



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

***Diseño y síntesis de inhibidores del  
camino biosintético de tripanotiona.***

**Director de Tesis**

Dr. Juan Bautista Rodríguez

**Lugar de Trabajo**

Departamento de Química Orgánica

**Esteban Luis Ravaschino**

Tesis presentada para optar por el título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

**Diciembre de 2006**



## Diseño y síntesis de inhibidores del camino biosintético de tripanotiona

---

En este trabajo de Tesis se planteó como objetivo el diseño y la síntesis de nuevos compuestos que pudieran actuar como inhibidores de las enzimas presentes en el camino biosintético de tripanotiona ( $N^1, N^8$ -bis-(glutationil)espermidina). Este es un metabolito que se encuentra únicamente en parásitos de la familia de los tripanosomátidos, los cuales son agentes causantes de varias tripanosomiasis y leishmaniasis, enfermedades endémicas que afectan aproximadamente a 12 millones de individuos en el mundo. Las enzimas responsables de la biosíntesis de tripanotiona son glutationilespermidina sintetasa (GspS) y tripanotiona sintetasa (TryS), las cuales se encuentran exclusivamente en parásitos de esta familia.

El diseño de inhibidores potenciales de estas enzimas se basó, en una primer etapa, en análogos estructurales de su sustrato natural glutación ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinilglicina). Luego de su síntesis, estos compuestos se evaluaron tanto como inhibidores de las enzimas aisladas, así también como inhibidores del crecimiento parasitario de *Trypanosoma cruzi*, el agente responsable de la enfermedad de Chagas.

En una segunda etapa el diseño y la síntesis de inhibidores se basó en análogos del estado de transición de las enzimas en cuestión, incorporando en la estructura de los nuevos análogos un grupo fosfinato como mimético del estado de transición tetraédrico de una ligasa C:N. Estos compuestos también se evaluaron como inhibidores de la actividad enzimática de GspS y TryS de distintos parásitos de la familia de los tripanosomátidos, siendo potentes inhibidores de las mismas. Finalmente, esta actividad inhibitoria enzimática tuvo una muy buena correlación con ensayos de inhibición del crecimiento de amastigotes de *T. cruzi*, la forma clínicamente más relevante del parásito.

---

*Palabras clave:* *Trypanosoma cruzi*; tripanotiona; tripanosomátidos, glutationilespermidina sintetasa; tripanotiona sintetasa; fosfinopéptidos.



## Design and synthesis of inhibitors of trypanothione biosynthesis

---

The aim of the present Doctoral Thesis was the search for new antiparasitic agents that could act as inhibitors of the enzymes involved in the biosynthetic pathway of trypanothione (*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>8</sup>-bis-(glutathionyl)spermidine). This metabolite is unique in parasites belonging to the trypanosomatidae family that are causative agents of many trypanosomiasis and leishmaniasis. These endemic diseases are estimated to affect around 12 million individuals.

Glutathionylspermidine synthase (GspS) and trypanothione synthase (TryS) catalize the last two steps of trypanothione biosynthesis and they are, as well as trypanothione, unique in parasites of the trypanosomatidae family.

As a first approach, inhibitors were designed as tripeptides conjugates structurally related to the natural substrate glutathion ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinylglycine). Once these compounds were at hand, they were screened towards both GspS and TryS. In addition, they were tested against *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease (American trypanosomiasis).

As a second approach, an alkyl phosphinate moiety was incorporated to the designed structures in order to mimic the tetrahedral transition state of these C:N ligases. A promising new series of phosphinopeptides structurally related to glutathion, were synthesized and evaluated against GspS and TryS of diverse parasites showing, in many cases, high potency. Some of these drugs were also potent growth inhibitors of *T. cruzi* amastigotes, the clinically more relevant form of the parasite. This cellular activity correlated quite well with the enzymatic activity exhibited by these drugs towards TryS of *T. cruzi*.

---

*Key words:* *Trypanosoma cruzi*; trypanothione; trypanosomatidae, glutathionylspermidine synthase; trypanothione synthase; phosphinopeptide.



*A María, el amor de mi vida*  
*A Marcos y Tomás, que iluminan cada uno de mis días*



*A mi madre, quien me contagió su entusiasmo*

*A mi padre, siempre presente*

*A mi hermano, mi compañero*



*Agradezco al Dr. Juan Bautista Rodríguez por haber confiado en mí, por haber compartido su conocimiento y por la paciencia y el respeto brindados a lo largo de estos años*



## **Agradecimientos**

Agradezco al Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires y al Dr. Eduardo Gros por haberme brindado la oportunidad y el lugar de trabajo para realizar el presente trabajo de tesis.

A la European Commission por otorgar el Fellowship que me permitió comenzar con dicho trabajo.

A la Universidad de Illinois at Urbana-Champaign por financiar mi estadía en dicho establecimiento durante octubre y noviembre de 2004.

Al Dr. Roberto Docampo por recibirme amablemente en Urbana y compartir su conocimiento, y a la Dra. Silvia Moreno por guiarme en los ensayos realizados en su laboratorio.

A los Dres. Achiel Haemers, Katie Amssoms, Alan Fairlamb, Sandra Oza, Marcelo Comini y Timo Jaeger por los ensayos enzimáticos realizados y sus consideraciones sobre los mismos.

Al personal de UMYMFOR (CONICET-FCEyN): Ana Burton, María de las Mercedes Rivero, Marta Marcote, Jorge Aznares, Susana Lagger, Gonzalo Abad, Gabriel Cases, José Gallardo y Gernot Eskuche por las determinaciones físicas realizadas para este trabajo, su excelente disposición y agradables conversaciones.

Al Dr. Gerardo Burton por el apoyo brindado a través de UMYMFOR.

Agradezco a Adriana, Jorge, Pedro y Sofía por haberme apoyado en todo momento y entregado su amor y confianza.

A Fede, Pablo, Camila, Amalia y Karina por su gran afecto y cariño. A Merlina y Nicolás por dejarse querer.

A mis amigos Fernando, Javier, Silvina, Nacho, Romina, Oscar, Claudia M., Fabiana, Osvaldo, Víctor y Claudia R. por estar siempre y por su infinito afecto.

A mis amigos y compañeros Javier, Constanza y Julieta por la amistad construida en estos años y porque hicieron agradables las horas de trabajo compartidas.

A Pupe y Eleonora, siempre dispuestas a dar una mano y a hacer más divertido el día de trabajo. A Sergio por su buena predisposición, a Nicolás C. por entusiasmarse con los nuevos proyectos y a Pablo M., Nicolás O. por su calidez.

A Andrea, Alejandra, Lydia, Alicia, Julietita, Flavia, Juan, Lorena y Santiago por aquellas

horas de laboratorio compartidas.

A mis vecinos Sergio y Olga, y a Pablo D. y Rosana, por muchos almuerzos compartidos.

A los Dres Jorge Palermo, Alberto Ghini y Adriana Veleiro por su trato cordial y ayuda desinteresada.

A María del Carmen, Olga, Rosa, Mabel, Virginio Pereyra y Sergio Jacobo por su colaboración y amabilidad.

## Índice

### Capítulo 1: Introducción

1.1 Enfermedades tropicales	25
1.2 Ciclo de vida de los parásitos	27
1.3 Enzimas o receptores indispensables para los parásitos	27
1.3.1 Lanosterol C-14 $\alpha$ desmetilasa	27
1.3.2 Escualeno sintetasa	28
1.3.3 Farnesil pirofosfato sintetasa	29
1.3.4 Purina fosforibosiltransferasas	31
1.3.5 Ornitina descarboxilasa	31
1.4 Enzimas o receptores encontrados únicamente en parásitos	32
1.4.1 Nucleósido fosfotransferasas	32
1.4.2 Enzimas del camino metabólico de tripanotiona	34
1.5 Metabolismo de tripanotiona	34
1.5.1 Estructura química y propiedades físicas de tripanotiona	34
1.5.2 Funciones metabólicas	35
1.5.2.1 Mantenimiento del equilibrio redox celular	35
1.5.2.2 Defensa antioxidante	37
1.5.2.3 Defensa contra xenobióticos	38
1.5.3 Biosíntesis de tripanotiona	39
1.5.3.1 Glutación	39
1.5.3.2 Espermidina	40
1.5.3.3 Tripanotiona	42
1.6 Blancos moleculares en la biosíntesis de tripanotiona	45
1.6.1 Tripanotiona reductasa	46
1.6.2 Glutacionil espermidina sinteteasa y Tripanotiona sintetasa	49
1.6.3 Inhibidores del crecimiento parasitario	51
1.7 Objetivos del trabajo de tesis	52

### Capítulo 2: Síntesis de amidas y ésteres de L- $\gamma$ -Glu-L-Leu-Gly-OH

2.1 Introducción	55
2.2 Diseño de los inhibidores	56
2.2.1 Elección de la estructura tripeptídica	56
2.2.2 Derivados de poliaminas	57
2.2.3 Derivados aminas y ésteres	58

2.3 Estrategia sintética	59
2.4 Síntesis del tripéptido	60
2.5 Caracterización del tripéptido	62
2.6 Acoplamiento con poliaminas	65
2.6.1 Acoplamiento con espermidina	65
2.6.1.1 Diferenciación del N <sup>1</sup> y N <sup>8</sup> de espermidina	65
2.6.1.2 Acoplamiento con el tripéptido	68
2.7 Acoplamiento con poliaminas aromáticas	72
2.8 Acoplamiento con alcoholes	77
2.9 Acoplamiento con aminas	81

### Capítulo 3: Análogos del estado de transición de GspS y TryS

3.1 Introducción	87
3.1.1 Antecedentes	87
3.2 Diseño de los inhibidores	89
3.3 Síntesis	90
3.3.1 Ácido $\alpha$ -aminofosfínico	91
3.3.1.1 Preparación de los ácidos <i>H</i> -fosfínicos	93
3.3.1.2 Incorporación del grupo aminometilo	101
3.3.2 Acoplamiento de los ácidos $\alpha$ -aminometilfosfínicos con $\gamma$ -L-Glu-L-Leu-OH	106
3.3.3 Desprotección de los grupos protectores	113

### Capítulo 4: Ensayos biológicos

4.1 Ensayos de inhibición contra GspS recombinante de <i>C. fasciculata</i>	123
4.1.1 Derivados amida y éster	123
4.1.2 Derivados fosfinato	125
4.2 Ensayos de inhibición contra TryS de <i>T. cruzi</i>	126
4.2.1 Derivados amida	126
4.2.2 Derivados fosfinato	127
4.3 Ensayos de inhibición contra TryS de <i>C. fasciculata</i>	128

4.4 Ensayos de inhibición contra TryS de otros parásitos de la familia de tripanosomátidos	129
4.5 Ensayos de inhibición de crecimiento parasitario en <i>T. cruzi</i>	130
4.5.1 Introducción	130
4.5.2 Ensayos sobre epimastigotes	131
4.5.3 Ensayos sobre amastigotes	132

## **Capítulo 5: Conclusiones**

5. Conclusiones	139
-----------------	-----

## **Capítulo 6: Parte experimental**

6.1 Generalidades	141
6.2 Síntesis del tripéptido protegido ( <i>N</i> -Benciloxycarbonil- $\gamma$ -L-glutamil-L-leucil-glicina $\alpha$ -éster bencílico)	143
6.3 Síntesis de derivados de poliamina	145
6.4 Síntesis de derivados de poliaminas aromáticas	149
6.5 Síntesis de derivados de ésteres lineales	154
6.6 Síntesis de erivados de aminas lineales y cíclicas	164
6.7 Síntesis de fosfinopéptidos	177
6.8 Ensayos de inhibición del crecimiento parasitario	201
<b>Apéndice A</b>	205
<b>Apéndice B</b>	209
<b>Apéndice C</b>	213
<b>Resumen</b>	231
<b>Referencias</b>	237



## Abreviaturas

$\delta$	desplazamiento químico
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
Bn	bencilo
BnOH	alcohol bencílico
CbzCl	cloroformiato de bencilo
COSY	espectro de correlación homonuclear hidrógeno-hidrógeno
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DCC	diciclohexilcarbodiimida
DMAP	dimetilaminopiridina
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
EM	espectro de masa
eq.	equivalentes
EMAR	espectro de masa de alta resolución
$\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{BF}_3$	trifluoruro de boro eterato
$\text{Et}_3\text{N}$	triethylamina
FBS	suero fetal bovino
FAD	flavina adenina dinucleótido
FADH	flavina adenina dinucleótido reducida
GSH	glutación forma reducida
GSSG	glutación forma oxidada
GspS	glutathionilespermidina sintetasa
HMDS	hexametildisilazano
HONSu	<i>N</i> -hidroxisuccinimida

HSQC	espectro de correlación heteronuclear
IE	impacto electrónico
ESI	Ionización por electrospray
IR	infrarrojo
<i>J</i>	constante de acoplamiento spin-spin
kDa	kilodalton
LIT	infusión de hígado-triptosa
M	concentración molar
m/z	relación masa/carga
M <sup>+</sup>	ion molecular
Me	metilo
MeCN	acetonitrilo
MeOH	metanol
MHz	megahertz
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NADP	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
ox.	oxidado
PBS	buffer fosfato salino
PCC	clorocromato de piridonio
PCP	pentaclorofenol
Pd/C	paladio sobre carbono
pf	punto de fusión
Ph	fenilo
ppm	partes por millón
P/S	penicilina/streptomicina
red.	reducido

RMN <sup>13</sup> C	resonancia magnética nuclear de carbono
RMN <sup>1</sup> H	resonancia magnética nuclear de protón
ss	solución saturada
Spd	espermidina
t.a.	temperatura ambiente
TCA	ácido tricloroacético
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TMSCl	cloruro de trimetilsilano
TryS	triptofano sintetasa
TR	triptofano reductasa
T(SH) <sub>2</sub>	triptofano forma reducida
TS <sub>2</sub>	triptofano forma oxidada



# Capítulo 1: Introducción



## 1.1 Enfermedades tropicales

Las llamadas enfermedades tropicales afectan a una gran cantidad de seres humanos en vastas áreas tropicales y subtropicales del mundo. Éstas son enfermedades infecciosas causadas por distintos virus, bacterias o parásitos, transmitidas, en el caso de las últimas, mediante la ayuda de algún vector, generalmente insectos. Están asociadas a condiciones precarias de vivienda e higiene y, por lo tanto, afectan mayormente a los sectores más pobres y marginados de la población.

Entre las parasitosis, la malaria es la que cuenta con mayor cantidad de individuos infectados en el mundo (500 millones) con un 40% de la población mundial en riesgo de infección. Sin embargo, esta enfermedad, causada principalmente por parásitos de cuatro especies del género *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*), ha sido eliminada de la mayoría de los países con clima templado y se concentra en África, especialmente al sur de la región del Sahara, de tal forma que el 90% de las muertes provocadas por dicha enfermedad se observa en esa zona.

De mayor incidencia en Latinoamérica son otras enfermedades parasitarias como distintas leishmaniasis y tripanosomiasis causadas por distintos parásitos que pertenecen a un mismo orden y familia (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). Existen distintos tipos de leishmaniasis causadas por unas 17 especies de *Leishmania* spp. Entre ellas se encuentran: la leishmaniasis visceral, más conocida como *kala azar*, leishmaniasis mucocutánea o *espundia* y leishmaniasis cutánea. Estas enfermedades son endémicas en 88 países de los 5 continentes y se estima que existen 350 millones de personas con riesgo de infección. La población afectada se calcula en 12 millones de personas, incluyendo tanto los casos evidentes como los asintomáticos. El 90% de los 500.000 nuevos casos anuales se concentran en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán.

La más severa de las leishmaniasis es la visceral, contando con una tasa de mortalidad del 100% para casos no tratados. En cuanto a la leishmaniasis mucocutánea, el 90% de los casos se encuentra concentrado en Bolivia, Brasil y Perú, y, en el caso de la leishmaniasis cutánea el 90% de los casos se circunscriben a Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita

y Siria. La distribución de dicha enfermedad está íntimamente relacionada a la distribución geográfica de su vector: la mosca de la arena, perteneciente a la subfamilia *Phlebotominae*. Este insecto habita en climas tropicales y se alimenta por succión de sangre de mamíferos, tolerando muy bien el desarrollo interno de distintos tipos de leishmania.

En cuanto a las tripanosomiasis, la africana (enfermedad del sueño) es causada por dos subespecies de *Trypanosoma brucei*, los parásitos *T. brucei rhodesiense* y *T. brucei gambiense*. Esta enfermedad afecta a 60 millones de personas en 36 países africanos al sur del Sahara, en áreas en donde habita la mosca tse-tse, su vector. La tripanosomiasis americana, más conocida como la enfermedad de Chagas, es causada por el parásito *T. cruzi* y afecta a aproximadamente a 18 millones de individuos en todo el área de incidencia, es decir, desde el sur de Estados Unidos, hasta el sur de nuestro país. La misma es transmitida a través de los vectores *Rhodnius prolixus* (chinche), desde el sur de América del Norte al norte de Argentina y *Triatoma infestans* (vinchuca) en América del Sur. A pesar de diferencias importantes como los ciclos de vida y vectores mediante los cuales son transmitidos, *Leishmania* spp, *T. brucei* y *T. cruzi* comparten aspectos fundamentales de su metabolismo, debido a que pertenecen, como se mencionó anteriormente, al mismo orden y familia.<sup>1</sup>

Un aspecto común a todas estas enfermedades es que a pesar de que se conocen desde hace más de un siglo, aún no se han desarrollado drogas efectivas contra ninguna de ellas. En efecto, la quimioterapia existente hasta la fecha se basa en drogas antiguas, descubiertas empíricamente y con serios efectos secundarios. Si bien en muchos casos es posible controlar y en algunos curar la enfermedad si es detectada y tratada en una etapa temprana, se hace evidente la necesidad de desarrollar nuevas drogas que sean más seguras para su tratamiento. Para ello existen dentro de las enfermedades causadas por tripanosomátidos aspectos particulares de su metabolismo, hallados en los últimos años, los cuales se pueden explotar para dicho propósito.

## 1.2. Ciclo de vida de los parásito

Los parásitos responsables de las enfermedades tropicales mencionadas anteriormente poseen ciclos de vida complejos, característicos de cada especie. Este ciclo de vida se inicia con el traspaso del parásito desde el vector al mamífero y se cierra al volver el parásito al vector por succión sanguínea. A lo largo de este ciclo el parásito pasa por distintos estadios, infectantes o de reproducción, los cuales varían según la especie. El ciclo de vida de *T. cruzi*<sup>2,3</sup> será discutido en detalle en el Capítulo 4.

### **1.3 Enzimas o receptores indispensables para los parásitos**

Las enzimas o receptores que son cruciales para el ciclo de vida del parásito se pueden seleccionar como blancos moleculares para quimioterapia ya que su inhibición afectaría, en principio, la proliferación celular. De todos modos, es importante comparar cada uno de estos blancos con su contraparte en el huésped mamífero para evaluar la posible especificidad de potenciales inhibidores contra la enzima del parásito. Esta evaluación puede comenzar con una comparación de las secuencias de la proteína o receptor. Cualquier proteína con un porcentaje de identidad entre la parasitaria y la del huésped superior a cierto valor debería abandonarse como posible blanco. Sin embargo, una comparación más completa no sería realmente posible hasta no disponer de las estructuras tridimensionales de las mismas. Se ha aceptado en forma general que si la contraparte del huésped no juega un rol fundamental en dicho organismo, entonces puede no ser necesaria una alta selectividad hacia la enzima del parásito, aunque la realidad es algo más compleja.

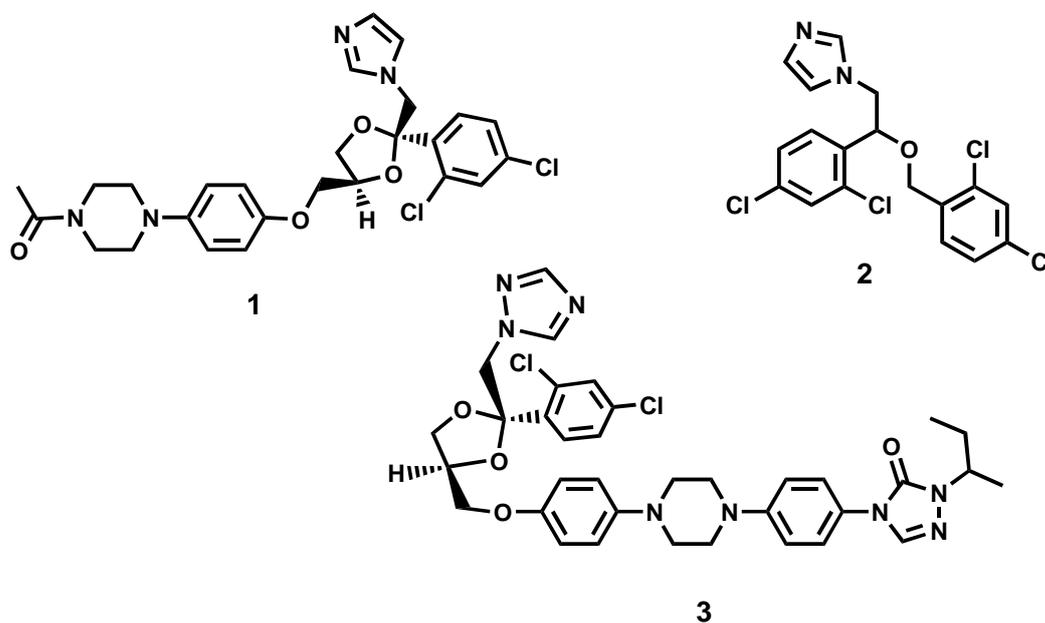
#### **1.3.1 Lanosterol C-14 $\alpha$ desmetilasa**

Es un hecho conocido que los azoles antifúngicos tales como ketoconazol (**1**), miconazol (**2**) e itraconazol (**3**) actúan en el camino biosintético de ergosterol, en mamíferos, inhibiendo la desmetilación (dependiente de citocromo P-450) de lanosterol.<sup>4</sup> *Leishmania* y *T. cruzi* también poseen ergosterol como principal esteroide en membranas

plasmáticas. Es más, se ha observado que los azoles antifúngicos inhiben el crecimiento de dichos organismos por bloqueo de la desmetilación de C-14 $\alpha$  de lanosterol en la biosíntesis de ergosterol en dichos organismos.

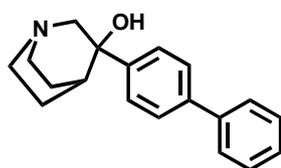
En cuanto a la selectividad de esta enzima como blanco molecular, se ha demostrado que la acción antifúngica de los azoles antimicóticos no se debe a una diferencia de sensibilidad entre lanosterol C-14 $\alpha$  desmetilasa del hongo y del mamífero sino a la presencia de otras isozimas susceptibles a azoles presentes únicamente en el último.<sup>5</sup> Todavía no se conoce cuál es la diferencia entre la enzima de humanos y la de *Leishmania* o *T. cruzi*.

El mayor sustento que tiene este blanco molecular es el precedente de los antimicóticos, con la consecuente ventaja del conocimiento de su relativamente baja toxicidad en humanos.

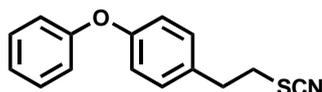


### 1.3.2 Escualeno sintetasa

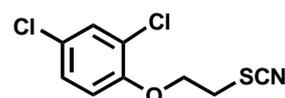
Dentro del camino biosintético de esteroides, otra enzima propuesta como blanco molecular para el desarrollo de agentes antiparasitarios es escualeno sintetasa (SQS). Esta enzima cataliza el primer paso de la biosíntesis de esteroides acoplando dos moléculas de pirofosfato de farnesilo para dar escualeno. La inhibición de la biosíntesis de esteroides en esta etapa no tiene efecto en otros isoprenoides vitales; además, los isoprenoides acumulados como pirofosfato de farnesilo y sus precursores se metabolizan sin efectos tóxicos. Por estos motivos, esta enzima se ha estudiado como blanco para terapias de disminución de colesterol. Se encontró que inhibidores de SQS de mamíferos como 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxiquinuclidina (**4**)<sup>6</sup> inhiben el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. mexicana*



4



5



6

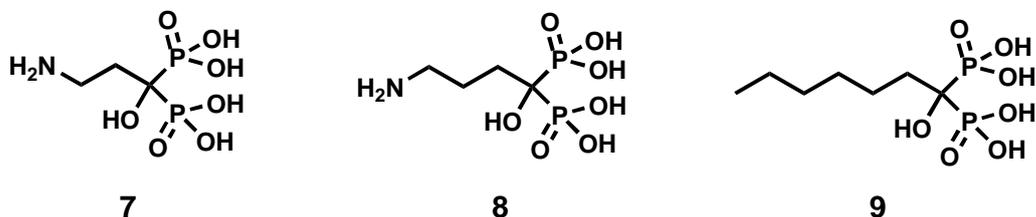
mediante la inhibición competitiva de SQS a nivel bajo micromolar.<sup>7</sup> WC-9 (tiocianato de 4-fenoxifenoxietilo, **5**), desarrollado en nuestro laboratorio, y otros compuestos estrechamente relacionados como **6**, son inhibidores potentes y selectivos tanto de la forma epimastigote como de la forma intracelular amastigote de *T. cruzi*.<sup>8-13</sup> WC-9 fue inclusive más potente que los conocidos agentes antiparasitarios nifurtimox y ketoconazol, en las mismas condiciones de ensayo<sup>8-10</sup>

### 1.3.3 Farnesil pirofosfato sintetasa

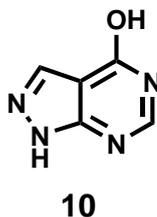
La prenilación de proteínas ha surgido como un blanco molecular atractivo para el diseño de drogas en varias enfermedades tropicales.<sup>14-16</sup> Ésta es responsable de la unión de unidades de farnesilo y geranilgeranilo a residuos C terminales de cisteína de distintas proteínas, como las GTPasas Ras, Rac, Rab y Rho, dando lugar a las proteínas farnesiladas y geranilgeraniladas. Éstas son moléculas de señalización importantes que participan en procesos

celulares claves para la función de los osteoclastos.<sup>17</sup> Los grupos prenilos juegan un papel clave en el anclado de las proteínas a las membranas y también actúan en las interacciones proteína-proteína. Farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS) cataliza la formación del sustrato de la prenilación.<sup>18</sup> Por lo tanto, la inhibición enzimática de FPPS lleva a la disminución en los niveles de esteroides, dolicoles y ubiquinonas, junto con la inhibición de la prenilación de proteínas.

Se ha encontrado que bisfosfonatos comerciales, utilizados para tratamientos prolongados en trastornos de resorción ósea, presentan actividad inhibitoria en la forma amastigote de *T. cruzi* en ensayos *in vivo* e *in vitro*.<sup>19</sup> Estos análogos no metabolizables de pirofosfato, como pamidronato (**7**) y alendronato (**8**) representan un excelente punto de partida para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos cuyo blanco es FPPS ya que, al ser drogas aprobadas por FDA (Food & Drug Administration, EE.UU.), han superado con éxito los ensayos clínicos requeridos para su uso en humanos. Se ha postulado que bisfosfonatos nitrogenados, en particular en C-3, actuarían como miméticos del estado de transición



carbocatiónico de los isoprenoides difosfato en la biosíntesis de isoprenoides;<sup>20,21</sup> sin embargo, se ha visto que otros bisfosfonatos no nitrogenados han actuado como inhibidores de crecimiento celular bloqueando FPPS.<sup>22-24</sup> En nuestro laboratorio se han sintetizado bisfosfonatos derivados de ácidos grasos no nitrogenados, como **9**, los cuales fueron potentes inhibidores de la actividad enzimática de FPPS. Dicha actividad enzimática tuvo excelente correlación con la inhibición de la proliferación celular de *T. cruzi*, obteniéndose inhibidores de potencia comparable a WC-9.<sup>22,23</sup> Al igual que en el caso de los antimicóticos, uno de los grandes atractivos de los bisfosfonatos es que la optimización de estructuras se realiza sobre la base de drogas de uso humano.



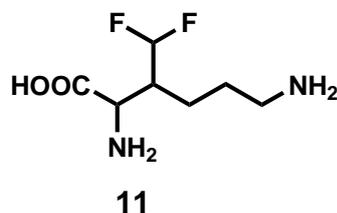
### 1.3.4 Purina fosforibosiltransferasas

La ausencia de síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos entre los parásitos protozoarios resulta en su dependencia de una o dos enzimas purínicas para mantener los niveles en la reserva de nucleótidos purínicos.

En *Leishmania*, alopurinol (**10**) es reconocido como sustrato por hipoxantina-guanina-xantina fosforibosiltransferasa y convertido en productos citotóxicos como alopurinol ribósido.<sup>25</sup> Esta droga se ensayó en leishmaniasis visceral demostrando efectos terapéuticos moderados<sup>26</sup> pero los ensayos clínicos posteriores llevaron a resultados poco claros.

### 1.3.5 Ornitina descarboxilasa

Las poliaminas, presentes en casi todos los organismos vivientes, son necesarias universalmente para la proliferación celular.<sup>27</sup> Ornitina descarboxilasa (ODC), la enzima que controla la síntesis de la poliamina putrescina, tiene como característica saliente una gran inductibilidad y un tiempo de vida medio muy corto en mamíferos. Las poliaminas se encuentran en niveles altos en mamíferos fuera del torrente sanguíneo en donde los altos niveles de poliamina oxidadas se reducen prácticamente a cero.<sup>28</sup> Ya que el hábitat principal de los tripanosomas africanos es el torrente sanguíneo, éstos dependen casi exclusivamente de su maquinaria interna para obtener niveles aceptables de poliaminas. Por este motivo, una inhibición eficiente de ODC debería inhibir la proliferación de los parásitos al inhibir la síntesis de poliaminas en los mismos.



Eflornithina (DL- $\alpha$ -difluorometilornitina, DFMO, **11**) es un inhibidor suicida de ODC de ratón.<sup>29</sup> La catálisis enzimática forma un aducto covalente entre DFMO descarboxilado y desfluorado y el residuo Cis-360 de la enzima. DFMO es una droga antitripanosoma con buena actividad quimioterapéutica en humanos contra *T. brucei gambiense* y, en menor medida contra *T. brucei rhodisense*.<sup>30</sup> La droga baja los contenidos de poliaminas y retarda su crecimiento,<sup>31</sup> pero este efecto se puede revertir por agregado de putrescina exógena.<sup>32</sup> Se han comparado ODC de ratón con ODC de *T. brucei*,<sup>32</sup> sin que esta comparación lograra explicar la relativamente baja toxicidad de DFMO en mamíferos, ya que éste fue un inhibidor más efectivo de ODC de ratón que de ODC parasitaria. Además, las mismas presentaron un 62% de homología en la secuencia de aminoácidos. Aparentemente, esta diferencia de susceptibilidad se halla en la rapidez con que esta enzima se repone dentro del organismo vivo. De manera que, en mamíferos, la rapidez con la que nuevas ODC activas reemplazan a viejas e inactivas hace que DFMO tenga menos efecto inhibitorio sobre la proliferación celular.

Queda claro, por lo indicado anteriormente, que la selectividad en este tipo de blancos moleculares se debe a factores complementarios a éstos y, en general, muy difícilmente predecibles.

#### **1.4 Enzimas o receptores encontrados únicamente en parásitos**

Este tipo de moléculas se presentan como los mejores blancos terapéuticos potenciales, siempre y cuando se encuentre que la función de la enzima o receptor en juego sea esencial para el desarrollo o supervivencia del parásito.

### 1.4.1 Nucleósido fosfotransferasas

Casi todos los parásitos protozoarios estudiados hasta la fecha son deficientes en la síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos.<sup>33</sup> Se ha identificado en *Leishmania* una enzima única: purina nucleósidotransferasa.<sup>34</sup> Ésta transfiere un fosfato desde una variedad de ésteres monofosfato hacia la posición 5' de los nucleósidos purínicos, así también como a algunos análogos como alopurinol ribósido, formicina B, 9-deazainosina y tiopurinol ribósido. Éstos análogos de nucleósidos pueden convertirse en trifosfatos e incorporarse en los ácidos nucleicos o, en el caso del alopurinol ribósido, convertirse en inhibidores de otras enzimas purínicas esenciales ejerciendo una acción antiparasitaria.<sup>35</sup> Sin embargo, purina nucleósido fosfotransferasa no cumpliría en *Leishmania* ninguna función esencial para el parásito pues existen varias purina fosforibosiltransferasas que constituyen los principales caminos metabólicos para la reserva de purinas.<sup>36</sup>

### 1.4.2 Enzimas del camino metabólico de tripanotiona

Desde el descubrimiento de tripanotiona ( $T(SH)_2$ , **12**)<sup>37</sup> las perspectivas en cuanto a la búsqueda de drogas contra la tripanosomiasis y la leishmaniasis han cambiado drásticamente. Se puede decir que a partir de este punto ha comenzado una búsqueda racional de drogas para una quimioterapia selectiva contra las enfermedades producidas por parásitos del orden Kinetoplastida. Esto se debe a que, en este caso, y contrariamente a las drogas utilizadas anteriormente, se ha hallado primero el potencial blanco molecular y, luego, comenzó la búsqueda del farmacóforo adecuado.

Las quimioterapias actuales se basan en drogas que interactúan con partes del metabolismo parasitario compartidas con mamíferos, por lo tanto, se basan en la capacidad de los últimos de balancear las deficiencias metabólicas con caminos biosintéticos alternativos. Por ello, el gran atractivo del camino biosintético de tripanotiona se debe a que este metabolito que no está presente en mamíferos, el cual es esencial para la supervivencia del parásito.<sup>38</sup> Si

bien tripanotiona cumple funciones análogas a las de glutatión (GSH) en humanos, como la defensa contra el estrés oxidativo y el mantenimiento del equilibrio redox celular, en su biosíntesis participan enzimas que no tienen contrapartida en mamíferos.

Por estos motivos, resulta interesante el desarrollo de nuevas drogas selectivas que no interfieran con los caminos biosintéticos del huésped mamífero.

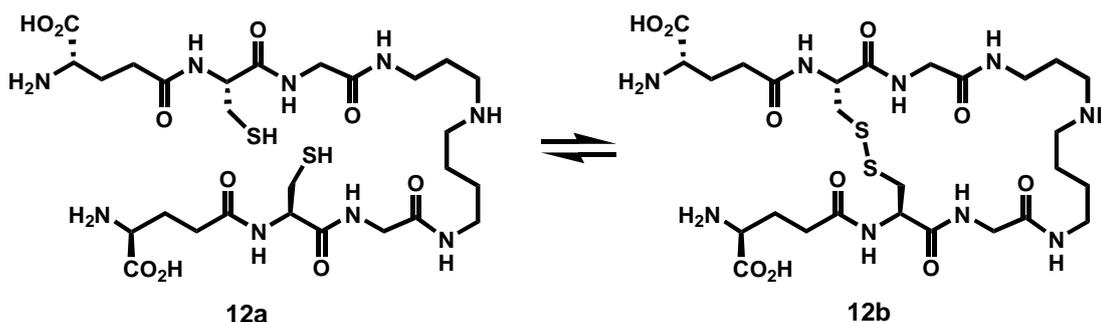
En base al conocimiento adquirido en los últimos años sobre el metabolismo y funciones de tripanotiona se han ido definiendo dos blancos moleculares muy interesantes: (a) tripanotiona reductasa (TR), enzima responsable de regenerar tripanotiona luego de su oxidación por distintos motivos; (b) las enzimas responsables de su biosíntesis: glutationil espermidina sintetasa (GspS) y tripanotiona sintetasa (TryS), sobre cuyos avances y posibilidades se discutirá seguidamente. Estas enzimas serán el blanco molecular de los compuestos sintetizados en el presente trabajo de tesis.

## 1.5 Metabolismo de tripanotiona

### 1.5.1 Estructura química y propiedades físicas de tripanotiona

Tripanotiona ( $N^1, N^8$ -bis-(glutationil)espermidina, **12a**) es el producto de doble conjugación entre el tripéptido glutatión ( $\gamma$ -L-Glu-L-Cis-Gli-OH, GSH, **13**) y la poliamina espermidina ( $N$ -(3-aminopropil)-1,4-butanodiamina, espermidina, **14**). Los residuos cisteína presentes en su estructura están involucrados en la interconversión entre la forma oxidada y la forma reducida de dicho metabolito, mediante la ruptura y la restitución del puente disulfuro (Figura 1.1). Ambas estructuras presentan una carga neta +1 a pH fisiológico.<sup>39</sup> El potencial redox de la cupla  $T(SH)_2/T(S)_2$  es  $E_0' = -0.242$  V, muy similar al de la cupla  $GSH_{red}/GSH_{ox}$  ( $E_0' = -0.230$  V). Al igual que otros tioles, tripanotiona posee la capacidad formar complejos estables con compuestos de arsénico. Las constantes de asociación con dichos compuestos

han sido medidas y se encuentran en un rango de entre  $10^7$  y  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ .<sup>40</sup> En cuanto a su estructura tridimensional en solución acuosa, tripanotona parece ser una molécula flexible, como lo demuestran estudios conformacionales por RMN.<sup>41</sup>



**Figura 1.1.** Tripanotona en sus estados reducido (**12a**) y oxidado (**12b**).

## 1.5.2 Funciones metabólicas

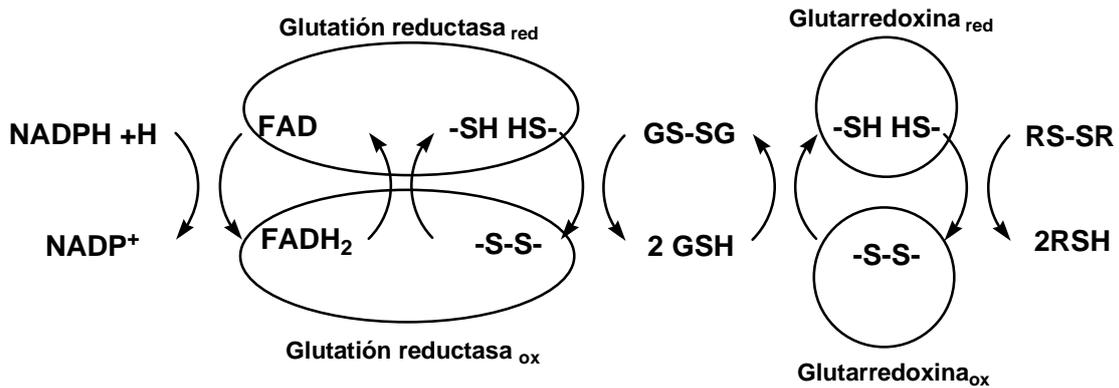
Se han identificado distintas funciones metabólicas de las que tripanotona es responsable.

(a) Mantenimiento del equilibrio redox celular; (b) defensa antioxidante; (c) defensa contra xenobióticos.

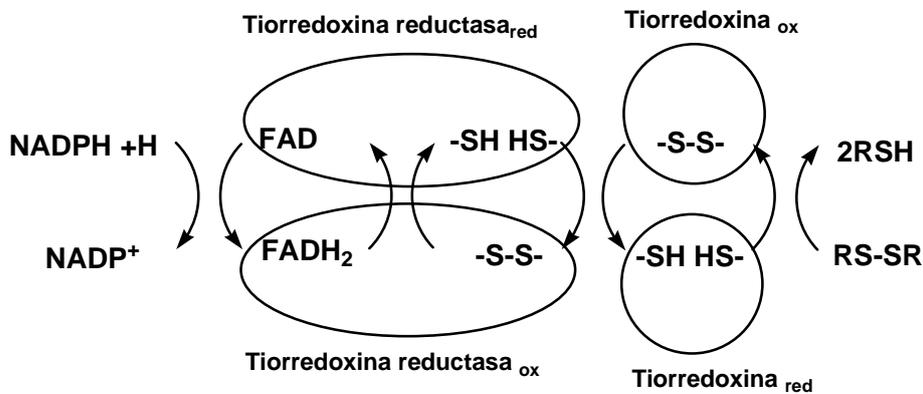
### 1.5.2.1 Mantenimiento del equilibrio redox celular

Todo organismo vivo necesita mantener su equilibrio redox celular para sobrevivir. Para lograr esto, siempre existe algún tiol de bajo peso molecular que alterna entre su forma reducida y su forma oxidada según sea necesario. En la mayoría de los casos este compuesto es glutatión, el cual pasa de uno a otro estado de oxidación mediante la formación y la ruptura enzimática de un puente disulfuro intermolecular  $\{\text{Prot}_{\text{ox}} + 2 \text{GSH} = \text{GS-SG} + \text{Prot}_{\text{red}}\}$ . Así, la función más importante de glutatión es la de evitar la formación de disulfuros intramoleculares en proteínas, ya que esto puede alterar seriamente su actividad. Las células de mamíferos

poseen dos mecanismos generales para la reducción de puentes disulfuro: el sistema *glutación reductasa*, *glutación*, *glutarredoxina* (Esquema 1.1), y el sistema *tiorredoxina reductasa*, *tiorredoxina*. (Esquema 1.2)



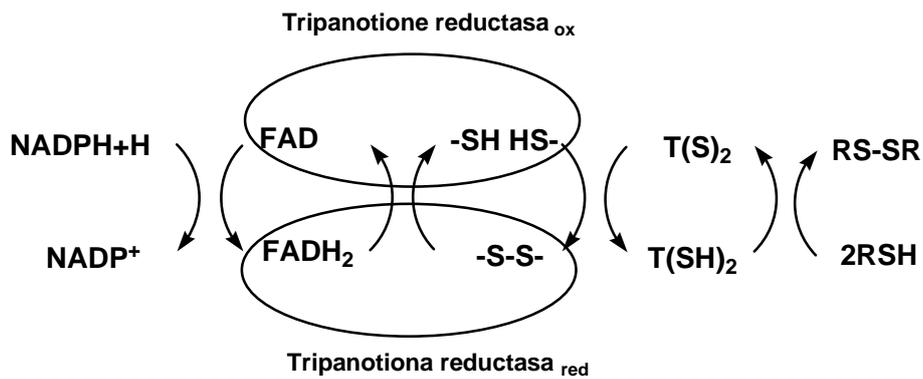
**Esquema 1.1.** Sistema GR, GSH, glutarredoxina.



**Esquema 1.2.** Sistema tiorredoxina reductasa, tiorredoxina.

Glutación también se encuentra en tripanosomátidos. Sin embargo, se ha visto que para la reducción enzimática de su disulfuro dimérico (GSSG), presente en extractos celulares crudos, es necesaria la presencia de un cofactor. El mismo ha sido identificado primeramente como un tiol de bajo peso molecular,<sup>42</sup> finalmente caracterizado como tripanotiona,

subsecuentemente a su aislamiento del parásito no patógeno *Crithidia fasciculata*. Por otro lado, se ha demostrado que estos parásitos no contienen una glutatión reductasa ya que la reducción de glutatión en extractos celulares liofilizados requiere de la presencia de T(SH)<sub>2</sub>. Lo mismo ocurre con la reducción de otros tioles como GSSG-CoA y cisteína. Dicha reducción transcurre mediante un intercambio de disulfuros entre GSSG y T(SH)<sub>2</sub> enzimáticamente reducida. La enzima responsable de la reducción de tripanotiona disulfuro (T(S)<sub>2</sub>) fue aislada, también de *C. fasciculata*, y denominada tripanotiona reductasa (TR).<sup>43</sup> Esta enzima parece ser altamente específica para T(SH)<sub>2</sub>. Estos descubrimientos llevaron a postular el siguiente sistema de mantenimiento de equilibrio redox en estos parásitos (Esquema 1.3).



**Esquema 1.3.** Sistema Redox en tripanosomátidos.

De esta forma, en parásitos del orden Kinetoplastida, el metabolito encargado de mantener un alto nivel de tioles libres es tripanotiona, en vez de glutatión, y la enzima encargada de mantener a tripanotiona en su estado reducido es tripanotiona reductasa, en lugar de glutatión reductasa.

### 1.5.2.2 Defensa antioxidante

Al igual que en otros organismos aeróbicos, tripanotona está expuesta a especies oxigenadas altamente reactivas como  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $HO\cdot$ . Estas sustancias se generan internamente por cofactores como flavinas reducidas, quininas o tioles y, externamente, por el sistema inmune del huésped. Los radicales  $HO\cdot$  y  $RO\cdot$  pueden causar daños letales si reaccionan irreversiblemente con ADN o con lípidos de la membrana celular.<sup>44</sup> La única defensa con la que cuentan los parásitos contra las especies radicalarias es atraparlas mediante moléculas de bajo peso molecular como vitamina A, C, y E, ácido úrico, bilirrubina o tioles, en particular, glutatión y tripanotona, dentro de los últimos. Sin embargo, la eliminación de estas especies es el último recurso con que cuenta el sistema de defensa. Para evitar llegar a esta instancia, el organismo trata de mantener bajos los niveles de precursores como  $H_2O_2$  y  $O_2^-$ . Si bien se han identificado superóxido dismutasas (SOD) en *T. cruzi*,<sup>45</sup> *L. donovani*,<sup>46</sup> y *C. fasciculata*,<sup>47</sup> su contribución a la defensa contra el estrés oxidativo no parece significativa. Siguiendo con las enzimas que metabolizan especies oxigenadas, no se han hallado catalasa, glutatión peroxidasa ni glutatión reductasa en éstos parásitos. A falta de las últimas sí se han identificado tripanotona reductasas muy eficientes.<sup>44</sup> Todos estos hallazgos concuerdan con la idea de glutatión como un precursor biosintético de tripanotona y con un metabolismo de hidroperóxidos tripanotona dependiente en lugar del metabolismo glutatión dependiente de mamíferos. Así, es posible establecer algunas analogías entre los dos metabolismos, aunque también algunas diferencias. Por un lado, TR en parásitos es análoga a GR en mamíferos, mientras que, en la parte inferior de la cascada redox de los tripanosomátidos el aceptor de equivalentes de reducción de  $T(SH)_2$  es triparredoxina, una enzima de la familia de las tiorredoxinas, la cual actúa a su vez como sustrato de triparredoxina peroxidasa parasitaria.<sup>48</sup> Es decir, en tripanosomátidos existen tres enzimas distintas involucradas en la cascada redox, mientras que en mamíferos sólo existen dos.

### 1.5.2.3 Defensa contra xenobióticos

Los xenobióticos son, en general, sustancias hidrofóbicas de muy variada estructura. Sin embargo, los mismos se pueden transformar en compuestos menos tóxicos e hidrosolubles

y, en consecuencia, más fácilmente excretables al estar conjugados con glutatión. Esto ocurre mediante una reacción catalizada por glutatión *S*-transferasas, enzimas presentes en organismos superiores. En tripanosomátidos, en cambio, esta función la cumple tripanotiona. Prueba de ello es el hallazgo de actividad tripanotiona *S*-transferasa en extractos celulares de *C. fasciculata*, *L. major*, *L. infantum*, *L. tarentolae* y *T. brucei*, asociada al factor de elongación eucariótico 1B (eEF1B).<sup>49</sup> Es más, recientemente se ha expresado, clonado y purificado EF1B en *L. major*.<sup>50</sup> Se ha demostrado también que dicha proteína es capaz de catalizar la conjugación de diversos sustratos electrofílicos con tripanotiona pero no con glutatión. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que tripanotiona cumple en tripanosomátidos el mismo rol que glutatión en mamíferos.

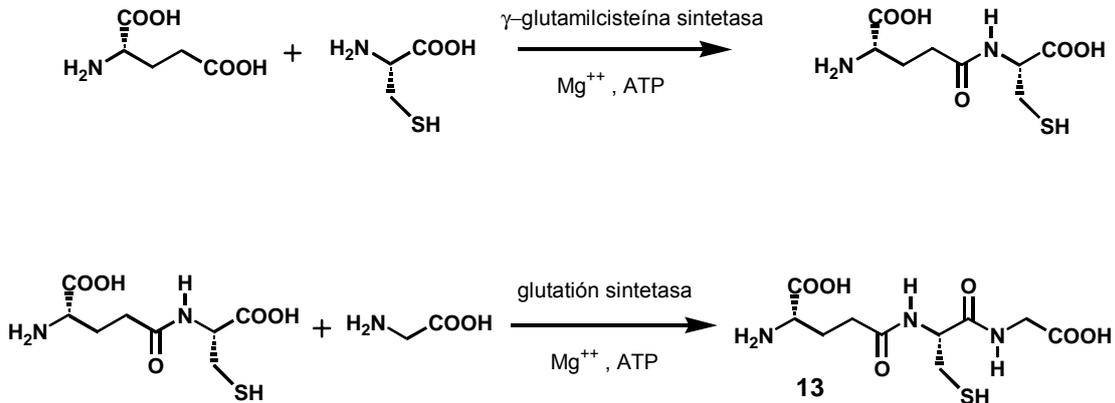
### 1.5.3 Biosíntesis de tripanotiona

El camino biosintético de glutatión (**13**) y el de la poliamina espermidina (**14**) confluyen para dar tripanotiona, producto de condensación de los mismos. Por este motivo, la biosíntesis de tripanotiona se puede considerar como una prolongación de la de glutatión y espermidina. Éstos son sustratos de dos enzimas que se hallan exclusivamente en parásitos del orden Kinetoplastida: glutatiónespermidina sintetasa (GspS) y tripanotiona sintetasa (TryS). Estas enzimas catalizan la conjugación entre glutatión y espermidina en una relación 2:1.

#### 1.5.3.1 Glutatión

Al igual que en mamíferos, la biosíntesis de glutatión está catalizada por dos ligasas que utilizan ATP como factor de activación:  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa y glutatión sintetasa. Ambas enzimas requieren de la presencia de  $Mg^{++}$  como cofactor. (Esquema 1.4)

Se han estudiado la especificidad por el sustrato y las propiedades cinéticas para  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa recombinante de *T. brucei* y se han comparado con las



**Esquema 1.4.** Biosíntesis de glutatión.

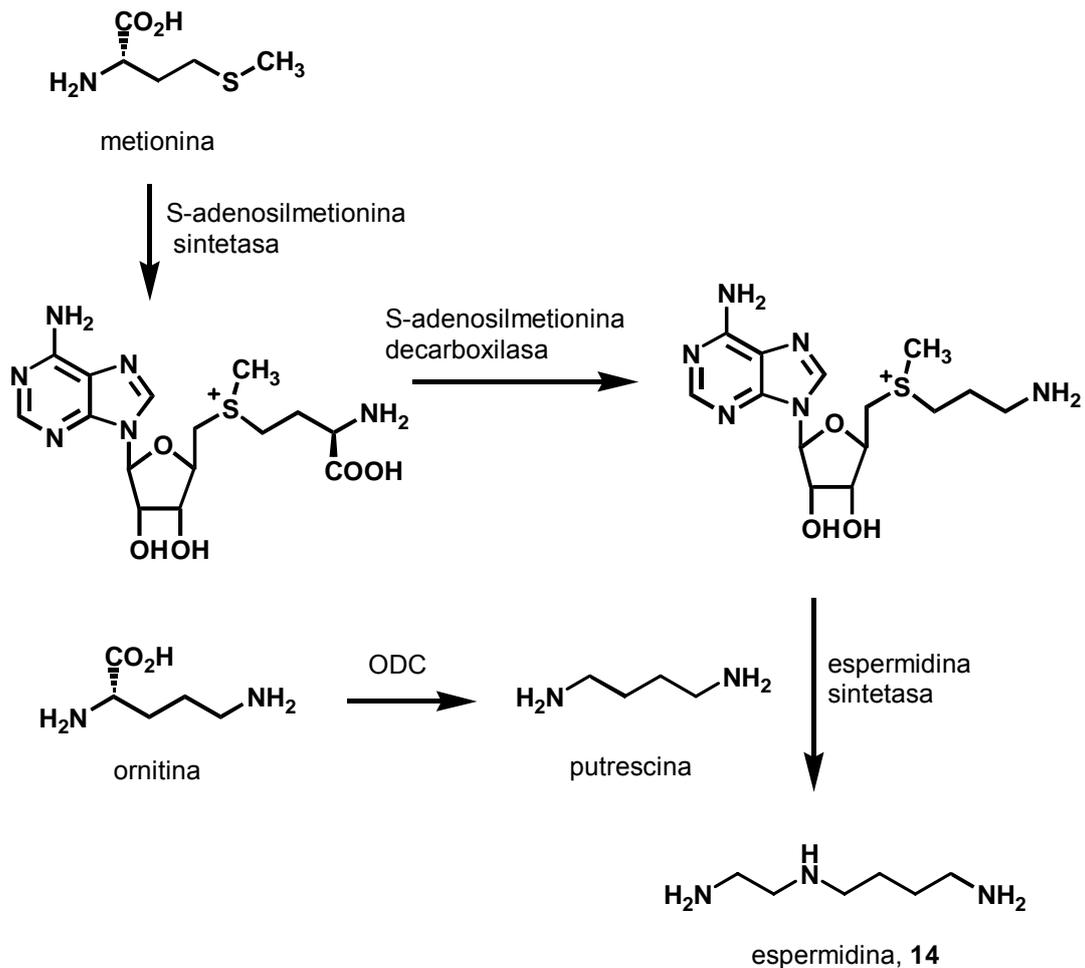
correspondiente enzimas de mamíferos. Si bien se encontraron algunas diferencias en el sitio de unión,<sup>51</sup> no se han hallado inhibidores selectivos.<sup>5</sup>

### 1.5.3.2 Espermidina

Espermidina se biosintetiza a partir de ornitina y metionina. Las siguientes enzimas se encuentran involucradas en el camino sintético: ornitina descarboxilasa (ODC), *S*-adenosilmetionina sintetasa, *S*-adenosilmetionina descarboxilasa y espermidina sintetasa. (Esquema 1.5).

Como se mencionó anteriormente, las poliaminas en general son esenciales para los procesos de proliferación celular, diferenciación y funciones de membrana. Por lo tanto, si su biosíntesis se inhibe, el crecimiento celular se detiene. Recientemente, se ha demostrado que espermidina es esencial para la proliferación normal de *C. fasciculata*.<sup>53</sup> Sin embargo, aún no resulta claro si los niveles de poliaminas hallados en todos los parásitos del orden Kinetoplastida son producto de biosíntesis de dichos organismos o son tomados del medio externo a través de procesos de transporte. Por ejemplo, se ha observado que inhibidores de ODC pueden disminuir la capacidad de *T. cruzi* de infectar células de mamíferos;<sup>54</sup> sin embargo, no se han podido detectar actividades significativas de ODC o arginina descarboxilasa (ADC) en dicho

parásito.<sup>55</sup> Además, se han publicado resultados contrapuestos en donde se han detectado niveles de actividad importantes de ADC.<sup>56</sup> Por otro lado, parece estar claro que *Leishmania* es capaz de sintetizar poliaminas a partir de ornitina.<sup>57</sup> Finalmente, se han identificado dos transportadores específicos de espermidina y putrescina en promastigotes de *L. mexicana* y *L. donovani*, y en amastigotes de *L. donovani*.<sup>58</sup> Más allá de los resultados contradictorios,

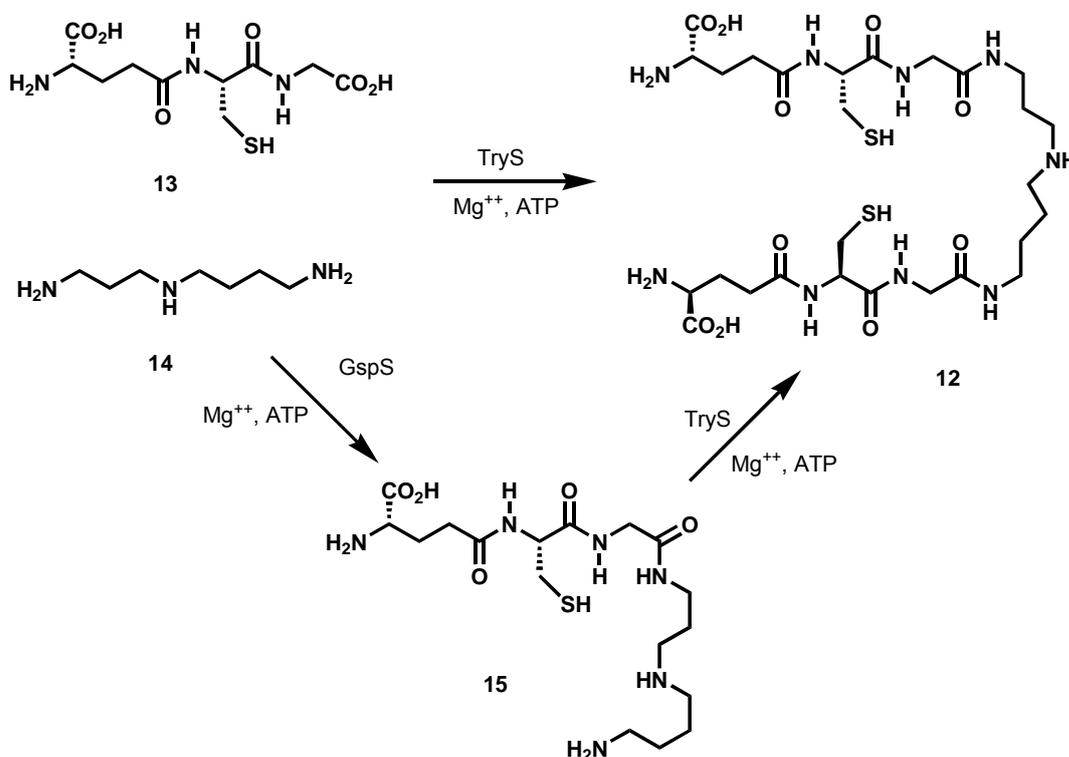


**Esquema 1.5.** Biosíntesis de espermidina.

cabe destacar que es posible que existan procesos de transporte de poliaminas, éstos no representan, entonces, un blanco molecular aceptable para el desarrollo de drogas.

### 1.5.3.3 Tripanotiona

De todo el camino biosintético que conduce a tripanotiona, los últimos dos pasos resultan los más interesantes como blancos moleculares para el diseño de drogas. Esto se debe a que las enzimas involucradas no tienen contraparte en mamíferos, hecho más que interesante a tener en cuenta para este fin. Dichas enzimas son ligasas C:N ATP-dependientes, que requieren  $Mg^{++}$  como activante y están asociadas a flavinas. Su función es la de catalizar la conjugación de espermidina con dos moléculas de glutatión para dar tripanotiona. Desde el descubrimiento de este metabolito ha habido resultados contradictorios en cuanto a esta última parte del camino biosintético. Más concretamente, se han planteado dos posibilidades para la biosíntesis de tripanotiona a partir de glutatión y espermidina: (a) la condensación de espermidina con dos unidades de glutatión, catalizada por una única enzima; (b) la condensación de espermidina con una unidad de glutatión, catalizada por una primera enzima, para dar el producto intermedio



Esquema 1.6. Biosíntesis de tripanotiona.

glutathionil espermidina (**15**) y la posterior condensación de este último con otra unidad de glutatión, catalizada por una segunda enzima, para dar tripanotiona. (Esquema 1.6).

De acuerdo al producto formado en la reacción que catalizan, dichas enzimas fueron nombradas: glutathionil espermidina sintetasa (GspS) y tripanotiona sintetasa (TryS), respectivamente. Los primeros ensayos de aislamiento y purificación se realizaron sobre *C. fasciculata*. En 1990, Henderson *et al.* purificaron de dicho parásito una enzima de peso molecular 83 kDa y la caracterizaron como un monómero que catalizaba la síntesis de tripanotiona a partir de glutatión y espermidina.<sup>59</sup> Más tarde, Smith *et al.* repitieron este procedimiento, pero agregando un paso extra, mediante el cual aislaron dos enzimas distintas: una de 90 kDa, con actividad GspS y la otra de 82 kDa con actividad TryS. La primera de ellas no presentó actividad con glutathionil espermidina como sustrato.<sup>60</sup> Por otro lado, Koenig *et al.*, utilizando otro sistema, también purificaron una enzima con actividad GspS, pero con un peso molecular de 78 kDa.<sup>61</sup> Estos resultados contradictorios evidenciaron la dificultad para separar ambas enzimas y, junto con la disminución de su actividad una vez aisladas, llevaron a pensar en la presencia de un complejo heterodimérico *in vivo* que mejoraba la actividad GspS y TryS. Además, se descartó la posibilidad de que una única enzima catalizara ambos pasos de reacción.

Otro resultado contradictorio en sí mismo fue la detección de una segunda actividad catalítica en estas enzimas. Smith *et al.* determinaron que GspS no sólo era capaz de sintetizar glutathionil espermidina a partir de glutatión y espermidina, sino también catalizaba la reacción inversa, es decir poseía actividad amidasa. Este tipo de bifuncionalidad ya había sido descrita en GspS de *Escherichia coli* asociada a una función de regulación de niveles de poliaminas libres, es decir, que la bacteria utilizaba este conjugado como reserva de espermidina y glutatión, para liberarlo cuando las condiciones de crecimiento lo requirieran. Más aún, ésta sería la principal función de GspS en *E. coli*, ya que la bacteria carece de tripanotiona y utiliza glutatión como tiol principal;<sup>62</sup> sin embargo, el motivo de la bifuncionalidad en la enzima parasitaria aún no está del todo claro.

Los primeros intentos de clonación y expresión de estas enzimas fueron realizados en *E. coli* y *Saccharomices cereviseae* sin mayores resultados. Luego de hallar los genes que

codificaban para GspS y TryS en *C. fasciculata* pero fracasaron en el intento de obtener enzimas activas a partir de ellos, Oza *et al.* lograron expresar GspS con cola de histidina en *E. coli*. La enzima era activa una vez quitada dicha cola, su peso molecular era de 80.524 Da, determinado por espectrometría de masas MALDI-TOF, el cual coincidió con el calculado a partir de la secuencia de aminoácidos (80.600 Da). Se realizó también un análisis de la actividad amidasa por HPLC, confirmándose dicha actividad y más aún: se halló una pequeña actividad amidasa utilizando tripanotona como sustrato (4% respecto de glutationil espermidina como sustrato). Basados en ensayos previos sobre GspS de *E. coli*, se realizó la mutación de Cis-79 a Ala-79 obteniéndose una enzima que retenía la actividad sintetasa pero carecía de actividad amidasa.<sup>63</sup>

Estos resultados sugerían que coexistían esta enzima dos dominios catalíticos distintos, pero nada aclaran sobre la manera de evitar un ciclo insustancial con gasto neto de ATP provocado por funciones catalíticas opuestas.

Las perspectivas en cuanto a la búsqueda de blancos moleculares relativos a tripanotona comenzaron a cambiar a partir del momento en que se clonó y expresó TryS de *T. cruzi* en *E. coli*. La enzima aislada no sólo fue capaz de sintetizar tripanotona a partir de glutationilespermidina, sino que también lo hizo a partir de glutatión y espermidina. Se halló además, en dicha enzima, actividad amidasa, tanto sobre tripanotona como sobre glutationilespermidina, en una magnitud similar, mostrando una marcada diferencia con GspS de *C. fasciculata*. Por otro lado, hasta ese momento, no se había podido identificar ningún gen que codificara para GspS en *T. cruzi*, lo que llevó a postular la presencia de una única enzima capaz de catalizar la síntesis de tripanotona directamente a partir de glutatión y espermidina, al menos para este parásito.<sup>64</sup> La misma actividad catalítica dual se encontró en TryS de *T. brucei brucei*.<sup>65</sup> Anteriormente a la clonación de TryS de *T. cruzi*, la única fuente de enzimas responsables de la síntesis de tripanotona en grandes cantidades con la que se contaba era *C. fasciculata*; sin embargo, las diferencias aparentemente halladas con el metabolismo de los parásitos patógenos hicieron que la validez del modelo fuera reconsiderada. Por este motivo, Comini *et al.* reinvestigaron las propiedades catalíticas de TryS de *C. fasciculata*. De esta forma, se logró clonar y expresar la enzima en *E. coli* como una proteína

activa capaz de catalizar la síntesis de tripanotiona, tanto a partir de glutationilespermidina y glutatión como de espermidina y glutatión. También se encontró actividad amidasa en dicha enzima.

Estos hallazgos indican algunas semejanzas entre la enzima con sus homólogas en *T. cruzi* y *T. brucei brucei*, y aclaran algunas dudas sobre la validez de la primera como modelo de blanco molecular para el diseño de drogas contra tripanosomátidos patógenos. Sin embargo, surgen nuevas incógnitas al descubrir la coexistencia, en *C. fasciculata*, de dos caminos paralelos para la síntesis de tripanotiona: (a) la síntesis de tripanotiona a partir de glutatión y espermidina, cuya conjugación está catalizada por TryS; (b) la síntesis de glutationilespermidina a partir de glutatión y espermidina, catalizada por GspS y su posterior conjugación con otra unidad de glutatión, catalizada por TryS. Esta redundancia metabólica aún no se ha podido explicar con claridad.

Los primeros intentos de hallar una razón evolutiva van de la mano con los resultados obtenidos durante el estudio de estas enzimas en el parásito *L. major*. Oza *et al.* clonaron y expresaron TryS en *E. coli*, e identificaron un pseudogen que codifica para GspS (*GSPS*). Este gen representaría un nexo evolutivo que resolvería la divergencia entre *C. fasciculata* y *Trypanosoma* spp. La hipótesis es que un gen *GSSP* ancestral con especificidad estrecha por el sustrato, podría haberse duplicado y divergido hacia dos genes independientes (*TYRS* y *GSSP*) produciendo las enzimas específicas GspS y TryS encontradas en *Crithidia*. Por otro lado, el genoma de *Trypanosoma* podría haber retenido solamente el gen *TRYS* y, por lo tanto, evolucionado en una enzima de amplia especificidad por el sustrato, escapando a la necesidad de dos enzimas distintas para la biosíntesis de T(SH)<sub>2</sub>.<sup>66</sup> Esta amplitud en la especificidad de sustrato ha sido observada en *T. cruzi*, cuya enzima puede conjugarse con una variedad de poliaminas con glutatión.<sup>67</sup>

## 1.6 Blancos moleculares en la biosíntesis de tripanotiona

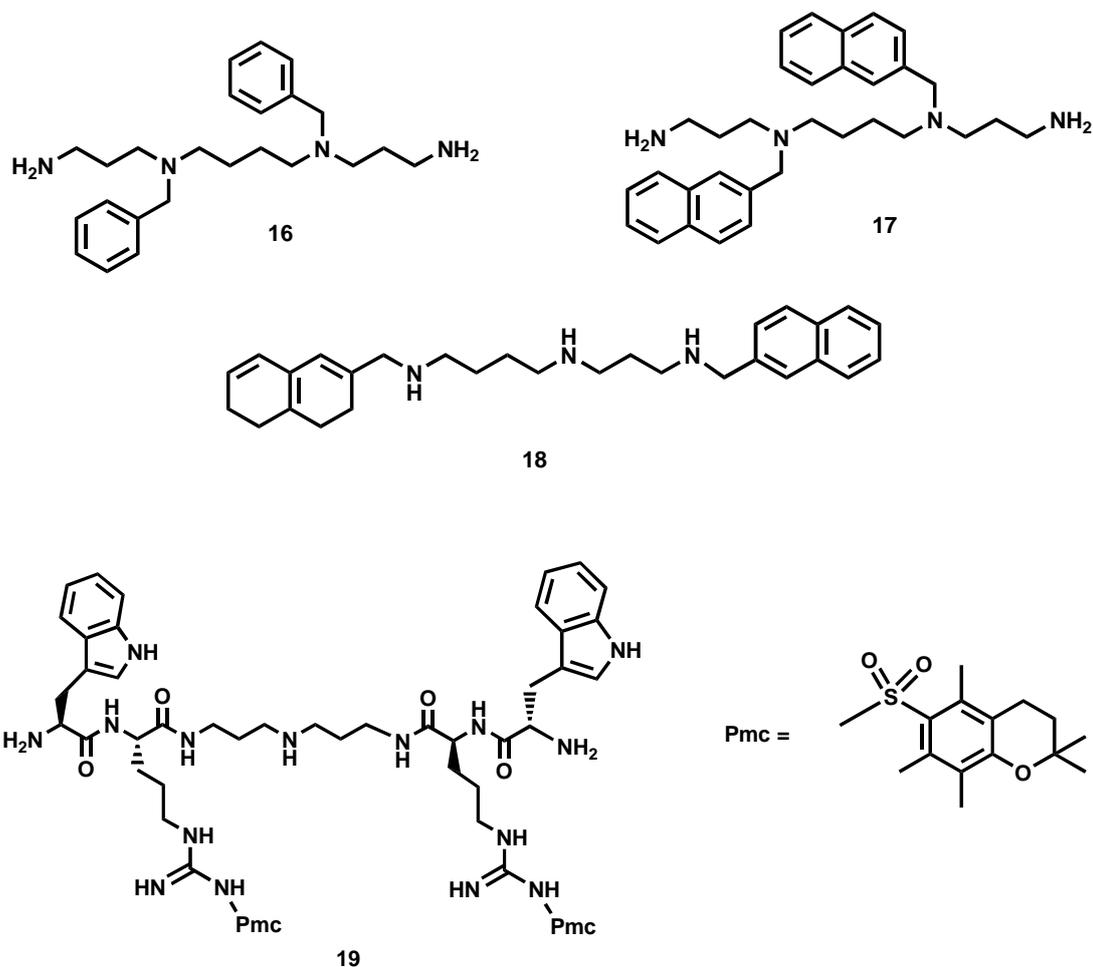
De todo el camino metabólico de tripanotiona se destacan los siguientes puntos: (a) la regeneración de los tioles de tripanotiona catalizada por la enzima tripanotiona reductasa; (b) el paso de biosíntesis de tripanotiona a partir de glutatión y espermidina. Estos son los puntos claves para la elección de blancos moleculares ya que en ambos participan enzimas esenciales para la supervivencia del parásito y exclusivas del mismo, o, al menos, no presentes en el organismo huésped.

### 1.6.1 Tripanotiona reductasa

Como se mencionó anteriormente, TR es la enzima encargada de catalizar la regeneración de tripanotiona y fue la primera enzima de este metabolismo exclusivo de tripanosomátidos en ser identificada y caracterizada.<sup>43</sup> Por lo tanto, se propuso inicialmente como blanco molecular para el diseño de agentes antiparasitarios. Esta enzima ha sido ampliamente estudiada desde su descubrimiento, junto con su sustrato tripanotiona. La relativa facilidad con la que se pudo purificar de *C. fasciculata*, en comparación con las enzimas del camino biosintético, dio como resultado la disponibilidad de la misma en cantidades suficientes como para realizar los ensayos necesarios para su validación como blanco molecular. Cabe destacar, entre éstos, los ensayos de especificidad por el sustrato<sup>68</sup> y de regulación del gen que codifica para TR disminuyendo su actividad en el parásito.<sup>69-71</sup> Mediante estos últimos, se ha demostrado el carácter esencial de dicha enzima para la supervivencia del parásito.

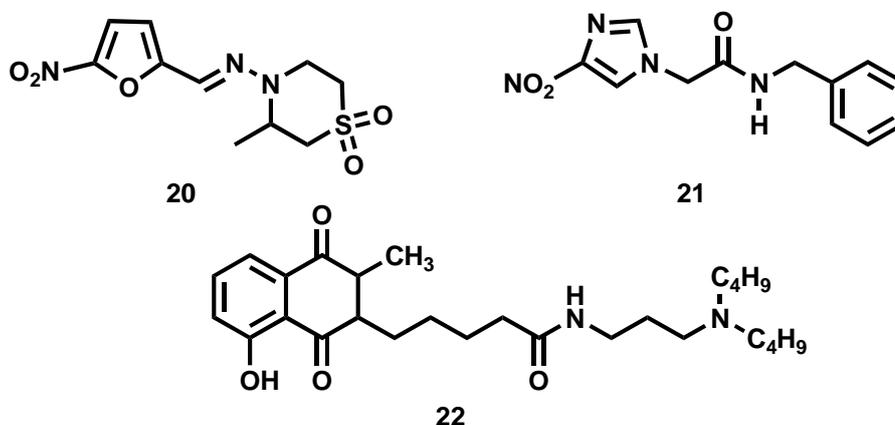
Los ensayos de especificidad por el sustrato son particularmente importantes en esta enzima, ya que se encuentra relacionada funcionalmente a glutatión reductasa (GR), enzima análoga en mamíferos. Por otro lado, la obtención de esta enzima en forma cristalina, tanto sola como cocrystalizada con sustratos e inhibidores, hizo posible conocer su estructura tridimensional y, en particular, la de su sitio activo.<sup>72,73</sup> Este conocimiento del sitio activo llevó al diseño racional y síntesis basado en poliaminas bloqueadas con grupos hidrofóbicos, como fenilo y naftilo, los cuales se unirían a los bolsillos hidrofóbicos de la enzima. De esta forma, se obtuvieron los compuestos **16**, **17** y **18**, los cuales fueron potentes inhibidores de TR y, además, dichos valores correlacionaron bien con la actividad celular observada contra cuatro

especies de *T. brucei*.<sup>74</sup> El compuesto más potente como inhibidor de la actividad enzimática de TR se obtuvo a partir de una biblioteca de conjugados espermidina-péptido. De ésta surgió el compuesto **19** con una  $K_i = 100$  nM.<sup>75</sup>

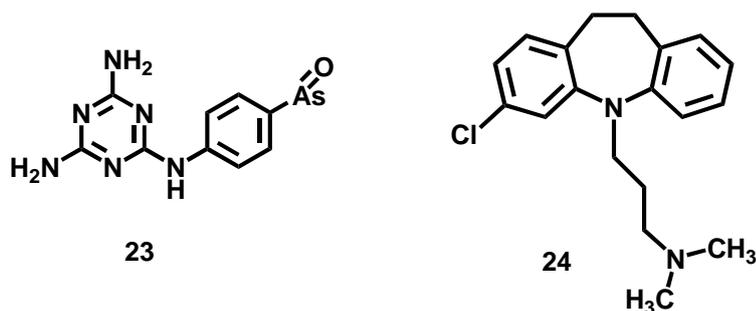


El descubrimiento de TR trajo aparejada, además de un nuevo blanco molecular para los kinetoplastidos, la elucidación del modo de acción de drogas tradicionalmente utilizadas contra distintas tripanosomiasis y leishmaniasis. Tales son los casos de nifurtimox (**20**) y benznidazol (**21**). Estos son generadores de ciclos redox los que, uniéndose al sitio catalítico de TR, son reducidos por NADPH mediante la transferencia de un electrón. Luego, son reoxidados por O<sub>2</sub> para dar anión radical superóxido, el cual inhibe la reducción del sustrato natural, en un ciclo redox. Con esta base se han diseñado gran cantidad de inhibidores, y muchos de ellos efectivos, como los basados en quinonas, en particular **22**.<sup>76</sup> Sin embargo,

todos ellos, al igual que nifurtimox y benznidazol, tienen muy baja selectividad contra otras enzimas con actividad redox y, consecuentemente, son altamente tóxicos para el huésped.<sup>77</sup>



Del resto de las drogas que tienen como blanco TR como inhibidores competitivos cabe destacar el óxido melarsen (**23**),<sup>78</sup> el cual se une covalentemente a tripanotona para formar un aducto que compite con tripanotona libre por TR. Este compuesto de arsénico ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento de tripanosomiasis africana y, al igual que otros compuestos de arsénico, es altamente tóxico. También preparados de antimonio como triostam



(gluconato de sodio y antimonio) son inhibidores competitivos de TR, al igual que compuestos tricíclicos como clomipramina (**24**).<sup>79</sup> Todos ellos son sumamente tóxicos en mamíferos.

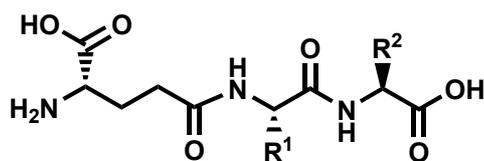
Finalmente, se puede agregar de TR que su principal desventaja como blanco molecular, a diferencia de GspS y TryS, es que a pesar de ser una enzima única en parásitos del orden

Kinetoplastida, existe una contrapartida en mamíferos: glutatión reductasa. No sólo la función metabólica de ambas enzimas es totalmente análoga, sino también comparten muchas características estructurales como el grupo prostético FAD, ser homodímeros de peso molecular 50 kDa, y un par de residuos Cis/Cis como par reducido y oxidado alternadamente durante la catálisis. Si bien es cierto que existe un alto grado de afinidad por el sustrato natural para ambas enzimas, como se vio previamente, parecería difícil hallar inhibidores altamente selectivos.

### 1.6.2 Glutationil espermidina sintetasa y Tripanotiona sintetasa

A diferencia de lo observado con tripanotiona reductasa, los intentos por cristalizar GspS o TryS han sido infructuosos. Por este motivo, los esfuerzos en la búsqueda de inhibidores de estas enzimas se han centrado en estudios de relación estructura-actividad (en inglés: SAR).

Como se mencionó anteriormente, la primer enzima disponible en cantidad suficiente como para realizar ensayos de inhibición fue GspS de *C. fasciculata*. Por lo tanto, se utilizó como modelo para la evaluación de inhibidores de la síntesis de tripanotiona. Debido a la naturaleza peptídica del sustrato, los primeros ensayos se realizaron a partir de una serie de tripéptidos análogos a glutatión. De esta manera, pudo evaluarse la importancia de cada uno de los residuos del tripéptido en relación a su actividad como inhibidor o sustrato. La modificación del residuo ácido glutámico dio por resultado una pérdida total de la actividad en el tripéptido, por lo tanto, se concluyó que el mismo era esencial para el reconocimiento molecular por parte de la enzima. Por otro lado, la alquilación del grupo tiol presente en el residuo cisteína, aumentó la eficiencia catalítica del tripéptido como sustrato, siempre y cuando el grupo alquilo no fuera mayor que propilo. Inclusive la substitución de L-Cis por L-Val (**25**) o L-Ile (**26**) no cambió apreciablemente esta eficiencia. El resultado más interesante de este estudio fue que al reemplazar el residuo L-Cis por L-Leu (**27**) o L-Phe (**28**) se encontró actividad inhibitoria. Lo mismo ocurrió al reemplazar Gli por L-Ala (**29**)<sup>80</sup> (Tabla 1.1.).

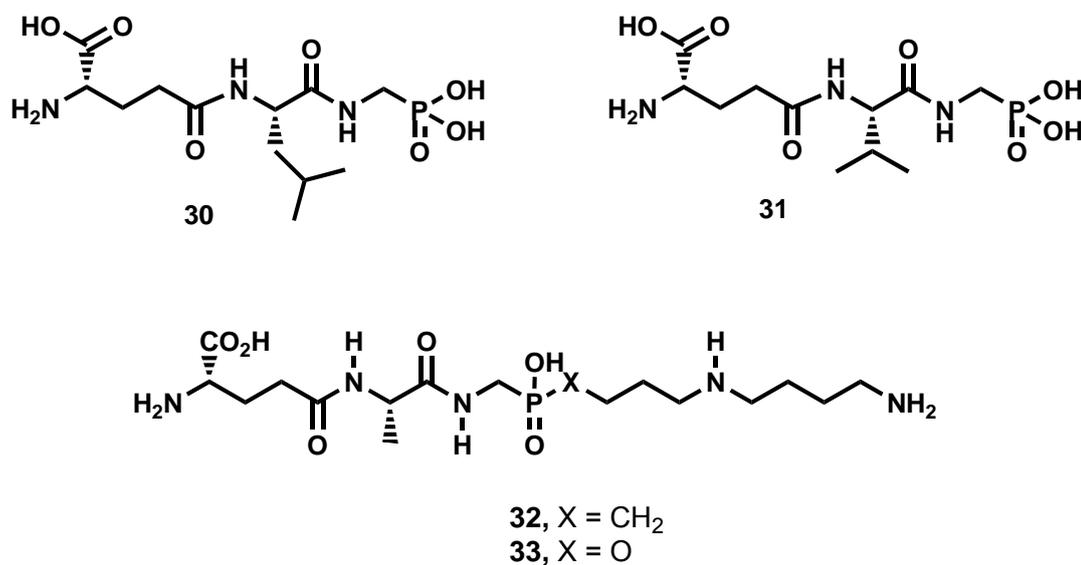


Compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Actividad
13		H	Sustrato natural
25		H	Sustrato
26		H	Sustrato
27		H	Inhibidor
28		H	Inhibidor
29		CH <sub>3</sub>	Inhibidor

**Tabla 1.1.** Análisis SAR del tripéptidos análogos

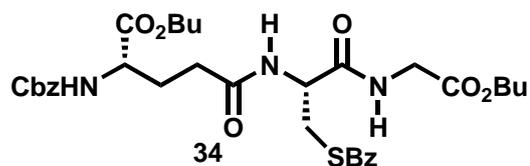
Basados en estos estudios previos, Verbruggen *et al.* diseñaron y sintetizaron análogos de glutatión en el cual se reemplazó el carboxilo terminal por grupos ácido fosfónicos y fosfinicos. El análogo ácido fosfínico **30** del tripéptido **27** fue un inhibidor linear no competitivo de GspS de *C. fasciculata*, con una  $K_i$  de 60  $\mu\text{M}$ . El reemplazo de L-Leu por L-Val (**31**) condujo a un inhibidor menos potente con una  $K_i$  de 290  $\mu\text{M}$ .<sup>81</sup> Basados en estos farmacóforos, Chen *et al.* sintetizaron análogos fosfonatos y fosfonamidatos de glutationilpermidina (Figura 1.2). En estos compuestos, el grupo fosforado reemplaza la unión amida. De esta manera, se imita el estado de transición tetraédrico que se produciría durante la reacción de condensación catalizada por una típica ligasa C:N.<sup>82</sup> Este tipo de mimético de estado de transición ya había sido utilizado en el diseño de inhibidores de otras ligasas como Ala-D-Ala ligasa, glutamina

sintetasa y glutatión sintetasa. Los compuestos **32** y **33** fueron inhibidores potentes de GspS de *E. coli*, con  $K_i$  de 6.0  $\mu\text{M}$  y 3.2  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Desafortunadamente, estos compuestos no han sido ensayados en la enzima proveniente de *C. fasciculata*.



### 1.6.3 Inhibidores del crecimiento parasitario

Paralelamente a la realización de este trabajo de tesis, sólo unos pocos ensayos de inhibición del crecimiento parasitario se han realizado con potenciales inhibidores de la síntesis de tripanotona. Siguiendo con la idea de los análogos de sustratos, D'Silva *et al.* ensayaron la actividad *in vitro* de distintos derivados protegidos en distintas posiciones contra *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. donovani*. El compuesto más potente fue **34**, con todos los grupos polares protegidos, con un IC<sub>50</sub> de 1.9  $\mu\text{M}$  contra *T. brucei*.<sup>83</sup> Los autores sugirieron que los grupos protectores facilitan la entrada de los compuestos a través de la membrana celular y luego de la hidrólisis de dichos grupos por medio de esterasas endógenas se obtendrían distintos monoésteres o ácidos libres protegidos sobre el azufre de cisteína, los que actúan así en los blancos moleculares respectivos.



## 1.7 Objetivos del trabajo de tesis

De lo expuesto en este capítulo se puede desprender que las enzimas del camino biosintético de tripanotona son un excelente blanco molecular para la búsqueda de nuevos y más seguros agentes antiparasitarios contra las enfermedades provocadas por parásitos de la familia de los tripanosomátidos. Este trabajo de tesis tiene como objetivo en una primer instancia el diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos compuestos relacionados estructuralmente a glutatión. En una segunda instancia se analizará la relación entre estructura y actividad biológica de dichos compuestos con el fin de hallar nuevas estructuras líderes en el marco de la búsqueda de nuevos inhibidores del camino biosintético de tripanotona.

**Capítulo 2: Síntesis de amidas y ésteres  
de L- $\gamma$ -Glu-L-Leu-Gly-OH**



## 2.1 Introducción

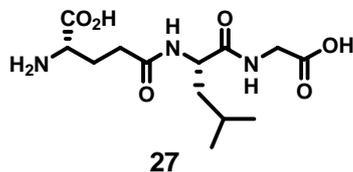
Como se mencionó en la introducción, ya se han sintetizado compuestos análogos de glutatión y se ha evaluado su actividad inhibitoria contra GspS. Los primeros compuestos sintéticos que presentaron una acción inhibitoria moderada fueron tripéptidos relacionados estructuralmente a glutatión modificando la naturaleza de cada residuo peptídico.<sup>80</sup> Estos datos sirvieron como antecedente para la elección de una estructura tripeptídica base sobre la cual realizar variaciones estructurales para optimizar su actividad inhibitoria.

Si se considera que el objetivo del presente trabajo es la inhibición de la actividad enzimática de una ligasa que cataliza el acoplamiento de glutatión con espermidina, es razonable pensar que el sitio activo de dicha enzima pudiera reconocer a una estructura que contenga tanto un domino tripeptídico como un dominio de poliamina. Por este motivo, la etapa inicial de este trabajo de tesis se focalizó en el diseño y síntesis de análogos de glutationilespermidina con el fin de involucrar a todo el sitio activo de la enzima. Sin embargo, la síntesis de análogos tripeptídicos acoplados a poliaminas, como espermidina, resultó complicada y los compuestos resultantes fueron difíciles de aislar y purificar.

Las dificultades encontradas señalaron que intentar establecer una relación estructura/actividad era impráctica desde el punto de vista sintético. Por esta razón, en una segunda etapa de este trabajo, se decidió realizar una búsqueda de análogos simplificados de glutationilespermidina reemplazando la unidad poliamina de espermidina por otras poliaminas menos polares o, directamente, por cadenas hidrocarbonadas saturadas acopladas al tripéptido a través de enlaces amida o éster.

Por otro lado, se intentó obtener una correlación entre la actividad inhibitoria enzimática y la actividad celular en cultivo de parásitos, hecho que ha sido poco estudiado hasta ese momento. En este capítulo se describirá el diseño, síntesis y evaluación biológica de análogos de ésteres y amidas del tripéptido **27**, como primera

aproximación, en la búsqueda de inhibidores de la actividad enzimática de GspS y TryS.



**Figura 2.1.** Tripeptido  $\gamma$ -L-Glu-L-Leu-Gli-OH (**27**)

## 2.2 Diseño de los inhibidores

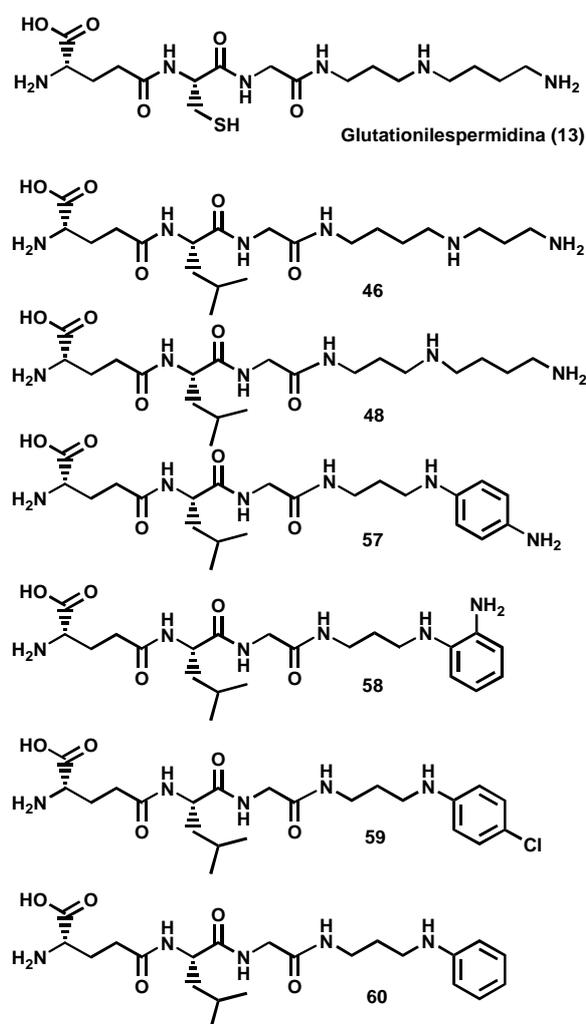
### 2.2.1 Elección de la estructura tripeptídica

Debido al desconocimiento de la estructura tridimensional de GspS en el momento del diseño de estos compuestos, la elección de la secuencia tripeptídica se basó en el trabajo de De Craecker *et al.*<sup>80</sup>, en el cual se pudo definir qué residuo era importante para el reconocimiento molecular de GspS basado en la estructura de glutatión. Allí quedaba claro que el residuo de ácido glutámico era imprescindible para dicho reconocimiento. Por otro lado, ciertas modificaciones sobre los residuos de cisteína y glicina podían transformar la actividad como sustrato que posee glutatión en actividad inhibitoria. Estos datos fueron de suma importancia y se tomaron en cuenta en el diseño de las moléculas blanco. De los tripeptidos con actividad inhibitoria se eligió entre aquellos que prescindían de cisteína, para facilitar su manipulación y purificación. Se decidió entonces tomar como estructura líder el más potente de dichos inhibidores, es decir que el compuesto en el cual residuo de cisteína se reemplazó por un residuo de leucina en la molécula de glutatión resultando el tripeptido **27** el cual se utilizó como intermediario común para la preparación de los derivados diseñados de esta familia de drogas.

### 2.2.2 Derivados de poliaminas

Una vez elegido el tripéptido común sobre el cual se basaría la construcción de los análogos de glutationilespermidina, se decidió acoplar al mismo diferentes poliaminas con el fin de conservar una cierta similitud con la porción de la estructura correspondiente a espermidina. En la Figura 2.2 se presentan los análogos diseñados como inhibidores enzimáticos.

En esta figura se puede observar que el derivado **43** mantiene la parte de espermidina sin cambios respecto de glutationilespermidina, mientras que en el derivado

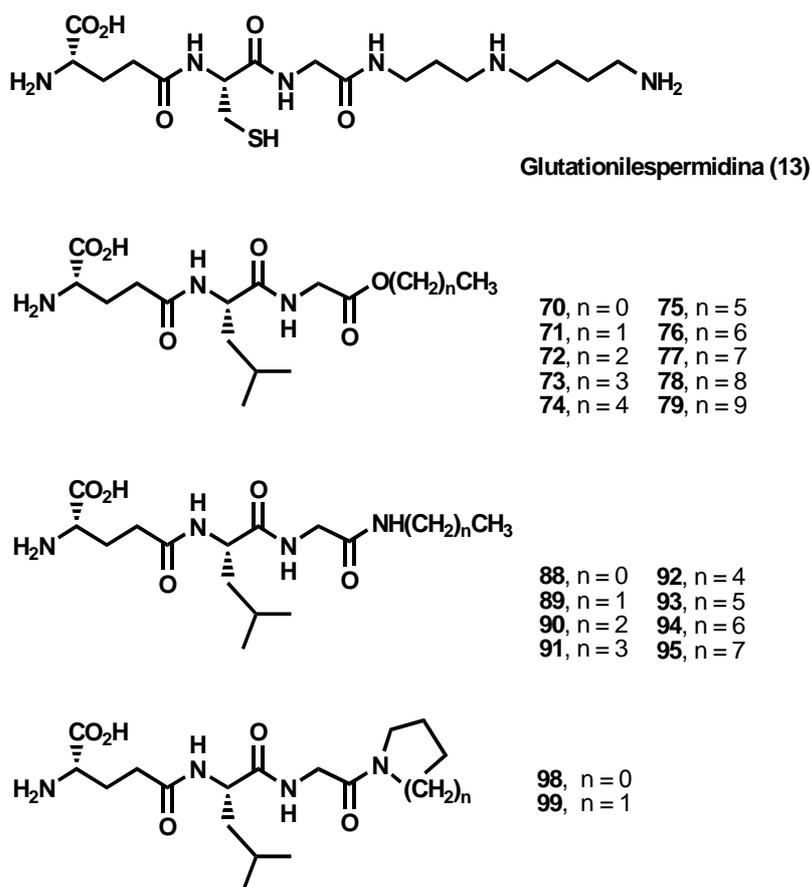


**Figura 2.2.** Derivados de poliaminas diseñados para actuar como inhibidores de la actividad enzimática de GspS.

**44** la molécula de espermidina se encuentra unida al tripéptido a través del  $N^8$ , en vez del  $N^1$ , imitando el metabolito  $N^8$  glutationilespermidina, también presente en tripanosomátidos e intermediario alternativo en la biosíntesis de tripanotiona.<sup>3</sup> En los derivados de aminas aromáticas se mantiene, respecto de glutationilespermidina, la distancia de 3 carbonos entre el átomo de nitrógeno unido al tripéptido y el átomo de nitrógeno secundario, variando la distancia entre el secundario y el terminal o, directamente, eliminando este último como en los casos de los derivados **55** y **56**.

### 2.2.3 Derivados aminas y ésteres

Las dificultades experimentales encontradas en el trabajo con poliaminas junto con valores modestos de actividad enzimática condujeron a la búsqueda de estructuras de los análogos de glutationilespermidina reduciendo la parte de espermidina a cadenas hidrocarbonadas acopladas por una unión éster o amida al tripéptido, variando únicamente el largo de las mismas. El diseño de este tipo de compuestos, motivado por la búsqueda de un farmacóforo simple, permitió obtener una cantidad razonable de derivados en poco tiempo. Este hecho redujo el tiempo de evaluación de estas drogas, las cuales se diseñaron para obtener una rápida respuesta y continuar con la búsqueda de una estructura de referencia. Los derivados diseñados se presentan en la Figura 2.3.

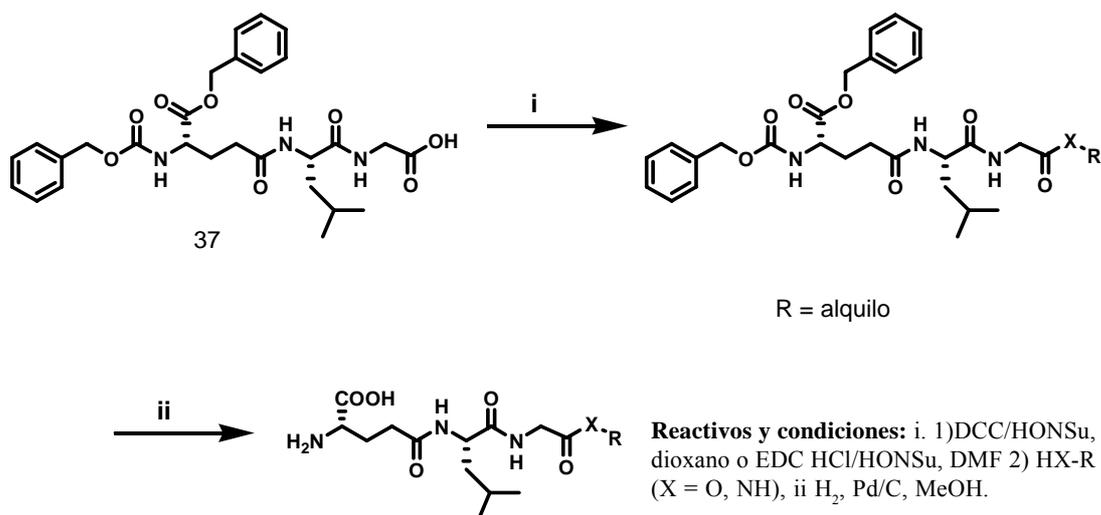


**Figura 2.3.** Derivados de aminas y ésteres.

### 2.3 Estrategia sintética

Se describirá, en esta sección, la síntesis de compuestos análogos a glutationilespermidina (**13**), resultantes del acoplamiento del tripéptido *N,O* diprottegido *N*-Cbz- $\gamma$ -L-Glu(OBn)-L-Leu-Gly-OH (**37**) con poliaminas, alcoholes y aminas lineales. La síntesis de estos derivados comparten una ruta en común, la preparación del tripéptido diprottegido **37**, el cual se preparó en escala del multigramo y se acopló con cada uno de los alcoholes o aminas para dar, luego de la desprotección de los grupos amino y carboxilo, los correspondientes análogos de glutationilespermidina (Esquema 2.1). Para ello se utilizó una estrategia de síntesis peptídica en solución, construyendo el tripéptido del extremo *N* terminal al *C* terminal. A pesar de la gran difusión que ha tenido la síntesis peptídica en fase sólida la síntesis en solución presenta

la ventaja de la facilidad para trabajar en escala multigramo en el laboratorio. Por lo tanto se optó por la última ya que la secuencia peptídica era corta y se necesitaba el intermedio **37** en esa escala.



**Esquema 2.1.** Esquema sintético de análogos de glutationilpermidina

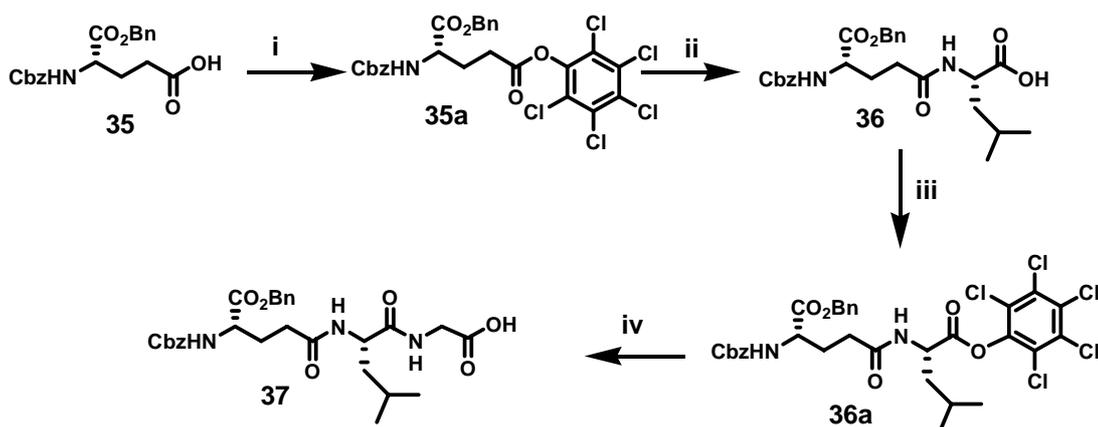
## 2.4 Síntesis del tripéptido

El tripéptido se construyó desde el extremo *N* terminal al *C* terminal, por conversión del carboxilo libre en un éster activo, en presencia de dicitlohexilcarbodiimida (DCC) utilizando como material de partida ácido *N*-carboniloxibencil-L-glutamato de  $\alpha$ -bencilo (**35**). La elección de los grupos protectores se basó en las siguientes ventajas: la estabilidad química que presentan frente a ácidos y, fundamentalmente, a la practicidad, eficiencia y limpieza de la reacción de hidrogenación catalítica para su remoción. Esto último es de suma importancia ya que los productos finales son extremadamente polares y, por lo tanto, su purificación es engorrosa.

La activación del carboxilo terminal se realizó, en primera instancia, mediante la formación del éster de pentaclorofenol (PCP) correspondiente, en presencia de dicitlohexilcarbodiimida. La dicitlohexilurea (DCU) resultante, producto de la incorporación de una molécula de agua

a dicitclohexilcarbodiimida, precipitó en el medio de reacción, por lo que fue eliminada por filtración. El éster de pentaclorofenol (**35a**) se obtuvo con un 46% de rendimiento luego de su purificación por cromatografía en columna (sílicagel).

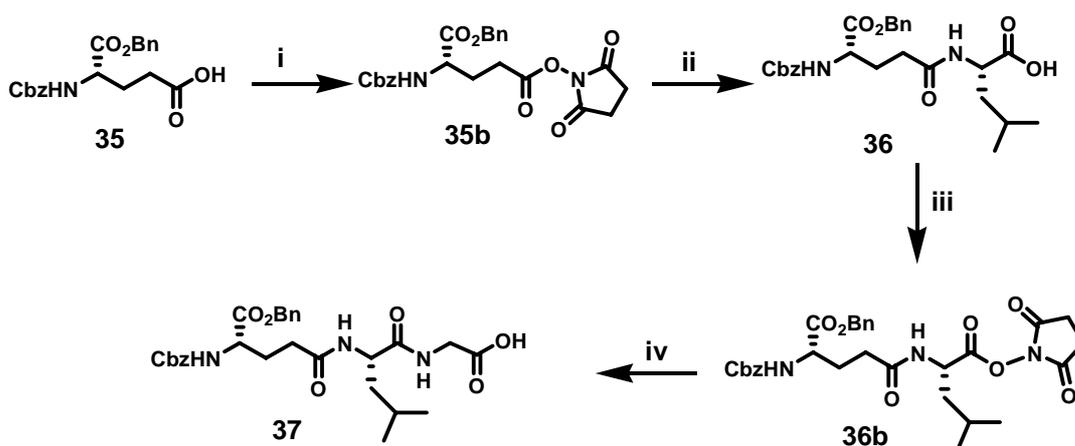
El dipéptido *N,O* diprotegido **36** se obtuvo por agregado de una solución de L-leucina en agua y trietilamina sobre una solución de **35a** en tetrahidrofurano, con un 66% de rendimiento luego de su purificación por cromatografía en columna de sílicagel. El acoplamiento de glicina al dipéptido **36** se realizó mediante el mismo procedimiento, con la salvedad de que no fue necesaria la purificación del éster de pentaclorofenol intermediario **36a**, el cual se obtuvo con un bajo rendimiento (44%). Más bajo aún fue el rendimiento del acoplamiento de **36a** con glicina, con un 32%. En consecuencia el rendimiento global de la preparación del tripéptido fue de sólo 4.2%. (Esquema 2.2).



**Reactivos y condiciones:** i. DCC/PCP, dioxano, 25°C, 16 hs. ii. Leu, Et<sub>3</sub>N, H<sub>2</sub>O, THF, 25°C, 2hs. iii. DCC/PCP, dioxano, 25°C, 16 hs. iv. Gli, Et<sub>3</sub>N, H<sub>2</sub>O, THF, 25°C, 2hs.

**Esquema 2.2.** Síntesis del tripéptido con DCC/PCP

Utilizando la misma estrategia, pero sustituyendo pentaclorofenol por *N*-hidroxisuccinimida (HON-Su) y eliminando la purificación del éster activo previa al agregado del aminoácido a acoplar, se logró aumentar notablemente el rendimiento de esta secuencia. El dipéptido **36** se obtuvo ahora con un 84%, luego de su purificación por cromatografía en columna de sílicagel, y el tripéptido **37** con un 80%, lo que elevó el rendimiento global al 67% (Esquema 2.3).



**Reactivos y condiciones:** i. DCC/HONSu, dioxano, 25°C, 16 hs. ii. Leu, Et<sub>3</sub>N, H<sub>2</sub>O, THF, 25 °C, 2 hs. iii. DCC/HONSu, dioxano, 25°C, 16 hs, iv. Gli, Et<sub>3</sub>N, H<sub>2</sub>O, THF, 25 °C, 2 hs.

**Esquema 2.3.** Síntesis del tripéptido **37** con DCC/HONSu

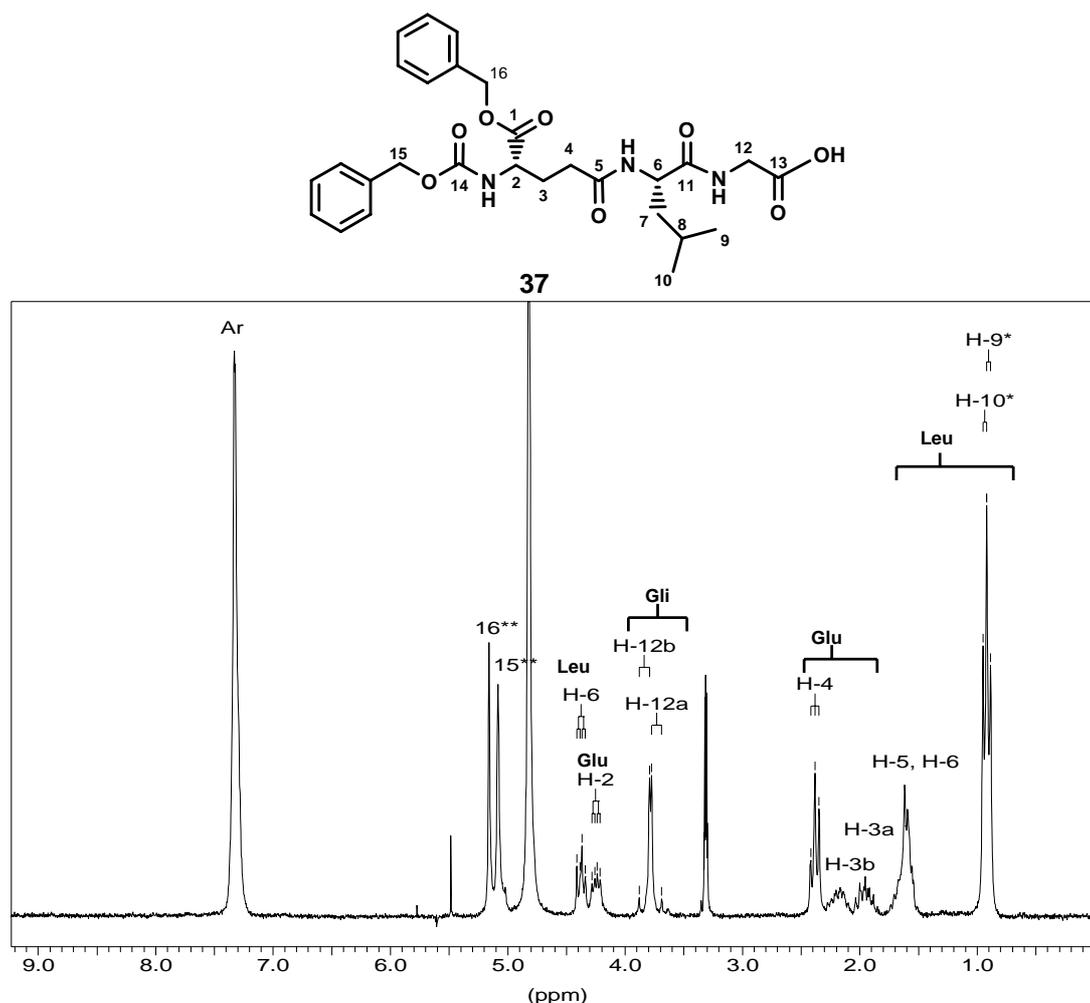
Si bien, como se mencionó previamente, los ésteres de *N*-hidroxisuccinimida no se purificaron, la identidad de los mismos se pudo confirmar por RMN <sup>1</sup>H del producto crudo.

## 2.5 Caracterización del tripéptido

La síntesis de compuestos oligopeptídicos tiene la ventaja, en cuanto a la caracterización de los mismos, de que se realiza por acoplamiento de fragmentos ya formados, facilitando la asignación de las señales de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de los intermedios de síntesis y los productos finales (Apéndice A).

Es importante la identificación de las señales en la estructura tripeptídica ya que la misma estará presente en todos los compuestos sintetizados en este trabajo. La misma se realizó por comparación sucesiva de los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de *N*-Cbz- $\gamma$ -L-glutamato de bencilo (**35**), del dipéptido *N,O* diprotegido (**36**) y del tripéptido *N,O* diprotegido (**37**). En el espectro de RMN <sup>1</sup>H de **37** (Figura 2.4) se pudieron observar las señales características de cada uno de los residuos de aminoácido del péptido. Comenzando a campos altos, se observaron las señales correspondientes al grupo isobutilo de leucina como dos dobletes centrados a 0,89

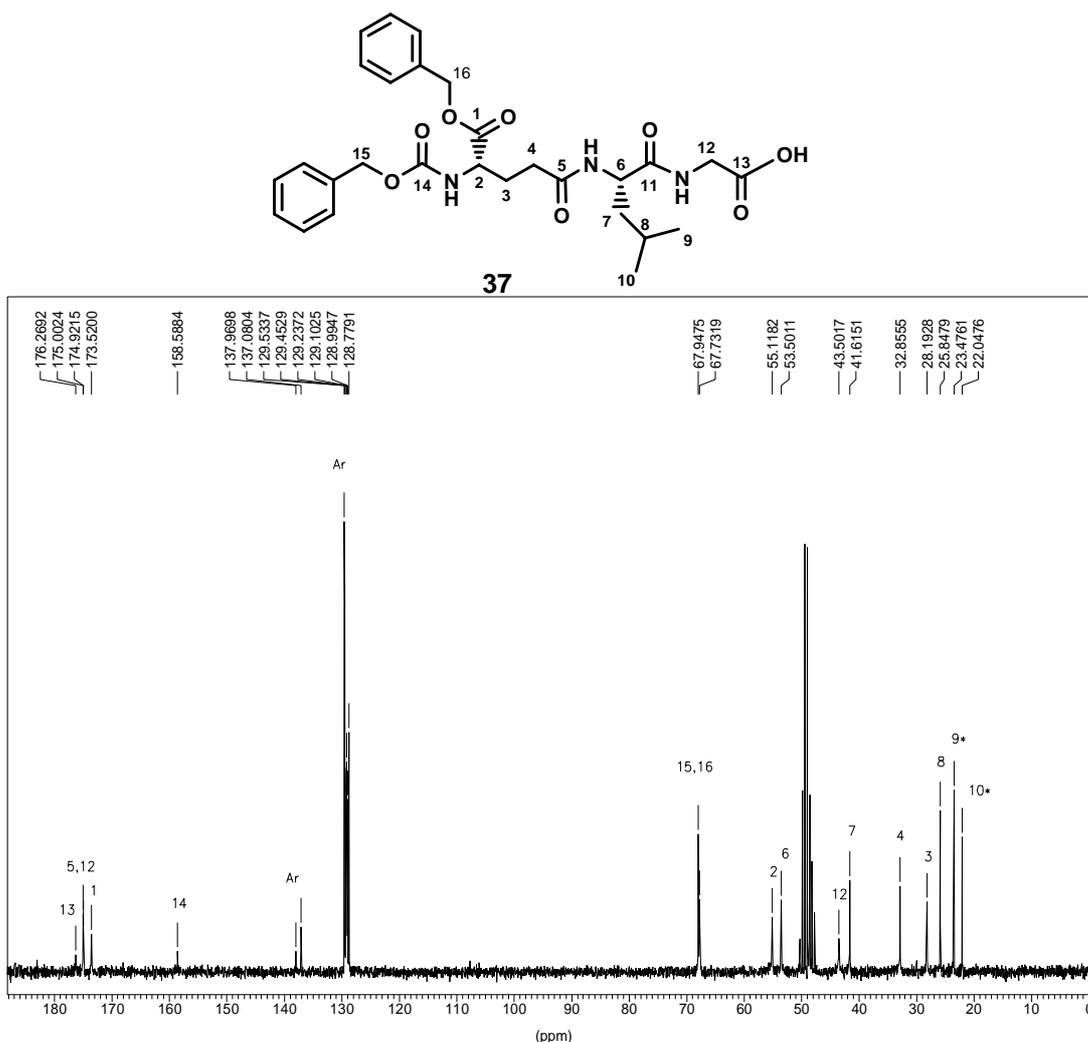
ppm y 0,92 ppm, con constantes de acoplamiento de 6,6 Hz y 6,2 Hz, respectivamente, correspondientes a los dos metilos y dos multipletes superpuestos entre 1,48 ppm y 1,74 ppm correspondientes a los otros 3 hidrógenos de este grupo. Las señales correspondientes al residuo de ácido glutámico son bien características: por un lado, los dos multipletes correspondientes a sendos hidrógenos  $\beta$  geminales, entre 1,80 ppm y 2,05 ppm la primer señal, y entre 2.05 ppm y 2,20 ppm la segunda; por otro lado, un triplete distorsionado centrado a 2,37 ppm. correspondiente a los hidrógenos  $\gamma$ . Continuando a campos más bajos se observaban las señales de los hidrógenos  $\alpha$  de los tres residuos de aminoácido: un sistema *AB* centrado a 3,77 ppm, correspondiente a los hidrógenos geminales de glicina, un doblete centrado a 4,24 ppm, con constantes de acoplamiento de 9,5 Hz y 4,8 Hz,



**Figura 2.4.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del tripéptido diprotectado **37**. \*,\*\* Asignaciones intercambiables

respectivamente, correspondientes al hidrógeno  $\alpha$  de ácido glutámico y otro doble doblete centrado a 4,36 ppm, con constantes de acoplamiento de 8,4 Hz y 6,2 Hz, correspondiente al hidrógeno  $\alpha$  de leucina. Finalmente, se encontraban dos singuletes a 5,11 ppm y 5,15 ppm, correspondientes a los metilenos bencílicos de los grupos protectores, y las señales de hidrógenos aromáticos superpuestas, correspondientes al éster bencílico y al carbamato bencílico.

En cuanto al espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observaron, a campos altos, las señales correspondientes al isopropilo de leucina a 22,0 ppm, 23,5 ppm y 25,8 ppm, luego, las señales correspondientes a los carbonos  $\beta$  y  $\gamma$  de ácido glutámico, a 28,2 ppm y 32,9 ppm, respectivamente. A 41,6 ppm se observó la señal correspondiente al carbono  $\beta$  de leucina. Luego, continuando a campos más bajos, las señales correspondientes a los carbonos  $\alpha$  de



**Figura 2.5.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del tripeptido **37**. \* Asignaciones intercambiables

Gli, Leu y Glu a 43,5 ppm, 53,5 ppm y 55,1 ppm, respectivamente. Se observaron también las señales de los carbonos oxigenados a 67,7 ppm y 67,9 ppm, así también como seis señales de aromáticos entre 128,7 ppm y 129,6 ppm, y las 2 señales de aromáticos cuaternarios a 137,1 ppm y 138,0 ppm. Finalmente se observaron las señales de los 5 carbonilos de la molécula: a 158,6 ppm la señal correspondiente al carbonilo de carbamato, luego, a 173,5 ppm la señal correspondiente al ester bencílico, a 174,9 ppm y 175,0 ppm las dos señales casi superpuestas de los 2 carbonilos de amida y, finalmente, a 176,3 ppm la señal correspondiente al carboxilo terminal.

## 2.6 Acoplamiento con poliaminas

La dificultad que surge en el acoplamiento de poliaminas con el tripéptido es la regioselectividad de la reacción, especialmente para poliaminas que presentan dos grupos amino primarios, como era el caso de los derivados **46**, **48**, **57** y **58**.

### 2.6.1 Acoplamiento con espermidina

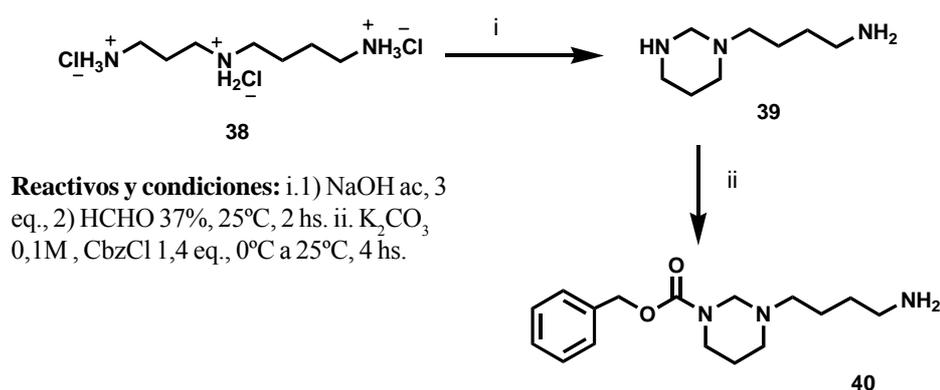
#### 2.6.1.1 Diferenciación del $N^1$ y $N^8$ de espermidina

Con respecto a los análogos de glutationilespermidina, compuestos **46** y **48**, era necesario diferenciar los dos grupos amino primario terminales. Quedó descartada desde un principio la protección de un solo nitrógeno utilizando exceso de amina ya que la reactividad de ambos es idéntica a los efectos prácticos y, al ser la molécula asimétrica, se obtendrían mezclas de productos protegidos en  $N^1$  y  $N^8$ , cuya separación sería impráctica.

Otra opción era la síntesis *de novo* de la molécula, convenientemente protegida, partiendo 1,3-diaminopropano y <sup>84</sup> Sin embargo, una alternativa más interesante era aprovechar la asimetría presente en la molécula para diferenciar ambos átomos de nitrógeno.

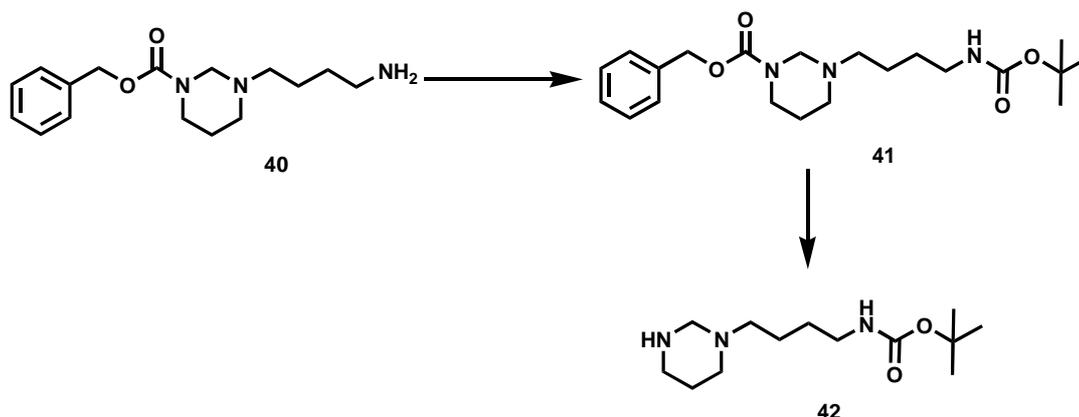
Tanto espermidina como otras poliaminas han sido ampliamente estudiadas debido a su gran relevancia en distintas funciones celulares.<sup>27</sup> Existe abundante bibliografía de trabajos de síntesis de derivados de poliaminas, en particular de espermidina. En algunos de ellos<sup>85-87</sup> se utilizó esta estrategia para diferenciar los nitrógenos de la misma, mediante la formación de un puente metileno entre  $N^1$  y el  $N^4$  y la posterior diferenciación de ambos nitrógenos mediante la protección ortogonal de los mismos. En este compuesto se encuentran los tres nitrógenos diferenciados como primario, secundario y terciario. Entonces, es posible realizar una protección selectiva sobre el átomo de nitrógeno secundario, el cual aumentará su carácter nucleofílico al estar ahora incorporado a un ciclo de seis átomos.

De esta forma, se preparó  $N^1, N^4$  metilenespermidina (**39**) con leves modificaciones respecto de la bibliografía.<sup>85</sup> En este caso se partió del triclorhidrato de espermidina en lugar de la amina libre, obteniéndose **39** prácticamente puro luego de finalizada la reacción con un 82% de rendimiento. El compuesto **39** se disolvió en una solución acuosa de  $K_2CO_3$  0,1 M y se trató con 1,4 equivalentes de cloroformiato de bencilo (CbzCl) a 0 °C, llevándolo luego a temperatura ambiente durante 4 horas. Se obtuvo el compuesto **40** como un aceite amarillento con un 54 % de rendimiento crudo prácticamente puro según los espectros de RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  (Esquema 2.4).



**Esquema 2.4.** Protección regioselectiva del  $N^1$  de espermidina.

Para acoplar la poliamina por el  $N^1$ , se puede utilizar este mismo intermediario y proteger el  $N^1$  con el grupo tertbutoxicarbonilo, para luego desproteger selectivamente el  $N^8$  mediante hidrogenación catalítica (Esquema 2.5).

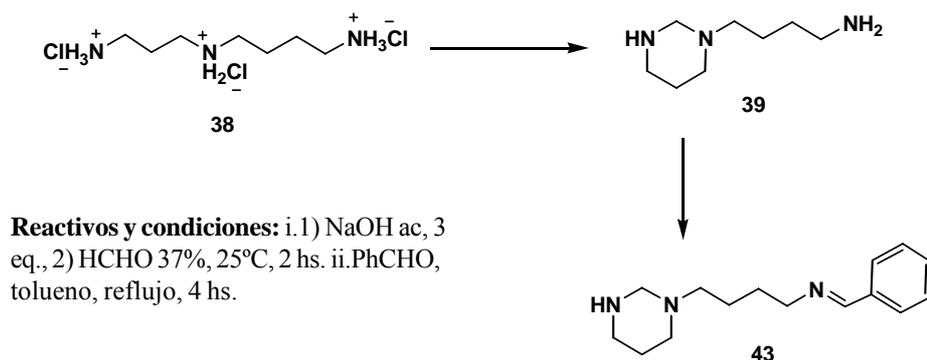


**Esquema 2.5.** Protección del  $N^8$  de espermidina utilizando grupos ortogonales.

La desventaja de esta estrategia radica en la incorporación de un paso adicional al final de la síntesis ya que además de la remoción de los grupos protectores del tripéptido protegido habría que realizar una hidrólisis ácida para eliminar el grupo tertbutoxicarbonilo. Además, para llegar al análogo de  $N^1$  glutationil espermidina (**44**) llevaría 5 pasos a partir de espermidina para llegar a tener la poliamina convenientemente protegida más un paso adicional al final de la síntesis.

Por este motivo se optó por aprovechar nuevamente la diferencia de reactividad de los nitrógenos, esta vez invirtiendo la regioselectividad, mediante la formación de la bencilimina **43**. Además, el grupo bencilimina podría ser eliminado al final de la síntesis, por hidrogenólisis junto con los demás grupos protectores del compuesto.

El intermediario **39** se trató con 1 equivalente de benzaldehído recién destilado, en tolueno. Se llevó a reflujo y se retiró el agua de reacción mediante una trampa Dean-Stark, manteniendo el reflujo durante 4 hs. Luego de evaporar el solvente se obtuvo la bencilimina **43** con un 98% de rendimiento, prácticamente puro según los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Esquema 2.6).



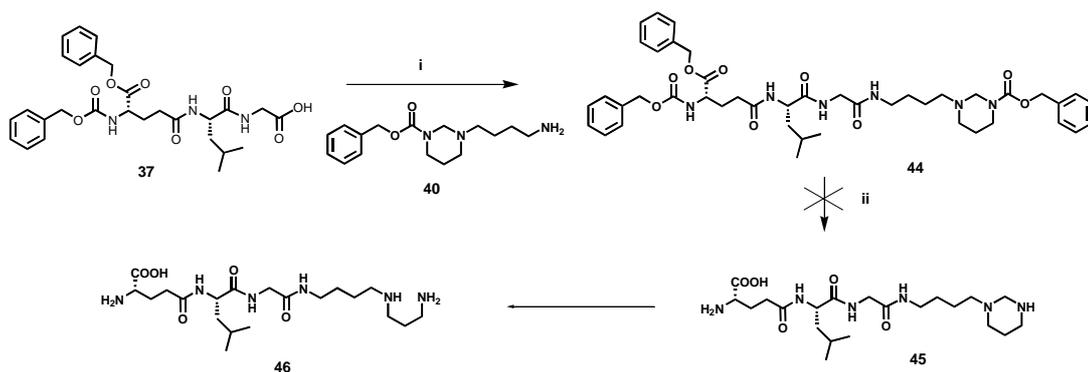
**Esquema 2.6.** Protección regioselectiva del  $N^8$  de espermidina.

### 2.6.1.2 Acoplamiento con el tripéptido

Se intentó acoplar el derivado de espermidina **40** al tripéptido diprotectado **37**, para dar el precursor **44** del análogo de homoglutationilespermidina **46** de la misma manera que en la preparación del tripéptido. Si bien fue posible preparar el éster *N*-hidroxisuccimidilo, caracterizándolo, no hubo formación de producto al tratar el mismo con la amina. Se decidió entonces realizar el agregado de la amina *in situ*, sin aislamiento previo del éster activo. El tripéptido **37** se trató, entonces, con DCC y HON-Su en dioxano.

Luego de comprobar la formación del éster activo por cromatografía en capa delgada, se trató la mezcla de reacción con una solución de la poliamina **40** en tetrahidrofurano para dar el derivado protegido **44**. El compuesto **44** se obtuvo con un 57% de rendimiento luego de su purificación por cromatografía en columna de sílicagel (Esquema 2.7).

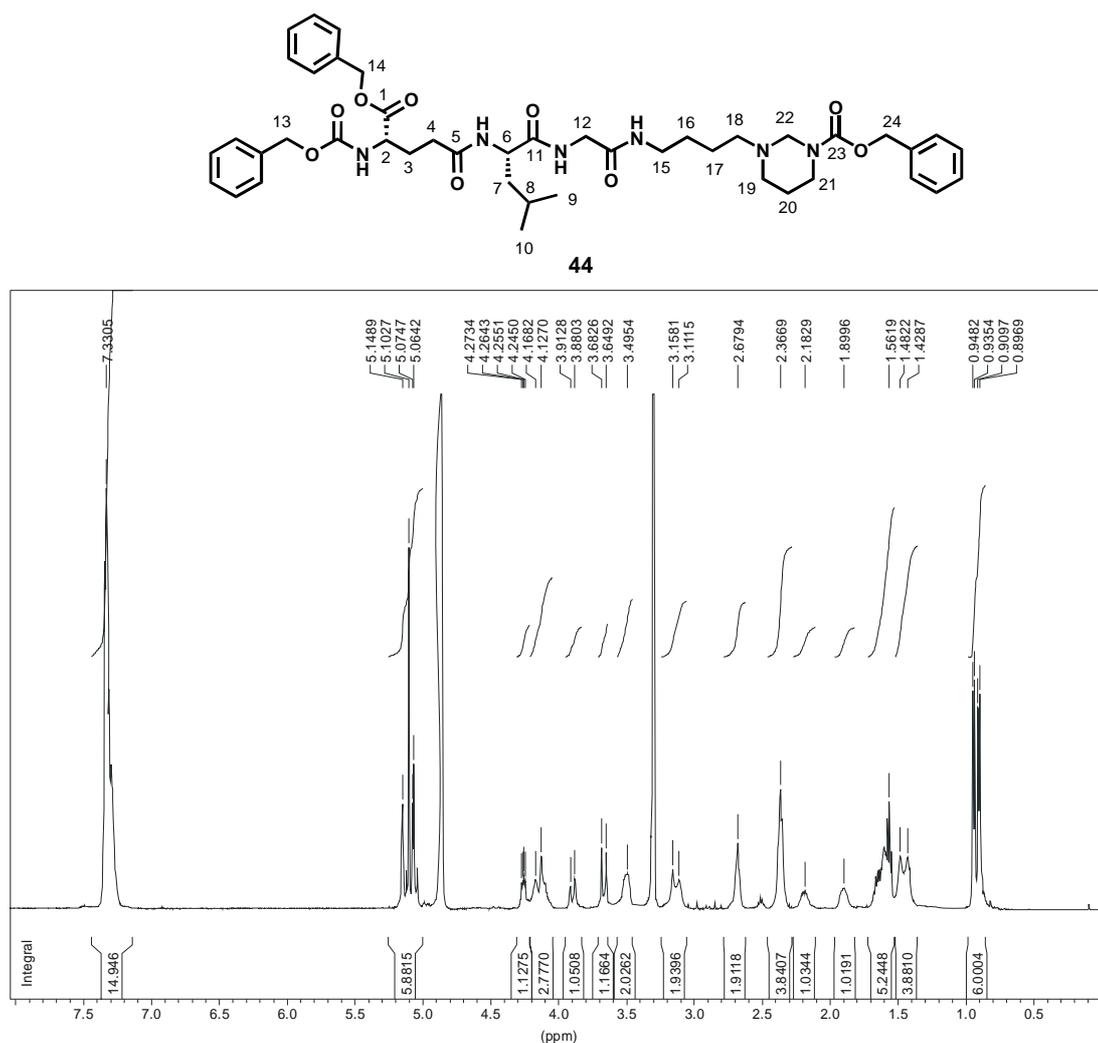
En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de **44** se pudieron reconocer las señales características de la estructura tripeptídica, y sumadas a ellas, las señales correspondientes al residuo de espermidina. En la Figura 2.6 se pueden apreciar las señales de 6 metilenos alifáticos provenientes del residuo de poliamina entre 1,48 ppm y 1,69 ppm (H-16, H-17) y entre 1,52 y 1,65 ppm (H-20), esta última superpuesta a las



**Reactivos y condiciones:** i. 1) DCC, HON-Su, dioxano, 25°C, 16 hs. 2) i. ii. H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, 25°C, 2hs

**Esquema 2.7** Ruta sintética para del análogo de N<sup>8</sup>-glutationilespermidina **46**

señales correspondientes al residuo de leucina (H-7, H-8). Siguiendo hacia campos bajos se observaron las señales de los metilenos nitrogenados a 2,37 ppm (H-18)



**Figura 2.6.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **44**.

, 2,67 ppm (H-19), 3,10 ppm (H-15) y 3,45 ppm (H-21). Se encontró, superpuesta a la señal de carbono  $\alpha$  del residuo de ácido glutámico, el singlete correspondiente al puente metileno entre el  $N^1$  y  $N^8$  del residuo de espermidina (H-22), a 4,13 ppm. Finalmente, se encontraron las 3 señales correspondientes a los metilenos bencílicos de los 3 grupos protectores, a 5,07 ppm, 5,10 ppm y 5,15 ppm, y la señal de aromáticos que integra para 15 protones, correspondiente a dichos grupos.

El análisis de los espectros de correlación homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , y heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , facilitó la asignación de las señales de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Las mismas fueron asignadas en forma casi unívoca. En el Apéndice B se presentan dichos espectros con las asignaciones correspondientes.

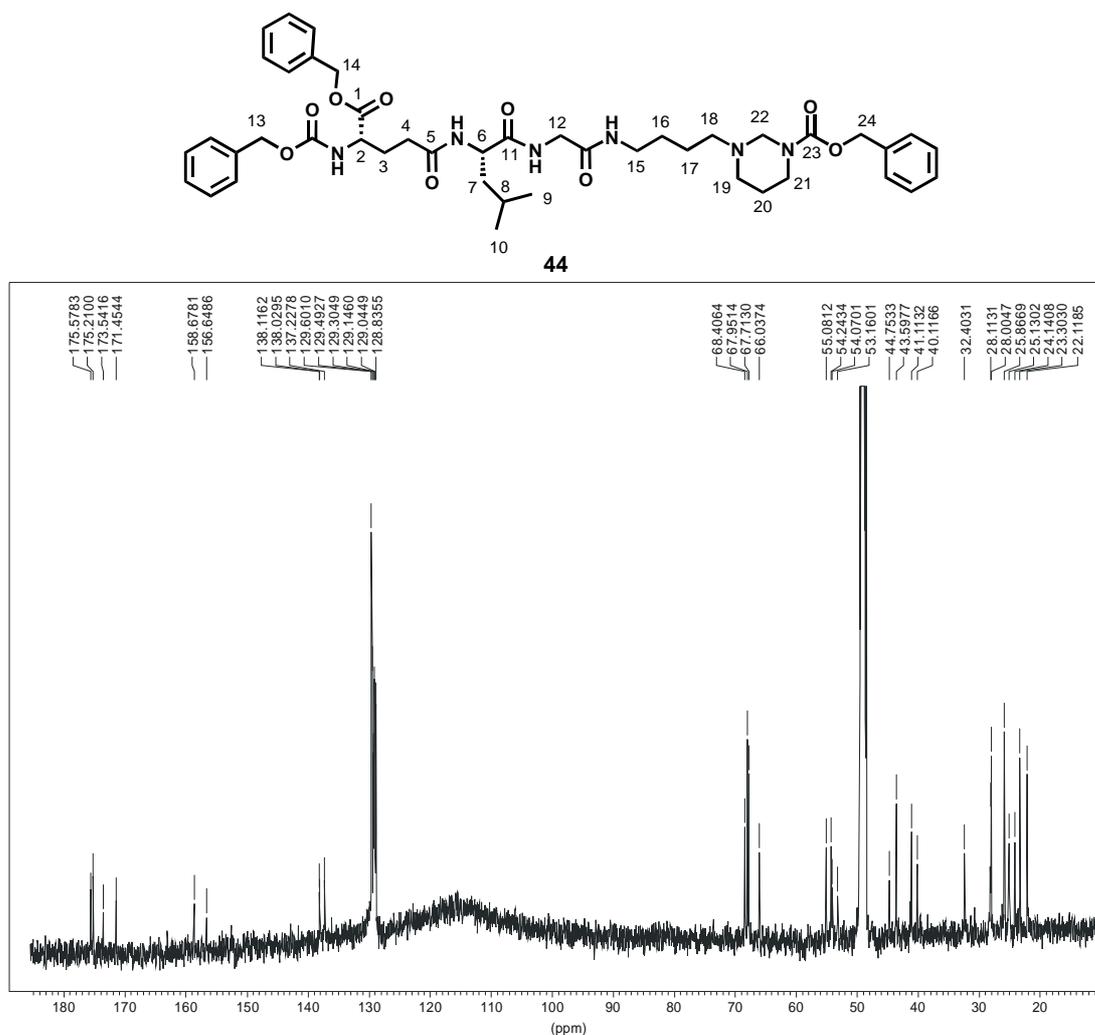


Figura 2.7. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 44.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  que se presenta en la Figura 2.7 pudieron apreciarse las señales correspondientes a los carbonos del residuo de metilenespermidina. Las señales correspondientes a los metilenos alifáticos del mismo se encontraron a 23,7 ppm (C-20), 24,1 ppm (C-17) y 28,0 ppm (C-16) y las señales de carbonos metilénicos nitrogenados se encontraron a 40,1 ppm (C-15), 44,8 ppm (C-21), 53,2 ppm (C-18), 54,1 ppm (C-19) y 66,0 (C-22). Finalmente se pudieron observar además de las señales correspondientes a los 3 grupos protectores: 3 señales de carbonos bencílicos oxigenados a 67,7 ppm, 68,0 ppm y 68,4 ppm y 2 señales de carbonilo de carbamato a 156,6 ppm y 158,7 ppm y, finalmente, las cuatro señales de carbonilo de amida restantes a 171,5 ppm, 173,5 ppm, 175,2 ppm y 175,6 ppm.

Sorprendentemente, cuando este compuesto se sometió a hidrogenación catalítica a una presión de 3 atmósferas de  $\text{H}_2$ , durante 2 horas se obtuvo una mezcla compleja de productos no pudiendo aislarse el producto deseado. El análisis de la mezcla de reacción por cromatografía en capa delgada indicó la desaparición del producto de partida (Esquema 2.7).

Paralelamente se intentó acoplar, mediante el mismo método, el derivado **43** con el tripéptido diprotectado **37**, sin embargo no pudo aislarse de la mezcla de reacción el producto deseado. Dado que el grupo imino puede ser inestable se transformó la bencilimina **43** en la correspondiente bencilamina, más estable, **47**, por tratamiento con 6 equivalentes de  $\text{NaBH}_4$  en metanol a  $0^\circ\text{C}$ , con un 68% de rendimiento luego de la purificación por cromatografía en columna (sílicagel) eluyendo con una mezcla de cloruro de metileno-metanol-amoníaco 25% en proporción 85:15:1 (Esquema 2.8).



**Reactivos y condiciones:**  $\text{NaBH}_4$ , 6 eq., MeOH,  $0^\circ\text{C}$ , 1 h.

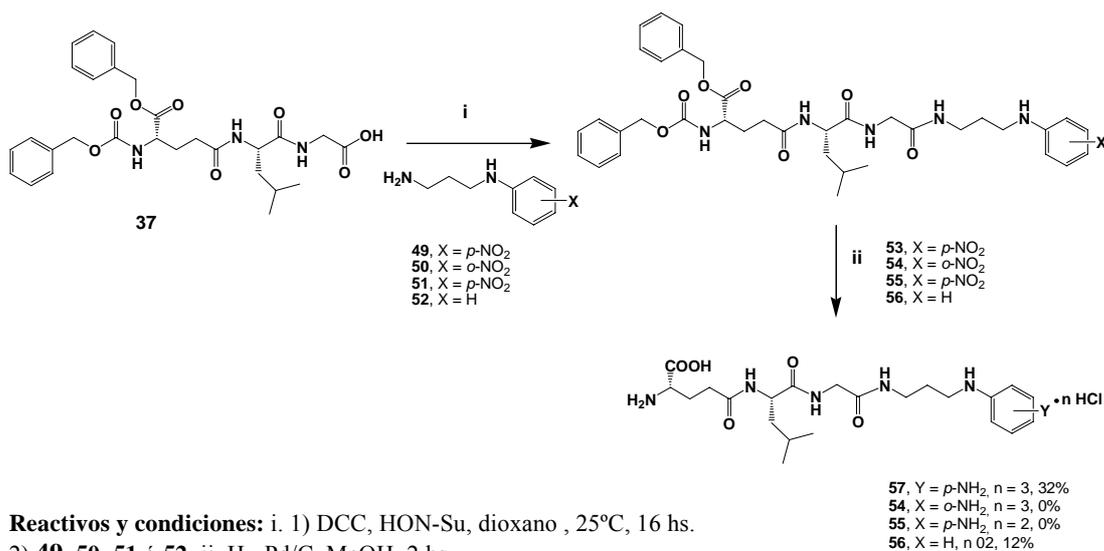
**Esquema 2.8.** Reducción de la bencilimina **43**.

Nuevamente se intentó el acoplamiento, ahora de la bencilamina **47**, con el tripéptido diprotectido **37**, y en este caso también se obtuvo una mezcla compleja de productos.

## 2.7 Acoplamiento con poliaminas aromáticas

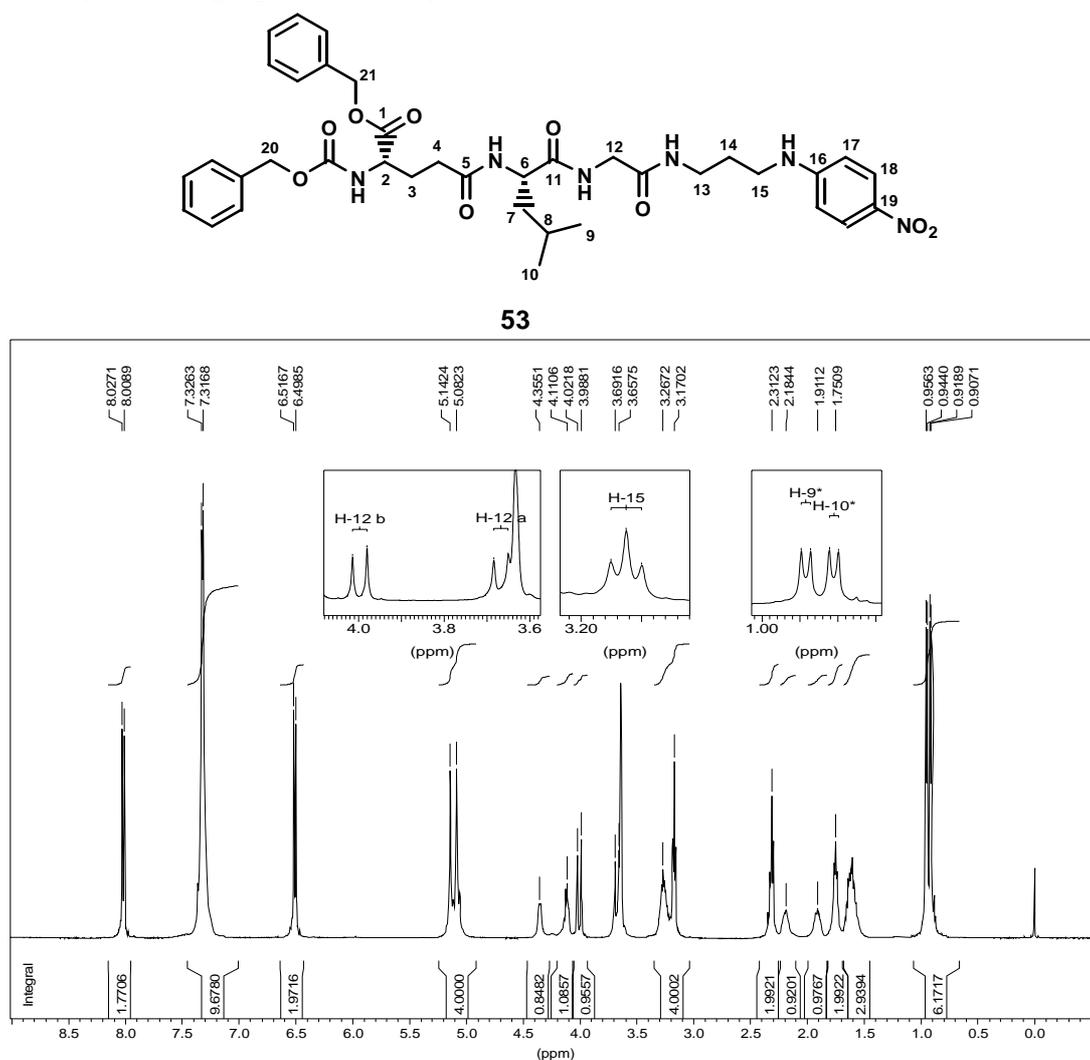
Para la síntesis de los derivados **57y 58** la diferenciación de ambos grupos amino no constituyó un problema ya que la reacción de acoplamiento al tripéptido **37** se llevó a cabo empleando como sustratos *p*-nitrofenilpropildiamina (**56**) y *o*-nitrofenilpropildiamina (**46**), los cuales fueron reducidos a la amina aromática correspondiente en el paso final de hidrogenación catalítica, empleada para la remoción de de los grupos protectores, como se indica en el Esquema 2.9. La reacción de acoplamiento se llevó a cabo de manera similar a la descrita para los derivados de espermidina.

La purificación por cromatografía en columna (sílicagel) de los crudos de reacción dio lugar a los derivados protegidos con rendimientos que oscilaron entre 58% y 93%. Estos derivados se caracterizaron por caracterizados por RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.



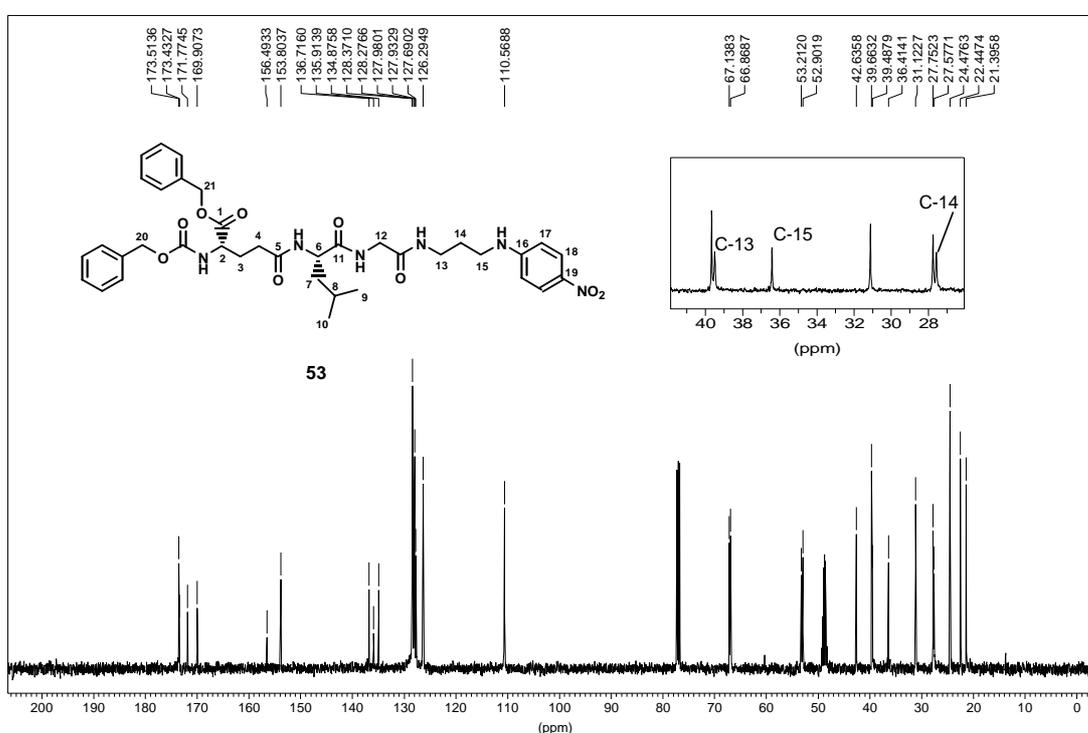
**Esquema 2.9.** Acoplamiento con poliaminas aromáticas.

Tomando como ejemplo el derivado **53**, se pudo observar en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 2.8) como se incorporaban las señales correspondientes al residuo de poliamina respecto del espectro del tripéptido **37**. Por un lado, las señales correspondientes al grupo diaminopropilo: un multiplete centrado a 1,75 ppm correspondiente los hidrógenos metilénicos centrales de este residuo (H-14), un triplete centrado a 3,17 ppm con constante de acoplamiento de 6,4 Hz correspondiente al metileno  $\alpha$  al grupo aminofenilo (H-15) y un multiplete centrado a 3,27 ppm correspondiente al metileno  $\alpha$  a la nueva unión amida (H-13). Por otro lado, las señales correspondientes al grupo nitrofenilo: dos dobletes centrados a 6,50 ppm y 8,10 ppm con constantes de acoplamiento de 9,1 Hz correspondientes a los hidrógenos arílicos en posición *meta* y *orto* al grupo nitro, respectivamente.



**Figura 2.8.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **53**.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 2.9) se observaban también las nuevas señales correspondientes al grupo diaminopropilo a 31,7 ppm (C-14), 35,3 ppm (C-15) y 43,6 ppm (C-13) y al grupo nitrofenilo, respectivamente. De estas últimas se diferencian claramente las señales cuaternarias, sobre todo el carbono cuaternario aromático, unido al grupo amino (C-16) a 153,8 ppm y el carbono *orto* al mismo, a 110,6 ppm (C-17).



**Figura 2.9.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del **57**.

Estos derivados de poliamina protegidos se hidrogenaron en presencia de paladio sobre carbono 5% (catalizador), en metanol a una presión de 3 atmósferas a fin de obtener los derivados de poliamina libres **57–60**.

La reacción de hidrogenólisis fue aparentemente cuantitativa en todos los casos, según el control de reacción llevado a cabo por cromatografía en placa delgada. Sin embargo, inmediatamente después de la filtración para eliminar el catalizador, los derivados desprotegidos resultaron algo inestables una vez en contacto

con la atmósfera, probablemente por oxidación del grupo fenilamino. Se intentó obtener estos derivados como clorhidrato pero no fue posible su cristalización, lo cual imposibilitó la purificación de los mismos. De todas formas, los derivados **53** y **56** fueron parcialmente purificados por cromatografía en columna (RP-18) como para poder caracterizarlos satisfactoriamente por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **53** (Figura 2.10) se observaron básicamente las mismas señales que en el precursor protegido, en lo que se refiere a los hidrógenos del esqueleto peptídico. En cuanto a las señales aromáticas se observó la ausencia de los protones correspondientes a los grupos protectores del residuo ácido glutámico, y un acercamiento de las señales aromáticas del residuo poliamina: dos dobletes centrados a 7,64 ppm y 7,79 ppm con constantes de acoplamiento de 8,2 Hz, producto del corrimiento a campos altos del hidrógeno *orto* al grupo amino primario resultante (H-18) de la reducción del grupo nitro, y del corrimiento a campos bajos del hidrógeno *orto* al grupo amino secundario (H-17) por protonación del mismo.

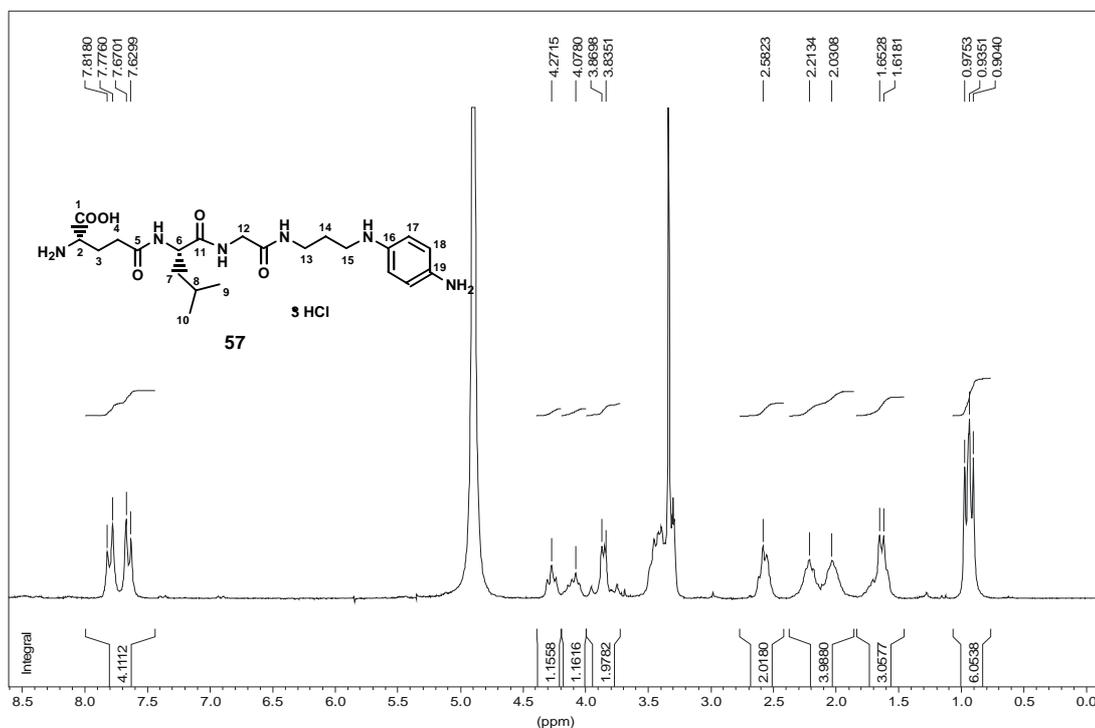


Figura 2.10. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del **57**.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 2.11), se observó, de la misma manera, la desaparición de las señales correspondientes a los grupos protectores y el corrimiento de las señales correspondientes carbonos aromáticos mencionados en el precursor como característicos, C-16 y C-17. Si bien no se pudo asignar unívocamente las señales del grupo diaminofenilo, se pudo apreciar el efecto que tuvo la protonación del grupo amino secundario ya que la señal del carbono unido al amino secundario (C-16) se desplazó de 153,8 ppm en el precursor, a 133,2 ppm o 137,5 ppm. Mientras que la señal correspondiente al carbono *orto* al amino secundario (C-17) se desplazó de 110,6 ppm, en el precursor, a 126,0 o 126,5 ppm en el producto final. Como se mencionó anteriormente, estos derivados no fueron productos muy estables, de todas maneras se realizaron sobre ellos los correspondientes ensayos biológicos los cuales serán descriptos en el Capítulo 4.

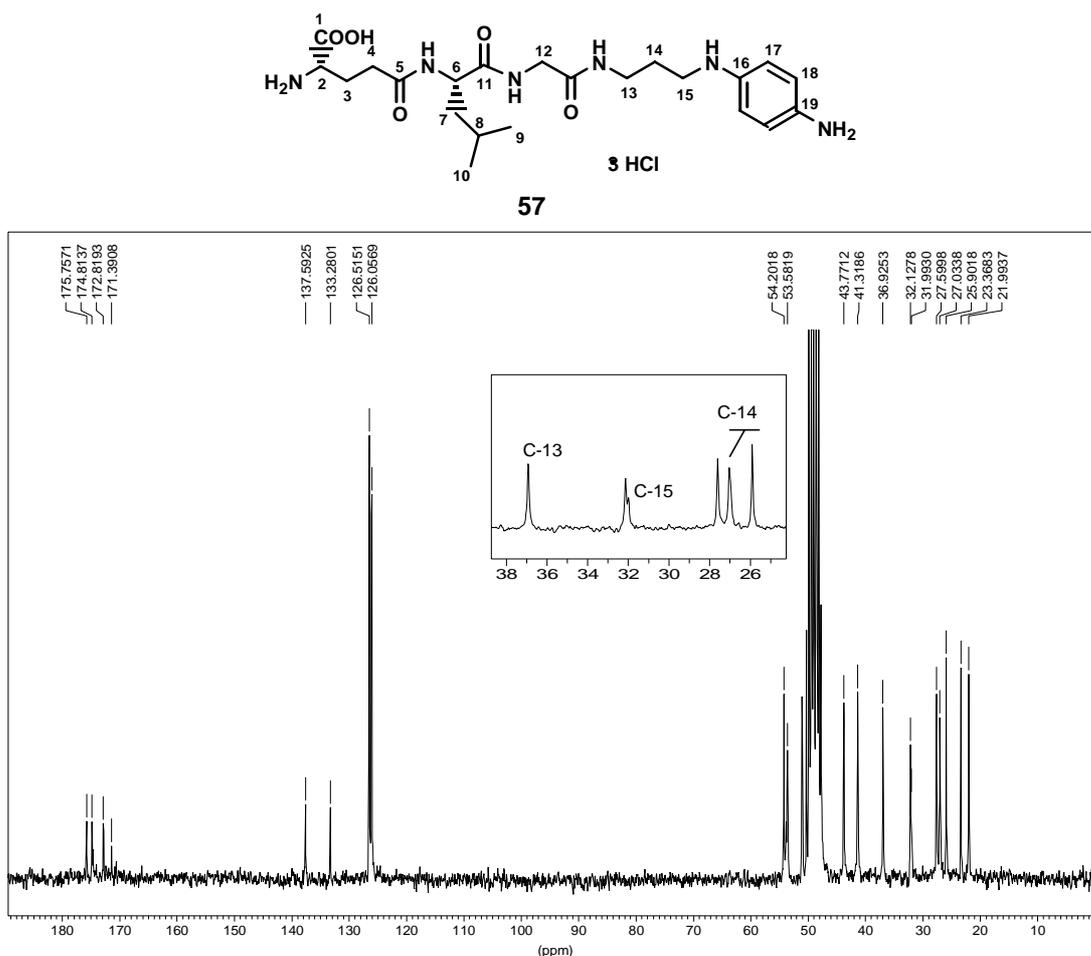


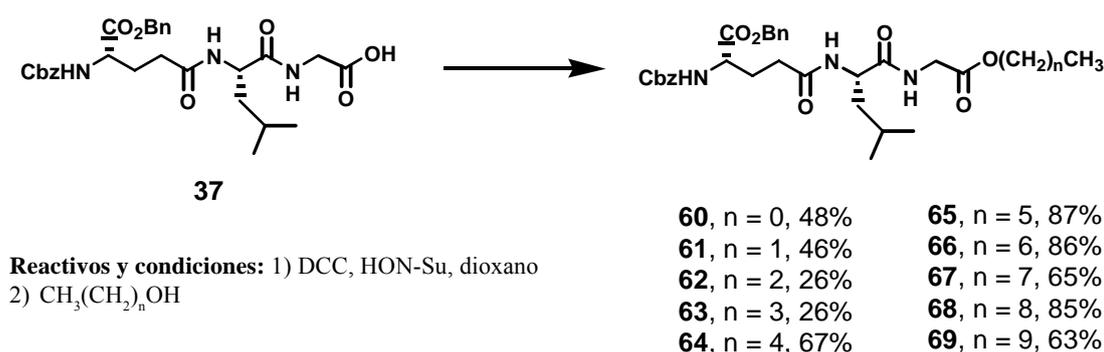
Figura 2.11. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del 57.

Teniendo en cuenta que la síntesis de derivados de poliamina era muy trabajosa y de resultados inciertos para plantear un estudio de la relación estructura actividad rigurosa, ya que la síntesis y purificación tanto de productos intermedios como finales consumía demasiado tiempo, se decidió seleccionar blancos moleculares más accesibles desde el punto de vista sintético motivados por la búsqueda de un farmacóforo simple que pudiera optimizarse *a posteriori*.

## 2.8 Acoplamiento con alcoholes

Al igual que los derivados poliamina, una vez verificada la activación del tripéptido por cromatografía en capa delgada se agregó el alcohol correspondiente a la mezcla de reacción para dar el precursor *N,O* diprotegido. Se obtuvieron rendimientos de entre 25% y 48% para los alcoholes de hasta 4 átomos de carbono y de entre 63% y 87% para los de mayor peso molecular como se indica en el Esquema 2.10.

Estas reacciones de esterificación se llevaron a cabo utilizando alcoholes comerciales a excepción de 1-heptanol y 1-nonanol, los cuales fueron preparados a partir de los ácidos



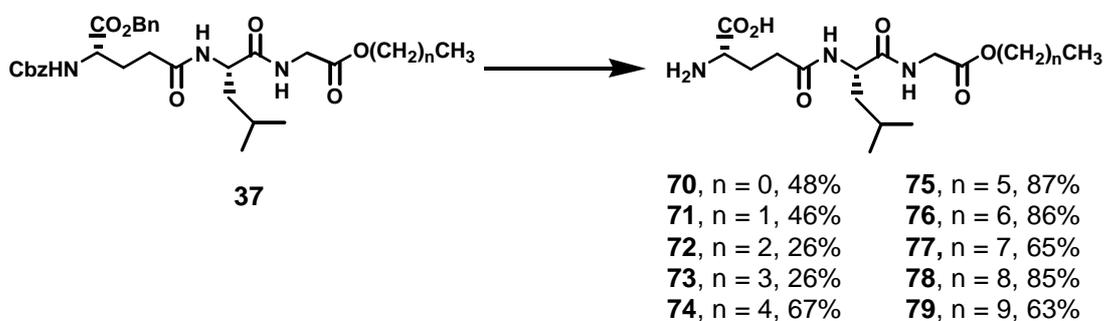
**Esquema 2.10.** Acoplamiento de **37** con alcoholes lineales.

carboxílicos correspondientes, por esterificación con metanol seguida de reducción con tratamiento con LiAlH<sub>4</sub>.

La purificación de los ésteres protegidos se realizó por cromatografía en columna (sílicagel) eluyendo con mezclas de hexano–AcOEt. Sin embargo, sucesivas purificaciones cromatográficas no llevaron a la total eliminación de dicitclohexilurea remanente en la mayoría de los derivados. Para obtener muestras libres de esta impureza fue necesario recrystalizar de etanol o isopropanol. El contenido de dicitclohexilurea fue analizado por cromatografía gaseosa.

Debido a la dificultad en la purificación de los precursores sintéticos se decidió hidrogenar los mismos parcialmente purificados y aprovechar la gran diferencia de movilidad en sistemas cromatográficos entre los productos finales desprotegidos y dicitclohexilurea. De esta forma, los ésteres de  $\gamma$ -L-Glu-L-Leu-Gly-OH se purificaron por cromatografía en columna (sílicagel) utilizando como solvente de elución AcOEt–MeOH (4:1), minimizando la altura de la misma para reducir la pérdida del producto dada su gran afinidad por la fase fija.

La desprotección de los precursores se llevó a cabo por hidrogenación catalítica a una presión de 3 atmósferas, durante 2 horas, en presencia de Pd/C 5%. Ambos grupos protectores fueron completamente eliminados en todos los casos. (Esquema 2.11).



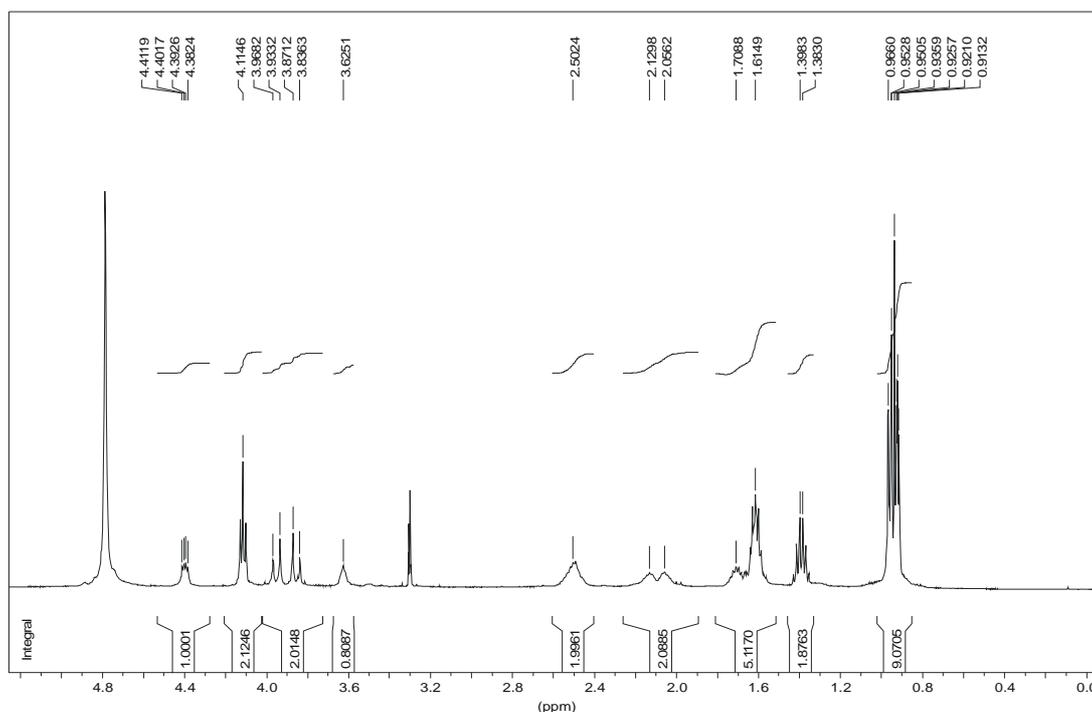
**Esquema 2.11.** Desprotección de los ésteres.

**Reactivos y condiciones:** H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, 25°C, 2 hs

A pesar de la gran polaridad de los derivados ésteres del tripéptido su purificación por cromatografía en columna (sílicagel) fue factible. Es muy importante destacar que en compuestos tan polares existe una pérdida de masa considerable en la purificación por cromatografía en columna. Esta pérdida de masa se vio reflejada en el descenso del rendimiento de la hidrogenación catalítica, reacción que ocurre generalmente con elevados rendimientos.

A modo de ejemplo se presentan en las Figuras 2.12 y 2.13 los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto **73** respectivamente. Nuevamente, se observaron en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  las señales correspondientes a los 3 residuos tripeptídicos. Además de las últimas, se observaron las señales correspondientes a la cadena alquílica. La señal correspondiente al metilo terminal (H-16) se presentó como un triplete centrado a 0,93 ppm con constante de acoplamiento de 7,4 Hz superpuesto a los dos dobletes centrados a 0,92 ppm y 0,96 ppm con constantes de acoplamiento de 6,3 Hz correspondientes a los metilos del residuo de leucina. Siguiendo hacia campos bajos, se pudo observar un multiplete centrado a 1,38 ppm correspondiente al metileno adyacente al metilo terminal (H-15). El siguiente metileno (H-14) se superpuso con las señales correspondientes a los 3 hidrógenos restantes del residuo de leucina, entre 1,52 y 1,77 ppm. Finalmente, el metileno oxigenado de la cadena alquílica (H-13) presentó un triplete centrado a 4,11 ppm y una constante de acoplamiento de 6,5 Hz.

En cuanto al espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observó la señal característica de carbono oxigenado de éster a 66,1 ppm (C-13), además de las señales a campos



**Figura 2.12** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **73**

más altos de la cadena alquílica. Hacia campos más bajos se pudo comprobar la presencia de cuatro señales correspondientes a los cuatro carbonilos presentes en la molécula: a 171,3 ppm la señal correspondiente a carbonilo de éster, a 174.0 ppm la señal correspondiente a carbonilo de ácido y a 175,1 ppm y 175,6 ppm las señales correspondientes a carbonilos de amida. La señal correspondiente al carbonilo de ácido carboxílico es fácilmente distinguible de las otras por ser más ancha, debido al efecto del extremo aminoácido libre, el cual, en una solución sin pH regulado provoca, por intercambio de protones, un ensanchamiento en las señales de los núcleos cercanos. Este mismo efecto se pudo observar en la señal correspondiente al carbono  $\alpha$  del residuo de ácido glutámico, a 55,4 ppm, adyacente al grupo amino libre.

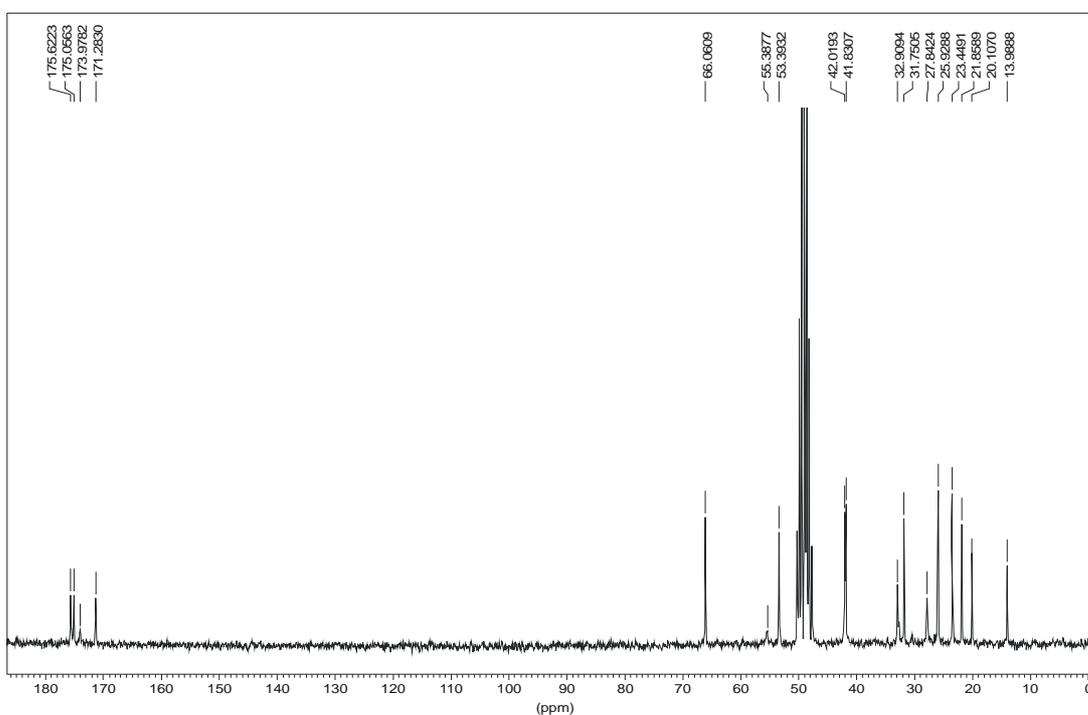
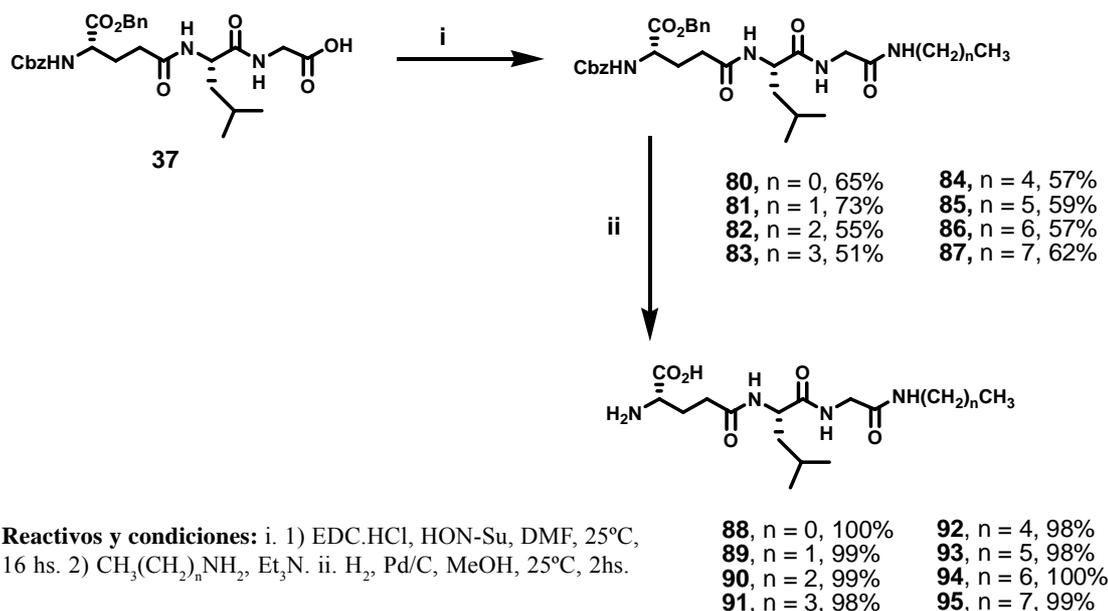


Figura 2.13 Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **73**

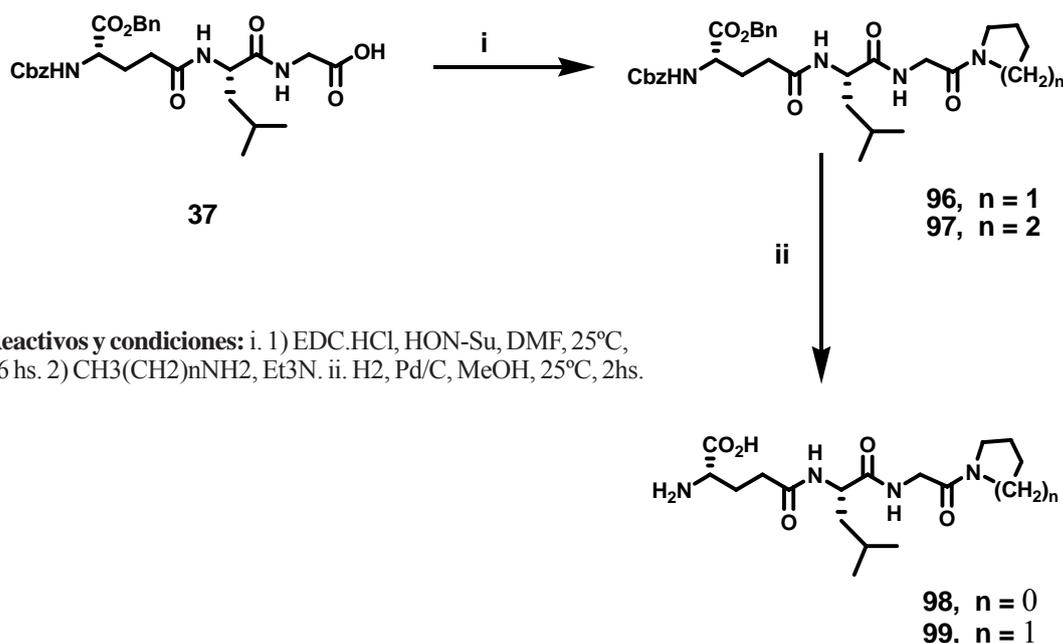
## 2.9 Acoplamiento con aminas

De la misma manera que en el caso de los ésteres de  $\gamma$ -L-Glu-L-Leu-Gly-OH, las amidas fueron preparadas por condensación del tripéptido **37** con aminas lineales de distinto peso molecular. A raíz de los inconvenientes surgidos durante la purificación de los precursores protegidos en los ésteres, se decidió utilizar una carbodiimida soluble en agua, clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida, (EDC·HCl) como agente acoplante, en reemplazo de diciclohexilurea. La activación del tripéptido se llevó a cabo de manera similar a los ésteres, esta vez en DMF anhidra, y una vez verificada la formación del éster de *N*-hidroxisuccinimida, se inyectó la amina correspondiente para dar el derivado amida protegido con rendimientos entre 51% y 73% (Esquemas 2.12 y 2.13). En el caso de las aminas volátiles de uno y dos carbonos, éstas se agregaron en forma de clorhidrato las que luego fueron liberadas *in situ* con trietilamina.



**Esquema 2.12.** Síntesis de derivados amida lineales

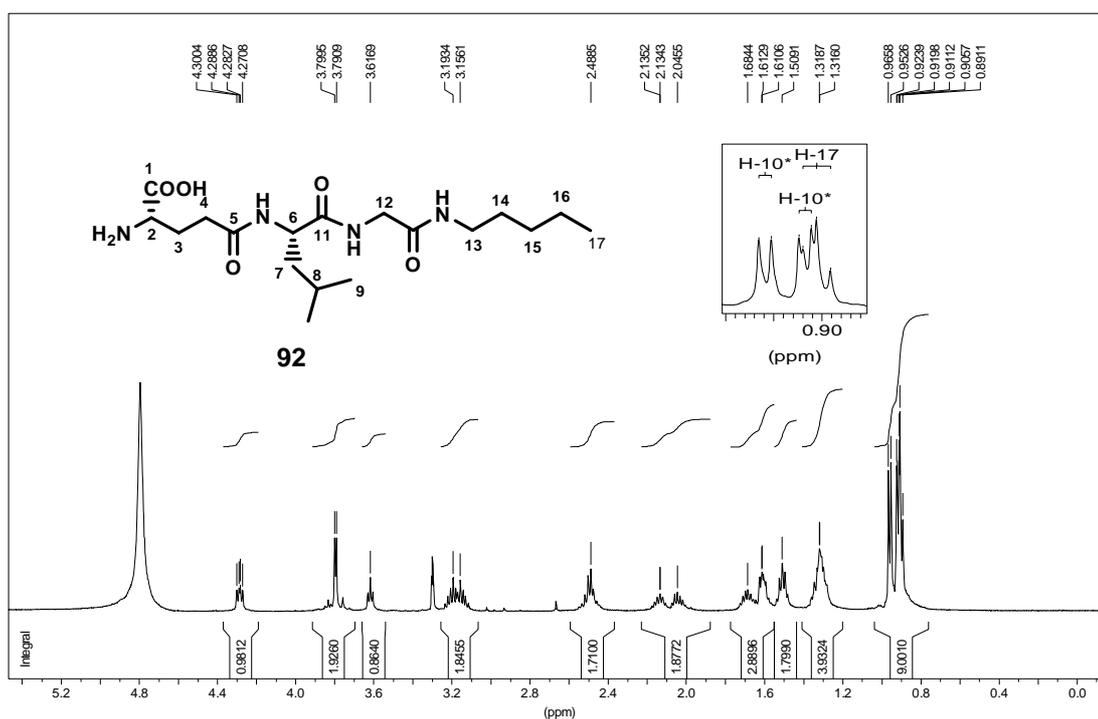
Los derivados amida *N,O* diprottegidos se purificaron por cromatografía en columna (sílicagel), y en algunos casos, por posterior recristalización. A diferencia de los derivados



**Esquema 2.13.** Síntesis de derivados amida cíclicas

ésteres, los precursores protegidos de los derivados de amidas lineales se obtuvieron con alto grado de pureza, de manera que al eliminar los grupos protectores en forma cuantitativa, no hubo necesidad de purificar los productos finales. Los precursores puros se sometieron a hidrogenación catalítica en las mismas condiciones que los derivados de ésteres.

En las Figura 2.14 y 2.15 se presentan los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto **92**, respectivamente. Al igual que en los derivados de éster se observaron en el espectro de RMN <sup>1</sup>H, como siempre, las señales correspondientes a los residuos de los tres aminoácidos del tripéptido. Como señal característica de esta serie de derivados se observaron, en este compuesto, dos multipletes superpuestos centrados a 3,16 ppm y a 3,20 ppm, correspondientes a los hidrógenos geminales del metileno unido al nitrógeno del residuo de amina alifática (H-13a, H-13b). La señal correspondiente al metilo terminal (H-17) se observó como un triplete centrado a 0,91 ppm con una constante de acoplamiento de 7,2 Hz, superpuesto a un de los dos dobletes correspondientes a los metilos del residuo de leucina. Éstos aparecieron centrados a 0,92 ppm y 0,96 ppm, con constantes de acoplamiento de 6,4 Hz. Siguiendo hacia campos bajos, se observó la señal correspondiente a los dos metilenos siguientes al metilo terminal (H-15 y H-16), entre 1,24 ppm y 1,38 ppm. Al igual que en los derivados ésteres, esta señal aumenta proporcionalmente al largo de la cadena alquílica para los distintos derivados .



**Figura 2.14** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **92**

En cuanto al espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observó la señal del carbono nitrogenado de amida a 44,4 ppm (C-13), además de las señales a campos más altos de la cadena alquímica. También en este compuesto, el espectro presentó señales correspondientes a los cuatro carbonilos presentes en la molécula: a 172,2 ppm la señal correspondiente a carbonilo de amida de la cadena alquímica, a 174.7 ppm la señal correspondiente a carbonilo de ácido y a 176,2 ppm y 176,4 ppm las correspondientes a carbonilo de amida de la cadena peptídica.

La evaluación biológico de los compuestos descritos en este capítulo se analizará en el Capítulo 4.

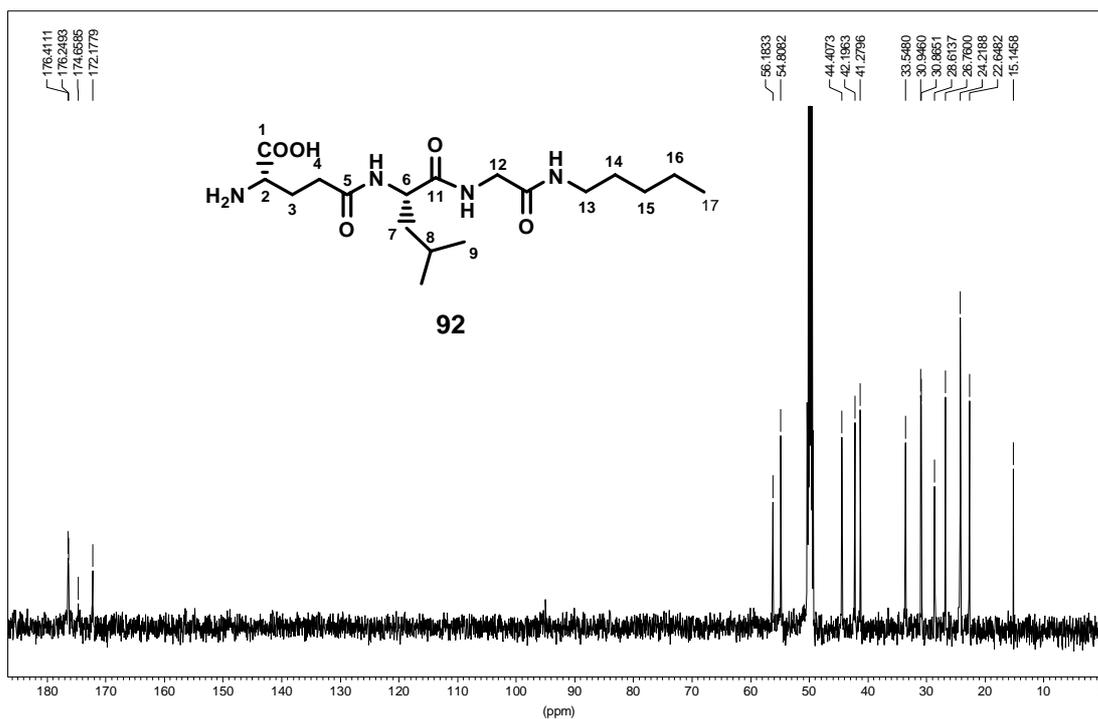


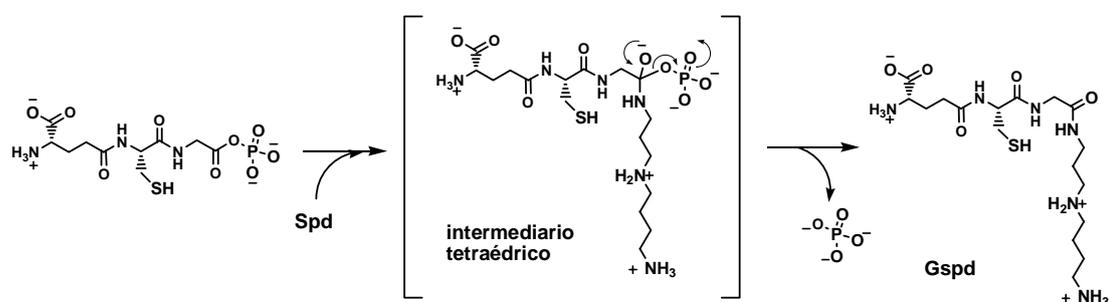
Figura 2.15 Espectro de RMN <sup>13</sup>C de **92**.

**Capítulo 3: Síntesis de análogos del estado de transición de GspS y TryS**



### 3.1 Introducción

Como se ha mencionado en la introducción general, tanto GspS como TryS, pertenecen al grupo de las C:N ligasas, ya que ambas catalizan la formación de una unión amida entre glutatión y espermidina. Se ha postulado el siguiente mecanismo dependiente de ATP, en el cual se fosforila glutatión y, luego, sufre el ataque nucleofílico de una molécula de espermidina. Por lo tanto, la reacción transcurriría a través de un intermediario tetraédrico como se indica en el Esquema 3.1.<sup>88</sup>

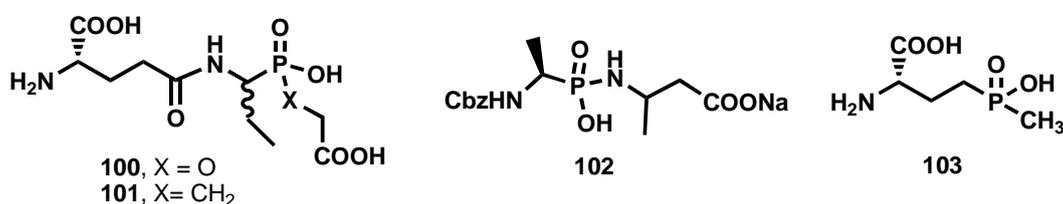


**Esquema 3.1.** Estado de transición tetraédrico de GspS

Teniendo en cuenta este postulado, aceptado para un gran número de ligasas, una estrategia tangible para el diseño de inhibidores de este tipo de enzimas sería la de simular estructural y electrónicamente el estado de transición tetraédrico. El reemplazo del carbono  $sp^2$  del carboxilo del residuo de la unidad de glicina de glutatión por un grupo que contenga un átomo con geometría tetraédrica y una distribución electrónica similar al del estado de transición postulado llevaría a un mimético del mismo, el cual actuaría como un inhibidor de la actividad enzimática de dichas enzimas.

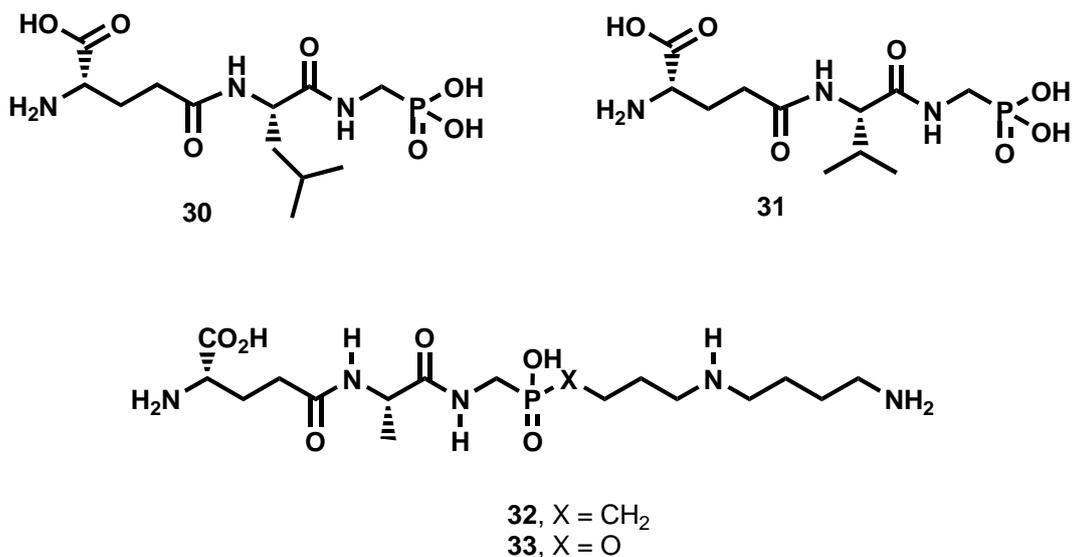
#### 3.1.1 Antecedentes

Como se mencionó anteriormente, existen antecedentes de diseño y síntesis de miméticos del estado de transición de enzimas C:N ligasas para su bloqueo. Se encontró que distintos fosfinatos y grupos funcionales relacionados estructuralmente imitan bien esta estructura. Por ejemplo, distintos fosfinatos y fosfonatos sintéticos actúan como inhibidores de glutatión sintetasa<sup>89</sup> y glutamina sintetasa,<sup>90</sup> mientras que fosfonamidatos son inhibidores de D-Ala-D-Ala ligasa<sup>91</sup> (Figura 3.1). Los compuestos **101**, **102** y **103** fueron inhibidores competitivos de glutatión sintetasa ( $K_i = 53$  nM), D-Ala-D-Ala ligasa ( $K_i = 4$  mM) y glutamina sintetasa ( $K_i = 0,9$  mM), respectivamente.



**Figura 3.1.** Fosfonatos, fosfinatos y fosfonamidatos que actúan como miméticos del estado de transición.

En cuanto a las enzimas que son el objeto de estudio de esta tesis, los compuestos **30** y **31**, mencionados en la introducción, son los primeros antecedentes de fosfonatos aplicados a éstas enzimas o estrechamente relacionadas a ellas. Se realizó el reemplazo isostérico del grupo carboxilo en los tripéptidos análogos a glutatión L- $\gamma$ -Glu-L-Leu-Gli-OH, y L- $\gamma$ -Glu-L-Val-Gli-OH por un grupo ácido fosfónico, obteniéndose inhibidores competitivos de GspS de *C. fasciculata* ( $K_i = 60$   $\mu$ M (**30**) y 290  $\mu$ M (**31**)).<sup>32</sup> En los compuestos **32** y **33**, desarrollados posteriormente, se incluyó en la estructura del tripéptido L- $\gamma$ -Glu-L-Ala-Gli-OH una unidad de poliamina tipo espermidina, a través de un grupo fosfonato o fosfinato. Estos compuestos se ensayaron también en GspS, pero de *E. coli*, con excelentes resultados en cuanto su potencia inhibitoria ( $K_i = 6.0$   $\mu$ M (**32**) y 3.2  $\mu$ M (**33**)), aunque no existen datos sobre su actividad celular contra trypanosomas patógenos (Figura 3.2).<sup>33</sup>



**Figura 3.2.** Fosfonatos y fosfinatos con actividad inhibitoria contra GspS.

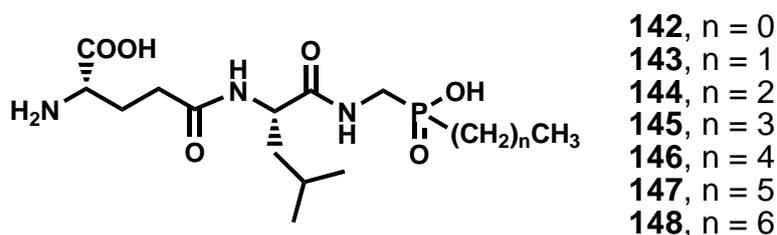
### 3.2 Diseño de los inhibidores

La evaluación biológica de los derivados sintetizados en el transcurso de este trabajo de tesis, descritos en los capítulos anteriores, presentaba dos problemas fundamentales: por un lado, la susceptibilidad a la actividad amidasa/estearasa encontrada en GspS, puesta en evidencia en los derivados de amida y éster de L- $\gamma$ -Glu-L-Leu-Gli-OH; por otro lado, la inestabilidad química y la dificultad en la manipulación y purificación de derivados que incorporan estructuras de poliamina. En particular, en el caso de las poliaminas tipo espermidina, surge además el problema de la regioselectividad en la poliamina, lo que aumenta la complejidad para la obtención de derivados, haciéndola impráctica, desde el punto de vista sintético, para establecer una relación estructura química-actividad biológica en este tipo de derivados. Dada la complejidad sintética para acceder a derivados de **32** y **33**, se decidió encarar la búsqueda de un farmacóforo simple para su reconocimiento molecular.

La incorporación de un grupo funcional del tipo fosfinato eliminaría el problema de la actividad amidasa/estearasa de estas enzimas; además, convertiría a estos derivados en miméticos del estado de transición tetraédrico. Se decidió, entonces, sintetizar derivados

fosfinatos que contuvieran cadenas hidrocarbonadas de distinto largo. Esto daría la posibilidad de obtener derivados accesibles sintéticamente y simplificar el análisis estructura-actividad de los mismos en relación a los anteriores derivados ya que se incorporarían los mismos grupos. La variabilidad en el largo de cadena podría dar una idea del requerimiento de tamaño del sustrato en los ensayos enzimáticos y de polaridad requerida para los ensayos en parásitos. Finalmente, la ventaja de utilizar un grupo fosfinato en lugar de fosfonato radica en que la cadena carbonada se incorpora mediante la formación de un enlace P-C, no hidrolizable químicamente, frente al enlace O-C de un fosfonato, lo que llevaría a derivados químicamente más estables.

Entonces, manteniendo siempre el triéptido base L- $\gamma$ -Glu-L-Leu-Gli-OH se diseñaron y sintetizaron y evaluaron biológicamente los siguientes análogos fosfinopeptídicos como se indica en la Figura 3.3.



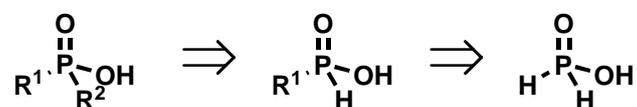
**Figura 3.3.** Fosfinopeptidos sintéticos diseñados con inhibidores de TryS.

### 3.3 Síntesis

Del análisis de la estructura se reconoce fácilmente una parte peptídica convencional que contiene a los residuos Glu y Leu, y una parte modificada que es la correspondiente al análogo aminoácido fosfínico de Gli. Por lo tanto, y de manera inmediata, se puede ver que la síntesis se centrará en la preparación de los aminoácidos fosfínicos análogos a glicina y, una vez preparados, se acoplarán con el dipéptido L- $\gamma$ -Glu-L-Leu-OH (**36**) mediante una reacción de acoplamiento similar a las aplicadas en los derivados anteriores.

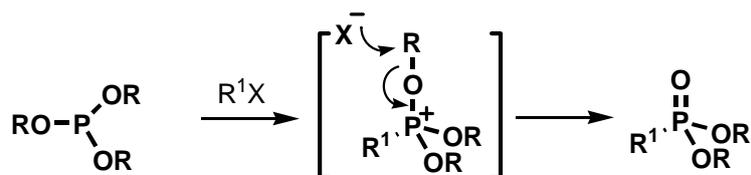
### 3.3.1 Ácido $\alpha$ -aminofosfínico

El análisis retrosintético del ácido aminofosfínico es inmediato y consta de la incorporación sucesiva de dos sustituyentes  $R^1$  y  $R^2$  a una unidad de ácido hipofosforoso, donde  $R^1$  es una cadena alquílica y  $R^2$  es un grupo aminometilo. Ambas incorporaciones se realizan a través de la formación de un enlace C-P. La reacción clave es la incorporación del primer grupo a partir del ácido inorgánico (Esquema 3.2).



**Esquema 3.2.** Análisis retrosintético para la obtención del ácido fosfínico.

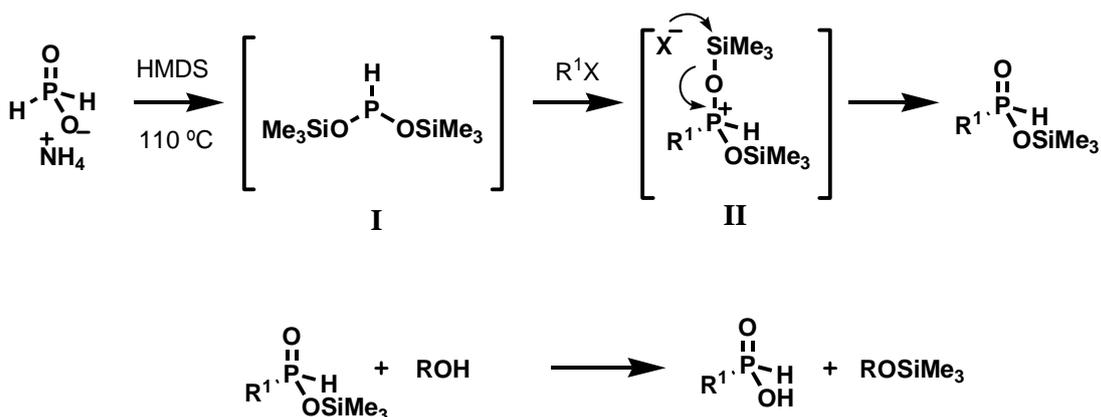
La introducción del primer grupo se puede realizar a través de una modificación de la reacción de Michaelis-Arbusov,<sup>92</sup> ampliamente utilizada para síntesis de fosfonatos a partir de fosfitos de trialquilo. Este tipo de reacciones transcurre a través de la formación de una sal de fosfonio seguida de un ataque nucleofílico del ión haluro correspondiente ( $X^-$ ) al carbono oxigenado (Esquema 3.3).



**Esquema 3.3.** Reacción de Michaelis-Arbusov.

De manera análoga, la introducción del grupo  $R^1$  se puede dar en fosfinatos a través de la generación *in situ* de fosfonito de bis(trimetilsililo) (**I**), a partir de la reacción directa entre hipofosfito de amonio y hexametildisilazano (HMDS) a 110 °C.<sup>93</sup> Este intermediario puede reaccionar, análogamente a los fosfitos de trialquilo, con halogenuros de alquilo para dar el intermediario fosfonio (**II**) que, a su vez, lleva al silil éster. Finalmente, durante el

“work-up”, se realiza la alcoholólisis del alquilfosfinato de trimetilsililo para dar el ácido *H*-fosfínico libre (Esquema 3.4).

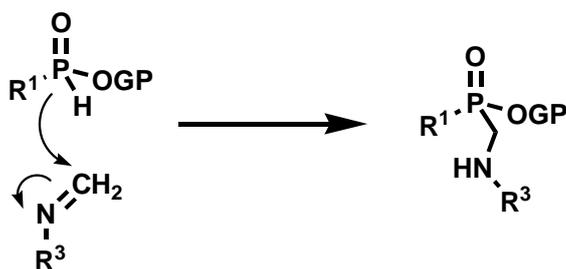


**Esquema 3.4.** Incorporación de la cadena alquílica al fosfinato.

Esta reacción había sido ensayada utilizando como electrófilos a cetonas  $\alpha,\beta$  insaturadas dando aductos tipo Michael. También se empleó con halogenuros de alquilo reactivos.<sup>94,95</sup>

Se decidió, entonces, incorporar en primera medida la cadena hidrocarbonada mediante el uso de ioduros o bromuros de alquilo y, una vez obtenido el ácido *H*-fosfínico, adicionar luego el grupo aminometilo.

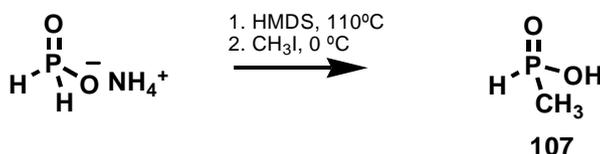
Para la incorporación del grupo aminometilo se empleó una variante de la reacción de Abramov, ampliamente utilizada en síntesis de fosfonatos.<sup>96</sup> En la reacción de Abramov un *H*-fosfonato se adiciona a un carbonilo para dar un  $\alpha$ -hidroxifosfonato. De la misma manera, los *H*-fosfinatos se pueden adicionar tanto a un grupo carbonilo como también a un grupo imino para dar el correspondiente aminometilfosfinato. En principio, el protón unido al átomo de fósforo se puede abstraer con una base, pero también es posible realizar la reacción en condiciones más suaves catalizando la reacción con un ácido de Lewis (Esquema 3.5).<sup>97</sup>



Esquema 3.5. Incorporación del grupo aminometilo

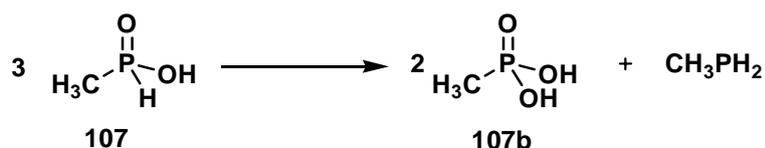
### 3.3.1.1 Preparación de los ácidos *H*-fosfínicos

El ácido metilfosfínico **107** se preparó mediante la reacción modificada de Michaelis-Arbuzov, a partir de hipofosfito de amonio, HMDS y posterior dilución con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y agregado de ioduro de metilo a  $0^\circ\text{C}$  llevando luego a temperatura ambiente, según el método descrito en literatura.<sup>93</sup>



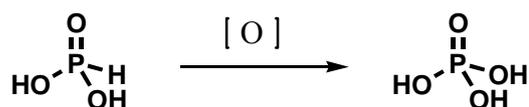
Del análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del producto crudo se pudo confirmar la obtención de **107**. La señal correspondiente al protón unido directamente al átomo de fósforo (H-P) se observó como un doble cuarteto centrado a 7,12 ppm con un fuerte acoplamiento del átomo de hidrógeno con el átomo de fósforo ( $J = 559,6$  Hz) y con los hidrógenos del metilo ( $J = 1,9$  Hz). También se observó la señal correspondiente al metilo como un doble doblete centrado a 1,50 ppm debido al acoplamiento a 2 enlaces entre los hidrógenos del metilo y el átomo de fósforo ( $J = 14,6$  Hz) y al acoplamiento hidrógeno-hidrógeno a 3 enlaces ( $J = 1,9$  Hz), como se ilustra en la Figura 3.4a. Además de las señales propias de este compuesto se observó, en menor proporción, un doblete parcialmente superpuesto al doble cuarteto antes mencionado, centrado a 6,84 ppm con una constante de acoplamiento de 672,0 Hz.

Esta señal minoritaria indicaba la presencia de algún producto secundario o de descomposición presente en el crudo de reacción. El valor de la constante de acoplamiento y el desplazamiento químico de dicha señal llevaron a suponer la presencia de ácido fosfónico **107c**, probablemente como producto de oxidación generado durante la etapa de calentamiento a partir del hipofosfito de amonio. Los intentos por purificar el ácido *H*-metilfosfínico **107** fueron infructuosos, principalmente porque resultó inestable. En el espectro protónico del crudo se pudo notar cómo la señal del protón unido a fósforo disminuía en relación al doble doblete de metilo, hasta llegar a desaparecer completamente al cabo de una semana de almacenamiento a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y bajo atmósfera de argón (Figuras 3.4b y 3.4c). La inestabilidad de este compuesto estaba relacionada a que los ácidos *H*-fosfínicos son susceptibles a desproporcionarse para dar el ácido fosfónico y la alquilfosfina correspondientes como se indica en el Esquema 3.6.

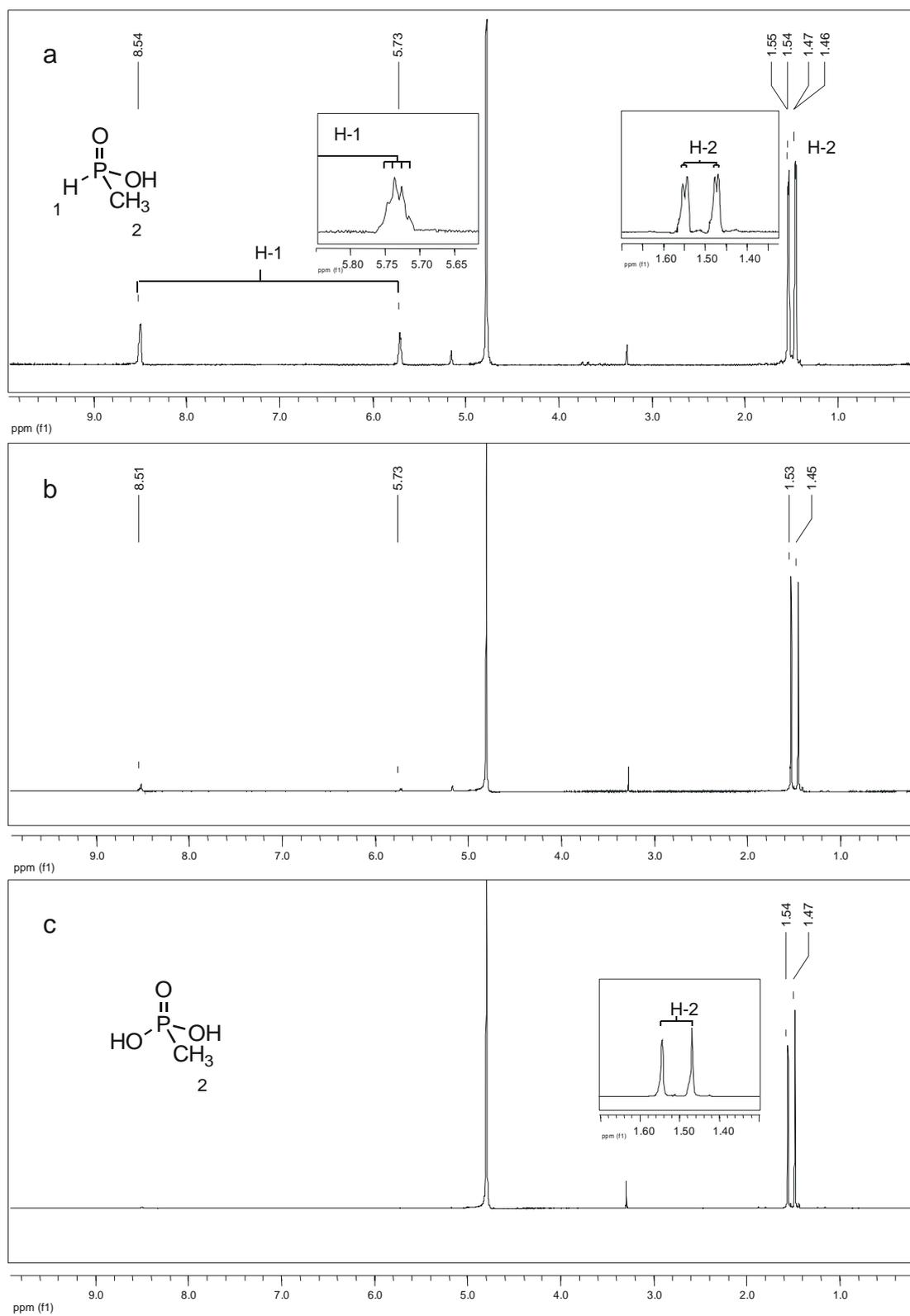


**Esquema 3.6.** Desproporción del ácido *H*-metilfosfínico.

Así, el ácido *H*-metilfosfínico **107** se desproporcionaba en metilfosfina y ácido metilfosfónico **107b**, explicando la desaparición de la señal de H unido a P con el transcurso del tiempo como se ilustra en los espectros de la Figura 3.4, tomados inmediatamente después de cortar la reacción (Figura 3.4a), a las 24 hs (Figura 3.4b) y a la semana (Figura 3.4c). Al igual que la señal de H-P del ácido metilfosfínico, la señal correspondiente al hidrógeno unido a fósforo del ácido fosfónico **107c** desaparecía con el tiempo, debido a la tendencia natural a oxidarse de los compuestos de fósforo con uniones H-P (Esquema 3.7).<sup>98</sup>



**Esquema 3.7.** Oxidación del ácido fosfónico.



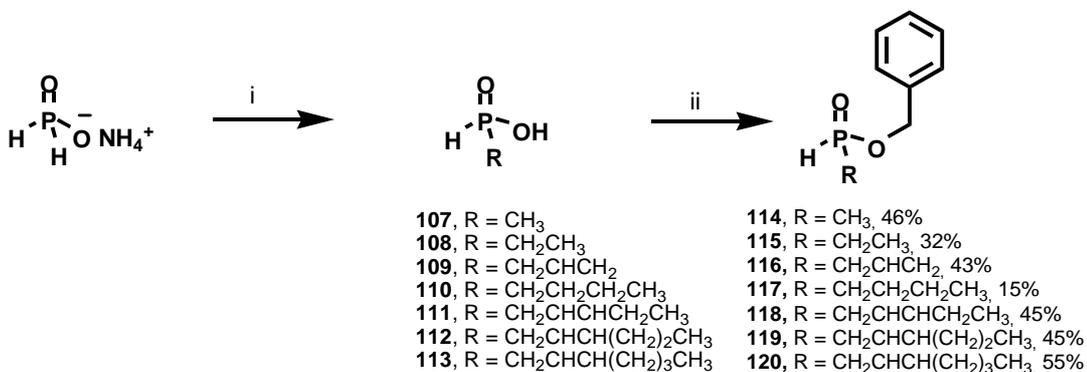
**Figura 3.4.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$ . (a) **104** recién obtenido. (b) **104** a las 24 hs. c) **104** a la semana (**104b**).

El siguiente paso de reacción considerado fue la esterificación del ácido fosfínico con alcohol bencílico empleado como grupo protector para la reacción de Abramov. Para minimizar, entonces, la pérdida de masa por descomposición se decidió utilizar el ácido fosfínico crudo con un “work-up” mínimo para luego proseguir inmediatamente con la esterificación. El mismo se llevó a cabo evitando, dentro de lo posible, el contacto del crudo de reacción con el aire. Se trató inmediatamente el crudo de reacción con alcohol bencílico, dicitclohexilurea y 4-dimetilaminopiridina en cantidades catalíticas a temperatura ambiente. Se obtuvieron los ésteres bencílicos de los ácidos metil y etil fosfínico con rendimientos de 46 % y 32% respectivamente, luego de purificación por cromatografía en columna (sílicagel), a partir de hipofosfito de amonio. Es un hecho conocido que los ésteres metílicos de los ácidos *H*-fosfínicos son inestables por su tendencia a hidrolizarse.<sup>99</sup> Este caso se evidenció también con los ésteres bencílicos, ya que luego de almacenarlos a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bajo atmósfera de argón, se hidrolizaron completamente en menos de 15 días. Entonces, si bien fue posible purificar cromatográficamente y caracterizar sin inconvenientes a los ésteres bencílicos correspondientes, estos compuestos se emplearon inmediatamente después de su preparación para minimizar el proceso de hidrólisis.

La reacción de Arbuzov se llevó a cabo sin inconvenientes empleando halogenuros de alquilo de 1 o 2 átomos de carbono. Cuando se intentó realizar la reacción con ioduro de *n*-pentilo, como fuente de grupo alquilo, la misma no procedió. Dada la menor reactividad de este halogenuro de alquilo frente al de 1 y 2 átomos de carbono, se repitió la reacción elevando la temperatura luego del agregado del halogenuro. Para ello se sustituyó el solvente habitual,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , por 1,2-diclorometano y se realizó la reacción calentándola a reflujo, lo cual condujo a una descomposición del intermediario de reacción, evidenciada por el desprendimiento de fosfinas. El mejor resultado se obtuvo a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , obteniéndose el éster del ácido *n*-pentilfosfínico con un rendimiento global no mayor al 2%. La solución al problema de reactividad se encontró empleando halogenuros alílicos como electrófilos. Si bien se incorpora, de esta manera, una insaturación en la cadena alquímica, esto no afecta al esquema de síntesis ya que, como el último paso es de desprotección de los grupos protectores bencílicos, se pensó que dicha instauración se eliminaría junto con la remoción de estos grupos. De esta manera, se introdujo la cadena de 3 átomos de carbono, utilizando bromuro de alilo

como halogenuro reactivo obteniéndose el éster bencílico del ácido alilfosfínico (**116**) con un 43% de rendimiento a partir de hipofosfito de amonio.

Las cadenas de 5, 6 y 7 átomos de carbono se introdujeron de la misma manera a partir de los ioduros alílicos correspondientes, con rendimientos de entre 45 y 55% para los ésteres bencílicos, a partir de hipofosfito de amonio. En cambio, la cadena de 4 átomos de carbono se introdujo utilizando *n*-iodobutano como electrófilo, obteniéndose sólo un 15% de rendimiento para los ésteres bencílicos, a partir de hipofosfito de amonio (Esquema 3.8). El bajo rendimiento de este derivado se correlaciona con la baja reactividad de los halogenuros alifáticos en la reacción de Arbuzov.



**Reactivos y condiciones:** i. 1) HMDS, 110 °C, 2 hs. 2) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, XR, 0 °C hasta t.a., 16 hs.; ii. BnOH, DCC,

**Esquema 3.8.** Síntesis "one-pot" de ésteres bencílicos de ácidos alquilaminofosfínicos

Los ioduros alílicos se sintetizaron a partir de los alcoholes correspondientes y se usaron inmediatamente después de su preparación ya que fueron inestables. El método de preparación de los ioduros alílicos consistía en tratar a los alcoholes alílicos correspondientes con ioduro de trimetilsilano generado *in situ* a partir de ioduro de sodio y cloruro de trimetilsilano (Esquema 3.9).<sup>100</sup> Los productos se purificaron por columna de alúmina neutra para dar estos reactivos puros de acuerdo al análisis de sus respectivos espectros de RMN <sup>1</sup>H.

La relativa estabilidad de los ácidos *H*-fosfínicos bencilados permitió una caracterización espectroscópica más completa que para los ácidos libres. El análisis del espectro



**104**, n = 1, 66%

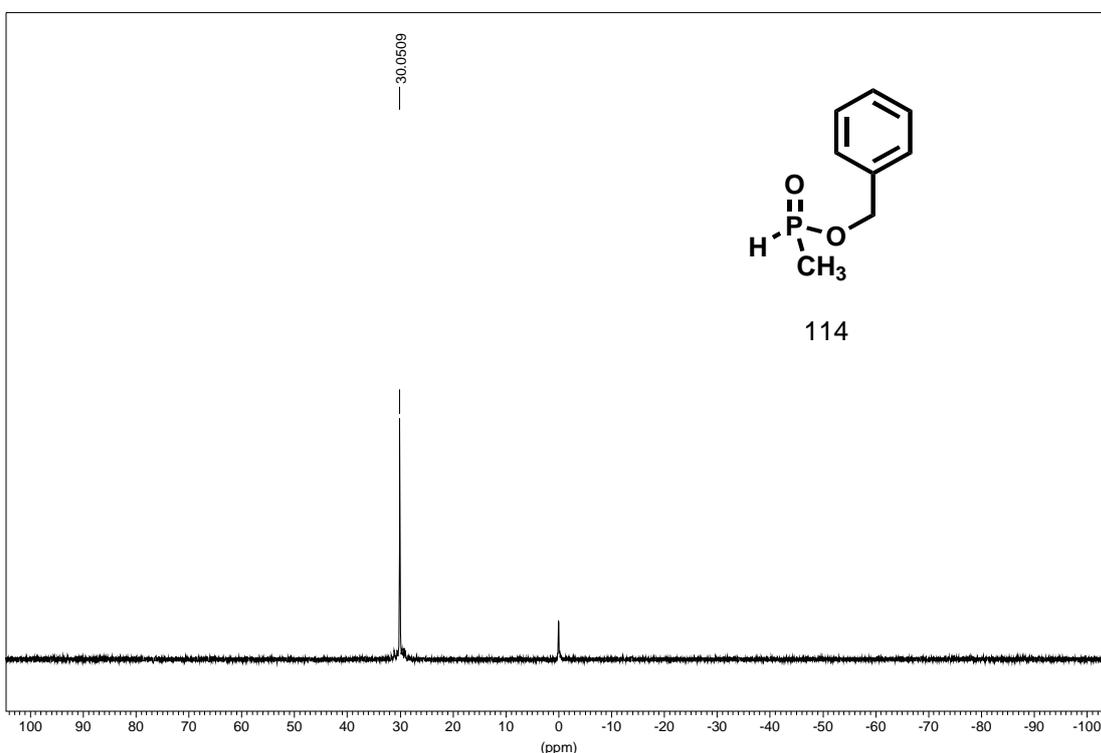
**105**, n = 2, 81%

**106**, n = 3, 83%

**Reactivos y condiciones:** TMSCl, NaI, MeCN, t.a., 30 min.

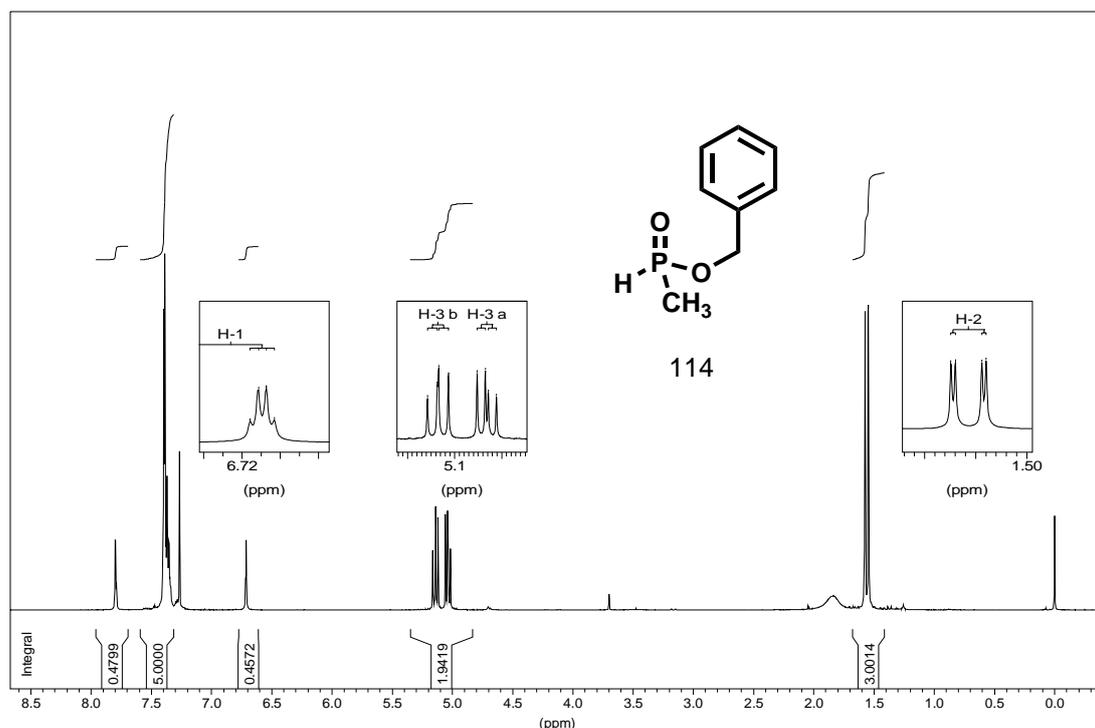
**Esquema 3.9.** Síntesis de ioduros alílicos.

de RMN  $^{31}\text{P}$  confirmó la obtención del compuesto **114**, observándose una única señal a 30,1 ppm. Estos datos indicaron la presencia del átomo de fósforo con la funcionalidad deseada. El desplazamiento químico de  $^{31}\text{P}$  depende fuertemente tanto del estado de oxidación del mismo como del tipo de sustituyentes en los compuestos con uniones C-P. Por lo tanto, un desplazamiento químico de alrededor de 35 ppm (30,1 ppm para **114**), característico de ácidos *H*-fosfónicos, confirmaba la presencia de dicho grupo funcional en el compuesto sintético (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  de **114**.

Por otro lado, en el espectro protónico pudo observarse el doble cuarteto característico del hidrógeno unido a fósforo centrado a 7,13 ppm, con una constante de acoplamiento de 541,4 Hz para el acoplamiento H-P y de 2,1 Hz para el acoplamiento H-H a 3 enlaces, similar al presentado por el precursor ácido libre **107**. La señal del grupo metilo se observó como un doble doblete centrado a 1,56 ppm, con constantes de acoplamiento de 15,1 Hz para el acoplamiento H-P a 2 enlaces y 2,1 Hz para la constante de acoplamiento H-H. Entre las señales diagnóstico se observaron también las de cada uno de los metilenos bencílicos como dos dobles dobletes centrados a 5,04 ppm y 5,14 ppm respectivamente, con constantes de acoplamiento H-P de 8,7 Hz y 10,5 Hz, respectivamente, y 11,8 Hz para el acoplamiento H-H geminal. (Figura 3.7)



**Figura 3.7** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **114**.

El acoplamiento con el átomo de fósforo se evidenció en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , en el cual se pudo apreciar el desdoblamiento de las señales a causa del acoplamiento C-P (Figura 3.8). La señal del carbono del grupo metilo apareció en dicho espectro como un doblete centrado a 17,0 ppm, con una constante de acoplamiento de 93,3 Hz.

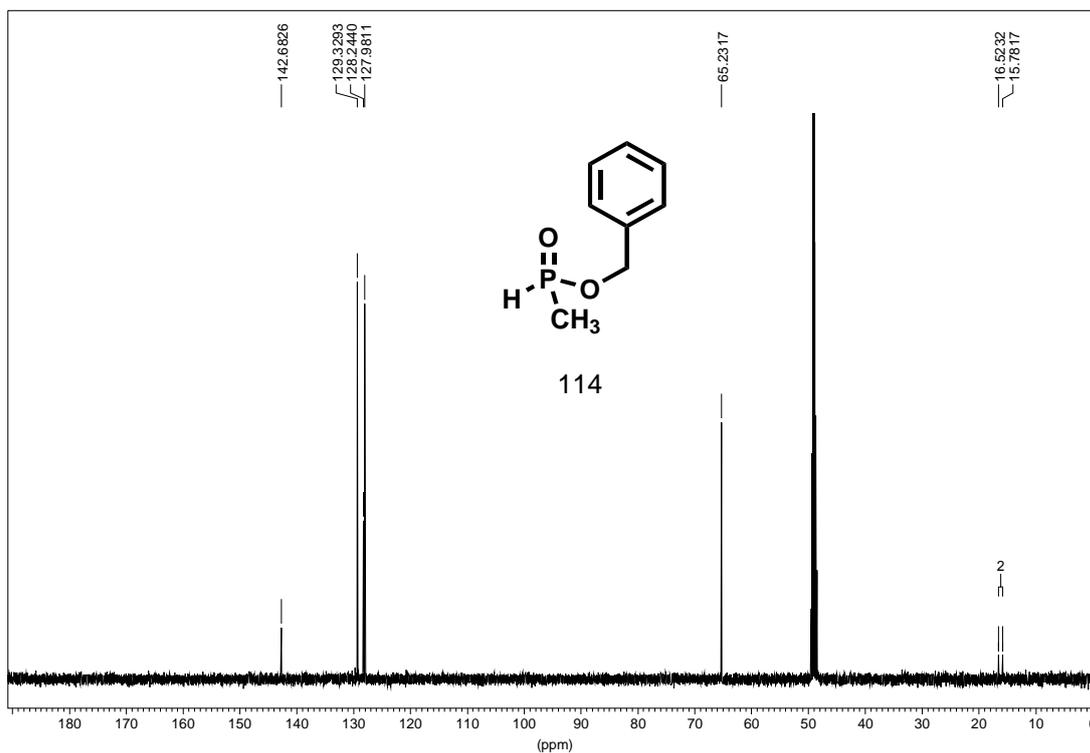
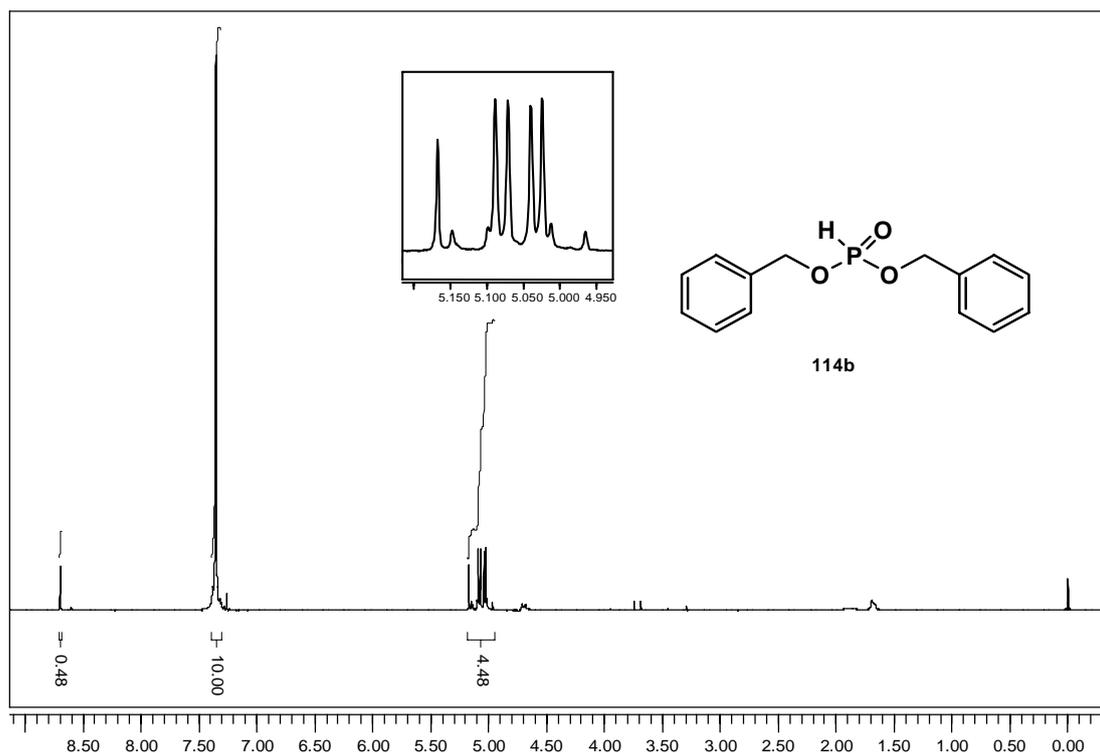


Figura 3.8. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **114**.

Durante la purificación de este compuesto pudo aislarse el éster bencílico del ácido fosfónico (**114b**), cuyo espectro de RMN  $^1\text{H}$  nuevamente mostró la presencia de un átomo de hidrógeno unido al átomo de fósforo, esta vez de fosfonato, como una señal centrada a 6,92 ppm con una constante de acoplamiento de 707,0 Hz, además de las señales correspondientes a los metilenos bencílicos, centradas a 5,05 ppm y 5,08 ppm respectivamente, como dos sistemas *AB* como se observa en la Figura 3.9. El aislamiento de este compuesto confirmó la presencia de ácido fosfónico en la reacción precedente, es decir durante la preparación del ácido *H*-metilfosfínico, como se postuló anteriormente. El mismo producto **114b** se encontró en distintas cantidades durante la purificación de todos los derivados en esta reacción.

Evidentemente, este método estaba limitado en cuanto al rendimiento debido a la oxidación del ácido fosfínico, más allá de la inestabilidad propia del producto formado. Por este motivo, se evaluaron otras posibilidades para intentar aumentar el rendimiento de esta reacción. Deprele y Montchamp<sup>101</sup> desarrollaron un método para la síntesis de ácidos fosfínicos *via* radicalaria. En dicho método, el radical hipofosfito, generado a partir de hipofosfito de



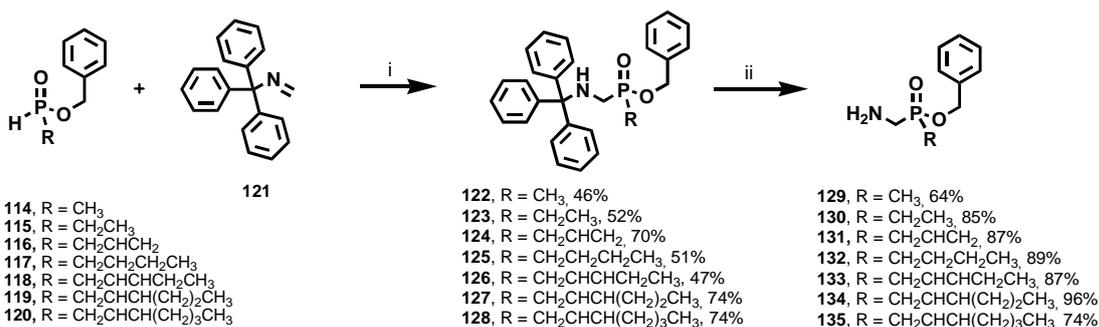
**Figura 3.9** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **114b**.

sodio y trietilborano como iniciador, se adiciona a una olefina. Si bien la reacción transcurre a temperatura ambiente y, en algunos casos, se obtienen buenos rendimientos, esta alternativa presentaba una seria dificultad experimental para la obtención de derivados de bajo peso molecular debido a la alta volatilidad de los alquenos correspondientes. Además, resultaba impráctica su aplicación como en el caso del ácido metilfosfínico.

Como se mencionó previamente, los ésteres de ácidos *H*-fosfínicos pueden reaccionar con carbonos de iminas a través de una reacción de Abramov, por lo tanto se utilizó *N*-tritolmetanimina (**121**) para incorporar el aminometilo a la estructura de ácido fosfínico. La base de Schiff **121** se preparó por condensación de tritolamina y formaldehído, eliminando el agua del medio con una trampa de Dean-Stark, según lo descrito en bibliografía.<sup>102</sup>

### 3.3.1.2 Incorporación del grupo aminometilo

Se utilizó como catalizador trifluoruro de boro eterato. Fue necesario ajustar bien las condiciones de reacción, tales como temperatura, dilución y orden de agregado, ya que el grupo tritilo es susceptible a la acidez del catalizador. Agregando el catalizador a una solución del solvente utilizado en esta reacción (tolueno anhidro), a 0 °C y luego llevando la reacción a temperatura ambiente se logró minimizar los efectos hidrolíticos del medio ácido, llegando rendimientos de entre 46% y 74% luego de la purificación por columna cromatográfica (sílicagel) utilizando mezclas de hexano–AcOEt como eluyente. La desprotección del grupo amino se llevó a cabo por tratamiento con ácido trifluoroacético en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a temperatura ambiente, en forma cuantitativa. Los derivados en su forma trifluoroacetato se llevaron a la forma de amina libre por tratamiento con resina de intercambio catiónico fuerte, y se purificaron por columna cromatográfica (sílicagel) con mezcla de AcOEt–MeOH como eluyente (Esquema 3.10). Estos compuestos son susceptibles a oxidación por lo que fueron utilizados inmediatamente después de su purificación. En cambio sus precursores tritilados mostraron una excelente estabilidad y pudieron purificarse sin inconvenientes y caracterizarse todos sus derivados por RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y <sup>31</sup>P.

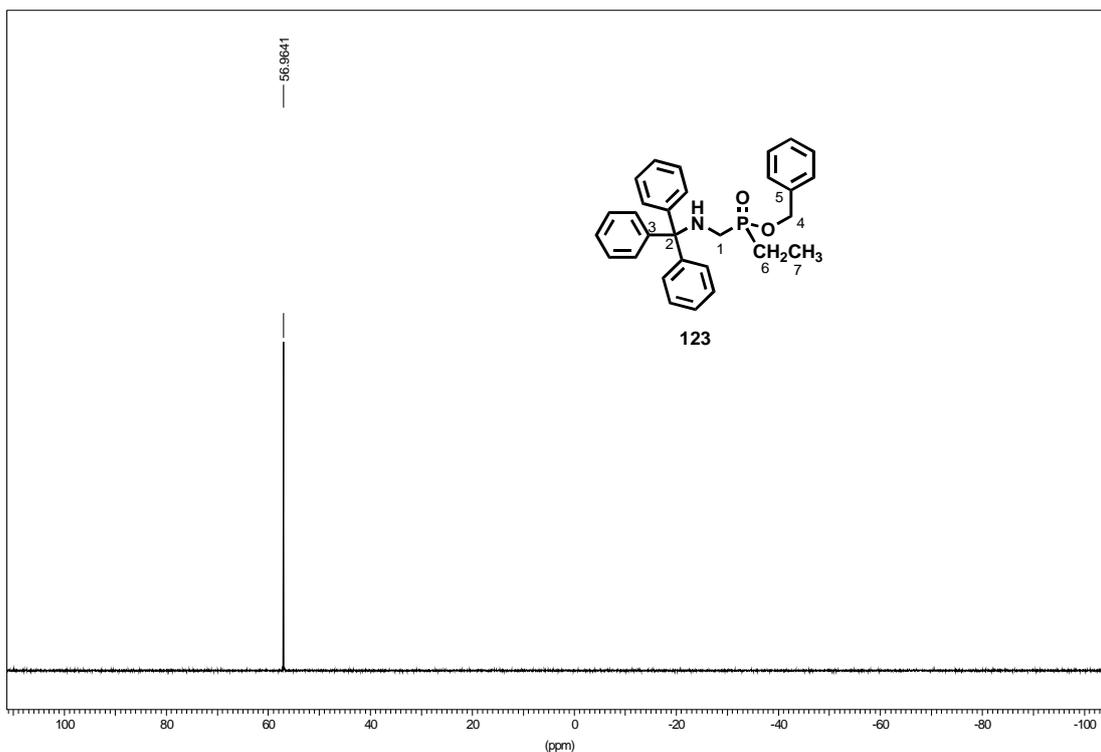


**Reactivos y condiciones:** (a) Et<sub>2</sub>O·BF<sub>3</sub>, tolueno, 0 °C hasta 25 °C, 16 hs.; b) 1) TFA 2,5%, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25 °C. 2) Amberlite CG-400 (forma HO<sup>-</sup>), metanol

**Esquema 3.10** Síntesis de ésteres bencílicos de los ácidos aminometilalquilfosfínicos

Nuevamente, el espectro de RMN <sup>31</sup>P dio información del estado de oxidación y del tipo de sustitución que presentaba el átomo de fósforo. Al pasar de un *H*-fosfinato a un

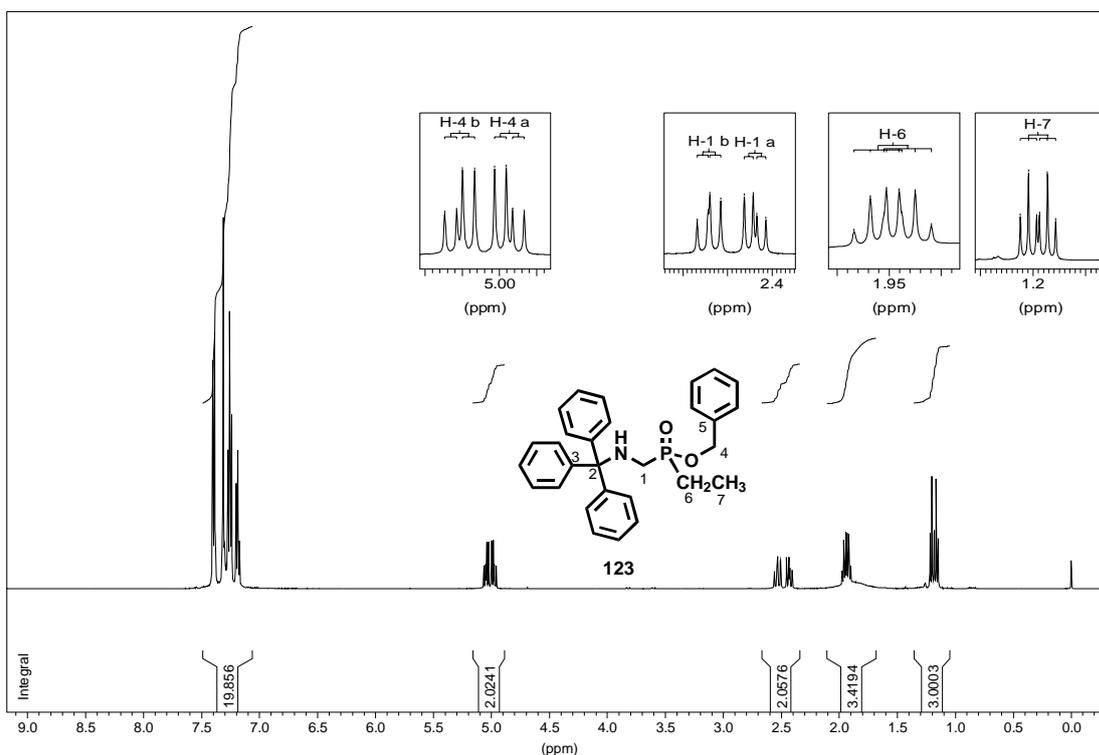
fosfinato, el desplazamiento químico promedio de  $^{31}\text{P}$  se modifica de 35 ppm a 50 ppm. Se pudo observar, tomando como ejemplo al derivado **123**, un desplazamiento químico de 57,0 ppm en  $^{31}\text{P}$ , que da cuenta de la disustitución sobre el fosfinato (Figura 3.9).



**Figura 3.9** Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  de **123**.

Por otro lado, en el espectro de  $^1\text{H}$  ya no se observaba la señal de hidrógeno unido a fósforo pero se podían apreciar, en las ampliaciones correspondientes, los distintos sistemas bien resueltos por el acoplamiento de todos los hidrógenos alifáticos de la molécula con el átomo de fósforo. Así, el pico correspondiente al grupo metilo (H-7) se observaba como un doble triplete centrado a 1,18 ppm, mientras que la constante de acoplamiento H-H fue de 7,7 Hz. La constante de acoplamiento H-P a 3 enlaces fue de 18,1 Hz. Curiosamente, las constantes de acoplamiento H-P a 2 enlaces eran del mismo orden de magnitud, inclusive algo menores. De esta manera, se pudo observar la señal correspondiente al metileno del etilo (H-6) como un doble cuarteto centrado a 1,94 ppm, con constantes de acoplamiento H-P de 13,9 Hz y H-H de 7,7 Hz. Las señales correspondientes a los hidrógenos del metileno del grupo aminometilo (H-1) aparecían como dos dobles dobletes centrados a 2,43 ppm y

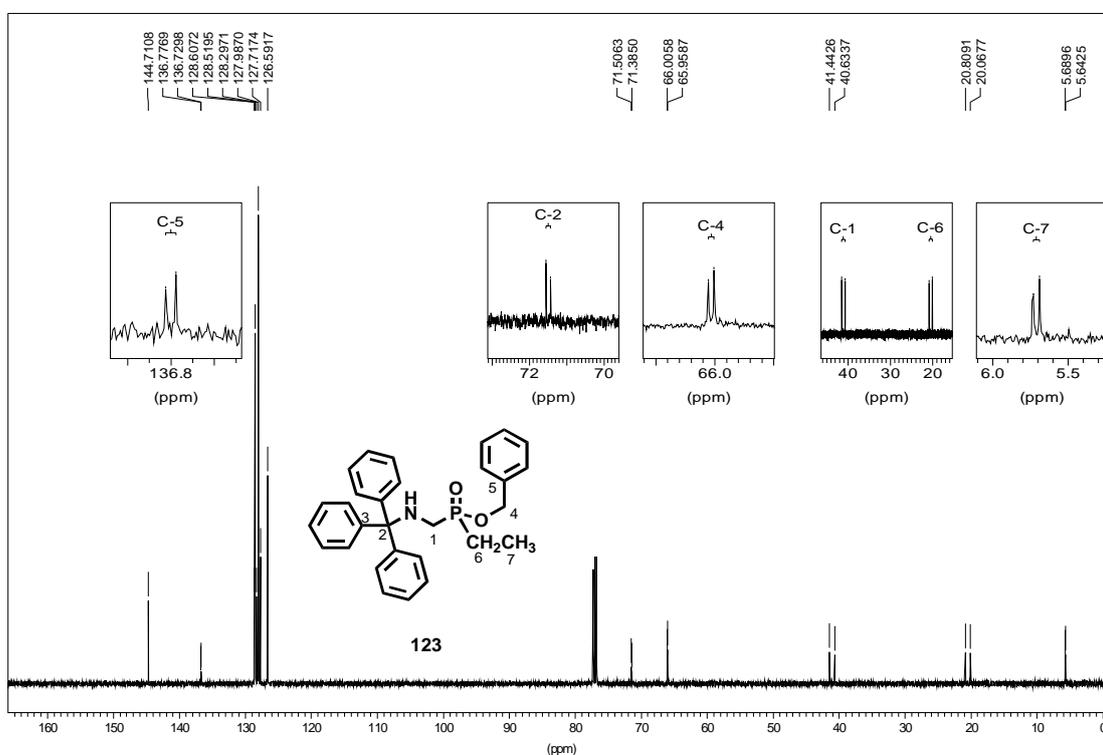
2,53 ppm, respectivamente, con constantes de acoplamiento H-P de 10,0 Hz y 12,1 Hz, respectivamente, mientras que la constante de acoplamiento H-H geminal fue de 14,1 Hz. En cambio, las constantes de acoplamiento H-P a 3 enlaces para los hidrógenos del metileno bencílico (H-4) fueron algo menores: los picos correspondientes a dichos hidrógenos aparecían como dos dobles dobletes centrados a 4,98 ppm y 5,04 ppm con constantes de acoplamiento H-P a de 7,7 Hz y 8,1 Hz, respectivamente (Figura 3.10).



**Figura 3.10** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **123**.

En cuanto al espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , se observaron en el mismo fuertes acoplamientos C-P en los carbonos unidos directamente al átomo de fósforo con constantes de acoplamiento del orden de los 100 Hz. Más precisamente, la señal correspondiente al grupo metileno (C-6) de la cadena alifática unido directamente al átomo de fósforo se observó como un doblete centrado a 20,4 ppm y una constante de acoplamiento C-P de 93,3 Hz, mientras que el pico correspondiente al grupo aminometilo (C-1) se observó como un doblete centrado a 41,0 ppm y constante de acoplamiento de 101,7 Hz. Las constantes de acoplamiento disminuían

notablemente a dos enlaces. Así, las señales correspondientes al metilo (C-7) y al metileno bencílico (C-4) aparecían como dos dobletes centrados a 5,7 ppm y 66,0 ppm con constantes de acoplamiento de 5,1 Hz y 5,9 Hz, respectivamente. Sin embargo, el acoplamiento C-P a tres enlaces seguía siendo detectable, y era, inclusive, mayor que a dos enlaces. Este efecto se podía apreciar en la señal correspondiente al carbono cuaternario del grupo tritilo, el cual aparecía como un doblete centrado a 71,4 ppm y en la señal correspondiente al carbono aromático del grupo bencilo, un doblete centrado a 136,8 ppm con constantes de acoplamiento de 15,3 Hz y 5,9 Hz, respectivamente (Figura 3.11).



**Figura 3.11** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **123**.

Es importante, en este punto, realizar un análisis de la magnitud de los acoplamientos C-P a lo largo de las cadenas alquílicas y alquénicas. Existían acoplamientos C-P detectables hasta una distancia de 6 enlaces a lo largo de dichas cadenas, como se puede ver en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del derivado de cadena alquénica de 7 carbonos (**128**) en donde las constantes de acoplamiento C-P van desde los 103,4 Hz para C-1 hasta los 1,7 Hz para C-5 (Figura 3.12). Es necesario tener en cuenta estos acoplamientos de largo alcance para la correcta interpretación de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de los productos de los siguientes

pasos de reacción, los cuales se verán complicados por la duplicación de señales por formación de diasterómeros, como se verá más adelante.

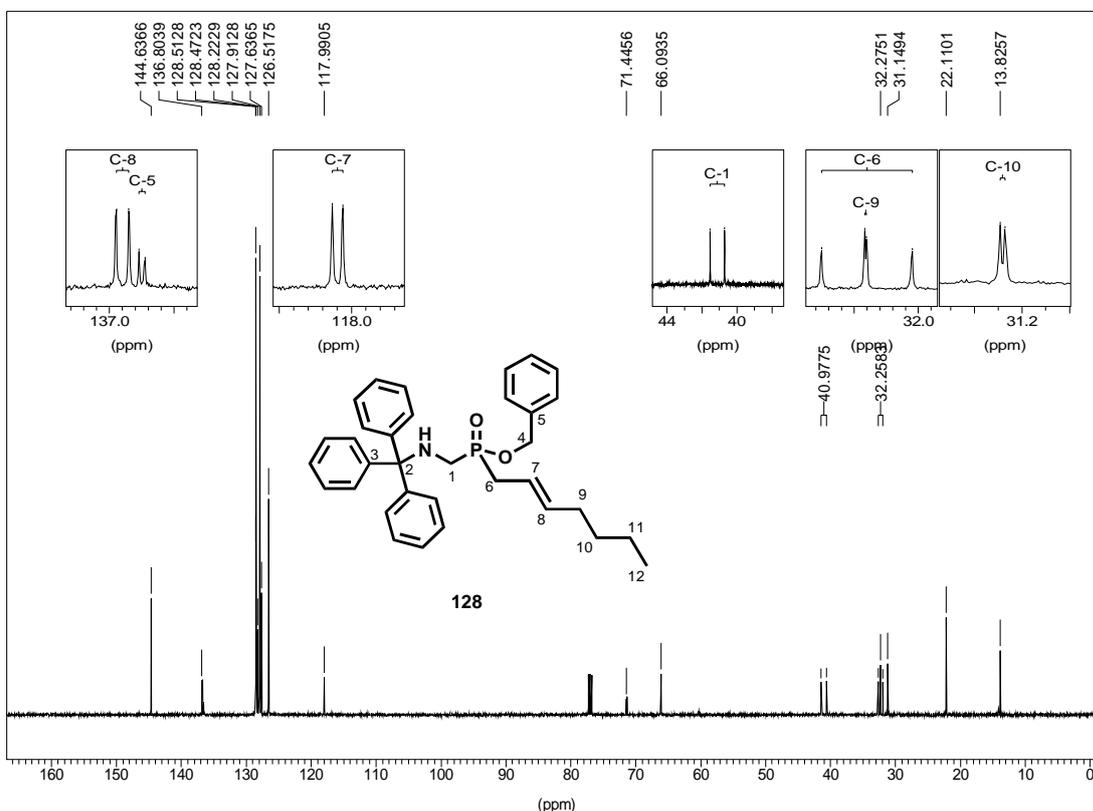
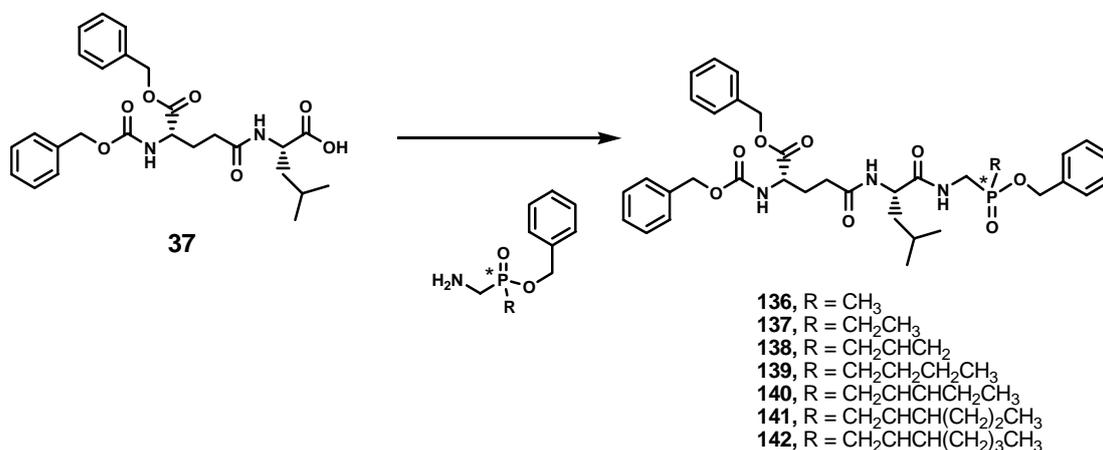


Figura 3.12 Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **128**.

### 3.4.4 Acoplamiento de los ácidos $\alpha$ -aminometilfosfínicos con L- $\gamma$ -Glu-L-Leu-OH

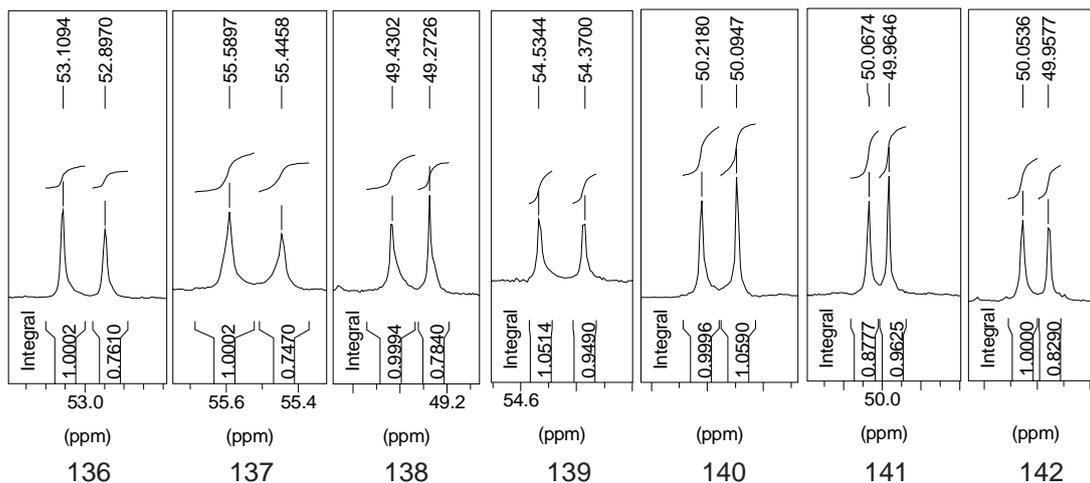
El acoplamiento entre el dipéptido L- $\gamma$ -Glu-L-Leu-OH (**36**) y los ácidos aminofosfínicos se realizó mediante una reacción clásica de formación enlaces peptídicos en solución, a través de la activación del ácido correspondiente con *N*-hidroxisuccinimida y la carbodiimida soluble *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*<sup>2</sup>-etilcarbodiimida. Los mismos se purificaron por cromatografía en columna (sílicagel) eluyendo con mezclas de hexano–AcOEt para dar una mezcla de dos diasterómeros. Durante la síntesis del ácido aminofosfínico, al incorporar la cadena alquílica sobre el grupo fosfinato, se generó sobre el átomo de fósforo un centro de asimetría, el

cual, luego de acoplarse al dipéptido, ópticamente puro, dio lugar a un par de diastereoisómeros cuya presencia se pudo determinar por espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , y  $^{31}\text{P}$  (Esquema 3.11).



**Esquema 3.11.** Acoplamiento de los ésteres bencílicos de los ácidos alquilaminofosfinicos con en dipéptido **37**

En la Figura 3.13 se presentan los espectros de RMN  $^{31}\text{P}$  de estos compuestos, en cada uno de los cuales se podían observar dos señales alrededor de los 50 ppm, separadas en 0,2 ppm aproximadamente. El área relativa de dichas señales oscilaba entre 1:1 a 1:0.75. La diferencia de desplazamientos químicos entre las dos señales de cada derivado era mínima,



**Figura 3.13.** Espectros de RMN  $^{31}\text{P}$  de los fosfinopéptidos protegidos.

teniendo en cuenta los 200 ppm de la ventana de  $^{31}\text{P}$ , lo cual era coherente con la presencia de una mezcla de diasterómeros, en los que el entorno químico del fósforo era sumamente similar pero no idéntico en cada uno de los isómeros.

Por otro lado, se pudo observar una diferencia en los desplazamientos químicos entre los derivados que contenían una instauración en la cadena alquílica y los que no. De esta manera, el desplazamiento químico de los compuestos **136**, **137** y **139** aparecían entre los 53 y 55 ppm aproximadamente, mientras que los compuestos **138**, **140**, **141** y **142** se encuentran alrededor de los 50 ppm.

Las diferencias en los desplazamientos químicos de ambos diasterómeros también eran notables en los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , en donde se podía ver que, en ciertas partes de la molécula, el entorno magnético era distinto para cada isómero, más específicamente la duplicación de señales se producía en los primeros carbonos de la cadena alquílica (C-17, C-18), el carbono metilénico correspondiente al residuo aminofosfinato (C-12) y a los carbonos del isopropilo de leucina (C-8, C-9, C-10). En la Figura 3.14 se ilustra el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **136** (diastereoisómeros A y B), en las ampliaciones se podían observar las señales correspondientes al metilo de cada isómero como dos dobletes bien resueltos centrados a 20,4 ppm y 20,6 ppm (C-17), con constantes de acoplamiento de 93,5 Hz y 92,5 Hz, respectivamente. Lo mismo se observó para el carbono metilénico correspondiente al residuo aminofosfínico, con dos dobletes centrados a 37,0 ppm y 37,1 ppm, con constantes de acoplamiento de 98,2 Hz para cada una de dichas señales. Finalmente, se presentaban los pares de señales, correspondientes a los dos metilos (C-9, C-10) y el metino del residuo de Leu de ambos isómeros a 21,92/21,96 ppm, 23,33/23,37 ppm y 25,85/25,89 ppm, respectivamente.

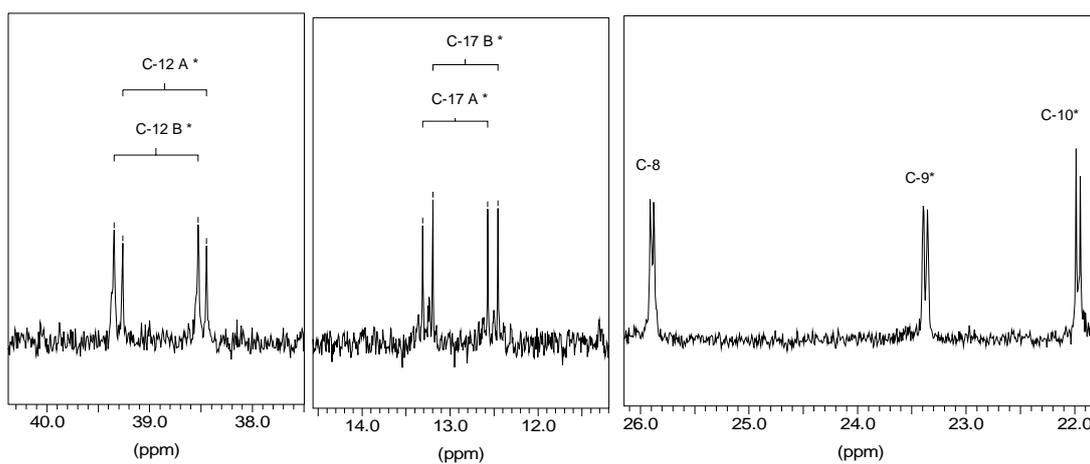
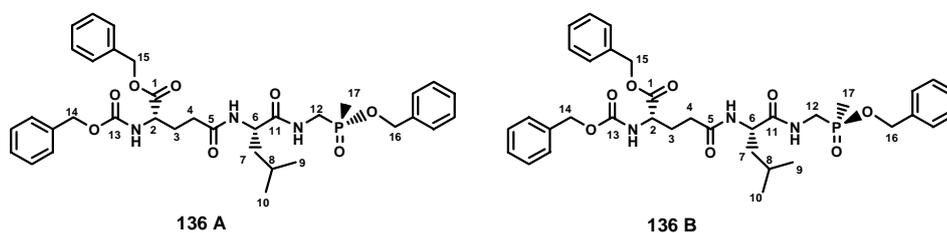
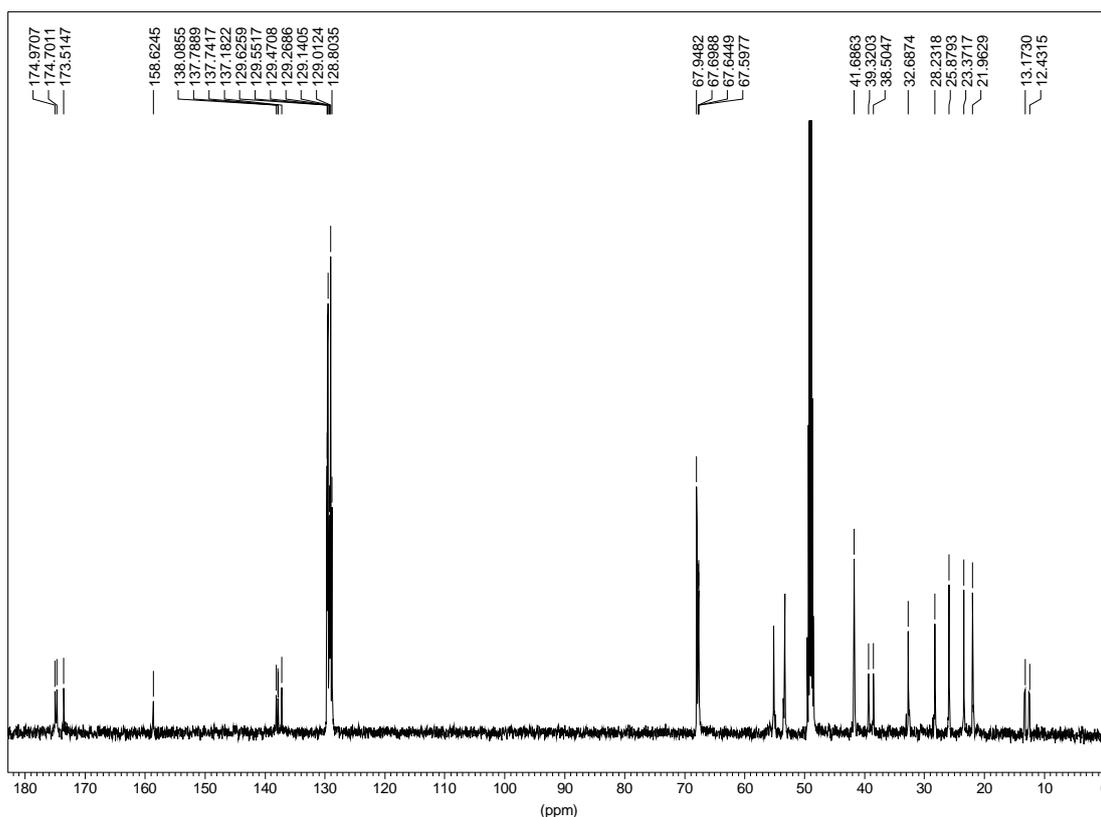
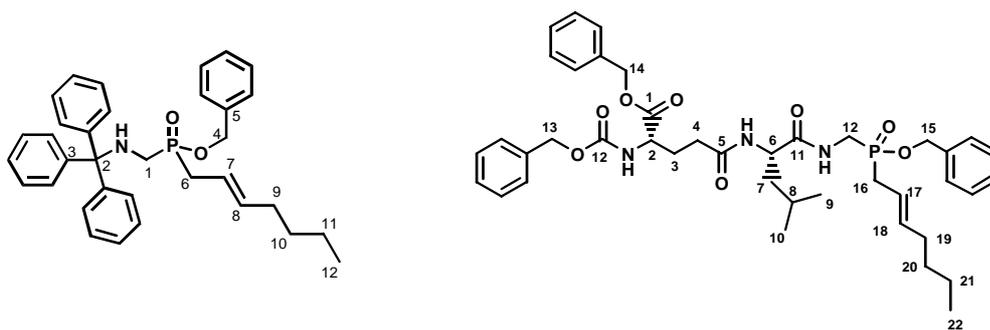


Figura 3.14. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **136**, mezcla de diastereómeros. \* Asignación intercambiable.

En cuanto a las señales correspondientes a los metilenos bencílicos, se distinguía entre los tres existentes en la molécula, el pico correspondiente al éster bencílico del ácido fosfínico (C-16) debido a su acoplamiento con fósforo como un doblete centrado a 67,6 ppm con una constante de acoplamiento de 6,7 Hz. Entre las señales aromáticas también distinguía el carbono cuaternario de este bencilo, el cual aparecía como un doblete centrado a 137,9 ppm con una constante de acoplamiento C-P de 5,7 Hz. El resto de las señales correspondía bien con las provenientes de los residuos *N*-benciloxi- $\gamma$ -glutámico bencil éster y leucina, ya discutidas en el Capítulo 2, en la descripción espectroscópica del dipéptido **37**.

El análisis de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de los derivados de cadena más larga era más complejo a medida que cada átomo de carbono se alejaba del átomo de fósforo a lo largo de la cadena carbonada, disminuyendo tanto las constantes de acoplamiento C-P como las diferencias en el entorno magnético en cada isómero. Es decir, que puede llegar a ser confusa la causa de la duplicación de señales, ya que una constante de acoplamiento C-P pequeña, del orden de los 3 Hz podría confundirse con una diferencia de desplazamientos químicos de 0,06 ppm entre señales correspondientes al mismo carbono de dos diastereoisómeros. Para resolver esta ambigüedad se realizó una comparación con los espectros de los precursores aminofosfinatos tritilados, los cuales eran una mezcla de enantiómeros y se podía evaluar el orden de los acoplamientos C-P para cada carbono de la cadena ya que, en este caso, el entorno magnético era exactamente igual para cada isómero. Como ya se mostró en el derivado de cadena de siete átomos de carbono, el acoplamiento C-P era detectable hasta una distancia de 5 enlaces a través de la misma. En la Tabla 3.1 se resumen los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento para los carbonos de la cadena alquénica del tripéptido protegido **142** y su precursor **128**. Para los dos primeros carbonos de la cadena del tripéptido protegido se podían observar los dos dobletes correspondientes a las señales provenientes de cada isómero. Se concluyó que a partir del tercer carbono se observaba una única señal, coincidente para los dos isómeros, ya que las constantes de acoplamiento medidas se mantenían en el mismo orden que en los carbonos del precursor respectivo.

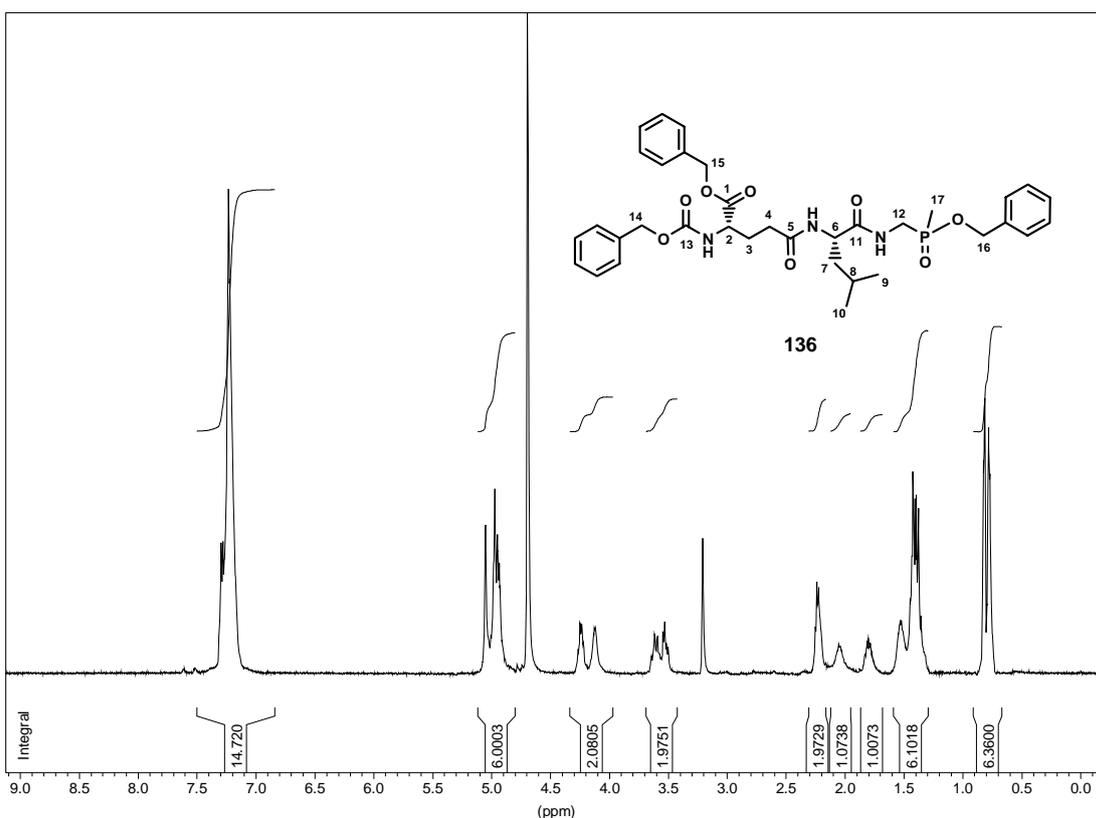


128 (mezla de enant.)			142 (mezla de diast.)		
Señal	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)	Señal	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)
C-6	32,2	88,2	C-16	28,3/32,4	88,1/88,1
C-7	118,0	9,3	C-17	118,36/118,41	9,3/10,2
C-8	136,8	11,9	C-18	137,8	12,7
C-9	32,3	1,7	C-19	33,4	2,5
C-10	31,1	2,5	C-20	32,4	3,4
C-11	22,1	-	C-21	23,2	-
C-12	13,8	-	C-22	14,2	-

**Tabla 3.1.** Desplazamiento químico y constantes de acoplamiento de la cadena alquénica de **128** y **142**.

Este mismo razonamiento se aplicó para la asignación de todos los fosfinopéptidos protegidos.

En cuanto al espectro de RMN  $^1\text{H}$  de estos derivados, no fue posible identificar en ellos señales provenientes de uno u otro isómero independientemente, sino que la mayoría de las mismas se observaban como multipletes sin resolver, como se pudo apreciar en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **136** en la Figura 3.15. En los siete derivados se pudieron observar las señales provenientes de los residuos ácido de *N*-benciloxi- $\gamma$ -glutámico  $\alpha$ -bencil éster y leucina, cuya asignación se discutió en el Capítulo 2. Además, se encontraban las señalecorrespondientes al grupo metileno del residuo aminofosfinato y las señales correspondientes a las cadenas alquílicas o alquénicas, según el caso.



**Figura 3.15.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **136**

Retomando el ejemplo del derivado de cadena de siete átomos de carbono **142**, se pudieron observar en su espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 3.16) las señales correspondientes a dicha cadena como un multiplete que integra para 9 hidrógenos entre 0,75 ppm y 0,96 ppm, correspondiente a los dos metilos del residuo de Leu y el metilo de la cadena alquénica (H-22), luego, entre 0,75 ppm y 0,96 ppm se observó un multiplete que integraba para 4 H correspondiente a los dos grupos metilenos (H-21, H-20). Entre 1,81 ppm y 2,05 ppm, junto con uno de los hidrógenos del C(β) de Glu, aparecían las señales correspondientes a los hidrógenos del siguiente metileno (H-19). Continuando hacia campos bajos aparecía un multiplete entre 3,55 ppm y 3,75 ppm que integraba para dos hidrógenos, correspondiente al metileno α al átomo de fósforo (H-16) y, finalmente, en la zona de olefinas aparecía un multiplete entre 5,27 ppm y 5,40 ppm que integraba para un hidrógeno (H-18) y otro entre 5,56 ppm y 5,69 ppm (H-17). El metileno del grupo amino metilo aparecía como un multiplete complejo entre 3,35 ppm y 3,75 ppm (H-12).

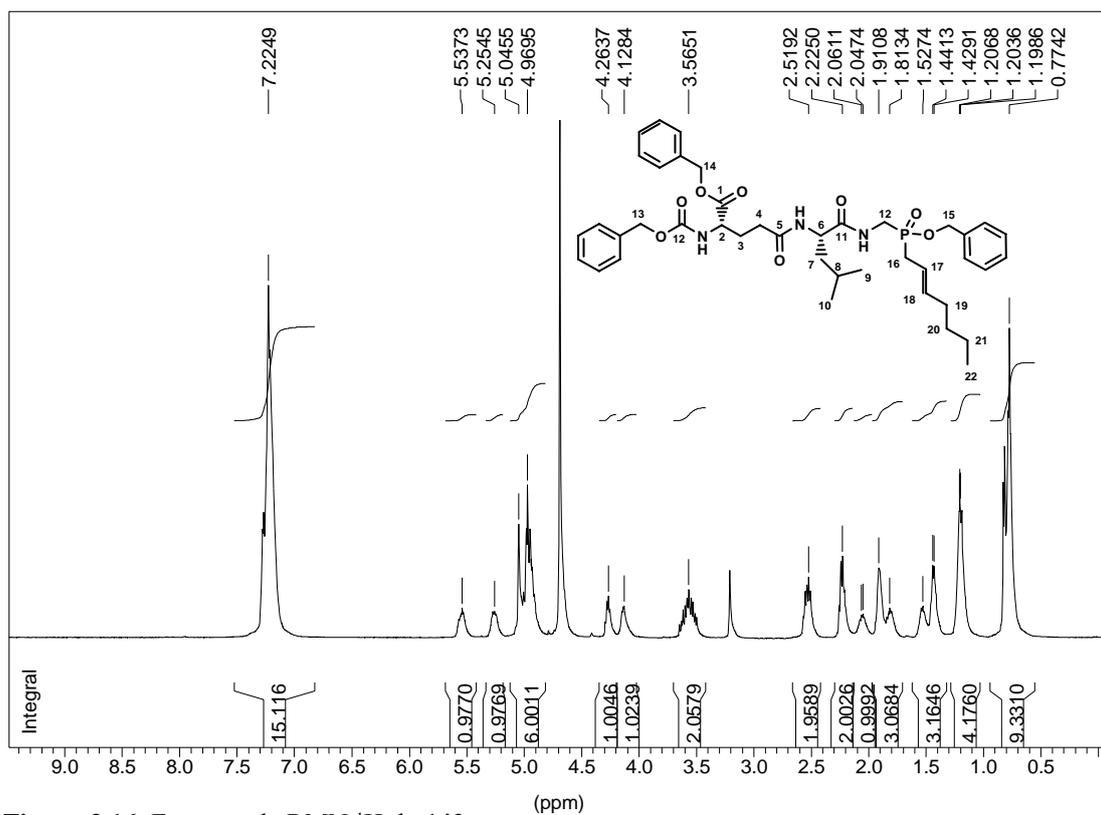
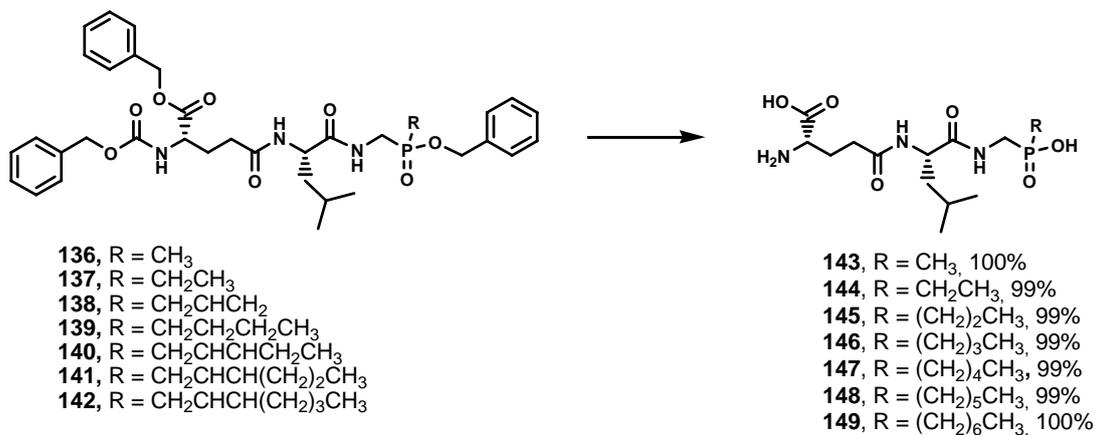


Figura 3.16. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 142.

### 3.3.3 Desprotección de los grupos protectores

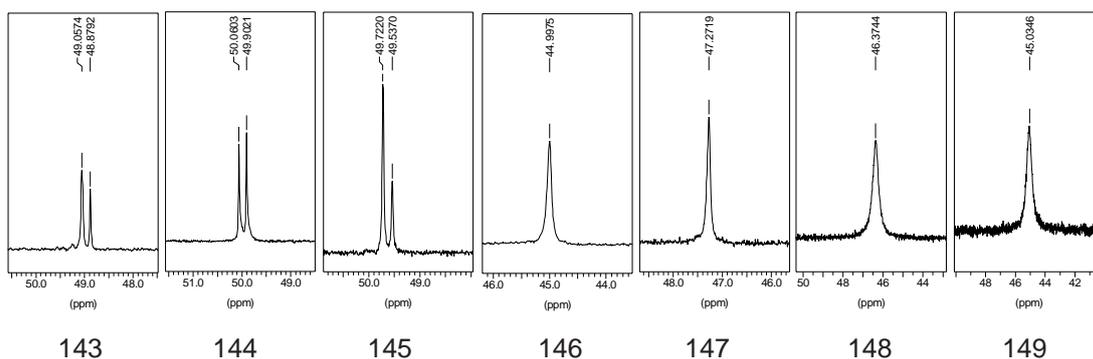


Esquema 3.12 Desprotección de los fosfopéptidos protegidos.

Los derivados protegidos se sometieron a hidrogenación catalítica con Pd/C 5%. La desprotección e hidrogenación de las olefinas en los casos correspondientes fue prácticamente cuantitativa. (Esquema 3.12).

Para contar con muestras de alta pureza para los análisis enzimáticos, de inhibición del crecimiento parasitario, y para su correcta caracterización espectroscópica fue necesario purificar estos derivados por CLAR preparativa, obteniendo así cada derivado fosfinopéptido como un par de diastereómeros, los cuales eluyeron en un único pico. En el Apéndice C se presentan los cromatogramas de estos derivados realizados como criterio de pureza.

Los espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  de los fosfinopéptidos **143**, **144** y **145** mostraban nuevamente dos señales, alrededor de los 50 ppm, separadas por 0,2 ppm. No así los espectros de **146**, **147**, **148** y **149** en los que dichas señales no estaban resueltas (Figura 3.17). Esta diferencia de resolución puede ser atribuida a efectos del solvente, ya que los espectros de los primeros tres compuestos (de cadena alquílica más corta) se realizaron en  $\text{D}_2\text{O}$ , mientras que los últimos, al ser menos hidrosolubles debido a la mayor longitud de cadena alquílica, se realizaron en  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Probablemente, estos compuestos de naturaleza peptídica y que presentan un extremo aminoácido y otro ácido, se encuentren una conformación más fija en agua que en metanol, en donde se reduce parcialmente la capacidad de estabilizar grupos polares o ionizables por unión hidrógeno.



**Figura 3.17.** Espectros de RMN  $^{31}\text{P}$  de los fosfinopéptidos.

Por otro lado, los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  no mostraban una duplicación de señales tan apreciable como la de los precursores protegidos. Evidentemente, al eliminar el grupo

bencilo disminuyen las diferencias entre los sustituyentes oxigenados del fósforo y, en consecuencia, también disminuye la diferencia de entorno químico para los carbonos correspondientes a cada isómero. A modo de ejemplo, se presenta el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **143** (Figura 3.18), en donde se podían observar las señales correspondientes a los carbonos unidos directamente a fósforo, como dos dobletes únicos, centrados a 13,8 ppm (C-13) y

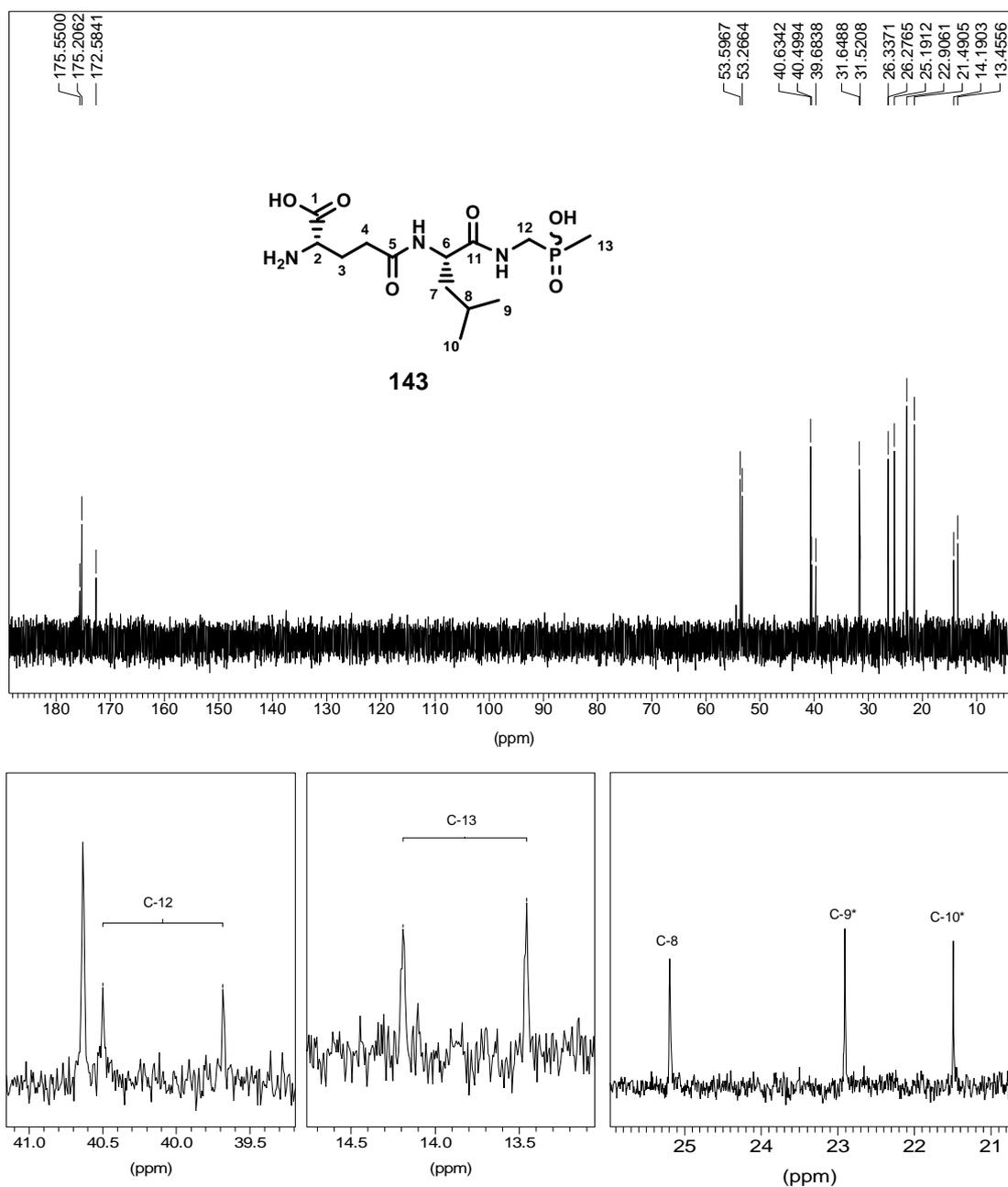


Figura 3.18. Espectros RMN  $^{13}\text{C}$  de **143**.

40,1 ppm (C-12), con constantes de acoplamiento de 92,4 Hz y 105,1 Hz, respectivamente. Las señales correspondientes a los grupos metilos y metino de leucina, cuyas señales se encontraban duplicadas en los precursores protegidos, ahora se observaban como picos únicos a 21,5 ppm, 22,9 ppm y 25,2 ppm, respectivamente. También se pudo observar la ausencia de señales aromáticas y de metilenos bencílicos provenientes de los grupos protectores, así como la señal de alrededor de 156 ppm del carbonilo de carbamato del grupo benciloxycarbonilo. En los derivados cuyas cadenas se incorporaron a partir de halogenuros alílicos se pudo apreciar la ausencia de las señales de carbonos olefinicos. Lo mismo ocurría con las señales de hidrógenos olefinicos en el espectro protónico.

Otro ejemplo representativo es el derivado **149**, cuyos espectros de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  del derivado son muy interesantes. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.19) presentaba los típicos dobletes provenientes del metilo del residuo leucina centrados a 0,91 ppm y 0,95 ppm con constantes de acoplamientos de 6,2 Hz, ambos. Parcialmente superpuesto con el doblete de campos más altos se encontraba el triplete característico de la cadena alquílica, centrado a 0,89 ppm, con una constante de acoplamiento de 7,0 Hz. Siguiendo hacia campos bajos se

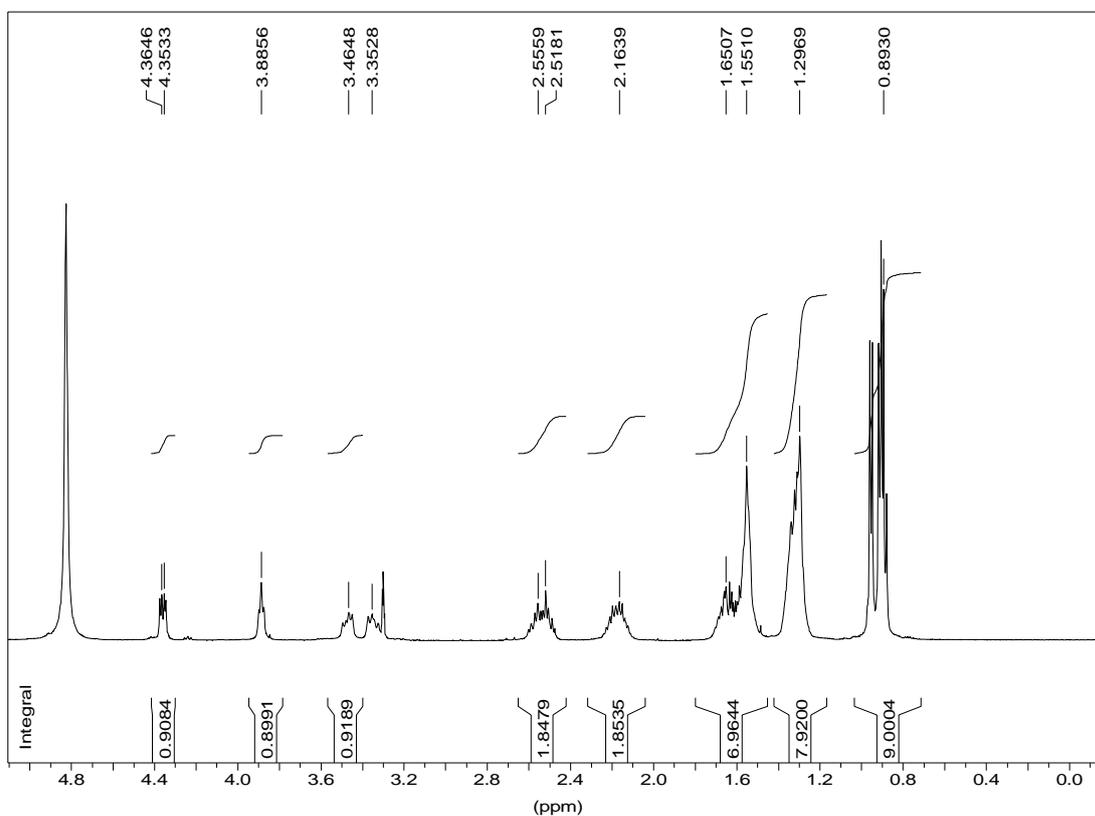


Figura 3.19. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **149**.

encontraba entre 1,23 ppm y 1,42 ppm una señal que integraba para 8 hidrógenos correspondiente a los cuatro metilenos siguientes de la cadena carbonada (H-14, H-15, H-16, H-17). Luego, las señales superpuestas provenientes del resto de los hidrógenos del isobutilo de leucina y de los metilenos correspondiente a los carbonos  $\alpha$  y  $\beta$  al átomo de fósforo (H-13, H-14). Continuando a campos aún más bajos se encontraban el resto de las señales características de los tripéptidos sintetizados en esta tesis: primero los dos multipletes que integraban para dos hidrógenos, centrados a 2,17 ppm (H-3) y 2,54 ppm (H-4), respectivamente, correspondientes a los dos metilenos de Glu; los dos dobles dobles centrados a 3,26 ppm ( $J_{\text{H-H}} = 14,7$  Hz,  $J_{\text{H-P}} = 9,8$  Hz) y 3,38 ppm ( $J_{\text{H-H}} = 14,7$  Hz,  $J_{\text{H-P}} = 9,8$  Hz), correspondientes al metileno del residuo aminofosfinico (H-12), el triplete centrado a 3,89 ppm ( $J = 6,0$  Hz) correspondiente al hidrógeno  $\alpha$  de Glu (H-2) y el doble doblete centrado a 4,36 ppm ( $J = 10,1$  Hz, 4,4 Hz) correspondiente al hidrógeno  $\alpha$  de Leu (H-6).

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 3.20) se pudieron observar las tres señales características del isopropilo del residuo Leu, cuyos desplazamientos químicos se mantuvieron en los mismos valores a lo largo de toda la serie de derivados (21,8 ppm, 23,4 ppm y 26,0

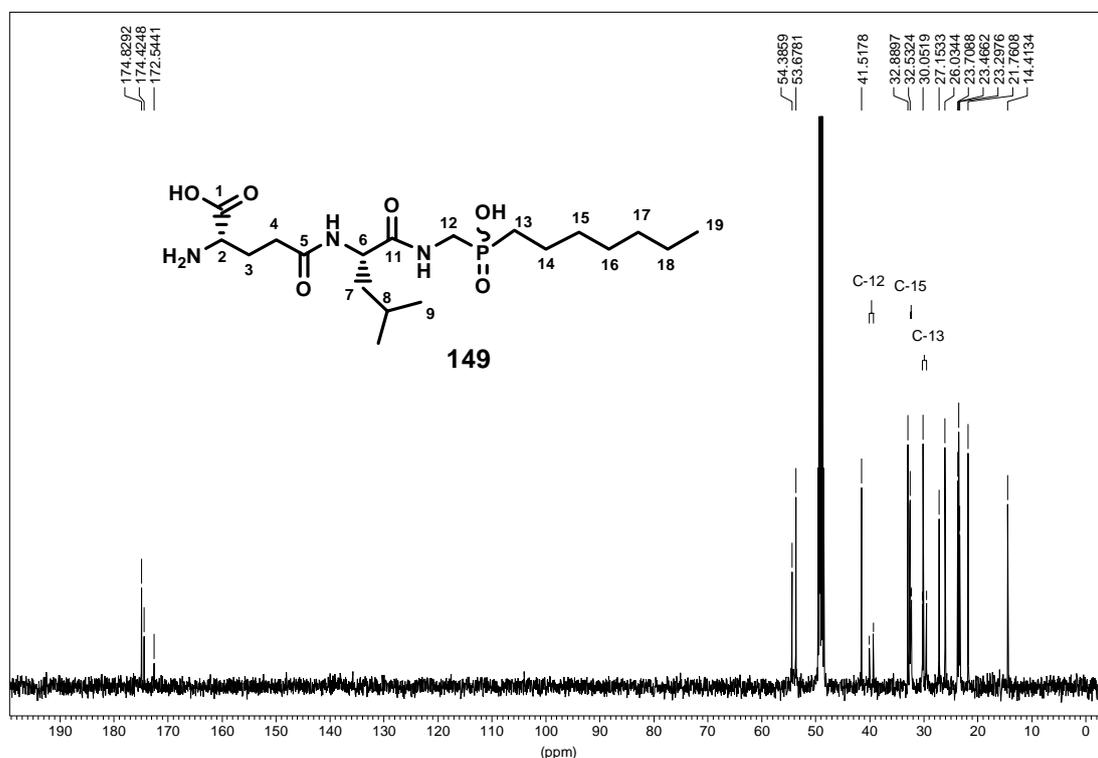


Figura 3.20. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 149.

ppm) distinguiéndose de las señales de los carbonos de la cadena alquílica. Dentro de esta cadena resultó fácil asignar la señal correspondiente al metilo a 14,4 ppm y la del carbono  $\alpha$  al átomo de fósforo (C-13) como un doblete centrado a 29,8 ppm con constante de acoplamiento de 87,3 Hz. Sería, en principio, esperable que el acoplamiento C-P disminuyera al aumentar la distancia entre ambos átomos. Sin embargo, la señal que sigue en magnitud de constante de acoplamiento es aquella centrada a 32,1 ppm con una constante de acoplamiento de 15,3 Hz, cuyo desplazamiento químico es demasiado alto respecto del esperable de alrededor de 20 ppm. Esta contradicción llevó a realizar espectros bidimensionales para resolver esta ambigüedad y, además, asignar inequívocamente el resto de los carbonos de la cadena.

Con la ayuda del espectro de correlación comonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY45 se verificó la correcta asignación del espectro de RMN  $^1\text{H}$  basada en las asignaciones de precursores. Mediante el espectro de correlación heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC se logró asignar inequívocamente casi todos los carbonos de la cadena hidrocarbonada y verificar la asignación de las señales de  $^{13}\text{C}$  de los residuos glutámico y leucina, también basadas en las asignaciones previas de *N*-Cbz- $\gamma$ -L-Glu(OBn)-OH (**36**) y *N*-Cbz- $\gamma$ -L-Glu(OBn)-L-Leu-Gly-OH (**37**).

En el espectro HSQC se pudo observar la correlación entre la señal a 32,1 ppm en  $^{13}\text{C}$  y la señal correspondiente a los 8 hidrógenos metilénicos H-15 a H-18, por lo tanto, ésta no correspondía al carbono  $\beta$  al átomo de fósforo (C-14), como se supuso en un principio debido a la constante de acoplamiento C-P de 15 Hz. En cambio, la señal centrada a 22,8 ppm en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  correlacionaba con la señal entre 1,45 y 1,75 ppm en  $^1\text{H}$  correspondiente a los metilenos  $\alpha$  (H-13) y  $\beta$  (H-14) al átomo de fósforo, entre otros hidrógenos y, dado que la señal de  $^{13}\text{C}$  del carbono  $\alpha$  (C-13) estaba claramente identificada, esta señal debía corresponder necesariamente al carbono  $\beta$  (C-14). En conclusión, el acoplamiento C-P a 2 enlaces (C-14) es prácticamente indetectable, mientras que el acoplamiento a tres enlaces es de 15,3 Hz (C-15). En cambio, los desplazamientos químicos correlacionaban bien con los valores estimados por programas de predicción. Los 3 átomos de carbono restantes de la cadena (C-16, C-17 y C-18) fueron asignados por su

desplazamiento químico ya que los tres correlacionaban con la señales superpuestas de los cuatro metilenos entre 1,45 ppm y 1,75 ppm.

Los compuestos descritos en este capítulo fueron evaluados como inhibidores contra TryS de distintos parásitos de la familia de los tripanosomátidos . Los resultados de estos ensayos serán discutidos en en Capítulo 4.



## **Capítulo 4: Ensayos biológicos**

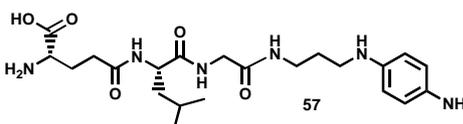
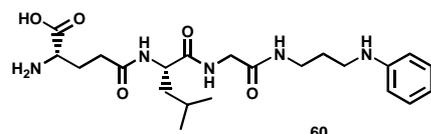
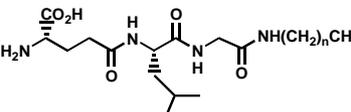


#### 4.1 Ensayos de inhibición contra GspS recombinante de *C. fasciculata*

Estos ensayos fueron realizados sobre la enzima recombinante del parásito *C. fasciculata*, por Katie Amssoms en la Universidad de Dundee, Escocia sobre la enzima expresada en *E. coli* por Oza *et al.*<sup>63</sup> En la Tabla 4.1 se presentan los porcentajes de inhibición a una concentración de inhibidor de 500  $\mu\text{M}$ .

##### 4.1.1 Derivados amida y éster

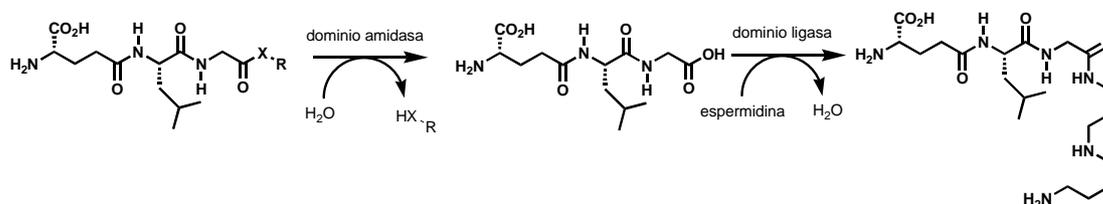
Los compuestos que presentaron mayor potencia inhibitoria fueron el análogo de *N*<sup>1</sup>-glutationilespermidina **57** y el derivado amida de metilamina **88** como se puede observar en la Tabla 4.1. Esta moderada acción inhibitoria puede entenderse en términos de la actividad amidasa de esta enzima, encontrada paralelamente al diseño y síntesis de estos inhibidores. Como se mencionó en la introducción, la enzima GspS del parásito *C. fasciculata* posee, además del dominio ligasa responsable de la formación de la unión amida entre glutatión y espermidina, otro dominio con actividad amidasa. Entonces se postuló, que la unión amida

Compuesto	% inhibición (500 $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	
<b>57</b>	36		
<b>60</b>	11	400	
<b>88</b>	44		
<b>89</b>	15		
<b>90</b>	15		
<b>91</b>	2		
<b>92</b>	3		
<b>93</b>	4		
<b>94</b>	4		
<b>95</b>	0		
<b>98</b>	13		
<b>99</b>	15		

88, n = 0    92, n = 4  
 89, n = 1    93, n = 5  
 90, n = 2    94, n = 6  
 91, n = 3    95, n = 7  
 98, n = 1  
 99, n = 2

**Tabla 4.1.** Acción inhibitoria de algunos derivados de amida sobre GspS.

entre el residuo amina o poliamina y el carboxilo terminal del tripéptido es hidrolizada por el dominio amidasa y luego el tripéptido resultante es sustrato del dominio ligasa, anulando o disminuyendo la capacidad inhibitoria del compuesto<sup>103</sup> (Esquema 4.1).

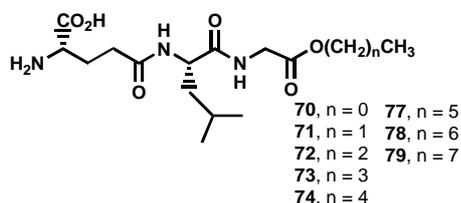


**Esquema 4.1.** Mecanismo de acción propuesto para GspS con derivados amida o éster.

En ese mismo sentido resultaron interesantes los resultados obtenidos con los derivados de ésteres en esta misma enzima.

En este caso también se ensayó la actividad como sustrato de los derivados. En la Tabla 4.2 se puede apreciar como todos los derivados ensayados tuvieron también actividad como sustrato. Se destaca que los ésteres de cadena hidrocarbonada de uno a cuatro átomos de carbono funcionaron enteramente como sustrato de la enzima, debido, probablemente, a que la actividad amidasa se podría extender a una actividad estearasa. Contrariamente, puede

Compuesto	% inhibición (500 μM)	% sustrato (500 μM)
70	36	96
71	11	103
72	44	103
73	15	102
74	15	38
75	2	31
76	3	38
77	4	43

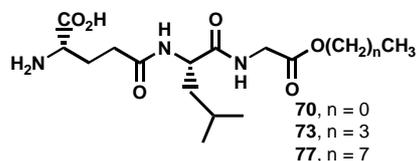


**Tabla 4.2.** Acción inhibitoria de los derivados de éster en GspS.

notarse que los ésteres de cadena alquílica más larga, presentaban menos eficiencia como sustrato de la enzima.

En base a estos resultados, no existía plena certeza de que la actividad como sustrato fuera enteramente debida a la actividad amidasa de la enzima. Para despejar esta incógnita se repitieron algunos ensayos utilizando una enzima con la mutación C79A. Es decir, que el residuo Cis-79 se cambió por Ala, de manera que la enzima resultante carecía de actividad amidasa. Los resultados se resumen en la Tabla 4.3.

Compuesto	% inhibición	%sustrato
<b>70</b>	62	32
<b>73</b>	26	3
<b>77</b>	51	0



**Tabla 4.3.** Acción inhibitoria de los derivados de amida en la mutante C79A de GspS.

La anulación del dominio hidrolítico puso de manifiesto el motivo principal de la actividad como sustrato de los ésteres en la enzima sin modificar. Se puede ver que al anular la actividad de dicho dominio, tanto el éster butílico como el octílico dejan de comportarse como sustratos de la enzima. En el caso del éster metílico, si bien mantiene cierta acción como sustrato, la merma en la misma es importante. Por otro lado, en todos los casos la disminución de efectividad como sustrato estaba asociada a un aumento en la potencia de la actividad inhibitoria. Es decir, que independientemente de la afinidad que tengan estos derivados por el sitio ligasa de esta enzima, los mismos son inactivados por el sitio hidrolasa, convirtiéndolos en sustrato.

#### 4.1.2 Derivados fosfinatos

De los siete derivados fosfinato sintetizados, sólo pudieron ensayarse los compuestos **143** y **144** en esta enzima. Los resultados obtenidos fueron substancialmente mejores a los

compuestos anteriores. El derivado **143** inhibió la actividad enzimática en un 98% a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ , presentando un  $\text{IC}_{50}$  de  $4,0 \pm 0,6 \mu\text{M}$  y una  $K_i$  de  $1,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ . Mejor resultado aún se obtuvo con el derivado **143**, el cual inhibió en un 99% la actividad enzimática a una concentración de 500  $\mu\text{M}$  y presentó un  $\text{IC}_{50}$  de  $1,14 \pm 0,04 \mu\text{M}$  y una  $K_i$  de  $0,37 \pm 0,02 \mu\text{M}$ , mejorando la actividad observada por los fosfinatos **30** y **31** mencionados en la introducción. Estos resultados refuerzan la afirmación de que es imprescindible eliminar la unión hidrolizable en el extremo C-terminal del tripéptido y que, por otro lado, la presencia de un centro de geometría tetraédrica en ese mismo punto puede conferir al inhibidor una característica de mimético del estado de transición capaz de inhibir la actividad de la enzima en cuestión.

## 4.2 Ensayos de inhibición contra TryS de *T. cruzi*

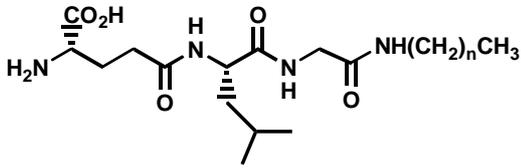
### 4.2.1 Derivados amida

Los derivados de amida **88-95** fueron ensayados por Katie Amssoms en la Universidad de Dundee, Escocia sobre la enzima TryS de *T. cruzi*, clonada, expresada y purificada en *E. coli*. por Oza *et al.*<sup>64</sup>

Los derivados amida lineales tuvieron una acción moderada como inhibidores de esta enzima, si bien mayor que en GspS de *C. fasciculata*. Si bien esta enzima posee, al igual que GspS, un dominio amidasa, la capacidad de hidrólisis del mismo es menor, y esto probablemente se vea reflejado en la mayor potencia de los derivados de amida como inhibidores de TryS de *T. cruzi* que de GspS de *C. fasciculata*. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.4.

Compuesto	% inhibición (500 $\mu$ M)
88	29
89	34
90	37
91	48
92	61
93	49
94	53
95	47



88, n = 0      93, n = 5  
 89, n = 1      94, n = 6  
 90, n = 2      95, n = 7  
 91, n = 3  
 92, n = 4

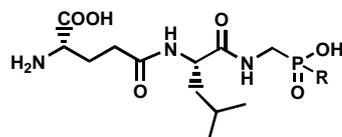
**Tabla 4.4.** Acción inhibitoria de los derivados amida sobre TryS de *T. cruzi*.

#### 4.2.2 Derivados fosfinato

Los derivados fosfinato se ensayaron en la enzima TryS de *T. cruzi*, al igual que los derivados amida. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.5. La inhibición de la actividad enzimática a una concentración de 500  $\mu$ M fue en todos los casos mayor al 90%, destacándose el derivado **142** de cadena alquílica de tres carbonos, con un 99% de inhibición a esa concentración. El IC<sub>50</sub> de este compuesto (11,8  $\mu$ M) no llegó a alcanzar los valores obtenidos para GspS de *C. fasciculata*. Sin embargo, éste dato fue de mayor relevancia por haberse logrado la inhibición de la propia enzima del parásito patógeno, y no de un parásito no patógeno modelo (*C. fasciculata*).

Por otro lado, es de esperar una diferencia de la afinidad por el sustrato entre ambas enzimas ya que, si bien no se conoce aún el mecanismo de acción de TryS de *T. cruzi*, debería haber una diferencia importante entre ambos sitios activos ya que GspS cataliza la conjugación de una unidad de glutatión con una unidad de espermidina, mientras que TryS de *T. cruzi* cataliza la conjugación de 2 unidades de glutatión con una de espermidina.<sup>64</sup>

Compuesto	% inhibición (500 $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub>
143	94	53,9 $\mu\text{M} \pm 5,2$
144	94	42,6 $\mu\text{M} \pm 2,6$
145	99	11,8 $\mu\text{M} \pm 0,6$
146	92	65,0 $\mu\text{M} \pm 7,8$
147	93	57,6 $\mu\text{M} \pm 4,1$
148	93	59,1 $\mu\text{M} \pm 2,4$



- 143**, R = CH<sub>3</sub>  
**144**, R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
**145**, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
**146**, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>  
**147**, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>  
**148**, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>

**Tabla 4.5.** Acción inhibitoria de los derivados amida sobre la TryS de *T. cruzi*.

### 4.3 Ensayos de inhibición contra TryS de *C. fasciculata*

Los derivados fosfinato fueron ensayados por Marcelo Comini y Timo Jäger en el German Research Center for Biotechnology (GBF), Braunschweig, Alemania, como inhibidores contra la enzima TryS de *C. fasciculata*, finalmente clonada y purificada en *E. coli* por Comini *et al.*<sup>104</sup> Estos compuestos que fueron potentes inhibidores de GspS de *C. fasciculata* y TryS de *T. cruzi* no fueron inhibidores de la actividad enzimática de TryS de *C. fasciculata* a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ . Únicamente el compuesto **144**, de cadena alquílica de 2 átomos de carbono exhibió una moderada acción inhibitoria hacia esta enzima, de un 10% a esa concentración. Estos datos refuerzan la hipótesis de los distintos caminos metabólicos para la síntesis de tripanotona ya que, si TryS de *T. cruzi* y de *C. fasciculata* tienen distintos sustratos naturales, es lógico que respondan de manera distinta a los mismos compuestos (inhibidores). Específicamente, es razonable pensar que un compuesto dado tenga actividad similar tanto en GspS de *C. fasciculata* como en TryS de *T. cruzi*. Los sustratos de ambas son gluatión y espermidina, mientras que para TryS de *C. fasciculata* los sustratos son glutationilespermidina y glutatión, como se explicó debidamente en la introducción.

#### 4.4 Ensayos de inhibición contra TryS de otros parásitos de la familia de tripanosomátidos.

Dada la actividad que mostraron los fosfinopéptidos contra TryS de *T. cruzi*, y la relevancia de este resultado, estos compuestos fueron ensayados contra TryS de los parásitos *L. major* y *T. brucei*., pertenecientes al igual que *T. cruzi* a la familia de los tripanosomátidos. Los resultados obtenidos se resumen a en la Tabla 4.6 .

Compuesto	TryS de <i>L. major</i>		TryS de <i>T. brucei</i>	
	% inhibición (500 $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	% inhibición (500 $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>143</b>	86	51	86	52
<b>144</b>	71	106	86	66
<b>145</b>	82	144	99	23
<b>146</b>	74	190	78	229
<b>147</b>	59	354	60	168
<b>148</b>	78	159	70	160

**Tabla 4.6.** Acción inhibitoria de los fosfinopéptidos sobre la TryS de *L. major* y *T. brucei*.

Manteniendo la tendencia encontrada en *T. cruzi*, los compuestos con mayor potencia, se encuentran, para TryS de estos parásitos, entre los derivados de cadena alquílica más corta.

Si bien la potencia de los fosfinopéptidos fue menor, estos resultados refuerzan la idea de que efectivamente existe un blanco molecular que es común a todos los miembros de la familia de los tripanosomátidos. O sea que el hallazgo de un inhibidor potente de esta enzima puede redundar en el avance en el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos de todo el conjunto de enfermedades producidas por esta familia de parásitos.

## 4.5 Ensayos de inhibición de crecimiento parasitario en *T. cruzi*

### 4.5.1 Introducción

El parásito tripanosomátido *T. cruzi* presenta, al igual que los otros miembros de su familia, un ciclo de vida complejo a lo largo del cual pasa por distintas formas morfológicas. Es importante tener en cuenta dichas formas, y sus características, al momento de realizar la evaluación de los potenciales inhibidores del crecimiento celular.

El ciclo de vida de *T. cruzi* (Figura 4.1) comprende tres formas morfológicas principales. Comienza con la ingesta de sangre infectada con tripomastigotes circulantes por parte del vector. El tripomastigote es la forma flagelada e infectiva del parásito. Éstos llegan al intestino medio del insecto, donde cambian a la forma epimastigote, también flagelada pero no infectiva. Allí se multiplica asexualmente y se dirige hacia la parte posterior del intestino y el recto fijándose a la pared celular mediante su flagelo. En este sitio se transforman en tripomastigotes metacíclicos, los cuales se desprenden cuando el insecto se vuelve a alimentar. En el momento de la alimentación, con sangre de humano u otro mamífero, deposita sus heces en la piel y es allí cuando los tripomastigotes pueden llegar al torrente sanguíneo del nuevo huésped a través de la picadura u otra herida en la piel. Una vez en el torrente sanguíneo de huésped, los tripomastigotes invaden las células del mismo donde se diferencian a la forma no flagelada amastigote replicándose en su citoplasma hasta producir la lisis celular. Finalmente, se transforman nuevamente a tripomastigotes circulantes, cerrando así el ciclo de vida.<sup>2</sup>

Sin duda la forma amastigote es la clínicamente más relevante del parásito en cuanto a la evaluación de una droga como inhibidor de esta parasitosis ya que es la forma en la que el parásito se replica dentro del mamífero. Al mismo tiempo, y dado que la reproducción del parásito es intracelular, es la más difícil de evaluar. Por este motivo, muchas veces la evaluación de un compuesto como inhibidor del crecimiento parasitario se realiza sobre la forma no infectiva epimastigote. Esta forma de los parásitos se pueden cultivar y la evaluación su división celular en un medio de cultivo apropiado es simple.

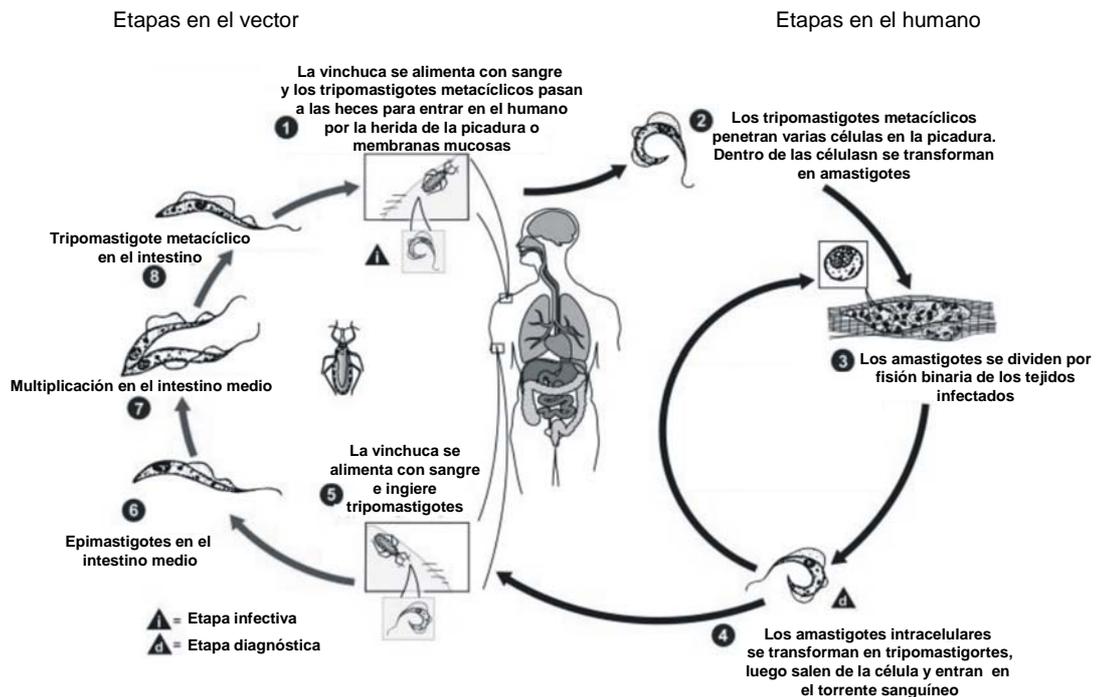


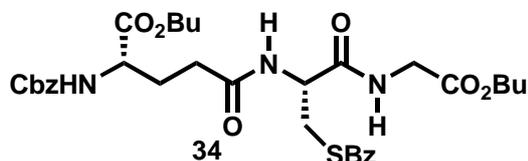
Figura 4.1 Ciclo de vida de *T. cruzi*.

#### 4.5.2 Ensayos sobre epimastigotes

Los derivados amida y sus precursores diprotegidos fueron evaluados contra epimastigotes de *T. cruzi* por el Dr. Roberto Docampo en el la Universidad de Illinois at Urbana-Champaign, U.S.A. Los derivados fosfinato fueron ensayados personalmente durante una pasantía que realicé en el laboratorio de Parasitología Molecular, Department of Pathobiology and Center for Zoonoses, Research, College of Veterinary Medicine, University of Illinois at Urbana-Champaign, U.S.A., bajo la supervisión del Dr. Docampo, durante septiembre y octubre de 2004.

Como se mencionó en la introducción, D'Silva *et al.* ensayaron la actividad biológica de derivados de *S*-alquil glutatión teniendo por blanco las enzimas del metabolismo de tripanotona.<sup>83</sup> El compuesto **34** fue el principal compuesto de la serie con actividad contra *T. brucei* ( $IC_{50} = 1,9 \mu M$ ).<sup>83</sup> Los autores postularon que los grupos que bloqueaban los extremos ácido y amino de glutatión convertían al mismo en una prodroga facilitando el ingreso del

tripéptido a través de las membranas celulares al conferirle mayor lipofiliencia al mismo. Una vez dentro de la célula, distintas esterasas y amidasas inespecíficas se encargarían de liberar la droga, es decir *S*-alquil glutatión. Los derivados de amida lineal y fosfinato se ensayaron contra epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Y en concentraciones de hasta 20 µg/ml. Debido a los resultados obtenidos por D'Silva en *T. cruzi* y *T. brucei*, también fueron evaluados los precursores protegidos de los derivados amida lineal. En dicho trabajo, se evaluaron ésteres de glutatión *S*-alquilado, en los que el residuo de glutatión se encontraba *N,O* diprotegido al igual que estos precursores como es el caso del compuesto **34**.

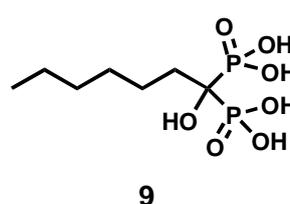
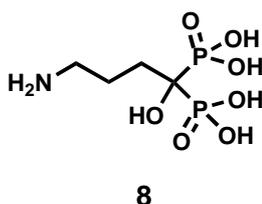
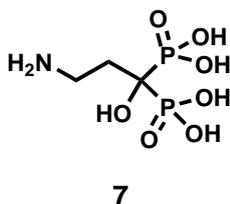


Sin embargo, en nuestro caso, ninguno de los derivados fosfinato, amida o sus precursores fueron capaces de inhibir apreciablemente el crecimiento parasitario contra epimastigotes de *T. cruzi*.<sup>105,106</sup>

#### 4.5.3 Ensayos sobre amastigotes

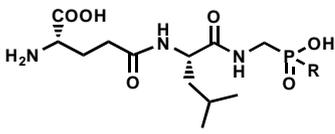
Al igual que los ensayos sobre epimastigotes de *T. cruzi*, los ensayos sobre amastigotes los realicé personalmente durante la pasantía mencionada anteriormente.

A pesar de los resultados obtenidos en epimastigotes, nuestras drogas se ensayaron contra amastigotes de *T. cruzi* ya que fueron potentes inhibidores de GspS y TryS. Por otro lado, existen antecedentes de agentes antiparasitarios que, libres de actividad contra la forma epimastigote, fueron potentes inhibidores contra la forma amastigote. Tal es el caso de los bisfosfonatos **7-9**, sintetizados en nuestro laboratorio.<sup>22,23</sup>



En la Tabla 4.7 se presentan los resultados obtenidos en estos ensayos.

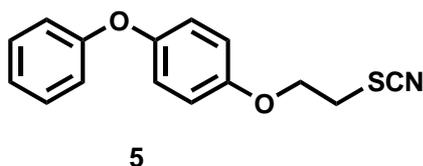
Compuesto	% inhibición (50 $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
143	0	>50
144	0	>50
145	0	>50
146	80	9,8
147	65	14,2
148	45	>50
149	31	>50



**143**, R = CH<sub>3</sub>  
**144**, R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
**145**, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
**146**, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>  
**147**, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>  
**148**, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>  
**149**, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>

**Tabla 4.7.** Acción inhibitoria sobre el crecimiento parasitario contra amastigotes de *T. cruzi*.

Los derivados de cadena alquílica de 4 y 5 carbonos (compuestos **135** y **136**, respectivamente) fueron los más potentes presentando valores de IC<sub>50</sub> de 9,8  $\mu\text{M}$  y 14,2  $\mu\text{M}$  para **135** y **136**, respectivamente. Estos datos son comparables a los mostrados por WC-9 (**5**), también desarrollado en nuestro laboratorio (IC<sub>50</sub> = 18,1  $\mu\text{M}$ ). De hecho, este compuesto se usó como control positivo en los ensayos de inhibición.



Al igual que los bisfosfonatos mencionados, estos son compuestos muy polares, por lo que probablemente se dificulte el ingreso en el parásito en la forma extracelular epimastigote. Es lógico pensar, por otro lado, que el parásito se encuentre más permeable en la forma amastigote intracelular y, si bien el compuesto tiene que atravesar la membrana celular del mamífero, ésta cuenta con más mecanismos de transporte transmembrana que la célula parasitaria.

Dada la actividad encontrada en estos derivados resultó interesante evaluar la toxicidad de los mismos frente a las células de mamífero utilizadas para dicho ensayo. Para ello, se estudió por microscopía de contraste de fase el efecto de estas drogas mediante la observación del desprendimiento de las mismas de su monocapa, redondez y formación de vacuolas. Además, se evaluó la viabilidad de las células tratadas mediante microscopía de fluorescencia, pudiendo diferenciarse a través de esta técnica, las células viables de las no viables luego del tratamiento. El análisis de estos ensayos arrojó que a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , es decir, la mayor concentración utilizada en los ensayos de inhibición del crecimiento del parásito, estos compuestos no presentaban una diferencia apreciable con el control. Esta selectividad encontrada es muy apreciable y no común a todas las drogas con efecto antiparasitario conocido. En efecto, antes de utilizar WC-9 como control positivo, se utilizó pentamidina, antiparasitario utilizado en distintas tripanosomiasis y leishmaniasis, el cual resultó altamente tóxico destruyendo completamente los mioblastos infectados con tripomastigotes, aún a una concentración de 2,5  $\mu\text{M}$ .

## **Capítulo 5: Conclusiones**



## 5 Conclusiones

En este trabajo de tesis se han sintetizado derivados del tripéptido  $\gamma$ -L-Glu-L-Leu-Gli-OH, el cual se utilizó como estructura líder para el diseño de inhibidores contra GspS y TryS. Los compuestos sintetizados se pueden dividir en dos grandes grupos en cuanto al tipo de modificación en el carboxilo terminal. Por un lado, los derivados de ésteres y amida del tripéptido. Por otro lado, los compuestos en que se reemplazó el grupo carboxilo por un grupo ácido fosfínico. El primero de ambos grupos mostró ser susceptible a la actividad amidasa encontrada en estas enzimas, eliminando toda potencial capacidad inhibitoria sobre las mismas, quedando así sólo la actividad inhibitoria inherente al tripéptido libre. La primera conclusión que surge de este trabajo, en un intento por establecer una relación estructura-actividad, es que cualquier modificación que se desee realizar sobre la estructura líder debe evitar uniones potencialmente hidrolizables por el sitio amidasa, como uniones amida o éster sobre el carboxilo terminal del tripéptido. El segundo grupo de compuestos no se vio afectado por esta actividad amidasa, encontrándose dentro del mismo inhibidores potentes de GspS y TryS. Se puede concluir entonces que la estrategia de incorporar un grupo mimético del estado de transición tetraédrico llevó a la obtención de una nueva estructura líder poseyendo un farmacóforo simple.

La complejidad que traía aparejada la síntesis de derivados de poliaminas llevó a la búsqueda de compuestos sintéticamente más accesibles. De esta forma, se lograron realizar distintas modificaciones sobre el carboxilo terminal del tripéptido, cada una de estas con su correspondiente serie homologada. Dentro de estas series homologadas, los derivados de cadena alquílica de 3 a 5 átomos de carbono **145**, **146** y **147**, fueron en los más potentes en los ensayos enzimáticos.

Una tendencia similar se observó en los ensayos de inhibición contra amastigotes de *T. cruzi*, en los cuales los derivados de cadena alquílica de menos de 4 carbonos no presentaron actividad, encontrándose el máximo de potencia en el derivado de 4 átomos de carbono **146**. Es justamente en este ensayo en donde la serie homologada toma importancia en cuanto a la incidencia de la longitud de la cadena alquílica sobre la lipofilidad de los compuestos y ésta,

a su vez, sobre la actividad biológica de los fosfinopéptidos. Se pudo verificar en este experimento que es necesario un mínimo de lipofilicidad para facilitar el ingreso de la droga al organismo vivo a través de las membranas celulares. En este caso, y en las condiciones del experimento, ese mínimo fue de 4 átomos de carbono (**146**).

Finalmente, lo más destacable de este trabajo de tesis es que por primera vez se encontraron inhibidores del camino biosintético de tripanotona cuya actividad enzimática correlaciona perfectamente con la actividad antiparasitaria *in vitro*, reforzando así la validez de tripanotona sintetasa como blanco molecular para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos contra las distintas leishmaniasis y tripanosomiasis. Además, se dispone de un farmacóforo simple para su optimización posterior. Este hecho permitirá en el futuro el acceso a distintos peptidomiméticos con una gran diversidad estructural.

Se puede decir que se ha encontrado una nueva estructura líder en la que existen dos partes bien definidas. Por un lado, una parte peptídica. Por otro lado, un ácido alquil fosfínico.

Teniendo en cuenta esta estructura como punto de partida para nuevas optimizaciones, ambas partes son fácilmente modificables según el esquema sintético seguido. Las nuevas optimizaciones tendrán que tener en cuenta los problemas afines al diseño de drogas tales como la estabilidad metabólica, penetración de las paredes celulares o la biodisponibilidad. En relación al primer punto, el desarrollo de peptidomiméticos que retengan la unidad farmacofórica podría llevar a drogas metabólicamente estables con retención de la actividad biológica ya que, como es sabido, el principal problema de las drogas peptídicas son sus tiempos de vida cortos.

## **Capítulo 6: Parte experimental**



## 6.1 Generalidades

**Solventes anhidros y reactivos sensibles a la humedad:** los solventes utilizados fueron de calidad “para análisis” o superior. El tetrahidrofurano, el éter y el tolueno se destilaron previamente sobre sodio-benzofenona, el cloruro de metileno y acetonitrilo se refluaron sobre pentóxido de fósforo y se almacenaron sobre tamices moleculares (4'), la dimetilformamida se utilizó como fue alquirida de Aldrich. En todos los casos, las reacciones con solventes o reactivos sensibles a la humedad se llevaron a cabo con material de vidrio previamente flameado y bajo atmósfera de nitrógeno o argón.

**Puntos de fusión:** se determinaron en un aparato de Fisher-Johns y no están corregidos.

**Espectroscopia IR:** los espectros IR se tomaron en film delgado o en pastillas de KBr con un espectrómetro Nicolet Magna IR 550 FT-IR.

**Resonancia magnética nuclear:** Los espectros de resonancia magnética nuclear se realizaron en espectrómetros Bruker AC-200 (200,13 MHz para  $^1\text{H}$  y 50,32 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) y AM-500 (500,15 MHz para  $^1\text{H}$ , 125,77 para  $^{13}\text{C}$  y 202,45 MHz para  $^{31}\text{P}$ ). Se utilizaron, según lo indicado en cada caso, los siguientes solventes deuterados: cloroformo- $d$ , metanol- $d_4$ , dimetilsulfóxido- $d_6$  y  $\text{D}_2\text{O}$  en tubos de 5 mm de diámetro. Los desplazamientos químicos para RMN  $^1\text{H}$  están expresados en la escala de  $\delta$ , en partes por millón (ppm) respecto a la resonancia del tetrametilsilano utilizado como referencia interna (0,00 ppm). Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) están expresados en Hz. Las señales se indican en cada caso como singulete (s), singulete ancho (sa), doblete (d), doble doblete (dd), doble doblete (ddd), triplete (t), doble triplete (dt), triplete triplete (tt), cuarteto (c), doble cuarteto (dc), quintuplete (q), multiplete (m), multiplete AB (mAB). Los desplazamientos químicos para RMN  $^{13}\text{C}$  están expresados en ppm tomando como referencia el pico central correspondiente a la señal del cloroformo- $d$  (77,0 ppm). Los desplazamientos químicos para RMN  $^{31}\text{P}$  están expresados en ppm tomando como referencia el pico correspondiente a la señal de  $^{31}\text{P}$  del ácido fosfórico, utilizado como referencia interna o externa (0,00 ppm). En la mayoría de los casos, la asignación de señales de  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$  se realizó utilizando una combinación

de técnicas mono y bidimensionales, como experimentos de correlación homonuclear (COSY-45) y heteronuclear (HETCOSY). La multiplicidad de las señales se determinó por la técnica de incremento libre de distorsión por transferencia de polarización (DEPT-135).

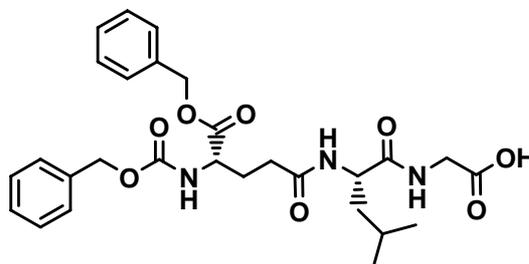
**Espectrometría de masa:** los espectros de masa electrospray-alta resolución se determinaron utilizando un espectrómetro Micromass Q-ToF Ultima, el cual es un híbrido cuadrupolo-tiempos de vuelo con capacidad EM/EM, Universidad de Illinois at Urbana-Champaign, IL, USA.

**Cromatografías en capa delgada:** las cromatografías analíticas en capa delgada (CCD) se realizaron utilizando la técnica ascendente en soportes de aluminio (Sílicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck). La detección se hizo por inmersión de las placas en una solución de ácido sulfúrico 10% en etanol, una solución de Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0,1% p/v y Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> 5 % p/v en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% y posterior calentamiento a 120°C, una solución de ninhidrina en etanol 0,1% m/v y posterior calentamiento o por detección al UV ( $\lambda=254$  nm).

**Cromatografía en columna:** se realizó utilizando como fase fija sílicagel 60 de malla 230-400 (Merck). Los solventes de elución se indican en cada caso.

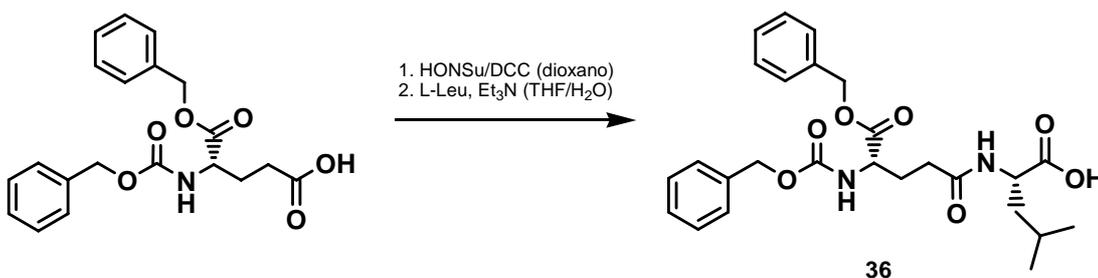
**Análisis elemental:** los microanálisis fueron realizados por UMYMFOR (CONICET-FCEyN) o Atlantic Microlab Inc., Norcross, GA, USA.

## 6.2 Síntesis del tripéptido protegido (*N*-Benciloxycarbonil-L-glutamil-L-leucil-glicina $\alpha$ -éster bencílico)



37

### 6.2.1 *N*-Benciloxycarbonil-L-glutamil-L-leucina $\alpha$ -éster bencílico (36)

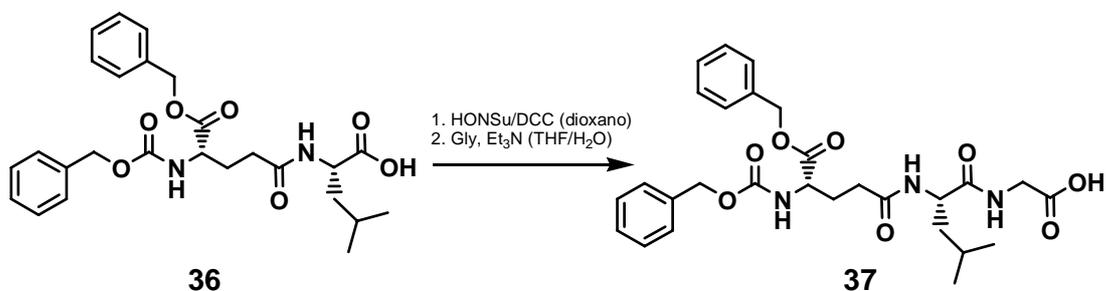


A una solución de *N*-benciloxycarbonil-L- $\gamma$ -glutamato de  $\alpha$ -bencilo (5,0 g, 13,46 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida (1,8 g, 13,16 mmol) en 1,4-dioxano anhidro (100 mL) se agregó dicitlohexilcarbodiimida (4,17g, 20,20 mmol) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 hs. El precipitado blanco de dicitlohexilurea se eliminó por filtración a través de un embudo de vidrio fritado y se evaporó el solvente. El residuo se disolvió en THF anhidro (60 mL), y esta solución se agregó gota a gota sobre una solución de L-leucina (2,12 g, 16,16 mmol) y trietilamina (2,25 mL, 16,16 mmol) en agua (30 mL). Esta mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Se evaporó el solvente, se resuspendió el residuo en agua (50 mL) y se ajustó el pH a 1,0 con una solución acuosa de HCl 5%. Se extrajo esta suspensión con acetato de etilo (3  $\times$  20 mL), se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel) eluyendo con una mezcal de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH-AcOH

(95:5:1) para dar 5,5 g (84% de rendimiento) de dipéptido protegido **36** como un sólido blanco altamente higroscópico.

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0,81 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H,  $H_3C_a(\delta)\text{Leu}$ ), 0,86 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H,  $H_3C_b(\delta)\text{Leu}$ ), 1,34-1,68 (m, 3H,  $H_2C(\beta)\text{Leu}$ ,  $HC(\gamma)\text{Leu}$ ), 1,69-1,89 (m, 1H,  $H_aC(\beta)\text{Glu}$ ), 1,89-2,11 (m, 1H,  $H_bC(\beta)\text{Glu}$ ), 2,11-2,32 (m, 2H,  $H_2C(\gamma)\text{Glu}$ ), 2,89-3,85 (sa, 1H, COOH), 4,02-4,25 (m, 2H,  $HC(\alpha)\text{Glu}$ ,  $HC(\alpha)\text{Leu}$ ), 5,03 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,13 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 7,21-7,43 (m, 10H, Ph), 7,81 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H, NH), 8,01 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H, NH); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  21,6 ( $C_a(\delta)\text{Leu}$ ), 22,7 ( $C_b(\delta)\text{Leu}$ ), 24,7 ( $C(\gamma)\text{Leu}$ ), 27,9 ( $C(\gamma)\text{Glu}$ ), 32,0 ( $C(\beta)\text{Glu}$ ), 40,8 ( $C(\beta)\text{Leu}$ ), 51,1 ( $C(\alpha)\text{Leu}$ ), 53,6 ( $C(\alpha)\text{Glu}$ ), 66,9 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67,1 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 127,9 (Ph), 128,0 (Ph), 128,2 (Ph), 128,3 (Ph), 128,4 (Ph), 135,1 (Ph), 136,0 (Ph), 156,4 (CONH), 171,8 (CO), 172,6 (CO), 176,4 (CO).

### 6.2.2 *N*-Benciloxycarbonil-L-glutamil-L-leucil-glicina $\alpha$ -éster bencilico (**37**)



El compuesto **36** (2,64 g, 5,45 mmol) se trató con *N*-hidroxisuccinimida (0,78 g, 6,54 mmol), diciclohexilcarbodiimida (1,69 g, 8,17 mmol) y glicina (0,49 g, 6,54 mmol) siguiendo el mismo procedimiento que para la síntesis de **36**.

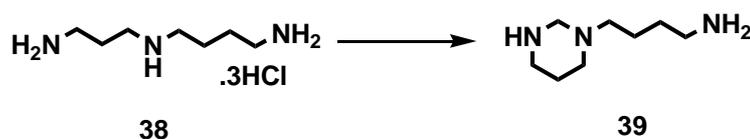
El producto se purificó por cromatografía en columna (sílica gel) eluyendo con una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH-AcOH (95:1:1) a  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH-AcOH (90:10:1) para dar 1,36 g (80% de rendimiento) del tripéptido **37** como un sólido blanco.

pf 106–108 °C; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0,80 (d,  $J = 7,2$  Hz, 3H,  $H_3C_a(\delta)\text{Leu}$ ), 0,84 (d,  $J = 7,2$  Hz, 3H,  $H_3C_b(\delta)\text{Leu}$ ), 1,29-1,67 (m, 3H,  $HC(\beta)\text{Leu}$ ,  $HC(\gamma)\text{Leu}$ ), 1,67-1,88 (m, 1H,  $H_aC(\beta)\text{Glu}$ ), 1,88-2,10 (m, 1H,  $H_bC(\beta)\text{Glu}$ ), 2,11-2,36 (m, 2H,  $HC(\gamma)\text{Glu}$ ), 2,87-3,96 (sa, 1H, COOH), 3,57 (s, 2H,  $CH_2\text{Gli}$ ), 4,00-4,17 (m, 1H,  $HC(\alpha)\text{Glu}$ ), 4,18-4,38 (m, 1H,  $HC(\alpha)\text{Leu}$ ), 5,03 (s, 2H,  $OCH_2\text{Ph}$ ), 5,12 (s, 2H,  $OCH_2\text{Ph}$ ), 7,21-7,48 (m, 10H, Ph), 7,83 (d, 1H,  $J = 7,5$  Hz, NH), 7,92 (m, 1H, NH), 8,07 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H, NH); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$  (95:5))  $\delta$  21,6 ( $C_a(\delta)\text{Leu}$ ), 22,7 ( $C_b(\delta)\text{Leu}$ ), 24,6 ( $C(\gamma)\text{Leu}$ ), 27,1 ( $C(\gamma)\text{Glu}$ ), 31,8 ( $C(\beta)\text{Glu}$ ), 40,4 ( $C(\beta)\text{Leu}$ ), 43,0 ( $CH_2\text{Gli}$ ), 52,4 ( $C(\alpha)\text{Leu}$ ), 53,7 ( $C(\alpha)\text{Glu}$ ), 66,8 ( $OCH_2\text{Ph}$ ), 67,0 ( $OCH_2\text{Ph}$ ), 127,8 (Ph), 128,0 (Ph), 128,2 (Ph), 128,3 (Ph), 128,4 (Ph), 135,2 (Ph), 136,2 (Ph), 156,6 (OCONH), 172,2 (CO), 173,6 (CO), 173,7 (CO), 177,3 (CO).

### 6.3 Síntesis de derivados de poliamina

#### 6.3.1 Protección del $N^1$ de espermidina

##### $N^1, N^4$ metilenespermidina (39)

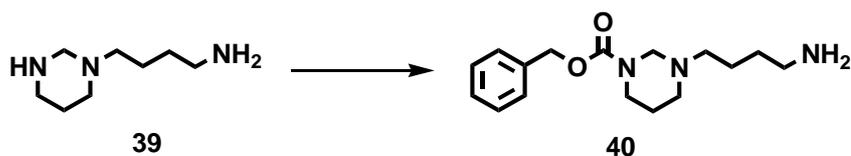


Se disolvieron 2,7 g de triclorhidrato de espermidina (**38**, 10,6 mmol) en 50 mL de una solución acuosa de hidróxido de sodio (1,27 g, 31,8 mmol). Sobre esta solución se agregaron 0,8 mL de solución acuosa de formaldehído 37% (10,6 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. bajo atmósfera de nitrógeno. Se saturó la solución con cloruro de sodio y se extrajo con cloroformo (5 x 30 mL). Los extractos orgánicos combinados se

secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se evaporaron para dar un 1,36 g (82%) de un aceite incoloro, el cual solidificó luego de almacenarlo un duranate día a  $5^\circ\text{C}$ .

Sólido blanco. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,34-1,71 (m, 9H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NH}$ ), 2,25 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 2,57 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 2,70 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 2,81 (t,  $J = 5,9$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3,38 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  27,1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 31,8 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 42,1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 45,2 ( $\text{NCH}_2$ ), 53,1 ( $\text{NCH}_2$ ), 55,4 ( $\text{NCH}_2$ ), 69,9 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ).

#### ***N*<sup>1</sup>-benciloxycarbonil-*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>4</sup>-metilenespermidina (40)**



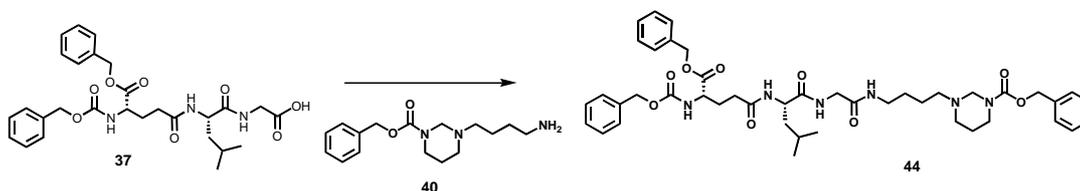
Se disolvieron 100 mg (0,67 mmol) de *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>4</sup>-metilenespermidina (**39**) en agua (6 mL) a  $0^\circ\text{C}$ . Se agregó sobre esa solución cloroformiato de bencilo (54  $\mu\text{L}$ , 0,66 mmol) y se dejó durante 3 hs con agitación enérgica. Se hizo otro agregado de cloroformiato de bencilo (20  $\mu\text{L}$ , 0,24 mmol) y se agitó una hora a temperatura ambiente. Se extrajo con cloruro de metileno (3 x 5 mL) y se llevó la fase acuosa (pH = 5) a pH = 10 con solución de carbonato de potasio 1M. Se extrajo con cloruro de metileno (6 x 5 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron con sulfato de sodio y se evaporaron a presión reducida, obteniéndose 40 mg (54%) de un aceite incoloro.

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,30-1,76 (m, 8H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{NH}_2$ ), 2,41 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 2,59-2,77 (m, 4H,  $\text{NCH}_2$ ), 3,53 (t,  $J = 5,7$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 4,14 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 5,13 (s, 2H,  $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 7,34 (sa, 5H, Ph). RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22,7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 24,7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 31,6 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 42,0 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 43,8

(NCH<sub>2</sub>), 52,1 (NCH<sub>2</sub>), 52,8 (NCH<sub>2</sub>), 65,3 (NCH<sub>2</sub>N), 67,1 (PhCH<sub>2</sub>O), 127,9 (Ph), 127,9 (Ph), 128,4 (Ph), 136,8 (Ph).

### 6.3.2 Acoplamiento del tripéptido diprotegido **37** con *N*<sup>1</sup>-benciloxycarbonil-*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>4</sup>-metilenespermidina

#### *N*-Benciloxycarbonil-L- $\gamma$ -glutamil(éster $\alpha$ -bencílico)-L-leucilglicil-*N*<sup>8</sup>(*N*<sup>1</sup>-Benciloxycarbonil-*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>4</sup>-metilenespermidina) (**44**)

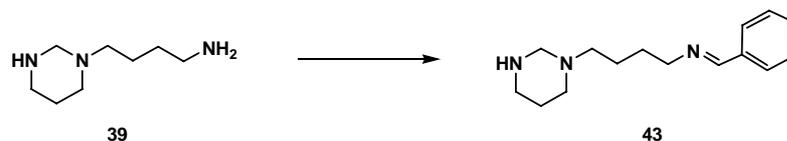


A una solución de **37** (186,0 mg, 0,34 mmol), *N*-hidroxisuccinimida (122 mg, 1,00 mmol) en dioxano anhidro (10 mL), se agregó DCC (212,6 mg, 1,00 mmol), bajo atmósfera de argón y se agitó durante 16 hs a temperatura ambiente. Sobre esta mezcla de reacción se agregó una solución de **40** (0,44 mmol) en dioxano (6 mL). La mezcla de reacción se dejó 1 hora a temperatura ambiente. Se filtró el precipitado blanco de DCU a través de un embudo de vidrio fritado y se evaporó el solvente. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (silicagel).

Sólido blanco; 57% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  0,90 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H,  $H_3C_a$ Leu), 0,94 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H,  $H_3C_b$ Leu), 1,39-1,52 (m, 4H, (CO)NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1,48-1,69 (m, 5H, HC( $\beta$ )Leu, HC( $\gamma$ )Leu, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CO)), 1,84-1,95 (m, 1H,  $H_a$ C( $\beta$ )Glu), 2,13-2,24 (m, 1H,  $H_b$ C( $\beta$ )Glu), 2,31-2,44 (m, 4H,  $H_2$ C( $\gamma$ )Glu, (CO)NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2,65-2,63 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CO)), 3,06-3,19 (m, 2H, (CO)NCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3,46-3,56 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CO)), 3,66 (d,  $J = 16,6$  Hz, 1H,  $CH_a$ Gli), 3,90 (d,  $J = 16,6$  Hz, 1H,  $CH_b$ Gli), 4,13 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>N), 4,14-4,22 (m, 1H, HC( $\alpha$ )Leu), 4,26 (dd,  $J = 9,3, 4,9$  Hz,

$^1\text{H}$ ,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 5,07 (mAB, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,10 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,15 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 7,19-7,43 (m, 15H, Ph). RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  22,1 ( $\text{C}_\alpha(\delta)\text{Leu}$ ), 23,3 ( $\text{C}_\beta(\delta)\text{Leu}$ ), 24,1 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})$ ), 25,1 ( $(\text{CO})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 25,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ ), 28,0 ( $(\text{CO})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 28,1 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 32,4 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 40,1 ( $(\text{CO})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 41,1 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 43,6 ( $\text{CH}_2\text{Gli}$ ), 44,8 ( $(\text{CO})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 53,2 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CO})$ ), 54,1 ( $(\text{CO})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 54,2 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 55,1 ( $\text{C}(\alpha)\text{Glu}$ ), 66,0 ( $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 67,7 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 68,0 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 68,4 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 128,8 (Ph), 129,0 (Ph), 129,1 (Ph), 129,3 (Ph), 129,5 (Ph), 129,6 (Ph), 137,2 (Ph), 138,0 (Ph), 138,1 (Ph), 156,6 ( $\text{OCONH}$ ), 158,7 ( $\text{OCONH}$ ), 171,5 (CO), 173,5 (CO), 175,2 (CO), 175,6 (CO).

### 6.3.3 Protección de $N^8$ de esperimidina



#### $N^8$ -bencilidén- $N^1, N^4$ -metilenesperimidina (43)

Una solución de 1,0 g de **39** (6,34 mmol) en 30 mL de tolueno se trató con benzaldehído recién destilado (0,67 g, 6,34 mmol). La mezcla de reacción se llevó a reflujo retirando el agua de reacción con una trampa de Dean-Stark. Se mantuvo el reflujo durante 4 hs. y se evaporó el solvente a presión reducida, obteniéndose 1,52 g (98%) de un aceite verdoso.

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,35-1,80 (m, 7H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ , NH), 2,36 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 2,50 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 2,58 (t,  $J = 5,7$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 2,81 (t,  $J = 6,0$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3,22 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{N}$ ), 3,62 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}=\text{CH}$ ), 7,36-7,48 (3H, Ph), 7,66-7,77 (2H, Ph), 8,27 (s, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}=\text{CHPh}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22,9 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 24,7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 28,7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 50,3 ( $\text{NCH}_2$ ),

52,8 (NCH<sub>2</sub>), 54,8 (NCH<sub>2</sub>), 61,2 (NCH<sub>2</sub>N), 74,3 (CH<sub>2</sub>N=CH), 127,7 (Ph), 128,2 (Ph), 130,1 (Ph), 136,0 (Ph), 160,5 (CH<sub>2</sub>N=CH).

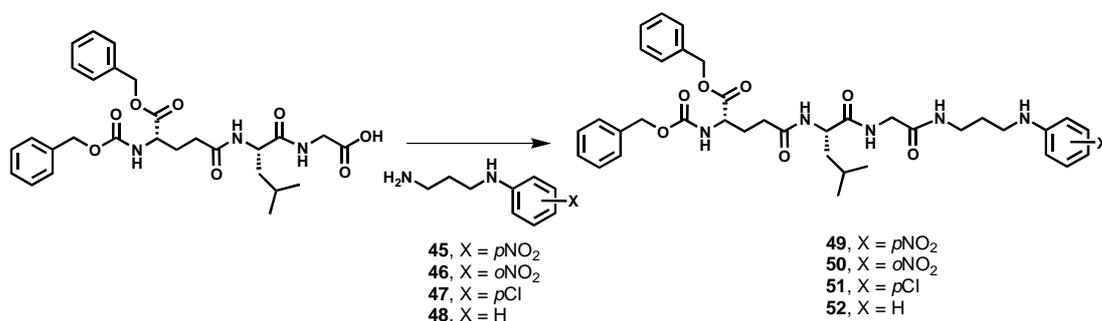
**N<sup>8</sup>-bencil-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-metilenespermidina (47)**



Una solución de 500 mg de **43** (2,04 mmol) en metanol (5 mL) se trató con borohidruro de sodio (462 mg, 12,24 mmol) a 0 °C durante una hora. La mezcla de reacción se trató con 30 mL de NaCl (s.s.) y 30 mL de diclorometano. Se separó la fase orgánica y la acuosa se extrajo 4 veces con 15 mL de diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el solvente se evaporó a presión reducida y temperatura ambiente. Se obtuvo **47** como un aceite verdoso el cual fue purificado por cromatografía en columna (silicagel) utilizando una mezcla de diclorometano–metanol–amoníaco acuoso 25% en un proporción 85:15:1, obteniéndose 343 mg (68%) de un aceite incoloro.

Aceite incoloro. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,47-1,67 (m, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1,85 (sa, 2H, NH), 2,18-2,33 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,51-2,72 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>), 2,80 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3,38 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>N), 3,80 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>NH), 7,29-7,36 (3H, Ph); RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>+ CD<sub>3</sub>OD) δ 23,9 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25,7 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 26,9 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 44,1 (NCH<sub>2</sub>), 48,2 (NCH<sub>2</sub>), 52,3 (NCH<sub>2</sub>), 54,7 (NCH<sub>2</sub>), 68,7 (NCH<sub>2</sub>N), 127,4 (Ph), 128,3 (Ph), 128,5 (Ph), 137,7 (Ph).

## 6.4 Derivados de poliaminas aromáticas



### 6.4.1 Acoplamiento del tripéptido diprotegido **37** con las poliaminas aromáticas

#### Procedimiento general

A una solución de **37** (200,0 mg, 0,37 mmol), *N*-hidroxisuccinimida (131,5 mg, 1,11 mmol) en dioxano anhidro (50 mL), se agregó DCC (228,5 mg, 1,11 mmol), bajo atmósfera de argón y se agitó durante 16 hs a temperatura ambiente. Sobre esta mezcla de reacción se agregó la poliamina correspondiente (0,44 mmol). La mezcla de reacción se dejó entre 16 y 64 hs a temperatura ambiente. Se filtró el precipitado blanco de DCU a través de un embudo de vidrio fritado y se evaporó el solvente. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (silicagel).

#### *N*-Benziloxicarbonil-L- $\gamma$ -glutamil(éster $\alpha$ -bencílico)-L-leucilglicil *N*-3-(4-nitrofenil) prop-1-ilamida (**53**)

Sólido naranja; 93% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  0,91 (d, *J* = 5,9 Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>a</sub> Leu), 0,95 (d, *J* = 6,2 Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>b</sub> Leu), 1,51-1,69 (m, 3H, HC( $\beta$ )Leu, HC( $\gamma$ )Leu), 1,70-1,82 (m, 2H, (CO)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 1,85-1,98 (m, 1H, H<sub>a</sub>C( $\beta$ )Glu), 2,13-2,24 (m, 1H, H<sub>b</sub>C( $\beta$ )Glu), 2,26-2,37 (m, 2H, H<sub>2</sub>C( $\gamma$ )Glu), 3,17 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, (CO)NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 3,21-3,33 (m, 2H, (CO)NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHPh), 3,68 (d, *J* = 16,7 Hz, 1H, CH<sub>a</sub>Gli), 4,00 (d, *J* = 16,7 Hz, 1H, CH<sub>b</sub>Gli), 4,08-4,17 (m, 1H, HC( $\alpha$ )Glu), 4,35 (dd, *J* = 8,7, 4,8 Hz, 1H, HC( $\alpha$ )Leu), 5,08 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5,14 (s, 2H,

OCH<sub>2</sub>Ph), 6,51 (d,  $J = 9,1$  Hz, *H*Ph(*o*NH)), 7,23-7,38 (m, 10H, Ph), 8,02 (d,  $J = 9,1$  Hz, *H*Ph(*o*NO<sub>2</sub>)); RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD) δ 21,8 (C<sub>a</sub>(δ)Leu), 22,7 (C<sub>b</sub>(δ)Leu)\*, 24,7 (C(γ)Leu), 27,8 (CO)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 28,0 (C(γ)Glu), 31,4 (C(β)Glu), 36,7 ((CO)NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 39,8 ((CO)NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHPh), 39,9 (C(β)Leu), 42,9 (C(α)Gli), 53,2 (C(α)Leu), 53,5 (C(α)Glu), 66,9 (OCH<sub>2</sub>Ph), 67,1 (OCH<sub>2</sub>Ph), 110,6 (C-*o*-NH), 126,3 (Ph), 127,7 (Ph), 127,9 (Ph), 128,0 (Ph), 128,3 (Ph), 128,4 (Ph), 134,9 (Ph), 135,9 (Ph), 136,7 (Ph), 153,8 (C-NH), 156,5 (OCONH), 171,8 (CO), 173,4 (CO), 173,5 (CO).

***N*-Benziloxycarbonil-*L*- $\gamma$ -glutamil(éster  $\alpha$ -bencílico)-*L*-leucilglicil-3-(2-nitrofenil)-prop-1-ilamida (54)**

Sólido naranja; 73% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,92 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H, *H*<sub>3</sub>C<sub>a</sub>Leu), 0,95 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H, *H*<sub>3</sub>C<sub>b</sub>Leu), 1,51-1,71 (m, 4H, *HC*(β)Leu, *HC*(γ)Leu, *NH*), 1,75-1,96 (m, 3H, *H*<sub>a</sub>C(β)Glu, (CO)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 2,14-2,33 (m, 3H, *H*<sub>b</sub>C(β)Glu, *H*<sub>2</sub>C(γ)Glu), 3,22-3,41 (m, 4H, (CO)NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh, (CO)NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHPh), 3,74 (dd,  $J = 16,3, 3,8$  Hz, *CH*<sub>a</sub>Gli), 3,93-4,18 (m, 3H, *H*<sub>b</sub>Gli, *HC*(α)Glu), 4,35 (t,  $J = 7,7$  Hz, 1H, *HC*(α)Leu), 5,09 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5,14 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5,63 (d,  $J = 7,7$  Hz, 1H, *NH*(CO)), 5,63 (sa, 1H, *NH*(CO)), 6,61 (ddd,  $J = 8,6, 7,1, 1,3$  Hz, 1H, ), 6,81 (d,  $J = 8,8$  Hz, *H*-Ph-(*o*-NH)), 7,03 (s,a., (CO)NH), 7,16 (sa, (CO)NH), 7,22-7,48 (m, 11H, Ph), 8,11 (dd,  $J = 8,6, 1,6$  Hz, *H*-Ph-(*o*-NO<sub>2</sub>)); RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD) δ 21,6 (C<sub>a</sub>(δ)Leu), 22,7 (C<sub>b</sub>(δ)Leu), 24,6 (C(γ)Leu), 27,9 (CO)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 28,3 (C(γ)Glu), 31,5 (C(β)Glu), 37,0 ((CO)NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 39,8 ((CO)NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHPh), 40,3 (C(β)Leu), 42,9 (C(α)Gli), 53,0 (C(α)Leu), 53,3 (C(α)Glu), 67,0 (OCH<sub>2</sub>Ph), 67,3 (OCH<sub>2</sub>Ph)113,7 (C-*o*-NH), 115,13 (C-*p*-NH), 126,7(Ph), 127,8 (Ph), 128,07 (Ph), 128,13 (Ph), 128,4 (Ph), 135,0 (Ph), 136,2 (Ph), 145,3 (Ph), 156,9 (OCONH), 169,8 (CO), 171,8 (CO), 173,3 (CO).

***N*-Benziloxicarbonil-*L*- $\gamma$ -glutamil(éster  $\alpha$ -bencílico)-*L*-leucilglicil *N*-1-propilaminofenilamida (55)**

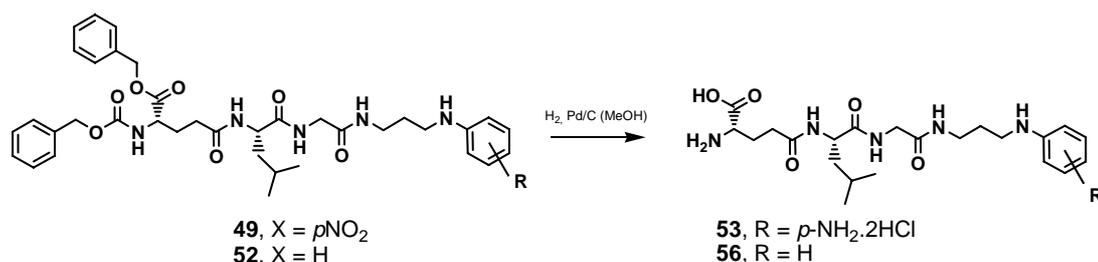
Sólido blanco; 68% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,91 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_a\text{Leu}$ ), 0,94 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_b\text{Leu}$ ), 1,49-2,04 (m, 6H,  $\text{HC}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ,  $\text{NH}$ ,  $\text{H}_a\text{C}(\beta)\text{Glu}$ , 1H, , (CO) $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHPh}$ ), 2,14-2,33 (m, 3H,  $\text{H}_b\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ,  $\text{H}_2\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,13 (t,  $J = 6,4$  Hz, 2H, (CO) $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHPh}$ ), 3,21-3,69 (m, 2H, (CO) $\text{NH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NHPh}$ ), 3,69 (d,  $J = 16,3$  Hz,  $\text{CH}_a\text{Gli}$ ), 4,04 (d,  $J = 16,8$  Hz, 1H,  $\text{CH}_b\text{Gli}$ ), 4,12 (s,a., 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 4,37 (m,  $J = 7,3$  Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ), 5,10 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,15 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,73 (d,  $J = 7,7$  Hz, 1H,  $\text{NH}(\text{CO})$ ), 6,30 (d,  $J = 6,2$  Hz, 1H,  $\text{NH}(\text{CO})$ ), 6,54-6,74 (m, 3H, Ph), 6,87 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1H, (CO) $\text{NH}$ ), 6,89 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H, (CO) $\text{NH}$ ), 7,13 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H, Ph), 7,17 (d,  $J = 7,7$  Hz, 1H, Ph), 7,28-7,40 (m, 10H, Ph); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  21,9 ( $\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 22,8 ( $\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 24,7 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ ), 28,2 (CO) $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHPh}$ ), 28,5 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 31,7 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 37,1 ((CO) $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHPh}$ ), 40,2 ((CO) $\text{NH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NHPh}$ ), 40,9 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 43,1 ( $\text{C}(\alpha)\text{Gli}$ ), 52,8 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 53,4 ( $\text{C}(\alpha)\text{Glu}$ ), 67,1 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67,3 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 112,8 (*o*-NH), 117,1 (*C-p*-NH), 127,0 (Ph), 128,2 (Ph), 128,48 (Ph), 128,59 (Ph), 129,2 (Ph), 135,1 (Ph), 136,1 (Ph), 148,2 (Ph), 156,4 (OCONH), 169,2 (CO), 171,8 (CO), 172,8 (CO).

***N*-Benziloxicarbonil-*L*- $\gamma$ -glutamil(éster  $\alpha$ -bencílico)-*L*-leucilglicil *N*-3-(2-clorofenil)prop-1-ilamida (56)**

Sólido blanco; 58% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,90 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H,  $\text{C}_a\text{H}_3\text{Leu}$ ), 0,93 (d,  $J = 5,6$  Hz, 3H,  $\text{C}_b\text{H}_3\text{Leu}$ ), 1,48-1,77 (m, 5H,  $\text{HC}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ , (CO) $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHPh}$ ), 1,79-2,00 (m, 1H,  $\text{H}_a\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,08-2,29 (m, 3H,  $\text{H}_b\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ,  $\text{H}_2\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,07 (t,  $J = 6,4$  Hz, 2H, (CO) $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHPh}$ ), 3,16-3,36 (m, 2H, (CO) $\text{NH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NHPh}$ ), 3,70 (dd,  $J = 16,3, 5,1$  Hz,  $\text{CH}_a\text{Gli}$ ), 3,98 (dd,  $J = 16,3, 6,8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_b\text{Gli}$ ), 4,01-4,18 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 4,26-4,42 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ), 5,07 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,13 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,78 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H,  $\text{NH}(\text{CO})$ ), 6,51 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H,  $\text{HPh}(\text{oNH})$ ), 6,96 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H, (CO) $\text{NH}$ ), 6,98 (d,  $J = 5,9$  Hz, 1H,

(CO)NH), 7,08 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H,  $H_{Ph}(mNH)$ ), 7,22-7,70 (m, 10H, Ph); RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  21,8 ( $C_a(\delta)Leu$ ), 22,7 ( $C_b(\delta)Leu$ ), 24,7 ( $C(\gamma)Leu$ ), 28,1 ((CO)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 28,3 ( $C(\gamma)Glu$ ), 31,7 ( $C(\beta)Glu$ ), 36,9 ((CO)NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 40,2 ((CO)NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHPh), 40,8 ( $C(\beta)Leu$ ), 43,1 ( $C(\alpha)Gli$ ), 52,8 ( $C(\alpha)Leu$ ), 53,4 ( $C(\alpha)Glu$ ), 67,1 (OCH<sub>2</sub>Ph), 67,3 (OCH<sub>2</sub>Ph), 113,8 ( $C_{o}NH$ ), 121,4 ( $C_{p}NH$ ), 127,9 (Ph), 128,2 (Ph), 128,48 (Ph), 128,56 (Ph), 128,9 (Ph), 135,0 (Ph), 136,1 (Ph), 146,8 (Ph), 156,4 (OCONH), 169,3 (CO), 171,8 (CO), 172,9 (CO).

#### 6.4.2 Hidrogenólisis de los grupos protectores



#### Procedimiento general

A una solución del compuesto protegido (0,1 mmol) en metanol (10 mL), en presencia de paladio sobre carbono (5%) se trató con hidrógeno a 1 atm durante una hora. La mezcla se filtró a través de un filtro de vidrio fritado y se evaporó el solvente.

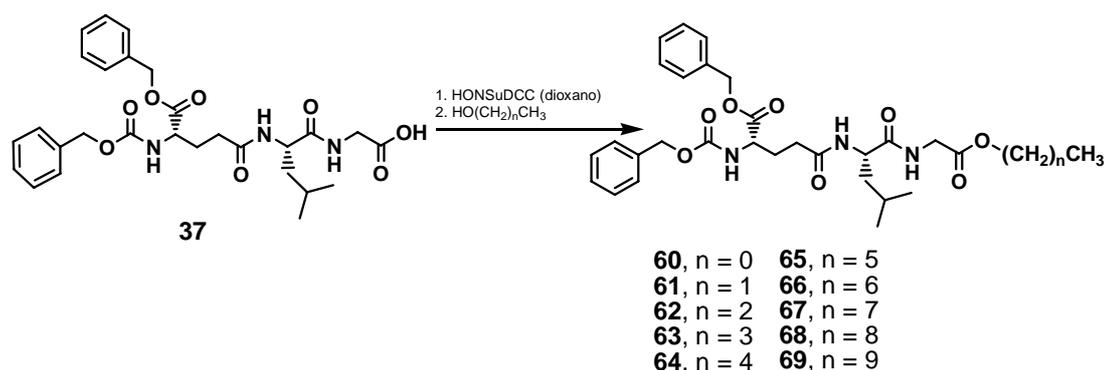
#### L- $\gamma$ -Glutamil-L-leucilglicil N-3-(4-aminofenil)prop-1-ilamida • 2HCl (57)

Sólido blanco; 32% de rendimiento; RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  0,93 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H,  $H_3C_a Leu$ ), 0,97 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H,  $H_3C_b Leu$ ), 1,52-1,81 (m, 3H,  $HC(\beta)Leu$ ,  $HC(\gamma)Leu$ ), 1,92-2,12 (m, 2H,  $H_2C(\beta)Glu$ ), 2,12-2,32 (m, 2H, (CO)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 2,50-2,98 (m, 1H,  $H_2C(\beta)Glu$ ), 3,25-3,54 (m, 4H, (CO)NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh,

(CO)NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHPh), 3,79 (d,  $J = 17,5$  Hz, 1H, CH<sub>a</sub>Gli), 3,88 (d,  $J = 17,5$  Hz, 1H, CH<sub>b</sub>Gli), 4,09 (dd,  $J = 12,2, 6,0$  Hz, 1H, HC(α)Glu), 4,27 (t,  $J = 6,7$  Hz, 1H, HC(α)Leu), 7,67 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H, Ph), 8,59 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H, Ph); RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 22,0 (C<sub>a</sub>(δ)Leu), 23,4 (C<sub>b</sub>(δ)Leu), 25,9 (C(γ)Leu), 26,95 (CO)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 27,03 (C(γ)Glu), 32,0 ((CO)NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 32,1 (C(β)Glu), 36,9 ((CO)NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHPh), 41,3 (C(β)Leu), 43,8 (C(α)Gli), 53,6 (C(α)Leu), 54,2 (C(α)Glu), 126,1 (Ph), 126,5 (Ph), 133,3 (Ph), 137,6 (Ph), 172,8 (CO), 174,8 (CO), 175,8 (CO)

### **L-γ-Glutamil-L-leucilglicil N-3-(4-fenil)prop-1-ilamida (60)**

Sólido blanco; 96% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0,93 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>a</sub>Leu), 0,96 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>b</sub>Leu), 1,60 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H, HC(β)Leu), 1,65-1,72 (m, 1H, HC(γ)Leu), 1,80 (c, 2H,  $J = 6,8$  Hz, (CO)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 1,89-1,95 (m, 1H, H<sub>a</sub>C(β)Glu), 2,01-2,09 (m, 1H, H<sub>b</sub>C(β)Glu), 2,35-2,41 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(γ)Glu), 3,11 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H, (CO)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 3,31 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H, (CO)NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHPh), 3,57 (sa, 1H, HC(α)Glu), 3,73 (d,  $J = 16,9$  Hz, CH<sub>a</sub>Gli), 3,91 (d,  $J = 16,9$  Hz, 1H, CH<sub>b</sub>Gli), 4,22 (m,  $J = 7,8$  Hz, 1H, HC(α)Leu), 6,59 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H, H-Ph-*p*-NH), 6,64 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H, H-Ph-*o*-NH), 7,08 (dd,  $J = 8,5, 7,3$  Hz, H-Ph-*m*-NH); RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 22,0 (C<sub>a</sub>(δ)Leu), 23,3 (C<sub>b</sub>(δ)Leu), 25,9 (C(γ)Leu), 29,8 (C(γ)Glu), 30,3 (CO)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 32,6 (C(β)Glu), 38,2 ((CO)NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHPh), 41,2 ((CO)NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHPh), 42,2 (C(β)Leu), 43,6 (C(α)Gli), 54,2 (C(α)Leu), 54,6 (C(α)Glu), 114,2 (Ph), 118,0 (Ph), 130,0 (Ph), 150,1 (Ph), 171,7 (CO), 174,3 (CO), 175,7 (CO).



## 6.5 Síntesis de derivados de ésteres lineales

### 6.5.1 Acoplamiento del tripéptido **37** con los alcoholes

#### Procedimiento general

A una solución de **37** (200,0 mg, 0,37 mmol), *N*-hidroxisuccinimida (131,5 mg, 1,11 mmol) en dioxano anhidro (50 mL), se agregó DCC (228,5 mg, 1,11 mmol), bajo atmósfera de argón y se agitó durante 16 hs a temperatura ambiente. Sobre esta mezcla de reacción se agregó el alcohol correspondiente (36,0 mmol para los alcoholes de hasta 5 átomos de carbono, y 3,60 mmol para los alcoholes de 6 a 10 átomos de carbono). La mezcla de reacción se dejó entre 16 y 64 hs a temperatura ambiente. Se filtró el precipitado blanco de DCU a través de un embudo de vidrio fritado y se evaporó el solvente. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (silicagel). El producto obtenido, con alto contenido de DCU, se recristalizó, cuando fue posible, de isopropanol. Solamente se obtuvieron puros los compuestos **57**, y **58**. Para el resto de los ésteres se cuantificó el contenido de DCU por cromatografía gaseosa y se desprotegieron como tales.

#### *N*-Benziloxicarbonil-*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-leucilglicinato de metilo $\alpha$ -bencil éster (**60**)

Sólido blanco; 48,1 % de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,91 (d, *J* = 5,5 Hz, 3H, H<sub>3</sub>C <sub>$\alpha$</sub> ( $\delta$ )Leu), 0,94 (d, *J* = 5,1 Hz, 3H, H<sub>3</sub>C <sub>$\beta$</sub> ( $\delta$ )Leu), 1,40-1,84 (m, 3H, H<sub>3</sub>C( $\beta$ )Leu,

*HC(γ)Leu*), 1,87-2,11 (m, 1H,  $H_aC(\beta)Glu$ ), 2,11-2,37 (m, 3H,  $H_bC(\beta)Glu$ , *HC(γ)Glu*), 3,71 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3,99 (d,  $J = 5,5$  Hz, 2H,  $CH_2Gli$ ), 4,29-4,56 (m, 2H, *HC(α)Leu*, *HC(α)Glu*), 5,10 (s, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,16 (s, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,72 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, *NH*), 6,17 (d,  $J = 6,9$  Hz, 1H, *NH*), 6,74 (d,  $J = 4,9$  Hz, 1H, *NH*), 7,34 (s, 10H, Ph); RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  22,0 ( $C_a(\delta)Leu$ ), 22,8 ( $C_b(\delta)Leu$ ), 24,7 ( $C(\gamma)Leu$ ), 28,0 ( $C(\gamma)Glu$ ), 32,0 ( $C(\beta)Glu$ ), 40,7 ( $C(\beta)Leu$ ), 41,0 ( $CH_2Gli$ ), 51,5 ( $C(\alpha)Leu$ ), 52,2 ( $C(\alpha)Glu$ ), 67,0 ( $OCH_2Ph$ ), 67,2 ( $OCH_2Ph$ ), 128,1 (Ph), 128,2 (Ph), 128,40 (Ph), 128,44 (Ph), 128,6 (Ph), 135,2 (Ph), 136,2 (Ph), 156,3 (CONH), 170,1 (CO), 171,8 (CO), 172,1 (CO), 172,4 (CO).

***N*-Benziloxycarbonil-L- $\gamma$ -glutamyl-L-leucilglicinato de etilo  $\alpha$ -bencil éster (61)**

Sólido blanco; 45.8% de rendimiento; RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  0,90 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H,  $H_3C_a(\delta)Leu$ ), 0,94 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H,  $H_3C_b(\delta)Leu$ ), 1,24 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $OCH_2CH_3$ ), 1,49-1,77 (m, 3H,  $Leu H_2C(\beta)Leu$ , *HC(γ)Leu*), 1,83-2,04 (m, 1H,  $H_aC(\beta)Glu$ ), 2,05-2,28 (m, 1H,  $H_bC(\beta)Glu$ ), 2,36 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H *HC(γ)Glu*), 3,81 (d,  $J = 17,4$  Hz, 1H,  $CH_aGli$ ), 3,94 (d,  $J = 17,4$  Hz, 1H,  $CH_bGli$ ), 4,05-4,29 (m, 1H, *HC(α)Leu*), 4.14 (c,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $OCH_2CH_3$ ), 4.45 (dd,  $J = 9,1, 5,9$  Hz, 1H, *HC(α)Glu*), 5,07 (s, 2H,  $CH_2Ph$ ), 5,16 (s, 2H,  $CH_2Ph$ ), 7,32 (s, 10H, Ph); RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  14,0 ( $OCH_2CH_3$ ), 22,0 ( $H_3C_a(\delta)Leu$ ), 22,8 ( $H_3C_b(\delta)Leu$ ), 24,7 ( $C(\gamma)Leu$ ), 28,1 ( $C(\gamma)Glu$ ), 32,0 ( $C(\beta)Glu$ ), 40,7 ( $C(\beta)Leu$ ), 41,2 ( $CH_2Gli$ ), 51,5 ( $C(\alpha)Leu$ ), 53,6 ( $C(\alpha)Glu$ ), 67,0 ( $OCH_2Ph$ ), 67,2 ( $OCH_2Ph$ ), 128,0 (Ph), 128,1 (Ph), 128,3 (Ph), 128,5 (Ph), 128,6 (Ph), 135,2 (Ph), 136,2 (Ph), 156,2 (CONH), 169,7 (CO), 171,8 (CO), 172,1 (CO), 172,3 (CO).

***N*-Benziloxycarbonil-L- $\gamma$ -glutamyl-L-leucilglicinato de 1-propilo  $\alpha$ -bencil éster (62).**

26% de rendimiento. 97.7% de pureza por CG; RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  0,84-0,95 (m, 9H,  $O(CH_2)_3CH_3$ , ( $H_3C$ ) $_2(\delta)Leu$ ), 1,48-1,76 (m, 5H,  $Leu H_2C(\beta)Leu$ , *HC(γ)Leu*,  $OCH_2CH_2CH_3$ ), 1,87-2,10 (m, 1H,  $H_aC(\beta)Glu$ ), 2,11-2,35 (m, 3H,  $H_bC(\beta)Glu$ , *HC(γ)Glu*), 3,99 (mABX, 2H,  $H_2C(\alpha)Gli$ ), 4.11 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H,  $OCH_2CH_2CH_3$ ), 4,31-4,55 (m, 2H,

$HC(\alpha)Glu$ ,  $HC(\alpha)Leu$ , 5,10 (mAB, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,16 (s, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,80(d,  $J = 7,8$  Hz, NH), 6,34 (d,  $J = 8,0$ Hz, NH), 6,83 (m, 1H, NH), 7,34 (sa, 10H, Ph);

***N*-Benziloxicarbonil-*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-leucilglicinato de 1-butilo  $\alpha$ -bencil éster (63).**

26% de rendimiento. 74.0% de pureza por CG . RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  0,85-0,98 (m, 9H,  $O(CH_2)_3CH_3$ ,  $(H_3C)_2(\delta)Leu$ ), 1,20-1,39 (m, 2H,  $O(CH_2)_2CH_2CH_3$ ), 1,49-1,79 (m, 5H, Leu  $H_2C(\beta)Leu$ ,  $HC(\gamma)Leu$ ,  $OCH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 1,87-2,12 (m, 1H,  $H_aC(\beta)Glu$ ), 2,11-2,36 (m, 3H,  $H_bC(\beta)Glu$ ,  $HC(\gamma)Glu$ ), 3,99 (mABX, 2H,  $H_2C(\alpha)Gli$ ), 4.12 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H,  $OCH_2(CH_2)_2CH_3$ ), 4,28-4,55 (m, 2H,  $HC(\alpha)Glu$ ,  $HC(\alpha)Leu$ ), 5,09 (mAB, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,17 (s, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,87 (d,  $J = 8,4$ Hz, NH), 6,42 (d,  $J = 8,9$  Hz, NH), 6,94 (m, 1H, NH), 7,35 (sa, 10H, Ph)

***N*-Benziloxicarbonil-*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-leucilglicinato de 1-pentilo  $\alpha$ -bencil éster (64).**

67% de rendimiento. 68.6% de pureza por CG . RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  0,82-0,97 (m, 9H,  $O(CH_2)_4CH_3$ ,  $(H_3C)_2(\delta)Leu$ ), 1,21-1,41 (m, 4H,  $O(CH_2)_2(CH_2)_3CH_3$ ), 1,48-1,76 (m, 5H, Leu  $H_2C(\beta)Leu$ ,  $HC(\gamma)Leu$ ,  $OCH_2CH_2(CH_2)_2CH_3$ ), 1,85-2,09 (m, 1H,  $H_aC(\beta)Glu$ ), 2,09-2,34 (m, 3H,  $H_bC(\beta)Glu$ ,  $HC(\gamma)Glu$ ), 3,97 (mABX, 2H,  $H_2C(\alpha)Gli$ ), 4.10 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H,  $OCH_2(CH_2)_3CH_3$ ), 4,31-4,57 (m, 2H,  $HC(\alpha)Glu$ ,  $HC(\alpha)Leu$ ), 5,09 (mAB, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,16 (s, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,86 (d,  $J = 8,0$ Hz, NH), 6,39 (d,  $J = 8,5$  Hz, NH), 6,88 (m, 1H, NH), 7,34 (sa, 10H, Ph);

***N*-Benziloxicarbonil-*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-leucilglicinato de 1-hexilo  $\alpha$ -bencil éster (65).**

87% de rendimiento 97.2% de pureza por CG . RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  0,83-0,96 (m,  $J = 7,7$  Hz, 3H,  $O(CH_2)_5CH_3$ ,  $(H_3C)_2(\delta)Leu$ ), 1,19-1,41 (m, 6H,  $O(CH_2)_2(CH_2)_3CH_3$ ), 1,49-1,77 (m, 5H, Leu  $H_2C(\beta)Leu$ ,  $HC(\gamma)Leu$ ,  $OCH_2CH_2(CH_2)_3CH_3$ ), 1,86-2,02 (m, 1H,  $H_aC(\beta)Glu$ ), 2,09-2,33 (m, 3H,  $H_bC(\beta)Glu$ ,  $HC(\gamma)Glu$ ), 3,96 (mABX, 2H,  $H_2C(\alpha)Gli$ ), 4.09 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H,  $OCH_2(CH_2)_4CH_3$ ), 4,31-4,56 (m, 2H,  $HC(\alpha)Glu$ ,  $HC(\alpha)Leu$ ), 5,08 (mAB, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,16 (s, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,70 (d,  $J = 8,0$ Hz, NH), 6,18 (d,  $J = 7,9$  Hz, NH), 6,70 (t,  $J = 5,1$  Hz 1H, NH), 7,34 (sa, 10H, Ph);

***N*-Benziloxicarbonil-L- $\gamma$ -glutamil-L-leucilglicinato de 1-heptilo  $\alpha$ -bencil éster (66).**

86% de rendimiento. 64.9 % de pureza (CG); RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,83-0,99 (m, 9H,  $(\text{H}_3\text{C})_2(\delta)\text{Leu}$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ), 1,19-1,39 (sa, 8H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 1,47-1,77 (m, 5H,  $\text{Leu } H_2\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 1,89-2,11 (m, 1H,  $H_a\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,13-2,35 (m, 3H,  $H_b\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,98 (d,  $J = 5,3$  Hz, 2H,  $H_2\text{C}(\alpha)\text{Gli}$ ), 4,11 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 4,31-4,56 (m, 2H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ), 5,10 (mAB, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,17 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,73 (d,  $J = 7,5$  Hz, NH), 6,18 (d,  $J = 6,5$  Hz, NH), 6,70 (m, 1H, NH), 7,36 (sa, 10H, Ph)

***N*-Benziloxicarbonil-L- $\gamma$ -glutamil-L-leucilglicinato de 1-octilo  $\alpha$ -bencil éster (67).**

65% de rendimiento 68.3 % de pureza por CG. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,88 (t,  $J = 7,7$  Hz, 3H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ), 0,91 (d,  $J = 5,8$  Hz, 3H,  $H_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 0,93 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H,  $H_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 1,18-1,34 (sa, 10H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 1,48-1,80 (m, 5H,  $\text{Leu } H_2\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ), 1,87-2,05 (m, 1H,  $H_a\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,09-2,31 (m, 3H,  $H_b\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,98 (d,  $J = 5,4$  Hz, 2H,  $H_2\text{C}(\alpha)\text{Gli}$ ), 4,10 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ), 4,30-4,51 (m, 2H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ), 5,09 (mAB, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,16 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,70 (d,  $J = 8,0$  Hz, NH), 6,18 (d,  $J = 7,5$  Hz, NH), 6,70 (m, 1H, NH), 7,32 (sa, 10H, Ph)

***N*-Benziloxicarbonil-L- $\gamma$ -glutamil-L-leucilglicinato de 1-nonilo  $\alpha$ -bencil éster (68).**

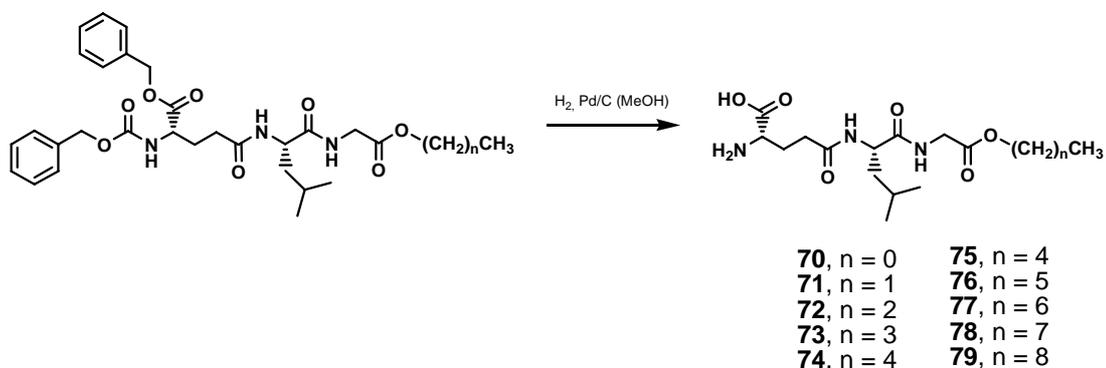
85% de rendimiento 75.6 % de pureza por CG. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,88 (t,  $J = 7,7$  Hz, 3H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 0,90 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H,  $H_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 0,93 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H,  $H_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 1,20-1,37 (sa, 12H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ), 1,49-1,78 (m, 5H,  $\text{Leu } H_2\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ,

$HC(\gamma)Leu$ ,  $OCH_2CH_2(CH_2)_6CH_3$ , 1,86-2,06 (m, 1H,  $H_aC(\beta)Glu$ ), 2,11-2,35 (m, 3H,  $H_bC(\beta)Glu$ ,  $HC(\gamma)Glu$ ), 3,98 (d,  $J = 5,3$  Hz, 2H,  $H_2C(\alpha)Gli$ ), 4,11 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H,  $OCH_2(CH_2)_7CH_3$ ), 4,33-4,54 (m, 2H,  $HC(\alpha)Glu$ ,  $HC(\alpha)Leu$ ), 5,10 (mAB, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,17 (s, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,74 (d,  $J = 8,1$  Hz, NH), 6,20 (d,  $J = 7,7$  Hz, NH), 6,71 (m, 1H, NH), 7,35 (sa, 10H, Ph);

***N*-Benziloxicarbonil-L- $\gamma$ -glutamil-L-leucilglicinato de 1-decilo  $\alpha$ -bencil éster (69).**

63% de rendimiento 81,6% pureza por CG; RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  0,88 (t,  $J = 6,8$  Hz, 3H,  $OCH_2CH_3$ ), 0,90 (d,  $J = 6,0$  Hz, 3H,  $H_3C_a(\delta)Leu$ ), 0,93 (d,  $J = 6,0$  Hz, 3H,  $H_3C_b(\delta)Leu$ ), 1,20-1,36 (sa, 14H,  $O(CH_2)_2(CH_2)_7CH_3$ ), 1,48-1,79 (m, 5H, Leu  $H_2C(\beta)Leu$ ,  $HC(\gamma)Leu$ ,  $OCH_2CH_2(CH_2)_7CH_3$ ), 1,85-2,08 (m, 1H,  $H_aC(\beta)Glu$ ), 2,12-2,32 (m, 3H,  $H_bC(\beta)Glu$ ,  $HC(\gamma)Glu$ ), 3,98 (d,  $J = 5,5$  Hz, 2H,  $H_2C(\alpha)Gli$ ), 4,11 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H,  $OCH_2(CH_2)_8CH_3$ ), 4,32-4,54 (m, 2H,  $HC(\alpha)Glu$ ,  $HC(\alpha)Leu$ ), 5,09 (mAB, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,17 (s, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,72 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H, NH), 6,17 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, NH), 6,68 (m, 1H, NH) 7,32 (sa, 10H, Ph).

**6.5.2 Hidrogenólisis de los grupos protectores**



**Procedimiento general**

A una solución del éster protegido (0,1 mmol) en metanol (10 mL), en presencia de paladio sobre carbono (5%) se trató con hidrógeno a 1 atm durante una hora. La mezcla se filtró a través de un filtro de vidrio fritado y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna eluyendo con una mezcla de AcoEt–MeOH (80:20).

### **L- $\gamma$ -Glutamyl-L-leucilglicinato de metilo (70)**

Aceite incoloro; 100% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,92 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 0,96 (d,  $J = 6,0$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 1,54-1,80 (m, 3H,  $\text{H}_2\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ), 1,53-1,84 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,42-2,60 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,61 (t,  $J = 6,4$  Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 3,70 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,85 (d,  $J = 17,3$  Hz, 1H,  $\text{H}_a\text{Gli}$ ), 3,97 (d,  $J = 17,3$  Hz, 1H,  $\text{H}_b\text{Gli}$ ), 4,39 (dd,  $J_1 = 9,1$ , 5,5 Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  21,9 ( $\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 23,4 ( $\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 25,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ ), 27,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 32,9 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 41,7 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ )\*, 41,8 ( $\text{CH}_2\text{Gli}$ )\*, 52,6 ( $\text{OCH}_3$ ), 53,4 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 55,5 ( $\text{C}(\alpha)\text{Glu}$ ), 171,7 (CO), 173,9 (CO), 175,0 (CO), 175,6 (CO).

### **L- $\gamma$ -Glutamyl-L-leucilglicinato de etilo (71)**

Aceite incoloro; 100% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,92 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 0,96 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 1,25 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1,52-1,79 (m, 3H,  $\text{H}_2\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ), 2,01-2,26 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,41-2,62 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,71 (t, 1H,  $J = 6,0$  Hz,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 3,83 (d,  $J = 17,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_a\text{Gli}$ ), 3,96 (d,  $J = 17,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_b\text{Gli}$ ), 4,14 (c, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 4,63 (dd,  $J = 9,0$ , 5,7 Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  14,5 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 21,9 ( $\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 23,4 ( $\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 25,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ ), 27,7 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 32,8 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 41,8 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ )\*, 42,0 ( $\text{CH}_2\text{Gli}$ )\*, 53,4 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 55,3 ( $\text{C}(\alpha)\text{Glu}$ ), 62,3 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 171,2 (CO), 172,4 (CO), 174,9 (CO), 175,6 (CO).

### **L- $\gamma$ -Glutamyl-L-leucilglicinato de 1-propilo (72)**

Aceite incoloro; 73% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,93 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 0,95 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 0,96 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 1,56-1,78 (m, 5H,  $\text{H}_2\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,93-2,25 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,41-2,58 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,56-3,69 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 3,86 (d,  $J = 17,2$  Hz, 1H,  $\text{H}_a\text{Gli}$ ), 3,98 (d,  $J = 17,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_b\text{Gli}$ ), 4,08 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4,41 (dd,  $J = 8,6, 5,7$  Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  10,6 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 21,8 ( $\text{C}_a\text{H}_3\text{Leu}$ ), 23,0 ( $\text{C}_b\text{H}_3\text{Leu}$ ), 25,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ ), 27,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 32,9 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 41,8 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ )\*, 42,0 ( $\text{CH}_2\text{Gli}$ )\*, 53,4 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 55,4 ( $\text{C}(\alpha)\text{Glu}$ ), 67,8 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 171,3 (CO), 173,8 (CO), 175,1 (CO), 175,6 (CO).

#### **L- $\gamma$ -Glutamyl-L-leucilglicinato de 1-butilo (73)**

Aceite incoloro; 67% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,92 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 0,94 (t,  $J = 7,4$  Hz, 3H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 0,96 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 1,35-1,46 (m, 2H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,55-1,68 (m, 4H,  $\text{H}_2\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,68-1,76 (m, 1H,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ), 2,00-2,09 (m, 1H,  $\text{H}_a\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,09-2,19 (m, 1H,  $\text{H}_b\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,43-2,58 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,60-3,66 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 3,85 (d,  $J = 17,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_a\text{Gli}$ ), 3,95 (d,  $J = 17,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_b\text{Gli}$ ), 4,11 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 4,39 (dd,  $J = 9,7, 5,1$  Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  13,9 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 20,1 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 21,8 ( $\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 23,4 ( $\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 25,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ ), 27,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 31,7 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 32,9 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 41,8 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ )\*, 42,0 ( $\text{CH}_2\text{Gli}$ )\*, 53,4 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 55,5 ( $\text{C}(\alpha)\text{Glu}$ ), 66,1 ( $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 171,3 (CO), 174,0 (CO), 175,1 (CO), 175,6 (CO)

#### **L- $\gamma$ -Glutamyl-L-leucilglicinato 1-pentilo (74)**

Aceite incoloro; 97% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,84-1,00 (m, 9H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ,  $\text{H}_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ,  $\text{H}_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 1,23-1,43 (m, 4H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,52-1,77 (m, 5H,  $\text{H}_2\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,97-2,23 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,41-2,60 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,54-3,69 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 3,84 (d,  $J = 17,1$  Hz, 1H,  $\text{H}_a\text{Gli}$ ), 3,96 (d,  $J = 17,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_b\text{Gli}$ ), 4,10 (t,  $J = 6,4$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 4,41 (dd,  $J = 8,6, 5,7$  Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,

CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  14,3 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 21,8 (C<sub>a</sub>( $\delta$ )Leu), 23,3 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23,4 (C<sub>b</sub>( $\delta$ )Leu), 25,9 (C( $\gamma$ )Leu), 27,9 (C( $\gamma$ )Glu), 29,4 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 32,9 (C( $\beta$ )Glu), 34,7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 41,8 (C( $\beta$ )Leu)\*, 42,0 (CH<sub>2</sub>Gli)\*, 53,4 (C( $\alpha$ )Leu), 55,4 (C( $\alpha$ )Glu), 66,4 (OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 171,3 (CO), 174,0 (CO), 175,1 (CO), 175,6 (CO)

### L- $\gamma$ -Glutamil-L-leucilglicinato de 1-hexilo (75)

Aceite incoloro; 97% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  0,91 (t,  $J$  = 6,6 Hz, 3H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 0,93 (d,  $J$  = 6,2 Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>a</sub>( $\delta$ )Leu), 0,97 (d,  $J$  = 6,2 Hz, H<sub>3</sub>C<sub>b</sub>( $\delta$ )Leu), 1,26-1,41 (m, 6H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 1,52-1,80 (m, 5H, H<sub>2</sub>C( $\beta$ )Leu, HC( $\gamma$ )Leu, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 1,96-2,25 (m, 2H, H<sub>2</sub>C( $\beta$ )Glu), 2,40-2,60 (m, 2H, H<sub>2</sub>C( $\gamma$ )Glu), 3,63 (t,  $J$  = 6,2 Hz, 1H, HC( $\alpha$ )Glu), 3,86 (d,  $J$  = 17,5 Hz, 1H, H<sub>a</sub>Gli), 3,98 (d,  $J$  = 17,5 Hz, 1H, H<sub>b</sub>Gli), 4,09 (t,  $J$  = 6,4 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4,41 (dd,  $J$  = 9,0, 6,0 Hz, 1H, HC( $\alpha$ )Leu); RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  14,3 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 21,9 (C<sub>a</sub>( $\delta$ )Leu), 23,5 (C<sub>b</sub>( $\delta$ )Leu), 23,6 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 25,9 (C( $\gamma$ )Leu), 26,7 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 27,9 (C( $\gamma$ )Glu), 29,7 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 32,6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 32,9 (C( $\beta$ )Glu), 41,8 (C( $\beta$ )Leu)\*, 42,0 (CH<sub>2</sub>Gli)\*, 53,4 (C( $\alpha$ )Leu), 55,4 (C( $\alpha$ )Glu), 66,3 (OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 171,3 (CO), 174,0 (CO), 175,1 (CO), 175,6 (CO).

### L- $\gamma$ -Glutamil-L-leucilglicinato de 1-heptilo (76)

Aceite incoloro; 73% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  0,91 (t,  $J$  = 7,1 Hz, 3H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>), 0,93 (d,  $J$  = 5,9 Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>a</sub>( $\delta$ )Leu), 0,97 (d,  $J$  = 6,2 Hz, H<sub>3</sub>C<sub>b</sub>( $\delta$ )Leu), 1,23-1,46 (m, 8H, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 1,53-1,80 (m, 5H, H<sub>2</sub>C( $\beta$ )Leu, HC( $\gamma$ )Leu, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 1,93-2,24 (m, 2H, H<sub>2</sub>C( $\beta$ )Glu), 2,43-2,66 (m, 2H, H<sub>2</sub>C( $\gamma$ )Glu), 3,62 (t,  $J$  = 6,0 Hz, 1H, HC( $\alpha$ )Glu), 3,85 (d,  $J$  = 17,5 Hz, 1H, H<sub>a</sub>Gli), 3,97 (d,  $J$  = 17,2 Hz, 1H, H<sub>b</sub>Gli), 4,11 (t,  $J$  = 6,6 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 4,41 (dd,  $J$  = 9,0, 5,7 Hz, 1H, HC( $\alpha$ )Leu); RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  14,4 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>), 21,9 (C<sub>a</sub>( $\delta$ )Leu), 23,4 (C<sub>b</sub>( $\delta$ )Leu), 23,6 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 25,9 (C( $\gamma$ )Leu), 26,9 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 27,9 (C( $\gamma$ )Glu), 29,7 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 30,0 (O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 32,9 (C( $\beta$ )Glu,

$\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 41,8 (C( $\beta$ )Leu)\*, 42,0 ( $\text{CH}_2\text{Gli}$ )\*, 53,4 (C( $\alpha$ )Leu), 55,5 (C( $\alpha$ )Glu), 66,3 ( $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 171,3 (CO), 174,0 (CO), 175,1 (CO), 175,6 (CO).

#### **L- $\gamma$ -Glutamil-L-leucilglicinato de 1-octilo (77)**

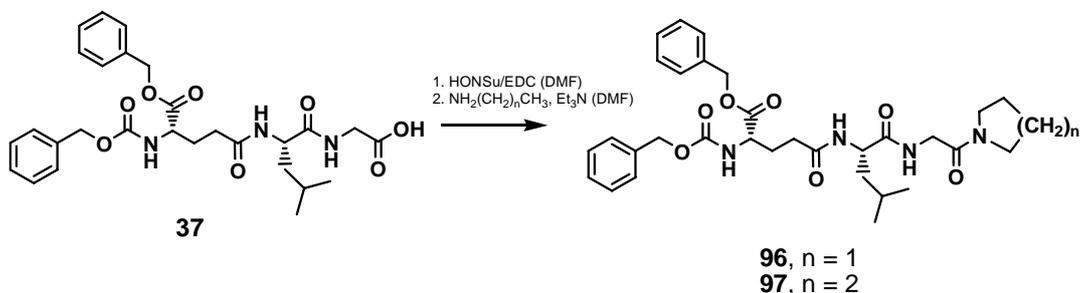
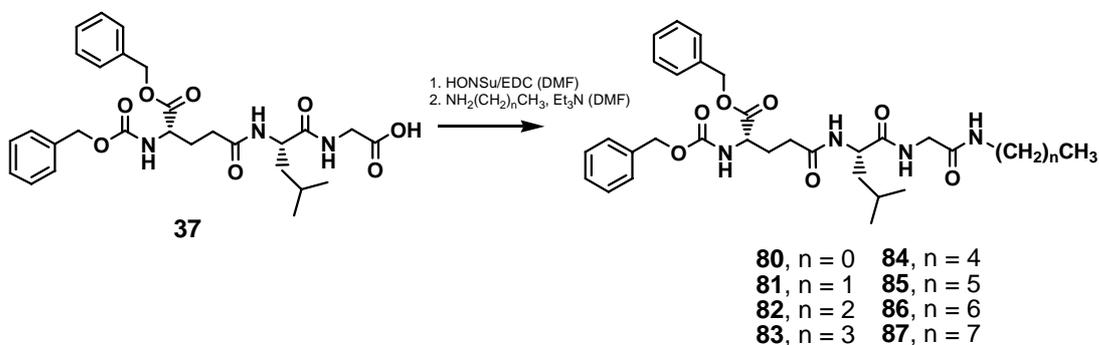
Aceite incoloro; 58% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,89 (t,  $J = 6,2$  Hz, 3H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 0,91 (d,  $J = 5,5$  Hz, 3H,  $H_3C_a(\delta)\text{Leu}$ ), 0,95 (d,  $J = 6,2$  Hz,  $H_3C_b(\delta)\text{Leu}$ ), 1,21-1,43 (m, 10H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 1,51-1,78 (m, 5H,  $H_2C(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 1,89-2,25 (m, 2H,  $H_2C(\beta)\text{Glu}$ ), 2,38-2,60 (m, 2H,  $H_2C(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,54-3,69 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 3,84 (d,  $J = 17,5$  Hz, 1H,  $H_a\text{Gli}$ ), 3,96 (d,  $J = 17,9$  Hz, 1H,  $H_b\text{Gli}$ ), 4,10 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ), 4,39 (dd,  $J = 7,5, 5,7$  Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  14,4 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 21,8 ( $C_a(\delta)\text{Leu}$ ), 23,4 ( $C_b(\delta)\text{Leu}$ ), 23,7 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 25,9 (C( $\gamma$ )Leu), 26,9 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 27,8 (C( $\gamma$ )Glu), 29,7 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 30,3 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 32,6 (C( $\beta$ )Glu), 32,9 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 41,8 (C( $\beta$ )Leu)\*, 42,0 ( $\text{CH}_2\text{Gli}$ )\*, 53,4 (C( $\alpha$ )Leu), 55,5 (C( $\alpha$ )Glu), 66,4 ( $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ), 171,3 (CO), 174,0 (CO), 175,1 (CO), 175,6 (CO).

#### **L- $\gamma$ -Glutamil-L-leucilglicinato de 1-nonilo (78)**

Aceite incoloro; 69% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,89 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ), 0,92 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H,  $H_3C_a(\delta)\text{Leu}$ ), 0,96 (d,  $J = 6,2$  Hz,  $H_3C_b(\delta)\text{Leu}$ ), 1,20-1,45 (m, 12H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ), 1,52-1,78 (m, 5H,  $H_2C(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ), 1,89-2,24 (m, 2H,  $H_2C(\beta)\text{Glu}$ ), 2,41-2,62 (m, 2H,  $H_2C(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,60 (t,  $J = 6,4$  Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 3,84 (d,  $J = 17,5$  Hz, 1H,  $H_a\text{Gli}$ ), 3,96 (d,  $J = 17,5$  Hz, 1H,  $H_b\text{Gli}$ ), 4,10 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 4,39 (dd,  $J = 9,1, 5,9$  Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  14,4 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ), 21,9 ( $C_a(\delta)\text{Leu}$ ), 23,5 ( $C_b(\delta)\text{Leu}$ ), 23,7 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 25,9 (C( $\gamma$ )Leu), 27,0 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 27,9 (C( $\gamma$ )Glu), 29,7 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 30,3 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 30,6 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 32,9 (C( $\beta$ )Glu), 33,0 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ), 41,8 (C( $\beta$ )Leu)\*, 42,0 ( $\text{CH}_2\text{Gli}$ )\*, 53,4 (C( $\alpha$ )Leu), 55,4 (C( $\alpha$ )Glu), 66,4 ( $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 171,3 (CO), 174,0 (CO), 175,1 (CO), 175,6 (CO).

**L- $\gamma$ -Glutamil-L-leucilglicinato de 1-decilo (79)**

Aceite incoloro; 60% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,90 (t,  $J = 6,0$  Hz, 3H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ ), 0,93 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H,  $H_3C_a(\delta)\text{Leu}$ ), 0,97 (d,  $J = 6,2$  Hz,  $H_3C_b(\delta)\text{Leu}$ ), 1,21-1,44 (m, 12H,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 1,54-1,79 (m, 5H,  $H_2C(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ), 1,91-2,26 (m, 2H,  $H_2C(\beta)\text{Glu}$ ), 2,39-2,60 (m, 2H,  $H_2C(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,54-3,67 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 3,83 (d,  $J = 17,5$  Hz, 1H,  $H_a\text{Gli}$ ), 3,96 (d,  $J = 17,5$  Hz, 1H,  $H_b\text{Gli}$ ), 4,10 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ), 4,39 (dd,  $J = 8,6, 6,8$  Hz, 1H,



$\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  14,4 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ ), 21,9 ( $C_a(\delta)\text{Leu}$ ), 23,5 ( $C_b(\delta)\text{Leu}$ ), 23,7 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 25,9 ( $C(\gamma)\text{Leu}$ ), 27,0 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 27,9 ( $C(\gamma)\text{Glu}$ ), 29,7 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 30,4 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 30,6 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ), 32,9

(C( $\beta$ )Glu), 33,0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>), 41,8 (C( $\beta$ )Leu)\*, 42,0 (CH<sub>2</sub>Gli)\*, 53,4 (C( $\alpha$ )Leu), 55,4 (C( $\alpha$ )Glu), 66,4 (OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CH<sub>3</sub>), 171,3 (CO), 174,0 (CO), 175,1 (CO), 175,6 (CO).

## 6.6 Síntesis de derivados de aminas lineales y cíclicas

### 6.6.1 Acoplamiento con el tripéptido diprotegido 37

Todos los derivados se prepararon de manera análoga a excepción de los de uno y dos átomos de carbono en su cadena alquílica; en este caso, se partió del clorhidrato de la amina, la cual se liberó *in situ* con 10 equivalentes de trietilamina.

#### Procedimiento general

A una solución del tripéptido **37** (100 mg, 0,185 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida en DMF anhidra (5 mL) se agregó clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC; 177 mg, 0,92 mmol) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 hs. Luego, se agregó la amina correspondiente (0,22 mmol) y la mezcla se dejó agitando durante una hora más.

Luego se particionó entre AcOEt (20 mL) y NaCl (s.s.) (20 mL). La fase acuosa se lavó con HCl (ac.) 5% (2 × 20 mL). La fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evaporó el solvente. El producto se purificó por cromatografía en columna (sílica gel) empleando mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-iPrOH desde 99:1 a 97:3 para dar los compuestos puros.

#### ***N*-Benziloxycarbonil(éster $\alpha$ -bencílico)-L- $\gamma$ -glutamyl-L-leucilglicil *N*-metilamida (80)**

Sólido blanco; 65% de rendimiento; pf 168–170 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3309, 2959, 1747, 1697, 1639, 1545, 762, 699; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,89 (d, *J* = 6,0 Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>a</sub>( $\delta$ )Leu), 0,92 (d, *J* = 6,0 Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>b</sub>( $\delta$ )Leu), 1,44-1,80 (m, 3H, H<sub>2</sub>C( $\beta$ )Leu, HC( $\gamma$ )Leu), 1,80-2,04 (m, 1H, H<sub>a</sub>C( $\beta$ )Glu), 2,12-2,36 (m, 3H, H<sub>b</sub>C( $\beta$ )Glu, HC( $\gamma$ )Glu), 2,43 (d, *J* = 4,6 Hz, 3H, NHCH<sub>3</sub>), 3,72 (dd, *J* = 16,6, 5,5 Hz, 1H, H<sub>a</sub>Gli), 4,00 (dd, *J* = 16,6, 6,4 Hz, 1H, H<sub>b</sub>Gli), 4,11-4,27 (m, 1H, HC( $\alpha$ )Glu), 4,27-4,44 (m, 1H, HC( $\alpha$ )Leu),

5,08 (s, 2H,  $CH_2Ph$ ), 5,15 (s, 2H,  $CH_2Ph$ ), 5,82 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H,  $NH$ ), 6,48 (d,  $J = 6,6$  Hz, 1H,  $NH$ ), 6,71 (d,  $J = 4,6$  Hz, 1H,  $NH$ ), 7,02-7,17 (m, 1H,  $NH$ ), 7,34 (m, 10H, Ph); RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  21,9 ( $C_a(\delta)Leu$ ), 22,8 ( $C_b(\delta)Leu$ ), 24,7 ( $C(\gamma)Leu$ ), 26,1 ( $NH-CH_3$ ), 28,1 ( $C(\gamma)Glu$ ), 31,7 ( $C(\beta)Glu$ ), 40,5 ( $C(\beta)Leu$ ), 42,9 ( $CH_2Gli$ ), 52,4 ( $C(\alpha)Leu$ ), 53,4 ( $C(\alpha)Glu$ ), 67,0 ( $OCH_2Ph$ ), 67,3 ( $OCH_2Ph$ ), 128,0 (Ph), 128,1 (Ph), 128,2 (Ph), 128,4 (Ph), 128,6 (Ph), 135,0 (Ph), 136,1 (Ph), 156,4 ( $OCONH$ ), 169,5 (CO), 171,9 (CO), 172,7 (CO), 172,8 (CO). Anal. Calculado para  $C_{29}H_{38}N_4O_7$ : C 62,80, H 6,91, N 10,10. Encontrado: C 62,49, H 7,13.

### ***N*-Benziloxycarbonil(éster $\alpha$ -bencílico)-*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-leucilglicil *N*-etilamida (81)**

Sólido blanco; 73% de rendimiento; pf 144–146 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ) 3301, 2966, 1747, 1710, 1647, 1547, 756, 699; RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  0,83-1,00 (m, 6H, ( $H_3C(\delta)$ ) $_2Leu$ ), 1,08 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H,  $NHCH_2CH_3$ ), 1,46-1,80 (m, 3H,  $H_2C(\beta)Leu$ ,  $HC(\gamma)Leu$ ), 1,80-2,05 (m, 1H,  $H_aC(\beta)Glu$ ), 2,10-2,41 (m, 3H,  $H_bC(\beta)Glu$ ,  $HC(\gamma)Glu$ ), 3,08-3,35 (m, 2H,  $NHCH_2CH_3$ ), 3,74 (dd,  $J = 16,6, 4,8$  Hz, 1H,  $H_aGli$ ), 3,99 (dd,  $J = 16,6, 6,2$  Hz, 1H,  $H_bGli$ ), 4,09-4,46 (m, 2H,  $HC(\alpha)Glu$ ,  $HC(\alpha)Leu$ ), 5,09 (s, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,16 (s, 2H,  $OCH_2Ph$ ), 5,74 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H,  $NH$ ), 6,32 (d,  $J = 6,6$  Hz, 1H), 6,45-6,61 (m, 1H,  $NH$ ), 6,87-7,02 (m, 1H,  $NH$ ), 7,33 (m, 10H, Ph); RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  14,4 ( $NHCH_2CH_3$ ), 21,9 ( $C_a(\delta)Leu$ ), 22,8 ( $C_b(\delta)Leu$ ), 24,7 ( $C(\gamma)Leu$ ), 28,1 ( $C(\gamma)Glu$ ), 31,8 ( $C(\beta)Glu$ ), 34,3 ( $NHCH_2CH_3$ ), 40,6 ( $C(\beta)Leu$ ), 43,0 ( $CH_2Gli$ ), 52,4 ( $C(\alpha)Leu$ ), 53,5 ( $C(\alpha)Glu$ ), 67,0 ( $PhCH_2$ ), 67,3 ( $PhCH_2$ ), 128,0 (Ph), 128,1 (Ph), 128,2 (Ph), 128,5 (Ph), 128,6 (Ph), 135,1 (Ph), 136,1 (Ph), 156,4 ( $OCONH$ ), 168,7 (CO), 171,9 (CO), 172,5 (CO), 172,7 (CO). Anal. Calculado para  $C_{30}H_{40}N_4O_7$ : C 63,36, H 7,09, N 9,85. Encontrado: C 63,10, H 7,06, N 9,71.

### ***N*-Benziloxycarbonil(éster $\alpha$ -bencílico)-*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-leucilglicil *N*-1-propilamida (82)**

Sólido blanco; 55% de rendimiento; pf 172–174 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ) 3294, 2966, 1740, 1695, 1633, 1547, 756, 706; RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  0,78-0,98 (m, 9H,

( $H_3C(\delta)_2$ Leu,  $NH(CH_2)_2CH_3$ ), 1,36-1,72 (m, 5H,  $NHCH_2CH_2CH_2$ ,  $H_2C(\beta)$ Leu,  $HC(\gamma)$ Leu), 1,72-2,06 (m, 1H,  $H_aC(\beta)$ Glu), 2,07-2,35 (m, 3H,  $H_bC(\beta)$ Glu,  $HC(\gamma)$ Glu), 3,08-3,22 (m, 2H,  $NHCH_2CH_2CH_3$ ), 3,69-4,02 (m, 2H,  $CH_2$ Gli), 4,18-4,45 (m, 2H,  $HC(\alpha)$ Glu,  $HC(\alpha)$ Leu), 5,08 (s, 2H,  $PhCH_2$ ), 5,15 (s, 2H,  $PhCH_2$ ), 5,82 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H,  $NH$ ), 6,53 (d,  $J = 6,9$  Hz, 1H,  $NH$ ), 6,64 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H,  $NH$ ), 7,08 (t,  $J = 5,3$  Hz, 1H,  $NH$ ), 7,33 (m, 10H, Ph); RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  11,2 ( $NH(CH_2)_2CH_3$ ), 21,8 ( $C_a(\delta)$ Leu), 22,4 ( $NHCH_2CH_2CH_3$ ), 22,7 ( $C_b(\delta)$ Leu), 24,6 ( $C(\gamma)$ Leu), 28,1 ( $C(\gamma)$ Glu), 31,8 ( $C(\beta)$ Glu), 40,6 ( $C(\beta)$ Leu), 41,1 ( $NHCH_2CH_2CH_3$ ), 43,0 ( $CH_2$ Gli), 52,3 ( $C(\alpha)$ Leu), 53,4 ( $C(\alpha)$ Glu), 67,0 ( $OCH_2Ph$ ), 67,2 ( $OCH_2Ph$ ), 127,9 (Ph), 128,0 (Ph), 128,1 (Ph), 128,4 (Ph), 128,5 (Ph), 135,0 (Ph), 136,4 (Ph), 156,6 ( $OCONH$ ), 168,7 (CO), 171,7 (CO), 172,4 (CO), 172,6 (CO). Anal. Calculado para  $C_{31}H_{42}N_4O_7 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ : C 62,93, H 7,15, N 9,47. Encontrado: C 62,80, H 7,27 N 9,47.

***N*-Benziloxicarbonil(éster  $\alpha$ -bencílico)-*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-leucilglicil *N*-1-butilamida (83)**

Sólido blanco; 51% de rendimiento; pf 148–150 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ) 3302, 2959, 1754, 1701, 1635, 1544, 754, 701; RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  0,81-0,97 (m, 9H,  $H_3C(\delta)_2$ Leu,  $NH(CH_2)_3CH_3$ ), 1,18-1,75 (m, 7H,  $NHCH_2(CH_2)_2CH_3$ ,  $H_2C(\beta)$ Leu,  $HC(\gamma)$ Leu), 1,82-2,03 (m, 1H,  $H_aC(\beta)$ Glu), 2,09-2,34 (m, 3H,  $H_bC(\beta)$ Glu,  $HC(\gamma)$ Glu), 3,09-3,27 (m, 2H,  $NHCH_2(CH_2)_2CH_3$ ), 3,87 (m, 2H,  $CH_2$ Gli), 4,13-4,45 (m, 2H,  $HC(\alpha)$ Glu,  $HC(\alpha)$ Leu), 5,09 (s, 2H,  $PhCH_2$ ), 5,16 (s, 2H,  $PhCH_2$ ), 5,70 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H,  $NH$ ), 6,37 (d,  $J = 6,6$  Hz, 1H,  $NH$ ), 5,51 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H,  $NH$ ), 6,93 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H,  $NH$ ), 7,34 (m, 10H, Ph); RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  13,7 ( $NH(CH_2)_3CH_3$ ), 19,9 ( $NH(CH_2)_2CH_2CH_3$ ), 21,9 ( $C_a(\delta)$ Leu), 22,8 ( $C_b(\delta)$ Leu), 24,7 ( $C(\gamma)$ Leu), 28,3 ( $C(\gamma)$ Glu), 31,3 ( $NHCH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 31,9 ( $C(\beta)$ Glu), 39,3 ( $NHCH_2(CH_2)_2CH_3$ ), 40,6 ( $C(\beta)$ Leu), 43,1 ( $C(\alpha)$ Gli), 52,4 ( $C(\alpha)$ Leu), 53,4 ( $C(\alpha)$ Glu), 67,1 ( $OCH_2Ph$ ), 67,3 ( $OCH_2Ph$ ), 127,8 (Ph), 128,0 (Ph), 128,2 (Ph), 128,5 (Ph), 128,6 (Ph), 135,1 (Ph), 136,1 (Ph), 156,4 ( $OCONH$ ), 168,7 (CO), 171,8 (CO), 172,5 (CO), 172,6 (CO). Anal. Calculado para  $C_{32}H_{44}N_4O_7$ : C 64,41, H 7,43. Encontrado: C 64,53, H 7,53.

***N*-Benziloxicarbonil(éster  $\alpha$ -bencílico)-*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-leucilglicil *N*-1-pentilamida (84)**

Sólido blanco; 57% de rendimiento; pf 185–187 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3302, 2960, 1736, 1701, 1632, 1550, 756, 708; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,86 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H,  $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 0,89 (d,  $J = 6,1$  Hz, 3H,  $H_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 0,92 (d,  $J = 6,1$  Hz, 3H,  $H_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 1,20-1,32 (m, 4H,  $\text{NH}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,41-1,49 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,50-1,72 (m, 3H,  $H_2\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ), 1,89-1,99 (m, 1H,  $H_a\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,11-2,34 (m, 3H,  $H_b\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,84 (m,  $\text{CH}_2\text{Gli}$ ), 4,23-4,43 (m, 2H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ), 5,08 (s, 2H,  $\text{PhCH}_2$ ), 5,15 (s, 2H,  $\text{PhCH}_2$ ), 5,83 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H,  $\text{NH}$ ), 6,53-6,68 (m, 2H,  $\text{NH}$ ), 7,04-7,12 (sa, 1H,  $\text{NH}$ ), 7,32 (m, 10H, Ph); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13,9 ( $\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 21,9 ( $\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 22,3 ( $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 22,8 ( $\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 24,8 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ ), 28,4 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 28,9 ( $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 31,9 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 39,5 ( $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 40,5 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 43,2 ( $\text{C}(\alpha)\text{Gli}$ ), 52,5 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 53,4 ( $\text{C}(\alpha)\text{Glu}$ ), 67,2 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67,4 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 128,1 (Ph), 128,2 (Ph), 128,3 (Ph), 128,5 (Ph), 128,6 (Ph), 135,1 (Ph), 136,2 (Ph), 156,4 ( $\text{NHCOO}$ ), 168,6 (CO), 171,8 (CO), 172,4 (CO), 172,5 (CO). Anal. Calculado para  $\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_7,0,6\text{H}_2\text{O}$ : C 63,36, H 7,09, N 9,85. Encontrado: C 63,10, H 7,06, N 9,71.

***N*-Benziloxicarbonil(éster  $\alpha$ -bencílico)-*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-leucilglicil *N*-1-hexilamida (85)**

Sólido blanco; 59% de rendimiento; pf 170–172 °C; IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3301, 2931, 1739, 1704, 1647, 1547, 749, 699; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,99-0,80 (m, 9H,  $\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ , ( $H_3\text{C}(\delta)$ ) $_2\text{Leu}$ ), 1,20-1,32 (m, 6H,  $\text{NH}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 1,38-1,75 (m, 5H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ,  $H_2\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ), 1,81-2,03 (m, 1H,  $H_a\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,13-2,33 (m, 3H,  $H_b\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,12-3,26 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 3,87 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Gli}$ ), 4,12-4,46 (m, 2H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ), 5,09 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,16 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,71 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H,  $\text{NH}$ ), 6,31 (d,  $J = 6,2$  Hz, 2H,  $\text{NH}$ ), 6,88 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H,  $\text{NH}$ ), 7,37 (m, 10H, Ph); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14,0 ( $\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ), 22,0 ( $\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 22,5 ( $\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 22,8 ( $\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 24,7 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ ), 28,2 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 29,2 ( $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 31,4 ( $\text{NHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 31,9 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 39,6 ( $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 40,8 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 43,1 ( $\text{C}(\alpha)\text{Gli}$ ), 52,2 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 53,5

(C( $\alpha$ )Glu), 67,0 (OCH<sub>2</sub>Ph), 67,3 (OCH<sub>2</sub>Ph), 128,0 (Ph), 128,1 (Ph), 128,2 (Ph), 128,6 (Ph), 135,1 (Ph), 136,1 (Ph), 156,4 (NHCOO), 168,6 (CO), 171,8 (CO), 172,4 (CO), 172,7 (CO). Anal. Calculado para C<sub>34</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·0.3H<sub>2</sub>O: C 64,80, H 7,68, N 8,89. Encontrado: C 64,77, H 7,67, N 8,75.

***N*-Benziloxicarbonil(éster  $\alpha$ -bencílico)-L- $\gamma$ -glutamil-L-leucilglicil *N*-1-heptilamida (86)**

Sólido blanco; 57% de rendimiento; pf 141–143 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3302, 2928, 1746, 1697, 1635, 1538, 762, 701; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,81-0,97 (m, 9H, NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>, ((H<sub>3</sub>C( $\delta$ ))<sub>2</sub>Leu), 1,20-1,32 (m, 8H, NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 1,36-1,75 (m, 5H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, HC( $\beta$ )Leu, HC( $\gamma$ )Leu), 1,82-2,05 (m, 1H, H<sub>a</sub>C( $\beta$ )Glu), 2,09-2,35 (m, 3H, H<sub>b</sub>C( $\beta$ )Glu, HC( $\gamma$ )Glu), 3,09-3,30 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 3,87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Gli), 4,15-4,45 (m, 2H, HC( $\alpha$ )Glu, HC( $\alpha$ )Leu), 5,10 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 5,17 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 5,73 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 1H, ,NH), 6,36 (d,  $J$  = 6,8 Hz, 1H, NH), 6,47 (t,  $J$  = 5,4 Hz, 1H, NH), 6,92 (t,  $J$  = 5,7 Hz, 1H, NH), 7,35 (m, 10H, Ph); RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14,0 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>), 22,0 (C<sub>a</sub>( $\delta$ )Leu), 22,5 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22,8 (C<sub>b</sub>( $\delta$ )Leu), 24,7 (C( $\gamma$ )Leu), 26,8 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 28,2 (C( $\gamma$ )Glu), 28,9 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 29,3 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 31,7 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 31,9 (C( $\beta$ )Glu), 39,6 (NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 40,8 (C( $\beta$ )Leu), 43,0 (C( $\alpha$ )Gli), 52,2 (C( $\alpha$ )Leu), 53,5 (C( $\alpha$ )Glu), 67,0 (OCH<sub>2</sub>Ph), 67,3 (OCH<sub>2</sub>Ph), 128,0 (Ph), 128,1 (Ph), 128,2 (Ph), 128,5 (Ph), 128,6 (Ph), 135,1 (Ph), 136,1 (Ph), 156,4 (NHCOO), 168,7 (CO), 171,8 (CO), 172,4 (CO), 172,7 (CO). Anal. Calculado para C<sub>35</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>: C 65,81, H 7,89, N 8,77. Encontrado: C 65,65, H 7,90, N 8,52.

***N*-Benziloxicarbonil(éster  $\alpha$ -bencílico)-L- $\gamma$ -glutamil-L-leucilglicil *N*-1-octilamida (87)**

Sólido blanco; 62% de rendimiento; pf 152–154 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3303, 2930, 1747, 1705, 1634, 1536, 754, 705; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,81-0,97 (m, 9H, NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>, (H<sub>3</sub>C( $\delta$ ))<sub>2</sub>Leu), 1,17-1,32 (m, 10H, NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 1,38-1,80 (m, 5H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>C( $\beta$ )Leu, HC( $\gamma$ )Leu), 1,83-2,07 (m, 1H, H<sub>a</sub>C( $\beta$ )Glu), 2,10-

2,34 (m, 3H,  $H_bC(\beta)$ Glu,  $H-C(\gamma)$ Glu), 3,11-3,27 (m, 2H,  $NHCH_2(CH_2)_6CH_3$ ), 3,87 (m, 2H,  $CH_2$ Gli), 4,17-4,47 (m, 2H,  $HC(\alpha)$ Glu,  $HC(\alpha)$ Leu), 5,09 (s, 2H,  $OCH_2$ Ph), 5,17 (s, 2H,  $OCH_2$ Ph), 5,76 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H,  $NH$ ), 6,41 (d,  $J = 6,1$  Hz, 1H,  $NH$ ), 6,49 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H,  $NH$ ), 6,90-7,02 (m,  $J = 5,7$  Hz, 1H,  $NH$ ), 7,35 (m, 10H, Ph); RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  14,0 ( $NH(CH_2)_6CH_3$ ), 22,0 ( $C_a(\delta)$ Leu), 22,7 ( $NH(CH_2)_6CH_2CH_3$ ), 22,9 ( $C_b(\delta)$ Leu), 24,8 ( $C(\gamma)$ Leu), 26,8 ( $NH(CH_2)_5CH_2CH_2CH_3$ ), 28,3 ( $C(\gamma)$ Glu), 29,2 ( $NH(CH_2)_4CH_2(CH_2)_2CH_3$ ), 29,3 ( $NH(CH_2)_3CH_2(CH_2)_3CH_3$ ), 29,4 ( $NH(CH_2)_2CH_2(CH_2)_4CH_3$ ), 31,8 ( $NHCH_2CH_2(CH_2)_5CH_3$ ), 32,0 ( $C(\beta)$ Glu), 39,7 ( $NHCH_2(CH_2)_6CH_3$ ), 41,0 ( $C(\beta)$ Leu), 43,1 ( $C(\alpha)$ Gli), 52,3 ( $C(\alpha)$ Leu), 53,6 ( $C(\alpha)$ Glu), 67,1 ( $OCH_2$ Ph), 67,3 ( $OCH_2$ Ph), 128,0 (Ph), 128,2 (Ph), 128,3 (Ph), 128,5 (Ph), 128,6 (Ph), 135,2 (Ph), 136,2 (Ph), 156,5 ( $NHCOO$ ), 168,7 (CO), 171,9 (CO), 172,5 (CO), 172,9 (CO). Anal. Calculado para  $C_{36}H_{52}N_4O_7$ : C 66,23, H 8,03, N 8,58. Encontrado: C 65,97, H 8,02, N 8,43.

#### ***N*-Benziloxicarbonil-*L*- $\gamma$ -glutamil(éster $\alpha$ -bencílico)-*L*-leucilglicil *N*-pirrolidina (88)**

Sólido blanco; 95% de rendimiento; RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  0,90 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H,  $H_3C_a(\delta)$ Leu), 0,93 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H,  $H_3C_b(\delta)$ Leu), 1,50-1,75 (m, 3H,  $H_2C(\beta)$ Leu,  $HC(\gamma)$ Leu), 1,75-2,13 (m, 5H,  $H_aC(\beta)$ Glu,  $N(CH_2CH_2)_2$ ), 2,06-2,30 (m, 1H,  $H_bC(\beta)$ Glu), 2,30 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H,  $H_2C(\gamma)$ Glu), 3,34-3,48 (m, 4H,  $N(CH_2CH_2)_2$ ), 3,91 (s, 2H,  $CH_2$ Gli), 4,22 (dd,  $J = 9,1, 4,8$  Hz, 1H,  $HC(\alpha)$ Leu), 4,38-4,48 (m, 1H,  $HC(\alpha)$ Glu), 5,07 (s, 2H,  $PhCH_2$ ), 5,16 (s, 2H,  $PhCH_2$ ), 7,32 (m, 10H, Ph); RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  21,9 ( $C_a(\delta)$ Leu), 23,5 ( $C_b(\delta)$ Leu), 25,0 ( $C(\gamma)$ Leu), 25,9 ( $N(CH_2CH_2-)(CH_2CH_2-)$ ), 26,9 ( $N(CH_2CH_2-)(CH_2CH_2-)$ ), 28,2 ( $C(\gamma)$ Glu), 32,9 ( $C(\beta)$ Glu), 41,7 ( $C(\beta)$ Leu), 42,6 ( $C(\alpha)$ Gli), 46,8 ( $N(CH_2CH_2-)(CH_2CH_2-)$ ), 47,1 ( $N(CH_2CH_2-)(CH_2CH_2-)$ ), 53,1 ( $C(\alpha)$ Leu), 55,2 ( $C(\alpha)$ Glu), 67,7 ( $OCH_2$ Ph), 68,0 ( $OCH_2$ Ph), 128,8 (Ph), 129,0 (Ph), 129,2 (Ph), 129,3 (Ph), 129,6 (Ph), 137,2 (Ph), 138,1 (Ph), 157,1 ( $OCONH$ ), 168,7 (CO), 173,5 (CO), 174,7 (CO), 175,0 (CO).

#### ***N*-Benziloxicarbonil-*L*- $\gamma$ -glutamil(éster $\alpha$ -bencílico)-*L*-leucilglicil *N*-piperidina (89)**

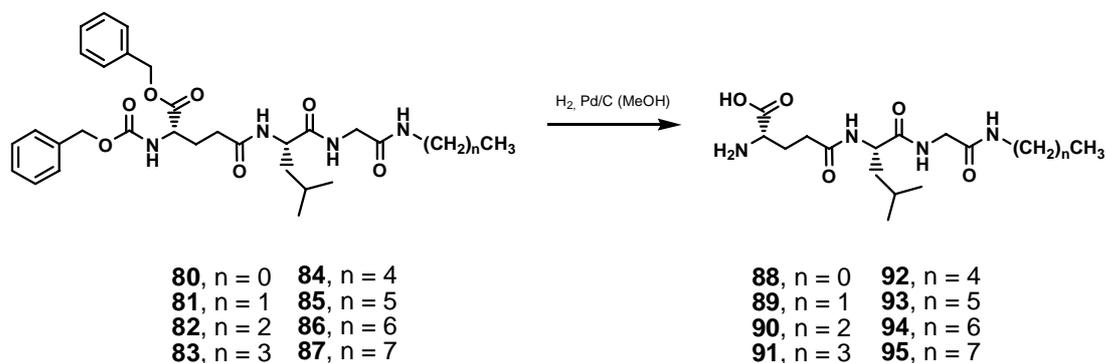
Sólido blanco; 94% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,91 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_\alpha(\delta)\text{Leu}$ ), 0,94 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_\beta(\delta)\text{Leu}$ ), 1,45-1,85 (m, 9H,  $\text{H}_2\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2-)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ ), 1,83-2,07 (m, 1H,  $\text{H}_\alpha\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,08-2,32 (m, 1H,  $\text{H}_\beta\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,38 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,37 (t dist.,  $J = 5,7$  Hz, 2H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2-)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ ), 3,48 (t dist.,  $J = 5,3$  Hz, 2H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2-)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ ), 4,00 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Gli}$ ), 4,24 (dd,  $J = 9,5, 5,1$  Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 4,38-4,48 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ), 5,08 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,17 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 7,33 (m, 10H, Ph); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  21,9 ( $\text{C}_\alpha(\delta)\text{Leu}$ ), 23,4 ( $\text{C}_\beta(\delta)\text{Leu}$ ), 25,2 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ ), 25,8 ( $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2-)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ ), 26,4 ( $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2-)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ ), 27,1 ( $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2-)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ ), 28,1 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 32,8 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 41,6 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 41,7 ( $\text{C}(\alpha)\text{Gli}$ ), 44,2 ( $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2-)(\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ ), 46,7 ( $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2-)(\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ ), 53,0 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 55,0 ( $\text{C}(\alpha)\text{Glu}$ ), 67,6 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67,9 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 128,6 (Ph), 128,9 (Ph), 129,0 (Ph), 129,2 (Ph), 129,3 (Ph), 129,5 (Ph), 136,9 (Ph), 137,8 (Ph), 158,4 (NH-CO-O), 167,9 (CO), 173,4 (CO), 174,5 (CO), 174,6 (CO).

## 6.6.2 Hidrogenólisis de los grupos protectores

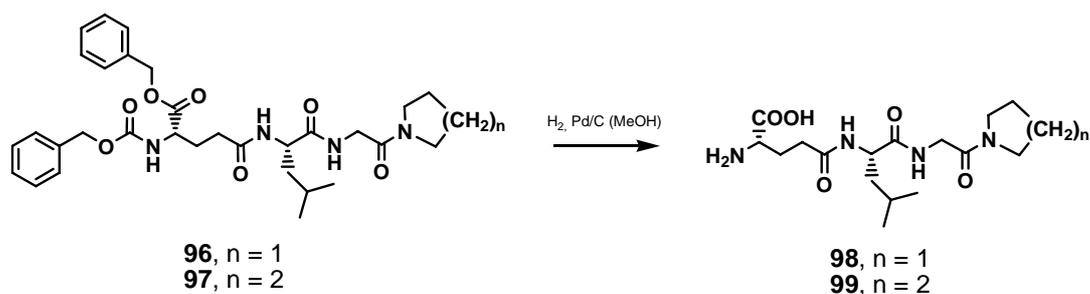
### Procedimiento general

La hidrogenólisis se llevó a cabo de la misma manera en la que fue descrita para los ésteres. Los compuestos se obtuvieron en forma pura cuantitativamente, salvo en el caso de los derivados de poliaminas, los cuales se purificaron por cromatografía en columna de fase reversa (RP-18) eluyendo con una mezcla de metanol-agua (1:1). El compuesto **80** se transformó en su clorhidrato correspondiente, previamente a su purificación, burbujeando HCl (g) sobre una solución de éste compuesto en metanol anhidro.

### Derivados de aminas lineales



### Derivados de aminas cíclicas



### L- $\gamma$ -Glutamyl-L-leucilglicil *N*-metilamida (**88**)

Sólido blanco; 100% de rendimiento; pf 115–117 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3287, 3075, 2962, 1659, 1542; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,92 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 0,96 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 1,54-1,77 (m, 3H,  $\text{HC}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ), 2,09-2,24 (m, 2H,  $\text{HC}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,54 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 2,73 (s, 3H,  $\text{NHCH}_3$ ), 3,76 (mAB, 2H,  $\text{CH}_2\text{Gli}$ ), 3,96 (t,  $J = 6,6$  Hz,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 4,28 (t,  $J = 7,2$  Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  21,9 ( $\text{C}_a\text{H}_3\text{Leu}$ ), 23,3 ( $\text{C}_b\text{H}_3\text{Leu}$ ), 25,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ ), 26,3 ( $\text{NHCH}_3$ ), 27,2 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 32,2 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 41,3 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 43,4 ( $\text{CH}_2\text{Gli}$ ), 54,0 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 172,0

(CO), 174,9 (CO), 176,1 (CO). Anal. Calculado para  $C_{14}H_{26}N_4O_5 \cdot 2\frac{1}{2}H_2O$ : C 44,79, H 6,98, N 14,93. Encontrado: C 44,55, H 7,48, N 15,08.

#### **L- $\gamma$ -Glutamil-L-leucilglicil N-etilamida (89)**

Sólido blanco; 99% de rendimiento; pf 119–120 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ) 3287, 3078, 2964, 1658, 1551; RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  0,92 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H,  $H_3C_b$ Leu), 0,94 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H,  $H_3C_a$ Leu), 1,12 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H), 1,53-1,77 (m, 3H,  $HC(\beta)$ Leu,  $HC(\gamma)$ Leu), 2,09 (m, 2H,  $HC(\beta)$ Glu), 2,52 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H,  $HC(\gamma)$ Glu), 3,17 (c,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 3,75 (mAB, 2H,  $CH_2$ Gli), 3,80 (m, 1H,  $HC(\alpha)$ Glu), 4,23 (t dist.,  $J = 7,4$  Hz, 1H,  $HC(\alpha)$ Leu); RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  14,8 ( $NHCH_2CH_3$ ), 21,9 ( $C_aH_3$ Leu), 23,4 ( $C_bH_3$ Leu), 25,9 ( $C(\gamma)$ Leu), 27,7 ( $C(\gamma)$ Glu), 32,6 ( $C(\beta)$ Glu), 35,3 ( $(NHCH_2CH_3)$ ), 41,3 ( $C(\beta)$ Leu), 43,6 ( $CH_2$ Gli), 54,0 ( $C(\alpha)$ Leu), 55,2 ( $C(\alpha)$ Glu), 171,2 (CO), 173,9 (CO), 175,4 (CO), 175,6 (CO). Anal. Calculado para  $C_{15}H_{28}N_4O_5 \cdot 2H_2O$ : C 47,36, H 7,42, N 14,73. Encontrado: C 47,79, H 7,84, N 14,14.

#### **L- $\gamma$ -Glutamil-L-leucilglicil N-1-propilamida (90)**

Sólido blanco; 100% de rendimiento; pf 125–127 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ) 3297, 3075, 2963, 1658, 1543; RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  0,75-0,91 (m, 9H,  $(H_3C(\delta))_2$ Leu,  $NH(CH_2)_2CH_3$ ), 1,33-1,70 (m, 5H,  $NHCH_2CH_2CH_2$ ,  $HC(\beta)$ Leu,  $HC(\gamma)$ Leu), 1,88-2,16 (m, 2H,  $HC(\beta)$ Glu), 2,42 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $HC(\gamma)$ Glu), 3,05 (t dist.,  $J = 6,4$  Hz, 2H,  $NHCH_2CH_2CH_3$ ), 3,62 (t,  $J = 6,2$  Hz, 1H,  $HC(\alpha)$ Glu), 3,71 (mAB, 2H,  $CH_2$ Gli), 4,18 (t dist.,  $J = 7,3$  Hz, 1H,  $HC(\alpha)$ Leu); RMN  $^{13}C$  (50 MHz, MeOD)  $\delta$  11,7 ( $NH(CH_2)_2CH_3$ ), 21,9 ( $C_a(\delta)$ Leu), 23,4 ( $C_b(\delta)$ Leu), 23,5 ( $NHCH_2CH_2CH_3$ ), 25,9 ( $C(\gamma)$ Leu), 27,6 ( $C(\gamma)$ Glu), 32,5 ( $C(\beta)$ Glu), 41,3 ( $C(\beta)$ Leu), 42,2 ( $NHCH_2CH_2CH_3$ ), 43,5 ( $C(\alpha)$ Gli), 54,0 ( $C(\alpha)$ Leu), 55,0 ( $C(\alpha)$ Glu), 171,4 (CO), 173,5 (CO), 175,3 (CO), 175,6 (CO). Anal. Calculado para  $C_{16}H_{30}N_4O_5 \cdot 1,7H_2O$ : C 49,90, H 7,77, N 14,40. Encontrado: C 49,54, H 8,20, N 14,18.

#### **L- $\gamma$ -Glutamil-L-leucilglicil N-1-butilamida (91)**

Sólido blanco; 97% de rendimiento; pf 126–128 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3298, 3086, 2964, 1659, 1542; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,86-1,00 (m, 9H,  $(\text{H}_3\text{C}(\delta))_2\text{Leu}$ ,  $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 1,27-1,39 (m, 2H,  $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,45-1,53 ( $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,55-1,76 (m, 3H,  $\text{HC}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ), 1,95-2,19 (m, 2H,  $\text{HC}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,43-2,59 (m, 2H,  $\text{HC}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,11-3,25 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 3,60-3,69 (sa, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 3,80 (m<sub>AB</sub>, 2H,  $\text{CH}_2\text{Gli}$ ), 4,28 (t dist.,  $J=7,2$  Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  14,1 ( $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 21,0 ( $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 21,8 ( $\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 23,4 ( $\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 25,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ ), 27,7 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 32,4 ( $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 32,6 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 40,2 ( $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 41,3 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 43,6 ( $\text{C}(\alpha)\text{Gli}$ ), 54,0 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 171,3 (CO), 175,4 (CO), 173,8 (CO), 175,6 (CO). Anal. Calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 1,6\text{H}_2\text{O}$ : C 50,89, H 8,04, N 13,96. Encontrado: C 50,23, H 8,22, N 13,56.

#### **L- $\gamma$ -Glutamil-L-leucilglicil N-1-pentilamida (92)**

Sólido blanco; 98% de rendimiento; pf 163–165 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3309, 3097, 2966, 1654, 1543; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,87-0,99 (m, 9H,  $(\text{H}_3\text{C}(\delta))_2\text{Leu}$ ,  $\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 1,26-1,37 (m, 4H,  $\text{NH}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,55-1,76 (m, 3H,  $\text{HC}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ), 1,99-2,08 (m, 1H,  $\text{H}_a\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,10-2,18 (m, 1H,  $\text{H}_b\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,42-2,56 (m, 2H,  $\text{HC}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,10-3,24 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 3,62 (t,  $J=6,5$  Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 3,79 (m<sub>AB</sub>, 2H,  $\text{CH}_2\text{Gli}$ ), 4,28 (dd,  $J=8,9, 6,0$  Hz, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  14,3 ( $\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 21,8 ( $\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 23,4 ( $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 25,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ ), 27,8 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 30,1 ( $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 32,7 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 40,4 ( $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 41,4 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 43,6 ( $\text{C}(\alpha)\text{Gli}$ ), 54,0 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 55,4 ( $\text{C}(\alpha)\text{Glu}$ ), 171,4 (CO), 175,4 (CO), 175,6 (CO). Anal. Calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ : C 54,66, H 8,60, N 14,17. Encontrado: C 54,74, H 8,71, N 13,67.

#### **L- $\gamma$ -Glutamil-L-leucilglicil N-1-hexilamida (90)**

Sólido blanco; 98% de rendimiento; pf 167–169 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3288, 3077, 2960, 1652, 1545; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,87-1,04 (m, 9H,  $(\text{H}_3\text{C}(\delta))_2\text{Leu}$ ,

NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 1,26-1,45 (m, 6H, NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 1,45-1,82 (m, 3H, HC(β)Leu, HC(γ)Leu), 1,99-2,29 (sa, 2H, H<sub>2</sub>C(β)Glu), 2,45-2,62 (m, 2H, HC(γ)Glu), 3,14-3,30 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 3,62-3,76 (m, 1H, HC(α)Glu), 3,83 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Gli), 4,28 (t dist., *J* = 6,6 Hz, 1H, HC(α)Leu); RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 14,3 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 21,8 (C<sub>a</sub>H<sub>3</sub>Leu), 23,4 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)\*, 23,6 (C<sub>b</sub>H<sub>3</sub>Leu)\*, 25,9 (C(γ)Leu), 27,6 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 27,7 (C(γ)Glu), 30,3 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 32,6 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 32,7 (C(β)Glu), 40,5 (NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 41,4 (C(β)Leu), 43,6 (C(α)Gli), 54,0 (C(α)Leu), 55,3 (C(α)Glu), 171,3 (CO), 175,4 (CO), 175,6 (CO). Anal. Calculado para C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>·1½H<sub>2</sub>O: C 53,38, H 8,49, N 13,11. Encontrado: C 53,64, H 8,79, N 12,79.

#### **L-γ-Glutamil-L-leucilglicil N-1-heptilamida (93)**

Sólido blanco; 100% de rendimiento; 171–173 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3311, 3078, 2934, 1640, 1543; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0,83-1,00 (m, 9H, (H<sub>3</sub>C(δ))<sub>2</sub>Leu, NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>), 1,23-1,37 (m, 8H, NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 1,41-1,80 (m, 3H, HC(β)Leu, HC(γ)Leu), 1,94-2,28 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(β)Glu), 2,40-2,59 (m, 2H, HC(γ)Glu), 3,08-3,27 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 3,57-3,70 (m, 1H, HC(α)Glu), 3,87 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Gli), 4,35 (t dist., *J* = 4,6 Hz, 1H, HC(α)Leu); RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 14,4 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>), 21,8 (C<sub>a</sub>(δ)Leu), 23,5 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)\*, 23,7 (C<sub>b</sub>(δ)Leu)\*, 25,9 (C(γ)Leu), 27,8 (C(γ)Glu), 27,9 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 30,1 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 30,4 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 32,6 (C(β)Glu), 40,5 (NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 41,4 (C(β)Leu), 43,5 (C(α)Gli), 53,9 (C(α)Leu), 55,5 (C(α)Glu), 171,4 (CO), 175,4 (CO), 175,7 (CO). Anal. Calculado para C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>·2H<sub>2</sub>O: C 53,32, H 8,50, N 12,44. Encontrado: C 53,34, H 8,63, N 12,12.

#### **L-γ-Glutamil-L-leucilglicil N-1-octilamida (94)**

Sólido blanco; 99% de rendimiento; pf 166–168 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3305, 3103, 2935, 1646, 1544; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0,85-1,05 (m, 9H, (H<sub>3</sub>C(δ))<sub>2</sub>Leu,

NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>), 1,27-1,40 (m, 8H, NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 1,45-1,84 (m, 3H, HC(β)Leu, HC(γ)Leu), 1,98-2,29 (sa, 2H, H<sub>2</sub>C(β)Glu), 2,46-2,60 (m, 2H, HC(γ)Glu), 3,13-3,30 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>), 3,60-3,73 (m, 1H, HC(α)Glu), 3,83 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Gli), 4,29 (t dist., *J* = 7,4 Hz, 1H, HC(α)Leu); RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 14,5 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>), 21,8 (C<sub>a</sub>(δ)Leu), 23,5 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)\*, 23,7 (C<sub>b</sub>(δ)Leu)\*, 25,9 (C(γ)Leu), 27,8 (C(γ)Glu), 28,0 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 30,4 (NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 32,6 (C(β)Glu), 33,0 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 40,5 (NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)-CH<sub>3</sub>), 41,3 (C(β)Leu), 43,5 (C(α)Gli), 53,9 (C(α)Leu), 55,3 (C(α)Glu), 171,4 (CO), 175,4 (CO), 175,6 (CO). Anal. Calculado para C<sub>21</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>·1,2H<sub>2</sub>O: C 56,03, H 8,96, N 12,45. Encontrado: C 55,86, H 9,30, N 12,45.

#### **L-γ-glutamil(éster α-bencílico)-L-leucilglicil N-pirrolidina (98)**

Sólido blanco; 98% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (200, MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0,92 (d, *J* = 5,6 Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>a</sub>(δ)Leu), 0,96 (d, *J* = 5,6 Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>b</sub>(δ)Leu), 1,00-1,46 (m, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)), 1,46-1,92 (m, 9H, H<sub>2</sub>C(β)Leu, HC(γ)Leu), 2,02-2,21 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(β)Glu), 2,38 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(γ)Glu), 3,35-3,57 (m, 4H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)), 4,03 (m<sub>AB</sub>, HC(α)Glu), 4,33-4,50 (m, 1H, HC(α)Leu); RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 21,8\* (C<sub>a</sub>(δ)Leu), 23,5\* (C<sub>b</sub>(δ)Leu), 25,0 (C(γ)Leu), 26,4 (N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)), 26,6 (N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)), 26,9 (N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)), 26,9 (C(γ)Glu), 32,6 (C(β)Glu), 41,7 (C(β)Leu), 42,6 (C(α)Gli), 46,8 (N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)), 47,1 (N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)), 53,4 (C(α)Leu), 54,8 (C(α)Glu), 168,8 (CO), 175,2 (CO).

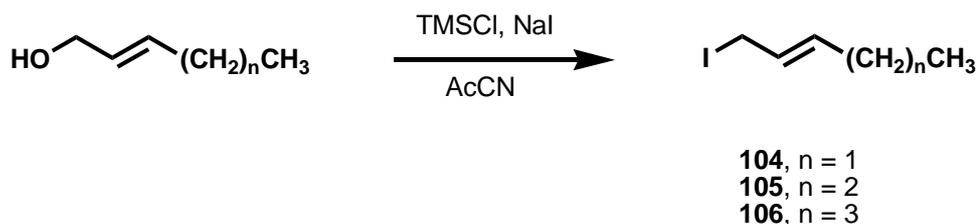
#### **L-γ-glutamil(éster α-bencílico)-L-leucilglicil N-piperidina (99)**

Sólido blanco; 99% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (200, MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0,92 (d, *J* = 5,6 Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>a</sub>(δ)Leu), 0,96 (d, *J* = 5,6 Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>b</sub>(δ)Leu), 1,00-1,46 (m, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)), 1,46-1,92 (m, 9H, H<sub>2</sub>C(β)Leu, HC(γ)Leu), 2,02-2,21 (m, 2H,

$H_2C(\beta)\text{Glu}$ ), 2,38 (m, 2H,  $H_2C(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,35-3,57 (m, 4H,  $N(\text{CH}_2\text{CH}_2-)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ ), 4,03 (mAB,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 4,33-4,50 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  21,8\* ( $\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ ), 23,5\* ( $\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ ), 25,0 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ ), 26,4 ( $N(\text{CH}_2\text{CH}_2-)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ ), 26,6 ( $N(\text{CH}_2\text{CH}_2-)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ ), 26,9 ( $N(\text{CH}_2\text{CH}_2-)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ ), 26,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 32,6 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 41,7 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 42,6 ( $\text{C}(\alpha)\text{Gli}$ ), 46,8 ( $N(\text{CH}_2\text{CH}_2-)(\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ ), 47,1 ( $N(\text{CH}_2\text{CH}_2-)(\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ ), 53,4 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 54,8 ( $\text{C}(\alpha)\text{Glu}$ ), 168,8 (CO), 175,2 (CO).

## 6.7 Síntesis de fosfinopéptidos

### 6.7.1 Preparación de ioduros alílicos



### Procedimiento general

A una solución de ioduro de sodio (3,80 g, 24,0 mmol) en 25 ml de acetonitrilo anhidro se agregó el alcohol alílico correspondiente (24,0 mmol) y TMSCl (3,2 mL, 24,0 mmol) gota a gota. Una vez finalizado el agregado se agitó la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se particionó entre éter etílico (100 mL) y NaCl (ss) (100 mL), y se lavó la fase orgánica con una solución acuosa al 10% de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (25 ml) y NaCl (ss) (25 ml). La fase orgánica se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se evaporó el solvente. El alcohol alílico correspondiente se purificó pasándolo a través de una columna de Alúmina neutra.

**(E)-1-Iodopent-2-eno (104)**

Líquido incoloro; 66% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,97 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,96-2,13 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,85-3,91 (m, 2H, ICH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5,68-5,77 (m, 2H, ICH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ICH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,0 (ICH<sub>3</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 13,0 (CH<sub>3</sub>), 25,0 (CH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 126,9 (CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 136,6 (CHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

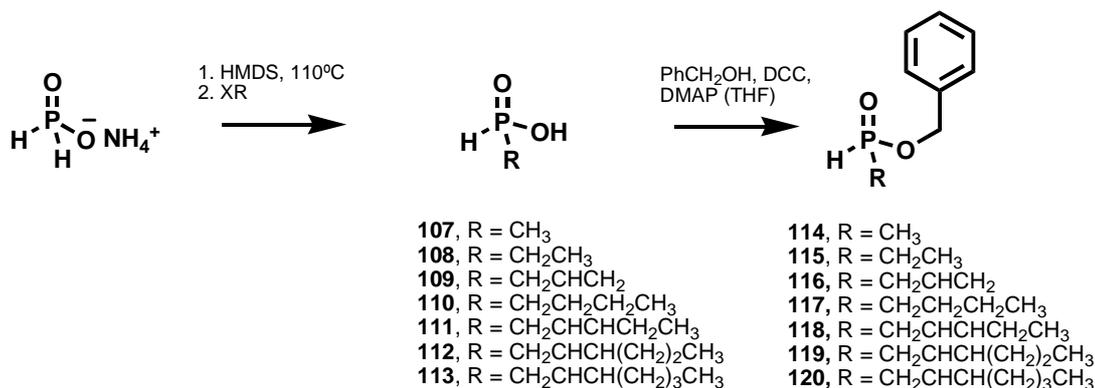
**(E)-1-Iodohex-2-eno (105)**

Líquido incoloro; 81% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,88 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,25-1,48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,92-2,08 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,82-3,93 (m, 2H, ICH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5,60-5,76 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**(E)-1-Iodohex-2-eno (106)**

Líquido incoloro; 83% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,96 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,26-1,52 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,98-2,21 (m, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,79-3,91 (m, 2H, ICH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5,61-5,78 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**6.7.2 Síntesis de ácidos α-aminoalquilfosfínicos****6.7.2.1 Ésteres bencílicos de ácidos alquil o alquenilfosfínicos**



### Procedimiento general de la síntesis “one-pot”

Se agitó una mezcla de fosfinato de amonio (1,00 g, 12,04 mmol) y hexametildisilazano (2,53 mL, 12,04 mmol) a 110 °C bajo atmósfera de argón durante 2 horas. Se enfrió la mezcla de reacción a 0 °C y se agregó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro, seguido del agregado del halogenuro de alquilo o alqueno correspondiente (12,04 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas bajo atmósfera de argón. Se filtró la mezcla a través de lecho de celite, bajo nitrógeno, para eliminar un precipitado amarillo formado durante la reacción, minimizando la pérdida de producto por oxidación con el aire. Se agregó sobre el filtrado alcohol bencílico (2,46 mL, 24,08 mmol) y se evaporó el solvente a presión reducida, restituyendo la presión con argón. Se disolvió el residuo color ámbar resultante con THF anhidro (20 mL). Luego se agregaron un equivalente más de alcohol bencílico (1,23 mL, 12,04 mmol), 4-dimetilaminopiridina (100 mg) y dicitclohexilcarbodiimida (3,23 g, 15,65 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se separó el precipitado blanco de dicitclohexilurea por filtración a través de un embudo de vidrio fritado. Se evaporó el solvente y se purificó el residuo por cromatografía en columna (sílica gel) empleando mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH desde 100:0 hasta 97:3. El aceite obtenido se redisolvió en una mínima cantidad de una mezcla hexano–AcOEt (1:1) y se filtró a través de lecho de celite para eliminar restos de dicitclohexilurea. Se evaporó el solvente y el compuesto puro fue utilizado rápidamente en el paso siguiente de reacción antes de que pudiera hidrolizarse.

Los rendimientos se calcularon en base a fosfinato de amonio. En algunos casos, se tomó una alícuota luego de finalizado el primer paso para verificar la formación del ácido fosfínico libre. Esta alícuota se trató con metanol, se filtró a través de lecho de celite y se evaporó. Se realizó un espectro de RMN  $^1\text{H}$  sobre el crudo, en los compuestos que se describen a continuación.

#### Ácido metilfosfínico (107)

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1,50 (dd,  $J_{\text{P-H}} = 14,6$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 1,9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,12 (dc,  $J_{\text{P-H}} = 559,6$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 1,9$  Hz, 1H, HP).

#### Ácido etilfosfínico (108)

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  0,97 (dc,  $J_{\text{P-H}} = 21,4$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 7,7$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,68 (ddc,  $J_{\text{P-H}} = 15,3$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 7,7$ , 1,1 Hz, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CH}_3$ ), 6,89 (dt,  $J_{\text{P-H}} = 549,1$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 2,0$  Hz, 1H, HP).

#### Ácido alilfosfínico (108)

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  2,69 (dd,  $J_{\text{P-H}} = 18,7$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 7,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 5,24-5,36 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 5,84-5,86 (m, , 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 6,89 (d,  $J = 670,7$  Hz, 1H, HP).

#### Ácido 1-butilfosfínico (110)

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,94 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,33-1,90 (m, 6H,  $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 7,13 (dt,  $J_{\text{P-H}} = 545,5$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 2,0$  Hz 1H, HP).

#### Ácido 2-pentenilfosfínico (111)

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,99 (t,  $J = 7,4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,94-2,20 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2,42-2,67 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 5,23-5,49 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 5,56-5,79 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 6,95 (dt,  $J_{\text{P-H}} = 551,8$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 2,0$  Hz 1H, HP).

**Ácido metilfosfínico éster bencílico (114)**

Aceite incoloro; 46% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,56 (dd,  $J_{\text{P-H}} = 15,1$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 2,1$  Hz, 3H,  $\text{PCH}_3$ ), 5,04 (dd,  $J_{\text{P-H}} = 8,7$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 11,8$  Hz 1H,  $\text{OCH}_a\text{Ph}$ ), 5,14 (dd,  $J_{\text{P-H}} = 10,5$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 11,8$  Hz 1H,  $\text{OCH}_b\text{Ph}$ ), 7,13 (dc,  $J_{\text{P-H}} = 541,4$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 2,1$  Hz, 1H,  $\text{PH}$ ), 7,31-7,42 (m, 5H, Ph); RMN  $^{13}\text{C}$  (125,77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  17,0 (d,  $J = 93,3$  Hz,  $\text{PCH}_3$ ), 65,2 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 128,0 (Ph), 128,2 (Ph), 129,3 (Ph), 142,7 (Ph); RMN  $^{31}\text{P}$  (202,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  30,1.

**Ácido etilfosfínico éster bencílico (115)**

Aceite incoloro; 32% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,16 (d,  $J_{\text{P-H}} = 21,4$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 7,7$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,7-1,95 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CH}_3$ ), 5,08 (dd,  $J_{\text{P-H}} = 24,7$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 11,7$  Hz, 1H,  $\text{PCH}_a\text{Ph}$ ), 5,12 (dd,  $J_{\text{P-H}} = 23,0$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 11,7$  Hz, 1H,  $\text{PCH}_b\text{Ph}$ ), 7,09 (dt,  $J_{\text{P-H}} = 530,0$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 1,8$  Hz, 1H,  $\text{HP}$ ), 7,27-7,50 (m, 5H, Ph).

**Ácido alilfosfínico éster bencílico (116)**

Aceite incoloro; 43% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,63-2,67 (m, 2H,  $\text{PCH}_a\text{CHCH}_2$ ), 2,67-2,70 (m, 2H,  $\text{PCH}_b\text{CHCH}_2$ ), 5,06 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 11,8$  Hz,  $J_{\text{P-H}} = 8,7$  Hz), 5,15 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 11,8$  Hz,  $J_{\text{P-H}} = 10,1$  Hz), 5,23 (dddt, 1H,  $^3J_{\text{H-H}} = 17,1$  Hz,  $J_{\text{P-H}} = 6,1$  Hz,  $^2J_{\text{H-H}} = 1,3$  Hz,  $^3J_{\text{H-H}} = 1,4$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}_a$ ), 5,27 (dddt, 1H,  $^3J_{\text{H-H}} = 10,2$  Hz,  $J_{\text{P-H}} = 5,4$  Hz,  $^2J_{\text{H-H}} = 1,3$  Hz,  $^3J_{\text{H-H}} = 1,1$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}_b$ ), 5,73 (dddt,  $^3J_{\text{H-H, trans}} = 17,1$  Hz,  $^3J_{\text{H-H, cis}} = 10,1$  Hz,  $J_{\text{P-H}} = 6,9$  Hz,  $^3J_{\text{H-H}} = 7,5$  Hz, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}_2$ ), 7,04 (ddd,  $J_{\text{P-H}} = 546,8$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 2,2$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 1,8$  Hz, 1H,  $\text{HP}$ ), 7,24-7,31 (m, 1H, Ph), 7,31-7,41 (m, 4H, Ph); RMN  $^{13}\text{C}$  (125,77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  35,3 (d,  $J = 90,7$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}_2$ ), 65,1 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 122,3 (d,  $J = 14,2$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}_2$ ), 125,6 (d,  $J = 9,3$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}_2$ ), 127,0 (Ph), 127,5 (Ph), 128,5 (Ph); RMN  $^{31}\text{P}$  (202,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  34,5.

**Ácido 1-butilfosfínico éster bencílico (117)**

Aceite incoloro; 15% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,91 (t, 1H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,41 (sext. dist., 2H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,53-1,62 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,75-1,83 (m, 2H,  $\text{PCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 5,03 (dd, 1H,  $J_{\text{H-H}} = 11,9$  Hz,  $J_{\text{P-H}} = 8,4$  Hz,  $\text{PCHH}_a\text{Ph}$ ), 5,14 (dd, 1H,  $J_{\text{H-H}} = 11,8$  Hz,  $J_{\text{P-H}} = 10,1$  Hz,  $\text{PCHH}_b\text{Ph}$ ), 7,32-7,41 (m, 5H, Ph), 7,65 (dt, 1H,  $J_{\text{P-H}} = 530,0$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 2,0$  Hz, *HP*); RMN  $^{13}\text{C}$  (125,77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13,5 ( $\text{PCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 22,7 (d,  $J = 2,5$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 23,5 (d,  $J = 16,1$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 28,5 (d,  $J = 92,4$  Hz,  $\text{PCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 67,5 (d,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 128,1 (Ph), 128,6 (Ph), 128,7 (Ph), 135,8 (d,  $J = 5,9$  Hz); RMN  $^{31}\text{P}$  (202,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  39,2.

#### Ácido 2-pentenilfosfínico éster bencílico (118)

Aceite incoloro; 45% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,97 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 2,01-2,11 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 2,50-2,63 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 5,04 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 11,9$  Hz,  $J_{\text{P-H}} = 8,7$  Hz, 1H,  $\text{OCHH}_a\text{Ph}$ ), 5,14 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 11,9$  Hz,  $J_{\text{P-H}} = 10,1$  Hz, 1H,  $\text{OCHH}_b\text{Ph}$ ), 5,27-5,39 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 5,62-5,72 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 6,99 (ddd,  $J_{\text{P-H}} = 544,5$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 2,4$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 1,8$  Hz, 1H, *HP*), 7,31-7,40 (m, 5H, Ph).

#### Ácido 2-hexenilfosfínico éster bencílico (119)

Aceite incoloro, 45% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,96 (t,  $J = 7,7$ , 3H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,37 (sext. dist.,  $J = 7,3$  Hz, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,92-2,09 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2,51-2,58 (m, 1H,  $\text{PCHH}_a\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 2,60-2,67 (m, 1H,  $\text{PCHH}_b\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 5,03 (dd,  $J_{\text{P-H}} = 8,9$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 12,0$  Hz, 1H,  $\text{OCHH}_a\text{Ph}$ ), 5,14 (dd, 1H,  $J_{\text{P-H}} = 10,2$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 12,0$  Hz,  $\text{OCHH}_b\text{Ph}$ ), 5,21-5,41 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 5,51-5,75 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 6,98 (dt,  $J_{\text{P-H}} = 543,7$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 2,1$  Hz, 1H, *HP*), 7,29-7,44 (m, 5H, Ph).

**Ácido 2-heptenilfosfínico éster bencílico (120)**

Aceite incoloro; 55% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,0,88 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 1,17-1,38 (m, 4H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,94-2,08 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2,47-2,58 (m, 1H,  $\text{PCHH}_a\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 2,60-2,68 (m, 1H,  $\text{PCHH}_b\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 5,04 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 12,0$  Hz,  $J_{\text{P-H}} = 10,0$  Hz, 1H,  $\text{OCHH}_a\text{Ph}$ ), 5,15 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 12,0$  Hz,  $J_{\text{P-H}} = 10,0$  Hz, 1H,  $\text{OCHH}_b\text{Ph}$ ), 5,19-5,43 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 5,57-5,78 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 6,99 (dt,  $J_{\text{P-H}} = 543,5$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 2,1$  Hz, 1H, *HP*), 7,28-7,40 (m, 5H, Ph).

**6.7.2.2 Incorporación del grupo aminometilo*****N*-Tritilmetanimina (113)**

A una solución de *N*-tritolamina (500 mg, 1,93 mmol) en tolueno (25 mL) se agregó una solución 37% m/v de formaldehído acuoso (0,22 mL, 2,90 mmol) en un balón equipado con una trampa Dean-Stark, La solución se calentó a reflujo durante 4hs. Luego de evaporar el solvente residual se obtuvieron (522 mg, 99,7% de rendimiento) de *N*-tritolmetanimina como un sólido blanco cristalino.

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,02 (d,  $J = 15,9$  Hz, 1H,  $\text{TrN}=\text{CH}_a\text{H}$ ), 7,09-7,39 (m, 15H, Ph), 7,78 (d,  $J = 15,9$  Hz, 1H,  $\text{TrN}=\text{CH}_b\text{H}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  79,9 ( $\text{C}(\text{Ph})_3$ ), 126,8 (Ph), 127,8 (Ph), 129,7 (Ph), 144,7 (Ph), 153,0 ( $\text{TrN}=\text{CH}_2$ ).

**Procedimiento general**

A una solución de metilnitritilamina (726 mg, 2,68 mmol) en tolueno anhidro (20 mL) enfriada a 0 °C se agregó el éster bencílico del ácido fosfínico correspondiente (2,30 mmol) bajo atmósfera de argón. Sobre esta solución se agregó una solución 5% v/v de trifluoroboro eterato, gota a gota, y se dejó llegar la reacción a temperatura ambiente. La mezcla se agitó

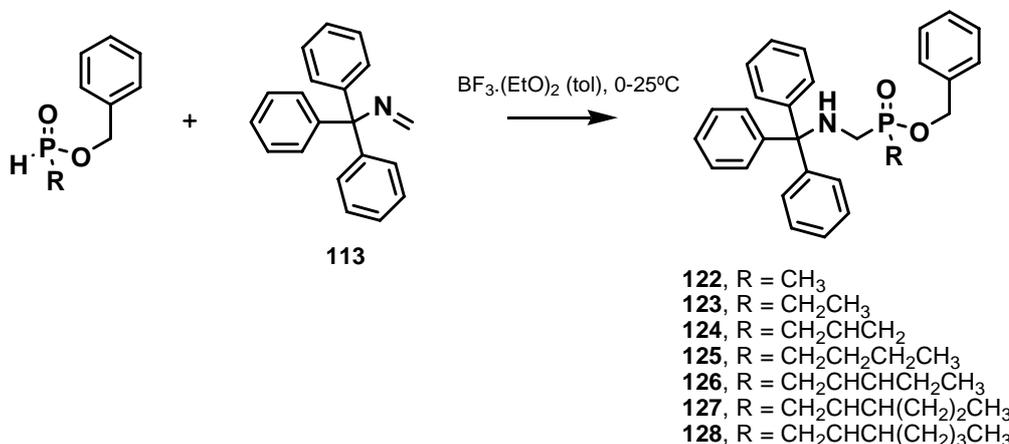
durante 72 hs. Se evaporó el solvente y se purificó el residuo por cromatografía en columna (sílica gel) utilizando como eluyente una mezcla de hexano–AcOEt (4:1) para dar el producto puro correspondiente.

### Fosfinato de metil[(*N*-tritolamino)metil] bencilo (122)

Aceite incoloro; 46% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1,63 (d,  $J = 14,0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,30 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 14,6$ ,  $J_{\text{P-H}} = 10,2$  Hz, 1H,  $\text{PCH}_a\text{NH}$ ), 2,38 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 14,6$  Hz,  $J_{\text{P-H}} = 11,6$  Hz, 1H,  $\text{PCH}_b\text{NH}$ ), 5,01 (d,  $J_{\text{P-H}} = 9,1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 7,06-7,52 (m, 20H, Ph); RMN  $^{13}\text{C}$  (125,77 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  12,9 (d,  $J = 93,2$  Hz,  $\text{PCH}_3$ ), 43,9 (d,  $J = 107,7$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{NH}$ ), 67,6 (d,  $J = 5,9$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 72,7 (d,  $J = 17,0$  Hz,  $\text{CPh}_3$ ), 127,7 (Ph), 128,9 (Ph), 129,0 (Ph), 129,6 (Ph), 129,7 (Ph), 129,8 (Ph), 137,9 (d,  $J = 5,1$  Hz, Ph), 146,2 (Ph); RMN  $^{31}\text{P}$  (202,45 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  56,6.

### Fosfinato de etil[(*N*-tritolamino)metil] bencilo (123)

Aceite incoloro; 52% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,18 (dt,  $J_{\text{P-H}} = 18,1$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 7,7$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,65-2,13 (bs, 1H,  $\text{NH}$ ), 1,94 (dc, 2H,  $J_{\text{H-P}} = 13,9$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 7,7$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CH}_3$ ), 2,43 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 14,1$  Hz,  $J_{\text{H-P}} = 10,0$  Hz, 1H,  $\text{PCHH}_a\text{NH}$ ), 2,53 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 14,1$  Hz,  $J_{\text{H-P}} = 12,1$  Hz, 1H,  $\text{PCHH}_b\text{NH}$ ), 4,98 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 12,1$  Hz,  $J_{\text{P-H}} = 7,7$  Hz, 1H,  $\text{OCHH}_a\text{Ph}$ ), 5,04 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 12,1$  Hz,  $J_{\text{P-H}} = 8,1$  Hz, 1H,  $\text{OCHH}_b\text{Ph}$ ), 7,15-7,43 (m, 20H, Ph); RMN  $^{13}\text{C}$  (125,77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,7 (d,  $J = 5,1$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CH}_3$ ), 20,4 (d,  $J = 93,3$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CH}_3$ ), 41,0 (d,  $J = 101,7$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{NH}$ ), 66,0 (d,  $J = 5,9$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ),



71,4 (d,  $J = 15,3$  Hz,  $CPh_3$ ), 126,6 (Ph), 127,7 (Ph), 128,0 (Ph), 128,5 (Ph), 128,6 (Ph), 136,8 (d,  $J = 5,9$  Hz, Ph), 144,7 (Ph); RMN  $^{31}P$  (202,45 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  57,0.

#### Fosfinato de 2-propenil[(*N*-tritolamino)metil] bencilo (124)

Aceite incoloro; 70% de rendimiento; RMN  $^1H$  (500,13 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  2,05 (dt,  $J_{H-P} = 8,0$  Hz,  $J_{H-H} = 3,3$  Hz, 1H, NH), 2,49 (ddd,  $J_{H-H} = 14,4$  Hz,  $J_{P-H} = 10,0$  Hz,  $J_{H-H} = 7,5$ , 1H,  $PCHH_aNH$ ), 2,56 (ddd,  $J_{H-H} = 14,2$  Hz,  $J_{P-H} = 12,0$  Hz,  $J_{H-H} = 8,7$  Hz, 1H,  $PCHH_bNH$ ), 2,82 (dd,  $J_{P-H} = 17,2$  Hz,  $J_{H-H} = 7,4$ , 2H,  $PCH_2CHCH_2$ ), 5,01 (dd,  $J_{H-H} = 12,0$ ,  $J_{P-H} = 8,1$  Hz, 1H,  $OCH_aPh$ ), 5,05 (dd,  $J_{H-H} = 12,0$ ,  $J_{P-H} = 8,2$  Hz, 1H,  $OCH_bPh$ ), 5,18-5,26 (m, 3H,  $PCH_2CHCH_2$ ), 5,83 (ddd,  $^3J_{H-H, trans} = 17,2$  Hz,  $^3J_{H-H, cis} = 9,9$  Hz,  $J_{P-H} = 5,9$  Hz,  $^3J_{H-H} = 7,3$  Hz, 1H,  $PCH_2CHCH_2$ ), 7,16-7,42 (m, 20H, Ph); RMN  $^{13}C$  (125,77 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  33,6 (d,  $J = 88,2$  Hz,  $PCH_2CHCH_2$ ), 41,2 (d,  $J = 104,3$  Hz,  $PCH_2NH$ ), 66,3 (d,  $J = 6,8$  Hz,  $OCH_2Ph$ ), 71,5 (d,  $J = 16,1$  Hz,  $CPh_3$ ), 120,4 (d,  $J = 12,7$  Hz,  $PCH_2CHCH_2$ ), 126,6 (Ph), 127,2 (d,  $J = 8,5$  Hz,  $PCH_2CHCH_2$ ), 127,7 (Ph), 128,0 (Ph), 128,3 (Ph), 128,5 (Ph), 128,6 (Ph), 136,5 (d,  $J = 5,1$  Hz, Ph); RMN  $^{31}P$  (202,45 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  51,5.

#### Fosfinato de 1-butil[(*N*-tritolamino)metil] bencilo (125)

Aceite incoloro; 51% de rendimiento; RMN  $^1H$  (500,13 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  0,92 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H,  $CH_3$ ), 1,37-1,48 (sext. dist.,  $J = 7,3$  Hz, 2H,  $P(CH_2)_2CH_2CH_3$ ), 1,51-1,64 (m, 2H,  $PCH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 1,85-2,09 (m, 3H,  $PCH_2(CH_2)_2CH_3$ ), 2,42 (dd,  $J_{H-H} = 14,2$  Hz,  $J_{H-P} = 10,0$  Hz, 1H,  $PCHH_aNH$ ), 2,53 (dd,  $J_{H-H} = 14,2$  Hz,  $J_{H-P} = 12,1$  Hz, 1H,  $PCHH_bNH$ ), 4,98 (dd,  $J_{H-H} = 12,0$  Hz,  $J_{H-P} = 7,9$  Hz, 1H,  $OCH_aPh$ ), 5,04 (dd,  $J_{H-H} = 12,0$  Hz,  $J_{H-P} = 8,1$  Hz, 1H,  $OCH_bPh$ ), 7,12-7,47 (m, 20H, Ph); RMN  $^{13}C$  (125,77 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  13,6 ( $P(CH_2)_2CH_2CH_3$ ), 23,6 (d,  $J = 4,2$  Hz,  $P(CH_2)_2CH_2CH_3$ ), 23,9 (d,  $J = 16,1$  Hz,  $PCH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 27,1 (d,  $J = 91,6$  Hz,  $PCH_2(CH_2)_2CH_3$ ), 41,4 (d,  $J = 100,1$  Hz,  $PCH_2NH$ ), 65,9 (d,  $J = 5,9$  Hz,  $OCH_2Ph$ ), 71,4 (d,  $J = 15,3$  Hz,  $CPh_3$ ), 126,7 (Ph), 127,8 (Ph), 128,1 (Ph), 128,4 (Ph), 128,6 (Ph), 128,7 (Ph), 136,8 (d,  $J = 5,1$ , Ph), 144,8 (Ph); RMN  $^{31}P$  (202,45 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  56,1.

**Fosfinato de 2-pentenil[(*N*-tritolamino)metil] bencilo (126)**

Aceite incoloro; 47% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (500.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.94 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, PCH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,96-2,08 (m, 3H, PCH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, NH), 2,46 (t dist., *J* = 11,9 Hz, 1H, PCH<sub>a</sub>NH), 2,54 (t dist., *J* = 13,6 Hz, 1H, PCH<sub>b</sub>NH), 2,74 (dd, *J*<sub>P-H</sub> = 16,8 Hz, *J*<sub>H-H</sub> = 7,3, 2H, PCH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5,00 (dd, *J*<sub>H-H</sub> = 12,0 Hz, *J*<sub>H-P</sub> = 7,9 Hz, 1H, OCHH<sub>a</sub>Ph), 5,06 (dd, *J*<sub>H-H</sub> = 12,0 Hz, *J*<sub>H-P</sub> = 7,9 Hz, 1H, OCHH<sub>b</sub>Ph), 5,36-5,46 (m, 1H, PCH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5,62-5,71 (m, 1H, PCH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7,14-7,51 (m, 20H, Ph); RMN <sup>13</sup>C (125,77 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13,7 (PCH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 25,7 (d, *J* = 2,5 Hz, PCH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 32,3 (d, *J* = 89,0 Hz, PCH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 41,0 (d, *J* = 103,4 Hz, PCH<sub>2</sub>NH), 66,1 (d, *J* = 6,8 Hz, OCH<sub>2</sub>Ph), 71,4 (d, *J* = 16,1 Hz, CPh<sub>3</sub>), 117,2 (d, *J* = 9,3 Hz, PCH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 126,6 (Ph), 127,7 (Ph), 128,0 (Ph), 128,3 (Ph), 128,5 (Ph), 128,6 (Ph), 136,6 (d, *J* = 5,9 Hz, Ph), 138,2 (d, *J* = 11,9 Hz, PCH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 144,7 (Ph); RMN <sup>31</sup>P (202,45 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 52,5.

**Fosfinato de 2-hexenil[(*N*-tritolamino)metil] bencilo (127)**

Aceite incoloro; 74% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (500,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,85 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, PCH<sub>2</sub>CHCH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,32 (sext. dist., *J* = 7,3 Hz, 2H, PCH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,93-2,00 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,00-2,08 (sa, 1H, NH), 2,41-2,60 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>NH), 2,74 (dd, *J*<sub>H-H</sub> = 7,3, *J*<sub>P-H</sub> = 17,1 Hz, 2H, PCH<sub>2</sub>CHCH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5,01 (dd, *J*<sub>H-H</sub> = 12,1 Hz, *J*<sub>P-P</sub> = 7,8 Hz, 1H, OCHH<sub>a</sub>Ph), 5,06 (dd, *J*<sub>H-H</sub> = 12,2 Hz, *J*<sub>P-P</sub> = 7,8 Hz, 1H, OCHH<sub>b</sub>Ph), 5,37-5,46 (m, 1H, PCH<sub>2</sub>CHCH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5,57-5,65 (m, 1H, PCH<sub>2</sub>CHCH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7,14-7,44 (m, 20H); RMN <sup>13</sup>C (125,77 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13,5 (PCH<sub>2</sub>CHCH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22,1 (d, *J* = 3,4 Hz, PCH<sub>2</sub>CHCH(CH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 32,2 (d, *J* = 89,0 Hz, PCH<sub>2</sub>CHCH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 35,9 (d, *J* = 1,7 Hz, PCH<sub>2</sub>CHCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 40,9 (d, *J* = 103,4 Hz, PCH<sub>2</sub>NH), 66,0 (d, *J* = 5,9 Hz, OCH<sub>2</sub>Ph), 71,3 (d, *J* = 16,1 Hz, CPh<sub>3</sub>), 118,1 (d, *J* = 9,3 Hz, PCH<sub>2</sub>CHCH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 126,4 (Ph), 127,6 (Ph), 127,8 (Ph), 128,1 (Ph), 128,38 (Ph), 128,43 (Ph), 136,4 (d, *J* = 12,7 Hz, PCH<sub>2</sub>CHCH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 136,5 (d, *J* = 5,1 Hz, Ph), 144,5 (Ph); RMN <sup>31</sup>P (202,45 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 52,4.

**Fosfinato de 2-heptenil[(*N*-tritolamino)metil] bencilo (128)**

Aceite incoloro; 74% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,86 (t,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 1,21-1,34 (m, 4H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,95-2,05 (m, 3H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ , NH), 2,45 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 13,4$  Hz,  $J_{\text{H-P}} = 10,5$  Hz, 1H,  $\text{PCH}_a\text{NH}$ ), 2,54 (t dist.,  $J_{\text{H-H}} = 13,1$  Hz, 1H,  $\text{PCH}_b\text{NH}$ ), 2,73 (dd,  $J_{\text{P-H}} = 16,9$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 7,3$ , 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 5,01 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 12,1$  Hz,  $J_{\text{P-P}} = 7,7$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_a\text{HPh}$ ), 5,06 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 12,1$  Hz,  $J_{\text{P-P}} = 7,7$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_b\text{HPh}$ ), 5,35-5,45 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 5,56-5,65 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 7,16-7,43 (m, 20H); RMN  $^{13}\text{C}$  (125,77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13,8 ( $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 22,1 ( $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 31,1 (d,  $J = 2,5$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 32,26 (d,  $J = 88,2$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 32,27 (d,  $J = 1,7$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 41,0 (d,  $J = 103,4$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{NH}$ ), 66,1 (d,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 71,4 (d,  $J = 15,3$  Hz,  $\text{CPh}_3$ ), 118,0 (d,  $J = 9,3$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 126,5 (Ph), 127,6 (Ph), 127,9 (Ph), 128,2 (Ph), 128,47 (Ph), 128,51 (Ph), 136,6 (d,  $J = 5,9$  Hz, Ph), 136,8 (d,  $J = 11,9$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 144,6 (Ph); RMN  $^{31}\text{P}$  (202,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  52,5.

**6.7.2.3 Desprotección del grupo amino****Procedimiento general**

Sobre una solución de fosfinato de alquil[(*N*-tritolamino)metil] bencilo o fosfinato de alquenal[(*N*-tritolamino)metil] bencilo (0.68 mmol) en cloruro de metileno (5 mL) se agregó, gota a gota, una solución de ácido trifluoroacético 5% v/v (5 mL) a temperatura ambiente. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, se agregó resina catiónica fuerte Amberlite CG-400 (1,00 g) y la mezcla se agitó durante una hora. Luego, se filtró la resina y se lavó con metanol (20 mL). El solvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel) eluyendo con mezclas de polaridad creciente desde AcOEt hasta AcOEt–MeOH (4:1). La amina libre, obtenida como un

aceite, se utilizó rápidamente en el siguiente paso de reacción para evitar la formación de *N*-óxido y posterior descomposición.

#### **Fosfinato de metil(aminometil) bencilo (129)**

Aceite amarillo; 64% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (500,13 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1,68 (d, *J* = 14,8 Hz, 3H, PCH<sub>3</sub>), 3,36 (d, *J* = 9,8 Hz, 2H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>P), 5,12 (dd, *J*<sub>H-H</sub> = 11,7 Hz, *J*<sub>H-P</sub> = 9,5 Hz, 1H, OCHH<sub>a</sub>Ph), 5,17 (dd, *J*<sub>H-H</sub> = 11,7 Hz, *J*<sub>H-P</sub> = 8,8 Hz, 1H, OCHH<sub>b</sub>Ph), 7,28-7,49 (m, 5H, Ph); RMN <sup>13</sup>C (125,77 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 13,8 (d, *J* = 96,6, CH<sub>3</sub>), 37,7 (d, *J* = 97,5 Hz, NHCH<sub>2</sub>P), 68,4 (d, *J* = 6,8 Hz, OCH<sub>2</sub>Ph), 129,4 (Ph), 129,8 (Ph), 129,9 (Ph), 137,2 (d, *J* = 5,9 Hz, Ph); RMN <sup>31</sup>P (202,45 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 47,6.

#### **Fosfinato de etil(aminometil) bencilo (130)**

Aceite amarillo; 85% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (500,13 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1,13 (dt, *J*<sub>H-P</sub> = 19,1 Hz, *J*<sub>H-H</sub> = 7,7 Hz, 3H, PCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,94 (dc, *J*<sub>H-P</sub> = 15,2 Hz, *J*<sub>H-H</sub> = 7,7 Hz, 2H, PCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,27 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>P), 5,03 (dd, *J*<sub>H-H</sub> = 11,8 Hz, *J*<sub>H-P</sub> = 8,5 Hz, 1H, OCHH<sub>a</sub>Ph), 5,15 (dd, *J*<sub>H-H</sub> = 11,8 Hz, *J*<sub>H-P</sub> = 10,1 Hz, 1H, OCHH<sub>b</sub>Ph), 7,36-7,50 (m, 5H, Ph),

#### **Fosfinato de 2-propenil(aminometil) bencilo (131)**

Aceite amarillo; 89% de rendimiento de; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,67 (dd, *J*<sub>H-P</sub> = 17,9 Hz, *J*<sub>H-H</sub> = 7,4 Hz, 3H, PCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2,96-3,14 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 3,14-3,44 (broad s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,05 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5,09-5,25 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 5,54-5,87 (m, 1H, PCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 7,26-7,37 (m, 5H, Ph).

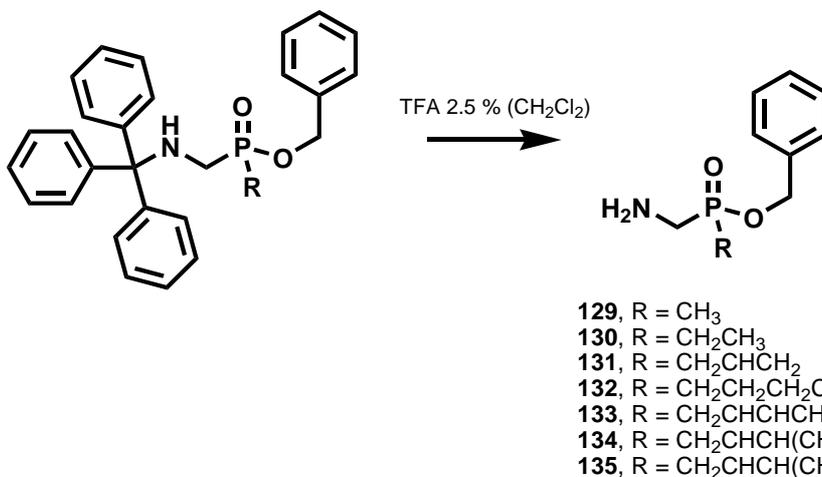
#### **Fosfinato de 1-butil(aminometil) bencilo (132)**

Aceite amarillo; 87% de rendimiento de; RMN <sup>1</sup>H (500,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,81 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, PCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,29 (sept. dist., *J* = 7,1 Hz, 2H, P(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 1,36-1,50

(m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,85 (dt,  $J_{\text{H-P}} = 15,4$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 8,2$  Hz, 2H,  $\text{PCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 3,21 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5,01 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 11,8$  Hz,  $J_{\text{H-P}} = 8,7$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_a\text{Ph}$ ), 5,09 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 11,8$  Hz,  $J_{\text{H-P}} = 8,4$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_b\text{Ph}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (125,77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13,2 ( $\text{PCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 23,1 (d,  $J = 5,1$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 23,5 (d,  $J = 17,0$  Hz,  $\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 27,6 (d,  $J = 95,8$ ,  $\text{PCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 35,7 (d,  $J = 91,6$  Hz,  $\text{NHCH}_2\text{P}$ ), 67,0 (d,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 127,9 (Ph), 128,7 (Ph), 135,7 (d,  $J = 5,9$  Hz, Ph); RMN  $^{31}\text{P}$  (202,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  50,9.

### Fosfinato de 2-pentenil(aminometil) bencilo (133)

Aceite amarillo; 76% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ , 4:1)  $\delta$  0,95 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 2,02 (sext. dist.,  $J = 6,8$  Hz, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 2,60-2,75 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{NH}_2$ ), 3,04-3,25 (m, 2H,



$\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 5,07 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 11,8$  Hz,  $J_{\text{H-P}} = 9,0$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_a\text{Ph}$ ), 5,11 (dd,  $J_{\text{H-H}} = 11,8$  Hz,  $J_{\text{H-P}} = 8,3$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_b\text{Ph}$ ), 5,21-5,30 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 5,62-5,72 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 7,31-7,44 (m, 5H, Ph).

### Fosfinato de 2-hexenil(aminometil) bencilo (134)

Aceite amarillo; 94% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ , 4:1)  $\delta$  0,89 (t,  $J = 7,4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,37 (sext. dist.,  $J = 7,3$  Hz, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ),

1,95-2,05 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2,61-2,69 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{NH}$ ), 2,92-3,06 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 5,08 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,28-5,42 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 5,57-5,71 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 7,31-7,44 (m, 5H, Ph).

### Fosfinato de 2-heptenil(aminometil) bencilo (135)

Aceite amarillo; 85% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ , 4:1)  $\delta$  0,89 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,25-1,37 (m, 4H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,98-2,07 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 2,61-2,68 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{NH}_2$ ), 2,96-3,01 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 5,07 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,28-5,39 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 5,59-5,69 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 7,32-7,43 (m, 5H, Ph).

### 6.7.3 Acoplamiento del ácido aminofosfínico con el dipéptido

#### Procedimiento general

A una solución del dipéptido **36** (300 mg, 0,619 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida (106,9 mg, 0,923 mmol) en DMF anhidra (5 mL) enfriada a 0 °C, se agregó EDC $\cdot$ HCl (237,3 mg, 2,24 mmol). La reacción se agitó durante 16 hs a temperatura ambiente. Luego, se agregó una solución de la amina correspondiente (0,495 mmol) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (15  $\mu\text{L}$ , 2,1 mmol) en DMF (3 mL) y se dejó agitando a temperatura ambiente durante 16 hs. La mezcla de reacción se diluyó con AcOEt (20 mL) y se lavó con NaCl (ss) ( $2 \times 20$  mL), 5% HCl ( $2 \times 10$  mL),  $\text{NaHCO}_3$  (ss) ( $2 \times 10$  mL) y agua ( $2 \times 10$  mL). La fase orgánica se secó con ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), y se evaporó el solvente. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna (sílica gel) utilizando mezclas desde hexano–AcOEt (4:1) hasta AcOEt puro para los compuestos más polares.

**Fosfinato de metil-[[*(N*-benziloxi-*L*- $\gamma$ -glutamil( $\alpha$ -bencil éster)-*L*-leucil)amino]metil] bencilo (136)**

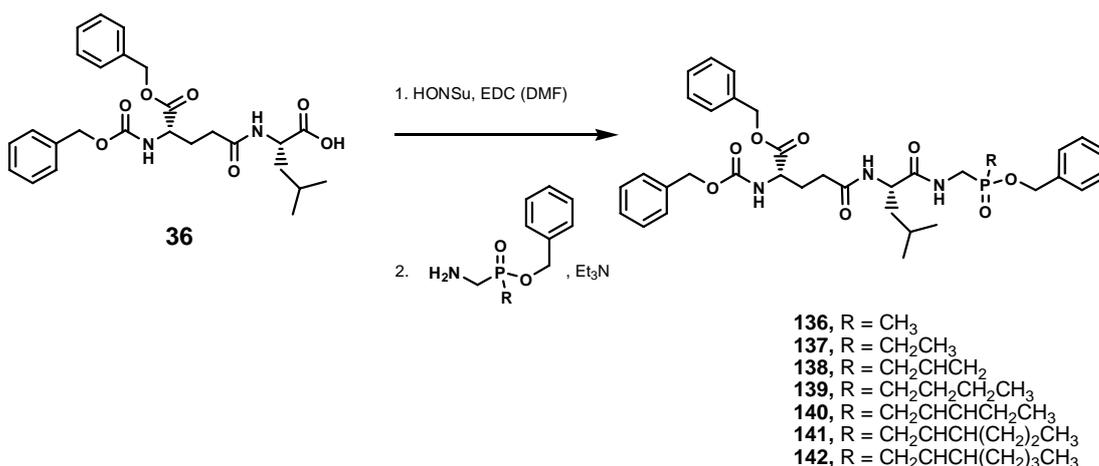
Sólido blanco; higroscópico; 42% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,83-0,96 (m, 6H,  $H_3\text{C}(\delta)\text{Leu}$ ), 1,43-1,69 (m, 6H,  $\text{PCH}_3$ ,  $\text{HC}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ), 1,83-1,97 (m, 1H,  $H_a\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 2,09-2,22 (m, 1H,  $H_b\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 3,58-3,76 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{P}$ ), 4,18-4,26 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 4,30-4,38 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ), 4,99-5,18 (m, 6H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 7,22-7,41 (m, 15H, Ph); RMN  $^{13}\text{C}$  (125,77 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ ? 12,8 (d,  $J = 93,3$  Hz,  $\text{PCH}_3$ , diast. ppal.), 12,9 (d,  $J = 93,3$  Hz,  $\text{PCH}_3$ , diast. min.), 21,9 ( $H_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ , diast. min.), 22,0 ( $H_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ , diast. ppal.), 23,3 ( $H_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ , diast. min.), 23,3 ( $H_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ , diast. min.), 25,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ , diast. min.), 25,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ , diast. ppal.), 28,3 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 32,7 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 38,8 (d,  $J = 102,6$  Hz,  $\text{NHCH}_2\text{P}$ , diast. min.), 38,9 (d,  $J = 102,6$  Hz,  $\text{NHCH}_2\text{P}$ , diast. ppal.), 41,7 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 53,3 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 55,1 ( $\text{C}(\alpha)\text{Glu}$ ), 67,6 (d,  $J = 5,9$  Hz,  $\text{POCH}_2\text{Ph}$ ), 67,7 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 68,0 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 128,8 (Ph), 128,8 (Ph), 129,0 (Ph), 129,1 (Ph), 129,2 (Ph), 129,5 (Ph), 129,5 (Ph), 129,6 (Ph), 129,7 (Ph), 129,7 (Ph), 172,6 (CO), 175,2 (CO), 175,6 (CO), 137,2 (Ph), 137,7 (d,  $J = 6,8$  Hz, Ph), 138,1 (Ph), 158,6 (CO), 173,5 (CO), 174,7 (CO), 175,0 (CO); RMN  $^{31}\text{P}$  (202,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  52,9 (diast. min.), 53,1 (diast. ppal.),

**Fosfinato de etil-[[*(N*-benziloxi-*L*- $\gamma$ -glutamil( $\alpha$ -bencil éster)-*L*-leucil)amino]metil] bencilo (137)**

Sólido blanco; higroscópico; 40% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,83-0,93 (m, 9H,  $H_3\text{C}(\delta)\text{Leu}$ ,  $\text{PCH}_2\text{CH}_3$ ), 1,01 (dt,  $J_{\text{H-P}} = 18,8$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 7,6$  Hz, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CH}_3$ , diast. min.), 1,11 (dt,  $J_{\text{H-P}} = 18,8$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 7,6$  Hz, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CH}_3$ , diast. ppal.), 1,44-1,69 (m, 3H,  $\text{HC}(\beta)\text{Leu}$ ,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ), 1,73-1,83 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CH}_3$ ), 1,83-1,95 (m, 1H,  $H_a\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 2,07-2,21 (m, 1H,  $H_b\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 2,27-2,39 (m, 2H,  $\text{HC}(\beta)\text{Glu}$ ), 3,59-3,77 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{P}$ ), 4,17-4,27 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 4,27-4,40 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ), 4,98-5,19 (m, 6H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 7,23-7,42 (m, 15H, Ph); RMN  $^{13}\text{C}$  (125,77 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ ? 5,52 (d,  $J = 4,8$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CH}_3$ , diast. ppal.), 5,54 (d,  $J = 4,8$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CH}_3$ , diast. min.), 20,4 (d,  $J = 93,5$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CH}_3$ , diast. ppal.), 20,6 (d,  $J = 92,5$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CH}_3$ , diast. min.), 21,87

( $H_3C_a(\delta)$ Leu, diast. min.), 21,93 ( $H_3C_a(\delta)$ Leu, diast. ppal.), 23,35 ( $H_3C_b(\delta)$ Leu, diast. min.), 23,40 ( $H_3C_b(\delta)$ Leu, diast. min.), 25,86 (C( $\gamma$ )Leu, major diast), 25,89 (C( $\gamma$ )Leu, diast. min.), 28,2 (C( $\gamma$ )Glu), 32,7 (C( $\beta$ )Glu), 37,0 (d,  $J=98,2$  Hz,  $NHCH_2P$ , diast. ppal.), 37,1 (d,  $J=98,2$  Hz,  $NHCH_2P$ , diast. min.), 41,7 (C( $\beta$ )Leu), 53,2 (C( $\alpha$ )Leu), 55,1 (C( $\alpha$ )Glu), 67,6 (d,  $J=6,7$  Hz,  $POCH_2Ph$ ), 67,7 ( $OCH_2Ph$ ), 68,0 ( $OCH_2Ph$ ), 128,8 (Ph), 129,0 (Ph), 129,2 (Ph), 129,3 (Ph), 129,5 (Ph), 129,6 (Ph), 129,64 (Ph), 129,66 (Ph), 129,7 (Ph), 137,2 (Ph), 137,9 (d,  $J=5,7$  Hz, Ph), 138,1 (Ph), 158,7 (CO), 173,5 (CO), 174,7 (CO), 175,0 (CO); RMN  $^{31}P$  (202,45 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  55,4 (diast. min.), 55,6 (diast. ppal.).

**Fosfinato de 2-propenil-[[*N*-benziloxi-*L*- $\gamma$ -glutamil( $\alpha$ -bencil éster)-*L*-leucil]amino]metil] bencilo (138)**



Sólido blanco; higroscópico; 38% de rendimiento; RMN  $^1H$  (500,13 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  0,80-0,96 (m, 6H,  $H_3C(\delta)$ Leu), 1,45-1,57 (m, 2H,  $H_2C(\beta)$ Leu), 1,57-1,69 (m, 1H,  $HC(\gamma)$ Leu), 1,83-1,94 (m, 1H,  $H_aC(\beta)$ Glu), 2,08-2,20 (m, 1H,  $H_bC(\beta)$ Glu), 2,25-2,37 (m, 2H,  $HC(\gamma)$ Glu), 2,61-2,78 (m, 2H,  $PCH_2CHCH_2$ ), 3,57-3,78 (m, 2H,  $NHCH_2P$ ), 4,13-4,27 (m, 1H,  $HC(\alpha)$ Glu), 4,29-4,41 (m, 1H,  $HC(\alpha)$ Leu), 4,95-5,31 (m, 8H,  $OCH_2Ph$ ,  $PCH_2CHCH_2$ ), 5,68-5,83 (m, 1H,  $PCH_2CHCH_2$ ), 7,17-7,45 (m, 15H, Ph); RMN  $^{13}C$  (125,77 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  21,86 ( $H_3C_a(\delta)$ Leu, major diast), 21,90 ( $H_3C_a(\delta)$ Leu, min. diast), 23,36 ( $H_3C_b(\delta)$ Leu), 25,85 (C( $\gamma$ )Leu, diast. min.), 25,89 (C( $\gamma$ )Leu, diast. ppal.), 26,3

(PCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 28,2 (C(γ)Glu), 32,7 (C(β) Glu), 33,6 (d,  $J = 88,0$  Hz, PCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>, diast. min.), 33,7 (d,  $J = 88,0$  Hz, PCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>, diast. ppal.), 37,3 (d,  $J = 100,5$  Hz, NHCH<sub>2</sub>P), 41,7 (C(β)Leu), 53,2 (C(α)Leu), 55,1 (C(α)Glu), 67,7 (OCH<sub>2</sub>Ph), 67,9 (d,  $J = 7,2$  Hz, OCH<sub>2</sub>Ph), 67,9 (OCH<sub>2</sub>Ph), 121,6 (d,  $J = 12,6$  Hz, PCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 127,6 (d,  $J = 9,9$  Hz, PCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>, diast. min.), 127,7 (d,  $J = 9,9$  Hz, PCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>, diast. ppal.), 128,3 (Ph), 129,0 (Ph), 129,2 (Ph), 129,3 (Ph), 129,5 (Ph), 129,56 (Ph), 129,62 (Ph), 137,2 (Ph), 137,8 (d,  $J = 7,2$  Hz, Ph), 138,1 (Ph), 158,7 (CO), 173,5 (CO), 174,7 (CO), 174,9 (d,  $J = 12,6$  Hz, CO); RMN <sup>31</sup>P (202,45 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 49,3 (diast. ppal.), 49,4 (diast. min.).

**Fosfinato de 1-butil-[[*N*-benziloxi-*L*- $\gamma$ -glutamil( $\alpha$ -bencil éster)-*L*-leucil]amino]metil] bencilo (139)**

Sólido blanco; higroscópico; 39% de rendimiento; RMN <sup>1</sup>H (500,13 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0,81-0,94 (m, 9H, H<sub>3</sub>C(δ)Leu, P(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 1,30-1,42 (m, 2H, P(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,44-1,68 (m, 5H, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>C(β)Leu, HC(γ)Leu), 1,71-1,84 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,84-1,95 (m, 1H, H<sub>a</sub>C(γ)Glu), 2,08-2,22 (m, 1H, H<sub>b</sub>C(γ)Glu), 2,27-2,39 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(γ)Glu), 3,58-3,76 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>P), 4,15-4,26 (m, 1H, HC(α)Glu), 4,30-4,7 (m, 1H, HC(α)Leu), 4,99-5,12 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5,14 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 7,23-7,42 (m, 15H, Ph); RMN <sup>13</sup>C (125,77 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 13,9 (P(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 21,88 (H<sub>3</sub>C<sub>a</sub>(δ)Leu, diast. min.), 21,94 (H<sub>3</sub>C<sub>a</sub>(δ)Leu, diast. ppal.), 23,32 (H<sub>3</sub>C<sub>b</sub>(δ)Leu, diast. ppal.), 23,37 (H<sub>3</sub>C<sub>b</sub>(δ)Leu, diast. min.), 24,3 (d,  $J = 4,2$  Hz, P(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24,8 (d,  $J = 14,4$  Hz, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 25,84 (C(γ)Leu, major diast), 25,89 (C(γ)Leu, diast. min.), 27,0 (d,  $J = 91,6$  Hz, PCH<sub>2</sub>NH, diast. min.), 27,2 (d,  $J = 91,6$  Hz, PCH<sub>2</sub>NH, diast. ppal.), 28,2 (C(γ)Glu), 32,7 (C(β) Glu), 37,5 (d,  $J = 98,3$  Hz, NHCH<sub>2</sub>P, diast. min.), 37,6 (d,  $J = 98,3$  Hz, NHCH<sub>2</sub>P, diast. ppal.), 41,7 (C(β)Leu), 53,2 (C(α)Leu), 55,1 (C(α)Glu), 67,57 (d,  $J = 5,9$  Hz, POCH<sub>2</sub>Ph, diast. ppal.), 67,59 (d,  $J = 5,9$  Hz, POCH<sub>2</sub>Ph, diast. min.), 67,7 (OCH<sub>2</sub>Ph), 68,0 (OCH<sub>2</sub>Ph), 128,8 (Ph), 129,0 (Ph), 129,1 (Ph), 129,2 (Ph), 129,3 (Ph), 129,48 (Ph), 129,51 (Ph), 129,57 (Ph), 129,64 (Ph), 129,66 (Ph), 137,88 (d,  $J = 5,9$  Hz, Ph, diast. min.), 137,89 (d,  $J = 5,9$  Hz, Ph, diast. ppal.), 138,1 (Ph), 158,7 (CO), 173,5 (CO), 174,7 (CO),

174,9 (d,  $J = 11,0$  Hz, CO); RMN  $^{31}\text{P}$  (202,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  54,4 (diast. min.), 54,5 (diast. ppal.).

**Fosfinato de 2-pentenil-[[*N*-benziloxi-*L*- $\gamma$ -glutamil( $\alpha$ -bencil éster)-*L*-leucil]amino]metil] bencilo (140)**

Sólido blanco; higroscópico; 36% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,82-1,00 (m, 9H,  $\text{H}_3\text{C}(\delta)\text{Leu}$ ,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 1,47-1,57 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 1,57-1,69 (m, 1H,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ), 1,83-1,95 (m, 1H,  $\text{H}_\alpha\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 1,97-2,07 (2H, 2,09-2,21,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 2,10-2,20 (m, 1H,  $\text{H}_\beta\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,28-2,39 (m, 2H,  $\text{H}_\beta\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 2,58-2,68 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 3,59-3,76 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{P}$ ), 4,19-4,28 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 4,33-4,51 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ), 5,99-5,19 (m, 6H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,31-5,41 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 5,58-5,68 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 7,22-7,40 (m, 15H, Ph); RMN  $^{13}\text{C}$  (125,77 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  13,79 ( $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ , diast. min.), 13,82 ( $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ , diast. ppal.), 21,90 ( $\text{H}_3\text{C}_\alpha(\delta)\text{Leu}$ , min. diast), 21,93 ( $\text{H}_3\text{C}_\alpha(\delta)\text{Leu}$ , major diast), 23,38 ( $\text{H}_3\text{C}_\beta(\delta)\text{Leu}$ , diast. min.), 23,41 ( $\text{H}_3\text{C}_\beta(\delta)\text{Leu}$ , diast. ppal.), 25,8 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ , diast. min.), 25,9 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ , diast. ppal.), 26,7 ( $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ , diast. min.), 26,8 ( $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ , diast. ppal.), 28,2 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 32,1 (d,  $J = 89,0$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ , diast. min.), 32,3 (d,  $J = 88,3$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ , diast. ppal.), 32,7 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 37,2 (d,  $J = 100,0$  Hz,  $\text{NHCH}_2\text{P}$ , diast. min.), 37,3 (d,  $J = 100,0$  Hz,  $\text{NHCH}_2\text{P}$ , diast. ppal.), 41,7 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 53,2 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 55,1 ( $\text{C}(\alpha)\text{Glu}$ ), 67,7 ( $\text{O-CH}_2\text{-Ph}$ ), 67,8 (d,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 68,0 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 117,4 (d,  $J = 10,2$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ , diast. ppal.), 117,5 (d,  $J = 10,2$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ , diast. ppal.), 128,96 (CO), 129,0 (CO), 129,2 (CO), 129,3 (CO), 129,5 (CO), 129,6 (CO), 129,61 (CO), 129,62 (CO), 137,2 (Ph), 137,87 (d,  $J = 5,9$  Hz, Ph, diast. ppal.), 137,89 (d,  $J = 5,9$  Hz, Ph, diast. ppal.), 138,1 (Ph), 140,1 (d,  $J = 12,7$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 158,65 (CO, diast. min.), 158,67 (CO, diast. ppal.), 173,5 (CO), 174,40 (CO, diast. ppal.), 174,73 (CO, diast. min.), 174,85 (CO, min. diast), 174,88 (CO, diast. ppal.), 174,5 (CO); RMN  $^{31}\text{P}$  (202,45 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  50,1 (diast. ppal.), 50,2 (diast. min.).

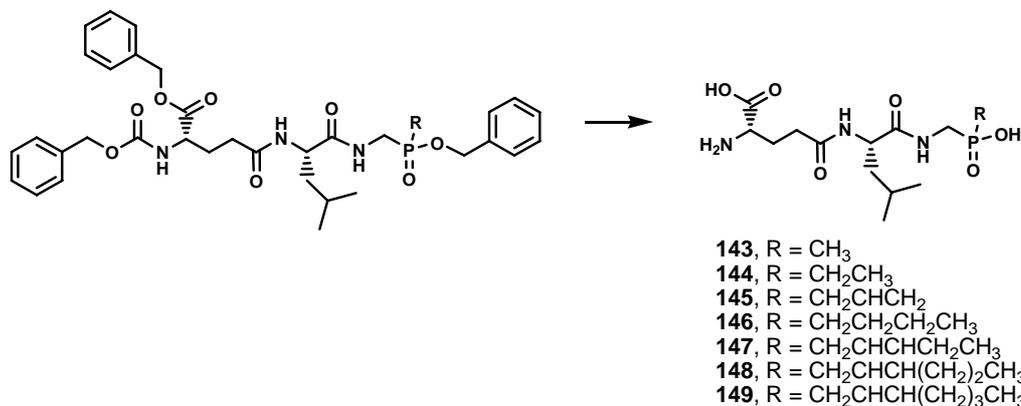
**Fosfinato de 2-hexenil-[[*(N*-benziloxi-*L*- $\gamma$ -glutamil( $\alpha$ -bencil éster)-*L*-leucil)amino]metil] bencilo (141)**

Sólido blanco; higroscópico; 63% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,83-0,93 (m, 9H,  $\text{H}_3\text{C}(\delta)\text{Leu}$ ,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,30-1,41 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,48-1,57 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 1,57-1,68 (m, 1H,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ), 1,85-2,02 (m, 3H,  $\text{H}_a\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2,09-2,21 (m, 1H,  $\text{H}_b\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,29-2,37 (m, 2H,  $\text{H}_b\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 2,57-2,68 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 3,58-3,74 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{P}$ ), 4,19-4,27 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 4,33-4,40 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ), 5,99-5,17 (m, 6H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,31-5,41 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 5,58-5,69 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 7,21-7,40 (m, 15H, Ph); RMN  $^{13}\text{C}$  (125,77 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  13,79 ( $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 21,93 ( $\text{H}_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ , min. diast), 21,97 ( $\text{H}_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ , major diast), 23,29 ( $\text{H}_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ , diast. min.), 23,31 ( $\text{H}_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ , diast. ppal.), 23,4 (d,  $J = 2,5$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 25,88 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ , diast. ppal.), 25,91 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ , diast. min.), 28,2 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 31,9 (d,  $J = 89,0$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ , diast. ppal.), 32,3 (d,  $J = 89,0$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ , diast. min.), 32,7 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 35,8 (d,  $J = 2,5$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 37,31 (d,  $J = 100,0$  Hz,  $\text{NHCH}_2\text{P}$ , diast. ppal.), 37,33 (d,  $J = 100,0$  Hz,  $\text{NHCH}_2\text{P}$ , diast. ppal.), 41,7 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 53,2 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 55,1 ( $\text{C}(\alpha)\text{Glu}$ ), 67,7 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67,8 (d,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 68,0 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 118,5 (d,  $J = 9,3$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ , diast. ppal.), 118,6 (d,  $J = 10,2$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ , diast. ppal.), 128,8 (Ph), 128,98 (Ph), 129,03 (Ph), 129,14 (Ph), 129,3 (Ph), 129,45 (Ph), 129,48 (Ph), 129,57 (Ph), 129,61 (Ph), 129,63 (Ph) 137,2 (Ph), 137,9 (d,  $J = 5,9$  Hz, Ph), 138,1 (Ph), 138,5 (d,  $J = 12,7$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 158,7 (CO), 173,5 (CO), 173,5 (CO), 174,7 (CO), 174,9 (d,  $J = 11,9$  Hz, CO); RMN  $^{31}\text{P}$  (202,45 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  49,9 (diast. ppal.), 50,1 (diast. min.).

**Fosfinato de 2-heptenil-[[*(N*-benziloxi-*L*- $\gamma$ -glutamil( $\alpha$ -bencil éster)-*L*-leucil)amino]metil] bencilo (142)**

Sólido blanco; higroscópico; 56% de rendimiento; RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0,75-0,96 (m, 9H,  $\text{H}_3\text{C}(\delta)\text{Leu}$ ,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 1,18-1,36 (m, 4H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,43-1,56 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 1,56-1,68 (m, 1H,  $\text{HC}(\gamma)\text{Leu}$ ), 1,81-2,05 (m, 3H,  $\text{H}_a\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 2,07-2,21 (m, 1H,  $\text{H}_b\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 2,24-2,38 (m, 2H,  $\text{H}_b\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 2,53-2,69 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 3,55-3,75 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{P}$ ), 4,15-4,27 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Glu}$ ), 4,29-4,40 (m, 1H,  $\text{HC}(\alpha)\text{Leu}$ ), 5,91-5,17 (m, 6H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,27-5,40 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 5,56-5,69 (m, 1H,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 7,18-7,41 (m, 15H, Ph); RMN  $^{13}\text{C}$  (125,77 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  14,2 ( $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 21,96 ( $\text{H}_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ , major diast), 22,0 ( $\text{H}_3\text{C}_a(\delta)\text{Leu}$ , min. diast), 23,2 ( $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 23,38 ( $\text{H}_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ , major diast), 23,41 ( $\text{H}_3\text{C}_b(\delta)\text{Leu}$ , min. diast), 25,88 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ , diast. ppal.), 25,91 ( $\text{C}(\gamma)\text{Leu}$ , diast. min.), 28,3 ( $\text{C}(\gamma)\text{Glu}$ ), 32,2 (d,  $J = 88,1$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ , diast. ppal.), 32,4 (d,  $J = 88,1$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ , diast. min.), 32,4 (d,  $J = 3,4$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 32,7 ( $\text{C}(\beta)\text{Glu}$ ), 33,4 (d,  $J = 2,5$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCHCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 37,3 (d,  $J = 99,2$  Hz,  $\text{NHCH}_2\text{P}$ ), 41,7 ( $\text{C}(\beta)\text{Leu}$ ), 53,2 ( $\text{C}(\alpha)\text{Leu}$ ), 55,1 ( $\text{C}(\alpha)\text{Glu}$ ), 67,7 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67,8 (d,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 68,0 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 118,36 (d,  $J = 9,3$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ , diast. ppal.), 118,41 (d,  $J = 10,2$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ , diast. min.), 128,8 (Ph), 128,96 (Ph), 129,03 (Ph), 129,14 (Ph), 129,3 (Ph), 129,45 (Ph), 129,49 (Ph), 129,57 (Ph), 129,62 (Ph), 129,64 (Ph) 137,2 (Ph), 137,9 (d,  $J = 5,9$  Hz, Ph), 138,1 (Ph), 138,7 (d,  $J = 12,7$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{CHCH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ), 158,6 (CO), 173,5 (CO), 173,5 (CO), 174,7 (CO), 174,9 (d,  $J = 9,3$  Hz, CO); RMN  $^{31}\text{P}$  (202,45 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  49,9 (diast. min.), 50,0 (diast. ppal.).

#### 6.7.4 Desprotección de los fosfinopéptidos protegidos



### Procedimiento general

Una solución del fosfinopéptido (0,1 mmol) en metanol (10 mL) se trató con hidrógeno a 1 atm durante una hora en presencia de paladio sobre carbono (5%). La mezcla se filtró a través de un filtro de vidrio fritado y se evaporó el solvente. Una alícuota del residuo se purificó por cromatografía líquida de alta resolución para su análisis químico y biológico utilizando una columna Beckman Ultrasphere OSD-2 de 5 mM (10 mm × 250 mm) con un flujo de 3 mL/min. La detección se realizó con lámpara UV a 230 nm. La pureza de los compuestos **118–124** se determinó por CLAR en dos condiciones diferentes (Apéndice A).

### Ácido metil-[[*(L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-leucil)amino]metil]-fosfínico (**143**)

Sólido blanco; 100% de rendimiento; purificación por CLAR (H<sub>2</sub>O–MeCN–TFA (90:10:0,2),  $t_R = 10,45$  min); RMN <sup>1</sup>H (500,13 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta^a$  0,97 (d,  $J = 6,1$  Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>a</sub>( $\delta$ )Leu), 1,01 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>b</sub>( $\delta$ )Leu), 1,49 (d,  $J = 13,7$  Hz, 3H, PCH<sub>3</sub>), 1,62-1,78 (m, 3H, H<sub>2</sub>C( $\beta$ )Leu, HC( $\gamma$ )Leu), 2,20-2,36 (m, 2H, H<sub>2</sub>C( $\beta$ )Glu), 2,57-2,70 (m, 2H, H<sub>2</sub>C( $\gamma$ )Glu), 3,48 (dd,  $J_{H-H} = 15,5$ ,  $J_{P-H} = 9,6$  Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>P, diast. min.), 3,49 (dd,  $J_{H-H} = 15,6$ ,  $J_{P-H} = 9,6$  Hz, 1H, NHCH<sub>a</sub>P, diast. ppal.), 3,55 (dd,  $J_{H-H} = 15,6$  Hz,  $J_{P-H} = 10,0$  Hz, 1H, NHCH<sub>b</sub>P, diast. ppal.), 3,56 (dd,  $J_{H-H} = 15,5$  Hz,  $J_{P-H} = 9,8$  Hz, NHCH<sub>b</sub>P, diast. min.), 3,99 (t,  $J = 6,6$  Hz, 1H, HC( $\alpha$ )Glu, diast. min.), 4,00 (t,  $J = 6,6$  Hz, 1H, HC( $\alpha$ )Glu, diast. ppal.),

4,27 (dd,  $J = 9,5, 5,1$  Hz, 1H,  $HC(\alpha)$ Leu); RMN  $^{13}C$  (125,77 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ ? 13,8 (d,  $J = 92,4$  Hz,  $PCH_3$ ), 21,5 ( $H_3C_a(\delta)$ Leu), 22,9 ( $H_3C_b(\delta)$ Leu), 25,2 ( $C(\gamma)$ Leu), 26,3 ( $C(\gamma)$ Glu), 31,6 ( $C(\beta)$  Glu), 40,6 ( $C(\beta)$ Leu), 40,1 (d,  $J = 105,1$  Hz,  $NHCH_2P$ ), 40,6  $C(\gamma)$ Leu), 53,3 ( $C(\alpha)$ Leu), 53,6 ( $C(\alpha)$ Glu), 172,6 (CO), 175,2 (CO), 175,6 (CO); RMN  $^{31}P$  (202,45 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  49,1 (diast. ppal.), 48,9 (diast. min.), HRMS (ESI), Calculado para  $C_{13}H_{27}N_3O_6P$  ( $MH^+$ ): 352,1637, encontrado: 352,1637.

#### Ácido etil-[[ $(L-\gamma$ -glutamil- $L$ -leucil)amino]metil]-fosfínico (144)

Sólido blanco; 99% de rendimiento; purificación por CLAR ( $H_2O$ -MeCN-TFA (87:13:0,2),  $t_R = 10,25$  min); RMN  $^1H$  (500,13 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  0,96 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H,  $H_3C_a(\delta)$ Leu), 1,01 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H,  $H_3C_b(\delta)$ Leu), 1,03 (dt,  $J = 13,7, 7,4$  Hz, 3H,  $PCH_2CH_3$ ), 1,47-1,71 (m, 5H,  $H_2C(\beta)$ Leu,  $HC(\gamma)$ Leu,  $PCH_2CH_3$ ), 2,08-2,23 (m, 2H,  $H_2C(\beta)$ Glu), 2,43-2,56 (m, 2H,  $H_2C(\gamma)$ Glu), 3,49 (dd,  $J_{H-H} = 15,6$  Hz,  $J_{P-H} = 9,5$  Hz, 2H,  $NHCH_aP$ , diast. min.), 3,50 (dd,  $J_{H-H} = 15,5$  Hz,  $J_{P-H} = 9,5$  Hz, 2H,  $NHCH_aP$ , diast. ppal.), 3,57 (dd,  $J_{H-H} = 15,5$  Hz,  $J_{P-H} = 9,5$  Hz, 1H,  $NHCH_bP$ , diast. ppal.), 3,58 (dd,  $J_{H-H} = 15,6$  Hz,  $J_{P-H} = 9,3$  Hz, 1H,  $NHCH_bP$ , diast. min.), 3,99 (t,  $J = 6,5$  Hz, 1H,  $HC(\alpha)$ Glu, diast. min.), 4,00 (t,  $J = 6,1$  Hz, 1H,  $HC(\alpha)$ Glu), 4,26 (dd,  $J = 9,2, 4,7$  Hz, 1H,  $HC(\alpha)$ Leu, diast. min.), 4,27 (dd,  $J = 9,4, 5,1$  Hz, 1H,  $HC(\alpha)$ Leu, diast. ppal.); RMN  $^{13}C$  (125,77 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7,4 (d,  $J = 5,1$  Hz,  $PCH_2CH_3$ ), 22,7 (d,  $J = 93,2$  Hz,  $PCH_2CH_3$ ), 23,2 ( $H_3C_a(\delta)$ Leu), 24,7 ( $H_3C_b(\delta)$ Leu), 26,9 ( $C(\gamma)$ Leu), 28,1 ( $C(\gamma)$ Glu), 33,3 ( $C(\beta)$  Glu), 40,1 (d,  $J = 98,3$  Hz,  $NH-CH_2-P$ ), 42,4 ( $C(\beta)$ Leu), 55,0 ( $C(\alpha)$ Leu), 55,3 ( $C(\alpha)$ Glu), 174,4 (CO), 176,9 (CO), 177,2 (CO); RMN  $^{31}P$  (202,45 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  50,1 (diast. ppal.), 49,9 (diast. min.). HRMS (ESI), Calculado para  $C_{14}H_{29}N_3O_6P$  ( $MH^+$ ): 366,1794, encontrado: 366,1790.

#### Ácido 1-propil-[[ $(L-\gamma$ -glutamil- $L$ -leucil)amino]metil]-fosfínico (145)

Sólido blanco; 99% de rendimiento; purificación por CLAR ( $H_2O$ -MeCN-TFA (85:15:0,2),  $t_R = 10,73$  min); RMN  $^1H$  (500,13 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  0,97 (d,  $J = 6,1$  Hz, 3H,  $H_3C_a(\delta)$ Leu), 1,01 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H,  $H_3C_b(\delta)$ Leu), 1,06 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H,  $PCH_2CH_2CH_3$ ), 1,56-1,79

(m, 5H,  $H_2C(\beta)$ Leu,  $HC(\gamma)$ Leu,  $P(CH_2)_2CH_3$ ), 2,23-2,36 (m, 2H,  $H_2C(\beta)$ Glu), 2,56-2,69 (m, 2H,  $H_2C(\gamma)$ Glu), 3,58 (dd,  $J_{H-H} = 15,6$ ,  $J_{P-H} = 9,2$  Hz, 2H,  $NHCH_aP$ , diast. min.), 3,59 (dd,  $J_{H-H} = 15,7$ ,  $J_{P-H} = 9,5$  Hz, 2H,  $NHCH_aP$ , diast. ppal.), 3,66 (dd,  $J_{H-H} = 15,7$ ,  $J_{P-H} = 9,6$  Hz,  $NHCH_bP$ , diast. ppal.), 3,67 (dd,  $J_{H-H} = 15,6$ ,  $J_{P-H} = 9,6$  Hz,  $NHCH_bP$ , diast. min.), 4,10 (t,  $J = 6,5$  Hz, 1H,  $HC(\alpha)$ Glu), 4,26 (dd,  $J = 9,6$ , 5,2 Hz, 1H,  $HC(\alpha)$ Leu); RMN  $^{13}C$  (125,77 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  15,8 (d,  $J = 4,2$  Hz,  $P(CH_2)_2CH_3$ ), 15,8 (d,  $J = 16,1$  Hz,  $PCH_2CH_2CH_3$ ), 21,5 ( $H_3C_a(\delta)$ Leu), 22,9 ( $H_3C_b(\delta)$ Leu), 25,2 (C( $\gamma$ )Leu), 26,4 (C( $\gamma$ )Glu), 30,1 (d,  $J = 93,2$  Hz,  $PCH_2CH_2CH_3$ ), 31,6 (C( $\beta$ )Glu), 38,9 (d,  $J = 97,4$  Hz,  $NH-CH_2-P$ ), 40,6 (C( $\beta$ )Leu), 53,5 (C( $\alpha$ )Leu), 53,6 (C( $\alpha$ )Glu), 172,9 (CO), 175,2 (CO), 175,4 (CO); RMN  $^{31}P$  (202,45 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  49,7 (diast. ppal.), 49,5 (diast. min.). HRMS (ESI), Calculado para  $C_{15}H_{31}N_3O_6P$  ( $MH^+$ ): 380,1950, encontrado: 380,1945.

#### Ácido 1-butil-[[*(L- $\gamma$ -glutamil-L-leucil)amino*]metil]-fosfínico (146)

Sólido blanco; 99% de rendimiento; purificación por CLAR ( $H_2O$ -MeCN-TFA (80:20:0,2),  $t_R = 9,14$  min); RMN  $^1H$  (500,13 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  0,91 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H,  $H_3C_a(\delta)$ Leu), 0,93 (t,  $J = 6,6$  Hz, 3H,  $P(CH_2)_3CH_3$ ), 0,96 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H,  $H_3C_b(\delta)$ Leu), 1,36-1,44 (m, 4H,  $P(CH_2)_2CH_2CH_3$ ), 1,50-1,72 (m, 7H,  $P(CH_2)_2CH_2CH_3$ ,  $H_2C(\beta)$ Leu,  $HC(\gamma)$ Leu), 2,14-2,21 (m, 2H,  $H_2C(\beta)$ Glu), 2,48,-2,59 (m, 2H,  $H_2C(\gamma)$ Glu), 3,36 (dd,  $J_{H-H} = 14,8$  Hz,  $J_{P-H} = 10,1$  Hz, 2H,  $NH-CH_a-P$ ), 3,46 (dd,  $J_{H-H} = 14,8$  Hz,  $J_{P-H} = 7,9$  Hz,  $NHCH_bP$ ), 3,89 (t,  $J = 6,0$  Hz, 1H,  $HC(\alpha)$ Glu), 4,27 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H,  $HC(\alpha)$ Leu); RMN  $^{13}C$  (125,77 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  14,0 ( $P(CH_2)_3CH_3$ ), 21,8 ( $H_3C_a(\delta)$ Leu), 23,4 ( $H_3C_b(\delta)$ Leu), 24,9 ( $P(CH_2)_2CH_2CH_3$ ), 25,1 (d,  $J = 16,7$  Hz,  $PCH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 25,9 (C( $\gamma$ )Leu), 27,0 (C( $\gamma$ )Glu), 32,3 (C( $\beta$ )Glu), 41,6 (C( $\beta$ )Leu), 53,6 (C( $\alpha$ )Leu), 174,5 (CO), 174,7 (CO); RMN  $^{31}P$  (202,45 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  45,0.; HRMS (ESI), Calculado para  $C_{16}H_{33}N_3O_6P$  ( $MH^+$ ): 394,2107, Encontrado: 394,2124.

#### Ácido 1-pentil-[[*(L- $\gamma$ -glutamil-L-leucil)amino*]metil]-fosfínico (147)

Sólido blanco; 100% de rendimiento; purificación por CLAR (H<sub>2</sub>O–MeCN–TFA (75:25:0,2),  $t_R = 10,39$  min.); RMN <sup>1</sup>H (500,13 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0,89 (t,  $J = 6,6$  Hz, 3H, P(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 0,90 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>a</sub>(δ)Leu), 0,94 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>b</sub>(δ)Leu), 1,30-1,41 (m, 4H, P(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 1,54-1,63 (m, 4H, P(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 1,63-1,73 (m, 3H, H<sub>2</sub>C(β)Leu, HC(γ)Leu), 2,07-2,28 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(β)Glu), 2,48,-2,59 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(γ)Glu), 3,39 (dd,  $J_{H-H} = 15,5$  Hz,  $J_{P-H} = 9,8$  Hz, 1H, NHCH<sub>a</sub>P), 3,53 (dd,  $J_{H-H} = 15,5$  Hz,  $J_{P-H} = 8,9$  Hz, 1H, NHCH<sub>b</sub>P), 4,00 (t,  $J = 6,4$  Hz, 1H, HC(α)Glu), 4,30 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H, HC(α)Leu); RMN <sup>13</sup>C (125,77 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 14,2 (P(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 21,8 (H<sub>3</sub>C<sub>a</sub>(δ)Leu), 22,2 (d,  $J = 4,2$  Hz, PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23,2 (P(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23,4 (H<sub>3</sub>C<sub>b</sub>(δ)Leu), 25,9 (C(γ)Leu), 27,0 (C(γ)Glu), 28,5 (d,  $J = 91,6$  Hz, PCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 32,2 (C(β) Glu), 34,2 (d,  $J = 16,1$  Hz, P(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 40,0 (d,  $J = 100,9$  Hz, NHCH<sub>2</sub>P), 41,7 (C(β)Leu), 53,5 (C(α)Leu), 55,6 (C(α)Glu), 171,5 (CO), 174,5 (CO), 174,8 (CO); RMN <sup>31</sup>P (202,45 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 47,3; HRMS (ESI), Calculado para C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>P (MH<sup>+</sup>): 402,2263, Encontrado: 402,2278.

#### Ácido 1-hexil-[[[L-γ-glutamil-L-leucil)amino]metil]-fosfínico (148)

Sólido blanco; 98% de rendimiento; purificación por CLAR (H<sub>2</sub>O–MeCN–TFA (75:25:0,2),  $t_R = 17,38$  min.); RMN <sup>1</sup>H (500,13 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0,90 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H, P(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 0,92 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>a</sub>(δ)Leu), 0,96 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>b</sub>(δ)Leu), 1,26-1,41 (m, 6H, P(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 1,54-1,62 (m, 4H, P(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,63-1,72 (m, 3H, H<sub>2</sub>C(β)Leu, HC(γ)Leu), 2,08-2,29 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(β)Glu), 2,48,-2,59 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(γ)Glu), 3,46 (dd,  $J_{H-H} = 15,4$  Hz,  $J_{P-H} = 8,8$  Hz, 2H, NHCH<sub>a</sub>P), 3,61 (dd,  $J_{H-H} = 15,4$  Hz,  $J_{P-H} = 8,7$  Hz, NHCH<sub>b</sub>P), 4,00 (t,  $J = 6,3$  Hz, 1H, HC(α)Glu), 4,36 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H, HC(α)Leu); δ 14,4 (P(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), 21,8 (H<sub>3</sub>C<sub>a</sub>(δ)Leu), 22,7 (PCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>), 23,4 (H<sub>3</sub>C<sub>b</sub>(δ)Leu), 23,5 (P(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 26,0 (C(γ)Leu), 27,0 (C(γ)Glu), 31,3 (d,  $J = 89,9$  Hz, PCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 34,3 (d,  $J = 14,4$  Hz, P(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 32,2 (C(β) Glu), 32,5 (P(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 41,6 (d,  $J = 100,9$  Hz, NHCH<sub>2</sub>P), 41,7 (C(β)Leu), 53,5 (C(α)Leu), 55,6 (C(α)Glu), 171,6 (CO), 174,5 (CO), 174,8 (CO); RMN <sup>31</sup>P (202,45 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

$\delta$  46,4; HRMS (ESI), Calculado para  $C_{18}H_{37}N_3O_6P$  ( $MH^+$ ): 422,2420, Encontrado: 422,2421.

### Ácido 1-heptil-[[*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-leucil]amino]metil]-fosfínico (149)

Sólido blanco; 99% de rendimiento; Purificación por CLAR ( $H_2O$ -MeCN-TFA (70:30:0,2),  $t_R = 13,96$  min.); RMN  $^1H$  (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  0,89 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H,  $P(CH_2)_6CH_3$ ), 0,91 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H,  $H_3C_a(\delta)Leu$ ), 0,95 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H,  $H_3C_b(\delta)Leu$ ), 1,23-1,42 (m, 8H,  $P(CH_2)_2(CH_2)_4CH_3$ ), 1,45-1,75 (m, 7H,  $H_2C(\beta)Leu$ ,  $HC(\gamma)Leu$ ,  $P(CH_2)_2(CH_2)_4CH_3$ ), 2,07-2,28 (m, 2H,  $H_2C(\beta)Glu$ ), 2,44,-2,63 (m, 2H,  $H_2C(\gamma)Glu$ ), 3,26 (dd,  $J_{H-H} = 14,7$  Hz,  $J_{P-H} = 9,8$  Hz, 2H,  $NHCH_aP$ ), 3,38 (dd,  $J_{H-H} = 114,7$  Hz,  $J_{P-H} = 8,8$  Hz, 1H,  $NHCH_bP$ ), 3,89 (t,  $J = 6,0$  Hz, 1H,  $HC(\alpha)Glu$ ), 4,36 (dd,  $J = 10,1, 4,4$  Hz, 1H,  $HC(\alpha)Leu$ ); RMN  $^{13}C$  (125,77 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  14,4 ( $P(CH_2)_6CH_3$ ), 21,8 ( $H_3C_a(\delta)Leu$ ), 22,8 ( $PCH_2CH_2(CH_2)_4CH_3$ ), 23,4 ( $H_3C_b(\delta)Leu$ ), 23,7 ( $P(CH_2)_5CH_2CH_3$ ), 26,0 ( $C(\gamma)Leu$ ), 27,0 ( $C(\gamma)Glu$ ), 29,8 (d,  $J = 87,3$  Hz,  $PCH_2(CH_2)_5CH_3$ ), 30,0 ( $P(CH_2)_3CH_2(CH_2)_2CH_3$ ), 32,1 (d,  $J = 15,3$  Hz,  $P(CH_2)_2CH_2(CH_2)_3CH_3$ ), 32,3 ( $C(\beta)Glu$ ), 32,8 ( $P(CH_2)_4CH_2CH_2CH_3$ ), 39,2 (d,  $J = 101,7$  Hz,  $NHCH_2P$ ), 41,7 ( $C(\beta)Leu$ ), 53,7 ( $C(\alpha)Leu$ ), 54,4 ( $C(\alpha)Glu$ ), 172,5 (CO), 174,4 (CO), 174,8 (CO); RMN  $^{31}P$  (202,45 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  45,0; HRMS (ESI), Calculado para  $C_{19}H_{39}N_3O_6P$  ( $MH^+$ ): 436,2576, Encontrado: 436,2584.

## 6.8 Ensayos de inhibición del crecimiento parasitario

### 6.8.1 Incorporación de uracilo marcado en amastigotes de *T. cruzi*

#### 6.8.1.1 Inhibición de la replicación

Se plaquearon células de mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>6</sub> ( $1 \times 10^7$  células/placa) irradiados con rayos gama, en medio DMEM con 20% suero fetal bovino, en placas de cultivos de tejidos de 12 pozos y se incubaron a 37 °C en una atmósfera conteniendo 7% de CO<sub>2</sub> durante 24 hs. Se lavaron los cultivos una vez con medio fresco y se agregó nuevo medio con  $4,17 \times 10^6$  tripomastigotes/pozo. Un pozo se dejó sin parásitos para control. Luego de 2 hs de incubación a 37 °C en una atmósfera conteniendo 7% de CO<sub>2</sub>, se lavaron los cultivos dos veces con solución de Hank y se agregó medio de cultivo con 1 µCi de [5,6-<sup>3</sup>H]uracilo/mL (actividad específica 40-50 Ci/mmol; NEN Research Products, Boston) en todos los pozos (1 mL/ pozo). Inmediatamente después se agregó la droga disuelta en etanol absoluto (10 µL). Se dejaron dos pozos sin droga para control de infección. Se agregó etanol absoluto (10 µL) en los pozos de control de cultivo y de infección. La incorporación de [<sup>3</sup>H] en el material precipitable con ácido tricloroacético (TCA) se midió en el día 3. Las células se disolvieron en 1,3 mL de dodecil sulfato de sodio (SDS) 1% conteniendo uracilo frío (100 µL/mL). Las suspensiones resultantes se transfirieron a los respectivos tubos de ensayo. Los pozos se enjuagaron con 3 mL de TCA 5% frío y se combinaron con las suspensiones anteriores. Se dejaron los tubos 15 min en hielo y se filtraron las suspensiones a través de fitros de fibra de vidrio (Whatman GF/D) mediante un adaptador de vacío de bocas múltiples (Millipore, Bedford, Massachussets). Los tubos de ensayo se enjuagaron 3 veces con TCA 5% (4 mL) y después se lavaron los filtros dos veces con TCA y una vez con etanol 95%. Luego de secados, los filtros se colocaron en viales Econolume de cocktail de centelleo de 5 mL. Se agitaron vigorosamente en Vortex y se contó.

### **6.8.1.2 Inhibición de la invasión**

Se utilizó el mismo protocolo que para inhibición de la replicación pero agregando las drogas en el momento de la infección.

### **6.8.1.3 Toxicidad en cultivos de mioblastos**

Se plaquearon células de mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>6</sub> ( $1 \times 10^7$  células/placa) irradiados con rayos gama, en medio DMEM con 20% suero fetal bovino, en placas de cultivos de tejidos de 12 pozos que contenían cubreobjetos y se incubaron a 37 °C en una atmósfera conteniendo 7% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo( DMEM, 1 % P/S, 20% FBS), durante 24 hs. Se retiró el medio de cultivo, se lavó dos veces con solución de Hank y se agregó medio de cultivo fresco. En este punto se agregó la droga disuelta en etanol absoluto (10 µL) a una concentración final de 50 µM. Cada droga se ensayó por triplicado. Las células se incubaron a 37 °C durante 3 días. Se retiró el medio de cultivo y se agregó medio fresco el cual contenía yoduro de propidio (5µg/mL) y DAPI (5 µg/mL). Las células se incubaron durante 5 minutos a 37 °C y se lavaron con solución de Hank (3 x 2 mL/pozo). Se agregó medio fresco (2 mL/pozo) y se incubaron durante 20 minutos. Las células se lavaron 10 veces con PBS y se trataron con formaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos, luego se lavaron 3 veces con PBS. Se retiraron los cubreobjetos y se colocaron sobre portaobjetos. Las células se contaron al microscopio de fluorescencia. Las células cuyos núcleos se tiñeron de azul se contaron como viables y las células cuyos núcleos se tiñeron de rojo se contaron como no viables. Se contaron 10 campos por cubreobjeto (50-70 células / campo) a un aumento de 100 X.

Resultados:

<b>compuesto</b>	<b>% células viables</b>
<b>control</b>	3±1
<b>146</b>	6±1
<b>147</b>	9±5
<b>148</b>	6±4

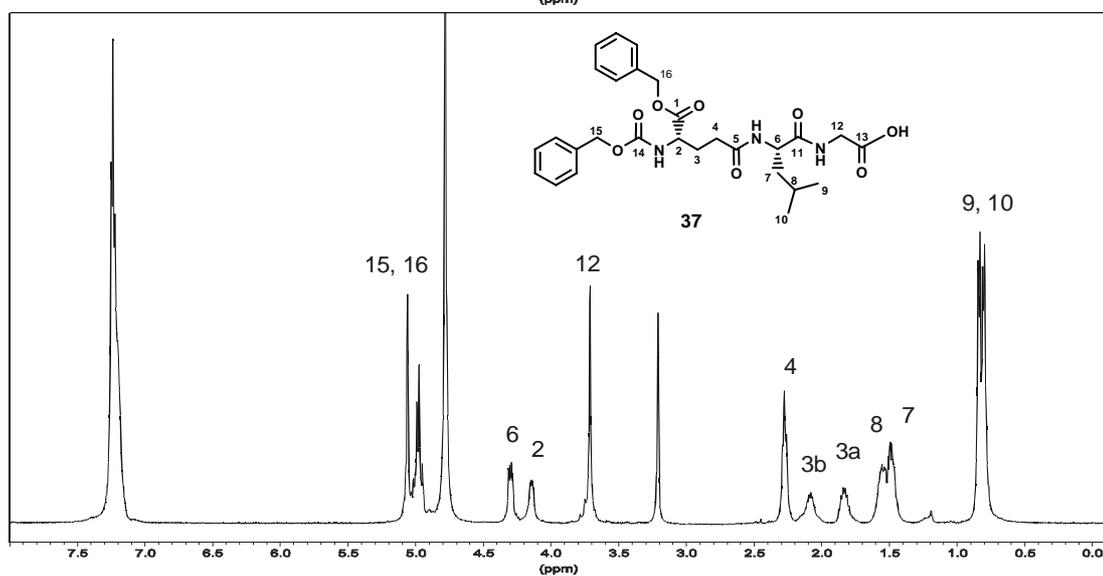
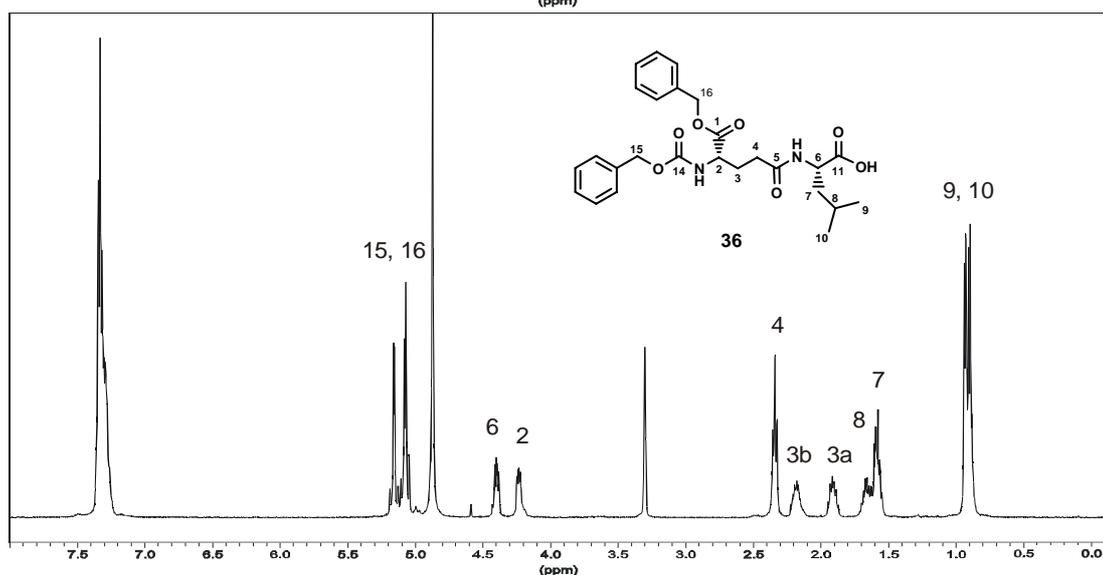
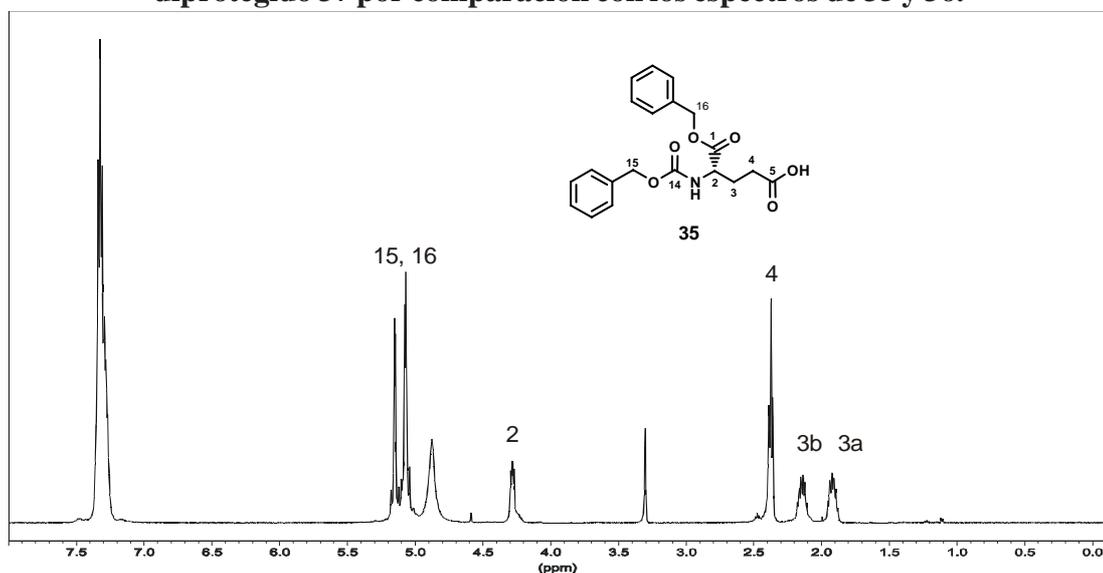
### 6.8.2 Inhibición del crecimiento contra epimastigotes de *T.cruzi*.

Se hicieron crecer células de *Trypanosoma cruzi* epimastigote (cepa Y) en medio LIT con 5% NCS y 1% P/S. Se centrifugó y resuspendió cultivo de 5 días en medio fresco de manera de obtener una suspensión entre  $2$  y  $3 \times 10^6$  células/mL (según medición en una cámara de Neubauer). Los parásitos se colocaron en tubos de vidrio con tapa a rosca (2 mL/tubo). Se llenaron dos tubos con medio como blanco. Cada droga se ensayó a cuatro concentraciones diferentes (1, 5, 15 y 25  $\mu\text{g/mL}$ ) cada una por triplicado. Las drogas se disolvieron en etanol absoluto. Para cada concentración se dejó un tubo sin droga como control. Se agregó una cantidad equivalente de etanol (20  $\mu\text{L}$ ) a los tubos de blanco y de control. La concentración de células se determinó midiendo la absorbancia del medio de cultivo parasitario a 600 nm contra el blanco con medio solo. Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente fórmula:  $\% \text{ inhibición} = 100 - (\Delta A_d \times 100) / \Delta A_c$ , donde  $\Delta A_d$  y  $\Delta A_c$  son las diferencias de absorbancia de los cultivos de control y los cultivos tratados con droga, respectivamente, al comienzo y al final del experimento. El máximo de solvente utilizado no tuvo efecto alguno sobre el crecimiento de los parásitos. El compuesto WC-9 (5) se utilizó como control positivo.

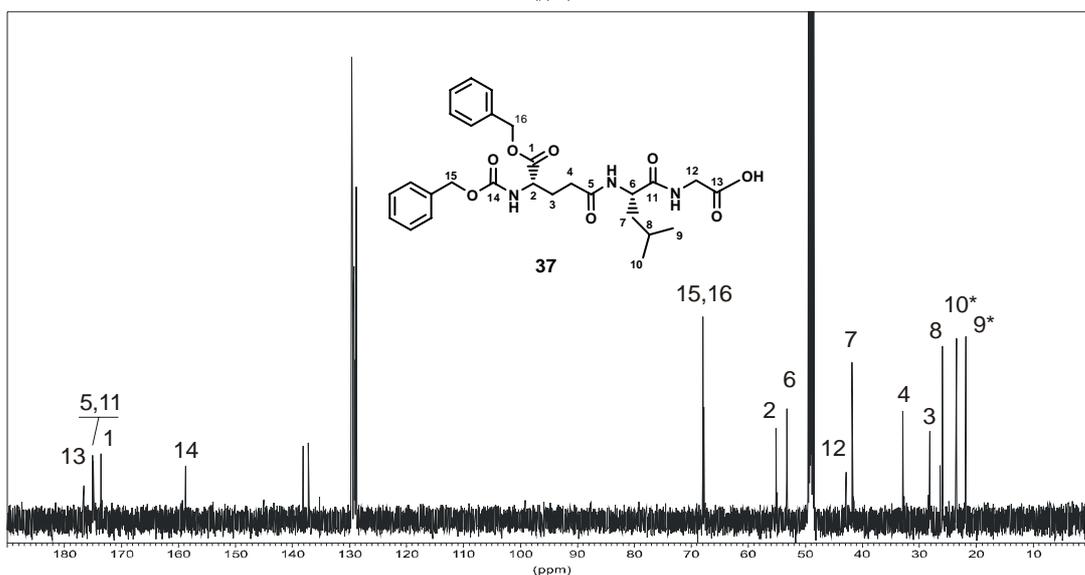
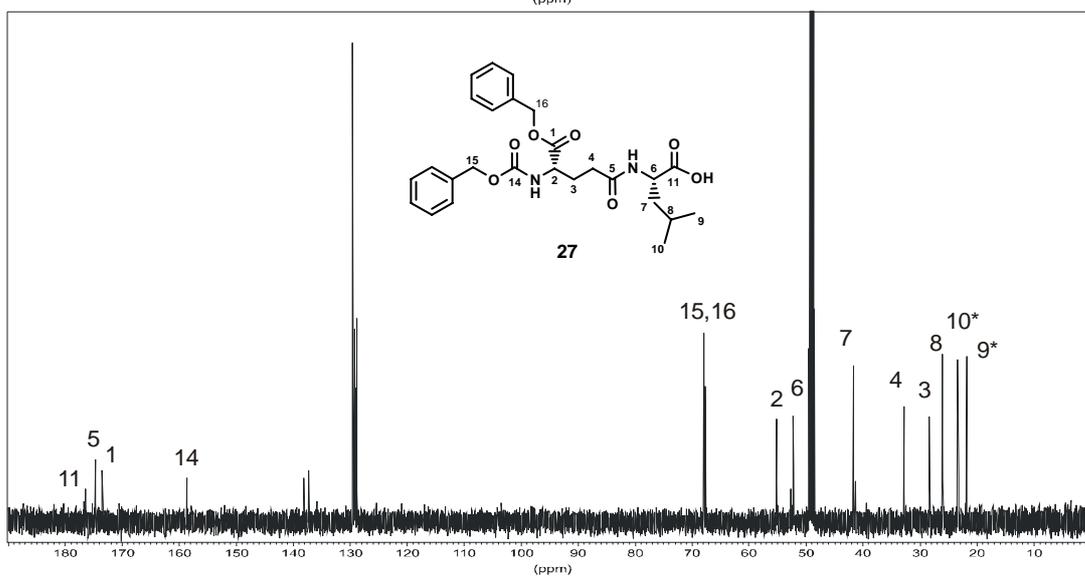
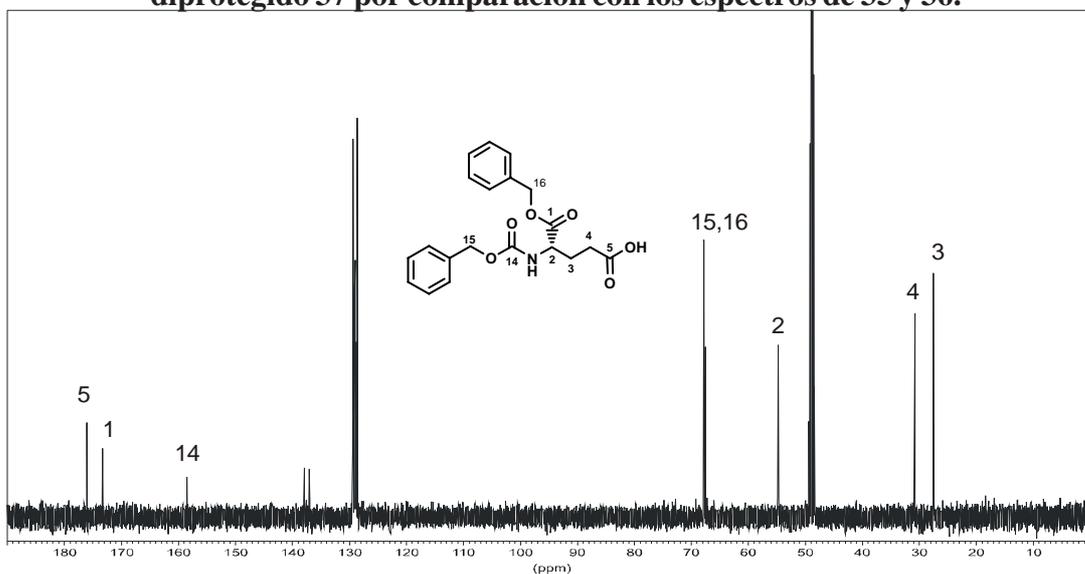
## **Apéndice A**



Asignación del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 Mhz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del tripéptido diprotegido 37 por comparación con los espectros de 35 y 36.

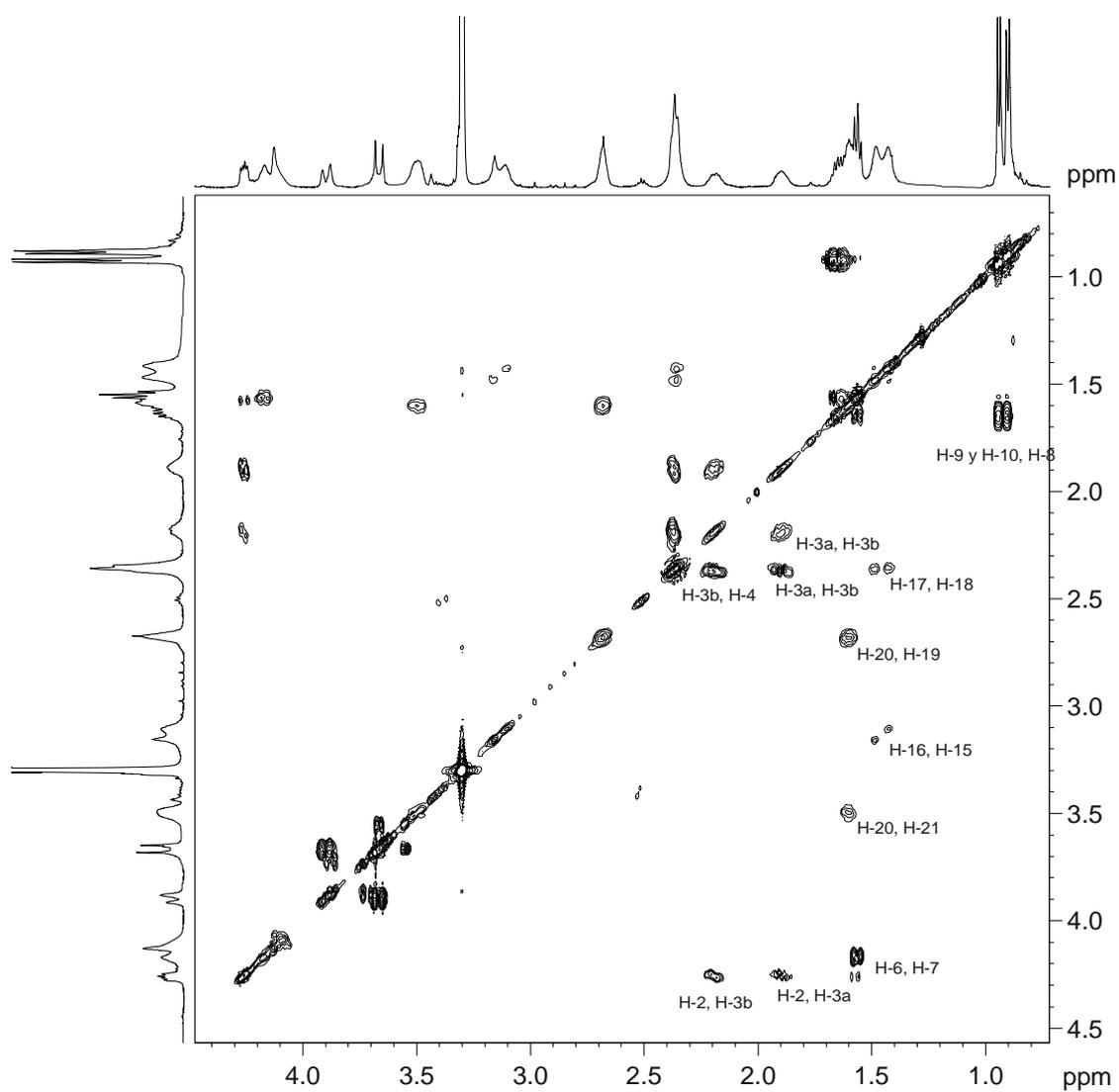
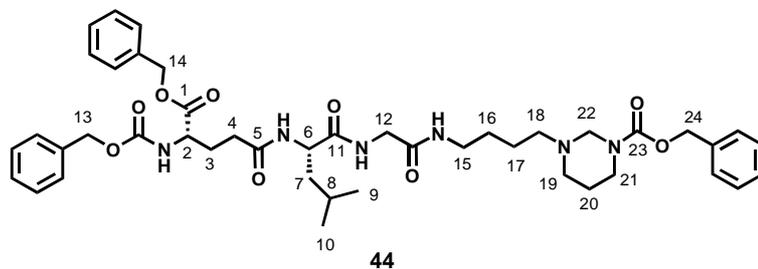


**Asignación del espectro de RMN  $^{13}\text{H}$  (125 Mhz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del tripéptido diprottegido **37** por comparación con los espectros de **35** y **36**.**

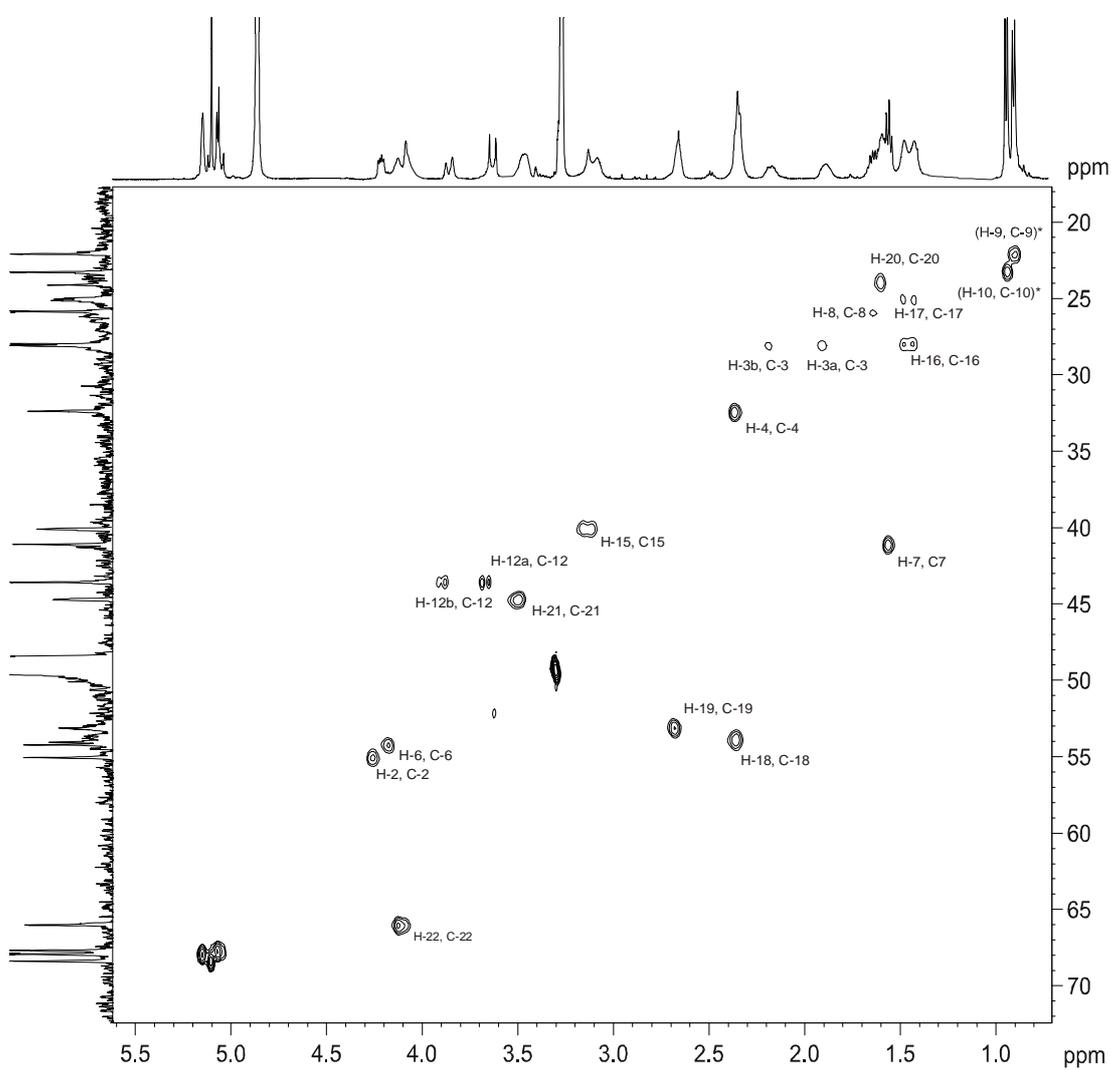
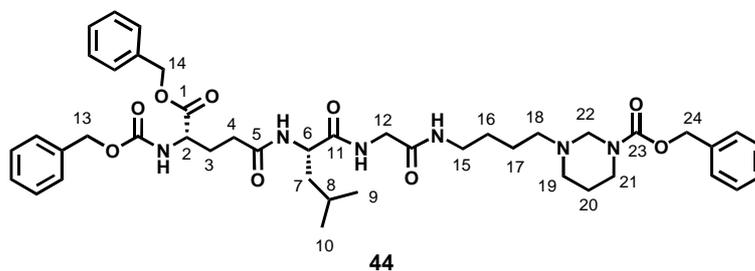


## **Apéndice B**



Espectro de correlación homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 45 de 44

Espectro de correlación heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de 44

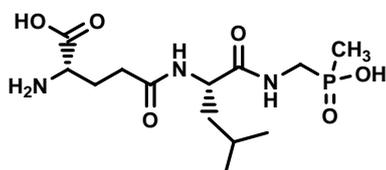


## **Apéndice C**



## Pureza cromatográfica de los fosfinopéptidos 143-149 en dos sistemas de elución distintos

Sistema 1: Agua : Acetonitrilo : Ácido Trifluoroacético



143

Report



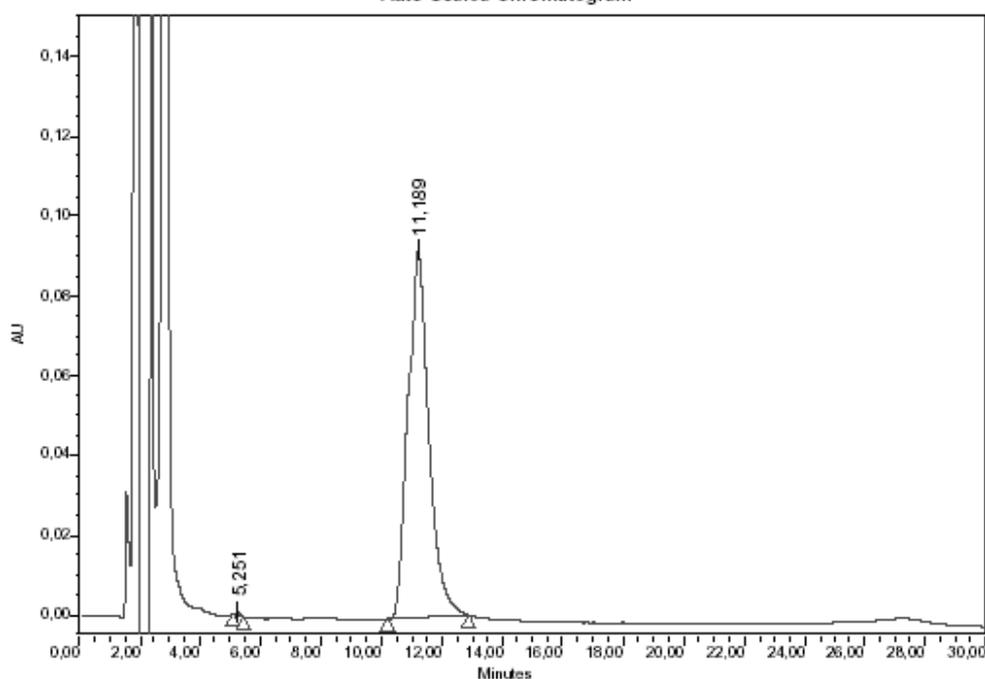
Reported by User: Esteban Ravaschino

Project Name: esteban

### SAMPLE INFORMATION

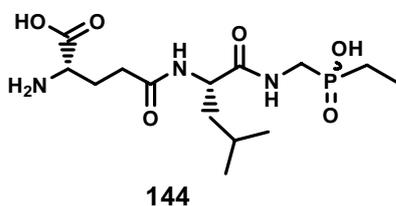
Sample Name:	Compound 50	Acquired By:	Esteban Ravaschino
Sample Type:	H2O:AcCN:TFA = 95:5:0.2	Date Acquired:	28/09/05 12:13:23 p.m.
Vial:	1	Acq. Method Set:	esteban
Injection #:	3	Date Processed:	28/09/05 01:14:07 p.m.
Injection Volume:	20,00 ul	Processing Method:	esteban
Run Time:	30,0 Minutes	Channel Name:	220nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	220,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units	% Area
1	5,251	7125	789			0,16
2	11,189	4424269	92266			99,84



Report

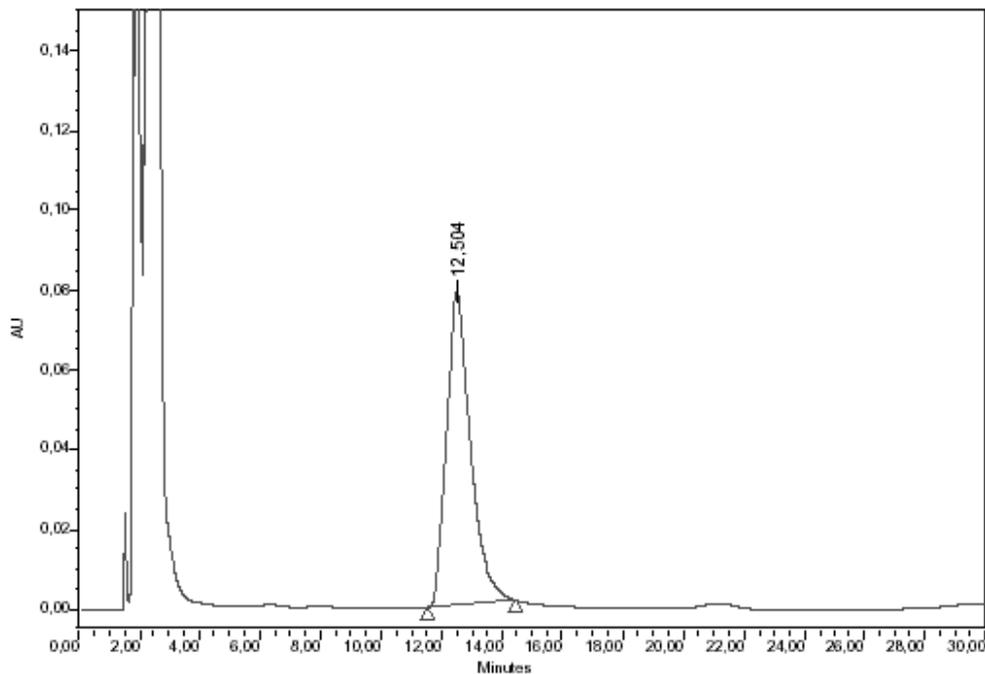
Reported by User: Esteban Ravaschino

Project Name: esteban

SAMPLE INFORMATION

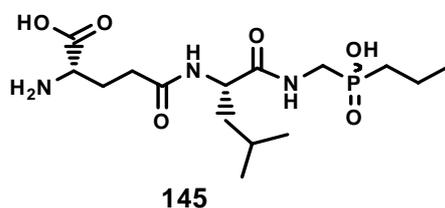
Sample Name:	Compound 51	Acquired By:	Esteban Ravaschino
Sample Type:	H2O:AcCN:TFA = 93:7:0.2	Date Acquired:	28/09/05 02:58:51 p.m.
Vial:	1	Acq. Method Set:	esteban
Injection #:	2	Date Processed:	28/09/05 03:46:15 p.m.
Injection Volume:	20,00 ul	Processing Method:	esteban
Run Time:	30,0 Minutes	Channel Name:	220nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	220,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units	% Area
1	12,504	4234305	78522			100,00



## Report

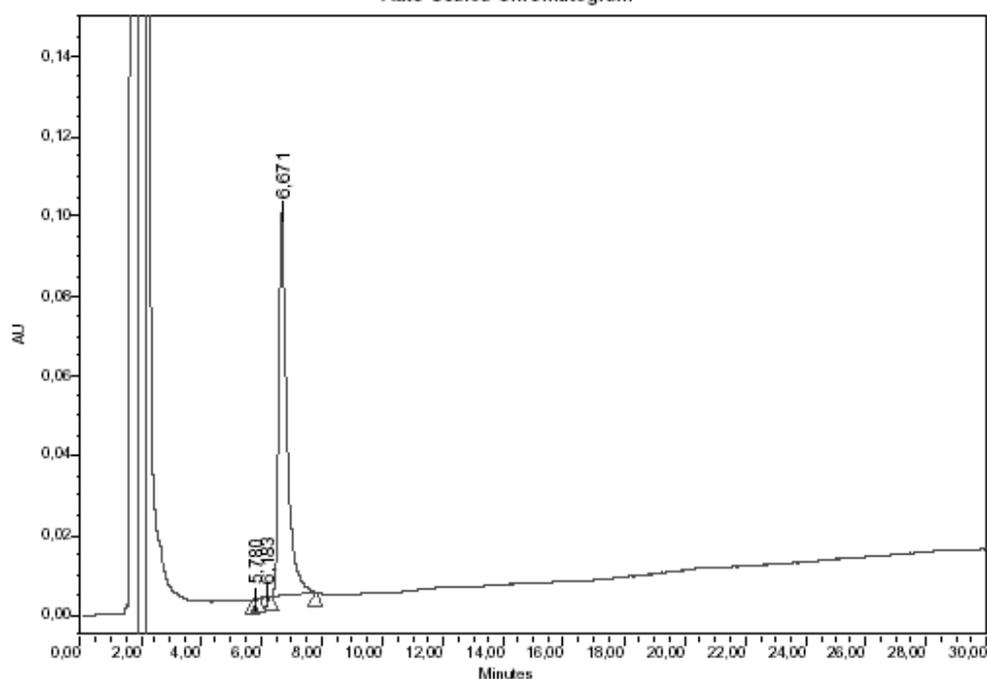
Reported by User: Esteban Ravaschino

Project Name: esteban

### SAMPLE INFORMATION

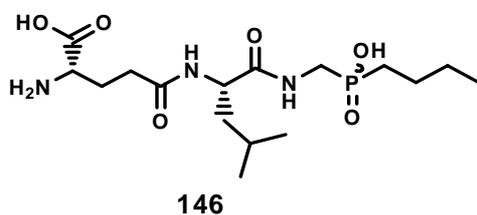
Sample Name: Compound 52	Acquired By: Esteban Ravaschino	Date Acquired: 27/09/05 12:54:20 p.m.
Sample Type: H2O:AcCN:TFA = 85:15:0.2	Date Acquired: 27/09/05 12:54:20 p.m.	Acq. Method Set: esteban
Vial: 1	Acq. Method Set: esteban	Date Processed: 28/09/05 09:52:04 a.m.
Injection #: 1	Date Processed: 28/09/05 09:52:04 a.m.	Processing Method: esteban
Injection Volume: 20,00 ul	Processing Method: esteban	Channel Name: 220nm
Run Time: 30,0 Minutes	Channel Name: 220nm	Proc. Chnl. Descr.: 220,0 nm
Sample Set Name:	Proc. Chnl. Descr.: 220,0 nm	

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units	% Area
1	5,780	831	112			0,04
2	6,183	4594	323			0,23
3	6,671	2018159	96533			99,73



## Report

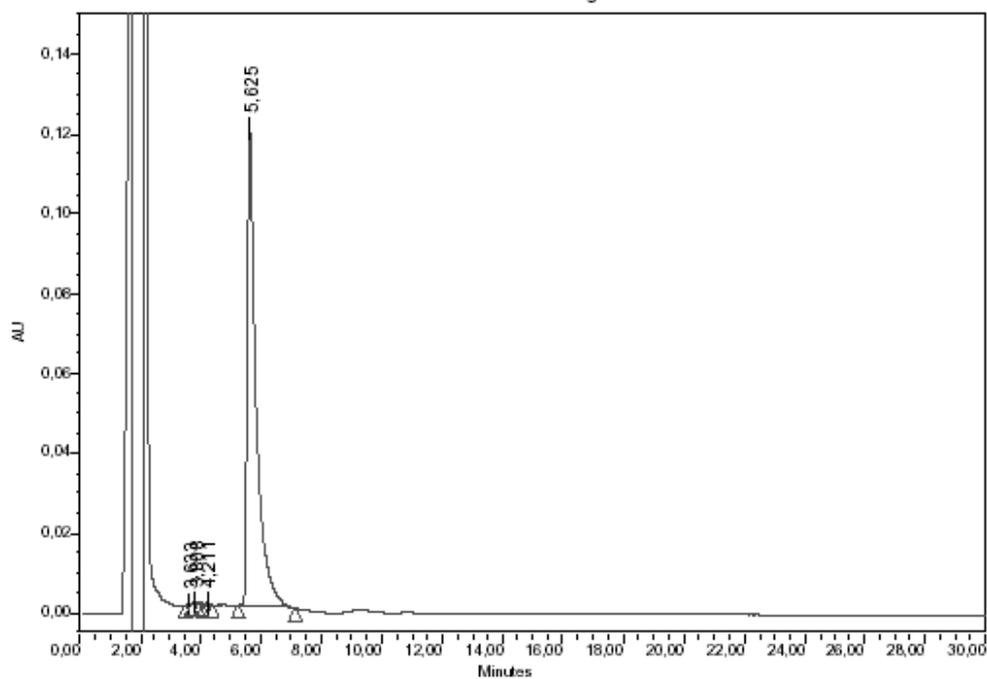
Reported by User: Esteban Ravaschino

Project Name: esteban

### SAMPLE INFORMATION

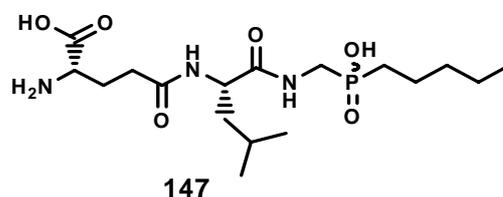
Sample Name: Compound 53	Acquired By: Esteban Ravaschino
Sample Type: H2O:AcCN:TFA = 80:20:0.2	Date Acquired: 26/09/05 06:32:13 p.m.
Vial: 1	Acq. Method Set: esteban
Injection #: 1	Date Processed: 28/09/05 09:51:58 a.m.
Injection Volume: 20,00 ul	Processing Method: esteban
Run Time: 30,0 Minutes	Channel Name: 220nm
Sample Set Name:	Proc. Chnl. Descr.: 220,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units	% Area
1	3,633	1008	135			0,04
2	3,808	3264	449			0,14
3	4,211	5300	624			0,22
4	5,625	2391473	119958			99,60



## Report

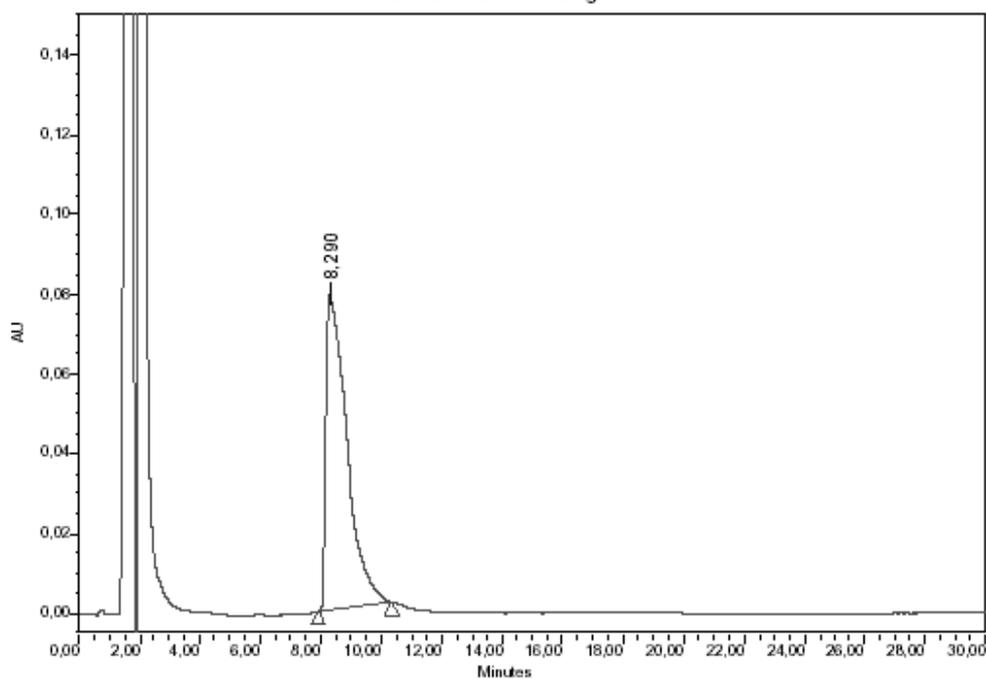
Reported by User: Esteban Ravaschino

Project Name: esteban

### SAMPLE INFORMATION

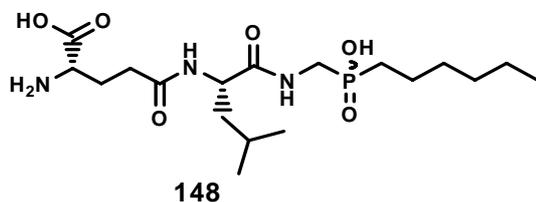
Sample Name:	Compound 54	Acquired By:	Esteban Ravaschino
Sample Type:	H <sub>2</sub> O:AcCN:TFA = 75:25:0.2	Date Acquired:	28/09/05 06:19:04 p.m.
Vial:	1	Acq. Method Set:	esteban
Injection #:	1	Date Processed:	28/09/05 08:46:32 p.m.
Injection Volume:	20,00 ul	Processing Method:	esteban
Run Time:	30,0 Minutes	Channel Name:	220 nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	220,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units	% Area
1	8,290	3797897	79216			100,00



Report

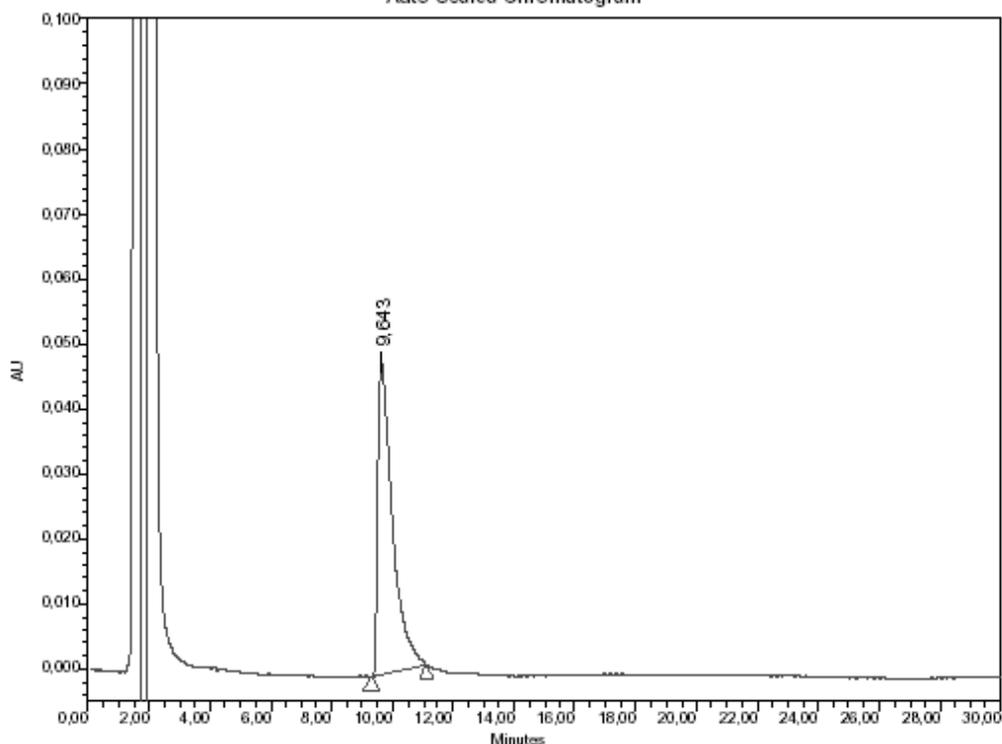
Reported by User: Esteban Ravaschino

Project Name: esteban

SAMPLE INFORMATION

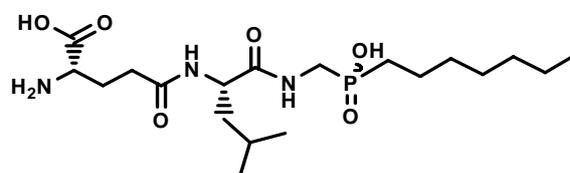
Sample Name:	Compound 55	Acquired By:	Esteban Ravaschino
Sample Type:	H2O:AcCN:TFA = 73:27:0.2	Date Acquired:	26/09/05 01:26:06 p.m.
Vial:	1	Acq. Method Set:	esteban
Injection #:	3	Date Processed:	28/09/05 09:44:08 a.m.
Injection Volume:	20,00 ul	Processing Method:	esteban
Run Time:	30,0 Minutes	Channel Name:	220nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	220,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units	% Area
1	9,643	1551418	48140			100,00



149



Report

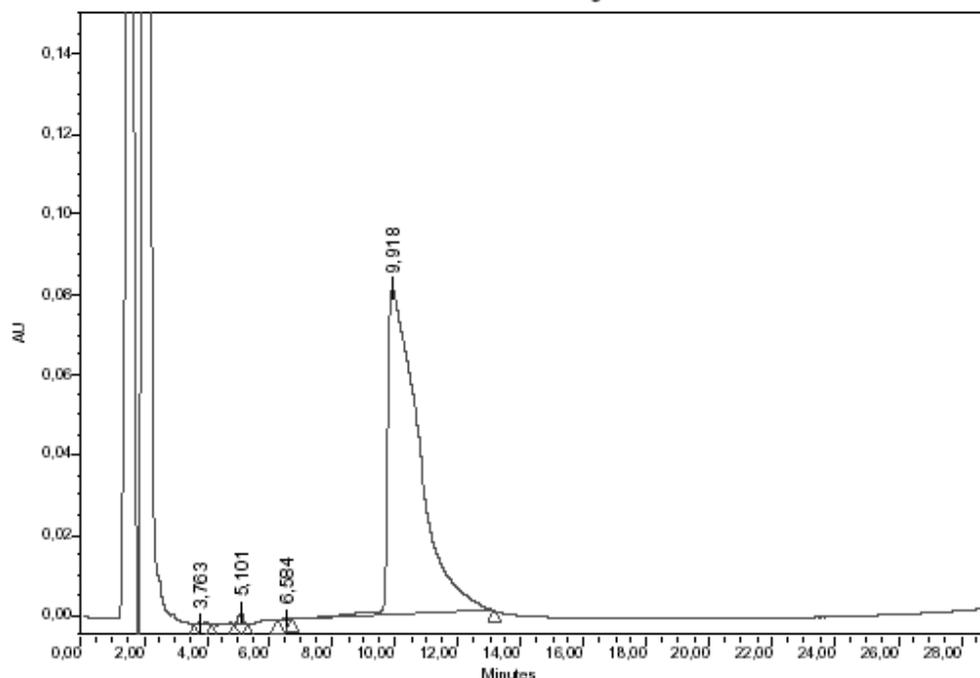
Reported by User: Esteban Ravaschino

Project Name: esteban

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Compound 56	Acquired By:	Esteban
Sample Type:	H2O:AcCN:TFA = 70:30:0.2	Date Acquired:	23/09/05 06:32:22 p.m.
Vial:	1	Acq. Method Set:	esteban
Injection #:	3	Date Processed:	28/09/05 09:58:45 a.m.
Injection Volume:	20,00 ul	Processing Method:	esteban
Run Time:	30,0 Minutes	Channel Name:	220nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	220,0 nm

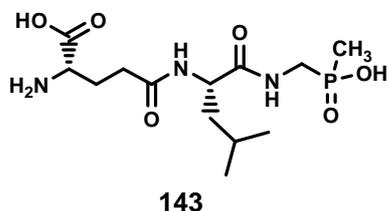
Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units	% Area
1	3,763	10219	617			0,18
2	5,101	33774	2999			0,60
3	6,584	3885	234			0,07
4	9,918	5600765	81339			99,15

Sistema 2 : Agua : tetrahydrofurano : Ácido Trifluoroacético



## Report

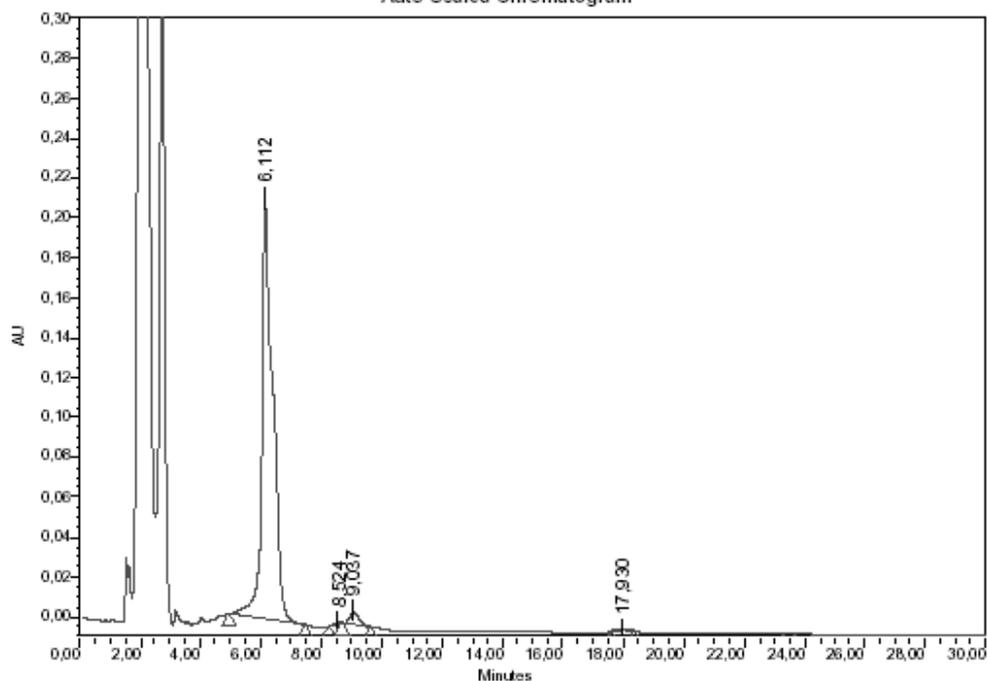
Reported by User: Esteban Ravaschino

Project Name: esteban

### SAMPLE INFORMATION

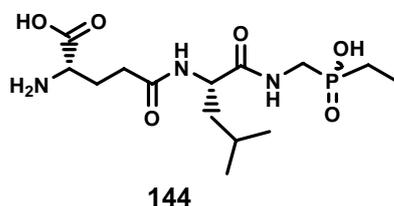
Sample Name:	Compound 50	Acquired By:	Esteban Ravaschino
Sample Type:	H2O:THF:TFA = 97:3:0.2	Date Acquired:	29/09/05 06:22:21 p.m.
Vial:	1	Acq. Method Set:	esteban
Injection #:	1	Date Processed:	29/09/05 07:56:03 p.m.
Injection Volume:	20,00 ul	Processing Method:	esteban
Run Time:	30,0 Minutes	Channel Name:	220 nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	220,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units	% Area
1	6,112	5318610	212229			96,67
2	8,524	16097	1141			0,29
3	9,037	145554	6667			2,65
4	17,930	21395	797			0,39



## Report

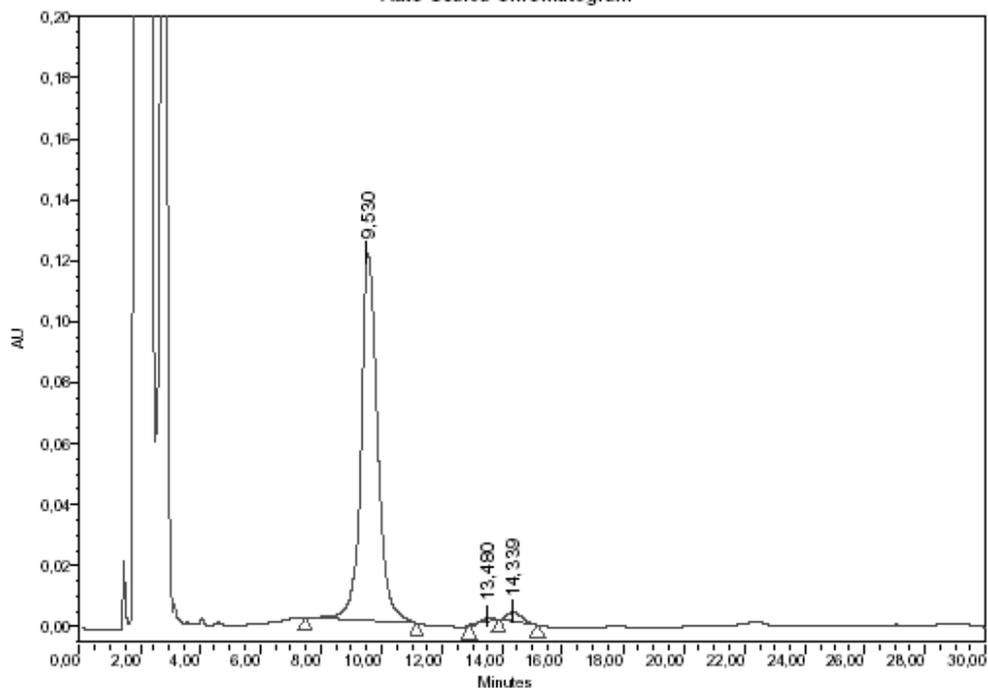
Reported by User: Esteban Ravaschino

Project Name: esteban

### SAMPLE INFORMATION

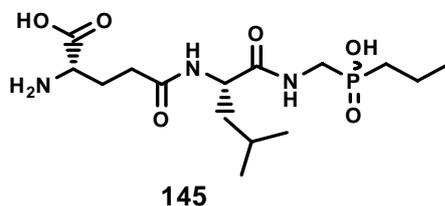
Sample Name: Compound 51	Acquired By: Esteban Ravaschino	Date Acquired: 29/09/05 07:03:41 p.m.
Sample Type: H2O:THF:TFA = 97:3:0.2	Date Acquired: 29/09/05 07:03:41 p.m.	Acq. Method Set: esteban
Vial: 1	Acq. Method Set: esteban	Date Processed: 30/09/05 11:33:05 p.m.
Injection #: 2	Date Processed: 30/09/05 11:33:05 p.m.	Processing Method: esteban
Injection Volume: 20,00 ul	Processing Method: esteban	Channel Name: 220nm
Run Time: 30,0 Minutes	Channel Name: 220nm	Proc. Chnl. Descr.: 220,0 nm
Sample Set Name:	Proc. Chnl. Descr.: 220,0 nm	

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units	% Area
1	9,530	4602304	120400			96,65
2	13,480	46676	1634			0,98
3	14,339	113075	3270			2,37



## Report

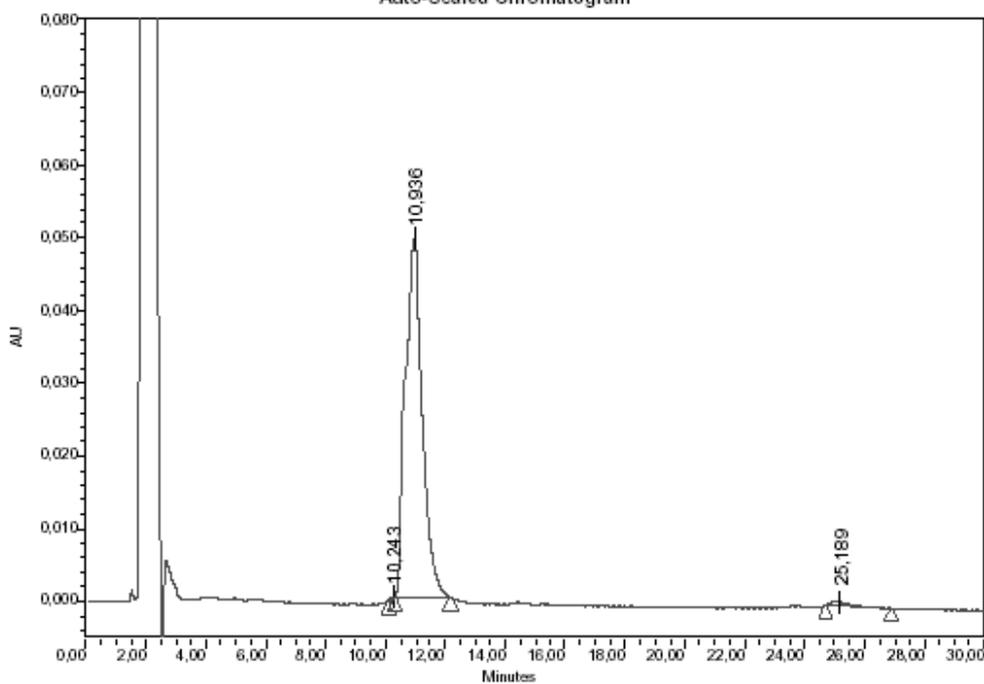
Reported by User: Esteban Ravaschino

Project Name: esteban

### SAMPLE INFORMATION

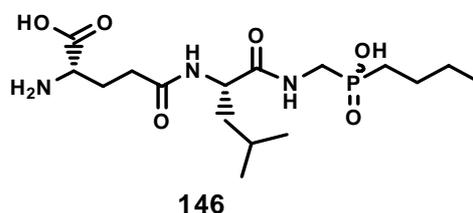
Sample Name: Compound 52	Acquired By: Esteban Ravaschino
Sample Type: H2O:THF:TFA = 95:5:0.2	Date Acquired: 30/09/05 10:29:40 a.m.
Vial: 1	Acq. Method Set: esteban
Injection #: 1	Date Processed: 30/09/05 07:40:21 p.m.
Injection Volume: 20,00 ul	Processing Method: esteban
Run Time: 30,0 Minutes	Channel Name: 220nm
Sample Set Name:	Proc. Chnl. Descr.: 220,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units	% Area
1	10,243	1060	107			0,05
2	10,936	2023801	49232			98,31
3	25,189	33796	652			1,64



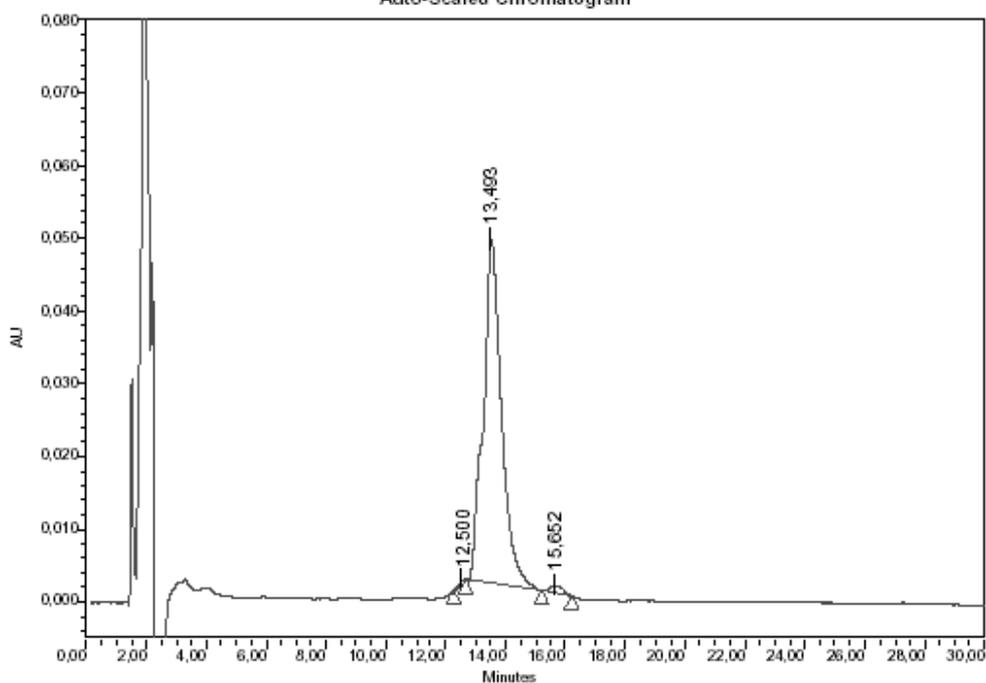
## Report

Reported by User: Esteban Ravaschino      Project Name: esteban

### SAMPLE INFORMATION

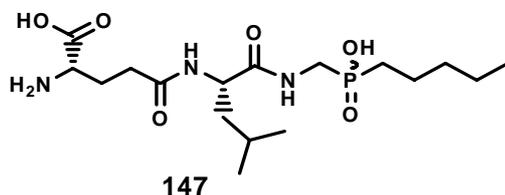
Sample Name:	Compound 53	Acquired By:	Esteban Ravaschino
Sample Type:	H <sub>2</sub> O:THF:TFA = 90:10:0.2	Date Acquired:	30/09/05 06:49:01 p.m.
Vial:	1	Acq. Method Set:	esteban
Injection #:	1	Date Processed:	30/09/05 07:22:43 p.m.
Injection Volume:	20,00 ul	Processing Method:	esteban
Run Time:	30,0 Minutes	Channel Name:	220nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	220,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units	% Area
1	12,500	5885	489			0,29
2	13,493	2007614	47370			97,99
3	15,652	35287	1161			1,72



Report

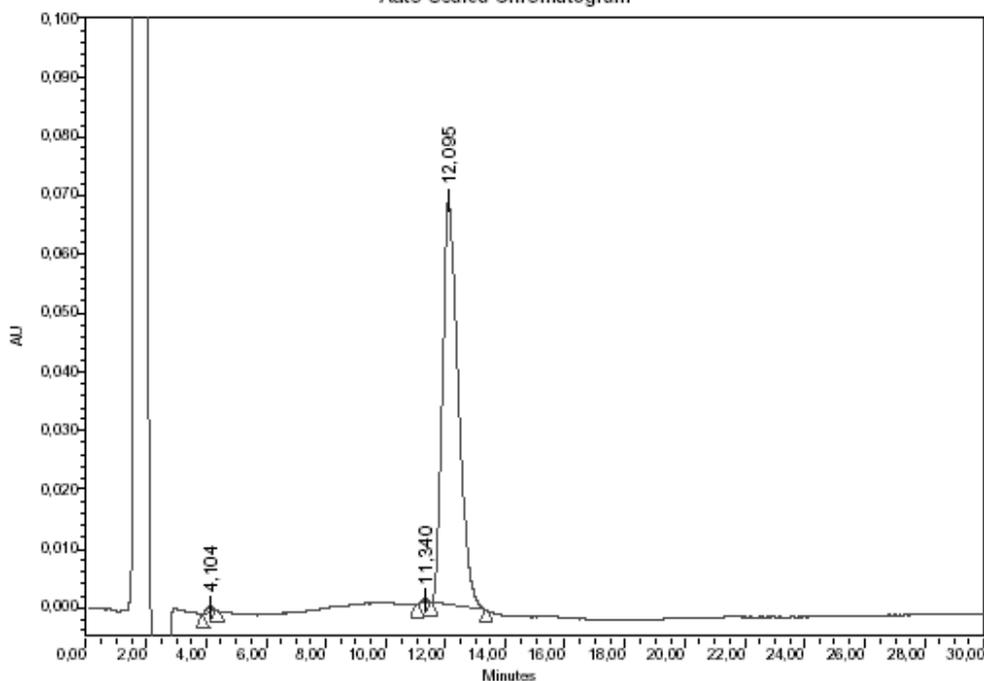
Reported by User: Esteban Ravaschino

Project Name: esteban

SAMPLE INFORMATION

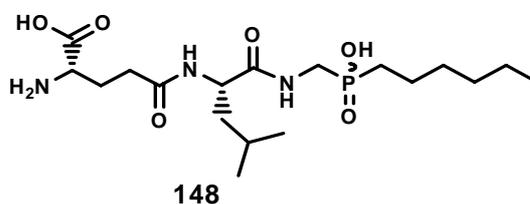
Sample Name:	Compound 54	Acquired By:	Esteban Ravaschino
Sample Type:	H2O:THF:TFA = 80:20:0.2	Date Acquired:	30/09/05 08:55:37 p.m.
Vial:	1	Acq. Method Set:	esteban
Injection #:	1	Date Processed:	30/09/05 09:55:37 p.m.
Injection Volume:	20,00 ul	Processing Method:	esteban
Run Time:	30,0 Minutes	Channel Name:	220nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	220,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units	% Area
1	4,104	17208	1020			0,69
2	11,340	10286	700			0,41
3	12,095	2467783	68725			98,90



Report

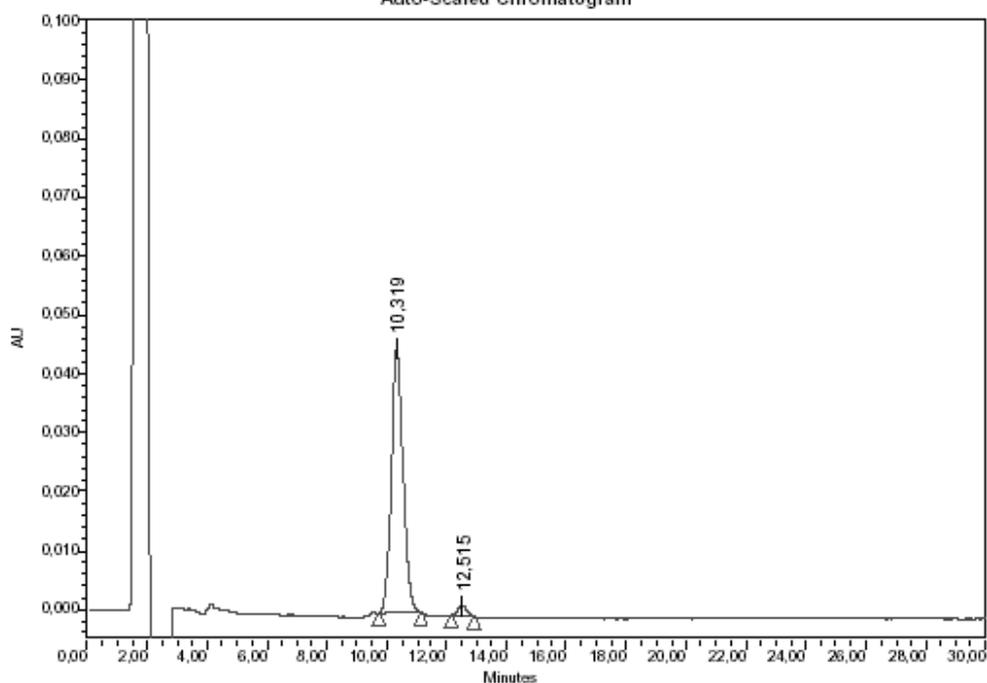
Reported by User: Esteban Ravaschino

Project Name: esteban

SAMPLE INFORMATION

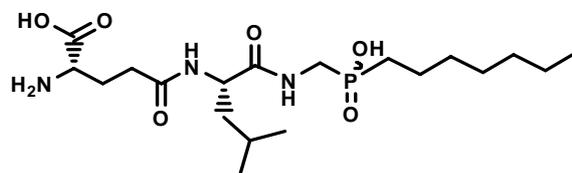
Sample Name:	Compound 55	Acquired By:	Esteban Ravaschino
Sample Type:	H2O:THF:TFA =80:20:0.2	Date Acquired:	30/09/05 10:14:09 p.m.
Vial:	1	Acq. Method Set:	esteban
Injection #:	2	Date Processed:	30/09/05 11:43:24 p.m.
Injection Volume:	20,00 ul	Processing Method:	esteban
Run Time:	30,0 Minutes	Channel Name:	220nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	220,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units	% Area
1	10,319	1179619	45037			97,24
2	12,515	33497	1598			2,76



149



Report

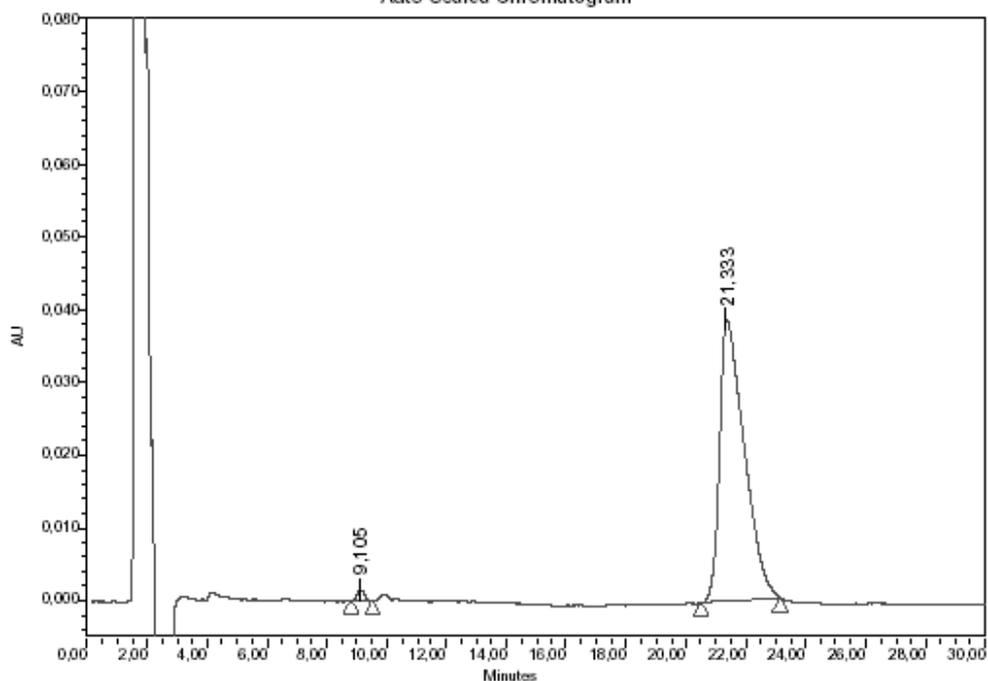
Reported by User: Esteban Rivaschino

Project Name: esteban

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Compound 56	Acquired By:	Esteban Rivaschino
Sample Type:	H2O:THF:TFA= 67:33:0.2	Date Acquired:	03/10/05 10:15:49 a.m.
Vial:	1	Acq. Method Set:	esteban
Injection #:	1	Date Processed:	03/10/05 10:46:32 a.m.
Injection Volume:	20,00 ul	Processing Method:	esteban
Run Time:	30,0 Minutes	Channel Name:	220nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	220,0 nm

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units	% Area
1	9,105	25928	1507			1,16
2	21,333	2218354	38721			98,84

## **Resumen**



## Resumen

En este trabajo de tesis se diseñaron y sintetizaron 29 nuevos agentes antiparasitarios estructuralmente relacionados a glutatión, el sustrato natural de glutationilperimidina sintetasa (GspS) y tripanotiona sintetasa (TryS), dos enzimas claves para parásitos de la familia de los tripanosomátidos y ausentes en mamíferos.

Los análogos sintetizados poseen en su estructura una parte peptídica, correspondiente al tripéptido  $\gamma$ -L-glutamil-L-leucinilglicina (compuesto **27**), y una parte no peptídica unida al compuesto **27** a través de su extremo C-terminal.

Estos derivados de péptidos se pueden clasificar en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura química. El primer grupo agrupa a aquellos derivados en los que el tripéptido está acoplado con distintas poliaminas, aminas y alcoholes para dar las correspondientes amidas y ésteres de  $\gamma$ -L-glutamil-L-leucinilglicina. Dentro del segundo grupo se encuentran los derivados resultantes del acoplamiento del dipéptido  $\gamma$ -L-glutamil-L-leucina con una unidad de glicina cuyo grupo carboxilo está reemplazado por una unidad de ácido fosfínico.

La parte peptídica de dichas estructuras se sintetizó mediante una estrategia clásica de formación del enlace peptídico en fase homogénea, utilizando reactivos de acoplamiento tales como diciclohexilcarbodiimida/*N*-hidroxisuccinimida o *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida/*N*-hidroxisuccinimida. Empleando este mismo tipo de reactivos se activó el tripéptido para su acoplamiento con los distintos alcoholes y aminas.

Para la modificación estructural de glicina en el segundo grupo de análogos, la síntesis de los ácidos  $\alpha$ -aminometilalquilfosfínicos se llevó a cabo a partir de fosfinato de amonio. La incorporación de los distintos sustituyentes al hipofosfito inorgánico se realizó a través de reacciones de tipo Michaelis-Arbusov, las cuales condujeron a la estructura deseada una vez adaptadas estas reacciones a los compuestos de interés. Una vez disponibles los ácidos  $\alpha$ -aminometilfosfínicos correspondientes, se acoplaron al dipéptido a través de una reacción de activación del grupo C-terminal con los reactivos habituales.

Los derivados de amidas que poseían en el sector no-peptídico una unidad de poliamina aromáticas tales como los compuestos **57** y **60**, los derivados de ésteres **70–77** y amidas

preparadas a partir de aminas alifáticas **88–95** y **98–99** se evaluaron como inhibidores de la actividad enzimática de GspS de *Crithidia fasciculata*. Sólo unos pocos compuestos del primer grupo presentaron una moderada acción inhibitoria contra esta enzima. Merecen destacarse los porcentajes de inhibición de la actividad enzimática a una concentración de 500  $\mu$  M, de 36% para **57**, 44% para **88** y 60% para **74**. En el caso de los ésteres, se estudió su actividad como sustrato de la enzima observándose que la misma era importante en todos ellos, siendo del 100% para los compuestos de cadena alquílica más corta (compuestos **70–73**). Las drogas **70** y **73** se ensayaron contra la enzima mutante C79A, en la que el segundo sitio catalítico, con actividad amidasa, se encuentra inactivado. La actividad de estos compuestos fue notablemente menor como sustrato, aumentando la actividad como inhibidor. Para el compuesto **70** la actividad como sustrato se redujo al 32% y la actividad como inhibidor aumentó al 62%.

Los derivados amida de aminas alifáticas **88–95** se ensayaron también contra TryS de *Trypanosoma cruzi*. En este caso, el compuesto más potente fue **92**, el derivado de cadena alquílica de cuatro carbonos, con un porcentaje de inhibición del 61% a una concentración de 500  $\mu$  M. También se evaluaron contra la forma epimastigote de *T. cruzi*. Estos compuestos no presentaron actividad celular a concentraciones de hasta 20  $\mu$  g/mL.

Estos resultados llevaron a la conclusión de que para modificar la estructura tripeptídica base en el extremo C-terminal era indispensable evitar la unión a través de enlaces potencialmente hidrolizables por el dominio amidasa de las enzimas blanco, como las uniones éster o amida.

Dentro del segundo grupo de análogos se sintetizaron los derivados fosfinopeptídicos **143–149**. En ellos la unión hidrolizable en el C-terminal del tripéptido se sustituyó por una unión C-P, no hidrolizable. Al mismo tiempo la geometría trigonal plana de la unión  $sp^2$  cambió a la geometría tetraédrica del grupo ácido fosfínico, convirtiendo estos compuestos en análogos del estado de transición, propuesto para enzimas del tipo ligasas C:N, como lo son GspS y TryS.

Como resultado de esta modificación estructural se obtuvieron inhibidores potentes, tanto contra GspS de *Crithidia fasciculata* como contra TryS de *Trypanosoma cruzi* y, lo

que es más importante, estos resultados tuvieron una excelente correlación con ensayos de inhibición del crecimiento de cultivos de amastigotes de *T. cruzi*, la forma clínicamente más relevante de este parásito. El compuesto **144**, de cadena alquílica de 2 átomos de carbono, inhibió en un 99% la enzima GspS de *C. fasciculata* a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ , mostrando un  $\text{IC}_{50}$  de  $1,14 \pm 0,04 \mu\text{ M}$  y una  $K_i$  de  $0,37 \pm 0,02 \mu\text{M}$ . El compuesto **145**, de 3 átomos de carbono, fue en cambio el más potente contra TryS de *T. cruzi*, inhibiendo en un 99% dicha enzima a 500  $\mu\text{ M}$  y mostrando un  $\text{IC}_{50}$  de  $11,8 \pm 0,6 \mu\text{ M}$ . Finalmente el derivado de cadena alquílica de 4 carbonos fue el más potente contra cultivos de amastigotes de *T. cruzi*, inhibiendo el crecimiento en un 80% a una concentración de 50  $\mu\text{ M}$  y mostrando un  $\text{IC}_{50}$  de 9,8  $\mu\text{ M}$ . Cabe destacar que en el ensayo de inhibición del crecimiento parasitario los compuestos de cadena alquílica de menos de 4 átomos de carbono no inhibieron en forma detectable a los parásitos a concentraciones de hasta 50  $\mu\text{ M}$ . Esto resalta la importancia de las series homologadas en el diseño de inhibidores ya que el largo de la cadena alquílica influyó notoriamente en la lipofilicidad de los compuestos sintetizados, lo que fue de suma importancia en los ensayos realizados en cultivos celulares. Los compuestos menos lipofílicos, si bien fueron activos contra la enzima blanco, no fueron efectivos contra el parásito. El logro más importante del presente trabajo de Tesis es haber encontrado una estructura relativamente simple que es un potente inhibidor de la proliferación del agente responsable de la enfermedad de Chagas (*T. cruzi*) cuyo modo de acción se estableció sin ambigüedad como el camino biosintético de tripanotona. Teniendo en cuenta que las enzimas que catalizan los últimos pasos de la biosíntesis de tripanotona no se encuentran en el huésped, se puede anticipar que una inhibición altamente selectiva de estas enzimas no traerá aparejado toxicidad para el mamífero correspondiente.

Parte de este trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

**Glutathione-like tripeptides as inhibitors of glutathionylspermidine synthetase. Part 1: Substitution of the glycine carboxylic acid group.**

Amsoms K.; Oza S.L.; Ravaschino E.; Yamani A.; Lambeir A.; Rajan P.; Bal G., Rodriguez J., Fairlamb A.H., Augustyns K., Haemers A.. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2553-2556.

**Synthesis and biological evaluation of glutathione-like tripeptides against *Trypanosoma cruzi*.**

Ravaschino, E.L.; Docampo, R; Rodríguez, J.B. *Arkivok*, **2003**, (x), 298-313.

**Design, synthesis, and biological evaluation of phosphinopeptides against *Trypanosoma cruzi* targeting trypanothione biosynthesis.**

Ravaschino, E.L.; Docampo, R; Rodríguez, J.B. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 426-435.

**Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases.**

García Liñares, G.E.; Ravaschino, E.L.; Rodríguez, J.B. *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 335-60.

## Referencias



---

**Referencias**

1. <http://www.who.int/tdr/>
2. Brener, Z. *Annu Rev. Microbiol.* **1973**, *27*, 347–382.
3. De Souza, W. *Int. Rev. Cytol.* **1984**, *86*, 197–283.
4. Yoshida, Y.; Aoyama, Y. *Biochem. Pharm.* **1987**, *36*, 229–235.
5. Trzaskos, J.M.; Henry, M.J. *Antimicrob. Ag. Chemot.* **1989**, *33*, 1228–1231.
6. Brown, G. R.; Clarke, D. S.; Foubister, A. J.; Freeman, S.; Harrison, P. J.; Johnson, M. C.; Mallion, K. B.; McCormick, J.; McTaggart, F.; Reid, A. C.; Smith, G. J.; Taylor, M. J. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2971–2979.
7. Urbina, J. A.; Concepción, J. L.; Rancel, S.; Visual, G.; Lira, R. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *125*, 35–45.
8. Cinque, G. M.; Szajnman, S. H.; Zhong, L.; Docampo, R.; Rodriguez, J. B.; Gros, E. *G. J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1540–1554.
9. Elhalem, E.; Bailey, B. N.; Docampo, R.; Ujváry, I.; Szajnman S. H.; Rodriguez, J. B. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3984–3999.
10. Szajnman, S. H.; Yan, W.; Bailey, B. N.; Docampo, R.; Elhalem, E.; Rodriguez, J. B. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1826–1840.
11. Schwartzapel, A. J.; Zhong, L.; Docampo, R.; Rodriguez, J. B.; Gros, E. *G. J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2314–2322.
12. Schwartzapel, A. J.; Fichera, L.; Esteva, M. Rodriguez, J. B.; Gros, E. *G. Helv. Chim. Acta.* **1995**, *78*, 1207–1214.
13. Rodriguez, J. B.; Docampo, R.; Gros, E. *G. Int. J. Antimicrob. Agents.* **2000**, *13*, 215–218.
14. Field, H.; Blench, I.; Croft, S.; Field, M. C. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *82*, 67–80.
15. Yokoyama, K.; Lin, Y.; Stuart, K. D.; Gelb, M. H. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, *87*, 61–69.

16. Buckner, F.S.; Yokoyama, K.; Nguyen, L.; Grewal, A.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Strickland, C. L.; Xiao, L.; Van Voorhis, W. C, Gelb, M. H. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21870–21876.
17. Glomset, J. A.; Farnsworth, C. C. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **1994**, *10*, 181–205.
18. Fisher, J. E.; Rogers, M. J.; Halasy, J. M.; Luckman, S. P.; Hughes, D. E.; Masarachia, P. J.; Wesolowski, G.; Russell, R. G. G.; Rodan, G. A.; Reszka, A. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 133–138.
19. Urbina, J. A.; Moreno, B.; Vierkotter, S.; Oldfield, E.; Payares, G.; Sanoja, C.; Bailey, B. N.; Yan, W.; Scott, D. A.; Moreno, S. N. J.; Docampo, R. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33609–33615.
20. Montalvetti, A.; Bailey, B. N.; Martin, M. B.; Severin, G. W.; Oldfield, E.; Docampo, R. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 33930–33937
21. Martin, M. B.; Arnold, W.; Heath III, H. T.; Urbina, J. A.; Oldfield, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *263*, 754–758.
22. Szajnman, S. H.; Bailey, B. N.; Docampo, R. Rodriguez, J. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 789–792.
23. Szajnman, S. H.; Montalvetti, A.; Wang, Y.; Docampo, R. Rodriguez, J. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3231–3235.
24. Ling, Y.; Sahota, G.; Odeh, S.; Chan, J. M. W.; Araujo, F. G.; Moreno, S. N. J.; Oldfield, E. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3130–3140.
25. Tuttle, J.V.; Krienitsky, T.A. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 909–916.
26. Kager, P.A.; Rees, P.H.; Wellde, P.T.; Hockmeyer, W.T.; Lyerly, W.H. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1981**, *75*, 556–559.
27. Tabor, C.W.; Tabor, H. *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 749–790.
28. Gahl, W.A.; Pitot, H.C. *In Vitro*, **1979**, *15*, 252–257.
29. Poulin, R.; Lu, L.; Ackermann, B.; Bey, P.; Pegg, A.E. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 150–158.
30. Milford, F.; Pepin, J.; Loko, L.; Ethier, L.; Mpia, B. *Lancet* **1992**, *340*, 652–655.
31. Fairlamb, A.H.; Henderson, B.G.; Bacchi, C.J.; Cerami, A. *Mol. Biol. Parasitol.* **1987**, *24*, 185–191.

32. Phillips, M.A.; Coffino, P.; Wang, C.C. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 8721–8727.
33. Wang, C.C. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1–9.
34. Nelson, D.J.; Lafon, S.W.; Tuttle, J.V.; Miller, W.H.; Krenitsky, T.A.; Elion, G.B.; Berens, R.S.; Marr, J.J. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 11544–11549.
35. Looker, D.L.; Marr, J.J.; Berens, R.L. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 9412–9415.
36. Tuttle, J.V.; Krenitsky, T.A. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 909–916.
37. Fairlamb, A. H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B., T.; Cerami, A. *Science* **1985**, *227*, 1485–1487.
38. Flohé, L.; Hecht, J.; Steinert, P. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 966–984.
39. Augustyns, K.; Amsoms, K.; Yamani, A.; Rajan, P. K.; Haemers, A. *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *7*, 1117–1141.
40. Fairlamb, A.H.; Henderson, G.B.; Cerami, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1989**, *86*, 2607–2611.
41. Henderson, G. B.; Glushka, J.; Cowburn, D.; Cerami, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 911–914.
42. Fairlamb, A. H.; Cerami, A. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1985**, *14*, 187–198.
43. Shames, S. L.; Fairlamb, A. H.; Cerami, A.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **1986**, *25*, 3519–3526.
44. Fairlamb, A.H. *Annu. Rev. Microbiol.* **1992**, *46*, 695–729.
45. Montemartini, M.; Kalisz, H.M.; Hecht, H.-J.; Steinert, P.; Flohé, L. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 516–524.
46. Wilkinson, S.R.; Temperton, N.J.; Mondragon, A.; Kelly, J.M. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *175*, 8220–8225.
47. Steinert, P.; Dittmar, K.; Kalisz, H.M.; Montemartini, M.; Nogoceke, E.; Rodhe, M.; Singh, M.; Flohé, L. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 844–849.
48. Flohé, L.; Hecht, J.; Steinert, P. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 966–984.
49. Vickers T.J.; Wyllie S.; Fairlamb A.H. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 49003–49009.
50. Vickers T.J.; Fairlamb A.H. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 27246–27256
51. Lueder, D.V.; Phillips, M.A. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 17485–17490.
52. Drew, R.; Miners, J.O. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *33*, 2989–2994.

53. González, N.S.; Huber, A.; Algranati, I.D. *FEBS Lett.* **2001**, *508*, 323–326.
54. Kierszbaum, F.; Wirth, J.J.; McCann, P.P.; Sjoerdsma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 4278–4282.
55. Ariyanayagam, M.R.; Fairlamb, A.H. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, *84*, 111–121.
56. Hernández, S.; Schwarcz De Tarlovsky, M. *Cell. Mol. Biol.* **1999**, *45*, 383–391.
57. Pegg, A.E.; McCann, P.P. *ISI Atlas of Science* **1988**, 11–18.
58. Basselin, M.; Coombs, G.H.; Barret, M.P. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *109*, 37–46.
59. Henderson, G.B.; Yamaguchi, M.; Novoa, L.; Fairlamb, A.H.; Cerami, A. *Biochemistry* **1990**, *29*, 3924–3929.
60. Smith, K.; Nadeau, K.; Bradley M.; Walsh, C.; Fairlamb, A.H. *Prot. Sci.* **1992**, *1*, 874–883.
61. Koenig, K.; Menge, U.; Kiess, M.; Wray, V.; Flohé, L. *J. Biol. Chem.* **1997**, *18*, 11908–11915.
62. Bollinger, J.M.; Kwon, D.S.; Huisman, G.W.; Kolters, R.; Walsh, C.T. *J. Biol. Chem.* **1995**, *23*, 14031–14041.
63. Oza, S.L.; Ariyanayagam, M.R.; Fairlamb, A.H. *Biochem. J.* **2002**, *364*, 679–686.
64. Oza, S.L.; Tetaud, E.; Ariyanayagam, M.R.; Warnon, S.S.; Fairlamb, A.H. *J. Biol. Chem.* **2002**, *39*, 35853–35861.
65. Oza, S.L.; Ariyanayagam, M.R.; Aitcheson, N.; Fairlamb, A.H. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *131*, 25–33.
66. Oza, S.L.; Shaw, M.P.; Wyllie, S.; Fairlamb, A.H. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2005**, *139*, 107–116.
67. Ariyanayagam, M.R.; Oza, S.L.; Mehlert, A.; Fairlamb, A.H. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 27612–2769.
68. Henderson, G. B.; Murgolo, N. J.; Kuriyan, J, Osapay, K.; Kominos, D.; Berry, A.; Scrutton, N. S.; Hinchliffe, N. W.; Perham, R. N.; Cerami, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 8769–8773.

69. Krieger S.; Schwarz W.; Ariyanayagam M.R.; Fairlamb A.H.; Krauth-Siegel R.L.; Clayton C. *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 542–552.
70. Tovar J.; Wilkinson S.; Mottram J.C.; Fairlamb A.H. *Mol. Microbiol.* **1998**, *29*, 653–660.
71. Tovar J.; Cunningham M.L.; Smith A.C.; Croft S.L.; Fairlamb A.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1998**, *95*, 5311–5316.
72. Kuriyan, J.; Kong, X. -P.; Krishna, T. S. R.; Sweet, R. M.; Murgolo, N. J.; Field, H.; Cerami, A.; Henderson, G. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, *88*, 8764–8768.
73. Lantwin, C. B.; Schlichting. I.; Kabsch, W.; Pai. E. F.; Krauth-Siegel, R. L. *Proteins* **1994**, *18*, 161–173.
74. O’Sullivan, M. C.; Zhou, Q.; Li, Z.; Dirham, T. B.; Rattendi, D.; Lane, S.; Bacchi, C. *J. Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *12*, 2145–2155.
75. Smith, H.K.; Bradley, M. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 326–332.
76. Cenas, N.; Bironaite, D.; Dickancaite, E.; Anusevicius, Z.; Sarlauskas, J.; Blanchard, J.S.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204*, 224–229.
77. Wang, C.C. *Parasitology*, **1997**, *114*, S31–S44.
78. Cunningham, M. L.; Zvelebil, M. J.; Fairlamb, A. H. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *221*, 285–295.
79. Benson, T. J.; McKie, J. H.; Garforth J.; Borges A.; Fairlamb, A. H.; Douglas, K. T. *Biochem. J.* **1992**, *286*, 9–11.
80. De Craecker, S.; Verbruggen, C.; Padinchare, R.; Smith, K.; Haemers, A.; Fairlamb, A.H. *Mol. Biochem. Parasitol*, **1997**, *84*, 25.
81. Verbruggen, C.; De Craecker, S.; Rajan, P.; Jiao, X.-Y.; Borloo, M.; Smith, K.; Fairlamb, A.H.; Haemers, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 253–258.
82. Chen, S.; Lin, S.-H.; Walsh, C.T.; Coward, J.K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 505–510.
83. D’Silva, C.; Daunes, S.; Rock, P.; Yardley, V.; Croft, S. L. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2072–2078.

84. Silva, E.T.; Cuhna, A.S.; Lima, E.L.S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3207–3208.
85. Chantrapromma, K.; McManis, J.S.; Ganem, B. *Tet. Lett.* **1980**, *21*, 2475–2476.
86. Ponasik, J.A.; Kassab, D.J.; Ganem, B. *Tet Lett*, **1996**, *37*, 6041–6044.
87. Almeida, M.L.S.; Grehn, L.; Ragnarsson, U. *J. Soc. Perkin Trans. I*, **1988**, 1905–1911.
88. Chen, S.; Coward, J., K. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 502–509.
89. Hiratake, J.; Kato, H.; Oda, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12059–12060.
90. Lacoste, A.M.; Chollet-Gravey, A.M.; Vo-Quang, V.; Vo-Quang, Y.; Goffic, F.L. *Eur. J. Med. Chem.* **1991**, *26*, 255–260.
91. Milewski, S.; Hoffmann, M.; Andruszkiewicz, R.; Borowski, E. *Bioorg Chem.* **1997**, *25*, 283–296.
92. Freedman, L.D.; Doak, G.O. *Chem. Rev.*, **1957**, *57*, 479–523.
93. Boyd, E.A.; Regan, A.C.; James, K. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 4223–4226.
94. Boyd, E.A.; James, K.; Regan, A.C. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 813–816.
95. Thottathil, J.K.; Prxybyla, C.A.; Monoit, J.L. *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 4737–4740.
96. Mitchell, M.C.; Kee, T.P. *Coord. Chem. Rev.* **1997**, *158*, 359–383.
97. Chen, S.; Coward, J.K. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 502–509.
98. Quin, L.D. *A Guide to Organophosphorus Chemistry*, Wiley-Interscience, **2000**, Capítulo 2, pp. 10–10.
99. Quin, L.D. *A Guide to Organophosphorus Chemistry*, Wiley-Interscience, **2000**, Capítulo 5, pp. 137–137.
100. Olah, G.A.; Narang, S.C.; Balaram Gupta, B.G.; Malhotra, R. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1247–1251.
101. Deprele, S.; Monchamp, J.L. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6745–6755.
102. Soroka, M.; Zygmunt, J. *Synthesis.* **1988**, 370–372.
103. Amssoms K.; Oza S.L.; Ravaschino E.; Yamani A.; Lambeir A.; Rajan P.; Bal G., Rodriguez J., Fairlamb A.H., Augustyns K., Haemers A.. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2553–2556.

104. Comini, M.; Menge, U.; Wissing, J.; Flohé, L. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 6850–6860.
105. Ravaschino, E.L.; Docampo, R.; Rodríguez, J.B. *Arkivok*, **2003**, (*x*), 298–313.
106. Ravaschino, E.L.; Docampo, R.; Rodríguez, J.B. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 426–435.