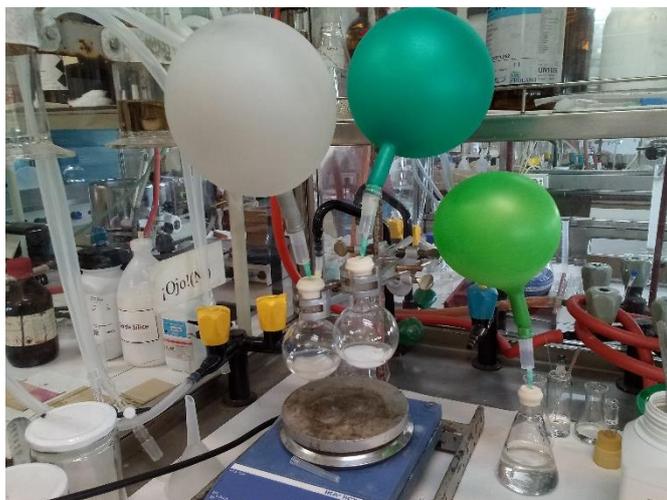


Grado en Farmacia, Universidad de La Laguna

SÍNTESIS DE DIPÉPTIDOS DE INTERÉS FARMACOLÓGICO Y AGROBIOLÓGICO

Gema Ramón García



Tutoras: Susana Abdala Kuri y Dácil Hernández Mesa.

Índice

Resumen	2
Abreviaturas	4
Introducción.....	5
Objetivos	8
Resultados y Discusión.	9
Materiales y Métodos.....	21
Conclusiones.....	29
Bibliografía.....	30
Anexos.....	32

Agradecimientos:

A mis tutoras Susan Abdala y Dácil Hernández por la excelente ayuda que he recibido y a la supervisora del grupo de fármacos del CSIC Alicia Boto por el incondicional apoyo prestado.

Resumen

Los dipéptidos naturales derivados de la L-treonina poseen unas interesantes actividades farmacológicas, tales como inhibidores del transporte de aminoácidos (con posible utilidad como antimicrobianos y/o citotóxicos), o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), con propiedades antihipertensivas, entre otras. Por otra parte, un derivado de estos productos naturales, que se diferencia de ellos porque los grupos amino y carboxilo están protegidos, también presenta una interesante actividad antimicrobiana frente a fitopatógenos.

Dado que en la literatura no se han encontrado estudios detallados de relación estructura-actividad para estos dipéptidos derivados de la L-treonina, nos propusimos preparar dipéptidos derivados de aminoácidos naturales, así como derivados modificados, para hacer en un futuro próximo estudios de estructura-actividad antimicrobiana.

Se presentarán los resultados experimentales obtenidos del proceso de síntesis de los dipéptidos, la purificación y caracterización de los mismos usando varias técnicas cromatográficas y espectroscópicas, respectivamente, y la preparación de una quimioteca de dichos dipéptidos y los intermedios sintéticos para futuro cribado biológico.

Abstract

Natural dipeptides derived from L-threonine possess interesting pharmacological properties; thus, some displayed potent activities such as inhibitors of amino acid transport (with potential applications as antimicrobial and/or cytotoxic agents), or ACE inhibitors, with antihypertensive properties, among others. On the other hand, a derivative of these natural products, which differed in the protection of the amino and carboxyl groups, also displayed a promising antimicrobial activity against phytopathogens.

Since no detailed studies of structure-activity relationships were found in the literature for these threonine-derived dipeptides, we set out to prepare di-peptides derived from natural amino acids, as well as modified derivatives, to carry out SAR studies (eg structure- antimicrobial activity) in the next future.

The report will describe the synthesis of the dipeptides, and their purification and characterization, using different chromatographic and spectroscopic techniques, respectively. The preparation of a library of the dipeptides and their synthetic precursors for future biological screening will be commented as well.

Abreviaturas

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo	m	Multiplete
Ar	Aromático	Min	Minutos
Bn	Bencilo	Me	Metilo
br-s	Singulete ancha	MeOH	Metanol
Cbz	Benciloxicarbonil	Mg	Miligramo
d	Doblete	mmol	Milimol
dd	Doble doblete	MHz	Megahertzios
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina	p.f.	Punto de fusión
DMF	Dimetilformamida	Ppm	Partes por millón
DCM	Diclorometano	RMN	Resonancia magnética nuclear
EAAT	Transportador excitatorio de aminoácidos	RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
Hyp	4- <i>trans</i> -hidroxiprolina	RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina	S	Singulete
Hz	Hertzios	t.a.	Temperatura ambiente
J	Constante de acoplamiento	TBS	<i>Tert</i> -butildimetilsilano

Introducción

En la naturaleza, los péptidos juegan un papel clave en numerosos procesos fisiológicos.¹ Al igual que las proteínas, se consideran biopolímeros constituidos por la unión de aminoácidos. Sin embargo, los péptidos tienen un tamaño menor al de las proteínas, de dos a unos cien aminoácidos.

Entre los componentes habituales de los péptidos se encuentra el aminoácido proteinogénico treonina **1** (Thr, Figura 1). Este aminoácido, y su análogo serina **2**, no sólo forman parte de α -péptidos bioactivos como el sideróforo y factor de virulencia pyoverdina *Pa* **3**,² sino que también sirven como precursores de oxazoles y dihidrooxazoles, como ocurre en el potente antimicrobiano plantazolicina **4**.^{3,4}

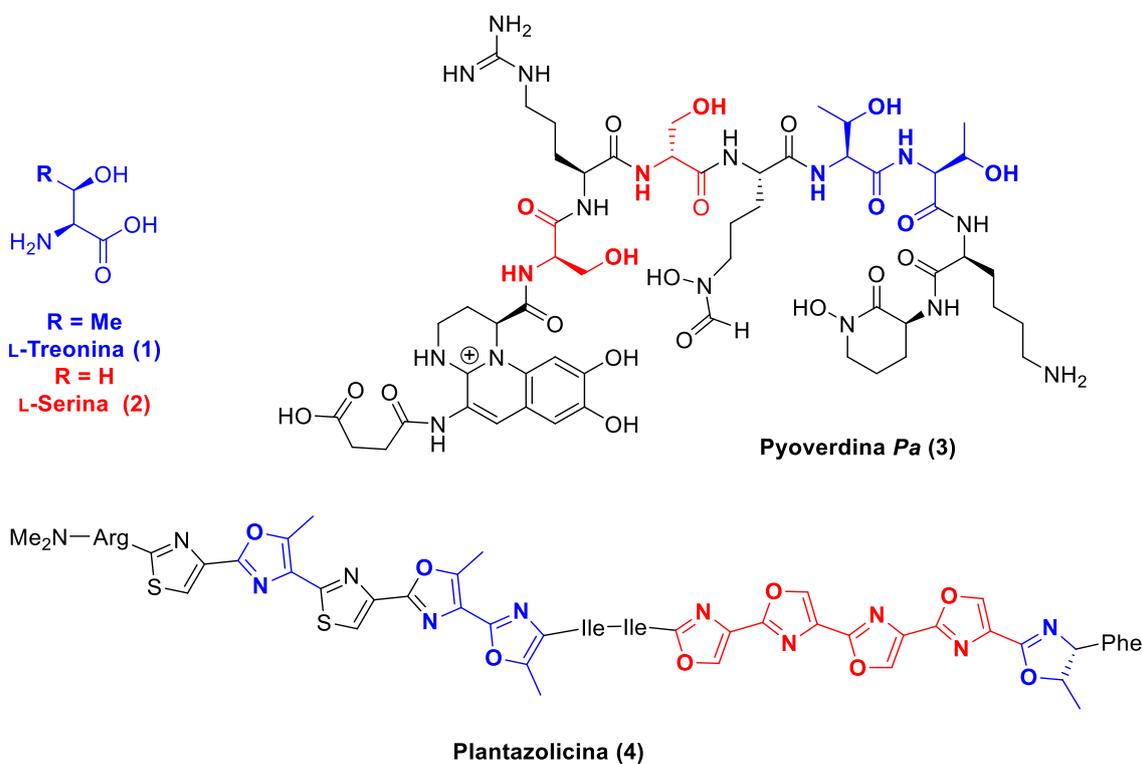


Figura 1. Treonina, serina y péptidos derivados.

Los péptidos más sencillos son los dipéptidos, constituidos por sólo dos aminoácidos. La treonina se encuentra en dipéptidos, como la treonil-treonina (**5**, **Figura 2**), con importante actividad farmacológica al actuar como inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).⁵ Su presencia en numerosos alimentos ha despertado el interés por el uso de éstos como nutracéuticos, con potenciales propiedades antihipertensivas.⁶

Por otra parte, el dipéptido treonil-glutámico **6** (Figura 2) es un potente inhibidor del transportador excitatorio de aminoácidos en humanos EAAT 3.⁷ Es interesante comprobar que el compuesto **7**, híbrido de los dos productos anteriores, es un inhibidor de los transportadores de aminoácidos humanos EAAT 1, 2, y 3, que afectan por ejemplo al transporte de los ácidos aspártico y glutámico.⁸

Finalmente, la treonil-prolina **8** (X = H) ha resultado efectiva para combatir enfermedades infecciosas.⁹ Destaca su capacidad de inactivar o de reducir la producción de la toxina de *Clostridium difficile*, que la OMS considera como uno de los patógenos multirresistentes más peligrosos.¹⁰ Para el dipéptido **8** también se ha descrito actividad antihipertensiva (inhibidor ECA).¹¹ Por su parte, un análogo natural del compuesto **9** ha mostrado propiedades antibióticas.¹² Los compuestos **5**, **6**, **8** y **9** se encuentran a menudo en la naturaleza, bien como tales o como componentes de péptidos, en hidrolizados de alimentos, etc.⁶ El compuesto **10**, por su parte, es un derivado sintético del dipéptido natural **8**, y muestra también una prometedora actividad antimicrobiana contra fitopatógenos.¹³

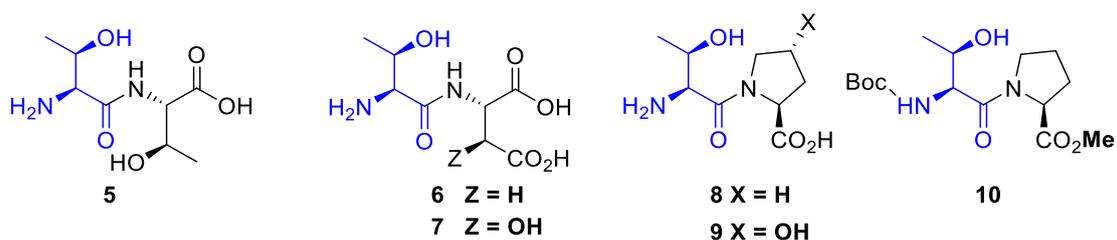


Figura 2. Dipéptidos con treonina.

Este trabajo se ha llevado a cabo junto con el grupo de *Síntesis de Fármacos y Compuestos Bioactivos (SFCB)* del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC (IPNA-CSIC). El grupo tiene desarrollada una línea de investigación sobre péptidos bioactivos, que ha permitido descubrir péptidos con una potente actividad y baja toxicidad contra patógenos humanos y fitopatógenos.¹⁴

Dado que varios dipéptidos naturales derivados de la L-treonina poseían unas interesantes actividades farmacológicas, tales como inhibidores del transporte de aminoácidos (con posible utilidad como antimicrobianos¹⁵ y/o citotóxicos),¹⁶ y que el derivado protegido **10** también presentaba actividad contra fitopatógenos, nos planteamos hacer estudios de estructura-actividad antimicrobiana.

En la literatura no se han encontrado estudios detallados de relación estructura-actividad para estos dipéptidos derivados de la L-treonina, por lo que nos propusimos preparar una colección de dipéptidos, para hacer en un futuro próximo estudios de estructura-actividad antimicrobiana.

En los Objetivos y Discusión se comenta la síntesis de dipéptidos que contengan treonina,¹⁷ para la futura determinación de su actividad biológica como antimicrobianos y fitosanitarios.

Objetivos

Los objetivos propuestos para esta memoria de *Trabajo de Fin de Grado* son los siguientes:

1. Preparar derivados protegidos de dipéptidos bioactivos naturales que contengan L-treonina, utilizando procedimientos establecidos para el acoplamiento peptídico. La síntesis de estos sustratos implicará el manejo de técnicas usuales en síntesis orgánica, como el seguimiento de las reacciones vía cromatografía en capa fina, neutralizaciones, la extracción de compuestos orgánicos, filtración, eliminación de disolventes vía evaporación en rotavapor, etc.
2. Purificar los dipéptidos obtenidos utilizando técnicas cromatográficas (cromatografía en columna y rotatoria).
3. Confirmar la estructura de los compuestos obtenidos vía Resonancia Magnética Nuclear y llevar a cabo su caracterización determinando otras características de los mismos como son su espectro de infrarrojo, actividad óptica o incluso su punto de fusión, si se trata de sólido cristalino.
4. Preparar muestras de los péptidos puros para futuros estudios de estructura-actividad biológica, especialmente de actividad antimicrobiana.

Resultados y Discusión.

Basándonos en las interesantes propiedades publicadas sobre los dipéptidos, en este trabajo se han podido preparar tres derivados protegidos de dipéptidos naturales que contienen L-treonina, los péptidos **11**, **12** y **13** (**Figura 3**). Además, estos dipéptidos poseen unidades de L-treonina, L-aspartato y L-hidroxiprolina, respectivamente.

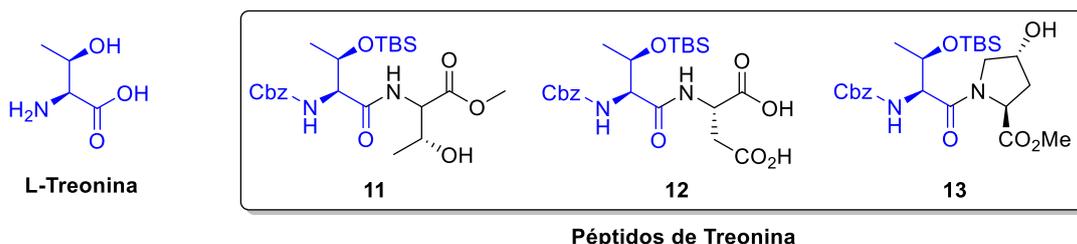
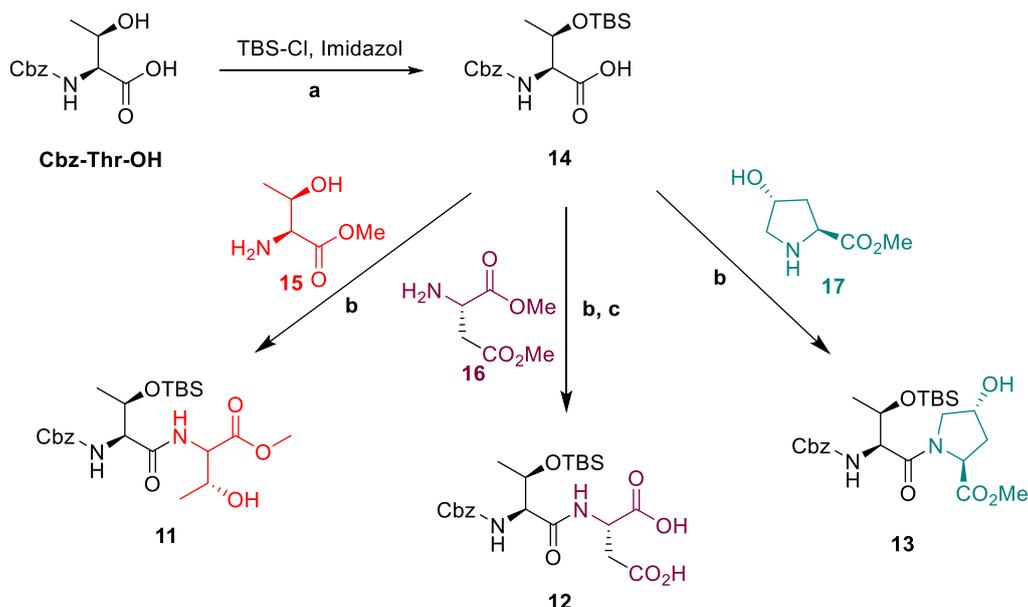


Figura 3

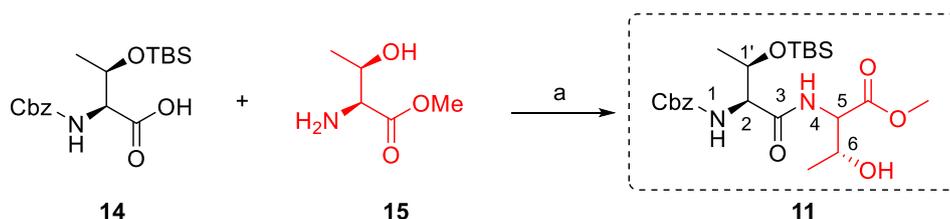
Para la preparación de estos dipéptidos se utilizó la secuencia sintética mostrada en el **Esquema 1**. Dado que la L-treonina tiene varios grupos reactivos, conviene protegerlos antes de su acoplamiento con otros aminoácidos. Por ello, el primer paso de la síntesis consistió en la protección del grupo hidroxilo de la cadena lateral de la Cbz-Thr-OH comercial, por tratamiento con cloruro de *tert*-butildimetilsilano (TBS) en presencia de imidazol. De esta forma se obtuvo el intermedio **14**, eslabón común en los tres dipéptidos.

Los otros tres derivados de aminoácidos necesarios para nuestra síntesis, el metil-éster de treonina **15**, el dimetil-aspartato **16** y la hidroxiprolina **17**, se prepararon por metilación de los ácidos carboxílicos comerciales con SO_2Cl en MeOH. En los tres casos se aislaron los ésteres correspondientes con rendimiento superior al 95%, y se utilizaron en las posteriores reacciones de acoplamiento sin necesidad de purificación.



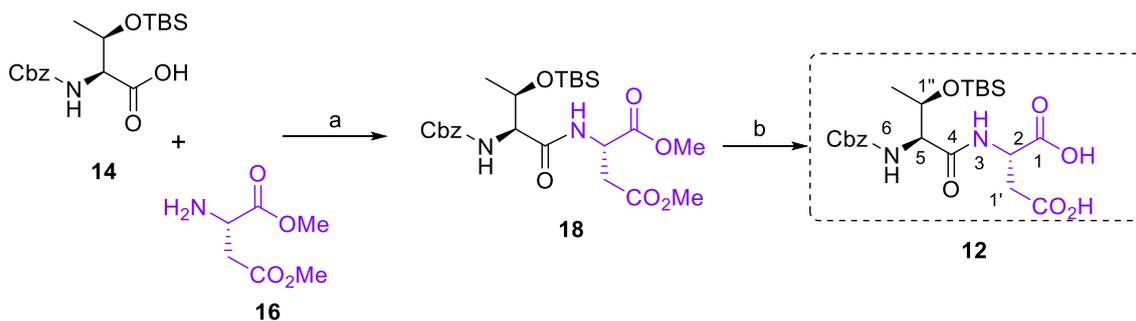
Esquema 1. a) TBSCl, imidazol, DMF seca, 0 °C, 16 h. b) HBTU, CH₂Cl₂, DIPEA, t.a., 2 h. c) LiOH, MeOH/H₂O 9:1, 16 h.

Una vez preparados los derivados de aminoácidos **14-17** se procedió a unirlos para obtener los péptidos de interés. En el caso del péptido **11**, la reacción se llevó a cabo utilizando HBTU como reactivo de acoplamiento (**Esquema 2**). Así, los aminoácidos **14** y **15** se disolvieron en CH₂Cl₂ y la mezcla se enfrió a 0 °C para añadir el HBTU y posteriormente, gota a gota, la diisopropiletilamina. Tras dos horas y los correspondientes procesos de extracción y purificación, se consiguió aislar el dipéptido de treonina **11** con un rendimiento del 76%.



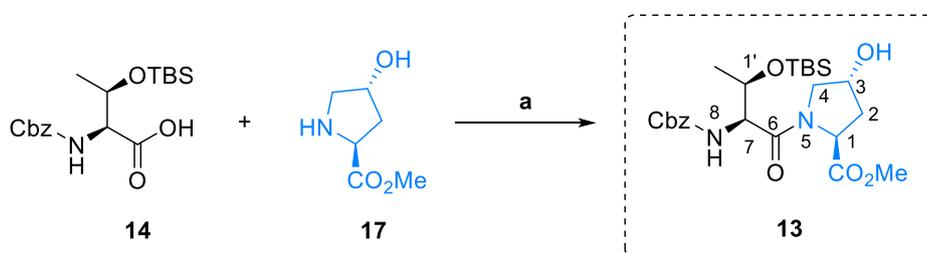
Esquema 2. a) HBTU, CH₂Cl₂, DIPEA, t.a., 2 h.

El mismo proceso se utilizó para acoplar **14** y **16**, aislándose, tras purificación en columna de gel de sílice, el compuesto **18** como único producto de reacción y con un rendimiento del 58% (**Esquema 3**). La desprotección de los ésteres metílicos se llevó a cabo por tratamiento con LiOH en MeOH, para acceder finalmente al dipéptido Cbz-Thr-Asp-OH **12**, con un rendimiento cuantitativo.



Esquema 3. a) HBTU, CH₂Cl₂, DIPEA, t.a., 2 h. b) LiOH, MeOH:H₂O 9:1.

Finalmente se acopló el derivado de treonina **14** con metilhidroxiprolina **17** para obtener el péptido **13**, en condiciones y rendimientos similares a los obtenidos en los dos casos anteriores (**Esquema 4**).

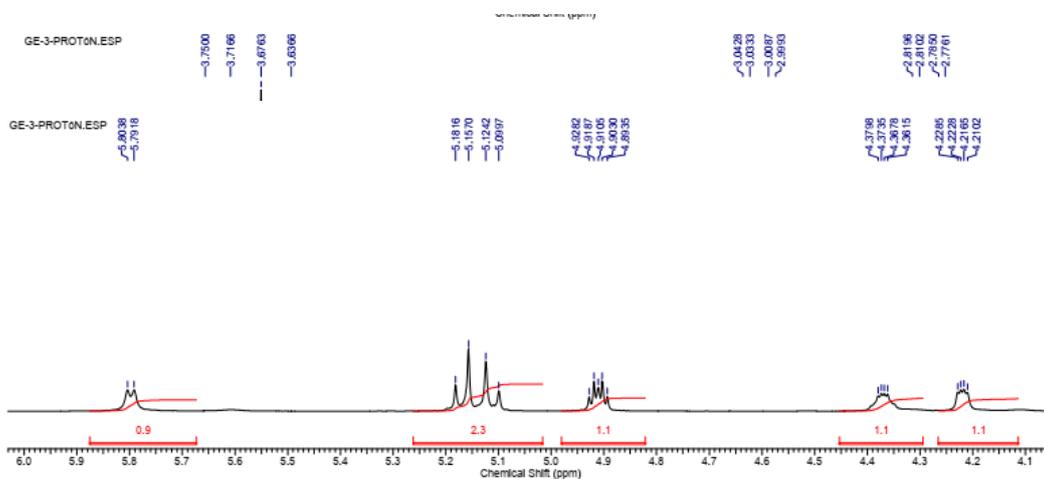
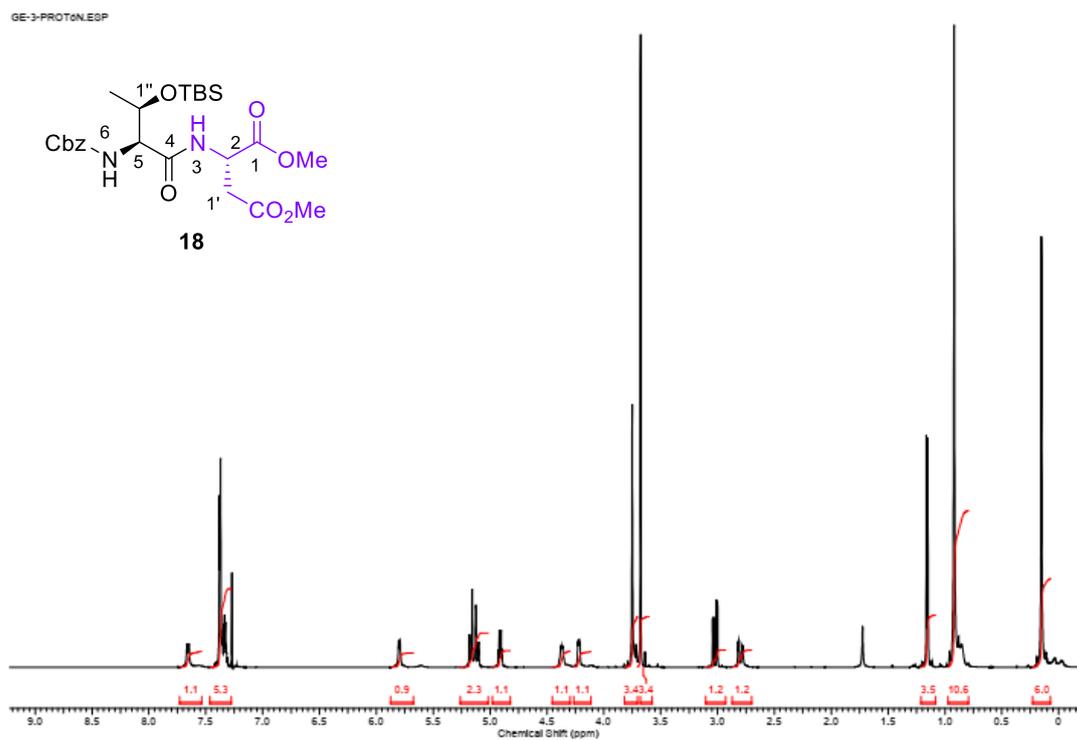


Esquema 4. a) HBTU, CH₂Cl₂, DIPEA, t.a., 2 h.

La estructura de los tres dipéptidos sintetizados se comprobó utilizando principalmente técnicas de ¹H-RMN y ¹³C-RMN así como experimentos 2D (COSY y HSQC). Además, se hicieron análisis elementales y espectros de infrarrojo (IR), y se determinó la actividad óptica α_D y el punto de fusión para los productos sólidos.

A continuación, se presenta, a modo de ejemplo, el análisis elemental y los espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, COSY, HSQC, e IR del dimetil-éster del *N*-[*N*-benciloxycarbonil-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)treonil]-L-aspartico (**18**).

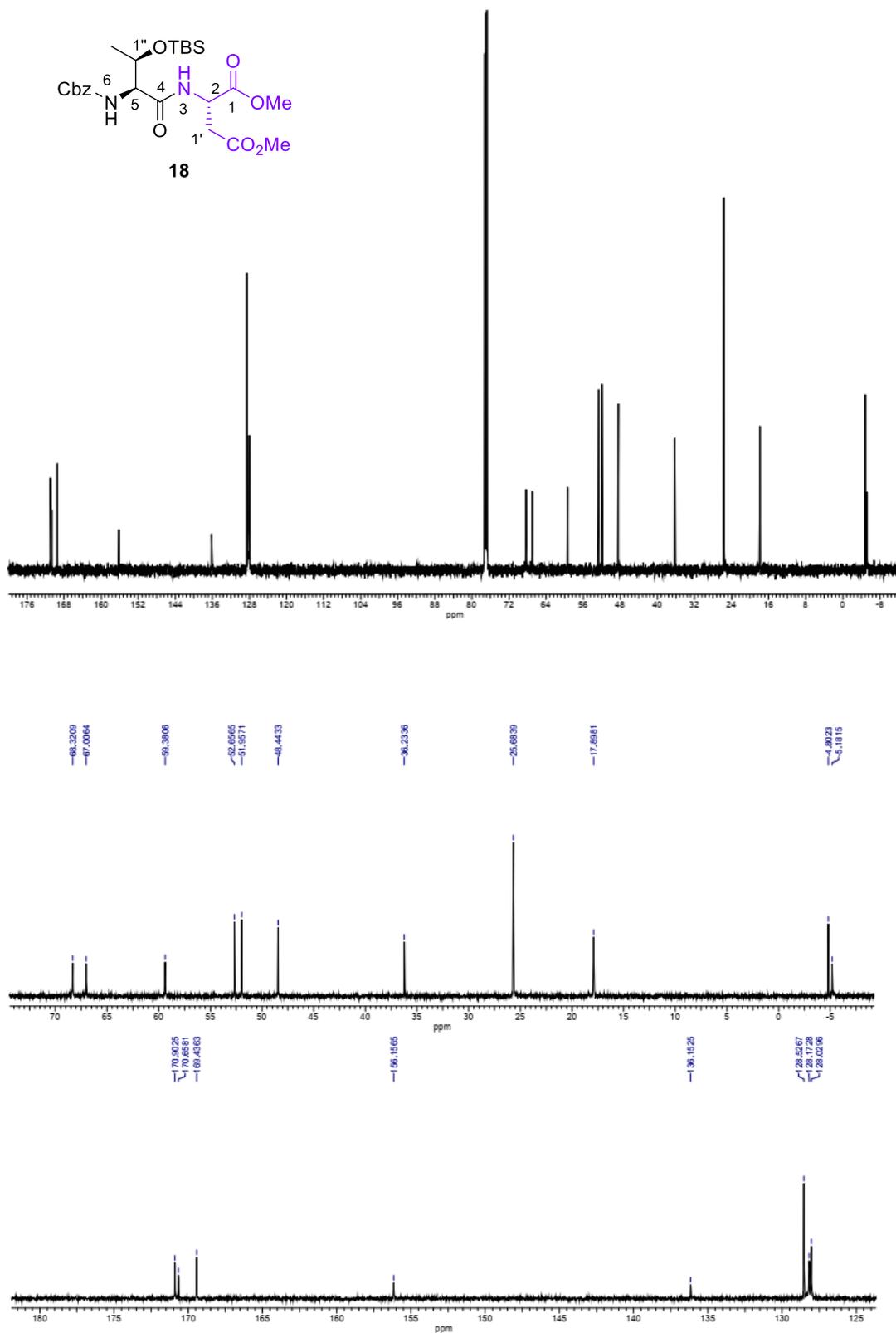
^1H -RMN (18)



Señal ¹ H-RMN (ppm)	Comentario
0.15 (6H, s, 2 × Me-Si)	Se trata de un singlete que integra por 6H; su desplazamiento químico (δ) indica que se trata de protones alifáticos, por lo que se deduce que son los dos metilos unidos al silicio del grupo OTBS.
0.92 (9H, s, 3 × Me, Si-CMe₃)	Singlete que integra por 9H alifáticos, por lo que se corresponde con los tres metilos del <i>terc</i> -butilo del grupo OTBS.
1.16 (3H, d, J = 6.3 Hz, 1''-Me)	Señal que integra por 3H alifáticos, correspondientes al metilo en posición 1''. Su multiplicidad (d) y su constante de acoplamiento sugieren que se trata de un grupo Me unido a un CH
2.80 (1H, dd, J = 4.6, 17.2 Hz, 1'-Ha)	Señal que integra por un 1H alifático. Su multiplicidad (dd) indica que se acopla con sólo dos protones. Como su desplazamiento químico no se corresponde con el de los protones CHN (más desapantallados), debe tratarse de uno de los H en posición beta del aspartato, que se acopla con el protón geminal (o sea, el que también va unido a su carbono) y con el CHN. Posteriormente veremos que el experimento COSY confirma estas asignaciones.
3.02 (1H, dd, J = 4.7, 17.0 Hz, 1'-Hb)	Señal que integra por un 1H alifático. Su multiplicidad (dd), desplazamiento químico y constante de acoplamiento geminal (17.0 Hz) sugieren que es el segundo de los H en posición beta del aspartato (se aplica también el razonamiento para la señal a δ 2.80).
3.68 (3H, s, OMe)	Singlete que integra por 3H. Su desplazamiento químico sugiere que su carbono está unido a un heteroátomo (grupo CH ₃ X). Se corresponde con el metilo del metiléster en posición 1'.
3.75 (3H, s, OMe),	Singlete que integra por 3H. Se corresponde con el metilo del metiléster en posición 1.
4.22 (1H, dd, J = 3.0, 6.1 Hz, 5-H)	Doble doblete que integra por un H. Corresponde al H en posición 5, desapantallado a causa de los grupos N-R y C=O adyacentes. Luego veremos que el experimento COSY confirma estas asignaciones
4.37 (1H, m, 1''-H)	Multipléte que integra por 1H; su desplazamiento químico sugiere que su carbono está unido a un heteroátomo (grupo CHX). Su multiplicidad sugiere que hay más de tres protones adyacentes. Esto se correspondería con el 1''-H, adyacente a un CH ₃ y a un CHN (así como a un OTBS). El HSQC confirma esta asignación, ya que la señal de protón a δ 4.37 está acoplada a la señal del carbono-1'' a δ 68.3
4.91 (1H, m, 2-H)	Multipléte que integra por 1H. Su desplazamiento químico sugiere que su carbono está unido a un heteroátomo (grupo CHX). Luego veremos que el experimento COSY confirma su asignación como el 2-H.

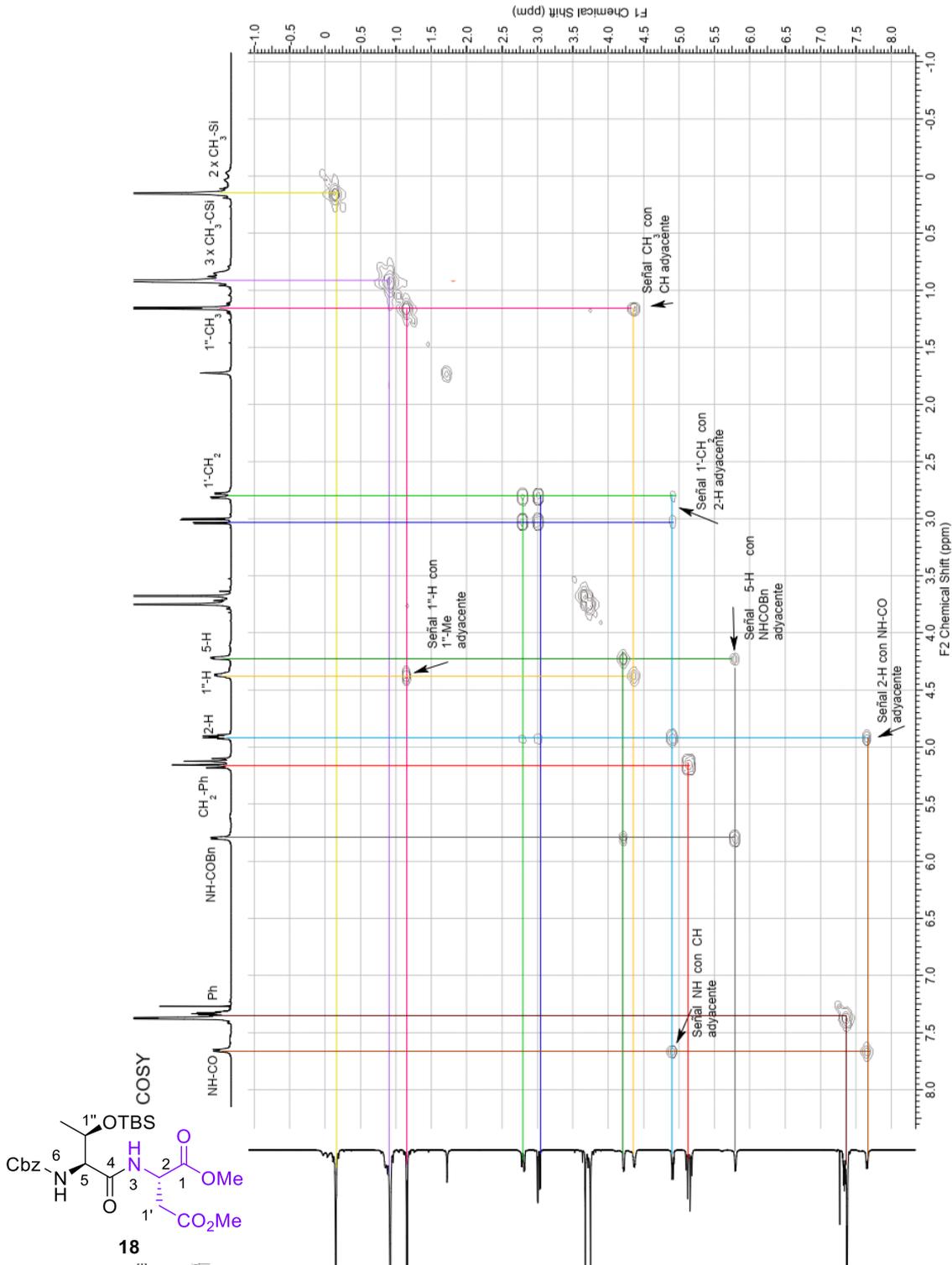
5.11 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, Ph-CH_aO)	Doblete que integra por 1H. Su constante de acoplamiento ($J = 12.3$ Hz), similar a la del doblete a δ 5.17, corresponden a un sistema AB. Considerando también su desplazamiento químico, correspondería a uno de los protones del grupo CH ₂ del Cbz.
5.17 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, PhCH_bO)	Doblete que integra por 1H. Su constante de acoplamiento ($J = 12.3$ Hz), similar a la del doblete a δ 5.11, corresponden a un sistema AB. Correspondería al segundo de los protones del grupo CH ₂ del Cbz.
5.80 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, NH-COBn)	Doblete que integra por 1H. Como se verá posteriormente en el HSQC, no va unido a ningún carbono, lo que sugiere un NH. En el experimento COSY se observa correlación entre esta señal y la del 5-H a δ 4.22, por lo que se asignó al 6-H.
7.31-7.38 (5H, m, Ph)	Multipléte que integra por 5H. Por su desplazamiento químico, se corresponden a los protones del fenilo.
7.66 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, NH-CO)	Doblete que integra por 1H. Como se verá posteriormente en el HSQC, no va unido a ningún carbono, lo que sugiere un NH. En el experimento COSY se observa correlación entre esta señal y la del 2-H a δ 4.91, por lo que se asignó al 3-H.

^{13}C -RMN (18)



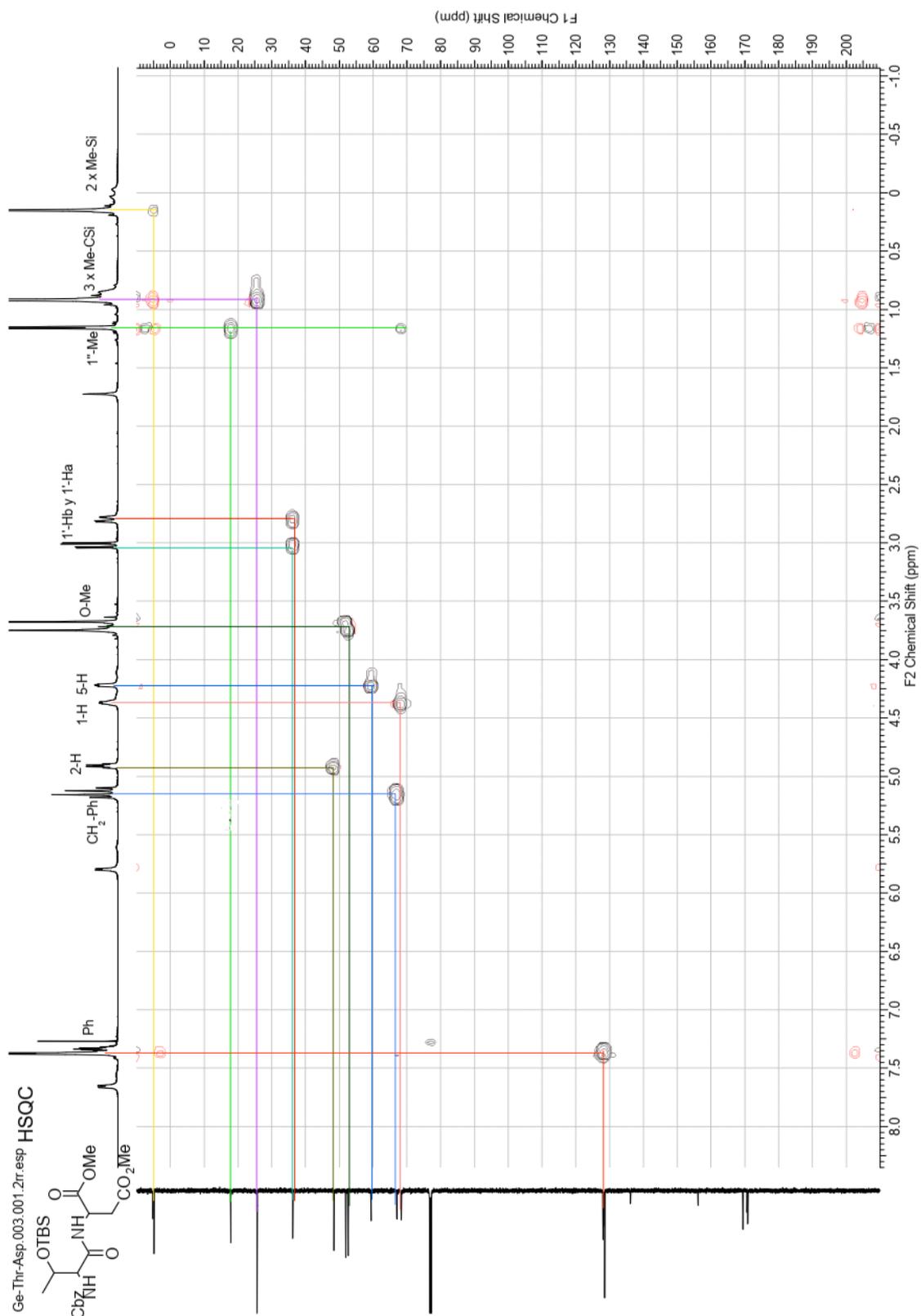
Señal (ppm)	Comentario
-5.1 (Me-Si) y -4.8 (Me-Si)	Carbonos muy apantallados, corresponden a los metilos unidos al Si del grupo OTBS.
17.9 (Me, 1''-Me, + C, Si-C)	Señal para el metilo de Thr y para el carbono cuaternario del grupo OTBS.
25.7 (3 x CH ₃ , Me ₃ CSi)	Carbonos del grupo terc-butilo del OTBS.
36.2 (CH ₂ , 1'-C)	Carbono beta del aspartato, adyacente al grupo CO ₂ Me que lo desapantalla.
48.4 (CH, 2-C)	CH en posición- α , desapantallado por los grupos carbonilo y amina adyacentes.
52.0 (CH ₃ , Me-O)	Carbono unido a O, metiléster.
52.7 (CH ₃ , Me-O)	Carbono unido a O, metiléster.
59.4 (CH, 5-C)	CH en posición- α , desapantallado por los grupos carbonilo y amina adyacentes.
67.0 (CH ₂ , OCH ₂ Ph)	Carbono desapantallado por estar unido a un O y a un grupo fenilo (grupo Cbz).
68.3 (CH, 1''-CH)	Carbono desapantallado por la unión al oxígeno del grupo OTBS.
128.0 (2 x CH, Ph)	Carbonos aromáticos.
128.2 (CH, Ph)	Carbono aromático.
128.5 (2 x CH, Ph)	Carbonos aromáticos.
136.2 (C, Ph)	Carbono aromático.
156.2 (C, COCH ₂ Bn)	Carbono cuaternario correspondiente al carbonilo del carbamato (Cbz).
169.4 (CO, CON)	Carbono cuaternario correspondiente a uno de los carbonilos (grupo amido)
170.7 (CO, CO ₂ Me)	Carbono cuaternario correspondiente a uno de los carbonilos (metil éster).
170.9 (C, CO ₂ Me)	Carbono muy desapantallado, se trata del carbonilo (metil éster).

COSY (18)

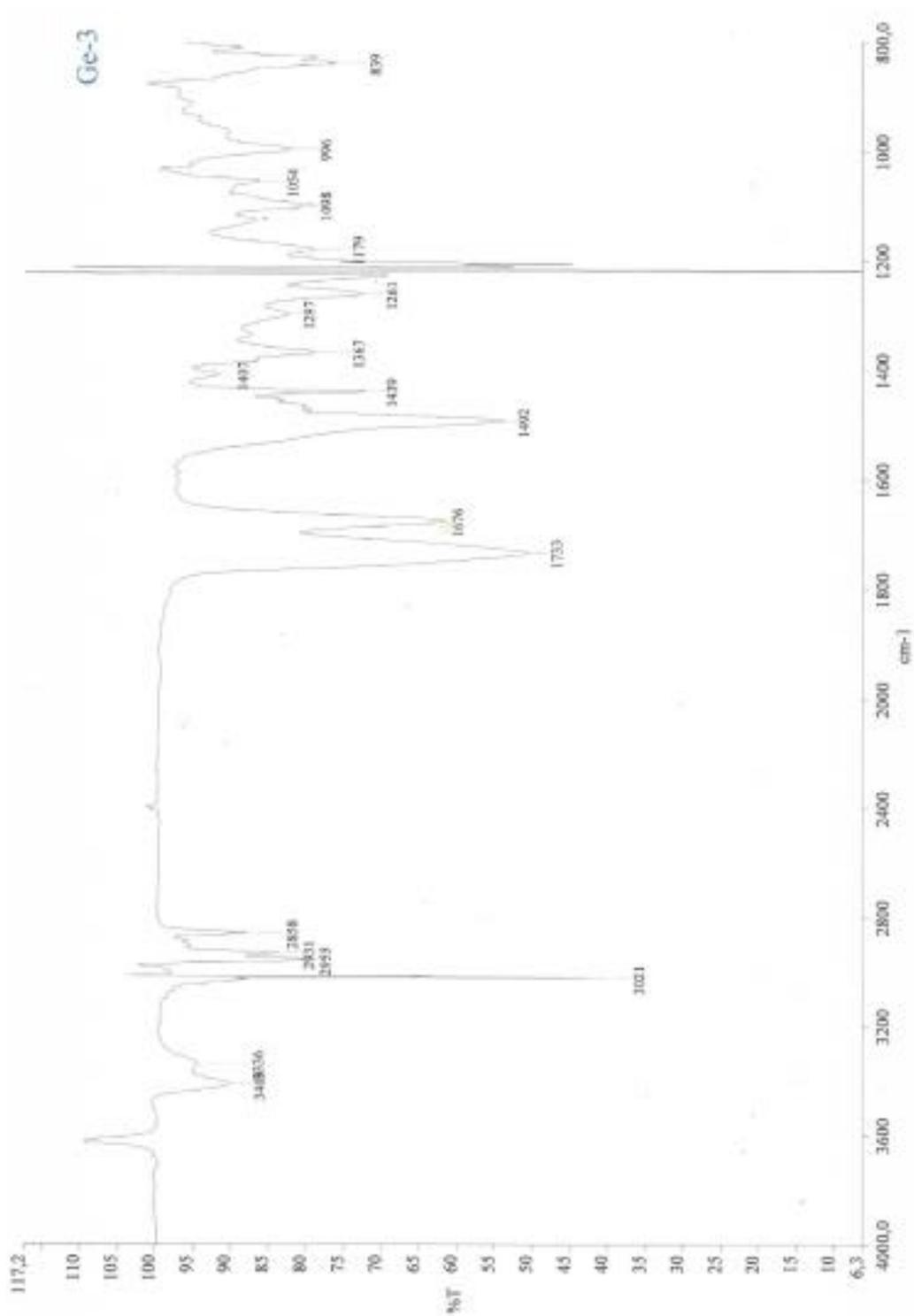


La diagonal la constituyen las señales de cada uno de los protones o grupos de protones consigo mismos, mientras que las señales que aparecen fuera de la misma muestran relaciones entre protones contiguos. Así, el 5-H presenta una correlación con el NH unido al grupo COBn. De la misma forma, el 1''-CH₃ de la Thr tiene señal consigo mismo y con el 1''-H adyacente.

HSQC (18)



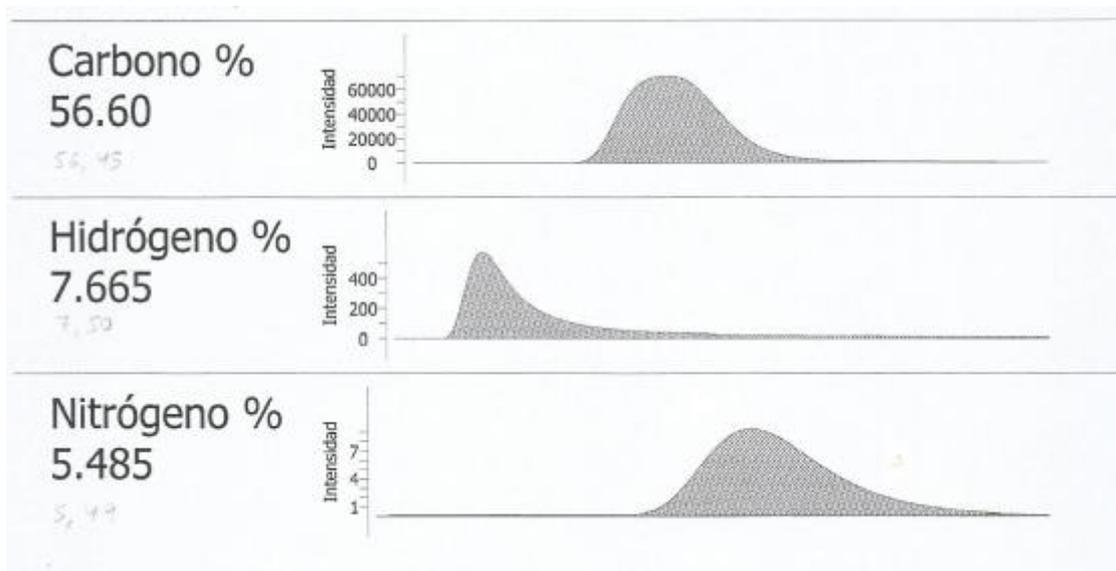
IR (18)



El espectro de IR nos permite confirmar la presencia de determinados grupos funcionales que caracterizan a la molécula. En este caso, se confirma la presencia de los grupos amina en 3409 y 3336 cm^{-1} y la de dos carbonilos en 1733 y 1676 cm^{-1} .

Análisis elemental (18):

ELEMENTO	TEÓRICO (%)	EXPERIMENTAL (%)
CARBONO	56.45	56.60
HIDRÓGENO	7.50	7.665
NITRÓGENO	5.49	5.485



Los resultados de este análisis son favorables; no se supera el límite de 0.4% de diferencia entre los valores teórico y experimental.

Materiales y Métodos.

1. Técnicas experimentales generales:

- **Resonancia Magnética Nuclear (RMN):** los experimentos de ^1H y ^{13}C se realizaron en un espectrómetro Bruker, modelo Avance II 500, a 500 MHz y 125.7 MHz, respectivamente. Se emplearon cloroformo o metanol deuterados como disolvente. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en partes por millón (ppm), en relación al disolvente empleado como referencia interna, y las constantes de acoplamiento (J), en Hertzios (Hz).
- **Análisis elemental:** se hicieron en un analizador Fisons modelo EA 1108 CHNS.
- **IR:** los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrómetro Perkin-Elmer modelo 681/FTIR, en células de 0.2 mm, disolviendo el producto en cloroformo seco sobre gel de sílice Merck con indicador de humedad. La espectrometría de infrarrojo (IR) permitió también comprobar para cada uno de los productos la presencia de grupos funcionales característicos.
- **Actividad 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 o metanol como disolvente, la longitud de la célula empleada es de 1 dm y la concentración está dada en g/100 mL de disolución. La rotación específica es una propiedad de compuestos quirales, consistente en que las moléculas, por su conformación, son capaces de cambiar el ángulo en el que un haz de luz monocromático pasa a través de una muestra acuosa de las mismas. Si el ángulo gira en sentido de las agujas del reloj, la sustancia será dextrógira y sus valores de α_D serán positivos, por el contrario, si gira en sentido contrario a las agujas del reloj, será levógira y los valores serán negativos.
- **Punto de fusión:** se utilizó un equipo Bibby-Stuart modelo SMP10, utilizando capilares de 100 mm de longitud y 1.3 mm de diámetro interno.

2. Técnicas cromatográficas:

- **Cromatografía en columna.** Los crudos de reacción se purificaron con esta técnica, utilizando gel de sílice Merck 60 (0.063-0.2 mm), con los gradientes de polaridad adecuados para cada caso (**Figuras 3 y 4**).

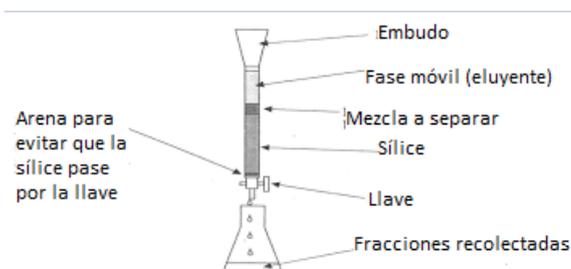


Figura 3. Esquema de una cromatografía en columna



Figura 4. Ejemplo de cromatografía en columna

- **Cromatografía en capa fina.** La evolución de las reacciones y cromatografías se monitorizó utilizando placas de gel de sílice Merck (60 F₂₅₄ de 0.25 mm de espesor) (**Figuras 5 y 6**). Los eluyentes empleados se especifican en cada caso. El revelado de las mismas se realizó por exposición a luz ultravioleta de 254 nm o pulverización con una disolución de permanganato potásico (por cada litro de agua, 10g KMnO₄, 66.7g K₂CO₃ y 0.85g NaOH) y posterior calentamiento.

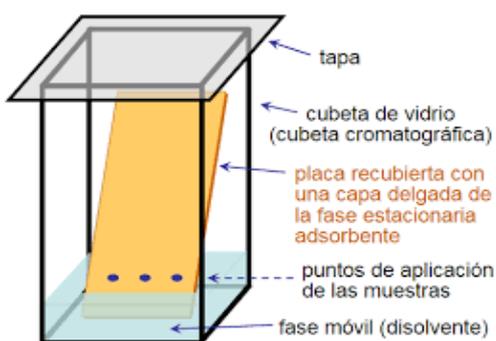


Figura 5. Esquema de la técnica de cromatografía en capa fina

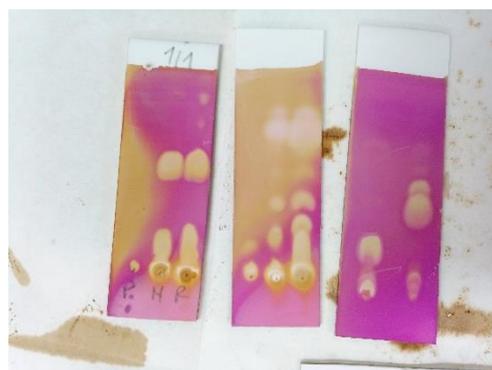


Figura 6. Ejemplo del seguimiento de una reacción por cromatografía en capa fina

- **Cromatografía rotatoria en cromatotrón.** Se trata de un aparato que utiliza un sistema de placas circulares en los que la mezcla a resolver se separa por un

proceso de cromatografía centrífuga. Se utilizó una placa circular de 2 mm de grosor de gel de sílice Merck (60PF₂₅₄) con yeso (**Figura 7**)

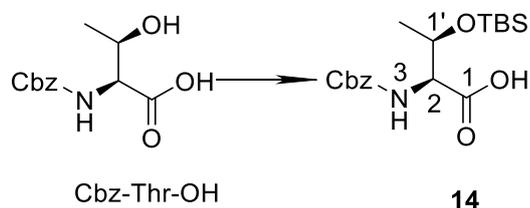


Figura 7. Cromatotrón

3. Procedimientos sintéticos y caracterización:

3.a. Protección de los aminoácidos.

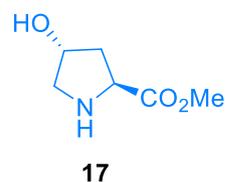
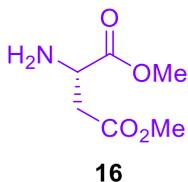
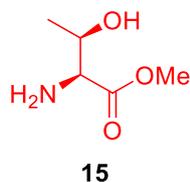
N – Benciloxycarbonil – *O* - (*tert* - butildimetilsilil) *L* - treonina (**14**).



A una disolución de Cbz-Thr-OH comercial (6.0 g, 23.69 mmol) en DMF seca (80 mL), a 0°C y bajo atmósfera de nitrógeno, se le añadió imidazol (4.83 g, 71.07 mmol) y TBSCl (4.64 g, 35.53 mmol) y la disolución resultante se agitó a 25 °C durante toda la noche. La mezcla se vertió entonces en agua y se extrajo con AcOEt. El combinado de extractos orgánicos se lavó con una disolución acuosa de NaCl saturada, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-AcOEt, 70:30) obteniéndose el derivado de aminoácido **4** como sólido cristalino (8.46 g, 23.04mmol, 97.26%).

→ *N* – Benciloxycarbonil–*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-*L*-treonina (**14**). Sólido cristalino. Cristalizó de AcOEt-hexano. $[\alpha]_D$: +11 ($c = 0.36$); **IR** (CHCl₃) 3469, 1725, 1676 cm⁻¹; **RMN** ¹H (500MHz, MeOH, 26°C): δ_H 0.09 (3H, s, Me-Si), 0.11 (3H, s, Me-Si), 0.88 (9H, s, Si-CMe₃), 1.22 (3H, d, $J = 6.3$ H, 1'-Me), 4.34 (1H, dd, $J = 2.4, 8.4$ Hz, 2-H), 4.49 (1H, m, 1'-H), 5.15 (2H, s, CH₂-Ph), 5.53 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, NH), 7.34-7.39 (5H, m, Ph), **RMN** ¹³C (125 MHz, CDCl₃, 26°C), δ_C : -5.2 (CH₃, Me-Si), -4.6 (CH₃, Me-Si), 17.8 (C, C-Me₃), 19.7 (CH₃, 1'-Me), 25.6 (3 × CH₃, Si-CMe₃), 59.3 (CH, 2-C), 67.3 (CH₂, CH₂-Ph), 68.5 (CH, 1'-C), 128.1 (2 × CH, Ph), 128.3 (CH, Ph), 128.6 (2 × CH, Ph), 136.0 (C, Ph), 156.5 (C, COBn), 174.1 (C, CO₂H). **Análisis elemental** para C₁₈H₅₉N₃O₁₅Si (873.37): calc. C 58.83, H 7.95, N 3.81; encontrado C 58.85, H 8.01, N 4.18.

L-Treonina metil éster (15), Dimetil L-aspartato (16), y 4-*trans*-L-Hidroxirolina metil éster (17).



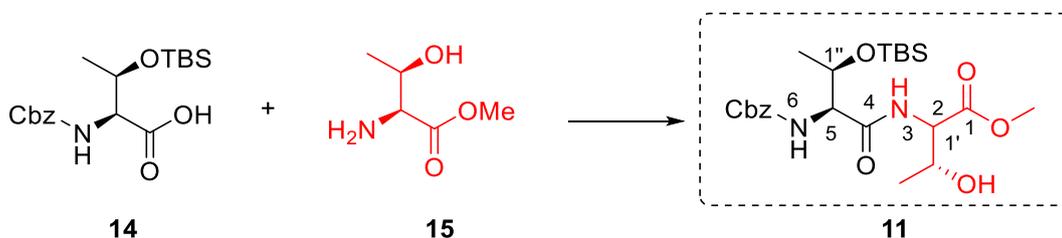
El aminoácido comercial se disolvió en MeOH seco y se enfrió a 0°C para añadir, bajo atmósfera de nitrógeno y gota a gota SOCl₂ (2 equivalentes). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación toda la noche. Entonces se llevó a sequedad en el rotavapor para obtener el producto metilado crudo (>95%),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

3.b. Reacciones de Acoplamiento Peptídico.

Método General. A una disolución del derivado de treonina **14** (1 mmol) y la amina a acoplar (1 mmol) en CH₂Cl₂ a 0 °C, se añadió HBTU (1.1 equivalentes) y DIPEA (3 equivalentes), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Entonces se lavó tres veces con disolución saturada de NaHCO₃ y otras tres con HCl diluido al 5%. El extracto orgánico se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando mezclas de hexano/acetato de etilo.

Obtención del producto 11.

***N*-[*N*-benciloxicarbonil-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)treonil]-*L*-treonina metil éster (11).**

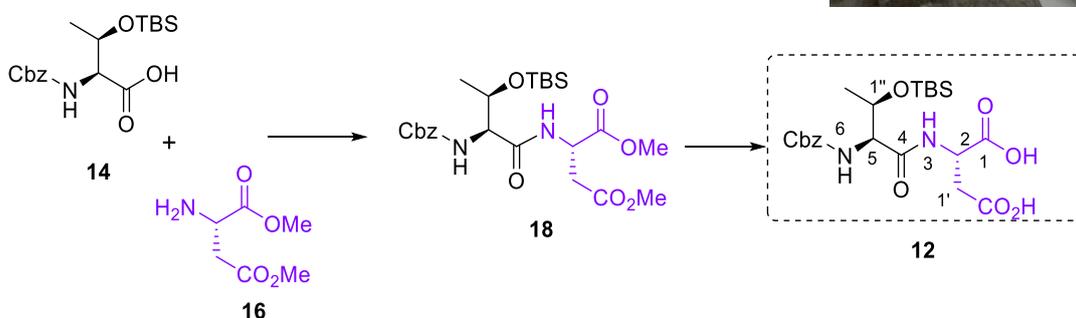


El dipéptido **11** se preparó a partir el **Método General**, partiendo de **14** (0.776 g, 2.11 mmol) y el metil éster **15** (0.36 g, 2.11 mmol). Tras cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-AcOEt 1:1) se aisló el compuesto **11** como un sólido cristalino (0.67 g, 1.39 mmol, 76%).

***N*-[*N*-benciloxycarbonil-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)treonil]-*L*-treonina metil éster (**11**). IR 3407, 3341, 1721, 1676, cm^{-1} ; α_D : +11.16 ($c = 0.43$); RMN ^1H (500MHz, CDCl_3 , 26°C): δ_H : 0.16 (3H, s, Me-Si), 0.19 (3H, s, Me-Si), 0.93 (9H, s, Si-CMe₃), 1.17 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, 1'-Me), 1.21 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, 1''-Me), 1.93 (1H, br s, OH), 3.77 (3H, s, OMe), 4.30 (1H, m, 5-H), 4.35–4.38 (2H, m, 1'-H y 1''H), 4.58 (1H, dd, $J = 1.9, 8.8$ Hz, 2-H), 5.11 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, Ph-CH_aO), 5.15 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, Ph-CH_bO), 5.87 (1H, d, $J = 5.7$ Hz, NH, 6-H), 7.31–7.38 (5H, m, Ph), 7.57 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, NH, 3-H); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , 26°C), δ_C : -5.1 (CH₃, Me-Si), -4.8 (CH₃, Me-Si), 17.4 (C, C-Si), 17.9 (CH₃, 1'-Me), 19.9 (CH₃, 1''-Me), 25.7 (3 × CH₃, Me₃CSi), 52.4 (CH₃, OMe), 57.3 (2-CH), 59.1 (5-CH), 67.0 (CH₂, OCH₂Ph), 67.6 (CH, 1'-C), 68.4 (CH, 1''-C), 128.0 (2 × CH, Ph), 128.16 (CH, Ph), 128.5 (2 × CH, Ph), 136.2 (C, Ph), 156.1 (C, COCH₂Ph), 170.0 (C, CO₂Me), 171.0 (C, CO-N). **Análisis elemental** para C₄₆H₇₈N₄O₁₅Si₂ (482.24): calc. C 58.28, H 7.74, N 5.66; encontrado C 58.05, H 7.62, N 5.55.**

Obtención del producto 12.

***N*-[*N*-benciloxycarbonil-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)treonil]-*L*-aspartato de dimetilo (**18**) y ácido *N*-[*N*-benciloxycarbonil-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)treonil]-*L*-aspártico (**12**).**



El dipéptido **18** se preparó a partir del **Método General**, partiendo de **14** (0.93 g, 2.53 mmol) y el metil éster **16** (0.85 g, 2.53 mmol). Tras cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-AcOEt, 70:30) se aisló el compuesto **18** (746 mg, 1.55 mmol, 58%).

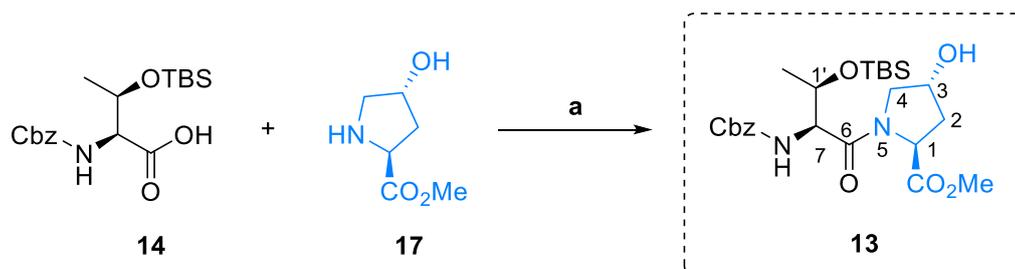
***N*-[*N*-benciloxycarbonil-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)treonil]-*L*-aspartato de dimetilo (18).** Aceite amarillo; IR 3409, 3336, 1733, 1676 cm⁻¹; [α]_D +46 (*c* = 1.01); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, 26 °C) δ_H 0.15 (6H, s, 2 × Me-Si), 0.92 (9H, s, Si-CMe₃), 1.16 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, 1''-Me), 2.80 (1H, dd, *J* = 4.6, 17.2 Hz, 1'-Ha), 3.02 (1H, dd, *J* = 4.7, 17.0 Hz, 1'-Hb), 3.68 (3H, s, OMe), 3.75 (3H, s, OMe), 4.22 (1H, dd, *J* = 3.0, 6.1 Hz, 5-H), 4.37 (1H, m, 1''-H), 4.91 (1H, m, 2-H), 5.11 (1H, d, *J* = 12.3 Hz, Ph-CH_aO), 5.17 (1H, d, *J* = 12.3 Hz, PhCH_bO), 5.80 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, NH-COBn), 7.31–7.38 (5H, m, Ph), 7.66 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, NH-CO). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, 26 °C), δ_C: -5.2 (CH₃, Me-Si), -4.8 (CH₃, Me-Si), 17.9 (CH₃, 1''-Me, + C, Si-C), 25.7 (3 × CH₃, Me₃CSi), 36.2 (CH₂, 1'-C), 48.4 (CH, 2-C), 52.0 (CH₃, MeO), 52.7 (CH₃, MeO), 59.4 (CH, 5-C), 67.0 (CH₂, PhCH₂O), 68.3 (CH, 1''-C), 128.0 (2 × CH, Ph), 128.2 (CH, Ph), 128.5 (2 × CH, Ph), 136.2 (C, Ph), 156.2 (CO, CO₂Bn), 169.4 (CO, CO₂Me), 170.7 (CO, CO₂Me), 170.9 (CO, CO-N). **Análisis elemental** para C₂₄H₃₈N₂O₈Si (510.24): calc. C 57.24, H 7.94, N 5.80; encontrado C 57.26, H 8.03, N 6.07.

A continuación, se saponificaron los dos ésteres metílicos. Para ello se disolvió el péptido **18** (100 mg, 0.17 mmol) en THF, se enfrió a 0°C, y se añadió una disolución de LiOH 1 M en THF (0.2 mL, 0.2 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Se acidificó con HCl hasta aproximadamente pH 2 y se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío, obteniendo el péptido **12** como un acetite incoloro (0.08mg, 0.17 mmol, 100%).

Ácido *N*-[*N*-benciloxycarbonil-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)treonil]-*L*-aspártico (12). IR 3430, 1765, 1720 cm⁻¹; α_D: -6 (*c* = 0.21); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, 26 °C), δ_H: -0.03 (3H, s, Me-Si), -0.00 (3H, s, Me-Si), 0.79 (9H, s, 3 × Me, Si-CMe₃), 1.09 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, 1''-Me), 2.70 (1H, dd, *J* = 5.4, 17.0 Hz, 1'-Ha), 2.79 (1H, dd, *J* = 5.4, 17.0 Hz, 1'-Hb), 4.08 (1H, br d, *J* = 3.5 Hz, 5-H), 4.20 (1H, m, 1''-H), 4.66 (1H, t, *J* = 5.4 Hz, 2-H), 5.02 (2H, s, CH₂Ph), 7.20–7.29 (5H, m, Ph). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, 26 °C), δ_C: -4.7 (CH₃, Me-Si), -4.3 (CH₃, Me-Si), 19.0 (CH₃, 1''-Me), 20.5 (C, C-Si), 26.5 (3 × Me, Me₃CSi), 37.2 (CH₂, 1'-C), 50.1 (CH, 2-C), 61.8 (CH, 5-C), 68.1 (CH₂, Ph-CH₂O), 70.4 (CH, 1''-C), 129.1 (2 × CH, Ph), 129.2 (CH, Ph), 129.7 (2 × CH, Ph), 138.1 (C, Ph), 158.6 (CO, CO₂Bn), 172.2 (CO, CON), 173.7 (CO, CO₂), 174.11 (CO, CO₂). **Análisis elemental** para C₂₂H₃₄N₂O₈Si (482.21): calc. C 56.45, H 7.50, N 5.49; encontrado C 56.60, H 4.67, N 5.49.

Obtención del producto 13.

N-[*N*-Benciloxycarbonil-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)treonil]-
4-*trans*-hidroxiprolina metil éster (13).



El dipéptido **3** se preparó a partir del **Método General**, partiendo de **14** (1 g, 2.72 mmol) y el metil éster **17** (0.49 g, 3.38 mmol). Tras cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-AcOEt, 1:1) se aisló el compuesto **13**, (1.05 g, 2.12 mmol, 78%).

→*N*-[*N*-Benciloxycarbonil-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)treonil]-4-*trans*-hidroxiprolina metil éster (**13**). Sólido cristalino blanco. Cristalizado de hexano/acetato de etilo, p.f. 40-42 °C; IR 3427, 1744, 1711, 1647, cm⁻¹; α_D: -50 (c = 0.67); RMN ¹H (500MHz, CDCl₃, 26°C): δ_H 0.07 (3H, s, Me-Si), 0.08 (3H, s, Me-Si), 0.88 (9H, s, Si-CMe₃), 1.23 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, 1'-Me), 2.00 (1H, ddd, *J* = 4.4, 9.0, 13.0 Hz, 2-H_a), 2.33 (1H, m, 2-H_b), 2.72 (1H, br s, 3-OH), 3.72 (3H, s, OMe), 3.78 (1H, dd, *J* = 3.94, 11.5 Hz, 4-H_a), 3.98 (1H, d, *J* = 11.3 Hz, 4-H_b), 4.02 (1H, t, *J* = 6.3 Hz, 8-H), 4.32 (1H, dd, *J* = 6.6, 7.6 Hz, 7-H), 4.50 (1H, m, 3-H), 4.66 (1H, t, *J* = 8.3 Hz, 1-H), 5.03 (1H, d, *J* = 12.3 Hz, Ph-CH_aO), 5.09 (1H, d, *J* = 12.3 Hz, Ph-CH_bO), 5.59 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, NH), 7.28–7.36 (5H, m, Ph); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, 26°C), δ_C: -4.9 (CH₃, Me-Si), -4.5 (CH₃, Me-Si), 17.8 (CH₃, 1'-Me), 20.2 (C, C-Si), 25.7 (3 × CH₃, Me), 37.6 (CH₂, 2-C), 52.2 (CH₃, MeO), 55.9 (CH₂, 4-C), 57.6 (CH, 7-C), 58.6 (CH, 1-C), 67.0 (CH, 3-C), 69.7 (CH₂, PhCH₂O), 70.1 (CH, 8-C), 127.9 (2 × CH, Ph), 128.1 (CH, Ph), 128.5 (2 × CH, Ph), 136.1 (C, Ph), 156.4 (C, CO₂Bn), 169.6 (C, CON), 172.4 (C, CO₂). Análisis elemental para C₂₄H₃₈N₂O₇Si (494.24): calc. C 54.75, H 7.10, N 5.80; encontrado C 54.55, H 7.48, N 5.84.

Conclusiones

- Se han sintetizado tres dipéptidos derivados de la L-treonina utilizando procedimientos estándar de acoplamiento peptídico.
- Durante la síntesis se manipularon otros aminoácidos naturales, como el ácido aspártico y la 4-*trans*-hidroxiprolina, utilizando procesos básicos de protección y desprotección de grupos funcionales de importancia en química de péptidos como son el grupo amino (-NH₂), el ácido carboxílico (-CO₂H) y el grupo hidroxilo (-OH) de la cadena lateral de la treonina.
- Los péptidos se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice o cromatografía rotatoria, utilizando mezclas de hexanos/acetato de etilo en proporción variable.
- Los compuestos obtenidos se caracterizaron utilizando Resonancia Magnética Nuclear de protón y carbono, así como experimentos bidimensionales COSY y HSQC. Además, se determinó su pureza vía análisis elemental y otros parámetros característicos como la actividad óptica y el punto de fusión, en el caso de sólidos cristalinos.
- Finalmente se prepararon muestras de los péptidos puros para posteriores estudios estructura-actividad antimicrobiana y citotóxica.

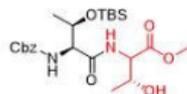
Bibliografía

- 1) *Handbook of Biologically Active Peptides* (Ed.: A. J. Kastin), Academic Press, San Diego, 2006.
- 2) (a) *The structure of pyoverdine Pa, the siderophore of Pseudomonas aeruginosa* S. Wendenbaum, P. Demange, A. Dell, J. M. Meyer, M. A. Abdallah *Tetrahedron Letters* **1983**, 24, 4877-80. (b) *The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in Pseudomonas aeruginosa*, P. N. Jiménez, G. Koch, J. A. Thompson, K. B. Xavier, R. H. Cool, W. J. Qua, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2012**, 46–65.
- 3) *The total synthesis of the bioactive natural product plantazolicin A and its biosynthetic precursor plantazolicin B*. S. Fenner, Z. E. Wilson, S. V. Ley, *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 15902–15912.
- 4) *One-Pot Conversion of Amino Acids into 2,5-Disubstituted Oxazoles: No Metals Needed*, I. Romero-Estudillo, V. R. Batchu, A. Boto, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, 356, 3742–3748 y referencias citadas allí.
- 5) L. van Buren, M. Foltz, J. R. Ramcharan Jane Rita; EP2161029; (A1); (2010)
- 6) (a) *Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods*. Z. Y. Chen, C. Peng, R. Jiao, Y. M. Wong, N. Yang, Y. Huang, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 4485-99. (b) *A review of meat protein hydrolysates and hypertension*. A. M. Ahmed, M. Muguruma, *Meat Sci.* **2010**, 86, 110-118; (c) *Plant food-derived Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides*. C. Guang, R. D. Phillips, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 5113-5120.
- 7) *A rational approach to the design of selective substrates and potent nontransportable inhibitors of the excitatory amino acid transporter EAAC1 (EAAT3). New glutamate and aspartate analogues as potential neuroprotective agents*. G. Campiani, M. De Angelis, S. Armaroli, C. Fattorusso, B. Catalanotti, A. Ramunno, V. Nacci, E. Novellino, C. Grewer, D. Ionescu, T. Rauen, R. Griffiths, C. Sinclair, E. Fumagalli, T. Mennini, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2507–2510.
- 8) *Amino acid transporters and uses*, S. G. Amara, J. L. Arriza, Patente US6020479, A, 2000.
- 9) *Compositions and Methods to inactivate and/or reduce production of microbial toxins*. B. Bochner, X.-H. Lei, Patent WO2014/130655 (2014, BIOLOG INC).
- 10) OMS. (2017). Un informe de la OMS confirma que el mundo se está quedando sin antibióticos [Comunicado de prensa]. Recuperado de <http://www.who.int/es/news-room/detail/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms>

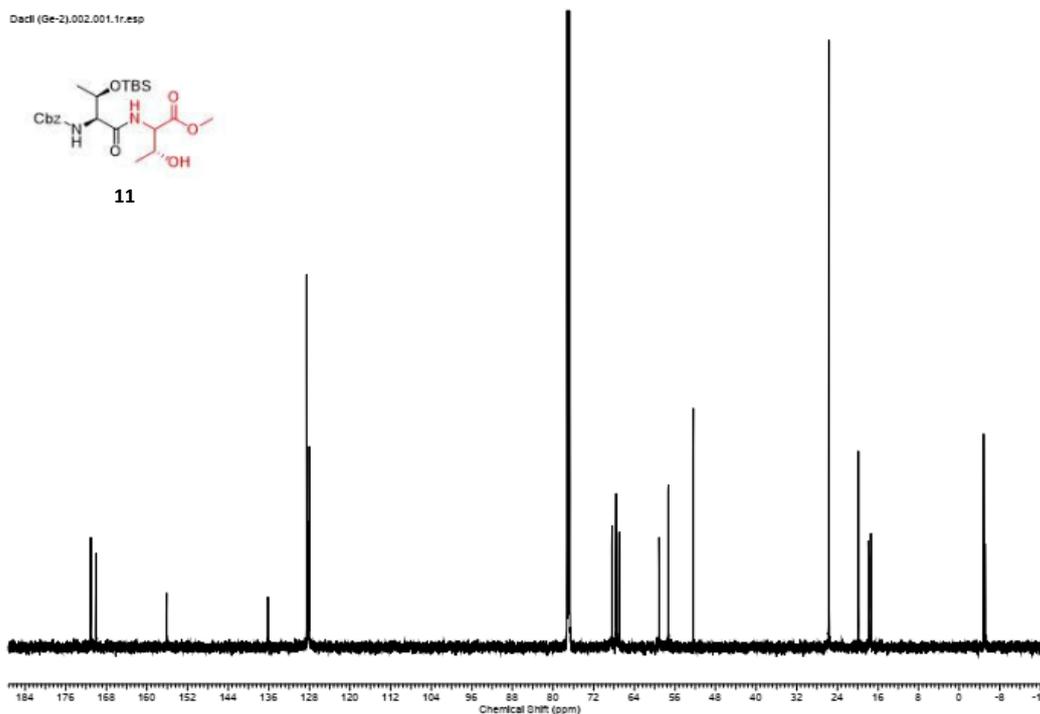
- 11) (a) Para ver también tripéptidos que lo contengan: *Peptides having an ACE inhibiting effect*, L. S. Abrahamse, B. R. Draaisma, J. Schalk, C. J. Van Platerink, Patent WO2005058070 (**2005**, UNILEVER PLC); (b) *Oligopeptide, Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors, Hypotensive Agent, and Method for treatment of Hypertension*. S. Maruyama, H. Tanaka, H. Maeda, S. Miyoshi, H. Ishikawa, F. Fukui, Patent US5238921 (1993) SHOWA SANGYO CO.
- 12) *A comparative study on the primary structure of polypeptide antibiotic A-128-Hyp and telomycin*. G. S. Katrukha, S. N. Maevskaya, A. B. Silaev, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **1977**, 3, 422-423.
- 13) *Agricultural Plant-protecting agents containing dipeptide derivative as active ingredient*. K. S. Park, J. W. Park, S. W. Lee, S. S. Moon, I. S. Hong, Patent US2015/119251, (2015).
- 14) *The Road from Host-Defense Peptides to a New Generation of Antimicrobial Drugs*, A. Boto, J. M. Pérez de la Lastra, C.C. González, *Molecules* **2018**, 23, 311-337.
- 15) (a) *Trypanocidal effect of isotretinoin through the inhibition of polyamine and amino acid transporters in Trypanosoma cruzi*. C. Reigada, E. A. Valera-Vera, M. Sayé, A. E. Errasti, C. C. Avila, M. R. Miranda, C. A. Pereira, *PLoS Negl Trop Dis* **2017**, 11: e0005472. (b) *Competitive Inhibition of Amino Acid Uptake Suppresses Chlamydial Growth: Involvement of the Chlamydial Amino Acid Transporter BrnQ*. P. R. Braun, H. Al-Younes, J. Gussmann, J. Klein, E. Schneider, T. F. Meyer. *J. Bacteriol.* **2008**, 1822–1830
- 16) (a) *Acid Transporters in Cancer and Their Relevance to "Glutamine Addiction": Novel Targets for the Design of a New Class of Anticancer Drugs*. Y. D. Bhutia, E. Babu, S. Ramachandran, V. Ganapathy, *Cancer Res* **2015**;75:1782-1788. (b) *Amino Acid Transporters and Glutamine Metabolism in Breast Cancer*. Y. J. Cha, E.-S. Kim, J. S. Koo, *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, 907.
- 17) Para trabajos previos, ver: *Metal-Free, Site-Selective Peptide Modification by Conversion of "Customizable" Units into β -Substituted Dehydroamino Acids*. C. J. Saavedra, D. Hernández, A. Boto, *Chem. Eur. J.* **2018**, 24, 599–607

¹³C-RMN (11)

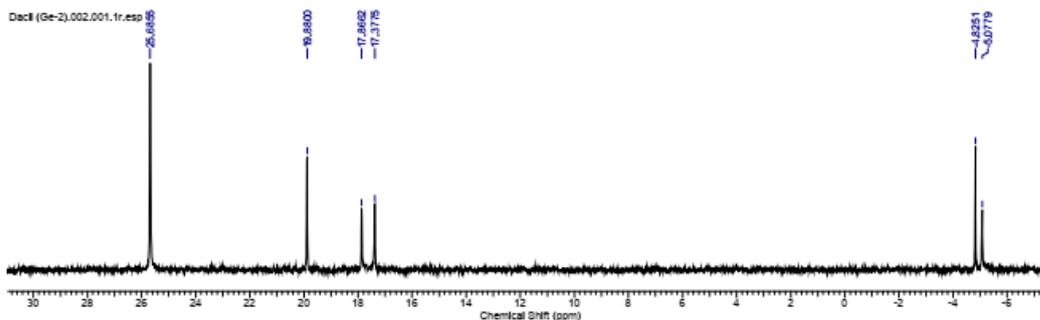
Dactl (Ge-2).002.001.fr.esp



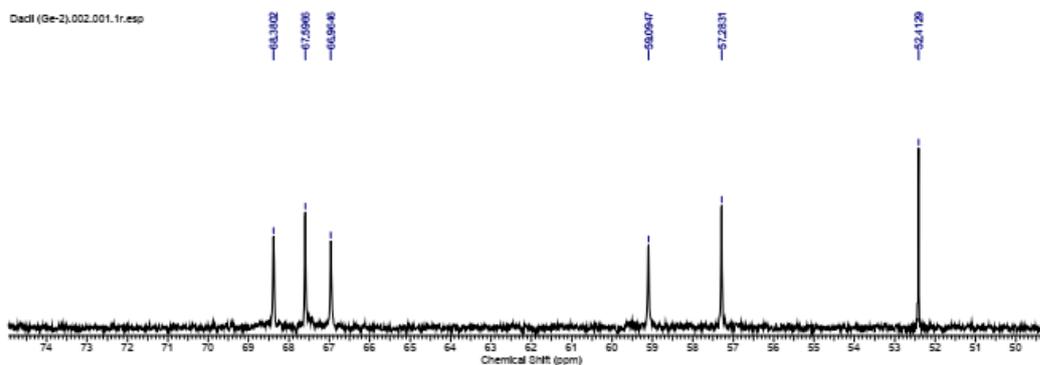
11



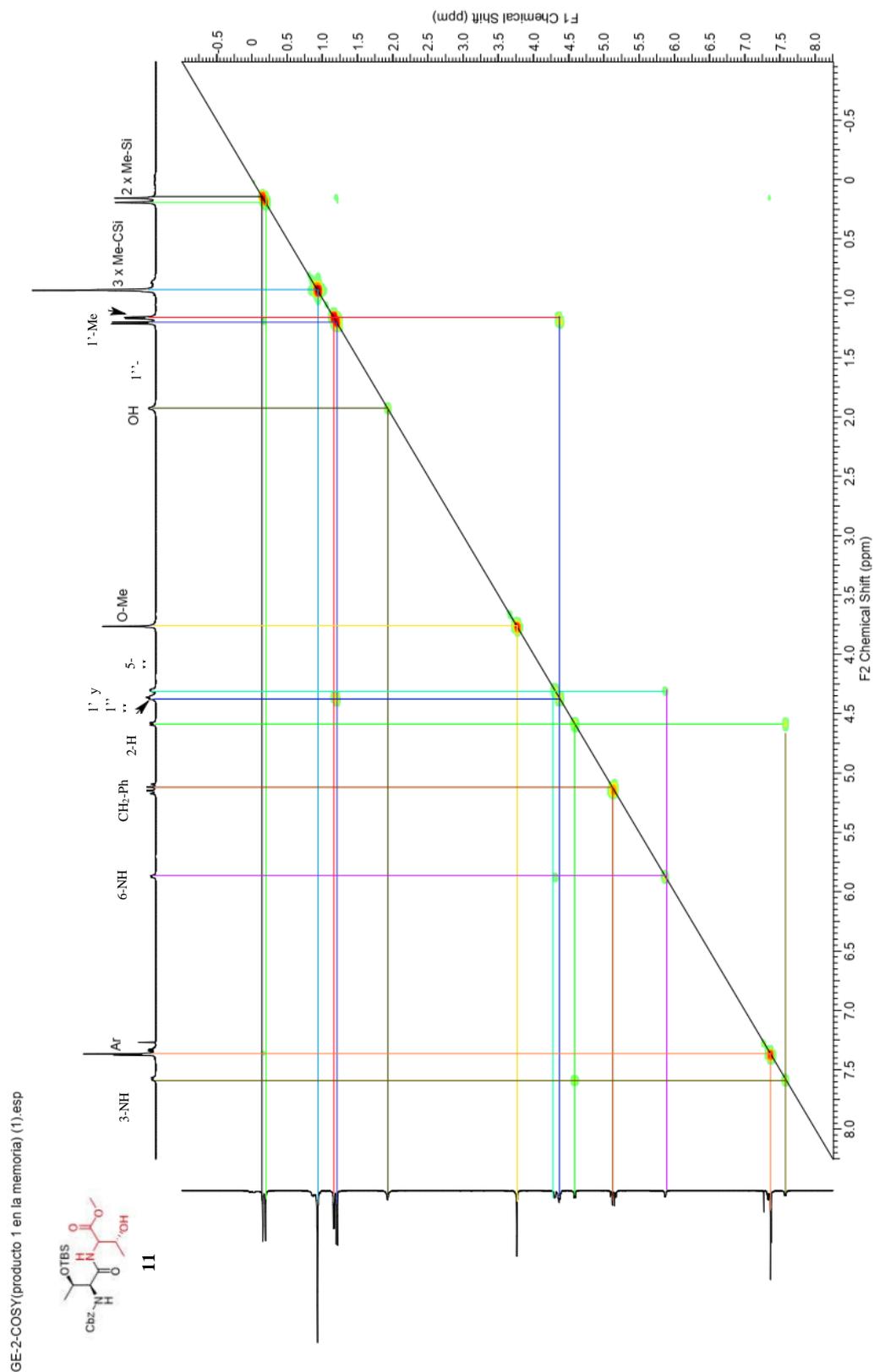
Dactl (Ge-2).002.001.fr.esp



Dactl (Ge-2).002.001.fr.esp

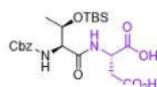


COSY (11)

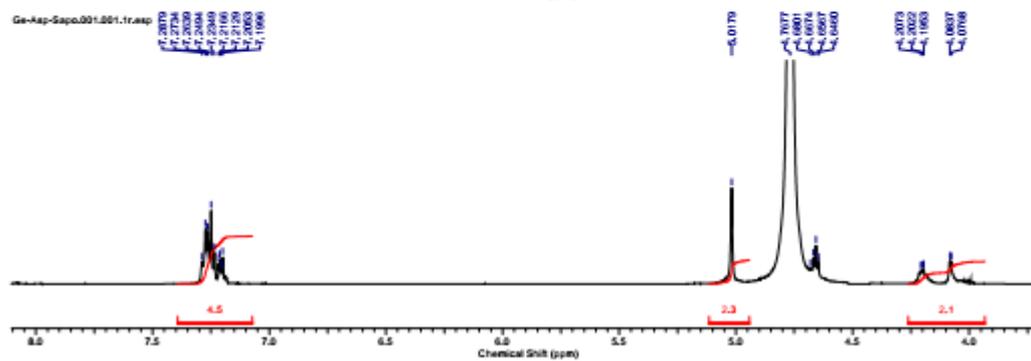
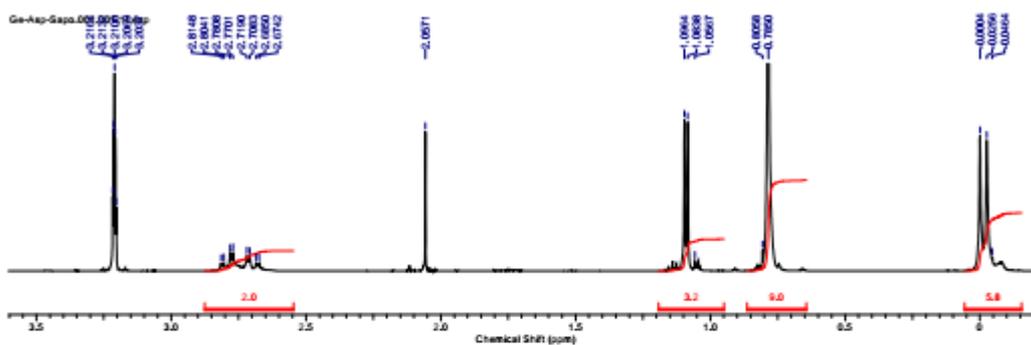
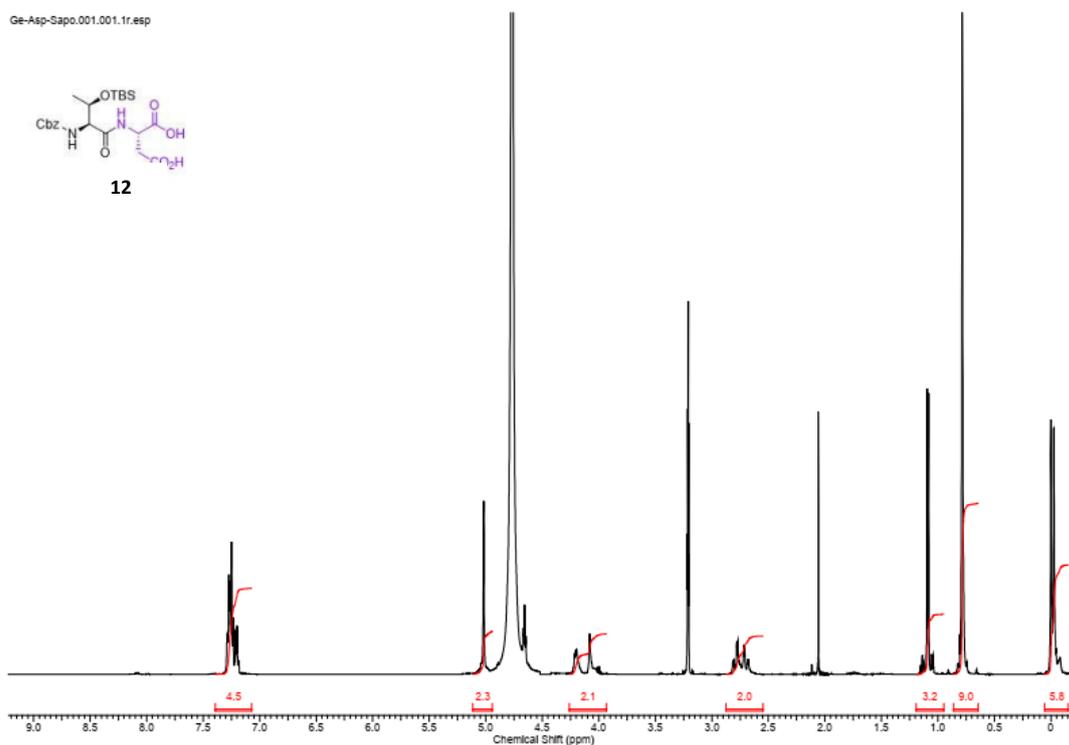


^1H -RMN (12)

Ge-Asp-Sapo.001.001.1r.esp

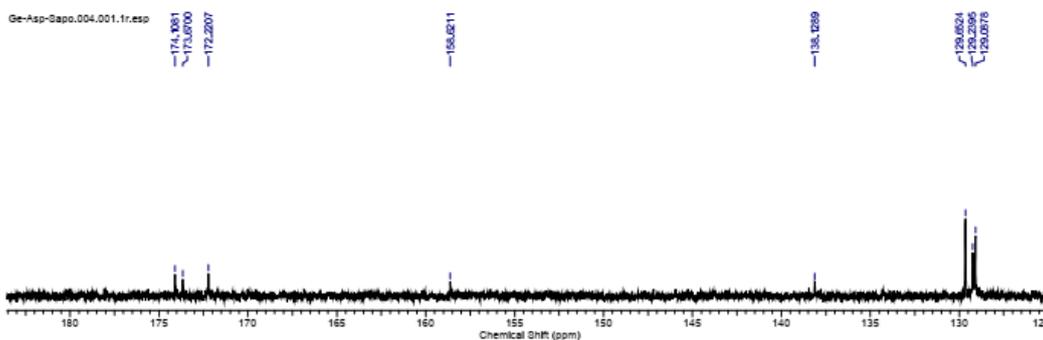
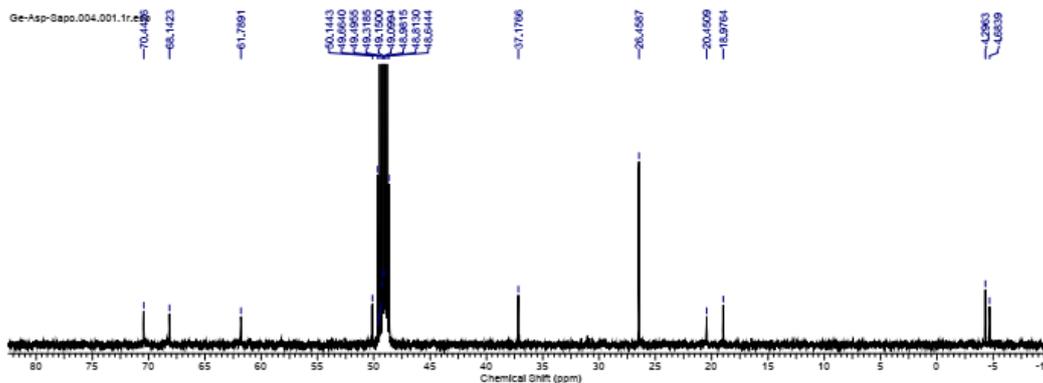
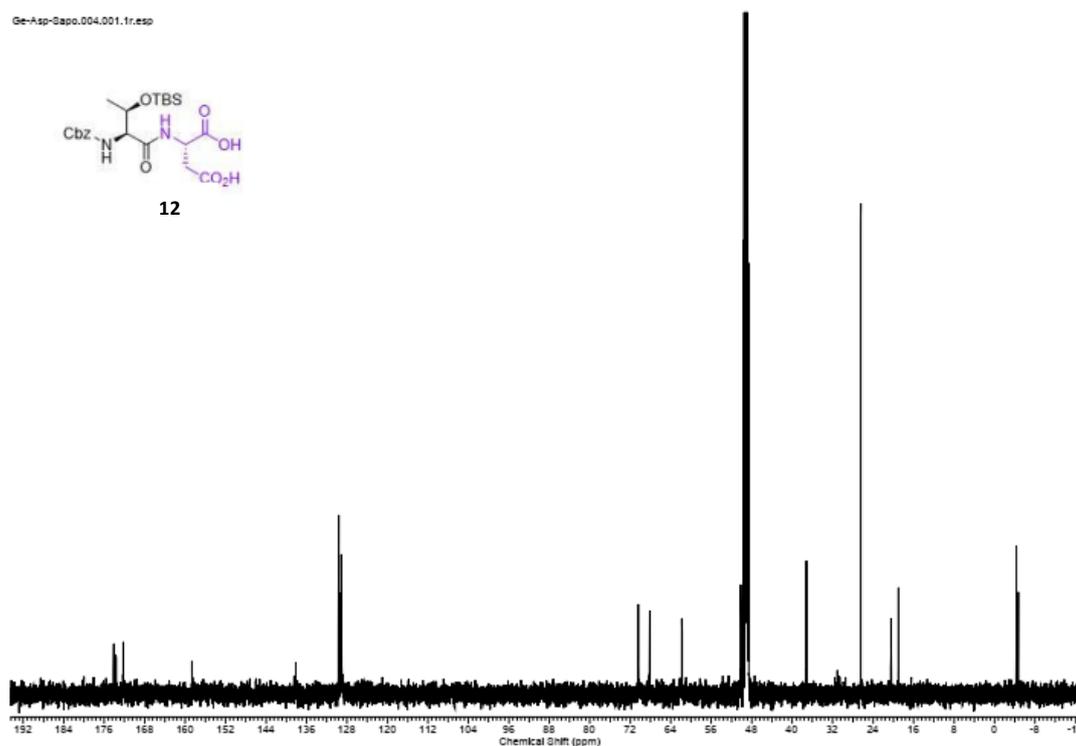
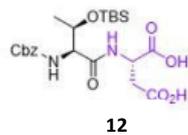


12

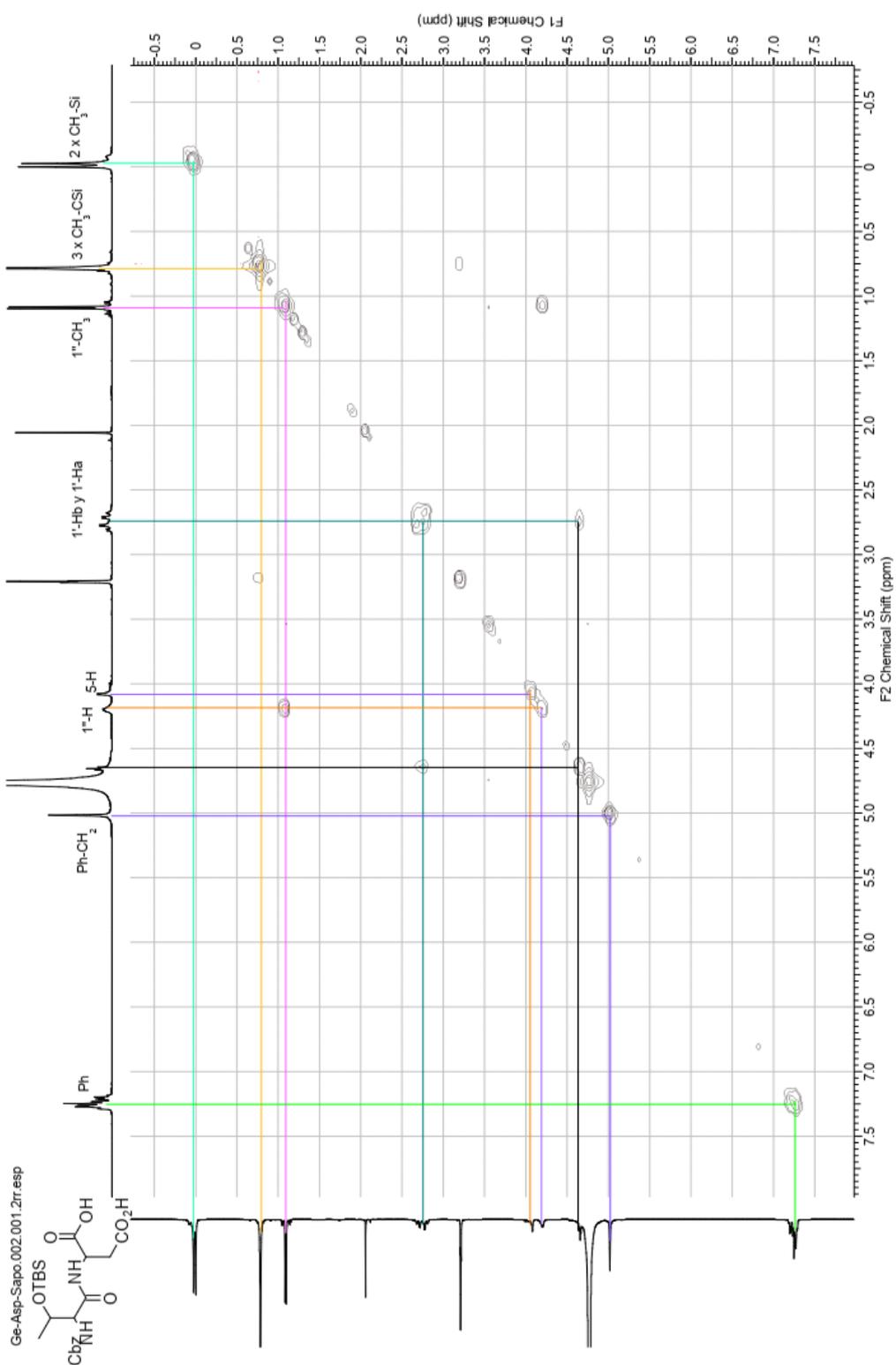


^{13}C -RMN (12)

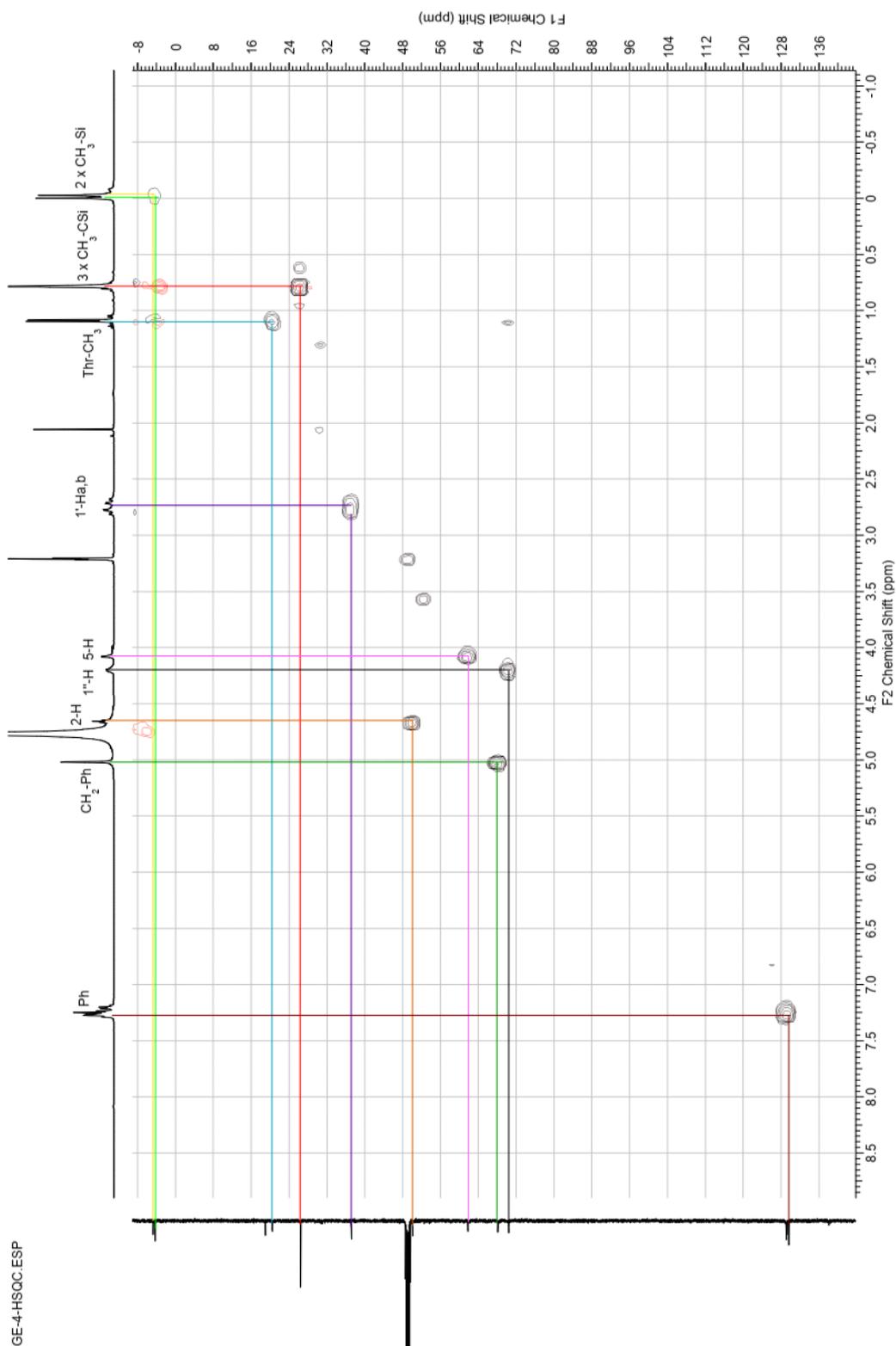
Ge-Asp-Sapo.004.001.fr.esp



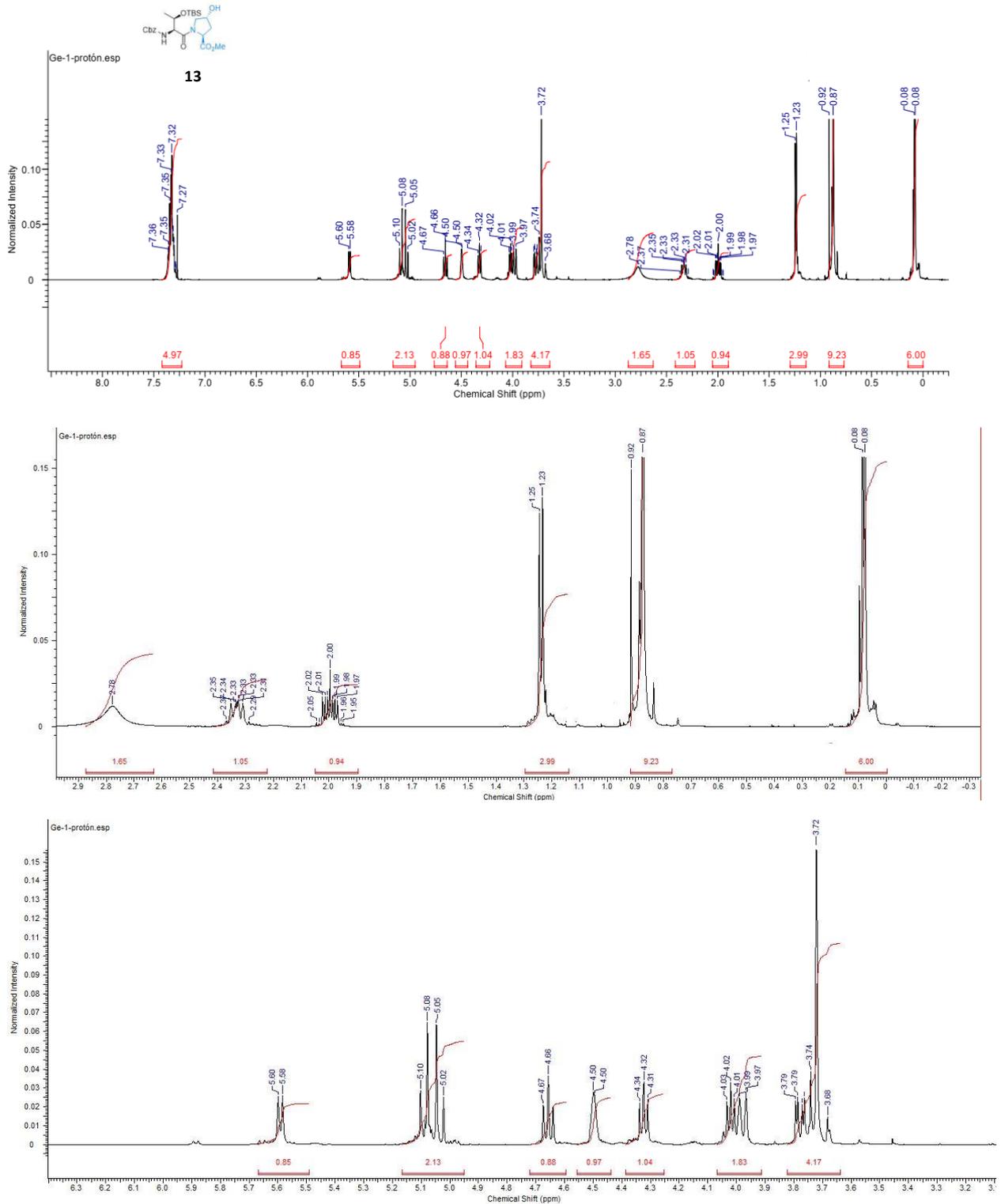
COSY (12)



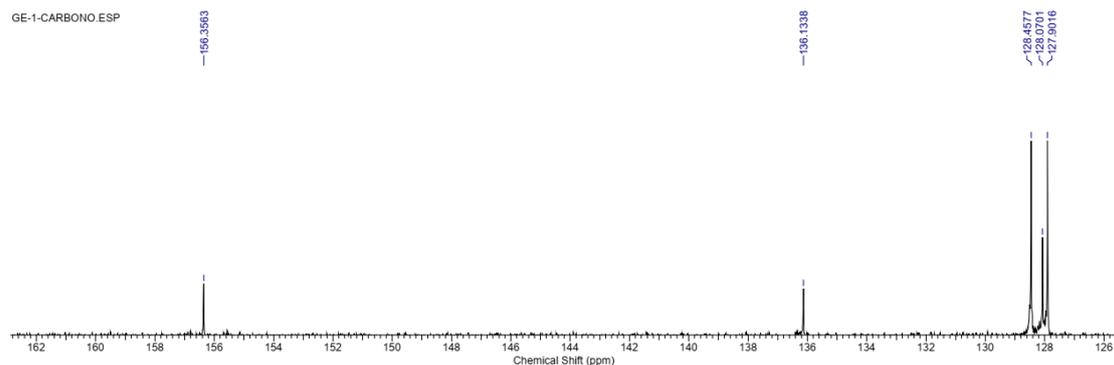
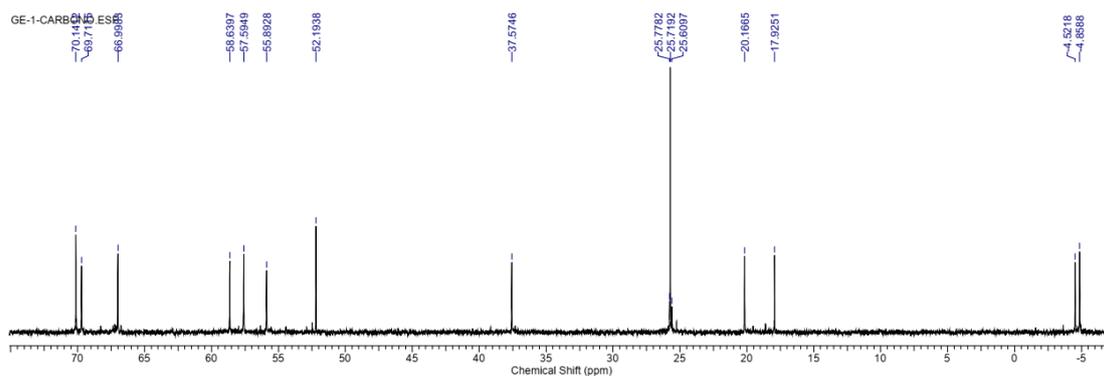
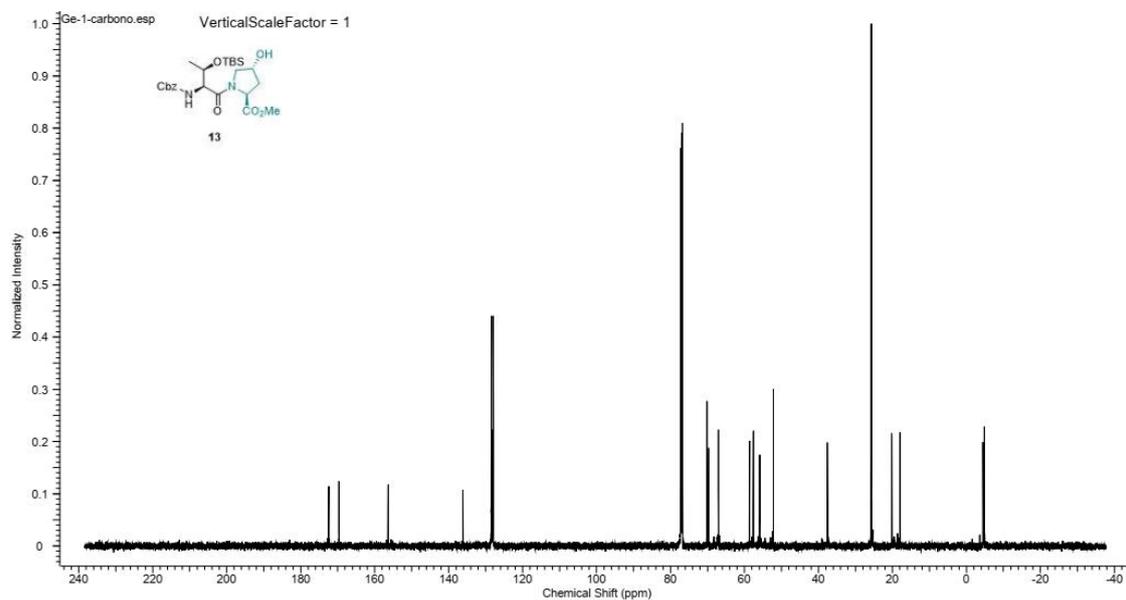
HSQC (12)



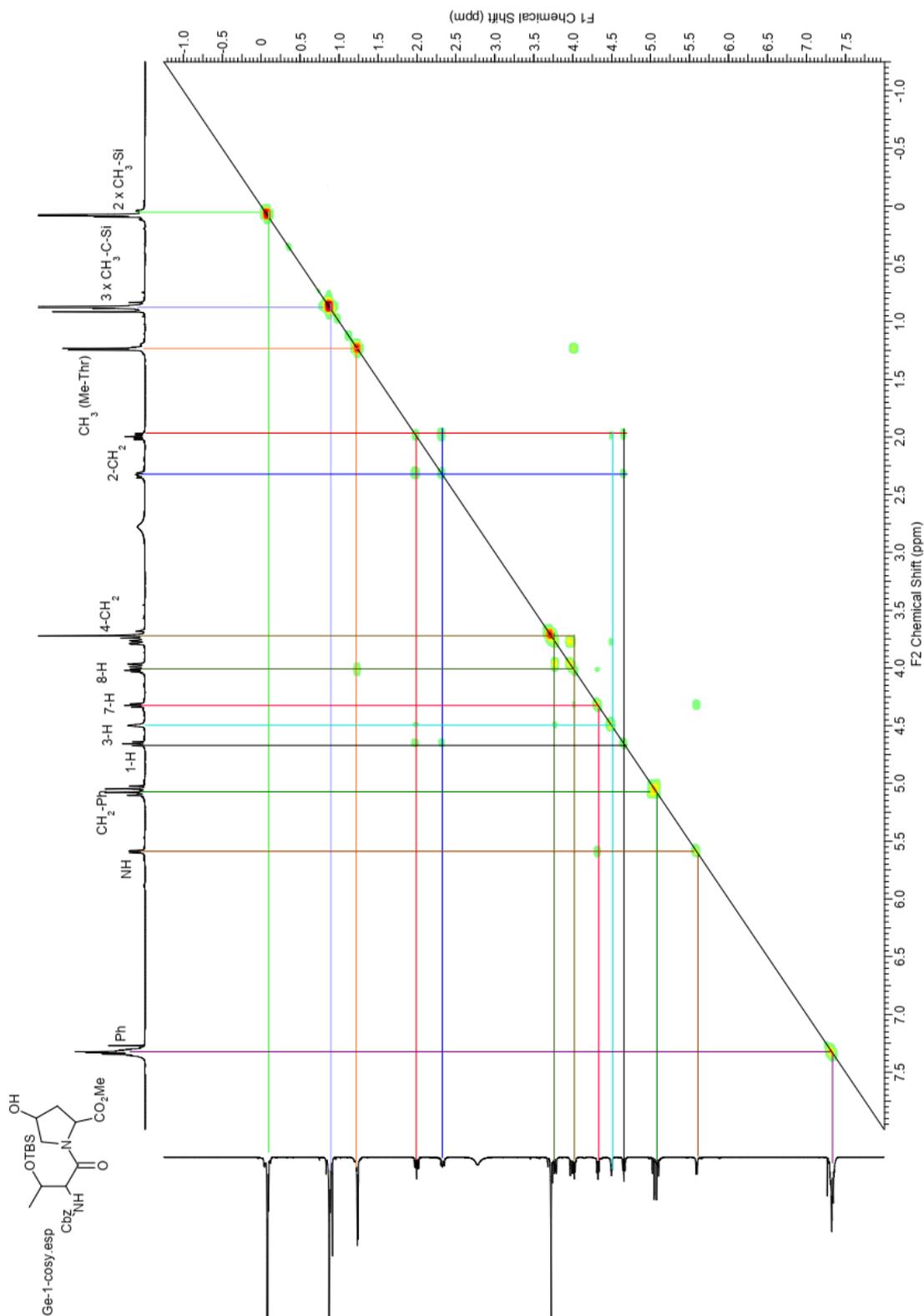
¹H-RMN (13)



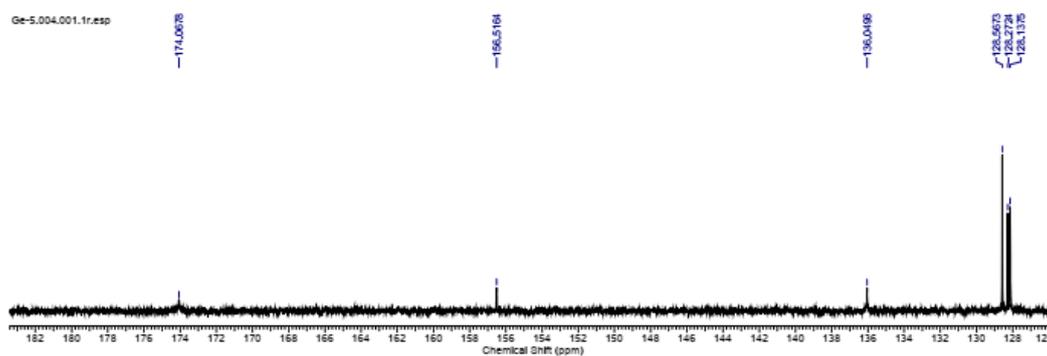
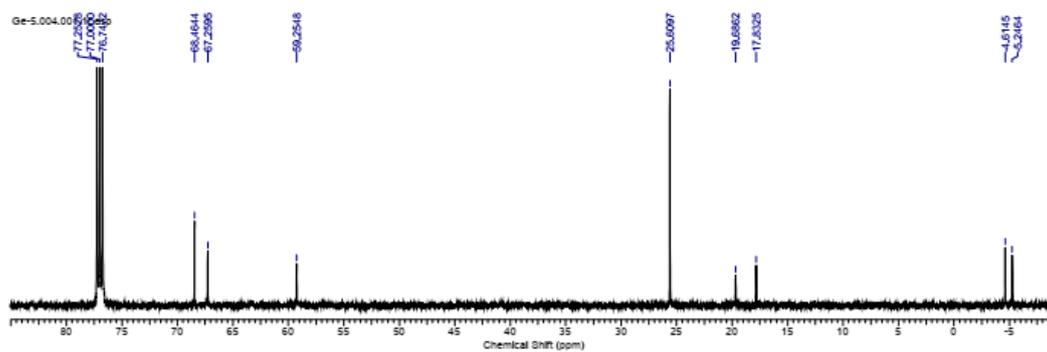
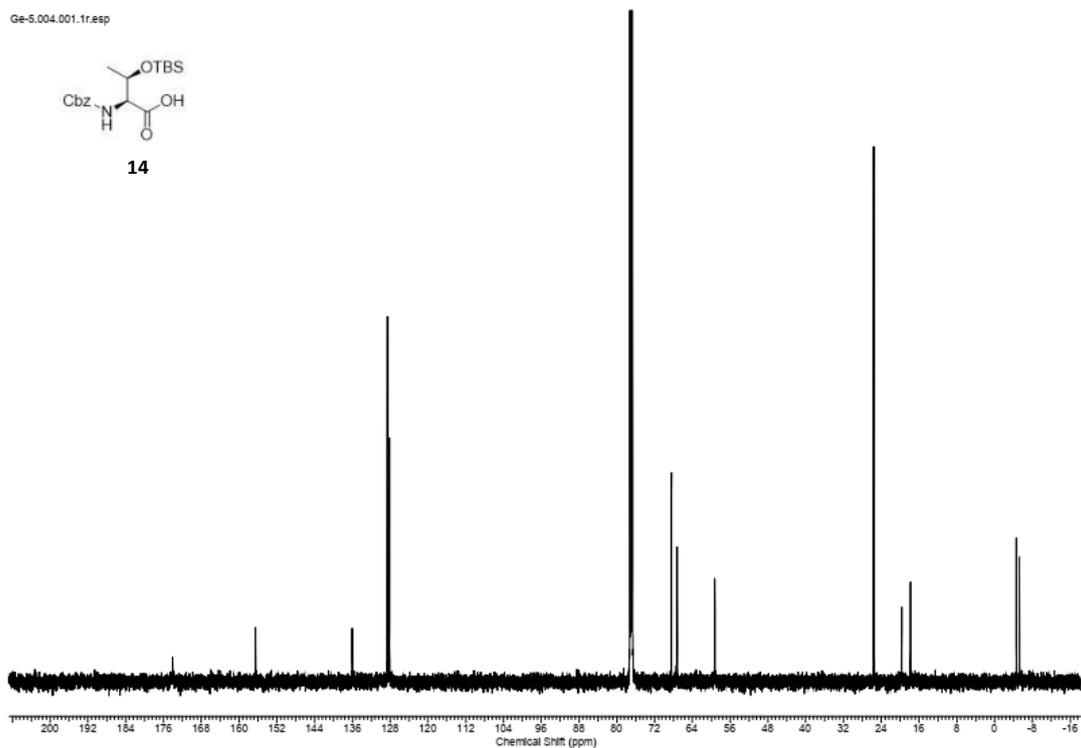
^{13}C -RMN (13)



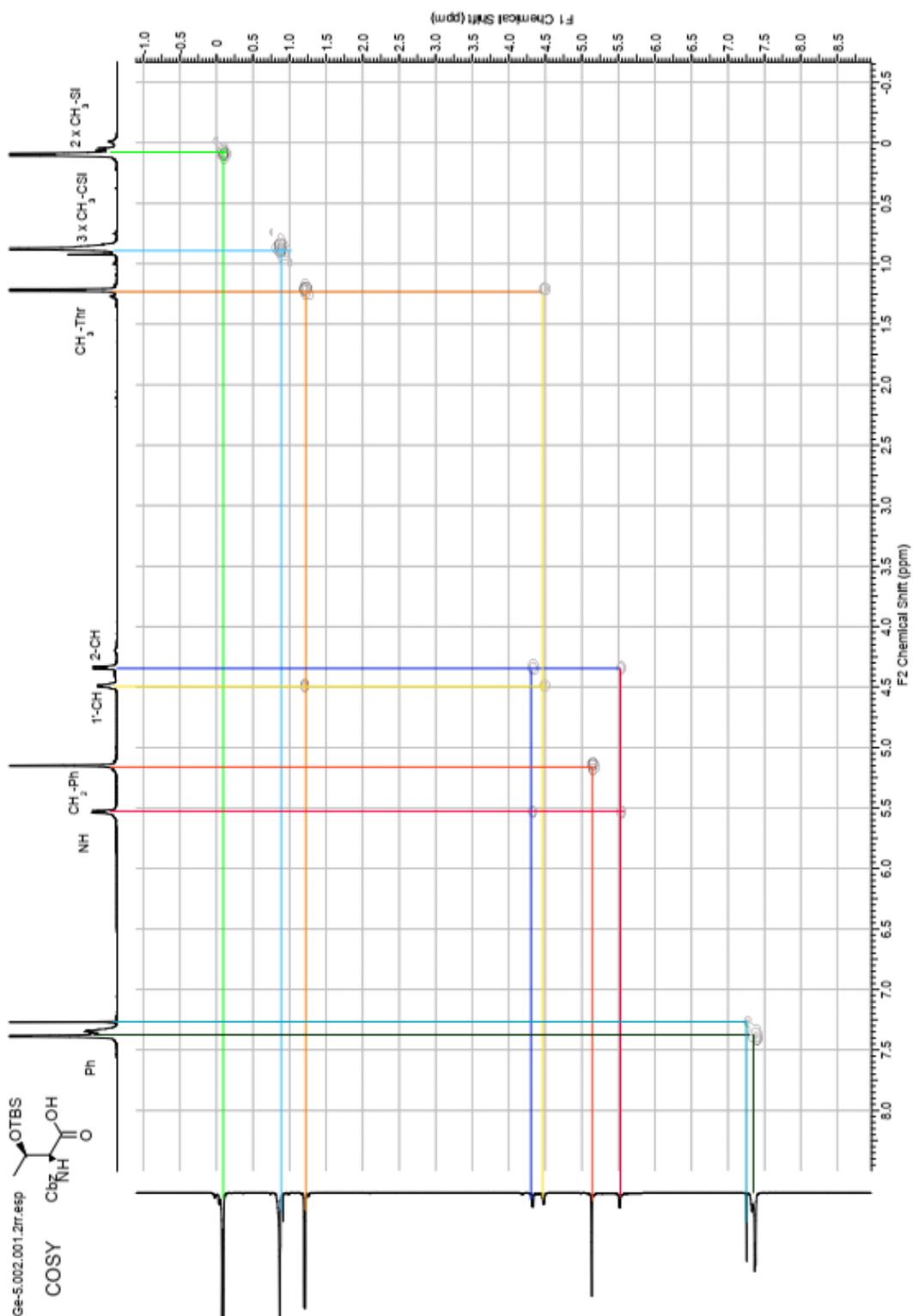
COSY (13)



¹³C-RMN (14)



COSY (14)



HSQC (14)

