

TESIS DOCTORAL

*Beta-o-glicosilación de péptidos
que incorporan aminoácidos no
naturales*

Alberto Fernández Tejada



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

*Beta-o-glicosilación de péptidos
que incorporan aminoácidos no
naturales*

Alberto Fernández Tejada

Universidad de La Rioja
Servicio de Publicaciones
2009

Esta tesis doctoral, dirigida por los doctores D. Jesús Manuel Peregrina García y D. Francisco Corzana López, fue leída el 16 de julio de 2009, y obtuvo la calificación de Sobresaliente Cum Laude

© Alberto Fernández Tejada

Edita: Universidad de La Rioja
Servicio de Publicaciones

ISBN Pendiente de asignación

UNIVERSIDAD DE LA RIOJA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ÁREA DE QUÍMICA ORGÁNICA

Grupo de Síntesis Química de La Rioja
U.A.-C.S.I.C.



TESIS DOCTORAL

β -O-GLICOSILACIÓN DE PÉPTIDOS
QUE INCORPORAN AMINOÁCIDOS
NO NATURALES

**Memoria presentada en la Universidad de La Rioja
para optar al grado de Doctor en Química por**

Alberto Fernández Tejada

Mayo 2009

A mis padres, por haber hecho de mí la persona que soy y realizar esta Tesis conmigo

A mi hermana, por su apoyo y por estar siempre ahí

A mi sobrina Sofía, por compartir estos cinco años de mi vida y llenarme de ilusión

A mi sobrino Sergio, por darme esa última gran alegría con su llegada al mundo

A mi abuela Vito, y a mis otros abuelos†, espero que estéis orgullosos de vuestro nieto

“La familia es base de la sociedad y el lugar donde las personas aprenden por vez primera los valores que les guían durante toda su vida”

Juan Pablo II

“El lugar donde nacen los niños y mueren los hombres, donde la libertad y el amor florecen, no es una oficina ni un comercio ni una fábrica. Ahí veo yo la importancia de la familia”

Gilbert Keith Chesterton

“Los únicos goces puros y sin mezcla de tristeza que le han sido dados sobre la Tierra al hombre, son los goces de la familia”

Giuseppe Mazzini

Pues sí, podía parecer que este momento no llegaría nunca, pero como en la vida, todo llega... Ciertamente, si de algo me he dado cuenta en estos cinco años, es que una Tesis Doctoral es como la vida misma.

Primero de todo, se necesita de alguien que te abra las puertas de una nueva experiencia. Me remontaré a los inicios. En mi caso, las puertas de la investigación científica se me abrieron gracias a Carmen Torres, Catedrática del Departamento de Agricultura y Alimentación, quien me permitió empezar a conocer el significado del verbo “investigar”. Fue en el Área de Bioquímica y Biología Molecular con prácticas tuteladas y con aquella Beca, no tan lejana, de Iniciación a la Investigación de la UR. Por ello, quería agradecer a Carmen desde estas líneas, a quien considero una gran investigadora y mejor persona.

Ya un año más tarde, fue otra beca, la de Colaboración del Ministerio de Educación y Ciencia, la excusa para iniciar mi camino en este grupo de investigación dirigido por Alberto Avenzo. Concretamente, Miguel Paris, mi primer profesor de prácticas en la licenciatura, fue la persona encargada de ayudarme a dar mis primeros pasos en la investigación en síntesis orgánica. Gracias Miguel por estar conmigo en esos inicios con aquellas reacciones de cicloadición [4+3].

A la conclusión de los seis meses de dicha beca, y ya licenciado, fue Alberto Avenzo quien me ofreció la posibilidad de, y cito textualmente, “dirigirme personalmente” para iniciar la Tesis Doctoral en su grupo de investigación. Por esto, no puedo más que estar eternamente agradecido a Alberto por haberme dejado pertenecer a esta “gran familia” y por transmitirme, tanto ya en la carrera como en el propio doctorado, su inagotable caudal de conocimientos en síntesis orgánica.

De esta manera, en las líneas precedentes ha quedado plasmado el breve recorrido previo a los cinco años de los que ha constado mi Tesis Doctoral.

Como decía antes, para mí, la Tesis Doctoral puede considerarse, aunque lógicamente en otra escala de tiempo menor, un fiel reflejo de lo que es la vida. Sin embargo y aunque pueda parecer un contrasentido, empezaré citando una “sutil” pero importantísima diferencia entre ambas. En la vida, las personas que te dan el regalo más grande, el don de vivir, son tus padres, y obviamente, no se eligen. Abro un breve paréntesis: Por supuesto, ni que decir tiene que es a ellos, a mis padres, Tomás y Begoña, a quienes dedico esta Tesis porque, sin haberlos elegido, han resultado ser los mejores. Más adelante volveré a hablar de ellos para agradecerles todo lo que han hecho por mí. Cierro paréntesis. Por el contrario, en la Tesis Doctoral, se puede escoger libremente, tanto el grupo de investigación del que se formará parte, como los directores que conducirán el trabajo a desarrollar y que, durante cinco años, serán en buena medida, parte fundamental de los éxitos o fracasos en el trabajo y, en consecuencia, de las alegrías o tristezas que se deriven de ello. Esta posibilidad de elección, que a priori, podría parecer una ventaja puede, quién sabe, no serlo tal en función de diversas circunstancias. En este sentido, quisiera dar las gracias a los dos directores de Tesis que *figuran* en este trabajo: Jesús M. Peregrina y Francisco Corzana.

Del primero, cariñosamente conocido como “Pere” por todos aquellos que hemos tenido la inmensa suerte de coincidir con él, no tengo más que palabras de agradecimiento por su interés desmedido y por su espectacular e inmediata dirección. Ha estado ahí siempre que lo he necesitado, desviviéndose por mí, sacrificando -incluso- tiempo de ocio de su vida personal si tenía entre manos asuntos urgentes relacionados con mi Tesis. Gracias de verdad, Pere.

Y de ti Paco, ¿qué más puedo decirte que no sepas, con todo lo que tú y yo hemos hablado? Te recuerdo vagamente en aquella cena de grupo hace unos seis años, en la que yo no era más que un simple becario de licenciatura. Me presentaron a esos jóvenes doctores del grupo de investigación y entre ellos, un *tal* Paco que, según me informaron, en aquella época se encontraba haciendo un “post-doc” en Madrid con un *tal* Juan Luis. Al año siguiente, año 2005, comencé a ver por los pasillos de la UR una cara que me “sonaba” de algo. Pues bien, casi sin darme cuenta, su despacho D-1116 empezó a convertirse en un lugar de visita habitual para mí. Allí bajaba cada vez que tenía alguna duda. Me encontraba con estupendas soluciones para resolverlas pero, sobre todo, con una enorme complicidad. Y así, sin apenas enterarme y sin elegirlo, esta maravillosa persona se estaba convirtiendo en mi director de Tesis. (A mis padres tampoco los pude escoger). Muchísimas gracias Paco. Por contagiarme tu pasión por la Química, por transmitirme la verdadera ilusión por investigar -algo que lamentablemente no abunda-. Quiero agradecerte especialmente por haber trabajado tantas y tantas horas para que las cosas, después de mucho esfuerzo, hayan dado sus frutos, y por lo que sigues trabajando para que las que aún quedan pendientes puedan, algún día, acabar saliendo por fin. En definitiva, por *tirar del carro*. Gracias también por todos los momentos tan bonitos que he tenido la suerte de compartir contigo, por ejemplo, de congresos. Espero que sigamos compartiendo muchos en el futuro. Cuenta conmigo. A pesar de los pesares, no dejes nunca de ser como eres. Sobre todo, no caigas en la, tan bien conocida, desidia ni en la indolencia, ni te instales en la mediocridad, porque puedes llegar a donde te propongas. Lo vales. Tú has hecho que todo esto me haya merecido la pena, amigo. Por todo ello, una vez más: GRACIAS PACO.

En ese paralelismo del que hablaba, personalmente, soy de la opinión que en la vida, la gran mayoría, al fin y a la postre, mira en último término para sí mismo, dando prioridad a sus propias circunstancias y relegando a un segundo plano las cosas que no son propias, aún siendo importantes para los demás. También, es obvio que en una Tesis

Doctoral, al igual que en la vida, se pasa por buenos, regulares y malos momentos. Evidentemente, es deseable que abunden los primeros, sin embargo, por desgracia, esto no es algo que dependa de uno mismo, sino del entorno que nos rodea. En este sentido, el papel que juegan los directores de tesis se me antoja crucial al respecto, para decantar la balanza hacia uno u otro lado. Y es que, en una Tesis Doctoral, el doctorando, aun con un interés y unas ganas tremendas, depende totalmente de las actuaciones de sus directores, en las que no puede otra cosa que confiar y *esperar*. De ellas va a depender, pues, su suerte o desdicha. En mi caso, además de los dos directores anteriormente citados, debo mencionar y agradecer muy afectuosamente a un tercero: a Héctor.

Como digo, el tercer director de esta tesis, al que le estoy profundamente agradecido por muchas cosas. Él fue quien, en ese año 2004 cuando empezaba, estuvo conmigo en todo momento, como no ha dejado de estarlo ni un solo instante de estos cinco años. A pesar de dirigir también a otros de los miembros del grupo en temáticas diversas, como la relacionada con el análisis de vino por RMN, siempre ha repartido perfectamente su tiempo y ha sabido multiplicarse y organizarse con maestría para nunca dejar de lado el análisis conformacional de los compuestos que yo sintetizaba en el campo de la “glico”. Gracias por tu buena disposición siempre y por toda la atención prestada a lo largo de este tiempo y, más recientemente, en la elaboración de esta memoria. Sin tu ayuda, seguro que la Tesis no hubiera sido la misma.

También quiero agradecer a Mari Mar por su excelso trabajo en la resolución de las estructuras de rayos X, aunque lamentablemente, no haya podido darle cristales de alguno de los glicopéptidos finales. Igualmente, gracias por tu carácter fresco y por esa labor oscura en el pedido de reactivos y material de laboratorio.

Fer, ha sido un placer compartir este último año de mi Tesis contigo. Me alegro mucho de que hayamos coincidido en el laboratorio, codo con codo casi en nuestras

mesas. Se necesitaba gente como tú arriba, por tu experiencia y conocimientos en Química y, especialmente, por tu buen humor y tus risas. Has hecho un esfuerzo encomiable, digno de agradecer, por todo ese tiempo que has invertido en la puesta a punto del aparato de HPLC y por intentar la purificación de algunos de “mis” compuestos. Lo siguiente, a poner en marcha el sintetizador de péptidos.

Además, también quisiera agradecer a Pedro y a Miguel Ángel por su gran labor en beneficio de la Licenciatura y el Doctorado en Química, así como por su carácter amable que ha ayudado a lograr un buen ambiente de convivencia entre ambos grupos, sobre todo en las cenas que hemos disfrutado juntos, con Diego, Alberto, Susana, Roberto, Rafa, Laura, Alegría, Marina... Gracias y buena suerte.

Una vez más, en este periodo de cinco años de la Tesis, como en la vida, vienen y van personas, unas salen y otras entran, unos se convierten en amigos -los menos, por desgracia- y otros, simplemente, sólo habrán sido compañeros de trabajo. Es así.

De toda esta gente quisiera acordarme, sobre todo, de Gonzalo. Él sabe que ha sido como mi hermano mayor. Hemos compartido momentos grandiosos, no sólo de ciencia sino en general. Me has enseñado mucho de Química y fue una auténtica gozada pasar más de la mitad de este tiempo disfrutando de tu presencia, de tus sabios consejos, de tus risas. Lástima que, lógicamente, algún día tenías que leer tu Tesis, porque desde que te marchaste, el laboratorio te empezó a echar de menos. Seguimos en contacto, amigo. ¡Que vaya todo genial!

También me acuerdo de Marta, que me ayudó muy amablemente en mi primer año y a la que le deseo que las cosas salgan bien.

Por último, unas palabritas para el resto del grupo -suerte con el vino, Eva y mucha paciencia para los que empezáis, chavales, os hará falta- y para los inorgánicos.

De estos, quiero destacar a un “aurón” y a un “platinero”. Primero a Jorge, el de las nanopartículas de plata. Un gran amigo ya en la carrera y todavía por supuesto en el doctorado. ¡Cómo olvidar nuestras interminables conversaciones de cualquier tipo, todas las carcajadas que nos hemos echado juntos! Cuídate y sigue siendo como eres, amigo. ¡Nos vemos! Y el platinero es Ángel, bueno, déjame escribirlo: Sepúlveda. Me acuerdo de esos años de licenciatura en los que compartimos más de una vez sitio, y ahora hemos compartido RMN en este caso. Mucho ánimo con lo que te queda por delante y que salgan las cosas lo mejor posible.

Además, un saludo desde estas líneas para José Ángel. Ya coincidimos en la carrera, y hemos vuelto a hacerlo en tercer ciclo. Estuvo genial el congreso de Santiago, ya seguiremos hablando para arreglar el mundo. ¡Jaja! Suerte con la Tesis.

Last but no least, no me puedo olvidar del *Professor* David Gin por darme la maravillosa oportunidad de realizar mi estancia breve bajo su supervisión en el *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* de NY. Quisiera agradecerle enormemente tanto a él como a los miembros de su grupo de investigación, el haber hecho de aquellos cuatro meses en 2008 la mejor experiencia sin duda de estos cinco años y, posiblemente, también de mi vida hasta ahora. *Thanks a lot* Dave, Danielle, Jeremy, Mike, Jun, Dan, Sudeep, Shelly, Nick, Roman, Yuan, Eric, Rashad y Matt. Me hicisteis todos sentir como en casa, o mejor incluso. *See you guys!*

Lógicamente, aunque ya estas personas no son científicos ni investigadores, quiero mandar un abrazo muy fuerte también a mis amigos, especialmente a Edi y a David, y a

esas personas -que ellas ya saben quiénes son- que en este último año de Tesis me han apoyado mucho y me han dado tantos ánimos en esta fase de escritura. ¡Gracias!

Bueno, y ahora ya sí acabo, con quién si no, con mis familiares: primos -Berta y Belén entre ellos-, tíos, mi abuela Vito y mis otros abuelos[†] -ojalá estuvieseis aquí-, de los que también me acuerdo. Para terminar con esa comparación que he establecido en estas páginas, son éstas las únicas personas que al fin y al cabo están ahí con uno hasta el final y en quienes se puede confiar con total seguridad por que nunca, nunca, van a fallar. Sobre todo, agradezco a mis padres.

Infinitas gracias mamá y papá. Vosotros conocéis perfectamente cómo han sido todos estos años para mí, habéis disfrutado conmigo mis alegrías y sufrido mis momentos más duros, que, como bien sabéis, siempre han sido por lo mismo y han venido del mismo sitio. Pero bueno, hemos llegado al final de este primer camino, aunque me queda mucho por recorrer. Gracias por escucharme siempre, por apoyarme en cada una de mis decisiones, por tener conmigo toda la paciencia que yo he tenido que tener también.

Por supuesto, me acuerdo, cómo no, de mi hermana Beatriz que, aunque a veces no entendía exactamente de lo que le hablaba, siempre me ha ayudado y ha estado junto a mí. Ella, junto con mi cuñado, me ha dado, sin dudar, las mayores alegrías de estos cinco años: Sofía y Sergio, los dos niños más bonitos del mundo. Tatita: con cinco añitos, sé que todavía no comprendes nada de todo lo que es esto, pero enseguida podrás leer este agradecimiento y te pondrás contenta y sonreirás. Te quiero muchísimo, gracias por toda la ilusión que me das día tras día para trabajar. Y a ti, Sergio, ¿qué te voy a decir si apenas tienes dos mesecitos?... pues que ¡te adoro mi bebé chiquitín!

Por otro lado, y ya para finalizar, me gustaría agradecer a las siguientes instituciones la ayuda económica aportada para la realización de este proyecto:

- Ministerio de Educación y Ciencia, por la beca F.P.U. concedida en el 2005 para la realización de la Tesis Doctoral así como para la estancia breve en el extranjero.
- Universidad de La Rioja, por su apoyo en forma de proyectos (API) y ayudas a tesis doctorales (ATUR), así como por conformar el marco humano y tecnológico idóneo para el desarrollo de este trabajo.
- Comunidad Autónoma de La Rioja, por su aportación económica en forma de proyectos ANGI.
- Dirección General de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia por su aportación económica a los proyectos *“Síntesis estereoselectiva de hidroxiaminoácidos conformacionalmente restringidos. Síntesis y análisis conformacional en agua de glicoaminoácidos y glicopéptidos”* (CTQ2005–06235) y *“Síntesis estereoselectiva de hidroxiaminoácidos conformacionalmente restringidos. Síntesis y análisis conformacional de O-glicoaminoácidos y O-glicopéptidos modelo de interés biológico”* (CTQ2006–05825/BQU).

“Si quieres que algo se haga, encárgaselo a una persona ocupada”

(Proverbio chino)

“La constancia es la virtud por la que todas las cosas dan su fruto”

(Arturo Graf)

“Sin embargo, hay un límite en el que la paciencia deja de ser una virtud”

(Edmund Burke)

“Dar ejemplo no es la principal manera de influir sobre los demás; es la única manera”

(Albert Einstein)

Abstract

Herein we present the synthesis and the conformational study of different peptides and glycopeptides containing non-natural amino acids as well as of the simplest model glycopeptides derived from β -GlcNAc-Ser/Thr.

In the first chapter of “Results and Discussion” section, the synthesis and conformational analysis in aqueous solution of different α -methyl- α -amino acid diamides, derived from serine, threonine, β -hydroxycyclobutane- α -amino acids and their corresponding model β -*O*-glycopeptides, are reported. The study reveals that the presence of an α -methyl group forces the model peptides to adopt helix-like conformations. These folded conformations are especially significant for cyclobutane derivatives. Interestingly, this feature was also observed in the corresponding model glycopeptides, thus indicating that the α -methyl group and not the β -*O*-glucosylation process largely determines the conformational preference of the backbone in these structures. On the other hand, atypical conformations of the glycosidic linkage were experimentally determined. Therefore, when a methyl group was located at the C β atom with an *R* configuration, the glycosidic linkage was rather rigid. Nevertheless, when the *S* configuration was displayed, a significant degree of flexibility was observed for the glycosidic linkage, thus showing both alternate and eclipsed conformations of the ψ_s dihedral angle. In addition, some derivatives exhibited an unusual value for the ϕ_s angle, which was far from a value of -60° expected for a conventional β -*O*-glycosidic linkage. In this sense, the different conformations exhibited by these molecules could be a useful tool in obtaining systems with conformational preferences “à la carte”.

With the intention of expanding our novel small systems, we have synthesized larger glycopeptides derived from the sequence Thr-Ala-Ala in which the threonine residue has

been replaced by non-natural amino acids as well. Their conformational analysis shows, in general terms, the same conclusions as above, thus indicating that the elongation of the backbone does not seem to drastically affect the conformational preferences of these glycopeptides. In contrast to other investigations, where, in most cases, glycosylation of peptides results in induction of turn conformations, it is worth noting that β -*O*-glucosylation of the non-natural cyclobutane tripeptide is responsible for relaxing the turn conformation within the glucopeptide.

To go one step further, and taking into account the biological significance of the epidermal growth factor (EGF), the synthesis of the glucopeptide incorporating the consensus sequence for *O*-glucose modification in EGF-like repeats: Cys-Ala-Ser-Ser-Pro-Cys, is reported. In addition, we have synthesized a novel glycopeptide and its corresponding peptide, in which the underlying serine residue has been replaced by the non-natural amino acid (*S*)- α -methylserine.

Finally, despite the important role that β -*O*-GlcNAc glycosylation plays in fundamental biological processes, sparse information has been reported to date concerning the geometry and dynamics of β -*O*-GlcNAc-Ser/Thr motifs. For this reason, we report the synthesis and conformational analysis of the simplest model glycopeptides derived from Ser and Thr glycosylated with β -*O*-GlcNAc. The results demonstrate a distinct behavior for the ψ_s torsion angle of the glycosidic linkages of both compounds allowing the carbohydrate moiety to adopt a completely different orientation. As a consequence, water pockets at key sites in both Ser and Thr derivatives, as well as specific hydrogen bonds in the latter, are the responsible agents for modulating sugar-peptide interactions in these β -*O*-GlcNAc glycopeptides. It is likely that these solvent pockets have important biological implications, providing the required presentation of the GlcNAc moieties to interact with their biological receptors. In order to compare the effect

of the substitution of these amino acids by non-natural ones, their analogues with (*S*)- α -MeSer and (*3R,2S*)- α -MeThr have been also synthesized. The conformational analysis of these molecules shows similar results to their natural partners. Interestingly, a high degree of flexibility is observed for the former whereas the MeThr derivative displays a significant rigidity.

ÍNDICE

Abreviaciones	I
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	19
2.1. Síntesis	25
2.1.1. Formación del enlace O-glicosídico	25
2.1.2. Formación del enlace peptídico	47
2.2. Análisis conformacional de péptidos y glicopéptidos.....	67
2.2.1. Estructura de los péptidos y glicopéptidos	68
2.2.2. Técnicas de RMN	88
2.2.3. Dinámica Molecular.....	93
2.3. Objetivos específicos.....	100
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	107
3. GLICOPÉPTIDOS MODELO QUE INCORPORAN AMINOÁCIDOS NO NATURALES	109
3.1. Introducción	111
3.2. Discusión de resultados	114
3.2.1. Síntesis	114
3.2.2. Estudio conformacional de los péptidos modelo.....	120
3.2.3. Estudio conformacional de los glicopéptidos modelo	133
3.2.4. Resumen del estudio conformacional de los péptidos y glicopéptidos modelo	147
3.3. Conclusiones	152

4. GLUCOPÉPTIDOS QUE INCORPORAN LA SECUENCIA	
Xaa-Ala-Ala	155
4.1. Introducción	157
4.2. Objetivos	159
4.3. Discusión de resultados	160
4.3.1. Síntesis	160
4.3.2. Estudios de RMN y DM	167
4.4. Conclusiones generales	195
5. GLICOPÉPTIDOS DE INTERÉS BIOLÓGICO CON LA	
SECUENCIA Cys-Ala-Xaa-Ser-Pro-Cys	199
5.1. Introducción	201
5.2. Objetivos	205
5.3. Discusión de resultados	207
5.3.1. Síntesis	207
6. GLICOPÉPTIDOS MODELO DERIVADOS DE β-O-GlcNAc	215
6.1. Introducción	217
6.2. Discusión de resultados	221
6.2.1. Síntesis	221
6.2.2. Estudios de RMN y DM	226
7. CONCLUSIONES	247
8. SECCIÓN EXPERIMENTAL	255

Abreviaciones

$[\alpha]_D^X$	rotación específica
δ	desplazamiento químico
ϵ	constante dieléctrica
ΔE	variación de energía
μL	microlitro
μm	micrómetro
$^{\circ}\text{C}$	grado Celsius
$^1\text{H RMN}$	resonancia magnética nuclear de protón
$^{13}\text{C RMN}$	resonancia magnética nuclear de carbono-13
\AA	angström
A	alanina
AA	aminoácido
Ac	acetilo
AcCl	cloruro de acetilo
Ac_m	acetamidometil
AcOH	ácido acético
Ac₂O	anhídrido acético
AcOEt	acetato de etilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
Ala	alanina
All	alilo
Aloc	aliloxicarbonil
Arg	arginina
ARN	ácido ribonucleico
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
B	base
BHE	barrera hemato-encefálica
Bn	bencilo
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
Boc₂O	di- <i>tert</i> -butil dicarbonato

BOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il- <i>N</i> -oxil-tris(dimetilamino)fosfonio
Bu	butilo
^tBu	<i>tert</i> -butilo
BuOH	butanol
^tBuOK	<i>tert</i> -butóxido potásico
Bz	benzoato
C	cisteína, carbono
c	concentración (g/100 mL), cuatriplete
c₄Ser	análogos cíclicos de 4 miembros de serina
CAN	ceric amonium nitrate (nitrato de cerio y amonio)
Cbz	benciloxicarbonilo
CH₂Cl₂	diclorometano
CH₃CN	acetonitrilo
CHARMM	<i>Chemistry at HARvard Molecular Modelling</i>
cm	centímetro
col.	colaboradores
conc.	concentrado
cos	coseno
COSY	<i>COrelated SpectroscopY</i>
CSI	<i>Chemical Shift Index</i> (índice de desplazamiento químico)
Cys	cisteína
D	dador, deuterio
d	doblete, día
DC	dicroísmo circular
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
dcha	derecha
DCM	diclorometano
dd	doblete de dobletes
DFT	teoría del funcional de la densidad
Dhbt	3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazo-3-il
DIEA	diisopropiletilamina
DIC/DIPCDI	<i>N, N'</i> -diisopropilcarbodiimida
dm	decímetro
DM	dinámica molecular

DM_{H2O}-tar	dinámica molecular con restricciones promediadas en el tiempo en agua explícita
DM_{H2O}	dinámica molecular sin restricciones con agua explícita
DM-tar	dinámica molecular con restricciones promediadas en el tiempo
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMDO	dimetildioxirano
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DMTST	dimetil(metiltio)sulfoniotrifluorometano
dt	doble de tripletes
DTBMP	2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilpiridina
Dts	ditiosuccinilo
E	electrófilo, energía, ácido glutámico
EDC/EDCI	1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
Ed., Eds.	editor, editores
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (factor de crecimiento epidérmico)
EI	electrófilo
EM	espectrometría de masas
Equiv./eq	equivalente
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (ionización por electrospray)
Et	etilo
Et₃N	triethylamina
Et₂O	éter dietílico
EtOH	etanol
Exp./Exptl.	experimental
F	fenilalanina
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo
Fuc	fucosa
g	gramo
g(+)	<i>gauche</i> (+)
g(-)	<i>gauche</i> (-)
G	glicina
Gal	galactosa
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
Glc	glucosa

GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina
Gly	glicina
Gs	grupo saliente
h	hora
H	histidina, protón
HATU	hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-Aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HBTU	hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(1H-benzotriazol-1-il)-dimetilaminometil]- <i>N</i> -metilmetanaminio
His	histidina
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMPA	ácido 4-hidroximetilfenoxiacético
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	hercios
IR	<i>Infrared Spectroscopy</i> (espectroscopía de infrarrojo)
ISPA	<i>Isolated Spin Par Approach</i> (aproximación de espines aislados)
izqda.	izquierda
<i>J</i>	constante de acoplamiento
K	grado Kelvin, lisina
Kcal	kilocaloría
l	líquido
L	leucina
m	multiplete
M	molaridad, metal
MABr	bis(2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-bromofenóxido) de metilaluminio
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz)
Man	manosa
MM	mecánica molecular
Me	metilo
MeCN	acetonitrilo
MeNH₂	metilamina
MeOH	metanol

MeONa	metóxido de sodio
MeSer	metilserina
MeThr	metiltreonina
mg	miligramo
min	minutos
mL	mililitro
mm	milímetro
mmol	milimol
ms	milisegundos
Ms	mesilo
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (espectrometría de masas)
m/z	relación masa/carga
N	normalidad, asparagina
NBO	<i>Natural Bonding Orbitals</i>
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimida
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
Nu	nucleófilo
OAlI	éster alílico
ORTEP	<i>Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot</i>
<i>p</i>-TsOH	ácido <i>p</i> -toluensulfónico
P	prolina
Pág./p.	página
Pfp	pentafluorofenilo
Ph	fenilo
Phe	fenilalanina
Piv	pivaloilo
PNP	<i>para</i> -nitrofenol
Pob	población
PPII	poliprolina II
ppm	partes por millón
Pro	prolina
prod.	producto
¹PrOH	2-propanol
ps	picosegundos

Py	piridina
PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il- <i>N</i> -oxil-tris(pirrolidin) fosfonio
R	sustituyente alquilo o arilo, arginina, distancia, configuración
RDF	<i>Radial Distribution Function</i> (función de distribución radial)
Rdto.	rendimiento
Ref. /ref.	referencia
RMN	resonancia magnética nuclear
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
s	singlete, azúcar (del inglés <i>sugar</i>)
S	serina
sa	singlete ancho
sat.	saturado
Ser	serina
Sia	ácido siálico
STD	<i>Saturation Transfer Difference</i>
t	triplete, tiempo
‘t’	pseudotriplete
T	temperatura, treonina
ta	temperatura ambiente
TBAF	fluoruro de tetrabutilamonio
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsililo
TBDPS	<i>tert</i> -butildifenilsililo
TBTU	tetrafluoroborato de <i>O</i> -benzotriazol-1-il- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
Tcoc/Troc	<i>N</i> -tricloroetoxicarbonilo
Tcp	tetracloroftaloil
TFA	ácido trifluoroacético
Tf	triflato
Tf₂O	anhídrido triflico
THF	tetrahidrofurano
Thr	treonina
TMS	trimetilsililo, tetrametilsilano
TMSOTf	triflato de trimetilsililo
TOTU	tetrafluoroborato de <i>O</i> -((etoxicarbonil)cianometilen amino)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
tr-NOE	NOE transferido

Tyr	tirosina
V/Val	valina
X	halógeno, grupo saliente
Xaa	aminoácido
Xyl	xilosa
Y	tirosina, promotor
Z	funcionalidades varias

1

Introducción

Todos los seres vivos están formados por el mismo tipo de moléculas y éstas gobiernan cada una de sus funciones. En este contexto, la Química ha tratado de correlacionar las funciones que realizan las biomoléculas con su estructura. En concreto, a esta característica se la conoce como relación estructura-actividad. Por lo tanto, hoy en día, es muy importante conocer la estructura de las biomoléculas para así poder inducir en ellas cambios estructurales que modifiquen y mejoren sus funciones biológicas. En la actualidad, las técnicas más utilizadas para la determinación estructural de biomoléculas son la resonancia magnética nuclear (RMN) y la difracción de rayos X. Si bien esta última sólo aporta información del estado sólido, la RMN es una técnica capaz de determinar la estructura en disolución acuosa, reproduciendo así el medio fisiológico en el que se encuentran estos compuestos.

Por otro lado, las bases de la biología molecular moderna se asientan en el modelo de transmisión de la información biológica desde el ADN hasta el ARN y de éste hasta las proteínas. A pesar de que durante años se ha creído que las proteínas son las responsables de dicha transmisión, en la actualidad se sabe que este mecanismo es mucho más complejo, y en él juegan un papel fundamental los glicoconjugados (compuestos formados por uniones covalentes de distintos carbohidratos a lípidos o proteínas). En este sentido, los carbohidratos están omnipresentes en la Naturaleza y no hay duda de que los elaborados complejos de los que forman parte en la superficie de las células son la clave para entender un gran número de complicados procesos biológicos.¹ Sin embargo, dada su complejidad y diversidad estructural, junto con el hecho de que su biosíntesis no pueda predecirse directamente del ADN -como es el caso de las proteínas- su estudio en muchos de esos procesos biológicos ha sufrido un retraso con respecto a otras biomoléculas, como los lípidos y las proteínas. No obstante, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías, en los

¹ Gamblin, D. P.; Scanlan, E. M.; Davis, B. G. *Chem Rev.* **2009**, *109*, 131-163.

últimos años, se ha abierto una nueva área de investigación en el campo de la biología molecular denominada *glicobiología*.² En su sentido más amplio, la glicobiología abarca el estudio de la estructura, biosíntesis y biología de carbohidratos que están extensamente distribuidos en la Naturaleza, siendo uno de los campos que más rápidamente ha crecido dentro de las ciencias biomédicas, con relevancia en la biomedicina y la biotecnología.

Importancia biológica de los glicopéptidos y glicoproteínas

De entre los diversos glicoconjugados la importancia biológica de glicopéptidos y glicoproteínas está fuera de toda duda. Por ejemplo, se sabe que poseen un papel fundamental en procesos tan diversos como la fertilización, el desarrollo neuronal, la actividad hormonal, la respuesta inmune y en procesos inflamatorios.³ Los carbohidratos orientados hacia el espacio extracelular en las glicoproteínas unidas a la membrana celular de las células huésped son a menudo utilizados por los patógenos para su entrada en la célula con la consiguiente invasión inmunológica.⁴ Además de su importancia en los procesos de comunicación célula-célula, un aspecto interesante de estos glicanos es su papel post-traducciona como “control de calidad” en la síntesis de proteínas.⁵ Es bien sabido que los carbohidratos unidos a la proteína alteran la estructura y en consecuencia

² (a) *Essentials of Glycobiology* (Eds.: Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J., Freeze, H., Hart, G. W., Marth, J.), Cold Spring Harbor Labs, Cold Spring Harbor, New York, **1999**; (b) Pratt, M. R.; Bertozzi, R. C. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 58-68; (c) Van den Steen, P.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Opendakker, G. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *33*, 151-208; (d) Strous, G. J.; Dekker, J. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1992**, *27*, 57-92; (e) Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720; (f) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130; (g) *Glycopeptides and Glycoproteins: Synthesis, Structure, and Application* en *Topics in Current Chemistry*, (Ed.: Wittmann, V.), Springer-Verlag, Berlín, vol. 267, **2007**.

³ (a) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science* **2001**, *291*, 2357-2364; (b) Rudd, P. M.; Elliot, T.; Cresswell, P.; Wilson, I. A.; Dwek, R. A. *Science* **2001**, *291*, 2370-2376; (c) Talbot, P.; Shur, B. D.; Myles, D. G. *Biol. Reprod.* **2003**, *68*, 1-9; (d) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.

⁴ Karlsson, K.-A. *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, *12*, 265-272.

⁵ Helenius, A. *Mol. Biol. Cell* **1994**, *5*, 253-265; (b) Helenius, A.; Aebi, M. *Science* **2001**, *291*, 2364-2369; (c) Trombetta, E. S.; Helenius, A. *Curr. Opin. Struct Biol.* **1998**, *8*, 587-592.

la función de ésta.^{4,6} Además, la glicosilación parece aumentar la estabilidad de la proteína reduciendo su vulnerabilidad a la degradación proteolítica, lo cual ayuda a su transporte.⁷ Finalmente, una glicosilación anormal está asociada con fallos en el sistema inmune así como con enfermedades infecciosas y cáncer.

Los carbohidratos alteran también otras propiedades fisicoquímicas de las proteínas. Por ejemplo, las denominadas glicoproteínas anticongelantes⁸ permiten sobrevivir a temperaturas muy bajas a animales que habitan en aguas polares. Estas glicoproteínas inhiben el crecimiento de cristales de hielo en su interior, evitando así la congelación de los fluidos de estos organismos vivos y han suscitado un enorme interés en medicina y en la industria.

Por lo tanto, la glicosilación de proteínas permite a los sistemas biológicos ampliar claramente la información contenida en el genoma. De hecho, las modificaciones post-traduccionales, como en las que intervienen los carbohidratos, pueden en parte explicar una de las paradojas actuales más importantes en ciencia. Y es que las funciones biológicas de las proteínas son mucho más variadas de lo que cabría esperar en comparación con el relativamente limitado código genético.⁹ Así, la alteración de las cadenas laterales de los aminoácidos mediante glicosilación conduce a una mayor diversidad estructural y funcional en las proteínas, lo cual explicaría la aparente incongruencia anterior.¹⁰

⁶ Park, H.; Suzuki, T.; Lennarz, W. J. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **2001**, *98*, 11163-11168.

⁷ Opdenakker, G.; Rudd, P. M.; Ponting, C. P.; Dwek, R. A. *FASEB J.* **1993**, *7*, 1330-1337.

⁸ (a) Chen, L.; Devries, A. L.; Cheng, C.-H. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 3817-3822; (b) Tsvetkova, N. M.; Phillips, B. L.; Krishnan, V. V.; Feeney, R. E.; Fink, W. H.; Crowe, J. H.; Risbud, S. H.; Tablin, F.; Yeh, Y. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 464-473.

⁹ Davis, B. G. *Science* **2004**, *303*, 480-482.

¹⁰ van Kasteren, S. I.; Kramer, H. B.; Jensen, H. H.; Campbell, S. J.; Kirkpatrick, J.; Oldham, N. J.; Anthony, D. C.; Davis, B. G. *Nature* **2007**, *446*, 1105-1109.

¿Por qué la Naturaleza utiliza carbohidratos?

La necesidad de los carbohidratos en procesos biológicos puede explicarse debido al gran número de estructuras que pueden formar -que supera con creces al de proteínas y ácidos nucleicos- y en consecuencia, la Naturaleza parece explotar esta enorme diversidad estructural para transmitir información a nivel molecular.¹¹ Además de su inherente variedad configuracional (gluco, mano, etc.), la adicional diversidad debida al tamaño del anillo, la ramificación, configuración anomérica y modificaciones varias (acilación, fosforilación...) otorga a los carbohidratos un enorme potencial. Esta intrínseca variabilidad estructural está directamente relacionada con su amplio rango de funciones en la Naturaleza.

Sin embargo, la alta heterogeneidad tiene como consecuencia la dificultad de obtener glicoproteínas puras, necesarias para el análisis estructural y funcional de las cadenas de oligosacáridos. Por ello, a pesar de la obvia importancia de los carbohidratos, el acceso al entendimiento del papel que juega la glicosilación es más bien limitado.¹² Para lograr comprender en profundidad la función de estos carbohidratos a nivel molecular es esencial tener acceso a glicoproteínas uniformes y estructuralmente definidas. Actualmente, la síntesis química parece ser la manera más adecuada de obtener glicopéptidos o glicoproteínas homogéneos.

Las glicoproteínas se caracterizan por poseer uno o más restos carbohidrato covalentemente unidos a la cadena peptídica mediante lo que se denomina un enlace glicosídico (que puede ser α ó β) (figura 1).

¹¹ Laine, R. A. *Glycobiology* **1994**, *4*, 759-767.

¹² Buskas, T.; Ingale, S.; Boons, G.-J. *Glycobiology* **2006**, *16*, 113R-136R.

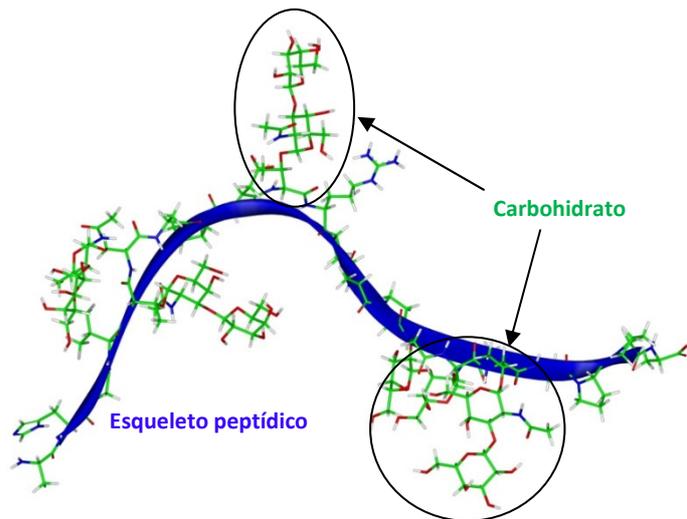


Figura 1. Representación esquemática de una glicoproteína.

Químicamente, estos carbohidratos están enlazados a la cadena peptídica por un enlace tipo éter al grupo hidroxilo de serina (Ser), treonina (Thr) o tirosina (Tyr) (enlace *O*-glicosídico) o mediante un enlace amida a la cadena lateral de una asparagina (Asn) situada en la secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr (enlace *N*-glicosídico)¹³ (figura 2).

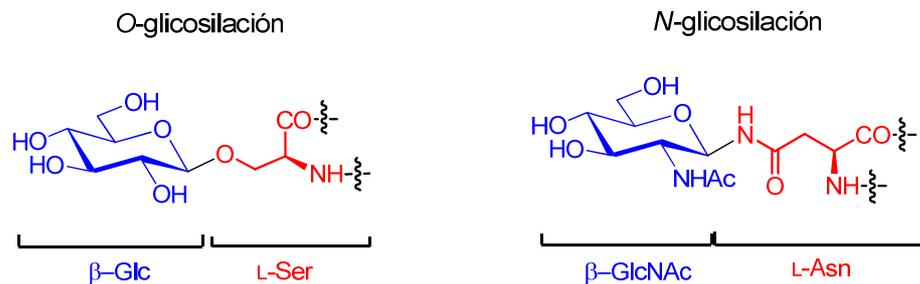


Figura 2. Tipos principales de glicosilación.

¹³ Hojo, H.; Nakahara, Y. *Biopolymers* **2007**, *88*, 308-324.

En eucariotas, uno de los tipos de *O*-glicoproteínas más importantes lo constituyen las mucinas. Éstas se encuentran en la membrana de muchas células epiteliales y se caracterizan por poseer varias serinas y treoninas consecutivas glicosiladas con α -*O*-*N*-acetilgalactosamina (α -*O*-GalNAc) como primer carbohidrato. Las mucinas están involucradas en un gran número de procesos biológicos como en la protección celular frente a patógenos (bacterias y virus) y en los procesos de inflamación y de respuesta inmunológica.^{2c,14} De hecho, algunas mucinas se emplean como marcadores en el diagnóstico de ciertos tipos de cáncer.

Por otro lado, las glicoproteínas glicosiladas con β -*O*-*N*-acetilglucosamina (β -*O*-GlcNAc) son también muy abundantes y poseen funciones biológicas de gran importancia. Por ejemplo, están involucradas en enfermedades degenerativas y diabetes.

Existen otros tipos de glicosilación menos frecuentes pero también importantes,¹² como por ejemplo con α -manosa¹⁵ (α -Man), α -fucosa¹⁶ (α -Fuc), β -xilosa (β -Xyl) o β -glucosa (β -Glc).

En la siguiente figura se resumen las seis clases principales de *O*-glicosilación.

¹⁴ (a) Lowe, J. B. *Cell* **2001**, *104*, 809-812; (b) Tachibana, Y.; Fletcher, G. L.; Fujitani, N.; Tsuda, S.; Monde, K.; Nishimura, S.-I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 856-862.

¹⁵ Strahl-Bolsinger, S.; Gentsch, M.; Tanner, W. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1426*, 297-307.

¹⁶ Haltiwanger, R. S. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 593-598.

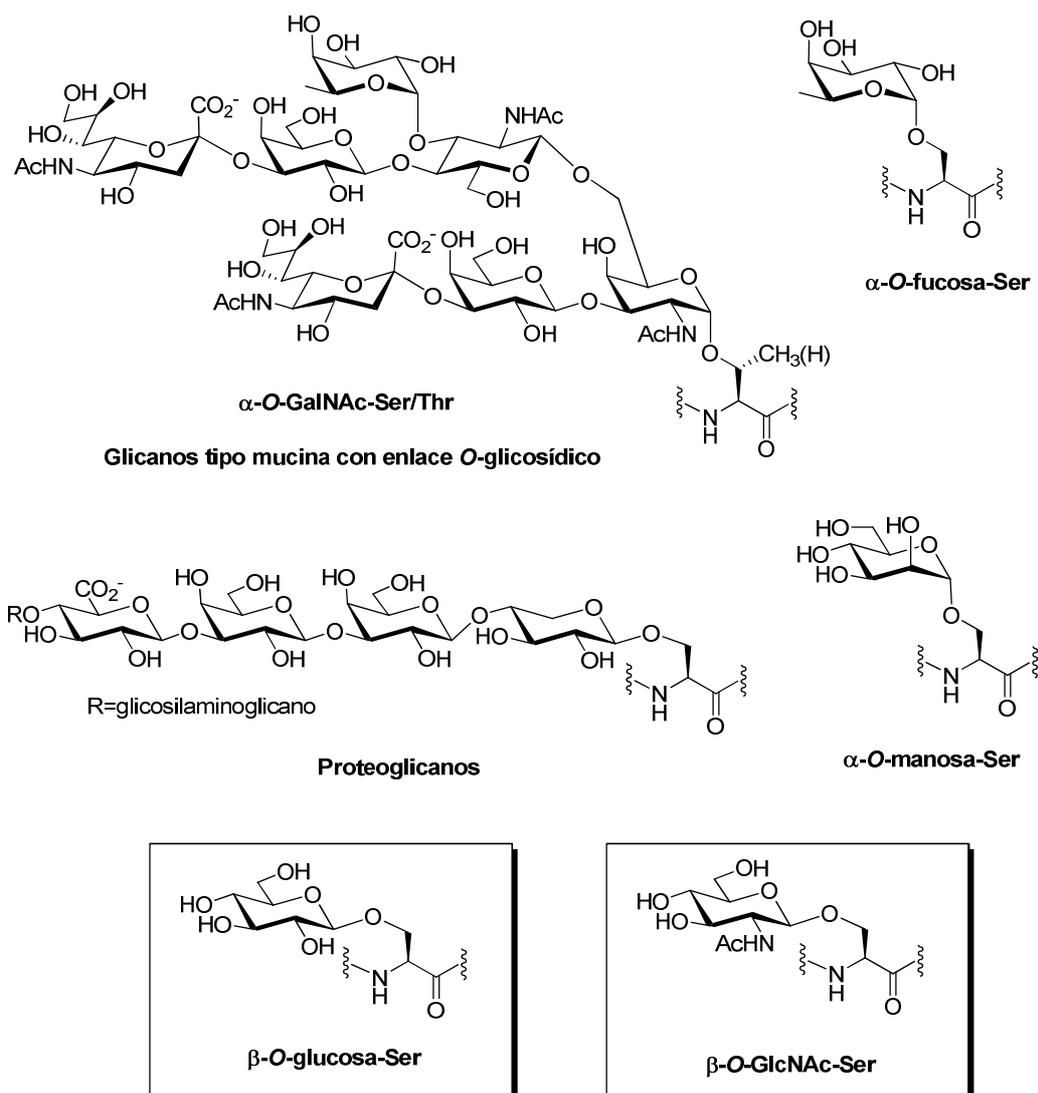


Figura 3. Los seis tipos de O-glicopéptidos más importantes.

En esta Tesis Doctoral nos centraremos en la β -*O*-glicosilación, concretamente, con Glc (β -*O*-glucosilación) y con GlcNAc.

β -*O*-glicosilación con glucosa: β -*O*-Glc-Ser

La β -*O*-glucosilación es un tipo específico de glicosilación no muy habitual pero que ha atraído mucha atención en los últimos años al estar presente en glicoproteínas relacionadas con el factor de crecimiento epidérmico (EGF)¹⁷ y con el receptor de Notch.¹⁸ En concreto, la β -Glc unida a un residuo de serina se ha encontrado en una secuencia consenso determinada que aparece en dominios proteicos del EGF de diferentes proteínas.^{17b} Sin embargo, desgraciadamente, todavía no se conoce bien la función estructural de la glucosa en estos sistemas y no está exenta de debate.

Los dominios EGF son pequeños motivos de unos 40 aminoácidos definidos por 6 cisteínas conservativas que forman tres enlaces disulfuro.¹⁹ Se sabe que estos fragmentos juegan un papel importante en las interacciones proteína-proteína, como por ejemplo en la unión ligando-receptor.^{17a} Estudios recientes han demostrado que dichas interacciones ligando-receptor pueden verse afectadas por alteraciones en los carbohidratos que modifican estos dominios EGF. Así, otra modificación habitual en el factor de crecimiento epidérmico es la *O*-fucosa que se une mediante enlace α -*O*-glicosídico a los aminoácidos serina o treonina de estos dominios. De hecho, en estos casos, el enlace Fuc- α -Ser/Thr puede considerarse conjuntamente con el anterior β -*O*-Glc-Ser.²⁰ Varias

¹⁷ (a) Shao, L.; Luo, Y.; Moloney, D. J.; Haltiwanger, R. S. *Glycobiology* **2002**, *12*, 763-770; (b) Harris, R. J.; Spellman, M. W. *Glycobiology* **1993**, *3*, 219-224.

¹⁸ Bruckner, K.; Perez, L.; Clausen, H.; Cohen, S. *Nature* **2000**, *406*, 411-415.

¹⁹ Campbell, I. D.; Bork, P. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 385-392.

²⁰ Spiro, R. G. *Glycobiology* **2002**, *12*, 43R-56R.

seroproteínas como los factores de coagulación de la sangre bovina (factores VII y IX),²¹ factores de coagulación humanos (VII y IX), la proteína Z de plasma humano y bovino²² y la trombospondina²³ presentan esta inusual modificación postraducciona con *O*-glucosa. La comparación de los sitios de glicosilación en estas proteínas revela una secuencia consenso compuesta por: -Cys¹-Xaa-Ser-Xaa-Pro-Cys²- donde Cys¹ y Cys² son la primera y segunda cisteínas conservativas del dominio EGF y Xaa puede ser cualquier aminoácido.^{17b} Este caso constituye uno de los pocos ejemplos de *O*-glicosilación para los que existe una secuencia consenso clara, al contrario que para la mayoría del resto de tipos de *O*-glicosilación. Este sitio de unión para la β -Glc parece, hasta ahora, estar limitado únicamente al residuo de Ser, y a su vez esta glucosa es en muchas ocasiones punto de unión de uno o dos residuos más de xilosa (Xyl) (figura 4).^{2c} Además, estas modificaciones son conservativas por lo que los dominios EGF pueden considerarse como módulos moleculares únicos en términos de *O*-glicosilación.

²¹ Hase, S.; Kawabata, S.; Nishimura, H.; Takeya, H.; Sueyoshi, T.; Miyata, T.; Iwanaga, S.; Takao, T.; Shimonishi, Y.; Ikenaka, T. *J. Biochem.* **1988**, *104*, 867-868.

²² Nishimura, H.; Kawabata, S.-I.; Kisiel, W.; Hase, S.; Ikenaka, T.; Takao, T.; Shimonishi, Y.; Iwanaga, S. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 20320-20325.

²³ Nishimura, H.; Yamashita, S.; Zeng, Z.; Walz, D.A.; Iwanaga, S. *J. Biochem. (Tokyo)* **1992**, *111*, 460-464.

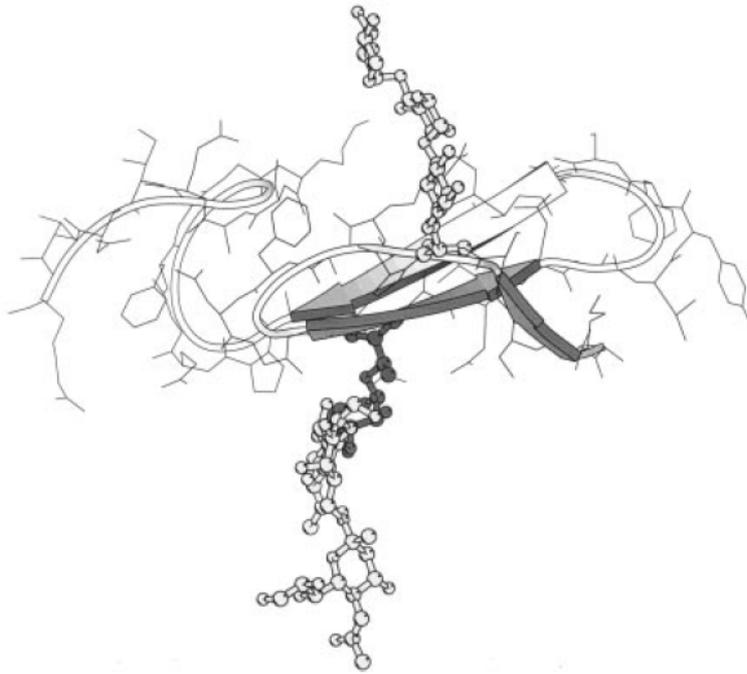


Figura 4. Estructura 3D de un dominio EGF. La figura muestra el trisacárido (Xyl α 1-3)Xyl α 1-3Glc β 1- unido a serina (parte superior) y el tetrasacárido Sia α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Fuc α 1- (la fucosa en gris oscuro) unido a la serina de un dominio EGF.

El número actual de proteínas modificadas por *O*-glucosa es limitado, pero la búsqueda en la base de datos de la secuencia consenso anterior revela que numerosas proteínas de secreción y de la superficie celular incorporan dicha secuencia y podrían, por tanto, ser también modificadas (tabla 1).

Proteínas modificadas con O-glucosa

Factor VII

Factor IX

Proteína Z

Antígeno fetal-1 / Proteína Delta (FA-1/DKL)

Notch

Trombospondina

Proteínas que contienen la secuencia consenso C-X-S/T-X-P-C

De secreción	De membrana
Agrina	Delta
Fibrilina	<i>Serrate</i>
Factor X	<i>Jagged</i>
Factor XII	<i>Crumbs</i>
<i>Aggrecan core protein</i>	Receptor LDL
<i>Versican core protein</i>	Lin-12
Activador del factor de crecimiento del hepatocito	<i>Sperm flagelar membrane protein precursor</i>

Tabla 1. Proteínas modificadas con O-glucosa.^{17a}

Las funciones de los carbohidratos en estas proteínas son todavía desconocidas. Sin embargo, en el factor VII humano, tras mutagénesis de la Ser glicosilada con β -Glc por alanina (Ala) se encontró que la actividad coagulante disminuía.²⁴ Esta misma mutación también suprime la β -glucosilación, lo cual sugiere que la enzima que añade el residuo de Glc reconoce no sólo la secuencia consenso en sí misma, sino también la estructura

²⁴ Bjoern, S.; Foster, D. C.; Thim, L.; Wiberg, F. C.; Christensen, M.; Komiyama, Y.; Pedersen, A. H.; Kisiel, W. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 11051-11057.

tridimensional del dominio EGF.^{17a} Así pues, todavía existe cierta controversia respecto al papel de estos carbohidratos ya que se desconoce si estos efectos se deben a la ausencia de glicosilación o a la propia mutación del aminoácido.

Glicopéptidos no naturales como agentes terapéuticos

Por otro lado, se sabe que péptidos endógenos del cerebro están involucrados en el control de muchos aspectos relacionados con la función del cerebro, la cognición y la percepción.^{2b} Desafortunadamente, el uso terapéutico de estos péptidos se ha retrasado debido a su inestabilidad ante enzimas hidrolíticas y pHs extremos y porque no atraviesan fácilmente la barrera hemato-encefálica (BHE), lo cual impide su entrada en el sistema nervioso central. A lo largo de los años, se han aislado y caracterizado muchos péptidos de este tipo, la mayoría de los cuales contienen el mismo tetrapéptido (Tyr-Gly-Gly-Phe) como farmacóforo (encefalina).²⁵ Utilizándose este esqueleto de encefalina como punto de partida, se han preparado muchos análogos, incluido el péptido que se muestra en la figura 5, con distintas afinidades *in vitro* para receptores opioides.²⁶ Sin embargo, los intentos de usar este péptido en ensayos *in vivo* han resultado infructuosos, debido a su incapacidad de atravesar la barrera hemato-encefálica comentada anteriormente. Polt y colaboradores han superado esta limitación sintetizando una forma glicosilada de dicho péptido, donde un resto de glucosa se ha enlazado al residuo C-terminal de Ser mediante un enlace β -O-glicosídico (figura 5).²⁷ La simple adición de este único monosacárido permite al glicopéptido no natural, análogo de la encefalina, penetrar la BHE y producir

²⁵ Strand, F. L.; *Endorphins, Chemistry, Physiology, Pharmacology, and Clinical Relevance*, Marcel Dekker, New York, NY, **1982**.

²⁶ Hruby, V. J.; Gehrig, C. *Med. Res. Rev.*, **1989**, *9*, 343-401.

²⁷ Mitchell, S. A.; Pratt, M. R.; Hruby, V. J.; Polt, R. *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 2327-2342.

efectos analgésicos similares a los de la morfina, incluso cuando se administra por vía periférica (intravenosa).²⁸

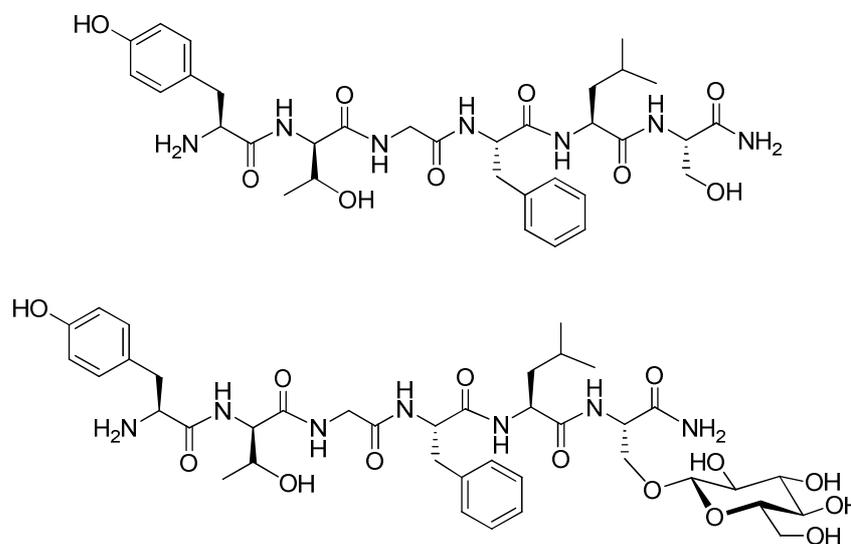


Figura 5. Estructuras del péptido y el correspondiente glicopéptido β -O-glucosilado, análogos no naturales de encefalina.

Más recientemente, se ha llevado a cabo la síntesis y el estudio biológico *in vitro* e *in vivo* de nuevos glicopéptidos opioides basados en el mismo esqueleto peptídico anterior.²⁹ Se sintetizaron una serie de glicopéptidos en los que se sustituyó el resto de Glc enlazado al sexto aminoácido (L-Ser) por otros monosacáridos como β -xilosa o α -manosa, y se detectó un descenso tanto en la afinidad como en la selectividad de los nuevos compuestos por sus receptores opioides, lo cual se tradujo en una pérdida de su potencia

²⁸ Bilsky, E. J.; Egleton, R. D.; Mitchell, S. A.; Palian, M. M.; Davis, P.; Huber, J. D.; Jones, H.; Yamamura, H. I.; Janders, J.; Davis, T. P.; Porreca, F.; Hruby, V. J.; Polt, R. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2586-2590.

²⁹ Elmagbari, N. O.; Egleton, R. D.; Palian, M. M.; Lowery, J. J.; Schmid, W. R.; Davis, P.; Navratilova, E.; Dhanasekaran, M.; Keyari, C. M.; Yamamura, H. I.; Porreca, F.; Hruby, V. J.; Polt, R.; Bilsky, E. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *311*, 290-297.

como analgésicos. Además, se realizó también la síntesis de disacáridos en los que se mantuvo el resto de glucosa directamente unido al aminoácido Ser. En estos casos, se pudo apreciar una importante mejora en el transporte a través de la BHE y/o en factores farmacocinéticos que maximizaron los efectos analgésicos de los hexapéptidos. Los resultados anteriores sugieren que el resto carbohidrato de β -Glc puede tener importantes implicaciones en las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de estas moléculas y, en consecuencia, en su potencial como drogas.

Todos estos ejemplos citados previamente ponen de manifiesto la importancia biológica de este tipo de β -*O*-glicosilación, que constituirá una parte fundamental en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. No obstante, pese a la relevancia de los mismos, no hay apenas estudios estructurales³⁰ al respecto.

β -*O*-glicosilación con *N*-acetilglucosamina: β -*O*-GlcNAc-Ser/Thr

Hasta la década de los 80, se creía que sólo existían glicoproteínas en la membrana celular, en la superficie de los orgánulos intracelulares o como moléculas secretadas. Sin embargo, en la actualidad, se sabe que ciertos tipos de glicoproteínas se sintetizan y se encuentran dentro del citoplasma y el núcleo, como las glicoproteínas β -*O*-glicosiladas con *N*-acetilglucosamina (GlcNAc).³¹ De hecho, esta unión de GlcNAc mediante enlace β -*O*-glicosídico a las cadenas laterales de serina y treonina de proteínas nucleares y citoplasmáticas constituye uno de los principales y más abundantes tipos de *O*-

³⁰ (a) Dhanasekaran, M.; Palian, M. M.; Alves, I.; Yeomans, L.; Keyari, C. M.; Davis, P.; Bilsky, E. J.; Egleton, R. D.; Yamamura, H. I.; Jacobsen, N. E.; Tollin, G.; Hruby, V. J.; Porreca, F.; Polt, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5435-5448; (b) Kitamura, M.; Hojo, H.; Nakahara, Y.; Ishimizu, T.; Hase, S. *Glycoconj. J.*, **2004**, *21*, 197-203.

³¹ Hart, G. W.; Haltiwanger, R. S.; Holt, G. D.; Kelly, W. G. *Annu. Rev. Biochem* **1989**, *58*, 841-874.

glicosilación.³² La introducción de este resto de β -*O*-GlcNAc en dichas proteínas nucleares, factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto parece tener implicación en la regulación transcripcional, análogamente a la regulación de la actividad proteica que ejerce la fosforilación.³³ Además, hay varios estudios que indican que la glicosilación con GlcNAc juega un papel relevante en la diabetes y en enfermedades neurodegenerativas.³⁴ Al contrario que en la mayoría del resto de glicopéptidos, el enlace β -*O*-glicosídico de Ser/Thr con GlcNAc no incorpora más carbohidratos unidos al residuo de GlcNAc sino que la proteína solamente es modificada por este único monosacárido. Este descubrimiento subraya la importancia en la biología celular de un patrón de glicosilación compuesto incluso por un simple monosacárido.

El hecho de que esta forma de glicosilación se descubriera tan tarde ha acentuado el estado relativamente inexplorado de las *O*-glicoproteínas con enlace β -*O*-glicosídico. Así, aunque se sabe que esta modificación post-traducciona con GlcNAc posee importantísimas implicaciones biológicas, aún no se conoce completamente su función. Este tipo de glicosilación se discutirá más en detalle en el último capítulo de la discusión de resultados de esta Tesis Doctoral.

Teniendo en cuenta esta gran cantidad de funciones que poseen las glicoproteínas, con objeto de llegar a un mayor entendimiento de los procesos biológicos en los que intervienen, es esencial profundizar en el conocimiento de los mecanismos que permiten a la parte carbohidrato modificar los equilibrios conformacionales de la cadena peptídica a la que está unida.

³² Comer, F. I.; Hart, G. W. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 29179.

³³ (a) Hayes, B. K.; Greis, K. D.; Hart, G. W. *Anal. Biochem.* **1995**, *228*, 115-122; (b) Haltiwanger, R. S.; Kelly, W. G.; Roquemore, E. P.; Blomberg, M. A.; Dong, L.-Y. D.; Kreppel, L.; Chou, T.-Y.; Greis, K.; Hart, G. W. *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, *20*, 264-269.

³⁴ Hart, G. W.; Housley, M. P.; Slawson, C. *Nature* **2007**, *446*, 1017-1022.

Para estudiar la relación existente entre la estructura y la función que estas glicoproteínas desempeñan, se decidió centrar esta Tesis Doctoral en la síntesis y el análisis conformacional de pequeños péptidos y glicopéptidos. Para su estudio estructural se combinaron técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) con cálculos de dinámica molecular (DM) y DFT (del inglés *density functional theory*). Así, nos planteamos algunas preguntas como las siguientes, que intentaremos esclarecer a lo largo de esta Tesis:

- ¿Cuáles son los factores que estabilizan las conformaciones adoptadas por los glicopéptidos?
- ¿Cómo afecta la β -*O*-glicosilación en la conformación del péptido?
- ¿Cómo influye la introducción de aminoácidos no naturales en el espacio conformacional de glicopéptidos modelo derivados de β -Glc?
- ¿Se mantienen las características anteriormente observadas al elongarse la cadena peptídica en glicopéptidos no naturales de mayor tamaño?
- ¿Cuáles son las preferencias conformacionales de un glicohexapéptido natural derivado de β -Glc-Ser que forma parte del dominio EGF en diversas proteínas?
- ¿Qué cambios conformacionales conlleva la sustitución del aminoácido natural Ser por α -metilserina (α -MeSer) no natural en el glicopéptido anterior y cuáles son las diferencias que se observan con respecto al mismo péptido no natural sin glucosilar?
- ¿Cuáles son las características estructurales de los glicopéptidos modelo naturales derivados de β -*O*-GlcNAc-Ser/Thr? ¿Cómo afecta la introducción de aminoácidos no naturales en las preferencias conformacionales de estos glicopéptidos?

2

Antecedentes

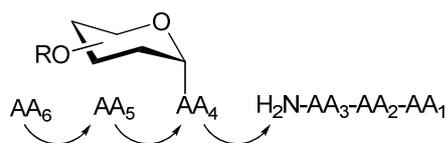
Como se ha comentado en la Introducción, se estima que más de la mitad de las proteínas presentes en la Naturaleza están glicosiladas. La glicosilación introduce una enorme diversidad estructural en las proteínas y al no estar bajo control genético existe un amplísimo número de glicoproteínas que poseen el mismo esqueleto peptídico pero difieren en la naturaleza y sitio de glicosilación¹. Por otro lado, el aislamiento de glicopéptidos a partir de fuentes naturales no suele conducir a la obtención de compuestos puros y con una estructura perfectamente definida. Por ello, la única manera de obtener glicopéptidos y glicoproteínas de estructura homogénea es a través de la síntesis química y/o enzimática. Así, la síntesis de estos glicopéptidos y glicoproteínas a partir de moléculas sencillas y fácilmente accesibles es un objetivo muy importante. Sin embargo, al contrario que la química de péptidos y ácidos nucleicos, la química de carbohidratos es complicada por su ramificación estructural y por la variada estereoquímica encontrada en complejos oligosacáridos. Además, la formación del enlace glicosídico es una cuestión delicada que requiere de estrictas condiciones anhidras incompatibles con péptidos y proteínas desprotegidas.²

El paso clave en la síntesis química de glicopéptidos es la incorporación de la parte carbohidrato en el péptido. En principio, hay dos estrategias para llevar a cabo esto. La más habitual es emplear como *building block* un aminoácido previamente glicosilado para sintetizar posteriormente, en etapas sucesivas, el esqueleto peptídico completo. Otra alternativa sería llevar a cabo la glicosilación directa del péptido de cadena larga (esquema 1). Una ventaja de este último método de glicosilación es que la ruta es más convergente y permite un acceso rápido a glicopéptidos que difieren en la parte carbohidrato. Sin embargo, esta glicosilación directa suele darse con bajos rendimientos.

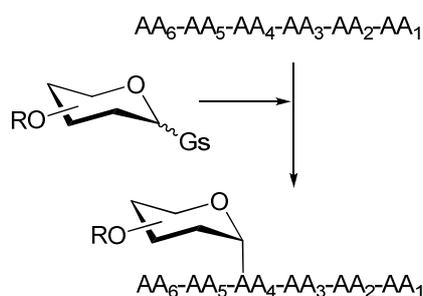
¹ Buskas, T.; Ingale, S.; Boons, G-J. *Glycobiology*, **2006**, *16*, 113R-136R.

² Pratt, M. R.; Bertozzi, C. R. *Chem. Rev. Soc.*, **2005**, *34*, 58-68.

A) Síntesis por pasos



B) Síntesis convergente



Esquema 1. Diferentes estrategias para la síntesis de glicopéptidos.

La formación del enlace *O*-glicosídico es incluso más compleja que la del *N*-glicosídico. De hecho, la *O*-glicosilación directa está a menudo dificultada por los bajos rendimientos debido a la poca reactividad de los grupos hidroxilos de la cadena lateral y a la escasa solubilidad del péptido en las condiciones comúnmente empleadas en la reacción. Por ello, es difícil llevar a cabo eficazmente reacciones de *O*-glicosilación de manera estereoselectiva cuando se trata de moléculas complejas.³

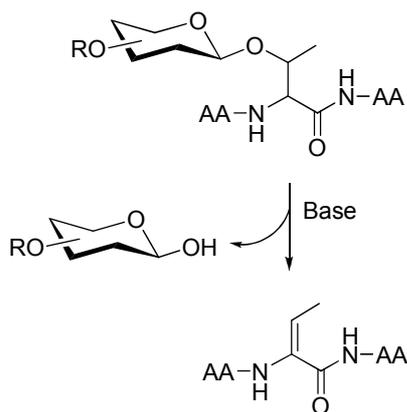
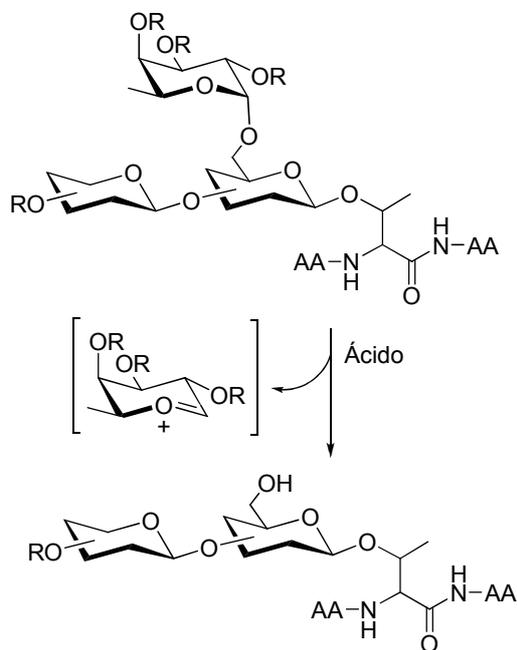
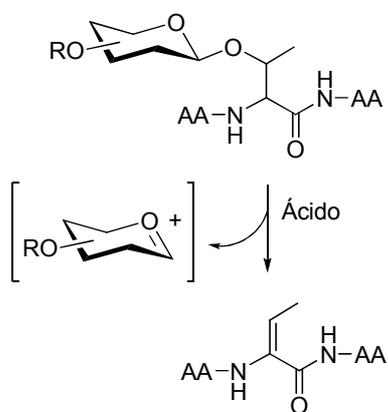
Por otro lado, en la síntesis de glicopéptidos también debe tenerse en cuenta la adicional complejidad y labilidad que confiere la parte carbohidrato. Por tanto, la adecuada selección de grupos protectores para proteger los numerosos grupos funcionales, tanto en la parte peptídica como en la parte carbohidrato, no es, en absoluto,

³ Seitz, O. *ChemBioChem*, **2000**, *1*, 214-246.

tarea fácil y debe hacerse con especial cuidado. El número de posibles grupos protectores está limitado ya que el enlace *O*-glicosídico resulta ser lábil tanto al medio ácido como al medio básico. En medio ácido puede producirse la ruptura del enlace glicosídico (especialmente lábil es el enlace α -fucosídico)⁴ mientras que en medio básico fuerte el *O*-glicopéptido puede sufrir una reacción de β -eliminación por captura del protón α de serina o treonina⁵ (esquema 2). Sin embargo, morfolina o piperidina no son suficientemente básicas como para dar la β -eliminación, con lo que pueden aplicarse en la conocida estrategia basada en la utilización de Fmoc como grupo protector. Además, las bases fuertes también pueden provocar la racemización de los centros estereogénicos del péptido.

⁴ Kunz, H.; Unverzagt, C. *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1763-1765; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1697-1699.

⁵ Sjölin, P.; Elofsson, M.; Kihlberg, J. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 560-565.

A) β -Eliminación inducida por baseB) Ruptura inducida por ácido de un resto α -fucosiloB) β -Eliminación inducida por ácido

Esquema 2. Labilidad química de los glicopéptidos (R=grupo protector).

Por tanto, como se acaba de comentar, la síntesis de glicopéptidos presenta un reto sintético importante, en concreto con respecto a la química de grupos protectores, la cual tiene que permitir la desprotección selectiva sin afectar la estructura del glicopéptido. Principalmente, los glicopéptidos se sintetizan en disolución o en fase sólida. Al principio, se creía que las reacciones de acoplamiento con aminoácidos glicosilados de cierto tamaño transcurrirían con poco rendimiento, lo cual unido a la falta de

conocimiento de las técnicas de síntesis en fase sólida y al intento por evitar el uso de grandes excesos de material de partida, hizo que, en los comienzos, la mayoría de las síntesis se realizaran en disolución. Sin embargo, no es cierto que esta síntesis haya quedado desfasada. Especialmente, cuando se quiere obtener cantidades razonables de los compuestos deseados, llevar a cabo reacciones en disolución permite una síntesis económica y eficiente de glicopéptidos de pequeño a mediano tamaño.³ Esta síntesis en disolución ha sido la empleada en nuestro caso para realizar toda la parte experimental en la que se ha basado esta Tesis Doctoral.

2.1. Síntesis

2.1.1. Formación del enlace *O*-glicosídico

Como ya se ha dicho, en las glicoproteínas las unidades carbohidrato se encuentran unidas a la cadena peptídica fundamentalmente mediante enlaces *O*-glicosídicos. Por tanto, la formación estereoselectiva del enlace *O*-glicosídico es la etapa clave en la síntesis. Desde las primeras síntesis de glicósidos de Michael⁶ y Fischer⁷, seguida de los estudios preliminares de Koenigs y Knorr,⁸ se ha desarrollado un importante número de métodos de glicosidación. A continuación, se presenta una visión general de las dos estrategias fundamentales⁹ y principios básicos para la formación del enlace glicosídico.¹⁰

⁶ Michael, A. *Am. Chem. J.* **1879**, *1*, 305-312.

⁷ Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1893**, *26*, 2400-2412.

⁸ Koenigs, W.; Knorr, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957-981.

⁹ Galonic, D. P.; Gin, D. Y. *Nature*, **2007**, *446*, 1000-1007.

¹⁰ Zhu, X.; Schmidt, R. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1900-1934.

Estrategias de glicosilación

Intercambio acetálico

La síntesis química de glicósidos implica, por lo general, la transformación de un azúcar en un “glicosil-dador” protegido selectivamente que presenta un grupo saliente (Gs) en su carbono anomérico. En presencia de un promotor/activador adecuado (EI^+), dicho centro anomérico se convierte en deficiente en electrones. De esta manera, se favorece la sustitución anomérica por parte del “glicosil-aceptor” (Nu-H) adecuadamente protegido (normalmente con un solo grupo hidroxilo libre) en la reacción de glicosilación propiamente dicha, para formar el glicoconjugado correspondiente (figura 1). En otras palabras, el “glicosil-dador” aporta su carbono anomérico en el enlace glicosídico transfiriendo la parte carbohidrato (generalmente como electrófilo) a la especie aceptora que funcionaría entonces como nucleófilo.⁹ Así, tanto el grupo saliente del “glicosil-dador” como los grupos protectores son los parámetros más importantes con respecto al rendimiento y la selectividad del centro anomérico en las reacciones de glicosilación. Este proceso de intercambio de la función acetal gobierna la mayoría de los procesos de glicosilación química existentes y es efectiva para el acoplamiento no sólo con nucleófilos simples sino también con complejos oligosacáridos, péptidos y lípidos que serían los “glicosil-aceptores”.

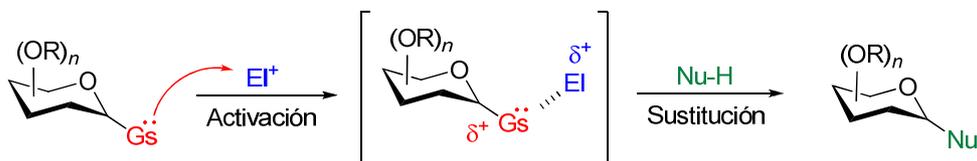


Figura 1. Glicosilación de “glicosil-dadores” derivados de acetales. A la activación del grupo saliente en posición anomérica (Gs, en rojo) con un electrófilo como promotor (EI^+ , en azul) le sigue el ataque nucleófilo del aceptor (Nu-H, en verde) sobre el carbono anomérico deficiente en electrones que resulta del “glicosil-dador”.

Los métodos habituales para la generación de “glicosil-dadores” son los basados en reacciones de intercambio de oxígeno en la posición anomérica de la parte hemiacetálica de piranosas y furanosas. Una de las aproximaciones más directas para la formación del enlace glicosídico comprende el grupo de los “glicosil-dadores” C1-hidroxilados (figura 2, izquierda), en la que un hidroxilo anomérico desprotegido es intercambiado en un proceso de deshidratación controlada mediante catálisis ácida. Se han probado varios agentes deshidratantes, incluyendo ácidos de Lewis de cationes metálicos, sales de sulfonio y fosfonio, y haluros de sulfonilo activados, y todos ellos han resultado ser efectivos. Esta estrategia para la sustitución directa del oxígeno anomérico se conoce como método de Fischer-Helferich (figura 3, A) y se ha aplicado con éxito en la síntesis de numerosos sustratos glicosilados aunque la reversibilidad de la reacción limita su utilidad en la síntesis de complejos oligosacáridos y glicoconjugados. A pesar de que esta aproximación minimiza el número de derivatizaciones del centro anomérico en el protocolo de glicosilación, el intercambio irreversible del oxígeno anomérico requiere también estrategias alternativas para la preactivación del centro anomérico. Éstas consisten en la funcionalización del hidroxilo anomérico a través de la introducción de un buen grupo saliente, convirtiéndolo en un “glicosil-dador” aislable, a lo que seguirá el posterior acoplamiento.

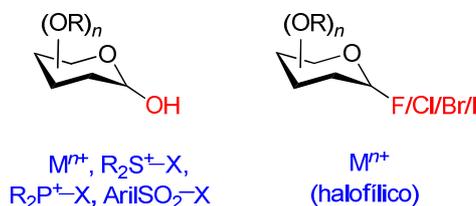


Figura 2. “Glicosil-dadores” C1-hidroxilados (izqda.) y “glicosil-haluros” (dcha.) (M, metal; R, sustituyentes varios; X, grupos salientes varios).

De estos métodos irreversibles, el más conocido es el método de Koenigs-Knorr (figura 3, **B**), en el que se genera un α -haloéter como “glicosil-dador”. Así, entre los primeros grupos salientes utilizados en las glicosilaciones químicas se encuentran los haluros anoméricos (figura 2, derecha): fluoruros, cloruros, bromuros y yoduros. Este intermedio es posteriormente activado mediante promotores halofílicos en la etapa de glicosidación. Generalmente, se utilizan entre uno y cuatro equivalentes del promotor (por esta razón, el término “catalizador” no debería usarse en este caso) y a menudo otros reactivos adicionales (por ejemplo, una base impedida estéricamente), lo cual resulta en una transferencia irreversible de la parte carbohidrato al aceptor.

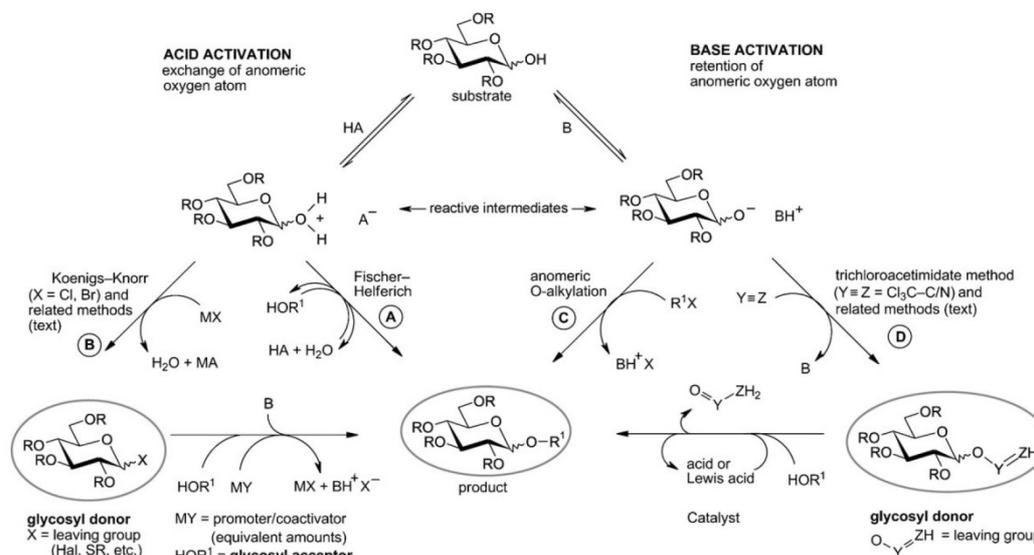


Figura 3. Formación de enlaces glicosídicos (figura tomada de la referencia 10).

También se han investigado exhaustivamente otras aproximaciones muy relacionadas con el método de Koenigs-Knorr. El intercambio del oxígeno anomérico por un grupo saliente como flúor, alquiltio o ariltio ha resultado de gran interés, ya que estos grupos no

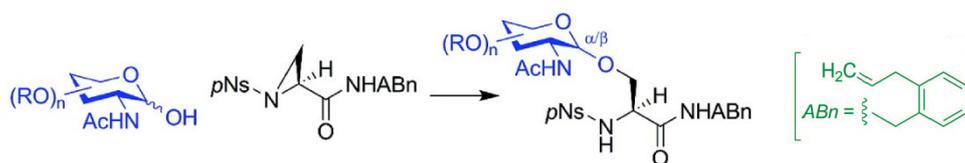
se ven afectados por las manipulaciones de grupos protectores ortogonales. Además, también es posible realizar reacciones de glicosidación con varios aceptores consecutivamente en una sola etapa.

En los métodos descritos previamente, el átomo de carbono anomérico del residuo carbohidrato actúa como electrófilo y el alcohol como nucleófilo. Otra alternativa útil sería la desprotonación mediada por base del grupo hidroxilo anomérico de la unidad piranosa o furanosa para generar un alcóxido anomérico, que ataque a R-X, en una *O*-alquilación anomérica directa e irreversible, para dar el glicósido correspondiente (figura 3, C). Esta “*O*-alquilación anomérica directa” de varios azúcares, tanto protegidos como no protegidos, en presencia de base y con triflatos o aceptores de Michael como agentes alquilantes se ha convertido en un método muy conveniente para la formación del enlace glicosídico.¹¹

Con esta misma idea, el grupo de Gin¹² ha desarrollado muy recientemente una metodología para la formación estereoselectiva de enlaces α -GalNAc-Ser, β -GlcNAc-Ser y α -Man-Ser a través de la apertura de aziridina-2-carboxamidas con C1-*O*-nucleófilos derivados de piranosas (esquema 3). La reacción transcurre con buena selectividad en la posición anomérica y no afecta al grupo NHAc del C2 original. Así, este acoplamiento utiliza piranosas C1-*O*-hemiacetálicas como nucleófilos con electrófilos derivados de Ser, precisamente, el enfoque contrario a los métodos anteriormente citados.

¹¹ (a) Schmidt, R. R.; Reichrath, M. *Angew. Chem.* **1979**, *91*, 497-499; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, *18*, 466-467; (b) Klotz, W.; Schmidt, R. R. *J. Carb. Chem.* **1994**, *13*, 1093-1011; (c) Schmidt, R. R.; Klotz, W. *Synlett* **1991**, 168-170; (d) Klotz, W.; Schmidt, R. R. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 683-690.

¹² Ryan, D. A.; Gin, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15228-15229.



Esquema 3. Apertura estereoselectiva de aziridinas con C1-O-nucleófilos derivados de carbohidratos.

La experiencia obtenida con la *O*-alquilación anomérica directa mostró que los requerimientos de simplicidad y eficiencia deseables en este tipo de reacciones pueden satisfacerse con una simple transformación, catalizada por base, del oxígeno anomérico en un grupo saliente y la posterior activación de este grupo, mediante catálisis ácida, en la etapa de glicosidación. De esta manera, los nitrilos deficientes en electrones, como por ejemplo el tricloroacetnitrilo (figura 3, **D**: $X \equiv Y = \text{CCl}_3\text{C} \equiv \text{N}$), experimentan una adición directa del grupo hidroxilo anomérico catalizada por base, para dar lugar a los correspondientes tricloroacetimidatos *O*-glicosilados (figura 4, izqda.) como “glicosiladores”. El grupo triclorometilo, voluminoso y fuertemente electroatrayente, y el grupo glicosilo, que facilita la formación de un ión oxocarbenio en el centro anomérico a través del átomo de oxígeno α , son la fuerza impulsora de la liberación, catalizada por ácido, del tricloroacetimidato como grupo saliente. Este grupo no presenta propiedades ácidas o básicas en las condiciones de reacción, lo cual posibilita la catálisis ácida. De hecho, bajo activación en medio ácido, los *O*-glicosiltricloroacetimidatos muestran excelentes propiedades como “glicosiladores”.

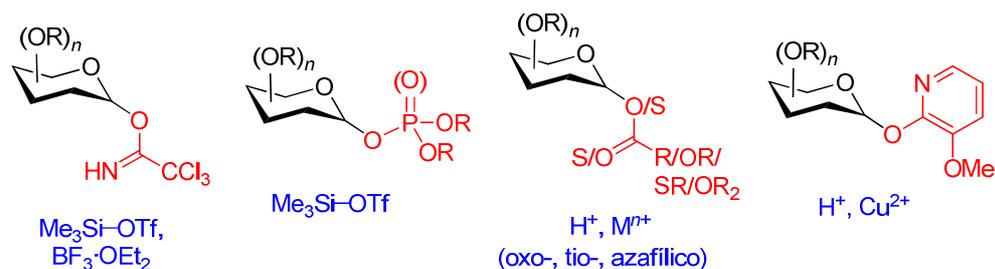
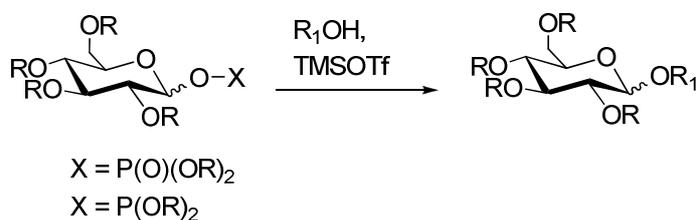


Figura 4. Activación del grupo hidroxilo anomérico por formación de diversos grupos salientes (trichloroacetimidatos, fosfatos y fosfitos, ésteres/carbonatos/tiocarbonatos y grupos ariloxi) (Tf, trifluorometanosulfonilo).

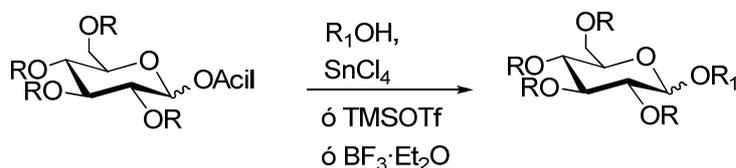
Otros métodos relacionados incluyen la activación del grupo hidroxilo anomérico para la formación de otros grupos salientes funcionalizados con oxígeno como son fosfatos/fosfitos, ésteres/carbonatos/tiocarbonatos, sulfatos/sulfonatos, y varios grupos ariloxi (figura 4). Los fosfatos^{13a} y fosfitos^{13b,c} glicosilados se han empleado con éxito en reacciones de glicosilación, previa activación con TMSOTf. Sin embargo, la desventaja en estos casos es el aumento en la acidez del medio de reacción en la etapa de glicosidación cuando estos grupos salientes son liberados (esquema 4).



Esquema 4. Método de los fosfatos y fosfitos glicosilados.

¹³ (a) Hashimoto, S.; Honda, T.; Ikegami, S. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 685-687; (b) Kondo, H.; Ichikawa, Y.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8748-8750; (c) Martin, T. J.; Schmidt, R. R. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6123-6126.

Los “glicosil-dadores” *O*-acilados, particularmente los *O*-acetilados (esquema 5), se obtienen fácilmente y se han empleado mucho en reacciones de glicosidación, previa activación con ácidos de Lewis.¹⁴ En este sentido, Kihlberg y col. descubrieron que acetatos anoméricos pueden ser usados en la glicosidación de aminoácidos con el grupo ácido carboxílico desprotegido.¹⁵



Esquema 5. Método del acilo (acetatos anoméricos).

También se puede citar el uso de los 4-pentenil glicósidos (figura 5, izda.) como “glicosil-dadores”, introducido por Fraser-Reid y col.¹⁶ Consiste en la activación con un electrófilo seguida de la expulsión del sustituyente anomérico y posterior captura de la especie oxonio con un compuesto hidroxilado. En este método, electrófilos con alta afinidad por electrones π han resultado ser promotores útiles y selectivos (esquema 6).

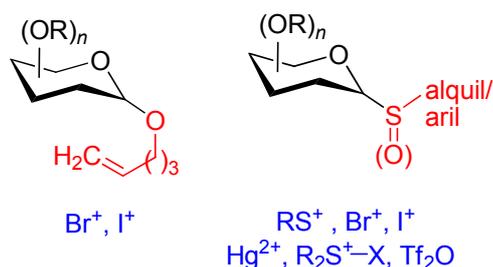
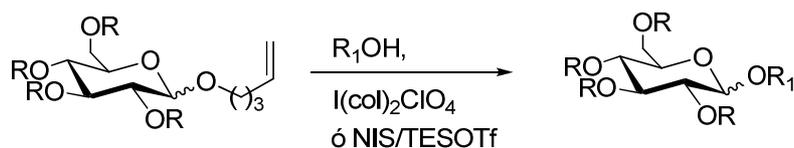


Figura 5. *n*-pentenil glicósidos (izqda.) y tioglicósidos (dcha.) como “glicosil-dadores” (R, sustituyentes varios; Tf, trifluorometanosulfonil; X, grupos salientes varios).

¹⁴ Helferich, B.; Schmitz-Hillebrecht, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1933**, 66, 378-383.

¹⁵ Elofsson, M.; Walse, B.; Kihlberg, J. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 7613-7616.

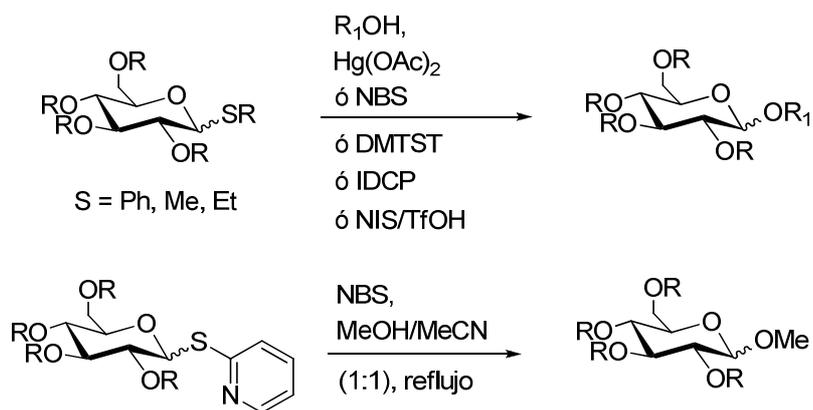
¹⁶ Fraser-Reid, B.; Konradsson, P.; Mootoo, D.; Udodong, U. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 823-825.



Esquema 6. Método de los 4-pentenil glicósidos.

Además, se ha demostrado que los sulfuros y sulfóxidos glicosilados (figura 5, dcha.) son extremadamente útiles no sólo como eventuales grupos salientes sino también como grupos protectores anoméricos estables antes de que tenga lugar la reacción de glicosilación.

Los tioglicósidos se encuentran entre los mejores “glicosil-dadores” de tipo Koenigs-Knorr, y especialmente los feniltio- y etiltioglicósidos (esquema 7) son frecuentemente utilizados en la síntesis de glicoconjugados.



Esquema 7. Método de los tioglicósidos.

Desde que aparecieran por primera vez en 1909,¹⁷ su química ha sido investigada constantemente. A lo largo del siglo pasado se han publicado numerosos procedimientos para la preparación y activación de tioglicósidos.¹⁸ La ventaja de estos “glicosil-dadores” se encuentra en su gran estabilidad ante el amplio rango de condiciones empleadas en la manipulación de grupos protectores. De hecho, los propios grupos tioéter anoméricos pueden actuar también como grupos protectores temporales. Por tanto, los tioglicósidos pueden servir no sólo como “glicosil-dadores”, sino además como “glicosil-aceptores”. Estas características han sido a menudo explotadas para la síntesis eficiente de oligosacáridos complejos.¹⁹ Los tioglicósidos se preparan de manera fácil, normalmente por tratamiento del correspondiente azúcar peracetilado con el tiol adecuado en presencia de un ácido de Lewis, típicamente $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$.²⁰ Los tioglicósidos pueden ser activados por un amplio número de promotores de diferente reactividad²¹ (aunque en todos los casos, se necesita al menos una cantidad estequiométrica). Una contribución importante al respecto fue la realizada en 1990 por Boom y colaboradores,^{21e} que por primera vez publicaron el empleo de una cantidad estequiométrica o un exceso de *N*-yodosuccinimida (NIS) junto con una cantidad catalítica de ácido triflico como promotor para activar tioglicósidos. El

¹⁷ Fischer, E.; Delbrück, K. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1909**, *42*, 1476-1482.

¹⁸ Oscarson, S. en *Carbohydrates in Chemistry and Biology, Vol. 1* (Eds.: Ernst, B.; Hart, G. W.; Sinay, P.), Wiley-VCH, Weinheim **2000**, pp. 93-116.

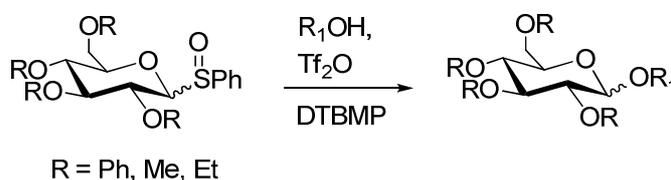
¹⁹ Codée, J. D. C.; Litjens, R. E. J. N.; van den Bos, L. J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. *Chem Soc. Rev.* **2005**, *34*, 769-782.

²⁰ Para ejemplos recientes de formación de tioglicósidos catalizada por $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ver: (a) Tai, C. A.; Kulkarni, S. S.; Hung, S. C. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8719-8722; (b) Agnihotri, G.; Tiwari, P.; Misra, A. K. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1393-1396; (c) Hasegawa, J. Y.; Hamada, M.; Miyamoto, T.; Nishide, K.; Kajimoto, T.; Uenishi, J. I.; Node, M. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2360-2368; (d) Kajimoto, T.; Ishioka, Y.; Katoh, T.; Node, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5736-5739; para la preparación de tioglicósidos catalizada por otros ácidos de Lewis, ver: (e) Das, S. K.; Roy, J.; Reddy, K. A.; Abbineni, C. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 2237-2240; (f) Weng, S. S.; Lin, Y. D.; Chen, C. T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5633-5636.

²¹ (a) Ferrier, R.; Hay, R.; Vethaviasar, N. *Carbohydr. Res.* **1973**, *27*, 55-61; (b) Nicolaou, K. C.; Seitz, S. P.; Papahatjis, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2430-2434; (c) Andersson, F.; Fuegedi, P.; Garegg, P.; Nashed, M. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3919-3922; (d) Veeneman, G. H.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 275-278; (e) Veeneman, G. H.; van Leeuwen, S. H.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1331-1334; (f) Hanessian, S.; Bacquet, C.; Lehong, N. *Carbohydr. Res.* **1980**, *80*, C17-C22.

uso de NIS/AgOTf apareció poco más tarde.²² En la década pasada, los compuestos organoazufrados se han convertido en importantes promotores para la activación de tioglicósidos, por ejemplo triflatos de sulfonio o sulfenilo, como DMTST, MeSOTf y PhSOTf.

Como ya demostraron Kahne y col. (método del sulfóxido),^{23a} los fenilsulfóxidos glicosilados actúan como “glicosil-dadores” suaves tras ser activados con Tf₂O (esquema 8). De hecho, la combinación de sulfinatos con Tf₂O (p. ej. Ph₂SO/Tf₂O) ha recibido mucha atención como activadores de tioglicósidos.²⁴ Avances recientes en este campo han conducido a un método basado en sulfóxidos para la síntesis de β-manósidos.²³



Esquema 8. Método del sulfóxido.

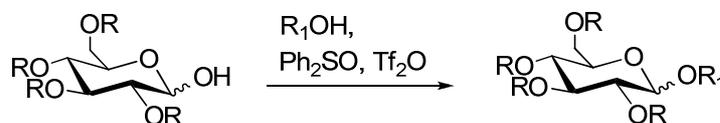
Otro procedimiento relacionado y de particular interés es el denominado *dehydrative glycosylation*, introducido por Gin y colaboradores, que permite la conversión directa de lactoles en glicósidos. Este método empieza, como el método de Fischer-Helferich, directamente a partir del hemiacetal, que sufre una activación irreversible *in situ* con

²² Konradsson, P.; Udodong, U. E.; Fraser-Reid, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4313-4316.

²³ (a) Kahne, D.; Walker, S.; Chang, Y.; Van Engen, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6881-6882; (b) Crich, D.; Sun, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 435-436.

²⁴ (a) Crich, D.; Smith, M. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4067-4069; (b) Crich, D.; Smith, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9015-9020; (c) Codée, J. D. C.; Litjens, R. E. J. N.; den Heeten, R.; Overkleeft, H. S.; van Boom, J. H.; van der Marel, G. A.; *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1519-1522; (d) Crich, D.; Banerjee, A.; Li, W.; Yao, Q. *J. Carbohydr. Chem.* **2005**, *24*, 415-424; (e) Wang, C.; Wang, H.; Huang, X.; Zhang, L. H.; Ye, X. S. *Synlett* **2006**, 2846-2850. (f) Crich, D.; Li, W. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 959-962.

Ph₂SO y Tf₂O como promotores y en presencia de una base (esquema 9).²⁵ Se ha aplicado con éxito en varias reacciones de glicosidación, incluida la síntesis de complejas saponinas.²⁶



Esquema 9. Método del lactol (*dehydrative glycosylation*).

Oxidación de glicales

Además de los “glicosil-dadores” con derivados de heteroátomos en posición anomérica, los glicales, que pueden obtenerse fácilmente a partir de los azúcares correspondientes, también son sustratos atractivos para la formación del enlace glicosídico y su uso ha sido muy explorado en la síntesis de glicoconjugados complejos. Su nucleofilia en el C2 por la presencia de la funcionalidad 1,2-alqueno permite el uso de varios oxidantes electrófilos (E⁺) tanto oxigenados como nitrogenados o azufrados, que reaccionan ante nucleófilos de tipo enol-éter con alta estereoselectividad y a través de la formación de un anillo de tres miembros. El “glicosil-dador” activado resultante se encuentra listo para recibir el ataque de un aceptor apropiado (Nu-H) que actuaría como nucleófilo, para formar el glicoconjugado correspondiente (figura 6).

²⁵ García, B. A.; Poole, J. L.; Gin, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7597-7598.

²⁶ (a) García, B. A.; Gin, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4269-4279; (b) Nguyen, H. M.; Chen, Y.; Duron, S. G.; Gin, D. Y.; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8766-8772, y referencias; (c) Boebel, T. A.; Gin, D. Y. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6054-6057; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5874-5877; (d) Kim, Y.-I.; Wang, P.; Navarro-Villalobos, M.; Rohde, B. D.; Derryberry, J.; Gin, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11906-11915.

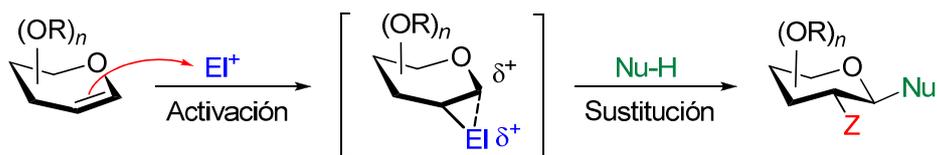


Figura 6. Glicosilación con “glical-dadores”. La activación de glicales con varios electrófilos (E^+) viene acompañada del acoplamiento posterior de un aceptor ($Nu-H$) al carbono anomérico (Z , funcionalidades varias).

Así, la apertura de este ciclo intermedio bajo catálisis ácida con alcoholes como aceptores, ya sea directamente mediante el método **Ea** o por el método **Eb**, y en presencia de un promotor Y (figura 7) proporciona los correspondientes glicósidos.²⁷

²⁷ (a) Danishefsky, S. J.; Bilodeau, M. T. *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1482-1522; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1380-1419; (b) Lemieux, R. U.; Morgan, A. R. *Can. J. Chem.* **1965**, *43*, 2190-2198; (c) Tatsuta, K.; Fujimoto, K.; Kinoshita, M.; Umezawa, S. *Carbohydr. Res.* **1977**, *54*, 85-104; (d) Thiem, J.; Karl, H.; Schwentner, H. *Synthesis* **1978**, 696-697; (e) Jaurand, G.; Beau, J.-M.; Sinaÿ, P. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 572-573; (f) Ito, Y.; Ogawa, T. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2723-2726; (g) Preuss, R.; Schmidt, R. R. *Synthesis* **1988**, 694-697; (h) Zuurmond, H. M.; van der Klein, P. A. M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2063-2066.

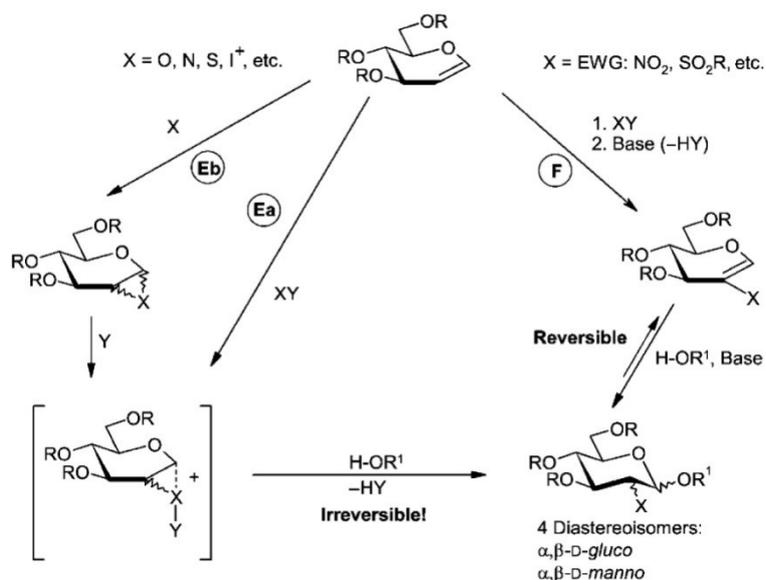


Figura 7. Glicales como intermedios en la formación de enlaces glicosídicos (figura tomada de la referencia 10).

Estos métodos, además de la formación del enlace glicosídico, permiten la introducción de varios grupos funcionales ‘Z’ en la posición C2 (figura 6). Por ejemplo, la transferencia de oxígeno al C2 en “glicosil-dadores” se ha demostrado útil a través de la 1,2-epoxidación de glicales mediada por dimetildioxirano (DMDO)^{27a} o sulfonio,²⁸ seguida por sustitución anomérica para generar C2-hidroxi glicósidos (figura 8, izqda). De la misma manera, se han utilizado reactivos de yodo (III) para la preparación de C2-aciloxiglicósidos selectivamente protegidos (figura 8).²⁹ Con un electrófilo apropiado, este método puede emplearse también para la síntesis de 2-desoxiglicósidos. La síntesis de 2-amino-2-desoxiglicósidos ha atraído una considerable atención debido a su abundancia y a la importancia de esta clase de glicósido en glicoconjugados presentes en

²⁸ Di Bussolo, V.; Kim, Y.-J.; Gin, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13515-13516.

²⁹ Shi, L.; Kim, Y.-J.; Gin, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6939-6940.

la Naturaleza. La típica reacción de C2-azidonitración de glicales³⁰ para dar lugar a derivados de C2-azido piranosas ha sido y continúa siendo uno de los métodos preferidos para introducir la N-funcionalidad en el C2 (figura 8). En este sentido, los glicales pueden transformarse también en derivados con un grupo electroatrayente en el C2, por ejemplo en 2-nitroglicales, que pueden sufrir adición de Michael. En este caso, la formación del enlace glicosídico tras catálisis básica conduce a los 2-desoxi-2-nitroglicósidos³¹ (método F, figura 7). Estos intermedios se convierten fácilmente en 2-amino-2-desoxiglicósidos. Posteriormente, se han desarrollado además otras reacciones para la transferencia de nitrógeno al C2 del “glicosil-dador”, entre las que se encuentran la incorporación estereoselectiva de un grupo sulfonamida (figura 8, dcha.)^{27a} y otros protocolos menos usados para introducir la función carbamato en posición C2³² y el grupo acetamido,³³ presente directamente en la Naturaleza.

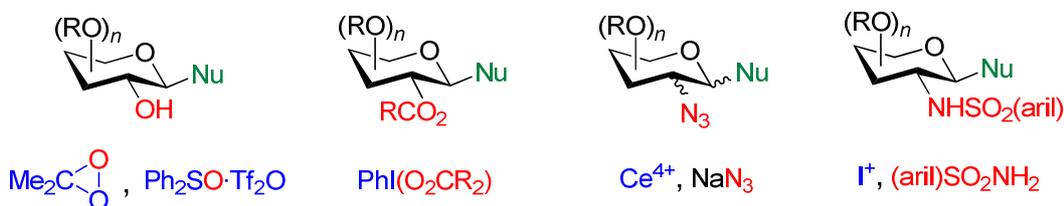


Figura 8. Estas glicosilaciones con glicales resultan en la funcionalización de ambas posiciones C1 y C2 del “glicosil-dador”.

³⁰ Lemieux, R. U.; Ratcliffe, R. M. *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244-1251.

³¹ (a) Das, J.; Schmidt, R. R. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1609-1613; (b) Schmidt, R. R.; Vankar, Y. D. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1059-1073;

³² Kan, C.; Long, C. M.; Moushumi, P.; Ring, C. M.; Tully, S. E.; Rojas, C. M. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 381-384.

³³ Di Bussolo, V.; Liu, J.; Huffman, L. G.; Gin, D. Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 204-207.

Estos acoplamientos a través de intercambio acetálico junto con las glicosilaciones de glicales, así como otros métodos diversos, han sido ampliamente utilizados en la síntesis química de glicoconjugados complejos.

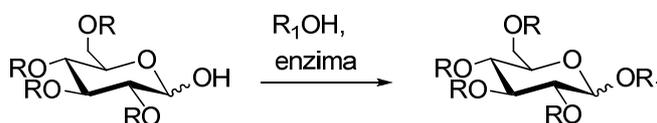
Además de sustratos y grupos salientes, los promotores también tienen una importante influencia en la selectividad de la glicosidación ya que afectan a la formación de los intermedios de reacción. Por tanto, es crucial una buena optimización del promotor a utilizar, de acuerdo con el resto de reactivos empleados en la reacción, para lograr la estereoselectividad deseada en la formación del enlace glicosídico.³⁴ De hecho, a veces, es un reto difícil encontrar un promotor que conduzca a una alta estereoselectividad y a un buen rendimiento en una glicosidación concreta.

En las reacciones de formación del enlace glicosídico a menudo se obtiene una mezcla de dos estereoisómeros anoméricos, es decir, glicósidos 1,2-*cis* y 1,2-*trans*. La participación del grupo vecinal en “glicosil-dadores” 2-*O* ó 2-*N*-acilados o el empleo de “glicosil-dadores” con grupos protectores voluminosos en posición 2 conduce con certeza a glicósidos 1,2-*trans* (enlace glicosídico β en nuestro caso). Como consecuencia, para la síntesis de glicósidos 1,2-*cis* (enlace glicosídico α) se suele utilizar en posición 2 un grupo que no participe y sea poco voluminoso. Sin embargo, el efecto de la presencia de grupos “espectadores” a menudo es insuficiente para garantizar la estereoselectividad *cis* en las reacciones de glicosidación ya que la mayoría de las glicosidaciones transcurren mediante un mecanismo S_N1 a través de intermedios de ion oxocarbenio, que pueden ser atacados por el aceptor por la cara α o β . Otros parámetros, como la temperatura, la presión, la concentración e incluso el orden de adición de los reactivos, tienen también un

³⁴ (a) Davis, B. G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 2137-2160; (b) Demchenko, A. V. *Synlett* **2003**, 1225-1240; (c) Toshima, K. *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 1282-1297; (d) Demchenko, A. V. *Handbook of Chemical Glycosylation*, Wiley-VCH, Weinheim **2008**; (e) Paulsen, H. *Angew. Chem.* **1982**, 94, 184-201; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 155-173.

importante efecto en la selectividad de la glicosidación.³⁵ Por tanto, para que una determinada glicosidación transcurra con alta estereoselectividad se requiere una adecuada optimización de todas las condiciones de reacción.

En los últimos años, se ha dedicado mucho esfuerzo a obtener métodos eficientes de glicosidación en una sola etapa que permitan la síntesis de glicoconjugados, a partir de *building blocks* adecuadamente protegidos, en el menor número de pasos posibles.³⁶ En este contexto, la síntesis en fase sólida de oligosacáridos y glicoconjugados es también un área de continua investigación.³⁷ Finalmente, cabe mencionar además la glicosidación enzimática,³⁸ (esquema 10) mediante el uso de glicosidasas y glicosil transferasas, que está, de alguna manera, relacionada con una transferencia intramolecular de la parte carbohidrato al aceptor y está siendo investigada extensamente en los últimos años.³⁹



Esquema 10. Método de glicosilación enzimática

A pesar de todas estas prometedoras técnicas junto con otros nuevos procedimientos, no existe todavía un único método de acoplamiento que pueda considerarse general y efectivo para la síntesis estereoselectiva de glicósidos y complejos glicoconjugados. Esto

³⁵ Boons, G. J. *Contemp. Org. Synth.* **1996**, *3*, 173-200.

³⁶ Wang, Y.; Ye, X. S.; Zhang, L. H. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2189-2200.

³⁷ Seeberger, P. H. *J. Carbohydr. Chem.* **2002**, *21*, 613-643.

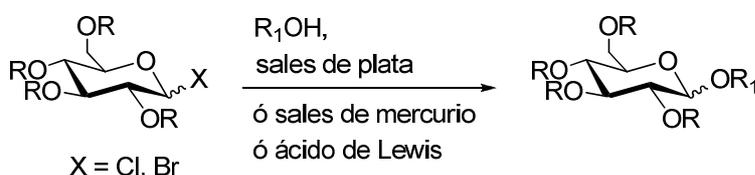
³⁸ (a) Takayama, S.; McGarvey, G. J.; Wong, C.-H. *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 407-415; (b) Fitz, W.; Wong, C.-H. en *Preparative Carbohydrate Chemistry* (Ed.: S. Hanessian), Marcel Dekker, New York, **1997**, 485-504.

³⁹ (a) Jung, K.-H.; Müller, M.; Schmidt, R. R. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4423-4442; (b) Ziegler, T. en *Handbook of Chemical Glycosylation* (Ed.: A. Demchenko), Wiley-VCH, Weinheim **2008**, p.469-496.

es debido, sin duda, a la alta variabilidad estructural y de grupos funcionales que poseen estos sustratos. Por tanto, la síntesis de estos compuestos requiere a menudo una exhaustiva y sistemática tarea de investigación.⁴⁰

Después de esta primeras páginas en las que se han descrito los principios básicos y generales en la formación del enlace *O*-glicosídico, a continuación se presentan de forma más exhaustiva, los métodos de glicosidación más utilizados en esta Tesis Doctoral para la formación de dichos enlaces. Así, se ha seguido fundamentalmente la metodología de Koenigs-Knorr modificada,⁴¹ con el empleo de bromuros de glicopiranosilo y tricloroacetimidatos *O*-glicosilados para la síntesis de los correspondientes glicopéptidos, tanto por su sencillez desde el punto de vista metodológico como por sus aceptables rendimientos.

El primer método de glicosidación conocido es el de Koenigs-Knorr⁸ (esquema 11), que fue publicado hace un siglo. Esta reacción consiste en el acoplamiento de un bromuro o cloruro de glicopiranosilo con un grupo hidroxilo, previa activación del primero con un ión de un metal pesado, normalmente plata o mercurio.⁴²



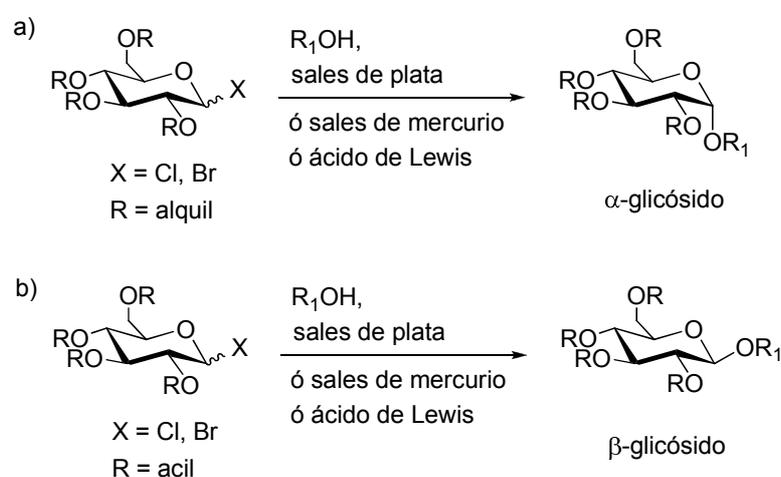
Esquema 11. Método de Koenigs-Knorr.

⁴⁰ Nicolaou, K. C.; Mitchell, H. J. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1624-1672; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 1576-1624.

⁴¹ Hannesian, S.; Banoub, J. *Carbohydr. Res.* **1977**, *53*, C13-C16.

⁴² (a) Koto, S.; Morishima, N.; Zen, S. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **1983**, *41*, 701-717; (b) Paulsen, H. *Chem. Soc. Rev.* **1984**, *13*, 15-45.

En la mayoría de las reacciones de glicosidación, la estereoquímica resultante en el centro anomérico viene determinada por la naturaleza del sustituyente en el C2. Cuando el oxígeno del C2 está protegido con un grupo alquilo o bencilo el efecto anomérico es el que domina y se forma preferentemente el anómero α (esquema 12a). La misma configuración se obtiene con “2-desoxiglicosil-dadores”. Sin embargo, cuando la posición C2 está ocupada por un grupo participante como un éster (esquema 12b), un feniltio, o un grupo fenilseleno, la estereoquímica obtenida (α o β) es la contraria a la del sustituyente en C2 y el producto formado es el 1,2-*trans*.⁴³ Otras modificaciones de las condiciones de Koenigs-Knorr incluyen el uso de ácidos de Lewis y catálisis de transferencia de fase⁴⁴ para activar los haluros anoméricos.



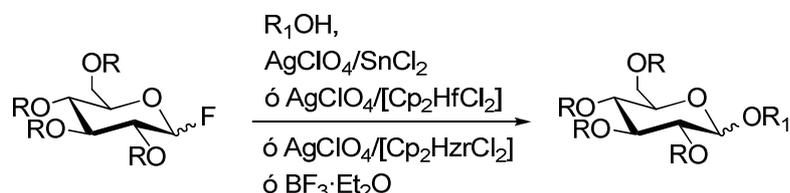
Esquema 12. Formación de α y β -glicósidos utilizando el método de Koenigs-Knorr.

Los fluoruros de glicosilo, aunque ya se conocían desde 1923, se emplearon por primera vez como “glicosil-dadores” en 1981 por el grupo de Mukaiyama (esquema

⁴³ Lemieux, R.; Hayami, J. *Can. J. Chem.* **1965**, *43*, 2162-2173.

⁴⁴ Lemieux, R.; Hendriks, K.; Stick, R.; James, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4056-4062.

13).⁴⁵ Este método ha tenido numerosas aplicaciones debido a las ventajas asociadas a estos compuestos. Son, por lo general, más estables que otros haluros y, a menudo, pueden purificarse por cromatografía. Además, presentan una considerable estabilidad tanto térmica como química.



Esquema 13. Método de los fluoruros de glicosilo.

Los fluoruros de glicosilo pueden obtenerse a partir de lactoles mediante la acción de DAST,^{46a} HF·py,^{46b} tosilato de 2-fluoro-1-metilpiridinio,^{46c} hexafluoropropeno,^{46d} Ph₃P/DEAD/Et₃OBF₄,^{46e} y Selectfluor (esquema 14a).^{46f} También han sido preparados por tratamiento con NBS/DAST (esquema 14b) y NBS/HF·py.⁴⁷ Son activados por exposición a fluorófilos como ácidos de Lewis,⁴⁸ sales de plata, y varios metallocenos.⁴⁹

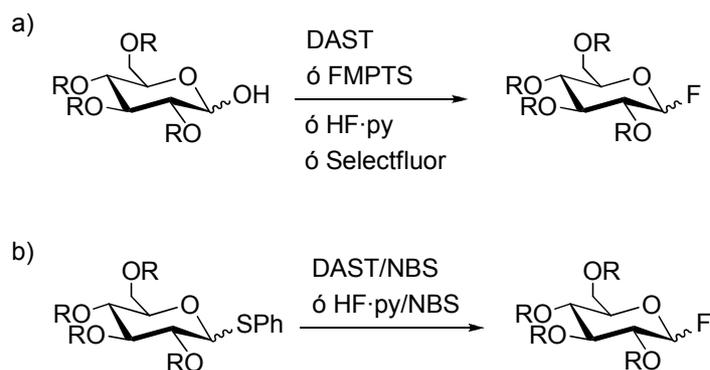
⁴⁵ Mukaiyama, T.; Murai, Y.; Shoda, S. *Chem. Lett.* **1981**, 431-432.

⁴⁶ (a) Rosenbrook, W. Jr.; Riley, D. A.; Lartey, P. A. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 3-4; Posner, G. H.; Haines, S. R. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 5-8; (b) Olah, G. A.; Welch, J. T.; Vankar, Y. D.; Nojima, M.; Kerekes, I.; Olah, J. A. *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 3872-3881; (c) Mukaiyama, T.; Hashimoto, Y.; Shoda, S. *Chem. Lett.* **1983**, 935-938; (d) Araki, Y.; Watanabe, K.; Kuan, F.-H.; Itoh, K.; Kobayashi, N.; Ishido, Y. *Carbohydr. Res.* **1984**, 127, C5-C9; (e) Kunz, H.; Sager, W. *Helv. Chim. Acta* **1985**, 68, 283-287; (f) Burkart, M.; Zhang, Z.; Hung, S.-C.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11743-11746.

⁴⁷ Nicolaou, K. C.; Dolle, R. E.; Papahatjis, D. P.; Randall, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4189-4192.

⁴⁸ (a) Hashimoto, S.; Hayashi, M.; Noyori, R. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 1379-1382; (b) Nicolaou, K. C.; Chucholowski, A.; Dolle, R. E.; Randall, J. L. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 1155-1156.

⁴⁹ (a) Matsumoto, T.; Maeta, H.; Suzuki, K.; Tsuchihashi, G. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 3567-3570. (b) Suzuki, K.; Maeta, H.; Matsumoto, T. Tsuchihashi, G. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 3571-3574.



Esquema 14. Formación de fluoruros de glicosilo a partir de lactoses (a) y de tioglicósidos (b).

Por su parte, los yoduros de glicosilo fueron preparados por primera vez mediante el tratamiento de bromuros de glicosilo con yoduro de sodio en acetona hace más de medio siglo,⁵⁰ y todavía siguen apareciendo nuevos procedimientos para su preparación.⁵¹ Aunque generalmente se ha considerado que son demasiado reactivos como para tener una utilidad sintética, varios grupos de investigación han demostrado que estos “glicosiladores” presentan unas propiedades únicas en reacciones de glicosidación y que a menudo ofrecen ventajas sobre sus congéneres, cloruros y bromuros, en cuanto a tiempos de reacción, eficiencia y estereoquímica obtenida.⁵² De hecho, se han sintetizado varios glicósidos usando yoduros de glicosilo como “glicosiladores”, sobre todo Gervay-Hague y colaboradores, quienes también han llevado a cabo estudios mecanísticos sobre

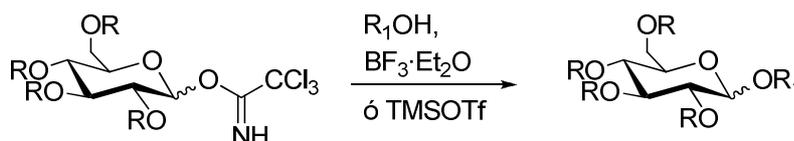
⁵⁰ Helferich, B.; Gootz, R. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, *62*, 2788-2792.

⁵¹ (a) Caputo, R.; Kunz, H.; Mastroianni, D.; Palumbo, G.; Pedatella, S.; Solla, F. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3147-3150; (b) Chervin, S. M.; Abada, P.; Koreeda, M. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 369-372; (c) Adinolfi, M.; Iadonisi, A.; Ravidà, A.; Schiattarella, M.; *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 7863-7866; (d) Bickley, J.; Cottrell, J. A.; Ferguson, J. R.; Field, R. A.; Harding, J. R.; Hughes, D. L.; Kartha, K. P. R.; Law, J. L.; Scheinmann, F.; Stachulski, A. V. *Chem. Commun.* **2003**, 1266-1267.

⁵² (a) Gervay, J.; Hadd, M. J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6961-6967; (b) Hadd, M. J.; Gervay, J. *Carbohydr. Res.* **1999**, *320*, 61-69; (c) Miquel, N.; Vignando, S.; Russo, G.; Lay, L. *Synlett* **2004**, *2*, 341-343; (d) van Well, R. M.; Kartha, K. P. R.; Field, R. A. *J. Carbohydr. Chem.* **2005**, *24*, 463-474.

la formación estereoselectiva de yoduros de α,β -glicosilo.⁵³ En general, estos “glicosiladores” pueden activarse en condiciones básicas para dar β -glicósidos con alta selectividad.⁵⁴ Como alternativa, la anomerización *in situ* de haluros de glicosilo introducida por Lemieux y col.⁵⁵ puede utilizarse para la síntesis selectiva de α -glicósidos.⁵⁶ Yoduros de glucosilo, galactosilo y manosilo mostraron alta reactividad ante aceptores de tipo oxacicloalcano restringidos, en presencia de óxido de magnesio, para dar los correspondientes β -glicósidos con alta selectividad.⁵⁷

De las varias estrategias sintéticas desarrolladas hasta la fecha, las síntesis de glicósidos basadas en imidatos *O*-glicosilados, especialmente tricloroacetimidatos (denominada a menudo “glicosidación de Schmidt”), son probablemente de las más populares. Este procedimiento de glicosilación a través del intermedio tricloroacetimidato (esquema 15), introducido por Schmidt y col.⁵⁸ en 1980, es un método muy potente y ha sido ampliamente utilizado en la síntesis de moléculas complejas.



Esquema 15. Método del tricloroacetimidato.

⁵³ Gervay, J.; Nguyen, T. N.; Hadd, M. J. *Carbohydr. Res.* **1997**, *300*, 119-125.

⁵⁴ El-Badry, M. H.; Gervay-Hague, J. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6727-6728.

⁵⁵ Lemieux, R. H.; Hendriks, K. B.; Sticks, R. V.; James, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4056-4062.

⁵⁶ (a) Lam, S. N.; Gervay-Hague, J. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1953-1965; (b) Lam, S. N.; Gervay-Hague, J. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2039-2042; (c) Lam, S. N.; Gervay-Hague, J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2387-2390.

⁵⁷ Dabideen, D. R.; Gervay-Hague, J. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 973-975.

⁵⁸ Schmidt, R. R.; Michel, J. *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 763-765; *Angew. Chem. Int., Ed. Engl.* **1980**, *19*, 731-732.

Estos tricloroacetimidatos *O*-glicosilados muestran unas excelentes propiedades como dadores en términos de facilidad de preparación, reactividad y aplicabilidad general. Normalmente, se obtienen buenos rendimientos y un alto estereocontrol anomérico en los productos de reacción. La configuración del centro anomérico en el glicósido resultante viene determinada por la configuración anomérica del tricloroacetimidato *O*-glicosilado (inversión o retención), la asistencia anquimérica, la influencia del disolvente y/o efectos termodinámicos o cinéticos. Estos compuestos pueden prepararse fácilmente mediante la adición, catalizada por base, del grupo hidroxilo anomérico a Cl_3CCN en presencia de una base inorgánica (NaH) u orgánica (DBU). Estos “glicosil-dadores” se activan mediante ácidos, normalmente ácidos de Lewis, siendo TMSOTf^{59} y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}^{58}$ los catalizadores más comúnmente usados. También se investigó AgOTf y resultó ser un catalizador suave y en algunos casos más eficiente, sobre todo en las reacciones de glicosidación sensibles a TMSOTf.⁶⁰

Finalmente, es importante señalar que en ninguna de las metodologías descritas en la bibliografía para la formación de enlaces α y/o β glicosídicos, la parte peptídica presenta sus funciones amino y carboxilo protegidas como amidas.

2.1.2. Formación del enlace peptídico

Existen dos metodologías de trabajo generales para llevar a cabo la síntesis de péptidos y proteínas en un laboratorio: la síntesis en disolución, método que podríamos denominar clásico, y la síntesis en fase sólida, metodología más moderna y muy útil para la síntesis de cadenas polipeptídicas de mayor tamaño, si bien ambas metodologías se basan en los mismos conceptos.

⁵⁹ Schmidt, R. R. *Angew. Chem.* **1986**, 98, 213-236; *Angew. Chem. Int., Ed. Engl.* **1986**, 25, 212-235.

⁶⁰ Wei, G.; Gu, G.; Du, Y. *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, 22, 385-393.

Síntesis de péptidos en fase sólida

La idea de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, del inglés *solid-phase peptide synthesis*) fue descrita por primera vez por Merrifield⁶¹ en 1963, y hoy en día es la manera más habitual y sencilla de obtener péptidos. Este método se basa en la unión del aminoácido carboxiterminal (C-terminal) a un soporte insoluble mediante un conector y la posterior elongación secuencial, aminoácido tras aminoácido, de la cadena peptídica siguiendo una estrategia iterativa. Este método de síntesis en fase sólida presenta numerosas ventajas respecto a la síntesis de péptidos en solución. Los rendimientos son buenos debido a que al trabajar con el péptido unido a un soporte sólido, se pueden emplear reactivos en exceso que se eliminan fácilmente tras sencillos procesos de lavado y filtrado. No se producen pérdidas mecánicas de péptido puesto que el soporte sólido al que está unido el péptido permanece en el mismo recipiente durante todo el proceso. Además, las operaciones de lavado y filtrado son sencillas y susceptibles de automatización.

El conector entre el soporte polimérico y el primer aminoácido variará dependiendo del tipo de péptido que se desee obtener (carboxilo, amida, aldehído, etc.). En el caso de los aminoácidos trifuncionales, la cadena lateral está protegida para evitar polimerizaciones o reacciones no deseadas con dichas cadenas. Estos grupos protectores dependen del tipo de grupo funcional del aminoácido y del tipo de estrategia que se emplee para la síntesis.

Existen dos estrategias distintas para la síntesis de péptidos en fase sólida, la estrategia Boc/Bn y la Fmoc/OtBu. La primera utiliza el grupo carbamato de terc-butoxicarbonilo (Boc) como protector de los grupos α -amino y grupos del tipo bencil

⁶¹ Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.

(Bn) como protector de las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales. La estrategia Fmoc/*Ot*Bu emplea el grupo carbamato de 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) como protector temporal del grupo α -amino y grupos del tipo *tert*-butilo (*Ot*Bu) para proteger las cadenas laterales (figura 9).

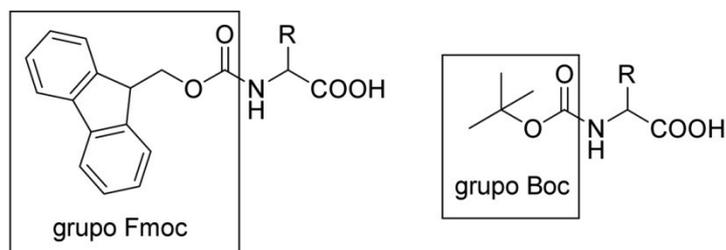
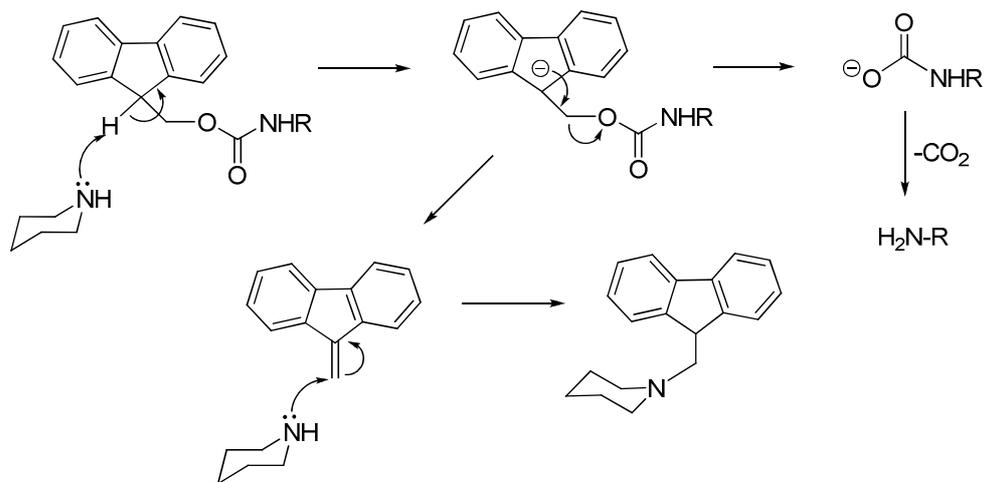


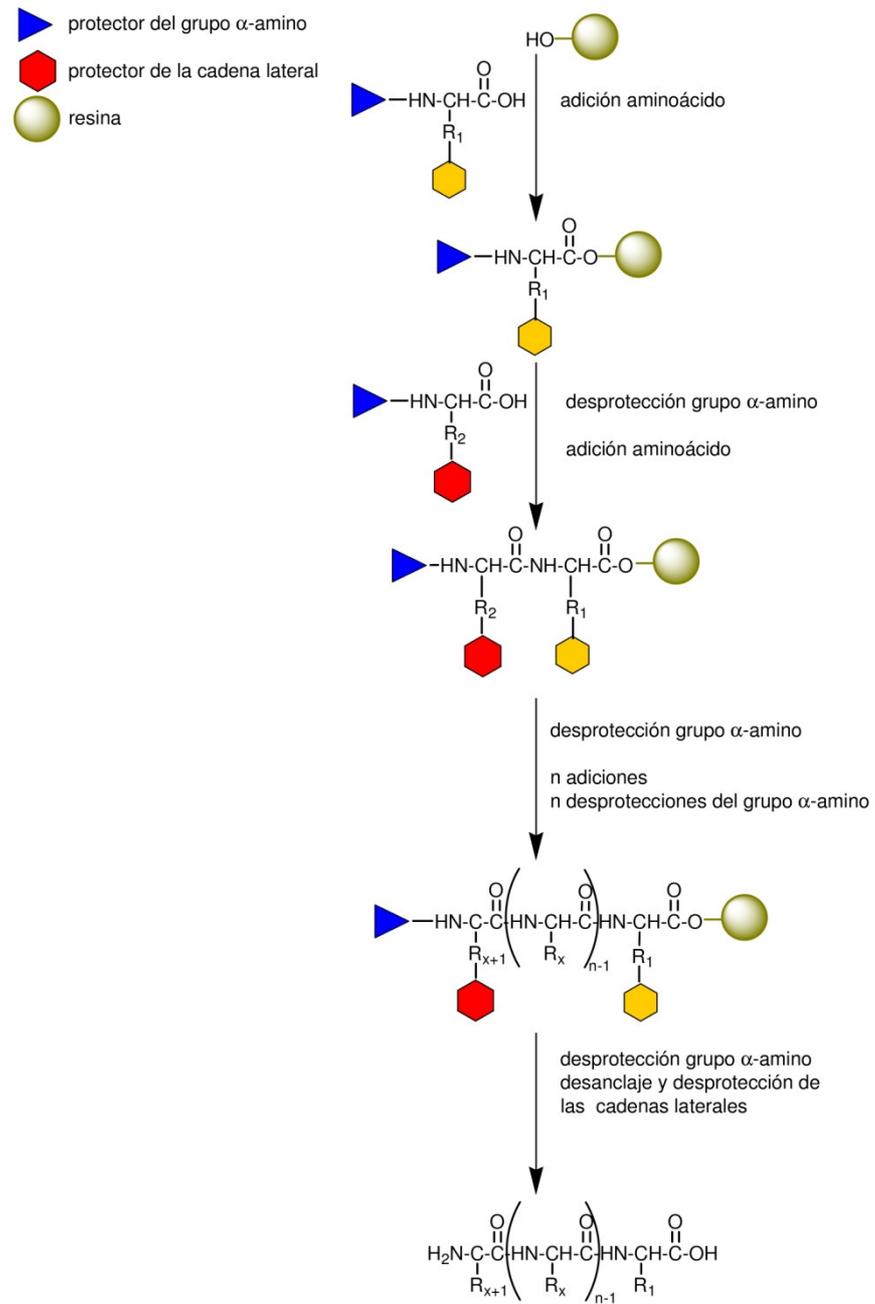
Figura 9. Estructura de los grupos protectores utilizados para aminas.

El grupo protector α -amino se elimina antes de la unión del siguiente aminoácido. La eliminación del grupo protector Boc se realiza en medio ácido mientras que la del grupo Fmoc se realiza en medio básico, habitualmente con piperidina (esquema 16).



Esquema 16. Mecanismo de eliminación del grupo Fmoc.

Una vez que el grupo α -amino se encuentra libre, se une el siguiente aminoácido, previamente activado, al aminoácido anterior formando el enlace peptídico. El proceso de acoplamiento requiere la activación del grupo α -carboxilo del aminoácido entrante de modo que éste sea susceptible de reaccionar con el grupo amino de la cadena de péptido creciente. Este proceso de desprotección y acoplamiento se repite tantas veces como sea necesario hasta completar la secuencia del péptido deseado. Una vez sintetizada la cadena peptídica, ésta se separa del soporte polimérico y se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos, habitualmente en una única etapa. Una visión general del proceso se muestra en el esquema 17.



Esquema 17. Esquema general de la síntesis en fase sólida.

Síntesis de péptidos en disolución

La síntesis de péptidos en disolución también tiene el mismo fundamento y los sucesivos aminoácidos se hacen reaccionar con la cadena peptídica creciente. La formación del enlace peptídico a partir de los grupos amina y ácido carboxílico de los residuos implicados requeriría condiciones de reacción drásticas, ya que al ser un proceso termodinámicamente desfavorable, a temperatura ambiente se generarían simplemente las correspondientes sales. Por ello, para favorecer la formación del enlace amida entre el grupo carboxilato de un aminoácido y el grupo amina del siguiente, es necesario activar el grupo ácido del residuo con el extremo C-terminal, para hacerlo más reactivo frente al ataque nucleófilo de la amina. Tanto la cadena peptídica creciente como el aminoácido que deseamos incorporar a ésta, son compuestos bifuncionales, que poseen un grupo ácido y un grupo amino. Para asegurarnos de que el enlace amida se forme entre los dos grupos deseados, y para evitar una polimerización incontrolada, debemos bloquear o proteger la amina y el carboxilato que no deseamos que reaccionen. De este modo, en la construcción de la cadena peptídica, se deben ir alternando pasos de protección, formación de enlaces amida y desprotección, para liberar los grupos reactivos que van a participar en la formación del siguiente enlace.

Los grupos protectores de aminas pueden ser eliminados fácilmente cuando ya no son necesarios. Los ácidos carboxílicos se protegen comúnmente en forma de ésteres, *terc*-butílico (CO_2tBu), alílico (CO_2AlI) o bencílico (CO_2Bn) por ejemplo.

Como se ha dicho, para que la formación del enlace peptídico sea eficiente y se minimicen los procesos de racemización es necesaria la activación del grupo α -carboxilo del aminoácido entrante. En este sentido, el desarrollo de diferentes estrategias y reactivos que aumentan la electrofilia del grupo ácido ha servido de gran ayuda en el avance de la investigación en este campo. Así, estos compuestos carboxilo pueden ser

activados como haluros de acilo, acil azidas, acilimidazoles, anhídridos, ésteres, etc. Hay diferentes modos de acoplar estos reactivos con la correspondiente amina según se produzca una preactivación previa o la activación sea directamente *in situ*:

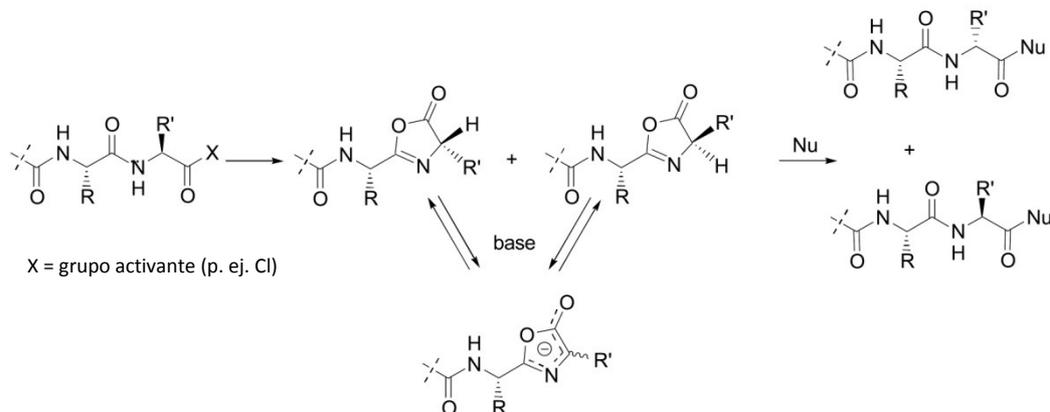
- El agente acilante se forma y aísla como intermedio y a continuación se somete a aminólisis.
- Se forma, en un primer paso, un agente acilante reactivo a partir del ácido, a lo que sigue inmediatamente el tratamiento con la amina.
- El reactivo acilante se genera *in situ* a partir del ácido y en presencia de la amina, mediante la adición de un agente activante o de acoplamiento (esquema 18).



Esquema 18. Esquema de las etapas de activación del ácido y acoplamiento con la amina.

Para solventar los problemas relacionados con la formación del enlace amida se han desarrollado numerosos métodos y agentes de acoplamientos que no sólo den lugar a buenos rendimientos, sino que ayuden también a evitar la racemización de los centros quirales vecinos. Un ejemplo clásico de racemización se observa en la síntesis de péptidos en los que el ácido terminal de la cadena está activado, lo que conduce a menudo a la formación de la correspondiente oxazolona. En condiciones básicas, esta oxazolona racemiza a través de la formación de un intermedio aniónico conjugado. De esta forma, es la mezcla de oxazolonas resultante la que reacciona entonces con un nucleófilo, lo que explica la pérdida de quiralidad del compuesto obtenido (esquema 19). Por ello, el crecimiento de la cadena tiene lugar normalmente desde el extremo C-terminal hacia el N-terminal del péptido, y se deben emplear condiciones de activación suaves. En este

caso, la activación del aminoácido entrante se realiza sobre el α -aminoácido *N*-protegido, evitándose así la formación no deseada de la oxazolona.



Esquema 19. Racemización durante el acoplamiento peptídico a través del intermedio oxazolona.

En distintos estudios recientes se hace una revisión de algunas de las metodologías más utilizadas para la formación del enlace peptídico.⁶² A continuación, se muestran algunos ejemplos, tanto por preactivación del ácido carboxílico como por activación *in situ*:

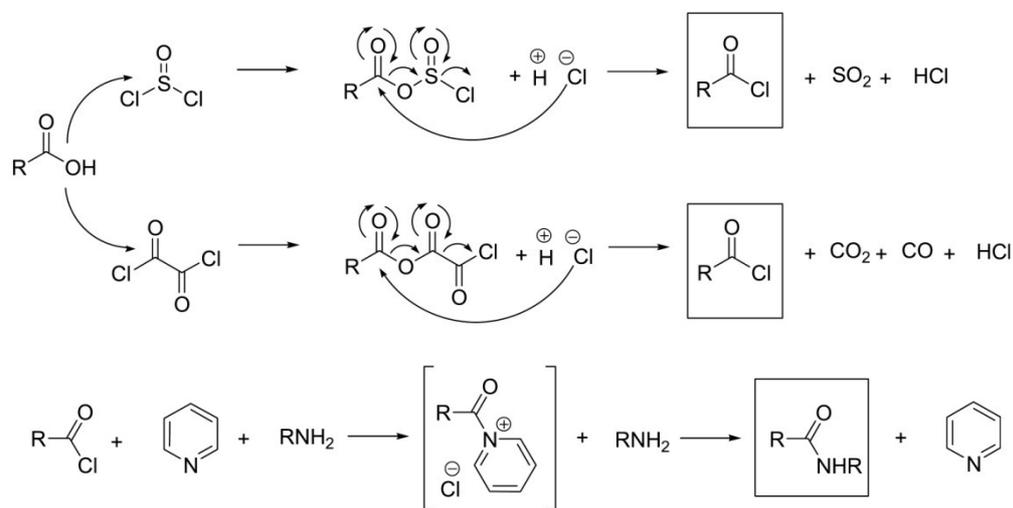
Preactivación

Haluros de acilo

Este método se basa en la activación del grupo carboxilo mediante la formación de su correspondiente haluro de ácido (también llamado haluro de acilo), ya sea el cloruro, el

⁶² (a) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2009**, DOI: 10.1021/cr8003235; (b) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852; (c) Nozaki, S. *J. Peptide Sci.* **2006**, *12*, 147-153; (d) Lippert III, J. W. *ARKIVOC* **2005**, 87-95; (e) Spengler, J.; Böttcher, C.; Albericio, F.; Burger, K. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 4728-4746.

fluoruro, o en menor medida, el bromuro de ácido. Éste es normalmente un proceso en dos etapas, que consiste, primero, en la conversión del ácido en el haluro de acilo para, una vez activado, producirse el posterior acoplamiento, en presencia de base, con la amina correspondiente formándose así el enlace peptídico. En el esquema 20 se muestra un ejemplo de activación con cloruro de acilo.⁶³



Esquema 20. Mecanismo de la formación de cloruro de acilo mediante el uso de cloruro de oxalilo o cloruro de tionilo (arriba). Acoplamiento catalizado por piridina (abajo).

Sin embargo, los cloruros de acilo tienen ciertas limitaciones como el riesgo de hidrólisis, racemización,⁶⁴ pérdida de grupos protectores y otras reacciones secundarias. Algunos de estos problemas como la racemización y ciertas reacciones no deseadas

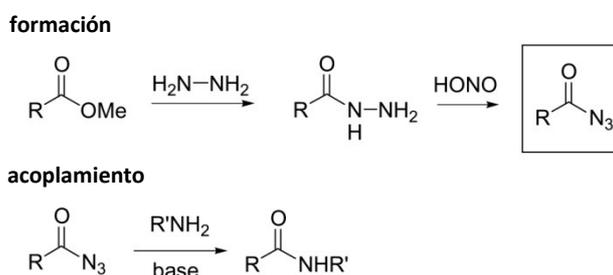
⁶³ (a) *Synthetic Reagents*, Pizey, J. S.; Ed. Wiley: New York, 1974, Vol. 1, pp 321-357; (b) *Handbook of Reagents for Organic Synthesis: Activating Agents and Protecting Groups*, Pearson, A. J.; Roush, W. R.; Eds. Wiley: New York, 1999, pp 370-373; (c) Chu, W.; Tu, Z.; McElveen, E.; Xu, J.; Taylor, M.; Luedtke, R. R.; Mach, R. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 77-87; (d) Adams, R.; Ulrich, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1920**, *42*, 599-611; (e) Kuwajima, I.; Urabe, H. en *Organic Syntheses*, Wiley: New York, 1993, Collect. Vol. VIII, pp 486-489; (f) Knapp, S.; Gibson, F. S. en *Organic Syntheses*, Wiley: New York, 1998, Collect. Vol. IX, pp 516-521.

⁶⁴ Luknitskii, F. I.; Vovsi, B. A. *Usp. Khim.* **1969**, *38*, 1072-1088.

pueden evitarse con el empleo de fluoruros de acilo,⁶⁵ que reaccionan igual que los cloruros pero son más estables frente a la humedad y más reactivos frente a las aminas.

Azidas de acilo

La síntesis de azidas de acilo⁶⁶ es una de las primeras rutas desarrollada por Curtius⁶⁷ para la formación del enlace peptídico. Se pueden preparar en dos pasos a partir del correspondiente éster metílico del ácido. El grupo metoxi es desplazado con hidracina para generar la hidracida de acilo, la cual sufre una reacción de nitrosación para dar lugar a la azida de acilo final (esquema 21).



Esquema 21. Síntesis de enlace amida en dos pasos a través de la preparación de azidas de acilo.

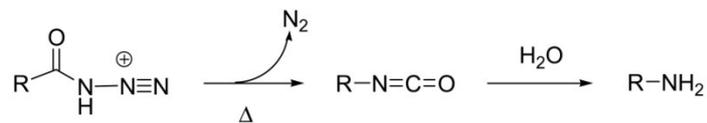
Habitualmente, éste es un método de acoplamiento eficiente que transcurre apenas sin racemización, sin embargo a veces se observa una reacción secundaria conocida como transposición de Curtius, que conduce a la formación del correspondiente isocianato no deseado (esquema 22).⁶⁸

⁶⁵ Para ver una revisión sobre acoplamiento peptídico usando haluros de acilo: Carpino, L. A.; Beyermann, M.; Wenschuh, H.; Bienert, M. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 268-274.

⁶⁶ Klausner, Y.; Bodansky, M. *Synthesis* **1974**, 549-559.

⁶⁷ Curtius, T. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1902**, *35*, 3226-3228.

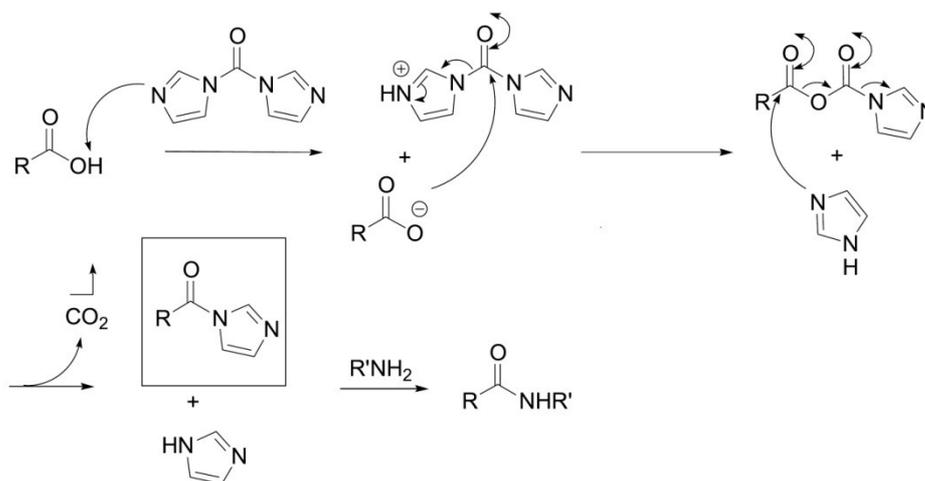
⁶⁸ (a) Curtius, T. *Chem. Ber.* **1890**, *23*, 3023-3033; (b) Curtius, T. *J. Prakt. Chem. [2]* **1894**, *50*, 275-294; (c) Smith, P. A. S. *Org. React.* **1946**, *3*, 337-449.



Esquema 22. Posible reacción secundaria en el método de las acil azidas: Transposición de Curtius

Acilimidazoles mediante CDI

El carbonildiimidazol (CDI)⁶⁹ es un reactivo de acoplamiento útil que permite la formación *one-pot* del enlace amida. Primero, se forman acilcarboxiimidazol e imidazol, pero inmediatamente reaccionan entre ellos para dar lugar a la especie activada, el acilimidazol (esquema 23). En la práctica, el acilimidazol se forma en 1 h y después se añade la amina.



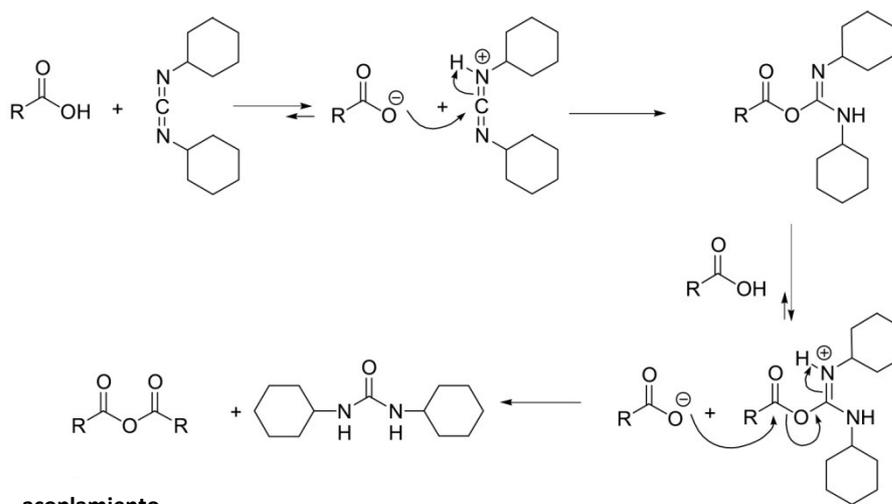
Esquema 23. Preparación *one-pot* del enlace amida utilizando CDI.

⁶⁹ Paul, R.; Anderson, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4596-4600.

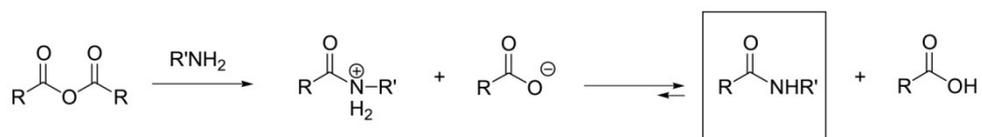
Anhídridos

Otra metodología consiste en la formación de anhídridos de ácido, ya sean simétricos (esquema 24) o mezcla de dos compuestos diferentes (esquema 25).⁷⁰ Los anhídridos son especies que reaccionan fácilmente con una amplia variedad de nucleófilos, entre ellos, por supuesto, aminas. La mayor dificultad que presentan es conseguir regioselectividad en la formación de la amida.

preparación del anhídrido

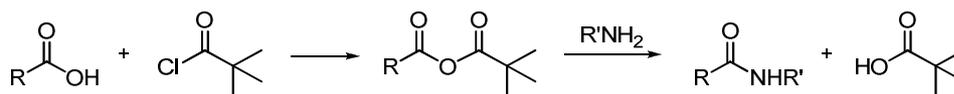


acoplamiento



Esquema 24. Preparación del anhídrido simétrico y acoplamiento posterior con aminas.

⁷⁰ Wittenberger, S. J.; McLaughlin, M. A. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7175-7178.



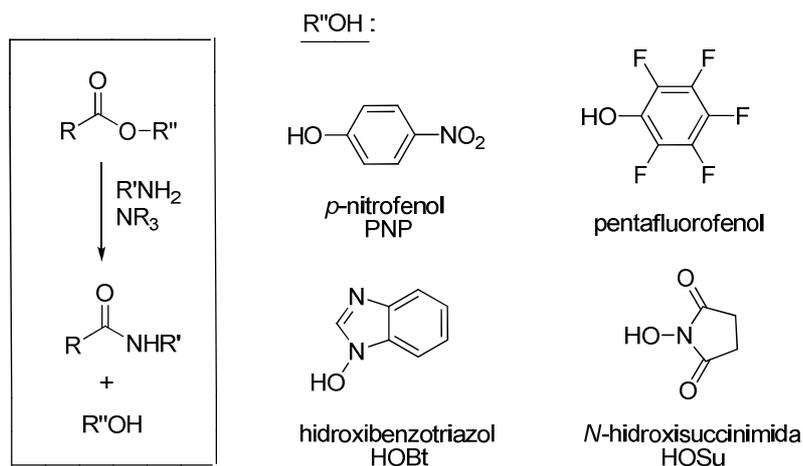
Esquema 25. Acoplamiento en dos pasos a través del correspondiente anhídrido mixto

Ésteres activados

Los ésteres alquílicos presentan una baja reactividad frente al ataque nucleófilo, debido a la menor electrofilia de su grupo carbonilo. Por esta razón, se emplean ésteres activados ya que son más fáciles de hidrolizar y reaccionan con un gran número de nucleófilos. Además, reaccionan con aminas limpiamente en condiciones suaves y con poca racemización. En el siguiente esquema se muestra una selección de diferentes alcoholes normalmente utilizados para la formación de estos ésteres activados (esquema 26). La mayor electrofilia del centro carbonílico en estos ésteres, comparado con los alquílicos, se debe al carácter electroatrayente de estos alcoholes. Para la síntesis peptídica, por ejemplo, los más comúnmente empleados son HOBt, *p*-nitrofenol (PNP),⁷¹ y el pentafluorofenol (Pfp).⁷² Los ésteres pentafluorofenílicos conducen a rápidos acoplamientos con aminoácidos protegidos con Fmoc. Los 2,4,5-triclorofenilésteres son más reactivos que los PNP ésteres y mejores que los derivados de *N*-hidroxisuccinimida (HOSu) como inhibidores de la racemización en la síntesis peptídica.

⁷¹ Gangwar, G. M.; Pauletti, T.; Siahaan, J.; Stella, V. J.; Borchardt, R. T. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1356-1362.

⁷² Kisfaludy, L.; Schön, I.; Szirtes, T.; Nyéki, O.; Lów, M. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *19*, 1785-1786.



Esquema 26. Algunos alcoholes comúnmente usados para la activación de ésteres.

No obstante, estos ésteres siguen siendo menos reactivos que los haluros de ácido y anhídridos y, aunque dan lugar a menos reacciones laterales, son menos utilizados.

A pesar de que todos los compuestos anteriores han sido de gran utilidad en la síntesis peptídica y que, incluso hoy en día, se siguen usando algunos de ellos han ido dando paso a procedimientos más modernos. Entre éstos, el empleo de los agentes de acoplamiento ocupa un lugar determinante.

Activación *in situ*

Agentes de acoplamiento

La síntesis de nuevos aminoácidos no proteinogénicos α,α -disustituidos y su utilización en la síntesis de péptidos y proteínas supone una herramienta muy importante para el avance dentro del campo peptídico. Sin embargo, la incorporación de estos

aminoácidos restringidos en cadenas peptídicas no es tarea fácil, sobre todo debido al impedimento estérico que supone tener α -aminoácidos cuaternarios.⁷³

En este sentido, los agentes de acoplamiento son capaces de generar especies muy reactivas por su extremo C-terminal, facilitando en gran medida la formación del enlace amida. De hecho, la metodología basada en el empleo de estos agentes de acoplamiento es la más comúnmente utilizada para la síntesis de péptidos.

Los primeros agentes de acoplamiento empleados fueron las carbodiimidas, a mediados de los años 50. Todavía hoy son uno de los reactivos de acoplamiento más utilizados y efectivos en la síntesis de péptidos. La *N,N'*-díciclohexilcarbodiimida (DCC)⁷⁴ fue la primera descrita y aún sigue siendo la más popular. Otra de las carbodiimidas más utilizadas es la *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI)⁷⁵ todavía más recomendada que su precursora debido a la gran solubilidad de las ureas que se forman como subproductos. También se emplea a menudo, especialmente para la síntesis en disolución, la sal de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), que al igual que su urea resultante es soluble en agua (figura 10).

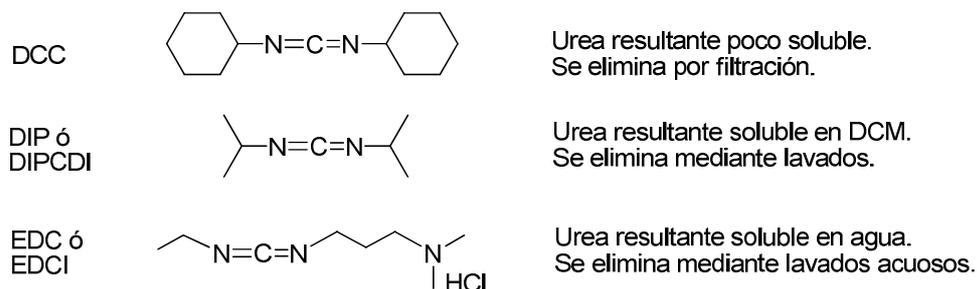


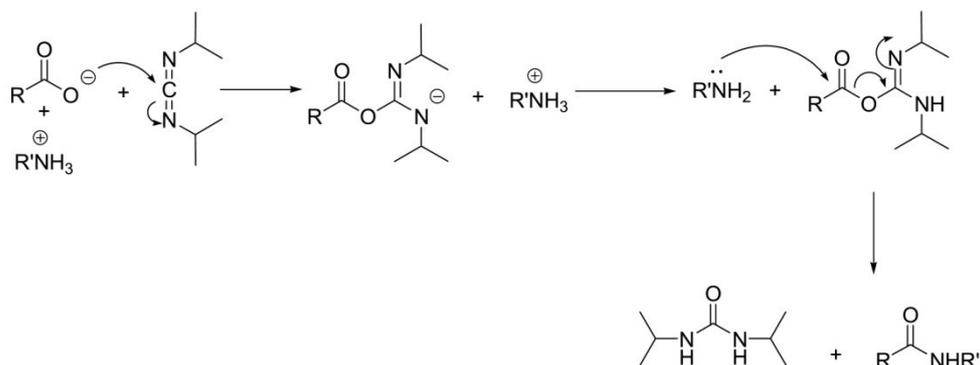
Figura 10. Estructura de las carbodiimidas más comúnmente empleadas.

⁷³ Humphrey, J. M.; Chamberlin, A. R. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243-2266.

⁷⁴ Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.

⁷⁵ Sarantakis, D.; Teichman, J.; Lien, E. L.; Fenichel, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *73*, 336-342.

En principio, no se requieren aminas adicionales durante este proceso *one-pot*. La carbodiimida reacciona con el ácido carboxílico para formar el intermedio de *O*-acilisourea (esquema 27). Éste puede entonces reaccionar directamente con la amina para dar lugar a la amida deseada y a una urea como subproducto. La fuerza dirigente de esta reacción es, de hecho, la formación de este subproducto. Sin embargo, un inconveniente de estos agentes de acoplamiento es que su gran reactividad puede provocar racemización de los aminoácidos y reacciones secundarias no deseadas.

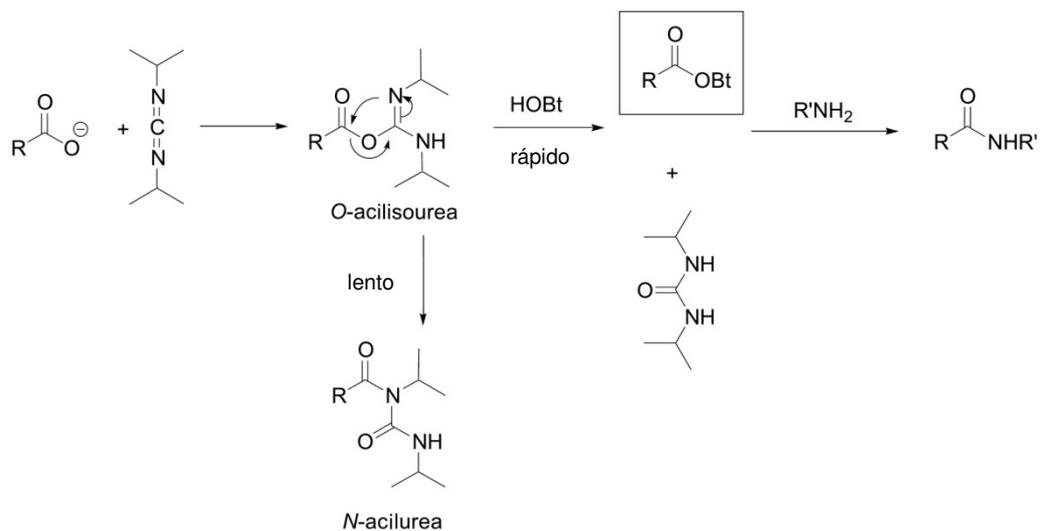


Esquema 27. Acoplamiento peptídico *one-pot* mediante carbodiimida

Así, a menudo, se observa transferencia del grupo acetilo para dar una *N*-acilurea estable (esquema 28). Esta reacción secundaria puede minimizarse haciendo reaccionar el ácido y el agente de acoplamiento a 0 °C antes de añadir la amina. Además, también se pueden prevenir estas reacciones no deseadas añadiendo un nucleófilo concreto que reaccione más rápido que la transferencia de acilo para generar un intermedio todavía activado para el acoplamiento con la amina. Estos nucleófilos, por ejemplo, dimetilaminopiridina (DMAP) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt)⁷⁶ se utilizan como aditivos

⁷⁶ (a) König, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798; (b) Windridge, G. C.; Jorgensen, E. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *17*, 6318-6319.

de las carbodiimidas, y como se ha dicho, aceleran la reacción y reducen el riesgo de racemización.



Esquema 28. Uso de HOBt para minimizar la formación de la *N*-acilurea estable.

En los últimos años han surgido nuevos reactivos que minimizan la formación de subproductos no deseados a la vez que reducen los tiempos de reacción, lo que hace que su utilización se haya extendido mucho. La mayoría son sales de fosfonio o uronio, las cuales, en presencia de una base, pueden convertir el carboxilato del aminoácido protegido en una especie muy activada (figura 11).

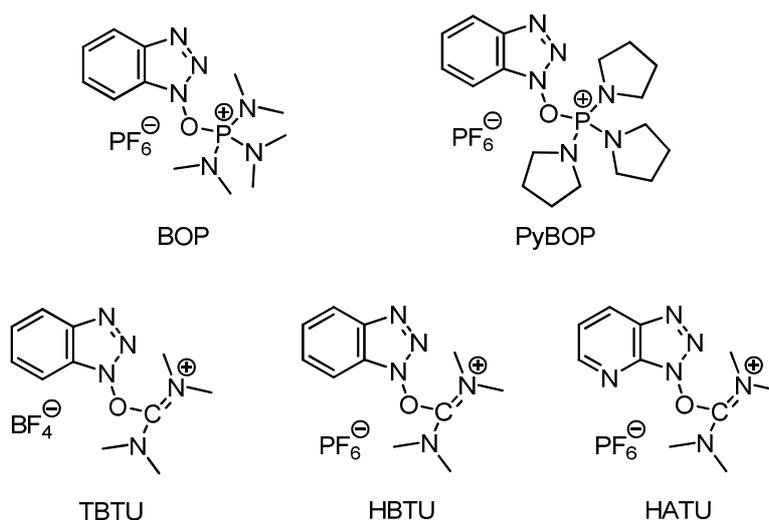


Figura 11. Estructura de algunas sales de fosfonio (BOP, PyBOP) y sales de uronio (TBTU, HBTU y HATU) utilizadas como agentes de acoplamiento.

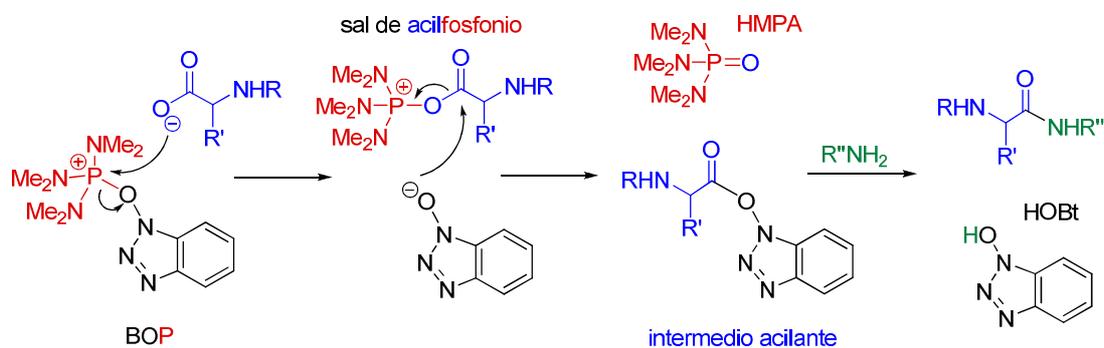
Entre las sales de fosfonio, las más empleadas son el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-*N*-oxil-tris(dimetilamino)fosfonio (BOP)⁷⁷ y el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-*N*-oxil-tris(pirrolidin)fosfonio (PyBOP),⁷⁸ ambas derivadas del HOBT.

El acoplamiento se lleva a cabo mezclando el ácido deseado con la amina en presencia de BOP y NEt₃. El ácido desprotonado reacciona primero con BOP para generar la especie de acilfosfonio activada y HOBT. Éste, a continuación, ataca fácilmente al ácido activado para producir el éster OBt que es muy reactivo y sufre la aminólisis

⁷⁷ Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *14*, 1219-1222.

⁷⁸ (a) Martínez, J.; Bali, J. P.; Rodríguez, M.; Castro, B.; Magous, R.; Laur, J.; Lignon, M. F. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1874-1879; (b) Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron. Lett.* **1990**, *31*, 205-208; (c) Wang, W.; McMurray, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2501-2504.

final. La fuerza dirigente de esta reacción es generar el correspondiente óxido (HMPA)⁷⁹ (esquema 29) que es extremadamente tóxico, lo cual supone un serio inconveniente.



Esquema 29. Procedimiento de formación del enlace peptídico usando BOP.

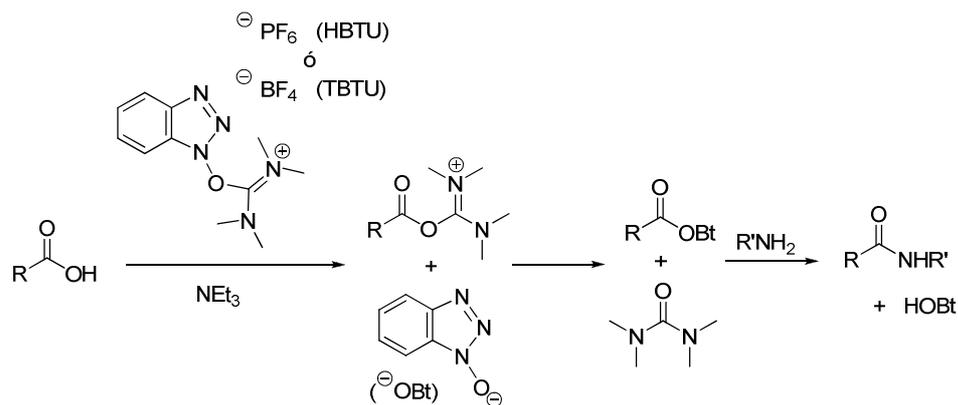
Por ello, se desarrolló la segunda sal de fosfonio anteriormente comentada (PyBop) que es igual de eficaz y genera un subproducto menos tóxico.

En cuanto a las sales de uronio, las más comunes son el hexafluorurato de *N*-óxido de *N*-[(1*H*-benzotriazol-1-il)-dimetilaminometil]-*N*-metilmetanaminio (hexafluorurato de *O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio) (HBTU)⁸⁰ y su análogo con tetrafluoroborato (tetrafluoroborato de *O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (TBTU)).⁸¹ El contraanión no tiene ninguna influencia en la reactividad. El acoplamiento tiene lugar de forma similar al observado con las especies de fosfonio. En este caso, la fuerza dirigente es la generación del subproducto de urea (esquema 30).

⁷⁹ Castro, B.; Dormoy, J.-R.; Dourtoglou, B.; Evin, G.; Selve, C.; Ziegler, J.-C. *Synthesis* **1976**, 751-752.

⁸⁰ (a) Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *15*, 1269-1272; (b) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillesen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.

⁸¹ Pettit, G. R.; Taylor, S. R. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2322-2325; (b) Poulain, R. F.; Tartar, A. L.; Deprez, B. P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1495-1498.



Esquema 30. Procedimiento de acoplamiento *one-pot* mediante HBTU o TBTU.

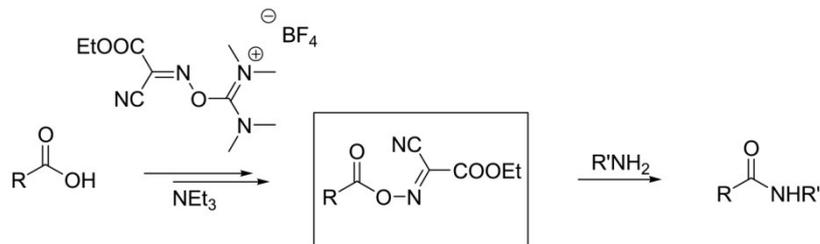
Otra nueva sal de uronio (HATU) ha demostrado ser muy eficaz para acoplamientos difíciles, impedidos estéricamente y, por lo general, da lugar a bajos niveles de racemización.⁸²

Estas especies de uronio pueden formar también subproductos de guanidina, reacción secundaria que puede disminuirse por la adición de HOBT.

Finalmente, cabe mencionar que al igual que para las sales de fosfonio, una de las limitaciones de estos ésteres activados (ésteres OBt) es que son muy voluminosos y por tanto existe un importante impedimento estérico durante la etapa de acoplamiento con la amina (especialmente en α -aminoácidos α,α -disustituidos). Esto hace que la especie activada vaya degradándose poco a poco. Así, se han diseñado también otros nuevos agentes de acoplamiento que ofrecen otros intermedios de activación alternativos. Por ejemplo, el tetrafluoroborato de *O*-((etoxicarbonil)cianometileno)amino)-*N,N,N',N'*-

⁸² (a) Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-439; (b) Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279-2282.

tetrametiluronio (TOTU) genera una aciloxima activada y con su empleo se han descrito acoplamientos peptídicos con poca racemización (esquema 31).⁸³



Esquema 31. Procedimiento de acoplamiento *one-pot* mediante TOTU.

En nuestro caso concreto, esta metodología basada en los agentes de acoplamiento ha sido muy utilizada por nuestro grupo de investigación, en particular el empleo de TBTU, y es, fundamentalmente, la que se llevará a cabo para la formación de la práctica totalidad de los enlaces peptídicos realizados en esta Tesis Doctoral (esquema 30).

2.2. Análisis conformacional de péptidos y glicopéptidos

Una vez sintetizados todos los compuestos objeto de estudio, el siguiente paso consiste en el análisis conformacional de los mismos.

El análisis por espectrometría de masas (EM) es uno de los métodos más sensibles para obtener información sobre la secuencia peptídica. Goletz y col. describieron una estrategia basada en la secuenciación por MALDI-EM que permite la identificación de

⁸³ Stowasser, B.; Budt, K.-H.; Jian-Qi, L.; Peyman, A.; Ruppert, D. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 6625-6628.

los sitios de *O*-glicosilación en un péptido.⁸⁴ En los comienzos, el análisis conformacional de glicopéptidos se hacía principalmente mediante espectroscopia de dicroísmo circular (DC), que proporciona información sobre la estructura secundaria como el contenido en α -hélice y lámina β . El reciente progreso en Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en combinación con métodos computacionales permite un entendimiento más detallado de la estructura local y los procesos dinámicos de estas moléculas.⁸⁵

En nuestro caso, para el análisis conformacional de los compuestos sintetizados, se utilizarán técnicas de (RMN) y cálculos de Dinámica Molecular (DM).

Gracias a la combinación de estas metodologías se puede cuantificar la población de cada una de las distintas conformaciones presentes en disolución para los péptidos y glicopéptidos, así como los factores que influyen en la estabilización de estas estructuras.

Por lo tanto, antes de saber en qué consisten estas técnicas y qué información se obtiene de cada una de ellas, conviene estudiar las estructuras que estos compuestos pueden adoptar.

2.2.1. Estructura de los péptidos y glicopéptidos

La estructura de las proteínas viene definida por cuatro niveles interdependientes, cada uno de los cuales informa de la disposición del anterior en el espacio. Estos niveles corresponden a:

⁸⁴ Goletz, S.; Thiede, B.; Hanisch F.-G.; Schultz, M.; Peter-Katalinic, J.; Müller, S.; Seitz, O.; Karsten, U. *Glycobiology* **1997**, *7*, 881-896.

⁸⁵ Imperiali, B.; O'Connor, S. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 643-649.

1. Estructura primaria, es la secuencia de aminoácidos. Nos indica qué aminoácidos componen la cadena polipeptídica y el orden en que dichos aminoácidos se encuentran.
2. Estructura secundaria, es la que adopta en el espacio dando como resultado la aparición de motivos estructurales (α -hélice, lámina β , etc.)
3. Estructura terciaria, que informa sobre la disposición de la estructura secundaria de un polipéptido al plegarse sobre sí misma originando una conformación globular o fribilar.
4. Estructura cuaternaria, que está representada por el acoplamiento de varias cadenas polipeptídicas, iguales o diferentes, con estructuras terciarias que quedan autoensambladas por enlaces débiles no covalentes.

La actividad biológica que presentan los péptidos y proteínas está estrechamente relacionada con su estructura tridimensional, de hecho, la estructura terciaria de una proteína puede definirse como la conformación tridimensional biológicamente activa. En este sentido, un péptido o proteína sólo puede asumir un número limitado de conformaciones a pesar de que cada uno de los residuos que componen la cadena puede adoptar, por separado, varias conformaciones posibles. Esto se conoce como “paradoja de Levinthal”.

La conformación de cada residuo es función de una serie de ángulos de torsión. Para poder conocer la estructura de un péptido o glicopéptido es importante conocer los ángulos diedros que son relevantes desde el punto de vista conformacional. Uno de los ángulos que va a influir en la estructura secundaria de una cadena peptídica es el ángulo de rotación alrededor del enlace peptídico o amida (ángulo ω). En un enlace peptídico, el mayor carácter electronegativo del átomo de oxígeno del grupo carbonilo hace que el par de electrones libre del nitrógeno amídico esté deslocalizado, concediendo al enlace amida

cierto carácter de doble enlace. Por este motivo, el giro alrededor del enlace amida está limitado. Este enlace puede considerarse un híbrido de resonancia de las dos formas resonantes que se muestran en la figura 12. De las dos posibles conformaciones que puede adoptar el enlace peptídico, *cis* y *trans*, la más estable es la que presenta las cadenas laterales más alejadas, es decir la *trans*, a la que corresponde un ángulo de $\omega=180^\circ$. Ésta es una característica para enlaces peptídicos formados entre todo tipo de aminoácidos salvo para la prolina en la que, por el hecho de tener un nitrógeno disustituido, la barrera energética entre las conformaciones *cis* y *trans* es menor que para el resto de aminoácidos.⁸⁶

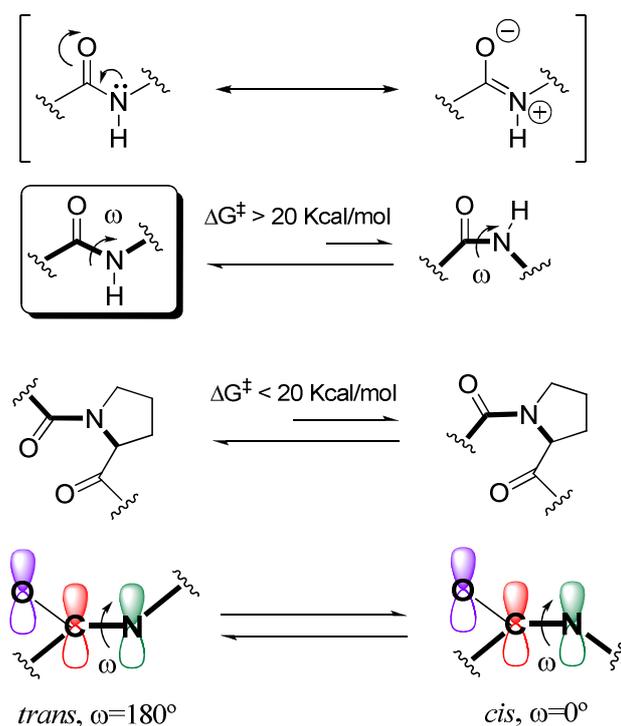


Figura 12. Formas resonantes del enlace amida y conformaciones que puede presentar.

⁸⁶ (a) Maigret, B.; Perahia, D.; Pullman, B. *J. Theor. Biol.* **1970**, *29*, 275-291; (b) Zimmerman, S. S.; Scheraga, H. A. *Macromolecules* **1976**, *9*, 408-416; (c) Reimer, U.; Fischer, G. *Biophys. Chem.* **2002**, *96*, 203-212.

Por otra parte, el carbono α del aminoácido va a actuar como pivote que conecta dos planos contiguos, teniendo cada plano la posibilidad de rotación alrededor del enlace que lo conecta con el carbono α . El ángulo de rotación del enlace entre el $C\alpha$ y el NH se denomina ϕ , mientras que el ángulo de rotación en torno al enlace $C\alpha$ y el $C=O$ se denomina ψ (figura 13).

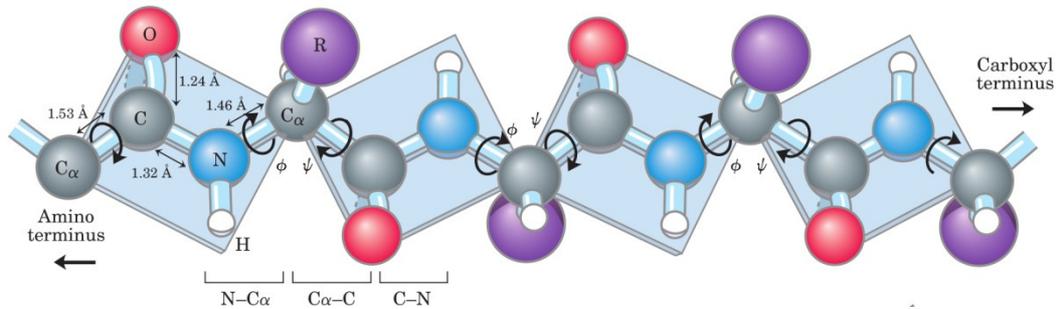


Figura 13. Ángulos ϕ/ψ que definen la conformación del esqueleto peptídico.

Existe un gran número de combinaciones para los valores que pueden tomar los ángulos ϕ y ψ , sin embargo, sólo algunas de ellas van a dar lugar a conformaciones energéticamente favorables. En este sentido, el bioquímico G. N. Ramachandran ideó un gráfico bidimensional para representar la conformación de una cadena polipeptídica de una manera más intuitiva.⁸⁷ En dicho gráfico se representan los valores de los ángulos diedros ϕ y ψ de cada uno de los residuos que componen la cadena peptídica. En el de la figura 14 se muestra la representación de la α -hélice y la lámina β , además de otras conformaciones usuales, como la poliprolina (PPII) ($\phi = -75^\circ$ y $\psi = 145^\circ$).

⁸⁷ Ramachandran, G. N.; Sasisekharan, V. *Adv. Prot. Res.* **1968**, 23, 283-438.

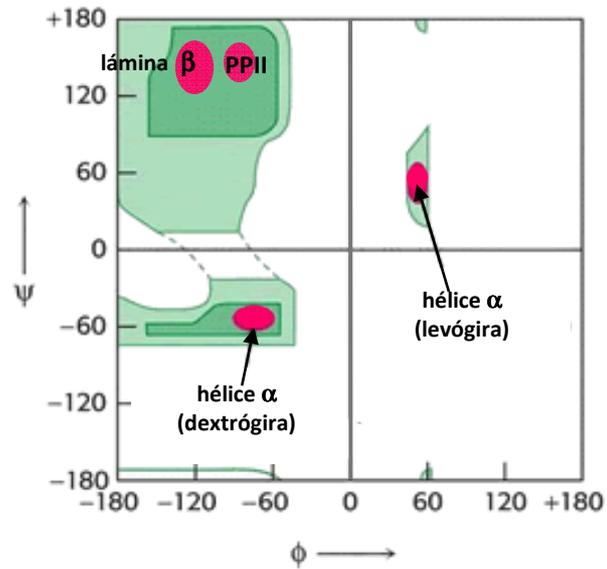


Figura 14. Diagrama de Ramachandran donde se representan las conformaciones más habituales para los péptidos.

En general, se habla de conformaciones extendidas y plegadas para la cadena peptídica, correspondiendo las primeras a conformaciones de lámina β y PPII y las segundas a hélices (α y 3_{10}) y giros (γ y β fundamentalmente). Estas conformaciones son las más favorables energéticamente y dan lugar a estructuras secundarias especialmente estables que forman parte de un gran número de proteínas (figura 15).

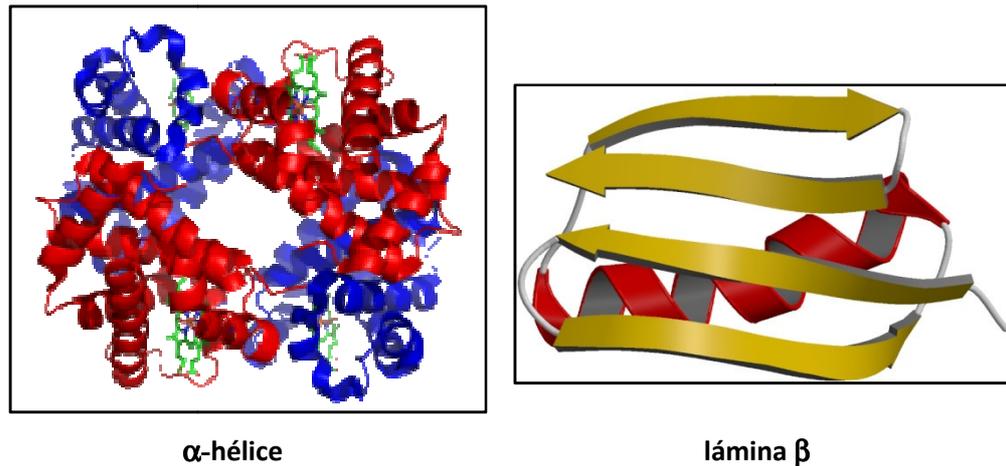


Figura 15. Estructura de una α -hélice y una lámina β (en amarillo).

Hélices

La α -hélice es la más común de las estructuras tipo hélice. En ella, la cadena peptídica adopta una disposición helicoidal, con unos 3.6 aminoácidos por vuelta. Cada aminoácido supone un giro de unos 100° en la hélice y los carbonos α de dos residuos contiguos están separados por 1.5 \AA (figura 16). Los valores de los ángulos de torsión son aproximadamente $\phi = \pm 60^\circ$ y $\psi = \pm 50^\circ$. Esta estructura está muy estabilizada por enlaces de hidrógeno entre el hidrógeno del grupo amida de cada aminoácido (i) y el grupo carbonilo del aminoácido ($i+4$) formándose como un anillo de 13 miembros. De ahí que su nomenclatura completa sea hélice 3.6_{13} . Todas las cadenas laterales de los aminoácidos están orientadas perpendicularmente al eje de la hélice y hacia el exterior para reducir la tensión estérica.

Sin embargo, no todos los aminoácidos pueden formar este tipo de estructura. Por ejemplo, en la prolina (Pro), el átomo de nitrógeno forma parte de un anillo rígido y la rotación alrededor del enlace N-C α no es posible. Además, como el nitrógeno de la

prolina en un enlace peptídico no posee el átomo de hidrógeno, no puede participar en la formación de enlaces de hidrógeno con otros residuos. Por todo ello, el residuo de Pro desestabiliza la α -hélice y raramente se encuentra en este tipo de estructuras.

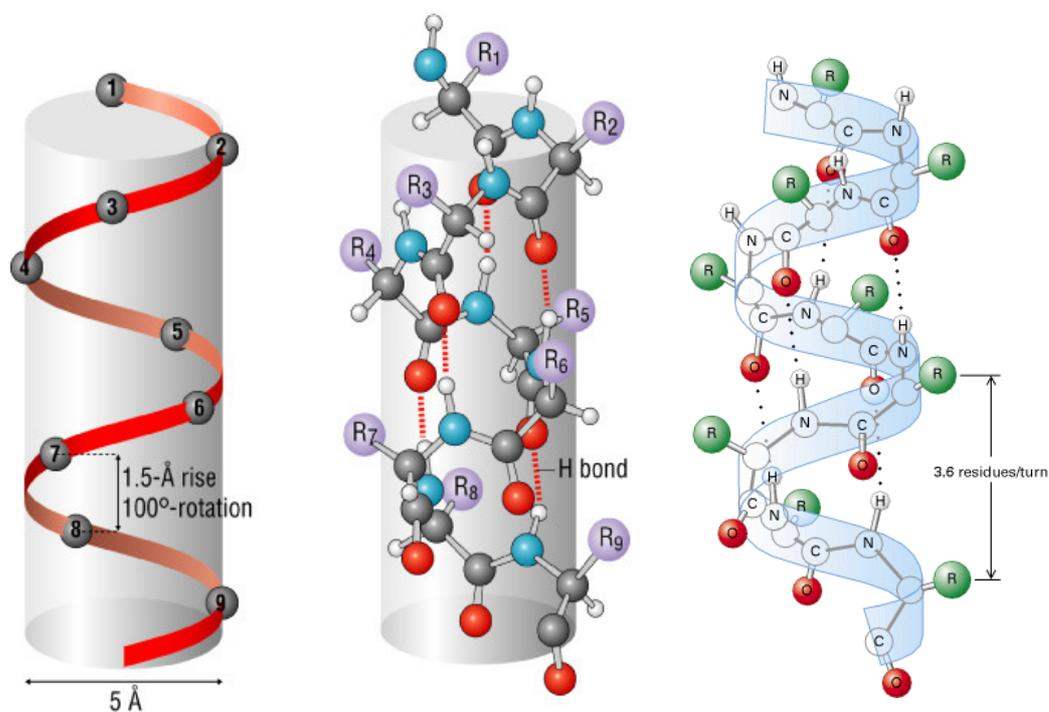


Figura 16. Representaciones de la estructura secundaria de α -hélice.

Existe otro tipo menos común de estructura helicoidal, como es la hélice 3_{10} ($\phi = \pm 60^\circ$ y $\psi = \pm 30^\circ$) en la que los enlaces de hidrógeno se forman entre los residuos i e $i+3$ dando lugar a una estructura más compacta.

Lámina β

Ésta es una conformación más extendida en la que los aminoácidos no forman una hélice sino una cadena en forma de zigzag. La lámina β se forma por el posicionamiento paralelo o antiparalelo de dos cadenas de aminoácidos. El patrón de enlaces de hidrógeno en estas estructuras difiere completamente del observado para las hélices y los enlaces de hidrógeno se forman entre los grupos amino de una de las cadenas polipeptídicas con los grupos carbonilo de la adyacente (figura 17).

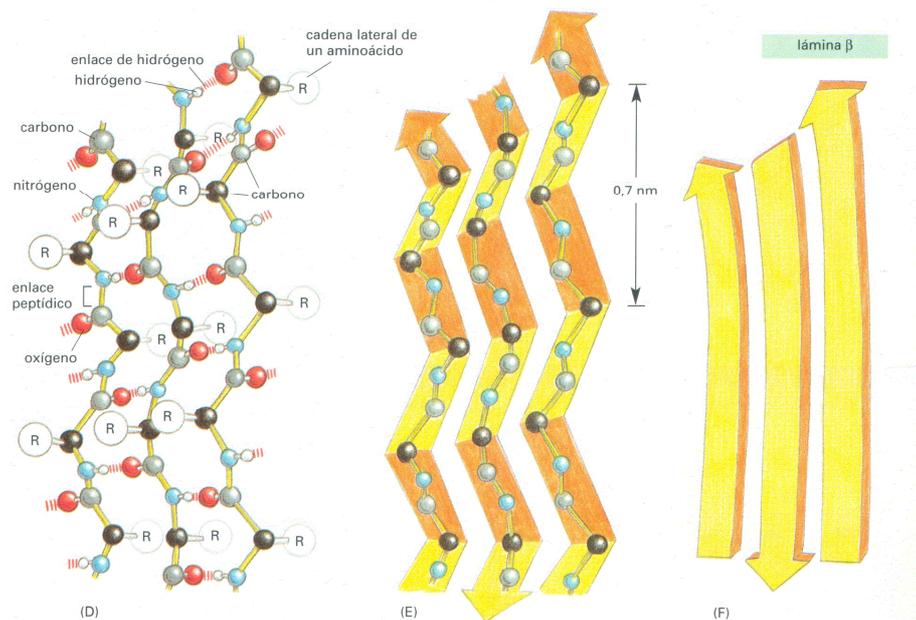


Figura 17. Representación de la estructura secundaria de lámina β .

La estructura de lámina β ideal para una cadena peptídica estaría caracterizada por unos valores de los ángulos ϕ y ψ de $\pm 180^\circ$ correspondientes a la estructura totalmente extendida. Sin embargo, con esta disposición no podrían acomodarse las cadenas laterales

de los aminoácidos sin provocar una distorsión de la misma. Así, las cadenas paralelas toman unos valores de $\phi = -119^\circ$ y $\psi = +113^\circ$ y las antiparalelas de $\phi = -139^\circ$ y $\psi = +135^\circ$ (figura 18), en ambos casos con los grupos R de los aminoácidos adyacentes orientados de manera alternada hacia ambos lados de la lámina y en direcciones opuestas.

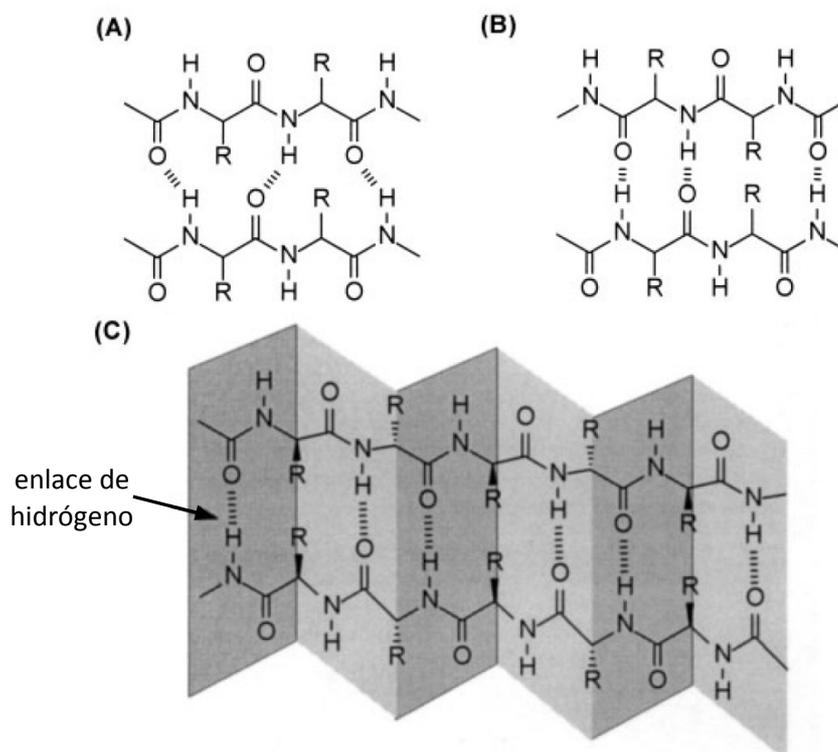


Figura 18. Patrón de enlaces de hidrógeno en las láminas β paralelas (A), antiparalelas (B,C) .

Como ya ocurría para la hélice α , se sabe que el residuo de Pro tampoco tiende a formar láminas β .

En la figura 19 se muestra la estructura terciaria de una proteína que contiene estos dos tipos de estructuras secundarias conectadas por giros.

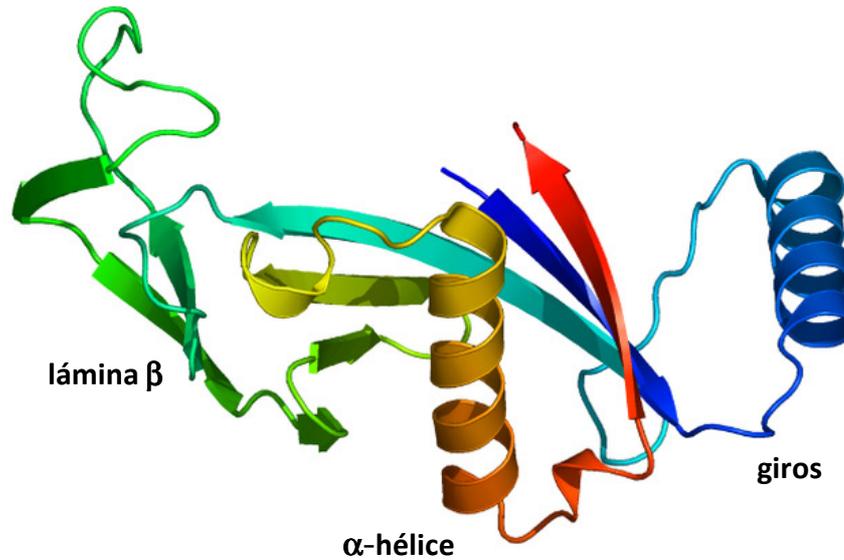


Figura 19. Estructura de una proteína que contiene α -hélices, láminas β y giros.

Giros

Los giros son otro tipo de estructura secundaria que pueden adoptar los péptidos. Aparecen en proteínas globulares en las zonas donde la cadena polipeptídica cambia bruscamente de dirección o de estructura (figura 19). De hecho, son los elementos que conectan los distintos fragmentos de α -hélice y/o lámina β entre sí. Éstos, son los llamados giros de inversión. Sin embargo, los giros también pueden encontrarse en pequeños péptidos. A menudo, aunque no necesariamente, se encuentran estabilizados por un enlace de hidrógeno entre un grupo amino localizado en un extremo C-terminal y el carbonilo del extremo N-terminal. Los giros se clasifican según el número de aminoácidos que estén involucrados. Así, existen desde giros γ (tres aminoácidos), giros β (cuatro aminoácidos), giros α (cinco), o giros π (seis aminoácidos).

Los giros β conectan los extremos de dos segmentos adyacentes de una lámina β antiparalela. Se originan cuando la cadena polipeptídica se pliega sobre sí misma dando lugar a una estructura que consta de cuatro aminoácidos, con el grupo carbonilo del primer residuo formando un enlace de hidrógeno con el hidrógeno del grupo amino del cuarto aminoácido (figura 20). Por su parte, los dos residuos centrales no participan en ningún enlace de hidrógeno. Un criterio general para la existencia de un giro β es que la distancia entre el átomo de oxígeno del carbonilo del residuo i y el nitrógeno amídico del residuo $i+3$ ha de ser igual o inferior a 3.5 \AA . La distancia entre los átomos $C\alpha$ (i) y $C\alpha$ ($i+3$) debe ser menor de 7 \AA . La caracterización de los giros β involucra los ángulos diedros ϕ y ψ de dos aminoácidos, el segundo (residuo $i+1$) y el tercer aminoácido (residuo $i+2$) (figura 20).

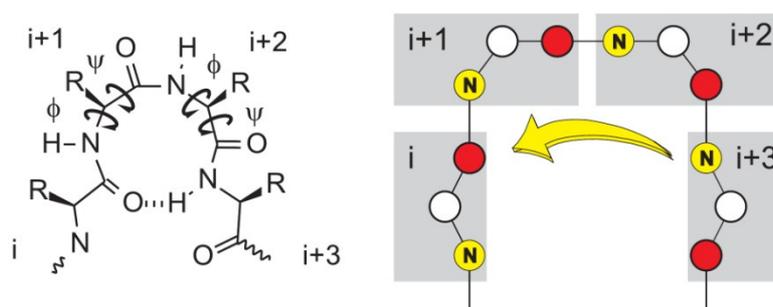


Figura 20. Ángulos de torsión característicos en giros β .

Según estos valores, los giros β pueden clasificarse en varios tipos⁸⁸ siendo los principales los de tipo I, I', II, II', III y III' (figura 21). Posteriormente, se sumaron los giros de tipo IV, V, VI, VII. Para los tipos I y II existen, en ambos casos, dos

⁸⁸ (a) Venkatachalam, C. M. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425-1436; (b) Lewis, P. N.; Momany, F. A.; Scheraga, H. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *303*, 211-229; (c) Chou, P. Y.; Fasman, G. D. *J. Mol. Biol.* **1977**, *115*, 135-175; (d) Wilmot, C. M.; Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 221-232; (e) Creighton, T. E. *Proteins: Structures and Molecular Properties* **1993**. Ed. Freeman, W. H.

conformaciones preferentes (tipo I: $\phi = -60$, $\psi = -30$, y $\phi = -90$, $\psi = 0$; tipo II: $\phi = -60$, $\psi = 120$, y $\phi = 80$, $\psi = 0$). Hay que destacar que los giros β tipo III ($\phi = \pm 60^\circ$ y $\psi = \pm 30^\circ$) son el elemento estructural básico de la hélice 3_{10} . Estas distintas estructuras de giros β difieren por tanto no sólo en orientación espacial de los grupos amino y carbonilo de los aminoácidos $i+1$ y $i+2$ sino también en la de las cadenas laterales.

Algunos tipos de giros están estabilizados intrínsecamente por ciertos aminoácidos. Por ejemplo, la prolina tiene una gran tendencia a formar parte de giros β ya que los enlaces peptídicos en los que está involucrado el nitrógeno de la prolina pueden adoptar fácilmente la configuración *cis*, susceptible de dar lugar a un giro de este tipo. De los enlaces peptídicos en los que está presente el nitrógeno amídico de la prolina, alrededor del 6% están en configuración *cis*, varios de ellos formando parte de giros β . El anillo de pirrolidina en la L-Pro restringe el ángulo diedro ϕ a un valor de -60° . Por tanto, la prolina con un enlace peptídico *trans* se encuentra fundamentalmente en posición $i+1$ en los giros β tipo I y II. Cuando el enlace es *cis*, aparece en posición $i+2$ del tipo VI, por lo que también se llama giro prolina.

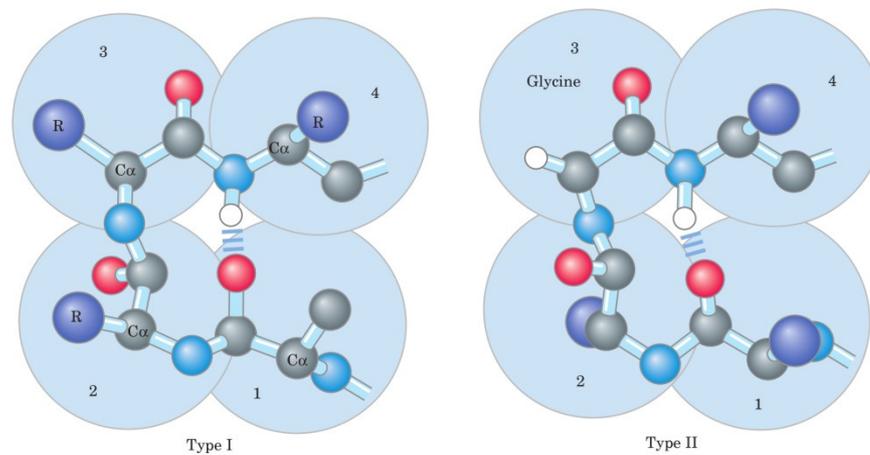


Figura 21. Estructuras de giros β tipo I y II (con glicina en el tercer residuo).

Para la identificación de algunos tipos de giros β existen patrones de RMN característicos según los NOEs que se observan. De hecho, la identificación de giros β al final de las hebras de lámina β es inmediata porque suponen una clara interrupción de los patrones NOE normales característicos de lámina β . Más concretamente, por ejemplo, tanto en el tipo I como en el II existe un NOE fuerte entre $\text{NH}(i+2)\text{--NH}(i+3)$. Los giros tipo II se identifican fácilmente por la ausencia de otros NOEs entre NH--NH y por un NOE fuerte $\text{H}\alpha\text{--NH}(i+2, i+3)$. Por su parte, el tipo I muestra un NOE débil $\text{H}\alpha\text{--NH}(i+2, i+3)$ y normalmente se observa un NOE $\text{NH--NH}(i+1, i+2)$. El tipo I es similar a la hélice α excepto en que presenta un NOE $\text{H}\alpha\text{--NH}(i+1, i+3)$ y no se observa sin embargo un patrón de NOEs NH--NH repetido. Finalmente, los protones NH de los residuos $i+1$ e $i+2$ están expuestos al disolvente, mientras que el $\text{NH}(i+3)$ normalmente forma parte de un enlace de hidrógeno con el $\text{CO}(i)$ en ambos tipos de giros β . Por ello, este $\text{NH}(i+3)$ tiene una relación de intercambio H/D menor.

Por su parte, los giros γ , que son menos comunes e involucran tres residuos, se originan por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el primer residuo (i) y el tercero ($i+2$) (figura 22). Se pueden dividir en clásicos e inversos^{88e} en función de los valores de los ángulos diedros ϕ y ψ del residuo de la posición $i+1$.

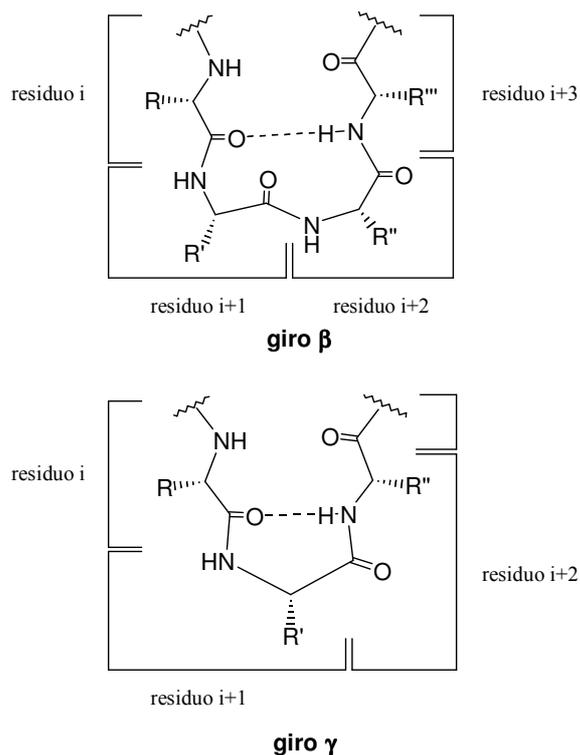


Figura 22. Estructura de los giros β y γ .

Tanto los giros β como los γ son muy importantes en funciones de reconocimiento a nivel molecular,^{88a,b,d} como por ejemplo en el reconocimiento de los antígenos por los anticuerpos⁸⁹ y en la fosforilación⁹⁰ o glicosilación⁹¹ de proteínas.

⁸⁹ (a) Dyson, H. J.; Cross, K. J.; Houghton, R. A.; Wilson, I. A.; Wright, P. E.; Lerner, R. A. *Nature* **1985**, *318*, 480-483; (b) Piconi, D.; Temussi, P. A.; Marastoni, M. M.; Tomatis, R.; Motta, A. *FEBS Lett.* **1988**, *231*, 159-163; (c) Rini, J. M.; Schulze-Gahmen, U.; Wilson, I. A. *Science* **1992**, *255*, 959-965.

⁹⁰ (a) Reed, J.; Kinzel, V.; Cheng, H. -C.; Walsh, D. A. *Biochemistry* **1987**, *26*, 7641-7647; (b) Tinker, D. A.; Krebs, E. A.; Feltham, I. A.; Atta-Poku, S. K.; Ananthanarayanan, V. S. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 5024-5026.

⁹¹ Imperiali, B.; Shannon, K. L.; Rickert, K. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7942-7944.

Por otro lado, otro factor que también va a influir en la conformación de cada residuo y por tanto en la de los péptidos o glicopéptidos de los que forme parte, es la disposición espacial de la cadena lateral.⁹² Para la cadena lateral se define el ángulo χ^1 de rotación alrededor del enlace $C\alpha-C\beta$, tal como se muestra en la figura 23.

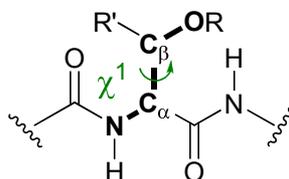


Figura 23. Ángulo χ^1 que define la conformación de la cadena lateral.

Por último, para el caso de los glicopéptidos existe un factor adicional a tener en cuenta. Es la disposición espacial del carbohidrato, que va a venir dada por los dos ángulos diedros que se muestran en la figura 24. El ángulo diedro alrededor del enlace entre el $C\beta$ del péptido y el O del enlace glicosídico se denomina ψ , mientras que el diedro entre el O del enlace glicosídico y el C anomérico del carbohidrato se denomina ϕ (figura 24). Para no confundirlos con los ángulos diedros que definen la conformación del esqueleto peptídico, a partir de ahora se denominarán ϕ_s y ψ_s , donde la letra 's' hace referencia a *sugar*, y los de la parte peptídica serán ϕ_p y ψ_p .

⁹² (a) Hruby, V. J.; Li, G.; Haskell- Luevano, C.; Shenderovich, M. *Pept. Sci.* **1997**, *43*, 219-266;
 (b) Hruby, V. J.; Cowell, S. M.; Lee, Y. S.; Cain, J. P. *Cur. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2785-2789.

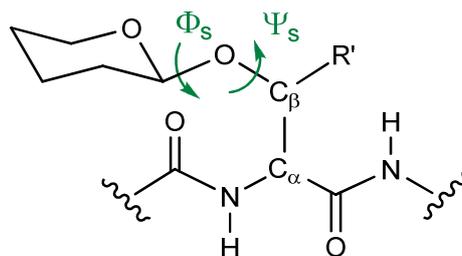


Figura 24. Ángulos ϕ_s/ψ_s que definen la conformación del enlace glicosídico.

A continuación, se introducen algunos aspectos estereoelectrónicos de los carbohidratos para poder entender la conformación y disposición espacial que van a presentar, posteriormente, los correspondientes glicopéptidos objeto de estudio.

Los factores fundamentales que determinan la conformación y estructura tridimensional de los carbohidratos son dos: los efectos estéricos, como en cualquier molécula, y los efectos estereoelectrónicos. Entre estos últimos, los más importantes son los denominados efecto “anomérico” y efecto “exo-anomérico”.⁹³

⁹³ (a) Tvaroska, I.; Bleha, T. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1989**, *47*, 45-123; (b) Thatcher, G. R. C. *The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects*, American Chemical Society, Washington DC **1993**; (c) Lemieux, R. U.; Bock, K.; Delbaere, L. T. J.; Koto, S.; Rao, V. S. *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 631-653; (d) Wolfe, S.; Whangbo, M. H.; Mitchell, D. J. *Carbohydr. Res.* **1979**, *69*, 1-26. (e) Praly, J. P.; Lemieux, R. U. *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 213-223; (f) Thogersen, H.; Lemieux, R. U.; Bock, K.; Meyer, B. *Can. J. Chem.*, **1982**, *60*, 44-57; (g) Pophristic, V.; Goodman, L. *Nature* **2001**, *411*, 565-568; (h) Schreiner, P. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 3579-3581.

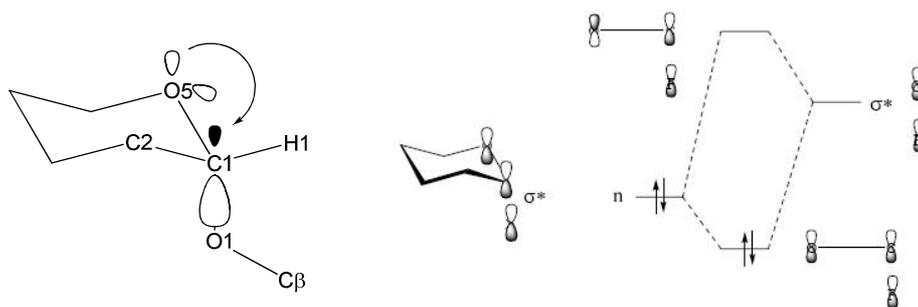


Figura 25. Efecto anomérico.

El efecto anomérico determina que, para los sustituyentes electronegativos en posición 1 de los anillos de piranosa, la orientación axial es más estable que la ecuatorial, en contra de lo previsible debido a las interacciones estéricas desestabilizantes 1,3-diaxiales. Esta preferencia tiene su origen en la interacción por deslocalización hiperconjugativa de un par electrónico no enlazante (del orbital n) del oxígeno endocíclico O5 con el orbital vacío antienlazante σ^* del enlace contiguo C1-O1 (figura 25). Esto es posible, únicamente, en la orientación axial porque es necesaria una disposición antiperiplanar de ambos orbitales, algo que sólo se cumple en los enlaces α -glicosídicos, conduciendo a una situación de estabilidad energética. Debido a este hecho, en la configuración axial (anómero α) se observa un acortamiento del enlace O5-C1, un alargamiento del enlace C1-O1 y un aumento del ángulo O5-C1-O1, con respecto al análogo ecuatorial. Los carbohidratos que presentan una configuración anomérica α en el enlace glicosídico, presentan un valor del ángulo diedro determinado por este enlace de $\phi_s=60^\circ$. La magnitud del efecto anomérico varía con la naturaleza del grupo electronegativo, con la polaridad del disolvente y con la orientación y naturaleza química del resto de sustituyentes de la molécula (figura 26).

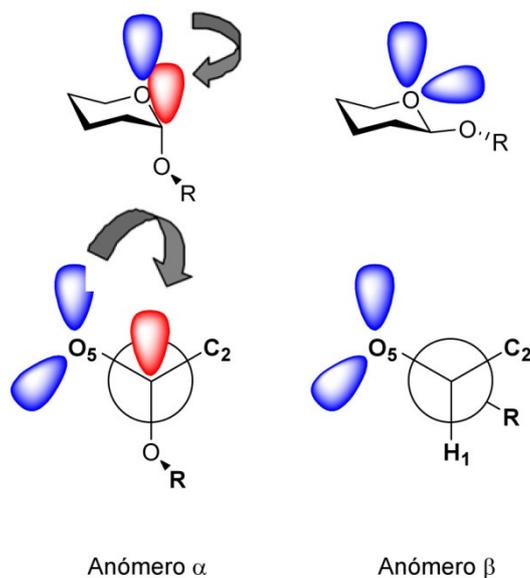


Figura 26. Representación esquemática del efecto anomérico.

Por otro lado, el efecto exo-anomérico se refiere al predominio de una orientación de tipo *gauche* para la torsión exocíclica, es decir, afecta al ángulo diedro ϕ_s . Este efecto determina que se encuentren favorecidas aquellas conformaciones alrededor del enlace glicosídico que permitan la interacción entre el par electrónico no enlazante (orbital n) del átomo de oxígeno exocíclico O1 con el orbital vacío no enlazante σ^* del enlace endocíclico C1-O5 (figura 27). Para que esto ocurra es necesaria también la disposición antiperiplanar de ambos orbitales. Este efecto influye notablemente en las conformaciones del ángulo diedro $\phi_s = \text{O5-C1-O1-C}\beta$, siendo responsable de la rigidez conformacional que normalmente presenta este ángulo.

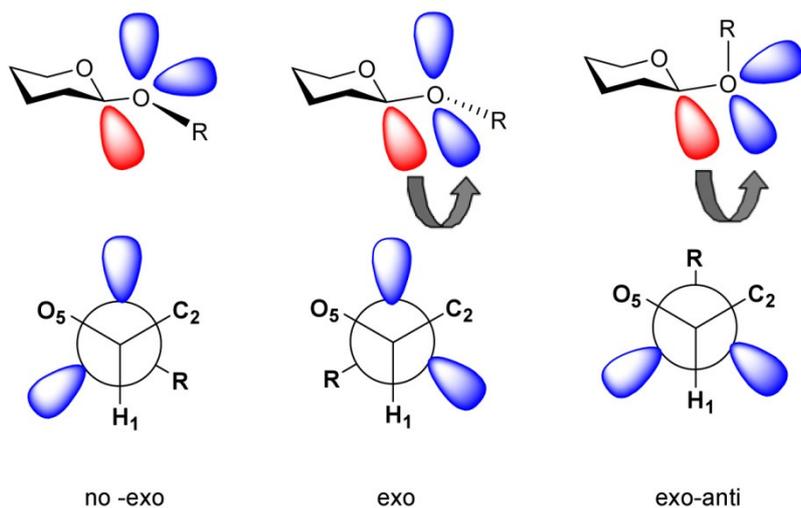


Figura 27. Representación esquemática del efecto exo-anomérico.

En este sentido, tanto para el enlace glicosídico α como para el enlace glicosídico β se obtienen dos conformaciones estabilizadas debido al efecto exo-anomérico, siendo ϕ_s de $+60^\circ$ y -60° . Sin embargo, la situación de mínima energía para el enlace glicosídico α se corresponde con $\phi_s = +60^\circ$ y para el enlace glicosídico β con $\phi_s = -60^\circ$, debido a que estas conformaciones presentan menor impedimento estérico (figura 28).

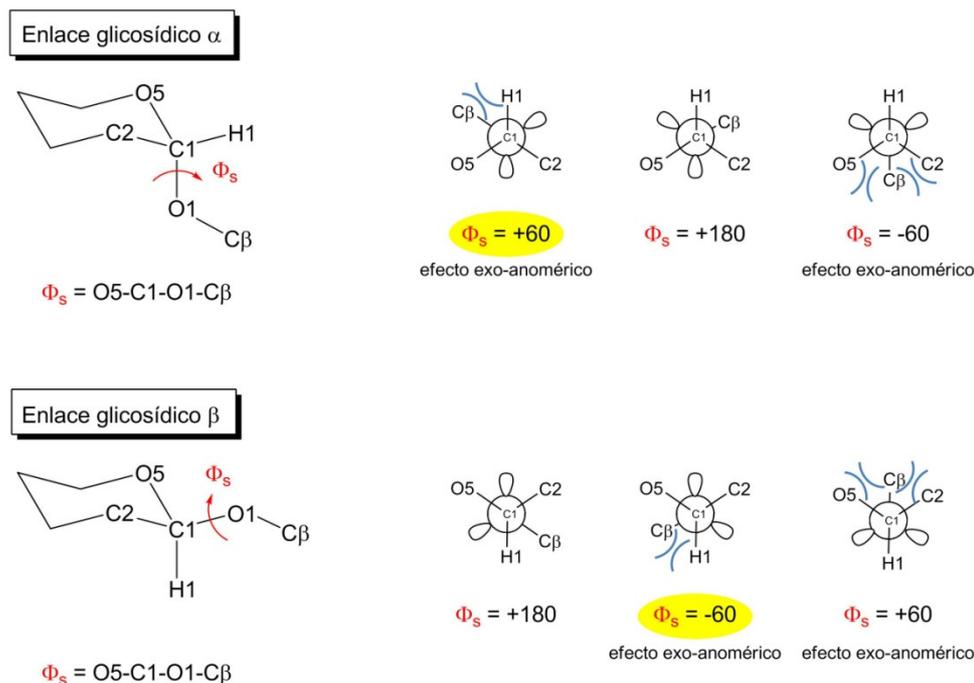


Figura 28. Proyección de Newman del enlace C1-O1.

Por tanto, en resumen, se puede concluir diciendo que la estructura secundaria de péptidos y glicopéptidos es función, en último término, de los valores de los ángulos diedros ω , ϕ_p , ψ_p , χ^1 , ϕ_s y ψ_s .

Para conocer estos valores de los ángulos diedros ω , ϕ_p , ψ_p , χ^1 , ϕ_s y ψ_s de los péptidos y glicopéptidos y poder determinar su estructura existen varias técnicas. En el caso del estudio en estado sólido, la técnica más potente es la difracción de rayos X, mientras que para el estudio en disolución, la técnica más empleada es, además de la espectroscopía de infrarrojo o el dicroísmo circular, la resonancia magnética nuclear (RMN) complementada con cálculos teóricos como la dinámica molecular, como se ha

mencionado anteriormente. En la presente memoria, se realizará el estudio estructural de algunos péptidos en estado sólido mediante difracción de rayos X. Además, tanto para los péptidos (porque sus preferencias conformacionales pueden variar en disolución) como para los glicopéptidos (para los que es difícil obtener mono-cristales) se llevará a cabo también su análisis conformacional en disolución utilizando la RMN combinada con cálculos de DM y también, en algunos casos, con cálculos DFT.

2.2.2. Técnicas de RMN

Los estudios estructurales de RMN en glicoproteínas constan, en general, de tres fases. La primera es la adquisición de espectros, la segunda consiste en la asignación y extracción de información estructural útil y la tercera consiste en el “modelado/refinado” de la molécula de acuerdo con la información experimental. Estas tres etapas no son totalmente independientes. Así, a veces, puede ser necesario realizar cálculos preliminares para ayudar en la asignación o adquirir experimentos en diferentes condiciones para discernir alguna restricción que puede resultar clave en el cálculo de la/s estructura/s.

Las principales fuentes de información estructural de las que disponemos con la técnica de RMN son las medidas del efecto nuclear Overhauser (NOE),⁹⁴ las constantes de acoplamiento escalar (3J), tanto homo- como heteronucleares,⁹⁵ y los desplazamientos

⁹⁴ Neuhaus, D.; Williamson, M. P. “The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis”, VCH Publishers, New York, **1989**.

⁹⁵ (a) Wijmenga, S. S.; Mooren, M. M. W.; Hilbers, C. W. “NMR in Macromolecules”, **1993**, G. C. Robert, IRL, Press, Oxford; (b) Case, D. A.; Dyson, A. J.; Wright, P. E. “Methods in enzymology”, **1994**, 239C, 392-416; (c) Seip, S.; Balbach, J.; Kessler, H. *J. Magn. Reson. B*, **1994**, *104*, 172-179.

químicos (δ) homo- y heteronucleares.⁹⁶ Todos estos parámetros están *promediados* para todas las posibles conformaciones presentes en disolución.

1. Efecto NOE

La principal fuente de información estructural viene dada por el denominado efecto NOE.⁹⁴ El efecto NOE es el resultado del cambio observable de la intensidad de la señal de resonancia de un núcleo debido a la transferencia de la magnetización, a través del espacio, de un spin a otro. Es una interacción dipolo-dipolo y como tal, depende de la distancia (r^{-6}). El NOE funciona como mecanismo de relajación y además, este efecto nos permite medir distancias interatómicas de pocos angstroms. Es bien conocido que los efectos NOE son extremadamente útiles para determinar la estructura tridimensional de cualquier tipo de molécula en disolución. La intensidad del NOE entre dos protones está relacionada con la distancia promedio que los separa. En general, los protones situados a más de 5 Å de distancia proporcionan una señal demasiado débil para ser observada. En este trabajo se llevarán a cabo dos tipos de experimentos NOE, los 1D-NOESY que se realizan en D₂O, y los 2D-NOESY que se hacen en una mezcla de H₂O/D₂O para poder obtener las distancias interprotónicas en las que están involucrados los protones de amida. La manera de obtener las distancias en los 1D-NOESY es a partir de las curvas de crecimiento NOE, que representan los valores de NOE para dos protones a distintos tiempos de mezcla. Estas curvas están relacionadas con las correspondientes distancias interprotónicas,⁹⁷ aplicando la aproximación de espines aislados (ISPA, del Inglés: Isolated Spin-Pair Approximation). Por otro lado, el método para obtener las distancias en un 2D-NOESY es semicuantitativo, por integración de los correspondientes picos de

⁹⁶ (a) Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647-1651; (b) Wishart, D. S.; Sykes, B. D. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 171-180.

⁹⁷ Haselhorst, T.; Weimar, T.; Peters, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10705-10714.

cruce en el espectro. De este manera, obtenemos una gran cantidad de distancias promedio interprotónicas, importantes para elucidar la estructura del compuesto.

Patrones NOE característicos

Sin duda alguna, los NOEs secuenciales, es decir NOEs entre los protones de aminoácidos unidos directamente en la secuencia peptídica, son claves en el análisis estructural de péptidos y proteínas. De hecho, la observación de NOEs $\text{NH}(i)$, $\text{NH}(i+1)$ es característico de conformaciones plegadas tipo α -hélice. Por el contrario, la presencia de un NOE intenso $\text{NH}(i)$, $\text{H}\alpha(i+1)$, junto con la ausencia de NOE $\text{NH}(i)$, $\text{NH}(i+1)$, sugiere la existencia de conformaciones extendidas tipo lámina β .⁹⁸ En la figura 29 se recogen algunos de los NOEs relevantes para el análisis conformacional de péptidos.

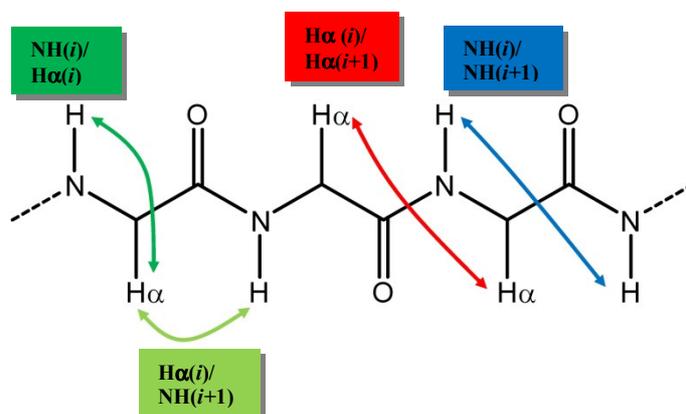


Figura 29. NOEs relevantes en el análisis estructural de péptidos y proteínas.

⁹⁸ Dyson, H. J.; Wright, P. E. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **1991**, *20*, 519-538.

2. Constantes de acoplamiento escalar

Las constantes más fáciles de obtener son las constantes entre protones vecinales conectados por tres enlaces (3J). Estas constantes están relacionadas con los correspondientes ángulos diedros de torsión a través de las ecuaciones de Karplus,⁹⁹ donde los valores de las constantes se ajustan empíricamente a cada caso particular (figura 30). En el caso de las proteínas, las constantes ${}^3J_{\text{NH},\text{H}\alpha}$ dan información acerca de la conformación del esqueleto peptídico (ángulo diedro ϕ_p), mientras que las constantes ${}^3J_{\text{H}\alpha,\text{H}\beta}$ están relacionadas con la conformación de la cadena lateral (ángulo χ^1).

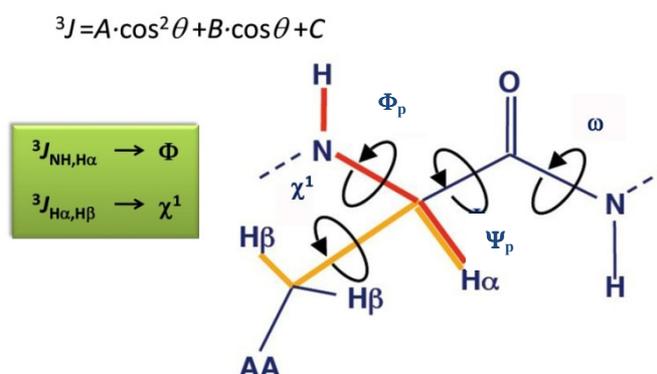


Figura 30. Relación entre constantes de acoplamiento ${}^3J_{\text{H},\text{H}}$ y ángulos diedros.

3. Desplazamientos químicos

Aunque estos son fácilmente accesibles, su relación con la estructura tridimensional es compleja, pues en ellos influyen numerosos efectos como corrientes de anillo, efectos electrostáticos, anisotropía de enlace, etc. Por tanto, su uso en determinación estructural de biomoléculas ha sido, hasta el momento, muy limitado, y se han aplicado

⁹⁹ (a) Marco, A.; Llinas, M.; Wuthrich, K. *Biopolymers* **1978**, *17*, 617-636; (b) Vuister, G. W.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7772-7777.

principalmente al estudio de proteínas. En este sentido, los desplazamientos químicos de los aminoácidos proteicos comunes, formando parte de pequeños péptidos que se han usado como modelos de cadena polipeptídica orientada al azar (*random coil*), son la referencia básica para cualquier análisis espectroscópico de las proteínas. La identificación de la presencia de una conformación preferente en un péptido a partir de los desplazamientos químicos se basa en la existencia de una diferencia apreciable entre los desplazamientos químicos observados de cada uno de los aminoácidos en el péptido investigado y los de un péptido de referencia con estructura de cadena orientada al azar (*random coil*): $\Delta\delta = (\delta - \delta_{\text{ref}})$ ppm. Este concepto recibe el nombre de “índice de desplazamiento químico” abreviado como CSI (del inglés *Chemical Shift Index*).⁹⁶

Finalmente, es importante señalar que el análisis de moléculas pequeñas basado en el efecto NOE¹⁰⁰ y en las constantes de acoplamiento escalar (J)¹⁰¹ es a menudo insuficiente para determinar las preferencias conformacionales de estas moléculas. En particular, en aquellos casos donde la molécula explora diferentes regiones del espacio conformacional, los datos de RMN representan un *promedio* de todas las conformaciones presentes en disolución. En estos casos, no existe un procedimiento sencillo para determinar sus geometrías y sus poblaciones relativas. De hecho, la interpretación directa de NOEs en moléculas flexibles puede conducir a la determinación de conformaciones virtuales de alta energía.¹⁰² Además, la RMN falla a la hora de describir las propiedades dinámicas, entre las que destacan las interacciones con el agua. Así pues, en este caso es necesaria la utilización de cálculos computacionales para explicar correctamente los datos experimentales provenientes de RMN. En este sentido, la dinámica molecular (DM) permite introducir *flexibilidad* a la hora de interpretar los datos experimentales, por lo que

¹⁰⁰ Kroonbatenburg, L. M. J.; Kroon, J.; Leeftang, B. R.; Vliegthart, J. F. G. *Carbohydr. Res.* **1993**, *245*, 21-42.

¹⁰¹ Bose, B.; Zhao, S.; Stenutz, R.; Cloran, F.; Bondo, P. B.; Bondo, G.; Hertz, B.; Carmichael, I.; Serianni, A. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11158-11173.

¹⁰² Cumming, D. A.; Carver, J. P. *Biochemistry* **1987**, *26*, 6664-6676.

ha sido empleada con éxito en numerosos estudios conformacionales.¹⁰³ A continuación se describen sus características generales.

2.2.3. Dinámica Molecular

La DM es una herramienta para el estudio teórico de propiedades dinámicas de las moléculas que ha tenido un gran desarrollo en el ámbito de las biomoléculas a partir de los 80. Al igual que en mecánica molecular (MM), está basada en las ecuaciones de la mecánica clásica por lo que los átomos se consideran esferas rígidas con una carga puntual centrada y los enlaces como muelles. De esta forma, el orden de enlace está relacionado con una constante elástica (figura 31).¹⁰⁴

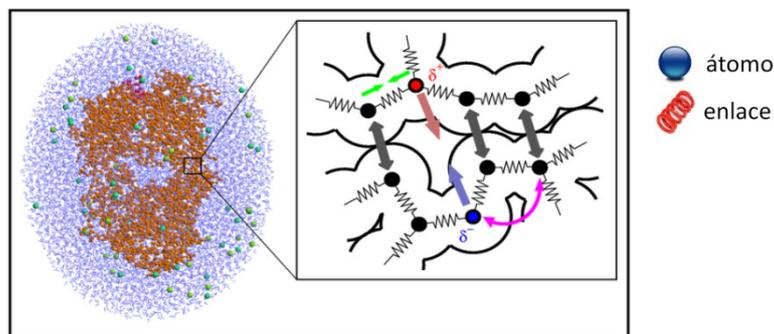


Figura 31. En MM y DM los átomos son considerados como esferas y los enlaces como muelles.

¹⁰³ Adcock S.A.; McCammon, J. A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1589-1615.

¹⁰⁴ (a) Machida K. "Principles of Molecular Mechanics", Kodansha/John Wiley & Sons, Tokyo/New York, **1999**; (b) Haile, J. M. "Molecular Dynamics Simulation", John Wiley and Sons, New York, **1992**; (c) Alexander, D.; Mackerell, J. R. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1584-1604.

El aspecto más importante de la DM es el campo de fuerzas (*force field* en inglés). Está formado por las ecuaciones matemáticas que describen la energía potencial (E) del sistema en función de las coordenadas atómicas y por un conjunto de parámetros necesarios para describir de forma correcta dicha energía (figura 32). Los parámetros se obtienen de datos experimentales (rayos X, IR, etc.) o bien de cálculos *ab initio*.

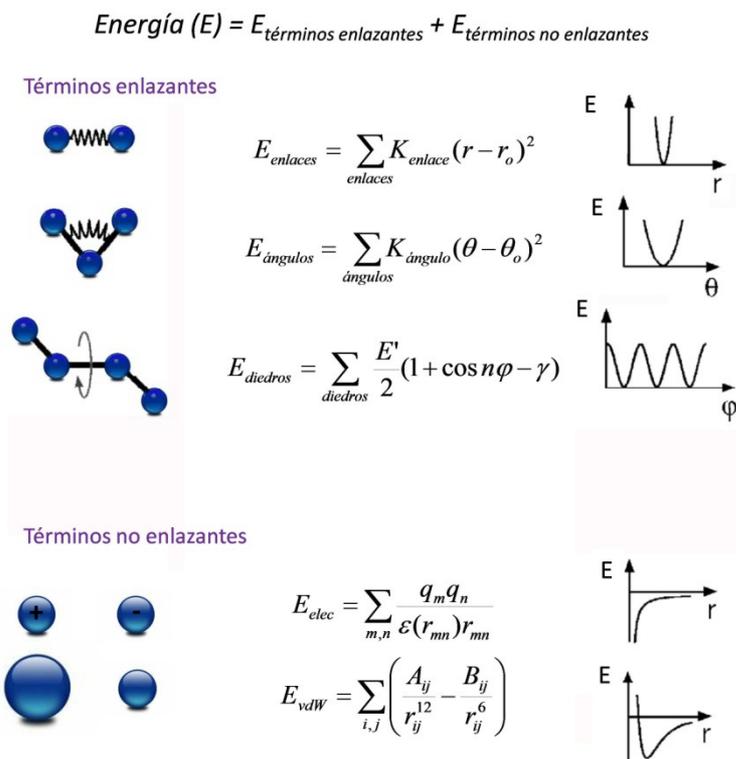


Figura 32. Ecuación general de un campo de fuerzas donde se desglosan los distintos términos que contribuyen a la energía potencial.

La misión del campo de fuerzas es deducir la estructura de un amplio conjunto de moléculas a partir de los datos empíricos de los que dispone (parámetros). Es, por tanto, muy importante que el campo de fuerzas elegido disponga de parámetros adecuados para

la molécula en cuestión. En nuestro caso se usará el campo de fuerzas AMBER,¹⁰⁵ ya que posee los parámetros adecuados para simular correctamente el comportamiento conformacional de péptidos y proteínas. También se empleó el GAFF (*General Amber Force Field*),¹⁰⁶ campo de fuerzas general para moléculas orgánicas, en la simulación de los péptidos no naturales. Además, para modelar la parte carbohidrato de los glicopéptidos, el campo de fuerzas AMBER se implementa con el GLYCAM.¹⁰⁷

La metodología de las simulaciones de DM podría dividirse en varios pasos: (1) construcción del modelo del sistema; (2) equilibrado del sistema; (3) simulación de la trayectoria; (4) análisis de la trayectoria resultante.

Desde el punto de vista matemático, el método de DM consiste en resolver la ecuación de movimiento de Newton para predecir la posición y la velocidad para un sistema de partículas dinámico. En este caso, la fuerza viene dada por el gradiente de la energía potencial del sistema con respecto a las coordenadas atómicas ($F_i = -\partial E / \partial x_i$) (ver figura 33).

¹⁰⁵ Cornell, W. D.; Cieplack, P. C.; Bayly, I.; Gould, I. R.; Merz, K.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179-5197.

¹⁰⁶ Wang, J., Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. *J. Comp. Chem.* **2004**, *25*, 1157-1174.

¹⁰⁷ Woods, R. J.; Dwek, R. A.; Edge, C. J.; Fraser-Reid, B. *J. Phys. Chem. B* **1995**, *99*, 3832-3846.

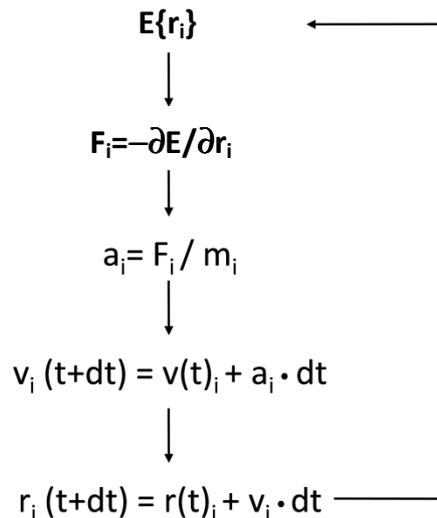


Figura 33. Obtención de la trayectoria en una DM ($E = E_{\text{potencial}}$).

Las posiciones iniciales r_i provienen de la estructura de partida, que se obtiene a partir de datos experimentales de rayos X o de cálculos en los que la energía ha sido minimizada, y las velocidades iniciales se toman de una distribución Maxwell-Boltzmann a la temperatura de simulación. Basándose en el campo de fuerzas dado, se calcula la fuerza sobre todos los átomos. Así, con la posición, velocidad y fuerza se calculan sucesivamente las nuevas posiciones y velocidades a distintos tiempos. La integración numérica de la última ecuación de la figura 33 permite entonces determinar la posición de cada partícula en un tiempo $t+\Delta t$ y se genera de esta forma la trayectoria descrita por una molécula en un tiempo determinado (suficientemente largo como para permitir un muestreo correcto). Una vez calculada la trayectoria, se analiza en busca de las conformaciones de mínima energía a las que tiende el sistema, es decir, se explora su espacio conformacional.

Los cálculos de DM suelen hacerse a temperatura constante y presión constante. En cuanto al tratamiento del disolvente, existen diversas aproximaciones. Estas van desde considerarlo simplemente como una constante dieléctrica,¹⁰⁸ o incluir explícitamente las moléculas de disolvente.¹⁰⁹ Esto último requiere más tiempo de simulación pero es imprescindible en aquellos casos en los que existan interacciones específicas soluto-disolvente.

Cabe destacar que los cálculos de DM identifican bastante bien las conformaciones de baja energía para una molécula dada, sin embargo, generalmente fallan a la hora de predecir sus poblaciones relativas, en especial cuando se emplea el campo de fuerzas AMBER, que tiende a sobreestimar la estructura de α -hélice para péptidos pequeños.¹¹⁰

Para mejorar los resultados obtenidos con este método se combina la RMN con los cálculos de DM, introduciéndose como restricciones los datos experimentales disponibles de RMN. Una limitación de esta técnica es que los datos experimentales son un promedio de las conformaciones existentes en disolución. Por ello, se llevan a cabo DM con restricciones promediadas en el tiempo (DM-tar, del inglés *Molecular Dynamics simulations with time-averaged restraints*),¹¹¹ con el objetivo de obtener una distribución cuantitativa de conformeros de baja energía capaces de reproducir los datos de RMN.¹¹² Las restricciones son satisfechas no sólo por una única estructura, sino por todas las estructuras *en promedio* que componen la trayectoria. De esta manera, este procedimiento

¹⁰⁸ Onufriev, A.; Bashford D.; Case, D. A. *J. Phys. Chem. B*, **2000**, *104*, 3712-3720.

¹⁰⁹ Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926-935.

¹¹⁰ (a) Gnanakaran, S.; García, A. E. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 12555-12557; (b) Best, R. B.; Buchete, N.-V.; Hummer, G. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 207-209.

¹¹¹ (a) Pearlman, D. A. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 1-16; (b) Nanzer, A. P.; van Gunsteren, W. E.; Torda, A. E. *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 313-320.

¹¹² Weimar, T.; Woods, R. en *NMR spectroscopy of glycoconjugates* (Eds.: Jiménez-Barbero, J.; Peters, T.), Wiley-VCH, Weinheim **2002**, pp 111-144.

proporciona un modo eficaz para estudiar la flexibilidad de pequeñas moléculas mediante la interpretación de los datos de RMN.

Las restricciones estructurales (generalmente distancias interprotónicas H-H y constantes de acoplamiento 3J) se introducen en la ecuación del campo de fuerzas utilizada en DM para forzar al sistema a ajustarse a estas propiedades. Así, la nueva función de potencial consta de dos partes (ecuación 1).

$$E_{\text{tot}} = E_{\text{teórico}} + E_{\text{exp}} \quad (\text{ecuación 1})$$

La primera parte, $E_{\text{teórico}}$, es el potencial habitual del campo de fuerzas, mientras que E_{exp} es un potencial que representa la información experimental introducida, y que contiene las distintas restricciones. Este potencial E_{rest} , incluido en el E_{exp} , es del tipo:

$$E_{\text{rest}} = K_{\text{rest}} \cdot (R_{ij} - R_{\text{experimental}})^2 \quad (\text{ecuación 2})$$

y su función es obligar a la estructura a satisfacer una distancia determinada (R_{deseado}), mediante una penalización energética. Si queremos que estas restricciones de distancia sean satisfechas no por una única estructura, sino por todas las integrantes de una trayectoria dinámica en *promedio*, bastaría con introducir el término de distancia promedio en la anterior ecuación:

$$E_{\text{rest}} = K_{\text{rest}} \cdot (\langle R_{ij} \rangle - R_{\text{experimental}})^2 \quad (\text{ecuación 3})$$

Sin embargo, dado que los NOEs no dependen de $\langle R \rangle$ sino de $\langle R^{-6} \rangle$, la expresión correcta para una distancia *promediada* en el tiempo sería:

$$E_{rest} = K_{rest} \cdot \left(\langle R_{ij}^{-6} \rangle^{-1/6} - R_{experimental} \right)^2 \quad (\text{ecuación 4})$$

donde

$$\langle R_{ij}^{-6} \rangle^{-1/6} = \frac{\left(\sum_0^t R(t)^{-6} \right)^{-1/6}}{N} \quad (\text{ecuación 5})$$

siendo N el número total de *frames* en la trayectoria. Un *frame* en DM es la congelación de una conformación particular, a un tiempo dado, de todo el conjunto de conformaciones que componen la dinámica completa.

Sin embargo, de forma experimental se ha visto que la expresión de la ecuación 5, aunque formalmente correcta, tiene la desventaja de que para garantizar que todo el conjunto de estructuras *en promedio* representativo de la trayectoria satisfagan las restricciones impuestas, se requieren tiempos de simulación excesivamente largos. Por ello, con objeto de reducir los tiempos de simulación, la ecuación utilizada para el *promedio* de distancias es en realidad ésta:

$$\langle R_{ij}^{-6} \rangle^{-1/6} = \frac{\left(\sum_0^t R(t)^{-6} \cdot e^{(t-t')/\tau} \right)^{-1/6}}{N} \quad (\text{ecuación 6})$$

En esta última expresión, la constante τ que aparece en el denominador de la función exponencial es un parámetro ajustable empíricamente con objeto de garantizar una rápida convergencia de las distancias promedio a los valores experimentales.

Ecuaciones similares pueden deducirse para las restricciones de constantes de acoplamiento $^3J_{H,H}$ promediadas en el tiempo (aunque, como es lógico, en este caso el promediado es lineal).

2.3. Objetivos específicos

En nuestro grupo, los antecedentes directos del trabajo reflejado en esta Tesis Doctoral aparecen publicados en *Chem. Eur.-J.* **2006**, *12*, 7864-7871.¹¹³

Como ya se ha comentado, la β -*O*-glicosilación de Ser y Thr con D-glucosa (D-Glc) aparece en moléculas biológicas importantes, como en dominios del factor de crecimiento epidérmico (EGF)¹¹⁴ de diferentes sero-proteínas y del receptor de Noch.¹¹⁵ Sin embargo, la función estructural de la D-Glc en estos sistemas es desconocida y existe aún cierta controversia al respecto. Teniendo esto en cuenta, nuestro grupo de investigación decidió estudiar, en primer lugar, el efecto de la β -D-O-glicosilación en péptidos modelo derivados de Ser y Thr que se sintetizaron en ambos casos funcionalizados como amida. Posteriormente, fueron glicosilados con β -*O*-Glc para obtener así sus correspondientes β -*O*-glucopéptidos. El estudio reveló que este tipo de glicosilación produce un importante efecto sobre el esqueleto peptídico de los péptidos modelo derivados de Ser y Thr natural, siendo responsable del cambio, experimentalmente observado, de conformaciones extendidas en los péptidos modelo a conformaciones plegadas en los glicopéptidos modelo (figura 34).

¹¹³ Corzana, F.; Busto, J. H.; Engelsen, S. B.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7864-7871.

¹¹⁴ Mann, K. G.; Jenny, R. J.; Krishnaswamy, S. *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 915-956.

¹¹⁵ Shao, L.; Luo, Y.; Moloney, D. J.; Haltiwanger, R. S. *Glycobiology* **2002**, *12*, 763-770.

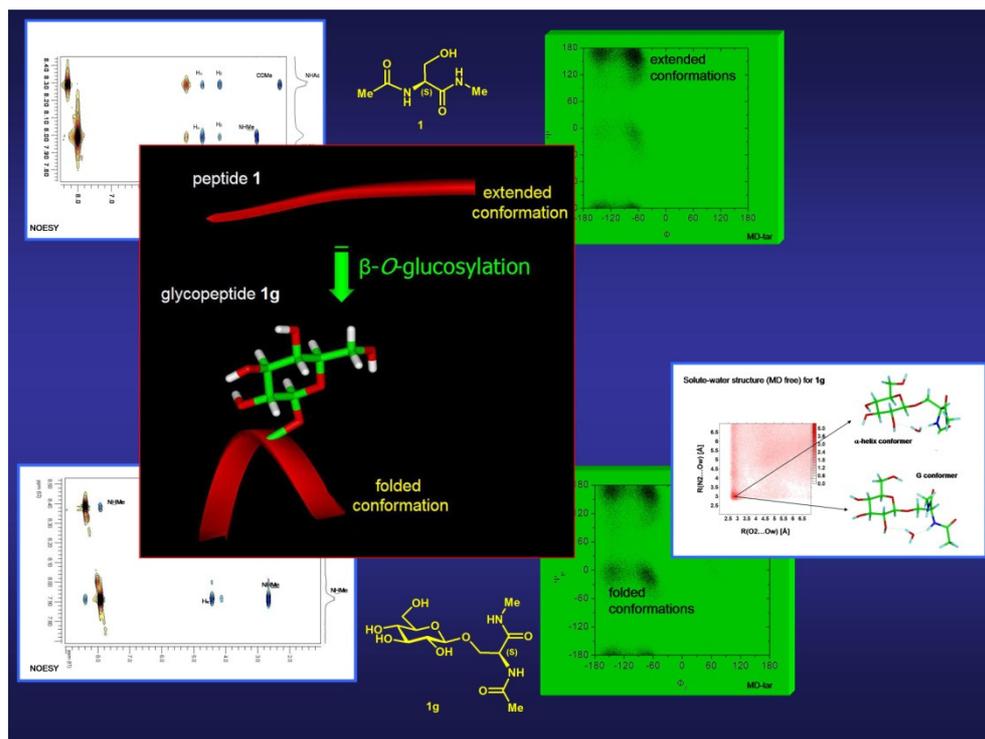


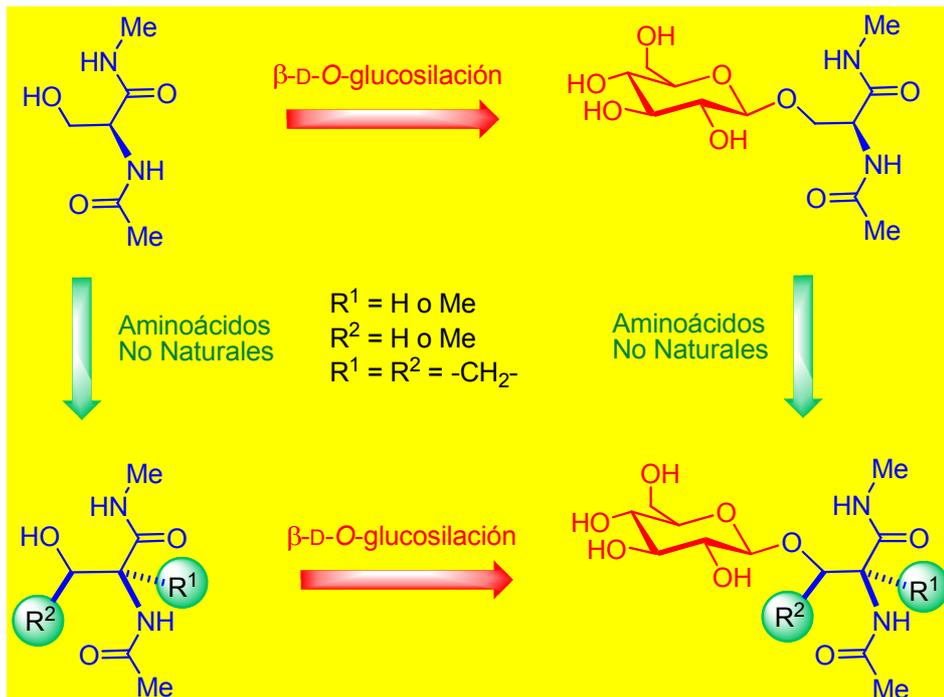
Figura 34. Influencia de la β -D-O-glucosilación en péptidos modelo de Ser y Thr.

A esta conclusión se llegó tras el análisis conformacional de los péptidos y glicopéptidos modelo, combinando experimentos de RMN con cálculos de DM. Es importante destacar que los resultados obtenidos mediante estos cálculos apuntan hacia la existencia de moléculas de agua puente que enlazan las partes peptídicas y carbohidrato del glicopéptido. Por tanto, estas moléculas de agua podrían explicar la estabilización de las conformaciones plegadas observadas en disolución acuosa.

A continuación, se presentan, de manera gráfica, los objetivos concretos correspondientes a cada uno de los capítulos de la discusión.

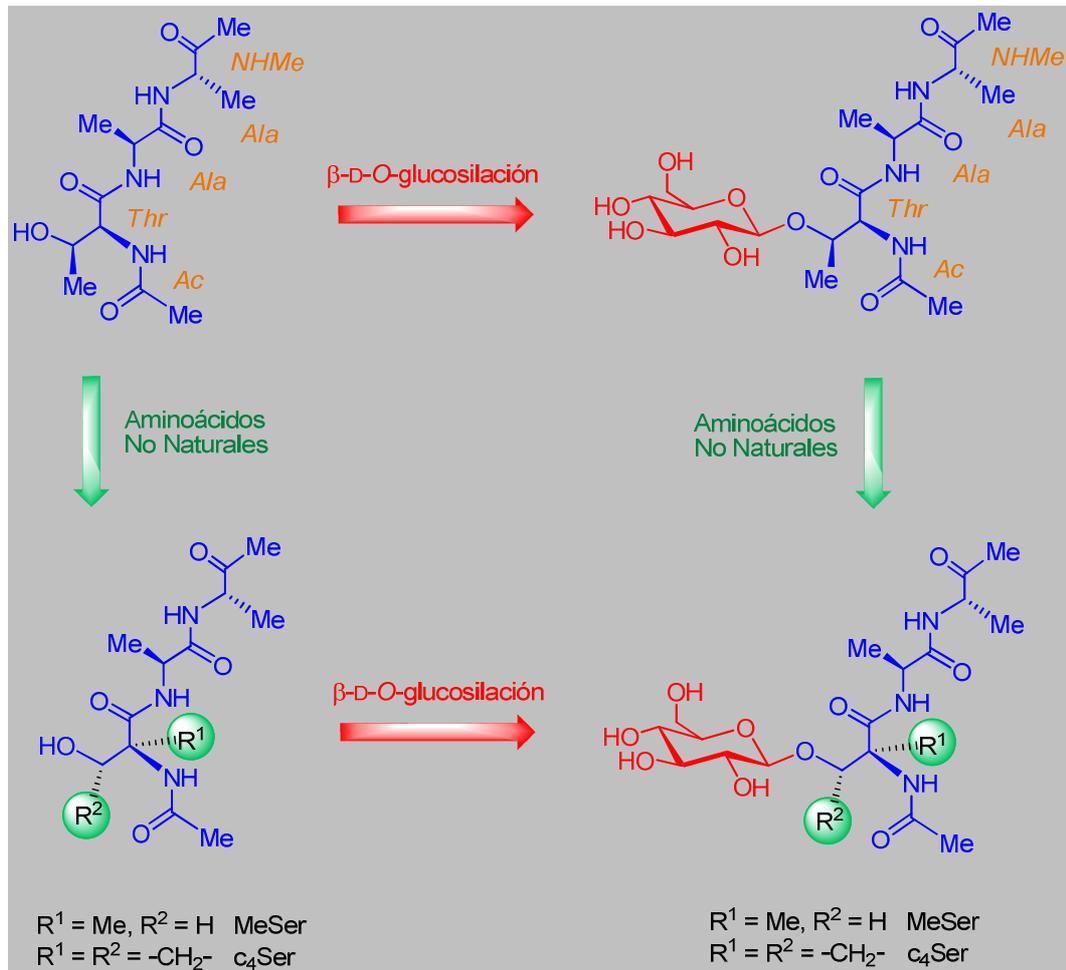
CAPÍTULO 3. Glicopéptidos modelo que incorporan aminoácidos no naturales.

- ¿Cómo influye la introducción de aminoácidos no naturales en el espacio conformacional de glicopéptidos modelo derivados de β -D-O-Glc?
- ¿Cómo afecta la β -D-O-glucosilación en péptidos modelo derivados de aminoácidos no naturales?



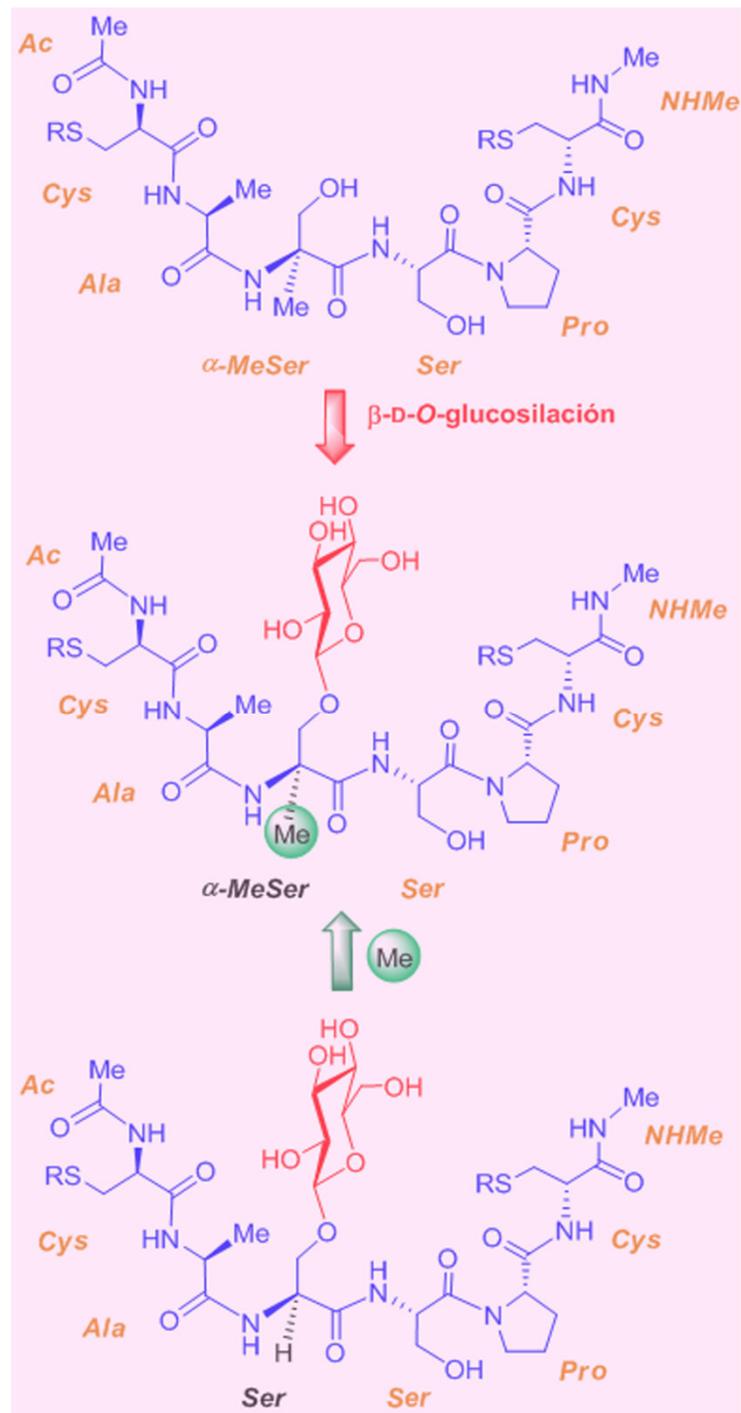
CAPÍTULO 4. Glicopéptidos que presentan la secuencia Xaa-Ala-Ala.

- ¿Cómo influye en las conclusiones del capítulo 3 el elongamiento de la cadena peptídica?



CAPÍTULO 5. Glicopéptidos de interés biológico con la secuencia Cys-Ala-Xaa-Ser-Pro-Cys.

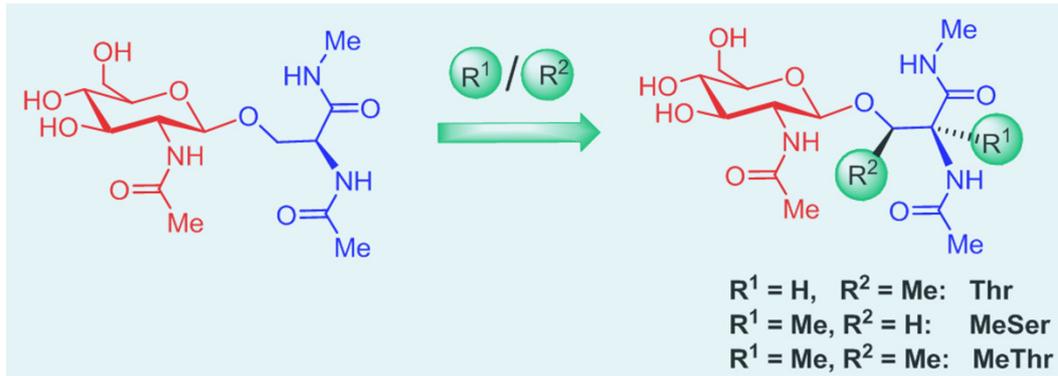
- *¿Cuáles son las preferencias conformacionales del glicopéptido con Ser?*
- *¿Qué influencia tiene la introducción del aminoácido cuaternario MeSer en el β -O-glicopéptido anterior?*
- *¿Qué efecto tiene la β -O-glicosidación sobre el péptido no natural que incorpora MeSer?*



CAPÍTULO 6. Glicopéptidos modelo derivados de β -O-GlcNAc.

- *¿Cuáles son las características estructurales de los glicopéptidos modelo naturales derivados de β -O-GlcNAc?*

¿Cómo afecta la introducción de aminoácidos no naturales en las preferencias conformacionales de estos glicopéptidos?



Discusión de Resultados

3

Glicopéptidos modelo
que incorporan
aminoácidos no naturales

3.1. Introducción

Las glicoproteínas y glicopéptidos están involucrados en procesos biológicos fundamentales en los que tanto el carbohidrato como la secuencia peptídica desempeñan complejas y diversas funciones.¹

De entre las *O*-glicosilaciones más comunes, destaca el enlace α -*O*-glicosídico entre la *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) y el grupo hidroxilo de la L-serina (Ser) y/o L-treonina (Thr) (tipo mucina)² o el enlace β -*O*-glicosídico entre la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y dominios ricos en Ser/Thr de proteínas citoplásmicas y nucleares. Estas glicosilaciones juegan un papel regulatorio importante en la función biológica de la proteína.³

Como ya se ha comentado anteriormente, otros tipos más específicos de *O*-glicosilación, como el enlace β -*O*-glicosídico entre la D-glucosa (Glc) y residuos de Ser/Thr (*O*-glucosilación), son menos frecuentes y se han encontrado en dominios del factor de crecimiento epidérmico (EGF) de diferentes sero-proteínas⁴ y del receptor de Notch.⁵ La función estructural de la Glc en estos sistemas es desconocida y todavía existe cierta controversia al respecto. Sin embargo, es esencial conocer la influencia que tiene la parte carbohidrato en el equilibrio conformacional de la cadena peptídica y viceversa. En

¹ (a) Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720; (b) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130; (c) Williams, D. H. *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13*, 469-478; (d) Wyss, D. F.; Wagner, G. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7*, 409-416; (e) Buskas, T.; Ingale, S.; Boons, G.-J. *Glycobiology* **2006**, *16*, 113R-136R; (f) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science* **2001**, *291*, 2357-2364; (g) Pratt, M. R.; Bertozzi, C. R. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 58-68.

² (a) Van de Steen, P.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Opdenakker, G. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *33*, 151-208; (b) Hang, C. H.; Bertozzi, C. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5021-5034.

³ Hart, G. W.; Housley, M. P.; Slawson, C. *Nature* **2007**, *446*, 1017-1022.

⁴ (a) Shao, L.; Luo, Y.; Moloney, D. J.; Haltiwanger, R. S. *Glycobiology* **2002**, *12*, 763-770; (b) Harris, R. J.; Spellman, M. W. *Glycobiology* **1993**, *3*, 219-224.

⁵ Bruckner, K.; Perez, L.; Clausen, H.; Cohen, S. *Nature*, **2000**, *406*, 411-415.

este sentido, se ha publicado recientemente que la β -O-glucosilación de péptidos modelo derivados de Ser y Thr permite a la cadena peptídica expandir su espacio conformacional, exhibiendo no sólo conformaciones extendidas sino también, como ocurre con los correspondientes gluco péptidos, conformaciones plegadas.⁶

Por otro lado, una aproximación interesante para estudiar en detalle la influencia que tienen distintos elementos estructurales en las preferencias conformacionales de una molécula, es el diseño de nuevos glicopéptidos en los cuales los aminoácidos naturales han sido sustituidos por aminoácidos no naturales. Además, los nuevos glicopéptidos podrían estabilizar una conformación (por ejemplo, la conformación bioactiva) o bien exhibir conformaciones que raramente se hayan observado en derivados naturales, modificándose así la unión a las moléculas diana. En este sentido, aunque la síntesis de α -aminoácidos no proteinogénicos ha recibido una enorme atención en los últimos años, especialmente la de α -aminoácidos α,α -disustituidos,⁷ el campo de glicosil- α -aminoácidos modificados está aún relativamente poco explorado. La mayor parte de las modificaciones estudiadas se han centrado en la parte del carbohidrato⁸ y raramente en la cadena peptídica.⁹ Por tanto, la glicosilación de nuevos β -hidroxiaminoácidos α,α -disustituidos¹⁰ podría considerarse como una herramienta útil en el diseño de moléculas

⁶ Corzana, F.; Busto, J. H.; Engelsen, S. B.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7864-7871.

⁷ (a) Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 3517-3599; (b) Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 645-732; (c) Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 569-623; (d) Vogt, H.; Bräse, S. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 406-430.

⁸ a) Wilstermann, M.; Kononov, L. O.; Nilsson, U.; Ray, A. K.; Magnusson, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4742-4754; b) Alibés, R.; Bundle, D. R. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6288-6301; c) Geyer, A.; Müller, M.; Schmidt, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6312-6313.

⁹ Lane, J. W.; Halcomb, R. L. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1348-1357.

¹⁰ (a) Avenoza, A.; Cativiela, C.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2195-2204; (b) Avenoza, A.; Cativiela, C.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Sucunza, D.; Zurbano, M. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 949-957; (c) Avenoza, A.; Barriobero, J. I.; Busto, J. H.; Cativiela, C.; Peregrina, J. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*,

con un comportamiento conformacional novedoso respecto al observado para los compuestos naturales.

Con esta idea, en este capítulo se presenta la síntesis y el análisis conformacional en disolución acuosa de diferentes péptidos modelo derivados de aminoácidos no naturales así como de sus correspondientes β -*O*-glicopéptidos (figura 1). En estos modelos, los grupos amino y ácido carboxílico se funcionalizaron como amidas con el fin de emular una cadena peptídica. El objetivo principal de este trabajo es investigar en detalle los efectos que tienen los sustituyentes en el C α y/o en el C β sobre las preferencias conformacionales del esqueleto peptídico, la cadena lateral y el enlace glicosídico.

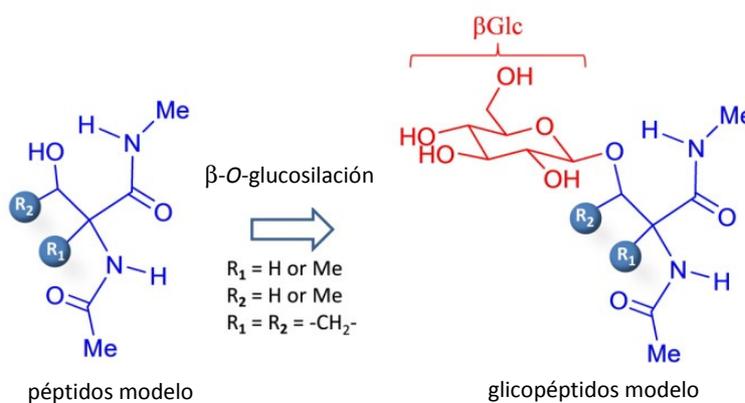


Figura 1. Diseño de nuevos β -*O*-glicopéptidos derivados de aminoácidos no naturales.

625-632; (d) Avenzoza, A.; Barriobero, J. I.; Busto, J. H.; Cativiela, C.; Fernández-Recio, M. A.; Peregrina, J. M.; Rodríguez, F. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2745-2755; (e) Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Cativiela, C.; Peregrina, J. M.; Sucunza, D.; Zurbano, M. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 399-405; (f) Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Sucunza, D.; Zurbano, M. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 719-724; (g) Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Sucunza, D.; Zurbano, M. M. *Synthesis* **2005**, 575-578; (h) Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Canal, N.; Peregrina, J. M. *Chem. Commun.* **2003**, 1376-1377; (i) Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Canal, N.; Peregrina, J. M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 330-333; (j) Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Canal, N.; Peregrina, J. M.; Pérez-Fernández, M. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3597-3600; (k) Aydilillo, C.; Jiménez-Osés, G.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M.; Avenzoza, A. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4840-4848; (l) Jiménez-Osés, G.; Aydilillo, C.; Busto, J. H.; Zurbano, M. M.; Peregrina, J. M.; Avenzoza, A. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5399-5402.

Este análisis estructural se llevó a cabo utilizándose técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), de donde se obtiene información de constantes de acoplamiento y distancias interprotónicas a partir de experimentos NOE, en combinación con cálculos de Dinámica Molecular (DM). Es importante señalar que tanto la síntesis de los derivados no naturales, como su estudio conformacional fue muy complicado. Desde un punto de vista sintético, los grupos amino y ácido soportados sobre un carbono cuaternario son menos reactivos, con la consiguiente disminución en el rendimiento de las reacciones. Desde un punto de vista estructural, la ausencia del H α supone la pérdida de datos experimentales (distancias y constantes de acoplamiento en las que está involucrado dicho hidrógeno) que son muy importantes para la elucidación de las conformaciones presentes en disolución. Además, los estudios computacionales de estos sistemas tampoco son sencillos. Por un lado, los campos de fuerza normalmente empleados, que predicen razonablemente bien las conformaciones de proteínas o péptidos de mayor tamaño, fallan al intentar reproducir las distribuciones conformacionales experimentalmente observadas para sistemas de dos y tres aminoácidos.¹¹ Por otro lado, para el estudio de estos aminoácidos no naturales es necesario utilizar campos de fuerza generales, que sin embargo no han sido probados todavía para todo tipo de moléculas orgánicas.

3.2. Discusión de resultados

3.2.1. Síntesis

En la figura 2 se muestran todos los péptidos y glicopéptidos modelo objeto de estudio. Los compuestos **Ac-L-Ser-NHMe**, Ac-L-Ser(β -O-D-Glc)-NHMe (nombrado como **Ac-L-Ser*-NHMe**), **Ac-L-Thr-NHMe** y Ac-L-Thr(β -O-D-Glc)-NHMe (referido

¹¹ Gnanakaran, S.; García, A. E. *J. Phys. Chem. B.* **2003**, *107*, 12555-12557.

como **Ac-L-Thr*-NHMe**) han sido previamente sintetizados y estudiados en nuestro propio grupo.⁶ Por otro lado, el compuesto α -metilado que deriva de α -metilserina (MeSer), los α,β -dimetilados que lo hacen de α -metiltreonina (MeThr) y los derivados ciclobutánicos que provienen del ácido 2-hidroxi-1-aminociclobutanocarboxílico (c_4 Ser), han sido sintetizados todos ellos en la presente Tesis Doctoral.

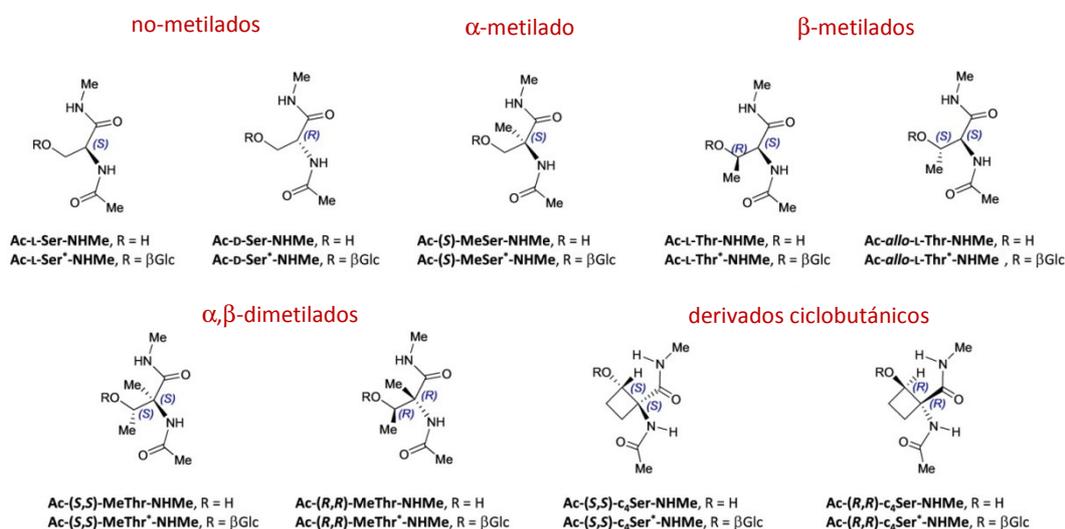
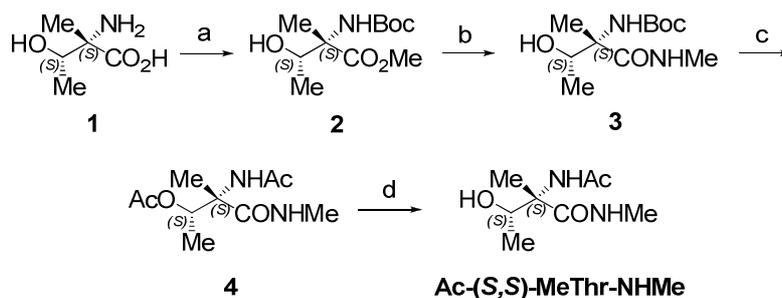


Figura 2. Péptidos y glicopéptidos modelo estudiados en el trabajo.

La síntesis de los péptidos se llevó a cabo siguiendo un procedimiento sintético general. A modo de ejemplo, en el esquema 1 se muestra la síntesis del derivado **Ac-(S,S)-MeThr-NHMe**. En la sección experimental se describe la síntesis de cada uno de los péptidos.

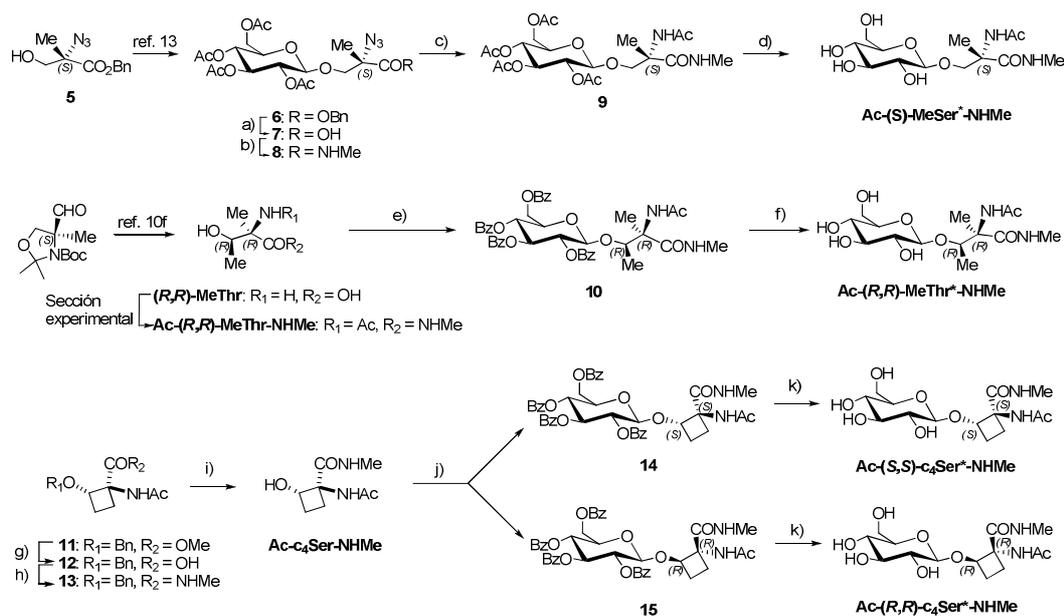


Esquema 1. Síntesis del péptido **Ac-(S,S)-MeThr-NHMe** (a) i. AcCl, MeOH, reflujo, 20 h; ii. $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, Boc_2O , THF/ H_2O (5:1), 25 °C, 16 h, 75% (b) i. $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$, MeOH/ H_2O (3:1), 25 °C, 12 h; ii. $\text{MeNH}_2 \cdot \text{HCl}$, TBTU, DIEA, CH_3CN , 25 °C, 16 h, 50%; (c) i. TFA/ CH_2Cl_2 (1:1), 25 °C, 3 h. ii. Ac_2O , Py, 25°C, 3 h, 95%; (d) MeONa/MeOH , 25°C, 3 h, 82%.

El aminoácido **1**, previamente sintetizado por nuestro grupo de investigación,^{10f} se transformó en el éster metílico y, a continuación, su grupo amino se protegió con Boc para dar el derivado **2**. La posterior desprotección del éster en medio básico fuerte y el tratamiento con metilamina, utilizando TBTU como agente de acoplamiento, permitió obtener el compuesto **3** con un rendimiento moderado. La desprotección del grupo amino y la posterior acetilación de éste y del hidroxilo con Ac_2O /piridina dio el derivado **4** con un buen rendimiento. Finalmente, la desprotección del hidroxilo con MeONa/MeOH permitió obtener el derivado **Ac-(S,S)-MeThr-NHMe**.

Los correspondientes glicopéptidos modelo se obtuvieron siguiendo las condiciones modificadas de la glicosilación de Koenigs-Knorr.¹² En el esquema 2 se muestra la síntesis de **Ac-(S)-MeSer*-NHMe**, **Ac-(R,R)-MeThr*-NHMe**, **Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe** y **Ac-(R,R)-c₄Ser*-NHMe** como ejemplos representativos de glicopéptidos modelo no naturales.

¹² Hannesian, S.; Banoub, J. *Carbohydr. Res.* **1977**, *53*, C13-C16.



Esquema 2. Síntesis de los glicopéptidos modelo **Ac-(S)-MeSer^{*}-NHMe**, **Ac-(R,R)-MeThr^{*}-NHMe**, **Ac-(S,S)-c₄Ser^{*}-NHMe** y **Ac-(R,R)-c₄Ser^{*}-NHMe**. (a) H₂, Pd/C, AcOEt, 25°C, 16 h, 90%; (b) MeNH₂·HCl, TBTU, DIEA, CH₃CN, 25°C, 16 h, 84%; (c) i. H₂, Pd/C, MeOH, 25°C, 15 h. ii. Ac₂O, Py, 25°C, 4 h, 77%; (d) MeONa/MeOH, 25°C, 3 h, 90%; (e) i. Bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo, AgTfO, CH₂Cl₂, de -30°C a 25°C, tamiz molecular 4Å, 15 h, 11%; (f) MeONa/MeOH, 25°C, 3 h, 87%; (g) LiOH·H₂O, MeOH/H₂O (3:1), 25°C, 12 h, 97%; (h) MeNH₂·HCl, TBTU, DIEA, MeCN, 25°C, 10 h, 92%; (i) H₂, Pd/C, MeOH, 1 atm, 25°C, 12 h, 99%; (j) i. Bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo, AgTfO, CH₂Cl₂, de -30°C a 25°C, tamiz molecular 4Å, 15 h, 30% (**14** + **15**). ii. Columna cromatográfica (diclorometano/MeOH, 9.5:0.5); (k) MeONa/MeOH, 25°C, 3 h, 92% para **Ac-(S,S)-c₄Ser^{*}-NHMe** y 85% para **Ac-(R,R)-c₄Ser^{*}-NHMe**.

El glicopéptido **Ac-(S)-MeSer^{*}-NHMe** se sintetizó a partir del derivado **5**, que ha sido previamente glicosilado en nuestro grupo¹³ para dar **6**. La desprotección del ácido

¹³ Avenzoa, A.; Peregrina, J. M.; San Martín, E. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6413-6416.

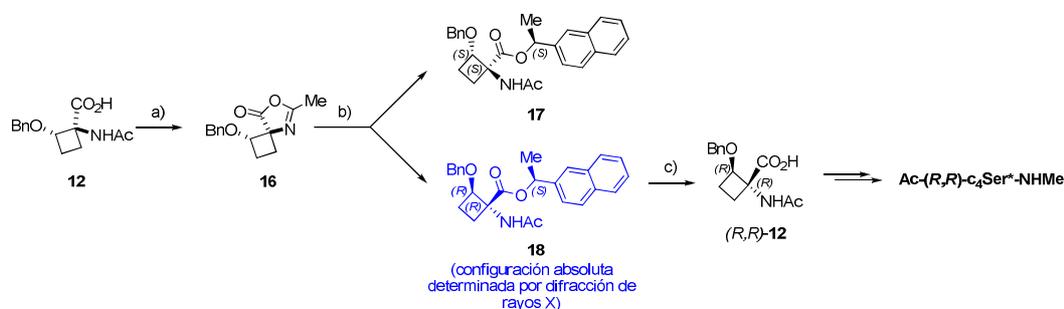
carboxílico y la posterior reacción con metilamina condujo al compuesto **8**. Por último, la transformación del grupo azida a amino con H_2 y Pd/C como catalizador, seguido de acetilación (Ac_2O /piridina) y desprotección final (MeONa/MeOH) dio como resultado el glicopéptido **Ac-(S)-MeSer*-NHMe**.

Por otro lado, el glicopéptido modelo **Ac-(R,R)-MeThr*-NHMe** se sintetizó a partir del péptido modelo **Ac-(R,R)-MeThr-NHMe**. El tratamiento de éste con bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo en presencia de triflato de plata (AgTfO) dio lugar al compuesto **10**, cuya posterior desprotección condujo al glicopéptido modelo **Ac-(R,R)-MeThr*-NHMe**.

En el caso de los derivados ciclobutánicos **Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe** y **Ac-(R,R)-c₄Ser*-NHMe**, la síntesis comenzó a partir de una mezcla racémica del compuesto **11**, que ha sido también sintetizado en nuestro grupo.^{10j} La hidrólisis del éster metílico con $LiOH \cdot H_2O$ proporcionó el correspondiente ácido **12** de manera prácticamente cuantitativa (97%). A continuación, se hizo reaccionar, en presencia de DIEA como base, con $MeNH_2 \cdot HCl$ y TBTU como agente de acoplamiento obteniéndose la diamida **13**. La hidrogenólisis final con H_2 y Pd/C eliminó el grupo bencilo dando como resultado el compuesto **Ac-c₄Ser-NHMe** deseado como mezcla racémica. El tratamiento de éste con bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo en presencia de AgTfO proporcionó exclusivamente los anómeros β **14** y **15**, los cuales fueron separados por cromatografía de columna sobre gel de sílice con rendimiento moderado. Finalmente, la desprotección de los grupos hidroxilo del carbohidrato con MeONa dio lugar a los correspondientes glicopéptidos modelo **Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe** y **Ac-(R,R)-c₄Ser*-NHMe**.

Para confirmar de manera inequívoca la configuración absoluta de estos compuestos, el ácido **12** se trató con EDCI·HCl como agente de acoplamiento y DMAP como base

para dar **16** con un 87% de rendimiento (esquema 3). La oxazolona **16** se transformó entonces en los ésteres **17** y **18** por reacción con (*S*)-(-)- α -metil-2-naftilmetanol en presencia de ^tBuOK como base. Estos ésteres fueron separados mediante columna cromatográfica obteniéndose **18** de forma enantioméricamente pura (6% de rendimiento a partir de **16**).



Esquema 3. Determinación de la configuración absoluta de los derivados **Ac-(*S,S*)-c₄Ser*⁻-NHMe** y **Ac-(*R,R*)-c₄Ser*⁻-NHMe**. (a) EDCI-HCl, DMAP, CH₂Cl₂, 25°C, 2 h, 87%; (b) i. (*S*)-(-)- α -metil-2-naftilmetanol, ^tBuOK, THF, 25°C, 12 h, 70%. ii. columna cromatográfica (hexano/acetato de etilo, 2:3) para obtener el compuesto **18** enantioméricamente puro (c) LiOH·H₂O, MeOH/H₂O (3:1), 25°C, 4 d, 96%.

La evaporación lenta de una disolución de **18** en hexano/diclorometano permitió obtener cristales del compuesto, del que se determinó su estructura mediante difracción de Rayos X (figura 3). Sus nuevos estereocentros resultaron tener configuración (*R,R*). Finalmente, la hidrólisis del éster quiral también con LiOH·H₂O proporcionó el ácido (*R,R*)-**12**, que se convirtió en el compuesto **Ac-(*R,R*)-c₄Ser*⁻-NHMe** siguiendo las mismas reacciones comentadas anteriormente.

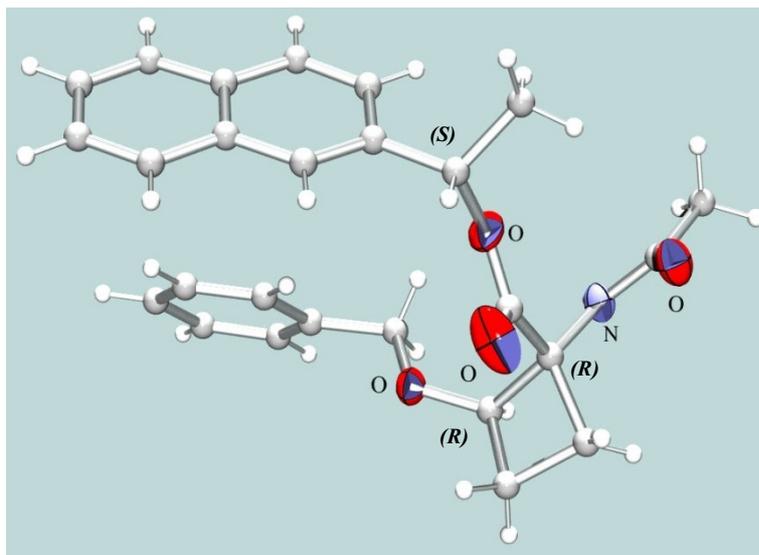


Figura 3. Representación ORTEP de la estructura cristalina del compuesto **18**.

3.2.2. Estudio conformacional de los péptidos modelo

Una vez sintetizados los péptidos y glicopéptidos modelo se realizó el análisis conformacional de todos ellos. En este sentido, y antes de abordar dicho estudio, es preciso definir los ángulos diedros relevantes desde el punto de vista conformacional. Estos ángulos, junto con las etiquetas de los distintos átomos de la molécula se recogen en la figura 4.

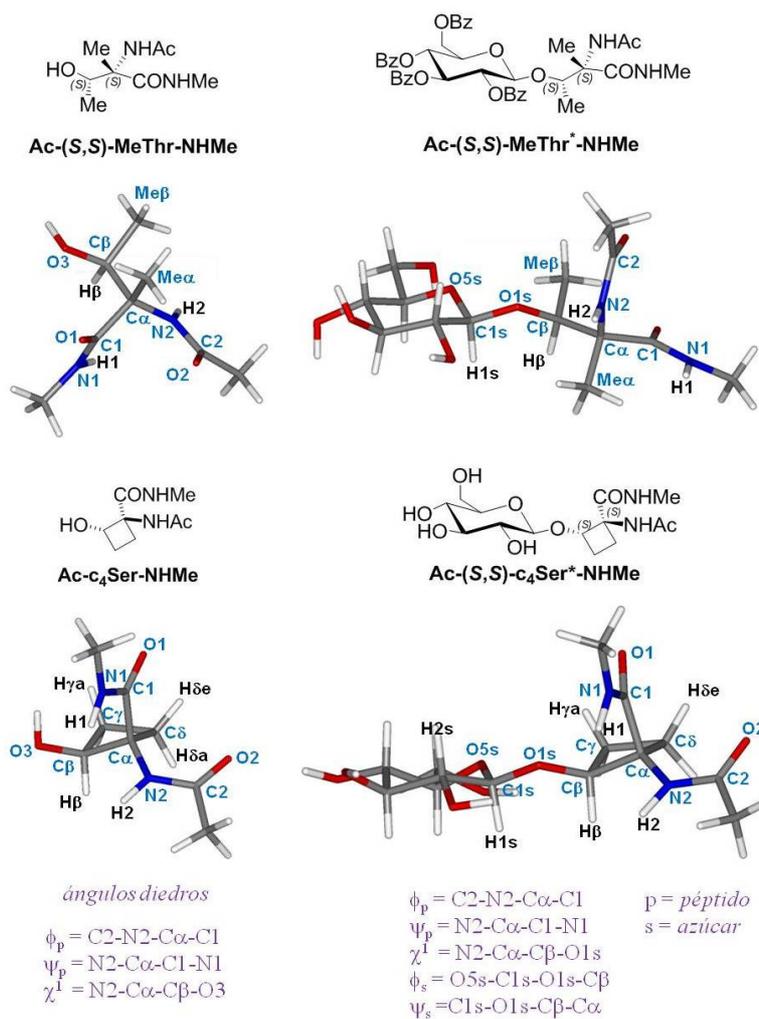


Figura 4. Definición de ángulos diedros y etiquetas de los átomos para los compuestos **Ac-(S,S)-MeThr-NHMe**, **Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe**, **Ac-c₄Ser-NHMe** y **Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe**. La misma definición se utiliza para el resto de los derivados.

Los ángulos diedros ϕ_p y ψ_p definen la conformación del esqueleto peptídico, el χ^1 la de la cadena lateral y los ángulos ϕ_s y ψ_s hacen referencia a la geometría del enlace glicosídico.

En primer lugar, fue necesario realizar la asignación de las señales de los espectros de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) para todos los compuestos utilizando experimentos COSY y HSQC. A continuación se llevaron a cabo experimentos 1D-NOESY selectivos (400 MHz) en D_2O (25°C, pH 5.2) y 2D-NOESY en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1). Además, en los casos en que fue posible, se midieron las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H}\alpha, \text{H}\beta}$ y $^3J_{\text{NH}_2, \text{H}\alpha}$.

Cabe destacar que aunque los péptidos modelo estudiados son demasiado pequeños como para adoptar una estructura secundaria definida, los datos obtenidos de los experimentos NOESY pueden utilizarse para asignar “preferencias conformacionales”. Este hecho está basado en la observación de las conectividades de las secuencias clave NH-NH ($i, i+1$) y $\text{H}\alpha$ -NH ($i, i+1$). Así, la existencia de un NOE fuerte $\text{H}\alpha$ -NH ($i, i+1$) junto con la ausencia ó NOE débil NH-NH ($i, i+1$) sugiere una preferencia por conformaciones extendidas para el esqueleto peptídico. Por el contrario, la presencia de un NOE débil-medio $\text{H}\alpha$ -NH ($i, i+1$) y un NOE fuerte NH-NH ($i, i+1$) indica la preferencia por conformaciones de tipo hélice.¹⁴

La figura 5 (parte superior) muestra la región de las amidas del espectro de 2D-NOESY de los péptidos modelo **Ac-*allo*-L-Thr-NHMe**, **Ac-(*S*)-MeSer-NHMe** y **Ac-(*S,S*)-c₄Ser-NHMe**, como ejemplos representativos. Como ya ocurría para los péptidos derivados de Ser y Thr naturales⁶ (**Ac-L-Ser-NHMe** y **Ac-L-Thr-NHMe**, respectivamente) el espectro de 2D-NOESY del derivado de (*S*)-*allo*-treonina (compuesto **Ac-*allo*-L-Thr-NHMe**), muestra un NOE fuerte entre los protones $\text{H}\alpha$ y NH_1 y no se aprecia, sin embargo, NOE entre los protones de las amidas NH_1 - NH_2 , lo cual indica una preferencia por conformaciones extendidas.¹⁴ Por el contrario, el NOE medio observado en los compuestos **Ac-(*S*)-MeSer-NHMe** y **Ac-c₄Ser-NHMe** indica la presencia de una población importante cuyos ángulos diedros ϕ_p/ψ_p caen en la zona típica de α -hélice.

¹⁴ a) Dyson, H. J.; Wright, P. E. *Annu. Rev. Anthropol. Annu. Rev. Biophys. Chem.* **1991**, *20*, 519-538; b) Dyson, H. J.; Wright, P. E. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1996**, *47*, 369-395.

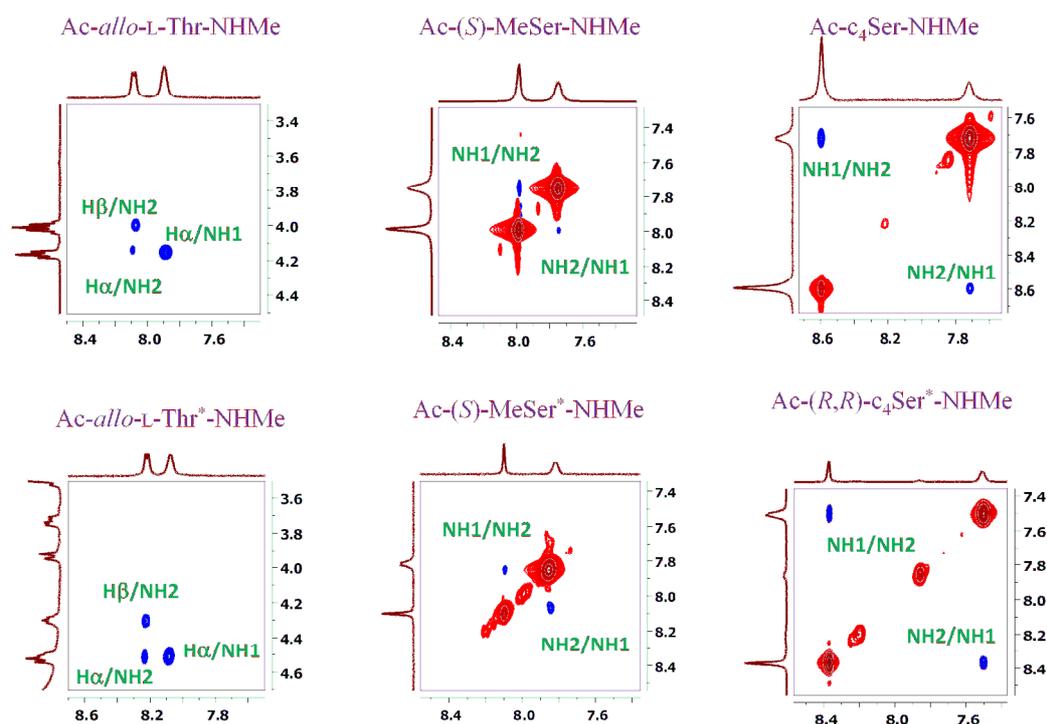


Figura 5. Secciones de los espectros 2D NOESY (400 MHz) para un tiempo de mezcla de 800 ms en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) a 25°C de distintos péptidos (arriba) y glicopéptidos (abajo). Los picos de la diagonal son negativos (color rojo). Los contactos NOE aparecen como picos positivos (color azul).

Como primer paso en la elucidación del comportamiento conformacional de estas moléculas, se calcularon, para todas ellas, los mapas adiabáticos usando los campos de fuerza AMBER94, CHARMM y MM+. Estas superficies de energía potencial proporcionan una primera estimación de las regiones conformacionales que son energéticamente accesibles para cada compuesto. Como se presenta en la figura 6, la superficie calculada, por ejemplo, con el campo de fuerzas CHARMM para **Ac-(S)-MeSer-NHMe** muestra la presencia de cuatro mínimos, nombrados como α_D (con ϕ_p cercano a -60° y ψ_p alrededor de -60°), α_L (caracterizado por valores de ϕ_p y ψ_p de

aproximadamente 60°), poliprolina tipo II (PPII, con ϕ_p cerca de -60° y ψ_p alrededor de 180°) y finalmente una conformación inusual para aminoácidos naturales (ϕ_p entorno a -60° y ψ_p sobre -180°), denominada como F*.¹⁵ Merece la pena comentar que estos cuatro conformeros mayoritarios encontrados para **Ac-(S)-MeSer-NHMe** caen en los mínimos locales previamente calculados para el mismo péptido modelo por otros grupos de investigación.¹⁶

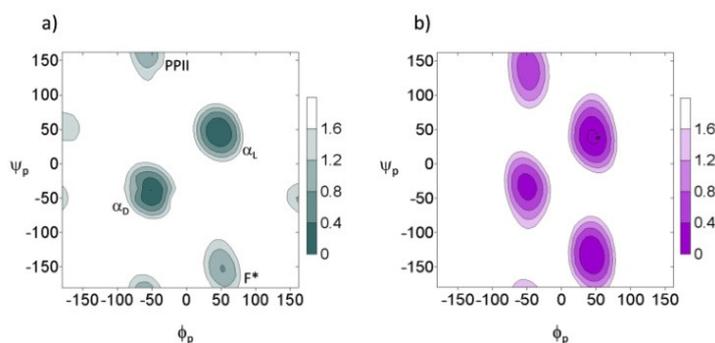


Figura 6. Mapas adiabáticos (ϕ_p/ψ_p) calculados con los campos de fuerza CHARMM (a) y AMBER (b) para el derivado **Ac-(S)-MeSer^{*}-NHMe**.

El siguiente paso consistió en obtener la población de cada una de las conformaciones existentes en disolución capaz de reproducir los datos experimentales de RMN. Como se ha dicho anteriormente, las DM sin restricciones llevadas a cabo sobre sistemas pequeños, normalmente fallan al intentar reproducir el comportamiento conformacional del esqueleto peptídico. En concreto, el campo de fuerzas AMBER94 usado en nuestras DM muestra una clara tendencia a sobreestimar las conformaciones de tipo hélice. Por ello, la población relativa de conformeros obtenida de las DM sin

¹⁵ El código de letras es el utilizado en Zimmerman, S. S.; Pottle, M. S.; Nemethy, G.; Scheraga, H. A. *Macromolecules* **1977**, *10*, 1-9; en ese trabajo el conformero β se nombra como E, el PPII como F, y la conformación de α -hélice como A.

¹⁶ Obrecht, D.; Altorfer, M.; Lehmann, C.; Schonholzer, P.; Muller, K. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4080-4086.

restricciones para el esqueleto peptídico no está totalmente de acuerdo con los datos de RMN. Por otro lado, es importante señalar que la interpretación directa de los datos de NOE en moléculas flexibles, *en términos de una única estructura*, puede conducir a la generación de conformaciones virtuales de alta energía.¹⁷ Por tanto, y siguiendo nuestro protocolo previamente comentado,^{6,18} aquí combinamos los datos de distancias interprotónicas y de constantes de acoplamiento obtenidos por RMN, con los cálculos de DM con restricciones promediadas en el tiempo (DM-tar) con el objetivo de obtener una distribución de conformeros de baja energía (de acuerdo con el campo de fuerzas AMBER) que sea capaz de reproducir cuantitativamente los datos experimentales de RMN.

Por tanto, se determinaron experimentalmente las distancias protón-protón a partir de las correspondientes curvas de crecimiento NOE¹⁹ (ver figura 7).

¹⁷ Cumming, D. A.; Carver, J. P. *Biochemistry* **1987**, *26*, 6664-6676.

¹⁸ a) Corzana, F.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14640-14648; b) Corzana, F.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; García de Luis, M.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9458-9467.

¹⁹ Haselhorst, T.; Weimar, T.; Peters, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10705-10714.

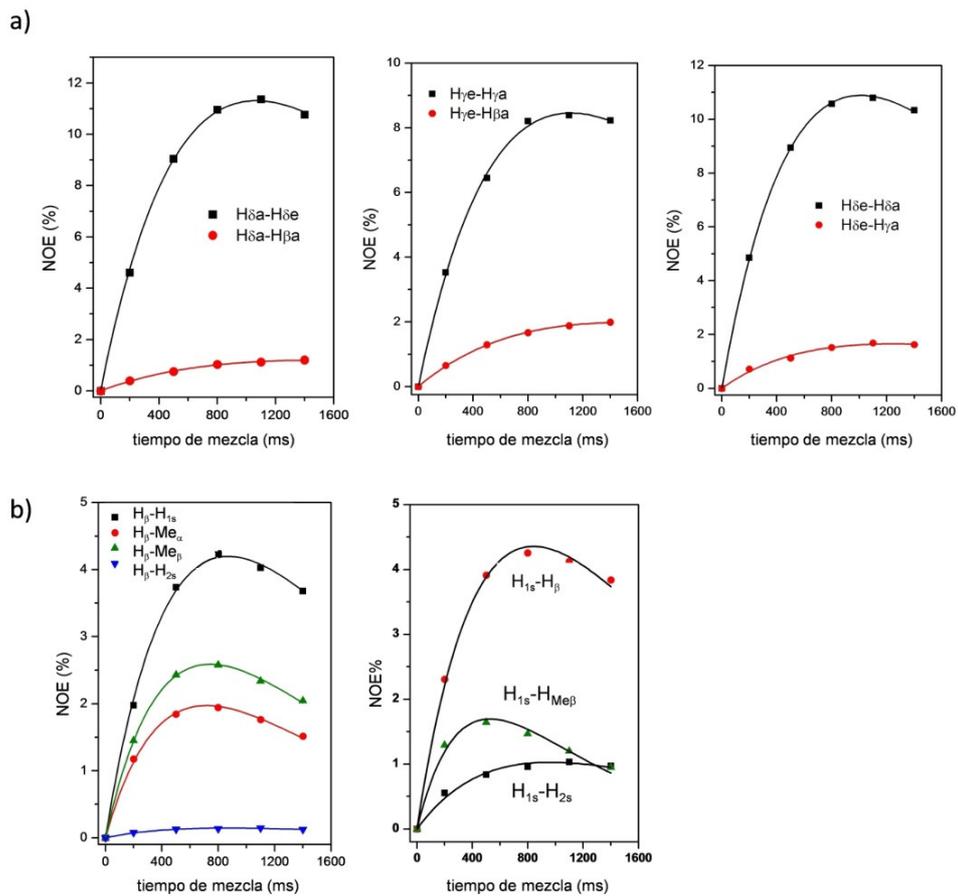


Figura 7. Ejemplos de curvas de crecimiento. (a) compuesto **Ac-c₄Ser-NHMe** y (b) derivado **Ac-(R,R)-MeThr*-NHMe**.

Igualmente, las distancias interprotónicas en las que están involucrados los protones de las amidas fueron obtenidas de forma semicuantitativa integrando el volumen de los correspondientes picos de cruce en el espectro 2D-NOESY. Todos estos datos junto con

las constantes de acoplamiento (3J)²⁰ se usaron como restricciones en los cálculos de DM²¹ (ver tablas 1-4).

Ac-(S,S)-MeThr-NHMe		
	Exptl	DM-tar
NH1–NH2	--	3.1
NH1–Me α	2.8	2.8
NH2–Me α	2.8	2.7
NH1–H β	3.1	3.0
NH2–H β	2.5	2.6
NH1–Me β	--	4.5
NH2–Me β	3.0	2.7

Tabla 1.

Ac-<i>allo</i>-L-Thr-NHMe		
	Exptl	DM-tar
NH1–NH2	--	3.1
NH1–H α	2.2	2.3
NH2–H α	2.8	2.9
NH1–H β	3.2	3.4
NH2–H β	2.5	2.5
$^3J_{H\alpha,H\beta}$	4.2	4.5
$^3J_{NH2,H\alpha}$	8.1	7.2

Tabla 2.

²⁰ a) Marco, A.; Llinas, M.; Wuthrich, K. *Biopolymers* **1978**, *17*, 617-636; b) Vuister, G.W.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7772-7777.

²¹ Pearlman, D. A. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 1-16.

Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe		
	Exptl	DM-tar
NH1-NH2	>3.0	3.1
NH1-H β	2.7	2.8
NH2-H β	2.4	2.6
NH1-Me α	2.9	3.1
NH2-Me α	3.0	2.6
NH1-Me β	4.2	3.7
NH2-Me β	3.1	3.0
NH2-H1s	3.3	3.2
H1s-H β	2.2	2.2
H1s-Me β	2.9	3.2
H2s-H β	3.4	3.5

Tabla 3.

Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe		
	Exptl	DM-tar
NH1-NH2	2.7	2.6
NH1-H1s	2.6	2.9
NH1-H δ e	2.7	2.9
NH2-H β	2.3	2.5
NH2-H δ a	3.0	2.9
NH2-H1s	3.2	3.2
H β -H δ a	2.7	2.9
H β -H1s	2.4	2.6
H β -H2s	2.9	3.0
H β -H γ e	2.4	2.4
$\langle \theta \rangle$	-31.6	-31.6

Tabla 4.

Tablas 1-4. Comparación de los datos experimentales con los obtenidos de las DM-tar para algunos de los compuestos estudiados. Las distancias están en Å y las 3J en Hz.

En la figura 8 se muestra la distribución de población para el esqueleto peptídico (ϕ_p/ψ_p) de los péptidos modelo obtenida de las DM-tar. Es importante señalar que los cálculos de DM-tar para **Ac-(S)-MeSer-NHMe** exploran las cuatro conformaciones que ya se observaban en la figura 6, con poblaciones relativas de acuerdo con los datos experimentales.

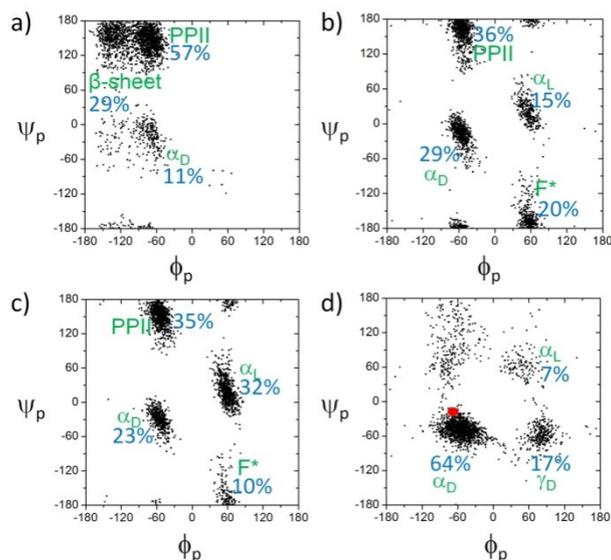


Figura 8. Distribuciones obtenidas de las DM-tar para la cadena peptídica (ϕ_p/ψ_p) de los derivados: a) *Ac-allo-L-Thr-NHMe*, b) *Ac-(S)-MeSer-NHMe*, c) *Ac-(S,S)-MeThr-NHMe* y d) *Ac-c₄Ser-NHMe*. Para el compuesto *Ac-c₄Ser-NHMe*, la conformación del *backbone* en el estado sólido se muestra con un círculo rojo.

Tal y como ya se comentaba anteriormente de los experimentos NOE, los ángulos diedros (ϕ_p/ψ_p) para el esqueleto peptídico de *Ac-allo-L-Thr-NHMe* son característicos de conformaciones extendidas, como la PPII y la lámina β , y sólo un pequeño número de confórmeros (cerca del 11%) mostraron valores de dichos ángulos diedros (ϕ_p/ψ_p) que corresponden a conformaciones de α -hélice. Este resultado es muy similar al previamente publicado para los compuestos *Ac-L-Ser-NHMe* y *Ac-L-Thr-NHMe*.⁶

Por otro lado, los péptidos modelo derivados de los aminoácidos α,α -disustituidos (por ejemplo, *Ac-(S)-MeSer-NHMe*, *Ac-(S,S)-MeThr-NHMe*, y *Ac-c₄Ser-NHMe*), mostraron una población significativa de confórmeros con valores de los ángulos diedros (ϕ_p/ψ_p) característicos de conformaciones de α -hélice. La figura 9 indica el número total

de conformaciones tipo α -hélice ($\alpha_D + \alpha_L$) presentes en los péptidos modelo en disolución acuosa. En el caso de **Ac-(S)-MeSer-NHMe** y **Ac-(S,S)-MeThr-NHMe**, los conformeros α_D y α_L coexisten con conformaciones extendidas, como la PPII y F*.

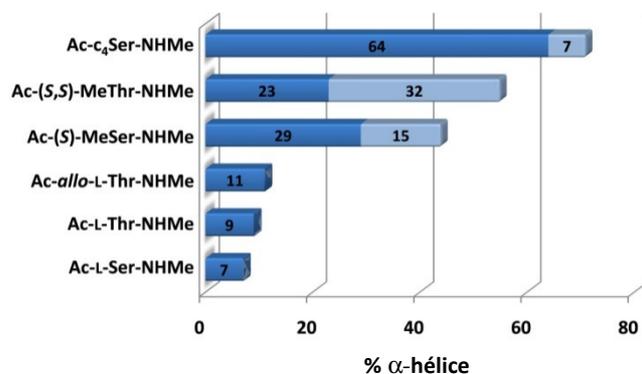


Figura 9. Población total para la conformación α -hélice (α_D en azul oscuro + α_L en azul claro) de los péptidos modelo obtenida de los cálculos de la DM-tar.

Por su parte, el anillo ciclobutánico promueve de manera importante las estructuras tipo hélice ($\alpha_D \approx 64\%$), de acuerdo con los resultados previamente descritos en la bibliografía.²² Las DM-tar llevadas a cabo para el derivado ciclobutánico sugieren también la existencia de aproximadamente el 17% de conformación giro γ (γ_D). En este caso, para el esqueleto péptidico de **Ac-c₄Ser-NHMe**, se observaron las mismas preferencias conformacionales en el estado sólido con $\phi_p = -84.4^\circ$ y $\psi_p = -7.8^\circ$ (figura 10). Además, la molécula adopta sólo una conformación del anillo en dicho estado sólido con un ángulo θ cercano a -24° y con el sustituyente en el C β situado en posición ecuatorial, lo cual es similar a lo descrito anteriormente por nuestro propio grupo para

²² a) Balaji, V. N.; Ramnarayan, K.; Chan, M. F.; Rao, S. N. *Peptide. Res.* **1995**, *8*, 178-186; b) Gatos, M.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Bonora, G. M.; Benedetti, Z.; Di Blasio, B.; Iacovino, R.; Santini, A.; Saviano, M.; Kamphuis, J. *J. Pept. Sci.* **1997**, *3*, 110-122.

otros derivados ciclobutánicos.²³ Igualmente, en disolución acuosa se encontró un único conformero para el ciclo, como se deduce de los cálculos de DM-tar, con $\theta = -20.3^\circ$. Como ya hemos publicado,²³ la existencia de una única conformación del anillo es totalmente compatible con la distancia observada H β -H δ a de 2.7 Å (experimentalmente calculada a partir de las curvas de crecimiento NOE).

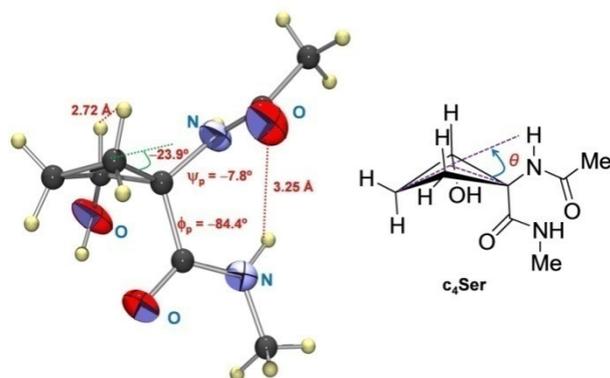


Figura 10. Estructura cristalina del compuesto Ac-c₄Ser-NHMe y definición del ángulo θ .

En cuanto a la cadena lateral, su comportamiento conformacional está caracterizado por el ángulo de torsión χ^1 , el cual puede adoptar tres rotámeros de mínima energía, denominados *gauche(-)* o *g(-)* ($\chi^1 \approx -60^\circ$), *gauche(+)* o *g(+)* ($\chi^1 \approx 60^\circ$) y *anti* o *t* ($\chi^1 \approx -180^\circ$; figura 11a).

²³ a) Jiménez-Osés, G.; Corzana, F.; Busto, J. H.; Pérez-Fernández, M.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1869-1878; b) Avenoza, A.; Busto, J. H.; Canal, N.; Peregrina, J. M. en *Structural Analysis of Cyclic Systems* (Ed.: I. Iriepa), Research Signpost, T. C., Kerala (India), **2005**, pp. 55-68.

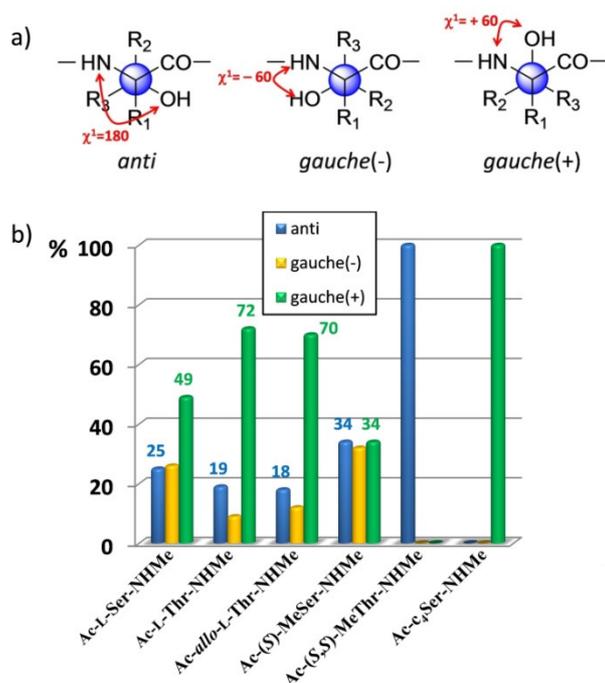


Figura 11. a) Conformaciones más estables para la cadena lateral (ángulo diedro χ^1). b) Distribuciones de χ^1 obtenida de la MD-tar para los péptidos modelo. Para el compuesto **Ac-c₄Ser-NHMe** χ^1 tiene un valor en torno a 105°.

La figura 11b presenta la población para el ángulo χ^1 , obtenida de los cálculos de DM-tar para los péptidos modelo y de ella merece la pena destacar una serie de puntos:

Los péptidos modelo derivados de L-Ser y L-Thr natural mostraron una preferencia conformacional para el ángulo χ^1 de aproximadamente 60°. Además, y debido a los requerimientos estéricos del grupo metilo en β de la Thr, la población *gauche*(+) es algo más alta en **Ac-L-Thr-NHMe** (cercana al 72%). Curiosamente, para el compuesto **Ac-allo-L-Thr-NHMe**, en donde el C β presenta la configuración contraria, se observó el mismo resultado. Por otro lado, el derivado α -metilado **Ac-(S)-MeSer-NHMe** mostró un comportamiento más bien flexible para dicho ángulo χ^1 . Por su parte, para el compuesto

α - y β -metilado **Ac-(S,S)-MeThr-NHMe**, la cadena lateral es rígida y únicamente presenta la conformación *anti*. Finalmente, en el derivado ciclobutánico **Ac-c₄Ser-NHMe** la cadena lateral está caracterizada por la restricción impuesta por el propio anillo de cuatro miembros y el ángulo χ^1 tiene un valor próximo a 105° a lo largo de todo el cálculo de DM.

3.2.3. Estudio conformacional de los glicopéptidos modelo

Como primer paso y siguiendo el protocolo descrito anteriormente para los péptidos modelo, se calcularon los mapas adiabáticos de energía para todos los glicopéptidos usando los campos de fuerzas AMBER94, CHARMM y MM+. La figura 12a muestra el mapa adiabático calculado para **Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe** con el campo de fuerzas CHARMM. Además, con el fin de explorar el comportamiento conformacional de estos compuestos, se realizaron cálculos de DM sin restricciones de 100 ns, en vacío y a 400 K, para todos los glicopéptidos (ver figura 12b). En este caso, al aumentar la temperatura se evita que las moléculas puedan quedar atrapadas en mínimos locales desde el punto de vista cinético. Como puede verse para el glicopéptido **Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe**, con este cálculo se exploran también todos los mínimos encontrados con el campo de fuerzas CHARMM (comparar figura 12a y 12b).

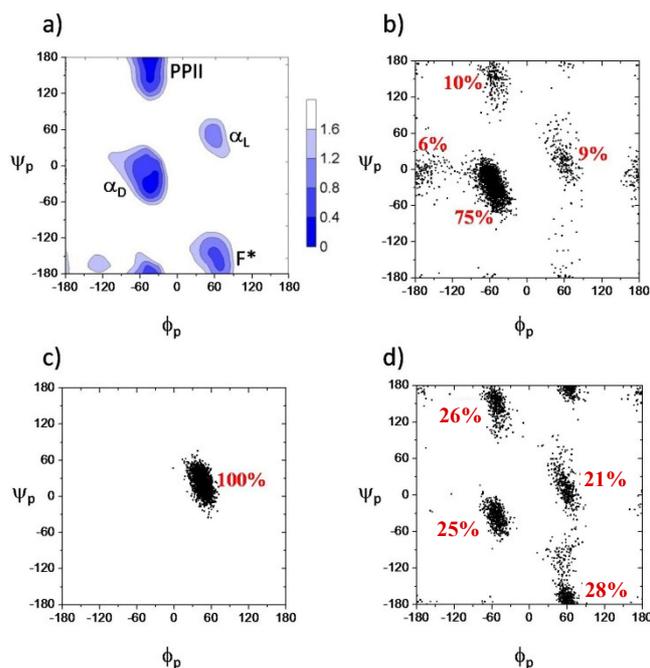


Figura 12. (a) Mapa adiabático calculado con el campo de fuerzas CHARMM para el compuesto **Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe**. (b) Distribución de la cadena peptídica (ϕ_p/ψ_p) obtenida de una DM sin restricciones de 100 ns, a 400 K y en el vacío (con constante dieléctrica 80) para **Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe**. (c) Distribución (ϕ_p/ψ_p) obtenida de una DM sin restricciones de 10 ns con agua explícita (TIP3P) a 298 K y 1 atm para **Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe**. (d) Distribución (ϕ_p/ψ_p) obtenida de la DM-tar en el vacío (con constante dieléctrica 80) para **Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe**.

Al igual que ocurría con los péptidos, los cálculos de DM sin restricciones realizados en agua explícita a 298 K no reproducen correctamente el comportamiento conformacional del esqueleto peptídico. Así, para **Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe** sólo se observó población en uno de los mínimos, correspondiente a la conformación α_L (figura 12c). Sin embargo, la inclusión de los datos de RMN (distancias protón-protón y constantes de acoplamiento 3J) como restricciones en los cálculos de DM-tar dio lugar a una distribución de los ángulos ϕ_p/ψ_p que sí reproduce cuantitativamente los datos experimentales (ver figura 12d y tabla 3 en pág. 128).

El patrón de 2D-NOESY correspondiente a los espectros de los glicopéptidos modelo es, en todos los casos, bastante similar al de los péptidos correspondientes (ver figura 5 abajo). Por tanto, se esperaría una distribución de los ángulos ϕ_p/ψ_p comparable a la obtenida para los péptidos. Es decir, la β -*O*-glucosilación no tiene un efecto importante sobre la conformación del esqueleto peptídico en el caso de los aminoácidos no naturales.

Los porcentajes de conformaciones tipo hélice para los glicopéptidos modelo **Ac-D-Ser^{*}-NHMe** y **Ac-*allo*-L-Thr^{*}-NHMe** resultaron ser de 12 y 11% respectivamente (figura 13).

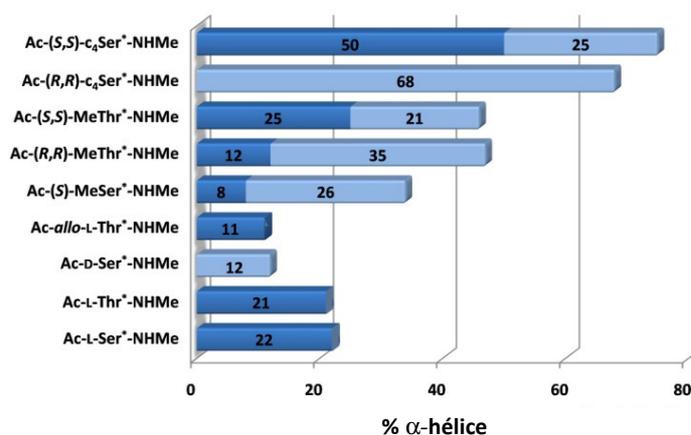


Figura 13. Población total para la conformación α -hélice (α_D en azul oscuro + α_L en azul claro) obtenida de los glicopéptidos modelo de los cálculos de la DM-tar.

Estos resultados son similares a los obtenidos para los compuestos no glicosilados **Ac-D-Ser-NHMe** y **Ac-*allo*-L-Thr-NHMe** (figura 9) y difieren, sin embargo, de los previamente descritos para los aminoácidos naturales **Ac-L-Ser-NHMe** y **Ac-L-Thr-NHMe**, para los que se observaba tanto teórica como experimentalmente, un importante aumento de las conformaciones plegadas para los derivados glucosilados (**Ac-L-Ser^{*}-NHMe** y **Ac-L-Thr^{*}-NHMe**) en comparación con los péptidos modelo.⁶ Por otra parte, aunque el esqueleto peptídico de **Ac-(*S,S*)-c₄Ser^{*}-NHMe** muestra fundamentalmente una

conformación de hélice α_D , la cadena peptídica de su diastereómero **Ac-(R,R)-c₄Ser*-NHMe** adopta la hélice contraria (hélice α_L), lo cual está de acuerdo con la distinta configuración que ambos compuestos presentan en el C α . La misma característica se puede encontrar en los derivados **Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe** (hélice α_D mayoritaria) y **Ac-(R,R)-MeThr*-NHMe** (hélice α_L).

Por otro lado, y como se ha comentado previamente para **Ac-c₄Ser-NHMe**, para los glicopéptidos modelo **Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe** y **Ac-(R,R)-c₄Ser*-NHMe** se observó también sólo una conformación del anillo ciclobutánico ($\theta = -31.6^\circ$ y 30.0° , respectivamente). Este hecho está de acuerdo con las distancias H β -H δ a experimentalmente determinadas para estos compuestos²³ (ver tabla 4, pág. 128). Además, y siguiendo el mismo comportamiento observado para el péptido **Ac-c₄Ser-NHMe**, los glicopéptidos presentaron también el sustituyente en el C β en posición ecuatorial.

La figura 14 muestra las preferencias conformacionales de la cadena lateral para los glicopéptidos modelo. En lo que se refiere a los glicopéptidos derivados de los aminoácidos naturales que describimos previamente,⁶ mientras que el ángulo diedro χ^1 en el glucopéptido **Ac-L-Ser*-NHMe** tiene una distribución similar a la de su péptido correspondiente **Ac-L-Ser-NHMe**, el glucopéptido **Ac-L-Thr*-NHMe** difiere significativamente de **Ac-L-Thr-NHMe** (comparar figuras 11 y 14). De hecho, la cadena lateral en **Ac-L-Thr*-NHMe** adopta principalmente las conformaciones *gauche*(+) y *anti* (44 y 47%, respectivamente), mientras que el conformero *gauche*(+) es el más poblado (72%) en el péptido modelo **Ac-L-Thr-NHMe**. Algo similar se observa cuando se compara **Ac-(S)-MeSer-NHMe** con **Ac-(S)-MeSer*-NHMe**. Por otra parte, en el caso de **Ac-*allo*-L-Thr-NHMe**, la β -O-glucosilación no parece afectar demasiado a la cadena lateral del péptido modelo. En cuanto a los derivados de α -metiltreonina, la cadena lateral

del péptido modelo **Ac-(S,S)-MeThr-NHMe** es totalmente rígida con un ángulo χ^1 de aproximadamente 180° . Sin embargo, los correspondientes glicopéptidos modelo **Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe** y **Ac-(R,R)-MeThr*-NHMe** exhiben los tres posibles conformeros, pero mostrando una clara preferencia por las conformaciones *anti*.

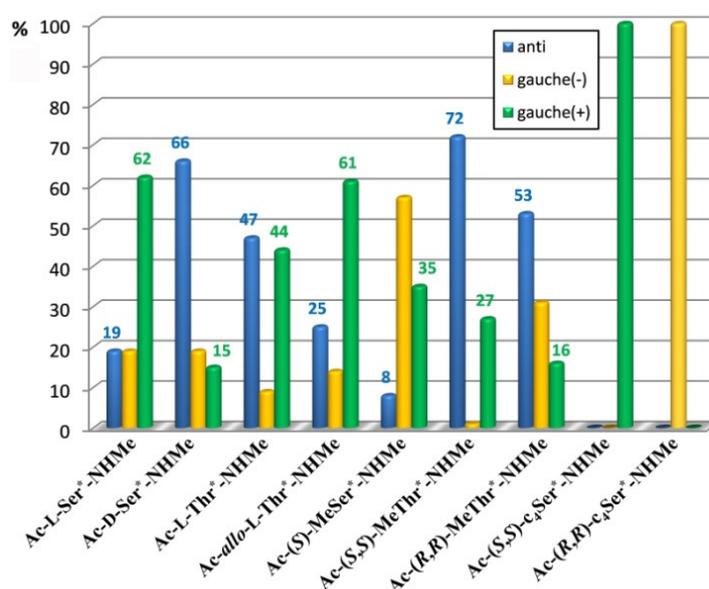


Figura 14. Distribuciones de χ^1 obtenida de la DM-tar para los glicopéptidos modelo. Para los compuestos **Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe** y **Ac-(R,R)-c₄Ser*-NHMe**, χ^1 toma valores en torno a 105° y -105° , respectivamente.

En el caso del glicopéptido **Ac-D-Ser*-NHMe** la rotación alrededor de χ^1 está, en cierto modo, restringida, con una clara preferencia por los conformeros *anti* (cerca del 70%). Finalmente, los derivados ciclobutánicos **Ac-(S,S)-c₄Ser-NHMe** y **Ac-(R,R)-c₄Ser-NHMe** presentan, como era de esperar, un único conformero para la cadena lateral (comparar figuras 11 y 14).

Por lo que respecta a la conformación del enlace glicosídico, ésta está caracterizada por los ángulos de torsión ϕ_s y ψ_s . Como ya se ha comentado en Antecedentes, el valor del ángulo diedro ϕ_s está determinado principalmente por el efecto exo-anomérico,²⁴ el cual fija su valor alrededor de -60° en todos los compuestos con enlace β -*O*-glicosídico. El enlace glicosídico en **Ac-D-Ser*-NHMe** y **Ac-(S)-MeSer*-NHMe** mostró un comportamiento similar al observado para **Ac-L-Ser*-NHMe** (figura 15), lo que indica por tanto, que la estereoquímica en el C α y la presencia del grupo metilo en dicho C α apenas influye en la conformación del enlace glicosídico en los derivados de serina.

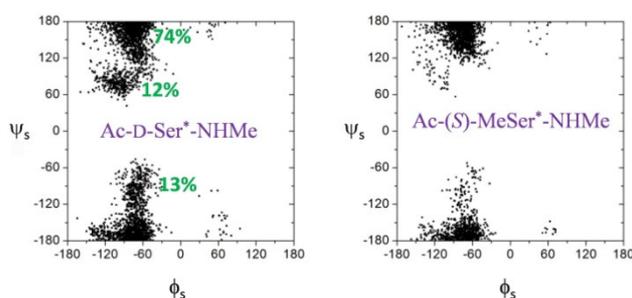


Figura 15. Distribución del enlace glicosídico (ϕ_s/ψ_s) obtenida de la MD-tar para los glicopéptidos **Ac-D-Ser*-NHMe** y **Ac-(S)-MeSer*-NHMe**.

Por el contrario, la presencia del grupo metilo en el C β afecta notablemente a la conformación de este enlace. En este sentido, hemos publicado recientemente que el grupo metilo de la Thr fuerza al ángulo ψ_s a adoptar un valor cercano a 120° para glicopéptidos con *N*-acetilgalactosamina. Por tanto, los enlaces H β -C β y O1s-C1s están en conformación eclipsada.^{18b} La típica conformación alternada del ángulo ψ_s (nombrada aquí como conformación *anti*) está desestabilizada en **Ac-L-Thr*-NHMe** por efectos

²⁴ Thatcher, G. R. J. *The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects*, American Chemical Society, Washington, DC **1993**.

estéricos entre el átomo H1s y el grupo metilo en β (figura 16). Por ello, esta conformación no se observa a lo largo de toda la trayectoria de la DM.

Ac-L-Thr*-NHMe (ψ_s análisis conformacional)

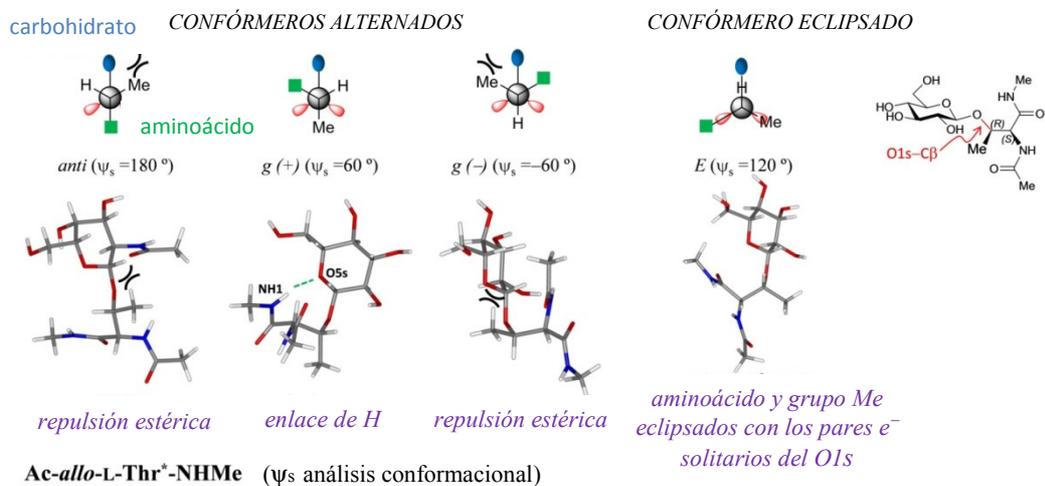


Figura 16. Proyecciones de Newman del enlace C β -O1s para los compuestos **Ac-L-Thr*-NHMe** y **Ac-allo-L-Thr*-NHMe**, junto con una representación 3D de cada una de las conformaciones.

Como consecuencia, el conformero eclipsado (centrado en torno a $\psi_s = 120^\circ$ y denotado como E en las figuras 16 y 17) es el más poblado (65%) en **Ac-L-Thr*-NHMe**. Además, aparece una nueva conformación alternada para el ángulo ψ_s (definida como $g(+)$) con ψ_s cercano a 60° . La conformación $g(+)$ del ángulo ψ_s es la mayoritariamente poblada cuando el ángulo χ^1 tiene un valor de aproximadamente 180° (figura 18a). Por el

contrario, los conformeros eclipsados presentan en su mayoría un valor de χ^1 de en torno a 60° .

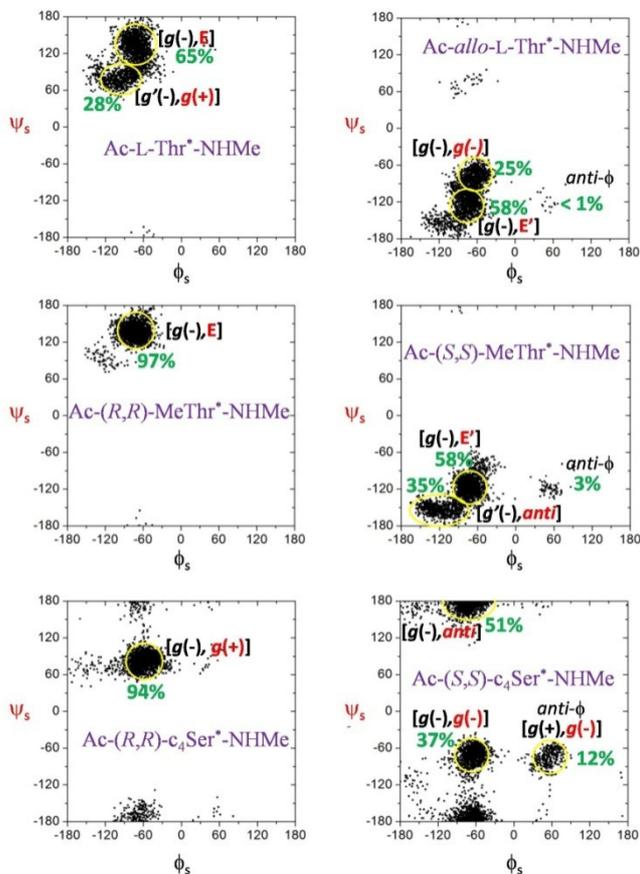


Figura 17. Distribución del enlace glicosídico (ϕ_s/ψ_s) obtenida de la DM-tar para los glicopéptidos Ac-L-Thr*-NHMe, Ac-*allo*-L-Thr*-NHMe, Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe, Ac-(R,R)-MeThr*-NHMe, Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe, y Ac-(R,R)-c₄Ser*-NHMe. La conformación $g(+)$ del ángulo diedro ϕ_s (O5s-C1s-O1s-C β = 60°) se conoce también como *anti- ϕ* (que corresponde a un valor de 180° para este ángulo diedro cuando es definido con los átomos H1s-C1s-O1s-C β).

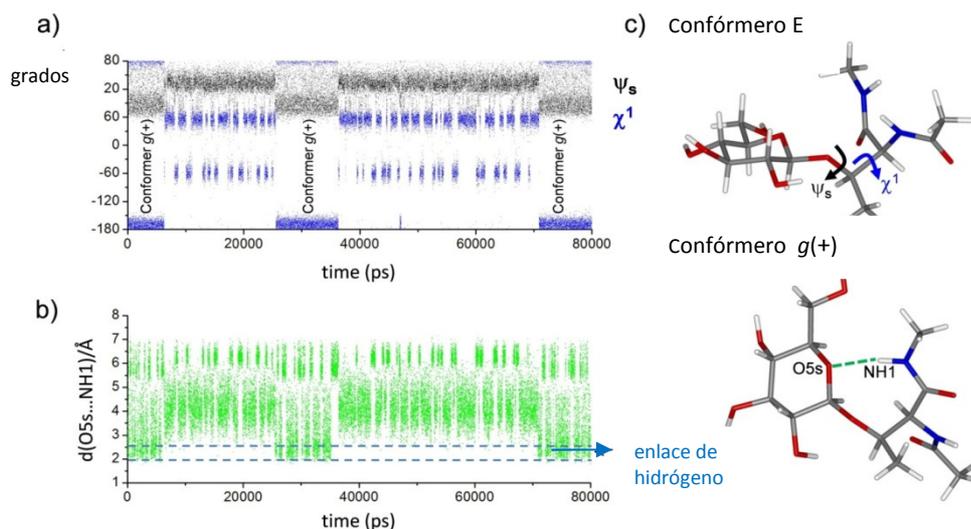


Figura 18. (a) Valores de ψ_s y χ^1 a lo largo de los 80 ns de la DM-tar. (b) Distancia O5s...NH1 en función del tiempo de la DM-tar. (c) Estructuras 3D de los conformeros E y g(+) de ψ_s para el compuesto **Ac-L-Thr*-NHMe**.

Es interesante señalar que la conformación g(+) del ángulo ψ_s está estabilizada por un enlace de hidrógeno entre los átomos O5s y NH1 (figura 18b). En este sentido, los valores atípicos para ϕ_s (alrededor de -100°) que se toman en esta conformación podrían contribuir a la optimización del enlace de hidrógeno. Por otro lado, y considerando el importante papel que juegan las moléculas de agua en las preferencias conformacionales de estos sistemas, es importante mencionar que esta interacción de enlace de hidrógeno se encontró también (44% del tiempo total de la trayectoria) en los cálculos de DM sin restricciones llevados a cabo para **Ac-L-Thr*-NHMe** con moléculas de agua explícitas.

Para determinar si este resultado inesperado podría provenir de *artifacts* en los cálculos de DM (figura 18), se calculó la energía de la molécula en función del enlace ψ_s a un nivel B3LYP/6-31G(d,p) sobre el modelo reducido de **Ac-L-Thr*-NHMe** y considerando las dos conformaciones principales del ángulo de torsión χ^1 , que son la *anti*

y la conformación $g(+)$ (figura 19). Como resultado de estos cálculos, se encontró que las conformaciones alternadas y eclipsadas de ψ_s , ($g(+)$ y E, respectivamente) para el modelo reducido correspondían a rotámeros de mínima energía.

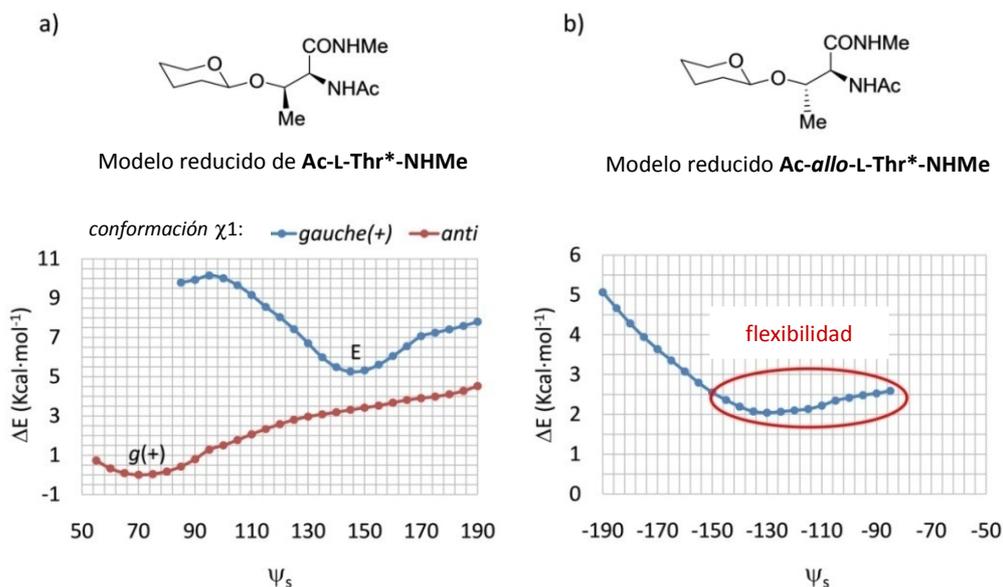


Figura 19. Potential Energy Surface en función del diedro ψ_s a nivel B3LYP/6-31G(d,p) para los modelos reducidos de (a) Ac-L-Thr*-NHMe y (b) Ac-allo-L-Thr*-NHMe.

Del análisis conformacional del enlace glicosídico en los compuestos β -metilados con configuración *S* en el C β (esto es, Ac-allo-L-Thr*-NHMe, Ac-(*S,S*)-MeThr*-NHMe, Ac-(*S,S*)-c₄Ser*-NHMe) se pueden establecer importantes conclusiones. Esta configuración del grupo metilo en β aumenta significativamente la flexibilidad del enlace glicosídico (figura 17). De hecho, el ángulo ψ_s toma valores desde -160° a -60° para los derivados acíclicos Ac-allo-L-Thr*-NHMe, Ac-(*S,S*)-MeThr*-NHMe. Esto está de acuerdo con el cálculo de la energía en función de ψ_s realizado sobre el modelo reducido de Ac-allo-L-Thr*-NHMe a nivel B3LYP/6-31G-(d,p), en donde se observa una meseta de menos de 1 Kcal·mol⁻¹ entre estos valores del ángulo (figura 19).

Para los compuestos **Ac-*allo*-L-Thr*-NHMe** y **Ac-(*S,S*)-MeThr*-NHMe**, la conformación eclipsada del ángulo ψ_s (denotada como E' en la figura 17) es la más poblada. Curiosamente, se observó también una conformación alternada *anti*, con un valor de ψ_s alrededor de -180° . Esta misma conformación presenta un valor de ϕ_s cercano a -120° evitando así el contacto estérico entre el O5s y el grupo metilo en β . Además, la conformación *g(-)* del ángulo ψ_s podría estar estabilizada por un enlace de hidrógeno intramolecular entre el NH2 y los átomos O5s y O6s (figura 20a). Sin embargo, aunque tanto la repulsión estérica entre el grupo metilo en β y la parte carbohidrato como el posible enlace de hidrógeno deben jugar un papel importante en la inesperada flexibilidad del ángulo ψ_s , la influencia de las moléculas de agua podría ser también relevante. En efecto, la conformación de **Ac-(*S,S*)-c₄Ser*-NHMe** en torno a $(-60^\circ, -60^\circ)$ para ϕ_s y ψ_s podría explicarse por la existencia de moléculas de agua puente entre los átomos O2s y el oxígeno carbonílico O1 de la cadena peptídica, como puede deducirse de la correspondiente función de distribución radial bidimensional²⁵ obtenida de los cálculos de DM sin restricciones de 20 ns (ver figura 20b). La densidad máxima calculada para este bolsillo hidrofílico fue de 2.5. El tiempo de residencia máximo y promedio calculado para una molécula de agua fue de 25.0 y 2.0 ps, respectivamente. Por otro lado, la distancia promedio de los átomos O2s...O1 fue 5.3 Å, con una variación de 2.5 hasta 7.2 Å.

²⁵ Andersson, C.; Engelsen, S. B. *J. Mol. Graphics J. Mol. Graph. Model.* **1999**, *17*, 101-105.

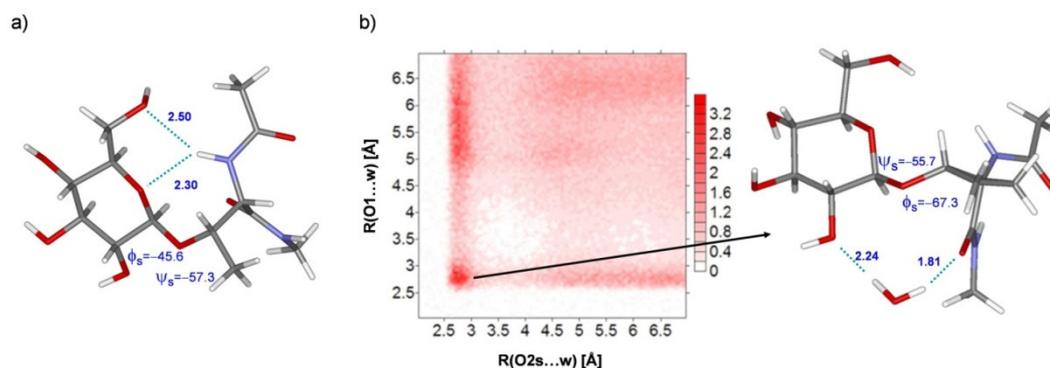


Figura 20. (a) Estructura optimizada [B3LYP/6-31G(d,p)] calculada para la conformación $g(-)$ del ángulo diedro ψ_s en el derivado **Ac-*allo*-L-Thr*-NHMe**. (b) Función de distribución radial 2D obtenida para los átomos O1 y O2s en la DM sin restricciones para el compuesto **Ac-(*S,S*)-c₄Ser*-NHMe**. La distancia está en Å y los ángulos diedros en grados.

Por otro lado, el enlace glicosídico de **Ac-(*S,S*)-c₄Ser*-NHMe** muestra un mayor grado de flexibilidad no sólo alrededor de ψ_s sino también alrededor del ángulo ϕ_s . Así, mientras las conformaciones más pobladas exhiben un valor típico para el ángulo diedro ϕ_s de en torno a -60° , hay también una considerable población con un valor de ϕ_s cercano a 60° . Esta conformación, que cumple también el efecto exo-anomérico, se suele denominar conformación *anti- ϕ* (porque los valores de ϕ_s están cercanos a 180° cuando el ángulo se define entre H1s-C1s-O1s-C β). Los cálculos de DM con restricciones sugieren una población de aproximadamente el 12% para esta inusual conformación. Cabe destacar que, aunque esta conformación de alta energía se ha confirmado experimentalmente para algunos di- y trisacáridos²⁶ y para oligosacáridos unidos a

²⁶ a) Dabrowsky, J.; Kozár, T.; Grosskurth, H.; Nifant'ev, N. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5534-5539; b) Landersjö, C.; Stenutz, R.; Widmalm, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8695-8698; c) Bukowski, R.; Morris, L. M.; Woods, R. J.; Weimar, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *7*, 2697-2705; d) Höög, C.; Landersjö, C.; Widmalm, G. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3069-3077; e) Lycknert, K.; Helander, A.; Oscarson, S.; Kenne, L.; Widmalm, G. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1331-1338.

proteínas,²⁷ éste es el primer caso en el que una conformación *anti-φ* se ha observado de manera experimental en glicopéptidos modelo. Esta excepcionalmente alta proporción de conformaciones *anti-φ* encontradas para el glicopéptido **Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe** fue detectada experimentalmente por la observación de un NOE medio Hβ–H2s, exclusivo de esta conformación. Es decir, la existencia de una distancia media Hβ–H2s corta (que de las curvas de crecimiento NOE se estima sería de 2.9 Å) nunca podría explicarse sin asumir la existencia de una cierta población con conformación *anti-φ* (ya que para una conformación *syn* dicha distancia es mayor de 4.5 Å; figura 21).

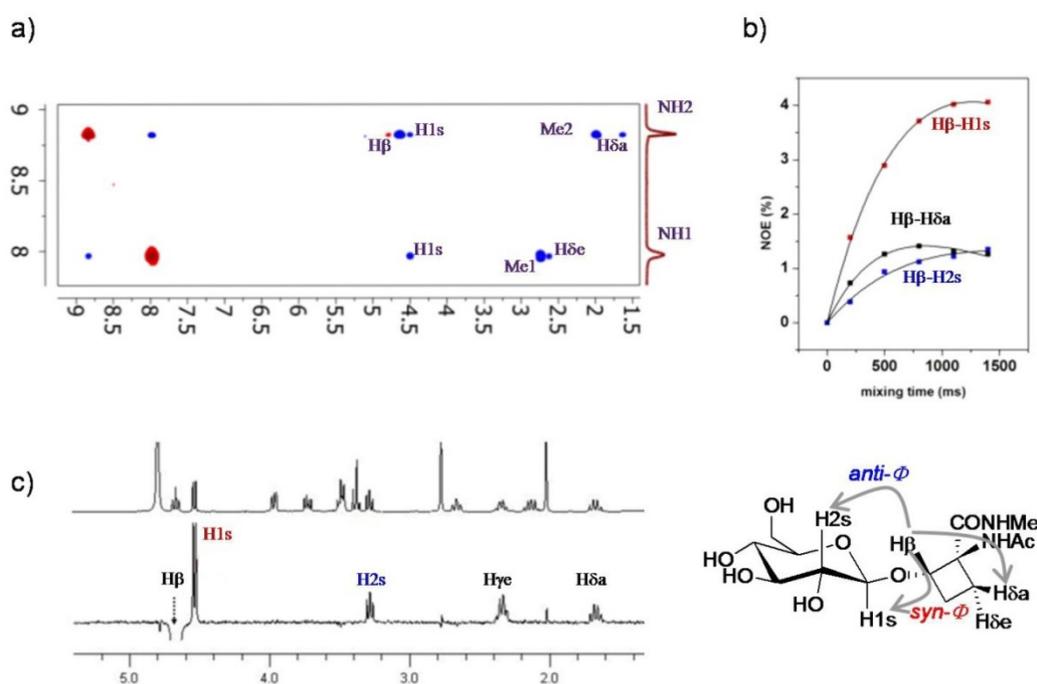


Figura 21. (a) Espectro 2D NOESY (400 MHz, 800 ms) del compuesto **Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe** en una mezcla H₂O/D₂O (9:1) a 25°C y pH = 5.2. Los picos de la diagonal son negativos (color rojo). (b) Curvas de crecimiento NOE para el protón Hβ del compuesto **Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe**. (c) Experimentos 1D NOESY correspondientes a la inversión del protón Hβ.

²⁷ Bush, C. A.; Martín-Pastor, M.; Imberty, A. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, *28*, 269-293.

La conformación *anti- ϕ* en disolución acuosa podría estar estabilizada por la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares. De hecho, hay una fuerte correlación entre esta conformación *anti- ϕ* y la presencia de dos enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los átomos NH1–O5s y los NH1–O6s simultáneamente. Este comportamiento del enlace glicosídico en **Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe** se observó también en las DM sin restricciones llevadas a cabo en agua explícita (figura 22). Finalmente, hay que decir, que esta conformación *anti- ϕ* se detectó experimentalmente también para **Ac-*allo*-L-Thr*-NHMe** y **Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe** (figura 17), es decir, para los compuestos con configuración (S,S) en los C α y C β . Sin embargo, la población de dicha conformación en ambos casos es menor del 4% (figura 17), lo cual está de acuerdo con la distancia H β –H2s deducida de las curvas de crecimiento NOE (3.7 y 3.4 Å para **Ac-*allo*-L-Thr*-NHMe** y **Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe**, respectivamente).

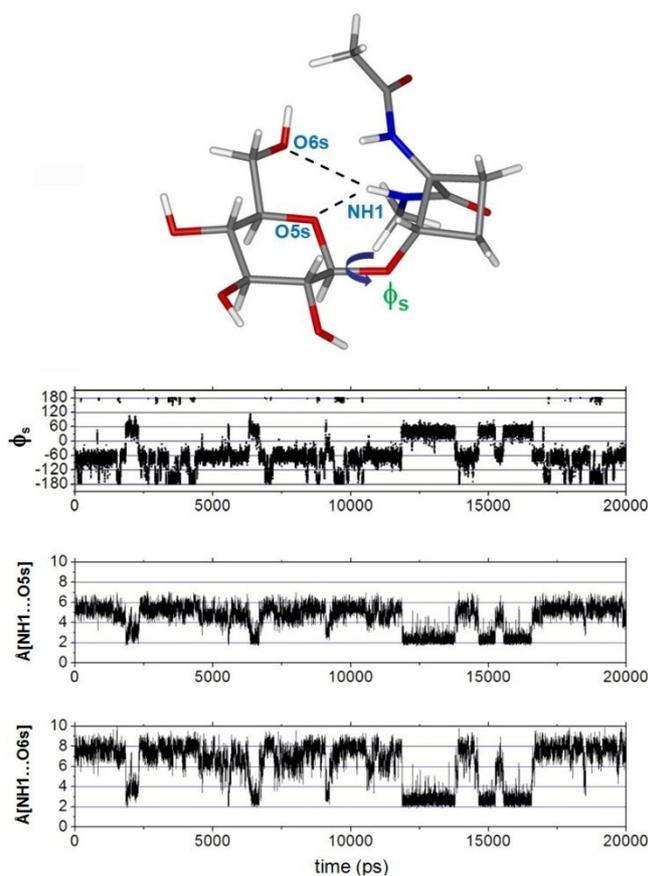


Figura 22. Variación del ángulo diedro ϕ_s y de las distancias $\text{NH1}\cdots\text{O5s}$ y $\text{NH1}\cdots\text{O6s}$ en función del tiempo obtenida para $\text{Ac}-(S,S)\text{-c}_4\text{Ser}^*\text{-NHMe}$ de la DM sin restricciones de 20 ns en disolvente explícito.

3.2.4 Resumen del estudio conformacional de los péptidos y glicopéptidos modelo.

Es bien sabido que la conformación extendida es la más estable en disolución acuosa para la cadena peptídica del péptido modelo derivado de Ser (Ac-L-Ser-NHMe). Además, la cadena lateral (definida por el ángulo χ^1) es muy flexible, y se observa la coexistencia de conformeros $g(+)$, $g(-)$ y *anti*, siendo el primero de ellos el más poblado.⁶

En este capítulo, hemos demostrado que con la incorporación de sustituyentes ya sea en el C α o en el C β de **Ac-L-Ser-NHMe** se puede modular tanto la conformación del esqueleto peptídico como la de la cadena lateral. Así, mientras que la presencia de un grupo metilo en el C β de **Ac-L-Ser-NHMe** ya sea en configuración *S* o *R* no afecta apenas a la cadena peptídica, sí rigidifica sin embargo la cadena lateral, que prefiere claramente la conformación *g*(+) (comparar **Ac-L-Ser-NHMe** con **Ac-L-Thr-NHMe** y **Ac-allo-L-Thr-NHMe** en las figuras 9 y 11). Por otro lado, la incorporación del grupo metilo en posición α - de **Ac-L-Ser-NHMe** o **Ac-L-Thr-NHMe** promueve la aparición de conformaciones plegadas para el esqueleto peptídico. Además, el grupo metilo en el C β (MeThr) rigidifica drásticamente el ángulo diedro χ^1 , modificando así sus valores hacia la conformación *anti* (comparar **Ac-L-Ser-NHMe** y **Ac-L-Thr-NHMe** con **Ac-(S,S)-Thr-NHMe** en la figura 11). Por su parte, en el caso de los derivados ciclobutánicos, la restricción impuesta por la incorporación del anillo en la estructura de Ser fuerza considerablemente al esqueleto peptídico a adoptar conformaciones de tipo hélice y hace que la cadena lateral presente únicamente la conformación *g*(+) (comparar **Ac-L-Ser-NHMe** con **Ac-c₄Ser-NHMe** en las figuras 9 y 11). Estos resultados aparecen resumidos en la tabla 5.

Entrada	Grupo incorporado	Posición del grupo	Configuración C α ,C β	Compuesto Ac-Xaa-NHMe	Backbone Φ_p/Ψ_p (% plegamiento)	Cadena lateral χ^1
1	--	--	S,--	L-Ser	7	flexible <i>anti</i> , g(+), g(-)
2	CH ₃ -	β	S,R	L-Thr	9	muy rígido g(+)(72%)
3	CH ₃ -	β	S,S	<i>allo</i> -L-Thr	11	muy rígido g(+)(70%)
4	CH ₃ -	α	S,--	MeSer	44	flexible <i>anti</i> , g(+), g(-)
5	CH ₃ -	α,β	S,S	MeThr	55	muy rígido <i>anti</i> (100%)
6	-CH ₂ CH ₂ -	α,β	S,S	c ₄ Ser	71	muy rígido, cercano a g(+) (100%)

Tabla 5. Influencia de los sustituyentes en los carbonos α y β en las preferencias conformacionales de péptidos modelo derivados de serina.

Por otro lado, hemos estudiado también como la β -O-glucosilación influye en las preferencias conformacionales del esqueleto peptídico y de la cadena lateral en los péptidos modelo presentados anteriormente. Puede decirse que aunque la incorporación de la unidad de β -O-glucosa en los β -hidroxi- α -aminoácidos no naturales α - o β -sustituidos no afecta significativamente la conformación de la cadena peptídica, la glucosilación promueve un importante aumento de las conformaciones plegadas en los aminoácidos naturales **Ac-L-Ser*-NHMe** y **Ac-L-Thr*-NHMe**⁶ (comparar figuras 9 y 13). En cuanto a la cadena lateral, la glucosilación no afecta al espacio conformacional, excepto para **Ac-L-Thr*-NHMe** y **Ac-(S)-MeSer*-NHMe**. En el primer caso, hace más flexible el ángulo χ^1 , produciendo el cambio de la conformación g(+) a la *anti*. Para el segundo, se observa una cierta restricción alrededor de dicho ángulo χ^1 , con una clara preferencia por conformaciones g(-) (comparar figuras 11 y 14). Es importante señalar

también que la β -*O*-glucosilación de **Ac-D-Ser-NHMe** induce principalmente una conformación *anti* para la cadena lateral.

Las conclusiones más importantes están relacionadas con la conformación del enlace glicosídico y especialmente con el ángulo diedro ψ_s , ya que el ángulo ϕ_s adopta un valor típico de -60° , conformación $g(-)$, determinada por el efecto exo-anomérico en la mayoría de los glicopéptidos. La única característica reseñable en relación al ángulo diedro ϕ_s es la existencia de una considerable proporción de la inusual conformación *anti- ϕ* , experimentalmente observada sobre todo en el caso de **Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe**, y que está estabilizada por un enlace de hidrógeno intramolecular.

Los valores de ψ_s dependen en gran medida de la sustitución en el C α o C β :

1.- La ausencia de sustituyentes en la posición β del β -hidroxi- α -aminoácido glucosilado es decir, **Ac-L-Ser*-NHMe**, **Ac-D-Ser*-NHMe** y **Ac-(S)-MeSer*-NHMe**, fuerza al ángulo ψ_s a adoptar la conformación *anti* habitual.

2.- La presencia del grupo metilo en el C β del aminoácido con configuración *R* (**Ac-L-Thr*-NHMe**) no favorece las conformaciones alternadas, *anti* y $g(-)$, de ψ_s ; así, esta sustitución da preferencia a la conformación alternada $g(+)$ y, sorprendentemente, a la conformación eclipsada (E, 120°).

3.- Una situación similar ocurre cuando el grupo metilo se coloca en el C β del aminoácido con configuración *S* (esto es, **Ac-allo-L-Thr*-NHMe**); en este caso, las conformaciones alternadas *anti* y $g(+)$ no están favorecidas, siendo las conformaciones alternada $g(-)$ y eclipsada (E' con ψ_s sobre -120°) las conformaciones preferidas para el ángulo ψ_s .

4.- Cuando las posiciones C α y C β del aminoácido están sustituidas en configuración absoluta (*R,R*), el ángulo diedro ψ_s se rigidifica hacia el conformero eclipsado en el caso

de **Ac-(R,R)-MeThr*-NHMe** y hacia el alternado g(+) en el caso de **Ac-(R,R)-c₄Ser*-NHMe**.

5.- Por el contrario e inesperadamente, cuando los C α y C β están sustituidos en configuración (S,S) (es decir, en **Ac-(S,S)-MeThr*-NHMe** y **Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe**) Ψ_s se hace más flexible adoptando varias conformaciones.

Finalmente, es importante subrayar que rigidez estructural no es sinónimo de rigidez conformacional. Así, por ejemplo **Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe** y **Ac-(R,R)-c₄Ser*-NHMe** son ambas moléculas estructuralmente rígidas; sin embargo, mientras **Ac-(R,R)-c₄Ser*-NHMe** muestra una gran rigidez conformacional, su diastereómero **Ac-(S,S)-c₄Ser*-NHMe** presenta una gran flexibilidad en torno al enlace glicosídico pero una considerable rigidez en la parte peptídica. Lógicamente, estas propiedades intrínsecas (flexibilidad y/o rigidez) deben tenerse en cuenta tanto en el análisis de las estructuras de los glicopéptidos como en la interacción de estos compuestos con otro tipo de moléculas (tabla 6).

Entrada	Grupo incorporado	Posición	Configuración C α ,C β	Compuesto Ac-Xaa*-NHMe	Backbone ϕ_p/ψ_p (% plegamiento)	Cadena lateral χ^1	diedro ϕ_s	diedro ψ_s
1	--	--	S,--	L-Ser*	22	rígida g(+) (62%)	rígido g(-)	anti (muy flexible)
2	CH ₃ -	β	S,R	L-Thr*	21	flexible g(+), anti	rígido g(-)	rígido g(+), E
3	--	—	R	D-Ser*	12	rígida anti (66%)	rígido g(-)	anti (con flexibilidad)
4	CH ₃ -	β	S,S	allo-L-Thr*	11	rígida g(+) (61%)	rígido g(-)	rígido g(-), E'
5	CH ₃ -	α	S,--	MeSer*	34	flexible g(-), g(+)	rígido g(-)	anti (con flexibilidad)
6	CH ₃ -	α,β	S,S	MeThr*	46	flexible anti, g(+)	rígido g(-)	rígido anti, E'
7	CH ₃ -	α,β	R,R	MeThr*	47	flexible anti, g(-)	rígido g(-)	rígido E
8	-CH ₂ CH ₂ -	α,β	S,S	c ₄ Ser*	75	muy rígida, cercano a g(+) (100%)	flexible g(-), g(+) ^[a]	flexible anti, g(-)
9	-CH ₂ CH ₂ -	α,β	R,R	c ₄ Ser*	74	muy rígida, cercano a g(-) (100%)	rígido g(-)	rígido g(+)

[a] a la conformación g(+) de ϕ_s (O5s-C1s-O1s-C β = 60°) también se le llama anti- ϕ (correspondiente a 180° cuando ϕ_s se define como H1s-C1s-O1s-C β).

Tabla 6. Influencia de los sustituyentes en los carbonos α y β en las preferencias conformacionales de glicopéptidos modelo derivados de β -O-Glc-Ser.

3.3. Conclusiones

En resumen, la incorporación de β -hidroxi- α -aminoácidos α - y/o β -sustituidos en β -O-glicopéptidos modelo es una herramienta importante para la obtención de sistemas con las preferencias conformacionales deseadas, modulando así el espacio conformacional de

los diferentes glicopéptidos sintetizados. En este sentido, el siguiente paso es la expansión de estas nuevas moléculas pequeñas a sistemas de glicopéptidos mayores, para diseñar así nuevos derivados que pudieran estabilizar una conformación bioactiva o mostraran conformeros raramente observados en los compuestos naturales, modificando así la interacción con sus moléculas diana, y por tanto su actividad biológica.

4

Glicopéptidos que
presentan la secuencia
Xaa-Ala-Ala

4.1. Introducción

Como ya se ha comentado en el capítulo de antecedentes, la β -D-O-glucosilación de los péptidos modelo derivados de los aminoácidos naturales serina y treonina afecta notablemente a la estructura de dichos péptidos, siendo responsable del cambio de conformaciones extendidas a conformaciones plegadas.¹ Como continuación lógica de este trabajo, se consideró expandir esos sistemas pequeños a glicopéptidos de mayor tamaño con la intención de comprobar si las conclusiones obtenidas previamente se seguían observando en moléculas más complejas.

Recientemente, se han identificado familias de péptidos con actividad antimicrobiana que han dado en nombrarse como *alyteserins*. En particular, el péptido *alyteserin-2a*, compuesto por 16 aminoácidos, incluye en su estructura la secuencia Thr-Ala-Ala y presenta mayor actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas que sus análogos estructuralmente similares en los que no está presente dicha secuencia.² Este mismo motivo aparece también en otros péptidos con diversas funciones biológicas.³ Adicionalmente, es bien sabido que la secuencia Thr-Ala-Ala forma parte de las glicoproteínas anticongelantes⁴, de suma importancia en la Naturaleza -ya que evitan la

¹ Corzana, F.; Busto, J. H.; Engelsen, S. B.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7864-7871.

² Conlon, J. M.; Demandt, A.; Nielsen, P. F.; Leprince, J.; Vaudry, H.; Woodhams, D. C. *Peptides* **2009**, DOI:10.1016/j.peptides.2009.03.004.

³ (a) Baumann, H.; Wilson, K. J.; Chen, P. S.; Humbel, R. E. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *52*, 521- 529; (b) Wong-Lun-Sang, S.; Bernardini, J. J.; Hennard, C.; Kysllkb, P.; Dell, A.; Abdallah, M. A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3329-3332.

⁴ Tachibana, Y.; Fletcher, G. L.; Fujitani, N.; Tsuda, S.; Monde, K.; Nishimura, S. I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 856-856.

congelación del agua y el crecimiento de cristales de hielo- y que han atraído un gran interés debido a sus potenciales aplicaciones en medicina y en la industria.⁵

Además de todos estos ejemplos que ponen de manifiesto la importancia biológica de este fragmento Thr-Ala-Ala, existen estudios que demuestran que dicha secuencia adopta una conformación extendida.⁶

Por todo lo anterior, decidimos elongar la cadena peptídica, con la incorporación de dos aminoácidos más, eligiendo la secuencia Thr-Ala-Ala. Así, abordamos la síntesis y el análisis conformacional tanto del péptido **Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe** como del correspondiente glicopéptido con β -D-O-Glc. De esta manera, al glicosilar podremos ver el efecto que produce la β -O-glucosilación sobre un pequeño péptido de conformación extendida.

Por otra parte, según se ha visto en el capítulo anterior con el estudio de los β -O-glicopéptidos modelo de diferentes diamidas de α -metilserina, α -metiltreonina y β -hidroxiciclobutan- α -aminoácidos, la β -O-glucosilación apenas influye en las preferencias conformacionales de la cadena peptídica en estos glicopéptidos que incorporan aminoácidos no naturales α -sustituidos. Sin embargo, se puede modular a conveniencia, tanto la cadena peptídica, con la introducción de un grupo Me en el carbono α (induciendo conformaciones plegadas de tipo α -hélice), como la flexibilidad del enlace glicosídico (apareciendo conformaciones atípicas) con la presencia de un grupo Me en el carbono β , según sea en configuración *R* o *S*.⁷ En este sentido, las diferentes

⁵ Harding, M. M.; Anderberg, P. I.; Haymet, A. D. J. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1381-1392.

⁶ Mimura, Y.; Inoue, Y.; Maeji, N. J.; Chûjô R. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1989**, *34*, 363-368.

⁷ Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7042-7058.

conformaciones exploradas por estas moléculas podrían ser utilizadas como herramientas útiles para obtener sistemas con preferencias conformacionales a la carta.

4.2. Objetivos

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, decidimos diseñar derivados no naturales de mayor tamaño que pudieran estabilizar una conformación bioactiva o mostraran conformeros raramente observados en los compuestos naturales, modificando así la interacción con sus moléculas diana, y por tanto su actividad biológica.

De esta forma, se planteó la síntesis y el análisis conformacional de los péptidos **Ac-MeSer-Ala-Ala-NHMe** y **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe**, así como de sus correspondientes β -*O*-glucopéptidos, que serán también comparados con los análogos naturales derivados de **Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe**.

En la figura 1 se muestran todos los péptidos y glucopéptidos modelo objeto de estudio. El análisis conformacional de los compuestos sintetizados se llevó a cabo utilizando la metodología habitual.

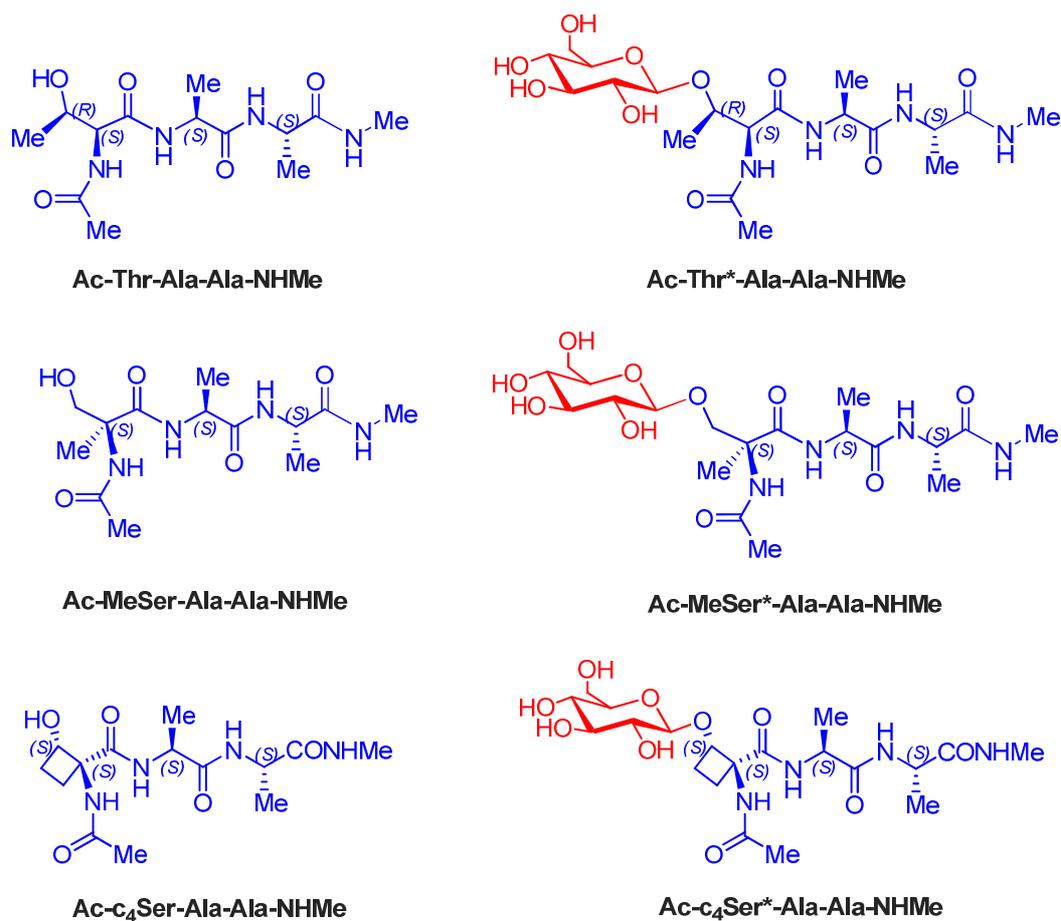


Figura 1. Péptidos y glicopéptidos objeto de estudio.

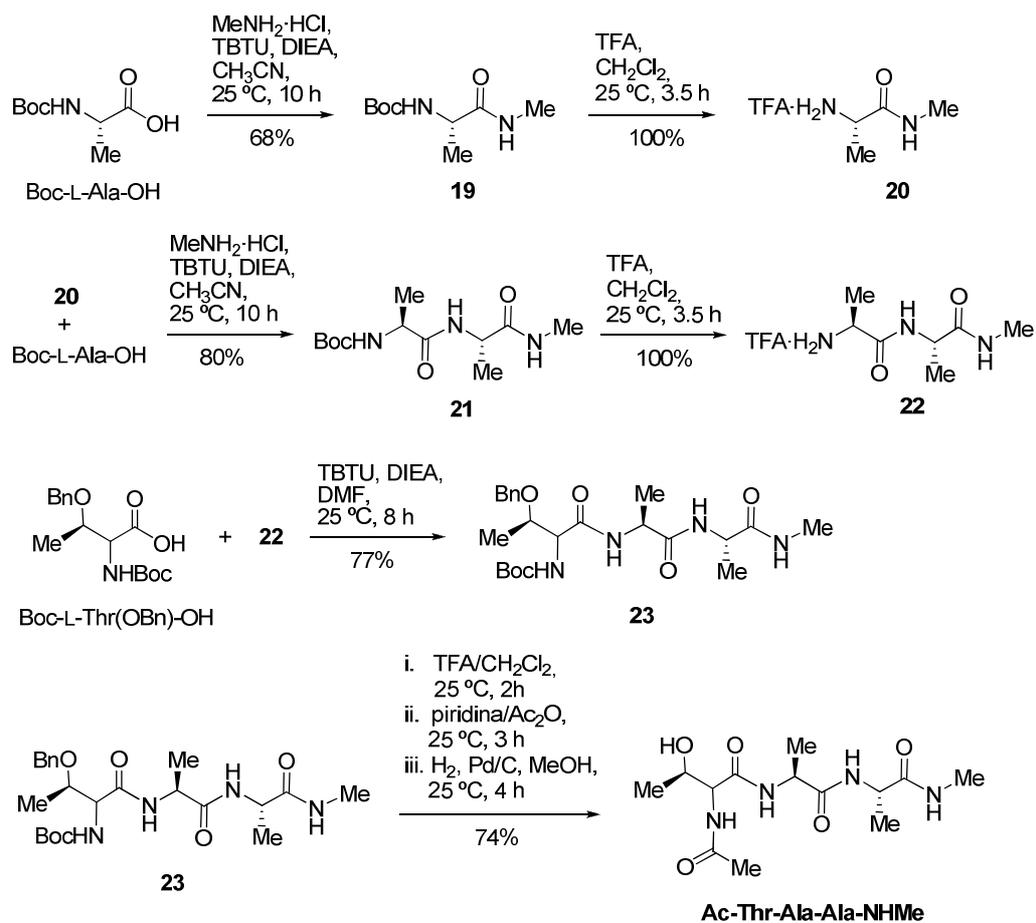
4.3. Discusión de resultados

4.3.1. Síntesis

En primer lugar se realizó la síntesis de los tres péptidos modelo siguiendo un esquema sintético similar en todos los casos. Se comenzó sintetizándose el dipéptido de

alanina **21** mediante el empleo de TBTU como agente de acoplamiento (esquema 1, pág 162). Partiendo de Boc-L-Ala-OH, disponible comercialmente, este compuesto se trató en CH₃CN con el clorhidrato de la metilamina, TBTU y diisopropiletilamina (DIEA) como base para dar la correspondiente metilamida **19**. La eliminación del grupo Boc en medio ácido y el tratamiento de la amina resultante con un equivalente adicional de Boc-L-Ala-OH en presencia de TBTU y DIEA en CH₃CN dió lugar al dipéptido de alanina **21**. Éste compuesto será utilizado para formar los tres tripéptidos mencionados siguiendo la metodología habitual antes comentada para la formación del enlace peptídico.

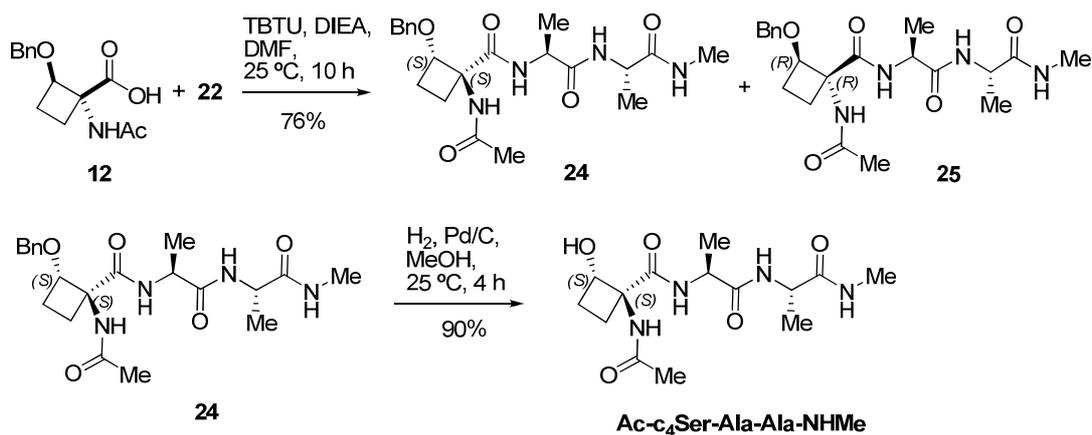
Así, el dipéptido **21** fue desprotegido con TFA y a continuación se hizo reaccionar con Boc-L-Thr(OBn)-OH en DMF y en presencia de DIEA y TBTU obteniéndose el tripéptido **23** con un rendimiento del 77%. La desprotección del grupo amino terminal, seguido de acetilación (Ac₂O/piridina) e hidrogenólisis del grupo bencilo con H₂ y Pd/C proporcionó el compuesto final **Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe** con un 74% de rendimiento (esquema 1).

Esquema 1. Síntesis del péptido modelo **Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe**

Por su parte, la síntesis de los tripéptidos no naturales de **Ac-MeSer-Ala-Ala-NHMe** y **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe** se realizó análogamente, pero partiendo ahora del ácido Boc-(S)-MeSer-OH y de la mezcla racémica del derivado ciclobutánico de Ser (**12**)

respectivamente. Estos productos ya habían sido previamente sintetizados en nuestro grupo.⁸

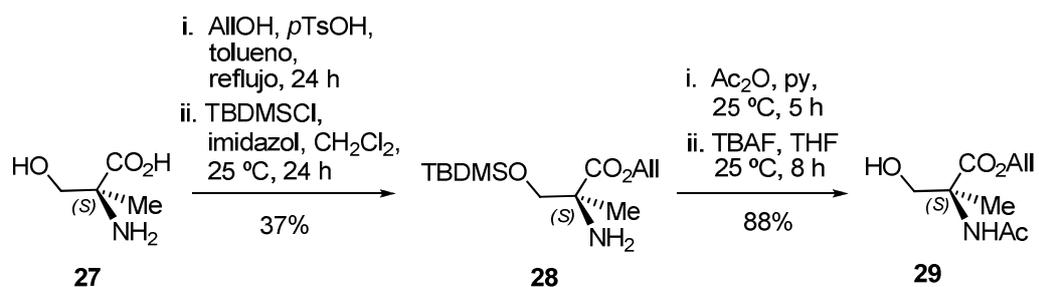
En el esquema 2 se recoge la síntesis del tripéptido **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe**. El ácido **12** se trató con el dipéptido de alanina **22** que presenta su amina libre, con DIEA y TBTU, en DMF, para dar una mezcla de los péptidos protegidos **24** y **25**. La purificación del compuesto **24** por cromatografía de columna en sílica gel y posterior hidrogenólisis del grupo bencilo con hidrógeno, en presencia de Pd/C como catalizador, dio lugar al compuesto deseado **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe**. Se obtuvieron monocristales tanto de este péptido como del intermedio **24**, lo que nos permitió determinar la esteoquímica relativa de ambos compuestos mediante difracción de rayos X. Sabiendo la configuración absoluta *S* de dos de los centros estereogénicos por partir de L-Ala, esto nos permitió deducir la configuración de los centros estereogénicos del anillo ciclobutánico, que resultaron ser también *S*.



Esquema 2. Síntesis del péptido modelo **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe**

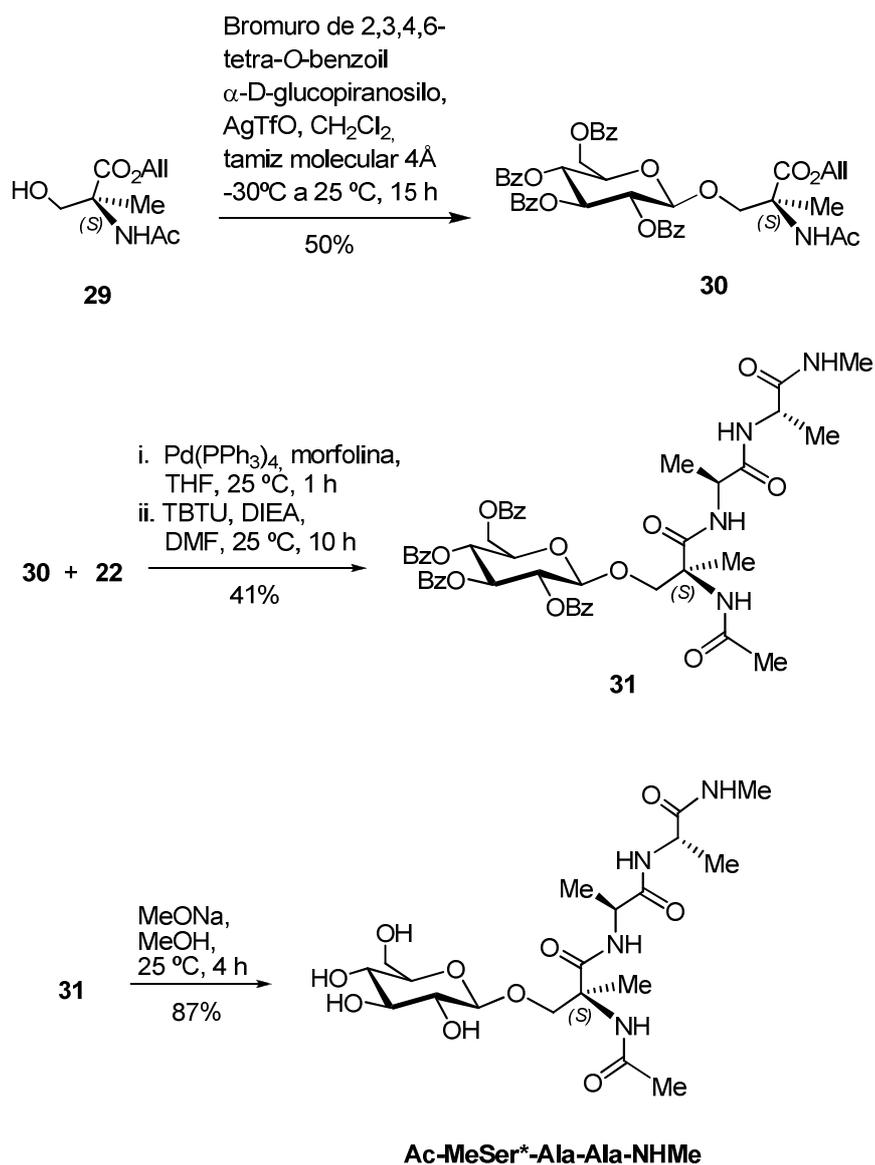
⁸ (a) Tesis Doctoral de Francisco Corzana. Universidad de La Rioja. Septiembre 2001; (b) Avenzo, A.; Busto, J. H.; Canal, N.; Peregrina, J. M.; Pérez-Fernández, M. *Org. Lett.* **2005**, *16*, 3597-3600.

En el caso del glicopéptido derivado de α -MeSer, primero se sintetizó el compuesto **29** (esquema 4). Partiendo del aminoácido libre **27**, en una sola etapa se protegió el ácido como éster alílico, utilizándose alcohol alílico y *p*TsOH en tolueno a reflujo, y el grupo hidroxilo con un sililéter para dar **28**. Seguidamente, la acetilación de la amina libre (piridina/ Ac_2O) y posterior desprotección del alcohol con TBAF proporcionó el compuesto **29**.



Esquema 4. Síntesis del derivado de MeSer **29** adecuadamente protegido

El producto anterior se glicosiló siguiendo la misma metodología comentada, obteniéndose el glicoaaminoácido **30**. La desprotección del grupo alilo en este compuesto y la posterior formación del enlace peptídico por reacción con la amina **22** dio lugar al intermedio **31**. Finalmente, se eliminaron los grupos benzoatos para dar el glicopéptido deseado **Ac-MeSer*⁻-Ala-Ala-NHMe** (esquema 5).



Esquema 5. Síntesis del glicopéptido modelo Ac-MeSer^{*}-Ala-Ala-NHMe

4.3.2. Estudios de RMN y DM

En la figura 2 se muestran los ángulos diedros relevantes desde el punto de vista conformacional, junto con las etiquetas de los distintos átomos del glicopéptido derivado de Thr. La misma definición se usó para los péptidos sin glicosilar.

Derivados naturales

Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe y Ac-Thr*-Ala-Ala-NHMe

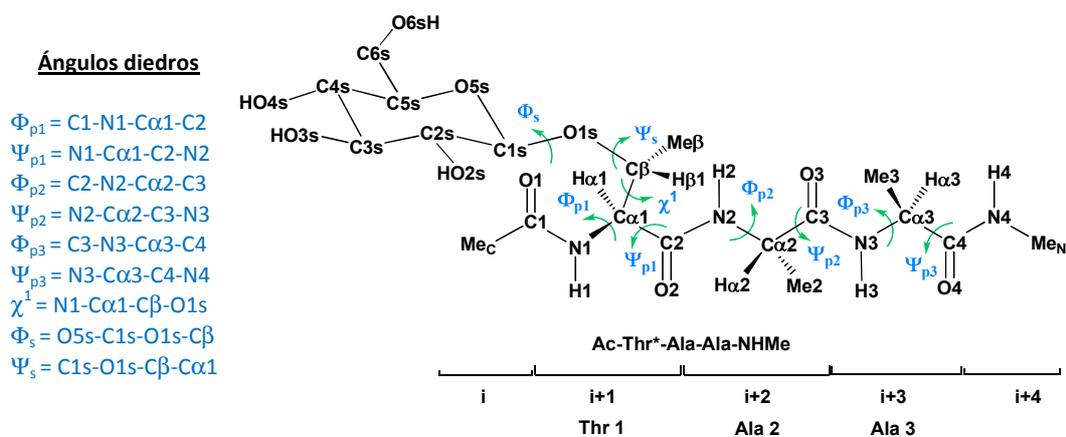


Figura 2. Etiquetas de cada uno de los átomos del glicopéptido **Ac-Thr*-Ala-Ala-NHMe** y ángulos diedros que definen sus geometrías.

Los ángulos diedros ϕ_{p1} , ψ_{p1} (Thr1), ϕ_{p2} , ψ_{p2} (Ala2), ϕ_{p3} , ψ_{p3} (Ala3) en el compuesto **Ac-Thr*-Ala-Ala-NHMe** definen la conformación del esqueleto peptídico, el χ^1 la de la cadena lateral y los ángulos ϕ_s y ψ_s hacen referencia a la geometría del enlace glicosídico.

Como primer paso del análisis estructural se llevó a cabo la asignación de las señales obtenidas en los experimentos de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) de todos los compuestos. En la figura 3 se recoge, a modo de ejemplo, la asignación del glicopéptido modelo **Ac-Thr*-Ala-Ala-NHMe**.

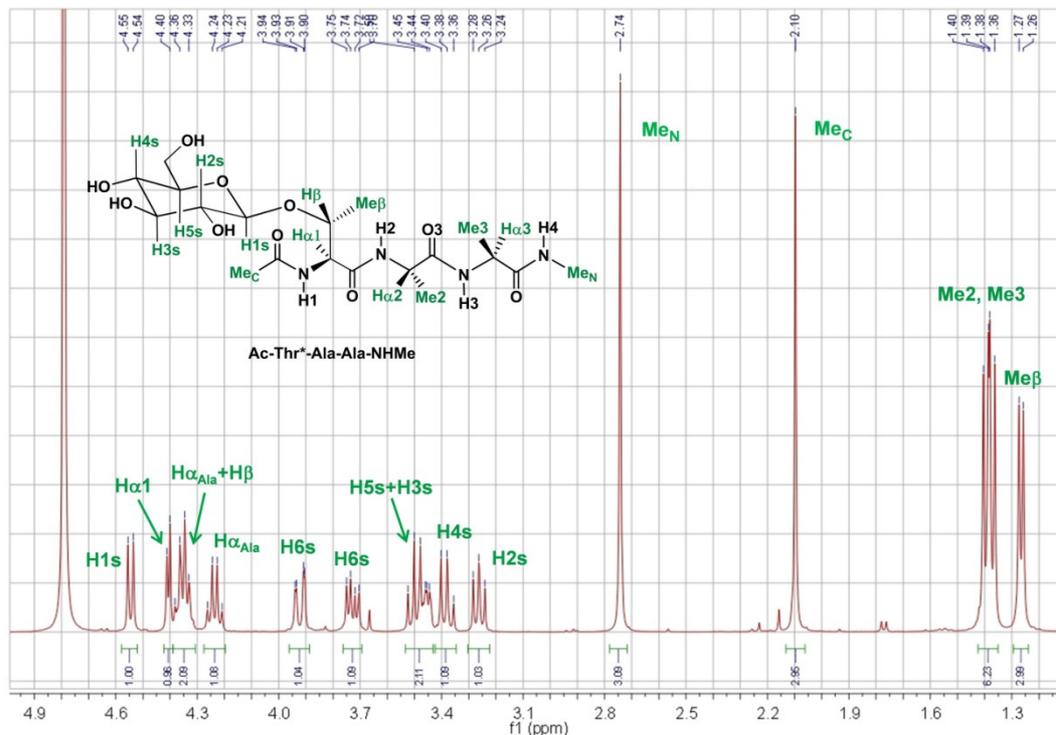


Figura 3. ^1H RMN (400 MHz) en D_2O del glicopéptido **Ac-Thr*-Ala-Ala-NHMe** con la asignación de todos sus protones.

A continuación, se abordó el estudio del compuesto **Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe** así como del correspondiente glicopéptido.

En la figura 4 se muestra una ampliación de los espectros 2D NOESY (400 MHz) para el péptido **Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe** y su derivado glicosilado. Como puede verse,

mientras que en el glicopéptido aparecen picos de cruce NH(*i*)–NH(*i*+1), característicos de conformaciones plegadas, en el péptido, y a pesar del solapamiento de señales, parece clara la ausencia de estos NOEs, lo cual sugiere la existencia de conformaciones extendidas para el esqueleto peptídico. Este hecho, junto con el desplazamiento químico (CSD)¹⁰ de las señales de los protones NH a campo más alto en el caso del glicopéptido, sugiere, tal y como ya se había observado en un trabajo previo de nuestro grupo con derivados de menor tamaño,¹ que la glicosilación con β-*O*-glucosa de péptidos naturales promueve el plegamiento de la cadena peptídica.

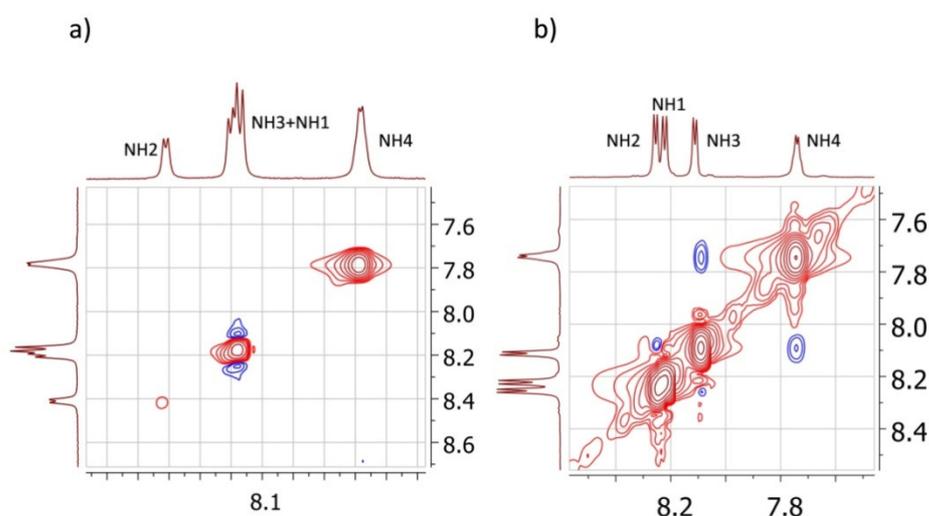


Figura 4. Sección del espectro 2D-NOESY (400 MHz) a 800 ms en H₂O/D₂O del compuesto (a) **Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe** y (b) **Ac-Thr*-Ala-Ala-NHMe**.

Con el objetivo de obtener una distribución de conformeros en disolución acuosa capaz de reproducir cuantitativamente los datos de RMN, se llevaron a cabo cálculos de

¹⁰ (a) Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647-1651; (b) Wishart, D. S.; Sykes, B. D. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 171-180.

DM-tar¹¹ utilizando como restricciones tanto las distancias protón-protón, como las constantes de acoplamiento experimentales. A modo de ejemplo, en la tabla 1, se muestra una comparación de los datos experimentales con los obtenidos de las DM para el glicopéptido derivado de Thr.

	Exp. ^a	DM-tar ($\epsilon=80$)
$d_{\text{NH1,NH2}}$	2.9	3.0
$d_{\text{NH2,NH3}}$	2.9	3.0
$d_{\text{NH3,NH4}}$	2.9	2.9
$d_{\text{NH4,H}\alpha 3}$	2.2	2.3
$d_{\text{NH3,H}\alpha 3}$	2.5	2.6
$d_{\text{NH3,H}\alpha 2}$	2.2	2.1
$d_{\text{NH2,H}\alpha 2}$	2.5	2.4
$d_{\text{NH1,H}\alpha 1}$	>2.7	2.8
$d_{\text{H1}\delta,\text{H}\beta}$	2.8	2.8
$^3J_{\text{H}\alpha 1,\text{H}\beta 1}$	4.3	3.8
$^3J_{\text{NH1,H}\alpha 1}$	6.9	6.5
$^3J_{\text{NH2,H}\alpha 2}$	5.9	5.4
$^3J_{\text{NH3,H}\alpha 3}$	5.5	5.7

Tabla 1. Distancias H-H y 3J experimentales y teóricas para el compuesto **Ac-Thr*-Ala-Ala-NHMe**.

En la figura 5 puede verse la distribución ϕ_p/ψ_p de cada uno de los residuos de los dos compuestos. Como indicaban los datos experimentales, el péptido **Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe** presenta mayoritariamente conformaciones extendidas. Esto está de acuerdo con lo observado por otros grupos de investigación para distintos péptidos de tamaño menor o igual a 6 aminoácidos, para los que la conformación PPII parece ser la más mayoritaria.¹² Por otro lado, este resultado es similar al obtenido para el derivado Cbz-Thr-Ala-Ala-CO₂Me. Dicho péptido adopta principalmente conformaciones extendidas en DMSO.⁶ Por el contrario, en el glicopéptido **Ac-Thr*Ala-Ala-NHMe**, los 3 aminoácidos presentan un cierto porcentaje de población correspondiente a α -hélice

¹¹ (a) Pearlman, D. A. *J. Biomol. NMR*, **1994**, *4*, 1-16. (b) Torda, A. E.; Scheek, R. M.; van Gunsteren, W. F. *J. Mol. Biol.*, **1990**, *214*, 223-235.

¹² Mu, Y.; Kosov, D. S.; Stock, G. *J. Phys. Chem. B*. **2003**, *107*, 5064 -5073.

(aproximadamente del 36% en el caso de la Thr y en torno al 20% para los dos residuos de Ala). Es preciso señalar que, en este caso, no se observó la formación de estructuras tipo giro β .

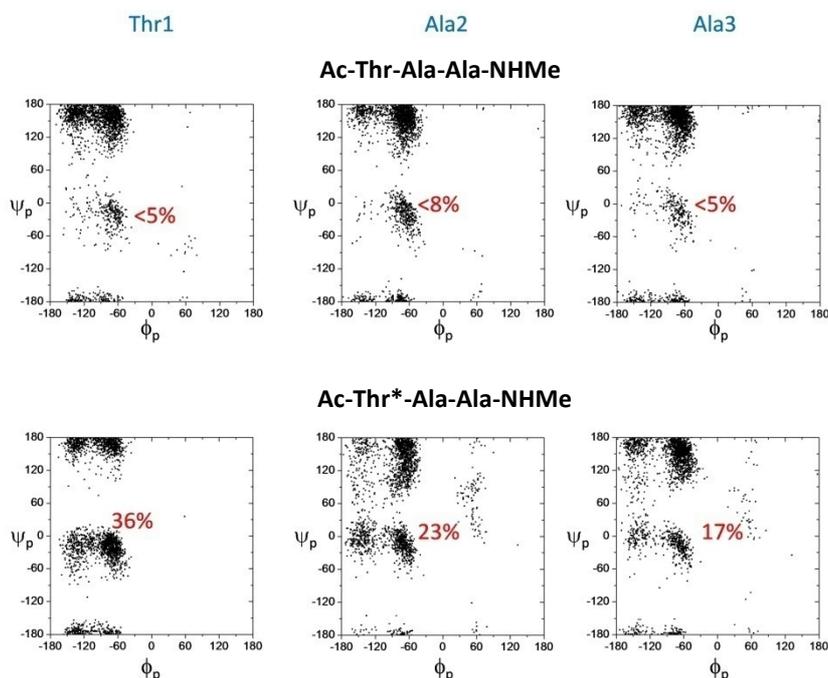


Figura 5. Distribuciones de los ángulos ϕ_p/ψ_p obtenidas de las DM-tar para el péptido y el glicopéptido derivados de Thr.

Con respecto al enlace glicosídico, el compuesto **Ac-Thr*Ala-Ala-NHMe** presenta un comportamiento prácticamente igual al observado para el glicopéptido modelo **Ac-Thr*-NHMe**. Es decir, el ángulo ϕ_s tiene un valor alrededor de -60° , lo que está de acuerdo con el efecto exo-anomérico, y el ángulo diedro ψ_s presenta una conformación mayoritaria en torno a 140° (figura 6a). Por otro lado, la cadena lateral, determinada por el diedro χ^1 , es ahora más rígida que para el glicopéptido modelo **Ac-Thr*-NHMe**, ya que se observa mayoritariamente la conformación $g(+)$ y únicamente un 10% de la conformación *anti* (figura 6b), la cual estaba presente en un 47% en el glicopéptido

modelo. Finalmente, en la figura 6c se recoge una superposición de varios conformeros obtenidos al azar de la DM-tar para cada una de las moléculas, donde puede apreciarse claramente la conformación extendida del péptido **Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe**.

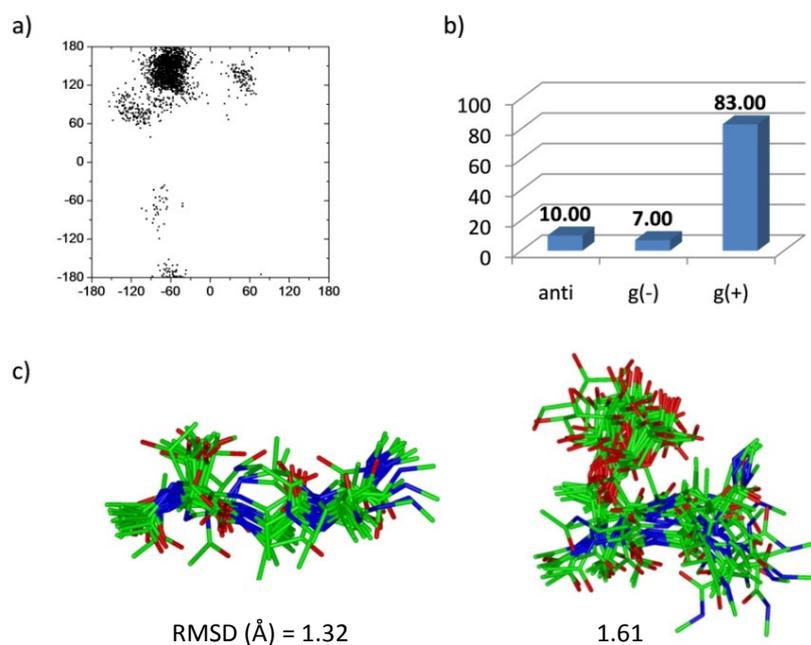


Figura 6. (a) Distribución de los ángulos ϕ_s/ψ_s obtenida de la DM-tar para el glicopéptido derivado de Thr. (b) Distribución para el ángulo χ^1 obtenida de la DM-tar para **Ac-Thr*-Ala-Ala-NHMe**. (c) Superposición de estructuras de la DM-tar del péptido **Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe** (izquierda) y del glicopéptido (derecha).

Una vez estudiado el comportamiento conformacional del péptido y glicopéptido derivado de **Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe**, se pasó al análisis de sus análogos no naturales.

Derivados NO naturales

Ac-MeSer-Ala-Ala-NHMe y Ac-MeSer*-Ala-Ala-NHMe

Los péptidos naturales pequeños son, en general, conformacionalmente flexibles y, por tanto, no son adecuados para estudiar o controlar las estructuras secundarias que puede adoptar. Teniendo en cuenta que una aproximación atractiva para restringir la conformación de un péptido consiste en la incorporación de α -aminoácidos cuaternarios en la cadena peptídica,¹³ la síntesis de α -aminoácidos α,α -disustituidos ha recibido una enorme atención por parte de muchos químicos orgánicos sintéticos en los últimos años.¹⁴ Por ello, con el objetivo de aumentar las posibilidades existentes de obtener péptidos modificados con nuevas propiedades o funciones, tanto la síntesis como el estudio conformacional de péptidos que incorporan aminoácidos no naturales está todavía en un proceso de continuo avance y optimización. Es bien sabido, por ejemplo, que la tetrasustitución del C α en pequeños homopéptidos favorece la estabilización de hélices

¹³ (a) Cowell, S. M.; Lee, Y. S.; Cain, J. P.; Hruby, V. J. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2785-2798; (b) Toniolo, C.; Formaggio, F.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B. *Synlett* **2006**, 1295-1310; (c) Venkatraman, J.; Shankaramma, S. C.; Balaram, P. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3131-3152.

¹⁴ (a) Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 3517-3599; (b) Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 645-732; (c) Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 569-623; (d) Calaza, I.; Cativiela, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 3427-3448; (e) Vogt, H.; Bräse, S. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 406-430; (f) Aydillo, C.; Jiménez-Oses, G.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M.; Avenoza, A. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4840-4848; (g) Jiménez-Oses, G.; Aydillo, C.; Busto, J. H.; Zurbano, M. M.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5399-5402; (h) Avenoza, A.; Busto, J. H.; Canal, N.; Peregrina, J. M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 330-333; (i) Avenoza, A.; Busto, J. H.; Canal, N.; Peregrina, J. M.; Pérez-Fernández, M. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3597-3600; (j) Avenoza, A.; Busto, J. H.; Cativiela, C.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Sucunza, D.; Zurbano, M. M. Preparation and synthetic applications of (*S*)- and (*R*)-*N*-Boc-*N*,*O*-isopropylidene- α -methylserinals in *Targets in Heterocyclic Systems. Chemistry and Properties*. (Eds.: Attanasi, O. A.; Spinelli, D.), Italian Society of Chemistry, Roma, Vol. 6. **2002**, 231-244; (k) Park, K. H.; Kurth, M. J. *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 8629-8659; (l) Ohfuné, Y.; Shinada, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 5127-5143; (m) *Asymmetric Synthesis of α -Amino Acids*, R. M. Williams, *Advances in Asymmetric Synthesis*, JAI Press, **1995**, Vol. 1, pp 45-94; Hassner, A. Ed.; (n) Williams, R. M.; Im, M.-N. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9276-9286; Williams, R. M. *Aldrichimica Acta* **1992**, *25*, 11-25.

3_{10} o de α -hélices.¹⁵ Además, en péptidos pequeños, los α -aminoácidos α,α -disustituidos estabilizan estructuras plegadas de tipo giro,¹⁶ que han suscitado un especial interés porque juegan un papel importante en proteínas tanto desde el punto de vista estructural como por su función.¹⁷ Con esta idea, buscando modificar la conformación bioactiva de un péptido, se han publicado varios giros “artificiales” durante los últimos años.¹⁸

Con el propósito de dar un paso más en el estudio de estos sistemas, y teniendo en cuenta el papel fundamental que desempeñan los glicopéptidos en procesos biológicos de gran importancia,¹⁹ decidimos diseñar nuevos glicopéptidos que incorporasen

¹⁵ (a) Toniolo, C.; Benedetti, E. *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 350-353; (b) Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Peggion, C. *Biopolymers (Peptide Science)* **2001**, *60*, 396-419; (c) Gessman, R.; Brückner, H.; Petratos, K. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 753-762; (d) Crisma, M.; Moretto, A.; Rainaldi, M.; Formaggio, F.; Broxterman, Q. B.; Kaptein, B.; Toniolo, C. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 620-637.

¹⁶ (a) Maity, P.; Zabel, M.; König, B. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8046-8053; (b) Crisma, M.; Moretto, A.; Zotti, D. M.; Formaggio, F.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Toniolo, C. *Biopolymers (Peptide Science)* **2005**, *80*, 279-293; (c) Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.; Rodríguez, F. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4241-4249; (d) Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Cativiela, C.; Peregrina, J. M.; Rodríguez, F. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 1429-1432; (e) Jiménez, A. I.; Cativiela, C.; París, M.; Peregrina, J. M.; Avenzoza, A.; Aubry, A.; Marraud, M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7841-7844; (f) Jiménez, A. I.; Cativiela, C.; Gómez-Catalán, J.; Pérez, J. J.; Aubry, M.; París, M.; Marraud, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5811-5821.

¹⁷ (a) Toniolo, C. *Crit. Rev. Biochem.* **1980**, *9*, 1-44; (b) Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1-109; (c) Vass, E.; Hollosi, M.; Besson, F.; Buchet, R. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1917-1954.

¹⁸ (a) Nowick, J. S.; Lam, K. S.; Khasanova, T. V.; Kemnitzer, W. E.; Maitra, S.; Mee, H. T.; Liu, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4972-4973; (b) Schmuck, C.; Geiger, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8898-8899; (c) Fregel, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 181-182; (d) Nesloney, C. L.; Kelly, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5836-5845; (e) Syud, F. A.; Stanger, H. E.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8667-8677; (f) Rai, R.; Raghothama, S.; Balaram, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2675-2681, y referencias relacionadas citadas ahí; (g) Izquierdo, S.; Kogan, M. J.; Parella, T.; Moglioni, A. G.; Branchadell, V.; Giralt, E.; Ortuño, R. M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5093-5099.

¹⁹ (a) Van den Steen, P.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Opdenakker, G. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *33*, 151-208; (b) Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720; (c) Angata, T.; Varki, A. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 439-470; (d) Taylor, C. M. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11317-11362; (e) Helzner, H.; Reipen, T.; Schultz, M.; Kunz, H. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495-4537; (f) Nicolaou, K.

aminoácidos no naturales en sus estructuras. Es importante destacar que, hasta donde nos consta, los glicopéptidos que presentaremos a continuación, son los primeros glicopéptidos sintetizados, publicados hasta la fecha, que incorporan un aminoácido no natural en el residuo subyacente al carbohidrato.

Dado que el compuesto **Ac-MeSer-Ala-Ala-NHMe** ha sido previamente estudiado por nuestro grupo²⁰ a continuación se muestra un resumen de los aspectos más destacados de su análisis estructural. Así, en la figura 7a pueden observarse unos NOEs medios entre los protones de las amidas NH(*i*)-NH(*i*+1), lo que indica claramente la existencia de conformaciones plegadas en disolución acuosa. Por otro lado, en la figura 7b se muestra la distribución ϕ_p/ψ_p obtenida de la DM-tar para cada uno de los residuos. Como puede verse, el residuo MeSer adopta únicamente conformaciones plegadas, con un 65% de conformación α_D , mientras que las extendidas son las preferidas para ambas alaninas. Con respecto a la cadena lateral (figura 7c), la conformación *g*(+) es la más poblada (54%). En la figura 7d se muestran las dos conformaciones mayoritarias obtenidas para el péptido **Ac-MeSer-Ala-Ala-NHMe** en disolución. Merece la pena destacar la existencia de un porcentaje relativamente alto (30% aproximadamente) de una conformación giro β tipo I.

C.; Mitchell, H. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1576-1624; (g) Pratt, M. R.; Bertozzi, C. R. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 58-68; (h) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.

²⁰ Tesis Doctoral de María Luisa García de Luis. Universidad de La Rioja. Julio 2008.

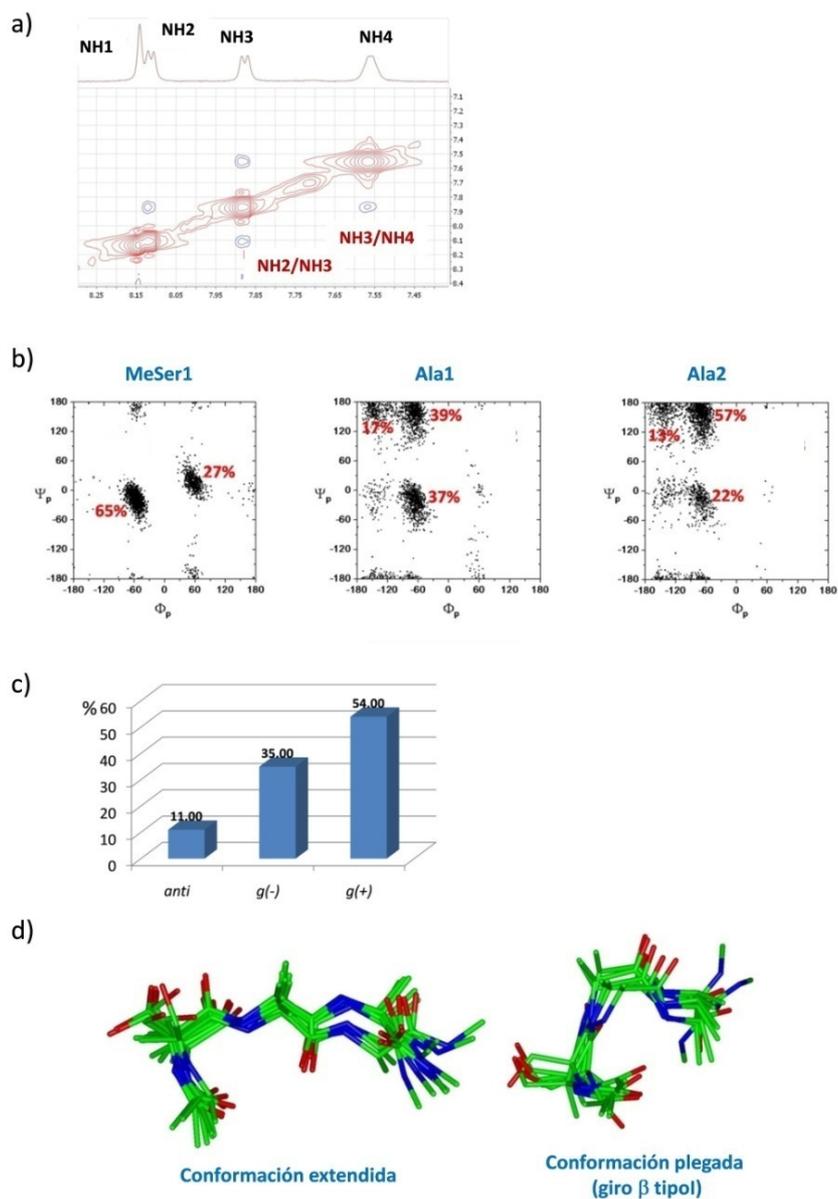


Figura 7. (a) Sección del espectro 2D-NOESY (400 MHz) a 800 ms en H₂O/D₂O correspondiente a los protones de amida. (b) Distribución ϕ_p/ψ_p del esqueleto peptídico de **Ac-MeSer-Ala-Ala-NHMe**. (c) Distribución obtenida de la DM-tar para la cadena lateral. (d) Superposición de estructuras de la DM-tar del péptido.

Tal como se ha comentado en Antecedentes, los giros β se originan cuando la cadena polipeptídica se pliega sobre sí misma dando lugar a una conformación en la que se puede formar un enlace de hidrógeno intramolecular entre los residuos i , $i+3$. En la siguiente figura se muestra más en detalle las propiedades de este giro β tipo I en el péptido **Ac-MeSer-Ala-Ala-NHMe**, así como los átomos que intervienen en la formación del enlace de hidrógeno (figura 8).

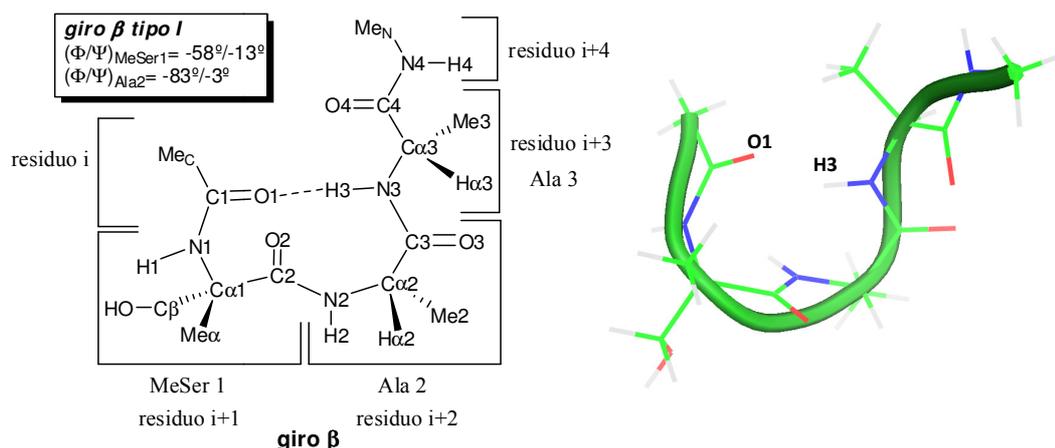


Figura 8. Esquema correspondiente a la conformación de giro β tipo I para el esqueleto peptídico del compuesto **Ac-MeSer-Ala-Ala-NHMe**

Además, se estudió también el tripéptido de MeSer anterior glicosilado con β -*O*-Glc, esto es, **Ac-MeSer*-Ala-Ala-NHMe**. Como en el caso del derivado de Thr, en primer lugar se realizó la asignación de todos los protones del compuesto (figura 9).

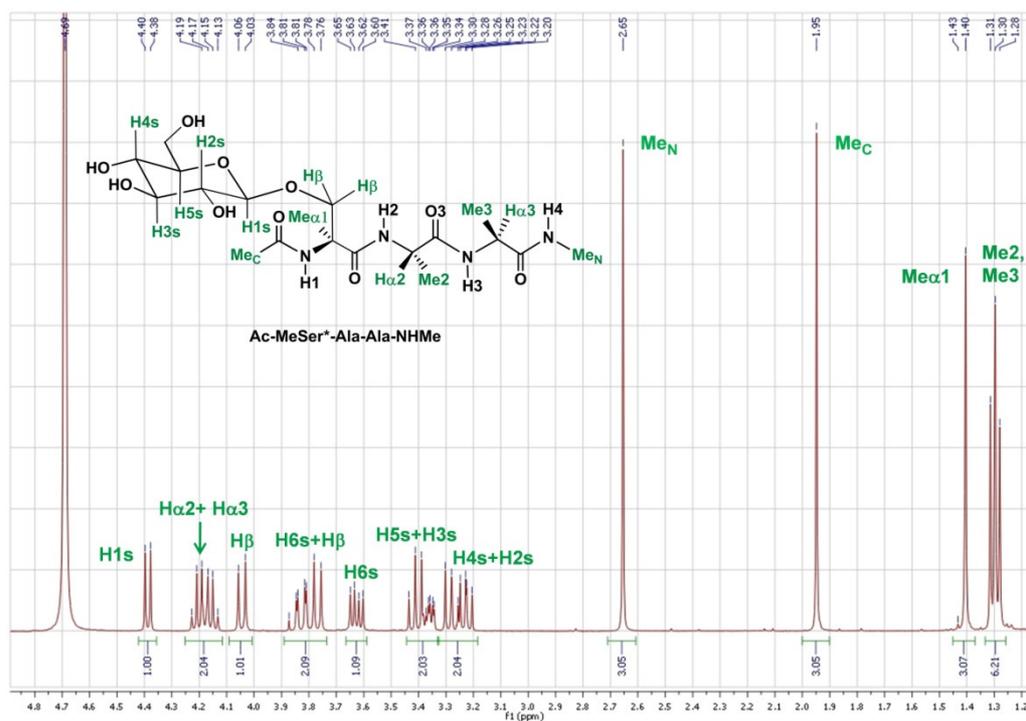


Figura 9. ^1H RMN (400 MHz) en D_2O del glicopéptido **Ac-MeSer*-Ala-Ala-NHMe** con la asignación de todos sus protones.

A continuación, se llevaron a cabo los experimentos 2D-NOESY en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) de donde se obtuvieron semicuantitativamente las distancias correspondientes a los protones de amida. Como puede verse en la figura 10, los NOEs entre los protones del $\text{Me}\alpha 1$ y el protón $\text{NH}1$ (figura 10a) y entre $\text{NH}1/\text{NH}2$ (figura 10b) característicos ambos de conformaciones plegadas, junto con el observado también entre $\text{Me}\alpha 1/\text{NH}2$ (propio de conformaciones extendidas) sugieren la coexistencia de ambas conformaciones para el residuo de MeSer. En el caso de los dos residuos de alanina, la presencia de NOEs entre los protones $\text{NH}2/\text{NH}3$ y $\text{NH}3/\text{NH}4$ (figura 10b) da idea de una determinada población con conformación plegada para ambas como ya ocurría para el péptido. Además, los

NOEs observados entre los protones NH1/H β y NH2/H β parecen indicar una cierta flexibilidad para las preferencias conformacionales del ángulo χ^1 (figura 10 a). Sin embargo, debido al solapamiento de las señales correspondientes a los H α de las dos alaninas y a la ausencia de dicho H α en la MeSer, no puede disponerse de toda la información experimental posible.

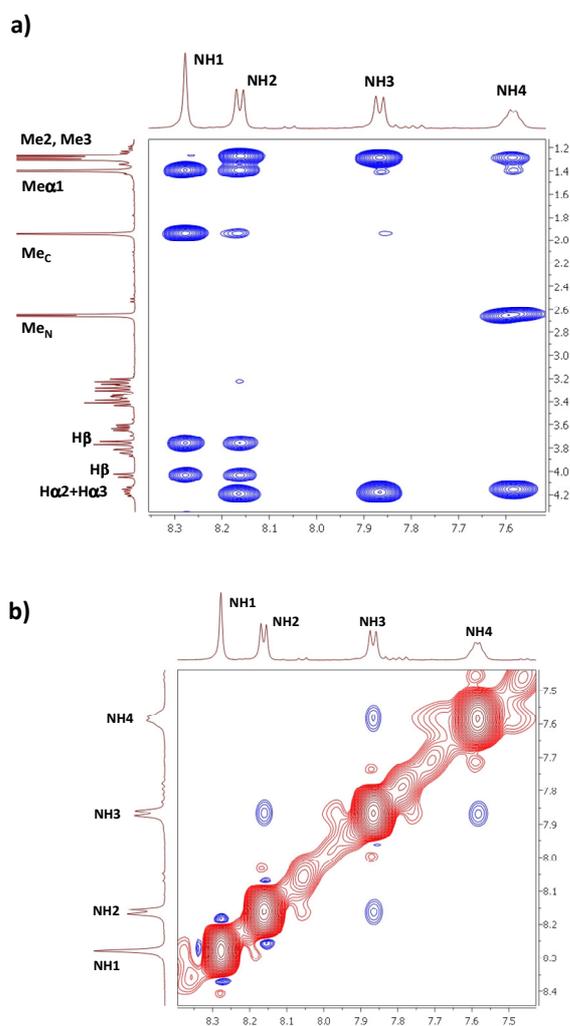


Figura 10. Secciones del espectro 2D-NOESY (400 MHz) a 800 ms en H₂O/D₂O correspondiente a los protones de amida para el glicopéptido Ac-MeSer*-Ala-Ala-NHMe.

Con el fin de cuantificar las conformaciones existentes en disolución acuosa para el glucopéptido se realizaron, a continuación, los cálculos de DM-tar. De la distribución obtenida para el esqueleto peptídico del glicopéptido **Ac-MeSer*Ala-Ala-NHMe**, como puede verse en la figura 11, el residuo de MeSer presenta unos valores de ϕ/ψ correspondientes, de forma ligeramente mayoritaria, a conformaciones de tipo hélice como son la hélice α_D y α_L y con preferencia por la primera, algo que ya ocurría para el tripéptido. Por lo que respecta a los dos residuos de alanina, el primero mostró valores de dichos ángulos diedros correspondientes a una considerable población con conformación de hélice α_D (53%), mientras que para la segunda alanina las conformaciones extendidas fueron las más pobladas (lámina β y PPII). Por tanto, del estudio de la conformación del esqueleto peptídico, se puede concluir la coexistencia de conformaciones plegadas y extendidas en general para los tres residuos, algo que ya se intuía de los NOEs previamente comentados.

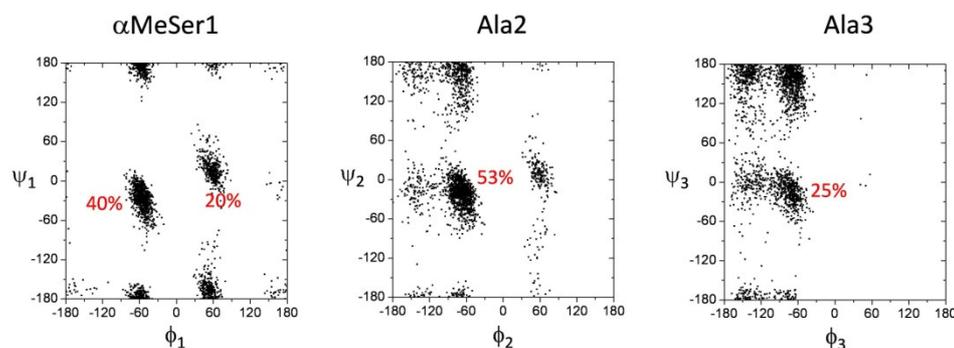


Figura 11. Distribución ϕ_p/ψ_p obtenida de la DM-tar para el esqueleto peptídico de **Ac-MeSer*Ala-Ala-NHMe**.

Cabe destacar también que se observa la formación de dos giros β tipo I, el primero (presente alrededor del 18% del tiempo total de la trayectoria) es igual al observado para el compuesto **Ac-MeSer-Ala-Ala-NHMe**, pero además, aparece un segundo giro (13%) distinto al anterior, en el que el enlace de hidrógeno se forma entre los residuos $i+1$ e $i+4$

del glicopéptido modelo, es decir, entre los átomos $C2=O2 \cdots H4-N4$ (figura 12). Estos resultados obtenidos están de acuerdo con los NOEs observados entre los protones del Me_C y el protón $NH3$, en el caso del primer giro, y entre el $Me_\alpha/NH4$ para el segundo.

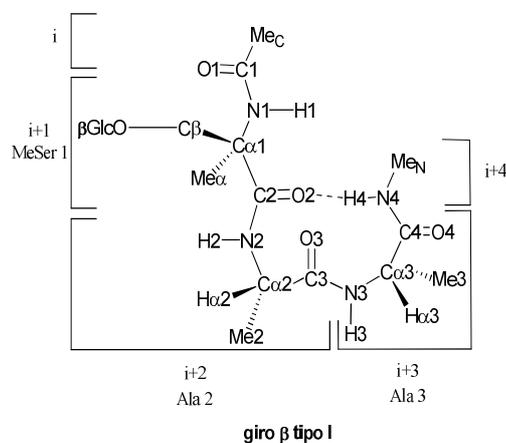


Figura 12. Conformación de giro β tipo I observada para el glicopéptido, donde aparece señalado el enlace de hidrógeno existente.

Por último, se calcularon las distribuciones obtenidas para el enlace glicosídico (ϕ_s/ψ_s) y para la cadena lateral (χ^1) del glicopéptido. En la figura 13 se presentan los resultados de los cálculos de la DM-tar.

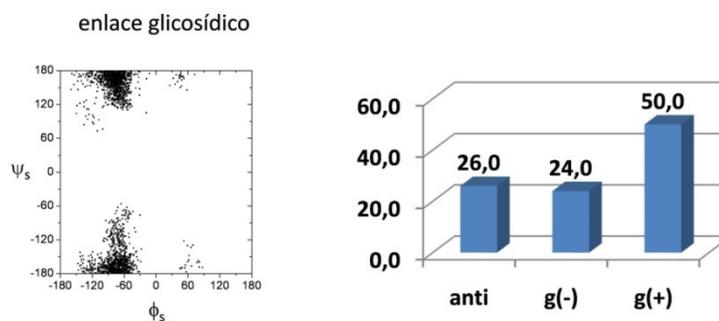


Figura 13. Distribución ϕ_s/ψ_s obtenida de la DM-tar para el enlace glicosídico del glicopéptido (izquierda). Distribución χ^1 obtenida de la DM-tar para la cadena lateral (derecha).

Con respecto al enlace glicosídico, en la figura 13 puede verse que el ángulo diedro ϕ_s tiene un valor próximo a -60° , lo que está de acuerdo con el efecto exo-anomérico,²¹ mientras que ψ_s muestra un valor de alrededor de 180° . Este comportamiento es distinto al que presentaba el derivado de treonina **Ac-Thr*-Ala-Ala-NHMe**, estudiado anteriormente, lo que indica que el cambio del grupo Me de la posición β a la α afecta a la geometría del enlace glicosídico como ya habíamos dicho en trabajos previos.²²

En cuanto a la distribución obtenida para la cadena lateral, representada por el ángulo diedro χ^1 , como puede observarse en la figura 13 (derecha), no existe una preferencia conformacional clara por uno de los posibles rotámeros, si bien la conformación $g(+)$ es la más poblada al igual que en el péptido. Este resultado está de acuerdo con la intensidad de los NOEs NH1/H β y NH2/H β a los que se ha hecho referencia previamente.

Así, de todo este completo análisis conformacional, pueden establecerse una serie de conclusiones. En primer lugar, comparando ambos péptidos **Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe** y **Ac-MeSer-Ala-Ala-NHMe**, se observa que, de acuerdo con lo comentado en el capítulo anterior⁷ la incorporación de un grupo metilo en posición α del aminoácido fuerza al péptido a adoptar un mayor porcentaje de conformaciones plegadas. Sin embargo, a pesar de la presencia de este aminoácido cuaternario, no se observa una elevada rigidez conformacional ni en el péptido **Ac-MeSer-Ala-Ala-NHMe** ni en su correspondiente glucopeptido. En concreto, como se ha visto, el péptido adoptaba dos conformaciones mayoritarias, la extendida y una conformación plegada (giro β tipo I). Por lo que respecta a los glucopeptidos, la β -O-glucosilación del péptido derivado de Thr afecta notablemente a su estructura, siendo responsable del cambio a conformaciones plegadas. Esta característica confirma las conclusiones obtenidas con los péptidos y glucopeptidos

²¹ Lemieux, R. U.; Koto S. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 1933-1944.

²² Corzana, F.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; García de Luis, M.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J. M.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9458-9467.

modelo derivados de Ser y Thr de nuestro trabajo anterior.¹ Sin embargo, del análisis del compuesto **Ac-MeSer*-Ala-Ala-NHMe**, se deduce que la β -O-glucosilación del péptido no natural no parece promover el paso a estructuras plegadas. Esto, sigue la tendencia ya observada también con los péptidos modelo no naturales (capítulo 3),⁷ según la cual es la presencia del grupo Me en posición α y no la β -O-glucosilación lo que determina en gran medida las preferencias conformacionales de la cadena peptídica en este tipo de sistemas. De hecho, pese a la rigidez estructural que le confiere el aminoácido cuaternario, puede decirse que el glicopéptido derivado de MeSer es más bien flexible en disolución acuosa (figura 14 derecha) (coexisten varias conformaciones para cada uno de los residuos) y sólo presenta una cierta conformación plegada con los dos giros β tipo I. En la figura 14 aparece una superposición de las estructuras obtenidas de la DM-tar para los glicopéptidos **Ac-Thr*-Ala-Ala-NHMe** (izquierda) y **Ac-MeSer*-Ala-Ala-NHMe** (derecha) donde puede apreciarse la diferencias conformacionales entre ambos ya que el derivado de MeSer (derecha) muestra una mayor flexibilidad.

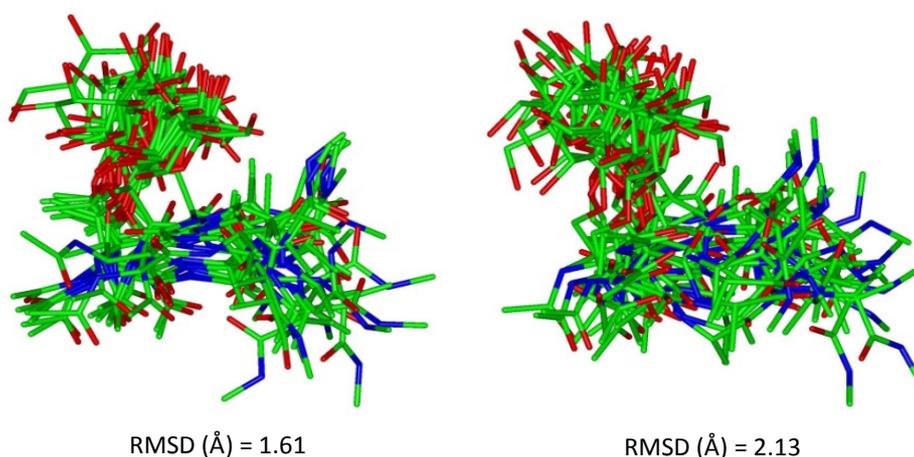


Figura 14. Superposición de conformaciones de la DM-tar de los glicopéptidos **Ac-Thr*-Ala-Ala-NHMe** (izquierda) y **Ac-MeSer*-Ala-Ala-NHMe** (derecha).

Además, como ha quedado demostrado, otra diferencia entre ambos glicopéptidos es la diferente geometría del enlace glicosídico ya que en el derivado de Thr, la presencia del Me en β es responsable de que el ángulo diedro ψ_s del glicopéptido adopte una conformación eclipsada en lugar de alternada como ocurre para **Ac-MeSer*-Ala-Ala-NHMe**.

Por tanto, puede concluirse que el simple cambio del grupo Me en β (Thr) a posición α (MeSer) evidencia una drástica modificación en las preferencias conformacionales de estos dos sistemas. Estas diferencias observadas en el glicopéptido de MeSer con respecto a su análogo natural, especialmente en términos de flexibilidad conformacional, podría tenerse en cuenta para modular el diseño de diferentes derivados con la idea de encontrar una determinada conformación bioactiva o conformeros atípicos en compuestos naturales.

Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe y Ac-c₄Ser*-Ala-Ala-NHMe

Dando un paso más en la incorporación de aminoácidos cuaternarios en el esqueleto peptídico y con la idea de lograr una mayor rigidez estructural, finalmente se llevó a cabo el análisis conformacional tanto del tripéptido **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe** como del glicopeptido **Ac-c₄Ser*-Ala-Ala-NHMe**. En ellos, el primer residuo de la cadena se ha sustituido por un α -aminoácido α,α -disustituido (hidroxiaminoácido ciclobutánico) derivado de serina (c₄Ser) con el propósito de restringir así la conformación del péptido y del glicopéptido. El análisis estructural se ha realizado tanto en estado sólido para el primero (mediante difracción de rayos X) como en disolución acuosa para ambos siguiendo el mismo protocolo habitual.

En la figura 15 se muestra la numeración de los átomos y etiquetas de los diferentes ángulos de torsión de los dos compuestos.

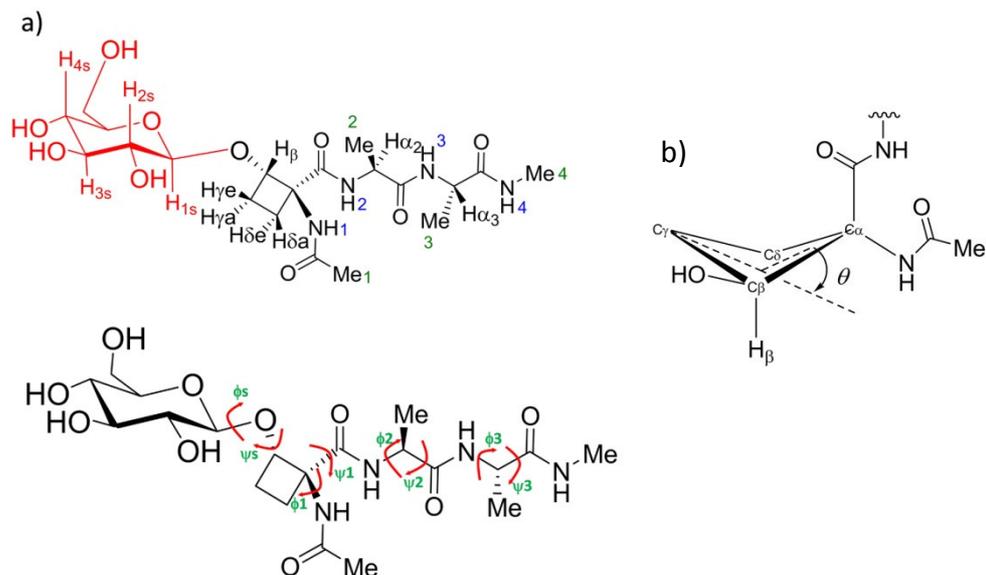


Figura 15. (a) Estructura molecular del glucopéptido. La misma numeración y etiquetas se usaron para el péptido. (b) El ángulo θ del anillo ciclobutánico se define como el ángulo agudo entre los planos $C\alpha$ - $C\beta$ - $C\delta$ y $C\beta$ - $C\gamma$ - $C\delta$.

Pueden establecerse conclusiones importantes respecto a la estructura en estado sólido (figura 16). En primer lugar, tanto para el tripéptido protegido con OBn (**24**) como para el péptido modelo se obtuvo una conformación consistente en dos giros β tipo III consecutivos, desviándose ligeramente de la estructura ideal de una hélice 3_{10} . Los ángulos de torsión ϕ/ψ mostrados en la figura 16 toman valores parecidos a los típicos para un giro beta tipo III (-60° , -30° y -60° , -30°). La estructura del péptido modelo está estabilizada por dos enlaces de hidrógeno intramoleculares (con distancias $N-H\cdots O$ de 2.02 y 2.06 Å y ángulos $N-H\cdots O$ de 166° y 161° respectivamente).

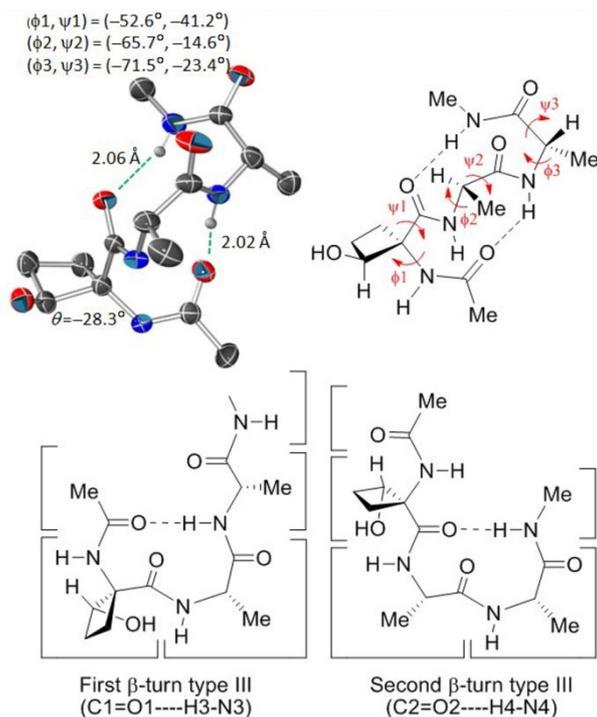


Figura 16. Algunas características geométricas de la estructura cristalina del péptido **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe**.

Recientemente, se ha encontrado una estructura similar para un tripéptido que incorpora un aminoácido derivado de un anillo de tetrahydrofurano^{23a} y con un C α tetrasustituido.²³ En segundo lugar, el anillo ciclobutánico sólo adopta una de las dos posibles conformaciones plegadas, con un ángulo de plegamiento θ de -28° y con el sustituyente

²³ (a) Maity, P.; Zabel, M.; König, B. *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 8046-8053. (b) Crisma, M.; Moretto, A.; Zotti, D. M.; Formaggio, F.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Toniolo, C. *Biopolymers (Peptide Science)* **2005**, *80*, 279-283. (c) Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.; Rodríguez, F. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4241-4249. (d) Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Cativiela, C.; Peregrina, J. M.; Rodríguez, F. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1429-1432. (e) Jiménez, A. I.; Cativiela, C.; París, M.; Peregrina, J. M.; Avenzoza, A.; Aubry, A.; Marraud, M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7841-7844. (f) Jiménez, A. I.; Cativiela, C.; Gómez-Catalán, J.; Pérez, J. J.; Aubry, A.; París, M.; Marraud, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5811-5821.

en el C β situado en posición ecuatorial. Esto está de acuerdo con la estructura cristalina en estado sólido de otros derivados ciclobutánicos previamente estudiados.²⁴

Preferencias conformacionales del péptido Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe en disolución acuosa

Como puede verse en la figura 17, la presencia de NOEs entre los protones H α 2-NH3 y H α 3-NH4 (propios de conformaciones extendidas), junto con los NOEs entre los protones H α 2-NH2 y H α 3-NH3 por un lado y los NOEs también entre los protones de las amidas NH2-NH3 y NH3-NH4 (característicos estos últimos de conformaciones plegadas) nos sugiere todo ello la coexistencia en disolución acuosa de tanto conformaciones extendidas como de tipo hélice para los dos residuos de alanina. Por su parte, el NOE entre los protones NH1-NH2 da idea una importante población con conformación plegada tipo helice para el residuo ciclobutánico.²⁵

²⁴ (a) Jiménez-Osés, G.; Corzana, F.; Busto, J. H.; Pérez-Fernández, M.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1869-1878. (b) *Structural analysis of acetamidocyclobutanes by a combination of X-ray diffraction and NMR spectroscopy*; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Canal, N.; Peregrina, J. M. en *Structural Analysis of Cyclic Systems*, Ed.: I. Iriepa, Research Signpost, T. C., 2005, pp 55–68.

²⁵ Dyson, H. J.; Wright, P. E. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **1991**, *20*, 519-538.

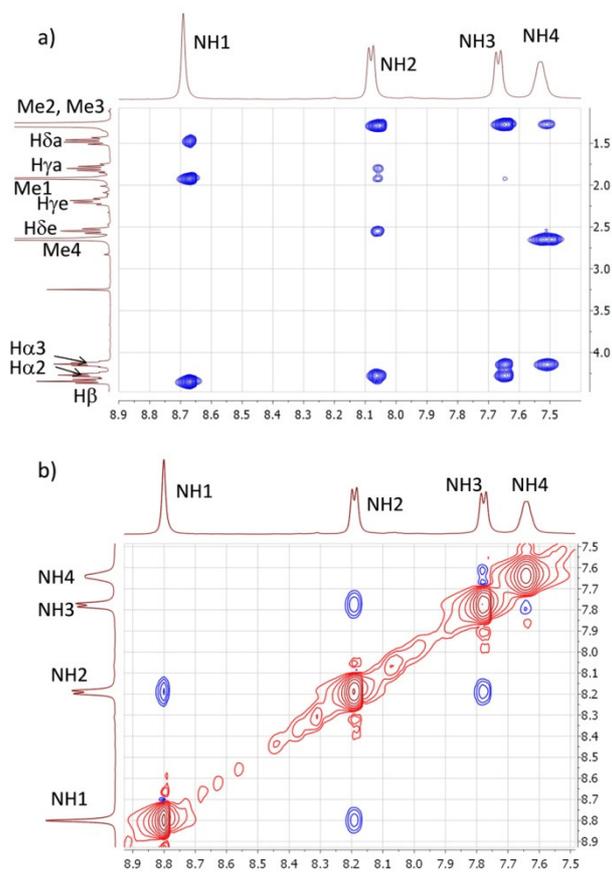


Figura 17. Secciones del espectro 2D-NOESY (400 MHz) a 800 ms en H₂O/D₂O (9:1) a 25 °C y pH=4.84 para el compuesto **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe**.

La distribución de los ángulos ϕ_i/ψ_i ($i=1, 2, 3$) obtenida de los cálculos de DM para el péptido se muestra en la figura 18.

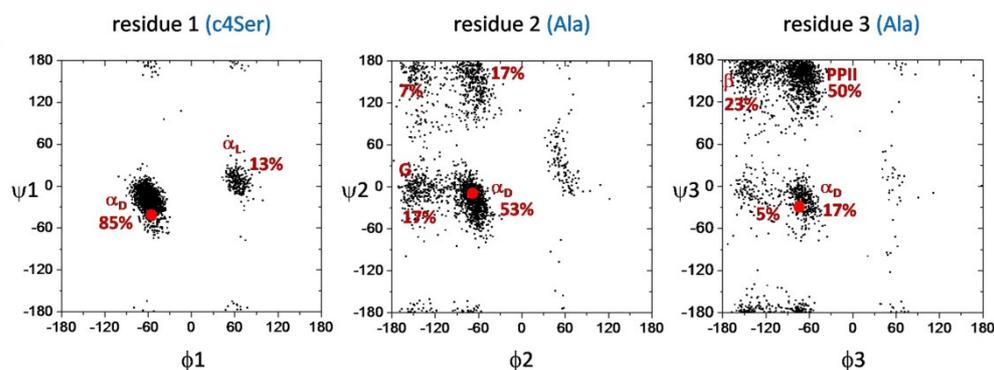
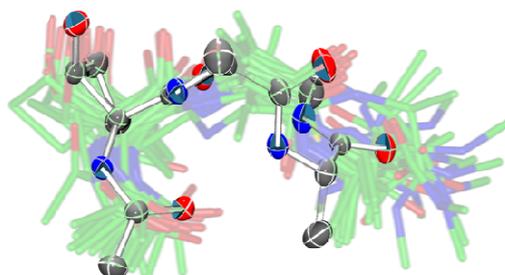


Figura 18. Distribuciones de los ángulos ϕ_i/ψ_i obtenidas de las DM-tar para el péptido. Los puntos rojos corresponden a los valores de ϕ/ψ observados en el estado sólido.

Como puede verse, el residuo ciclobutánico presenta unos valores de ϕ_1/ψ_1 característicos de conformaciones de tipo hélice, como son la α -hélice dextrógira y levógira (α_D , 85%; α_L , 13%) con clara preferencia por la primera, algo que ya ocurría para el péptido modelo más sencillo de c_4Ser .⁷ Por lo que respecta a los dos residuos de alanina, el primero (Ala correspondiente al residuo 2) mostró valores dispersos de ϕ_2/ψ_2 con una considerable población de conformación de α -hélice (53%), mientras que para la Ala correspondiente al residuo 3 las conformaciones extendidas fueron las más pobladas (β , 23% y PPII, 50%). De todos estos datos, puede establecerse que el péptido **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe** es más bien flexible en disolución acuosa. La figura 19 muestra la superposición de 10 conformeros del péptido recogidos de las simulaciones de DM, junto con la conformación en estado sólido. Sólo el primer giro β que aparecía en la estructura cristalina entre el carbonilo del grupo NHAc y el NH₃ se mantiene en disolución. Concretamente, de acuerdo con los resultados de la DM-tar, esta conformación está presente alrededor del 30% del tiempo total de la trayectoria. Sin embargo, el segundo giro β (entre el C₂=O₂ y NH₄) sólo se detectó en un 7% del tiempo total. De todos estos resultados, cabe destacar que este nuevo péptido presenta un comportamiento conformacional completamente distinto a los derivados anteriores. Finalmente, como ya

se observaba en el estado sólido, el anillo ciclobutánico adopta principalmente (95% del tiempo total de la trayectoria) una única conformación también en agua con $\theta = -19^\circ$. Este resultado está perfectamente de acuerdo con la corta distancia existente (2.7 Å) entre los átomos H β y H δ a.



RMSD (Å) = 1.14

Figura 19. Superposición de conformeros obtenida de la DM-tar para el péptido mostrándose el RMSD para los átomos pesados. Se presenta también la estructura cristalina superpuesta.

Preferencias conformacionales del glucopéptido Ac-c₄Ser*-Ala-Ala-NHMe en disolución acuosa

Con respecto a la conformación de la cadena péptidica, como puede verse en la figura 20, el residuo ciclobutánico adopta casi exclusivamente conformación de α -hélice lo cual es similar a lo observado para el péptido. Sin embargo, la mayor diferencia entre ambos compuestos se encuentra en la alanina del residuo 2. Mientras que en el péptido, existía una clara preferencia por conformaciones de tipo hélice, en el glucopéptido las conformaciones extendidas fueron las más pobladas.

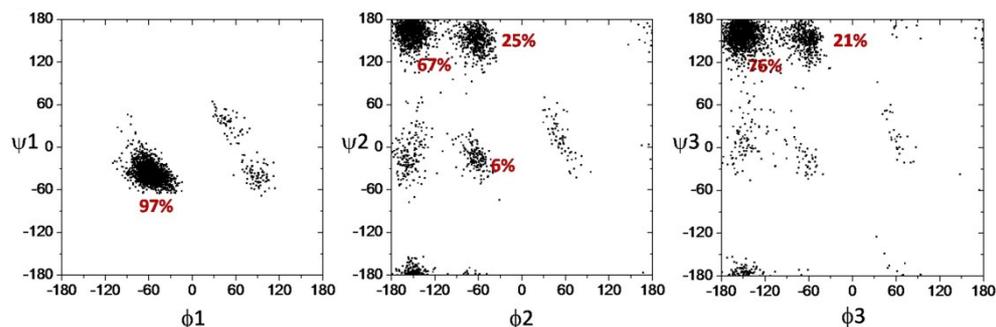


Figura 20. Distribuciones de los ángulos ϕ_i/ψ_i obtenidas de las DM-tar para el glicopéptido.

Como consecuencia, los giros β observados en la estructura cristalina para el péptido apenas se detectaron en disolución para el glicopéptido (menos del 4% del tiempo total de la trayectoria). Así, como se muestra en la figura 21, el glicopéptido modelo presenta una conformación más extendida en comparación con el péptido. Por tanto, puede concluirse que la β -O-glucosidación modifica la conformación de la cadena peptídica del compuesto **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe**, lo cual resulta en un cambio conformacional del glucopéptido correspondiente. Esta influencia de la glucosidación sobre el péptido subyacente ya ha sido también frecuentemente observada en glicopéptidos naturales.²⁶

²⁶ Como ejemplos ver: (a) Coltart, D. M.; Royyuru, A. K.; Williams, L. J.; Glunz, P. W.; Sames, D.; Kuduk, S.; Schwarz, J. B.; Chen, X.-T.; Danishefsky, S. J.; Live, D. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 9833-9844. (b) Dziadek, S.; Griesinger, C.; Kunz, H.; Reinscheid, U. M. *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 4981-4993. (c) Kuhn, A.; Kunz, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 454-458; (d) Braun, P.; Davies, G. M.; Price, M. R.; Williams, P. M.; Tandler, S. J. B.; Kunz, H. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1531-1545; (e) Simanek, E. E.; Huang, D.-H.; Pasternack, L.; Machajewski, T. D.; Seitz, O.; Millar, D. S.; Dyson, H. J.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11567-11575; (f) Wu, W. G.; Pasternack, L.; Huang, D. H.; Koeller, K. M.; Lin, C. C.; Seitz, O.; Wong, C.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2409-2417.

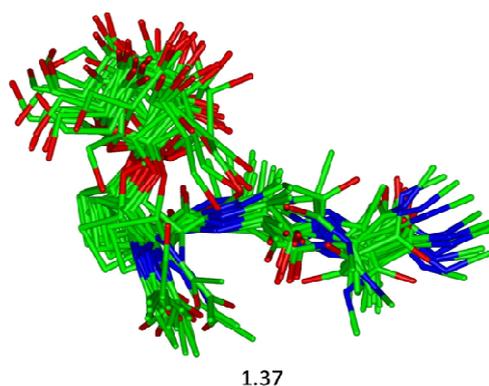


Figura 21. Superposición de conformeros obtenida de la DM-tar para el glicopéptido con el RMSD (Å) para los átomos pesados.

En cuanto al enlace glicosídico, los valores del ángulo diedro ϕ_s están determinados sobre todo por el efecto exo-anomérico.²⁷ Por tanto, el enlace glicosídico adopta fundamentalmente la conformación *syn* en disolución acuosa [$\phi_s(\text{O5s-C1s-O1s-C}\beta)=-60^\circ$ para enlaces β -*O*-glicosídicos], lo cual corresponde al mínimo de energía. En el caso del glucopeptido **Ac-c₄Ser*-Ala-Ala-NHMe**, no sólo se observa un NOE intenso H β -H1s, representativo de la conformación *syn* para el ángulo diedro ϕ_s , sino también un NOE medio entre H β -H2s (con una distancia media de 2.9 Å, calculada experimentalmente de la curva de crecimiento NOE²⁸) (figura 22a). Esta distancia experimental así como el correspondiente NOE no podría explicarse sin asumir la existencia de una cierta población con conformación *anti*- ϕ , ya que para una conformación *syn* pura la distancia H β -H2s sería mayor de 4.5 Å.⁷ Concretamente, la relación cuantitativa entre ambas conformaciones se obtuvo mediante cálculos de DM-tar que sugirieron una población de alrededor del 20% para esta conformación *anti*- ϕ de alta energía (figura 22c).

²⁷ Thatcher, G. R. J. *The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects*, American Chemical Society, Washington, DC, 1993.

²⁸ Haselhorst, T.; Weimar, T.; Peters, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10705-10714.

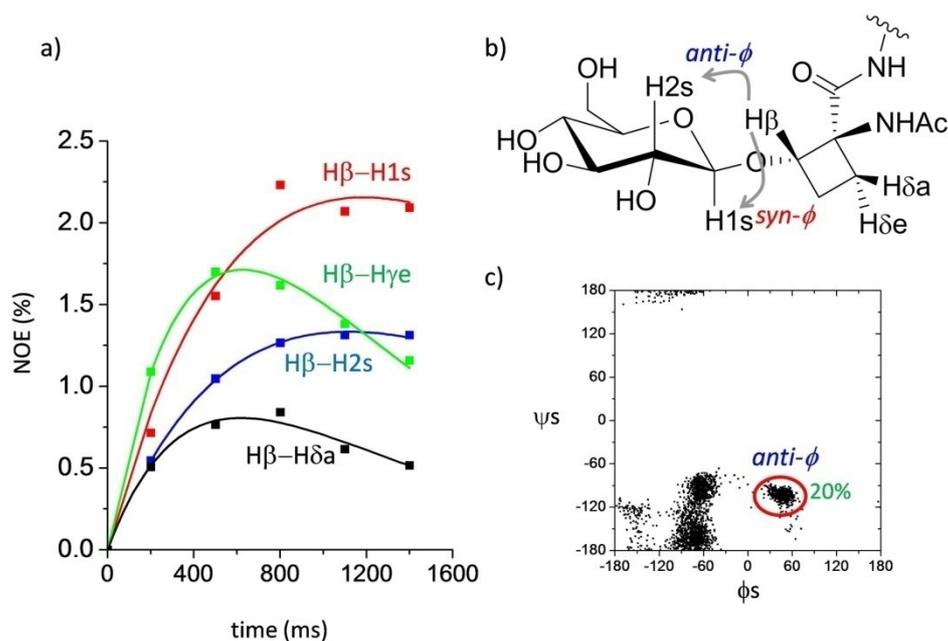


Figura 22. (a) Curva de crecimiento NOE correspondiente al H β del compuesto **Ac-c₄Ser*-Ala-Ala**. (b) Representación esquemática de los NOEs característicos de las conformaciones *syn* y *anti-φ* en **Ac-c₄Ser*-Ala-Ala**. (c) Distribución de los ángulos diedros ϕ_s/ψ_s obtenida de los cálculos de DM-tar para el glicopéptido.

Para lograr un mayor entendimiento de los cambios estructurales inducidos por la β -O-glicosilación tanto en el esqueleto peptídico de **Ac-c₄Ser*-Ala-Ala** como en el ángulo diedro ϕ_s , el siguiente paso fue estudiar la posible presencia de enlaces de hidrógeno en el glicopéptido. Esta relativamente alta proporción de conformeros *anti-φ* en disolución acuosa podría estar estabilizada por la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares (figura 23). De hecho, hay una fuerte correlación entre la conformación *anti-φ* y la existencia de dos enlaces de hidrógeno simultáneos entre el oxígeno endocíclico de la glucosa y dos protones amídicos del péptido, esto es, uno entre el N1 y el O5s y otro entre N2 y O5s. Precisamente, dichos enlaces son responsables también de

la desaparición del primer giro β de la cadena peptídica observado en el compuesto **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe**, y explican así el efecto de la parte carbohidrato sobre la conformación del péptido. Por tanto, y teniendo en cuenta que la glicosilación de péptidos, especialmente de aquellos que contienen enlaces β -O-glicosídicos, induce generalmente conformaciones de plegadas,²⁶ el ejemplo que se presenta en este trabajo supone un interesante contraste que pone de manifiesto el uso de aminoácidos no naturales para obtener nuevos compuestos con un novedoso comportamiento conformacional.

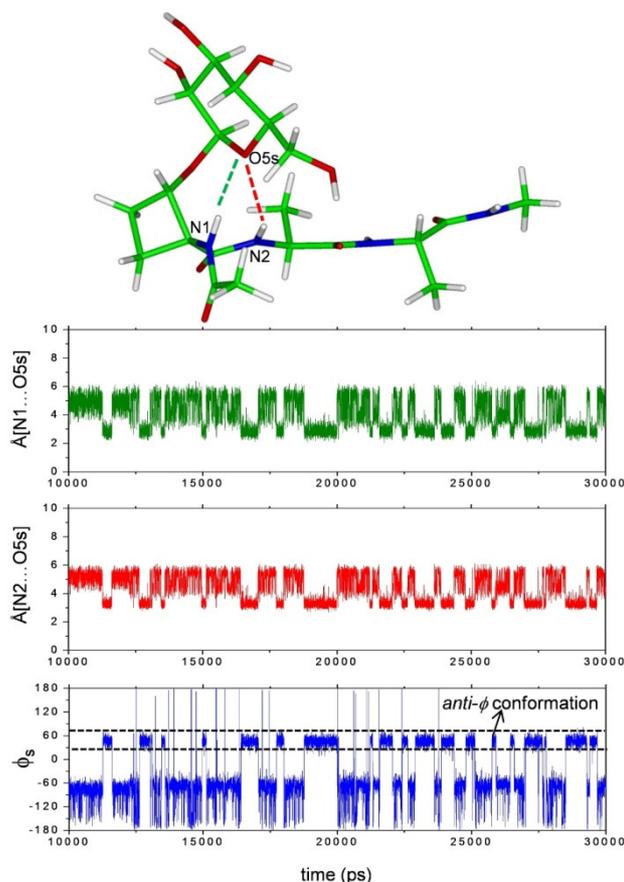


Figura 23. Monitorización en el tiempo del ángulo diedro ϕ_s y las distancias N1...O5s y N2...O5s en la DM-tar para el compuesto **Ac-c₄Ser*-Ala-Ala-NHMe**.

A modo de resumen, de esta última parte del capítulo con los derivados ciclobutánicos, puede concluirse que **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe** presenta una conformación en el estado sólido consistente en dos giros β de tipo III consecutivos (elemento estructural básico de una hélice 3_{10}). Sin embargo, sólo el primer giro β está presente parcialmente en disolución. Por su parte, la β -O-glicosilación modifica notablemente la conformación del esqueleto peptídico. Así, ninguno de los dos giros β observados en el péptido se mantienen en el glicopéptido que adopta conformaciones más extendidas. En este caso, aunque el residuo de c₄Ser sigue presentando conformación de tipo hélice, las dos alaninas prefieren las conformaciones extendidas. Estos resultados difieren de estudios previos con glicopéptidos que incorporan aminoácidos naturales. Como se ha visto, la influencia de la parte carbohidrato en el esqueleto peptídico puede explicarse por la existencia de dos enlaces de hidrógeno intramoleculares simultáneos entre el oxígeno endocíclico de la glucosa y los protones de las amidas H-N1 y H-N2 del péptido. Finalmente, la presencia del residuo no natural de c₄Ser (como ya ocurría con el glicopéptido modelo más sencillo de c₄Ser -**Ac-c₄Ser*-NHMe**-) favorece la existencia de conformaciones de alta energía para el enlace glicosídico, como es la *anti*- ϕ .

4.4. Conclusiones generales

A continuación, se muestran, de manera esquemática, las conclusiones más relevantes obtenidas en este capítulo.

EFFECTOS CONFORMACIONALES EN PÉPTIDOS Y β -O-GLUCOPÉPTIDOS DEBIDOS A LA SUSTITUCIÓN DE UN AMINOÁCIDO NATURAL POR UNO CUATERNARIO NO NATURAL

Ac-MeSer-Ala-Ala-NHMe
Ac-MeSer*-Ala-Ala-NHMe



Cambio (Me)
de C β a C α

Backbone

Tanto en péptidos como en β -O-glicopéptidos promueve el paso de conformaciones extendidas a plegadas. Sin embargo, no es capaz de rigidificar el sistema, sino que más bien lo flexibiliza, coexistiendo conformaciones extendidas y plegadas.

Cadena lateral

La flexibiliza enormemente, coexistiendo las tres conformaciones mayoritarias $g(+)$, $g(-)$ y $anti$.

Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe
Ac-Thr*-Ala-Ala-NHMe



Incorporación
ciclo en C α -C β

Backbone

Tanto en péptidos como en β -O-glicopéptidos induce conformaciones plegadas en el residuo que es incorporado, prevaleciendo las extendidas en el resto. De alguna manera, rigidifica más este efecto que el anterior.

Cadena lateral

Evidentemente queda restringida por completo

Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe
Ac-c₄Ser*-Ala-Ala-NHMe

EFECTOS CONFORMACIONALES EN PÉPTIDOS PROVOCADOS POR SU β -O-GLUCOSILACIÓN

Ac-Xaa-Ala-Ala-NHMe

Xaa
Thr
MeSer
c₄Ser



Incorporación
 β -O-glucosa

Ac-Xaa*-Ala-Ala-NHMe

Derivados naturales (Thr)

Se mantiene la tendencia observada en esta glicosilación para el caso de derivados de menor tamaño (Ac-Xaa-NHMe). Es decir, en cierta medida, induce el paso de conformaciones extendidas a plegadas.

Derivados no naturales (MeSer, c₄Ser)

Esta glicosilación, que en derivados de menor tamaño (Ac-Xaa-NHMe) apenas provocaba efectos conformacionales, ahora sí que provoca cambios, sobretodo en el *backbone*, debido a interacciones entre la parte carbohidrato y peptídica (enlaces de hidrógeno fundamentalmente).

Conformación del enlace glicosídico

- 1) ϕ_s adopta en todos los casos valores próximos a -60° (efecto exo-anomérico).
- 2) ψ_s adopta valores alrededor de 180° (conformación alternada) cuando el Me está en C α , mientras que si se sitúa en C β toma valores cercanos a 120° (conformación eclipsada).
- 3) Es de destacar que la incorporación de un ciclo favorece conformaciones de alta energía como la *anti*- ϕ .

5

Glicopéptidos de interés biológico con la secuencia Cys-Ala-Xaa-Ser-Pro-Cys

5.1. Introducción

Como se ha comentado en el capítulo de Introducción, varias seroproteínas implicadas en la cascada de la coagulación sanguínea, como los factores de coagulación de la sangre bovina y humana (factores VII y IX),¹ la proteína Z del plasma humano y bovino² y la trombospondina³ son modificadas postraduccionalmente con β -D-O-glucosa. Estas proteínas se sintetizan en el hígado y se glicosilan antes de ser secretadas al torrente sanguíneo. Esta glicosilación ha atraído mucha atención en los últimos años al encontrarse en una secuencia de consenso determinada que aparece en dominios proteicos del factor de crecimiento epidérmico (EGF)⁴ de esas seroproteínas y del receptor de Notch⁵. Dicha secuencia glicosilada está compuesta por: -Cys¹-Xaa-Ser-Xaa-Pro-Cys²- donde Cys¹ y Cys² son la primera y segunda cisteínas conservativas del dominio EGF y Xaa puede ser cualquier aminoácido. Más concretamente, se conocen con exactitud las secuencias específicas de los dos factores de coagulación. Para el factor IX, el motivo es Cys-Glu-Ser-Asn-Pro-Cys, correspondiente a los residuos 51-56. Por su parte, en el factor VII de coagulación la secuencia es la formada por -Cys-Ala-Ser-Ser-Pro-Cys- para los mismos residuos.^{4a} En estas proteínas el residuo de serina lleva unido un disacárido (α -D-Xyl-1 \rightarrow 3- β -D-Glc) o un trisacárido (α -D-Xyl-1 \rightarrow 3- α -D-Xyl-1 \rightarrow 3- β -D-Glc).⁶

¹ Hase, S.; Kawabata, S.; Nishimura, H.; Takeya, H.; Sueyoshi, T.; Miyata, T.; Iwanaga, S.; Takao, T.; Shimonishi, Y.; Ikenaka, T. *J. Biochem.* **1988**, *104*, 867-868.

² Nishimura, H.; Kawabata, S.-I.; Kisiel, W.; Hase, S.; Ikenaka, T.; Takao, T.; Shimonishi, Y.; Iwanaga, S. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 20320-20325.

³ Nishimura, H.; Yamashita, S.; Zeng, Z.; Walz, D.A.; Iwanaga, S. *J. Biochem. (Tokyo)* **1992**, *111*, 460-464.

⁴ (a) Shao, L.; Luo, Y.; Moloney, D. J.; Haltiwanger, R. S. *Glycobiology* **2002**, *12*, 763-770; (b) Harris, R. J.; Spellman, M. W. *Glycobiology* **1993**, *3*, 219-224.

⁵ Bruckner, K.; Perez, L.; Clausen, H.; Cohen, S. *Nature* **2000**, *406*, 411-415.

⁶ Hase, S.; Nishimura, H.; Kawabata, S.-I.; Iwanaga, S.; Ikenaka, T. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 1858-1861.

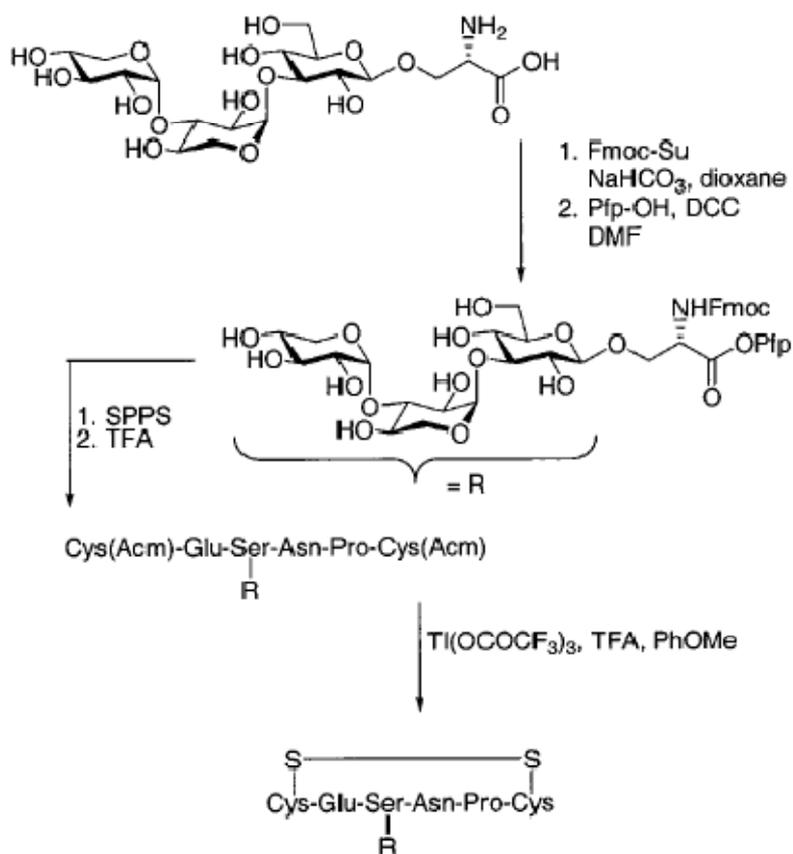
Estos fragmentos juegan un papel importante en las interacciones proteína-proteína y éstas pueden verse afectadas por la alteración del carbohidrato que modifica estos motivos. Además, diversos estudios han demostrado que la enzima que añade el residuo de Glc reconoce no sólo la secuencia consenso en sí misma, sino también la estructura tridimensional del dominio EGF.^{4a} Sin embargo, todavía no se conoce bien la función biológica de estos carbohidratos, y en concreto, de la glucosa, en estas proteínas y existe cierta controversia respecto al papel estructural que desempeñan.

En este sentido, no son demasiados los trabajos descritos hasta la fecha dedicados a la síntesis y al análisis estructural de estos sistemas. Al respecto, hay que mencionar que se ha llevado a cabo la síntesis química del disacárido⁷ y trisacárido⁸, previamente comentados, unidos a serina. Además, para investigar la importancia biológica de dichos carbohidratos en estas proteínas, tanto el *building block* β -D-Glc-Ser como también una muestra del trisacárido enlazado a Ser (α -D-Xyl-1 \rightarrow 3- α -D-Xyl-1 \rightarrow 3- β -D-Glc-Ser) fueron incorporados a una secuencia peptídica para formar los glicopéptidos que corresponden a los residuos 51-56 del factor IX de coagulación de la sangre humana y bovina comentado anteriormente. La síntesis de ambas secuencias glicopeptídicas se llevó a cabo utilizando la estrategia Fmoc/Dhbt de síntesis en fase sólida partiendo de los dos precursores glicosilados. A partir de los glicopéptidos lineales protegidos como SAcM se prepararon los glicopéptidos cíclicos mediante formación de un enlace disulfuro entre ambas cisteínas por tratamiento con trifluoroacetato de talio (III) en TFA (esquema 1). Finalmente, estos glicopéptidos cíclicos fueron caracterizados completamente por espectroscopía de RMN y de masas.⁹

⁷ Lüning, B.; Norberg, T.; Tejbrant, J. *J. Carbohydr. Chem.*, **1992**, *11*, 933-943.

⁸ Fukase, K.; Hase, S.; Ikenaka, T.; Kusumoto, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1992**, *65*, 436-445.

⁹ Reimer, K. B.; Meldal, M.; Kusumoto, S.; Fukase, K.; Bock, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1993**, 925-932.



Esquema 1. Síntesis del glicopéptido cíclico del dominio EGF del factor IX de coagulación de la sangre bovina (residuos 51-56).

Para lograr un mejor entendimiento de la función de esta β -O-glucosilación, más recientemente, se ha llevado a cabo también la síntesis en fase sólida de una secuencia mayor (residuos 45-87) del mismo dominio EGF del factor IX. En este caso, se sintetizó

dicha secuencia sin glicosilar, y glicosilada con β -Glc y con un resto de xilosil-glucosa ($-\alpha$ -D-Xyl-1 \rightarrow 3- β -D-Glc-Ser) (figura 1).¹⁰

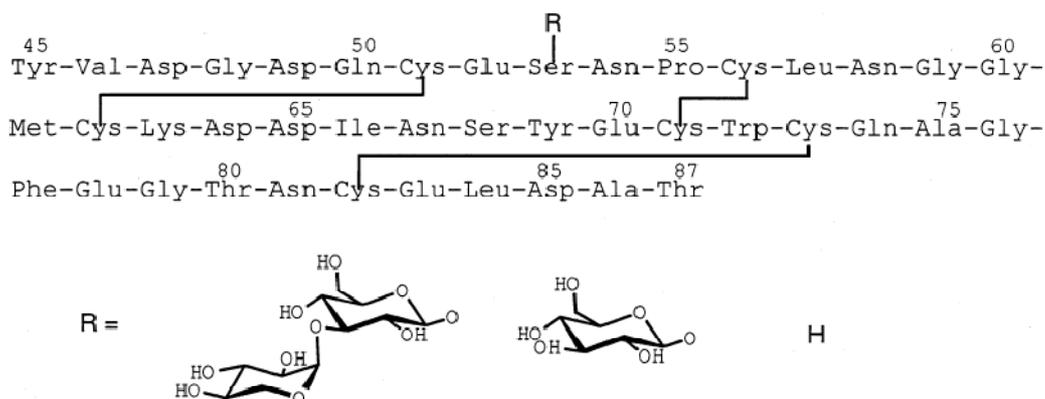


Figura 1. Secuencia peptídica del dominio EGF del factor IX (residuos 45-87).

La estructura secundaria de estos productos fue caracterizada por difracción circular (CD). Los resultados sugirieron que en presencia de Ca^{2+} (ya que existe un sitio de unión a este catión en la región *N*-terminal del péptido) se forma una estructura bien definida de lámina β sin participación del carbohidrato. Esto significa que el azúcar no influye en la formación o estabilización de la estructura tridimensional del dominio. Rao y col.¹¹ determinaron la conformación del dominio EGF sin glicosilar en presencia de Ca^{2+} y observaron que el grupo hidroxilo de Ser⁵³ está orientado hacia fuera de la molécula. Así, es probable que, al glicosilar, el carbohidrato pueda acomodarse sin alterar la

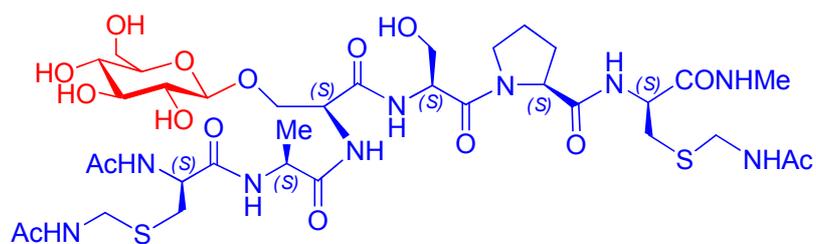
¹⁰ (a) Takemura, T.; Hojo, H.; Nakahara, Y.; Ishimizu, T.; Hase, S. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 133-136; (b) Kitamura, M.; Hojo, H.; Nakahara, Y.; Ishimizu, T.; Hase, S. *Glycoconj. J.*, **2004**, *21*, 197-203.

¹¹ Rao, Z.; Handford, P.; Mayhew, M.; Knott, V.; Brownlee, G. G.; Stuart, D. *Cell* **1995**, *82*, 131-141.

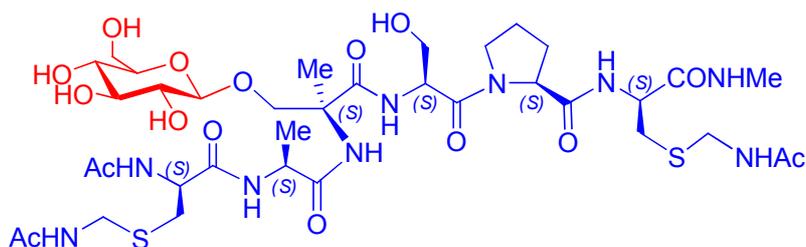
conformación de la cadena peptídica. Además, todavía se siguen realizando estudios con el fin de clarificar el papel de la parte carbohidrato.

5.2. Objetivos

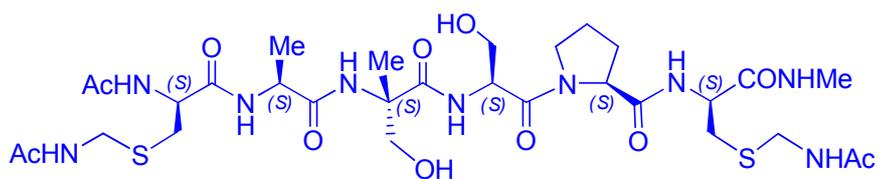
Teniendo en cuenta todo lo anterior, y al constatar que no existen apenas trabajos previos acerca del factor VII de coagulación con la secuencia -Cys-Ala-Ser-Ser-Pro-Cys-, se decidió llevar a cabo la síntesis de dicha secuencia glicosilada con β -O-Glc (residuos 51-56) así como de análogos no naturales de la misma. De esta manera, se pretende estudiar qué cambios conformacionales conlleva la sustitución del aminoácido natural Ser por MeSer no natural en el glicopéptido y cuáles son las diferencias que se observan con respecto al mismo péptido no natural sin glucosilar. Por tanto, el objetivo general en este capítulo es la síntesis de los compuestos que se muestran en la figura 2. En una fase posterior, ya fuera del ámbito de esta Tesis Doctoral, se realizará su análisis conformacional con el fin de elucidar y comprender la función tanto estructural como biológica de esta β -O-glucosilación.



Ac-Cys(Acm)-Ala-Ser*-Ser-Pro-Cys(Acm)-NHMe



Ac-Cys(Acm)-Ala-MeSer*-Ser-Pro-Cys(Acm)-NHMe



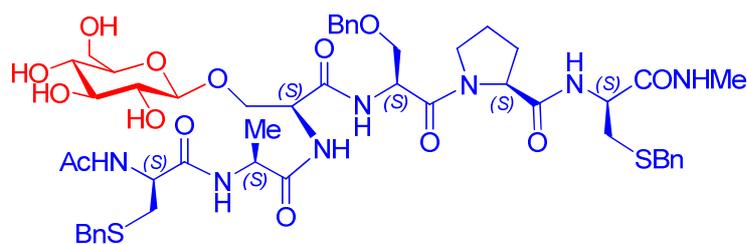
Ac-Cys(Acm)-Ala-MeSer-Ser-Pro-Cys(Acm)-NHMe

Figura 2. Péptido y glicopéptidos objeto de estudio

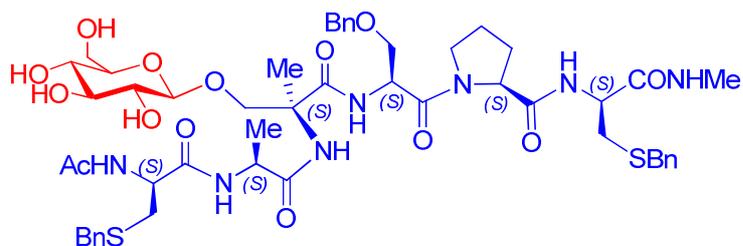
5.3. Discusión de resultados

5.3.1. Síntesis

Inicialmente, cabe mencionar que se utilizó el Bn como grupo protector de la cadena lateral de cisteína y también de serina y así se sintetizaron los compuestos que aparecen en la figura 3. Estos compuestos fueron perfectamente caracterizados y en la última etapa se intentó la desprotección de los grupos tiol e hidroxilo mediante reducción con Na en NH_3 líquido. Sin embargo, no se obtuvieron resultados demasiado concluyentes por lo que se decidió variar la ruta sintética eligiendo, en esta ocasión, el grupo acetamidometil (Acm) como grupo protector del $-\text{SH}$ en la cadena lateral de la Cys. No obstante, se seguirá trabajando en esa última etapa clave para lograr la obtención de los compuestos finales deseados mediante la vía anterior.



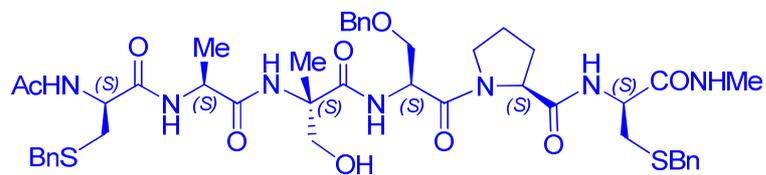
Ac-Cys(Bn)-Ala-Ser*-Ser(Bn)-Pro-Cys(Bn)-NHMe



Ac-Cys(Bn)-Ala-MeSer*-Ser(Bn)-Pro-Cys(Bn)-NHMe



Ac-Cys(Bn)-Ala-Ser(Bn)-Ser(Bn)-Pro-Cys(Bn)-NHMe

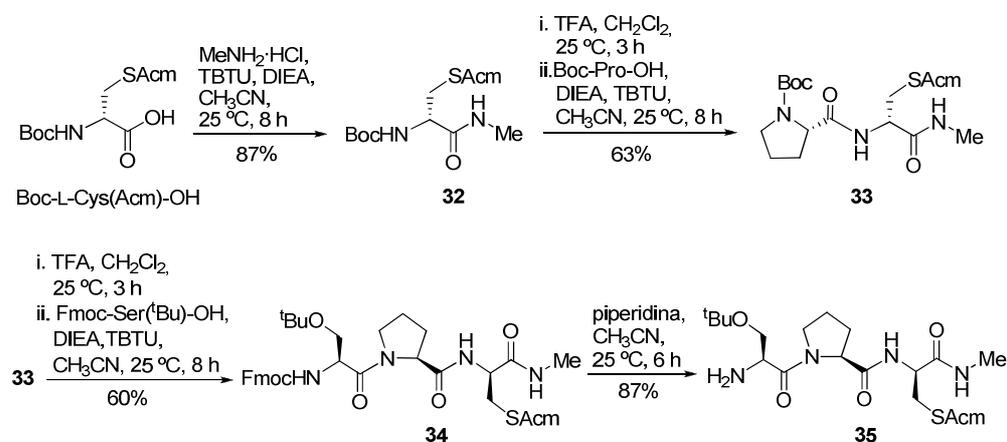


Ac-Cys(Bn)-Ala-MeSer-Ser(Bn)-Pro-Cys(Bn)-NHMe

Figura 3. Otros péptidos y glicopéptidos sintetizados en el presente trabajo.

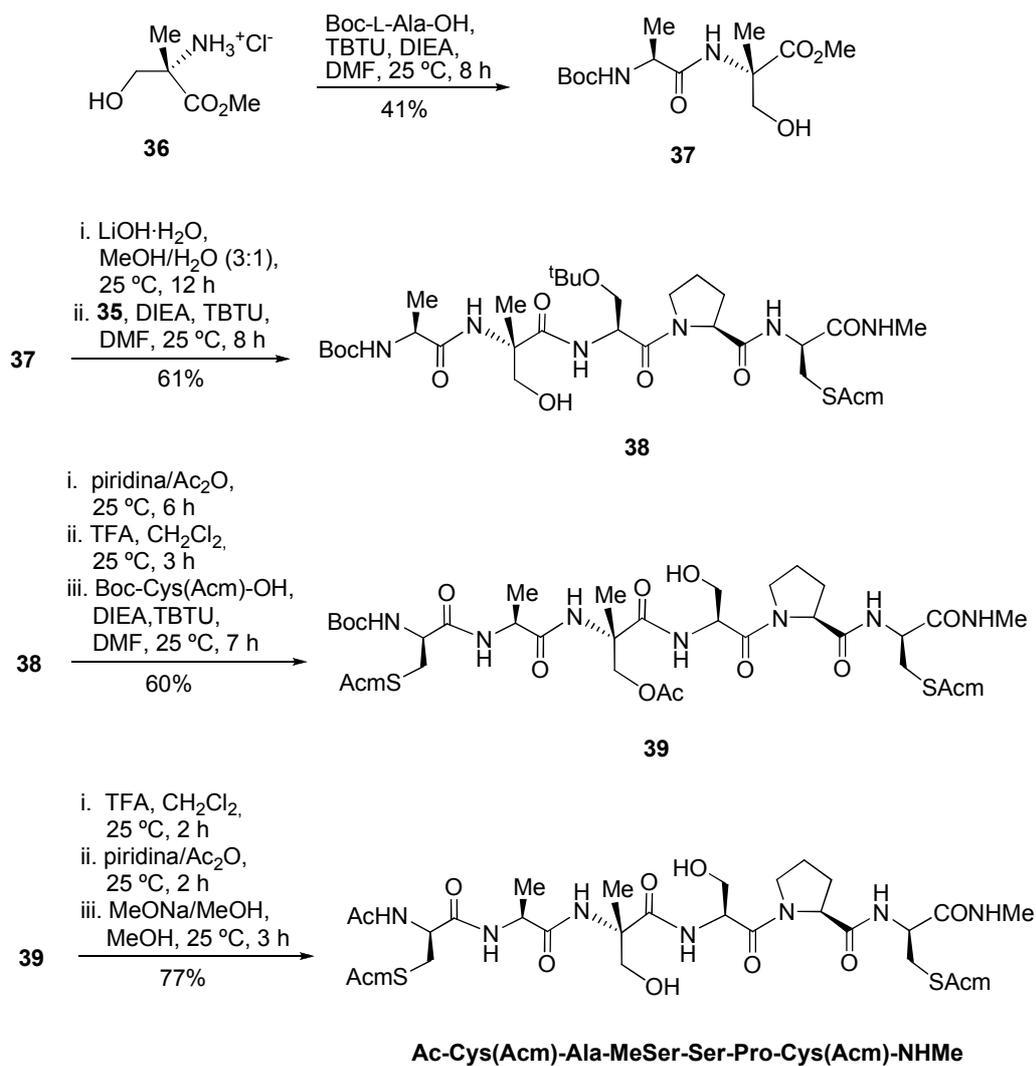
Una vez decidido el cambio de estrategia con la elección del AcM como nuevo grupo protector, en primer lugar se llevó a cabo la síntesis del péptido sin glicosilar pero sustituyendo la Ser⁵³ por MeSer no natural para estudiar el efecto del grupo Me en posición α sobre el esqueleto peptídico. Para ello, se siguió la misma metodología habitual de síntesis peptídica en disolución utilizada en los capítulos anteriores, con el empleo de TBTU como agente de acoplamiento.

Se comenzó sintetizándose la mitad derecha de la molécula, esto es, el tripéptido Ser-Pro-Cys adecuadamente protegido (esquema 2). Partiendo de Boc-L-Cys(AcM)-OH, disponible comercialmente, este compuesto se hizo reaccionar en CH₃CN con el clorhidrato de la metilamina, TBTU y DIEA, como base, para dar la correspondiente metilamida **32**. La eliminación del grupo Boc en medio ácido y el tratamiento de la amina resultante con Boc-L-Pro-OH, en presencia de TBTU y DIEA en CH₃CN, proporcionó el dipéptido **33**. Como antes, la desprotección del grupo amino del residuo de Pro en el compuesto **33** y la posterior reacción en CH₃CN con Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH, TBTU y DIEA dio lugar al compuesto **34**, que se trató en CH₃CN con piperidina obteniéndose la amina libre **35**.



Esquema 2. Síntesis del tripéptido intermedio **35**.

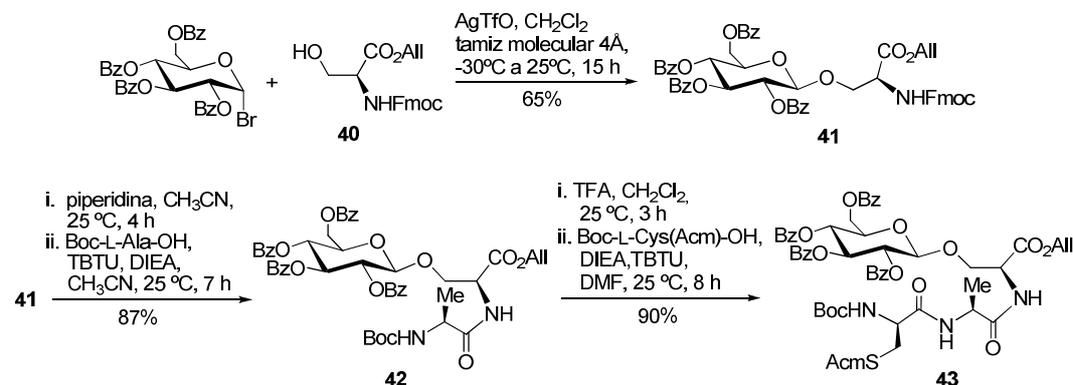
Paralelamente, el clorhidrato del éster metílico de la (*S*)-MeSer (**36**) se hizo reaccionar en DMF con Boc-L-Ala-OH en presencia de TBTU y DIEA para dar el dipéptido **37** con un rendimiento moderado. La hidrólisis del éster metílico en medio básico fuerte, seguido del tratamiento del ácido resultante con el péptido **35** en DMF y en presencia de TBTU y DIEA, proporcionó el pentapéptido **38** con un 61% de rendimiento (esquema 3). Este compuesto se trató con Ac₂O/piridina, acetilándose así el grupo hidroxilo del residuo de MeSer, y se desprotegió el grupo amino del residuo de Ala y el terc-butilo de Ser con TFA para, a continuación, hacerse reaccionar con Boc-L-Cys(Acm)-OH, TBTU y DIEA en DMF. De esta manera, se obtuvo el hexapéptido protegido (**39**) con buen rendimiento. La eliminación del grupo Boc de la Cys, seguido de acetilación de su grupo amino y por ende, del hidroxilo de la Ser, dio lugar al compuesto Ac-Cys(Acm)-Ala-MeSer(Ac)-Ser(Ac)-Pro-Cys(Acm)-NHMe. Finalmente, la desprotección de ambos grupos hidroxilo en MeSer y Ser con MeONa/MeOH permitió obtener el hexapéptido final **Ac-Cys(Acm)-Ala-MeSer-Ser-Pro-Cys(Acm)-NHMe**.



Esquema 3. Síntesis del hexapéptido final derivado de MeSer.

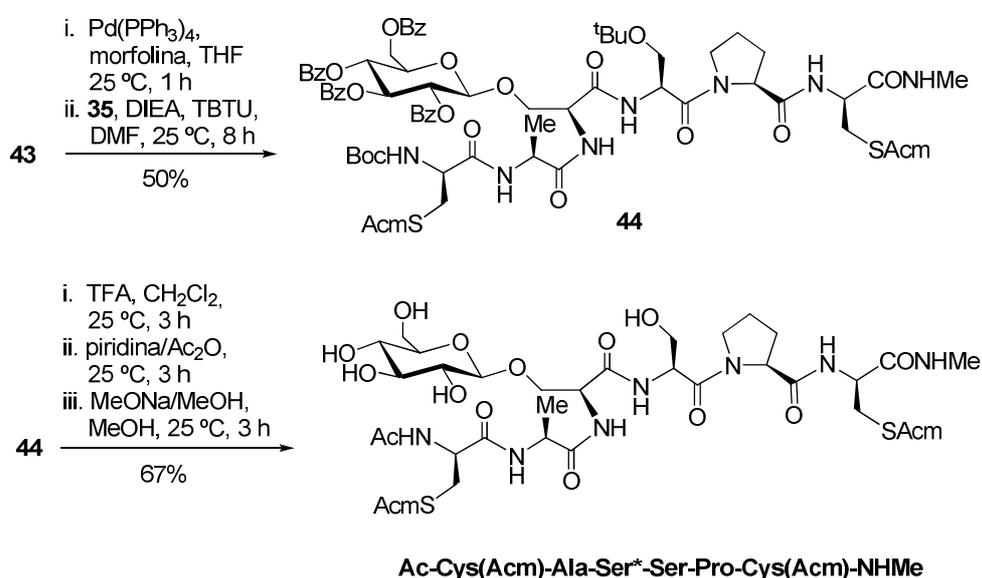
Una vez sintetizado el péptido derivado del aminoácido no natural MeSer, se procedió a la síntesis de ambas secuencias peptídicas (tanto con Ser como con MeSer) glicosiladas con β -O-Glc. Ambos glicopéptidos se realizaron siguiendo el mismo esquema sintético que se detalla a continuación para la obtención del derivado natural **Ac-Cys(Acm)-Ala-Ser*-Ser-Pro-Cys(Acm)-NHMe**.

En primer lugar, se llevó a cabo la formación del enlace glicosídico entre Fmoc-L-Ser-All (**40**) y el “glicosil-dador” de Glc habitualmente empleado en esta Tesis Doctoral. Así, siguiendo la metodología de Koenigs-Knorr con AgTfO se preparó el correspondiente *building block* glicosilado (**41**) con buen rendimiento. Éste, es el compuesto de partida clave para continuar el resto de la síntesis peptídica mediante el acoplamiento de los demás aminoácidos. El siguiente paso fue la eliminación del grupo Fmoc del glicoaminoácido y la posterior reacción de la amina libre con Boc-L-Ala-OH en CH₃CN, y en presencia de TBTU y DIEA, para dar el compuesto **42**. Seguidamente, el tratamiento con TFA/CH₂Cl₂ seguido del acoplamiento bajo las mismas condiciones anteriores con Boc-L-Cys(Acm)-OH proporcionó el glicopéptido **43** (esquema 4).



Esquema 4. Síntesis del glicopéptido intermedio **43**.

A continuación, se desprotegió el grupo alilo en **43** utilizándose Pd(PPh₃)₄ y morfolina en THF. El ácido resultante se hizo reaccionar en DMF con el tripéptido **35** anterior, TBTU y DIEA para formar el correspondiente glicohexapéptido protegido **44** con un rendimiento aceptable. La desprotección del grupo amino terminal en medio ácido, seguido de acetilación de éste e, inevitablemente, también del hidroxilo de la Ser dio lugar al compuesto Ac-Cys(Acm)-Ala-Ser[β-O-Glc(Bz)₄]-Ser(Ac)-Pro-Cys(Acm)-NHMe. Finalmente, la hidrólisis suave del grupo acetato en la Ser y la de los grupos benzoatos en la glucosa con MeONa/MeOH permitió obtener el glicohexapéptido final Ac-Cys(Acm)-Ala-Ser*-Ser-Pro-Cys(Acm)-NHMe (esquema 5).



Esquema 5. Síntesis del glicohexapéptido final derivado de Ser.

Actualmente, se está llevando a cabo el análisis estructural de los tres compuestos objetivo con los residuos de cisteína protegidos como acetamidometil para evitar la

oxidación de los mismos. Los resultados preliminares muestran una gran flexibilidad conformacional para el derivado **Ac-Cys(Acm)-Ala-MeSer*-Ser-Pro-Cys(Acm)-NHMe** a pesar de la presencia del aminoácido cuaternario con su grupo Me en posición α . Este hecho confirma lo observado en el compuesto del capítulo anterior **Ac-MeSer*-Ala-Ala-NHMe** e indicaría una vez más que la rigidez estructural aportada por dicho grupo Me del residuo no natural no implica rigidez conformacional.

Por otro lado, no se sabe con seguridad si la secuencia peptídica natural del factor de coagulación presenta un puente disulfuro entre los residuos 51 y 56. De hecho, este puente es posible por la presencia de la prolina en posición 55 que favorecería la formación de esa estructura. En base a esto, tenemos decidido preparar también todos los compuestos anteriores cíclicos mediante la eliminación de los grupos Acm y posterior oxidación intramolecular de ambas cisteínas para obtener ese puente disulfuro. Así, esta estructura cíclica sería probablemente más definida conformacionalmente y facilitaría, por tanto, el análisis conformacional.

6

Glicopéptidos modelo
derivados de β -O-GlcNAc

6.1. Introducción

Dentro de los enlaces β -O-glicosídicos, otro tipo de O-glicosilación muy común es la unión de la N-acetilglucosamina (GlcNAc) a los residuos de serina y treonina de proteínas nucleares y citoplasmáticas.¹ Desde el punto de vista estructural, al contrario que en la mayor parte del resto de glicosilaciones en proteínas, este carbohidrato aparece por lo general como un monosacárido único enlazado a la cadena lateral de serina y treonina y no formando parte de un oligosacárido mayor.² Además, del análisis de los sitios de glicosilación, se observa que no hay una secuencia consenso definida para la adición de O-GlcNAc a la cadena peptídica.³

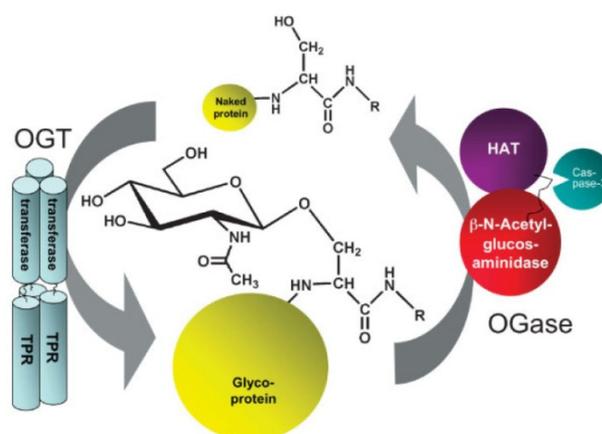


Figura 1. OGT= O-GalNAc transferasa; OGA = β -N-acetilglucosaminidasa

La β -O-glicosilación de Ser/Thr con GlcNAc es una modificación muy abundante, dinámica y reversible, similar a la fosforilación. Estos dos procesos son recíprocos y pueden ocurrir en sitios similares o adyacentes, modulándose respectivamente (figura 1). Así, hay evidencias de que el equilibrio dinámico entre ambos procesos regula el

¹ Comer, F. I.; Hart, G. W. *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 29179-29182.

² Helzner, H.; Reipen, T.; Schultz, M.; Kunz, H. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4495-4537.

³ Whelan, S. A.; Hart, G. W. *Methods in enzymology.* **2006**, 415, 113-133.

transporte de glicoproteínas entre el núcleo y el citosol (por ejemplo, en la ARN polimerasa II).⁴

Las proteínas glicosiladas con *N*-acetilglucosamina son cruciales en la regulación de prácticamente todos los procesos celulares, entre los que se incluyen la transducción de señales,⁵ el ciclo celular y el metabolismo, la respuesta al estrés,⁶ apoptosis⁷ y la transcripción genética.⁸ Por otro lado, la glicosilación con GlcNAc afecta a las interacciones entre proteínas así como a su actividad, estabilidad y expresión de las mismas. Además, el *O*-GlcNAc al actuar como sensor de glucosa⁹ y como mediador de la resistencia a la insulina, posee una importante implicación en la enfermedad de la diabetes.¹⁰ Tanto la hiperglucemia como la hipoglucemia por hiperinsulinismo aumentan la glicosilación con GlcNAc de proteínas que están involucradas en los procesos de transducción de señales de la insulina y, en definitiva, asociadas con la diabetes.

Adicionalmente, se sabe también que estas proteínas modificadas con β -*O*-GlcNAc juegan un papel fundamental en el sistema nervioso estando involucradas en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.¹¹ De hecho, una disminución de este tipo de glicosilación en la proteína “tau”, debido a desórdenes en el metabolismo de

⁴ Haltiwanger, R. S.; Kelly, W. G.; Roquemore, E. P.; Blomberg, M. A.; Dong, L.-Y. D.; Kreppel, L.; Chou, T.-Y.; Greis, K.; Hart, G. W. *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, *20*, 264-268.

⁵ Slawson, C.; Hart, G. W. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 631-636.

⁶ (a) Zachara, N. E.; Hart, G. W. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1673*, 13-28; (b) Fulop, N., Marchase, R.B.; Chatham, J. C. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *73*, 288-297

⁷ (a) Wells, L.; Hart, G. W. *FEBS Lett.* **2003**, *546*, 154-158; (b) Wells, L.; Whelan, S. A.; Hart, G. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *302*, 435-441.

⁸ (a) Love, D.C.; Hanover, J. A. *Sci. STKE* **2005**; (b) Comer, F. I.; Hart, G. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 161-171.

⁹ Wells, L.; Vosseller, K.; Hart, G. W. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 222-228.

¹⁰ Dias, W. B.; Hart, G. W. *Mol. BioSyst.* **2007**, *3*, 766-772.

¹¹ (a) Lefebvre, T., Guinez, C., Dehennaut, V., Beseme-Dekeyser, O., Morelle, W., Michalski, J.C. *Expert Rev. Proteomics* **2005**, *2*, 265-275; (b) Lefebvre, T.; Caillet-Boudin, M. L.; Buee, L.; Delacourte, A.; Michalski, J. C. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2003**, *535*, 189-202.

la glucosa en el cerebro, conduce a una anormal hiperfosforilación de esta proteína que forma agregados en el cerebro de pacientes de Alzheimer, traducándose así en la muerte neuronal.¹²

Como ha podido quedar demostrado en las líneas anteriores, la importancia biológica de este novedoso tipo de β -O-glicosilación es incuestionable. Sin embargo, la función estructural del GlcNAc es todavía desconocida y, hasta la fecha, apenas se dispone de información respecto a la geometría, dinámica e hidratación de los motivos β -O-GlcNAc-Ser y β -O-GlcNAc-Thr. De hecho, en la *Protein Data Bank*¹³ sólo se ha depositado una estructura cristalina con una serina glicosilada con β -O-GlcNAc.¹⁴ Esta estructura muestra el complejo entre un glicopéptido derivado de β -O-GlcNAc de secuencia FAPSNYPAL (nombrada como K3G) y el anticuerpo H-2D.^b Los autores sugieren la existencia de dos conformaciones para el enlace O-GlcNAc-Ser, cada una de similar ocupación. Este hecho experimental indica claramente un importante grado de movilidad para este enlace. En la figura 2 se muestra uno de estos conformeros.¹⁴

¹² Liu, F.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Hart, G. W.; Gong, C. X. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10804-10809.

¹³ <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

¹⁴ Glithero, A.; Tormo, J.; Haurum, J. S.; Arsequell, G.; Valencia, G.; Edwards, J.; Springer, S.; Townsend, A.; Pao, Y.-L.; Wormald, M.; Dwek, R. A.; Jones, E. Y.; Elliott, T. *Immunity* **1999**, *10*, 63-74.

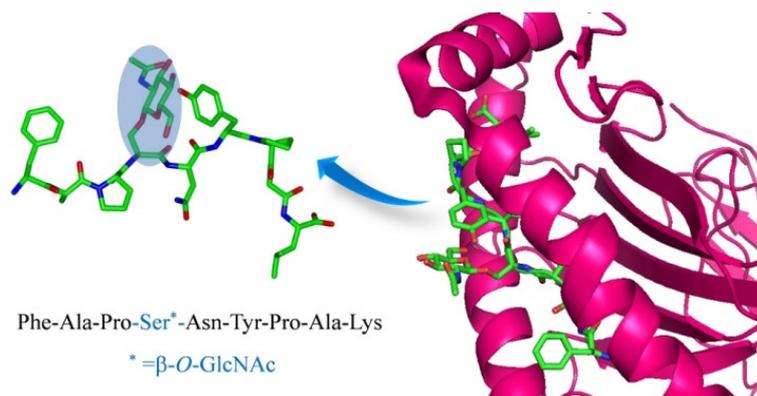


Figura 2. Única estructura cristalina encontrada en la *Protein Data Bank* (código 1QLF) que contiene un glicopéptido glicosilado con β -O-GlcNAc. La estructura muestra el complejo H-2D^b/glicopéptido.¹⁴

Por otro lado, el estudio conformacional, en disolución acuosa, de glicopéptidos que presentan el motivo β -O-GlcNAc-Ser/Thr se limita a muy pocos trabajos, que han sugerido que la glicosilación de Ser o Thr con GlcNAc promueve estructuras plegadas.¹⁵ Sin embargo, en estos casos, no hay una hipótesis clara sobre el mecanismo que podría respaldar la influencia del resto carbohidrato sobre el esqueleto peptídico.

Desde una base química, uno de los pasos fundamentales para entender la actividad biológica de estos motivos β -GlcNAc-Ser y β -GlcNAc-Thr sería estudiar sus preferencias conformacionales, así como su comportamiento dinámico y sus interacciones (si las hubiera) con el esqueleto peptídico. El modo de presentación del resto de GlcNAc podría ser también de gran importancia para establecer posibles interacciones con las correspondientes entidades moleculares.

¹⁵ (a) Wu, W. G.; Pasternack, L.; Huang, D. H.; Koeller, K. M.; Lin, C. C.; Seitz, O.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2409-2417; (b) Simanek, E. E.; Huang, D. H.; Pasternack, L.; Machajewski, T. D.; Seitz, O.; Millar, D. S.; Dyson, H. J.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11567-11575; (c) Chen, Y. X.; Du, J. T.; Zhou, L. X.; Liu, X. H.; Zhao, Y. F.; Nakanishi, H.; Li, Y. M. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 937-944.

Por todas estas razones, decidimos abordar la síntesis y el posterior análisis conformacional en disolución acuosa, por RMN y DM, de los glicopéptidos modelo más sencillos de β -O-GlcNAc-Ser/Thr. Además, siguiendo con nuestra línea de trabajo relacionada con glicopéptidos no naturales, preparamos también los correspondientes glicopéptidos derivados de los aminoácidos α -(*S*)-MeSer y α -(*3R,2S*)-MeThr (figura 3).

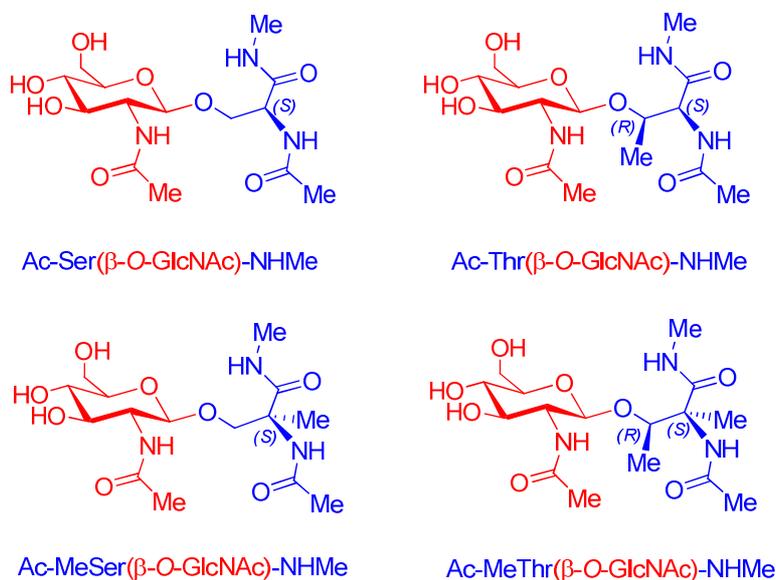


Figura 3. Glicopéptidos modelo derivados de GlcNAc objeto de estudio.

6.2. Discusión de resultados

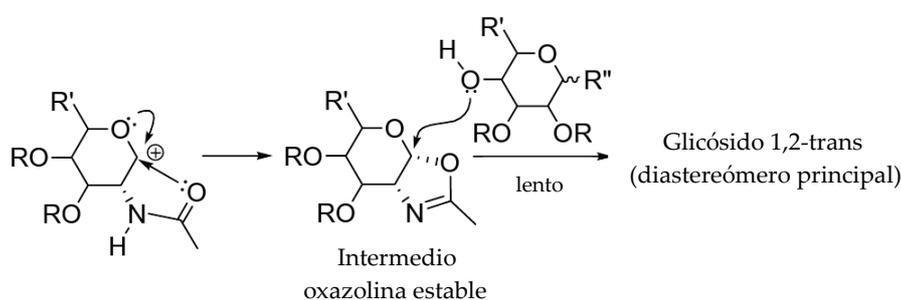
6.2.1. Síntesis

La preparación de los primeros glicopéptidos que incorporan *O*-GlcNAc data de la década de los 50.¹⁶ Sin embargo, a pesar de esta antigüedad, hasta comienzos de los años 90 no se describieron *building blocks* de aplicabilidad general para la síntesis de estas

¹⁶ Micheel, F.; Köchling, H. *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 673-676.

moléculas. Teniendo en cuenta la importante función regulatoria del GlcNAc en las proteínas modificadas, en los últimos años se ha dedicado mucha atención a la síntesis del esqueleto β -O-GlcNAc-Ser/Thr.

En la reacción de glicosilación debe conseguirse el anómero β , que a menudo está garantizado mediante la participación de un grupo vecinal en posición 2. Como la 2-acetamido-2-desoxiglucosa (GlcNAc) posee ya un grupo en dicha posición, los primeros intentos se centraron en el uso de “glicosil-dadores” basados en haluros de glucosilo derivados de 2-acetamido-2-desoxi-glucosa, adecuadamente protegidos.¹⁷ Sin embargo, los rendimientos eran pobres debido a la escasa reactividad del intermedio oxazolina formado (esquema 1).



Esquema 1. Transformación del ion oxocarbenio en el intermedio oxazolina estable en el caso de 2-acetamido-2-desoxi-“glicosil-dadores”.

Dado que la utilización de ácidos de Lewis como catalizadores incrementa ligeramente la reactividad de la oxazolina, se ha demostrado que la activación de acetatos de glucosilo con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ aumenta los rendimientos de estas reacciones para la síntesis de los derivados de β -O-GlcNAc-Ser/Thr.¹⁸ Es interesante señalar que el uso de estos

¹⁷ Jones, J. K. N.; Perry, M. B.; Shelton, B.; Walton, D. T. *Can. J. Chem.* **1961**, *39*, 1005-1016.

¹⁸ (a) Arsequell, G.; Krippner, L.; Dwek, R. A.; Wong, S. Y. C. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2383-2384; (b) Seitz, O.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8766-8776; (c) Pohl, T.; Waldmann, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6702-6710.

acetatos anoméricos como “glicosil-dadores” no requiere de la protección del ácido carboxílico del aminoácido.¹⁹ En principio, la reacción de la glucosamina peracetilada con serina o treonina protegidas proporciona de la manera más rápida los *building blocks* sustituidos con GlcNAc, minimizando la manipulación de grupos protectores. Sin embargo, la necesidad de laboriosos procedimientos de purificación, particularmente cuando la reacción se realiza a gran escala, puede ser una seria limitación.²⁰ De todos modos, en la práctica, incluso en esas condiciones de catálisis con ácidos de Lewis, este intermedio oxazolina es bastante estable y no exhibe grandes propiedades como “glicosil-dador”.

Con el propósito de obtener nuevos “glicosil-dadores” más eficientes se han investigado distintas funcionalidades en el N-2 y en posición anomérica capaces de dar el enlace β -O-glicosídico a través de un intermedio aciloxonio que no sea la 2-metiloxazolina.²¹ Así, la sustitución del grupo N-acetilo por grupos fuertemente electroatrayentes reduce la formación de esa oxazolina y se han publicado varios ejemplos de glicosilaciones con buenos rendimientos con “glicosil-dadores” protegidos con Aloc-²² Troc-²³ o Dts.²⁴ Tanto la desprotección catalizada por Pd del grupo Aloc, como la eliminación reductora del grupo Troc o Dts puede llevarse a cabo en presencia de anhídrido acético para dar lugar a la amina directamente acetilada, minimizando, de esta forma, el número de pasos y la posibilidad de reacciones secundarias. En la figura 4 se

¹⁹ Elofsson, M.; Walse, B.; Kihlberg, J. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7613-7616.

²⁰ Salvador, L. A.; Elofson, M.; Kihlberg, J. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5643-5656.

²¹ (a) Banoub, J.; Boullanger, P.; Lafont, D. *Chem. Soc. Rev.* **1992**, *92*, 1167-1195; (b) Bongat, A. F. G.; Demchenko, A. V. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 374-406.

²² Vargas-Berenguel, A.; Meldal, M.; Paulsen, H.; Bock, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1994**, 2615-2619.

²³ (a) Schultz, M.; Kunz, H. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5319-5322; (b) Meinjohanns, E.; Meldal, M.; Bock, K. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9205-9208; (c) Saha, U. K.; Schmidt, R. R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1997**, 1855-1860.

²⁴ Jensen, K. J.; Hansen, P. R.; Venugopal, D.; Barany, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3148-3155.

presenta una selección de “glicosil-dadores” adecuados para este tipo de glicosilaciones con GlcNAc.

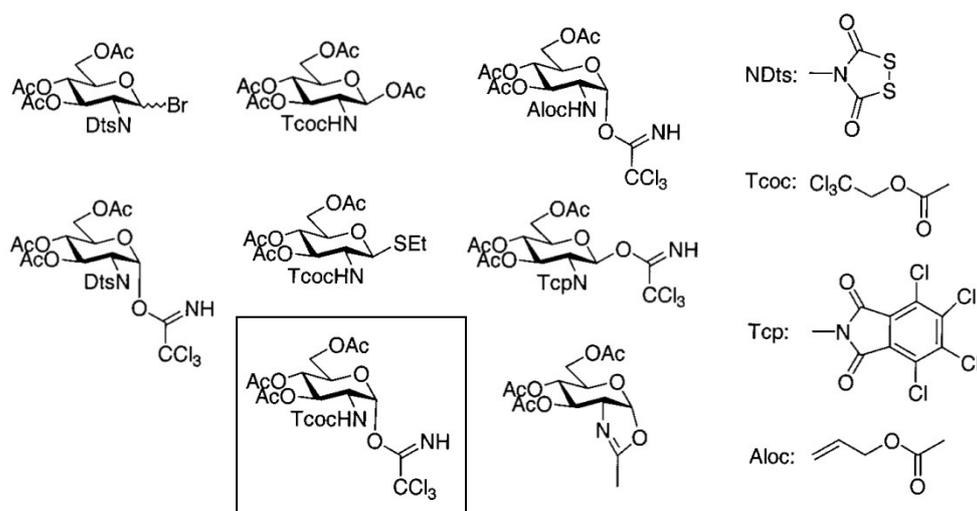


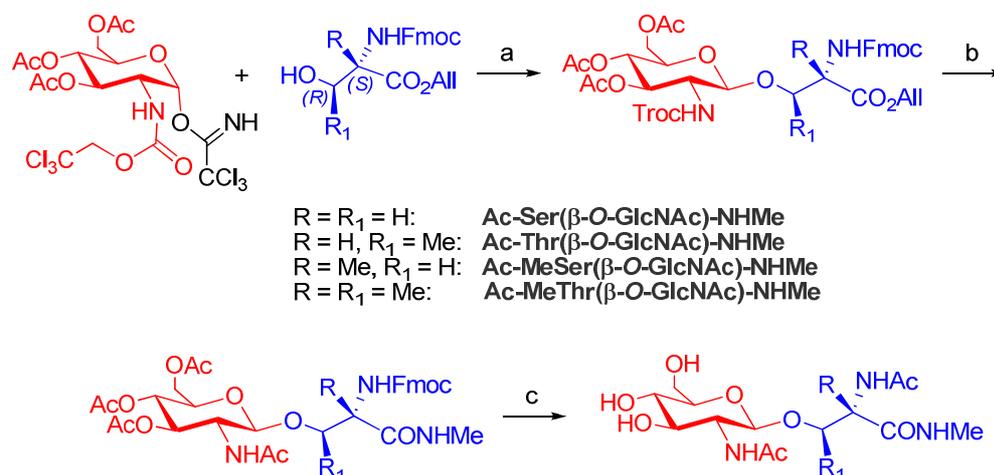
Figura 4. Algunos de los “glicosil-dadores” más comunes en las glicosilaciones con GlcNAc.

Un método nuevo y elegante para la síntesis de *O*-glicósidos que contienen este grupo 2-acetamido ha sido recientemente publicado por el grupo de Gin como C-2-amidoglicosilación.²⁵ Partiendo de glicales, que son activados mediante un reactivo formado *in situ* a partir de sulfóxido de tiantreno/anhidrido triflico, esta reacción *one-pot* proporciona los correspondientes C2-acetamidoglicósidos. Sin embargo, este procedimiento que ha sido aplicado con éxito en la síntesis de varios disacáridos, no se ha utilizado todavía en la preparación de glicopéptidos.

En nuestro caso, comenzamos primero con la síntesis de los compuestos derivados de los aminoácidos naturales, sintetizándose las diamidas de β -O-GlcNAc-Ser/Thr.

²⁵ (a) Di Bussolo, V.; Liu, J.; Huffman, L. G. J.; Gin, D. Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39, 204-207; (b) Liu, J.; Gin, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9789-9797.

Primeramente, se probó la glicosilación directa con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ de la glucosamina peracetilada con serina protegida de varias formas. De las diversas pruebas ensayadas con Fmoc-Ser-OH, Cbz-Ser-OH y Fmoc-Ser-OAll, sólo esta última dio lugar al producto buscado pero con un rendimiento muy pobre. Por ello, se optó por utilizar el tricloroacetimidato de la figura 4 con NHTroc. Dicho “glicosil-dador” se hizo reaccionar, siguiendo la metodología descrita,^{23c} con los derivados protegidos de serina y treonina, en presencia de TMSOTf como catalizador, para dar los deseados *building blocks* Fmoc-(β -O-GlcNHTroc)-Ser/Thr-OAll. Seguidamente, el grupo NHTroc se transformó en NHAc mediante reducción con Zn y acetilación *in situ* de la amina resultante en la mezcla de reacción (THF/Ac₂O/HAcO). A continuación, se desprotegió el ácido y tras el tratamiento con $\text{MeNH}_2 \cdot \text{HCl}$ se obtuvo la correspondiente metilamida. Finalmente, la eliminación del grupo Fmoc, seguida de acetilación y posterior desprotección de los grupos acetatos proporcionó las diamidas de β -O-GlcNAc-Ser/Thr objeto de estudio (esquema 2).



Esquema 2. Ruta sintética general para la síntesis de los glicopéptidos modelo de GlcNAc. (a) TMSOTf, 1 h, 25 °C (para Ser, Thr y MeSer) /AgOTf, tamiz molecular 3 Å, 15 h, 25 °C (en el caso de MeThr), CH_2Cl_2 ; (b) i. Zn, THF/Ac₂O/HAcO (3:2:1), 3-4 h; ii. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, morfolina, THF, 25 °C, 1 h; iii. $\text{MeNH}_2 \cdot \text{HCl}$, TBTU, DIEA, DMF, tamiz, 25 °C, 8 h; (c) i. Piperidina, DMF, 7 h; ii. Ac₂O/piridina, 25 °C, 3 h. iii. MeONa/MeOH, 25 °C, 1 h.

Una vez sintetizados los derivados naturales, decidimos preparar los glicopéptidos modelo de (S)- α -MeSer, (3R,2S)- α -MeThr. Para ello, se utilizó la misma estrategia sintética que antes. En primer lugar, se protegieron adecuadamente los aminoácidos no naturales²⁶ como NHFmoc y CO₂All. A continuación, en el caso de la MeSer, se realizó la glicosilación con TMSOTf, mientras que para la MeThr se quiso probar con AgOTf. En ambos casos se obtuvieron los correspondientes glicopéptidos adecuadamente protegidos con similares rendimientos (45% y 55%, respectivamente). Por último, mediante la misma química de transformación de grupos funcionales empleada antes se obtuvieron las diamidas de β -O-GlcNAc-MeSer/MeThr (esquema 2).

6.2.2. Estudios de RMN y DM

Derivados naturales: Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe y Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe

Una vez asignadas las señales de los espectros de RMN, se realizaron experimentos 1D-NOESY selectivos en D₂O (20 °C, pH=5.2) y 2D-selectivos en H₂O/D₂O (9/1) (20 °C, pH=5.2) para todos los glicopéptidos (figura 5).

²⁶ (a) Aydillo, C.; Jiménez-Osés, G.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M.; Avenoza, A. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4840-4848; (b) Aydillo, C.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2829-2834.

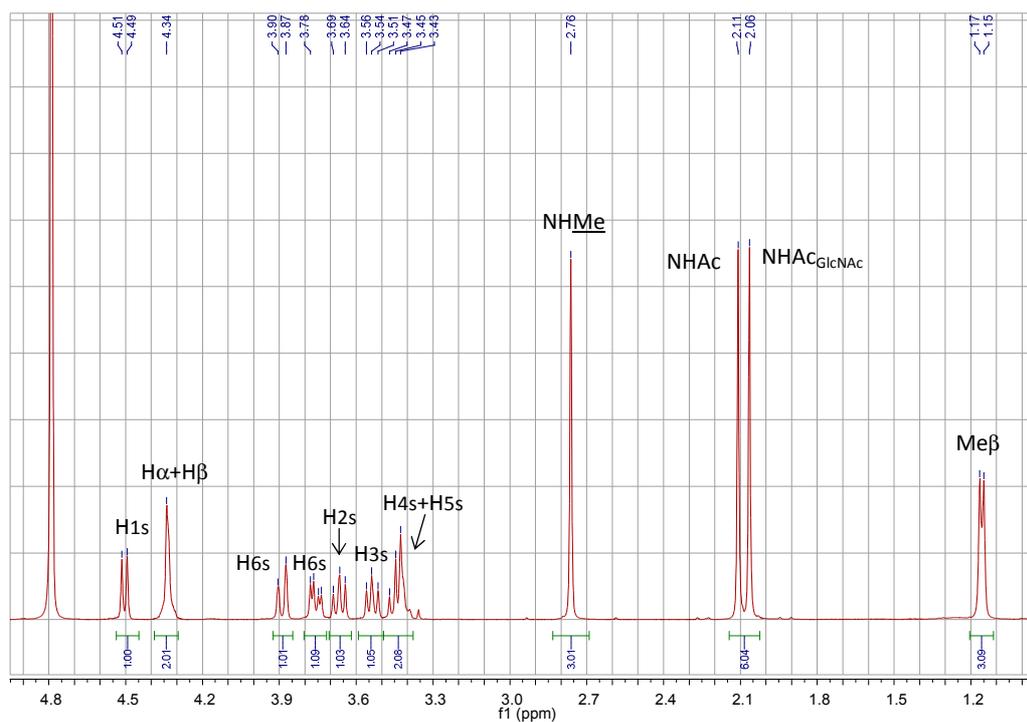


Figura 5. ^1H RMN (400 MHz) en D_2O del glicopéptido modelo **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe** con la asignación de todos sus protones.

A continuación, de los valores de NOE a distintos tiempos de mezcla se construyeron las curvas de crecimiento NOE de las que se extrajeron, desde un punto de vista cuantitativo, las correspondientes distancias protón-protón. Las distancias en las que están implicados los protones clave de las amidas se determinaron semicuantitativamente a partir de la integración de los volúmenes de los correspondientes picos de cruce (figuras 6 y 7). Además, también se midieron las constantes de acoplamiento 3J a partir del desdoblamiento de las señales de resonancia en el espectro monodimensional.

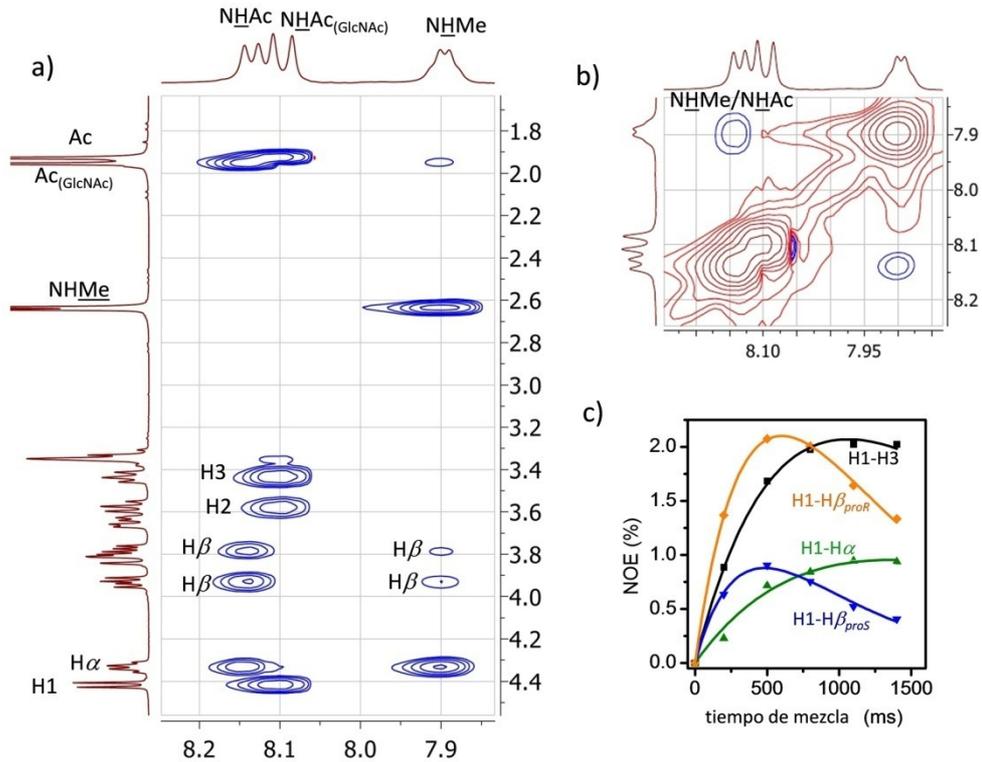


Figura 6. (a), (b) Secciones del espectro 2D-NOESY a 800 ms (400 MHz) en H_2O/D_2O (9:1) a 25 °C del compuesto Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe, mostrando los picos de cruce de las amidas. Los picos de la diagonal y los picos de cruce de intercambio que conectan los protones NH y el agua son negativos (color rojo). Los NOEs se representan como picos de cruce positivos (en color azul). (c) Curvas de crecimiento NOE para el H1s del mismo compuesto.

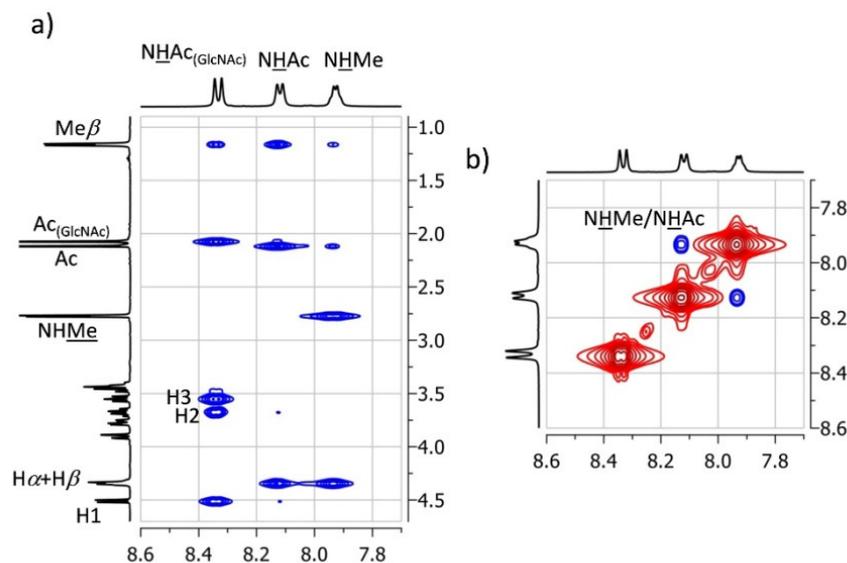


Figura 7. (a), (b) Secciones del espectro 2D-NOESY a 800 ms (400 MHz) en H₂O/D₂O (9:1) a 25 °C del compuesto **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe**, mostrando los picos de cruce de las amidas. Los picos de la diagonal y los picos de cruce de intercambio que conectan los protones NH y el agua son negativos (color rojo). Los NOEs se representan como picos de cruce positivos (en color azul).

El comportamiento conformacional de los compuestos **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe** y **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe** se estudió mediante simulaciones de DM con restricciones promediadas en el tiempo²⁷ (DM-tar), empleándose el mismo protocolo que se ha descrito en los capítulos anteriores.²⁸ Para ambos compuestos, las distancias obtenidas de los cálculos de DM-tar de 16 ns en agua explícita están de acuerdo con las distancias experimentales de RMN medidas previamente (tabla 1).

²⁷ Pearlman, D. A. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 1-16.

²⁸ (a) Corzana, F.; Busto, J. H.; Engelsen, S. B.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7864-7871; (b) Fernandez-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7042-7058.

	<i>Expl</i> ^a	<i>MD-tar</i> (agua)
$d_{H1s,H\beta\text{proS}}$	2.5	2.7
$d_{H1s,H\beta\text{proR}}$	2.2	2.4
$d_{H1s,H\alpha}$	2.9	3.1
$d_{H\alpha,H\beta\text{proS}}$	2.7	2.5
$d_{H2s,H\beta\text{proS}}$	3.4	3.6
$d_{NHMe,NHAc}$	3.0 ^b	2.9
$d_{NHAc,H\alpha}$	2.7 ^b	2.8
$d_{NHAc,H\beta\text{proS}}$	2.6 ^b	2.7
$d_{NHAc,H\beta\text{proR}}$	2.9 ^b	2.7
$d_{NHMe,H\alpha}$	2.3 ^b	2.4
$d_{NHMe,H\beta\text{proS}}$	3.4 ^b	3.2
$d_{NHMe,H\beta\text{proR}}$	3.9 ^b	3.6
$d_{NHAc(GlcNAc),H1s}$	2.4 ^b	2.5
$d_{NHAc(GlcNAc),H3s}$	2.3 ^b	2.4
$^3J_{H\alpha,H\beta\text{proS}}$	6.6	4.7
$^3J_{H\alpha,H\beta\text{proR}}$	5.2	4.3
$^3J_{H\alpha,NHAc}$	6.8	6.8
$^3J_{H2s,NHAc(GlcNAc)}$	9.4	9.1

Tabla 1. Comparación de los datos experimentales con los obtenidos de la DM-tar en agua explícita para el glicopéptido **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe**. ^aLas distancias están dadas en Å y las ³*J* en Hz. ^bDeterminadas semi-cuantitativamente por integración del volumen del pico de cruce.

El esqueleto peptídico de ambos derivados adoptó fundamentalmente conformaciones tipo PPII (47% y 43% para **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe** y **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe**, respectivamente). Sin embargo, alrededor del 20% de los conformeros mostraron también valores de los ángulos diedros ϕ_p/ψ_p correspondientes a estructuras de tipo hélice (figura 8). Este resultado concuerda con el NOE débil-medio observado entre los protones NH de las amidas del esqueleto peptídico (figuras 6 y 7).

Por otro lado, el elevado valor de ³*J* (9.4 Hz para ambos compuestos) sugiere que la orientación relativa del grupo N-acetilo respecto al esqueleto carbohidrato parece estar esencialmente fijada. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por otros

autores para carbohidratos con β -O-GlcNAc²⁹ o derivados de glicopéptidos que incorporan β -O-GalNAc.³⁰

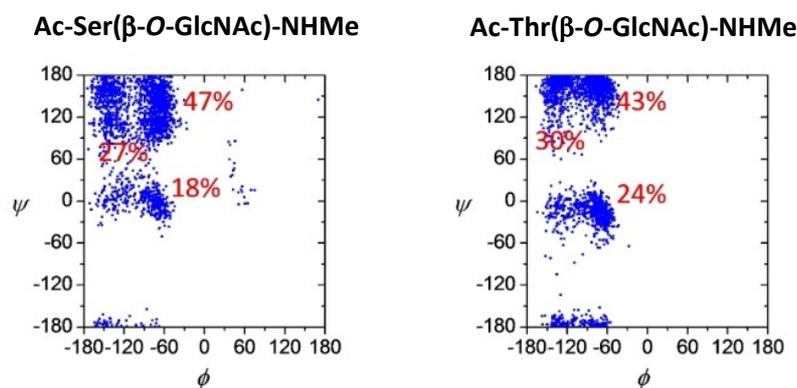


Figura 8. Distribución de los ángulos diedros ϕ_p/ψ_p obtenida de los cálculos de DM-tar en agua explícita para los glicopéptidos derivados de Ser y Thr.

Con respecto a la cadena lateral (ángulo de torsión χ^1), los cálculos sugieren que la rotación alrededor de este ángulo en el derivado de Thr está restringida en parte, con valores para χ^1 cercanos a 60° (figura 9a). Aunque para el compuesto **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe** no pudimos medir experimentalmente el valor de $^3J_{H\alpha,H\beta}$ debido al solapamiento de las señales en el espectro, para el motivo β -O-GlcNAc-Thr en un glicopéptido derivado de la ARN polimerasa II se obtuvo un valor para $^3J_{H\alpha,H\beta}$ de 1.8 Hz.^{15b} Por el contrario, la cadena lateral del glicopéptido de Ser es bastante flexible, mostrando una significativa población de cada una de las conformaciones alternadas para este ángulo de torsión. Este resultado concuerda perfectamente con los valores medios de $^3J_{H\alpha,H\beta}$ (6.6 y 5.2 Hz) observados experimentalmente para **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe**.

²⁹ Mobli, M.; Almond, A. *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 2243–2251.

³⁰ Coltart, D. M.; Royyuru, A. K.; Williams, L. J.; Glunz, P. W.; Sames, D.; Kuduk, S. D.; Schwarz, J. B.; Chen, X. T.; Danishefsky, S. J.; Live, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9833–9844.

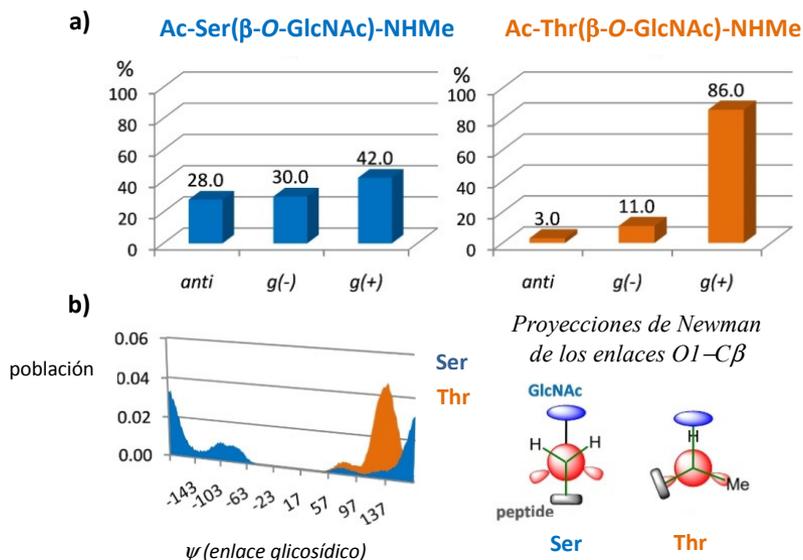


Figura 9. (a) Distribución para χ^1 obtenida de las DM-tar para **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe** (izquierda) y **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe** (derecha). (b) Distribución del ángulo ψ_s obtenida de las DM-tar para los compuestos citados; se muestra también la proyección de Newman del enlace C β -O1.

Por lo que respecta al enlace glicosídico, se encontró que el ángulo diedro ϕ_s (O5-C1-O1-C β) es bastante rígido, con valores alrededor de -60° en ambos compuestos, en total acuerdo con el efecto exo-anomérico.³¹ Sin embargo, es importante destacar que los derivados de Ser y Thr presentaron un comportamiento considerablemente distinto en cuanto al ángulo diedro ψ_s (figura 9b). Así, para el compuesto **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe**, este ángulo mostró valores bien definidos en torno a 120° - 140° , lo que resulta en una conformación eclipsada para los enlaces H β -C β y O1-C1. Esta conformación evita las repulsiones estéricas entre el grupo metilo del C β y el proton anomérico H1, que están presentes cuando este ángulo es cercano a 180° .

³¹ Thatcher, G. R. J. *The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects*, American Chemical Society, Washington, DC, **1993**.

Cabe destacar que esta conformación también se ha observado en el glicopéptido derivado de la ARN polimerasa II, hecho éste corroborado por el fuerte NOE experimental entre los protones H1-H β , exclusivo de esta conformación eclipsada.^{15b} Al contrario que en el caso del compuesto de Thr, para el compuesto **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe** se vió que el ángulo ψ_s era más flexible, con una disposición mayoritaria de tipo *anti* para el residuo GlcNAc y el resto peptídico (figura 9b). Los diferentes conformeros encontrados en estas dos moléculas para el enlace glicosídico estaban de acuerdo con los mapas adiabáticos de energía calculados con el campo de fuerzas AMBER³² (figura 10).

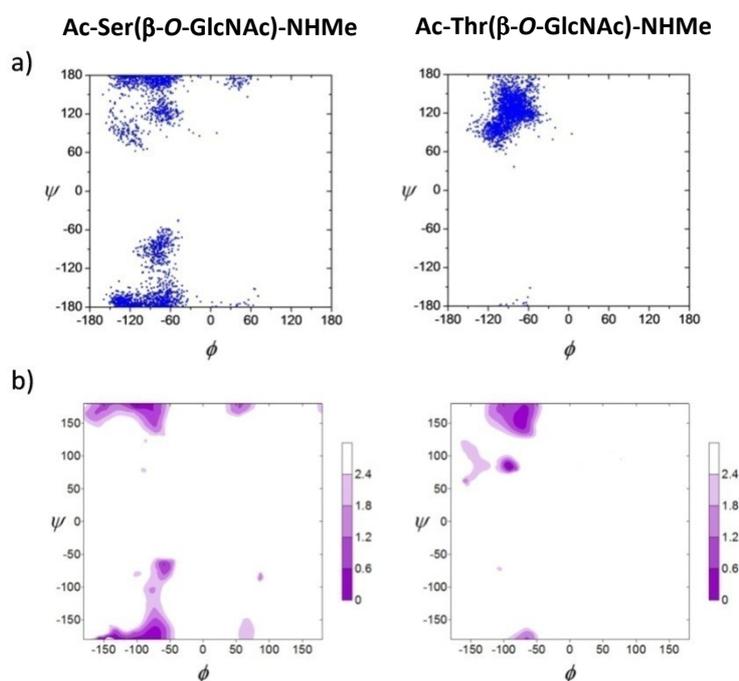


Figura 10. (a) Distribución de los diedros ϕ_s/ψ_s del enlace glicosídico obtenida de los cálculos de DM-tar de 16 ns en agua explícita (TIP3P) para los glicopéptidos **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe** y **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe**. (b) Mapas adiabáticos calculados con el campo de fuerzas AMBER para los enlaces glicosídicos de ambos compuestos. Los niveles de energía relativa se trazaron desde 0.0 hasta 2.4 Kcal·mol⁻¹ con un espaciado de 0.6 Kcal·mol⁻¹.

³² Wang, J.; Cieplak, P.; Kollman, P. A. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1049-1074.

Curiosamente, aunque el enlace glicosídico y la naturaleza química del carbohidrato es completamente diferente, debe mencionarse que nuestro grupo ha publicado previamente la existencia de una conformación eclipsada para el ángulo ψ_s en glicopéptidos que contienen α -GalNAc-Thr.³³ Este comportamiento similar podría indicar que las tendencias conformacionales de ψ_s en O-glicopéptidos están determinadas fundamentalmente por la presencia (o no) del grupo metilo del residuo de Thr, con independencia de la naturaleza química del resto carbohidrato y de la configuración del centro anomérico.

La figura 11 muestra la superposición de las conformaciones obtenidas de la DM-tar que reproducen cuantitativamente los datos experimentales de RMN. Estos valores tan drásticamente diferentes de ψ_s entre los compuestos **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe** y **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe** son responsables de la existencia de una orientación relativa completamente distinta entre el resto carbohidrato y peptídico, lo cual afecta al modo de presentación del residuo de GlcNAc.

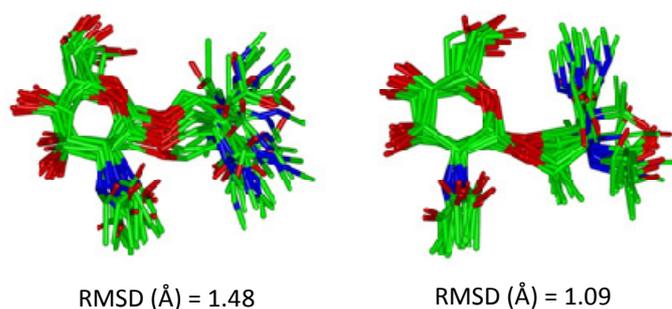


Figura 11. Superposición de estructuras obtenidas de los cálculos de DM-tar para **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe** (izquierda) y **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe** (derecha).

³³ Corzana, F.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; de Luis, M. G.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9458-9467.

De hecho, mientras que para el derivado **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe** el grupo acetilo de la unidad de GlcNAc está próximo al esqueleto peptídico, para su análogo de Thr (**Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe**) es el grupo hidroximetilo del resto carbohidrato el que está más cercano al péptido, lo cual permite la formación de un enlace de hidrógeno entre dicho grupo hidroximetilo del azúcar y el grupo carbonilo de la Thr (figura 12). Este enlace de hidrógeno está presente alrededor del 45% del tiempo total de los 16 ns de la trayectoria. Sin embargo, no se observó la existencia de enlace de hidrógeno en un porcentaje superior al 5% del tiempo total de la trayectoria para el compuesto **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe**.

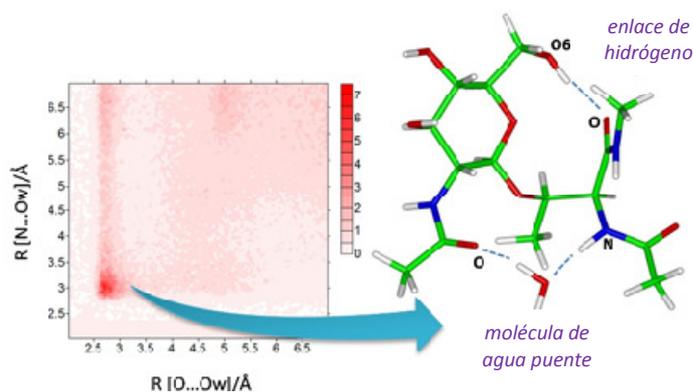


Figura 12. Molécula de agua puente y enlace de hidrógeno encontrados entre las partes carbohidrato y peptídica para el compuesto **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe**.

Por otro lado, existen distintos estudios^{29,34} que introducen nuevos elementos para lograr un mejor entendimiento sobre el papel de las moléculas de agua en la organización de la estructura de polisacáridos, y en el plegamiento de proteínas y de pequeños ácidos nucleicos. Esto apunta hacia una nueva vía para la observación de los efectos del agua en

³⁴ (a) Sorin, E. J.; Rhee, Y. M.; Pande, V. S. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 2516-2524; (b) Almond, A.; Sheehan, J. K. *Glycobiology* **2003**, *13*, 255-264; (c) Rhee, Y. M.; Sorin, E. J.; Jayachandran, G.; Lindahl, E.; Pande, V. S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6456-6461.

estas estructuras. Sin embargo, se han publicado pocos ejemplos relacionados con el papel que juega el agua en modular las interacciones entre el carbohidrato y el esqueleto peptídico en glicopéptidos.^{28,33} Estas moléculas de agua podrían ser claves modificando la orientación y/o la flexibilidad de los restos carbohidrato y en consecuencia afectando su capacidad de disponerse para interactuar con sus dianas biológicas.

Por ello, decidimos investigar la hidratación anisotrópica de ambos compuestos **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe** y **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe** siguiendo nuestro protocolo descrito previamente.²⁸ De esta manera, se calcularon las funciones de distribución radial (RDF) en 2D normalizadas para todos los posibles sitios de densidad de agua compartida ($O \cdots O_w \cdots O$ y $O \cdots O_w \cdots N$) donde O_w es el oxígeno del agua y O y N son los átomos de oxígeno y nitrógeno del soluto.³⁵ Estas funciones RDF dan la probabilidad de encontrar una molécula de agua a unas distancias dadas de un par de heteroátomos del soluto, en relación a la probabilidad esperada para una distribución de agua pura.

En la figura 12 (ver página anterior) se presenta la función de distribución radial 2D obtenida para el átomo de oxígeno del grupo acetilo del GlcNAc y el nitrógeno de la Thr del compuesto **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe**. La densidad de agua encontrada en la primera esfera de hidratación de estos dos átomos, a una distancia de ambos de aproximadamente 2.8 Å fue mayor que la unidad, lo que reveló la existencia de moléculas de agua puente entre ellos. Hay que destacar que esta densidad de agua a dicha distancia fue de 7 veces la densidad del agua pura. En este sentido, en un carbohidrato de GlcNAc, también se ha encontrado previamente²⁹ mediante cálculos *ab initio*, un puente de agua en el que está involucrado el grupo *N*-acetilo.

³⁵ Andersson, C.; Engelsen, S. B. *J. Mol. Graph. Model.* **1999**, *17*, 101-105.

Por otro lado, aunque este puente de agua observado en el glicopéptido **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe** también estaba presente en el derivado **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe**, en este caso, la densidad de agua encontrada fue menor, cercana al doble de la densidad de agua pura. Esta diferencia probablemente se deba tanto a la distinta flexibilidad de las cadenas laterales, como a la diferente orientación de los enlaces glicosídicos. También merece la pena señalar que, para ambos compuestos, esta densidad de agua encontrada es más persistente (mayor densidad y tiempos de residencia más altos), en concreto 1.5 veces, cuando están presentes las estructuras de tipo hélice. Además, tanto el enlace de hidrógeno como una molécula de agua puente se encontraron simultáneamente alrededor del 20% del tiempo total de la trayectoria de la DM-tar.

Por tanto, como conclusión, proponemos un modelo simple y novedoso para explicar la diferente orientación relativa del esqueleto peptídico y la disposición espacial de los residuos β -O-GlcNAc-Thr/Ser. Las interacciones péptido-carbohidrato están, por lo tanto, moduladas no sólo por enlaces de hidrógeno específicos,³⁶ sino también por la existencia de moléculas de agua puente en puntos clave, como ha quedado demostrado en los párrafos precedentes. De este modo, la presencia de estos puentes de agua podría además tener importantes implicaciones biológicas, proporcionando a los residuos de GlcNAc la orientación necesaria para interactuar con sus receptores biológicos.

Derivados NO naturales: Ac-MeSer(β -O-GlcNAc)-NHMe y Ac-MeThr(β -O-GlcNAc)-NHMe

Una vez analizado el comportamiento conformacional de los derivados naturales decidimos hacer lo mismo con los glicopéptidos modelo de **Ac-MeSer(β -O-GlcNAc)-**

³⁶ Shuman, J.; Campbell, A. P.; Koganty, R. R.; Logenecker, B. M. *J. Pept. Res.* **2003**, *61*, 91-108.

NHMe, y Ac-MeThr(β -O-GlcNAc)-NHMe para observar cómo afecta la incorporación de los aminoácidos no naturales en las preferencias conformacionales del sistema.

Así, se siguió el mismo protocolo comentado anteriormente, combinando experimentos de RMN con cálculos de DM.²⁸

Una vez asignados los distintos espectros, se llevó a cabo el análisis conformacional en disolución acuosa de estos compuestos. A modo de ejemplo, en la figura 13 se muestra el espectro de protón para el derivado Ac-MeSer(β -O-GlcNAc)-NHMe.

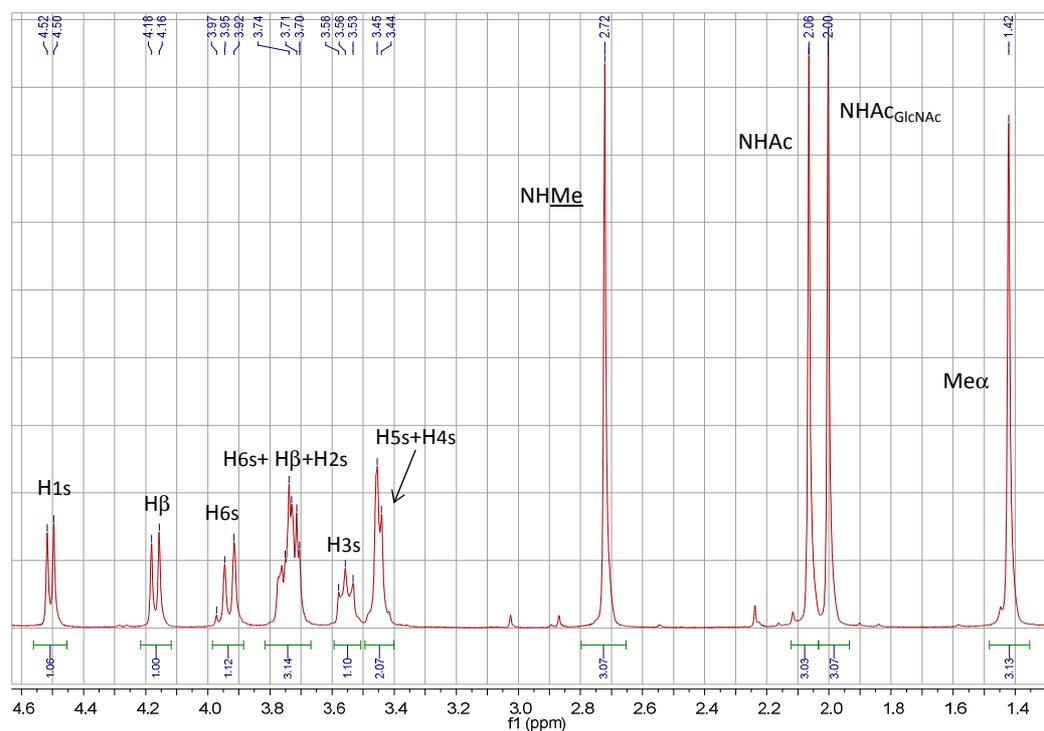


Figura 13. ^1H RMN (400 MHz) en D_2O del glicopéptido Ac-MeSer(β -O-GlcNAc)-NHMe con la asignación de todos sus protones.

Las distancias obtenidas de los cálculos de DM-tar de 16 ns en agua explícita están de acuerdo con las distancias experimentales de RMN medidas previamente. En ambos derivados, el esqueleto peptídico adoptó de forma muy mayoritaria conformaciones de tipo α -hélice (88% y 79% para **Ac-MeSer(β -O-GlcNAc)-NHMe** y **Ac-MeThr(β -O-GlcNAc)-NHMe**, respectivamente). En el caso del glicopéptido de MeSer se observó la existencia tanto de α -hélice dextrógira ($\alpha_D=56\%$) como levógira ($\alpha_L=32\%$) mientras que para el de MeThr la α_D fue la única detectada (figura 14).

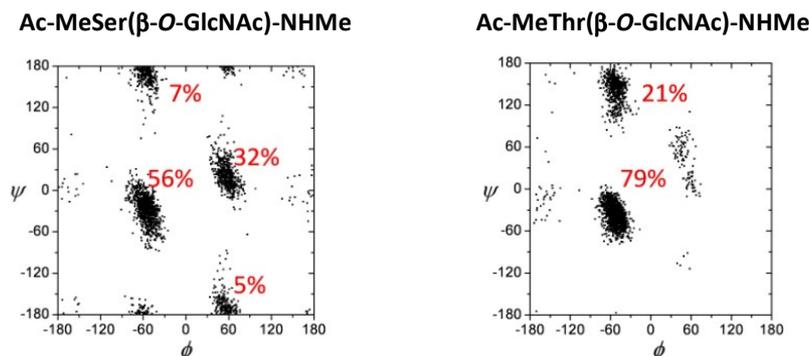


Figura 14. Distribución de los ángulos diedros ϕ_p/ψ_p obtenida de los cálculos de DM-tar para los compuestos **Ac-MeSer(β -O-GlcNAc)-NHMe** (izquierda) y **Ac-MeThr(β -O-GlcNAc)-NHMe** (derecha).

Este resultado concuerda perfectamente con el fuerte NOE observado entre los protones NH de las amidas del esqueleto peptídico (figura 15) y se explica por la presencia, en ambos casos, del grupo metilo en posición α del aminoácido. Este hecho corrobora la conclusión a la que hemos llegado en el primer capítulo de “Discusión de Resultados”,^{28b} según la cual la incorporación de dicho grupo metilo fuerza al glicopéptido modelo a adoptar conformaciones plegadas.

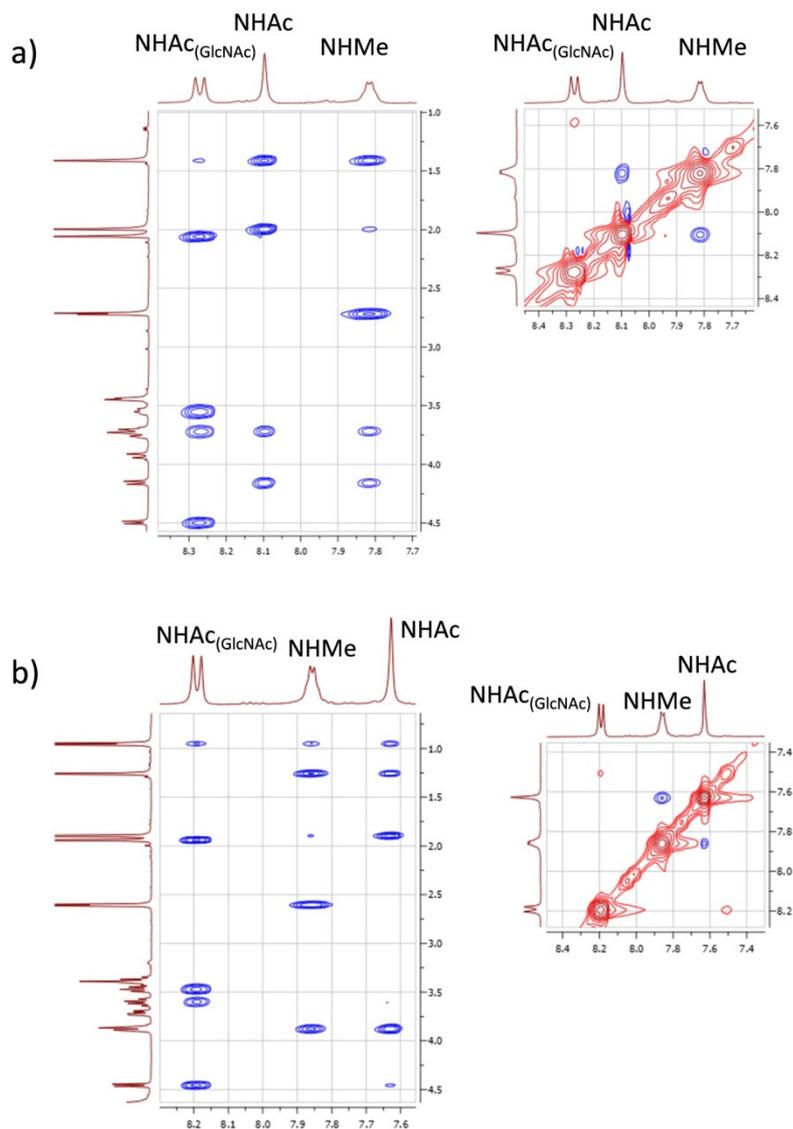


Figura 15. Secciones del espectro 2D-NOESY a 800 ms (400 MHz) en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) a 25 °C y pH = 5.2 de los compuestos **Ac-MeSer(β -O-GlcNAc)-NHMe** (a) y **Ac-MeThr(β -O-GlcNAc)-NHMe** (b), mostrando los picos de cruce de las amidas. Los picos de la diagonal y los picos de cruce de intercambio que conectan los protones NH y el agua son negativos (color rojo). Los NOEs se representan como picos de cruce positivos (en color azul).

Con respecto a la cadena lateral (ángulo de torsión χ^1), los cálculos ponen de manifiesto que la rotación alrededor de este ángulo en el derivado de MeThr está totalmente restringida, con valores para χ^1 cercanos a -60° (figura 16 derecha). Sin embargo, para su análogo natural, si bien existía también mayoritariamente una única conformación, ésta era la $g(+)$ con $\chi^1 \approx 60^\circ$. Por el contrario, la cadena lateral del glicopéptido de MeSer es bastante flexible, mostrando una significativa población de cada una de las conformaciones alternadas para este ángulo de torsión (figura 16 izquierda), al igual que en el caso del compuesto **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe**, antes descrito.

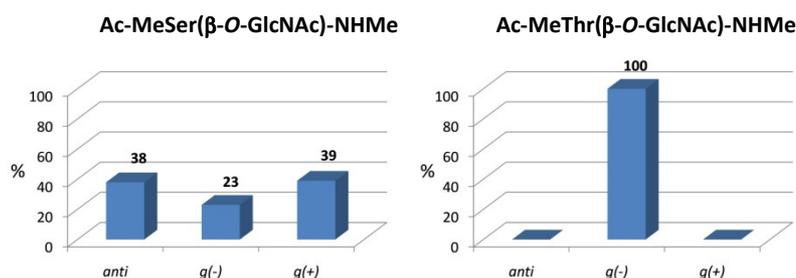


Figura 16. Distribución para χ^1 obtenida de las DM-tar para **Ac-MeSer(β -O-GlcNAc)-NHMe** (izquierda) y **Ac-MeThr(β -O-GlcNAc)-NHMe** (derecha).

Por lo que respecta al enlace glicosídico se observó la misma tendencia que la comentada previamente para los análogos naturales. Se encontró que el ángulo diedro ϕ_s (O5-C1-O1-C β) es bastante rígido, con valores alrededor de -60° en ambos compuestos, en total acuerdo con el efecto exo-anomérico. Como ocurría para los derivados **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe** y **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe**, es importante destacar que los glicopéptidos de MeSer y MeThr presentaron también un comportamiento considerablemente distinto en cuanto al ángulo diedro ψ_s (figura 17a). Para el primero, se vió que el enlace glicosídico adoptaba una disposición mayoritaria alternada ($\psi_s \approx 180^\circ$). Sin embargo, para el compuesto **Ac-MeThr(β -O-GlcNAc)-NHMe**, este ángulo mostró

valores bien definidos en torno a 120° - 140° , lo que resulta en una conformación eclipsada para los enlaces $H\beta-C\beta$ y $O1-C1$, y el enlace glicosídico fue bastante rígido. Esto está de acuerdo con la configuración *R* del $C\beta$ que soporta el grupo metilo, como se observaba en el capítulo 1 de la Discusión.^{28b} Como se ha comentado previamente, esa conformación con $\psi_s \approx 130^\circ$ evita las repulsiones estéricas entre el grupo metilo del $C\beta$ y el proton anomérico H1, que sí estarían presentes si dicho ángulo se acercara a 180° . Una vez más, este comportamiento similar corrobora las tendencias conformacionales de ψ_s en *O*-glicopéptidos, que están determinadas fundamentalmente por la presencia (o no) del grupo metilo del residuo de Thr.

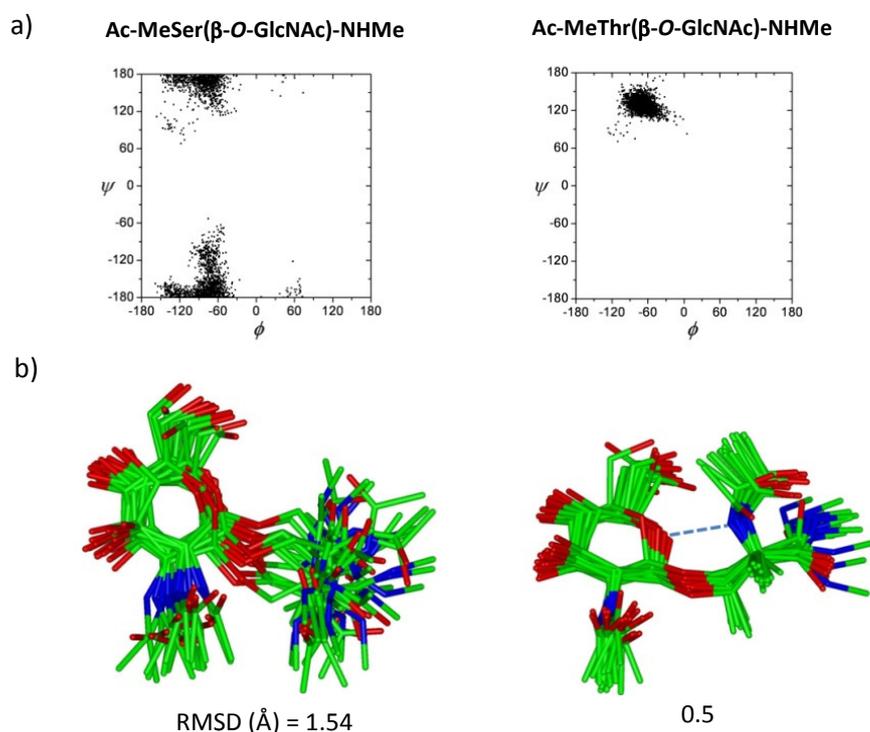


Figura 17. (a) Distribución de los ángulos diedros ϕ_s/ψ_s obtenida de los cálculos de DM-tar de 16 ns en agua explícita para los glicopéptidos **Ac-MeSer(β -O-GlcNAc)-NHMe** (izquierda) y **Ac-MeThr(β -O-GlcNAc)-NHMe** (derecha). (b) Superposición de estructuras obtenidas de los cálculos de DM-tar para **Ac-MeSer(β -O-GlcNAc)-NHMe** (izquierda) y **Ac-MeThr(β -O-GlcNAc)-NHMe** (derecha).

La figura 17b muestra la superposición de las conformaciones obtenidas de la DM-tar que reproducen cuantitativamente los datos experimentales de RMN. Las conclusiones son similares a las observadas para los análogos naturales. Así, las diferencias en el valor de ψ_s entre los compuestos **Ac-MeSer(β -O-GlcNAc)-NHMe** y **Ac-MeThr(β -O-GlcNAc)-NHMe** son responsables de la existencia de una orientación relativa totalmente distinta entre el resto carbohidrato y peptídico, lo cual afecta al modo de presentación del residuo de GlcNAc. De esta manera, mientras que para el derivado **Ac-MeSer(β -O-GlcNAc)-NHMe** el grupo acetilo del GlcNAc está próximo al esqueleto peptídico, para su análogo de MeThr, es el grupo hidroximetil del resto carbohidrato el que está más cercano al péptido. Como consecuencia de esta diferente disposición, en el glicopéptido de MeThr se detecta un enlace de hidrógeno entre el O5 endocíclico del azúcar y el N2 del esqueleto peptídico. Este enlace de hidrógeno está presente un 60% del tiempo total de la trayectoria.

Conviene señalar que la alta flexibilidad del derivado de MeSer, es responsable de la ausencia de enlaces de hidrógeno significativos entre la parte peptídica y carbohidrato. Además, el “bolsillo de agua” comentado para los derivados **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe** y **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe** -entre el oxígeno carbonílico del grupo acetamido del GalNAc y el nitrógeno del aminoácido- aparece ahora también pero con una densidad de tan solo dos veces superior a la encontrada para el agua pura. De hecho, el resultado es muy similar al encontrado previamente para su análogo natural **Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe**. Además, esta interacción por moléculas de agua puente entre la parte peptídica y carbohidrato no existe en el derivado de **Ac-MeThr(β -O-GlcNAc)-NHMe** debido a que ahora la cadena lateral adopta una conformación $g(-)$, la cual aleja el grupo acetamido del GlcNAc del NH de la MeThr.

Por último, como continuación de este trabajo y más allá de los límites de esta Tesis Doctoral, se pretende hacer interaccionar todos estos glicopéptidos con un receptor sintético altamente selectivo para β -O-GlcNAc³⁷ (figura 18) capaz de unirse a este carbohidrato en agua mediante interacciones no covalentes. De esta manera, se realizarían estudios de competitividad en el reconocimiento de todos los glicopéptidos modelo para evaluar también el efecto de la introducción de los aminoácidos no naturales en la interacción de estas moléculas con sus dianas biológicas.

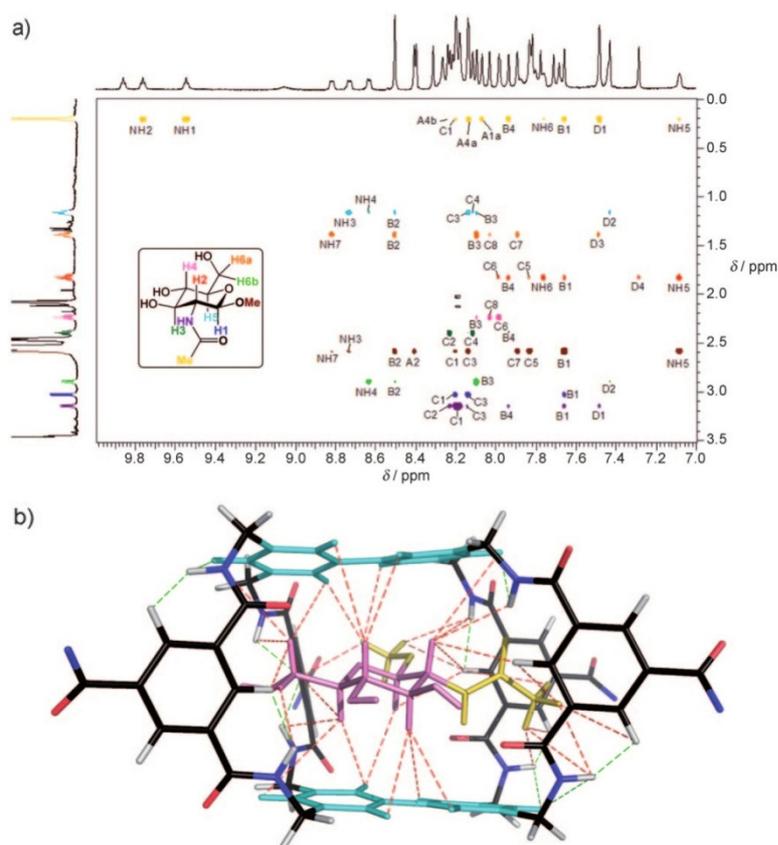


Figura 18. (a) Espectro tNOE entre la lectina sintética de Davis y el β -O-GlcNAc-OMe. (b) Estructura propuesta para el complejo lectina- β -O-GlcNAc-OMe (figura tomada de la referencia 37).

³⁷ Ferrand, Y.; Klein, E.; Barwell, N. P.; Crump, M. P.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C.; Boons, G.-J.; Ingale, S.; Davis, A. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1775-1779.

En nuestro caso, se utilizarán técnicas de RMN, como los experimentos de NOE transferido (tr-NOE) que permiten conocer la conformación del glicopéptido cuando forma parte del complejo ligando-receptor y los experimentos de transferencia de magnetización (experimentos STD) que nos dan información sobre las zonas del ligando que están directamente unidas al centro activo de la enzima (figura 19).³⁸ Además, los experimentos de competitividad comentados entre los derivados naturales y los no naturales nos permitirán determinar qué elementos son decisivos para el reconocimiento molecular por este tipo de receptores.

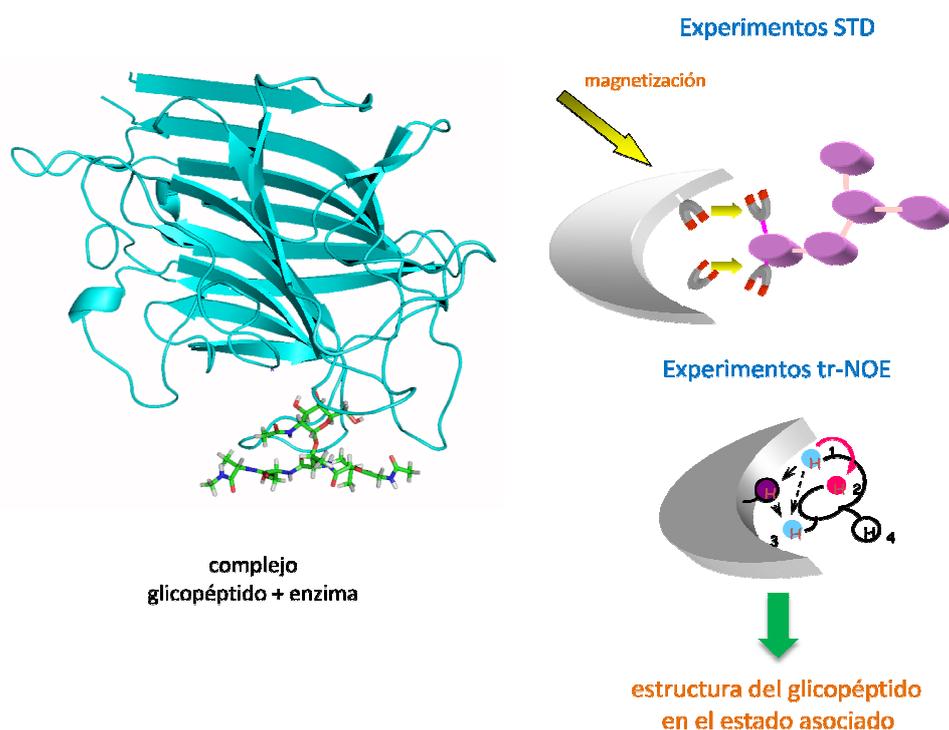


Figura 19. Representación esquemática de las dos técnicas de RMN que se emplearán en el reconocimiento molecular de los glicopéptidos estudiados.

³⁸ Meyer, B.; Peters, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 864-890.

7

Conclusiones

Las conclusiones más relevantes de la presente Tesis Doctoral son:

1.- Se ha realizado la síntesis y el estudio conformacional en disolución acuosa de diferentes diamidas de α -metil- α -aminoácidos derivados de Ser, Thr y β -hidroxiciclobutan- α -aminoácidos, así como de sus correspondientes β -*O*-glucopéptidos modelo. Este estudio reveló que la presencia de un grupo metilo en posición α del aminoácido fuerza al péptido modelo a adoptar conformaciones plegadas de tipo hélice. Estas conformaciones plegadas son especialmente significativas para los derivados que incorporan la estructura de ciclobutano. Esta característica también se observó para los correspondientes glucopéptidos modelo, lo cual indica que es el grupo metilo en posición α y no la β -*O*-glucosilación lo que determina en gran medida las preferencias conformacionales de estas moléculas. Por otro lado, se observaron experimentalmente conformaciones atípicas del enlace glicosídico. Así, cuando un grupo metilo está localizado en el C β con configuración *R*, el enlace glicosídico es bastante rígido. Sin embargo, cuando dicho carbono muestra configuración *S* se observa un alto grado de flexibilidad en el enlace glicosídico, mostrando el ángulo ψ_s tanto conformaciones alternadas como eclipsadas. Además, algunos derivados exhibieron valores inusuales del ángulo diedro ϕ_s , bastante apartados del valor de -60° que cabría esperar para un enlace β -*O*-glicosídico convencional. En este sentido, las diferentes conformaciones exploradas por estas moléculas podrían ser utilizadas como herramientas útiles para obtener sistemas con preferencias conformacionales “a la carta”.

2.- Se ha llevado a cabo la síntesis y el análisis conformacional de péptidos y glicopéptidos de mayor tamaño que incorporan la secuencia Xaa-Ala-Ala. En líneas generales, las conclusiones observadas corroboran las expuestas anteriormente con lo que

la elongación de la cadena peptídica no parece afectar drásticamente las preferencias conformacionales de los glicopéptidos modelo. Cabe destacar que, al contrario de lo que ocurre en el caso de péptidos derivados de aminoácidos naturales, la β -*O*-glucosilación de **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe** es responsable de la ruptura de la conformación plegada que adopta el péptido sin glicosilar.

3.- Se ha sintetizado el glicopéptido de interés biológico con la secuencia de consenso Cys-Ala-Ser-Ser-Pro-Cys presente en dominios del factor de crecimiento epidérmico. Además, se ha realizado la síntesis de su análogo no natural donde el primer residuo de Ser ha sido sustituido por MeSer con el fin de observar la influencia de la incorporación de un aminoácido no natural. Finalmente, también se ha sintetizado el correspondiente péptido con MeSer sin glicosilar para observar el efecto de la β -*O*-glucosilación.

4.- Se ha llevado a cabo la síntesis y el análisis conformacional de las diamidas de los glicopéptidos derivados de β -*O*-GlcNAc-Ser/Thr. Con este trabajo, se ha propuesto un modelo simple y novedoso para explicar la diferente orientación relativa del esqueleto peptídico y la orientación espacial de los motivos anteriores. Las interacciones péptido-carbohidrato están moduladas no sólo por enlaces de hidrógeno específicos, sino también por la existencia de moléculas de agua puente en puntos clave. La presencia de estos puentes de agua podría además tener importantes implicaciones biológicas, proporcionando a los residuos de GlcNAc el modo de presentación necesario para interactuar con sus receptores biológicos. Adicionalmente, también se ha realizado la síntesis y el análisis conformacional de los mismos derivados con β -*O*-GlcNAc pero sustituyendo los aminoácidos naturales Ser/Thr por sus análogos no naturales (*S*)- α -

MeSer y (3*R*,2*S*)- α -MeThr. Los resultados son similares a los anteriores y revelan que la alta flexibilidad del compuesto con MeSer es responsable de la ausencia de enlaces de hidrógeno significativos entre la parte peptídica y carbohidrato mientras que sí se observa el “bolsillo de agua” entre ambos residuos. Por su parte, el compuesto **Ac-MeThr(β -O-GlcNAc)-NHMe** es muy rígido y no existen moléculas de agua puente sino una interacción mediante enlace de hidrógeno entre la cadena peptídica y el resto carbohidrato.

Los resultados obtenidos durante la realización de la presente Tesis Doctoral se han plasmado, hasta el momento, en los siguientes trabajos:

ARTÍCULOS EN PUBLICACIONES CIENTÍFICAS:

“Non-natural Amino Acids as Modulating Agents of the Conformational Space of Model Glycopeptides”. Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7042-7058.

“Stabilizing Unusal Conformations in Small Peptides and Glucopeptides using a Hydroxilated Cyclobutane Amino Acid”. Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2885-2893.

“Insights into the Geometrical Features Underlying β -O-GlcNAc Glycosylation: Water Pockets Drastically Modulate the Interactions between the Carbohydrate and the Peptide Backbone”. Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Jiménez-Barbero, J.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7297-7301.

“Conformational Effects of the Non-natural α -Methylserine on Small Peptides and Glycopeptides”. Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *J. Org. Chem.* **2009**, enviado.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS CIENTÍFICOS:

Comunicación en panel: “Síntesis y Análisis Estructural de Glicoaminoácidos Conformacionalmente Restringidos por Glicosidación de Ciclobutan- α -aminoácidos Análogos de Serina”

Fernández-Tejada, A.; Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Pérez-Fernández, M. “XXX Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química (RSEQ)”, celebrada en Lugo, del 19 al 23 de septiembre de 2005.

Comunicación oral: “Are the Hydrogen Bonds Truly Responsible for the Defined Conformation of the α -GalNAc-Ser/Thr Linkages?”

Corzana, F.; Busto, J. H.; Fernández-Tejada, A.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Peregrina, J. M.; Avenzoza, A. “XXIII International Carbohydrate Symposium” celebrado en Whistler (Canadá), del 23 al 28 de julio de 2006.

Comunicación en panel: “Synthesis and Conformational Analysis of Model β -O-Glucopeptides Derived from Non-natural α -MeSer and c_4 Ser Diamide”.

Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; J.; Peregrina, J. M.; Avenzoza, A. “VIII Jornadas de Carbohidratos (RSEQ)”, celebradas en Alcalá de Henares, del 13 al 15 de septiembre de 2006.

Comunicación en panel: “Síntesis y Análisis Conformacional de Diamidas de β -O-Glicoaminoácidos No Naturales Derivados de α -MeSer y α -MeThr”.

Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; J.; Peregrina, J. M.; Avenzoza, A. “XXXI Reunión Bienal de la RSEQ”, celebrada en Toledo, del 9 al 14 de septiembre de 2007.

Comunicación oral: “Stabilizing Unusual Conformations in Peptides and Glcopeptides using a Cyclobutane α -Amino Acid”

Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; J.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. “V Simposium de Investigadores Jóvenes RSEQ-Sigma Aldrich” celebrado en Santiago de Compostela, del 9 al 12 de noviembre de 2008.

Comunicación en panel: “Synthesis and Conformational Analysis of β -*O*-GlcNAc-Ser/Thr derivatives”

Fernández-Tejada, A.; Corzana, F.; Busto, J. H.; J.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. “15th European Carbohydrate Symposium” a celebrar en Viena, del 19 al 24 de julio de 2009 (abstract aceptado).

Adicionalmente, se ha llevado a cabo una estancia breve en el extranjero, subvencionada por la Beca FPU del Ministerio de Ciencia e Innovación.

ESTANCIA BREVE:

Centro de investigación: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center

Lugar: New York, U.S.A.

Duración: 2 junio al 1 de octubre de 2008

Profesor supervisor: David Y. Gin

Objeto de la estancia: “Diseño y Síntesis de Coadyuvantes Basados en Glicoconjugados para la Preparación de Vacunas contra el Cáncer”

8

Sección experimental

Los espectros de ^1H y ^{13}C se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance-400, los desplazamientos químicos se expresaron en ppm en la escala δ y las constantes de acoplamiento en Hz. Se utilizaron como disolventes deuterados cloroformo, con TMS como referencia interna, metanol- d_4 y agua deuterada, con referencia interna el propio disolvente.

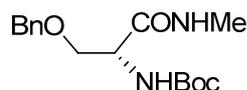
Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Büchi 350 y no están corregidos.

Los ángulos de rotación óptica se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 341, utilizando células de 1.0 y 0.5 dm de longitud y de 0.35 y 1.0 mL de capacidad, respectivamente.

La cromatografía de capa fina se llevó a cabo en placas de silicagel (Polychrom SI F₂₅₄) sobre soporte de poliéster y para su visualización se utilizó luz ultravioleta, revelador de H_2SO_4 al 5% en etanol (revelador de azúcares) y revelador de ácido fosfomolibdico en etanol.

La cromatografía de columna se realizó utilizando silicagel de 0.04-0.06 mm (230-240 mesh).

Todas las reacciones se llevaron a cabo empleando disolventes secos. Dichos disolventes se purificaron y secaron utilizando técnicas estándar.

Boc-D-Ser(Bn)-NHMe

Sobre una disolución de Boc-D-Ser(Bn)-OH (825 mg, 2.79 mmol) en CH₃CN seco (25 mL) bajo atmósfera inerte se añade sucesivamente DIEA (1.85 mL, 11.17 mmol), NH₂CH₃·HCl (377 mg, 5.59 mmol) y TBTU (1.08 g, 3.35 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 10 horas. Después de la agitación, tras evaporar el CH₃CN, el residuo resultante se disuelve en AcOEt (30 mL) y se lava con HCl 1N (15 mL) y NaHCO₃ al 5% (15 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice utilizando hexano/AcOEt (4:6) como eluyente para dar el compuesto **Boc-D-Ser(Bn)-NHMe** (700 mg, 81%) como un sólido blanco.

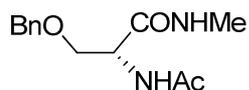
Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₆ H ₂₄ N ₂ O ₄):	C, 62.32; H, 7.84; N, 9.08
	encontrado:	C, 62.45; H, 7.78; N, 9.16

Punto de fusión: 91-93 °C

$[\alpha]_D^{25}$ (c=0.80, CH₃OH): -10.5

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 1.37 (s, 9H, (CH₃)₃), 2.75 (d, *J*=4.8 Hz, 3H, NHCH₃), 3.50 (dd, *J*_{β1-β2}=9.3 Hz, *J*_{β1-α}=6.3 Hz, 1H, H_{β1}), 3.85 (dd, *J*_{β2-β1}=9.3 Hz, *J*_{β2-α}=3.6 Hz, 1H, H_{β2}), 4.13-4.25 (m, 1H, H_α), 4.51 (d, *J*=11.7 Hz, 1H, CH_aH_bPh), 4.58 (d, *J*=11.7 Hz, 1H, CH_aH_bPh), 5.33 (s ancho, 1H, NH-Boc), 6.31-6.42 (m, 1H, NHCH₃), 7.16-7.32 (m, 5H, Ph).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 26.3 (NHCH_3), 28.2 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 53.8 (C_α), 69.8 (C_β), 73.4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 80.2 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 127.7, 127.9, 128.5, 137.4 (Ph), 155.5 ($\underline{\text{C}}\text{O}_{\text{Boc}}$), 170.8 ($\underline{\text{C}}\text{ONHCH}_3$).

Ac-D-Ser(Bn)-NHMe

A una disolución de **Boc-D-Ser(Bn)-NHMe** (700 mg, 2.27 mmol) en CH_2Cl_2 (10 mL) se añade ácido trifluoroacético (10 mL, 0.13 mmol) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 6 horas. Una vez terminada la reacción, se concentra y se obtiene $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H-D-Ser(Bn)-NHMe}$ (720 mg, 98%) como un sólido amarillento que se utiliza directamente, sin purificar, en la siguiente reacción. Se disuelve este compuesto (720 mg, 2.23 mmol) en una mezcla de piridina/anhidrido acético (2:1, 9 mL) y se agita durante 10 horas a temperatura ambiente. Se concentra a sequedad, evaporando con tolueno para eliminar así completamente los restos volátiles de piridina y Ac_2O , y el residuo resultante se purifica por columna cromatográfica ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 15:1) para obtener el compuesto **Ac-D-Ser(Bn)-NHMe** (550 mg, 99%) como un sólido blanco.

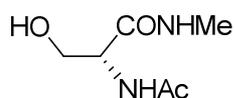
Análisis elemental (%)	calculado ($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$):	C, 62.38; H, 7.25; N, 11.19
	encontrado:	C, 62.48; H, 7.29; N, 11.13

Punto de fusión: 137-139 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (c=0.75, CH_3OH): -4.6

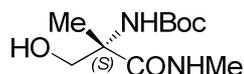
^1H RMN (CD_3OD) δ (ppm): 2.00 (s, 3H, CH_3CO), 2.74 (d, $J=9.2$ Hz, 3H, NHCH_3), 3.66 (dd, $J_{\beta_1-\beta_2}=9.6$ Hz, $J_{\beta_1-\alpha}=4.8$ Hz, 1H, H_{β_1}), 3.74 (dd, $J_{\beta_2-\beta_1}=9.6$ Hz, $J_{\beta_2-\alpha}=5.6$ Hz, 1H, H_{β_2}), 4.46-4.57 (m, 3H, H_α , CH_2Ph), 7.23-7.34 (m, 5H, Ph).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 22.5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 26.4 (NHCH_3), 55.0 (C_α), 70.7 (C_β), 74.1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 128.7, 128.8, 129.4, 139.2 (Ph), 172.8, 173.4 (2CO).

Ac-D-Ser-NHMe**Ac-D-Ser-NHMe**

Una disolución de **Ac-D-Ser(Bn)-NHMe** (550 mg, 2.20 mmol) en MeOH (12 mL) se hidrogena a presión atmosférica y temperatura ambiente durante 12 horas utilizando Pd/C (125 mg) como catalizador. Se elimina el catalizador y el filtrado se evapora obteniéndose el compuesto **Ac-D-Ser-NHMe** (350 mg, 99%) como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₃):	C, 44.99; H, 7.55; N, 17.49
	encontrado:	C, 44.88; H, 7.51; N, 17.54
Punto de fusión:	113-115 °C	
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.00, CH ₃ OH):	+15.1	
¹ H RMN (CD ₃ OD)	δ (ppm): 2.02 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.74 (s, 3H, NHCH ₃), 3.72-3.80 (m, 2H, H _{β1} , H _{β2}), 4.36-4.38 (m, 1H, H _α).	
¹³ C RMN (CD ₃ OD)	δ (ppm): 22.7 (CH ₃ CO), 26.4 (NHCH ₃), 57.0 (C _α), 63.0 (C _β), 173.1, 173.5 (2CO).	

Boc-(S)- α -MeSer-NHMe

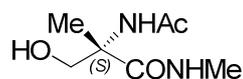
A una disolución de (*S*)- α -metilserina (**27**) (compuesto descrito en: Aydillo, C.; Jiménez-Osés, G.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M.; Avenzoza, A. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 4840-4848) (331 mg, 2.78 mmol) en NaOH 1N (10 mL) y dioxano (5 mL) se le añade Boc₂O (720 mg, 3.28 mmol) a 0 °C. La mezcla se agita durante 24 h dejando que alcance temperatura ambiente. Se evapora entonces el dioxano y la fase acuosa se lava con Et₂O (20 mL). A continuación, se añade a la fase acuosa CHCl₃/PrOH (3:1) (30 mL) y la mezcla se agita mientras se acidifica hasta pH 2-3 con una disolución de H₂SO₄ 1M. Tras separarse la fase orgánica, la fase acuosa se satura con NaCl y se extrae con CHCl₃/PrOH (3:1) (4 x 20 mL). El conjunto de las fases orgánicas se seca (Na₂SO₄), filtra y se concentra para dar *N*-Boc-(*S*)- α -metilserina (548 mg) como un aceite incoloro en un 90% de rendimiento que se utiliza sin purificar en la siguiente reacción. Una disolución de este compuesto en CH₃CN (30 mL) se trata con con DIEA (2.1 mL, 12.5 mmol), clorhidrato de metilamina (338 mg, 5.0 mmol) y TBTU (1.04 g, 3.25 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 h. Se evapora el disolvente y el residuo se disuelve en AcOEt (70 mL) y se le añade una disolución saturada de NaCl (20 mL). Se separa la fase orgánica y se lava con HCl 1N (2 x 20 mL), y NaHCO₃ al 5% (2 x 20 mL). Se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora dando un residuo que se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 94:6) para obtener **Boc-(S)-MeSer-NHMe** (348 mg, 60%) como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₀ H ₂₀ N ₂ O ₄):	C, 51.71; H, 8.68; N, 12.06
	encontrado:	C, 51.44; H, 8.65; N, 12.03

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.12, CHCl₃): -25.2

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 1.44 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.47 (s, 3H, CH₃), 2.78-2.85 (m, 3H, NHCH₃), 3.53-3.64 (m, 1H, H_β), 3.87-3.98 (m, 1H, H_β), 5.42-5.54 (m, 1H, NH_{Boc}), 7.15-7.21 (m, 1H, NHCH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 20.6 (CH₃), 26.3 (NHCH₃), 28.3 (C(CH₃)₃), 59.6 (C_α), 68.1 (C_β), 80.6 (C(CH₃)₃), 156.1 (CO_{Boc}), 174.9 (CONHCH₃).

Ac-(S)- α -MeSer-NHMe**Ac-(S)-MeSer-NHMe**

A una disolución de **Boc-(S)-MeSer-NHMe** (300 mg, 1.29 mmol) en CH_2Cl_2 (5 mL) se añade TFA (5 mL) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 h y se concentra. El residuo se disuelve entonces en piridina/ Ac_2O (2:1, 6 mL) y se agita la mezcla durante otras 4 h para dar el correspondiente producto *O,N*-diacetilado, que se utiliza directamente en el siguiente paso sin purificación previa. Este compuesto, se disuelve en MeOH (5 mL) y se trata con MeONa/MeOH (5 mL) hasta pH=9. Después de agitarse durante 3 h, la mezcla de reacción se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y se evapora. Finalmente, el residuo se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 85:15) para dar el compuesto **Ac-(S)-MeSer-NHMe** (168 mg, 75%) como un aceite incoloro.

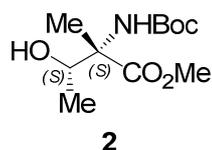
Análisis elemental (%)	calculado ($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$):	C, 48.26; H, 8.10; N, 16.08
	encontrado:	C, 48.12; H, 8.12; N, 16.05

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (c=1.51, H_2O): -6.8

^1H RMN (D_2O) δ (ppm): 1.38 (s, 3H, CH_3), 1.98 (s, 3H, CH_3CO), 2.69 (s, 3H, NHCH_3), 3.70 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, H_β), 3.82 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, H_β).

^1H RMN ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$) δ (ppm): 1.39 (s, 3H, CH_3), 1.98 (s, 3H, CH_3CO), 2.69 (d, $J = 4.7$ Hz, 3H, NHCH_3), 3.71 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, H_β), 3.82 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz, H_β), 7.86 (s ancho, 1H, NHCH_3), 8.10 (s, 1H, NHAc).

^{13}C RMN (D_2O) δ (ppm): 19.9 (CH_3), 22.3 (CH_3CO), 26.0 (NHCH_3), 60.5 (C_α), 64.4 (C_β), 174.0, 175.4 (2CO).

Boc-(2*S*,3*S*)- α -MeThr-OMe

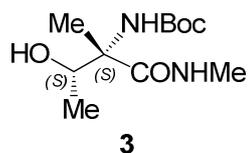
Se añade AcCl (5 mL) gota a gota sobre MeOH (25 mL) a 0 °C. Se deja agitar la disolución durante 5 min y se adiciona sobre la (2*S*,3*S*)- α -metiltreonina (**1**) (compuesto descrito en: Avenoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Sucunza, D.; Zurbano, M. M. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, *15*, 719-724) (300 mg, 2.25 mmol). La disolución se calienta lentamente hasta reflujo y se mantiene en agitación a esa temperatura. Pasadas 12 h se deja enfriar y se evapora el disolvente para dar el éster metílico de la metiltreonina como un sólido blanco. Este compuesto se disuelve en THF/H₂O (5:1, 15 mL) y se añade Na₂CO₃·10H₂O (1.94 g, 6.8 mmol) y Boc₂O (0.64 g, 2.92 mmol). La mezcla se agita durante 12 h y se evapora el disolvente. El crudo obtenido se disuelve en AcOEt (40 mL) y se lava con NaCl (15 mL), HCl 1N (15 mL) y NaHCO₃ al 5% (15 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora. El residuo resultante se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice (hexano, AcOEt, 1:1) para obtener el compuesto **2** (417 mg, 75%) como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₁ H ₂₁ NO ₅):	C, 53.43; H, 8.56; N, 5.66
	encontrado:	C, 53.30; H, 8.62; N, 5.62

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.10, CH₃OH): -5.3

^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 0.98-1.09 (m, 3H, $\text{CH}_{3\beta}$), 1.37 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.48 (s, 3H, $\text{CH}_{3\alpha}$), 3.60-3.79 (m, 3H, CO_2CH_3), 3.98-4.14 (m, 1H, H_β), 4.15-4.48 (s ancho, 1H, OH), 5.43-5.77 (s ancho, 1H, NH_{Boc}).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 18.0 ($\text{CH}_{3\beta}$), 19.6 ($\text{CH}_{3\alpha}$), 28.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 52.7 (CO_2CH_3), 63.3 (C_α), 70.9 (C_β), 80.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 155.6 (CO_{Boc}), 174.2 (CO_2CH_3).

Boc-(2*S*,3*S*)- α -MeThr-NHMe

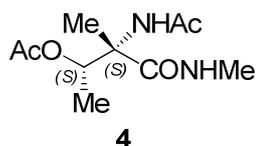
A una disolución de **2** (400 mg, 1.62 mmol) en MeOH/H₂O (3:1, 12 mL) se le añade LiOH·H₂O (250 mg, 5.0 mmol) y se deja agitando a temperatura ambiente durante 12 h. Se evapora el MeOH y la fase acuosa se acidifica con HCl 1N y se extrae con CHCl₃/*i*PrOH (3:1) (3 x 15 mL). El conjunto de las fases orgánicas se seca (Na₂SO₄ anhidro), se filtra y evapora para dar un residuo que se utiliza sin purificar en el siguiente paso. Así, a una disolución del crudo (314 mg, 1.35 mmol) en CH₃CN y en presencia de tamiz molecular (4 Å, 50 mg) se le añade sucesivamente DIEA (0.9 mL, 5.40 mmol), clorhidrato de metilamina (182 mg, 2.70 mmol) y TBTU (572 mg, 1.78 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 10 h, se evapora el disolvente y se añade al residuo una disolución saturada de NaCl (7 mL) y CHCl₃/*i*PrOH (3:1) (15 mL). La fase orgánica se separa y se lava con HCl 1N (5 mL) y NaHCO₃ al 5% (5mL). Se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y evapora obteniéndose un crudo que se purifica por columna cromatográfica eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH (15:1) para dar **3** (200 mg, 50%) como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₁ H ₂₂ N ₂ O ₄):	C, 53.64; H, 9.00; N, 11.37
	encontrado:	C, 53.50; H, 9.08; N, 11.43

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.00, CH₃OH): +5.4

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.08-1.18 (m, 3H, CH _{3β}), 1.43 (s, 9H, (CH ₃) ₃), 1.47 (s, 3H, CH _{3ω}), 2.77-2.88 (m, 3H, NHCH ₃), 3.98-4.20
---	--

(m, 1H, H_β), 4.40-4.84 (s ancho, 1H, OH), 5.36-5.80 (s ancho, 1H, NH₂Boc), 6.42-6.53 (m, 1H, NHCH₃).

Ac-(2*S*,3*S*)- α -MeThr(Ac)-NHMe

A una disolución de **3** en CH₂Cl₂ (5 mL) se añade TFA (5 mL) y la reacción se agita durante 3 h y se concentra. El residuo obtenido se disuelve en piridina/Ac₂O (2:1, 6 mL), se agita a temperatura ambiente durante 3 h y se concentra a sequedad para dar el correspondiente producto diacetilado, que se purifica por columna cromatográfica (CH₂Cl₂/MeOH, 13:1) obteniéndose el compuesto **4** (177 mg, 95%) como un sólido blanco.

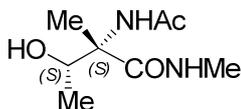
Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₄):	C, 52.16; H, 7.88; N, 12.17
	encontrado:	C, 52.30; H, 7.82; N, 12.25

Punto de fusión: 74-76 °C

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.25, CH₃OH): -8.0

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 1.25 (d, *J*=6.4 Hz, 3H, CH_{3 β}), 1.57 (s, 3H, CH_{3 α}), 2.02 (s, 3H, CH₃CO), 2.08 (s, 3H, NHCOCH₃), 2.80 (d, *J*=4.7 Hz, 3H, NHCH₃), 5.46 (c, *J* = 6.1 Hz, 1H, H _{β}), 6.25 (s ancho, 1H, NHCOCH₃), 6.69-6.89 (m, 1H, NHCH₃).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 14.8 ($\text{CH}_{3\beta}$), 18.6 ($\text{CH}_{3\alpha}$), 20.8 ($\text{NHCO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 23.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 26.3 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 63.1 (C_α), 72.3 (C_β), 170.2, 170.4, 171.1 (3CO).

Ac-(2*S*,3*S*)- α -MeThr-NHMe**Ac-(*S,S*)-MeThr-NHMe**

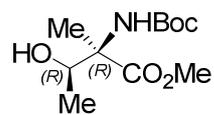
Una disolución de **4** (177 mg, 0.77 mmol) en MeOH (5 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5M) hasta pH 9. Después de agitarse durante 3 h a temperatura ambiente, la mezcla se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y evapora. La purificación del residuo resultante mediante cromatografía en fase reversa (C₁₈) permite obtener el compuesto **Ac-(*S,S*)-MeThr-NHMe** (119 mg, 82%) como aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃):	C, 51.05; H, 8.57; N, 14.88
	encontrado:	C, 50.92; H, 8.52; N, 14.94

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.03, CH₃OH): +4.9

¹H RMN (CD₃OD) δ (ppm): 1.11 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, CH_{3 β}), 1.41 (s, 3H, CH_{3 α}), 1.97 (s, 3H, COCH₃), 2.72 (s, 3H, NHCH₃), 4.20 (c, $J=6.4$ Hz, 1H, H β).

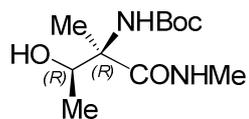
¹³C RMN (CD₃OD) δ (ppm): 17.6 (CH_{3 β}), 18.7 (CH_{3 α}), 23.1 (NHCOCH₃), 26.6 (NHCH₃), 63.9 (C α), 70.6 (C β), 173.2, 176.4 (2CO).

Boc-(2R,3R)- α -MeThr-OMe

Siguiendo el mismo método que el descrito para la síntesis de su enantiómero **2** se parte en este caso de la (2R,3R)- α -metiltreonina (compuesto descrito en: Avenzoa, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Sucunza, D.; Zurbano, M. M. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, *15*, 719-724) (500 mg, 3.76 mmol) para obtener el compuesto **Boc-(2R,3R)-MeThr-OMe** (715 mg, 77%).

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₁ H ₂₁ NO ₅):	C, 53.43; H, 8.56; N, 5.66
	encontrado:	C, 53.33; H, 8.61; N, 5.64

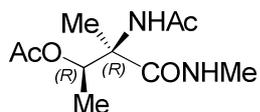
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.23, CH₃OH): +5.5

Boc-(2*R*,3*R*)- α -MeThr-NHMe

Siguiendo el mismo método que el descrito para la síntesis de su enantiómero **3**, se parte del compuesto **Boc-(2*R*,3*R*)-MeThr-OMe** (400 mg, 1.62 mmol) para obtener el compuesto **Boc-(2*R*,3*R*)-MeThr-NHMe** (211 mg, 53%).

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₁ H ₂₂ N ₂ O ₄):	C, 53.64; H, 9.00; N, 11.37
	encontrado:	C, 53.73; H, 8.95; N, 11.30

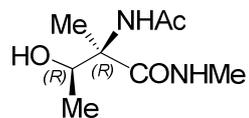
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.16, CH₃OH): -5.7

Ac-(2*R*,3*R*)- α -MeThr(Ac)-NHMe

Siguiendo el mismo método que el descrito para la síntesis de su enantiómero **4**, partiéndose del compuesto **Boc-(2*R*,3*R*)-MeThr-NHMe** (200 mg, 0.81 mmol) se obtiene el compuesto **Ac-(2*R*,3*R*)-MeThr(Ac)-NHMe** (168 mg, 90%).

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₄):	C, 52.16; H, 7.88; N, 12.17
	encontrado:	C, 52.33; H, 7.83; N, 12.23

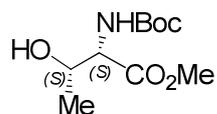
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.00, CH₃OH): +8.3

Ac-(2*R*,3*R*)- α -MeThr-NHMe**Ac-(*R,R*)-MeThr-NHMe**

Siguiendo el mismo método que el descrito para la síntesis de su enantiómero **Ac-(*S,S*)-MeThr-NHMe**, el compuesto **Ac-(*R,R*)-MeThr-NHMe** (112 mg, 80%) se obtiene a partir de **Ac-(*R,R*)-MeThr(Ac)-NHMe** (170 mg, 0.74 mmol).

Análisis elemental (%)	calculado (C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃):	C, 51.05; H, 8.57; N, 14.88
	encontrado:	C, 50.87; H, 8.50; N, 14.96

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.12, CH₃OH): -4.7

Boc-*allo*-L-Thr-OMe

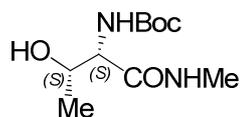
Siguiendo un procedimiento similar al descrito para la síntesis de **2**, se parte en este caso del éster metílico del clorhidrato de la ***allo*-L-treonina** (disponible comercialmente) (570 mg, 3.36 mmol) para obtener el compuesto **Boc-*allo*-L-Thr-OMe** (768 mg, 98%).

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₀ H ₁₉ NO ₅):	C, 51.49; H, 8.21; N, 6.00
	encontrado:	C, 51.63; H, 8.27; N, 5.95

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.10, CH₃OH): -18.0

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 1.20 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH₃) 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.09 (s ancho, 1H, OH), 3.78 (s, 3H, CH₃CO), 4.09-4.19 (m, 1H, H_β), 4.29-4.47 (m, 1H, H_α), 5.39-5.56 (s ancho, 1H, NH-Boc).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 18.8 (CH₃), 28.2 (C(CH₃)₃), 52.5 (CH₃CO), 59.0 (C_α), 69.0 (C_β), 80.5 (C(CH₃)₃), 156.1 (CO_{Boc}), 171.0 (CH₃CO).

Boc-*allo*-L-Thr-NHMe

Siguiendo un procedimiento similar al descrito para la síntesis de **3**, el compuesto **Boc-*allo*-L-Thr-NHMe** (200 mg, 40%) se obtiene a partir de **Boc-*allo*-L-Thr-OMe** (500 mg, 2.14 mmol) como un sólido blanco.

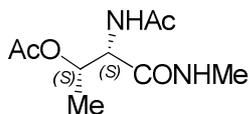
Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₀ H ₂₀ N ₂ O ₄):	C, 51.71; H, 8.68; N, 12.06
	encontrado:	C, 51.59; H, 8.74; N, 12.14

Punto de fusión: 119-121 °C

$[\alpha]^{25}_D$ (c=1.33, CH₃OH): -10.5

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 1.23 (d, *J*=6.4 Hz, 3H, CH₃), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.80 (d, *J*= 4.8 Hz, 3H, NHCH₃), 3.85–4.11 (m, 2H, H_β, H_α), 5.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, NHBoc), 6.77–6.97 (m, 1H, NHCH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 19.6 (CH₃), 26.0 (NHCH₃), 28.3 (C(CH₃)₃), 58.1 (C_α), 69.2 (C_β), 80.4 (C(CH₃)₃), 156.3 (CO_{Boc}), 171.8 (CONH).

Ac-*allo*-L-Thr(Ac)-NHMe

Siguiendo un procedimiento similar al descrito para la síntesis de **4**, se parte del compuesto **Boc-*allo*-L-Thr-NHMe** (200 mg, 0.86 mmol) para obtener el compuesto **Ac-*allo*-L-Thr(Ac)-NHMe** (83 mg, 45%) como un sólido blanco.

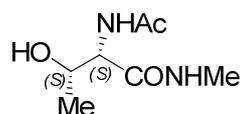
Análisis elemental (%)	calculado (C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₄):	C, 49.99; H, 7.46; N, 12.96
	encontrado:	C, 50.11; H, 7.52; N, 12.90

Punto de fusión: 213-215 °C

$[\alpha]_D^{25}$ (c=0.96, CH₃OH): -2.8

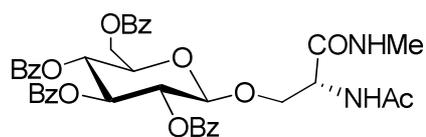
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 1.25 (d, *J*=6.6 Hz, 3H, CH₃), 2.01-2.10 (m, 6H, 2COCH₃), 2.83 (d, *J*= 4.8 Hz, 3H, NHCH₃), 4.78 (dd, *J*=4.9 Hz, *J*=8.4 Hz, 1H, H_α), 4.94-5.13 (m, 1H, H_β), 6.42-6.57 (m, 1H, NHCH₃), 6.65 (d, *J*=8.2 Hz, 1H, NHCOCH₃).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 14.8 (CH₃), 20.7 (CH₃CO), 22.8 (NHCOCH₃), 25.9 (NHCH₃), 54.8 (C_ω), 70.7 (C_β), 168.8, 169.8, 170.6 (3CO).

Ac-*allo*-L-Thr-NHMe**Ac-*allo*-L-Thr-NHMe**

Siguiendo un procedimiento similar al descrito para la síntesis de **Ac-(*S,S*)-MeThr-NHMe**, a partir de **Ac-*allo*-L-Thr(Ac)-NHMe** (70 mg, 0.32 mmol), se obtiene el compuesto **Ac-*allo*-L-Thr-NHMe** (54 mg, 95%) como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃):	C, 48.26; H, 8.10; N, 16.08
	encontrado:	C, 48.14; H, 8.06; N, 16.02
Punto de fusión:	174-176 °C	
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.15, CH ₃ OH):	-22.2	
¹ H RMN (D ₂ O)	δ (ppm): 1.10 (d, <i>J</i> =6.5 Hz, 3H, CH ₃), 1.95 (s, 3H, NHCOCH ₃), 2.64 (s, 3H, NHMe), 4.00 ('q', <i>J</i> =6.3 Hz, 1H, H _β), 4.17 (d, <i>J</i> = 6.1 Hz, 1H, H _α).	
¹³ C RMN (D ₂ O)	δ (ppm): 17.4 (CH ₃), 21.0 (NHCOCH ₃), 25.0 (NHCH ₃), 58.5 (C _α), 66.1 (C _β), 171.4, 173.6 (2CO).	

Ac-D-Ser-[β -O-D-Glc(Bz₄)]-NHMe

Sobre una suspensión de **Ac-D-Ser-NHMe** (100 mg, 0.62 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4 mL) con tamiz molecular (4 Å) se añade, bajo atmósfera inerte, triflato de plata (263 mg, 1.02 mmol). La mezcla se agita a -30 °C y a continuación se añade una disolución de bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo (572 mg, 0.87 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4 mL). La mezcla se agita a esta temperatura durante 1 hora y después, dejando que alcance temperatura ambiente, se mantiene la agitación durante otras 14 horas. El crudo se filtra para eliminar el tamiz y se lava con NaHCO₃ saturado (10 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra. El residuo resultante se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con AcOEt/MeOH (95:5) para obtener 100 mg (22%) de **Ac-D-Ser-[β -O-D-Glc(Bz₄)]-NHMe** como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₄₀ H ₃₈ N ₂ O ₁₂):	C, 65.03; H, 5.18; N, 3.79
	encontrado:	C, 64.91; H, 5.22; N, 3.75

Punto de fusión: 101-103 °C

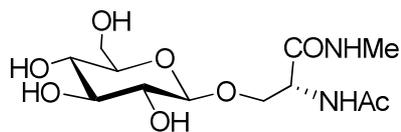
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.10, CH₃OH): +7.0

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 1.92 (s, 3H, CH₃CO), 2.45 (d, 3H, *J*=4.6 Hz, NHCH₃), 3.78 (dd, *J*=7.4 Hz, *J*=9.6 Hz, 1H, H _{β 1}), 4.04 (dd, *J*=3.2 Hz, *J*=10.0 Hz, 1H, H _{β 2}), 4.07-4.15 (m, 1H, H₅), 4.24-4.33 (m, 1H, H _{α}), 4.42 (dd, *J*=5.0 Hz, *J*=12.2 Hz, 1H,

H_{6a}), 4.57 (dd, $J=2.2$ Hz, $J=12.2$ Hz, 1H, H_{6b}), 4.92 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H₁), 5.38 ('t', $J=8.8$ Hz, 1H, H₂), 5.62 ('t', $J=9.7$ Hz, 1H, H₄), 5.88 ('t', $J=9.7$ Hz, 1H, H₃), 6.14-6.22 (m, 1H, NHCH₃), 6.41 (d, $J=6.6$ Hz, 1H, NHAc), 7.18-7.24 (m, 2H, Ph), 7.25-7.39 (m, 7H, Ph), 7.39-7.52 (m, 3H, Ph), 7.72-7.79 (m, 2H, Ph), 7.80-7.86 (m, 2H, Ph), 7.86-7.92 (m, 2H, Ph), 7.93-7.99 (m, 2H, Ph).

¹³C RMN (CDCl₃)

δ (ppm): 23.1 (CH₃CO), 26.1 (NHCH₃), 52.4 (C_a), 62.8 (C₆), 68.2 (C _{β}), 69.4 (C₄), 72.3 (C₃), 72.4 (C₂), 72.4 (C₅), 101.2 (C₁), 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 128.8, 129.5, 129.6, 129.7, 129.8, 133.2, 133.3, 133.5, 133.7 (Ph), 165.1, 165.6, 165.9, 166.1, 169.9, 170.4 (6CO).

Ac-D-Ser-(β -O-D-Glc)-NHMe**Ac-D-Ser*-NHMe**

Una disolución de **Ac-D-Ser-[β -O-D-Glc(Bz₄)]-NHMe** (70 mg, 0.095 mmol) en MeOH (5 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5 M) hasta pH=9. Después de agitarse durante 3 horas, la mezcla se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y se concentra. La purificación del residuo mediante un lavado con AcOEt para eliminar los restos de ácido benzoico, proporciona **Ac-D-Ser*-NHMe** (28 mg, 92%) como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₈):	C, 44.72; H, 6.88; N, 8.69
	encontrado:	C, 44.81; H, 6.79; N, 8.75

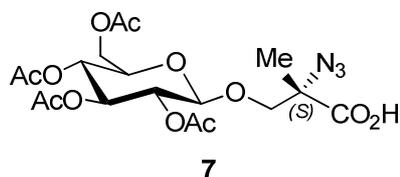
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.21, H₂O): -12.7

¹H RMN (D₂O) δ (ppm): 2.05 (s, 3H, CH₃CO), 2.72 (s, 3H, NHCH₃), 3.25 (dd, $J=8.0$ Hz, $J=9.2$ Hz, 1H, H₂), 3.33-3.39 (m, 1H, H₄), 3.40-3.49 (m, 2H, H₅, H₃), 3.71 (dd, $J=5.7$ Hz, $J=12.3$ Hz, 1H, H_{6a}), 3.89 (dd, $J=2.0$ Hz, $J=12.3$ Hz, 1H, H_{6b}), 4.02 (dd, $J=5.3$ Hz, $J=11.0$ Hz, 1H, H _{β 1}), 4.08 (dd, $J=4.0$ Hz, $J=11.0$ Hz, 1H, H _{β 2}), 4.42 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, H₁), 4.47 ('t', $J=4.6$ Hz, 1H, H _{α}).

^{13}C RMN (D_2O) δ (ppm): 21.6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 25.7 (NHCH_3), 54.0 (C_α), 60.5 (C_6), 68.9 (C_β), 69.3 (C_4), 72.7 (C_2), 75.4, 75.7 (C_3 , C_5), 102.4 (C_1), 171.8, 174.5 (2CO).

Ácido-(2*S*)-2-azido-2-metil-3-(β-*O*-D-tetra-*O*-acetilglucosil)propanoico.

Compuesto 7.

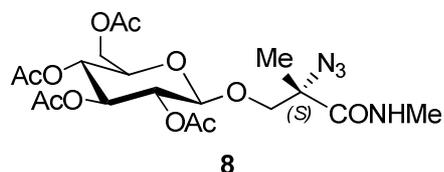


Una disolución de **6** (compuesto descrito en: Avenzoa, A.; Peregrina, J. M.; San Marín, E. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6413-6416) (150 mg, 0.26 mmol) en AcOEt (10 mL) se somete a hidrogenólisis a presión atmosférica y temperatura ambiente durante 16 h, utilizando Pd/C (70 mg) como catalizador. Se elimina el catalizador sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente, obteniéndose el compuesto **7** (113 mg, 90%) que se emplea directamente en la siguiente etapa sin purificación previa.

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 1.43 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 3.64 (d, *J*=10.4 Hz, 1H), 3.67-3.73 (m, 1H), 4.07-4.19 (m, 2H), 4.24 (dd, *J*=4.4 Hz, *J*=12.4 Hz, 1H), 4.63 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 4.97 (dd, *J*=8.1 Hz, *J*=9.0 Hz, 1H), 5.09 ('t', *J*=9.6 Hz, 1H), 5.20 ('t', *J*=9.4 Hz, 1H).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 19.8, 20.5, 20.6, 20.7, 21.0, 61.8, 66.0, 68.3, 71.0, 71.8, 72.6, 74.1, 100.8, 169.5, 169.7, 170.3, 170.9, 174.0.

Metil amida del ácido-(2*S*)-2-azido-2-metil-3-(β-*O*-D-tetra-*O*-acetilglucosil)-propanoico. Compuesto 8.

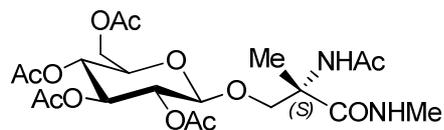


Una disolución de **7** (109 mg, 0.23 mmol) en CH₃CN (5 mL) se trata con DIEA (0.2 mL, 1.5 mmol), clorhidrato de metilamina (29 mg, 0.46 mmol) y TBTU (90 mg, 0.27 mmol) bajo atmósfera inerte. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 h, se evapora el disolvente y al residuo resultante se le añade H₂O (5 mL) y AcOEt (10 mL). La fase orgánica se separa y se lava con HCl 0.5 N (10 mL) y una disolución saturada de NaCl (10 mL). La fase acuosa se vuelve a extraer con CHCl₃/i>PrOH (3:1, 2 x 15 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se seca (Na₂SO₄), filtra y evapora. El crudo obtenido se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) para dar el compuesto **8** (93 mg, 84%) como un aceite blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₉ H ₂₈ N ₄ O ₁₁):	C, 46.72; H, 5.78; N, 11.47
	encontrado:	C, 46.59; H, 5.84; N, 11.32

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.53 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.81 (d, <i>J</i> =4.2 Hz, 3H), 3.68-3.75 (m, 2H), 4.08-4.17 (m, 2H), 4.25 (dd, <i>J</i> =4.7 Hz, <i>J</i> =12.4 Hz, 1H), 4.56 (d, <i>J</i> =7.9 Hz, 1H), 5.03 (dd, <i>J</i> =7.9 Hz, <i>J</i> =9.5 Hz, 1H), 5.09 (‘t’, <i>J</i> =9.7 Hz, 1H), 5.22 (‘t’, <i>J</i> =9.5 Hz, 1H), 6.59-6.67 (m, 1H).
---	--

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 19.1, 20.6, 20.6, 20.6, 20.7, 26.4, 61.8, 66.4, 68.3,
71.2, 71.9, 72.6, 73.8, 100.9, 169.4, 169.4, 170.2, 170.2,
170.7.

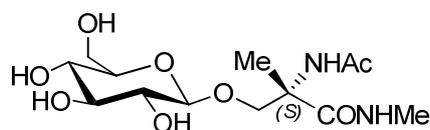
Ac-(S)- α -MeSer-[β -O-D-Glc(Ac₄)]-NHMe**9**

Una disolución de la metilamida **8** (94 mg, 0.19 mmol) en MeOH (10 mL) se hidrogena a temperatura ambiente durante 15 h con Pd/C (40 mg) como catalizador. Se filtra el catalizador, se evapora el disolvente y el residuo se utiliza directamente sin purificar en el siguiente paso. Se disuelve en piridina/Ac₂O (2:1, 3 mL) y se deja agitando unas 4 h a temperatura ambiente. El disolvente se evapora completamente y el crudo se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH (95:5) para dar el compuesto **9** (74 mg, 77%).

Análisis elemental (%)	calculado (C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₁₂):	C, 50.00; H, 6.39; N, 5.55
	encontrado:	C, 49.89; H, 6.32; N, 5.59

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.56 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.80 (d, $J=4.8$ Hz, 3H), 3.71 (ddd, $J=2.3$ Hz, $J=4.8$ Hz, $J=10.0$ Hz, 1H), 3.86 (d, $J=9.9$ Hz, 1H), 4.12 (dd, $J=2.2$ Hz, $J=12.4$ Hz, 1H), 4.29-4.36 (m, 2H), 4.52 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.00 (dd, $J=8.0$ Hz, $J=9.7$ Hz, 1H), 5.07 ('t', $J=9.7$ Hz, 1H), 5.22 ('t', $J=9.5$ Hz, 1H), 6.65 (s ancho, 1H), 6.75-6.81 (m, 1H).
---	---

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 20.3, 20.5, 20.6, 24.1, 25.3, 26.5, 59.5, 61.6, 68.2, 71.2, 71.5, 71.9, 72.3, 100.5, 169.4, 169.6, 170.0, 170.4, 170.6, 172.9.

Ac-(S)- α -MeSer-(β -O-D-Glc)-NHMe**Ac-(S)-MeSer*-NHMe**

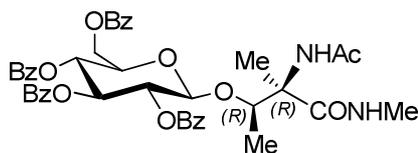
Una disolución del compuesto **9** (52 mg, 0.10 mmol) en MeOH (5 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5 M) hasta pH= 9. La reacción se agita durante 3 horas y se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y evapora. La purificación del residuo mediante un cartucho (C₁₈) de fase reversa proporciona el glucopéptido modelo deseado **Ac-(S)-MeSer*-NHMe** (31 mg, 90%).

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O ₈):	C, 46.42; H, 7.19; N, 8.33
	encontrado:	C, 46.54; H, 7.11; N, 8.39

$[\alpha]_D^{25}$ (c=0.60, MeOH): -23.7

¹H RMN (D₂O) δ (ppm): 1.36 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 2.60 (s, 3H), 3.18 (dd, $J=8.1$ Hz, $J=9.3$ Hz, 1H), 3.23 ('t', $J=9.6$ Hz, 1H), 3.30-3.34 (m, 1H), 3.37 ('t', $J=9.1$ Hz, 1H), 3.60 (dd, $J=5.6$ Hz, $J=12.3$ Hz, 1H), 3.71 (d, $J=10.2$ Hz, 1H), 3.79 (dd, $J=1.9$ Hz, $J=12.3$ Hz, 1H), 4.04 (d, $J=10.2$ Hz, 1H), 4.34 (d, $J=7.9$ Hz, 1H).

¹³C RMN (D₂O) δ (ppm): 19.8, 22.2, 26.0, 59.5, 60.7, 69.6, 72.2, 73.0, 75.6, 75.9, 102.7, 173.8, 174.8.

Ac-(*R,R*)- α -MeThr-[β -*O*-D-Glc(Bz₄)]-NHMe**10**

Sobre una suspensión de **Ac-(*R,R*)-MeThr-NHMe** (110 mg, 0.58 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4 mL) con tamiz molecular (4 Å, 100 mg) se añade triflato de plata (248 mg, 0.96 mmol) bajo atmósfera inerte. La mezcla se agita a -30 °C y, a continuación, se añade una disolución de bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo (539 mg, 0.82 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4 mL). La mezcla se agita a esta temperatura durante 1 hora y después, dejando que alcance temperatura ambiente, se mantiene la agitación durante otras 14 horas. El crudo se filtra sobre tierra de diatomeas y se concentra y el residuo resultante se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH (95:5) para obtener 50 mg (11%) del compuesto **10** como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₄₂ H ₄₂ N ₂ O ₁₂):	C, 65.79; H, 5.52; N, 3.65
	encontrado:	C, 65.66; H, 5.58; N, 3.70

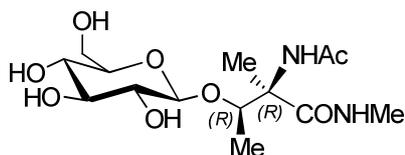
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.02, CH₃OH): +15.1

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 0.92 (d, *J*=6.3Hz, 3H, CH_{3 β}), 1.32 (s, 3H, CH_{3 α}), 1.87 (s, 3H, CH₃CO), 2.64 (d, *J*=4.7 Hz, 3H, NHCH₃), 3.80 (q, *J* = 6.2 Hz, 1H, H _{β}), 4.09-4.17 (m, 1H, H_{5s}), 4.54 (dd, *J* = 5.8 Hz, *J* = 12.3 Hz, 1H, H_{6s}), 4.62 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, H_{6s}), 4.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{1s}), 5.44-5.55 (m, 1H,

H_{2s}), 5.66 ('t', $J = 9.8$ Hz, 1H, H_{4s}), 5.91 ('t', $J = 9.8$ Hz, 1H, H_{3s}), 6.17-6.26 (m, 1H, NHCH₃), 6.34 (s ancho, 1H, NHCOCH₃), 7.17-7.25 (m, 2H, Ph), 7.27-7.35 (m, 4H, Ph), 7.35-7.42 (m, 3H, Ph), 7.43-7.49 (m, 2H, Ph), 7.49-7.56 (m, 1H, Ph), 7.74-7.80 (m, 2H, Ph), 7.82-7.89 (m, 4H, Ph), 7.94-8.00 (m, 2H, Ph).

¹³C RMN (CDCl₃)

δ (ppm): 14.3 (CH_{3β}), 19.2 (CH_{3α}), 23.6 (COCH₃), 26.4 (NHCH₃), 62.0 (C_α), 62.5 (C_{6s}), 69.4 (C_{4s}), 71.4 (C_{2s}), 72.0 (C_{3s}), 72.9 (C_{5s}), 78.5 (C_β), 98.9 (C_{1s}), 128.4, 128.5, 128.5, 128.6, 128.6, 128.7, 129.2, 129.6, 129.6, 129.7, 129.8, 133.4, 133.6, 133.6, 133.7 (Ph), 165.2, 165.3, 165.6, 166.0, 169.6, 170.6 (6CO).

Ac-(*R,R*)- α -MeThr(β -*O*-D-Glc)-NHMe**Ac-(*R,R*)-MeThr*-NHMe**

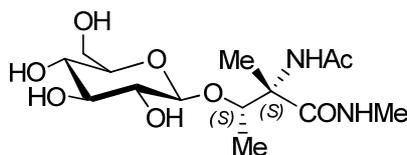
Una disolución de **10** (50 mg, 0.06 mmol) en MeOH (5 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5M) hasta pH =9. La reacción se agita durante 3 horas y se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y evapora. La purificación del residuo mediante un cartucho (C₁₈) de fase reversa proporciona el glucopéptido modelo deseado **Ac-(*R,R*)-MeThr*-NHMe** (20 mg, 87%) como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₄ H ₂₆ N ₂ O ₈):	C, 47.99; H, 7.48; N, 8.00
	encontrado:	C, 48.11; H, 7.52; N, 7.94

$[\alpha]_D^{25}$ (c=0.97, H₂O): +4.2

¹H RMN (D₂O) δ (ppm): 1.19 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, CH_{3 β}) 1.45 (s, 3H, CH_{3 α}), 1.99 (s, 3H, CH₃CO), 2.72 (s, 3H, NHCH₃), 3.29-3.36 (m, 1H, H_{2s}) 3.43-3.55 (m, 3H, H_{3s}, H_{4s}, H_{5s}), 3.82 (dd, $J=4.5$ Hz, $J=12.1$ Hz, 1H, H_{6s}), 3.94-3.99 (m, 1H, H_{6s}), 4.12 (c, $J=6.4$ Hz, 1H, H _{β}), 4.51 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, H_{1s}).

¹³C RMN (D₂O) δ (ppm): 14.1 (CH_{3 β}), 18.3 (CH_{3 α}), 22.4 (CH₃CO), 26.0 (NHCH₃), 60.5 (C₆), 62.2 (C _{α}), 69.4 (C_{4s}), 72.7 (C₂), 75.6, 75.9 (C_{3s}, C_{5s}), 78.0 (C _{β}), 100.6 (C₁), 173.4, 173.6 (2CO).

Ac-(*S,S*)- α -MeThr-(β -*O*-D-Glc)-NHMe**Ac-(*S,S*)-MeThr-NHMe**

Sobre una suspensión de **Ac-(*S,S*)-MeThr-NHMe** (90 mg, 0.48 mmol) en CH_2Cl_2 seco (4 mL) con tamiz molecular (4 Å, 100 mg) se añade triflato de plata (203 mg, 0.79 mmol) bajo atmósfera inerte. La mezcla se agita a $-30\text{ }^\circ\text{C}$ y a continuación se añade una disolución de bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo (441 mg, 0.67 mmol) en CH_2Cl_2 seco (4 mL). La mezcla se agita a esta temperatura durante 1 hora y después, dejando que alcance temperatura ambiente, se mantiene la agitación durante otras 14 horas. El crudo se filtra sobre tierra de diatomeas, se concentra y se somete a una columna cromatográfica (AcOEt/MeOH, 95:5) sobre gel de sílice. El producto obtenido se emplea en la siguiente reacción sin caracterización. Así, el residuo resultante se disuelve en MeOH (5 mL) y se trata con MeONa/MeOH (0.5M) hasta pH 9. La reacción se agita durante 3 horas y se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y evapora. La purificación del crudo mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (NH_3 /EtOH/BuOH/ CHCl_3 , 8:5:4:2) seguida de un cartucho (C_{18}) de fase reversa proporciona el glucopéptido modelo deseado **Ac-(*S,S*)-MeThr*-NHMe** (30 mg, 16%) como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado ($\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_8$):	C, 47.99; H, 7.48; N, 8.00
	encontrado:	C, 47.86; H, 7.44; N, 8.06

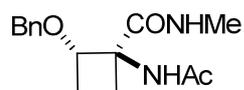
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (c=1.10, H_2O): -17.0

^1H RMN (D_2O)	δ (ppm): 1.29 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, $\text{CH}_{3\beta}$) 1.47 (s, 3H, $\text{CH}_{3\alpha}$), 2.00 (s, 3H, CH_3CO), 2.74 (s, 3H, NHCH_3), 3.28-3.42 (m, 2H, H_{2s} , H_{4s}) 3.45-3.60 (m, 2H, H_{5s} , H_{3s}), 3.72 (dd, $J=5.9$ Hz, $J=12.5$ Hz, 1H, H_{6s}), 3.92 (d, $J=12.3$ Hz, 1H, H_{6s}), 4.19 (c, $J=6.3$ Hz, 1H, H_β), 4.61 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, H_{1s}).
^{13}C RMN (D_2O)	δ (ppm): 13.2 ($\text{CH}_{3\beta}$), 15.1 ($\text{CH}_{3\alpha}$), 19.4 (CH_3CO), 23.2 (NHCH_3), 57.8 (C_{6s}), 60.0 (C_α), 66.7 (C_{4s}), 70.6 (C_{2s}), 72.9 (C_{3s}), 73.2 (C_{5s}), 77.9 (C_β), 101.0 (C_1), 170.8, 171.4 (2CO).

Ac-c₄Ser(Bn)-OH**12**

A una suspensión de Ac-c₄Ser(Bn)-OMe (**11**) (350 mg, 1.26 mmol) en H₂O/MeOH, 1:3 (8 mL) se le añade LiOH·H₂O (265 mg, 6.31 mmol) y se deja agitando toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se evapora el MeOH y el residuo se diluye con H₂O (20 mL) y se lava con AcOEt (20 mL) para eliminar impurezas orgánicas. La fase acuosa se acidifica y se extrae con CHCl₃/iPrOH (3:1) (3 x 15 mL). El conjunto de las fases orgánicas se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora, obteniéndose un sólido blanco que es el ácido **12** (320 mg, 97%).

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₄ H ₁₇ NO ₄):	C, 63.87; H, 6.51; N, 5.32
	encontrado:	C, 64.01; H, 6.56; N, 5.28
Punto de fusión:	190-192 °C	
¹ H RMN (CD ₃ OD)	δ (ppm): 1.60 ('c', 1H, J=9.2 Hz, H _δ), 1.96 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.12-2.25 (m, 2H, 2H _γ), 2.70-2.78 (m, 1H, H _δ) 4.30 ('t', 1H, J=8.4 Hz, H _β), 4.48 (d, 1H, J=11.1 Hz, CH _a H _b Ph), 4.66 (d, 1H, J=11.1 Hz, CH _a H _b Ph), 7.26-7.32 (m, 5H, Ph).	
¹³ C RMN (CD ₃ OD)	δ (ppm): 22.2 (CH ₃ CO), 25.6 (C _γ), 25.7 (C _δ), 67.0 (C _α), 72.8 (CH ₂ Ph), 78.8 (C _β), 128.7, 128.9, 129.3, 139.3 (Ph), 172.8, 173.9 (2CO).	

Ac-c₄Ser(Bn)-NHMe**13**

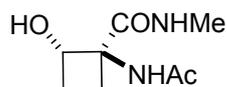
Sobre una suspensión del ácido **12** (620 mg, 2.36 mmol) en CH₃CN seco (30 mL) bajo atmósfera inerte se añade sucesivamente DIEA (1.56 mL, 9.43 mmol), clorhidrato de metilamina (318 mg, 4.71 mmol) y TBTU (908 mg, 2.83 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 10 horas. Después de la agitación, y tras evaporar el CH₃CN, el residuo resultante se disuelve en AcOEt (30 mL) y se lava con HCl 1N (15 mL), NaHCO₃ al 5% (15 mL) y NaCl (15 mL), respectivamente. La fase acuosa reunida se extrae con CHCl₃/ⁱPrOH (4:1) (2 x 15 mL). El conjunto de las fases orgánicas se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice utilizando AcOEt/MeOH (95:5) como eluyente para dar el compuesto **13** (600 mg, 92%) como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₃):	C, 65.20; H, 7.30; N, 10.14
	encontrado:	C, 65.33; H, 7.25; N, 10.20

Punto de fusión: 172-174 °C

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 1.82-1.95 (m, 4H, H_γ, CH₃CO), 1.99-2.09 (m, 1H, H_δ), 2.11-2.28 (m, 2H, H_γ, H_δ), 2.78 (d, *J*=4.7 Hz, 3H, NHCH₃), 4.49 (d, *J*=11.5 Hz, 1H, CH_aH_bPh), 4.56-4.69 (m, 2H, H_β, CH_aH_bPh), 6.39 (s ancho, 1H, NHAc), 7.22-7.33 (m, 5H, Ph), 7.40 (m, 1H, NHMe).

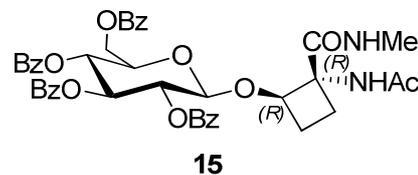
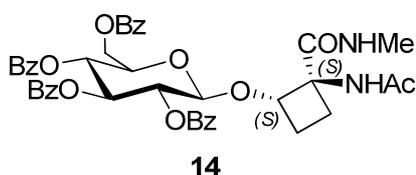
^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 23.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 24.1 (C_δ), 24.5 (C_γ), 26.4 (NHCH_3), 64.7 (C_α), 72.2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 78.1 (C_β), 128.0, 128.0, 128.5, 137.6 (Ph), 170.1, 172.3 (2CO).

Ac-c₄Ser-NHMe**Ac-c₄Ser-NHMe**

Una disolución de **13** (600 mg, 2.17 mmol) en MeOH (15 mL) se hidrogena a presión atmosférica y temperatura ambiente, utilizando Pd/C al 10% (120 mg) como catalizador. La hidrogenación se deja toda la noche y, al día siguiente, se filtra el catalizador sobre tierra de diatomeas. El filtrado se evapora y se obtiene el compuesto **Ac-c₄Ser-NHMe** (400 mg, 99%) como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₃):	C, 51.60; H, 7.58; N, 15.04
	encontrado:	C, 51.71; H, 7.62; N, 15.10
¹ H RMN (D ₂ O)	δ (ppm):	1.51-1.67 (m, 1H, H _δ), 1.85-2.01 (m, 4H, H _γ , CH ₃ CO), 2.18-2.35 (m, 1H, H _γ), 2.48-2.63 (m, 1H, H _δ), 2.73 (s, 3H, NHCH ₃), 4.34 ('t', 1H, J=8.7 Hz, H _β).
¹³ C RMN (D ₂ O)	δ (ppm):	21.8 (CH ₃ CO), 23.8 (C _δ), 26.0 (C _γ), 26.1 (NHCH ₃), 65.9 (C _α), 71.2 (C _β), 172.8, 173.9, (2CO).

Ac-(1*S*,2*S*)-c₄Ser-[β-*O*-D-Glc(Bz₄)]-NHMe y **Ac-(1*R*,2*R*)-c₄Ser-[β-*O*-D-Glc(Bz₄)]-NHMe**



Sobre una suspensión del aminoácido **Ac-c₄Ser-NHMe** (115 mg, 0.62 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4 mL) con tamiz molecular (4 Å) se añade, bajo atmósfera inerte, triflato de plata (262 mg, 1.02 mmol). El schlenck que contiene la mezcla se cubre con papel de aluminio y se agita a -30 °C. A continuación se añade una disolución de bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-α-D-glucopiranosilo (570 mg, 0.86 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4 mL). La mezcla se agita a esta temperatura durante 1 hora y después, dejando que alcance temperatura ambiente, se mantiene la agitación durante otras 14 horas. El crudo se filtra para eliminar el tamiz y se lava con NaHCO₃ saturado (10 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra. El residuo resultante se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH (95:5) para obtener los compuestos **14** y **15** como mezcla (110 mg, 23%). Posteriormente, con el objetivo de separar ambos diastereómeros, se realiza una purificación por columna cromatográfica tras la cual se logra obtener los compuestos **14** (34 mg, 7%) y **15** (55 mg, 12 %) por separado como dos sólidos blancos.

Compuesto 14

Análisis elemental (%)	calculado (C ₄₂ H ₄₀ N ₂ O ₁₂):	C, 65.96; H, 5.27; N, 3.66
	encontrado:	C, 65.82; H, 5.33; N, 3.60

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.12, CH₃OH): +22.4

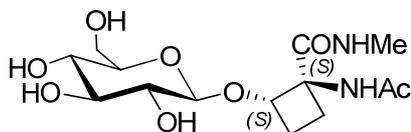
Punto de fusión: 100-102 °C

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 1.71-1.84 (m, 1H, H_δ), 1.89 (s, 3H, CH₃CO), 1.97-2.09 (m, 1H, H_γ), 2.21-2.35 (m, 2H, H_γ, H_δ), 2.42 (d, *J*=4.5 Hz, 3H, NHCH₃), 4.11-4.20 (m, 1H, H_ε), 4.49-4.65 (m, 2H, H_{6a}, H_{6b}), 4.73-4.83 (m, 1H, H_β), 5.20 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, H₁), 5.55 (dd, *J*=8.3 Hz, *J*=9.5 Hz, 1H, H₂), 5.65 ('t', *J*=9.7 Hz, 1H, H₄), 5.94 ('t', *J*=9.7 Hz, 1H, H₃), 6.37 (s ancho, 1H, NHAc), 6.85-6.99 (m, 1H, NHMe), 7.22-7.31 (m, 2H, Ph), 7.32-7.47 (m, 7H, Ph), 7.47-7.61 (m, 3H, 1.30 (d, 3H, Ph), 7.77-7.85 (m, 2H, Ph), 7.88-7.94 (m, 2H, Ph), 7.96-8.07 (m, 4H, Ph).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 23.5 (CH₃CO), 24.4 (C_δ), 26.1 (C_γ), 26.1 (NHCH₃), 63.0 (C₆), 64.7 (C_α), 69.8 (C₄), 71.8 (C₂), 72.5 (C₅), 72.8 (C₃), 77.0 (C_β), 100.2 (C₁), 128.3, 128.5, 128.6, 128.7, 128.8, 129.0, 129.6, 129.8, 129.9, 130.0, 133.3, 133.4, 133.5, 133.5 (Ph), 165.3, 165.6, 165.7, 166.2, 170.0, 171.4 (6CO).

Compuesto 15

Análisis elemental (%)	calculado (C ₄₂ H ₄₀ N ₂ O ₁₂):	C, 65.96; H, 5.27; N, 3.66
	encontrado:	C, 66.10; H, 5.21; N, 3.71
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.07, CH ₃ OH):		+11.0
Punto de fusión:		128-130 °C
¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm):	1.87-1.93 (m, 1H, H _γ), 1.98 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.03-2.22 (m, 2H, H _γ , H _δ), 2.34-2.45 (m, 1H, H _δ), 2.64 (d, J=4.7 Hz, 3H, NHCH ₃), 4.12-4.19 (m, 1H, H ₅), 4.36 (dd, J=4.2 Hz, J=12.3 Hz, 1H, H _{6a}), 4.84 (dd, J=2.6 Hz, J=12.3 Hz, 1H, H _{6b}), 4.92 (d, J=8.0 Hz, 1H, H ₁), 4.97 ('t', J=8.6 Hz, 1H, H _β), 5.43 (dd, J=8.1 Hz, J=9.7 Hz, 1H, H ₂), 5.71 ('t', J=9.8 Hz, 1H, H ₄), 5.90 ('t', J=9.7 Hz, 1H, H ₃), 6.58 (s ancho, 1H, NHAc), 6.63-6.69 (m, 1H, NHMe), 7.24-7.32 (m, 1H, Ph), 7.33-7.56 (m, 10H, Ph), 7.56-7.63 (m, 1H, Ph), 7.79-7.86 (m, 2H, Ph), 7.89-7.96 (m, 4H, Ph), 8.05-8.11 (m, 2H, Ph).
¹³ C RMN (CDCl ₃)	δ (ppm):	23.7 (C _δ), 23.8 (CH ₃ CO), 24.5 (C _γ), 26.5 (NHCH ₃), 62.3 (C ₆), 65.6 (C _α), 69.1 (C ₄), 71.8 (C ₂), 72.6 (C ₃), 72.8 (C ₅), 77.3 (C _β), 100.4 (C ₁), 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 128.8, 129.0, 129.3, 129.8, 129.9, 133.4, 133.5, 133.6 (Ph), 165.2, 165.4, 165.7, 166.4, 170.3, 170.9 (6CO).

Ac-(1*S*,2*S*)-c₄Ser-(β-*O*-D-Glc)-NHMe**Ac-(*S,S*)-c₄Ser*-NHMe**

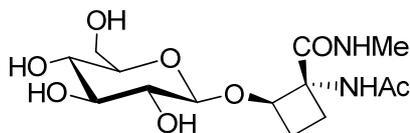
Una disolución del compuesto **14** (38 mg, 0.050 mmol) en MeOH (5 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5M) hasta pH=9. Después de agitarse durante 3 horas, la mezcla se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y se concentra, obteniéndose el glicopéptido modelo **Ac-(*S,S*)-c₄Ser*-NHMe** (16 mg, 92%) como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₈):	C, 48.27; H, 6.94; N, 8.04
	encontrado:	C, 48.17; H, 6.88; N, 8.10

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.24, H₂O): -7.2

¹H RMN (D₂O) δ (ppm): 1.59-1.73 (m, 1H, H_δ), 2.01 (s, 3H, CH₃CO), 2.06-2.19 (m, 1H, H_γ), 2.28-2.39 (m, 1H, H_γ), 2.60-2.71 (m, 1H, H_δ), 2.77 (s, 3H, NHCH₃), 3.28 ('t', *J*=8.5 Hz, 1H, H₂), 3.34-3.40 (m, 1H, H₄), 3.44-3.53 (m, 2H, H₅, H₃), 3.72 (dd, *J*=6.7 Hz, *J*=12.2 Hz, 1H, H_{6a}), 3.92-4.00 (m, 1H, H_{6b}), 4.53 (d, *J*=7.9 Hz, 1H, H₁), 4.66 ('t', *J*=8.8 Hz, 1H, H_β).

^{13}C RMN (D_2O) δ (ppm): 21.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 24.4 (C_δ), 25.1 (C_γ), 26.1 (NHCH_3), 60.9 (C_6), 65.4 (C_α), 69.8 (C_4), 72.7 (C_2), 75.4 (C_β), 75.5, 76.1 (C_3, C_5), 100.8 (C_1), 172.3, 173.7 (2CO).

Ac-(1*R*,2*R*)-c₄Ser-(β-*O*-D-Glc)-NHMe**Ac-(*R,R*)-c₄Ser*-NHMe**

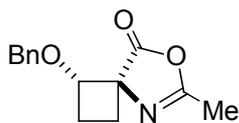
Una disolución de **15** (60 mg, 0.078 mmol) en MeOH (5 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5M) hasta pH=9. Después de agitarse durante 3 horas, la mezcla se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y se concentra, obteniéndose el compuesto **Ac-(*R,R*)-c₄Ser*-NHMe** (23 mg, 85%) como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₈):	C, 48.27; H, 6.94; N, 8.04
	encontrado:	C, 48.40; H, 7.00; N, 7.98

[α]²⁵_D (c=1.17, H₂O): -16.1

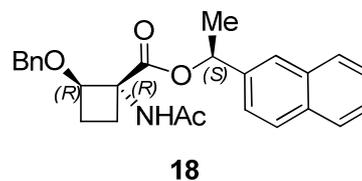
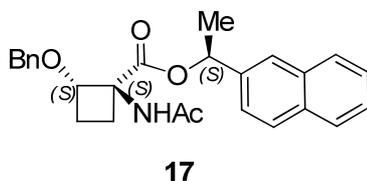
¹H RMN (D₂O) δ (ppm): 1.56-1.68 (m, 1H, H_δ), 2.00 (s, 3H, CH₃CO), 2.07-2.15 (m, 1H, H_γ), 2.26-2.39 (m, 1H, H_γ), 2.66-2.79 (m, 4H, H_δ, NHCH₃), 3.23 ('t', *J*=8.5 Hz, 1H, H₂), 3.35-3.41 (m, 1H, H₄), 3.44-3.56 (m, 2H, H₅, H₃), 3.78 (dd, *J*=6.0 Hz, *J*=12.0 Hz, 1H, H_{6a}), 3.99 (dd, *J*=2.0 Hz, *J*=12.0 Hz, 1H, H_{6b}), 4.40 ('t', *J*=8.9 Hz, 1H, H_β), 4.47 (d, *J*=7.8 Hz, 1H, H₁).

^{13}C RMN (D_2O) δ (ppm): 21.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 24.1 (C_δ), 24.7 (C_γ), 26.1 (NHCH_3), 60.7 (C_6), 66.0 (C_a), 69.7 (C_4), 73.0 (C_2), 75.5 (C_5), 75.5 (C_3), 77.6 (C_β), 101.3 (C_1), 172.6, 173.5 (2CO).

(1*R,2*R**)-2-Benciloxiciclobutano-1-espiro-{4'[2'-metil-5'(4'*H*)-oxazolona]}****16**

En un schlenck se añade sucesivamente el compuesto **12** (100 mg, 0.38 mmol), EDCI (80 mg, 0.42 mmol) y DMAP (9 mg, 0.08 mmol). A continuación y bajo atmósfera inerte, se añade CH₂Cl₂ (5 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 2 h. Después de la agitación, la mezcla se concentra y el residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice utilizando hexano/AcOEt (4:6) como eluyente para dar la oxazolona **16** (80 mg, 87%) como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado(C ₁₄ H ₁₅ NO ₃):	C, 68.56; H, 6.16; N, 5.71
	encontrado:	C, 68.68; H, 6.21; N, 5.67
¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm):	1.95-2.12 (m, 4H, H _δ , CH ₃), 2.12-2.32 (m, 2H, H _δ , H _γ), 2.33-2.53 (m, 1H, H _γ), 4.26-4.46 (m, 2H, CH _α H _β Ph, H _β), 4.48-4.62 (m, 1H, CH _α H _β Ph), 7.23-7.42 (m, 5H, Ph).
¹³ C RMN (CD ₃ OD)	δ (ppm):	14.8 (CH ₃), 22.8 (C _δ), 24.1 (C _γ), 71.7 (CH ₂ Ph), 73.6 (C _α), 78.0 (C _β), 127.6, 127.7, 128.1, 137.2 (Ph), 162.3 (C=N), 176.6 (CO).

(1*R*,2*R*)-1-Acetamido-2-benciloxiciclobutano-1-carboxilato de (*S*)-(-)- α -metil-2'-naftilmetanol

Sobre una disolución de (*S*)-(-)- α -metil-2-naftilmetanol (100 mg, 0.58 mmol) en THF seco (3 mL) bajo atmósfera inerte se añade ^tBuOK (0.3 mL, 0.29 mmol) y se deja 5 minutos con agitación. A continuación, se adiciona la oxazolona **16** (72 mg, 0.29 mmol) disuelta en THF (3 mL) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Al día siguiente, se evapora el disolvente y el crudo se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt (4:6) para obtener los compuestos **17** y **18** como mezcla (85 mg, 70%). Posteriormente, con el objetivo de separar ambos diastereómeros, se realiza una nueva columna cromatográfica en el mismo eluyente tras la cual se logra obtener el compuesto **18** puro (7 mg, 6%) y otra fracción de la mezcla **17** y **18** enriquecida en una relación **18/17**=4:1 (17 mg, 14%).

Análisis elemental (%)	calculado (C ₂₆ H ₂₇ NO ₄):	C, 74.80; H, 6.52; N, 3.35
	encontrado:	C, 74.69; H, 6.46; N, 3.40

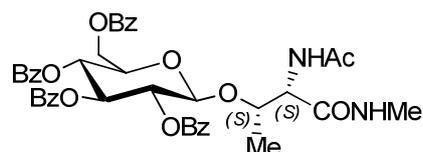
Punto de fusión: 133-135 °C

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.58 (d, <i>J</i> =6.6 Hz, 3H, CH ₃), 1.86 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.17-2.33 (m, 3H, 2H _{γ} , H _{δ}), 2.33-2.52 (m, 1H, H _{δ}), 4.33-4.47 (m, 2H, CH ₂ Ph), 4.56-4.71 (m, 1H, H _{β}),
---	---

6.04-6.30 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{HMe}$, $\underline{\text{N}}\text{HAc}$), 7.12-7.25 (m, 5H, Ph),
7.36-7.50 (m, 3H, Ar.), 7.70-7.82 (m, 4H, Ar.).

^{13}C RMN (CDCl_3)

δ (ppm): 22.0 (CH_3), 22.7 (C_δ), 23.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 24.7 (C_γ),
66.4 (C_α), 71.6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 74.3 ($\underline{\text{C}}\text{HMe}$), 77.3 (C_β), 124.1,
125.1, 126.2, 126.3, 127.7, 127.8, 128.0, 128.1, 128.4,
128.5, 133.1, 133.2, 137.7, 138.5 (Ar.), 169.9, 170.8
(2CO).

Ac-*allo*-L-Thr-[β -O-D-Glc(Bz₄)]-NHMe

Sobre una suspensión de **Ac-*allo*-L-Thr-NHMe** (60 mg, 0.34 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4 mL) con tamiz molecular (4 Å, 100 mg) se añade triflato de plata (146 mg, 0.57 mmol) bajo atmósfera inerte. La mezcla se agita a -30 °C y a continuación se añade una disolución de bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo (318 mg, 0.48 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4 mL). La mezcla se agita a esta temperatura 1 hora y después, dejando que alcance temperatura ambiente, se mantiene la agitación durante otras 14 horas. El crudo se filtra sobre tierra de diatomeas y se concentra y el residuo resultante se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH (95:5) para obtener 55 mg (22%) de **Ac-*allo*-L-Thr-(β -O-D-Glc(Bz₄))-NHMe** como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₄₁ H ₄₀ N ₂ O ₁₂):	C, 65.42; H, 5.36; N, 3.72
	encontrado:	C, 65.30; H, 5.41; N, 3.68

Punto de fusión: 182-184 °C

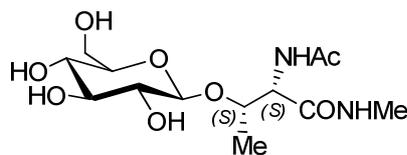
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.10, CH₃OH): -9.0

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.23 (d, <i>J</i> =6.1Hz, 3H, CH ₃), 1.70 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.37 (d, <i>J</i> =4.3 Hz, 3H, NHCH ₃), 3.97-4.07 (m, 1H, H _{β}), 4.10-4.17 (m, 1H, H _{5s}), 4.28-4.44 (m, 2H, H _{α} ,
---	---

H_{6s}), 4.62 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, H_{6s}), 4.95 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{1s}), 5.42 ('t', $J = 8.8$ Hz, 1H, H_{2s}), 5.58 ('t', $J = 9.7$ Hz, 1H, H_{4s}), 5.87 ('t', $J = 9.7$ Hz, 1H, H_{3s}), 6.02–6.16 (m, 2H, 2NH), 7.16–7.22 (m, 2H, Ph), 7.25–7.37 (m, 7H, Ph), 7.39–7.52 (m, 3H, Ph), 7.70–7.76 (m, 2H, Ph), 7.81–7.92 (m, 4H, Ph), 7.92–7.99 (m, 2H, Ph).

¹³C RMN (CDCl₃)

δ (ppm): 18.0 (CH₃), 22.8 (COCH₃), 26.0 (NHCH₃), 56.8 (C_α), 62.8 (C_{6s}), 69.5 (C_{4s}), 72.1 (C_{2s}), 72.3 (C_{5s}), 72.7 (C_{3s}), 76.6 (C_β), 100.5 (C_{1s}), 128.3, 128.4, 128.4, 128.5, 128.7, 128.7, 129.0, 129.5, 129.7, 129.7, 129.8, 129.8, 133.2, 133.2, 133.5 (Ph), 165.2, 165.2, 165.7, 166.1, 170.0, (5CO).

Ac-*allo*-L-Thr-(β -O-D-Glc)-NHMe**Ac-*allo*-L-Thr*-NHMe**

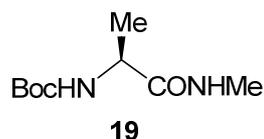
Una disolución de **Ac-*allo*-L-Thr-(β -O-D-Glc(Bz₄)]-NHMe** (40 mg, 0.05 mmol) en MeOH (5 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5M) hasta pH 9. La reacción se agita durante 3 horas y se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y evapora. La purificación del residuo mediante columna cromatográfica (NH₃/EtOH/BuOH/CHCl₃, 4:5:4:2) seguida de un cartucho (C₁₈) de fase reversa proporciona el glucopéptido modelo deseado, **Ac-*allo*-L-Thr*-NHMe**, (15 mg, 85%) como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O ₈):	C, 46.42; H, 7.19; N, 8.33
	encontrado:	C, 46.57; H, 7.14; N, 8.40

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.15, H₂O): -15.2

¹H RMN (D₂O) δ (ppm): 1.26 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, CH₃), 2.05 (s, 3H, CH₃CO), 2.73 (s, 3H, NHCH₃), 3.24 ('t', $J=8.6$ Hz, 1H, H_{2s}), 3.30-3.39 (m, 1H, H_{4s}), 3.42-3.52 (m, 2H, H_{5s}, H_{3s}), 3.70 (dd, $J=5.9$ Hz, $J=12.3$ Hz, 1H, H_{6s}), 3.90 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, H_{6s}), 4.28 ('q', $J=6.3$ Hz, 1H, H β), 4.45-4.56 (m, 2H, H α , H_{1s}).

^{13}C RMN (D_2O) δ (ppm): 16.8 (CH_3), 21.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 25.8 (NHCH_3), 57.1 (C_α), 60.7 (C_{6s}), 69.6 (C_{4s}), 73.1 (C_{2s}), 75.6 (C_β), 75.7 (C_{3s}), 76.0 (C_{5s}), 102.1 (C_1), 171.5, 174.5 (2CO).

Boc-L-Ala-NHMe

Sobre una disolución de Boc-L-Ala-OH (1.00 g, 5.29 mmol) en CH₃CN seco (40 mL) y con tamiz molecular (4 Å) se añade DIEA (4.4 mL, 26.4 mmol) a 0 °C, clorhidrato de metilamina (714 mg, 10.60 mmol) y TBTU (2.21 g, 6.88 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 8 h, se filtra sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en AcOEt (40 mL) y se lava con HCl 1N (20 mL) y NaHCO₃ al 5% (20 mL). La fase orgánica se seca, se evapora y el crudo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) para obtener el compuesto **19** (730 mg) como un sólido blanco, con un 68% de rendimiento.

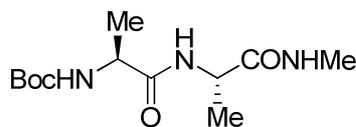
Análisis elemental (%)	calculado (C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₃):	C, 53.45; H, 8.97; N, 13.85
	encontrado:	C, 53.61; H, 8.99; N, 13.80

Punto de fusión: 106-108 °C

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.18, CHCl₃): -26.1

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 1.36 (d, *J*=7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.44 (s, 9H, (CH₃)₃), 2.81 (d, *J*=4.7 Hz, 3H, NHCH₃), 4.08-4.26 (m, 1H, H_α), 5.20 (d, *J*=7.3 Hz, 1H, NHBoc), 6.36-6.57 (m, 1H, NHCH₃).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 18.6 (CH_3), 26.2 (NHCH_3), 28.3 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 50.0 (C_α), 80.0 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 155.5 (CO_{Boc}), 173.4 (CO).

Boc-L-Ala-L-Ala-NHMe**21**

A una disolución del compuesto **19** (226 mg, 1.12 mmol) en CH_2Cl_2 (5 mL) se añade TFA (5 mL). La reacción se agita durante 3 h y se concentra para dar la sal trifluoroacética **20** (1.09 mmol). Este compuesto se disuelve en CH_3CN (10 mL), se añade tamiz molecular (4 Å) y se trata con Boc-L-Ala-OH (247 mg, 1.30 mmol), DIEA (0.9 mL, 5.44 mmol) y TBTU (454 mg, 1.41 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 8 h, se filtra sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en AcOEt (20 mL) y se lava con HCl 1N (10 mL) y NaHCO_3 al 5% (10 mL). La fase orgánica se seca y se evapora y el crudo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 15:1) para dar el compuesto **21** (238 mg, 80%) como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado ($\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$):	C, 52.73; H, 8.48; N, 15.37
	encontrado:	C, 52.75; H, 8.39; N, 15.40

Punto de fusión: 106-108 °C

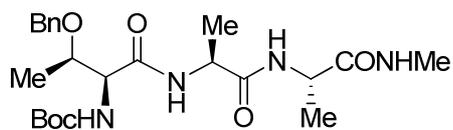
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.07, CH_3OH): -39.5

^1H RMN (CDCl_3)	δ (ppm): 1.37 (d, $J=4.3$ Hz, 3H, $\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 1.40 (d, $J=4.3$ Hz, 3H, $\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 1.46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.80 (d, $J=4.8$ Hz, 3H, NHCH_3), 4.02-4.18 (m, 1H, $\text{H}_{\alpha\text{Ala}}$), 4.38-4.54 (m, 1H,
--------------------------------------	--

H_{αAla}), 4.89-4.99 (m, 1H, NHBoc), 6.48 (s ancho, 1H, NHCH₃), 6.58 (d, *J*=7.3 Hz, 1H, NH).

¹³C RMN (CDCl₃)

δ (ppm): 18.0 (2CH_{3Ala}), 26.3 (NHCH₃), 28.3 (C(CH₃)₃), 48.8 (C_{αAla}), 50.8 (C_{αAla}), 80.7 (C(CH₃)₃), 155.8 (CO_{Boc}), 172.5 (2CO).

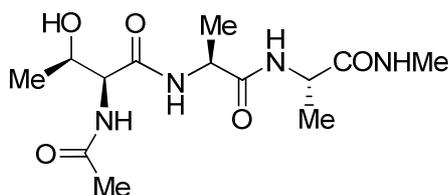
Boc-L-Thr(Bn)-L-Ala-L-Ala-NHMe**23**

Sobre una disolución de la sal trifluoroacética **22** (90 mg, 0.31 mmol) en DMF (4 mL) y con tamiz molecular (4 Å, 100 mg) se añade, a 0 °C, Boc-L-Thr(Bn)-OH (125 mg, 0.40 mmol), TBTU (129 mg, 0.40 mmol) y DIEA (0.26 mL, 1.55 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 10 h, se filtra el tamiz sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El residuo resultante se disuelve en CHCl₃/ⁱPrOH (3:1) (15 mL) y se lava con HCl 1N (5 mL). La fase orgánica se seca (Na₂SO₄), se filtra y evapora. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 15:1) para dar el compuesto **23** (110 mg, 77%) como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₂₃ H ₃₆ N ₄ O ₆):	C, 59.46; H, 7.81; N, 12.06
	encontrado:	C, 59.33; H, 7.86; N, 12.00

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.29 (d, <i>J</i> =6.1 Hz, 3H, CH ₃ Thr), 1.32-1.40 (m, 6H, 2CH ₃ Ala), 1.45 (s, 9H, (CH ₃) ₃), 2.79 (d, <i>J</i> =4.8 Hz, 3H, NHCH ₃), 4.04-4.20 (m, 2H, H _α Thr, H _β Thr), 4.29-4.37 (m, 1H, H _α Ala), 4.39-4.50 (m, 2H, H _α Ala, CH _a H _b Ph), 4.63 (d, <i>J</i> =11.3 Hz, 1H, CH _a H _b Ph), 5.49 (d, <i>J</i> =4.6 Hz, 1H, NH _{Boc}), 6.54-6.75 (m, 2H, NH _{Ala} , NHCH ₃), 7.07 (d, <i>J</i> =7.2 Hz, 1H, NH _{Ala}), 7.25-7.41 (m, 5H, Ph).
---	--

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 16.2 ($\text{CH}_{3\text{Thr}}$), 17.5 ($2\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 25.5 (NHCH_3), 28.2 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 49.1 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 49.9 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 59.7 ($\text{C}_{\alpha\text{Thr}}$), 71.6 (CH_2Ph), 74.1 (C_{β}), 81.0 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 127.8, 128.1, 128.5, 137.4 (Ph), 156.3 (CO_{Boc}), 171.4, 171.5, 172.6 (3CO).

Ac-L-Thr-L-Ala-L-Ala-NHMe**Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe**

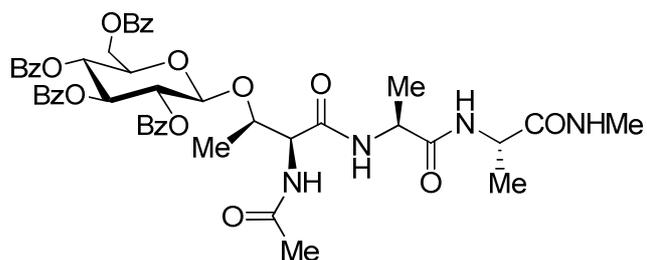
A una disolución de **23** (80 mg, 0.17 mmol) en CH_2Cl_2 (3 mL) se le añade TFA (3 mL) y la reacción se agita durante 2 h y se evapora. El residuo obtenido se trata con piridina/ Ac_2O (2:1, 6 mL) y después de 3 h de agitación se concentra. Por último, el crudo resultante se disuelve en una mezcla de MeOH/ AcOEt (6 mL) y se somete a hidrogenólisis durante 4 h, a presión atmosférica y temperatura ambiente, utilizando Pd/C (20 mg) como catalizador. La reacción se filtra sobre diatomeas, se evapora y el residuo se purifica mediante columna cromatográfica en fase reversa (C_{18}), obteniéndose el compuesto **Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe** (40 mg, 74%) como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado ($\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_5$):	C, 49.36; H, 7.65; N, 17.71
	encontrado:	C, 49.44; H, 7.61; N, 17.77
^1H RMN (D_2O)	δ (ppm):	1.19 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, CH_3_{Thr}), 1.29-1.40 (m, 6H, $2\text{CH}_3_{\text{Ala}}$), 2.06 (s, 3H, CH_3CO), 2.70 (s, 3H, NHCH_3), 4.12-4.23 (m, 2H, $\text{H}_{\beta\text{Thr}}$, $\text{H}_{\alpha\text{Ala}}$), 4.24-4.33 (m, 2H, $\text{H}_{\alpha\text{Thr}}$, $\text{H}_{\alpha\text{Ala}}$).
^1H RMN ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$)	δ (ppm):	1.19 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, CH_3_{Thr}), 1.29-1.40 (m, 6H, $2\text{CH}_3_{\text{Ala}}$), 2.06 (s, 3H, CH_3CO), 2.70 (s, 3H, NHCH_3),

4.12-4.23 (m, 2H, H_βThr, H_αAla), 4.24-4.33 (m, 2H, H_αThr, H_αAla), 7.77 (d, *J*=4.2 Hz, 1H, NH), 8.11-8.23 (m, 2H, 2NH), 8.40 (d, *J*=5.6 Hz, 1H, NH).

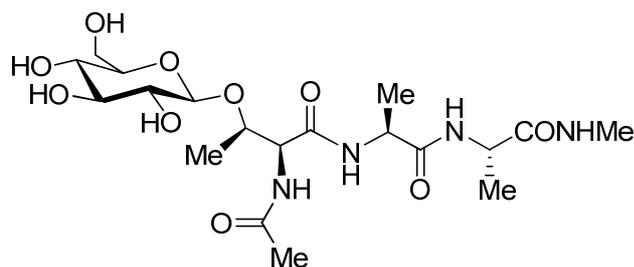
¹³C RMN (D₂O)

δ (ppm): 16.2 (CH₃Ala), 16.4 (CH₃Ala), 18.7 (CH₃Thr), 21.6 (CH₃CO), 25.8 (NHCH₃), 49.7 (C_αAla), 49.8 (C_αAla), 59.1 (C_αThr), 67.0 (C_βThr), 172.1, 174.6, 174.7, 175.2 (4CO).

Ac-L-Thr-[β -D-O-Glc(Bz₄)]-L-Ala-L-Ala-NHMe

Sobre una suspensión de **Ac-Thr-Ala-Ala-NHMe** (35 mg, 0.15 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4 mL) con tamiz molecular (4 Å, 20 mg) se añade triflato de plata (60 mg, 0.25 mmol) bajo atmósfera inerte. La mezcla se agita a -30 °C y a continuación se añade una disolución de bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo (570 mg, 0.86 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4 mL). La reacción se agita a esta temperatura 1 hora y después, dejando que alcance temperatura ambiente, se mantiene la agitación durante otras 14 horas. El crudo se filtra sobre tierra de diatomeas y se concentra y el residuo resultante se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH (95:5) para obtener 31 mg (31%) de **Ac-L-Thr-[β -D-O-Glc(Bz₄)]-L-Ala-L-Ala-NHMe**. Este producto se empleó directamente en la siguiente reacción sin caracterización previa.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₄₇ H ₅₀ N ₄ O ₁₄):	C, 63.08; H, 5.63; N, 6.26
	encontrado:	C, 63.14; H, 5.60; N, 6.30

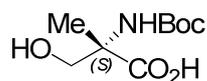
Ac-L-Thr-(β -D-O-Glc)-L-Ala-L-Ala-NHMe**Ac-Thr*-Ala-Ala-NHMe**

Una disolución de **Ac-L-Thr-[β -O-D-Glc(Bz₄)]-L-Ala-L-Ala-NHMe** (30 mg, 0.03 mmol) en MeOH (5 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5 M) hasta pH=9. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 horas y se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y evapora. La purificación del residuo mediante cromatografía en fase reversa (cartucho C₁₈) proporciona el glucopéptido modelo deseado **Ac-Thr*-Ala-Ala-NHMe** (14 mg, 88%) como un aceite incoloro.

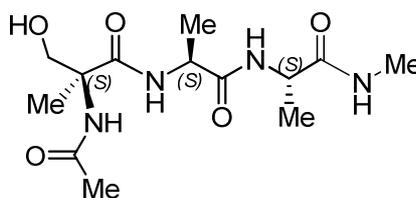
Análisis elemental (%)	calculado (C ₄₇ H ₅₀ N ₄ O ₁₄):	C, 47.69; H, 7.16; N, 11.71
	encontrado:	C, 47.79; H, 7.20; N, 11.65

¹ H RMN (D ₂ O)	δ (ppm): 1.27 (d, $J=6.3$ Hz, 3H, CH ₃ Thr), 1.35-1.43 (m, 6H, 2CH ₃ Ala), 2.10 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.74 (s, 3H, NHCH ₃), 3.22-3.30 (m, 1H, H ₂), 3.35-3.42 (m, 1H, H ₄), 3.43-3.53 (m, 2H, H ₅ , H ₃), 3.73 (dd, $J=12.3$ Hz, $J=5.9$ Hz, 1H, H ₆), 3.92 (dd, $J=12.2$ Hz, $J=1.8$ Hz, 1H, H ₆), 4.24 (c, $J=7.2$ Hz, 1H, H _{α} Ala), 4.31-4.39 (m, 2H, H _{α} Ala, H _{β}), 4.41 (d, $J=4.6$ Hz, 1H, H _{α} Thr), 4.55 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, H ₁).
---------------------------------------	--

^{13}C RMN (D_2O) δ (ppm): 15.6 (CH_3Thr), 16.4 (CH_3Ala), 16.5 (CH_3Ala), 21.7 (CH_3CO), 25.8 (NHCH_3), 49.7 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 49.8 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 58.3 (C_ω), 60.8 (C_6), 69.7 (C_4), 73.0 (C_2), 73.6 (C_β), 75.6, 75.9 (C_5, C_3), 99.7 (C_1), 171.6, 174.4, 174.8, 175.2 (4CO).

Boc-(S)- α -MeSer-OH

A una disolución de (*S*)- α -metilserina (**27**) (compuesto descrito en: Aydillo, C.; Jiménez-Osés, G.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M.; Avenzoza, A. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 4840-4848) (331 mg, 2.78 mmol) en NaOH 1N (10 mL) y dioxano (5 mL) se le añade Boc₂O (720 mg, 3.28 mmol) a 0 °C. La mezcla se agita durante 24 h dejando que alcance temperatura ambiente. Se evapora entonces el dioxano y la fase acuosa se lava con Et₂O (20 mL). A continuación, se añade a la fase acuosa CHCl₃/iPrOH (3:1) (30 mL) y la mezcla se agita mientras se acidifica hasta pH 2-3 con una disolución de H₂SO₄ 1M. Tras separarse la fase orgánica, la fase acuosa se satura con NaCl y se extrae con CHCl₃/iPrOH (3:1) (4 x 20 mL). El conjunto de las fases orgánicas se seca (Na₂SO₄), filtra y se concentra para dar **Boc-(S)-MeSer-OH** (548 mg), como un aceite incoloro y en un 90% de rendimiento, que se utiliza sin purificar en la siguiente reacción.

Ac-(S)- α -MeSer-L-Ala-L-Ala-NHMe**Ac-MeSer-Ala-Ala-NHMe**

A una disolución del dipéptido **21** (66 mg, 0.24 mmol) en CH_2Cl_2 (2 mL) se le añade TFA (2 mL). La reacción se agita durante 3 h y se concentra para dar la sal trifluoroacética **22** (0.22 mmol). Este compuesto se disuelve en DMF (3 mL) y se adiciona sobre una disolución del ácido **Boc-(S)-MeSer-OH** (43 mg, 0.20 mmol) en DMF (2 mL) con tamiz molecular (4 Å). A continuación, se añade DIEA (0.2 mL, 0.90 mmol) y TBTU (83 mg, 0.26 mmol) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 8 h. Se filtra el tamiz sobre tierra de diatomeas, se evapora el disolvente y el residuo resultante se purifica por columna cromatográfica ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 15:1). El compuesto obtenido (40 mg, 0.11 mmol) se disuelve en una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (1:1) (5 mL) y se agita durante 3h. La disolución se concentra y el crudo que resulta se disuelve en piridina (2 mL) y se le añade Ac_2O (1 mL). La reacción se agita durante 3 h y se evapora el disolvente. Finalmente, el residuo obtenido se trata con MeOH/MeONa (0.5 M) hasta $\text{pH}=9$ y, después de 2 h de agitación, la mezcla se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y se concentra. La purificación del crudo por cromatografía de columna en fase reversa (C_{18}) da lugar al compuesto **Ac-MeSer-Ala-Ala-NHMe** (30 mg, 0.09 mmol) como un sólido blanco, con un rendimiento global tras tres etapas del 47%.

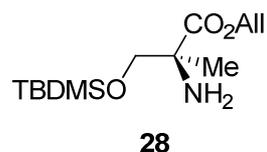
Análisis elemental (%)	calculado ($\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_5$):	C, 49.36; H, 7.65; N, 17.71
	encontrado:	C, 49.40; H, 7.62; N, 17.74

$[\alpha]_D^{25}$ (c=0.24, CH₃OH): -15.0

¹H RMN (D₂O) δ (ppm): 1.36-1.47 (m, 6H, 2CH_{3Ala}), 1.45 (s, 3H, CH_{3MeSer}), 2.05 (s, 3H, CH_{3CO}), 2.75 (s, 3H, NHCH₃), 3.74-3.87 (m, 2H, 2H_{βMeSer}), 4.22-4.34 (m, 2H, 2H_{αAla}).

¹H RMN (H₂O/D₂O) δ (ppm): 1.31-1.37 (m, 6H, 2CH_{3Ala}), 1.40 (s, 3H, CH_{3MeSer}), 2.00 (s, 3H, CH_{3CO}), 2.71 (d, *J*=4.5 Hz, 3H, NHCH₃), 3.69-3.84 (m, 2H, 2H_{βMeSer}), 4.15-4.31 (m, 2H, 2H_{αAla}), 7.66 (s ancho, 1H, NHCH₃), 7.98 (d, *J*=6.0 Hz, 1H, NH), 8.21 (d, *J*=5.6 Hz, 1H, NH), 8.24 (s, 1H, NHAc).

¹³C RMN (D₂O) δ (ppm): 15.9 (CH_{3Ala}), 16.4 (CH_{3Ala}), 19.3 (CH_{3MeSer}), 22.2 (CH_{3CO}), 25.8 (NHCH₃), 49.8 (C_{αAla}), 50.1 (C_{αAla}), 60.3 (C_{αMeSer}), 64.5 (C_{βMeSer}), 174.3, 175.1, 175.3, 175.4 (4CO).

(S)- α -MeSer(TBDMS)-OAlI

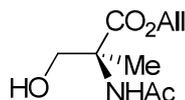
A una disolución de (*S*)- α -metilserina (**27**) (compuesto descrito en: Aydillo, C.; Jiménez-Osés, G.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M.; Avenoza, A. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 4840-4848) (430 mg, 2.76 mmol) en tolueno (20 mL) se añade alcohol alílico (1.7 mL, 25.0 mmol) y *p*TsOH (635 mg, 3.34 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 24 h usando un Dean-Stark. Se evapora el disolvente y el crudo obtenido se suspende en CH₂Cl₂ (15 mL) y se le añade imidazol (946 mg, 13.9 mmol) y TBDMSCl (922 mg, 6.12 mmol). La reacción se agita durante 24 h, se concentra y al residuo resultante se le añade NaOH 1N y AcOEt (20 mL). La fase orgánica se lava con NaOH 1N (3 x 10 mL) y con una disolución saturada de NaCl (10 mL), se seca y evapora. El crudo se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice (AcOEt/hexano, 8:2) para obtener el compuesto **28** (280 mg, 37%) como un aceite amarillo.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₃ H ₂₇ NO ₃ Si):	C, 57.10; H, 9.95; N, 5.12
	encontrado:	C, 57.22; H, 9.90; N, 5.10

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.10, CH₃OH): -5.9

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 0.00-0.11 (m, 6H, 2SiCH ₃), 0.87 (s, 9H, SiC(CH ₃) ₃), 1.25 (s, 3H, CH ₃), 1.90 (s, 1H, OH), 3.48 (d, <i>J</i> =9.1 Hz, 1H, H _{β}), 3.90 (d, <i>J</i> =9.1 Hz, 1H, H _{β}), 4.52-4.69 (m, 2H, CH _{2AlI}), 5.14-5.51 (m, 2H, CH _{2AlIt}), 5.80-6.03 (m, 1H, CH _{AlI}).
---	--

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): -5.8 (SiCH_3), -5.7 (SiCH_3), 18.0 ($\text{Si}\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$),
22.3 (CH_3MeSer), 25.6 ($\text{SiC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 59.5 (C_α), 65.5 (C_β),
69.9 ($\text{CH}_{2\text{All}}$), 118.0 ($\text{CH}_{2\text{All}}$), 131.9 (CH_{All}), 176.2 (CO).

Ac-(S)- α -MeSer-OAll**29**

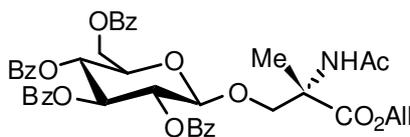
Se disuelve el compuesto **28** (260 mg, 0.95 mmol) en una mezcla de piridina/Ac₂O (2:1) (9 mL) y, después de agitarse a temperatura ambiente durante 5 h, se concentra. El crudo resultante se disuelve en THF (10 mL) y se añade una disolución 1M de TBAF en THF (1.25 mL, 1.25 mmol). La mezcla de reacción se mantiene en agitación 8 h. Se evapora el disolvente y al residuo obtenido se le añade CHCl₃/iPrOH (4:1, 15 mL) y una disolución saturada de NH₄Cl (5 ml). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y evapora. El crudo se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (AcOEt/MeOH, 95:5), obteniéndose el compuesto **29** (170 mg, 88%) como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₉ H ₁₅ NO ₄):	C, 53.72; H, 7.51; N, 6.96
	encontrado:	C, 53.61; H, 7.54; N, 7.01

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.10, CH₃OH): -10.7

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.47 (s, 3H, CH ₃ MeSer), 1.97 (s, 3H, CH ₃ CO), 3.59 (s ancho, 1H, OH), 3.76 (d, <i>J</i> =11.3 Hz, 1H, H _{β}), 4.01 (d, <i>J</i> =11.5 Hz, 1H, H _{β}), 4.52-4.72 (m, 2H, CH ₂ All), 5.11-5.41 (m, 2H, CH ₂ All-), 5.73-5.97 (m, 1H, CH _{All}), 6.36 (s ancho, 1H, NHAc).
---	--

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 20.3 (CH_3), 23.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 62.3 (C_α), 66.5, 66.6 (C_β , $\text{CH}_{2\text{AlI}}$), 118.9 ($\text{CH}_{2\text{AlI-t}}$), 131.4 (CH_{AlI}), 170.8, 172.9 (2CO).

Ac-(S)- α -MeSer[β -D-O-Glc(Bz₄)]-OAll**30**

Sobre una disolución del compuesto **29** (70 mg, 0.35 mmol) en CH₂Cl₂ seco (3 mL) con tamiz molecular (4 Å, 100 mg) se añade triflato de plata (149 mg, 0.58 mmol) bajo atmósfera inerte. La mezcla se agita a -30 °C y a continuación se añade una disolución de bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo (323 mg, 0.49 mmol) en CH₂Cl₂ seco (3 mL). La reacción se agita a esta temperatura 1 hora y después, dejando que alcance temperatura ambiente, se mantiene la agitación durante otras 14 horas. El crudo se filtra sobre tierra de diatomeas y se concentra y el residuo resultante se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice, eluyendo con AcOEt/hexano (1:1), para obtener 135 mg (50%) del glicoaminoácido **30** como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₄₃ H ₄₁ NO ₁₃):	C, 66.23; H, 5.30; N, 1.80
	encontrado:	C, 66.16; H, 5.35; N, 1.77

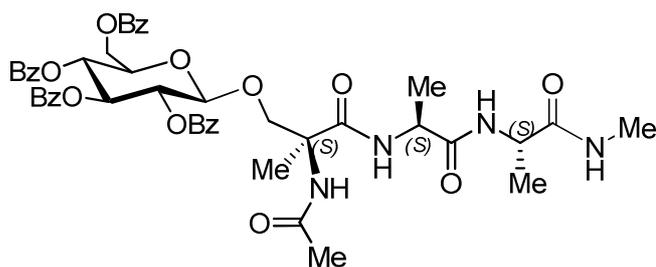
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.25, CH₃OH): +3.7

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.38 (s, 3H, CH ₃ MeSer), 1.56 (s, 3H, CH ₃ CO), 4.01-4.08 (m, 1H, H _{5s}), 4.11 (d, <i>J</i> =9.9 Hz, 1H, H _{β}), 4.18 (d, <i>J</i> =9.9 Hz, 1H, H _{β}), 4.39 (dd, <i>J</i> =12.2 Hz, <i>J</i> =4.8 Hz, 1H, H _{6s}), 4.48-4.61 (m, 3H, 2CH _{All} , H _{6s}), 4.74 (d, <i>J</i> =7.9 Hz, 1H, H _{1s}), 5.12 (d, <i>J</i> =11.0 Hz, 1H, CH _{All-t}), 5.17-5.28 (m, 1H, CH _{All-t}), 5.40 (dd, <i>J</i> =9.7 Hz, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H, H _{2s}), 5.61
---	---

('t', $J=9.7$ Hz, 1H, H_{4s}), 5.72-5.87 (m, 2H, H_{3s}, CH_{All}), 6.16 (s ancho, 1H, NHAc), 7.16-7.23 (m, 2H, Ph), 7.24-7.30 (m, 2H, Ph), 7.31-7.38 (m, 5H, Ph), 7.39-7.53 (m, 3H, Ph), 7.73-7.79 (m, 2H, Ph), 7.80-7.86 (m, 2H, Ph), 7.87-7.92 (m, 2H, Ph), 7.93-8.01 (m, 2H, Ph).

¹³C RMN (CDCl₃)

δ (ppm): 19.6 (CH₃), 23.4 (CH₃CO), 60.3 (C_α), 63.0 (C_{6s}), 66.5 (CH_{2All}), 69.5 (C_{4s}), 71.5 (C_β), 71.8 (C_{2s}), 72.3 (C_{5s}), 72.6 (C_{3s}), 101.5 (C_{1s}), 118.5 (CH_{All-t}), 128.3, 128.4, 128.5, 128.7, 128.8, 129.3, 129.6, 129.8, 129.8, 129.9 (Ph), 131.5 (CH_{All}), 133.2, 133.3, 133.4, 133.5 (Ph), 165.0, 165.2, 165.8, 166.2, 169.7, 171.9 (6CO).

Ac-(S)- α -MeSer[β -D-O-Glc(Bz₄)]-L-Ala-L-Ala-NHMe**31**

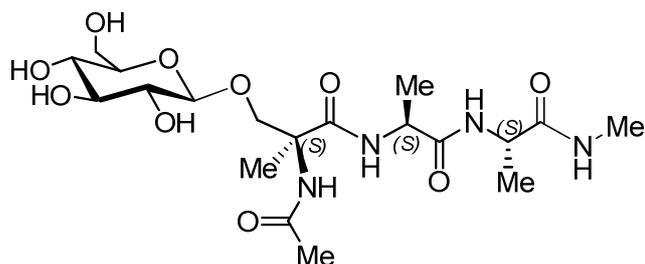
A una disolución del compuesto **30** (130 mg, 0.17 mmol) en THF seco (10 mL) se añade, bajo atmósfera inerte, Pd(PPh₃)₄ (2 mg, 1.7·10⁻³) y morfolina (52 μ L, 0.60 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h, se evapora el disolvente y el residuo resultante se disuelve en AcOEt (10 mL). La fase orgánica se lava con HCl 1N, se seca, filtra y se evapora para dar lugar al ácido correspondiente que se usa en la siguiente reacción sin purificación previa. Sobre una disolución del ácido en DMF (3 mL), con tamiz molecular (4 Å, 100 mg), se añade DIEA (0.13 mL, 0.8 mmol), TBTU (71 mg, 0.22 mmol) y una disolución de la sal **22** (63 mg, 0.22 mmol) en DMF (3 mL). La reacción se agita a durante 10 h, se filtra el tamiz sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El residuo resultante se purifica por columna cromatográfica (CH₂Cl₂/MeOH, 15:1) para obtener 60 mg (41%) del derivado **31** como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₄₇ H ₅₀ N ₄ O ₁₄):	C, 63.08; H, 5.63; N, 6.26
	encontrado:	C, 63.18; H, 5.57; N, 6.22

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.10, CH₃OH): +1.0

^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 1.30-1.55 (m, 9H, $2\text{CH}_{3\text{Ala}}$, $\text{CH}_{3\text{MeSer}}$), 1.72 (s, 3H, CH_3CO), 2.74 (d, $J=4.8$ Hz, 3H, NHCH_3), 3.74 (d, $J=9.9$ Hz, 1H, H_β), 4.00 (d, $J=9.9$ Hz, 1H, H_β), 4.15-4.31 (m, 2H, H_5 , $\text{H}_{\alpha\text{Ala}}$), 4.39-4.56 (m, 2H, H_6 , $\text{H}_{\alpha\text{Ala}}$), 4.72 (dd, $J=12.0$ Hz, $J=2.8$ Hz, 1H, H_6), 4.94 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H_1), 5.42-5.55 (m, 1H, H_2), 5.72 ('t', $J=9.8$ Hz, H_4 1H), 6.00 ('t', $J=9.9$ Hz, 1H, H_3), 6.60 (s, 1H, NHAc), 6.72 (d, $J=4.5$ Hz, 1H, NH_{Ala}), 6.85-6.98 (m, 1H, NHCH_3), 7.22-7.62 (m, 13H, NH_{Ala} , Ph), 7.78-8.07 (m, 8H, Ph).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 17.1 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 17.3 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 19.2 ($\text{CH}_{3\text{MeSer}}$), 23.1 (CH_3CO), 26.3 (NHCH_3), 29.7 (C), 49.4 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 51.4 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 59.8 (C_α), 62.6 (C_6), 69.3 (C_4), 72.1, 72.2 (C_2 , C_3), 72.4, 72.5 (C_5 , C_β), 101.0 (C_1), 128.4, 128.5, 128.5, 128.6, 128.7, 128.8, 129.4, 129.7, 129.8, 133.4, 133.5, 133.6, 134.0 (Ph), 165.2, 165.6, 165.7, 166.2, 171.6, 172.2, 172.7, 173.4 (8CO).

Ac- α -(S)-MeSer(β -D-O-Glc)-L-Ala-L-Ala-NHMe**Ac-MeSer*-Ala-Ala-NHMe**

Una disolución del compuesto **31** (30 mg, 0.03 mmol) en MeOH (5 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5 M) hasta pH=9. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 horas y se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y evapora. La purificación del residuo mediante cromatografía en fase reversa (cartucho C₁₈) proporciona el glucopéptido modelo deseado **Ac-MeSer*-Ala-Ala-NHMe** (14 mg, 87%) como un aceite incoloro.

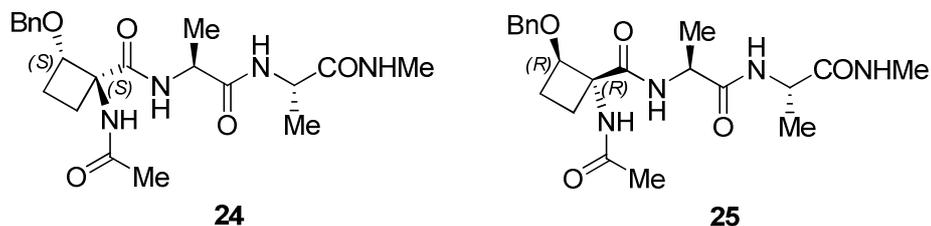
Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₉ H ₃₄ N ₄ O ₁₀):	C, 47.69; H, 7.16; N, 11.71
	encontrado:	C, 47.78; H, 7.13; N, 11.78

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.20, H₂O): -26.0

¹ H RMN (D ₂ O)	δ (ppm): 1.26-1.33 (m, 6H, 2CH _{3Ala}), 1.40 (s, 3H, CH _{3MeSer}), 1.95 (s, 3H, CH _{3CO}), 2.65 (s, 3H, NHCH ₃), 3.18-3.32 (m, 2H, H ₂ , H ₄), 3.33-3.44 (m, 2H, H ₃ , H ₅), 3.63 (dd, $J=12.3$ Hz, $J=6.1$ Hz, 1H, H ₆), 3.73-3.89 (m, 2H, H _{β} , H ₆), 4.04 (d, $J=10.3$ Hz, 1H, H _{β}), 4.12-4.25 (m, 2H, 2H _{αAla}), 4.39 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, H ₁)
---------------------------------------	---

^{13}C RMN (D_2O) δ (ppm): 15.9 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 16.4 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 19.4 ($\text{CH}_{3\text{MeSer}}$), 22.3 (CH_3CO), 25.8 (NHCH_3), 49.8 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 50.2 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 59.4 (C_{α}), 60.8 (C_6), 69.7 (C_4), 71.8 (C_{β}), 73.1 (C_2), 75.6, 76.0 (C_5, C_3), 102.4 (C_1), 174.3, 174.8, 175.1, 175.3 (4CO).

Ac-(1*S*,2*S*)-c₄Ser(Bn)- L-Ala-L-Ala-NHMe y Ac-(1*R*,2*R*)-c₄Ser(Bn)- L-Ala-L-Ala-NHMe



A una disolución del dipéptido **21** (52 mg, 0.19 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL) se le añade TFA (2 mL). La reacción se agita durante 3 h y se concentra para dar su correspondiente sal trifluoroacética **22** (0.18 mmol). Este compuesto se disuelve en DMF (3 mL), se añade tamiz molecular (4 Å) y se trata con la mezcla racémica del derivado ciclobutánico **12** (48 mg, 0.18 mmol), DIEA (0.2 mL, 0.90 mmol) y TBTU (75 mg, 0.23 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 8 h, se filtra el tamiz sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente, obteniéndose una mezcla de los compuestos **24** y **25**. Dicho crudo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 15:1) para dar los compuestos puros **24** (30 mg, 40%) y **25** (27 mg, 36%) como dos sólidos blancos.

Compuesto 24

Análisis elemental (%)	calculado (C ₂₁ H ₃₀ N ₄ O ₅):	C, 60.27; H, 7.23; N, 13.39
	encontrado:	C, 59.98; H, 7.21; N, 13.37

[α]²⁵_D (c=1.22, CH₃OH): +21.2

Punto de fusión: 173-175 °C

^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 1.27 (d, $J=7.4$ Hz, 3H, CH_3Ala), 1.43 (d, $J=7.3$ Hz, 3H, CH_3Ala), 1.69 ('c', $J=11.0$ Hz, 1H, H_δ), 1.94 (s, 3H, CH_3CO), 1.97-2.13 (m, 1H, H_γ), 2.14-2.32 (m, 1H, H_γ), 2.49 ('t', $J=10.6$ Hz, 1H, H_δ), 2.74 (d, $J=4.6$ Hz, 3H, NHCH_3), 4.13-4.30 (m, 2H, $2\text{H}_{\alpha\text{Ala}}$), 4.39 ('t', $J=7.7$ Hz, 1H, H_β), 4.52 (d, $J=11.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_a\text{H}_b\text{Ph}$), 4.63 (d, $J=11.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_a\text{H}_b\text{Ph}$), 7.03-7.15 (m, 1H, NHCH_3), 7.31 (s ancho, 5H, Ph), 7.71 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, $\text{NH}_{c4\text{-Ala}}$), 8.01 (s, 1H, NHAc), 8.56 (d, $J=5.2$ Hz, 1H, NHAla).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 16.8 (CH_3Ala), 17.2 (CH_3Ala), 22.5 (CH_3CO), 24.5, 24.7, (C_γ , C_δ), 26.2 (NHCH_3), 49.7 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 51.0 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 63.7 ($\text{C}_{\alpha c4\text{Ser}}$), 71.6 (CH_2Ph), 79.6 (C_β), 127.8, 128.1, 128.4, 137.0 (Ph), 171.4, 173.0, 173.2, 173.8 (4CO).

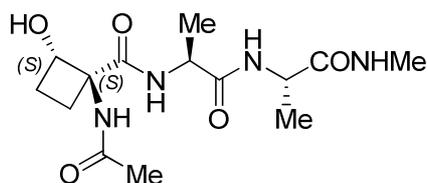
Compuesto 25

Análisis elemental (%) calculado ($\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5$): C, 60.27; H, 7.23; N, 13.39
 encontrado: C, 60.08; H, 7.29; N, 13.35

^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 1.06 (d, 3H, $J=7.3$ Hz, CH_3Ala), 1.44 (d, $J=7.3$ Hz, 3H, CH_3Ala), 1.45-1.51 (m, 1H, H_δ), 1.72-1.82 (m, 1H, H_γ), 2.05 (s, 3H, CH_3CO), 2.17-2.25 (m, 1H, H_γ), 2.70-2.75 (m, 1H, H_δ), 2.76 (d, $J=4.6$ Hz, 3H, NHCH_3), 4.08-4.23 (m, 2H, $2\text{H}_{\alpha\text{Ala}}$), 4.29-4.39 (m, 1H, H_β), 4.67 (d, $J=11.9$ Hz, 1H, $\text{CH}_a\text{H}_b\text{Ph}$), 4.74 (d, $J=11.9$ Hz, 1H, $\text{CH}_a\text{H}_b\text{Ph}$), 7.02-7.10 (m, 1H, NHCH_3), 7.22 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, $\text{NH}_{c4\text{-Ala}}$),

7.33 (s ancho, 5H, Ph), 7.89 (s, 1H, NHAc), 8.31 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, NH_{Ala}).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 17.0 (CH_{3Ala}), 17.1 (CH_{3Ala}), 22.3 (CH₃CO), 23.2, 25.8, (C_γ, C_δ), 26.3 (NHCH₃), 48.9 (C_{αAla}), 51.4 (C_{αAla}), 66.1 (C_{αc4Ser}), 73.0 (CH₂Ph), 80.1 (C_β), 128.2, 128.3, 128.6, 137.0 (Ph), 171.3, 171.4, 172.3, 173.1 (4CO).

Ac-(1*S*,2*S*)-c₄Ser- L-Ala-L-Ala-NHMe**Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe**

Una disolución de **24** (50 mg, 0.12 mmol) en MeOH (5 mL) se somete a hidrogenólisis a presión atmosférica y 25 °C usando H₂ y Pd/C (10 mg) como catalizador. La reacción se mantiene 5 h en agitación, se filtra el catalizador y se evapora el disolvente, obteniéndose un residuo que se purifica mediante cromatografía en fase reversa (cartucho C₁₈) para dar el compuesto **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe** (35 mg, 90%) como un sólido blanco.

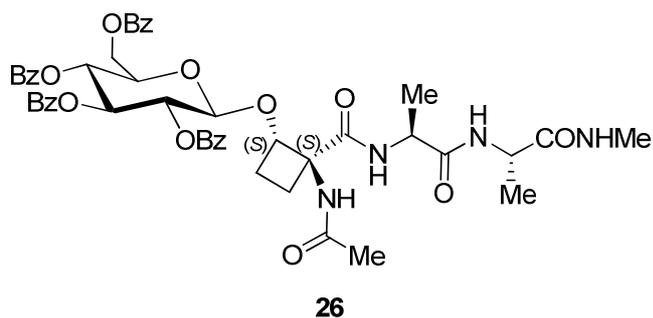
Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₄ H ₂₄ N ₄ O ₅):	C, 51.21; H, 7.37; N, 17.06
	encontrado:	C, 51.01; H, 7.36; N, 17.02

[α]²⁵_D (c=1.03, H₂O): +17.4

Punto de fusión: 129-131 °C

¹H RMN (D₂O) δ (ppm): 1.10-1.27 (m, 6H, 2CH_{3Ala}), 1.31-1.47 (m, 1H, H_{δa}), 1.63-1.78 (m, 1H, H_{γa}), 1.83 (s, 3H, CH₃CO), 2.05-2.18 (m, 1H, H_{γe}), 2.41-2.52 (m, 1H, H_{δe}), 2.56 (s, 3H, NHCH₃), 4.05 (c, *J*=7.1 Hz, 1H, H_{αAla2}), 4.18 (c, *J*=7.1 Hz, 1H, H_{αAla1}), 4.26 (‘t’, *J*=7.1 Hz, 1H, H_β).

^1H RMN ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$)	δ (ppm): 1.10-1.27 (m, 6H, $2\text{CH}_3\text{Ala}$), 1.31-1.47 (m, 1H, $\text{H}_{\delta\text{a}}$), 1.63-1.78 (m, 1H, $\text{H}_{\gamma\text{a}}$), 1.83 (s, 3H, CH_3CO), 2.05-2.18 (m, 1H, $\text{H}_{\gamma\text{c}}$), 2.41-2.52 (m, 1H, $\text{H}_{\delta\text{c}}$), 2.56 (s, 3H, NHCH_3), 4.05 (c, $J=7.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{\alpha\text{Ala}2}$), 4.18 (c, $J=7.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{\alpha\text{Ala}1}$), 4.26 ('t', $J=7.1$ Hz, 1H, H_{β}), 7.49-7.57 (m, 1H, NHCH_3), 7.67 (d, $J=6.2$ Hz, 1H, NH_{Ala}), 8.08 (d, $J=5.8$ Hz, 1H, $\text{NH}_{\text{c4-Ala}}$), 8.69 (s, 1H, NHAc).
^{13}C RMN (D_2O)	δ (ppm): 16.1 (CH_3Ala), 16.4 (CH_3Ala), 21.8 (CH_3CO), 23.7 (C_{δ}), 25.6, (C_{γ}), 25.9 (NHCH_3), 49.8 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 50.2 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 65.8 ($\text{C}_{\alpha\text{c4Ser}}$), 70.8 (C_{β}), 172.9, 174.5, 175.1, 175.3 (4CO).

Ac-(1*S*,2*S*)-c₄Ser-[β-*O*-D-Glc(Bz₄)]-L-Ala-L-Ala-NHMe

Sobre una suspensión de **Ac-c₄Ser-Ala-Ala-NHMe** (50 mg, 0.15 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4 mL) con tamiz molecular (4 Å, 20 mg) se añade triflato de plata (60 mg, 0.25 mmol) bajo atmósfera inerte. La mezcla se agita a -30 °C y a continuación se añade una disolución de bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-α-D-glucopiranosilo (570 mg, 0.86 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4 mL). La reacción se agita a esta temperatura 1 hora y después, dejando que alcance temperatura ambiente, se mantiene la agitación durante otras 14 horas. El crudo se filtra sobre tierra de diatomeas y se concentra y el residuo resultante se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH (95:5) para obtener 39 mg (30%) del compuesto **26** como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₄₈ H ₅₀ N ₄ O ₁₄):	C, 63.57; H, 5.56; N, 6.18
	encontrado:	C, 63.70; H, 5.65; N, 6.10

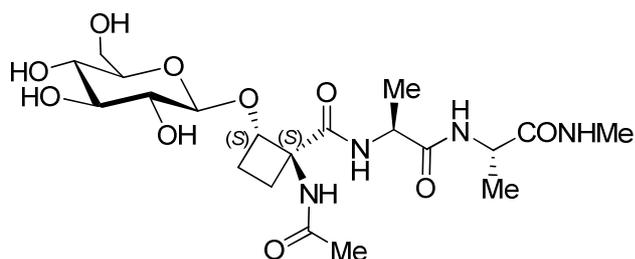
[α]²⁵_D (c=0.98, CH₃OH): +11.4

¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 1.22 (d, *J*=7.3 Hz, 3H, CH_{3Ala}), 1.35 (d, *J*=7.4 Hz, 3H, CH_{3Ala}), 1.51-1.62 (m, 1H, H_δ), 1.83 (s, 3H, CH₃CO), 2.10-2.19 (m, 1H, H_γ), 2.22-2.33 (m, 1H, H_γ), 2.42-2.54

(m, 1H, H₈), 2.70 (d, $J=4.6$ Hz, 3H, NHCH₃), 4.17-4.44 (m, 4H, 2H_{αAla}, H_β, H₅), 4.56 (dd, $J=12.3$ Hz, $J=5.3$ Hz, 1H, H₆), 4.70 (dd, $J=12.4$ Hz, $J=2.6$ Hz, 1H, H₆), 5.07 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H₁), 5.50-5.58 (m, 1H, H₂), 5.68 ('t', $J=9.7$ Hz, 1H, H₄), 5.93 ('t', $J=9.7$ Hz, 1H, H₃), 6.73 (s, 1H, NHAc), 6.81 (d, $J=4.7$ Hz, 1H, NHCH₃), 7.17-7.82 (m, 14H, 2NH, Ph), 7.88-8.07 (m, 8H, Ph).

¹³C RMN (CDCl₃)

δ (ppm): 16.5 (CH_{3Ala}), 16.9 (CH_{3Ala}), 22.6 (CH_{3CO}), 25.2 (C₈), 26.0 (C_γ), 26.3 (NHCH₃), 49.2 (C_{αAla}), 51.1 (C_{αAla}), 62.9 (C₆), 64.4 (C_ω), 69.3 (C₄), 71.3 (C₂), 72.4 (C₃), 73.0 (C₅), 77.9 (C_β), 100.1 (C₁), 128.4, 128.5, 128.5, 128.6, 128.7, 129.4, 129.7, 129.7, 129.9, 129.9, 133.4, 133.6, 133.7, 133.7 (Ph), 165.2, 165.4, 165.7, 166.3, 171.1, 171.9, 172.3, 173.4 (8CO).

Ac-(1*S*,2*S*)-c₄Ser-(β-*O*-D-Glc)-L-Ala-L-Ala-NHMe**Ac-c₄Ser*-Ala-Ala-NHMe**

Una disolución de **26** (30 mg, 0.04 mmol) en MeOH (5 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5 M) hasta pH=9. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 horas y se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y evapora. La purificación del residuo mediante cromatografía en fase reversa (cartucho C₁₈) proporciona el glucopéptido modelo deseado **Ac-c₄Ser*-Ala-Ala-NHMe** (15 mg, 85%) como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₂₀ H ₃₄ N ₄ O ₁₀):	C, 48.97; H, 6.99; N, 11.42
	encontrado:	C, 48.88; H, 6.93; N, 11.38

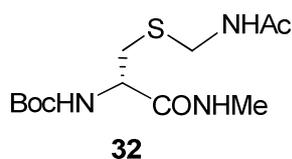
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.05, H₂O): -12.5

¹H RMN (D₂O) δ (ppm): 1.28-1.35 (m, 6H, 2CH_{3Ala}), 1.57 (dd, *J*=20.8 Hz, *J*=11.2 Hz, 1H, H_{δa}), 1.95 (s, 3H, CH₃CO), 1.95-2.06 (m, 1H, H_γ), 2.25 (dd, *J*=19.0 Hz, *J*=9.8 Hz, 1H, H_γ), 2.54-2.63 (m, 1H, H_{δe}), 2.67 (s, 3H, NHCH₃), 3.20-3.32 (m, 2H, H₂, H₄), 3.35-3.44 (m, 2H, H₃, H₅), 3.59-3.67 (m, 1H, H₆), 3.84-3.90 (m, 1H, H₆), 4.17 (c, *J*=7.3 Hz, 1H, H_α), 4.24 (c,

$J=7.2$ Hz, 1H, H_α), 4.53 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, H_1), 4.61 ('t', $J=8.8$ Hz, 1H, H_β).

^1H RMN ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$) δ (ppm): 1.28-1.35 (m, 6H, $2\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 1.57 (dd, $J=20.8$ Hz, $J=11.2$ Hz, 1H, $H_{\delta\text{a}}$), 1.95 (s, 3H, CH_3CO), 1.95-2.06 (m, 1H, H_γ), 2.25 (dd, $J=19.0$ Hz, $J=9.8$ Hz, 1H, H_γ), 2.54-2.63 (m, 1H, $H_{\delta\text{e}}$), 2.67 (s, 3H, NHCH_3), 3.20-3.32 (m, 2H, H_2 , H_4), 3.35-3.44 (m, 2H, H_3 , H_5), 3.59-3.67 (m, 1H, H_6), 3.84-3.90 (m, 1H, H_6), 4.17 (c, $J=7.3$ Hz, 1H, H_α), 4.24 (c, $J=7.2$ Hz, 1H, H_α), 4.53 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, H_1), 4.61 ('t', $J=8.8$ Hz, 1H, H_β), 7.52-7.59 (m, 1H, NHCH_3), 7.72 (d, $J=6.7$ Hz, 1H, NH), 8.37 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, NH), 8.87 (s, 1H, NHAc).

^{13}C RMN (D_2O) δ (ppm): 15.8 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 16.4 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 21.8 (CH_3CO), 24.3, 24.6, (C_δ , C_γ), 25.9 (NHCH_3), 49.8 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 50.6 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 60.9 (C_6), 65.1 (C_α), 69.7 (C_4), 72.3 (C_2), 75.0, 75.7, 76.3 (C_3 , C_5 , C_β), 100.5 (C_1), 172.8, 174.2, 175.3, 175.3 (4CO).

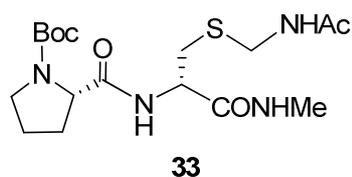
Boc-L-Cys(Acm)-NHMe

Sobre una disolución de Boc-L-Cys(Acm)-OH (1.00 g, 3.42 mmol) en CH₃CN seco (30 mL) y con tamiz molecular (4Å), se añade DIEA (2.2 mL, 13.6 mmol) a 0 °C, clorhidrato de metilamina (460 mg, 6.80 mmol) y TBTU (1.40 g, 4.40 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 8 h, se filtra sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en AcOEt (40 mL) y se lava con HCl 1N (20 mL) y NaHCO₃ al 5% (20 mL). La fase orgánica se seca, se evapora y el crudo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) para obtener el compuesto **32** (910 mg) como un sólido blanco, con un 87% de rendimiento.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₂ H ₂₃ N ₃ O ₄ S):	C, 47.19; H, 7.59; N, 13.76; S, 10.50
	encontrado:	C, 47.10; H, 7.64; N, 10.82; S, 10.44

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.44 (s, 9H, (CH ₃) ₃), 2.02 (s, 3H, SCH ₂ NHCOCH ₃), 2.66-3.03 (m, 5H, NHCH ₃ , 2H _{βCys}), 4.23-4.42 (m, 2H, SCH _a , H _{αCys}), 4.48 (dd, <i>J</i> =14.0 Hz, <i>J</i> =6.7 Hz, 1H, SCH _b), 5.72 (d, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H, NH _{Boc}), 6.80-6.96 (m, 1H, NHMe), 7.31-7.49 (m, 1H, NH _{Acm}).
---	--

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 23.4 ($\text{SCH}_2\text{NHCOCH}_3$), 26.6 (NHCH_3), 28.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34.6 ($\text{C}_{\beta\text{Cys}}$), 41.4 (SCH_2), 53.9 ($\text{C}_{\alpha\text{Cys}}$), 80.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 156.2 (CO_{Boc}), 171.1, 171.5 (2CO).

Boc-L-Pro-L-Cys(Acm)-NHMe

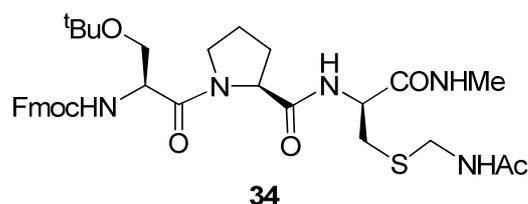
A una disolución de **32** (900 mg, 2.95 mmol) en CH_2Cl_2 (10 mL) se le añade TFA (10 mL). La reacción se agita durante 3 h y se concentra para dar la sal trifluoroacética. Este compuesto se disuelve en CH_3CN (30 mL), se añade tamiz molecular (4Å) y se trata con Boc-L-Pro-OH (762 mg, 3.54 mmol), DIEA (2.0 mL, 11.8 mmol) y TBTU (1.23 g, 3.84 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 8 h, se filtra sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en $\text{CHCl}_3/\text{PrOH}$ (3:1, 30 mL) y se lava con HCl 1N (10 mL) y NaHCO_3 al 5% (10 mL). La fase acuosa se vuelve a extraer con $\text{CHCl}_3/\text{PrOH}$ (3:1, 20 mL) y el conjunto de las fases orgánicas reunidas se seca y evapora. El crudo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1) para dar el compuesto **33** (750 mg, 63%) como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado ($\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$):	C, 50.73; H, 7.51; N, 13.92; S, 7.97
	encontrado:	C, 50.84; H, 7.54; N, 13.98; S, 7.94

^1H RMN (CDCl_3)	δ (ppm): 1.46 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.82-1.95 (m, 2H, $2\text{H}_{\gamma\text{Pro}}$), 1.96-2.12 (m, 4H, $\text{SCH}_2\text{NHCOCH}_3$, $\text{H}_{\beta\text{Pro}}$), 2.13-2.29 (m, 1H, $\text{H}_{\beta\text{Pro}}$), 2.77 (d, $J=4.3$ Hz, 3H, NHCH_3), 2.90 (dd, $J=14.7$ Hz, $J=5.2$ Hz, 1H, $\text{H}_{\beta\text{Cys}}$), 3.04-3.19 (m, 1H, $\text{H}_{\beta\text{Cys}}$),
--------------------------------------	--

3.34-3.59 (m, 2H, 2H_{δPro}), 4.10-4.40 (m, 3H, SCH₂, H_{αPro}),
4.60-4.77 (m, 1H, H_{αCys}), 7.20-7.50 (m, 3H, 3NH).

¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 23.2 (SCH₂NHCOCH₃), 24.6 (C_{γPro}), 26.5
(NHCH₃), 28.3 (C(CH₃)₃), 29.9 (C_{βPro}), 32.5 (C_{βCys}), 41.0
(SCH₂), 47.4 (C_{δPro}), 52.6 (C_{αCys}), 61.2 (C_{αPro}), 81.1
(C(CH₃)₃), 155.9 (CO_{Boc}), 170.6, 171.2, 172.6 (3CO).

Fmoc-L-Ser(^tBu)-Pro-Cys(Acm)-NHMe

A una disolución de **33** (700 mg, 1.74 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL) se le añade TFA (10 mL). La reacción se agita durante 3 h y se concentra. El crudo resultante se disuelve en CH₃CN (25 mL) y, en presencia de tamiz molecular (4Å), se añade Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH (801 mg, 2.10 mmol), DIEA (1.20 mL, 6.96 mmol) y TBTU (726 mg, 2.26 mmol) a 0 °C. Después de 8 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El residuo obtenido se disuelve en AcOEt (25 mL) y se lava con HCl 1N (10 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y evapora. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 15:1) para dar el compuesto **34** (700 mg, 60%) como un sólido blanco.

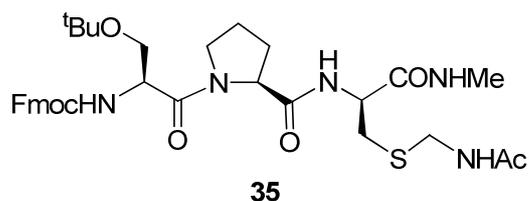
Análisis elemental (%)	calculado (C ₃₄ H ₄₅ N ₅ O ₇ S):	C, 61.15; H, 6.79; N, 10.49;
		S, 4.80
	encontrado:	C, 60.04; H, 6.74; N, 10.55;
		S, 4.83

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm):	1.18 (s, 9H, (CH ₃) ₃), 1.96-2.32 (m, 7H, SCH ₂ NHCOCH ₃ , 2H _{γPro} , 2H _{βPro}), 2.65-2.97 (m, 4H, NHCH ₃ , H _{βCys}), 3.17 (dd, <i>J</i> =15.0 Hz, <i>J</i> =5.0 Hz, 1H, H _{βCys})
		3.37-3.56 (m, 1H, H _{βSer}), 3.60-3.89 (m, 3H, H _{βSer} , 2H _{δPro}), 4.15-4.80 (m, 8H, SCH ₂ , CH _{Fmoc} , CH _{2Fmoc} , H _{αPro} , H _{αSer} ,

$H_{\alpha\text{Cys}}$, 5.59 (d, $J=7.3$ Hz, NH_{Fmoc}), 6.80-6.96 (m, 1H, NH), 7.02-7.24 (m, 2H, 2NH), 7.28-7.48 (m, 4H, Ar.), 7.53-7.68 (m, 2H, Ar.), 7.73-7.86 (m, 2H, Ar.).

^{13}C RMN (CDCl_3)

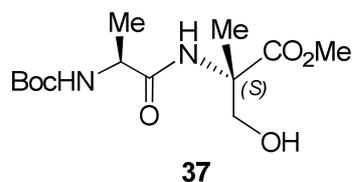
δ (ppm): 23.5 ($\text{SCH}_2\text{NHCO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 25.3 ($\text{C}_{\gamma\text{Pro}}$), 26.8 (NHCH_3), 27.6 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 29.3 ($\text{C}_{\beta\text{Pro}}$), 33.9 ($\text{C}_{\beta\text{Cys}}$), 41.9 (SCH_2), 47.3 (CH_{Fmoc}), 48.4 ($\text{CH}_{\delta\text{Pro}}$), 53.0 ($\text{C}_{\alpha\text{Ser}}$), 53.7 ($\text{C}_{\alpha\text{Cys}}$), 61.7 ($\text{C}_{\beta\text{Ser}}$), 63.0 ($\text{C}_{\alpha\text{Pro}}$), 67.3 ($\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$), 74.8 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 120.2, 125.2, 127.3, 128.0, 141.5, 143.8, 143.9 (Ar.), 156.1 (CO_{Boc}), 170.5, 170.7, 171.7, 171.9 (4CO).

L-Ser(^tBu)- L-Pro- L-Cys(Acm)-NHMe

Una disolución del compuesto **34** (500 mg, 0.75 mmol) en CH₃CN (20 mL) se trata con piperidina (0.30 mL, 2.99 mmol). La reacción se agita durante 6 h a temperatura ambiente y se concentra. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃, 90:10:0.5) para dar la amina libre **35** (291 mg, 87%) como un sólido blanco que se utiliza en el siguiente paso sin caracterizarse previamente.

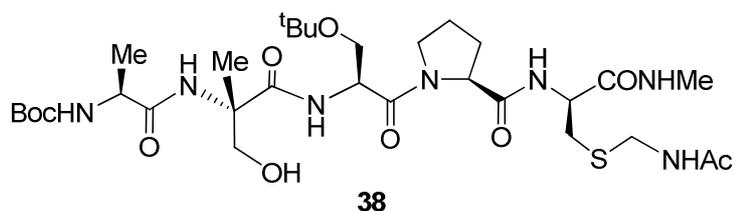
Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₉ H ₃₅ N ₅ O ₅ S):	C, 51.22; H, 7.92; N, 15.72; S, 7.20
	encontrado:	C, 51.13; H, 7.97; N, 15.66; S, 7.24

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.12-1.25 (m, 9H, (CH ₃) ₃), 1.88-2.31 (m, 7H, SCH ₂ NHCOCH ₃ , 2H _{γPro} , 2H _{βPro}), 2.75 (s, 3H, NHCH ₃), 2.79-2.90 (m, 1H, H _{βCys}), 3.02-3.12 (m, 1H, H _{βCys}), 3.38-3.81 (m, 4H, H _{βSer} , H _{βSer} , 2H _{δPro}), 4.17-4.38 (m, 2H, SCH ₂), 4.43-4.58 (H _{αPro} , H _{αCys}), 4.70-4.86 (m, 1H, H _{αSer}).
---	--

Boc-L-Ala-(S)-MeSer- OMe

Sobre una disolución del clorhidrato del éster metílico de MeSer (**36**) (300 mg, 1.77 mmol) en DMF (6 mL) y con tamiz molecular (4 Å, 100 mg) se añade Boc-L-Ala-OH (400 mg, 2.12 mmol), TBTU (680 mg, 2.12 mmol) y DIEA (1.32 mL, 7.97 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 8 h, se filtra el tamiz sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El residuo resultante se disuelve en AcOEt (15 mL) y se lava con HCl 1N (5 mL). La fase orgánica se seca (Na_2SO_4), se filtra y evapora. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 15:1) para dar el compuesto **37** (220 mg, 41%) como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado ($\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$):	C, 51.30; H, 7.95; N, 9.20
	encontrado:	C, 51.41; H, 7.98; N, 9.24
^1H RMN (CDCl_3)	δ (ppm):	1.36 (d, $J=7.1$ Hz, 3H, CH_3Ala), 1.43 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.53 (s, 3H, CH_3MeSer), 3.77-3.85 (m, 4H, CO_2CH_3 , H_β), 3.98-4.21 (m, 2H, $\text{H}_{\alpha\text{Ala}}$, H_β), 5.05 (s ancho, 1H, NH_{Boc}), 7.03 (s, 1H, NH).
^{13}C RMN (CDCl_3)	δ (ppm):	17.5 (CH_3Ala), 20.0 (CH_3MeSer), 28.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 51.3 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 53.2 (CO_2CH_3), 62.6 ($\text{C}_{\alpha\text{MeSer}}$), 65.6 ($\text{C}_{\beta\text{MeSer}}$), 80.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 156.2 (CO_{Boc}), 173.1, 173.8 (2CO).

Boc-L-Ala-(S)-MeSer- L-Ser(^tBu)-L-Pro- L-Cys(Acm)-NHMe

A una disolución del dipéptido **37** (160 mg, 0.52 mmol) en MeOH/H₂O (3:1, 4 mL), se añade LiOH·H₂O (110 mg, 2.6 mmol) y se deja agitando a temperatura ambiente durante 12 h. Se evapora el MeOH y la fase acuosa se acidifica con HCl 1N y se extrae con CHCl₃/iPrOH (3:1) (3 x 10 mL). El conjunto de las fases orgánicas se seca (Na₂SO₄ anhidro), se filtra y evapora para dar un residuo que se utiliza sin purificar en el siguiente paso. Sobre una disolución del ácido en DMF (6 mL) con tamiz molecular (4Å, 100 mg) se añade sucesivamente DIEA (0.4 mL, 2.40 mmol), el tripéptido **35** (256 mg, 0.58 mmol) y TBTU (200 mg, 0.62 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 8 h, se filtra el tamiz y se evapora el disolvente. El crudo resultante se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH (9:1) para dar el pentapéptido **38** (220 mg, 61%) como un aceite incoloro.

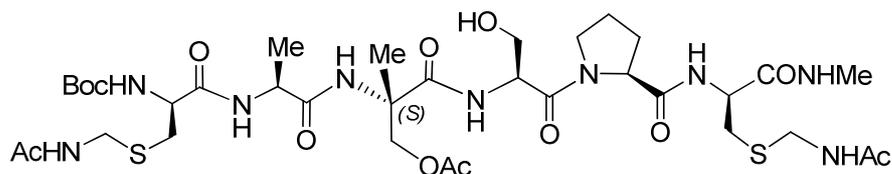
Análisis elemental (%)	calculado (C ₃₁ H ₅₅ N ₇ O ₁₀ S):	C, 51.87; H, 7.72; N, 13.66; S, 4.47
	encontrado:	C, 51.99; H, 7.77; N, 13.60; S, 4.49

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.17 (s, 9H, OC(CH ₃) ₃), 1.36 (d, 3H, <i>J</i> =7.2 Hz, CH ₃ Ala), 1.42 (s, 9H, C(O)O(CH ₃) ₃), 1.90-2.11 (m, 6H, H _β Pro, SCH ₂ NHCOCH ₃ , 2H _γ Pro), 2.18-2.32 (m, 1H, H _β Pro), 2.76 (d, <i>J</i> =4.8 Hz, 3H, NHCH ₃), 3.07-3.23 (m, 2H, 2H _β Cys),
---	--

3.41-4.11 (m, 6H, 2H_{βSer}, 2H_{δPro}, 2H_{βMeSer}), 4.20-5.04 (m, 6H, SCH₂, H_{αAla}, H_{αCys}, H_{αPro}, H_{αSer}), 5.49 (d, 1H, *J*=5.1 Hz, NH_{Boc}), 6.47 (d, *J*=6.8 Hz, 1H, NH), 6.97 (d, *J*=4.7 Hz, 1H, NH), 7.05-7.60 (m, 3H, 3NH).

¹³C RMN (CDCl₃)

δ (ppm): 17.5 (CH_{3Ala}), 18.8 (CH_{3MeSer}), 23.4 (SCH₂NHCOCH₃), 25.2 (C_{γPro}), 26.7 (NHCH₃), 27.5 (C(CH₃)₃), 28.4 (C(CH₃)₃), 29.3 (C_{βPro}), 33.4 (C_{βCys}), 41.8 (SCH₂), 48.1 (C_{δPro}), 48.5 (C_{αAla}), 51.6, 51.9 (C_{αSer}, C_{αCys}), 61.3, 61.5, 62.6 (C_{αMeSer}, C_{βSer}, C_{αPro}), 67.0 (C_{βMeSer}), 80.8 (2C(CH₃)₃), 156.2 (CO_{Boc}), 170.4, 170.9, 171.0, 171.7, 172.0, 172.3, 173.7 (7CO).

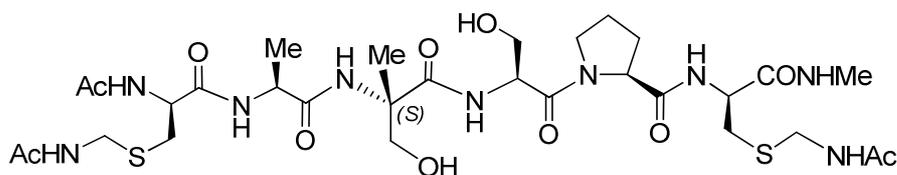
Boc-L-Cys(Acm)-L-Ala-(S)-MeSer(Ac)-L-Ser-L-Pro-L-Cys(Acm)-NHMe**39**

El compuesto **38** (220 mg, 0.31 mmol) se disuelve en piridina/ Ac_2O (2:1, 6 mL) y se agita durante 6 h a temperatura ambiente. La mezcla se concentra y el residuo resultante se purifica por columna cromatográfica ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1) para dar 130 mg (55 %) del producto acetilado (se recuperaron también 80 mg de producto de partida). A una disolución de este compuesto (130 mg, 0.17 mmol) en CH_2Cl_2 (3 mL) se añade TFA (3 mL) y después de 3 h de agitación se evapora el disolvente. La amina obtenida se disuelve en DMF (4 mL), se añade tamiz molecular (4Å, 50 mg) y se trata a 0 °C con Boc-L-Cys(Acm)-OH (50 mg, 0.17 mmol), DIEA (0.13 mL, 0.77 mmol) y TBTU (71 mg, 0.22 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 7 h y, tras filtrarse el tamiz, se concentra. El crudo resultante se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1) para dar el hexapéptido **39** (130 mg, 87%) como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado ($\text{C}_{35}\text{H}_{59}\text{N}_9\text{O}_{13}\text{S}_2$):	C, 47.88; H, 6.77; N, 14.36; S, 7.30
	encontrado:	C, 47.79; H, 6.80; N, 14.32; S, 7.31

^1H RMN (CD_3OD)	δ (ppm): 1.30-1.34 (m, 3H, CH_3_{Ala}), 1.41 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.43 (s, 3H, $\text{CH}_3_{\text{MeSer}}$), 1.80-2.16 (m, 12H,
---	--

2SCH₂NHCOCH₃, OCOCH₃, 2H_γPro, H_βPro), 2.18-2.29 (m, 1H, H_βPro), 2.61-2.86 (m, 5H, NHCH₃, 2H_βCys), 2.98 (dd, $J=14.0$ Hz, $J=4.3$ Hz, 1H, H_βCys), 3.09 (dd, $J=14.1$ Hz, $J=4.3$ Hz, 1H, H_βCys), 3.62-3.90 (m, 6H, 2H_βSer, 2H_δPro, 2H_βMeSer), 4.12-4.54 (m, 8H, H_αAla, 2SCH₂, H_αPro, 2H_α2Cys), 4.67-4.75 (m, 1H, H_αSer).

Ac-L-Cys(Acm)-L-Ala-(S)-MeSer- L-Ser-Pro-Cys(Acm)-NHMe**Ac-Cys(Acm)-Ala-MeSer-Ser-Pro-Cys(Acm)-NHMe**

Una disolución del compuesto **39** (130 mg, 0.15 mmol) en CH₂Cl₂/TFA (1:1, 6 mL) se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Se evapora el disolvente y el crudo obtenido se disuelve en piridina/Ac₂O (2:1, 6 mL) y se mantiene en agitación durante 2 h. La mezcla se concentra y al residuo resultante se le añade MeOH (5 mL) y se trata con MeONa/MeOH (0.5 M) hasta pH=9. Después de agitarse a temperatura ambiente durante 3 h se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y se concentra. El crudo de reacción se purifica primero mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con NH₃/EtOH/BuOH/CHCl₃ (4:5:4:2). Finalmente, se pasa por un cartucho (C₁₈) de fase reversa para obtener el compuesto **Ac-Cys(Acm)-Ala-MeSer-Ser-Pro-Cys(Acm)-NHMe** (90 mg, 77%) como sólido blanco.

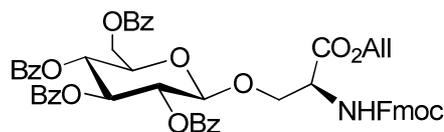
Análisis elemental (%)	calculado (C ₃₀ H ₅₁ N ₉ O ₁₁ S ₂):	C, 46.32; H, 6.61; N, 16.21;
		S, 8.24
	encontrado:	C, 46.40; H, 6.57; N, 16.26;
		S, 8.28

¹ H RMN (D ₂ O)	δ (ppm): 1.34 (d, <i>J</i> =7.1 Hz, 3H, CH _{3Ala}), 1.40 (s, 3H, CH _{3MeSer}), 1.87-2.08 (m, 12H, H _{βPro} , 2SCH ₂ NHCOCH ₃ , 2H _{γPro} , NHCOCH ₃), 2.19-2.35 (m, 1H, H _{βPro}), 2.70 (s, 3H, NHCH ₃), 2.76-2.91 (m, 2H, 2H _{βCys}), 2.94-3.09 (m, 2H,
---------------------------------------	--

$2H_{\beta\text{Cys}}$), 3.61-3.94 (m, 6H, $2H_{\delta\text{Pro}}$, $2H_{\beta\text{Ser}}$, $2H_{\beta\text{MeSer}}$), 4.16-4.36 (m, 5H, $H_{\alpha\text{Ala}}$, 2SCH_2), 4.38-4.55 (m, 3H, $H_{\alpha\text{Pro}}$, $2H_{\alpha 2\text{Cys}}$), 4.68-4.75 (m, 1H, $H_{\alpha\text{Ser}}$).

^{13}C RMN (D_2O)

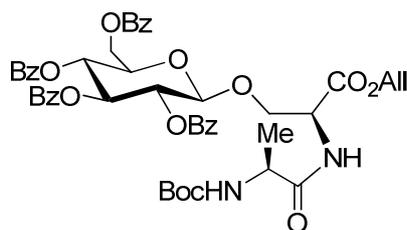
δ (ppm): 16.3 (CH_3Ala), 20.0 (CH_3MeSer), 21.7 (NHCOCH_3), 22.0 ($2\text{SCH}_2\text{NHCOCH}_3$), 24.5 ($\text{C}_{\gamma\text{Pro}}$), 25.9 (NHCH_3), 29.3 ($\text{C}_{\beta\text{Pro}}$), 31.8, 31.8 ($2\text{C}_{\beta 2\text{Cys}}$), 40.8, 40.9 (2SCH_2), 48.0 ($\text{C}_{\delta\text{Pro}}$), 50.0 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 53.0 ($\text{C}_{\alpha\text{Cys}}$), 53.3, 53.3 ($\text{C}_{\alpha\text{Ser}}$, $\text{C}_{\alpha\text{Cys}}$), 60.4 ($\text{C}_{\alpha\text{MeSer}}$), 60.8, 60.9 ($\text{C}_{\beta\text{Ser}}$, $\text{C}_{\alpha\text{Pro}}$), 63.6 ($\text{C}_{\beta\text{MeSer}}$), 170.6, 172.2, 172.2, 174.1, 174.1, 174.2, 174.7 (CO).

Fmoc-L-Ser[β -D-O-Glc(Bz₄)]-OAll**41**

Sobre una disolución del compuesto **40** (300 mg, 0.82 mmol) en CH₂Cl₂ seco (12 mL) con tamiz molecular (4 Å, 250 mg) se añade triflato de plata (348 mg, 1.35 mmol) bajo atmósfera inerte. La mezcla se agita a -30 °C y a continuación se añade una disolución de bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo (755 mg, 1.14 mmol) en CH₂Cl₂ seco (12 mL). La reacción se agita a esta temperatura 1 hora y después, dejando que alcance temperatura ambiente, se mantiene la agitación durante otras 14 horas. El crudo se filtra sobre tierra de diatomeas y se concentra. El residuo resultante se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con AcOEt/hexano (4:6) para obtener 700 mg (65%) del glicoaminoácido **41** como un aceite incoloro.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₅₅ H ₄₇ NO ₁₄):	C, 69.83; H, 5.01; N, 1.48
	encontrado:	C, 69.72; H, 5.04; N, 1.50

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 3.82-4.00 (m, 1H, H ₅), 4.02-4.70 (m, 10H, 2H _{β} , 2H _{α} , CH _{Fmoc} , CH _{2/Fmoc} , CH _{2/All} , H _{α}), 4.81 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H ₁), 5.11-5.35 (m, 2H, CH _{2/All-t}), 5.44-5.60 (m, 2H, H ₂ , H ₄), 5.61-5.72 (m, 1H, H ₃), 5.73-6.00 (m, 2H, CH _{All} , NH _{Fmoc}), 7.19-7.60 (m, 18H, Ph), 7.72-8.10 (m, 10H, Ph).
---	--

Boc-L-Ala-L-Ser[β -D-O-Glc(Bz₄)]-OAll**42**

El compuesto **41** (570 mg, 0.60 mmol) se disuelve en CH₃CN (20 mL), se trata con piperidina (0.24 mL, 2.41 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla se concentra y el residuo obtenido se purifica por columna cromatográfica (CH₂Cl₂/MeOH, 96:4) dando lugar a la correspondiente amina libre (430 mg, 98%) que se utiliza en la siguiente reacción sin caracterización previa. Así, sobre una disolución de la amina (430 mg, 0.59 mmol) en CH₃CN (17 mL) y con tamiz molecular (4 Å, 200 mg) se añade Boc-L-Ala-OH (157 mg, 0.83 mmol), DIEA (0.49 mL, 2.95 mmol) y TBTU (246 mg, 0.77 mmol). La mezcla se agita a 25 °C durante 7 h, se filtra el tamiz sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El crudo resultante se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH (98:2) para obtener el compuesto **42** (460 mg, 87%) como un sólido blanco.

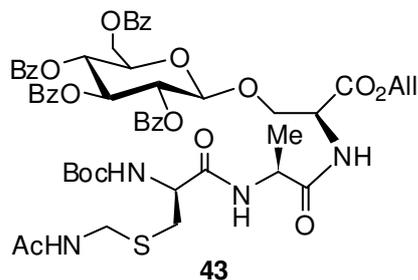
Análisis elemental (%)	calculado (C ₄₈ H ₅₀ N ₂ O ₁₅):	C, 64.42; H, 5.63; N, 3.13
	encontrado:	C, 64.33; H, 5.60; N, 3.15

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.16 (d, <i>J</i> =7.2 Hz, 3H, CH ₃ Ala), 1.46 (s, 9H, (CH ₃) ₃), 3.87-4.07 (m, 2H, H _β Ser, H _α Ala), 4.13-4.23 (m, 1H, H ₅), 4.35 (dd, <i>J</i> =10.3 Hz, <i>J</i> =2.7 Hz, 1H, H _β Ser), 4.46 (dd, <i>J</i> =12.3 Hz, <i>J</i> =4.8 Hz, 1H, H ₆), 4.54-4.71 (m, 4H, CH ₂ All, H ₆ , H _α Ser), 4.81 (d, <i>J</i> =6.7 Hz, 1H, NHBoc), 4.95 (d, <i>J</i> =7.2
---	--

Hz, H₁), 5.13-5.35 (m, 2H, CH_{2/AlI-t}), 5.46 (dd, $J=9.7$ Hz, $J=7.7$ Hz, 1H, H₂), 5.68 (‘t’, $J=9.7$ Hz, 1H, H₄), 5.75-5.90 (m, 1H, CH_{All}), 5.96 (‘t’, $J=9.6$ Hz, 1H, H₃), 6.60 (d, $J=6.6$ Hz, 1H, NH), 7.24-7.61 (m, 12H, Ph), 7.79-7.94 (m, 4H, Ph), 7.97-8.09 (m, 4H, Ph).

¹³C RMN (CDCl₃)

δ (ppm): 18.6 (CH_{3Ala}), 28.6 (C(CH₃)₃), 50.4 (C_{αAla}), 52.8 (C_{αSer}), 63.1 (C₆), 66.5 (CH_{2/All}), 69.2, 69.6 (C₄, C_{βSer}), 72.2, 72.5, 72.7 (C₂, C₅, C₃), 80.1 (C(CH₃)₃), 101.4 (C₁), 118.9 (CH_{All-t}), 127.2, 128.5, 128.6, 128.6, 128.8, 128.9, 128.9, 129.4, 129.6, 130.0, 130.0 (Ph), 131.5 (CH_{All}), 133.4, 133.5, 133.7, 133.7 (Ph), 155.3 (CO_{Boc}), 165.2, 165.3, 165.9, 166.3, 169.0, 172.9 (6CO).

Boc-L-Cys(Acm)-L-Ala-L-Ser[β -D-O-Glc(Bz₄)]-OAll

A una disolución del compuesto **42** (450 mg, 0.50 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL) se añade TFA (10 mL) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 h, tras las cuales, se concentra y se seca. El crudo resultante se disuelve en CH₃CN (20 mL) y, en presencia de tamiz molecular (4Å, 150 mg), se trata a 0 °C con Boc-L-Cys(Acm)-OH (225 mg, 0.77 mmol), DIEA (0.42 mL, 2.57 mmol) y TBTU (215 mg, 0.67 mmol). Después de 8 h de agitación a 25 °C se filtra el tamiz sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) para dar el intermedio **43** (480 mg, 90%) como un sólido blanco.

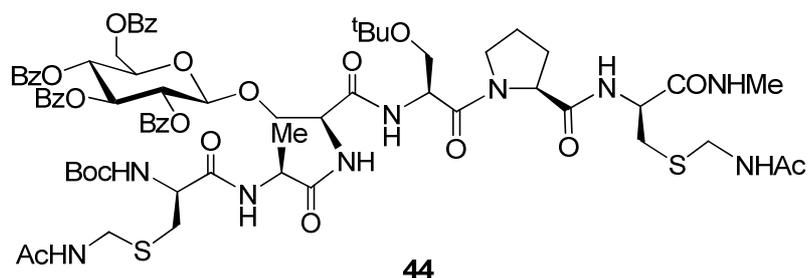
Análisis elemental (%)	calculado (C ₅₄ H ₆₀ N ₄ O ₁₇ S):	C, 60.66; H, 5.66; N, 5.24;
		S, 3.00
	encontrado:	C, 60.58; H, 5.61; N, 5.28;
		S, 3.02

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.26 (d, <i>J</i> =7.1 Hz, 3H, CH ₃ Ala), 1.44 (m, 9H, (CH ₃) ₃), 1.98 (s, 3H, SCH ₂ NHCOCH ₃), 2.85-3.12 (m, 2H, 2H _{βCys}), 3.89 (dd, <i>J</i> =10.4 Hz, 3.6 Hz, 1H, H _{βSer}), 4.13-4.40
---	--

(m, 4H, H₅, H_{βSer}, H_{αAla}, H₆), 4.42-4.59 (m, 4H, H₆, H_{αCys}, CH_{2All}), 4.60-4.72 (m, 3H, SCH₂, H_{αSer}), 4.92 (d, 1H, *J*=7.7 Hz, H₁), 5.12-5.32 (m, 2H, CH_{2/All-t}), 5.42-5.57 (m, 2H, H₂, NH_{Boc}), 5.70 ('t', *J*=9.7 Hz, 1H, H₄), 5.74-5.88 (m, 1H, CH_{All}), 5.92 ('t', *J*=9.6 Hz, 1H, H₃), 6.69 (d, *J*=8.1 Hz, 1H, NH), 7.06-7.24 (m, 2H, 2NH), 7.25-7.60 (m, 12H, Ph), 7.77-7.93 (m, 4H, Ph), 7.95-8.07 (m, 4H, Ph).

¹³C RMN (CDCl₃)

δ (ppm): 17.7 (CH_{3Ala}), 23.1 (SCH₂NHCOCH₃), 28.2 (C(CH₃)₃), 33.8 (C_{βCys}), 40.5 (SCH₂), 49.0 (C_{αAla}), 52.5 (C_{αCys}), 53.1 (C_{αSer}), 62.8 (C₆), 66.3 (CH_{2/All}), 68.9, 69.2 (C₄, C_{βSer}), 72.0, 72.2, 72.5 (C₂, C₅, C₃), 80.1 (C(CH₃)₃), 101.1 (C₁), 118.7 (CH_{All-t}), 128.3, 128.4, 128.4, 128.6, 128.8, 129.3, 129.7, 129.7, 129.8, 129.8 (Ph), 131.2 (CH_{All}), 133.3, 133.3, 133.5, 133.6 (Ph), 155.7 (CO_{Boc}), 165.1, 165.3, 165.7, 166.2, 168.9, 170.6, 171.0, 171.9 (8CO).

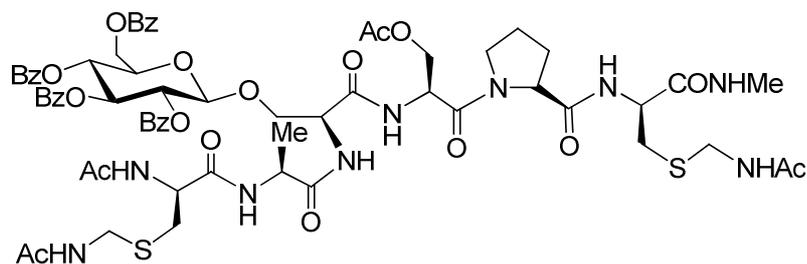
Boc-L-Cys(Acm)-L-Ala-L-Ser[β -D-O-Glc(Bz₄)]-L-Ser(^tBu)-L-Pro-L-Cys(Acm)-NHMe

A una disolución desoxigenada del compuesto **43** (300 mg, 0.28 mmol) en THF seco (15 mL) se le añade, bajo atmósfera inerte, Pd(PPh₃)₄ (3.2 mg, 2.8·10⁻³ mmol) y morfolina (0.10 mL, 1.12 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h y se evapora el disolvente. El crudo obtenido se disuelve en CHCl₃/ⁱPrOH (3:1, 10 mL) y se lava con HCl 1N. Se separan las fases y la acuosa se extrae con CHCl₃/ⁱPrOH (2 x 10 mL). El conjunto de las fases orgánicas reunidas se seca (Na₂SO₄) y se concentra para dar lugar al ácido correspondiente que se usa en la siguiente reacción sin purificación previa. Sobre una disolución del ácido en DMF (4 mL), a 0 °C y con tamiz molecular (4 Å, 100 mg), se añade el compuesto **35** (150 mg, 0.34 mmol), DIEA (0.23 mL, 1.40 mmol) y TBTU (117 mg, 0.37 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 8 h, se filtra el tamiz y se evapora el disolvente. El residuo resultante se purifica por columna cromatográfica (CH₂Cl₂/MeOH, 14:1) para obtener 200 mg (50%) del compuesto **44** como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₇₀ H ₈₉ N ₉ O ₂₁ S ₂):	C, 57.72; H, 6.16; N, 8.65; S, 4.40
	encontrado:	C, 57.81; H, 6.12; N, 8.70; S, 4.42

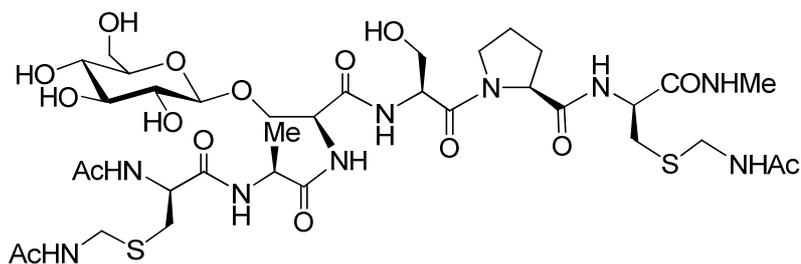
^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm): 1.16 (s, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 1.30 (d, $J=7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_3)_3$), 1.90-2.11 (m, 9H, $\text{H}_{\beta\text{Pro}}$, $2\text{SCH}_2\text{NHCOCH}_3$, $2\text{H}_{\gamma\text{Pro}}$), 2.18-2.40 (m, 1H, $\text{H}_{\beta\text{Pro}}$), 2.77 (d, $J=4.7$ Hz, 3H, NHCH_3), 2.82-3.00 (m, 2H, $2\text{H}_{\beta\text{Cys}}$), 3.04-3.24 (m, 2H, $2\text{H}_{\beta\text{Cys}}$), 3.43-3.55 (m, 1H, $\text{H}_{\beta\text{Ser}2}$), 3.60-3.92 (m, 4H, $\text{H}_{\beta\text{Ser}2}$, $2\text{H}_{\delta\text{Pro}}$, $\text{H}_{\beta\text{Ser}1}$), 4.08 (dd, $J=11.0$ Hz, $J=5.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{\beta\text{Ser}1}$), 4.17-4.42 (m, 5H, H_5 , SCH_2 , H_6 , $\text{H}_{\alpha\text{Ala}}$), 4.43-4.76 (m, 8H, H_6 , $\text{H}_{\alpha\text{Cys}}$, SCH_2 , $\text{H}_{\alpha\text{Cys}}$, $\text{H}_{\alpha\text{Pro}}$, $2\text{H}_{\alpha\text{Ser}}$), 4.99 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, H_1), 5.46 (dd, $J=9.7$ Hz, $J=8.0$ Hz, 1H, H_2), 5.59 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, NH^{Boc}), 5.73 ('t', $J=9.7$ Hz, 1H, H_4), 5.90 ('t', $J=9.6$ Hz, 1H, H_3), 7.00 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, NH), 7.04-7.14 (m, 1H, NHMe), 7.20-7.59 (m, 17H, $12\text{Ph} + 5\text{NH}$), 7.75-7.83 (m, 2H, Ph), 7.84-7.96 (m, 4H, Ph), 7.97-8.06 (m, 2H, Ph).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 17.2 ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$), 23.1, 23.2 ($2\text{SCH}_2\text{NHCOCH}_3$), 25.2 ($\text{C}_{\gamma\text{Pro}}$), 26.5 (NHCH_3), 27.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.0 ($\text{C}_{\beta\text{Pro}}$), 33.3, 33.7 ($2\text{C}_{\beta 2\text{Cys}}$), 40.7, 41.6 (2SCH_2), 48.2 ($\text{C}_{\delta\text{Pro}}$), 49.4 ($\text{C}_{\alpha\text{Ala}}$), 52.7, 53.0, 53.3, 53.8 ($2\text{C}_{\alpha 2\text{Ser}}$, $2\text{C}_{\alpha 2\text{Cys}}$), 61.6, 62.0, 63.1 (C_{6s} , $\text{C}_{\beta\text{Ser}2}$, $\text{C}_{\alpha\text{Pro}}$), 69.3, 69.9 (C_4 , $\text{C}_{\beta\text{Ser}1}$), 71.7, 72.6, 74.3 (C_2 , C_5 , C_3), 80.3 ($2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 102.1 (C_1), 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.2, 129.6, 129.7, 129.8 (Ph), 133.3, 133.4, 133.6, 133.6 (Ph), 155.8 (CO_{Boc}), 165.2, 165.3, 165.6, 166.2, 169.4, 170.6, 170.9, 170.9, 171.2, 171.3, 172.0 (11CO).

Ac-L-Cys(Acm)-L-Ala-L-Ser[β -D-O-Glc(Bz₄)]-L-Ser(Ac)-L-Pro-L-Cys(Acm)-NHMe

A una disolución de **44** (170 mg, 0.12 mmol) en CH₂Cl₂ (3 mL) se añade TFA (3 mL), la reacción se agita durante 3 h y se evapora. El residuo obtenido se trata con piridina/Ac₂O (2:1, 6 mL) y después de 3 h de agitación se concentra. El crudo resultante se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1), obteniéndose el compuesto deseado (140 mg, 84%) como un sólido blanco que se empleó en la siguiente etapa sin caracterización previa.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₆₅ H ₇₇ N ₉ O ₂₁ S ₂):	C, 56.39; H, 5.61; N, 9.11; S, 4.63
	encontrado:	C, 56.27; H, 5.59; N, 9.14; S, 4.66

Ac-L-Cys(Acm)-L-Ala-L-Ser (β -D-O-Glc)- L-Ser-L-Pro-L-Cys(Acm)-NHMe**Ac-Cys(Acm)-Ala-Ser*-Ser-Pro-Cys-NHMe**

Una disolución del compuesto **Ac-L-Cys(Acm)-L-Ala-L-Ser[β -O-Glc(Bz)₄]-L-Ser(Ac)-L-Pro-L-Cys(Acm)-NHMe** (130 mg, 0.09 mmol) en MeOH (7 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5 M) hasta pH=9. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 horas y se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y evapora. La purificación del residuo mediante cromatografía en fase reversa (cartucho C₁₈) proporciona el glucopéptido deseado **Ac-L-Cys(Acm)-L-Ala-L-Ser(β -O-Glc)-L-Ser-L-Pro-L-Cys(Acm)-NHMe** (70 mg, 80%) como un sólido blanco.

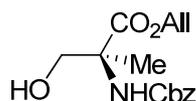
Análisis elemental (%)	calculado (C ₃₅ H ₅₉ N ₉ O ₁₆ S ₂):	C, 45.40; H, 6.42; N, 13.61; S, 6.93
	encontrado:	C, 45.31; H, 6.38; N, 13.66; S, 6.97

¹ H RMN (D ₂ O)	δ (ppm): 1.31 (d, $J=7.0$ Hz, 3H, CH ₃ Ala), 1.80-2.00 (m, 12H, H $_{\beta$ Pro, 2SCH ₂ NHCOCH ₃ , 2H $_{\gamma$ Pro, NHCOCH ₃), 2.12-2.25 (m, 1H, H $_{\beta$ Pro), 2.64 (s, 3H, NHCH ₃), 2.73-2.86 (m, 2H, 2H $_{\beta$ Cys), 2.88-3.01 (m, 2H, 2H $_{\beta$ Cys), 3.18 ('t', $J=8.6$ Hz,
---------------------------------------	---

1H, H₂), 3.27 (dd, $J=17.2$ Hz, $J=7.9$ Hz, 1H, H₄), 3.32-3.43 (m, 2H, H₅, H₃), 3.55-3.88 (m, 7H, H₆, 2H_{δPro}, 2H_{βSer2}, H_{βSer1}, H₆), 4.08 (dd, $J=10.5$ Hz, $J=5.2$ Hz, 1H, H_{βSer1}), 4.13-4.31 (m, 5H, 2SCH₂, H_{αAla}), 4.32-4.41 (m, 3H, H₁, H_{αPro}, H_{αCys}), 4.42-4.48 (m, 1H, H_{αCys}), 4.51-4.57 (m, 1H, H_{αSer1}), 4.68-4.74 (m, 1H, H_{αSer2}).

¹³C RMN (D₂O)

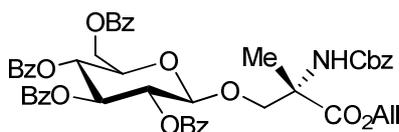
δ (ppm): 16.5 (CH_{3Ala}), 21.7 (NHCOCH₃), 22.0, 22.0 (2SCH₂NHCOCH₃), 24.5 (C_{γPro}), 25.9 (NHCH₃), 29.3 (C_{βPro}), 31.8 (2C_{β2Cys}), 40.8, 40.9 (2SCH₂), 48.0 (C_{δPro}), 49.8 (C_{αAla}), 53.0, 53.3, 53.4, 53.4 (2C_{αSer}, 2C_{α2Cys}), 60.7, 60.8, 60.8 (C₆, C_{βSer}, C_{αPro}), 68.4 (C_{βSer1}), 69.6 (C₄), 73.0 (C₂), 75.5 (C₃), 75.9 (C₅), 102.3 (C₁), 170.3, 170.9, 172.1, 172.2, 174.1, 174.1, 174.2, 174.2, 174.7 (9CO).

Cbz-(S)- α -MeSer-OAll

A una disolución de (S)- α -MeSer (**27**) (compuesto descrito en: Aydillo, C.; Jiménez-Osés, G.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M.; Avenzoa, A. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 4840-4848) (200 mg, 1.28 mmol) en una mezcla dioxano/agua (1:1, 15 mL) se añade Na₂CO₃ (354 mg, 3.34 mmol) y CbzCl (0.22 mL, 1.54 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 72 h y se evapora el dioxano. La fase acuosa se lava con Et₂O, se acidifica y se extrae con CHCl₃/iPrOH (3 x 10 mL). El conjunto de las fases orgánicas reunidas se seca (Na₂SO₄), filtra y se concentra. El crudo resultante se suspende en H₂O (7 mL), se le añade NaHCO₃ (83 mg, 0.99 mmol) y una disolución de *aliquat 336* (400 mg, 0.99 mmol) y bromuro de alilo (86 μ L, 0.99 mmol) en CH₂Cl₂ (7 mL). Después de 96 h de agitación la mezcla de reacción se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). La suma de las fases orgánicas se seca, filtra y evapora. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice (AcOEt/hexano, 4:6) para dar el compuesto **Cbz-(S)- α -MeSer-OAll** (160 mg, 43%) como un aceite incoloro. Este compuesto se utilizó en la siguiente etapa sin caracterización previa.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₅ H ₁₉ NO ₅):	C, 61.42; H, 6.53; N, 4.78
	encontrado:	C, 61.50; H, 6.56; N, 4.76

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.51 (s, 3H, CH ₃ MeSer), 3.25 (s ancho, 1H, OH), 3.83 (d, <i>J</i> =11.4 Hz, 1H, H _{β}), 4.00 (d, <i>J</i> =11.4 Hz, 1H, H _{β}), 4.52-4.80 (m, 2H, CH ₂ Allyl), 5.00-5.12 (m, 2H, CH ₂ Ph), 5.15-5.40 (m, 2H, CH ₂ Allyl), 5.70-6.00 (m, 2H, NHCBz, CH _{Allyl}), 7.20-7.50 (m, 4H, Ph).
---	--

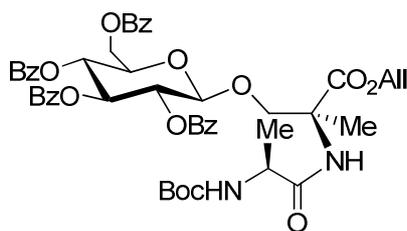
Cbz-(S)- α -MeSer[β -D-O-Glc(Bz₄)]-OAll

Sobre una disolución del compuesto **Cbz-(S)- α -MeSer-OAll** (225 mg, 0.77 mmol) en CH₂Cl₂ seco (8 mL) con tamiz molecular (4 Å, 200 mg) se añade triflato de plata (327 mg, 1.27 mmol) bajo atmósfera inerte. La mezcla se agita a -30 °C y a continuación se añade una disolución de bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-glucopiranosilo (708 mg, 1.08 mmol) en CH₂Cl₂ seco (8 mL). La reacción se agita a esta temperatura 1 hora y después, dejando que alcance temperatura ambiente, se mantiene la agitación durante otras 14 horas. El crudo se filtra sobre tierra de diatomeas y se concentra y el residuo resultante se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con AcOEt/hexano (3:7) para obtener 630 mg (94%) de **Cbz-(S)-MeSer-[β -O-D-Glc(Bz₄)]-OAll** como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₄₉ H ₄₅ NO ₁₄):	C, 67.50; H, 5.20; N, 1.61
	encontrado:	C, 67.60; H, 5.16; N, 1.63

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.45 (s, 3H, CH ₃ MeSer), 3.77-3.93 (m, 1H, H ₅), 4.10-4.27 (m, 2H, 2H _{β}), 4.39 (dd, <i>J</i> =12.2 Hz, <i>J</i> =4.7 Hz, 1H, H _{6s}), 4.49-4.71 (m, 4H, 2CH _{All} , H ₆ , H ₁), 4.85-5.09 (m, 2H, CH ₂ Ph), 5.12-5.32 (m, 2H, CH _{All-t}), 5.38-5.52 (m, 1H, H ₂), 5.63 ('t', <i>J</i> =9.7 Hz, 1H, H ₄), 5.70-5.90 (m, 3H, H ₃ , CH _{All} , NHCBz), 7.25-7.60 (m, 17H, Ph), 7.77-7.85 (m, 2H, Ph), 7.87-7.99 (m, 4H, Ph), 8.01-8.09 (m, 2H, Ph).
---	---

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 19.9 (CH_3), 60.3 (C_α), 62.8 ($\text{C}_{6\text{s}}$), 66.4, 66.5 ($\text{CH}_{2\text{All}}$, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 69.5 (C_4), 71.6, 71.7 (C_β , C_2), 72.1 (C_5), 72.8 (C_3), 101.7 (C_1), 118.6 ($\text{CH}_{\text{All-t}}$), 128.3, 128.3, 128.3, 128.4, 128.4, 128.5, 128.6, 128.6, 128.8, 129.3, 129.6, 129.8, 129.9 (Ph), 131.5 (CH_{All}), 132.0, 132.0, 132.1, 132.2, 133.2, 133.2, 133.2, 133.5 (Ph), 154.7 (CO_{Cbz}), 165.0, 165.2, 165.8, 166.2, 171.6 (5CO).

Boc-L-Ala-(S)- α -MeSer[β -D-O-Glc(Bz₄)]-OAll

El compuesto **Cbz-(S)-MeSer-[β -O-D-Glc(Bz₄)]-OAll** (620 mg, 0.71 mmol) se trata con TFA (17 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 72 h. La mezcla se concentra y el residuo obtenido se purifica por columna cromatográfica (CH₂Cl₂/MeOH, 17:1) dando lugar a la correspondiente amina libre (410 mg, 78%) que se utiliza en la siguiente reacción sin caracterización previa. Así, sobre una disolución de la amina (410 mg, 0.56 mmol) en DMF (7 mL) y con tamiz molecular (4Å, 200 mg) se añade Boc-L-Ala-OH (158 mg, 0.83 mmol), DIEA (0.46 mL, 2.78 mmol) y TBTU (232 mg, 0.72 mmol). La mezcla se agita a 25 °C durante 12 h, se filtra el tamiz sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El crudo resultante se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con CH₂Cl₂/MeOH (97:3) para obtener el compuesto **Boc-L-Ala-(S)-MeSer-[β -O-D-Glc(Bz₄)]-OAll** (335 mg, 67%) como un sólido blanco.

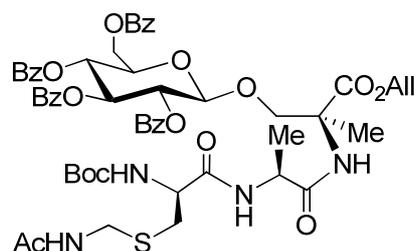
Análisis elemental (%)	calculado (C ₄₉ H ₅₂ N ₂ O ₁₅):	C, 64.75; H, 5.77; N, 3.08
	encontrado:	C, 61.63; H, 5.74; N, 3.10

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.20 (d, $J=7.1$ Hz, 3H, CH _{3Ala}), 1.51 (s, 9H, (CH ₃) ₃), 1.62 (s, 3H, CH _{3MeSer}), 3.99-4.13 (m, 1H, H _{αAla}), 4.16-4.26 (m, 2H, H _{βMeSer} , H ₅), 4.31 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, H _{βMeSer}), 4.51 (dd, $J=12.1$ Hz, $J=4.7$ Hz, 1H, H ₆), 4.57-4.78 (m, 3H, H ₆ , CH _{2All}), 4.96 (d, $J=6.9$ Hz, 1H, H ₁), 5.21-5.36
---	---

(m, 2H, CH_{2All-t}), 5.44-5.54 (m, 1H, H₂), 5.72 (‘t’, 1H, $J=9.7$ Hz, H₄), 5.83-5.95 (m, 1H, CH_{Allyl}), 6.02 (‘t’, 1H, $J=9.5$ Hz, H₃), 6.80 (s, 1H, NH), 7.29-7.62 (m, 12H, Ph), 7.83-7.90 (m, 2H, Ph), 7.91-7.97 (m, 2H, Ph), 7.99-8.12 (m, 4H, Ph).

¹³C RMN (CDCl₃)

δ (ppm): 18.0 (CH_{3Ala}), 19.3 (CH_{3MeSer}), 28.4 (C(CH₃)₃), 50.4 (C_{αAla}), 60.3 (C_{αMeSer}), 63.0 (C₆), 66.5 (CH_{2Allyl}), 69.6 (C₄), 70.8 (C_{βMeSer}), 72.0, 72.1 (C₂, C₅), 72.7 (C₃), 80.0 (C(CH₃)₃), 101.2 (C₁), 118.6 (CH_{All-t}), 128.3, 128.4, 128.5, 128.8, 128.9, 129.5, 129.6, 129.7, 129.8, 129.9 (Ph), 131.5 (CH_{All}), 133.1, 133.2, 133.4, 133.4 (Ph), 155.4 (CO_{Boc}), 165.0, 165.2, 165.7, 166.2, 171.8, 172.2 (6CO).

Boc-L-Cys(Acm)-L-Ala-(S)-MeSer[β -D-O-Glc(Bz₄)]-OAll

A una disolución del compuesto **Boc-Ala-(S)-MeSer-[β -O-D-Glc(Bz₄)]-OAll** (330 mg, 0.36 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL) se añade TFA (5 mL) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 h, tras las cuales se concentra y se seca. El crudo resultante se disuelve en DMF (4 mL) y, en presencia de tamiz molecular (4 Å, 150 mg), se trata a 0 °C con Boc-L-Cys(Acm)-OH (159 mg, 0.55 mmol), DIEA (0.30 mL, 1.82 mmol) y TBTU (152 mg, 0.47 mmol). Después de 12 h de agitación a 25 °C se filtra el tamiz sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 17:1) para dar el compuesto **Boc-L-Cys(Acm)-L-Ala-(S)-MeSer-[β -O-D-Glc(Bz₄)]-OAll** (280 mg, 72%) como un sólido blanco.

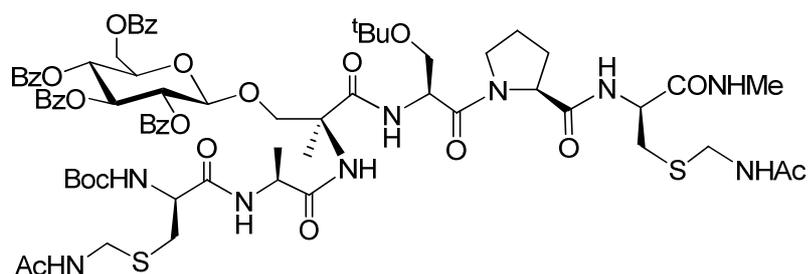
Análisis elemental (%)	calculado (C ₅₄ H ₆₀ N ₄ O ₁₇ S):	C, 60.66; H, 5.66; N, 5.24; S, 3.00
	encontrado:	C, 61.79; H, 5.70; N, 5.21; S, 3.02

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.22 (d, $J=7.2$ Hz, 3H, CH ₃ Ala), 1.38-1.50 (m, 12H, CH ₃ MeSer, (CH ₃) ₃), 1.99 (s, 3H, SCH ₂ NHCOCH ₃), 2.84-3.01 (m, 2H, 2H _{βCys}), 4.11-4.31 (m, 5H, H ₅ , 2H _{βMeSer})
---	--

SCH_a, H_{αAla}), 4.42-4.72 (m, 6H, 2H₆, H_{αCys}, CH_{2All}, SCH_b)
4.89 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H₁), 5.14-5.32 (m, 2H, CH_{2All-t}),
5.40-5.52 (m, 1H, H₂), 5.55-5.90 (m, 3H, NHBoc, H₄,
CH_{All}), 5.96 ('t', $J=9.6$ Hz, 1H, H₃), 6.69 (s, 1H, NH),
7.02-7.17 (m, 2H, 2NH), 7.20-7.60 (m, 12H, Ph), 7.75-
7.91 (m, 4H, Ph), 7.94-8.06 (m, 4H, Ph).

¹³C RMN (CDCl₃)

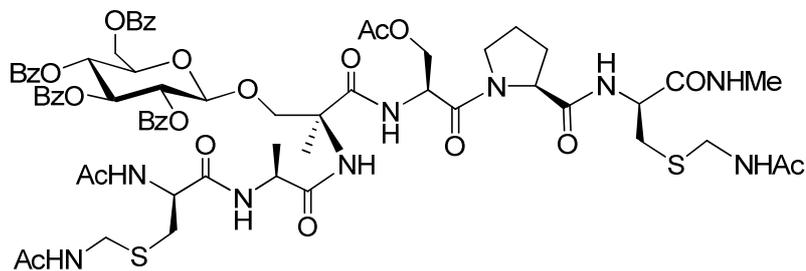
δ (ppm): 17.6 (CH_{3Ala}), 19.5 (CH_{3MeSer}), 23.2
(SCH₂NHCOCH₃), 28.3 (C(CH₃)₃), 34.0 (C_{βCys}), 40.8
(SCH₂), 49.4 (C_{αAla}), 53.3 (C_{αCys}), 60.3 (C_{αMeSer}), 63.0 (C₆),
66.5 (CH_{2All}), 69.6 (C₄), 70.9 (C_{βMeSer}), 72.0, 72.1 (C₂, C₅),
72.7 (C₃), 80.3 (C(CH₃)₃), 101.1 (C₁), 118.7 (CH_{All-t}),
128.3, 128.4, 128.5, 128.8, 128.8, 129.2, 129.5, 129.7,
129.8, 129.8 (Ph), 131.5 (CH_{All}), 133.2, 133.3, 133.5,
133.5 (Ph), 155.9 (CO_{Boc}), 165.2, 165.3, 165.8, 166.2,
170.7, 170.9, 171.4, 171.6 (8CO).

Boc-L-Cys(Acm)-L-Ala-(S)- α -MeSer[β -D-O-Glc(Bz₄)]-L-Ser(^tBu)-L-Pro-L-Cys(Acm)-NHMe

A una disolución desoxigenada del compuesto **Boc-L-Cys(Acm)-L-Ala-(S)-MeSer-[β -O-D-Glc(Bz₄)]-OAlI** (275 mg, 0.26 mmol) en THF seco (15 mL) se le añade, bajo atmósfera inerte, Pd(PPh₃)₄ (3.0 mg, 2.6·10⁻³ mmol) y morfolina (90 μ L, 1.03 mmol). La mezcla se agita a 25 °C durante 1 h y se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en CHCl₃/ⁱPrOH (3:1, 10 mL) y se lava con HCl 1N. Se separan las fases y la acuosa se extrae con CHCl₃/ⁱPrOH (2 x 10 mL). Las fases orgánicas reunidas se secan (Na₂SO₄) y se concentran para dar lugar al ácido correspondiente que se usa en la siguiente reacción sin purificación previa. Sobre una disolución del ácido en DMF (4 mL), a 0 °C y con tamiz molecular (4 Å, 100 mg), se añade el compuesto **35** (145 mg, 0.33 mmol), DIEA (0.21 mL, 1.25 mmol) y TBTU (104 mg, 0.33 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 8 h, se filtra el tamiz sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El crudo resultante se purifica por columna cromatográfica (CH₂Cl₂/MeOH, 12:1) para obtener 190 mg (51%) de **Boc-L-Cys(Acm)-L-Ala-(S)-MeSer-[β -O-D-Glc(Bz₄)]-L-Ser(^tBu)-L-Pro-L-Cys(Acm)-NHMe** como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₇₁ H ₉₁ N ₉ O ₂₁ S ₂):	C, 57.98; H, 6.24; N, 8.57; S, 4.36
	encontrado:	C, 57.90; H, 6.21; N, 8.61; S, 4.33

Ac-L-Cys(Acm)-L-Ala-(S)-MeSer[β-D-O-Glc(Bz₄)]-L-Ser(Ac)-L-Pro-L-Cys(Acm)-NHMe



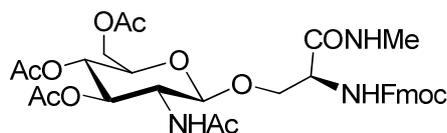
A una disolución de **Boc-L-Cys(Acm)-L-Ala-(S)-MeSer-[β-O-D-Glc(Bz₄)]-L-Ser(^tBu)-L-Pro-L-Cys(Acm)-NHMe** (185 mg, 0.13 mmol) en CH₂Cl₂ (3 mL) se añade TFA (3 mL) y la reacción se agita durante 2 h y se evapora. El residuo obtenido se trata con piridina/Ac₂O (2:1, 6 mL) y después de 1.5 h de agitación se concentra. El crudo resultante se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) obteniéndose el compuesto **Ac-L-Cys(Acm)-L-Ala-(S)-MeSer-[β-O-D-Glc(Bz₄)]-L-Ser(Ac)-L-Pro-L-Cys(Acm)-NHMe** (140 mg, 79%) como un sólido blanco que se empleó en la siguiente etapa sin caracterización previa.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₆₆ H ₇₉ N ₉ O ₂₁ S ₂):	C, 56.68; H, 5.69; N, 9.01; S, 4.59
	encontrado:	C, 56.77; H, 5.66; N, 9.04; S, 4.61

7H, H₆, 2H_{δPro}, 2H_{βSer}, H_{βMeSer}, H₆), 4.15-4.35 (m, 6H, H_{βMeSer}, 2SCH₂, H_{αAla}), 4.38-4.54 (m, 4H, H₁, H_{αPro}, 2H_{α2Cys}), 4.70-4.76 (m, 1H, H_{αSer}).

¹³C RMN (D₂O)

δ (ppm): 16.3 (CH_{3Ala}), 20.1 (CH_{3MeSer}), 21.7 (NHCOCH₃), 22.0 (2SCH₂NHCOCH₃), 24.5 (C_{γPro}), 25.9 (NHCH₃), 29.3 (C_{βPro}), 31.8 (2C_{β2Cys}), 40.8, 40.9 (2SCH₂), 48.0 (C_{δPro}), 49.8 (C_{αAla}), 53.0 (C_{αSer}), 53.3, 53.3 (C_{αCys}, C_{αSer}), 59.5 (C_{αMeSer}), 60.8 (C_{6s} C_{βSer}, C_{αPro}), 69.7 (C₄), 70.9 (C_{βMeSer}), 73.2 (C₂), 75.6 (C₃), 75.9 (C₅), 102.4 (C₁), 170.5, 172.0, 172.2, 174.0, 174.1, 174.2, 174.2 (CO).

Fmoc-L-Ser-[β -O-D-GlcNAc(Ac)₃]-NHMe

A una disolución del compuesto **Fmoc-L-Ser[β -O-D-GlcNAc(Ac)₃]-OAlI** (Saha, U. K.; Schmidt, R. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 1855-1860) (140 mg, 0.20 mmol) en THF seco (10 mL) se le añade, bajo atmósfera inerte, Pd(PPh₃)₄ (2.3 mg, 2.0·10⁻³ mmol) y morfolina (70 μ L, 0.80 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h, se evapora el disolvente y el residuo resultante se disuelve en CHCl₃/ⁱPrOH (3:1, 10 mL) y se lava con HCl 1N. Se separan las fases y la acuosa se extrae con CHCl₃/ⁱPrOH (10 mL). El conjunto de las fases orgánicas reunidas se seca (Na₂SO₄) y se concentra para dar lugar al ácido correspondiente que se usa en la siguiente reacción sin purificación previa. Sobre una disolución del ácido en DMF (5 mL) con tamiz molecular (4 Å, 100 mg) se añade DIEA (0.13 mL, 0.80 mmol) a 0 °C, TBTU (84 mg, 0.26 mmol) y clorhidrato de metilamina (27 mg, 0.40 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 10 h, se filtra el tamiz sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El residuo resultante se purifica por columna cromatográfica (CH₂Cl₂/MeOH, 15:1) para obtener 80 mg (60%) de **Fmoc-L-Ser[β -O-D-GlcNAc(Ac)₃]-NHMe** como un sólido blanco.

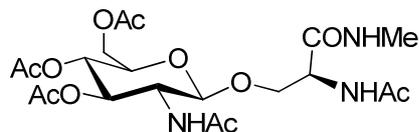
Análisis elemental (%)	calculado (C ₃₃ H ₃₉ N ₃ O ₁₂):	C, 59.19; H, 5.87; N, 6.27
	encontrado:	C, 59.10; H, 5.83; N, 6.29

Punto de fusión:	189-191 °C
------------------	------------

$[\alpha]_D^{25}$ (c=0.93, DMF): -3.5

^1H RMN
($\text{CD}_3\text{COCD}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ (ppm): 1.89 (s, 3H, NHCOCH_3), 1.98-2.06 (m, 9H, $3\text{CH}_3\text{CO}$), 2.77 (s, 3H, NHCH_3), 3.85-3.97 (m, 3H, H_β , H_5 , H_2), 4.00-4.20 (m, 2H, H_β , H_6), 4.24-4.36 (m, 3H, CH_{Fmoc} , H_6 , H_α), 4.37-4.45 (m, 2H, CH_2/Fmoc), 4.79 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H_1), 5.02 ('t', $J=9.6$ Hz, 1H, H_4), 5.24 ('t', $J=9.9$ Hz, 1H, H_3), 5.62 (s, 1H, NH_{Fmoc}), 7.33-7.49 (m, 4H, Ar.), 7.70-7.79 (m, 2H, Ar.), 7.85-7.92 (m, 2H, Ar.).

^{13}C RMN
($\text{CD}_3\text{COCD}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ (ppm): 20.8, 20.9, 20.9 ($3\text{CH}_3\text{CO}$), 23.2 (NHCOCH_3), 26.6 (NHCH_3), 48.9 ($\text{C}_{\text{CH}/\text{Fmoc}}$), 55.1 (C_α), 56.2 (C_2), 63.3 (C_6), 67.9 ($\text{C}_{\text{CH}_2/\text{Fmoc}}$), 70.1 (C_4), 70.3 (C_β), 73.0 (C_5), 73.9 (C_3), 102.3 (C_1), 121.2, 126.5, 128.4, 129.0, 142.5, 145.3, 145.4 (Ar.), 157.7 (CO_{Fmoc}), 170.8, 171.4, 171.7, 172.0, 172.6 (5CO).

Ac-L-Ser-[β -O-D-GlcNAc(Ac₃)]-NHMe

A una disolución del compuesto **Fmoc-L-Ser[β -O-D-GlcNAc(Ac₃)]-NHMe** (75 mg, 0.11 mmol) en DMF (3 mL) se le añade piperidina (47 μ L, 0.48 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 8 h. La mezcla se concentra y el residuo obtenido se disuelve en piridina/Ac₂O (2:1, 3 mL) y se mantiene en agitación 2 h. A continuación, se evapora el disolvente y el crudo resultante se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) para dar el compuesto **Ac-L-Ser[β -O-D-GlcNAc(Ac₃)]-NHMe** (45 mg, 83%) como un sólido blanco.

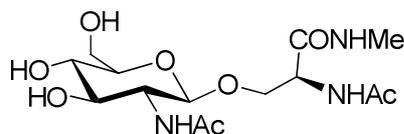
Análisis elemental (%)	calculado (C ₂₀ H ₃₁ N ₃ O ₁₁):	C, 49.08; H, 6.38; N, 8.58
	encontrado:	C, 49.17; H, 6.41; N, 8.54

Punto de fusión: 243-245 °C

$[\alpha]_D^{25}$ (c=0.91, CH₃OH): -16.6

¹H RMN (CD₃OD) δ (ppm): 1.91 (s, 3H, CH₃CO), 1.96-2.03 (m, 6H, 2CH₃CO), 2.06 (s, 3H, CH₃CO), 2.73 (s, 3H, NHCH₃), 3.77-3.99 (m, 4H, H₅, H₂, 2H _{β}), 4.14 (dd, $J=12.4$ Hz, $J=2.3$ Hz, 1H, H₆), 4.31 (dd, $J=12.4$ Hz, $J=4.6$ Hz, 1H, H₆), 4.49 (‘t’, $J=6.3$ Hz, 1H, H _{α}), 4.65 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, H₁), 4.97-5.03 (m, 1H, H₄), 5.20 (dd, $J=10.5$ Hz, $J=9.3$ Hz, 1H, H₃).

^{13}C RMN (CD_3OD) δ (ppm): 23.0, 23.0, 23.1 ($3\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 25.0, 25.3 ($2\text{NHCO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 28.9 (NHCH_3), 57.1 (C_α), 57.7 (C_2), 65.6 (C_6), 72.3, 72.4 (C_β , C_4), 75.5 (C_5), 76.5 (C_3), 104.5 (C_1), 173.7, 174.3, 174.7, 174.9, 175.9, 176.0 (6CO).

Ac-L-Ser-(β -O-D-GlcNAc)-NHMe**Ac-Ser(β -O-GlcNAc)-NHMe**

Una disolución del compuesto **Ac-L-Ser[β -O-D-GlcNAc(Ac₃)]-NHMe** (40 mg, 0.08 mmol) en MeOH (5 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5 M) hasta pH=9. Después de agitarse a temperatura ambiente durante 1 h se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y se concentra. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía de columna en fase reversa (C₁₈) para obtener el compuesto **Ac-Ser[β -O-GlcNAc]-NHMe** (27 mg, 91%) como sólido blanco.

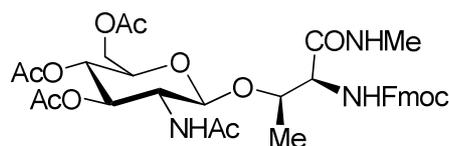
Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₄ H ₂₅ N ₃ O ₈):	C, 46.28; H, 6.93; N, 11.56
	encontrado:	C, 46.38; H, 6.90; N, 11.61

Punto de fusión: 235-237 °C

$[\alpha]_D^{25}$ (c=0.95, H₂O): -22.7

¹H RMN (D₂O) δ (ppm): 1.93-2.10 (m, 6H, 2CH₃CO), 2.70 (s, 3H, NHCH₃), 3.38-3.56 (m, 3H, H₄, H₅, H₃), 3.60-3.77 (m, 2H, H₂, H₆), 3.81-3.94 (m, 2H, H _{β} , H₆), 4.01 (dd, J =10.8 Hz, J =6.7 Hz, 1H, H _{β}), 4.40 (t, J =5.8 Hz, 1H, H _{α}), 4.49 (d, J =8.4 Hz, 1H, H₁).

^{13}C RMN (D_2O) δ (ppm): 21.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 22.1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 25.9 (NHCH_3),
53.8 (C_α), 55.3 (C_2), 60.6 (C_6), 68.1 (C_β), 69.8 (C_4), 73.6
(C_3), 75.8 (C_5), 100.8 (C_1), 171.6, 174.3, 174.5 (3CO).

Fmoc-L-Thr-[β -O-D-GlcNAc(Ac₃)]-NHMe

A una disolución del compuesto **Fmoc-L-Thr[β -O-D-GlcNAc(Ac₃)]-OAll** (Saha, U. K.; Schmidt, R. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 1855-1860) (150 mg, 0.21 mmol) en THF seco (10 mL) se le añade, bajo atmósfera inerte, Pd(PPh₃)₄ (2.4 mg, 2.0·10⁻³ mmol) y morfolina (73 μ L, 0.84 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h, se evapora el disolvente y el residuo resultante se disuelve en CHCl₃/ⁱPrOH (3:1, 10 mL) y se lava con HCl 1N. La fase acuosa se extrae con CHCl₃/ⁱPrOH (10 mL) y el conjunto de las fases orgánicas reunidas se seca (Na₂SO₄) y se concentra para dar lugar al ácido correspondiente que se usa en la siguiente reacción sin purificación previa. Sobre una disolución del ácido en DMF (5 mL) con tamiz molecular (4 Å, 100 mg) se añade a 0 °C DIEA (0.14 mL, 0.84 mmol), TBTU (88 mg, 0.27 mmol) y clorhidrato de metilamina (28 mg, 0.42 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 10 h, se filtra el tamiz sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El residuo resultante se purifica por columna cromatográfica (CH₂Cl₂/MeOH, 15:1) para obtener 80 mg (56%) de **Fmoc-L-Thr[β -O-D-GlcNAc(Ac₃)]-NHMe** como un sólido blanco.

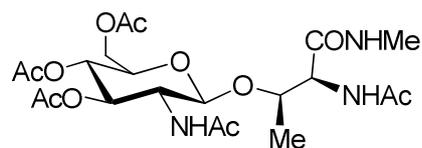
Análisis elemental (%)	calculado (C ₃₄ H ₄₁ N ₃ O ₁₂):	C, 59.73; H, 6.04; N, 6.15
	encontrado:	C, 59.80; H, 6.01; N, 6.19

Punto de fusión: 189-191 °C

$[\alpha]_D^{25}$ (c=0.91, DMF): +3.6

^1H RMN (CD_3OD) δ (ppm): 1.13 (d, $J=5.5$ Hz, 3H, CH_3Thr), 1.94 (s, 3H, NHCOCH_3), 1.97-2.07 (m, 9H, $3\text{CH}_3\text{CO}$), 2.76 (s, 3H, NHCH_3), 3.73-3.92 (m, 2H, H_5 , H_2), 4.03-4.20 (m, 3H, H_6 , H_β , H_α), 4.21-4.34 (m, 2H, CH_{Fmoc} , H_6), 4.39 (dd, $J=10.4$ Hz, $J=6.4$ Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.50 (dd, $J=10.2$ Hz, $J=7.1$ Hz, 1H, CH_{Fmoc}), 4.62 (d, $J=8.7$ Hz, 1H, H_1), 4.99 ('t', $J=9.7$ Hz, 1H, H_4), 5.20 ('t', $J=9.9$ Hz, 1H, H_3), 7.30-7.37 (m, 2H, Ar.), 7.38-7.44 (m, 2H, Ar.), 7.62-7.72 (m, 2H, Ar.), 7.78-7.84 (m, 2H, Ar.).

^{13}C RMN (CD_3OD) δ (ppm): 15.9 (CH_3Thr), 19.3, 19.4, 19.5 ($3\text{CH}_3\text{CO}$), 21.6 (NHCOCH_3), 25.2 (NHCH_3), 47.4 ($\text{C}_{\text{CH}/\text{Fmoc}}$), 53.9 (C_2), 59.3 (C_α), 61.8 (C_6), 66.6 ($\text{C}_{\text{CH}_2/\text{Fmoc}}$), 68.6 (C_4), 71.5 (C_5), 72.4 (C_3), 75.5 (C_β), 100.0 (C_1), 119.6, 124.8, 124.8, 126.8, 127.5, 141.2, 143.7, 143.8 (Ar.), 156.9 (CO_{Fmoc}), 169.9, 170.4, 171.0, 171.2, 172.3 (5CO).

Ac-L-Thr-[β -O-D-GlcNAc(Ac₃)]-NHMe

A una disolución del compuesto **Fmoc-L-Thr[β -O-D-GlcNAc(Ac₃)]-NHMe** (75 mg, 0.11 mmol) en DMF (3 mL) se le añade piperidina (43 μ L, 0.44 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 7 h. La mezcla se concentra y el residuo obtenido se disuelve en piridina/Ac₂O (2:1, 3 mL) y se mantiene en agitación 1.5 h. A continuación, se evapora el disolvente y el crudo resultante se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) para dar el compuesto **Ac-L-Thr[β -O-D-GlcNAc(Ac₃)]-NHMe** (50 mg, 91%) como un sólido blanco.

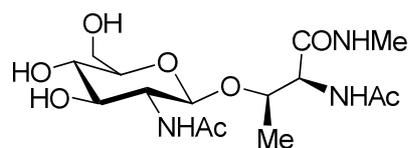
Análisis elemental (%)	calculado (C ₂₁ H ₃₃ N ₃ O ₁₁):	C, 50.09; H, 6.61; N, 8.35
	encontrado:	C, 50.17; H, 6.65; N, 8.30

Punto de fusión: 269-271 °C

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.27, CH₃OH): -16.1

¹H RMN (CD₃OD) δ (ppm): 1.15 (d, $J=6.1$ Hz, 3H, CH₃Thr), 1.98 (s, 3H, CH₃CO), 2.04 (s, 3H, CH₃CO), 2.05-2.09 (m, 6H, 2CH₃CO), 2.11 (s, 3H, CH₃CO), 2.71 (s, 3H, NHCH₃), 3.87-3.99 (m, 2H, H₂, H₅), 4.13 (d, $J=12.6$ Hz, 1H, H₆), 4.30-4.38 (m, 2H, H _{β} , H _{α}), 4.42 (dd, $J=12.6$ Hz, $J=3.2$ Hz, 1H, H₆), 4.71 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, H₁), 5.03 ('t', $J=9.7$ Hz, 1H, H₄), 5.21 ('t', $J=9.9$ Hz, 1H, H₃).

^{13}C RMN (CD_3OD) δ (ppm): 16.4 ($\text{CH}_{3\text{Thr}}$), 19.9, 20.0, 20.1 ($3\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{CO}$), 21.7, 21.9 ($2\text{NHCO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 25.9 (NHCH_3), 53.5 (C_2), 57.9 (C_α), 61.8 (C_6), 68.3 (C_4), 70.9 (C_5), 72.7 (C_3), 75.8 (C_β), 99.7 (C_1), 171.7, 172.8, 173.1, 173.6, 174.7, 174.7 (6CO).

Ac-L-Thr-(β -O-D-GlcNAc)-NHMe**Ac-Thr-(β -O-GlcNAc)-NHMe**

Una disolución del compuesto **Ac-L-Thr[β -O-D-GlcNAc(Ac₃)]-NHMe** (40 mg, 0.08 mmol) en MeOH (5 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5 M) hasta pH=9. Después de agitarse a temperatura ambiente durante 1 h se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y se concentra. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía de columna en fase reversa (C₁₈) para obtener el compuesto **Ac-Thr(β -O-GlcNAc)-NHMe** (26 mg, 87%) como sólido blanco.

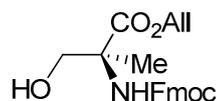
Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₅ H ₂₇ N ₃ O ₈):	C, 47.74; H, 7.21; N, 11.13
	encontrado:	C, 47.66; H, 7.18; N, 11.16

Punto de fusión: 225-227 °C

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.15, H₂O): -30.6

¹H RMN (D₂O) δ (ppm): 1.16 (d, $J=6.2$ Hz, 3H, CH₃_{Thr}), 2.02-2.14 (m, 6H, 2CH₃CO), 2.76 (s, 3H, NHCH₃), 3.38-3.49 (m, 2H, H₅, H₄), 3.54 (‘t’, $J=9.1$ Hz, 1H, H₃), 3.63-3.70 (m, 1H, H₂), 3.76 (dd, $J=12.2$ Hz, $J=4.8$ Hz, 1H, H₆), 3.89 (d, $J=12.2$ Hz, 1H, H₆), 4.30-4.39 (m, 2H, H _{β} , H _{α}), 4.50 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H₁).

^{13}C RMN (D_2O) δ (ppm): 16.4 ($\text{CH}_{3\text{Thr}}$), 21.8, 22.1 ($2\text{CH}_3\text{CO}$), 25.9 (NHCH_3), 55.5 (C_2), 58.1 (C_α), 60.7 (C_6), 69.7 (C_4), 73.6 (C_3), 75.0 (C_β), 75.6 (C_5), 100.0 (C_1), 172.0, 174.8, 174.8 (3CO).

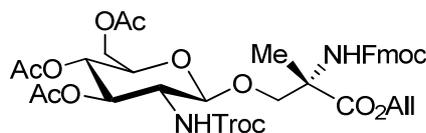
Fmoc-(S)- α -MeSer-OAll

A una disolución de (*S*)- α -metilserina (**27**) (compuesto descrito en: Aydillo, C.; Jiménez-Osés, G.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M.; Avenoza, A. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 4840-4848) (250 mg, 1.60 mmol) en tolueno (15 mL) se le añade alcohol alílico (1.0 mL, 14.4 mmol) y *p*TsOH (366 mg, 1.93 mmol). La reacción se calienta a reflujo durante 24 h usando un Dean-Stark. Se evapora el disolvente y el crudo obtenido se suspende en una mezcla H₂O/CH₃CN (1:2, 25 mL) y se le añade NaHCO₃ (538 mg, 6.4 mmol) y Fmoc-OSu (812 mg, 2.40 mmol). Después de 48 h de agitación se evapora el CH₃CN y la fase acuosa se extrae con AcOEt (3 x 15mL). El conjunto de las fases orgánicas reunidas se seca (Na₂SO₄), filtra y se lleva a sequedad. El residuo se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice (AcOEt/hexano, 4:6) para dar el compuesto **Fmoc-(S)-MeSer-OAll** (200 mg, 33%) como un aceite incoloro. Este compuesto se utilizó en la siguiente etapa sin caracterización previa.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₂₂ H ₂₃ NO ₅):	C, 69.28; H, 6.08; N, 3.67
	encontrado:	C, 69.21; H, 6.04; N, 3.70

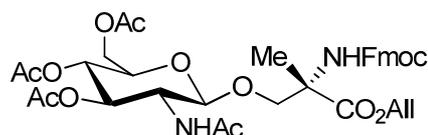
¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.53 (s, 3H, CH ₃ MeSer), 2.93 (s ancho, 1H, OH), 3.85 (d, <i>J</i> =6.5 Hz, 1H, H _{β}), 4.04 (d, <i>J</i> =6.4 Hz, 1H, H _{β}), 4.22 (‘t’, <i>J</i> =6.6 Hz, 1H, CH _{Fmoc}), 4.35-4.52 (m, 2H, CH _{2/Fmoc}), 4.62-4.77 (m, 2H, CH _{2All}), 5.21-5.42 (m, 2H, CH _{2Allt}), 5.72 (s ancho, 1H, NHFmoc), 5.80-6.02 (m, 1H,
---	--

CH_{All} , 7.29-7.46 (m, 4H, Ar.), 7.57-7.65 (m, 2H, Ar.),
7.74-7.82 (m, 2H, Ar.).

Fmoc-(S)- α -MeSer[β -O-GlcNTroc(Ac₃)]-OAll

A una mezcla de los compuestos α -[OC(NH)CCl₃]-D-GlcNTroc(Ac₃) [compuesto descrito en: (a) Paulsen, H.; Helpap, B. *Carbohydrate Res.*, **1991**, 216, 289; (b) Dullenkopf, W.; Castro-Palomino, J. C.; Manzoni, L.; Schmidt, R. R. *Carbohydrate Res.*, **1996**, 296, 135)] (335 mg, 0.53 mmol) y **Fmoc-(S)-MeSer-OAll** (170 mg, 0.45 mmol) en diclorometano seco (5 mL) se añade gota a gota TMSOTf (0.8 μ L -diluido con 0.5 mL de diclorometano-, $4.5 \cdot 10^{-3}$ mmol) a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte. Después de 1 h de agitación a la misma temperatura, la disolución se neutraliza con Et₃N y se concentra. El residuo se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice (hexano:AcOEt, 6:4) para obtener el compuesto **Fmoc-(S)-MeSer-[β -GlcNTroc(Ac₃)]-OAll** (170 mg, 45%) como un sólido amarillo que se utiliza en la siguiente reacción sin ser previamente caracterizado.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₃₇ H ₄₁ Cl ₃ N ₂ O ₁₄):	C, 52.65; H, 4.90; N, 3.32
	encontrado:	C, 52.57; H, 4.94; N, 3.29

Fmoc-(S)- α -MeSer[β -O-GlcNAc(Ac₃)]-OAll

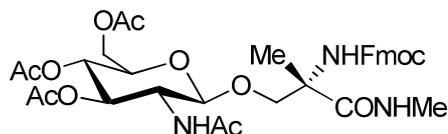
A una disolución de **Fmoc-(S)-MeSer-[β -GlcNTroc(Ac₃)]-OAll** (160 mg, 0.19 mmol) en THF/Ac₂O/HAcO (6 mL, 3:2:1) se añade Zn en polvo (400 mg). Después de agitarse durante 3 h, la mezcla se filtra sobre tierra de diatomeas, se lava varias veces con THF y se concentra. El crudo resultante se purifica por columna cromatográfica (hexano/AcOEt, 2:8) para dar el compuesto **Fmoc-(S)-MeSer-[β -GlcNAc(Ac₃)]-OAll** (100 mg, 74%) como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₃₆ H ₄₂ N ₂ O ₁₃):	C, 60.84; H, 5.96; N, 3.94
	encontrado:	C, 60.92; H, 6.02; N, 3.91

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.25, CHCl₃): -6.6

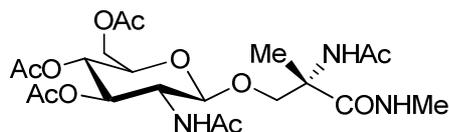
¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm): 1.48 (s, 3H, CH₃MeSer), 1.78 (s, 3H, NHCOCH₃), 1.99-2.04 (m, 9H, 3CH₃CO), 3.54 (ddd, $J=9.0$ Hz, $J=4.7$ Hz, $J=1.9$ Hz, 1H, H₅), 3.80-3.94 (m, 1H, H₂), 3.98-4.23 (m, 5H, 2H _{β} , 2H₆, CH_{Fmoc}), 4.31-4.54 (m, 3H, H₁, 2CH_{Fmoc}), 4.55-4.71 (m, 2H, CH₂All), 4.99 ('t', $J=9.6$ Hz, 1H, H₄), 5.09-5.36 (m, 3H, H₃, CH₂All-t), 5.54 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, NHAc), 5.71-5.97 (m, 2H, NHFmoc, CH_{All}), 7.27-7.46 (m, 4H, Ar.), 7.56-7.66 (m, 2H, Ar.), 7.71-7.84 (m, 2H, Ar.).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 20.0 (CH_3MeSer), 20.6, 20.6, ($3\text{CH}_3\text{CO}$), 23.0 (NHCOCH_3), 47.2 ($\text{C}_{\text{CH/Fmoc}}$), 54.0 (C_2), 59.9 (C_α), 61.9 (C_6), 65.9 ($\text{C}_{\text{CH}_2/\text{Fmoc}}$), 66.3 ($\text{C}_{\text{CH}_2/\text{All}}$), 68.4 (C_4), 71.6 (C_5), 71.9 (C_β), 72.3 (C_3), 101.5 (C_1), 118.5 ($\text{C}_{\text{CH}_2/\text{All-l}}$), 120.0, 124.9, 127.1, 127.7, 127.7, 131.5 ($\text{C}_{\text{CH/All}}$); 141.3, 143.7, 143.8, (Ar.), 154.8 (CO_{Fmoc}), 169.3, 170.2, 170.6, 170.8, 171.9 (5CO).

Fmoc-(S)- α -MeSer[β -O-GlcNAc(Ac₃)]-NHMe

A una disolución desoxigenada del compuesto **Fmoc-(S)-MeSer-[β -GlcNAc(Ac₃)]-OAlI** (95 mg, 0.13 mmol) en THF seco (7 mL), se le añade, bajo atmósfera inerte, Pd(PPh₃)₄ (1.5 mg, 1.4·10⁻³ mmol) y morfolina (47 μ L, 0.53 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h y se evapora el disolvente. El residuo resultante se disuelve en CHCl₃/ⁱPrOH (3:1, 10 mL) y se lava con HCl 1N. Se separan las fases y la acuosa se extrae con CHCl₃/ⁱPrOH (10 mL). El conjunto de las fases orgánicas reunidas, se seca (Na₂SO₄) y se concentra para dar lugar al ácido correspondiente que se usa en la siguiente reacción sin purificación previa. Sobre una disolución del ácido en DMF (4 mL) con tamiz molecular (4 Å, 100 mg) se añade DIEA (90 μ L, 0.53 mmol) a 0 °C, TBTU (56 mg, 0.17 mmol) y clorhidrato de metilamina (19 mg, 0.28 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 10 h, se filtra el tamiz sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El residuo resultante se purifica por columna cromatográfica (CH₂Cl₂/MeOH, 15:1) para obtener 55 mg (60%) de **Fmoc-(S)-MeSer-[β -GlcNAc(Ac₃)]-NHMe** como un sólido blanco. Este producto se utilizó directamente en la siguiente reacción sin caracterización previa.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₃₄ H ₄₁ N ₃ O ₁₂):	C, 59.73; H, 6.04; N, 6.15
	encontrado:	C, 59.82; H, 6.02; N, 6.11

Ac-(S)- α -MeSer[β -O-GlcNAc(Ac₃)]-NHMe

A una disolución del compuesto **Fmoc-(S)-MeSer-[β -GlcNAc(Ac₃)]-NHMe** (55 mg, 0.08 mmol) en DMF (3 mL) se le añade piperidina (32 μ L, 0.32 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 7 h. La mezcla se concentra y el residuo obtenido se disuelve en piridina/Ac₂O (2:1, 3 mL) y se mantiene en agitación 1.5 h. A continuación, se evapora el disolvente y el crudo resultante se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) para dar el compuesto **Ac-(S)-MeSer-[β -GlcNAc(Ac₃)]-NHMe** (35 mg, 87%) como un sólido blanco.

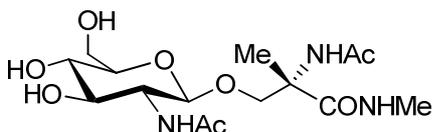
Análisis elemental (%)	calculado (C ₂₁ H ₃₃ N ₃ O ₁₁):	C, 50.09; H, 6.61; N, 8.35
	encontrado:	C, 50.18; H, 6.65; N, 8.32

$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.20, CH₃OH): -33.6

¹ H RMN (CD ₃ OD)	δ (ppm): 1.42 (s, 3H, CH ₃ MeSer), 1.95 (s, 3H, NHCOCH ₃), 1.98 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.01 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.03 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.08 (s, 3H, NHCOCH ₃), 2.73 (s, 3H, NHCH ₃), 3.78-3.86 (m, 2H, H _{β} , H ₅), 3.96 (dd, J =10.4 Hz, J =8.6 Hz, H ₂), 4.12 (dd, J =12.3 Hz, J =2.0 Hz, 1H, H ₆), 4.22 (d, J =9.6 Hz, H _{β}), 4.35 (dd, J =12.4 Hz, J =4.4 Hz, 1H, H ₆), 4.61 (d, J =8.4 Hz, 1H, H ₁), 5.01 ('t', J =9.7 Hz, 1H, H ₄), 5.14-5.26 (m, 1H, H ₃).
---	--

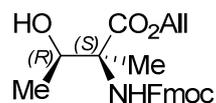
¹³C RMN (CD₃OD)

δ (ppm): 20.7, 20.7, 20.8 (3C_{H₃CO}), 21.6 (CH₃MeSer) 23.0, 23.2 (2NHCOCH₃), 26.7 (NHCH₃), 55.4 (C₂), 60.7 (C_α), 63.3 (C₆), 70.2 (C₄), 72.8 (C_β), 73.1 (C₅), 74.2 (C₃), 102.6 (C₁), 171.4, 171.9, 172.4, 173.3, 173.7, 175.5 (6CO).

Ac-(S)- α -MeSer(β -O-GlcNAc)-NHMe**Ac-MeSer(β -O-GlcNAc)-NHMe**

Una disolución del compuesto **Ac-(S)-MeSer[β -GlcNAc(Ac₃)]-NHMe** (33 mg, 0.08 mmol) en MeOH (5 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5M) hasta pH=9. Después de agitarse a temperatura ambiente durante 1 h se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y se concentra. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía de columna en fase reversa (C₁₈) para obtener el compuesto **Ac-MeSer(β -GlcNAc)-NHMe** (22 mg, 89%) como sólido blanco.

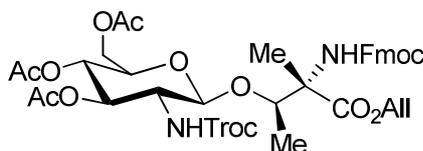
Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₅ H ₂₇ N ₃ O ₈):	C, 47.74; H, 7.21; N, 11.13
	encontrado:	C, 47.81; H, 7.22; N, 11.10
¹ H RMN (D ₂ O)	δ (ppm):	1.42 (s, 3H, CH ₃), 2.00 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.06 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.72 (s, 3H, NHCH ₃), 3.40-3.49 (m, 2H, H ₄ , H ₅), 3.51-3.59 (m, 1H, H ₃), 3.67-3.82 (m, 3H, H ₂ , H _{β} , H ₆), 3.88-3.99 (m, 1H, H ₆), 4.17 (d, $J=9.9$ Hz, 1H, H _{β}), 4.51 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H ₁).
¹³ C RMN (D ₂ O)	δ (ppm):	19.8 (CH ₃), 22.1, 22.2 (2CH ₃ CO), 26.0 (NHCH ₃), 55.5 (C ₂), 59.4 (C _{α}), 60.7 (C ₆), 69.9 (C ₄), 71.7 (C _{β}), 73.5 (C ₃), 75.8 (C ₅), 101.5 (C ₁), 173.7, 174.5, 174.7 (3CO).

Fmoc-(3*R*,2*S*)- α -MeThr-OAll

A una disolución de **(3*R*,2*S*)- α -MeThr** (compuesto descrito en: Aydillo, C.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Jiménez-Osés, G.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2829-2834) (300 mg, 1.77 mmol) en tolueno (15 mL) se añade alcohol alílico (1.1 mL, 15.9 mmol) y *p*TsOH (404 mg, 2.12 mmol). La reacción se calienta a reflujo durante 24 h usando un Dean-Stark. Se evapora el disolvente y el crudo obtenido se suspende en una mezcla H₂O/CH₃CN (1:2, 25 mL) y se le añade NaHCO₃ (595 mg, 7.1 mmol) y Fmoc-OSu (896 mg, 2.66 mmol). Después de 48 h de agitación se evapora el CH₃CN y la fase acuosa se extrae con AcOEt (3 x 15mL). El conjunto de las fases orgánicas reunidas se seca (Na₂SO₄), filtra y se lleva a sequedad. El residuo se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice (AcOEt/hexano, 4:6) para dar el compuesto **Fmoc-(3*R*,2*S*)-MeThr-OAll** (220 mg, 31%) como un aceite incoloro. Este compuesto se utilizó en la siguiente etapa sin caracterización previa.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₂₃ H ₂₅ NO ₅):	C, 69.86; H, 6.37; N, 3.54
	encontrado:	C, 69.99; H, 6.32; N, 3.50

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm):	1.20 (d, <i>J</i> =6.4 Hz, 3H, CH _{3β}), 1.51 (s, 3H, CH _{3α}), 3.55 (s ancho, 1H, OH), 4.03-4.18 (m, 1H, H β), 4.24 ('t', <i>J</i> =6.8 Hz, 1H, CH _{Fmoc}), 4.33-4.50 (m, 2H, CH _{2/Fmoc}), 4.54-4.84 (m, 2H, CH _{2All}), 5.17-5.41 (m, 2H, CH _{2All-t}), 5.56 (s ancho, 1H, NH _{Fmoc}), 5.76-6.04 (m, 1H, CH _{All}), 7.28-7.48 (m, 4H, Ar.), 7.56-7.66 (m, 2H, Ar.), 7.73-7.82 (m, 2H, Ar.).
---	-----------------	--

Fmoc-(3*R*,2*S*)- α -MeThr[β -*O*-GlcNTroc(Ac₃)]-OAll

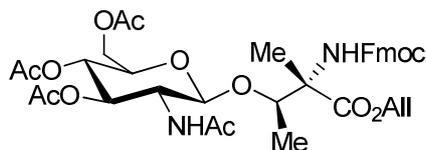
En un schlenck con tamiz molecular (3Å), bajo atmósfera inerte y a oscuras, se colocan el imidato α -[OC(NH)CCl₃]-D-GlcNTroc(Ac₃) [(a) Paulsen, H.; Helpap, B. *Carbohydrate Res.*, **1991**, 216, 289; (b) Dullenkopf, W.; Castro-Palomino, J. C.; Manzoni, L.; Schmidt, R. R. *Carbohydrate Res.*, **1996**, 296, 135)] (305 mg, 0.49 mmol), el compuesto **Fmoc-(3*R*,2*S*)-MeThr-OAll** (160 mg, 0.40 mmol) y AgTfO (135mg, 0.53 mmol). A continuación, se inyecta CH₂Cl₂ seco (7 mL) y la reacción se deja agitando a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla se filtra sobre tierra de diatomeas y se concentra. El residuo resultante se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (hexano:AcOEt, 65:35) para obtener el compuesto **Fmoc-(3*R*,2*S*)-MeThr[β -GlcNTroc(Ac₃)]-OAll** (190 mg, 55%) como sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₃₈ H ₄₃ Cl ₃ N ₂ O ₁₄):	C, 53.19; H, 5.05; N, 3.26
	encontrado:	C, 53.27; H, 5.10; N, 3.29

¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm):	1.09 (d, <i>J</i> =6.0 Hz, 3H, CH _{3β}), 1.48 (s, 3H, CH _{3α}),
		1.98-2.06 (m, 9H, 3CH ₃ CO), 3.63-3.80 (m, 2H, H ₂ , H ₅),
		3.99-4.16 (m, 2H, H _{β} , H ₆), 4.17-4.36 (m, 4H, H ₆ , CH _{Fmoc} ,
		CH _{2/Fmoc}), 4.56-4.75 (m, 5H, CH _{2/Troc} , CH _{2All} , H ₁), 5.01-5.38
		(m, 4H, H ₄ , H ₃ , CH _{2All}), 5.45 (d, <i>J</i> =9.5 Hz, 1H, NH _{Troc}),
		5.77-5.97 (m, 1H, CH _{All}), 6.32 (s, 1H, NH _{Fmoc}), 7.24-

7.43 (m, 4H, Ar.), 7.52-7.64 (m, 2H, Ar.), 7.69-7.82 (m, 2H, Ar.).

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 14.9, 15.9, 20.6, 20.6, 20.7, 47.1, 54.1, 56.1, 61.9, 66.2, 66.8, 68.5, 70.7, 71.4, 71.8, 79., 99.2, 118.6, 119.9, 125.0, 127.0, 127.6, 127.7, 131.8, 141.2, 143.7, 143.9, 154.0, 155.3, 169.4, 170.6, 170.6, 171.5.

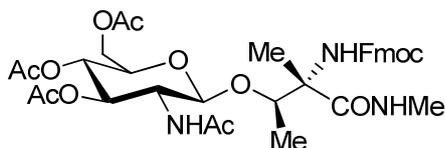
Fmoc-(3*R*,2*S*)- α -MeThr[β -*O*-GlcNAc(Ac₃)]-OAll

A una disolución de **Fmoc-(3*R*,2*S*)-MeThr[β -GlcNTroc(Ac₃)]-OAll** (180 mg, 0.21 mmol) en THF/Ac₂O/HAcO (6 mL, 3:2:1) se añade Zn en polvo (450 mg). Después de agitarse durante 3 h, la mezcla se filtra sobre tierra de diatomeas, se lava varias veces con THF y se concentra. El crudo resultante se purifica por columna cromatográfica (hexano/AcOEt, 2:8) para dar el compuesto **Fmoc-(3*R*,2*S*)-MeThr[β -GlcNAc(Ac₃)]-OAll** (100 mg, 66%) como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₃₇ H ₄₄ N ₂ O ₁₃):	C, 61.32; H, 6.12; N, 3.87
	encontrado:	C, 61.22; H, 6.16; N, 3.91

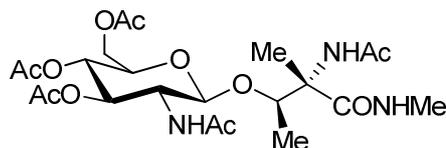
¹ H RMN (CDCl ₃)	δ (ppm): 1.07 (d, $J=6.1$ Hz, 3H, CH _{3β}), 1.48 (s, 3H, CH _{3α}), 1.87-1.98 (m, 6H, 2CH ₃ CO), 2.00-2.06 (m, 6H, 2CH ₃ CO), 3.65-3.85 (m, 2H, H ₂ , H ₅), 4.00 (dd, $J=12.1$ Hz, $J=5.7$ Hz, 1H, H _{β}), 4.11 (dd, $J=12.3$ Hz, $J=2.5$ Hz, 1H, H ₆), 4.17-4.40 (m, 4H, H ₆ , CH ₂ Fmoc, CH _{Fmoc}), 4.51-4.70 (m, 2H, CH ₂ All), 4.83 (d, $J=4.84$ Hz, 1H, H ₁), 5.05 ('t', $J=9.7$ Hz, 1H, H ₄), 5.19 (dd, $J=10.4$ Hz, $J=1.2$ Hz, 1H, CH _{All-t}), 5.25-5.47 (m, 2H, CH _{All-t} , H ₃), 5.69-5.99 (m, 2H, NHAc, CH _{All}), 6.41 (s ancho, 1H, NHFmoc), 7.22-7.47 (m, 4H, Ar.), 7.51-7.66 (m, 2H, Ar.), 7.68-7.83 (m, 2H, Ar.).
---	---

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm): 15.3, 16.0, 20.8, 20.8, 20.9, 23.5, 47.4, 55.4, 62.2, 63.1, 66.4, 67.0, 68.8, 71.9, 72.0, 79.6, 99.5, 118.9, 120.2, 125.3, 127.2, 127.9, 127.9, 132.0, 141.4, 141.5, 144.0, 144.2, 155.4, 169.6, 170.5, 170.8, 171.0, 171.8.

Fmoc-(3*R*,2*S*)- α -MeThr[β -*O*-GlcNAc(Ac₃)]-NHMe

A una disolución desoxigenada del compuesto **Fmoc-(3*R*,2*S*)-MeThr[β -GlcNAc(Ac₃)]-OAll** (90 mg, 0.12 mmol) en THF seco (7 mL) se le añade, bajo atmósfera inerte, Pd(PPh₃)₄ (1.5 mg, 1.3·10⁻³ mmol) y morfolina (44 μ L, 0.50 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h y se evapora el disolvente. El residuo resultante se disuelve en CHCl₃/ⁱPrOH (3:1, 10 mL) y se lava con HCl 1N. Se separan las fases y la acuosa se extrae con CHCl₃/ⁱPrOH (10 mL). El conjunto de las fases orgánicas reunidas, se seca (Na₂SO₄) y se concentra para dar lugar al ácido correspondiente que se usa en la siguiente reacción sin purificación previa. Sobre una disolución del ácido en DMF (4 mL), con tamiz molecular (4 Å, 100 mg), se añade DIEA (80 μ L, 0.48 mmol), TBTU (50 mg, 0.16 mmol) y clorhidrato de metilamina (16 mg, 0.24 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 10 h, se filtra el tamiz sobre tierra de diatomeas y se evapora el disolvente. El residuo resultante se purifica por columna cromatográfica (CH₂Cl₂/MeOH, 15:1) para obtener 45 mg (52%) de **Fmoc-(3*R*,2*S*)-MeThr[β -GlcNAc(Ac₃)]-NHMe** como un sólido blanco. Este producto se utilizó directamente en la siguiente reacción sin caracterización previa.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₃₅ H ₄₃ N ₃ O ₁₂):	C, 60.25; H, 6.21; N, 6.02
	encontrado:	C, 60.32; H, 6.17; N, 6.04

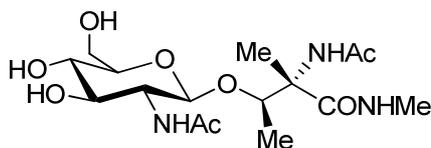
Ac-(3*R*,2*S*)- α -MeThr[β -O-GlcNAc(Ac₃)]-NHMe

A una disolución del compuesto **Fmoc-(3*R*,2*S*)-MeThr[β -GlcNAc(Ac₃)]-NHMe** (44 mg, 0.06 mmol) en DMF (3 mL) se le añade piperidina (31 μ L, 0.31 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 7 h. La mezcla se concentra y el residuo obtenido se disuelve en piridina/Ac₂O (2:1, 3 mL) y se mantiene en agitación 1 h. A continuación, se evapora el disolvente y el crudo resultante se purifica mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) para dar el compuesto **Ac-(3*R*,2*S*)-MeThr[β -GlcNAc(Ac₃)]-NHMe** (28 mg, 86%) como un sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₂₂ H ₃₅ N ₃ O ₁₁):	C, 51.06; H, 6.82; N, 8.12
	encontrado:	C, 51.18; H, 6.85; N, 8.17

¹ H RMN (CD ₃ OD)	δ (ppm): 1.03 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, CH _{3β}), 1.39 (s, 3H, CH _{3α}), 1.89 (s, 3H, NHCOCH ₃), 1.92 (s, 3H, CH ₃ CO), 1.96 (s, 3H, CH ₃ CO), 1.98 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.04 (s, 3H, NHCOCH ₃), 2.69 (d, $J=4.6$ Hz, 3H, NHCH ₃), 3.80-3.90 (m, 2H, H ₂ , H ₅), 4.06 (c, $J=6.3$ Hz, 1H, H _{β}), 4.13 (dd, $J=12.5$ Hz, $J=2.2$ Hz, H ₆), 4.41 (dd, $J=12.5$ Hz, $J=4.0$ Hz, 1H, H ₆), 4.67 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, H ₁), 4.97-5.07 (m, 1H, H ₄), 5.22 (dd, $J=10.6$ Hz, $J=9.4$ Hz, 1H, H ₃).
---	---

^{13}C RMN (CD_3OD) δ (ppm): 15.1 ($\text{CH}_{3\beta}$), 16.3 ($\text{CH}_{3\alpha}$), 20.7, 20.7, 20.7 ($3\text{CH}_3\text{CO}$), 22.9, 23.5 (2NHCOCH_3), 27.0 (NHCH_3), 55.4 (C_2), 62.9 (C_6), 64.2 (C_α), 69.9 (C_4), 73.3, 73.7 (C_3, C_5), 79.6 (C_β), 100.9 (C_1), 171.4, 171.9, 172.4, 172.4, 173.8, 174.6 (6CO).

Ac-(3*R*,2*S*)- α -MeThr(β -*O*-GlcNAc)-NHMe**Ac-MeThr(β -*O*-GlcNAc)-NHMe**

Una disolución del compuesto **Ac-(3*R*,2*S*)-MeThr[β -GlcNAc(*Ac*₃)]-NHMe** (25 mg, 0.08 mmol) en MeOH (5 mL) se trata con MeONa/MeOH (0.5 M) hasta pH=9. Después de agitarse a temperatura ambiente durante 2 h se neutraliza con Dowex 50-X8, se filtra y se concentra. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía de columna en fase reversa (C₁₈) para obtener el compuesto **Ac-MeThr(β -GlcNAc)-NHMe** (16 mg, 85%) como sólido blanco.

Análisis elemental (%)	calculado (C ₁₆ H ₂₉ N ₃ O ₈):	C, 49.10; H, 7.47; N, 10.74
	encontrado:	C, 49.21; H, 7.44; N, 10.70

¹ H RMN (D ₂ O)	δ (ppm): 1.00 (d, <i>J</i> =6.4 Hz, 3H, CH _{3β}), 1.31 (s, 3H, CH _{3α}), 1.94 (s, 3H, CH ₃ CO), 1.99 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.65 (s, 3H, NHCH ₃), 3.37-3.47 (m, 2H, H ₄ , H ₅), 3.48-3.55 (m, 1H, H ₃), 3.61-3.69 (m, 1H, H ₂), 3.76 (dd, <i>J</i> =12.1 Hz, <i>J</i> =5.0 Hz, 1H, H ₆), 3.86-3.99 (m, 2H, H ₆ , H _{β}), 4.51 (d, <i>J</i> =8.3 Hz, 1H, H ₁).
---------------------------------------	---

^{13}C RMN (D_2O) δ (ppm): 13.5 ($\text{CH}_{3\beta}$), 14.4 ($\text{CH}_{3\alpha}$), 22.0, 22.3 ($2\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 26.1 (NHCH_3), 55.3 (C_2), 60.7 (C_6), 62.9 (C_α), 69.9 (C_4), 73.4 (C_3), 75.9 (C_5), 78.5 (C_β), 99.4 (C_1), 173.1, 174.3, 174.7 (3CO).

*“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,
y pensar lo que nadie más ha pensado”*

“Dios no sólo juega a los dados, a veces los tira donde no se pueden ver”



*“Las diferentes conformaciones exploradas por estas moléculas
podrían utilizarse como herramientas útiles para la obtención de
sistemas con preferencias conformacionales a la carta”*



Alberto Fernández Tejada (Logroño, 1982).
Licenciado en Química por la Universidad de la Rioja
en 2004. Obtuvo la Suficiencia Investigadora y el
Diploma de Estudios Avanzados en 2006. Sus líneas
de interés se centran en la síntesis y análisis
conformacional, en disolución acuosa, de péptidos y
glicopéptidos.