



β -pèptids ciclobutànics: síntesi, estructura i possibles aplicacions

Elisabeth Torres Cano

2009

Tesi Doctoral realitzada al Departament de Química
de la Universitat Autònoma de Barcelona

ROSA Ma. ORTUÑO MINGARRO, Catedràtica d'Universitat al Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

CERTIFICA

Que na **Elisabeth Torres Cano**, Llicenciada en Química, ha dut a terme sota la seva direcció el treball que porta per títol “ β -pèptids ciclobutànics: síntesi, estructura i possibles aplicacions” que es recull en aquesta memòria per optar al grau de Doctora en Química.

I perquè així consti, signa el present certificat

Dra. Rosa Ma. Ortuño

Bellaterra, 6 de març de 2009

Als meus pares

Agraïments

En primer lloc vull agrair a la Dra. Rosa Ma. Ortuño Mingarro, directora d'aquesta Tesi Doctoral, l'oportunitat d'entrar en aquest grup, així com la seva ajuda i suport en tot moment al llarg d'aquests anys.

També vull agrair als Professors Vicenç Branchadell i Carlos Jaime, la seva col·laboració en la realització de diferents càlculs teòrics, DFT i AMBER, respectivament. I en especial al Carles Acosta i al Kepa Koldo Burusco per la seva bona disposició i per intentar iniciar-me en el món dels càlculs teòrics.

Agrair també al Professor Josep Vendrell i al Daniel Fernández per la seva col·laboració avaluant l'activitat inhibidora dels diferents β -pèptids, sintetitzats al nostre laboratori, oferint-nos la possibilitat de donar aplicacions als nostres productes.

També haig de donar les gràcies al Dr. David Amabilino per la seva col·laboració en la síntesi i l'estudi de noves molècules orgàniques derivades de TTF, oferint-me així l'oportunitat de conèixer nous camps en l'aplicació de materials orgànics. I especialment al Dr. Josep Puigmartí ja que, fins i tot des de la distància, ha atès els meus dubtes en tot moment.

M'agradaria també agrair al Dr. Ángel Álvarez, del Servei de Cristal·lografia, per ensenyar-me la paciència i insistència que requereix l'obtenció d'un bon cristall apte per la realització de raigs-X i per ajudar-me a entendre conceptes relacionats amb aquesta temàtica.

També donar les gràcies al Dr. Pau Nolis, del Servei de Ressonància Magnètica Nuclear, per la seva eficàcia i col·laboració en la realització de nous i sofisticats experiments de RMN.

Haig de donar també les gràcies als membres del Servei d'Anàlisi Química, així com al Departament de Química i molt especialment als membres de la Unitat de Química Orgànica.

Un agraïment molt especial pels meus actuals companys de laboratori: l'Ona, el Jordi, la Raquel, el Sergi, l'Esther i l'Eric, (i pels que ho han estat amb anterioritat, com la Sandra i el Fede) amb els que he compartit tantes bones estones i per la seva participació en aquesta Tesi Doctoral ajudant-me a resoldre dubtes sempre que ha calgut.

També vull donar les gràcies als meus amics, en especial al Marc i la Sofia, per la seva ajuda en el disseny de la portada, però molt especialment per suportar la monotemàtica de la meva conversa en els darrers mesos.

No puc acabar aquests agraïments sense donar les gràcies als meus pares i la meva germaneta per animar-me a continuar la meva formació, sent conscient de que sense el seu suport i la seva paciència, aquesta Tesi Doctoral no hagués estat possible.

I finalment, però no per això menys important, vull donar les gràcies al Carles, per animar-me i donar-me suport sempre que ha calgut però sobretot per tenir tanta paciència i aguantar-me aquests darrers mesos.

En definitiva: Moltes gràcies a tots!

Summary

It is well documented that peptides built in β -amino acids could be able to adopt secondary structures like helices, turns or sheets. Therefore, in our research group, we have synthesized β -peptides made of cyclobutane containing residues with the purpose to study if this carbocyclic ring could provide conformational constraint to prompt the formation of secondary or even tertiary structures.

In the present work, we have synthesized two different kinds of cyclobutane containing peptides, one where the cyclobutane ring is a part of the main carbon chain and another class where this ring is taken in as a substituent. We have also synthesized different cyclobutane ureas and mixed materials composed of TTF-cyclobutane β -dipeptide.

This Doctoral Thesis has been organized in different parts. There is a General Introduction where we explain our interest in this sort of compounds, followed by different chapters for every subject. In each chapter we describe the synthetic procedure(s) for the target cyclobutane containing compounds as well as their structural study. This has been carried out in solution, to analyse the generated secondary structures, using NMR techniques, CD and theoretical calculations. We have also performed a supramolecular study by microscopic approaches (TEM, AFM, SEM) to explore the possible tertiary structures these compounds could develop.

In the chapter devoted to ureas, we describe these compounds as secondary products obtained from the synthesis of β -*cis*-cyclobutane derivatives. In this case, we have been able to obtain X-ray diffraction pattern and, consequently, we have studied these compounds in the solid state too.

In addition, we have carried out a preliminary study about the applications these cyclobutane derivatives could present. For that reason, on one hand, we have explored the activity of some cyclobutane β -peptides as CPA and CPB enzyme inhibitors. On the other hand, we also show how we have synthesized and studied a chiral organic conductor by coupling one of our cyclobutane β -dipeptide with a TTF derivative.

Abreviatures

AcOEt	Acetat d'etil
AFM	Atomic Force Microscope
B3LYP	Funcional de bescanvi de Becke 3 i correlació de Lee, Tang i Parr
Bn	Benzil
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
Cbz	Carbamat de benzil
COSY	Correlated Spectroscopy
CPA	Carboxipeptidasa A
CPB	Carboxipeptidasa B
CS-AFM	Current Sensing-Atomic Force Microscopy
DC	Dicroïsme Circular
DCC	1,3-Diciclohexilcarbodiïmida
DEC	1,3-Dietilcarbodiïmida
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DFT	Teoria del Funcional de Densitat
DM	Dinàmica Molecular
DMF	Dimetilformamida
EDAC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide hydrochloride
e.e.	excès enantiomèric
GABA	àcid γ -aminobutíric
HMPA	<i>Hexamethylphosphoramide</i>
HMQC	Heteronucler Multiple Quantum Correlation
HOBt	1-hidroxibenzotriazol

HR-MAS	High Resolution Magic Angle Spinning
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Spectrum
IR	Espectroscòpia d'Infraroig
MCP	Metal·locarboxipeptidasa
MM	Mecànica Molecular
NOE	Nuclear Overhauser effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PLE	<i>Pig Liver Esterase</i>
ppm, ppb	parts per milió, parts per bilió
PPTS	<i>p</i> -toluensulfonat de piridini
RMN	Ressonància Magnètica Nuclear
SEM	Scanning Electron Microscopy
SPFM	Scanning Polarization Force Microscopy
t.a.	Temperatura ambient
TEA	Trietilamina
TEM	Transmision Electron Microscopy
TFA	Àcid trifluoroacètic
TTF	Tetratiafulvalè

Capítol 1	1
Introducció General	1
Objectius Generals	15
Capítol 2: β-aminoàcids i β-pèptids ciclobutànics de la sèrie <i>cis</i>	19
Introducció	19
2.1 β-pèptids	19
2.1.1 Tècniques comunament utilitzades per realitzar l'anàlisi conformacional de β -pèptids	20
2.1.2 Propietats conformacionals	26
2.1.3 Conformacions helicoïdals	29
2.1.4 Conformacions laminars: làmines β	41
2.1.5 Conformacions tipus cinta	46
2.1.6 β -pèptids biològicament actius	50
2.1.7 Estructures terciàries	54
2.2 Antecedents en el grup d'investigació	60
2.2.1 Síntesi i estudi estructural de β -pèptids <i>Tipus A</i>	62
2.2.2 Síntesi i estudi estructural de β -pèptids <i>Tipus B</i>	65
2.3 Objectius	75
2.4 Resultats i discussió	77
2.4.1 Síntesi del β -hexapèptid 32	78
2.4.2 Estudi estructural del β -hexapèptid 32	83

I. Estudi estructural del β -hexapèptid 32 mitjançant RMN	83
II. Estudi estructural del β -hexapèptid 32 mitjançant DC	91
2.4.3 Estudi conformacional teòric de la sèrie d'oligòmers <i>cis</i> - poli(ciclobutànics)	94
2.4.4 Estudi supramolecular mitjançant TEM de la sèrie d'oligòmers <i>cis</i> -poli(ciclobutànics)	101
2.4.5 Estudi estructural del β -tetrapèptid 29 mitjançant SPFM	110
2.4.6 Estudi mitjançant càlculs teòrics de l'empaquetament de la sèrie d'oligòmers <i>cis</i> -poli(ciclobutànics) que originen estructures terciàries fibril·lars	113
2.5 Conclusions	119

Capítol 3: β -aminoàcids i β -pèptids ciclobutànics incloent residus

<u>amb estereoquímica <i>trans</i></u>	121
3.1 Objectius	121
3.2 Resultats i discussió	123
3.2.1 Síntesi dels β -dipèptids (<i>trans,trans</i>)-bis(ciclobutànic) 38 i el (<i>cis, trans</i>)-bis(ciclobutànic) 40	123
3.2.2 Estudi estructural en solució del β -dipèptid (<i>trans,trans</i>)- bis(ciclobutànic) 38	135
I. Estudi estructural en solució del β -dipèptid (<i>trans,trans</i>)-bis(ciclobutànic) 38 mitjançant RMN	135
II. Estudi estructural en solució del β -dipèptid (<i>trans,trans</i>)-bis(ciclobutànic) 38 mitjançant DC	144
3.2.3 Estudi supramolecular del β -dipèptid (<i>trans,trans</i>)-bis (ciclobutànic) 38	146
3.2.4 Estudi conformacional teòric del β -dipèptid (<i>trans,trans</i>)-bis (ciclobutànic) 38	153

3.2.5 Estudi estructural en solució del β -dipèptid (<i>cis,trans</i>)-bis (ciclobutànic) 40	157
I. Estudi estructural del β -dipèptid (<i>cis,trans</i>)-bis (ciclobutànic) 40 mitjançant RMN	157
II. Estudi estructural del β -dipèptid (<i>cis,trans</i>)-bis (ciclobutànic) 40 mitjançant DC	159
3.2.6 Estudi supramolecular del β -dipèptid (<i>cis,trans</i>)-bis (ciclobutànic) 40	162
3.2.7 Estudi conformacional teòric del β -dipèptid (<i>cis,trans</i>)-bis (ciclobutànic) 40	164
3.3 Conclusions	167
<u>Capítol 4: Estudi estructural d'urees ciclobutàniques</u>	171
4.1 Objectius	171
4.2 Resultats i discussió	173
4.2.1 Obtenció de les urees –Ome 20 i O ^t Bu 69	174
4.2.2 Estudi estructural de les urees –Ome 20 i O ^t Bu 69 en solució mitjançant RMN	176
4.2.3 Estudi estructural de les urees –Ome 20 i O ^t Bu 69 en estat sòlid mitjançant IR	179
4.2.4 Estudi estructural de les urees –Ome 20 i O ^t Bu 69 en estat sòlid mitjançant raigs-X	181
4.2.5 Estudi supramolecular de les urees –Ome 20 i O ^t Bu 69 mitjançant TEM	191
4.3 Conclusions	197

Capítol 5: Aplicacions de β-pèptids ciclobutànics	199
5.1 Introducció	199
5.2 Resultats i discussió	202
5.2.1 Síntesi del pèptid ciclobutànic 41	203
5.2.2 Inhibició de les carboxipeptidases	204
5.2.3 Anàlisi de la manera d'ancorar-se del β -dipèptid 15b	206
5.2.4 Anàlisi de la manera d'ancorar-se del β,δ -dipèptid 42	208
5.3 Conclusions	211
Capítol 6: β-aminoàcids i β-pèptids ciclobutílics	213
6.1 Introducció	213
6.2 Objectius	219
6.3 Resultats i discussió	221
6.3.1 Síntesi dels β -derivats ciclobutílics	221
6.3.2 Estudi estructural en solució dels compostos 52, 56, 60 i 61	229
I. Estudi estructural en solució mitjançant IR	229
II. Estudi estructural en solució mitjançant RMN	230
III. Estudi estructural en solució mitjançant DC	241
IV. Estudi estructural en solució mitjançant càlculs teòrics	244
6.3.3 Estudi estructural en estat sòlid i supramolecular	251
6.4 Conclusions	257

Capítol 7: preparació i estudi de materials mixtes TTF-bis

<u>(ciclobutànics)</u>	258
7.1 Introducció	258
7.2 Objectius	264
7.3 Resultats i discussió	266
7.3.1 Síntesi del derivat TTF-bis(ciclobutànic) 63	266
7.3.2 Estudi supramolecular del derivat TTF-bis(ciclobutànic) 63	269
7.4 Conclusions	274
<u>Conclusions Generals</u>	276

Capítol 8: Descripció experimental

8.1. Consideracions generals sobre els procediments	
Experimentals	278
8.1.1 Espectroscòpia i espectrometria	278
8.1.2 Cromatografia	279
8.1.3 Utillatges generals de laboratori	280
8.1.4 Preparació de les mostres per les tècniques microscòpiques	280
8.2 Síntesi dels compostos	283
8.2.1 Síntesi de l'anhídrid 3,4-diclorociclobutan-1,2-dicarboxílic	
3a, b i c	283
8.2.2 Síntesi del 3,4-diclorociclobutan-1,2-dicarboxilat de dimetil,	
4a, b i c	284
8.2.3 Síntesi del 1,2-ciclobutandicarboxilat de dimetil, 6	285
8.2.4 Síntesi de l'àcid 2-metoxicarbonil-(1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)-ciclobutan-1- carboxílic, 7	286

8.2.5 Síntesi del 2-azidocarbonil-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, 8	287
8.2.6 Síntesi del 2-benziloxicarbonilamino-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, 9	288
8.2.7 Síntesi de l'àcid 2-benzilcarbonilamino-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxílic, 10	289
8.2.8 Síntesi del β-dipèptid bisciclobutànic 19	290
8.2.9 Síntesi de l'àcid del β-dipèptid <i>bis</i> (ciclobutànic), 24	292
8.2.10 Síntesi del β-tripèptid ciclobutànic, 25 (via Curtius)	293
8.2.11 Síntesi de l'amina del β-dipèptid <i>bis</i> (ciclobutànic), 25	295
8.2.12 Síntesi del β-tripèptid ciclobutànic, 26 (via acoblament peptídic)	296
8.2.13 Síntesi de l'àcid del β-tripèptid ciclobutànic, 27	297
8.2.14 Síntesi de l'amina del β-tripèptid ciclobutànic, 28	299
8.2.15 Síntesi del β-hexapèptid ciclobutànic, 32	300
8.2.16 Síntesi del 2- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, 34	303
8.2.17 Síntesi del 2- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, 35	304
8.2.18 Síntesi del 2-amino-(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, 36	305
8.2.19 Síntesi de l'àcid 2- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-(1 <i>S</i> , 2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxílic, 37	306
8.2.20 Síntesi del β-dipèptid (<i>trans,trans</i>)- <i>bis</i> (ciclobutànic), 38	307
8.2.21 Síntesi de l'àcid 2- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-(1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)-ciclobutan-1-carboxílic, 39	309
8.2.22 Síntesi del β-dipèptid (<i>cis,trans</i>)- <i>bis</i> (ciclobutànic), 40	310
8.2.23 Síntesi del pèptid 41	312

8.2.24 Síntesi de l'àcid (1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-acetil-2,2-dimetilciclobutan- carboxílic, 44 (àcid (-)pinonònic)	314
8.2.25 Síntesi de (1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-acetil-2,2-dimetilciclobutanocarboxilat de metil, 45	315
8.2.26 Síntesi de (1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2,2-dimetil-3-(2'-metil-[1',3']-dioxolan-2'-il)ciclobutanocarboxilat de metil, 46	316
8.2.27 Síntesi de (1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-(2'-metil-[1',3']-dioxolan-2'-il)- 2,2-dimetilciclobutilmetanol, 47	317
8.2.28 Síntesi de (1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2,2-dimetil-3-(2'-metil-[1',3']-dioxolan- 2'-il)ciclobutilmetanal, 48	318
8.2.29 Síntesi de (1' <i>R</i> , 3' <i>R</i>)-3-[2',2'-dimetil-3'-(2-metil-[1,3]-dioxolan- 2-il)ciclobutil]-2-propenoat de metil, 49(E)	319
8.2.30 Síntesi de (1' <i>R</i> ,3' <i>R</i>)-3-[2',2'-dimetil-3'-(2-metil-[1,3]-dioxolan- 2-il)ciclobutil]-2-propenoat de metil, 49(Z/E)	320
8.2.31 Síntesi de (<i>R</i>)-4-benzil- 3- ((1' <i>S</i> , 3' <i>R</i>)-2',2'-dimetil-3'-(2'-metil- 1',3'-dioxolan-2'-il)ciclobutil)isoxazolidin-1-ona, 50	321
8.2.32 Síntesi de l'àcid de 3 <i>S</i> -[(1' <i>S</i> , 3' <i>R</i>)-3'-[1'',3'']-dioxolan-2''-il- 2',2'-dimetilciclobutil- <i>N-tert</i> -butoxicarbonil]-propanoic, 51	322
8.2.33 Síntesi del 3 <i>S</i> -[(1' <i>S</i> , 3' <i>R</i>)-3'-[1'',3'']-dioxolan-2''-il-2',2'- dimetilciclobutil- <i>N-tert</i> -butoxicarbonil]-propanoat de metil, 52	324
8.2.34 Síntesi de (<i>R</i>)-3-((1' <i>S</i> , 3' <i>R</i>)-3'-[1'',3'']-dioxolan-2''-il-2', 2'-dimetilciclobutil)-4-benzilisoxazolidin-1-ona, 53	326
8.2.35 Síntesi de l'éster metílic de 3-[(1' <i>S</i> ,3' <i>R</i>)-2',2'-dimetilciclo- butil-3'-metilcetona- <i>N-tert</i> -butoxicarbonil]-β-alanina, 54	328
8.2.36 Síntesi del pèptid 56	330
8.2.37 Síntesi del pèptid 57	332
8.2.38 Síntesi de l'àcid de (3 <i>S</i>)-3-amino-[(1' <i>S</i> ,3' <i>R</i>)-3'-[1'',3'']-dioxolan -2''- il-2',2'-dimetilciclobutil]-propanoic, 58	333
8.2.39 Síntesi del (3 <i>S</i>)-3-amino-3-[(1' <i>S</i> ,3' <i>R</i>)-3'-[1'',3'']- dioxolan-2''-il -2',2'-dimetilciclobutil]propanoat de metil, 59	334
8.2.40 Síntesi del dipèptid 60	335

8.2.41 Síntesi del dipèptid 61	338
8.2.42 Síntesi del TTF- β -dipèptid bis(ciclobutànic), 63	340
8.2.43 Síntesi de <i>p</i> -toluensulfonat de piridini (PPTS), 66	342
8.2.44 Preparació de diazometà, 68	342

Annex 1: Mètode de càlcul **344**

1. Càlculs teòrics realitzats de la sèrie d'oligòmers <i>cis</i> -poli-(ciclobutànics)	347
2. Estudi mitjançant càlculs teòrics de l'empaquetament de la sèrie d'oligòmers <i>cis</i> -poli(ciclobutànics) que originen estructures terciàries <i>fibril·lars</i>	358
3. Estudi conformacional teòric del β -dipèptid (<i>trans,trans</i>)-bis(ciclobutànic) 38 i del β -dipèptid (<i>cis,trans</i>)-bis(ciclobutànic) 40	361
4. Estudi conformacional teòric dels compostos 52 , 56 , 60 i 61	363

Annex 2: Què és un gel?

1. Introducció	364
2. Gels supramoleculars amb component dispers orgànic (Organogels)	366

Annex 3: Experiments de RMN **368**

1. Caracterització de l'hexàmer 32	368
2. Caracterització del β -dipèptid (<i>trans,trans</i>)-bis(ciclobutànic) 38	374
3. Caracterització del β -dipèptid (<i>cis,trans</i>)-bis(ciclobutànic) 40	379
4. Caracterització de la urea-OMe 20	384
5. Experiments addicionals realitzats a la urea-OtBu 69	388
6. Caracterització de l'aminoàcid 52	391
7. Caracterització de l'aminoàcid 56	393
8. Caracterització del pèptid 60	395
9. Caracterització del pèptid 61	400
10. Caracterització del TTF- β -dipèptid <i>bis</i> (ciclobutànic) 63	404

Annex 4: Dades cristal·logràfiques

1. Diàcid <i>trans</i> 1,2-ciclobutancarboxílic	408
2. β -dipèptid 56	412
3. β -dipèptid 60	420

Els compostos orgànics que contenen anells de 4 membres constitueixen un grup singular de compostos, incloent productes naturals i fàrmacs, on la unitat ciclobutànica es troba com a element estructural bàsic. Els podem trobar en diversos compostos naturals com ara bacteris, fongs, plantes, invertebrats marins^{1,2} o també formant part d'alcaloides, nucleòsids i aminoàcids, així com en els seus respectius derivats peptídics. En general, la informació sobre l'activitat biològica d'aquests metabòlits és escassa, encara que es coneix que alguns d'aquests compostos aïllats presenten una forta activitat antibacteriana, antimicrobiana, antifúngica, anticonceptiva i insecticida, entre d'altres.³

Aquests derivats es presenten com uns candidats prometedors en el desenvolupament de nous fàrmacs contra diverses malalties ja que l'activitat biològica d'aquests compostos es pot veure potenciada per la presència de l'anell ciclobutànic, que permet restringir la llibertat conformacional degut a la rigidesa que confereix.³

El 1980, Bell i col·laboradors⁴ van ésser els primers en aïllar α -aminoàcids ciclobutànics d'origen natural. Concretament van aïllar l'àcid 2,4-metanglutàmic i la 2,4-metanprolina de la planta *Ateleia herbert smithii* Pittier (Leguminosae). Més tard, el 1987 Austin i col·laboradors⁵ van aïllar, d'aquesta mateixa planta, un altre α -aminoàcid, l'àcid *cis*-1-amino-3-hidroximetilciclobutan-1-carboxílic. Tot i així, posteriorment tant l'àcid 2,4-metanglutàmic com la 2,4-metanprolina han estat detectats a diferents espècies de la *Bocoa* (Leguminosae; Papilionoideae).⁶

De la mateixa manera, l'àcid *cis*-2-amino-1-hidroxiciclobutanacètic ha estat aïllat del *S. rochei* i ha presentat activitat herbicida.⁷ També s'ha de

¹ Ortuño, R. M.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, Y., *Current Organic Chemistry*, **2005**, *9*, 237

² Dembitsky, V. M.; *J. Nat. Med.*, **2008**, *62*, 1

³ Ordóñez, M.; Cativiela, C., *Tetrahedron Asymetry*, **2007**, *18*, 3

⁴ Bell, E. A.; Qureshi, M. Y.; Pryce, R. J.; Janzen, D. H.; Lemke, P.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 1409.

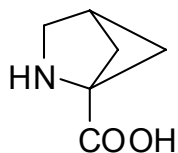
⁵ Austin, G. H.; Baird, P. D.; Chow, H-F.; Fellows, L. E.; Fleet, G.; Nash, R. J.; Peach, J.M.; Pryce, R. J.; Stirton, C. H., *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 1857

⁶ Kite, G. C.; Ireland, H. *Phytochemistry*, **2002**, *59*, 163

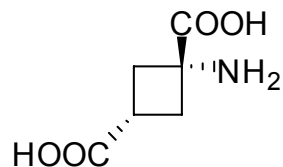
⁷ Ayer, S. W.; Isaac, B. G.; Luchsinger, K.; Makkar, N.; Tran, M.; Stonard, R. J., *J. Antibiot.*, **1991**, *44*

Capítol 1: Introducció General

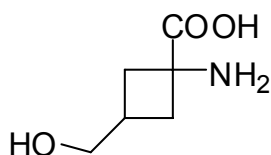
destacar l'antibiòtic X 1092, produït pel microorganisme *Streptomyces species X-1092*, que sota condicions aeròbiques és efectiu inhibint bacteris Grampositius.⁸ (Figura 1)



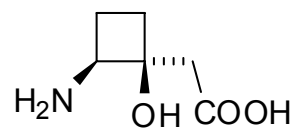
2,4-metanprolina



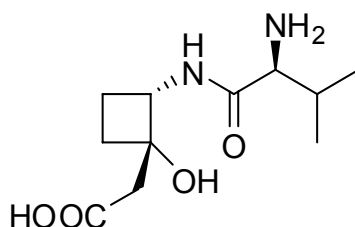
Àcid 2,4-metanglutàmic



Àcid *cis*-1-amino-3-hidroximetilciclobutan-1-carboxílic



Àcid *cis*-2-amino-1-hiroxiciclobutanacètic



X 1092

Figura 1

També s'ha pogut aïllar i elucidar l'estructura d'alcaloides que contenen l'anell ciclobutànic provinents d'algues marines i invertebrats. Alguns d'aquests alcaloides presenten activitats biològiques interessants. Entre aquests trobem l'esceptrin, agent antimicrobià, aïllat per primera vegada per Faulkner al 1981 de

⁸ Pruess, D.; Scannell, J. P.; Blount, J. F.; Ax, H. A.; Kellet, M.; Williams, T. H.; Stempel, A., *J. Antibiot.*, **1974**, 27, 754

l'esponja marina *Agelas sceptrum*.⁹ Anys més tard també es van aïllar l'amina lliure i la diacetamida d'aquest mateix compost. Aquest alcaloide presenta activitat antimicrobiana contra el *Staphylococcus aureus*, el *Bacillus subtilis*, la *Candida albicans*, la *Pseudomonas aeruginosa*, l'*Alternaria* (fong), i el *Cladosporium cucumerinum*.² (Figura 2)

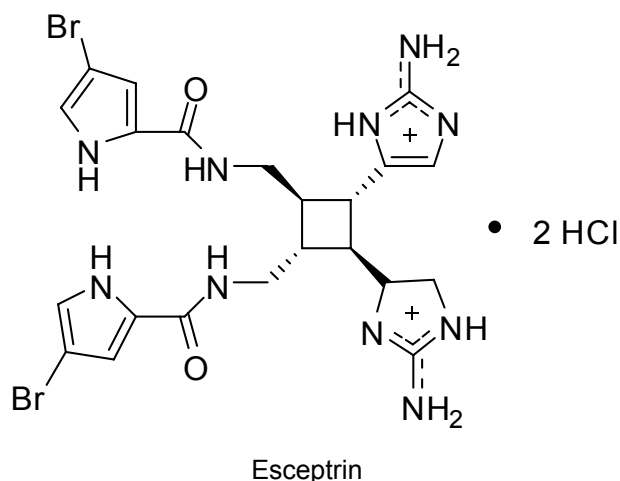


Figura 2

Donat que en els últims anys la síntesi de compostos ciclobutànics està adquirint un creixent interès, s'han investigat diferents metodologies sintètiques. Cal esmentar, però, que mentre nombroses síntesis d'alcaloides i/o nucleòsids, que contenen anells ciclobutànics, han estat descrites, estudis sobre la preparació i l'estudi estructural d'aminoàcids i pèptids ciclobutànics són més escassos.

Entre els anàlegs sintètics d'alcaloides naturals que continguin l'anell ciclobutànic trobem l'oxetanocina A, produïda pel *Bacillus megaterium*¹⁰ i que presenta activitat contra el virus de l'herpes simple II. (Figura 3) D'altra banda, els nucleòsids carbocíclics com el ganciclovir, acyclovir i azidotimidina tenen una gran activitat contra HCMV (infeccions relacionades amb pacients

⁹ Walker, R. P.; Faulkner, D. J.; Van Engen, D.; Clardy, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 6772

¹⁰ Shimada, N.; Hasegawa, S.; Harada, T.; Tomisawa, T.; Fujii, A.; Takita, T., *J. Antibiot.*, **1986**, *39*, 1623

immunodepressius), el virus de l'hepatitis i el virus de la immunodeficiència humana (VIH). Els seus anàlegs ciclobutànics, com el cyclobut-A i el cyclobut-G, presenten activitat d'ampli espectre contra el VHS (virus de l'herpes simple) i el VIH.¹ A més, darrerament el cyclobut-A i l'anàleg del cyclobut-G han mostrat activitat en models experimentals de malalties víriques que presentaven resistència al ganciclovir, acyclovir i azidotimidina.² **(Figura 3)**

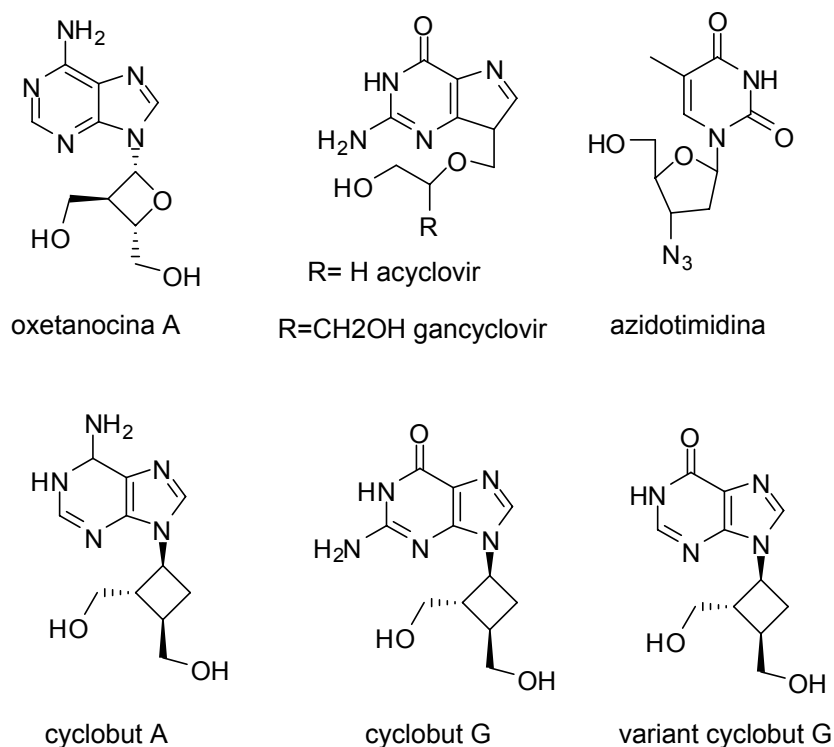


Figura 3

Com anàlegs conformacionalment restringits del àcid γ -aminobutíric (normalment abreuiat GABA), principal neurotransmissor inhibitor, s'han sintetitzat els àcids *cis*- i *trans*-3-aminociclobutan-1-carboxílic. S'ha comprovat, així, que aquests àcids presenten una activitat de dèbil a moderada, comparat amb el GABA². **(Figura 4A)** Recentment Ortuño i col·laboradors¹¹ han sintetitzat γ -oligòmers, preparats a partir del GABA, amb residus ciclobutànics entre altres **(Figura 4B)**. També s'han sintetitzat anàlegs de la tuftsina^{12,13} i, en aquest cas,

¹¹ Aguilera, J.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, *19*, 302

¹² Lasa, M.; Lopez, P.; Cativiela, C., *Tetrahedron: Asym.*, **2005**, *16*, 4022

¹³ Gershonov, E.; Granoth, R.; Tzehoval, E.; Gaoni, Y.; Fridkin, M., *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4833

s'ha observat que alguns d'aquests anàlegs presenten una elevada resistència a la hidròlisi enzimàtica comparat amb la tuftsina. (**Figura 4C**)

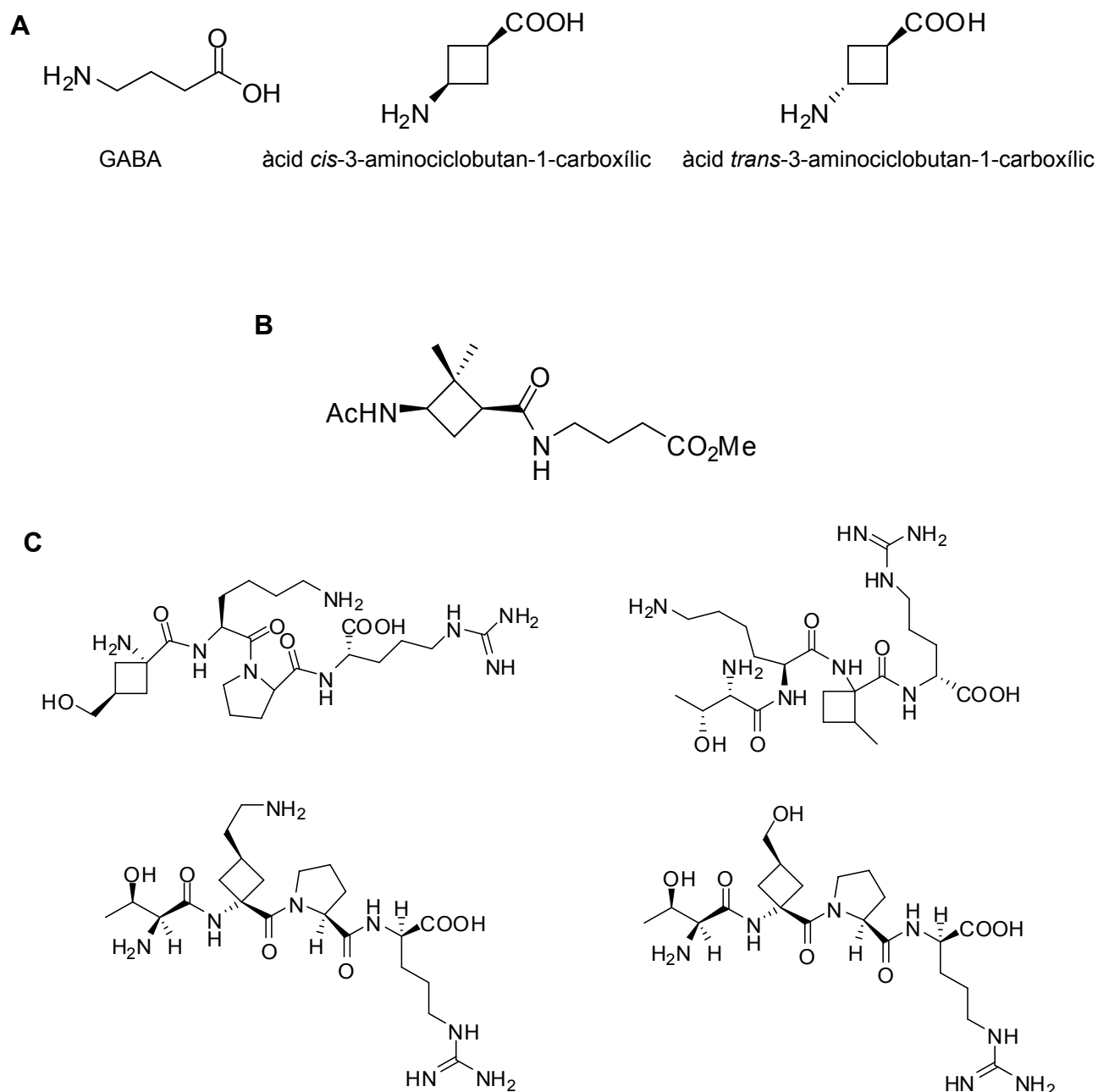
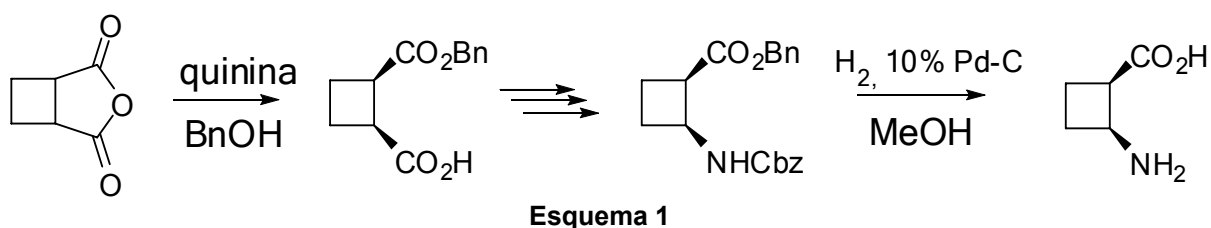


Figura 4

D'altra banda, Bolm i col·laboradors¹⁴ han desenvolupat rutes sintètiques per l'obtenció de β -aminoàcids ciclobutànics i altres derivats, a partir de l'obertura del corresponent anhídrid *meso* utilitzant alcohol benzílic i quinina com

¹⁴ (a) Bolm, C.; Schiffers, I.; Atodiresei, I.; Hackenberger, C. P. R., *Tetrahedrom Asymmetry*, **2003**, *14*, 3455. (b) Bolm, c., *Synthesis*, **2001**, 1719. (c) Bolm, C., *Synthesis*, **2001**, *43*, 6177

auxiliar quiral. Aquesta obertura es dona amb un 93% d'e.e. A continuació es realitzen tota una sèrie de transformacions (transposició de Curtius i desprotecció dels grups funcionals) i s'arriba al corresponent aminoàcid lliure. (**Esquema 1**)

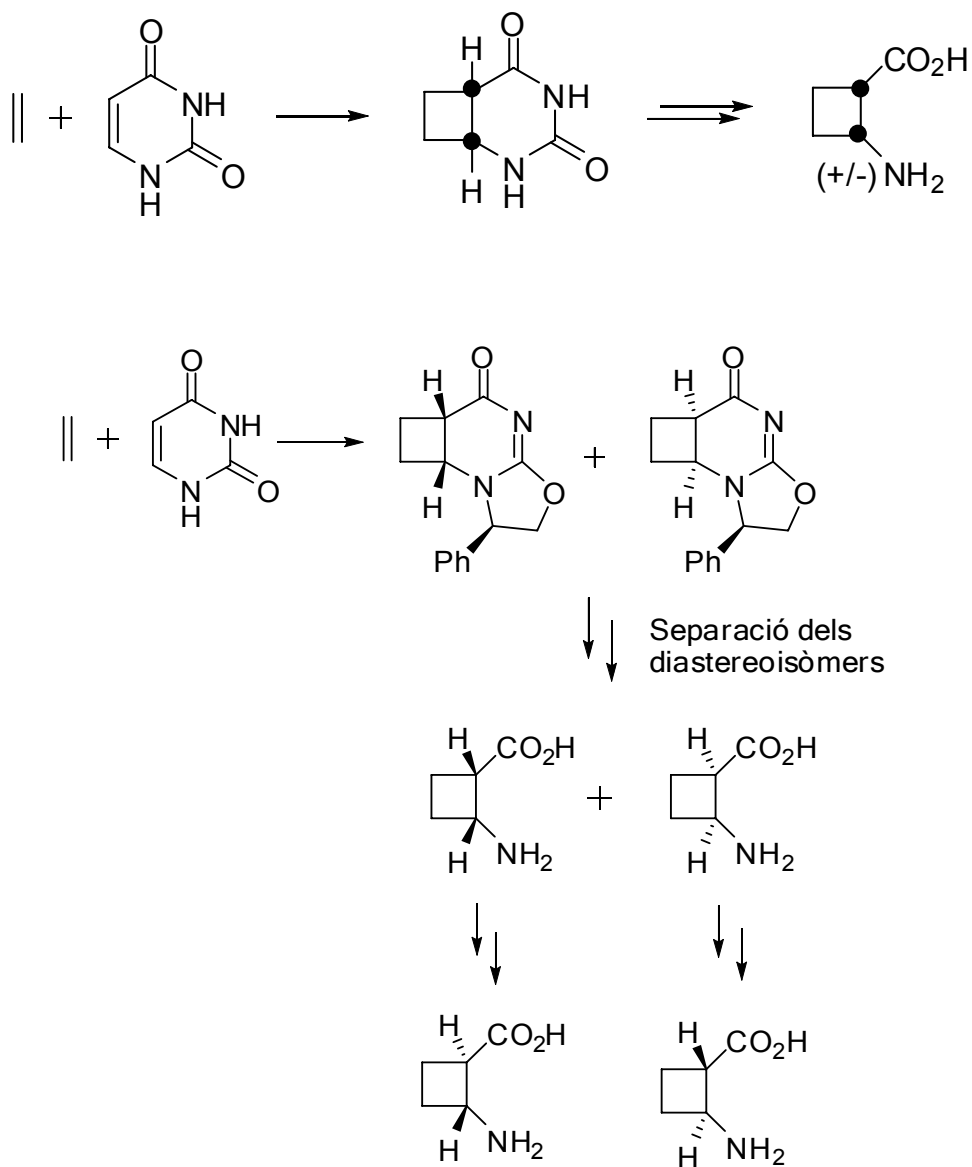


Per la seva part, Aitken i col·laboradors¹⁵ han preparat β -aminoàcids ciclobutànics en forma racèmica a partir d'una reacció de cicloadició fotoquímica [2+2] utilitzant etilè i un derivat quiral de l'uracil. Obtenint així, mitjançant una posterior degradació de l'anell heterocíclic, la funció aminoàcid. Seguidament, després de realitzar les proteccions ortogonals adequades han obtingut els àcids (+/-) *trans*-2-aminociclobutan-1-carboxílics mitjançant una epimerització regioselectiva. (**Esquema 2**)

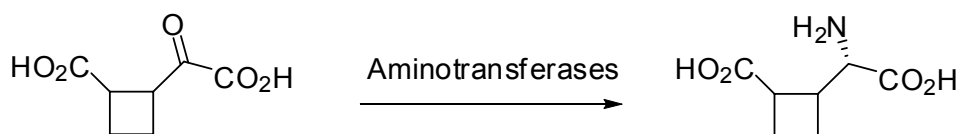
Continuant amb aquesta línia de treball, aquests autors també han desenvolupat una ruta sintètica per a l'obtenció dels diferents diastereoisòmers de *L*-2-(2-carboxiciclobutil)glicina (*L*-CBG-I, *L*-CBG-II, *L*-CBG-III i *L*-CBG-IV), a partir dels corresponents àcids *cis* i *trans*-2-oxalilciclobutan-1-carboxílic, i utilitzant enzims de l'*Escherichia coli*.¹⁶ (**Esquema 3**)

¹⁵ (a) Aitken, D. J.; Gauzy, E.; Pereira, E., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 2359. (b) Gauzy, C.; Pereira, E.; Faure, S.; Aitken, D. J., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 7095. (c) Aitken, D. J., *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 6177.

¹⁶ Faure, S.; Jensen, A. A.; Maurat, V.; Gu, X.; Sagot, E.; Aitken, D. J.; Bolte, J.; Gefflaut, T.; Bunch, L., *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 6532

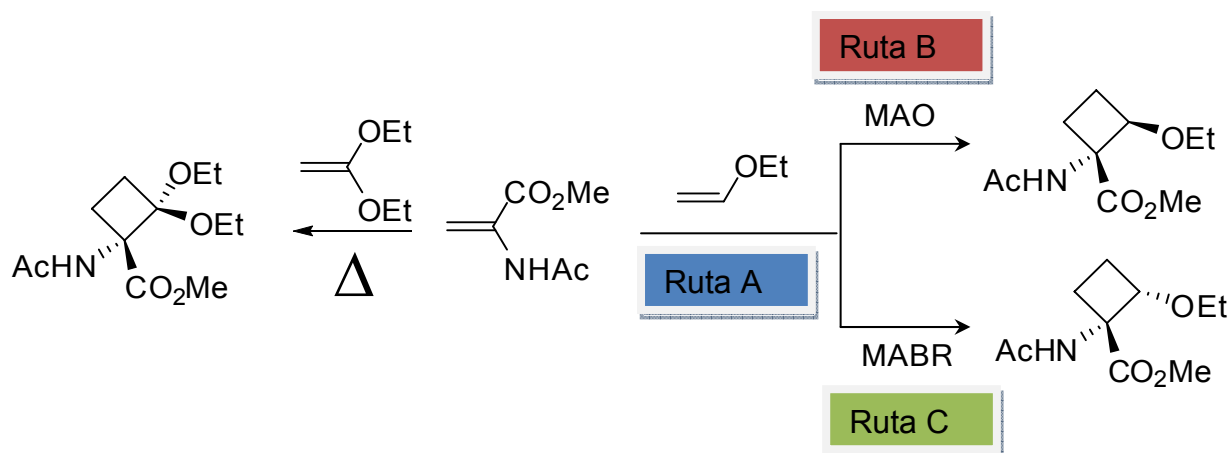


Esquema 2. A la part superior es mostra la síntesi del racèmic i a la part inferior la dels enantiòmers



Esquema 3. Síntesi d'aminoàcids ciclobutànics utilitzant aminotransferases

També s'ha d'esmentar el treball dut a terme per Avenzoza a principis del 2000. Aquest autor, va desenvolupar una nova estratègia sintètica destinada a la síntesi d' α -aminoàcids ciclobutànics on també es realitza una cicloadició [2+2], essent en aquest cas no fotoquímica, sinó tèrmica, entre una olefina i el 2-acetamidoacrilat de metil i utilitzant com a catalitzador un àcid de Lewis. (Esquema 4)



Esquema 4

Si es realitza la cicloadició sobre l'acetamidoacrilat de metil utilitzant dietòxid de vinil¹⁷ i sense catalitzador, s'obté el ciclobutà *gem*-substituït (Ruta A). En canvi, si es vol obtenir el ciclobutà monosubstituït, com a segon reactiu s'utilitza l'etil vinil éter.¹⁸ D'aquesta manera, és possible controlar l'estereoquímica de la reacció segons el catalitzador de Lewis que s'utilitzi. Per a l'obtenció de cadascun dels diastereoisòmers s'han utilitzat el *bis*(4-bromo-2,6-di-*tert*-butilfenòxid) (MABR, Ruta C) i el metil aluminoxà (MAO) (Ruta B). (Esquema 4)

En general, tot i que els β -aminoàcids són molt menys abundants que els seus anàlegs α , també es poden trobar a la naturalesa, ja sigui en forma lliure, en pèptids o formant part de molècules de major mida que presenten propietats antibiòtiques, antifúngiques o farmacològiques.¹⁹ Els β -aminoàcids

¹⁷ Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Canal, N.; Peregrina, J. M.; Pérez-Fernández, M., *Org. Lett.*, **2005**, 7, 3597

¹⁸ Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Canal, N.; Peregrina, J. M.; *Chem. Commun.*, **2003**, 12, 1376

¹⁹ Michael, J. P.; Pattenden, G., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1993**, 32, 1

enantiòmericament purs constitueixen *building blocks* de preferència per la preparació de β -pèptids. Aquest tipus de pèptids acostumen a presentar una estabilitat enzimàtica elevada, respecte els seus anàlegs α , així com estructures tridimensionals.²⁰ Probablement aquesta estabilitat es deu a la dificultat de les peptidases per trencar els enllaços amida entre dos β -aminoàcids i això fa que siguin molècules molt interessants, des del punt de vista del disseny d'anàlegs, que puguin ser inclosos en la formulació de fàrmacs.²¹

Degut a l'elevat potencial d'aquests compostos a la indústria farmacèutica, la preparació de β -aminoàcids quirals ha estat àmpliament estudiada.²² Alguns d'aquests són productes, que per ells mateixos ja són biològicament actius. Per exemple, la *cis*-pentacina presenta una elevada activitat antibiòtica i antifúngica,²³ i l'emieramina mostra propietats hipoglicèmiques i anticetogèniques.²⁴ També, una gran varietat de productes lineals polifuncionalitzats²⁵ o macrocíclics²⁶ incorporant les subestructures dels β -aminoàcids han posat de manifest activitats biològiques interessants. (**Figura 5**)

Els β -amino- α -hidroxiàcids enantiomèricament purs són derivats importants dins d'aquest grup, ja que són molècules crucials en medicina. Dins d'aquests compostos cal destacar per exemple el taxol²⁷, un dels principals

²⁰ (a) Gademan, K.; Hintermann, T.; Schreiber, J. V., *Curr. Med. Chem.*, **1999**, *6*, 905. (b) Gellman, S. H., *Acc. Chem. Res.*, **1998**, *31*, 173. (c) Guenard, D.; Guéritte-Voegelein, R.; Potier, P., *Acc. Chem. Res.*, **1993**, *26*, 160. (d) Seebach, D.; Matthews, J. L., *Chem. Commun.*, **1997**, 2015

²¹ (a) Rueping, M.; Mahajan, Y.; Sauer, M.; Seebach, D., *ChemBioChem.*, **2002**, *3*, 257. (b) Schreiber, J. V.; Frackennpohl, J.; Moser, F.; Fleishmann, T.; Kohler, H. P.; Seebach, D., *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 424

²² (a) Bruneau, C.; Renaud, J-L.; Jerphagnon, T., *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, *252*, 532. (b) Abele, S.; Seebach, D., *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, *1*

²³ (a) Konishi, M.; Nishio, M.; Saitoh, T.; Miyaki, T.; Oki, T.; Kawaguchi, H., *J. Antibiot.*, **1989**, *42*, 1749. (b) Oki, T.; Hirano, M.; Tomatsu, K.; Numata, K.; Kamei, H., *J. Antibiot.*, **1989**, *42*, 1756

²⁴ Shinagawa, S.; Kanamaru, T.; Harada, S.; Asai, M.; Okazaki, H., *J. Med. Chem.*, **1987**, *30*, 1458

²⁵ (a) Namikoshi, M.; Rinehart, K. L.; Dahlem, A. M.; Beasley, V. R.; Carmichael, W. W., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 4349 (b) Roers, R.; Verdine, G.L., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 3563. (c) Bull, S. D.; Davies, S. G.; Fox, D. J.; Gianotti, M.; Kelly, P. M.; Pierres, C.; Savory, E. D.; Smith, A. d., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2002**, *1*, 1858

²⁶ (a) Crews, P.; Manes, L.; Boehler, M., *Tetrahedron Lett.*, **27**. (b) Shih, C.; Gossett, L. S.; Gruber, J. M.; Grossman, c. S.; Andis, S. L.; Schultz, R. M.; Worzalla, J. F.; Corbett, T. H.; Metz, J. T., *Bioinorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 69

²⁷ Fitzpatrick, F. A.; Wheeler, R., *International Immunopharmacology*, **2003**, *3*, 1699

agents utilitzats en el tractament del càncer de pit i d'ovaris, i la bestatina²⁸, que és un modificador de la resposta immunològica que augmenta, per exemple, els efectes antitumorals de la mitomicina C (antibiòtic antitumoral utilitzat en el tractament del càncer gastro-intestinal i de pit, entre altres).²⁹ (Figura 5)

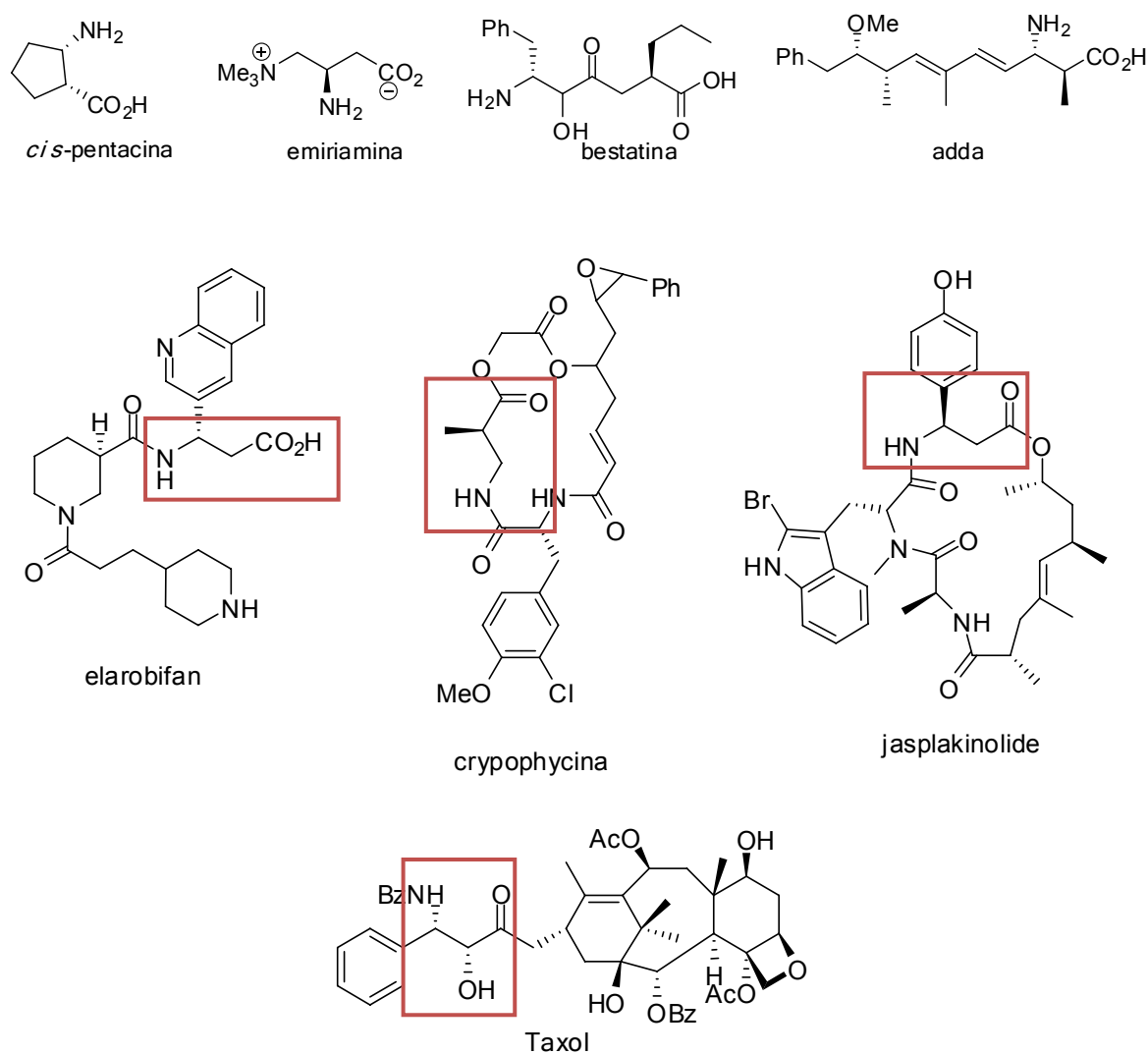


Figura 5

Entre els derivats més rellevants dels β -aminoàcids no proteinogènics es troben els β -lactams, que inclouen antibiòtics àmpliament coneguts com és el cas de les penicil·lines i les cefal·losporines, entre altres agents medicinals. Per exemple el faropenem³⁰, que és un nou β -lactam amb activitat antimicrobiana

²⁸ Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Suda, H.; Hamada, M.; Takeuchi, T., *J. Antibiot.*, **1976**, *29*, 97

²⁹ Abe, F.; Shibuya, K.; Ashizawa, J.; Takahashi, K.; Horinishi, H.; Matsuda, A.; Ishizuka, M.; Takeuchi, T.; Umezawa, H., *J. Antibiot.*, **1984**, *Vol. XXXVIII No. 3*, 411

³⁰ Du Plessis, M.; Capper, T. P.; Klugman, K. P., *J. Antimicrobial Chemotherapy*, **2002**, *49*, 573

contra bacteris Gram-positius, negatius i alguns anaeròbics. Dins d'aquest grup també es troba l'àcid clavulànic, una substància amb pobre capacitat antibiòtica però que es caracteritza per ésser un potent inhibidor dels enzims que hidrolitzen els β -lactams. Això fa que administrat conjuntament amb una penicil·lina la seva activitat antibiòtica no disminueixi.³¹ Un exemple d'això és l'administració conjunta d'amoxicil·lina amb àcid clavulànic (Augmentine XR®) la qual cosa fa més efectiva la teràpia, en adults i adolescents, contra patògens del tracte respiratori, particularment l'*Streptococcus pneumoniae*, amb reduïda susceptibilitat a l'amoxil·licina.³² (Figura 6)

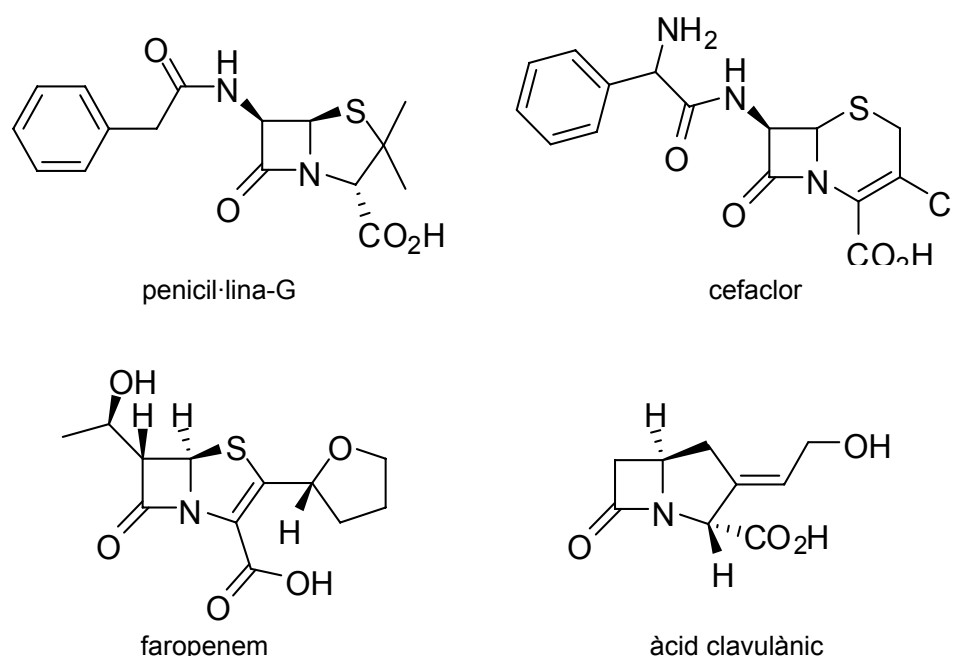


Figura 6

Els β -aminoàcids alicíclics s'utilitzen com a *building blocks* per a la preparació d'anàlegs modificats (no naturals) de pèptids biològicament actius. Així, mitjançant la inserció d'un β -aminoàcid alicíclic en el lloc d'un α -aminoàcid,

³¹ (a) Mann, J., *Secondary Metabolism, Chapter 5: The secondary metabolism of amino acids.*, University Press, U. K., **1993**, 191. (b) Torssell, K. B. G., *A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism, Chapter 6: Amino acids, peptides and proteins*, John Wiley & Sons, N. Y., **1983**, 226

³² McCormack, P. L.; Keating, G. M., *Drugs*, **2005**, 65 (1), 121

l'estabilitat dels pèptids naturals es pot incrementar degut a la superior resistència, en front la degradació enzimàtica dels β -aminoàcids.³³

La major part dels estudis relacionats amb el disseny de *building blocks* estan enfocats cap a compostos que presenten una llibertat conformacional restringida. Això és perquè aquesta rigidesa influeix directament en la tendència a adoptar conformacions que afavoreixin la formació d'estructures secundàries com hèlix, gir o làmina.³⁴ De vegades, aquests tipus de plegaments són els responsables de l'activitat biològica de les molècules, i per tant, la manera d'induir rigidesa als β -aminoàcids és o per la presència d'un anell carbocíclic o per substituents voluminosos en les posicions α ó β .³⁵ També s'ha comprovat que els β -aminoàcids necessiten menys residus que els seus anàlegs α per formar estructures secundàries estables³⁶ i que per tant poden induir estructures i/o plegaments amb més facilitat.

Dins dels derivats de β -aminoàcids cíclics els que han estat més estudiats són els derivats que contenen anells de cinc i sis membres. Per exemple, a l'estudiar l'activitat antifúngica de certs homòlegs i anàlegs derivats de la *cis*-pentacina, antibiòtic antifúngic que va ser aïllat independentment per dos grups japonesos del *Bacillus cereus*³⁷ i del *Streptomyces setonii*³⁸, s'ha trobat que dels β -aminoàcids investigats, els que contenien anells de cinc membres presentaven activitats raonables, mentre els derivats amb ciclohexans o norborans presentaven poca o cap activitat. Es pot observar com la *cis*-pentacina és també un component clau en l'estructura de l'antibiòtic antifúngic amipurimicina³⁹, aïllat del *Streptomyces novoguineensis*. (Figura 7)

³³ Fülöp, F., *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 2181

³⁴ (a) De Grado, W. F.; Schreider, J. P.; Hamuro, Y., *J. Pept. Res.*, **1999**, *54*, 206. (b) Venkatram, J.; Shakaramma, S.; Balaram, P., *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 3131

³⁵ Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 7324

³⁶ Apella, D.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Richards, M. R.; Powell, D. R.; Gellman, S.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 7574

³⁷ (a) Konishi, M.; Nishio, M., *J. Antibiot.*, **1989**, *42*, 1749. (b) Oki, T.; Hirano, M.; Tomatsu, K., *J. Antibiot.*, **1989**, *42*, 1756. (c) Ohki, H.; Inamoto, Y.; Kawabata, K.; Kamimura, T.; Sakane, K., *J. Antibiot.*, **1991**, *vol. 44*, no 5, 546

³⁸ (a)Iwamoto, T.; Tsujii, E.; Ezaki, M., *J. Antibiot.*, **1990**, *43*, 1. (b) Kawabata, K.; Inamoto, Y.; Skane, K., *J. Antibiot.*, **1989**, *43*, 513

³⁹ Ortuño, R. M., en *Enantioselective Synthesis of β -aminoacids*, Second Edition, Editat per Juaristi, E. I Soloshonok, V. A., John Wiley&Sons, Inc., N. Y., **2005**, 117 i les seves referències

Entre els aminoàcids sintètics trobem la tilidina (veure **Figura 7**), derivat d'un β -aminoàcid cíclic, que constitueix un analgèsic opioid utilitzat en teràpies per controlar dolors de moderats a greus.³³

En el cas de l'àcid 2-amino-3-hexen-1-carboxílic tot i que presenta una forta activitat antifúngica contra la *Candida albicans* també resulta un compost amb un perfil de tolerància poc favorable.

Tot i així, arrel d'aquests resultats s'han obert noves línees de investigació per tal de trobar derivats de β -aminoàcids contenint l'anell de ciclohexè, que presentin un perfil superior d'eficàcia/tolerància.⁴⁰

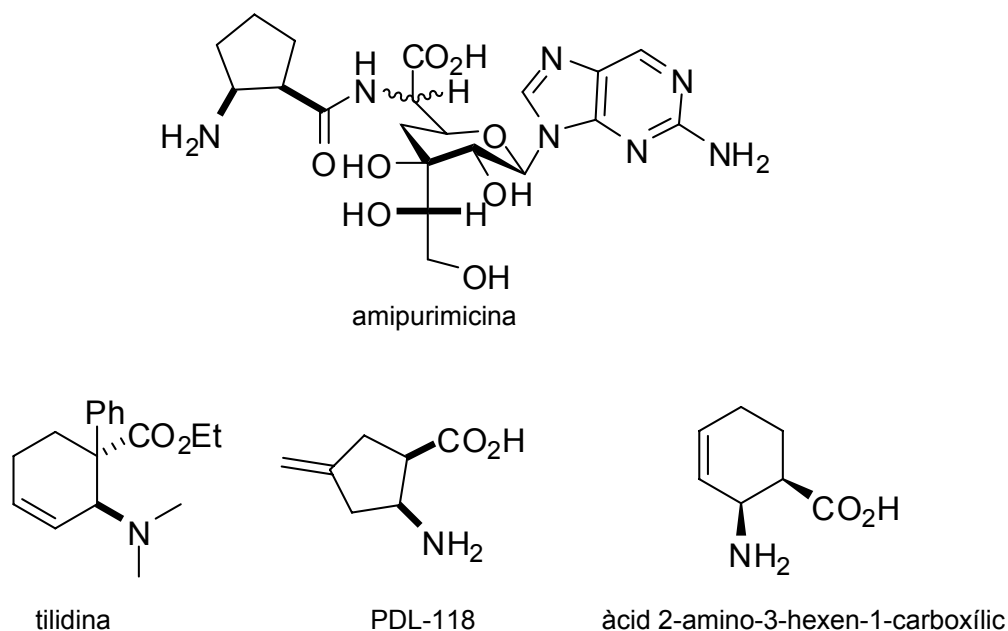


Figura 7

⁴⁰ Kuhl, A.; Hahn, M. G.; Dumic, M.; Mitterndorf, J., *Amino Acids*, **2005**, 29, 89

Objectius generals

Donada la àmplia experiència en el nostre grup de recerca en quant a la síntesi i estudi estructural de compostos ciclobutànics es refereix, s'ha plantejat com a objectiu principal de la present Tesi Doctoral sintetitzar dos tipus d'aminoàcids que continguin l'anell ciclobutànic, així com els seus pèptids derivats.

El primer tipus de derivats ciclobutànics són els que s'anomenen β -pèptids poli(ciclobutànics), on l'anell ciclobutànic es troba formant part de l'esquelet de la cadena principal. D'aquesta manera, s'ha proposat dur a terme la síntesi de β -oligòmers poli(ciclobutànics) amb configuració *cis*, així com el seu estudi estructural en solució, mitjançant Ressonància Magnètica Nuclear, Dicroïsme Circular i càlculs teòrics, i a nivell supramolecular, mitjançant tècniques microscòpiques, Microscòpia Electrònica de Transmissió (TEM) i Microscòpia de Força Atòmica (AFM). (**Figura 8**)

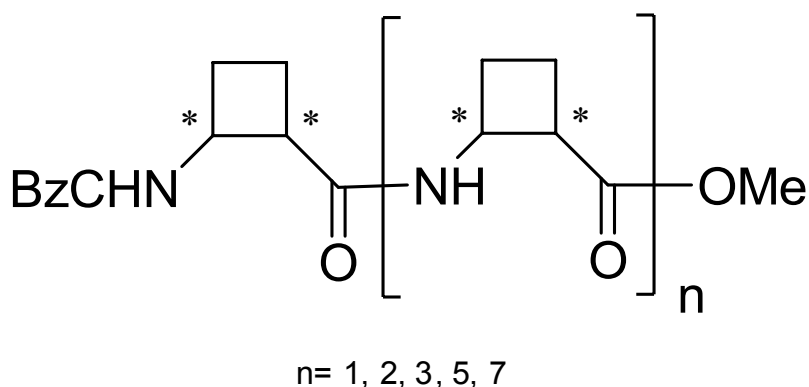


Figura 8. Sèrie de β -pèptids *cis*-poli(ciclobutànics)

Donat que al sintetitzar aquests β -oligòmers *cis*-poli(ciclobutànics), s'havien obtingut urees ciclobutàniques com a productes secundaris, s'ha

proposat també realitzar un estudi estructural en solució (RMN) i en estat sòlid (raigs-X) d'aquestes. (**Figura 9**)

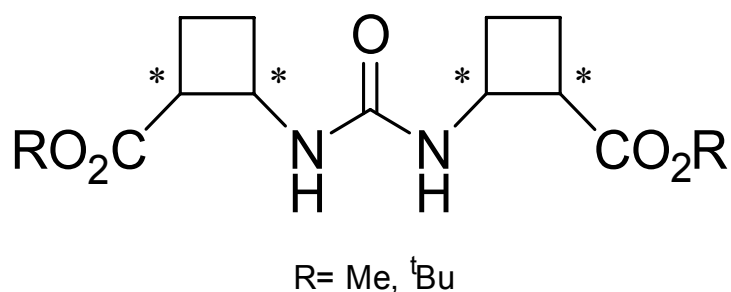


Figura 9. Urees obtingudes com a productes secundaris de la reacció de transposició de Curtius emprada en la síntesi de β -pèptids poli(ciclobutànics)

D'altra banda, dins d'aquest mateix tipus de derivats ciclobutànics, també es volia sintetitzar el β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38** i el β -dipèptid (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic) **40**. Dins d'aquesta línia de recerca, s'ha proposat estudiar l'efecte de la quiralitat d'ambdós dipèptids realitzant un estudi de les estructures secundàries i terciàries formades, mitjançant tècniques de RMN, DC, càlculs teòrics, SEM, TEM i AFM. (**Figura 10**)

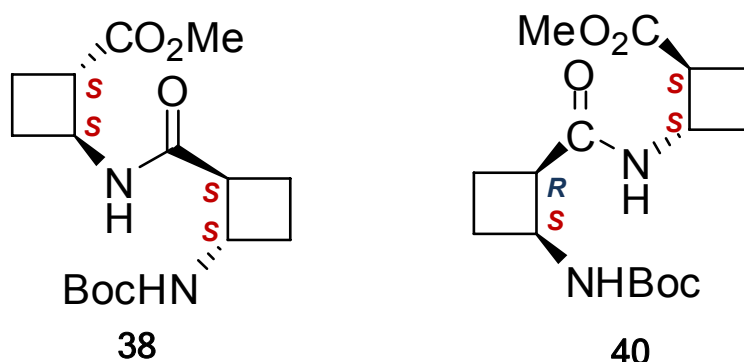


Figura 10. β -dipèptids (*trans,trans*) i (*cis,trans*)-bis(ciclobutànics) **38** i **40**

El segon tipus de compostos ciclobutànics que es volien sintetitzar, són aquells on l'anell ciclobutànic no es troba formant part de l'esquelet de la cadena principal, sinó que constitueix un substituent voluminós de la cadena. D'aquesta manera, es volia obtenir tota una sèrie de β -aminoàcids i β -pèptids ciclobutílics utilitzant com a precursor quiral la (-)-verbenona. (**Figura 11**)

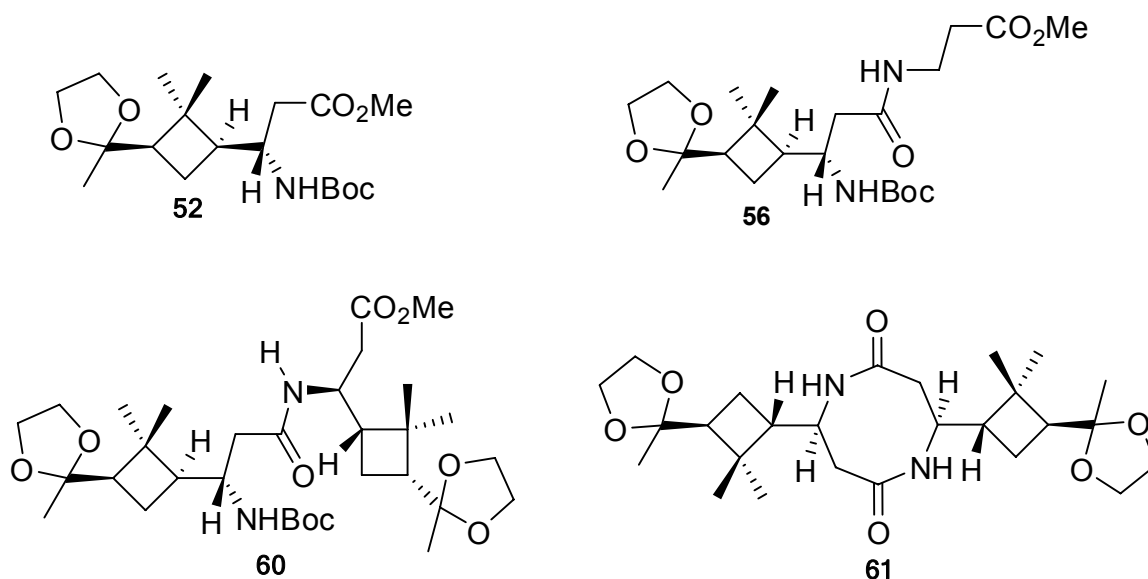


Figura 11. β -pèptids ciclobutílics objectiu

Així, es va plantejar estudiar estructuralment aquests β -pèptids ciclobutílics en solució mitjançant RMN, DC i càlculs teòrics, i en estat sòlid mitjançant raigs-X. D'aquesta manera, es pretenia analitzar la rigidesa que l'anell ciclobutànic pogués conferir a les estructures secundàries generades.

També es va decidir realitzar un estudi preliminar per establir les possibles aplicacions que aquests compostos ciclobutànics poguessin presentar. Un objectiu va ser l'avaluació de l'activitat biològica d'alguns derivats ciclobutànics, com a inhibidors de la carboxipeptidasa A (CPA) i la carboxipeptidasa B (CPB), ja que la presència de l'anell ciclobutànic pot suposar una bastida adequada pel disseny de nous inhibidors enzimàtics.

Capítol 1: Objectius generals

Un altre objectiu va consistir en el disseny, síntesi i estudi d'un compost derivat mixt tetrahidrofulvalè- β -dipèptid ciclobutànic, **63**. (**Figura 12**) Es va proposar la verificació de la formació d'agregats quirals per part d'aquest compost, degut a la presència del β -dipèptid *cis*-bis(ciclobutànic) marcat amb un cercle a la **Figura 12**, així com la seva capacitat d'actuar com a conductor orgànic.

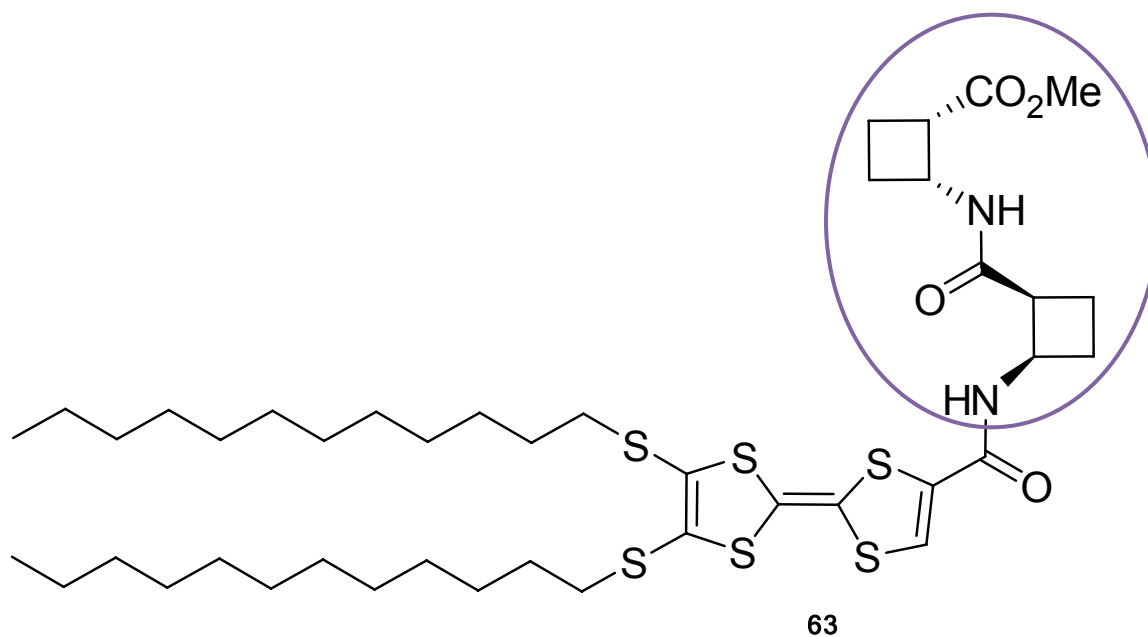


Figura 12. Derivat TTF- β -dipèptid ciclobutànic **63**

Introducció

2.1 β -pèptids

En els darrers anys s'ha descobert que els pèptids que contenen β -aminoàcids són capaços d'adoptar estructures secundàries novedoses, demostrant així que els pèptids formats per α -aminoàcids no són els únics que tenen la capacitat de plegar-se donant lloc a estructures secundàries ben definides. Així mateix, s'ha observat com tant els pèptids cíclics com alicíclics formats per residus de β -aminoàcids poden adoptar conformacions tipus gir, hèlix i/o làmina. En general, les propietats tant físiques com biològiques dels pèptids depenen dels plegaments que aquests adoptin.

Els pèptids (β -pèptids i γ -pèptids entre d'altres) que adopten estructures secundàries definides es poden incorporar en nous sistemes on poder estudiar els plegaments de proteïnes així com l'estabilització estructural. A més a més, aquests poden proporcionar excel·lents suports pel disseny d'estructures biomimètiques amb aplicacions pràctiques en àrees com la indústria farmacèutica i la ciència dels materials.³⁴

L'àrea a destacar, és la possibilitat de dissenyar anàlegs de proteïnes dins dels pèptids no naturals que es puguin plegar i que puguin adoptar conformacions específiques.

Per tal de descriure i estudiar estructuralment els β -pèptids prenem com a base les definicions donades per Gellman.⁴¹

Per proteïnes es defineix el terme *estructura secundària* com la preferència conformacional adoptada pel poliesquelet (aminoàcids). Així mateix, es defineix el concepte *foldàmer* com un polímer amb una forta tendència a adoptar una conformació específica. El primer pas en el disseny de foldàmers consisteix en identificar nous esquelets amb estructures secundàries preferents ben definides. En aquest cas, quan diem ben definides

⁴¹ Gellman, S. H., *Acc. Chem. Res.*, **1998**, *31*, 173

ens referim a la preferència conformacional que s'ha d'observar en solució per part dels oligòmers de llargada moderada. D'aquesta manera s'assignarà com a foldàmer qualsevol oligòmer que coincideixi amb aquest criteri.

De la mateixa manera, es defineix el concepte *estructura terciària* com la combinació dels elements regulars de les estructures secundàries (hèlix, làmina, gir), és a dir, com la manera en que diferents elements amb estructures secundàries regulars s'empaqueten conjuntament.

2.1.1 Tècniques comunament utilitzades per realitzar l'anàlisi conformacional de β -pèptids

Per tal d'estudiar les estructures regulars que adopten els β -pèptids s'utilitzen diverses tècniques com espectroscòpia d'infraroig, ressonància magnètica nuclear⁴², càlculs teòrics, dicroïsmes circulars i raigs-X. D'aquesta manera, combinant la informació obtinguda mitjançant les diferents tècniques es pot determinar quina és la conformació adoptada pel β -pèptid en qüestió.

- *IR*

L'espectroscòpia d'infraroig s'utilitza per obtenir informació sobre l'estructura en solució que poden adoptar els β -pèptids. Així, utilitzant solucions diluïdes en dissolvents apolars, és possible detectar enllaços d'hidrogen intramoleculars mitjançant l'anàlisi de la regió de l'espectre corresponent a les bandes de tensió N-H. D'aquesta manera, les bandes de tensió corresponents a les amides que no formen part d'un enllaç d'hidrogen normalment apareixen entre 3400-3500 cm^{-1} , mentre que quan sí que el formen acostumen a aparèixer entre 3100-3300 cm^{-1} . Experimentalment és conegut que la forma de la banda de tensió N-H també és important, donat que els protons amídics

⁴² Gademann, K.; Bernahrd, J.; Seebach, D., *Helv. Chem. Acta*, **1999**, *82*, 1

involucrats en la formació d'enllaços d'hidrogen donen bandes amples mentre que els no involucrats acostumen a presentar senyals molt més estrets.⁴³

Com a exemple, trobem un treball de Abele i col·laboradors⁴⁴ on analitzen els enllaços d'hidrogen intramoleculars formats per diferents β -oligòmers. Així els senyals aguts que apareixen entre 3446-3456 cm^{-1} s'atribueixen als N-H lliures i els senyals amples que apareixen entre 3285-3344 cm^{-1} s'atribueix a la formació d'enllaços d'hidrogen intramoleculars per part dels N-H dels grups amida. (**Figura 13**)

Així doncs, aquesta tècnica permet determinar qualitativament l'existència d'enllaços intramoleculars, tot i que en cap cas permet identificar amb quin carbonil de la molècula té lloc l'enllaç d'hidrogen intramolecular.

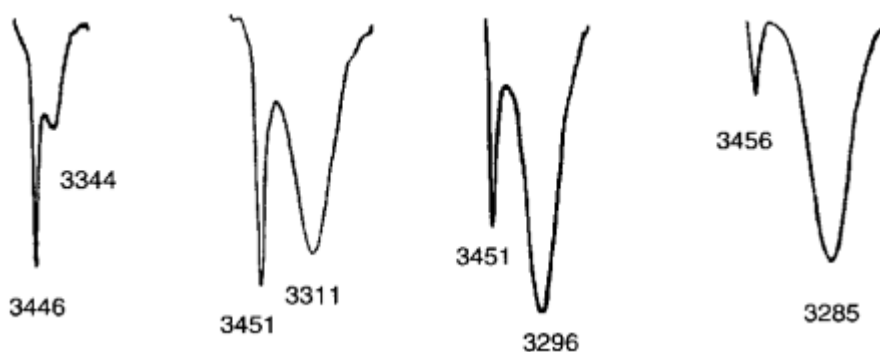


Figura 13. Espectres d'IR en solució 5 mM de diferents β -oligòmers en CHCl_3

- *RMN*

L'espectroscòpia de Ressonància Magnètica Nuclear resulta l'eina principal a l'estudi conformacional d'estructures secundàries de proteïnes i pèptids en solució. Una vegada s'ha dut a terme l'assignació completa dels senyals, l'experiment que dóna més informació sobre les conformacions adoptades és la determinació dels NOES. Aquest experiment pot ser mono o bidimensional i permet determinar els acoblaments entre protons no adjacents.

⁴³ Haque, T. S.; Little, J. C.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 4105

⁴⁴ Abele, S.; Seiler, P.; Seebach D., *Helv. Chim. Acta.*, **1999**, 82, 1559

Aquesta tècnica és àmpliament utilitzada per Gellman i col·laboradors.⁴⁵ Aquests autors han determinat per RMN quina és la conformació adoptada per un pèptid, és en aquest cas una 14-hèlix. A continuació es mostra un exemple. (Figura 14)

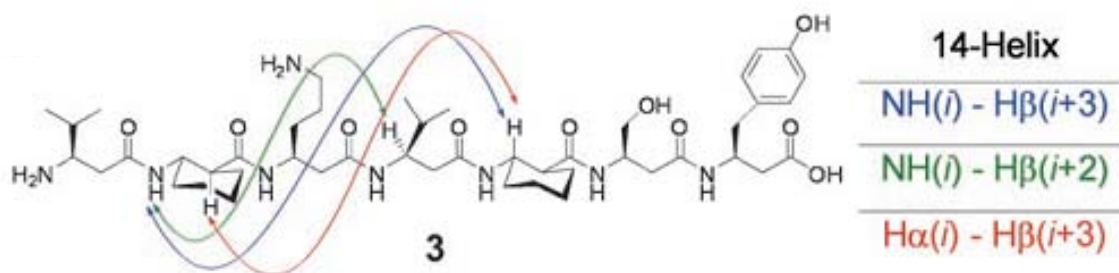


Figura 14. Interaccions NOE característiques de la 14-hèlix d'un β-dipèptid

Donat que aquestes estructures secundàries s'originen com a conseqüència de la formació d'enllaços d'hidrogen intramoleculars ($C=O \cdots H-N$), una altra tècnica que resulta útil per dur a terme aquest estudi és la quantificació de la intensitat d'aquests enllaços d'hidrogen. Aquesta quantificació es pot realitzar mitjançant la determinació dels coeficients de temperatura dels protons involucrats. Així doncs, s'enregistren diferents espectres de RMN 1H a diferents temperatures per determinar com varia el desplaçament químic (δ) del protó amídic amb aquesta. Seguidament, amb els resultats obtinguts es realitza una representació gràfica de la temperatura *versus* el desplaçament químic i la pendent de la recta resultant ens dona el coeficient de temperatura.⁴⁶ Tot i que existeixen diferents barems, prenem que els valors dels coeficients de temperatura més positius que $-4.6 \text{ ppb} \cdot K^{-1}$ indiquen la presència d'enllaços d'hidrogen amb una predictibilitat que excedeix el 85%, i que supera el 93% en aquells casos en què els valors dels coeficients es troben en el rang de -4 i $-1 \text{ ppb} \cdot K^{-1}$. D'altra banda, valors més negatius que -

⁴⁵ Vaz, E.; Pomerantz, W. C.; Geyer, M.; Gellman, S. H.; Brunsveld, L., *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 2254

⁴⁶ (a) Rothermund, S.; Weibhoff, H.; Beyermann, M.; Krause, E.; Bienert, E.; Mugge, E.; Sykes, B. D.; Sonnichsen, F. D., *J. Biomol. NMR*, **1996**, *8*, 93. (b) Baxter, N. J.; Williamson, M. P., *J. Biomol. NMR*, **1997**, *9*, 359

4.6 ppb·K⁻¹ indiquen la no formació d'enllaços d'hidrogen per part dels protons.⁴⁷

També es pot utilitzar RMN per mesurar el temps d'intercanvi dels protons amídics amb el dissolvent, això és el que es coneix com difusió. Així, aquests experiments es basen en què els protons d'amida s'intercanvien en pocs minuts sempre i quan no estiguin involucrats en la formació d'un enllaç d'hidrogen fort. Com més intercanviables siguin amb l'aigua del dissolvent més accessibles resultaran al medi, deduïnt-se que es troben més lliures i que estaran menys involucrats en la formació d'un enllaç d'hidrogen.⁴⁸ Així que, donat que els protons amídics són fàcilment intercanviables amb l'aigua, si en realitzar l'experiment de difusió s'observa que la intensitat del protó NH decau a una velocitat superior que qualsevol protó no intercanviable de la molècula, voldrà dir que aquest protó no participa en la formació de cap enllaç d'hidrogen. Pel contrari, si la intensitat del protó en qüestió decau en la mateixa proporció que la resta, voldrà dir que no s'intercanvia amb l'aigua del dissolvent i que es troba fixat a la molècula, probablement formant enllaç d'hidrogen.

D'aquesta manera Gellman i col·laboradors³⁶ van observar com els protons amídics del pèptid trigaven en intercanviar-se dos dies, deixant patent l'estabilitat de l'estructura i la formació dels enllaços d'hidrogen que donen lloc a la 14-hèlix. (**Figura 15**)

⁴⁷ (a) Cierpicki, T.; Otlewski, J., *J. Biomol. NMR*, **2001**, *21*, 249. (b) Abele, S.; Seiler, P.; Seebach, D., *Helv. Chim. Acta.*, **1999**, *82*, 1559

⁴⁸ a) Cabrita, E. J.; Berger, S.; Bräuer, P., *J. Magn. Reson.*, **2002**, *157*, 124. b) Cabrita, E. J.; Berger, S., *Magn. Reson. Chem.*, **2002**, *40*, 122. c) Liu, M.; Toms, H. C.; Hawkes, G. E.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C., *J. Biomol. NMR*, **1999**, *13*, 25

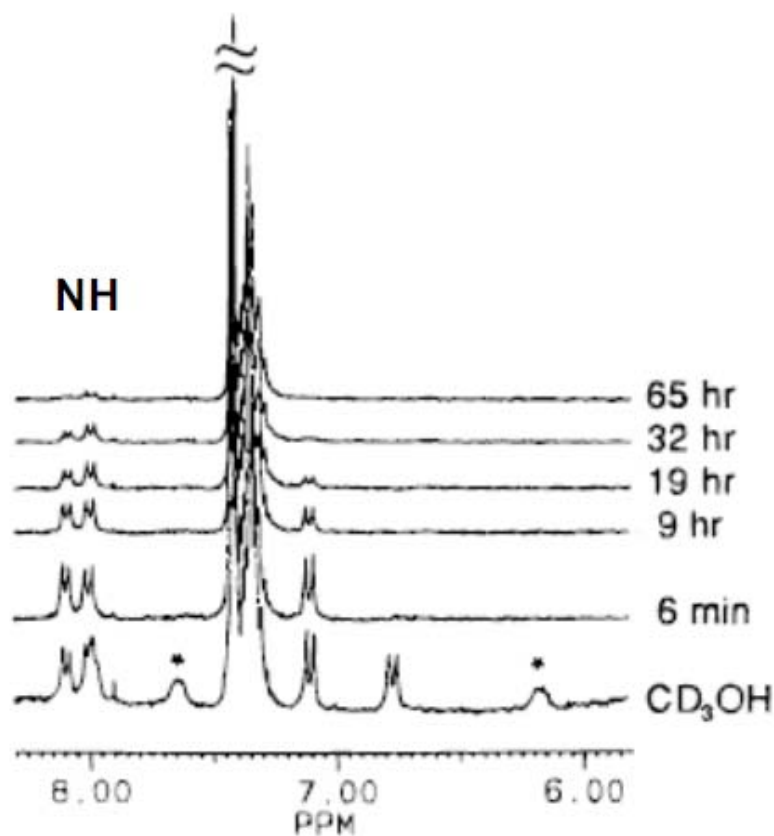


Figura 15. Exemple d'espectre de RMN de ^1H en MeOD-d_4 d'un β -hexapèptid que presenta una conformació 14-hèlix

- *Càlculs teòrics*

La realització de càlculs teòrics és una tècnica molt útil, ja que ajuda a realitzar un estudi conformacional complet en aquells casos on pugui existir alguna ambigüitat amb els resultats experimentals obtinguts per RMN.

Un exemple de la combinació d'aquestes tècniques és el treball realitzat per Sharma i col·laboradors⁶⁷ on es mostra com, amb la informació obtinguda de l'estudi per RMN i la realització d'una dinàmica molecular, determinen que l'oligòmer estudiat adopta una conformació tipus 10/12-hèlix. (**Figura 16**)

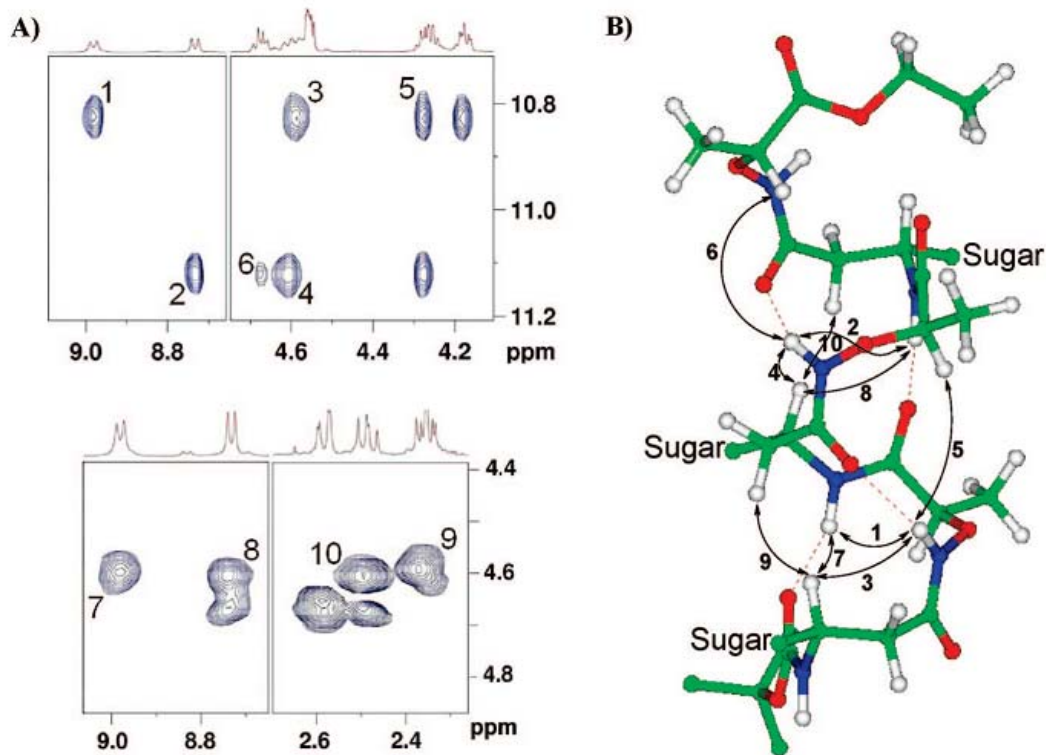


Figura 16. A) Correlacions NOE i B) Conformació calculada més estable de l'oligòmer on es marquen els NOES determinats.

- *Dicroïsme circular*

Aquesta tècnica ens proporciona espectres amb bandes d'absorció a l'UV de molècules òpticament actives. Així doncs, cada tipus d'estructura secundària (hèlix, làmina, gir) presenta unes bandes d'absorció característiques, tot i que hi ha algunes (10-hèlix i 8-hèlix) que no han estat massa estudiades i de les quals no existeixen referències suficients com per que les bandes d'absorció estiguin assignades. Així, aquesta tècnica resulta una eina interessant per l'estudi d'estructures secundàries de β -pèptids ja que permet treballar amb petites quantitats de producte, amb una àmplia gama de solvents i a diferents temperatures. El fet de poder variar la temperatura ens permet obtenir informació sobre l'estabilitat tèrmica que presenta la conformació adoptada.

També es poden realitzar prediccions del DC mitjançant càlculs teòrics. D'aquesta manera es determina el dicroïsme circular electrònic on s'obté un

espectre d'acord amb els enllaços d'hidrogen que originen l'estructura secundària definida.⁴⁹

- Raigs X

El difractograma de raigs X ens proporciona informació sobre la conformació adoptada pel β -dipèptid en estat sòlid, ja que les tècniques fins el moment esmentades ens donen informació en solució. En general, trobem casos on existeix una correlació entre la conformació adoptada en solució i la conformació en estat sòlid, com en un treball de Seebach⁵⁰ on el β -pèptid estudiat adopta la mateixa conformació d'hèlix tant en estat sòlid com en solució. Tot i que aquesta correlació resulta raonable també es poden trobar casos on no es dona i on la conformació adoptada en solució difereix de la observada en estat sòlid.⁵¹

2.1.2 Propietats conformacionals

Les conformacions dels β -pèptids poder ser analitzades en funció dels angles de torsió de la cadena principal, designats pels angles ω , ϕ , θ i ψ , segons el conveni de Balaram (**Figura 17**).⁵²

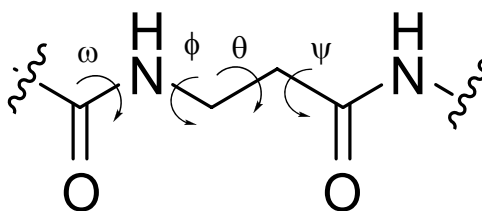


Figura 17. Angles de torsió de la cadena principal de la β -alanina

⁴⁹ (a) Bode, K. A.; Applequist, J., *Macromolecules*, **1997**, *30*, 2144. (b) Applequist, J.; Bode, K. A.; Apella, D. H.; Christianson, L. A.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 4891

⁵⁰ Seebach, D.; Matthews, J. L., *Chem. Commun.*, **1997**, 2015

⁵¹ Izquierdo, S.; Rúa, F.; Sbai, A.; Parella, T.; Álvarez-Larena, Á.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M., *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 7963

⁵² (a) Barnejee, A.; Balaram, P., *Science*, **1997**, *73*, 1067. (b) De Grado, W. F.; Schneider, J. P.; Hamuro, Y., *J. Peptide Res.*, **1999**, *54*, 206. (c) Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F., *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 3219

Les conformacions dels β -pèptids que adopten plegaments tipus hèlix o girs requereixen d'una conformació *gauche* al voltant de l'angle θ definit per l'enllaç C2-C3. Un rotàmer *trans* ens porta a una conformació totalment estesa sempre i quan els valors dels angles ϕ i ψ siguin els apropiats. Un substituent voluminós en la posició 2 ó 3 pot afavorir estèricament una disposició *gauche* enfront d'una conformació *trans*, forçant així, la formació d'una conformació determinada. (**Figura 18**)

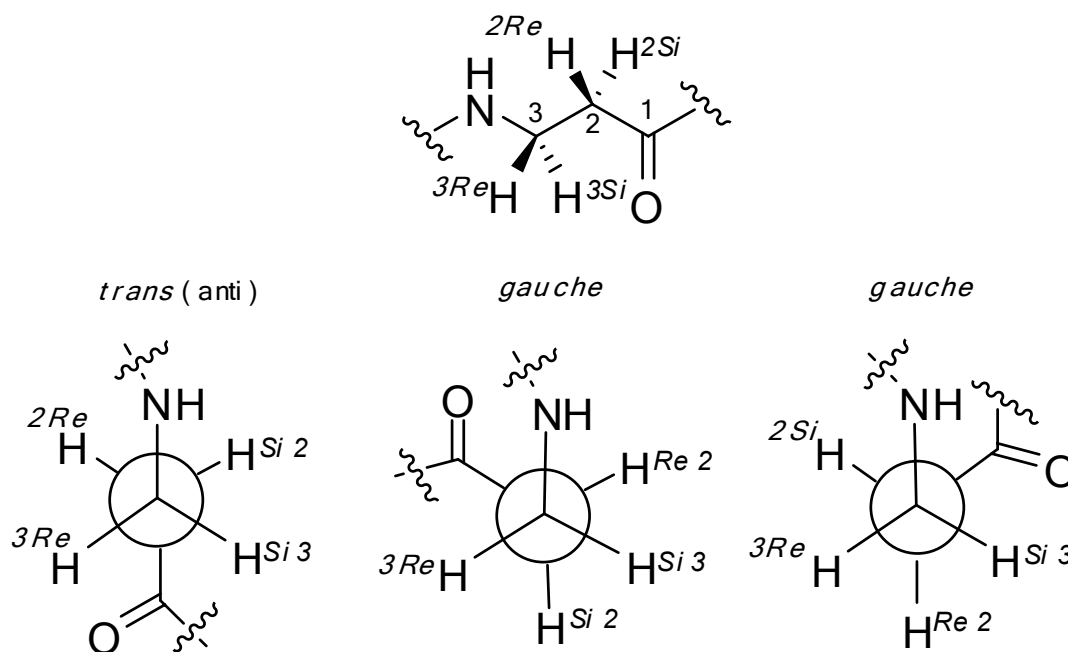


Figura 18. Rotàmers per la β -alanina a través d l'angle de torsió θ

Els efectes dels substituents en la conformació local del β -aminoàcid es resumeixen a la **Figura 19**.

La β -alanina, que és un β -aminoàcid no substituït, és altament flexible, anàlogament a la glicina en els α -aminoàcids. La presència de substituents alquílics en les posicions C2 i C3 afavoreixen una conformació *gauche* al voltant de l'enllaç C2-C3. Els β -aminoàcids disubstituïts en les posicions C2 i C3 es troben encara més restringits conformacionalment i afavoreixen la conformació *gauche* principalment quan els substituents estan en *sin*. (**Figura 19**)

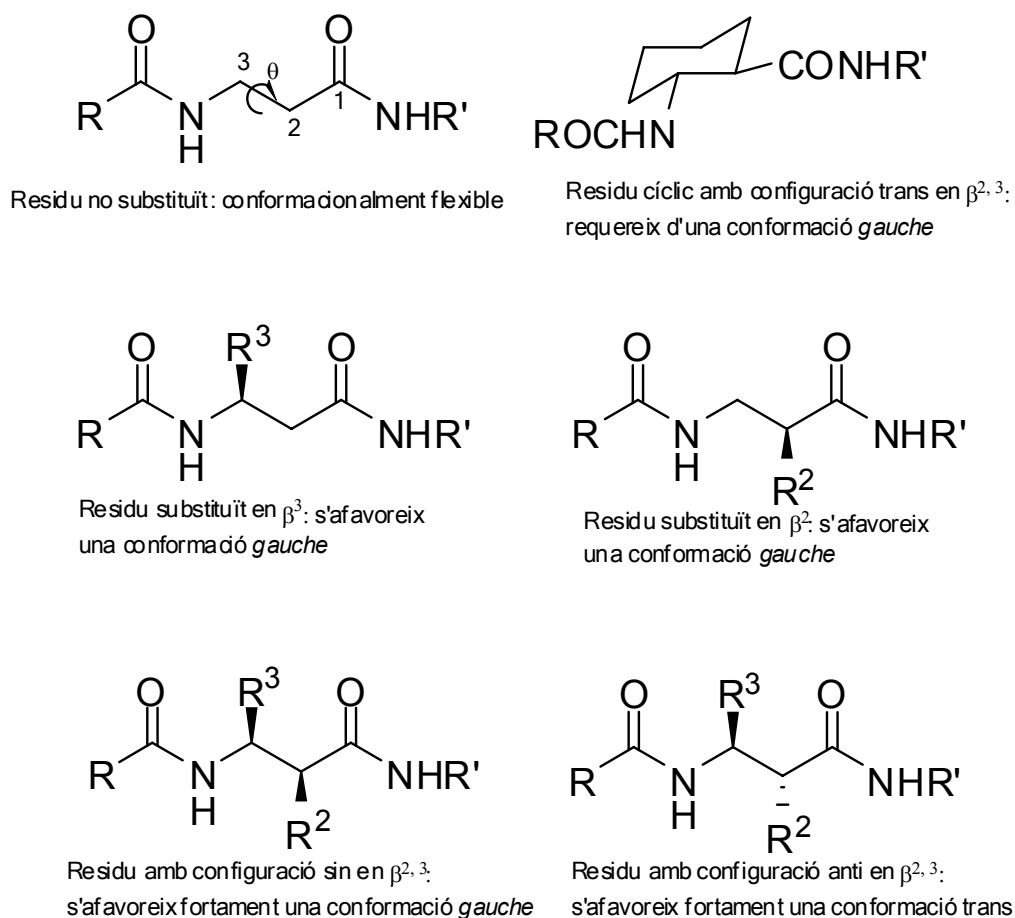


Figura 19. Efecte dels substituents en l'angle de torsió θ

La conformació *gauche* és encara més fortament afavorida quan aquest enllaç C2-C3 es troba formant part d'un anell carbocíclic, com és el cas dels anells ciclopentànics i ciclohexànics. D'aquesta manera, la mida de l'anell carbocíclic determina concretament la preferència torsional de l'angle C2-C3 que alhora serà qui determinarà el tipus d'hèlix formada pel β -dipèptid.

D'altra banda, quan els substituents en aquestes posicions estan disposats en *anti*, s'afavoreix una conformació *trans* al voltant de l'enllaç C2-C3, la qual cosa promou la formació d'estructures de tipus laminar.

2.1.3 Conformacions helicoidals

Els pèptids formats per residus amb substituents en les posicions C2 i/o C3 adopten conformacions helicoidals, la nomenclatura de les quals pot variar segons l'autor. Seebach,⁵³ per exemple, utilitza una nomenclatura basada en la descripció de la simetria de l'hèlix, indicant amb la lletra P ó M l'orientació topològica cap a la dreta o l'esquerra.

En el nostre cas seguirem la nomenclatura establerta per Gellman. Aquesta nomenclatura depèn del nombre d'àtoms que formen l'anell descrit per l'enllaç d'hidrogen.⁵⁴ Així trobem que els β -pèptids poden adoptar conformacions tipus 14-hèlix, 12-hèlix, 10-hèlix i en algun cas 8-hèlix, tal i com es mostra a la **Figura 20**.

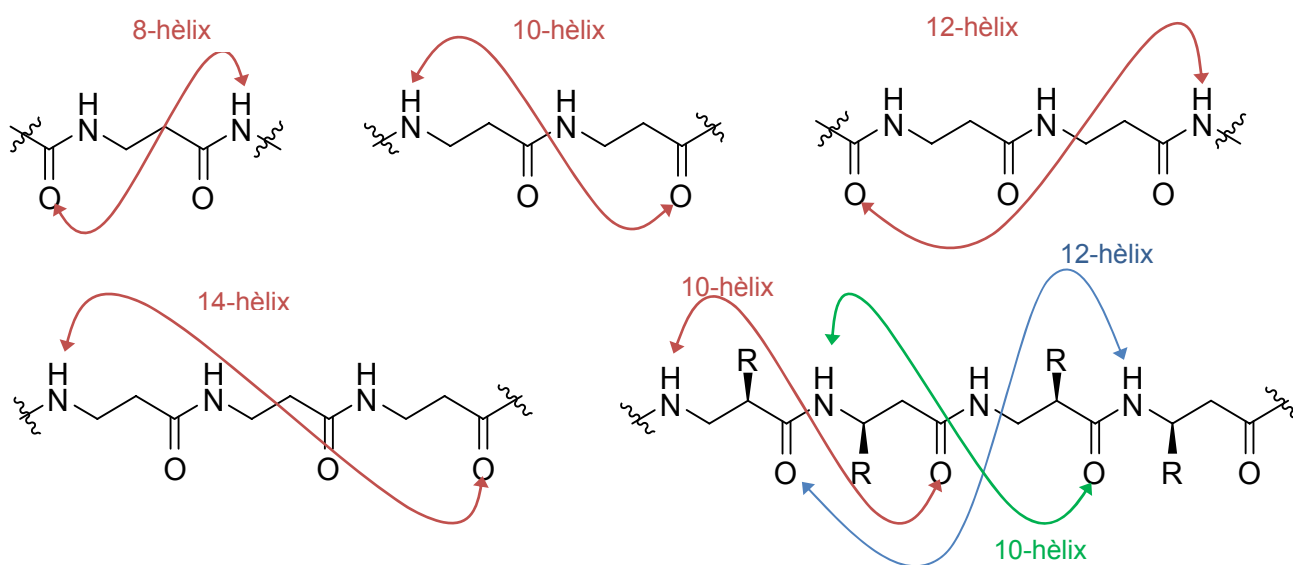


Figura 20. Nomenclatura de les hèlixs dels β -pèptids basada en el patró d'enllaços d'hidrogen

⁵³ Seebach, D.; Ciceri, P. E.; Overhand, M.; Jaun, B.; Rigo, D., *Helv. Chim. Acta*, **1996**, 79, 2043

⁵⁴ (a) Apella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D., R.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 13071. (b) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Powell, D. R.; Huang, X.; Barchi, J. J.; Gellman, S. H., *Nature*, **1997**, 387, 381

- **Conformació tipus 14-hèlix**

Al 1996 Seebach i col·laboradors van ésser dels primers en observar aquests tipus de conformació al sintetitzar un β -hexapèptid amb residus acíclics, tal com es mostra a la **Figura 21**. Aquest pèptid es va preparar mitjançant l'homologació de Arndt-Eistert dels aminoàcids valina, alanina i leucina. Però, la major sorpresa d'aquest estudi va ser descobrir que aquest pèptid, contenint només sis residus, era capaç d'adoptar una conformació de 14-hèlix estable en solució. Això va contrastar amb el fet que els α -pèptids necessiten de 15 a 20 residus d'aminoàcids per donar lloc a estructures secundàries estables en solució.^{53,55}

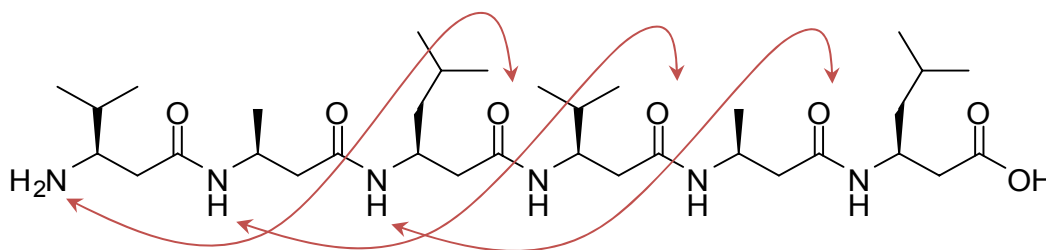


Figura 21. β -hexapèptid sintetitzat per Seebach que adopta una conformació de 14-hèlix

De forma gairebé paral·lela, Gellman i col·laboradors van sintetitzar i estudiar estructuralment, mitjançant RMN, β -pèptids conformacionalment restringits que contenen aminoàcids cíclics, com l'àcid *trans*-2-aminociclohexancarboxílic (ACHC), que mostraven conformacions tipus 14-hèlix tant en solució (solvents orgànics) com en estat sòlid.³⁶

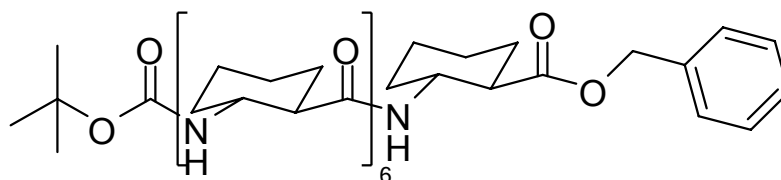


Figura 22. β -pèptid derivat de l'àcid *trans*-2-aminociclohexancarboxílic

⁵⁵ Seebach, D.; Overhand, M.; Kühnle, F.; Martinoni, B.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H., *Helv. Chim. Acta*, **1996**, 79, 913

La conformació de 14-hèlix ve estabilitzada per la presència d'un enllaç d'hidrogen entre el protó de l'amida en el residu i i el carbonil de la cadena principal en el residu $i+2$, formant així una sèrie d'anells de 14 membres. Globlament l'estructura de 14-hèlix difereix de les α -hèlix en molts aspectes. La 14-hèlix té un radi lleugerament més ample i més tendència a formar-se per una longitud de cadena donada.⁴⁹ Així, a l' α -hèlix són necessaris més residus per generar una volta que en la 14-hèlix. Tanmateix, la 14-hèlix té una longitud de 5Å contenint 3 residus de β -aminoàcid ciclohexànic i l' α -hèlix estàndard conté 3.6 residus i fa 5.6 Å per volta.

En solvents orgànics la conformació 14-hèlix és força estable en relació amb les conformacions α -hèlix dels α -pèptids. La formació d'hèlix en biopolímers depèn generalment de la llargada de la cadena, ja que la formació d'aquesta estructura només s'adquireix quan s'arriba a una llargada determinada. En solvents orgànics com metanol o trifluoroetanol, els α -pèptids formats per aminoàcids naturals requereixen aproximadament 10 o 12 residus per formar hèlix estables; en canvi, les 14-hèlix es formen a partir de β -pèptids amb β -aminoàcids monosubstituïts en la posició β^3 , amb només 6 residus. A més els β -pèptids conformacionalment restringits poden formar una hèlix inclús amb 4 residus. Aquests pèptids contenen seqüències d'aminoàcids conformacionalment restringits, com per exemple el ciclohexà (ACHC), o seqüències formades exclusivament per β -aminoàcids monosubstituïts en la posició C2 ó C3 més flexibles.⁵⁶

En el nostre grup s'ha comprovat aquest fet, ja que s'ha observat com només amb 4 residus de β -aminoàcids (alternança de residus de β -alanina i β -aminoàcids ciclobutànics) s'obtenia una conformació tipus 14-hèlix, en solució de cloroform.⁵⁷

Per tal de realitzar l'estudi estructural d'aquest tipus de compostos s'han utilitzat diverses tècniques.

⁵⁶ Cheng, R. P.; Gellman, S. H., *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 3219 | les seves referències

⁵⁷ Izquierdo, S.; Kogan, M.; Parella, T.; Moglioni, A.; Branchadell, V.; Giralt, E.; Ortuño, R. M., *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 5093

Per RMN s'ha mesurat el temps d'intercanvi dels protons amida, o també anomenat experiment de difusió, mètode molt emprat en l'estudi de l'estabilitat conformacional en pèptids i proteïnes. D'aquesta manera Gellman i col·laboradors³⁶ van comprovar com els protons amida de l'hexàmer trigaven més de dos dies és intercanviar-se amb el medi, demostrant així l'estabilitat conformacional d'aquest foldàmer de sis residus i la formació d'enllaços d'hidrogen.

També l'espectroscopia de DC s'ha utilitzat en l'estudi de l'estructura i els canvis conformacionals de pèptids que presenten α -hèlix. Així, aquesta tècnica resulta igualment útil en l'estudi de 14-hèlix. L'espectre de DC de diversos hexa- i heptapèptids, que adoptaven una 14-hèlix determinada per RMN i cristal·lografia, presentaven un màxim al voltant de 195 nm i un mínim a 215 nm aproximadament, és a dir, s'observava efecte Cotton.⁵⁶

És conegut que la intensitat de l'espectre de DC de les α -hèlix depèn de la llargada de la cadena, essent l'espectre més intens com més llarga és la hèlix. Un efecte similar s'observa a les 14-hèlix. Els espectres de DC de pèptids amb 10-15 residus, on s'ha determinat prèviament que adopten una conformació tipus 14-hèlix, són més intensos que els seus equivalents més curts.⁵⁸

En general l'espectroscopia de DC és una eina molt útil per assignar de forma qualitativa la presència de 14-hèlix en β -pèptids.⁵⁹

Aquests experiments conjuntament amb estudis bidimensionals de RMN, (NOES, TOCSY, ROESY) així com càlculs teòrics resulten de gran utilitat en l'estudi conformacional d'aquests tipus de compostos, obtenint d'aquesta manera unes conclusions globals sobre la conformació que adopten.⁶⁰

⁵⁸ (a) Barchi, J. J.; Huang, X. L.; Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Durell, A. R.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 2711. (b) Hamuro, Y.; Schneider, J. P.; De Grado, W. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 12200.

⁵⁹ (a) Raguse, T. L.; Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 12774. (b) Brückner, A. M.; Chakraborty, P.; Gellman, S. H.; Diederichsen, U., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 4395

⁶⁰ (a) Raguse, T. L.; Lai, J. R.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 5592. (b) Hayen, A.; Schmitt, M. A.; Ngassa, F. N.; Thomasson, K. A.; Gellman, S. H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 505. (c) Lee, M.; Raguse, T. L.; Schinnerl, M.; Pomerantz, W. C.; Wang, X.; Wipf, P.;

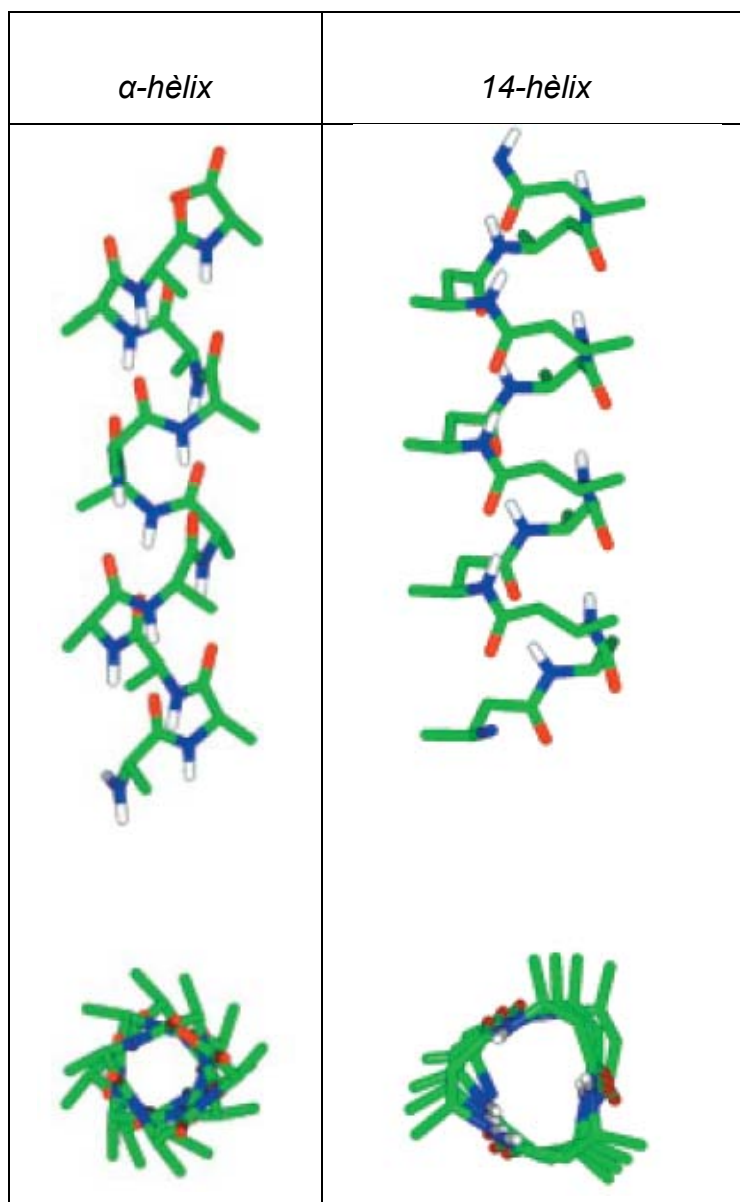


Figura 23. Estructura α -hèlix (α -pèptid) vs 14-hèlix (β -pèptid). Els hidrògens han estat omesos per simplificar, excepte en el cas de l'hidrògen amida (en blanc). Els carbonis es mostren en verd, el nitrogen en blau i l'oxigen en vermell.

Gellman, S. H., *Org. Lett.*, **2007**, Vol. 9, No. 9, 1801. (d) Vaz, E.; Pomerantz, W. C.; Geyer, M.; Gellman, S. H.; Brunsveld, L., *ChemBioChem*, **2008**, 9, 2254. (e) Wu, T-D.; Han, W.; Wanp, D-P.; Gao, Y.; Zhao, Y-L., *Acc. Chem. Res.*, **2008**, Vol. 41, No. 10, 1418

- **Conformació tipus 12-hèlix**

La conformació tipus 12-hèlix s'estabilitza per tota una sèrie d'enllaços d'hidrogen entre els carbonils dels grups amida en la posició *i* i el protó amídic en la posició *i+3* de la seqüència, formant així un anell de 12 membres.

La hèlix es repeteix aproximadament cada 2.5 residus i presenta la mateixa polaritat que les α -hèlix, amb els protons amida orientats com els N-terminal de la hèlix.

Mitjançant estudis experimentals s'ha trobat que oligòmers de l'àcid *trans*-2-aminociclopentancarboxílic (ACPC) donen lloc a estructures tipus 12-hèlix⁶¹ on oligòmers relativament curts adopten aquest tipus de conformació, tant en solvents orgànics com en estat sòlid. En solvents orgànics, és tan estable que s'observa en pèptids que contenen només sis residus ACPC, tot i que, els β -pèptids d'aquests aminoàcids no són solubles en aigua. Per abordar aquesta limitació, es va preparar l'àcid *trans*-3-aminopirrolidin-4-carboxílic (APC) i es va incorporar als β -pèptids juntament amb els residus ACPC.⁶² (Figura 24) Els DC i els estudis de RMN mostraven com aquests oligòmers amb només 4 residus adoptaven una conformació tipus 12-hèlix en aigua.

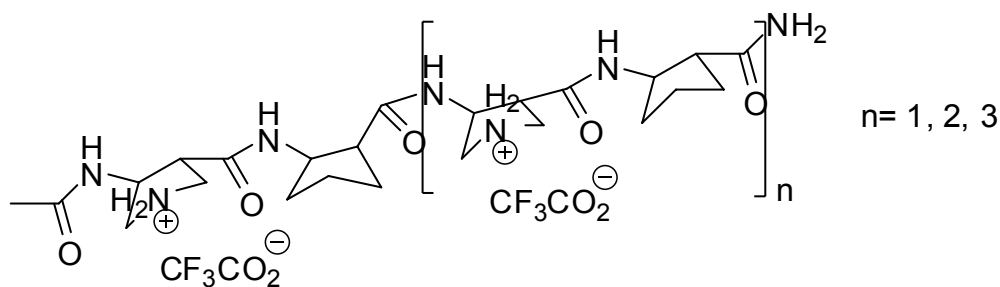


Figura 24

⁶¹ (a) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Powell, D. R.; Huang, X.; Barchi, J. J.; Gellman, S. H., *Nature*, **1997**, *387*, 381. (b) Barchi, J. J.; Huang, X. L.; Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Durell, A. R.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 2711. (c) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Richards, M.R.; Powell, D. R.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 7574

⁶² Wang, C.; Espinosa, J. F.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 4821

Càlculs teòrics⁶³ han mostrat com la contribució de la transició π - π^* a l'espectre de DC de la 12-hèlix ha de ser molt similiar a la corba d'una 14-hèlix però de signe invers. L'espectre experimental d'una 12-hèlix dóna un màxim al voltant de 205 nm i un mínim aproximadament a 190 nm (efecte Cotton).⁵⁶

Així, conjuntament amb aquesta tècnica, s'han realitzat estudis de RMN per poder determinar la conformació adoptada per aquests tipus de compostos.⁶⁴ També s'ha estudiat com afecta el fet d'insertar residus β -aminoàcids acíclics en la posició β^2 .⁶⁵

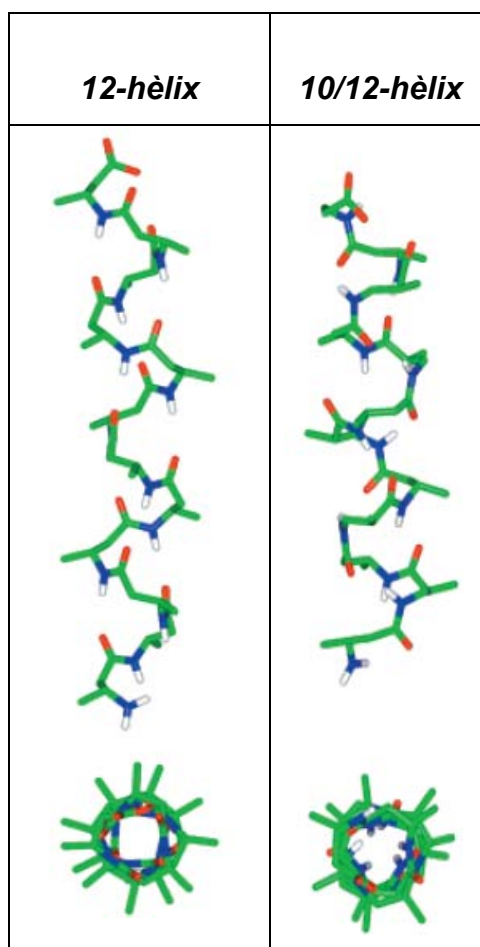


Figura 25. Estructura de la 12-hèlix i de la 10/12-hèlix. Els hidrògens han estat omesos per simplificar, excepte en el cas de l'hidrògen amida (en blanc). Els carbonis es mostren en verd, el nitrogen en blau i l'oxigen en vermell.

⁶³ Applequist, J.; Bode, K. A.; Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 4891

⁶⁴ (a) LePlae, P. R.; Fisk, J. D.; Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 6820. (b) Porter, E. A.; Wang, X.; Schmitt, M. A.; Gellman, S. H., *Org. Lett.*, **2002**, *Vol. 4*, No. 19, 3317.

⁶⁵ Park, J-S.; Lee, H-S.; Lai, J. R.; Kim, B. M.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 8539

- **Conformació tipus 10/12-hèlix**

Els β -pèptids que alternen residus monosubstituïts en les posicions β^2 i β^3 poden adoptar conformacions tipus 10/12-hèlix (**Figura 25**).

Seebach i col·laboradors van trobar dos tipus de conformacions diferents en β -pèptids acíclics en solució. Així, van identificar un anell central de 10 membres i dos terminals de 12 membres, com a conseqüència de la formació de tres enllaços d'hidrogen intramoleculars amb els carbonils i els protons amídics orientats alternativament amunt i a baix al llarg de l'eix de l'hèlix.⁶⁶

El tret característic d'aquest tipus d'hèlix és que alternen enllaços d'hidrogen que donen lloc a anells de 10 i 12 membres, respectivament. Els enllaços d'hidrogen que formen anells de 10 membres estan formats pel carbonil del residu i i el protó de l'amida del residu $i+2$, en canvi els anells de 12 baules es donen entre el carbonil del residu i i el protó de l'amida $i+1$ i $i+3$, de forma alternada. A més a més, contràriament a l'alineament uniforme dels enllaços amida amb l'eix de l'hèlix que s'observa a les hèlix 12 i 14, en el cas de la 10/12-hèlix hi ha dos tipus d'orientacions de l'enllaç amida. A l'anell de 10 membres és aproximadament perpendicular a l'eix helicoïdal, mentre l'anell de 12 baules es troba gairebé alineat amb l'eix. (**Figura 26**)

Per estudiar la conformació tipus 10/12-hèlix s'han realitzat experiments de DC així com de RMN en solvents orgànics (piridina i metanol). La senyal característica d'aquest tipus de conformació en el DC és un únic pic intens a 205 nm aproximadament.⁵⁶

Seguint aquesta metodologia trobem treballs recents⁶⁷ en l'estudi d'oligòmers amb residus alternats en les posicions β^2 i β^3 , on mitjançant experiments de RMN, DC i càlculs teòrics identifiquen estructures tipus 10/12-hèlix.

⁶⁶ Seebach, D.; Abele, S.; Gademann, K.; Guichard, G.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Matthews, J. L.; Schreiber, J. V., *Helv. Chem. Acta*, **1998**, Vol. 81, 932

⁶⁷ Sharma, G. V. M.; Manohar, V.; Dutta, S. K.; Subash, V.; Kunwar, A. C., *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 3689

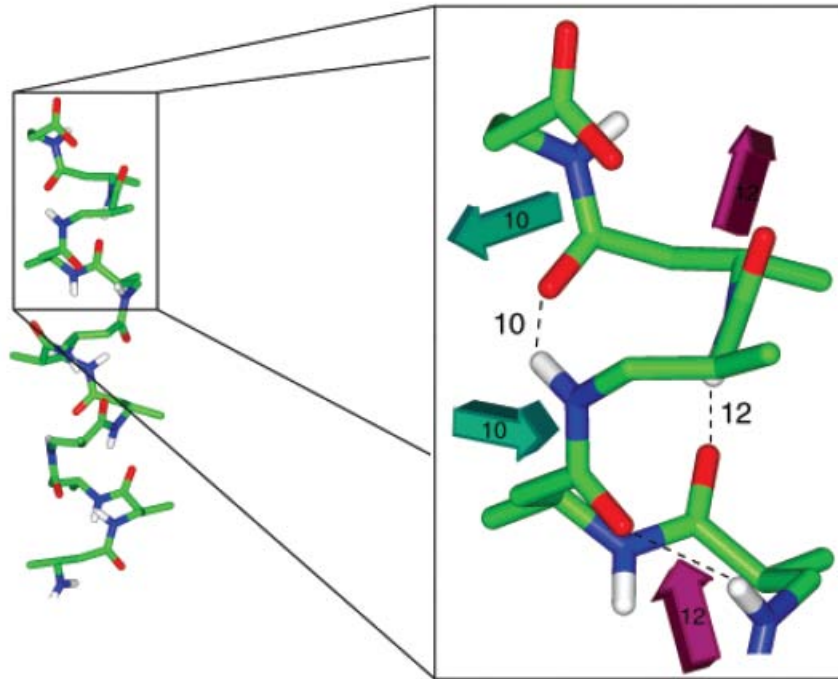


Figure 26. Estructura de la 10/12-hèlix amb zoom a la zona dels dos tipus d'enllaç amida. Per clarificar, els hidrògens no apareixen, excepte els dels enllaços amida (en blanc). Els carbonis es mostren en verd, els nitrògens en blau i els oxígens en vermell. Els vectors mostren els anells de 10 i 12 membres, en cian i magenta respectivament

- **Conformació tipus 10-hèlix**

Fleet i col·laboradors han preparat β -pèptids a partir de monòmers amb anells de 4 membres conformacionalment restringits. Aquests β -pèptids presenten una estructura secundària tipus 10-hèlix sense precedents. Els β -aminoàcids que constitueixen aquests β -pèptids contenen un anell oxetànic (de 4 baules) i són derivats sintèticament dels monosacàrids (**Figura 27**). Els substituents amino i carboxil es troben en *cis* a l'anell de 4 membres, al contrari que en els *trans* dels compostos amb residus ciclohexànics, ciclopentànics i pirrolidínics abans esmentats. El plegament tipus 10-hèlix es dona en solvents no polars (cloroform o benzè).

La conformació que adopten aquests tipus de compostos va quedar determinada mitjançant anàlisis bidimensionals de RMN així com per càlculs teòrics.⁶⁸

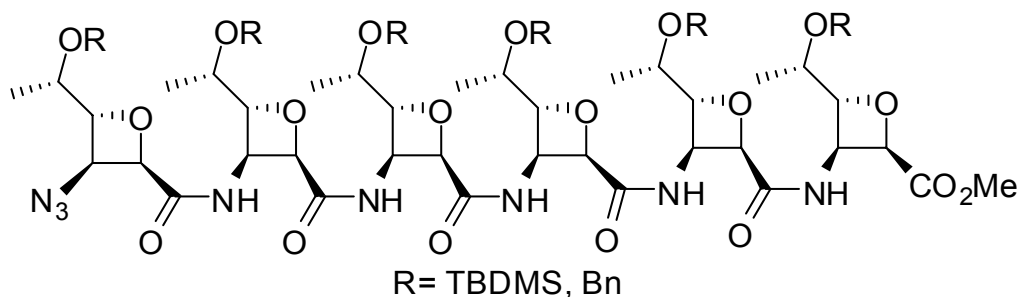


Figura 27

Més tard, Fülöp i col·laboradors⁶⁹ han estudiat oligòmers, utilitzant monòmers de l'àcid *trans*-2-aminociclohexancarboxílic, sense grups protectors. (Figura 28) Mitjançant càlculs teòrics i estudis de RMN s'ha determinat que en el cas del tetràmer ($n=3$) aquest adopta una conformació tipus 10-hèlix, mentre que pel pentàmer i l'hexàmer ($n=4$ i $n=5$) adopta una conformació tipus 14-hèlix.

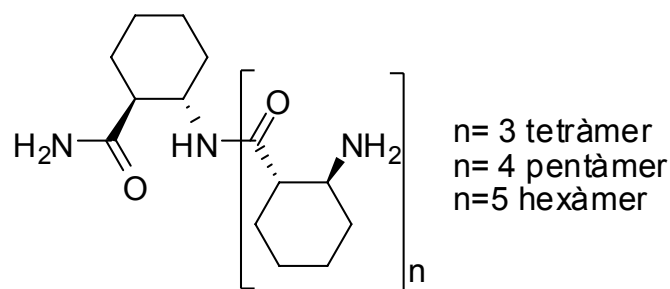


Figura 28

⁶⁸ Claridge, T. D. W.; Goodman, J. M.; Moreno, A.; Angus, D.; Barker, S. F.; Taillefumier, C.; Watterson, M. P.; Fleet, G. W. J., *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 4251

⁶⁹ Hetényi, A.; Mandity, I. M.; Martinek, T. A.; Toth, G. K.; Fülöp, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 547

- **Conformació tipus 8-hèlix**

Les estructures cristal·lines d'oligòmers curts del monòmer aquiral àcid 1-metilaminociclopropanocarboxílic mostren com aquests residus β -aminoàcids tenen tendència a formar anells de 8 membres, mitjançant enllaços d'hidrogen.⁷⁰ (Figura 29)

Aquestes observacions d'Abele i col·laboradors suggereixen que oligòmers de major llargada podrien adoptar com a estructura regular aquesta conformació tipus 8-hèlix, la qual tindria aproximadament dos residus per volta.

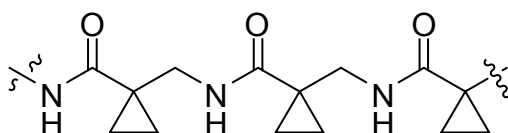


Figura 29

També es poden trobar altres referències⁷¹ on estudien, mitjançant càlculs DFT i experiments de RMN, les geometries que poden adoptar β -pèptids amb residus oxanorbornènics. (Figura 30)

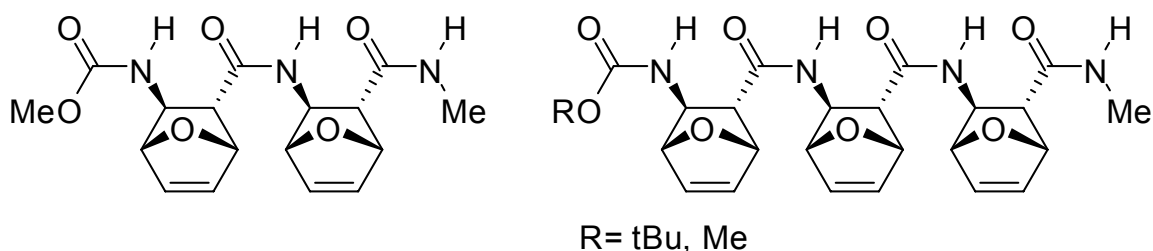


Figura 30. Dímer i trímer amb residus oxanorbornènics

Així, tant el dímer com el trímer adopten com a conformació consecutiva, la formació d'un anell de 8 baules mitjançant enllaços d'hidrogen. El fet que aquests compostos adoptin exclusivament aquesta conformació tipus 8-hèlix

⁷⁰ Abele, S.; Seiler, P.; Seebach, D., *Helv. Chim. Acta.*, **1999**, 82, 1559

⁷¹ Doerksen, R. J.; Chen, B.; Yuan, J.; Winkler, J. D.; Klein, M. L., *Chem. Commun.*, **2003**, 2534

sembla ser degut a la restricció conformacional que suposa la presència de l'anell oxanorbornènic.

Com a referència més recent⁷² trobem la síntesi i l'estudi mitjançant RMN i càlculs teòrics de pèptids derivats de β -aminoàcids *trans*-ACPC substituïts amb timidina. (**Figura 31**) Mitjançant aquest estudi, s'ha observat com el tetràmer d'aquesta sèrie adopta una conformació tipus 8-hèlix, la qual difereix considerablement de la conformació 12-hèlix observada pels oligòmers *trans*-ACPC abans esmentats.

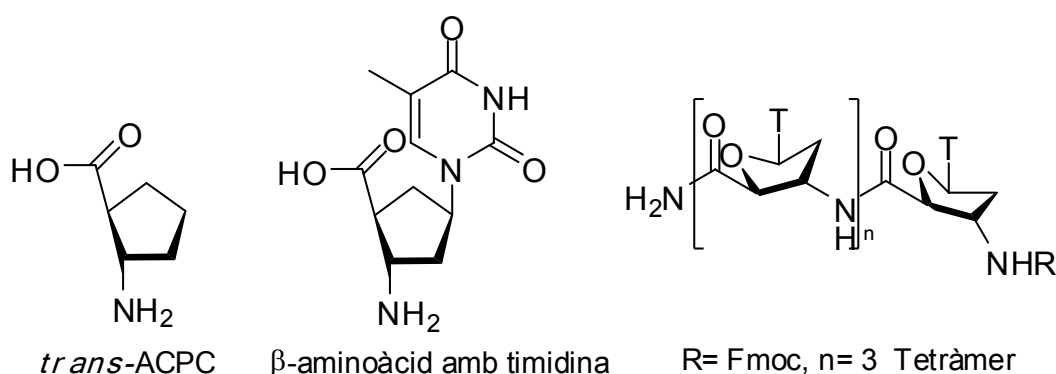


Figura 31

- **Altres tipus de conformacions helicoidals**

De la combinació d' α -aminoàcids i β -aminoàcids cíclics amb un patró seqüencialment alternat es pot obtenir una conformació hèlix amb heterooligòmers relativament curts. Les dades estructurals suggereixen que aquests tipus de foldàmers tenen el que s'anomena una "personalitat múltiple", ja que simultàniament es donen dues conformacions helicoidals diferents. Els diferents tipus de monòmers de l'esquelet heterogeni α/β -peptídic ofereix beneficis complementaris als nous foldàmers: els β -residus conformacionalment restringits proporcionen preorganització, mentre els α -residus permeten una fàcil introducció de cadenes en posicions específiques.

⁷² Threlfall, R.; Davies, A.; Howarth, N. M.; Fisher, J.; Cosstick, R., *Chem. Commun.*, **2008**, 585

Mitjançant estudis de RMN (NOES) i càlculs teòrics (NOES teòrics) s'ha observat una forta tendència a formar estructures secundàries tipus hèlix en oligòmers curts amb esquelets heterogenis amb alternança de residus β -aminoàcids cíclics i α -aminoàcids. Així en aquest cas es produeix una ràpida interconversió entre dues conformacions helicoïdals alternatives, que poden ser 11-, 14/15- i 18-hèlix. Això suggereix que oligòmers heterogenis que continguin dos o més tipus de residus aminoàcids seran una font fructífera de nous foldàmers.⁷³

Posteriorment s'ha observat, de forma qualitativa, que en α/β -pèptids helicoïdals la incorporació en la posició β^3 de residus acíclics o α -residus ramificats disminueixen l'estabilitat de l'hèlix del α/β -pèptid, mentre la incorporació de α -residus α,α -disubstituïts proporciona estabilitat a l'hèlix.⁷⁴

2.1.4 Conformacions laminars: làmines- β

En principi, hi ha dos tipus d'estructura secundària laminar possible en els β -pèptids, una considerant els residus de l'enllaç C2-C3 es troben en *anti* i una altra on els residus es troben en *gauche* a l'angle de torsió C2-C3. (**Figura 32**)

La conformació tipus *anti* es distingeix perquè tots els carbonils de l'esquelet estan orientats aproximadament en la mateixa direcció, la qual cosa dona lloc a una làmina amb un dipol net. En canvi en la conformació *gauche* es pot observar com els carbonils queden alternats en la direcció de la cadena. Aquesta conformació impedeix l'aparició d'un dipol net i a aquests pertanyen les estructures dels α -pèptids.⁵⁶ En canvi, les làmines- β tipus *anti* resulten interessants per l'aparició d'un dipol en funció de la conformació adoptada.

⁷³ Hayen, A.; Schmitt, M. A.; Ngassa, F. N.; Thomasson, K. A.; Gellman, S. H., *Agew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 505.

⁷⁴ Schmitt, M. A.; Choi, S. H.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 13130

D'aquesta manera, la introducció de grups iònics poden influenciar l'estabilitat de la làmina.⁷⁵

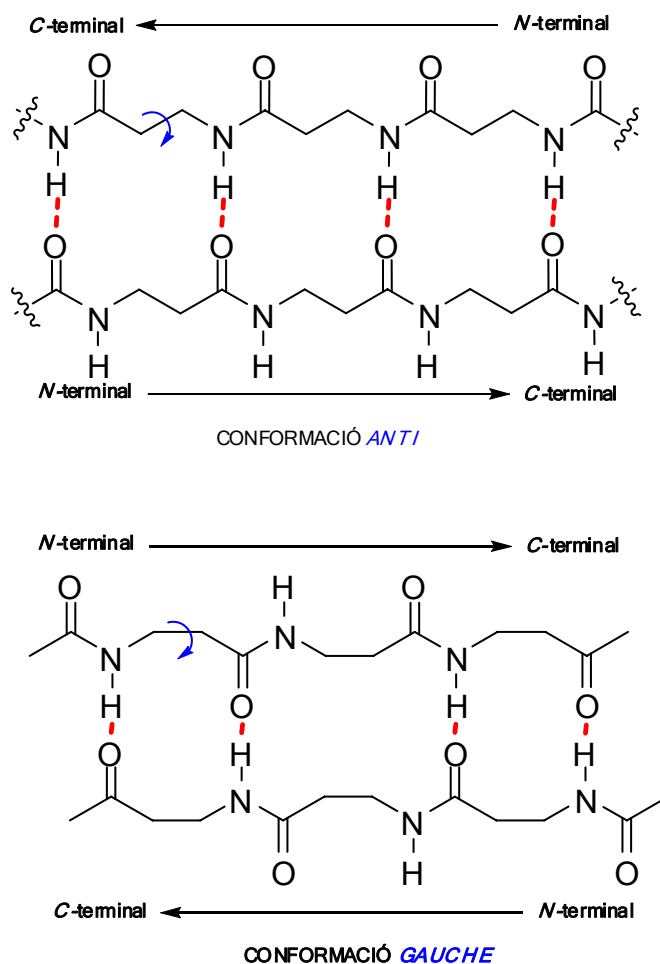


Figura 32

Les làmines- β que adopten aquest tipus de conformació *anti* poden ser de dos tipus, paral·leles o antiparal·leles. Aquesta diferenciació ve determinada per la direcció que presenta cada cadena peptídica.⁷⁶ (Figura 33)

⁷⁵ Gallo, E. A.; Gellman, S. H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 11560

⁷⁶ Seebach, D.; Abele, S.; Gademann, K.; Jaun, B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 1595

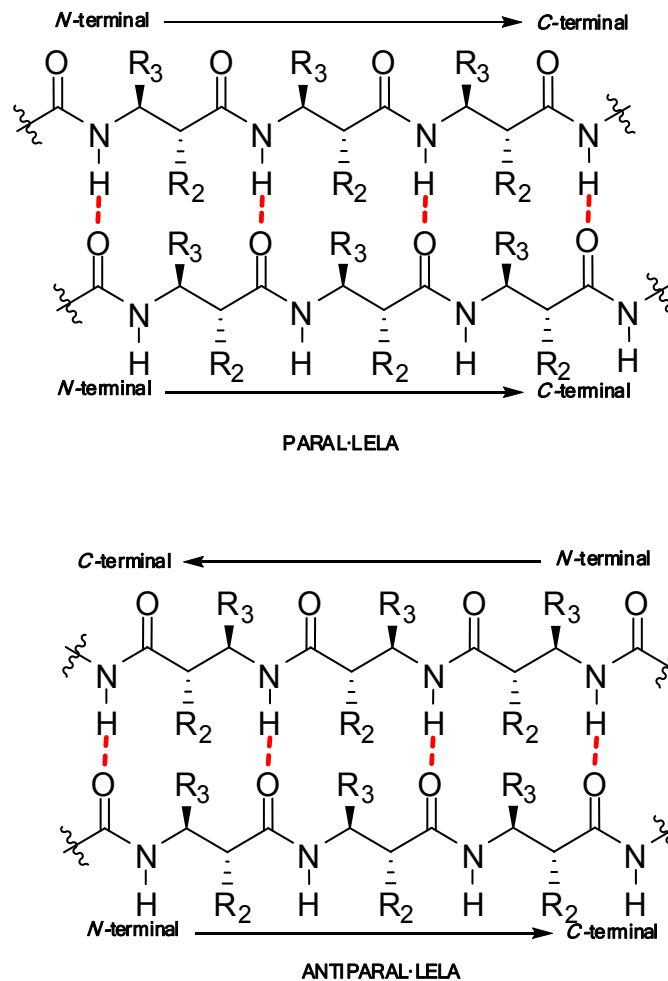


Figura 33

En els últims anys s'ha avançat significativament en la preparació de β -pèptids amb conformació tipus laminar. Treballs realitzats a finals de la dècada dels seixanta i principis dels setanta, van trobar com compostos polimèrics de la β -alanina presentaven una estructura cristal·lina estesa tipus làminar i en canvi presentaven una conformació desordenada en solució. Aquesta estructura secundària tipus laminar també va ésser observar en altres β -oligòmers, tot i que estudis de polímers similars van portar a la conclusió que aquests compostos preferien adoptar conformacions helicoidals.⁵⁶

Gellman i col·laboradors,⁷⁷ per la seva part, han dissenyat la molècula **I**, que es mostra a la **Figura 34**, la qual adopta tant en solució com en estat sòlid una conformació anomenada *agulla de cabell*. En aquesta conformació els dos β -aminoàcids finals participen en interaccions formant enllaços d'hidrogen i donant així lloc a una estructura tipus laminar antiparal·lela. Aquesta molècula conté com a seqüència central un segment de D-prolina-glicolat (marcat en **vermell** a la **Figura 34**) que promou una conformació tipus gir- β i inicia la formació de la làmina antiparal·lela.

Estudis posteriors de β -pèptids amb estructura secundària tipus laminar van portar a la substitució d'aquest segment per un dipèptid heteroquiral format per dos residus d'àcid nipecòtic, tal com s'observa a la molècula **II** (marcat en **blau** a la **Figura 34**). Aquest tetrapèptid conté exclusivament residus β -aminoàcids, amb dos residus centrals que donen lloc a un β -pèptid de gir invers.⁵⁶

Seebach i col·laboradors⁷⁶ han utilitzat estratègies similars per estabilitzar, en solvents orgànics, estructures tipus *agulla de cabell*. Així, han preparat un hexapèptid amb β -aminoàcids disubstituits en *sin*-C2,C3 en els dos primers i dos últims residus (molècula **III**, **Figura 34**).

La conformació tipus *agulla de cabell* adoptada per la molècula **III** va ésser estudiada mitjançant càlculs de dinàmica molecular així com per estudis de RMN. Les simulacions amb les restriccions experimentals van indicar que el gir es trobava format en la majoria de les estructures, en les quals els N- i C-terminals adoptaven una orientació principalment antiparal·lela i estesa, tot i que aquests grups no es trobaven a distància d'enllaç d'hidrogen. La simulació sense restriccions, però, va donar la millor concordança amb els resultats experimentals i va mostrar com el gir només estava present el 30% del temps. La baixa població observada de l'estructura desitjada tipus *agulla de cabell* va ésser justificada pels impediments estèrics entre els grups voluminosos de la cadena.

⁷⁷ Krauthauser, S.; Christianson, L. A.; Powell, D. R.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 11719

Més endavant, Gellman i col·laboradors han dissenyat làmines- β antiparal·leles amb un número variable de branques per mostrar com les estructures secundàries tipus làmina- β antiparal·lela esdevenen més estables quan augmenta el número de branques. En aquest cas utilitzen segments de D-prolina-glicolat per enllaçar les branques adjacents i facilitar aquest estudi, ja que aquest dipèptid actua com a *branch-stop* de les senyals.⁷⁸

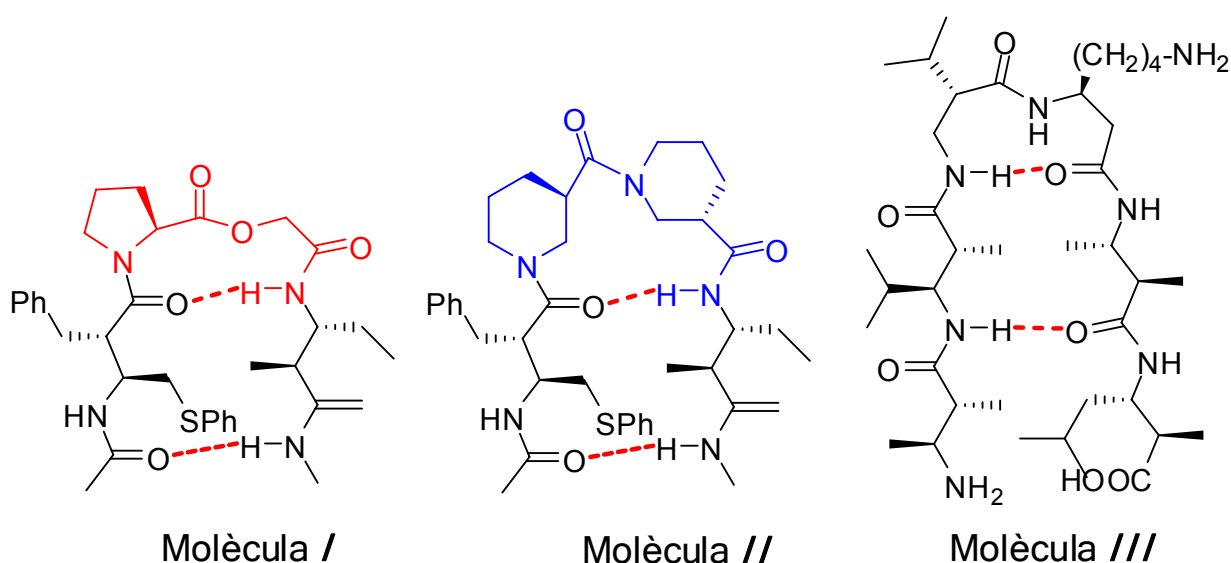


Figura 34

Com a referències més recents trobem, per exemple, la síntesi i l'estudi de pèptids que adopten l'estructura tipus *agulla de cabell*, així com la manera d'induir aquest plegament introduint determinats dipèptids restringits conformacionalment que augmenten la cadena peptídica. Així s'han estudiat les conformacions que adopten tota una sèrie de pèptids (seqüències tetra-, penta, i hexapeptidomimètics) mitjançant RMN, càlculs teòrics, DC i IR.⁷⁹ (Figura 35)

⁷⁸ Syud, F. A.; Stanger, H. E.; Mortell, H. S.; Espinosa, J. F.; Fisk, J. D.; Fry, C. G.; Gellman, S. H., *J. Mol. Biol.*, **2003**, 326, 553

⁷⁹ Ressurreiçao, A. S. M.; Bordessa, A.; Civera, M.; Belvisi, L.; Gennari, C.; Piarulli, V., *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 652

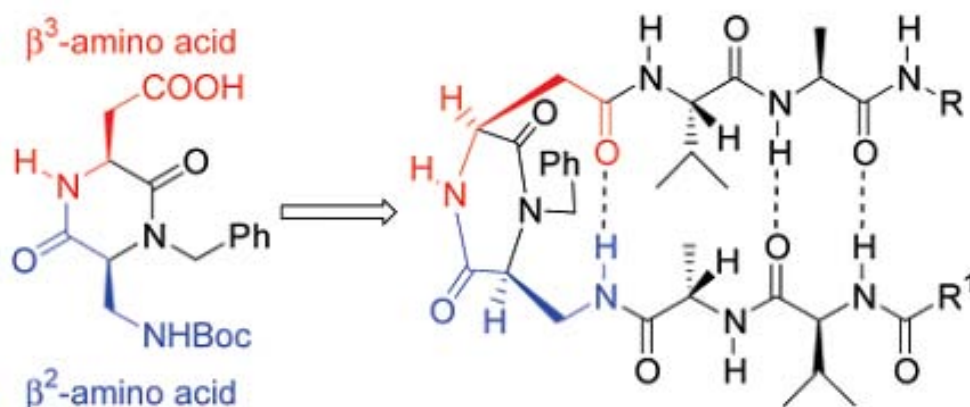


Figura 35

2.1.5 Conformacions tipus cinta

Fülöp i col·laboradors han mostrat com mitjançant una inversió de la configuració relativa dels β -aminoàcids conformacionalment restringits, l'estructura periòdica adoptada pot canviar de conformació tipus hèlix a una simple conformació tipus *cinta no polar*. (Figura 36)

Així, ha quedat patent com, per exemple, el pentàmer i l'hexàmer del (1*R*,2*S*)-*cis*-ACPC adopten una estructura secundària tipus *cinta* en solució. Això resulta interessant ja que es coneixia, per estudis previs, que els sistemes formats pels monòmers (1*R*,2*R*)-*trans*-ACPC adoptaven una conformació tipus 12-hèlix elevadament estable. D'aquesta manera, es pot observar com el canvi de la configuració relativa dels residus ACPC en aquests models, suposa un eficient control sobre les estructures secundàries tipus hèlix o *cinta*.⁸⁰

⁸⁰ Martinek, T. A.; Tóth, G. K.; Vass, E.; Hollósi, M.; Fülöp, F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 1718

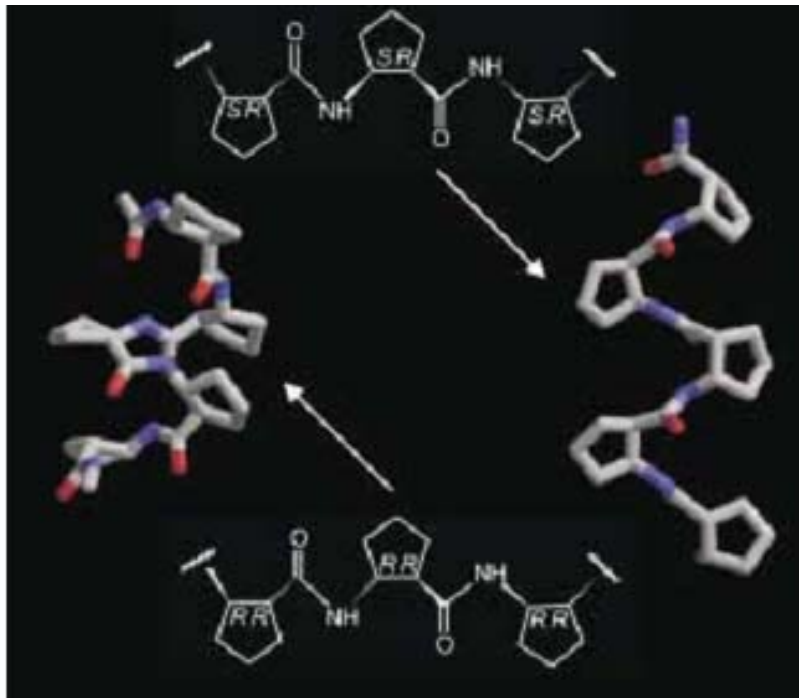


Figura 36. Comparació de les estructures secundàries induïdes per les diferents configuracions relatives dels residus ACPC

Per tal d'evitar ambigüitat, s'ha de posar de manifest que totes les estructures periòdiques posseeixen una simetria helicoïdal, però les conformacions tipus *cinta* es diferencien de les conformacions tipus hèlix en base a l'angle de l'enllaç d'hidrogen. Així, les estructures estabilitzades per enllaços d'hidrogen amb un angle inferior a 120° es classifiquen com *cintes no polars*. (**Figura 37**)

En aquestes conformacions els enllaços amida poden trobar-se participant en una gran varietat de interaccions donant lloc a la formació de làmines plegades.⁸¹

⁸¹ Martinek, T. A.; Fülöp, F., *Eur. J. Biochem.*, **2003**, 270, 3657

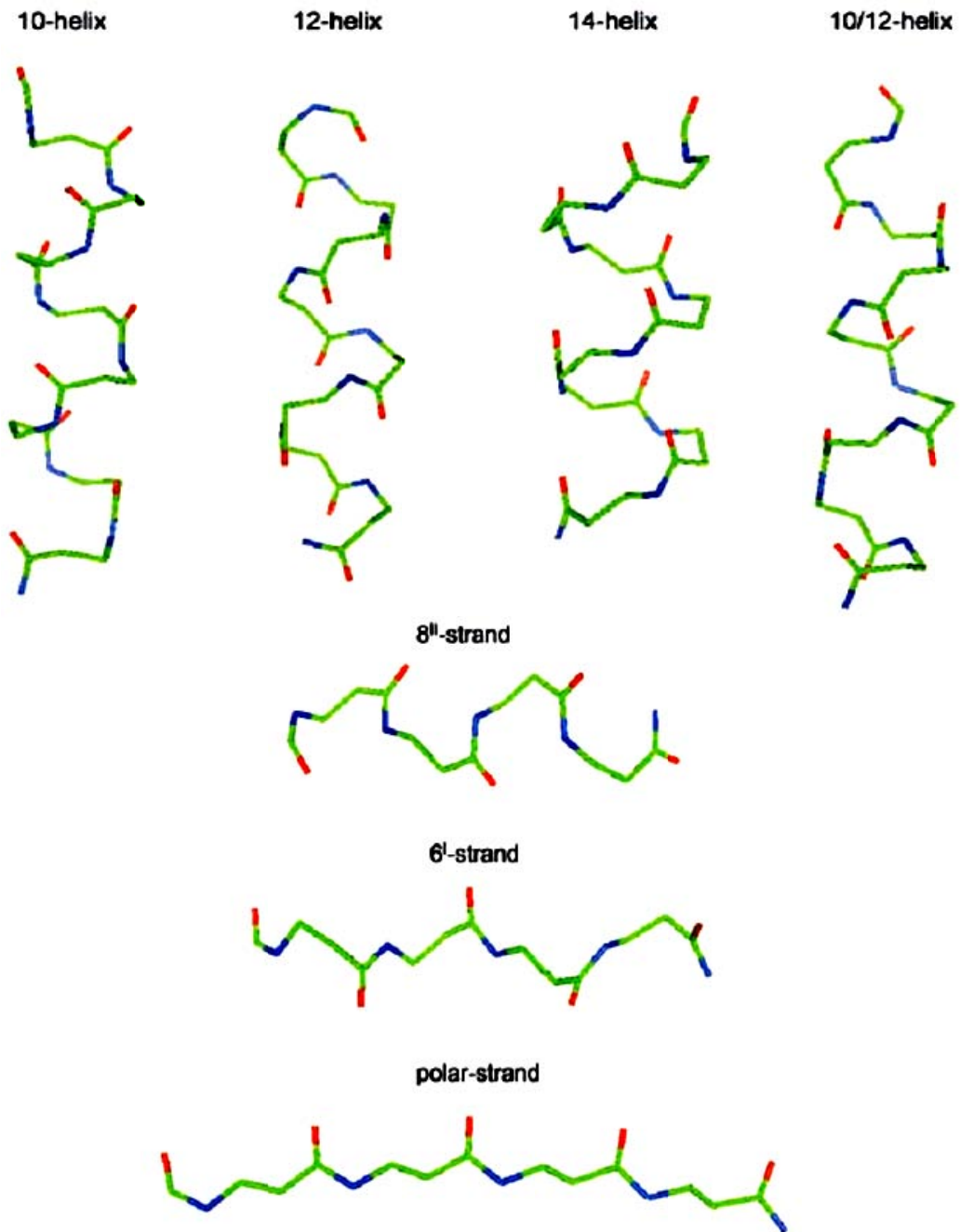


Figura 37. Geometria experimentalment observada en conformacions tipus hèlix i *cinta* de β -pèptids amb gir a l'esquerra.

- **Cintes torsionades o “twisted strands”**

Alguns homooligòmers (**Figura 38**) adopten una conformació de *cinta torsionada* en cloroform, tal com s’observa als estudis per RMN.⁸² Al contrari que els enllaços d’hidrogen inter-residuals observats a les estructures tipus *agulla de cabell* abans esmentats, aquesta *cinta torsionada* presenta enllaços d’hidrogen intra-residuals, és a dir, dins del mateix aminoàcid. A més a més, els residus adopten una conformació *gauche* per aquesta *cinta torsionada*, donant com a resultat una estructura repetitiva de 13 residus. (**Figura 38**) L’estructura presenta interaccions de van der Waals i electrostàtiques, així com enllaços d’hidrogen bifurcats.⁵⁶

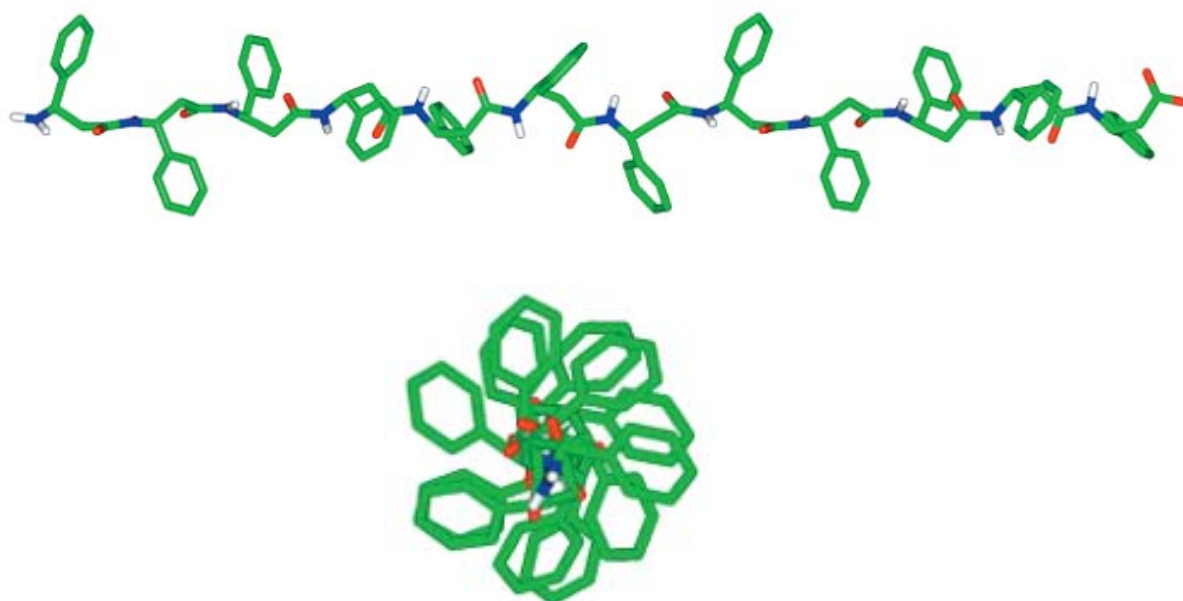
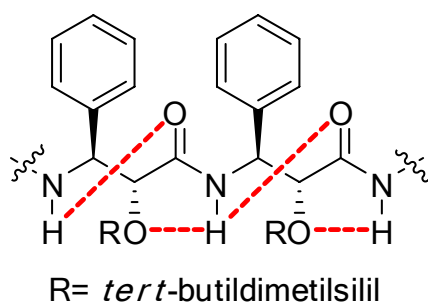


Figura 38. Conformació de tipus *cinta torsionada*. A la part inferior es mostra una vista lateral i frontal de la conformació

⁸² Motorina, I. A.; Huel, C.; Quiniou, E.; Mispelter, J.; Adjadj, E.; Grierson, D. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 8

2.1.6 β -pèptids biològicament actius

Com hem vist fins ara, els β -pèptids són capaços d'adoptar conformacions estables tipus hèlix, làmina i gir. Això fa que siguin un bon punt de partida pel disseny de peptidomimètics. Els β -pèptids són estables en front la degradació proteolítica tant in vitro com in vivo,^{56,83} una avantatge important sobre els pèptids i les proteïnes naturals. És per això, que els pèptids amb estructures secundàries relativament simples han estat objecte d'investigacions. Així, s'hauria de poder dissenyar β -pèptids les activitats dels quals dependrien de la formació d'estructures secundàries ben definides.

- ***Inhibidors de l'absorció del greix i del colesterol***

Seebach i col·laboradors van dissenyar un β -pèptid amb configuració tipus 14-hèlix intentant mimetitzar les α -hèlix amfifíliques de les apoliproteïnes humanes, involucrades en l'assimilació i el transport de lípids.⁸⁴ Els α -pèptids helicoïdals son capaços d'inhibir aquest procés, i per tant, era d'esperar que β -pèptids dissenyats convenientment fossin també inhibidors eficients. Però els β -pèptids actius resulten aproximadament la meitat d'actius que els α -pèptids, tot i que són resistents a la degradació proteolítica. Per això, aquests β -pèptids s'han de considerar com un prometedor primer model a partir del qual es podrien obtenir avanços significants.⁵⁶

- ***β -pèptids amb activitat antibacteriana***

Els bacteris patogènics cada vegada són més resistents als antibiòtic comuns. Aquest fet ha estimulat una intensiva cerca de nous antibiòtics. Sabent que un tipus de pèptids de mida mitjana són àmpliament utilitzats pels organismes com a defensa contra invasions microbianes, Gellman i col·laboradors han desenvolupat un β -pèptid que mimetitza els antibiòtics naturals i s'ha assajat la seva activitat antimicrobiana.⁵⁶

⁸³ Kohler, H. P.; Seebach, D.; Geueke, B.; Namoto, K., *J. Bacteriology*, **2005**, 187, 5910

⁸⁴ Werder, M.; Hauser, H.; Abele, S.; Seebach, D., *Helv. Chim. Acta*, **1999**, 82, 1774

Els antibiòtics peptídics naturals són àmpliament diversos en quant a mida, seqüència i conformació; aquests són catiónics i sovint adopten estructures secundàries amfifíliques. Un tipus comú són aquells pèptids que presenten de 20- a 30-residus i que donen lloc a α -hèlix amfifíliques (les cadenes hidrofòbiques es troben en una de les cares de la hèlix i les cadenes catióniques a l'altra) que són atretes per la superfície de la bacteria carregada negativament. Aquestes hèlix pertorben d'alguna manera la membrana bacteriana.

Els β -pèptids són candidats antimicrobians prometedors perquè tenen la capacitat d'adoptar estructures secundàries⁸⁵ i perquè l'esquelet dels β -pèptids no naturals és resistent a la degradació proteolítica, a diferència dels α -pèptids com ja s'ha comentat anteriorment.

Oligòmers de l'àcid (*R,R*)-*trans*-2-aminociclopentacarboxílic (ACPC) adopten una hèlix definida per un anell de 12 baules com a resultat dels enllaços d'hidrogen entre els grup carbonil de la cadena i el protó amídic del tercer residu en la direcció C-terminal (conformació tipus 12-hèlix).⁶¹

Així, Gellman i col·laboradors, per provar l'activitat antimicrobiana del β -pèptid amb conformació 12-hèlix, han utilitzat l'àcid (*3R,4S*)-*trans*-4-aminopirrolidin-3-carboxílic (APC) conjuntament amb l'ACPC, per preparar l'oligòmer β -17 (**Figura 39**). La conformació 12-hèlix d'aquest compost és amfifílica, amb tots els residus hidrofílics APC en una banda de la hèlix i tots els residus hidrofòbics ACPC a l'altre.

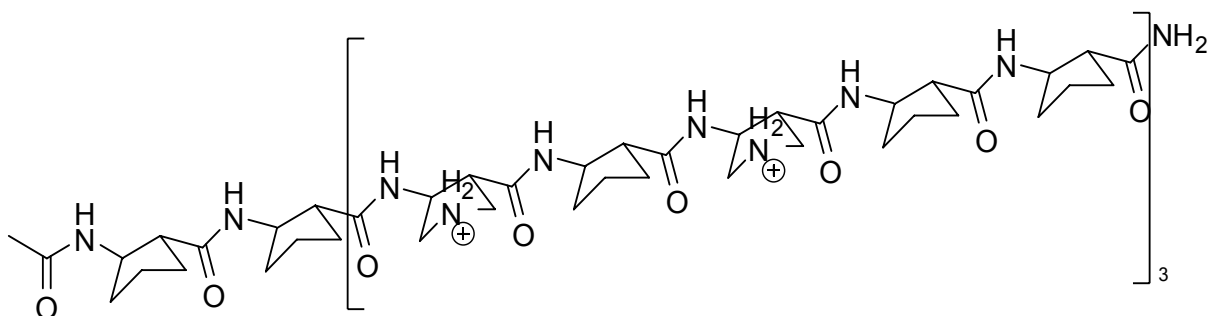


Figura 39. Estructura química del β -17

⁸⁵ a) Seebach, D.; Matthews, J. L., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1997**, 2015. b) Gellman, S. H., *Acc. Chem. Res.*, **1998**, *31*, 173. c) De Grado, W. F.; Schneider, J. P.; Hamuro, Y., *J. Peptide Res.*, **1999**, *54*, 206.

Aquests autors han trobat que el seu β -pèptid també és efectiu contra quatre tipus de bacteris, incloent dos patògens que resulten resistents als antibiòtics comuns.⁸⁶

Aquest β -pèptid presenta una baixa activitat hemolítica enfront els glòbuls vermells humans, el que indica una selectivitat per les cèl·lules bacterianes en front cèl·lules de mamífers. Gellman i col·laboradors³⁵ han examinat alguns factors importants que influeixen en l'activitat d'aquest tipus de β -pèptids, i han arribat a la conclusió que una hèlix amfifílica es necessària, perquè un isòmer no amfifílic resulta ésser inactiu. La proporció de residus catiónics versus residus hidrofòbics és també important.

També trobem un treball de Hamuro i col·laboradors⁸⁷ on es mostra com oligòmers de β -aminoàcids (β -pèptids) que adopten una conformació tipus hèlix amfifílica definida per la formació d'un anell de 14 membres, mitjançant enllaços d'hidrogen (14-hèlix), presenten activitat contra l'*Escherichia coli*. En base a això, Gellman i col·laboradors han creat dues sèries de β -pèptids amfifílics amb 9- i 10-residus catiónics per estudiar l'efecte de l'activitat antimicrobiana i hemolítica sobre l'estabilitat de la 14-hèlix. L'estabilitat d'aquesta 14-hèlix s'ha anat modulant mitjançant la variació de les proporcions del residu rígid (àcid *trans*-2-aminociclohexacarboxílic, ACHC) i els residus acíclics flexibles. Segons aquest estudi, els β -pèptids semblen ser les úniques eïnes per analitzar la relació entre estabilitat conformacional i activitat biològica.⁸⁸ Altres anàlegs han estat posteriorment preparats i avaluats i tot i que alguns presentaven una molt bona activitat antimicrobiana cap presentava més activitat que el pèptid β -17 abans esmentat.⁸⁹

Més recentment, aquest mateix grup ha publicat un treball en el que han dissenyat tota una sèrie de β -oligòmers, amb una estructura secundària tipus 12-hèlix, capaços d'inhibir l'entrada del citomegalovirus humà (HCMV) dins de les cèl·lules dianes. A la **Figura 40** es mostren alguns d'aquests compostos.

⁸⁶ Porter, E. A.; Wang, X.; Lee, H-S.; Weisblum, B.; Gellman, S. H., *Nature*, **2000**, *404*, 565 | les seves referències

⁸⁷ Hamuro, Y.; Schneider, J. P.; De Grado, W. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 12200

⁸⁸ Raguse, T. L.; Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 12774

⁸⁹ Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 11516

Darrerament, també s'ha observat com oligòmers que adopten una conformació tipus 14-hèlix presenten activitat antifúngica.⁹⁰

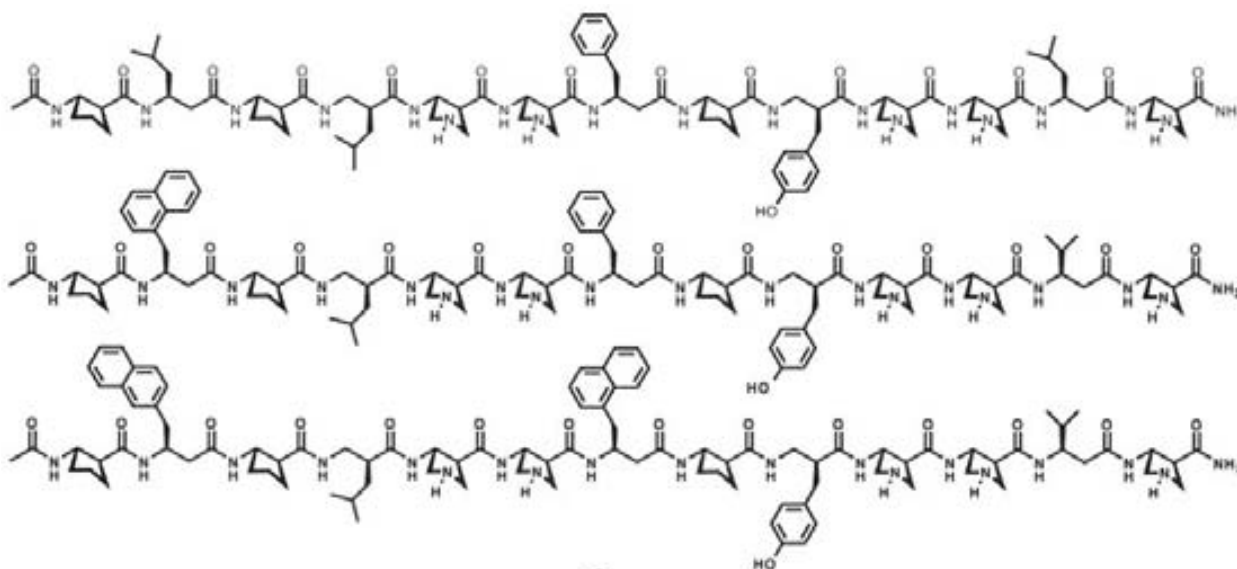


Figura 40

Per la seva part, Seebach i col·laboradors han estudiat la biodegradació de β -pèptids i han descrit per primera vegada un enzim capaç de trencar els enllaços peptídics de β -pèptids no naturals. Això, considerant aspectes ecològics, és un fet de gran importància perquè es podrien utilitzar aquests tipus de compostos tant en medicina com en materials, ja que els residus generats es podrien reinsertar al mediambient mitjançant la biodegradació.⁹¹

⁹⁰ Karlsson, A. J.; Pomerantz, W. C.; Weisblum, B.; Gellman, S. H.; Palecek, S. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 12630

⁹¹ a) Schreiber, J. V.; Frackenpohl, J.; Moser, F.; Fleischmann, T.; Kohler, H-P., E.; Seebach, D., *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 424. b) Geueke, B.; Namoto, K.; Seebach, D.; Kohler, H-P., *J. Bacteriology*, **2005**, *187*, 5910

2.1.7 Estructures terciàries

El pas següent, després de tota una dècada estudiant les diferents estructures secundàries que adopten els β -pèptids, ha estat estudiar com interaccionen les diferents estructures secundàries entre elles, és a dir, estudiar les estructures terciàries així com intentar controlar la seva formació.

Al llarg d'aquesta dècada s'han donat diferents casos on s'observaven agregats resultat d'una auto-associació en solució de les hèlix formades per β -pèptids. Aquesta auto-associació donava lloc, així, a estructures terciàries, tot i que per aleshores dissenyar estructures terciàries amb morfologies determinades suposava encara un repte.⁹²

Així, amb aquestes premisses, Fülöp i col·laboradors⁹³ es van proposar controlar l'auto-associació específica de les unitats estructurals secundàries de β -pèptids en solució, per construir estructures supramoleculares assequibles, en les quals l'auto-associació estigui governada per les forces que generen les estructures terciàries (manats d'hèlix i sandvitx laminar).⁹⁴ (**Figures 41 i 42**)

D'aquesta manera, aquests autors han dissenyat i utilitzat oligòmers β -peptídics que, depenent de la naturalesa de les estructures secundàries (controlat per la configuració relativa de l'esquelet β -peptídica), amb auto-assemblatge de les làmines sandvitx i dels manats d'hèlix, poden induir la formació de fibres de mida nanomètrica i vesícules, respectivament.

Els *building blocks* triats han estat els homo-oligòmers de residus β -aminoàcids cíclics preparats amb diferents llargades de la cadena a partir de l'àcid *cis*-(1*R*,2*S*)-ACPCn i de l'àcid *trans*-(1*S*,2*S*)-ACHCm, que són coneguts per formar estructures tipus *cintes* no polars i hèlix en solució, respectivament.⁸⁰

⁹² a) Raguse, T. L.; Lai, J. R.; LePlae, P. R.; Gellman, S. H., *Org. Lett.*, **2001**, Vol. 3, No. 24, 3963. b) Hetényi, A.; Mándity, I. M.; Martinek, T. A.; Tóth, G. K.; Fülöp, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 547

⁹³ Martinek, T. A.; Hetényi, A.; Fülöp, L.; Mándity, I. M.; Tóth, G. K.; Dékány, I.; Fülöp, F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 2396

⁹⁴ Fülöp, F.; Martinek, T. A.; Tóth, G. K., *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 323

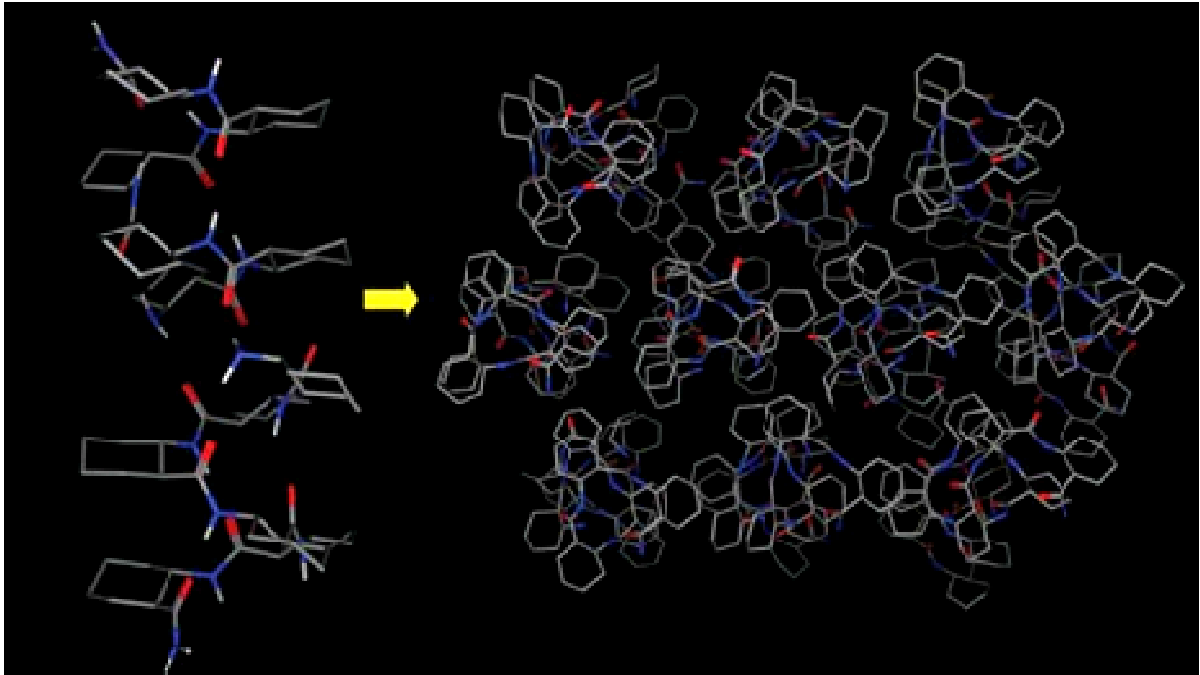


Figura 41. Estructura terciària tipus manat-hèlix de β -pèptids

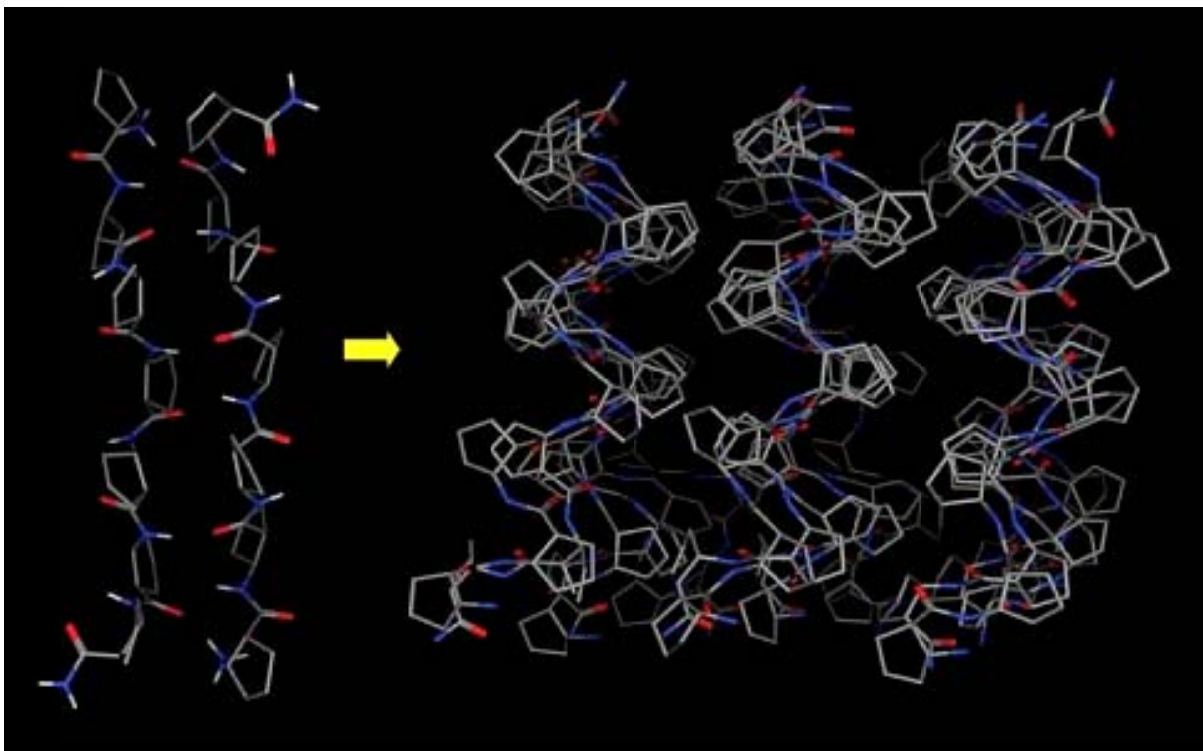


Figura 42. Estructura terciària tipus làmina-sanvitx de β -pèptids

Després d'incubar solucions dels β -pèptids corresponents en metanol durant una setmana, es van poder observar, mitjançant Microscopia Electrònica de Transmissió (TEM), la formació d'unes estructures fibril·lars tipus *cinta*,

Capítol 2: Introducció

l'alçada de les quals corresponia exactament amb la distància entre el N- i el C-terminal del ACPC7. També s'ha pogut determinar que l'amplada de les fibres augmenta al augmentar la mida de l'oligòmer. En canvi, al repetir els experiments amb el compost *trans*-ACHC6 es van observar unes estructures vesiculars multilaminars de diferents diàmetres constituïdes per una membrana tipus manat-hèlix. (**Figura 43**)

Així, van poder comprovar la relació que existeix entre les conformacions de les estructures secundàries que s'adopten i la morfologia de les estructures terciàries mitjançant el canvi de les conformacions relatives de les unitats monomèriques i/o la mida del pèptid.

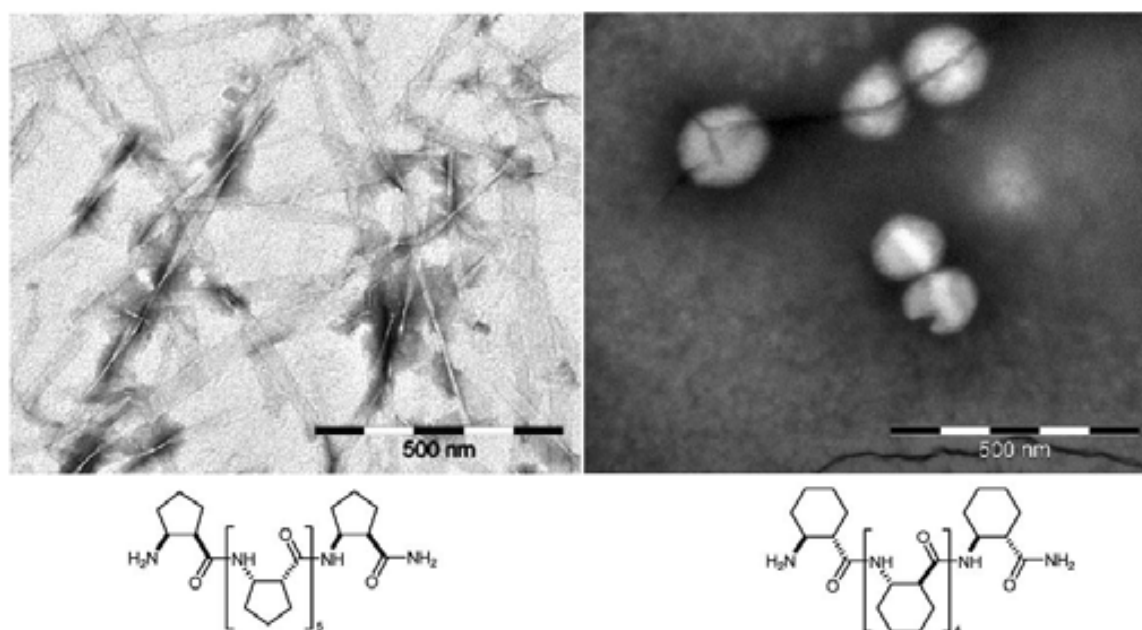


Figura 43. Fibres tipus làmina-sandvitx (esquerra) i vesícules tipus manat-hèlix (dreta) observades per β -pèptids.

Més recentment, Gellman i col·laboradors⁹⁵ han caracteritzat nanoestructures fibril·lars formades per seqüències directes resultat d'assemblatges d'oligòmers β -peptídics. Mitjançant aquest estudi, han observat com els β -pèptids es troben assemblats en solució donant lloc a estructures

⁹⁵ Pizzey, C. L.; Pomerantz, W. C.; Sung, B.-J.; Yuwono, V. M.; Gellman, S. H.; Hartgerink, J. D.; Yethiraj, A.; Abbott, N. L., *J. Chem. Phys.*, **2008**, 129, 095103

calculat i s'han trobat valors que varien segons el tipus i el número de residus. (Figura 45)

Les molècules que presenten un moment dipolar gran, així com una estructura secundària estable, resulten bons candidats per l'auto-assemblatge de materials.

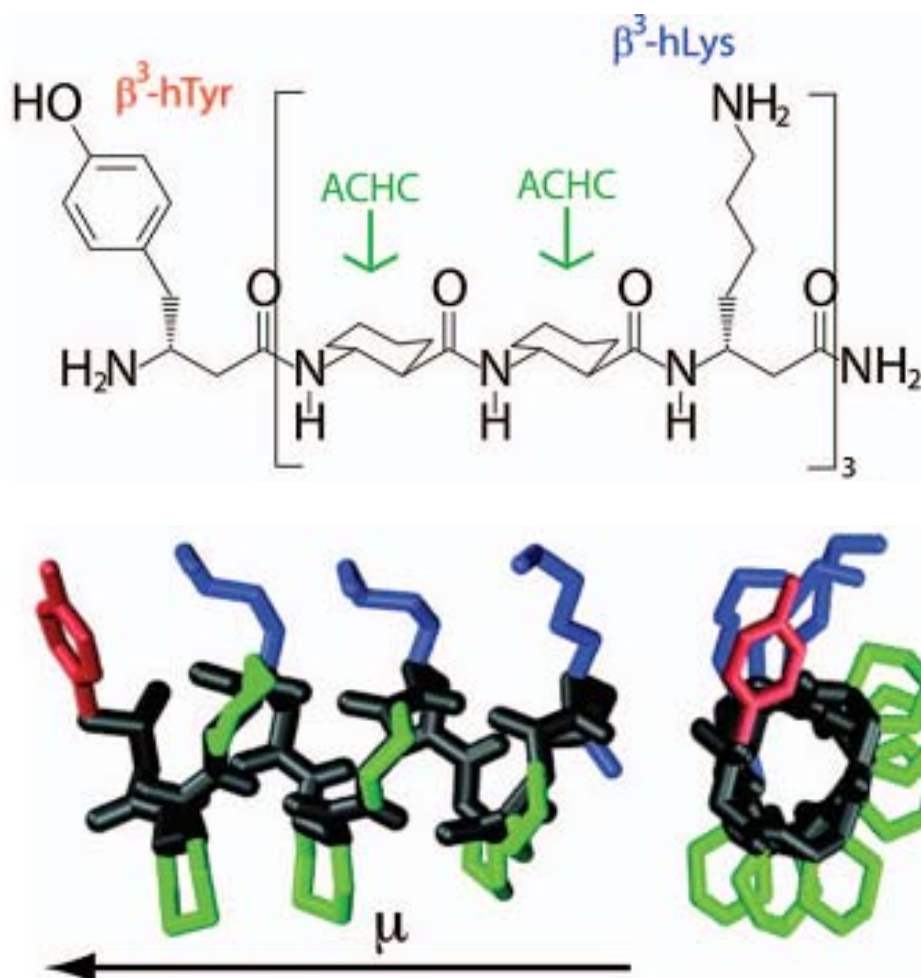


Figura 45. Exemple d'un dels β -pèptids estudiats el qual forma una 14-hèlix i presenta propietats de cristall líquid. A la part inferior es representa en negre l'esquelet del pèptid, en verd els residus cíclics, en blau els residus β^3 -homolisina i en vermell els residus β^3 -homotyrosina.

També s'ha determinat, mitjançant càlculs de potencials, les interaccions existents entre les dues cadenes hèlix dels β -pèptids en solvent. Així, sembla ser que les interaccions electroestàtiques dirigeixen l'assemblatge i el dipol de l'hèlix dirigeix el procés d'associació. El dipol de l'hèlix determina la distància i

l'orientació relativa dels dos pèptids, és a dir, d'un amb l'altre. Així resulta ser més favorable l'alineament paral·lel, amb l'orientació que s'observa a la **Figura 46** (esquerra), que l'alineament l'antiparal·lel (dreta).⁹⁷

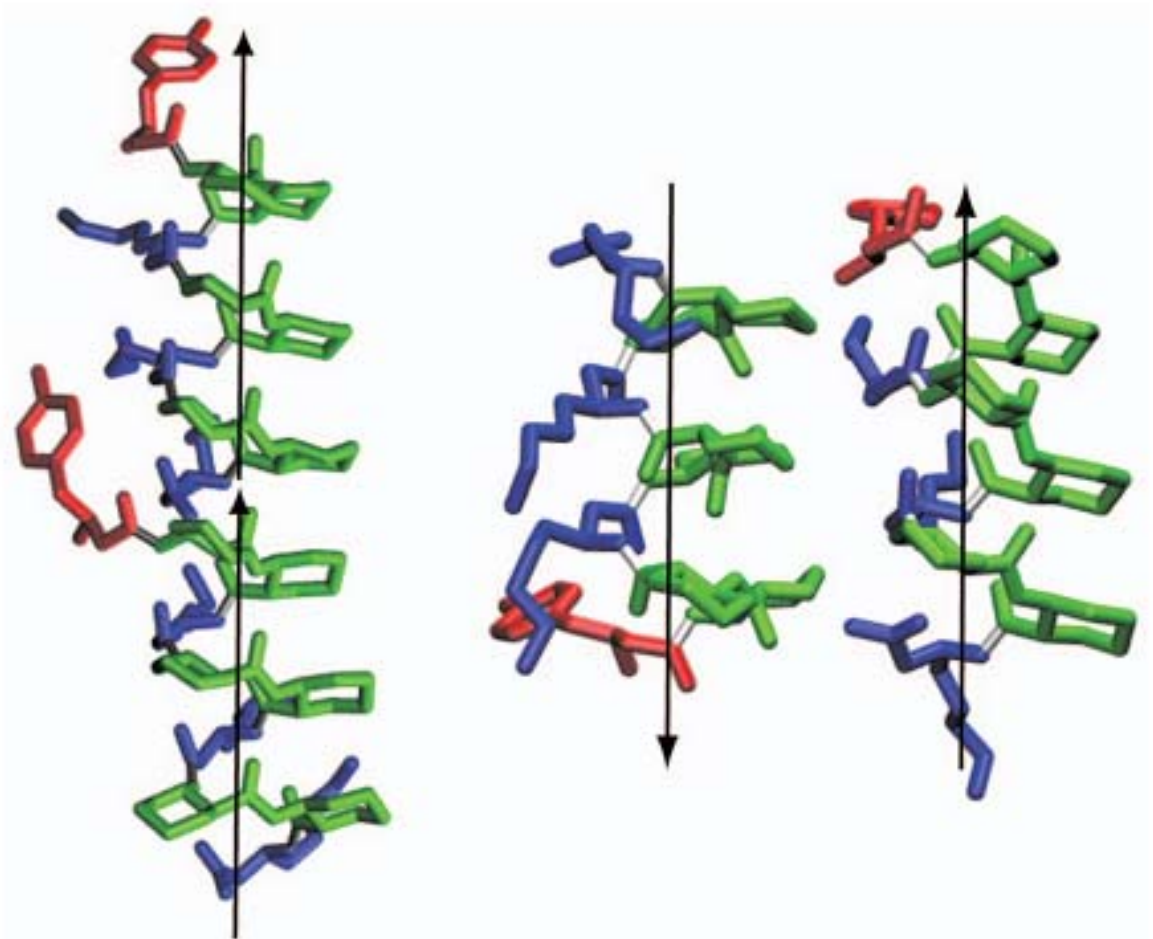


Figura 46. Representació de la configuració de dos molècules de β -pèptids de forma paral·lela i antiparal·lela.

⁹⁷ Miller, C. A.; Hernández-Ortiz, J. P.; Abbott, N. L.; Gellman, S. H.; de Pablo, J. J., *J. Chem. Phys.*, **2008**, 129, 015102.

2.2 Antecedents en el grup de investigació

En els últims anys, en el nostre grup de recerca s'han estudiat diversos oligòmers de β -aminoàcids ciclobutànics enantiomèrics. Així mateix, s'han desenvolupat diferents rutes enantioselectives per a la síntesi d'aquests compostos ciclobutànics. Així, s'han pogut sintetitzar selectivament els aminoàcids enantiomèrics que es mostren a la **Figura 47**.

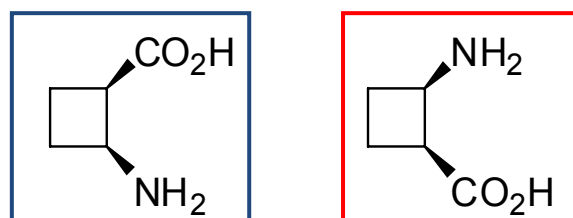


Figura 47. β -aminoàcids ciclobutànics enantiomèrics

Les estratègies sintètiques, per a l'obtenció d'ambdós enantiòmers, van ser desenvolupades per les Dres. Marta Martín-Vilà⁹⁸ i Sandra Izquierdo⁹⁹ durant les seves respectives Tesis Doctorals (**Esquema 5**).

Aquestes dues rutes sintètiques tenen un pas clau en comú que consisteix en una reacció quimioenzimàtica, per induir asimetria. Així, sobre el dièster meso **6**, i utilitzant com a enzim l'estereasa de fetge de porc (PLE),¹⁰⁰ es porta a terme la hidròlisi enzimàtica del centre *pro-S*, de manera que s'obté l'hemièster **7**. Aquest és l'intermedi clau que resulta ser el punt de bifurcació per a l'obtenció d'un o altre enantiòmer. D'aquesta manera, si sobre l'hemièster

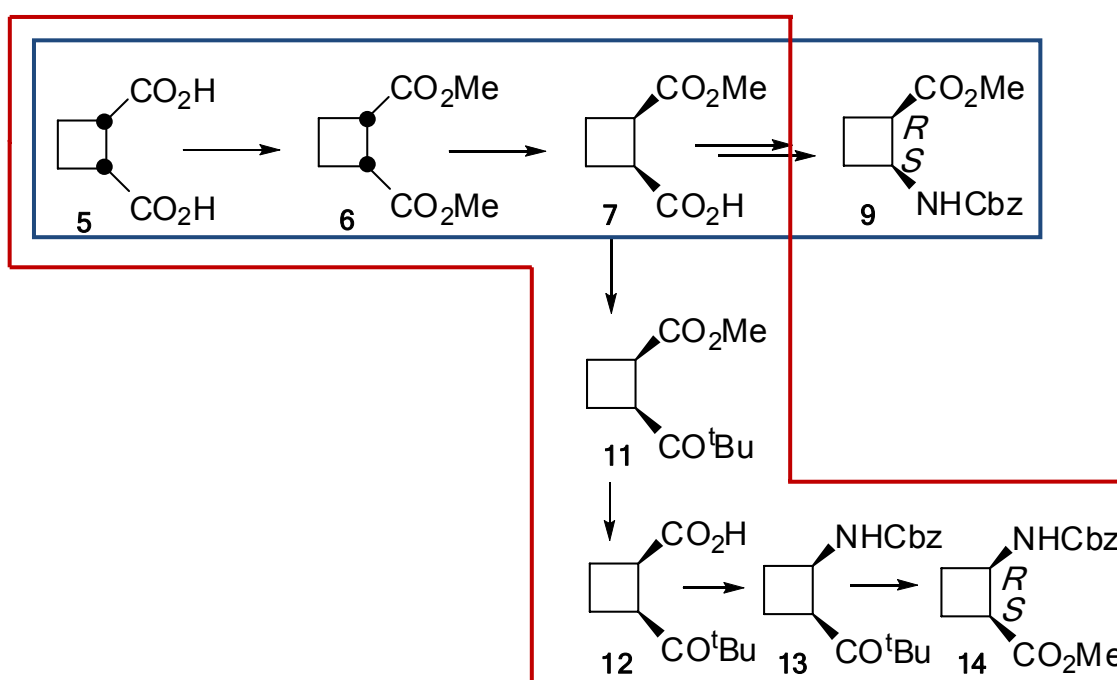
⁹⁸ Martín-Vilà, M.; Minguillón, C.; Ortuño, R. M., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, *9*, 4291-4294

⁹⁹ Izquierdo, S.; Martín-Vilà, M.; Moglioni, A. G.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 2403-2405 i Tesi Doctoral de la Dra. Sandra Izquierdo titulada *Àcids (+) i (-)-2-aminociclobutan-1-carboxílics i la seva incorporació en β -pèptids. Estudi sintètic i estructural*, **2005**

¹⁰⁰ Sabbioni, G.; Jones, J. B., *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 4565

7 es du a terme una reacció de Curtius en presència d'alcohol benzílic s'obté el β -aminoàcid protegit **9**. (**Esquema 5**)

D'altra banda, es realitza una protecció ortogonal de l'hemièster **7** en forma d'èster *tert*-butílic, per poder així saponificar l'èster metílic. A continuació, igual que en la ruta anterior, mitjançant una transformació de l'àcid carboxílic **12** en acil azida i una posterior transposició de Curtius, s'obté el β -aminoàcid protegit **14**, enantiòmer de **9**. (**Esquema 5**)



Esquema 5. Rutes sintètiques utilitzades per la Dra. Marta Martín-Vilà (en blau) i la Dra. Sandra Izquierdo (en vermell)

Els β -aminoàcids **9** i **14** han estat posteriorment incorporats en diferents tipus de β -pèptids. Per a la seva incorporació ha estat necessària la desprotecció selectiva dels grups funcionals.

En aquest sentit, en el nostre grup s'han dissenyat i estudiat estructuralment dos tipus de β -pèptids ciclobutànics. Així, s'han sintetitzat β -oligòmers que anomenem de *Tipus A*, formats per β -aminoàcids ciclobutànics alternats amb residus de β -alanina, i β -oligòmers de *Tipus B*, formats

Capítol 2: Antecedents

únicament per unitats de β -aminoàcids ciclobutànics directament unides entre sí. (**Figura 48**)

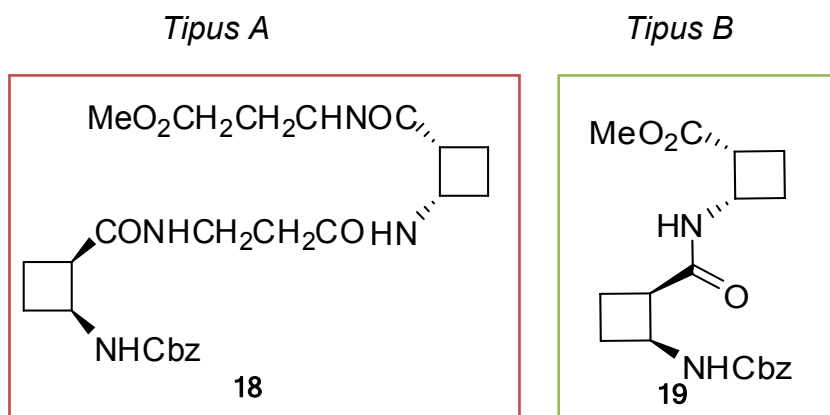
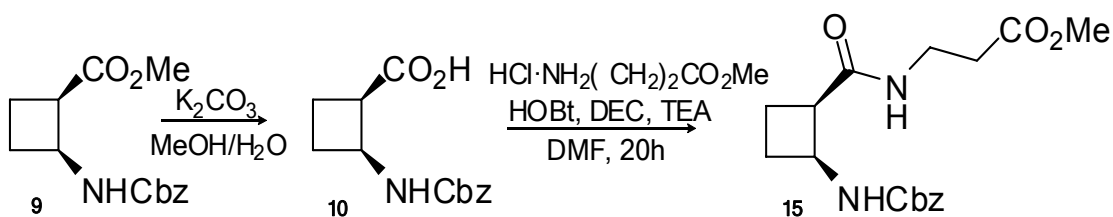


Figura 48. Famílies de β -aminoàcids ciclobutànics

2.2.1 Síntesi i estudi estructural de β -pèptids *Tipus A*

En primer lloc es va sintetitzar el β -dipèptid **15** mitjançant l'acoblament peptídic clàssic de l'àcid carboxílic **10**, provinent de la saponificació de l'èster metílic del monòmer **9**, amb el β -alaninat de metil.¹⁰¹ (**Esquema 6**)



Esquema 6

Aquest β -dipèptid **15** va resultar ser un sòlid cristal·lí del qual es va enregistrar el difractograma de raigs X i s'ha pogut observar com, segons la

¹⁰¹ Martín-Vilà, M.; Muray, E.; Aguado, G. P.; Álvarez-Larena, Á.; Branchadell, V.; Minguillón, C.; Giral, E.; Ortuño, R. M., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, *11*, 3569

disposició de les dues cadenes unides a l'anell ciclobutànic, aquest compost adopta una estructura tipus *agulla de cabell*. També s'ha de destacar el fet que a l'empaquetament cristal·lí s'observin enllaços d'hidrogen intermoleculars entre el NH del carbamat i el CO de l'enllaç peptídic. (**Figura 49**)

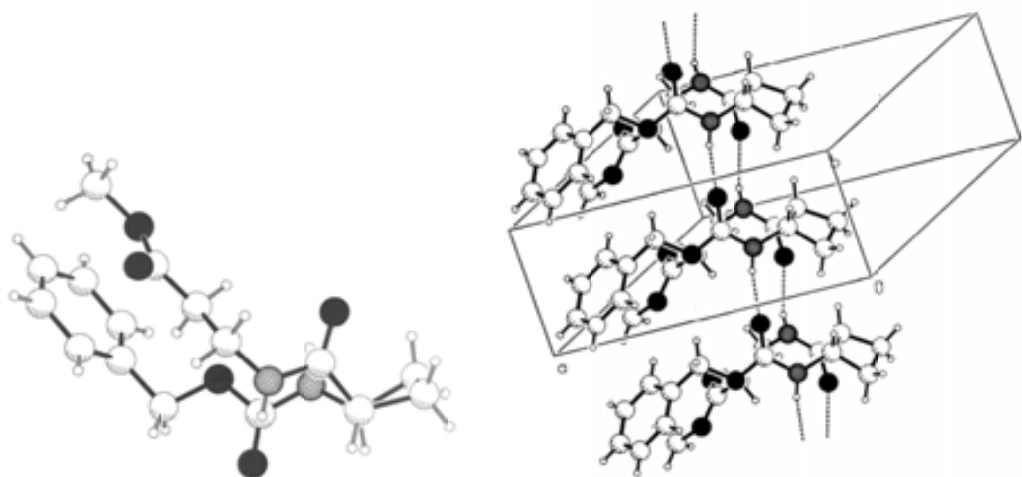


Figura 49. Monocristall (esquerra) i empaquetament cristal·lí del β -dipèptid **15**

Donats aquests resultats es va decidir continuar la síntesi i l'estudi estructural d'oligòmers d'aquesta mateixa sèrie però de mida superior. Així es va sintetitzar el tetrapèptid **18**. (**Figura 50**)

Davant la impossibilitat d'obtenir, en aquest cas, un monocristall adequat per a la difracció de raigs-X d'aquest tetrapèptid, la Dra. Sandra Izquierdo va realitzar un estudi estructural exhaustiu per RMN i càlculs teòrics.⁵⁷

Així doncs, per tal d'estudiar la tendència conformacional d'aquest compost en solució, es va realitzar la determinació dels coeficients de temperatura dels protons NH així com experiments de difusió, per determinar si aquests protons podien estar formant enllaços d'hidrogen intramoleculars en solució donant lloc a estructures secundàries definides.

D'altra banda es van realitzar càlculs teòrics per determinar entre quins àtoms es donava la formació d'enllaços d'hidrogen intramoleculars. Com a

Capítol 2: Antecedents

resultat d'aquests càlculs, es va observar que el NH_{10} forma enllaç d'hidrogen amb el OC_{25} la qual cosa va resultar indicatiu de la presència d'una estructura secundària tipus 14-hèlix. La dinàmica molecular va mostrar que es mantenia aquesta conformació en el temps. A més l'estructura optimitzada per DFT va donar una distància $NH_{10}-OC_{25}$ de 2.01 Å, perfectament compatible amb un enllaç d'hidrogen. (**Figura 50**)

Així, la conformació tipus 14-hèlix obtinguda mitjançant càlculs teòrics concorda perfectament amb el què s'havia observat experimentalment per RMN.⁵⁷

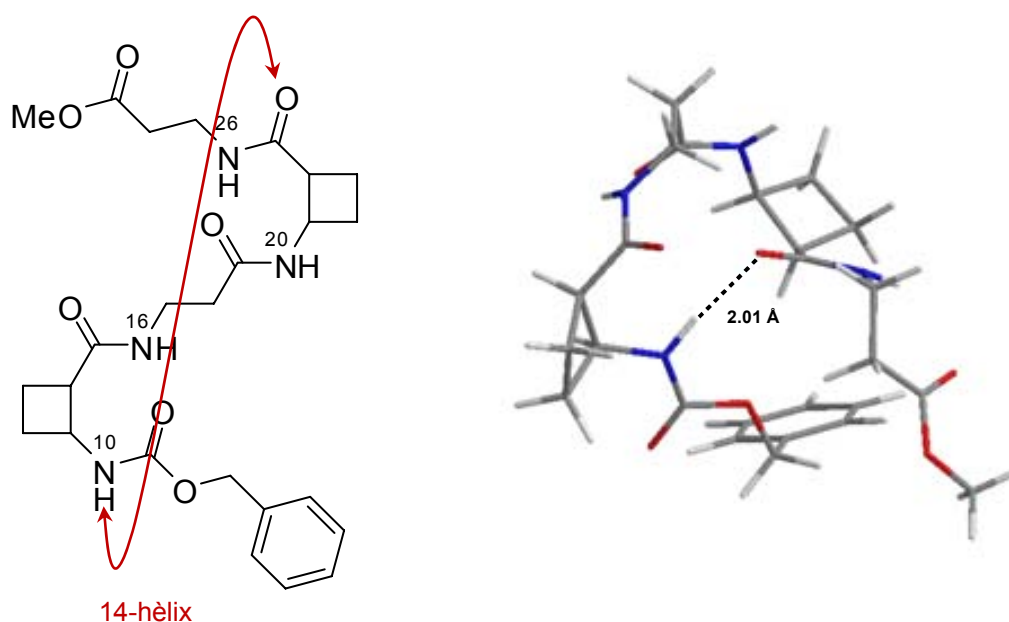


Figura 50. Representació de l'enllaç d'hidrogen (esquerra) i estructura optimitzada mitjançant càlculs B3LYP/6-31G(d) en el tetrapèptid **18**

Donat que l'anell ciclobutànic es perfilava com un molt bon inductor d'estructures secundàries (tipus hèlix), es va decidir continuar sintetitzant compostos β -peptídics formats exclusivament per unitats ciclobutàniques (*Tipus B*), per tal d'estudiar l'estabilització que l'anell ciclobutànic podia conferir als diferents sistemes.

Capítol 2: Antecedents

22b i **23**, segons els coeficients de temperatura obtinguts, sembla ser que tant els protons NH_{10} com els NH_{16} es troben formant enllaços d'hidrogen intramoleculars en solució de $CDCl_3$. Així, segons aquests resultats, tant el monòmer com els diferents β -dipèptids es trobarien formant una estructura secundària molt ben definida. La formació d'aquests enllaços d'hidrogen intramoleculars van quedar recolzats pel NOES inter-residuals observats entre cada protó amídic NH_{16} i els protons CH_{13} del ciclobutà veí. (**Figura 52**)

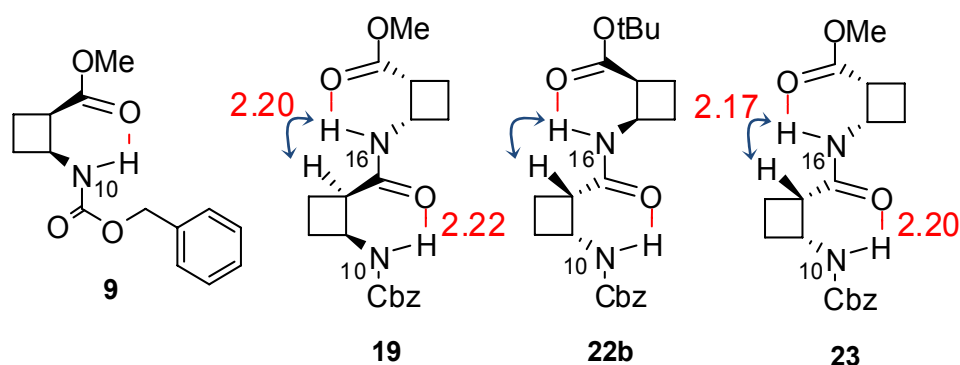


Figura 52. En blau es marquen els NOES observats i en vermell els enllaços d'hidrogen intramoleculars que s'observen així com els valors de les distàncies d'enllaç d'hidrogen obtingudes mitjançant càlculs teòrics.

També es van realitzar càlculs teòrics, per determinar les distàncies dels enllaços d'hidrogen (**Figura 52**).

Afortunadament, es van obtenir cristalls aptes per realitzar difracció de raigs-X d'aquests β -dipèptids. D'aquesta manera, es va poder determinar tant l'estructura molecular com l'empaquetament cristal·lí d'aquests compostos en estat sòlid. Aquests β -dipèptids presenten la formació d'enllaços intermoleculars on es troben involucrats els grups amida. Cada cadena conté dos jocs d'enllaços d'hidrogen antiparal·lels. (**Figura 53**)

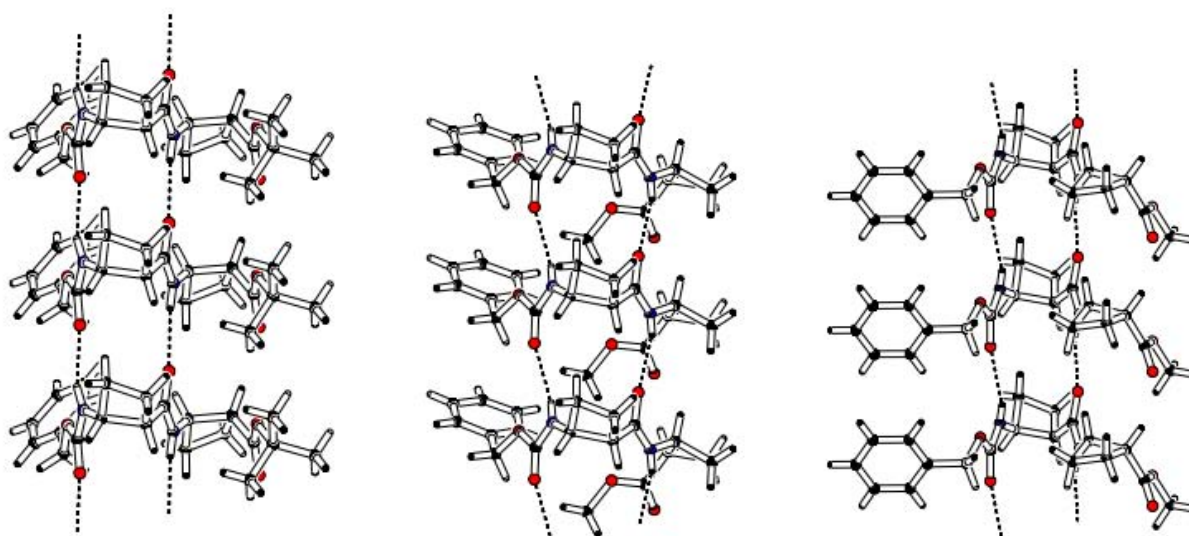


Figura 53. Vistes parcials dels β -dipèptids **19**, **22b** i **23**, respectivament, en les quals s'aprecien els enllaços d'hidrogen intermoleculars.

Així, en base a tots aquests resultats obtinguts, es va concloure que els β -dipèptids bis(ciclobutànics) presenten comportaments estructurals diferents depenent de si es troben en solució o en estat sòlid. D'aquesta manera es va observar la formació d'enllaços d'hidrogen intramoleculars en solució mentre que en estat sòlid s'observaren enllaços d'hidrogen intermoleculars entre les diferents cadenes.

Davant aquests resultats va semblar interessant realitzar la síntesi de β -pèptids d'aquesta mateixa sèrie de compostos, però de mida superior. Per tal de portar a terme el seu estudi estructural i comprovar si les característiques trobades pels dipèptids es mantenen en oligòmers superiors.

Amb aquests objectius, el Dr. Federico Rúa va sintetitzar i estudiar estructuralment el β -tripèptid ciclobutànic **26**, el β -tetrapèptid **29** i el β -octapèptid **33**, que es mostren a la **Figura 54**.

Una vegada sintetitzats el β -tripèptid **26** i el β -tetrapèptid **29** es van realitzar diferents experiments per tal de realitzar l'estudi estructural. Donat que no es van obtenir cristalls adequats per realitzar difracció de raigs-X

Capítol 2: Antecedents

l'estudi estructural es va realitzar només en solució (CDCl_3). Així, seguint la metòdica emprada per la Dra. Sandra Izquierdo, es va procedir a l'assignació completa dels senyals així com a la determinació dels coeficients de temperatura dels protons NH mitjançant RMN de ^1H , per tal d'investigar quins protons podrien trobar-se involucrats en la formació d'enllaços d'hidrogen intramoleculars.

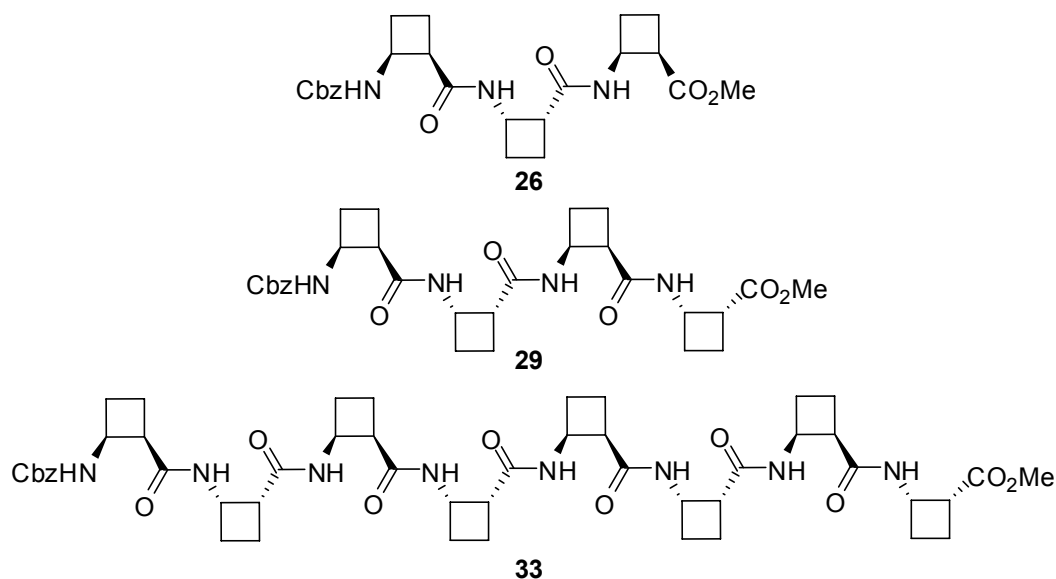


Figura 54

Així mateix, es van realitzar experiments de NOESY ^1H - ^1H i es van observar NOES inter-residuals entre els protons NH en qüestió i els protons alfa-carbonílics del residu adjacent. També es van realitzar experiments DOSY per tal de determinar els coeficients de difusió.

A la vista de tots els resultats obtinguts mitjançant els experiments de RMN es va arribar a una mateixa conclusió. Tot semblava indicar que la conformació més estable d'aquests compostos en solució era una conformació estesa on els NH 's, tant del tripèptid **26** com del tetrapèptid **29**, es trobaven formant enllaços d'hidrogen intramoleculars, donant lloc així a anells de 6 baules. (Figura 55)

En el cas de l'octapèptid **33** aquests experiments no es van poder dur a terme donada la complexitat de l'espectre de RMN de ^1H .

Una vegada realitzats tots els experiments de RMN adients es va procedir a la cerca conformational mitjançant càlculs teòrics. D'aquesta manera, es va obtenir com a confòrmers més estables unes estructures del tripèptid i del tetrapèptid on aquests adquirien una conformació estesa, que es podria classificar segons la bibliografia,¹⁰² com estructura *tipus cinta no polar*.

També, es van determinar les distàncies d'enllaç d'hidrogen així com les distàncies H-H determinades a partir dels NOES (en Å) d'aquestes conformacions. (**Figura 55**) Cal destacar que els resultats obtinguts mitjançant mètodes teòrics presentaven una excel·lent correlació amb els resultats obtinguts per RMN.

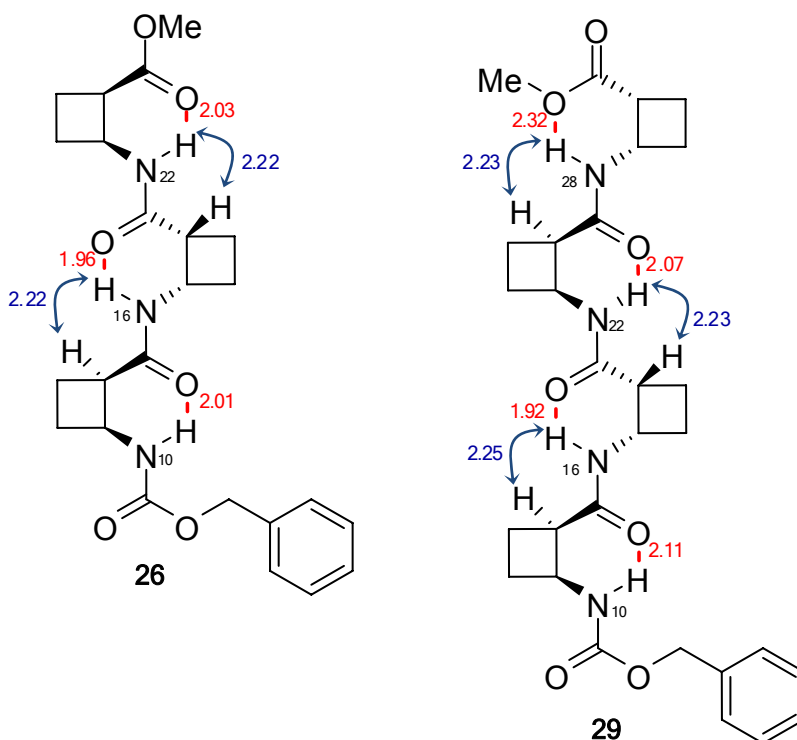


Figura 55. En blau es marquen els NOES observats i en vermell els enllaços d'hidrogen intramoleculars que s'observen així com els valors de les distàncies d'enllaç d'hidrogen obtingudes mitjançant càlculs teòrics.

¹⁰² Fülöp, F.; Martinek, T. A.; Tóth, G. K., *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 323-334

Capítol 2: Antecedents

En el cas de l'octapèptid també es va realitzar la cerca conformacional amb el mateix mètode però, en aquest cas sembla que aquesta molècula no seguia el mateix patró que el tripèptid **26** i el tetrapèptid **29**. (**Figura 56**)

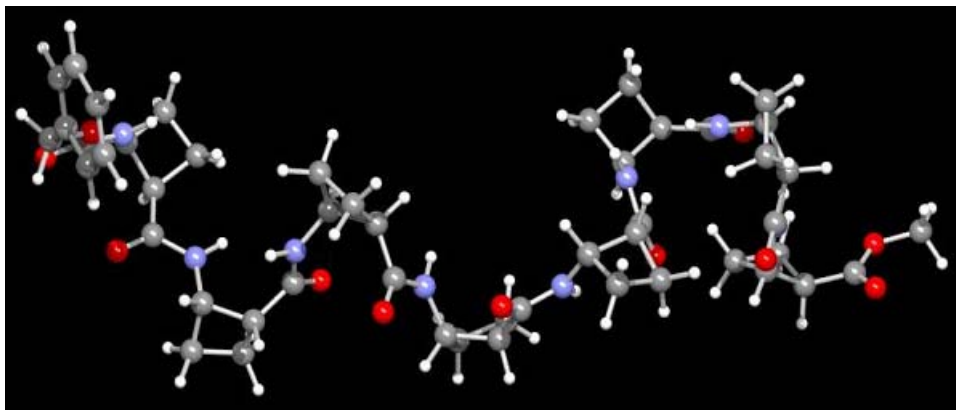


Figura 56. Conformer més estable trobat per l'octàmer **33**

És per aquest motiu que en el nostre grup de recerca es va plantejar la necessitat de sintetitzar un oligòmer de mida inferior a l'octàmer que resultés més fàcil d'estudiar, tant per RMN com per càlculs, i que pogués confirmar i/o justificar el comportament observat en el cas de l'octàmer.

Donat que el tetràmer **29** es va estudiar àmpliament en solució (RMN, càlculs teòrics), es va pensar que aquest compost era el més adequat per ésser estudiat també a nivell supramolecular ja que presenta quatre unitats monomèriques, i semblava més fàcil que donés lloc a estructures terciàries ben definides pel fet de tenir una llargada superior al β -dipèptid **19** i β -tripèptid **26**.

Per tant, es va realitzar l'estudi estructural del β -tetrapèptid **29** mitjançant Microscòpia Electrònica de Transmissió (TEM) i Microscòpia de Força Atòmica (AFM).

De l'estudi del tetràmer mitjançant TEM es van obtenir imatges on s'aprecia la formació d'estructures fibril·lars d'amplada constant (23-25nm), les quals augmentaven la seva llargada amb el temps d'incubació. (**Figura 57**)

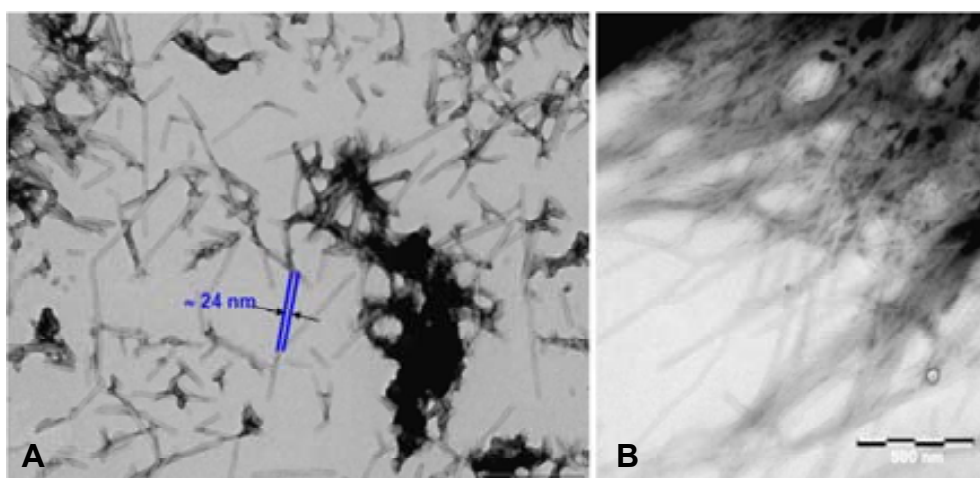


Figura 57. Imatge **A** solució 1mM en 24h de incubació. Imatge **B** solució 1mM després d'una setmana de incubació. (Reixeta de coure coberta amb un film de carboni i tenyit amb acetat d'uranil al 2%)

Per continuar amb aquest estudi es va utilitzar l'AFM, tècnica que permet determinar l'alçada dels agregats sobre una superfície que en aquest cas és mica. Així es va poder determinar que l'alçada dels agregats de les solucions més diluïdes eren de 2.2 nm d'alçada aproximadament.¹⁰³ (**Figura 58**)

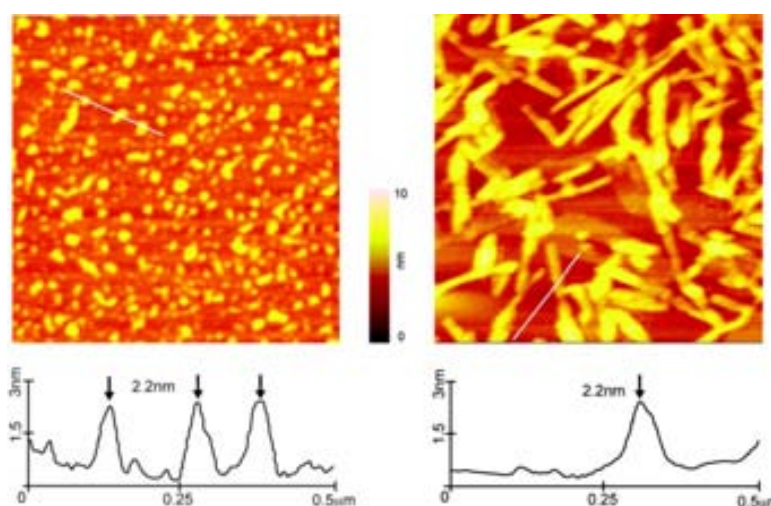


Figura 58. **A)** Imatge obtinguda amb mode *tapping* del tetramer d'una solució 50 μM en MeOH acabada de preparar **B)** Imatge obtinguda amb mode *tapping* d'una solució 50 μM després de 24 h de incubació.

¹⁰³ Rúa, F.; Bousert, S.; Parella, T.; Díez-Pérez, I.; Branchadell, V.; Giral, E.; Ortuño, R. M., *Org. Lett.*, **2007**, 9, 3643

Capítol 2: Antecedents

Aquestes dades determinades experimentalment tenen molt bona concordança amb els paràmetres obtinguts mitjançant càlculs teòrics DFT sobre les dimensions moleculars del tetràmer. (**Figura 59**)

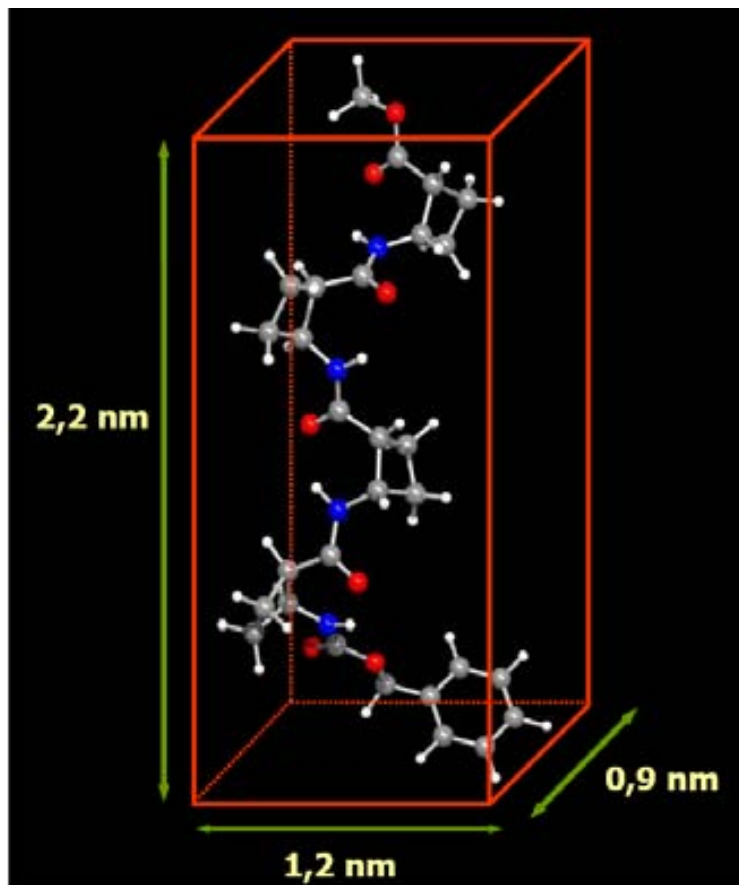


Figura 59. Dimensions moleculars del tetràmer dins d'un prisma tenint en compte els radis de Van der Waals.

D'altra banda, per tal de justificar els agregats que s'observen per AFM de mida superior (> 2.2 nm) a temps d'incubació més grans, es va plantejar una hipòtesi segons la qual les molècules s'anirien depositant amb el temps, una sobre l'altra formant una estructura tipus piramidal tal i com es mostra a la **Figura 60**.

Així, segons aquest model, quedaria justificat el fet de veure agregats d'alçada superior per a temps d'incubació més llargs ja que el que estariem veient seria $n \times 2.2$ nm, depenent n del temps d'incubació.

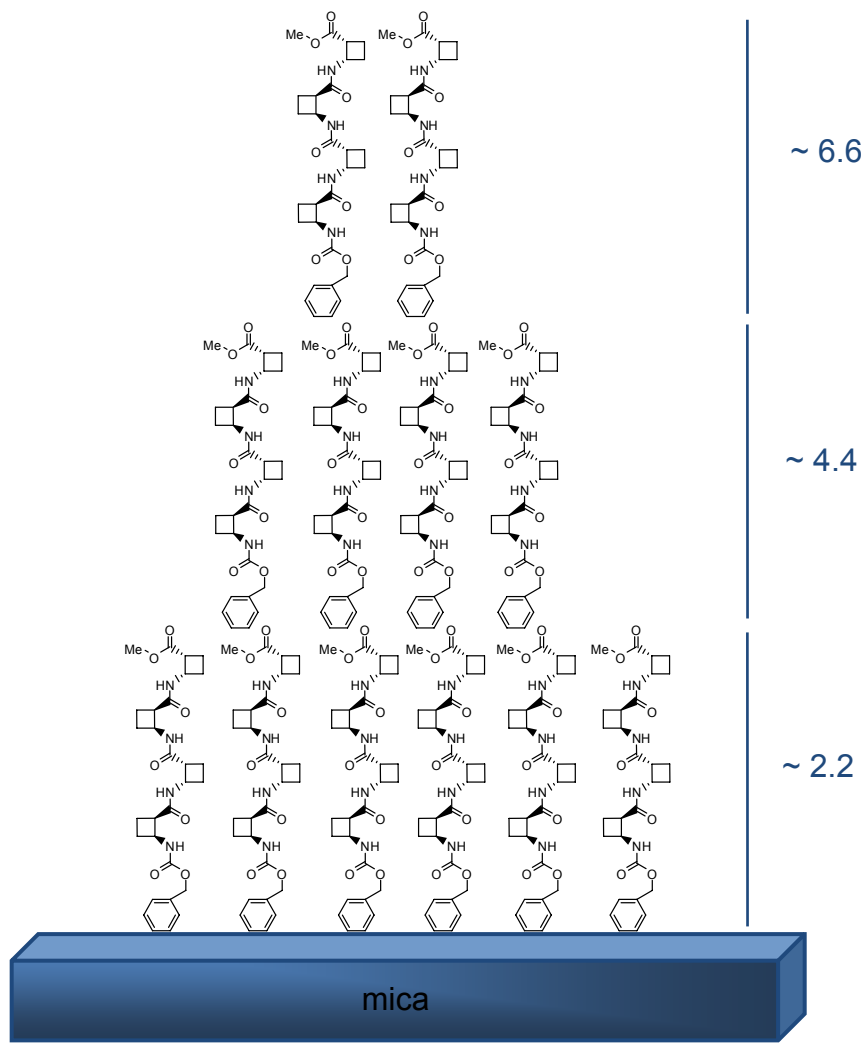


Figura 60. Model per la formació d'agregats de mida superior

Cal esmentar que també es va observar la formació d'un gel per part del tetràmer **29** en una solució 1 mM d'acetat d'etil:hexà 3:2. Un resultat similar es va obtenir també amb una solució 1mM d'acetona:hexà 3:1 essent però, en aquest cas, menys estable.¹⁰³

En el cas de l'octàmer, tot i tenir problemes per dur a terme la seva purificació, també es va realitzar un estudi supramolecular mitjançant TEM, seguint el mateix protocol.

Capítol 2: Antecedents

Així, es van realitzar mesures d'una solució d'aquest compost en una solució 0.5 mM en metanol després d'un dia d'incubació i es van obtenir les imatges que es mostren a la **Figura 61**.

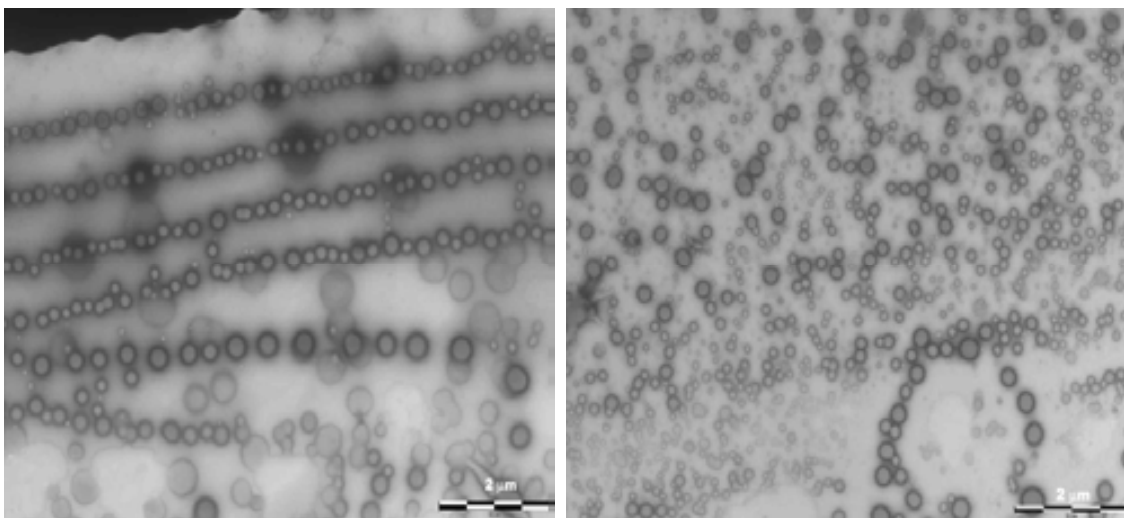


Figura 61. Imatges TEM de l'octàmer **33** 0.5 mM després de 24 h de incubació

Com es pot observar a la **Figura 60**, els agregats eren vesiculars i presentaven diferents mides variant el diàmetre entre 70 i 360 nm. D'aquesta manera, es va arribar a la conclusió que l'octàmer **33** presentava un comportament diferent del tetràmer, ja que donava lloc a estructures terciàries completament diferents.

Davant de tots aquests resultats obtinguts, es va creure convenient sintetitzar i estudiar el β -hexàmer d'aquesta mateixa sèrie d'oligòmers amb la idea de clarificar el diferent comportament observat per part del β -octàmer **33**. Així, es podria estudiar si el β -hexàmer suposa un punt d'inflexió en el diferent comportament supramolecular observat entre el tetràmer **29** i l'octàmer **33**.

2.3 Objectius

Tenint en compte els treballs, realitzats en el nostre laboratori, sobre la síntesi i l'estudi estructural de β -pèptids bis(ciclobutànics) iniciats per la Dra. Sandra Izquierdo i posteriorment pel Dr. Federico Rúa, per aquesta part de la Tesi Doctoral s'han plantejat els següents objectius:

- Síntesi del β -hexapèptid ciclobutànic que conté sis residus ciclobutànics acoblats directament.

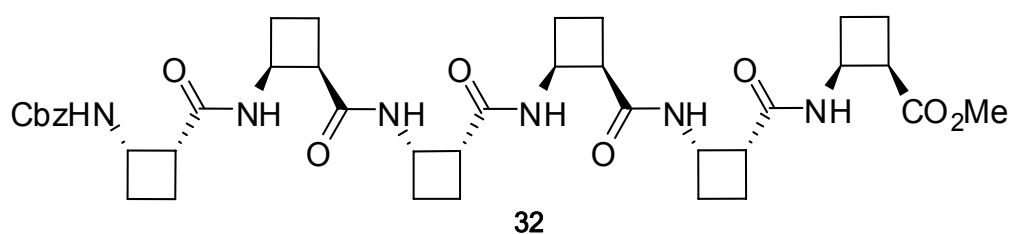


Figura 62. β -oligòmer objectiu de la síntesi, **32**

- Estudi estructural en solució de les estructures secundàries del β -hexapèptid ciclobutànic mitjançant tècniques de RMN i DC.
- Estudi conformacional teòric del β -hexapèptid ciclobutànic, així com de tots els β -oligòmers de la sèrie anteriorment sintetitzats.
- Estudi supramolecular del β -hexapèptid, així com dels β -oligòmers de la sèrie poli(ciclobutànica) de mida inferior (β -dipèptids diferentment substituïts i β -tripèptid), mitjançant TEM per tal de poder comparar el comportament de tota la sèrie de β -oligòmers *cis*.

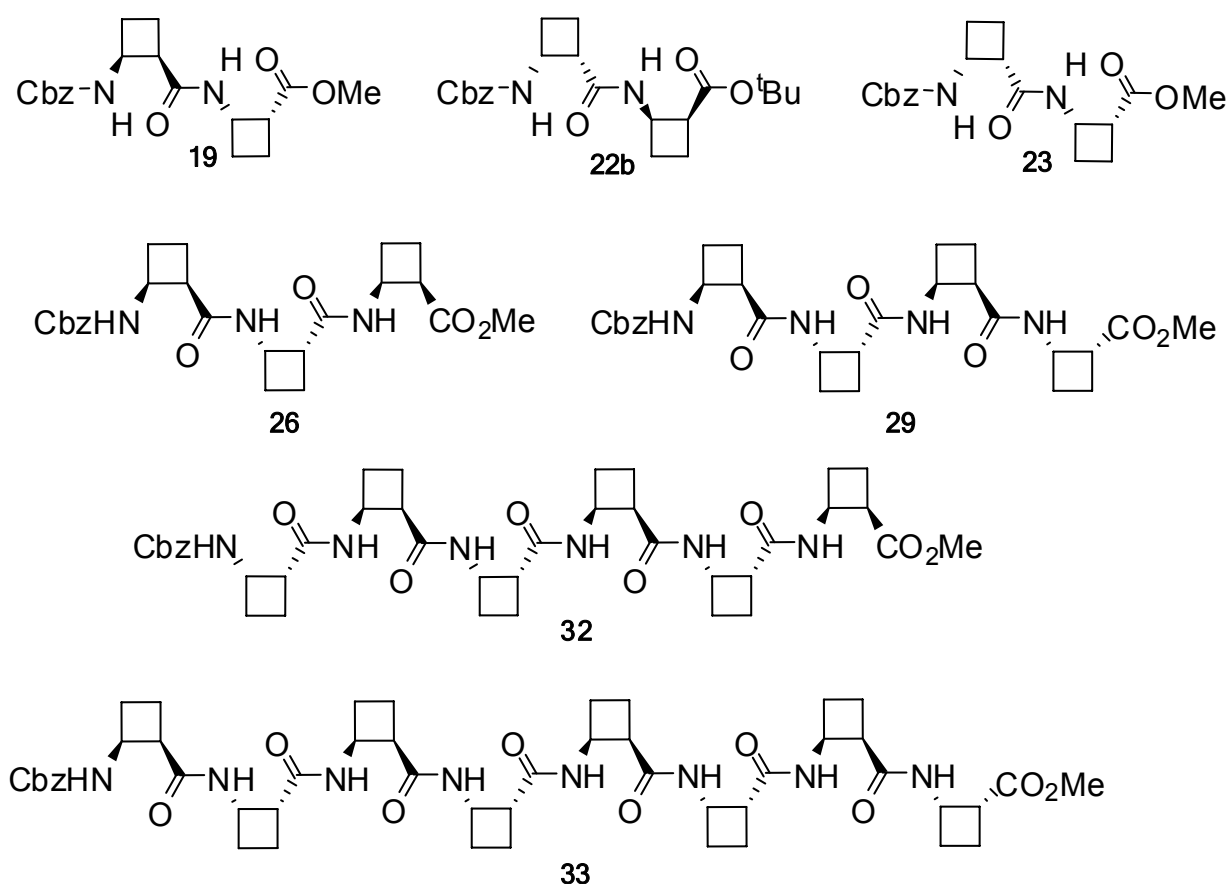


Figura 63. β -oligòmers de *Tipus B* proposats per realitzar l'estudi supramolecular mitjançant tècniques microscòpiques.

- Estudi estructural del β -tetrapèptid **29** mitjançant *Scanning Polarization Force Microscopy* (SPFM) per obtenir més dades sobre els agregats anteriorment observats.
- Estudi, mitjançant càlculs teòrics, de l'empaquetament de la sèrie d'oligòmers *cis*-poli(ciclobutànics) que donen lloc a estructures terciàries *fibril·lars* per tal de proposar un model per explicar l'auto-assemblatge.

2.4 Resultats i discussió

En base als objectius plantejats i per tal d'estructurar tots els resultats obtinguts, aquest capítol es dividirà en diferents apartats.

D'una banda es presentaran els resultats corresponents a la síntesi del β -hexapèptid ciclobutànic **32**, i d'altra banda, es comentarà detalladament l'estudi estructural en solució d'aquest β -hexàmer realitzat mitjançant tècniques de RMN. (**Figura 62**)

Seguidament es passarà a comentar l'estudi conformacional teòric dels β -oligòmers de tota la sèrie *cis*-poli(ciclobutànics), així com l'estudi supramolecular d'aquests mitjançant TEM. (**Figura 63**)

I finalment es passarà a comentar els resultats obtinguts de l'estudi mitjançant SPFM del β -tetrapèptid **29**. (**Figura 64**)

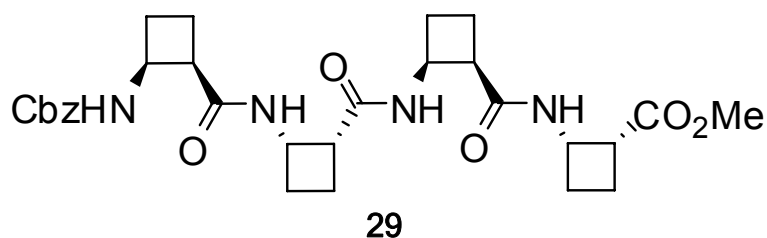
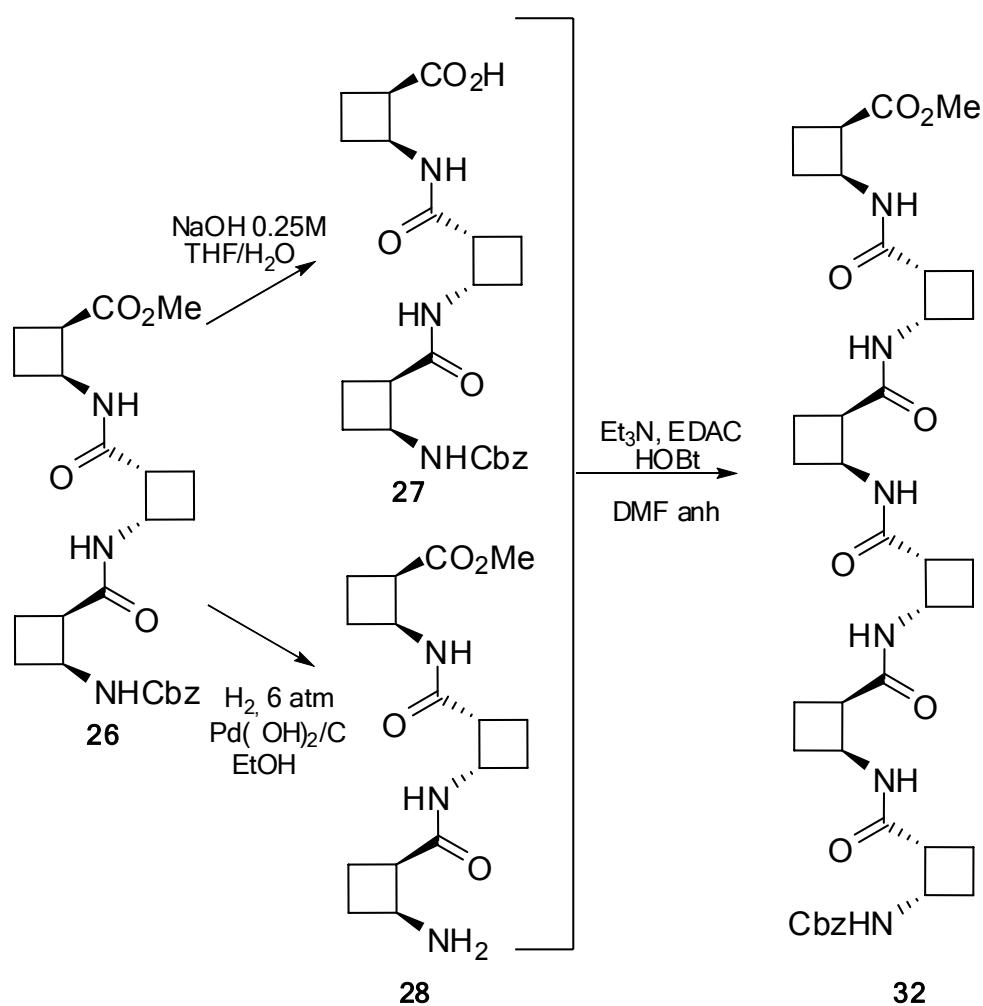


Figura 64. β -tetràmer sotmès a *Scanning Polarization Force Microscopy* (SPFM)

2.4.1 Síntesi del β -hexapèptid **32**.

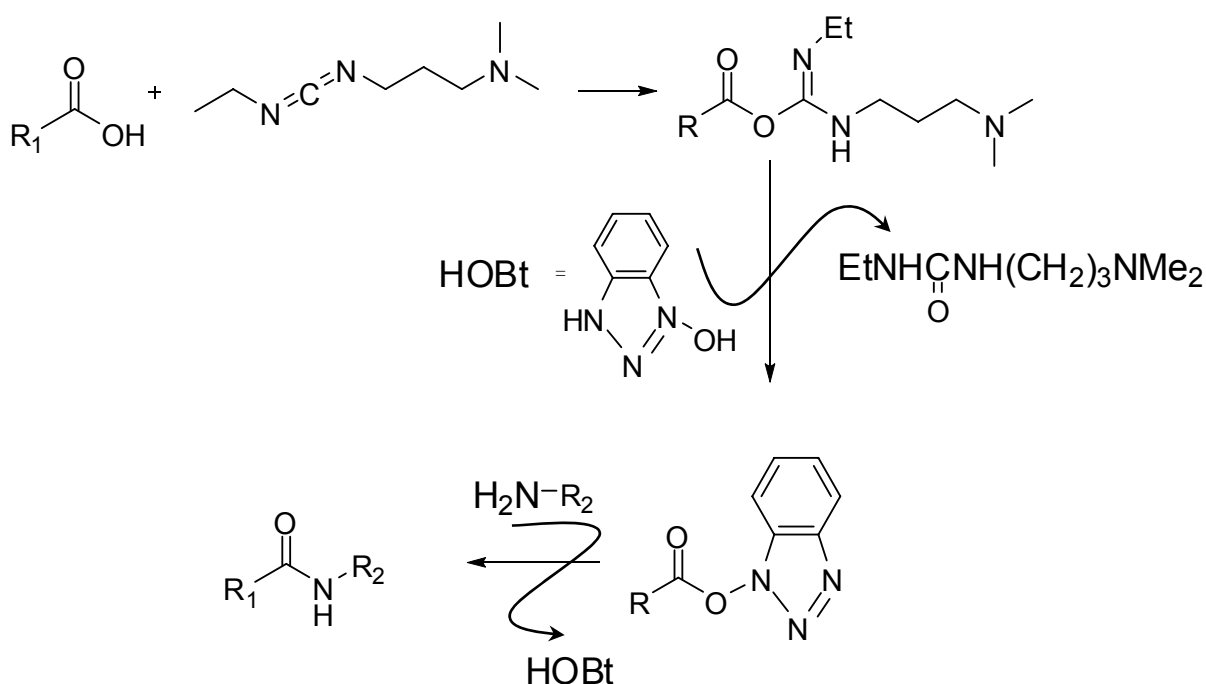
Per tal de sintetitzar el β -hexapèptid **32** s'ha utilitzat una ruta convergent. Així doncs, l'hexàmer **32** s'ha obtingut mitjançant un acoblament peptídic clàssic entre l'àcid **27** i l'amina **28**, provinents de la desprotecció selectiva dels grups funcionals del tripèptid **26**.

Així, per dur a terme aquest acoblament peptídic s'ha utilitzat una metodologia habitual en el nostre grup de recerca que consisteix en portar a terme la reacció en el si de DMF, en presència de EDAC com a agent deshidratant, utilitzant el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) com a catalitzador i a temperatura ambient, en aquest cas deixant-la reaccionar durant 20 dies sota atmosfera de nitrogen. D'aquesta manera s'ha obtingut el producte desitjat amb un 45% de rendiment. (**Esquema 7**)



Esquema 7

Amb anterioritat, en el nostre grup s'havia utilitzat àmpliament la dicitclohexilcarbodiimida (DCC) però la dificultat d'eliminar la seva urea resultant ha fet que optéssim per la utilització de la EDAC. Aquesta variant millora el mètode de la DCC ja que la urea resultant s'elimina fàcilment fent rentats amb aigua, obtenint-se així un cru de reacció lliure de impureses. El mecanisme de la reacció que té lloc durant l'acoblament peptídic es mostra a l'**Esquema 8**.



Esquema 8. Mecanisme de la reacció de formació de l'enllaç peptídic en presència de EDAC i HOBt

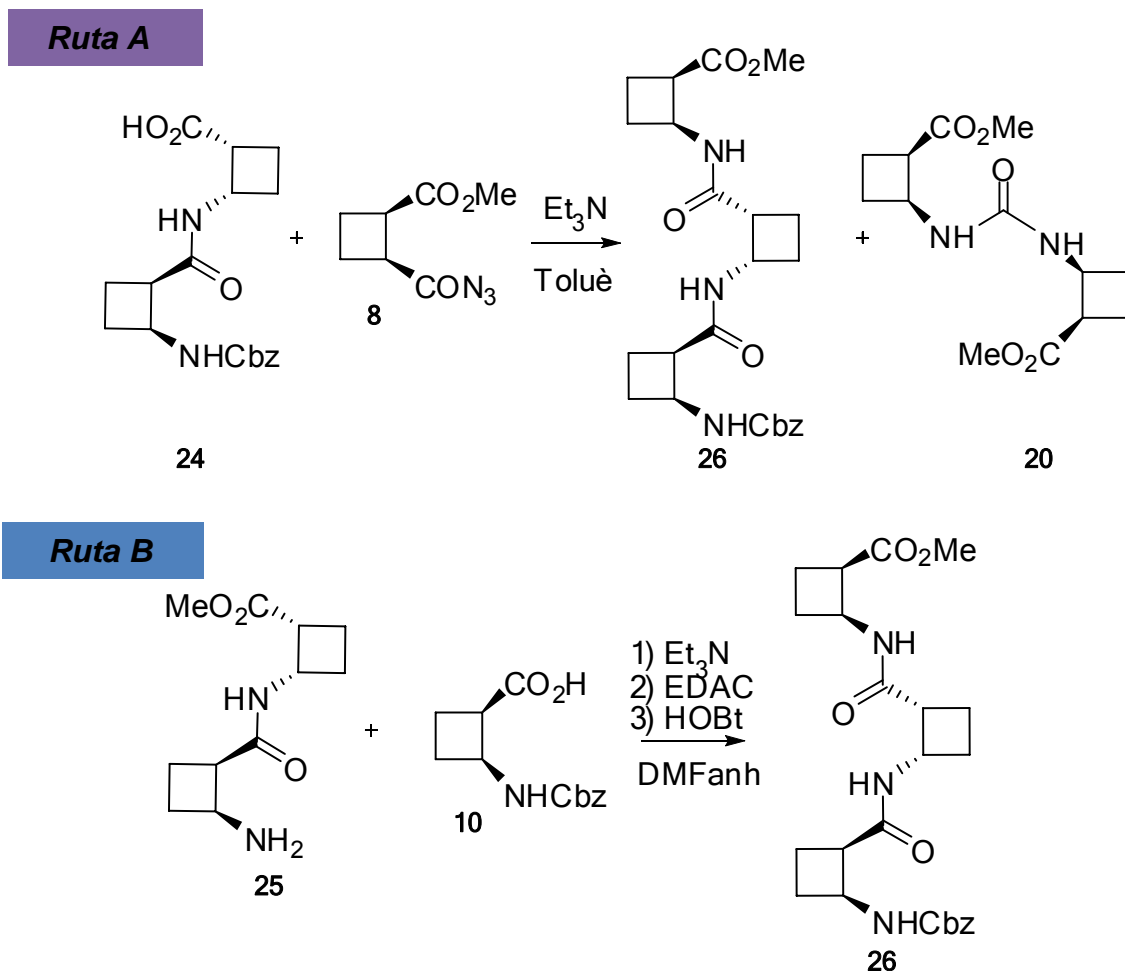
Per a l'obtenció de l'àcid **27** es saponifica el trímer **26** sota condicions suaus utilitzant una solució 0.25M de NaOH en el si d'una barreja de THF/ H_2O a $0^\circ C$ i així, passades 4h i 30 min s'obté l'àcid **27** amb un rendiment del 70%, sense epimerització. Altrament, es desprotegeix el carbamat de benzil del trímer **26** hidrogenant la mostra a una pressió de 6 atm i s'obté, passades 12 hores, l'amina lliure **28** de forma quantitativa. S'ha de remarcar que, donada la inestabilitat intrínseca dels compostos **27** i **28**, aquests van ser utilitzats

Capítol 2: Ruta sintètica

directament sense purificació addicional, essent però controlats per RMN de ^1H per tal de verificar la seva identitat.

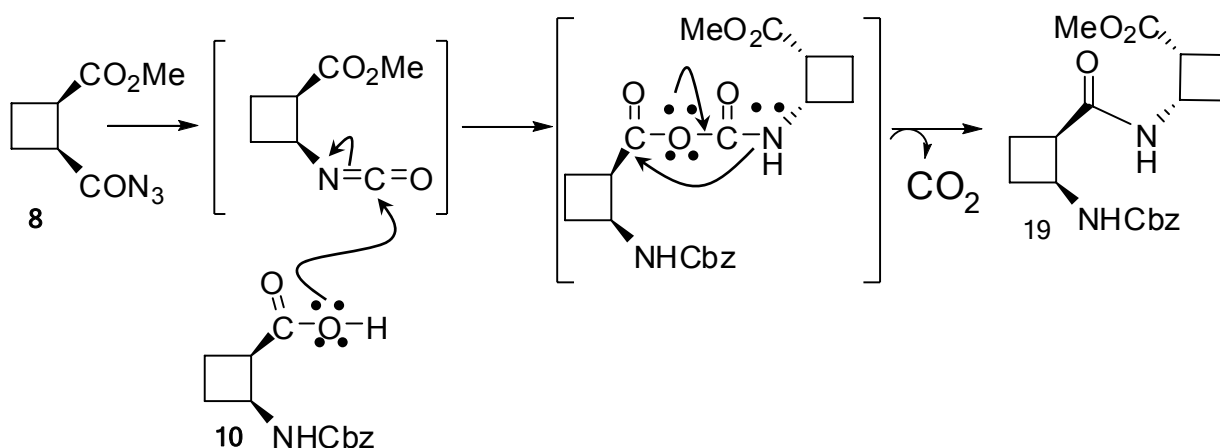
Per a l'obtenció del β -tripèptid **26** es van provar dues rutes sintètiques diferents.

En la primera ruta (*Ruta A*), es va utilitzar una transposició de Curtius per a l'obtenció del trimer **26** però, degut a l'obtenció d'una urea **20** com a producte secundari en una proporció important, es va optar per provar una segona ruta que evités la formació d'aquest producte secundari indesitjat. Així, en aquesta segona ruta (*Ruta B*) es va obtenir el trimer **26** mitjançant un acoblament peptídic clàssic. (**Esquema 9**)



Donat que el rendiment obtingut en la *Ruta A* va ser del 51.5% i el de la *Ruta B* només del 40%, es va decidir continuar sintetitzant el trímer mitjançant la *Ruta A* tot i obtenir la urea **20**, com a subproducte, en una proporció important (46%). Aquest producte secundari indesitjat en aquell moment, ha estat objecte d'un ampli estudi estructural, tal i com es mostrarà en posteriors capítols d'aquesta Tesi Doctoral.

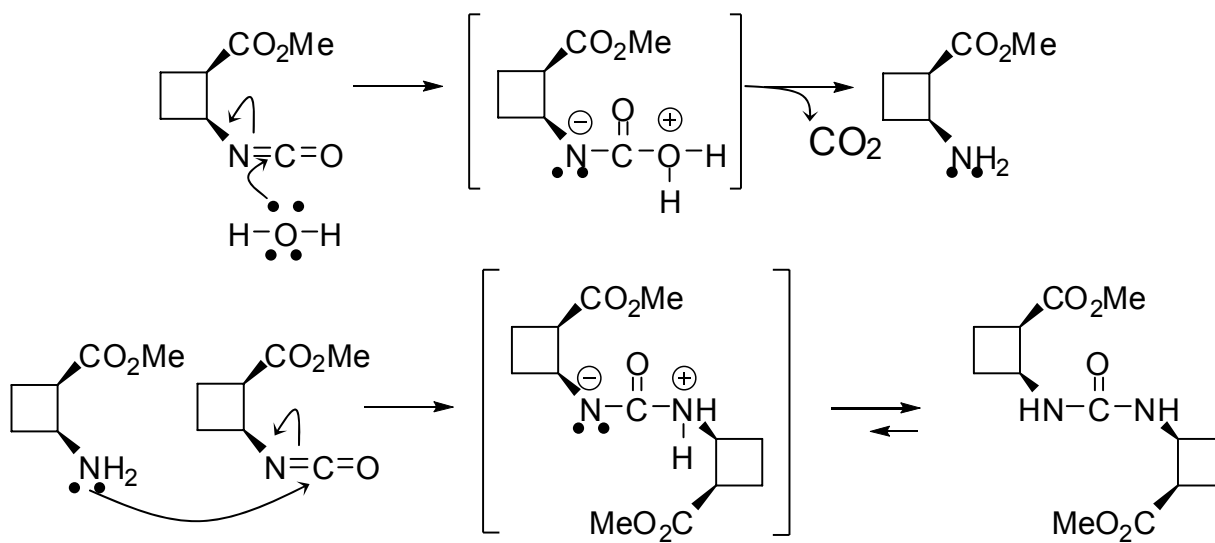
El mecanisme de la reacció de transposició de Curtius per a l'obtenció del tripèptid **26** (*Ruta A*), es mostra a l'**Esquema 10**.



Esquema 10. Mecanisme de la reacció de transposició de Curtius

L'aparició d'urees com a subproductes en les transposicions de Curtius ja s'havia observat amb anterioritat en el nostre grup de recerca.⁵¹ La formació de la urea **20** durant la transposició es justifica segons el mecanisme que es mostra a la l'**Esquema 11**, on juga un paper clau l'aigua present en el dissolvent.

Així, segons aquest mecanisme proposat, la urea procediria de l'atac de l'amina resultant de la hidròlisi d'una molècula d'isocianat, sobre una altra molècula d'isocianat (**Esquema 11**). Aquesta hidròlisi resulta inevitable tot i treballar amb dissolvent anhidres i en condicions inerts de reacció (atmosfera de nitrogen sec).



Esquema 11. Mecanisme de la reacció de formació d'urea

2.4.2 Estudi estructural del β -hexapèptid **32**

I. Estudi estructural del β -hexapèptid mitjançant RMN

Una vegada sintetitzat l'hexàmer **32**, i un cop purificat convenientment, s'ha procedit a la caracterització completa d'aquest així com a l'assignació dels senyals obtinguts a l'espectre de RMN- ^1H . La caracterització d'aquest producte s'ha dut a terme en CDCl_3 . (Veure *Annex 3: Experiments de RMN*) Així, s'ha obtingut l'espectre que apareix a la **Figura 65** totalment assignat.

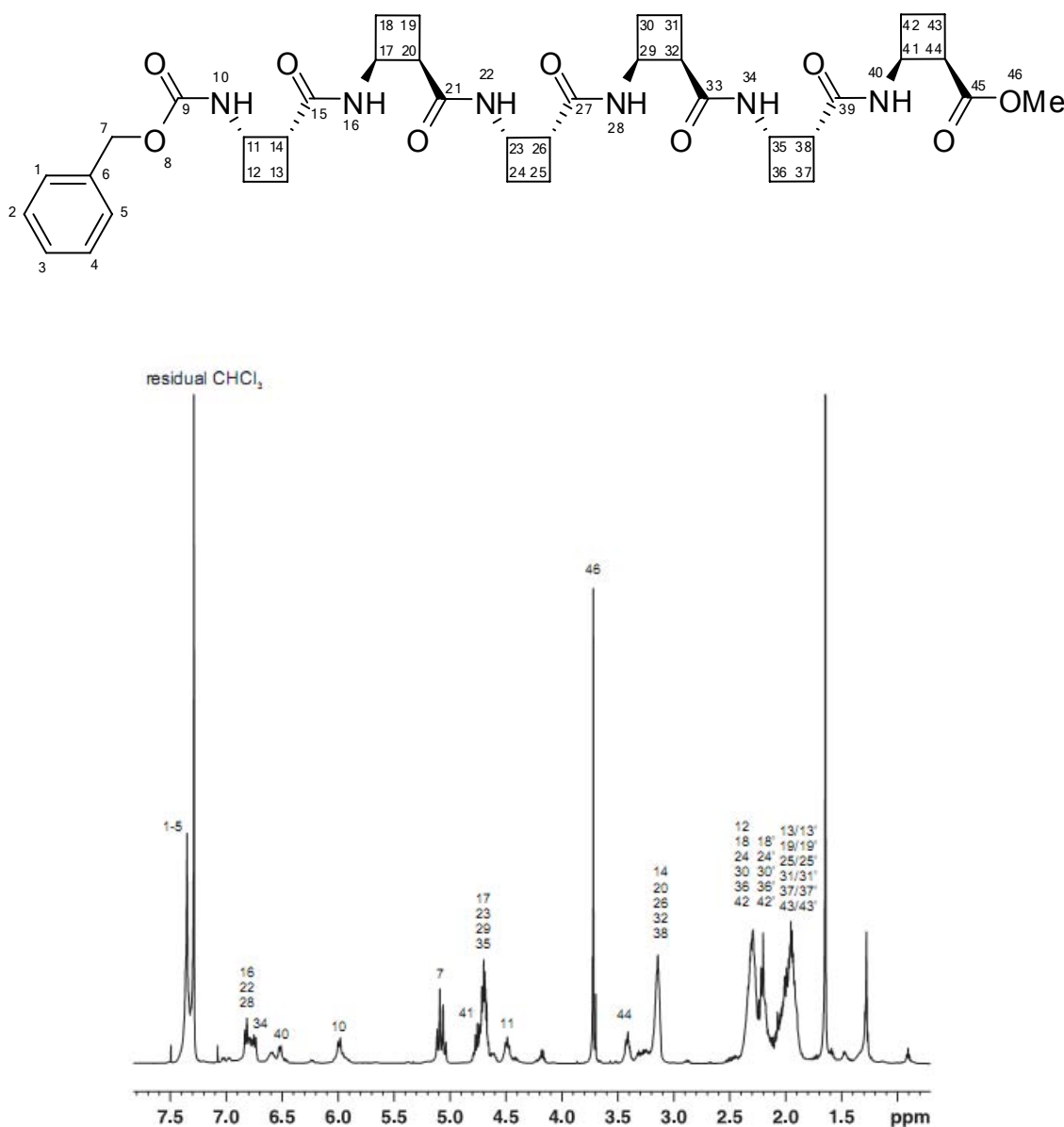


Figura 65. Espectre de RMN- ^1H en CDCl_3 del β -hexàmer **32**, la seva assignació i numeració dels àtoms

Capítol 2: Estudi estructural en solució

L'elucidació de l'espectre que es mostra a la **Figura 65** no ha estat trivial ja que, com pot observar-se, aquest espectre presenta moltes zones on hi ha solapament de senyals. Per exemple, el multiplet a 6.73-6.83 ppm corresponent als NH's, la zona entre 3.00-3.50 ppm corresponent als protons alfa-carbonílics i els senyals entre 4.30-4.80 ppm corresponents als protons alfa-nitrogen. Aquest mateix problema de solapament de senyals es va trobar en l'assignació dels protons alfa-carbonílics, així com en l'assignació dels protons alfa-nitrogen.

És per aquest motiu que, en col·laboració amb el Dr. Pau Nolis del Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la Universitat Autònoma de Barcelona, s'han realitzat tota una sèrie d'experiments mono- i bidimensionals per assignar les senyals de l'hexàmer **32**.

Primerament, per assignar cada NH s'han realitzat experiments 2D de NOESY ^1H - ^1H . Aquest experiment permet comprovar la proximitat espacial entre els protons NH i els protons alfa-carbonílics i alfa-nitrogen del residu adjacent, és a dir, utilitzant aquest experiment és possible confirmar l'existència de NOES inter-residuals. Així, s'ha pogut assignar el senyal que apareix a 6.00 ppm com el senyal corresponent al NH_{10} , ja que com es pot observar a la **Figura 66** i a la **Figura 67** el NH_{10} no presenta NOE inter-residual, de manera que pot assignar-se com el NH de l'extrem del carbamat de benzil. D'altra banda, el NH_{40} s'ha assignat per correlació amb els espectres obtinguts en el cas del tetràmer **29**.

Una vegada assignats aquests dos senyals es continua amb l'assignació mitjançant el TOCSY i NOES selectius.

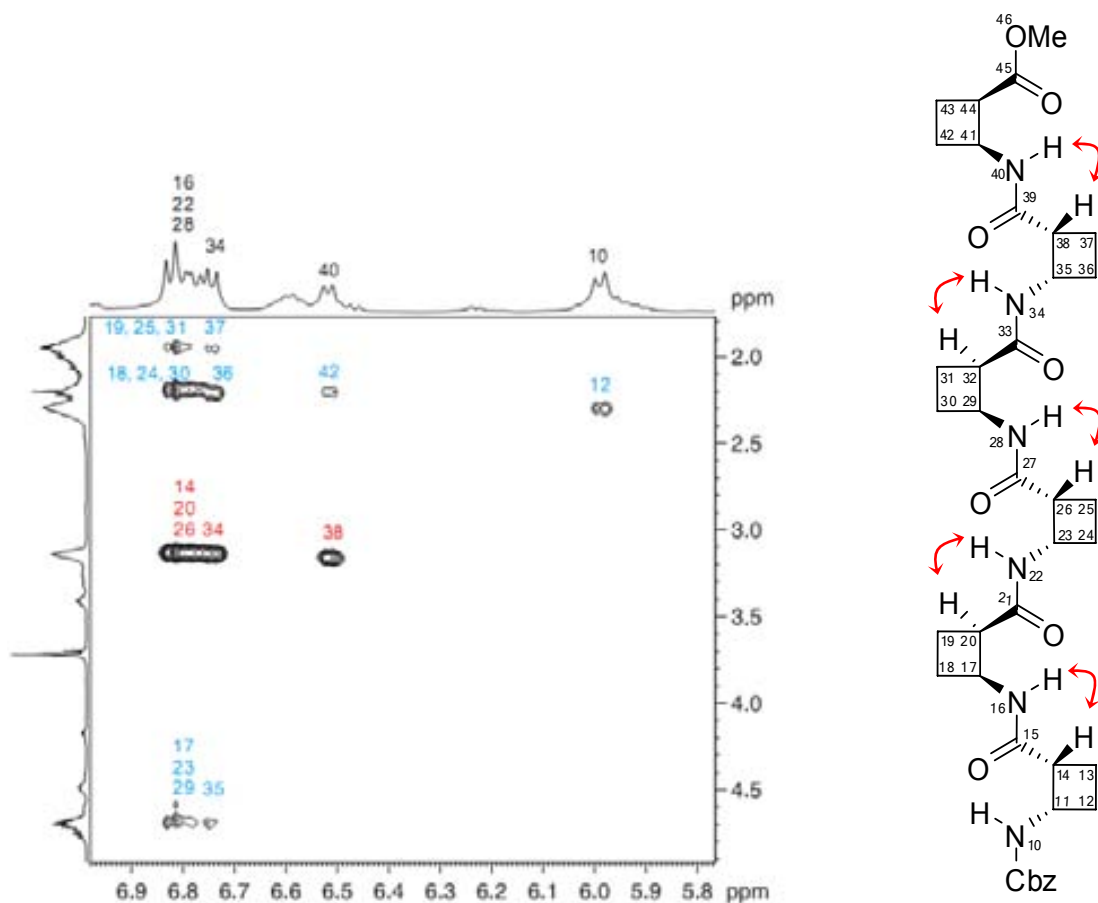


Figura 66. Espectre 2D NOESY ^1H - ^1H (temps de mescla de 500 ms) de l'hexàmer **32** ampliat a la zona dels NH. En blau i vermell es mostren els NOES intra- i inter-residuals, respectivament.

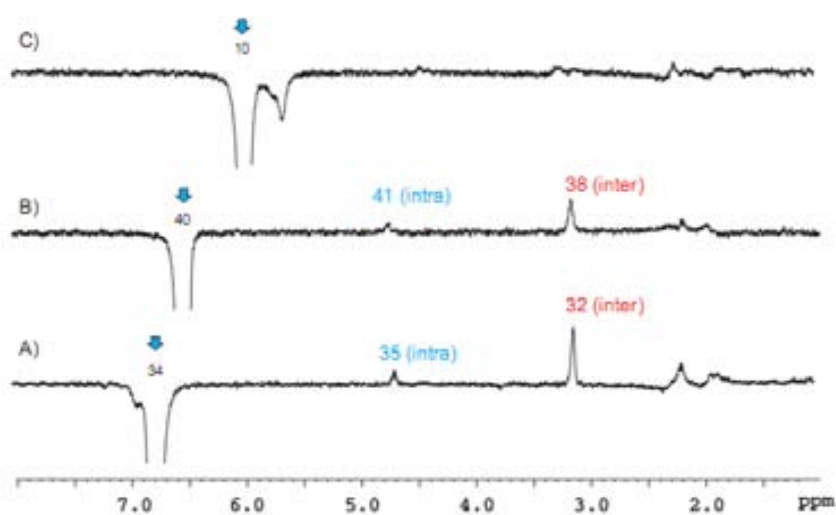


Figura 67. Experiments de NOESY 1D irradiant els protons NH amb un temps de mescla de 500 ms. En blau i vermell es troben marcats els residus intra- i inter-residuals respectivament. **A)** Irradiació selectiva del NH_{34} . S'observa un NOE fort inter-residual amb el H_{32} . **B)** Irradiació selectiva del NH_{40} . S'observa un NOE fort inter-residual amb el H_{38} . **C)** Irradiació selectiva del NH_{10} . No s'observa NOE inter-residual.

L'experiment de TOCSY selectiu és un experiment monodimensional que consisteix en irradiar selectivament un protó, en el nostre cas els NH, per tal de saber quins senyals corresponen als protons del mateix residu que el NH irradiat. Això es produeix perquè en excitar selectivament un NH, la magnetització es transfereix a tot el seu subsistema donant la connectivitat ^1H - ^1H mitjançant un acoblament en cadena.

D'aquesta manera, l'experiment de TOCSY (**Figura 68**) conjuntament amb el NOE selectius monodimensionals (**Figura 67**) han permès assignar tres dels sis residus del compost **32** ja que, malauradament, en el nostre cas, només s'ha pogut excitar selectivament 4 dels 6 residus, tot i així únicament s'han pogut assignar 3 dels 6 residus de manera inequívoca.

A la **Figura 68**, on es mostren els espectres de TOCSY selectius, es pot observar com el NH_{10} , marcat a la **Figura 68** amb un asterisc **lila**, i el NH_{40} , marcat a la **Figura 67** amb un asterisc **verd**, s'han irradiat selectivament sense cap complicació i s'han pogut identificar els senyals que corresponen als protons del mateix residu.

Així, en el cas del NH_{10} s'ha pogut determinar que el senyal a 4.49 ppm correspon al CH_{11} , el senyal de 3.15 ppm al CH_{14} i els senyals que apareixen en l'interval de 1.90-2.34 ppm corresponen als protons ciclobutànics d'aquest residu $H_{12/12'}$ i $H_{13/13'}$. De la mateixa manera, en irradiar el NH_{40} s'ha determinat que el multiplet que apareix a 4.75 ppm correspon al CH_{41} , el senyal de 3.42 ppm correspon amb el CH_{44} i els multiplets que apareixen en un rang de 2.33-2.05 correspon als protons $H_{42/42'}$ i $H_{43/43'}$.

D'altra banda, de la irradiació selectiva del NH_{34} , marcat a la **Figura 68** amb un asterisc **taronja**, s'ha pogut deduir que el multiplet que apareix a 4.70 ppm correspon al CH_{35} , el senyal que apareix a 3.16 ppm correspon al CH_{38} i els multiplets entre 2.30-2.00 ppm corresponen als protons ciclobutànics del mateix residu $H_{36/36'}$ i $H_{37/37'}$.

En el cas de la irradiació selectiva del NH que apareix a la **Figura 68** marcat amb un asterisc blau, no s'ha pogut determinar si el senyal a 6.83 ppm pertany al NH_{22} , el NH_{28} o el NH_{16} .

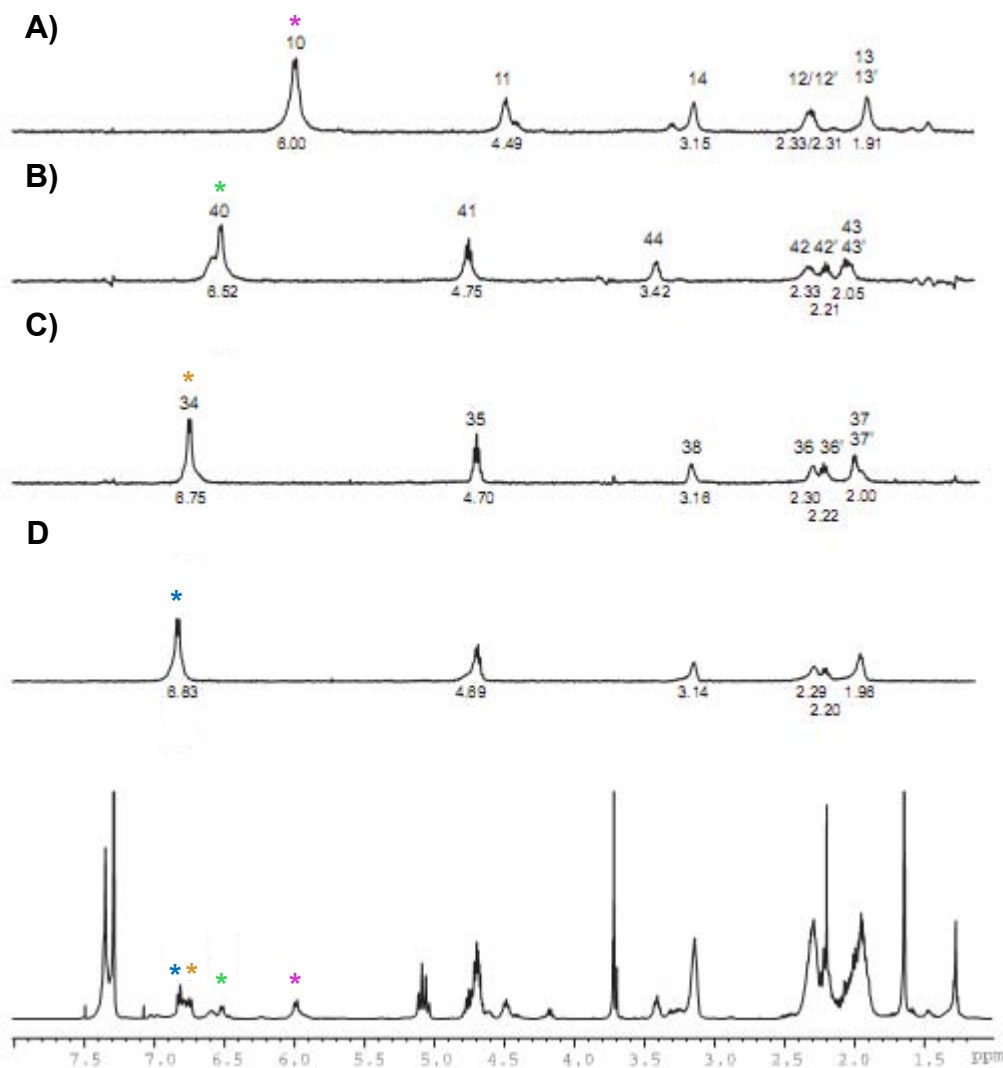


Figura 68. Experiment TOCSY selectiu (amb temps de mescla de 60 ms) de l'hexàmer **32**. **A)** Irradiació selectiva a NH_{10} , **B)** Irradiació selectiva a NH_{40} , **C)** Irradiació selectiva a NH_{34} .

Tot i que no es mostren detalladament, resulta evident que per tal de dur a terme l'assignació completa d'aquest compost s'han realitzat tota una sèrie d'experiments de RMN habituals en la caracterització de qualsevol producte (^{13}C , COSY 1H - 1H , HSQC 1H - ^{13}C , HSQC 1H - ^{15}N). (Veure *Annex 3: Experiments de RMN*)

Una vegada caracteritzada completament la molècula i donat que, segons els resultats obtinguts fins el moment, semblava que l'hexàmer **32** adoptava una conformació estesa igual que en el cas del tetràmer, s'han realitzat experiments per tal de determinar els coeficients de temperatura dels protons *NH*. Amb la determinació dels coeficients de temperatura s'ha estudiat de forma qualitativa si aquests protons *NH* podrien estar participant en la formació d'enllaços d'hidrogen, amb els carbonils corresponents, donant lloc a anells de 6 membres.

El rang de temperatura utilitzat ha estat des de 328 K fins 238 K. A la **Figura 69** es mostren els espectres enregistrats a aquestes temperatures.

Cal destacar que, el primer indicatiu que un *NH* es trobi fixat formant un enllaç d'hidrogen és que mostri una multiplicitat clara i ben definida. En el nostre cas, com es pot observar a la **Figura 69**, tant el NH_{10} com el NH_{40} a temperatura ambient es veuen com a doblets molt ben definits. Per a la resta de *NH*'s no es pot dir quina multiplicitat tenen ja que hi ha solapament dels senyals. És per aquest motiu que només s'ha pogut determinar els coeficients de temperatura pel NH_{10} i el NH_{40} essent aquests protons els dels residus dels extrems.

Els coeficients de temperatura s'han calculat amb els valors dels desplaçaments químics i temperatures que es mostren a la **Taula 1**. A la **Figura 70** es mostra la representació gràfica d'aquests valors.

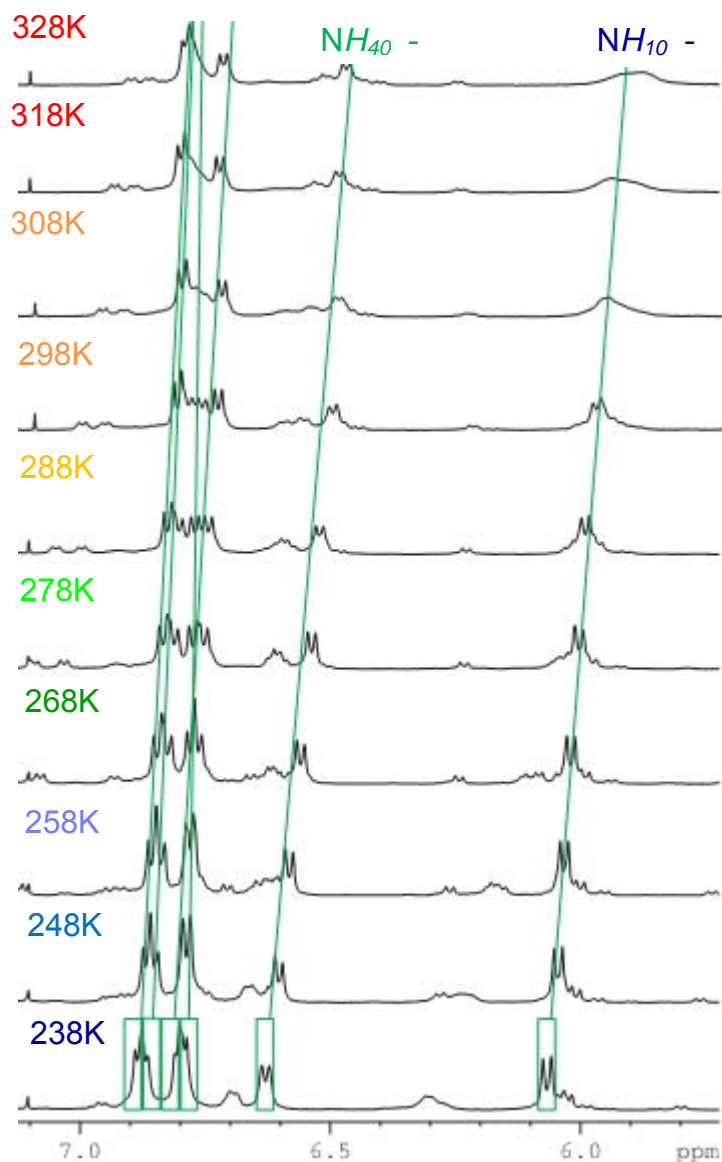


Figura 69. Espectres de RMN- ^1H a diferents temperatures ampliat a la zona dels NH . Es troben indicats els valors dels coeficients de temperatura en $\text{ppb}\cdot\text{K}^{-1}$. Les línees mostren el desplaçament dels senyals

S'ha de recordar, que segons el barem adoptat, per poder afirmar que els NH estan participant en enllaços d'hidrogen intramoleculars els valors dels coeficients de temperatura han d'estar entre els valors de 0.0 i $-4.6 \text{ ppb}\cdot\text{K}^{-1}$.

Capítol 2: Estudi estructural en solució

T (K)	NH ₄₀ (ppm)	NH ₁₀ (ppm)
238	6.63	6.06
248	6.60	6.04
258	6.58	6.03
268	6.56	6.02
278	6.53	6.00
288	6.52	5.99
298	6.50	5.98
308	6.49	5.96
318	6.48	5.94
328	6.46	5.89

Taula 1. Valors dels desplaçaments químics dels protons amida de l'hexàmer **32** a les diferents temperatures a les quals s'ha enregistrat els espectres.

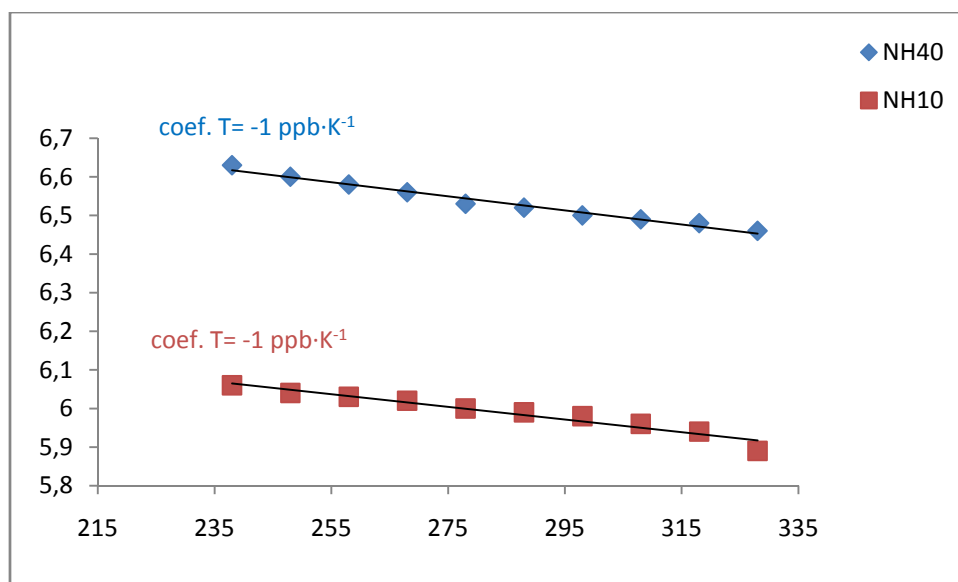


Figura 70. Representació gràfica dels desplaçaments químics en funció de la temperatura pels NH₄₀ i NH₁₀. S'indiquen també els valors dels coeficients de temperatura (ppb·K⁻¹)

Segons els valors obtinguts dels coeficients de temperatura (**Figura 70**) es pot afirmar que aquests dos NH estan formant enllaços d'hidrogen i en la mateixa proporció.

Donat que no s'han pogut obtenir els coeficients de temperatura de la resta de protons amídics, no es poden realitzar comparacions de quin o quins protons estan més fortament involucrats en un enllaç d'hidrogen, tot i que sí podem afirmar que els protons amídics dels extrems de l'hexàmer **32** es troben fortament involucrats en enllaços d'hidrogen.

Per tant, davant els resultats obtinguts mitjançant estudis experimentals realitzats a l'hexàmer **32** en solució (NOES i coeficients de temperatura), es pot afirmar que aquest oligòmer té tendència a formar enllaços d'hidrogen intramoleculars.

II. Estudi estructural en solució mitjançant DC

Per tal de complementar l'estudi estructural d'aquesta sèrie d'oligòmers *cis*-poli(ciclobutànics) s'han obtingut els espectres de DC del dipèptid **19**, el tetràmer **29**, l'hexàmer **32** i l'octàmer **33** en solucions de metanol 0.5 mM.

Els espectres de DC obtinguts per cada cas es mostren a la **Figura 71** superposats al mateix gràfic.

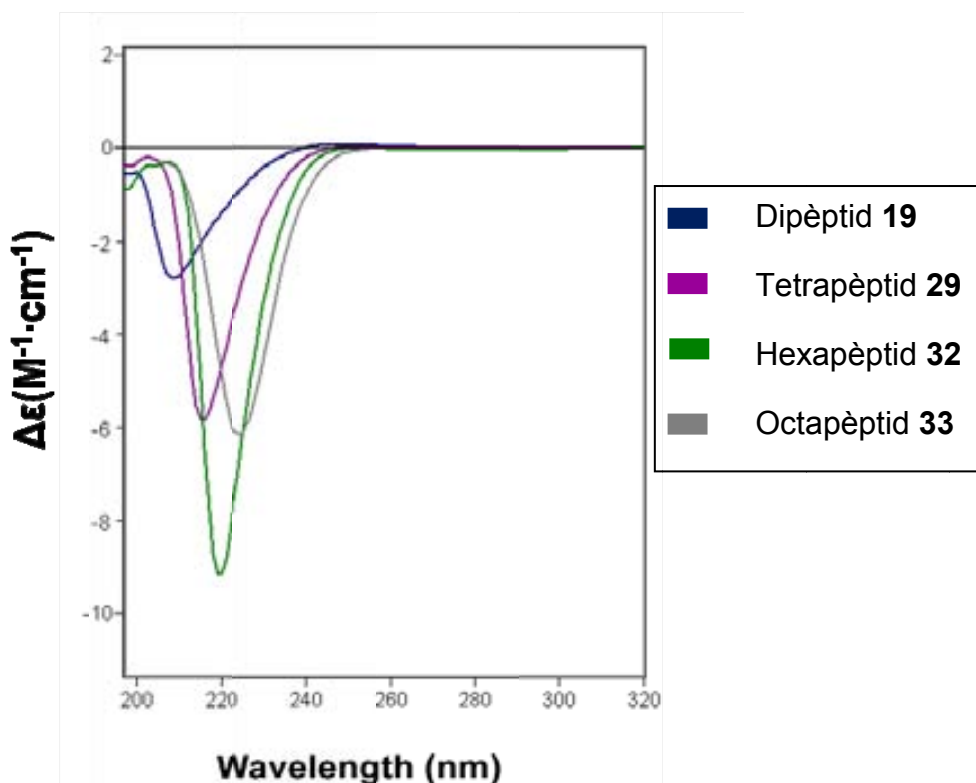


Figura 71. Espectres de diroïsm circular de **19**, **29**, **32**, **33** 0.5 mM en metanol normalitzats segons la concentració.

Com pot observar-se a la **Figura 71** en el cas del dipèptid **19** s'obté una corba de baixa intensitat amb un mínim a 210 nm aproximadament. Per la seva banda, l'espectre obtingut pel tetràmer **29** mostra un mínim a aproximadament 218 nm de intensitat superior que el seu precursor. En el cas de l'hexàmer **32** s'obté una corba de gran intensitat amb un mínim a 220 nm. I finalment al realitzar el DC de l'octàmer **33** s'obté una corba de intensitat mitja amb un mínim al voltant de 225 nm.

Tal com es mostra a la **Figura 71**, a mida que augmenta la llargada de la cadena oligomèrica el mínim de la corba es desplaça lleugerament cap a longituds d'ona superiors seguint un mateix patró. En canvi, pel que fa a la intensitat de les corbes, seria d'esperar que a l'augmentar el llarg de la cadena peptídica augmentés també la intensitat d'aquestes com a conseqüència d'una major estabilització de les estructures secundàries.¹⁰⁴ Però, el que s'observa en

¹⁰⁴ (a) Martinek, T. A.; Tóth, G. K.; Vass, E.; Hollósi, M.; Fülöp, F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *41*, No. 10, 1718. (b) Huck, B. R.; Langenhan, J. M.; Gellman, S. H., *Org. Lett.*, **1999**, *Vol. 1*,

el nostre cas és que, l'octàmer **33** presenta un espectre de menor intensitat que l'hexàmer **32**. Això es podria justificar pel fet que aquests oligòmers adopten una estructura secundària específica en solució que resulta màxima quan l'oligòmer està format per sis residus. És a dir, que la conformació que adopta l'hexàmer **32** resulta ser la més estabilitzada.

Davant aquests resultats obtinguts, i seguint la metòdica emprada en el nostre grup de recerca en aquests casos, ha semblat interessant continuar l'estudi estructural d'aquests compostos realitzant estudis estructurals teòrics, per tal de conèixer de quina manera s'organitzen els enllaços d'hidrogen observats per RMN, ja que resulta interessant saber quins àtoms queden units per aquests enllaços i estudiar si aquest compost és capaç d'adoptar algun tipus d'estructura secundària.

Donat que amb el mètode utilitzat pel Dr. Federico Rúa durant la seva Tesi Doctoral només va poder estudiar el tetràmer perquè es van presentar problemes a l'hora d'analitzar oligòmers de mida superior com l'octàmer, s'ha decidit canviar de mètode i realitzar un Anàlisi de Components Principals.

D'aquesta manera, per tal de poder realitzar comparacions amb els oligòmers de mida inferior anteriorment sintetitzats al nostre laboratori, s'ha decidit refer els càlculs de la sèrie d'oligòmers *cis*-poli(ciclobutànics) amb aquest nou mètode.

2.4.3 Estudi conformacional teòric de la sèrie d'oligòmers *cis*-poli(ciclobutànics)

En col·laboració amb Kepa Koldo Burusco i el Professor Carles Jaime del nostre Departament, s'han realitzat càlculs teòrics del β -tetràmer **29**, el β -hexàmer **32** i l'octàmer **33** aprofitant la filosofia modular de què disposa Amber¹⁰⁵ i utilitzant el Camp de Forces Parm99¹⁰⁶ en tots els casos. (Veure *Annex 1: Mètode de càlcul*)

Així doncs, el propòsit d'aquest estudi ha estat trobar les conformacions més estables dels oligòmers de la sèrie *cis*-poli(ciclobutànics) en CHCl₃ i analitzar la concordança amb els resultats dels NOES obtinguts experimentalment mitjançant RMN.

Per a obtenir les conformacions més representatives de cadascun dels oligòmers s'ha realitzat una cerca conformacional i s'ha estudiat la flexibilitat que presenta la sèrie mitjançant diferents paràmetres (determinació d'angles díedres i distàncies entre àtoms) obtenint que el número total de conformacions de cada oligòmer augmenta segons l'ordre següent: tetràmer < hexàmer < octàmer. Així, els diferents grups de conformacions obtingudes s'observen menys definits i més dispersos a mida que augmenta el número d'aminoàcids que constitueixen els oligòmers de la sèrie.

Donada l'àmplia llibertat conformacional d'aquestes molècules no s'ha pogut seleccionar una única conformació que resulti representativa per a cadascun dels oligòmers. Així mateix, 3 estructures han estat seleccionades en cada cas. La flexibilitat observada en aquests oligòmers ens indica que els intercanvis conformacionals es donen amb facilitat.

Així, les 3 conformacions seleccionades pel tetràmer **29**, hexàmer **32** i octàmer **33** es mostren a les **Figures 72, 73 i 74**, respectivament.

¹⁰⁵ (a) Case, D.A.; Pearlman, D.A.; Caldwell, J.W.; Cheatham III, T.E.; Wang, J.; Ross, W.S.; Simmerling, C.L.; Darden, T.A.; Merz, K.M.; Stanton, R.V.; Cheng, A.L.; Vincent, J.J.; Crowley, M.; Tsui, V.; Gohlke, H.; Radmer, R.J.; Duan, Y.; Pitera J.; Massova, I.; Seibel, G.L.; Singh, U.C.; Weiner, P.K.; Kollman, P.A.; **2002. AMBER 7**. University of California, San Francisco. (b) Pearlman, D.A.; Case, D.A.; Caldwell, J.W.; Ross, W.S.; Cheatham III, T.E.; DeBolt, S.; Ferguson, D.; Seibel, G.; Kollman, P.A.; *Comp. Phys. Commun.* **1995**. *91*(1-3). 1.

¹⁰⁶ Wang, J.; Cieplak, P.; Kollman, P.A.; *J. Comput. Chem.* **2000**. *21*(12). 1049.

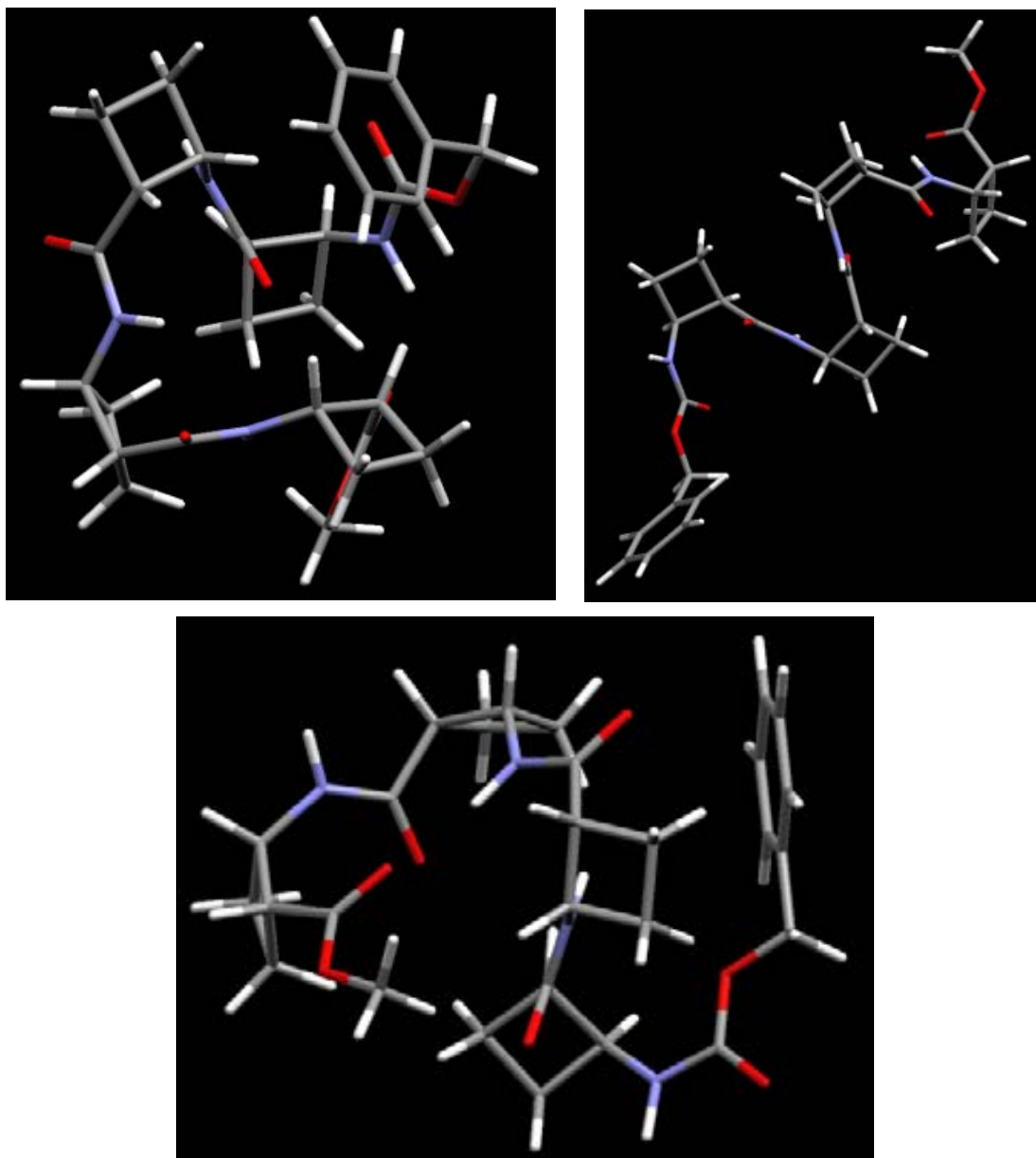


Figura 72. Confòrmers seleccionats pel tetràmer **29**

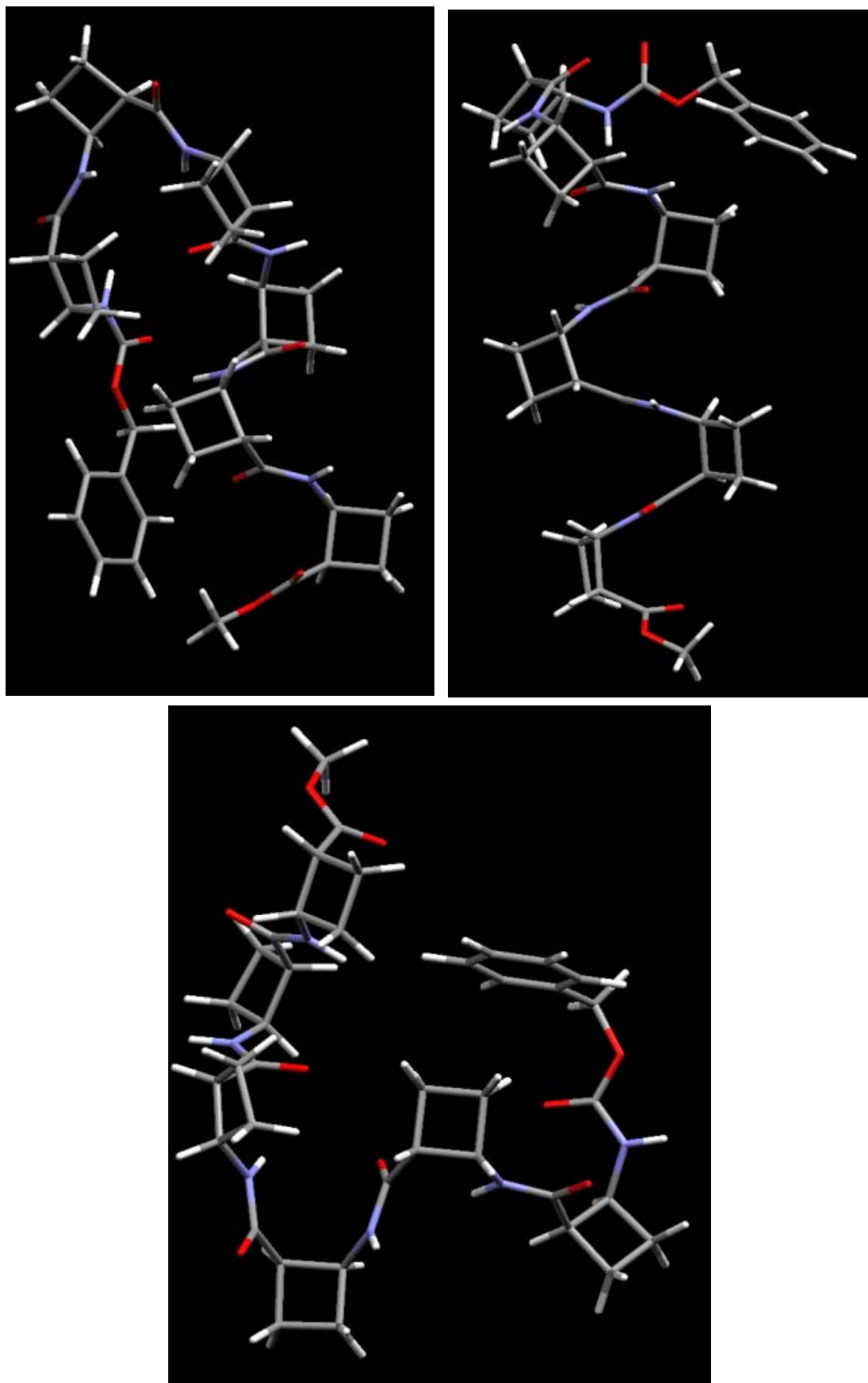


Figura 73. Confòrmers seleccionats per l'hexàmer 32

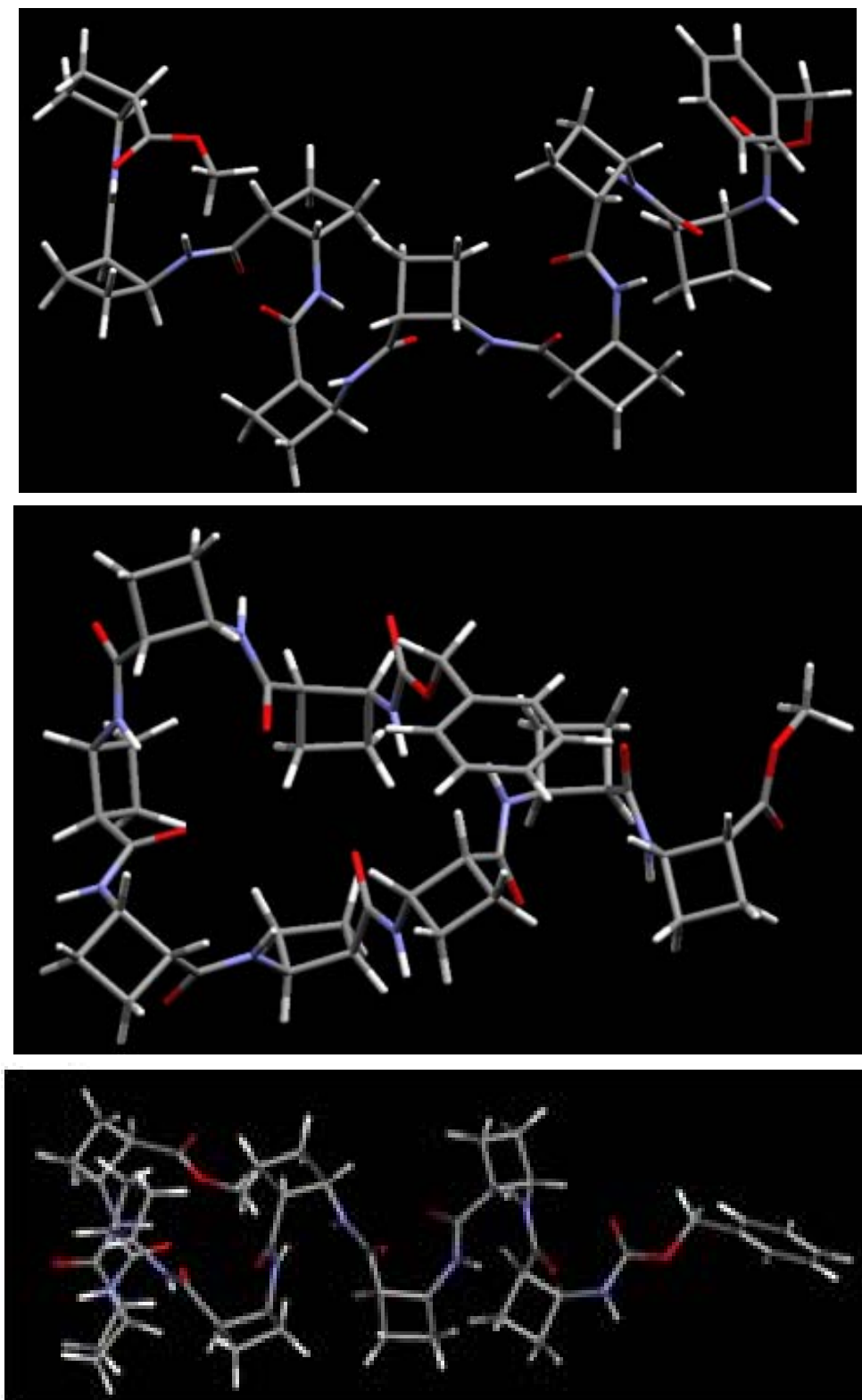


Figura 74. Confòrmers seleccionats per l'octàmer 33

Així doncs, una vegada seleccionades les estructures de les cerques conformacionals, s'han realitzat càlculs de Dinàmica Molecular¹⁰⁷ amb i sense restriccions de les 3 estructures representatives seleccionades de cada oligòmer (tetra-**Figura 72**, hexa-**Figura 73** i octa-**Figura 74**) essent en ambdós casos les estructures promig obtingudes molt similars.

A continuació a mode d'exemple passarem a comentar detalladament els resultats de la Dinàmica Molecular obtinguts per l'hexàmer **32** ja que és el què s'ha estudiat per RMN. Tot i que, tal com s'explicarà a continuació sembla ser que tots 3 oligòmers segueixen un mateix comportament.

Així, dels resultats obtinguts de la Dinàmica Molecular es dedueix que l'hexapèptid **32**, al igual que el tetrapèptid **29** i l'octapèptid **33**, adopta una conformació estesa en cloroform. A la **Figura 75** es mostren les estructures promig obtingudes de les trajectòries de la Dinàmica Molecular.

D'aquesta manera, per tal de recolzar els resultats experimentals obtinguts per RMN, (**Figura 76**) s'han mesurat les distàncies promig entre els hidrògens involucrats en els NOES observats per l'hexàmer **32** que oscil·len en valors al voltant de 2.30 ± 0.30 Å (**Taula 2**), i els quals estan totalment d'acord amb els resultats obtinguts per RMN.

Com es pot observar a la **Taula 2** els valors de les distàncies H-H no disten massa d'una configuració a l'altra ja que pràcticament es pot dir que totes 3 conformacions convergeixen en una mateixa. En conseqüència, els resultats de la Dinàmica Molecular mostren com el β -oligòmer **32** adopta en solució una conformació estesa tipus *cinta*, la qual corrobora els resultats experimentals obtinguts.

¹⁰⁷ (a) Van Gunsteren, W.F.; Berendsen, H.J.C.; Rullmann, J.A.C.; *Molecular Physics*, **1981**, *44*(1), 69. (b) Van Gunsteren, W.F.; Berendsen, H.J.C.; *Molecular Physics*, **1982**, *45*(3), 637.

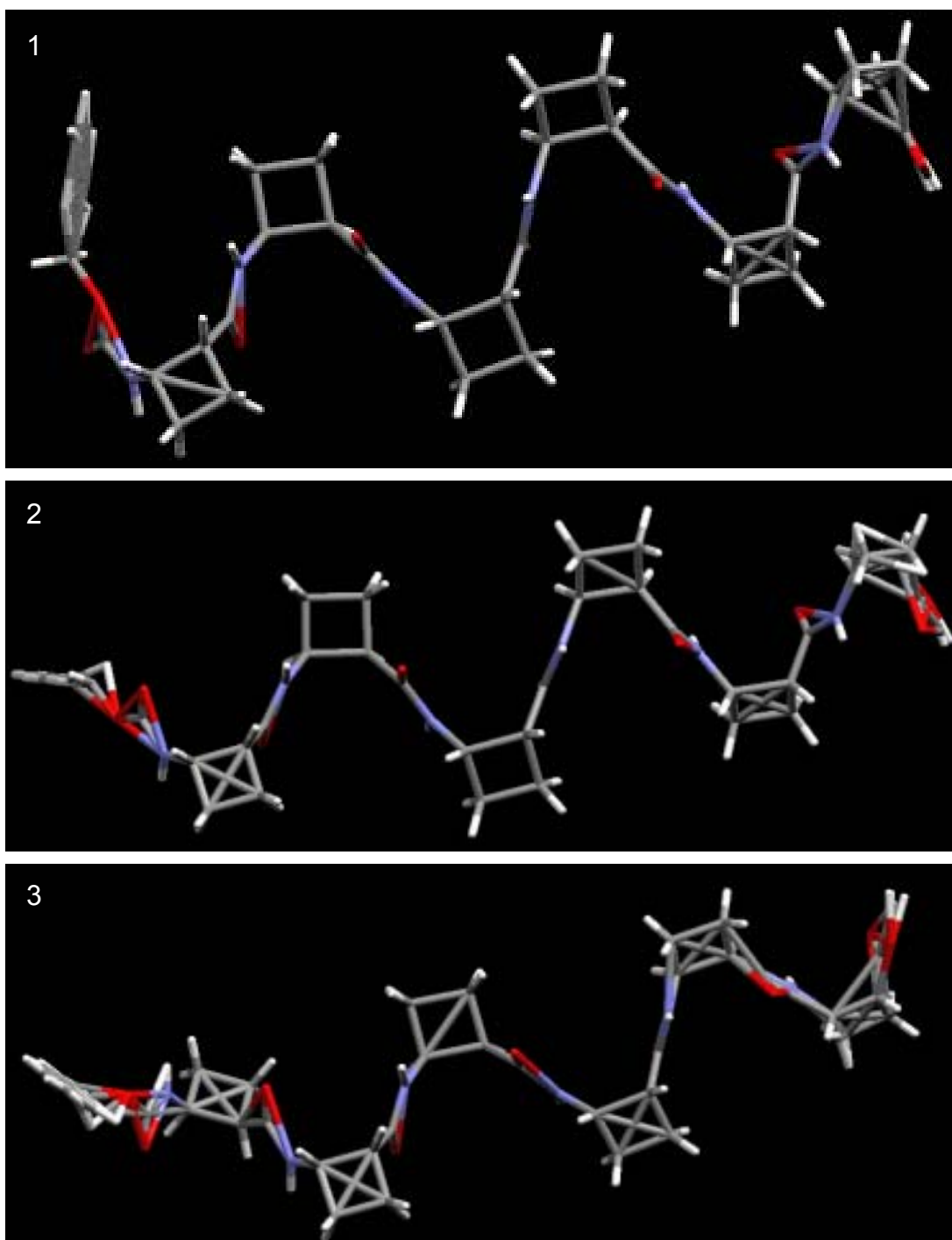


Figura 75. Estructures promig de les trajectòries de la DM de l'hexàmer 32

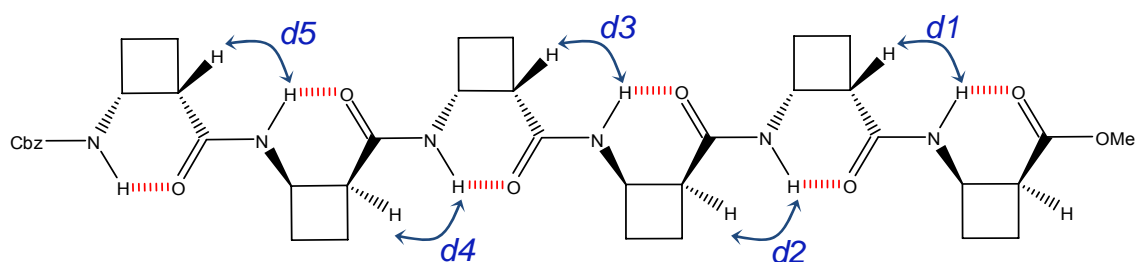


Figura 76. Estructura de l'hexàmer **32** on es marquen amb fletxes blaves els NOES observats per RMN

Config. Hexàmer		Distàncies:				
		NH---HC (sense restriccions) (Å)				
		d1	d2	d3	d4	d5
Promig	1	2.28	2.43	2.28	2.32	2.32
	2	2.38	2.34	2.31	2.28	2.36
	3	2.35	2.29	2.32	2.38	2.23
Desv. Estàndard	1	0.27	0.36	0.26	0.29	0.31
	2	0.34	0.31	0.29	0.27	0.33
	3	0.33	0.27	0.31	0.34	0.20

Taula 2

Tot i que no es comentaran en detall, cal destacar que les estructures promig i les distàncies H-H determinades mitjançant la realització de la Dinàmica Molecular corresponent, en el cas del tetrapèptid **29** i de l'octapèptid **33**, també conclouen que les conformacions que adopten aquests oligòmers en solució és una conformació estesa, equivalent a la observada per l'hexàmer **32**.

Així, segons els resultats obtinguts d'aquests càlculs teòrics sembla que els enllaços d'hidrogen i les interaccions intramoleculares són els responsables de què aquesta sèrie d'oligòmers adoptin conformacions esteses tipus *cinta*.

2.4.4 Estudi supramolecular mitjançant TEM de la sèrie d'oligòmers *cis*-poli(ciclobutànics)

- Estudi supramolecular de l'hexàmer 32

Inicialment es va plantejar realitzar l'estudi supramolecular de l'hexàmer **32** mitjançant TEM per poder comparar-ho amb els resultats obtinguts amb el tetràmer **29** i l'octàmer **33**.

Tenint en compte aquests antecedents, per dur a terme l'estudi de l'hexàmer **32** s'han preparat solucions 0.5 mM i 1mM. Ambdues solucions van ésser analitzades amb el microscopi a temps iguals d'incubació (24 hores). En aquestes condicions les mostres van ser enregistrades tant tenyides com sense tenyir amb acetat d'uranil per tal d'analitzar si l'acetat podia influir en la formació de les estructures. En el nostre cas l'única diferència a destacar de les imatges tenyides és l'obtenció d'una imatge on els agregats es poden observar amb més contrast. A la Part Experimental de la present Tesi Doctoral s'explica el protocol seguit per a la preparació de les mostres.

Com s'observa a la **Figura 77** les solucions de l'hexàmer **32** a concentració 0.5 mM preparades en metanol, passades 24 hores d'incubació, presenten una estructura repetitiva en forma de *xarxa fibril·lar*. Fixant-se en les imatges amb menys augment es pot observar com aquesta *xarxa fibril·lar* sembla créixer a partir de centres de nucleació (veure **Figura 77C**). En aquest cas donat l'encreuament que presenta aquesta *xarxa fibril·lar* no s'han pogut determinar les mides de les fibres observades, ja que tot i donar lloc a una morfologia regular no ha estat possible obtenir fibres aïllades per realitzar la mesura.

Al realitzar TEM de mostres més concentrades (1 mM) que les anteriors s'han obtingut estructures molt més definides i denses.(**Figura 78**)

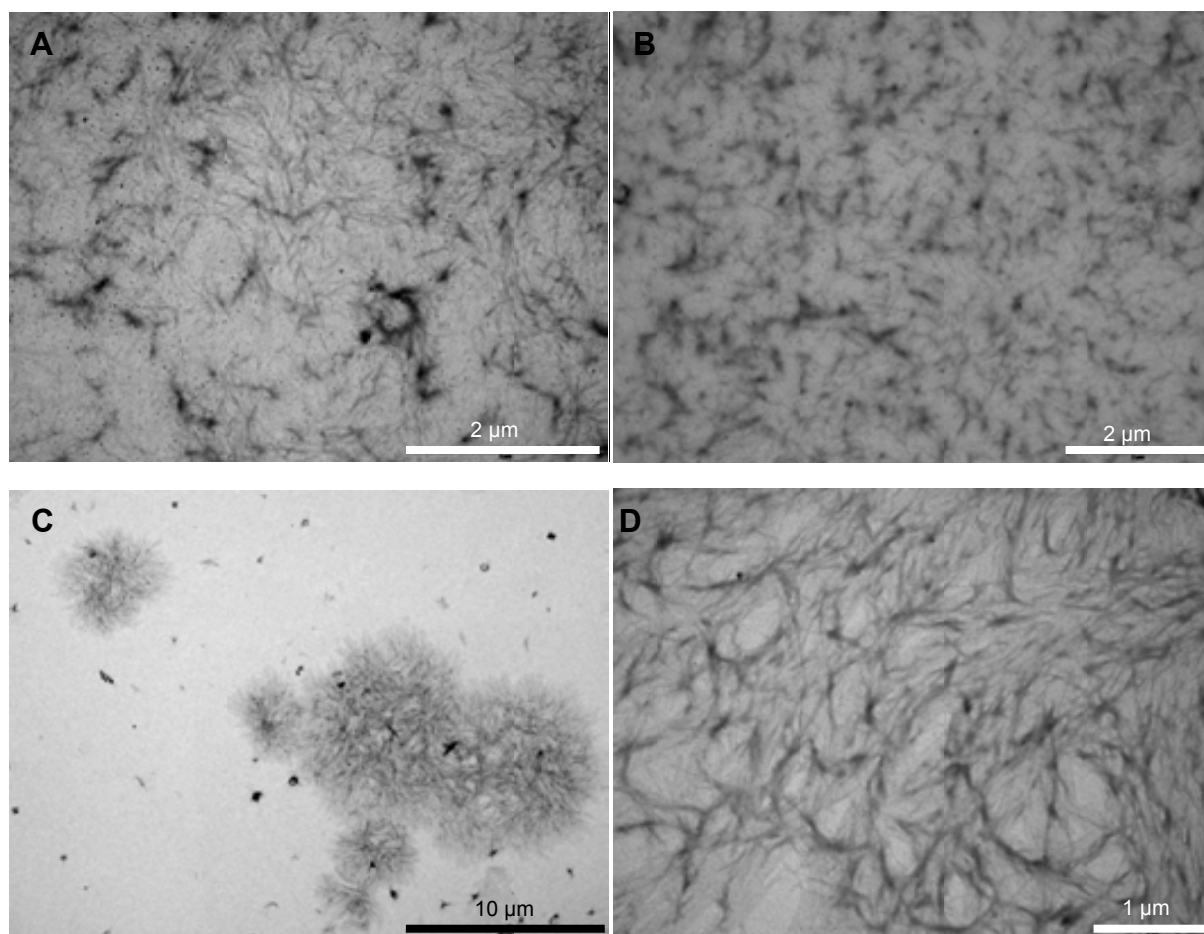


Figura 77. Imatges TEM de l'hexàmer **32**. **A** i **B** mostren solucions 0.5 mM preparades en metanol passades 24 hores de incubació sense tenyir. **C** i **D** mostren solucions 0.5 mM preparades en metanol passades 24 hores de incubació i tenyides amb acetat d'uranil.

Així, de l'estudi supramolecular de l'hexàmer **32** mitjançant TEM, es pot dir que aquest compost en solució de metanol presenta una estructura terciària repetitiva homogènia que es podria classificar com *xarxa fibril·lar*, tot i que, donat que les fibres que constitueixen aquesta estructura fibril·lar no són tan definides com en el cas del tetràmer **29**, no ha estat possible mesurar l'amplada.

També s'han pres imatges d'aquestes mostres passades 72 hores però no s'han observat diferències significatives.

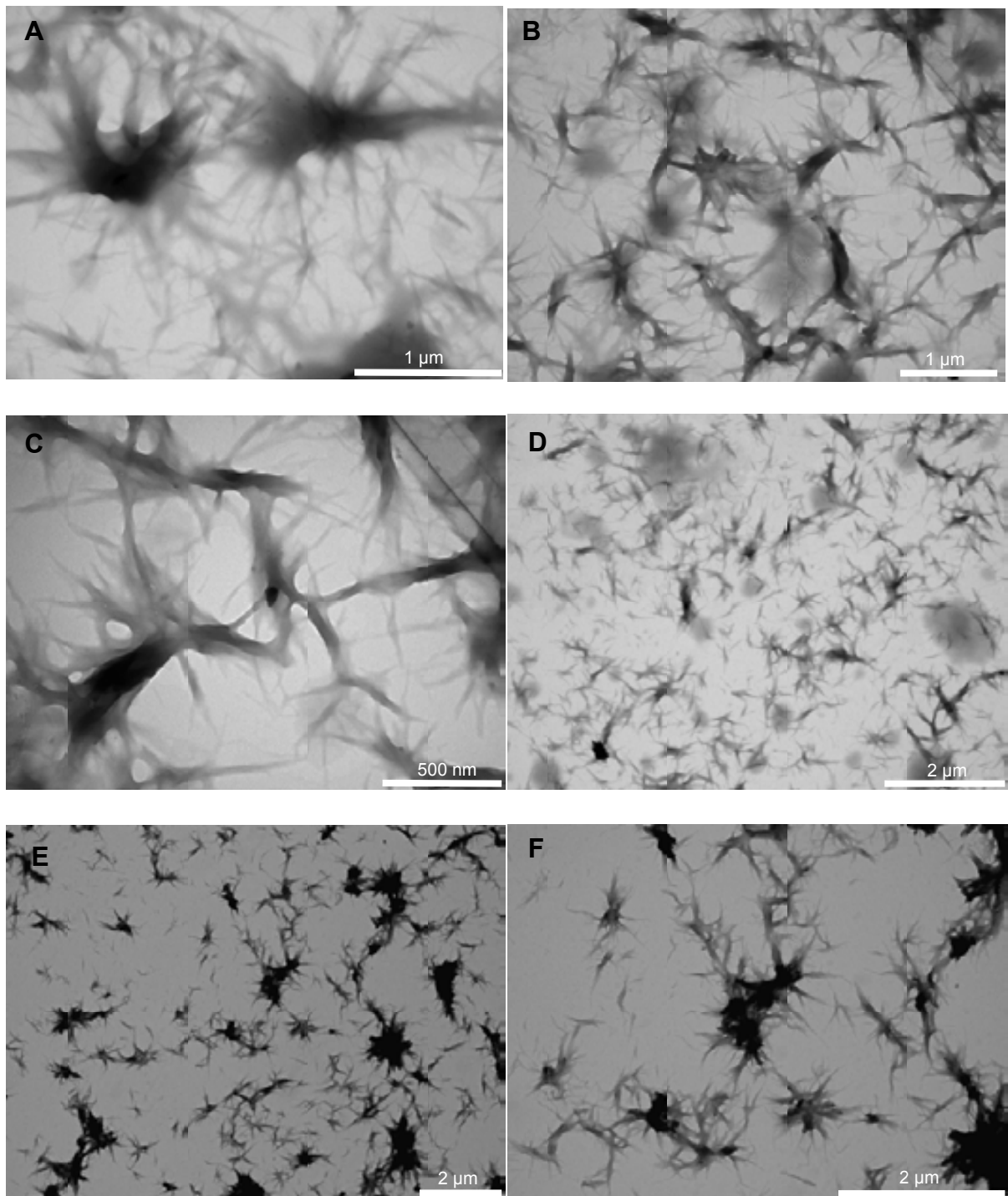


Figura 78. Imatges TEM de l'hexàmer **32**. **A, B, C** i **D** mostren solucions 1 mM preparades en metanol passades 24 hores de incubació sense tenyir. **E** i **F** mostren solucions 1 mM preparades en metanol passades 24 hores de incubació i tenyits amb acetat d'uranil.

Capítol 2: Estudi supramolecular

Davant aquests resultats es va decidir realitzar l'estudi dels oligòmers d'aquesta sèrie però de mida inferior, ja que inicialment havien semblat més interessants els oligòmers de mida superior.

- Estudi supramolecular dels dipèptids 19, 22b i 23

En el cas d'aquests pèptids s'ha realitzat TEM dels productes sintetitzats per la Dra. Sandra Izquierdo durant la seva Tesi Doctoral.

Igual que en el cas de l'hexàmer, s'han preparat dissolucions d'aquests dipèptids de concentració 5 mM en metanol i s'han deixat incubar les dissolucions durant 24 hores. Així, s'han obtingut les imatges que es mostren a les següents figures.

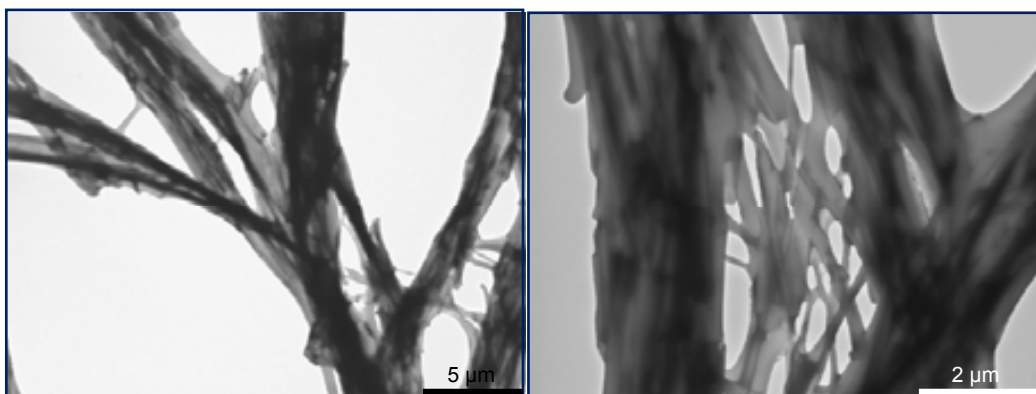
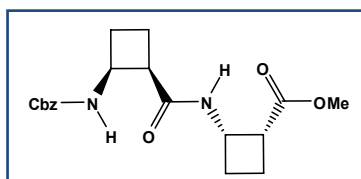


Figura 79. Imatges TEM del dipèptid **19** a una concentració 5mM, passades 24 hores i tenyit amb acetat d'uranil

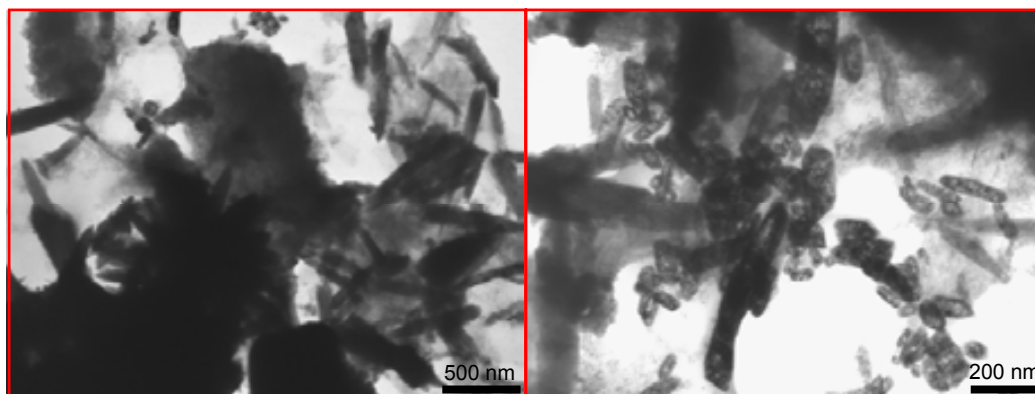
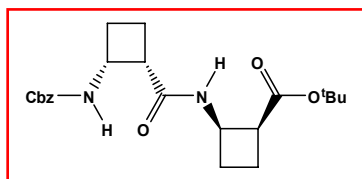


Figura 80. Imatges TEM del dipèptid **22b** a una concentració 5mM, passades 24 hores i tenyides amb acetat d'uranil

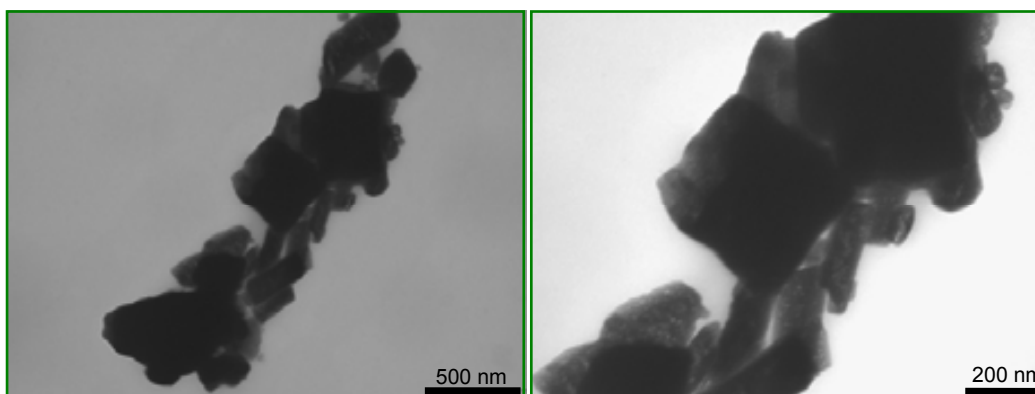
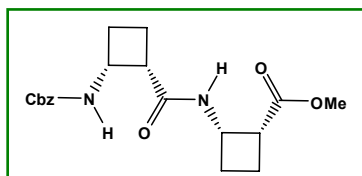


Figura 81. Imatges TEM del dipèptid **23** a una concentració 5mM, passades 24 hores i tenyides amb acetat d'uranil

Com pot apreciar-se a la **Figura 79**, el dipèptid **19** dona lloc a una morfologia *fibril·lar*. En canvi, tant el dipèptid **22b** com el dipèptid **23** donen lloc a agregats irregulars, tal i com es mostra a les **Figures 80 i 81**. Així sembla que es pot afirmar que tant l'efecte dels substituents com l'efecte estereoquímic afecten a l'hora d'induir estructures terciàries definides, essent els substituents i l'estereoquímica del dipèptid **19** els més adequats per induir aquests tipus d'estructures.

En tots aquests casos s'ha treballat amb concentracions superiors que per l'hexàmer **32**, ja que a concentracions inferiors a 5 mM no s'apreciava cap tipus d'agregació i/o morfologia.

- Estudi supramolecular del tripèptid **26**

Per tal de continuar amb l'estudi supramolecular dels oligòmers de la sèrie, s'ha realitzat també estudis de TEM del tripèptid **26**, intermedi clau en l'obtenció de l'hexàmer **32**.

En aquest cas, igual que en els dipèptids abans esmentats, s'ha realitzat l'estudi per TEM d'una solució en metanol del tripèptid **26** de concentració 5 mM. Les imatges s'han pres passades 24 hores d'incubació.

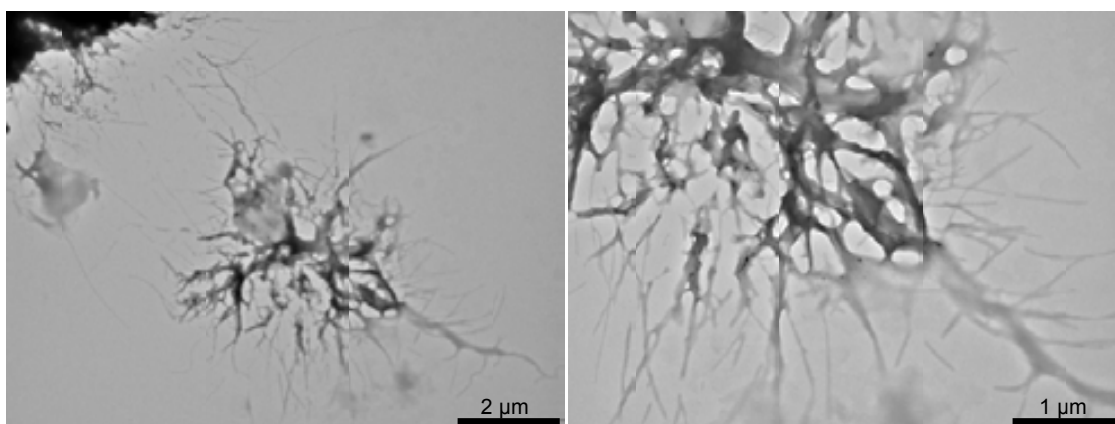


Figura 82. Imatges TEM del tripèptid **26** de concentració 5mM, passades 24 hores i tenyit amb acetat d'uranil

Tal i com s'observa a la **Figura 82**, en aquest cas s'ha obtingut una estructura *fibril·lar* que recorda molt a la *xarxa fibril·lar* observada en l'hexàmer **32**. Tot i utilitzar una solució més concentrada que en el cas de l'hexàmer, s'obté una estructura *fibril·lar* poc definida i menys regular.

Donat que els resultats obtinguts tant per RMN com per càlculs teòrics mostren com tota aquesta sèrie d'oligòmers *cis*-poli(ciclobutànics) presenten un mateix comportament conformacional, i davant l'evidència que tant el dipèptid **19**, com el trímer **26**, el tetràmer **29** i l'hexàmer **32** donen lloc a estructures terciàries més o menys definides, essent en tots els casos estructures tipus *fibril·lars*, es va decidir repetir el TEM de l'octàmer **33** utilitzant una solució de concentració superior a la utilitzada pel Dr. Federico Rua, ja que seguint aquest raonament l'octàmer **33** també hauria de presentar una estructura *fibril·lar* i no *vesicular* com la inicialment observada.

- Estudi supramolecular de l'octàmer 33

Tal com s'ha esmentat anteriorment, el Dr. Federico Rua va realitzar TEM d'una solució 0.5 mM de l'octàmer **33** passades 24 hores d'incubació i va observar una morfologia homogènia i regular en forma de *vesícules*. (**Figura 83**). Tot i així, donat el comportament observat en la resta d'oligòmers de la sèrie, vam realitzar TEM d'aquesta mateixa mostra més concentrada (1 mM). (**Figura 84**)

Així doncs, davant aquests resultats es pot afirmar de forma definitiva que tots els oligòmers de la sèrie *cis*-poli(ciclobutànics) segueixen un mateix comportament supramolecular donant lloc a estructures terciàries tipus *fibril·lars* més o menys definides i regulars en cada cas.

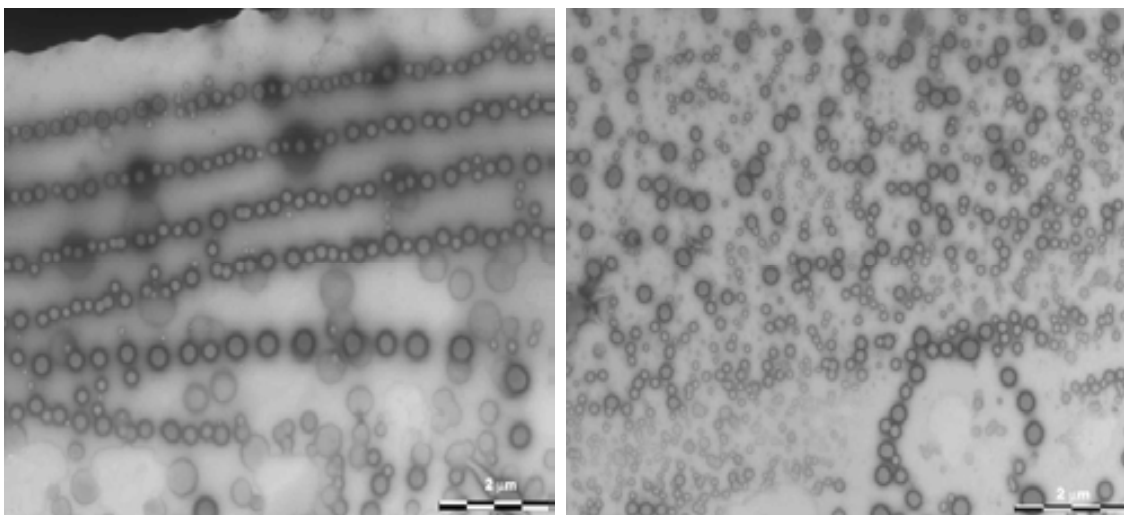


Figura 83. Imatges TEM de l'octàmer **33** 0.5 mM després de 24 h de incubació

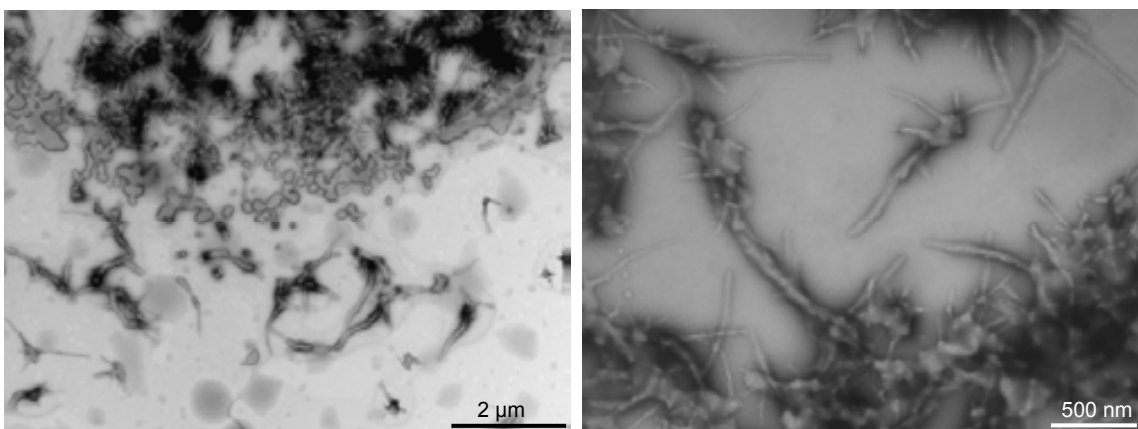


Figura 84. Imatges TEM d'una solució 1mM l'octàmer **33**, passada una setmana. A la dreta es mostra la imatge ampliada de la zona marcada amb un rectangle vermell on es pot apreciar la morfologia *fibril·lar*.

El fet que en el cas de l'octàmer **33** en solucions de baixa concentració i amb poc temps de incubació s'observin estructures vesiculars de diferent diàmetre es podria justificar degut a l'efecte de la concentració i al temps d'incubació.

A la literatura trobem exemples de l'efecte del temps d'incubació en proteïnes polimèriques. Així, Moore i col·laboradors¹⁰⁸, entre d'altres,¹⁰⁹ han

¹⁰⁸ Moore, R. A.; Hayes, S. F.; Fischer, E. R.; Priola, S. A., *Biochemistry*, **2007**, Vol. 46, No. 24, 7079.

mostrat com estructures terciàries globulars observades per TEM precedien la formació de fibres ja que les vesícules interaccionaven directament donant lloc al creixement d'un manat de fibres. D'aquesta manera, aquests autors expliquen com s'obtenen estructures fibril·lars de morfologies variables partint d'estructures globulars observades a temps d'incubació baixos. (**Figura 85**)

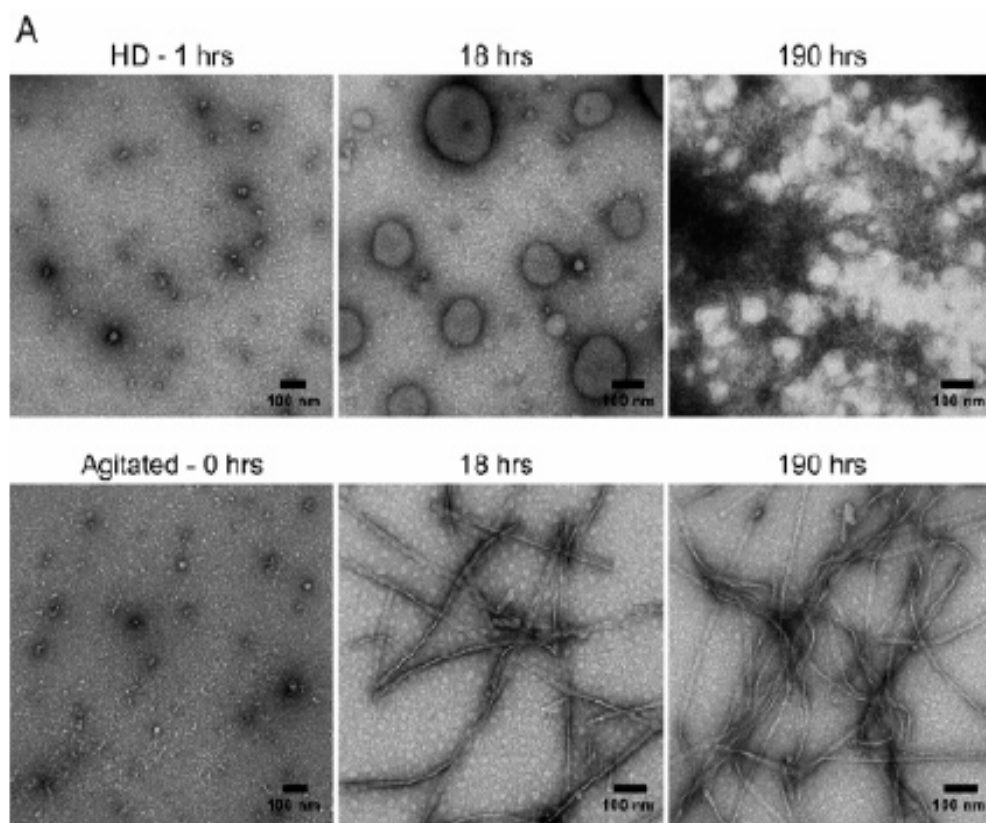


Figura 85. Anàlisi mitjançant TEM dels processos de fibril·lació del A β 40. Després de incubar 1 h, ambdues barreges mostren estructures globulars i petites fibres però no fibres madures. A mida que augmenta el temps de incubació s'observa amb claredat material fibril·lar.

Així doncs, aquest efecte observat al variar el temps d'incubació també es podria aplicar a l'efecte de la variació de la concentració, ja que per l'octàmer **33** s'ha pogut observar com en solucions de baixes concentracions apareixen morfologies vesiculars (**Figura 83**) que a concentracions superiors passen a ser fibril·lars (**Figura 84**). Aquest canvi de morfologia segurament sigui degut a la interacció entre les diferents vesícules originant els manats fibril·lars.

¹⁰⁹ Chimon, S.; Shaibat, M. A.; Jones, C. R.; Calero, D. C.; Aizezi, B.; Ishii, Y., *Nature structural & molecular biology*, **2007**, Vol. 14, No. 12, 1157

2.4.5 Estudi estructural del β -tetrapèptid **29** mitjançant *Scanning Polarization Force Microscopy* (SPFM)

La tècnica microscòpica del SPFM és una variació del AFM on s'utilitzen forces de polarització entre una punta modificada d'AFM parcialment carregada i la superfície de la mostra per registrar canvis en el potencial de superfície.

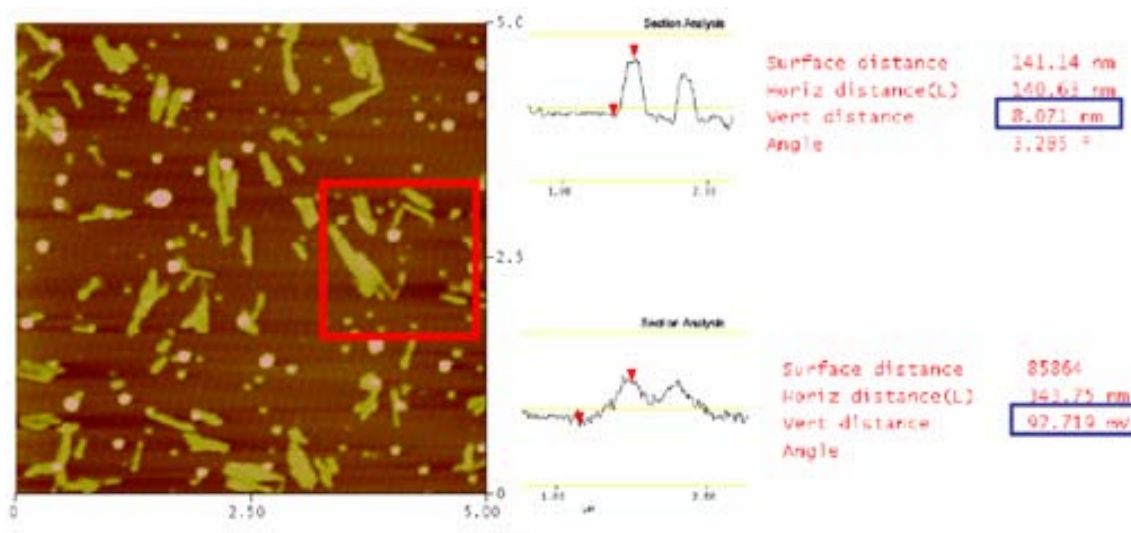


Figura 86. SPFM d'una solució 1 mM del tetràmer **29** en MeOH

Tal com s'observa a la **Figura 86**, el potencial obtingut que origina la molècula és positiu. D'aquesta manera s'ha obtingut que la molècula es disposa sobre una superfície de mica amb una orientació com la que es mostra a la **Figura 87**.

Donat que s'ha determinat físicament que el potencial en superfície es positiu, s'assumeix que la molècula es disposa verticalment sobre la superfície de mica, essent el pol positiu de la molècula l'extrem de l'ester metílic i el pol negatiu el fenil del carbamat de benzil. Que la molècula es disposi verticalment ve marcat pel fet que el potencial observat en superfície és diferent de zero, ja que si el potencial en superfície fos igual a zero voldria dir que la disposició de la molècula sobre la superfície seria horitzontal.

Així, tenint en compte l'orientació dels moments dipolars de cadascun dels enllaços amida s'obté un moment dipolar global que va de l'extrem positiu

al negatiu, tal i com es mostra a la **Figura 87**, essent aquest moment dipolar de 11.1 D segons la determinació realitzada mitjançant càlculs teòrics.

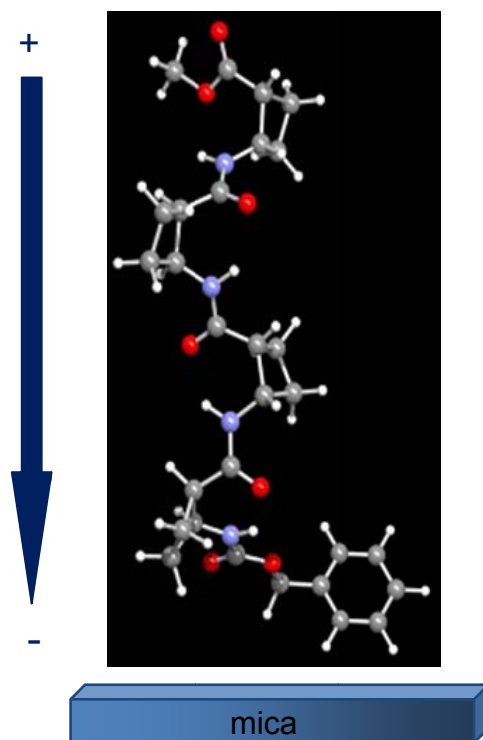


Figura 87

La informació que s'obté amb el SPFM resulta de molta utilitat per entendre com es pot donar l'agregació observada en el cas del tetràmer **29**, ja que abans d'obtenir aquests resultats el Dr. Federico Rúa havia proposat un model, amb les dades que fins aleshores disposava, per justificar la formació de les fibres observades. Així, amb les dades obtingudes sobre la mida de les fibres (TEM, AFM) i tenint en compte els resultats obtinguts mitjançant càlculs teòrics va postular un model, que es mostra a la **Figura 88**.

En aquest model, l'amplada de les fibres venia determinada per l'associació lineal d'aproximadament 20 unitats del tetràmer (24 nm (TEM) / 1.2 nm (model molecular)), l'alçada estaria constituïda per una unitat tetramèrica, (2.2 nm (AFM) = 2.2 nm (model molecular)) i el llarg de les fibres estaria format per n unitats dependent el número de unitats (n) del temps.

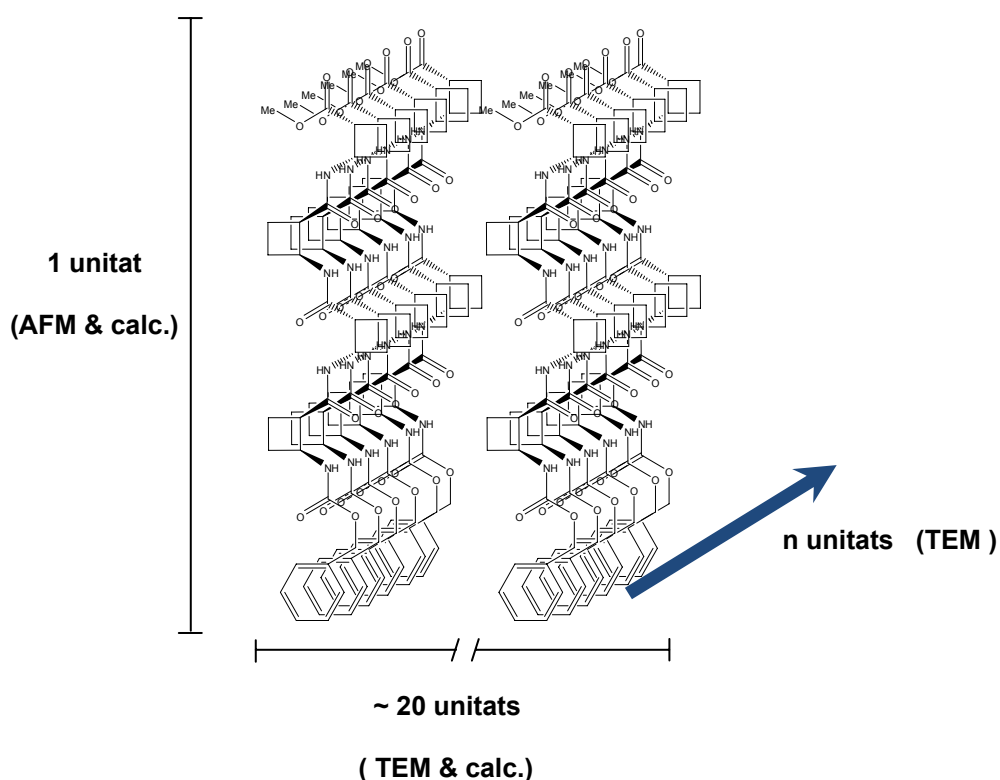


Figura 88. Model proposat per la formació de les fibres observades en el tetràmer **29**

Així doncs, es pot afirmar que segons les dades obtingudes per SPFM, el tetràmer es disposa sobre la superfície de mica verticalment (**Figura 87**) i corrobora el model proposat pel Dr. Federico Rúa per justificar la formació d'una estructura fibril·lar per part d'aquest tetràmer.

Tot i obtenir aquests resultats, ha semblat interessant realitzar càlculs teòrics per recolzar el model proposat de la formació d'aquesta agregació que origina les estructures supramoleculares fibril·lars observades per TEM.

2.4.6 Estudi mitjançant càlculs teòrics de l'empaquetament de la sèrie d'oligòmers *cis*-poli(ciclobutànics) que originen estructures terciàries *fibril·lars*.

Per tal de justificar la formació d'estructures terciàries fibril·lars, s'ha centrat l'estudi en el cas del tetràmer **29** del qual s'ha obtingut, per TEM, imatges més regulars i definides i del qual es disposa també de dades de AFM i SPFM.

Els resultats del TEM mostren que el tetràmer **29** forma fibres que, com ja va postular el Dr. Federico Rúa, podrien procedir de l'agregació entre les molècules apilant-se unes al costat de les altres (de forma paral·lela, SPFM) i unes a sobre de les altres (agregats de mida superior, AFM), donant lloc a una estructura que resultaria multicapa. (**Figura 89**)

És per això que s'ha realitzat en col·laboració amb Kepa Koldo Burusco un estudi teòric amb dues finalitats:

- Donar una explicació de per què les molècules s'agreguen entre elles de forma vertical i paral·lela, orientant els grups fenils de manera que queden en contacte amb la superfície.
- Provar l'existència d'interaccions tipus enllaços d'hidrogen que estabilitzin l'agregació.

S'ha proposat un experiment computacional i s'han utilitzat dues cel·les, una en paral·lel i una altra alternada, formades per 9 molècules disposades de tres en tres. (**Figura 90**)

Per mantenir aquesta ordenació estable al llarg de tota la Dinàmica Molecular, les 8 molècules que envolten a la central han estat parcialment retingudes en les seves posicions mitjançant restriccions. En qualsevol cas, per què aquests resultats siguin totalment fiables les restriccions aplicades han estat molt rigoroses i han estat incloses progressivament al sistema. La molècula del mig està sense cap restricció i per aquest motiu és capaç d'interaccionar lliurement amb el seu entorn.

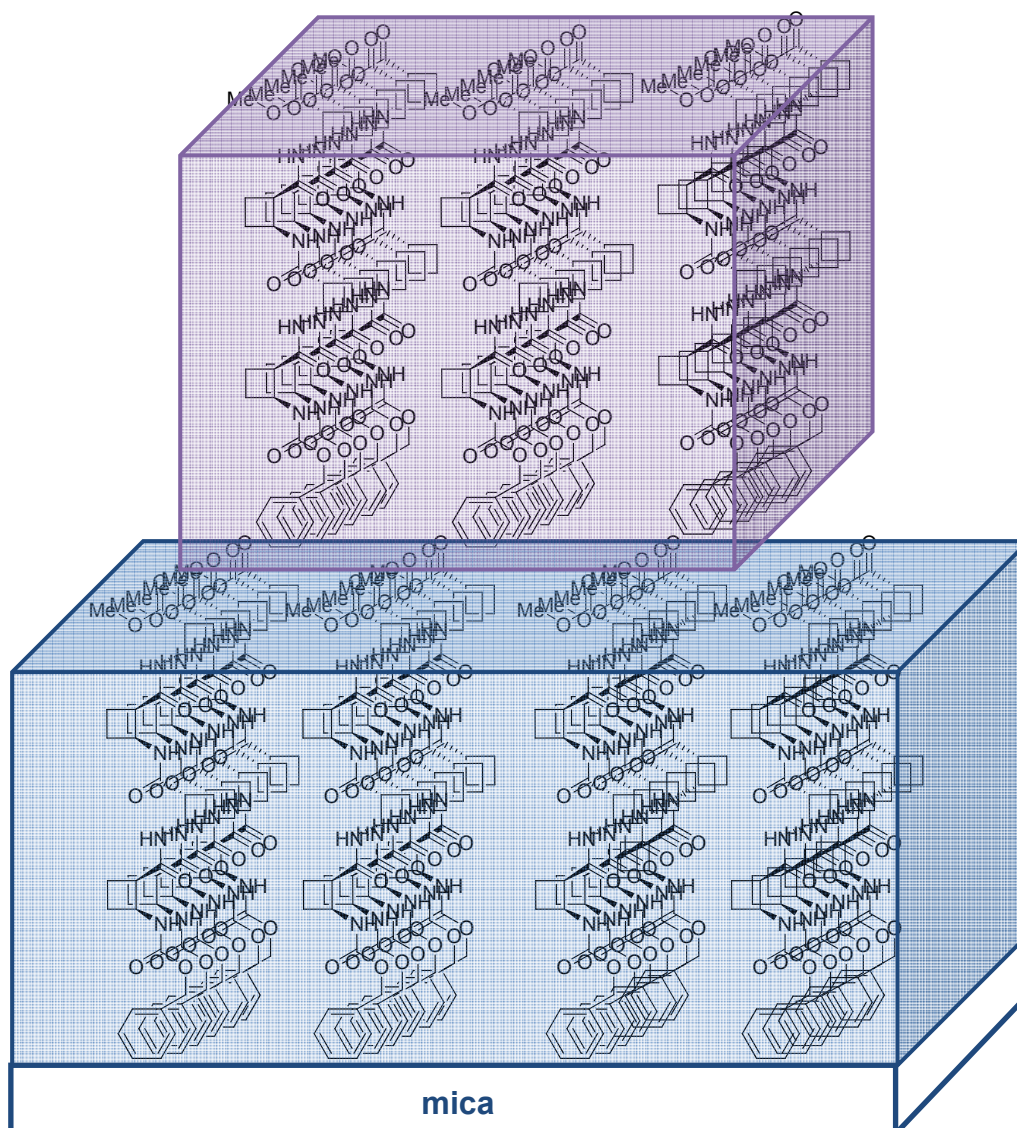


Figura 89. Estructura multicapa tenint en compte l'orientació obtinguda per SPFM, el model proposat i l'alçada dels agregats observats per AFM

Els resultats energètics obtinguts mostren com el sistema presenta una preferència per a l'organització paral·lela perquè és la de més baixa energia (*Annex 1: Mètode de càlcul*), la qual cosa està en total acordança amb els resultats de SPFM.

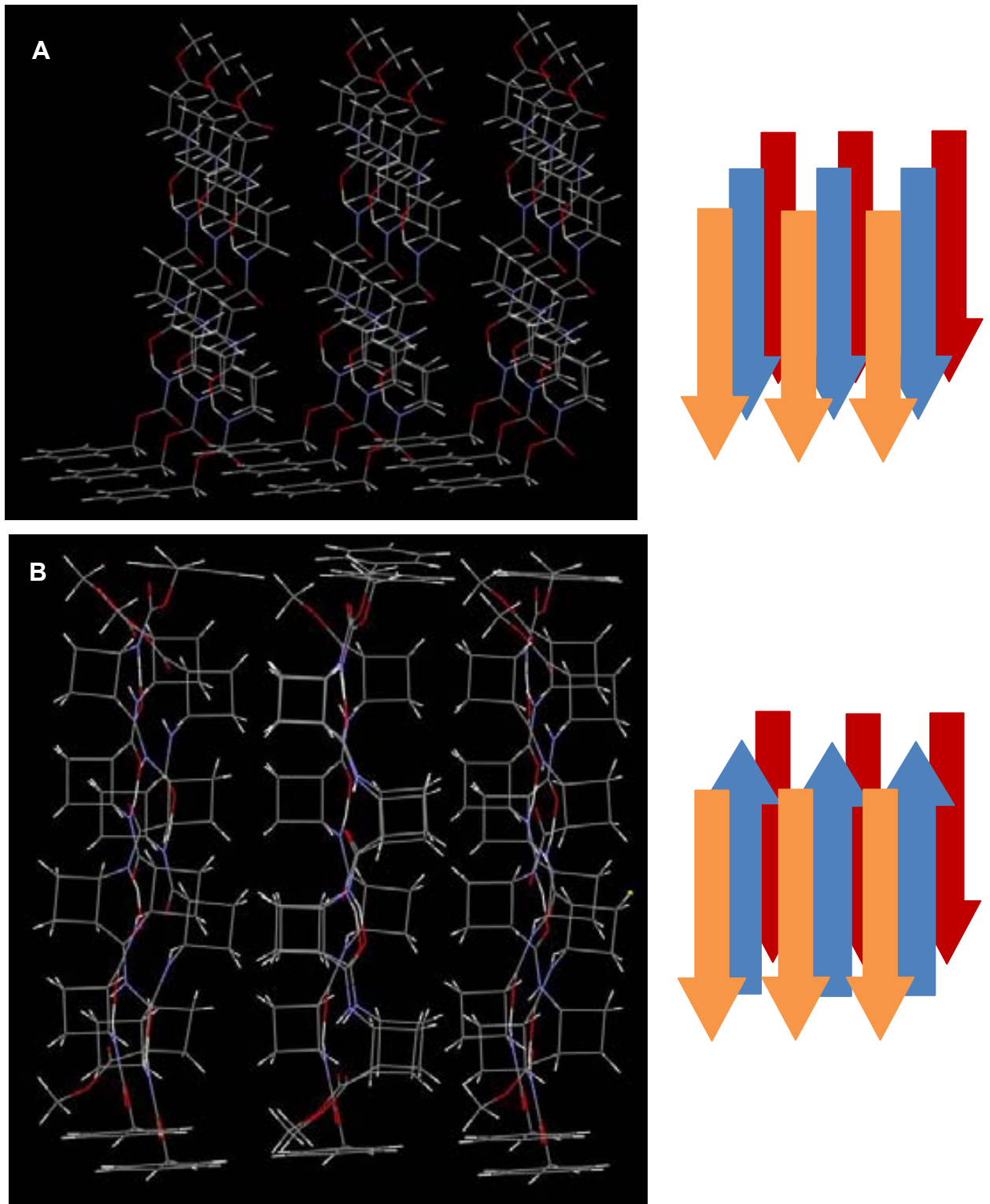


Figura 90. A) Imatge de la cel·la paral·lela. B) Imatge de la cel·la alternada

També s'ha realitzat un estudi dels enllaços d'hidrogen inter- i intramoleculars de les dues organitzacions (paral·lela i alternada) donant com a

Capítol 2: Estudi teòric de l'empaquetament

resultat que en l'agregació paral·lela les fibres interactuen una mica millor que en l'alternada mitjançant enllaços d'hidrogen. Això també indica que l'organització paral·lela està energèticament afavorida.

Aquest estudi també posa de manifest que, considerant ambdues organitzacions paral·lela i alternada, hi ha moltes més interaccions intramoleculares que no pas intermoleculares.

A la **Figura 91** es mostra una instantània de la Dinàmica Molecular de la cel·la paral·lela on algunes interaccions entre les fibres apareixen marcades. Cal remarcar, que donada la complexitat de la cel·la generada resultaria molt laboriós quantificar quins àtoms NH i CO es troben involucrats en enllaços d'hidrogen intramoleculares i quins en intermoleculares.

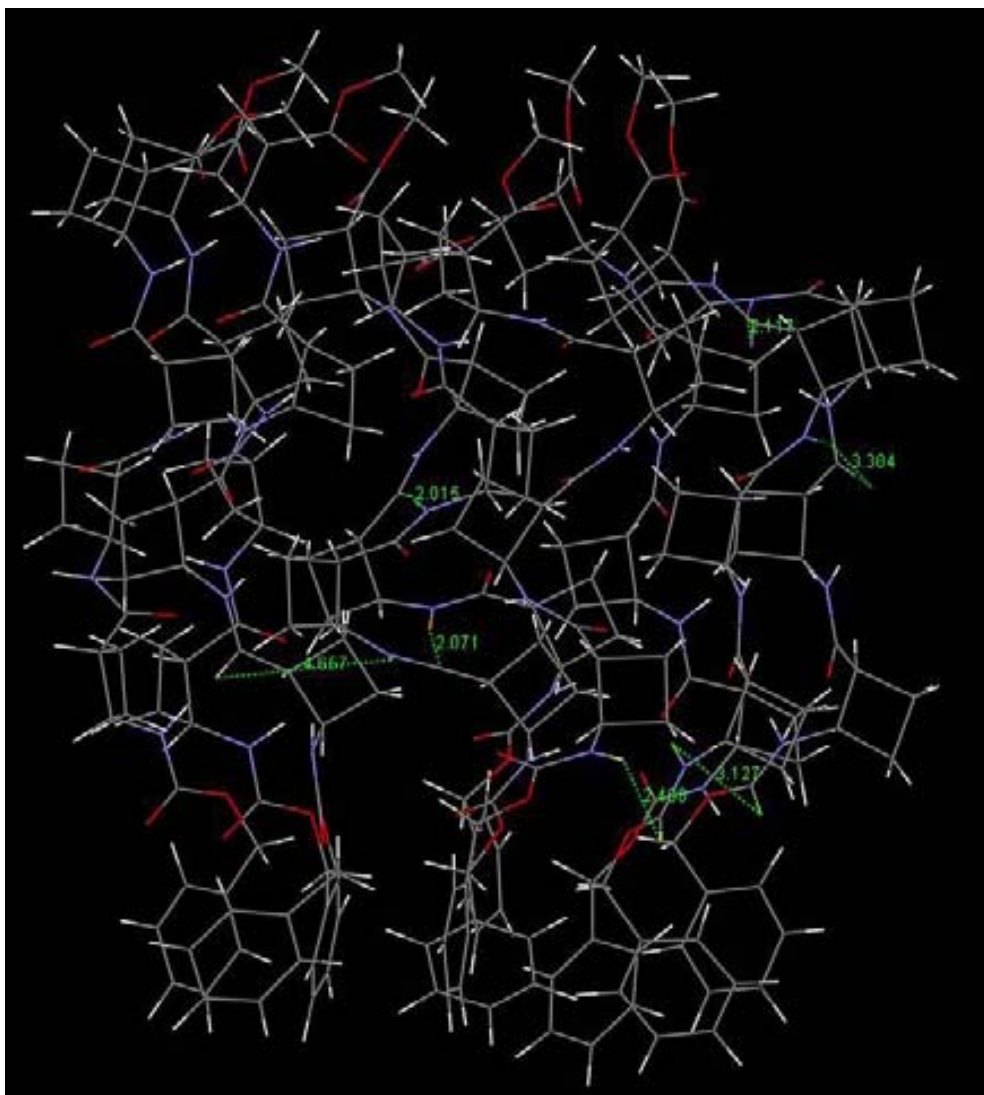


Figura 91. Instantània de la Dinàmica molecular

Així, segons aquests càlculs realitzats, sembla que existeixen un abundant nombre d'interaccions d'enllaços d'hidrogen intramoleculars on els hidrògens dels grups amida (N-H) interaccionen amb els oxígens dels grups carbonílics, explicant així, les conformacions esteses detectades en els experiments NOE. (**Figura 92**)

Així, tot i que existeixen interaccions intermoleculars dins de la cel·la, resulten majoritàries les interaccions intramoleculars fent que es mantingui l'estructura de l'oligòmer estesa. És per aquest motiu que l'estructura promig obtinguda d'aquests estudis teòrics és també la conformació estesa o *tipus cinta*.

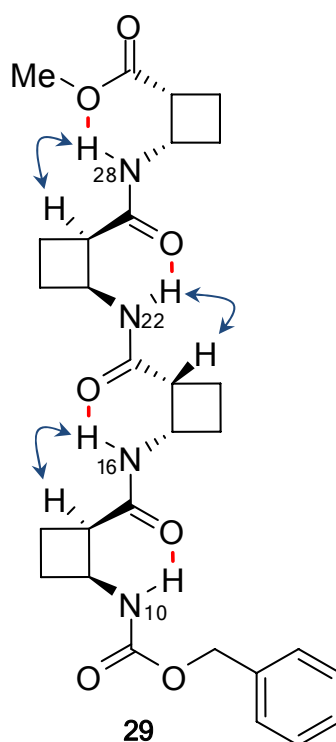


Figura 92. Conformació estesa del tetràmer **29**. En vermell apareixen marcats els enllaços d'hidrogen intramoleculars, responsables de l'adopció de la conformació estesa, i en blau els NOES observats per RMN que corroboren aquesta conformació.

2.5 Conclusions

De l'estudi estructural de l'hexàmer **32** mitjançant RMN, així com de l'octàmer **33**, i comparant amb els resultats del trímer **26** i el tetràmer **29**, s'ha pogut deduir com tota aquesta sèrie d'oligòmers *cis*-poli(ciclobutànics) presenten un mateix comportament en solució. La conformació estesa és l'adoptada per tots aquests pèptids en cloroform, com a conseqüència de la formació d'enllaços d'hidrogen intramoleculars entre els protons dels grups amida i els oxígens dels grups carbonílics. També s'han pogut corroborar aquestes evidències mitjançant la realització de càlculs teòrics, els quals han confirmat la tendència conformacional observada per RMN mitjançant la determinació de NOES inter-residuals.

Així doncs, s'ha arribat a la conclusió que aquesta sèrie de compostos *cis*-poli(ciclobutànics) adopten una estructura *tipus cinta*, connectada per 2, 3, 4, 6 i 8 girs en el dipèptid **19**, tripèptid **26**, tetrapèptid **29**, hexapèptid **32** i octapèptid **33**, respectivament. (Veure per exemple l'hexàmer **32** que es mostra a la **Figura 93**)

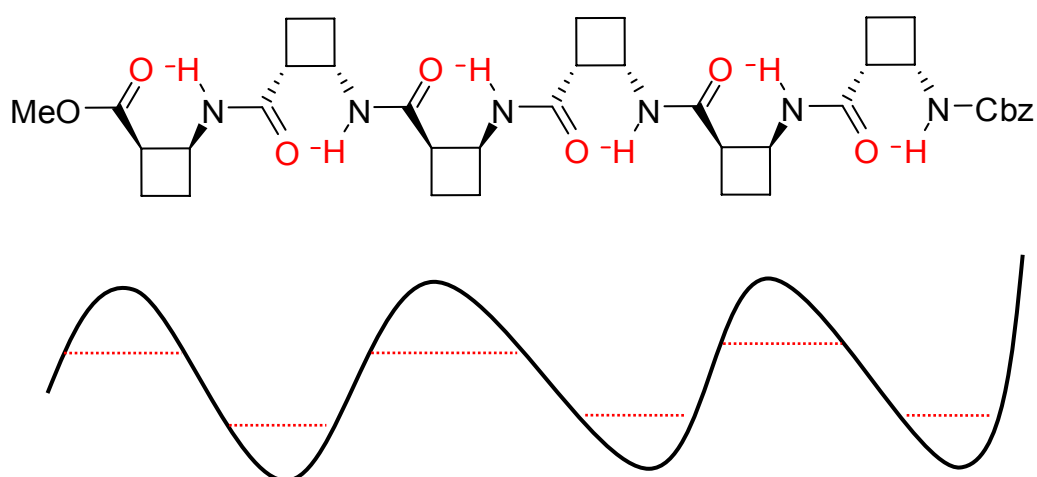


Figura 93. Estructura tipus cinta connectada per 6 girs (enllaços d'hidrogen marcats en vermell) que origina l'hexàmer **32**

De l'estudi en solució mitjançant DC, es pot deduir que l'estructura secundària específica adoptada per l'hexàmer **32** resulta ésser la més estabilitzada, respecte tota la sèrie.

També s'ha pogut comprovar per TEM com tota la sèrie de compostos segueix un comportament similar a nivell microscòpic, observant-se en tots els casos *xarxes fibril·lars*, més o menys definides i d'amplades regulars.

De l'estudi estructural del tetràptid **29** mitjançant SPFM, s'ha pogut deduir com es disposen les molècules sobre la superfície de mica, corroborant així el model d'apilament proposat pel Dr. Federico Rúa.

També, s'han realitzat càlculs teòrics per tal de justificar l'observació de morfologies fibril·lars per TEM, així com el model d'apilament proposat en el cas del tetrapèptid **29**.

Així, s'ha pogut comprovar mitjançant càlculs teòrics, la disposició del grup fenil observada per SPFM. D'aquesta manera, sembla probable que les interaccions π - π stacking, entre les diferents molècules, juguen un paper important en l'estabilització dels agregats i segurament, aquestes interaccions siguin suficientment fortes com per ser les responsables d'una l'organització paral·lela.

Com a conclusió de l'estudi teòric, es pot deduir que l'agregació amb disposició paral·lela de les fibres interactua millor que l'alternada, mitjançant interaccions d'enllaç d'hidrogen, essent aquesta organització la més afavorida energèticament. També s'ha pogut comprovar una proporció superior d'enllaços d'hidrogen intramoleculars *versus* intermoleculars, explicant així que es mantingui la conformació estesa o *tipus cinta*.

3.1 Objectius

- Síntesi dels β -dipèptid (*trans, trans*)-bis(ciclobutànic) **38** i del β -dipèptid (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic) **40**.

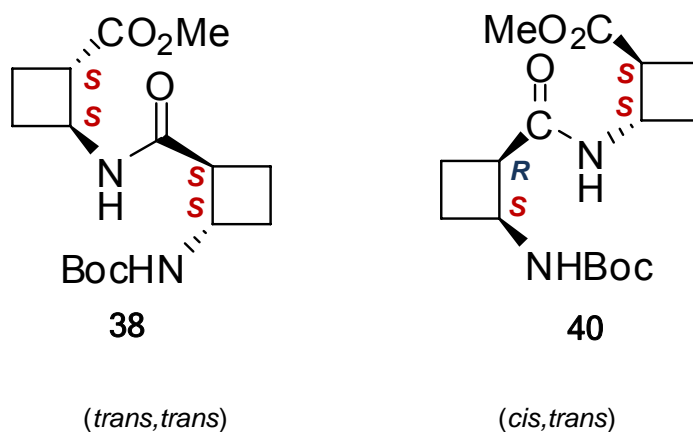


Figura 94. β -dipèptid (*trans,trans*) i (*cis, trans*)-bis(ciclobutànics) **38** i **40**

- Estudi de l'efecte de la quiralitat d'ambdós β -dipèptids realitzant un estudi estructural de les estructures secundàries i terciàries formades mitjançant tècniques de RMN, DC, càlculs teòrics, SEM, TEM i AFM.

3.2 Resultats i discussió

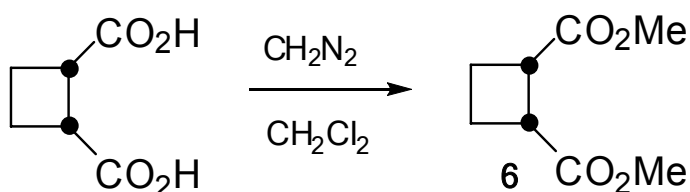
Primerament es passarà a comentar la síntesi realitzada per a l'obtenció dels β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38** i el β -dipèptid (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic) **40** que es mostren a la **Figura 94**. Per tal d'obtenir aquests compostos s'han sintetitzat tots els precursors corresponents.

Seguidament, es descriurà un estudi estructural realitzat en solució i estat semi-sòlid mitjançant tècniques de RMN i DC. També es detallaran els estudis conformacionals teòrics i supramoleculars realitzats per a cada β -dipèptid.

3.2.1 Síntesi dels β -dipèptids (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38** i (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic) **40**.

Tal com es mostrarà a continuació, la ruta sintètica seguida per a l'obtenció dels β -dipèptids (*trans,trans*) i (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic) **38** i **40** és comuna.

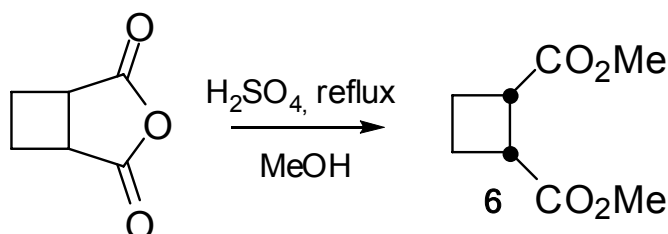
Amb anterioritat, en el nostre grup de recerca la Dra. Sandra Izquierdo i el Dr. Federico Rúa, havien sintetitzat productes derivats de la sèrie *cis*-poli(ciclobutànics) utilitzant l'àcid 1,2-ciclobutancarboxílic, comercialment assequible, com a producte de partida. Així, a partir d'aquest producte es realitzava una metilació amb diazometà en el si de clorur de metilè i s'obtenia el dièster **6** de forma quantitativa. (**Esquema 12**)



Esquema 12. Obtenció del 1,2-ciclobutandicarboxilat de dimetil, **6** a partir de l'àcid 1,2-ciclobutancarboxílic comercialment assequible.

Però donada la necessitat en la present Tesi Doctoral, de treballar a escala multigram, es va plantejar la necessitat de desenvolupar una ruta sintètica alternativa que ens permetés l'obtenció del precursor **6** amb un cost econòmic inferior, ja que 5 g de l'àcid 1,2-ciclobutancarboxílic tenen un preu de 600 euros aproximadament.

S'ha de destacar que en el nostre grup de recerca ja s'havia utilitzat una ruta sintètica diferent per obtenir el dièster *meso* com a precursor de la ruta sintètica a desenvolupar¹¹⁰ (**Esquema 13**).

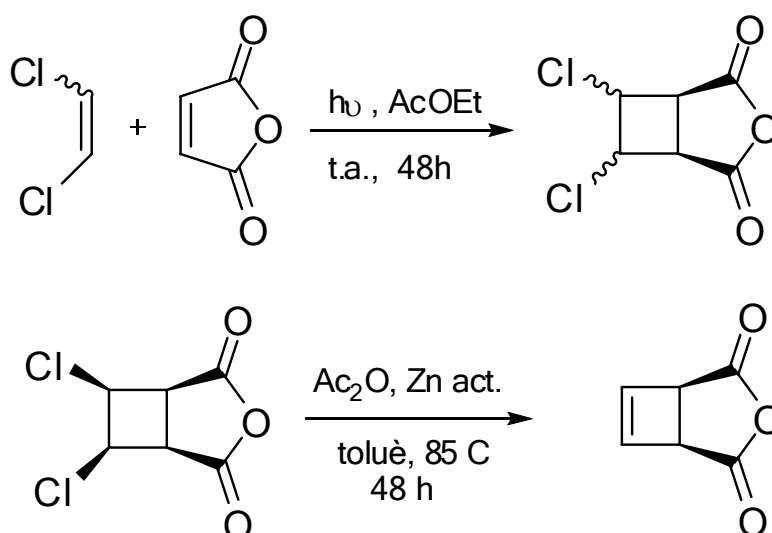


Esquema 13. Síntesi del dièster *meso*

A més, a la literatura podem trobar referències com la de Huet i col·laboradors¹¹¹, que van realitzar la preparació de la mescla d'isòmers de l'anhídrid 3,4-diclorociclobutan-1,2-dicarboxílic a partir de la cicloadició fotoquímica [2+2] entre el (*E*)-1,2-dicloroetilè i l'anhídrid maleic. Seguidament, van eliminar els clors mitjançant una reacció amb anhídrid acètic i zinc activat en el si de toluè obtenint l'adducte que es mostra a l'**Esquema 14**.

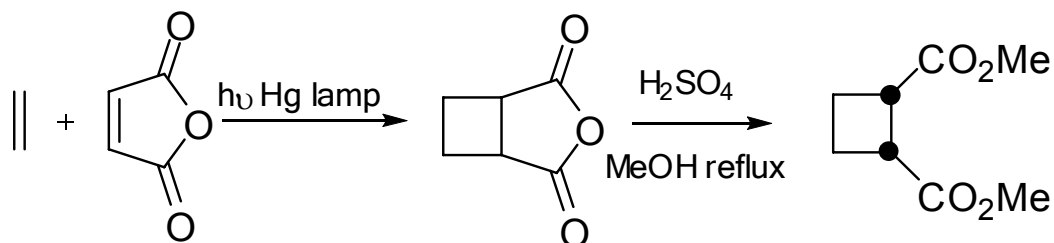
¹¹⁰ Martín-Vilà, M.; Minguillón, C.; Ortuño, R. M., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 4291 i les seves referències com per exemple Owsley, D.; Bloomfield, J.J., *J. Org. Chem.*, **1971**, 36, 3768

¹¹¹ Gauvry, N.; Comoy, C.; Lescop, C.; Huet, F., *Synthesis*, **1999**, 4, 574



Esquema 14

Darrerament aquest mateix autor¹¹² també ha publicat l'obtenció del compost proquiral 1,2-ciclobutandicarboxilat de metil mitjançant una cicloaddició fotoquímica [2+2] entre l'etilè i l'anhídrid maleic amb una posterior obertura de l'anell anhídrid cíclic per tal d'obtenir el compost proquiral. (Esquema 15)



Esquema 15

Així doncs, tenint presents aquests antecedents Esther Gorrea durant el seu Màster en Experimentació Química, ha desenvolupat una ruta alternativa (Esquema 16) que comença amb una reacció fotoquímica de cicloaddició [2+2] utilitzant dicloroetilè **1** i anhídrid maleic **2** com a productes de partida. D'aquesta manera mitjançant una reacció fotoquímica de 4 hores de durada, en el si d'acetonitril, s'obté l'adducte intermedi **3** amb un rendiment quantitatiu com a mescla d'estereoisòmers. En el nostre cas el fet que l'addició no sigui

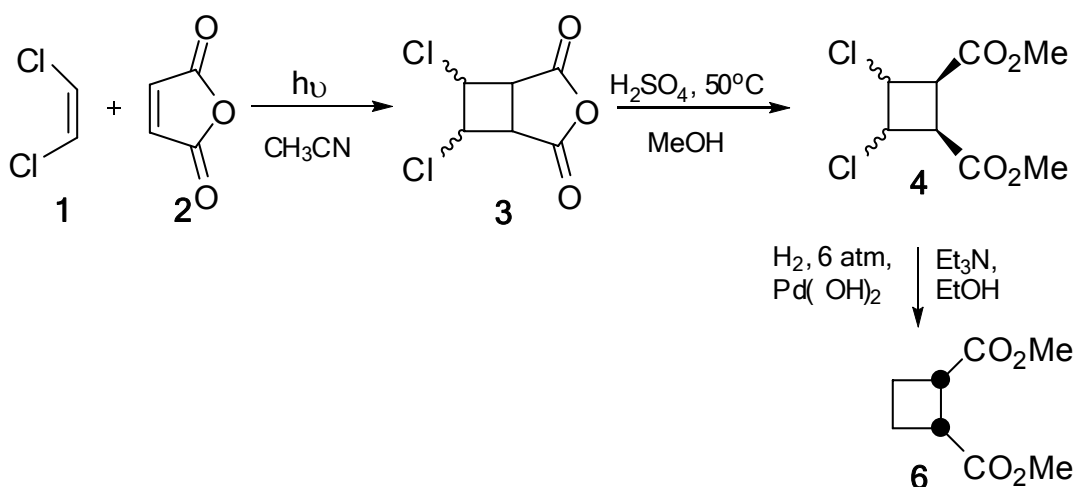
¹¹² Gu, X.; Xian, M.; Faure, S. R.; Bolte, J.; Aitken, D. J.; Gefflaut, T., *Tetrahedron Letters*, **2006**, 47, 193

Capítol 3: Ruta sintètica

estereoselectiva no ens afecta ja que en un posterior pas de la ruta sintètica es procedeix a l'eliminació dels clors.

Seguidament es procedeix a l'obertura de l'adducte en presència d'àcid sulfúric i utilitzant metanol com a dissolvent. Així, deixant la reacció a 50-70°C durant 5 hores s'obtenen els diastereoisòmers **4** amb un 87% de rendiment.

A continuació, es procedeix a l'eliminació dels clors per hidrogenació, utilitzant hidròxid de pal·ladi com a catalitzador en presència de trietilamina, i en el si d'etanol. D'aquesta manera, hidrogenant a una pressió de 6-7 atm durant 60 hores aproximadament obtenim el precursor clau de la ruta, el dièster **6**. El cru d'aquesta reacció es purifica realitzant una destil·lació a pressió reduïda (P= 1 mbar) a 150°C obtenint el producte **6** amb un 70% de rendiment.



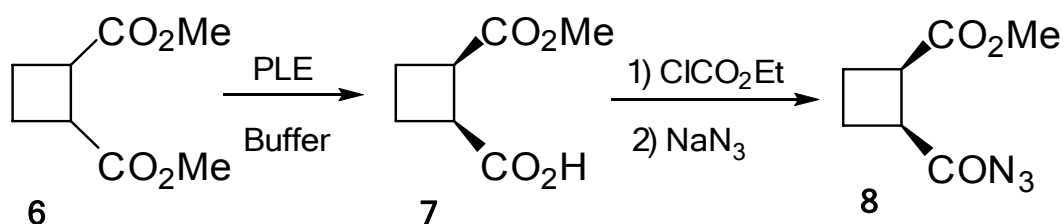
Esquema 16. Ruta sintètica desenvolupada per a l'obtenció del 1,2-ciclobutandicarboxilat de dimetil, **6** a partir del dicloroetilè **1** i l'anhídrid maleic **2**.

Així doncs, s'obté el dièster **6** a escala multigram en tres passos de síntesi, amb un rendiment global del 60% i amb un preu molt més econòmic (26.32 €/g).

Una vegada s'ha obtingut l'intermedi clau **6**, es procedeix a continuar la ruta sintètica seguint les reaccions descrites per la Dra. Marta Martín-Vilà⁹⁸

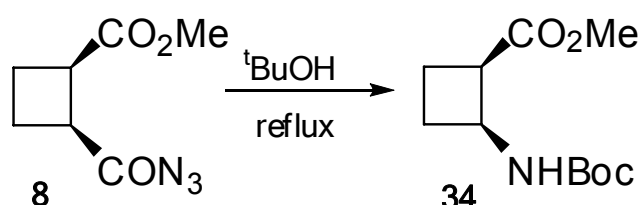
durant la seva Tesi Doctoral. D'aquesta manera, arribem a l'hemièster **7** amb un 90% de rendiment mitjançant una reacció de desimetrització amb l'enzim PLE.¹⁰⁰ Aquest hemièster **7** s'utilitza directament en la següent reacció de formació de l'acil azida **8** (**Esquema 17**). Així, es fa reaccionar l'hemièster **7** amb cloroformat d'etil en el si d'acetona anhidre, en presència de Et₃N per tal de captar el clorur d'hidrogen alliberat, a 0°C durant 3 hores, i a continuació s'addiciona l'azida sòdica dissolta en aigua. Un cop passades 1 h i 30 min la reacció es dona per finalitzada ja que s'observa per espectroscopia d'IR l'aparició d'un senyal a 2134 cm⁻¹ corresponent a la presència del grup -N₃. Aquesta acil azida **8** s'obté amb un 95% de rendiment com un oli groguenc.

Degut a la inestabilitat intrínseca de les azides no s'ha realitzat cap purificació addicional de l'acil azida **8** i s'ha utilitzat directament en el següent pas de reacció.



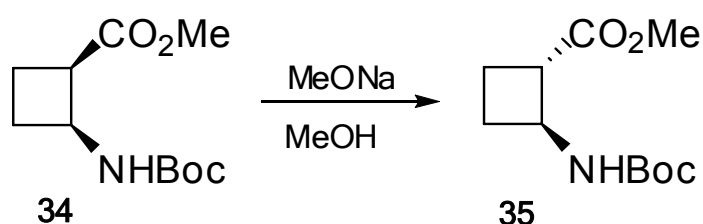
Esquema 17. Obtenció de l'acil azida **8** a partir del dièster **6**

Així, s'ha procedit a dissoldre l'azida en *tert*-butanol deixant el sistema reaccionant a reflux durant tota una nit. Seguidament el cru de reacció obtingut es purifica mitjançant una cromatografia en columna obtenint el 2-*tert*-butoxicarbonilamino-(1*R*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil **34** com un sòlid blanc i amb un 57.5% de rendiment. (**Esquema 18**)



Esquema 18. Obtenció del 2-*tert*-butoxicarbonilamino-(1*R*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil

Continuant amb la ruta sintètica i per tal d'obtenir l'aminoàcid epimeritzat 2-*tert*-butoxicarbonilamino-(1*S*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil **35** es segueixen les condicions descrites per Aitken i col·laboradors.¹¹³ Així, es canulla l'aminoàcid protegit **34** dissolt en metanol anhidre sobre MeONa comercial sota atmosfera de nitrogen obtenint-se l'epímer **35** amb un 42% de rendiment (conversió del 35.3%). (**Esquema 19**)



Esquema 19. Obtenció de l'epímer 2-*tert*-butoxicarbonilamino-(1*S*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil **35**

En el nostre cas les millors condicions de reacció per a l'obtenció d'aquest epímer s'han donat utilitzant 1.2 equivalents de MeONa i deixant el sistema a reflux durant 1h i 30 min com a màxim, ja que s'ha pogut comprovar com, tant a l'augmentar el número d'equivalents de MeONa com el temps de reacció, s'incrementen el número de productes secundaris. Per exemple, s'ha pogut identificar per Espectrometria de Masses un d'aquests productes minoritaris obtinguts, **30** (<10 % de rendiment) utilitzant 2 equivalents de MeONa (**Figura 95**).

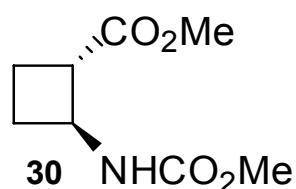
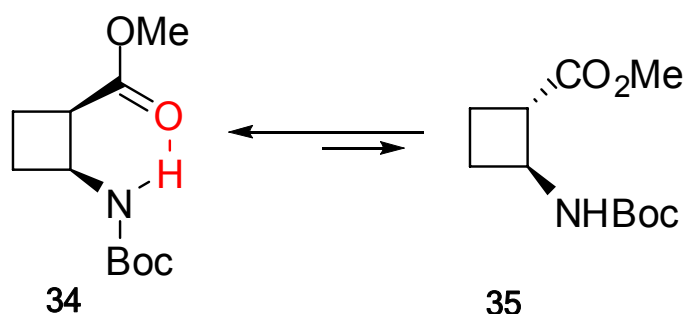


Figura 95. 2-metoxicarbonilamino-(1*S*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil

¹¹³ Fernandes, C.; Gauzy, C.; Yang, Y.; Roy, O.; Pereira, E.; Faure, S.; Aitken, D. J., *Synthesis*, **2007**, *14*, 2222

Així, tot sembla indicar que la reacció d'epimerització arriba ràpidament a un equilibri a partir del qual deixa d'avançar cap el producte desitjat **35** i comença a generar productes secundaris.

Aquest fet es pot explicar en base els resultats obtinguts per la sèrie d'oligòmers *cis*-ciclobutànics,^{51,103} ja en el nostre grup de recerca s'ha observat que tota aquesta sèrie adopta una conformació estesa en solució, com a conseqüència de la formació d'enllaços intramoleculars que originen anells de 6 baules. Així doncs, resulta evident que l'equilibri es trobi desplaçat cap el producte *cis* en comptes del *trans* ja que, aquest es troba estabilitzat formant un anell de 6 baules mitjançant un enllaç d'hidrogen intramolecular. És obvi que aquesta possibilitat de formar una estructura secundària definida, mitjançant un enllaç d'hidrogen intramolecular, no es pot donar en la conformació *trans*. (Esquema 20)



Esquema 20. Equilibri *cis-trans*

Cal dir que abans de realitzar la reacció d'epimerització sobre el monòmer protegit **34** havíem provat de dur a terme l'epimerització sobre l'hemièster **7**. D'aquesta manera, s'havia intentat realitzar la reacció utilitzant 5 equivalents de MeONa preparat al laboratori, en metanol anhidre i deixant la reacció refluxint tota una nit. Com a producte de la reacció es va obtenir un sòlid blanc amb un rendiment quantitatiu del qual es va poder realitzar difracció de raigs-X. El producte obtingut però, va resultar ser l'epímer saponificat, **31**. (Figura 96)

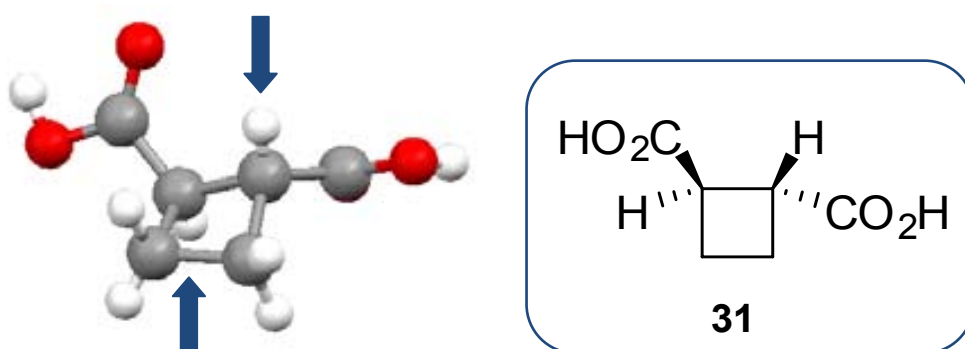


Figura 96. A l'esquerra imatge de raigs-X del monocristall del diàcid *trans* 1,2-ciclobutandicarboxílic, **31** on les fletxes blaves marquen els protons en *trans*. I a la dreta es mostra l'estructura del diàcid

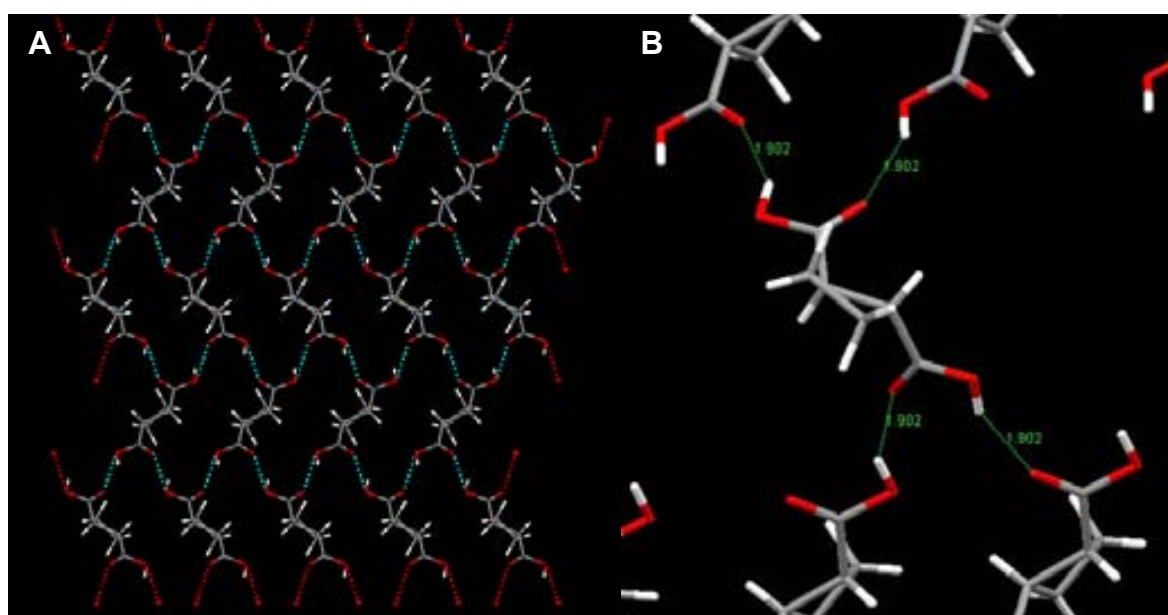


Figura 97. **A)** Empaquetament del cristall determinat per raigs-X. **B)** Ampliació d'una zona de l'empaquetament on s'aprecien enllaços d'hidrogen intermoleculars.

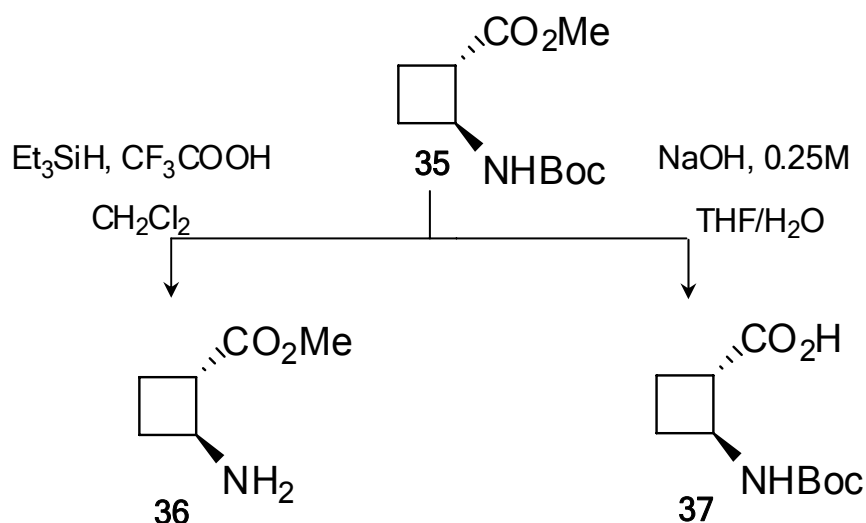
Tal com es mostra a la **Figura 97** aquest compost en estat sòlid dóna a lloc a cadenes connectades per enllaços d'hidrogen intermoleculars entre l'oxigen carbonílic (C=O) de l'àcid carboxílic d'una molècula amb el protó (OH) de l'àcid carboxílic de la molècula veïna. En conseqüència, cada oxigen carbonílic i cada H àcid donen lloc a dos enllaços d'hidrogen intermoleculars

amb dues molècules veïnes diferents i amb unes distàncies d'enllaç, en tots els casos, de 1.902 Å. Així, tal com es pot observar a la **Figura 97**, cada molècula de diàcid *trans* dona lloc a 4 enllaços d'hidrogen intermoleculars.

Continuant amb la ruta sintètica desenvolupada per a l'obtenció del dipèptid objectiu **38**, es procedeix a la desprotecció selectiva dels grups funcionals del monòmer ortogonalment protegit **35**.

Així, per una banda es procedeix a la desprotecció del carbamat de *tert*-butil per tal d'obtenir l'amina lliure **36**. D'aquesta manera, es fa reaccionar l'aminoàcid protegit **35** amb Et₃SiH i CF₃COOH en el si de CH₂Cl₂ anhidre, per obtenir el 2-amino-(1*S*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil **36** passades 4 hores, i amb un 90% de rendiment. (**Esquema 21**)

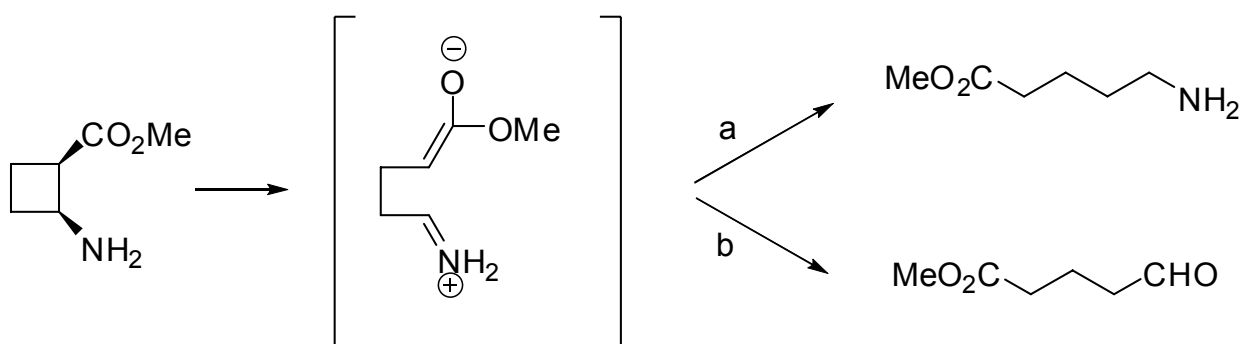
D'altra banda, per tal d'obtenir l'àcid carboxílic **37** es procedeix a la saponificació del monòmer protegit **35**. Per dur a terme aquesta saponificació es dissol el cru de reacció en una barreja de THF:H₂O (1:2) i s'addiciona una solució de NaOH 0.25 M. Seguidament es deixa la barreja agitant a 0°C durant 3 hores. Passat aquest temps s'atura la reacció i s'obté l'àcid 2-*tert*-butoxicarbonilamino-(1*S*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxílic, **37** com un sòlid blanc i amb gairebé un 80% de rendiment. (**Esquema 21**)



Esquema 21. Desprotecció selectiva de l'aminoàcid ortogonalment protegit **35** per a l'obtenció del 2-amino-(1*S*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, **36** i l'àcid 2-*tert*-butoxicarbonilamino-(1*S*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxílic, **37**

Capítol 3: Ruta sintètica

El per què de sintetitzar aquests aminoàcids *trans* amb la funció amina protegida com a carbamat de *tert*-butil i no com a carbamat de benzil, com s'havia dut a terme en la sèrie d'oligòmers *cis*-poli(ciclobutànics), té una explicació. En el nostre grup, ens vam adonar que al hidrogenar l'aminoàcid amb l'amina protegida en forma de carbamat de benzil, o al utilitzar aigua en el tractament per obtenir l'amina lliure, s'obtenia una barreja de productes com a conseqüència de l'obertura del ciclobutà.⁵¹ (**Esquema 22**)

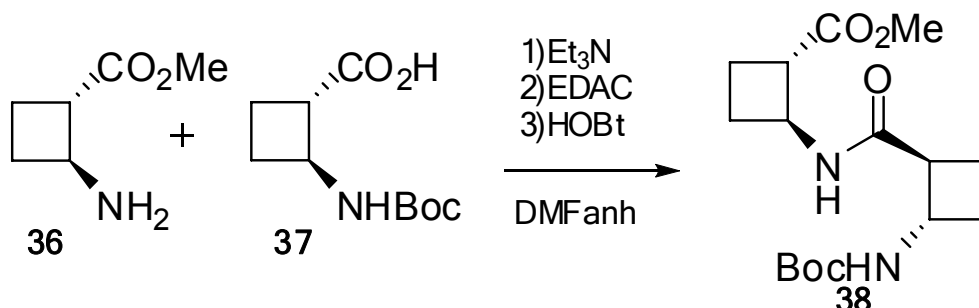


Esquema 22. Obertura del ciclobutà. a) H₂, b) TFA, Et₃SiH, CH₂Cl₂, H₃O⁺

D'aquesta manera, s'obtenia l'aminoèster que es mostra a l'**Esquema 22**, mitjançant un sistema captodatiu que podia evolucionar cap a una sal d'imini de cadena oberta, la qual es reduïa *in situ* donant lloc a un δ-aminoèster aquiral. D'altra banda si s'utilitzava aigua en el tractament de l'amina per eliminar les traces de TFA, la sal s'hidrolitzava obtenint l'aldehid lineal que es mostra a l'Esquema. Aquesta obertura també havia estat observada per Aitken i col·laboradors.¹⁵

Continuant amb la ruta sintètica objectiu, i una vegada hem desprotegit selectivament cada grup funcional i hem disposat dels aminoàcids **36** i **37**, s'ha procedit a realitzar una reacció d'acoblament peptídica sota condicions clàssiques, és a dir, utilitzant EDAC com a agent deshidratant, HOBT com a catalitzador, en el si de DMF anhidre i a temperatura ambient durant 7 dies. Passat aquest temps s'atura la reacció i s'obté, després de dur a terme una

purificació per cromatografia en columna, el dipèptid (*trans,trans*)-**38** com un sòlid blanc amb un 42% de rendiment. (**Esquema 23**)



Esquema 23. Reacció d'acoblament per a l'obtenció del β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic), **38**

D'altra banda, per tal d'estudiar l'efecte de la quiralitat en els β -dipèptids bis(ciclobutànic), s'ha procedit a sintetitzar el β -dipèptid (*cis,trans*) bis(ciclobutànic), **40**. La ruta sintètica emprada és pràcticament idèntica a l'anterior essent la única diferència principal el fet que s'utilitzi per l'acoblament dos monòmers diferents, un *trans* i un *cis*, i no ambdós *trans* com en el cas del β -dipèptid anterior **38**.

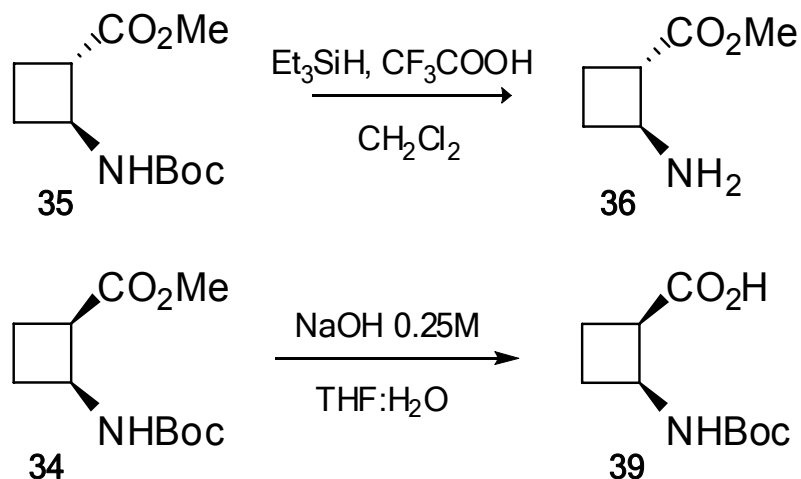
Així, es procedeix a la desprotecció del carbamat de *tert*-butil de la mateixa manera abans descrita, obtenint l'amina lliure **36**.

També, es realitza sota les condicions descrites anteriorment, la saponificació del monòmer ortogonalment protegit 2-*tert*-butoxicarbonilamino-(1*R*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, **34** amb el propòsit d'obtenir l'àcid 2-*tert*-butoxicarbonilamino-(1*R*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxílic, **39**. Així, seguint aquesta metodologia s'obté l'àcid carboxílic **39** com un sòlid blanc amb un 72% de rendiment. (**Esquema 24**)

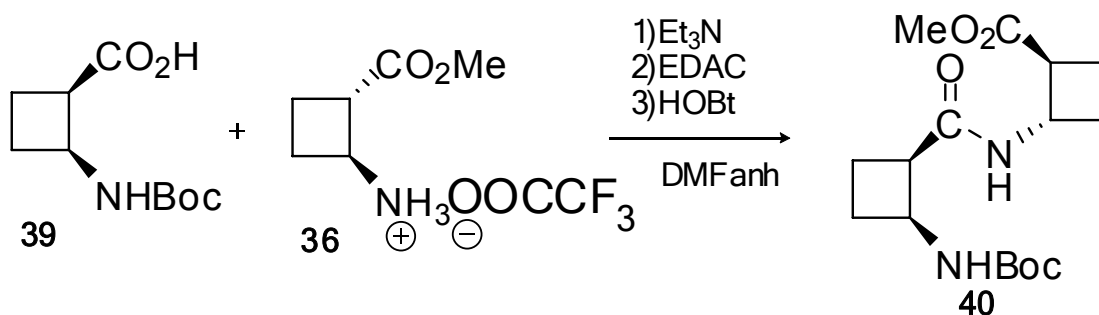
Seguidament, es procedeix a realitzar un acoblament peptídic clàssic entre el 2-*tert*-butoxicarbonilamino-(1*R*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil **34**, en forma de trifluoroacetat i l'àcid 2-*tert*-butoxicarbonilamino-(1*R*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxílic **39**. Les condicions emprades són les abans descrites,

Capítol 3: Ruta sintètica

obtenint en aquest cas el β -dipèptid (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic) **40**, amb un 44% de rendiment. (**Esquema 25**)



Esquema 24. Desprotecció selectiva dels aminoàcids **34** i **35** per a l'obtenció del 2-amino-(1*S*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxilat de metil, **36** i l'àcid 2-*tert*-butoxicarbonilamino-(1*R*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxílic, **39**



Esquema 25. Obtenció del β -dipèptid (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic), **40** mitjançant un acoblament peptídic clàssic.

Així doncs, s'ha sintetitzat, utilitzant una mateixa estratègia sintètica, dos β -dipèptids bis(ciclobutànics) amb diferent quiralitat.

3.2.2 Estudi estructural en solució del β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38**

I. Estudi estructural del β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38** mitjançant RMN

Una vegada sintetitzat i convenientment purificat el β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38**, s'ha dut a terme la caracterització i assignació completa mitjançant RMN (^1H , ^{13}C , DEPT, HSQC, HMBC, COSY). Aquesta caracterització s'ha realitzat utilitzant com a dissolvent CDCl_3 . (Veure *Annex 3: Experiments de RMN*) L'espectre obtingut per RMN de ^1H es mostra a la **Figura 98**.

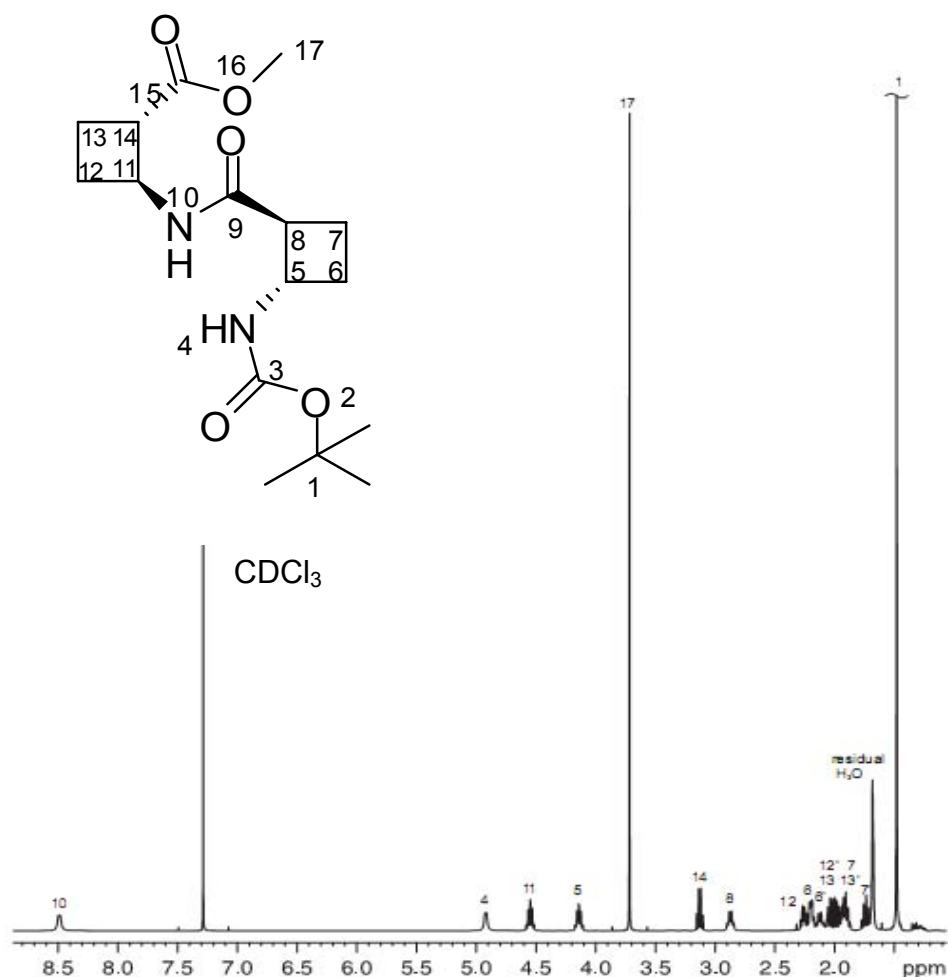


Figura 98. Espectre de RMN de ^1H del β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38** en CDCl_3 , enregistrat a 298 K en un espectrofotòmetre Bruker Avance de 500.13 MHz per ^1H .

Capítol 3: Estudi estructural

Per tal de dur a terme una assignació inequívoca de les senyals de l'espectre de RMN de ^1H s'han realitzat experiments monodimensionals de TOCSY i NOESY selectiu. (**Figura 99**)

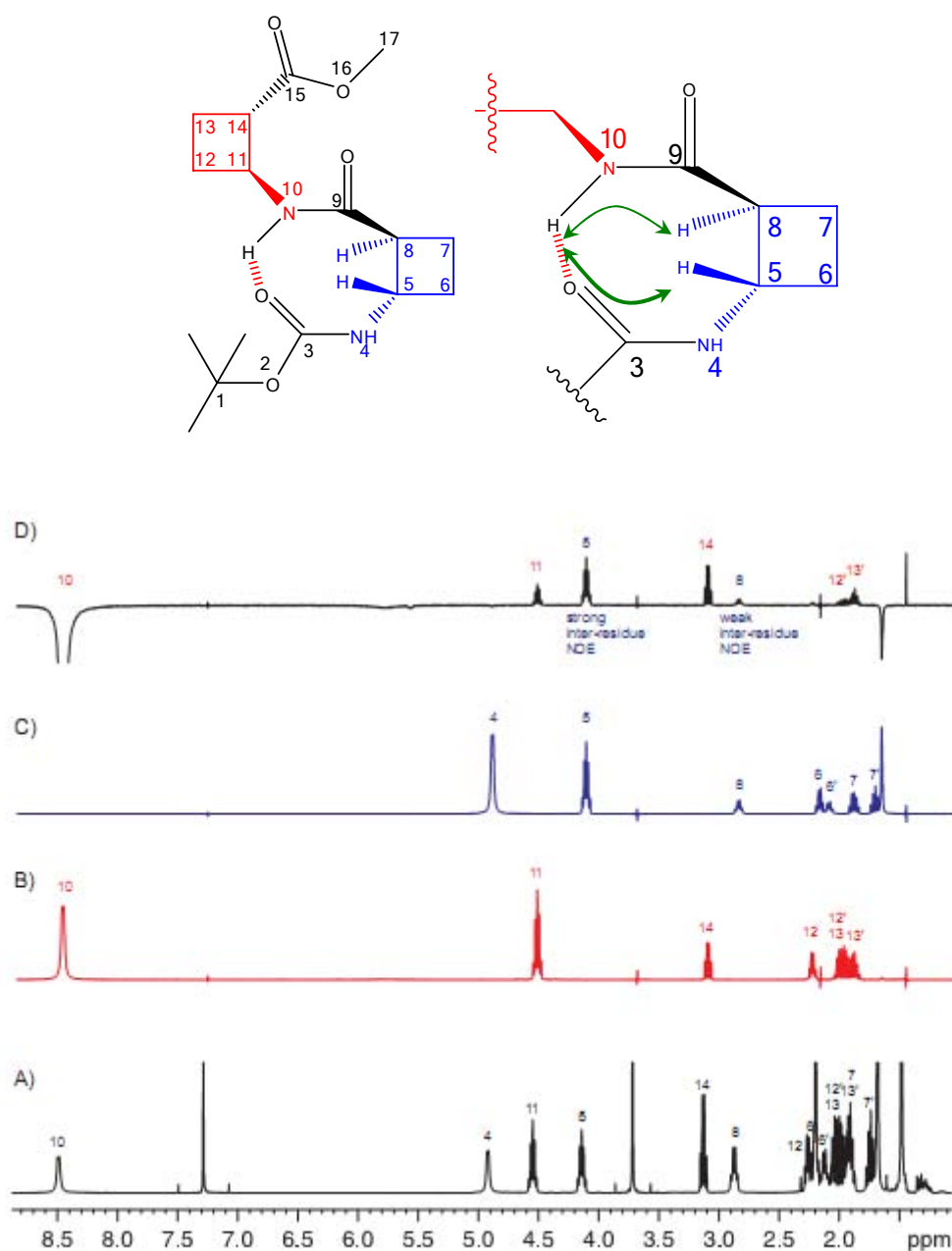


Figura 99. **A)** RMN de ^1H . **B)** Experiment de TOCSY 1D selectiu irradiant al protó NH_{10} . La magnetització es transfereix pels spins de tots els residus del sistema utilitzant un temps de barreja de 60 ms. **C)** Experiment de TOCSY 1D selectiu irradiant al protó NH_4 . La magnetització es transfereix pels spins de tots els residus del sistema utilitzant un temps de barreja de 60 ms. **D)** Experiment de NOESY selectiu 1D irradiant el protó NH_{10} (amb un temps de barreja de 500 ms). En vermell i blau es mostren els NOE intra- i inter-residuals, respectivament.

Mitjançant l'experiment monodimensional de TOCSY selectiu, (**Figura 99B i 99C**) es realitza una irradiació selectiva dels NH_{10} i NH_4 , amb una posterior transferència magnètica a tot el spin del sistema, obtenint així espectres de RMN de 1H amb les senyals de cada residu per separat. D'aquesta manera obtenim informació de a quin residu pertany cada senyal observada a l'espectre de RMN de 1H .

A més a més, la disposició espacial entre els residus ha quedat resolta mitjançant l'execució d'un experiment monodimensional de NOESY, irradiant selectivament sobre el protó del NH_{10} . D'aquesta manera, dins d'aquest residu es poden observar dos contactes NOE inter-residuals (**Figura 98D**), un d'ells molt fort entre el NH_{10} - H_5 i un altre més feble entre el NH_{10} - H_8 .

Aquests NOES clarament observats, ens indiquen que el protó NH_{10} està formant un enllaç d'hidrogen inter-residual amb l'oxigen del carbonil $O=C_3$ donant lloc a una estructura cíclica de 8 membres, on els protons H_5 i H_8 apuntant cap a l'interior d'aquesta tal com es mostra a la **Figura 99**.

El tret més característic d'aquest β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38** ha estat l'aparició del NH_{10} al voltant de 8.5 ppm, trobant-se aquest protó molt desapantallat.

La característica més sorprenent d'aquest compost es va donar al intentar recristalitzar-lo per dur a terme la seva purificació utilitzant diferents barreges de dissolvents. Així doncs, al intentar recristalitzar una solució 30 mM en CH_2Cl_2 / pentà 1:1 s'ha obtingut un gel translúcid, que col·lapsa a 303 K. També s'ha obtingut un gel transparent que col·lapsa a 277 K d'una solució 15 mM en toluè. (**Figura 100**)

Cal remarcar que el gel format pel β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38** (**Figura 100**) resulta totalment estable durant diversos dies a temperatura ambient.



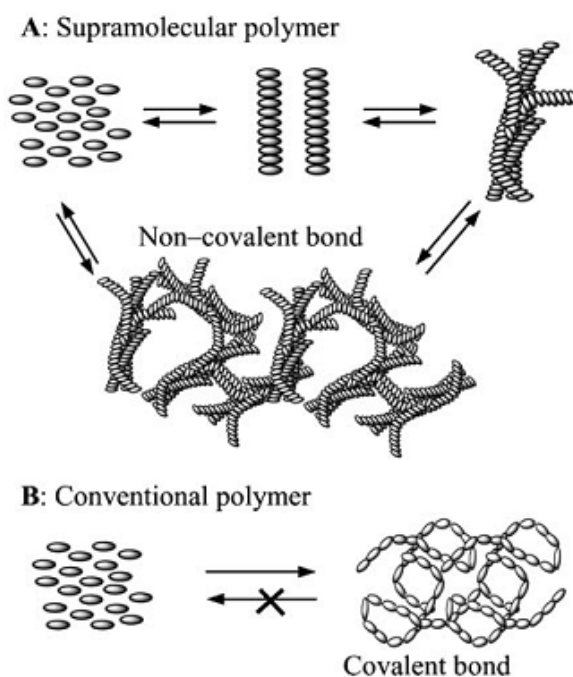
Figura 100. A l'esquerra imatge del β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38** gelificat (translúcid) en una solució de CH_2Cl_2 /pentà 30 mM i a la dreta en toluè (transparent) 15 mM.

Així doncs, davant aquest fet, es va plantejar la possibilitat de realitzar un experiment HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning) en col·laboració amb el Dr. Pau Nolis del Servei de RMN de la UAB. Aquesta és una tècnica que permet realitzar una RMN en estat semi-sòlid obtenint així, un espectre amb resolució comparable a la observada en solució.

S'ha de tenir present que la gelificació de fluids orgànics de baix pes molecular és un tema que està adquirint un creixent interès en els darrers anys, ja que són possibles nombroses aplicacions com a materials tous "intel·ligents", basant-se en la transició de fase controlada de "gel-a-solució", la qual es pot desencadenar mitjançant diferents estímuls externs o interns com la temperatura, la llum, el pH o la identificació d'un solut específic. Aquestes aplicacions inclouen sistemes d'alliberació de nous fàrmacs, enginyeria de teixits, tractament de residus líquids i més recentment, la preparació de materials nano-dimensionals mitjançant processos sol-gel.

En general, s'ha demostrat que els gels es formen mitjançant l'auto-assemblatge de les molècules de l'agent gelificant, donant lloc a agregats fibril·lars estabilitzats per interaccions específiques intermoleculares. D'aquesta manera, quan els agregats són suficientment llargs, s'organitzen en xarxes

tridimensionals capaces d'immobilitzar el solvent¹¹⁴ i donant lloc a un gel. Així, aquest gel es troba format per l'auto-assemblatge no covalent de nanofibres, originant el que s'anomena polímer supramolecular. (**Esquema 26**)



Esquema 26. Formació de polímers supramolculars (A) i convencionals (B)

Tot i que els polímers convencionals (macromolècules) tenen una unitat polimèrica que es manté unida per enllaços covalents, les unitats monomèriques dels polímers supramolculars es troben unides ordenadament mitjançant enllaços no covalents, com per exemple enllaços d'hidrogen, van der Waals, π -stacking, electrostàtic, i interaccions de coordinació.¹¹⁵

Així doncs, amb aquestes premisses es va decidir realitzar un estudi estructural mitjançant RMN del gel format pel β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38**. D'aquesta manera, s'ha realitzat un espectre de HR-MAS utilitzant com a dissolvent CD_2Cl_2 i pentà (sense deuterar) amb l'objectiu

¹¹⁴ Dzolic, Z.; Wolsperger, K.; Zinic, M., *New J. Chem.*, **2006**, 30, 1411-1419 i les seves referències com per exemple: Terech, P.; Weiss, R. G., *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 3133-3159 o Estroff, L. A.; Hamilton, A. D., *Chem Rev.*, **2004**, 104 (3), 1201-1218

¹¹⁵ Suzuki, M.; Setoguchi, C.; Shirai, H.; Hanabusa, K., *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 8193-8200 i les seves referències

Capítol 3: Estudi estructural

d'obtenir informació sobre quina és l'estructura que origina la formació del gel. L'espectre obtingut es mostra a la **Figura 101**.

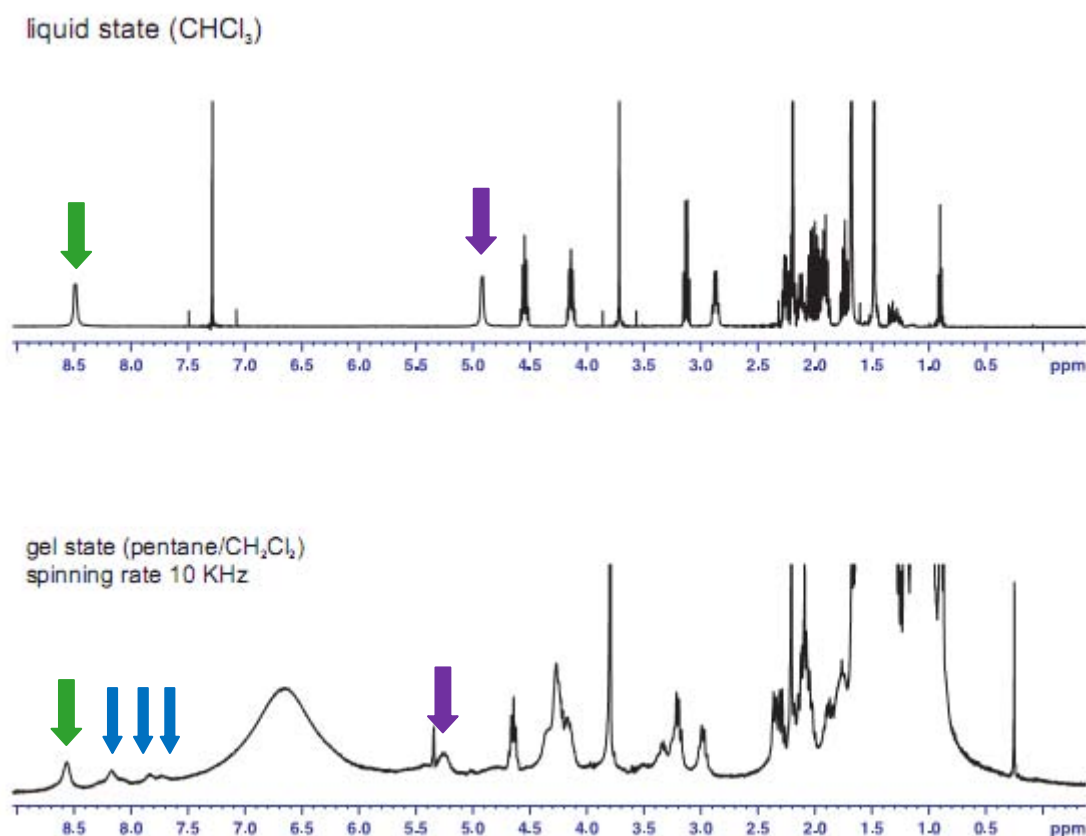


Figura 101. Comparació de l'espectre tradicional del β -dipèptid **38** realitzat en solució de CHCl_3 (a dalt) i l'espectre en estat gel del mateix compost en CH_2Cl_2 /pentà (a baix). Amb la fletxa verda es marca el NH_{10} i amb la lila el NH_4 . Amb les fletxes blaves es marquen els senyals que podrien correspondre a la formació d'enllaços intermoleculars per part dels NH .

Tal com s'observa a la **Figura 101**, s'ha obtingut un espectre que presenta força resolució tenint en compte que s'ha dut a terme en estat semi-sòlid, però que presenta un eixamplament dels senyals considerable. Si es posa atenció a la zona del NH_{10} (marcat a la **Figura 101** amb fletxes blaves), es pot observar com entre 7.5 ppm i 8.5 ppm apareixen més senyals dels que s'observen en estat líquid. El fet que a la zona del protó amídic és on apareguin els nous senyals, i que la resta de senyals de l'espectre romanguin pràcticament inalterats, ens porta a pensar que aquests nous senyals poden

correspondre a interaccions intermoleculares dels protons amídics entre diferents molècules. Així, aquests nous senyals marcats en blau, podrien correspondre a la formació d'enllaços intermoleculares per part de NH_4 , i això provocaria que els senyals, corresponents a aquests protons involucrats en enllaços d'hidrogen intermoleculares, apareguessin a desplaçaments químics més alts.¹¹⁶

Així doncs, segons el que s'observa a l'espectre del gel es pot proposar un model que justifiqui la seva formació mitjançant interaccions d'enllaç d'hidrogen intermoleculares i forces de van der Waals entre les diferents molècules. El model que es proposa es mostra a la **Figura 102**.

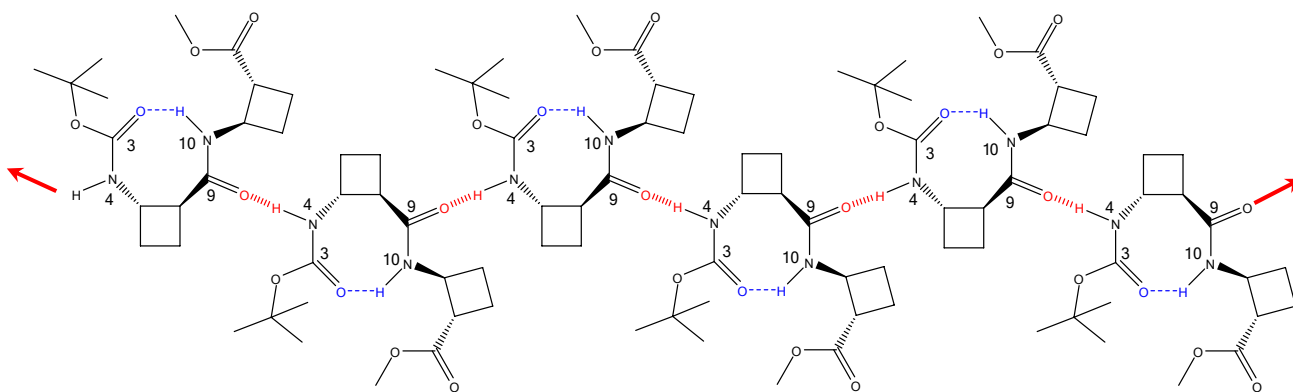


Figura 102. Model proposat per justificar la formació del gel obtingut

Segons aquest model, per RMN en estat semi-sòlid s'estaria observant la formació d'enllaços intermoleculares (marcats en vermell a la **Figura 102**) entre el NH_4 del β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38** i l'oxigen del grup carbonil $C_9=O$ de la molècula veïna, mantenint-se sempre l'enllaç d'hidrogen intramolecular (marcat en blau a la **Figura 102**) entre el NH_{10} i l'oxigen del grup carbonil $C_3=O$ de la mateixa molècula.

D'altra banda, amb el propòsit d'entendre millor el procés de gelificació del β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38**, i com a estudi preliminar, s'ha

¹¹⁶ Tu, T.; Assenmacher, W.; Peterlik, H.; Weisbarth, R.; Nieger, M.; Dotz, K. H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 6368-6371

Capítol 3: Estudi estructural

seguit l'evolució d'aquest procés enregistrant espectres de RMN de ^1H a diferents temperatures utilitzant toluè- d_8 per dur a terme la determinació de la temperatura de transició sol-gel.¹¹⁷ S'ha utilitzat aquest solvent perquè resulta més adequat per realitzar experiments de RMN de ^1H que el pentà i CD_2Cl_2 .

Així, s'han enregistrat espectres de RMN de ^1H (400 MHz) d'una solució 15 mM en toluè deuterat del β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38** des de 298 K fins a 270 K, en intervals de 1 K. Amb aquestes dades s'ha realitzat una gràfica de la temperatura *versus* els valors de les integrals normalitzades. (**Figura 103**)

En aquesta gràfica (**Figura 103**) es veu com tots els senyals dels protons es mantenen inalterats en el rang de temperatures entre 298 K i 292 K, indicant així que la mostra es troba en estat líquid. A temperatures més baixes, s'observa un comportament diferent del protó NH_{10} comparat amb els altres. Així doncs, mentre el senyal del protó NH_{10} comença a decaure notablement, el resta de senyals presenten una disminució molt més suau fins que la temperatura arriba a 282 K. Aleshores, es detecta un punt d'inflexió amb un decreixement pronunciat per tots els protons. A la temperatura més baixa estudiada (270 K), només el 29% del senyal del protó NH_{10} es manté, mentre que aproximadament un 40% dels senyals corresponents a la resta de protons es manté.

Aquests resultats indiquen clarament que l'enllaç d'hidrogen intramolecular entre el NH_{10} i l'oxigen del $\text{C}_3=\text{O}$ és suficientment fort per induir a aquesta molècula a adoptar una disposició en l'espai que resulti adequada per auto-assemblar-se amb altres molècules a través del NH_4 i $\text{C}_9=\text{O}$. (**Figura 102**)

¹¹⁷ Brand, T.; Nolis, P.; Richter, S.; Berger, S., *Magn. Reson. Chem.*, **2008**, 46, 545

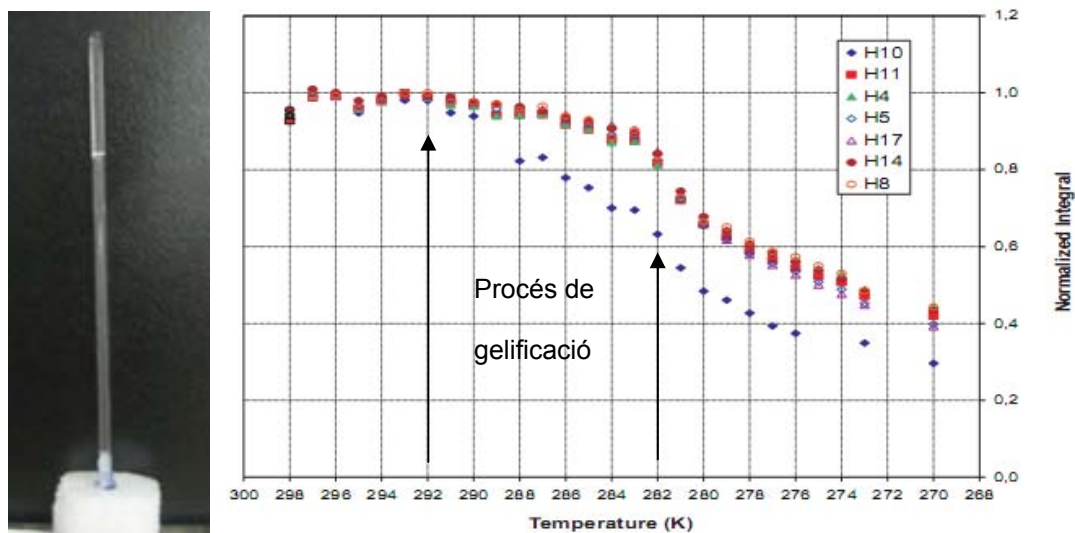


Figura 103. Gel format en una solució 15 mM de toluè a 277 K. A la dreta es mostra la dependència amb la temperatura de les integrals normalitzades dels protons durant el refredament des de 298 K a 270 K. Els protons H₄ (▲), H₅ (◇), H₈ (□), H₁₀ (◆), H₁₁ (■), H₁₄ (●) i H₁₇ (△) han estat assignats.

Donat que el punt de gelificació no està massa ben definit per tots els protons, suposem que el procés de gelificació comença a 292 K seguint un model isodèsmic, és a dir, amb una transició pobrament definida des del monòmer fins a agregats estesos, passant per la formació de dímers, trímers i oligòmers. Cal destacar que, a mesura que es baixa la temperatura, i es va gelificant la mostra, l'espectre no presenta nous senyals, és a dir, la presència d'aquests oligòmers no es veu a l'espectre de protó indicant que aquests ja formen part de l'estructura més rígida del gel, la qual no es pot detectar per RMN en solució.

També suggerim que el punt d'inflexió a 282 K és degut a la creació d'un grau de reticulació superior, probablement la formació d'una xarxa polimèrica reticular tridimensional, la qual es detecta simultàniament per tots els protons i en conseqüència fa que apuntin cap a un cert grau d'auto-assemblatge cooperatiu.¹¹⁸

¹¹⁸ Hirst, A. R.; Coates, I. A.; Boucheteau, T. R.; Miravet, J. F.; Escuder, B.; Castelletto, V.; Hamley, I. W.; Smith, D. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130 (20), 9113

Conseqüentment, aquest β -dipèptid **38** ha estat investigat per tota una sèrie de diferents mètodes amb l'objectiu de constatar la seva habilitat a auto-assemblar-se, conduint a una gelificació macroscòpica en solvent orgànic.

II. Estudi estructural del β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic), **38 mitjançant DC**

El DC és una tècnica àmpliament utilitzada en la determinació d'estructures secundàries en proteïnes (p. e. α -hèlix), i resulta un mètode adequat per provar l'organització d'un compost gelant dins d'un entorn quiral nanoestructurat.¹¹⁹

Donat que els grups amida absorbeixen al voltant de 220 nm s'ha utilitzat com a solvent el metanol, ja que aquest absorbeix a longituds d'ona més baixes, i ens permet obtenir uns espectres on el solvent no intervé a la zona d'interès.

Després de provar diferents concentracions (0.5 mM, 1 mM i 5 mM) s'ha trobat que la concentració més adequada resulta ser la 0.5 mM per la millor relació senyal/soroll que proporciona. De totes maneres, s'ha pogut observar com la intensitat de l'espectre és directament proporcional a la concentració de la mostra. (**Figura 104**)

També s'ha pogut observar com l'espectre pràcticament no varia amb la temperatura mantenint sempre el màxim i el mínim observats a temperatura ambient. (**Figura 104B**)

Les bandes que s'observen a l'espectre per aquest β -dipèptid **38** es poden atribuir a l'auto-assemblatge de les molècules del compost originant una nanoestructura quiral. Així, tal com s'observa a la **Figura 104A**, aquest compost presenta un marcat efecte Cotton centrat al voltant de 215 nm, amb

¹¹⁹ Hardy, J. G.; Hirst, A. R.; Ashworth, I.; Brennan, C.; Smith, D. K., *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 7397-7406

una intensitat de $2.1 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 225 nm i de $-1.5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 210 nm aproximadament.

Així doncs, aquestes bandes poden indicar que els cromòfors CONH del compost responen a una nanoestructura organitzada quiral.

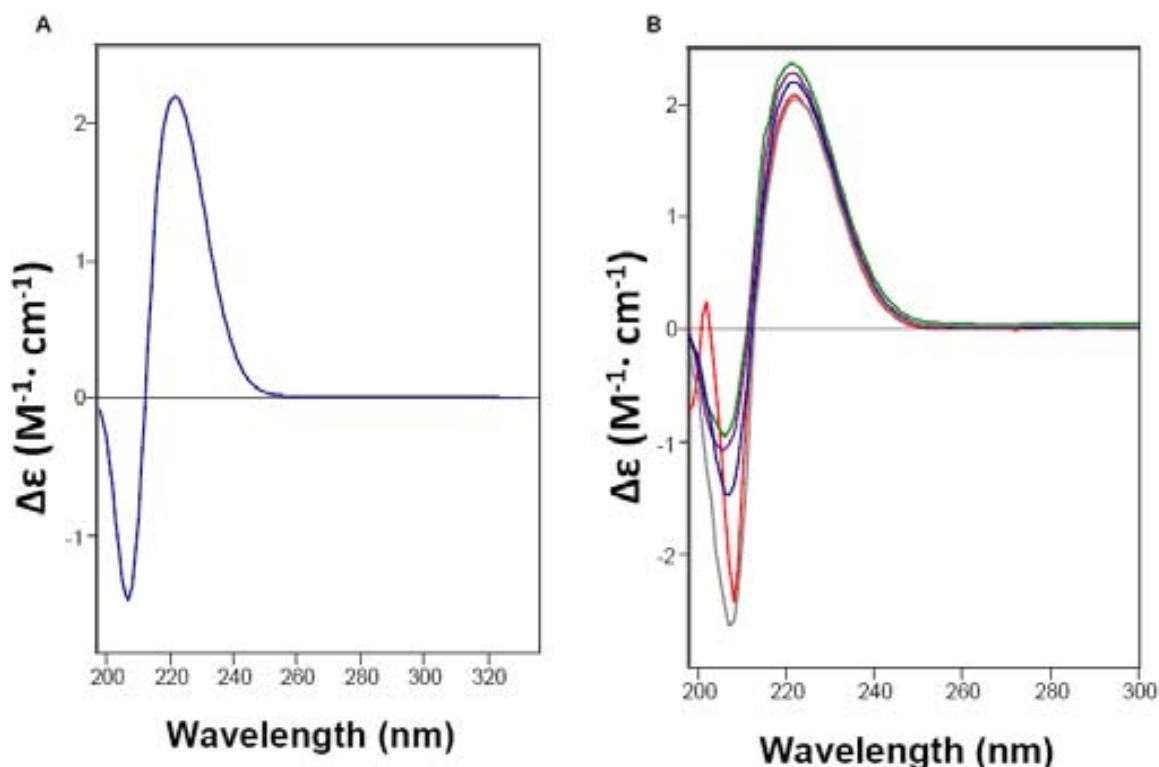


Figura 104. **A)** Espectre de DC d'una solució 0.5 mM en metanol. **B)** Superposició d'espectres de DC a diferents temperatures d'una solució 0.5 mM en metanol a $-5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$

D'altra banda, també s'ha determinat l'espectre computacional de DC electrònic del confòrmer més estable del β -dipèptid (*trans,trans*)-**38**, obtingut mitjançant càlculs teòrics. Així, utilitzant el programa Gauss View s'ha obtingut l'espectre que es mostra a la **Figura 105**, on es pot observar un màxim a 220 nm i un mínim de menys intensitat al voltant de 190 nm. Tenint en compte que aquests càlculs no són exactes, ja que no tenen en compte el solvent, es pot dir que l'espectre obtingut concorda força bé amb l'espectre de DC experimental recolzant així la conformació més estable obtinguda mitjançant càlculs teòrics.

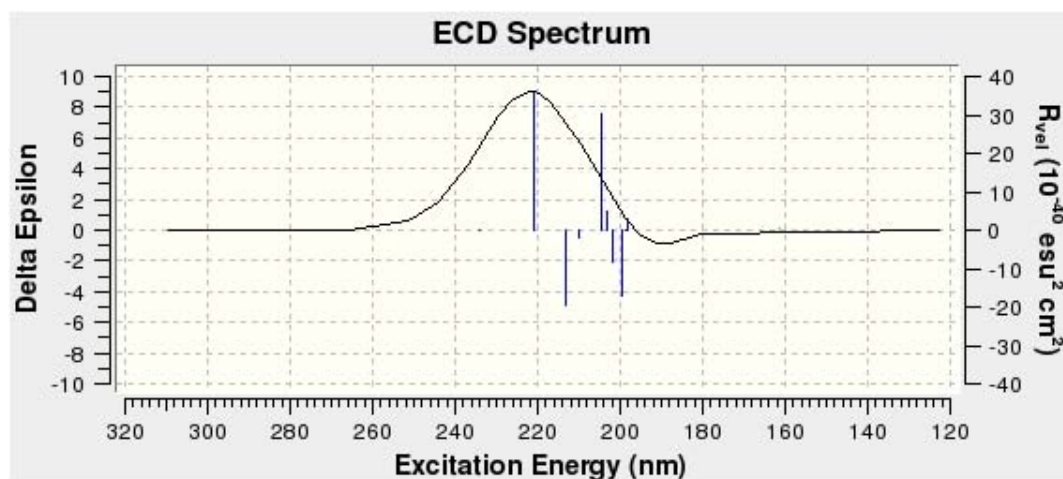


Figura 105. Espectre electrònic de DC del β -dipèptid (*trans,trans*)-**38** realitzat amb Gauss View.

3.2.3 Estudi supramolecular del β -dipèptid (*trans,trans*)-*bis*(ciclobutànic) **38**: SEM, TEM i AFM

Per dur a terme l'estudi supramolecular del β -dipèptid (*trans,trans*)-**38**, s'han utilitzat diferents tècniques microscòpiques: SEM, TEM i AFM.

Primerament s'ha dut a terme l'estudi supramolecular del gel format en una barreja d'AcOEt/pentà. Així, s'ha realitzat un experiment SEM (Scanning Electron Microscopy) d'aquest gel depositant una petita fracció d'aquest gel "mullat" sobre un film de grafit i treballant a pressió ambiental. D'aquesta manera, s'han obtingut les imatges que es mostren a la **Figura 106**.

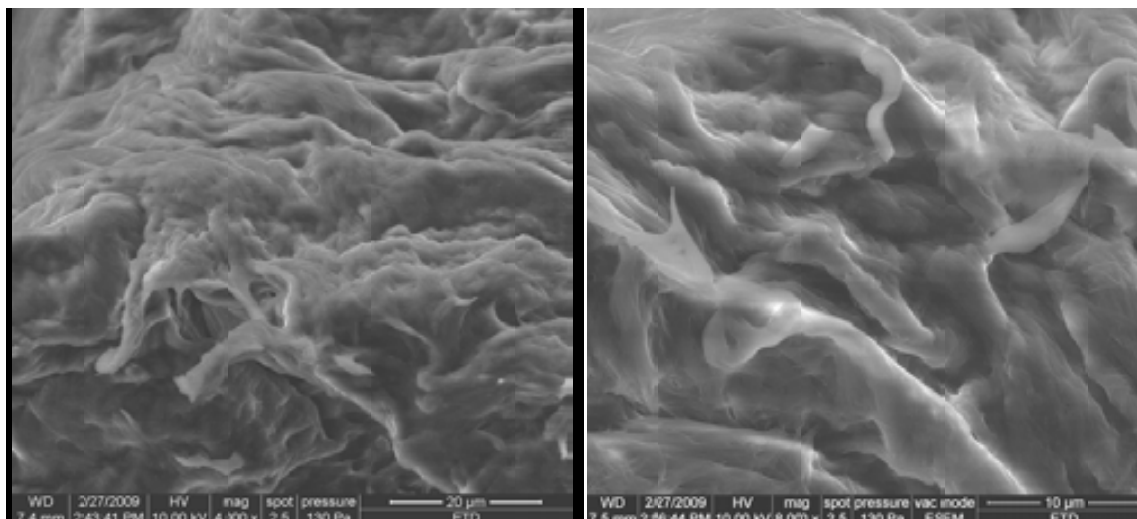


Figura 106. Imatges SEM del gel obtingut del β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38** en una solució de AcOEt/pentà 30 mM.

Així doncs, s'han obtingut aquestes imatges on es pot observar una estructura regular i repetitiva que sembla presentar una tendència fibril·lar. El fet de realitzar SEM a pressió ambiental provoca una falta de resolució i nitidesa a les imatges, és per aquest motiu que es va decidir utilitzar aquesta tècnica microscòpica per estudiar el xerogel d'aquest compost, és a dir, l'estructura que resulta de dipositar sobre un film de grafit una petita porció de gel i deixar-ho assecat a temperatura ambiental. D'aquesta manera, treballant en condicions de buit (50 Pa) s'han obtingut imatges tridimensionals de l'estructura que presenta aquest xerogel. (**Figura 107**)

S'han obtingut les imatges que es mostren a la **Figura 107**, on es pot apreciar, amb molt bona resolució i de forma clara, una estructura fibril·lar ordenada, homogènia i regular.

Aquestes imatges topogràfiques mostren com aquest xerogel es troba constituït per manats de fibres entrecruats. Això provoca que les dimensions mesurades d'aquestes fibres resultin molt variables (de 69 nm a 265 nm aproximadament), tal com s'observa a la **Figura 107**.

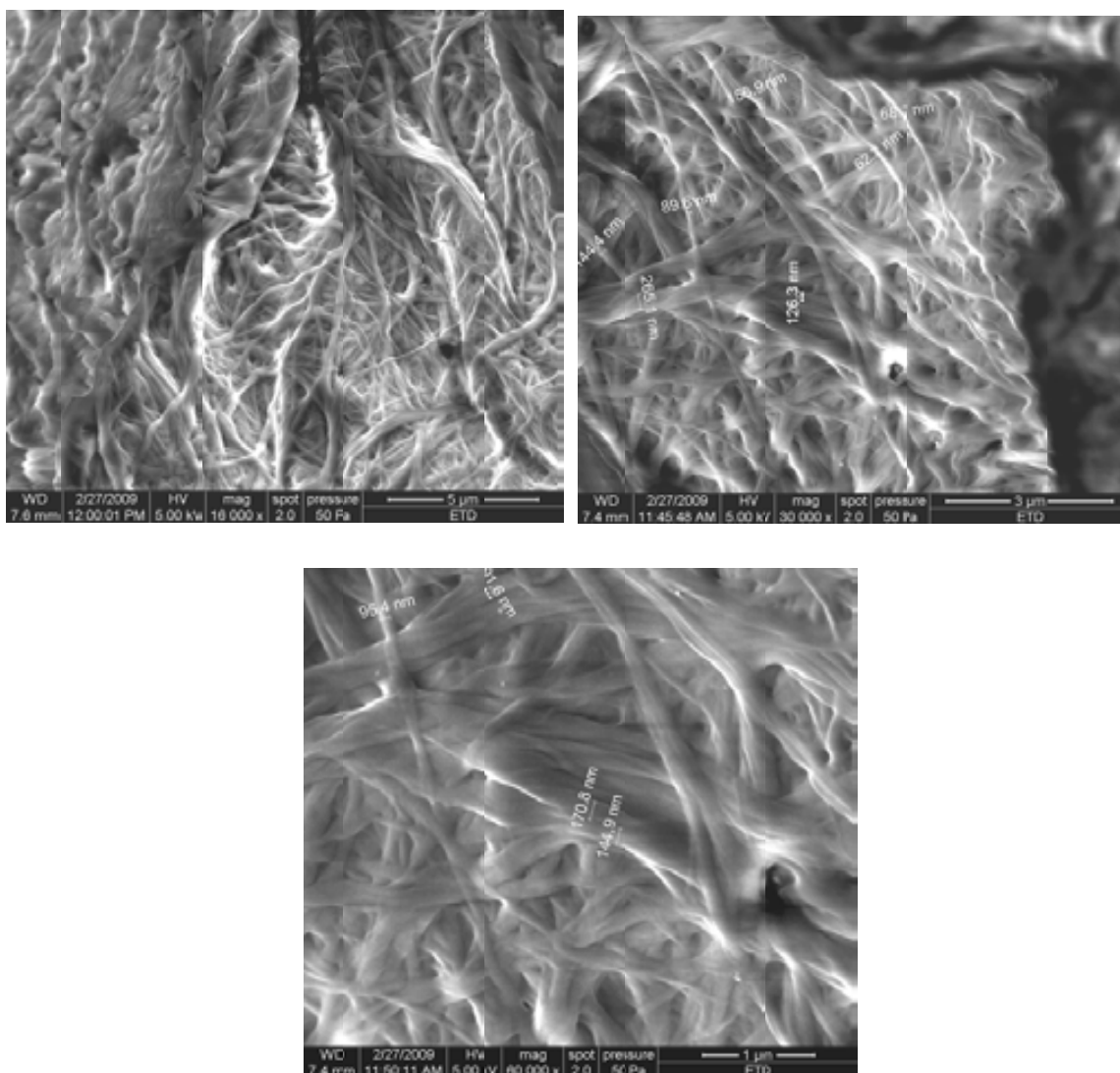


Figura 107. Imatges SEM del xerogel obtingut mitjançant la gelificació del β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38** en una solució de AcOEt/pentà 30 mM on s'ha pogut determinar les mides dels manats fibril·lars (69-265 nm).

Mitjançant aquesta tècnica s'ha obtingut una visió tridimensional única d'estructures nanoscòpiques que poden justificar el procés de gelificació del compost.

A la literatura es troben exemples d'imatges SEM (Scanning Electron Microscopy) mitjançant les quals Smith i col·laboradors¹¹⁹ diferencien entre diversos tipus de morfologies obtingudes. Així, sembla ser que morfologies fibril·lars entrecruades observades a microescala, s'aproximen més a estructures de compostos cristal·lins i no pas a estructures de gels. A més, en

aquests casos si els compostos suposadament cristal·lins arriben a formar gels aquests resulten ser estables només a temperatures baixes. Així doncs, aquests autors proposen que les morfologies observades per aquests tipus de compostos adopten l'estructura cristal·lina durant el procés d'evaporació del solvent (**Figura 108A**).

En canvi, les morfologies que es presenten com xarxes constituïdes per manats de fibres entrelaçats observats a nanoescala, constitueixen imatges típiques en l'estudi de gels. Aquesta suposició queda recolzada pel fet que els gels originats per aquests tipus de compostos presenten una ampla estabilitat tèrmica. (**Figura 108B**)

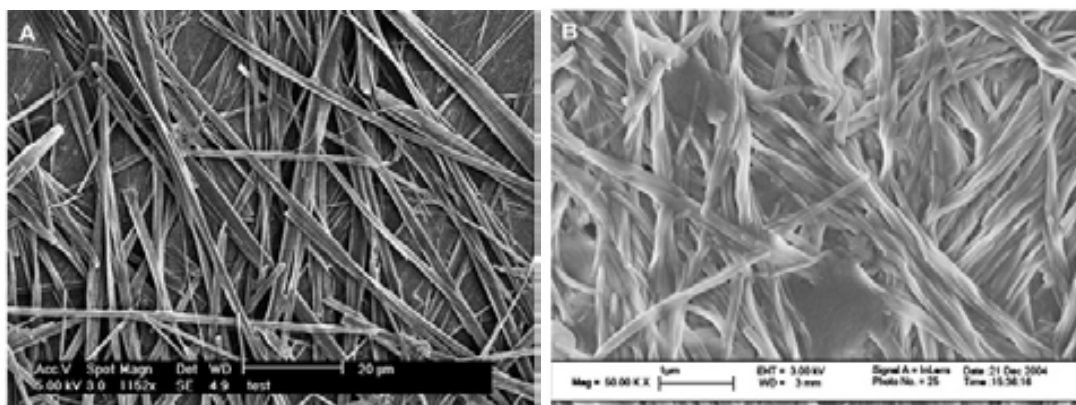


Figura 108. Imatges SEM realitzades per Smith i col·laboradors, de mostres assecades de toluè. **A)** gel 3mM 2-amida (escala 20 µm) i **B)** gel 2-amida (3 mM) + diaminododeca (1.5 mM) (escala 1 µm)

Així, segons els resultats obtinguts, i tenint present els antecedents bibliogràfics, sembla que les fibres observades a nanoescala mitjançant SEM del β -dipèptid (*trans,trans*)-**38**, resulten ser una xarxa fibril·lar tridimensional regular i homogènia que constitueix l'estructura del gel obtingut a escala macroscòpica.

D'altra banda, per tal d'estudiar en més profunditat com es troben constituïts els manats fibril·lars observats per SEM, s'ha procedit a realitzar estudis de TEM i AFM de solucions d'aquest β -dipèptid **38**.

Capítol 3: Estudi estructural

Així, s'ha realitzat l'estudi de TEM d'una mostra 5 mM en metanol, amb un temps d'incubació de 24 hores. Aquesta mostra s'ha deixat assecat a l'aire i s'ha tenyit amb una solució al 2% d'acetat d'uranil per tal d'obtenir imatges amb un millor contrast. (**Figura 109**)

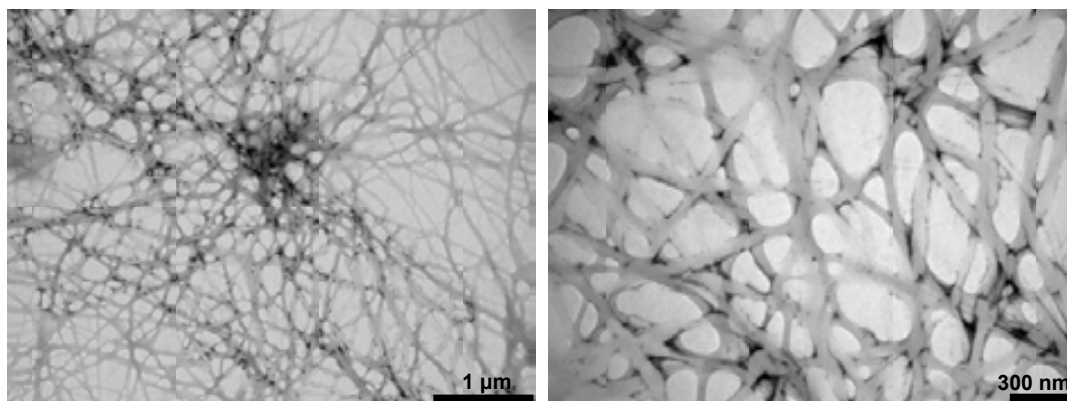


Figura 109. Imatges de TEM de les fibres formades d'una solució 5 mM passades 24 h d'incubació.

Tal com es mostra a la **Figura 109** s'han obtingut imatges on es confirma la homogeneïtat i regularitat de la xarxa fibril·lar observada per SEM. Donada aquesta homogeneïtat, s'han pogut mesurar les amplades de les fibres observades trobant-se aquestes en un rang entre 38-40 nm.

També, i continuant amb l'estudi supramolecular, hem realitzat experiments AFM d'aquest compost per obtenir el màxim d'informació de la xarxa fibril·lar observada per SEM.

Així doncs, s'ha procedit a realitzar AFM d'una solució 0.5 mM en metanol dipositada sobre una superfície de mica perquè la de grafit resultava ser massa rugosa i podia induir a errors a l'hora d'interpretar les imatges obtingudes. D'aquesta manera, mitjançant aquesta tècnica s'ha pogut observar en la superfície agregats en forma de fibres, d'alçades compreses entre 5.6 i 16.0 (± 0.2) nm. (**Figura 110**)

També s'han pres imatges a concentracions superiors en les que s'observa com les fibres s'apilen unes sobre les altres. (**Figura 111**)

Cal dir que aquests tipus d'imatges d'AFM són típiques de gels orgànics de petita mida, veient-se en la majoria dels casos fibres entrecreuades que donen lloc a xarxes homogènies tridimensionals.¹²⁰

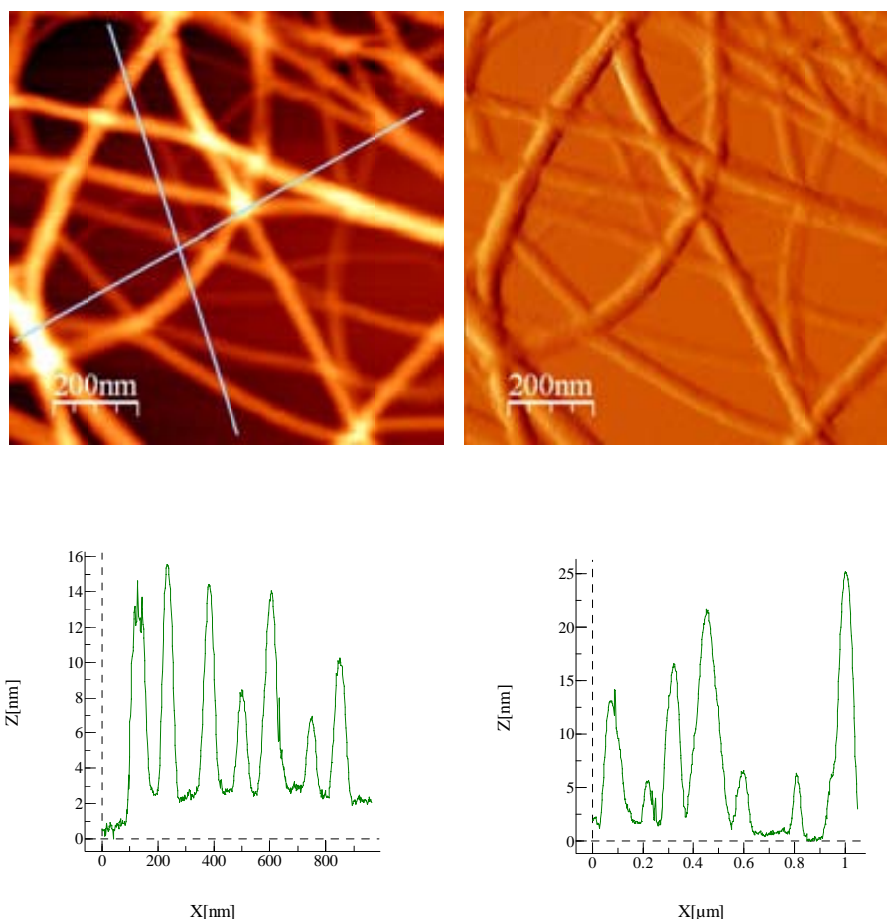


Figura 110. Imatges AFM en mode tapping (contrast de fase, esquerra, i topologia, dreta). Es dipositen 10 μl d'una solució 0.5 mM en metanol i seguidament s'asseca sota argó durant 5 minuts sobre mica com a suport. A la part inferior es mostren les alçades mesurades de les fibres en nm.

¹²⁰ Deng, W.; Yamaguchi, H.; Takashima, Y.; Harada, A., *Angew. Chem.*, **2007**, 119, 5236-5239

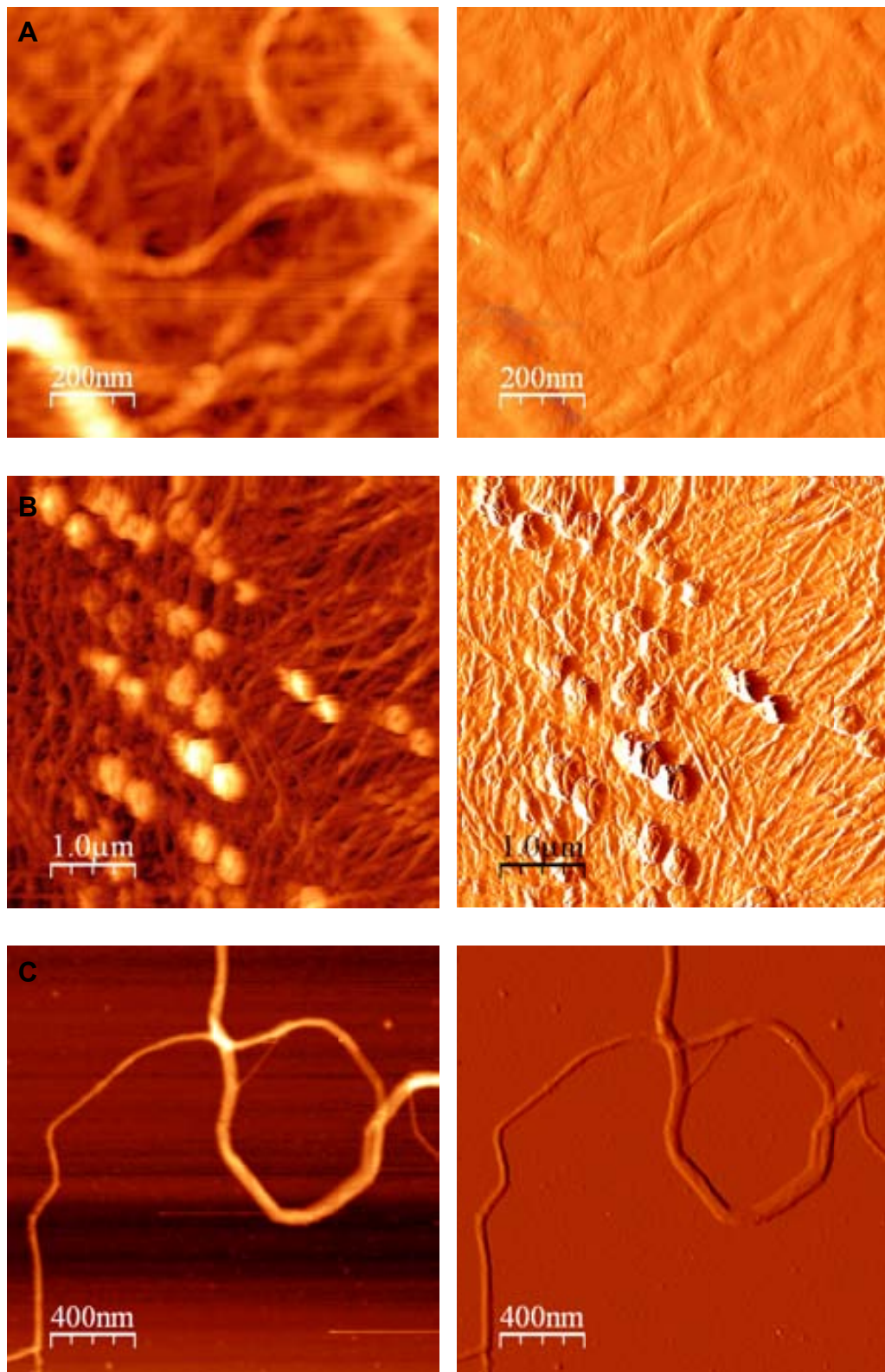


Figura 111. Imatges AFM en mode contacte (contrast de fase, esquerra, i topologia, dreta). Es dipositen 10 μ l de mostra sobre un suport de mica i seguidament es s'asseca la mostra sota argó durant 5 minuts. **A)** solució 5 mM en metanol, **B)** solució 1mM en metanol i **C)** solució 0.1 mM en metanol.

3.2.4 Estudi conformacional teòric del β -dipèptid (*trans,trans*)-bis(ciclobutànic) **38**

Amb l'objectiu de completar l'estudi estructural d'aquest β -dipèptid **38** s'ha dut a terme un estudi teòric per corroborar la formació de les fibres observades per TEM i AFM, així com el gel.

D'aquesta manera s'ha realitzat, en col·laboració amb el Professor Vicenç Branchadell, càlculs B3LYP/6-31G(d) del β -dipèptid (*trans,trans*)-**38**, utilitzant cloroform com a solvent (Veure *Annex 1: Mètode de càlcul*), i s'ha obtingut com a confòrmer més estable el que es mostra a la **Figura 112**.

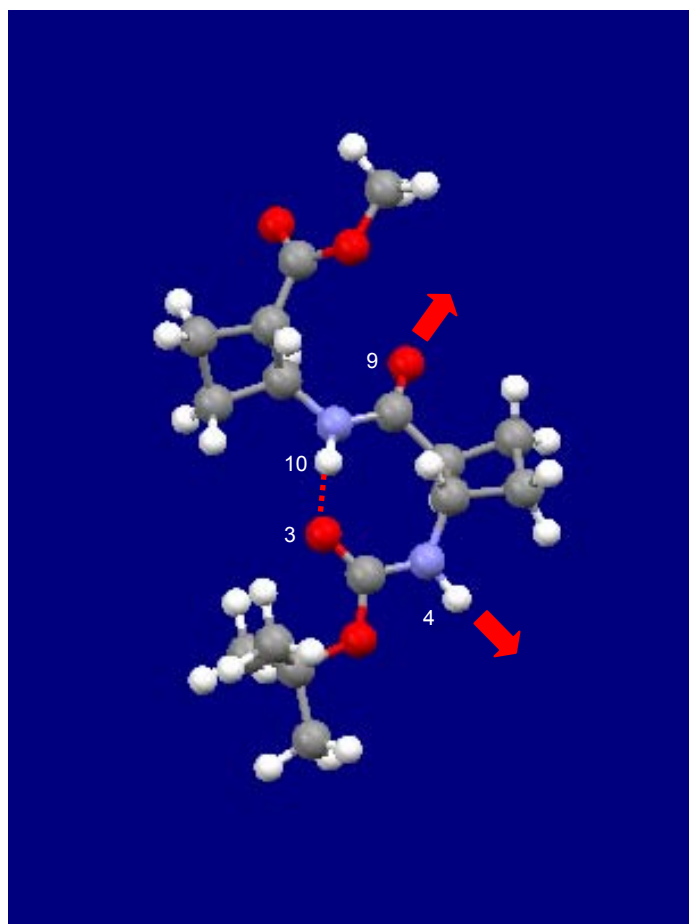


Figura 112. Confòrmer del β -dipèptid (*trans,trans*)-**38** optimitzat mitjançant càlculs teòrics B3LYP/6-31G(d) en cloroform.

Segons aquest càlcul, el β -dipèptid (*trans,trans*)-**38** presenta una conformació on s'observa la formació d'un enllaç d'hidrogen intramolecular entre el protó del NH_{10} i l'oxigen del grup carbonil de la mateixa molècula C_3O ,

Capítol 3: Estudi estructural

donant lloc a un anell de 8 baules. Aquesta conformació presenta una disposició adequada per què els grups NH_4 i C_9O es puguin auto-assemblar amb molècules veïnes mitjançant la formació d'enllaços d'hidrogen intermoleculars. (**Figura 112**)

D'acord amb aquest resultat, i amb la finalitat de justificar la formació de la xarxa tridimensional fibril·lar observada mitjançant tècniques microscòpiques (SEM, TEM i AFM) així com el gel, s'han realitzat càlculs teòrics d'estructures supramoleculares que es poguessin originar per l'auto-assemblatge de diferents molècules mitjançant enllaços d'hidrogen intermoleculars i/o forces de van der Waals.

Així doncs, s'han realitzat càlculs teòrics d'estructures moleculars resultat de diferents assemblatges que s'han anomenat *dímer*, *tetràmer* i *octàmer*, i que han estat optimitzades utilitzant el camp de força MMFF i cloroform com a solvent. En el cas de les estructures del *dímer* i *tetràmer* aquestes també s'han pogut optimitzar a un nivell de càlculs B3LYP/6-31G(d).

Com es pot observar a la **Figura 113**, en tots els casos l'assemblatge entre diferents molècules (*dímer*, *tetràmer* i *octàmer*) es dona mitjançant enllaços d'hidrogen intermoleculars, els quals conjuntament amb interaccions tipus van der Waals, fa que les molècules es disposin de tal manera que originen la formació d'una estructura terciària helicoïdal, tal com es mostra a la **Figura 113**.

Així, l'estructura de l'*octàmer* (**Figura 113D**) presenta una organització helicoïdal amb unes dimensions de 3.6 (x), 2.5 (y) i 1.6 (z) nm. Aquests resultats suggereixen que l'agregació molecular d'aquest compost es dona formant un manat supramolecular format per n unitats helicoïdals. Això estaria d'acord amb la formació de les fibres observades per TEM i AFM així com amb el model inicialment proposat, a partir de les dades obtingudes mitjançant experiments de RMN (**Figura 102**).

També s'ha determinat, mitjançant un nivell de càlculs B3LYP/6-31G(d), l'energia d'agregació quan es parteix del β -dipèptid (*trans,trans*)-**38** cap al *dímer*, com a resultat de l'assemblatge de 2 molècules d'aquest compost,

obtenint un valor de $-9.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ i l'energia d'agregació del *dímer* al *tetràmer* essent en aquest cas de $-14 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Per tant, la formació d'aquests agregats és favorable termodinàmicament.

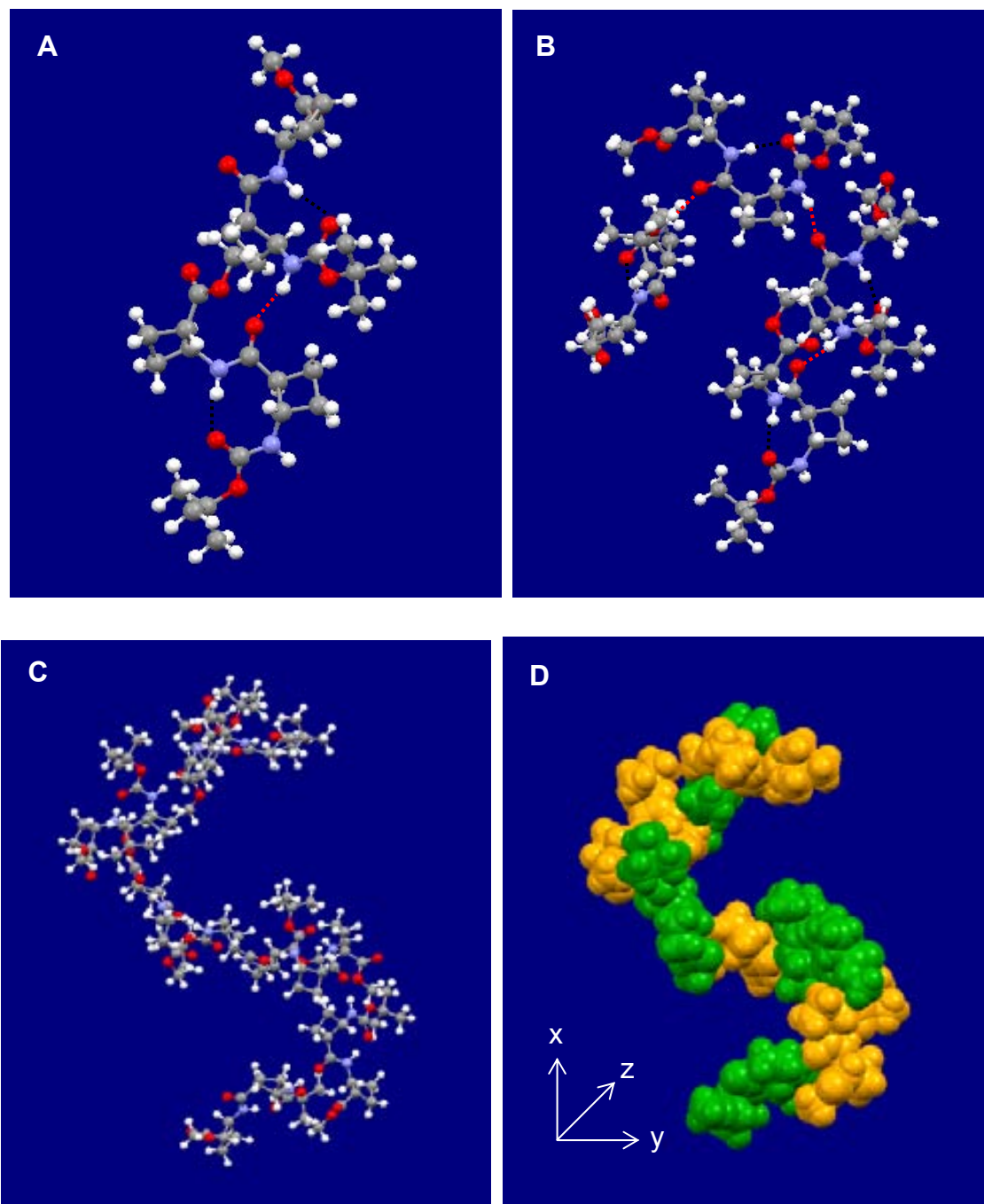


Figura 113. Diferents estructures de l'assemblatge del β -dipèptid (*trans,trans*)-38. **A)** estructura del dímer, **B)** tetràmer i **C)** octàmer. Es representen els enllaços d'hidrogen intramoleculars i intermoleculars amb ratlles discontinues en negre i vermell, respectivament. En els darrers es troben involucrats el NH_4 i el C_9O , responsables principals de l'agregació supramolecular. **D)** es mostra l'estructura helicoidal de l'agregat octamèric amb volum.

Capítol 3: Estudi estructural

A més a més, s'ha pogut comprovar com els dos tipus d'enllaços d'hidrogen (intra- i intermolecular) es van fer més forts a mida que els agregats augmenten la seva dimensió, és a dir, del monòmer (on només hi ha un enllaç d'hidrogen intramolecular) al dímer i del dímer al tetràmer.

Així doncs, segons aquests resultats sembla que aquesta agregació helicoidal està totalment afavorida.

D'aquesta manera, basant-se en aquests resultats es pot dir que els càlculs teòrics realitzats justifiquen la formació d'estructures terciàries que originen la formació de la xarxa fibril·lar tridimensional observada experimentalment (TEM, AFM i RMN) i, en conseqüència, la formació del gel.

3.2.5 Estudi estructural en solució del β -dipèptid (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic) **40**

I. Estudi estructural del β -dipèptid (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic) **40** mitjançant RMN

Seguint la metòdica emprada al llarg d'aquesta Tesi Doctoral s'ha procedit a realitzar la caracterització completa (^1H , ^{13}C , HSQC editat, COSY, HMBC, veure *Annex: Experiments de RMN*) així com a l'assignació total dels senyals de RMN d'aquest β -dipèptid (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic) **40**. L'espectre de RMN de ^1H obtingut es mostra a continuació. (**Figura 114**)

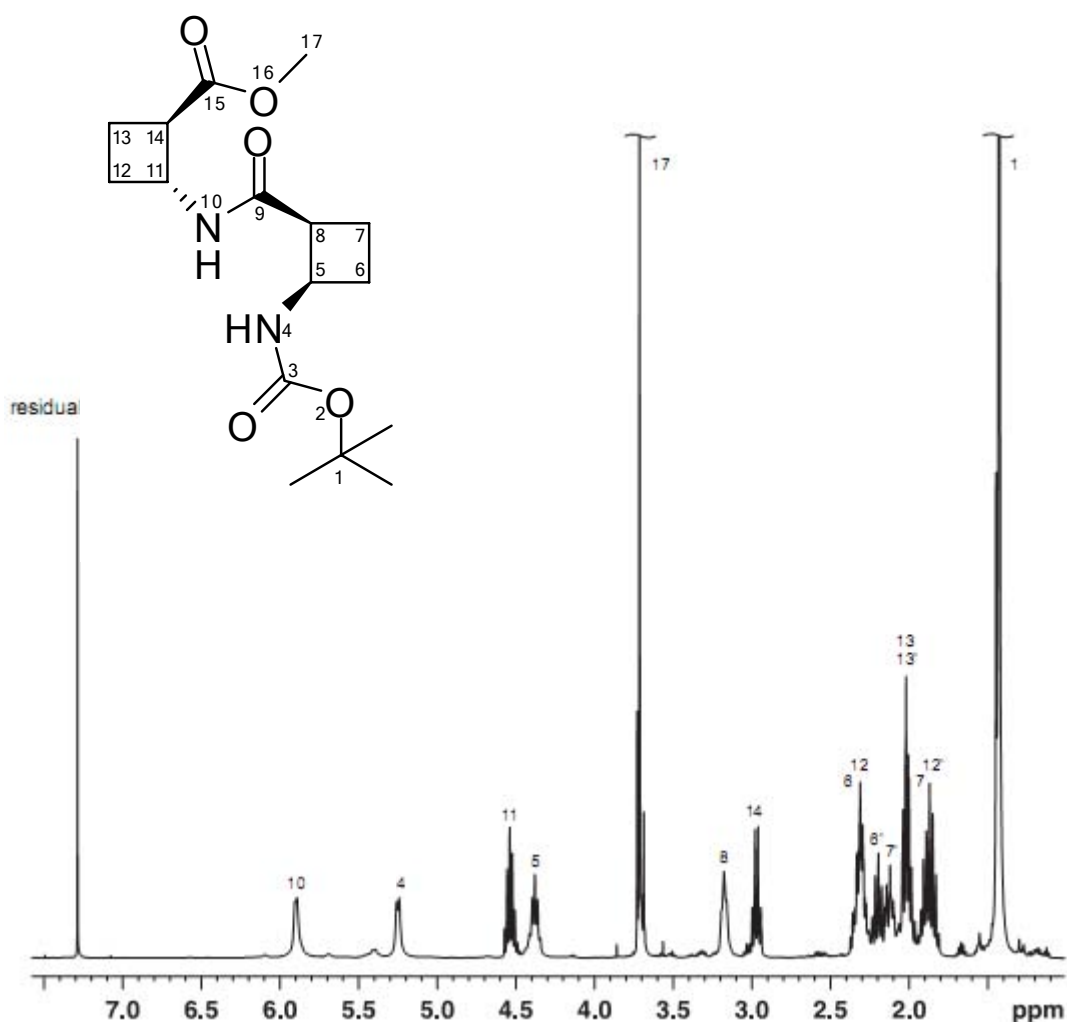


Figura 114. Espectre de RMN de ^1H del β -dipèptid (*cis,trans*)-**40** en CDCl_3 enregistrat a 298 K en un espectròmetre Bruker Avance operant a 500.13 MHz.

Capítol 3: Estudi estructural

Per dur a terme aquesta assignació de manera inequívoca s'ha seguit el mateix procediment realitzat pel β -dipèptid (*trans,trans*)-**38**. Així, s'ha realitzat TOCSY selectiu monodimensional amb l'objectiu de saber a quin residu (*cis* o *trans*) pertanyia cada senyal de l'espectre de ^1H . (**Figura 116**)

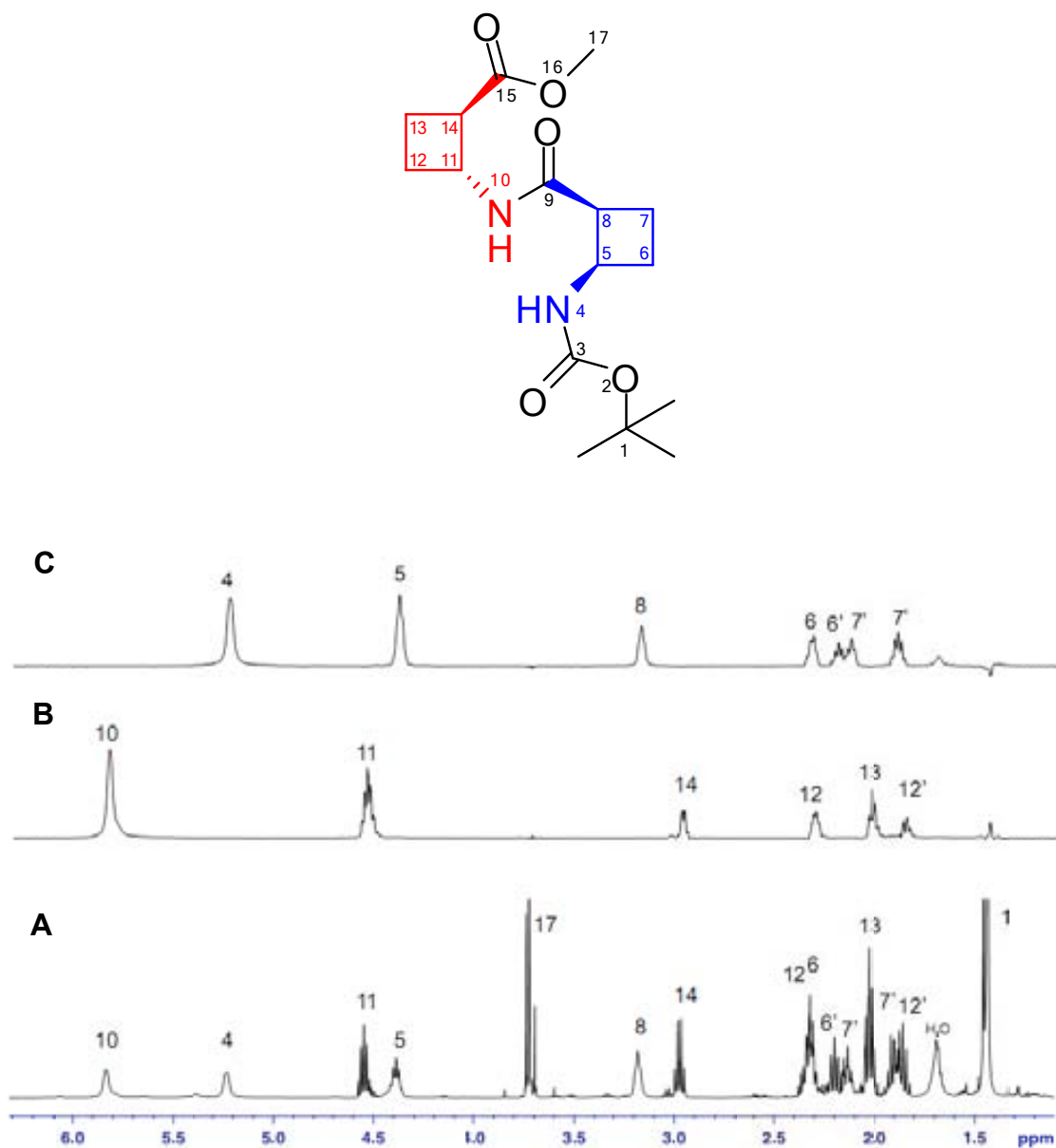


Figura 116. A) RMN de ^1H . B) Experiment de TOCSY 1D selectiu irradiant al protó NH_{10} , corresponent al residu *trans*. C) Experiment de TOCSY 1D selectiu irradiant al protó NH_4 , corresponent al residu *cis*.

També s'han realitzat experiments NOESY però en aquest cas no s'han obtingut resultats significatius, ja que tant el NH_{10} com el NH_4 presenten només acoblament H-H amb els protons que tenen en posició α , és a dir amb H_{11} i H_5 , respectivament.

Cal destacar que per aquest β -dipèptid (*cis,trans*)-**40** no s'ha observat en cap moment procés de gelificació, tot i haver provat les mateixes condicions emprades pel β -dipèptid (*trans,trans*)-**38**. Això concorda amb el fet que el protó NH_{10} del β -dipèptid (*cis,trans*)-**40**, apareix a un desplaçament químic (δ) més baix (5.8 ppm) comparant amb el desplaçament del mateix protó en el β -dipèptid (*trans,trans*)-**38** (8.5 ppm). Segons això, *a priori* es pot suggerir que aquest β -dipèptid (*cis,trans*)-**40** sembla no presentar interaccions significatives, entre les diferents molècules (enllaços d'hidrogen intermoleculars), que originin la formació d'un gel.

II. Estudi estructural del β -dipèptid (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic) **40** mitjançant DC

Seguint amb el mètode de treball, s'ha realitzat DC d'una solució 1 mM del β -dipèptid (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic) **40**. L'espectre obtingut a temperatura ambient es mostra a la **Figura 117**.

Així, s'obté un espectre amb un mínim d'absorció al voltant de 210 nm i amb una intensitat de $-30 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. D'aquesta manera, la banda observada es pot atribuir a una organització molecular quiral del compost. La major intensitat d'aquesta banda en comparació amb les bandes obtingudes pel β -dipèptid (*trans,trans*)-**38**, es pot atribuir a la utilització d'una solució de concentració superior.

També es pot observar com al variar la temperatura la intensitat de la banda varia lleugerament però manté sempre el mínim al voltant de 210 nm. Això indica que la conformació adoptada per aquest compost resulta estable tot i variar la temperatura. (**Figura 117**)

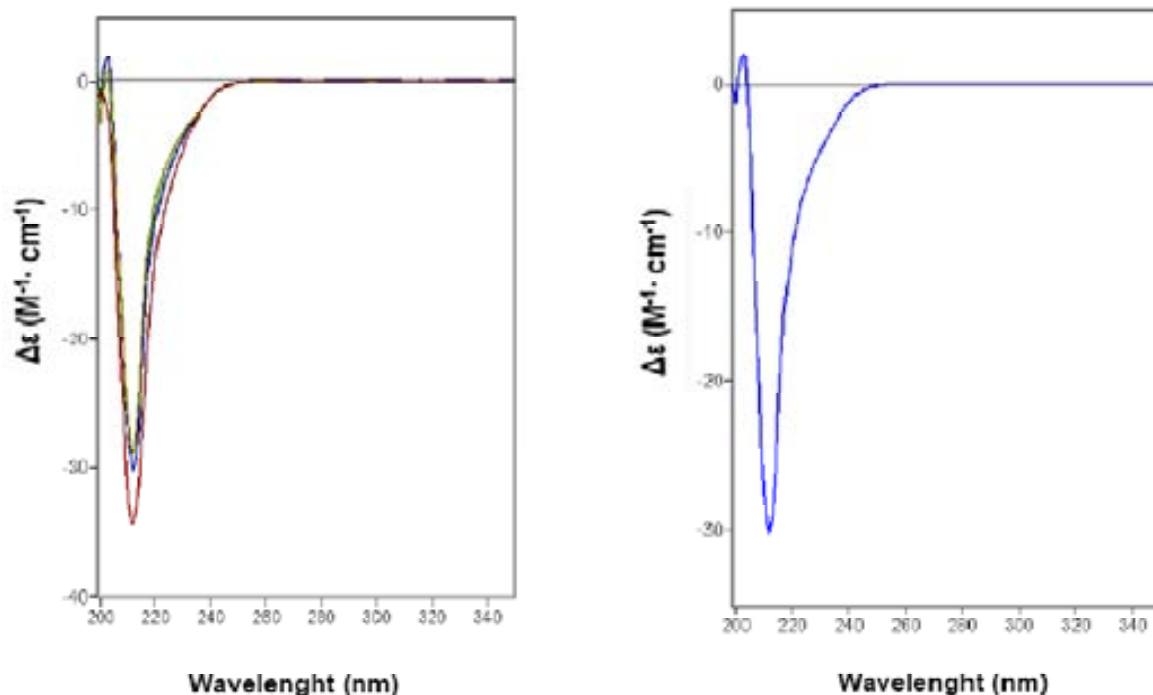


Figura 117. A l'esquerra es mostra l'espectre de DC d'una solució del β -dipèptid (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic) **40**, 1 mM en metanol i a la dreta els diferents espectres enregistrats a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $45\text{ }^{\circ}\text{C}$

També s'ha determinat, l'espectre computacional de DC electrònic del confòrmer més estable d'aquest β -dipèptid (*cis,trans*)-**40**, mitjançant càlculs teòrics.

D'aquesta manera, utilitzant el programa Gauss View, s'ha obtingut l'espectre que es mostra a la **Figura 118** on es pot observar un mínim a 210 nm i un màxim de menys intensitat al voltant de 230 nm.

En aquest cas si comparem aquest espectre electrònic de DC amb l'experimental obtingut (**Figura 117**), podem veure com el mínim concorda amb les dades experimentals obtingudes però en canvi, no s'ha observat cap màxim d'absorció. Aquesta diferència observada es pot atribuir a l'efecte del solvent, ja que el càlcul es realitza sense tenir en compte aquest efecte.

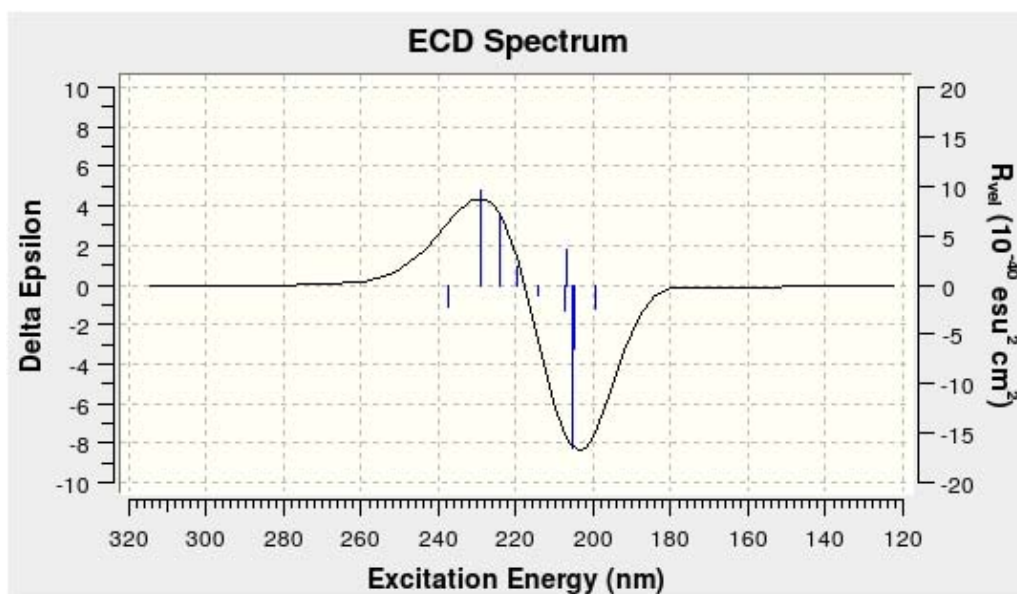


Figura 118. Espectre electrònic de DC del β -dipèptid cis, trans **40** realitzat amb Gauss View.

3.2.6 Estudi supramolecular del β -dipèptid (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic) **40**

Per realitzar l'estudi supramolecular del β -dipèptid (*cis,trans*)-bis(ciclobutànic) **40**, s'ha realitzat un experiment de TEM d'una solució 5 mM d'aquest compost en metanol. D'aquesta manera, s'han obtingut les imatges que es mostren a la **Figura 120**.

Així, per aquest β -dipèptid (*cis,trans*)-**40** s'han obtingut unes imatges on es pot apreciar també una estructura fibril·lar entrecreuada. Aquesta estructura però, no resulta ser tan homogènia i definida com pel β -dipèptid (*trans,trans*)-**38**. La poca definició que presenten les fibres ha fet molt difícil la realització d'una mesura fiable de les mateixes.

Una diferència destacada, respecte les imatges obtingudes del β -dipèptid (*trans,trans*)-**38** és que, al estudiar per TEM el β -dipèptid (*cis,trans*)-**40** s'ha pogut apreciar com l'estructura fibril·lar sembla créixer a partir de punts de nucleació i no presenta una textura tan homogènia com en el β -dipèptid anterior (**Figura 120A**).

Així doncs, segons Smith i col·laboradors¹¹⁹ aquesta morfologia observada podria correspondre amb una estructura cristal·lina, que no originaria la formació de gels, i que s'hauria pogut formar durant el procés d'evaporació del dissolvent. Tot i que el fet que aquesta morfologia s'observi a nanoescala fa pensar en la possibilitat que aquest compost, el β -dipèptid (*cis,trans*)-**40**, pugui auto-assemblar-se mitjançant enllaços d'hidrogen intermoleculars més febles que en el cas del β -dipèptid (*trans,trans*)-**38**, donant lloc a una estructura fibril·lar menys definida i que sigui per aquest motiu que no s'observi la formació de cap gel a nivell macroscòpic.

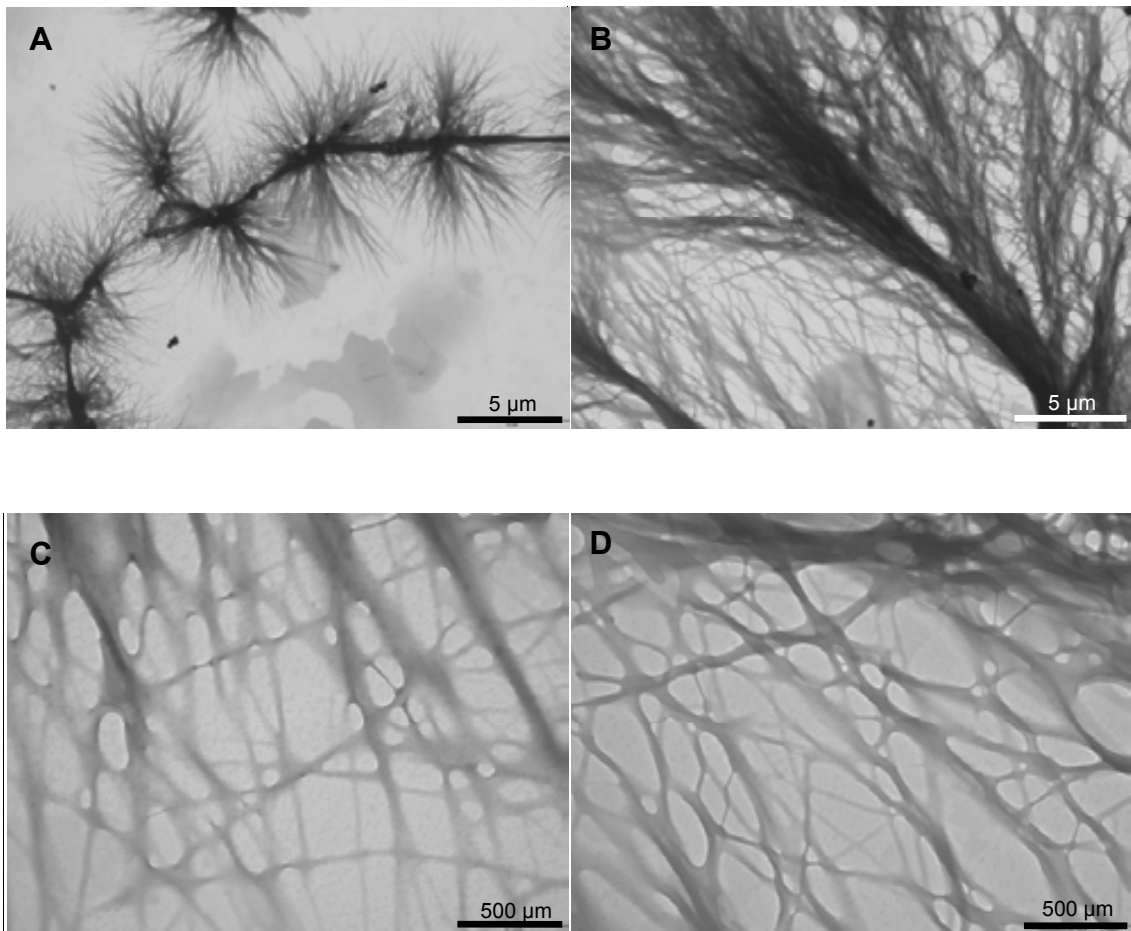


Figura 120. Imatges de TEM d'una solució 5 mM en MeOH del β -dipèptid (*cis,trans*)-40 passades 24 h d'incubació.

3.2.7 Estudi conformacional teòric del β -dipèptid (*cis, trans*)-**40**

Donat que la determinació dels NOES per aquest compost, mitjançant RMN, no ha aportat informació significativa que pugui ajudar a determinar quina és la conformació adoptada per aquest en solució, s'ha realitzat un estudi conformacional mitjançant càlculs teòrics amb l'objectiu d'obtenir el confòrmer més estable en solució d'aquest β -dipèptid (*cis,trans*)-**40**. Mitjançant aquests càlculs, també es pretén explicar perquè aquest compost no dona lloc a la formació de cap gel.

Així, s'han realitzat càlculs teòrics utilitzant com a mètode de càlcul el B3LYP/6-31G(d) i considerant el cloroform com a dissolvent. D'aquesta manera, s'han obtingut dos possibles confòrmers de la cerca conformacional realitzada (**Figura 121**).

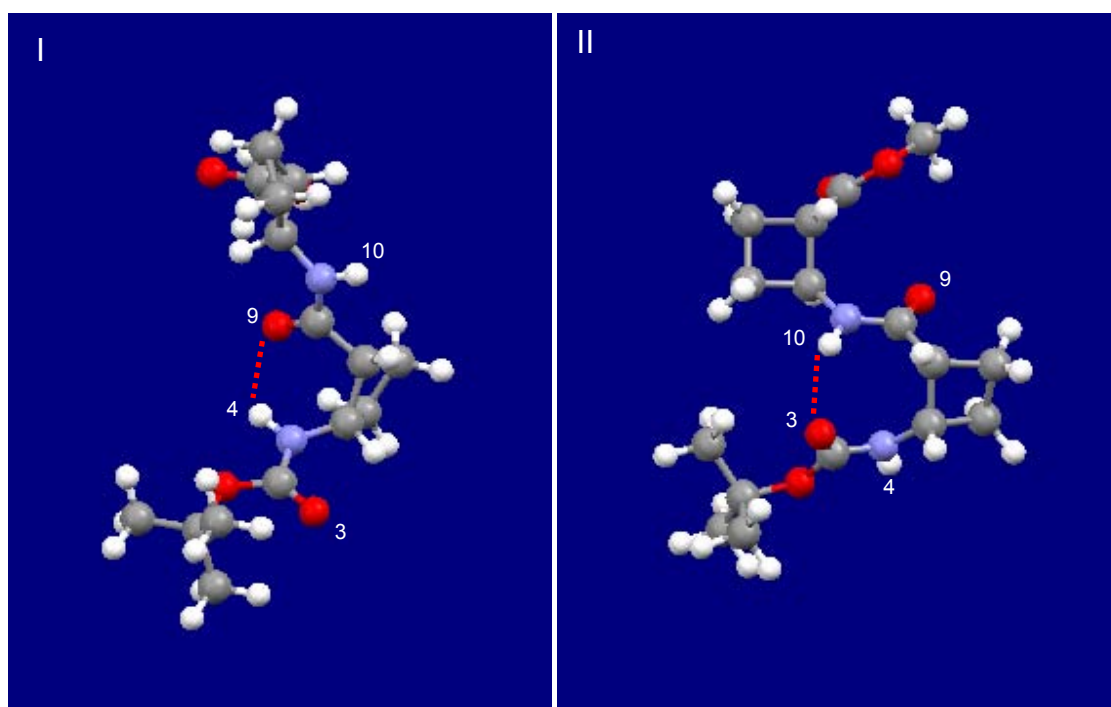


Figura 121. Confòrmers I (anell de 6 membres) i II (anell de 8 membres) més estables obtinguts de la cerca conformacional del β -dipèptid (*cis,trans*)-**40** en cloroform.

Així doncs, s'han obtingut aquests dos confòrmers on el **40-I**, el més estable, queda +1.7 kcal/mol per sota del confòrmer **40-II**.

Com es pot observar a la **Figura 121**, en el confòrmer **40-I** es dona la formació d'un anell de 6 membres com a conseqüència d'un enllaç d'hidrogen intramolecular entre el protó del NH_4 i l'oxigen del grup carbonílic C_9O . Aquest tipus d'enllaç origina una estructura secundària que recorda molt a les obtingudes en la serie *cis*-poli(ciclobutànics).⁵¹ En canvi, el confòrmer menys estable, el **40-II**, presenta la formació d'un anell de 8 baules com a conseqüència d'un enllaç d'hidrogen intramolecular entre el NH_{10} i l'oxigen del grup carbonílic C_3O .

Així, si es pren la conformació **40-I** com l'adoptada pel compost en solució, es pot afirmar que el NH_{10} no es troba involucrat en la formació de cap enllaç d'hidrogen intramolecular i en canvi el NH_4 dona lloc a un anell de 6 baules com a conseqüència de la formació d'un enllaç d'hidrogen intramolecular i intraresidual amb l'oxigen de C_9O . Això concorda amb el desplaçament químic obtingut per NH_{10} , ja que en aquest cas és molt més baix (≈ 5.7 ppm) que pel β -dipèptid (*trans,trans*)-**38** (≈ 8.5 ppm) on aquest protó es trobava formant un enllaç d'hidrogen intramolecular originant un anell de 8 membres en solució.

En base a aquests resultats obtinguts, i donada l'absència de NOES significatius, es pren el confòrmer més estable **40-I** com la conformació adoptada en solució pel β -dipèptid (*cis,trans*)-**40**.

3.3 Conclusions

De l'estudi estructural realitzat dels β -dipèptids (*trans,trans*)-**38** i (*cis,trans*)-**40** s'han obtingut comportaments completament diferents. Així s'ha pogut analitzar com aquests compostos amb els mateixos grups funcionals però de diferent quiralitat, presenten propietats físiques diverses fins el punt que un dels compostos doni lloc a un gel estable, en un ampli rang de temperatures, i en canvi l'altre ni gelifiqui a baixes temperatures.

De la mateixa manera, de l'estudi estructural del β -dipèptid (*trans,trans*)-**38** (RMN, DC i càlculs teòrics), es podria deduir que les interaccions responsables de la formació del gel resulten ésser enllaços d'hidrogen intermoleculars (entre protons amídics i oxígens carbonílics) i forces de van der Waals entre diferents molècules. Així, aquestes interaccions podrien originar la formació d'una xarxa entrecreuada tridimensional homogènia que s'ha pogut mesurar i estudiar per SEM, TEM i AFM. A més a més, cal dir que la morfologia adoptada per aquest compost és la típica observada en agents gelants.¹²¹ Així doncs, es proposa la formació d'una xarxa fibril·lar com a conseqüència d'interaccions d'enllaç d'hidrogen intermoleculars i van der Waals, essent aquestes fibres les responsables de l'atrapament del dissolvent orgànic, on prèviament ha estat dissolta la molècula, originant així la formació del gel (Veure *Annex 2: Què és un gel?*). (**Figura 122**)

¹²¹ Veure per exemple Deng, W.; Yamaguchi, H.; Takashima, Y.; Harada, A., *Angew. Chem.*, **2007**, *119*, 5236-5239 i Hardy, J. G.; Hirst, A. R.; Ashworth, I.; Brennan, C.; Smith, D. K., *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 7397-7406

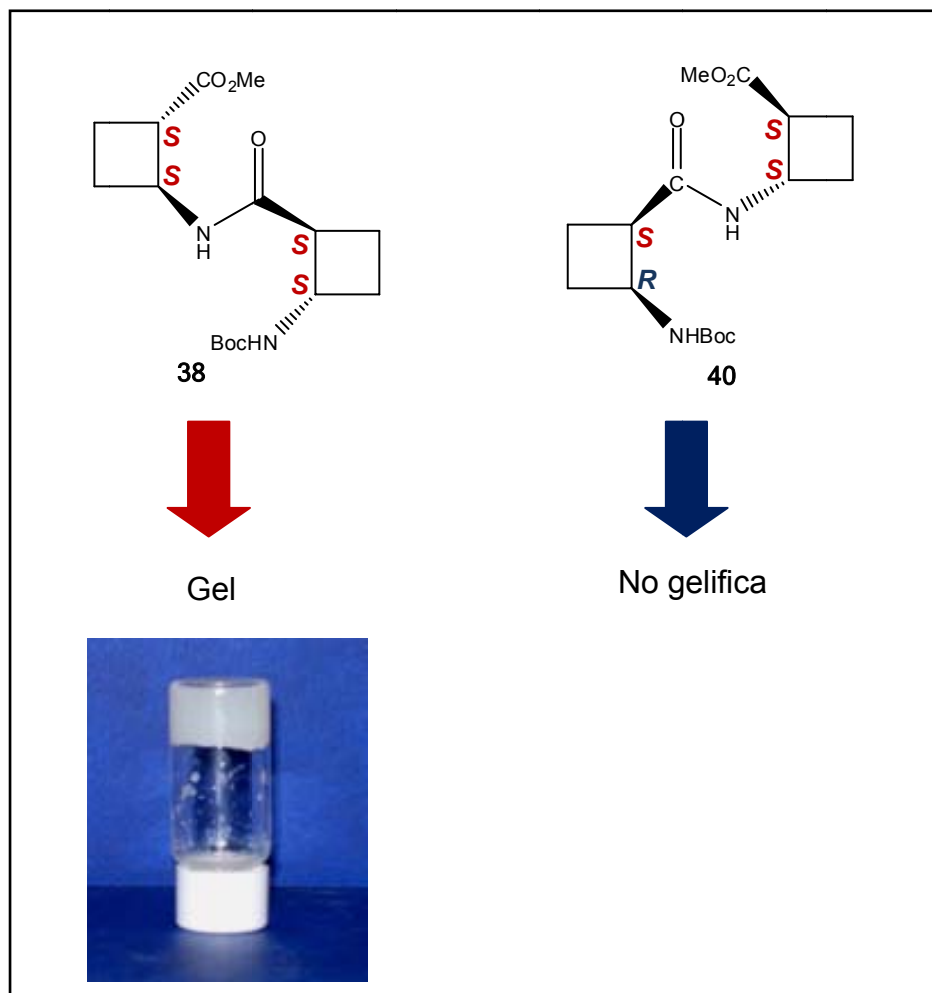
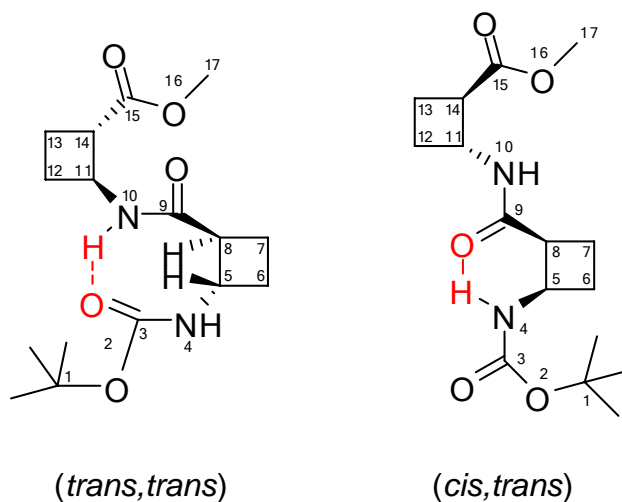


Figura 122

A continuació es recullen a la **Taula 3**, a tall de resum, les distàncies calculades així com la quantificació de les interaccions experimentals observades H-H (NOES), obtingudes mitjançant RMN.



β -dipèptid	δ NH ₁₀ (ppm)	δ NH ₄ (ppm)	NOES inter- residuals H ₁₀ -H ₅ / H ₁₀ -H ₈	Distància calculada ^a H ₁₀ -H ₅	Distància calculada ^a H ₁₀ -H ₈	Distància d'enllaç d'hidrogen calculada ^a
(trans,trans)- 38	8.47	4.92	Fort/feble	2.47	3.02	CO ₃ -NH ₁₀ 1.93
(cis,trans)-40	5.90	5.25	Feble/fort	4.51	2.23	CO ₉ -NH ₄ 2.24

[a] En Å

Taula 3. Comparació dels NOES, observats experimentalment, amb de les distàncies (H-H i NH-OC) calculades a partir de les conformacions obtingudes mitjançant càlculs teòrics.

Així doncs, s'ha pogut comprovar com la conformació adoptada pel β -dipèptid (*trans,trans*)-**38** (RMN i càlculs teòrics) resulta ésser l'adequada per què es donin interaccions supramoleculares. En la formació de l'anell de 8 baules, participen els grups C₃=O i NH₁₀ però queden lliures el C₉=O i NH₄ quedant aquests darreres orientats i accessibles per interaccionar amb molècules veïnes. (**Figura 123**)

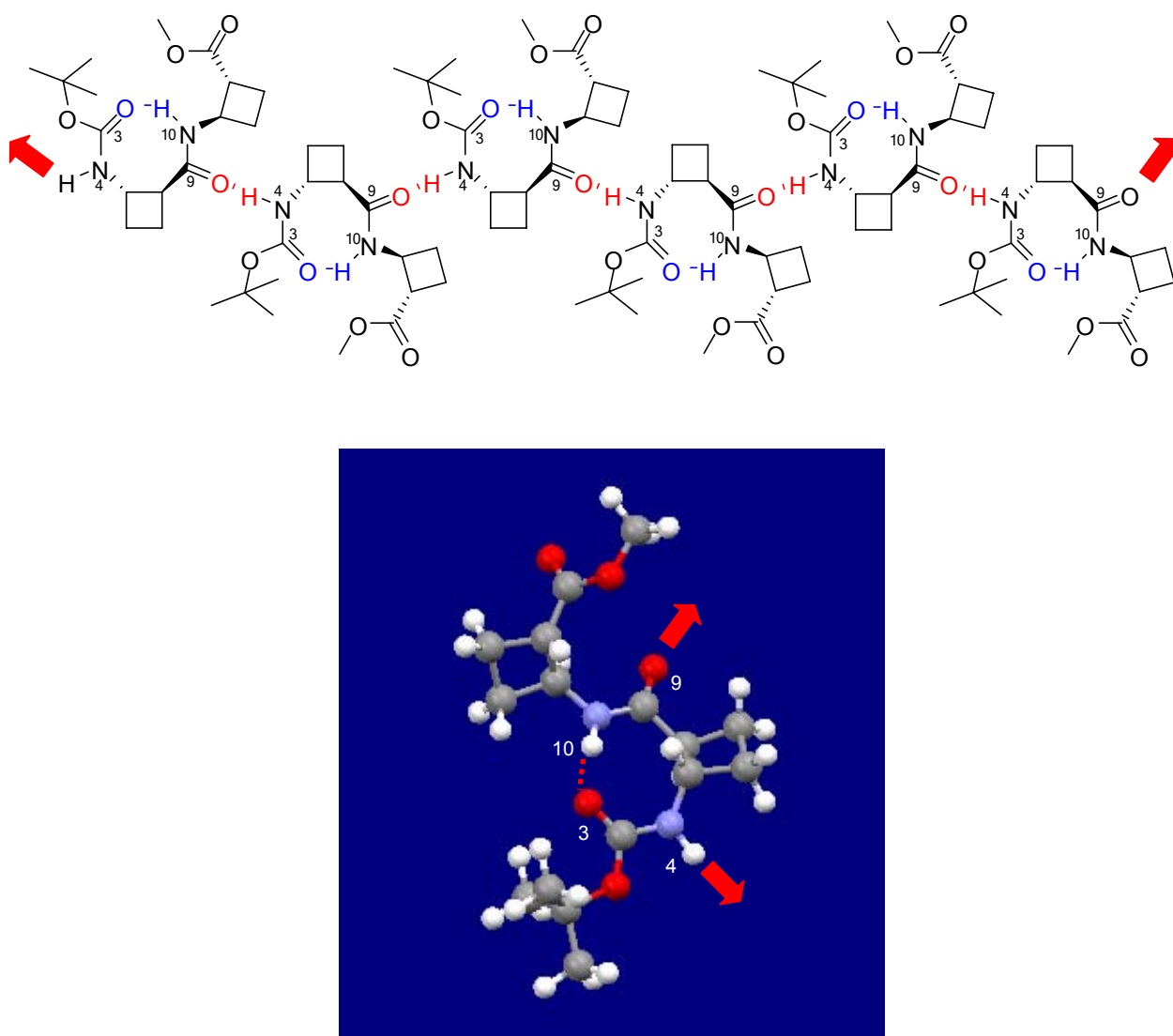


Figura 123. A la part superior es mostra l'agregació a que donaria lloc el β -dipèptid (*trans,trans*) **38**. A la part inferior es mostra la conformació adoptada en solució per aquest, on es pot apreciar l'anell de 8 baules originat per la formació d'un enllaç d'hidrogen intramolecular i la disposició dels grups que no participen en aquest enllaç.

Davant aquests resultats obtinguts la pregunta que es planteja és si es requereix que ambdós residus ciclobutànics siguin *trans* per obtenir un gel, ó si pel contrari simplement es requereix que el residu ciclobutànic que presenta el carbamat de *tert*-butil presenti aquesta quiralitat. En el nostre grup de recerca es continuen les investigacions per respondre aquesta pregunta.

4.1 Objectius

- Estudi estructural de les urees **20** i **69**, obtingudes com a productes secundaris en la reacció de transposició de Curtius emprada en la síntesi dels β -pèptids ciclobutànics.

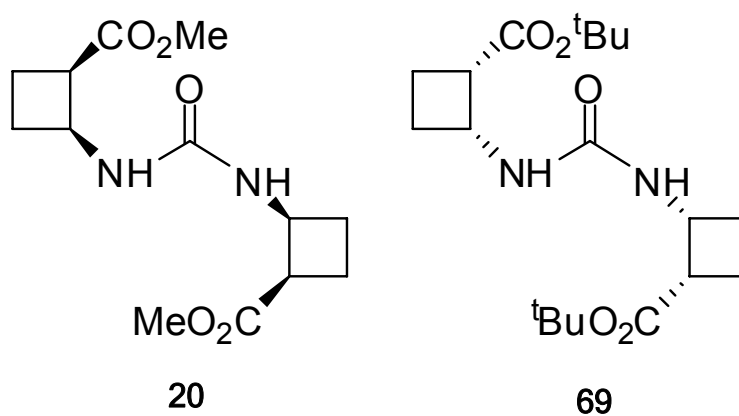


Figura 124. Urea-OMe **20** i urea-O^tBu **69** obtingudes com a productes secundaris de la reacció de transposició de Curtius.

4.2 Resultats i discussió

Durant la seva Tesi Doctoral, la Dra. Sandra Izquierdo va detectar a diferents reaccions de transposició de Curtius, la formació de productes secundaris en forma d'urees com els compostos **20** i **69**. (**Figura 125**)

Donat que, en la present Tesi Doctoral durant la síntesi del oligòmers de la sèrie *cis* (Capítol 2), s'ha utilitzat aquesta reacció i s'han obtingut quantitats considerables d'urea-OMe **20**, hem decidit dur a terme un estudi estructural tant en solució com en estat sòlid d'aquesta, comparant-ho amb l'urea-O^tBu **69** obtinguda per la Dra. Sandra Izquierdo.

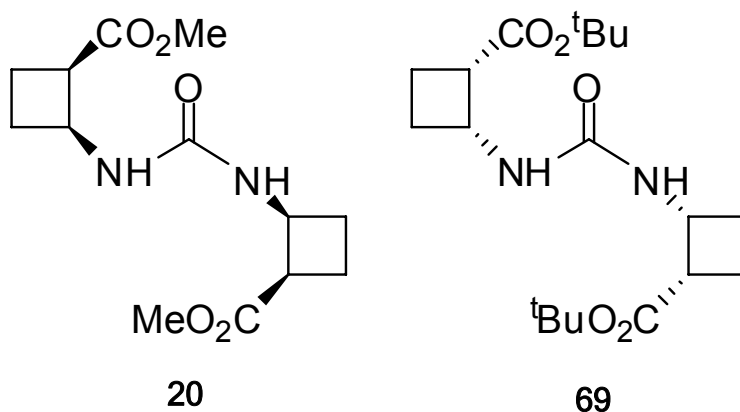


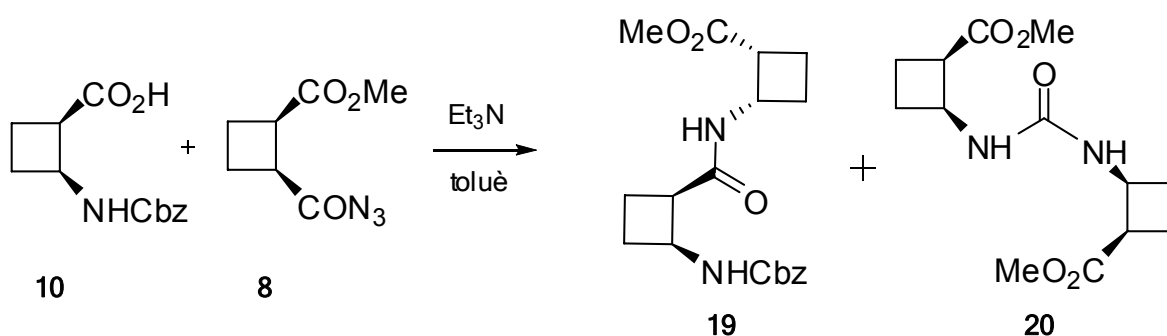
Figura 125. Urea-OMe **20** i urea-O^tBu **69** obtingudes com a productes secundaris de la reacció de transposició de Curtius.

4.2.1 Obtenció de les urees-OMe **20** i -O^tBu **69**

Per tal de dur a terme la síntesi de l'hexàmer **32**, s'han hagut d'acumular quantitats importants del β -dipèptid **19**, convertint-se aquest en un intermedi clau d'aquesta ruta sintètica.

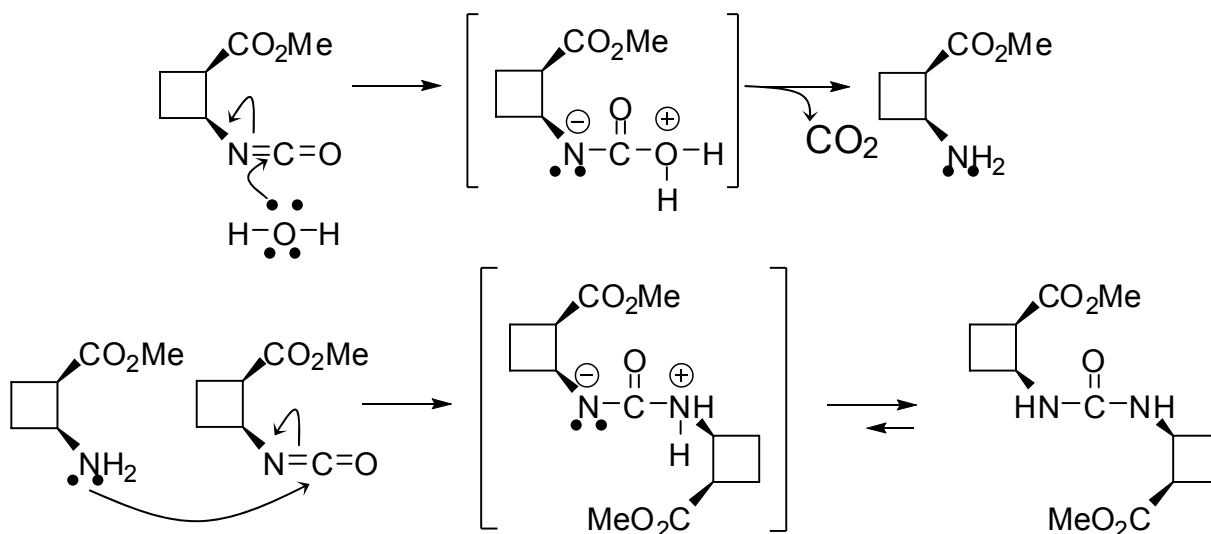
D'aquesta manera, durant la síntesi d'aquest intermedi clau **19** s'han obtingut percentatges considerables de la urea-OMe **20** com a producte secundari (20-42% de producte desitjat *versus* 33-55% de producte secundari).

Així doncs, durant la ruta sintètica duta a terme hem obtingut la urea-OMe **20**, com a producte secundari de la reacció de transposició de Curtius, tal com es mostra a l'**Esquema 27**.



Esquema 27. Obtenció de la urea-OMe **20** com a producte secundari de la reacció de transposició de Curtius

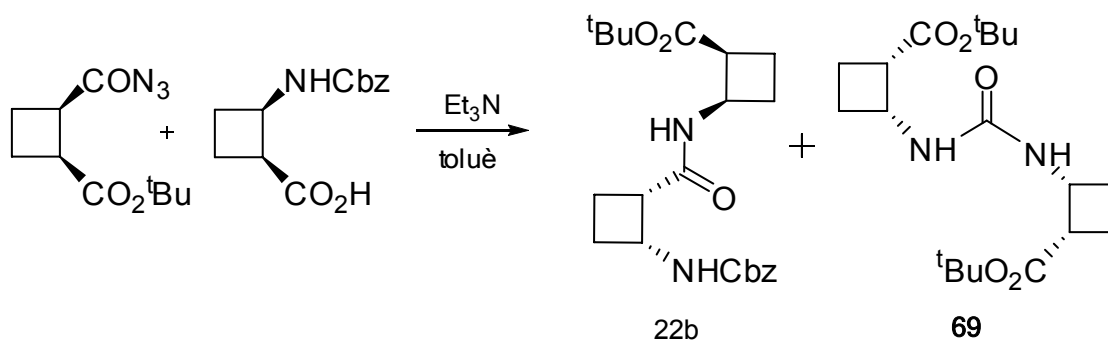
El mecanisme que justifica la formació d'aquesta urea com a producte secundari prové de l'atac de l'amina resultant de la hidròlisi d'una molècula d'isocianat, sobre una altra molècula d'isocianat (**Esquema 28**). Aquesta hidròlisi ens ha resultat inevitable tot i treballar amb nitrogen sec i dissolvents anhidres.



Esquema 28. Mecanisme de la reacció de formació d'urea urea-OMe **20**.

Per la seva part, la Dra. Sandra Izquierdo va poder comprovar com a l'augmentar el impediment estèric de la reacció augmentava la proporció de producte secundari obtingut. Aquest efecte no es va poder minimitzar ni realitzant la reacció a una temperatura més baixa.

Així doncs, va comprovar com, al realitzar la reacció de transposició de Curtius tenint el -O^tBu com a grup funcional, la proporció d'urea-O^tBu **69** era superior a la obtinguda en el cas de la urea-OMe **20**. La reacció d'obtenció de la urea-O^tBu **69** es mostra a l'**Esquema 29**.



Esquema 29. Reacció de transposició de Curtius mitjançant la qual s'obté la urea-O^tBu **69**

4.2.2 Estudi estructural de les urees-OMe **20** i -O^tBu **69** en solució, mitjançant RMN.

Seguint amb el protocol emprat al llarg d'aquesta Tesi Doctoral en quant a estudi estructural es refereix, s'ha procedit a estudiar ambdues urees mitjançant RMN.

Primerament, i donat que la urea-O^tBu **69** havia estat prèviament caracteritzada per la Dra. Sandra Izquierdo, s'ha procedit a realitzar la caracterització completa de la urea-OMe **20**. Així doncs, s'han realitzat tots els experiments necessaris per dur a terme la caracterització i assignació completa dels senyals d'aquest compost (¹H, ¹³C, HSQC editat i NOESY, veure *Annex 3: Experiments de RMN*). A la **Figura 126** es mostra l'espectre de RMN de ¹H.

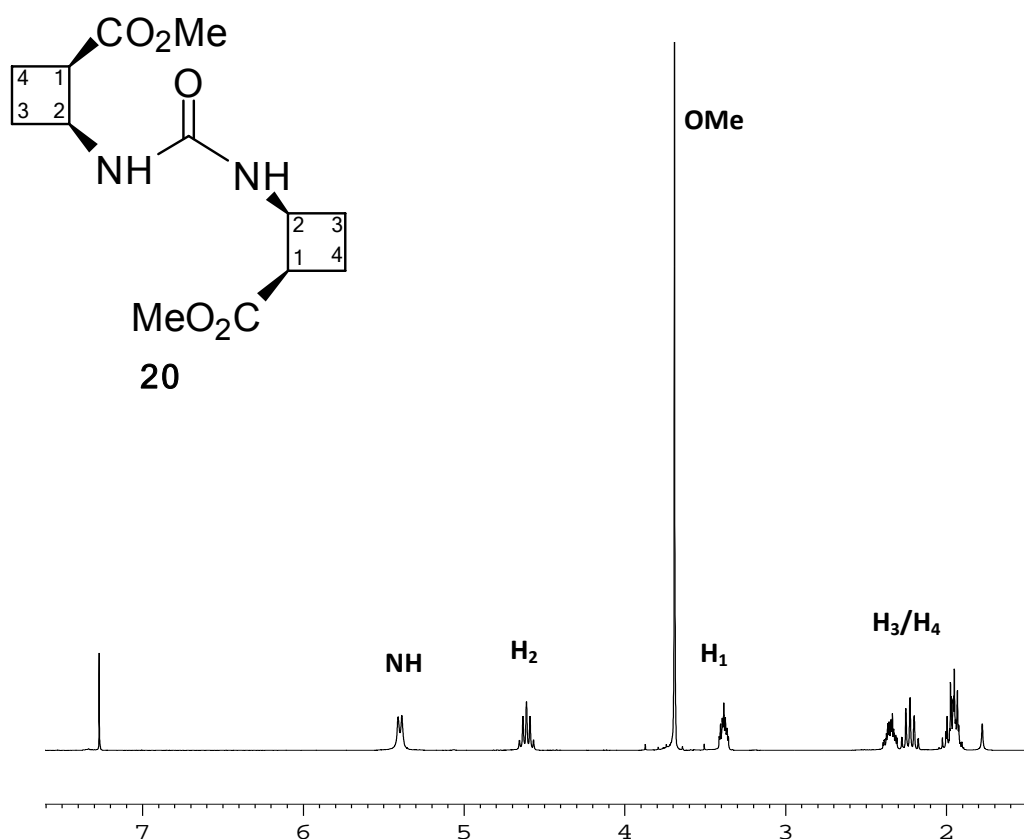


Figura 126. Espectre de ¹H de la urea-OMe **20**

Per tal de poder realitzar comparacions entre les dues urees, s'adjunta espectre de RMN de ^1H de la urea- O^tBu **69**.¹²² (Figura 127)

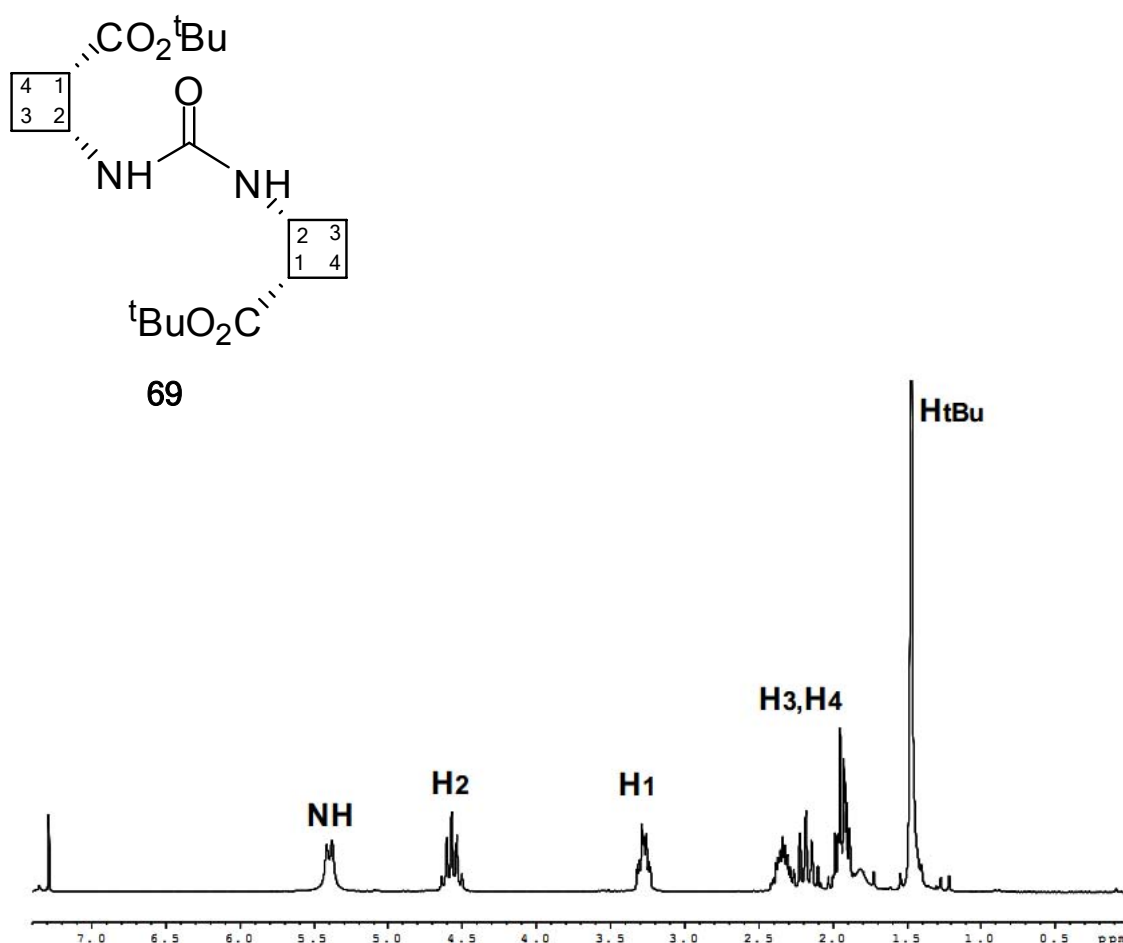


Figura 127. Espectre de ^1H de la urea- O^tBu **69**

Com es pot observar als espectres de RMN de ^1H de les dues urees (Figura 127 i 127) les molècules tenen un eix de simetria C_2 . També es pot apreciar com els desplaçaments químics dels NH's d'ambdues molècules són força semblants (≈ 5.5 ppm). Això juntament amb el fet que els senyals dels NH's apareguin com un doblet molt ben definit, ens fa pensar que aquests protons es troben molt fixats, probablement formant algun tipus d'estructura secundària en solució.

¹²² Tesi Doctoral de la Dra. Sandra Izquierdo titulada Àcids (+) i (-)-2-aminociclobutan-1-carboxílics i la seva incorporació en β -pèptids. Estudi sintètic i estructural, 2005, UAB.

Capítol 4: Estudi estructural

Seguidament, per tal d'estudiar les possibles estructures secundàries que tant la urea-O^tBu **69** com la urea-OMe **20** poguessin originar, s'han realitzat experiments de NOESY bidimensional d'ambdós compostos (Veure *Annex 3: experiments de RMN*). Malauradament aquests experiments no han proporcionat cap informació significativa que ens pugui indicar quina és la conformació adoptada per aquests compostos en solució.

Per aquest motiu s'ha procedit a mesurar els coeficients de temperatura dels NH's d'ambdues urees a dues concentracions diferents per poder avaluar l'efecte de la concentració sobre aquests protons. D'aquesta manera s'han determinat els coeficients de temperatura de dues dissolucions en CDCl₃ 9 i 18 mM, obtenint-se els valors que es mostren a la **Taula 4**.

Coeficients de temperatura (ppb·K ⁻¹)		
	18 mM	9 mM
NH urea-O^tBu, 69	-1.9	-1
NH urea-OMe, 20	-3.7	-2.4

Taula 4. Coeficients de temperatura de la urea-O^tBu, **69** i la urea-OMe, **20**

Tal com s'observa a la **Taula 4**, al diluir la mostra en CDCl₃ s'obtenen uns coeficients de temperatura inferiors en valor absolut. Això indica, que al diluir la mostra els enllaços d'hidrogen intramoleculars existents s'enforteixen, és a dir, que ambdós compostos presenten més tendència a formar enllaços d'hidrogen intramoleculars en solucions diluïdes.

Segons aquests resultats, les conformacions que adoptarien aquests compostos en solució serien les que es mostren a la **Figura 128**.

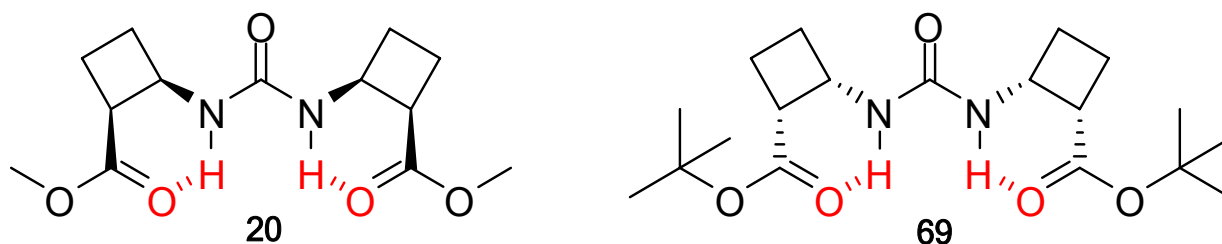


Figura 128. Conformacions adoptades per les urees **20** i **69** en solució. En vermell es marquen els enllaços d'hidrogen intramoleculars

Donat que ambdues molècules són simètriques suposem que presenten dos enllaços d'hidrogen intramoleculars cadascuna, entre el NH del grup urea i el C=O dels respectius èsters (metílic per **20** i *tert*-butílic per **69**) donant lloc a la formació de dos cicles de 6 baules cadascuna.

4.2.3 Estudi estructural de les urees-OMe **20** i -O^tBu **69** en estat sòlid, mitjançant IR.

S'han realitzat estudis estructurals preliminars d'aquests compostos en estat sòlid utilitzant espectroscòpia FT-IR.

En els espectres d'aquestes dues urees es poden apreciar bandes ben definides corresponents al CO-*stretching* al voltant de 1630 cm⁻¹ i bandes corresponents al NH-*stretching* al voltant de 3260-3310 cm⁻¹. Aquestes bandes són típiques en aquells compostos que, en estat sòlid, formen enllaços d'hidrogen intermoleculars donant lloc a estructures tipus *làmina β*. A més a més, el fet que apareguin bandes a 1555 i 1559 cm⁻¹ també suggereix la formació d'aquests tipus d'estructures.¹²³ (**Figura 129 i 130**)

¹²³ Ray, S.; Das, A. K.; Drew, M. G. B.; Banerjee, A., *Chem. Commun.*, **2006**, 4230-4232 I les seves referències com per exemple: Moretto, V.; Crisma, M.; Bonora, G. M.; Toniolo, C., *Macromolecules*, **1989**, 22(7), 2939 I Mazor, Y.; Gilead, S.; Benhar, I.; Gazit, E., *J. Mol. Biol.*, **2002**, 322, 1013-1024

Capítol 4: Estudi estructural

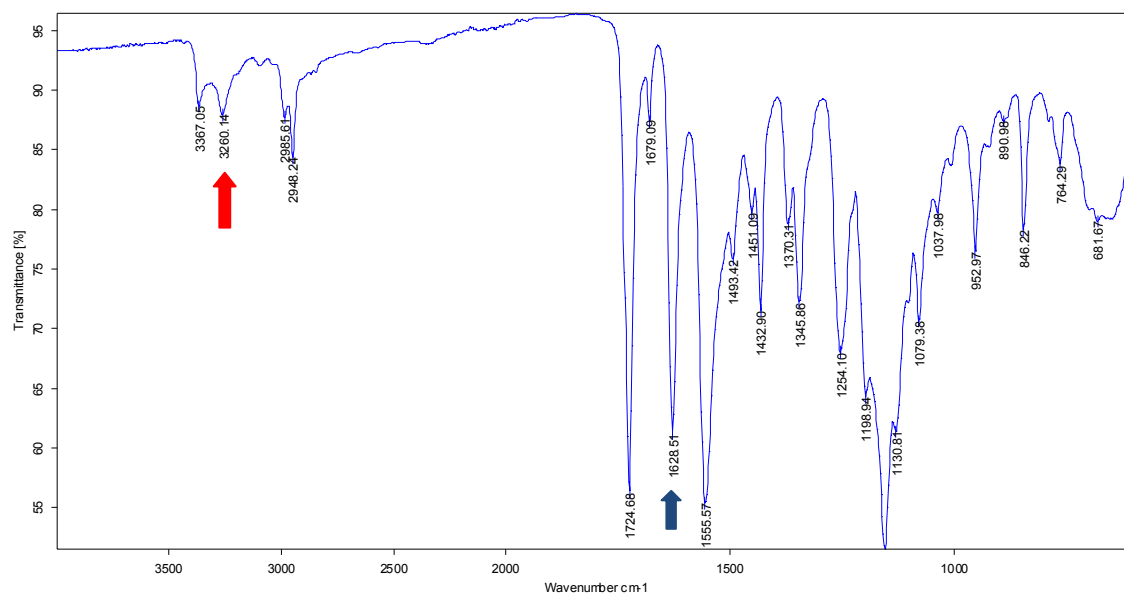


Figura 129. Espectre de IR en estat sòlid de la urea-OMe **20**. Assenyalat amb una fletxa vermella: NH-stretching, amb una blava: CO-stretching

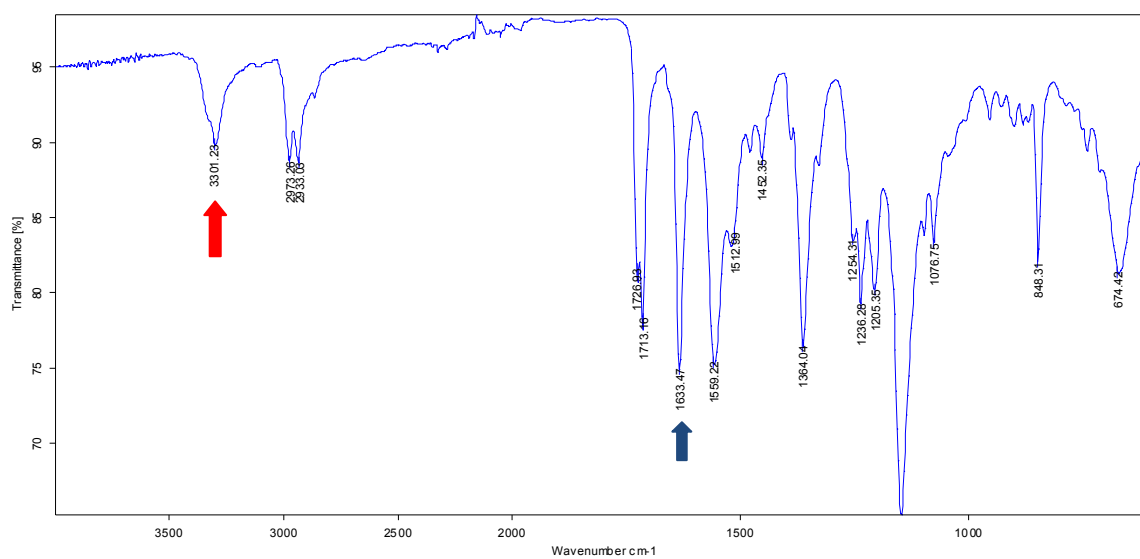


Figura 130. Espectre de IR en estat sòlid de la urea-O^tBu **69**. Assenyalat amb una fletxa vermella: NH-stretching, amb una blava: CO-stretching

4.2.4 Estudi estructural de les urees–O^tBu 69 i -OMe 20 en estat sòlid, mitjançant raigs-X.

Ambdues urees han resultat ser sòlids blancs que han cristal·litzat amb facilitat, utilitzant AcOEt i pentà com a dissolvents. Així, d'aquests cristalls obtinguts s'ha pogut realitzar difracció de raigs-X.

A la **Figura 131** es mostra el monocristall obtingut de la difracció de raigs-X de la urea-O^tBu 69.⁵¹

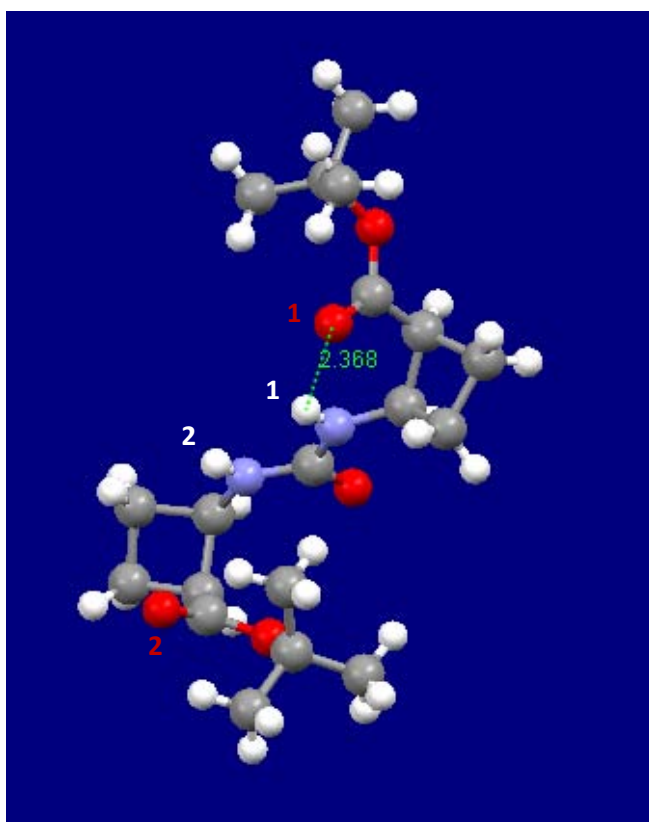


Figura 131. Estructura del monocristall obtingut per difracció de raigs-X de la urea-O^tBu 69

Tal com s'observa a la **Figura 131** aquest compost en estat sòlid manté un enllaç d'hidrogen intramolecular entre el protó d'un dels NH₁ i l'oxigen del grup C=O₁, amb una distància d'enllaç de 2.36 Å. En canvi a l'altre part de la molècula tot i que el NH₂ i l'oxigen del grup C=O₂ es troben a distància d'enllaç, els àtoms no es troben amb l'angle adequat per formar enllaç d'hidrogen

Capítol 4: Estudi estructural

intramolecular, ja que, tal com es pot apreciar a la **Figura 131**, els àtoms no es troben encarats.

Per tal de diferenciar entre els diversos enllaços d'hidrogen intermoleculars que es puguin donar, i per fer més entenedora la nomenclatura assignada, s'anomenarà arbitràriament com *Enllaç d'hidrogen intermolecular de Tipus I*, aquell on el grup C=O estigui unit a dos protons de diferents grups NH a l'hora i *Enllaç d'hidrogen intermolecular de Tipus II*, a aquell on el grup NH es trobi unit a un únic oxigen d'un grup carbonil. (**Figura 132**)

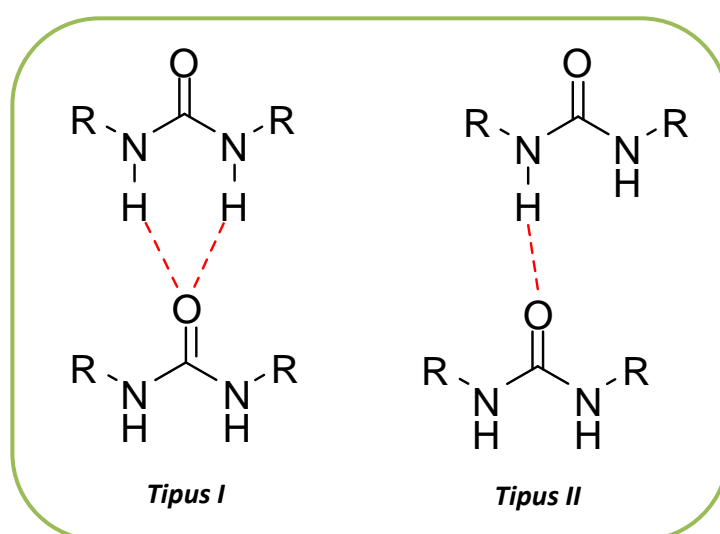


Figura 132. Nomenclatura arbitrària utilitzada per diferenciar els diferents tipus d'enllaços d'hidrogen intermoleculars.

Així doncs, si ens fixem en l'empaquetament que presenta la urea-O^tBu **69**, es pot observar la formació d'enllaços d'hidrogen intermoleculars de *Tipus I*, entre el grup C=O del grup urea d'una molècula i els dos NH's de la molècula veïna, amb unes distàncies d'enllaç de 2.259 Å i 2.028 Å, i amb un angle de 63.8°. (**Figura 133**)

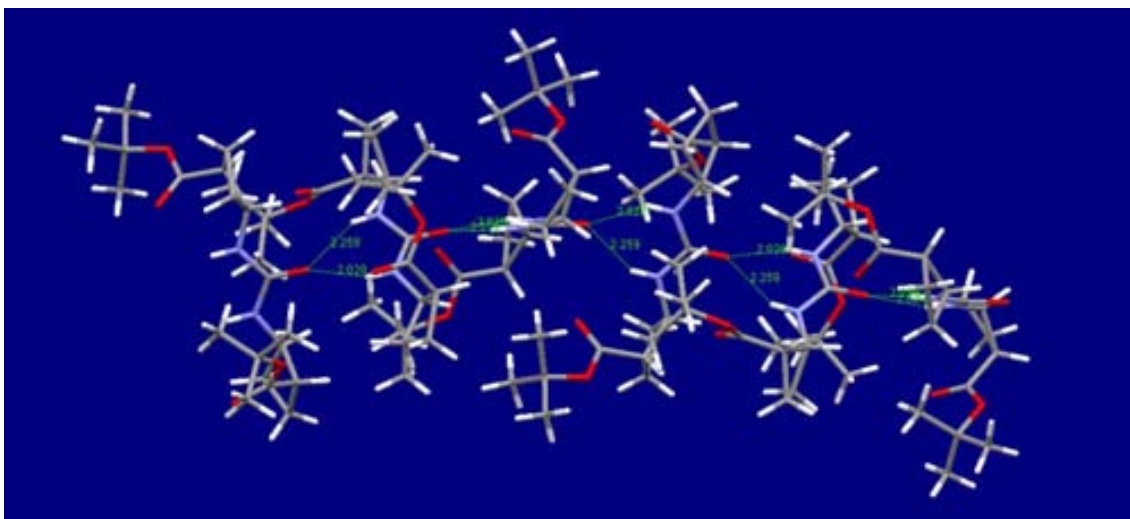


Figura 133. Vista lateral de la urea-O^tBu **69**

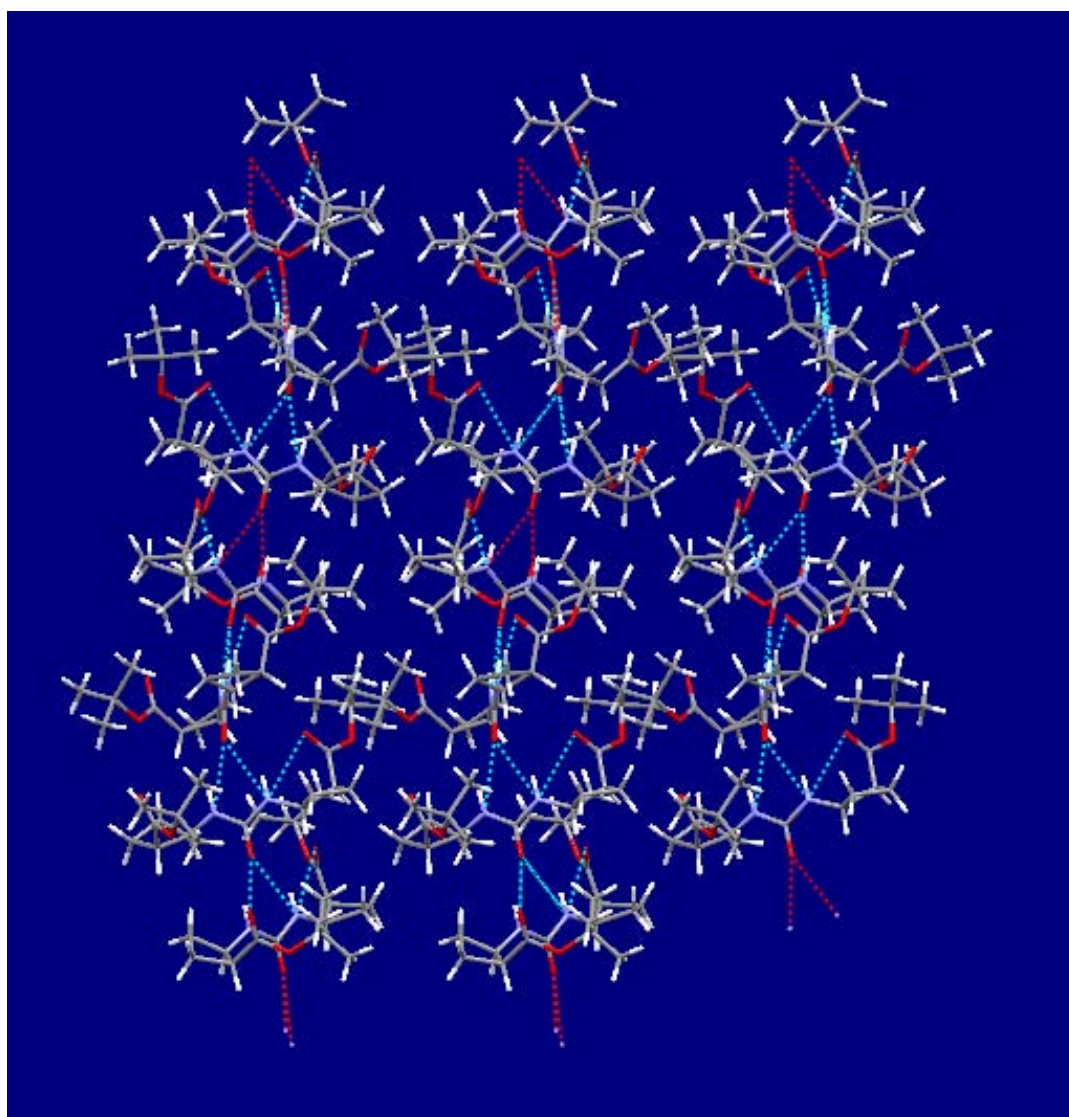


Figura 134. Vista frontal de l'empaquetament de la urea-O^tBu **69**

D'aquesta manera, tal com s'observa a la **Figura 134**, com a conseqüència de la formació d'enllaços d'hidrogen intermoleculars, s'obtenen cadenes paral·leles entre sí, on cada molècula manté sempre l'enllaç d'hidrogen intramolecular abans esmentat.

Però el tret més característic d'aquest empaquetament és troba en el tipus d'estructura originada per la formació d'aquests enllaços d'hidrogen intermoleculars, ja que les cadenes presenten un gir complet cada sis unitats moleculars. És a dir, que la unitat molecular adopta diferents disposicions a l'espai, que es repeteixen cada sis unitats, donant lloc a un gir complet de la cadena. (**Figura 135**)

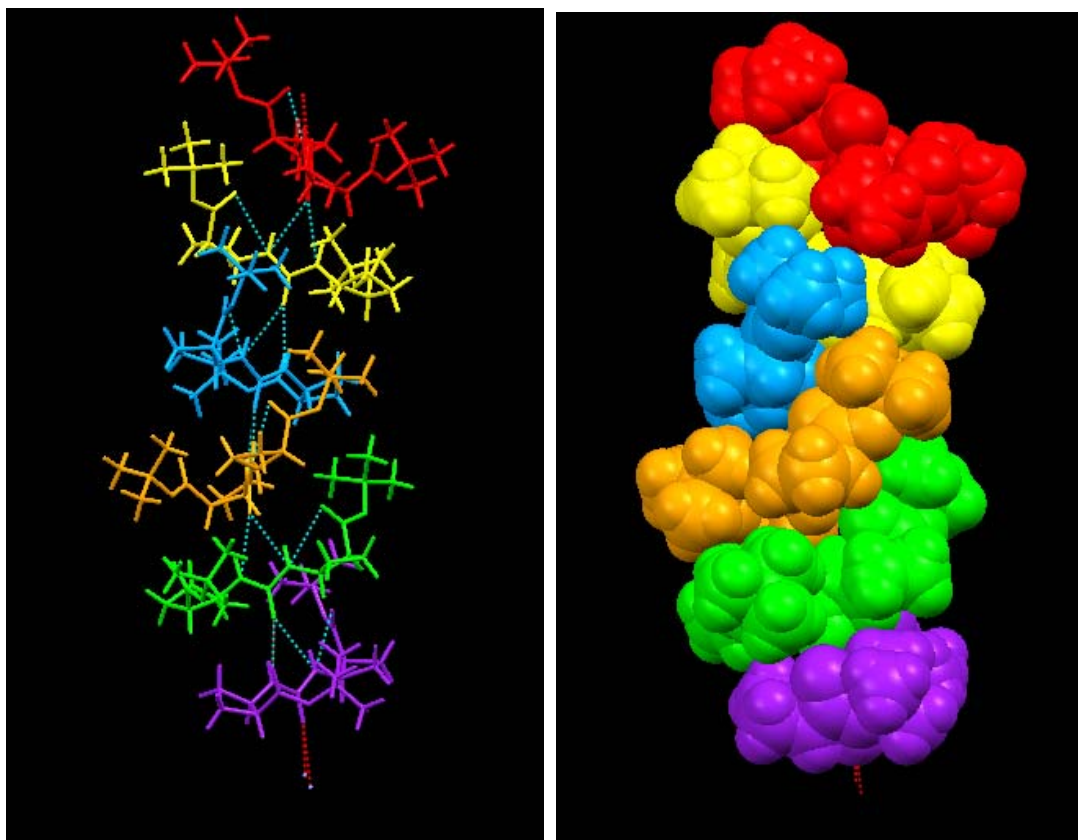


Figura 135. Esquematització del gir realitzat cada sis unitats moleculars de la urea-O^tBu **69**. A la figura de la dreta es mostra aquest mateix gir amb volum.

Si aquest empaquetament es mira des de dalt, es pot apreciar una organització que anomenem de *floquet de neu*, on tots els grups *tert*-butílics queden cap a fora de la cadena originada. Tot i que pugui semblar que queda un forat al mig del floquet, si es té en compte el volum de cada àtom, es pot veure com l'espai central queda totalment cobert. L'empaquetament global de

la urea-O^tBu **69** des d'aquesta vista (des de dalt) sembla que adopti una estructura tipus *eixam d'abelles*. (**Figura 136**)

Davant aquesta estructura obtinguda, s'ha realitzat una cerca bibliogràfica exhaustiva (cerca realitzada al Cambridge Structural Database, CSD) de compostos urees substituïts que poguessin presentar una agrupació supramolecular semblant i cal dir que en el camp de les urees, aquesta ha estat l'única estructura on les molècules s'uneixen per donar lloc a cadenes helicoïdals infinites amb 6 molècules per volta.

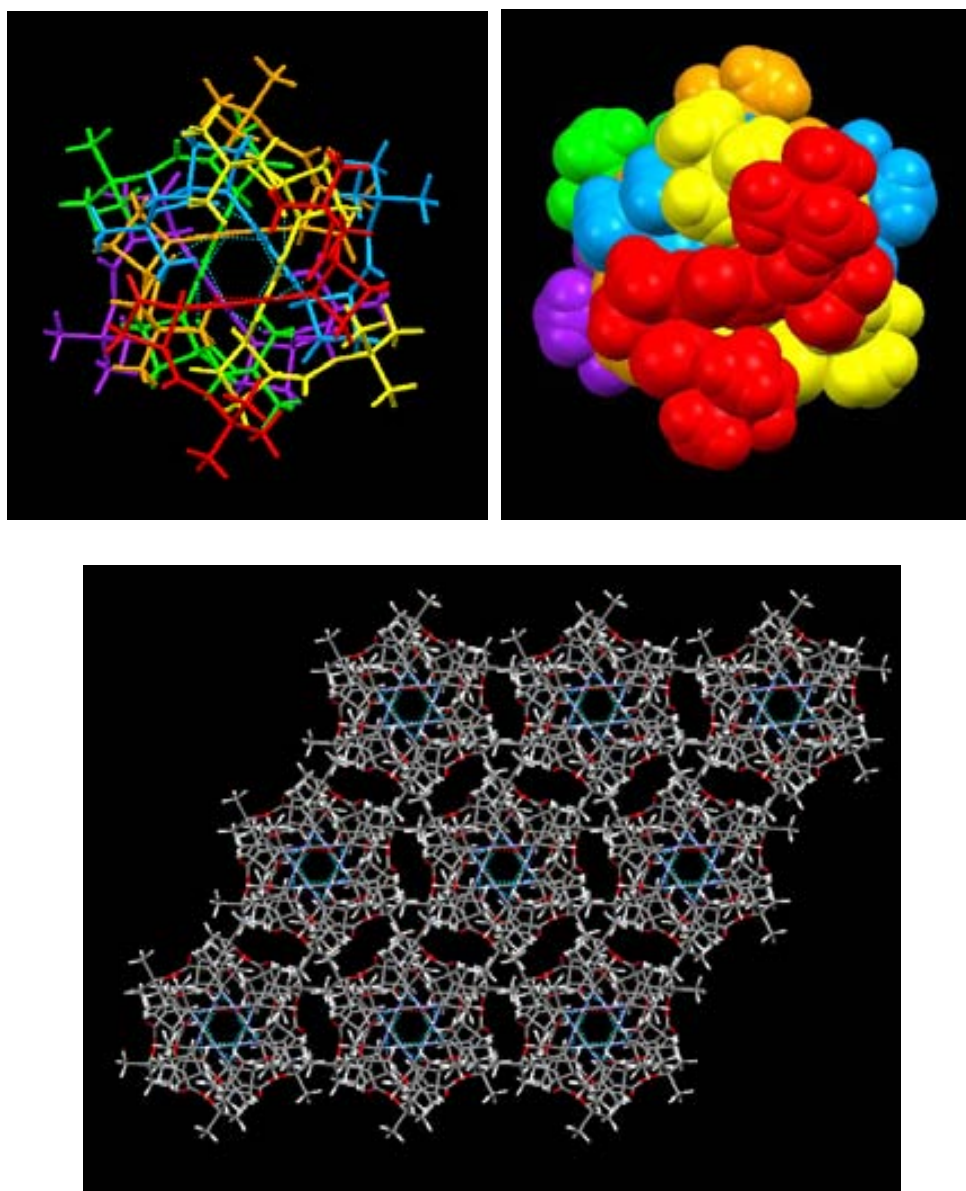


Figura 136. Vista des de dalt de l'empaquetament de la urea-O^tBu **69**. A la part superior es mostra l'estructura tipus *floquet de neu* i a la part inferior la morfologia observada en conjunt, que recorda a un *eixam d'abelles*.

Capítol 4: Estudi estructural

Davant aquests resultats, va semblar molt interessant realitzar el difractograma de raigs-X de la urea-OMe **20** per tal d'avaluar com el grup funcional afectava a l'empaquetament cristal·lí del compost.

Així doncs, s'ha obtingut el monocristall de la urea-OMe **20** que es mostra a la **Figura 137**, on es pot observar l'existència de dos confòrmers diferents a l'empaquetament.

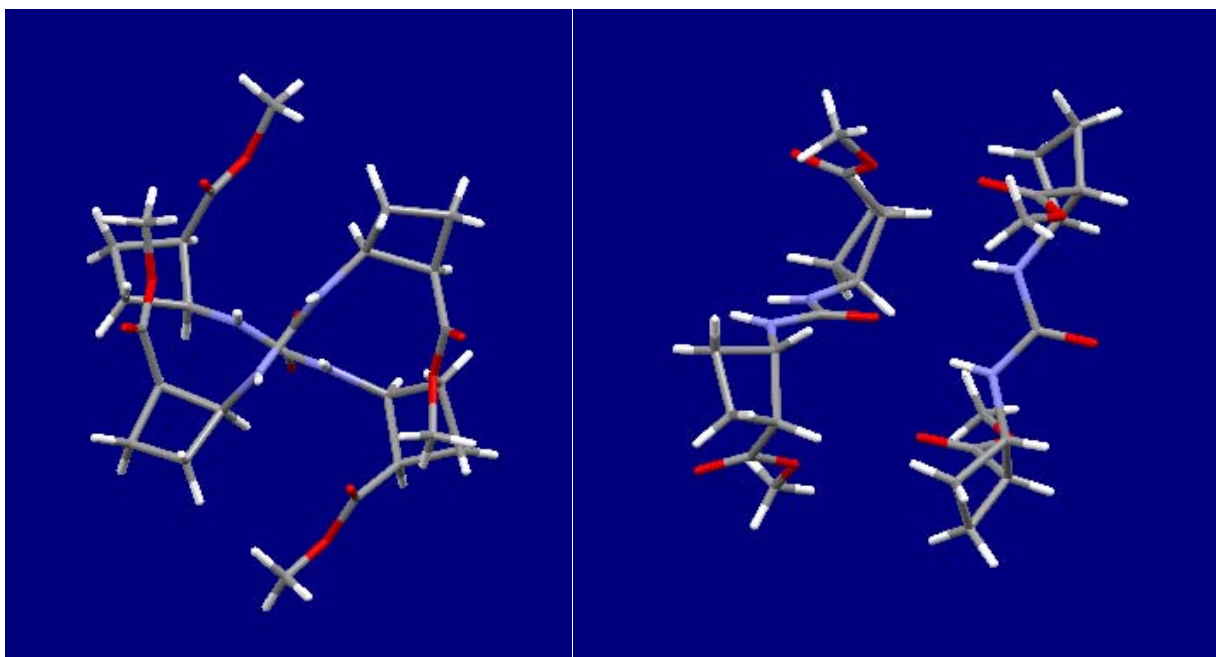


Figura 137. Vistes diferents dels dos confòrmers de la urea-OMe **20** que constitueixen l'empaquetament cristal·lí. A l'esquerra vista des de dalt i a la dreta vista lateral lleugerament modificada.

En el cas d'aquesta urea-OMe **20**, no s'observen enllaços d'hidrogen intramoleculars en cap dels dos confòrmers, ja que tot i que els àtoms (NH i C=O) es troben a prop, l'angle no és l'adequat per que es doni un enllaç. (**Figura 137**)

Observant els enllaços d'hidrogen intermoleculars que es donen, es pot apreciar com al llarg de la cadena s'alternen dos tipus diferents d'enllaç d'hidrogen intermolecular com a conseqüència de l'alternança dels diferents confòrmers, representats en verd i lila a la **Figura 138**. És a dir, que les

cadena d'aquest empaquetament cristal·lí estan formades per l'alternança d'enllaços d'hidrogen intermolecular de *Tipus II*, amb una distància de 2.030 Å, i per enllaços d'hidrogen intermoleculars de *Tipus I*, amb unes distàncies d'enllaç de 2.207 Å i 2.190 Å, i essent l'angle de 59.50°. (**Figura 138**)

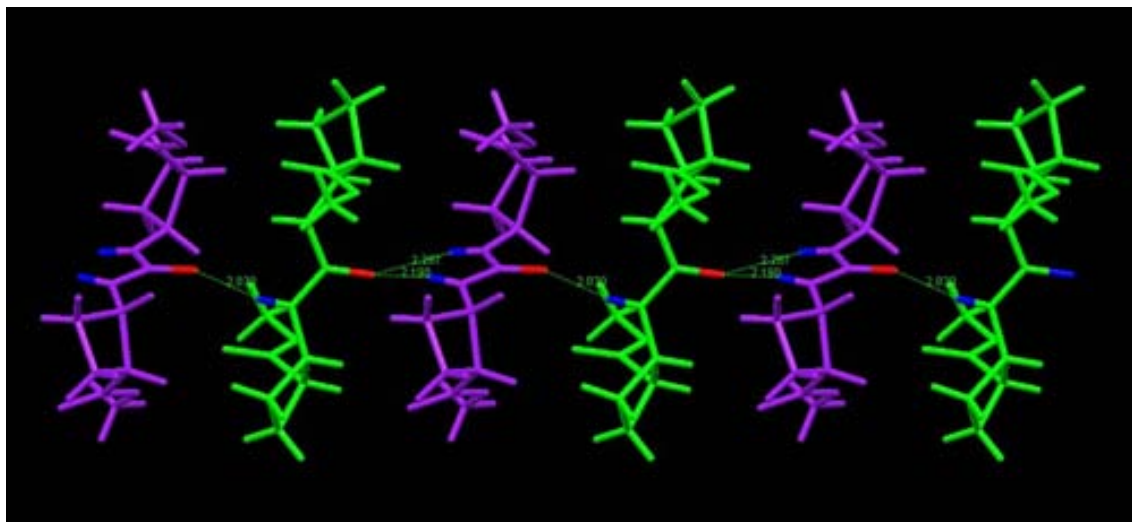


Figura 138. Vista lateral de la urea-OMe 20

Així, l'empaquetament cristal·lí d'aquest compost està constituït per cadenes paral·leles entre sí, on les diferents molècules s'uneixen com a conseqüència de la formació d'enllaços d'hidrogen intermoleculars. (**Figura 139**)

Si es mira l'empaquetament des de dalt, es pot observar com els dos confòrmers es disposen de tal manera que queden formant una X, on el confòrmer *lila*, podríem dir que adopta una conformació en forma de **S** i en canvi el confòrmer *verd* adopta una conformació en forma de **Z**. Tot i així, ambdós confòrmers mantenen sempre una disposició que els permet la formació d'enllaços intermoleculars entre ells. (**Figura 140**)

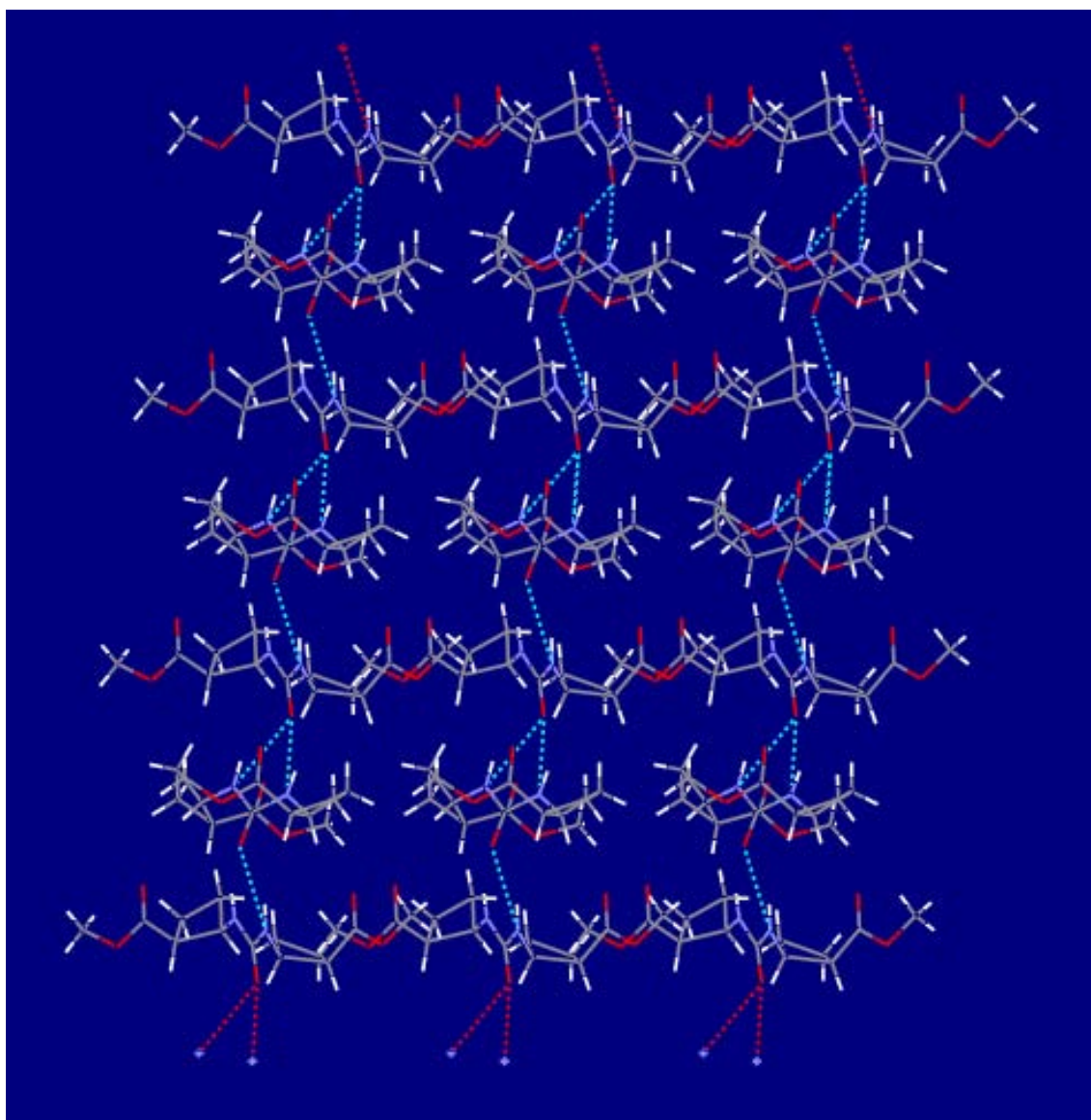


Figura 139. Vista frontal de l'empaquetament de la urea-OMe 20

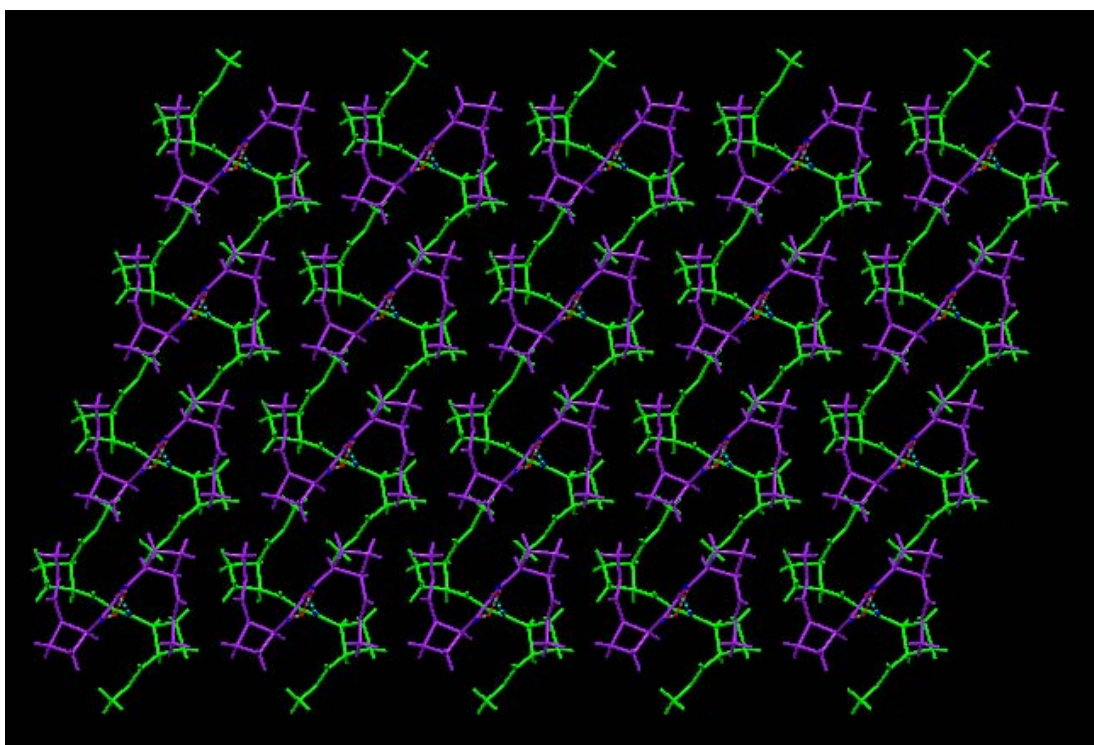
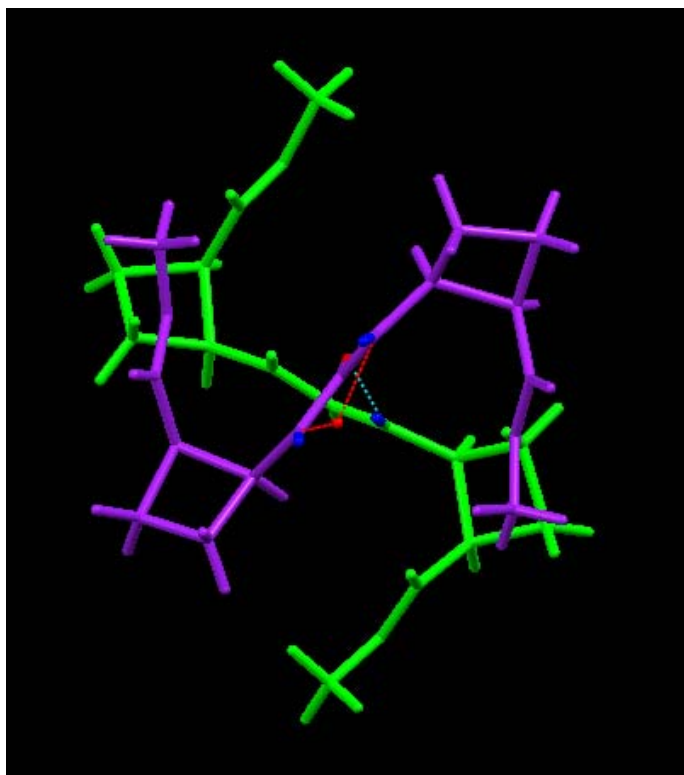


Figura 140. A la part superior es mostren els dos confòrmers vistos des de dalt: el lila en forma de S i el verd en forma de Z. A la part inferior es mostra l'empaquetament de la urea-OMe **20** vista des de dalt.

En aquest cas, l'empaquetament observat és ordinari, ja que les cadenes que s'originen com a conseqüència de la formació d'enllaços d'hidrogen intermoleculars, no presenten cap gir. L'empaquetament originat simplement és una repetició infinita de l'alternança de dos confòrmers diferents disposats paral·lelament entre sí. (**Figura 141**)

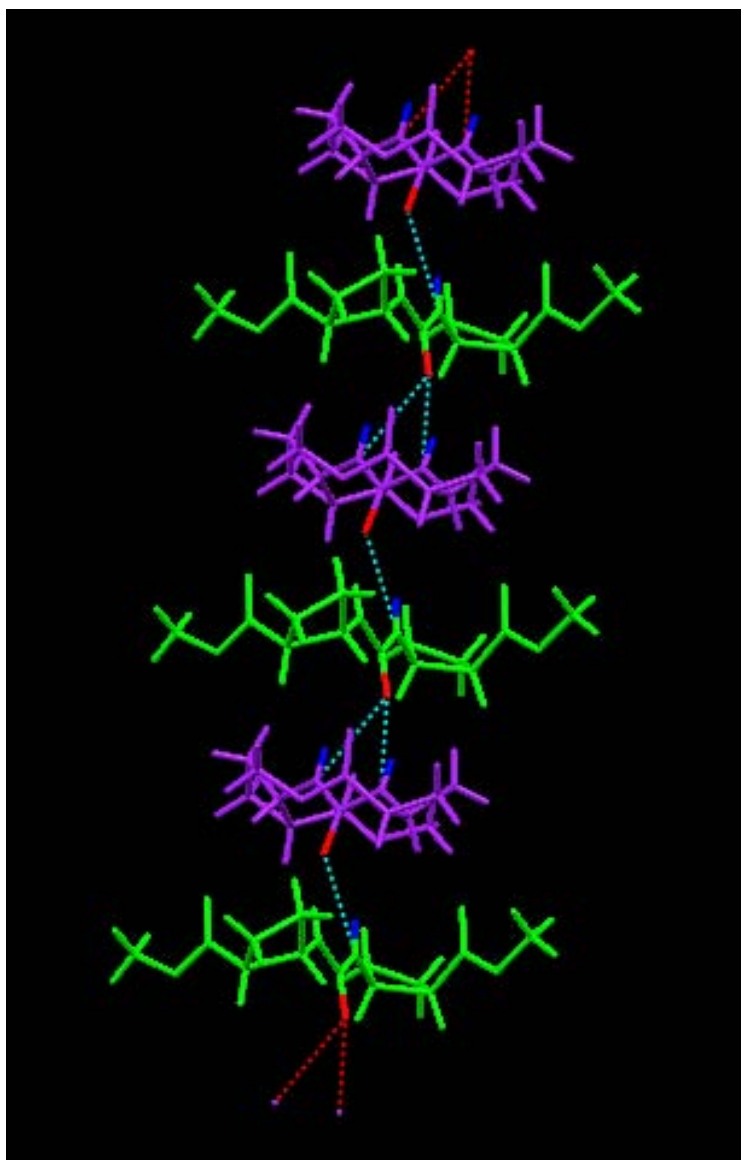


Figura 141. Vista frontal e la disposició paral·lela de cada confòrmer entre sí de la urea-OMe

4.2.5 Estudi supramolecular de les urees-O^tBu 69 i -OMe 20 mitjançant TEM.

Per tal d'estudiar supramolecularment la urea-O^tBu 69, s'han realitzat experiments de TEM a diferents concentracions, dissolvents i temps d'incubació.

Així doncs, s'ha començat analitzant una dissolució 1 mM en metanol, passades 24 i 72 hores d'incubació i tenyint les mostres amb una solució d'acetat d'uranil al 2%. També s'han analitzat unes solucions 2.5 i 5 mM en metanol passades 24 hores d'incubació. A la **Figura 142** es recull un resum de les imatges de TEM obtingudes variant el temps d'incubació i la concentració de la solució.

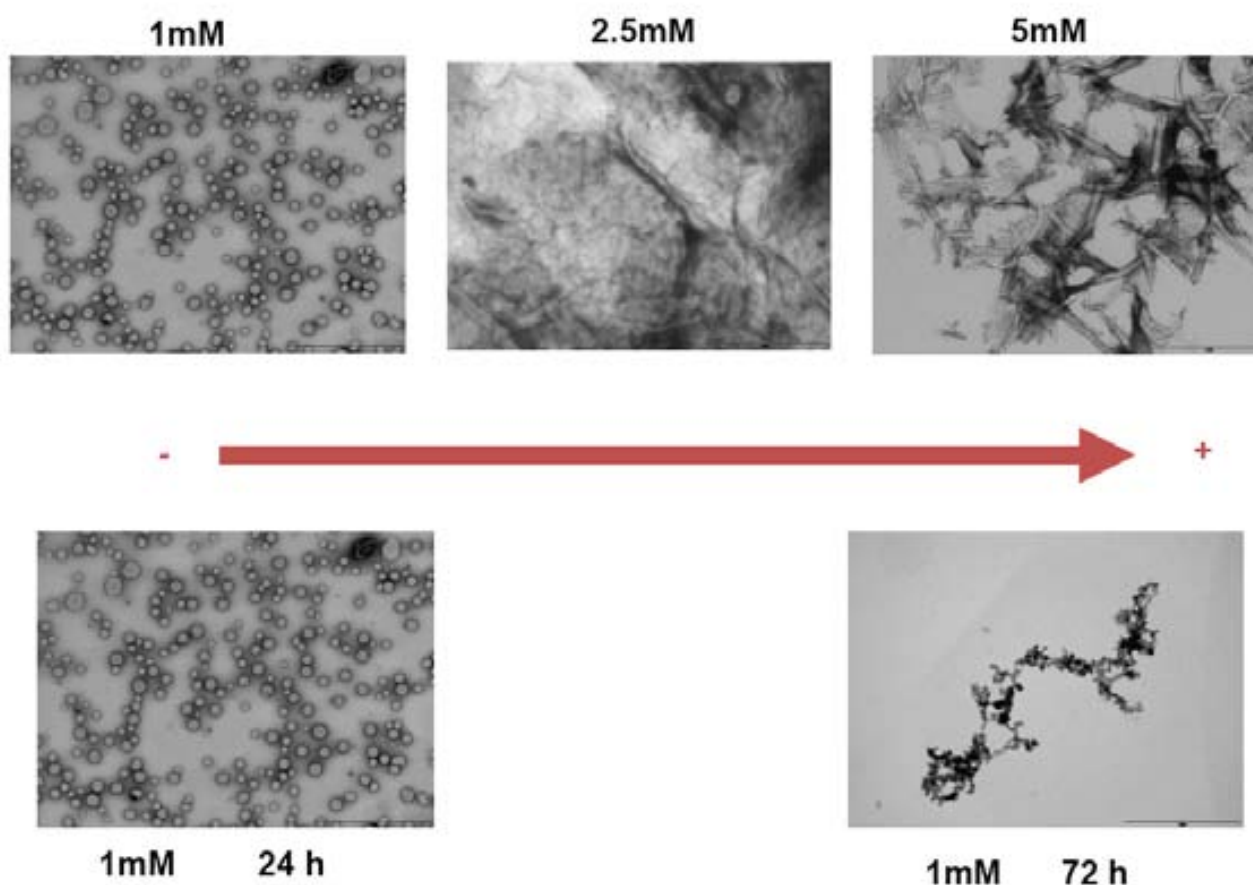


Figura 142. Morfologies observades per TEM de la urea-O^tBu 69 en solucions de MeOH a diferents concentracions i temps d'incubació.

Capítol 4: Estudi estructural

Com es pot observar (**Figura 142**), aquest compost a una concentració 1 mM en metanol i incubat durant 24 hores, dóna lloc a una estructura regular *tipus globular*. Així, s'han pogut mesurar els diàmetres dels glòbuls observats trobant-se en un rang de 120-127 nm. (**Figura 143**)

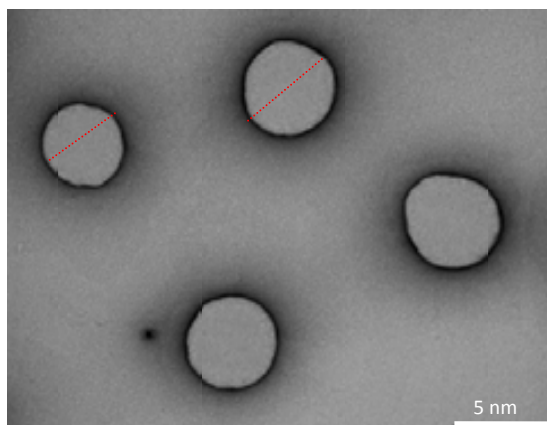


Figura 143. Solució 1 mM de la urea-OⁱBu **69** en MeOH passades 24 hores.

També, tal com s'observa a la **Figura 142**, sembla que al deixar la solució 1mM incubant durant més temps (72 hores) les nanoestructures *globulars* observades a temps d'incubació inferiors, s'agrupen per donar lloc a una estructura superior formada per l'associació d'aquestes petites unitats globulars. D'altra banda, es pot veure com al utilitzar concentracions superiors (2.5 mM) no s'aprecien estructures globulars i en canvi, apareix una estructura regular i a la vegada indefinida que tant podria ser una deposició uniforme dels agregats en forma de capa en la superfície de la reixeta, com una estructura intermèdia en la formació d'estructures fibril·lars. I finalment, a l'analitzar la solució de concentració 5 mM ens hem trobat amb una estructura *fibril·lar* on aquestes fibres presenten una amplada variable (30-70 nm). Si s'amplia una de les zones de la imatge obtinguda de la solució 5 mM (**Figura 144**), es pot apreciar amb més claredat una estructura que sembla estar constituïda per un manat de fibres entrelaçades, donant lloc a una fibra de mida superior (a la **Figura 144** marcada amb fletxes).

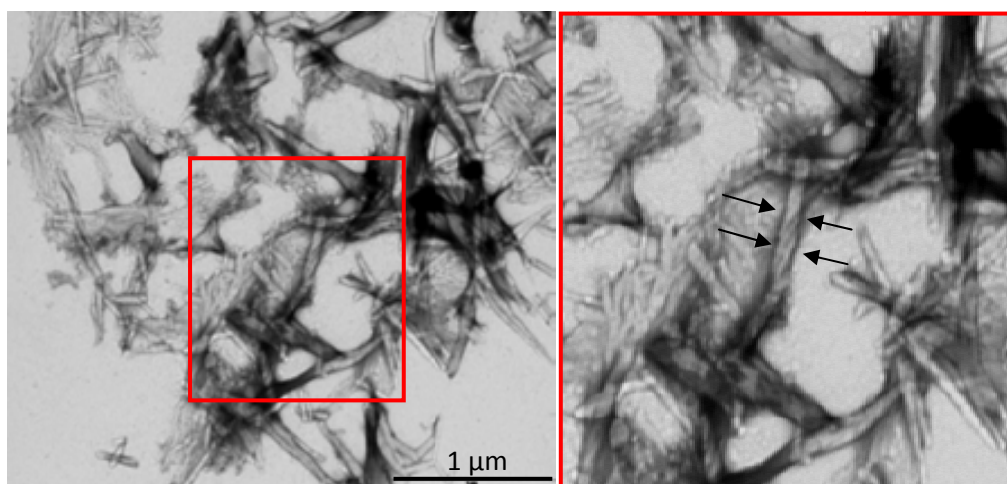


Figura 144. Solució 5 mM de la urea-O^tBu **69** en MeOH passades 24 hores (esquerra). Ampliació d'una zona on es pot apreciar l'estructura fibril·lar del compost (dreta).

D'altra banda, també s'ha dut a terme un estudi supramolecular, mitjançant TEM, de la urea-OMe **20**. D'aquesta manera, s'ha analitzat la morfologia observada en solució 1 mM en metanol passades 72 h d'incubació, ja que passades 24 hores no s'observava cap tipus d'agregat. També s'han pres imatges d'una solució 5 mM en metanol d'aquesta mateixa urea-OMe **20** passades 24 h d'incubació. (**Figura 145**)

Com pot observar-se a la **Figura 146**, a l'analitzar una solució de concentració superior (5 mM) s'ha obtingut una morfologia globular densa que s'agrupa per zones.

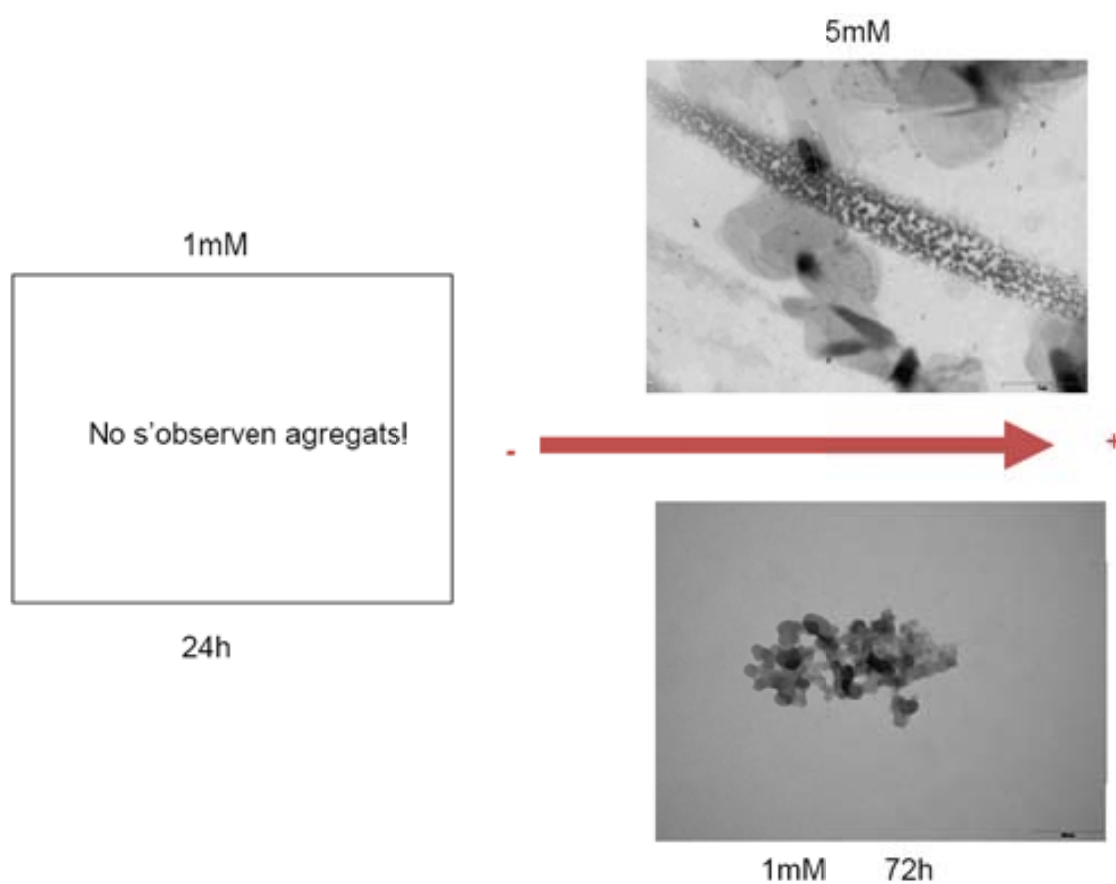


Figura 145. Morfologies observades per TEM en MeOH de la urea-OMe **20** a diferents concentracions i temps d'incubació.

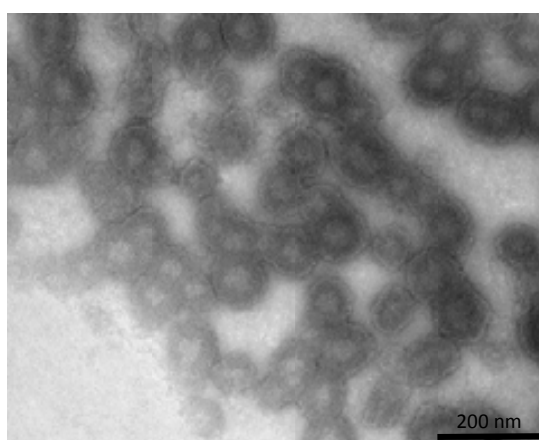
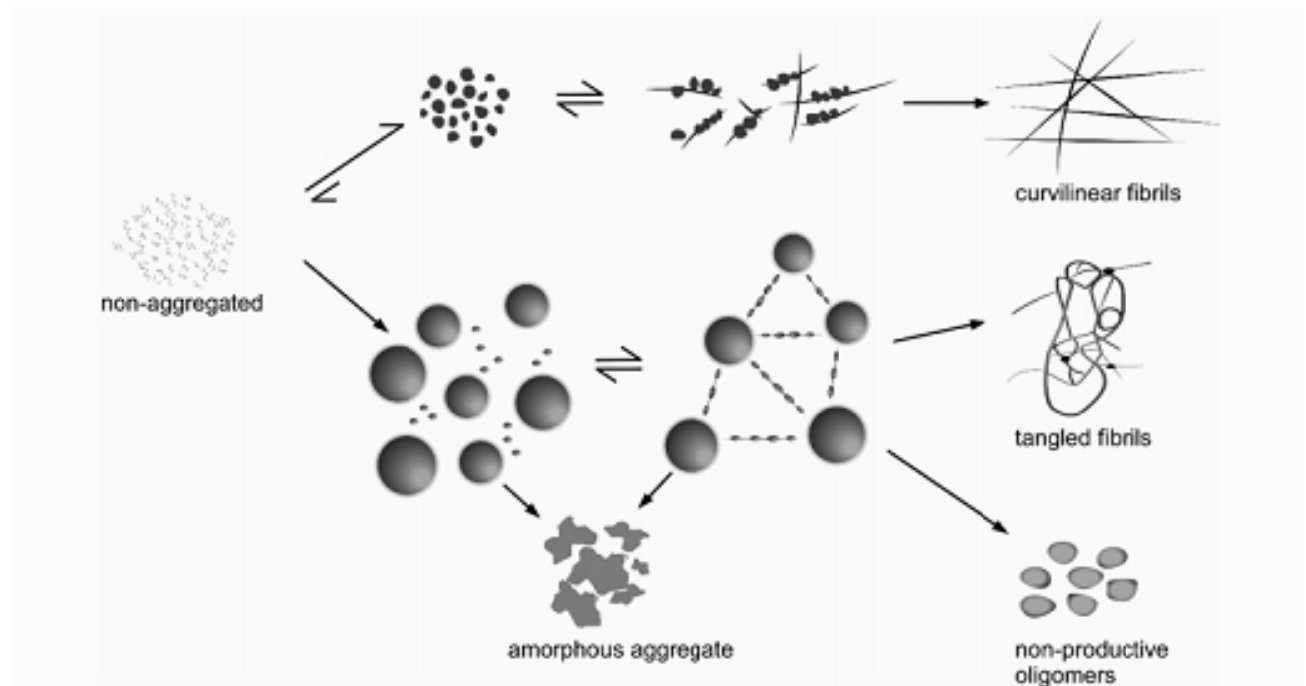


Figura 146. Solució 5 mM de la urea-OMe **20** en metanol passades 24 hores d'incubació

El fet que per aquests compostos s'observin morfologies diferents es pot explicar amb l'**Esquema 29**, ja que Moore i col·laboradors¹⁰⁸ han observat també com una gran proporció d'estructures globulars poden donar lloc alternativament a precipitats amorfs, a material inert, o poden polimeritzar en espècies competents donant lloc a complexes xarxes fibril·lars. (Part inferior de l'**Esquema 29**)



Esquema 30. A la part superior es mostra la formació de fibres de solucions sotmeses a agitació, a partir de petits oligòmers que interaccionen per formar fibres en un 80%. A la part inferior es mostren els diferents assemblatges que originen estructures supramoleculares que s'interconnecten i donen lloc a manats de fibres en un 20%. També en alguns casos s'han originat la formació d'agregats amorfs i d'espècies globulars aparentment inerts.

4.3 Conclusions

S'ha realitzat un estudi estructural en solució de les urees –OMe **20** i –O^tBu **69** mitjançant RMN. D'aquesta manera, segons els coeficients de temperatura obtinguts i l'absència de NOES significatius en ambdós casos, s'ha arribat a la conclusió que, aquests compostos en solució, donen lloc a la formació d'enllaços d'hidrogen intramoleculars.

Així, originen una estructura secundària on es dona la formació de dos cicles de 6 membres per a cada compost. (**Figura 147**)

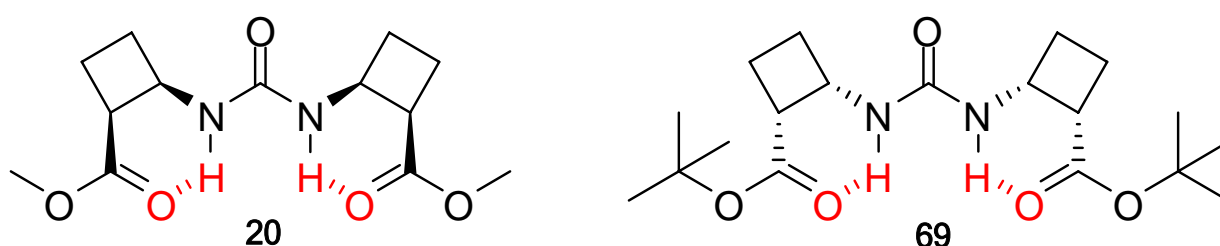


Figura 147. Conformacions adoptades per les urees **20** i **69** en solució de CHCl₃ com a conseqüència de la formació d'enllaços d'hidrogen intramoleculars.

S'ha realitzat un estudi estructural d'ambdós compostos en estat sòlid, mitjançant difracció de raigs-X. D'aquesta manera, s'ha pogut analitzar l'empaquetament cristal·lí d'ambdós compostos i s'ha pogut comprovar la peculiaritat que presenta la urea-O^tBu **69**. També s'ha comprovat com en estat sòlid, ambdós urees originen la formació d'enllaços d'hidrogen intermoleculars donant lloc a cadenes paral·leles, tot i que en el cas de la urea-O^tBu **69** un dels enllaços intramoleculars entre el NH i l'oxigen del C=O es manté. (**Figura 148**)

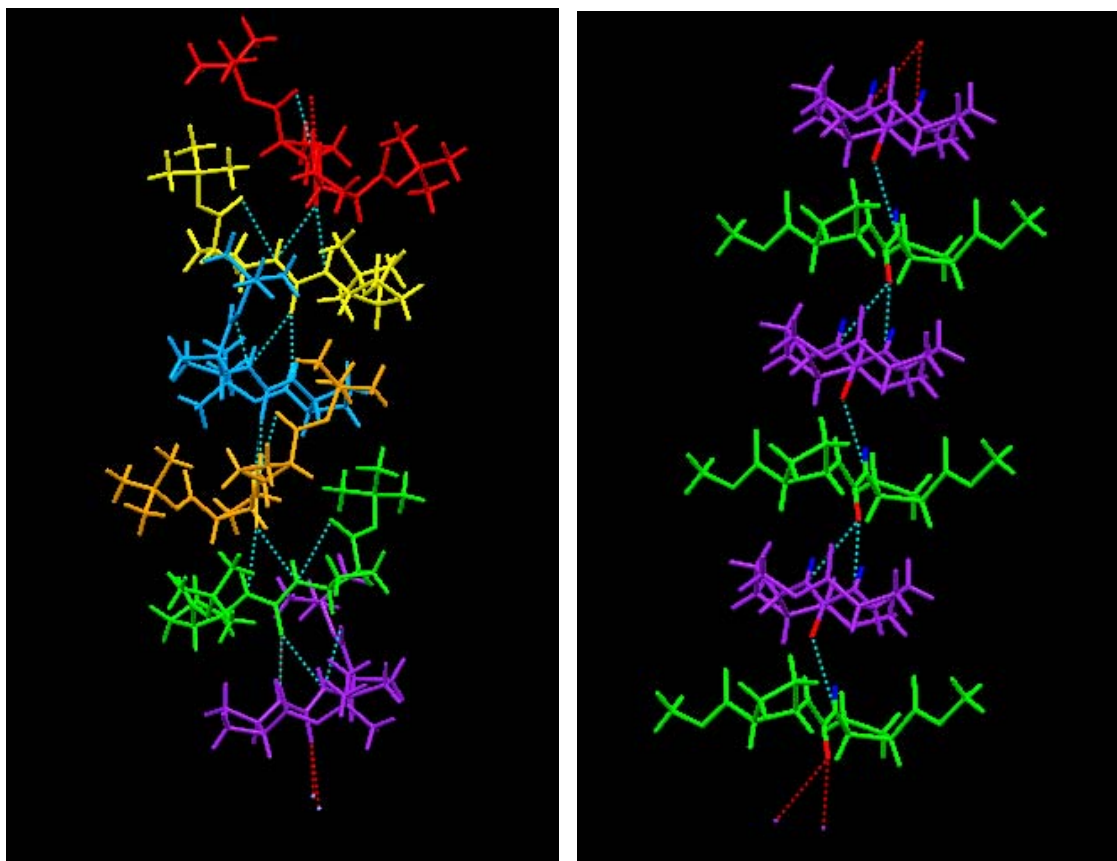


Figura 148. A l'esquerra es mostra la cadena originada per la urea-O^tBu **69** i a la dreta la originada per la urea-OMe **20**. En ambdós casos, aquests compostos en estat sòlid presenten enllaços d'hidrogen intermoleculars.

També s'ha realitzat un estudi supramolecular on s'ha trobat la formació d'estructures *globulars*, a baixes concentracions i baixos temps d'incubació, que s'agrupen per donar lloc, a temps d'incubació i concentracions superiors, a una estructura *fibril·lar* en el cas de la urea-O^tBu **69**, i a agregats irregulars en el cas de la urea-OMe **20**.

Per tal d'entendre com es dóna l'auto-assemblatge, que origina les fibres, entre les diferents molècules de urea-O^tBu **69**, resulten molt útils els estudis de difracció de raigs-X, ja que seria lògic pensar que aquestes morfologies s'originen com a conseqüència de la formació d'enllaços d'hidrogen intermoleculars entre molècules, juntament amb forces de van der Waals.

5. Aplicacions de β -pèptids ciclobutànics: activitat biològica en front de metal·locarboxipeptidases

Darrerament en el nostre grup de recerca s'ha iniciat una col·laboració amb el Professor Josep Vendrell del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la UAB. Així, s'ha avaluat l'activitat de noves molècules (tiofosforanil oxirans) que poden actuar com a inhibidors de las metal·locarboxipeptidases (MCP).¹²⁴

D'aquesta manera, i com a continuació d'aquest treball, ens ha semblat interessant avaluar tota una sèrie de pèptids que contenen l'anell ciclobutànic, i que poden suposar una bastida adequada pel disseny d'inhibidors de MCP, resultant així en uns compostos interessants per posteriors investigacions.

5.1 Introducció

Des del seu descobriment la carboxipeptidasa A (CPA) i la carboxipeptidasa B (CPB), de la família M14 de les metal·loproteases, han estat àmpliament investigades com a model mecanístic de la dependència del metall que actua com a cofactor de les proteases.¹²⁵ L'avaluació de les funcions que desenvolupen les MCPs en diferents patologies, com pancreatitis aguda,¹²⁶ inflamació,¹²⁷ diabetis,¹²⁸ i càncer¹²⁹ és un camp que s'està estudiant àmpliament a l'actualitat.

¹²⁴ Fernandez, D.; Illa, O.; Aviles, F. X.; Branchadell, V.; Vendrell, J.; Ortuño, R. M., *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 4823

¹²⁵ (a) Cho, J. H.; Kim, D. H.; Lee, K. J.; Choi, K. Y., *Biochemistry*, **2001**, *40*, 10197. (b) Cross, J. B.; Vreven, T.; Meroueh, S. O.; Mobashery, S.; Schlegel, H. B., *J. Phys. Chem. B.*, **2005**, *109*, 4761. (c) Liu, Y. H.; Konermann, L., *FEBS Lett*, **2006**, *580*, 5137. (d) Phoon, L.; Burton, N. A., *J. Mol. Graph. Model*, **2005**, *24*, 94

¹²⁶ (a) Borgstrom, A.; Regner, S., *Pancreatology*, **2005**, *5*, 530. (b) Muller, C. A.; Appelros, S.; Uhl, W.; Buchler, M. W.; Borgstrom, A., *Gut*, **2002**, *51*, 229. (c) Regner, S.; Manjer, J.; Appelros, S.; Hjalmarsson, C.; Sadic, J.; Borgstrom, A., *Pancreatology*, **2008**, *8*, 600

¹²⁷ (a) Asai, S.; Sato, T.; Tada, T.; Miyamoto, T.; Kimbara, N.; Motoyama, N.; Okada, H.; Okada, N., *J. Immunol.*, **2004**, *173*, 4669. (b) Rooth, E.; Wallen, H.; Antovic, A.; von Arbin, M.; Kaponides, G.; Wahlgren, N.; Blomback, M.; Antovic, J., *Blood Coagul Fibrinolysis*, **2007**, *18*, 365.

¹²⁸ Jeffrey, K. D.; Alejandro, E. U.; Luciani, D. S.; Kalynyak, T. B.; Hu, X.; Li, H.; Lin, Y.; Townsend, R. R.; Polonsky, K. S.; Johnson, J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*, 8452

Capítol 5: Introducció

Darrerament també s'estan duent a terme investigacions sobre els enzims proteolítics gastrointestinals, como ara les CPA i CPB pancreàtiques, per tal de trobar solució al problema de la deficient absorció de pèptids i fàrmacs proteínics.¹³⁰

En altres contextos, en canvi, la CPA i la CPB són considerats bons bioindicadors per la detecció temprana de pancreatitis aguda i càncer.¹³¹ Aquests fets, juntament amb el recent descobriment d'una nova subfamília completa,¹³² poden garantir posteriors desenvolupaments d'agents quimioterapèutics o *bioimaging* basats en les proteases M14.¹³³

Peptidomimètics que continguin enllaços no hidrolitzables han estat àmpliament explotats en el disseny d'inhibidors potents de proteases.¹³⁴ Un exemple recent de l'aplicació d'aquesta estratègia el trobem en el compost BX528, un fosfinat que conté un mimètic del tripèptid Phe-Val-Lys, que actua com a inhibidor de la CPB del plasma humà, el qual inhibeix el procés de fibrinòlisi augmentant així el risc de patir trombòsi.¹³⁵ (Figura 149)

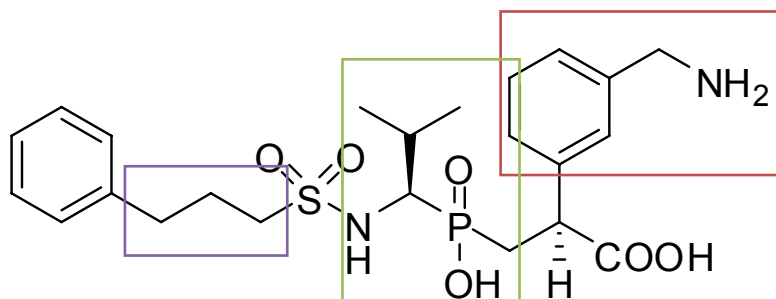


Figura 149. Estructura química del BX528 (mimètic del tripèptid Phe-Val-Lys)

¹²⁹ (a) O'Malley, P. G.; Sangster, S. M.; Abdelmagid, S. A.; Bearne, S. L.; Too, C. K., *Biochem. J.*, **2005**, 390, 665. (b) Vovchuk, I. L.; Petrov, S. A., *Biomed. Khim.*, **2008**, 54, 167. (c) Fialka, F.; Gruber, R. M.; Hitt, R.; Opitz, L.; Brunner, E.; Schliephake, H.; Kramer, F. J., *Oral. Oncol.*, **2008**, 44, 941. (d) Vovchuk, I. L.; Chernadchuk, S. S.; Petrov, S. A., *Biomed. Khim.*, **2007**, 53, 205

¹³⁰ (a) Bernkop-Schnurch, A.; Schmitz, T., *Curr. Drug. Metab.*, **2007**, 8, 509. (b) Fredholt, K.; Adrian, C.; Just, L.; Hoj Larsen, D.; Weng, S.; Moss, B.; Juel Friis, G., *J. Control Release*, **2000**, 63, 261. (c) Pallares, I.; Fernandez, D.; Comellas-Bigler, M.; Fernandez-Recio, J.; Ventura, S.; Aviles, F. X.; Bode, W.; Vendrell, J., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **2008**, D64, 784

¹³¹ (a) Matsugi, S.; Hamada, T.; Shioi, N.; Tanaka, T.; Kumada, T.; Satomura, S., *Clin. Chim. Acta*, **2007**, 378, 147. (b) Stewart, J. D.; Gilvarg, C., *Clin. Chim. Acta.*, **1999**, 281, 19.

¹³² Rodriguez de la Vega, M.; Sevilla, R. G.; Hermoso, A.; Lorenzo, J.; Tanco, S.; Diez, A.; Fricker, L. D.; Bautista, J. M.; Aviles, F. X., *FASEB J.*, **2007**, 21, 851

¹³³ Golz, S.; Brueggemeier, U.; Geerts, A., *WO. Patent No.2006010499*, **2006**, 95 pp.

¹³⁴ (a) Bartlett, P. A.; Marlowe, C. K.; Giannousis, P. P.; Hanson, J. E.; *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **1987**, 52, 83. (b) Fan, H.; Zhao, Y.; Byers, L.; Hammer, R. P., In *peptides for the New Millennium*; Fields, G. B.; Tam, J. P.; Barany, G., Eds.; Springer Netherlands, **2000**, 6, 91

¹³⁵ Wang, Y. X.; Zhao, L.; Nagashima, M.; Vincelette, J.; Sukovich, D.; Li, W.; Subramanyam, B.; Yuan, S.; Emayan, K.; Islam, I.; Hrvatin, P.; Bryant, J.; Light, D. R.; Vergona, R.; Morser, J.; Buckman, B. O., *Thromb. Haemost.*, **2007**, 97, 45

Així, s'ha pensat que una estratègia alternativa a aquesta es pot donar utilitzant β - i γ -pèptids, ja que s'ha pogut comprovar com alguns d'aquests compostos resulten resistents al trencament hidrolític provocat per proteases de referència, incloent la CPA.¹³⁶ A més, és conegut que els β - i γ -pèptids comparteixen algunes propietats com el seu origen natural, l'estabilitat, i la tendència a originar estructures que presenten plegaments.¹³⁷

Dins de la gran diversitat d'oligòmers coneguts, naturals i sintetitzats, els pèptids ciclobutànics són compostos dels quals gairebé no s'han explorat les seves propietats biològiques. L'esquelet d'aquests pèptids conté un grup ciclobutil que confereix rigidesa conformacional a la molècula, en comptes d'unitats $-\text{CH}_2-$ que proporcionen una lliure rotació. A més a més, aquests compostos constitueixen un interessant punt de partida per realitzar una selecció donada la seva semblança amb els α -pèptids que actuen com a substrats de les MCP: un pes molecular baix i una ruta sintètica fàcil per la seva preparació.^{51,57} És per aquest motiu, que hem decidit avaluar l'habilitat d'aquests pèptids ciclobutànics per bloquejar la reacció duta a terme per les proteases M14 i investigar si el seu esquelet rígid pot constituir una restricció necessària per a la seva activitat.

Així, s'ha procedit a avaluar tota una sèrie de pèptids ciclobutànics en front dues MCP prototípiques amb diferents especificacions. D'aquesta manera, s'ha trobat com alguns d'aquests pèptids presenten una activitat inhibitoria *in vitro* contra la CPA bovina i la CPB humana. Aquests pèptids ciclobutànics seleccionats han estat fixats computacionalment als enzims ("docking") i les seves propietats s'han analitzat en profunditat.

Com a resultat, s'ha dut a terme la identificació i caracterització d'un nou tipus d'inhibidors de MCP.

¹³⁶ Frackenpohl, J.; Arvidsson, P. I.; Schreiber, J. V.; Seebach, D., *ChemBiochem.*, **2001**, 2, 445

¹³⁷ Seebach, D.; Beck, A. K.; Bierbaum, D. J.; *Chem. Biodivers.*, **2004**, 1, 1111.

5.2 Resultats i discussió

Alguns dels pèptids ciclobutànics que s'han estudiat (**Figura 150**) havien estat sintetitzats i caracteritzats anteriorment en el nostre grup.^{51,57} Així, tal com es mostra a la **Figura 150** s'han avaluat compostos ciclobutànics de *Tipus A* amb residus lineals de diferent llargada. Entre ells es troben els pèptids **15a i b** que presenten el grup carboxílic protegit i desprotegit, el β -tripèptid **18**, que conté dos residus de β -alanina alternats amb el residu ciclobutànic, i el pèptid **43** que és un β,δ -dipèptid. D'altra banda, també s'han avaluat els dos dipèptids bis(ciclobutànics) de *Tipus B* **19 i 22a**.

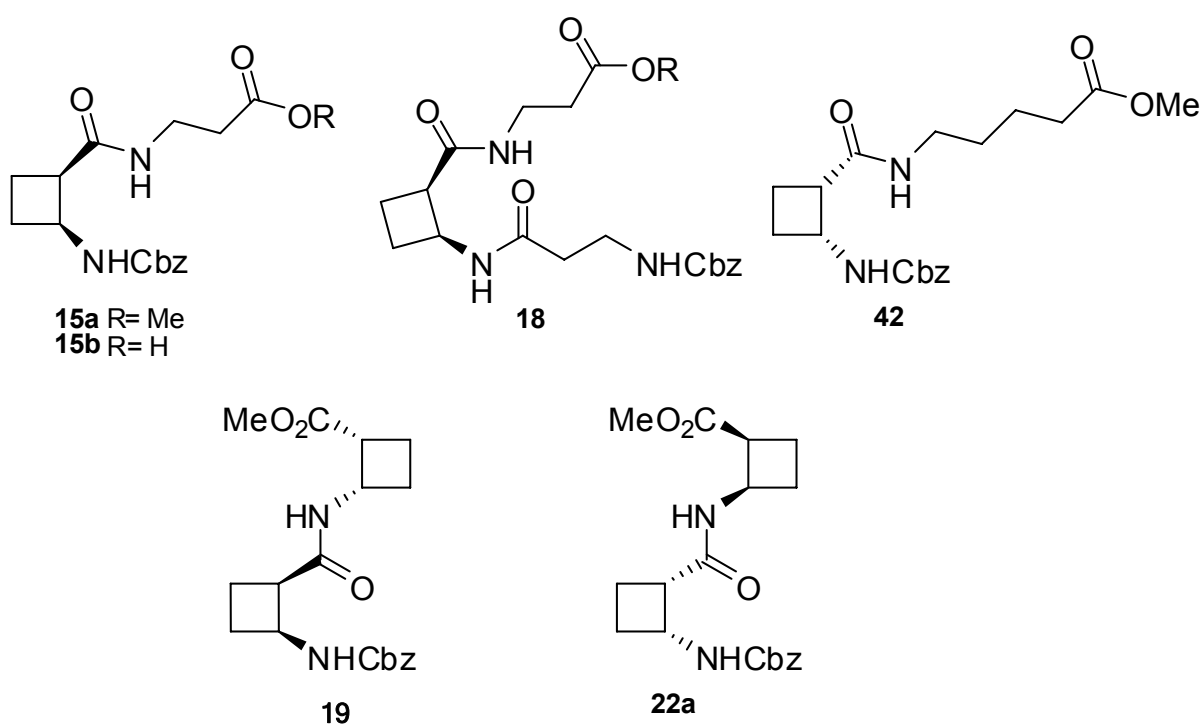


Figura 150. Pèptids ciclobutànics analitzats

Així doncs, davant aquesta varietats de productes es va pensar que resultaria interessant disposar de més pèptids ciclobutànics de *Tipus A* que presentessin un residu lineal més curt. És per aquest motiu que en aquesta Tesi s'ha sintetitzat i caracteritzat completament el nou compost **41**. (**Figura 151**)

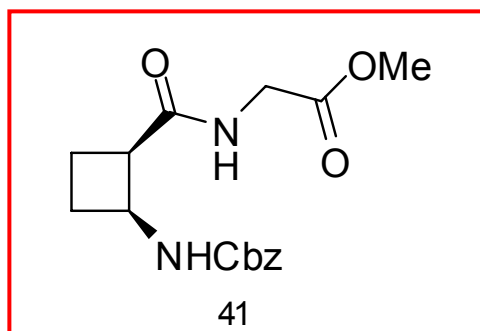
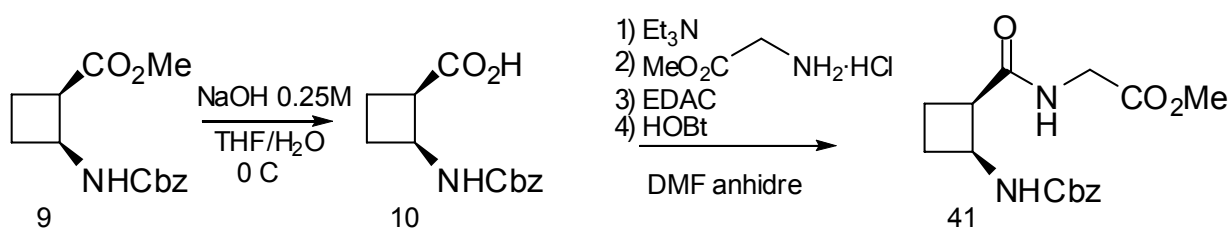


Figura 151. Pèptid ciclobutànic sintetitzat per ésser avaluat.

Així, amb la síntesi d'aquest nou producte, hem pogut disposar de tota una sèrie de pèptids que presenten un anell ciclobutànic central flanquejat per grups Cbz i carboxilats en ambdues terminacions. D'acord amb anteriors treballs, l'esquelet dels pèptids ciclobutànics es troba plegat al voltant de l'anell ciclobutànic i els seus grups funcionals poden participar en un gran nombre d'interaccions intermoleculares amb les molècules veïnes, tal com s'ha mostrat al llarg d'aquesta Tesi Doctoral.

5.2.1 Síntesi del pèptid ciclobutànic 41

Per dur a terme la síntesi del dipèptid **41** s'ha utilitzat l'àcid 2-benziloxicarbonilamino-(1*R*,2*S*)-ciclobutan-1-carboxílic, **10**, com a producte de partida. Aquest àcid prové de la saponificació de l'èster metílic del compost **9** utilitzant una solució de NaOH 0.25 M en una barreja de THF/H₂O a 0°C. D'aquesta manera s'obté l'àcid **10** amb un rendiment quantitatiu. Seguidament, per tal d'obtenir el dipèptid objectiu **41**, s'ha dut a terme un acoblament clàssic amb glicinat de metil. D'aquesta manera, s'ha dissolt aquest àcid **10** en DMF anhidre i s'ha afegit successivament Et₃N, glicinat de metil com a clorhidrat, EDAC, HOBt com a catalitzador i s'ha deixat la solució agitant durant 20 hores sota atmosfera de nitrogen. El cru de reacció obtingut s'ha purificat mitjançant una cromatografia en columna i s'ha obtingut el producte com un sòlid blanc amb un 44% de rendiment. (**Esquema 30**)



Esquema 31. Síntesi del dipèptid **41**

5.2.2 Inhibició de les carboxipeptidases

Els resultats obtinguts de l'avaluació d'aquests pèptids ciclobutànics en front les dues metalocarboxipeptidases prototípiques, CPA i CPB, es mostren a la **Taula 5**.

Compost	$K_i(\mu\text{M})^a$	
	CPA	CPB
41	550(100)	500(95)
15a	180(30)	400(70)
15b	70(12)	43.0(7.5)
42	72.5(9.5)	410(80)
18	70(15)	165(55)
22a	67(10)	70(10)
19	95(18)	275(45)

Taula 5. Activitats biològiques dels pèptids ciclobutànics. ^aEls valors en parèntesi indiquen els errors standard de la mitja

Així doncs, aquests compostos ciclobutànics han presentat activitat contra la CPA i la CPB en un rang micromolar. El dipèptid **41**, que conté un

residu de glicina, ha presentat l'efecte inhibitori més baix de tota la sèrie de compostos. En canvi el β -dipèptid **15a**, que és una unitat $-\text{CH}_2-$ més llarg que **41**, exerceix una inhibició més efectiva, especialment contra la CPA. La cadena alquíllica més curta i el grup carboxilat protegit en els compostos **41** i **15a**, poden ser els responsables de la feble força d'ancoratge (*binding strength*), ja que els anàlegs **15b**, amb el grup carboxilat lliure, i **42**, amb la cadena alquíllica més llarga, presenten valors de K_i més baixos.

L'inhibidor **42**, que només difereix de **15a** en que presenta una cadena més llarga en 2 unitats $-\text{CH}_2-$, actua com un inhibidor el doble de potent contra la CPA. Aquesta observació, juntament amb la selectivitat que presenta el compost **42** per les CPA comparat amb les CPB, posa de manifest la preferència d'aquest enzim a ancorar-se amb compostos alifàtics.

El compost **18**, que presenta l'estructura més llarga de tota la sèrie amb dues cadenes alquílques, és semblant a l'anterior ancorant-se a la CPA, la qual cosa suggereix que la cadena alquíllica extra pot proporcionar una mínima contribució a l'ancoratge.

Els compostos enantiomèrics **22a** i **19**, que contenen una segona unitat ciclobutànica, presenten una potència inhibidora moderada contra ambdues proteïnes objectius. No obstant això, mentre el compost **22a** no resulta ser selectiu entre la CPA i la CPB, el seu enantiòmer **19** és lleugerament més selectiu amb la CPA. Un estudi més exhaustiu dels complexos de les estructures ancorades de les CPA i CPB amb **22a** i **19** suggereixen una manera d'ancorar-se comuna, amb el grup Cbz amagat dins de la cavitat activa mentre que el grup carboxilat protegit es troba a la superfície de la proteïna, en contrast amb la manera d'ancorar-se dels compostos que només presenten una unitat ciclobutànica, tal com es mostrarà a continuació.

En resum, s'ha trobat que aquests pèptids ciclobutànics constitueixen un nou tipus de lligands per les MCP de la família M14. El compost que ha presentat una activitat inhibidora més potent ha estat el compost **15b**, el qual presenta preferència per interaccionar amb la CPB, comparant-ho amb altres compostos de la mateixa sèrie. Un altre pèptid ciclobutànic que presenta una activitat lleugerament menys potent però que actua amb una elevada

selectivitat contra la CPA, és el compost **42**. Tot i això, ambdós compostos, **15b** i **42**, han estat seleccionats per realitzar anàlisis addicionals sobre la manera d'ancorar-se.

5.2.3 Anàlisi de la manera d'ancorar-se (*binding*) del β -dipèptid **15b**

El β -dipèptid **15b** ocupa tres subespais dins de la cavitat activa de la CPB: S1' (al voltant de Asp255), S1 (definit per Arg145 i Glu270, un subespai per substrats ancorats i processats) i S2 (configurat per Arg71, Ser197, Tyr198 i Ser199). (**Figura 152**)

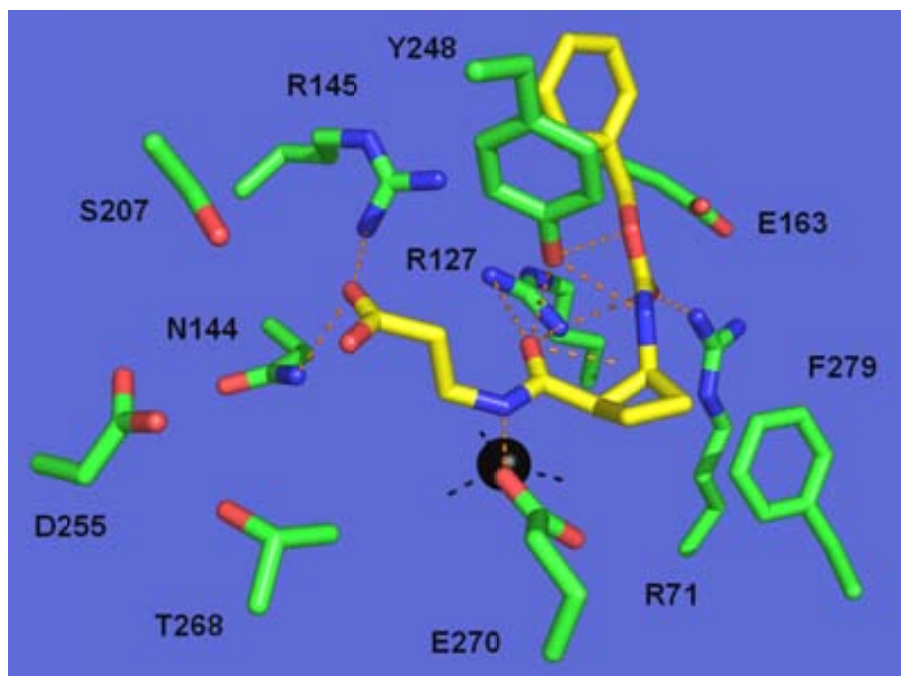


Figura 152. Predicció de l'ancoratge del compost **15b** a l'estructura de la CPB humana. El lligand (carbonis grisos) i les cadenes seleccionades de la CPB (carbonis verds) es mostren en model bastó. Els altres àtoms colorejats en blau són nitrogenis i en vermell oxígens. Les interaccions intermoleculares es troben marcades amb línies discontinues taronges. L'ió de zinc catalític es mostra com una esfera on la coordinació a la proteïna es troba marcada amb línies discontinues negres.

L'esquelet inhibidor es troba plegat a l'anell ciclobutànic. Això pot ser degut a la rigidesa conformacional que confereix un anell de 4 membres per sí mateix i a les interaccions intermoleculares proteïna-lligand. L'àcid carboxílic lliure s'ancora al substrat pels residus Asn144 i Arg145 a través d'un dels seus

àtoms d'oxigen (amb unes distàncies de 3.0 i 2.9 Å, respectivament). Aquesta funcionalitat el deixa a més de 5 Å del residu Asp255, residu específic i determinant a la CPB.

L'enllaç amida de la cadena alquílica de l'inhibidor presenta diverses interaccions amb diferents residus del lloc actiu: l'àtom de N es troba a l'esfera de coordinació del Zn^{2+} (a 3.1 Å) i formant un enllaç d'hidrogen amb la Glu270, i l'oxigen carbonílic interacciona amb la cadena de la Arg127. L'anell ciclobutànic es troba a prop dos residus aromàtics, Tyr 198 i Phe279, i a la cadena de Ser199. També té lloc una interacció entre l'oxigen carbonílic de l'enllaç amida del carbamat de benzil amb Arg71 (separats per 2.7 Å).

La majoria de les interaccions intermoleculares de la cadena del carbamat de benzil tenen involucrat l'anell fenílic del Tyr248. Així, aquest residu sembla quedar atrapat per aquest compost **15b**, amb l'anell aromàtic del Cbz encarat a la superfície de la proteïna, quedant el lligand disposat en una depressió hidrofòbica (**Figura 153**).

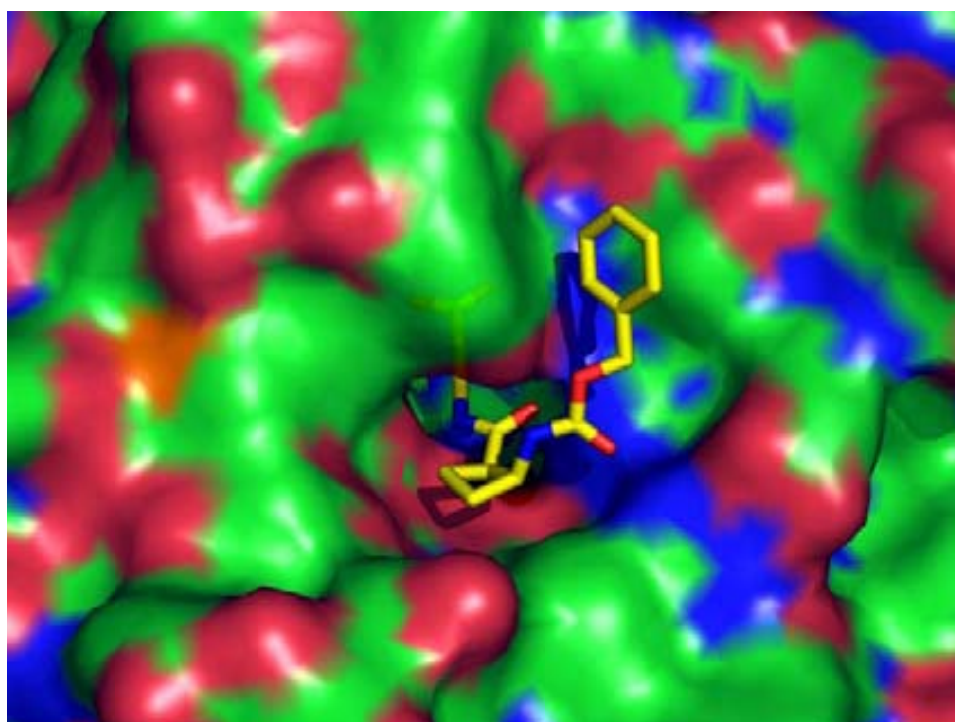


Figura 153. Diposició de **15b** a la superfície de la CPB. A la figura es mostra el forat actiu orientat cap el lector, en aproximadament la mateixa orientació que a la **Figura 152** (Tyr248 es troba al voltant de les 12 en punt). El lligand apareix amb els carbonis en groc i en model de bastó. Destacar el plegament del lligand essent la unitat ciclobutànica el vèrtex d'aquest plegament. La figura es presenta com una superfície translúcida colorejada segons els tipus d'àtoms (veure **Figura 152**). L'ió catalític de zinc es mostra com una esfera negra.

El procés d'ancoratge de **15b** a la CPA és molt semblant al CPB. El lligand es pot superposar fàcilment en ambdues estructures. Aquest fet podria explicar els valors similars obtinguts de K_i per la inhibició de la CPA i la CPB.

5.2.4 Anàlisi de la manera d'ancorar-se del β,δ -dipèptid **42**

Els dipèptids **15b** i **42** difereixen en la llargada de la cadena alquíllica i en que en el primer l'extrem funcional d'aquesta cadena és un àcid carboxílic i en el segon un èster metílic.

D'altra banda, a diferència que en el compost **15b**, els valors obtinguts de K_i per aquest compost difereixen molt de la CPA a la CPB. A la CPA l'anell aromàtic de la Tyr 248 juga un paper molt important a l'ancoratge degut al gran nombre d'interaccions que aquest residu presenta amb el lligand. D'aquesta manera, aquest presenta enllaços d'hidrogen amb els grups adjacents a l'anell ciclobutànic així com interaccions de π -stacking entre els anells aromàtics. (**Figura 154**) Un dels àtoms d'oxigen de l'èster metílic es troba formant un enllaç d'hidrogen al el grup hidroxil de la Thr268 (3.4 Å) i amb un nitrogen del Asn144 (3.2 Å). La llargada de la cadena alquíllica és a dins d'un medi hidrofòbic format per la alineació de la Leu203, Ile243, Ile247, i Ala250 (per simplificar la **Figura 154** no apareixen tots els residus). L'èster carboxílic es troba al subespai S1', a prop del Ile 255, residu específic i determinant de la CPA.

L'interior del medi té una naturalesa diferent a la CPB (**Taula 5**) i pot provocar que la cadena alquíllica no es col·loqui satisfactòriament. Això probablement sigui el causant de l'orientació inversa predita pel complex **42**-CPB (que no es mostrarà), on la branca del Cbz queda a dins de la cavitat S1'.

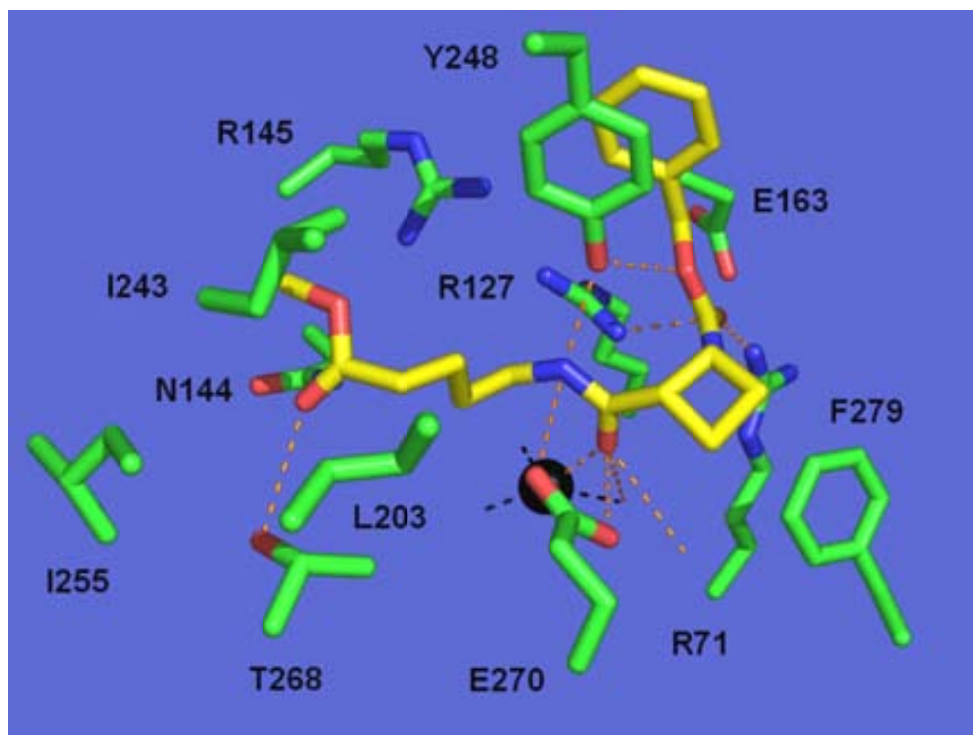


Figura 154. Predicció de l'ancoratge de **42** a l'estructura de la CPA. Aquesta vista és aproximadament la mateixa que les dues anteriors (**Figura 152 i 153**). Els altres detalls són els mateixos que al peu de la **Figura 152**.

Per sobre de l'anell ciclobutànic i dirigit cap el lloc actiu, l'enllaç amida es troba interaccionant amb Glu270, mitjançant els àtoms d'oxigen del carbonil i el nitrogen, indicant que el lligand pot estar coordinant-se amb l'ió metàl·lic. D'altra banda, l'anell ciclobutànic també es troba encarat a dos residus aromàtics, Tyr198 i Phe279, mentre que l'oxigen carbonílic del carbamat de benzil interacciona amb la Arg71 i Arg127 (amb unes distàncies de 2.7 i 2.6 Å, respectivament).

Finalment, l'anell aromàtic del carbamat de benzil es troba distribuït cara a cara amb l'anell fenòlic de la Tyr248, i envoltat per altres àtoms de carboni de les cadenes de Glu163 i Thr164.

Tal com es mostra a la **Figura 155**, l'esquelet del β,δ -dipèptid **42** es troba plegat entre el carbamat de benzil i l'èster metílic, és a dir que la molècula es plega a la posició de l'anell ciclobutànic. Això suggereix que el lligand, tot i presentar una clara restricció conformacional, és capaç d'ancorar-se en una estreta cavitat activa com la que es troba a les proteases M14.

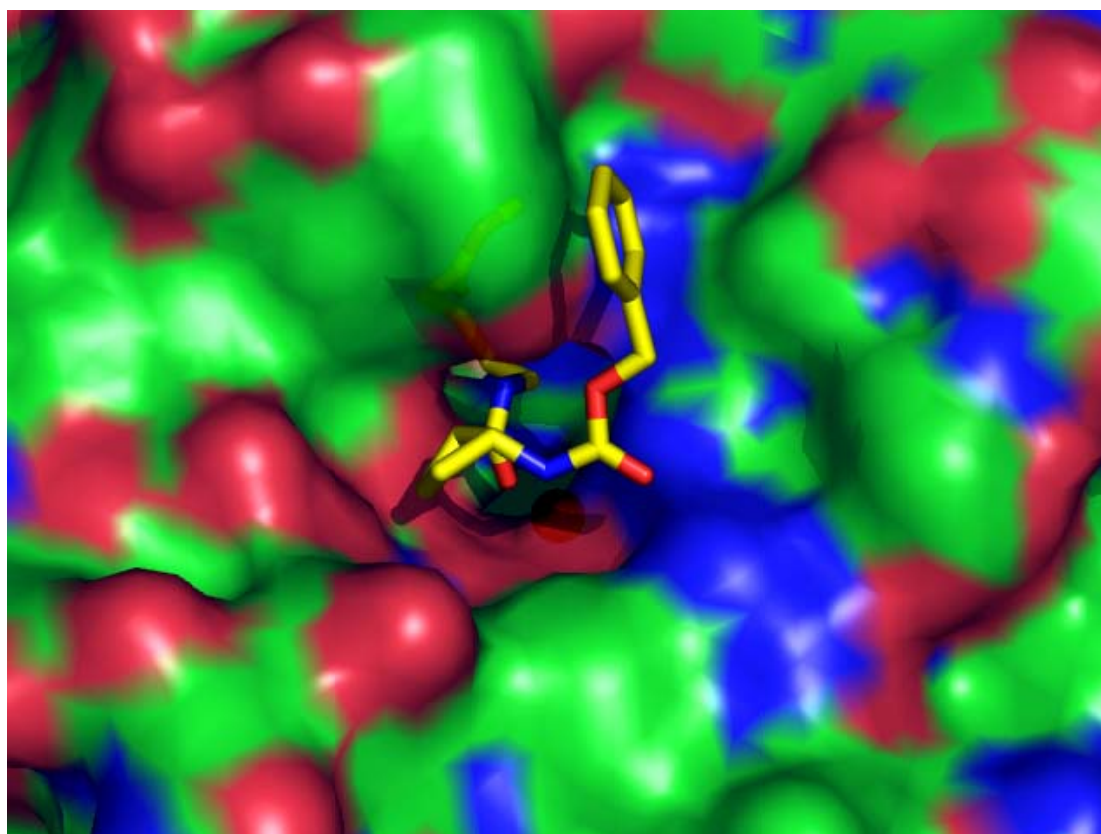


Figura 155. Vista de les interaccions entre el compost **42** i la CPA. Es mostra la mateixa orientació que en la **Figura 153**.

5.3 Conclusions

S'ha trobat una col·lecció de pèptids ciclobutànics que presenten activitat inhibidora contra les dues proteases prototípiques de la família M14, la CPA i la CPB, en un rang micromolar.

Així, el compost **15b** ha estat el més potent del pèptids avaluats, presentant un millor comportament com a inhibidor de la CPB, mentre que el compost **42**, el qual presenta una cadena alquíllica més llarga, mostra preferència per inhibir la CPA.

Com a característica sense precedents cal dir que aquests β -pèptids ciclobutànics envolten a la cadena del residu Tyr248, bloquejant la reacció enzimàtica ja que aquest residu resulta essencial per a la mateixa. Això deu ser conseqüència de les interaccions π - π stacking entre Tyr 248 i el grup fenil del carbamat de benzil, afavorit per les conformacions restringides que presenten aquests pèptids ciclobutànics, i de les interaccions intermoleculares que es generen amb les molècules veïnes. (**Figura 156**)

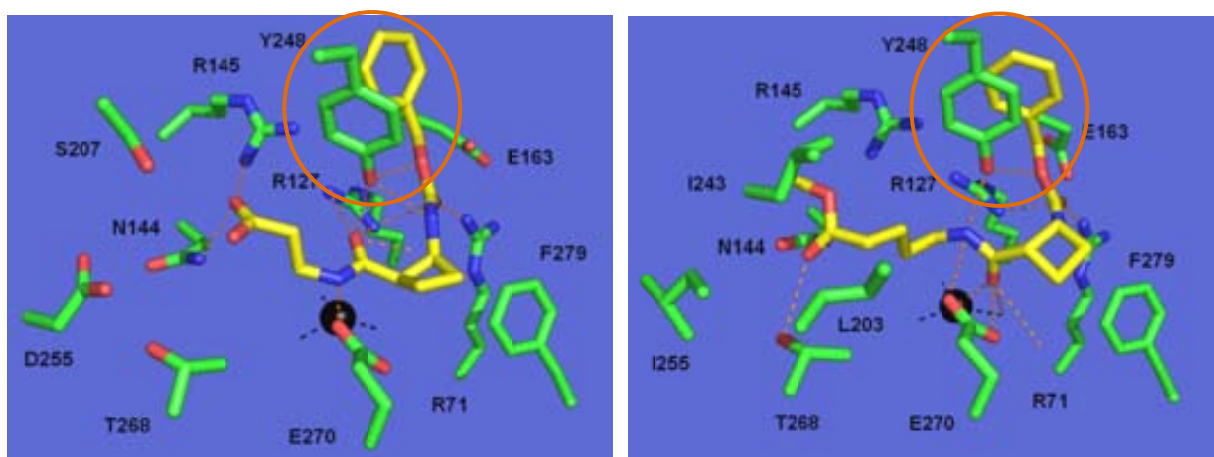


Figura 156. A l'esquerra es mostra la predicció de l'ancoratge del compost **15b** a l'estructura de la CPB humana. I a la dreta la predicció de l'ancoratge de **42** a l'estructura de la CPA. S'ha marcat amb un cercle les interaccions π - π stacking amb Tyr248

Capítol 5: Resultats i discussió

Així doncs, els β -pèptids ciclobutànics poden representar una alternativa a considerar en el disseny d'inhibidors de MCP, donat que resulten uns compostos innovadors i accessibles. Conseqüentment, poden ser considerats com uns interessants punts de partida per realitzar posteriors desenvolupaments en termes de potencia i selectivitat. Amb aquestes idees, en el nostre laboratori s'estan preparant nous productes que seran avaluats properament.