



GRADO UNIVERSITARIO EN FARMACIA.

ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE PRODUCTOS NATURALES



Mairys Nicools Morín Seguerí.

2018

Tutores: Sandra Dévora Gutiérrez y Dácil Hernández Mesa.

ÍNDICE

	Página
• Abstract	3
• Abreviaturas y acrónimos	4
• Introducción	5
• Objetivos del trabajo	7
• Resultados y discusión	8
• Materiales y métodos	17
• Conclusiones	23
• Bibliografía	24
• Anexo	25

ABSTRACT

Since many pathogens have become resistant to standard antimicrobial treatments, there is an urgent need to develop new antimicrobials. Host-defense peptides (HDP, also called antimicrobial peptides AMPs) have been used by animals and plants as a defense against pathogens during millions of years, with very little development of resistance, because of their multiple mechanism of action. Thus, they can disrupt the pathogen cell membrane or its cytoplasmic processes, alter its genetic material, and finally, recruit the immune system.

As part of a research line on the synthesis of drugs and bioactive compounds, this work is devoted to the development of small antimicrobial peptides, or components of these peptides. Since the desired biological activity requires a balance between cationic and hydrophobic residues, a non-proteinogenic cationic amino acid, which will likely increase *in-vivo* peptide stability to proteases, was prepared first. The efficient synthesis of Dap (L-2,3-Diaminopropionic acid) from commercial L-serine is reported herein, as well as its coupling to an hydrophobic amino acid (hydroxyproline methyl ester), in order to generate the desired dipeptide.

Likewise, the purification of the peptide and its precursors was carried out by different chromatography techniques (rotary, column and thin layer chromatography), followed by their characterization by using different spectroscopic techniques ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, COZY, HSQC, IR) and elemental analysis.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Ac	Acetilo
AcOEt	Acetato de etilo
b.a	Banda ancha
Cbz	Benciloxicarbonil
d	Doblete
dd	Doble doblete
δ	Desplazamiento químico en RMN (en ppm)
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
EM	Espectrometría de masa
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
Equiv	Equivalentes
Et	Etilo
Hyp	4-trans-hidroxiprolina
Hz	Hertzios
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	Multiplete
Me	Metilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mmol	Milimol
MHz	Megahertzios
Ph	Fenilo
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
s	Singlete

INTRODUCCIÓN

Los péptidos son moléculas formadas por la unión de aminoácidos mediante enlaces peptídicos diferenciándose de las proteínas por su menor tamaño (2-100 aminoácidos). Al igual que las proteínas, éstos juegan un papel clave en muchos procesos fisiológicos. De hecho, estos metabolitos son motivo de estudio en diversas disciplinas, dado que presentan actividades biológicas de interés para el ser humano o para las plantas, entre ellas actividad antifúngica, antibacteriana, inmunomoduladora y anticancerígena.¹⁻³

Recientemente, ha surgido gran interés en los péptidos antimicrobianos, dado que muchos patógenos se han vuelto resistentes a los tratamientos habituales, lo que la OMS considera la mayor amenaza a corto plazo contra la salud humana.⁴ Si no se afronta bien esta amenaza, en el año 2050 las infecciones serán la principal causa de muerte de los países desarrollados. Entre los antimicrobianos más prometedores, se encuentran los péptidos antimicrobianos (*antimicrobial peptides*, AMPs)⁵ y, en especial, los péptidos de defensa del hospedador (*host-defense peptides*, HDP).⁶ Estos últimos han sido usados durante millones de años por animales y plantas como defensa contra los patógenos, con un desarrollo de resistencias mínimo, debido a su mecanismo de acción múltiple. Estos péptidos pueden actuar: desorganizando la membrana celular o el material genético de la célula, alterando procesos citoplasmáticos claves o, finalmente, reclutando el sistema inmunológico.⁶

Los HDP se caracterizan por ser de pequeño tamaño (hasta 50 aminoácidos), son anfifílicos y tienen una carga catiónica neta. La bioactividad depende de una correcta proporción entre aminoácidos hidrofóbicos (alanina, fenilalanina, prolina, etc.) y catiónicos (lisina, ornitina, arginina, etc.) pues, un exceso de estos últimos produce hemólisis y otros efectos secundarios, pero un defecto de los mismos produce pérdida de la actividad antimicrobiana.

Como fármacos, los HDP tienen ventajas importantes: un amplio espectro de actividad, actúan sinérgicamente con otros antibióticos, inducen muy poca resistencia, y neutralizan endotoxinas. Sin embargo, algunos de estos péptidos tienen problemas de estabilidad *in vivo*, de biodisponibilidad, o de toxicidad, con lo que se están desarrollando análogos sintéticos que permitan solucionar dichos problemas. Por ejemplo, para aumentar su estabilidad *in vivo*, se preparan péptidos con aminoácidos no naturales o análogos de aminoácidos no reconocibles por las enzimas. Algunos de estos análogos ya están en uso clínico o en fases clínicas avanzadas.⁶

Cuando se desarrollan análogos, es importante optimizar la proporción de residuos catiónicos e hidrofóbicos. Por ello, en este proyecto se han desarrollado unidades con un residuo catiónico (ácido 2,3-Diaminopropiónico, Dap) y un residuo hidrofóbico (hidroxiprolina, Hyp). El Dap es un homólogo del α -aminoácido lisina, y está presente en varios péptidos antimicrobianos como edeínas,⁷ tuberactinomycinas⁸ o bleomicinas.⁹

Este trabajo se ha realizado con el grupo de *Síntesis de Fármacos y Compuestos Bioactivos (SFCB)* del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Este grupo trabaja en la preparación de péptidos bioactivos, especialmente de péptidos antimicrobianos de interés en biomedicina, salud animal, y en agricultura (seguridad alimentaria).⁶ Es de destacar que el grupo ha desarrollado metodologías para la modificación selectiva de péptidos por transformación de “*unidades convertibles*” como serina, treonina o hidroxiprolina.¹⁰ Gracias a ello, a partir de muy pocos péptidos de partida, se pueden obtener colecciones (quimiotecas) de péptidos con residuos variados como deshidroaminoácidos,¹⁰ cetoésteres,¹¹ etc. El estudio de la actividad antimicrobiana de estas quimiotecas ha permitido identificar péptidos con una potente actividad y baja toxicidad contra patógenos humanos y fitopatógenos.

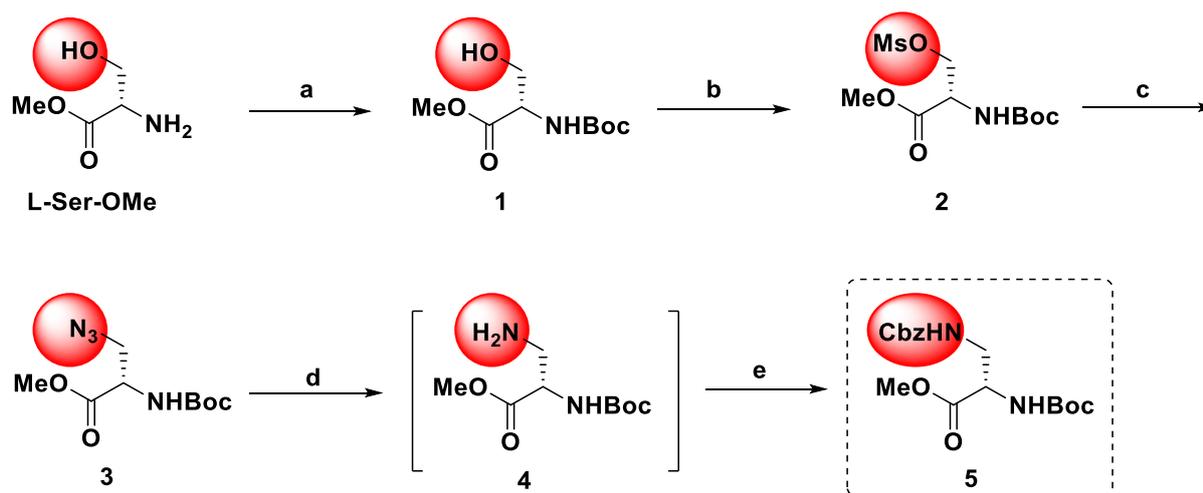
OBJETIVOS

- Sintetizar y purificar un derivado del ácido L-2,3-Diaminopropiónico (Dap) a partir de L-serina comercial utilizando reacciones, técnicas y procedimientos básicos de síntesis orgánica.
- Preparar un dipéptido con un residuo catiónico y otro hidrofóbico, acoplado el derivado de Dap sintetizado con 4-*trans*-hidroxiprolina natural haciendo uso de reacciones estándar para el acoplamiento peptídico.
- Confirmar la estructura de los compuestos obtenidos mediante Resonancia Magnética Nuclear (^1H , ^{13}C , COSY y HSQC) y caracterizarlos determinando otras características de éstos, como son su espectro de infrarrojo, actividad óptica y, si se trata de un sólido cristalino, su punto de fusión.
- Preparar muestras del péptido puro para posteriores estudios estructura-actividad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se va a preparar un componente de péptidos antimicrobianos consistente en un dipéptido formado por un residuo catiónico (ácido L-2,3-Diaminopropiónico, Dap) y otro hidrofóbico (hidroxiprolina, Hyp).

El derivado de Dap que se necesita para el acoplamiento tiene un alto valor comercial, por ello, se prefirió prepararlo a partir del metil éster de serina comercial (**Esquema 1**).



Esquema 1. Síntesis del derivado de Dap 5. a) Anhídrido de Boc, NaHCO₃, THF/H₂O. b) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂. c) NaN₃, acetona/H₂O. d) Pd(OH)₂/C, MeOH. e) BnOCOCl, NaHCO₃, THF/H₂O.

En primer lugar, se protegió la amina del metil éster de L-serina comercial en forma de metilcarbamato para que no reaccionase en los pasos sucesivos. Para ello, se trató con anhídrido de Boc y NaHCO₃, dando lugar al producto **1**, que se purificó por cromatografía.

Posteriormente (conversión **1**→**2**), el grupo OH del compuesto **1**, se transformó en un grupo mesilo (OMs). Estos dos primeros pasos de reacción transcurrieron sin complicaciones, obteniéndose los productos esperados con rendimientos del 86% y del 89%, respectivamente.

Tras preparar el compuesto **2**, se trató con azida sódica para sustituir el grupo mesilo (OMs) por un grupo azida (N₃), buen precursor del grupo β-amino del Dap. Sin embargo, esta transformación presentó problemas; en muchas condiciones, se producía eliminación del mesilato para dar derivados de deshidroalanina. Después de probar varias condiciones de reacción, se consiguió el producto de interés tratando el mesilo con azida sódica (NaN₃) y NH₄Cl en disolución de acetona/agua en proporción 8:1. Tras su purificación, se aisló con un rendimiento del 26%, resultado que habrá que mejorar en un futuro.

Los dos últimos pasos de reacción consistieron en la reducción de la azida a un grupo amino y posterior protección de este, dos procesos que transcurrieron sin incidentes, obteniéndose

el derivado del ácido 2,3-diaminopropiónico **5**, con un rendimiento global en los dos pasos, del 58%.

Una vez completada la síntesis del derivado de Dap **5**, se preparó el dipéptido deseado **6** (**Figura 1**) por acoplamiento del diaminoácido **5** con el metil éster de la L-*trans*-hidroxirolina comercial.

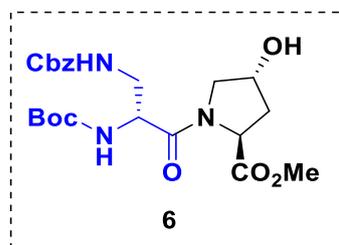
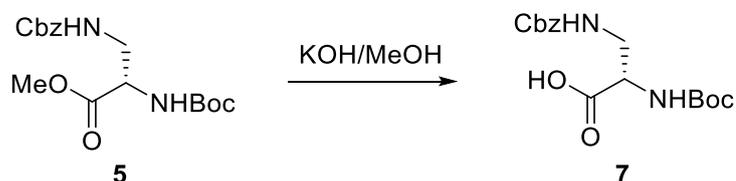


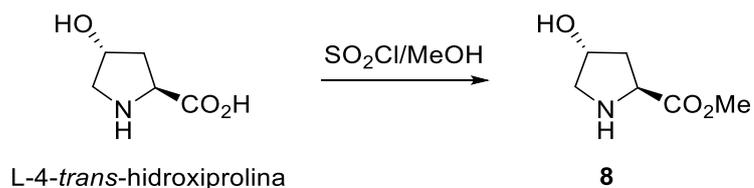
Figura 1. Dipéptido de L-Dap y L-4-*trans*-hidroxirolina.

Para poder llevar a cabo el acoplamiento entre el grupo ácido del derivado de Dap **5** y el grupo amino de la hidroxirolina, se realizó primero la saponificación del éster en **5** (**Esquema 2**). El ácido libre **7** no se purificó, sino que el crudo de la saponificación se utilizó en el paso de acoplamiento.



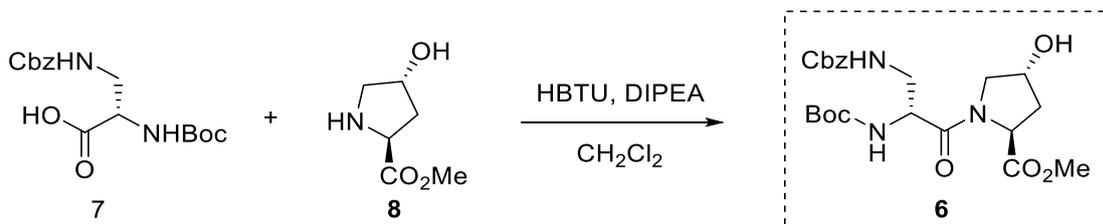
Esquema 2. Saponificación de **5**.

La hidroxirolina comercial tiene los grupos amino y ácido libres. Para el acoplamiento, se necesita dejar el grupo amino libre. Sin embargo, hay que proteger el grupo ácido para que no reaccione en el paso siguiente. Por ello, se formó el metil éster de hidroxirolina, por tratamiento de la L-hidroxirolina comercial con cloruro de tionilo en metanol (**Esquema 3**). Se ha de destacar que, este éster así formado, tiene rendimiento cuantitativo.



Esquema 3. Metilación de L-4-*trans*-hidroxirolina.

Finalmente, los sustratos **7** y **8** se acoplaron, utilizando condiciones de síntesis de péptidos ya establecidas, con HBTU como reactivo de acoplamiento (**Esquema 4**). La reacción transcurrió favorablemente aislándose el dipéptido **6** con un rendimiento del 64%.

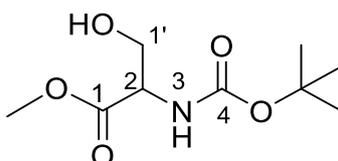


Esquema 4. Síntesis del péptido Dap-Hyp **6**.

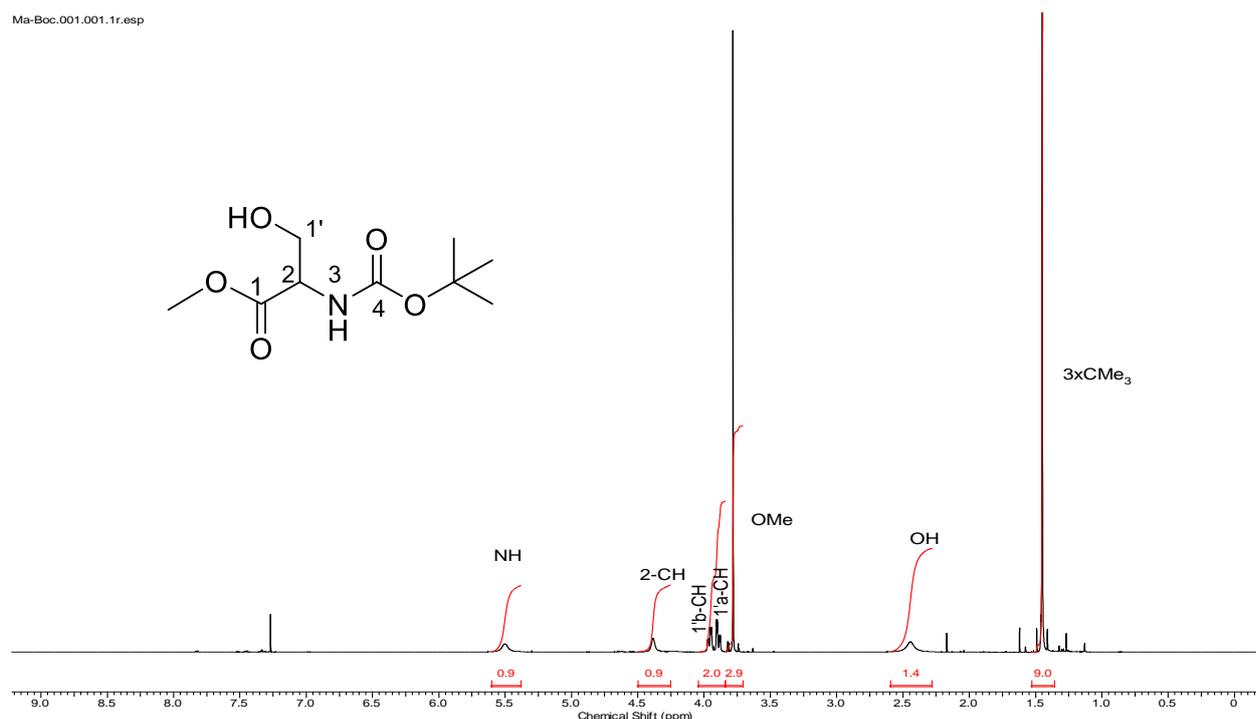
Las estructuras de todos los compuestos sintetizados durante el desarrollo de este trabajo de fin de grado se comprobaron utilizando técnicas de RMN ¹H y RMN ¹³C, así como experimentos de doble dimensión (COSY y HSQC). Igualmente se utilizaron técnicas de espectroscopía infrarroja (IR), análisis elemental, y actividad óptica.

De forma ilustrativa, se comenta a continuación la caracterización del compuesto **1**.

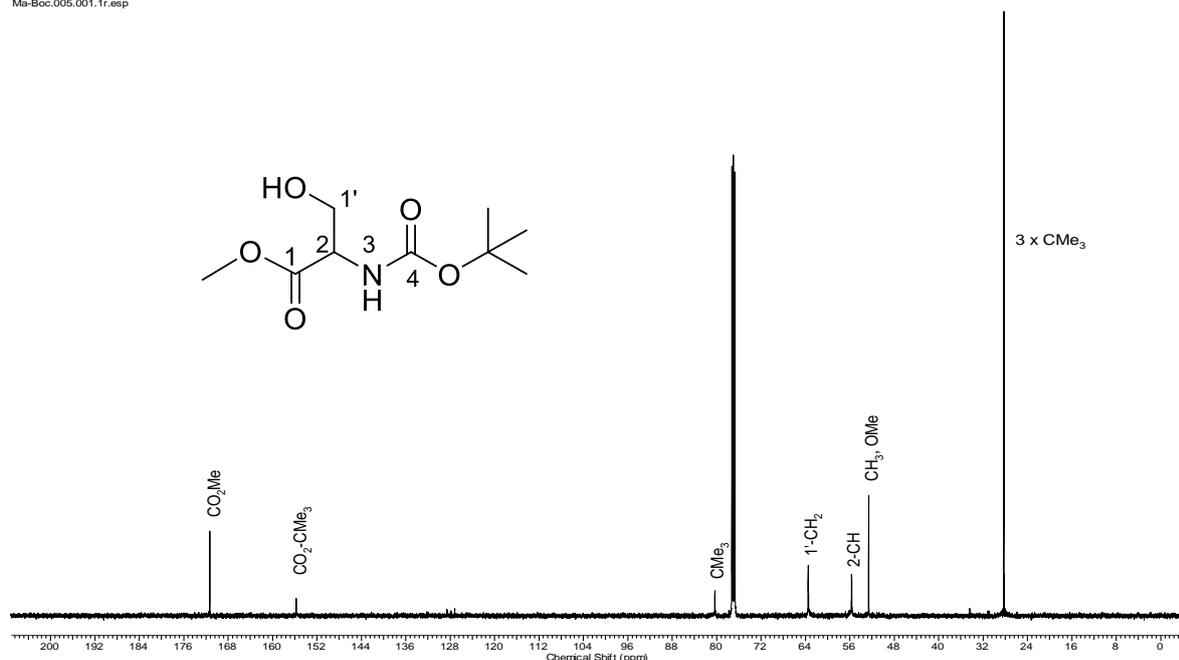
Producto 1



En la caracterización se realizaron primero los espectros de resonancia magnética de protón (RMN ¹H) y de carbono-13 (RMN ¹³C). El desplazamiento químico (δ) de las señales de los protones y carbonos ayudó a asignar los principales grupos funcionales.

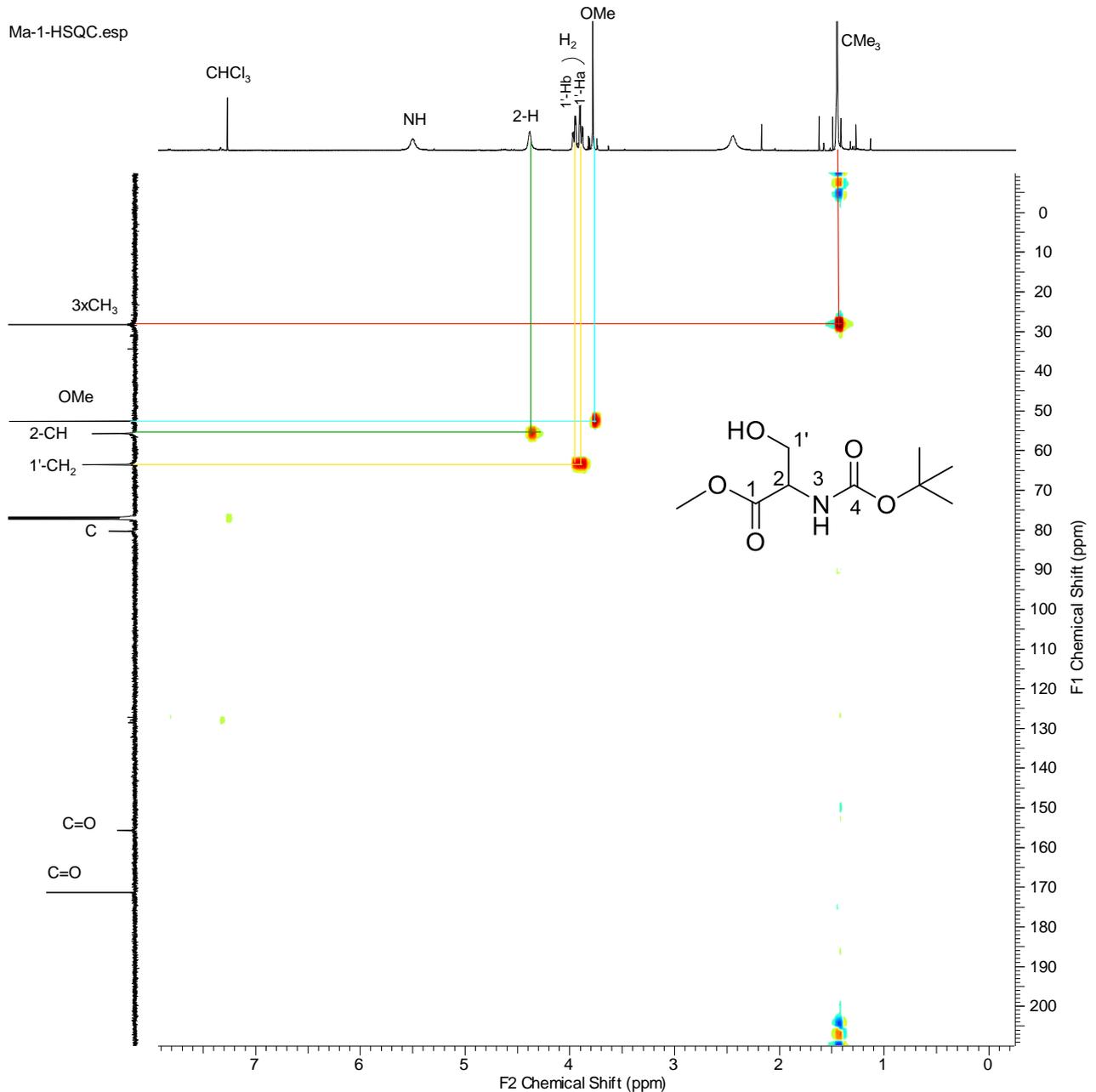


1.45 ppm → 9H, s, CMe₃	Señal que integra por 9 protones. Se trata de un singlete, lo que indica que no hay protones en posiciones contiguas. Corresponde a los 3 metilos del grupo protector Boc unidos a un carbono cuaternario.
2.44 ppm → 1H, br s, OH	Señal que integra por un protón. En el HSQC no se observa correlación con ningún carbono, por lo que se deduce que está unido a un heteroátomo. Corresponde a: -OH.
3.78 ppm → CH₃, s, OMe	Señal que integra por tres protones. Se trata de un metilo sin hidrógenos contiguos. Su desplazamiento indica que su carbono está unido a un heteroátomo. Corresponde a CH ₃ -O.
3.89 ppm → 1H, dd, J = 3.5, 11.4 Hz. 1'-Ha	Señal que integra por un protón. Aparece como doblete, debido al acoplamiento con dos protones (uno geminal y el otro contiguo). Por su desplazamiento químico, su carbono debe estar unido a un heteroátomo. Corresponde a uno de los protones del CH ₂ -OH
3.96 ppm → 1H, dd, J = 3.8, 11.4 Hz. 1'-Hb	Similar al anterior.
4.38 ppm → 1H, 2-H	Multiplete que integra por un protón. Por su desplazamiento químico, su carbono está unido a un heteroátomo. Posteriormente se observará con el experimento COSY que es el 2-H.
5.50 ppm → 1H, br s, NH	Banda ancha que integra por un protón. En el HSQC no se observa correlación con carbonos. Por su desplazamiento, sería un NH.



28.3 ppm → 3 x CH ₃ , CMe ₃	Señal correspondiente a tres metilos equivalentes. Con el experimento de HSQC se comprobará que se trata de los metilos del grupo protector Boc (C-Me ₃).
52.6 ppm → CH ₃ , OMe	Señal correspondiente a un carbono. Por su desplazamiento químico se sabe que se trata de un metilo unido a un heteroátomo. Con el HSQC se comprobará que se trata del grupo CH ₃ -O
55.7 ppm → CH, 2-CH	Señal correspondiente a un CH. Por su desplazamiento químico corresponde al carbono en posición 2.
63.5 ppm → CH ₂ , 1'-CH ₂	Señal correspondiente al CH ₂ contiguo al OH.
80.3 ppm → C, CMe ₃	Señal de carbono cuaternario, y por tanto sin correspondencia en HSQC con ningún protón. Por su desplazamiento químico se deduce que se trata del cuaternario del grupo Boc.
155.7 ppm → CO, CO ₂ CMe ₃	Esta señal también corresponde a carbono cuaternario, pero por su desplazamiento químico debe pertenecer a un grupo carbonilo. Concretamente a un carbamato (R-NH-CO-O-R) que está menos desapantallado que un grupo éster. Es el C=O del grupo Boc.
171.3 → CO, CO ₂ Me	Se corresponde con un carbono de carbonilo. Por el desplazamiento químico, se deduce que se trata del éster.

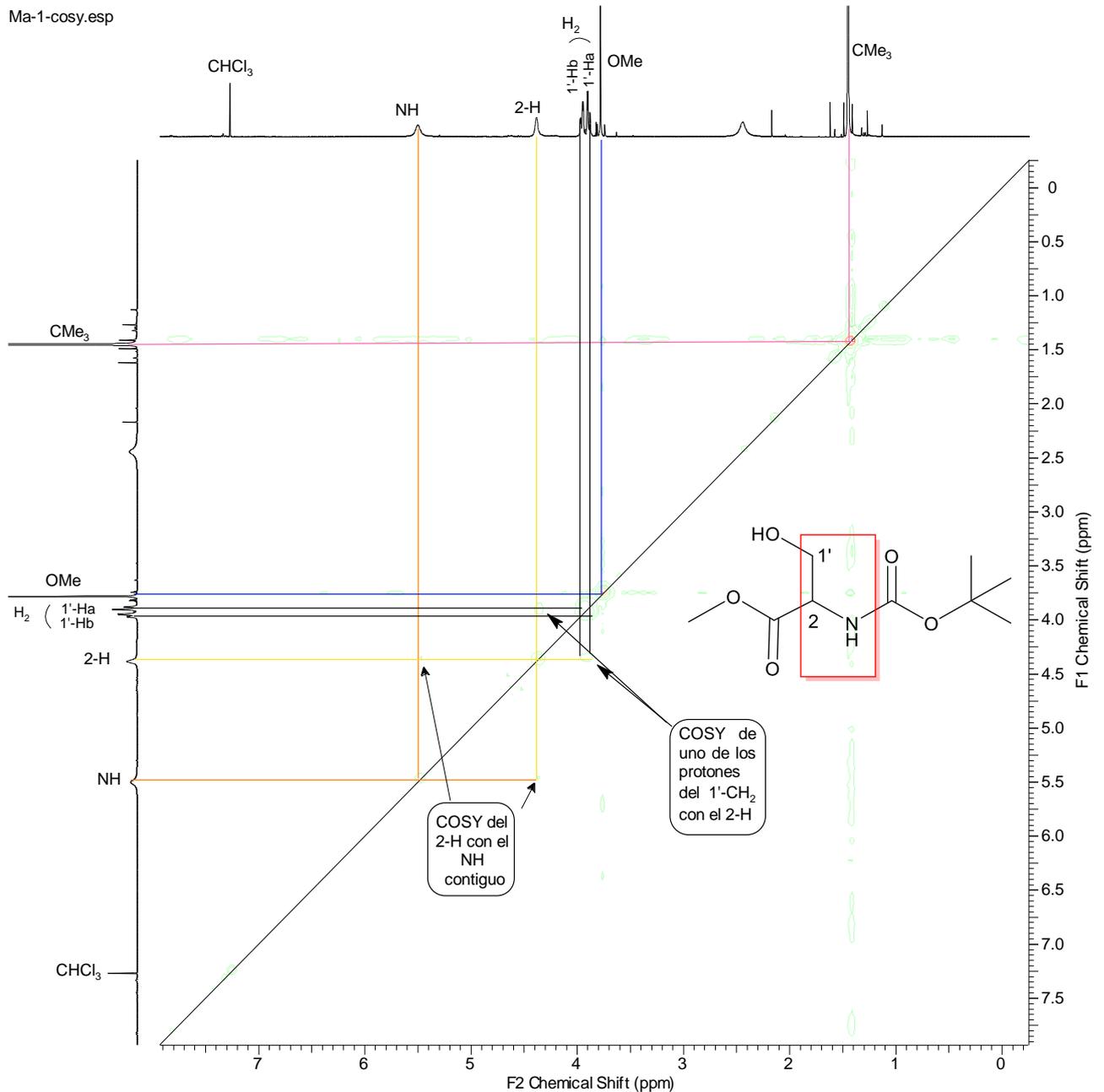
HSQC



En el HSQC se puede ver el espectro de protón en la parte superior, mientras que el espectro de carbono aparece en la parte izquierda. Así, por ejemplo, la señal de protón a δ 5.50 no está relacionada con la señal de los carbonos; ello es debido a que dicho protón va unido a un nitrógeno y no a un carbono. Se trata la señal de un grupo amino. En cambio, la señal de protón a cerca de δ 4.38 está correlacionada con un CH, y teniendo en cuenta sus desplazamientos químicos, se concluye que en la molécula hay un grupo CHN. El resto de las señales se identifican siguiendo el mismo procedimiento, mediante la ayuda de tablas de desplazamientos químicos para señales de RMN ^1H y RMN ^{13}C .

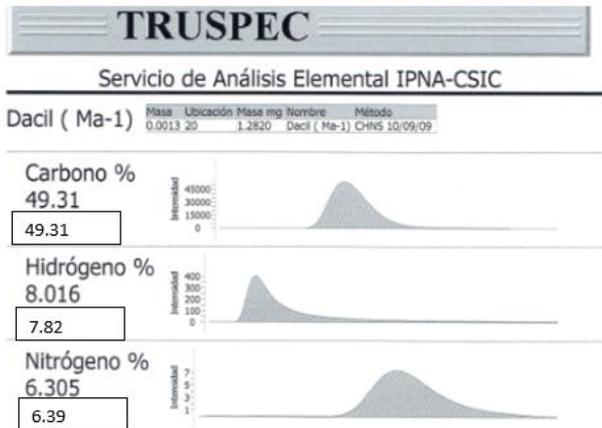
COSY

Ma-1-cosy.esp



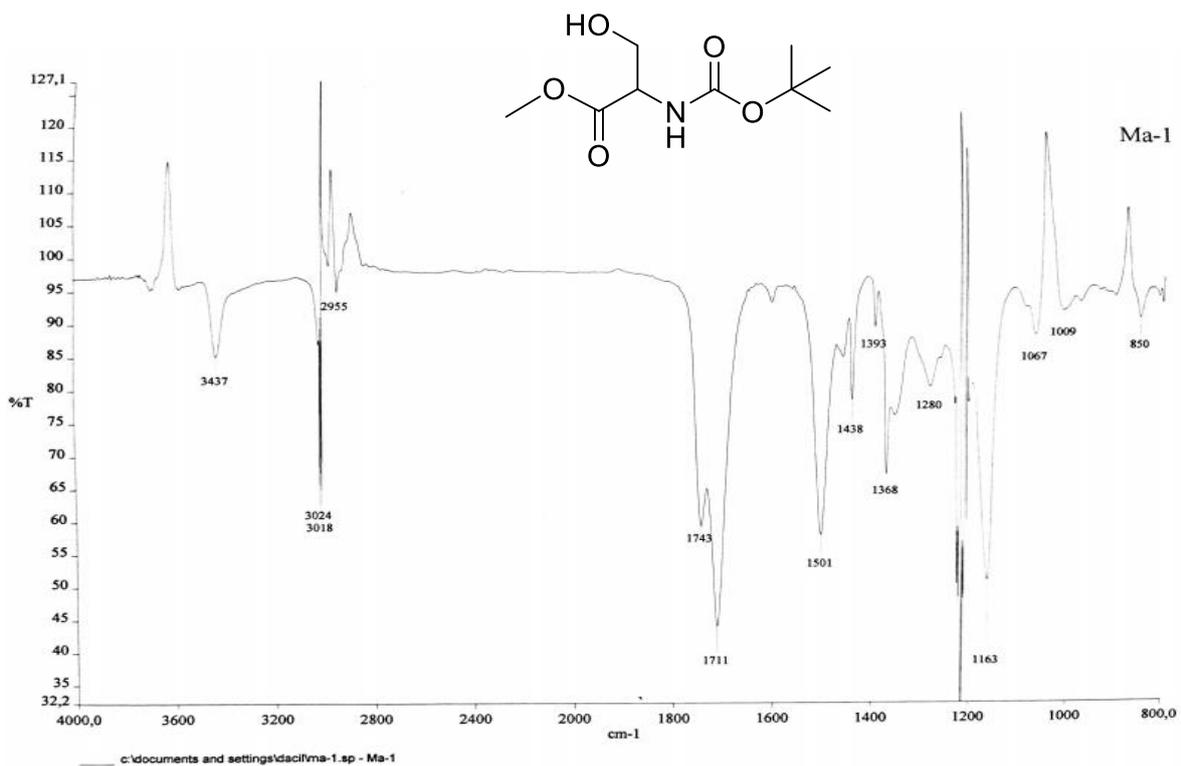
En el experimento de COSY se puede ver dos espectros de protón, tanto en la parte superior como a la izquierda. La señal de cada protón se correlaciona con las de los protones cercanos con los que se acopla. De esta forma, con ambos experimentos se puede ir estableciendo la secuencia de CH_n de la molécula.

Análisis elemental



El análisis elemental da el porcentaje de C, H y N que hay en la molécula, con gran precisión. Así se puede comprobar que la fórmula química del compuesto propuesto se corresponde con la fórmula experimental

IR



El espectro de infrarrojo presenta bandas de absorción características de cada grupo funcional presente en la molécula. En este caso, son de importancia para la caracterización del compuesto las bandas correspondientes a grupos carbonilo a 1743 y 1711 cm^{-1} y la del grupo amida, solapada con la del grupo OH, a 3437 cm^{-1} .

El péptido **6** y sus intermedios sintéticos han sido incorporados a una biblioteca de compuestos para posteriores estudios de relaciones estructura-actividad antimicrobiana y citotóxica.

MATERIALES Y METODOS

a. *TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.*

Cromatografía en capa fina.

La evolución de las reacciones y de las cromatografías en columna y rotatoria se monitorizó mediante placas de gel de sílice Merck (60 F₂₅₄ de 0,25 mm de espesor). Los eluyentes empleados se especifican en cada caso. El revelado de las mismas se realizó utilizando:

- Exposición a la luz ultravioleta de 254 nm.
- Pulverización con una disolución de permanganato potásico (por cada litro de agua, 10 g de KMnO₄, 66,7 g K₂CO₃ y 0,85 g NaOH) y posterior calentamiento.

Cromatografía en columna.

Para algunos crudos de reacción, la purificación se realizó mediante cromatografía en columna, utilizando gel de sílice Merck 60 (0,063 - 0,2 mm) con gradientes de polaridad de los disolventes indicados en cada caso.

Cromatografía rotatoria.

Para cromatografía preparativa se empleó el cromatotrón, aparato que utiliza un sistema de placas circulares en los que la mezcla a resolver se separa por un proceso de cromatografía en centrífuga. Se utilizaron placas circulares de 1 ó 2 mm de grosor de gel de sílice Merck (60 PF₂₅₄) con yeso.

b. *TÉCNICAS EXPERIMENTALES GENERALES.*

Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C se realizaron en los espectrómetros Bruker, modelo Avance II 500 (500 MHz para ¹H y 125.7 MHz para ¹³C). Como disolventes, se usaron cloroformo y metanol deuterados. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresaron en partes por millón (ppm), en relación al disolvente empleado como referencia interna, y las constantes de acoplamiento (*J*), en Hertzios (Hz)

Análisis elemental.

Los análisis elementales se realizaron en un analizador Fisons modelo EA 1108 CHNS

Actividad óptica.

La rotación óptica se determinó con un polarímetro Perkin-Elmer modelo 241 Plus. Las medidas se tomaron usando la línea D de emisión de la lámpara de sodio a una temperatura de 25 °C. Se empleó cloroformo como disolvente, la longitud de la célula empleada es de 1 dm y la concentración está dada en g/100 mL de disolución.

c. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS Y DE CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.

1. PROTECCIÓN DEL GRUPO AMINO DE LA METILSERINA CON ANHÍDRIDO DE BOC (1).

Metil éster de *N*-*t*-butoxicarbonil L-serina (1).

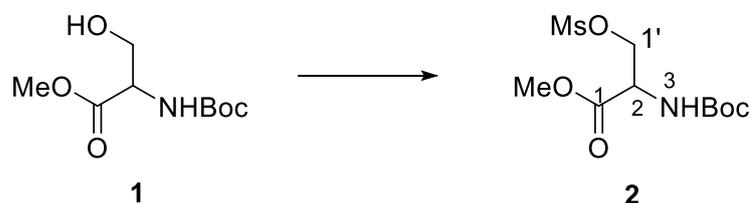


A una disolución de L-Ser-OMe comercial (5 g, 42,0 mmol) en THF (59 mL) y agua (82 mL) se añadió, a 0 °C y con agitación, NaHCO₃ (7 g, 84,0 mmol) y anhídrido de Boc (11,9 g; 54,6 mmol), y la mezcla se mantuvo con agitación 20 h. Luego se vertió sobre una disolución acuosa de HCl al 5%, y se extrajo con AcOEt. El combinado de extractos orgánicos se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío, y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 70:30), obteniendo finalmente el producto **1** como aceite amarillo (7,87 g, 86%).

Metil éster de *N*-*t*-butoxicarbonil L-serina (1). $[\alpha]_d = +10.2$ (*c* 0.73, CHCl₃). IR (CHCl₃) ν_{\max} 3437, 2955, 1743, 1501 cm⁻¹. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, 26 °C): δ_H 1.45 (9H, s, CMe₃), 2.44 (1H, br s, OH), 3.78 (3H, s, OMe), 3.89 (1H, dd, *J* = 3.5, 11.4 Hz, 1'-Ha), 3.96 (1H, dd, *J* = 3.8, 11.4 Hz, 1'-Hb), 4.38 (1H, m, 2-H), 5.50 (1H, br s, NH). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃, 26 °C): δ_C 28.3 (3 × CH₃, CMe₃), 52.6 (CH₃, OMe), 55.7 (CH, 2-C), 63.5 (CH₂, 1'-C), 80.3 (C, CMe₃), 155.7 (C, NCO₂), 171.3 (C, CO₂). Anal. Calcd para C₉H₁₇NO₅: C, 49.31; H, 7.82; N, 6.39. Encontrado: C, 49.31; H, 8.016; N, 6.305.

2. PROTECCIÓN DEL OH DE BOC-METILSERINA CON CLORURO DE MESILO (2).

Metil éster de *N*-*t*-butoxicarbonil-*O*-metilsulfonil L-serina (2).



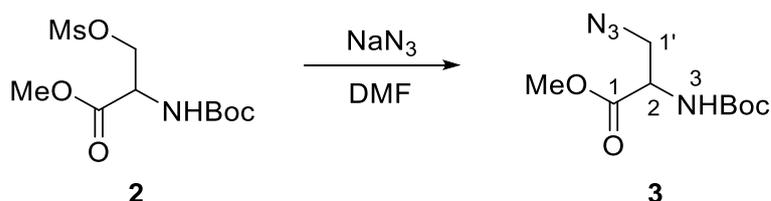
A una disolución del sustrato **1** (500 mg, 2,28 mmol) en CH₂Cl₂ seco (10 mL), a 0 °C, bajo atmósfera de nitrógeno y con agitación, se le añadió MsCl (0,19 mL) y Et₃N (0,63 mL, 4,56 mmol). Tras 30 min de reacción, se dejó que la mezcla alcanzara temperatura ambiente y se continuó agitando durante 4 horas. Entonces, se vertió en agua y se extrajo con CH₂Cl₂. El combinado de extractos orgánicos se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío, y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 60:40), obteniéndose finalmente el producto **2** como aceite incoloro (605 mg, 89%).

Metil éster de *N*-*t*-butoxicarbonil-*O*-metilsulfonil L-serina (2). [α]_D = +21.2 (c 0.39, CHCl₃).

IR (CHCl₃) ν_{\max} 3436, 2951, 1752, 1501 cm⁻¹. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, 26 °C): δ_{H} 1.46 (9H, s, CMe₃), 3.03 (3H, s, SO₂Me), 3.82 (3H, s, OMe), 4.51 (1H, dd, *J* = 3.2, 10.4 Hz, 1'-Ha), 4.58-4.62 (2H, m, 1'-Hb, 2-H), 5.41 (1H, br s, NH). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃, 26 °C): δ_{C} 28.2 (3 × CH₃, CMe₃), 37.4 (CH₃, SO₂Me), 53.06 (CH₃ + CH, OMe, 2-C), 68.9 (CH₂, 1'-C), 80.7 (C, CMe₃), 155.0 (C, NCO₂), 169.1 (C, CO₂). Anal. Calcd para C₁₀H₁₉NO₇S: C, 40.40; H, 6.44; N, 4.71; S, 10.78. Encontrado: C, 40.08; H, 6.59; N, 5.10; S, 10.68.

3. SUSTITUCIÓN DEL GRUPO MESILO CON AZIDA SÓDICA.

3-Azido-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)propanato de metilo (3).



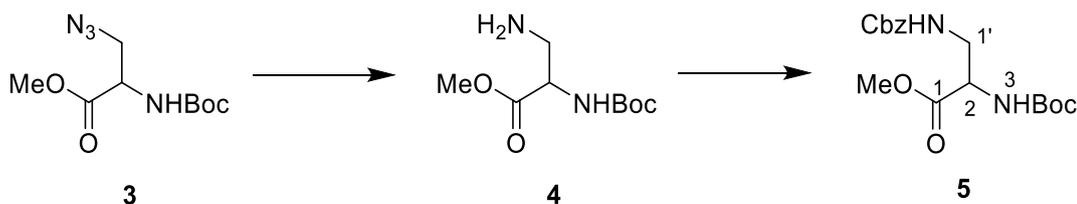
A una disolución del compuesto **2** (100 mg, 0,34 mmol) en acetona/agua 8:1 (10 mL), a 70 °C, se le añadió NH₄Cl (40 mg; 0,77 mmol) y NaN₃ (109,4 mg, 1,68 mmol) y la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 72 h. Entonces se vertió en agua y se extrajo con

AcOEt. El combinado de extractos orgánicos se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía rotatoria en cromatotrón (hexano/AcOEt, 95:5) para obtener el derivado de serina **3** como aceite incoloro (21,6 mg, 26%).

Metil éster de *N*-*t*-butoxicarbonil-*O*-metilsulfonil L-serina (3**).** [α]_d = +27.8 (c 0.47, CHCl₃). IR (CHCl₃) ν_{\max} 3433, 2951, 1747, 1500 cm⁻¹. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, 26 °C): δ_{H} 1.46 (9H, s, CMe₃), 3.72 (2H, d, J = 3.5 Hz, 1'-H₂), 3.80 (3H, s, OMe), 4.48 (1H, m, 2-H), 5.37 (1H, br s, NH). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃, 26 °C): δ_{C} 28.2 (3 × CH₃, CMe₃), 52.6 (CH₂, 1'-C), 52.8 (CH₃, OMe), 53.5 (CH, 2-C), 80.4 (C, CMe₃), 155.0 (C, NCO₂), 170.2 (C, CO₂). Anal. Calcd para C₉H₁₆N₄O₄: C, 44.26; H, 6.60; N, 22.63. Encontrado: C, 44.41; H, 6.770; N, 22.63.

4. HIDROGENACIÓN DE LA AZIDA Y PROTECCIÓN DE LA AMINA RESULTANTE CON BENCILCLOROFORMATO.

3-*N*-(Benciloxicarbonil)-2-*N*-(*t*-Butoxicarbonil)-2,3-diaminopropionato de metilo (5**).**



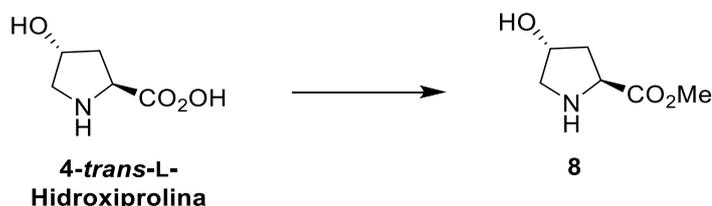
A una disolución de la azida **3** (399,4 mg, 1,64 mmol) en MeOH (32 mL) se le añadió el catalizador Pd(OH)₂/C (327 mg) y la mezcla se agitó, bajo atmósfera de hidrógeno durante 24 horas. Entonces, la mezcla se filtró sobre celita y se concentró a vacío. El producto obtenido se disolvió en THF (3 mL) y H₂O (mL), y la mezcla se enfrió a 0 °C para añadir una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (3 mL) y, gota a gota, cloroformato de bencilo (0,59 g, 3,48 mmol). Tras 24 h de reacción, la mezcla se vertió sobre una disolución acuosa al 5% de HCl y se extrajo con AcOEt. El combinado de extractos orgánicos se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía rotatoria en cromatotrón (hexano/AcOEt, 80:20) aislándose finalmente el derivado de Dap **5** como aceite incoloro (357,3 mg, 58%).

3-*N*-(Benciloxicarbonil)-2-*N*-(*t*-Butoxicarbonil)-2,3-diaminopropionato de metilo (5**).**

[α]_d = +16.1 (c 0.40, CHCl₃). IR (CHCl₃) ν_{\max} 3438, 2360, 1714, 1514 cm⁻¹. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, 26 °C): δ_{H} 1.44 (9H, s, C-Me₃), 3.60 (2H, m, 1'-H₂), 3.74 (3H, s, OMe), 4.38 (1H, br s, 2-H), 5.10 (2H, s, OCH₂Bn), 5.19 (1H, br s, NH-Cbz), 5.45 (1H, br s, NH-Boc), 7.32-7.36 (5H, m, Ph). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃, 26 °C): δ_{C} 28.2 (CH₃, C-Me₃), 42.9 (CH₂, 1'-C), 52.6

(CH₃, OMe), 54.0 (CH, 2-C), 67.0 (CH₂, OCH₂Bn), 80.3 (C, CMe₃), 128.1 (CH, Ph), 128.2 (2 × CH, Ph), 128.8 (2 × CH, Ph), 155.4 (C, NCO₂), 156.6 (C, NCO₂), 171.1 (C, CO₂Me). Anal. Calcd para C₁₇H₂₄N₂O₆: C, 57.94; H, 6.87; N, 7.95. Encontrado: C, 58.27; H, 6.922; N, 7.564.

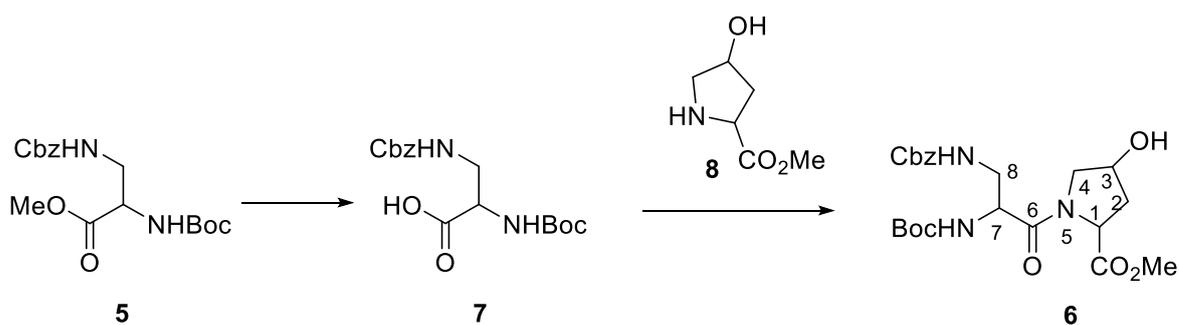
5. PREPARACIÓN DE 4-TRANS-L-HIDROXIPROLINA METIL ÉSTER (8)



El aminoácido comercial se disolvió en MeOH seco y se enfrió a 0 °C para añadir, bajo atmósfera de nitrógeno y gota a gota, SOCl₂ (2 equivalentes). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación toda la noche. Entonces, se llevó a sequedad en el rotavapor para obtener el producto metilado crudo (>95 %), que se utiliza en el proceso de acoplamiento peptídico sin purificación previa.

6. SAPONIFICACIÓN DEL METILÉSTER Y ACOPLAMIENTO PEPTÍDICO

***N*-[3-*N*-(Benciloxicarbonil)-2-*N*-(*t*-Butoxicarbonil)-2,3-diaminopropionil]-L-4-*trans*-hidroxirolina (6).**



El metil éster **5** (357,3 mg, 1,06 mmol) se disolvió en MeOH (5 mL) y se trató con una disolución acuosa 1M de KOH (2,11 mL, 2,11 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Entonces se vertió sobre una disolución acuosa de HCl, y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con agua y luego se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo obtenido (con el ácido **7**) se redisolvió en CH₂Cl₂ (5 mL), y la disolución se enfrió a 0 °C. A continuación, se añadieron metil 4-*trans*-hidroxirolina **8** (191,7 mg, 1,06 mmol), HBTU (440 mg, 1,16 mmol) y DIPEA (0,74 mL). Tras 2 h de reacción, la mezcla se vertió en agua y, la fase orgánica, se lavó con una

solución acuosa de NaHCO₃ (3 veces) y luego con HCl (3 veces). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía rotatoria en cromatotrón (hexano/AcOEt, 20:80) para obtener el dipéptido **6** en forma de sólido amorfo (316,5 mg, 64%).

***N*-[3-*N*-(Benciloxicarbonil)-2-*N*-(*t*-Butoxicarbonil)-2,3-diaminopropionil]-L-4-*trans*-hidroxiprolina (**6**). $[\alpha]_D = -42.4$ (*c* 0.77, CHCl₃). IR (CHCl₃) ν_{\max} 3428, 3021, 1744, 1650 cm⁻¹. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, 70 °C): δ_H 1.45 (9H, s, CMe₃), 2.02 (1H, m, 2-Ha), 2.30 (1H, m, 2-Hb), 2.48 (1H, br s, OH), 3.42-3.52 (2H, m, 8-H₂), 3.66 (1H, m, 4-Ha), 3.72-3.74 (3H, s, OMe), 3.77 (1H, m, 4-Hb), 4.49 (1H, m, 3-H), 4.56 (1H, m, 7-H), 4.68 (1H, t, *J* = 8.2 Hz, 1-H), 5.10 (1H, brd, *J* = 12.2 Hz, OCHa-Ph), 5.18 (1H, d, *J* = 12.3 Hz, OCHb-Ph), 5.39 (1H, br s, NHCbz), 5.50 (1H, br s, NHBoc), 7.31-7.39 (5H, m, Ph). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃, 70 °C): δ_C 28.3 (3 × CH₃, CMe₃), 37.5 (CH₂, 2-C), 43.6 (CH, 8-C), 52.1 (CH, 7-C), 52.3 (CH₃, OMe), 55.3 (CH₂, 4-C), 57.8 (CH, 1-C), 66.8 (CH₂, Bn), 70.3 (CH, 3-C), 80.3 (C, C-Me₃), 128.0 (CH, Ph), 128.1 (2 × CH), 128.5 (2 × CHPh), 136.9 (C, Ph), 155.6 (C, NCO₂), 156.3 (C, NCO₂), 170.0 (C, CO₂), 172.4 (C, CO₂). Anal. Calcd para C₂₂H₃₁N₃O₈: C, 56.76; H, 6.71; N, 9.03. Encontrado: C, 56.46; H, 7.04; N, 9.29.**

CONCLUSIONES

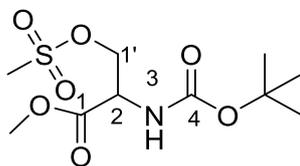
- Se ha sintetizado y purificado un derivado protegido del ácido L-2,3-Diaminopropiónico (Dap) a partir de L-serina comercial. El proceso ha implicado 5 pasos de reacción en los que se han trabajado reacciones de protección y desprotección de grupos funcionales comunes en el campo de los péptidos. Se ha conseguido sintetizar un producto de alto valor añadido a partir de un sustrato de bajo coste.
- Se ha preparado un dipéptido, componente de péptidos antimicrobianos, acoplado el residuo catiónico de Dap con el aminoácido hidrofóbico 4-*trans*-hidroxiprolina, haciendo uso de reacciones estándar para el acoplamiento peptídico.
- Se ha confirmado la estructura de los compuestos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas como la Resonancia Magnética Nuclear (^1H , ^{13}C , COSY y HSQC) e IR, así como análisis elemental. También se han determinado su actividad óptica y, si se trata de un sólido cristalino, su punto de fusión.
- Se han preparado muestras del péptido puro para posteriores estudios estructura-actividad antimicrobiana y citotóxica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Handbook of Biologically Active Peptides (Ed.: A. J. Kastin), Academic Press, San Diego, 2006.
2. Cabello-Ruiz, E.D., Núñez-González, M.A., & Torres de la Cruz, V.M. (2016). Actividad biológica de proteínas y péptidos. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 313-350.
3. Jiménez, J.C.; Giralt, E.; Albericio, F. *Péptidos y la industria farmacéutica*. Anales de La Real Sociedad Española de Química. Segunda Época, enero-marzo 2004, pág. 10-16.
4. <http://www.who.int/es/news-room/detail/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms>
5. Téllez, G.A.; Castaño, J.C. *Péptidos antimicrobianos*. *Infectio*. **2010**, 14(1), 55-67.
6. Boto, A.; Pérez de Lastra, J.M.; González, C.G. *The Road from Host-Defense Peptides to a New Generation of Antimicrobial Drugs*. *Molecules* **2018**, 23, 311.
7. Hettinger, T. P.; Craig, L. C. *The composition of the antibiotic peptide edeine A*. *Biochemistry* **1970**, 9, 521.
8. Yoshioka, H.; Aoki, T.; Goko, H.; Nakatsu, K.; Noda, T.; Sakakibara, H.; Take, T.; Nagata, A.; Abe, J.; Wakamiya, T.; Shiba, T.; Kaneko, T. Chemical studies on tuberactinomycin. II. The structure of tuberactinomycin *Tetrahedron Lett.* **1971**, 12, 2043.
9. (a) Takita, T.; Muraoka, Y.; Nakatani, T.; Fujii, A.; Umezawa, Y.; Naganawa, H. Chemistry of bleomycin. XIX Revised structures of bleomycin and phleomycin. *J. Antibiot.* 1978, 31, 801. (b) Scholtz, J. M.; Bartlett, P. A. A Convenient Differential Protection Strategy for Functional Group Manipulation of Aspartic and Glutamic Acids, *Synthesis* **1989**, 542.
10. Saavedra, C.; Hernández, D.; Boto, A. *Metal-Free, Site-Selective Peptide Modification by Conversion of "Customizable" Units into β -Substituted Dehydroamino Acids*. *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 1–10.
11. Hernández, D.; Boto, A.; Guzmán, D.; Alvarez, E. *Metal-free, direct conversion of α -amino acids into α -keto γ -amino esters for the synthesis of α,γ -peptides*. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 7736–7742.

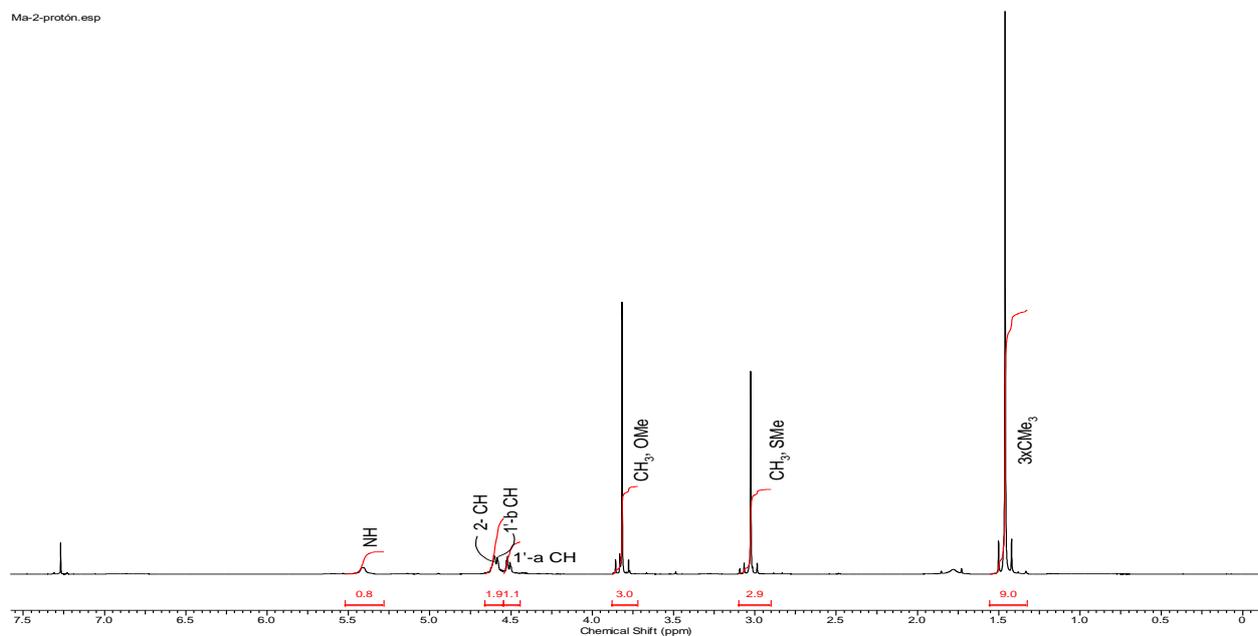
ANEXO

PRODUCTO 2



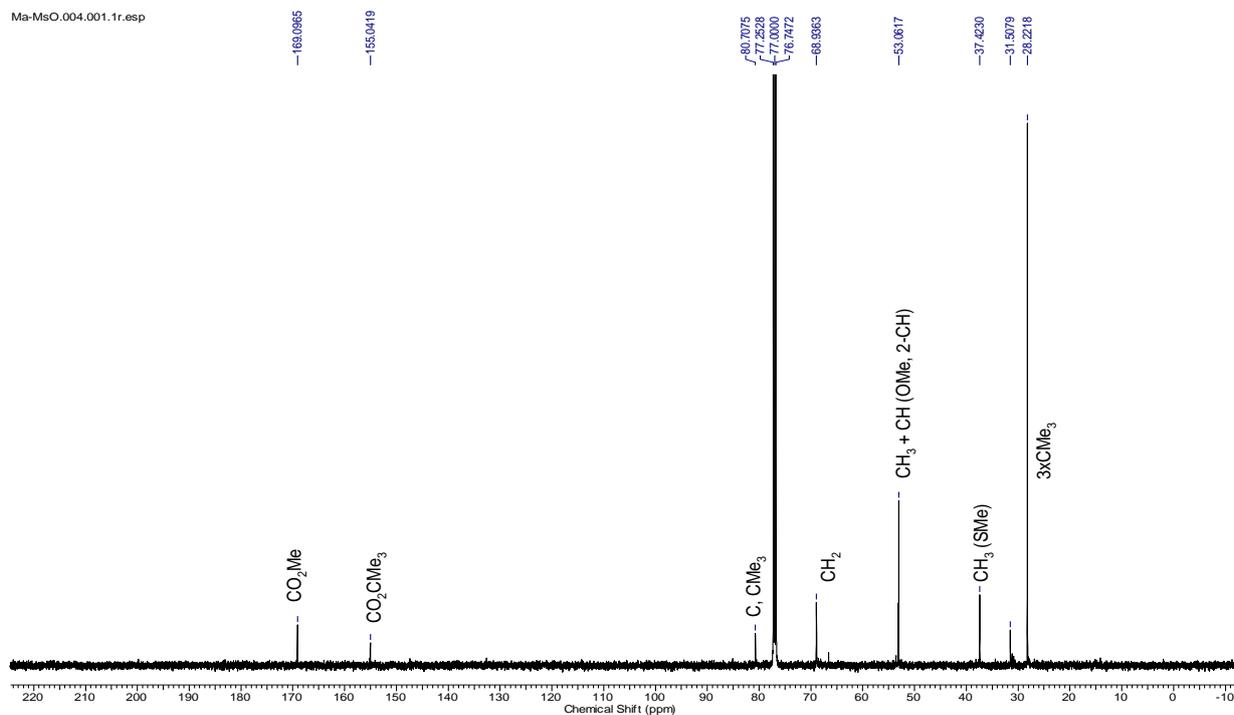
RMN ¹H

Ma-2-protón.esp

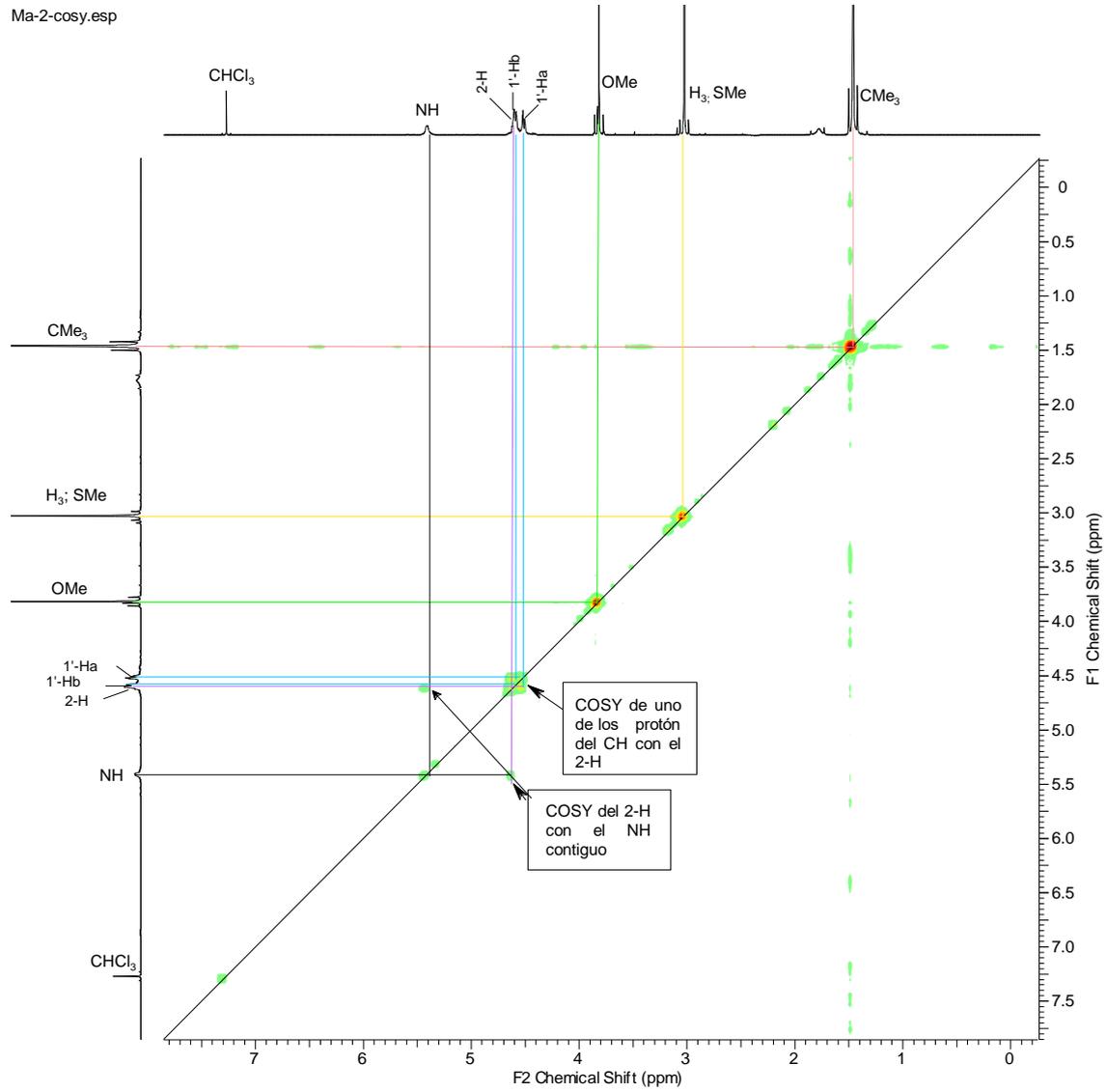


RMN ¹³C

Ma-MsO.004.001.1r.esp

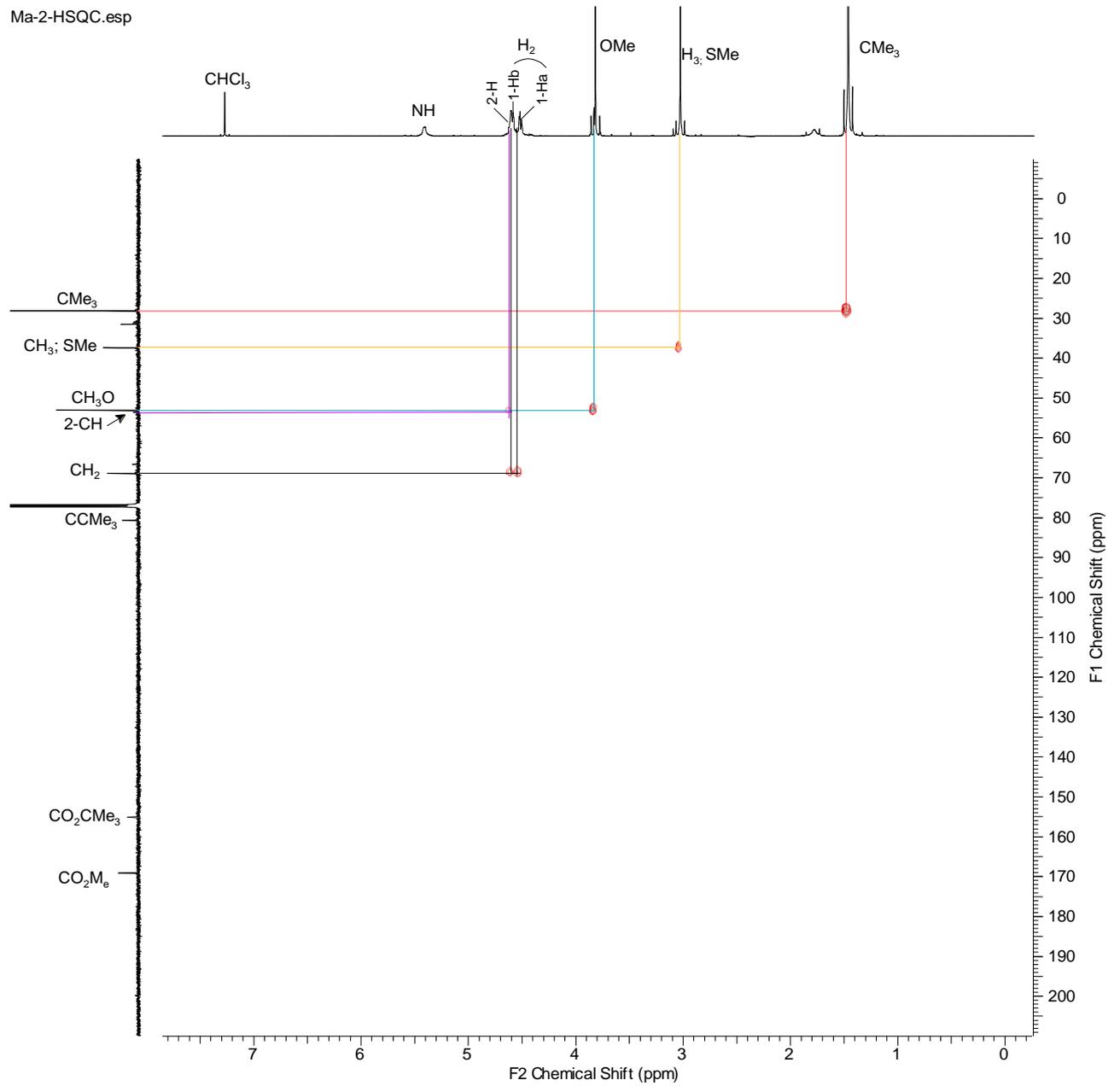


COSY

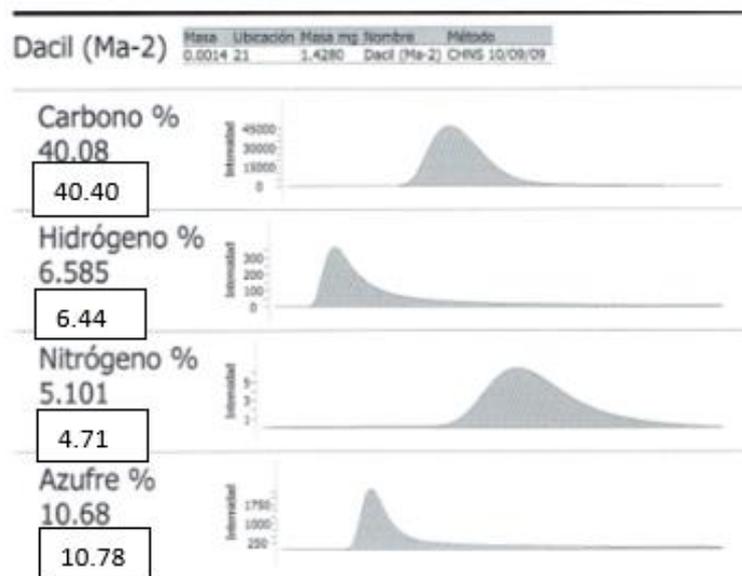


HSQC

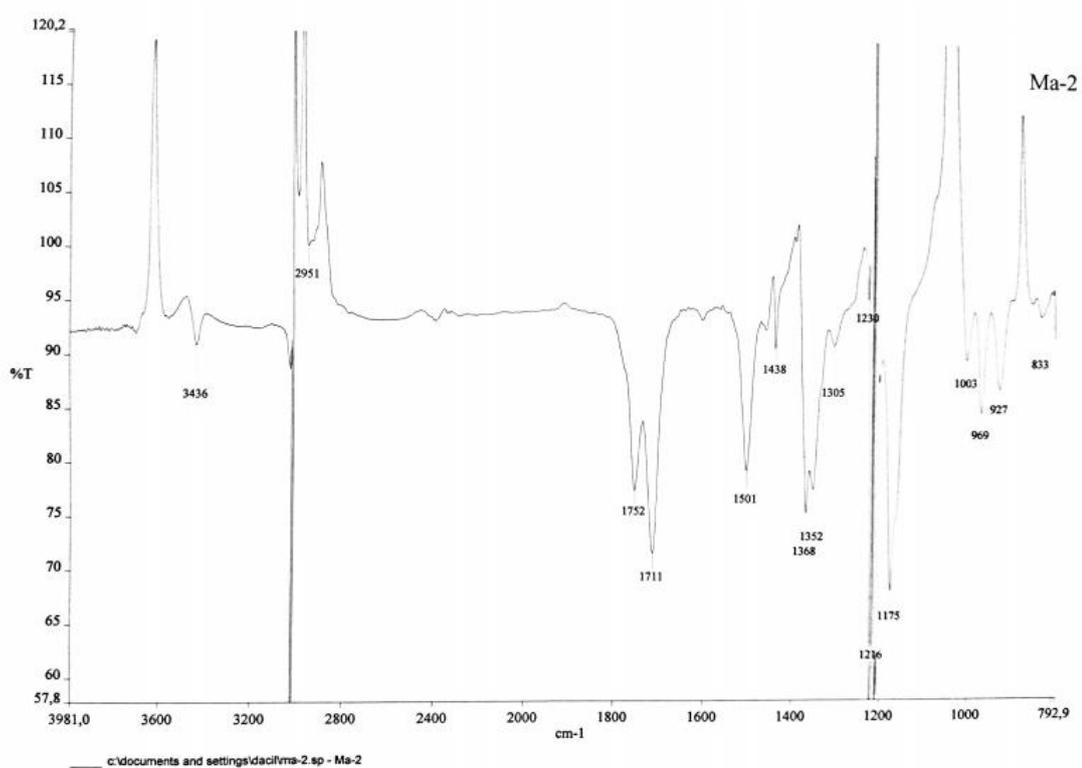
Ma-2-HSQC.esp



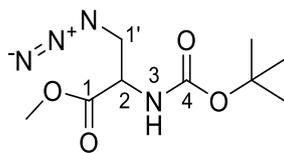
Análisis elemental



IR

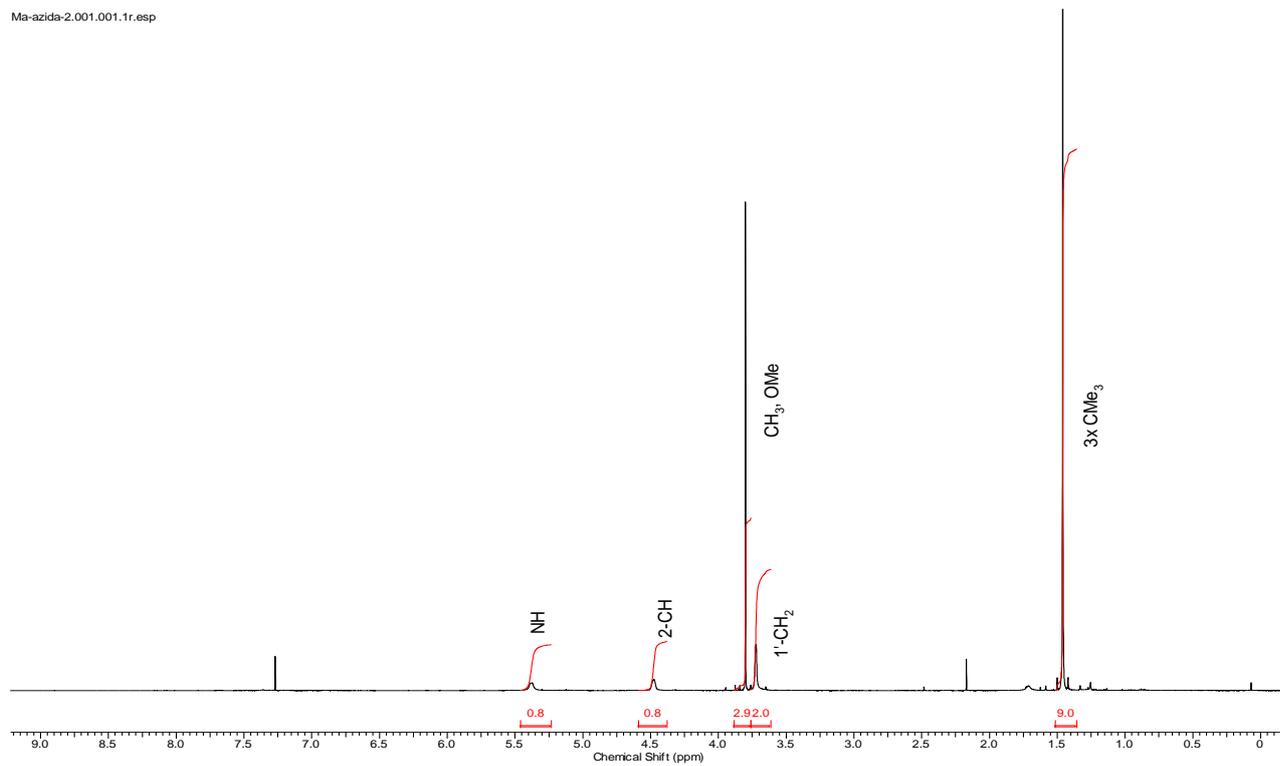


PRODUCTO 3



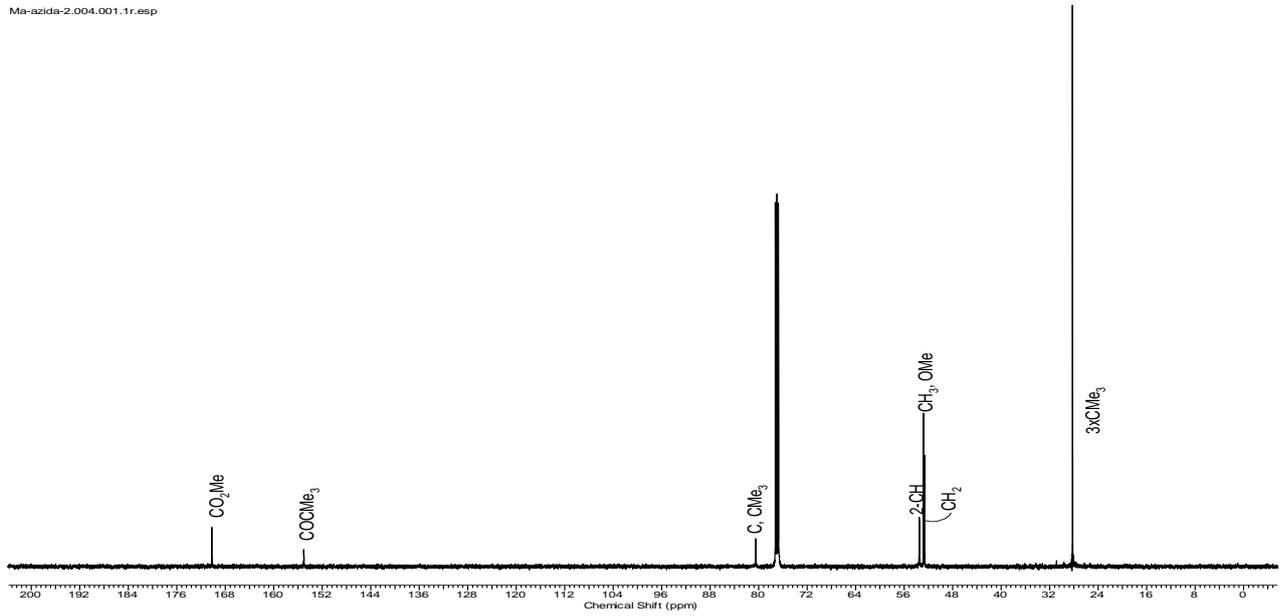
RMN ¹H

Ma-azida-2.001.001.1r.esp

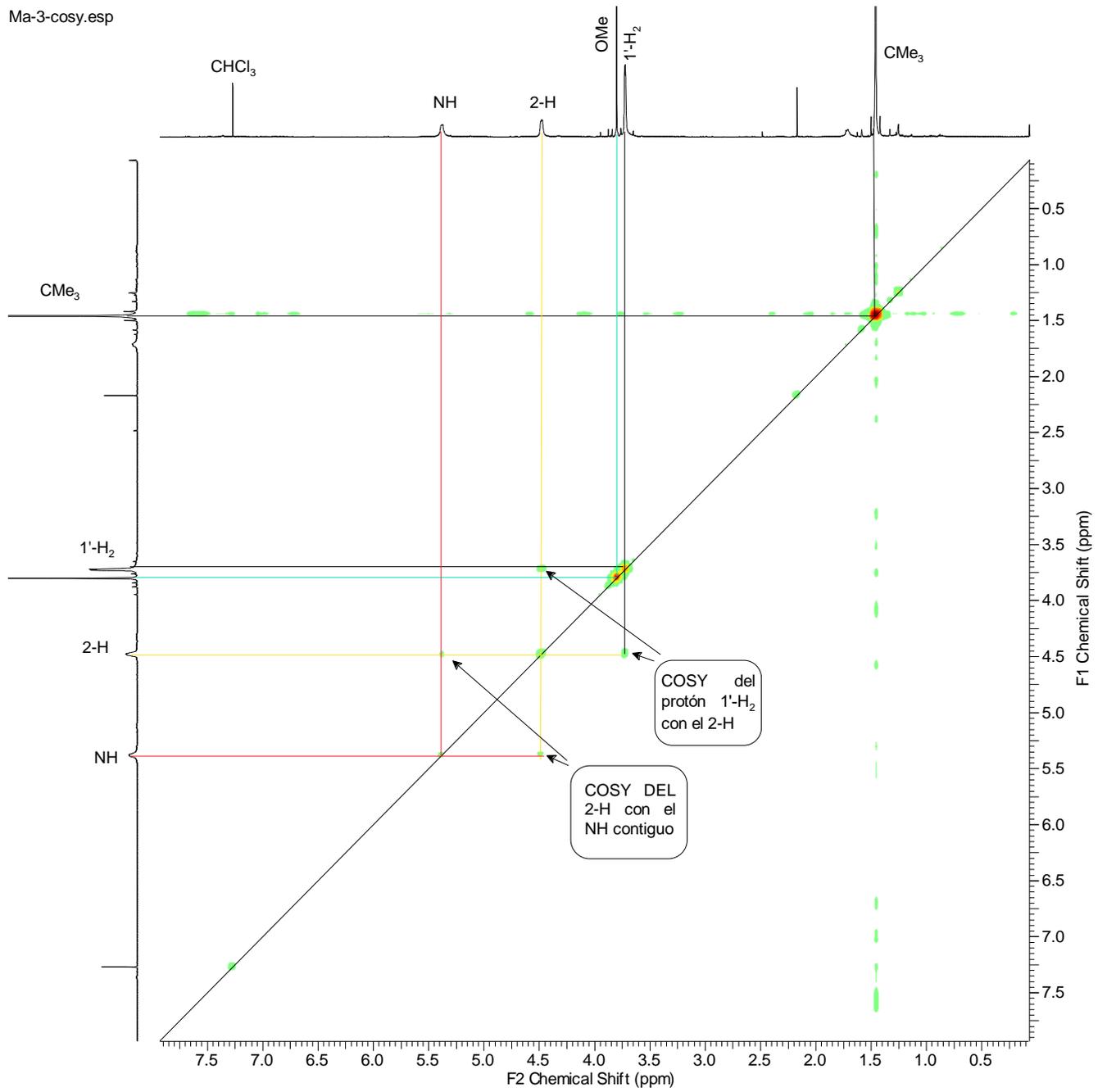


RMN ¹³C

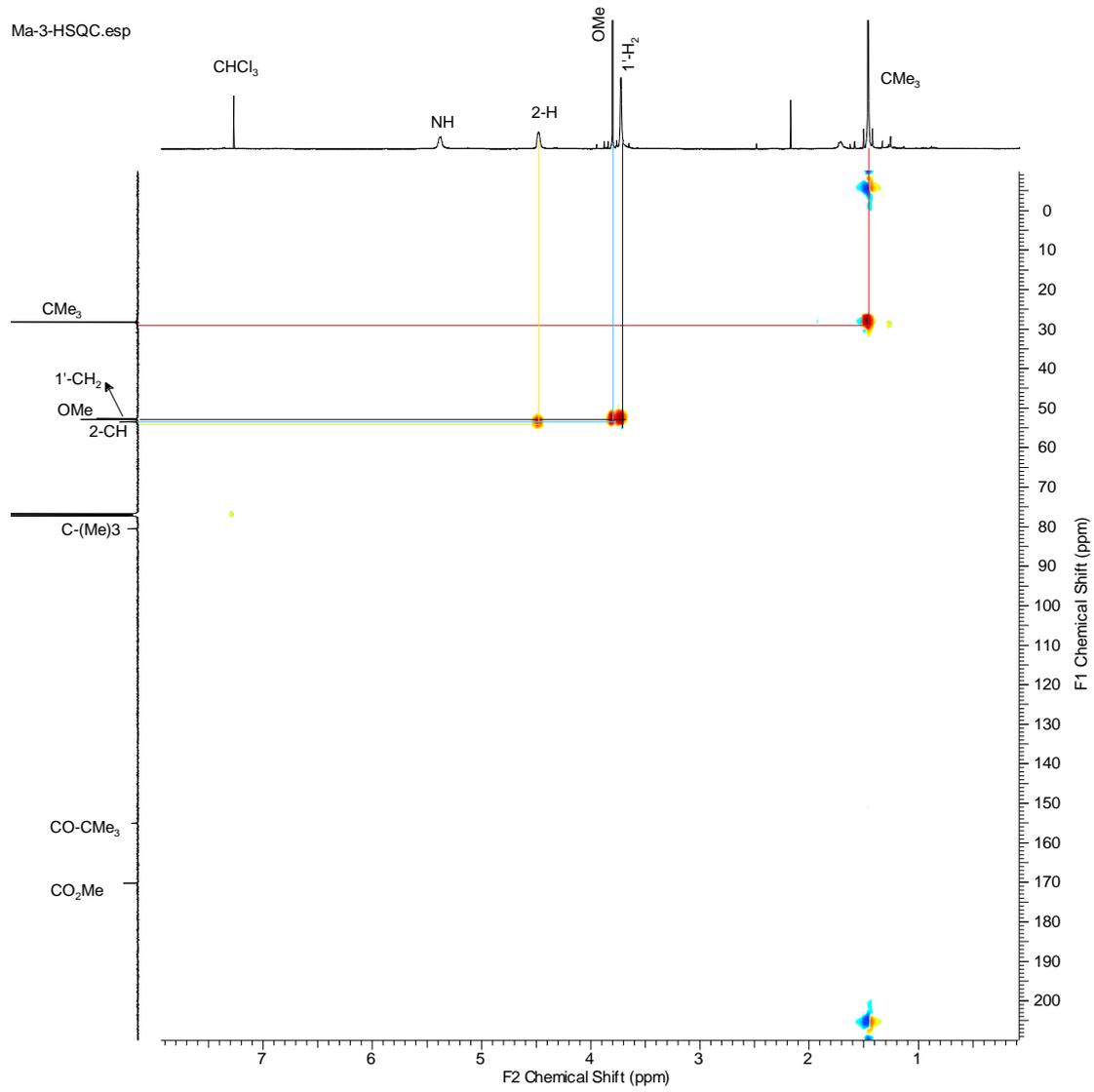
Ma-azida-2.004.001.1r.esp



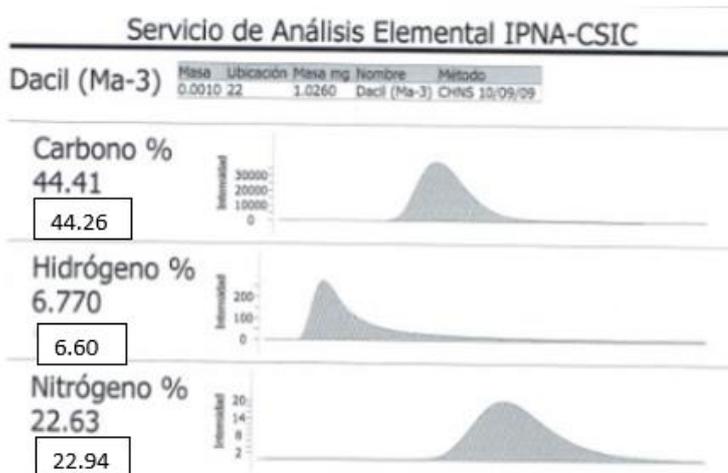
COSY



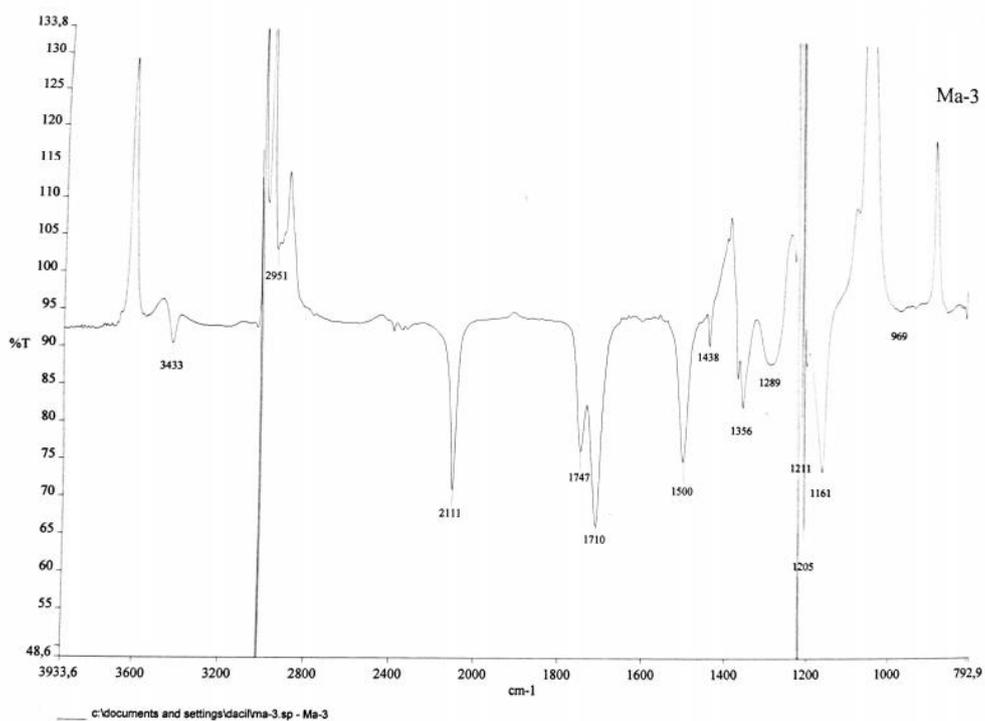
HSQC



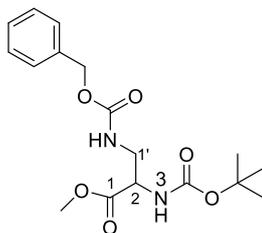
Análisis elemental



IR

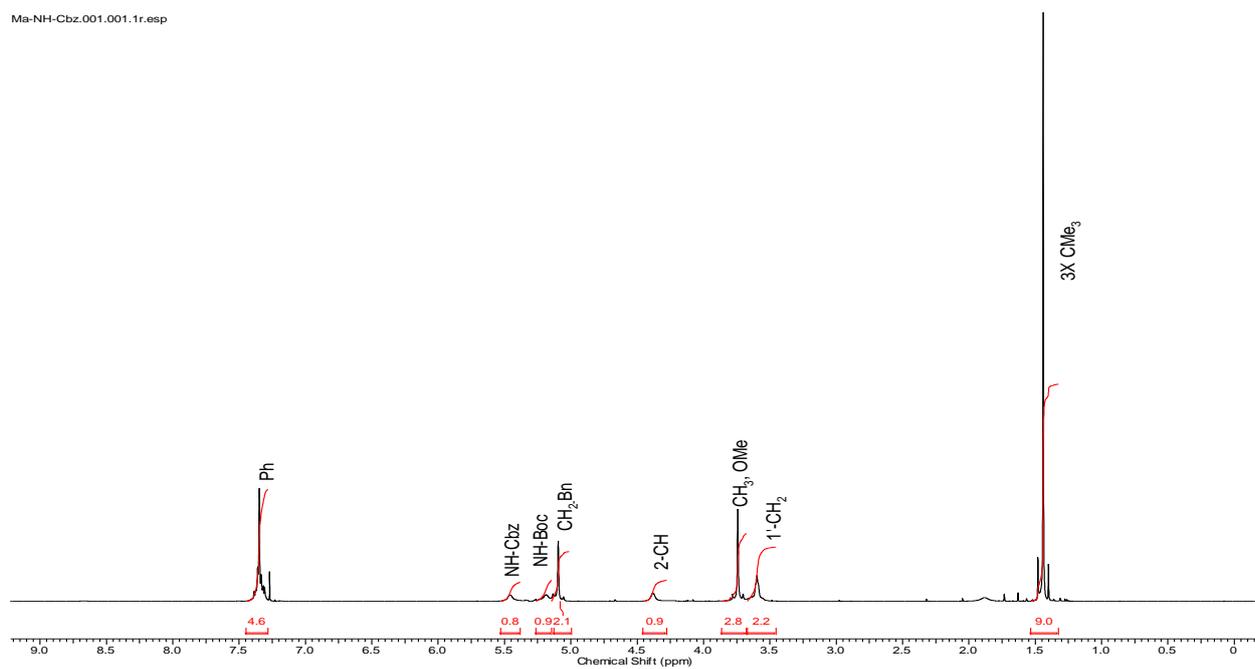


PRODUCTO 5



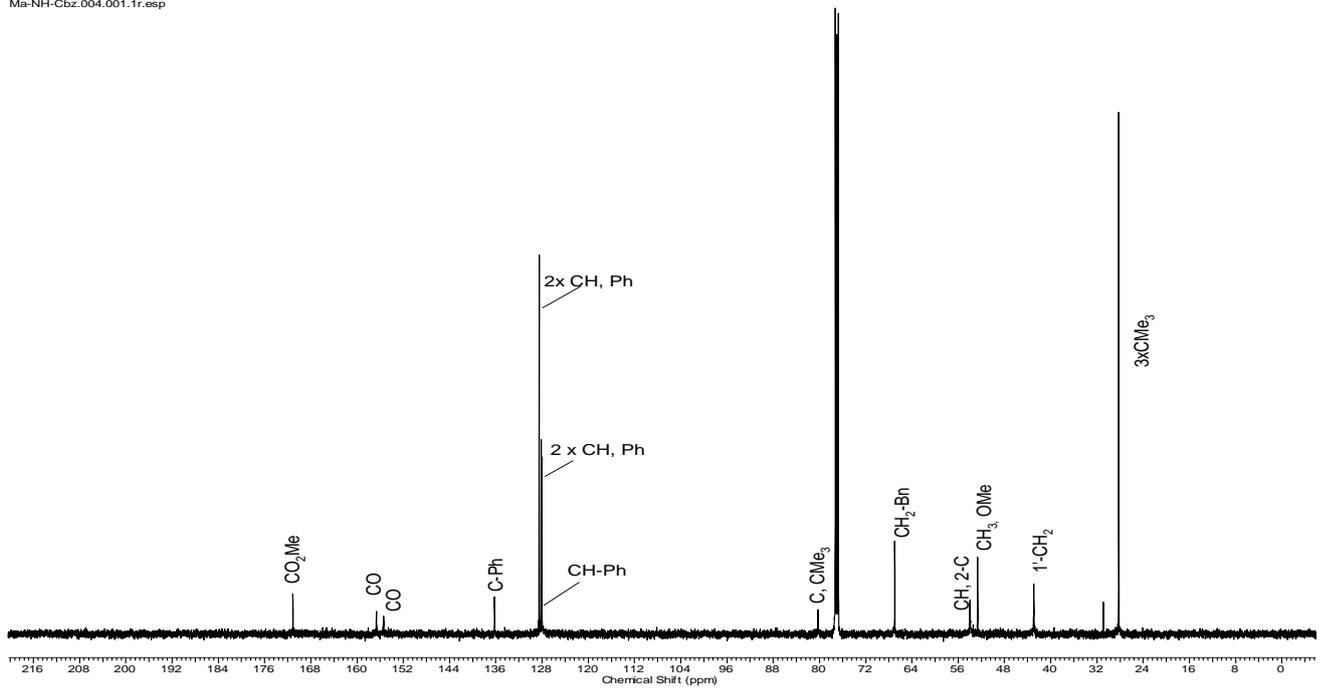
RMN ¹H

Ma-NH-Cbz.001.001.1r.esp

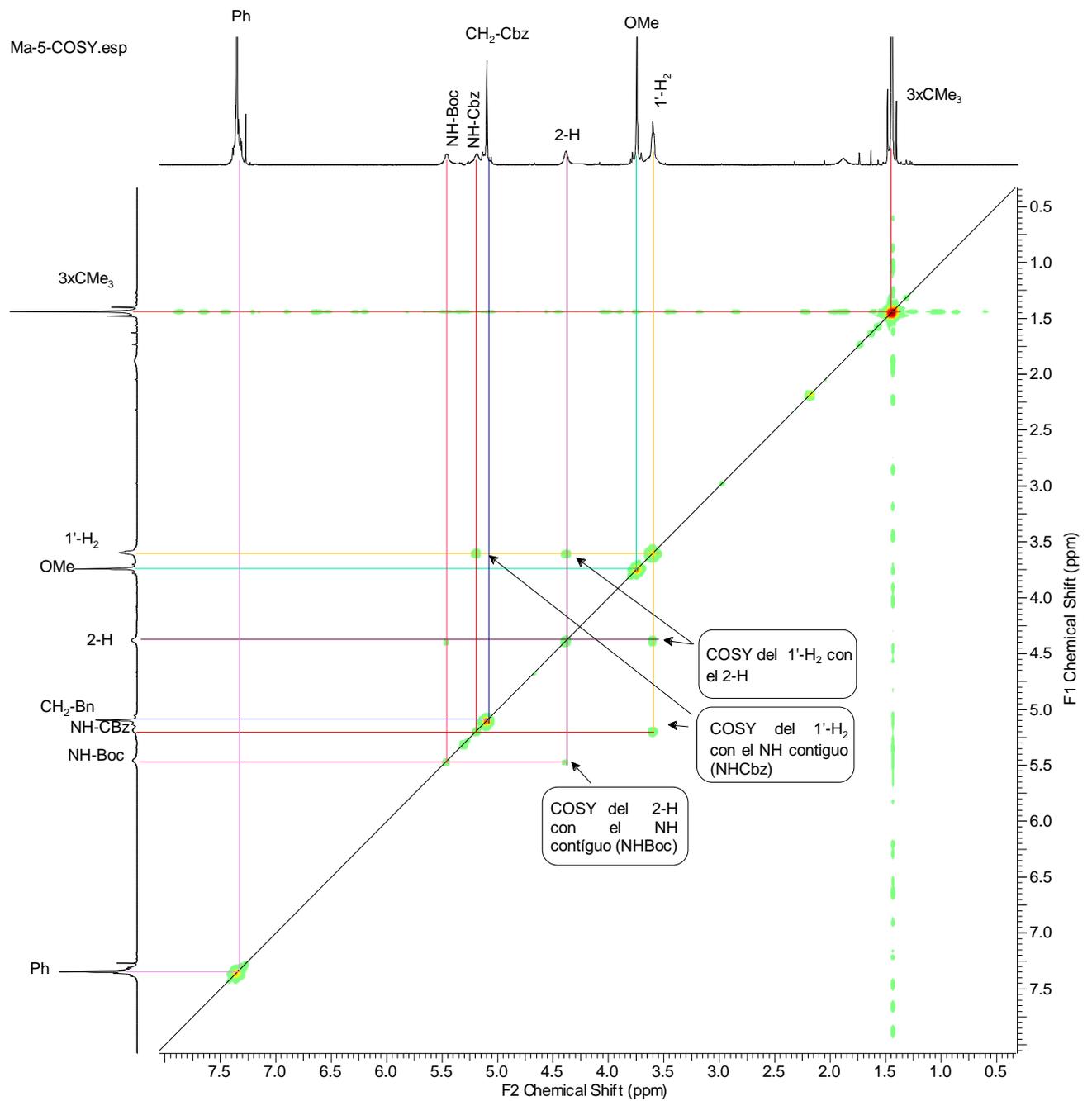


RMN ¹³C

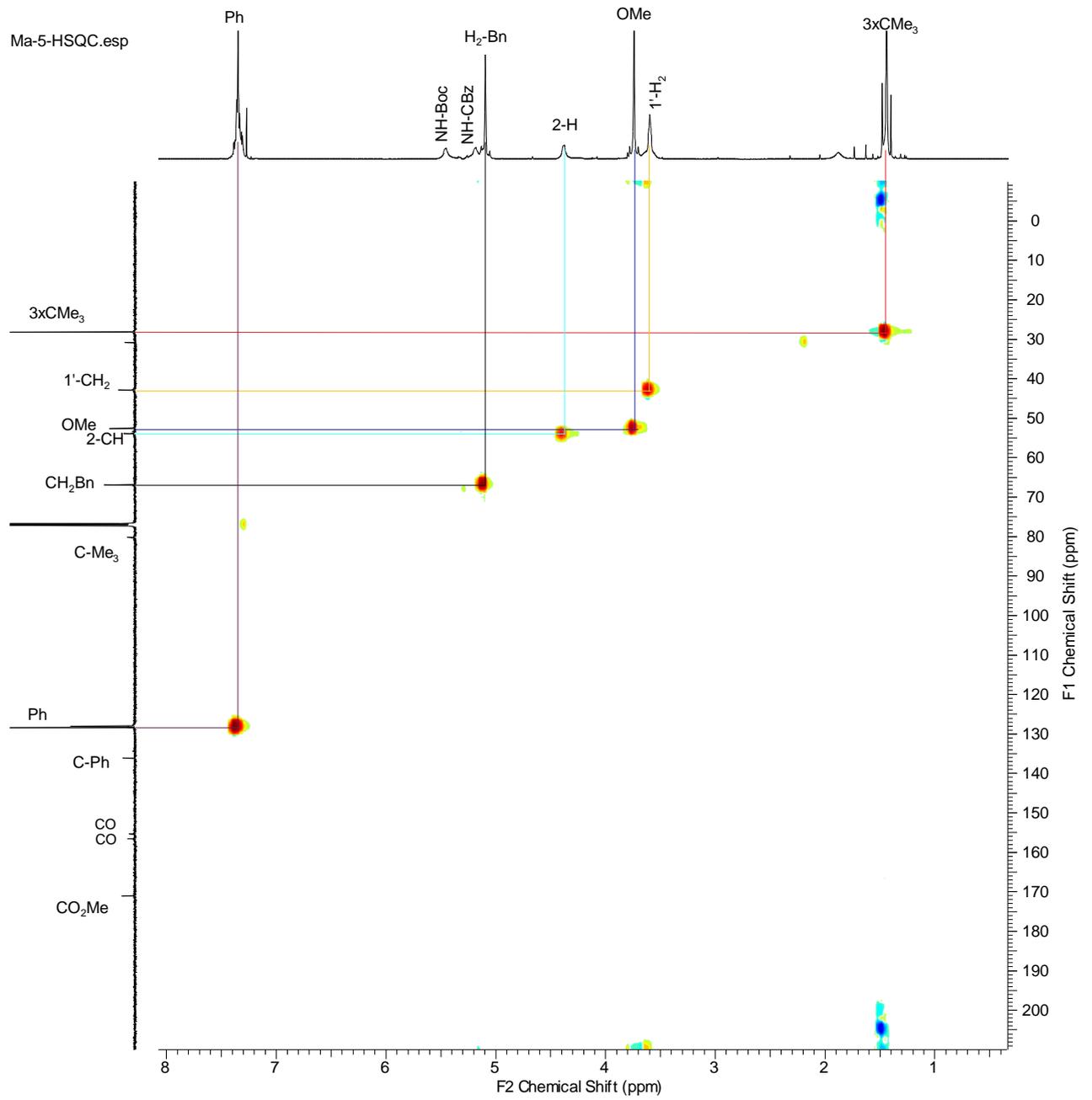
Ma-NH-Cbz.004.001.1r.esp



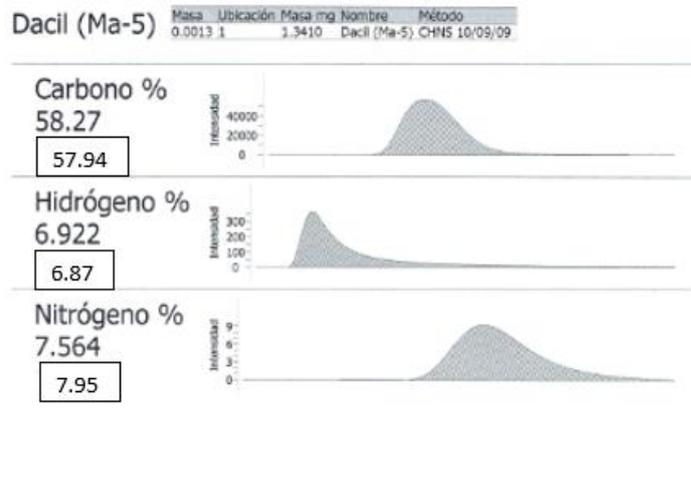
COSY



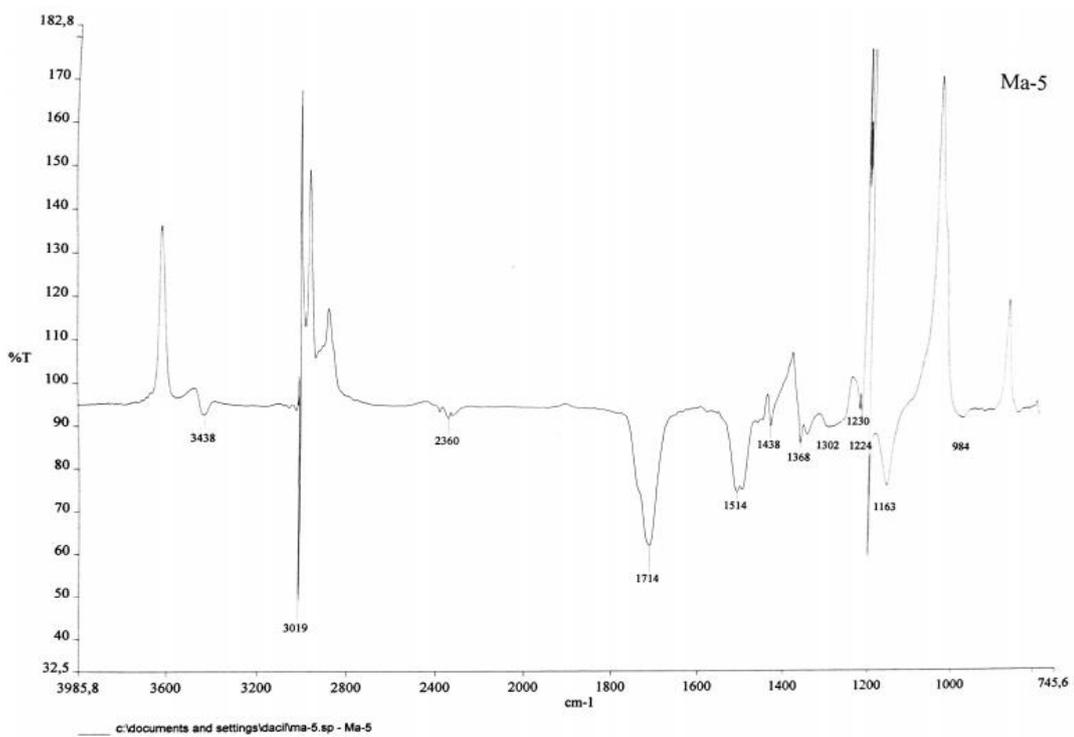
HSQC



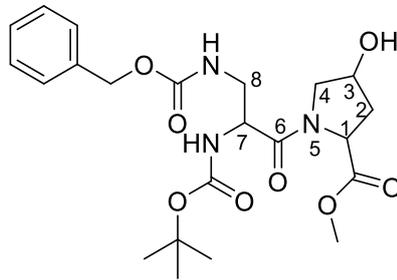
Análisis elemental



IR

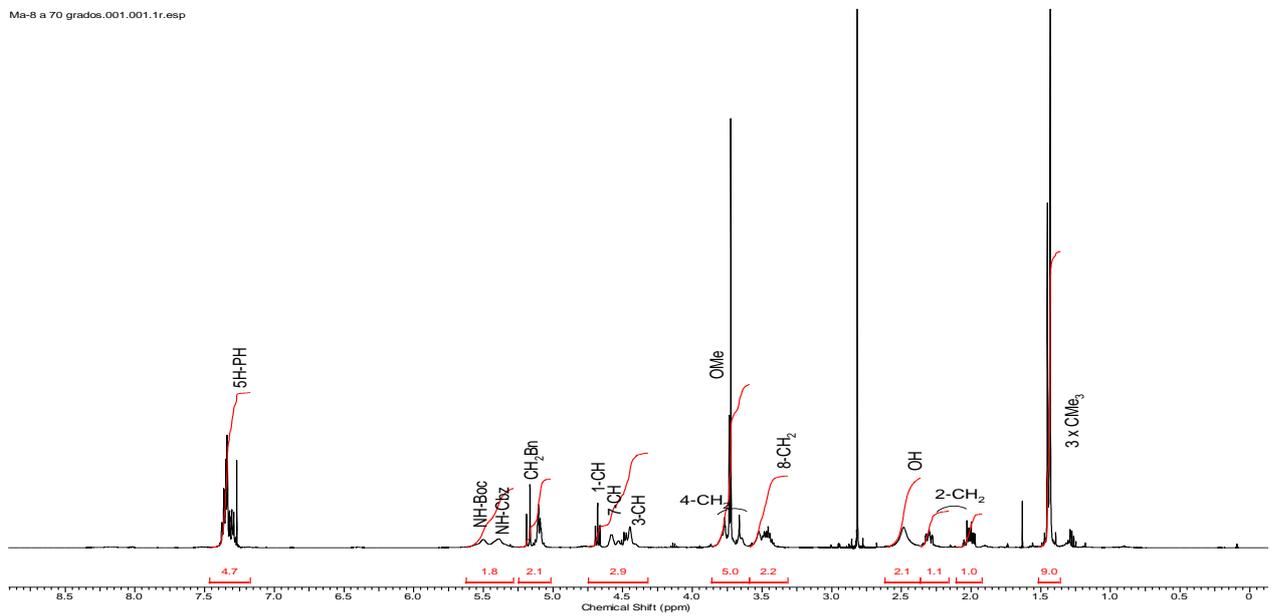


PRODUCTO 6



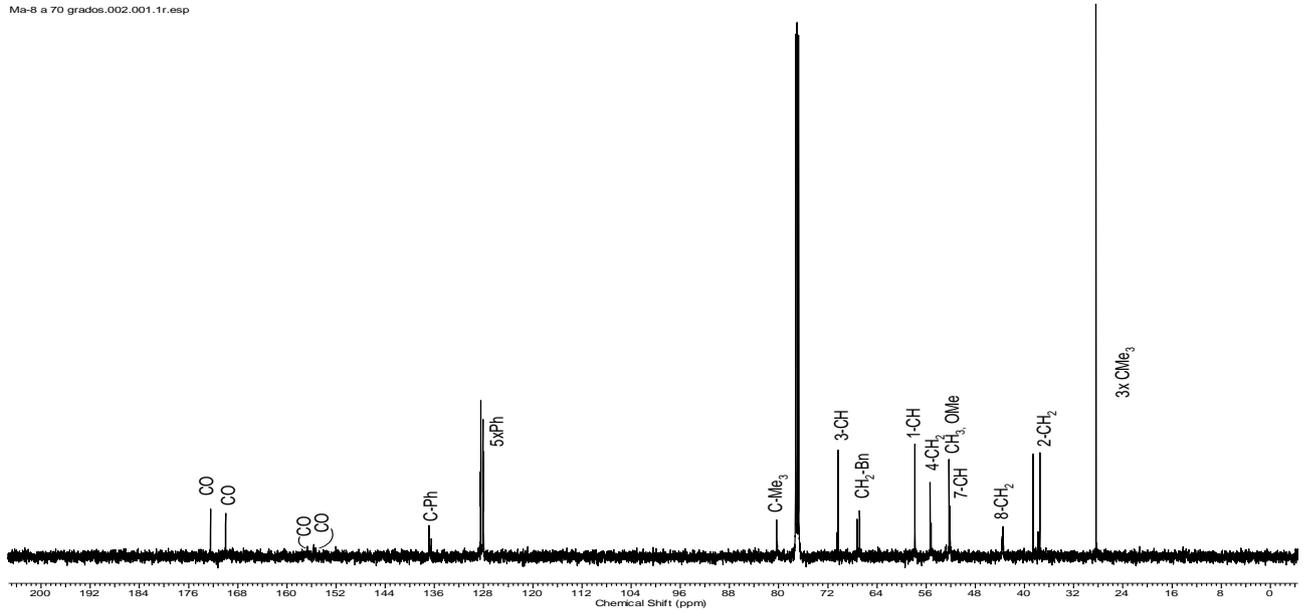
RMN ¹H

Ma-8 a 70 grados.001.001.1r.esp

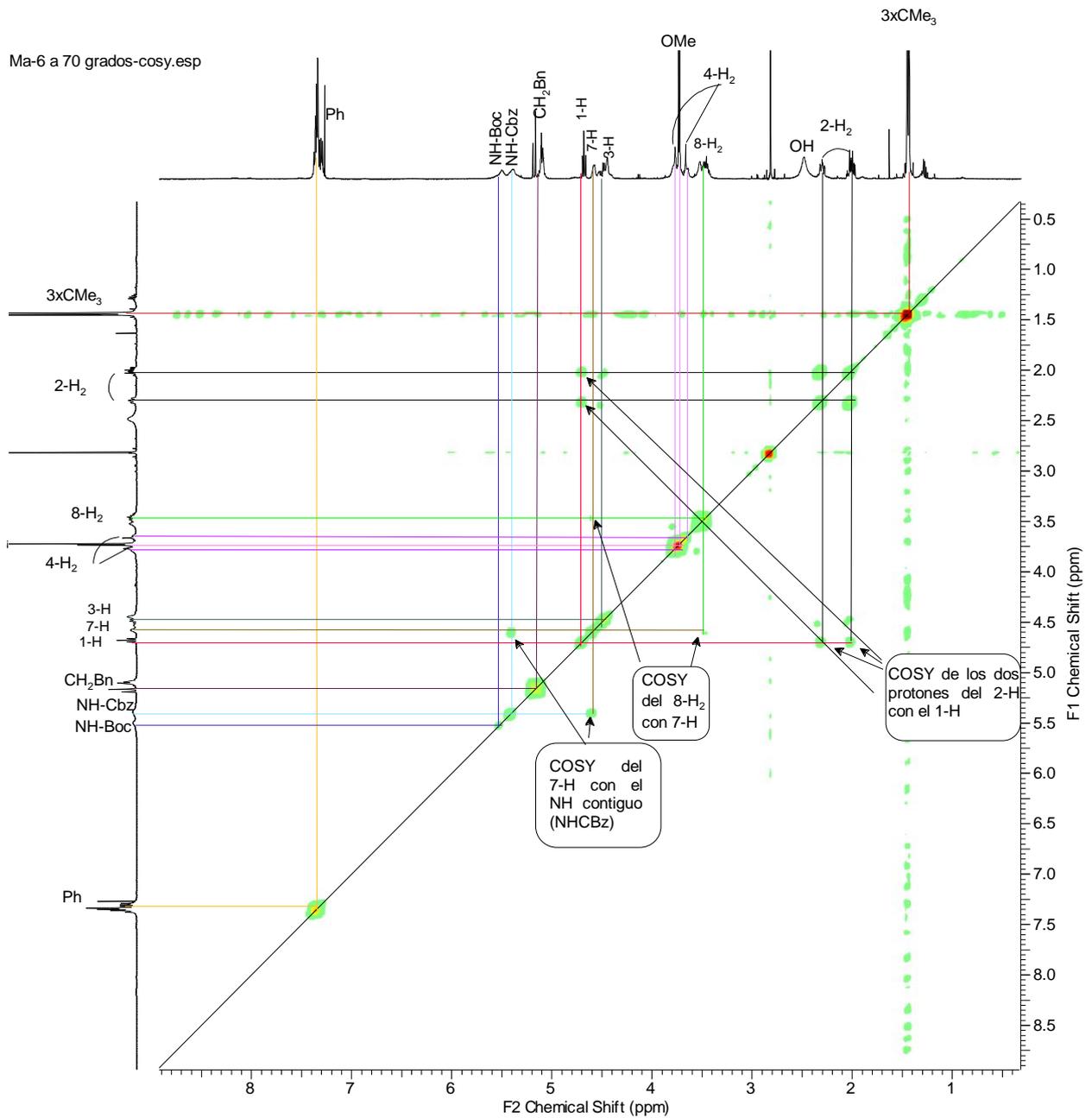


RMN ¹³C

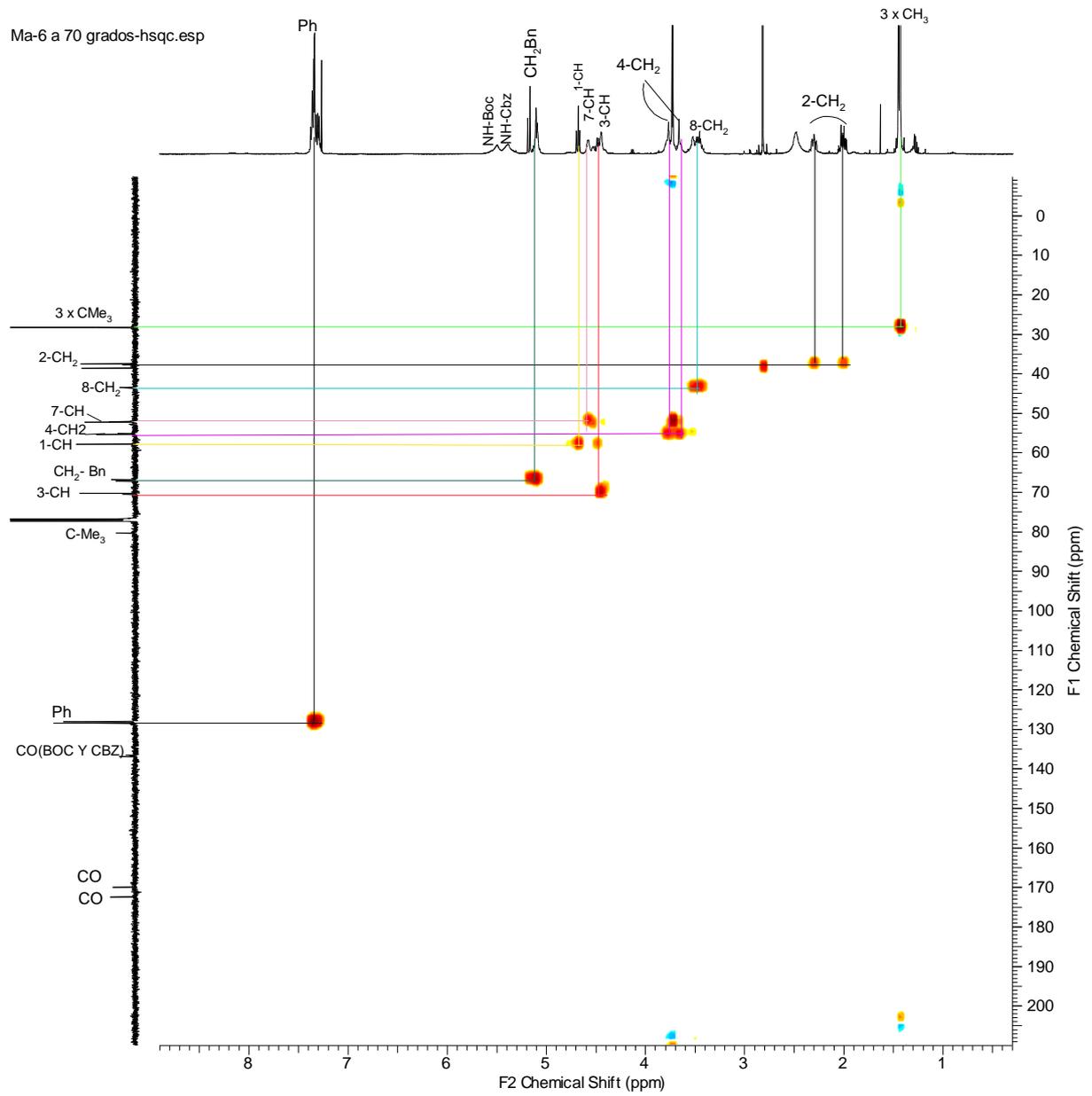
Ma-8 a 70 grados.002.001.1r.esp



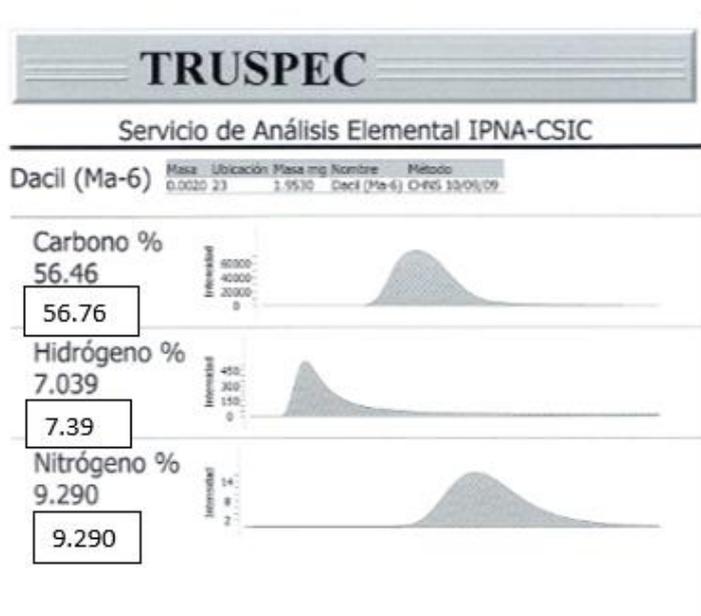
COSY



HSQC



Análisis elemental



IR

