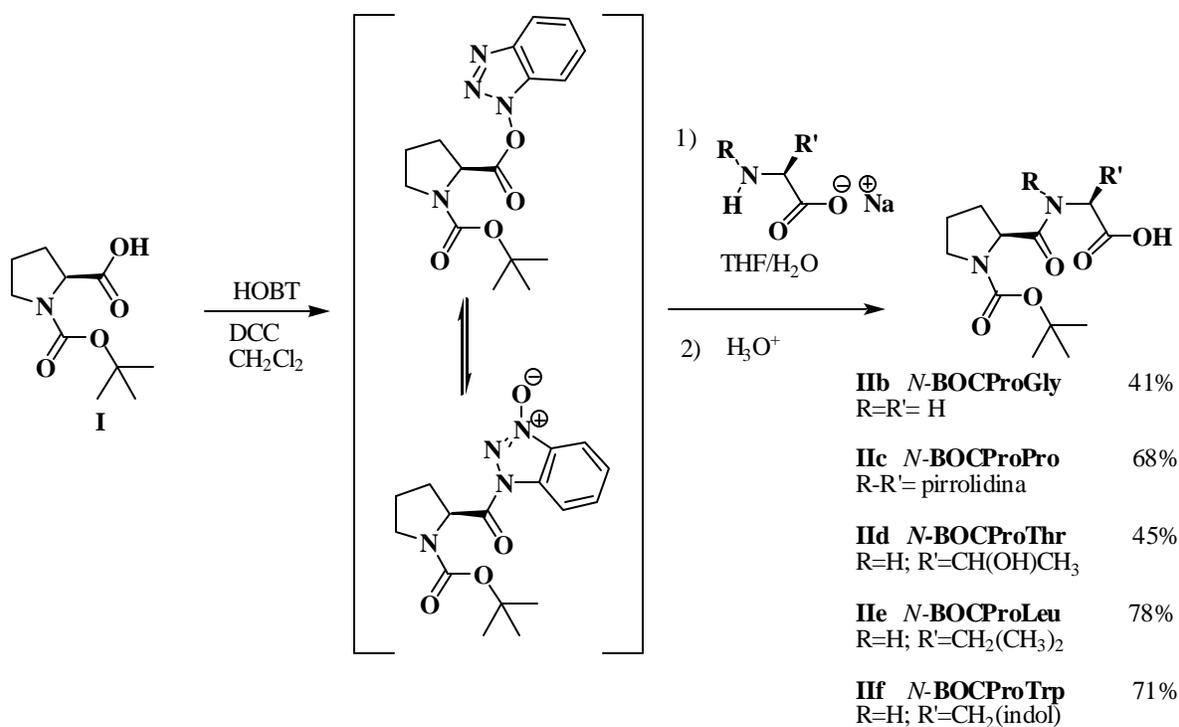
tiene una banda correspondiente a la vibración C-H de un anillo aromático y en esta misma zona del espectro a valores menores de 3000 cm^{-1} hay bandas que corresponden a vibraciones C-H de sistemas saturados. En 1748 cm^{-1} aparece una banda que corresponde a la vibración C=O de un éster alifático, a continuación en 1695 cm^{-1} se tiene otra banda que pertenece a la vibración C=O de una amida. En 1554 cm^{-1} se tiene una banda que se asigna a la vibración C-O de éster. En la espectrometría de masas por impacto electrónico (Espectro 14) se muestra el ion molecular $[M^+]$ a m/z 376.

Para conocer el comportamiento general del método, se realizó una serie de dipéptidos derivados de la *N*-BOC-Prolina (**I**) con cada uno de los aminoácidos involucrados en la secuencia peptídica que se construiría, los rendimientos de estas reacciones solo se evaluaron por RMN- ^1H y solo muestran una tendencia general del comportamiento de la reacción con distintos aminoácidos, los resultados se muestran en la tabla 1.

dipéptido	% rendimiento
<i>N</i> -BOCProGly	41
<i>N</i> -BOCProPro	68
<i>N</i> -BOCProThr	45
<i>N</i> -BOCProLeu	78
<i>N</i> -BOCProTrp	71

Tabla 1. Rendimientos obtenidos para los dipéptidos derivados de la *N*-BOC-Prolina.

Como puede apreciarse, los acoplamientos con Glicina (Gly) y Treonina (Thr) muestran los valores de rendimiento comparativamente más bajos.



Esquema 31. Dipéptidos con *N*-BOCPro

Acoplamiento *N*-BOCProGly

Para realizar este acoplamiento se utilizaron cuatro equivalentes del zwitterion de Glicina y la formación de los ésteres de benzotriazol, así como la reacción de acoplamiento, se realizaron de acuerdo a lo descrito previamente para la formación del dipéptido con fenilalanina. Como resultado de la reacción se obtiene una mezcla *N*-BOCProGly (**IIb**) y HOBT. En el espectro de RMN-¹H obtenido en 200 MHz (espectro 15) se pueden observar las señales correspondientes al HOBT y al dipéptido *N*-BOCProGly. La relación HOBT:*N*-BOCProGly que se observa es de 2.5:1, se obtuvieron 252 mg de dicha mezcla y se partió de 200 mg de *N*-BOCPro. Las señales correspondientes al HOBT son las siguientes: en primer término se tiene a campo bajo una señal simple ancha a 10.05 ppm que integra para dos protones y que corresponde a los hidrógenos del grupo OH del HOBT y del grupo carboxilo del dipéptido *N*-BOCProGly. A continuación en 7.9 ppm y 7.68 ppm, se observan dos señales dobles con constantes de acoplamiento de 8.2 Hz y 7.6 Hz respectivamente, que

integran cada una para un protón y que se asocian con los hidrógenos de las posiciones 4 y 7 del anillo de HOBT. A campo ligeramente más alto, alrededor de 7.43 ppm, se observan dos señales triples sobrepuestas que no obedecen a un comportamiento de primer orden que integran conjuntamente para dos protones y que se asignan a los hidrógenos de las posiciones 5 y 6 del anillo de HOBT. Las señales correspondientes al dipéptido no se resuelven totalmente debido a la presencia de puentes de hidrógeno y conformaciones de la molécula; las señales, descritas de manera general, son las siguientes: a campo bajo se tiene la señal ya descrita a 10.05 ppm que incluye a los protones del grupo carboxilo, a continuación a 7.2 ppm y 6.8 ppm se muestra un par de señales cuya integral no está determinada y que se propone pertenecen al protón del grupo NH del enlace peptídico, se observan dos señales debido a las conformaciones que puede adoptar la molécula. En 4.2 ppm hay una señal simple ancha que integra para un protón (respecto a los otros protones del dipéptido) y que se vincula al hidrógeno en posición α al grupo carbonilo del anillo de pirrolidina. En 3.99 ppm aparece un sistema AB ($J= 17$ Hz) que integra para dos protones y que corresponde a los hidrógenos diastereotópicos del residuo de Glicina. En 3.86 ppm y 3.47 ppm se tienen dos señales simples anchas que se asignan a los protones de la posición cinco del anillo de pirrolidina. Entre 2.3 y 1.7 ppm se muestra un conjunto de señales que integra para cuatro protones y que se propone son de los hidrógenos de los grupos CH_2 de las posiciones tres y cuatro del anillo de pirrolidina. Finalmente en 1.45 ppm, se tiene un singulete que integra para aproximadamente nueve protones y que se asigna a los hidrógenos del grupo *ter*-butilo. Para calcular la proporción de ambos compuestos se usaron las señales a 7.9 ppm para el HOBT y a 4.2 ppm para el dipéptido *N*-BOCProGly (**IIb**).

Acoplamiento *N*-BOCProPro

El acoplamiento se realizó de acuerdo a lo descrito anteriormente utilizando cuatro equivalentes del zwitterion de Prolina. Como producto de la reacción se obtiene una mezcla del dipéptido *N*-BOCProPro (**IIc**) y HOBT. En el espectro de RMN- ^1H obtenido a 200 MHz (espectro 16), se tienen las señales correspondientes a ambos compuestos. La relación HOBT:*N*-BOCProPro es 1.49:1. Se obtuvieron 341 mg de mezcla y al igual que en el acoplamiento anterior se partió de 200 mg de *N*-BOCProlina. Las señales usadas para

calcular la relación HOBt:dipéptido fueron la señal a 7.9 ppm para el HOBt y la señal a 4.5 ppm para el dipéptido. Las señales correspondientes al anillo de HOBt y su asignación son las mismas que las observadas en el caso anterior. Las señales del dipéptido *N*-BOCProPro son en general bastante complejas debido a las conformaciones que adquiere el compuesto así como a la presencia de puentes de hidrógeno, las señales son las siguientes: En 9.02 ppm se observa una señal simple ancha que corresponde a los hidrógenos del HOBt y del grupo carboxilo del dipéptido. Alrededor de 4.5 ppm se tiene un conjunto de señales que integra para dos protones (respecto a los otros protones del dipéptido) y que por desplazamiento químico se propone pertenecen a los hidrógenos en posición alfa a los grupos carbonilo en cada uno de los anillos de pirrolidina. Alrededor de 3.5 ppm, se muestra otro conjunto de señales que integra para cuatro protones y que se asigna a los hidrógenos en posición α al nitrógeno en ambos anillos de pirrolidina. El siguiente conjunto de señales aparece alrededor de 2 ppm, la integral asociada a este grupo de señales adquiere un valor relativo de ocho protones y se asocia a los hidrógenos de las posiciones tres y cuatro de ambos anillos. Finalmente, en 1.44 ppm y en 1.38 ppm se presentan dos singuletes que integran para nueve protones y que se relacionan con los hidrógenos del grupo *ter*-butilo. Los dos singuletes corresponden a dos distintas conformaciones de la molécula.

Acoplamiento *N*-BOCPro-Thr

El acoplamiento se realizó de acuerdo al procedimiento general descrito anteriormente utilizando cuatro equivalentes del zwitterion de Treonina. Como producto de la reacción se obtiene una mezcla del dipéptido *N*-BOCProThr (**IIId**) y HOBt. En el espectro de RMN-¹H obtenido a 200 MHz (espectro 17) aparecen las señales correspondientes a ambos compuestos. La relación HOBt:*N*-BOCProThr observada es de 1.6:1 y las señales utilizadas para el cálculo fueron la señal a 7.9 ppm para el HOBt y la señal a 1.17 ppm para el dipéptido. Se obtuvieron 234 mg de la mezcla a partir de 200 mg de *N*-BOCProlina. Las señales correspondientes al anillo de HOBt y su asignación son las mismas a las observadas en el caso anterior. Las señales correspondientes al dipéptido *N*-BOCProThr son las siguientes: En 7.15 ppm se tiene una señal doble ancha con una constante de

acoplamiento de 8.6 Hz que se asocia al hidrógeno unido al átomo de nitrógeno del enlace peptídico. En 4.97 ppm se observa una señal simple bastante ancha que se asigna a los hidrógenos del HOBT, del grupo carboxilo y al grupo hidroxilo del residuo de treonina. A continuación en 4.51 ppm hay una señal doble ancha que integra para un protón (con respecto a los otros protones del dipéptido) y que se vincula al hidrógeno en posición α al grupo carboxilo del residuo de treonina. En 4.29 ppm se presenta un conjunto de señales que integra para dos protones y que corresponden a dos señales empalmadas, por desplazamiento químico se propone pertenecen al hidrógeno de la posición dos del anillo de pirrolidina y al hidrógeno del CH base de oxígeno en el residuo de treonina. En 3.5 ppm se muestra una señal multiplete que integra para dos protones y que se asigna a los hidrógenos de la posición cinco del anillo de pirrolidina. En 2.0 ppm hay un conjunto de señales que integra para cuatro protones y que corresponde a los hidrógenos de las posiciones tres y cuatro del anillo de pirrolidina. A continuación, se tiene una señal singulete a 1.45 ppm que integra para nueve protones y que pertenece a los hidrógenos del grupo *ter*-butilo. Finalmente, a 1.17 ppm hay una señal doblete que posee una constante de acoplamiento de 6.4 Hz y que se asocia a los hidrógenos del grupo metilo del residuo de treonina, la señal se encuentra sobrepuesta con otra señal doblete más pequeña que es debida a efectos conformacionales de la molécula, el conjunto de ambas señales integra para tres protones.

Como puede observarse el espectro es en general bastante complejo y en muchas de las señales no se puede determinar la multiplicidad correspondiente, esto se debe principalmente, como ya se dijo, a efectos conformacionales y a la presencia de puentes de hidrógeno.

Acoplamiento *N*-BOCPro-Leu

El acoplamiento se realizó de acuerdo al procedimiento general descrito anteriormente utilizando cuatro equivalentes del zwitterion de Leucina. Como producto de la reacción se obtiene una mezcla del dipéptido *N*-BOCProLeu (**IIe**) y HOBT. En el espectro de RMN- ^1H obtenido a 200 MHz (espectro 18) se tienen las señales correspondientes a ambos compuestos. La relación HOBT:*N*-BOCProLeu observada fue de 1.25:1 y las señales consideradas para realizar el cálculo fueron la señal a 7.68 ppm para el HOBT y las señales

a 3.4 ppm y 0.9 ppm para el dipéptido. Se obtuvieron 376 mg de la mezcla a partir de 200 mg de *N*-BOCPro. Las señales correspondientes al anillo de HOBT y su asignación son las mismas a las observadas en los casos anteriores. Las señales correspondientes al dipéptido son las siguientes: a campo bajo a 8.16 ppm se tiene una señal simple ancha que se asocia a los hidrógenos del grupo carboxilo del dipéptido y a los hidrógenos del grupo OH del HOBT. A aproximadamente 7.3 ppm se observa una señal ancha que junto con la señal a 6.68 ppm, se asignan al hidrógeno unido al nitrógeno del enlace peptídico, la presencia de ambas señales se explica por la existencia de conformaciones que adopta la molécula en solución. A continuación, aparece una señal simple ancha a 4.52 ppm que integra para un protón (con respecto a los otros protones asignados al dipéptido) y que se propone pertenece al hidrógeno en posición α al grupo carboxilo del residuo de leucina. Continuando en dirección de campo alto se presenta una señal a 4.26 ppm que integra también para un protón y que corresponde al hidrógeno en posición α al grupo carbonilo del enlace peptídico en el anillo de *N*-BOCProlina. En 3.44 ppm se tiene una señal simple ancha que integra para dos protones y que se vincula por desplazamiento químico a los protones de la posición cinco en el anillo de pirrolidina en el residuo de *N*-BOCProlina. Continuando hacia campo alto se observa un conjunto de señales montadas entre 2.4 y 1.3 ppm. El conjunto de señales integra para aproximadamente dieciséis protones, dentro de este conjunto de señales podemos asignar por desplazamiento químico las siguientes: la señal a 2.12 ppm se propone es de los hidrógenos de las posiciones tres y cuatro del anillo de pirrolidina; la señal a 1.9 ppm se asocia a su vez al hidrógeno del CH del grupo isopropilo del residuo de leucina; el conjunto de señales contiguas observadas a campo alto alrededor de 1.7 ppm pertenecen al grupo CH₂ del residuo de leucina; finalmente, se establece que la señal singulete a 1.45 ppm es de los hidrógenos del grupo *ter*-butilo. Por último, a campo alto a 0.9 ppm se presenta una señal doblete que integra para seis protones y que se asigna a los grupos metilo del residuo de leucina.

Acoplamiento *N*-BOCProTrp

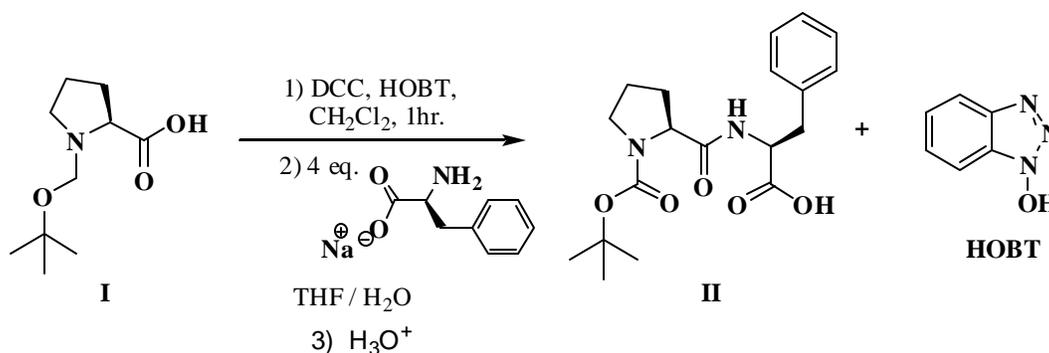
El acoplamiento se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento usando cuatro equivalentes del zwitterion de triptofano. Como producto de reacción se obtiene una mezcla del dipéptido *N*-BOCProTrp (**II**f) más HOBT. En el espectro de RMN-¹H obtenido a 200

MHz (espectro 19), se presentan las señales correspondientes a cada uno de los compuestos. La relación HOBt:N-BOCProTrp que se observa en el espectro es de 1.87:1, las señales utilizadas para evaluar esta proporción fueron: la señal a 7.88 ppm para el HOBt y la señal a 4.83 ppm para el dipéptido N-BOCProTrp. Al final de la reacción se obtienen 452 mg de la mezcla a partir de 200 mg de N-BOCPro. Las señales correspondientes al HOBt son las mismas a las observadas en los casos anteriores, mientras que las señales correspondientes al dipéptido son las siguientes: a campo bajo alrededor de 9 ppm aparece una señal simple ancha que integra para un protón (con respecto a los otros protones del dipéptido) y que corresponde al hidrógeno unido al nitrógeno en el anillo de indol en el residuo de triptofano. En 7.59 ppm se tiene una señal doble ancha con una constante de 7.2 Hz que integra para un protón y que se asigna al hidrógeno de la posición cuatro del anillo de indol. A continuación, en 7.33 ppm se tiene otra señal doble, montada con las señales del anillo de HOBt, que se establece pertenece al hidrógeno de la posición 7 del anillo de indol. Entre 7.2 y 7.0 ppm hay un conjunto de señales que integran en total para cuatro protones, en el conjunto podemos observar en primer término a 7.13 ppm una señal ddd con constantes de acoplamiento de 7, 7 y 1.4 Hz que pertenece al hidrógeno en la posición seis del anillo de indol. Asimismo, se tiene una señal ddd a 7.05 ppm con constantes de acoplamiento de 7, 7 y 1.2 Hz que se asocia al hidrógeno de la posición 5 del anillo de indol. Montada con la señal anterior hay una señal simple ancha que se propone corresponde al hidrógeno unido al nitrógeno del enlace peptídico. Continuando hacia campo alto, se muestra en 4.83 ppm una señal cuadruple ancha que integra para un protón y que se vincula al hidrógeno en la posición á al grupo carboxilo del residuo de triptofano. En 4.17 ppm se tiene una señal simple ancha que integra para un protón y que se asocia al hidrógeno en posición á al carbonilo de la función amida, ubicado en la posición dos del anillo de pirrolidina. En seguida, se observa la parte AB de un sistema ABX. La primera señal se encuentra en 3.38 ppm y tiene constantes de acoplamiento de 14.8 y 5.2 Hz, la segunda señal aparece a 3.28 ppm y tiene constantes de acoplamiento de 14.8 y 5.8 Hz, en conjunto las señales integran para dos protones y corresponden a los hidrógenos diasterotópicos del CH₂ unido al anillo de indol en el residuo de triptofano. Montada con la señal doble de doble a 3.28 ppm se muestra una señal simple ancha a 3.24 ppm que integra para dos protones y que pertenece a los hidrógenos de

la posición cinco del anillo de pirrolidina. Finalmente, entre 1.2 y 2.2 ppm hay un conjunto de señales que integra para trece protones, en donde encontramos a 1.35 ppm una señal singlete correspondiente a los protones del grupo *ter*-butilo y un conjunto de señales que se propone pertenecen a los hidrógenos en las posiciones tres y cuatro del anillo de pirrolidina.

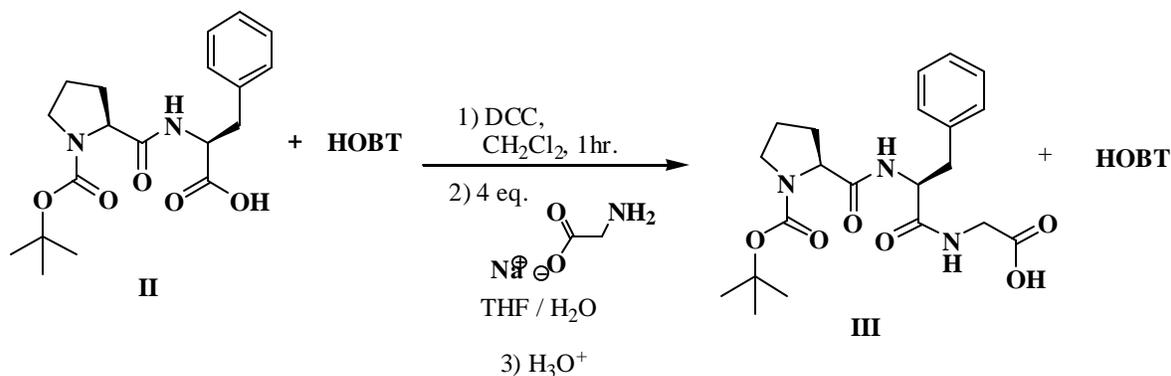
Síntesis de la secuencia peptídica *N*-BOCProPheGlyProThrLeuTrp

La secuencia peptídica se comenzó a partir de *N*-BOCProlina, así el primer aminoácido que se acopló fue la fenilalanina. Para llevar a cabo este acoplamiento se utilizaron 4.64 mmol de BOCPro (1 g), que se activaron en diclorometano (DCM) utilizando 1.5 equivalentes de HOBT y 1.5 equivalentes de DCC. Una vez formados los ésteres activados, se evaporó el DCM y se redisolvieron en THF. Finalmente, se adicionó una disolución en THF/H₂O del zwitterion de fenilalanina liberado con NaOH 1 N (18.58 mmol, 4 equivalentes, 1.07g). La reacción se mantuvo en agitación constante durante veinte horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se trabajó la reacción de acuerdo con la metodología descrita en la parte experimental. Como producto de la reacción se obtiene la mezcla del dipéptido **II** y HOBT (Esquema 32). Para identificar cualitativamente al dipéptido se obtuvo el espectro de resonancia de la mezcla dipéptido:HOBT (Espectro 20).



Esquema 32. Formación del dipéptido **II**.

A esta mezcla de reacción se adicionó el 90% de la cantidad de DCC usada en el primer acoplamiento, la mezcla se disolvió en diclorometano para obtener los correspondientes ésteres de benzotriazol del dipéptido **II**. Posteriormente, después de una hora de reacción se cambió el disolvente por THF y se adicionó una disolución en THF/H₂O del zwitterion liberado de Glicina (16.72 mmol, 4 equivalentes, 1.25g)*. La reacción se agitó a temperatura ambiente por 20 horas. Posteriormente, se trabajó la reacción de acuerdo con la metodología descrita en la parte experimental para obtener la mezcla del tripéptido **III** y HOBT (Esquema 33). Para determinar cualitativamente la presencia del tripéptido, se obtuvo el espectro de RMN-¹H de la mezcla, en el que es posible observar la señal correspondiente a los hidrógenos diasterotópicos del metileno del residuo de glicina a 4.0 ppm (Espectro 21).

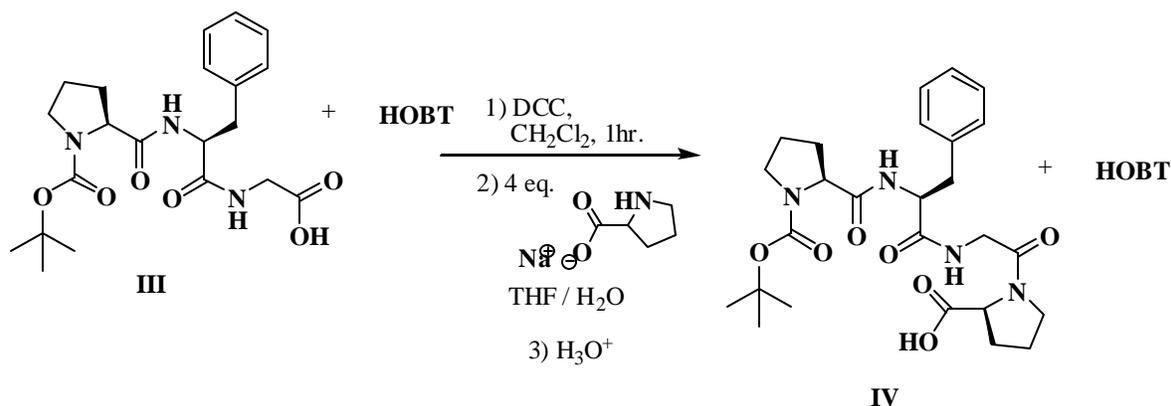


Esquema 33. Formación del tripéptido **III**.

A continuación, se procedió a realizar el siguiente acoplamiento en donde nuevamente se adicionó el 90% de la cantidad de DCC usada en el acoplamiento anterior para formar los correspondientes ésteres activados de benzotriazol del tripéptido en diclorometano. Al paso

* La cantidad usada de zwitterion corresponde a una relación 4:1 con respecto a la cantidad de producto si se hubiera obtenido el 90% de rendimiento en el acoplamiento previo. De esta manera, los cuatro equivalentes del zwitterion corresponden a una cantidad menor en mmol (el 90%) a la cantidad de zwitterion usada en el acoplamiento anterior.

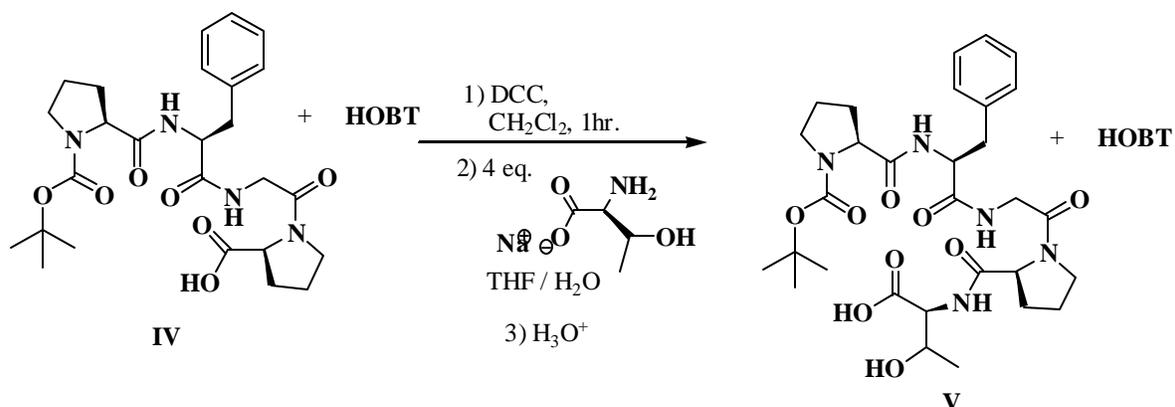
de una hora, se cambió el disolvente por THF y se adicionó una disolución del zwitterion liberado de Prolina (15.05 mmol, 4 equivalentes, 1.73g)*, la reacción se agitó por 20 horas a temperatura constante y se trabajó de acuerdo a lo descrito en la parte experimental para obtener el tetrapéptido **IV** mezclado con HOBT. Para determinar cualitativamente la presencia del tetrapéptido se obtuvo el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de la mezcla de **IV** y HOBT (Esquema 34). En el espectro se observa como señal característica la aparición en 4.5 ppm de una señal que corresponde al hidrógeno en posición alfa al grupo carboxilo en el anillo de pirrolidina del residuo de prolina que se ha acoplado (Espectro 22).



Esquema 34. Formación del tetrapéptido **IV**.

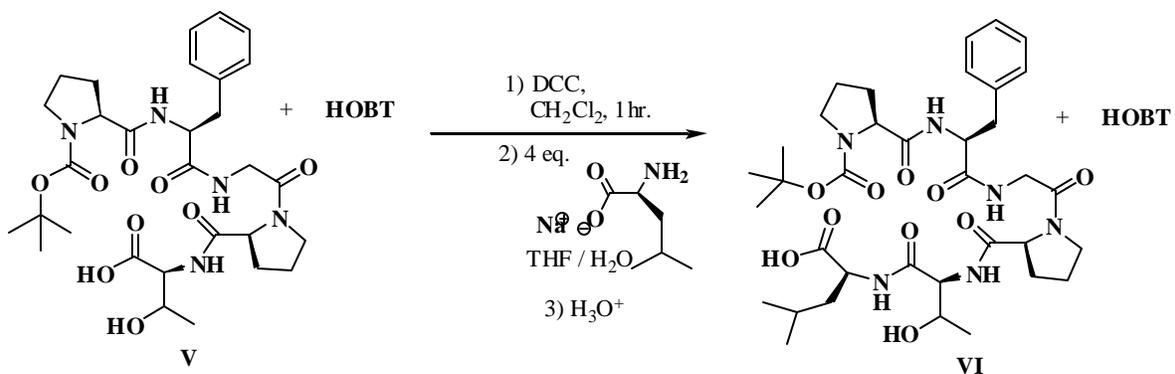
En el siguiente acoplamiento, para formar los ésteres activados correspondientes, se adicionó el 90% de la cantidad de DCC usada en el acoplamiento previo a la mezcla del tetrapéptido **IV** y HOBT; después de esto se procedió a cambiar el disolvente y a adicionar la disolución en THF/agua del zwitterion liberado de treonina (13.54 mmol, 4 equivalentes, 1.61 g)*. Finalmente, la reacción se mantuvo en agitación por veinte horas a temperatura ambiente. Como producto de reacción se obtuvo principalmente la mezcla del pentapéptido **V** y HOBT. Para determinar cualitativamente la presencia del pentapéptido **V**, se obtuvo el espectro de RMN-¹H (200 MHz) de la mezcla pentapéptido:HOBT (Esquema 35). En el

espectro se observa como señal característica una señal doblete a 1.19 ppm ($J = 6.4$ Hz) que se asigna al grupo metilo del residuo de treonina (Espectro 23).



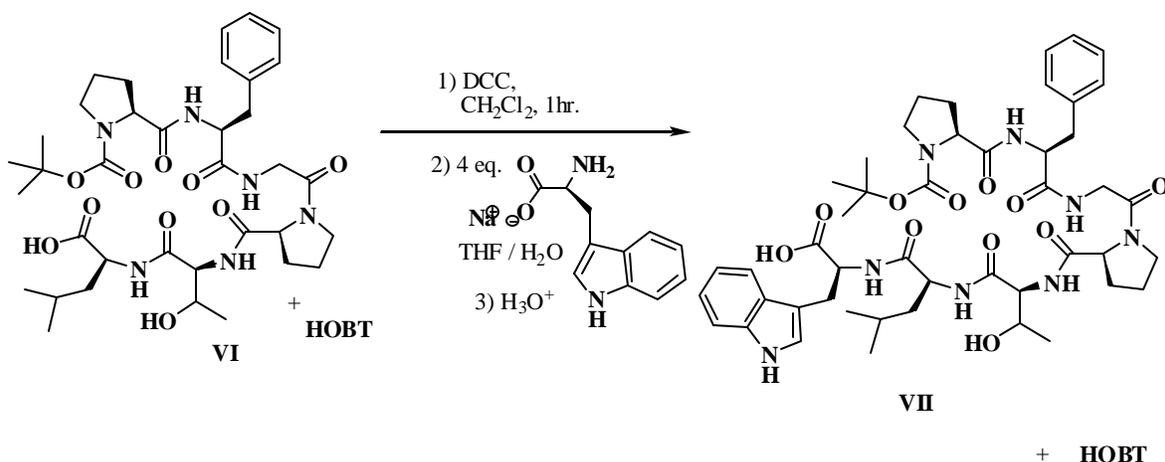
Esquema 35. Formación del pentapéptido **V**.

El quinto acoplamiento se realizó considerando también la adición del 90% de la DCC usada en el acoplamiento previo para formar los correspondientes ésteres activados del pentapéptido en diclorometano; después de esto se realizó el cambio de disolvente y se adicionó la disolución en THF/H₂O del zwitterion liberado de leucina (4 equivalentes, 12.19 mmol, 1.59g)*, como producto se obtuvo la mezcla del hexapéptido **VI** y HOBT (Esquema 36). Para verificar cualitativamente la presencia del hexapéptido se obtuvo el espectro de RMN-¹H (200 MHz) de la mezcla, en donde se puede observar una señal simple ancha en 0.89 ppm que se asigna a los hidrógenos de los dos grupos metilo presentes en el residuo de leucina (Espectro 24).



Esquema 36. Formación del hexapéptido **VI**.

Finalmente, para realizar el sexto y último acoplamiento se decidió acoplar el triptófano siguiendo la metodología descrita anteriormente. Por lo que para obtener los correspondientes ésteres activados del hexapéptido **VI** se adicionó el 90% de la cantidad de DCC usada en el acoplamiento previo. La activación se llevó a cabo en DCM, que fue evaporado y sustituido posteriormente por THF. Se adicionaron cuatro equivalentes del zwitterion de triptófano (9.22 mmol, 1.2g)* que se liberaron usando una disolución de NaOH 1M, a continuación se adicionó THF a la solución acuosa y la nueva disolución se adicionó lentamente a la solución de los ésteres activados del hexapéptido. La reacción se agitó por veinte horas a temperatura ambiente y por último se trabajó para obtener la mezcla de HOBT y el heptapéptido **VII** (Esquema 37). Para determinar cualitativamente la presencia del heptapéptido se obtuvo el espectro de RMN-¹H de la mezcla, en donde se observa como señales características las señales a 9.28 ppm correspondiente al hidrógeno de la posición 1 en el anillo de indol en el residuo de triptófano, así como la señal doble a 7.5 ppm (J = 7.6 Hz) que corresponde al hidrógeno de la posición 4 en el mismo anillo aromático (Espectro 25).



Esquema 37. Formación del heptapéptido **VII**.

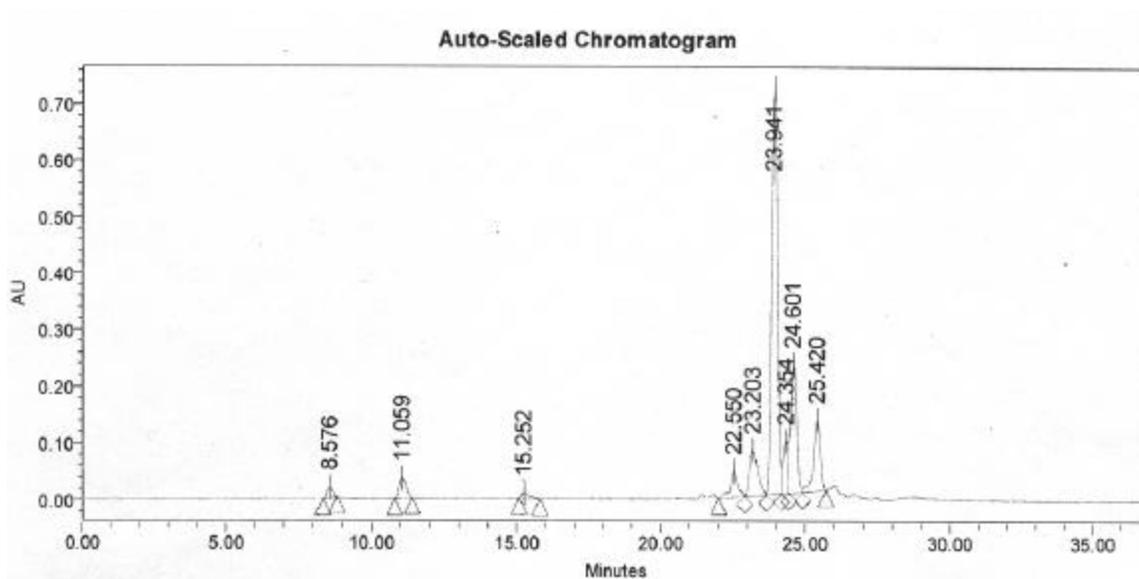
Es importante mencionar que la decisión de adicionar el 90% de la cantidad de DCC usada en el acoplamiento previo, obedece al hecho de querer evitar la formación de la *N*-acilurea; ya que un exceso de DCC representaría una disminución en la concentración de HOBT disponible para formar los correspondientes ésteres activados; en estas condiciones, la disminución de HOBT provocaría que el intermediario de *O*-acilurea tuviera solo como

rutas alternativas la formación del anhídrido simétrico correspondiente como producto del ataque de una molécula del ácido, o bien, se presente la transposición hacia la *N*-acilurea. Además, una disminución en la cantidad de HOBT, favorecería la abstracción intramolecular del protón alfa de la *O*-acilurea, aumentando la probabilidad de formación de epímeros durante el acoplamiento.

Como desde el inicio de la síntesis se parte de un exceso estequiométrico de HOBT, consideramos que éste último se puede mantener siempre en exceso con respecto al ácido carboxílico que se forme durante la secuencia sintética; sin embargo, es importante considerar posibles pérdidas en la cantidad de HOBT debidas al trabajo de la reacción; por lo tanto, después de cada acoplamiento se decide adicionar 10% menos cantidad de DCC.

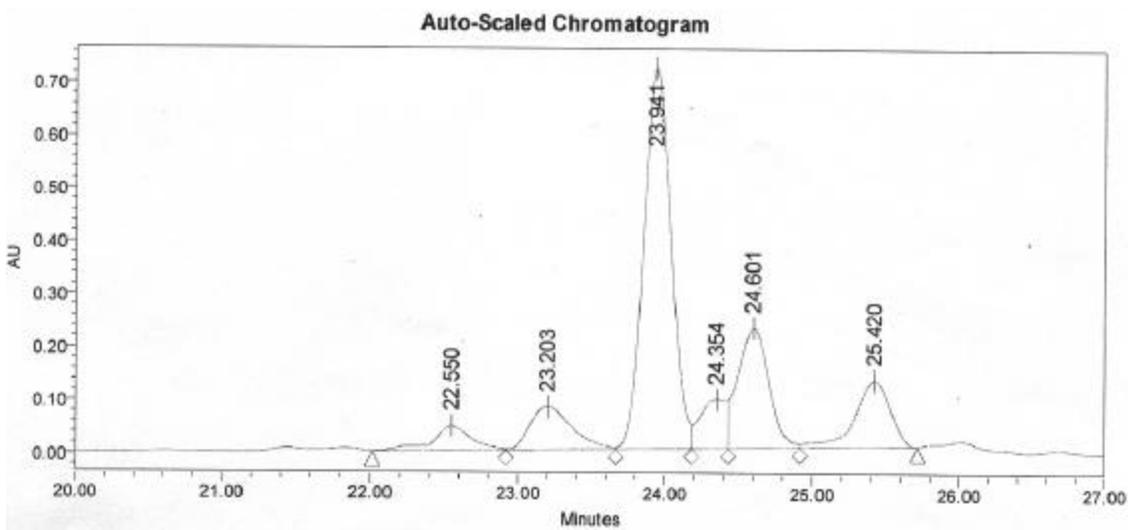
La mezcla del heptapéptido **VII** con HOBT se separó por cromatografía en columna. La separación permitió obtener de las fracciones más polares de la cromatografía (mezclas AcOEt:metanol), 1.763g de un sólido blanco que se descompone antes de fundir a aproximadamente 130°C. Como durante la secuencia no se evaluaron de manera directa los rendimientos en cada acoplamiento se decidió hacer una evaluación del rendimiento global por HPLC. De este modo, se tomó una muestra del sólido obtenido y se obtuvo el perfil cromatográfico de la misma, en el análisis se utilizó un gradiente metanol-ácido fórmico acuoso (1%) (30:80:100) como fase móvil y una columna Nucleosil C-18 de 25 cm de largo, con un diámetro de 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5µm. La longitud de onda utilizada para la lectura en HPLC-UV fue de 285 nm. El compuesto con la secuencia lineal esperada se obtiene de la mezclas de elusión metanol-ácido fórmico acuoso (1%) 80:20. En el análisis por HPLC-UV (Figuras 3 y 4) se observa una señal a un tiempo de retención de 23.9 minutos, la señal tiene un porcentaje de área bajo la curva de 48.39%. Esta señal corresponde al heptapéptido *N*-BOCProPheGlyProThrLeuTrp. Para poder determinar lo anterior, se realizó el análisis de la muestra acoplado el equipo de HPLC a un espectrómetro de masas, ahí se observó que el pico con tiempo de retención de 23.8 minutos poseía un espectro de masas en donde se encontraba el ion molecular a m/z 917.5 ($M^+ + 1$) (Figura 4).

De este modo, al obtenerse 1.763g como producto al final de la secuencia de síntesis lineal del heptapéptido *N*-BOCProPheGlyProThrLeuTrp, el porcentaje de rendimiento de la síntesis es del 20%, si consideramos que en la mezcla obtenida el 48.4% es del producto deseado. Ahora bien, considerando que se realizaron seis reacciones de acoplamiento, el rendimiento promedio por acoplamiento es del 86.7%.



Peak Results					
Name	RT	Area	% Area	Int Type	Processed Channel Descr.
1	8.576	267494	1.39	BB	PDA 285.7 nm
2	11.059	560601	2.91	BB	PDA 285.7 nm
3	15.252	183719	0.96	BB	PDA 285.7 nm
4	22.550	812154	4.22	BV	PDA 285.7 nm
5	23.203	1582055	8.22	VV	PDA 285.7 nm
6	23.941	9308217	48.39	VV	PDA 285.7 nm
7	24.354	1149461	5.98	VV	PDA 285.7 nm
8	24.601	3271570	17.01	VV	PDA 285.7 nm
9	25.420	2101235	10.92	VB	PDA 285.7 nm

Figura 3. Análisis por HPLC-UV de la muestra del sólido obtenido al término de la síntesis lineal de la secuencia peptídica.



Cmpd 5, 23.8 min

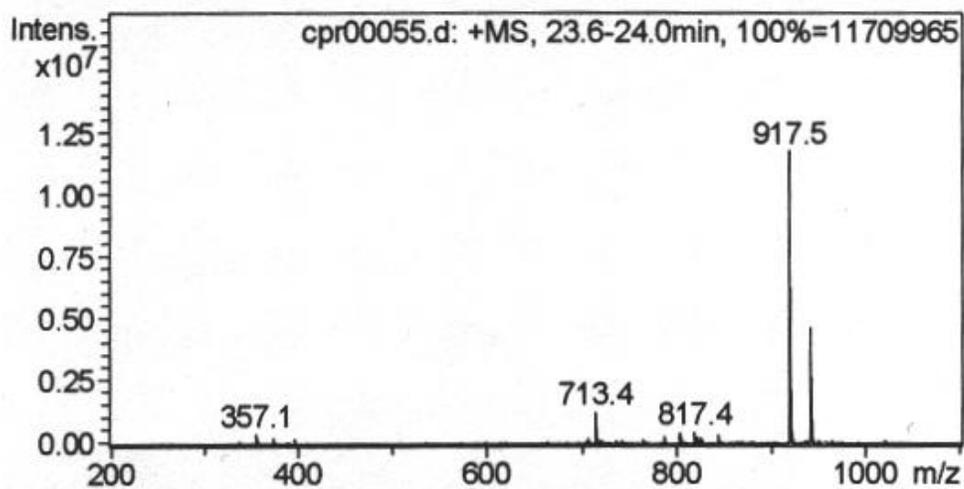
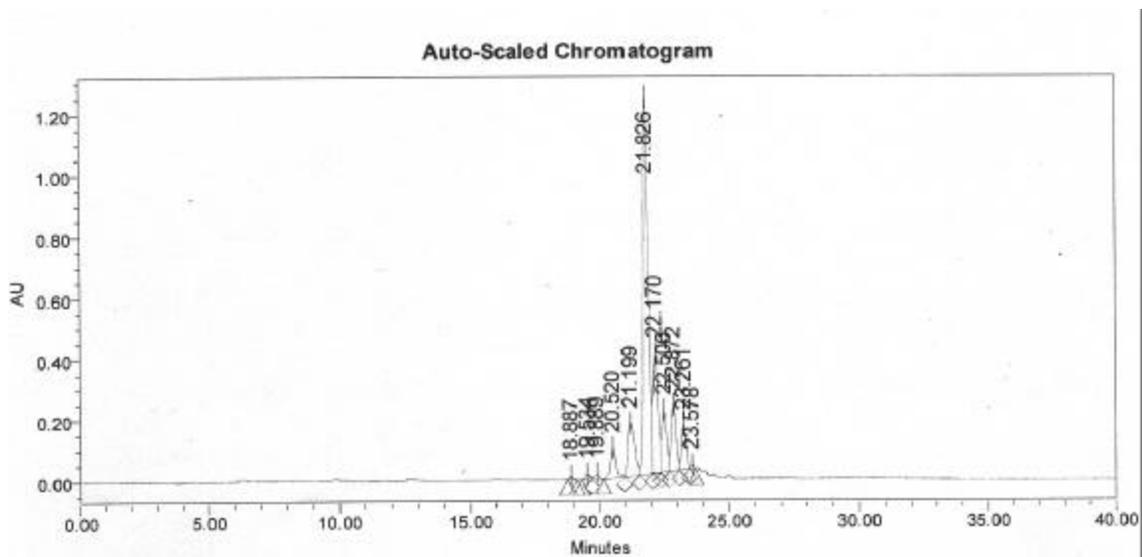


Figura 4. Expansión del cromatograma obtenido por HPLC-UV y espectro de masas de la señal obtenida a 23.8 minutos de tiempo de retención en el análisis por HPLC-masas que corresponde a la secuencia peptídica *N*-BOCProPheGlyProThrLeuTrp.

De manera paralela al análisis anterior, se realizó la metilación de una muestra del producto de acoplamiento lineal utilizando diazometano. La mezcla resultante de la reacción se separó por cromatografía en columna, se reunieron las fracciones eluidas con acetato de etilo y se realizó un análisis por HPLC usando las mismas condiciones de elusión que para el caso anterior. En el cromatograma obtenido del análisis por HPLC-UV (Figuras 5 y 6), se observa una señal a 21.8 minutos cuyo porcentaje de área bajo la curva es de 49.94%. Esta señal corresponde al compuesto metilado del heptapéptido *N*-BOCProPheGlyProThrLeuTrp, pues al acoplar el equipo de HPLC a un espectrómetro de masas se observa que la señal con un tiempo de retención de 21.8 minutos corresponde a un compuesto en cuyo espectro de masas se observa el ion molecular $[M+1]^+$ a m/z 931.7 (Figura 6). Considerando el área bajo la curva observada en el análisis así como un rendimiento del 100% para la metilación del producto y la separación por columna cromatográfica abierta de la mezcla de metilación, en la que se metilaron 100 mg y se obtuvieron 89mg; el rendimiento del acoplamiento lineal de la secuencia obtenido de esta manera fue de 18%, mientras que el rendimiento promedio por acoplamiento sería del 86.4%.

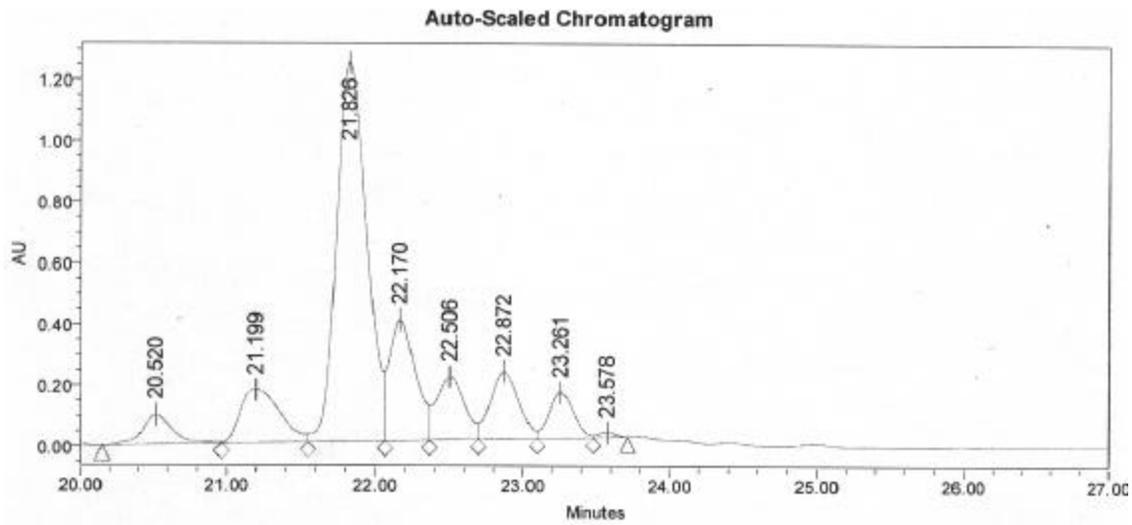
El porcentaje de rendimiento obtenido para la síntesis lineal es similar en ambos casos y como es de esperarse, dadas las condiciones de mayor manipulación en el caso de la muestra metilada, el rendimiento calculado es menor. Por otra parte, resulta lógico pensar que al final de la síntesis de la secuencia lineal por la estrategia propuesta se obtengan mezclas de secuencias incompletas. Este hecho es sin duda un evento que en las condiciones de trabajo propuestas no se puede evitar, debido a que los aminoácidos se van acoplando uno tras otro a la manera como se hace en la síntesis en fase sólida, es decir, sin aislar completamente el producto de la reacción. Sin embargo, al final de la secuencia es factible realizar una separación. En nuestro caso, la separación por cromatografía en columna abierta permitió separar parte del HOBt remanente y la mayoría de las secuencias incompletas.



Peak Results

Name	RT	Area	% Area	Int Type	Processed Channel Descr.
1	18.887	89751	0.26	BB	PDA 285.7 nm
2	19.534	178808	0.51	BV	PDA 285.7 nm
3	19.889	227129	0.65	VB	PDA 285.7 nm
4	20.520	1442300	4.14	BV	PDA 285.7 nm
5	21.199	3214650	9.22	VV	PDA 285.7 nm
6	21.826	17404437	49.94	VV	PDA 285.7 nm
7	22.170	4794004	13.75	VV	PDA 285.7 nm
8	22.506	2708676	7.77	VV	PDA 285.7 nm
9	22.872	2950840	8.47	VV	PDA 285.7 nm
10	23.261	1711146	4.91	VV	PDA 285.7 nm
11	23.578	132086	0.38	VB	PDA 285.7 nm

Figura 5. Análisis por HPLC-UV de la muestra metilada del sólido obtenido al término de la síntesis lineal de la secuencia peptídica.



Cmpd 6, 21.8 min

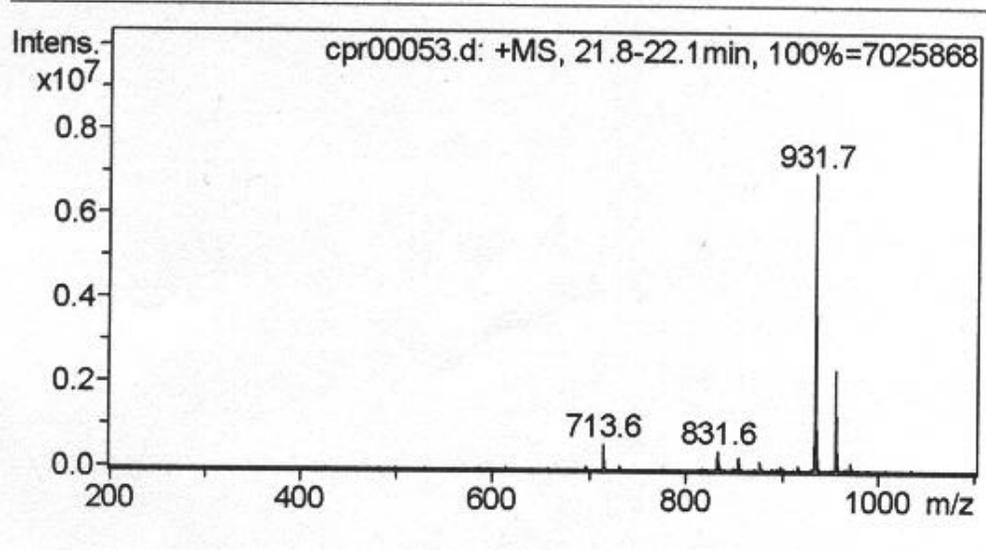


Figura 6. Expansión del cromatograma obtenido por HPLC-UV y espectro de masas de la señal obtenida a 21.8 minutos de tiempo de retención en el análisis por HPLC-masas, correspondiente a la secuencia peptídica BOCProPheGlyProThrLeuTrpOMe.

De este modo, solo se pudieron detectar algunas secuencias incompletas en el análisis hecho por HPLC de la muestra metilada (Figura 7), como la secuencia BOCProPheGlyProThrLeuOMe, cuya señal de ion molecular $M^+ + 1$ a m/z 745.5 se observa en el análisis por HPLC-masas y que corresponde a la señal con tiempo de retención de 19.8 minutos, cuyo porcentaje de área bajo la curva es de 0.65%. Asimismo, se observa la presencia de la secuencia BOCProPheGlyProThrTrpOMe, que se identifica por la señal de su ion molecular $M^+ + 1$ a m/z 818.5 en el análisis por HPLC acoplado a masas. En el cromatograma obtenido en el análisis por HPLC-UV la señal correspondiente es la de tiempo de retención de 20.5 minutos que tiene un porcentaje de área bajo la curva de 4.14%. Finalmente, la última secuencia observable es la secuencia BOCProPheGlyThrLeuTrpOMe que se identifica por la señal de su ion molecular $M^+ + 1$ a m/z 834.6 en el análisis por HPLC acoplado a masas y que se asocia a la señal con tiempo de retención de 21.2 minutos en el análisis HPLC-UV en donde el porcentaje de área bajo la curva es de 9.22%.

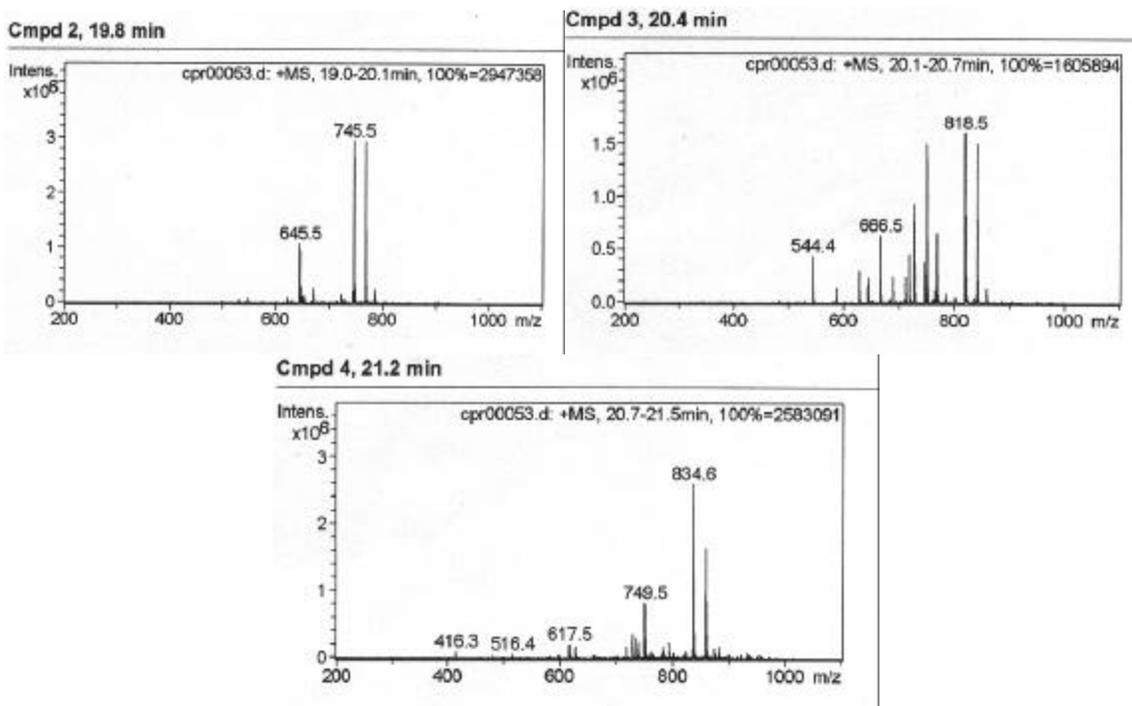
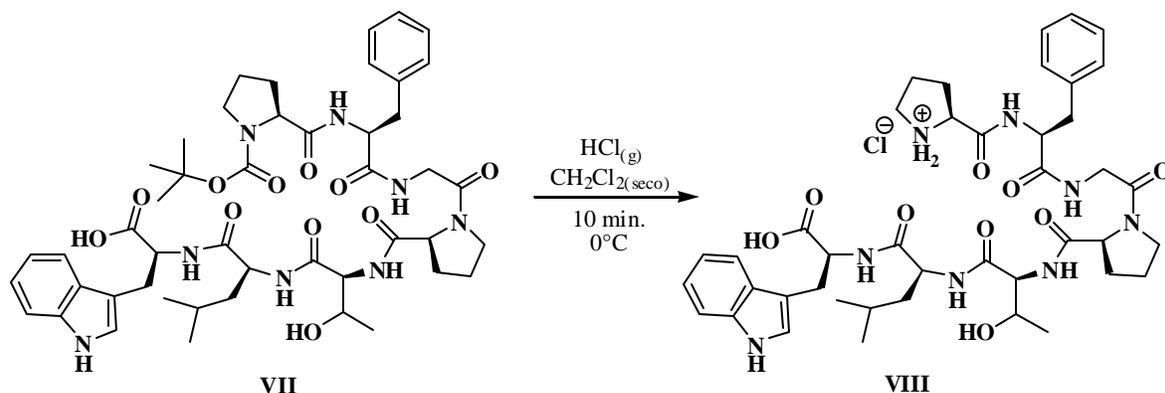


Figura 7. Espectros de masas de algunas señales observadas por HPLC correspondientes a secuencias metiladas incompletas.

Macrolactamización. Obtención de Phakellistatina-13.

Para realizar la síntesis de la phakellistatina-13 fue necesario realizar la desprotección de un lote de la mezcla que contenía la secuencia peptídica *N*-BOCProPheGlyProThrLeuTrp; para esto se utilizaron 150 mg de esta mezcla, la desprotección se realizó burbujeando cloruro de hidrógeno en DCM seco durante diez minutos. Como producto de la reacción se obtuvo un sólido blanco insoluble en diclorometano (Esquema 38).



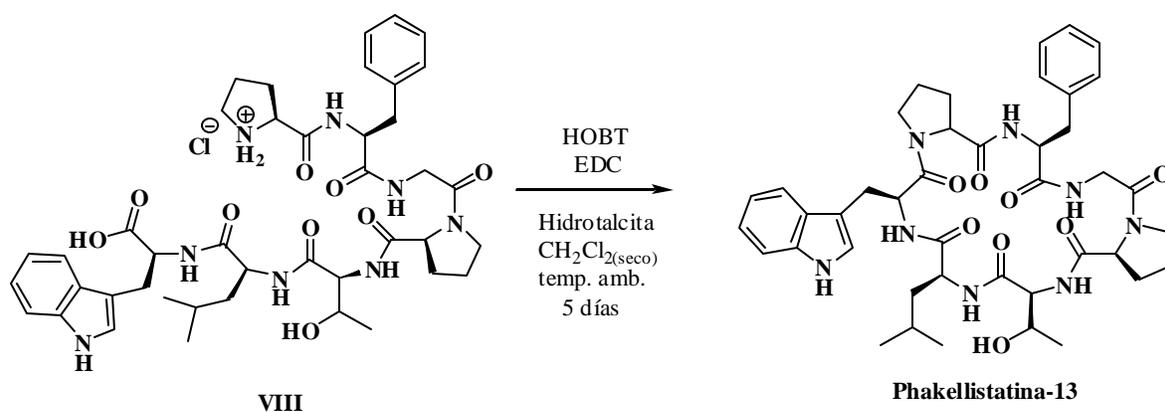
Esquema 38. Reacción de desprotección del grupo BOC.

La reacción de macrolactamización se diseñó teniendo como antecedente que es posible realizar la formación del enlace peptídico utilizando un material sólido catalítico de carácter básico del tipo hidrotalcita⁵. Adicionalmente, se realizó una prueba para determinar la capacidad de epimerización del soporte sólido, para lo cuál se utilizó un lote del dipéptido *N*-BOCProPheOMe (56 mg) al que se adicionaron 250mg de hidrotalcita Aldrich[®] y 50 mL de DCM seco. La mezcla se mantuvo en agitación constante y a reflujo durante veinticuatro horas. Al término de este periodo de tiempo se recristalizó el producto de éter-hexano y se midió la rotación óptica en metanol a 25°C , resultando en este caso de -48.8 . Asimismo se obtuvo el espectro de RMN-¹H a 50°C (Espectro 26) del producto expuesto a la hidrotalcita; el espectro presenta las mismas señales que el compuesto no tratado con hidrotalcita y no se observan señales correspondientes al epímero. De esta manera, se puede determinar que es prácticamente nula la posibilidad de epimerización mediante la abstracción directa de un hidrógeno alfa en un éster mediante el uso de hidrotalcita. Con

⁵ Cruz Montes de Oca, Alejandro. *Nuevo método de formación del enlace peptídico*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química UNAM 2005.

estos antecedentes, se decidió utilizar la hidrotalcita como base para llevar a cabo la macrociclización de la secuencia lineal (HCl)NHProPheGlyProThrLeuTrp.

De esta manera, se pesaron 121 mg del producto que contenían a la secuencia lineal (HCl)NHProPheGlyProThrLeuTrp, los cuales se colocaron junto con 300 mg de hidrotalcita Aldrich®, 32.5mg de HOBT y 100 mL de DCM en un matraz bola de 250 mL, la mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante bajo atmósfera inerte y en baño de hielo. A continuación se agregó una disolución de EDC en DCM seco y se dejó la reacción en agitación constante bajo atmósfera inerte por cinco días a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se trabajó la reacción de acuerdo con el procedimiento descrito en la parte experimental y finalmente se obtuvieron 61mg de un sólido blanco (Esquema 39).



Esquema 39. Reacción de macrociclización.

El sólido obtenido se analizó por HPLC-UV y HPLC-masas. En el análisis HPLC-UV (Figuras 8 y 9) se encuentra una señal con 22.4 minutos de tiempo de retención, cuya área bajo la curva es de 29.65%; en el análisis por HPLC-masas esta señal se observa a 22.5 min. y presenta una señal a m/z 799.4 en el espectro de masas que corresponde al ion molecular más un protón (M^++1) del compuesto cíclico esperado (Figura 9). De esta manera, de acuerdo con éste análisis, de los 61mg obtenidos, solo el 37% corresponde al compuesto esperado, es decir 18mg (0.022 mmol). Considerando que se parte de 121 mg de

mezcla que contiene a la secuencia peptídica liberada, en donde el 48.4% corresponde a la secuencia (HCl)NH-ProPheGyProThrLeuTrp[†], es decir 53.55 mg (0.068 mmol). El rendimiento de la reacción de ciclización es del 42%.

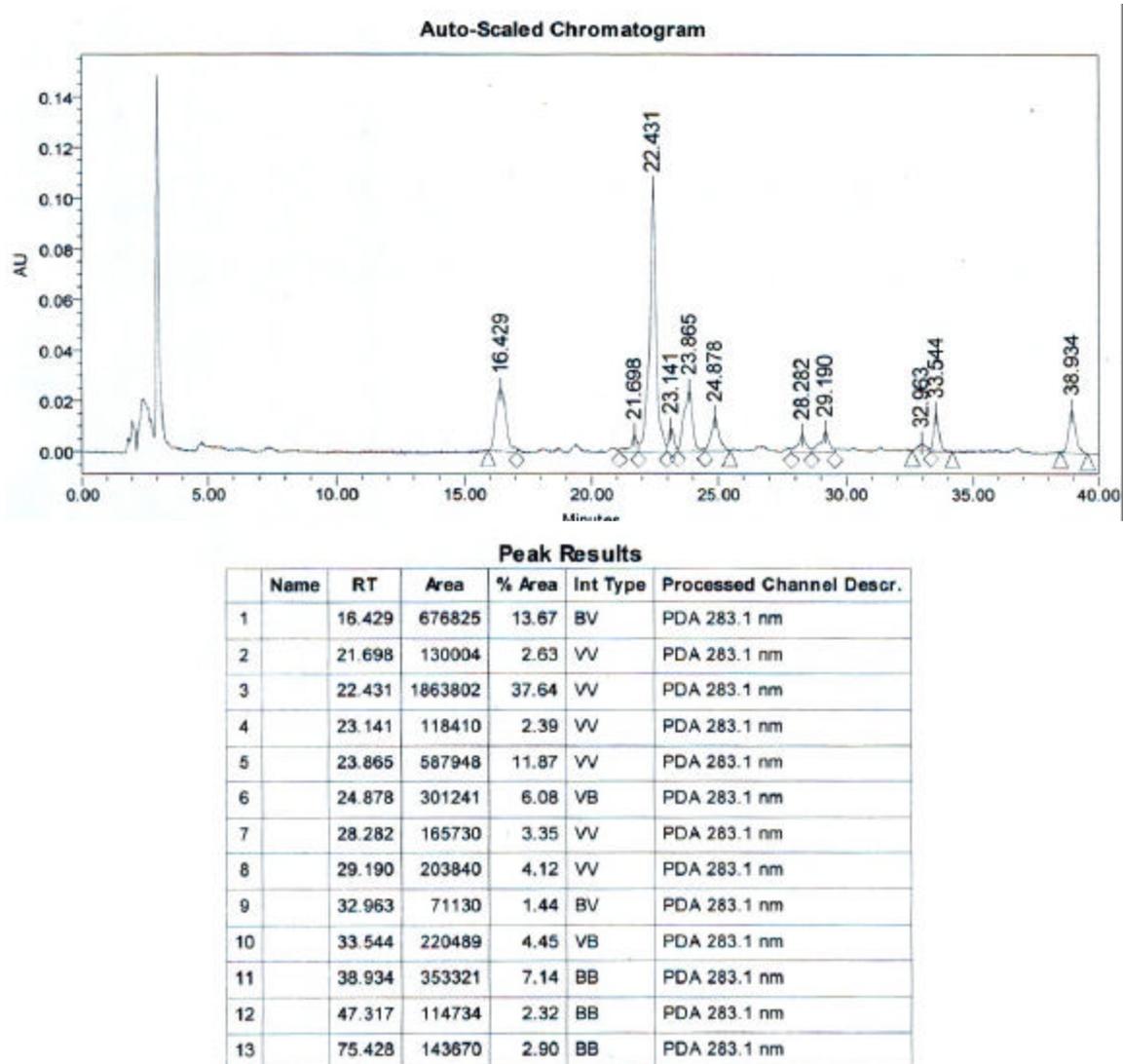
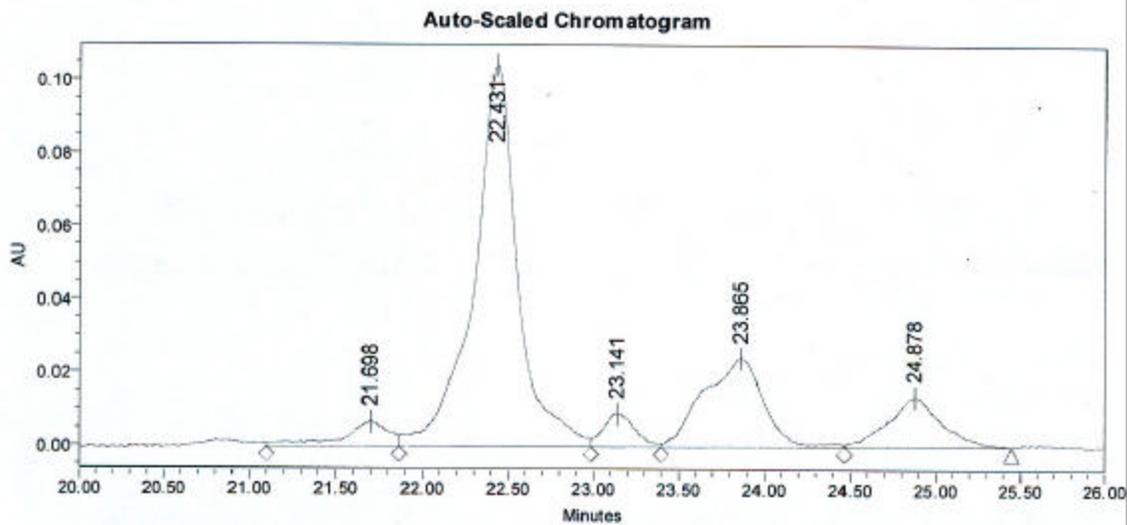


Figura 8. Análisis por HPLC-UV del producto de la reacción de macrociclización.

[†] Se considera que la reacción de desprotección procede con un 100% de rendimiento y la proporción del heptapéptido no varía.



Cmpd 3, 22.5 min

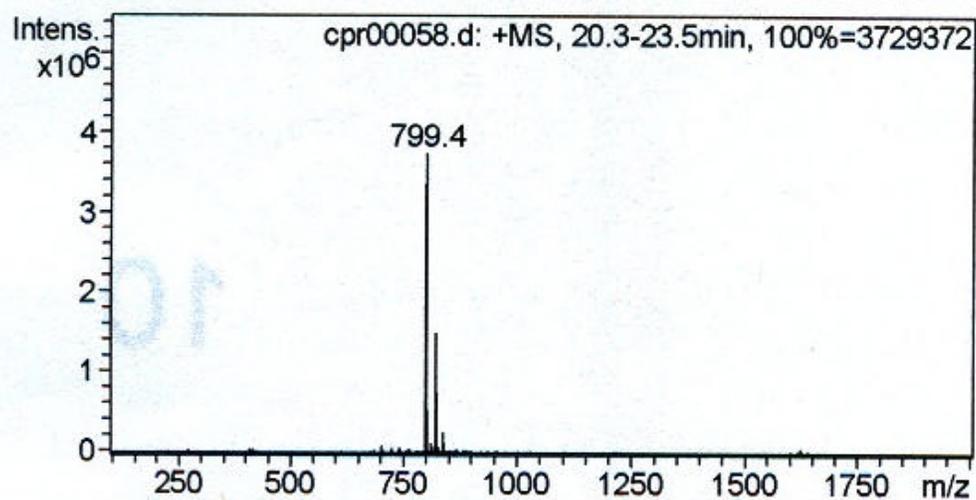


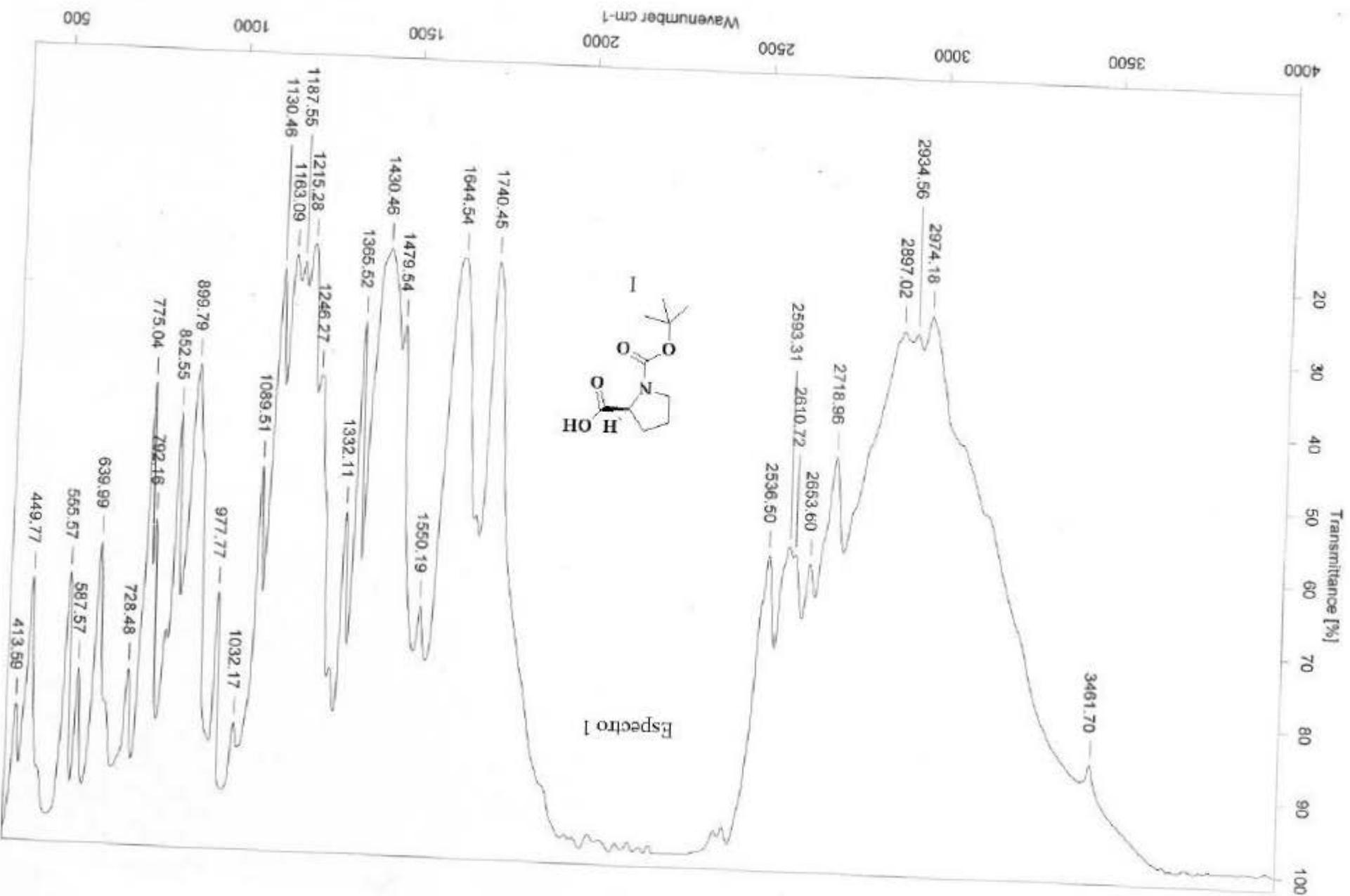
Figura 9. Expansión del cromatograma obtenido por HPLC-UV y espectro de masas de la señal con tiempo de retención de 22.5 minutos correspondiente al macrociclo.

CONCLUSIONES

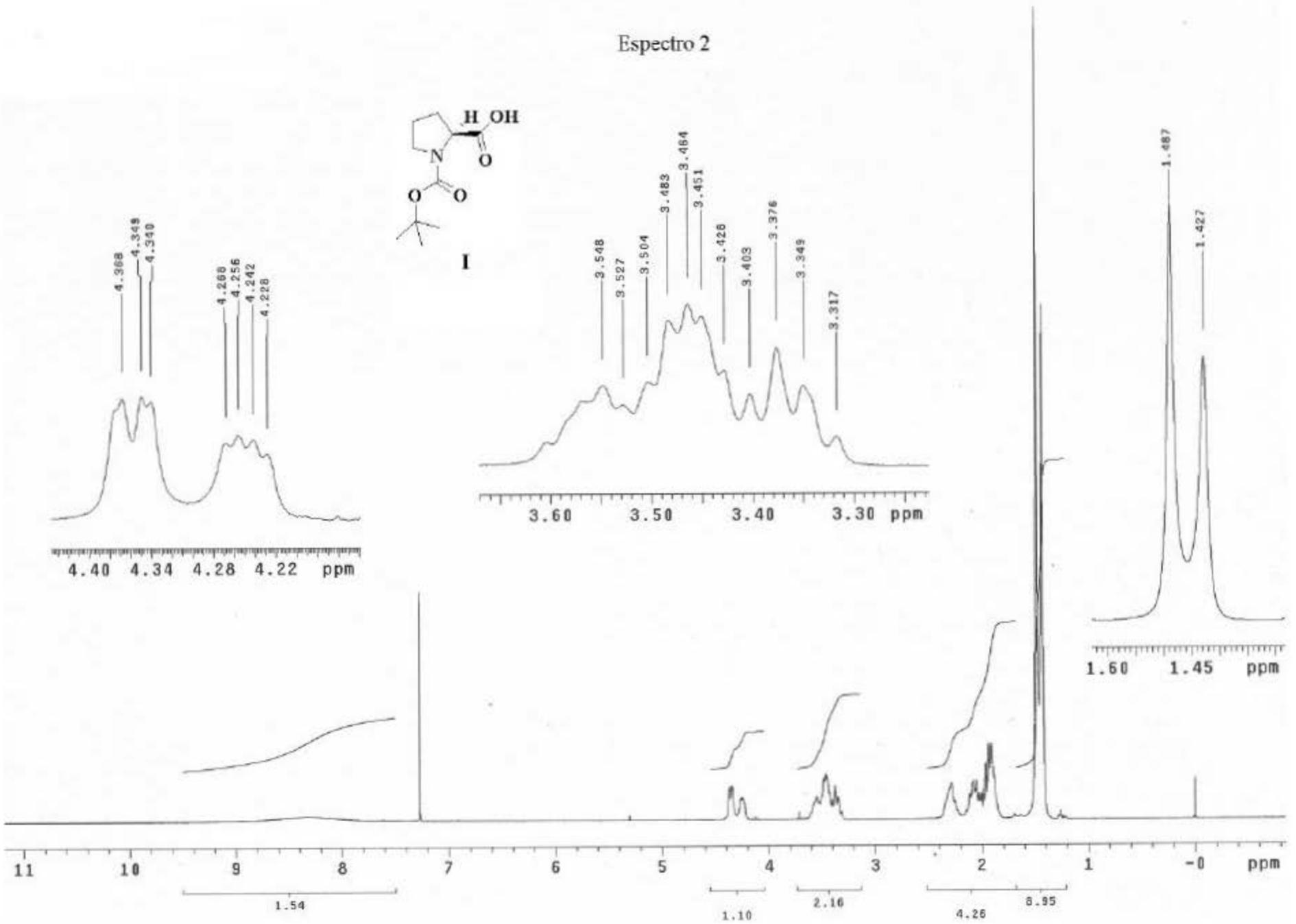
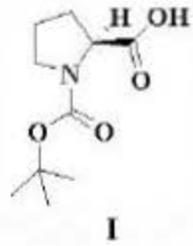
Se demuestra que es posible formar el enlace peptídico en un medio no anhidro utilizando un aminoácido *N*-protegido y el ion zwitter de un segundo aminoácido. De esta manera, se elimina el paso de desprotección usado tradicionalmente en la síntesis en fase líquida.

Mediante la aplicación de esta metodología, es posible realizar la unión de una secuencia bien definida de varios aminoácidos a través de un acoplamiento sucesivo sin aislar como productos intermedios las secuencias peptídicas obtenidas.

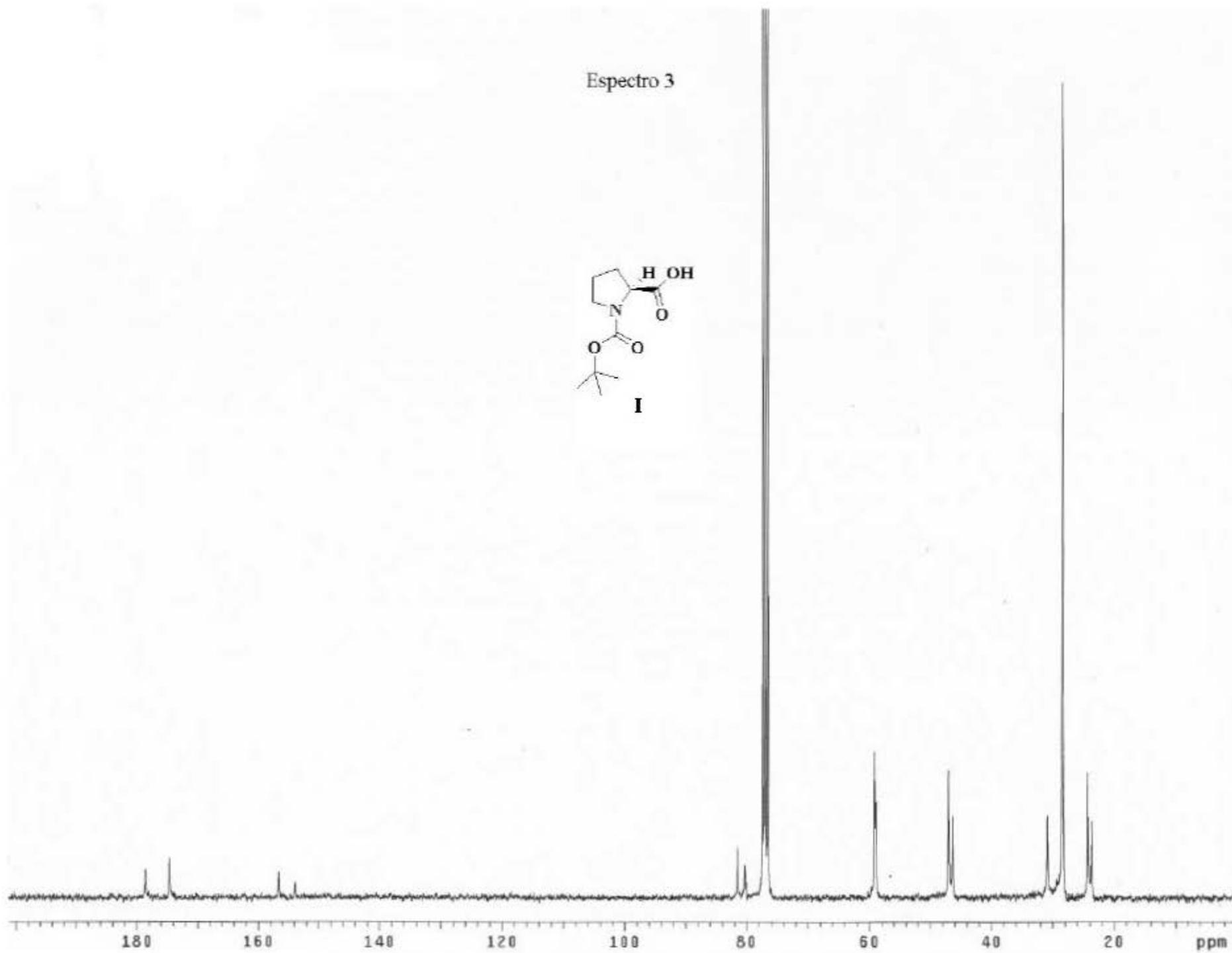
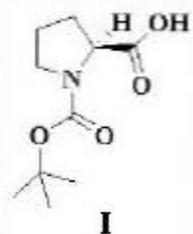
La metodología permite realizar la formación de enlaces peptídicos en condiciones más favorables y deseables desde un punto de vista técnico, económico y ecológico.

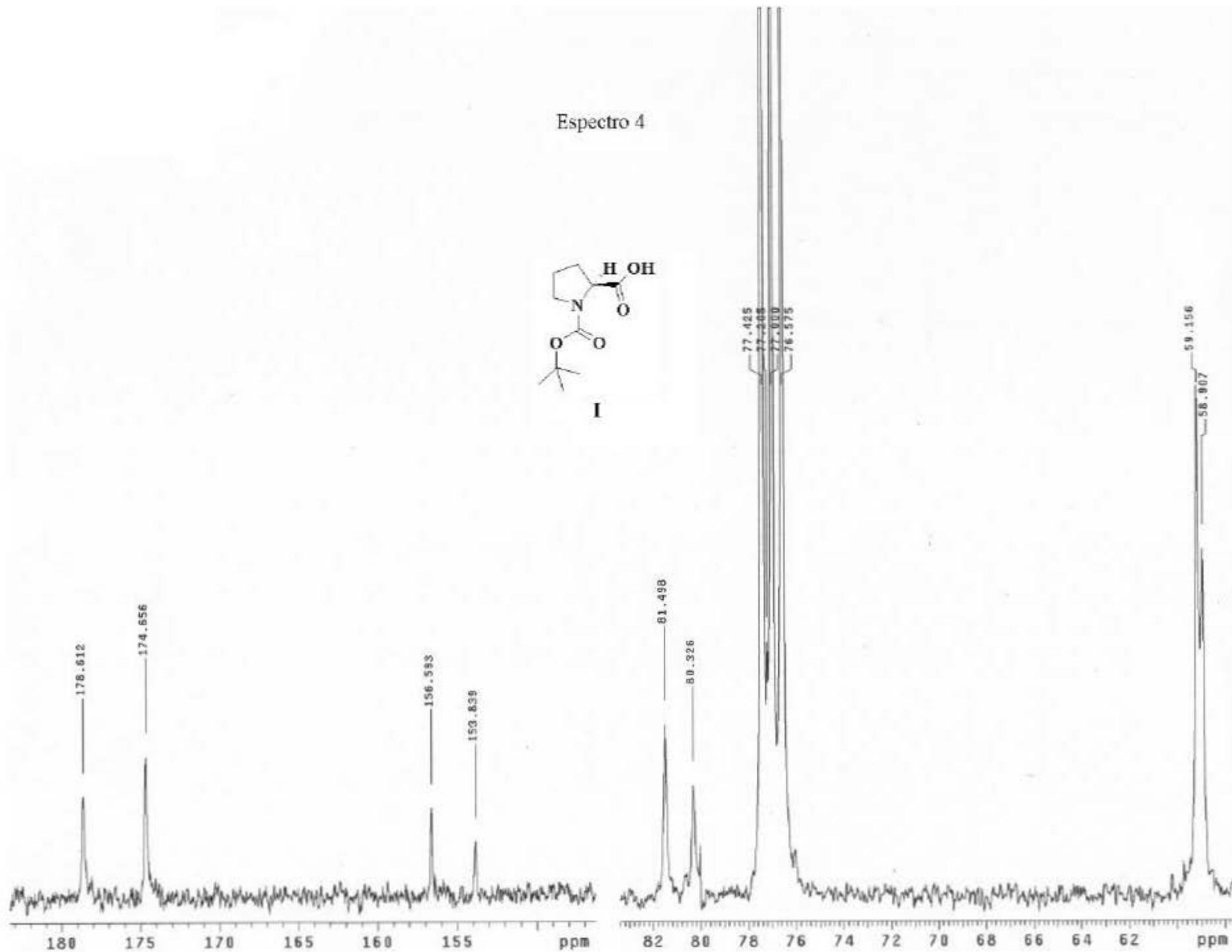


Espectro 2

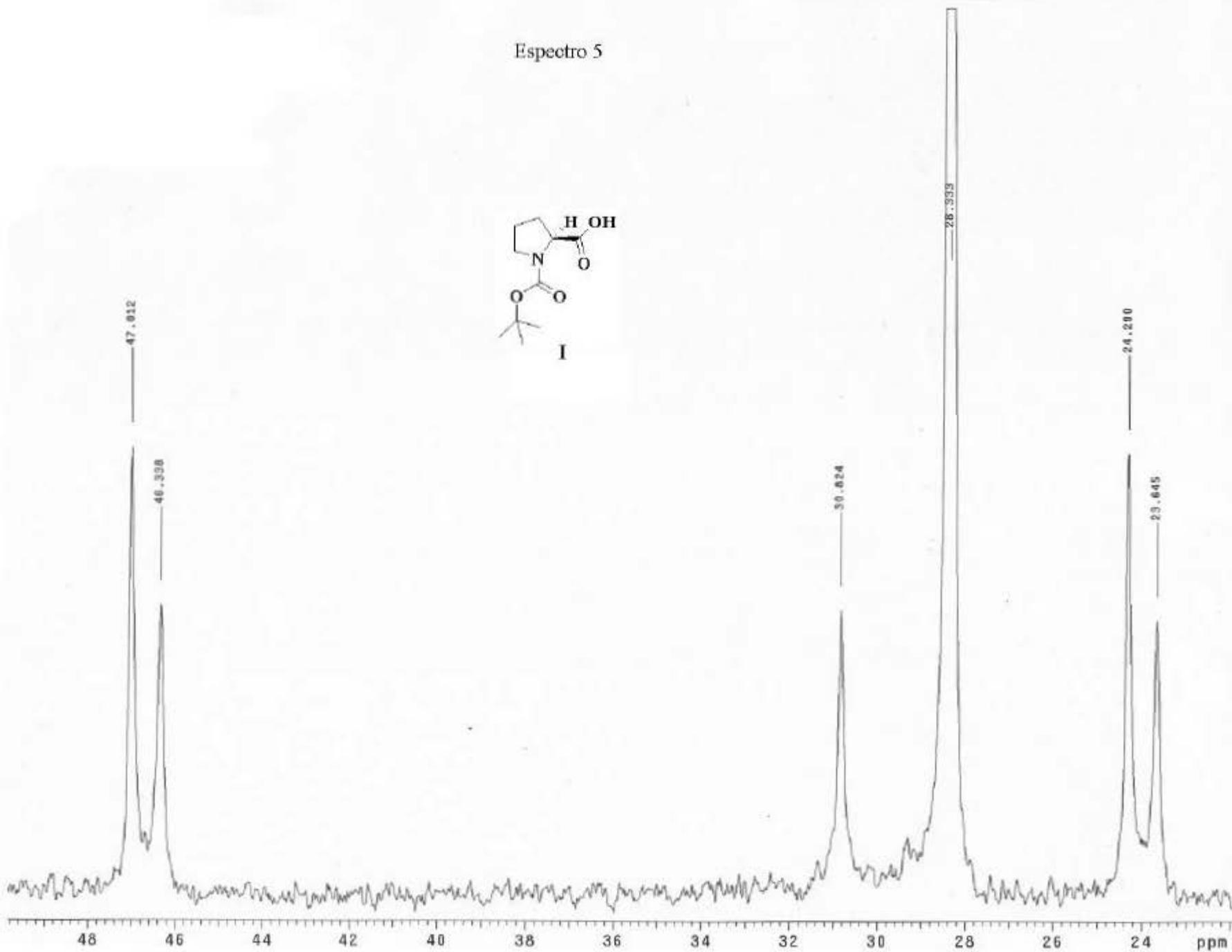
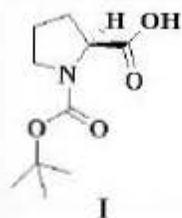


Espectro 3

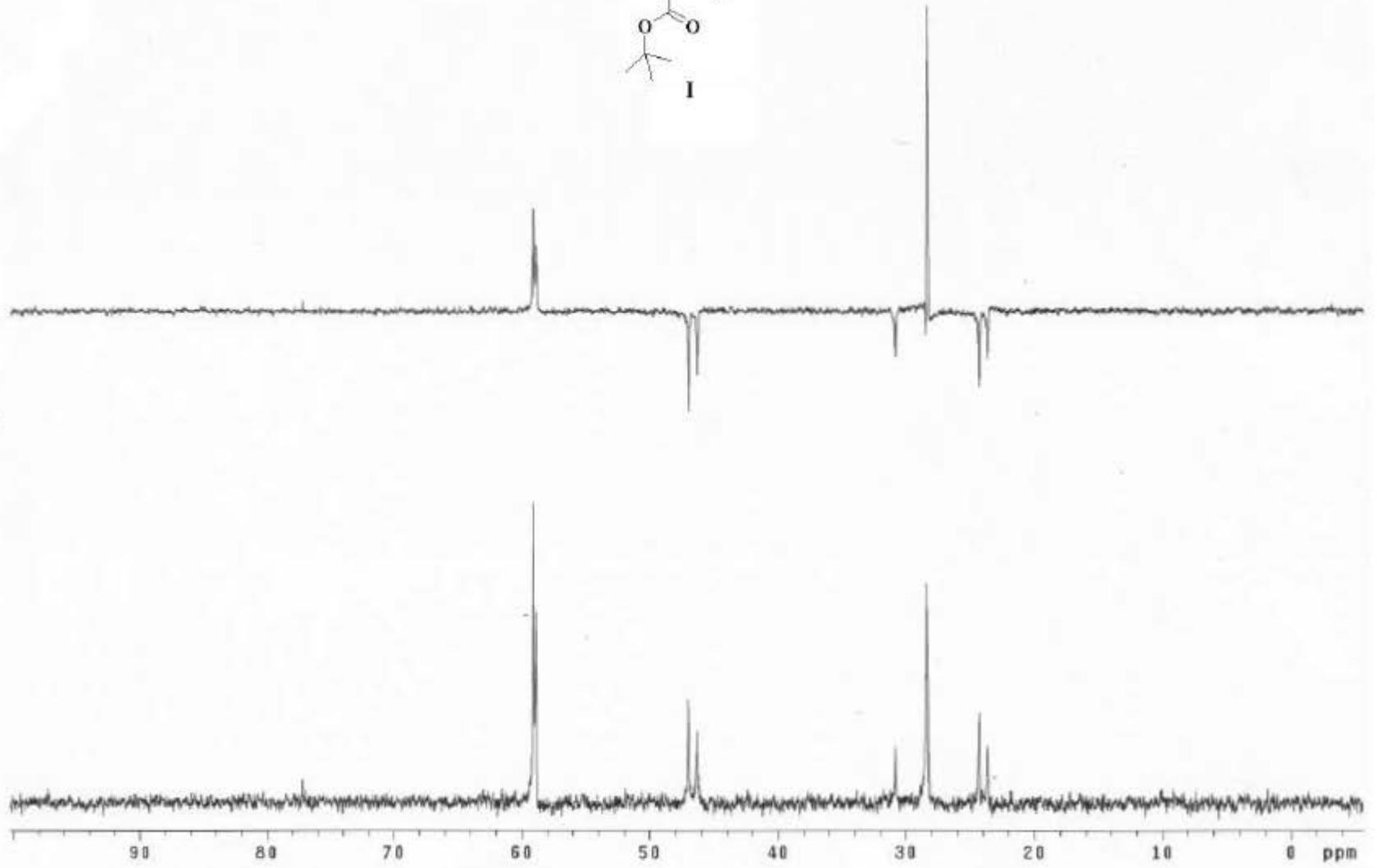
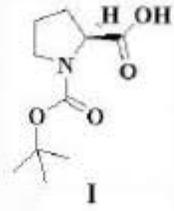


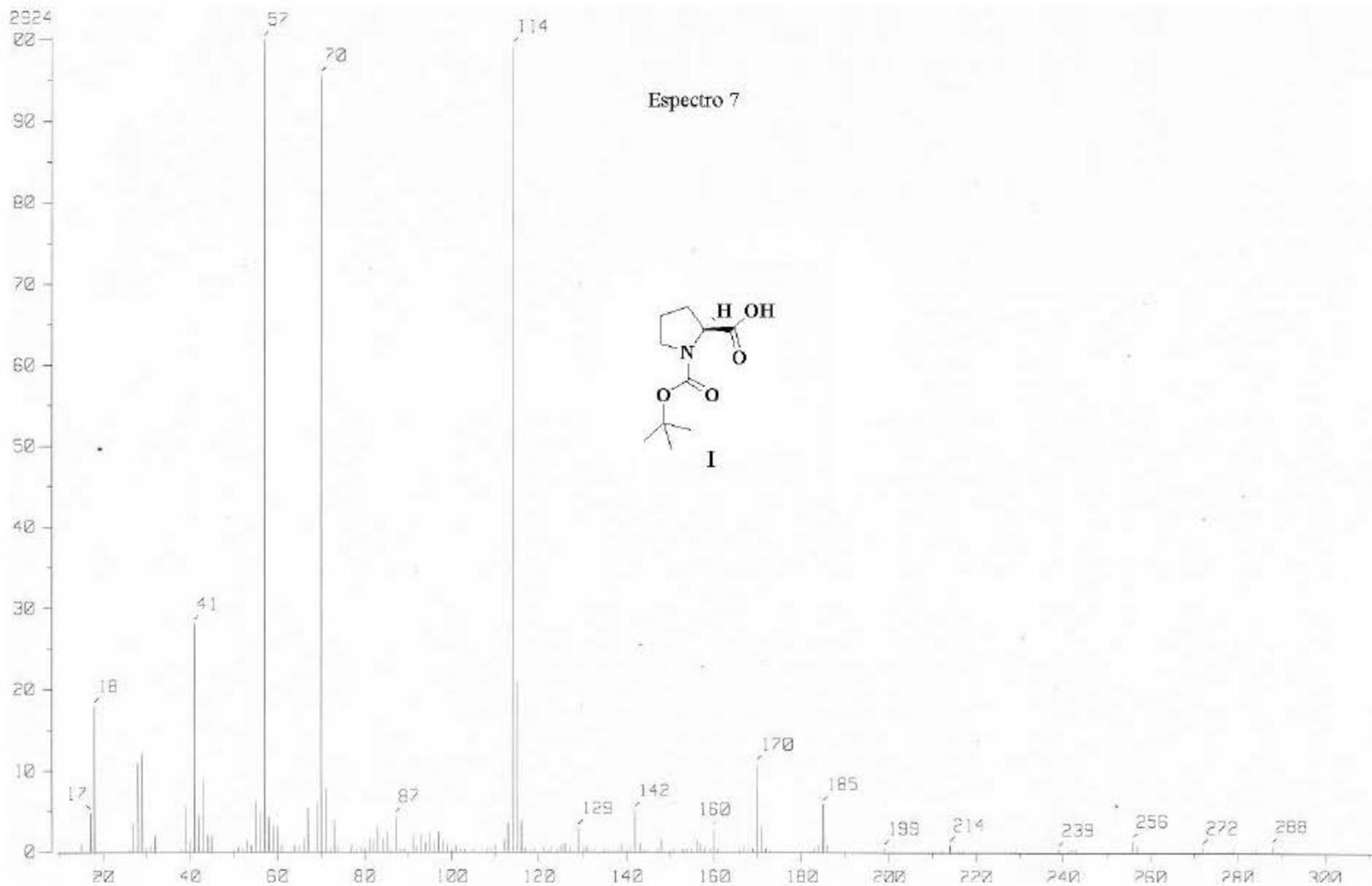


Espectro 5



Espectro 6





Espectro 9

7.2876
 7.2793
 7.2740
 7.2668
 7.2583
 7.2521
 7.2500
 7.2347
 7.2324
 7.2268
 7.2200
 7.2133
 7.2045
 7.2020
 7.1780
 7.1141
 7.1079
 7.1067
 7.0873
 7.0824

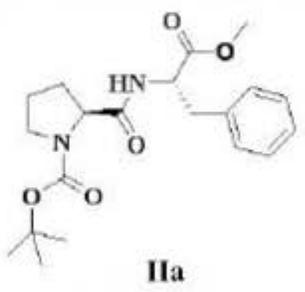
4.8805
 4.8630
 4.8408
 4.8377
 4.8176

4.2473
 4.2220
 4.2135

3.7036
 3.3400
 3.3110
 3.2907
 3.2857
 3.2737
 3.2098
 3.1905
 3.1634
 3.1441
 3.0407
 3.0177
 2.9843
 2.9712

1.7778
 1.7668
 1.7558
 1.5389
 1.4201

0.0000



Integral

3.4835
 2.0045

0.8078

0.8035

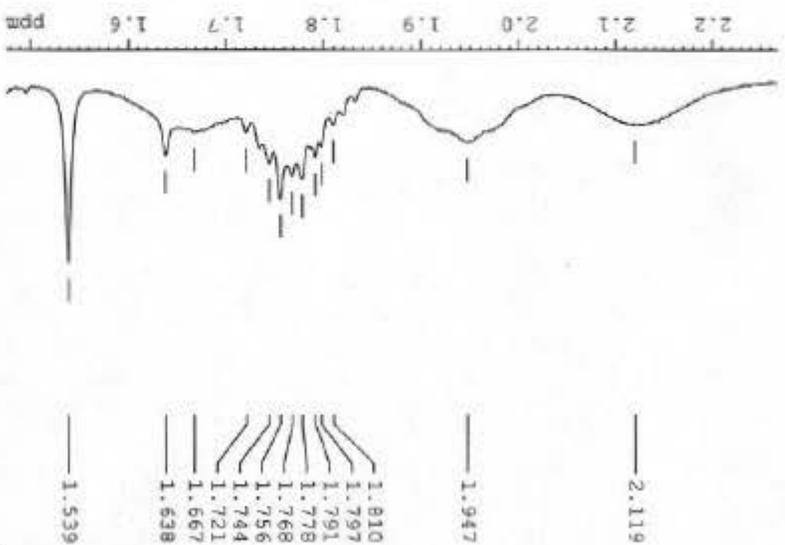
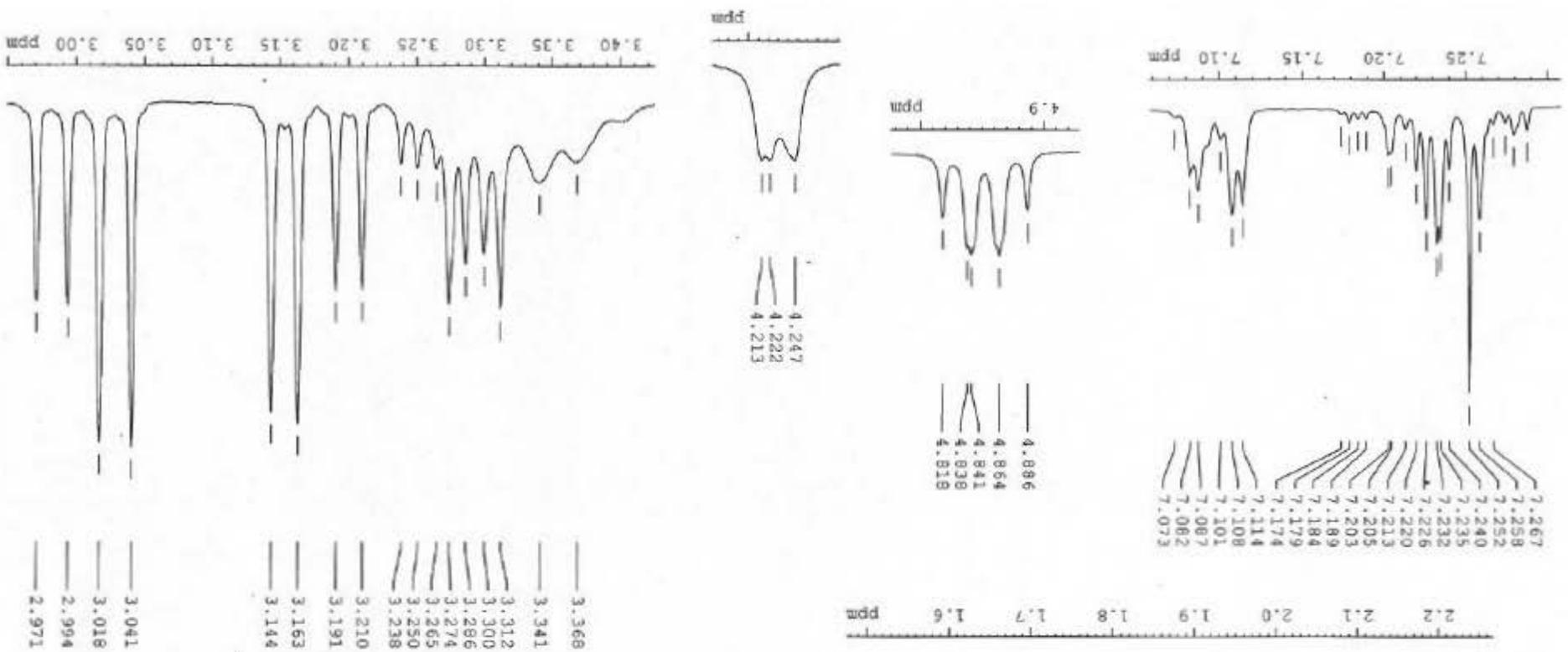
3.0803

1.8385
 0.9642
 1.0000

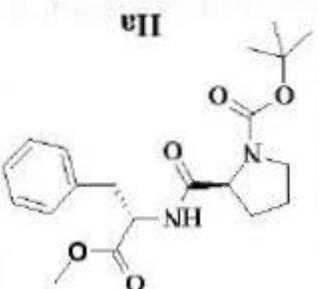
2.8830

9.6896

8 7 6 5 4 3 2 1 0



Espectro 10



Espectro 11

ppm

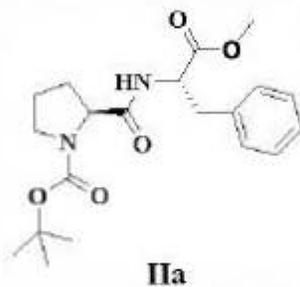
171.911
171.702

136.063
129.206
128.482
127.032

80.575
77.427
77.003
76.579

60.445
52.978
52.183
46.933

38.173
30.284
28.269
23.947



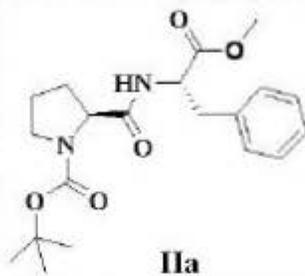
180 160 140 120 100 80 60 40 20

98

Espectro 12

ppm

129.211
128.508
127.032



53.114
52.264
46.953

38.159

28.299

ppm

129.255
128.551
127.109

78

150

140

120

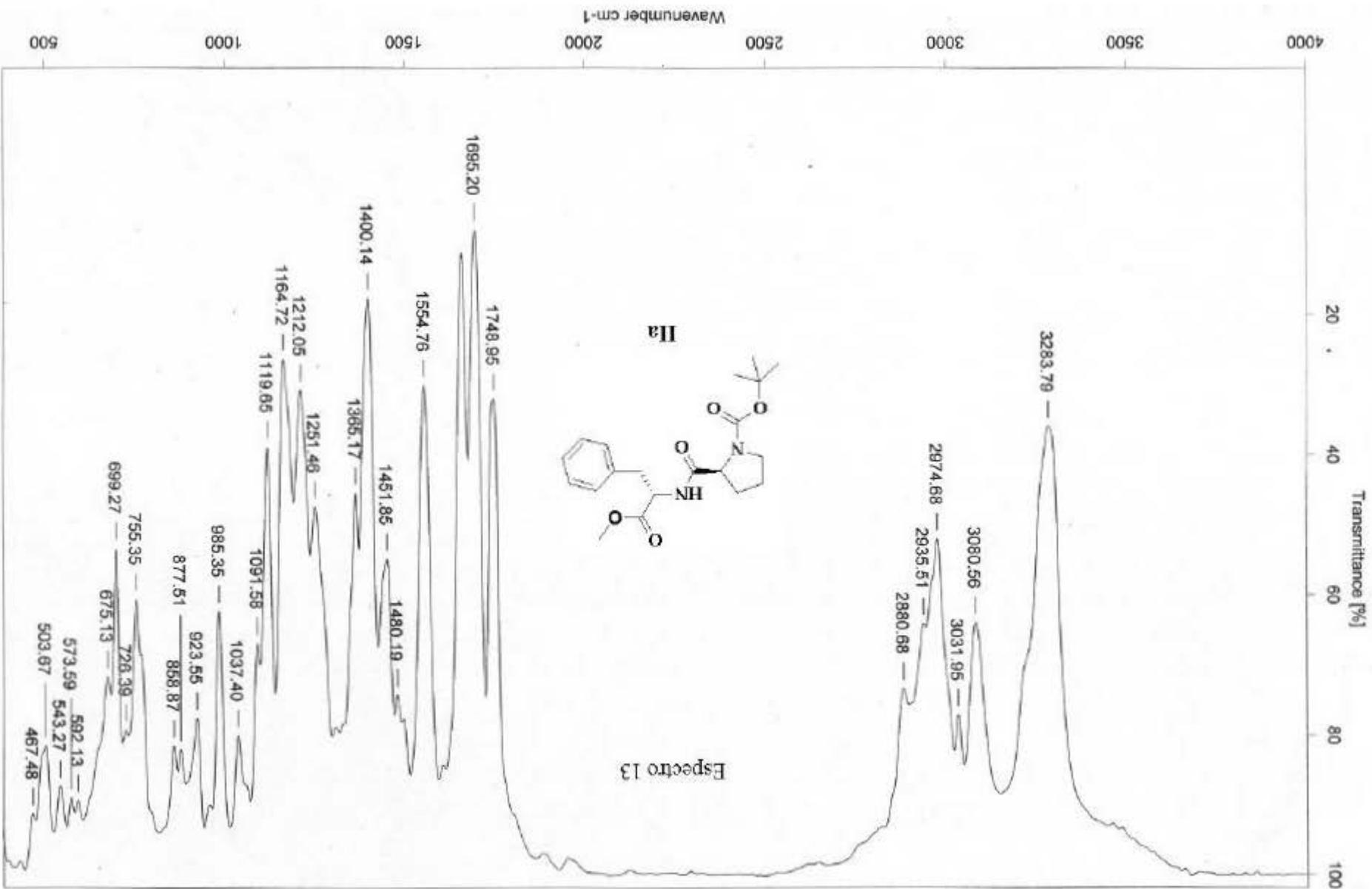
100

80

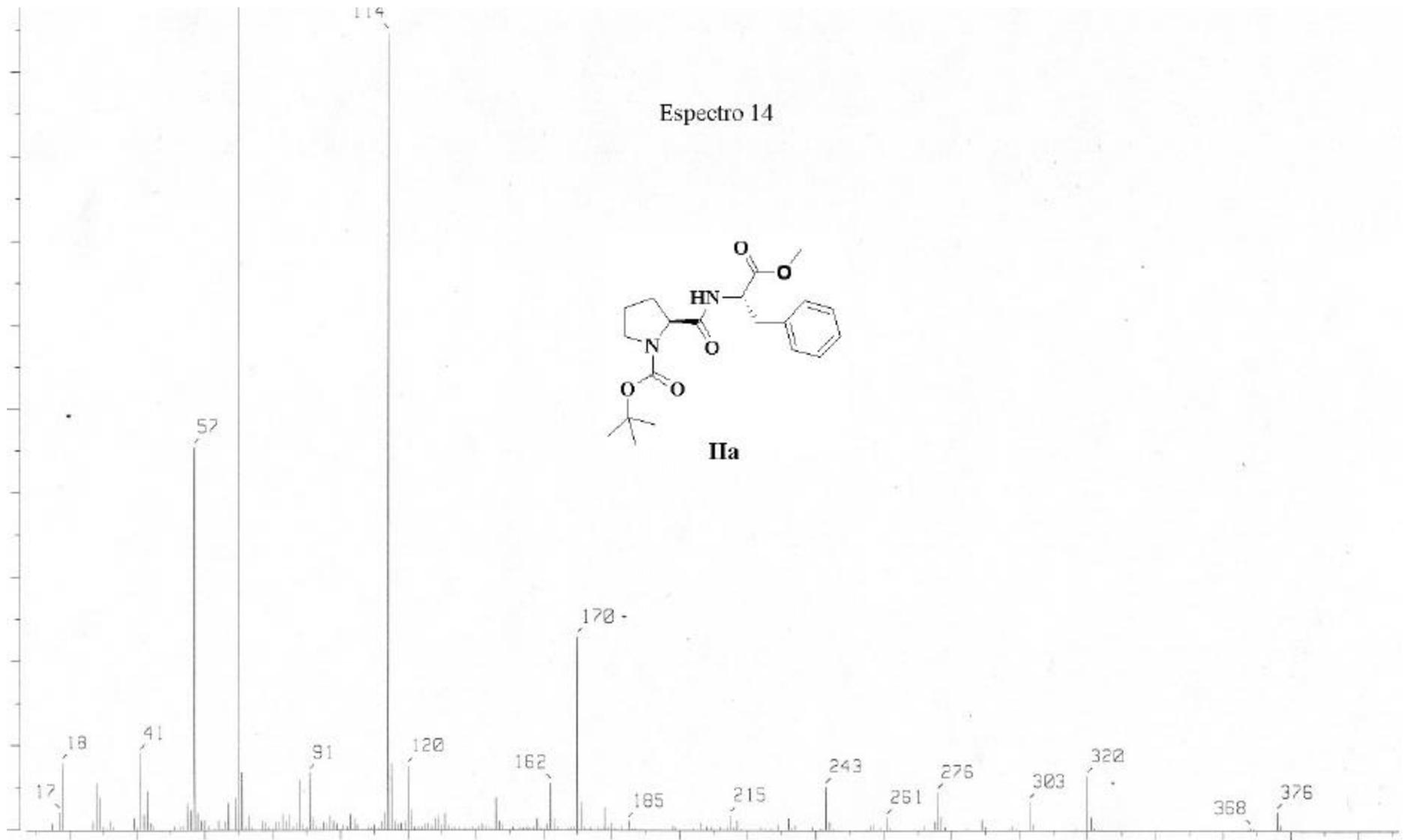
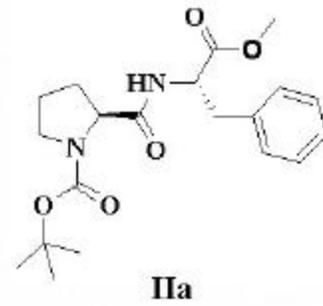
60

40

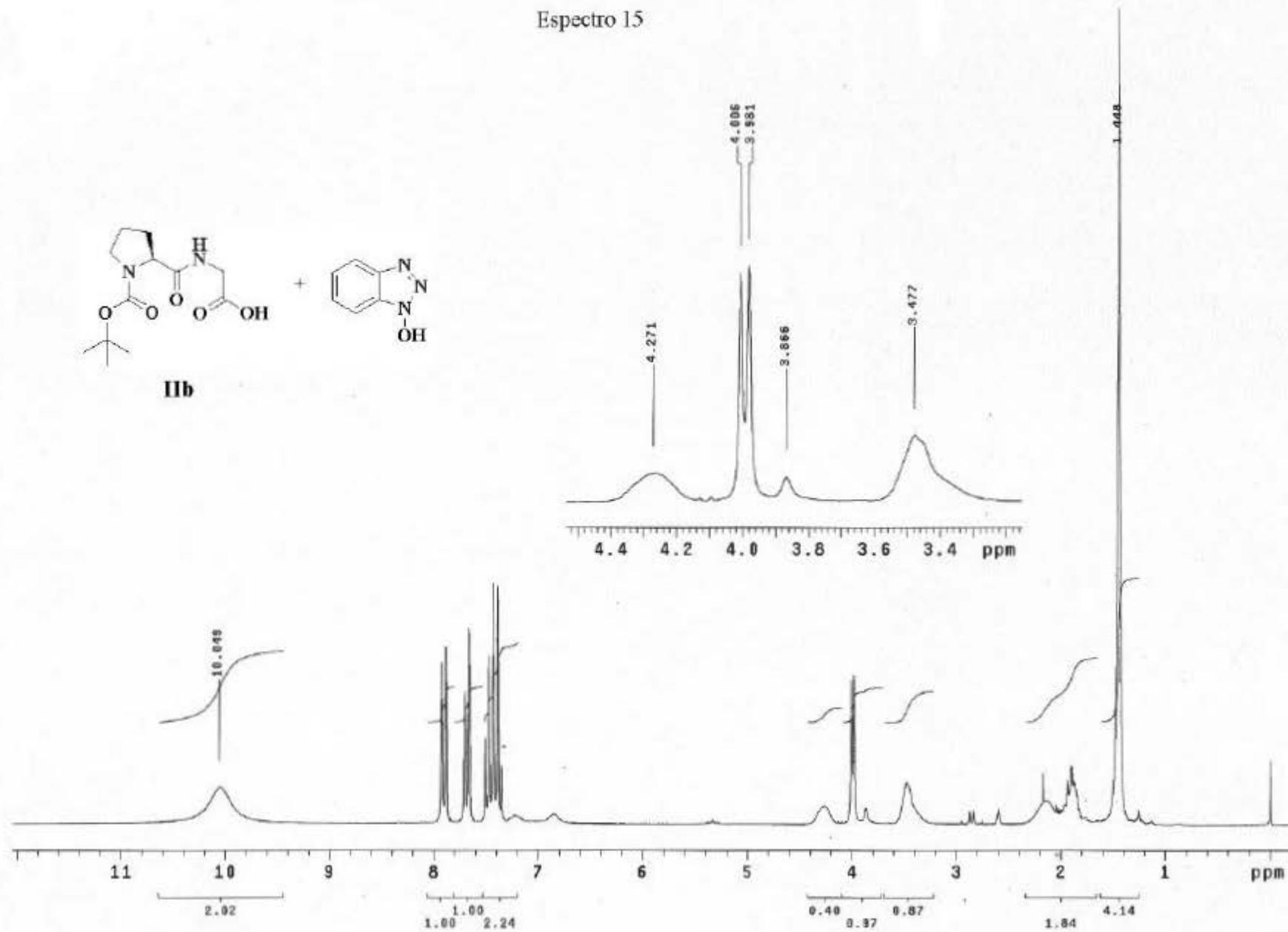
20



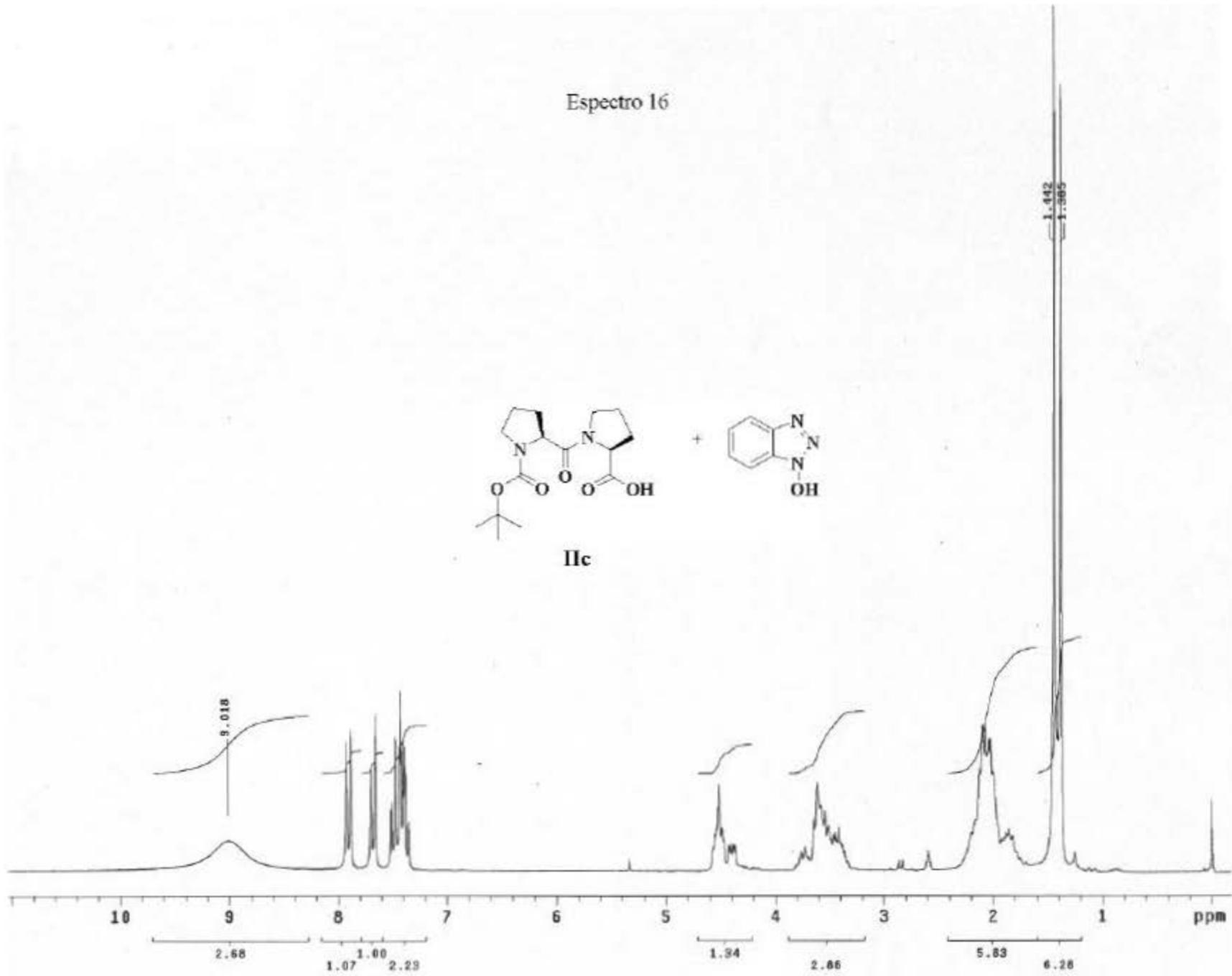
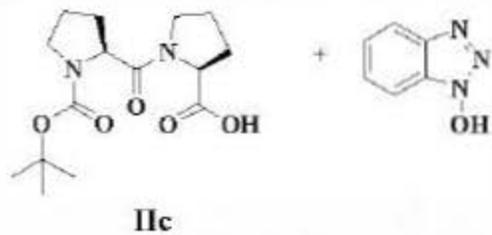
Espectro 14



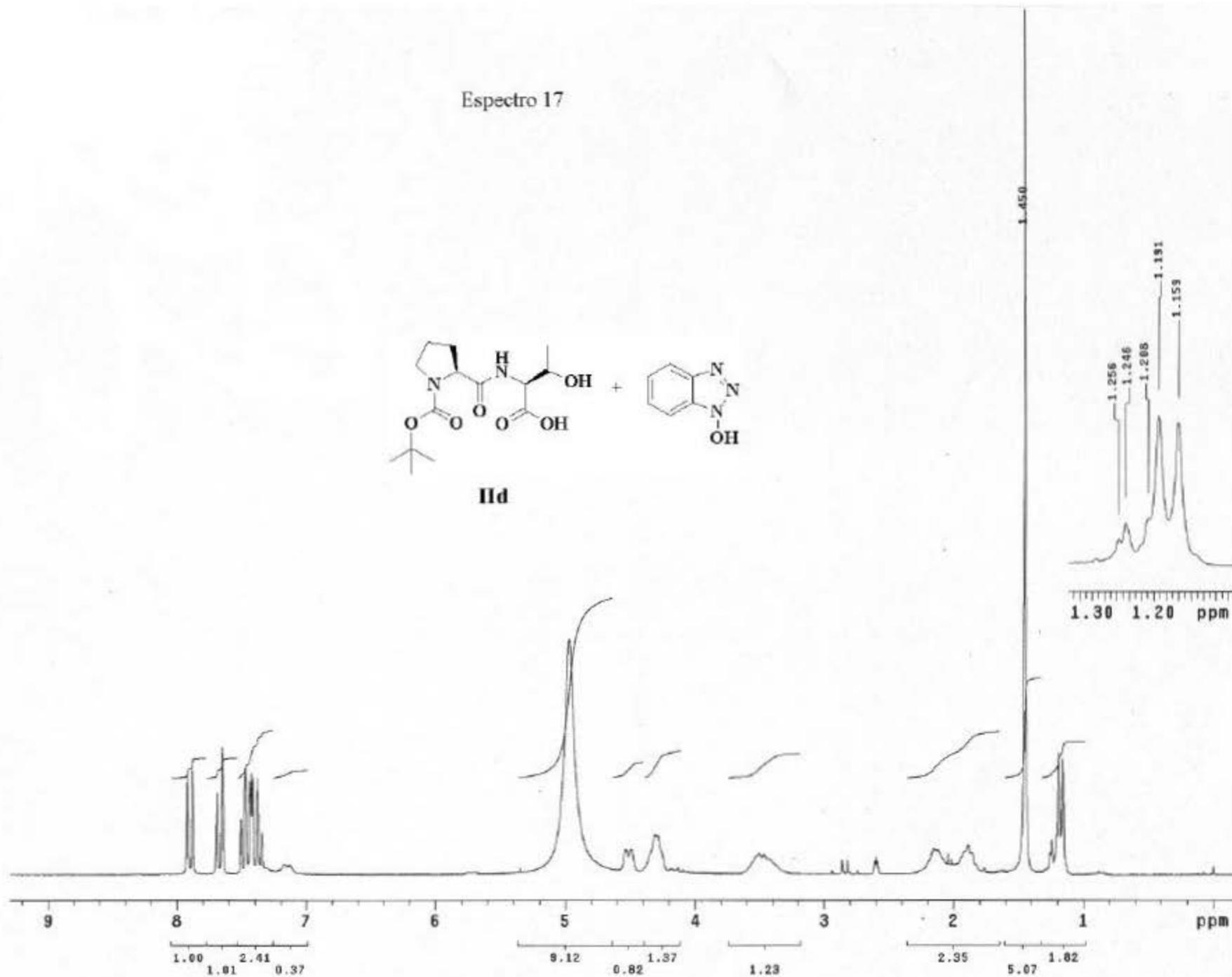
Espectro 15



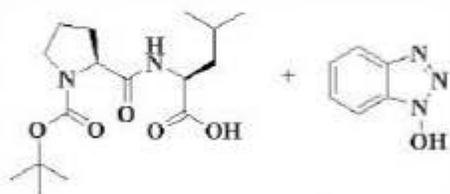
Espectro 16



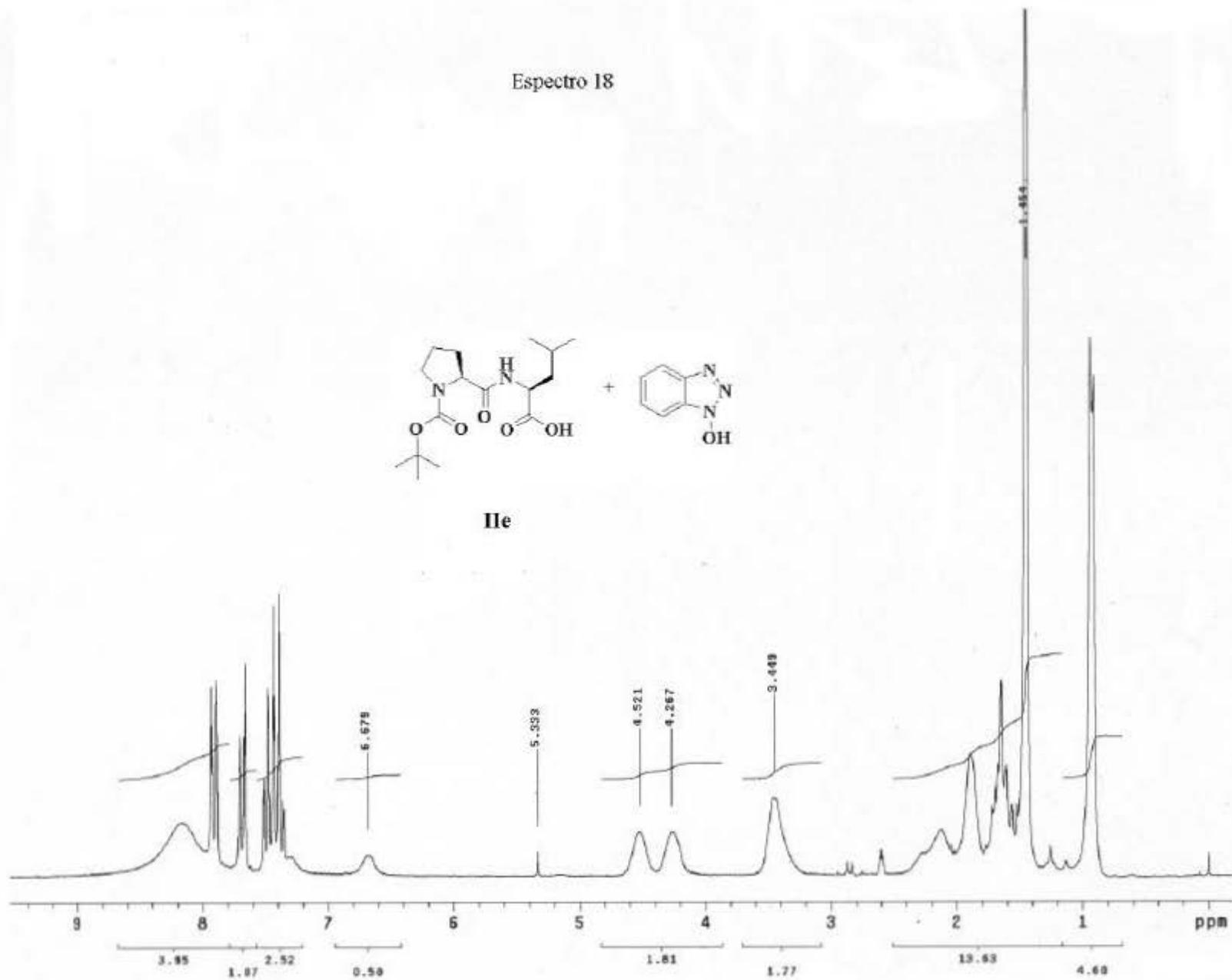
Espectro 17



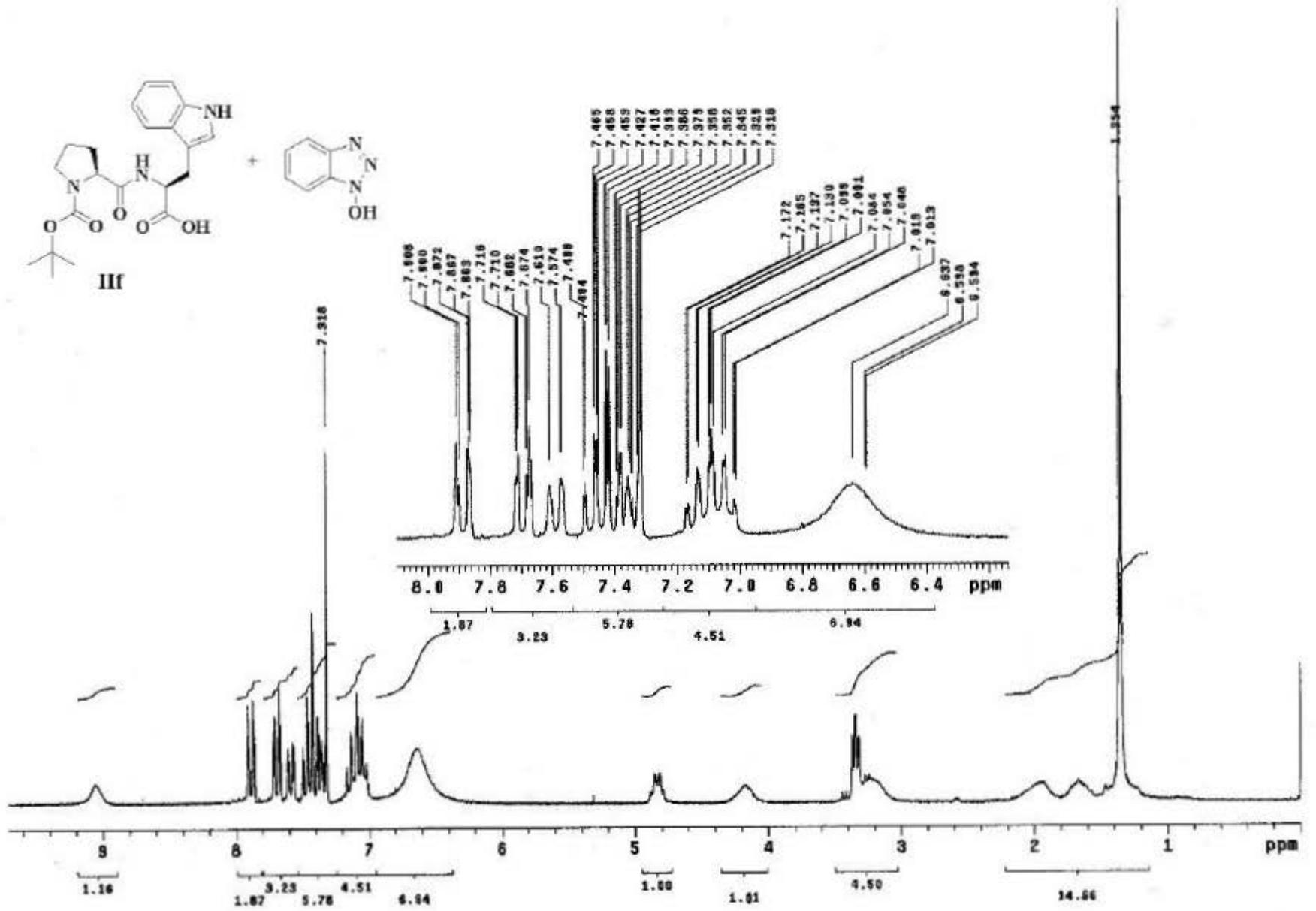
Espectro 18



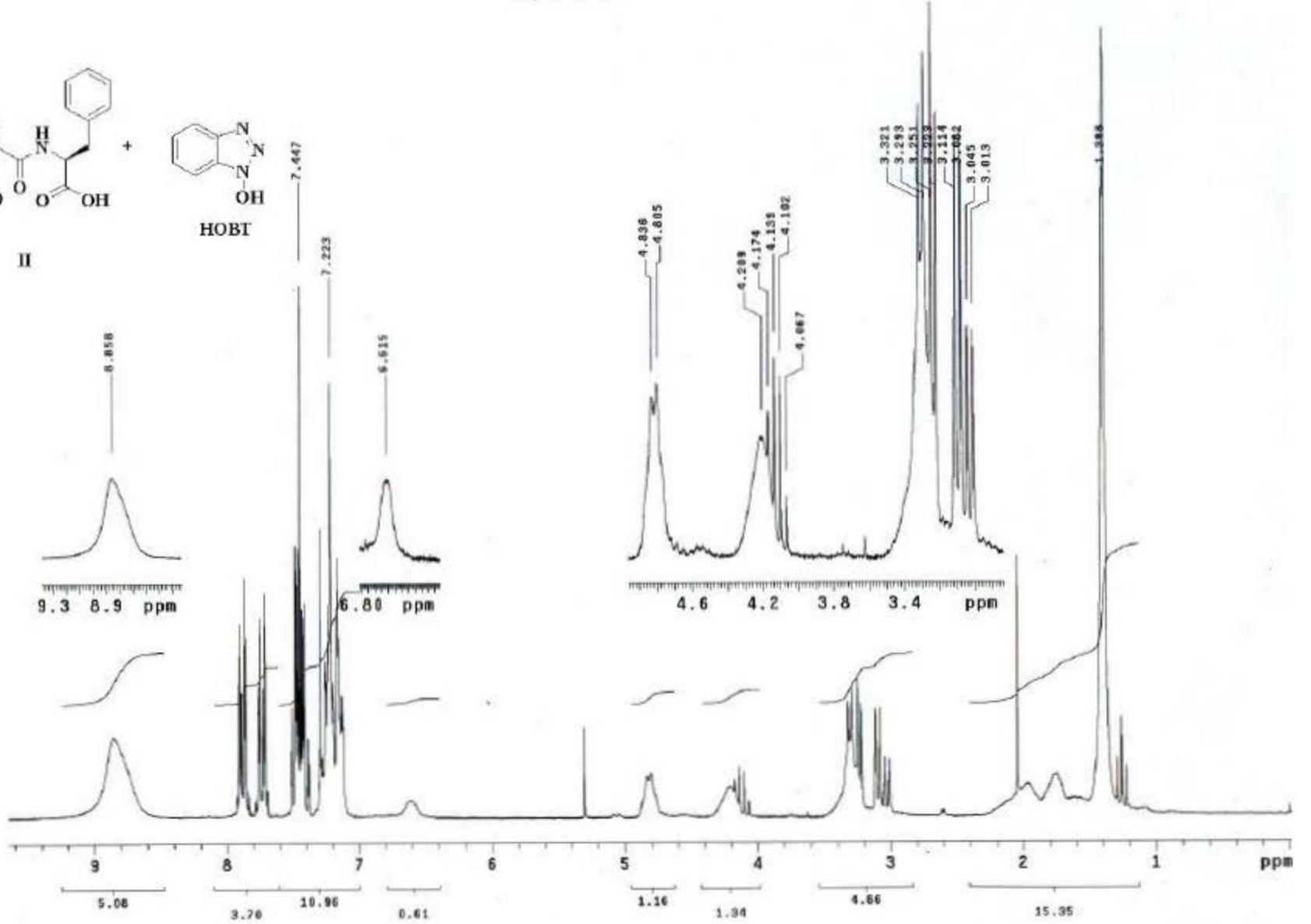
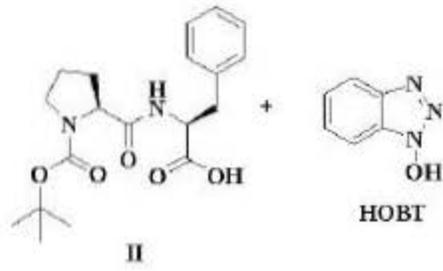
IIe



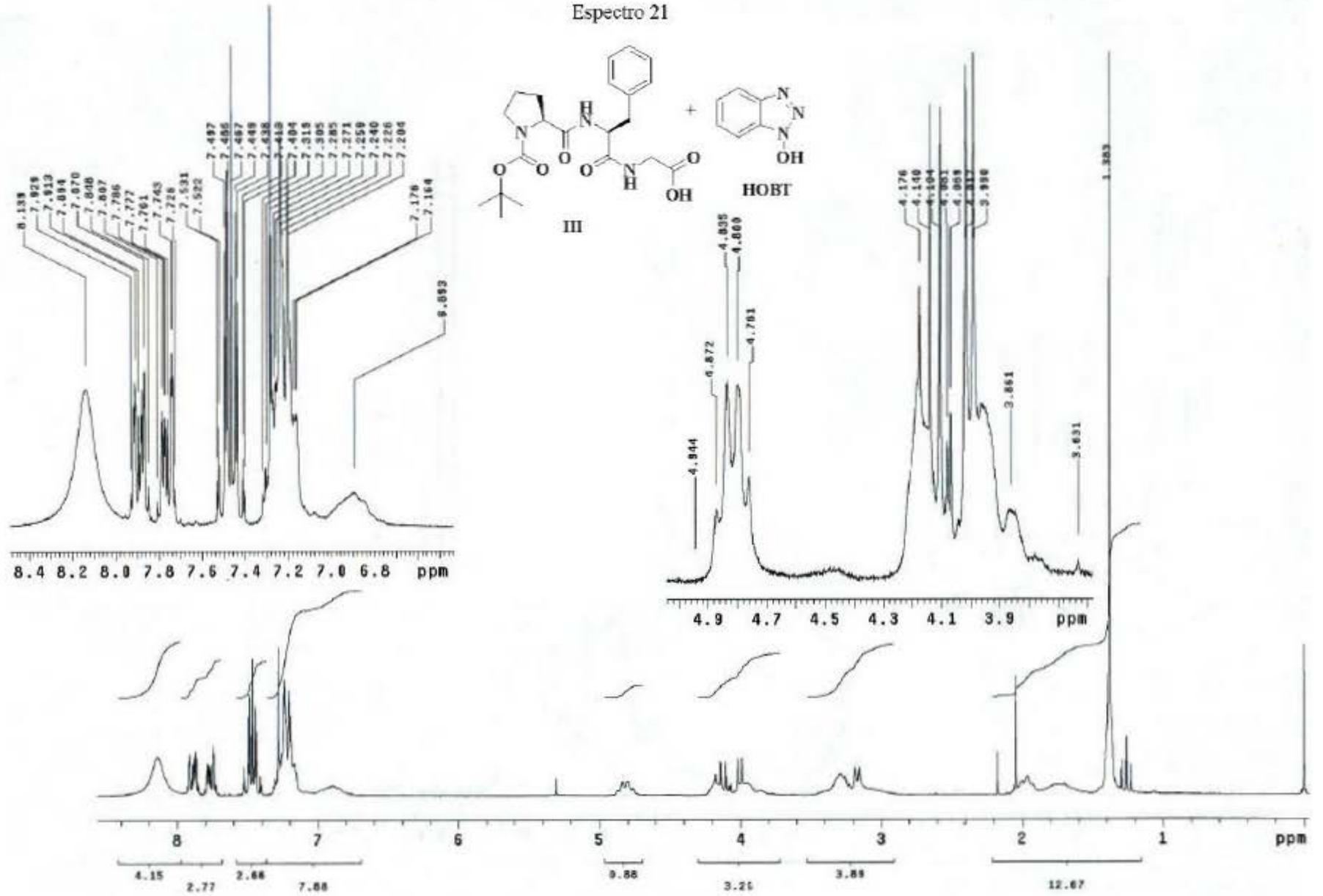
Espectro 19



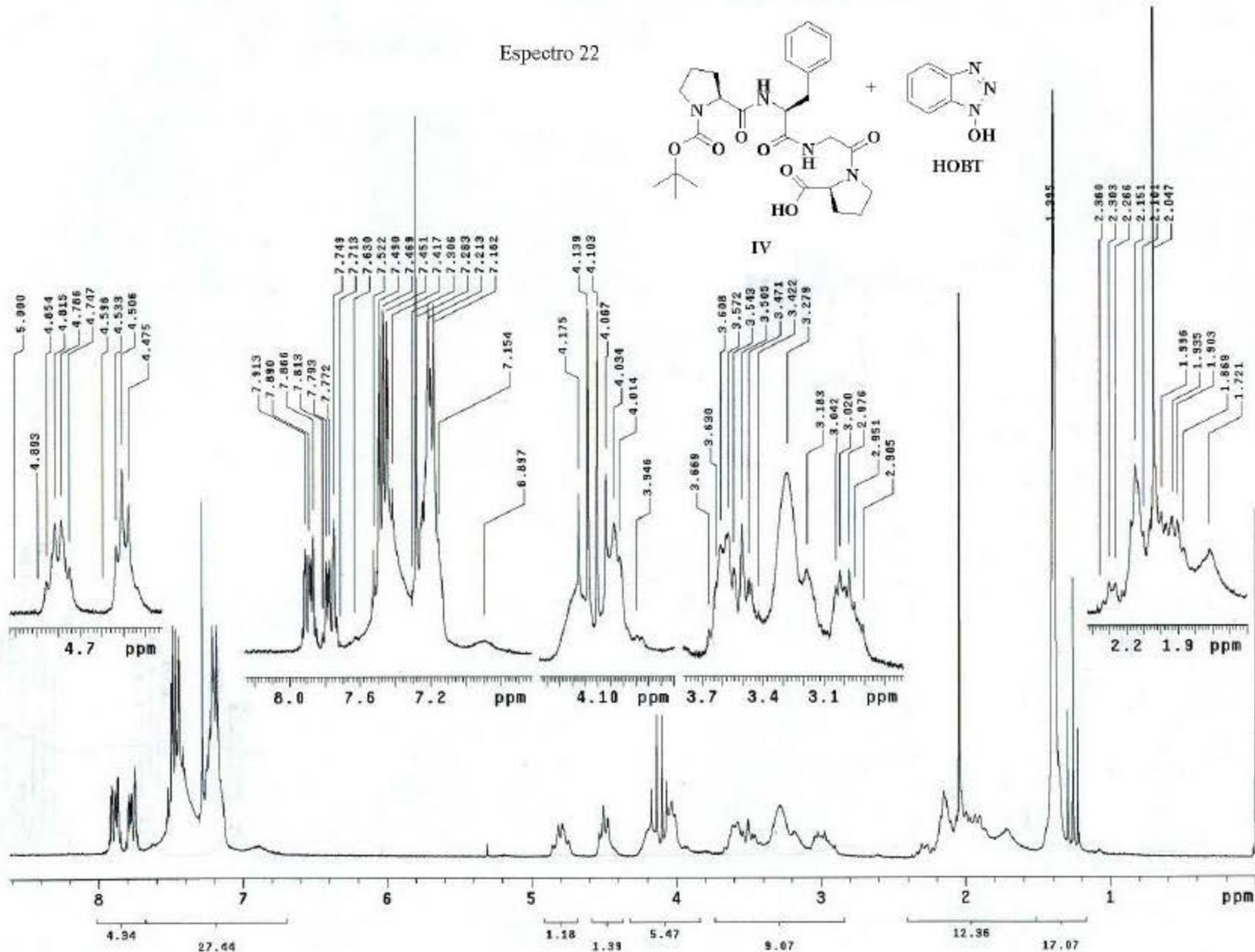
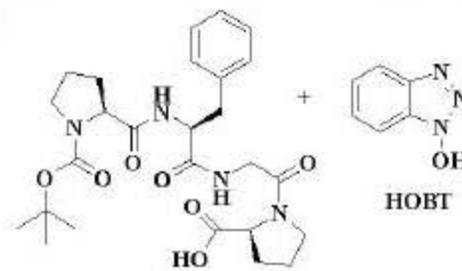
Espectro 20



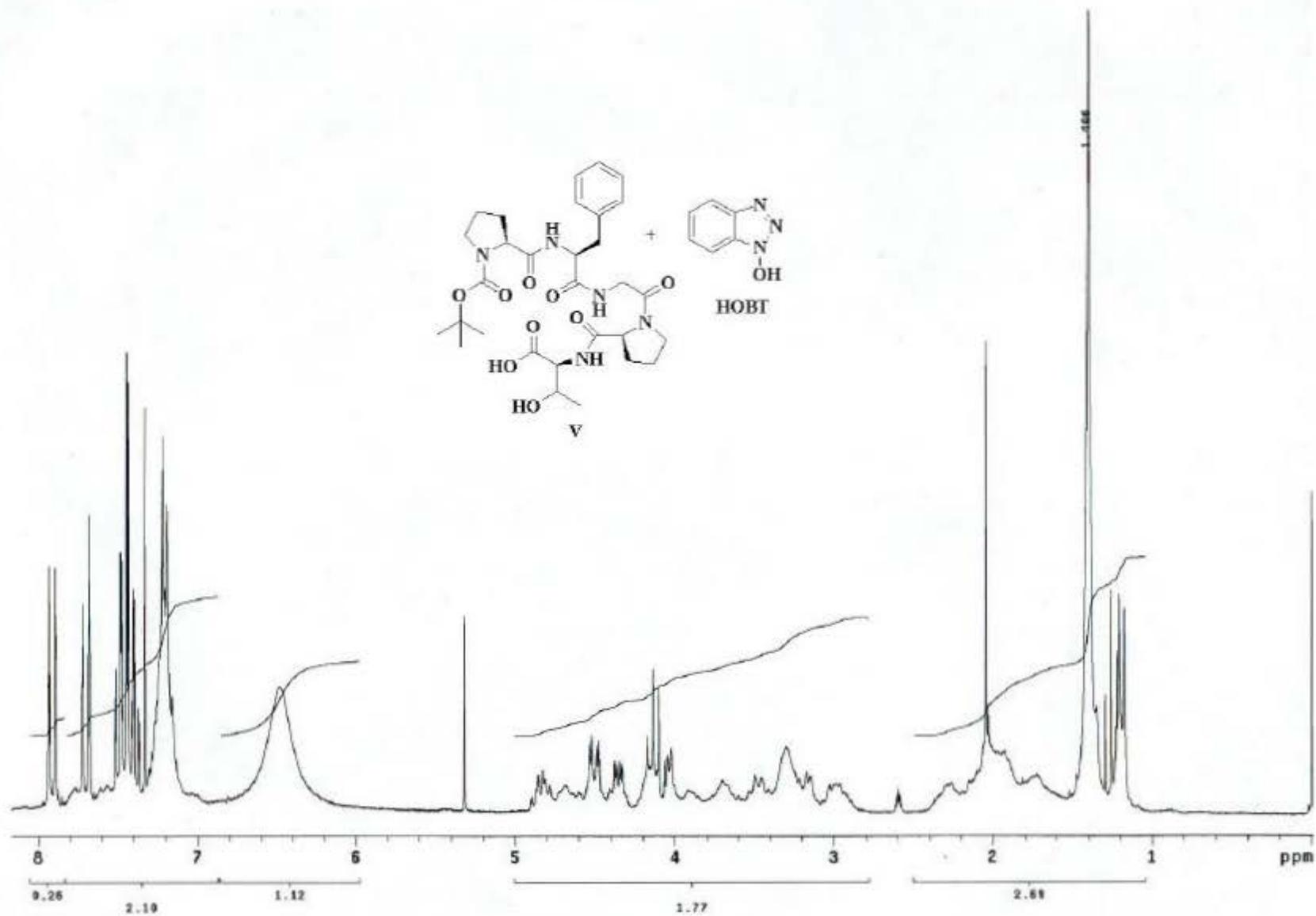
Espectro 21



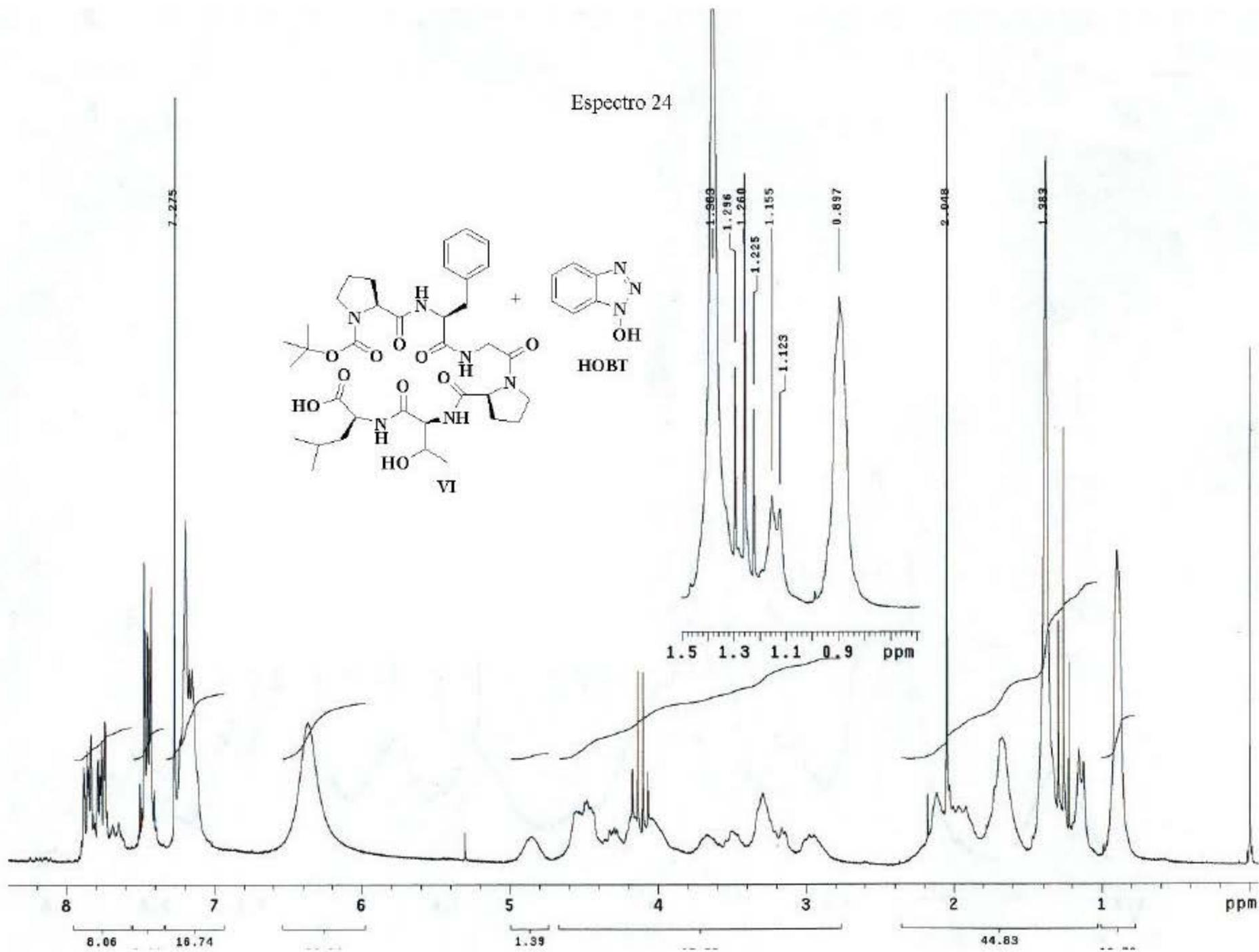
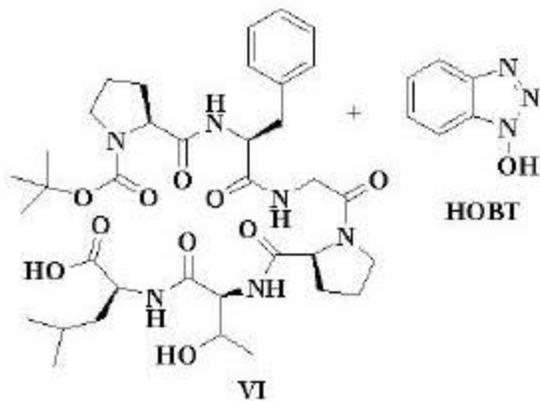
Espectro 22

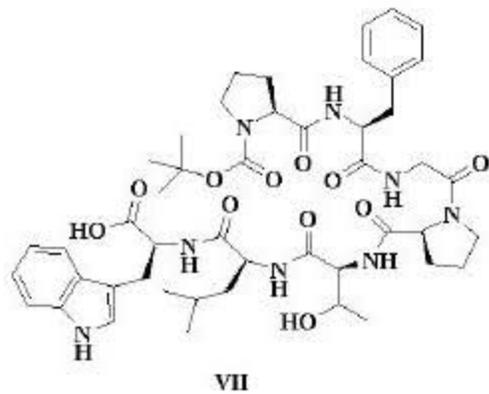


Espectro 23

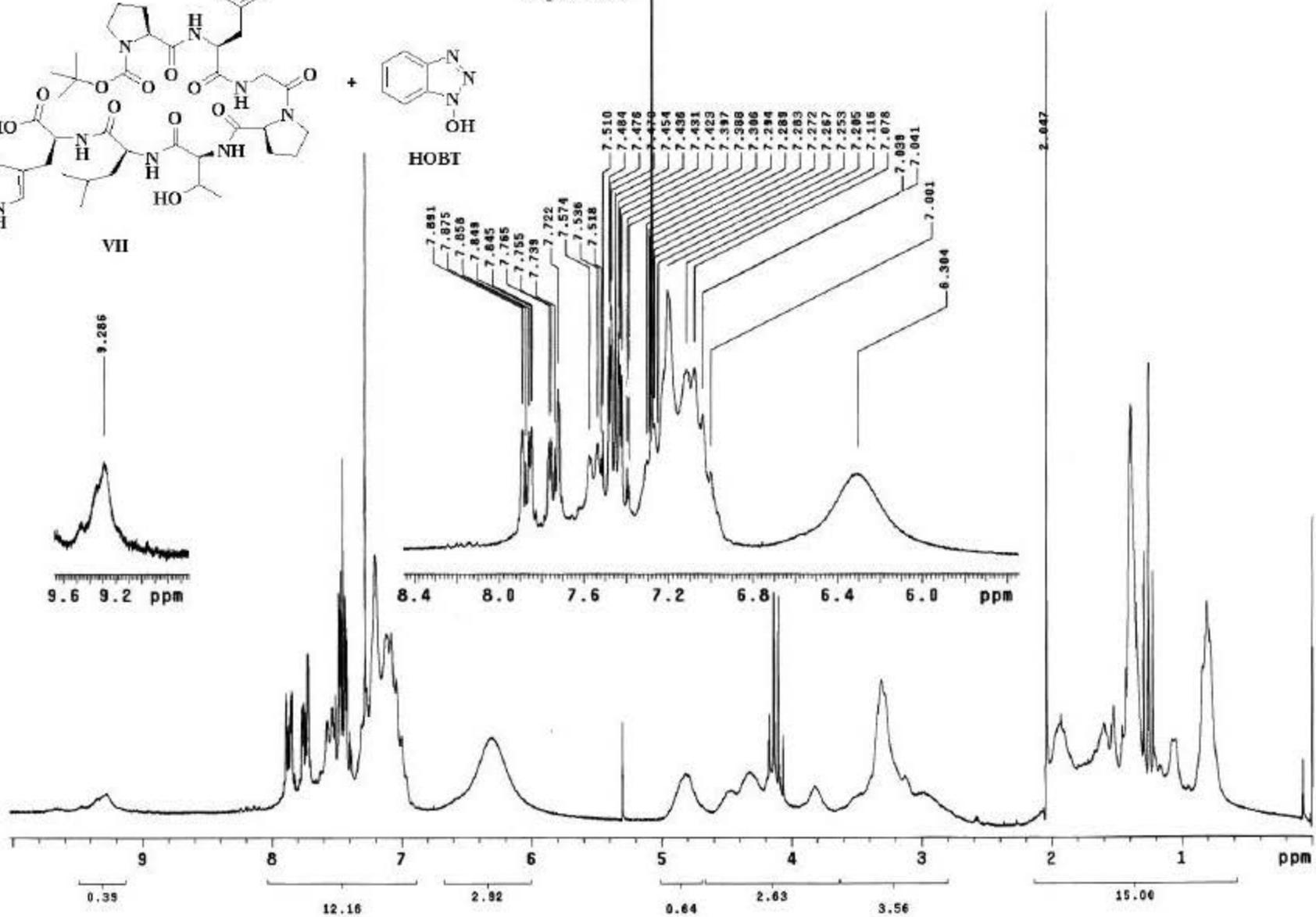


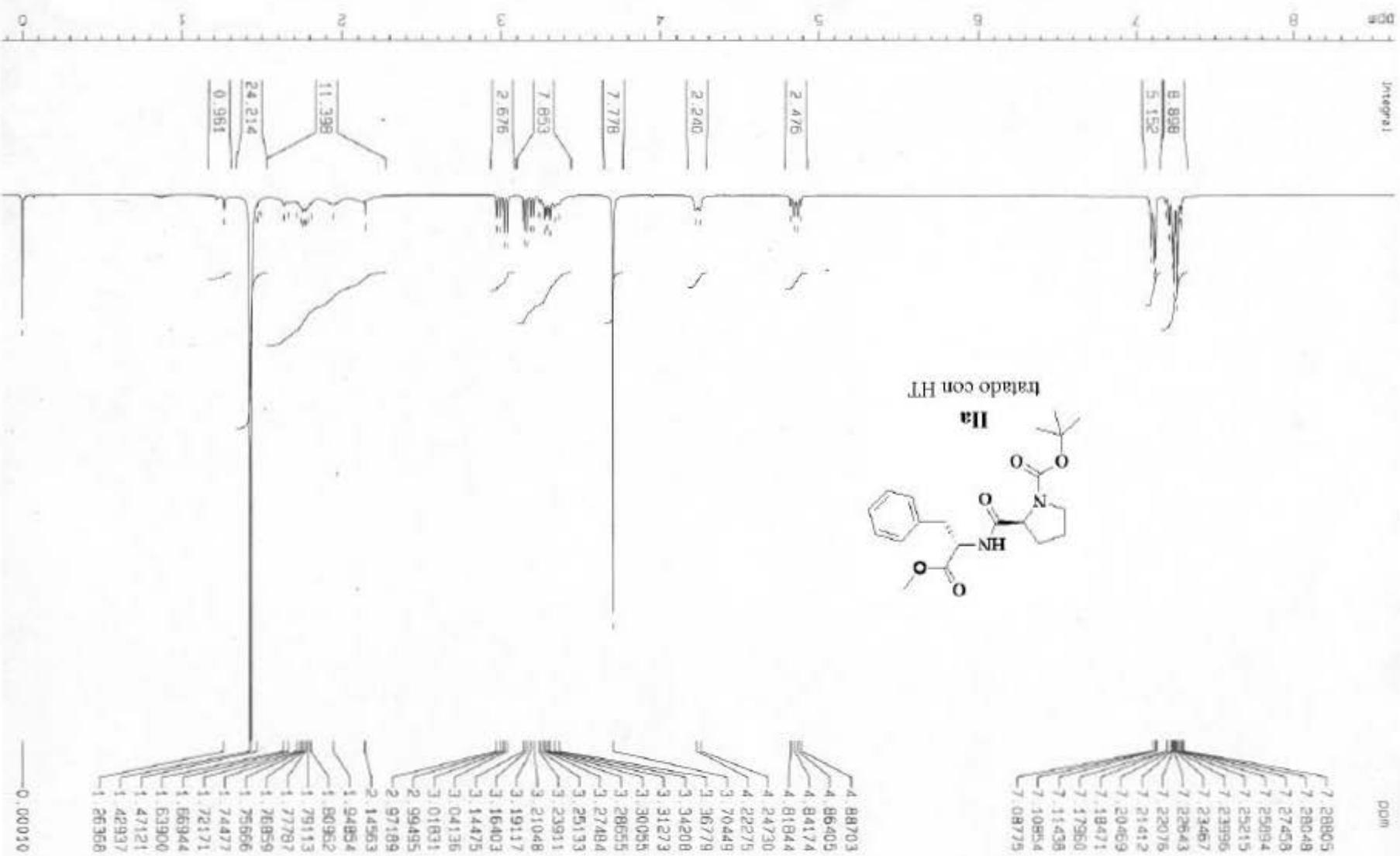
Espectro 24





Espectro 25





Espectro 26