

“Síntesis, Estudios Conformacionales y Evaluación Biológica de Péptidos Cíclicos Naturales y Análogos”

Q.F. LAURA POSADA
DIRECTORA: DRA. GLORIA SERRA

LABORATORIO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA, DQO,
FACULTAD DE QUÍMICA,
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA.

MARZO 2021



“Síntesis, Estudios Conformacionales y Evaluación Biológica de Péptidos Cíclicos Naturales y Análogos”

Trabajo presentado por Q.F. Laura Posada para aspirar al título de
Doctora en Química

Directora: Dra. Gloria Serra

Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química
Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República.

Marzo 2021

“What a large volume of adventures may be grasped within the span of his little life by him who interests his heart in everything.”

-Laurence Sterne-

Agradecimientos

A las instituciones donde se desarrolló este trabajo: Facultad de Química- Universidad de la República, Universidad de Barcelona (grupo de Judith Tulla-Puche) y Institute for Protein Research (Osaka University, Hironobu Hojo's Lab), donde se llevaron a cabo dos pasantías.

A PEDECIBA (Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas) por la financiación parcial de la pasantía en la Universidad de Barcelona y por el apoyo para realizar este trabajo. CSIC (UdelaR) por la financiación parcial de la pasantía en la Universidad de Barcelona y por la financiación del proyecto CSIC-Grupos de Química Farmacéutica. A la ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) por la beca de maestría por la financiación del Proyecto FCE_1_2019_1_155516 y a la CAP (Comisión Académica de Posgrado) por la beca doctoral.

Al Institute for Protein Research, Osaka University por la beca total para la pasantía realizada en el Lab. del Profesor Hironobu Hojo.

A Hilda Garay, Viviana Huguaburu y Gustavo Seoane por su disposición para formar parte del tribunal.

A los grupos de colaboración por su excelente disposición sobre todo en este último año caótico. A Rafael Guido y su grupo de trabajo por realizar los ensayos de actividad sobre *P.falciparum* y los de citotoxicidad contra células HepG2. A Marcelo Comini y Estefanía Dibello por los ensayos sobre *T.b.brucei*, y a Josphat Matasyoh y su grupo por los ensayos de actividad larvicida en *Anopheles*.

A Danilo, por los espectros de masas y por todo el conocimiento transmitido. A Ale por ayudarme con la parte cristalográfica junto con Leopoldo. A Horacio, Vero y Gonzalo, Carolina Fontana y Guillermo Moyna y su grupo por todos los espectros de RMN.

A Gloria, no solo por guiarme, sino por impulsarme a lo largo de este camino apoyándome en cada oportunidad de formación que surgió a lo largo de estos años. Por ser un ejemplo a seguir de mujer científica empoderada y proactiva que lucha todos los días por lo que quiere y cree. Por confiar en mi potencial y hacerme sentir siempre respaldada y cuidada.

A mis padres y mi hermana por apoyarme a seguir mis sueños. Sin ustedes esto no habría sido posible.

A mis compañeros de farmacia por todos los momentos compartidos y por su amistad invaluable. Espero no olvidarme de nadie. A Cathe por ser una referente y enseñarme muchísimo, y encima estar siempre para todo lo que implique cumbia y alcohol o ambas. A Vero que también me enseñó un montón cuando recién empezaba a trabajar en el laboratorio y ha sido una gran compañera. A Nati por estar siempre afín a cualquier plan, por entender mis problemas de memoria a corto plazo y la importancia del dulce de leche y el chocolate sobre el estado de ánimo. Sin dudas conocimiento que solo otra taurina puede tener. A Martin, por enseñarme que la cerveza artesanal se tomará en número par de pintas o no se tomará. Por tantas bajadas compartidas junto con Cathe. A Franco por crear la CoHLuCo, y por tantos gifs de pandas enviados. Por ser junto con Ramiro una de las fuentes más importantes de conocimiento inútil (A.K.A. boludatos) de este planeta. Por todo el tiempo compartido y por ser un gran compañero. A Camila, la más chiquita, que con su personalidad fuerte pero dulce ya nos compró a todos. A Vale, por todos los momentos compartidos. Por ser una compañera siempre dispuesta a dar una mano. Al Chelo, el Jorge Rial que nos tocó por padrón y un cupido sin mucho éxito, gracias por tantas risas y estar ahí para escuchar y aconsejar, y sobre todo por cantar cada día mejor. A Vanesa, la parte espiritual de este grupo y a Magdalena. A todos con los que compartí un tiempo más corto al principio de este camino; Stella, Chiara y Jaime.

A Ceci, Guille, Graciela y Laurita, también grandes referentes. En particular a Guille por la referencia de cómo NO escribir estos agradecimientos. A Eduardo por dar unos teóricos hermosos, que fueron los principales culpables de que yo terminara eligiendo el laboratorio de Química Farmacéutica para explorar mi vocación por la investigación.

A mis compañeros de orgánica, farmacognosia y LBB por los congresos, cursos y momentos compartidos. Quedo a la espera de los resultados de la penca de Mirtha Legrand. A la banda del Morro y a Choni con quien amé compartir la Green Chem Summer School.

A Judith por recibirme tan cálidamente en su grupo de trabajo en Barcelona, y junto con Ariadna enseñarme tanto sobre fase sólida. A todos los compañeros del departamento por incluirme en el grupo y por todos los almuerzos compartidos, en particular los de comer sushi

hasta reventar. A la comunitat de l'anell aromàtic por organizar eventos divertidos. A mis queridísimos flamongos por hacer todas las tardes compartidas en el lab más divertidas.

A Gea, Hugo, Pepe y Morgana por ser mi familia en Barcelona. En especial a Gea, en quien encontré una gran amiga.

To Hironobu and all his group, thank you for receiving me at his Lab and being always kind and polite.

To Eva, Ben, Josephine and all the crazy awesome people I loved to meet in Japan. Thank you, Eva, for all those melonpans when I had to stay till late hours at the Lab. I miss both you and melonpans. To Ben for all the David Attenborough and Game of Thrones and everything else shared between Osaka and Tokyo (too much to mention it). To Wakako, great chemist and best saxophonist in Osaka, for being kind and so much fun.

A mis amigas de toda la vida, Serry, Day, Vale y Malu que siempre creen en mí y me apoyan en todo. Por estar siempre conectadas, y no me refiero al celular.

A Flor, otra de las tantas amistades que me regaló este posgrado, tal vez la más cariñosa e incondicional.

A las bagartas por tantas risas y por alentarme a seguir lo que me gustaba.

A Mayra y Mariana por generar siempre un ambiente hermoso para disfrutar de la acrobacia aérea que fue mi escape de lo cerebral a lo corporal todo este tiempo.

Índice

1. Introducción y Objetivos	1
2. Síntesis de bloques de construcción	17
2.1. Introducción.....	17
2.2. Resultados y discusión.....	17
2.2.1. Síntesis de tiazoles.....	17
2.2.2. Protección y N metilación de aminoácidos.....	18
2.3. Conclusiones.....	19
2.4. Parte experimental.....	20
3. Síntesis en fase sólida y macrolactamización en solución de ciclopéptidos conteniendo α aminoácidos	26
3.1. Introducción.....	26
3.2. Resultados y discusión.....	40
3.3. Conclusiones.....	48
3.4. Parte experimental.....	50
4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos.....	107
4.1. Introducción.....	107
4.2. Resultados y discusión.....	109
4.2.1. Síntesis en solución de productos conteniendo ác. Antranílico.....	109
4.2.2. Síntesis de análogos de Versicotides conteniendo ácido 2- aminotiazol-4-carboxílico.....	116
4.2.3. Síntesis de precursores abiertos de Versicotides en fase sólida.....	117
4.2.4. Macrolactamización en solución.....	127
4.3. Análisis conformacional.....	130
4.4. Conclusiones.....	136
4.5. Parte experimental.....	138
5. Síntesis y Ciclación de Péptidos en Fase Sólida.....	183
5.1. Introducción.....	183

5.2. Resultados y discusiones.....	197
5.2.1. SPPS y macrociclación sobre la resina 2-CTC	197
5.2.2. Macrociclación mediante Native Chemical Ligation intramolecular.....	200
5.3. Conclusiones.....	202
5.4. Parte experimental.....	203
6. Evaluación biológica.....	209
6.1. Introducción.....	209
6.2. Resultados y discusión.....	210
6.2.1. Evaluación sobre <i>P. falciparum</i> 3D7.....	210
6.2.2. Evaluación sobre <i>T.b.brucei</i>	215
6.2.3. Estudios de actividad insecticida.....	219
6.2.4. Estudios de inhibición de MPro de Sars-Cov2.....	221
6.3. Conclusiones.....	222
6.4. Parte experimental.....	223
7. Conclusiones y perspectivas.....	226
Anexo I: Abreviaciones y acrónimos.....	230
Anexo II: Artículos publicados.....	232



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Los productos naturales juegan un rol muy importante en el desarrollo de nuevos fármacos. Según la última revisión de Newman y Cragg para el período 1981-2019¹, alrededor del 70 % de los fármacos que ingresaron al mercado son productos naturales, derivados o inspirados en éstos.

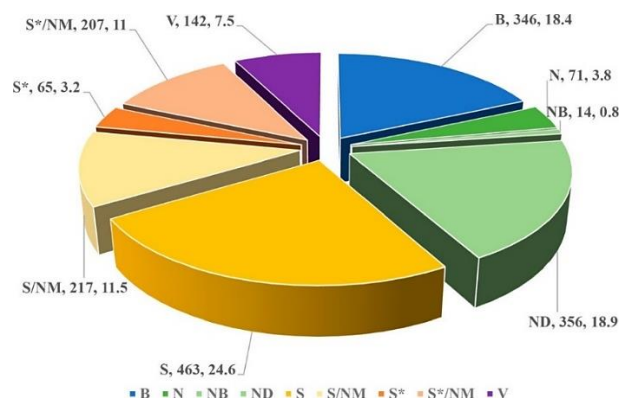


Figura 1.1. Todos los fármacos aprobados entre 01/01/1981-30/09/2019. Referencias; **B**: macromoléculas biológicas, **N**: productos naturales inalterados, **NB**: productos naturales “botánicos”, **ND**: derivados de productos naturales, generalmente semisintéticos, **S**: drogas totalmente sintéticas, generalmente encontradas por *screening* aleatorio o por modificación de otros agentes **S***: drogas sintéticas cuyo farmacóforo es un producto natural, **V**: vacunas, **/NM** subcategoría imitadores de productos naturales.

Entre la gran diversidad de productos naturales, aquellos procedentes de ambientes marinos han atraído especial interés en la búsqueda de nuevos bioactivos debido a su diversidad estructural inexplorada.^{2,3} Más del 70% de la superficie terrestre está cubierta por mares y océanos, sin embargo, debido a las dificultades de acceso, se considera que menos del 5% de su diversidad ha sido explorada. Numerosos compuestos bioactivos de interés terapéutico se han aislado de organismos marinos invertebrados, algunos de ellos de origen microbiano.

En el año 2011 el grupo de Zhu y Li aisló los compuestos Versicotides A y B² a partir del hongo marino *Aspergillus Versicolor* ZLN60. Posteriormente, el mismo grupo aisló los compuestos Versicotide C y Psychrophilins E-H al realizar un estudio sistemático de la variación del metabolismo secundario de este hongo en función de variaciones en las condiciones de su

¹ Newman, D.J.; Cragg, G.M. *Journal of Natural Products* **2020**, *83* (3), 770.

² Jiménez, C. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 10, 959.

³ Molinski, T. F.; Dalisay, D. S.; Lievens, S. L.; Saludes, J. P., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2008**, *8*, 69.

1. Introducción y Objetivos

cultivo.⁴ Estos compuestos ciclopeptídicos presentan en su estructura ácido *o*-aminobenzoico como análogo de β aminoácido y N-metil aminoácidos.

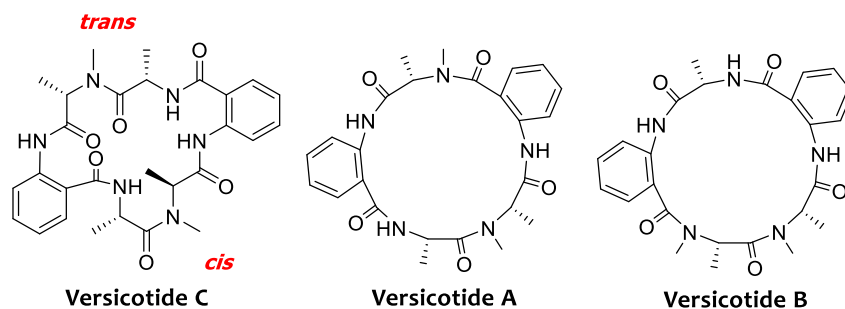


Figura 1.2. Versicotides A, B, y C

En 2017, 3 nuevos compuestos: Versicotides D-F, fueron aislados y caracterizados a partir de medios de fermentación de arroz conteniendo *Aspergillus versicolor* LZD-14-1.⁵

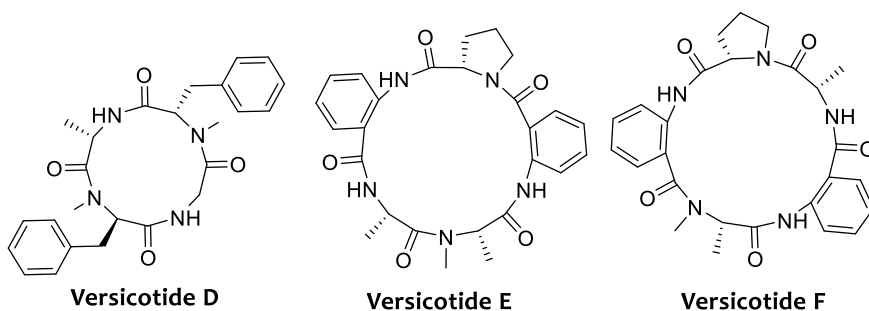


Figura 1.3. Estructura de los productos naturales Versicotides D-F.

En relación a la evaluación biológica previamente reportada para los productos naturales Versicotides, Versicotide C resultó no tóxico contra las células de cáncer A-549, HeLa y SMMC-7721 (IC₅₀ > 100 μ M). De la misma forma, versicotide A y B no fueron tóxicos contra las líneas celulares P388, BEL-7402, HL-60 y A-549.

Por otra parte, los Versicotides D-F poseen la capacidad de disminuir los lípidos en macrófagos RAW264.7 y regular el eflujo de colesterol a HDL, evitando su evolución en células espumosas, proceso determinante en la formación de placas de ateroma. El mismo experimento fue llevado a cabo sobre los Versicotides A, B y D-F, y sobre el fármaco comercialmente disponible simvastatina, utilizado como control positivo. En una dosis de 10 μ M, la simvastatina demostró una reducción de lípidos del 22 % sobre los macrófagos RAW264.7 inducidos con LDL oxidadas (oxLDL), mientras que los Versicotides D-F demostraron reducciones del 11, 12 y 13% respectivamente. Los compuestos versicotide A y B, sin embargo, solo presentaron una débil actividad, en comparación con el control positivo. Además, los Versicotides D-F disminuyen los

⁴ J. Peng, H. Gao, X. Zhang, S. Wang, C. Wu, Q. Gu, P. Guo, T. Zhu, D. Li, *J. Nat. Prod.*, **2014**, *77*, 2218.

⁵ Chen, R.; Cheng, Z.; Huang, J.; Li, D.; Wu, C.; Guo, P.; Lin, W. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 49235.

niveles de colesterol intracelular total. En particular los Versicotides E y F provocan una disminución del 8.7% y 9.2% respectivamente, lo cual es comparable al control positivo que causa una disminución del 9.3%.

Péptidos y peptidomiméticos en el desarrollo de nuevos fármacos

Diversos péptidos naturales endógenos cumplen funciones fisiológicas importantes, y controlan funciones vitales en el cuerpo humano, incluyendo la respuesta inmune, la digestión, el metabolismo, la reproducción, respiración y la sensibilidad al dolor. El primer tratamiento de diabetes con insulina purificada de páncreas bovino en 1920 demostró que es posible tratar enfermedades utilizando péptidos endógenos.

En general, los péptidos muestran buena eficacia y tolerancia, con un metabolismo predecible, así como perfiles favorables en las etapas de desarrollo. Inicialmente, el empleo de péptidos como fármacos era particularmente difícil debido a las dificultades en su síntesis, que incluyen bajos rendimientos debido al número elevado de etapas, dificultad en su purificación, inestabilidad y dificultades para su administración. Sin embargo, a lo largo de los años se desarrollaron diversas formas de superar estos obstáculos; el surgimiento de la síntesis de péptidos en fase sólida y los progresos en el desarrollo de tecnologías para la purificación de péptidos, tales como HPLC fueron cruciales para el desarrollo de fármacos con estructura peptídica. Gracias a esto, un número creciente de péptidos han ingresado en etapas de estudios clínicos o se han aprobado como fármacos. Sin embargo, estas moléculas pueden presentar desventajas importantes. Frecuentemente su empleo como fármacos se ve limitado por su inestabilidad metabólica y por su baja permeabilidad frente a membranas. Generalmente los péptidos lineales presentan una vida media corta, de minutos a horas, lo cual puede ser insuficiente para generar una concentración efectiva en el órgano blanco. Esta vida media plasmática corta es el resultado principalmente de la degradación enzimática por parte de proteasas tanto en el tracto gastrointestinal como en el plasma. Por otra parte, debido a su peso molecular relativamente elevado, su absorción y transporte puede ser pobre, lo cual también contribuye a una rápida excreción

Las limitaciones asociadas con el uso de péptidos como fármacos pueden superarse mediante modificación de péptidos existentes para crear peptidomiméticos, esto es, péptidos conteniendo aminoácidos modificados o alteraciones químicas. Las modificaciones estructurales introducidas con la finalidad de mejorar la estabilidad metabólica, la biodisponibilidad y la selectividad frente a receptores incluyen: la ciclación de péptidos, la

incorporación de aminoácidos N-metilados, D-aminoácidos, aminoácidos no naturales y la sustitución de enlaces peptídicos por bioisómeros.^{6,7}

Los péptidos provenientes de especies no mamíferas también pueden ser una fuente de estructuras bioactivas interesantes en la búsqueda de nuevos fármacos. Como ejemplos podemos citar la ciclosporina A, que es un ciclopéptido conteniendo aminoácidos modificados y de configuración D, producido por el hongo *Tolypocladium inflatum*, que se utiliza como inmunodepresor, o la gramicidina S, antibiótico derivado del producto natural gramicidina, producido por la bacteria gram-positiva *Bacillus brevis*.

Ciclopéptidos

Los péptidos cíclicos han atraído especial interés durante las últimas décadas. La ausencia de extremos C y N terminal ionizables mejora su capacidad de atravesar las membranas biológicas, les otorga mayor estabilidad frente a la degradación enzimática *in vivo*, y mejora su biodisponibilidad. Además, mediante diseños adecuados, los ciclopéptidos pueden imitar estructuras secundarias presentes en proteínas (α hélices, hojas β , etc) que constituyen motivos clave en el reconocimiento por receptores.^{8,9} La creciente atención sobre esta clase de compuestos se evidencia por el constante aumento en la cantidad de publicaciones relacionadas¹⁰ y por la existencia de compañías farmacéuticas establecidas recientemente que enfocan su investigación a esta área, como resultado de lo cual varios macrociclos se encuentran en etapas de desarrollo clínico.¹¹

Entre 2006 y 2015 nueve nuevos péptidos cíclicos fueron aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) y la European Medicines Agency (EMA)¹². Entre 2017 y 2019, de los 153 nuevos fármacos aprobados por la FDA^{13,14,15,16,17} 10 son péptidos y 3 de ellos son macrociclos. Además de su potencial como fármacos, los ciclopéptidos también han sido

⁶ Lenci, E.; Trabocchi, A. *Chem. Soc. Rev.*, 2020, 49, 3262.

⁷ Qvit, N; Rubin, S.J.S.; Urban, T.J.; Mochly-Rosen, D.; Gross, E.R., *Drug Discovery Today*, 2017, 22 (2), 454.

⁸ Luther, A.; Moehle, K.; Chevalier, E.; Dale, G.; Obrecht, D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2017, 38, 45–51.

⁹ Robinson, J. A. *Acc. Chem. Res.* 2008, 41, 1278.

¹⁰ Vinogradov, A.A.; Yin, Y.; Suga, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2019, 141, 4167.

¹¹ Morrison, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018, 17, 531.

¹² Zorzi, A.; Deyle, K.; Heinis, C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2017, 38, 24.

¹³ de la Torre, B.G.; Albericio, F. *Molecules* 2017, 22.

¹⁴ de la Torre, B.G.; Albericio, F. *Molecules* 2018, 23.

¹⁵ de la Torre, B.G.; Albericio, F. *Molecules* 2019, 24.

¹⁶ de la Torre, B.G.; Albericio, F. *Molecules* 2020, 25, 745.

¹⁷ Al Shaer, D.; Al Musaimi, O.; Albericio, F.; de la Torre, B.G. *Pharmaceuticals* 2020, 13, 40.

1. Introducción y Objetivos

utilizados para construir nanomateriales,¹⁸ y en imagenología.¹⁹ La gran variedad de aplicaciones para este tipo de moléculas ha impulsado la búsqueda de metodologías prácticas y eficientes para su síntesis, tanto en la academia como en la industria.

Estas moléculas permiten acceder a un espacio químico relativamente inexplorado ya que presentan un peso molecular mayor que el establecido por las 5 reglas de Lipinski y menor que los anticuerpos o fármacos biológicos. Además, son adecuados para explorar interacciones de tipo proteína-proteína, los cuales se consideran blancos no susceptibles a efectos farmacológicos utilizando moléculas pequeñas.^{20,21,22}

Los efectos de las conformaciones adoptadas luego de la ciclación y de la introducción de otras modificaciones sobre una estructura peptídica, así como su impacto sobre su actividad biológica y propiedades farmacocinéticas han dado lugar a diversas investigaciones, y continúan en estudio. Por un lado, ha sido demostrado que la flexibilidad conformacional es importante para facilitar la permeación de forma pasiva de las membranas biológicas y para la absorción oral. Los ciclopéptidos, exponen la superficie polar al agua del medio biológico para lograr solubilizarse y luego mediante un cambio conformacional, en el cual se forman enlaces de hidrógeno intramoleculares, minimizan la exposición de dicha superficie a los lípidos que componen las membranas biológicas. Como consecuencia, terminan atravesando la membrana de manera pasiva. Este comportamiento “camaleónico” fue estudiado por diversos autores utilizando modelos de membranas biológicas tales como células Caco2 o ensayos de PAMPA,^{23,24,25,26,27,28,29,30} y permite explicar por qué ciclopéptidos como la ciclosporina A, **Figura 1.4.**, pueden ser administrados vía oral.

¹⁸ Brea, R.J.; Reiriz, C.; Granja, J.R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1448.

¹⁹ Staderini, M.; Megia-Fernandez, A.; Dhaliwal, K.; Bradley, M. *Bioorg Med Chem*, **2018**, *26*, 2816.

²⁰ Bruzzoni-Giovanelli, H.; Alezra, V.; Wolff, N.; Dong, C. Z.; Tuffery, P.; Rebollo, A. *Drug Discovery Today*, **2018**, *23*, 272.

²¹ Qian, Z.; Dougherty, P. G.; Pei, D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *38*, 80.

²² Cardote, T. A.; Ciulli, A. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 787.

²³ Alex, A.; Millan, D. S.; Perez, M.; Wakenhut, F.; Whitlock, G. A. *Med. Chem. Comm*, **2011**, *2*, 669.

²⁴ Whitty, A.; Zhong, M.; Viarengo, L.; Beglov, D.; Hall, D. R.; Vajda, S. *Drug Discovery Today*, **2016**, *21*, 712.

²⁵ Matsson, P.; Kihlberg, J. *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 1662.

²⁶ Caron, G.; Ermondi, G.; *Drug Discovery Today*, **2017**, *22*, 835.

²⁷ Rossi Sebastiano, M.; Doak, B. C.; Backlund, M.; Poongavanam, V.; Over, B.; Ermondi, G.; Caron, G.; Matsson, P.; Kihlberg, J. *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*, 4189.

²⁸ Schwochert, J.; Lao, Y.; Pye, C.R.; Naylor, M.R.; Desai, P.V.; Gonzalez Valcarcel, I.C.; Barrett, J.A.; Sawada, G.; Blanco, M.J.; Lokey, R.S. *ACS Med Chem Lett* **2016**, *7*(8), 757.

²⁹ Rezai, T.; Bock, J. E.; Zhou, M. V.; Kalyanaraman, C.; Lokey, R. S.; Jacobson, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14073.

³⁰ Hewitt, W.M.; Leung, S.S.F.; Pye, C.R.; Ponkey, A.R.; Bednarek, M.; Jacobson, M.P.; Lokey, R.S. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*(2), 715.

1. Introducción y Objetivos

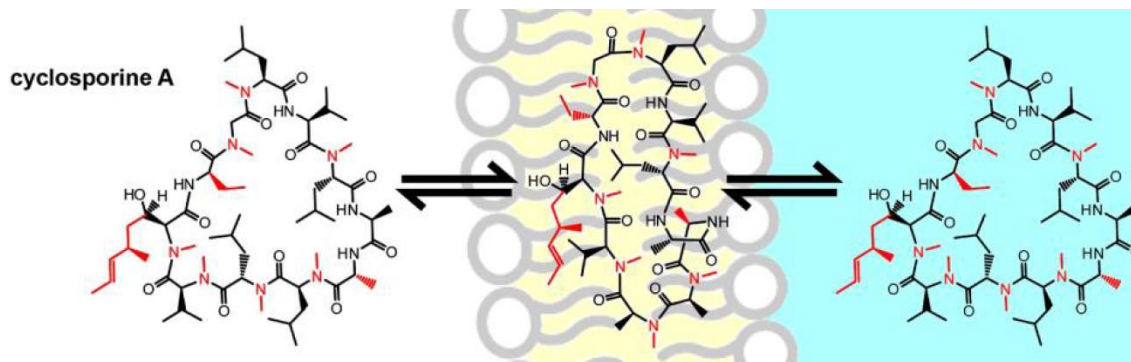


Figura 1.4. Comportamiento camaleónico de la ciclosporina A.³¹

Por otra parte, la ciclación reduce considerablemente la flexibilidad conformacional en comparación con su péptido precursor abierto. Esto, además de facilitar la determinación y manipulación racional de su estructura tridimensional,³² impacta en la afinidad y selectividad por un receptor. Al reducirse la flexibilidad conformacional, disminuye la pérdida de entropía asociada a la unión a su blanco molecular, aumentando por lo tanto la afinidad por dicho blanco.³³ Debido a esto, muchos grupos han investigado generar un aumento en la rigidez, en búsqueda de obtener un único conformero potencialmente bioactivo.³⁴ Además, se ha demostrado que un aumento adicional de la rigidez causando que un ciclopéptido se encuentre en una conformación capaz de “enmascarar” los grupos NH mediante enlaces de hidrógeno intramoleculares tanto en medio acuoso como hidrofóbico, puede aumentar significativamente su permeabilidad celular y absorción oral, si bien la solubilidad en agua puede verse comprometida.^{35,36} También se han estudiado y descrito casos de macrociclos peptídicos con determinadas características estructurales que son capaces de atravesar las membranas biológicas mediante difusión facilitada, transporte activo o pinocitosis.¹⁰

Incorporación de N- metil aminoácidos y D- aminoácidos

La mayoría de los amino ácidos existen en la naturaleza en configuración L. La configuración D, si bien no es frecuente en humanos, puede encontrarse en otras especies. La incorporación

³¹ Bock, J.E.; Gavenonis, J.; Kritzer, J.A. *ACS Chem Biol.* **2013**, *8*, 3, 488.

³² Wipf, P. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2115.

³³ Tran, H. L.; Lexa, K. W.; Julien, O.; Young, T. S.; Walsh, C. T.; Jacobson, M. P.; Wells, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 2541.

³⁴ L. M. De Leon Rodriguez, E. T. Williams and M. A. Brimble, *Chemistry*, **2018**, *24*, 17869.

³⁵ Nielsen, D.S.; Lohmna, R.J.; Hoang, H.N.; Hill, T.A.; Jones, A.; Lucke, A.J.; Fairlie, D.P. *ChemBioChem*, **2015**, *16*, 2289.

³⁶ Nielsen, D.S.M Shepherd, N.E.; Xu, W.; Lucke, A.J.; Stoermer, M.J.; Fairlie, D.P. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 12, 8094.

1. Introducción y Objetivos

de aminoácidos D en péptidos biológicamente activos puede mejorar su estabilidad metabólica ya que pocas enzimas humanas hidrolizan enlaces peptídicos de configuración D. Además de reducir la susceptibilidad a degradación enzimática, facilitan disposiciones espaciales en la cadena peptídica que favorecen la ciclación (ver sección 3.1.)

Por otra parte, los aminoácidos N-metilados tienen una gran influencia sobre las propiedades fisicoquímicas de los péptidos y ciclopéptidos que componen. Ha sido demostrado que la N metilación de ciclopéptidos mejora considerablemente la permeabilidad celular.^{37,38,39} Además, se han reportado estudios involucrando la comparación quimioinformática de bibliotecas de pentapéptidos cíclicos y lineales con sets de datos de compuestos de relevancia farmacéutica, incluyendo péptidos aprobados para su uso clínico e inhibidores de interacciones proteína-proteína, que sugerirían que la ciclación y N-metilación traslada su posición hacia el espacio químico definido por la FDA como moléculas con características de potenciales fármacos. Por lo tanto, estas modificaciones podrían resultar en compuestos biológicamente activos con permeabilidad adecuada frente a membranas biológicas.⁴⁰

Los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo en la evaluación de ciclohexapéptidos contra *P.falciparum* y *T.b.brucei* son consistentes con estas observaciones. La introducción de dos o tres residuos de N-metil glicina permitió acceder a ciclopéptidos con elevada potencia y selectividad frente a estos parásitos, superior a la observada para aquellos que contenían uno o ningún N-metilo.⁴¹

La introducción de grupos N-metilos genera la posibilidad de observar heterogeneidad conformacional basada en la isomería *cis-trans* del enlace amida (**Figura 1.5.**). El grupo amida presenta la particularidad de que el enlace C-N posee características de enlace doble parcial ya que el átomo de nitrógeno puede deslocalizar su par de electrones libre. Como consecuencia la rotación alrededor de este enlace se encuentra parcialmente restringida. En general, en ausencia de otros factores determinantes, en las amidas secundarias se observa el isómero *trans*, mientras que las mezclas *cis/trans* normalmente ocurren en amidas terciarias, donde la proporción de cada isómero depende de la naturaleza y tamaño de los sustituyentes unidos a

³⁷ Chatterjee, J.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H. *Acc. Chem. Res.* 2008, 41, 10, 1331.

³⁸ Räder, A.F.B.; Reichart, F.; Weinmüller, M.; Kessler, H. *Bioorg & Med Chem*, 2018, 10, 2766.

³⁹ White, T.; Renzelman, C.; Rand, A.; Rezai, T.; McEwen C.M.; Gelev V.M.; Turner R.A.; Lington R.G.; Leung S.S.; Kalgutkar A.S.; Bauman J.N.; Zhang Y, Liras S; Price D.A.; Mathiowetz A.M.; Jacobson M.P.; Lokey R.S. *Nat Chem Biol*, 2011, 7, 810.

⁴⁰ Díaz-Eufracio, B. I.; Palomino-Hernández, O.; Houghten, R. A.; Medina-Franco, J. L. *Mol. Divers.* 2018, 22, 259.

⁴¹ Fagúndez, C; Sellanes, D.; Peña, S.; Scarone, L.; Aguiar, A.C.C.; de Souza, J.O.; Guido, R.V.C.; Stewart, L.; Yardley, V.; Otilie, A.; Winzeler, E.A.; Gamo, F.J.; Sanz, L.M.; Serra, G.; *ACS Med. Chem. Lett.* 2019, 10, 1, 137.

1. Introducción y Objetivos

N.⁴² Debido a que la configuración del enlace amida tiene gran influencia sobre la estructura tridimensional del péptido, ambos conformeros pueden ser sustrato de reconocimiento isómero específico por parte de otras proteínas y enzimas, por lo cual, su estudio es de gran interés en química medicinal y biotecnología.

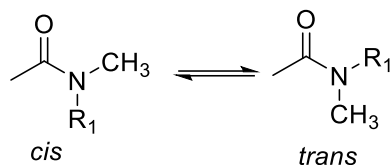


Figura 1.5. Isomería *cis-trans* en amidas

La coexistencia de isómeros *cis/trans* de amidas terciarias en solución fue demostrada mediante métodos espectroscópicos a mediados de los 50', estudiando amidas simples como dimetilformamida.⁴³ Actualmente, los conformeros *cis* pueden diferenciarse de los *trans* mediante estudios de RMN (Resonancia Magnética Nuclear). La resonancia del N-metilo del conformero *cis* (*syn* al carbonilo) aparece a campos más altos en relación al *trans* debido al efecto de blindaje del grupo carbonilo.⁴⁴

Basados en los estudios realizados mediante RMN, el grupo de Zhu y Li, asignó la estructura del ciclohexapéptido versicotide C.⁴ Este producto natural contiene dos restos de N-Me-Ala y un plano de simetría, por lo cual, si ambos enlaces N-metil amida tuvieran igual configuración el número de señales en el espectro de ¹H-RMN debería ser la mitad. Los autores explican la ausencia de simetría en el espectro de ¹H-RMN proponiendo que el compuesto presentaría uno de los enlaces peptídicos correspondientes en configuración *cis* con una δ H= 2.91 ppm y δ C= 29.6 ppm, y el otro *trans* con una δ H= 3.35 ppm y δ C= 37.6 ppm (figura 1.2). Por otra parte, para el caso de los Versicotides A, B y D-F no se informa ni discute la presencia de conformeros.

Malaria

La malaria es una enfermedad tropical causada por parásitos del género *Plasmodium*, y transmitida a humanos por el mosquito *Anopheles*. El último reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS),⁴⁵ estima que en 2019 se registraron 229 millones de casos de malaria, en 87 países endémicos. 29 de estos países registraron el 95% de los casos totales destacándose entre

⁴² Fischer, G. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, 119.

⁴³ Dorman, D. E.; Bovey, F. A. *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 1719

⁴⁴ Quintanilla-Licea, R.; Colunga-Valladares, J.F.; Caballero-Quintero, A.; Rodríguez-Padilla, C.; Tamez-Guerra, R.; Gómez-Flores, R.; Waksman, *Molecules* **2002**, 7, 662.

⁴⁵ WHO malaria report **2020**.

1. Introducción y Objetivos

estos Nigeria (27%), la república Democrática del Congo (12%), Uganda (5%) y Mozambique (4%). En América, los casos de malaria se redujeron un 40% (de 1.5 millones a 0.9 millones). Sin embargo, el progreso de la región se contrapone al aumento de casos de malaria en Venezuela, que tenía cerca de 35 500 casos en el 2000 y 467 000 en 2019. Brasil, Colombia y Venezuela registran el 86% de los casos de la región.

Los esfuerzos por controlar la enfermedad han descendido significativamente su prevalencia desde el año 2000, sin embargo, esta progresión parece haberse estancado desde el año 2015. En 2019 se registraron 409000 muertes por malaria, un 67% de ellas correspondientes a niños menores de 5 años.

El diagnóstico, tratamiento efectivo y control del vector son pilares fundamentales de los programas de control y eliminación de la enfermedad. El ciclo de vida del parásito involucra dos huéspedes: el mosquito transmisor y el humano (**Figura 1.6**). En el humano, el parásito invade en primer lugar las células hepáticas donde madura y luego pasa a la sangre donde invade los eritrocitos. El estadio sanguíneo del parásito es el responsable por las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Dentro de los eritrocitos se reproduce de forma asexual y luego destruye la célula que lo contiene liberando un mayor número de parásitos a la sangre que continúan el ciclo invadiendo otras células. Algunos parásitos se diferencian en el estadio eritrocitario sexual (gametocitos). Los gametocitos femeninos y masculinos son ingeridos por el mosquito desde la sangre y se reproducen dentro del mosquito. Los esporocitos generados se acumulan en las glándulas salivares del mosquito. Al morder otra persona, inyecta saliva ya que actúa como anticoagulante y junto con ella a los esporocitos que migran al hígado comenzando un nuevo ciclo.

El tratamiento farmacológico actual consiste en terapias combinadas de artemisinina y otros fármacos (ACT). Algunas de las combinaciones sugeridas por la OMS son: arteméter – lumefantrina, artesunato – amodiaquina, artesunato – mefloquina, dehidroartemisinina – piperaquina y artesunato- sulfadoxina-pirimetamina. De esta forma, se busca disminuir rápidamente la carga parasitaria para evitar el progreso de la enfermedad y al reducir la cantidad de parásitos en sangre, prevenir la transmisión. Para reducir la transmisibilidad de la infección por *P.falciparum* también se recomienda administrar una única dosis de primaquina en combinación con la ACT.

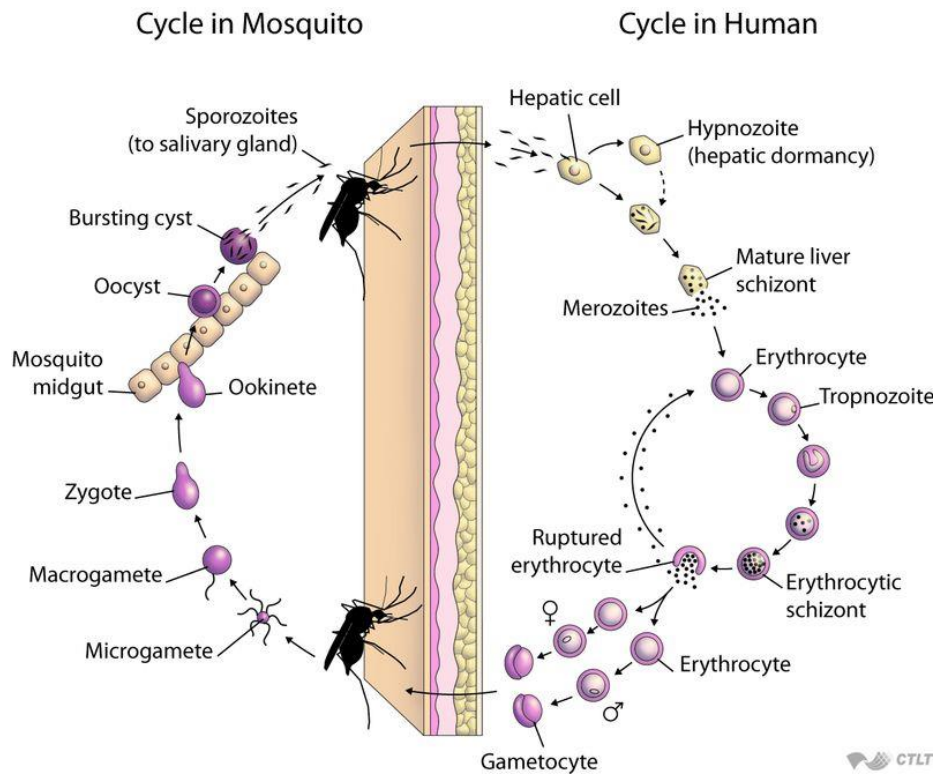


Figura 1.6. Ciclo de vida de *Plasmodium*.

El tratamiento profiláctico de la malaria actúa sobre la forma hepática del parásito, previniendo el pasaje al estadio sanguíneo, evitando por lo tanto la manifestación de la enfermedad. Se administra a viajeros o personas que representen grupos de riesgo, previo a la temporada lluviosa, cuando el riesgo de contagio es mayor. Se utiliza cloroquina o mefloquina, excepto en niños y embarazadas, cuando el tratamiento profiláctico consiste en sulfadoxina-pirimetamina.

La aparición de resistencia a artemisinina y fármacos que se administran en conjunto amenaza los esfuerzos realizados para controlar la prevalencia de malaria. La eficacia de los tratamientos se encuentra en monitoreo continuo, así como la capacidad de los test rápidos de detectar el parásito, ya que se han observado mutaciones en las principales proteínas del parásito que detectan estos test (HRP2 y 3).

La intensidad de la transmisión depende de varios factores relacionados al parásito, el vector y el ambiente. El mosquito *Anopheles* deja sus huevos en agua, que luego eclosionan en larvas que eventualmente crecen convirtiéndose en mosquitos adultos. Los cúmulos de agua fresca formados frecuentemente durante la temporada lluviosa en los países tropicales sirven de hábitat para la reproducción de muchas especies de *Anopheles*.

La transmisión del parásito es más intensa en los lugares donde el mosquito tiene una vida más larga lo cual da tiempo al parásito a completar su desarrollo dentro del mosquito.

1. Introducción y Objetivos

Factores climáticos como la temperatura y la humedad determinan la supervivencia del mosquito.

El desarrollo de inmunidad es otro factor importante. Tras años de exposición se puede desarrollar una inmunidad parcial, que, si bien nunca provee una protección completa, reduce los riesgos de mortalidad por una infección de malaria. Por esta razón, la mayoría de las muertes registradas por esta enfermedad se dan en niños menores a 5 años.

El control del vector es la principal forma de prevenir y reducir la transmisión de la malaria. Las dos formas recomendadas de controlar el vector son el uso de mosquiteros tratados con insecticida y el rociado de insecticida en lugares cerrados. Como la picadura del mosquito suele suceder durante la noche, dormir bajo redes mosquitero tratadas con insecticida puede brindar una barrera física para evitarla.

Desde el 2000, el progreso en el control de la malaria ha sido el resultado principalmente del control del vector. Sin embargo, ese progreso se ve amenazado por el desarrollo de resistencia del mosquito *Anopheles* a los insecticidas piretroides. Los piretroides son los insecticidas más comúnmente utilizados, tanto para el tratamiento de redes mosquiteras como para el rociado de lugares cerrados.

Si bien el uso de redes tratadas con piretroides continúa siendo un método relativamente eficaz en el control de la transmisión, la OMS ha destacado la urgente necesidad de desarrollar nuevas y mejores herramientas para combatir la malaria.

Además, según la OMS, el seguimiento tanto del número de casos y de la prevalencia de mutaciones en el parásito causantes de dificultades en el diagnóstico rápido o de resistencia al tratamiento, se ha visto afectado por la pandemia por COVID-19.

Trypanosomiasis africana

La Tripanosomiasis Africana humana, o enfermedad del sueño, es causada por parásitos del género *Trypanosoma* que son transmitidos por la mosca tsé-tsé. Esta enfermedad se encuentra únicamente en la región de África subsahariana. Dos especies de *Trypanosoma brucei* causan esta enfermedad: *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*.

Durante los últimos años se han llevado a cabo diversas acciones con la finalidad de controlar y eliminar esta enfermedad. En 2018 se reportaron 977 casos, lo cual significa una marcada baja respecto a los 2164 detectados en 2016. El área en riesgo moderado a alto de esta enfermedad también se ha reducido, y más de la mitad de la misma se encuentra en la República Democrática del Congo.

1. Introducción y Objetivos

A pesar del relativo éxito en el control de la enfermedad, existe un número limitado de fármacos útiles, que presentan pobre eficacia, rutas de administraciones indeseables, o efectos secundarios y toxicidad importantes. Además, se ha detectado el desarrollo de resistencia a los mismos.⁴⁶

Los parásitos en su estado trypomastigotes ingresan al cuerpo por la picadura de la mosca vector. De esta forma ingresan al sistema linfático y pasan a la sangre. Dentro del huésped se distribuyen a través del torrente sanguíneo y continúan su replicación por fisión binaria, llegando a atravesar la barrera hematoencefálica. Todo el ciclo de vida de estos tripanosomátidos se da de forma extracelular. A su vez la mosca se infecta al picar al humano, y una vez en el interior de la mosca los trypomastigotes se replican y se transforman en epimastigotes. Los epimastigotes se transportan a las glándulas salivares de la mosca donde continúan su replicación (**Figura 1.7.**). El ciclo de vida en el interior de la mosca tarda aproximadamente 3 semanas.

El tratamiento de la Tripanosomiasis africana humana depende de la forma y estadio en la cual se encuentre la enfermedad. En una primera etapa, el parásito se multiplica en los tejidos subcutáneos, sangre y linfa. Esta es llamada la etapa hemo-linfática, en la cual se da fiebre, dolor de cabeza, dolor en las articulaciones y agrandamiento de los nódulos linfáticos. En la segunda etapa el parásito cruza la barrera hematoencefálica para infectar el sistema nervioso central. Esta es conocida como la etapa neurológica o meningo-encefálica. En general es cuando aparecen síntomas como cambios en el comportamiento, confusión, y falta de coordinación. Se ven afectados los ciclos del sueño, lo cual le da su nombre a la enfermedad. Sin tratamiento, la enfermedad del sueño puede ser mortal.

Los fármacos utilizados en etapas tempranas son más seguros y fáciles de administrar que los utilizados en etapas más avanzadas. Los fármacos usados en las etapas tempranas de la enfermedad son Pentamidina y Suramin. El primero en general es bien tolerado, mientras que el segundo causa efectos no deseados incluyendo alergias. Para el segundo estadio de la enfermedad se usa Melarsoprol, principalmente si se trata de una infección por *T.b.rhodesiense* y Eflornitina (efectiva contra *T.b.gambiense*) que generalmente se administra en conjunto con Nifurtimox. El melarsoprol presenta cierta toxicidad por contener arsénico, entre los efectos secundarios más graves esta la posibilidad de causar una encefalopatía, lo cual puede ser fatal. Eflornitina es menos tóxica que melarsopol, pero se administra de forma intravenosa. Al administrarlo en conjunto con Nifurtimox simplifica el tratamiento, reduciendo su duración y cantidad de administraciones IV necesarias. Otra opción es el tratamiento con Fexinidazol, el

⁴⁶ Cavalli, A.; Bolognesi, L, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7339.

1. Introducción y Objetivos

cual fue incluido en 2019 en la guía para el tratamiento de la Trypanosomiasis africana, siendo efectivo en ambas etapas de la enfermedad.

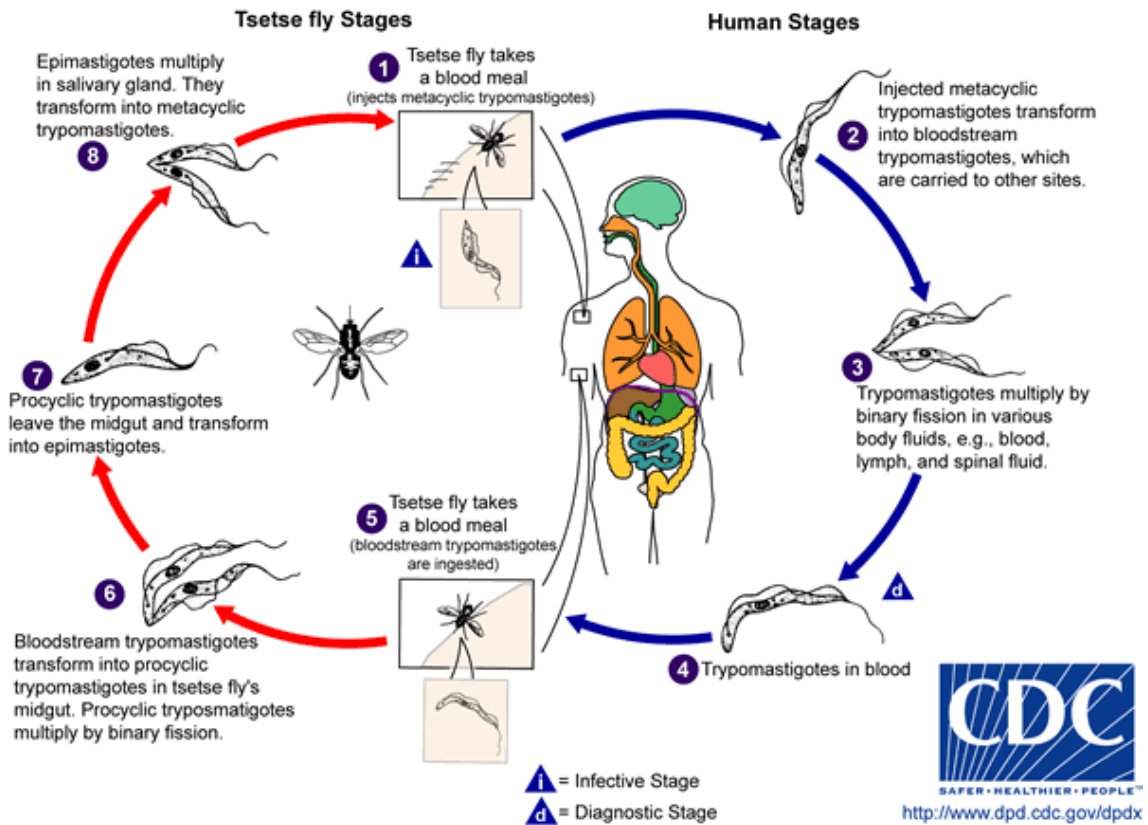


Figura 1.7. Ciclo de vida de *T. brucei*

Por otro lado, si bien no son patogénicas para el ser humano, las especies *T. brucei brucei* producen una enfermedad en el Ganado conocida como Nagana, que impacta fuertemente en la economía y estado nutricional de las comunidades rurales afectadas.

Hipótesis de trabajo de esta tesis

Durante los últimos años nuestro grupo de investigación viene trabajando en el estudio de metodologías para la síntesis de macrociclos peptídicos y su posterior evaluación

1. Introducción y Objetivos

biológica.^{47,48,49,50,51} Se han obtenido resultados relevantes tanto en la optimización de la ruta de obtención como en las actividades contra *Plasmodium falciparum* K1 y/o *Trypanosoma brucei*, parásitos causantes de la malaria y la tripanosomiasis africana, respectivamente. Como antecedentes de bioactividad de macrociclos generados en el grupo, podemos citar los resultados obtenidos durante las tesis doctorales de Catherine Fagundez y Stella Peña, que se resumen en la **Figura 1.8**.

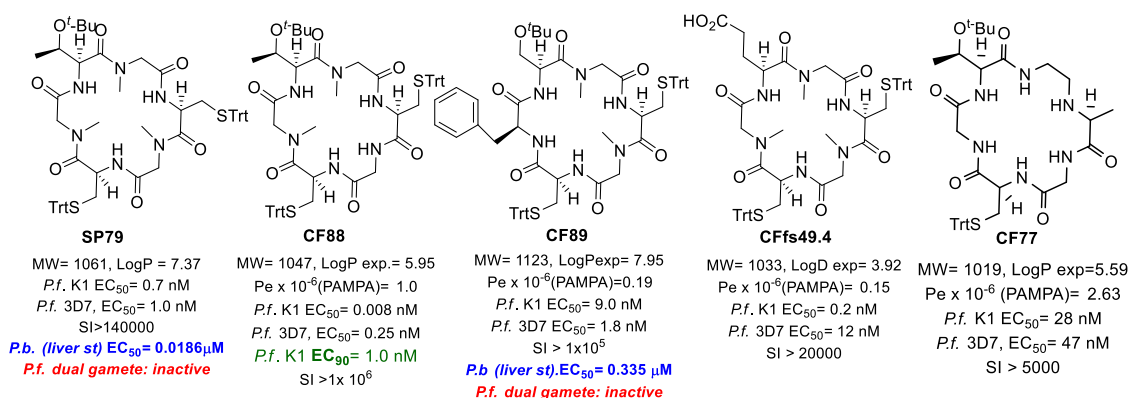


Figura 1.8. principales resultados de bioactividad frente a *P.falciparum* obtenidos previamente por el grupo.⁵²

Basados en estos resultados previos de evaluación biológica, y dado que los Versicotides son análogos a los mismos, consideramos que estos productos naturales podrían ser potencialmente activos contra *Plasmodium falciparum* K1 y/o *Trypanosoma b. brucei*.

Por otra parte, algunos de los ciclopéptidos conteniendo ácido antranílico reportados previamente en la literatura han presentado actividad insecticida interesante.^{35,53} Inspirados en esto, se propone evaluar algunos de los compuestos sintetizados en su actividad insecticida frente a larvas del mosquito *Anopheles*.

⁴⁷ Fagúndez, C.; Sellanes, D.; Serra, G. *ACS Comb Sci*, **2018**, *20*, 4, 212.

⁴⁸ Peña, S.; Fagúndez, C.; Medeiros, A.; Comini, M.; Scarone, L.; Sellanes, D.; Manta, E.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F.; Stewart, L. Yardley, V.; Serra, G. *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 130.

⁴⁹ Peña, S.; Scarone, L.; Manta, E.; Serra, G. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2806.

⁵⁰ Peña, S.; Scarone, L.; Manta, E.; Stewart, L.; Yardley, V.; Croft, S.; Serra, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4994.

⁵¹ Peña, S.; Scarone, L.; Medeiros, A.; Manta, E.; Comini, M. Serra, G. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1443.

⁵² Fagúndez, C.; Sellanes, D.; Peña, S.; Scarone, L.; Aguiar, A.C.C.; de Souza, J.O, Guido, R.V.C.; Stewart, L.; Yardley, V.; Otilie, S.; Winzeler, E.A.; Gamo, F.J.; Sanza, L.M.; Serra, G. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1, 137-

⁵³ Masuda, Y.; Tanaka, R.; Kai, K.; Ganesan, A.; Doi, T. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 17, 7844.

Antecedentes sintéticos

Como se ha comentado previamente, se ha descrito la presencia de confórmeros para el versicotide C. Otra particularidad de este compuesto radica en la presencia de ácido antranílico (*o*-aminobenzoico, Anth) como análogo a un β aminoácido (amina a tres enlaces del carboxilo).

Hay algunos ejemplos en la literatura en relación a la síntesis de productos naturales de estructura ciclopeptídica conteniendo ácido antranílico,^{54,55,56,57,58} y todos ellos concuerdan en que la formación del enlace amida involucrando el grupo amino del ácido antranílico es un desafío, no solo por encontrarse desactivado por resonancia con el anillo aromático, sino también porque el Anth puede estar involucrado en rearreglos.^{59,60} Frecuentemente se utilizan rutas sintéticas largas, complicadas y con bajos rendimientos para obtener estos compuestos. Un ejemplo es la síntesis total de deoxo-solomonamide B, en la cual el Anth se enmascara con un grupo indol que es clivado por ozonólisis en las últimas etapas de la ruta sintética.⁶¹ Por lo tanto, el desarrollo de metodologías más sencillas para la síntesis de compuestos conteniendo Anth continúa siendo un desafío interesante.

Este conjunto de particularidades presente en los productos naturales Versicotides motivó el estudio de su síntesis, características conformacionales y potencial actividad biológica.

También se propone la síntesis de análogos a Versicotides donde se sustituya el ácido antranílico por tiazoles u oxazoles. Diversos ejemplos de macrociclos naturales y sintéticos sugerirían que la presencia de anillos heterocíclicos pequeños tales como tiazoles, oxazoles y triazoles les otorgarían propiedades deseables en campañas de búsqueda de nuevos fármacos, tales como permeabilidad celular.⁶² Sin embargo, la incorporación de heterociclos en macrociclos generalmente es desafiante y suele requerir varios pasos de reacción. Algunos compuestos análogos a productos naturales, conteniendo heterociclos de este tipo fueron

⁵⁴ S. T. Y. Ngen, H. Kaur, P. A. Hume, D. P. Fukert and M. A. Brimble, *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, 7635

⁵⁵ Nakao, K.; Hamada, Y.; Shioiri, T. *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, *37*, 930.

⁵⁶ Tseng, M. C.; Yang, H. Y.; Chu, Y. H. *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 419

⁵⁷ Chettu, S. K.; Madhu, R. B.; Raolji, G. B.; Babu, K. R.; Rao, N. S. K.; Gopalakrishnan, S.; Ismail, A.; Reddy, G. B.; Shafi, S. *RSC Adv.*, **2016**, *6*, 61555

⁵⁸ Lewer, P.; Graupner, P. R.; Hahn, D. R.; Karr, L. L.; Duebelbeis, D. O.; Lira, J. M.; Anzeveno, P. B.; Fields, S. C.; Gilbert, J. R.; Pearce, C. J. *Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1506.

⁵⁹ R. Costil, H. J. A Dale, N. Fey, G. Whitcombe, J. V Matlock, and J. Clayden *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*, 12533.

⁶⁰ J. Noguchi, M. Kawai and M. Hamada, *Isr. J. Chem.*, **1974**, *12*, 87.

⁶¹ N. Vasudevan, K. Kashinath and D. S. Reddy, *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 23, 6148.

⁶² Soor, H. S.; Appavoo, S.D.; Yudin, A.K. *Bioorg & Med. Chem.*, **2018**, *26* (10), 2774.

1. Introducción y Objetivos

sintetizados previamente por nuestro grupo de investigación, encontrándose resultados prometedores en cuanto a su actividad frente a *T.b.brucei* y *P.falciparum*.^{63,64,65}

Objetivos

El objetivo general de esta tesis es desarrollar metodologías sintéticas que nos permitan obtener en cantidades adecuadas péptidos cíclicos naturales y análogos (**1**), **Figura 1.9**. Además de la síntesis de estructuras de tipo **1**, se propone sustituir el ácido antranílico por α -aminoácidos ó por anillos de tiazol u oxazol adecuadamente sustituidos.

Posteriormente se realizarán estudios conformacionales y de sus potenciales actividades: antitripanosómica contra *Trypanosoma brucei brucei*, antimalárica contra *Plasmodium falciparum* K1, citotóxicas e insecticidas contra *Anopheles*.

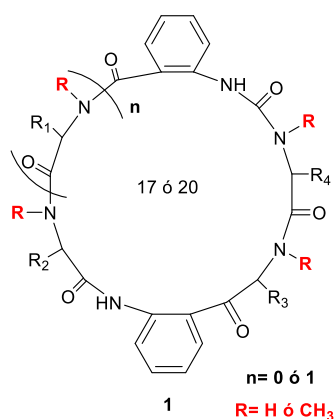


Figura 1.9. Versicotides y análogos

Los objetivos específicos pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Síntesis de bloques de construcción.
2. Síntesis en fase sólida y macrolactamización en solución o en fase sólida de ciclopéptidos conteniendo α aminoácidos
3. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo ácido o-aminobenzoico.
4. Estudios conformacionales de los macrociclos obtenidos por RMN.
5. Ensayos de actividad biológica *in vitro*: contra *T.b.brucei*, contra *P. falciparum*, citotóxicas e insecticidas contra *Anopheles*. Estudios de Relación Estructura –Actividad

⁶³ Peña, S.; Fagúndez, C.; Medeiros, A.; Comini, M.; Scarone, L.; Sellanes, D.; Manta, E. Tulla-Puche, J.; Albericio, F.; Stewart, L.; Yardley, V.; Serra, G. *Med chem comm* **2014**, *5*, 1309.

⁶⁴ Franco, J.; Scarone, L.; Comini, M.A. *Eur J Med Chem*, **2020**, *189*, 112043.

⁶⁵ Franco, J.; Medeiros, A.; Benitez, D.; Perelmuter, K.; Serra, G.; Comini, M.A.; Scarone, L. *Eur J Med Chem*, **2017**, *126*, 776.



Capítulo 2

**Síntesis de bloques de
construcción**

2. Síntesis de bloques de construcción

2.1. Introducción

Tanto en síntesis de péptidos en fase sólida como en síntesis de péptidos en solución la correcta protección de los aminoácidos involucrados es de fundamental importancia ya que evita la formación de productos secundarios indeseados. Mientras que la síntesis de péptidos en solución requiere la protección tanto de grupos amino como ácidos carboxílicos, en fase sólida la unión a la resina evita la posibilidad de reacciones involucrando el grupo C terminal del primer aminoácido por lo cual únicamente se requieren grupos protectores de α amino y cadenas laterales.

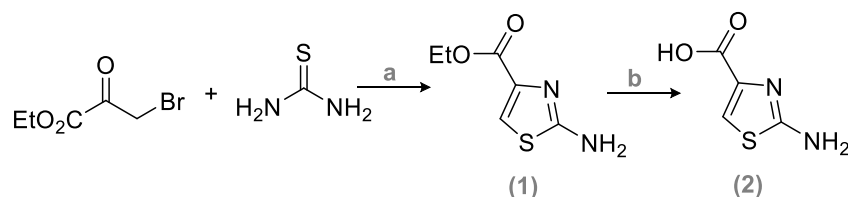
Entre los grupos protectores de aminas más comúnmente utilizados se destacan los carbamatos Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonil) y Boc (*tert*-butiloxycarbonil). Cada grupo protector posee características que determinan su aplicación, como se discute en profundidad en el capítulo 3. En el caso del grupo Fmoc su desprotección se realiza con bases tales como piperidina, si bien morfolina, piperazina y etanolamina también pueden usarse. Por su parte el grupo Boc requiere condiciones ácidas tales como ácido trifluoroacético o HCl. Esto determina que el primero sea más utilizado en fase sólida, mientras que el grupo Boc se utiliza mayoritariamente en solución.

En este capítulo se describe la obtención y/o protección de todos aquellos aminoácidos que no fueron adquiridos de manera comercial, para su uso en SPPS o síntesis en solución, así como la preparación y protección de tiazoles.

2.2. Resultados y discusión

2.2.1. Síntesis de tiazoles

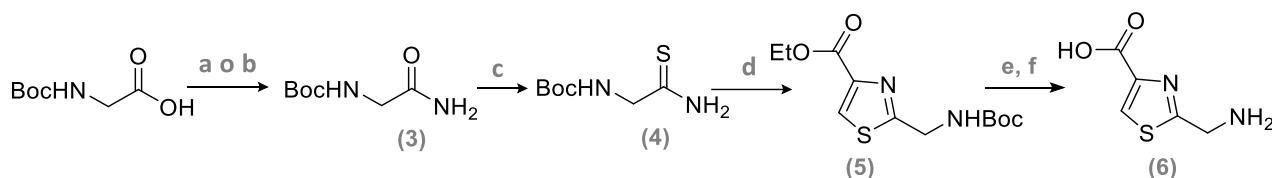
La síntesis del ácido 2-aminotiazol-4-carboxílico (**2**) se llevo a cabo por la reacción de Hantzsch en condiciones clásicas,¹ a partir de bromopiruvato de etilo y tiourea según el **Esquema 2.1**. Por otra parte, el Boc-2-aminometiltiazol-4-carboxilato de etilo (**5**), se sintetizó a partir de BocNH-Gly-OH siguiendo la metodología de Hantzch modificada,² y desprotegido para obtener (**6**).



Esquema 2.1. Síntesis de 2-aminotiazol-4-carboxílico. **a)** EtOH, piridina, reflujo, R=97%. **b)** KOH 10%, THF.

¹ Hantzsch, A. *Ann. Chem.* **1888**, 249, 1.

² Bredenkamp, M. W.; Holzapfel, C. W.; van Zyl, W. J. *Synth. Commun.* **1990**, 20, 2235.



Esquema 2.2. Síntesis de ácido 2-aminometiltiazol-4-carboxílico. **a)** 2,2,2-Tricloroetil cloroformiato, DIPEA, NH₃, THF, R=81%. **b)** Etil cloroformiato, DIPEA, NH₃, THF, R=63%. **c)** Reactivo de Lawesson, THF, R=76%. **d)** Etil bromopiruvato, piridina, EtOH, reflujo, R=46%. **e)** KOH 10%, THF. **f)** HCl/Dioxano 2M, R= cuantitativo.

2.2.2. Protección y N metilación de aminoácidos

Protección del grupo amino

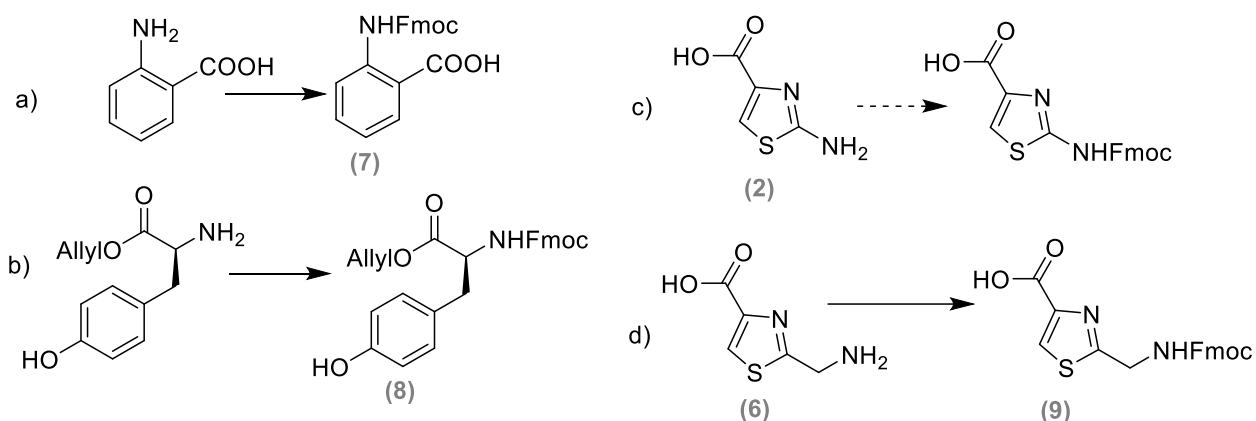
Como se explicó previamente, el grupo amino del ácido antranílico se encuentra desactivado por resonancia con el anillo aromático. De forma similar, el par de electrones libre del grupo amino del ácido 2-aminotiazol-4-carboxílico se encuentra desactivado por la existencia de formas tautoméricas.³ Como consecuencia, además de las dificultades previstas para la formación de enlaces amida, la protección de estos grupos amino representa un desafío mayor que la protección de aminoácidos naturales.

Las metodologías descritas para la protección de grupos amino se basan en la reacción del amino ácido libre (con su cadena lateral protegida si es necesario) con el haloformiato o dicarbonato del grupo protector, usando un sistema bifásico (solvente orgánico-medio básico acuoso)⁴ o con el correspondiente haluro en solventes orgánicos. Sin embargo, en algunos casos la presencia del ácido carboxílico libre puede interferir en la reacción y generar, por ejemplo, la formación de dipéptidos. Para evitar esto, se puede utilizar el ácido carboxílico protegido, o un electrófilo menos reactivo. Esto sucede en la protección con Fmoc, donde se utiliza Fmoc-OSu (N-(9-Fluorenilmetoxicarboniloxi)succinimida) en lugar de Fmoc-Cl (9-Fluorenilmetil cloroformiato) para evitar la oligomerización.⁵ La protección del ácido antranílico con Fmoc-OSu, Esquema 2.3., permitió acceder a Fmoc-Anth con buen rendimiento, superior al 80%. El Fmoc-Anth obtenido fue utilizado luego para la síntesis en fase sólida de los péptidos precursores de Versicotides (capítulo 4). En el caso del tiazol 6, la reacción de protección con Fmoc transcurrió con rendimiento mucho menor, 68 %, y en el caso del tiazol 2, no fue posible aislar el producto. También se realizó la protección de NH₂-Tyr-OAllyl para utilizarlo en la síntesis y ciclación de péptidos sobre la resina 2-CTC (capítulo 5).

³ Dondoni, A.; Merino, P. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, **1996**, Chapter 3, 373-474.

⁴ Kates, S. A., Albericio, F. *Solid Phase Synthesis: A Practical Guide*, **2000**, Chapter 3, 114.

⁵ Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. *Chem. Rev* **2009**, *109*, 2455.

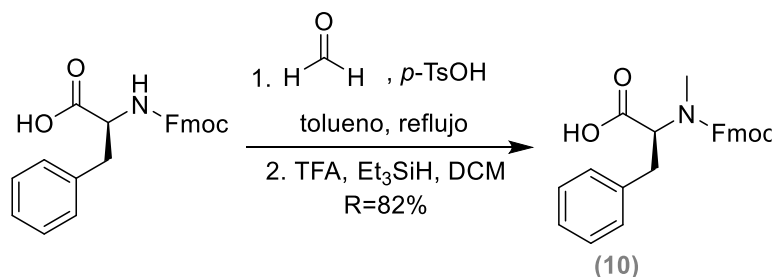


Esquema 2.3. Protección con Fmoc. Condiciones: Fmoc-OSu, dioxano:agua (3:2), acetona, NaHCO₃.

R_a=84%, R_b=80 %, R_d=68 %.

N metilación de Fmoc-Phe

Por otra parte, al comenzar a estudiar la síntesis del Versicotide D, no se contaba con Fmoc-NMe-L-Phe por lo cual se realizó la N-metilación de Fmoc-L-Phe como muestra el Esquema 2.4.⁶



Esquema 2.4. N metilación de Fmoc-Phe

2.3. Conclusiones

Se obtuvieron dos tiazoles para utilizar como bloques de construcción de análogos a los productos naturales de interés. La dificultad para proteger el grupo amino del ácido 2-aminotiazol-4-carboxílico con Fmoc determinó que éste será usado en la síntesis de ciclopéptidos en solución.

Por otra parte, se protegió con buenos rendimientos el grupo amino del ácido antranílico y de Fmoc-Tyr-OAllyl para su empleo en SPPS.

Además, se obtuvo con buenos rendimientos Fmoc-NMe-Phe.

⁶ Ishiyama, H.; Yoshizawa, K; Kobayashi, J. *Tetrahedron*, **2012**, 68(31), 6186.

2.4. Parte experimental

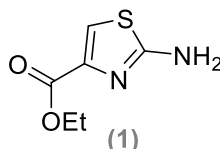
2.4.1. Información experimental general

Todas las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera inerte de nitrógeno y utilizando disolventes secos, recientemente destilados, bajo condiciones anhidras, a menos que se indique de otra forma. Todos los solventes fueron purificados de acuerdo a procedimientos descritos en la literatura.⁷

Todos los rendimientos informados refieren a productos cromatográfica y espectroscópicamente puros (determinado mediante ¹H-RMN y ¹³C-RMN). Todos los espectros de RMN fueron registrados utilizando un equipo Bruker Advance NEO-400 o Bruker Avance III 500 MHz. Todos los desplazamientos químicos reportados son relativos a TMS utilizado como referencia interna.

2.4.2. Síntesis de tiazoles

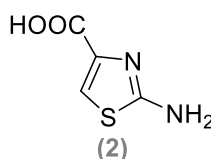
2-Amino-4-etoxicarbonil tiazol



Se disuelven 26 mmoles de bromopiruvato de etilo (1 eq) y 26 mmoles (1 eq) de tiourea en 60 mL de EtOH absoluto, se agregan 28 mmoles (1.2 eq) de piridina. La reacción se deja a reflujo toda la noche y luego se controla por TLC. Se evapora a vacío el etanol, y se agrega HCl 5% hasta pH 2. Se forma un precipitado que se filtra, obteniéndose el producto deseado. R= 97%

(1) Sólido amarillo, R_f= 0.3 (AcOEt: EP, 1:1) ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.37-1.41 (t, J= 7.9 Hz, 3H), 4.35- 4.40 (q, J=7.2 (Hz, 2H), 7.28 (s, 1 H), 7.45 (s, 1 H).

Ácido 2-aminotiazol-4-carboxílico



1 g del éster etílico se disuelve en 20 mL THF, se agrega una solución acuosa al 10% de KOH (4.5 eq) y se deja con agitación a temperatura ambiente hasta desaparición del reactivo confirmada

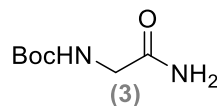
⁷ Perrin, D. D. ; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", 3th Ed. Pergamon Press, Oxford, 1988.

por TLC. El THF se evapora a vacío y se lleva la solución resultante a pH 4 con HCl 5%. Se forma un precipitado que se coloca en baño de hielo 15 minutos y luego se filtra a vacío, obteniéndose una pequeña proporción del producto en forma pura.

Debido a que se evidencia presencia del producto en las aguas del filtrado se evaporan a presión reducida y se utiliza el producto crudo en etapas posteriores.

(2) Sólido amarillo verdoso, $R_f=0.46$ (BuOH: NH_3 : H_2O , 2:0,1: 0,1) ^1H -RMN (400 MHz, D_2O) δ 7.13 (s, 1H)

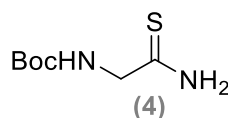
Boc-Glicinamida (3)



Boc-glicina (2.85 mmol), se disuelve en 8.0 mL de THF seco bajo atmósfera de N_2 , se coloca en baño de agua-hielo, se agrega DIPEA (3,42 mmoles) y se agita durante 30 minutos. A continuación, se agrega 2,2,2-tricloroetil cloroformiato (3,42 mmoles) y se continúa agitando a 0°C durante 30 minutos. Se agrega una solución acuosa de amoníaco (1.0 mL en 1.0 mL de THF) y se agita a temperatura ambiente durante 16 hs. Se evapora a vacío y el residuo se retoma en AcOEt (20 mL) y agua (20 mL) La capa acuosa se extrae con AcOEt (2 x 15 mL). Las capas orgánicas se lavan con solución saturada de NaHCO_3 (15 mL), agua (15 mL) y salmuera (15 mL), se secan con Na_2SO_4 , se filtra y se concentra bajo presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna utilizando AcOEt como fase móvil. $R=81\%$.

(3) Sólido blanco, $R_f=0.25$ (AcOEt) ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 1.47 (s, 9 H), 3.84 (d, $J=4.9$ Hz, 2 H), 5.30 (s, 1 H), 5.83 (s, 1 H), 6.23 (s, 1 H).

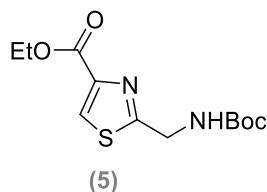
Boc-Tioglicinamida (4)



4,25 mmoles de la glicinamida se disuelven en THF seco bajo atmósfera de N_2 , se agrega reactivo de Lawesson y se deja con agitación durante 16 hs. Se agrega solución saturada de NaHCO_3 y se agita una hora. Luego se rotavapora el THF y se extrae con AcOEt. Se lava con salmuera y se seca con Na_2SO_4 , se filtra y se purifica por cromatografía en columna utilizando AcOEt:EP (1:1). $R=76\%$

(4) Sólido blanco, $R_f=0.48$ (AcOEt: EP, 1:1) $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.48 (s, 9 H), 4.18 (d, $J=6.5$ Hz, 2 H), 5.23 (s, 1 H), 7.48 (s, 1 H), 7.80 (s, 1 H).

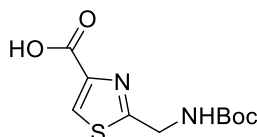
2-(((tert-Butoxicarbonil)amino)metil)tiazol-4-carboxilato de etilo (5)



7 mmoles de Boc-tioglicinamida se disuelven en etanol seco, se agregan 14 mmoles de bromopiruvato de etilo y 21 mmoles de piridina. La mezcla de reacción se agita a reflujo 6 hs. Se elimina el solvente a vacío se retoma en AcOEt y se lava con agua y salmuera. La capa orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y se purifica por cromatografía en columna utilizando AcOEt: EP (2:3). $R=46\%$

(5) Aceite amarillo, $R_f=0.42$ (AcOEt: EP, 2:3) $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.43 (t, $J=6.9$ Hz, 3 H), 1.49 (s, 9 H), 4.44 (c, $J=7.2$ Hz, 2 H), 4.67 (d, $J=6.6$ Hz, 2 H), 5.30 (s, 1 H), 8.14 (s, 1 H).

Ácido 2-(((tert-butoxicarbonil)amino)metil)tiazol-4-carboxílico



A 1.7 mmoles del éster **5** disueltos en MeOH:H₂O (5:1), se agrega LiOH (8.7 mmoles). Se deja con agitación durante 4 horas y luego se acidifica la fase acuosa a pH 3 con HCl 5% y se extrae con AcOEt. $R=99\%$.

Sólido amarillo, $R_f=0.42$ (AcOEt: MeOH, 3:0.3) $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, acetona d_6) δ 8.33 (s, 1 H), 6.99 (s, 1H), 4.57 (d, $J=5.2$ Hz, 2 H), 1.44 (s, 9H).

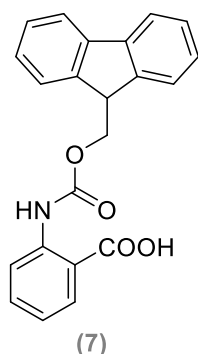
Se desprotege el grupo amino utilizando una solución 1:1 de TFA en CH_2Cl_2 (12,5 mL para 1.7 mmoles de tiazol) para obtener (**6**). Se evapora el solvente a vacío y el crudo se usa en la reacción de protección con Fmoc-Osu.

2.4.3. Procedimiento general de protección del grupo amino con Fmoc-OSu.

El compuesto a proteger (50 mmol) se disuelve en 50 mL de dioxano y 133 mL de bicarbonato de sodio al 10%, se coloca en baño de hielo y se agrega Fmoc-OSu (55 mmol). Puede ser conveniente el agregado de acetona para disolver el Fmoc-OSu. La reacción se deja con agitación toda la noche y luego se controla por TLC. Al observar desaparición del reactivo, se acidifica a pH 3 con HCl 5% y luego

de evaporar los disolventes orgánicos, se extrae con AcOEt. Las capas orgánicas se lavan con salmuera y se secan con Na₂SO₄.

Fmoc-Anth-OH (7)

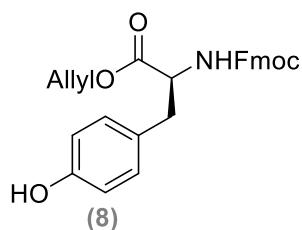


Se utilizan 5.0 g (36.5 mmoles) de ácido antranílico disueltos en 35.5 mL de dioxano y 90 mL de solución acuosa de bicarbonato al 10%. Se coloca en baño de hielo y se agregan 14.8 g (43.8 mmoles) de Fmoc-OSu junto con 20 mL de acetona.

Luego se agrega HCl 5% hasta pH 3, precipitando el producto de interés, que luego se filtra. Las aguas del filtrado se concentran para favorecer la precipitación de una cantidad mayor de producto, que luego se recristaliza de acetato de etilo-éter de petróleo. R= 88 %

(7) Sólido blanco, R_f=0.53 (AcOEt: EP, 1:2) ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 4.36 (t, J= 6.8 Hz, 1 H), 4.50 (t, J= 6.8 Hz, 2H), 7.10-7.14 (m, 1H), 7.33- 7.37 (m, 2H), 7.43 (t, J= 7.4 Hz, 2H), 7.56-7.60 (m, 1H), 7.69 (d, J= 7.4 Hz, 2H), 7.92 (d, J= 7.5 Hz, 2H), 7.98 (dd, J₁= 7.9 Hz, J₂= 1.5 Hz, 1H), 8.16 (d, J= 8.3, 1H). ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ 46.9, 66.7, 116.3, 118.9, 120.7, 122.5(2C), 125.5(2C), 127.6(2C), 128.2(2C), 131.7(2C), 134.7(2C), 141.3(2C), 144.1, 153.2, 170.2

Fmoc-Tyr-OAllyl (8)

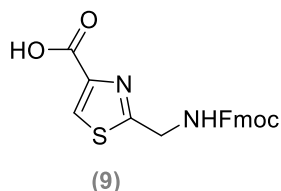


NH₂-Tyr-OAllyl (1.27 mmoles, 1 eq) en 20 mL de dioxano y 3 mL NaHCO₃ (ac) al 10% se hicieron reaccionar con una solución de Fmoc-OSu (2.54 mmoles, 2 eq.) en acetona (8mL). Luego de 12 horas se acidifica el medio por agregado de HCl hasta pH3 y se remueven todos los solventes orgánicos a

vacío. Se extrae con AcOEt y se purifica por cromatografía flash para obtener 439 mg de Fmoc-Tyr-OAllyl (R=78%).

(8) Sólido blanco. Rf= 0.52 (AcOEt:EP, 3:2) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 2.96 – 3.18 (m, 2H), 4.22 (dd, $J = 13.6, 6.6$ Hz, 1H), 4.29 – 4.42 (m, 1H), 4.46 (dd, $J = 10.6, 7.3$ Hz, 1H), 4.61 – 4.72 (m, 3H), 5.23 – 5.40 (m, 3H), 5.83 – 5.97 (m, 1H), 6.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.98 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.43 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.53 – 7.62 (m, 2H), 7.79 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H) .

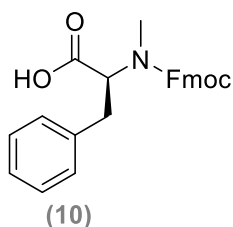
Ácido 2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)metil)tiazol-4-carboxílico (9)



Usando el procedimiento general el producto no precipita por disminución del pH por lo cual se rotavapora a sequedad, se retoma en AcOEt, y se extrae primero con agua a pH 8. La fase orgánica se descarta y la acuosa se acidifica hasta pH 3 por agregado de HCl 5% y se vuelve a extraer con AcOEt. La capa acuosa se evapora a vacío para obtener el producto. R=68%.

(9) Sólido blanco, Rf=0.65 (AcOEt: MeOH, 3:0.3) ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 4.26 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.40 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.47 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.43 (t, $J = 7.2$ Hz, 2 H), 7.71 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.90 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 8.32 (t, $J = 5.9$ Hz, 1 H), 8.36 (s, 1H).

2.5.4. N metilación de Fmoc-L-Phe

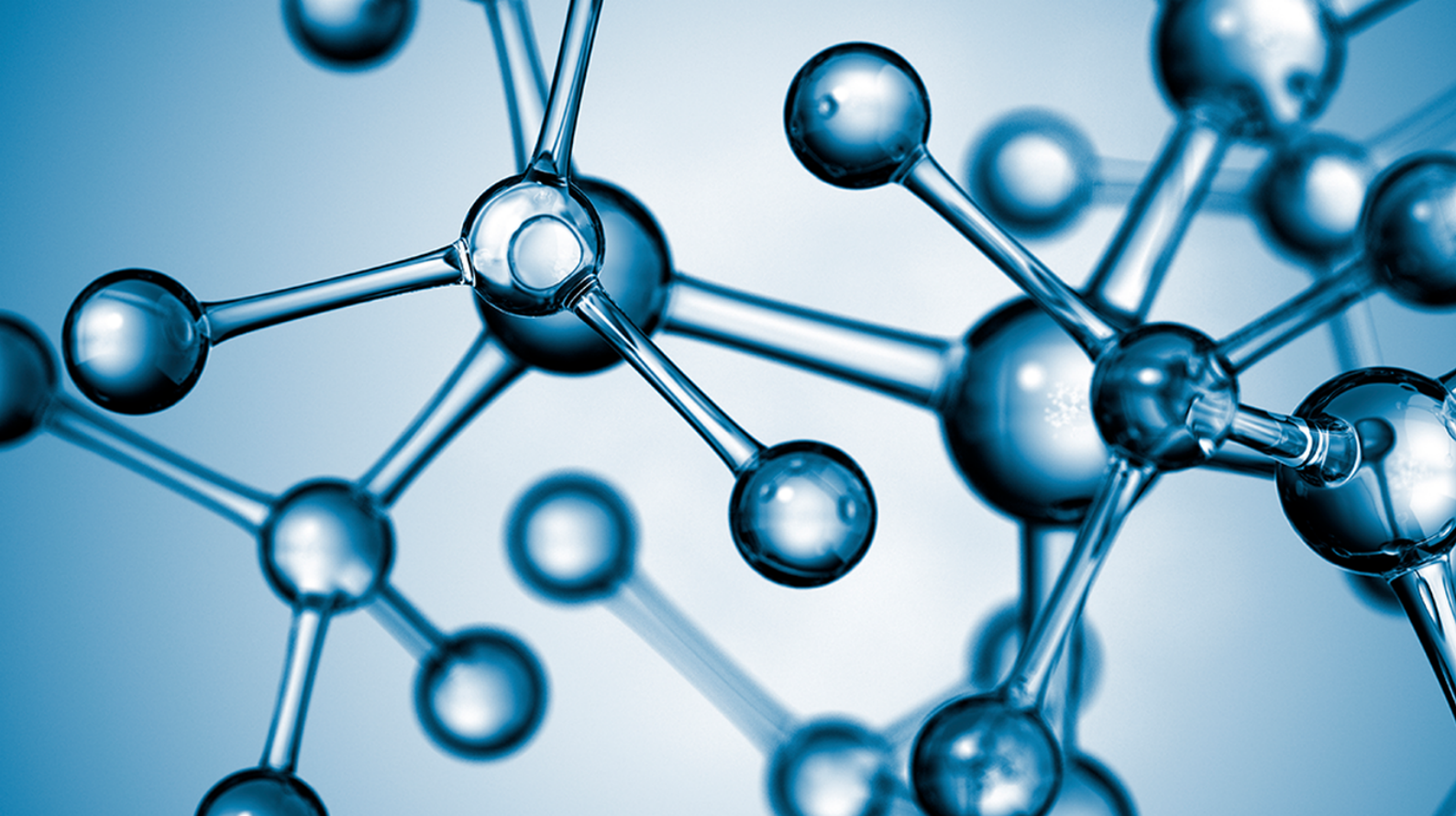


En un balón de dos bocas se disuelven 500 mg (1.3 mmoles) de Fmoc-Phe-OH en 26 mL de tolueno. Se agregan 258 mg de p-formaldehído y 0.22 mg (0.10 mmoles) de p-toluensulfónico. La mezcla de reacción se refluxa durante 8 horas utilizando una trampa dean stark para remover el agua generada. Se deja enfriar y se agita a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

Se lava con NaHCO_3 10% (3x10mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 y se filtra y rotavapora. Se le agregan 4 mL de TFA y 0.65 mL de Et_3SiH (4 mmoles) y se agita durante 16 horas a temperatura ambiente. Se concentra a vacío la mezcla. Se disuelve el concentrado en CHCl_3 y se vuelve a

rotavaporar 3 veces, se repite con dietil éter 3 veces. Se purifica por cromatografía en columna usando AcOEt:EP (1:1).

(10) Sólido blanco, $R_f=0.36$ (AcOEt: EP, 1:1) $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3), dos confórmers en proporción 1: 0.5. δ 2.67 – 2.75 (m, 1H_a), 2.77 (s, $3\text{H}_a + 3\text{H}_b$), 3.04 – 3.18 (m, $1\text{H}_a + 1\text{H}_b$), 3.38 (dd, $J= 14.5, 4.6$ Hz, 1H_b), 4.14 – 4.21 (m, 2H_a), 4.24 -4.41 (m, $2\text{H}_b + 1\text{H}_a$), 4.42 – 4.52 (m, 1H_b), 4.61 (dd, $J= 10.4, 4.6$ Hz, 1H_a), 4.82 – 4.97 (m, 1H_b), 6.95 (d, $J= 6.4$ Hz, 2H_a), 7.17 – 7.23 (m, 7H_{a+b}), 7.25 – 7.30 (m, 3H_{a+b}), 7.31 – 7.43 (m, 4.5H_{a+b}), 7.47 (t, $J= 9.3, 2\text{H}_b$), 7.73 (d, $J= 7.5$ Hz, 3H_b).



Capítulo 3

Síntesis
de ciclopéptidos
conteniendo α -AA
mediante SPPS y
macrolactamización en
solución

3. Síntesis en fase sólida y macrolactamización en solución de ciclopeptidos conteniendo α aminoácidos

3.1. Introducción

En este capítulo se discute la síntesis del producto natural Versicotide D, así como ciclotetrapéptidos análogos a éste, la obtención de ciclopentapéptidos análogos de Versicotides A, B, E y F y de un ciclohexapéptido. La metodología empleada fue la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) y posterior ciclación en solución.

Síntesis de Péptidos en Fase Sólida

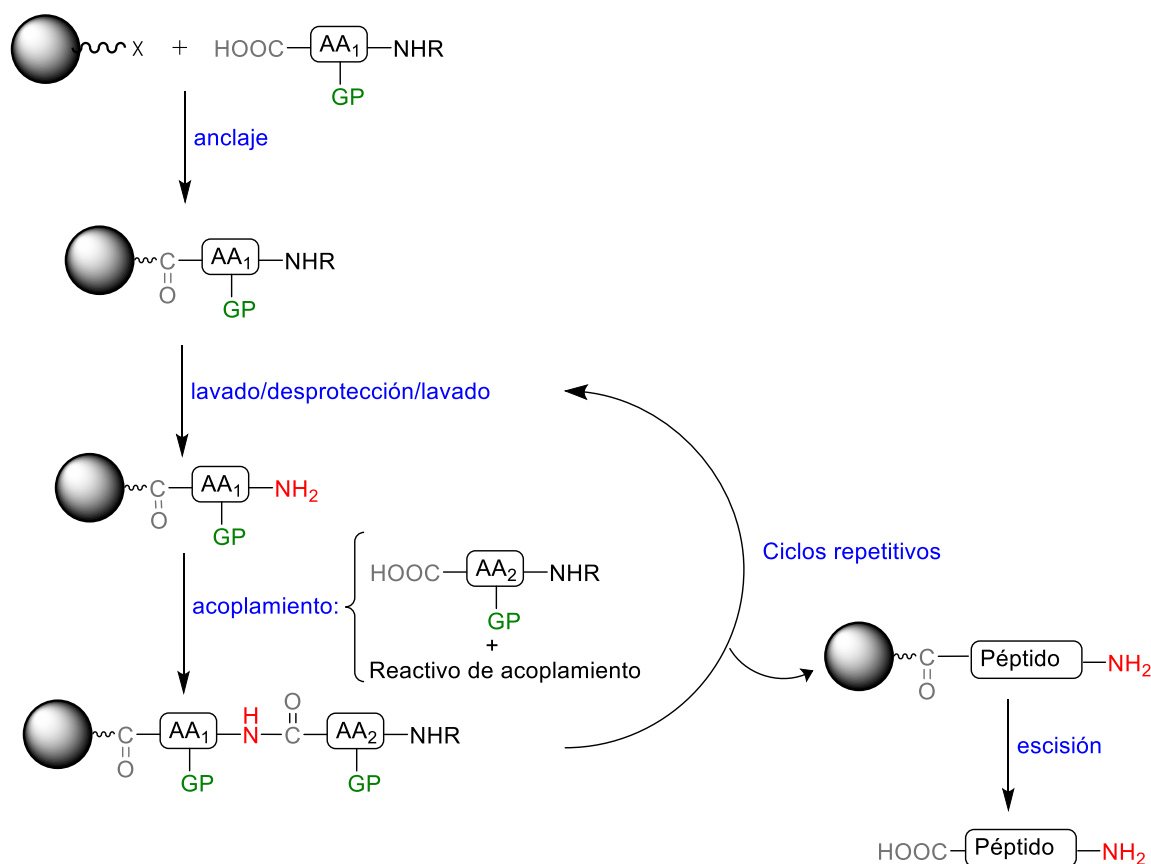
La síntesis de péptidos y pequeñas proteínas mediante las metodologías clásicas en solución requieren una gran inversión de tiempo debido a la necesidad de realizar procedimientos de acoplamiento repetitivos, desprotección de grupos protectores del amino N terminal y pasos trabajosos de purificación de intermediarios. Además, a medida que aumenta el tamaño del péptido surgen problemas de solubilidad que dificultan su elongación. La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) es una técnica desarrollada por Merrifield, por la cual recibió el premio Nobel en 1984,¹ y que tuvo un gran impacto en el desarrollo de la síntesis de péptidos. Esta metodología presenta varias ventajas frente a la síntesis en solución; las reacciones de acoplamiento pueden llevarse a cabo de manera rápida, con rendimientos casi cuantitativos usando un exceso del aminoácido activado, el cual se remueve del medio al finalizar la reacción simplemente por lavado del soporte sólido, ahorrando así tiempo de pasos de purificación de intermediarios. Además de su simpleza y eficiencia, es un proceso fácilmente escalable y automatizable.

El proceso general para sintetizar péptidos sobre una resina (**Esquema 3.1.**) comienza con el anclaje del primer aminoácido de su extremo C- terminal desde su grupo ácido carboxílico. Luego se procede con la construcción de la secuencia peptídica hacia el extremo N terminal. Los aminoácidos se acoplan sucesivamente al grupo α amino de la cadena en crecimiento, y los grupos funcionales reactivos de las cadenas laterales deben estar protegidos adecuadamente. El ácido carboxílico del aminoácido correspondiente debe ser activado para lograr el acoplamiento. Luego, la resina se filtra y se lava para remover el exceso de reactivos y los posibles productos secundarios. A continuación, el grupo protector del aminoácido recientemente acoplado se remueve y la resina se lava nuevamente. Estos ciclos de desprotección y acoplamiento se repiten hasta completar la secuencia peptídica.

¹ Merrifield R. B. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1985**, *24*, 799.

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

Finalmente, todos los grupos protectores pueden removerse, la resina se lava y el péptido es escindido de la resina (escisión ó *cleavage*).



Esquema 3.1. Procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida²

Soportes sólidos y linkers

El soporte sólido (resina) está compuesto por partículas esféricas de un núcleo polimérico insoluble al cual se enlazan grupos funcionalizados comúnmente llamados "linkers". Estos linkers proporcionan un enlace reversible entre la resina y la cadena peptídica a ser sintetizada. Existen diferentes tipos de resinas y linkers, y su correcta elección es fundamental para el éxito de la síntesis.

Si bien la resina desarrollada por Merrifield continúa en uso, el desarrollo de nuevos soportes, así como el avance en metodologías de acoplamiento y grupos protectores, ha permitido ampliar el alcance de la metodología de SPPS.

La mayoría de los soportes sólidos, incluyendo la resina de Merrifield, están compuestos por poliestireno entrecruzado con 1 o 2 % de divinilbenceno. Esta matriz polimérica es insoluble en todos

² Palomo, J.M. *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 32658.

3. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

los disolventes comúnmente utilizados. Las resinas deben hincharse en un disolvente adecuado para lograr la difusión y el acceso de los reactivos al núcleo. Las resinas de poliestireno se hinchan entre 5 a 6 veces con solventes como THF, tolueno, CH_2Cl_2 , o dioxano, 4 veces en DMF, 1.6 veces en metanol, y no se hinchan en agua. Si bien estas resinas se hinchan más en CH_2Cl_2 , este disolvente es incompatible con las condiciones utilizadas para desprotección del grupo Fmoc y no es un buen disolvente para la mayoría de los aminoácidos y reactivos de acoplamiento. Debido a esto la DMF es el solvente en el cual se realiza la mayor parte de la síntesis sobre estas resinas, mientras que el CH_2Cl_2 , es utilizado al comienzo (durante el anclaje del primer aminoácido) y durante la etapa de escisión del péptido de la resina. Por otro lado, las resinas cuyo núcleo está formado por polietilenglicol poseen la capacidad de hincharse en solvente como acetonitrilo, e incluso agua.

Del tipo de linker utilizado dependen las condiciones necesarias para el anclaje del primer aminoácido, la elección de grupos protectores, las condiciones para la escisión del péptido de la resina y cuál será el grupo funcional en el C terminal del producto final. La mayoría de los linkers están diseñados para liberar el péptido con su ácido carboxílico libre o como amida al ser tratados con TFA. También existen linkers en los que el enlace resina-péptido se escinde utilizando nucleófilos, y se usan para la preparación de péptidos modificados en su extremo C terminal. En la **tabla 3.1.** se muestran algunos de los linkers más utilizados.

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

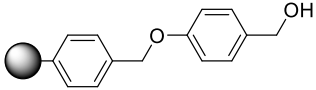
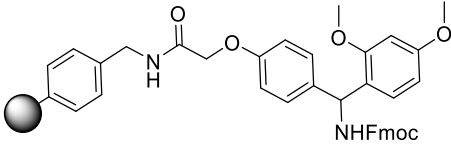
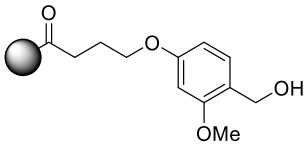
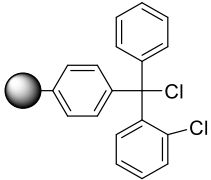
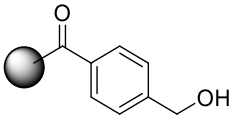
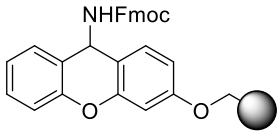
Linker	Condiciones de clivaje
<p>Wang:</p> 	90-95% v/v TFA, 1-2 h.
<p>Rink amida:</p> 	95 % v/v TFA en DCM
<p>4-(4-Hidroximetil-3-metoxifenoxi)butiril (HMPB):</p> 	1% TFA EN DCM, 2-5 min
<p>Cloruro de 2-clorotritilo:</p> 	1-5% TFA en DCM, 1 min 20 %HFIP en DCM, 3-5 min. AcOH-TFE-DCM (1:1:8), 15-60 min
<p>4-Hidroximetil benzoil:</p> 	Amoníaco en MeOH, 24 hs.
<p>9-aminoxantenil (Sieber):</p> 	2% TFA en DCE, 5-10 min 1-5% TFA en DCM, 5-15 min

Tabla 3.1. Linkers comúnmente utilizados en SPPS.

Grupos protectores

Para controlar la síntesis de cualquier péptido, el grupo α amino de uno de los aminoácidos y el C terminal del otro deben estar bloqueados con grupos protectores adecuados. En SPPS el C terminal está bloqueado por la unión a la resina, y el grupo protector utilizado en el grupo amino es una característica que define la metodología a utilizar. Los dos grupos protectores más utilizados son el tert-butoxicarbonilo(Boc), sensible a ácidos tales como TFA, y el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc)³, sensible a bases tales como piperidina. Cuando se utilizan aminoácidos con tres grupos funcionales, las cadenas laterales también deben encontrarse adecuadamente protegidas. Es importante que exista compatibilidad entre los diferentes tipos de grupos protectores de forma que uno pueda ser removido selectivamente en presencia del otro, es decir que sean ortogonales. Al final de la síntesis, los grupos protectores se deben de poder remover para obtener el péptido deseado.⁴

La estrategia Fmoc a menudo es preferida frente a la Boc, debido a que el primero puede ser desprotegido en condiciones más suaves y es ortogonal a la mayoría de los linkers y grupos protectores de cadenas laterales utilizados. La mayoría de los grupos protectores de aminoácidos pueden desprotegerse en medio ácido, así como la mayoría de los linkers se escinden en estas condiciones. Por otra parte, al utilizar la metodología Boc, se protegen las cadenas laterales con grupos bencilo, el cual requiere el uso de ácidos fuertes como HF para su desprotección, con los riesgos que esto implica.

Si bien existen protocolos para la utilización de la estrategia Boc/Bn,⁵ y esta opción es muy utilizada en casos particulares, sobre todo cuando se trata de secuencias largas y con alta probabilidad de agregación, la estrategia Fmoc presenta claras ventajas.

La mayoría de los grupos protectores de cadenas laterales utilizados de manera ortogonal al grupo Fmoc son sensibles a condiciones ácidas, como se resume en la **tabla 3.2**.⁶

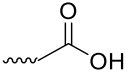
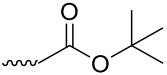
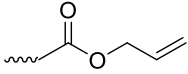
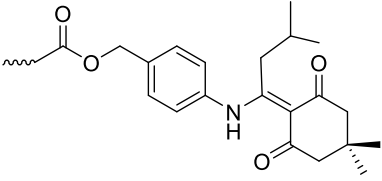
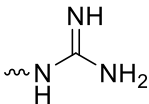
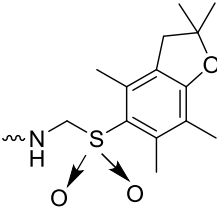
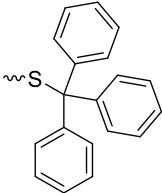
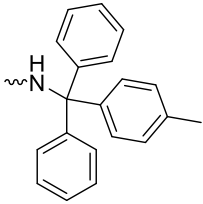
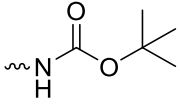
³ Carpino, L. A. y Han, G. Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 5748.

⁴ Albericio, F. *Biopolymers (Pept Sci)* **2000**, *55*, 123-139.

⁵ a) Schnolzer, M.; Alewood, P.; Jones, A.; Alewood, D.; Kent, S. B. H. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *22*, 57. b) Merrifield, R. B. *Science*, **1986**, *232*, 341.

⁶ White; P.D.; Chan, W.C. "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A practical approach", Oxford University, 2004, 20.

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

Grupo funcional de cadena lateral de aminoácido	Grupo protector	Condiciones de cleavage
Asp/Glu 	O-tBu: 	90 % v/v TFA, 30 min
	Oallyl: 	Pd(Ph ₃ P) ₄ -AcOH-NMM Pd(Ph ₃ P) ₄ (0.02 eq) PhSiH ₃ (1.2 – 2 eq.) en DCM, 10 – 30 min.
	ODmab: 	2% NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O en DMF, 5 – 10 min
Arg 	Pbf 	95% v/v TFA, 30 min
Cys \sim SH	Trt 	90% v/v TFA, 30 min
Lys/ Orn \sim NH	Mmt 	95% v/v TFA, 30 min
	Boc 	25-50 % v/v TFA, 30 min, o 4M HCl en dioxano

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

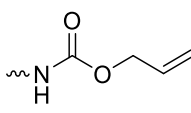

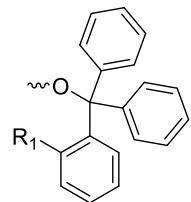
	<p>Alloc</p> 	<p>$\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ (0.1 eq) PhSiH_3 (24 eq.) en DCM, 10 – 30 min.</p>
<p>Ser/Thr/Tyr $\sim\text{OH}$</p>	<p>tBu</p> 	<p>90 % v/v TFA, 30 min</p>
	<p>Trt ($R_1=\text{H}$) Clt ($R_1=\text{Cl}$) for Tyr</p> 	<p>1 -5% TFA en DCM, 2 -5 min</p>

Tabla 3.2. Grupos protectores de cadenas laterales utilizados en SPPS

Estrategias de acoplamiento

El uso de reactivos capaces de activar el grupo ácido carboxílico de los aminoácidos es necesario para lograr la formación del enlace amida. En particular en SPPS, la reacción debe ser rápida y cuantitativa. En la **figura 3.1.** se muestran los agentes acoplantes más utilizados tanto en solución como SPPS. Estos presentan diferentes características de estabilidad, solubilidad, capacidad de activación y posibilidad de producir reacciones secundarias, que determinan su utilidad en cada caso particular.

Entre las reacciones secundarias que pueden llegar a producirse, se destaca la importancia de la racemización. El mecanismo por el cual ocurre se muestra en el **esquema 3.2.** donde el aminoácido C terminal ha sido activado y se da la formación de una oxazolona cíclica, propensa a racemizar en medio básico. Al ser atacada por un nucleófilo posteriormente, la oxazolona se abre obteniéndose el péptido con pérdida de la quiralidad.

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

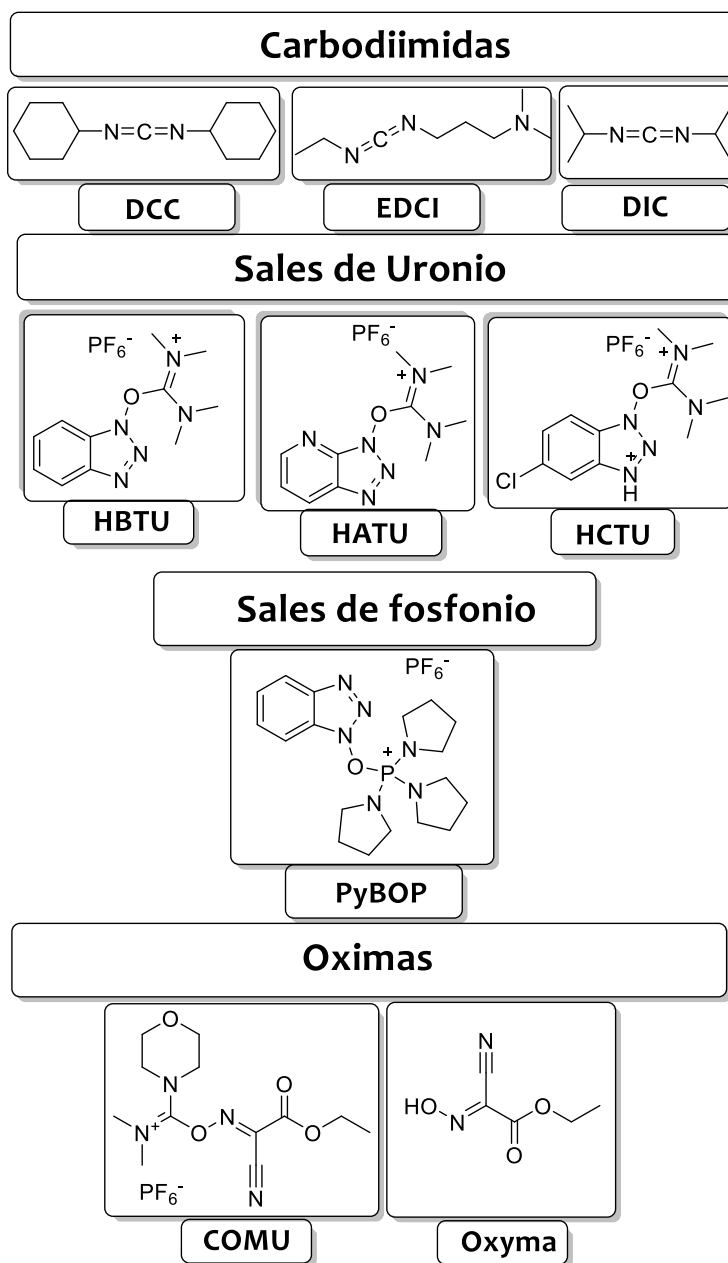
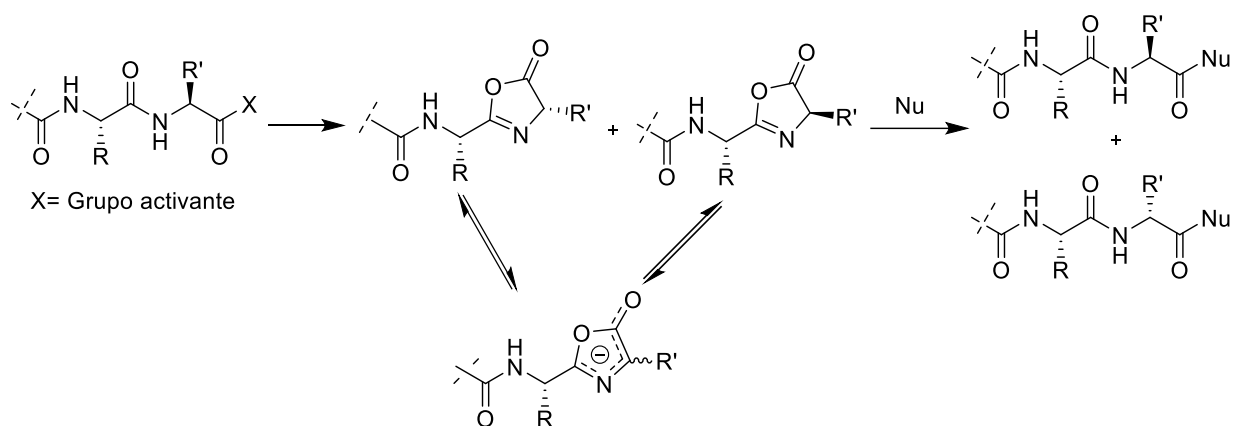


Figura 3.1. Resumen de agentes acoplantes más utilizados.

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



Esquema 3.2. Mecanismo de racemización por formación de oxazolonas.

Halogenuros de ácido

La formación de cloruros de ácido es uno de los métodos más simples para activar un ácido carboxílico. Esto es un proceso en general de dos pasos, que involucra primero una etapa de conversión del ácido a cloruro de ácido, seguido de una etapa de acoplamiento en sí. Cloruro de tionilo (SOCl_2), cloruro de oxalilo (COCl_2) o tricloruro de fósforo PCl_3 son usados generalmente para producir cloruros de ácidos. En enlace amida se forma por la reacción del cloruro de ácido con la amina. Se requiere el agregado adicional de base para atrapar el HCl formado y evitar la conversión de la amina a su correspondiente clorhidrato no reactivo. Una de las desventajas del uso de cloruros de ácido es la formación de HCl, al cual muchos grupos protectores son sensibles. Además, en SPPS, el enlace péptido-resina suele ser sensible a condiciones ácidas. Sin embargo, el uso de trifósgeno para generar un cloruro de ácido *in situ* para realizar acoplamientos en fase sólida se encuentra reportado.⁷

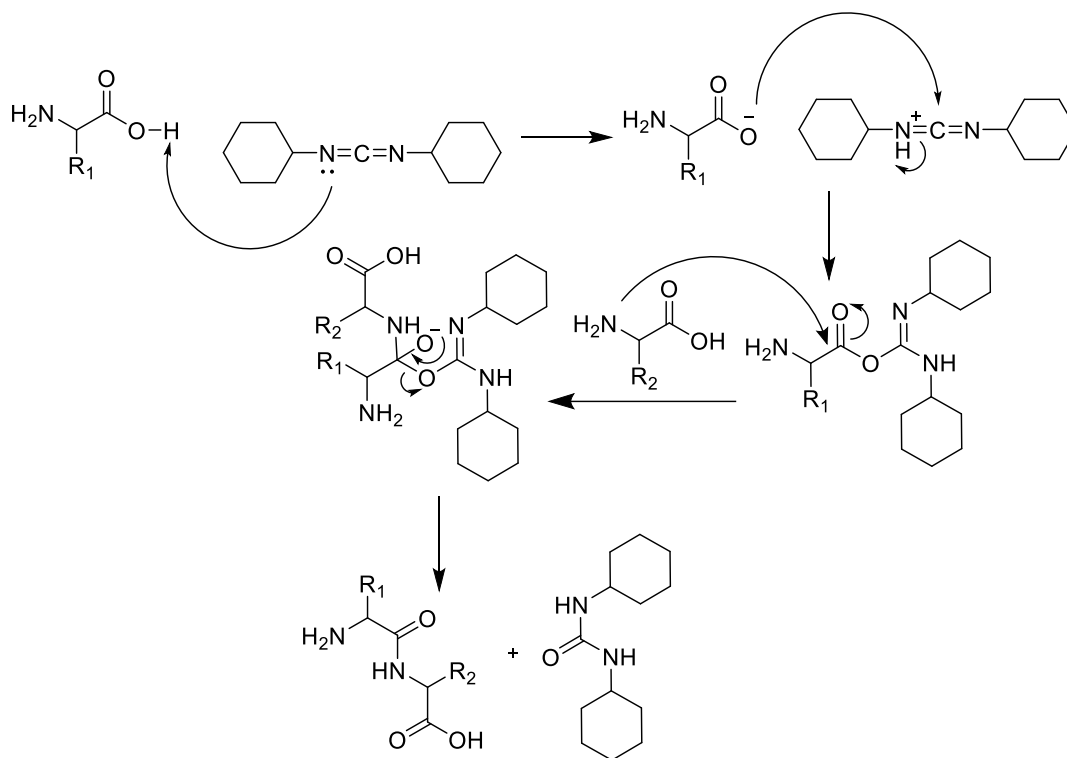
Otra desventaja importante del uso de cloruros de ácido se encuentra en la posibilidad de racemización, a través del mecanismo descrito en el **esquema 3.2**.

Carbodiimidias

La dicitlohexilcarbodiimida (DCC) fue utilizada por Merrifield como el agente acoplante más popular y simple. La reacción se llevaba a cabo en DCM o DMF. La dicitlohexilurea, formada como producto secundario de la DCC, es poco soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos. Esto hace que la DCC sea muy utilizada en solución, pero que no sea apropiada para SPPS. En fase sólida, es reemplazada por DIC (diisopropilcarbodiimida) ya que la urea que genera como producto secundario es soluble.

⁷ Falb, E.; Yechezkel, T.; Salitra, Y.; Gilon, C. *J. Peptide Res.*, **1999**, *53*, 507.

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



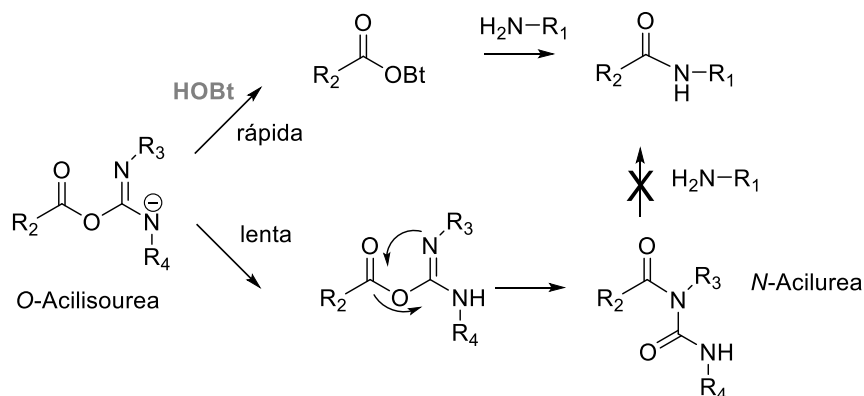
Esquema 3.3. Mecanismo de acoplamiento utilizando DCC

La principal desventaja de las carbodiimidas como agentes acoplantes es la posibilidad de racemización. Esto ocurre ya que, luego de que se da la activación, puede producirse la enolización y consecuente ciclación para la formación de una oxazolona⁸ (Esquema 3.2.) También puede darse la transferencia de acilo formando una N-acilurea no reactiva (esquema 3.4.), perdiéndose de esta forma el aminoácido activado. Esta reacción secundaria puede ser disminuida considerablemente por agregado de aditivos, tales como 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), que reaccionan más rápidamente que lo que tarda en ocurrir la transferencia de acilo, y forma un intermediario (benzotriazol éster) lo suficientemente activo para que se produzca el acoplamiento a la amina.⁹

⁸ Benoiton, N.L. *Biopolymers(Petide Science)* **1996**, *40*, 245.

⁹ El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557.

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



Esquema 3.4. Aditivos en acoplamientos con carbodiimidas para evitar la formación de N-acilureas.

Ésteres activos

Varios ésteres han sido estudiados para la formación de especies activas. La mayoría de los ésteres activos se basan en N-hidroxilaminas como grupos salientes, por ejemplo, triazoles, benzotriazoles y succinimidas, o en fenoles atractores de electrones capaces de aumentar la electrofilia del carbono carbonílico. Se utilizan tanto como agentes acoplantes en sí mismos, o como aditivos. En particular, los ésteres de pentafluorofenol (OPfp) han resultado de gran aplicación en SPPS. Son agentes acilantes eficientes y generalmente no producen racemización.

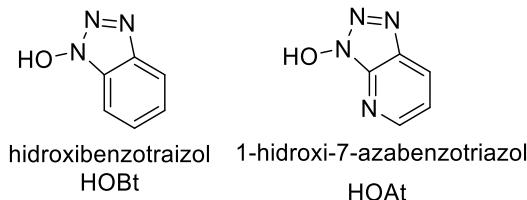


Figura 3.2. Estructura de benzotriazoles más utilizados.

La principal desventaja de los derivados de benzotriazoles, es que algunos de ellos son considerados explosivos de clase 1, ya que presentan descomposición autocatalítica. Esto los convierte en reactivos de difícil manejo durante su almacenamiento y transporte.¹⁰

Derivados de benzotriazoles

Posteriormente, las sales de fosfonio y uronio de benzotriazoles tales como PyBOP, HATU, HCTU y HBTU, ganaron popularidad por su gran eficiencia y capacidad para suprimir la racemización. Las sales de fosfonio presentan mayor solubilidad en DMF que las sales de uronio, pero son menos utilizadas debido a que las reacciones de acoplamiento utilizando estos agentes son más lentas que

¹⁰ Wehrstedt, K. D.; Wandrey, P. A.; Heitkamp, D. J. *Hazard. Mater.* **2005**, A126, 1.

con las sales de uronio, en particular si se trata de un acoplamiento a un N- metil aminoácido. Por otra parte, las sales de fosfonio presentan menor estabilidad en solución, lo que las hace menos atractivas para su uso en sistemas automatizados de SPPS.

Oximas

Las oximas son un grupo de compuestos de estructura $RR'C=NOH$, que recientemente han emergido como aditivos o agentes acoplantes en el área de síntesis de péptidos.^{11,12} En 2009, se demostró que OxymaPure® (etil ciano(hidroxiimino)acetato) es capaz de superar los rendimientos obtenidos con reactivos basados en benzotriazoles, además de ocasionar menor racemización y no presentar riesgos de explosión. Entre las aplicaciones de oxyma se encuentran el acoplamiento de aminoácidos en solución, al utilizarse en conjunto con EDCI, en fase sólida junto a DIC,¹³ y en la protección de aminoácidos, al utilizarse para generar Fmoc-oxima que se utiliza para proteger grupos amino con Fmoc¹⁴.

El interés generado por este tipo de reactivos llevó al desarrollo de sales de uronio basadas en oxyma tales como COMU (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi dimetilamino-morfolinocarbenio hexafluorofosfato). Este reactivo presenta varias ventajas frente a las sales de uronio basadas en benzotriazoles: su solubilidad es mayor, presenta menos probabilidad de racemización, elevados rendimientos, y facilita el work up de las reacciones de acoplamiento en las que se utiliza. Sin embargo, presenta mala estabilidad a la hidrólisis en DMF.

Recientemente, la American Chemical Society (ACS) Green Chemistry Institute Pharmaceutical Roundtable (GCIPR) describió a OxymaPure y COMU junto con TFFH (Tetrametilfluoroformamidinio hexafluorofosfato) y T3P (anhidrido propilfosfónico) como los agentes acoplantes más verdes.¹⁵

Monitoreo de reacciones en SPPS

Monitorear cada etapa de acoplamiento es crítico para el éxito de la síntesis de un péptido. Diferentes tests colorimétricos han sido desarrollados para lograrlo de una manera rápida. El test de Kaiser es de los más utilizados. Detecta cualitativamente la presencia o ausencia de grupos amino

¹¹ Rao Manne, S.; de la Torre, B. G.; El-Faham, A.; Albericio F. *Synthesis* **2020**, 52(21) 3189.

¹² Subirós-Funosas, R.; Khattab, S. N.; Nieto-Rodríguez, L.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Aldrichimica Acta* **2013**, 46, 21.

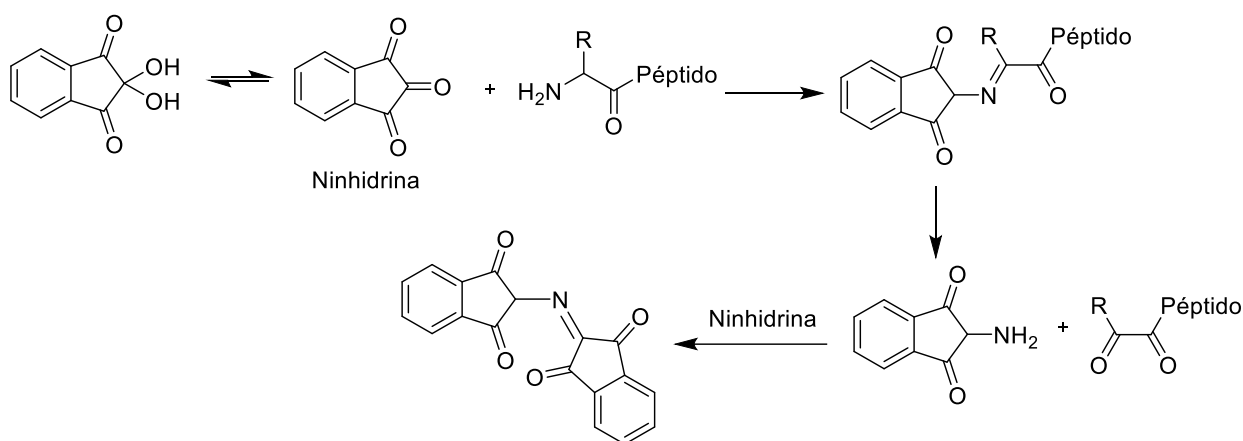
¹³ Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 9394.

¹⁴ Khattab, S. N.; Subirós-Funosas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3275.

¹⁵ Isidro-Llobet, A.; Kenworthy, M. N.; Mukherjee, S.; Kopach, M.E.; Wegner, K.; Gallou, F.; Smith, A. G.; Roschangar, F. *J. Org. Chem.* **2019**, 84, 4615.

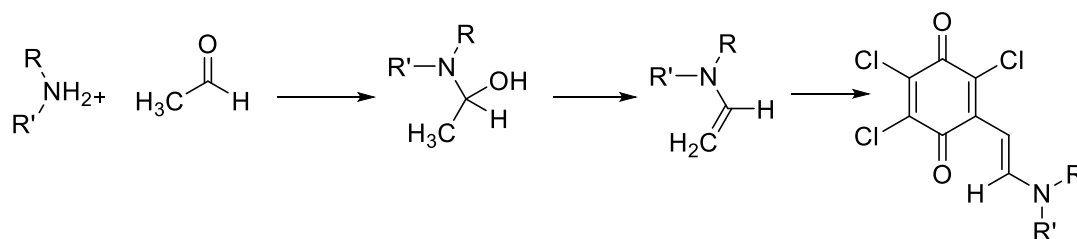
3. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

primarios libres, **Esquema 3.5**. El test se basa en la reacción de ninhidrina con aminas primarias, el cual da un color azul oscuro característico.



Esquema 3.5. Detección de aminas primarias libres mediante test de Kaiser.

Para determinar la presencia de aminas secundarias, el test de Cloranil es el más adecuado (**Esquema 3.6.**). El test es positivo a la presencia de aminas secundarias libres si hay desarrollo de color marrón, rojo o naranja dependiendo de la amina.



Esquema 3.6. Detección de aminas secundarias libres mediante test de cloranil.

Estos test requieren cantidades mínimas de analito y se realizan en unos pocos minutos

Ciclación de péptidos en solución

A pesar de las ventajas que poseen los ciclopéptidos en comparación con sus precursores lineales, representan un desafío interesante para la química sintética.

La formación de ciclopéptidos encontrados en la naturaleza, generalmente involucra la reacción de dos grupos reactivos mediante lactamización, lactonización, tiolactonización o formación de puentes disulfuro. Según el sitio en el que se encuentren esos dos grupos reactivos dentro del péptido, existen 4 formas en las que puede ciclarse: cabeza a cola (de C- terminal a N- terminal), cabeza a cadena lateral, cadena lateral a cola, o de una cadena lateral a otra (**figura 3.3**).

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

Muchos ciclopeptidos naturales se encuentran ciclados en forma cabeza a cola. La ausencia de extremos N y C terminal libres, le da a este tipo de ciclopeptidos resistencia a la hidrólisis por parte de exopeptidasas, lo cual aumenta su estabilidad metabólica aún más con respecto a otros tipos de ciclopeptidos.

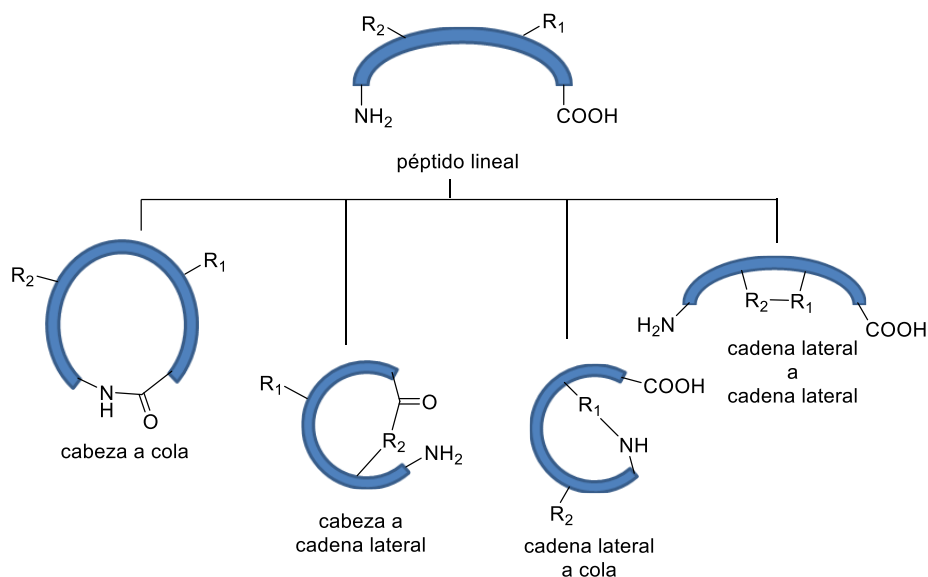


Figura 3.3. clasificación de ciclopeptidos.

Los desafíos relacionados a la síntesis de este tipo de ciclopeptidos están presentes en varios aspectos. Cuando el extremo C terminal está ocupado por cualquier aminoácido que no sea glicina o prolina, existe la posibilidad de epimerización en el sitio de ciclación.¹⁶ Además, pueden ocurrir oligo- o polimerizaciones relacionadas a la prevalencia de la reacción intermolecular frente a la intramolecular. Debido a esto, las macrociclaciones suelen llevarse a cabo bajo condiciones de elevada dilución (típicamente concentraciones submilimolares o bajo milimolar) para minimizar procesos no deseados de polimerización, y generalmente los rendimientos obtenidos son bajos.

El tamaño del ciclo es uno de los factores más importantes que gobierna el éxito de una macrociclación de tipo cabeza-cola. Las dificultades asociadas a su síntesis aumentan al disminuir el tamaño del ciclo. En general, los ciclos de tamaño intermedio (9 a 12 átomos) son más difíciles de obtener que ciclos pequeños (5-7 átomos) o de mayor tamaño (>12 átomos) debido a efectos estéricos. Por lo tanto, los ciclotetrapéptidos compuestos por α aminoácidos son particularmente difíciles de obtener en buenos rendimientos,¹⁷ mientras que los péptidos conteniendo siete aminoácidos o más son fáciles de ciclar.

¹⁶ Kemp, D. S.; Rebek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5792.

¹⁷ Sarojini, V.; Cameron, A. J.; Varnava, K. G.; Denny, W.A.; Sanjayan, G. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 17, 10318.

Para que ocurra la macrociclación el péptido debe preorganizarse en una conformación tal que sus extremos se encuentren próximos en el espacio. Cuando todos los aminoácidos que componen el péptido poseen la misma configuración, D o L, las conformaciones extendidas se ven favorecidas. De la misma forma, los precursores lineales sin ningún elemento inductor de giro tienden a adoptar una conformación extendida debido a que la configuración *trans* del enlace amida es más estable, como resultado los extremos C y N terminal del péptido se encuentran lejos entre sí, por lo cual es menos probable que reaccionen. Para favorecer las conformaciones en las cuales los extremos se encuentren próximos, es fundamental tomar en cuenta algunos aspectos al momento de realizar la desconexión del anillo para elegir el péptido lineal precursor. Por ejemplo, el rendimiento de la ciclación puede optimizarse si el sitio de macrociclación no se encuentra impedido estéricamente por N-alkil aminoácidos, aminoácidos α,α -disustituidos, o β -ramificados (Val o Ile). También puede favorecerse si la macrociclación ocurre entre dos residuos de configuración opuesta, o por incorporación de elementos estructurales inductores de giro ubicados entre medio de los extremos en el precursor lineal.¹⁸

La introducción de enlaces amida de configuración *cis* en el medio de la cadena peptídica, es decir formar un motivo similar a un giro β , puede disminuir las distancias entre los extremos. La prolina es un aminoácido capaz de inducir este tipo de giros. Los aminoácidos N metilados y los heterociclos derivados de serina o cisteína (oxazolidinas o tiazolidinas) tienen un impacto similar en la conformación del péptido. A estos últimos se los ha denominado “pseudo prolinas” por inducir principalmente una conformación *cis* en el enlace amida. Una característica interesante es la posibilidad de ser clivados bajo condiciones ácidas luego de la ciclación para liberar la serina, treonina o cisteína correspondiente. Sin embargo, presentan como desventaja que son muy difíciles de acilar debido a su impedimento estérico.

En resumen, la secuencia del péptido, el tamaño del ciclo, la configuración de los aminoácidos constituyentes, N-alkilación, la presencia de prolina u otros inductores de giro en la estructura del péptido lineal son factores determinantes en el resultado de las reacciones de ciclación, así como los agentes acoplantes escogidos y las condiciones de reacción.¹⁹

3.2. Resultados y discusión

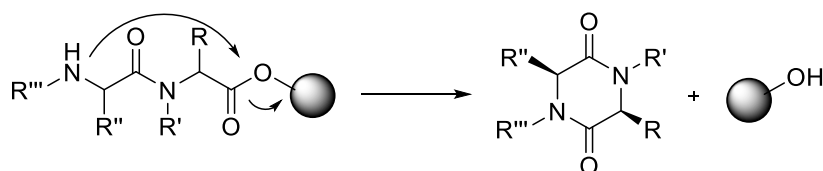
La metodología utilizada para la síntesis de los ciclopéptidos de interés, fue la síntesis en fase sólida de los péptidos precursores sobre la resina 2-clorotritilo (2-CTC), utilizando Fmoc como grupo

¹⁸ Daidone, I.; Neuweiler, H.; Doose, S.; Sauer, M.; Smith, J. C. *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6*, 276.

¹⁹ White, C. J.; Yudin, A. K. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 509.

protector. La síntesis en fase sólida de péptidos conteniendo prolina o N-metil aminoácidos, como en este caso, presenta una dificultad adicional debido a la facilidad con la que ciclan para formar dicetopiperazinas (**Esquema 3.7.**). Esto ocurre durante la desprotección del segundo aminoácido, y no solamente disminuye el rendimiento del péptido deseado por escindirse de la resina, sino que además posibilita la formación de secuencias truncadas, al ser posible la acilación posterior de los sitios activos de la resina que quedan libres. La resina 2-CTC es el soporte de elección en este tipo de casos ya que minimiza la formación de dicetopiperazina debido al gran tamaño del grupo tritilo.²⁰ Por otra parte, esta posible reacción secundaria es uno de los factores a tener en cuenta durante la elección de la secuencia del péptido lineal.

Se utilizó el procedimiento general descrito en la **parte experimental** del presente capítulo. Todas las reacciones de acoplamiento fueron monitoreadas mediante test colorimétricos: Kaiser en el caso de acoplamientos a aminas primarias y Cloranil para aminas secundarias. Se utilizó como agente acoplante HBTU, excepto en los casos en que la formación del enlace peptídico involucra un N- metil aminoácido, donde se utiliza HATU. Luego de escindirlos de la resina 2-CTC utilizando ácido trifluoroacético (TFA) al 1% en diclorometano, la pureza de cada péptido se determinó mediante HPLC. En una etapa posterior se ciclaron estos precursores lineales en solución.



Esquema 3.7. Formación de dicetopiperazina

3.2.1 Síntesis de Versicotide D

Para la obtención del ciclotetrapéptido Versicotide D (**esquema 3.8.**) se tomaron en cuenta los factores discutidos anteriormente durante la desconexión del anillo y selección de la secuencia del péptido lineal precursor. Se eligió NMe-L-Phe como extremo C terminal para anclar a la resina, ya que de esta forma se requiere solo un equivalente de este aminoácido. A su vez, con esta desconexión se evitan los N-metil aminoácidos, que presentan inconvenientes como punto para realizar la ciclación debido a su impedimento estérico, en el extremo N terminal. También se tomó en consideración evitar

²⁰ Barlos, K.; Gatos, D.; Schäfer, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 590.

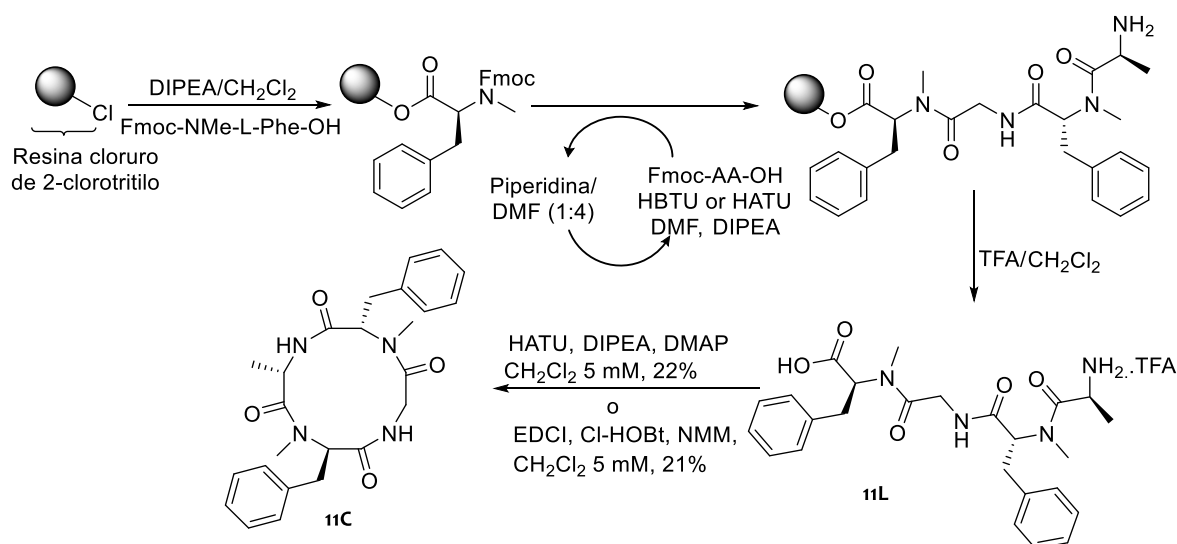
3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macro lactamización en solución.

elegir una secuencia que pudiera favorecer la formación de dicetopiperazina. En particular, se evitó colocar un NMe-AA como segundo aminoácido.

Como se explicó en el capítulo 2, NMe-L-Phe fue sintetizado a partir de Fmoc-L-Phe-OH y formaldehído. El aminoácido así obtenido se utilizó en la síntesis del precursor lineal de Versicotide D: **NH₂Ala-NMe-D-Phe-Gly-NMe-L-Phe (11L)**, que se realizó inicialmente en una escala de 100 mg. Posteriormente se repite la síntesis del péptido en mayor escala con el aminoácido comercial. Mediante ¹H-RMN y HPLC no se detectaron diferencias con el péptido obtenido previamente, verificando que no hubo racemización durante el proceso de metilación de NMe-L-Phe.

Mediante esta metodología, la sal de trifluoroacetato de **11 L** se obtuvo con buenos rendimientos (89%) y pureza (94%).

Si bien se estudiaron dos condiciones diferentes de macro ciclación; utilizando HATU/DIPEA/DMAP o EDCI, Cl-HOBT, NMM, el compuesto se obtuvo luego de dos días, con rendimientos similares, 22% y 21%. No se observó racemización en ninguno de los dos casos.



Esquema 3.8. Esquema de síntesis de Versicotide D

Los datos espectroscópicos del Versicotide D sintetizado concuerdan con los reportados para el producto natural. Sin embargo, si comparamos los espectros en DMSO-d₆ y CDCl₃ del Versicotide D sintetizado, podemos notar que en el espectro de ¹H-NMR en CDCl₃ la resolución es mejor que para el de DMSO-d₆. Como el DMSO es un fuerte formador de enlaces de hidrógeno, las señales de NH en este solvente se mueven a campos menores (δ : 7.82 y 7.59 ppm). Por el contrario, en CDCl₃ los grupos NH de glicina y alanina se observan en δ : 6.80 y 7.44 ppm respectivamente. Las señales de los grupos NMe de D-Phe y L-Phe se asignaron tomando en cuenta la correlación observada por HMBC con el

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

carbonilo de Alanina y Glicina respectivamente. De acuerdo con esto, los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C de dichos metilos son δ 2.14 y 29.1 ppm para NMe-D-Phe y δ 3.13. y 30.1 ppm para NMe-L-Phe. Como la resonancia de los conformeros *cis* (*syn* al grupo carbonilo) se da a campos mayores en relación a los conformeros *trans* debido al efecto de blindaje del grupo carbonilo,^{21,22} los resultados obtenidos podrían indicar una conformación *cis* del NMe de la NMe-D-Phe con el carbonilo de Ala y *trans* para el NMe de NMe-L-Phe con el carbonilo de Gly.

3.2.2 Síntesis de ciclotetrapéptidos análogos a productos naturales

Se sintetizó una serie de tetrapéptidos análogos utilizando la misma metodología en fase sólida que para el precursor lineal de Versicotide D. En la **tabla 3.3** se muestra la secuencia de dichos péptidos, así como el rendimiento global de su síntesis y la pureza del crudo. Las modificaciones realizadas se seleccionaron con el objetivo de estudiar variaciones en la posición relativa de los N-metilos en la secuencia (compuestos **12** y **13**) y sustitución de aminoácidos por otros de mayor polaridad (**14-16**).

Referencia	Secuencia	Rendimiento (%)	Pureza (%)
12L	NHMe-D-Phe-Ala-Phe-NMeGly-OH	99	99
13L	NHMeAla-Phe-NMePhe-Gly-OH	97	98.5
14L	NHMeAla-Tyr(O ^t Bu)-Gly-NMe-D-Phe-OH	85	88.5
15L	NH ₂ -Thr(O ^t Bu)-NMeGly-Phe-NMeGly-OH	90	93.7
16L	NHPhe-NMeGly-Cys(Bn)-NMeGly-OH	75	78.6

Tabla 3.3. Tetrapéptidos sintetizados mediante SPPS. Rendimiento determinado en base a la carga calculada por espectrometría del aducto dibenzofulveno-piperidina del primer aminoácido anclado y pureza determinada por HPLC.

En la mayoría de los casos se eligió Gly o NMeGly como extremo C-terminal ya que la presencia de este aminoácido no quiral en esta posición resulta conveniente para evitar la posibilidad de racemización durante la etapa posterior de macrolactamización. Además, se observó que es posible alcanzar una carga de resina mayor con este aminoácido que utilizando aminoácidos α -sustituídos, tratando la resina durante hora con 2 equivalentes del aminoácido y DIPEA. Además, como medida para evitar la posibilidad de formación de dicetopiperazina dada por la presencia de un N-metil

²¹ Dorman, D. E.; Bovey, F. A. *J. Org. Chem.* 1973, **38**, 1719

²² Quintanilla-Licea, R.; Colunga-Valladares, J.F.; Caballero-Quintero, A.; Rodríguez-Padilla, C.; Tamez-Guerra, R.; Gómez-Flores, R.; Waksman, N. *Molecules* **2002**, *7*, 662.

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

aminoácido en esta posición se redujeron los tiempos de desprotección del segundo aminoácido a un único tratamiento de 5 minutos con piperidina/DMF.

En el caso del péptido **14L**, se eligió el aminoácido de mayor costo como extremo C terminal (NMe-D-Phe), al requerirse menor cantidad del mismo para esta etapa.

La metodología empleada permitió la obtención de tetrapéptidos lineales conteniendo aminoácidos N-Metilados con buenos rendimientos y pureza y de forma rápida, pudiéndose llevar a cabo la síntesis de un tetrapéptido en un día de trabajo luego de la selección de las condiciones más adecuadas, dependiendo de los aminoácidos a acoplar.

Posteriormente se realizó la ciclación en solución de estos péptidos, mediante lactamización “cabeza-a- cola”, utilizando una dilución de 5mM del mismo para favorecer la reacción intramolecular, como se explicó anteriormente.

Si bien HATU demostró ser un agente acoplante eficiente para la formación de enlaces amida involucrando N-metil aminoácidos tanto en fase sólida como en solución, éste genera tetrametilurea como producto secundario. Esto representa una desventaja para su utilización como agente acoplante durante la etapa de macrociclación, ya que el macrociclo obtenido puede ser difícil de purificar. Se estudiaron otras alternativas en cuanto a agentes acoplantes, para evitar la formación de mezclas de reacción difíciles de purificar y buscando mejorar los rendimientos obtenidos. Además de la combinación de Cl-HOBT y EDCI estudiada para la obtención de Versicotide D, se decidió ensayar la sustitución de Cl-HOBT por oxima, ya que se ha reportado la obtención de mejores resultados con este aditivo que con derivados de benzotriazoles.¹²

Referencia	Secuencia	Agente acoplante	Rendimiento(%)	Tiempo de reacción
12C	<i>Ciclo</i> -[NMe-D-Phe-Ala-Phe-NMeGly]	HATU	17	24 hs
13C	<i>Ciclo</i> -[NMeAla-Phe-NMePhe-Gly]	HATU	86	72 hs
14C	<i>Ciclo</i> -[NMeAla-Tyr(O ^t Bu)-Gly-NMe-D-Phe]	HATU	32	72 hs
15C	<i>Ciclo</i> -[Thr(O ^t Bu)-NMeGly-Phe-NMeGly]	Oxima/EDCI	45	72 hs
16C	<i>Ciclo</i> -[Phe-NMeGly-Cys(Bn)-NMeGly]	Oxima/EDCI	54	48 hs

Tabla 3.4. Macrociclación en solución de los tetrapéptidos lineales **12L-16L**.

Como puede observarse, parece ser que el rendimiento de la reacción depende más de la secuencia y disposición de los N Metilos, y por lo tanto de la disposición espacial del péptido en

3. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

solución, que del agente acoplante utilizado. Los mejores rendimientos fueron para los péptidos que contienen un NMe- aminoácido en posición 2 ó 3 del tetrapéptido.

La purificación de los macrociclos obtenidos con Oxima/EDCI resultó más sencilla que con HATU/HBTU ya que todos los productos secundarios de la reacción presentan diferencias significativas de polaridad con los macrociclos.

15C fue posteriormente desprotegido con HCl/dioxano 4M para dar **15D**: *Ciclo*-[Thr(OH)-NMeGly-Phe-NMeGly].

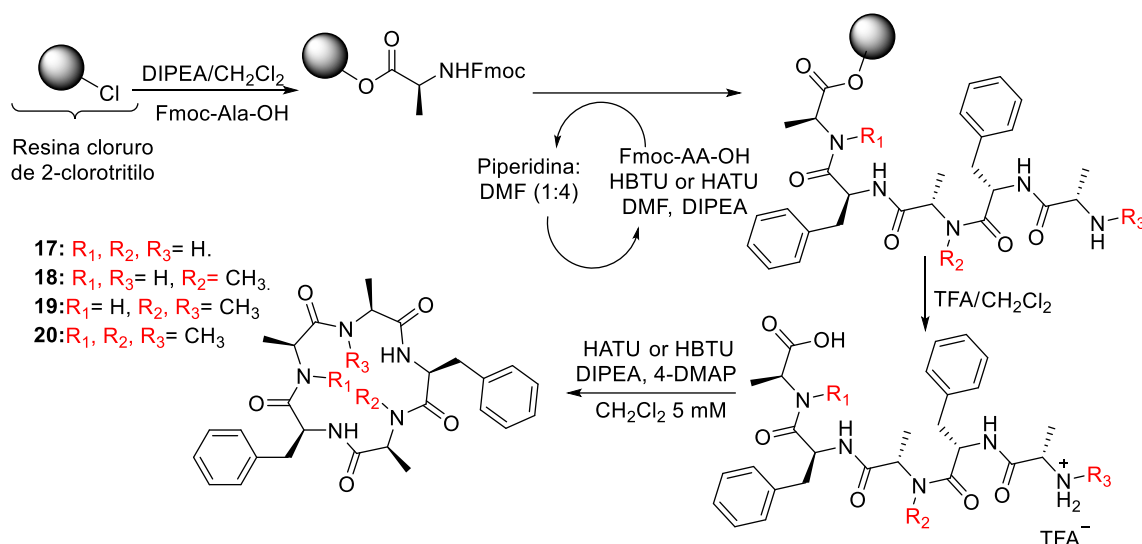
3.2.3. Síntesis de ciclopentapéptidos análogos a productos naturales

Se propone como objetivo en esta etapa, la preparación de ciclopentapéptidos análogos a Versicotides A, B, E y F. En primer lugar, se seleccionaron análogos conteniendo el aminoácido aromático fenilalanina en lugar de ácido *o*-aminobenzoico. Esta modificación se fundamenta en el interés por estudiar la actividad biológica de compuestos que cuenten con propiedades similares a los productos naturales en cuanto a propiedades fisicoquímicas, pero que carezcan de las dificultades sintéticas derivadas de la presencia del ácido antranílico. Por otra parte, esta sustitución de dos β -aminoácidos por dos α -aminoácidos ocasiona una disminución en el tamaño del ciclopéptido de 17 a 15 átomos lo cual puede afectar tanto la actividad biológica como la síntesis, en particular en la etapa de ciclación.

Con la finalidad de estudiar la influencia del número de N-metil aminoácidos sobre la actividad biológica se preparó una serie de 4 análogos variando el número de NMe-Ala de 0 a 3 (**Esquema 3.9.**).

Las secuencias lineales fueron elegidas en base a la estructura de los Versicotides A y B, y la mayoría de ellos fueron comenzados por el aminoácido Ala en el extremo C-terminal, de manera de reducir el impedimento estérico del mismo durante la macrociclación. Como agente acoplante se utilizó HBTU en la mayoría de los casos. HATU resultó más efectivo para los acoplamientos luego de un residuo de NMe-Ala.

3. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macro lactamización en solución.



Esquema 3.9. Síntesis de ciclopentapéptidos conteniendo fenilalanina.

Compuesto Nº	Secuencia	R (%)	
		Péptido lineal (L)	Ciclopéptido (C)
17	NH ₂ Ala-Phe-Ala-Phe-Ala	87	21
18	NH ₂ Ala-Phe-NMeAla-Phe-Ala	92	28
19	NHMeAla-Phe-NMeAla-Phe-Ala	99	23
20	NHMeAla-Phe-NMeAla-Phe-NMeAla	100	24

Tabla 3.5. Rendimientos en la obtención de pentapéptidos y ciclopentapéptidos 17-20.

Al igual que en la sección anterior, todas las reacciones de acoplamiento fueron monitoreadas utilizando test de Kaiser o cloranil.²³ Luego de escindirlos de la resina 2-CTC utilizando ácido trifluoroacético (TFA) al 1% en diclorometano, la pureza de cada péptido se determinó mediante HPLC. Los pentapéptidos lineales se obtuvieron con rendimientos globales de 85-95%, calculados teniendo en cuenta la carga inicial de la resina y la pureza del péptido.

Posteriormente se realizó la macro ciclación en solución, en concentraciones de 5 mM del péptido lineal, y utilizando HBTU o HATU como agente acoplante dependiendo si el grupo amino libre correspondía a Ala o NMeAla. Luego de 2-3 días de reacción, la purificación de los productos finales se llevó a cabo mediante cromatografía flash. De esta forma se obtuvo la serie de compuestos 17-20 con rendimientos entre 20 y 30%, siendo el compuesto 18, que presenta solo un NMe para el que se obtuvo un mayor rendimiento. En el resto de los casos, los resultados indican que no hubo diferencias

²³ Maharani, R.; Brownlee, R.T.C.; Hughes, A.B.; Abbott, B.M. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 2351.

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

significativas durante la macrociclación entre los péptidos sin NMe y con dos o tres NMeAla. Los ciclopeptidos obtenidos fueron caracterizados mediante RMN y HPLC-MS.

Por otra parte, se sintetizó otra serie de análogos en la cual se buscó introducir aminoácidos que contengan grupos funcionales polares en sus cadenas laterales. En la **tabla 3.6.** se muestra la secuencia de los péptidos lineales sintetizados mediante SPPS sobre la resina 2-CTC y sus respectivos rendimientos globales y pureza.

Referencia	Secuencia	Rendimiento (%)	Pureza (%)
21L	NH ₂ -Ala-Tyr(O ^t Bu)-Ala-Tyr(O ^t Bu)-Ala-OH	92	81.4
22L	NH ₂ Ala-NMeAla-Leu-Phe-NMeGly-OH	81	83.1
23L	NH ₂ Ala-NMeAla-Ser(O ^t Bu)-Phe-NMeGly-OH	93	93.4
24L	NH ₂ Ala-NMeAla-Lys(Boc)-Phe-NMeGly-OH	92	86.7

Tabla 3.6. SPPS de péptidos 21L-24L.

La macrociclación de estos péptidos lineales se realizó en solución utilizando HATU u oxima como se muestra en la **Tabla 3.7.**

Referencia	Secuencia	Agente acoplante	Rendimiento (%)
21C	<i>Cyclo</i> -[Ala-Tyr(O ^t Bu)-Ala-Tyr(O ^t Bu)-Ala]	HBTU	--
22C	<i>Cyclo</i> -[Ala-NMeAla-Leu-Phe-NMeGly]	Oxima/EDCI	50
23C	<i>Cyclo</i> -[Ala-NMeAla-Ser(O ^t Bu)-Phe-NMeGly]	Oxima/EDCI	32
24C	<i>Cyclo</i> -[Ala-NMeAla-Lys(Boc)-Phe-NMeGly]	Oxima/EDCI	13

Tabla 3.7. Macrociclación de péptidos 21L-24L.

Si bien **21L** cuenta con una amina primaria en su extremo N terminal, por lo cual HBTU sería un agente acoplante adecuado, no fue posible encontrar el producto de macrociclación en este caso.

En vistas de los resultados comentados anteriormente con respecto al uso de oxima/EDCI en las reacciones de macrociclación, se continuó utilizando esta metodología para la ciclación de los péptidos restantes, obteniéndose rendimientos variados. Esto sugeriría nuevamente, que los rendimientos de las reacciones de ciclación dependen principalmente de la secuencia aminoacídica.

23C y **24C** fueron desprotegidos posteriormente utilizando HCl/dioxano 4M para obtener **23D** y **14D**.

3.2.4. Síntesis de ciclohexapéptido análogo al compuesto 37 (tesis de C.Fagundez)

En base a los resultados de actividad biológica frente a *P.falciparum* y *T.b.brucei* obtenidos como parte de la tesis doctoral de Catherine Fagúndez, nos propusimos sintetizar algunos ciclohexapéptidos análogos para profundizar en la relación estructura-actividad de los mismos. Entre las modificaciones propuestas se encuentran la sustitución de los grupos tritilo como grupos protectores de tioles por grupos bencilo (ver capítulo 5) y la variación en los sitios de N metilación. Con este último objetivo, se sintetizó el ciclohexapéptido **25C** en base a 37²⁴ (Figura 3.4.).

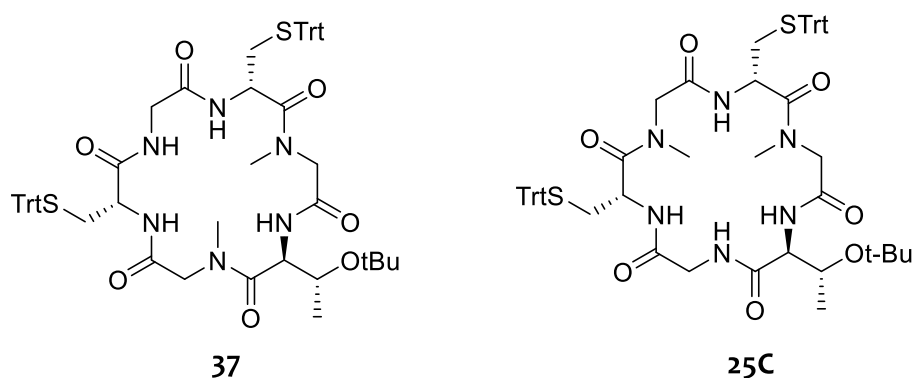


Figura 3.4. Estructura de 37 y 25C.

La síntesis se llevó a cabo mediante la metodología descrita anteriormente, por síntesis sobre la resina 2-CTC del precursor lineal **25L**: Cys(Trt)-NMe-Gly-Cys(Trt)-NMe-Gly-Thr(O-^tBu)-Gly y posterior ciclación en solución utilizando HATU.

25L se obtuvo con un 98% de rendimiento mientras que el macrociclo **25C** se obtuvo con un rendimiento del 76%. El elevado rendimiento de macrociclación en comparación con los ciclotetra y ciclopentapéptidos descritos anteriormente está en concordancia con lo discutido previamente respecto a que la facilidad para ciclar un péptido aumenta al aumentar el tamaño del ciclo. Además, es considerablemente mayor al obtenido para la macrociclación de CF37 (secuencia lineal: NMeGly-Thr(O-^tBu)-NMeGly-Cys(Trt)-Gly-Cys(Trt), rendimiento 42%), utilizando el mismo agente acoplante, evidenciando la influencia de la secuencia lineal y posición de N metilos sobre esta etapa.

3.3. Conclusiones

Se estudiaron metodologías de SPPS y macrociclación en solución que permitieron la obtención de 6 ciclotetrapéptidos, 7 ciclopentapéptidos y un ciclohexapéptido con rendimientos

²⁴ "Síntesis de Ciclopéptidos Análogos a Productos Naturales como Potenciales Antiparasitarios". Catherine Fagúndez. Tesis Doctoral **2018**, Facultad de Química, UdelaR.

moderados a buenos. A excepción del ciclohexapéptido **25C**, donde se usó HATU, se utilizó HBTU para la ciclación de péptidos sin NMe en su extremo N terminal, y HATU para la ciclación de péptidos con NMe. Posteriormente, en base a referencias bibliográficas y resultados que se discuten en el próximo capítulo, se decidió estudiar el empleo de oxima/EDCI para la ciclación de diferentes péptidos. Esto arrojó generalmente resultados comparables o mejores que para los agentes acoplantes anteriores, a la vez que genera crudos de reacción más fáciles de purificar.

Entre los ciclotetrapéptidos sintetizados se encuentra el producto natural Versicotide D. El conformero mayoritario de Versicotide D en CDCl_3 aparenta presentar una conformación *cis* (*syn* con respecto al carbonilo) en el grupo NMe de NMe-D-Phe y *trans* en el NMe de NMe-L-Phe.

Parte de los resultados obtenidos en este capítulo, incluyendo la síntesis del Versicotide D, fueron publicados²⁵ y se encuentran disponibles en el Anexo II.

²⁵ Posada, L.; Serra, G. *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60* (48), 151281.

3.4. Parte experimental

3.4.1. Métodos experimentales generales

Todas las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera inerte de nitrógeno y utilizando disolventes secos, recientemente destilados, bajo condiciones anhidras, a menos que se indique de otra forma. Todos los solventes fueron purificados de acuerdo a procedimientos descritos en la literatura.¹

Todos los rendimientos informados refieren a productos cromatográfica y espectroscópicamente puros (determinado mediante ¹H-RMN y ¹³C-RMN). Todos los espectros de RMN fueron registrados utilizando un equipo Bruker Advance NEO-400, Bruker Advance DPX- 400 o Bruker Advance III 500 MHz. Todos los desplazamientos químicos reportados son relativos TMS utilizado como referencia interna.

La resina Cloruro de 2-clorotritilo (2-CTC, 100-200 mesh, 1.1 mEq/g) fue adquirida de CHEM-IMPEX INT'L INC.

Todas las reacciones en fase solida fueron monitoreadas mediante test colorimétricos (Kaiser o Cloranil según corresponda), y mediante HPLC.

La pureza de los péptidos obtenidos utilizando la resina 2-CTC fue determinada utilizando un equipo de HPLC analítico Shimadzu (Bombas LC-10AT) equipado con una columna Phenomenex Luna C18 (150 x 4.6 mm, 5 μ m) ó Phenomenex Kinetex C18 (150 x 4.6 mm, 5 μ m) y detector UV/Vis SPD20A prominence, utilizando como fase móvil gradientes de acetonitrilo: agua con 0.003M TFA ó acetonitrilo: agua con 0.1% ácido fórmico. Los espectros de masas correspondientes a los productos obtenidos por ciclación en solución fueron adquiridos utilizando HPLC Agilent Infinity 1200 equipado con un detector ABSciex QTRAP 4500 híbrido (triple cuadrupolo con trampa lineal) e ionizador por electrospray.

¹ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", 3th Ed. Pergamon Press, Oxford, 1988.

3.4.2. Procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) sobre la resina 2-CTC.

a. Carga de la resina.

La resina cloruro de 2-clorotritilo (100-300 mesh, 1.20 mmol/g) se pesa en una jeringa de síntesis de péptidos provista de un filtro adecuado. Se hincha la resina por agregado del doble de su volumen de CH_2Cl_2 , se filtra y repite el procedimiento (3 x 5 min).

Se agregan a la resina una solución del primer amino ácido protegido, Fmoc-AA-OH (1 eq. para una carga de 0.8 mmol/g) y DIPEA (3 eq.) en CH_2Cl_2 y se agita en shaker durante 10 minutos. Luego se agregan 7.0 eq. adicionales de DIPEA y se continúa agitando durante 50 min. A la mezcla anterior se agrega MeOH (0.8 mL/ g of resina) para bloquear los sitios activos que hayan quedado sin reaccionar. Se continúa agitando durante 10 min. Después de filtrar, la resina se lava con CH_2Cl_2 (x3), MeOH (x3), CH_2Cl_2 (x3), DMF (x3).

b. Desprotección de Fmoc y cuantificación

Agregar una solución de piperidina-DMF (1:4) a la resina y agitar manualmente por un min. Remover a vacío y repetir los tratamientos con piperidina otras tres veces (la primera 1 min, y los siguientes dos veces 5 minutos cada una). Remover todos los solventes a vacío y lavar con DMF (3x1min) y CH_2Cl_2 (3x1min). En casos excepcionales, el paso de desprotección se llevó a cabo mediante un tratamiento único de la resina con la solución de piperidina en DMF durante 5 minutos, para prevenir reacciones secundarias.

Para cuantificar, todos los filtrados se recogen en un matraz aforado de 25.0 mL. Se enrasa con DMF y se agita para homogeneizar. Para 400 mg de resina y una carga de resina de 0.6 mmol/g, 200 μL de esta solución se transfieren a un matraz aforado de 10.0 mL. Se enrasa y homogeniza. Se mide la absorción UV a 290 nm. La carga de Fmoc se calcula teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción del aducto piperidina-dibenzofulveno a 290 nm es 5800 l/mol/cm.

c. Procedimiento general de elongación de la cadena peptídica

Luego de desproteger el grupo Fmoc lavar la resina con DMF (x3), CH_2Cl_2 (x3) y DMF (x3). Pesar 3 Eq. del aminoácido protegido con Fmoc y disolver en DMF. Agregar 6 Eq. de DIPEA a la solución del aminoácido. Por otra parte, disolver 2.9 Eq. de HBTU o HCTU (agente acoplante) en DMF. Agregar a la

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

resina primero la solución del aminoácido y luego la del agente acoplante. Agitar durante 1 hora o 1 hora media. Filtrar y lavar con DMF 3 veces. Hacer lavados con CH_2Cl_2 y MeOH intercalados (3 veces). Realizar la desprotección del NH-Fmoc y agregado del próximo aminoácido.

d. Escisión del péptido

Luego de la desprotección del último NHFmoc se lava la resina con DMF (X3), CH_2Cl_2 (x3), MeOH (x3) y CH_2Cl_2 (x3). Se trata la resina 3 veces con solución de TFA en DCM entre 1 y 5% por unos 3-5 minutos sucesivos. Se recoge el filtrado en un balón con abundante MeOH y se lava la resina con CH_2Cl_2 y MeOH intercalados.

3.4.3. Ensayos colorimétricos para monitorear finalización de acoplamientos

Test de Kaiser

Una vez finalizada la reacción de acoplamiento, y luego de lavar la resina con CH_2Cl_2 (x3), se transfiere una pequeña cantidad de resina a un Eppendorf. Se agregan 2 gotas de solución A, 2 gotas de solución B y 2 gotas de solución C. Se calienta a 100° por 3 minutos en un termobloque y se observa el desarrollo de color. Si la solución permanece amarilla significa que la reacción de acoplamiento se ha completado (resultado negativo para aminas primarias libres). Si se observa desarrollo de color azul, indica acoplamiento incompleto. En este caso se debe repetir la reacción antes de desproteger el NHFmoc.

Solución A. 250 mg de ninhidrina se disuelven en 5 mL de EtOH absoluto.

Solución B. 40 g de fenol se disuelven en 10 mL de EtOH absoluto.

Solución C. 0.5 mL de una solución 2mM de KCN (3.25 mg de KCN en 25 mL de agua destilada) se diluyen con 50 mL de piridina recientemente destilada.

Test de Cloranil

Una vez finalizada la reacción de acoplamiento, y luego de lavar la resina con CH_2Cl_2 (x3), se transfiere una pequeña cantidad de resina a un Eppendorf. Se agregan 2 gotas de cada una de las siguientes soluciones: 20 mg de p-cloranil en 10 mL de DMF, y acetaldehído al 2% en DMF. Se deja reaccionar durante 5 minutos y se observa el desarrollo de color. Una solución incolora significa que la reacción de acoplamiento se ha completado (resultado negativo para aminas secundarias libres). Si se observa desarrollo de color azul o verde, indica acoplamiento incompleto. En este caso se debe repetir la reacción

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

3.4.5. Procedimiento general de macrociclación en solución

a. Utilizando HATU o HBTU

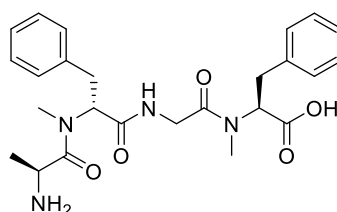
La sal de trifluoroacetato del péptido lineal correspondiente se disuelve en CH_2Cl_2 seco (1-5 mM) bajo atmósfera de nitrógeno. La solución se enfría a 0°C utilizando un baño de agua-hielo y se adicionan DIPEA (3 eq.), 4-DMAP (catalítico) y HBTU o HATU (1.5 eq.). La mezcla de reacción se agita a 0°C durante 10 minutos y luego se deja llegar a temperatura ambiente. Luego de 1-3 días la mezcla de reacción se evapora y el crudo se retoma en AcOEt. Se lava con HCl 5% y luego solución saturada de NaHCO_3 , y brine. Se seca con MgSO_4 , se filtra y concentra a vacío. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash para obtener el macrociclo deseado.

b. Utilizando Oxima y EDCI

La sal de trifluoroacetato del péptido lineal correspondiente se disuelve en CH_2Cl_2 seco (1-5 mM) bajo atmósfera de nitrógeno. La solución se enfría a 0°C utilizando un baño de agua-hielo y se adicionan DIPEA (1 eq.), oxima (1.5 eq) y EDCI (1.5 eq). La mezcla de reacción se agita a 0°C durante 10 minutos y luego se deja llegar a temperatura ambiente. Luego de 1-3 días la mezcla de reacción se evapora y el crudo se retoma en AcOEt. Se lava con HCl 5% y luego solución saturada de NaHCO_3 , y brine. Se seca con MgSO_4 , se filtra y concentra a vacío. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash para obtener el macrociclo deseado.

3.4.6. Caracterización de productos

Tetrapéptidos lineales



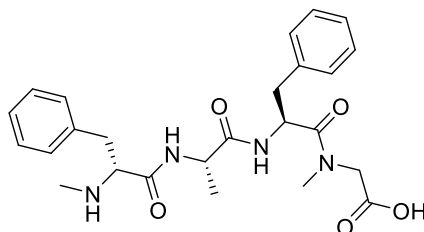
11L

La sal de trifluoroacetato de $\text{NH}_2\text{Ala-NMe-D-Phe-Gly-NMe-L-Phe-OH}$ (**11L**) se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, usando HATU/DIPEA para acoplar los Fmoc-AA-OH luego de NMe-Ala. Se obtuvieron 150 mg (89% de rendimiento) como sólido blanco. La pureza (94%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 10 a 100% acetonitrilo en $\text{H}_2\text{O}/0.003\text{M}$ durante 10 min; flujo = 1.5 mL/min; t_R = 6.03 min).

$\text{NH}_2\text{Ala-NMe-D-Phe-Gly-NMe-L-Phe-OH}$ (11L**):** sólido blanco (89%). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 0.99 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 2.56 (s, 3H), 2.93 (s, 3H), 2.95 – 3.06 (m, 1H), 3.08 – 3.26 (m, 2H), 3.61 - 3.78 (m, 3H),

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

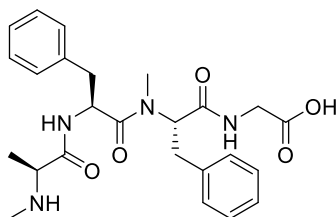
4.32 (dd, J = 16.9, 7.6 Hz, 1H), 4.46 (s, 1H), 5.68 (dd, J = 12.1, 5.0 Hz, 1H), 7.25 – 7.11 (m, 5H), 7.37 – 7.27 (m, 5H), 8.03 (s, 1H).). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 15.6, 30.9, 34.2, 34.4, 37.5, 40.9, 47.5, 58.3, 66.6, 126.9, 127.1, 128.6 (2C), 128.8 (2C), 128.9 (2C), 129.2 (2C), 136.5, 137.8, 169.8, 170.0, 172.1, 174.0.



12L

La sal de trifluoroacetato de NHMe-D-Phe-Ala-Phe-NMe-Gly-OH (**12L**) se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, usando HATU/DIPEA para acoplar los Fmoc-AA-OH luego de NMe-Gly. Se obtuvieron 90 mg (99% de rendimiento) como sólido blanco. La pureza (99%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 8 to 100% acetonitrilo en H_2O / 0.003M durante 10 min; flujo = 1.5 mL/min; t_R = 8.3 min).

NHMe-D-Phe-Ala-Phe-NMe-Gly-OH (12L): sólido blanco (R=99%). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 0.93 (d, J =7.2 Hz, 3H), 2.67 (s, 3H), 2.83 – 2.92 (m, 1H), 2.94 (s, 3H), 2.96 – 3.08 (m, 2H), 3.31 (dd, J = 13.1, 5.1 Hz, 1H), 3.39 (d, J = 17.2, 1H), 4.05 – 4.17 (m, 1H), 4.24 – 4.31 (m, 1H), 4.50 (d, J =17.2 Hz, 1H), 5.13 (q, J =7.8 Hz, 1H), 7.09 – 7.25 (m, 7H), 7.28 – 7.35 (m, 3H), 7.89 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H).)



13L

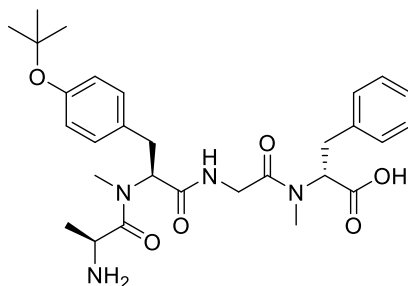
La sal de trifluoroacetato de NHMe-Ala-Phe-NMePhe-Gly-OH se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, usando HATU/DIPEA para acoplar los Fmoc-AA-OH luego de NMe-Ala. Se obtuvieron 410 mg (97 %) como un sólido blanco. La pureza (98.5 %) se determinó por HPLC (gradiente lineal 10 a 100% acetonitrilo en H_2O / 0.1% ácido fórmico, durante 10 min; flujo = 1.5 mL/min; t_R = 5.62 min).

NHMe-Ala-Phe-NMePhe-Gly-OH (13L): sólido blanco (R=97%). ^1H RMN (400 MHz, D_2O)

Confórmeros **a**, **b** en proporción 1:0.46

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

δ 1.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H_a), 1.35 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H_b), 1.83 (dd, $J = 14.2, 4.1$ Hz, 1H_b), 2.13 (s, 3H_b), 2.30 (s, 3H_a), 2.56 (dd, $J = 14.2, 11.1$ Hz, 1H_b), 2.78 – 2.89 (m, 2H_a), 2.98 (s, 3H_a), 2.99 (s, 3H_b), 3.00 – 3.10 (m, 2H_a + 1H_b), 3.29 (dd, $J = 14.4, 5.2$ Hz, 1H_a), 3.41 (dd, $J = 14.0, 3.8$ Hz, 1H_b), 3.62 – 3.73 (m, 1H_a + 1H_b), 3.94 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H_b), 3.98 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H_a), 4.64 (dd, $J = 11.0, 4.3$ Hz, 1H_b), 5.00 (dd, $J = 10.9, 3.9$ Hz, 1H_b), 5.06 (dd, $J = 9.3, 6.1$ Hz, 1H_a), 5.35 (dd, $J = 11.0, 5.3$ Hz, 1H_a), 7.03 (m, 2H_b), 7.23 - 7.35 (m, 10H_a+6H_b), 7.44 (m, 2H_b). ¹³C RMN (100 MHz, D₂O) δ 15.6 (C_b), 15.8 (C_a), 30.7 (C_b), 30.9 (C_b), 31.0 (C_a), 32.1 (C_a), 33.1 (C_a), 33.6 (C_b), 37.1 (C_a), 41.1 (C_a), 41.3 (C_b), 49.8 (C_b), 51.0 (C_a), 57.0 (C_a), 58.8 (C_a), 62.8 (C_b), 126.9, 127.3, 128.6 (2C), 128.8 (2C), 128.9 (2C), 129.3 (2C), 136.0, 136.6, 168.3 (C_a), 168.4 (C_b), 171.3 (C_b), 172.0 (C_a), 172.5 (C_a), 172.8 (C_b), 173.0 (C_a), 173.1 (C_b). ESI-MS m/z calc. for C₂₅H₃₃N₄O₅ ([M+H]⁺) 469.2, experimental 469.2.

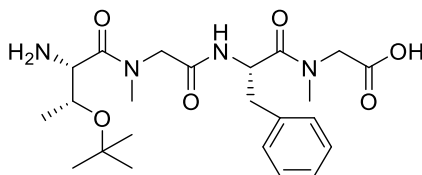


14L

La sal de trifluoroacetato de NHMeAla-Tyr(O^tBu)-Gly-NMe-D-Phe-OH se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, usando HATU/DIPEA para acoplar los Fmoc-AA-OH luego de NMe-Ala. Se obtuvieron 380 mg (85.4 %) como un sólido blanco. La pureza (88.5 %) se determinó por HPLC (gradiente lineal 10 a 100% acetonitrilo en H₂O/ 0.1% ácido fórmico durante 15 min; flujo = 1.5 mL/min; t_R = 5.1 min).

NHMeAla-Tyr(O^tBu)-Gly-NMe-D-Phe-OH (14L): sólido blanco (R=97%). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 1.28- 1.34 (s, 9H), 1.47 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 2.38 (s, 3H_a), 2.40 (s, 3H_b), 2.47 (s, 3H_c), 2.80 (s, 3H_a) 2.81 (s, 3H_b), 2.83-3.07 (m, 1H), 3.08 – 3.22 (m, 2H), 3.29 – 3.46 (m, 1H), 3.74 – 4.13 (m, 3H), 4.69 – 4.76 (m, 1H), 4.93 – 5.04 (m, 1H), 6.79 – 6.87 (m, 1H), 7.05 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.07 – 7.20 (m, 1H), 7.22 – 7.34 (m, 4H), 7.34- 7.44 (m, 3H). ¹³C RMN (100 MHz, (D₂O) δ (ppm) 15.6, 27.7 (3C), 30.9, 33.3, 33.5, 36.5, 40.9, 54.9, 57.2, 60.9, 80.9, 1247.7, 126.9, 128.2, 128.7 (2C), 129.0 (3C), 129.9, 130.5, 130.6, 137.2, 169.2, 170.1, 172.5, 173.9. ESI-MS m/z calc. for C₂₉H₄₁N₄O₄ ([M+H]⁺) 541.30, experimental 541.45.

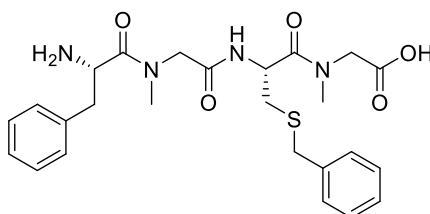
3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



15L

La sal de trifluoroacetato de $\text{NH}_2\text{-Thr(Boc)-NMeGly-Phe-NMeGly-OH}$ se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, usando HATU/DIPEA para acoplar los Fmoc-AA-OH luego de NMe-Ala. Se obtuvieron 232 mg (90 %) como un sólido blanco. La pureza (93.7%) se determinó por HPLC (gradiente lineal 10 a 100% acetonitrilo en H_2O / 0.1% ácido fórmico durante 15 min; flujo = 1.5 mL/min; t_R = 6.4 min).

$\text{NH}_2\text{-Thr(Boc)-NMeGly-Phe-NMeGly-OH}$ (15L): sólido blanco (R=90.1 %). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, D_2O) A, b: confórmicos. δ 1.06 (s, 9Hb), 1.09 (s, 9Ha), 1.12 (d, J = 6.5 Hz, 3Hb), 1.19 (d, J = 6.4 Hz, 3Ha), 2.65- 3.13 (m, 8H), 3.67 (d, J = 15.0 Hz, 1Hb), 3.76 (d, J = 16.7 Hz, 1Ha), 3.89 – 4.16 (m, 3H), 4.16 – 4.32 (m, 3H), 4.84-5.15 (m, 1H), 7.13- 7.33 (m, 5H). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, D_2O) δ 19.2 (Cb), 19.3 (Ca), 27.0 (3Cb), 27.0 (3Ca), 35.0 (Cb), 35.3 (Cb), 36.6 (Ca), 36.7(Ca), 37.0, 49.8, 50.2 (Ca), 50.6 (Cb), 51.1 (Ca+Cb), 51.8 (Cb), 55.2 (Cb), 55.3 (Ca), 65.8 (Ca), 76.4 (Ca), 76.5 (Cb), 76.5 (Ca), 127.2 (Ca+Cb), 128.7 (2Ca + 2Cb), 129.3 (2Cb), 129.4 (2Ca), 136.1 (Ca), 168.4 (Ca), 168.5 (Cb), 169.0 (Ca), 172.4 (Cb), 172.5 (Ca), 172.9 (Cb), 173.0 (Ca). **ESI-MS** m/z calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 465.27, experimental 465.35



16L

La sal de trifluoroacetato de $\text{NH}_2\text{-Phe-NMeGly-Cys(Bzl)-NMeGly-OH}$ se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, usando HATU/DIPEA para acoplar los Fmoc-AA-OH luego de NMe-Ala. Se obtuvieron 307 mg (74.7 %) como un sólido blanco. La pureza (78.6 %) se determinó por HPLC (gradiente lineal 10 a 100% acetonitrilo en H_2O / 0.1% ácido fórmico durante 15 min; flujo = 1.5 mL/min; t_R = 5.93 min).

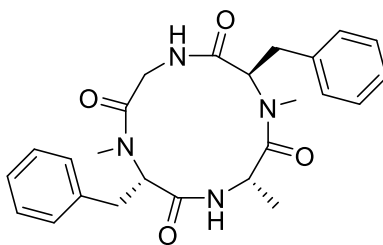
$\text{NH}_2\text{-Phe-NMeGly-Cys(Bzl)-NMeGly-OH}$ (16L): sólido blanco (R=95.1%). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, D_2O) δ 2.52 – 2.66 (m, 1H), 2.73 – 2.92 (m, 7 H), 2.98 – 3.18 (m, 2H), 3.53 – 4.19 (m, 6H), 4.40 – 4.55 (m, 1Ha), 4.47-4.52 (m, 1Ha), 4.63 – 4.69 (m, 1Hb), 4.72 – 4.77 (m, 1Hb), 7.11 – 7.39 (m, 10H). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, D_2O) δ 31.4-32.6 (1C), 35.0 – 35.2 (1C), 35.7 – 36.8 (3C), 49.1, 50.2 - 50.7 (1C), 51.7, 53.8, 120.7, 127.5, 128.1, 128.8, 128.9 (2C), 129.1, 129.2, 129.4, 129.6, 133.3, 138.2, 168.8 – 169.3 (1C), 169.6 –

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

169.8 (1C), 171.9 – 172.0 (1C), 172.2 – 172.3 (1C). **ESI-MS** m/z calc. for $C_{25}H_{33}N_4O_4S$ ($[M+H]^+$) 501.2, experimental 501.3.

Se observan confórmers a y b

Ciclotetrapéptidos

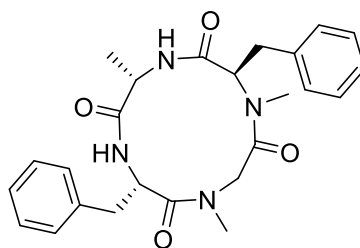


11C

La reacción de macrociclación en solución se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general dilución 5mM, 24 horas), partiendo de la sal de trifluoroacetato de 11L: NHMe-D-Phe-Ala-Phe-NMe-Gly-OH (100 mg, 0.17 mmol), usando HATU/DIPEA o EDCI/Cl-HOBt/NMM como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash rindió el macrociclo deseado **11C** (16.5 mg, 0.01 mmol, R=21%).

Ciclo-[Ala-NMe-D-Phe-Gly-NMe-L-Phe] (11C): Sólido blanco (21%). $R_f=0.6$ ($CHCl_3$: MeOH, 9:1). 1H **RMN (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 1.24 (d, $J=6.4$ Hz, 3 H), 2.14 (s, 3H), 2.60- 2.86 (m, 2H), 3.13 (s, 3H), 3.23- 3.42 (m, 2H), 3.51(dd, $J=17.2$, 1.8, 1H), 4.55 (dd, $J=17.2$, 8, 1H), 4.59-4.71 (m, 1 H), 5.46 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 5.72 (dd, $J=11.1$, 4.5, 1 H), 6.80 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.10-7.28 (m, 10H), 7.44 (d, $J=8.5$ Hz, 1 H). ^{13}C **RMN (100 MHz, $CDCl_3$)** δ 17.3, 29.1, 29.9, 32.3, 34.9, 40.6, 45.4, 56.3 (2C), 126.7, 127.1, 128.4 (2 C), 128.6 (2 C), 128.8 (2 C), 129.0 (2C), 135.9, 136.9, 167.9, 168.8, 169.5, 172.2. **ESI-MS** m/z calc. for $C_{25}H_{31}N_4O_4$ ($[M+H]^+$) 451.2, experimental 450.4.

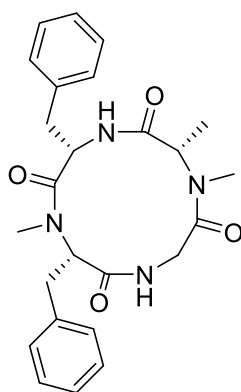
3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



12C

La reacción de macrociclación en solución se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general (dilución 5mM, 24 horas), partiendo de la sal de trifluoroacetato lineal 12L: NHMe-D-Phe-Ala-Phe-NMe-Gly-OH (40 mg, 0.07 mmol), usando HATU como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash rindió el macrociclo deseado 12C (5 mg, 0.01 mmol, R=17%).

Ciclo-[N-Me-D-Phe-Ala-Phe-NMe-Gly] (12C): Sólido blanco (17%). Rf=0.4 (AcOEt:EP, 3:2). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.14 (d, $J=5.8$ Hz, 3H), 2.98 (s, 3H), 2.95-3.08 (m, 3H), 3.10 (s, 3H), 3.23-3.37 (m, 2H), 4.39-4.60 (m, 3H), 5.41 (d, $J=14.5$ Hz, 1H), 7.16- 7.25 (m, 5H), 7.27-7.31 (m, 1H), 7.36-7.42 (m, 4H), 8.12 (s, 1H), 9.21 (s, 1H). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 16.6, 29.7, 30.8, 34.3, 36.1, 38.5, 45.3, 51.2, 54.7, 62.0, 127.0, 127.6, 128.32, 128.8, 128.9, 129.0, 129.1, 129.8, 136.1, 137.2, 169.3, 169.5, 172.0, 173.9. **ESI-MS** m/z calc. for $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 451.2, experimental 451.2.



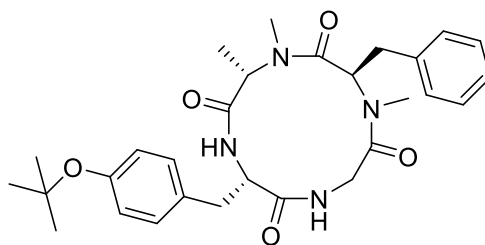
13C

La reacción de macrociclación en solución se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general (dilución 5mM, 72 horas), partiendo de la sal de trifluoroacetato lineal 13L: NMe-D-Phe-Ala-Phe-NMe-Gly-OH (220 mg, 0.38 mmol), usando HATU como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash rindió el macrociclo deseado (147 mg, 0.32 mmol, R=85.7 %).

Ciclo-[NMe-Ala-Phe-NMePhe-Gly] (13C): Sólido blanco (85.7%). Rf=0.35 (AcOEt). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.20 (d, $J=7.0$ Hz, 3H), 2.50 (s, 3H), 2.77 (s, 3H), 3.12 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 3.34 - 3.42 (m, 1H),

3. Síntesis de ciclo péptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

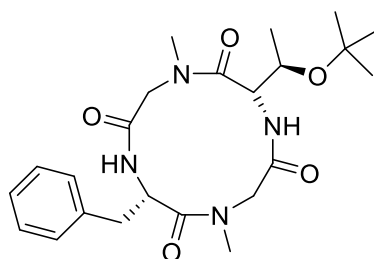
3.46 (dd, $J = 16.5, 1.9$ Hz, 1H), 3.56 (dd, $J = 14.0, 4.5$ Hz, 1H), 3.77 (dd, $J = 10.6, 4.1$ Hz, 1H), 4.47 (dd, $J = 16.6, 6.8$ Hz, 1H), 5.13 (q, $J = 7.68$ Hz, 1H), 5.46 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.00- 7.11 (m, 2H), 7.12 - 7.24 (m, 3H), 7.28-7.32 (m, 2H), 7.32-7.43 (m, 3H), 7.58 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 13.6, 29.1, 33.8, 37.9, 39.2, 41.0, 50.6, 51.4, 68.6, 126.7 (2C), 126.8 (2C), 128.6(2C), 128.7(2C), 129.2, 129.9, 136.8, 138.7, 169.6, 169.6, 170.2, 171.4. **ESI-MS** m/z calc. para $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 450.23, experimental 450.85.



14C

La reacción de macrociclación en solución se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general (dilución 5mM, 72 horas), partiendo de la sal de trifluoroacetato de 14L: NHMeAla-Tyr(OtBu)-Gly-NMe-D-Phe-OH (200 mg, 0.31 mmol), usando HATU como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash rindió el macrociclo deseado (52 mg, 0.10 mmol, R= 32.2 %).

Ciclo-[NMeAla-Tyr(OtBu)-Gly-NMe-D-Phe] (14C): Sólido blanco (32.2 %). $R_f=0.35$ (AcOEt). ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 1.20 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 2.50 (s, 3H), 2.77 (s, 3H), 3.12 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.34 - 3.42 (m, 1H), 3.46 (dd, $J = 16.5, 1.9$ Hz, 1H), 3.56 (dd, $J = 14.0, 4.5$ Hz, 1H), 3.77 (dd, $J = 10.6, 4.1$ Hz, 1H), 4.47 (dd, $J = 16.6, 6.8$ Hz, 1H), 5.13 (q, $J = 7.68$ Hz, 1H), 5.46 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.00- 7.11 (m, 2H), 7.12 - 7.24 (m, 3H), 7.28-7.32 (m, 2H), 7.32-7.43 (m, 3H), 7.58 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, MeOD) δ 12.0, 27.7 (3C), 30.5, 35.0, 37.5, 41.9, 48.0, 52.3, 55.1, 56.4, 78.1, 123.8, 123.9, 127.0, 128.2, 128.4, 128.7, 129.0, 129.2, 129.4, 132.2, 135.9, 170.4, 171.7, 173.3, 173.8. **ESI-MS** m/z calc. para $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 523.29, $\text{C}_{58}\text{H}_{77}\text{N}_8\text{O}_{10}^+$ ($[2\text{M}+\text{H}]^+$) 1045.58, experimental 523.35, 1045.55.

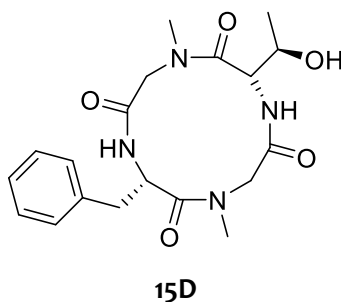


15C

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

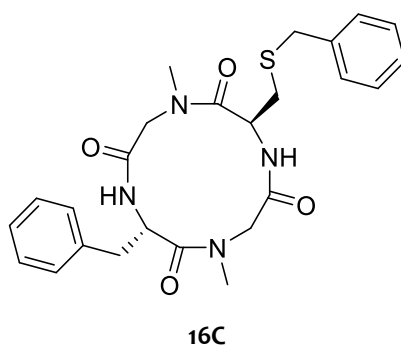
La reacción de macrociclación en solución se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general (dilución 5mM, 72 horas), partiendo de la sal de trifluoroacetato lineal 15L: $\text{NH}_2\text{-Thr(Boc)-NMeGly-Phe-NMeGly-OH}$ (166 mg, 0.29 mmol), usando oxima/EDCI como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash rindió el macrociclo deseado (57 mg, 0.13 mmol, R=44.8 %).

Ciclo-[Thr(O^tBu)-NMeGly-Phe-NMeGly] (15C): Sólido blanco (44.8%). R_f=0.35 (AcOEt). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.08 (s, 9H), 1.17 (d, J=10.8 Hz, 3H), 2.75-2.89 (m, 1H), 2.93- 3.04 (m, 2H), 3.10 – 3.20 (m, 2H), 3.24 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.90 – 3.97 (m, 1H), 4.34 (d, J= 14.3 Hz, 1H), 4.71-4.85 (m, 2H), 7.20-7.26 (m, 2H), 7.27-7.37 (m, 2H), 7.45 (d, J=7.3Hz, 1H), 7.80 (d, J= 7.0Hz, 1H), 8.72 (d, J=5.7Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 19.6, 28.0 (3C), 28.1, 35.9, 37.6, 38.6, 53.1, 53.6, 55.4, 67.2, 74.4, 127.1, 128.7 (2C), 129.4 (2C), 136.8, 168.2, 170.3, 170.9, 174.0. ESI-MS m/z calc. para C₂₃H₃₅N₄O₅ ([M+H]⁺) 447.26, C₄₆H₆₈N₈NaO₁₀⁺ ([2M+Na]⁺) 915.50, experimental 915.70.



5mg de 15C se colocaron en un vial y se trataron con 100 μ L de HCl 4M en dioxano durante 1 hora para obtener 15D de forma cuantitativa.

Ciclo-[Thr(OH)-NMeGly-Phe-NMeGly] (15D): ESI-MS m/z calc. para C₁₉H₂₇N₄O₅ ([M+H]⁺) 391.20, experimental 391.35.

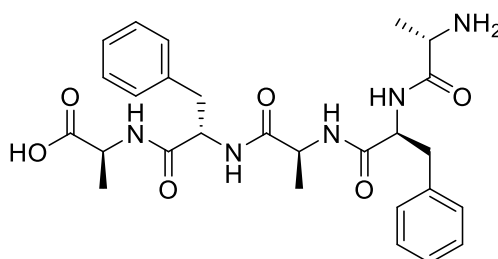


La reacción de macrociclación en solución se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general (dilución 5mM, 48 horas), partiendo de la sal de trifluoroacetato lineal 16L: $\text{NH}_2\text{-Phe-NMeGly-Cys(Bzl)-NMeGly-OH}$ (196 mg, 0.31mmol), usando oxima/EDCI como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash rindió el macrociclo deseado (81 mg, 0.17 mmol, R =54%).

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

Ciclo-[Phe-NMeGly-Cys(Bzl)-NMeGly] (16C): Sólido blanco (54 %). $R_f=0.35$ (AcOEt). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.64 (dd, $J=13.6, 6.5$ Hz, 1H), 2.72 – 3.28 (m, 9H), 3.46 (d, $J= 15.2$ Hz, 3H), 3.64 – 3.82 (m, 3H), 4.20 (d, $J= 14.9$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J=15.1$ Hz, 1H), 4.87 – 5.00 (m, 1H), 5.02 – 5.19 (m, 1H), 6.97 (d, $J= 8.2$ Hz, 1H), 7.09 (d, $J= 8.4$ Hz, 1H), 7.14 – 7.24 (m, 4H), 7.27 – 7.40 (m, 6H). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 32.8, 35.8, 36.1, 36.2, 37.9, 48.0, 50.0, 51.4, 52.1, 126.7, 126.8, 128.1, 128.2, 128.4, 128.5, 128.6, 129.0, 131.6, 131.8, 135.7, 137.5, 167.3, 167.4, 170.6, 171.6. **ESI-MS** m/z calc. para $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 483.20, $\text{C}_{50}\text{H}_{60}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_2\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 987.4, experimental 987.5.

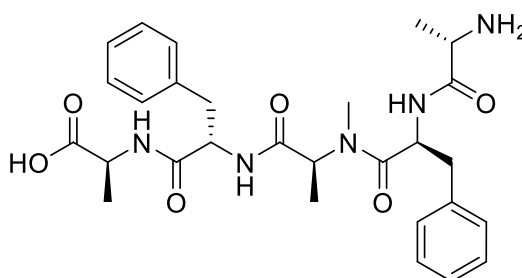
Pentapéptidos lineales



17L

La sal de trifluoroacetato de $\text{NH}_2\text{-Ala-Phe-Ala-Phe-Ala-OH}$ se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, se obtuvieron 158 mg ($R=78\%$) a como sólido blanco. La pureza (90 %) se determine por HPLC (gradiente lineal: 10 a 100% acetonitrilo en $\text{H}_2\text{O}/0.003\text{M TFA}$ durante 20 min; flujo= 1.5 mL/min; $t_R = 11.15$ min).

$\text{NH}_2\text{-Ala-Phe-Ala-Phe-Ala}$ (17L): Sólido blanco (78%). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, D_2O) δ 1.47 (d, $J= 7.1$ Hz, 3H), 1.61 (d, $J= 7.3$ Hz, 3H), 1.70 (d, $J= 7.1$ Hz, 3H), 3.14 – 3.21 (m, 1H), 3.23 – 3.30 (m, 1H), 3.36 – 3.41 (m, 2 H), 4.24 (q, $J= 7.1$ Hz, 1H), 4.49 (q, $J= 7.1$ Hz, 1H), 4.58 (q, $J= 7.3$ Hz, 1H), 4.77 – 4.85 (m, 2 H), 7.40 – 7.64 (m, 10 H), 8.15 (s, 1H).

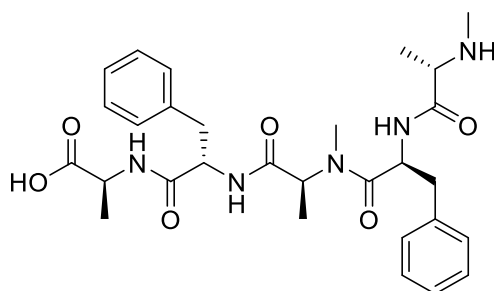


18L

3. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

La sal de trifluoroacetato de NH_2 -Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-Ala-OH se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, usando HATU/DIPEA para acoplar los Fmoc-AA-OH luego de NMe-Ala. Se obtuvieron 166 mg (83%) como un sólido blanco. La pureza (86 %) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 10 a 100% acetonitrilo en H_2O / 0.003M TFA durante 10 min; flujo = 1.5 mL/min; t_R = 5.9 min).

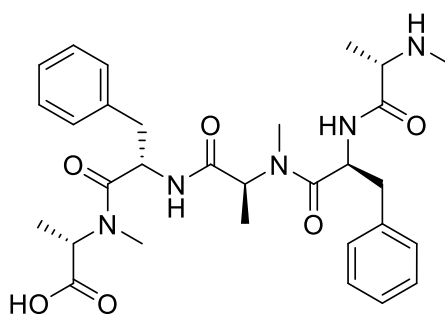
NH_2 -Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-Ala-OH (18L): sólido blanco (83%). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, D_2O) δ 1.25 – 1.68 (m, 9H), 2.35 (s, 3 Ha), 2.74 (s, 3Hb), 2.75 – 3.32 (m, 4H), 3.74– 4.76 (m, 3H), 4.90 – 5.20 (m, 2H), 7.22 – 7.44 (m, 10 H)



19L

La sal de trifluoroacetato de NHMe-Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-Ala-OH se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, usando HATU/DIPEA para acoplar los Fmoc-AA-OH luego de NMe-Ala. Se obtuvieron 240 mg (98%) como un sólido blanco. La pureza (97%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 10 a 50% acetonitrilo en H_2O /0.003M durante 10 min; flujo = 1.5 mL/min; t_R =8.44 min).

NHMe-Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-Ala (19L): Sólido blanco (98%). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 1.07 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.27 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.32 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 2.12 (t, J = 5.2 Hz, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.75 – 2.87 (m, 2H), 2.97 – 3.12 (m, 2H), 4.23 (m, 1H), 4.48 – 4.57 (m, 1H), 4.57 – 4.65 (m, 1H), 4.79 – 4.87 (m, 1H), 4.95 (q, J =7.3 Hz, 1H), 7.11 – 7.35 (m, 10H), 7.97 – 7.96 (m, 1H), 8.42 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.95 (d, J = 8.6 Hz, 1H). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ 14.1, 16.5, 17.6, 30.2, 31.1, 37.4,37.5, 48.0, 51.2, 52.4, 54.2, 56.4, 126.7, 126.9, 128.4 (2C), 128.8 (2C), 129.7 (2C), 129.8 (2C), 137.9, 138.5, 168.4, 170.4, 170.8, 171.5, 174.5.

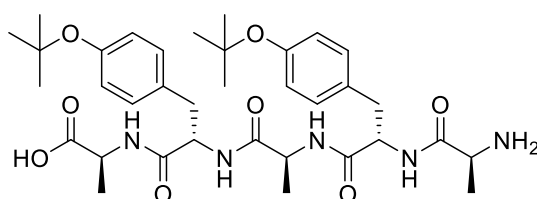


20L

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

La sal de trifluoroacetato de NHMe-Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-NMe-Ala-OH (**20L**) se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, usando HATU/DIPEA para acoplar los Fmoc-AA-OH luego de NMe-Ala. Se obtuvieron 214 mg (84%) como sólido blanco. La pureza (97%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 10 a 100% acetonitrilo en H₂O/ 0.003M durante 10 min; flujo = 1.5 mL/min; t_R = 6.14 min).

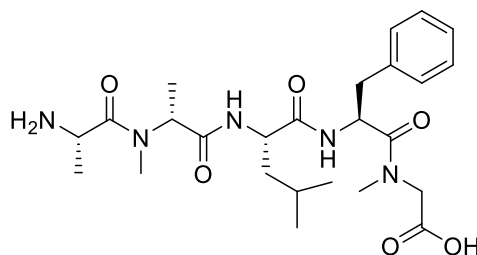
NHMe-Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-NMe-Ala-OH (20L). Sólido blanco (84%) ¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) a, b confórmeros en proporción 1:0.7. δ 0.65 (d, $J=6.5$ Hz, 3Hb), 1.27- 1.36 (m, 3Ha + 3Hb), 1.44 (d, $J=7.1$ Hz, 3Ha), 1.49 (d, $J=6.9$ Hz, 3Ha), 1.59 (d, $J=7.0$ Hz, 3H), 2.40 – 3.20 (m, 13Ha + 13Hb), 4.04 (m, 1Ha), 4.13 – 4.21 (m, 1Hb), 4.24 – 4.32 (m, 1Hb), 4.35 – 4.45 (m, 1Ha), 4.79 – 4.87 (m, 1Ha), 5.00 – 5.08 (m, 1Ha), 5.09 – 5.20 (m, 1Hb), 5.20 – 5.30 (m, 1Ha + 1Hb), 5.5 – 5.61 (m, 1Hb), 7.13 – 7.39 (m, 10Ha + 10 Hb).



21L

La sal de trifluoroacetato de Ala-Tyr(O^tBu)-Ala-Tyr(O^tBu)-Ala-OH (**21L**) se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, usando HBTU/DIPEA como acoplante. Se obtuvieron 245.6 mg (92% de rendimiento) como sólido blanco. La pureza (81.4 %) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 25 a 50% acetonitrilo en H₂O/ 0.1% ácido fórmico durante 20 min; flujo = 1.5 mL/min; t_R =11.7 min).

NH₂-Ala-Tyr(tBu)-Ala-Tyr(tBu)-Ala (21L): Sólido amarillo (92%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.15 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.23 (s, 9H), 1.25- 1.31 (m, 15H), 2.66-2.80 (m, 2H), 2.93-3.02 (m, 2H), 3.70 (dd, $J = 13.9, 7.1$ Hz, 1H), 4.05-4.31 (m, 2H), 4.39-4.69 (m, 2H), 6.84 (m, 4H), 7.16 (m, 4H), 7.94 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.49 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H).



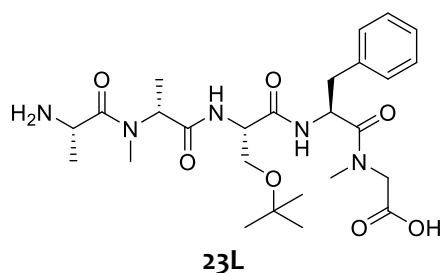
22L

La sal de trifluoroacetato de NH₂Ala-NMeAla-Leu-Phe-NMeGly-OH (**22L**) se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, usando HBTU/DIPEA como acoplante. Se obtuvieron 248 mg (81 % de

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

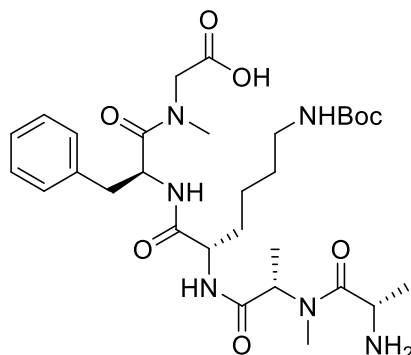
rendimiento) como sólido blanco. La pureza (83.1 %) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 0-100% acetonitrilo en H₂O/ 0.1% ácido fórmico durante 15 min; flujo = 1.5 mL/min; t_R =5.07 min).

NH₂Ala-NMeAla-Leu-Phe-NMeGly-OH (22L): Sólido blanco (83.1%). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 0.75 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 0.81 (d, *J* = 5.9 Hz, 3H), 1.28 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.30 – 1.53 (m, 6H), 2.86-2.91 (m, 1H), 2.954 (s, 3H), 3.01 (s, 3H), 3.02-3.10 (m, 1H), 4.02 (s, 1H), 4.11 – 4.15 (m, 1H), 4.16 – 4.24 (m, 1H), 4.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.73 – 4.83 (m, 1H), 5.06 (dd, *J* = 8.4, 6.1 Hz, 1H), 7.08 – 7.38 (m, 5H). ¹³C RMN (100 MHz, D₂O) δ 13.2, 15.1, 20.6, 22.0, 24.3, 30.2, 31.0, 36.4, 36.9, 39.6, 47.4, 50.2, 50.6, 52.4, 53.9, 127.1, 128.6 (2C), 129.5 (2C), 136.1, 170.7, 172.5, 172.8, 172.9, 173.6. ESI-MS *m/z* calc. for C₂₅H₄₀N₅O₆ ([M+H]⁺) 506.3, experimental 506.4.



La sal de trifluoroacetato de **NH₂Ala-NMeAla-Ser(O^tBu)-Phe-NMeGly-OH (23L)** se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, usando HBTU/DIPEA como acoplante. Se obtuvieron 480 mg (93% de rendimiento) como sólido blanco. La pureza (93 %) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 0-100% acetonitrilo en H₂O/ 0.1% ácido fórmico durante 15 min; flujo = 1.5 mL/min; t_R =5.56 min).

NH₂Ala-NMeAla-Ser(O^tBu)-Phe-NMeGly-OH (23L): Sólido amarillo (93 %). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 1.15 (s, 9H), 1.40 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.52 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 2.85-2.92 (m, 1H), 3.03 (s, 3H), 3.09 (s, 3H), 3.11-3.18 (m, 1H), 3.51 – 3.66 (m, 2H), 4.10 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 4.41 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H,) 4.50 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.81- 4.89 (m, 1H), 5.19 (dd, *J* = 7.7, 6.4 Hz, 1H), 7.12- 7.44 (m, 5H). ¹³C RMN (100 MHz, D₂O) δ 13.2, 15.2, 26.4 (3C), 31.4, 36.6, 37.1, 47.4, 50.1, 50.7, 54.1, 54.5, 61.0, 75.2, 127.2, 128.6, 128.7, 129.3, 129.5, 136.0, 170.6, 170.8, 172.5, 172.6, 172.9. ESI-MS *m/z* calc. for C₂₆H₄₂N₅O₇ ([M+H]⁺) 536.3, experimental 536.3.

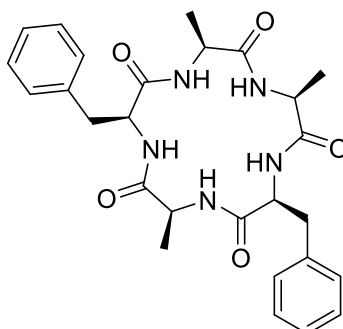


24L

La sal de trifluoroacetato de **NH₂Ala-NMeAla-Lys(Boc)-Phe-NMeGly-OH (24L)** se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, usando HBTU/DIPEA como acoplante. Se obtuvieron 311 mg (92 % de rendimiento) como sólido blanco. La pureza (87%) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 10-100% acetonitrilo en H₂O/ 0.1% ácido fórmico durante 20 min; flujo = 1.5 mL/min; t_R =5.9 min).

NH₂Ala-NMeAla-Lys(Boc)-Phe-NMeGly-OH (24L): sólido blanco (92 %). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 1.03 – 1.21 (m, 2H), 1.22 – 1.38 (m, 12H), 1.40 (d, *J*=7.0 Hz, 3H), 1.47 – 1.61 (m, 4H), 2.75 (s, 3Hb), 2.83 (s, 3Hb), 2.79 – 2.89 (m, 2H), 2.89 – 2.95 (m, 3Ha+ 2H), 2.98 (s, 3Ha), 2.99 – 3.07 (m, 1H), 3.92 - 4.03 (m, 2H), 4.03 – 4.22 (m, 3H), 4.31 – 4.44 (m, 1H), 4.72 – 4.79 (m, 1H), 5.05 (dd, *J*= 8.3, 6.2 Hz, 1H), 7.10-7.33 (m, 6H). ¹³C RMN (100 MHz, D₂O) 13.5, 15.1, 22.0, 26.2, 29.6 (3C), 30.2, 31.3, 36.6, 36.9, 39.1, 47.4, 50.2, 50.6, 53.5, 54.2, 69.7, 114.8, 117.7, 127.1, 128.6, 129.4, 136.0, 164.9, 170.8, 172.5, 172.8, 172.9, 173.1. δ ESI-MS *m/z* calc. for C₃₀H₄₈N₆O₈ ([M+H]⁺) 621.4, experimental 621.5.

Ciclopentapéptidos

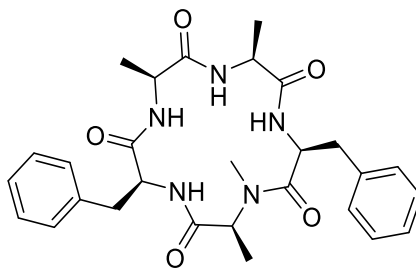


17C

La reacción de macrociclación en solución se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general (dilución 5mM, 3 días), partiendo de la sal de trifluoroacetato de **NH₂-Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-Ala-OH (17L)**, 100 mg, 0.16 mmol), usando HBTU como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash rindió el macrociclo deseado **17C** (15 mg, 0.03 mmol) con un 21 % de rendimiento.

Ciclo-[Ala-Phe-Ala-Phe-Ala] (17C): Sólido blanco (21%). *R*_f= 0.58. (CHCl₃: MeOH, 5:0.5). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.19- 1.30 (m, 6H), 1.37 (d, *J*=7.0 Hz, 3H), 2.90-3.25 (m, 4H), 4.05-4.25 (m, 2H), 4.25-4.65 (m, 3H), 7.13-7.30 (m, 10H), 7.57 (m, 1 H), 7.82 (m, 1 H) . ¹³C RMN (100 MHz, (CDCl₃) δ (ppm) 16.2, 16.2, 16.5, 36.7, 36.8, 49.9, 50.6, 51.1, 55.4, 56.2, 127.0 (2 C), 128.1 (2 C), 128.5 (2 C), 128.6 (2 C), 129.1 (2 C), 136.3 (2 C), 172.0, 173.2 (2 C), 173.5 (2 C). ESI-MS *m/z* calc. for C₂₇H₃₄N₅O₅ ([M]⁺) 508.3, experimental 508.3.

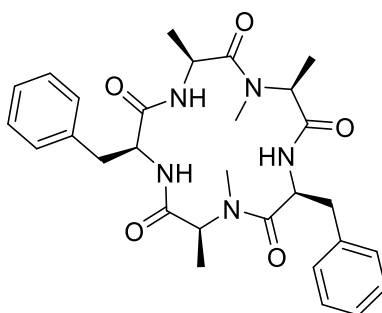
3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



18C

La reacción de macrociclación en solución se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general (dilución 5mM, 3 días), partiendo de la sal de trifluoroacetato de NH_2 -Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-Ala-OH (**18L**, 147 mg, 0.23 mmol), usando HBTU como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash rindió el macrociclo deseado **18C** (33.2 mg, 0.06 mmol) con un 28 % de rendimiento.

Ciclo-[Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-Ala] (**18C**): sólido blanco (28 %). $R_f=0.63$ (CHCl_3 : MeOH, 5:0.5). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz,) δ (ppm) 0.87-1.11 (m, 9H), 1.87 (s, 3H), 2.52-2.99 (m, 4H), 3.97-4.77 (m, 5H), 6.90-7.13 (m, 10H), 7.31-8.06 (m, 3H), 8.50-8.81 (m, 1H). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, DMSO) δ (ppm) 17.9, 18.5, 19.3, 28.3, 29.5, 37.5, 48.3, 48.8, 51.4, 55.4, 55.6, 126.7, 127.4, 128.4, 128.6, 129.0, 129.4, 129.5, 129.6, 129.9, 130.0, 136.8, 138.4, 170.0, 171.1, 171.2, 171.9, 173.2. ESI-MS m/z calc. for $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 522.3, experimental 522.3.



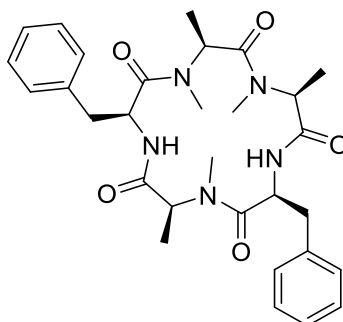
19C

La reacción de macrociclación en solución se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general dilución 5mM, 3 días), partiendo de la sal de trifluoroacetato de NHMe -Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-Ala-OH (**19L**, 83 mg, 0.15 mmol), usando HATU como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash rindió el macrociclo deseado **19C** (18 mg, 0.03 mmol) con 23 % de rendimiento.

Ciclo-[NMe-Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-Ala] (**19C**): sólido blanco (23%). $R_f=0.54$ (EtOAc: Hexane, 4:1). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 1.21 (d, $J=6.9$ Hz, 3H), 1.33 (d, $J=7.6$ Hz, 3H), 1.53 (d, $J=7.3$ Hz, 3H), 2.77 (s, 3H), 2.88-3.03 (m, 3H), 3.08-3.16 (m, 4H), 3.39 (q, $J=7.3$ Hz, 1H), 4.59 (q, $J=7.6$ Hz, 1H), 4.64-4.76 (m, 1H), 4.83-4.98 (m, 2H), 6.52 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.15-7.36 (m, 10H), 7.53

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

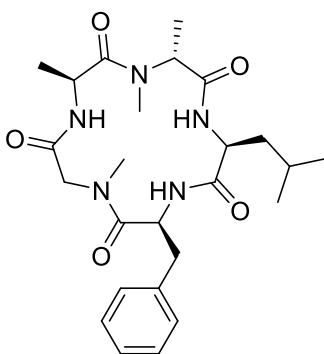
(d, $J=9.3$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 14.6, 14.9, 16.9, 29.7, 30.8, 37.4, 38.7, 45.8, 51.7, 54.2, 54.4, 65.4, 126.8, 126.9, 127.2, 127.6, 128.3, 128.5, 129.1, 129.2, 129.5, 129.8, 136.8, 136.9, 170.3, 171.8 (2 C), 172.1, 173.8. ESI-MS m/z calc. for $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 536.3, experimental 536.3.



20C

La reacción de macrociclación en solución se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general dilución 5mM, 3 días), partiendo de la sal de trifluoroacetato de 20L: NHMe-Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-NMe-Ala-OH (100 mg, 0.15 mmol), usando HATU como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash rindió el macrociclo deseado **20C** (20 mg, 0.04 mmol) con 24% de rendimiento.

Ciclo-[NMe-Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-NMe-Ala] (20C): Sólido blanco (24%). $R_f=0.4$ (EtOAc). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 1.24 (d, $J = 7.4$ Hz, 3H), 1.31 (d, $J = 7.4$ Hz, 3H), 1.70 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H), 2.77 (s, 3H), 2.78 (s, 3H), 2.93–3.03 (m, 3H), 3.11 (s, 3H), 3.27–3.36 (m, 1H), 3.44 (q, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.82 (q, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.93 (m, 1H), 5.03–5.16 (m, 2H), 7.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.18–7.27 (m, 4H), 7.27–7.35 (m, 6H), 8.36 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 14.0, 14.5, 16.1, 30.5, 31.0, 38.0, 39.1, 39.3, 50.9, 51.1, 52.8, 52.8, 67.4, 126.5, 126.8, 127.1, 127.4, 128.2, 128.4, 128.7, 129.1, 129.6, 129.9, 136.4, 137.5, 170.2, 171.9, 172.0, 174.4, 174.5. ESI-MS m/z calc. for $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 550.3 experimental 550.3.

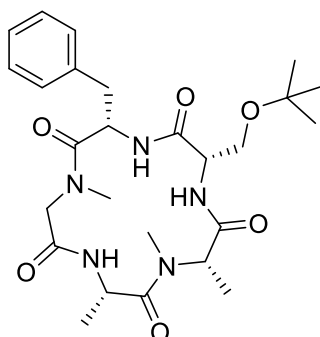


22C

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

La reacción de macrociclación en solución se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general dilución 5mM, 24 horas), partiendo de la sal de trifluoroacetato de 22 L: **NH₂Ala-NMeAla-Leu-Phe-NMeGly-OH** (140 mg, 0.22 mmol), usando agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash rindió el macrociclo deseado **22C** (53 mg, 0.11 mmol, R=50.3%).

Ciclo-[Ala-NMeAla-Leu-Phe-NMeGly] (22C): Sólido blanco (50%). **R_f**=0.35 (AcOEt). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 0.88 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.94 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.29 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.35 – 1.46 (m, 1H), 1.53 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.60 (dd, *J* = 11.5, 6.4 Hz, 1H), 1.68 – 1.80 (m, 1H), 2.82 – 2.94 (m, 5H), 3.25 (s, 3H), 3.30 (dd, *J* = 13.2, 9.0 Hz, 1H), 3.50 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.22 – 4.33 (m, 1H), 4.83 – 4.94 (m, 2H), 5.10 (td, *J* = 8.7, 5.5 Hz, 1H), 5.80 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.14 – 7.21 (m, 1H), 7.21 – 7.39 (m, 5H), 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H). **¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃)** δ 13.2, 17.4, 21.3, 23.2, 25.2, 36.0, 38.2, 40.7, 44.9, 51.1, 52.9, 53.3, 61.6, 126.4, 128.2 (2C), 129.8 (2C), 137.7, 169.2, 170.0, 170.8, 171.0, 173.8. **ESI-MS *m/z*** calc. for C₂₅H₃₈N₅O₅ ([M+H]⁺) 488.6, experimental 488.3.

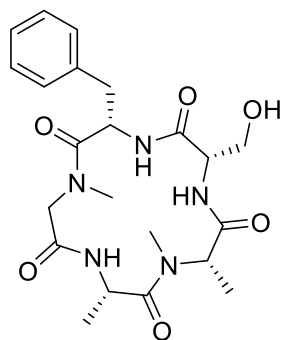


22C

La reacción de macrociclación en solución se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general dilución 5mM, 3 días), partiendo de la sal de trifluoroacetato de 23L: **NH₂Ala-NMeAla-Ser(O^tBu)-Phe-NMeGly-OH** (180 mg, 0.27 mmol), usando EDCl/oxima como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash rindió el macrociclo deseado **23C** con 32 % de rendimiento (54 mg, 0.86 mmoles).

Ciclo-[Ala-NMeAla-Ser(O^tBu)-Phe-NMeGly] 23): Sólido blanco (32 %). **R_f**= 0.30 (AcOEt:MeOH, 9:1). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ (ppm) 1.18 (s, 9H), 1.29 (d, *J*= 7.2 Hz, 3H), 1.54 (d, *J*= 7.0 Hz, 3H), 2.78 - 2.97 (m, 4H), 3.25 (s, 3H), 3.40 (dd, *J*=13.0, 10.2 Hz, 1H), 3.45 - 3.55 (m, 2H), 4.03 (dd, *J*=8.8, 2.5 Hz, 1H), 4.33 - 4.41 (m, 1H), 4.79 - 4.96 (m, 2H), 5.01 - 5.13 (m, 1H), 6.69 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.12 - 7.22 (m, 1H), 7.24 - 7.40 (m, 5H), 7.95 (d, *J*=8.4 Hz, 1H). **¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃)** δ (ppm) 12.9, 17.4, 27.5 (3C), 35.9, 38.0, 38.2, 45.0, 52.0, 53.3, 54.2, 61.5, 61.7, 73.6, 126.3, 128.2 (2C), 129.8 (2C), 138.0, 169.2, 169.5, 170.7, 171.2, 173.8. **ESI-MS *m/z*** calc. for C₂₆H₃₉N₅O₆ ([M+H]⁺) 518.3, experimental 518.3.

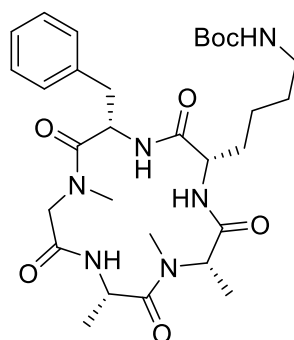
3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



23D

5mg de 23C se colocaron en un vial y se trataron con 100 μ L de HCl 4M en dioxano durante 1 hora para obtener 23D de forma cuantitativa.

Ciclo-[Ala-NMeAla-Ser(OH)-Phe-NMeGly] (23D): ESI-MS m/z calc. para $C_{22}H_{32}N_5O_6$ ($[M+H]^+$) 463.2, experimental 462.3.

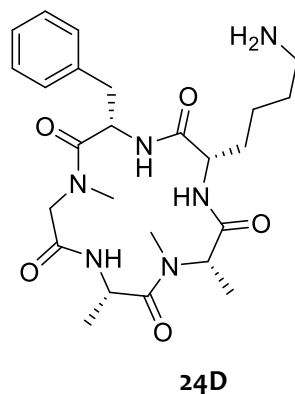


24C

La reacción de macrociclación en solución se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general dilución 5mM, 3 días), partiendo de la sal de trifluoroacetato de 24L: $NH_2Ala-NMeAla-Lys(Boc)-Phe-NMeGly-OH$ (140 mg, 0.21 mmol), usando EDCl/oxima como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash rindió el macrociclo deseado **24C** con 13 % de rendimiento (15 mg, 0.025 mmoles).

Ciclo-[Ala-NMeAla-Lys(Boc)-Phe-NMeGly-OH] (24C): Sólido blanco (13 %). R_f = 0.30 (AcOEt:MeOH, 9:1). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.27 - 1.32 (m, 5H), 1.43 (s, 9H), 1.46-1.49 (m, 2H), 1.55 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.58 -1.68 (m, 1H), 1.77-1.92 (m, 1H), 2.84 - 2.93 (m, 5H), 3.05 - 3.13 (m, 2H), 3.25 (s, 3H), 3,31 (dd, J =13.2, 8.9 Hz, 1H), 3.49 (q, J =7.0 Hz, 1H), 4.17 – 4.26 (m, 1H), 4.53 – 4.63 (m, 1H), 4.81 – 4.92 (m, 2H), 5.06 – 5.15 (m, 1H), 5.98 (d, J =6.2 Hz, 1H), 7.15 – 7.21 (m, 1H), 7.23 – 7.26 (m, 2H), 7.27 -7.35 (m, 3H), 7.81 (d, J = 8.5 Hz, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 13.2, 17.3, 23.2, 28.4 (3C), 29.8, 31.3, 36.0, 38.2, 38.3, 40.1, 45.0, 51.1, 53.3, 54.4, 61.6, 79.2, 126.4, 128.2 (2C), 129.8 (2C), 137.6, 156.2, 169.3, 170.3, 170.5, 170.8, 173.8. ESI-MS m/z calc. para $C_{30}H_{47}N_6O_7$ ($[M+H]^+$) 603.3, experimental

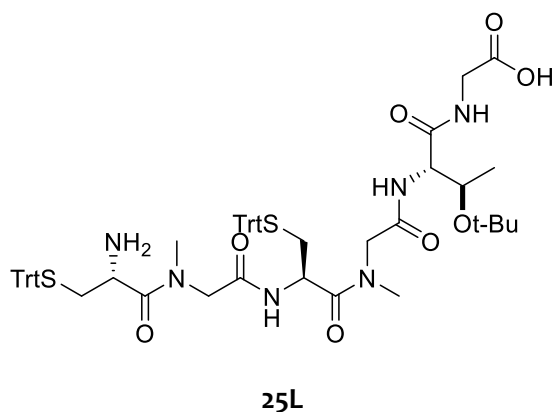
603.4.



5mg de 24C se colocaron en un vial y se trataron con 100 μ L de HCl 4M en dioxano durante 1 hora para obtener 24D de forma cuantitativa.

Ciclo-[Ala-NMeAla-Lys-Phe-NMeGly-OH] (15D): ESI-MS m/z calc. para C₂₅H₃₉N₆O₅ ([M+H]⁺) 503.3, experimental 503.4.

Hexapéptido lineal

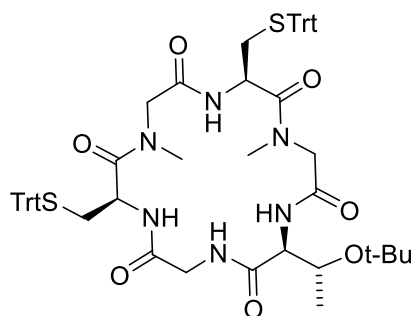


La sal de trifluoroacetato de **Cys(Trt)-NMe-Gly-Cys(Trt)-NMe-Gly-Thr(O-tBu)-Gly (25L)** se obtuvo según el procedimiento general de SPPS, usando para acoplar los Fmoc-AA-OH luego de NMe-Ala. Se obtuvieron 440 mg (0.37 mmoles, 98% de rendimiento) como sólido blanco. La pureza (89 %) se determinó por HPLC (gradiente lineal: 10 a 100% acetonitrilo en H₂O/0.1% ác. Fórmico, durante 15 min; flujo = 1.5 mL/min; t_R = 7.33 min).

Cys(Trt)-NMe-Gly-Cys(Trt)-NMe-Gly-Thr(O-tBu)-Gly (25L): Sólido blanco (98%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 0.99 (m, 3H), 1.11 (s, 9H), 2.35 – 2.47 (m, 2H), 2.52 – 2.58 (m, 2H), 2.60 (s, 3Ha), 2.63 (s, 3Hb), 2.65 (s, 3Hc), 2.69 (s, 3Hd), 3.51 – 3.67 (m, 2H), 3.73 – 4.03 (m, 6H), 4.04 – 4.15 (m, 1H), 4.17 – 4.37 (m, 2H), 4.54 – 4.71 (m, 1H), 7.18 – 7.42 (m, 30H). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-d₆) δ 19.5, 28.5 (3C), 31.2, 34.4, 36.1, 36.3, 41.3, 48.3, 49.2, 50.9, 52.5, 57.9, 66.7, 67.2, 67.6, 74.2, 127.3 (2C), 127.6 (4C),

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

128.0 (2C), 128.2 (2C), 128.5 (2C), 128.6 (4C), 128.7(2C), 128.8 (6C), 129.6 (6C), 144.1 (2C), 144.7 (3C), 144.8, 167.0, 167.7, 168.1, 170.1, 170.2, 171.4.



25C

Ciclo-[Cys(Trt)-NMe-Gly-Cys(Trt)-NMe-Gly-Thr(O-tBu)-Gly] (25C): sólido blanco (R=75 %). $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.11 (s, 9H), 1.16 (d, $J=6.3$ Hz, 3H), 2.31 (dd, $J=13.3, 5.1$ Hz, 1H), (m, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.74 (dd, $J=14.2, 8.1$ Hz, 1H), 2.87 (d, $J=16.6$ Hz, 1H), 2.97 (dd, $J=14.2, 6.0$ Hz, 1H), 3.07 (s, 3H), 3.18 (dd, $J=13.3, 10.5$ Hz, 1H), 3.25 (d, $J=14.1$ Hz, 1H), 3.33 (dd, $J=13.6, 4.9$ Hz, 1H), 4.09 – 4.18 (m, 2H), 4.19 – 4.34 (m, 3H+1H conform_a), 4.72 (m, 1H conform_b), 4.96 (d, $J=16.6$ Hz, 1H), 6.56 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J=9.5$ Hz, 1H), 6.88 (dd, $J=5.9$ Hz, 1H), 7.17 – 7.24 (m, 7H), 7.27 – 7.31 (m, 9H), 7.34 – 7.43 (m, 9H), 7.45 – 7.49 (m, 5H), 8.20 (dd, $J=7.3, 5.0$ Hz, 1H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 21.2, 28.0 (3H), 31.4, 33.1, 35.1, 38.9, 44.3, 46.9, 50.6, 51.0, 53.6, 59.2, 65.5, 66.7, 67.0, 74.2, 126.5 (6C), 127.7 (12C), 129.3 (12C), 143.9 (6C), 166.5, 168.6, 169.3, 169.5, 171.5, 171.9.

HRMS m/z calc. para $\text{C}_{60}\text{H}_{66}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}_2\text{Na}^+$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 1069.4, experimental 1069.6.

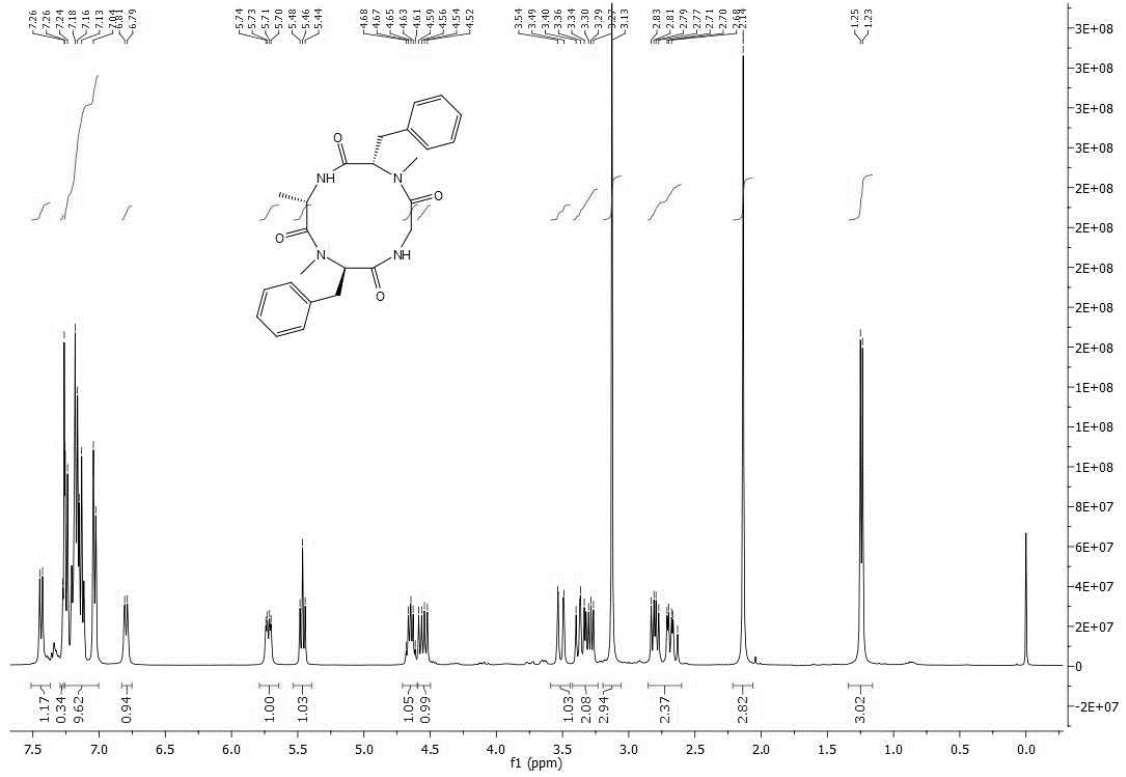
3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

3.4.7. Espectros de ^1H , ^{13}C RMN, LC-MS y cromatogramas de compuestos seleccionados

Ciclotetrapéptidos

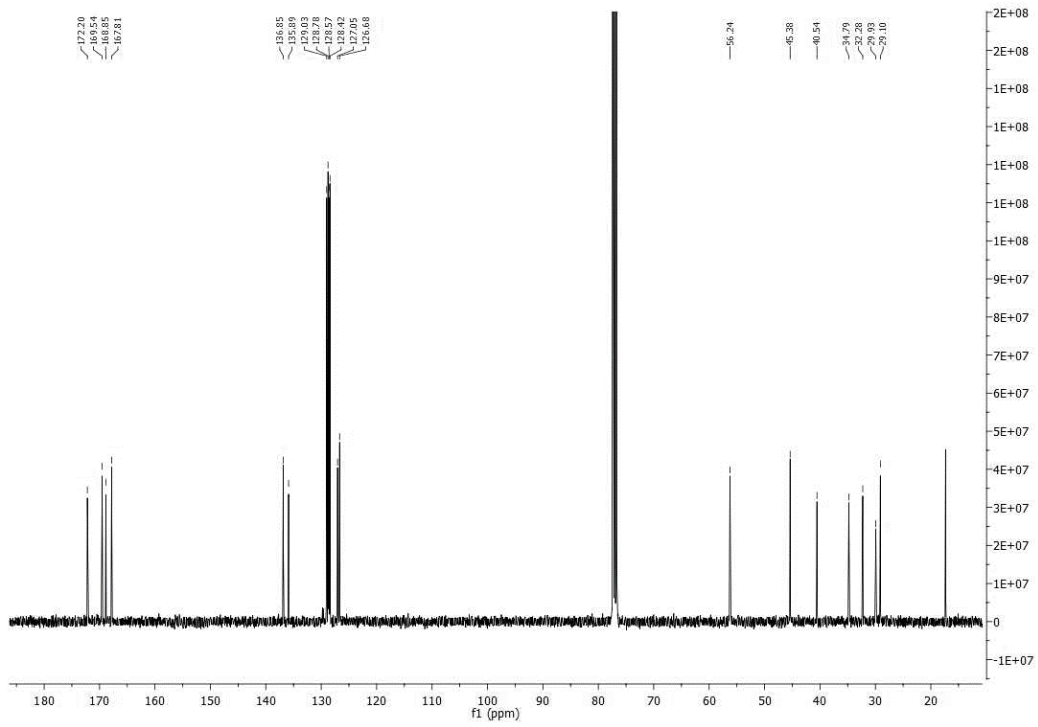
11C (Versicotide D): *Ciclo*[Ala-NMe-D-Phe-Gly-NMe-L-Phe]

^1H -RMN en CDCl_3

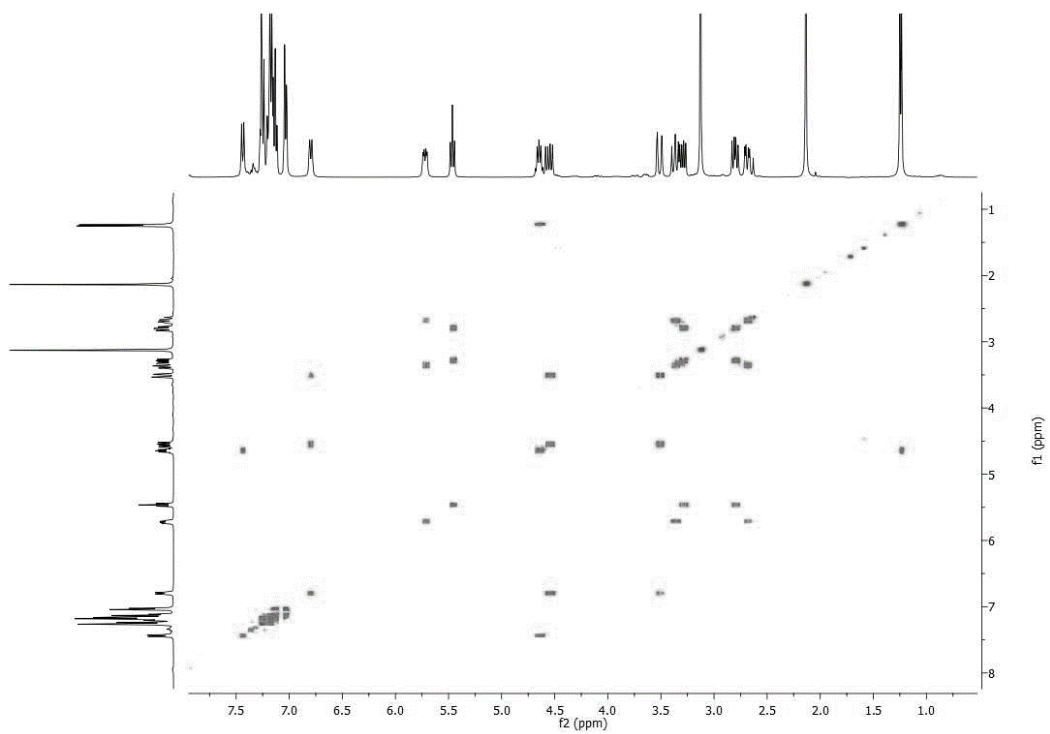


3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

^{13}C -RMN en CDCl_3 *Ciclo*-[Ala-NMe-D-Phe-Gly-NMe-L-Phe] (11C)

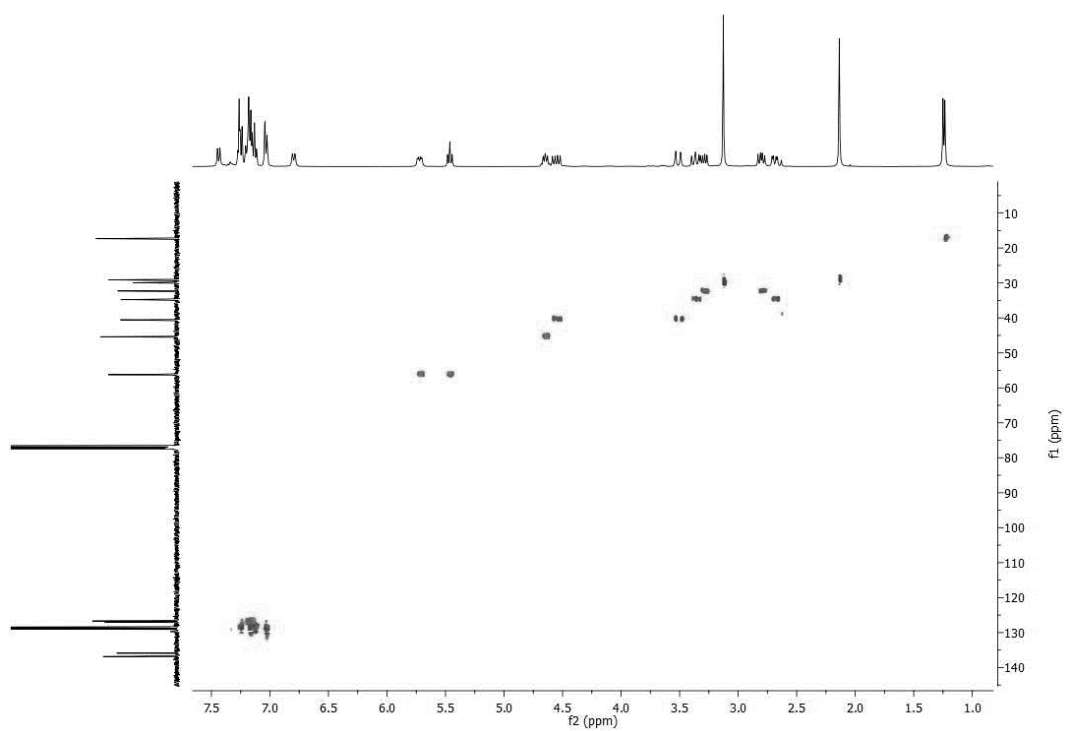


COSY de *Ciclo*-[Ala-NMe-D-Phe-Gly-NMe-L-Phe] (11C)

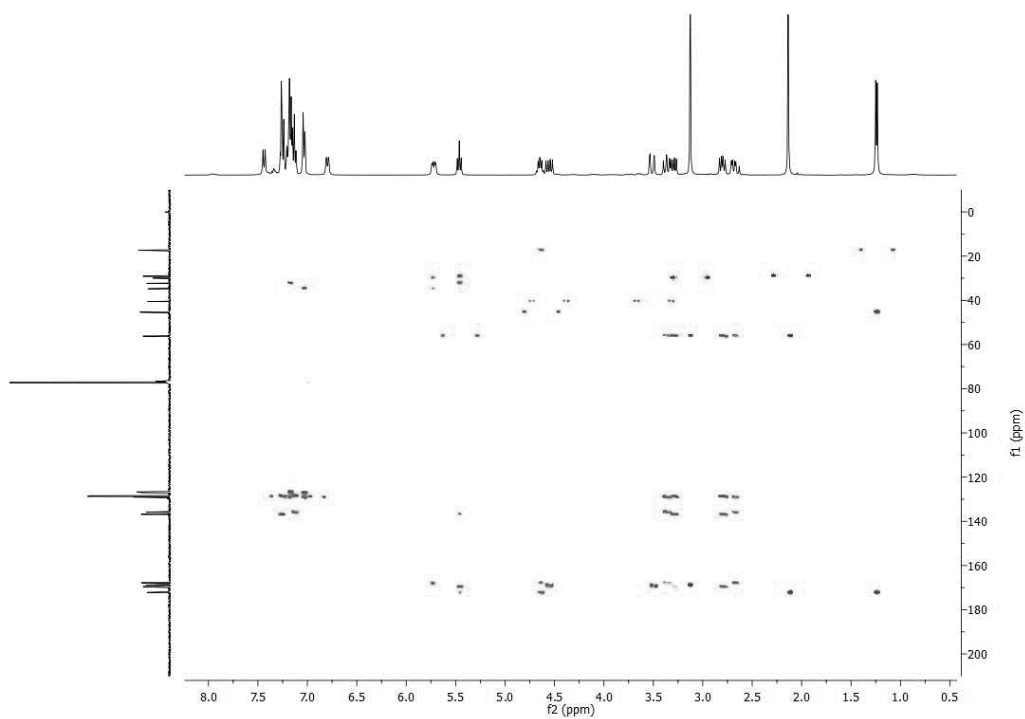


HSQC de *Ciclo*-[Ala-NMe-D-Phe-Gly-NMe-L-Phe] (11C)

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

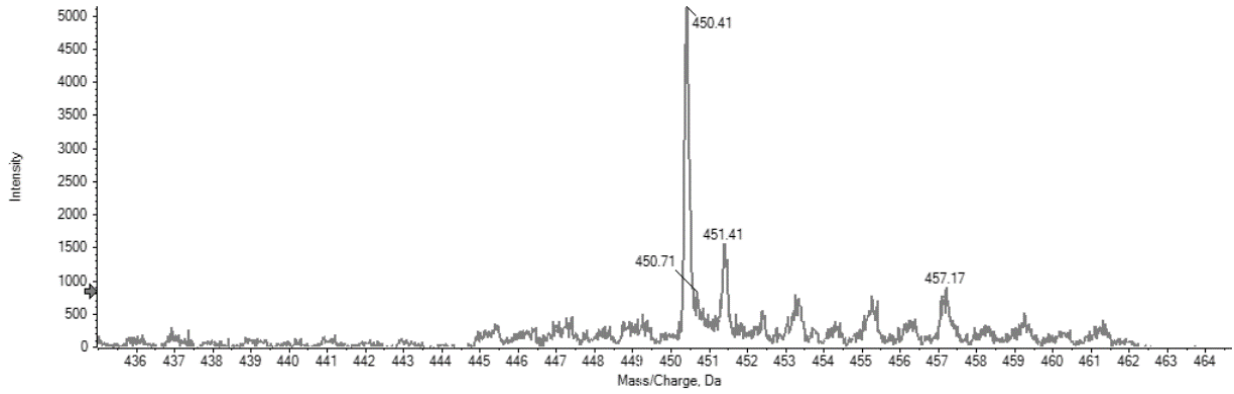


HMBC de *Ciclo*-[Ala-NMe-D-Phe-Gly-NMe-L-Phe] (11C)



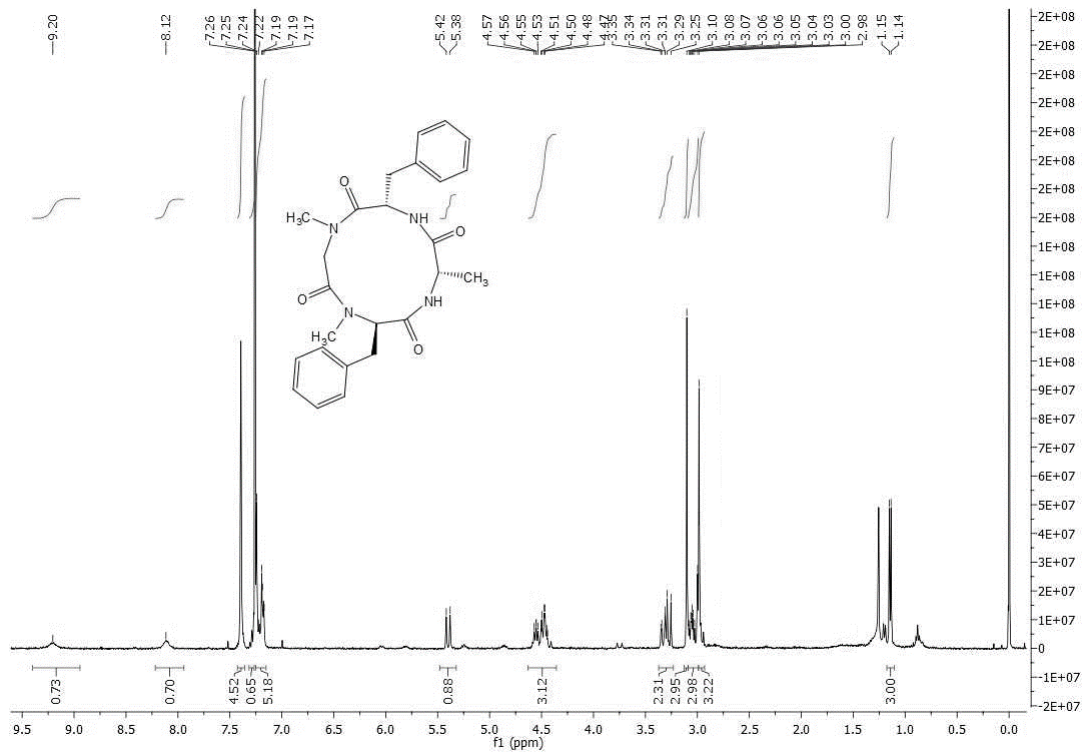
ESI-MS: *Ciclo*-[Ala-NMe-D-Phe-Gly-NMe-L-Phe] (11C)

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

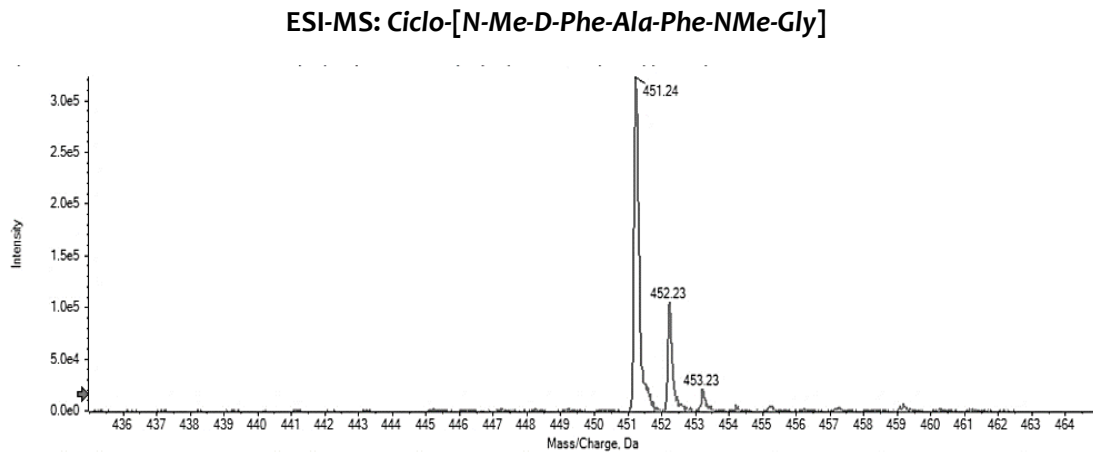
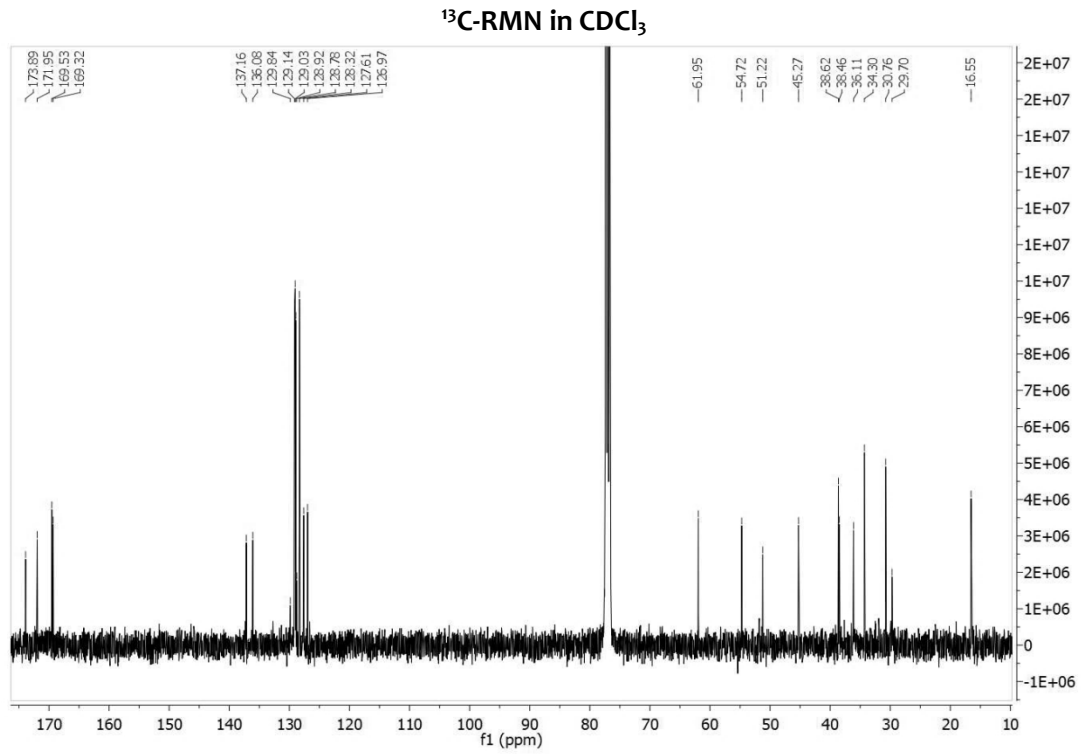


12C: Ciclo-[NMe-D-Phe-Ala-Phe-NMe-Gly]

¹H-RMN in CDCl₃

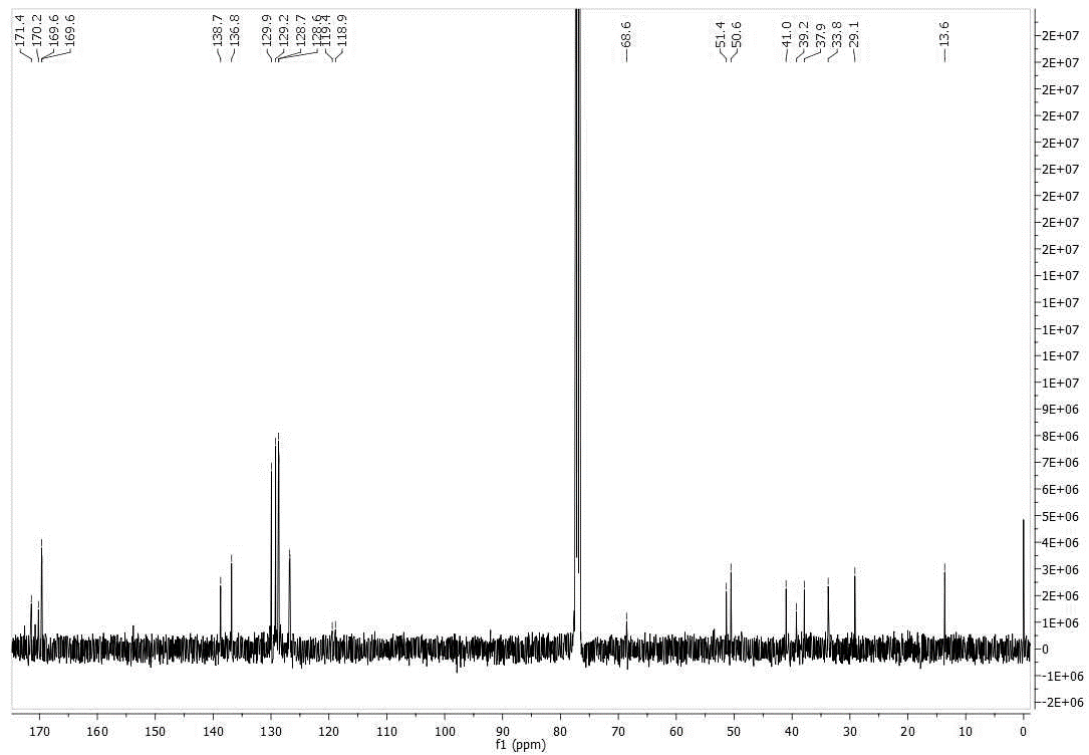
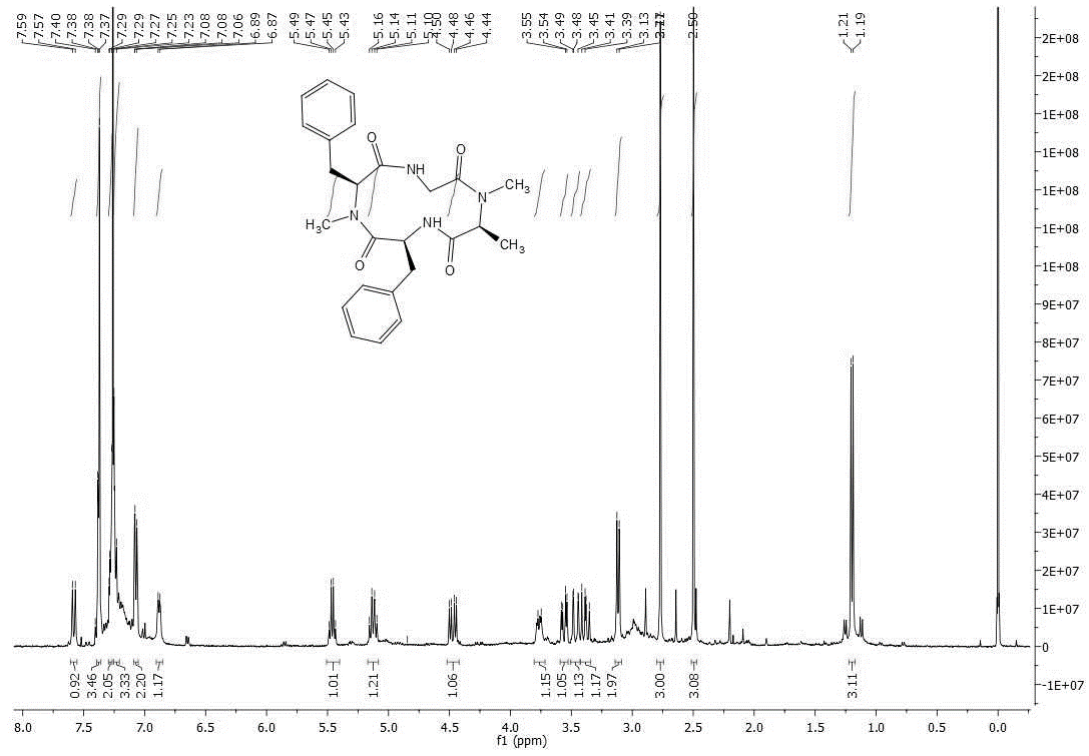


3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



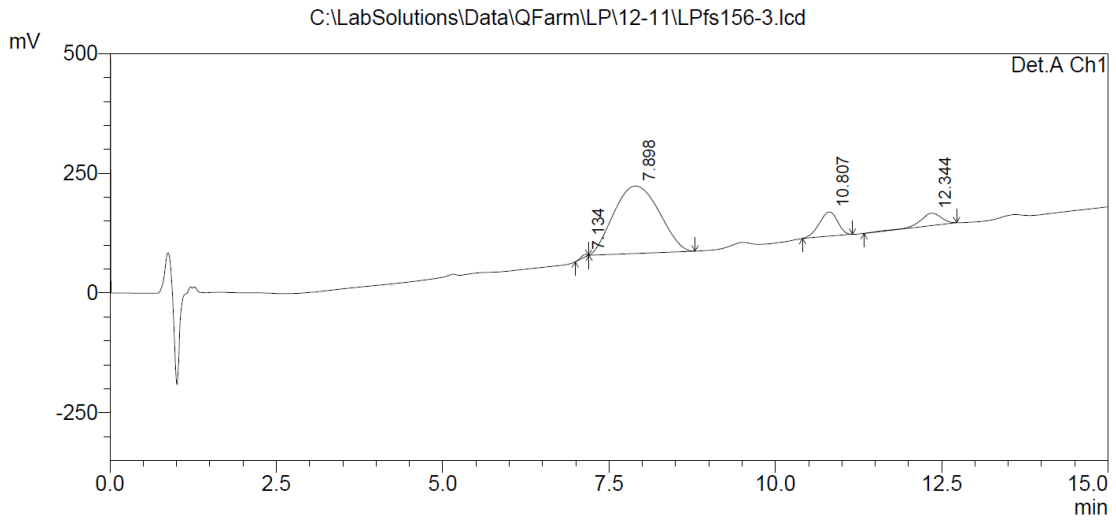
3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

^{13}C : Ciclo-[NmeAla-Phe-NMePhe-Gly]



3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

<Chromatogram>

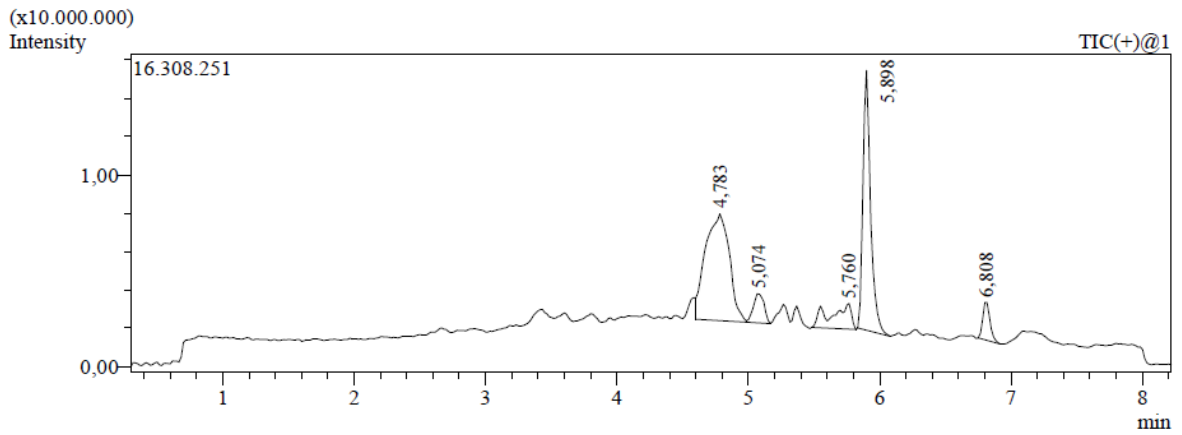


PeakTable

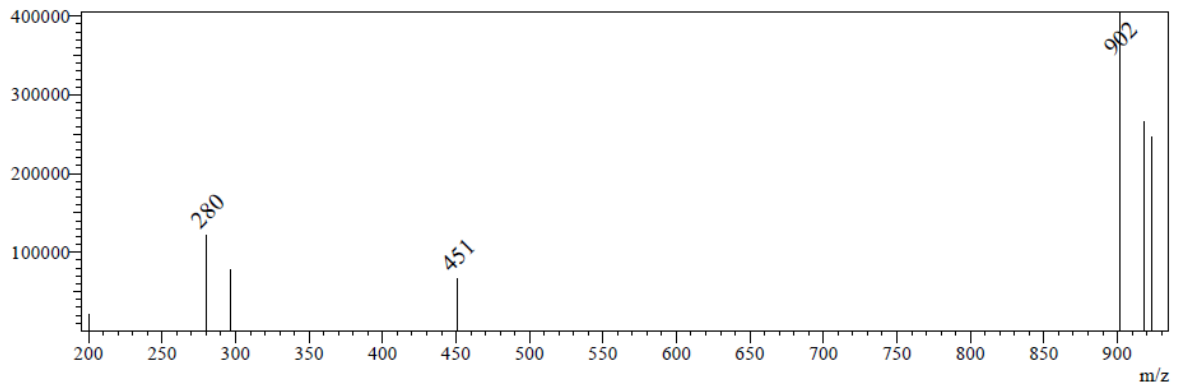
Detector A Ch1 225nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.134	37448	5860	0.451	2.620
2	7.898	6708310	141014	80.832	63.033
3	10.807	971206	50668	11.703	22.648
4	12.344	582123	26174	7.014	11.699
Total		8299086	223716	100.000	100.000

3. Síntesis de ciclo péptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



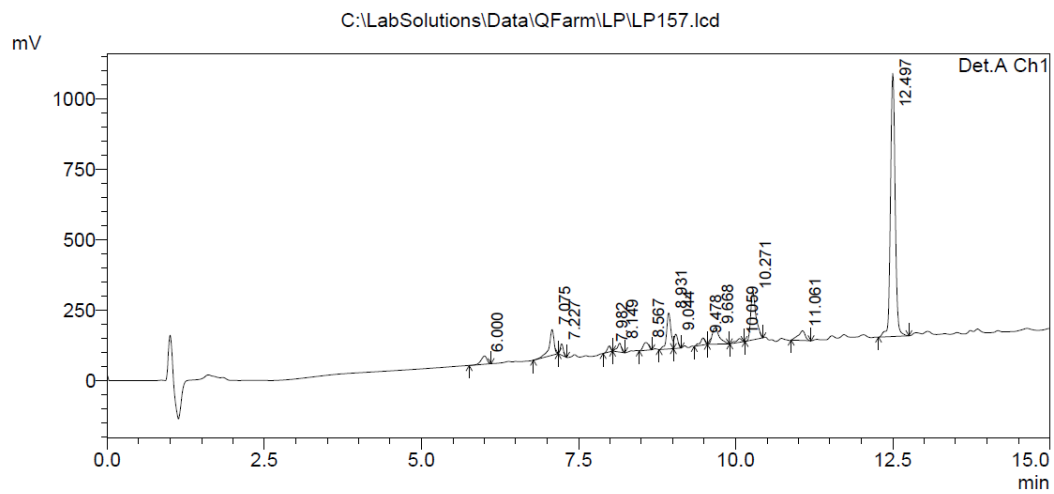
Line#:1 R.Time:----(Scan#:) MassPeaks:7 BasePeak:902(404797)
Spectrum Mode:Averaged 4,617-4,833(260-273)
BG Mode:None Segment 1 - Event 1



14C: Ciclo-[NHMeAla-Thr(OtBu)-Gly-NMe-D-Phe]

¹H-RMN en D₂O

<Chromatogram>

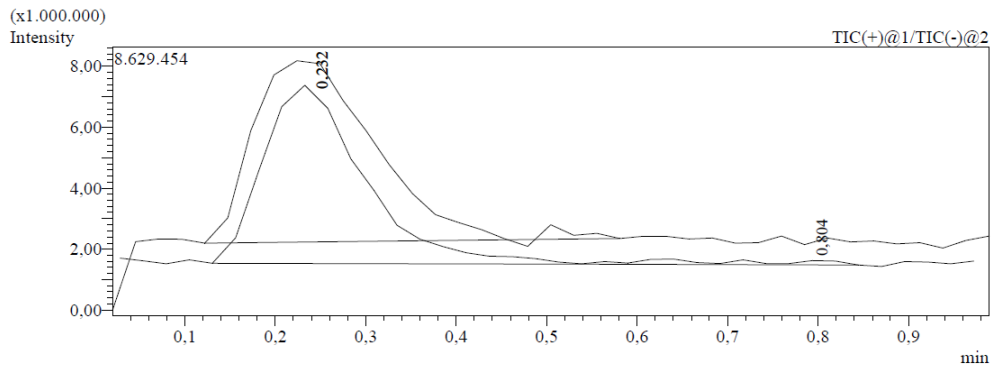


3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

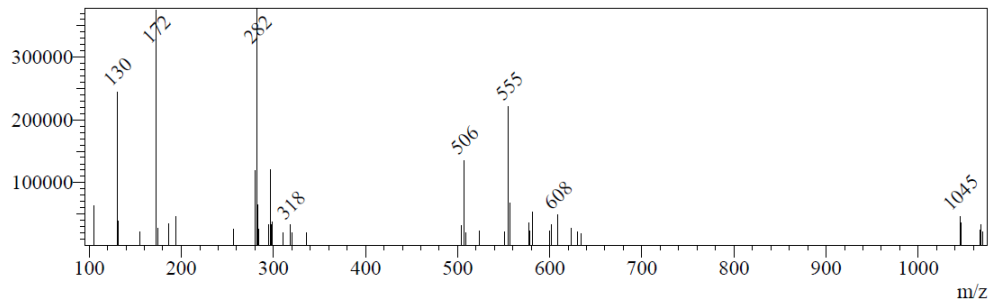
PeakTable

Detector A Ch1 225nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	6.000	189722	29121	2.147	1.760
2	7.075	492888	91278	5.579	5.516
3	7.227	135650	39490	1.535	2.387
4	7.982	80001	21070	0.906	1.273
5	8.149	143516	31539	1.624	1.906
6	8.567	163487	27066	1.851	1.636
7	8.931	622835	128063	7.050	7.739
8	9.044	197073	50494	2.231	3.052
9	9.478	128481	25116	1.454	1.518
10	9.668	455026	57957	5.150	3.503
11	10.059	86835	13483	0.983	0.815
12	10.271	1005269	170086	11.379	10.279
13	11.061	267329	34499	3.026	2.085
14	12.497	4866627	935444	55.085	56.532
Total		8834739	1654705	100.000	100.000



Line#:1 R. Time:----(Scan#:) MassPeaks:44 BasePeak:282(378530)
 Spectrum Mode:Averaged 0.173-0.250(13-19)
 BG Mode:Averaged 0.046-0.097(3-7) Segment 1 - Event 1

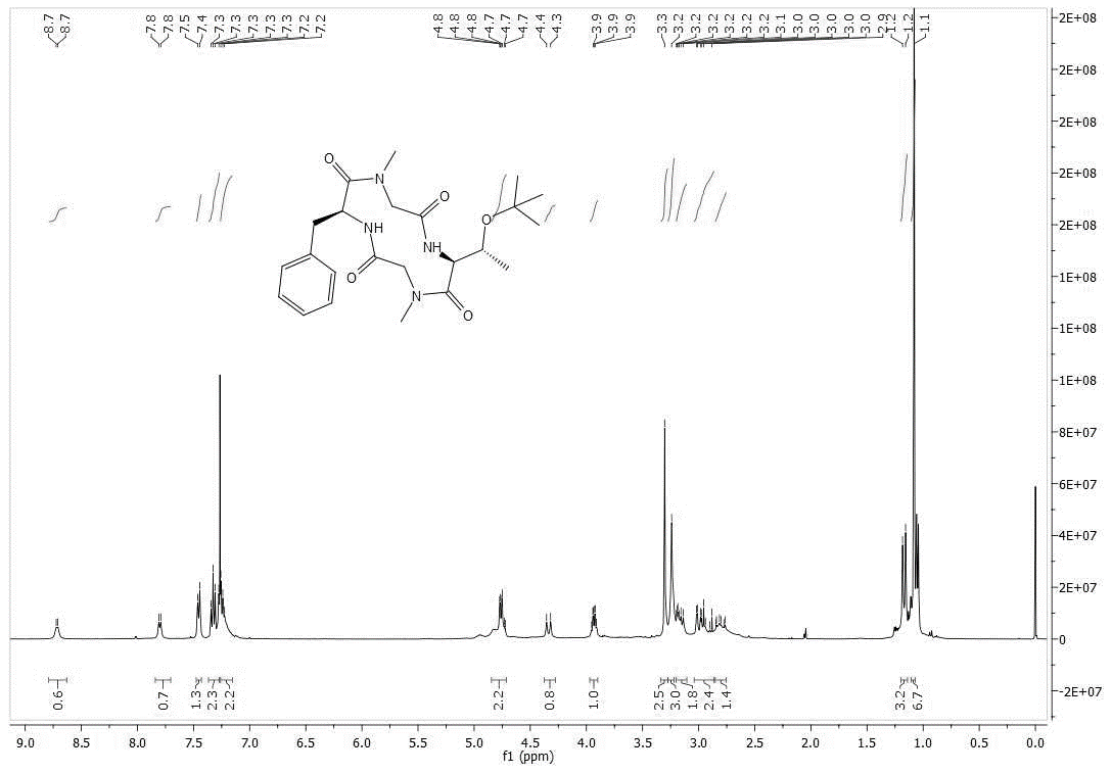


3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

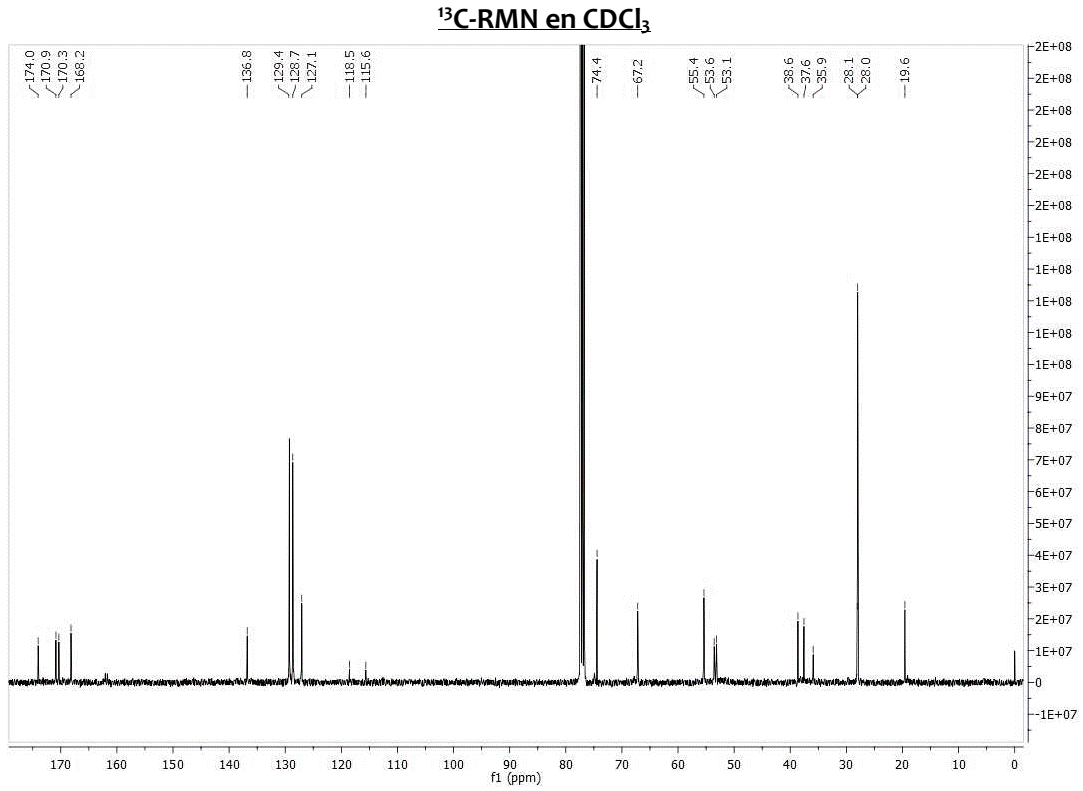
Line# 1 R. Time:----(Scan#----)
 MassPeaks:44
 Spectrum Mode:Averaged 0,173-0,250(13-19) Base Peak:282(378530)
 BG Mode:Averaged 0,046-0,097(3-7) Segment 1 - Event 1

#	m/z	solute	Inten	Inten:
1	105.15	63074	16,66	
2	130.20	244729	64,65	
3	131.25	38516	10,18	
4	155.20	20914	5,53	
5	172.10	375915	99,31	
6	173.10	25473	6,73	
7	174.10	26988	7,13	
8	186.10	34664	9,16	
9	194.05	46042	12,16	
10	256.25	26336	6,96	
11	280.20	119100	31,46	
12	282.25	378530	100,00	
13	283.30	64437	17,02	
14	284.30	26365	6,97	
15	294.30	32782	8,66	
16	296.20	120873	31,93	
17	297.35	33132	8,75	
18	298.30	36988	9,77	
19	310.30	19927	5,26	
20	318.25	32462	8,58	
21	320.30	19539	5,16	
22	336.30	20141	5,32	
23	504.50	32039	8,46	
24	506.50	135309	35,75	
25	507.50	45540	12,03	
26	508.40	19711	5,21	
27	523.35	22230	5,87	
28	551.30	21215	5,60	
29	555.25	221818	58,60	
30	556.30	68060	17,98	
31	577.25	35712	9,43	
32	578.35	23543	6,22	
33	581.30	53388	14,10	
34	600.35	23490	6,21	
35	601.35	32627	8,62	
36	608.40	48341	12,77	
37	623.35	26573	7,02	
38	630.35	20812	5,50	
39	634.40	19066	5,04	
40	1045.55	45903	12,13	
41	1046.65	36146	9,55	

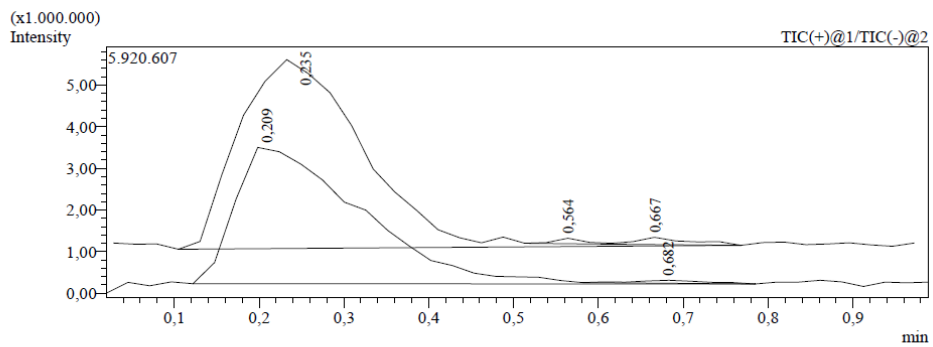
15C: Ciclo-[NH₂-Thr(OtBu)-NMeGly-Phe-NMeGly-OH]¹H-RMN en CDCl₃



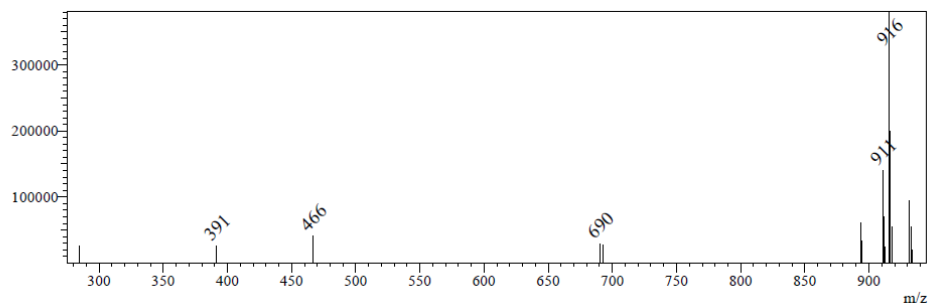
3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



ESI-MS Ciclo-[NH₂-Thr(OtBu)-NMeGly-Phe-NMeGly-OH]



Line#1 R. Time:----(Scan#:) MassPeaks:16 BasePeak:916(380656)
Spectrum Mode:Averaged 0,173-0,301(13-23)
BG Mode:Averaged 0,046-0,097(3-7) Segment 1 - Event 1



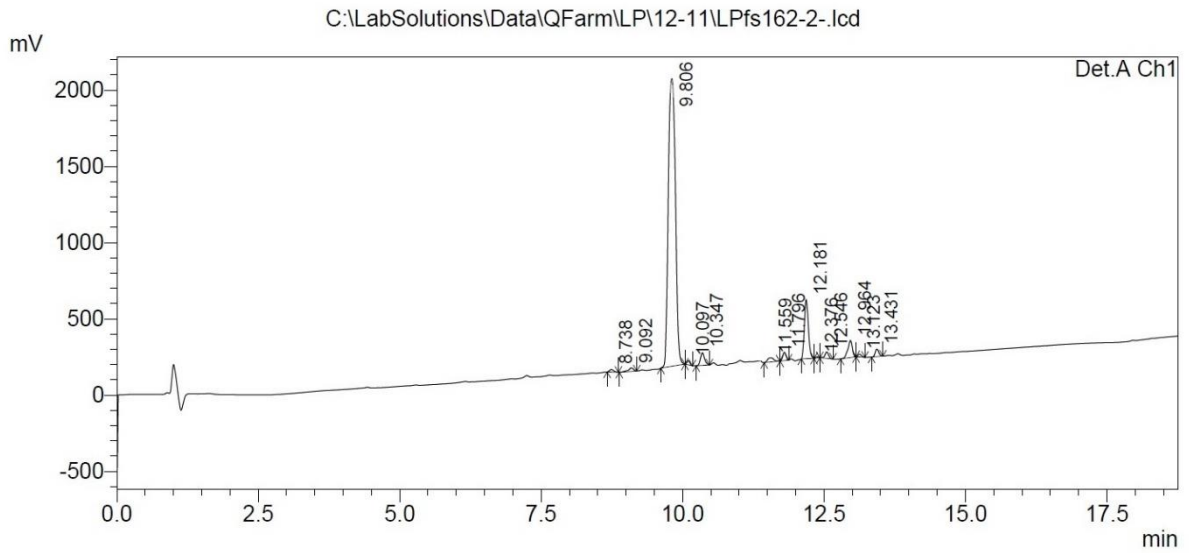
3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

MS Spectrum

Line#:1 R.Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:16
 Spectrum Mode:Averaged 0.173-0.301(13-23) Base Peak:916(380656)
 BG Mode:Averaged 0.046-0.097(3-7) Segment 1 - Event 1

#	m/z	Relative Inten:	Inten:
1	284.35	26098	6.86
2	391.40	26241	6.89
3	466.45	40277	10.58
4	690.20	29211	7.67
5	692.50	26788	7.04
6	893.60	61302	16.10
7	894.70	32684	8.59
8	910.70	140744	36.97
9	911.75	70369	18.49
10	912.75	24899	6.54
11	915.70	380656	100.00
12	916.65	200409	52.65
13	917.70	54200	14.24
14	931.65	93733	24.62

<Chromatogram>



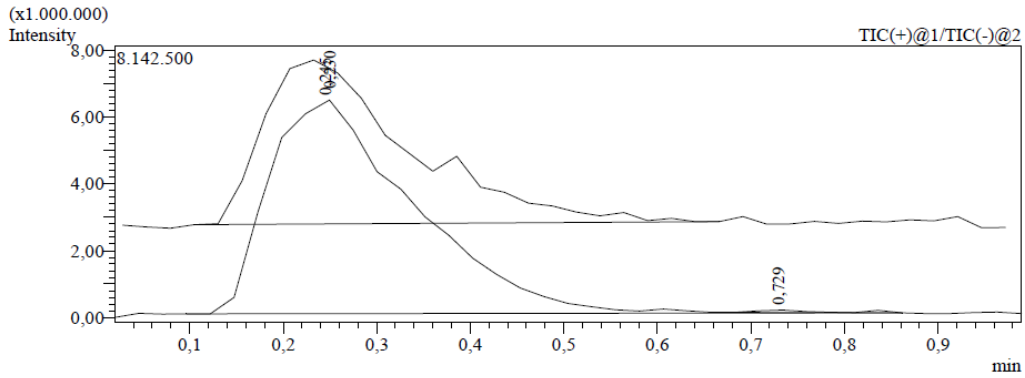
PeakTable

Detector A Ch1 225mm

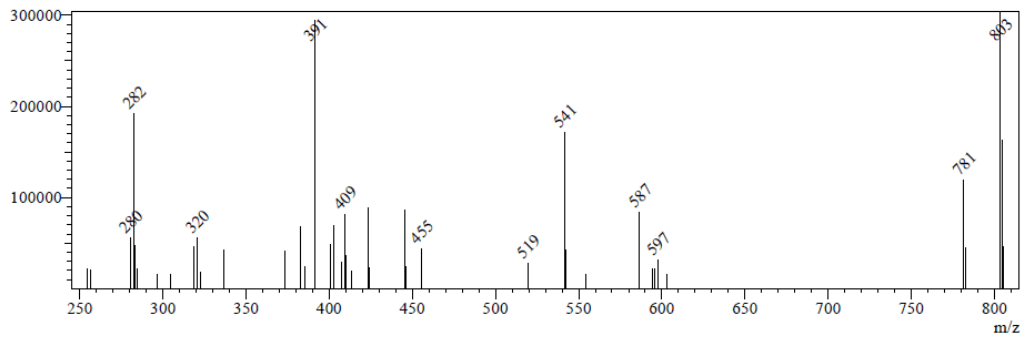
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.738	90212	17410	0.436	0.635
2	9.092	150316	23430	0.726	0.855
3	9.806	16470484	1889032	79.531	68.950
4	10.097	95413	25855	0.461	0.944
5	10.347	417207	83874	2.015	3.061
6	11.559	209575	26446	1.012	0.965
7	11.796	226670	54795	1.095	2.000
8	12.181	1916964	388095	9.256	14.166
9	12.376	25471	8246	0.123	0.301
10	12.546	194446	43243	0.939	1.578
11	12.964	619331	112132	2.991	4.093
12	13.123	76503	17974	0.369	0.656
13	13.431	216875	49175	1.047	1.795
Total		20709466	2739706	100.000	100.000

3. Síntesis de ciclo péptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

**15D: Ciclo-[NH₂-Thr(OH)-NMeGly-Phe-NMeGly-OH]
ESI-MS**



Line#:1 R.Time:----(Scan#:) MassPeaks:41 BasePeak:803(303520)
Spectrum Mode:Averaged 0.173-0.301(13-23)
BG Mode:Averaged 0.046-0.122(3-9) Segment 1 - Event 1



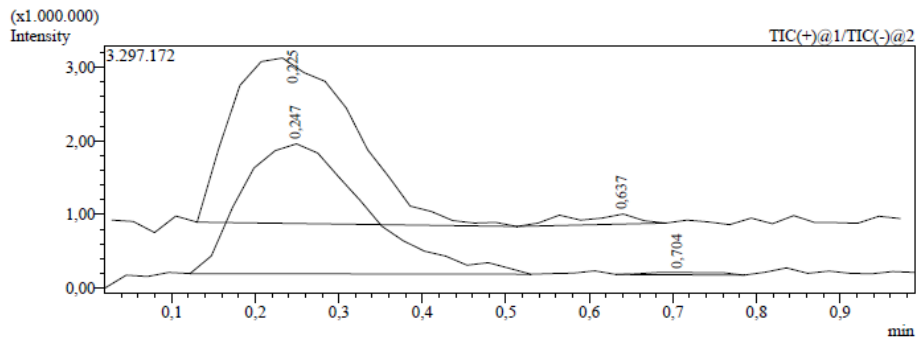
MS Spectrum

Line#:1 R.Time:----(Scan#:----)
MassPeaks:41
Spectrum Mode:Averaged 0.173-0.301(13-23) Base Peak:803(303520)
BG Mode:Averaged 0.046-0.122(3-9) Segment 1 - Event 1

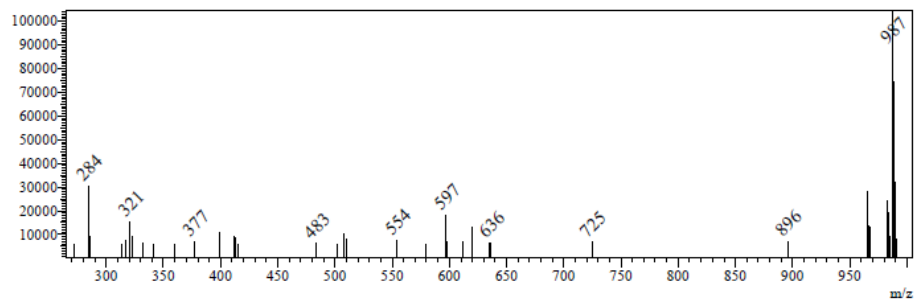
#	m/z	Relative Intensity	Intens:
1	254.35	21547	7.10
2	256.30	20931	6.90
3	280.30	55646	18.33
4	282.40	191648	63.14
5	283.30	47297	15.58
6	284.40	21789	7.18
7	296.30	15928	5.25
8	304.45	15832	5.22
9	318.35	45427	14.97
10	320.30	55659	18.34
11	322.30	17915	5.90
12	336.40	43161	14.22
13	373.40	40906	13.48
14	382.35	67737	22.32
15	385.45	24483	8.07
16	391.35	294108	96.90
17	400.40	48184	15.88
18	402.35	69560	22.92
19	407.55	28638	9.44
20	409.30	81749	26.93
21	410.35	36690	12.09
22	413.30	19667	6.48
23	423.35	89252	29.41
24	424.30	22526	7.42
25	445.30	86265	28.42
26	446.30	24560	8.09
27	455.35	44122	14.54
28	519.35	28405	9.36
29	541.40	171449	56.49
30	542.30	42569	14.03
31	554.25	15945	5.25
32	586.60	83888	27.64
33	594.40	22155	7.30
34	595.50	22280	7.34
35	597.45	31201	10.28
36	602.95	15206	5.01
37	781.55	119099	39.24
38	782.60	45141	14.87

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

ESI-MS: Ciclo-[Phe-NMeGly-Cys(Bn)-NMeGly]



Line#:1 R.Time:----(Scan#) MassPeaks:40 BasePeak:987(104510)
 Spectrum Mode:Averaged 0.148-0.301(11-23)
 BG Mode:Averaged 0.046-0.097(3-7) Segment 1 - Event 1



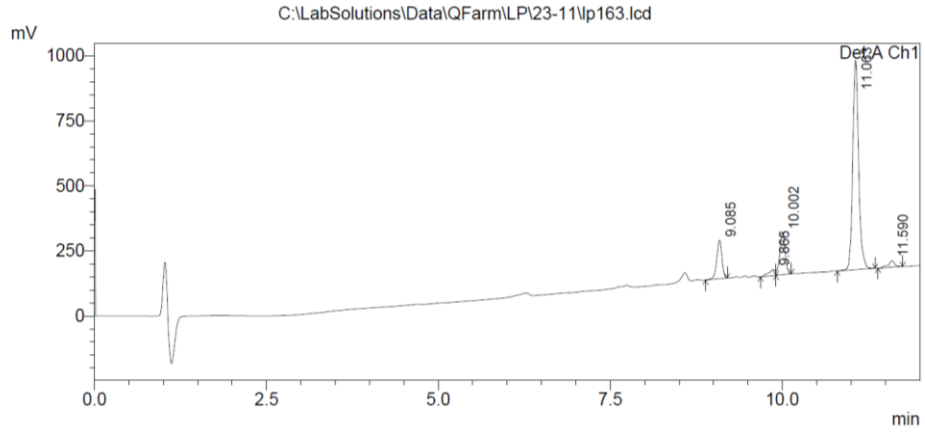
MS Spectrum

Line#:1 R.Time:----(Scan#)----)
 MassPeaks:40
 Spectrum Mode:Averaged 0.148-0.301(11-23) Base Peak:987(104510)
 BG Mode:Averaged 0.046-0.097(3-7) Segment 1 - Event 1

#	m/z	Relative Inten:	Inten:
1	272.10	5715	5.47
2	284.35	30420	29.11
3	285.45	9094	8.70
4	313.40	5869	5.62
5	317.20	7271	6.96
6	321.10	15278	14.62
7	322.30	8858	8.48
8	331.50	6460	6.18
9	341.40	5625	5.38
10	359.55	6022	5.76
11	377.40	6953	6.65
12	399.25	10984	10.51
13	412.15	9175	8.78
14	413.30	8426	8.06
15	415.15	6042	5.78
16	483.55	6124	5.86
17	502.30	5510	5.27
18	508.25	10137	9.70
19	510.35	8006	7.66
20	554.20	7586	7.26
21	579.70	6009	5.75
22	597.25	18304	17.51
23	598.35	6872	6.58
24	611.40	6685	6.40
25	619.35	13162	12.59
26	620.10	5437	5.20
27	635.25	6435	6.16
28	636.20	6538	6.26
29	724.65	6717	6.43
30	895.65	6742	6.45
31	965.60	28030	26.82
32	966.60	13476	12.89
33	967.55	13259	12.69
34	982.65	23984	22.95
35	983.65	18971	18.15
36	984.65	8992	8.60
37	987.55	104510	100.00

3. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

<Chromatogram>



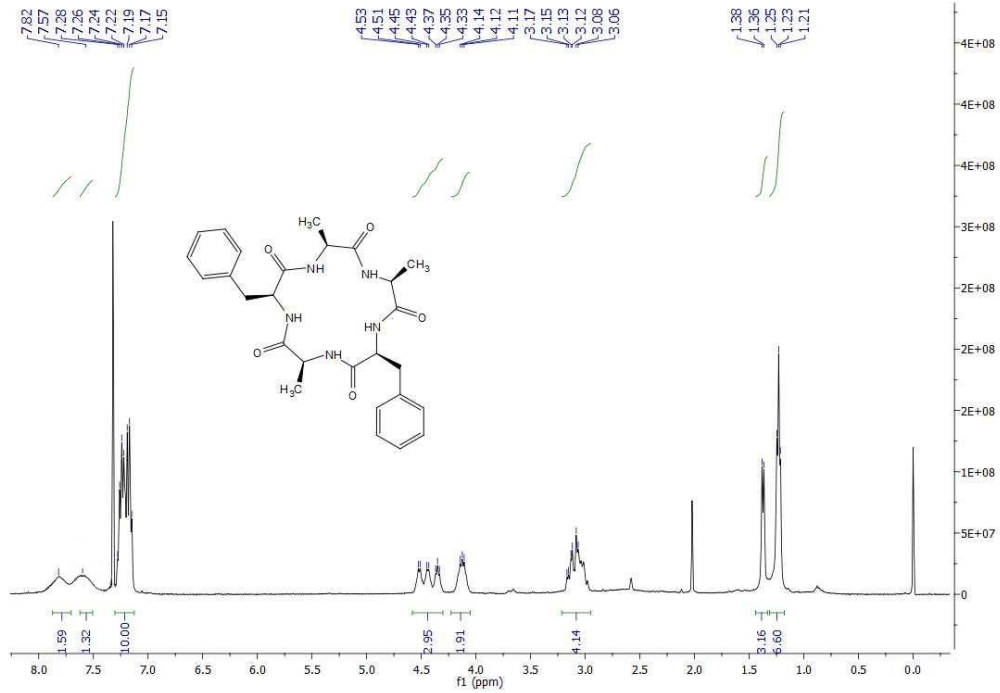
PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	9.085	779284	147706	11.495	12.694
2	9.866	166137	23382	2.451	2.009
3	10.002	866950	162060	12.788	13.927
4	11.063	4804569	805582	70.869	69.231
5	11.590	162590	24889	2.398	2.139
Total		6779530	1163619	100.000	100.000

Ciclopentapéptidos

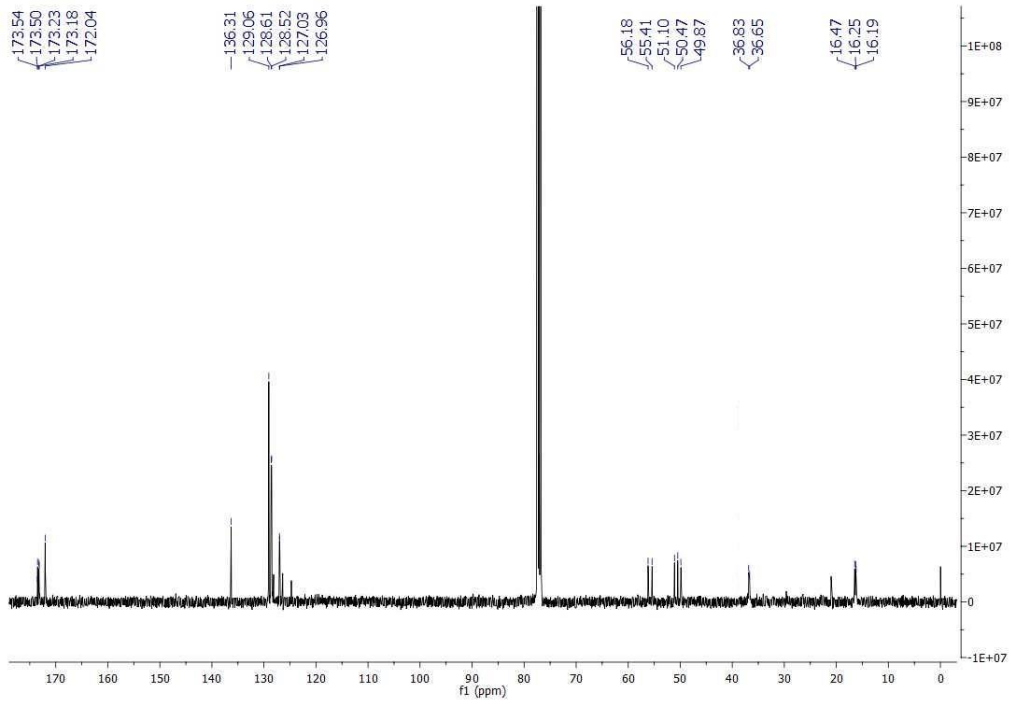
17C: Ciclo-[NH₂-Ala-Phe-Ala-Phe-Ala]

¹H-RMN en CDCl₃

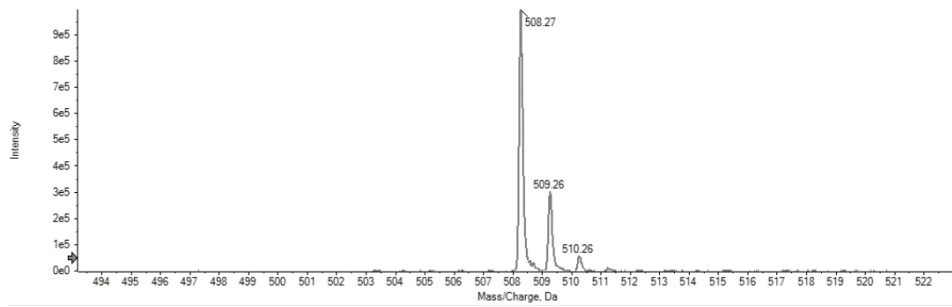


¹³C-RMN en CDCl₃

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



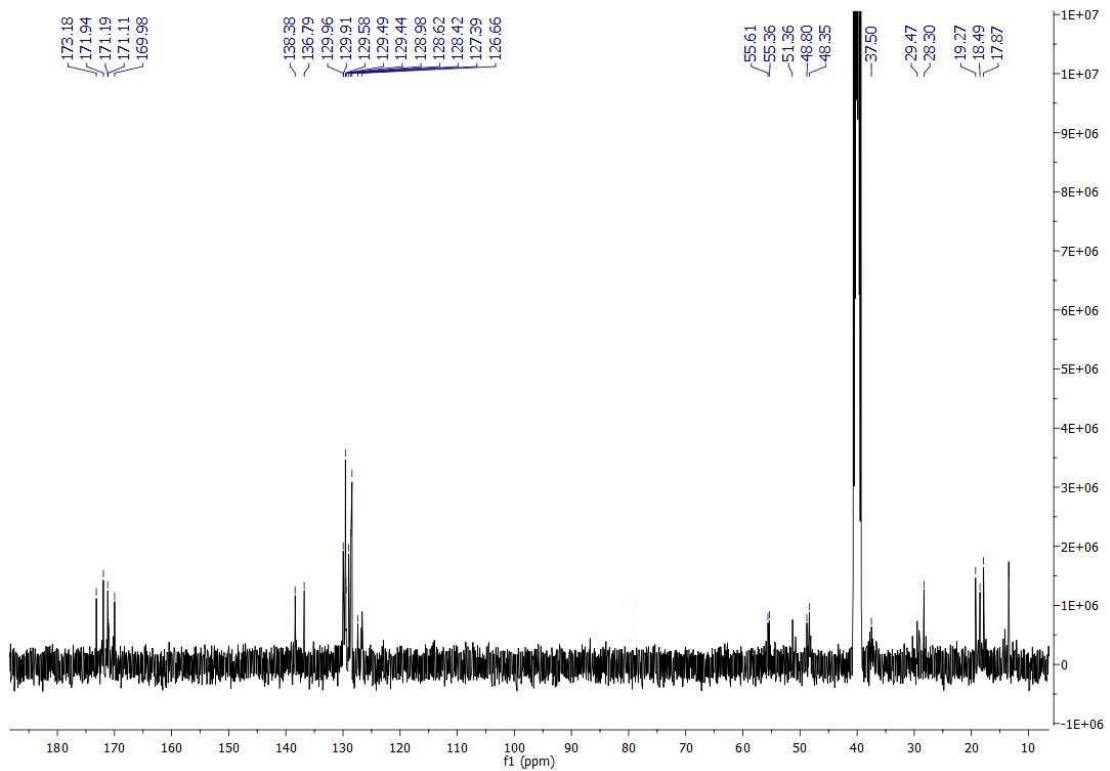
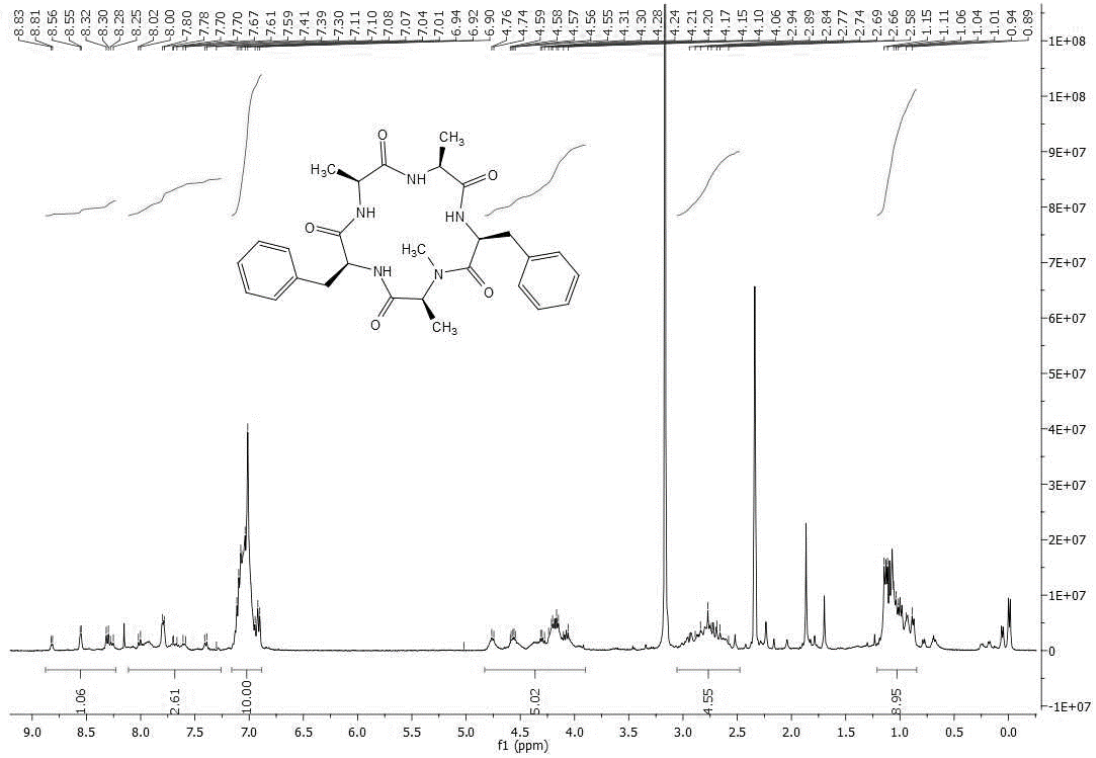
ESI-MS: *Ciclo-[NH₂-Ala-Phe-Ala-Phe-Ala]*



3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

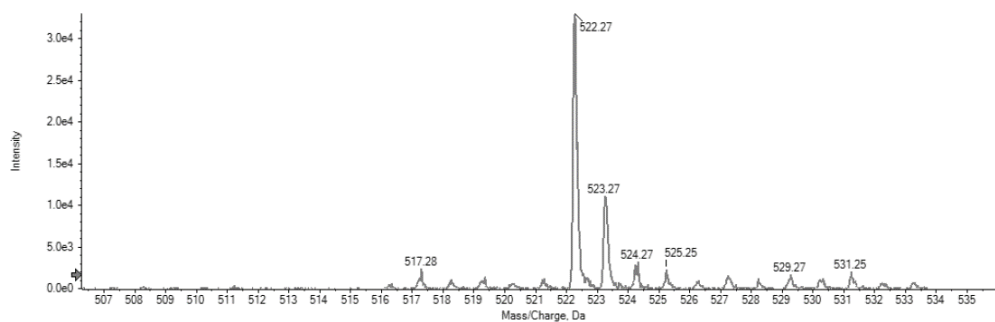
18C: Ciclo-[NH₂-Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-Ala]

RMN in DMSO-d₆



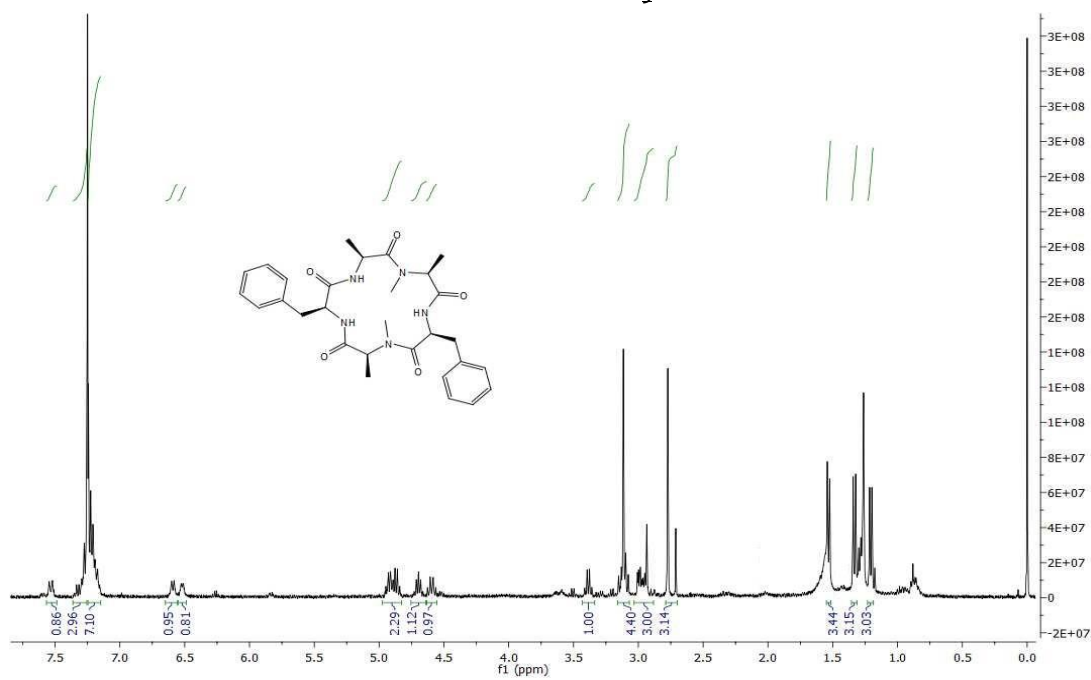
3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

ESI-MS: Ciclo-[Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-Ala]

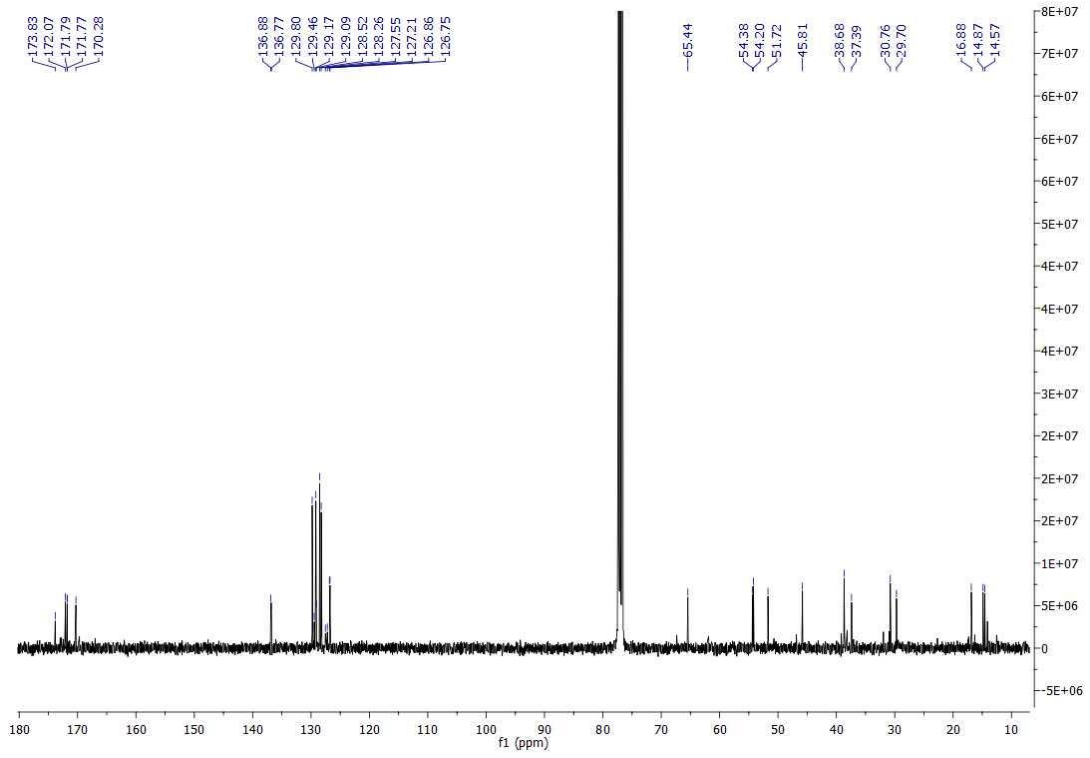


19C: Ciclo-[NMe-Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-Ala]

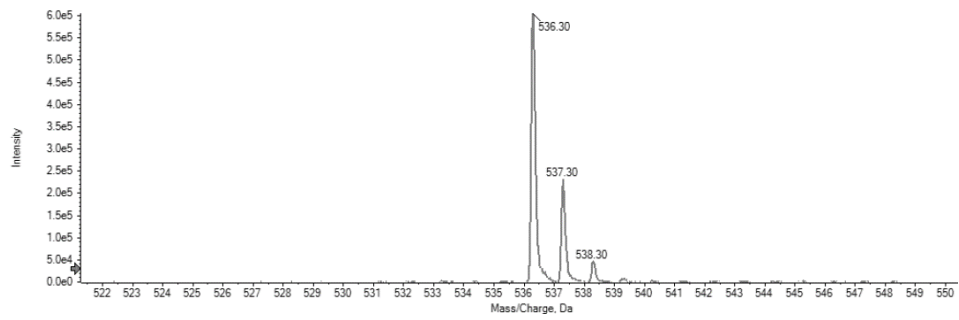
¹HRMN en CDCl₃



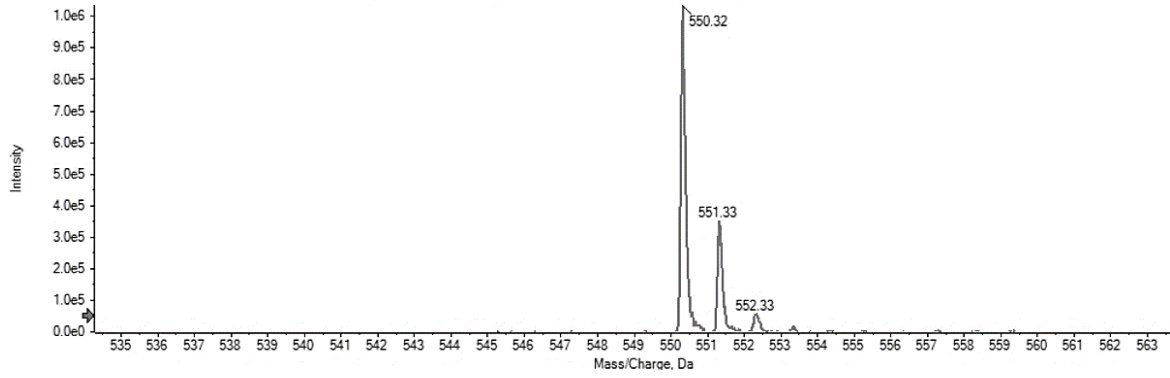
3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



ESI-MS: *Ciclo-[NMe-Ala-Phe-NMe-Ala-Phe-Ala]*

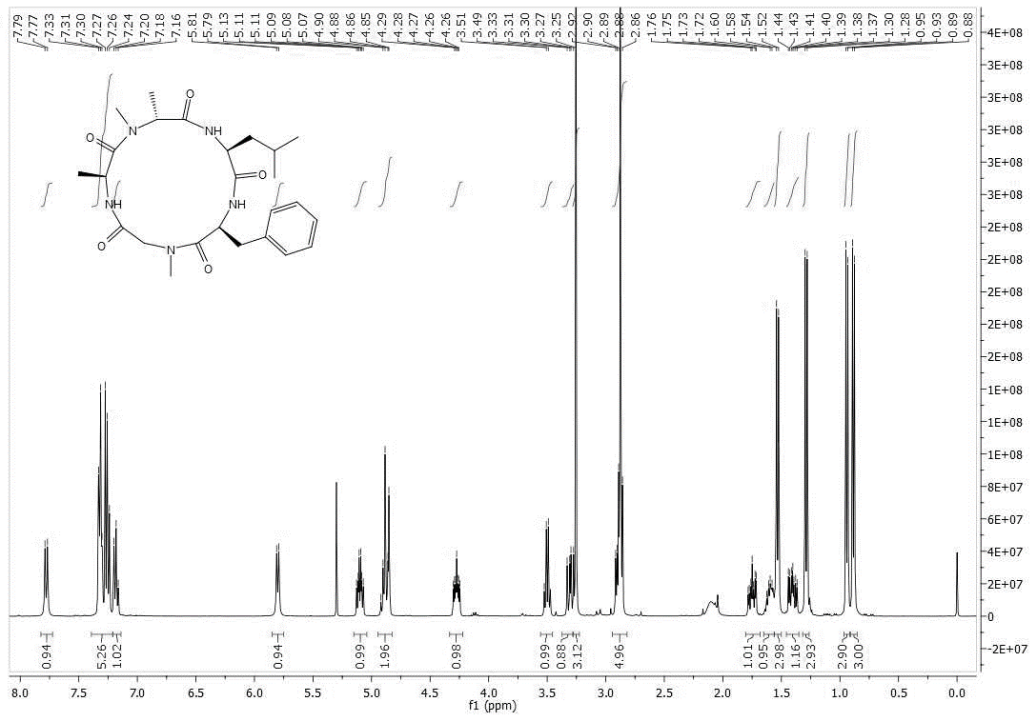


3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



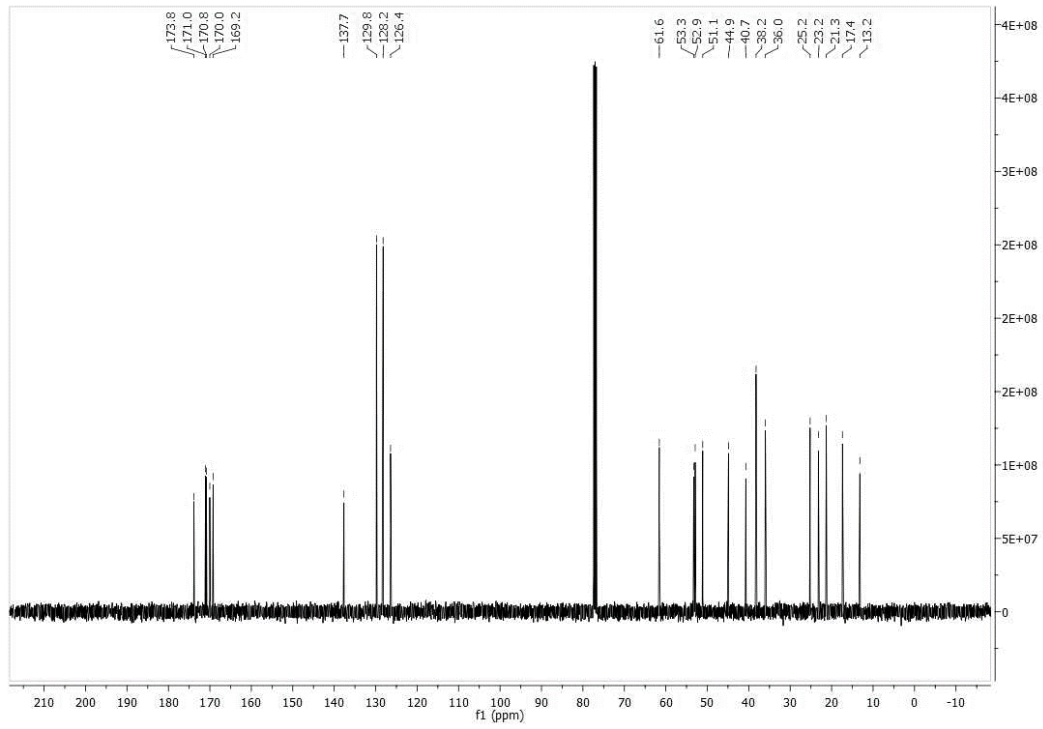
22C: Ciclo-[Ala-NMeAla-Leu-Phe-NMeGly]

^1H -RMN en CDCl_3

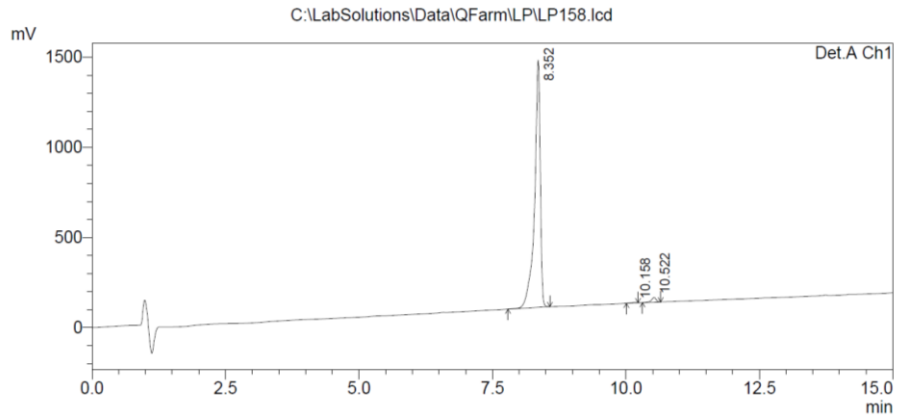


^{13}C -RMN en CDCl_3

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



<Chromatogram>



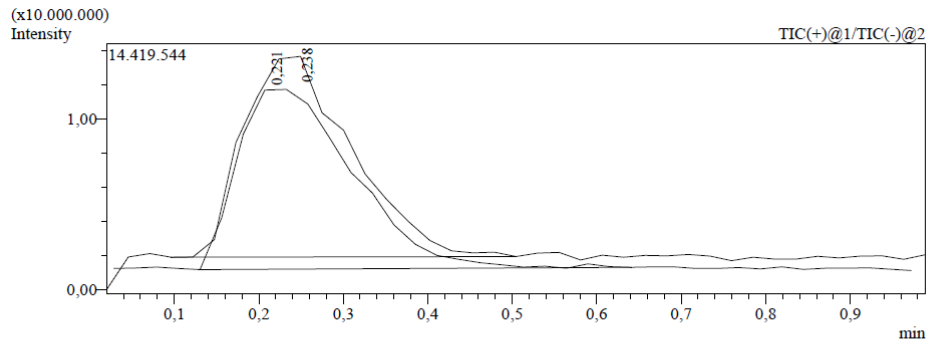
PeakTable

Detector A Ch1 225nm

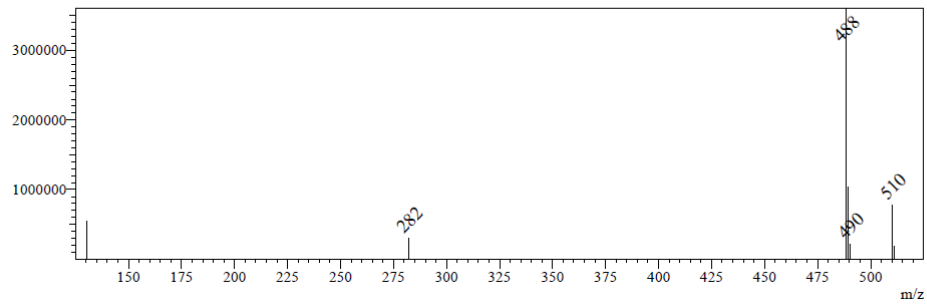
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.352	10238392	1372369	98.299	97.908
2	10.158	17182	2966	0.165	0.212
3	10.522	159985	26351	1.536	1.880
Total		10415559	1401687	100.000	100.000

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

ESI-MS de Cíclo-[Ala-NMeAla-Leu-Phe-NMeGly]



Line#:1 R.Time:----(Scan#:) MassPeaks:7 BasePeak:488(3599041)
 Spectrum Mode:Averaged 0.173-0.275(13-21)
 BG Mode:Averaged 0.071-0.097(5-7) Segment 1 - Event 1



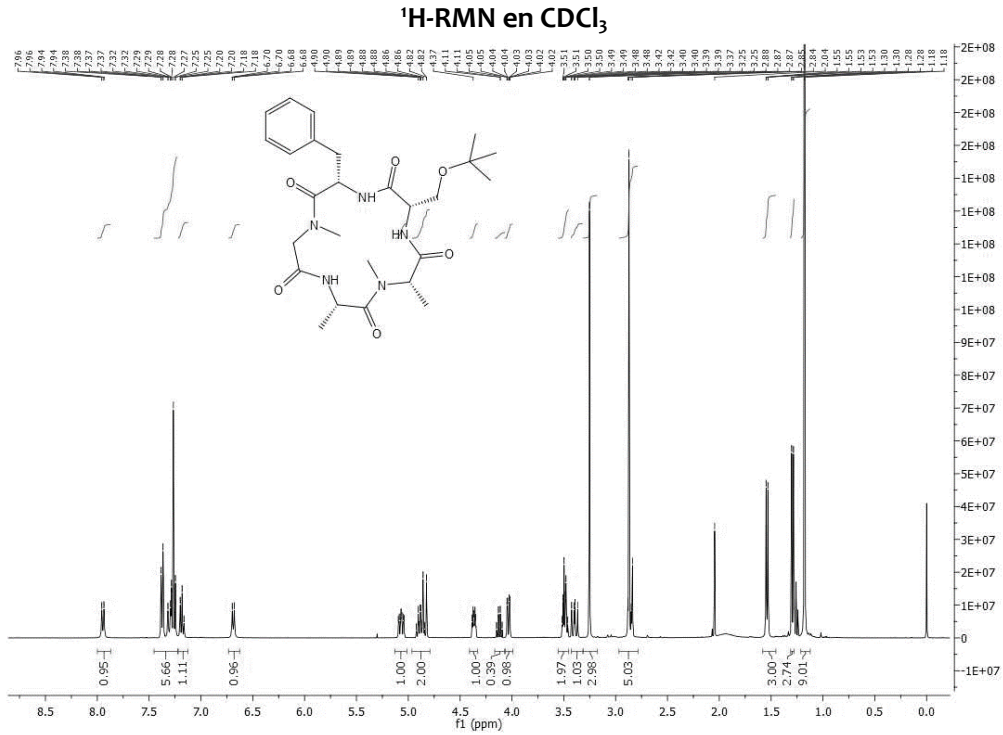
MS Spectrum

Line#:1 R.Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:7
 Spectrum Mode:Averaged 0.173-0.275(13-21) Base Peak:488(3599041)
 BG Mode:Averaged 0.071-0.097(5-7) Segment 1 - Event 1

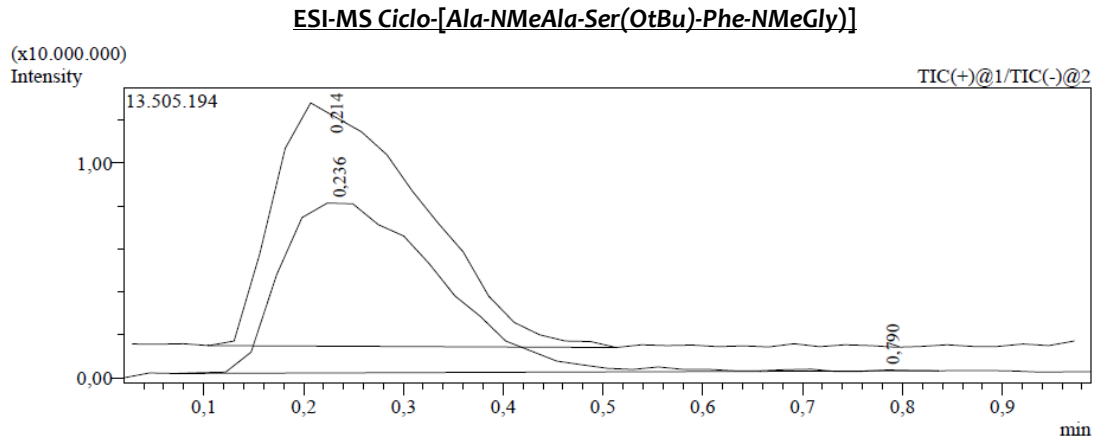
#	m/z	solute	Inten	Intenative	Intens:
1	130.20	550474	15.30		
2	282.25	298730	8.30		
3	488.25	3599041	100.00		
4	489.30	1034069	28.73		
5	490.30	213237	5.92		
6	510.25	779429	21.66		

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

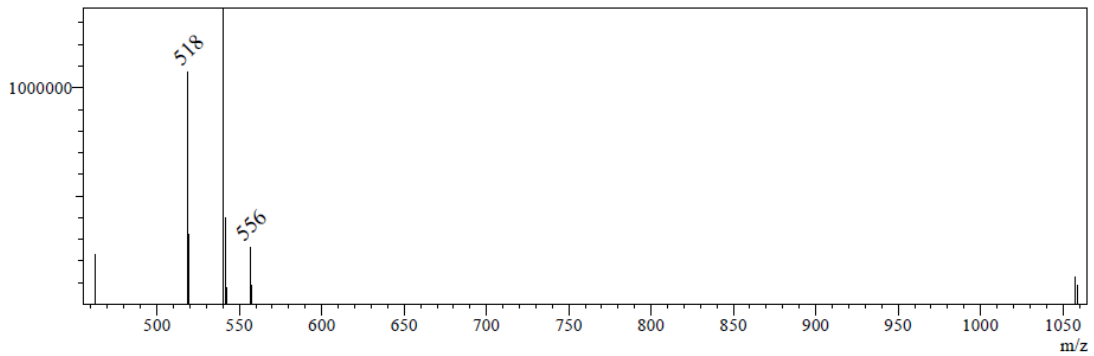
23C: Ciclo-[Ala-NMeAla-Ser(OtBu)-Phe-NMeGly]



3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



Line#:1 R.Time:----(Scan#:) MassPeaks:10 BasePeak:540(1366707)
 Spectrum Mode:Averaged 0.148-0.326(11-25)
 BG Mode:Averaged 0.020-0.097(1-7) Segment 1 - Event 1



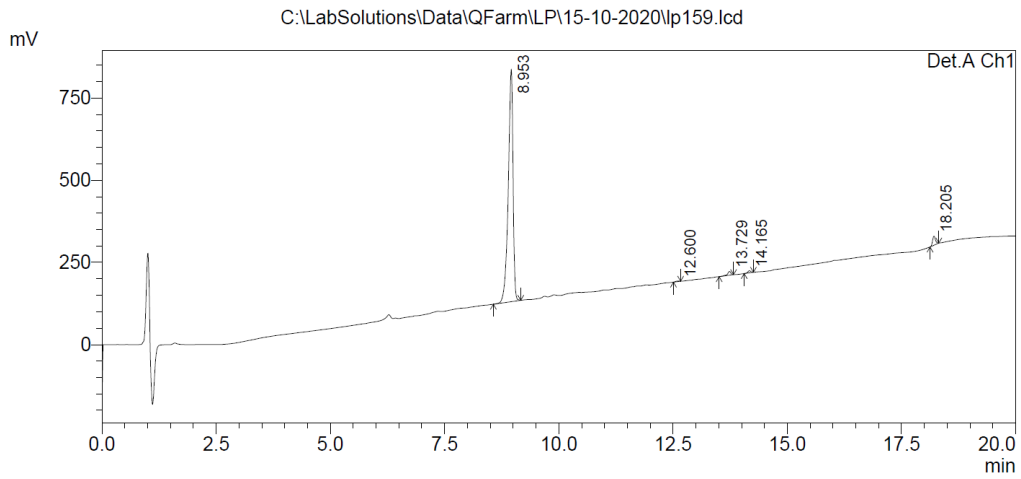
MS Spectrum

Line#:1 R.Time:----(Scan#:) MassPeaks:10
 Spectrum Mode:Averaged 0.148-0.326(11-25) Base Peak:540(1366707)
 BG Mode:Averaged 0.020-0.097(1-7) Segment 1 - Event 1

#	m/z	solute Inten	Inten	Intens
1	462,25	228964	16,75	
2	518,35	1073806	78,57	
3	519,35	321791	23,54	
4	540,35	1366707	100,00	
5	541,40	397737	29,10	
6	542,40	77809	5,69	
7	556,30	264165	19,33	
8	557,35	85951	6,29	
9	1057,75	127281	9,31	

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

<Chromatogram>



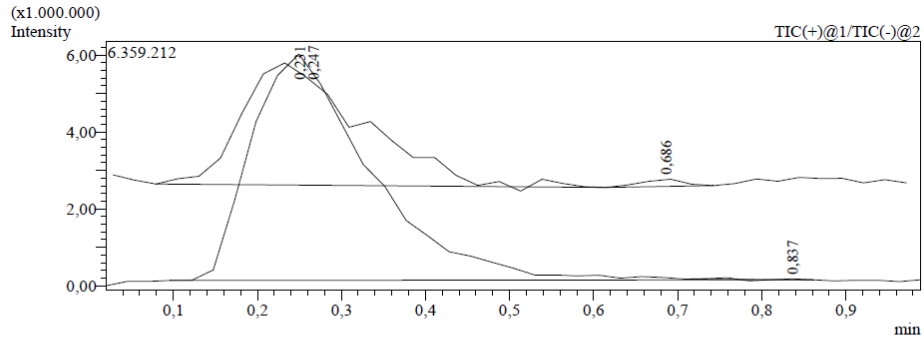
PeakTable

Detector A Ch1 225nm

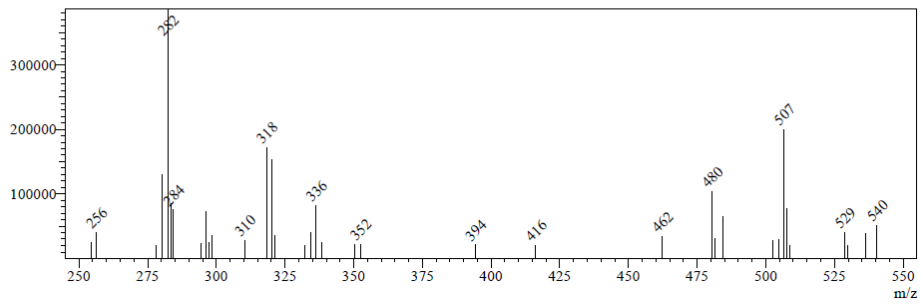
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.953	5122834	707933	95.790	93.633
2	12.600	10037	1828	0.188	0.242
3	13.729	60176	11406	1.125	1.509
4	14.165	29740	6748	0.556	0.892
5	18.205	125179	28158	2.341	3.724
Total		5347965	756073	100.000	100.000

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

23D: ESI-MS Ciclo-[Ala-NMeAla-Ser(OtBu)-Phe-NMeGly]



Line#:1 R Time:----(Scan#) MassPeaks:36 BasePeak:282(386317)
 Spectrum Mode:Averaged 0.173-0.301(13-23)
 BG Mode:Averaged 0.097-0.122(7-9) Segment 1 - Event 1



MS Spectrum

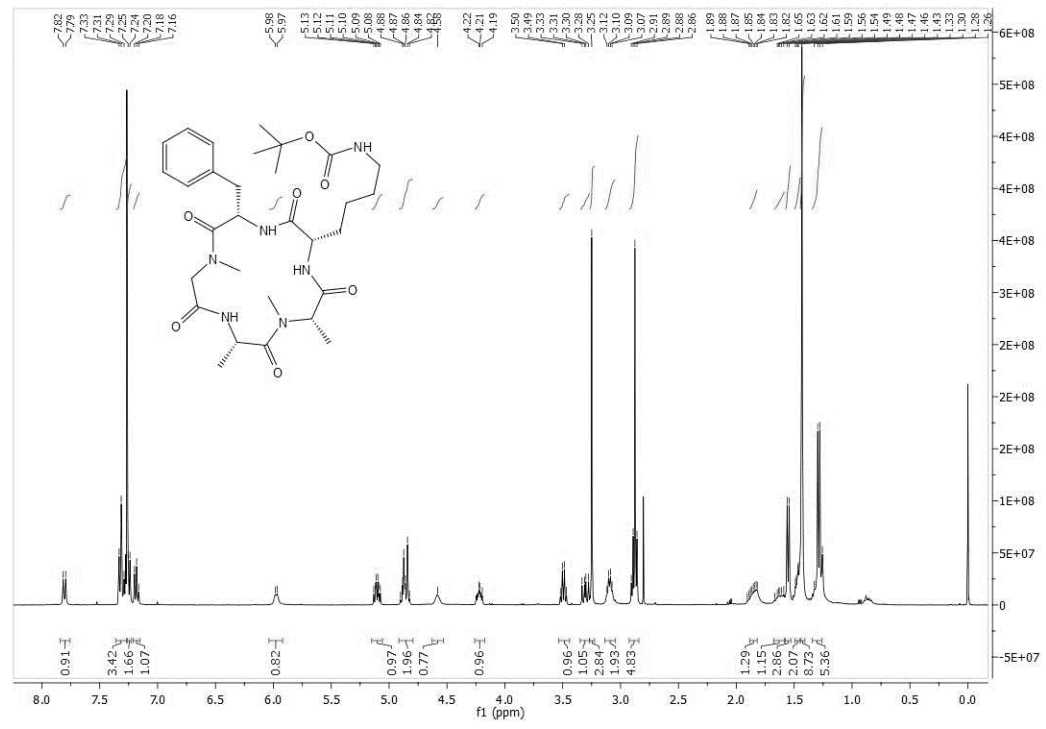
Line#:1 R Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:36
 Spectrum Mode:Averaged 0.173-0.301(13-23) Base Peak:282(386317)
 BG Mode:Averaged 0.097-0.122(7-9) Segment 1 - Event 1

#	m/z	Relative Intensity	Intensive Intensity
1	254.40	24312	6.29
2	256.30	39710	10.28
3	278.25	20087	5.20
4	280.35	129609	33.55
5	282.35	386317	100.00
6	283.40	84703	21.93
7	284.40	74863	19.38
8	294.40	22895	5.93
9	296.30	71997	18.64
10	297.35	24948	6.46
11	298.35	35920	9.30
12	310.35	27852	7.21
13	318.30	171818	44.48
14	320.35	153492	39.73
15	321.35	35584	9.21
16	332.30	20407	5.28
17	334.30	39548	10.24
18	336.30	81682	21.14
19	338.35	25005	6.47
20	350.30	21513	5.57
21	352.40	21968	5.69
22	394.30	20790	5.38
23	416.25	20258	5.24
24	462.30	33604	8.70
25	480.40	103058	26.68
26	481.40	31574	8.17
27	484.30	65172	16.87
28	502.40	27715	7.17
29	504.65	28778	7.45
30	506.60	200161	51.81
31	507.60	77580	20.08
32	508.65	19995	5.18
33	528.70	39470	10.22

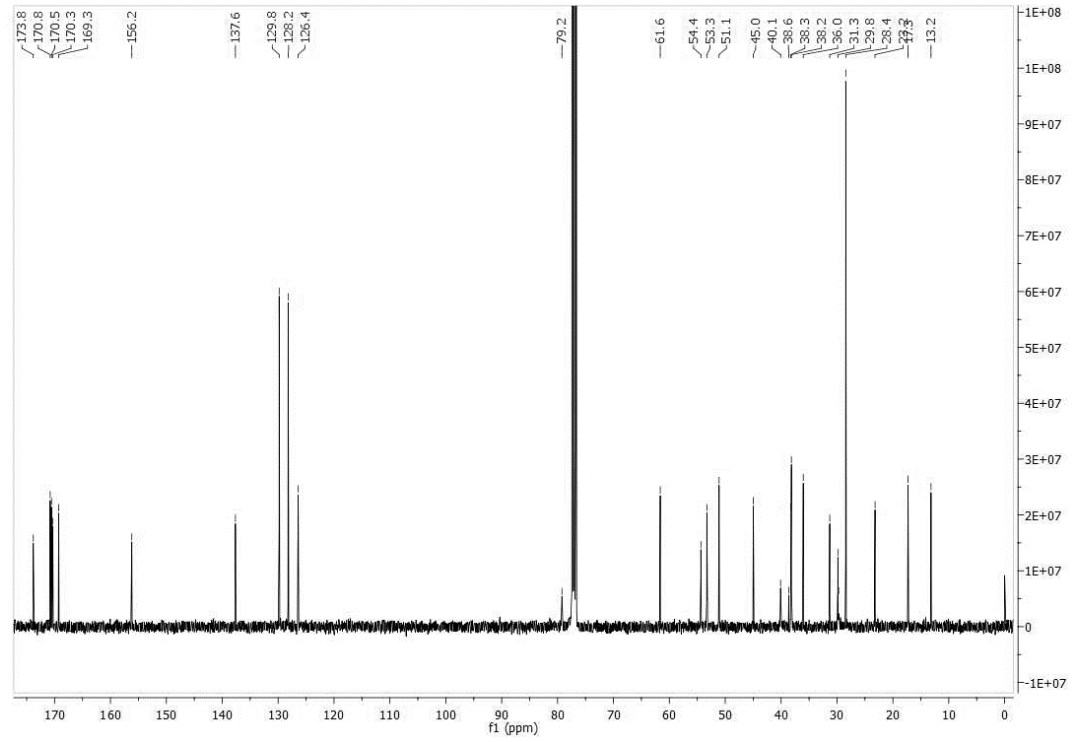
3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

24C: Ciclo-[Ala-NMeAla-Lys(Boc)-Phe-NMeGly]

^1H -RMN en CDCl_3

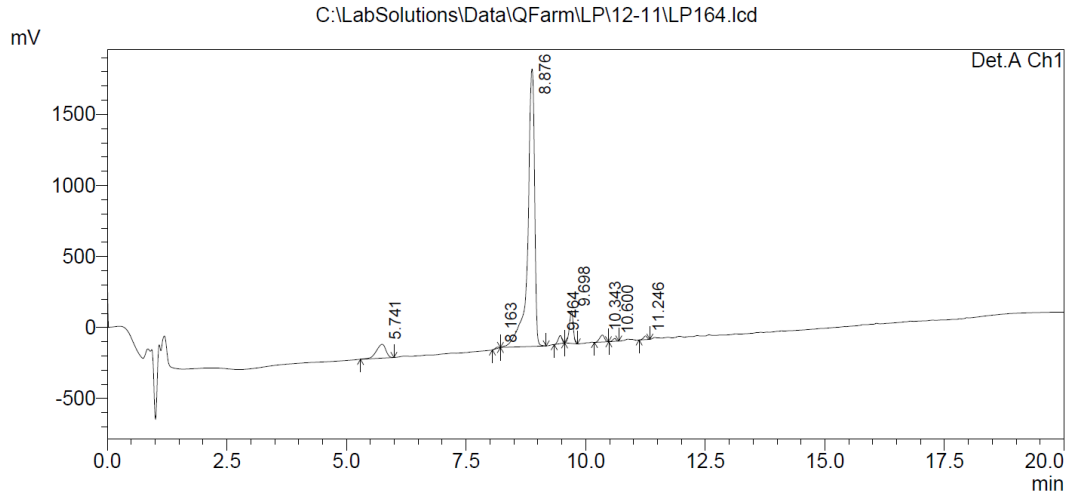


^{13}C -RMN en CDCl_3



3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

<Chromatogram>



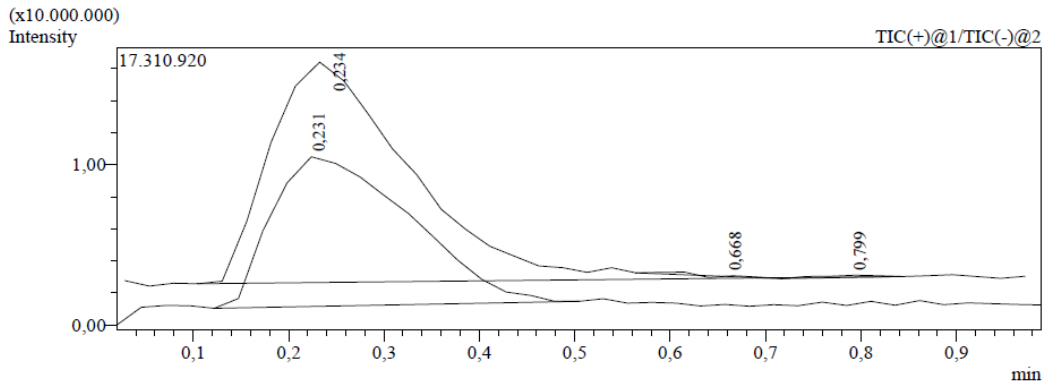
PeakTable

Detector A Ch1 225nm

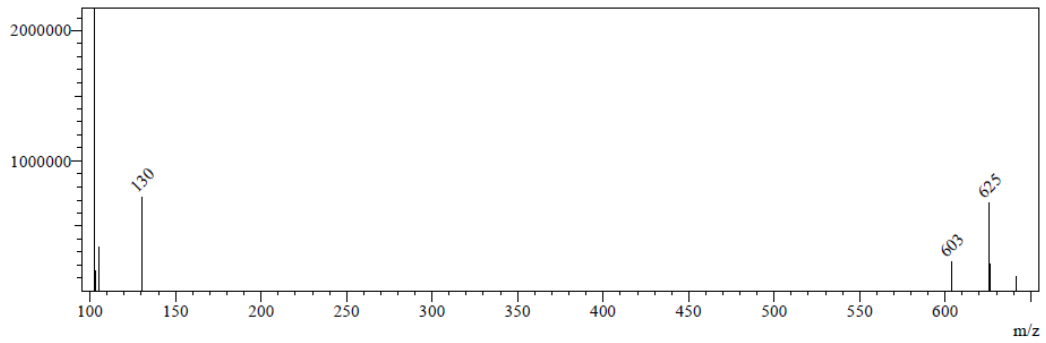
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.741	1340718	96971	5.820	3.971
2	8.163	46397	8276	0.201	0.339
3	8.876	19472968	1953649	84.533	80.008
4	9.464	308730	56607	1.340	2.318
5	9.698	1270896	229659	5.517	9.405
6	10.343	355722	49262	1.544	2.017
7	10.600	104239	20548	0.453	0.842
8	11.246	136351	26850	0.592	1.100
Total		23036021	2441823	100.000	100.000

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

ESI-MS Ciclo-[Ala-NMeAla-Lys(Boc)-Phe-NMeGly]



Line#:1 R.Time:----(Scan#:) MassPeaks:8 BasePeak:102(2170838)
 Spectrum Mode:Averaged 0,148-0,301(11-23)
 BG Mode:Averaged 0,071-0,097(5-7) Segment 1 - Event 1



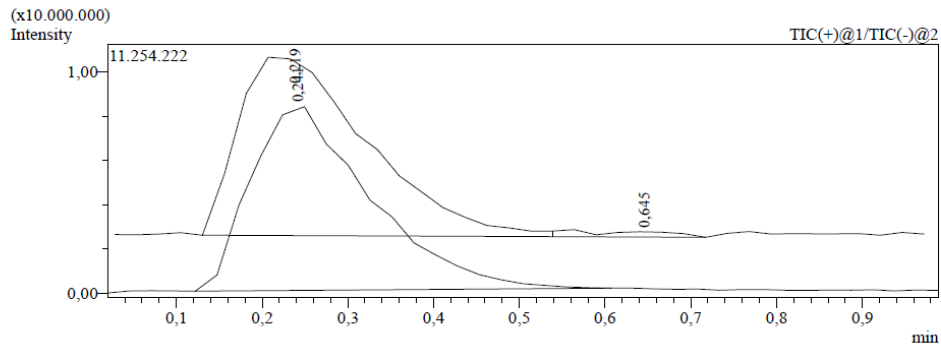
MS Spectrum

Line#:1 R.Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:8
 Spectrum Mode:Averaged 0,148-0,301(11-23) Base Peak:102(2170838)
 BG Mode:Averaged 0,071-0,097(5-7) Segment 1 - Event 1

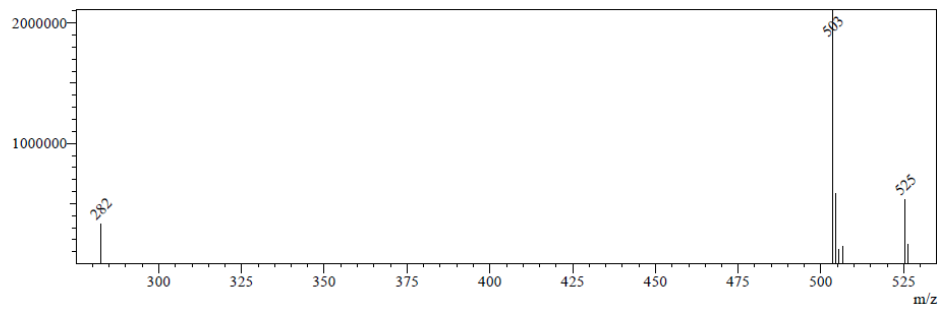
#	m/z	solute	Intenlative	Intens:
1	102,25	2170838	100,00	
2	103,30	153710	7,08	
3	105,20	337935	15,57	
4	130,25	720985	33,21	
5	603,40	221521	10,20	
6	625,45	676311	31,15	
7	626,45	206919	9,53	

3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

ESI-MS Ciclo-[Ala-NMeAla-Lys-Phe-NMeGly-OH] (24D):



Line#:1 R.Time:---(Scan#) MassPeaks:7 BasePeak:503(2109522)
 Spectrum Mode:Averaged 0.148-0.301(11-23)
 BG Mode:Averaged 0.046-0.097(3-7) Segment 1 - Event 1



MS Spectrum

Line#:1 R.Time:---(Scan#:---)

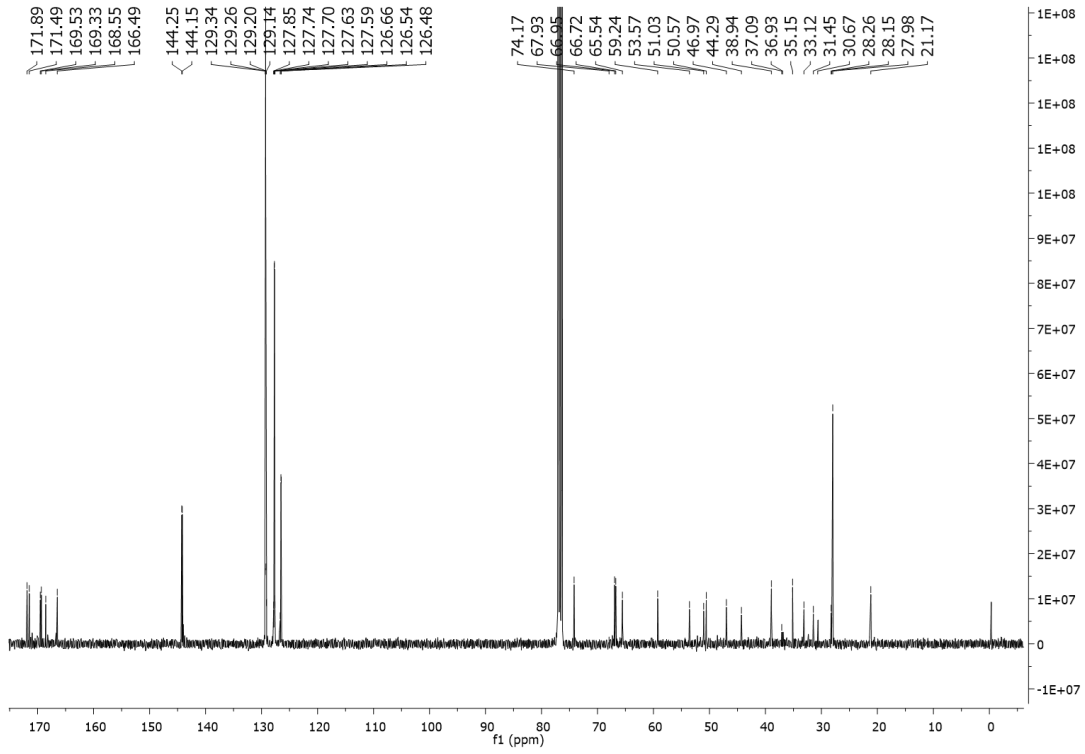
MassPeaks:7

Spectrum Mode:Averaged 0.148-0.301(11-23) Base Peak:503(2109522)

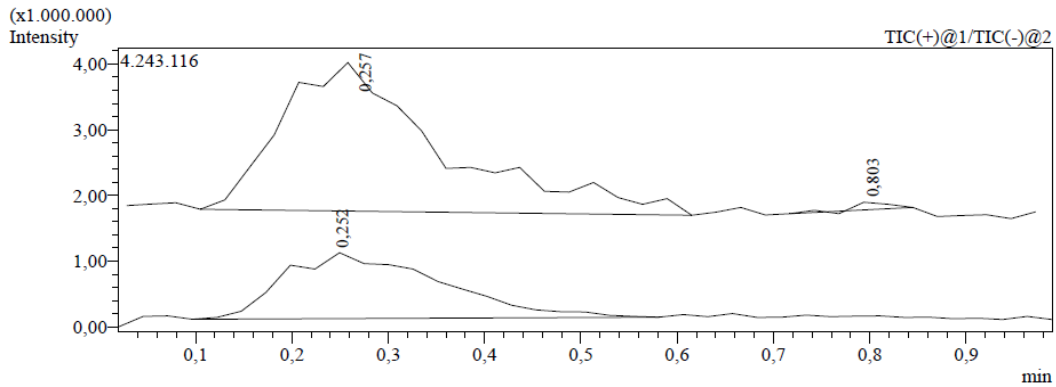
BG Mode:Averaged 0.046-0.097(3-7) Segment 1 - Event 1

#	m/z	solute Inten	lative Inten:
1	282,35	327560	15,53
2	503,40	2109522	100,00
3	504,45	584216	27,69
4	505,45	118170	5,60
5	506,70	140181	6,65
6	525,40	529652	25,11

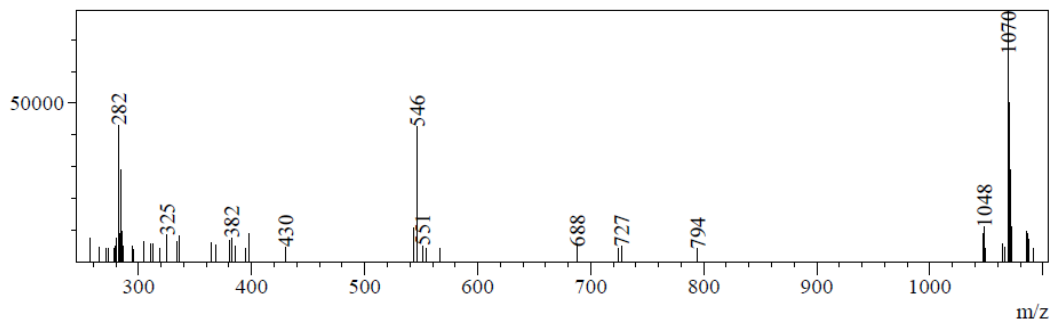
3. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.



ESI-MS de Ciclo-[Cys(Trt)-NMe-Gly-Cys(Trt)-NMe-Gly-Thr(O-tBu)-Gly] 25C



Peak#:1 R.Time:0.252(Scan#:) MassPeaks:51 BasePeak:1070(79162)
 Spectrum Mode:Averaged 0.224-0.275(17-21)
 BG Mode:Calc Segment 1 - Event 1



3. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo α -AA mediante SPPS y macrolactamización en solución.

MS Spectrum

Line#:1 R.Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:41
 Spectrum Mode:Averaged 0.173-0.301(13-23) Base Peak:1070(61953)
 BG Mode:Averaged 0.607-0.658(47-51) Segment 1 - Event 1

#	m/z	solute Inten	relative Inten
1	256,40	6070	9,80
2	265,15	3136	5,06
3	271,25	5109	8,25
4	278,20	4268	6,89
5	280,25	7813	12,61
6	282,40	34045	54,95
7	283,30	9089	14,67
8	284,35	27618	44,58
9	285,50	8521	13,75
10	286,25	4876	7,87
11	294,30	6389	10,31
12	295,00	4529	7,31
13	304,10	3663	5,91
14	311,00	3452	5,57
15	325,15	5584	9,01
16	332,35	3133	5,06
17	334,10	3182	5,14
18	336,35	4109	6,63
19	380,75	3919	6,33
20	382,25	6480	10,46
21	385,35	4969	8,02
22	397,10	4396	7,10
23	398,20	3637	5,87
24	431,00	3748	6,05
25	543,70	13632	22,00
26	546,60	36417	58,78
27	551,40	3504	5,66
28	554,85	4819	7,78
29	1047,45	7409	11,96
30	1048,55	7954	12,84
31	1049,65	5210	8,41
32	1064,65	4059	6,55
33	1066,55	3862	6,23
34	1069,60	61953	100,00
35	1070,60	42855	69,17
36	1071,60	25523	41,20
37	1072,55	10815	17,46
38	1085,55	7853	12,68



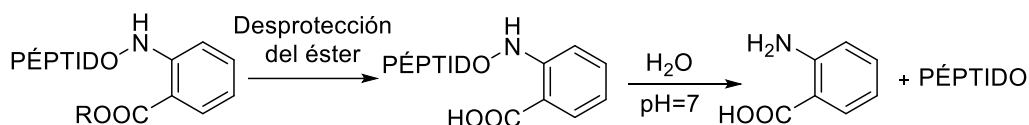
CAPÍTULO 4

Síntesis de ciclopéptidos
conteniendo β o γ
aminoácidos

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

4.1. Introducción y antecedentes

Como se discutió previamente, la síntesis de los productos naturales Versicotides representa un desafío sintético interesante. Por un lado, la formación de enlaces peptídicos con grupos amino metilados conlleva dificultades debido al mayor impedimento estérico que presentan con respecto a las aminas primarias. Además, la presencia de ácido antranílico (Anth) representa un desafío adicional, debido a que su grupo amino aromático se encuentra desactivado por resonancia con el anillo y se ha descrito la inestabilidad de compuestos conteniendo ácido antranílico y rearrreglos en los cuales puede estar involucrado. Hamada y colaboradores estudiaron las propiedades de péptidos conteniendo ácido antranílico, encontrándose que, si bien los péptidos conteniendo un éster de ácido antranílico en su extremo C terminal son estables en las condiciones de reacción utilizadas durante la síntesis de péptidos, al hidrolizar dicho éster liberando el grupo ácido carboxílico, el enlace amida en posición orto es fácilmente hidrolizado, liberando el péptido correspondiente (**Esquema 4.1.**)¹ Por otro lado, Clayden y colaboradores reportaron la formación de diarilaminas a partir de N-aril antranilamidas mediante rearrreglo de Smiles.²



Esquema 4.1. Hidrólisis de péptidos conteniendo ac. Antranílico catalizada por el ácido carboxílico en posición orto.

Existen algunos ejemplos en la literatura de síntesis de ciclopéptidos naturales conteniendo ácido antranílico. En estos, se utilizan rutas sintéticas largas, complicadas, con varios pasos y bajos rendimientos.^{3,4,5,6,7,8} Shiori y colaboradores,³ realizaron la síntesis en solución de los ciclopéptidos Avellanins A y B, superando las dificultades derivadas de la presencia de ácido antranílico mediante la

¹ Noguchi, J.; Kawai, M.; Hamada, M. *Isr. J. Chem.* **1974**, *12*, 87.

² Costil, R.; Dale, H.J.A; Fey, N.; Whitcombe, G.; Matlock, J. V; Clayden, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 12533.

³ Nakao, K.; Hamada, Y.; Shiori, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*(4), 930.

⁴ Masuda, Y; Tanaka, R; Kai, K; Ganesan, A.; Doi, T. *J.Org.Chem.* **2014**, *79*, 7844.

⁵ Yao, G.; Pan, Z.; Wu, C.; Wang, W.; Fang, L.; Su, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (42), 13488.

⁶ Tseng, M. C.; Yang, H. Y.; Chu, Y. H. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 419

⁷ Chettu, S. K.; Madhu, R. B; Raolji, G. B.; Babu, K. R.; Rao, N. S. K.; Ismail, S. G. A.; Reddyc, G. B.; Shafi, S. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 61555

⁸ Vasudevan, N.; Kashinath, K.; Srinivasa Reddy, D. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 23, 6148.

estrategia de utilizar cloruros de Fmoc-aminoácidos para acoplarlos al antranilato de metilo. La formación de estos cloruros de ácidos se realiza por reacción con SOCl_2 y luego se purifican por recristalización en hexano- CH_2Cl_2 .⁹ Los autores destacan como principales ventajas de esta metodología los buenos rendimientos y que la reacción se da sin racemización, a diferencia de lo que ocurre al utilizar DCC y DMAP en este acoplamiento. Sin embargo, la principal desventaja de esta metodología es la producción de HCl durante el acoplamiento. Debido a esto, durante la síntesis de estos productos naturales, se utiliza el grupo Boc, lábil en medio ácido, como grupo protector en todos los casos, excepto en el aminoácido involucrado en la formación del cloruro de ácido, donde el grupo amino se encuentra protegido con Fmoc. Es de destacar que el uso de Fmoc en solución puede generar mezclas complejas de purificar debido a la descomposición del mismo.

La estrategia de utilizar cloruros de ácidos también ha sido aplicada al acoplamiento entre ácidos carboxílicos y grupos N-metilados en fase sólida. En particular se describe una técnica para formar estos compuestos con trifósgeno (bis(triclorometil)carbonato o BTC) y 2, 4, 6-colidina, sin necesidad de purificarlo antes de utilizarlo en el acoplamiento.¹⁰ Esta técnica fue utilizada para la síntesis sobre la resina Cloruro de 2-clorotritilo (2-CTC) de los péptidos PF1171A y C⁴, en el acoplamiento entre el grupo amino del ácido antranílico y el aminoácido siguiente, y también en la síntesis de Coibamida A⁵, péptido conteniendo varios aminoácidos N-metilados, sobre la resina Fmoc-hidrazinobenzoil AM. En este último caso se emplea además un exceso de 20 equivalentes de DIPEA, para captar el HCl generado al agregar el cloruro de aminoácido a la resina.

Xin y Burgess lograron la síntesis en solución de ciclotetrapéptidos conteniendo una unidad de ácido antranílico en su estructura utilizando EDCI y HOAt como agentes acoplantes. Sin embargo, esto solo fue posible utilizando grandes excesos de Anth y de todos los reactivos.¹¹

Otros ejemplos de síntesis de productos naturales conteniendo ácido antranílico en su estructura, recurren a estrategias más sofisticadas para la formación del enlace amida correspondiente. Por ejemplo, durante la síntesis total de deoxo-solomonamide B,⁸ el ácido antranílico es enmascarado utilizando un grupo indol, el cual es sometido a cleavage oxidativo mediante ozonólisis en las últimas etapas de la ruta sintética para generar este ácido antranílico.

Como consecuencia, el desarrollo de una metodología más simple para la obtención de compuestos conteniendo Anth con buenos rendimientos representa un desafío químico interesante.

⁹ Carpino, L.A.; Cohen, B.J.; Stephens, K.E.; Sadat-Aalae, S.Y.; Heh Tien, J.; Langridge, D.C. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3734.

¹⁰ Falb, E.; Yechezkel, T.; Salitra, Y.; Gilon, C. *J. Pept. Res.* **1999**, *53*, 507.

¹¹ Xin, D.; Burgess, K. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 5049.

Se realizará la síntesis de los precursores lineales para posteriormente ciclarlos. Para llevar a cabo los acoplamientos dificultosos involucrando al grupo amino del antranílico se compararán diferentes agentes acoplantes disponibles y se estudiarán las metodologías discutidas en la sección anterior, tanto en solución como en fase sólida.

4.2. Resultados y Discusión

4.2.1 Síntesis en Solución de productos conteniendo Anth

Se realizó un análisis retrosintético (**Figura 4.1.**) para determinar cuál sería el péptido lineal que por macrolactamización rendiría el Versicotide A con mejores rendimientos. Como se discutió anteriormente, el paso de macrolactamización suele tener rendimientos bajos y estar muy relacionado a la conformación que adopte el péptido lineal en solución, por lo que escoger un precursor lineal adecuado es crucial. Se tomó en consideración la necesidad de evitar el ácido antranílico como extremo N terminal, previendo que esto resultaría en rendimientos muy bajos de la reacción de macrociclación.

De las dos opciones que se muestran en la figura se propone en primer lugar obtener el péptido **(I)**: **NH₂-Ala-NMeAla-Anth-NMeAla-Anth-COOH**, anclando a la resina el Fmoc-ácido antranílico. De esta manera la macrociclación sería una reacción aparentemente sencilla, entre una amina primaria (correspondiente a Ala) y el ácido carboxílico del antranílico. Otra opción sería realizar la ciclación en la posición marcada en **(II)**, la cual implica el acoplamiento entre un grupo N- metilo y el ácido carboxílico de la alanina. Si bien en este caso la reacción podría ser mas lenta o tener un menor rendimiento debido al impedimento estérico de este grupo amino, la posición de los ácidos antranílico, los cuales son inductores de giro podría inducir una conformación del péptido lineal más favorable para la ciclación.

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

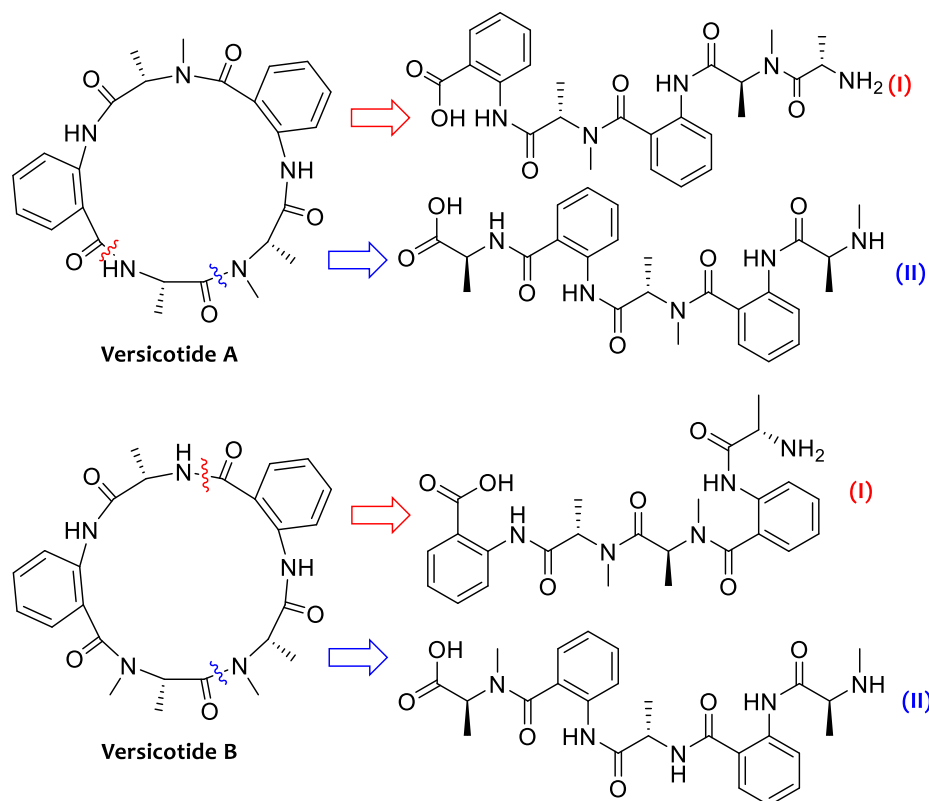


Figura 4.1. Análisis retrosintético Versicotides

De la misma forma se estudiaron las posibles desconexiones para el Versicotide C, encontrándose opciones con las mismas características.

Por otra parte, previendo las posibles dificultades sintéticas, y el elevado costo del aminoácido Boc-NMe-Ala-OH, se planteó realizar la síntesis de un análogo simplificado, sin N- metilos, como se muestra en la **Figura 4.2**.

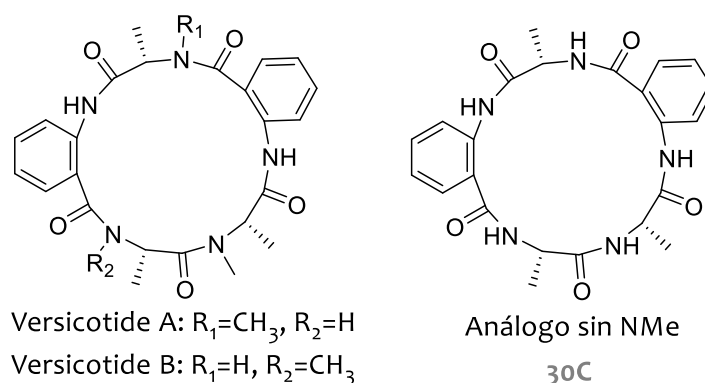
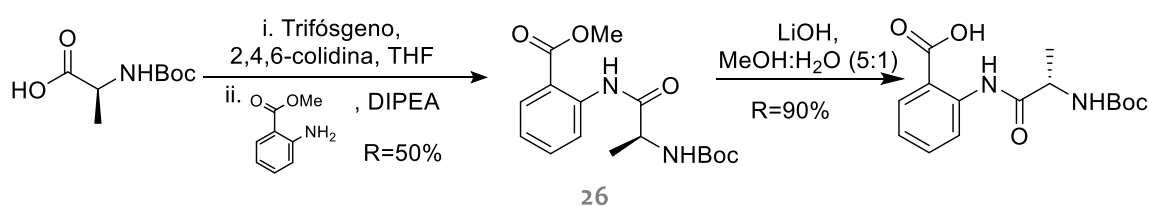


Figura 4.2. Análogo Versicotide A y B

Para la síntesis de precursores lineales conteniendo Anth, se estudiaron metodologías de acoplamiento en solución para realizar la formación del enlace peptídico involucrando al grupo amino

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

del ácido antranílico buscando adquirir experiencia en el manejo de la reactividad de éste bloque de construcción ya sea para la síntesis de los compuestos de interés en fase sólida, o en solución. Se comenzó trabajando sobre estrategias para obtener el precursor abierto del análogo (**30C**) de manera de evitar momentáneamente la dificultad asociada a la presencia de N-metil amino ácidos. Tomando en cuenta las referencias discutidas en la sección 4.1. se prueba la utilización de cloruros de ácido para realizar estos acoplamiento difíciles. Se activa el ácido carboxílico de BocAlaOH por formación del cloruro de ácido correspondiente con trifósgeno. La formación del enlace amida ocurre al agregar el cloruro de ácido resultante a una solución de antranilato de metilo.



Esquema 4.2. síntesis en solución del dipéptido Boc-Ala-Anth-OH

Al realizar estudios de RMN del dipéptido producto de esta reacción, se demostró que el mismo puede presentarse en más de una conformación posible, según cuál sea el solvente y la temperatura a la que se realiza el experimento. Cuando se presentan estos conformeros las señales de los protones aromáticos se duplican, con lo cual un dipéptido y un tetrapéptido se podrían confundir fácilmente. A partir de esta observación surgió la necesidad de verificar los intermediarios y productos mediante HPLC-MS.

Tiempo de formación de NHBoc-Ala-COCl	Equivalentes de NH ₂ -Anth-OMe	Equivalentes de NHBoc-Ala-OH	Equivalentes de DIPEA	Rendimiento (%)
1 minuto	1	1,2	1,5	50
30 minutos	1	1,5	3	17
15 minutos	1	1,5	1,5	32
30 minutos	1	1,5	1	8
15 minutos	1	1,5	10	16

Tabla 4.1. Condiciones ensayadas para síntesis de Boc-Ala-Anth-OMe con trifósgeno.

Se trató de optimizar la síntesis del dipéptido Boc-Ala-Anth. Las condiciones utilizadas y los rendimientos obtenidos se muestran en la **Tabla 4.1**. Como se puede observar, un mayor tiempo durante la formación del cloruro de ácido no conduce a un mejor rendimiento, por lo que se podría pensar que el mismo se descompone rápidamente. Por otra parte, un exceso grande de DIPEA tampoco mejora el rendimiento. El rendimiento obtenido en el mejor de los casos fue de un 50%, lo

cual puede tener relación con la presencia del grupo protector Boc y su posible inestabilidad en el medio de la reacción.

Durante la síntesis de Avellanins A y B los autores realizan la misma protegiendo todos los aminoácidos con Boc excepto al involucrado en la formación del cloruro de ácido donde utilizan Fmoc.² Si bien este grupo protector no es recomendable al trabajar en solución, debido a que es lábil en medios básicos y su remoción genera mezclas altamente complejas y difíciles de purificar, estudiar este acoplamiento con el grupo Fmoc puede resultar de utilidad para determinar su aplicación en fase sólida. Utilizando trifósgeno, los rendimientos obtenidos para Fmoc-Ala-Anth-OMe no lograron superar los obtenidos previamente utilizando el grupo Boc (**Esquema 4.2.**). Otra forma descrita en bibliografía de realizar la síntesis de este dipéptido en solución es utilizando EDCI y HOAt como agente acoplante y un exceso de 3 equivalentes de antranilato de metilo¹². No es posible reproducir exactamente estas condiciones en nuestro laboratorio debido a las dificultades de comercialización y llegada a nuestro país del HOAt (explosivo), por lo que en su lugar se utiliza Cl-HOBt. De esta manera se obtuvieron resultados más reproducibles para la síntesis tanto de Boc-Ala-Anth-OMe como Fmoc-Ala-Anth-OMe y se alcanzaron rendimientos de 42 y 63% respectivamente.

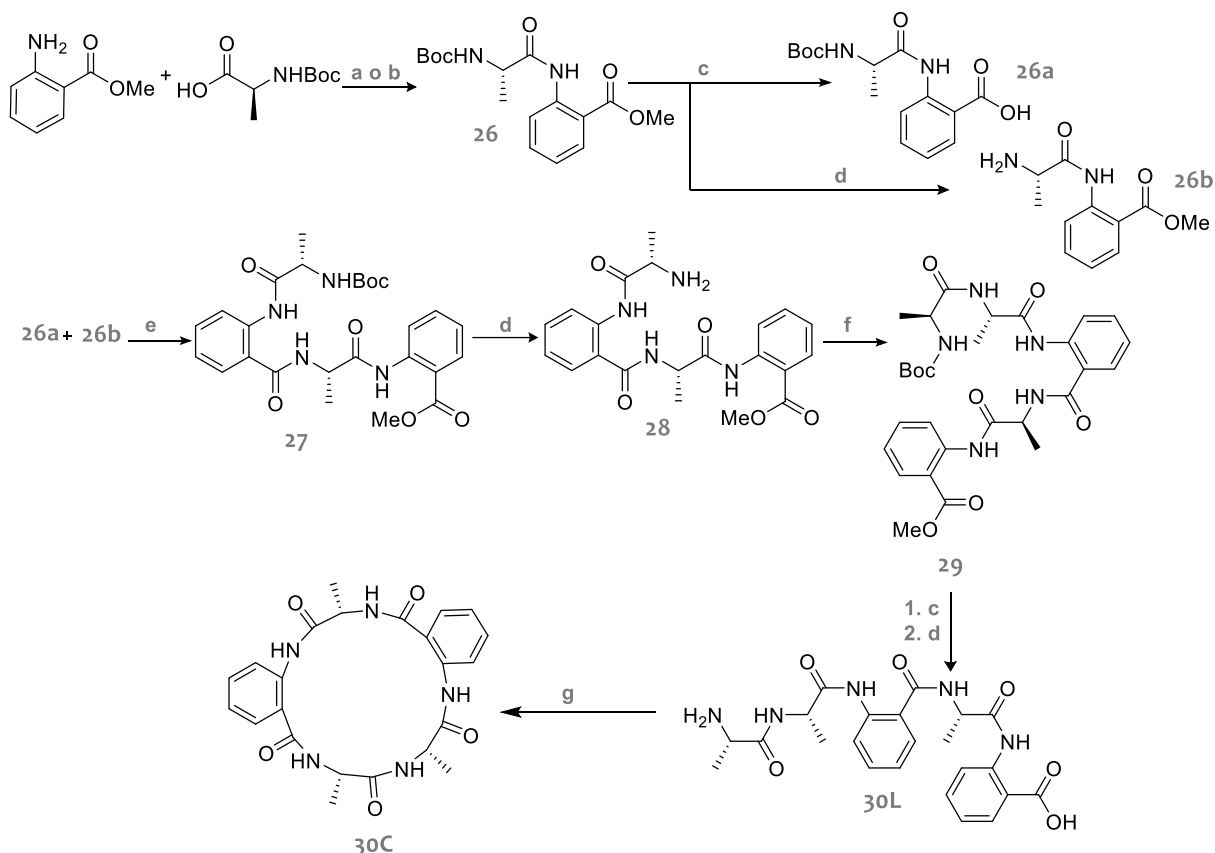
4.2.1.1. Síntesis en solución de **30 C**

Continuando con la obtención del precursor lineal del análogo sin N metilos de Versicotides A y B, **30L**, se estudiaron rutas convergentes (**Esquema 4.3.**). El dipéptido BocAla-AnthOMe obtenido por cualquiera de las metodologías explicadas anteriormente se desprotege en sus extremos C (**26a**) o N terminal (**26b**) para luego acoplar y obtener **27**. Durante esta etapa se obtuvo un rendimiento del 10% y se aislaron varios productos secundarios, como los fragmentos del tetrapéptido deseado: antranilato de metilo y NH₂-Anth-Ala-Anth-OMe. Si bien la reacción se lleva a cabo en condiciones diferentes a la descritas por Hamada y col.¹ (condiciones anhidras y medio básico dado por la presencia de DIPEA en lugar de medio acuoso), la ruptura del enlace peptídico entre BocAla y Anth de **26a** en el medio de reacción, de la misma forma a lo explicado en el **Esquema 4.1.**, y posterior activación del ácido antranílico para acoplarse a NHAla-Anth-OMe explicaría la identificación de NH₂-Anth-Ala-Anth-OMe como subproducto. La presencia de antranilato de metilo como producto secundario podría explicarse por una reacción de hidrólisis de **26b** o **27**.

Posteriormente, la preparación del pentapéptido **29** a partir de **28** resultó en un proceso de elevado rendimiento (92%). Finalmente, el éster metílico de **30** se hidroliza rápidamente con LiOH. El producto se extrajo y se desprotegió el grupo amino utilizando HCl/ dioxano. Posteriormente el crudo se sometió a condiciones de ciclación. Se buscó realizar las desprotecciones lo más rápido posible y se

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

evitó almacenar los intermediarios, comenzando la ciclación el mismo día. La macrociclación se realizó bajo condiciones de elevada dilución (2mM) durante 48 horas, lo cual permitió obtener **30C** en 35% de rendimiento.

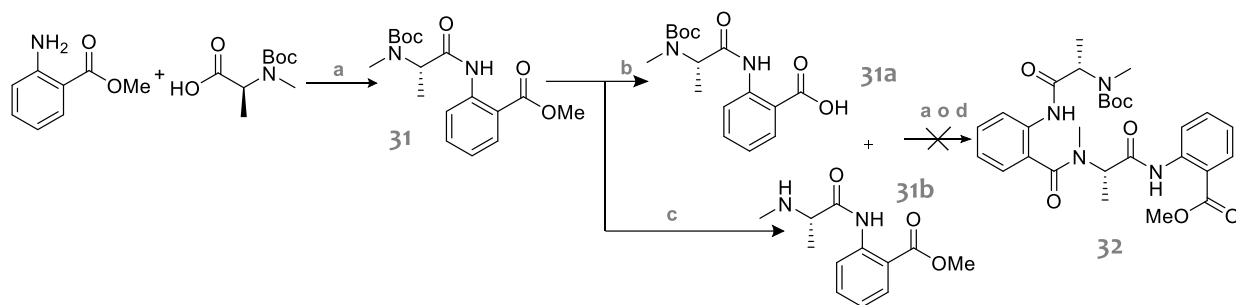


Esquema 4.3. Síntesis en solución de análogo a Versicotide A y B. **a.** Cl-HOBt, EDCI, NMM, DCM. R=42%. **b.** BTC, 2,4,6-colidina, DIPEA, THF. R=51% **c.** LiOH, THF/H₂O, R=100%, **d.** HCl, dioxano, R=100%. **e.** Cl-HOBt, EDCI, DIPEA, DCM. R=10%. **f.** BocNH-Ala-OH, Cl-HOBt, EDCI, DIPEA, DCM. R=92%. **g.** Cl-HOBt, EDCI, DIPEA, DCM 2mM, 2 días. R=35%.

4.2.1.2. Aproximación a la Síntesis de Versicotide A

En vistas de que se logró obtener el análogo sin N-metilos del Versicotide A o B, a pesar de los bajos rendimientos en algunos de los pasos, se continuó buscando la síntesis de los productos naturales, trabajando en solución. Se plantea, obtener el Versicotide A, a partir de la secuencia (I): Ala-N(Me)Ala-Anth-N(Me)Ala-Anth, siguiendo el **Esquema 4.4**.

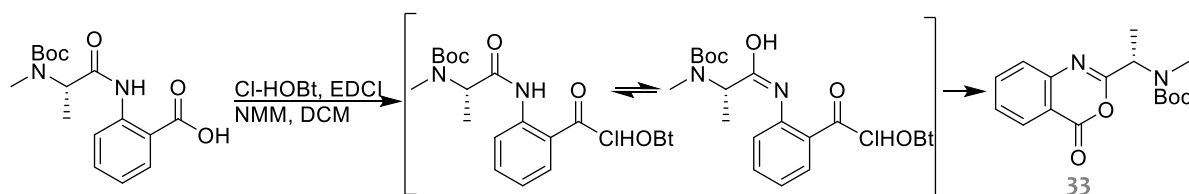
4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos



Esquema 4.4. Ruta sintética propuesta para la obtención del Versicotide A. **a.** Cl-HOBt, EDCI, NMM, DCM.

R=86%. **b.** LiOH, THF/H₂O, R=100%, **c.** HCl, dioxano, R=100%. **d.** BTC, 2,4,6-colidina, DIPEA, THF.

En este caso, se alcanzó un rendimiento del 86% para la síntesis del dipéptido **31** utilizando las condiciones descritas anteriormente. Luego, durante la formación del tetrapéptido, se probaron dos condiciones diferentes; una utilizando Cl-HOBt y EDCI al igual que en el **Esquema 4.3.** y otra utilizando trifósgeno. En ninguno de los casos se logró aislar el producto **32**, y se obtuvo un producto secundario que contiene ácido antranílico y BocNMeAla. Las diferencias en desplazamientos químicos demuestran que no se trata de ninguno de los dipéptidos de partida **31a** o **31b**. Luego de estudiar la espectroscopía del producto secundario obtenido, se propone que se trata de la benzoxazinona **33**. Este compuesto pudo formarse mediante un mecanismo análogo a la formación de oxazolonas,¹² previamente presentado en el **Esquema 3.2**. La formación de este tipo de compuestos a partir de dipéptidos conteniendo Anth se encuentra reportada en la literatura.^{13,14,15,16}



Esquema 4.5. Mecanismo propuesto para la formación de la benzoxazinona **33**.

Por otra parte, durante la reacción de formación de **32** se aisló el tripéptido BocNMeAla-NMeAla-AnthOMe. Si bien las condiciones de reacción presentan diferencias a las reportadas previamente¹ esto podría explicarse, al igual que la formación de Anth-Ala-Anth-OMe durante la síntesis del tetrapéptido **27**, por la ruptura del enlace peptídico entre BocNMeAla y Anth de **31a** en el medio de reacción, y posterior activación de BocNMeAla para acoplarse a **31b**.

¹² Montalbetti, C.A.G.N, Falque, V. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 10827.

¹³ Baravkar, S. B.; Wagh, M. A.; Paul, D.; Santra, M.; Sanjayan, G. J. *Tetrahedron Lett.*, **2018**, *59*, 3473.

¹⁴ S. B. Baravkar, Roy, A.; Gawade, R. L.; Puranik, V. G.; Sanjayan, G. J. *Synth Commun.* **2014**, *44*, 2955.

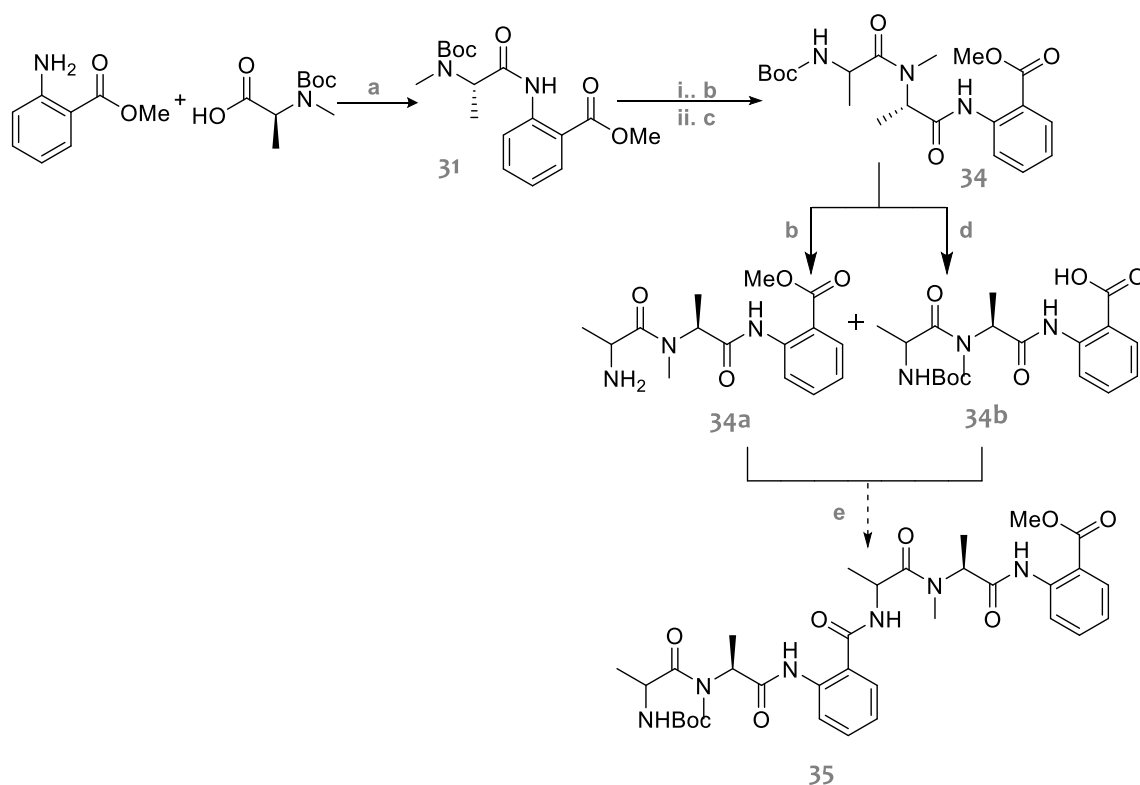
¹⁵ Errede, L. A. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 1763

¹⁶ Errede, L. A.; McBrady, J. J.; Oien, H. T. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 656.

4.2.1.3. Aproximación a la Síntesis de Versicotide C

En el caso del Versicotide C, se plantea la posibilidad de obtenerlo siguiendo la ruta que se muestra en el **Esquema 4.6**. De esta forma, luego de la desprotección del éster del tripéptido, el siguiente acoplamiento sería entre un amino primario y ácido antranílico, reacción que debería ocurrir sin problemas con un agente acoplante como HBTU. Sin embargo esta reacción produjo una mezcla compleja de productos de la cual no fue posible aislar el producto **35**.

En resumen, frente a las diversas reacciones secundarias que impidieron la síntesis en solución de los péptidos precursores de los productos naturales, empleando las metodologías en solución estudiadas, se decide continuar buscando alternativas más eficientes.



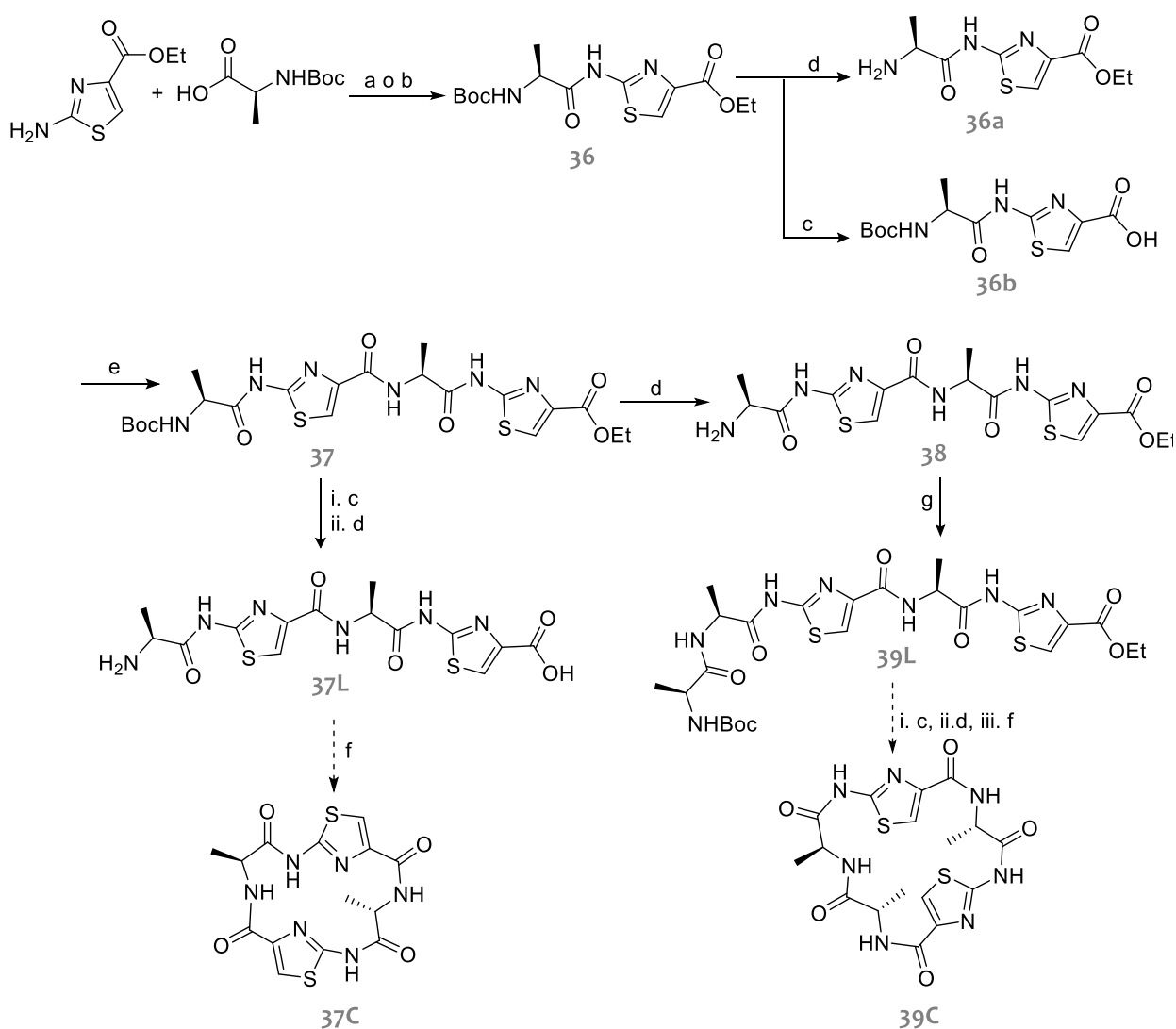
Esquema 4.6. Ruta propuesta para la síntesis en solución del Versicotide C. **a.** Cl-HOBt, EDCI, NMM, DCM. R=86%.

b. HCl/dioxano. R=100% **c.** Boc-Ala-OH, BTC, 2,4,6-colidina, THF, DIPEA. R=25%. **d.** LiOH, THF, H₂O. **e.**

HBTU,4-DMAP, DIPEA, DCM. **f.** HBTU,4-DMAP, DIPEA, DCM.

4.2.2 Síntesis en solución de análogos de Versicotides conteniendo ácido 2-aminotiazol-4-carboxílico

Teniendo en cuenta las dificultades para la protección del grupo amino del ácido 2-aminotiazol-4-carboxílico con Fmoc (capítulo 2), se estudió la síntesis en solución de ciclopéptidos conteniendo este heterociclo. Partiendo del tiazol y Boc-Ala, **Esquema 4.7.**, se obtuvo **36** en un 62% de rendimiento utilizando la metodología reportada por Xin y Burgess,¹⁷ estudiada para el acoplamiento al amino del ácido antranílico.



Esquema 4.7. Síntesis de análogos conteniendo tiazoles. a. Cl-HOBt, NMM, EDCI, DCM/DMF. R=62%. b. HBTU, DIPEA, DCM. R=78%. c. LiOH, THF/H₂O. d. HCl, dioxano. e. HBTU, DIPEA, 4-DMAP, DCM. R= 88%. f. HBTU, DIPEA, 4-DMAP, 2mM DCM. g. BocNH-Ala-OH, HBTU, DIPEA, 4-DMAP, DCM. R= 98%.

¹⁷ Xin, D.; Burgess, K. *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 5049.

El uso de HBTU, permitió realizar el acoplamiento con rendimientos aún mayores (78%). Luego **36a** y **36b** se acoplaron para obtener el intermediario **37**. Parte del mismo se desprotegió y se intentó ciclar **37L** en solución utilizando HBTU a una concentración de 5mM, sin éxito. Por otra parte, se acopló un residuo de alanina adicional a **38** para obtener **39L**, el cual se desprotegió en ambos extremos e intentó ciclar usando Cl-HOBt y EDCI como acoplantes. En este caso tampoco fue posible aislar el producto de macrociclación por lo cual se deberían estudiar modificaciones en la secuencia.

4.2.3. Síntesis de precursores abiertos de Versicotides en fase sólida

4.2.3.1. Síntesis en fase sólida de precursores de **30C**

Se estudió la síntesis sobre la resina 2-CTC de **30L**: **NH₂-Ala-Ala-Anth-Ala-Anth-OH**, precursor de **30C**. Durante la etapa de carga de la resina, la medida de absorbancia del aducto dibenzofulvenopiperidina demostró una baja eficacia para el anclaje de Anth. Adicionalmente, se observaron dificultades para el acoplamiento del segundo aminoácido al grupo amino libre del ácido antranílico, paso clave de la síntesis. Se utilizó DIC y Cl-HOBt como agentes acoplantes en dicho paso, dado que se conoce que esta combinación puede permitir acoplamientos dificultosos, siendo similar a la combinación EDCI+Cl-HOBt utilizada en solución. En fase sólida se utiliza DIC en lugar de EDCI ya que luego del acoplamiento EDCI genera ureas que no son solubles en los disolventes utilizados, y por lo tanto no se removerían en los pasos de lavado. Se verificó por HPLC y RMN que el acoplamiento no ocurrió, lo cual puede deberse a la baja nucleofilia del grupo amino, o a que la disposición espacial del ácido antranílico anclado a la resina sea tal que la reacción con el siguiente aminoácido se vea impedida.

Debido a lo anterior, se decidió sustituir la secuencia escogida por **NH₂-Ala-Anth-Ala-Anth-Ala-OH**, ya que la misma permite estudiar mejor las condiciones de los acoplamientos involucrando al amino del antranílico, al limitar las otras condicionantes para que el mismo no ocurra. Se propuso el uso de HBTU como agente acoplante excepto en el acoplamiento entre el grupo amino del ácido antranílico y el aminoácido siguiente, donde se continuó utilizando DIC y Cl-HOBt. Siguiendo este procedimiento se logró obtener el dipéptido **NH₂-Anth-Ala-OH**, y se lograron cargas de resina mayores, pero el acoplamiento del tercer aminoácido no se logró con ninguno de los agentes acoplantes ensayados; HATU, HCTU, DIC + Cl-HOBt.

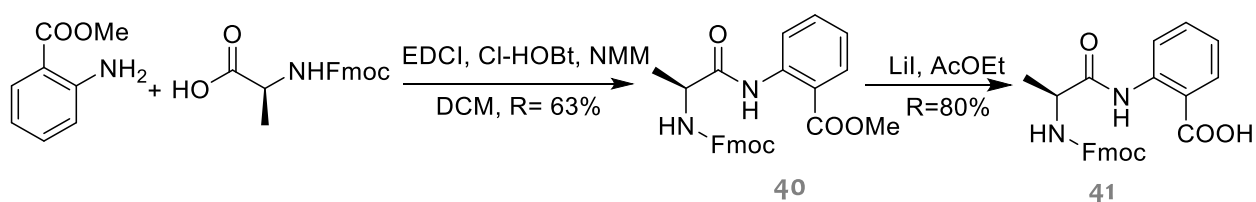
Se decidió estudiar la metodología reportada por Masuda y colaboradores,⁴ preparando el cloruro de ácido Fmoc-Ala-Cl con trifósgeno, de manera similar a como se realizó en solución, para luego acoplarlo directamente sobre la resina al amino libre del Anth. Lamentablemente con esta metodología los resultados fueron muy variables. Por un lado en los primeros intentos se obtuvieron

rendimientos muy bajos para la preparación de **Fmoc-Ala-Anth-Ala-OH**, pero al seguir los acoplamientos sucesivos por HPLC se observó una disminución de la intensidad de la señal observada a medida que se avanzaba en las etapas de síntesis, que se atribuyó a que el cloruro de hidrógeno producido por la reacción con trifósgeno produciría el clivaje del péptido de la resina. Se realizaron ajustes en la cantidad de base empleada y basándonos en la bibliografía discutida anteriormente,⁵ se aumentó la proporción de DIPEA. Al intentar con esta modificación se logró sintetizar el tripéptido **Ala-Anth-Ala** exitosamente, sin embargo persistieron los problemas en el acoplamiento del cuarto aminoácido, incluso al ensayar varios agentes acoplantes para las siguientes etapas como HBTU, DIC y Cl-HOBt y HCTU.

Se planteó obtener el pentapéptido deseado por acoplamiento del tripéptido -Ala-Anth-Ala sintetizado en fase sólida con el dipéptido Boc-Ala-Anth-OH obtenido en solución según el **Esquema 4.2**. Este tripéptido se preparó, en pequeña escala, con un rendimiento del 99% (utilizando HBTU en el acoplamiento entre el grupo amino de Ala y el carboxilo de Anth y trifósgeno entre el amino de Anth y carboxilo de Ala) y el dipéptido fue obtenido en solución en 3 pasos y con buenos rendimientos.

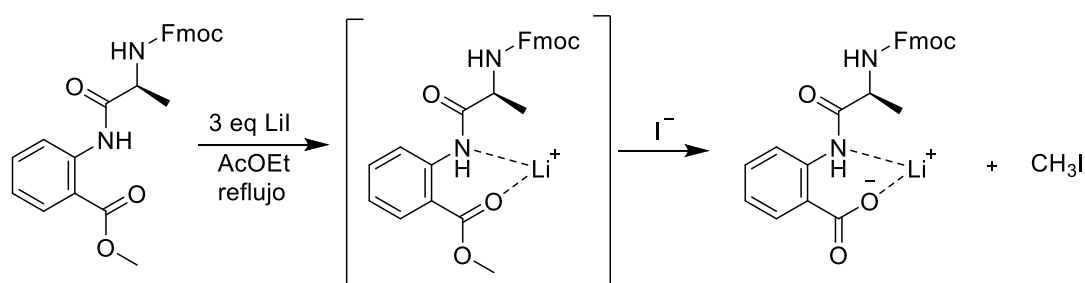
Se realizó el acoplamiento, en solución, del tripéptido NH_2 -Ala-Anth-Ala-OH sintetizado sobre la resina 2-CTC con el dipéptido Boc-Ala-Anth obtenido en solución. Debido a que el tripéptido no tiene ningún grupo protector en su extremo C terminal se decide no utilizar HBTU u otro agente acoplante, para evitar productos secundarios indeseados, activándose el extremo C terminal del dipéptido por formación de un cloruro de ácido con trifósgeno y colidina. Luego se agrega el tripéptido a dicha suspensión. No fue posible verificar la obtención del producto deseado por RMN, por lo que se propuso realizar la reacción en mayores cantidades. Sin embargo, la síntesis en SPPS del tripéptido no resultó ser reproducible, obteniéndose rendimientos mucho menores.

Se realizó una pasantía de tres meses en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universitat de Barcelona, bajo la supervisión de la Dra. Judit Tulla-Puche. Durante esta pasantía emplearon dos estrategias buscando obtener **30C**. Para la primera de ellas se sintetizó en solución el dipéptido Fmoc-Ala-Anth-OMe, utilizando las condiciones de reacción reportadas por Xin y Burgess,¹² **Esquema 4.8**.



Esquema 4.8. Síntesis del dipéptido Fmoc-Ala-Anth-OH

Posteriormente, se estudiaron condiciones de hidrólisis del éster metílico evitando el medio básico capaz de desproteger el grupo NHFmoc. Como se explicó anteriormente, el grupo protector Fmoc dificulta los pasos de purificación en solución por lo cual el objetivo sería obtener el péptido Fmoc-Ala-Anth para utilizarlo en la síntesis en fase sólida de los productos deseados. Se obtuvieron buenos resultados para la hidrólisis del éster metílico con LiI. Esta metodología, específica para la hidrólisis de ésteres bencílicos, t-butílicos o metílicos, utiliza la capacidad del litio de coordinar con el grupo carbonilo en disolventes apróticos poco polares. Esta coordinación aumenta la deficiencia de densidad electrónica sobre el carbono del carbonilo, como se muestra en el **Esquema 4.9**, favoreciendo la ruptura del enlace carbono-oxígeno por el ión yoduro.¹⁸ Los compuestos conteniendo carbonilos o heteroátomos en posición β o γ al éster reaccionan a mayor velocidad ya que al coordinar ambos grupos con el litio se forman quelatos de 5 o 6 miembros.¹⁹ En este caso, la reacción se dejó transcurrir durante la noche.



Esquema 4.9. Hidrólisis de éster metílico con LiI

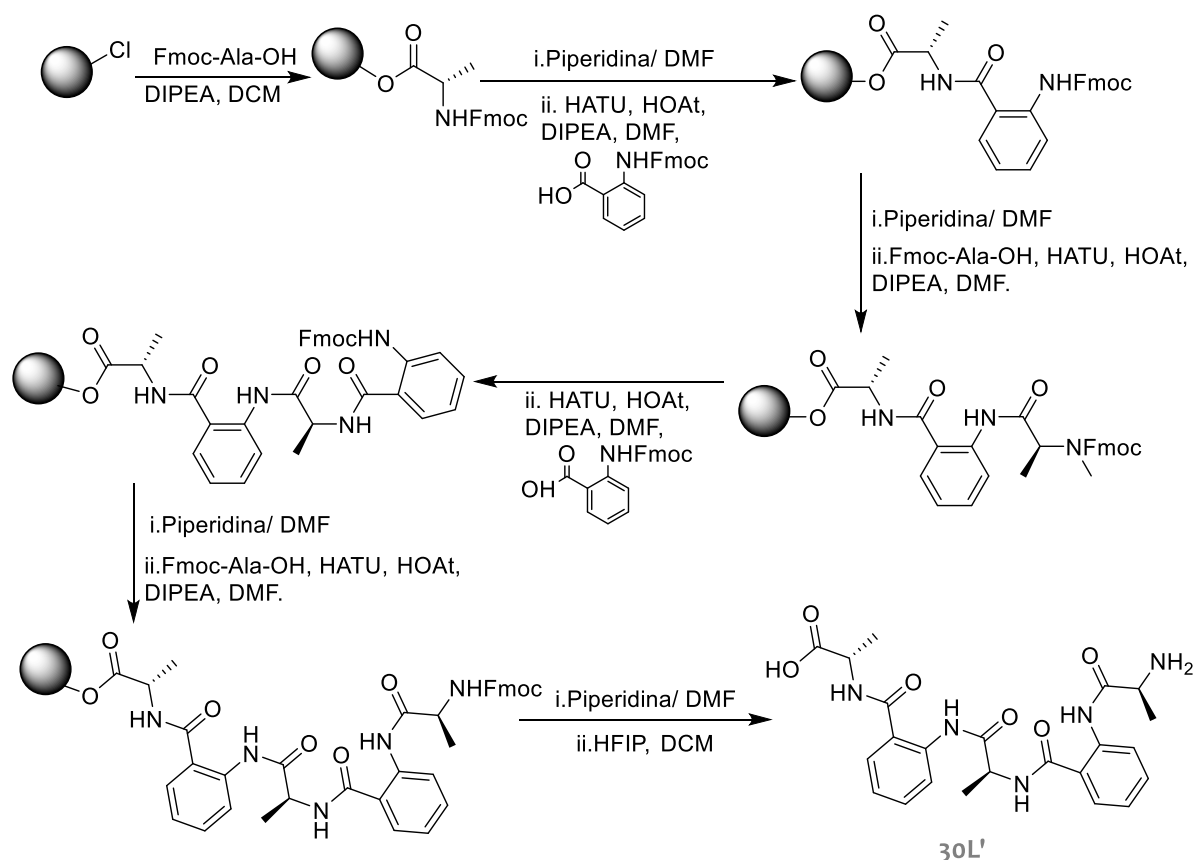
El péptido sintetizado se utilizó como bloque de construcción en fase sólida. Para esto se empleó la resina 2-CTC. Se ancló el dipéptido a la resina, para luego realizar la elongación del mismo. No se obtuvo **30L** en estas condiciones. Para descartar que esto haya sido consecuencia del impedimento estérico relacionado al uso de la resina 2-CTC, se decidió probar la síntesis sobre la resina aminometil poliestireno, utilizando como linker el ácido 3-(4-hidroximetilfenoxi) propiónico. Esta resina, sin embargo, requiere condiciones más drásticas para realizar el cleavage (95% de TFA). No se llegó al producto deseado, y posteriormente se concluyó que las condiciones de clivado pudieron ocasionar la descomposición del producto, por lo cual se continuaron estudiando alternativas.

Se descarta el uso de esta resina y se continúa trabajando sobre la 2-CTC. La segunda metodología ensayada permitió obtener el pentapéptido **Ala-Anth-Ala-Anth-Ala** (que fue identificado

¹⁸ Fisher, J.W.; Trinkle, K.L. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2505.

¹⁹ Mattson, S.; Dahlsrtom, M.; Karlsson, S. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 2497.

mediante HPLC-MS) siguiendo una síntesis secuencial, realizando acoplamientos de 2 horas y reacoplamiento durante toda la noche, empleando HATU y HOAt (**Esquema 4.10**). Cada acoplamiento se monitoreó por clivado de una mínima cantidad de resina y análisis del crudo por HPLC-MS. Se observó que las reacciones en cada paso no logran completarse totalmente, por lo cual si bien se logró obtener este precursor de **30C**, el crudo presentaba varios péptidos truncados como impurezas. Para la escisión de la resina se evitó el uso TFA, por lo cual se utilizó hexafluoroisopropanol (HFIP).



Esquema 4.10. Síntesis en fase sólida de un precursor lineal de **30C**

Durante esta síntesis se verificó que el ácido antranílico arroja falsos negativos en el test de Kaiser. Con los acoplamientos involucrando al grupo amino del ácido antranílico se obtiene una coloración amarilla (negativo), cuando aún restan grupos amino sin reaccionar, lo cual se verifica al realizar HPLC-MS de una pequeña cantidad de péptido escindido de la resina. Como consecuencia el test no es útil en este caso, ya que lleva a concluir que la reacción se ha completado cuando aún quedan grupos amino libres. Por otra parte, al escindir el péptido de la resina con hexafluoroisopropanol (HFIP) o con TFA al 1% en DCM se encontró que los perfiles de HPLC-MS variaban, indicando que el péptido se descompone en presencia de TFA. Esto explica resultados

anteriores. Lamentablemente, el reactivo HFIP, al igual que el HOAt, presenta dificultades para su transporte al desear adquirirlo en Uruguay.

Luego, en el laboratorio de Química Farmacéutica, se colocó el producto impuro obtenido durante la pasantía en Barcelona en condiciones de macrociclación utilizando Cl-HOBt y EDCI, no lográndose aislar el producto deseado.

4.2.3.2. Síntesis del precursor lineal de Versicotide A

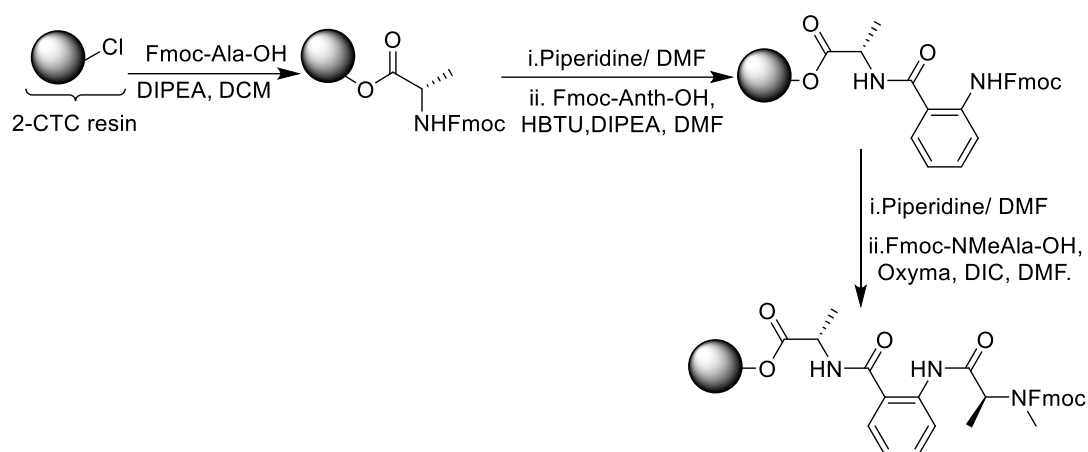
En base a lo discutido anteriormente la secuencia escogida para la síntesis del Versicotide A en la resina 2-CTC fue **(II)**: NMe-Ala-Anth-NMeAla-Anth-Ala. En primera instancia se utilizó de HBTU como agente acoplante excepto en el acoplamiento entre el grupo amino del ácido antranílico y el aminoácido siguiente, donde se continuó utilizando DIC y Cl-HOBt. Siguiendo este procedimiento se logró obtener el dipéptido Anth-Ala, pero nuevamente el acoplamiento del tercer aminoácido no se logró.

Posteriormente, se empleó la metodología de formación del cloruro de ácido Fmoc-NMeAla-Cl con trifósgeno, de la misma forma que se realizó en solución, para luego acoplarlo directamente sobre la resina al amino libre del Anth. Lamentablemente con esta metodología se obtuvieron resultados muy variables al igual que para la obtención de Ala-Ant-Ala, y persistieron los problemas para realizar los acoplamientos siguientes. Si bien la preparación del cloruro de ácido con trifósgeno es una opción también para la formación del enlace amida del grupo amino de la NMe-Ala y el ácido carboxílico del aminoácido siguiente, se prefirió buscar una alternativa para evitar utilizar este reactivo repetidas veces sobre la resina. Se encontró que de los agentes acoplantes que han sido ensayados en estos casos, HATU resultó ser el más adecuado.²⁰ El acoplamiento del cuarto aminoácido con HATU se dio de forma incompleta, según lo observado por HPLC. La realización de reacoplamientos no mejoró los resultados, sino que se observó disminución de la intensidad del pico en HPLC, del tetrapéptido obtenido. Los bajos rendimientos en el tetrapéptido podrían indicar que el péptido se cliva de la resina durante el reacoplamiento.

Tomando en cuenta la experiencia adquirida durante la pasantía, se busca un agente acoplante con características similares al HOAt que pueda ser adquirido en Uruguay. Tras una búsqueda bibliográfica se realizan pruebas con la combinación DIC-Oxyma. Utilizar oxyma (ciano(hidroxiimino)acetato de etilo) como aditivo puede ser una excelente opción ya que este aditivo

²⁰ Angell, Y.; Garcia-Echeverria, C.; Rich, D.; *Tetraedron Lett.*, **1994**, 35, 5981.

no presenta los riesgos de seguridad asociados al HOAt por lo que puede ser comercializado sin dificultades (ver sección 3.1). Luego de desproteger el grupo Fmoc del Anth por un único tratamiento de 5 minutos con piperidina al 20% en DMF, como precaución para evitar la formación de dicetopiperazina, se acopla NMeAla con DIC-oxima, **Esquema 4.11**. Se cliva una muestra de este tripéptido de la resina sin desproteger el grupo NHFmoc utilizando TFA 1% y se confirma mediante RMN y LC-MS que el producto era el tripéptido deseado, y que el acoplamiento de FmocNMeAla fue completo, en tan solo una hora y media de reacción. De esta forma se demuestra que esta combinación genera una activación superior del ácido carboxílico correspondiente llevando a acoplamientos completos de manera simple.

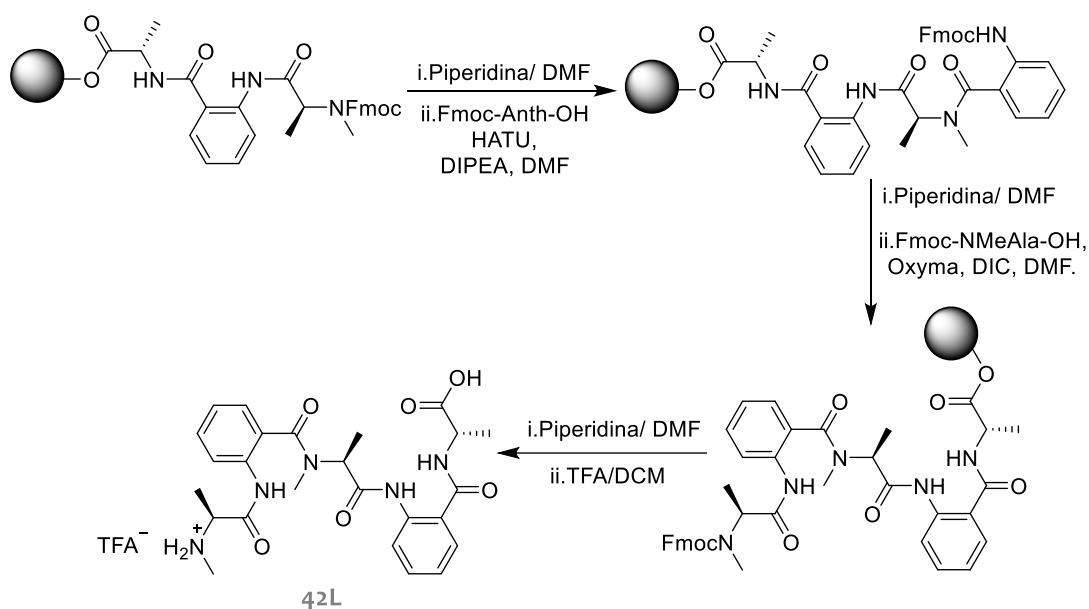


Esquema 4.11. Síntesis de tripéptido intermediario para la obtención de Versicotides.

Se continúa con la síntesis, **Esquema 4.12.**, tomando precauciones para evitar la descomposición del péptido en crecimiento; todas las desprotecciones de Fmoc se realizan por un único tratamiento de 5 minutos con piperidina, y finalizada la síntesis del péptido, la mitad se escinde utilizando AcOH:TFE:DCM (1:1:8),²¹ y la otra utilizando TFA 1% en DCM. Por RMN no se observan diferencias entre ambas porciones, concluyendo que el TFA no causó la descomposición del producto en esta ocasión. Se logra así obtener el péptido precursor del Versicotide A (**42L**) con un rendimiento del 90% en base a la carga inicial de la resina. Su ciclación se explica en la sección 4.2.5.

²¹ Jin, K., Hou Sam, I.; Hiu Laam Po, K.; Lun, D.; Zadeh, E.H.G.; Li, X. *Nat Comm*, **2016**, 7, 12394.

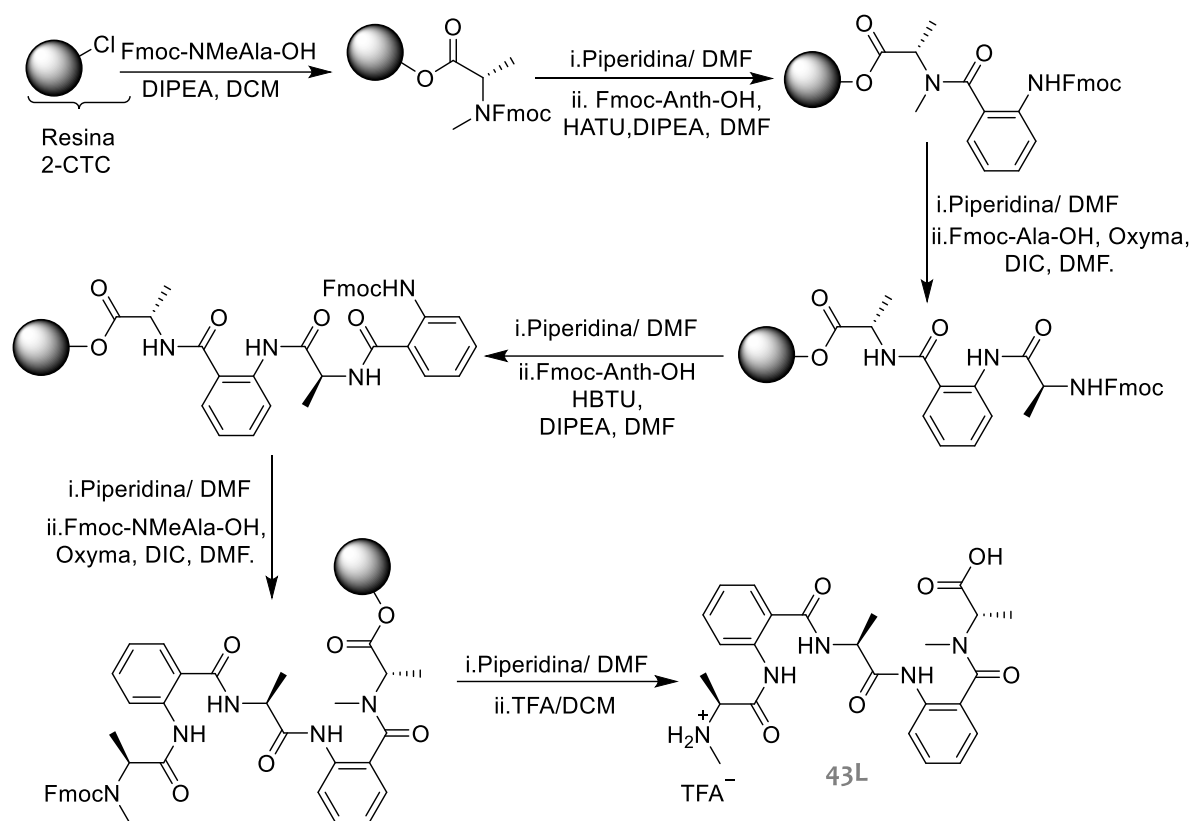
4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos



Esquema 4.12. Síntesis de precursor lineal de Versicotide A.

4.2.3.3. Síntesis de precursor lineal de Versicotide B

Utilizando el mismo procedimiento que para la obtención del precursor lineal de Versicotide A se sintetizó su isómero; precursor de Versicotide B (**Esquema 4.13.**). En este caso la secuencia lineal escogida fue (II): MeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla, evitando el ácido antranílico en el extremo C terminal por las razones explicadas anteriormente. Fue previsto que esta secuencia presentaría más dificultades en la síntesis; la utilización de N- metil amino ácidos en el extremo C terminal puede favorecer la formación de dicetopiperazinas, además de dificultar los primeros acoplamiento. Por este motivo se limitaron todas las etapas de desprotección de grupos amino a un único tratamiento de 5 minutos con piperidina: DMF (1:4), y el lavado de la resina y acoplamiento siguiente se realizaron evitando demoras innecesarias. Se siguieron las reacciones por test de Kaiser o cloranil y fueron necesarias etapas de reacoplamiento en más de un paso, pudiéndose obtener el precursor lineal del Versicotide B con buenos rendimientos (87%).



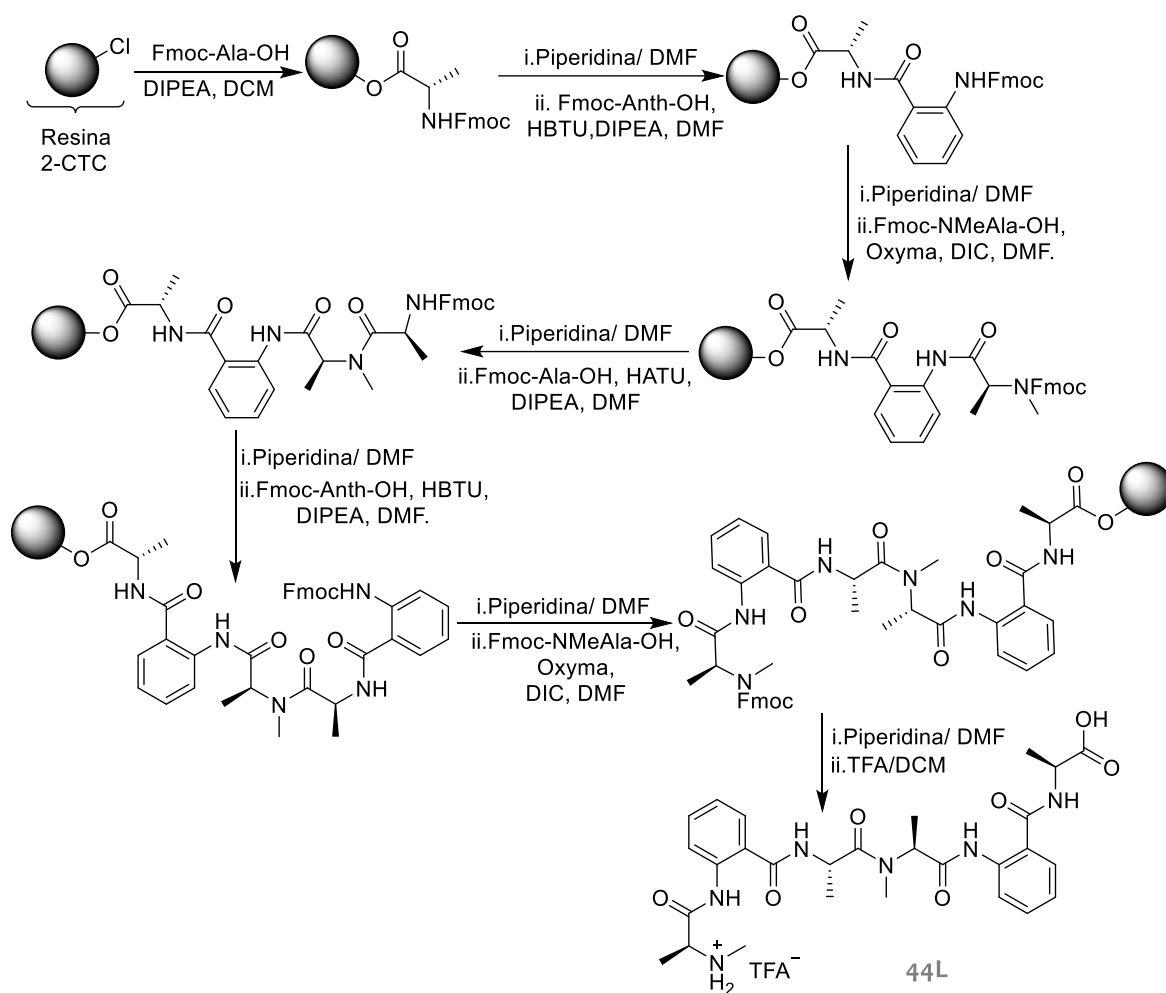
Esquema 4.13. Síntesis de precursor lineal de Versicotide B.

4.2.3.4. Síntesis de precursor lineal de Versicotide C

Para la obtención del precursor lineal del Versicotide C también se eligió la secuencia lineal de tipo (II): MeAla-Anth-Ala-NMeAla-Anth-Ala.

Debido a que este péptido es simétrico se estudió la posibilidad de reducir el número de pasos de síntesis preparando el tripéptido FmocNMe-Ala-Anth-Ala-OH como se mostró en el **Esquema 4.11** en cantidades mayores, luego clivar parte de resina y acoplarlo al tripéptido restante aún anclado a la resina. Para esto se secó y pesó la resina una vez finalizada la síntesis del tripéptido, se separaron 2/3 de dicha masa para realizar el tratamiento con TFA/DCM. Por otra parte se desprotegió el grupo amino del péptido aún unido a la resina para luego realizar el acoplamiento. Se probaron como agentes acoplantes en este caso HATU o DIC/oxyma, pero en ninguna de las dos oportunidades se detectó el producto deseado, por lo cual se continuó con la síntesis secuencial como se venía realizando para los casos anteriores (**Esquema 4.14.**).

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos



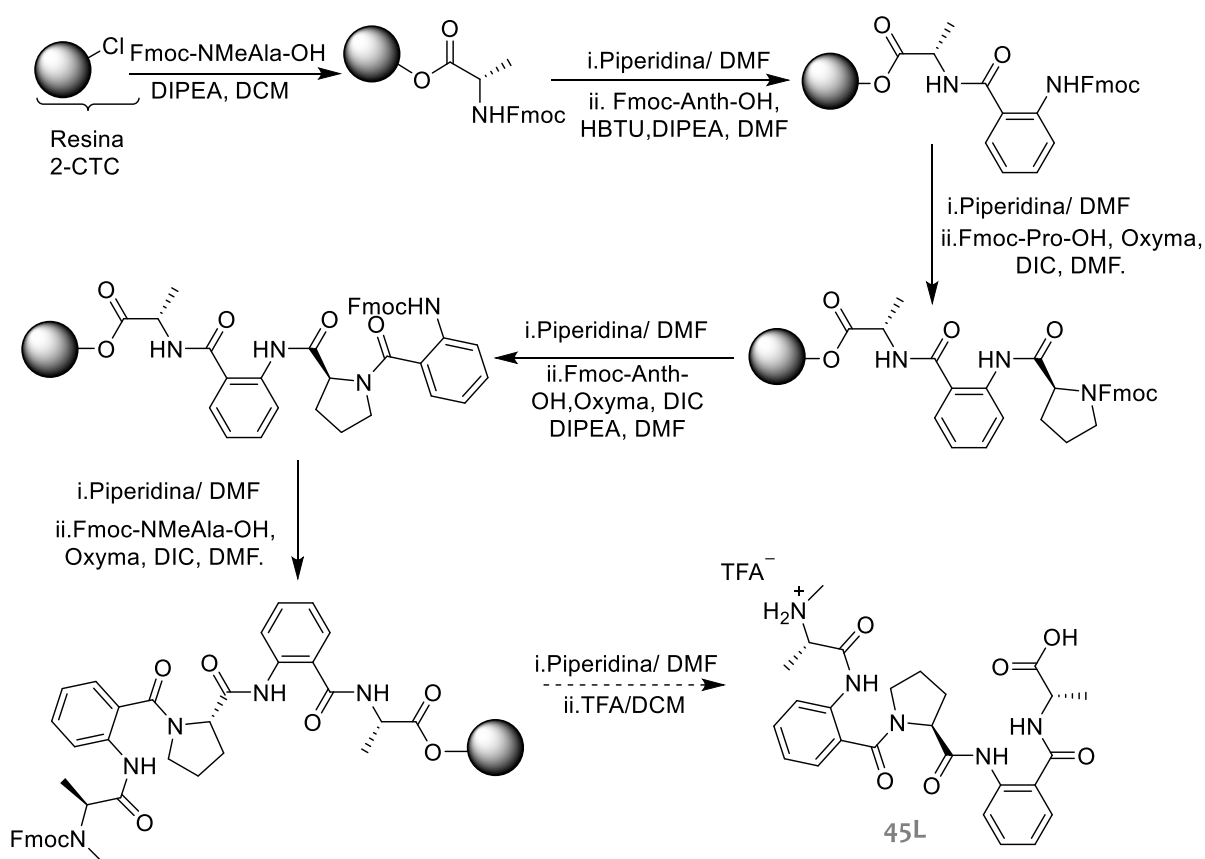
Esquema 4.14. Síntesis del precursor abierto de Versicotide C

Se utilizaron los mismos agentes acoplantes que para la obtención de los precursores de Versicotide A y B: HBTU para acoplamiento al amino de Ala, HATU para NMeAla y Oxyma/DIC para Anth. Esta metodología permitió obtener el péptido deseado, **44L**, con un rendimiento del 98% en base a la carga inicial de la resina.

4.2.3.5. Síntesis de precursor lineal de Versicotide E

Para la síntesis del Versicotide E, la secuencia del péptido precursor elegida fue MeAla-Anth-Pro-Anth-Ala. Cada paso de acoplamiento se siguió por test colorimétricos y por HPLC, de esta forma se monitorearon también los acoplamiento al amino del ácido antranílico. Se requirieron reacoplamiento durante el agregado del último aminoácido. Al igual que en el caso del Versicotide B los tres aminoácidos que se encuentran en el medio de la secuencia son inductores de giro β , al

favorecer la conformación *cis* del enlace amida, como se discutió en el capítulo 3, con lo cual pueden haber factores estéricos dificultando aún más la formación del enlace con el último aminoácido. El seguimiento de cada paso de reacción realizado permite asegurar que todas las reacciones ocurrieron de forma cuantitativa o casi cuantitativa utilizando DIC+oxima en la mayoría de los acoplamientos (**Esquema 1.15.**). Sin embargo, una vez clivado de la resina, el péptido obtenido (con una masa de crudo que correspondería a un 85% de rendimiento) mostró un perfil de HPLC con múltiples productos. Al analizar el crudo mediante LC-MS se encontró la masa correspondiente al compuesto **45L**. Por motivos de tiempo no fue posible repetir la síntesis de **45L** modificando las condiciones de clivado. De todas maneras se intentó realizar la reacción de macrociclación sobre el crudo obtenido.

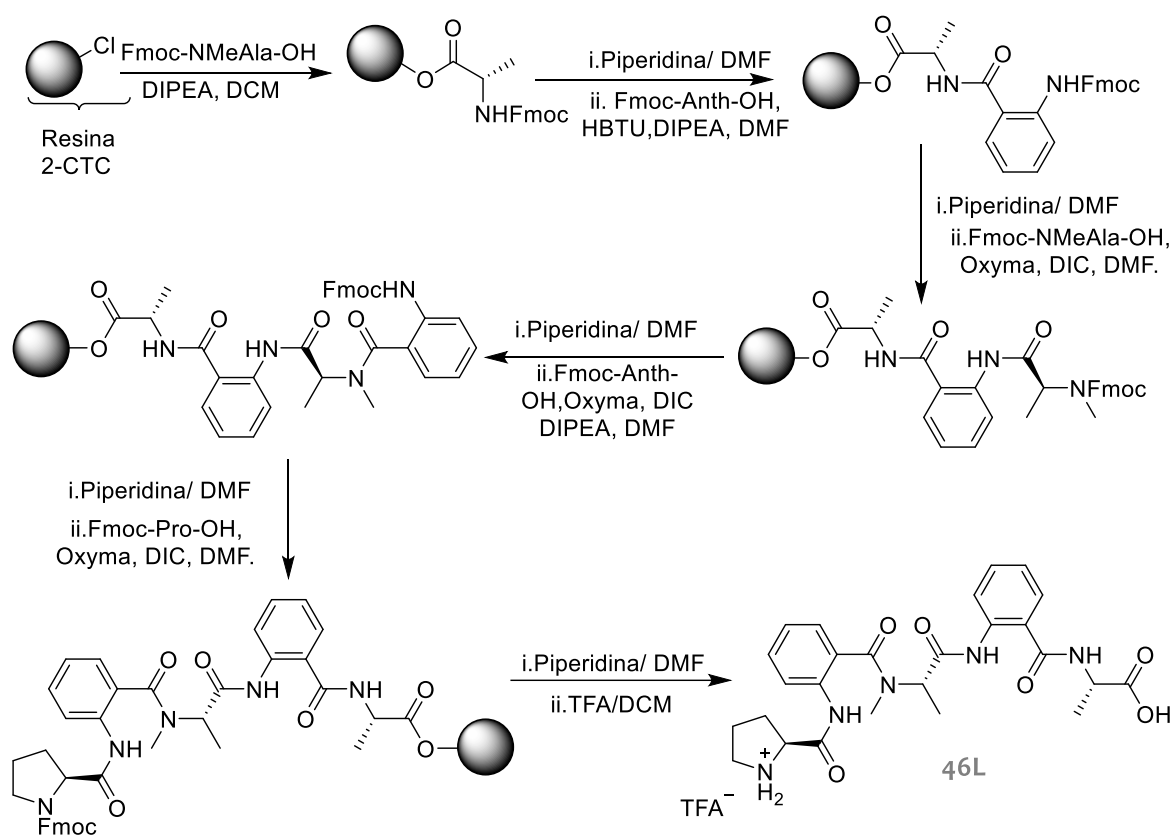


Esquema 4.15. Síntesis del precursor lineal del Versicotide E

4.2.3.6. Síntesis de precursor lineal de Versicotide F

El precursor del Versicotide F: Pro-Anth-NMeAla-Anth-Ala, se obtuvo en un 92% de rendimiento siguiendo el **Esquema 4.16**. En este caso no se observó ruptura del péptido lineal durante su escisión de la resina y fue posible confirmar su presencia en el crudo obtenido mediante LC-MS.

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos



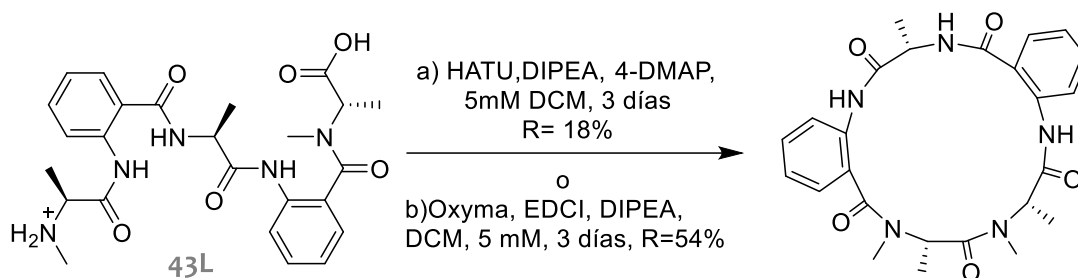
Esquema 4.16. Síntesis del precursor lineal del Versicotide F.

4.2.4. Macrolactamización en solución

4.2.4.1. Síntesis del análogo a Versicotides: 30C

La macrolactamización en solución del péptido precursor de **30C** se realizó en una dilución 2mM en diclorometano, utilizando EDCI y Cl-HOBT como agentes acoplantes. Se agregó 4-DMAP con la finalidad de acelerar la reacción. Partiendo del péptido sintetizado en solución, que corresponde a la secuencia (I), el producto de interés pudo aislarse mediante cromatografía flash para obtener un rendimiento del 35%, **Esquema 4.17**. Sin embargo, no fue posible aislar el producto de la ciclación del péptido obtenido en fase sólida. En este caso se trabajó en menor escala debido a que la cantidad obtenida mediante SPPS fue menor, por lo que es posible que eso haya dificultado la identificación del producto.

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos



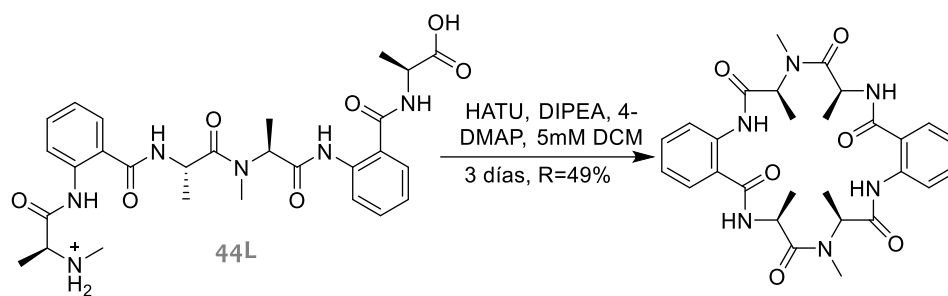
Esquema 4.19. Macro ciclación de precursor para obtener Versicotide B

El producto se observó como una única mancha por TLC en diferentes fases móviles, sin embargo, por HPLC se observaron dos picos. El análisis de cada uno por FIA-LC-ESI-MS mostró, en ambos picos, la señal de m/z 480.3 correspondiente al ion $[M+H]^+$ de Versicotide B. Por otra parte, el espectro de 1H -RMN de cada pico, purificado por HPLC semipreparativo, en $DMSO-d_6$ mostró un número mayor de señales a las esperadas. Finalmente, realizando la determinación del espectro de 1H en un gradiente térmico se observó que algunas señales, correspondientes a los N metilos y α metilenos cambiaron su proporción al aumentar la temperatura. Esto nos permitió descartar la posibilidad de epimerización y concluir que se trata de una mezcla de conformémeros. La discusión del análisis conformacional se realiza en **4.3**

Si comparamos estos rendimientos con los obtenidos para la macro ciclación de los pentapéptidos análogos que contienen fenilalanina en lugar ácido antranílico, presentados en el capítulo 3, podemos observar que en el caso de los análogos **17-20C**, estos rendimientos son de casi la mitad, en condiciones similares. Esta diferencia puede deberse a dos factores: en primer lugar el tamaño del ciclo en el caso de los Versicotides A y B será mayor que en el caso de los análogos que únicamente presentan α aminoácidos, esto puede facilitar la ciclación. Por otra parte, el ácido o-aminobenzoico puede actuar como inductor de giro, favoreciendo conformaciones del péptido abierto en las cuales sus extremos se encuentren más próximos.

4.2.4.4. Síntesis de Versicotide C

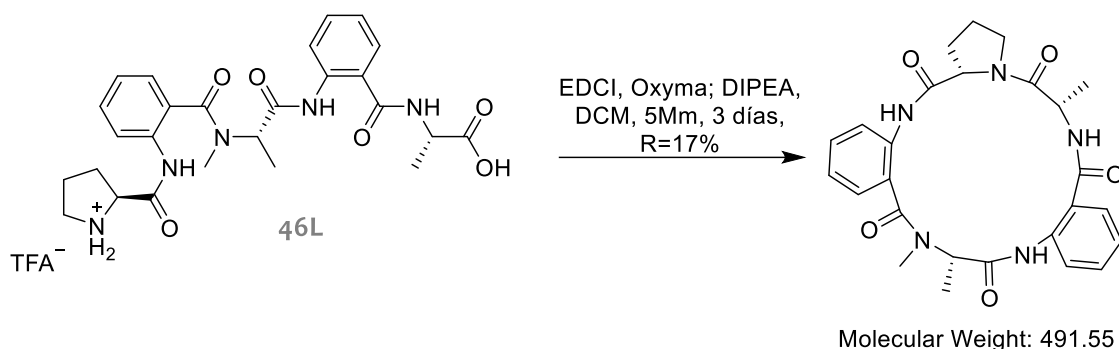
El mismo procedimiento utilizado para la macro ciclación del Versicotide A permitió obtener el Versicotide C con un rendimiento del 49% luego de su purificación por cromatografía en columna. No se detectó dimerización. El análisis por LC-MS demostró la obtención del compuesto de interés de $[M+H]^+$: 551.3. La determinación estructural por RMN y el análisis conformacional se realiza en **4.3**.



Esquema 4.20. Macrociación de Versicotide C

4.2.4.5. Síntesis de Versicotide F

La macrolactamización de **41L** para obtener el Versicotide F se llevó a cabo utilizando EDCI y oxima como se describió anteriormente, pero en este caso el rendimiento obtenido fue menor (17%) que para los Versicotides A-C.



Esquema 4.21. Macrociación de Versicotide F

Mediante LC-MS del producto, luego de su purificación, se confirmó la masa esperada $[M+H]^+$: 492.4. La determinación estructural por RMN y el análisis conformacional se realiza en **4.3**

4.3. Análisis conformacional

En los espectros de RMN en DMSO- d_6 del Versicotide A puro, se observó la presencia de tres conformémeros diferentes (**Figura 4.3**). Para descartar la posibilidad de epimerización se realizó un gradiente de temperatura donde se estudió la variación en el espectro de 1H -RMN al aumentar la temperatura. Se observó corrimiento de los picos de N-metilos y α metilenos, y variación en sus integraciones, lo cual es indicativo de la presencia de conformémeros en lento intercambio (**ver parte experimental**).

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

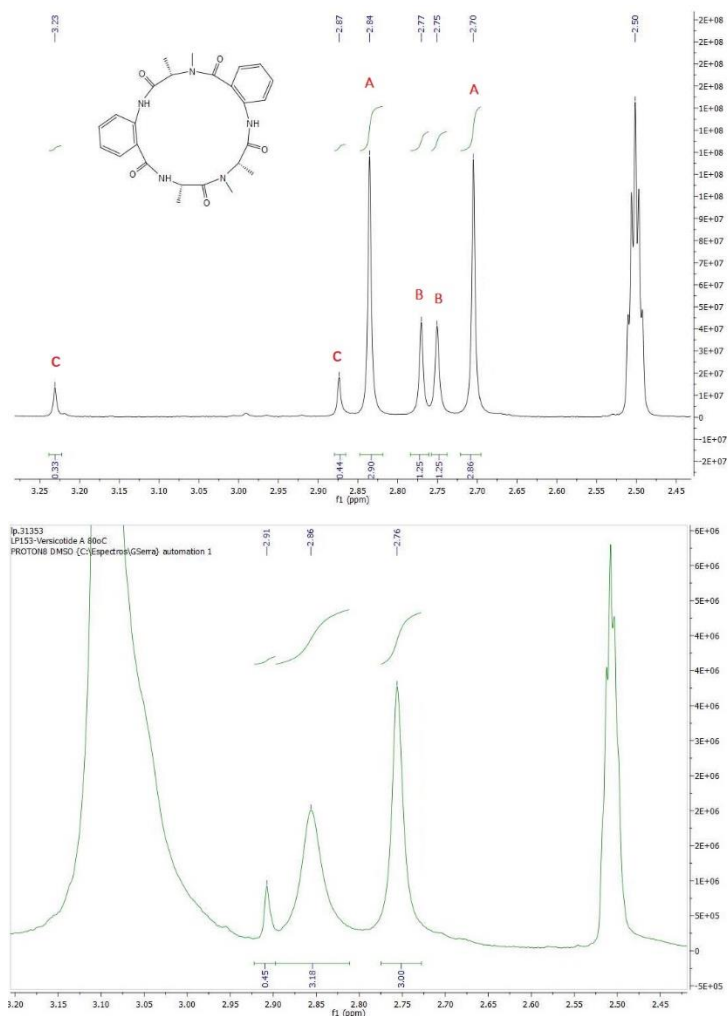


Figura 4.3. ¹H-RMN en DMSO-d₆ de Ciclo-[Ala-Anth-NMeAla-Anth-NMeAla] (Versicotide A, 42C)
Arriba: ampliación de 2.2 a 3.9 ppm para mostrar confórmers A, B y C a 25°C. Abajo: mismo espectro registrado a 80°C.

Tal como se discutió en el capítulo 3, el enlace amida de los aminoácidos que contienen una amina secundaria pueden presentarse en configuración *cis* o *trans*. Tomando en cuenta que la resonancia del N-metilo de las amidas en configuración *trans* se mueve a campos menores en relación al confórmero *cis* debido al efecto de blindaje del grupo carbonilo,^{22,23} observamos que el confórmero mayoritario presenta los dos enlaces N-metil amida en configuración *cis* (**Figura 4.4.**). Los desplazamientos químicos de este confórmero concuerdan con los reportados para el producto

²² Dorman, D. E.; Bovey, F. A. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 1719.

²³ Quintanilla-Licea, R.; Colunga-Valladares, J.F.; Caballero-Quintero, A.; Rodríguez-Padilla, C.; Tamez-Guerra, R.; Gómez-Flores, R.; Waksman, N. *Molecules* **2002**, *7*, 662.

natural. Siguiendo el mismo razonamiento, se pudo determinar que los otros dos confórmeros estarían presentes en configuración (*cis*, *trans*) y (*trans*, *trans*) (ver parte experimental)

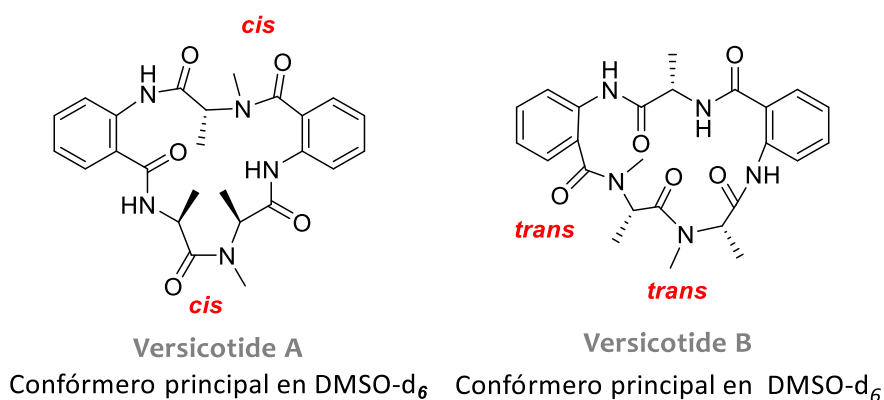


Figura 4.4. Estructura de los principales confórmeros de los Versicotides A y B en los solventes correspondientes.

Fue posible obtener un cristal de este compuesto con características adecuadas para su estudio mediante cristalografía de rayos X, por lenta evaporación de una solución metanólica (**Figura 4.5.**). Dicho estudio coincide con lo reportado,²⁴ y con el confórmero mayoritario observado en DMSO-d₆.

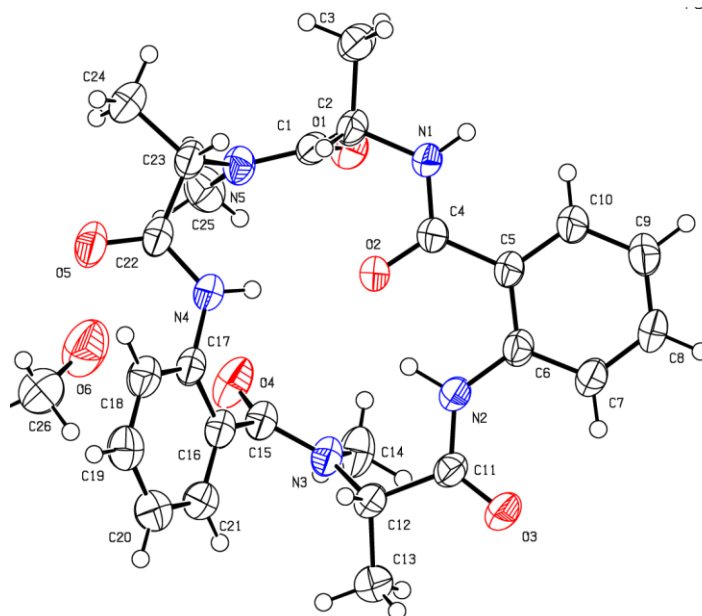


Figura 4.5. Estructura del Versicotide A sintetizado obtenida mediante cristalografía de rayos X. Número de CCDC 2023773.

²⁴ Chen, R.; Cheng, Z.; Huang, J.; Li, D.; Wu, C.; Guo, P.; Lin, W. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 49235.

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

Un análisis similar sobre la espectroscopía del Versicotide B permitió determinar que en este caso la mezcla de confórmeros presentaría uno mayoritario en donde ambos enlaces N metil amida estarían en configuración *trans* y en el otro, uno en configuración *cis* y el otro en *trans*, figuras 4.4 y 4.6. De la misma forma que para el Versicotide A, la presencia de confórmeros se verificó mediante la determinación del espectro de ^1H -RMN a diferentes temperaturas (ver parte experimental).

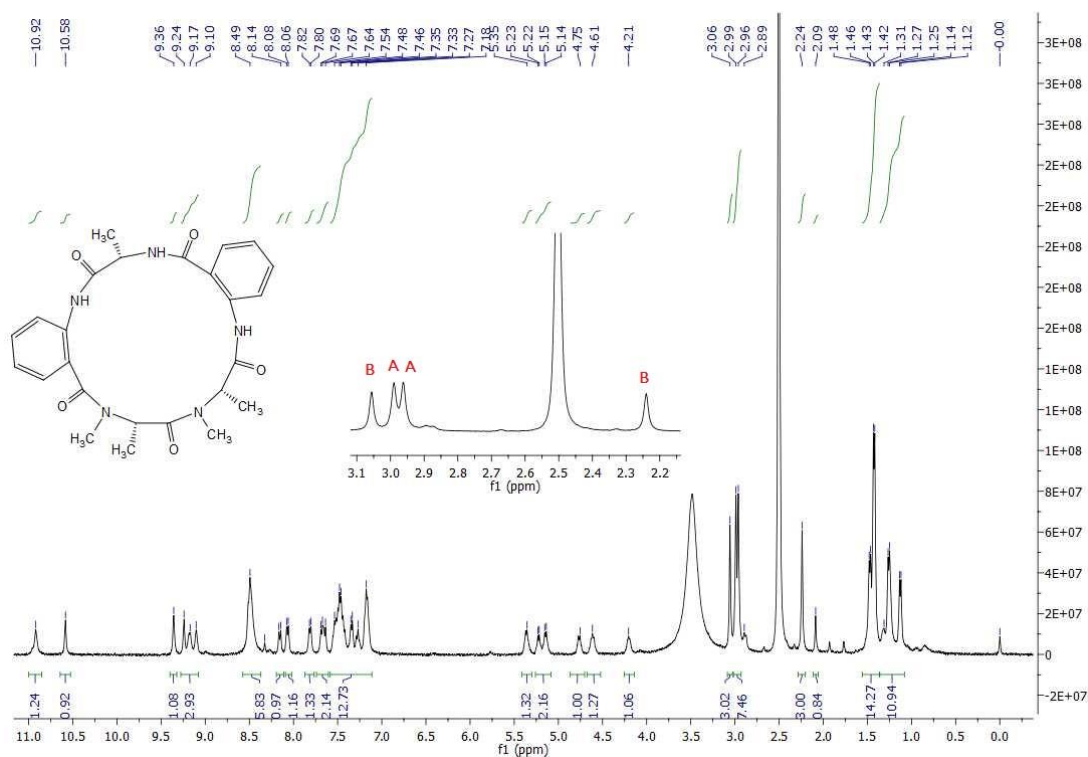


Figura 4.6. ^1H -RMN en DMSO-d_6 de *Ciclo*-[NMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla] (Versicotide B, 43C). Ampliación de área: 2.20 – 3.15 ppm, A y B: confórmeros.

Por otra parte, los desplazamientos químicos de ^1H en los espectros de RMN en DMSO-d_6 del Versicotide C coinciden con los reportados para el producto natural. En dicho artículo, los autores discuten que este producto sería simétrico si los dos enlaces amida se presentaran en la misma conformación, por lo que solo se observarían la mitad de las señales. Sin embargo, se ven tres señales diferentes en la zona donde se encuentran normalmente los protones unidos al carbono α de la Alanina. Los autores justifican esta observación por la presencia de un único confórmero presentando un enlace amida en configuración *cis* y otro *trans*, lo cual rompería la simetría de la molécula. El espectro del producto sintetizado también presenta esta particularidad, pero al analizar en profundidad el espectro de RMN se observan un grupo de señales cuyos desplazamientos e integración podrían corresponderse a un confórmero (simétrico) y otro grupo de señales cuya

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

integración es menor a la del primer grupo, y que entre ellas se corresponden con otro conformero, también simétrico. En acetona d_6 también observamos los dos conformeros, en una relación 1:0.22 (Figura 4.7).

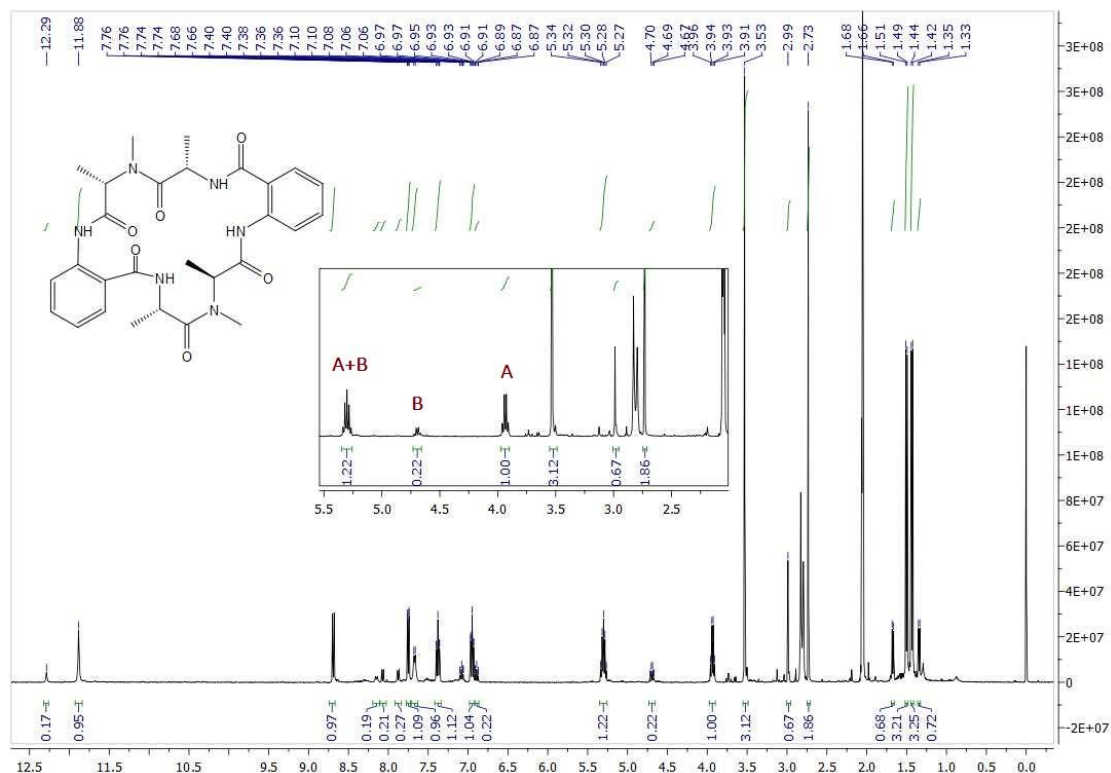


Figura 4.7. ^1H -RMN en $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ de *Ciclo*-[NMeAla-Anth-Ala-NMeAla-Anth-Ala] (Versicotide C, 44C). Área ampliada: 2-5.5 ppm mostrando conformeros.

Se registró el espectro de protón del producto obtenido a diferentes temperaturas, donde se puede observar que a mayor temperatura el conformero minoritario desaparece, **Figura 4.8.**

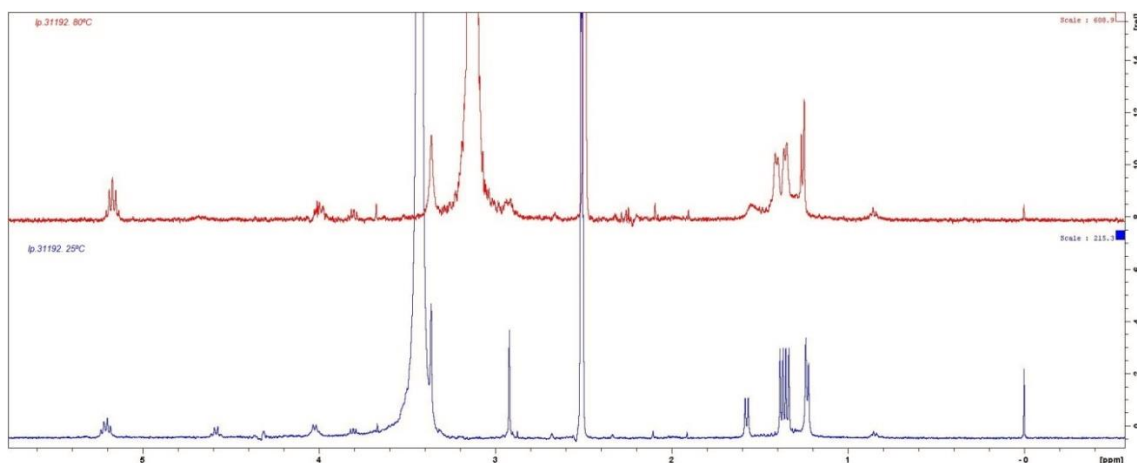


Figura 4.7. Comparación de ^1H -RMN de Versicotide C a 25°C (azul) y 80°C (rojo)

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

Observando la integración de las señales en el producto natural se puede concluir que, tanto en el caso del producto natural como en el sintético, hay un equilibrio entre dos conforméres, uno con sus dos enlaces amida en configuración *cis* y otro con los dos en configuración *trans* (Figura 4.8.), cuya interconversión es lo suficientemente lenta a temperatura ambiente como para observar ambos en el tiempo de medida del equipo de RMN.

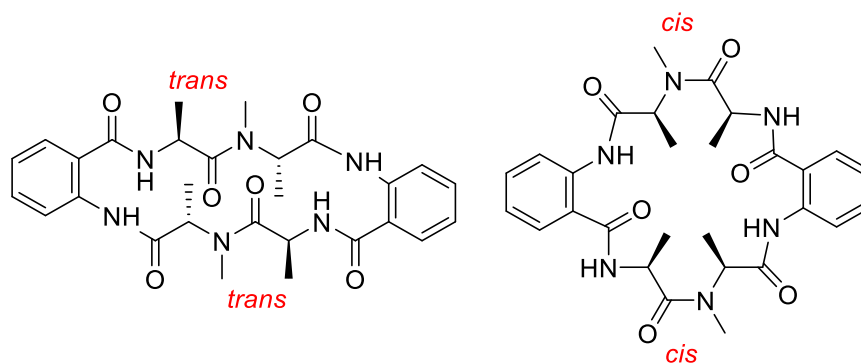


Figura 4.8. Conforméres de Versicotide C observados en DMSO-d₆

A diferencia de lo observado para los Versicotides A-C, en el caso del Versicotide F se observan picos definidos correspondientes a un único conforméres, Figura 4.9. Los desplazamientos químicos de ¹H-RMN (δ 2.92) y ¹³C-RMN (δ 30.0) del N-metilo sugieren que el mismo se encontraría en conformación *trans* respecto al carbonilo.

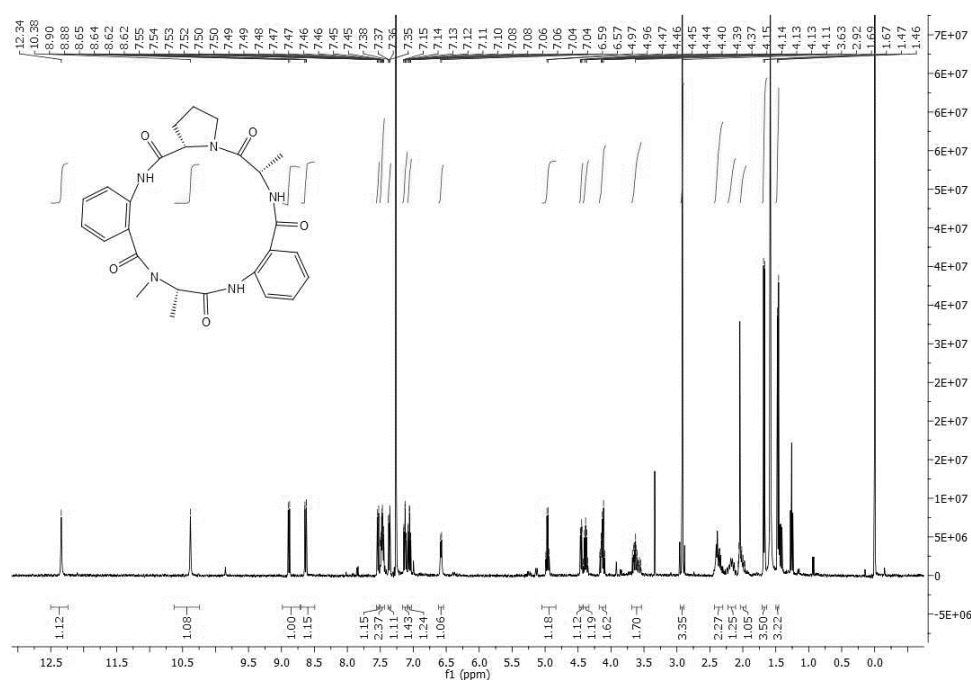


Figura 4.9. ¹H-RMN en CDCl₃ de *Ciclo*-[Pro-Anth-NMeAla -Anth-Ala] (46C)

4.4. Conclusiones

Se estudiaron diferentes opciones de rutas sintéticas de los productos naturales de interés mediante SPPS o una combinación de SPPS y síntesis en solución.

Se logró obtener el pentapéptido Ala-Anth-Ala-Anth-Ala, mediante SPPS sobre la resina 2-CTC utilizando HOAt y HATU como agentes acoplantes, pero esta metodología presenta la limitante de que el HOAt es explosivo y por lo tanto el transporte para su comercialización está restringido. Al realizar la macrolactamización en solución de este compuesto, no fue posible aislar el producto.

Se obtuvo mediante síntesis en solución el péptido de secuencia Ala-Ala-Anth-Ala-Anth, usando como alternativa a la combinación HOAt/HATU, trifósgeno o la combinación de EDCI/Cl-HOBt. En este caso sí fue posible aislar el ciclopéptido derivado de su macrociclación, si bien la síntesis global presentó rendimientos relativamente bajos como consecuencia de una menor eficiencia de los agentes acoplantes utilizados y de reacciones secundarias que fueron identificadas.

Finalmente, la síntesis de los productos naturales Versicotides A-C, conteniendo Anth, se logró con buenos rendimientos luego de una extensiva búsqueda de la metodología y agentes acoplantes más adecuados. Sus precursores lineales fueron sintetizados en fase sólida sobre la resina 2-CTC. El uso de oxima y DIC proporcionó un método simple para realizar los acoplamientos involucrando la amina aromática del ácido antranílico en tiempos cortos y con muy buenos rendimientos, evitando posibles rearrreglos o reacciones secundarias. Además, este reactivo es más seguro que los derivados de benzotriazol (HOAt y HOBt) ya que no es explosivo,²⁵ por lo cual no hay restricciones para su comercialización. Esta metodología también se aplicó a la síntesis de los precursores lineales de los Versicotides E y F, permitiendo acceder a los mismos con rendimientos del 85% y 92% respectivamente.

La macrociclación de los Versicotides A y C se llevó a cabo utilizando HATU como agente acoplante y no se detectó epimerización durante la ciclación. En el caso del Versicotide B, la combinación de oxima y EDCI proporcionó mejores rendimientos. La misma metodología se aplicó a la macrociclación de **46L** para obtener el Versicotide F, si bien en este caso el rendimiento fue notablemente menor. Esto puede explicarse por una mayor rigidez del péptido lineal, limitando la disposición del mismo en una conformación que favorezca la ciclación. Los espectros de RMN de este compuesto muestran picos finos y bien definidos, sugiriendo la presencia de un único conformero.

²⁵ Wehrstedt, K. D.; Wandrey, P. A.; Heitkamp, D. J. *Hazard. Mater.* **2005**, A126, 1.

4. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo β o γ aminoácidos

En los espectros de RMN de los Versicotides A-C se observan mezclas de conformeros con picos bien definidos para cada uno, lo cual muestra que estas moléculas son lo suficientemente rígidas para que la interconversión entre conformeros sea más lenta que el tiempo de adquisición de datos del RMN.

Los datos de rayos X y RMN coinciden con los de los productos naturales. Sin embargo, un análisis exhaustivo de los espectros del Versicotide C permitió concluir que en DMSO- d_6 está presente una mezcla de conformeros (*cis, cis*) y (*trans, trans*) y no un único conformero (*cis, trans*) como fue informado por los autores de su aislamiento.

Parte de los resultados presentados en este capítulo fueron publicados²⁶ y dicho artículo se encuentra disponible en el anexo II.

²⁶ Posada, L.; Serra, G. *RSC Advances*, 2020, **10**, 43653.

4.5. Parte experimental

4.5.1. Información experimental general

Todas las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera inerte de nitrógeno y utilizando disolventes secos, recientemente destilados, bajo condiciones anhidras, a menos que se indique de otra forma. Todos los solventes fueron purificados de acuerdo a procedimientos descritos en la literatura.²⁷

Todos los rendimientos informados refieren a productos cromatográfica y espectroscópicamente puros (determinado mediante $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$). Todos los espectros de RMN fueron registrados utilizando un equipo Bruker Advance NEO-400 o Bruker Avance III 500 MHz. Todos los desplazamientos químicos reportados son relativos TMS utilizado como referencia interna.

La resina Cloruro de 2-clorotritilo (2-CTC, 100-200 mesh, 1.1 mEq/g) fue adquirida de CHEM-IMPEX INT'L INC. Todos los solventes utilizados en SPPS fueron de calidad HPLC.

La pureza de los péptidos obtenidos utilizando la resina 2-CTC fue determinada utilizando un equipo de HPLC analítico Shimadzu (Bombas LC-10AT) equipado con una Phenomenex Kinetex C18 (150 x 4.6 mm, 5 μm) y detector UV/Vis SPD20A prominence. Se utilizó una columna Phenomenex Luna C18 (150 x 4.6 mm, 5 μm) ó Phenomenex Kinetex C18 (4.6x150mm, 5 μm) y H₂O: CH₃CN con 0.1 % ácido fórmico como fase móvil. Todos los espectros de masas se adquirieron con un equipo Shimadzu 8040 HPLC-MS-MS, que utiliza bombas LC-20AD, un autosampler SIL-20A, ionización por electrospray y un detector de masas triple cuadrupolo.

4.5.2. Procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) sobre la resina 2-CTC.

Se siguieron los procedimientos generales de carga de resina, elongación de la cadena peptídica, desprotección y escisión descritos en la sección 3.4.2.

Procedimiento general de acoplamiento utilizando oxima + DIC

Luego de desproteger el grupo Fmoc lavar la resina con DMF (x3), CH₂Cl₂ (x3) y DMF (x3). Pesar 3 Eq. del aminoácido protegido con Fmoc y 3 Eq de oxima. Disolver en la mínima cantidad necesaria de DMF. Agregar 3 Eq. de DIC a la solución anterior. Agitar en vortex durante 30 segundos. Agregar a la resina y agitar de forma manual 1 minuto y luego en shaker 1 hora o 1 hora y media. Filtrar y lavar

²⁷ Perrin, D. D. ; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", 3th Ed. Pergamon Press, Oxford, 1988.

con DMF 3 veces. Hacer lavados con CH_2Cl_2 y MeOH intercalados (3 veces). Realizar la desprotección del NH-Fmoc y agregado del próximo aminoácido.

4.5.3. Procedimientos generales de síntesis de péptidos en solución.

a. Procedimiento general de formación de enlaces amidas

Método 1

EDC.HCl (1.5 eq.), Cl-HOBt (1.5 eq.) y DIPEA (2.0 eq.) se agregan a una solución del aminoácido protegido con Boc (1.0 eq.) en CH_2Cl_2 bajo atmósfera de N_2 y a 0°C . El péptido lineal con el extremo N terminal desprotegido o el amino ácido correspondiente ($\text{NH}_2\text{-AA-COOEt}$) se agrega a la reacción y la mezcla se agita por 10 min a 0°C por 10, y luego a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Se evapora el CH_2Cl_2 y se retoma en AcOEt. Se extrae con 0.1 M HCl (30 mL \times 2), brine (10 mL), NaHCO_3 (30 mL \times 2) y brine (10 mL), se seca con Na_2SO_4 y se filtra. El solvente se evapora a vacío y el crudo obtenido se purifica por cromatografía flash.

Método 2

A una solución de Boc-AA-OH (1eq.) en THF seco bajo atmósfera de N_2 y a 0°C se agrega Bis(triclorometil)carbonato (0.33 eq.) Se agrega 2,4,6-colidina (2.6 eq.) a la solución y se forma una suspensión blanca. La reacción se agita durante 5 minutos y luego se agrega a una solución del péptido lineal o amino éster ($\text{NH}_2\text{-AA-COOEt}$) (1 eq.) en THF seco, seguido de DIPEA (1 eq). La mezcla de reacción se agita toda la noche y luego se concentra a vacío. Se retoma en AcOEt y se lava la capa orgánica con HCl 5% \times 3, NaHCO_3 \times 3 y brine \times 3. Se seca con Na_2SO_4 , filtra y concentra. El crudo se purifica por cromatografía flash.

Método 3

En un balón de dos bocas se agregan a una solución de 1.0 eq (3.2 mmoles) de Boc-AA-OH en 20 mL de DCM seco, bajo atmósfera de N_2 y a 0°C , $\text{NH}_2\text{-AA-OMe}$ (1.0 eq, 3.2 mmoles) HBTU (1.2 eq, 3.8 mmoles), DIPEA (2.2 eq, 6.9 mmoles) y una punta de espátula de 4-DMAP. Se deja con agitación, a temperatura ambiente, toda la noche. Se evapora a vacío, se agrega agua se y se extrae con AcOEt. Los extractos orgánicos se juntan y se lavan con HCl 5% y luego con solución saturada de NaHCO_3 . La capa orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y se evapora a vacío. El crudo se purifica por cromatografía en columna usando como fase móvil éter de petróleo/AcOEt.

b. Hidrólisis de ésteres en medio básico

1 eq. del éster se disuelve en THF y se agregan 3 eq. de LiOH disueltos en agua. La reacción se agita por dos horas a temperatura ambiente. Luego el THF se evapora a vacío y se agrega HCl 5% hasta un pH de 3. La solución se extrae con AcOEt. Las fases orgánicas se secan con Na_2SO_4 , se filtran y el solvente se evapora a vacío.

c. Hidrólisis de ésteres metílicos

En un balón de dos bocas bajo atmósfera de nitrógeno se disuelve 1 Eq. del éster metílico y 4 Eq. de Lil en AcOEt. Se calienta a reflujo por 16 horas y se deja llegar a temperatura ambiente. Se lava 3 veces con HCl 5% y 5 veces con tiosulfato de sodio 10%. La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y el solvente se evapora a vacío.

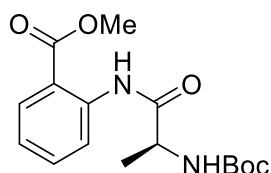
d. Desprotección de NHBoc

Se agrega una solución de HCl 1.8M en dioxano en un exceso de 3 veces respecto al NHBoc-amino ácido. La solución se agita a temperatura ambiente una hora y luego el solvente se evapora a vacío. El clorhidrato obtenido se usa en la etapa siguiente sin purificación.

4.5.4. Procedimiento general de macrociclación en solución

Para la macrolactamización en solución utilizando HATU o oxima/EDCI se siguieron los procedimientos descritos en la sección 3.4.5, métodos a y b respectivamente.

4.5.5 Caracterización de productos



26

El compuesto 26 se preparó en solución mediante el método general de formación de enlaces amida 2 o 3.

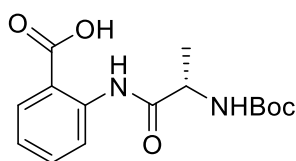
Para el **método 2**. Alanina Boc (Boc-Ala-OH, 378.4 mg, 2 mmol) se agregó a una solución de Cl-HOBt (508.7 mg, 3 mmol) y NMM (220 μL , 2 mmol) en 3 mL de DCM at 0°C bajo atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción se agita a 0°C por 10 min y luego se agrega metil antranilato (NH_2 -Anth-OMe, 906 mg, 6.0 mmol) y EDC.HCl (575 mg, 3.0 mmol). La mezcla de reacción se deja llegar a temperatura

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

ambiente y se agita hasta el día siguiente. Se diluye con 30 mL de DCM, y la fase orgánica se extrae con 0.2 M HCl (3x15 mL), brine (10 mL), y solución saturada de NaHCO₃, se seca con Na₂SO₄ y se filtra. El solvente se evapora a vacío y el crudo se purifica por cromatografía flash (AcOEt:hexane, 1:4) para obtener Boc-Ala-Anth-OMe puro con un rendimiento de 42%.

Método 3: Bis(triclorometil)carbonato (74 mg, 0.25 mmol) se agrega a una solución de Boc-Ala-OH (140.0 mg, 0.74 mmol) en THF seco (2.5 mL) bajo atmósfera de N₂ a 0°C. 2,4,6-colidina (250 μ L, 1.86 mmoles) se agregan a la solución. La mezcla de reacción se agita por 5 minutos y luego la suspensión se agrega a una solución de metil antranilato (85 μ L, 0.62 mmol) en 2 mL de THF seco, seguido de DIPEA (128 μ L, 0.74 mmol). La mezcla de reacción se agita toda la noche y se concentra a vacío. Se agregan 30 mL de AcOEt y la fase orgánica se lava con HCl 5% (3 x 5mL), brine (3 x 5mL) y NaHCO₃ (3 x 5mL), se seca con Na₂SO₄, se filtra y concentra. El material crudo se purifica por cromatografía flash (AcOEt:EP, 1:4) y se obtiene Boc-Ala-Anth-OMe puro con un rendimiento del 51%.

BocNH-Ala-Anth-OMe(26). Sólido blanco. Rf=0.43 (AcOEt: EP, 1:4). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.34–1.74 (m, 12 H), 3.92 (s, 3H), 4.40 (s, 1 H), 5.15 (s, 1 H), 7.10 (t, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.56 (t, *J*=7.4 Hz, 1 H), 8.04 (dd, *J*=8.0, 1.3 Hz, 1H), 8.76 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H), 11.57 (s, 1H). ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 13.8, 14.0, 28.3, 52.3, 55.5, 57.6, 80.6, 115.2, 120.1, 122.6, 130.8, 134.6, 141.2, 168.3, 171.1.

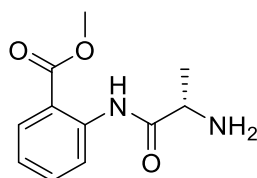


26a

El procedimiento general de hidrólisis de ésteres sobre 1 permitió obtener 2 en un 95% de rendimiento.

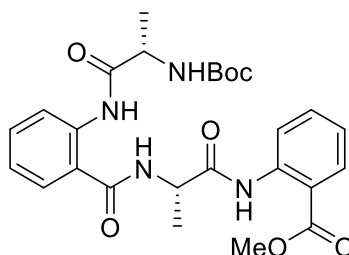
BocNH-Ala-Anth-OH (26a). Sólido blanco. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (d, *J*=10.0, 12H), 4.25 -4.44 (m, 1H), 5.17 (d, *J*=7.2, 1H), 7.12 (t, *J*=7.5, 1H), 7.24 (d, *J*=6.4, 1H), 7.41 (t, *J*=7.4, 1H), 8.22 (d, *J*=8.1, 1H), 9.29 (s, 1H).

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos



26b

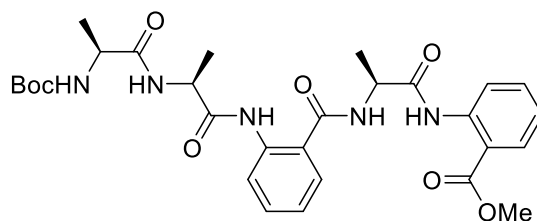
Boc-Ala-Anth-OMe (644.4 mg, 2 mmol) se trata con una solución de HCl 1.8 M en dioxane (15 mL) por 2 horas, para remover el grupo protector Boc. La mezcla se evapora a vacío para obtener **NH₂-Ala-Anth-OMe (26b)**.



27

Se aplicó el método de acoplamiento 2 a una solución del compuesto **26a** (130 mg, 0.42 mmol, 1 eq) y **26b** (100 mg, 0.42 mmol, 1 eq). Luego de la extracción el crudo se purifica por cromatografía flash usando EP: AcOEt (3:2) como fase móvil.

BocNH-Ala-Anth-Ala-Anth-OMe (27). Rendimiento= 10%. Aceite incoloro. $R_f=0.7$ (AcOEt:EP, 3:2). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.47 (m, 12 H), 1.66 (d, $J=7.1$ Hz, 3H), 3.91 (s, 3 H), 4.28 – 4.44 (m, 1 H), 4.85 (d, $J=7.0$ Hz, 1 H), 5.10 – 5.27 (m, 1H), 7.10- 7.18 (m, 3 H), 7.50 (d, $J=7.6$ Hz, 1 H), 7.55 – 7.62 (m, 1H), 7.71 (dd, $J=7.9, 1.3$ Hz, 1 H), 8.06 (dd, $J=8.0$ Hz, 1.5, 1 H), 8.62 (d, $J=8.4$ Hz, 1 H), 8.70 (d, $J=8.4$ Hz, 1 H), 11.45 (s, 1H), 11.59 (s, 1H).



29

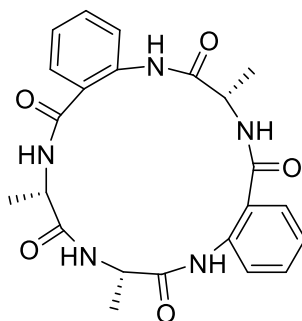
Se desprotege el grupo Boc utilizando el procedimiento general. La amina resultante (20 mg, 0.042 mmol) se disuelve en DCM bajo atmósfera de N_2 y se agregan 3 eq. de DIPEA. La mezcla de reacción se coloca en un baño de agua hielo a 0°C y se agrega Boc-Ala-OH (10 mg, 0.05), HBTU (20 mg, 0.05 mmol) y 4-DMAP. La mezcla de reacción se agita a 0°C por 10 min y luego se deja llegar a

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

temperatura ambiente y se agita toda la noche. El disolvente se evapora a vacío y se agrega AcOEt. La fase orgánica se lava con 0.1 M HCl (30 mL \times 2), solución saturada de NaHCO₃ (30 mL \times 2) y brine (10 mL), se seca con MgSO₄ y se filtra. El solvente se evapora a vacío y el crudo se purifica por cromatografía flash utilizando 4:1 AcOEt:EP como fase móvil. Se obtienen 23 mg de **29** (92% de rendimiento)

BocNH-Ala-Ala-Anth-Ala-Anth-OMe (29). Rendimiento 92%. Aceite amarillo. R_f= 0.46 (AcOEt:EP, 4:1).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.42 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.50 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.65 (d, J = 7.1 Hz, 3 H), 3.92 (s, 3 H), 4.21- 4.39 (m, 1 H), 4.56 - 4.65 (m, 1 H), 4.77- 4.88 (m, 1 H), 5.04- 5.17 (m, 1 H), 6.94 (s, 1 H), 7.05 – 7.21 (m, 3 H), 7.45 – 7.65 (m, 2 H), 7.71 (dd, J =7.9, 1.3 Hz, 1H), 8.06 (dd, J =8.0, 1.5 Hz, 1 H), 8.62 (d, J =8.4 Hz, 1 H), 8.70 (d, J =8.4 Hz, 1 H), 11.53 (s, 1H), 11.57 (s, 1H).



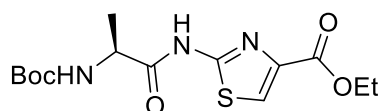
30C

Se desprotege **29** en sus extremos C y N terminal mediante los procedimientos descritos anteriormente para obtener el precursor lineal **NH₂-Ala-Ala-Anth-Ala-Anth-OH; 30L**, que se utiliza en una concentración de 2 mM en la reacción de macrociclación utilizando el procedimiento general, con Cl-HOBt (10 mg, 0.06 mmol) y EDC.HCl (23 mg, 0.12 mmol) como agentes acoplantes. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna utilizando AcOEt/EP (4:1) como fase móvil. R=35%. La pureza (98%) se determine mediante HPLC (gradiente lineal: 10 a 100% acetonitrile:H₂O/ 0.003M TFA durante 10 min; flujo 1.5 mL/min; t_R = 6.64 min).

Ciclo-[Ala-Ala-Antr-Ala-Antr] (30C): sólido amarillo (35% yield). R_f=0.41 (AcOEt:EP, 4:1). ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 1.27-1.36 (m, 3H), 1.53-1.62 (m, 6H), 4.46-4.58 (m, 1H), 4.63-4.75 (m, 1 H), 4.80-4.95 (m, 1H), 7.08-7.19 (m, 2H), 7.72 (dd, J =7.6, 1.0 Hz, 1 H), 7.48 (m, 2 H), 7.85 (d, J =7.9 Hz, 1H), 7.98-8.06 (m, 1H), 8.10-8.19 (m, 1 H), 8.20-8.26 (m, 1H), 8.35 (d, J =8.3 Hz, 1 H), 8.62 (d, J =8.7 Hz, 1 H), 11.05 (s, 1H), 11.31 (s, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, ((CD₃)₂CO) δ (ppm) 15.5, 17.1, 17.4, 49.6, 50.4, 51.2, 121.1, 121.2, 121.4, 121.5, 122.6, 122.8, 123.7, 125.3, 127.4, 128.6, 131.4, 132.1, 168.3, 170.2, 171.2, 173.0,

173.1. **MS** m/z calc. for $C_{23}H_{25}N_5O_5$ ($[M+1]^+$) 452.19, experimental 452.2.

Boc-Ala-Tz-OEt (36)

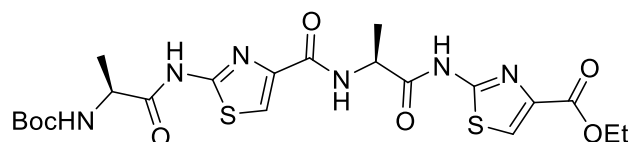


36

El compuesto **36** se obtuvo mediante dos metodologías diferentes; mediante el método 1, usando EDC·HCl (1.2 eq) y Cl-HOBt (1.2 eq), y mediante el método 3, usando HBTU. En este caso se obtuvieron mejores resultados con HBTU como agente acoplante (R= 62% y 78% respectivamente).

(36) Sólido blanco. $R_f=0.67$, (AcOEt: EP, 1:5). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.40 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.46 (s, 9 H), 1.51 (d, $J=7.2$ Hz, 3 H), 4.41 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.51 (s, 1 H), 5.06 (s, 1 H), 7.86 (s, 1 H), 10.36 (s, 1 H). ^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ = 14.4, 17.9, 28.3, 50.4, 61.5, 81.1, 122.4, 141.7, 155.4, 157.8, 161.5, 171.5.

Boc-Ala-Tz-Ala-Tz-OEt (37)

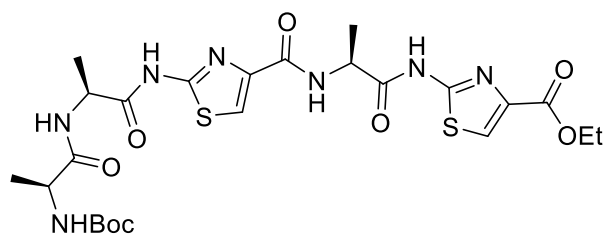


37

Se fraccionó en dos partes el compuesto **36** obtenido. Sobre una mitad se realizó la hidrólisis del éster con LiOH para obtener **36b** y sobre la otra la desprotección del grupo amino, siguiendo el procedimiento general, obteniendo **36a**. Posteriormente se realizó el acoplamiento, utilizando HBTU de 1.3 mmoles de **36a** y 1.2 mmoles de **36b** para obtener **37**. R=88%

(37) Aceite incoloro. $R_f=0.49$, (AcOEt: EP, 2:1). 1H RMN (400 MHz, acetona d_6) δ 1.35 (t, $J=7.1$ Hz, 3 H), 1.43 (s, 9H), 1.49 (d, $J=7.2$ Hz, 3 H), 1.63 (d, $J=7.1$ Hz, 3 H), 4.32 (q, $J=7.1$ Hz, 2 H), 4.57 – 4.46 (m, 1H), 5.05 – 4.94 (m, 1H), 6.53 (s, 1H), 8.04 – 7.93 (m, 3H), 11.32 (s, 1H), 11.54 (s, 1H).

Boc-Ala-Ala-Tz-Ala-Tz-OEt (39)

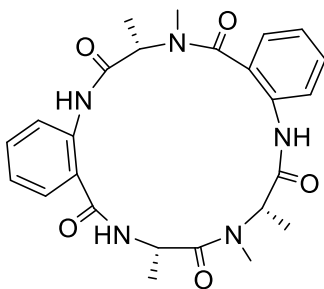


39

Se desprotegió el extremo N terminal de **37** y se acopló el aminoácido Boc-Ala-OH siguiendo la técnica con HBTU, para obtener **39**.

(39) Sólido blanco. Rf=0.3 (AcOEt: EP, 3:2). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 1.29 (t, $J=7.1$ Hz, 3 H), 1.34 (d, $J=7.1$ Hz, 3 H), 1.38 (s, 12 H), 1.46 (d, $J=7.1$ Hz, 3H), 4.07 – 3.93 (m, 1H), 4.27 (q, $J=7.1$ Hz, 2 H), 4.44–4.62 (m, 1 H), 4.66 (q, $J=7.1$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J=7.3$ Hz, 0.75 H confórmero mayoritario), 7.30 (s, 0.25 H confórmero minoritario), 7.88 (s, 1 H), 8.09 (m, 2H), 8.20 (d, $J=6.8$, 1H), 12.44 (s, 1 H), 12.83 (s, 1 H),

***Ciclo* NHMeAla-Anth-NMeAla-Anth-Ala-OH (Versicotide A) (42C)**



42C

La sal de trifluoroacetato **NHMeAla-Anth-NMeAla-Anth-Ala-OH** se obtuvo siguiendo el procedimiento general de SPPS. El producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento global del 90 % (352 mg, 0.58 mmol), en base a la carga inicial de la resina. **ESI-MS** m/z calc. for $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_6$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 498.2, experimental 498.4.

La reacción de macrociclación se lleva a cabo siguiendo el procedimiento general (a), descrito en la sección 3.4.5. (dilución 5mM, 3 días), partiendo de la sal de trifluoroacetato del péptido lineal **NHMeAla-Anth-Ala-NMeAla-Anth-Ala-OH** (200 mg, 0.33 mmol), usando HATU como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash utilizando AcOEt como fase móvil, rindió el macrociclo

deseado en 50 % de rendimiento (78 mg, 0.16 mmol). El análisis de HPLC empleando H_2O : MeCN y 0.1% ácido fórmico en gradiente lineal de 90:10 a 0:100 mostró dos picos de tiempo de retención 7.9 y 8.1 minutos en proporción 1:1.4. El análisis de RMN con gradiente de temperatura demostró que son confórmeros. Pureza total 85 %.

Ciclo-[Ala-Anth-NMeAla -Anth-Ala] (42C): Sólido blanco (50%). $R_f=0.32$ (AcOEt). $[\alpha]_D^{25} = -215.7$ (c 0.275, $CHCl_3$).

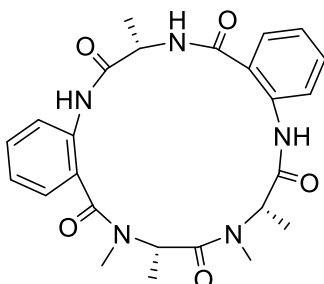
1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) Se observan tres confórmeros: confórmero a: confórmero b: confórmero c en relación 1: 0.4: 0.1.

δ 1.30-1.37 (m, 3H_a, 6H_b, 6H_c), 1.41 (d, $J=6.8$ Hz, 3H_a, 3H_b), 1.53 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H_a), 1.58 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H_c), 2.70 (s, 3H_a), 2.75 (s, 3H_b), 2.77 (s, 3H_b), 2.84 (s, 3H_a), 2.87 (s, 3H_c), 3.23 (s, 3H_c), 4.68-4.80 (m, 1H_a, 2H_c), 4.81- 4.92 (m, 1H_a), 5.00-5.08 (m, 1H_b), 5.20 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H_a), 5.26- 5.34 (m, 1H_c), 5.35- 5.44 (m, 2H_b, 1H_c), 7.14-7.20 (m, 1H_a, 1H_b), 7.22-7.28 (m, 1H_a, 2H_c), 7.40-7.58 (m, 3H_a, 1H_b, 3H_c), 7.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H_b), 7.86 (dd, $J = 8.0$, 0.9 Hz, 1H_b), 7.98- 8.09 (m, 2H_a, 1H_c), 8.48 (dd, $J = 8.3$, 0.7 Hz, 1H_c), 8.54 (dd, $J = 8.4$, 0.4 Hz, 1H_b), 8.60 (dd, $J = 8.4$, 0.7 Hz, 1H_a), 8.73 (s, 1H_c), 9.04 (s, 1H_b), 9.27 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H_b), 9.40 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H_a), 9.51 (s, 1H_a), 11.43 (s, 1H_b), 12.22 (s, 1H_a), 12.67 (s, 1H_c),

^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ 13.5 (C_b), 15.0 (C_a), 15.3 (C_a), 15.5 (C_b), 16.6 (C_a), 17.5 (C_b), 28.7 (C_b), 29.4 (C_a), 29.8 (C_a), 38.7 (C_b), 45.5 (C_b), 46.7 (C_a), 55.7 (C_b), 56.2 (C_a), 59.2 (C_a), 116.9 (C_a), 119.4 (C_b), 119.5 (C_a), 119.7 (C_b), 122.9 (C_a), 123.0 (C_b), 124.4 (C_a), 124.8 (C_b), 125.4 (C_a), 125.5 (C_a), 126.2 (C_b), 126.6 (C_b), 127.5 (C_a), 129.4 (C_b), 129.6 (C_a), 130.6 (C_b), 130.7 (C_a), 133.1 (C_b), 133.8 (C_a), 136.0 (C_b), 136.2 (C_b), 136.7 (C_a), 139.2 (C_b), 140.3 (C_a), 167.9 (C_a), 168.5 (C_a), 168.8 (2C_b), 169.3 (C_b), 169.5 (C_a), 169.6 (C_a), 169.9 (C_b), 170.1 (C_b), 173.0 (C_a), 173.1 (C_b).

ESI-MS m/z calc. para $C_{25}H_{30}N_5O_6$ ($[M+H]^+$) 480.2, experimental 480.3.

Ciclo[NHMe-Ala-Anth-Ala-Anth-NMeAla-OH] (Versicotide B) (43C)



43C

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

La sal de trifluoroacetato de **NHMe-Ala-Anth-Ala-Anth-NMeAla-OH** se obtuvo siguiendo el procedimiento general de SPPS. El rendimiento global, en base a la carga inicial de la fue del 87 % (350 mg, 0.57 mmol). **ESI-MS** m/z calc. for $C_{25}H_{32}N_5O_6$ ($[M+H]^+$) 498.2, experimental 498.4.

La macrociclación se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección 3.4.5., método a. o b. (dilución 5mM, 3 días), a partir de la sal de trifluoroacetato del péptido lineal **NHMe-Ala-Anth-Ala-NMe-Ala-Anth-Ala-OH** (200 mg, 0.33 mmol).

Método de macrociclación a; usando HATU como agente acoplante, se obtuvo el macrociclo deseado con un rendimiento del 18 % (28 mg, 0.06 mmol) luego de su purificación por cromatografía flash usando AcOEt como fase móvil. El análisis por HPLC empleando $H_2O:MeCN$ and 0.1% ácido fórmico en un gradiente lineal de 90:10 a 0:100 durante 15 minutos mostró dos picos de $t_r=7.5$ y 7.8 min.

Método de macrociclación b; usando Oxima y EDCI como agente acoplante, se obtuvo el macrociclo deseado con un rendimiento del 54 % (65 mg, 0.13 mmol) luego de su purificación por cromatografía flash usando AcOEt:EP (3:2) como fase móvil. El análisis por HPLC empleando $H_2O:MeCN$ and 0.1% ácido fórmico en un gradiente lineal de 90:10 a 0:100 durante 15 minutos mostró dos picos de $t_r=7.5$ y 7.8 min en una proporción 1.4:1. La recolección de los picos al final de la columna y análisis por ESI-MS mostró que ambos picos poseen la misma masa que el producto natural Versicotide B. El análisis por RMN con gradiente de temperatura demostró que son confórmeros. Pureza total 91%.

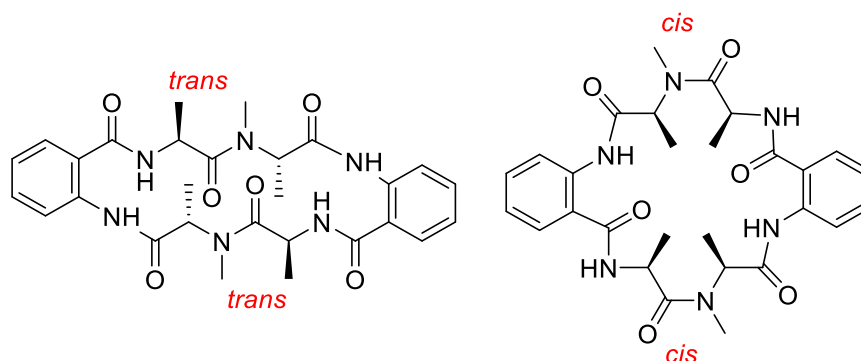
Ciclo-[NMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla] (43C): sólido amarillo (R=54%). **ESI-MS** m/z calc. para $C_{25}H_{30}N_5O_6$ ($[M+H]^+$) 480.2, experimental 480.6.

1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) dos confórmeros a: b en proporción 1:1.3. δ 1.13 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H_a), 1.26 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H_b), 1.40- 1.44 (m, 6 H_a, 3 H_b), 1.47 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H_b), 2.24 (s, 3H_a), 2.96 (s, 3 H_b), 2.99 (s, 3 H_b), 3.06 (s, 3H_a), 4.14- 4.25 (m, 1H_a), 4.52- 4.68 (m, 1 H_b), 4.70- 4.87 (m, 1H_a), 5.08- 5.17 (m, 1 H_b), 5.17- 5.26 (m, 1H_a), 5.30- 5.41 (m, 1 H_b), 7.12- 7.22 (m, 1 H_a+ 1 H_b), 7.23- 7.31 (m, 1H_a), 7.34 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H_b), 7.39- 7.58 (m, 2H_a, 2H_b), 7.60 (m, 2H_a), 7.81 (d, $J = 6.1$ Hz, 1 H_b), 8.07 (d, $J = 7.6$ Hz, 1 H_b), 8.16 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H_a), 8.44- 8.5 (m, 2 H_a, + 2H_b), 9.07- 9.20 (m, 2H_a), 9.24 (s, 1H_b), 9.36 (s, 1H_b), 10.58 (s, 1H_a), 10.92 (s, 1H_b).

^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ 13.5 (C_a), 13.8 (C_b), 14.8 (C_a), 16.7 (C_a), 17.1(C_b), 17.5 (C_b), 28.7 (C_a), 30.3 (C_b), 30.8(C_a), 34.3(C_b), 49.8 (C_b), 50.3 (C_b), 52.1 (C_a), 52.5 (C_a), 52.6 (C_b), 54.5 (C_a), 120.3, 120.6, 122.1, 123.1, 123.7, 124.3, 124.6, 125.6, 126.1, 127.3, 128.6, 129.2, 129.4 (C_a), 130.2, 130.6, 132.1 (C_a),

132.9, 135.3, 136.2, 137.4 (C_a), 139.8, 141.6, 145.7, 168.4 (C_b), 168.6 (C_a), 169.6 (2C_{a,b}), 169.8 (C_a), 170.3 (C_b), 170.9 (C_b), 171.3 (C_a), 171.9 (C_a), 172.3 (C_b).

Ciclo [NHMe-Ala-Anth-Ala-NMe-Ala-Anth-Ala-OH] (Versicotide C) (44C)



44C

La sal de trifluoroacetato **NHMe-Ala-Anth-Ala-NMe-Ala-Anth-Ala-OH** se obtuvo siguiendo el procedimiento general de SPPS. El producto se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento global del 98% (240 mg, 0.35 mmol) en base a la carga inicial de la resina. **ESI-MS** m/z calc. for C₂₈H₃₇N₆O₇ ([M+H]⁺) 569.3, experimental 569.3.

La reacción de macrociclación se lleva a cabo siguiendo el procedimiento general 3.4.5. (a) (dilución 5mM, 3 días), partiendo de la sal de trifluoroacetato del péptido lineal **NHMe-Ala-Anth-Ala-NMe-Ala-Anth-Ala-OH** (200 mg, 0.30 mmol) usando HATU como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash utilizando AcOEt como fase móvil, rindió el macrociclo deseado en 49 % de rendimiento (77 mg, 0.15 mmol). La pureza determinada por HPLC utilizando H₂O: MeCN and 0.1% ácido fórmico en un gradiente lineal de 90:10 a 0:100 durante 15 minutos fue del 93%, tr=6.88 min.

Ciclo-[Ala-Anth-NMeAla-Ala-Anth-NMeAla] (44C): Sólido blanco (R=49%). R_f=0.25 (AcOEt). [α]_D²⁵= -35.83 (c 0.25, MeOH).

¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO) Se observan dos conforméres: un conforméres *trans trans* y *cis cis* en proporción 1: 0.2.

Conforméres *trans, trans*: δ 1.43 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.50 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.93 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 5.26-5.36 (m, 1H), 6.91-6.99 (m, 1H), 7.34-7.41 (m, 1H), 7.67 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.75 (dd, J = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 8.69 (dd, J = 8.4, 0.9 Hz, 1H), 11.88 (s, 1H).

4. Síntesis de ciclopeptidos conteniendo β o γ aminoácidos

Confórmero *cis, cis*: δ 1.34 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 1.67 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 2.73(s, 3H), 4.69 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 5.26-5.36 (m, 1H), 6.86-6.91 (m, 1H), 7.05-7.11 (m, 1H), 7.88 (dd, J = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 8.07 (dd, J = 8.4, 0.8 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 12.29 (s, 1H).

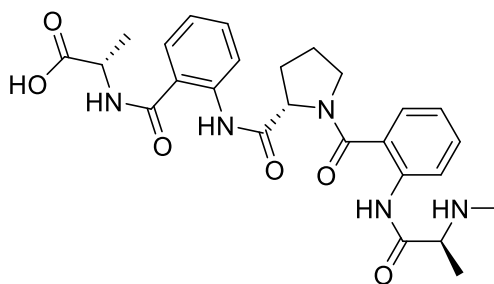
^{13}C RMN (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

Confórmero *trans, trans*: δ 12.7(2C), 18.1(2C), 38.4(2C), 46.7(2C), 63.1(2C), 119.5(2C), 119.9(2C), 122.6(2C), 128.6(2C), 133.2(2C), 141.6(2C), 168.3(2C), 169.8(2C), 172.3(2C).

Confórmero *cis, cis*: δ 17.1(2C), 18.1(2C), 28.4 (2C), 46.1(2C), 56.4(2C), 119.8(2C), 120.1(2C), 128.1(2C), 133.3(2C), 141.6(2C), 142.9(2C), 169.7(2C), 170.7(2C), 171.1(2C).

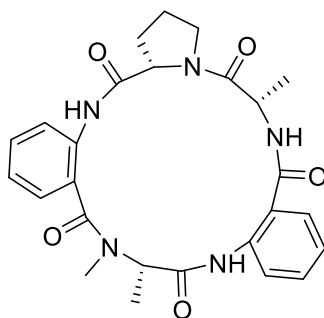
ESI-MS m/z calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_6$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 551.3, experimental 551.3.

NHMeAla-Anth-Pro-Anth-Ala-OH (45L)



45L

La sal de trifluoroacetato de **NHMeAla-Anth-Pro-Anth-Ala-OH** se obtuvo siguiendo el procedimiento general de SPPS. El producto se obtuvo como un sólido amarillo con un rendimiento global del 85% (191 mg, 0.31 mmoles) de acuerdo a la carga inicial de la resina. **ESI-MS m/z calc. for $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_6$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 510.23, experimental 510.35.**

Ciclo[Pro-Anth-NMeAla-Anth-Ala-OH] (Versicotide F) (46C)**46C**

La sal de trifluoroacetato de **NHPro-Anth-NMeAla-Anth-Ala-OH** se obtuvo siguiendo el procedimiento general de SPPS. El producto se obtuvo como un sólido amarillo con un rendimiento global del 81% (283 mg, 0.45 mmoles). **ESI-MS** m/z calc. for $C_{26}H_{32}N_5O_6$ ($[M+H]^+$) 510.23, experimental 510.25.

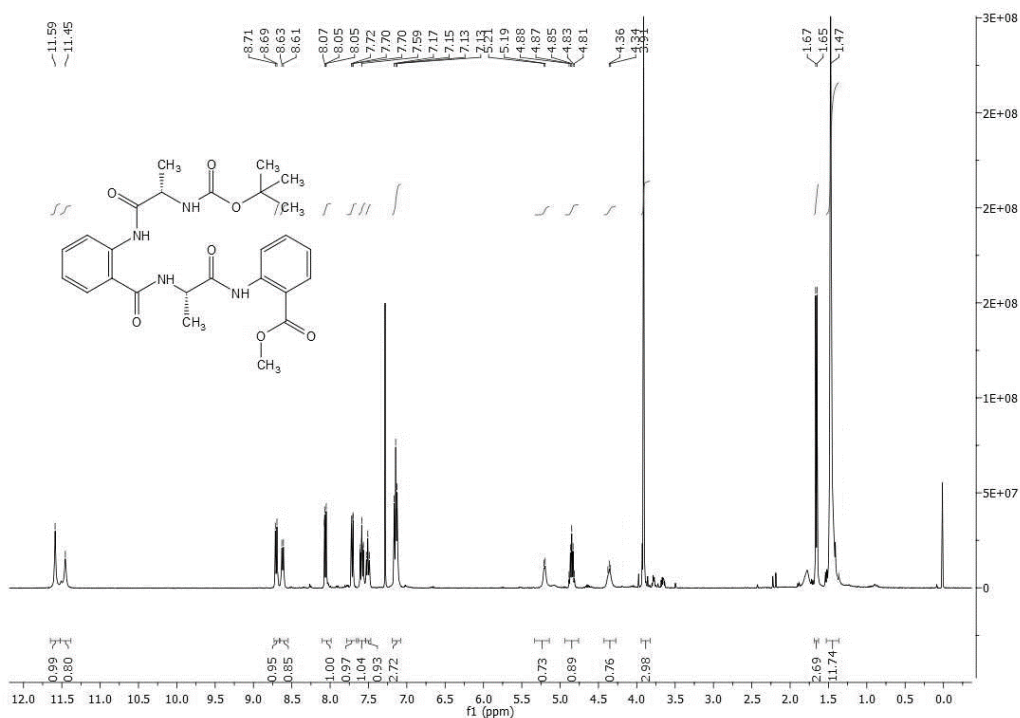
La reacción de macrociclación se lleva a cabo siguiendo el procedimiento general (dilución 5mM, 3 días), partiendo de la sal de trifluoroacetato del péptido lineal **NHPro-Anth-NMeAla-Anth-Ala-OH** (150 mg, 0.24 mmol), usando oxima/EDCI como agente acoplante. La purificación del crudo por cromatografía flash utilizando AcOEt como fase móvil, rindió el macrociclo deseado en 17 % de rendimiento (21 mg, 0.04 mmol).

Cyclo-[Pro-Anth-NMeAla -Anth-Ala] (46C): Sólido amarillo (17%). $R_f=0.25$ (AcOEt). **1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 1.47 (d, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.68 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 1.96 – 2.07 (m, 1H), 2.11 – 2.25 (m, 1H), 2.30 – 2.46 (m, 2H), 2.92 (s, 3H), 3.47 – 3.72 (m, 1H), 4.03 – 4.23 (m, 1H), 4.33 – 4.42 (m, 1H), 4.45 (dd, $J=8.1$, 2.2 Hz, 1H), 4.96 (q, $J=6.8$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J=6.2$ Hz, 1H), 7.06 (td, $J=7.9$, 1.1 Hz, 1H), 7.12 (td, $J=7.6$, 1.1 Hz, 1H), 7.36 (dd, $J=7.8$, 1.5 Hz, 1H), 7.44- 7.51 (m, 2H), 7.54 (dd, $J=8.0$, 1.4 Hz, 1H), 8.63 (dd, $J=8.5$, 1.0 Hz, 1H), 8.89 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 10.38 (s, 1H), 12.34 (s, 1H). **^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$)** 14.8, 16.2, 22.3, 30.0, 32.8, 47.2, 48.8, 59.6, 62.8, 116.6, 119.8, 120.2, 121.0, 122.4, 122.7, 126.9, 127.3, 131.8, 133.7, 138.7, 140.5, 167.9, 169.4, 169.6, 169.9, 172.0. **ESI-MS** m/z calc. para $C_{26}H_{30}N_5O_5$ ($[M+H]^+$) 492.2, experimental 492.4.

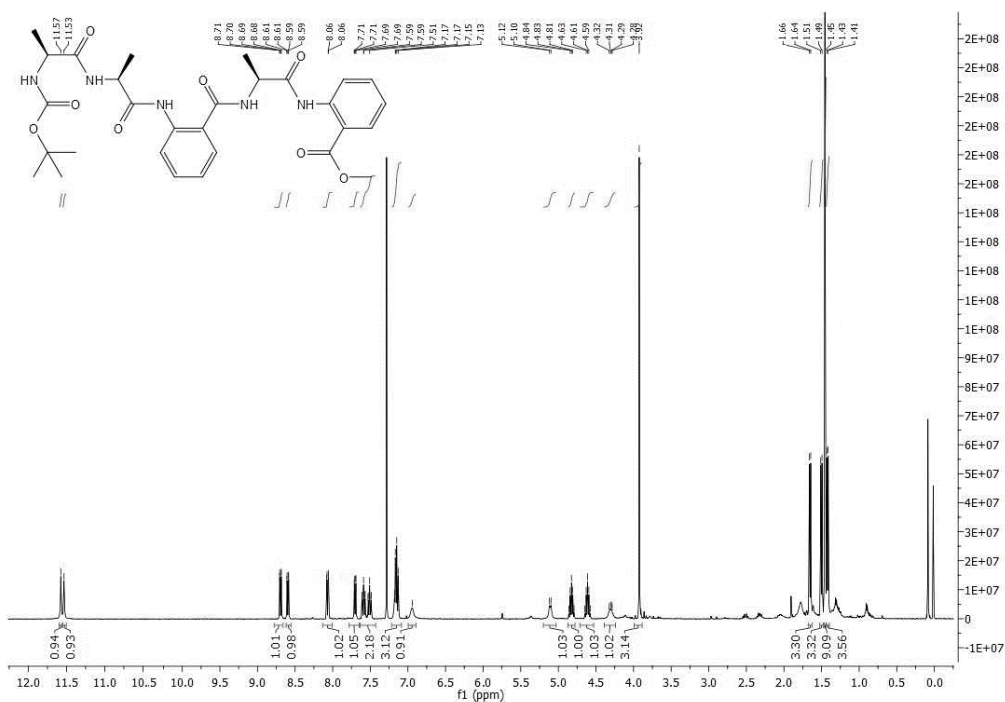
4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

RMN y ESI-MS de los compuestos obtenidos

^1H -RMN en CDCl_3 de BocNHAla-Anth-Ala-AnthOMe

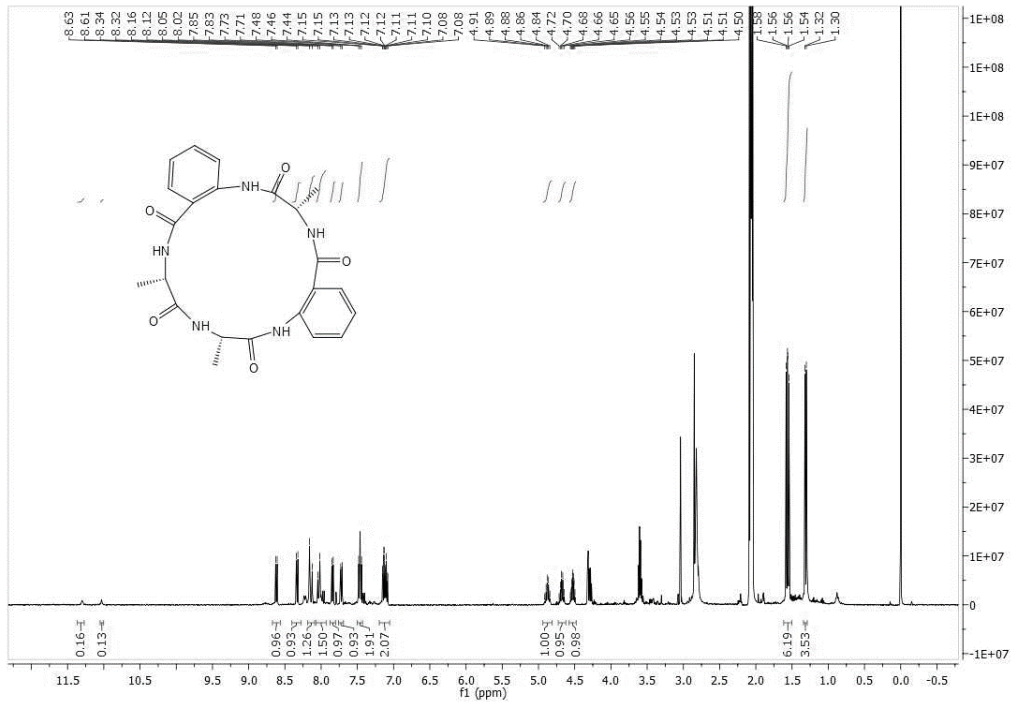


^1H -RMN en CDCl_3 de BocNHAla-Ala-Anth-Ala-AnthOMe

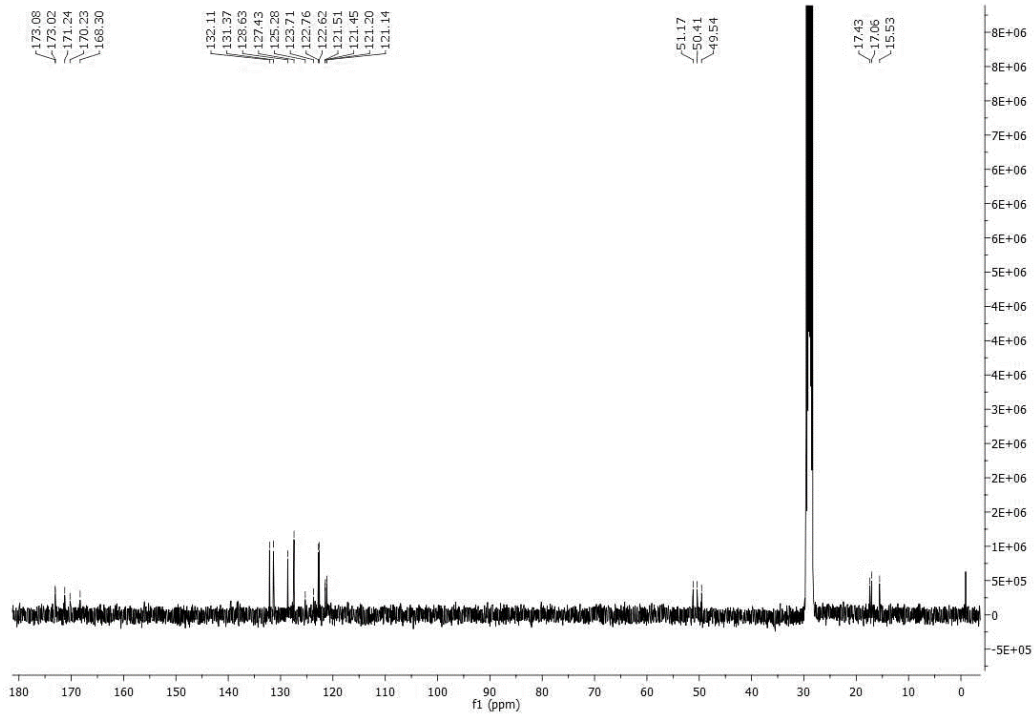


^1H -RMN en $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ de Cyclo-[Ala-Ala-Anth-Ala-Anth] (30C)

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos



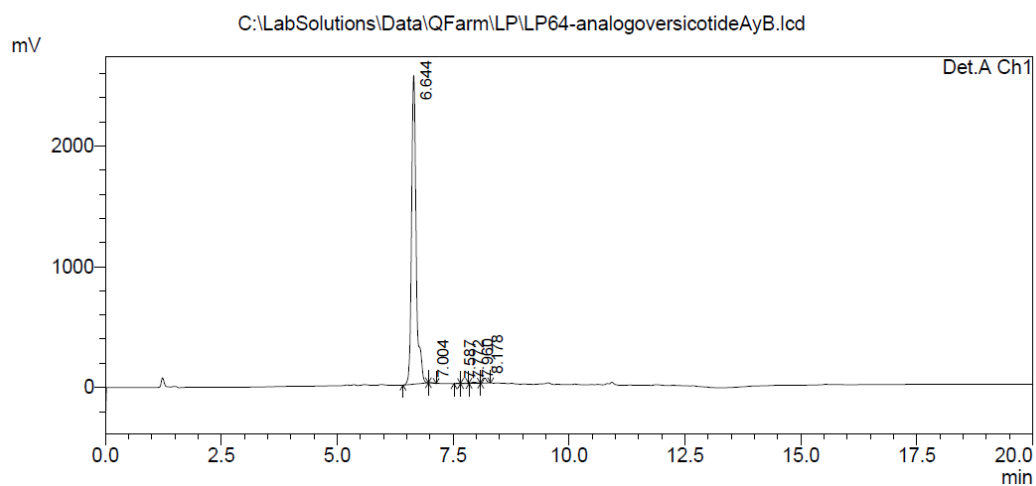
¹³C-RMN en (CD₃)₂CO de Cyclo-[Ala-Ala-Anth-Ala-Anth]



Cromatograma de Cyclo-[Ala-Ala-Anth-Ala-Anth]

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

<Chromatogram>

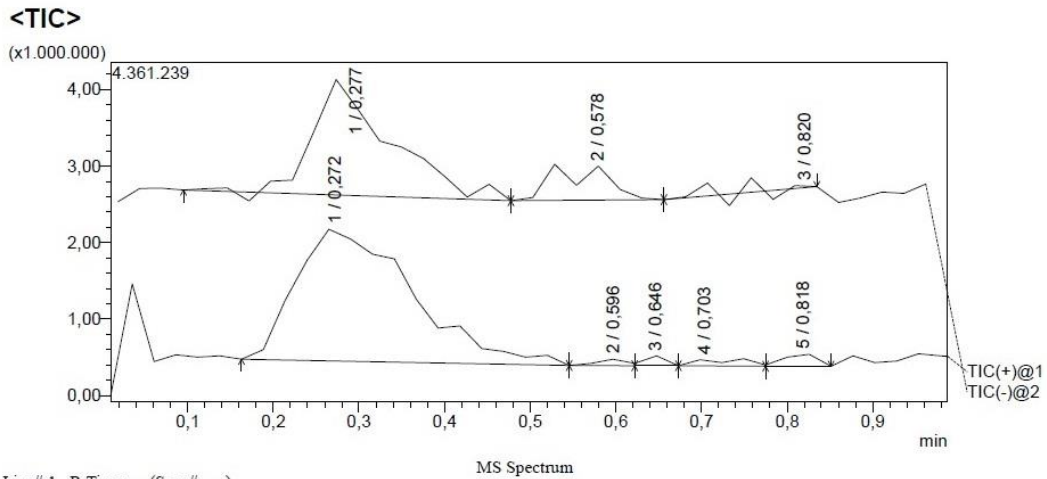


PeakTable

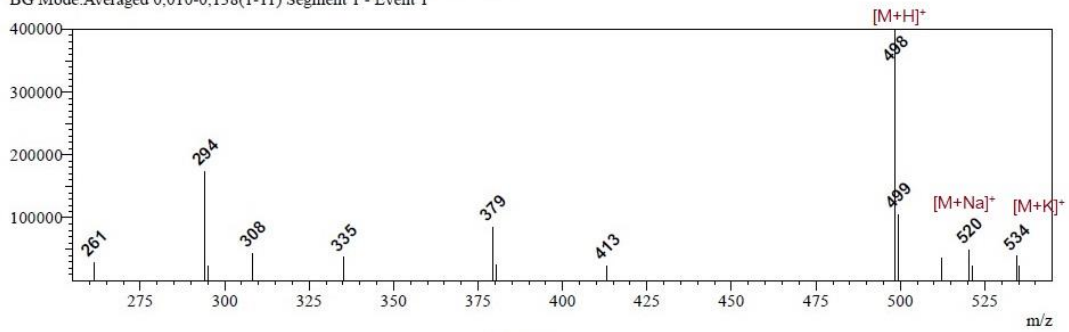
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	6.644	17623262	2559012	98.213	97.750
2	7.004	18446	2648	0.103	0.101
3	7.587	16018	3991	0.089	0.152
4	7.772	19829	3746	0.111	0.143
5	7.960	67182	8406	0.374	0.321
6	8.178	199105	40116	1.110	1.532
Total		17943841	2617919	100.000	100.000

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

ESI-MS de NHMeAla-Anth-NMeAla-Anth Ala-OH (precursor lineal de Versicotide A, (42L)



Line#1 R.Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:15
 Spectrum Mode:Averaged 0.240-0.342(19-27) Base Peak:498(400833)
 BG Mode:Averaged 0.010-0.138(1-11) Segment 1 - Event 1



ESPECTRO MS+

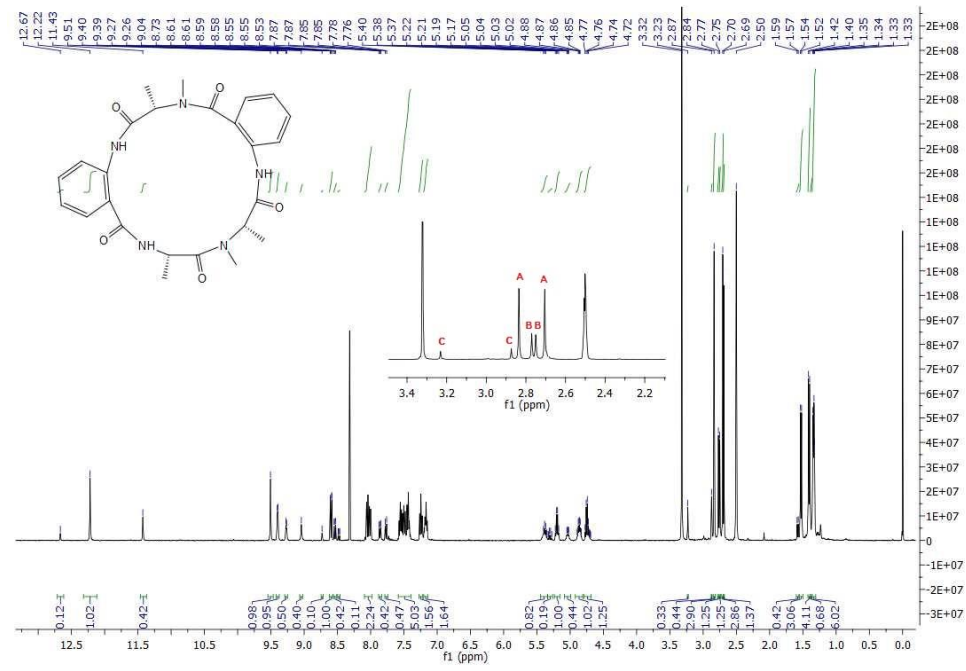
Line#1 R.Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:15
 Spectrum Mode:Averaged 0.240-0.342(19-27) Base Peak:498(400833)
 BG Mode:Averaged 0.010-0.138(1-11) Segment 1 - Event 1

#	m/z	Absolute Intensity	Relative Intensity
1	261,20	28427	7,09
2	294,20	173194	43,21
3	295,15	23281	5,81
4	308,30	43414	10,83
5	335,20	37146	9,27
6	379,30	85045	21,22
7	380,40	24759	6,18
8	413,15	23853	5,95
9	498,40	400833	100,00
10	499,30	105640	26,36
11	512,30	36212	9,03
12	520,30	48888	12,20
13	521,40	23979	5,98
14	534,30	39006	9,73

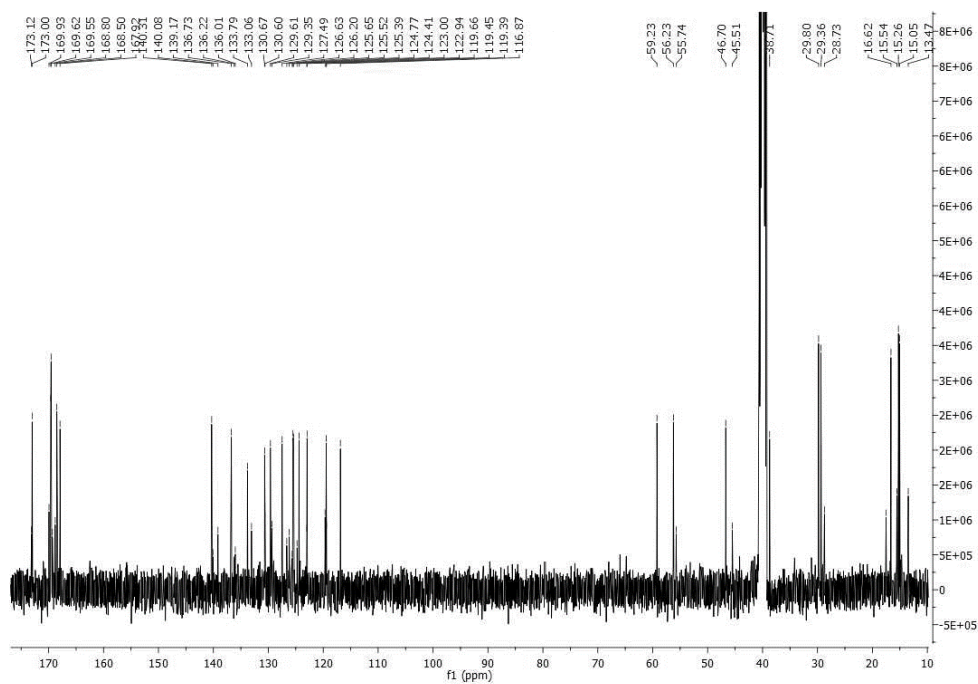
4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

^1H -RMN en DMSO-d_6 de *Ciclo*-[Ala-Anth-NMeAla-Anth-NMeAla] (Versicotide A, 42C)

Ampliación de 2.2 a 3.9 ppm para mostrar conformeros A, B y C

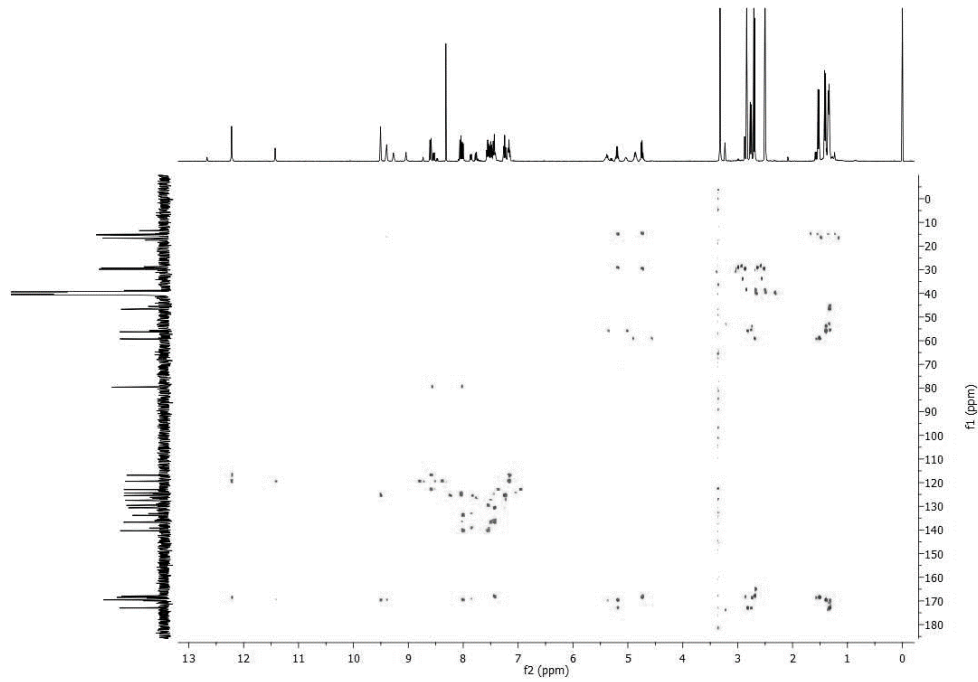


^{13}C -RMN en DMSO-d_6 de *Ciclo*-[Ala-Anth-NMeAla-Anth-NMeAla] (Versicotide A)

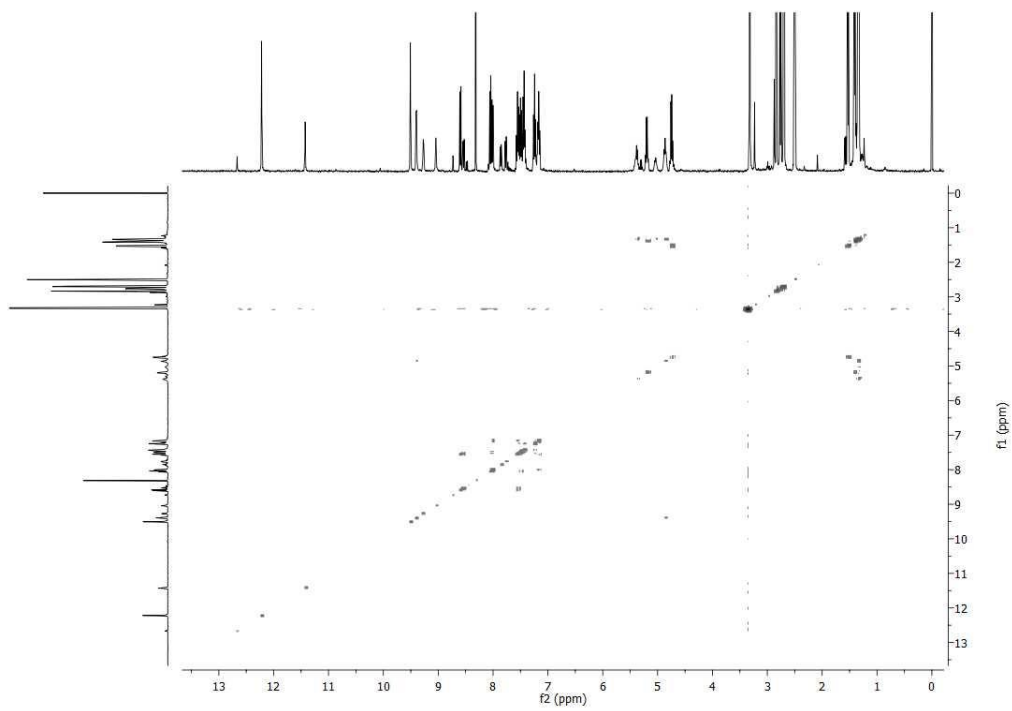


4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

HMBC en DMSO-d6 de *Cyclo*-[Ala-Anth-NMeAla-Anth-NMeAla]
(Versicotide A)

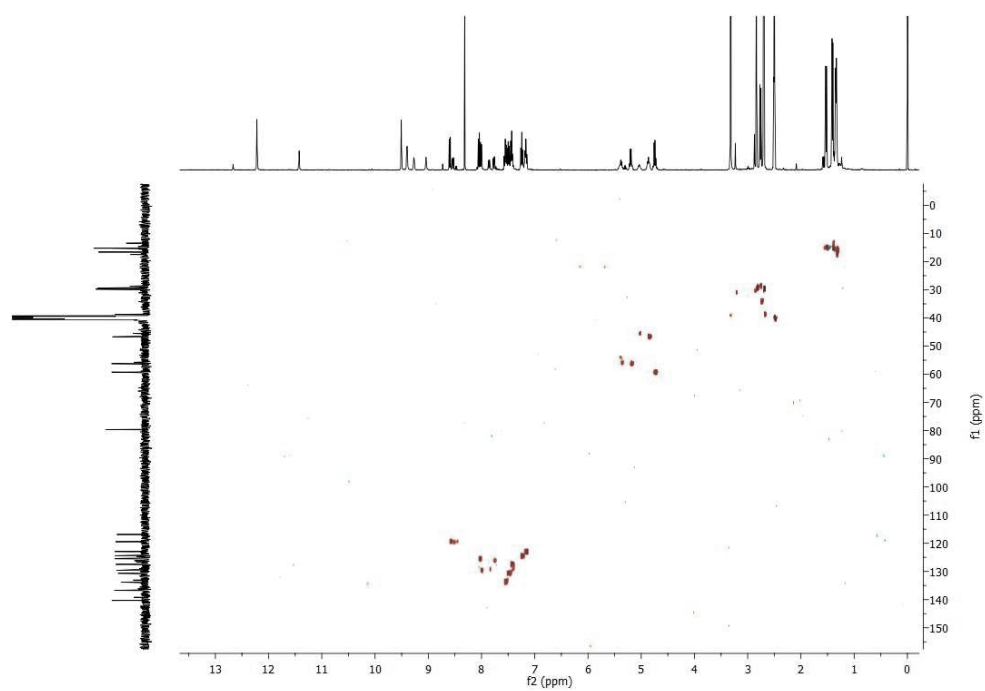


COSY en DMSO-d6 de *Cyclo*-[Ala-Anth-NMeAla-Anth-NMeAla]
(Versicotide A)



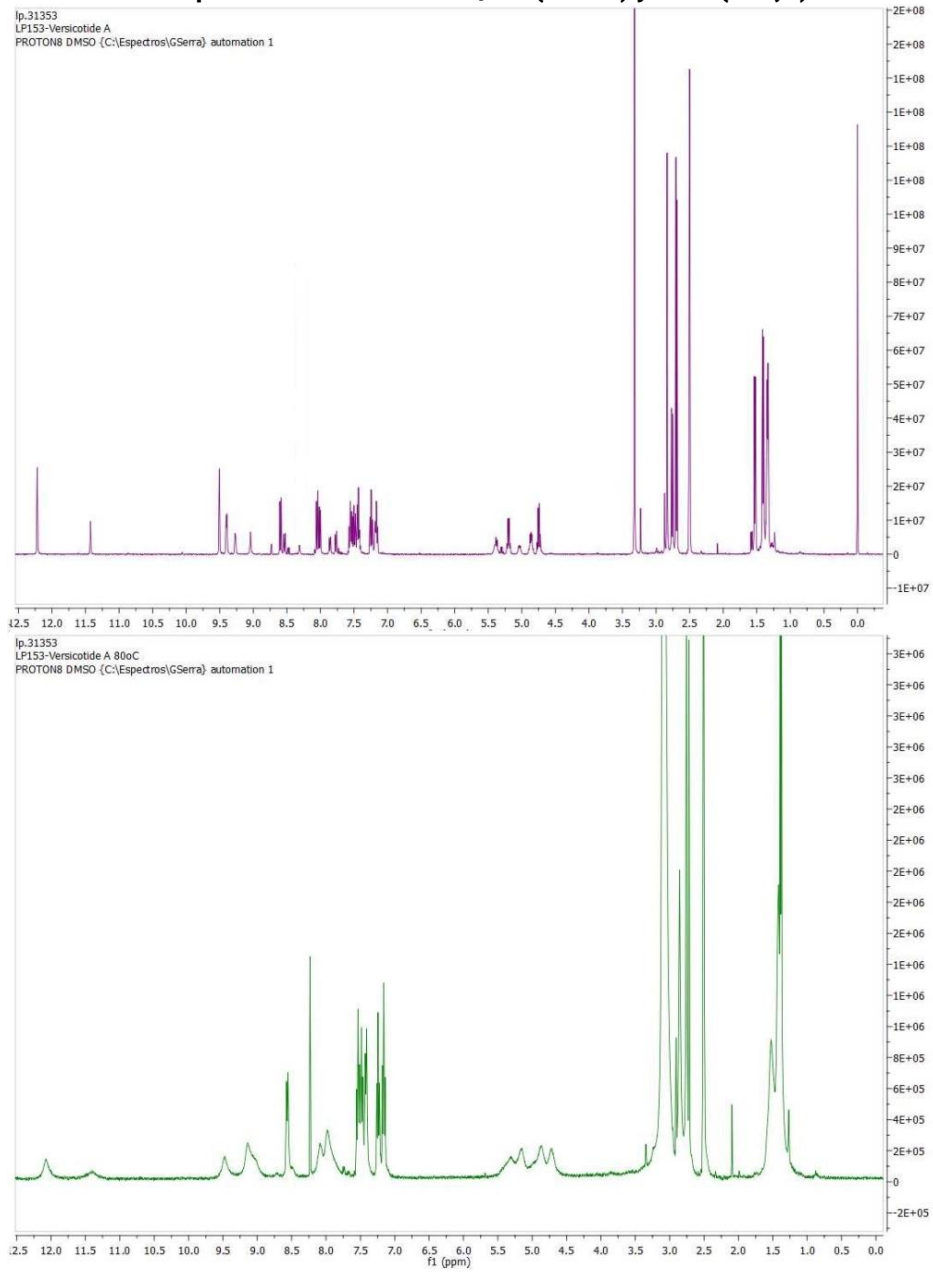
4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

HSQC en DMSO-d6 de *Ciclo*-[Ala-Anth-NMeAla-Anth-NMeAla]
(Versicotide A)



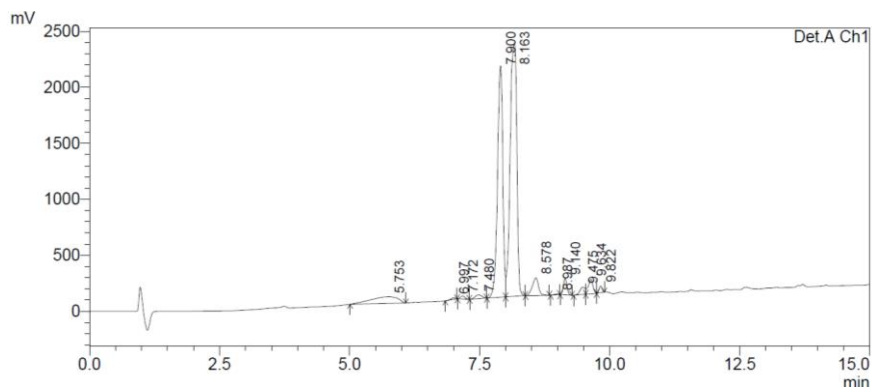
4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

Comparación de ^1H -RMN a 40°C (arriba) y 80°C (abajo)



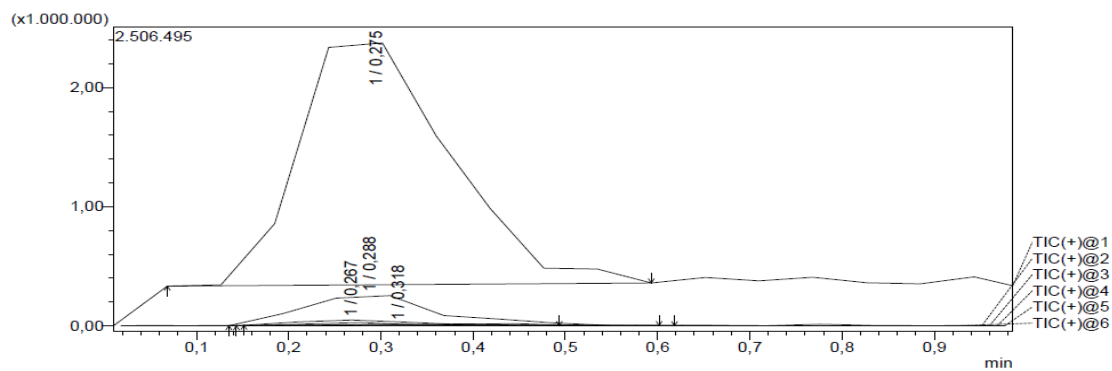
4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

Cromatograma de HPLC de: Ciclo-[NMeAla-Anth-NMeAla-Anth Ala] (Versicotide A)



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.753	2175015	59906	5.338	1.193
2	6.997	85636	14091	0.210	0.281
3	7.172	159693	27192	0.392	0.541
4	7.480	311367	33075	0.764	0.658
5	7.900	14493866	2064533	35.570	41.100
6	8.163	19957971	2256177	48.980	44.915
7	8.578	1308882	158299	3.212	3.151
8	8.987	42885	9004	0.105	0.179
9	9.140	697338	145837	1.711	2.903
10	9.475	466984	66476	1.146	1.323
11	9.634	805925	128845	1.978	2.565
12	9.822	241792	59736	0.593	1.189
Total		40747354	5023172	100.000	100.000

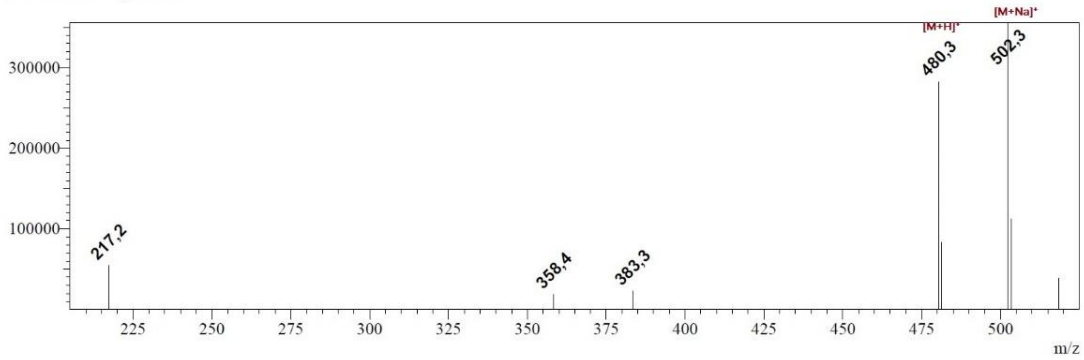
ESI-MS de Ciclo-[NMeAla-Anth-NMeAla-Anth Ala] (Versicotide A)



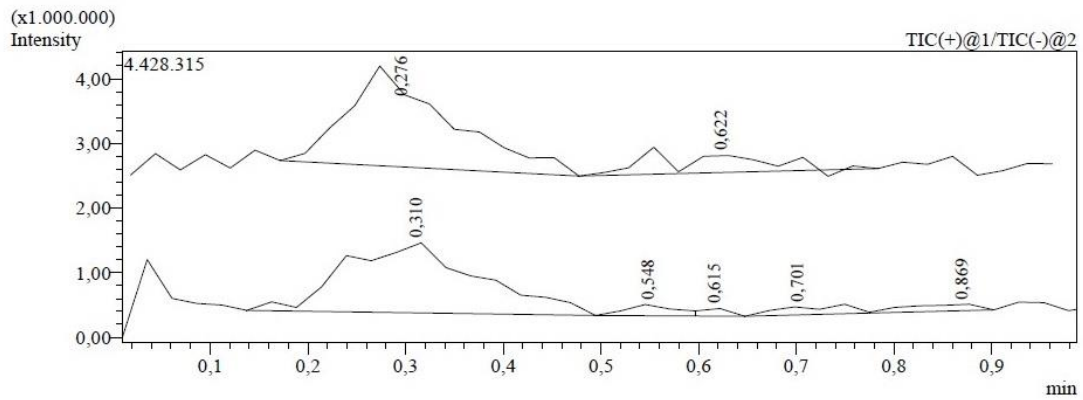
4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

MS Spectrum
 LP-153 DD-LP-153-004.lcd
 UFMS +, 5 μ L,
 Line#:1 R.Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:8
 Spectrum Mode:Averaged 0,185-0,302(19-31) Base Peak:502,3(356029)
 BG Mode:Averaged 0,010-0,068(1-7) Segment 1 - Event 1

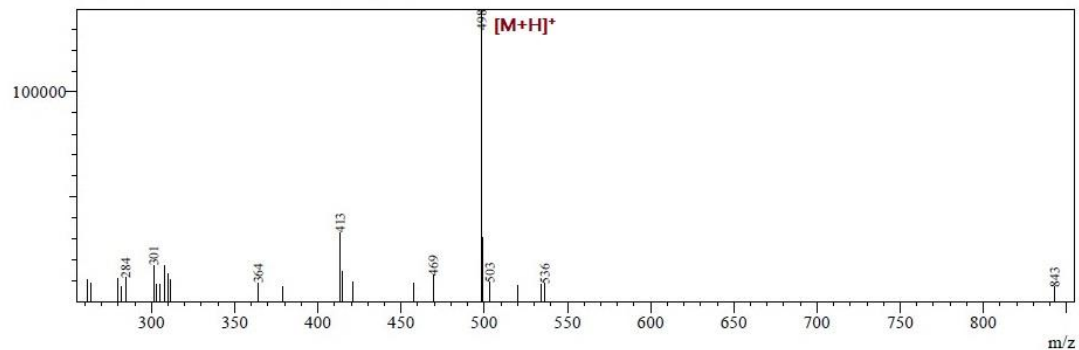
Positive1ESI+Q3 Scan



ESI MS de NHMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla-OH (Precursor lineal de Versicotide B, 11)



Line#:1 R.Time:----(Scan#:) MassPeaks:25 BasePeak:498(139136)
 Spectrum Mode:Averaged 0,214-0,316(17-25)
 BG Mode:Averaged 0,036-0,138(3-11) Segment 1 - Event 1



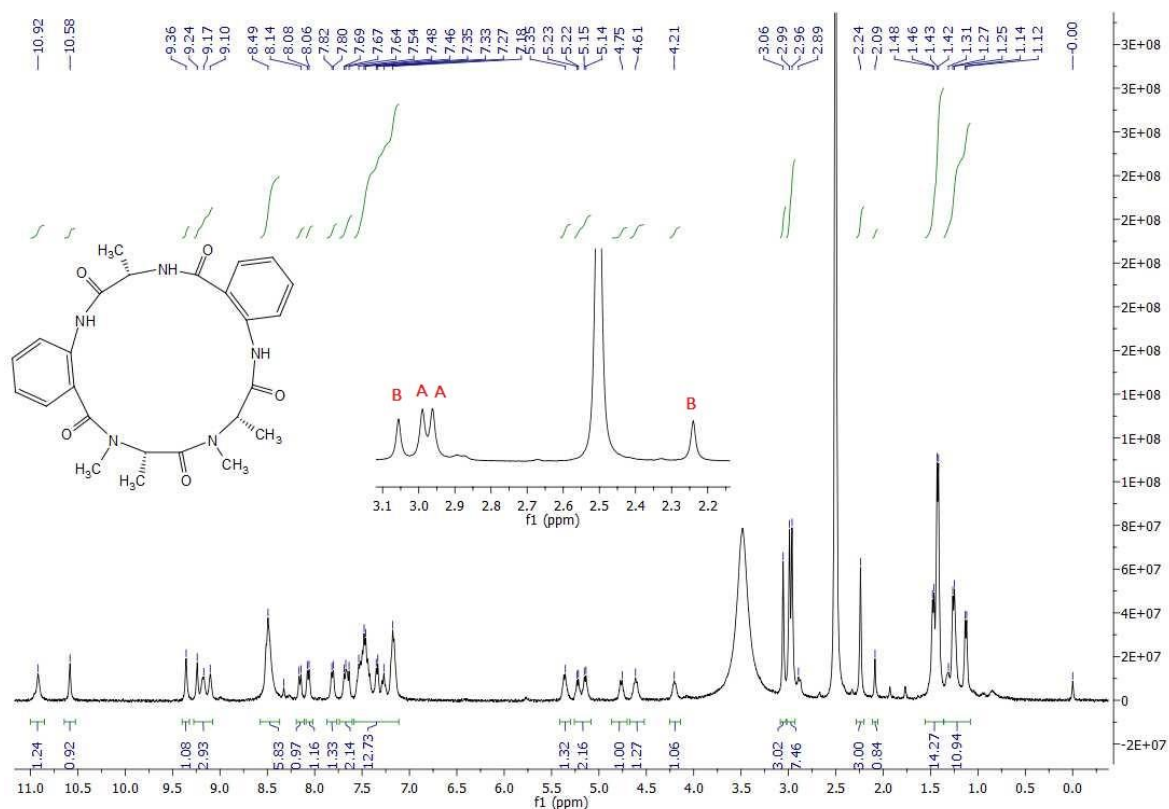
4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

ESPECTRO MS+

Line#1 R.Time:---(Scan#:---)
 MassPeaks:22
 Spectrum Mode:Averaged 0.240-0.342(19-27) Base Peak:498(151930)
 BG Mode:Averaged 0.010-0.112(1-9) Segment 1 - Event 1

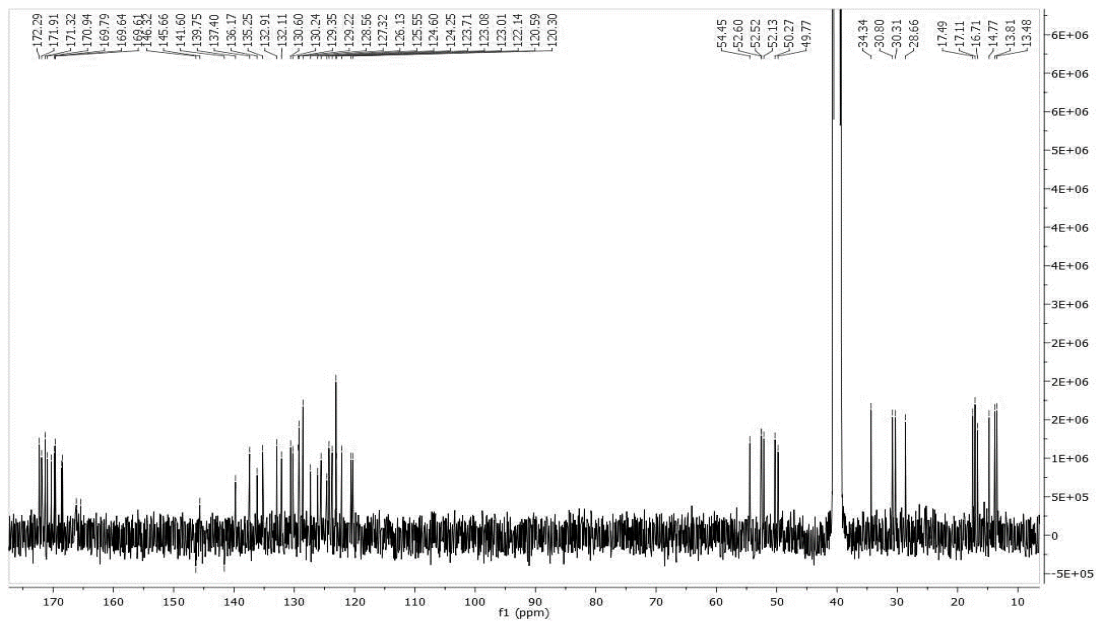
#	m/z	Absolute Intensity	Relative Intensity
1	261,25	11346	7,47
2	263,10	7943	5,23
3	279,05	10106	6,65
4	280,15	12216	8,04
5	284,45	16956	11,16
6	301,25	22178	14,60
7	308,25	16084	10,59
8	310,00	12314	8,11
9	311,10	9991	6,58
10	364,10	12879	8,48
11	365,35	8324	5,48
12	413,30	38829	25,56
13	414,35	14589	9,60
14	421,30	9678	6,37
15	457,30	8909	5,86
16	469,25	12541	8,25
17	498,35	151930	100,00
18	499,30	30816	20,28
19	503,30	9246	6,09
20	534,30	9488	6,24

^1H -RMN en DMSO-d_6 de $\text{Ciclo-[NMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla]}$ (43C) (Versicotide B). Ampliación de área: 2.20 – 3.15 ppm, A y B: conformeros.

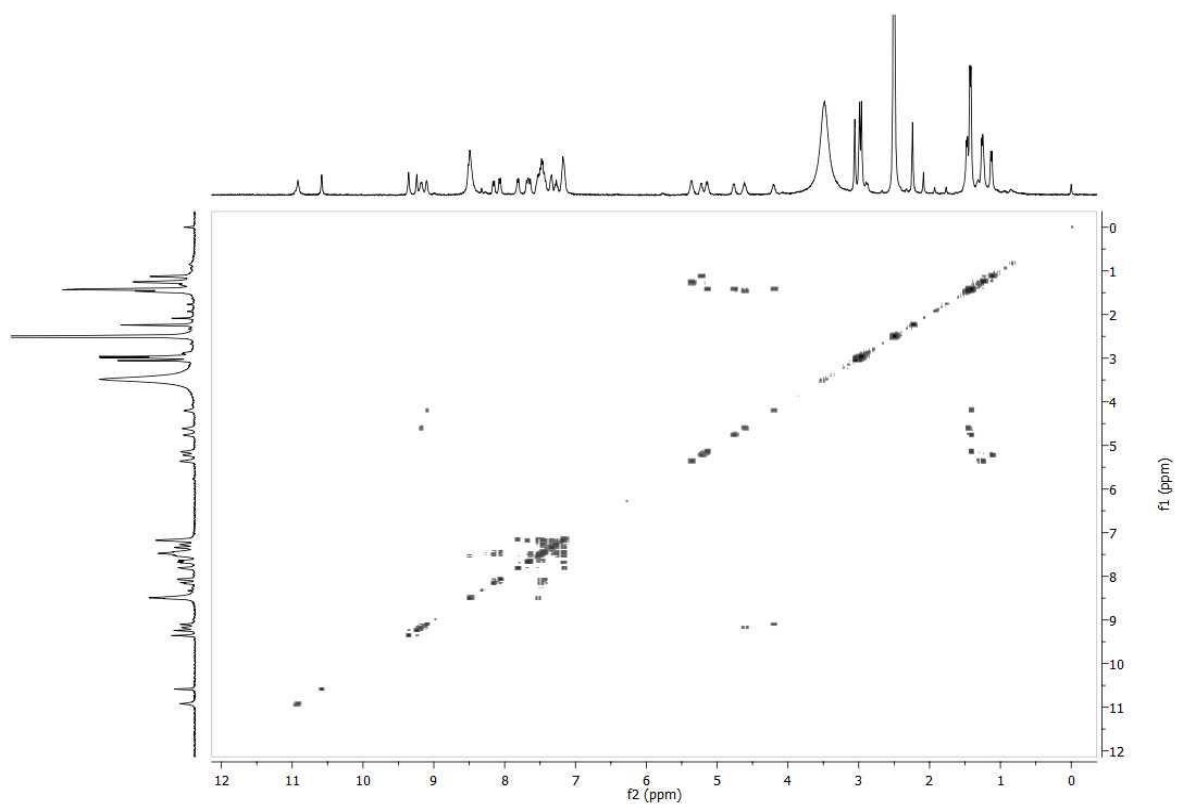


4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

^{13}C -RMN en DMSO-d_6 de *Ciclo*-[NMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla] (43C) (Versicotide B)

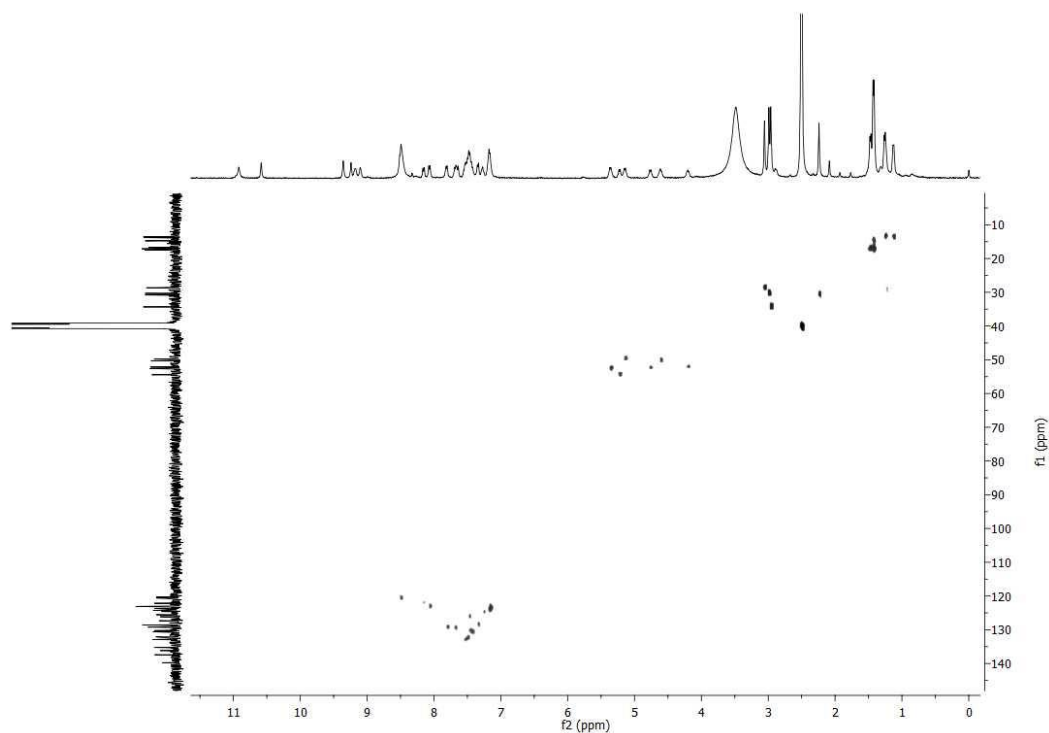


COSY en DMSO-d_6 de *Ciclo*-[NMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla] (43C)

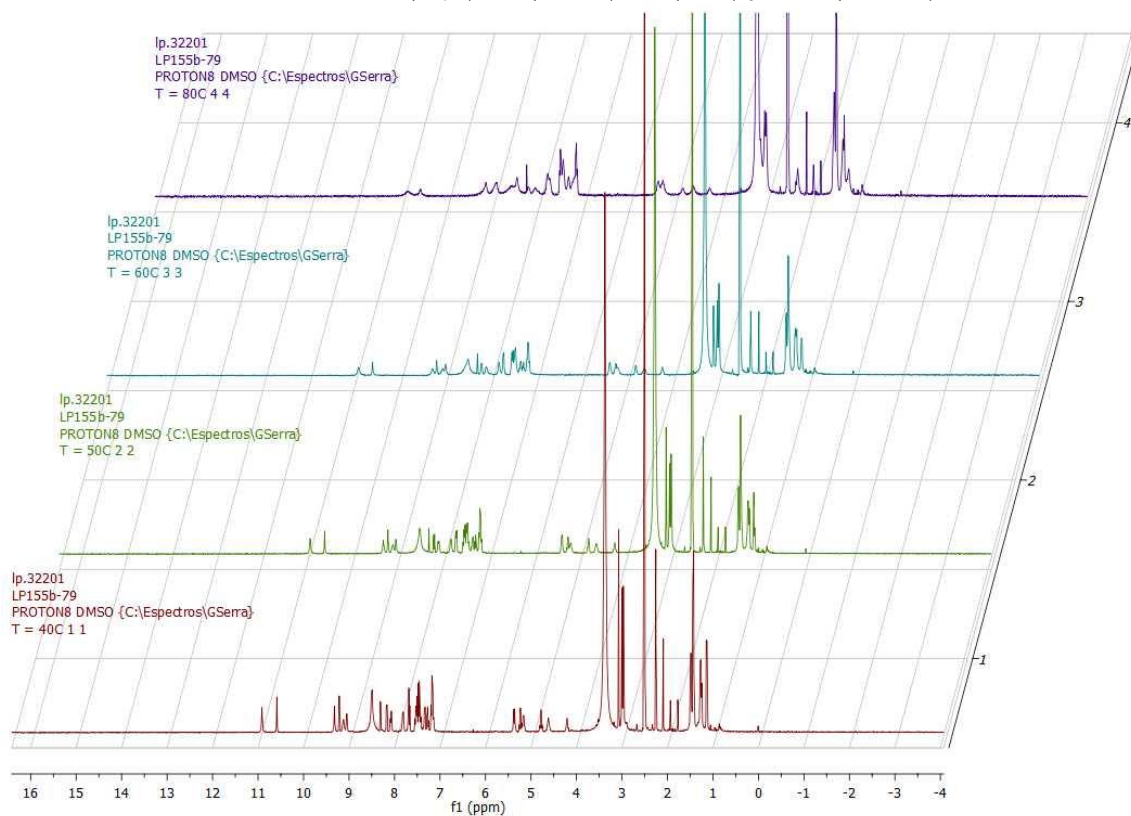


4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

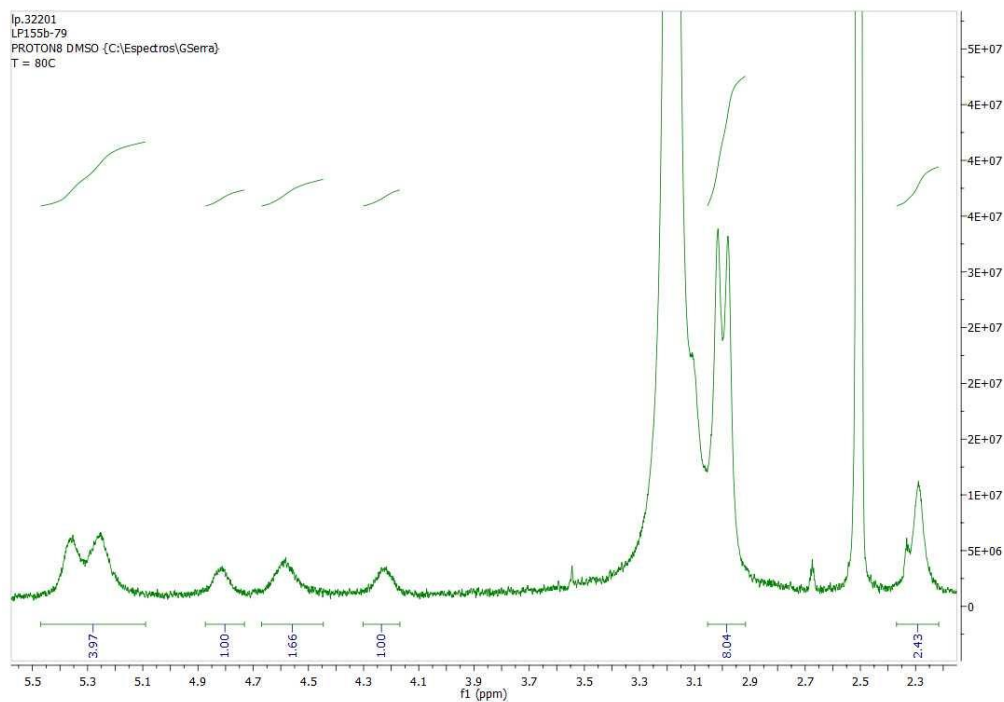
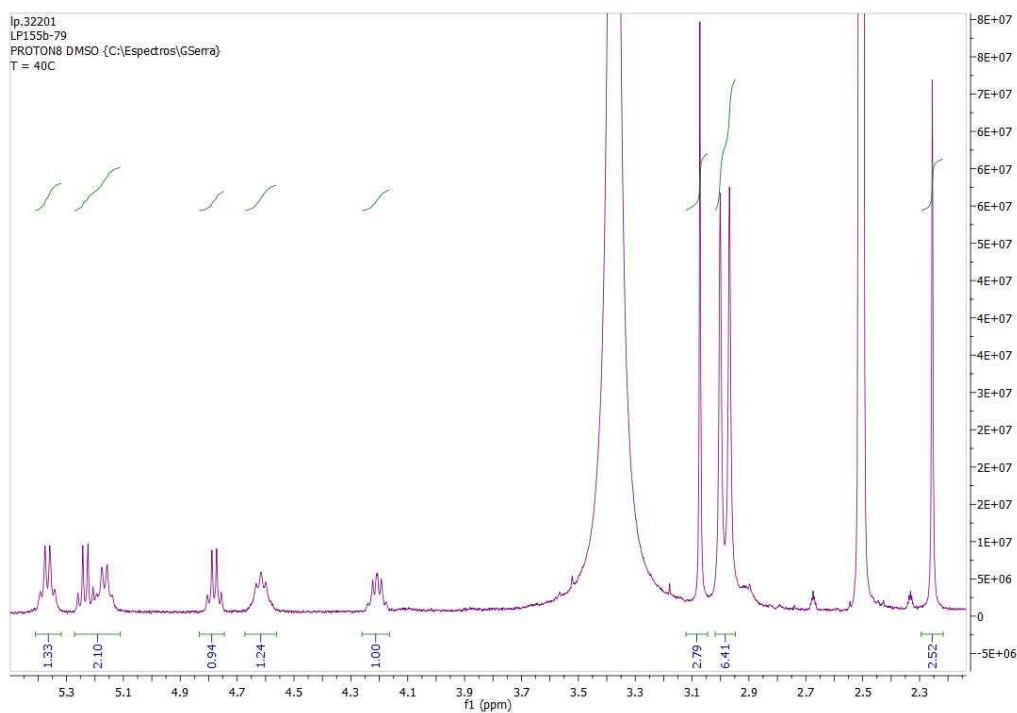
HSQC en DMSO-d₆ de Ciclo-[NMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla] (43C)



Gradiente térmico en DMSO-d₆ de Ciclo-[NMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla] (43C). Comparación de ¹H-RMN a 40 (rojo), 50 (verde), 60 (azul) y 80°C (violeta)



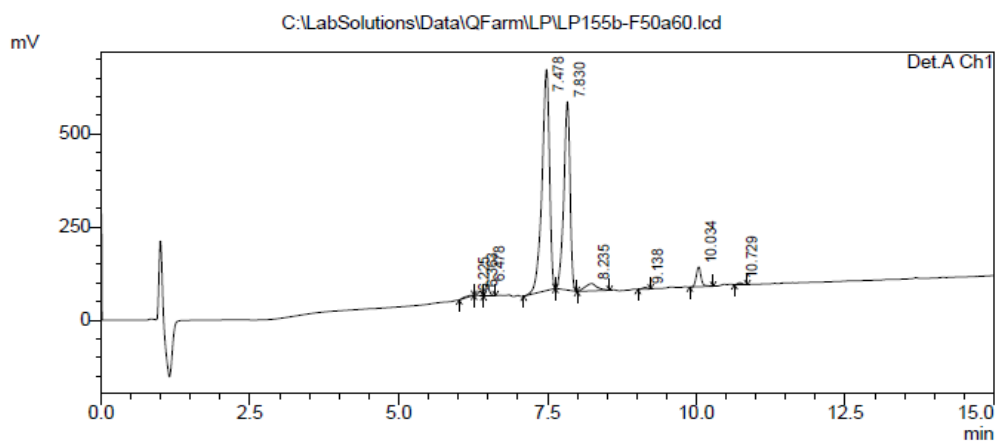
Gradiente térmico en DMSO- d_6 de *Ciclo*-[NMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla] (43C). Ampliación entre 2.2 y 5.5 ppm. Comparación de ^1H -RMN a 40 (violeta) y 80°C (verde).



4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

HPLC chromatograma de Ciclo-[NMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla] (43C)

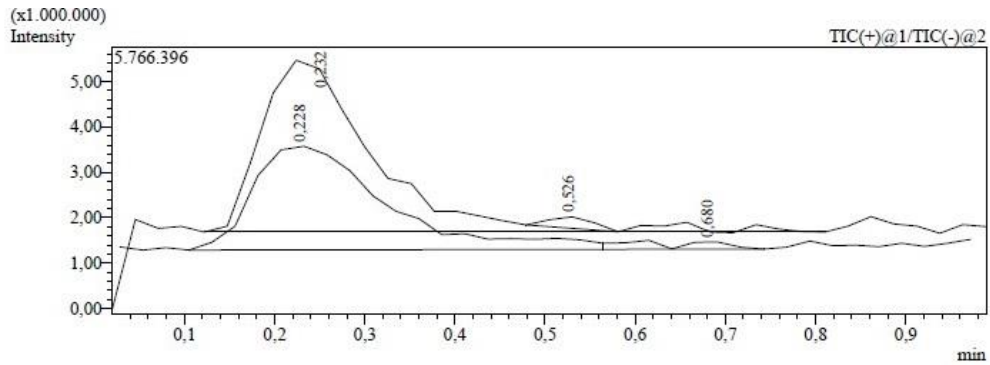
<Chromatogram>



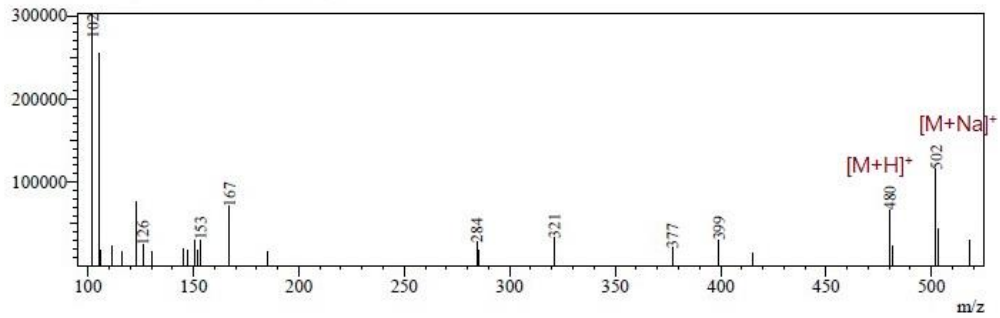
PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	6.225	35626	2118	0.367	0.173
2	6.363	51899	12195	0.535	0.994
3	6.478	129447	30488	1.334	2.485
4	7.478	5171208	594011	53.293	48.418
5	7.830	3684549	505602	37.972	41.212
6	8.235	278530	20050	2.870	1.634
7	9.138	27061	4412	0.279	0.360
8	10.034	297509	52674	3.066	4.293
9	10.729	27579	5287	0.284	0.431
Total		9703407	1226837	100.000	100.000

ESI-MS de Ciclo-[NMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla] (43C) Pico de tr=7.48 min



Line# 1 R Time:----(Scan#) MassPeaks:26 BasePeak:102(302718)
 Spectrum Mode:Averaged 0.173-0.250(13-19)
 BG Mode:Averaged 0.581-0.709(45-55) Segment 1 - Event 1



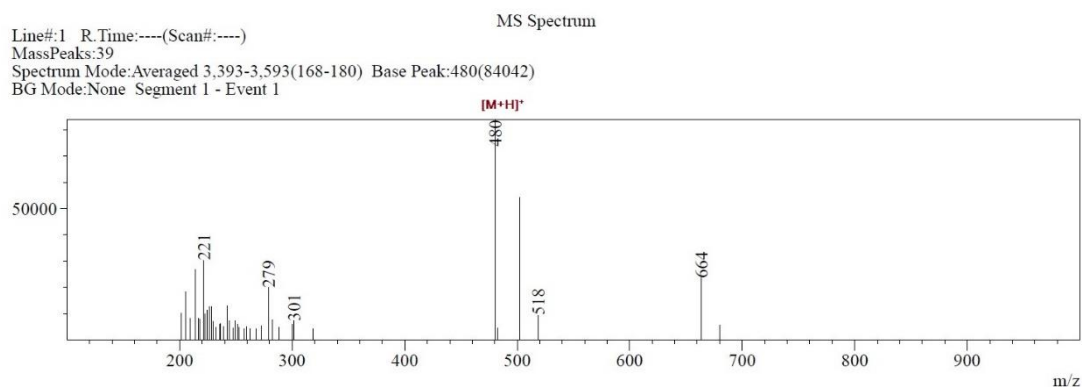
MS Spectrum

Line# 1 R Time:----(Scan#)----
 MassPeaks:26
 Spectrum Mode:Averaged 0.173-0.250(13-19) Base Peak:102(302718)
 BG Mode:Averaged 0.581-0.709(45-55) Segment 1 - Event 1

#	m/z	Relative Inten:	Intenative Inten:
1	102.20	302718	100.00
2	105.10	254952	84.22
3	106.20	17592	5.81
4	111.20	23397	7.73
5	116.15	16683	5.51
6	122.60	76698	25.34
7	126.05	24624	8.13
8	130.25	16015	5.29
9	145.10	20279	6.70
10	147.15	18116	5.98
11	150.25	30020	9.92
12	152.00	18874	6.23
13	153.15	30139	9.96
14	167.05	70893	23.42
15	185.25	16414	5.42
16	284.35	27775	9.18
17	285.35	18358	6.06
18	321.15	33382	11.03
19	377.10	21086	6.97
20	399.10	30236	9.99
21	415.15	15412	5.09
22	480.25	66339	21.91
23	481.30	23233	7.67
24	502.20	115082	38.02

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

ESI-MS de Ciclo-[NMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla] (43C) Pico de tr=7.83 min

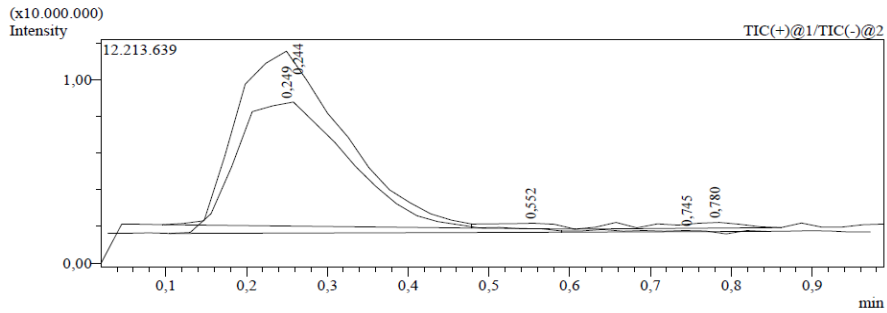


Line#:1 R.Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:39
 Spectrum Mode:Averaged 3.393-3.593(168-180) Base Peak:480(84042)
 BG Mode:None Segment 1 - Event 1

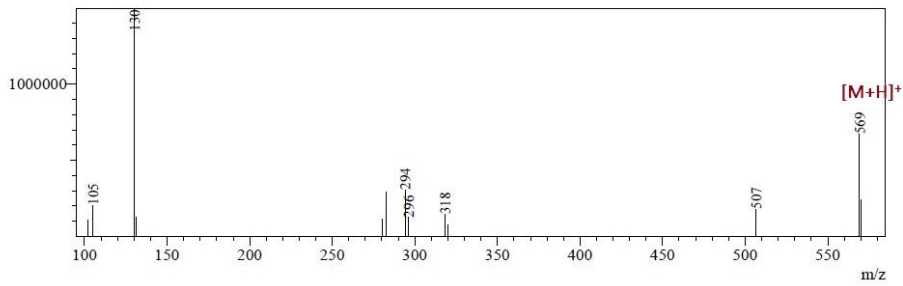
#	m/z	solute	Intenlative	Intens:
1	201.35		10117	12.04
2	205.25		18213	21.67
3	209.40		8153	9.70
4	213.70		26895	32.00
5	216.60		8291	9.87
6	217.55		7902	9.40
7	221.35		30281	36.03
8	222.45		10009	11.91
9	224.45		11156	13.27
10	226.50		12706	15.12
11	228.20		12630	15.03
12	229.45		7130	8.48
13	232.35		4700	5.59
14	235.55		6052	7.20
15	236.65		6184	7.36
16	239.00		5237	6.23
17	242.60		12926	15.38
18	244.35		7443	8.86
19	247.60		4336	5.16
20	249.15		7479	8.90
21	251.35		5876	6.99
22	252.65		4656	5.54
23	257.45		4255	5.06
24	259.30		4944	5.88
25	262.45		4262	5.07
26	267.80		4222	5.02
27	272.30		5521	6.57
28	279.00		19966	23.76
29	282.60		7490	8.91
30	288.15		4912	5.84
31	300.00		5819	6.92
32	301.50		7368	8.77
33	318.35		4273	5.08
34	480.35		84042	100.00
35	482.55		4339	5.16
36	502.10		54334	64.65

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

ESI-MS de Ala-Anth-NMeAla-Ala-Anth-NMeAla (precursor lineal de Versicotide C, 44L)



Line#:1 R.Time:----(Scan#:) MassPeaks:13 BasePeak:130(1492710)
 Spectrum Mode:Averaged 0,173-0,275(13-21)
 BG Mode:Averaged 0,658-0,760(51-59) Segment 1 - Event 1



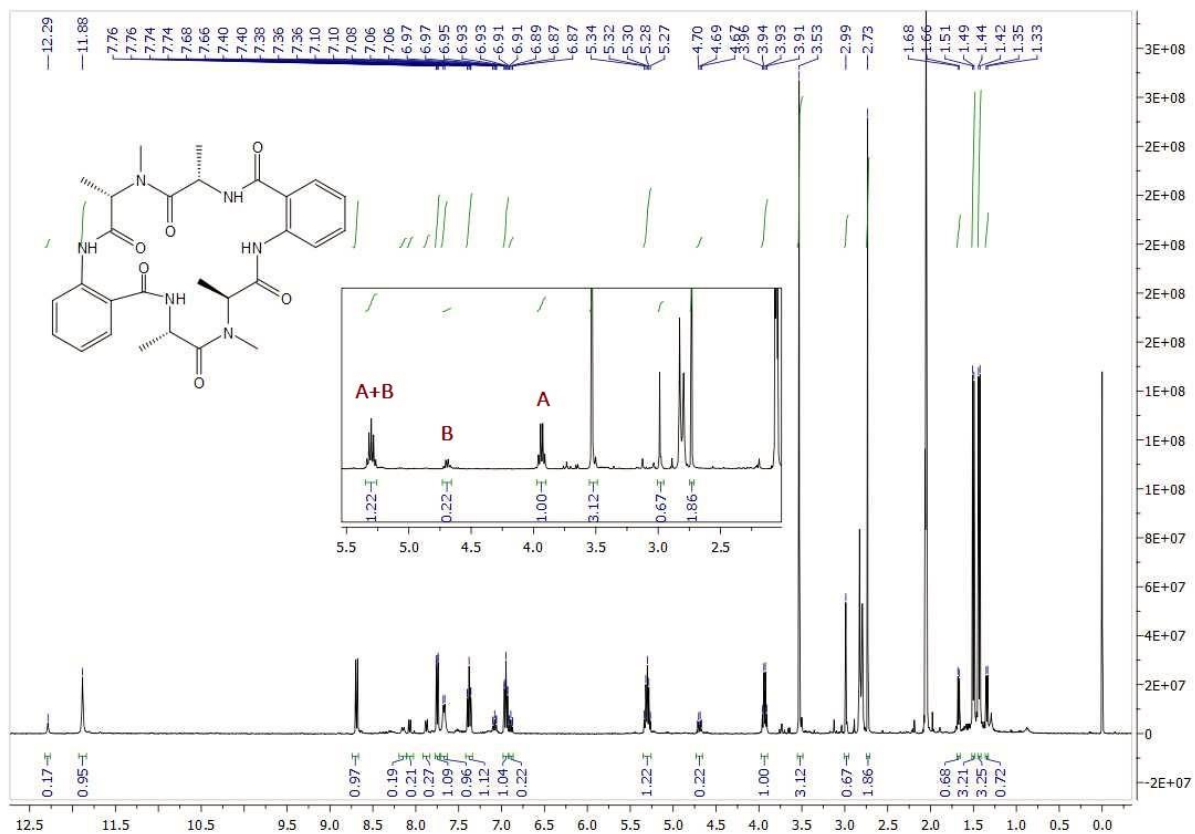
MS Spectrum

Line#:1 R.Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:13
 Spectrum Mode:Averaged 0,173-0,275(13-21) Base Peak:130(1492710)
 BG Mode:Averaged 0,658-0,760(51-59) Segment 1 - Event 1

#	m/z	solute	Intenlati	Intens
1	102,30		107976	7,23
2	105,15		204417	13,69
3	130,20		1492710	100,00
4	131,30		123573	8,28
5	280,30		115840	7,76
6	282,30		288073	19,30
7	294,15		306128	20,51
8	296,25		125985	8,44
9	318,30		146129	9,79
10	320,25		76463	5,12
11	506,60		178090	11,93
12	569,30		672448	45,05

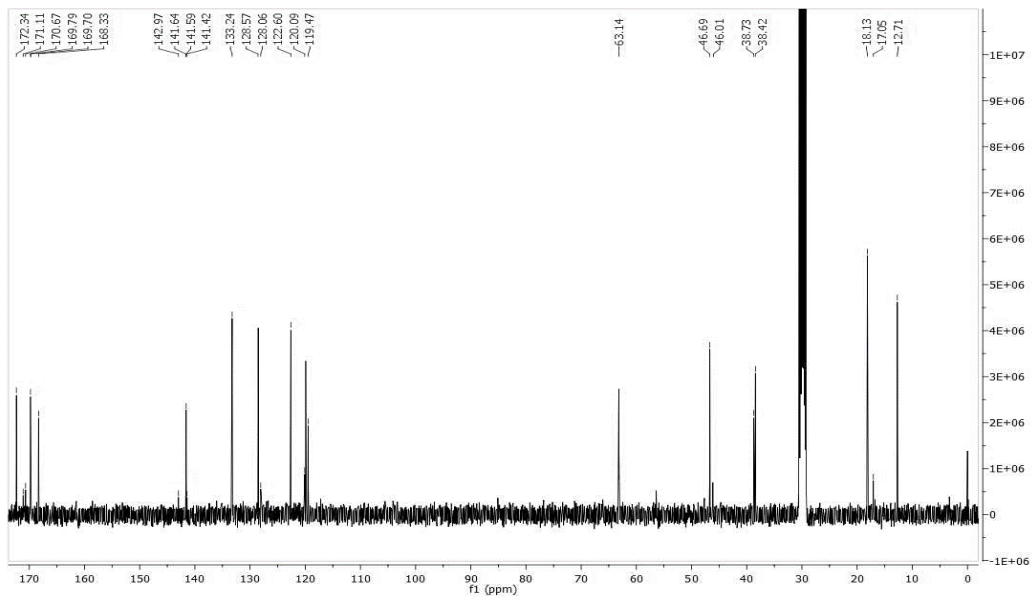
4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

$^1\text{H-RMN}$ en $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ de *Ciclo*-[NMeAla-Anth-Ala-NMeAla-Anth-Ala] (44C)
(Versicotide C). Área ampliada: 2-5,5 ppm mostrando confórmers.

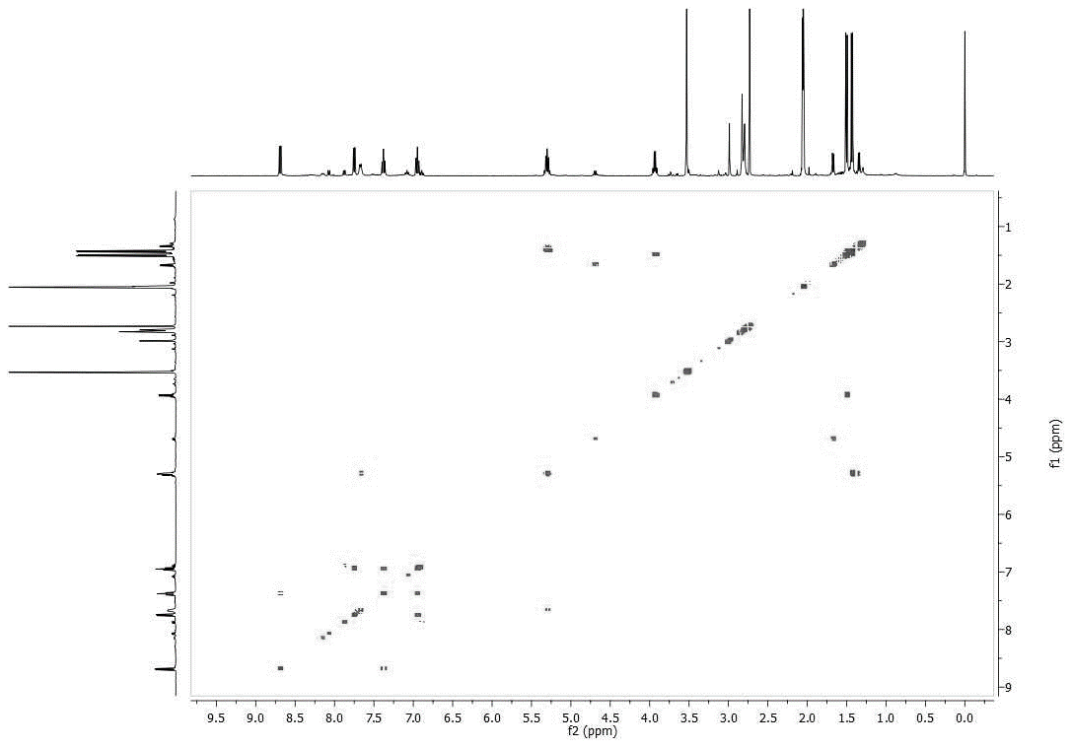


4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

^{13}C -RMN en $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ de Versicotide C

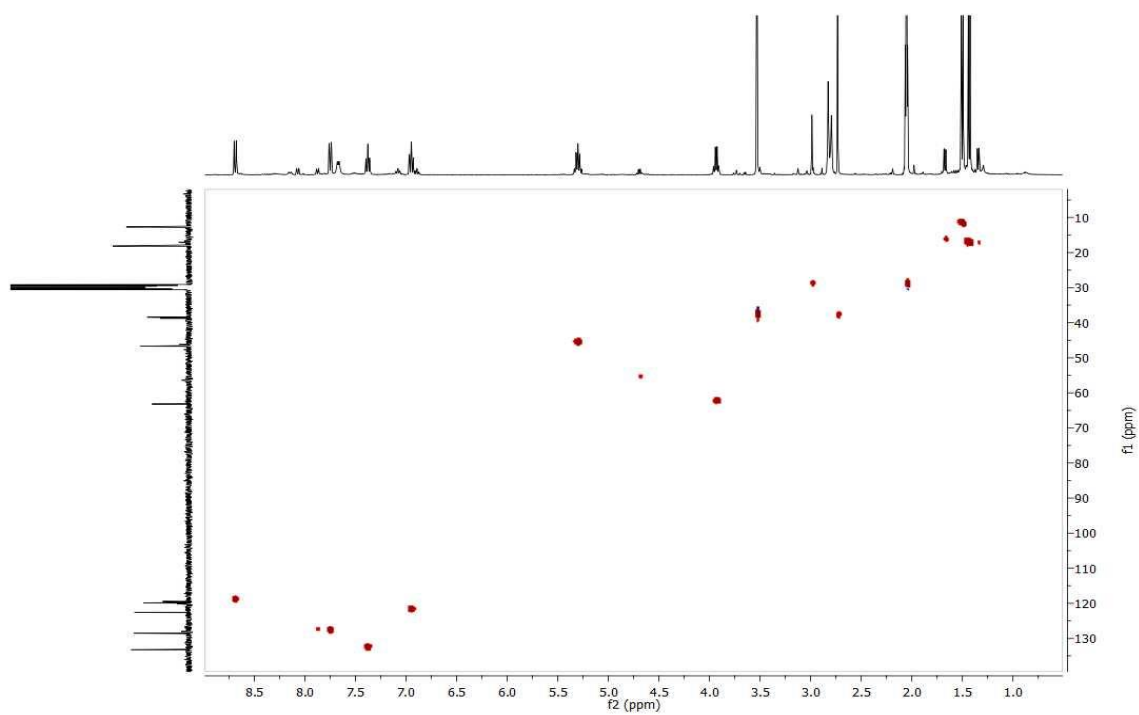


COSY en $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ de Versicotide C

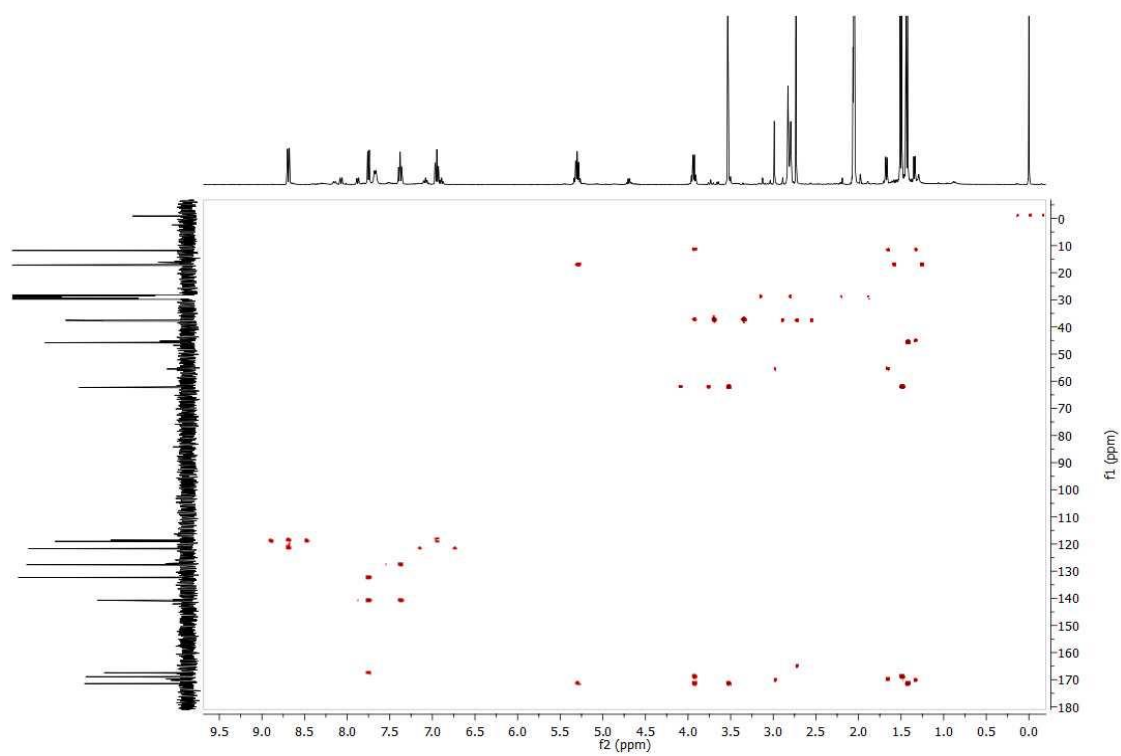


4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

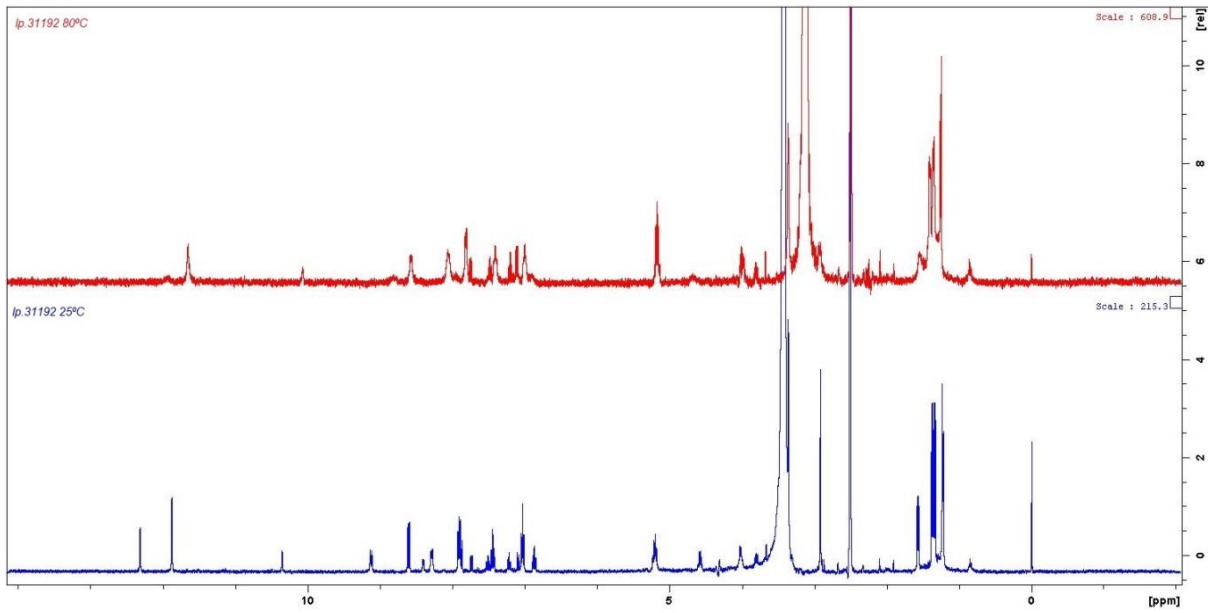
HSQC en $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ de Versicotide C



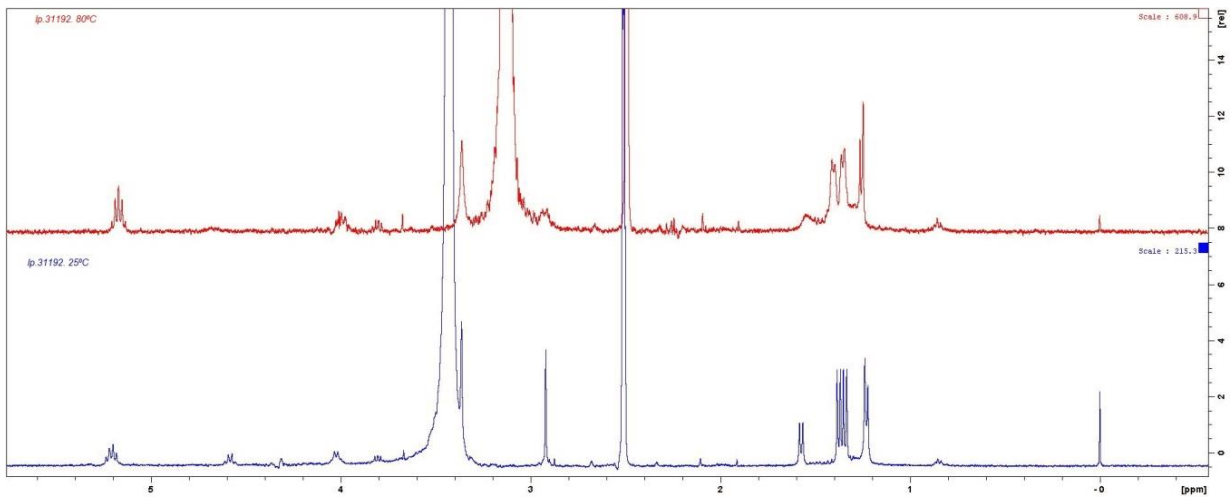
HMBC en $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ de Versicotide C



Comparación de ^1H -RMN de Versicotide C a 25°C (azul) y 80°C (rojo)

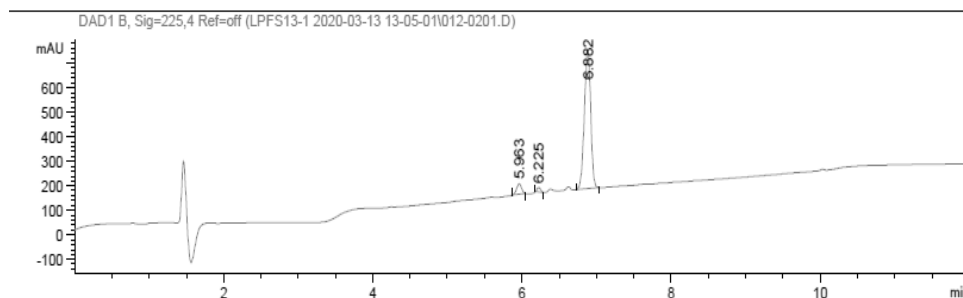


Comparación de ^1H -RMN de Versicotide C a 25°C (azul) y 80°C (rojo)



4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

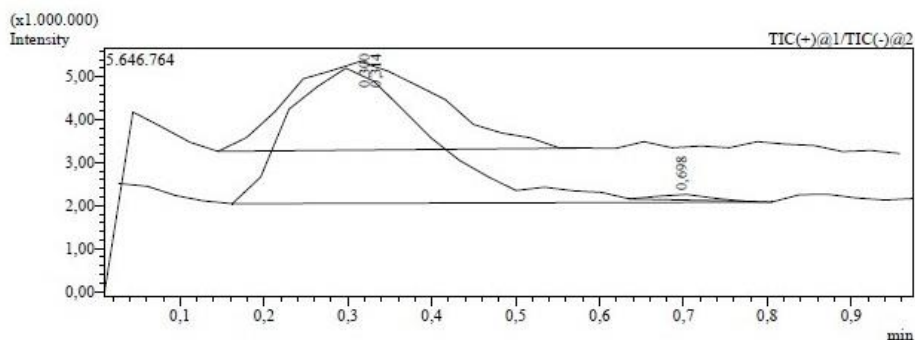
Cromatograma de HPLC de Ciclo-[Ala-Anth-NMeAla-Ala-Anth-NMeAla] (44C)(Versicotide C)



Signal 2: DAD1 B, Sig=225,4 Ref=off

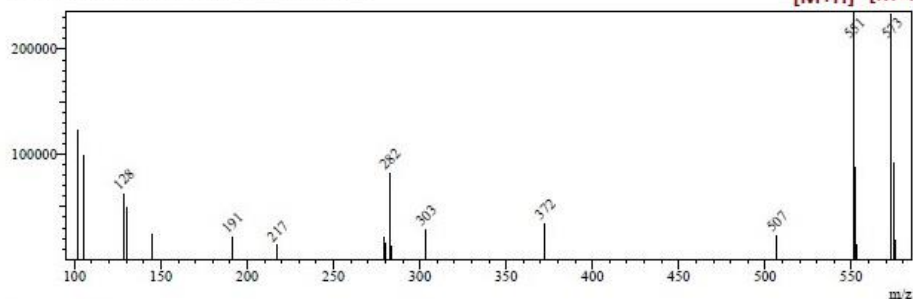
RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
5.963	2.99	194.34052	43.00684	1.04	0.0733	36608	-	-
6.225	3.16	56.87580	18.06624	0.89	0.0547	71904	2.41	1.06
6.882	3.60	3327.74341	565.47705	1.10	0.0933	30114	5.22	1.14

ESI-MS de Ciclo-[Ala-Anth-NMeAla-Ala-Anth-NMeAla] (44C)



Line#1 R. Time:----(Scan#) MassPeaks:20 BasePeak:551(235684)
 Spectrum Mode:Averaged 0.145-0.382(9-23)
 BG Mode:Averaged 0.078-0.112(5-7) Segment 1 - Event 1

m/z=551: m/z=573:
 [M+H]⁺ [M+Na]⁺



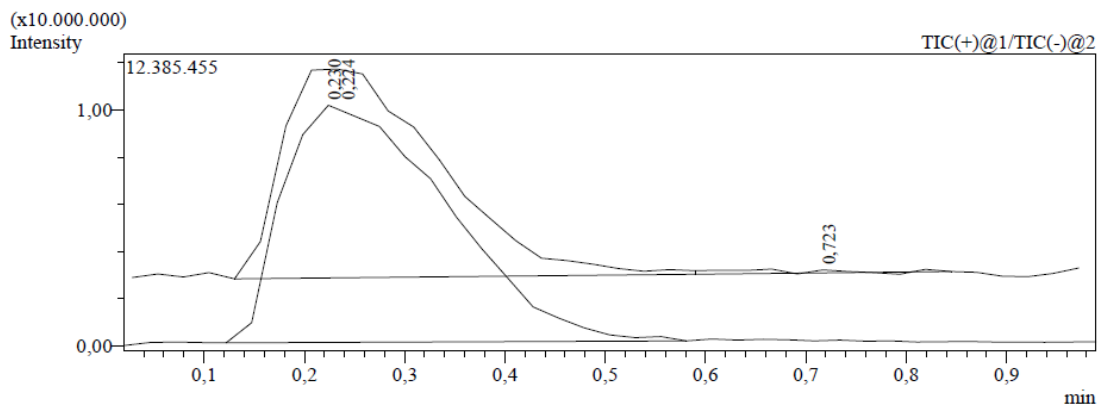
4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

MS Spectrum

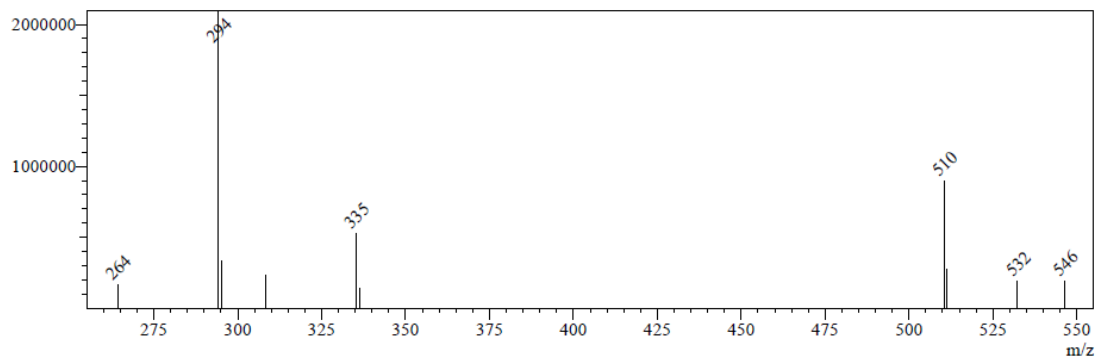
Line#:1 R.Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:20
 Spectrum Mode:Averaged 0,145-0,382(9-23) Base Peak:551(235684)
 BG Mode:Averaged 0,078-0,112(5-7) Segment 1 - Event 1

#	m/z	solute Inten	relative Inten:
1	102.20	122700	52,06
2	105.15	99169	42,08
3	128.10	62540	26,54
4	130.10	49255	20,90
5	145.00	23496	9,97
6	191.10	21056	8,93
7	217.15	13160	5,58
8	279.15	21156	8,98
9	280.25	15371	6,52
10	282.30	81902	34,75
11	283.30	11958	5,07
12	303.10	27816	11,80
13	372.15	34352	14,58
14	506.60	22514	9,55
15	551.30	235684	100,00
16	552.30	87161	36,98
17	553.35	14547	6,17
18	573.25	233749	99,18

ESI-MS de NHMeAla-Anth-Pro-Anth-Ala-OH (45L)



Line#:1 R.Time:----(Scan#:) MassPeaks:10 BasePeak:294(2092895)
 Spectrum Mode:Averaged 0,173-0,326(13-25)
 BG Mode:None Segment 1 - Event 1



4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

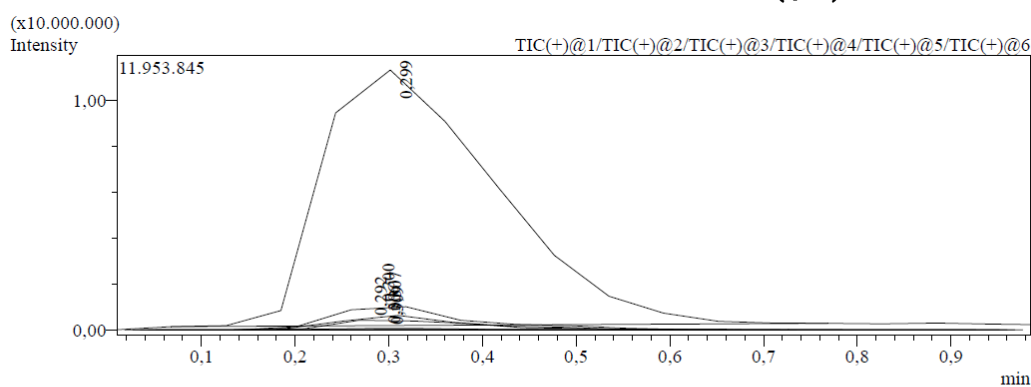
MS Spectrum

Line#:1 R.Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:10
 Spectrum Mode:Averaged 0,173-0,326(13-25) Base Peak:294(2092895)
 BG Mode:None Segment 1 - Event 1

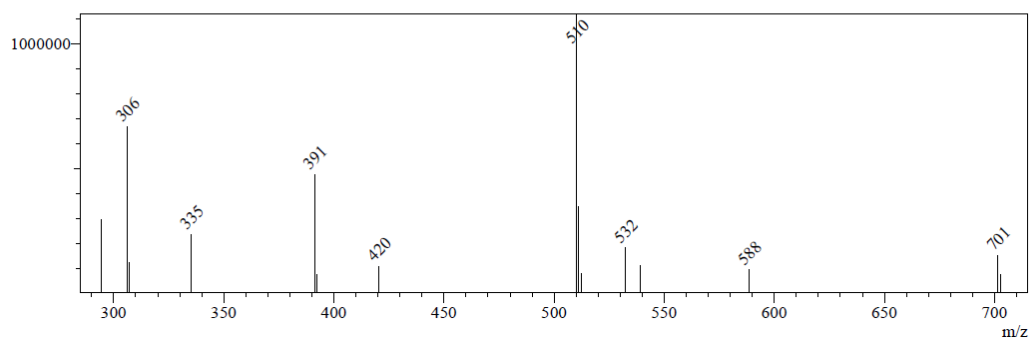
#	m/z	solute	Intenlati	Intens
1	264,25	164085		7,84
2	294,25	2092895		100,00
3	295,25	337289		16,12
4	308,25	231617		11,07
5	335,30	526180		25,14
6	336,35	140571		6,72
7	510,35	894024		42,72
8	511,35	280338		13,39
9	532,35	188786		9,02

Versicotide F

ESI-MS de NHPro-Anth-NMeAla-Anth-Ala-OH (46L)



Line#:1 R.Time:----(Scan#:) MassPeaks:15 BasePeak:510(1121704)
 Spectrum Mode:Averaged 0,185-0,418(19-43)
 BG Mode:None Segment 1 - Event 1



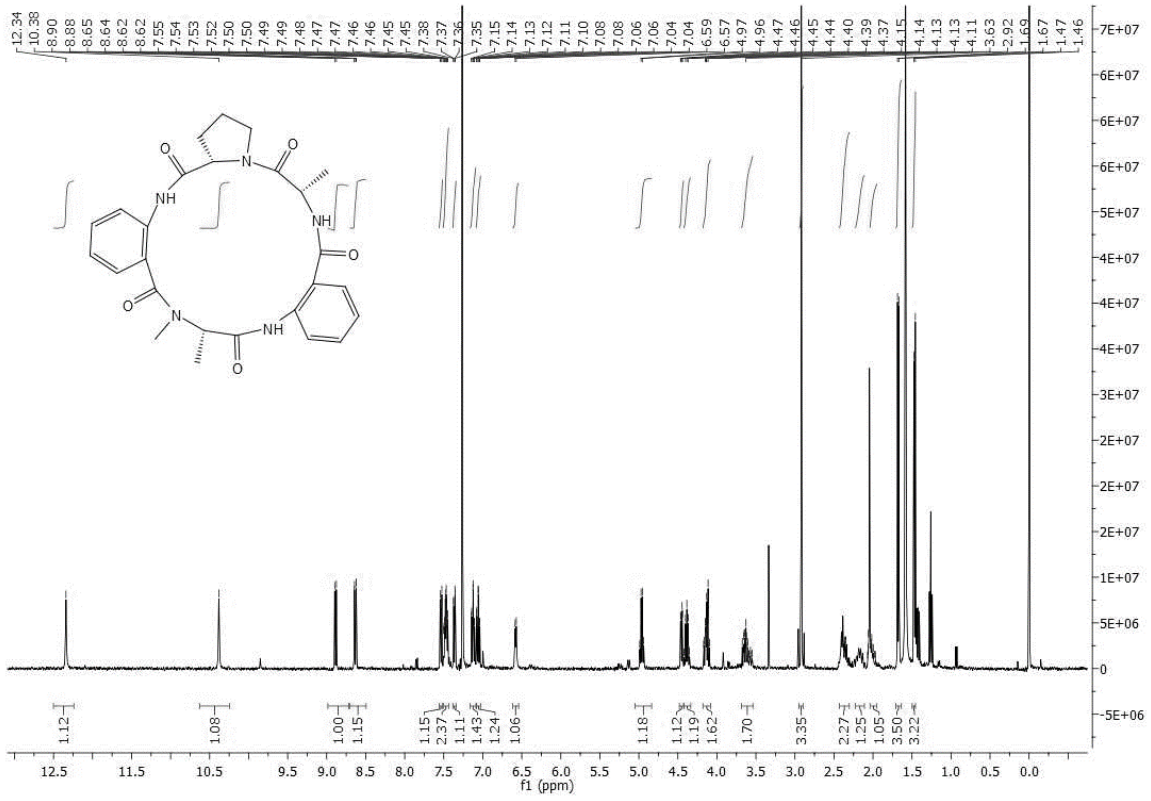
MS Spectrum

Line#:1 R.Time:----(Scan#:----)
 MassPeaks:15
 Spectrum Mode:Averaged 0,185-0,418(19-43) Base Peak:510(1121704)
 BG Mode:None Segment 1 - Event 1

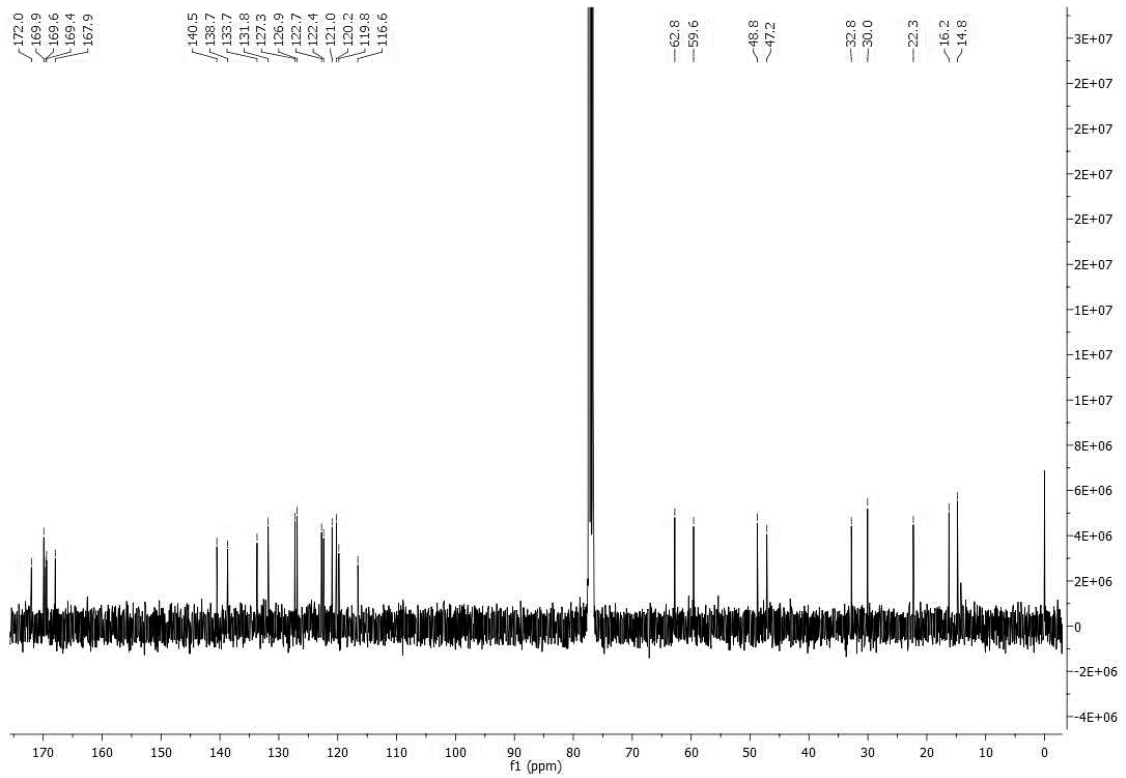
#	m/z	solute	Intenlati	Intens
1	294,15	293190		26,14
2	306,15	667936		59,55
3	307,20	123356		11,00
4	335,20	236379		21,07
5	391,20	475802		42,42
6	392,25	73336		6,54
7	420,25	107441		9,58
8	510,25	1121704		100,00
9	511,25	347181		30,95
10	512,25	75847		6,76
11	532,25	181004		16,14
12	539,25	111010		9,90
13	588,40	93917		8,37
14	701,55	151182		13,48

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

$^1\text{H-RMN}$ en CDCl_3 de *Ciclo*-[Pro-Anth-NMeAla -Anth-Ala] (46C)

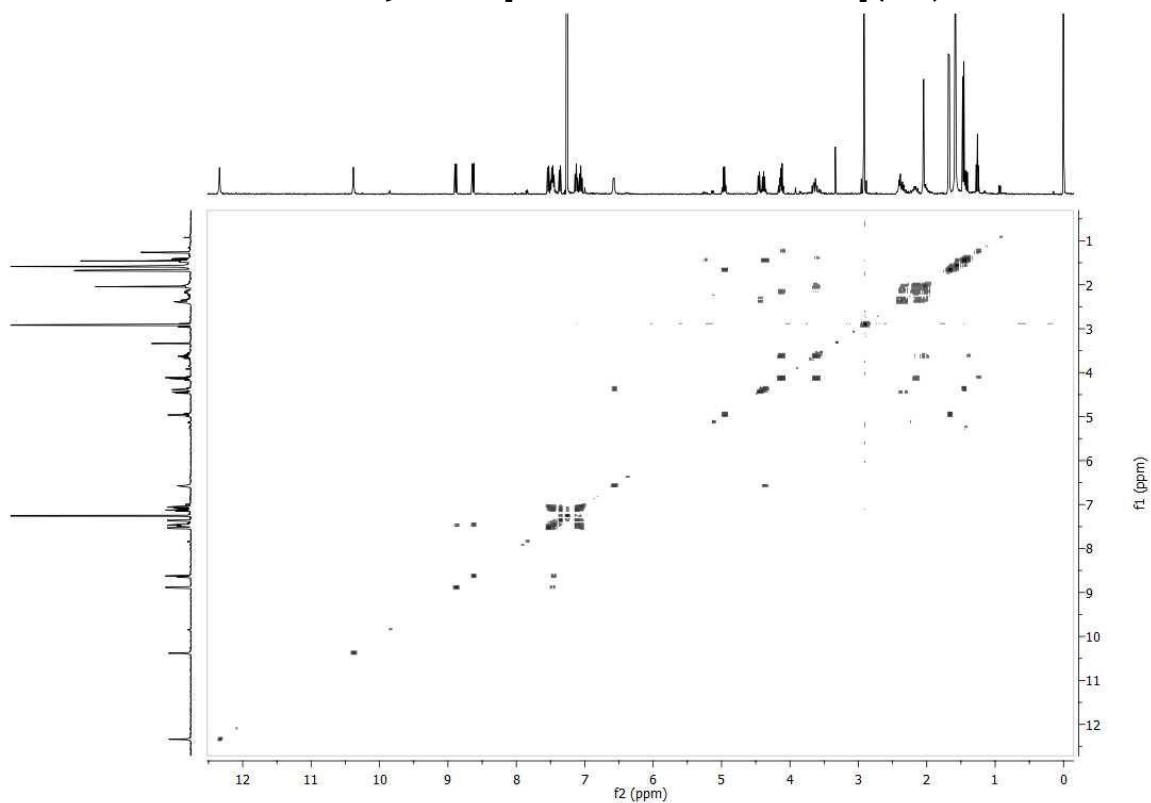


$^{13}\text{C-RMN}$ en CDCl_3 de *Ciclo*-[Pro-Anth-NMeAla -Anth-Ala] (46C)

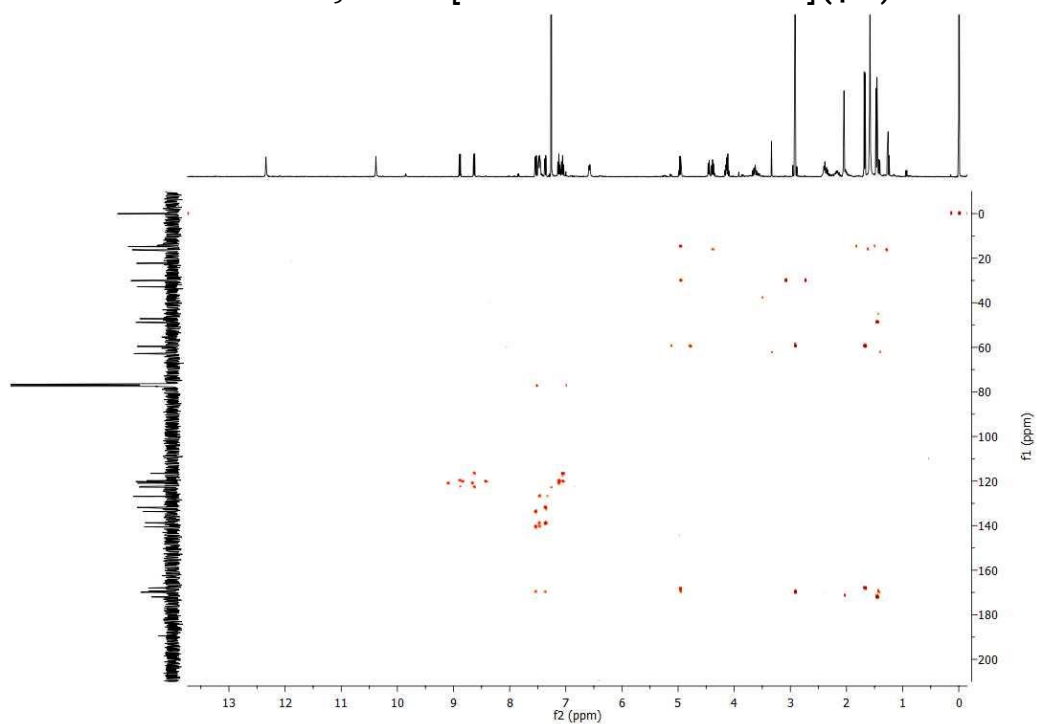


4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

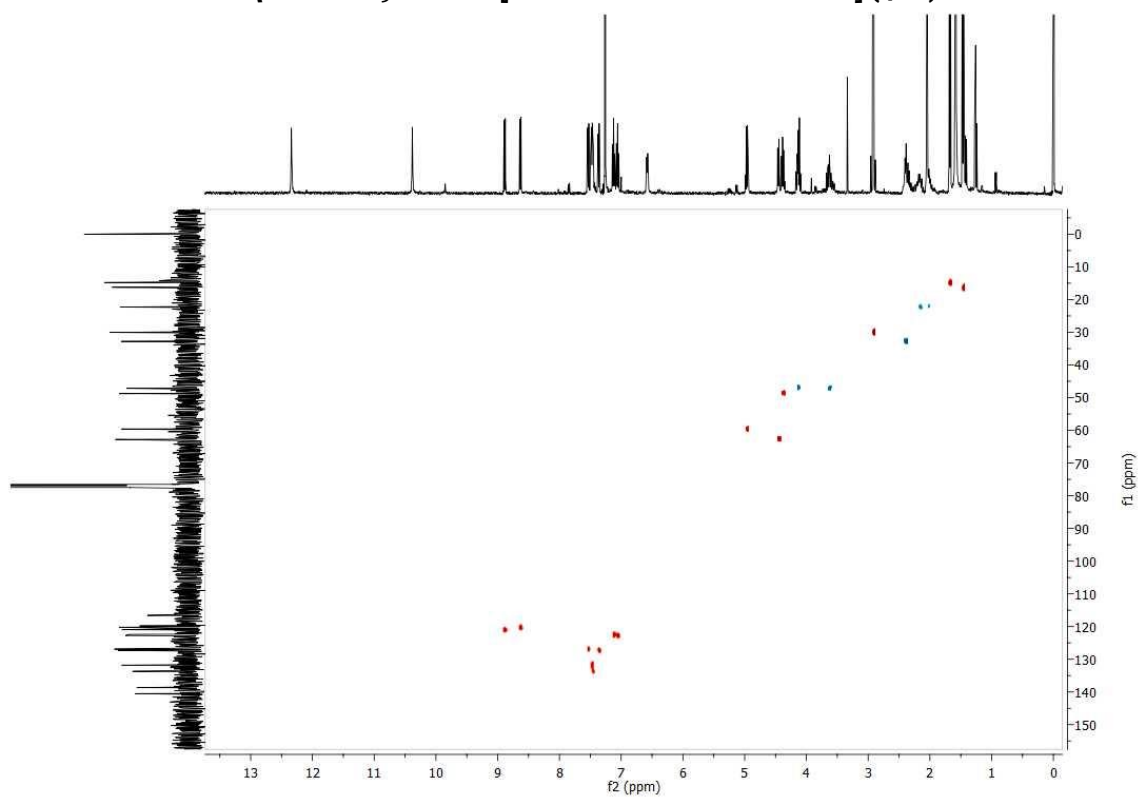
COSY en CDCl_3 de *Ciclo*-[Pro-Anth-NMeAla -Anth-Ala] (46C)



HMBC en CDCl_3 de *Ciclo*-[Pro-Anth-NMeAla -Anth-Ala] (46C)



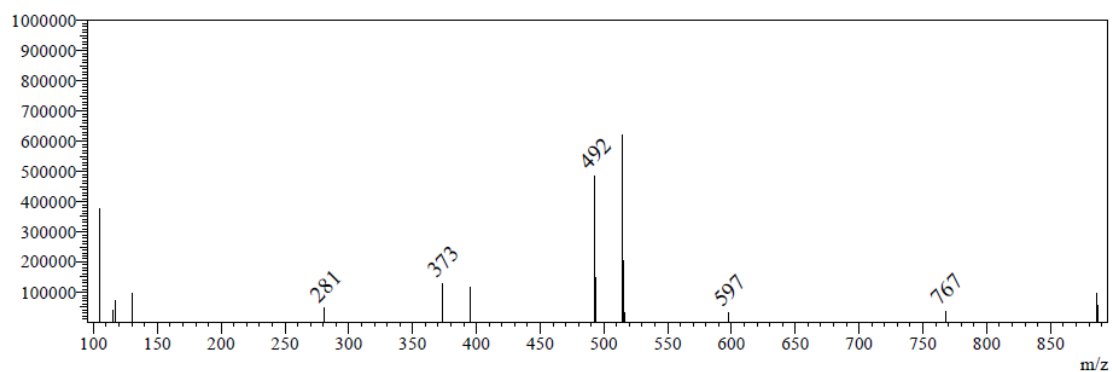
HSQC en CDCl_3 de *Ciclo*-[Pro-Anth-NMeAla -Anth-Ala] (46C)



4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

ESI-MS de Ciclo(Pro-Anth-NMeAla-Anth-Ala) (46C)

Line#:1 R. Time:---(Scan#:) MassPeaks:16 BasePeak:514(620966)
Spectrum Mode:Averaged 0,173-0,352(13-27)
BG Mode:Averaged 0,046-0,097(3-7) Segment 1 - Event 1



MS Spectrum

Line#:1 R. Time:---(Scan#:---)
MassPeaks:16
Spectrum Mode:Averaged 0,173-0,352(13-27) Base Peak:514(620966)
BG Mode:Averaged 0,046-0,097(3-7) Segment 1 - Event 1

#	m/z	solute	Intenlative	Inten:
1	105,15	375466	60,46	
2	115,10	38475	6,20	
3	117,20	72484	11,67	
4	130,25	94196	15,17	
5	281,25	46033	7,41	
6	373,25	127178	20,48	
7	395,25	116804	18,81	
8	492,35	485549	78,19	
9	493,35	147491	23,75	
10	514,30	620966	100,00	
11	515,35	203623	32,79	
12	516,35	31141	5,01	
13	597,35	32070	5,16	
14	767,50	35168	5,66	

X ray crystallographic data

CDCC reference number of Cyclo-[NMeAla-Anth-NMeAla-Anth Ala] (Versicotide A, 42C):

2023773

checkCIF/PLATON report

Structure factors have been supplied for datablock(s) cu_200311_aplp_lp153_0m_a

THIS REPORT IS FOR GUIDANCE ONLY. IF USED AS PART OF A REVIEW PROCEDURE FOR PUBLICATION, IT SHOULD NOT REPLACE THE EXPERTISE OF AN EXPERIENCED CRYSTALLOGRAPHIC REFEREE.

No syntax errors found. CIF dictionary Interpreting this report

Datablock: cu_200311_aplp_lp153_0m_a

Bond precision:	C-C = 0.0048 A	Wavelength=1.54178	
Cell:	a=9.9455 (3)	b=8.2022 (3)	c=15.9136 (6)
	alpha=90	beta=93.461 (2)	gamma=90
Temperature:	298 K		

	Calculated	Reported
Volume	1295.78 (8)	1295.78 (8)
Space group	P 21	P 1 21 1
Hall group	P 2yb	P 2yb
Moiety formula	C25 H29 N5 O5, C H4 O	C25 H29 N5 O5, C H4 O
Sum formula	C26 H33 N5 O6	C26 H33 N5 O6
Mr	511.57	511.57
Dx, g cm ⁻³	1.311	1.311
Z	2	2
Mu (mm ⁻¹)	0.779	0.779
F000	544.0	544.0
F000'	545.74	
h,k,lmax	12,10,19	12,10,19
Nref	5249 [2817]	5186
Tmin,Tmax	0.773,0.853	0.479,0.754
Tmin'	0.691	

Correction method= # Reported T Limits: Tmin=0.479 Tmax=0.754
AbsCorr = MULTI-SCAN

Data completeness= 1.84/0.99 Theta(max)= 73.877

R(reflections)= 0.0442 (4496) wR2(reflections)= 0.1210 (5186)

S = 1.059 Npar= 361

The following ALERTS were generated. Each ALERT has the format
test-name_ALERT_alert-type_alert-level.
Click on the hyperlinks for more details of the test.

4. Síntesis de ciclopéptidos conteniendo β o γ aminoácidos

● **Alert level C**

PLAT340_ALERT_3_C	Low Bond Precision on C-C Bonds	0.0048	Ang.
PLAT355_ALERT_3_C	Long O-H (X0.82,N0.98A)	O6 - H33 .	1.06	Ang.
PLAT410_ALERT_2_C	Short Intra H...H Contact	H1 ..H23 .	1.95	Ang.
		x,y,z =	1_555	Check
PLAT414_ALERT_2_C	Short Intra D-H..H-X	H5 ..H9	1.94	Ang.
		x,y,z =	1_555	Check
PLAT911_ALERT_3_C	Missing FCF Refl Between Thmin & STh/L=	0.600	3	Report

● **Alert level G**

PLAT007_ALERT_5_G	Number of Unrefined Donor-H Atoms	1	Report
PLAT791_ALERT_4_G	Model has Chirality at C2	(Chiral SPGR)	S	Verify
PLAT791_ALERT_4_G	Model has Chirality at C12	(Chiral SPGR)	S	Verify
PLAT791_ALERT_4_G	Model has Chirality at C23	(Chiral SPGR)	S	Verify
PLAT912_ALERT_4_G	Missing # of FCF Reflections Above STh/L=	0.600	24	Note
PLAT978_ALERT_2_G	Number C-C Bonds with Positive Residual Density.		2	Info
PLAT992_ALERT_5_G	Repd & Actual _reflns_number_gt Values Differ by		1	Check

0 **ALERT level A** = Most likely a serious problem - resolve or explain
0 **ALERT level B** = A potentially serious problem, consider carefully
5 **ALERT level C** = Check. Ensure it is not caused by an omission or oversight
7 **ALERT level G** = General information/check it is not something unexpected

0 ALERT type 1 CIF construction/syntax error, inconsistent or missing data
3 ALERT type 2 Indicator that the structure model may be wrong or deficient
3 ALERT type 3 Indicator that the structure quality may be low
4 ALERT type 4 Improvement, methodology, query or suggestion
2 ALERT type 5 Informative message, check

CAPÍTULO 5

Síntesis y Ciclación
de Péptidos en Fase
Sólida



5. Síntesis y Ciclación de Péptidos en Fase Sólida

5.1 Introducción

La macrociclación en fase sólida representa una alternativa interesante a las metodologías clásicas en solución, ya que permite minimizar la posibilidad de que ocurran reacciones intermoleculares durante el proceso. Al anclar una molécula a un soporte insoluble se puede crear un ambiente de pseudodilución. Los grupos funcionales anclados a un soporte insoluble son menos propensos a encontrarse entre sí en comparación con moléculas en solución que pueden difundir libremente, en especial si la carga de la resina es moderada a baja.^{1,2} Otra ventaja fundamental de la macrociclación sobre un soporte sólido es que facilita la purificación del ciclopéptido obtenido, la cual suele ser una etapa particularmente difícil debido a las características fisicoquímicas de estos compuestos. Al realizar la ciclación en fase sólida, el lavado y filtrado suelen ser suficientes para purificar el macrociclo obtenido.

Existen básicamente dos estrategias para lograr la ciclación cabeza a cola de un péptido sobre una resina, dependiendo de cómo se ancla a la misma (**Figura 5.1.**). La primera, consiste en anclar la cadena lateral de un aminoácido trifuncional a la resina. A partir de este aminoácido se hace crecer el péptido y luego se desprotegen selectivamente los extremos N y C terminal liberándolos para llevar a cabo la lactamización mediante acoplamiento directo. Para aplicar esta metodología se requieren tres dimensiones de ortogonalidad en los grupos protectores escogidos de forma que luego de ciclado el péptido, se desprotegen las cadenas laterales del resto de los aminoácidos y se cliva de la resina el ciclopéptido deseado. La epimerización potencial en el sitio de ciclado (siempre que no se trate de glicina) continúa siendo un problema al aplicar esta metodología. Además, la necesidad de contar con aminoácidos trifuncionales en la secuencia del péptido objetivo es una limitación. Esta metodología fue utilizada previamente por nuestro grupo para la síntesis de ciclohexapéptidos y ciclopentapéptidos con actividad antimalárica, utilizando aminoácidos con un grupo ácido carboxílico libre en su cadena lateral como punto de anclaje a la resina. Se comparó la eficiencia de la macrociclación en solución con la ciclación sobre la resina 2-CTC, llegando a la conclusión de que la ciclación sobre la resina es más conveniente ya que permite acceder a cantidades mayores de producto, al mejorar los rendimientos de esta etapa clave.³

¹ Scott, L. T., Rebek, J., Ovsyanko, L. & Sims, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 626.

² Mazur, S.; Jayalekshmy, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 677.

³ Fagúndez, C.; Sellanes, D.; Serra, G. *ACS Comb. Sci.* **2018**, *20*, 212.

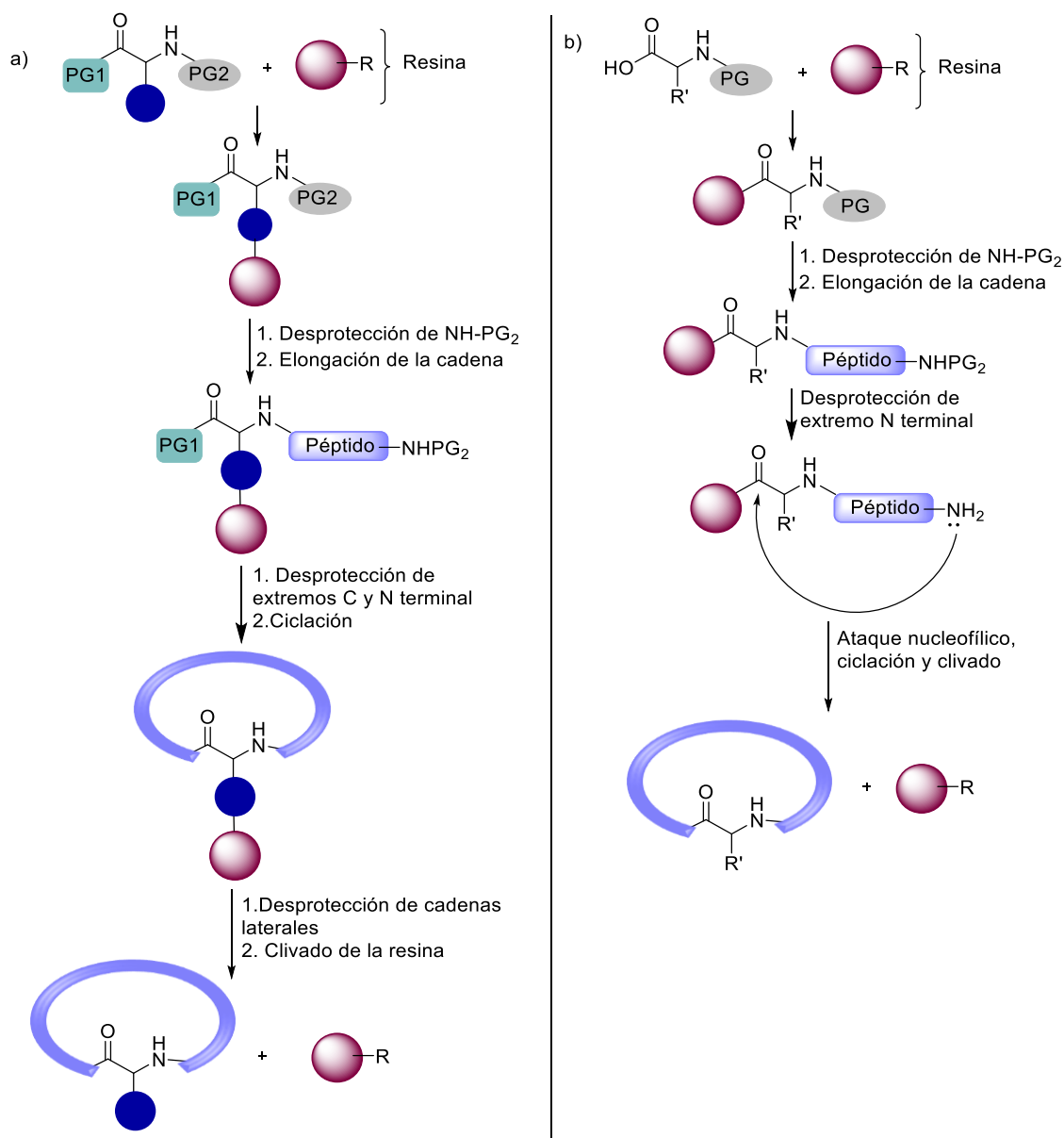


Figura 5.1. Estrategias de ciclado sobre resina. a) Acoplamiento directo de extremos C y N-terminal de un péptido anclado a la resina por la cadena lateral de un aminoácido trifuncional. b) macrociclación y clivaje simultáneo por ataque nucleofílico del grupo amino N-terminal al C-terminal activado por unión a la resina.

La segunda opción es generar la ciclación cabeza a cola de un péptido mediante aminólisis sobre la resina. Esto consiste en sintetizar un péptido, con las cadenas laterales protegidas, con su extremo C terminal levemente activado por la propia unión a la resina, lo que puede usarse para generar la ciclación y al mismo tiempo el clivado de la resina.⁴ Una gran variedad de estrategias han sido desarrolladas para generar este tipo de unión resina-péptido, incluyendo estrategias

⁴ Chow, H.Y; Zhang, Y.; Matheson, E.; Li, X. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 9971.

quimioselectivas que permiten la ciclación de forma selectiva entre los extremos N y C terminal en presencia de grupos funcionales desprotegidos en las cadenas laterales.

Native Chemical Ligation (NCL) es una metodología desarrollada por Kent y colaboradores,⁵ que involucra la reacción de una cisteína N-terminal y un tioéster C-terminal para formar un enlace peptídico nativo. Esta estrategia está inspirada en procesos biológicos enzimáticos tales como la transglutaminación, la ubiquitinación y ligado de proteínas. Involucra a una cisteína N-terminal y un tioéster C-terminal reaccionando de forma reversible en una tiotransesterificación como primer paso (**Figura 5.2**). Luego, se da el ataque nucleofílico del grupo amino al tioéster, formándose una tiazolidina intermediaria terminando en la formación del enlace péptido nativo. NCL es un proceso altamente quimioselectivo que transcurre en medio acuoso, en condiciones suaves con elevados rendimientos y permite, por ejemplo, ligar dos proteínas de manera quimioselectiva.⁶ Se basa en la mayor reactividad de los tioésteres respecto a los oxoésteres, que permite que los primeros puedan reaccionar más fácilmente con un nucleófilo tal como un grupo amino, generando la transferencia de acilo de S a N. Usando SPPS para ensamblar dos péptidos, NCL ha sido empleado para acceder de una manera convergente a péptidos y proteínas que antes eran inaccesibles mediante síntesis química.

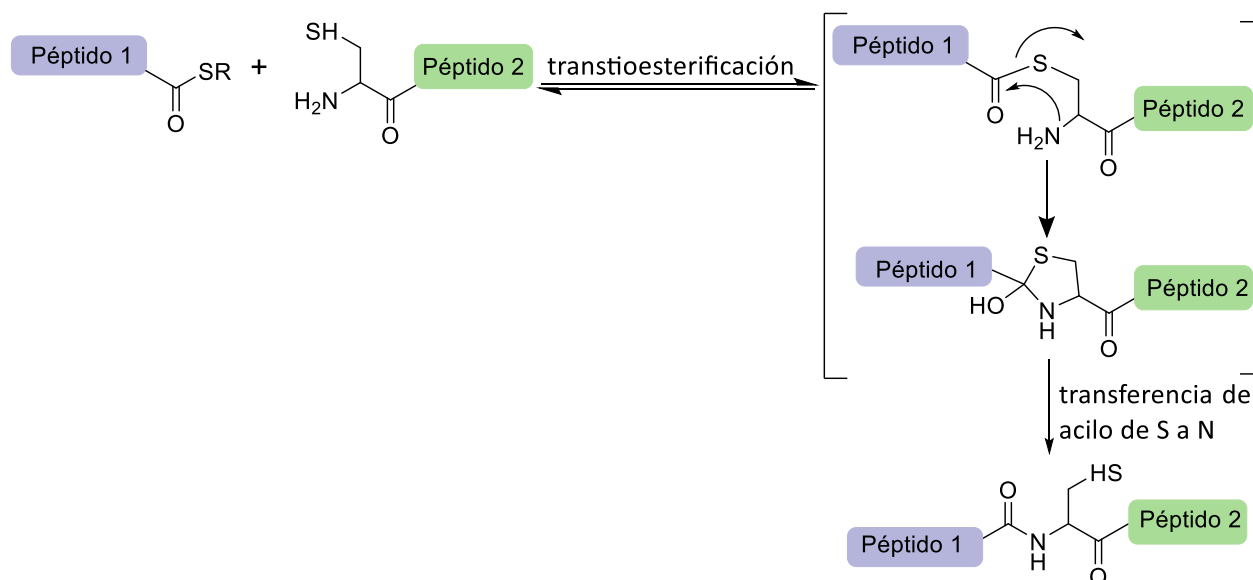


Figura 5.2. Mecanismo general de Native Chemical Ligation

El hecho de que la primera etapa de transtioesterificación sea reversible, sumado a la distancia que existe entre el grupo amino y el tiol de la cisteína N-terminal (permite formar la tiazolidina), son la base de la quimioselectividad del proceso. Esto significa que el nuevo enlace peptídico se generará

⁵ Kent, S. *Biopolymers*, **2010**, 94, 4.

⁶ Burke, M.; McSweeney, L.; Scanlan, E.M. *Nat. Comm*, **2017**, 15655.

entre el grupo amino de la cisteína N-terminal y el extremo C-terminal tioesterificado, incluso en presencia de otros grupos funcionales sin proteger. Si el paso de tiotransesterificación ocurriera con otro tiol de la secuencia, la etapa de transferencia de acilo de S a N no ocurriría debido a la ausencia de un grupo amino adyacente. Otros grupos funcionales presentes en aminoácidos naturales poseen menor nucleofilia en las condiciones de reacción, por lo que tampoco interferirán.

Los tioésteres alquílicos pueden prepararse fácilmente mediante SPPS, pero no son reactivos en NCL, requiriéndose periodos de 24-48 hs para que se dé la transtioesterificación inicial. La velocidad de la reacción puede acelerarse agregando un tiol arílico. Estos son más reactivos que los alquílicos ya que son mejores grupos salientes, por lo tanto, su agregado puede acelerar la reacción por formación de un tioéster más reactivo.

A pesar de la utilidad de NCL, existen algunas desventajas en el uso de esta metodología. La principal de ellas es la necesidad de contar con una cisteína en el sitio donde se quiere realizar el ligado, el cual no es un aminoácido muy abundante en la naturaleza. Un avance importante para superar esta limitante, es la desulfurización posterior a NCL,⁷ usando Níquel Raney. Este concepto se probó inicialmente para formar Alanina a partir de Cisteína después de NCL, y luego se amplió a otros aminoácidos al estudiar la síntesis de otros mercapto-amino ácidos, donde se incorpora un grupo tiol en la posición adecuada del aminoácido.

La ciclación en solución usando NCL de un péptido conteniendo cisteína en su extremo N terminal y un tioéster en el C terminal, demostró que la metodología puede ser aplicada eficazmente a la obtención de ciclopéptidos.^{8,9,10} Recientemente esta estrategia se extendió a la síntesis de ciclopéptidos conteniendo selenocisteína.¹¹ Tulla-Puche y Barany describieron la ciclación sobre resina de un péptido anclado por el β carboxilato de un ácido aspártico, acoplado Phe-SBzl en el extremo C terminal, previo a la reacción de NCL, por tratamiento de la resina en buffer y tiofenol. En este caso se requirió un paso adicional de clivaje de la resina después de la ciclación.¹² Camarero y colaboradores describieron la aplicación de NCL intramolecular usando Boc-SPPS, al tratar la resina PEGA con buffer.¹³ Más recientemente, Gless y Olsen,¹⁴ describieron el uso de NCL sobre resina para sintetizar ciclopéptidos usando un linker ácido N3-Fmoc-3,4-metil-diaminobenzoico (Fmoc-MeDbz).

⁷ Yan, L. Z.; Dawson, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526.

⁸ Terrier, V. P.; Delmas, A. F.; Aucagne, V. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 316.

⁹ Hemu, X.; Taichi, M.; Qiu, Y.; Liu D.X.; Tam, J. P. *J. Pept. Sci.* **2013**, *100*, 492.

¹⁰ Agouridas, V.; El Mahdi, O.; Diemer, V.; Cargoët, M.; Monbaliu, J-C M.; Melnyk, O. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 7328.

¹¹ Shimodaira, S.; Takeji, T.; Hojo, H.; Iwaoka, M. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 11737.

¹² Tulla-Puche, J.; Barany, G. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4101.

¹³ Camarero, J. A.; Cotton, G. J.; Adeva, A.; Muir, T. W. *J. Peptide Res.* **1998**, *51*, 303.

¹⁴ Gless, B. H.; Olsen, C. A. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 10525.

En este capítulo nos proponemos explorar la metodología NCL realizando una reacción intramolecular, es decir entre un tioéster y una cisteína N- terminal en un mismo péptido sintetizado mediante Fmoc/SPPS, para generar el macrociclo correspondiente. Debido a que la estrategia Fmoc es la más ampliamente utilizada en SPPS, resulta de particular interés explorar metodologías de ciclación sobre la resina mediante NCL compatibles al uso de este grupo protector. Para esto se propuso la obtención de ciclohexapéptidos diseñados realizando modificaciones sobre compuestos sintetizados como parte de la tesis doctoral de Catherine Fagúndez que mostraron valores de IC₅₀ en el rango nanomolar en estudios *in vitro* frente a *P. falciparum*.

También se utilizó la metodología de ciclación sobre resina 2-CTC, reportada previamente por nuestro grupo,³ para la síntesis de algunos ciclopéptidos análogos a los productos naturales Versicotides, donde se incorporan aminoácidos de mayor polaridad.

5.2. Resultados y discusión

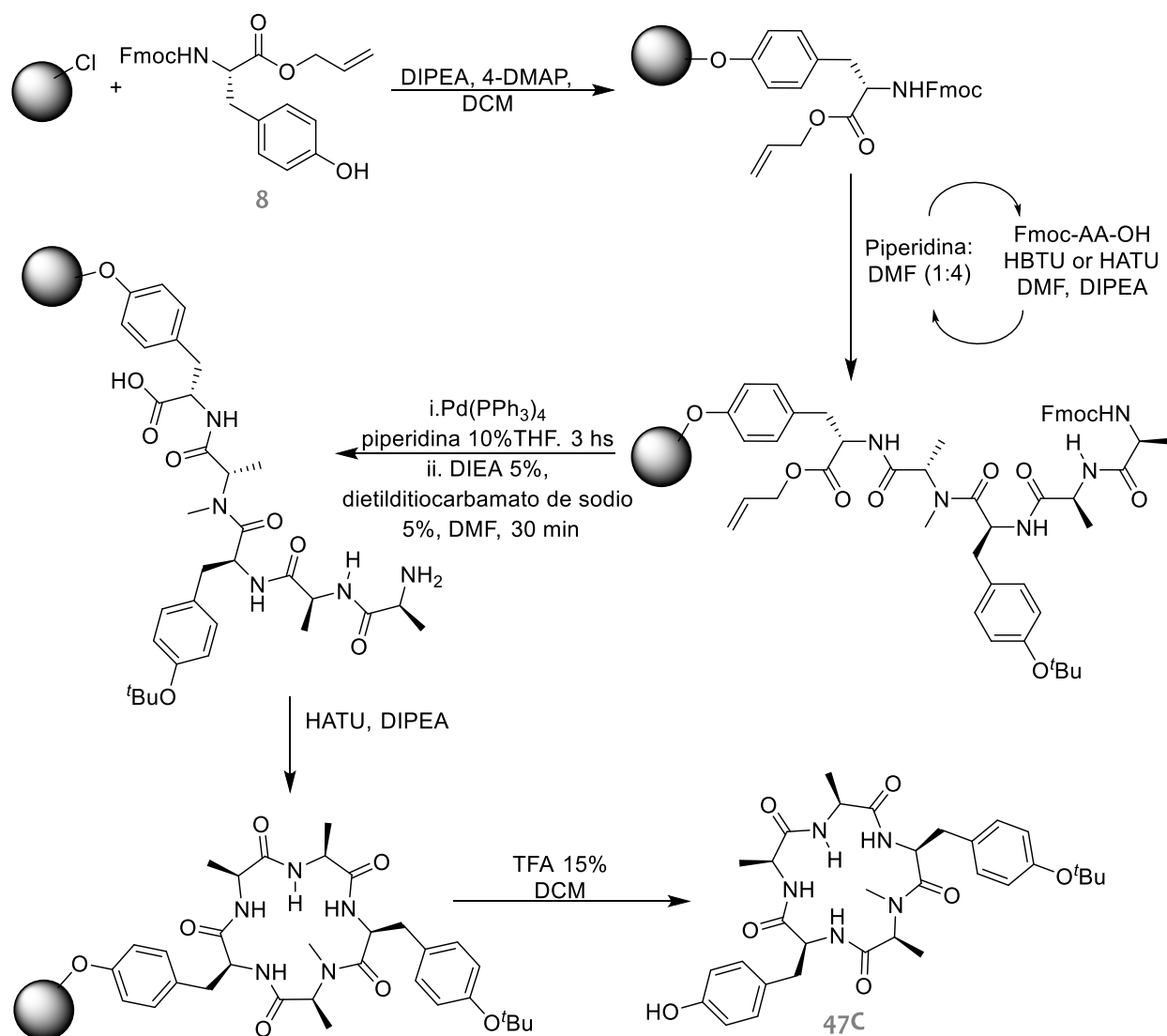
5.2.1. SPPS y macrociclación sobre la resina 2-CTC

Debido a las dificultades observadas para ciclar en solución el péptido **21L** conteniendo dos residuos de Tyr(O^tBu) se decidió realizar tanto la síntesis de péptidos conteniendo tirosina como su ciclación en la resina. Además, para favorecer la adopción de una conformación que permita la ciclación se propuso adicionar un aminoácido N- metilado, por lo que la secuencia lineal sería Ala-Ala-Tyr(O^tBu)-NMeAla-Tyr.

Para la síntesis total sobre la resina se preparó en primer lugar Fmoc-Tyr-OAllyl a partir de Tyr-OAllyl en escala gramo (ver capítulo 2). Al contar con este aminoácido, es posible anclarlo a la resina a través del grupo fenol de la cadena lateral, en lugar de hacerlo mediante el ácido carboxílico. Se utilizó la resina 2-CTC cuya carga máxima según el fabricante es de 1.1 meq/g. El anclaje a la resina se llevó a cabo utilizando 2 eq de este aminoácido, e incorporando DIPEA y 4-DMAP para favorecer el ataque nucleofílico del fenol de Tyr. La carga obtenida de esta manera fue de 0.4 mEq/g lo cual es una carga adecuada para llevar a cabo la ciclación sobre la resina.

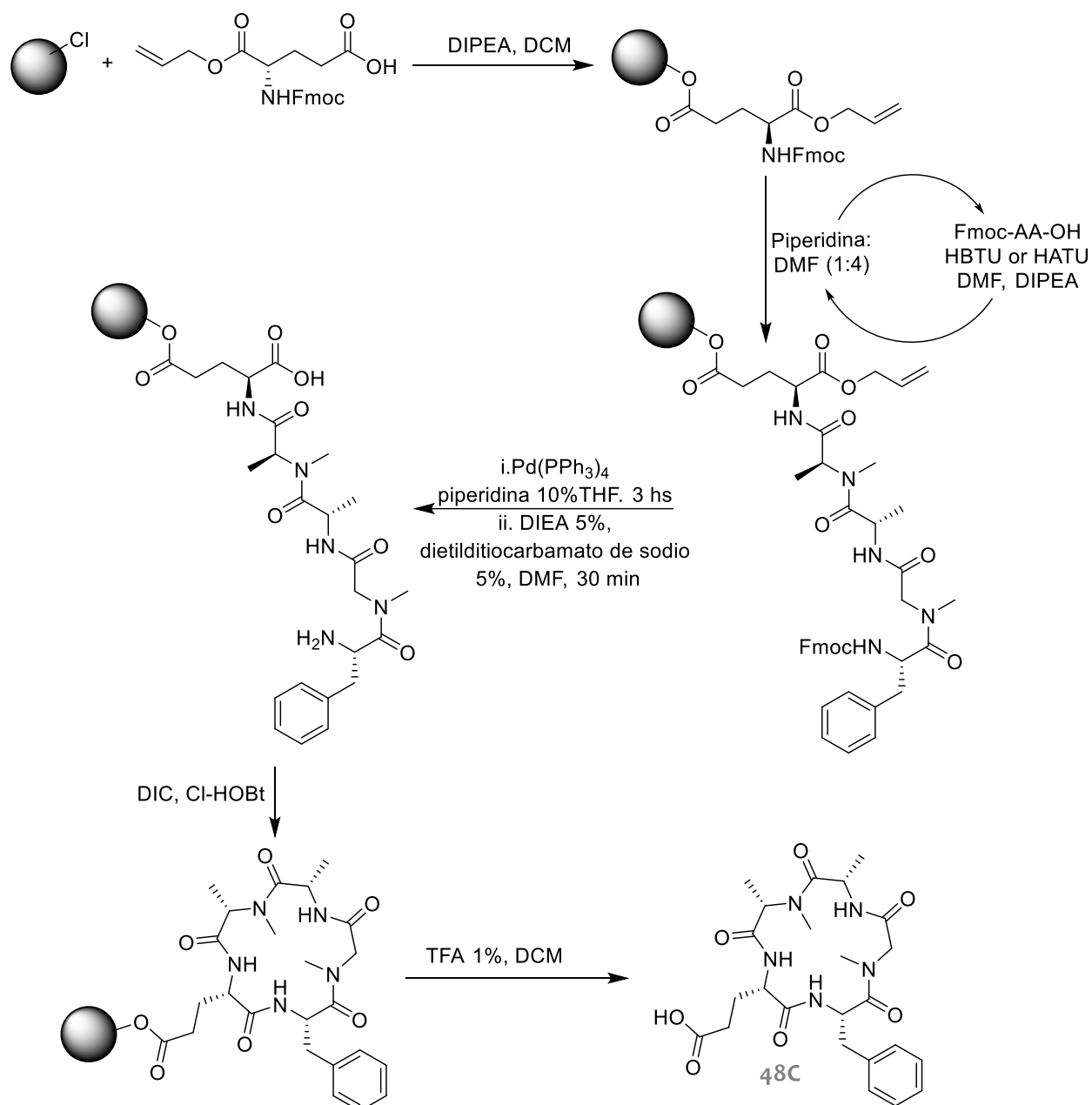
Luego de la desprotección del NHFmoc, se hace crecer el péptido por ciclos iterativos de acoplamiento-desprotección. Una vez alcanzado el pentapéptido deseado se desprotege el grupo amino terminal y el ácido carboxílico utilizando tetrakis y piperidina al 10% en THF. Una vez que se cuenta con ambos extremos libres, se cicla utilizando HATU/DIPEA. La resina se agita en shaker por dos días y finalmente se escinde el péptido usando TFA 15% lo cual ocasiona la desprotección del grupo tert-butilo al mismo tiempo (**Esquema 5.1**). De esta forma fue posible obtener un ciclopentapéptido conteniendo dos Ala, una NMeAla y dos Tyr (**47C**) que fue purificado mediante HPLC

semi-preparativo obteniendo un 40% aproximado de rendimiento. En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ puede observarse la presencia de las señales características del producto, sin embargo, la definición de los picos es pobre debido a la presencia de diferentes conformeros.



Esquema 5.1. Síntesis y ciclación de **47C** sobre la resina 2-CTC

También se empleó esta metodología para la síntesis de un ciclopéptido conteniendo ácido glutámico, cuyo grupo ácido carboxílico presente en la cadena lateral se usó como punto de anclaje a la resina, **Esquema 5.2**. En este caso la carga de la resina obtenida fue de 0.8 meq/g, sin utilizar 4-DMAP durante este paso.

Esquema 5.2. Síntesis de **48C**

Luego de escindir el péptido de la resina, se lo purificó mediante extracción en medio ácido obteniéndose 152 mg de producto (61% de rendimiento).

5.2.2. Macrociclación mediante Native Chemical Ligation intramolecular

Durante una estancia de investigación en el Institute for Protein Research, de la Universidad de Osaka, como parte de un proyecto de colaboración internacional dirigido por el Profesor Hironobu Hojo, estudiamos la metodología NCL aplicada a una reacción intramolecular, es decir entre un tioéster y una cisteína N- terminal en un mismo péptido, para generar el macrociclo correspondiente. Como se muestra en el **Esquema 5.3.**, la síntesis del péptido lineal se realiza sobre la resina amino-

PEGA, mediante la estrategia Fmoc. Utilizando la metodología desarrollada por Hojo y colaboradores,^{15,16} se ancla a la resina un dipéptido sintetizado previamente compuesto por N-Etil- Cisteína y el aminoácido que se desea como extremo C-terminal del péptido lineal final (Fmoc-AA-NEt-Cys(Trt)-OH) utilizando DIC y oxyma pure en dicloroetileno. Luego se aplican ciclos de desprotección del NHFmoc y acoplamiento del Fmoc-AA correspondiente utilizando HBTU, HATU/DIPEA ó DIC/OxymaPure en DMF hasta alcanzar el ciclohexapéptido deseado. Es importante notar que el último aminoácido a acoplar debe ser una cisteína. Finalmente, se desprotege el grupo Fmoc con piperidina y los grupos tiol con TFA/TIS. Luego de filtrar y lavar la resina con MeOH, se agrega una solución de urea y AcOH en H₂O/CH₃CN al péptido desprotegido anclado a la resina, y la mezcla se agita toda la noche a 37°C. Esto promueve que ocurra una transferencia de acilo de N a S que resulta en la formación de un tioéster entre la NEtCys y el péptido. Posteriormente, se da la tiotransesterificación con la cisteína N-terminal liberando NEt-Cys unido a la resina amino PEGA. Finalmente, la transferencia de acilo de S a N genera el enlace peptídico nativo, rindiendo el producto final.

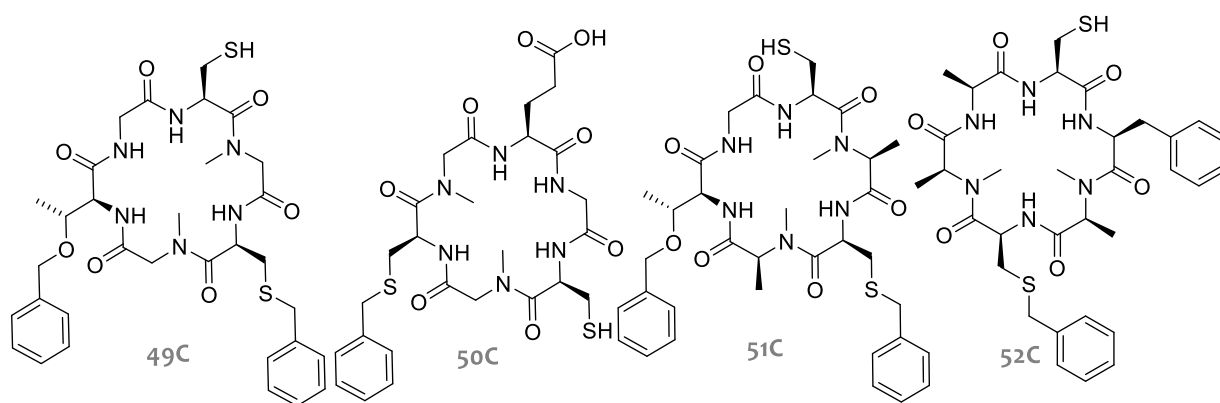
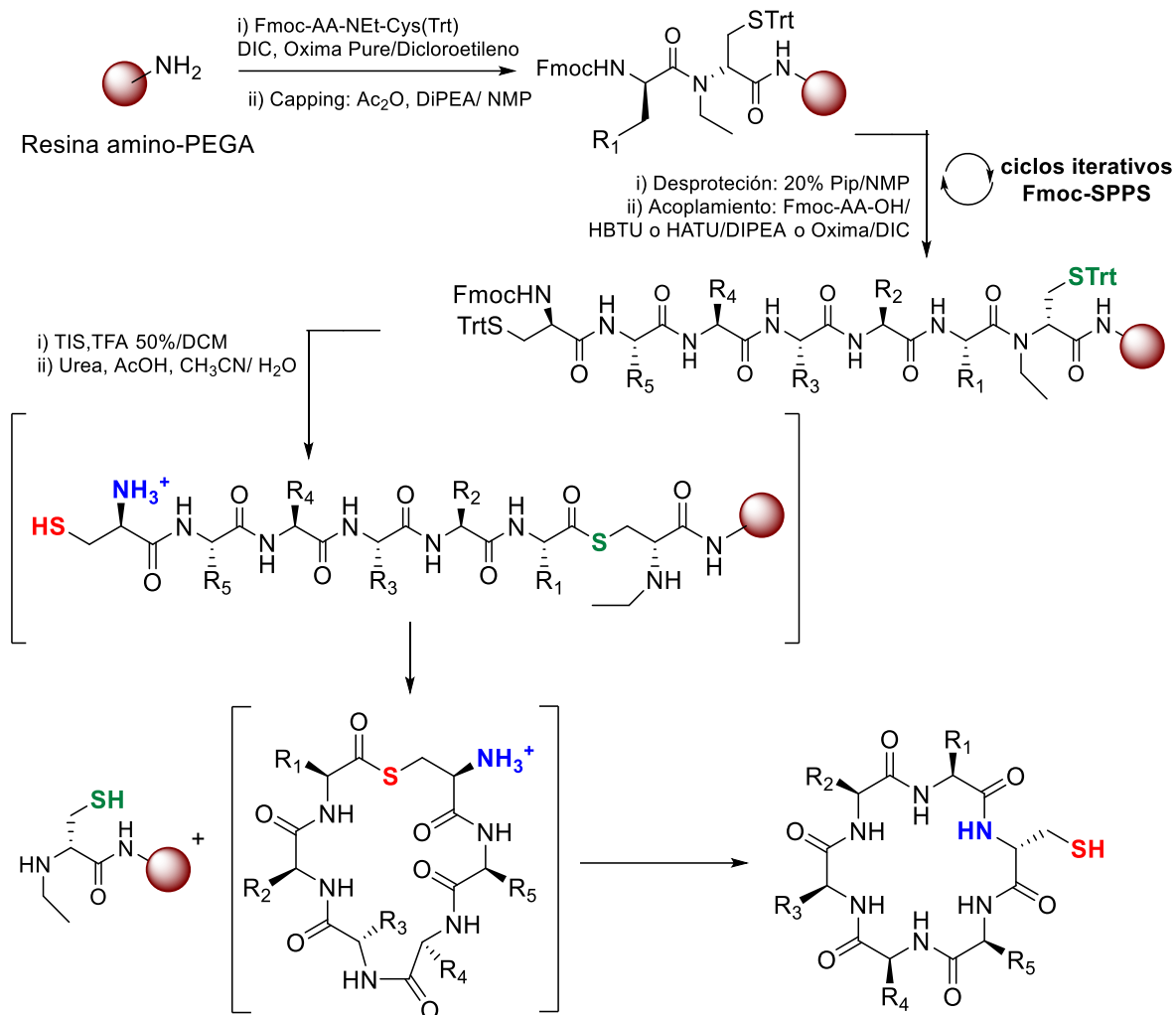
La secuencia lineal de los compuestos sintetizados se escogió tomando como punto de partida los resultados obtenidos en cuanto a síntesis y evaluación biológica frente a *P. falciparum* por las Dras. Catherine Fagúndez y Stella Peña en sus tesis doctorales. Se propusieron modificaciones que puedan impactar sobre las propiedades fisicoquímicas de los mismos tales como sustitución de grupos protectores tritilo por bencilo y de glicina por alanina (**Figura 5.3.**).

Mediante esta técnica se sintetizaron 3 ciclopéptidos con rendimientos globales de 15 a 20% para su posterior evaluación frente a *P. falciparum*. Si bien estos rendimientos fueron relativamente bajos, los resultados obtenidos por nuestro grupo en la síntesis de ciclopentapéptidos mediante esta misma metodología,¹⁷ demuestran que es posible optimizar estos rendimientos teniendo en cuenta aspectos experimentales del manejo de la resina, la cual es sumamente frágil. También se trabajó en la síntesis de un cuarto ciclopéptido, ciclo[Cys-Phe-NMeAla-Cys(Bn)-NMeAla-Ala], que fue correctamente identificado mediante HPLC-MS del crudo de reacción, pero por errores en la purificación no se logró obtener cantidades suficientes para su evaluación. Los compuestos obtenidos fueron identificados mediante HPLC-MS y purificados por HPLC preparativo. El cuarto ciclopéptido propuesto; fue identificado en el crudo de reacción mediante HPLC-MS, sin embargo, solo fue posible purificar una cantidad muy pequeña mediante HPLC preparativo.

¹⁵ Asahina, Y.; Nabeshima, K.; Hojo, H. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 1370.

¹⁶ Hojo, H. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6368.

¹⁷ Serra, G.; Posada, L.; Hojo, H. *Chem. Commun.*, **2020**, *56*, 956.



5.3. Conclusiones

Se realizó la síntesis y macrociclación sobre la resina 2-CTC de dos péptidos conteniendo aminoácidos trifuncionales adecuados para su unión a la resina por su cadena lateral. Esta

metodología, que requiere al menos tres dimensiones de ortogonalidad, permitió obtener rendimientos superiores a los observados en solución para ciclopéptidos del mismo tamaño. Sin embargo, la purificación del producto obtenido resultó más compleja de lo esperado.

Se desarrolló un procedimiento para la ciclación y clivaje concomitante de la resina usando reacciones en tándem de transferencia de acilo de N a S y subsecuente NCL intramolecular de péptidos conteniendo N^εCys obtenidos mediante Fmoc/SPPS. Esta metodología permite acceder rápidamente a este tipo de compuestos en un rendimiento razonable considerando los rendimientos frecuentemente alcanzados para la obtención de ciclopéptidos. Además, no se detectaron reacciones secundarias utilizando esta metodología y no fue necesario utilizar tioles auxiliares. La ausencia de agentes activantes en el paso de ciclación permite la posibilidad, de así requerirlo, de realizar una desulfurización directa de la cisteína que se encontraba en posición N terminal en el péptido lineal, transformándola en otros aminoácidos, lo cual amplía el alcance de la metodología.

Parte de los resultados presentados en este capítulo fueron publicados¹⁸ y el artículo correspondiente se encuentra disponible en el Anexo II.

¹⁸ Serra, G.; Posada, L.; Hojo, H. *Chem. Comm.* **2020**, *56*, 956.

5.4. Parte experimental

5.4.1. Métodos experimentales generales

Todas las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera inerte de nitrógeno y utilizando disolventes secos, recientemente destilados, bajo condiciones anhidras, a menos que se indique de otra forma. Todos los solventes fueron purificados de acuerdo a procedimientos descritos en la literatura.¹⁹

Todos los rendimientos informados se refieren a productos cromatográfica y espectroscópicamente puros (determinado mediante ¹H-NMR y ¹³C-NMR). Todos los espectros de RMN fueron registrados utilizando un equipo Bruker Advance NEO-400 o Bruker Avance III 500 MHz. Todos los desplazamientos químicos reportados son relativos al TMS utilizado como referencia interna.

La resina Cloruro de 2-clorotritilo (2-CTC, 100-200 mesh, 1.1 mEq/g) fue adquirida de CHEM-IMPEX INT'L INC.

Todas las reacciones en fase solida fueron monitoreadas mediante test colorimétricos (Kaiser o Cloranil según corresponda), y mediante HPLC.

La pureza de los péptidos obtenidos utilizando la resina 2-CTC fue determinada utilizando un equipo de HPLC analítico Shimadzu (Bombas LC-10AT) equipado con una columna Phenomenex Luna C18 (150 x 4.6 mm, 5µm) ó Phenomenex Kinetex C18 (150 x 4.6 mm, 5µm) y detector UV/Vis SPD20A prominence. Utilizando como fase móvil gradientes de acetonitrilo: agua con 0.003M TFA ó acetonitrilo: agua con 0.1% ácido fórmico. Los espectros de masas correspondientes a dichos productos fueron adquiridos utilizando HPLC Agilent Infinity 1200 equipado con un detector ABSciex QTRAP 4500 híbrido (triple cuadrupolo con trampa lineal) e ionizador por electrospray.

Por otra parte, los productos finales obtenidos utilizando la resina Amino-PEGA fueron analizados utilizando un HPLC analítico HITACHI LaChrom elite, equipado con dos bombas L-2130 y detector UV L-248, columna Cosmosil C18 (4.6x150mm, 5µm) mediante un gradiente de H₂O: CH₃CN y 0.1 % TFA. Una vez identificados los productos fueron purificados mediante HPLC preparativo utilizando un HPLC Waters 2487 equipado con un controlador de bombas Waters 600 y detector UV de doble λ, utilizando gradientes de agua y acetonitrilo con 0.1 % TFA. Los espectros de masas fueron obtenidos utilizando un equipo Thermo LC-Q DECA XP Plus con ionizador de electrospray y detector triple cuadrupolo-trampa de iones.

¹⁹ Perrin, D. D. ; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", 3th Ed. Pergamon Press, Oxford, 1988.

5.4.2. Síntesis y macrociclación de péptidos sobre la resina 2-CTC

5.4.2.1. Procedimiento general de carga de la resina

Las síntesis se llevaron a cabo en jeringas de plástico equipadas con filtros de teflón. La resina cloruro de 2-clorotritilo (100-300 mesh, 1.20 mmol/g) se hincha mediante tratamientos con CH_2Cl_2 (3 × 30 seg). Una solución del primer aminoácido adecuadamente protegido Fmoc-AA(OH)-OAllyl, (1.0 eq. para una carga de resina de 0.6-0.8 mmol/g) en CH_2Cl_2 y DIPEA (3.0 eq.) se incorporan a la resina y se agita por 10 min. Luego se agregan 7.0 eq. adicionales de DIPEA y se continúa agitando por 50 min. A la mezcla anterior se le agrega MeOH (0.8 mL/ g de resina) para realizar el capping de los sitios activos que hayan quedado sin reaccionar, y se agita 10 minutos. Luego de filtrar se lava con CH_2Cl_2 (x3), DMF (x3) y CH_2Cl_2 (x3).

5.4.2.2. Elongación de la cadena peptídica.

Para la desprotección de los grupos Fmoc y su cuantificación, y crecimiento de la cadena peptídica, se siguen los procedimientos descritos en **3.4.2 b** y **c** respectivamente. El avance de todas las reacciones de formación de enlace amida sobre la resina se verifica mediante test de Kaiser o Cloranil según **3.4.3**.

5.4.2.3. Macrociclación sobre la resina y escisión del ciclopéptido

Luego de completarse el acoplamiento del último aminoácido, se lava la resina con DMF (x3), DCM (x3). Se desprotegen ambos extremos con $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.5 eq.) en una solución de Piperidina al 10% en THF durante 3 horas. Luego se filtra y se lava con DCM (x3) y DMF (x3). Se agrega una solución de Dietilditiocarbamato de sodio (5% m/v) y DIPEA (5%) en DMF y se agita durante 30 minutos. Se filtra y lava la resina con DCM (x3), MeOH (x3) y DCM (x3). Se agrega una solución de HATU (3eq) y DIPEA (6eq) en DCM y se deja agitando entre 24 y 48 horas. Se lava con DCM (X3), MeOH (x3) y DMC (x3). Se trata la resina con una solución de TFA al 20% en DCM para escindir el péptido de la resina. Se filtra y se recoge en un balón con MeOH y se concentra a vacío el filtrado.

5.4.3. Síntesis y macrociclación de péptidos sobre la resina amino polietilenglicol (amino PEGA).

5.4.3.1. Síntesis de Fmoc-AA-N(Et)Cys-OH

El éster de pentafluorofenol del Fmoc-AA correspondiente se obtiene por reacción del Fmoc-AA-OH (3.0 mmoles, 1 eq.) con pentafluorofenol (3.0 mmoles, 1eq.) y EDCI (3.3 mmoles, 1.1 eq.) en CH_2Cl_2 (10mL). La reacción se agita a temperatura ambiente toda la noche. Luego se concentra a vacío, se retoma en CHCl_3 y se lava con H_2O . Las fases orgánicas se secan con Na_2SO_4 y se concentran a vacío.

Se recristaliza de AcOEt y se obtienen 1.5 mmoles de producto (R=50%). 1.5 mmoles, 1eq de Fmoc-AA-O(Pfp) se disuelven en 5.7 mL de DMF y se agrega Net-Cys(Trt)-OH (1.5 mmoles, 1eq) y HOOBt (1.5 mmoles, 1 eq.)²⁰. Se agita a 50°C durante dos horas. El solvente se evapora a vacío y el crudo se purifica por cromatografía flash (R=60%).

5.4.3.2. Carga de la resina

Aproximadamente 700 mg de resina Amino-PEGA (0.4 mmol/g) se pesan en jeringas de plástico equipadas con filtros de teflón. Se agrega NMP y se deja agitando suavemente 10 minutos, se filtra y se repite dos veces durante medio minuto. Se trata la resina con una solución de piperidina al 20% en NMP durante 2 minutos. Se filtra y se repite dos veces dejando con agitación suave 1 minuto cada vez. Se lava con NMP (5x0.5min) y DCM (2 x 0.5 min).

Se agrega una solución de Fmoc-AA-NEt-Cys(Trt) (2 eq.), Oxyma Pure (2.2 eq.) y DIC (2.2 eq.) en dicloroetileno. Se agita durante 6 a 12 horas. La finalización de la reacción se verifica mediante test de Kaiser para esto tomar una pequeña cantidad de la suspensión y proseguir de acuerdo a 2.4.1. Una vez finalizada la reacción se filtra y se lava con NMP (0.5 min x 3).

Para bloquear los sitios activos que puedan haber quedado sin reaccionar se agrega una solución conteniendo Ac₂O, DIPEA en NMP (300 uL, 150 uL, 2.5 mL) y se deja con agitación 15 minutos. Se lava con NMP (5x0.5min) y DCM (2 x 0.5 min).

5.4.3.3. Elongación de la cadena peptídica

El grupo NHFmoc se desprotege por tratamiento con una solución de piperidina al 20% en NMP durante 2 minutos. Se filtra y se repite dos veces dejando con agitación suave 1 minuto cada vez. Se lava con NMP (5 x 0.5min) y DCM (2 x 0.5 min).

Se agrega una solución de NHFmoc-AA-OH (4 eq.), HBTU (3.8 eq.) y DIPEA (8eq.) en DMF ó NMeFmoc-AA- (4eq.), HATU (3.8 eq.) y DIPEA (8eq.) se deja con agitación 20 minutos. Se filtra, se lava con NMP (5x0.5min) y se realiza el test de Kaiser o Cloranil según corresponda. En caso de resultar negativo se repite el ciclo.

Para el acoplamiento del último aminoácido (Fmoc-Cys(Trt)-OH) se utilizan 4 eq del mismo disueltos en DMF junto con Oxyma Pure (4eq.) y DIC (4eq.). Se agrega a la resina y se deja agitando durante 1

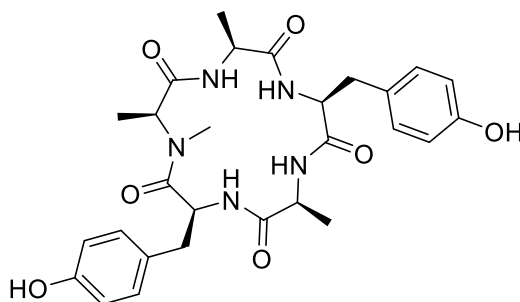
²⁰ Hojo, H.; Kobayashi, H.; Ubagai, R.; Asahina, Y.; Nakahara, Y.; Katamaya, H.; Ito, Y.; Nakahara, Y. *Org. Biomol. Chem*, **2011**, 9, 6807.

hora. Se lava con NMP y realiza el test de Kaiser. En caso de ser negativo se lava 5 veces con NMP y se procede a la desprotección del NHFmoc. Por último, se lava con NMP (5x 0.5 min) y DCM (5x0.5min).

5.4.3.4. **Macro ciclación y escisión de la resina mediante Native Chemical Ligation (NCL)**

Se trata la resina con una solución de 0.12 mL de TIS + 2 mL de TFA + 2 mL de DCM durante 10 minutos. Se filtra rápidamente la solución, y se lava 4 veces con MeOH. Agregar a la resina una solución de 0.9 g urea, 0.5 mL de CH₃CN, 2 mL H₂O, 125 µL de ácido acético. Se deja con agitación suave a 37°C durante toda la noche. Se analizan 20 µL de esta solución mediante HPLC analítico. Se recoge el eluyente correspondiente al pico principal y se analiza mediante HPLC-MS. Una vez identificado el producto se purifica mediante HPLC preparativo.

5.4.4. **Caracterización de productos**

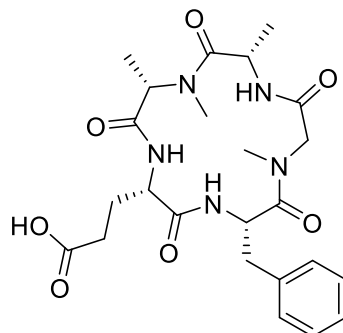


47C

47C se obtuvo siguiendo el procedimiento de síntesis y macro ciclación sobre la resina 2-CTC.

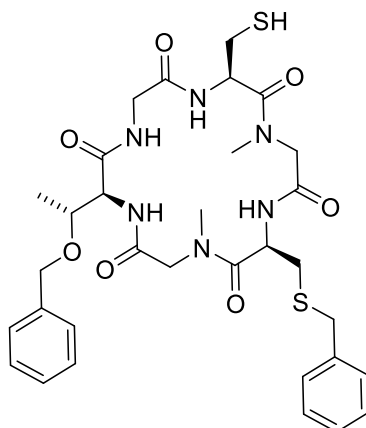
Fmoc-Tyr-OAllyl se ancla a la resina 2-CTC mediante el procedimiento 5.4.3.2 obteniéndose una carga de 0.4 mmol/g. Una vez obtenido el péptido lineal mediante ciclos de desprotección y acoplamiento se cicla sobre la resina y se escinde utilizando 20% de TFA en DCM. Se purifica por HPLC utilizando una columna Phenomenex Luna C18 (250x10 mmx5µm) y gradiente lineal CH₃CN: H₂O (0.1% ác. Fórmico) de 40:60 a 60:40 en 15 minutos en y se obtienen 15 mg de producto (R=40%).

Ciclo(Ala-Ala-Tyr-NMeAla-Tyr) (47C): sólido blanco (40%) ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 1.12 – 1.51 (m, 18H), 2.19 – 2.42 (m, 1H), 2.55 – 3.27 (m, 9H), 3.98 – 4.83 (m, 5H), 6.64 – 6.78 (m, 4H), 6.82 – 6.96 (m, 1H), 6.96 – 7.20 (m, 4H).

**48C**

48C se obtuvo siguiendo el procedimiento de síntesis y macroclicación sobre la resina 2-CTC. Fmoc-Glu-OAllyl se ancla a la resina 2-CTC mediante el procedimiento 5.4.3.2 obteniéndose una carga de 0.8 mmol/g. Una vez obtenido el péptido lineal mediante ciclos de desprotección y acoplamiento se cicla sobre la resina usando DIC y Cl-HOBt durante dos días y se escinde utilizando 1% de TFA en DCM. Mediante RMN se percibe que el producto podría estar impurificado por el péptido lineal por lo que se retoma en AcOEt y se extrae 3 veces con HCl 5%, la fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y se concentra a vacío. Se obtienen 152 mg de producto (0.3 mmoles, 61% de rendimiento)

Ciclo-[Phe-NMeAla-Ala-NMeAla-Glu] (48C): Sólido amarillo (61%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.06 - 1.32 (m, 6H), 1.60 - 1.93 (m, 2H), 2.04- 2.39 (m, 2H), 2.57 - 3.18 (m, 8 H), 3.51 - 3.66 (m, 1H), 3.68 - 4.06 (m, 1H), 4.06 - 4.41 (m, 1H), 4.42 - 5.05 (m, 3H), 7.03 - 7.36 (m, 5H). ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) 14.6, 17.8, 22.6, 30.1, 30.4, 30.5, 31.0, 45.4, 51.9, 52.0, 52.3, 65.3, 125.9, 126.9, 128.4, 128.6, 129.8, 130.1, 171.1, 171.8, 172.5, 172.6, 174.2, 174.4.

**49C**

El compuesto **49C** se obtuvo como sólido blanco en un 18% de rendimiento (3.7 mg, 5.4 μmoles) siguiendo el procedimiento general de síntesis y macroclicación de péptidos sobre la resina amino polietilenglicol (amino PEGA). Para su purificación mediante HPLC preparativo se utilizó el siguiente

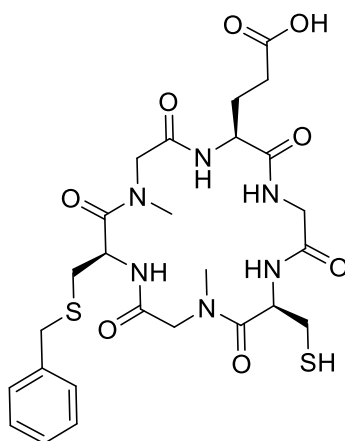
gradiente. El producto eluyó con un $t_R=19.08$ min y fue recolectado en tubos de polipropileno y liofilizado.

Tiempo (m)	% A	%B
0	75	35
20	45	55
20.1	30	70
25	10	90
25.1	65	35
35	65	35

A: H₂O, 0.1% TFA

B: CH₃CN, 0.1 % TFA

Cyclo-[Cys-NMe-Gly-Cys(Bn)-NMe-Gly-Thr(Bn)-Gly] (49C): Sólido blanco (18 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.22 (d, *J*=6.4 Hz, 3H), 1.66 (t, *J*=8.9 Hz, 1H), 2.63 (dd, *J*= 13.6, 5.1 Hz, 1H), 2.68-2.81 (m, 1H), 2.91-3.03 (m, 2H), 3.05 (s, 3H), 3.16 (s, 3H), 3.20 (d, *J*=16.2 Hz, 1H), 3.42 (d, *J* = 14.4 Hz, 1H), 3.63 (dd, *J* = 14.8, 4.4 Hz, 1H), 3.70 (s, 2H), 4.19-4.28 (m, 3H), 4.30 – 4.39 (m, 2H), 4.44 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.57 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 5.00-5.11 (m, 2H), 6.74 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.17 – 7.06 (m, 2H), 7.23-7.25 (m, 2H), 7.27–7.38 (m, 8H), 8.03 (m, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 17.0, 26.0, 32.5, 36.5, 37.0, 38.7, 44.0, 48.3, 52.2, 53.9, 54.3, 58.3, 71.8, 73.3, 127.3, 127.9 (2C), 128.1, 128.5(2C), 128.7(2C), 129.0 (2C), 137.6, 138.2, 167.7, 169.5, 169.6, 171.4, 172.1, 184.0. HRMS *m/z* calc. for C₃₂H₄₃N₆O₇S₂ ([M+H]⁺) 687.3, experimental 687.4.



50C

El compuesto **50C** se obtuvo como sólido blanco en un 15% de rendimiento (3.1 mg, 5.1 μmoles) siguiendo el procedimiento general de síntesis y macroclicación de péptidos sobre la resina amino polietilenglicol (amino PEGA). Para su purificación mediante HPLC preparativo se utilizó el siguiente

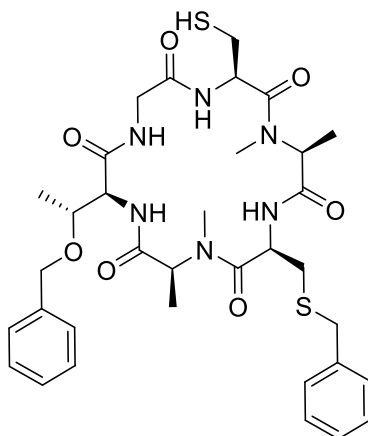
gradiente. El producto eluyó con un $t_R=18.5$ min y fue recolectado en tubos de polipropileno y liofilizado.

Tiempo (m)	% A	%B
0	80	20
20	60	40
20.1	30	70
25	10	90
25.1	80	20
35	80	20

A: H₂O, 0.1% TFA

B: CH₃CN, 0.1 % TFA

Cyclo-[Cys-NMe-Gly-Cys(Bn)-NMe-Gly-Glu-Gly] (50C): sólido blanco (15 %). **¹H NMR (400 MHz, MeOD)** δ 1.87-2.00 (m, 1H) , 2.19-2.34 (m, 1H), 2.37-2.50 (m, 2H), 2.67-2.81 (m, 2H), 2.82-2.94 (m, 2H), 2.97 (d, $J=5.4$ Hz, 1H), 3.15 (s, 3H), 3.25 (s, 3H), 3.46 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 3.55-3.77 (m, 2H), 3.80 (s, 2H), 4.20 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 4.25-4.41 (m, 2H), 4.47-4.68 (m, 1H), 4.73-4.81 (m, 1H), 4.93-5.14 (m, 1H), 7.19-7.45 (m, 5H). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD)** δ 24.4, 25.7, 30.0, 32.2, 36.4, 37.2, 41.5, 44.5, 49.5, 52.4, 53.0, 53.1, 53.2, 126.7, 128.1, 128.2, 128.8, 129.7, 138.7, 169.0, 170.3, 171.1(2C), 171.8, 174.9 175.1. **HRMS** m/z calc. for C₂₆H₃₇N₆O₈S₂ ([M+H]⁺) 625.2, experimental 625.3.



51C

El compuesto **51C** se obtuvo como sólido blanco en un 13% de rendimiento (3.2 mg, 4.5 μ moles) siguiendo el procedimiento general de síntesis y macrociclación de péptidos sobre la resina amino polietilenglicol (amino PEGA). Para su purificación mediante HPLC preparativo se utilizó el siguiente gradiente. El producto eluyó con un $t_R=20.2$ min y fue recolectado en tubos de polipropileno y liofilizado.

Tiempo (m)	% A	%B
0	52	48
20	42	58
20.1	30	70
25	10	90
25.1	52	48
35	52	48

A: H₂O, 0.1% TFA

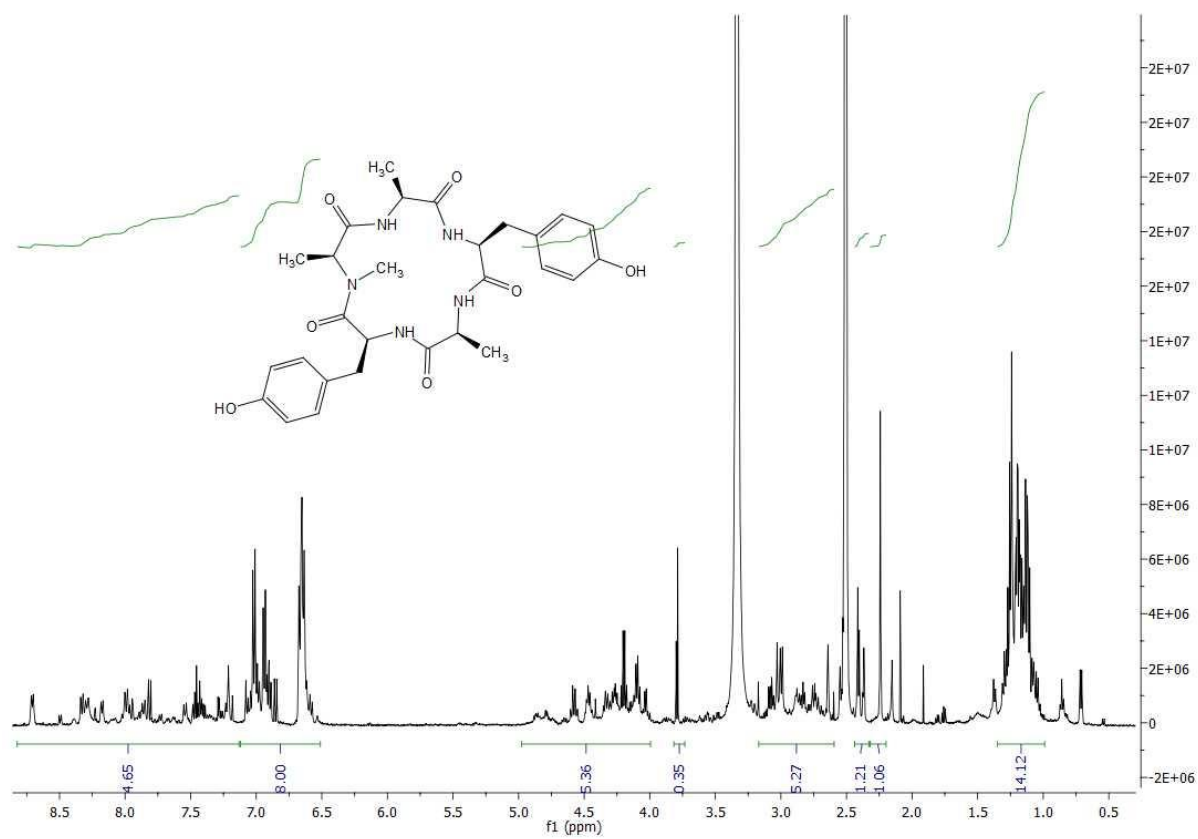
B: CH₃CN, 0.1 % TFA

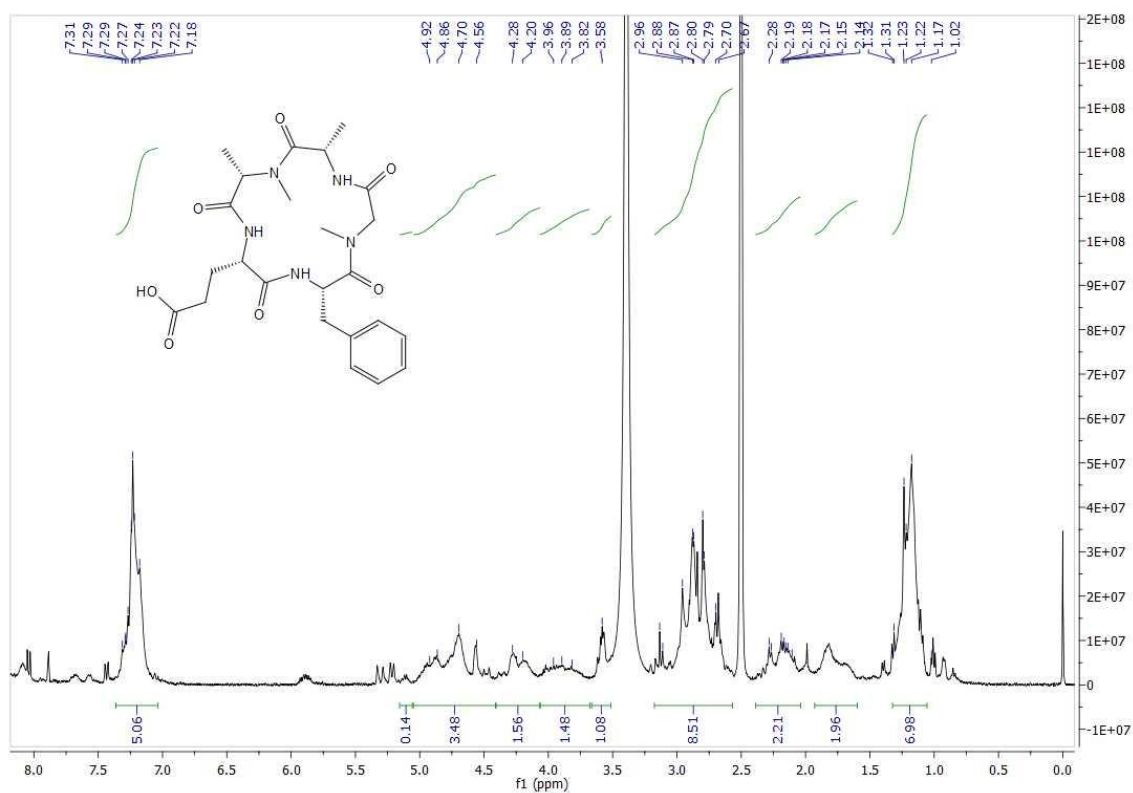
Cyclo-[Cys-NMe-Ala-Cys(Bn)-NMe-Ala-Thr(Bn)-Gly] (51C): sólido blanco (13 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.19 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 1.42 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.53 (m, 4H), 2.71 (m, 3H), 2.78 (s, 3H), 3.00 (m, 1H), 3.15 (s, 3H), 3.53 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H), 3.58-3.66 (m, 1H), 3.77 (s, 2H), 4.35 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.47 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.52-4.60 (m, 2H), 4.74 (dd, *J* = 17.4, 8.7 Hz, 1H), 4.88-5.01 (m, 2H), 5.26-5.33 (m, 1H), 6.19 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.66 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.24 (m, 2H), 7.27-7.38 (m, 8H), 7.55 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 12.9, 14.7, 17.7, 25.7, 29.0, 34.5, 37.2, 39.2, 41.6, 49.2, 50.7, 56.0, 58.8, 61.9, 71.7, 73.6, 127.3 (2 C), 127.6 (2C), 127.8, 128.4 (2C), 128.7, 129.0 (2 C), 138.1, 138.2, 169.0, 170.0, 170.4, 170.5, 170.8, 171.3. HRMS *m/z* calc. for C₃₄H₄₇N₆O₇S₂ ([M+H]) 715.3, experimental 715.3.

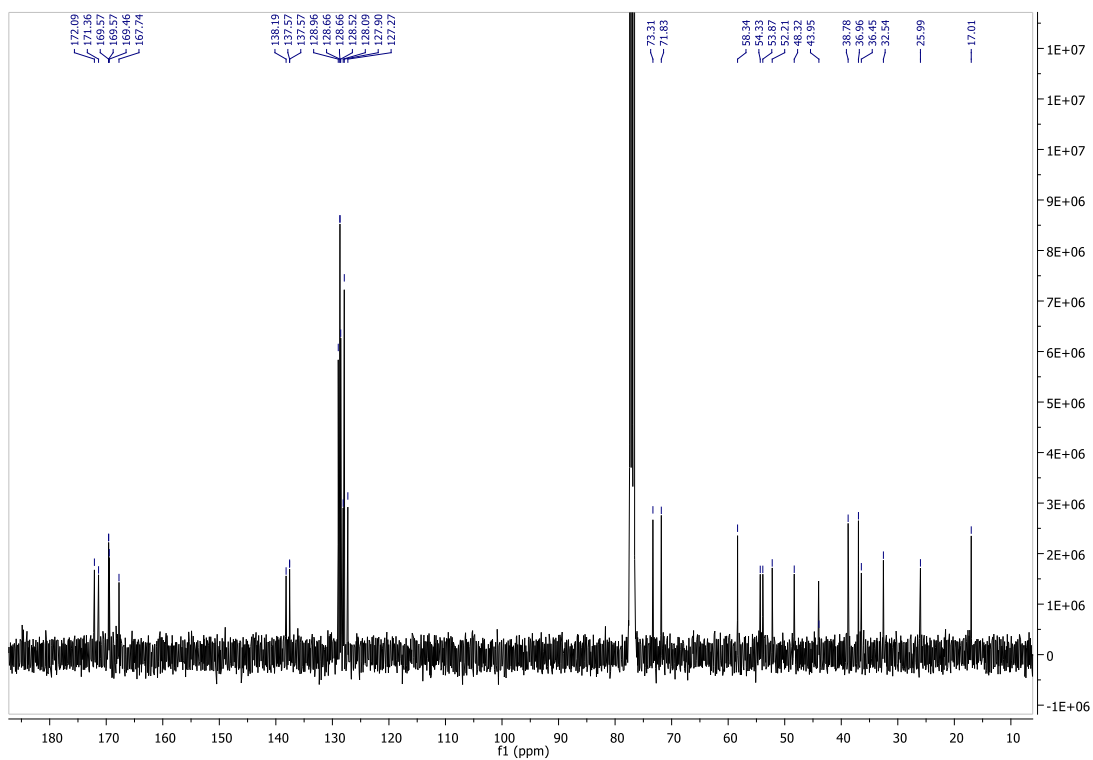
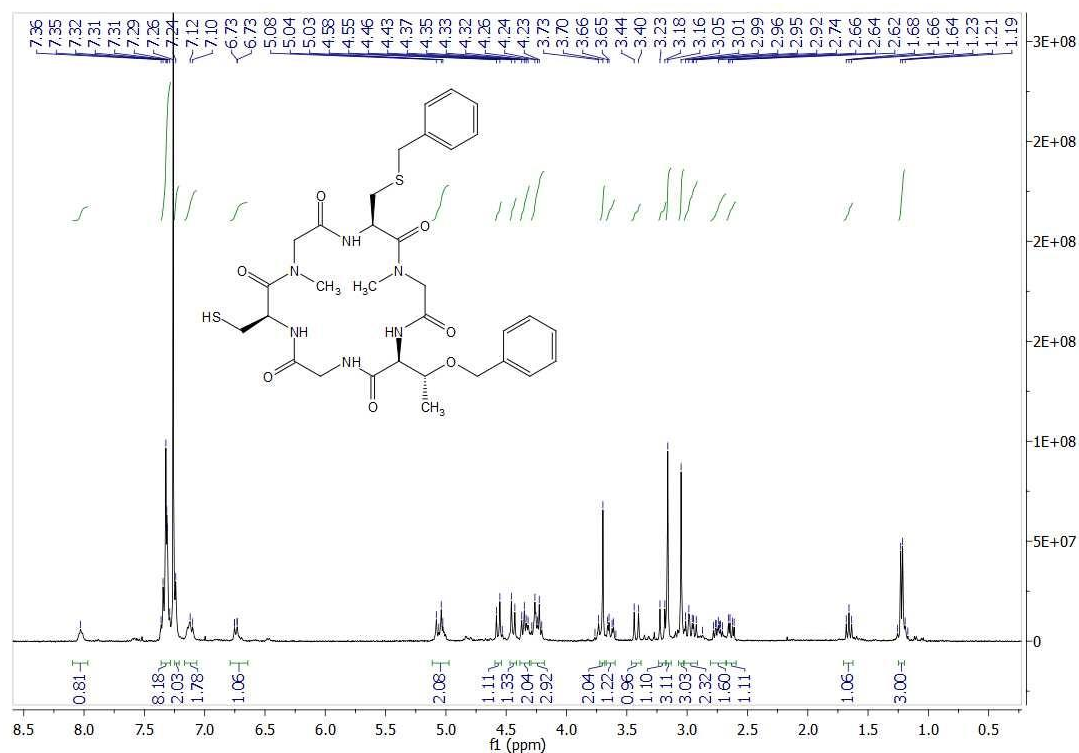
Espectros de ¹H, ¹³C NMR, LC-MS y cromatogramas de los compuestos obtenidos

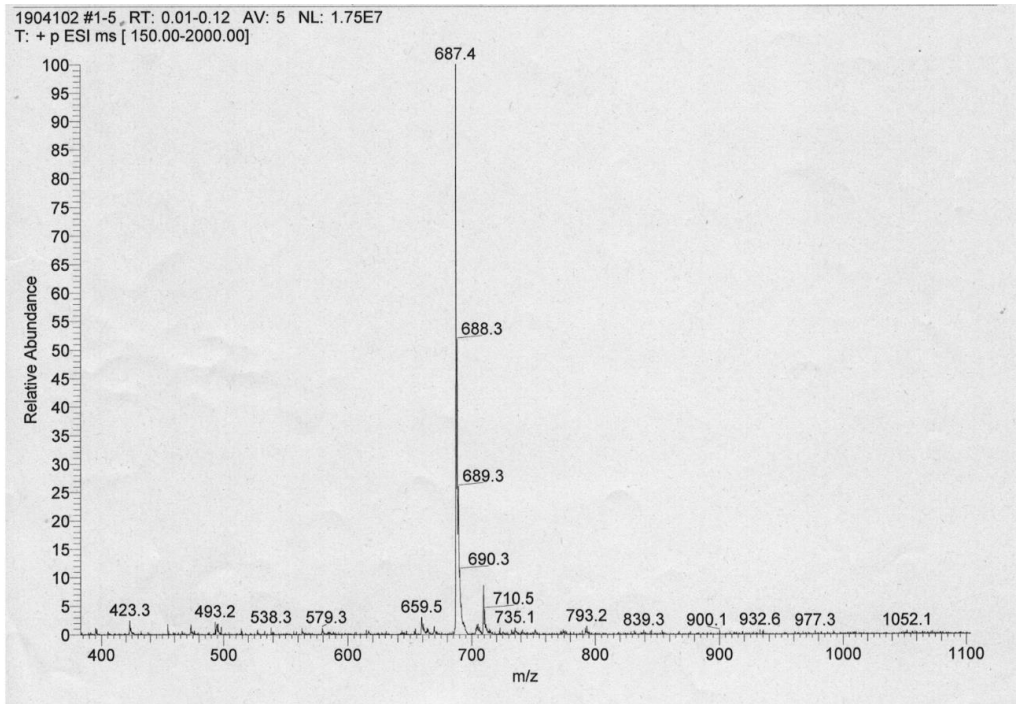
47C: Ciclo-[NMeAla-Tyr-Ala-Try-Ala]

¹HRMN en DMSO-d₆

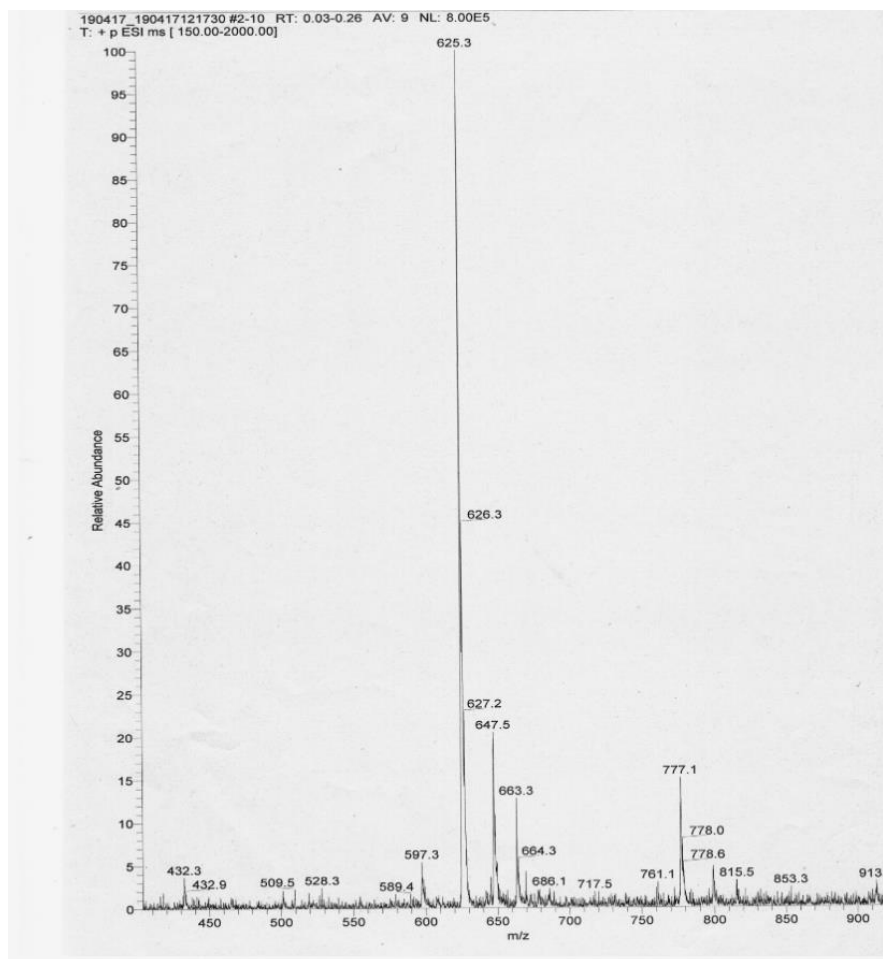


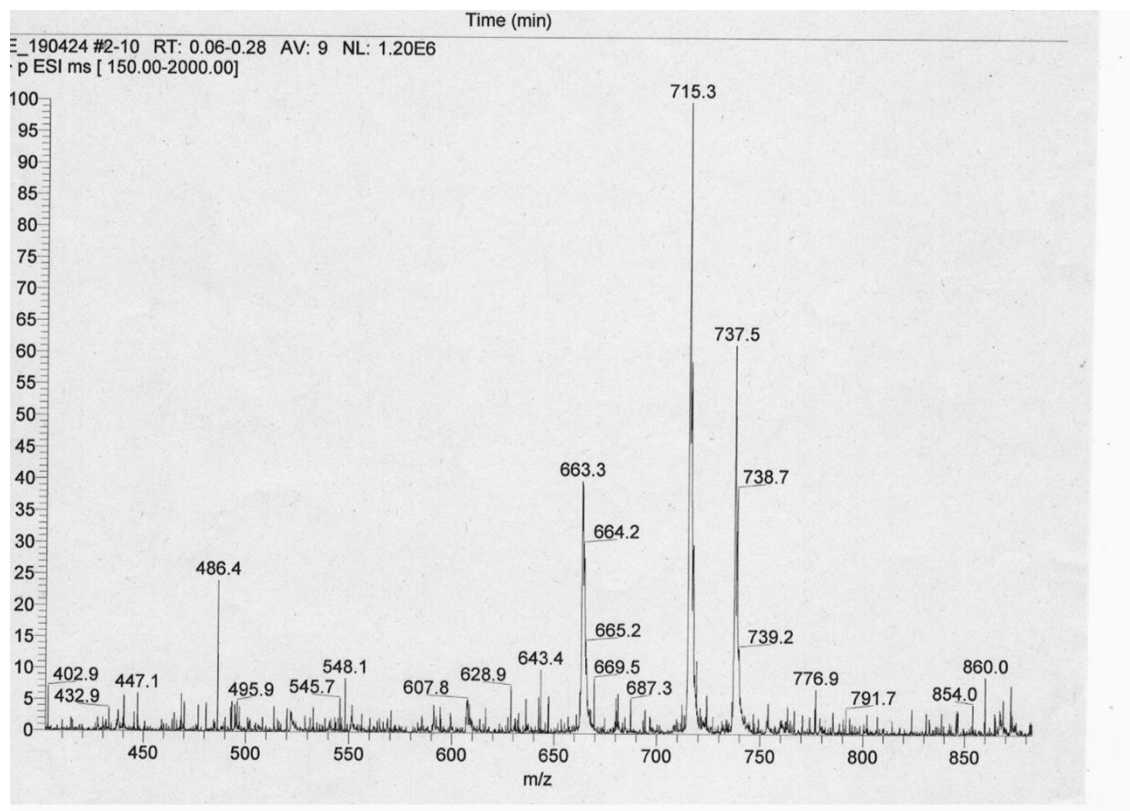
48C: *Ciclo*-[Phe-NMeAla-Ala-NMeAla-Glu]¹H RMN en DMSO-d₆

49C: Ciclo-[Cys-NMe-Gly-Cys(Bn)-NMe-Gly-Thr(Bn)-Gly]RMN en CDCl₃**ESI-MS: Ciclo-[Cys-NMe-Gly-Cys(Bn)-NMe-Gly-Thr(Bn)-Gly]**



5. Síntesis y Ciclación de Péptidos en Fase Sólida





CAPÍTULO 6

Evaluación biológica
de los compuestos
obtenidos



6. Evaluación biológica de los compuestos obtenidos

6.1. Introducción

En el presente capítulo se describe la evaluación de los compuestos obtenidos frente a los parásitos *P. falciparum* y *T.b.brucei*, además de los estudios de citotoxicidad realizados sobre los compuestos que mostraron actividad, y los ensayos de actividad insecticida frente a larvas de *Anopheles gambiae* y de inhibición de Mpro, proteasa principal de Sars-Cov2.

En el caso de *P.falciparum*, se utilizó la cepa sensible a cloroquina 3D7 en fase anillo, es decir trofozoitos inmaduros, que son una forma intraeritrocitaria (ver capítulo 1) y el ensayo de tinción de ADN SYBR Green.

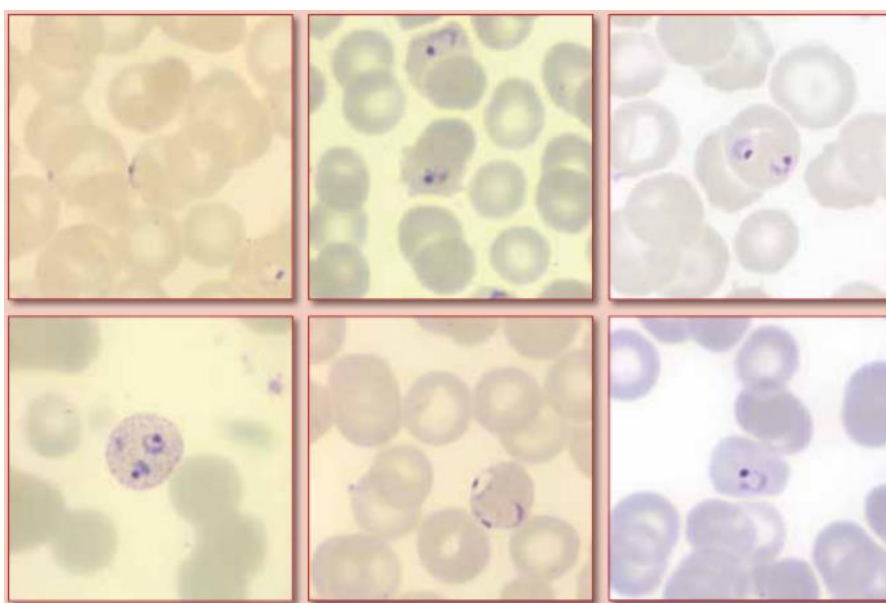


Figura 6.1. microfotografías de extensiones finas teñidas con Giemsa que muestran (en el sentido de las agujas del reloj, empezando por el extremo superior izquierdo): trofozoítos inmaduros (fase de anillo) de 1) *Plasmodium falciparum*, 2) *Plasmodium vivax*, 3) *Plasmodium malariae* y 4) *Plasmodium ovale*, y trofozoítos maduros de 5) *Plasmodium falciparum* y 6) *Plasmodium vivax*.

En cuanto a *T. brucei brucei*, se realizó un screening primario sobre la línea 5141313-clon BB3, a una concentración de 10 μ M, para identificar los compuestos potencialmente activos y luego determinar su EC₅₀.

Por otra parte, se estudió la posible actividad larvicida de los compuestos frente a larvas de *Anopheles gambiae* en su tercer estadio. Estos ensayos fueron realizados por el grupo del Prof. Josphat Matasyoh de la Universidad de Egerton. Las larvas se incubaron con la solución de prueba y alimento para peces tetramin (Tetra). La mortalidad y supervivencia se establecieron luego de 24 horas de exposición. La viabilidad de las larvas se determinó por observación directa, considerándose muertas al no responder a movimientos suaves. El control negativo fue 1% de DMSO en agua de río, y el control

positivo fue el larvicida piretroide pylarvex® (Pyrethrum Board of Kenya). Como se comentó en el capítulo 1, se ha detectado que existe desarrollo de resistencia por parte del mosquito a este tipo de insecticidas que son actualmente utilizados, por lo que la búsqueda de nuevas formas de control del vector de la malaria es un desafío actual.

En último lugar, a raíz de la situación que se desarrolló desde el 2020, todos los compuestos sintetizados durante esta tesis se utilizaron en un *screening* virtual, realizado por el Dr. Alan Talevi de la Universidad Nacional de la Plata, para evaluar su potencial actividad inhibitoria de la principal proteasa de Sars-CoV2, MPro.

Las proteasas son proteínas que constituyen blancos validados de diversos organismos patógenos para el desarrollo de terapias virales y anti-parasitarias (apicomplejos, helmintos, tripanosomátidos), dado que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis, así como factores de virulencia que cumplen funciones esenciales como facilitar la invasión de tejidos, evadir la respuesta inmune, activar respuesta inflamatoria y la apoptosis.^{1,2} En el caso de los virus de ARN, como los coronavirus, las proteasas resultan esenciales para la replicación del virus ya que escinden las poliproteínas virales en sus componentes/proteínas individuales.³

Los compuestos seleccionados mediante dicho *screening* se sometieron a ensayos de inhibición, realizados en el Insitut Pasteur de Montvideo, para lo cual las formas recombinantes de las proteasas Mpro y PLpro de SARS-CoV2 fueron expresadas y purificadas de acuerdo a protocolos previamente establecidos. La actividad de las proteasas en presencia (10 µM) de los compuestos se monitoreo empleando como sustratos péptidos conjugados a fluoróforos.

6.2. Resultados y discusión

6.2.1. Evaluación frente a *P. falciparum* 3D7

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos para todos los compuestos que fueron evaluados frente a la cepa sensible a cloroquina *P. falciparum* 3D7. Estos estudios fueron realizados por el grupo del Prof. Rafael Guido en el Instituto de Física de São Carlos, USP.

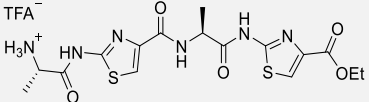
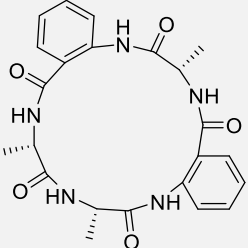
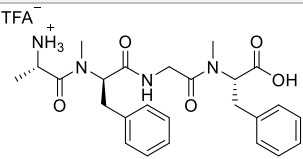
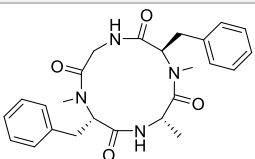
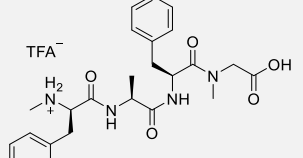
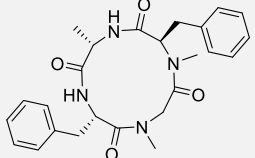
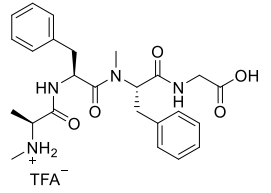
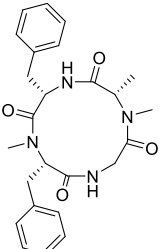
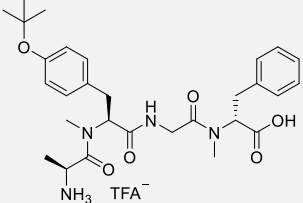
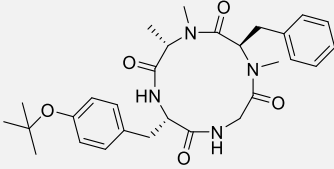
De forma resumida, una alícuota de los cultivos *in vitro* se ajustan a un 0.5% de parasitemia y 2% de hematocrito, y el parásito se incuba con diluciones seriadas del compuesto a evaluar durante 72 horas en placas de 96 pocillos. Luego de transcurrido este tiempo, los glóbulos rojos se lisan y se agrega el marcador de ADN SYBR Green I, para marcar los parásitos viables. La fluorescencia de las

¹ Agbowuro, A. A., Huston, W. M., Gamble, A. B. & Tyndall, J. D. A. *Med. Res. Rev.* **2018**, *38*, 1295.

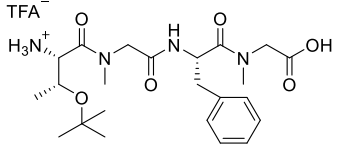
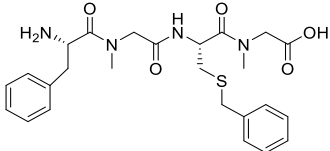
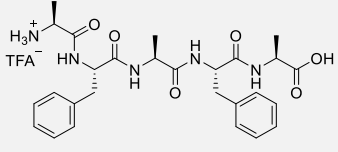
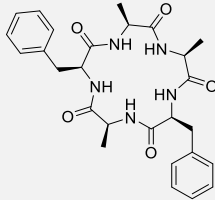
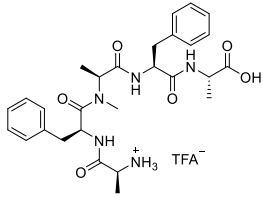
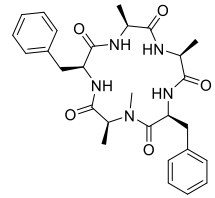
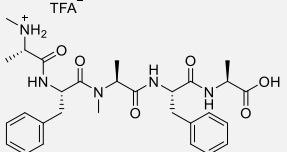
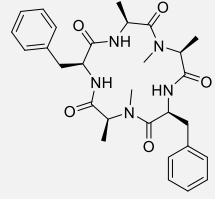
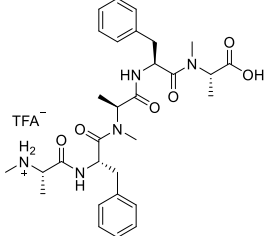
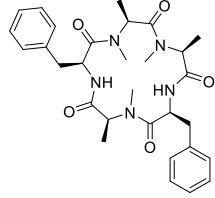
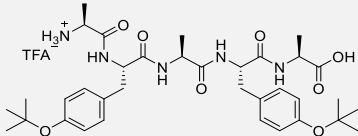
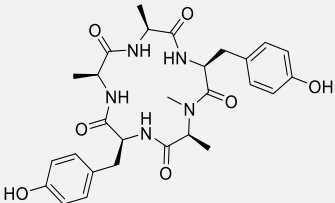
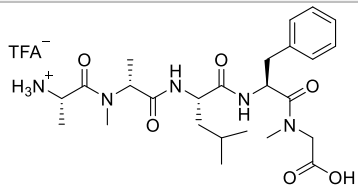
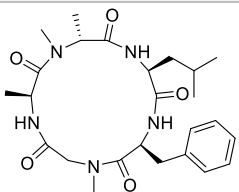
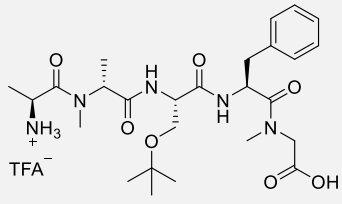
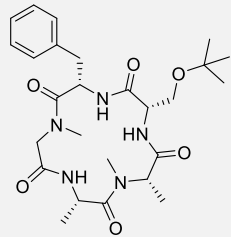
² Salvesen, Guy S, M. D. **2010**, *9*, 690.

³ Dai, W.; Zhang, B.; Jiang, X-M.; Su, H.; Li, J.; Zhao, Y.; Xie, X. *Science* **2020** *368*, 1331.

placas se mide ($\lambda_{\text{abs}} = 485 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emi}} = 535 \text{ nm}$) y la viabilidad de los parásitos en cada pocillo se calcula y normaliza en relación a la intensidad de dos controles: glóbulos rojos sin parásitos (0% de viabilidad) y glóbulos rojos conteniendo parásitos a los que no se les agregó el compuesto a evaluar (100% de viabilidad). Los compuestos a evaluar se disuelven en DMSO y se preparan soluciones stock de concentración 20 mM que luego son diluidas. Se usa una concentración de 10 μM para determinar qué compuestos son activos, y se obtienen curvas de concentración-respuesta para cada compuesto. La concentración inhibitoria máxima media (IC_{50}) se obtiene a partir de la curva sigmoïdal de los gráficos obtenidos. Los ensayos se realizan por duplicado. Los compuestos con actividad en el rango bajo micromolar se someten a ensayos de citotoxicidad utilizando células HepG2. De esta forma se define el índice de selectividad como el cociente $\text{IC}_{50}\text{HepG2}/\text{IC}_{50}\text{3D7}$.

	Compuesto	IC_{50}	Compuesto	IC_{50}	
37		>10 μM	30C		>10 μM
11L		>10 μM	11C		(1.5±0.3) μM
12L		>10 μM	12C		>10 μM
13L		>10 μM	13C		>10 μM
14L		>10 μM	14C		(3.1±0. >3) μM

6. Evaluación biológica de los compuestos obtenidos

15L		>10 μM	16L		>10 μM
17L		>10 μM	17C		>10 μM
18L		>10 μM	18C		>10 μM
19L		>10 μM	19C		>10 μM
20L		>10 μM	20C		>10 μM
21L		>10 μM	47D		>10 μM
22L		>10 μM	22C		>10 μM
23L		>10 μM	23C		>10 μM

42L		>10 μM	42C		>10 μM
43L		>10 μM	43C		>10 μM
44L		>10 μM	44C		>10 μM
49C		>10 μM	50C		>10 μM
25L		(5 \pm 1) nM	25C		(30 \pm 6) nM

Tabla 6.1. Evaluación frente a *P. falciparum* 3D7. Control positivo Artesunato $\text{IC}_{50} = (0.012 \pm 0.003) \mu\text{M}$

Como puede observarse, ninguno de los pentapéptidos lineales o cíclicos mostró actividad significativa frente a *P. falciparum* 3D7, incluyendo los productos naturales Versicotide A y B. Por su parte, el ciclotetrapéptido Versicotide D mostró una IC_{50} de 1.5 μM contra el parásito, y su análogo **14C** una IC_{50} de 3.1 μM con una baja citotoxicidad frente a células HepG2 ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). El índice de selectividad de **14C** por lo tanto es mayor a 29. Por el contrario, los análogos de Versicotide D **12C** y **13C**, que contienen variaciones en la secuencia y posición de los N metilos, fueron inactivos a una concentración de 10 μM . La **figura 6.2** permite visualizar más claramente las modificaciones.

Si bien las modificaciones realizadas no permitieron mejorar la actividad exhibida por el

producto natural versicotide D, los resultados obtenidos sugerirían algunas características que podrían ser esenciales para la actividad. Por ejemplo, la N metilación del nitrógeno 12 podría ser la causa de la inactividad de **12C**. La configuración del carbono 2 también podría ser un factor importante, pero esto se debería comprobar mediante la síntesis de un mayor número de ciclotetrapéptidos realizando una sola modificación a la vez para verificarlo.

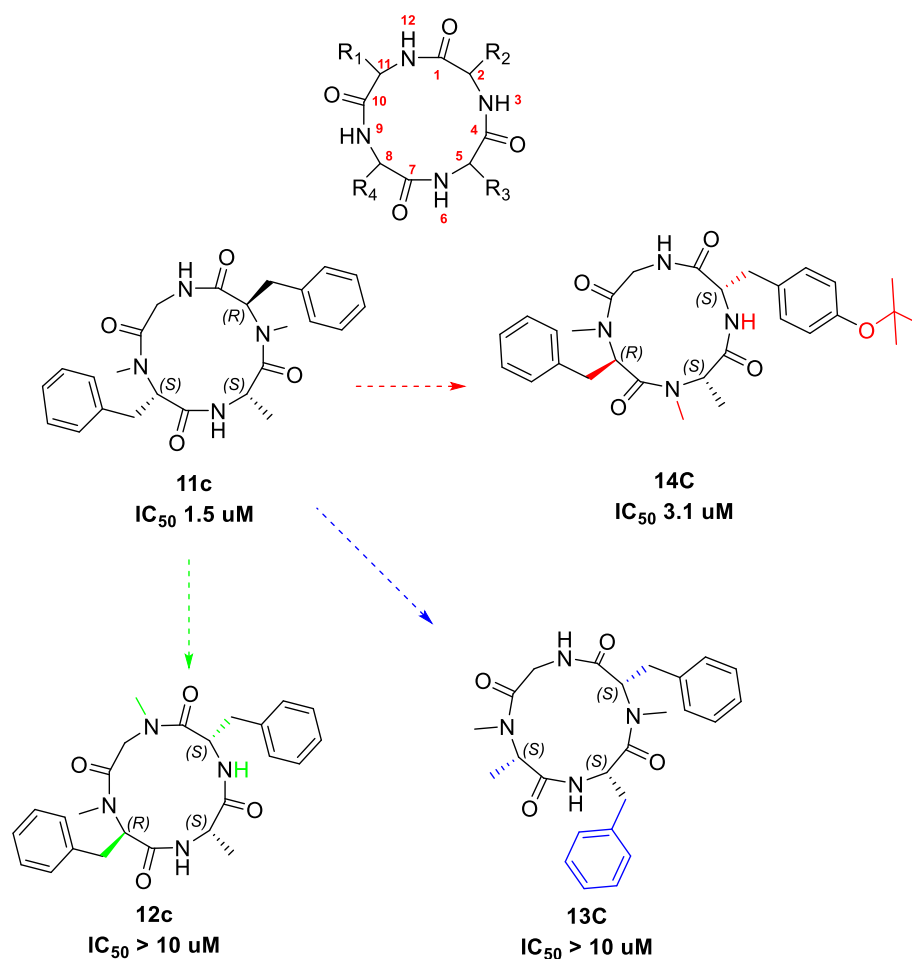


Figura 6.2. comparación de Versicotide D y análogos

Por comparación de **11C** con **14C** (se marca en rojo en **14C**), **Figura 6.2**, se puede concluir que: la presencia de un NMe en 3 o en 6, junto con estereoquímica opuesta en 2 y en 8, además de presencia de O^t Bu en R_2 no parecen afectar de forma muy significativa la actividad contra *P.falciparum*. Sin embargo, por comparación de **13C** con **11C**, el cambio en **11C** de R_3 por Bn y de R_4 por Me junto con el cambio de estereoquímica en 2, hace que la actividad se pierda. Por otro lado, por comparación de **11C** con **12C**, el cambio de NMe en 3 o en 12 junto con el cambio de estereoquímica en 2 y en 8 afectan de manera significativa en la actividad.

Por comparación de **14C** con **12C**, **Figura 6.3**, la presencia de NMe en posición 6 y de O^t Bu en R_2 , junto con NH en lugar de NMe en posición 12 incrementa la actividad.

Dado que 1C tampoco contiene NMe en posición 6 parecería que esto sería un requerimiento para

exhibir actividad y la presencia de NMe en posición 12 sería perjudicial.

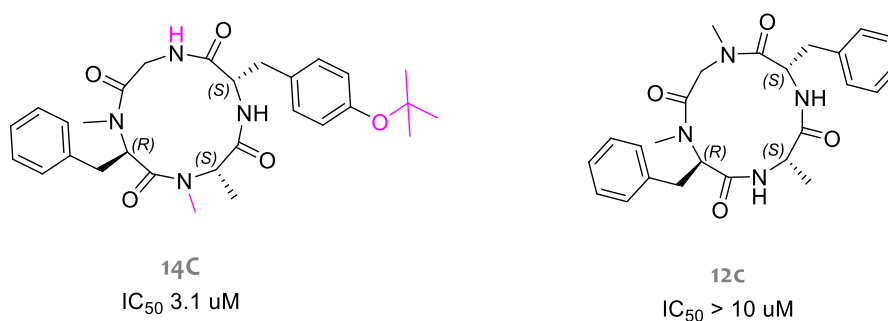


Figura 6.3. comparación de ciclotetrapéptidos análogos a Versicotide D

Los ciclohexapéptidos sintetizados mediante la metodología de Native Chemical Ligation, cuya secuencia se diseñó en base a los compuestos con actividad nanomolar frente a este parásito reportados en la tesis de C.Fagúndez; **37** y **47**,⁴ no mostraron actividad frente a *P.falciparum* 3D7. Para determinar si esto se debe a las variaciones en los grupos protectores de los tioles o a la posición de los N metilos se sintetizó **25C** a partir de su precursor lineal **25L**. La evaluación de estos compuestos arrojó un IC_{50} de 30 y 5nM respectivamente. A diferencia de lo que se había observado anteriormente por nuestro grupo, donde los ciclohexapéptidos habían mostrado mayor actividad que sus precursores abiertos, **25L** muestra una mayor potencia que **25C** frente a *P. falciparum*. Ninguno de los dos fue citotóxico sobre la línea celular HepG2 y mostraron buena selectividad (>690 y 16800 respectivamente). Esto confirma la importancia de los grupos tritilo sobre la actividad. Estos compuestos también mostraron buena actividad frente a *T.b.brucei* y se está determinando su EC_{50} .

Por otra parte, Versicotide C demostró ser inactivo.

Debido a retrasos experimentados el último año, los resultados de evaluación del resto de los compuestos sintetizados, y el resultado de citotoxicidad de Versicotide D continúan pendientes.

6.2.2. Evaluación frente a *T. brucei brucei*

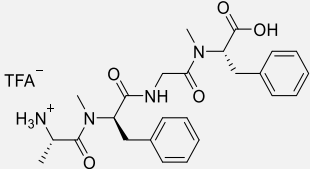
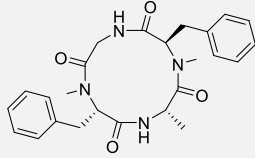
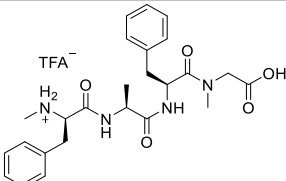
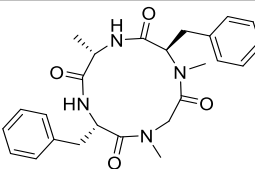
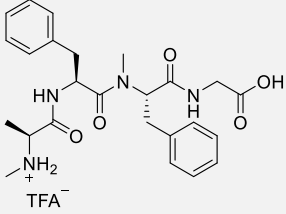
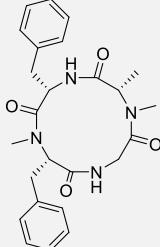
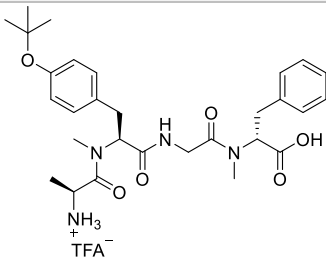
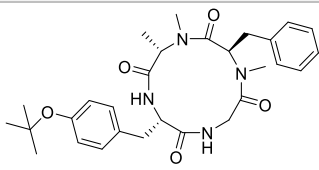
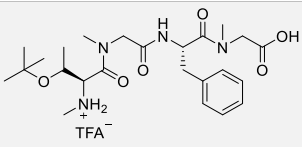
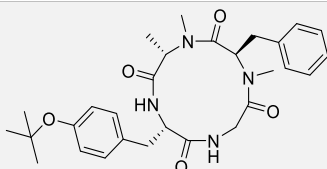
En la siguiente tabla se listan todos los compuestos que fueron evaluados frente a *T. brucei brucei* línea 5141313-clon BB3, a una concentración de 10 μ M. Estos estudios fueron llevados a cabo por la Dra. Estefanía Dibello y el Dr Marcelo Comini en el Instituto Pasteur de Montevideo, siguiendo protocolos estandarizados por el grupo⁵.

Para realizar el screening de una biblioteca de 141 compuestos se utiliza el protocolo de bioluminiscencia estandarizado (ver parte experimental). Se preparan soluciones de los compuestos

⁴ "Síntesis de Ciclopéptidos Análogos a Productos Naturales como Potenciales Antiparasitarios". Catherine Fagúndez. Tesis Doctoral **2018**, Facultad de Química, UdelaR.

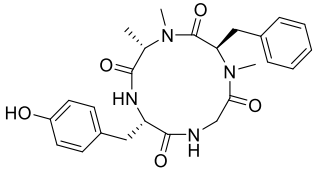
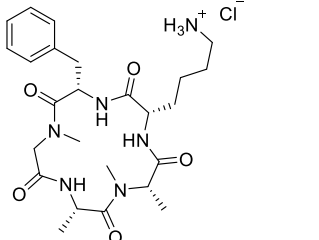
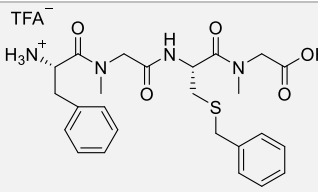
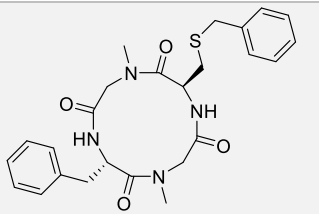
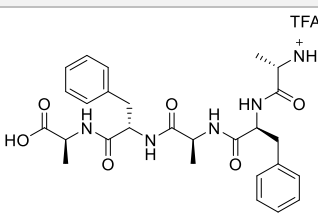
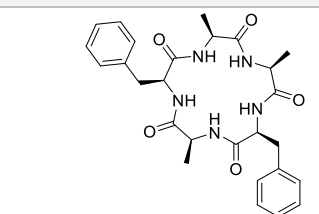
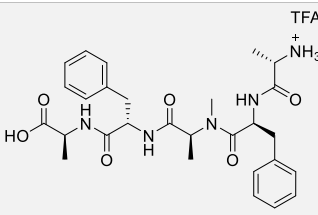
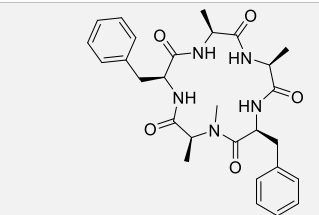
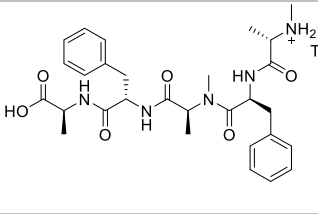
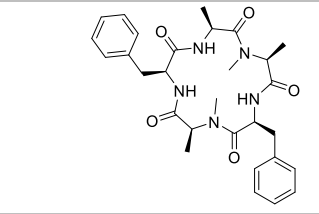
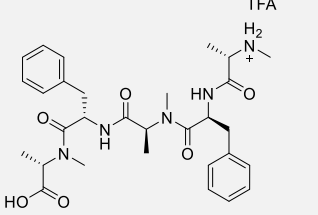
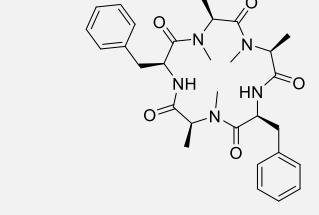
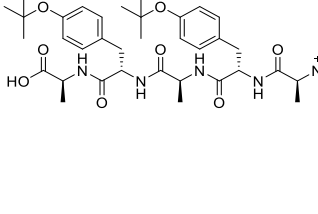
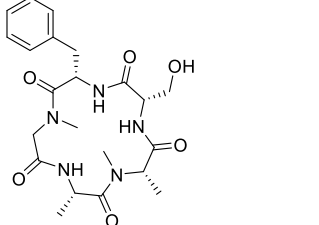
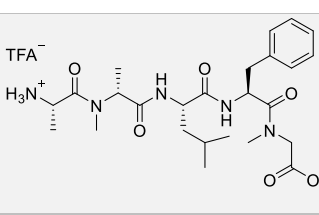
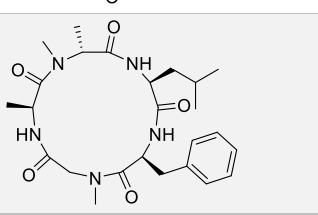
⁵ Benítez, D.; Dibello, E.; Bonilla, M.; Comini, M.A. *Drug Dev Res* **2020**, 1.

a 1 mM en 100% vol/vol DMSO) y se llevan a una concentración final de 10 μ M (1% vol/vol DMSO). Se hacen tres réplicas. Siguiendo las guías de *The Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi)*, organización que lidera descubrimientos tempranos para enfermedades olvidadas, un compuesto se considera un *hit* para tripanosomiasis Africana humana si presenta una $EC_{50} \leq 10 \mu$ M contra la forma que circula en sangre de subespecies de *T.brucei*.⁶ Para un subgrupo de compuestos hit identificados en un screening primario se realiza un análisis de concentración-respuesta, al menos a 7 concentraciones diferentes. Para todos los experimentos Nifurtimox (EC_{50} 6 μ M) y DMSO (1% vol/vol) fueron utilizados como control positivo y negativo respectivamente. Los valores de EC_{50} se calculan a partir de las curvas de concentración – respuesta obtenidas.

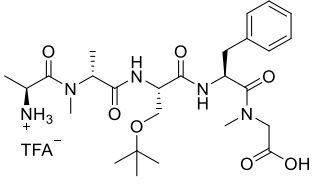
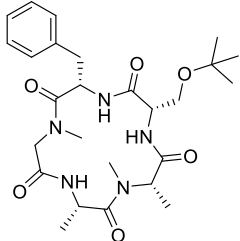
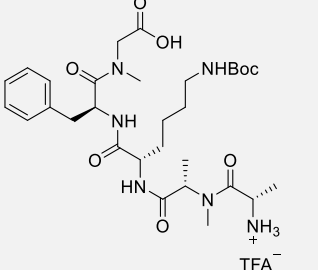
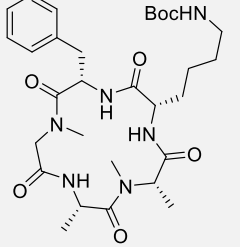
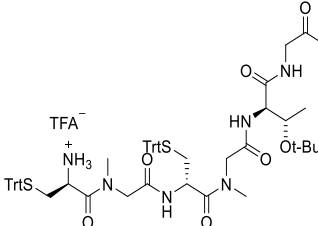
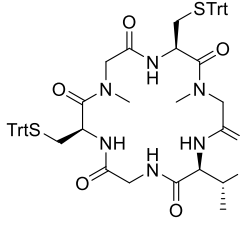
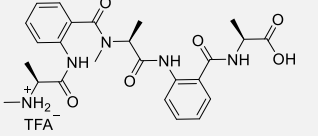
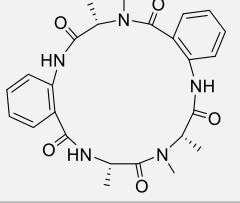
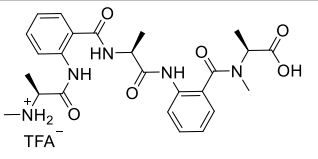
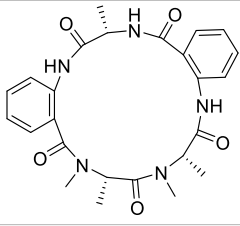
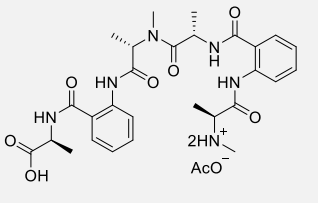
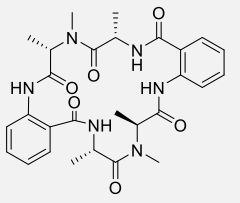
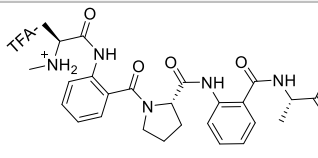
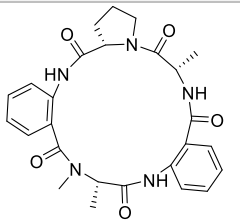
	Compuesto	%supervivencia \pm SD (10 μ M)	Compuesto	%supervivencia \pm SD (10 μ M)	
11L		96.7 \pm 8.6	11C		75.3 \pm 6.7
12L		101.3 \pm 5.03	12C		93.0 \pm 7.6
13L		41.6 \pm 4.0	13C		84.4 \pm 5.9
14L		51.5 \pm 1.0	14C		78.1 \pm 14.3
15L		63.0 \pm 8.7	15C		34.7 \pm 9.6

⁶ Don, R; Loset, J.R. *Parasitology*. 2014, 141, 140.

6. Evaluación biológica de los compuestos obtenidos

15D		54.3 ± 14.3	24D		48.9 ± 7.4
16L		83.3 ± 15.9	16C		42.6 ± 5.4
17L		100.2 ± 10.4	17C		82.7 ± 7.7
18L		94.4 ± 6.2	18C		91.6 ± 7.9
19L		89.5 ± 5.0	19C		97.2 ± 6.2
20L		84.4 ± 3.4	20C		86.1 ± 4.2
21L		107.9 ± 4.2	23D		59.7 ± 15.2
22L		49.7 ± 8.6	22C		89.6 ± 9.5

6. Evaluación biológica de los compuestos obtenidos

23L		44.2 ± 5.4	23C		98.1 ± 7.1
24L		45.6 ± 6.6	24C		37.4 ± 0.9
25L		2.3 ± 0.6	25C		-0.3 ± 0.4
42L		67.1 ± 0.5	42C		101.5 ± 4.6
43L		46.0 ± 3.7	43C		44.1 ± 13.4
44L		42.5 ± 0.2	44C		89.7 ± 12.5
45L		46.5 ± 18.0	45C		36.4 ± 8.3

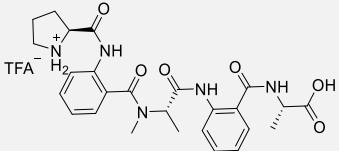
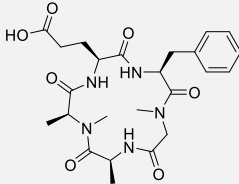
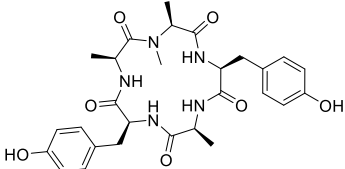
46L		51.0 ± 9.7	48C		77.3 ± 2.9
47C		101.3 ± 5.03			

Tabla 6.2. Evaluación frente a *T. brucei brucei* línea 5141313-clon BB3. Control positivo Nifurtimox, $IC_{50} = (5.31 \pm 0.44) \mu M$

Como puede observarse, en el ensayo preliminar, con algunos compuestos se observó un porcentaje de supervivencia del parásito menor a 50% a $10 \mu M$; entre estos se encuentran los Versicotides B y F (43C y 44C) y los ciclopéptidos 15C y 24C. Con respecto a 24C, su precursor 24L y su derivado, producto de la desprotección del NHBoc, muestran un % de supervivencia similar. Ninguno de estos compuestos causó la muerte de la totalidad de los parásitos a dicha concentración, contrariamente a lo observado para 25L y 25C. Por esto último, se determinó el EC_{50} del ciclohexapéptido **25C**, análogo al compuesto **37** de la tesis de C.Fagundez⁴, junto con su precursor lineal, **25L**. Se observó una actividad en el orden bajo micromolar siendo el compuesto cíclico tres veces más activo (tabla 6.3).

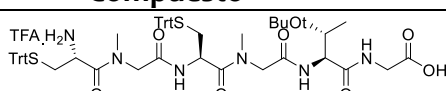
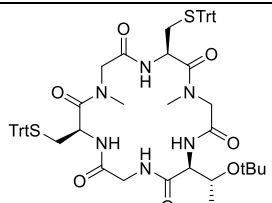
Compuesto		EC_{50}
25L		$(6.18 \pm 0.02) \mu M$
25C		$(2.4 \pm 1.12) \mu M$

Tabla 6.3. Determinación de EC_{50} de **25L** y **25C**.

6.2.3. Estudio de actividad insecticida

La evaluación sobre larvas de mosquito *Anopheles gambiae*, vector responsable de la transmisión de parásitos del género *Plasmodium*, fue realizada por el grupo del Prof. Josphat Matasyoh de la Universidad de Egerton. En primer lugar, se llevó a cabo una evaluación preliminar con 1 mg de cada uno de los 14 compuestos enviados (**17-21**). En la misma solo demostraron ser potencialmente activos algunos péptidos lineales. Dado que los ensayos de determinación de LC_{50} requieren una cantidad

importante de muestra: 400 mg teniendo en cuenta los resultados, se seleccionaron 3 compuestos. En la tabla 6.4 se muestran los resultados obtenidos.



Figura 6.4. Imágenes de los ensayos realizados sobre larvas de *Anopheles gambiae*.

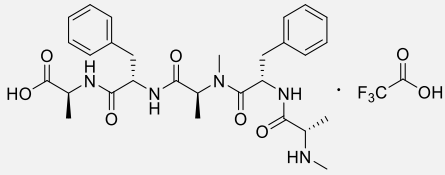
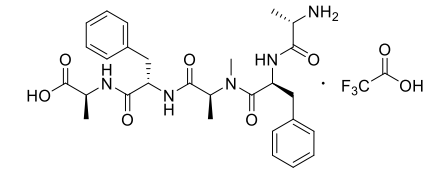
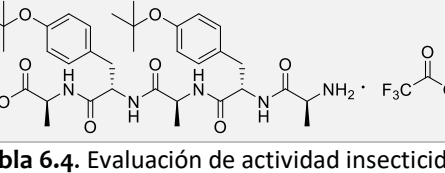
	Compuesto	LC ₅₀ (ppm)	LC ₉₅ (ppm)
19L		146.80	324.88
18L		1020.23	inactivo
21L		--	--

Tabla 6.4. Evaluación de actividad insecticida frente a larvas de *Anopheles gambiae*. Control positivo pylarvex®, LC₅₀=3.7 ppm

Para el último caso (21L) no fue posible determinar los valores de LC₅₀ y LC₉₅ debido a que la solubilidad del compuesto no permitió realizar las diluciones seriadas necesarias, por lo cual no fue posible aplicar el análisis Probit para calcular dichos valores. Sin embargo, se muestran a continuación los valores de porcentaje de mortalidad vs concentración obtenidos. Se puede observar que, a iguales concentraciones, éste compuesto muestra un porcentaje de mortalidad mayor que el pentapéptido de secuencia Ala-Phe-NMeAla-Phe-Ala (18L).

	Concentración (ppm)	Mortalidad	% mortalidad
--	---------------------	------------	--------------

		promedio	
21L	250.00	1.67	8.33
	500.00	1.33	6.66
	750.00	1.67	8.33
	1000.00	13.00	65.00
	1500.00	18.67	93.33
	2000.00	20.00	100.00
18L	63.00	0.34	1.66
	125.00	0.34	1.66
	250.00	1.00	5.00
	500.00	1.33	6.66
	750.00	1.67	8.33
	1000.00	1.67	8.33
	1500.00	2.67	13.33
	2000.00	8.00	40.00

Tabla 6.5. Porcentaje de mortalidad vs concentración de **21L** y **18L**

Tomando como control positivo el larvicida comercial pylarvex®, que tiene valores de LC₅₀ y LC₉₅ de 3.7 y 7.8 ppm respectivamente, es posible concluir que el primero de estos compuestos, **19L**, presenta actividad, mientras que el segundo sería inactivo contra la larva del mosquito *Anopheles gambiae*.⁷ Estos datos resultan interesantes como punto de partida para la síntesis de nuevos péptidos que puedan tener esta aplicación y la realización de optimización estructural. Sin embargo, el requerimiento de grandes cantidades de muestra para la evaluación, limita este tipo de estudios.

6.2.4. Ensayos de inhibición de MPro de Sars-Cov2

Como se comentó anteriormente estos ensayos estuvieron a cargo del grupo del Dr. Marcelo Comini del Instituto Pasteur de Montevideo, y se llevaron a cabo sobre compuestos seleccionados en base a un screening virtual realizado previamente por el Dr. Alan Talevi de la Universidad Nacional de La Plata

⁷ a) Talontsi, F.M.; Matasyoh, J.C.; Ngoumfo, R.M.; Chepkorir, R. *Pesticide Biochem. Physiol.* **2011**, 99, 82. b) Matasyoh, J.C.; Wathuta, E.M.; Kariuki, S.T.; Chepkorir, R. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, **2011**, 14, 26.

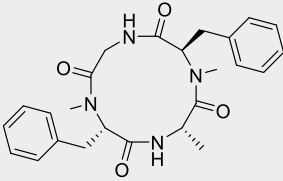
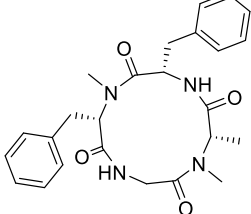
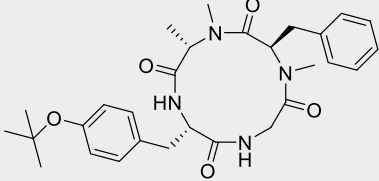
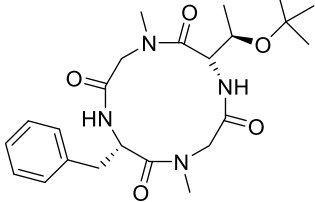
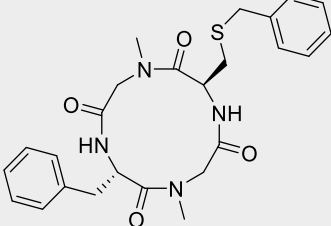
	Compuesto	% de actividad de MPro a 10 μ M
11C		100
13C		100
14C		100
15C		100
16C		100

Tabla 6.6. Resultados de evaluación de actividad inhibitoria de MPro.

Como puede observarse, a pesar de que la gran mayoría de los ciclótetrapéptidos sintetizados fueron evaluados positivamente de manera virtual, no presentaron la capacidad inhibitoria esperada sobre la enzima MPro en los ensayos *in vitro*.

6.3. Conclusiones

Ninguno de los productos naturales Versicotide A-C, o sus análogos mostró actividad frente a *P.falciparum* 3D7 o *T.b.brucei*. Sin embargo, el ciclótetrapéptido natural conteniendo un aminoácido de configuración D y dos N metil aminoácidos, Versicotide D, mostro un IC₅₀ de 1.5 μ M. Entre las

modificaciones propuestas se identificó un nuevo compuesto con actividad contra este parásito, que mantiene un residuo de NMe-D-Phe en su estructura. Si bien la información obtenida con la biblioteca de compuestos sintetizado es insuficiente para realizar una aproximación a la relación estructura actividad para estos ciclotetrapéptidos, se identificaron modificaciones que causan pérdida total de la actividad lo cual es sumamente útil para continuar realizando nuevas modificaciones

De los ciclohexapéptidos sintetizados, únicamente **25L** y **25C** mostraron actividad frente a *T.b.brucei* y *P.falciparum*, demostrándose la importancia de los grupos tritilo sobre la actividad antiparasitaria. La EC₅₀ frente a *T.b.brucei* fue del orden bajo micromolar, siendo el compuesto cíclico tres veces más activo que el lineal. Por su parte la IC₅₀ frente a *P.falciparum* fue del orden nanomolar, y se destaca la mayor actividad del péptido lineal en comparación con el macrociclo, al contrario de lo que se había observado hasta el momento.

Además, se identificaron dos péptidos con actividad insecticida frente a larvas de *Anopheles gambiae* que constituyen un punto de partida importante para la búsqueda de nuevos compuestos capaces de controlar el desarrollo del vector de la malaria. Como se discutió en el capítulo 1, el desarrollo de resistencia a los insecticidas piretroides por parte de este mosquito motiva esta búsqueda. Las grandes cantidades de muestra necesarias limitaron el número de compuestos evaluados, que debería ampliarse a futuro.

Por último, si bien los compuestos evaluados frente a MPro, principal cisteín-proteasa de Sars-Cov2, no presentaron actividad inhibitoria, resulta interesante que todos los compuestos seleccionados mediante *screening* virtual cuentan con el mismo tamaño de ciclo (12 átomos).

6.4. Parte Experimental

Procedimiento para evaluación in vitro contra *P. falciparum* 3D7

Este ensayo utiliza el colorante de ácidos nucleicos SYBR Green I. Se prepararon dos soluciones madre de los compuestos: solución A (dilución de la muestra en polvo) a 20 mM, y solución B a 1 mM (preparada por dilución de la solución A). A continuación, los compuestos se diluyeron 100 veces (concentración del compuesto = 10 µM), luego, se transfirió el volumen adecuado de solución del producto en la placa de ensayo SYBR GREEN (concentración final = 10 – 0.15 µM) (ver **Figura 6.5.**). si los compuestos muestran una actividad mayor, la concentración inicial se reduce para determinar los valores de CI50. condiciones del ensayo: hematocrito al 2%, parasitemia inicial 0,5% y artesunato y piremetamina como control positivo. El valor de IC₅₀ de cada compuesto se evaluó en al menos dos experimentos independientes. Las muestras se distribuyeron en la placa y en una línea se colocan los controles de eritrocitos infectados y no infectados. Se mide la fluorescencia de las muestras en los distintos pozos.

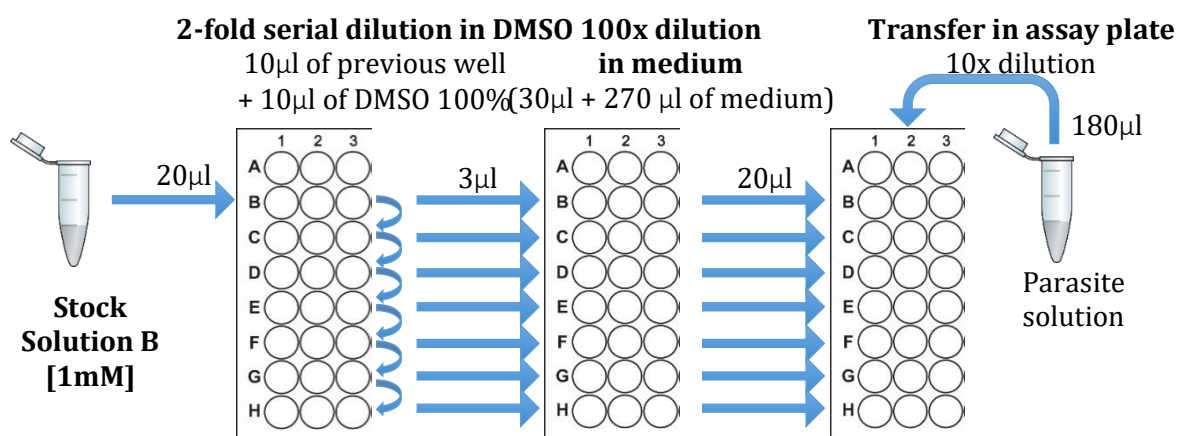


Figura 6.5. Esquema del procedimiento utilizado para el ensayo de actividad sobre *P.falciparum* 3D7

Ensayo de citotoxicidad contra células HepG2

Se utilizó el ensayo del colorante tetrazolium MTT para evaluar la citotoxicidad de los compuestos activos. Brevemente, se distribuyeron las células HepG2 en una placa de 96 pocillos a una concentración de 5×10^4 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas para la adhesión. La solución madre A, del ensayo de *P. falciparum* 3D7, se transfirió a esta placa en el volumen adecuado para concentraciones finales de 100 - 1.5 µM. El ensayo MTT fue realizado comparando con el control negativo (10% de viabilidad) después de 24 horas de incubación y se determinaron los valores de MLC50 para los compuestos.

Procedimiento para evaluación in vitro contra *T.b.brucei*

Ensayo de bioluminiscencia estandarizado

Una suspensión de 1×10^5 parásitos/mL de un cultivo sincronizado (220 µL/pocillo) se agrega a una placa de cultivo de 96 pocillos conteniendo 2.2 µL de DMSO (control negativo) o el compuesto a evaluar disuelto en DMSO a diferentes concentraciones. Se realizan al menos tres réplicas. Las placas se incuban a 37°C y 5% CO_2 durante 24 hs. Luego, 20 µl de cada pocillo se transfieren a una placa negra de 96 pocillos conteniendo en cada uno 20 µl de una solución de D-Luciferin (1.5 mg/ml en PBS glucosa 1% wt/vol) y se agrega Triton X-100 (0.05% vol/vol). La señal de bioluminiscencia se mide cada 8 minutos durante un total de 32 minutos en un iluminómetro de microplaca LUMIstar OPTIMA usando la siguiente configuración: 10 s de agitación, adquisición de 5 s/por pocillo, retraso de medida de 0.2 s, ganancia máxima y 37°C .

Ensayo de actividad larvica contra *Anopheles gambiae*:

Los productos se solubilizaron en dimetilsulfóxido (DMSO ppa, Lobarchemi) y se diluyeron con agua para dar una solución stock de 500 ppm. La concentración de DMSO se mantuvo por debajo del

1%. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los procedimientos estándares establecidos por la OMS (1981) con pequeñas modificaciones: los ensayos se llevaron a cabo en el Instituto de Investigación Médica de Kenia (KEMRI), Centro de Control de Enfermedades (CDC), Kismu, Kenia, donde los insectos se criaron en bandejas de plástico con agua de río. Se mantuvieron a 26 ± 3 °C a y una humedad entre 70 y 75%, y todos los experimentos se llevaron a cabo en estas condiciones.

Se utilizaron larvas de *A. gambiae* en su tercer estadio. Se realizaron 3 réplicas, cada una usando 20 larvas para cada concentración. Las réplicas se realizaron en simultáneo, utilizándose en total 60 larvas para cada concentración.

Las larvas se colocaron en vasos descartables de 50 mL conteniendo 15 mL de la solución de prueba y alimento para peces tetramin (Tetra). La mortalidad y supervivencia se establecieron luego de 24 horas de exposición. Las larvas se consideraron muertas al no responder a movimientos suaves. El número de larvas muertas en las tres réplicas se expresó como porcentaje de mortalidad para cada concentración. El control negativo fue 1% de DMSO en agua de río, y el control positivo fue el larvicida piretroide pylarvex® (Pyrethrum Board of Kenya).



CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Y

PERSPECTIVAS

7. Conclusiones y perspectivas

Las conclusiones específicas para cada objetivo propuesto, fueron expuestas en el capítulo correspondiente, por lo que en éste se presentarán las conclusiones generales de este trabajo.

7.1. Síntesis de ciclopeptidos

El producto natural Versicotide D fue sintetizado exitosamente mediante SPPS de su precursor lineal sobre la resina 2-CTC, y ciclación en solución. Se utilizó HATU para realizar los acoplamientos a N metil aminoácidos.

Para la síntesis de los productos naturales conteniendo ácido antranílico se estudiaron diferentes opciones de rutas sintéticas mediante SPPS o una combinación de SPPS y síntesis en solución. Esto permitió realizar la síntesis de los productos naturales Versicotides A-C y F, conteniendo Anth, con rendimientos buenos o moderados luego de una extensiva búsqueda de la metodología y agentes acoplantes más adecuados. El uso de oxima y DIC proporcionó un método simple para realizar los acoplamientos involucrando la amina aromática del ácido antranílico, en fase sólida, en tiempos cortos y con muy buenos rendimientos, evitando posibles rearrreglos o reacciones secundarias.

Para las macrociclaciones de los Versicotides, en el caso de A y C se realizó utilizando HATU como agente acoplante y para el B se encontró que la combinación de oxima y EDCI proporcionó mejores rendimientos. Por esta razón se utilizó esta última estrategia para la obtención de Versicotide F. Dado que las síntesis de productos naturales conteniendo Anth que fueron previamente descritos en la bibliografía involucran rutas sintéticas largas, complicadas y de bajos rendimientos, consideramos que los métodos utilizados en este trabajo son un importante aporte para estudios relacionados.

Por otra parte, las metodologías estudiadas de SPPS y macrociclación en solución permitieron la obtención de 6 ciclotetrapéptidos, 7 ciclopentapéptidos y un ciclohexapéptido con rendimientos moderados a buenos. También en estos casos, el empleo de oxima/EDCI para la ciclación de diferentes péptidos, arrojó resultados comparables o mejores que el uso de HBTU ó HATU, generando crudos de reacción más fáciles de purificar, por lo que consideramos que puede ser un aporte de interés en el área de macrociclaciones.

Además, se estudiaron metodologías de ciclación sobre resina. Se desarrolló un procedimiento nuevo para la ciclación y el clivaje concomitante de la resina usando reacciones en tándem de transferencia de acilo de N a S y subsecuente NCL intramolecular de péptidos conteniendo N₂EtCys obtenidos mediante Fmoc/SPPS. La misma no utiliza tioles como auxiliares, lo que la convierte

en un procedimiento sencillo con la consiguiente ventaja de una mayor pureza del ciclopeptido obtenido. Dado que no se utilizan agentes activantes en el paso de ciclación el alcance de esta metodología es mayor dado que podría realizarse una desulfurización directa de la cisteína involucrada en la ciclación, y así obtener otros amino ácidos en esa posición. Como perspectiva de trabajo futuro se plantea aplicar esta metodología desarrollada para la obtención de penta y hexapeptidos, para la obtención de ciclopeptidos de mayor tamaño de interés en Química Medicinal.

En resumen, este trabajo constituye un aporte al área de la síntesis de macrociclos peptídicos, compuestos de emergente interés en la búsqueda de nuevos fármacos, entre varios campos de aplicación, tanto en la academia como en la industria.

Por otro lado, fue posible realizar estudios conformacionales de los ciclopeptidos obtenidos. En los espectros de RMN de los Versicotides A-C se observan mezclas de conformeros con señales definidas para cada uno. Esto permitió asignar los grupos de señales para cada conformero. Como contraparte, los espectros de RMN de Versicotide F sugieren la presencia de un único conformero, con señales finas y bien definidos, probablemente debido a la presencia de Pro además de los Anth que fijaría la conformación del mismo.

Un análisis exhaustivo de los espectros del Versicotide C permitió concluir que contrariamente a lo informado por los autores del aislamiento,¹ en DMSO-d₆ está presente una mezcla de conformeros (*cis, cis*) y (*trans, trans*) y no un único conformero (*cis, trans*).

7.2. Estudio de la actividad biológica de los compuestos obtenidos.

Ninguno de los productos naturales Versicotide A-C, o sus análogos mostró actividad frente a *P.falciparum* 3D7 o *T.b.brucei*. Sin embargo, el ciclotetrapeptido natural conteniendo un aminoácido de configuración D y dos N metil aminoácidos, Versicotide D, mostro un IC₅₀ de 1.5 μM. Entre las modificaciones propuestas se identificó un nuevo compuesto con actividad contra este parásito, que mantiene un residuo de NMe-D-Phe en su estructura. Si bien la información obtenida con la biblioteca de compuestos sintetizados es insuficiente para realizar un estudio de relación estructura actividad para estos ciclotetrapeptidos, se identificaron modificaciones que causan pérdida total de la actividad lo cual es sumamente útil para continuar realizando nuevas modificaciones, lo que constituye una de las principales perspectivas a futuro de este trabajo. Teniendo en cuenta esta información, se realizarán modificaciones en las secuencias de estos ciclotetrapeptidos con el fin de obtener

¹ J. Peng, H. Gao, X. Zhang, S. Wang, C. Wu, Q. Gu, P. Guo, T. Zhu, D. Li, *J. Nat. Prod.*, **2014**, 77, 2218.

compuestos potencialmente más activos estudiando sus propiedades fisicoquímicas y la presencia de conformeros en distintos disolventes que puedan influir en la actividad biológica.

Por otra parte, se avanzó en el establecimiento de la relación estructura-actividad de los compuestos previamente preparados por nuestro grupo.² Los ciclohexapéptidos sintetizados mediante la metodología de Native Chemical Ligation, cuya secuencia se diseñó en base a los compuestos con actividad nanomolar o subnanomolar frente a este parásito; **37** y **47** de la tesis de Catherine Fagundez, tampoco mostraron actividad frente a *P.falciparum* 3D7. Para determinar si esto se debía a las variaciones en los grupos protectores de los tioles o a la posición de los N metilos se sintetizó **25C** a partir de su precursor lineal **25L**. La macrociclación de 25L con HATU transcurrió con buenos rendimientos (76%) demostrando la influencia de la secuencia lineal y posición de N metilos en el preordenamiento de estos compuestos para su ciclación. La evaluación de estos compuestos arrojó un IC₅₀ de 30 y 5nM respectivamente. Ninguno de los dos fue citotóxico sobre la línea celular HepG2 y mostraron buena selectividad (>690 y 16800 respectivamente). Esto confirma la importancia de los grupos tritilo para la actividad antimalárica. A su vez, tanto **25L** como **25C** mostraron buena actividad frente a *T.b.brucei*, determinándose sus EC₅₀ en 6.2 y 2.4 μM respectivamente.

Además, se identificaron dos péptidos con actividad insecticida frente a larvas de *Anopheles gambiae* que constituyen un punto de partida importante para la búsqueda de nuevos compuestos capaces de controlar el desarrollo del vector de la malaria.

Cuatro ciclotetrapéptidos sintetizados durante este trabajo; **13C**, **14C**, **15C** y **16C** se destacaron en un screening virtual llevado a cabo por el Dr. Alan Talevi, investigador de la Universidad Nacional de La Plata como potenciales inhibidores de MPro, la principal cisteín-proteasa de Sars-CoV2. Posteriormente, en colaboración con el grupo de Marcelo Comini del Institut Pasteur de Montevideo se llevaron a cabo ensayos de inhibición de esta enzima por parte de esos 4 compuestos y el producto natural Versicotide D (**11C**) por ser análogo a los mismos. Si bien los compuestos no mostraron actividad inhibitoria, la concordancia en el tamaño del ciclo de los compuestos seleccionados por el screening virtual puede constituir un punto de partida para la síntesis de nuevos macrociclos peptídicos con potencial actividad.

Por último, en base a la identificación de la actividad de los Versicotides D-F como reguladores de la lipídemia surge el interés en explorar esta potencial actividad sobre la biblioteca de ciclo péptidos análogos a Versicotides sintetizada. La determinación de la relación estructura actividad y optimización de estos compuestos para el tratamiento preventivo de la aterosclerosis, enfermedad

² Síntesis de Ciclopéptidos Análogos a Productos Naturales como Potenciales Antiparasitarios. Catherine Fagúndez, tesis doctoral **2018**, Universidad de la República.

7. CONCLUSIONES Y PERSEPECTIVAS

no transmisible de gran relevancia, no fue posible de realizar durante el período comprendido por esta tesis, constituyendo otra perspectiva a futuro importante.

Anexo I: Abreviaciones y acrónimos

A

AA: aminoácido

Abs: absorbancia

AcOH: ácido acético

Alloc: Aliloxicarbonil

Allyl: Aliloxi

Ala: Alanina

AM: Amino metil

ANTH: Ácido antranílico (*o*-aminobenzoico)

B

Boc: *tert*-Butiloxicarbonil

C

2-CTC: resina cloruro de 2-clorotritilo

Cys: cisteína

D

DBU: 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ene

DCC: *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida

DCM: Diclorometano

DIC: *N,N'*-Diisopropilcarbodiimida

DIPEA: *N,N'*-Diisopropiletilamina

DKP: Diketopiperazina

DMAP: Dimetilaminopiridina

DMF: Dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

E

EDCI: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

ESI: Electrospray ionization mass spectrometry

F

Fmoc: Fluorenilmetiloxicarbonil

G

Glu: Ácido glutámico

Gly: Glicina

H

HATU: 1-[Bis(dimethylamino)metileno]-1H-1,2,3-triazol[4,5-b]piridinium 3-oxo hexafluorofosfato

HFIP: Hexafluoroisopropanol

HOAt: 1-Hidroxi-7-azabenzotriazol

HOBt: 1-Hidroxibenzotriazol

I

Ile: Isoleucina

L

Leu: leucina

N

NMe: N-metilo

NMM: N metil morfolina

P

Phe: fenilalanina

S

Ser: serina

T

TFA: ácido trifluoroacético

Thr: Treonina

TIS: Triisopropilsilano

Trt: Tritilo

Tyr: tirosina

TZ: tiazol



First total synthesis of versicotide D and analogs

Laura Posada, Gloria Serra*

Laboratorio de Química Farmacéutica, (DQO), Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, Montevideo CP 11800, Uruguay



ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 September 2019

Revised 5 October 2019

Accepted 12 October 2019

Available online 14 October 2019

Keywords:

Solid phase

Cyclopeptides

Solution cyclization

Malaria

ABSTRACT

The first total synthesis of cyclotrapeptide versicotide D has been achieved in 21% overall yield using solid phase peptide synthesis and solution cyclization. In addition, in the search for candidates of anti-malarial new drugs, one cyclic tetrapeptide analog which differs in the sequence, and four cyclic pentapeptide containing *N*-methyl amino acids, were prepared. The obtained compounds were evaluated against *P. falciparum* 3D7. Versicotide D showed low micromolar antiplasmodial activity.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* ZLN-60 is recognized as emerging source of active secondary metabolites. In 2011, Li and co-workers reported the isolation from this fungus, of two cyclopentapeptides, versicotides A and B, containing one alanine, two *N*-methyl alanine, and two anthranilic acid, Fig. 1 [1]. Versicotides A and B were not toxic against the cell lines P388, BEL-7402, HL-60 or A-549. In 2014, using the OSMAC (one strain many compounds) approach, the same group reported the isolation of the cyclohexapeptide versicotide C, from a rice-based solid medium of *Aspergillus versicolor* ZLN-60 [2]. This cyclohexapeptide was not toxic against the cancer cell lines A-549, HeLa and SMMC-7721 ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$). Furthermore, in 2017 the cyclotrapeptide vers-

cotide D, Fig. 1, was isolated from the fermentation rice medium of *Aspergillus versicolor* LZD-14-1 [3]. It prevents the foam cells formation in RAW264.7 cells by the reduction of lipid accumulation through the regulation of cholesterol efflux and influx.

During the last years, cyclic peptides have attracted great attention for their desirable properties that make them promising candidates for the discovery of novel drugs. In general, they present structural characteristics to favor bioactive conformations and selectivity to the receptors [4]. In addition, cell permeability and oral bioavailability could be enhanced by controlling hydrophobicity and the number of hydrogen-bond by *N*-methylation [5,6]. It is known that cyclopeptides containing *N*-methyl amino acids can adopt different conformations; as a result, higher receptor selectivity may be achieved increasing their biological activity.

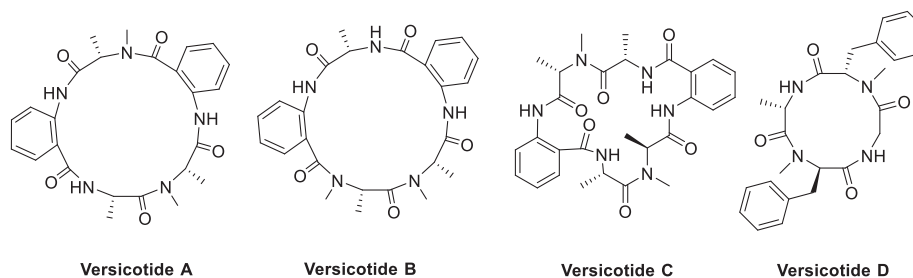


Fig. 1. Versicotides A, B, C and D.

* Corresponding author.

E-mail address: gserra@fq.edu.uy (G. Serra).

Recently, our group reported the synthesis, profiling and *in vivo* evaluation of cyclopeptides containing NMe-Gly as antiplasmodials [7]. Their structures were inspired in natural products isolated from different sources, and in this study, we concluded that the number of NMe amino acids has great influence in the antimalarial activity.

Malaria is a tropical disease caused by *Plasmodium* spp. parasites and transmitted to human by the Anopheles vector mosquito. The last WHO World Health Organization report, estimated 219 million malaria cases in 2017, principally in the sub-Saharan region [8]. Efforts to control the disease have decreased significantly the burden since 2000. However, this progression seems to be stalled during the last two years and the estimated deaths in 2017 were 435.000, with the majority of infants under-five.

In continuation to our interest in bioactive natural products, here we describe the preparation of versicotide D and five analogs: four cyclopentapeptides and one cyclotetrapeptide in order to study if the ring size, the peptide sequences and/or the number of NMe groups affects the synthesis or the biological activity. The cyclic pentapeptides are analogs of versicotides A and B, where two anthranilic acid were substituted by two Phe as in versicotide D. The synthesis of cyclic peptides containing many nonpolar residues, which are also *N*-methylated, resulting in very hydrophobic compounds and then, their purification, are challenging.

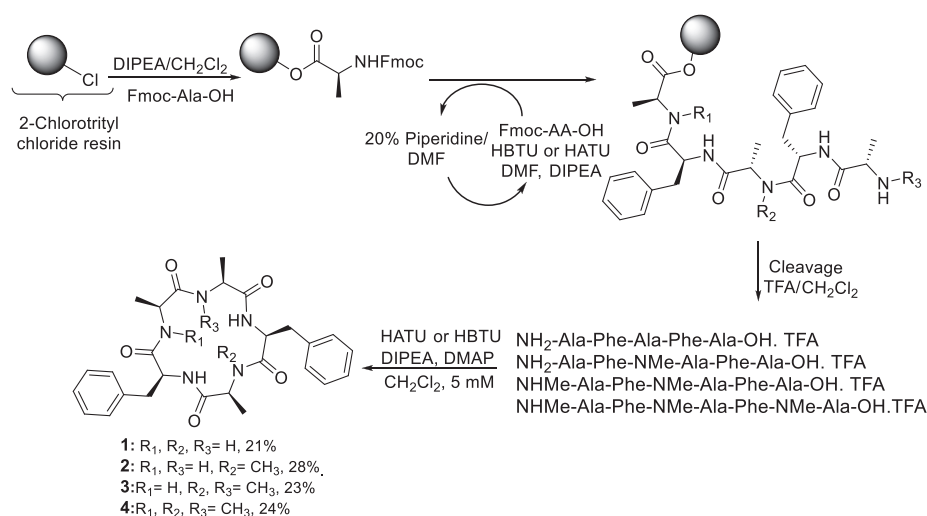
Results and discussion

First, we prepared the cyclopentapeptides, containing Phe, Ala and/or NMe-Ala using Fmoc based-Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) and solution macrocyclization, Scheme 1. Sequences were chosen based on versicotides A and B structures, and most of them were started with Ala at the C-terminus, to minimize steric hindrance during the macrocyclization process. The 2-chlorotrityl resin (2-CTC) was used to decrease the diketopiperazine formation due to the large size of the chlorotrityl group [9], and HBTU and DIPEA were employed as coupling reagents in most cases. HATU and DIPEA resulted in a more effective reagent for the coupling of the next amino acid to NMe-Ala. In order to avoid the diketopiperazine formation during the deprotection of FmocNMe-AA with 20% piperidine/DMF, shorter reaction times were used. All of the amino acid coupling and deprotection reactions were monitored by Kaiser or chloranil tests [10]. To determine the reaction progress, the process was monitored by HPLC analysis. The cleav-

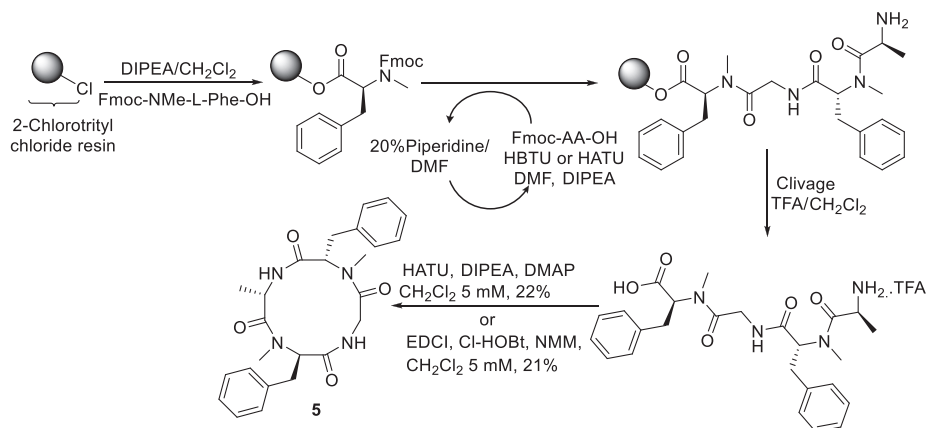
age between linear peptide and 2-CTC resin was achieved by using 1–10% trifluoroacetic acid (TFA) in dichloromethane (DCM). The linear pentapeptides were obtained with total yield between 85 and 95%. Following resin cleavage, solution macrocyclization in scale: 0.20–0.45 mM range was performed at 5 mM concentration by activation with HBTU or HATU, using DIPEA in DCM. Although it is known that the E-geometry of the peptide bond prevents the ring-like conformation suitable to cyclization of peptides with less than seven amino acids [11,12], a β -turn inducer such as a proline, a D-amino acid, a thiazole, an oxazole ring, or a NMe amino acid in the sequence, could favor the cyclization of a small peptide. Nevertheless, the cyclization is very dependent on the peptide sequence. Purification of the crude cyclic products was difficult due to their hydrophobicity, but flash column chromatography was able to purify the desired compounds, **1**, **2**, **3** and **4**. They were obtained in yields that could be commonly achieved for cyclic pentapeptides (20–28%), with the higher yield for compound **2** that presents only one NMe. In the other cases the results indicated that there are not significant differences during the macrocyclization reaction of the peptide without NMe, precursor of **1**, and peptides containing two or three NMe-Ala, precursor of **3** and **4**, respectively.

Then two cyclotetrapeptides, versicotide D (**5**), Scheme 2 and analog (**6**), Scheme 3, were prepared following a similar SPPS procedure, using HATU/DIPEA for Fmoc-AA-OH coupling after NMe-amino acid. In the case of analog **6**, as we previously reported that NMe-Gly improved the activity against *P. falciparum* [7], this amino acid was used instead of NMe-L-Phe that is present in versicotide D, in order to study its possible effect on the bioactivity.

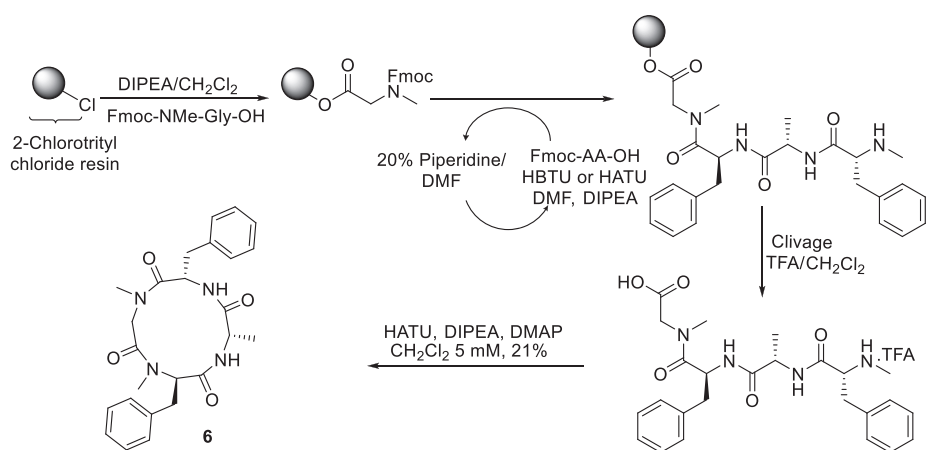
For the synthesis of versicotide D, NMe-L-Phe was selected as the C-terminus to anchorage to the resin, in order to use only one equivalent of this amino acid in DIPEA. In all the successive coupling reactions, three equivalents of the corresponding amino acid have to be used. The amino acid coupling and deprotection reactions were monitored by Kaiser or chloranil tests to determine the reaction progress and the process was monitored by HPLC analysis. The trifluoroacetate salt of Ala-NMe-D-Phe-Gly-NMe-L-Phe was obtained in very good yield (89%) and purity (94%). Even though the macrocyclization (scale: 0.22 mM range), was performed using two reaction conditions, HATU/DIPEA/DMAP/CH₂Cl₂ and EDCI/Cl-HOBT/NMM, the compound was obtained in similar yield, 22% and 21%. No racemization was detected by analysis of HPLC chromatograms and NMR spectra. The spectroscopic data of the synthesized versicotide D are in agreement with those reported



Scheme 1. Synthesis of cyclopentapeptides.



Scheme 2. Synthesis of versicotide D (5).



Scheme 3. Synthesis of cyclotetrapeptide 6.

to the natural product. However, it is worth to note that the ^1H NMR in CDCl_3 of the synthesized versicotide D has a better resolution than that of DMSO. As DMSO is a strong hydrogen-bond acceptor the NH signals are moved to downfield (δ : 7.82. and 7.59). For the contrary in CDCl_3 the NH-Gly and NH-Ala are on δ : 6.80 and 7.44 ppm, respectively, and the rest of the peaks are much well-defined. The proton signals of NMe groups of D-Phe and L-Phe were assigned taking into account the HMBC correlation with the carbonyl groups of Ala and Gly respectively [13]. According with that, the ^1H and ^{13}C chemical shifts for NMe of D-Phe are $\delta = 2.14$ and 29.1 ppm respectively. ^1H and ^{13}C chemical shifts for NMe of L-Phe, are $\delta = 3.13$ and 30.1 ppm respectively. As the NMe resonance of *cis* conformers (*syn* to carbonyl group) is upfield relative to the *trans* due to the shielding effect of the carbonyl group, those results could indicate a *cis* conformation to NMe of NMe-D-Phe and a *trans* one to NMe of NMe-L-Phe. The spectroscopic data of the natural product, reported in DMSO, showed the two ^1H and ^{13}C signals for each NMe groups with similar chemical shifts, $\delta = 2.61$ and 2.69 and $\delta = 28.5$ and 29.7, respectively, and no assignment was made by the authors.

For the synthesis of cyclotetrapeptide **6**, we started with NMe-Gly at the C-terminus, Scheme 3, in order to minimize racemization and thereby the formation of diastereomers during ring closure. The tetrapeptide NMe-D-Phe-Ala-L-Phe-NMe-Gly was obtained in very good yield and purity. After 24 h of cyclization (scale: 0.09 mM range) using HATU as coupling reagent, the reaction did not show any progress. Reaction work-up followed by purification, rendered cyclopeptide **6** in 21% yield.

The obtained cyclic peptides were evaluated *in vitro* in two independent experiments against *P. falciparum* 3D7 (SYBR Green assay) using artesunate as positive control ($\text{EC}_{50} = 0.012 \pm 0.003 - \mu\text{M}$). [14] Compounds **1–4**, analogs to versicotide A and B, where two anthranilic acid were substituted by two Phe as in versicotide D, are not active showing $\text{EC}_{50} > 10 \mu\text{M}$. Contrary to our previous results [7], where the cyclic pentapeptide containing two NMe-Gly, Cyclo NMe-Gly-L-Ser(*t*-Bu)-NMe-Gly-L-Cys(Trt)-L-Cys(Trt) showed $\text{EC}_{50} = 0.15 \mu\text{M}$, in the case of compounds **1–4**, the number of NMe groups present do not have appreciable incidence in the antiplasmodial activity. In addition, the cyclotetrapeptide **6** which present an NMe-Gly, showed $\text{EC}_{50} > 10$. However, the natural cyclotetrapeptide versicotide D (**5**), that differs from **6** in the sequence and the position of one NMe showed $\text{EC}_{50} = 1.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$.

Conclusions

In conclusion, versicotide D was prepared using solid phase peptide synthesis and solution cyclization. The most important conformer of versicotide D in CDCl_3 seems to present a *cis* conformation (*syn* to carbonyl group) to the NMe group of NMe-D-Phe and a *trans* one to the NMe of NMe-L-Phe.

Versicotide D showed low micromolar activity against *Plasmodium falciparum* 3D7 and none of the obtained analogs, cyclotetrapeptide **6** and cyclic pentapeptides **1–4**, show cytotoxicity against the parasite, thus the sequence of the cyclic peptide has significant influence in the antiplasmodial activity.

Further work could aid greater understanding about the influences on the bioactivity of the sequences and/or the ring size of cyclic tetra and pentapeptides.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors acknowledge the collaboration of Prof. Rafael Guido, Anna C. Aguiar and Juliana Oliveira de Souza from Institute of Physics of Sao Carlos, Universidade de Sao Paulo, Brazil, for performing the biological evaluations and Prof. Rafael Radi and Mauricio Mastrogiovanni from Center for Free Radical and Biomedical Research Medicine, Universidad de la República, Uruguay, for the MS spectra measurements.

This work was supported by Grants from CSIC Grupos (UdelaR) and PEDECIBA.

The authors acknowledge a postgraduate fellowship from ANII and CAP (UdelaR) (Laura Posada).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.151281>.

References

- [1] L.N. Zhou, H.Q. Gao, X.S. Cai, T.J. Zhu, Q.Q. Gu, D.H. Li, *Helv. Chim. Acta* 94 (2011) 1065–1070.
- [2] J. Peng, H. Gao, X. Zhang, S. Wang, C. Wu, Q. Gu, P. Guo, T. Zhu, D. Li, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 2218–2223.
- [3] R. Chen, Z. Cheng, J. Huang, L. Dong, C. Wu, P. Guo, W. Lin, *RSC Adv.* 7 (2017) 49235–49243.
- [4] F. Giordanetto, J. Kihlberg, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 278.
- [5] W.M. Hewitt, S.S.F. Leung, C.R. Pye, A.R. Ponkey, M. Bednarek, M.P. Jacobson, R. S. Lokey, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 715.
- [6] O. Ovadia, S. Greenberg, J. Chatterjee, B. Laufer, F. Opperer, H. Kessler, C. Gilon, A. Hoffman, *Mol. Pharm.* 8 (2011) 479.
- [7] C. Fagundez, D. Sellanes, S. Peña, L. Scarone, A.C.C. Aguiar, J.O. de Souza, R.V.C. Guido, L. Stewart, V. Yardley, S. Ottilie, E. Winzeler, F.-J. Gamo, L.M. Sanz, G.L. Serra, *ACS Med. Chem. Lett.* 10 (2019) 137.
- [8] WHO, World Malaria Report 2018, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2018.
- [9] K. Barlos, D. Gatos, W. Schäfer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30 (1991) 590.
- [10] R. Maharani, R.T.C. Brownlee, A.B. Hughes, B.M. Abbott, *Tetrahedron* 70 (2014) 2351–2358.
- [11] U. Schmidt, J.J. Langner, *Pep. Res.* 49 (1997) 67.
- [12] C. White, A. Yudin, *Nat. Chem.* 3 (2011) 509.
- [13] See Supporting Information.
- [14] M. Smilkstein, N. Sriwilajaroen, J.X. Kelly, P. Wilairat, M. Riscoe, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004 (1803) 48.



Cite this: *Chem. Commun.*, 2020, 56, 956

Received 3rd October 2019,
Accepted 12th December 2019

DOI: 10.1039/c9cc07783a

rsc.li/chemcomm

On-resin synthesis of cyclic peptides *via* tandem *N*-to-*S* acyl migration and intramolecular thiol additive-free native chemical ligation†

Gloria Serra, *^a Laura Posada^a and Hironobu Hojo *^b

On-resin intramolecular native chemical ligation (NCL) assisted by *N*-ethylcysteine using Fmoc/SPPS to obtain cyclic peptides is described. *N*-terminal cysteine-containing peptides were subjected to NCL conditions leading to cyclization–cleavage reactions and consecutive *S* → *N* shift, rendering cyclic peptides in good yields and purities. The compounds were evaluated against *P. falciparum* 3D7.

During the past few years, cyclic peptides have attracted great attention not only from academic researchers but also from the pharmaceutical industry. These compounds possess a number of desirable properties, such as selectivity for receptors and metabolic stability, that make them promising candidates for the discovery of novel drug molecules.¹ In addition, cell permeability and oral bioavailability could be enhanced by controlling hydrophobicity and the number of hydrogen-bonds by *N*-methylation and therefore this strategy can be utilized in the design of new orally available drugs.² Recently, our group reported the synthesis, profiling and *in vivo* evaluation of cyclopeptides containing MeGly as antimalarials.³

Malaria is a tropical disease caused by *Plasmodium spp.* parasites and transmitted to humans by the *Anopheles* vector mosquito. The last World Health Organization (WHO) report estimated 219 million malaria cases in 2017, principally in the sub-Saharan region. Efforts to control the disease have decreased significantly the burden since 2000. However, this progression seems to have stalled during the last two years and the estimated deaths in 2017 were 435,000, with the majority being infants under-five.⁴

Many strategies have been explored by using solution or on-resin cyclization to synthesize cyclic peptides.⁵ Solution cyclization using native chemical ligation (NCL) of a peptide

having a cysteine at the *N*-terminus and a thioester at the *C*-terminus has been demonstrated to be an effective methodology.⁶ Recently, this strategy was extended to the synthesis of selenocysteine-containing cyclic peptides using a selenocysteine-mediated native chemical ligation.⁷ Tulla-Puche and Barany described on-resin cyclization by coupling the Phe-SBzl previously to NCL by swelling the peptide-resin in a buffer and thiophenol.⁸ Using Boc-solid phase synthesis, Camarero *et al.* performed intramolecular chemical ligation by swelling the peptide PEGA resin in an aqueous buffer.⁹ More recently, Gless and Olsen described on-resin NCL protocols to synthesize cyclic peptides using a *N*³-Fmoc-3,4-methyl-diaminobenzoic acid (Fmoc-MeDbz) linker.¹⁰ These three strategies to obtain cyclic peptides by on-resin NCL are shown in Fig. 1.

Following our ongoing interest in the synthesis of cyclic peptides as antimalarials, we decided to explore intramolecular NCL assisted by the use of *N*-alkylcysteine at the peptide *C*-terminus as an *N* → *S* acyl migration device.¹¹ As peptides are most commonly obtained by Fmoc-based solid phase peptide synthesis (SPPS), this strategy using amino-PEGA resin was selected to prepare the desired compounds. As far as we are concerned, on-resin intramolecular NCL assisted by an *N* → *S* acyl shift device using Fmoc-peptide synthesis has not been previously described in the literature. We envisioned that subjecting *N*-terminal Cys-containing peptides to NCL conditions would lead to cyclization-cleavage reactions and consecutive *S* → *N* shift rendering cyclic peptides (Fig. 2). In addition, as this methodology does not use activating coupling additives, a direct desulfurization subsequent to the cyclization could enable the preparation of cyclic peptides containing other amino acids.¹²

Herein, we report a novel synthesis of cyclic peptides containing Cys by using tandem reactions of *N* → *S* acyl migration of peptides having *N*-ethylcysteine (EtCys) at the *C*-terminus and then intramolecular NCL of the thioester intermediate, without the addition of thiol cofactors. This allows access to a *C* terminal thioester peptide after the SPPS, avoiding the exposure of this moiety to Fmoc deprotection conditions, in which it might be unstable. In addition, the evaluation against *Plasmodium falciparum* is presented.

^a Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, General Flores 2124, CC 1157, Montevideo, Uruguay. E-mail: gserra@fq.edu.uy

^b Institute for Protein Research, Osaka University, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka, 565-0871, Japan. E-mail: hojo@protein.osaka-u.ac.jp

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental protocols for the synthesis and identification of 1–6. See DOI: 10.1039/c9cc07783a

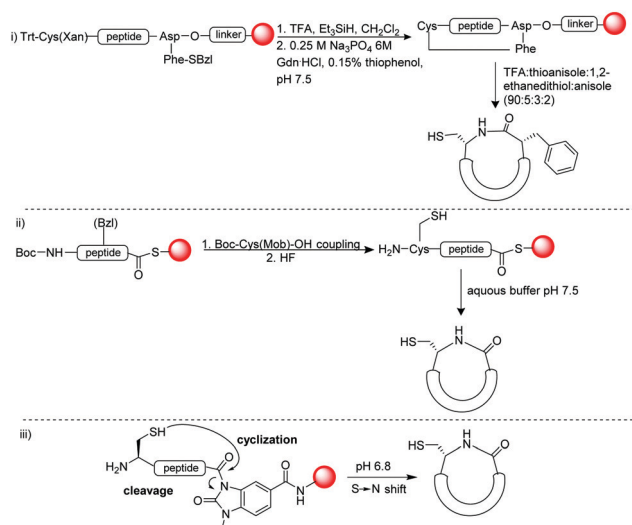


Fig. 1 On-resin intramolecular NCL: (i) Tulla-Puche *et al.*⁸ protected the C terminal residue as a preactivated thioester. After selective removal of Trt and Xan protecting groups, on-resin cyclization by NCL proceeded in aqueous conditions (0.25 M sodium phosphate, 6 M guanidine hydrochloride, and 1% thiophenol, at pH 7.5). An additional step for peptide cleavage was required. (ii) Camarero *et al.*⁹ used Boc-solid-phase peptide synthesis on a HS-PEGA resin. Cyclization with concomitant cleavage from the resin was performed in aqueous buffer at pH 7.5. (iii) Gless and Olsen¹⁰ performed the cyclization–cleavage reaction in 0.2 M phosphate buffer: MeCN (1 : 1) for 2 h at 50 °C on a MeDbz-ChemMatrix resin.

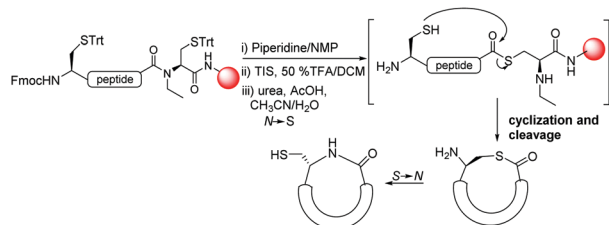
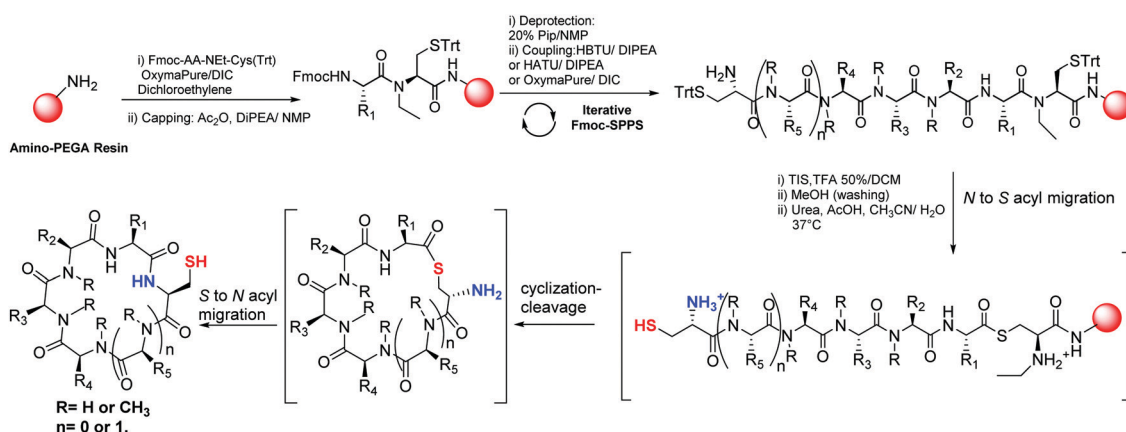


Fig. 2 On-resin intramolecular NCL using a PEGA resin and Fmoc strategy.

We decided to prepare several macrocycles containing *N*-methyl amino acids and the sequences were selected taking into account the biological results in previous studies with cyclic peptides.^{3,13}

For the synthesis of the peptide sequences, dipeptides Fmoc-AA-EtCys(Trt)-OH that were previously prepared in solution^{14,15} were anchored to the amino-PEGA resin by using OxymaPure[®]/DIC. This protocol has proven to be more efficient than performing the anchorage of the Fmoc-EtCys(Trt)-OH to the resin and then deprotection and coupling with Fmoc-AA.¹⁵ Iterative deprotection and coupling cycles allowed the preparation of the peptides attached to the resin. HBTU and DIPEA were used in most cases except for the coupling of the next amino acid to *N*-methyl amino acid (MeAA) where HATU and DIPEA resulted in a more effective reagent and for the last coupling of Fmoc-Cys(Trt)-OH, where OxymaPure[®]/DIC was used as shown in Scheme 1. After treatment with 20% Piperidine/NMP and deprotection of the trityl groups for ten minutes, using TIS (3%)/TFA : DCM (50 : 50) followed by quick filtering and washing with MeOH rendered the deprotected peptide attached to the resin. Finally, a solution of urea and AcOH in CH₃CN/H₂O was added to the peptide-resin and the reaction mixture was shaken overnight at 37 °C. This promotes the *N*-to-*S* acyl shift for the formation of the thioester intermediate. As previously discussed, the thioethylamido moiety is essential to induce this migration *via* a five-membered ring transition state.¹³ The sulfhydryl group of the *N*-terminal Cys led to the cyclization–cleavage reactions *via* *S* → *S* acyl shift, and consecutive *S* → *N* acyl migration rendered the desired cyclic peptide. The resin was filtered and the solution was analyzed by HPLC showing only a major peak that required just a single purification step by preparative RP-HPLC. Fig. 3 illustrates the peak of the crude cyclopeptide 2 in a RP-HPLC chromatogram. In order to check out if a part of the precursor was still attached to the resin, extra fresh solution of urea and AcOH in CH₃CN/H₂O was added to the resin and shaken overnight. However, cyclopeptides were not detected in the HPLC chromatograms by analysis of the solutions.

Five cyclic hexapeptides and one cyclic pentapeptide were obtained in 18 to 50% overall yield after purification by preparative RP-HPLC as shown in Table 1. In order to obtain more soluble compounds in several cases, and to study the influence of amino acids on the bioactivities, some compounds present amino acids containing functional groups such as Thr, Cys, and Glu and others present hydrophobic amino acids such as Ala, Phe, and Gly. In addition, as we were interested in



Scheme 1 Synthesis of cyclic peptides by NCL.

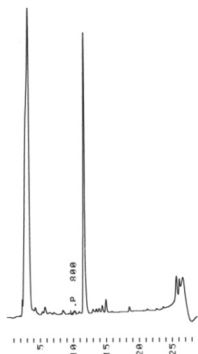


Fig. 3 RP-HPLC chromatogram of crude cyclopeptide **2** (gradient: increasing the ratio of eluent B (0.1% TFA in acetonitrile) from 30% to 50% in 20 min against eluent A (0.1% TFA in H₂O)).

Table 1 Cyclic peptides obtained and yields

Cyclic peptide	Yield ^a (%)
Cyclo Cys-Phe-Ala-Phe-Ala-Phe (1)	50
Cyclo Cys-Phe-Ala-Phe-Ala-Ala (2)	40
Cyclo Cys-MeAla-Phe-MeAla-Ala (3)	46
Cyclo Cys-MeGly-Cys(Bn)-MeGly-Thr(Bn)-Gly (4)	23
Cyclo Cys-MeGly-Cys(Bn)-MeGly-Glu-Gly (5)	19
Cyclo Cys-MeAla-Cys(Bn)-MeAla-Thr(Bn)-Gly (6)	18

^a After purification by preparative RP-HPLC.

evaluating if the ring size affects the antimalarial activity, one cyclic pentapeptide (**3**) was prepared. No racemization was detected by the analysis of cyclopeptides by HPLC and NMR spectra.

The higher yields were for compounds containing Phe, Ala or MeAla (**1–3**). On the other hand, contrary to our expectation, cyclic peptides containing Thr, Glu and Gly (**4–6**) showed lower yields. It is known that the *E*-geometry of the peptide bond prevents the ring-like conformation suitable for cyclization of peptides with less than seven amino acids.^{5,16} However, a β -turn inducer such as a proline, a *D*-amino acid, a thiazole, an oxazole ring, or a MeAA in the sequence could favor the cyclization of a small peptide. Nevertheless, as it was observed in our results that the cyclization is very dependent on the peptide sequence. Indeed, cyclic hexapeptides **4–6** and cyclic pentapeptide **3** that present two MeAla were obtained in moderate yield (18–23%) and in good yield (46%), respectively.

The obtained cyclic peptides were evaluated *in vitro* in two independent experiments against *P. falciparum* 3D7 (SYBR Green assay) using artesunate as a positive control ($EC_{50} = 0.012 \pm 0.003 \mu\text{M}$).¹⁷ Compounds **1–3** containing one Cys and Phe, Ala or MeAla are not active, showing $EC_{50} > 10 \mu\text{M}$. In addition, cyclic hexapeptides **4–6** which are analogous to the antiplasmodial Cyclo MeGly-Thr(^tBu)-MeGly-Cys(Trt)-Gly-Cys(Trt) ($EC_{50} = 0.25 \text{ nM}$)³ are not toxic to the parasite, showing $EC_{50} > 10 \mu\text{M}$. Contrary to our previous results, the number of NMe groups present do not have appreciable incidence in the antiplasmodial activity of the obtained compounds.

In conclusion, we have developed a procedure for on-resin cyclization with concomitant cleavage from the resin by using

tandem reactions of *N* \rightarrow *S* acyl migration and subsequent intramolecular NCL of peptides containing EtCys obtained by Fmoc/SPPS. This method is very easy to handle and enables rapid access to this type of compound in a reasonable yield considering the common yields achieved for cyclic peptides. Moreover, as no side reactions were detected and this method does not require the use of thiols (thiophenol, mercaptopropionic acid, *etc.*), cyclic peptides were obtained in very good purity. Moreover, the absence of activating additives allows direct desulfurization reaction of the Cys residue that would be transformed to other amino acids. Consequently, the procedure could be applied to obtain cyclic peptides of varying ring size and sequences with a wide range of applications.

Compounds **1–6** do not show cytotoxicity against *Plasmodium falciparum* 3D7. Further investigations are needed to determine the influence on the bioactivity of the sequences and/or the ring size of this type of cyclic peptide.

General procedure. 620 mg of Amino-PEGA resin (0.4 mmol/g) was added to a syringe peptide synthesis vessel. The resin was treated with NMP three times for one minute each time and CH₂Cl₂ (2 \times 0.5 min). A solution of Fmoc-AA-EtCys(Trt)-OH (2 eq.), OxymaPure[®] (2.2 eq.) and DIC (2.2 eq.) in dichloroethylene was added and the resin was shaken overnight. Reaction completion was monitored by a Kaiser test. When a negative Kaiser test is obtained, the resin is filtered and washed with NMP (0.5 min \times 3).

Finally, unreacted sites are capped by treatment with a solution of Ac₂O (300 μL), and DIPEA (150 μL) in NMP (2.5 mL) for 15 minutes. After filtering, the resin was washed with NMP (5 \times 0.5 min).

Then, the resin was treated with NMP (3 \times 0.5) and then with 20% piperidine solution in NMP and shaken (first for two minutes and then twice for one minute). After filtering, the resin was washed with NMP (7 \times 0.5 min).

Coupling of subsequent Fmoc-protected amino acids. A solution of the amino acid Fmoc-AA-OH (4 eq.), HBTU (3.8 eq.) and DIPEA (8 eq.) or Fmoc-MeAA-OH (4 eq.), HATU (3.8 eq.) and DIPEA (8 eq.) in DMF was added to the peptide synthesis vessel and shaken for 12 minutes. The resin was filtered, and washed with NMP (5 \times 0.5 min) and a Kaiser or Chloranil test was performed. If the test was negative, iterative cycles of Fmoc deprotection and coupling were carried out.

For coupling the last amino acid of every sequence (Fmoc-Cys(Trt)-OH), 4 eq. of the acid was dissolved in DMF:CH₂Cl₂ (50:50) along with OxymaPure[®] (4 eq.) and DIC (4 eq.). The solution was added to the resin and shaken for one hour. The resin was washed with NMP and a Kaiser or chloranil test was performed. In the case of a negative result, the resin was further washed with NMP 5 times and the last Fmoc deprotected. Finally, the resin was washed with NMP (6 \times 0.5 min) and CH₂Cl₂ (5 \times 0.5 min).

Cleavage and cyclization by Native Chemical Ligation (NCL). Removal of the trityl group was achieved by resin treatment with a solution of TIS (0.12 mL), TFA (2.0 mL) and CH₂Cl₂ (2.0 mL) and shaken for 10 minutes. After quick filtering, the resin was washed 4 times with MeOH.

A solution of 0.9 g of urea, 0.5 mL of CH₃CN and 125 μL of acetic acid in 2 mL distilled water was added to the resin and

gently shaken at 37 °C for 14 hours. The filtrate was collected and analyzed by analytical HPLC (increasing a ratio of eluent B (0.1% TFA in acetonitrile) from 30% to 50% in 20 min against eluent A (0.1% TFA in H₂O)). The main peak was further analyzed by LC-MS for identification of the desired product. The same gradient was used for purifying the crude product by preparative HPLC. The product was collected into polypropylene tubes and lyophilized.

See the ESI† for HPLC chromatograms, MS and NMR spectra data of the cyclopeptides.

This work was in part performed under the International Collaborative Research Program of Institute for Protein Research, Osaka University, ICR-19-01. The authors acknowledge the collaboration of Prof. Rafael Guido, Anna C. Aguiar and Juliana Oliveira de Souza from Institute of Physics of Sao Carlos, Universidade de São Paulo, Brazil, for performing the biological evaluations and Prof. Carolina Fontana, Polo Agroalimentario de Paysanadú, UdelaR for the NMR spectra. The authors acknowledge a postgraduate fellowship from CAP (UdelaR) (Laura Posada).

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Notes and references

- (a) F. Giordanetto and J. Kihlberg, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 278; (b) J. Mallinson and I. Collins, *Future Med. Chem.*, 2012, **4**, 1409; (c) S. Peña, L. Scarone and G. Serra, *Future Med. Chem.*, 2015, **7**, 355; (d) E. Driggers, S. Hale, J. Lee and N. Terret, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2008, **7**, 608; (e) P. G. Dougherty, A. Sahni and D. Pei, *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 10241.
- (a) W. M. Hewitt, S. S. F. Leung, C. R. Pye, A. R. Ponkey, M. Bednarek, M. P. Jacobson and R. S. Lokey, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 715; (b) L. Doedens, F. Opperer, M. Cai, J. G. Beck, M. Dedek, E. Palmer, V. J. Hruby and H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 8115; (c) O. Ovadia, S. Greenberg, J. Chatterjee, B. Laufer, F. Opperer, H. Kessler, C. Gilon and A. Hoffman, *Mol. Pharmaceutics*, 2011, **8**, 479.
- C. Fagundez, D. Sellanes, S. Peña, L. Scarone, A. C. C. Aguiar, J. O. de Souza, R. V. C. Guido, L. Stewart, V. Yardley, S. Otilie, E. Winzeler, F.-J. Gamo, L. M. Sanz and G. L. Serra, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2019, **10**, 137.
- WHO, World Malaria Report 2018, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- (a) H. Y. Chow, Y. Zhang, E. Matheson and X. Li, *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 9971; (b) L. Reguera and D. G. Rivera, *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 9836; (c) V. Sarojini, A. J. Cameron, K. G. Varnava, W. A. Denny and G. Sanjayan, *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 10318; (d) J. White and A. K. Yudin, *Nat. Chem.*, 2011, **3**, 509; (e) M. Malesevic, U. Strijowski, D. Bachle and N. Sewald, *J. Biotechnol.*, 2004, **112**, 73; (f) J. Kim, I.-K. Hong, H.-J. Kim, H.-J. Jeong, M.-J. Choi, C.-N. Yoon and J.-H. Jeong, *Arch. Pharmacol. Res.*, 2002, **25**, 801.
- (a) V. P. Terrier, A. F. Delmas and V. Aucagne, *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 316; (b) X. Hemu, M. Taichi, Y. Qiu, D.-X. Liu and J. P. Tam, *J. Pept. Sci.*, 2013, **100**, 492; (c) V. Agouridas, O. El Mahdi, V. Diemer, M. Cargoët, J.-C. M. Monbaliu and O. Melnyk, *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 7328.
- S. Shimodaira, T. Takei, H. Hojo and M. Iwaoka, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 11737.
- J. Tulla-Puche and G. Barany, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 4101.
- J. A. Camarero, G. J. Cotton, A. Adeva and T. W. Muir, *J. Pept. Res.*, 1998, **51**, 303.
- B. H. Gless and C. A. Olsen, *J. Org. Chem.*, 2018, **83**, 10525.
- H. Hojo, Y. Onuma, Y. Akimoto, Y. Nakahara and Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 25.
- (a) L. Z. Yan and P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 526; (b) Q. Wan and S. J. Danishefsky, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 9248; (c) K. Jin, T. Li, H. Y. Chow, H. Liu and X. Li, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2017, **56**, 14607.
- C. Fagundez, D. Sellanes and G. Serra, *ACS Comb. Sci.*, 2018, **20**, 212.
- H. Hojo, H. Kobayashi, R. Ubagai, Y. Asahina, Y. Nakahara, H. Katayama, Y. Ito and Y. Nakahara, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 6807.
- Y. Asahina, K. Nabeshima and H. Hojo, *Tetrahedron Lett.*, 2015, **56**, 1370.
- U. Schmidt and J. Langner, *J. Pept. Res.*, 1997, **49**, 67.
- M. Smilkstein, N. Sriwilaijaroen, J. X. Kelly, P. Wilairat and M. Riscoe, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, **48**, 1803.



First total synthesis of versicotide A, B and C†

Cite this: *RSC Adv.*, 2020, 10, 43653

Laura Posada,^{ab} Danilo Davyt^a and Gloria Serra^{ab*}

Received 12th November 2020
Accepted 24th November 2020

DOI: 10.1039/d0ra09635k

rsc.li/rsc-advances

The syntheses of versicotides A–C, natural products containing anthranilic acid and NMe-Ala, were achieved by solid phase peptide synthesis on 2-chlorotrityl resin followed by solution phase macrocyclization. Using an oxyma additive, the difficult coupling reactions to the deactivated aromatic amine of *o*-aminobenzoic acid, were performed in high yield, avoiding anthranilic rearrangements or side reactions.

1. Introduction

In the past years, a significant number of macrocyclic peptides, with very interesting biological activities, have been described in the literature.¹ They are known to be promising candidates in the search for new drugs as they show enhanced metabolic stability in comparison with their corresponding linear peptides, and could bind to receptors with high selectivity.² Moreover, chemoinformatic exploratory analyses of synthetic peptide combinatorial data sets have suggested that *N*-methylation and cyclization shifts their position toward the chemical space defined by sets of FDA approved drugs. Therefore, this modifications could result in compounds with biological activity and suitable physicochemical properties.³ In addition, it was demonstrated that multiple backbone *N*-methylation of cyclic peptides remarkably improves their cell permeability and therefore can be utilized in the design of new orally available drugs.⁴ Recent studies suggest that because of their conformational flexibility, cyclopeptides behave as molecular chameleons as they adjust their conformations and polar surface areas according with the properties of surrounding environment.⁵ On the other hand, constrained structures are expected to present a minor loss of conformational entropy upon binding, resulting in higher target affinity.⁶ Thus, many groups investigate the addition of further constraints to cyclopeptides in order to obtain a potential bioactive conformer.⁷

Natural products are a continuous source of inspiration for the discovery and development of new drug candidates.⁸ Those proceeding from marine environments, have been attracting special interest for their unexplored structural diversity.⁹

Particularly, marine fungi are subjected to many factors that contribute to gene modifications and to adaptive processes producing unique secondary metabolites. *Aspergillus* genus is an important source of bioactive secondary metabolites with high structural diversity.¹⁰ Versicotides are natural products produced by fungi of the *Aspergillus* family. Versicotides A (1) and B (2), Fig. 1, were first isolated by Li and co-workers from *Aspergillus versicolor* ZLN-60 extracts of the Yellow Sea sediment.¹¹ Later, the same group employed the OSMAC (one strain many compounds) approach on this fungus, resulting in the isolation and characterization of a new compound with structural similarities named versicotide C (3),¹² the first natural cyclic hexapeptide containing two anthranilic acids (Anth). Further on, three new cyclopeptides were isolated from *Aspergillus versicolor* LZD-14-1 namely versicotides D–F,¹³ along with the previously known versicotides A and B.

The presence of two rigid β -amino acids, Anth units, and two *N*-methyl-alanine (NMe-Ala) in 1–3 add further constraints to these cyclopeptides. In the case of the reported isolation of versicotide C (3), the authors stated that, in DMSO- d_6 , it presents one *trans* amide bond and one *cis* amide bond on its structure.¹²

Regarding their biological activity, 1 and 2 showed no cytotoxicity against murine leukemia P388, human hepatoma cell line BEL-7402 and human leukemia cell HL-60; versicotides A–C showed no activity against cancer cell lines A-549, HeLa and SMMC-7721. In addition, versicotides D–F exerted lipid lowering effects through the regulation of cholesterol efflux to HDL in RAW264.7 macrophages, while 1–3 do not exhibit this effect.

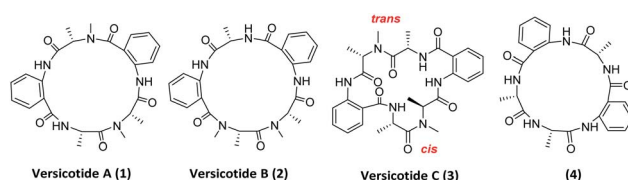


Fig. 1 Versicotides A–C and analogue 4.

^aQuímica Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, General Flores 2124, CC1157, Montevideo, Uruguay. E-mail: gserra@fq.edu.uy

^bGraduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

† Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 2023773. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/d0ra09635k

Recently, as part of a general program to obtain anti-plasmodial candidates,¹⁴ our group reported the synthesis of versicotide D and analogues and their evaluation as antimalarials against the chloroquine sensitive strain *P. falciparum* 3D7, where versicotide D showed $EC_{50} = 1.5 \mu\text{M}$.¹⁵

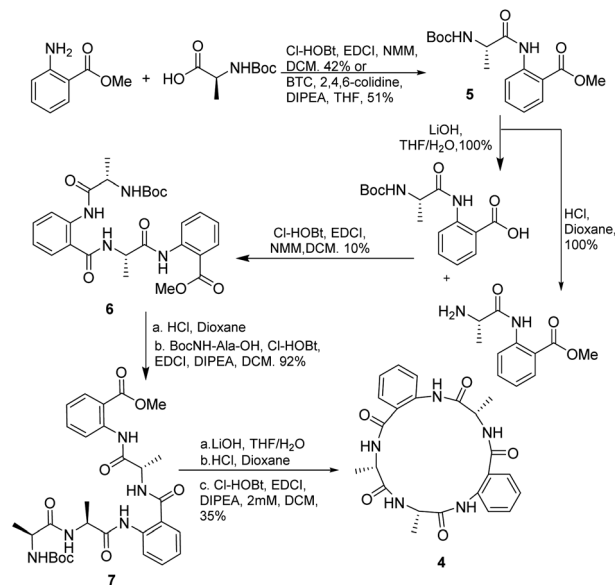
There are few examples in the literature related to the synthesis of cyclopeptide natural products containing anthranilic acid,¹⁶ and they are all broadly in line to the fact that amide bond formation involving the amine of Anth is a challenge not only because of the deactivation of the aromatic amine *via* resonance, but also due to rearrangements in which the Anth motif can be involved.¹⁷ Frequently, long, complicated, multi-stage and low yielding routes have been used to achieve the synthesis of natural products containing this motif. An example is the total synthesis of deoxo-solomonamide B in which Anth motif was masked with an indole group that is cleaved by ozonolysis in the last steps of the synthetic route.¹⁸ Therefore, a simpler methodology to obtain compounds with Anth in good yield is a chemical challenge. In addition, as many cyclopeptides containing Anth, present diverse bioactivities such as increasing blood pressure,^{16b} lipid lowering effect,¹² anti-proliferative,^{16a,16d} anti-inflammatory,¹⁸ insecticide,^{16e} the interest on this issue is enhanced. Here, we report the total synthesis of versicotides A–C and analogue 4. The structures of the obtained compounds were confirmed by MS, NMR and, in the case of versicotide A (1), by X-ray analysis. A deep analysis of NMR data (¹H, ¹³C, COSY, HSQC and HMBC) was done in order to determine the adopted conformations in the used solvents, along with temperature variation studies.

2. Results and discussion

2.1. Solution phase approach

First, we decided to prepare the *cyclo*[Ala-Anth-Ala-Anth-Ala] (4), analogue of 1 and 2, and to investigate the solution phase synthesis of the peptide precursor containing only Ala and Anth. The *in situ* acyl chloride formation using triphosgene¹⁹ made it possible to couple Ala to the amine of methyl anthranilate in 51% yield, Scheme 1. No racemization was observed by ¹H-NMR analysis. However, advanced intermediates could not be prepared using triphosgene. In an attempt to circumvent this, we tried to apply the methodology described by Xin and Burgess,²⁰ which employed a combination of EDCI and HOBt. As HOBt and HOAt present restrictions for their overseas shipment, we decided to substitute HOBt by Cl-HOBt.

Dipeptide 5 and tetrapeptide 6 were obtained in 42% and 10% yield, respectively. No racemization during the coupling reaction steps was detected according with the NMR spectra of 6. However, in the case of the synthesis of 6 many by-products, as fragments of the desired compound, were observed. Two of the detected by-products were methyl anthranilate and the tripeptide NH₂-Anth-Ala-Anth-OMe, derived from fragmentation of the labile Anth amide bond according with Hamada *et al.* results.^{17b} The preparation of pentapeptide 7 from 6 resulted in a high yielding process (92%). Finally, deprotection and cyclization in diluted conditions (2 mM) rendered analogue 4 in 35% yield.



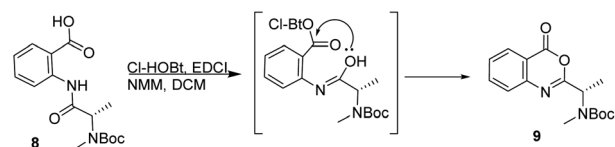
Scheme 1 Solution synthesis of cyclopentapeptide analogue 4.

Attempts to apply this strategy for the synthesis of versicotide A were not successful. The coupling reaction between BocNHMeAla-Anth (8) and Ala-Anth(OMe) using EDCI and Cl-HOBt rendered the corresponding tetrapeptide intermediate in very low yield along with the benzoxazinone 9, Scheme 2. According with previous results,²¹ this heterocycle is derived from the cyclodehydration reaction of 8.

2.2. SPPS synthesis of linear precursors and solution phase cyclization

In view of the limited achievements of the solution phase synthetic methodology, we decided to explore the synthesis of the linear precursors of versicotides A–C on solid phase and cyclize them on solution phase. The linear sequence of each one was chosen taking into account the characteristics of Anth explained before. Based on this, Anth amine was not chosen as the N-terminal in any case. Furthermore, we realized in early steps of this work that using Anth as the C terminal on solid phase peptide synthesis (SPPS) was not a good choice either, as it leads to very low resin loadings and it could give a great steric hindrance for the first coupling to occur. Because of this, the linear sequences chosen were: NHMeAla-Anth-NMeAla-Anth-Ala-OH for 1, NHMe-Ala-Anth-Ala-Anth-NMeAla-OH for 2 and NMeAla-Anth-Ala-NMeAla-Anth-Ala for 3.

Our first efforts to obtain the linear precursor of versicotide A, 10, by SPPS on 2-chlorotriethyl chloride resin (2-CTC), were not successful. The use of HBTU, HATU, or DIC/Cl-HOBt for the



Scheme 2 Synthesis of benzoxazinone 9 from BocNHMeAla-Anth.

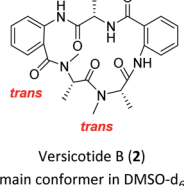
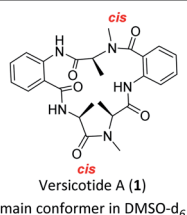
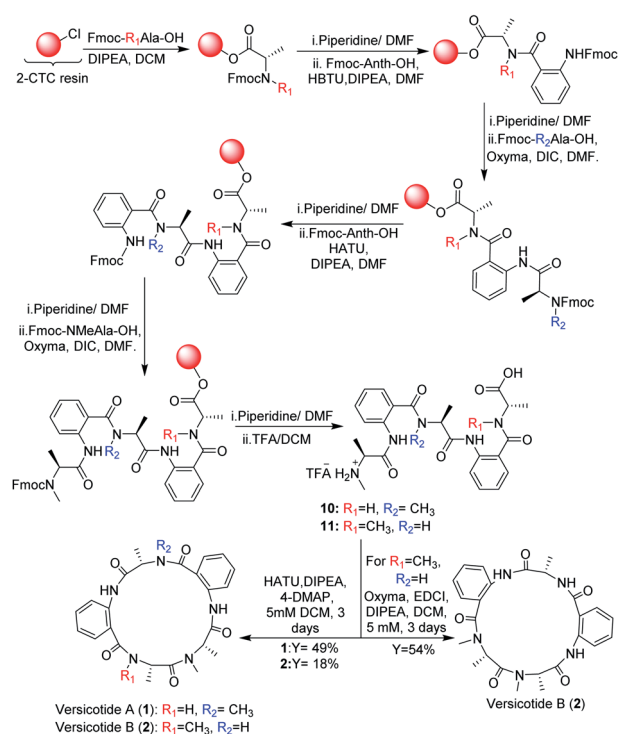
coupling involving the amine of Anth led to incomplete or no coupling at all. Doi and co-workers described the SPPS of Anth containing peptides on the 2-CTC resin by generating an acyl chloride of the corresponding amino acid with triphosgene and adding it to the resin without previous purification.²² During attempts to apply this methodology to obtain the desired peptide, it was possible to prepare the tripeptide FmocNMeAla-Anth-Ala, but subsequent coupling reactions produced cleavage of the growing peptide from the resin.

Albericio *et al.* described the impressive coupling efficiency of oxyma (ethylcyanooacetate oxime), in combination with DIC,²³ surpassing HOAt coupling agent in more demanding peptide models. Taking into account their results, we decided to select it as an excellent option to overcome those difficulties. Consequently, the use of oxyma for the coupling involving the amine of Anth allowed us to prepare the dipeptide FmocNMeAla-Anth-OH by SPPS, Scheme 3, in excellent yield. Moreover, the synthesis of the open precursor of versicotide A (**10**) was achieved in 90% yield, based on the determination of the resin loading. Completion of each coupling step was verified by Kaiser or chloranil test, for primary or secondary amines, respectively. These colorimetric assays were not useful for monitoring couplings to anthranilic acid amine group because

we notice this throws false negative results as an incomplete coupling was observed by HPLC-MS analysis of a small sample cleaved from the resin. Nevertheless, with oxyma/DIC, we confirmed optimal coupling after 60 min of reaction time by HPLC and ¹H-NMR analysis. For the solution phase cyclization, HATU (1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate) was employed as coupling reagent and dilution of the linear peptide was taken to 5 mM concentration. After purification, **1** was obtained in 49% yield and no dimer formation was observed.

Chromatographically pure versicotide A (**1**) showed three different conformers in the NMR spectra using DMSO-*d*₆ as solvent. To discard epimerization, ¹H-NMR studies using temperature gradient were performed. The spectra showed variations of NMe and α methine peak integrations arising from conformers in slow exchange (see ESI†). The amide of NMe-amino acids can present *cis* or *trans* configuration that depends, in many cases, on the used solvent. Taking into account that the *N*-methyl resonance of the amides in *trans* configuration are shifted downfield relative to the *cis* because of the shielding effect of the carbonyl group,²⁴ we observed that the major conformer, presents the two *N*-methyl amide bonds in *cis* configuration, Scheme 3. The chemical shifts of this conformer match with the reported ones for the isolated natural product. The other two conformers would be in (*cis*, *trans*) and (*trans*, *trans*) configuration (see ESI†). X-ray crystallographic structure of versicotide A, Fig. 2, obtained from a crystal grown in methanol, also agrees with previously described data for the natural product, and presents both NMe-amides in *cis* configuration.

Following the same procedure, the linear precursor of versicotide B (**11**), Scheme 3, was successfully synthesized in 87% global yield (based on the determination of the resin loading). However, cyclization using HATU in diluted conditions (5 mM), led to a small amount of **2** (18% yield). The macrolactamization reaction was repeated using EDCI/oxyma and **2** was purified by flash chromatography to obtain 54% yield. The product presented a single spot by TLC in different mobile phases and two peaks by HPLC. The analysis of both peaks by FIA-LC-ESI-MS showed the signal of *m/z* 480.3 corresponding to [M + H]⁺ ion of versicotide B (**2**). The ¹H-NMR of each sample in DMSO-*d*₆ showed a greater number of signals than expected. Finally, a thermal gradient of the ¹H-NMR in DMSO-*d*₆ showed that some signals corresponding to NMe and α methine change



Scheme 3 SPPS and solution macrocyclization of versicotides A (**1**) and B (**2**).

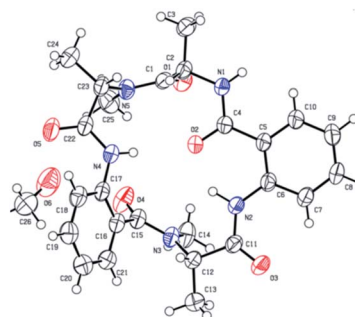


Fig. 2 X-ray crystallographic structure of **1**.²⁵

their proportion at higher temperatures. This fact allowed us to discard epimerization and to conclude that both samples contain a mixture of conformers of **2**; in one of them both NMe-amides are in *trans* configuration, Scheme 3, and in the other conformer, one amide is in *cis* and the other in *trans* configuration, (see ESI†) according with the literature.²⁴

In a similar way, the synthesis of the linear precursor of versicotide C (**12**), Scheme 4, was successfully achieved employing Oxyma + DIC in key steps, leading to 98% overall yield (based on the determination of the resin loading).

Then, macrocyclization in solution phase, using HATU in DCM (5 mM), rendered versicotide C (**3**) in 49% yield after purification and no dimer formation was observed. NMR spectra of synthetic versicotide C in DMSO-*d*₆, match those of the isolated natural product, even though the authors informed a single conformer with one NMe amide bond in *cis* and the other one in *trans* configuration.¹² A deep analysis of NMR spectra, with special regard to signal integrations, lead us to conclude that two conformers of **3**, in a 1 : 0.2 ratio, are present in both acetone-*d*₆ and DMSO-*d*₆. The conformers, which present symmetrical structure, were easily distinguished by the NMR signals of the two *N*-Me groups. The two corresponding *N*-methyl amide bonds of one conformer are in *trans* configuration, Scheme 4, and of the other conformer, in *cis* configuration. The presence of these two conformers were further confirmed

by a ¹H-NMR experiment of **3** at 80 °C which showed that the peaks assignable to the (*cis*, *cis*) conformer at 25 °C, disappeared at this temperature (see ESI†).

3. Experimental section

3.1. General procedure. Solid phase peptide synthesis

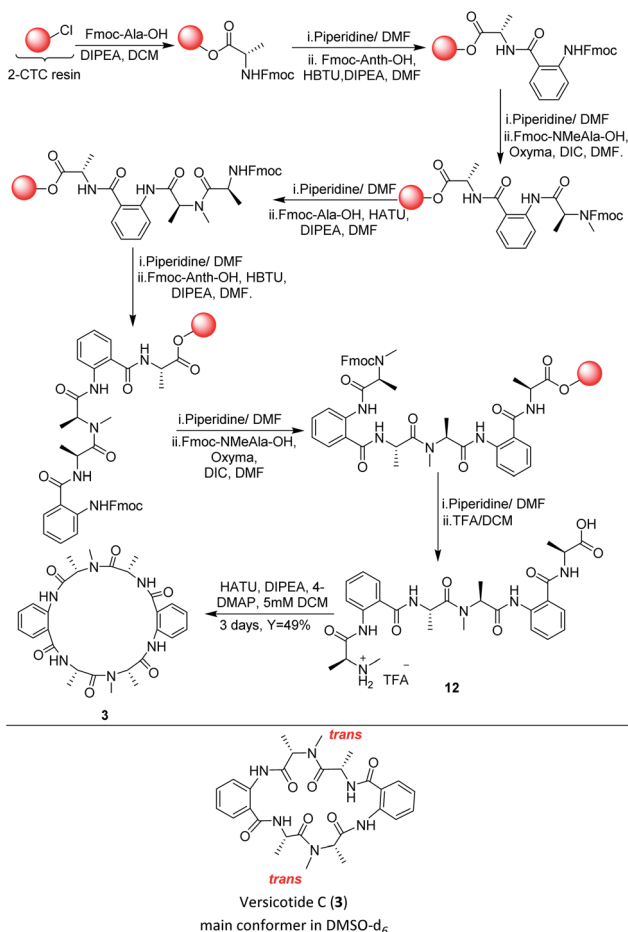
2-Chlorotrityl chloride resin (2-CTC) (100–300 mesh, 1.20 mmol g⁻¹) was added to a syringe peptide synthesis vessel. The resin was swelled in CH₂Cl₂ (3 × 5 min). A solution of first protected amino acid Fmoc-AA-OH (1 eq. for 0.8 mmol g⁻¹ loading) and DIPEA (3 eq.) in CH₂Cl₂ was added and the resin was shaken 10 minutes. Then, an extra 7.0 eq. of DIPEA were added and shaking was continued for 50 min. MeOH (0.8 mLg⁻¹ of resin) was added to the previous mixture in order to cap unreacted functional groups on the resin, and shaken for 10 min. After filtering, the resin was washed with CH₂Cl₂ (×3), MeOH (×3), CH₂Cl₂ (×3), DMF (×3). The resin was washed with DMF (×3) and Fmoc protecting group was removed by treating the resin with piperidine–DMF solution (1 : 4) for 1, 5 and 5 minutes successively. In exceptional cases deprotection step was accomplish by a single treatment with piperidine–DMF solution for 5 minutes, in order to prevent side reactions. Then, the resin was washed with DMF (×3), CH₂Cl₂ (×3) and DMF (×3). A solution of Fmoc-AA-OH or Fmoc-Anth-OH (3 eq.) and DIPEA (6 eq.) in DMF was added to the resin, followed by a solution of HBTU, for coupling to primary amines, or HATU (2.9 eq.) in DMF, in case of coupling to an *N*-methylated amino acid. The mixture was stirred for 60 min. After the coupling was completed, the resin was washed with DMF (×3) and CH₂Cl₂ (×3). Completion of the coupling was monitored by colorimetric assays; Kaiser test in case of primary amines and Chloranil test for secondary amines. Coupling procedure was repeated in case of positive results. For the coupling of subsequent Fmoc-AA to anthranilic acid, a solution of Fmoc-AA-OH (5 eq.), Oxyma Pure (5 eq.), and DIC (5 eq.) was added to the vessel. The mixture was stirred for 60 min. Then, the resin was washed with DMF (×3) and CH₂Cl₂ (×3). Deprotection and coupling cycles were repeated with the appropriate amino acids or Anth to provide the desired compound. The peptide was cleaved from the resin by treatment with 1% TFA in CH₂Cl₂ for 2–3 minutes at room temperature followed by filtration and collection of the filtrate in MeOH. The treatment was repeated three times and then the resin washed with CH₂Cl₂ (×5) and MeOH (×3). Solvents were removed *in vacuo* to obtain the crude peptide. LC-MS was used to identify the product.

3.2. Solution phase synthesis

3.2.1. General procedures for coupling reaction

3.2.1.1. Method 1. EDC·HCl (1.5 eq.), Cl-HOBT (1.5 eq.) and DIPEA (2.0 eq.) were added to a solution of Boc protected amino acid (Boc-AA-OH, 1.0 eq.) in DCM at 0 °C under N₂ atmosphere. *N*-Terminus deprotected linear peptide or amino acid ester (NH₂-AA-COOEt) was added and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 10 min and then at room temperature, overnight.

DCM was removed under vacuum and AcOEt was added. The organic phase was washed with 0.1 M HCl aqueous solution



Scheme 4 SPPS and solution macrocyclization of versicotide C (**3**)

(30 mL × 2), brine (10 mL), saturated NaHCO₃ solution (30 mL × 2) and brine (10 mL), dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was removed under vacuum to give the crude material. The crude material was purified by flash chromatography.

3.2.1.2. Method II. Bis(trichloromethyl)carbonate (0.33 eq.) was added to a solution of Boc-Ala-OH (1 eq.) in dry THF under N₂ atmosphere at 0 °C. 2,4,6-Colidine (2.6 eq.) were added to the solution and a white suspension was formed. The reaction mixture was stirred for 5 minutes and the suspension was added to a solution of N-terminus deprotected linear peptide or amino acid ester (NH₂-AA-COOEt) (1 eq.) in dry THF, followed by DIPEA (1 eq.). The reaction mixture was stirred overnight and concentrated under vacuum. 30 mL of AcOEt were added and the organic phase was washed with HCl 5% (3 × 5 mL), brine (3 × 5 mL) and NaHCO₃ (3 × 5 mL), dried with Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude material was purified by flash chromatography.

3.2.2. Ester hydrolysis. 1 eq. of the ester was dissolved in THF and 3 eq. of de LiOH dissolved in water. The reaction was stirred for two hours at room temperature. THF was removed under vacuum. HCl 5% was added to the remaining solution to a pH of 3. The solution was extracted with AcOEt. The organic layers were dried with Na₂SO₄, filtered, and the solvent removed under vacuum.

3.2.3. Boc deprotection procedure. A threefold excess of a solution of 1.8 M HCl in dioxane was added to the Boc-aminoacid. The solution was stirred at room temperature for an hour and the solvent removed under vacuum. The obtained hydrochloride derivative was used in the next step without further purification.

3.3. Macrocyclization in solution phase

3.3.1. Method I. Macrocyclization reaction of the corresponding linear peptide was performed in diluted conditions (1–5 mM) using HBTU or HATU (1.5 eq.), DIPEA (3 eq.), 4-DMAP (catalytic) in dried CH₂Cl₂ at room temperature during 3 days. The reaction mixture was washed with HCl 5% and then with saturated aqueous NaHCO₃, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash chromatography to obtain the pure macrocycle.

3.3.2. Method II. The trifluoroacetate salt of the corresponding linear peptide was dissolved in dried CH₂Cl₂ and diluted to a concentration of 1–5 mM. DIPEA (1 eq.) was added to enable dissolution. EDCI (1.2 eq.) and oxyrna (1.2 eq.) were added at 0 °C and the reaction mixture was stirred for 10 minutes. Then, the reaction mixture is allowed to reach room temperature and stirred for 3 days. The reaction mixture was washed with HCl 5% and then with saturated aqueous NaHCO₃, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash chromatography to obtain the pure macrocycle.

3.3.2.1. Cyclo-[NHMeAla-Anth-NMeAla-Anth-Ala] (versicotide A) (1). The trifluoroacetate salt of NHMeAla-Anth-NMeAla-Anth-Ala-OH was obtained as a white solid following the general SPPS procedure. The global yield, based on the determination of the resin loading, was 90% (352 mg, 0.58 mmol). ESI-MS *m/z* calc.

for C₂₅H₃₂N₅O₆ ([M + H]⁺) 498.2, found 498.4. Macrocyclization reaction was performed following the general procedure method I (dilution 5 mM, 3 days), starting from the trifluoroacetate salt of linear peptide NHMe-Ala-Anth-Ala-NMeAla-Anth-Ala-OH (200 mg, 0.33 mmol), using HATU as coupling agent. Further purification by flash chromatography using AcOEt as mobile phase, rendered the desired macrocycle in 50% yield (78 mg, 0.16 mmol). HPLC analysis employing H₂O : MeCN and 0.1% formic acid in a 90 : 10 to 0 : 100 linear gradient showed two peaks of retention times 7.9 and 8.1 min in 1 : 1.4 ratio. Thermal analysis by NMR, proved them to be conformers. 85% total purity.

3.3.2.2. Cyclo-[NMeAla-Anth-NMeAla-Anth-Ala] (1). White solid (Y = 50%). R_f = 0.32 (AcOEt). [α]_D²⁵ = −215.7 (c 0.275, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) Three conformers were present: conformer A : conformer B : conformer C in 1 : 0.4 : 0.1 ratio. δ 1.30–1.37 (m, 3H_a, 6H_b, 6H_c), 1.41 (d, J = 6.8 Hz, 3H_a, 3H_b), 1.53 (d, J = 6.7 Hz, 3H_a), 1.58 (d, J = 6.9 Hz, 3H_c), 2.70 (s, 3H_a), 2.75 (s, 3H_b), 2.77 (s, 3H_b), 2.84 (s, 3H_a), 2.87 (s, 3H_c), 3.23 (s, 3H_c), 4.68–4.80 (m, 1H_a, 2H_c), 4.81–4.92 (m, 1H_a), 5.00–5.08 (m, 1H_b), 5.20 (q, J = 6.8 Hz, 1H_a), 5.26–5.34 (m, 1H_c), 5.35–5.44 (m, 2H_b, 1H_c), 7.14–7.20 (m, 1H_a, 1H_b), 7.22–7.28 (m, 1H_a, 2H_c), 7.40–7.58 (m, 3H_a, 1H_b, 3H_c), 7.77 (d, J = 8.2 Hz, 1H_b), 7.86 (dd, J = 8.0, 0.9 Hz, 1H_b), 7.98–8.09 (m, 2H_a, 1H_c), 8.48 (dd, J = 8.3, 0.7 Hz, 1H_c), 8.54 (dd, J = 8.4, 0.4 Hz, 1H_b), 8.60 (dd, J = 8.4, 0.7 Hz, 1H_a), 8.73 (s, 1H_c), 9.04 (s, 1H_b), 9.27 (d, J = 3.7 Hz, 1H_b), 9.40 (d, J = 4.2 Hz, 1H_a), 9.51 (s, 1H_a), 11.43 (s, 1H_b), 12.22 (s, 1H_a), 12.67 (s, 1H_c). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 13.5 (C_b), 15.0 (C_a), 15.3 (C_a), 15.5 (C_b), 16.6 (C_a), 17.5 (C_b), 28.7 (C_b), 29.4 (C_a), 29.8 (C_a), 38.7 (C_b), 45.5 (C_b), 46.7 (C_a), 55.7 (C_b), 56.2 (C_a), 59.2 (C_a), 116.9 (C_a), 119.4 (C_b), 119.5 (C_a), 119.7 (C_b), 122.9 (C_a), 123.0 (C_b), 124.4 (C_a), 124.8 (C_b), 125.4 (C_a), 125.5 (C_a), 126.2 (C_b), 126.6 (C_b), 127.5 (C_a), 129.4 (C_b), 129.6 (C_a), 130.6 (C_b), 130.7 (C_a), 133.1 (C_b), 133.8 (C_a), 136.0 (C_b), 136.2 (C_b), 136.7 (C_a), 139.2 (C_b), 140.3 (C_a), 167.9 (C_a), 168.5 (C_a), 168.8 (2C_b), 169.3 (C_b), 169.5 (C_a), 169.6 (C_a), 169.9 (C_b), 170.1 (C_b), 173.0 (C_a), 173.1 (C_b). ESI-MS *m/z* calc. for C₂₅H₃₀N₅O₆ ([M + H]⁺) 480.2, found 480.3.

3.3.2.3. Cyclo-[NHMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla] (versicotide B) (2). The trifluoroacetate salt of NHMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla-OH was obtained as a white solid following the general SPPS procedure. The global yield based on the determination of the resin loading, was 87% (350 mg, 0.57 mmol). ESI-MS *m/z* calc. for C₂₅H₃₂N₅O₆ ([M + H]⁺) 498.2, found 498.4. Macrocyclization reaction was performed following the general procedure method I or II (dilution 5 mM, 3 days), starting from the trifluoroacetate salt of linear peptide NHMe-Ala-Anth-Ala-NMeAla-Anth-Ala-OH (200 mg, 0.33 mmol). Cyclization method I, using HATU as coupling agent, rendered the desired macrocycle in 18% yield (28 mg, 0.06 mmol) after purification by flash chromatography using AcOEt as mobile phase. HPLC analysis employing H₂O : MeCN and 0.1% formic acid in a 90 : 10 to 0 : 100 linear gradient showed two peaks tr = 7.5 and 7.8 min. Cyclization method II, using Oxyrna and EDCI as coupling reagents rendered the desired macrocycle in 54% yield (65 mg, 0.13 mmol) after purification by flash chromatography using AcOEt : EP (3 : 2) as mobile phase. HPLC analysis

employing H₂O : MeCN and 0.1% formic acid in a 90 : 10 to 0 : 100 linear gradient in 15 min showed two peaks *tr* = 7.5 and 7.8 min in a 1.4 : 1 ratio. Collection of the peaks at the end of the column and LC-MS analysis revealed both peaks have the same mass as the natural product versicotide B. Thermal analysis by NMR proved them to be conformers. 91% total purity.

3.3.2.4. Cyclo-[NMeAla-Anth-Ala-Anth-NMeAla] (2). Yellow solid (*Y* = 54%). ESI-MS *m/z* calc. for C₂₅H₃₀N₅O₆ ([*M* + *H*]⁺) 480.2, found 480.6. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) two conformers A : B in 1 : 1.3 ratio. δ 1.13 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H_a), 1.26 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H_b), 1.40–1.44 (m, 6H_a, 3H_b), 1.47 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H_b), 2.24 (s, 3H_a), 2.96 (s, 3H_b), 2.99 (s, 3H_b), 3.06 (s, 3H_a), 4.14–4.25 (m, 1H_a), 4.52–4.68 (m, 1H_b), 4.70–4.87 (m, 1H_a), 5.08–5.17 (m, 1H_b), 5.17–5.26 (m, 1H_a), 5.30–5.41 (m, 1H_b), 7.12–7.22 (m, 1H_a + 1H_b), 7.23–7.31 (m, 1H_a), 7.34 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H_b), 7.39–7.58 (m, 2H_a, 2H_b), 7.60 (m, 2H_a), 7.81 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H_b), 8.07 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_b), 8.16 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H_a), 8.44–8.5 (m, 2H_a + 2H_b), 9.07–9.20 (m, 2H_a), 9.24 (s, 1H_b), 9.36 (s, 1H_b), 10.58 (s, 1H_a), 10.92 (s, 1H_b). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.5 (C_a), 13.8 (C_b), 14.8 (C_a), 16.7 (C_a), 17.1 (C_b), 17.5 (C_b), 28.7 (C_a), 30.3 (C_b), 30.8 (C_a), 34.3 (C_b), 49.8 (C_b), 50.3 (C_b), 52.1 (C_a), 52.5 (C_a), 52.6 (C_b), 54.5 (C_a), 120.3, 120.6, 122.1, 123.1, 123.7, 124.3, 124.6, 125.6, 126.1, 127.3, 128.6, 129.2, 129.4 (C_a), 130.2, 130.6, 132.1 (C_a), 132.9, 135.3, 136.2, 137.4 (C_a), 139.8, 141.6, 145.7, 168.4 (C_b), 168.6 (C_a), 169.6 (2C_{a,b}), 169.8 (C_a), 170.3 (C_b), 170.9 (C_b), 171.3 (C_a), 171.9 (C_a), 172.3 (C_b).

3.3.2.5. Cyclo-[NHMe-Ala-Anth-Ala-NMe-Ala-Anth-Ala] (versicotide C) (3). The trifluoroacetate salt of NHMe-Ala-Anth-Ala-NMe-Ala-Anth-Ala-OH was obtained as a white solid following the general SPPS procedure. The global yield, based on the determination of the resin loading, was 98% (240 mg, 0.35 mmol). ESI-MS *m/z* calc. for C₂₈H₃₇N₆O₇ ([*M* + *H*]⁺) 569.3, found 569.3. Macrocyclization reaction was performed following the general procedure method I (dilution 5 mM, 3 days), starting from the trifluoroacetate salt of linear peptide NHMe-Ala-Anth-Ala-NMe-Ala-Anth-Ala-OH (200 mg, 0.30 mmol), using HATU as coupling agent. Further purification by flash chromatography using AcOEt as mobile phase, rendered the desired macrocycle in 49% yield (77 mg, 0.15 mmol). HPLC analysis employing H₂O : MeCN and 0.1% formic acid in a 90 : 10 to 0 : 100 linear gradient showed 93% purity, *tr* = 6.88 min.

3.3.2.6. Cyclo-[NMeAla-Anth-Ala-NMeAla-Anth-Ala] (3). White solid (*Y* = 49%). *R_f* = 0.25 (AcOEt). [α]_D²⁵ = –35.83 (c 0.25, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO) two conformers were present: A (*trans, trans*)-conformer and B (*cis, cis*)-conformer in 1 : 0.2 ratio. (*trans, trans*) Conformer: δ 1.43 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.50 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.93 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H), 5.26–5.36 (m, 1H), 6.91–6.99 (m, 1H), 7.34–7.41 (m, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.75 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 8.69 (dd, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 1H), 11.88 (s, 1H). (*cis, cis*) Conformer: δ 1.34 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 1.67 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 2.73 (s, 3H), 4.69 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.26–5.36 (m, 1H), 6.86–6.91 (m, 1H), 7.05–7.11 (m, 1H), 7.88 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 8.07 (dd, *J* = 8.4, 0.8 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 12.29 (s, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, (CD₃)₂CO) (*trans, trans*) conformer: δ 12.7(2C), 18.1(2C), 38.4(2C), 46.7(2C), 63.1(2C), 119.5(2C), 119.9(2C), 122.6(2C),

128.6(2C), 133.2(2C), 141.6(2C), 168.3(2C), 169.8(2C), 172.3(2C). (*cis, cis*) Conformer: δ 17.1(2C), 18.1(2C), 28.4(2C), 46.1(2C), 56.4(2C), 119.8(2C), 120.1(2C), 128.1(2C), 133.3(2C), 141.6(2C), 142.9(2C), 169.7(2C), 170.7(2C), 171.1(2C). ESI-MS *m/z* calc. for C₂₈H₃₅N₆O₆ ([*M* + *H*]⁺) 551.3, found 551.3.

3.3.2.7. Cyclo-[NH₂Ala-Ala-Anth-Ala-Anth] (4). Compound 5 was prepared by solution phase synthesis, either by coupling method I or II (yield 42% and 51% respectively). Half of dipeptide 5 was deprotected on the C terminal following the general ester hydrolysis procedure. The other half was deprotected on the N terminal by Boc deprotection procedure. The resulting dipeptides were coupled following coupling method I to obtain 6 in a 10% yield. 6 was subjected to Boc deprotection conditions and then Boc-Ala-OH was coupled with coupling method I to obtain 7. 7 was deprotected first on the C terminal with ester hydrolysis procedure, and then at the N terminal with Boc deprotection procedure. The resulting peptide was cyclized following macrocyclization method II to render cyclopeptide 4 in 35% yield.

3.3.2.8. Cyclo-[Ala-Ala-Antr-Ala-Antr] (4). Yellow solid *R_f* = 0.41 (AcOEt : EP, 4 : 1). ¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 1.27–1.36 (m, 3H), 1.53–1.62 (m, 6H), 4.46–4.58 (m, 1H), 4.63–4.75 (m, 1H), 4.80–4.95 (m, 1H), 7.08–7.19 (m, 2H), 7.72 (dd, *J* = 7.6, 1.0 Hz, 1H), 7.48 (m, 2H), 7.85 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.98–8.06 (m, 1H), 8.10–8.19 (m, 1H), 8.20–8.26 (m, 1H), 8.35 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 11.05 (s, 1H), 11.31 (s, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, (CD₃)₂CO) δ (ppm) 15.5, 17.1, 17.4, 49.6, 50.4, 51.2, 121.1, 121.2, 121.4, 121.5, 122.6, 122.8, 123.7, 125.3, 127.4, 128.6, 131.4, 132.1, 168.3, 170.2, 171.2, 173.0, 173.1. MS *m/z* calc. for C₂₃H₂₅N₅O₅ ([*M* + *H*]⁺) 452.19, found 452.2.

See ESI† for HPLC chromatograms, MS and NMR spectra data of the cyclopeptides.

4. Conclusions

In conclusion, the syntheses of three natural products, versicotides A–C, containing Anth, were accomplished in very good yields and purity after searching for the most adequate methodology and coupling reagents. The combination of oxyma and DIC, provided a simple methodology to achieve difficult couplings involving the aromatic amine of Anth, in short times, to avoid possible rearrangements or side reactions, and with very good yields. This methodology could be applied to the synthesis of interesting compounds containing this motif.

Macrocyclization of versicotides A and C was achieved with HATU and no epimerization was detected. For macrocyclization of versicotide B (2), Oxyma and EDCI provided higher yield. In the versicotides A–C NMR spectra, the presence of well-defined peaks for each conformer shows that these molecules are rigid enough for the conversion from one conformer into another to be slower than NMR time scale. A deep analysis of versicotide C NMR spectra led us to conclude that a mixture of (*cis, cis*) and (*trans, trans*) symmetrical conformers is present in DMSO-*d*₆ rather than a single (*cis, trans*) conformer as previously reported for the natural product. Biological evaluation against *P. falciparum* of compounds 1–4 will be performed and reported in the due course.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors acknowledge the collaboration of Leopoldo Suescun and Alejandro Peixoto to obtain the versicotide A X-ray crystallographic data. This work was supported by Grants from CSIC Grupos 2006 (Universidad de la República) and PEDECIBA (Uruguay). The authors acknowledge a postgraduate fellowship from CAP (UdelaR) (Laura Posada).

Notes and references

- (a) F. Giordanetto and J. Kihlberg, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 278; (b) S. Peña, L. Scarone and G. Serra, *Future Med. Chem.*, 2015, **7**, 355.
- (a) J. Mallinson and I. Collins, *Future Med. Chem.*, 2012, **4**, 1409; (b) J. E. Bock, J. Gavenonis and J. A. Kritzer, *ACS Chem. Biol.*, 2013, **8**, 488; (c) A. Bhat, L. R. Roberts and J. J. Dwyer, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **94**, 471; (d) A. A. Vinogradov, Y. Yi and H. Suga, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, **141**(10), 4167.
- B. I. Díaz-Eufracio, O. Palomino-Hernández, R. A. Houghten and J. L. Medina-Franco, *Mol. Diversity*, 2018, **22**, 259.
- (a) W. M. Hewitt, S. S. F. Leung, C. R. Pye, A. R. Ponkey, M. Bednarek, M. P. Jacobson and R. S. Lokey, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 715; (b) L. Doedens, F. Opperer, M. Cai, J. G. Beck, M. Dedek, E. Palmer, V. J. Hruby and H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 8115; (c) O. Ovadia, S. Greenberg, J. Chatterjee, B. Laufer, F. Opperer, H. Kessler, C. Gilon and A. Hoffman, *Mol. Pharmaceutics*, 2011, **8**, 479.
- (a) A. Alex, D. S. Millan, M. Perez, F. Wakenhut and G. A. Whitlock, *MedChemComm*, 2011, **2**, 669; (b) A. Whitty, M. Zhong, L. Viarengo, D. Beglov, D. R. Hall and S. Vajda, *Drug Discovery Today*, 2016, **21**, 712; (c) P. Matsson and J. Kihlberg, *J. Med. Chem.*, 2017, **60**, 1662; (d) G. Caron and G. Ermondi, *Drug Discovery Today*, 2017, **22**, 835; (e) M. Rossi Sebastiano, B. C. Doak, M. Backlund, V. Poongavanam, B. Over, G. Ermondi, G. Caron, P. Matsson and J. Kihlberg, *J. Med. Chem.*, 2018, **61**, 4189.
- D. W. Carney, K. R. Schmitz, J. V. Truong, R. T. Sauer and J. K. Sello, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 1922.
- L. M. De Leon Rodriguez, E. T. Williams and M. A. Brimble, *Chemistry*, 2018, **24**, 17869.
- (a) D. J. Newman and G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.*, 2016, **79**, 629; (b) J. W. Li and J. C. Vederas, *Science*, 2009, **325**(5937), 161.
- (a) C. Jiménez, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2018, **9**(10), 959; (b) T. F. Molinski, D. S. Dalisay, S. L. Lievens and J. P. Saludes, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2008, **8**, 69.
- R. J. Cox, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 2010.
- L. N. Zhou, H. Q. Gao, X. S. Cai, T. J. Zhu, Q. Q. Gu and D. H. Li, *Helv. Chim. Acta*, 2011, **94**, 1065.
- J. Peng, H. Gao, X. Zhang, S. Wang, C. Wu, Q. Gu, P. Guo, T. Zhu and D. Li, *J. Nat. Prod.*, 2014, **77**, 2218.
- R. Chen, Z. Cheng, J. Huang, L. Dong, C. Wu, P. Guo and W. Lin, *RSC Adv.*, 2017, **7**, 49235.
- (a) S. Peña, C. Fagundez, A. Medeiros, M. Comini, L. Scarone, D. Sellanes, E. Manta, J. Tulla-Puche, F. Albericio, L. Stewart, V. Yardley and G. Serra, *MedChemComm*, 2014, **5**, 1309; (b) C. Fagundez, D. Sellanes and G. Serra, *ACS Comb. Sci.*, 2018, **20**, 212; (c) C. Fagundez, D. Sellanes, S. Peña, L. Scarone, A. C. C. Aguiar, J. de Souza, R. V. C. Guido, L. Stewart, V. Yardley, S. Ottilie, E. A. Winzeler, F.-J. Gamo, L. M. Sanz and G. L. Serra, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2019, **10**, 137.
- L. Posada and G. Serra, *Tetrahedron Lett.*, 2019, **60**(48), 151281.
- (a) S. T. Y. Ngen, H. Kaur, P. A. Hume, D. P. Fukert and M. A. Brimble, *J. Org. Chem.*, 2016, **81**, 7635; (b) K. Nakao, Y. Hamada and T. Shioiri, *Chem. Pharm. Bull.*, 1989, **37**, 930; (c) M. C. Tseng, H. Y. Yang and Y. H. Chu, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 419; (d) S. K. Chettu, R. B. Madhu, G. B. Raolji, K. R. Babu, N. S. K. Rao, S. Gopalakrishnan, A. Ismail, G. B. Reddy and S. Shafi, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 61555; (e) P. Lewer, P. R. Graupner, D. R. Hahn, L. L. Karr, D. O. Duebelbeis, J. M. Lira, P. B. Anzeveno, S. C. Fields, J. R. Gilbert and C. Pearce, *J. Nat. Prod.*, 2006, **69**, 1506.
- (a) R. Costil, H. J. A Dale, N. Fey, G. Whitcombe, J. V Matlock and J. Clayden, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2017, **56**, 12533; (b) J. Noguchi, M. Kawai and M. Hamada, *Isr. J. Chem.*, 1974, **12**, 87.
- N. Vasudevan, K. Kashinath and D. S. Reddy, *Org. Lett.*, 2014, **16**(23), 6148.
- E. Falb, T. Yechezkel, Y. Salitra and C. Gilon, *J. Pept. Res.*, 1999, **53**, 507.
- D. Xin and K. Burgess, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 5049.
- (a) S. B. Baravkar, M. A. Wagh, D. Paul, M. Santra and G. J. Sanjayan, *Tetrahedron Lett.*, 2018, **59**, 3473; (b) S. B. Baravkar, A. Roy, R. L. Gawade, V. G. Puranik and G. J. Sanjayan, *Synth. Commun.*, 2014, **44**, 2955; (c) L. A. Errede, *J. Org. Chem.*, 1976, **41**, 1763; (d) L. A. Errede, J. J. McBrady and H. T Oien, *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 656.
- Y. Masuda, R. Tanaka, K. Kai, A. Ganesan and T. Doi, *J. Org. Chem.*, 2014, **79**(17), 7844.
- R. Subirós-Funosas, R. Prohens, R. Barbas, A. El-Faham and F. Albericio, *Chem.-Eur. J.*, 2009, **15**, 9394.
- (a) D. E. Dorman and F. A. Bovey, *J. Org. Chem.*, 1973, **38**, 1719; (b) R. Quintanilla-Licea, J. F. Colunga-Valladares, A. Caballero-Quintero, C. Rodríguez-Padilla, R. Tamez-Guerra, R. Gómez-Flores and N. Waksman, *Molecules*, 2002, **7**, 662.
- X ray CDCC reference number of compound 1: 2023773†.

