

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA



* 5 3 0 9 5 5 2 7 9 8 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**DERIVADOS DE 2,5-DICETOPIPERIDINAS
Y 3-OXOINDOLIZIDINAS COMO UNA
APROXIMACION A LA OBTENCION
DE PEPTIDOMIMETICOS**

TESIS DOCTORAL

MARIA JOSE DOMINGUEZ PEREZ

DIRECTOR: Dra. ROSARIO GONZALEZ MUÑIZ

A mis padres

El Trabajo que se describe en esta Memoria ha sido realizado en el Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo la dirección de la Dra. M^a Rosario González Muñiz, a quien quiero expresar mi más sincero agradecimiento por su gran ayuda, dedicación y asesoramiento.

Deseo expresar mi gratitud, de manera muy especial, a la Dra. M^a Teresa García López por las facilidades dadas, como Directora del Instituto de Química Médica, para la realización de este Trabajo, así como, y principalmente, por su constante ayuda e interés en el desarrollo del mismo, como Jefe del Equipo de Investigación.

Agradezco al Dr. Benito Alcaide Alañón el haber aceptado ser ponente de esta Tesis.

Mi reconocimiento también al Dr. Joaquín del Río Zambrana por la realización de los ensayos biológicos.

Agradezco al Dr. Ibón Alkorta Osoro la realización de los estudios de modelización molecular.

Igualmente, deseo agradecer a la Dra. M^a Luisa Jimeno Herranz su asesoramiento en los estudios de análisis conformacional mediante RMN.

Agradezco también al Dr. B. Lundt, Jefe del Departamento del Sistema Nervioso Central de la compañía danesa Novo-Nordisk A/S, su interés en nuestro tema de trabajo y a los Dres. N.L. Johansen, H. Thøgersen y P. Suzdak y al Sr. K. Madsen, su colaboración directa en el mismo.

Agradezco al Dr. Federico Gómez de las Heras, Director del Instituto de Química Médica cuando comencé este Trabajo, las facilidades dadas para iniciar su realización.

Quiero dar las gracias también al personal especializado del C.N.Q.O. por la realización de los microanálisis y los espectros de Masas y, especialmente, a Dña. M^a Dolores Casado López y a Dña. Mercedes Plaza Ramírez por su ayuda con los espectros de RMN.

Igualmente, agradezco a Dña. Asunción Lorenzo Vián su colaboración con el HPLC y a D. Francisco Caballero Pérez, su ayuda en la transcripción del manuscrito.

A la Dra. Rosario Herranz Herranz y a mis compañeros de laboratorio, Ana, Isabel, Juan, Marisol, M^a Luisa, Mercedes y Natalia, gracias por vuestro apoyo y por todos los buenos momentos que hemos compartido a lo largo de estos años.

ÍNDICE

	Págs.
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. APROXIMACIONES HACIA LA BÚSQUEDA DE PEPTIDOMIMÉTICOS....	19
1.1.1. Búsqueda al azar de nuevos compuestos cabeza de serie.....	19
1.1.2. Diseño racional de peptidomiméticos.....	21
1.2. RESTRICCIONES CONFORMACIONALES EN PÉPTIDOS BIOACTIVOS. UTILIZACIÓN DE LACTAMAS.....	27
1.3. ANTECEDENTES INMEDIATOS, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	29
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
2.1. 2,5-DICETOPIPERIDINAS COMO ANÁLOGOS CÍCLICOS DE PSEUDOPÉP- TIDOS CETOMETILÉNICOS.....	37
2.1.1. 3-Metoxicarbonil-2,5-dicetopiperidinas 6-sustituidas.....	38
2.1.2. 2,5-Dicetopiperidinas 3,3,6-trisustituidas.....	43
2.1.3. Pseudodipéptidos cetometilénicos cíclicos.....	52
2.2. DERIVADOS DE 3-OXOINDOLIZIDINAS COMO ANÁLOGOS CONFOR- MACIONALMENTE RESTRINGIDOS DE DIPÉPTIDOS.....	54
2.2.1. Formación del esqueleto de 8-amino-3-oxoindolizidina-2-carboxi- lato.....	55
2.2.2. Alquilación de derivados de 8-amino-3-oxoindolizidina-2-carboxi- lato.....	58
2.2.3. Enantioselectividad en la formación de derivados de 8-amino-3-oxo- indolizidina-2-carboxilato.....	61
2.2.4. Formación de derivados de 8a-hidroxi- y 8a-alcoxi-8-amino-3-oxoin- dolizidina-2-carboxilato 2-sustituidos.....	70
2.2.5. Modelización molecular de derivados de 8-amino-3-oxoindolizidina- 2-carboxilato. Análisis conformacional mediante dinámica molecu- lar.....	78
2.3. ANÁLOGOS CONFORMACIONALMENTE RESTRINGIDOS DE COLECIS- TOQUININA Y NEUROTENSINA.....	89
2.3.1. Análogos conformacionalmente restringidos de CCK.....	89
2.3.1.1. Análogos de CCK ₄ derivados de 2,5-dicetopiperidinas.....	92
2.3.1.2. Análogos de CCK ₄ portadores del esqueleto de 3-oxoindolizi- dina.....	97
2.3.2. Análogos conformacionalmente restringidos de NT.....	107

	Págs.
3. PARTE EXPERIMENTAL	117
3.1. SÍNTESIS DE CLOROMETILCETONAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS.....	123
3.2. SÍNTESIS DE 4-CETODIÉSTERES DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS.....	125
3.3. OBTENCIÓN DE 4-CETODIÉSTERES 2-SUSTITUIDOS.....	127
3.4. SÍNTESIS DE 2,5-DICETOPIPERIDINAS	130
3.4.1. Síntesis de 3-metoxicarbonil-2,5-dicetopiperidinas 6-sustituidas.....	130
3.4.2. Síntesis de 6-aralquil-3-metoxicarbonil-2,5-dicetopiperidinas 3,3-disustituidas.....	136
3.4.3. Síntesis de pseudodipéptidos cetometilénicos cíclicos.....	143
3.5. SÍNTESIS DE 3-OXOINDOLIZIDINAS.....	146
3.5.1. Síntesis de 8-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)amino-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidinas	146
3.5.2. Preparación de 8-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)amino-3-oxoindolizidina.....	147
3.5.3. Síntesis de 8-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)amino-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidinas 2,2-disustituidas.....	151
3.5.3.1. Preparación de derivados 2-bencil, 2-etoxicarbonilmetil y 2- <i>terc</i> -butoxicarbonilmetil sustituidos.....	151
3.5.3.2. Obtención de derivados 2-(indol-3'-il)metil sustituidos	154
3.5.3.3. Preparación de 8-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)amino-2-carboxi-3-oxoindolizidinas 2,2-disustituidas.....	159
3.5.4. Preparación de derivados de MTPA.....	164
3.5.4.1. Reacciones de derivatización con el ácido (<i>R</i>)-(+)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético	164
3.5.4.2. Reacciones de derivatización con el cloruro de (<i>S</i>)-(+)- ó (<i>R</i>)-(-)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacetilo.....	166
3.5.5. Obtención de derivados de 8 α -hidroxi- y 8 α -alcoxi-8-amino-3-oxoindolizidina-2-carboxilato 2-sustituidos.....	169
3.5.5.1. Reacciones de hidrogenación del 2-bencil-4-cetodiéster derivado de Boc-Orn(Z)-OH	169
3.5.5.2. Reacciones de reducción de 8 α -hidroxi- y 8 α -alcoxi-3-oxoindolizidinas.....	175
3.5.5.3. Obtención de $\Delta^{8,8a}$ -hexahidroindolizinas	177
3.6. PREPARACIÓN DE ANÁLOGOS DE COLECISTOQUININA DERIVADOS DE 2,5-DICETOPIPERIDINAS	181
3.6.1. Acoplamiento peptídico de derivados de 2,5-dicetopiperidinas con H-Phe-NH ₂	181
3.6.2. Eliminación del grupo protector <i>terc</i> -butilo.....	182
3.7. PREPARACIÓN DE ANÁLOGOS DE COLECISTOQUININA DERIVADOS DE 3-OXOINDOLIZIDINAS.....	186
3.7.1. Acoplamiento peptídico de derivados de 3-oxoindolizidina 2-bencil sustituidos con Boc-L-Trp-OH ó Boc-D-Trp-OH	186
3.7.2. Transformación de ésteres metílicos en amidas.....	188
3.7.3. Acoplamiento peptídico de derivados de 3-oxoindolizidina 2- <i>terc</i> -butoxicarbonilmetil sustituidos con H-Phe-NH ₂	191

3.7.4. Acoplamiento peptídico de derivados de 3-oxoindolizidina 2-carboximetil sustituidos con Boc-L-Trp-OH.....	192
3.7.5. Eliminación del grupo protector <i>tert</i> -butoxicarbonilo.....	196
3.8. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE NEUROTENSINA PORTADORES DE ESQUELETOS DE 3-OXOINDOLIZIDINAS.....	199
3.9. MÉTODOS BIOLÓGICOS	202
3.9.1. Ensayos de unión a los receptores de CCK	202
3.9.2. Ensayos de liberación de amilasa.....	202
3.9.3. Inhibición de las contracciones inducidas por CCK ₈ ó CCK ₄ en el íleon de cobaya: Preparación de músculo longitudinal- plexo mientérico...	202
3.9.4. Ensayos de unión a los receptores de NT.....	203
4. CONCLUSIONES	205
5. BIBLIOGRAFÍA.....	211

NOTA SOBRE NOMENCLATURA

A lo largo de esta Memoria se han utilizado la nomenclatura y simbolismo de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB ("Nomenclature and Symbolism for Aminoacids and Peptides", *Pure & Appl. Chem.*, **1984**, 56, 595).

Los aminoácidos se nombran mediante el sistema de símbolos de tres letras y pertenecen a la serie natural L, salvo que se indique lo contrario. Las sustituciones sobre el grupo α -NH₂ se indican anteponiendo el símbolo aceptado para el sustituyente al símbolo del aminoácido, mientras que las sustituciones sobre los grupos funcionales de las cadenas laterales se indican entre paréntesis, inmediatamente después del símbolo del aminoácido.

En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene el grupo amino libre, o no acilado por otro aminoácido, se denomina *N*-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre se denomina *C*-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente se comienza por el residuo *N*-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo *C*-terminal.

Para las sustituciones del enlace peptídico por agrupamientos bioisósteros se utiliza la terminología aceptada para pseudopéptidos, consistente en la introducción de la letra griega Ψ entre los símbolos de los aminoácidos cuyo enlace peptídico se ha modificado, seguida del agrupamiento que sustituye al enlace peptídico entre corchetes.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Boc : *tert*-butoxicarbonilo

BOP : hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio

DCC : *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida

DCU : *N,N'*-diciclohexilurea

DIEA : diisopropiletilamina

DMAP : *N,N*-dimetilaminopiridina

DME : 1,2-dimetoxietano

HOSu : *N*-hidroxisuccinimida

In : 3-indolilo

MTPA : ácido α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético

NMM : *N*-metilmorfolina

TEA : trietilamina

TFA : ácido trifluoroacético

TFAE : 1-(9-antril)-2,2,2-trifluoroetanol

THF : tetrahidrofurano

Z : benciloxicarbonilo

1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento y caracterización, así como el estudio de las propiedades y funciones biológicas, de los péptidos bioactivos, han tenido un desarrollo exponencial en los últimos 40 años. Este desarrollo es resultado de los avances surgidos tanto en la química orgánica de péptidos (síntesis en fase sólida), la biología molecular (producción de hormonas por ingeniería genética, clonaje de receptores), como en las técnicas disponibles para los estudios estructurales, más químico-físicos (RMN, métodos informáticos) y para la caracterización farmacológica (ensayos de unión al receptor, radioinmunoensayos). La participación de los péptidos en la mayoría de los procesos bioquímicos, donde actúan como hormonas y/o neurotransmisores, hace que la modulación con agonistas o antagonistas de los receptores peptídicos asociados a la superficie celular, o la inhibición de las enzimas implicadas en su biosíntesis y/o degradación, puedan tener importantes implicaciones terapéuticas (Figura 1). De hecho, péptidos o análogos peptídicos, entre los que destaca como ejemplo clásico la Insulina, son ya de uso clínico generalizado. Entre ellos, los análogos sintéticos del Factor Liberador de la Hormona Luteinizante (LH-RH), Buserelin y Goserelin, y de la Somatostatina, Octeotride, se han comercializado para el tratamiento de ciertos tumores, mientras que el Acetato de Desmopresina, un agonista selectivo de Vasopresina, se utiliza actualmente en el tratamiento de la diabetes insípida ¹⁻³.

Desafortunadamente, el interés de los péptidos como fuente directa de nuevos fármacos está limitado por una serie de propiedades adversas, inherentes a la propia estructura peptídica, como son:

- a) Baja estabilidad metabólica o, lo que es lo mismo, rápida degradación por peptidasas tanto en el tracto gastrointestinal como en la sangre, que origina efectos biológicos de corta duración.
- b) Pobre biodisponibilidad oral, debida al alto peso molecular de estos compuestos o a la falta de sistemas específicos de transporte o a una conjunción de ambos factores.

Figura 1. Principales grupos de péptidos bioactivos e interés terapéutico de los mismos

Péptido	Interés terapéutico
1. NEUROPEPTIDOS	
Péptidos opioides	Analgésico
Sustancia P (SP)	Hipotensor, antiinflamatorio
Neurotensina (NT)	Hipotensor
Neuroquininas (NK)	Hipotensor, antidepresivo
Hormonas del Hipotálamo	
Tirotropina (TRH)	Desórdenes tiroidales
Somatostatina (ST)	Diabetes, úlceras gástricas, cáncer de próstata
Factor Liberador de la Hormona Luteinizante (LH-RH)	Fertilidad, contracepción, cáncer de próstata
Hormonas de la Hipófisis	
Hormona del Crecimiento (Somatotropina)	Enanismo, osteoporosis
Oxitocina (OT)	Contracciones uterinas
Vasopresina	Diabetes insípida
2. PÉPTIDOS GASTROINTESTINALES	
Insulina	Diabetes
Glucagón	Hipoglicemia, fallo cardíaco
Gastrina	Secreción HCl
Colecistoquinina (CCK)	Pancreatitis, anorexia, ansiedad
3. PÉPTIDOS DE IMPORTANCIA INMUNOLÓGICA	
Ciclosporinas	Inmunosupresor (Transplantes)
Muramilpéptidos	Inmunoestimulante
4. PÉPTIDOS DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	
Inhibidores de ECA	Antihipertensor
Inhibidores de Renina	Antihipertensor
5. VACUNAS	
Péptidos sintéticos	Gripe, SIDA
6. PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS ATRIALES	
ANF	Diurético, antihipertensor
7. OTROS	
Saborizantes	Edulcorante (Aspartame)
Péptidos antibióticos	Antibiótico
Péptidos-Leucotrienos	Antialérgico, antiinflamatorio

- c) Rápida excreción a través del hígado y del riñón.
- d) Alta flexibilidad conformacional, que conlleva la posibilidad de unión a diversos receptores y, por lo tanto, una baja especificidad de acción.

Uno de los mayores retos actuales de la Química Médica es encontrar vías racionales para la transformación sistemática de la información contenida en un ligando peptídico natural en moléculas no peptídicas de bajo peso molecular, capaces de interactuar con receptores específicos para ese ligando y de mimetizar o bloquear la acción del péptido endógeno considerado ⁴⁻⁷. Es de esperar que estos compuestos no peptídicos, denominados peptidomiméticos, posean propiedades farmacodinámicas mejoradas con respecto a las de los péptidos naturales y, por lo tanto, pueden considerarse *a priori* un objetivo mejor en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos. Por otra parte, la aparición de reacciones inmunológicas tras la aplicación de fármacos peptídicos es otro factor que apoya, cada vez más, la necesidad de profundizar en la investigación conducente al desarrollo de peptidomiméticos ⁸.

1.1. APROXIMACIONES HACIA LA BÚSQUEDA DE PEPTIDOMIMÉTICOS

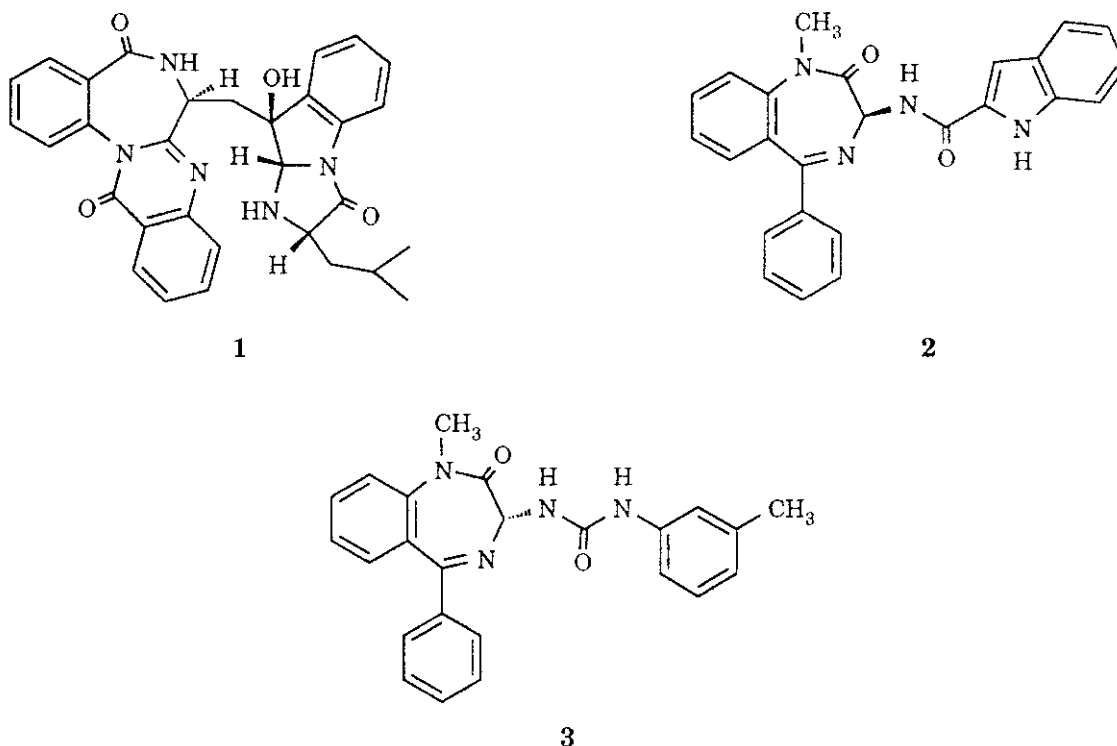
La obtención de peptidomiméticos puede abordarse desde dos perspectivas bien diferenciadas, la búsqueda al azar, más o menos dirigida, de nuevos compuestos cabeza de serie y el diseño racional ⁹.

1.1.1. BÚSQUEDA AL AZAR DE NUEVOS COMPUESTOS CABEZA DE SERIE

Esta estrategia consiste en el ensayo generalizado de compuestos tanto de origen natural como sintético, sobre un amplio abanico de receptores peptídicos, con el fin de identificar estructuras cabeza de serie. Posteriormente, a partir de aquel compuesto que haya mostrado una afinidad interesante, aunque generalmente moderada, por un determinado receptor, se aplican los principios de variaciones estructurales clásicos de la Química Médica hasta lograr el desarrollo de un agente terapéutico con propiedades adecuadas ¹⁰⁻¹².

El primer gran éxito en este campo surgió a raíz de la moderada capacidad para actuar como antagonista de Colecistoquinina (CCK) mostrada por la Asperlicina (**1**) ¹³. Tras una serie de modificaciones en el anillo de 1,4-benzodiazepina, característica estructural clave para la actividad de este producto natural, se desarrollaron los compuestos MK-329 (Devazepide, **2**),

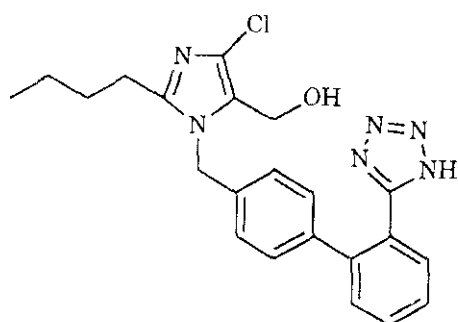
antagonista selectivo de los receptores periféricos de CCK (CCK_A) y activo por vía oral ¹⁴, así como el análogo L-365,260 (**3**), que resultó ser un antagonista selectivo de los receptores centrales (CCK_B) de este neuropéptido ¹⁵. Concretamente, el Devazepide está siendo objeto de estudios clínicos en humanos para explorar su potencial aplicación en la pancreatitis y en el síndrome de irritación intestinal. Por otra parte, los antagonistas de CCK_B pueden ser de utilidad para el tratamiento de disfunciones alimentarias y ciertos desórdenes asociados con la ansiedad.



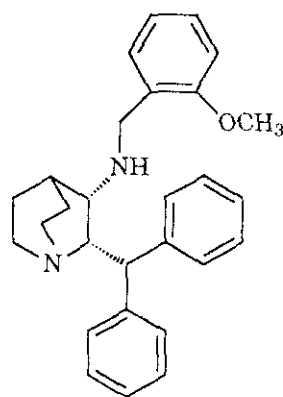
Entre otros ejemplos de peptidomiméticos desarrollados por esta vía se pueden destacar el compuesto **4**, antagonista de Angiotensina II y, por tanto, con aplicación en el control de la hipertensión ¹⁶, los antagonistas de Sustancia P **5** y **6**, con interés para el tratamiento de la inflamación y el dolor ^{17,18} y el antagonista de Oxitocina (OT) **7**, que permitirá la evaluación de la utilidad clínica de los antagonistas de OT en la prevención del parto prematuro ¹⁹.

Es de destacar que, aunque algunos de los antagonistas de neuropéptidos comentados anteriormente están en fase clínica avanzada, esta vía de aproximación no ha conducido todavía a la obtención de peptidomiméticos con capacidad para actuar como agonistas. Sin embargo, y como aspecto positivo,

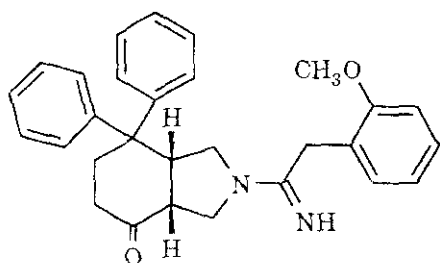
los peptidomiméticos surgidos de esta primera vía pueden contribuir a una mejor comprensión de los grupos farmacóforos implicados en las uniones péptido/receptor y, por lo tanto, deberán ser considerados a la hora de emprender el diseño racional de un peptidomimético a partir del correspondiente péptido bioactivo.



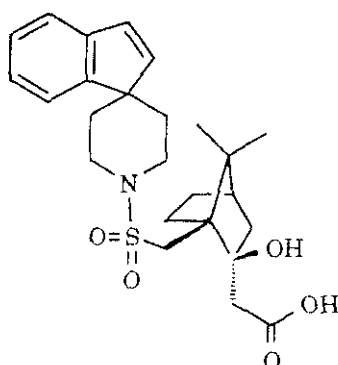
4



5



6



7

1.1.2. DISEÑO RACIONAL DE PEPTIDOMIMÉTICOS

La preparación de peptidomiméticos a través de diseño racional, utilizando un péptido de interés o sus análogos como punto de partida para realizar modificaciones estructurales posteriores, es la segunda vía desarrollada para acceder a este tipo de compuestos 20-22.

Teniendo en cuenta que en las interacciones péptido/receptor solamente un reducido número de aminoácidos del péptido bioactivo son responsables del proceso de activación/inhibición de dicho receptor, parece razonable suponer que moléculas pequeñas puedan asumir sus funciones. Sin embargo, el diseño

de estas moléculas es un proceso laborioso, ya que requiere el conocimiento previo de los elementos químicos y espaciales del farmacóforo de interés. Por lo tanto, el diseño de un peptidomimético debe contemplar los siguientes puntos fundamentales:

1. Identificación de los grupos importantes para la unión al receptor.
2. Definición de la disposición tridimensional de dichos grupos.
3. Unión de los grupos necesarios para la interacción en estructuras rígidas, no peptídicas, que cumplan los requisitos tridimensionales previamente especificados.

A partir de un péptido biológicamente activo, y como se indica de manera esquemática en la figura 2, la primera etapa a llevar a cabo es la determinación del fragmento mínimo necesario para la actividad biológica. Una vez conocido este fragmento, la sustitución de cada uno de sus aminoácidos constituyentes por alanina da idea de la importancia que tienen para la actividad el tipo y la funcionalidad de las cadenas laterales de cada residuo. Posteriormente, las sustituciones de los distintos aminoácidos por sus análogos de configuración D aportan información acerca de la disposición espacial preferida por las diferentes cadenas laterales. La D-sustitución, junto con la introducción de aminoácidos modificados, generalmente análogos conformacionalmente restringidos, y el estudio de los derivados peptídicos resultantes son de crucial interés para llegar a definir una serie de parámetros conformacionales locales, así como para establecer la presencia de estructuras secundarias concretas ²³. De una manera paralela, la sustitución del enlace peptídico por grupos bioisósteros o estructuralmente relacionados, tales como CH_2NH , COCH_2 , NHCO , permite determinar la participación de los enlaces CONH del esqueleto en las interacciones con el receptor, bien por formación de enlaces tipo puente de hidrógeno o bien por ser responsables de la adopción de una disposición espacial adecuada de las cadenas laterales críticas ²⁴. La preparación de análogos conformacionalmente restringidos, tanto por medio de diferentes tipos de ciclaciones ^{21,23} como por introducción de miméticos de estructuras secundarias peptídicas ^{25,26}, constituye una etapa avanzada hacia el desarrollo de peptidomiméticos, ya que permite comprobar si los parámetros conformacionales previamente definidos se ajustan a la topografía del receptor en estudio. Para ello, se han de realizar los análisis conformacionales y físico-químicos tanto de los compuestos que muestren actividad significativa como de

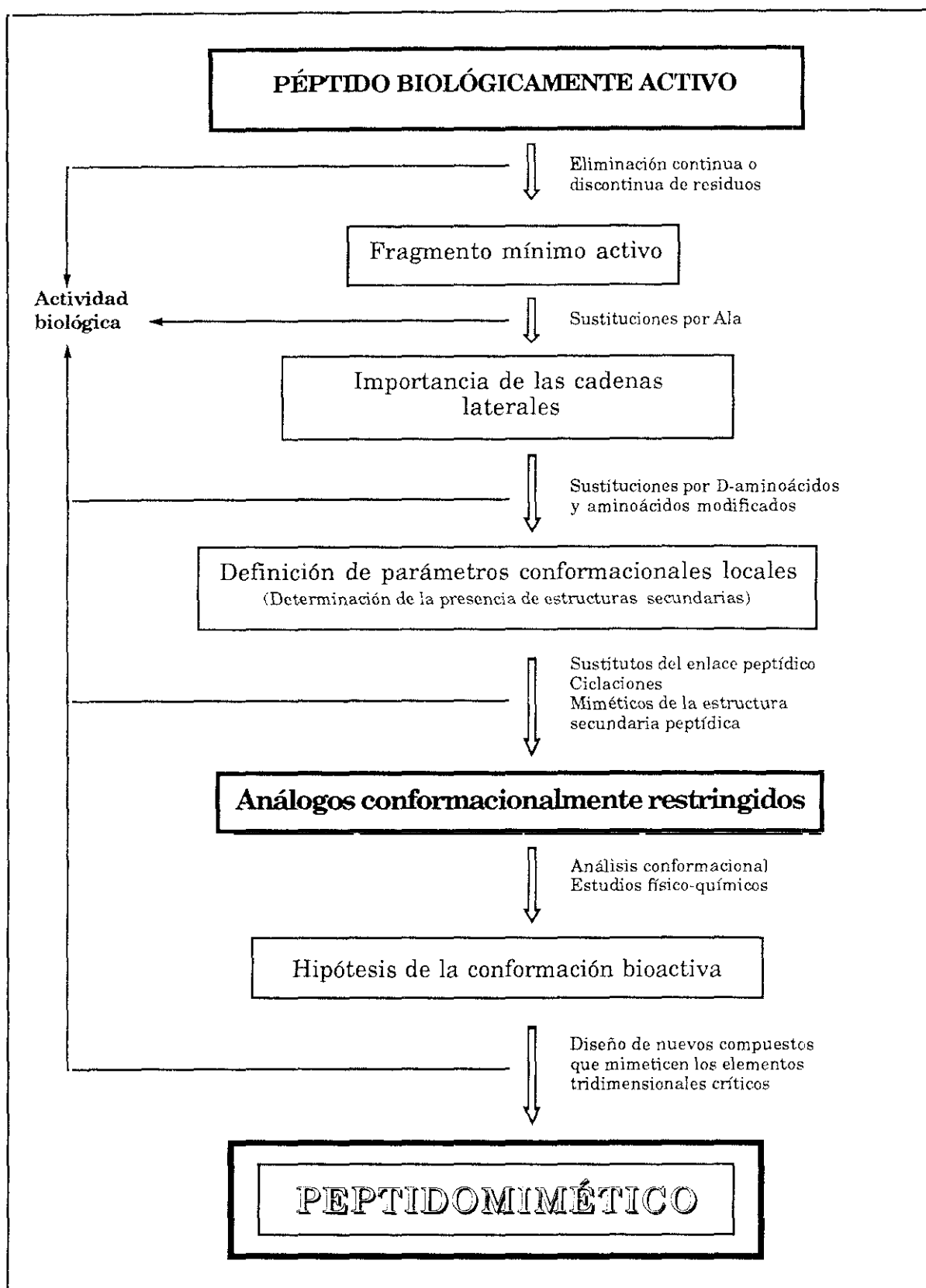
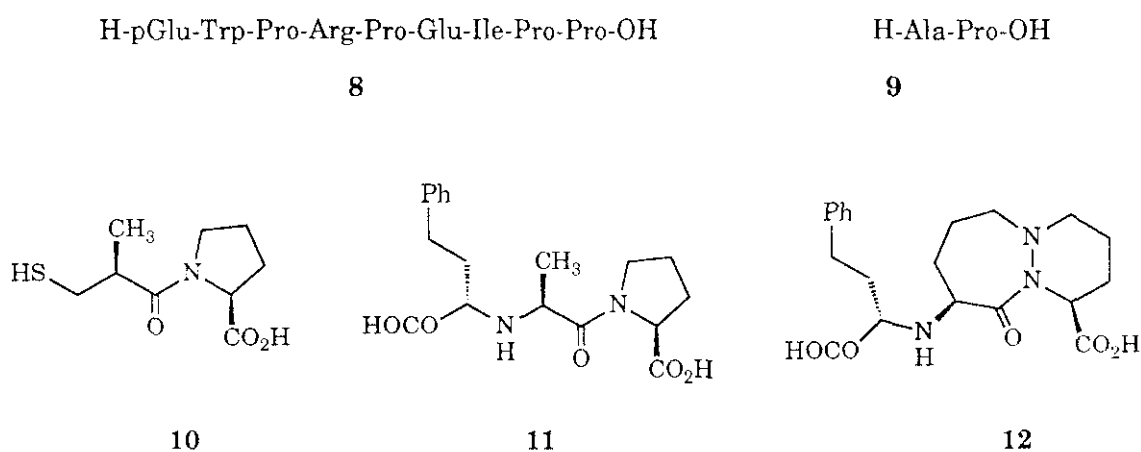


Figura 2. Aproximaciones hacia el diseño racional de peptidomiméticos.

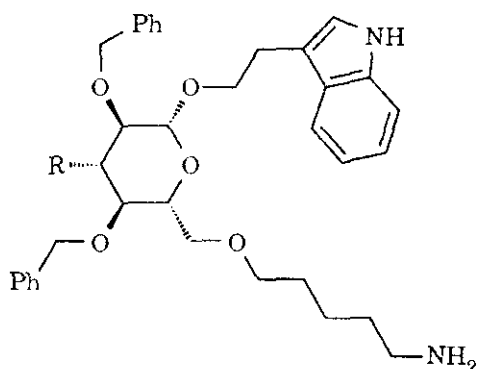
aquéllos que resulten inactivos. Una vez llegados a este punto, se define una hipótesis para la conformación bioactiva del péptido, a partir de la cual se puede abordar la preparación de moléculas pequeñas, no peptídicas, que cumplan los requisitos preestablecidos, tanto en cuanto a grupos funcionales necesarios para la actividad como, y principalmente, en cuanto a su disposición espacial.

La falta de estudios de relaciones estructura-actividad detallados para muchos péptidos bioactivos, junto con la dificultad de extrapolar las conformaciones en estado sólido y/o en disolución con las de unión a un determinado receptor, ralentizan la obtención de peptidomiméticos siguiendo esta estrategia. Sin embargo, los ejemplos de compuestos no peptídicos desarrollados por esta vía en los últimos años apoyan la validez de la misma. La primera aplicación con éxito de esta estrategia se encuentra en el campo de los inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA). Así, los compuestos Captopril (**10**) y Enalapril (**11**) surgieron, por diseño racional, a partir del moderado poder de inhibición sobre la ECA mostrado por el Teprótido (**8**) y el dipéptido **9** y del conocimiento de la presencia de un átomo de Zn en el centro activo de dicha enzima ^{27,28}. Posteriormente, estudios de modelización molecular, basados en las coordenadas de R-X y en datos de RMN del Captopril, permitieron el diseño de una nueva generación de inhibidores conformacionalmente restringidos, entre los que destaca el Cilazapril (**12**) ^{29,30}. Los compuestos **10**, **11** y **12** se encuentran actualmente comercializados para el tratamiento de la hipertensión arterial.

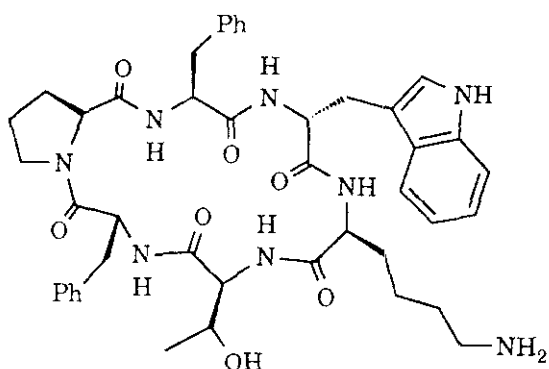


Más recientemente ³¹, la utilización de la 3-desoxi-β-D-glucosa como molde para el anclaje de las cadenas laterales esenciales del análogo de

Somatostatina (ST) **15**, ha conducido a los derivados **13** y **14**, que se unen al receptor de la ST con afinidades de rango micromolar, mostrando propiedades mixtas agonista/antagonista. El compuesto **13** se une también a los receptores β -adrenérgicos y al receptor de la Sustancia P, todos ellos receptores acoplados a proteínas G, lo que pone de manifiesto una gran similitud estructural en los centros de unión de esta familia de receptores. Por su parte, el benciloxi derivado **14** actúa como un antagonista potente de la SP ³¹.

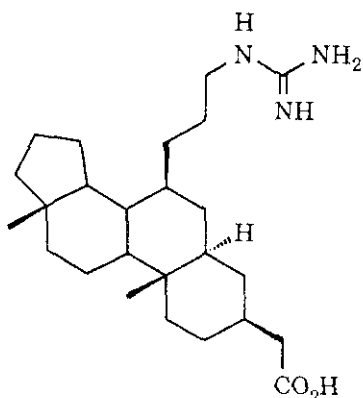


R = H, OBn **13, 14**

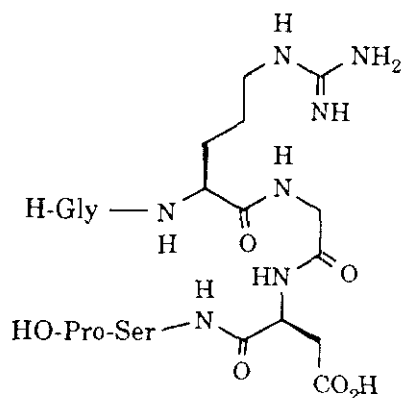


15

Basándose en la rigidez y en las múltiples posibilidades de anclaje que ofrecen los esqueletos de tipo esteróidico, el grupo de Hirschmann ha preparado el compuesto **16**, como mimético del péptido H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-OH (**17**), un agonista del receptor del Fibrinógeno, responsable de la iniciación de la agregación plaquetaria. Desafortunadamente, el antagonista **16** presenta una afinidad demasiado baja para ser considerado como un candidato de utilidad terapéutica ³².

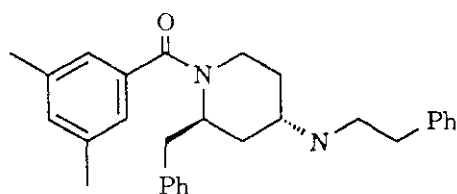


16

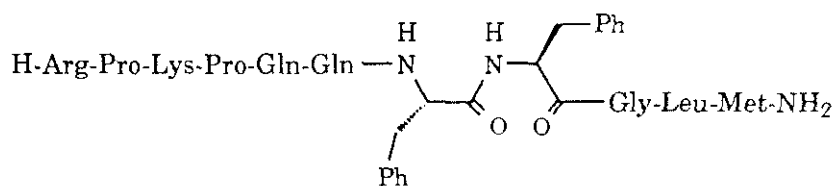


17

El derivado de piperidina **18**, peptidomimético antagonista de SP, fue diseñado a partir de estudios combinados de RMN y de mecánica molecular de la SP y análogos activos, y admitiendo la hipótesis de que el fragmento -Phe-Phe- es el responsable principal de la unión al receptor de la SP (**19**)³³.

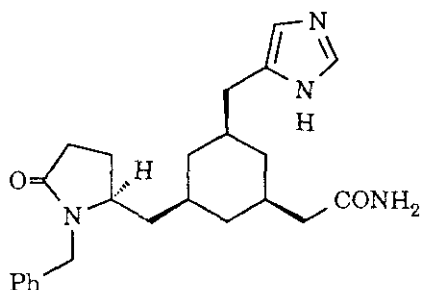


18

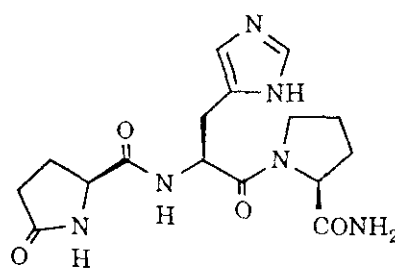


19

El derivado de ciclohexano 1,3,5-*cis*-trisustituido **20** se diseñó como mimético de la Hormona Liberadora de Tirotrópina (TRH, pGlu-His-Pro-NH₂, **21**), un péptido hipotalámico que parece relacionarse con ciertos desórdenes de la memoria, como son los asociados con la enfermedad de Alzheimer. El compuesto **20** presenta una actividad similar a la TRH en diversos modelos animales, siendo activo por vía oral. Sin embargo, este peptidomimético no compete con la TRH tritiada en su unión al receptor, por lo que se está estudiando el mecanismo de acción a través del cual este derivado es capaz de mimetizar los efectos del péptido endógeno³⁴.



20



21

1.2. RESTRICCIONES CONFORMACIONALES EN PÉPTIDOS BIOACTIVOS. UTILIZACIÓN DE LACTAMAS

La determinación de relaciones estructura tridimensional-actividad en péptidos bioactivos, enormemente dificultada por la flexibilidad inherente a las estructuras peptídicas, constituye una etapa fundamental en el diseño racional de peptidomiméticos. Dado el amplio desconocimiento de los receptores peptídicos y la dificultad de establecer cuál o cuáles de los muchos conformeros presentes en disolución se ajusta(n) a la geometría del receptor, para abordar este problema se aplica una aproximación sintética que consiste en la introducción de restricciones conformacionales. Así, es de esperar que un análogo conformacionalmente restringido adopte, en disolución, conformaciones preferentes, que permitan una extrapolación más fidedigna de la(s) conformación(es) bioactiva(s). Atendiendo al grado de rigidez que se incorpora al péptido, las restricciones conformacionales pueden agruparse en tres apartados:

1. Restricciones locales: Incorporación de sustitutos del enlace peptídico como *N*-alquil derivados, retroanálogos, dobles enlaces *trans* y restricciones de la movilidad de las cadenas laterales, como α -alquil, dehidro y ciclopropil aminoácidos.
2. Restricciones regionales: Introducción de miméticos de la estructura secundaria peptídica, hélices α , láminas β , giros inversos β y γ .
3. Restricciones globales: Ciclaciones.

Los dos primeros tipos de modificaciones son muy útiles para dar una visión general de la importancia de la conformación de residuos específicos y de la participación o no de estructuras secundarias, respectivamente, en la unión al receptor. Por otra parte, los compuestos obtenidos mediante ciclaciones *N*-*C*-terminal, cadena lateral-grupos *N*- y/o *C*-terminales o por unión de los grupos funcionales de distintas cadenas laterales, facilitan el estudio de la conformación global del péptido y la extrapolación de esta conformación con la de unión al receptor. Además, la introducción de restricciones conformacionales proporciona en muchos casos ligandos selectivos para un determinado subtipo de receptor e incrementa de manera general la resistencia frente a la proteólisis enzimática^{5,21}.

La incorporación de lactamas en péptidos bioactivos como vía para la preparación de análogos conformacionalmente restringidos fue iniciada por

Freidinger a principios de la década de los 80³⁵⁻³⁷. Estas lactamas, concebidas en principio para fijar el enlace peptídico en su forma *trans*, han marcado la pauta de una línea de investigación de creciente actualidad que engloba a los miméticos de la estructura secundaria peptídica, también denominados miméticos de la conformación peptídica^{25,26}. En los últimos años se han descrito un gran número de ciclos pequeños, principalmente de tipo lactámico, cuya incorporación en péptidos de interés biológico ha dado lugar a análogos conformacionalmente restringidos que, en mayor o menor medida, han contribuido al esclarecimiento de las interacciones péptido-receptor^{25,26}. Las estructuras más representativas de estos compuestos se recogen en la figura 3.

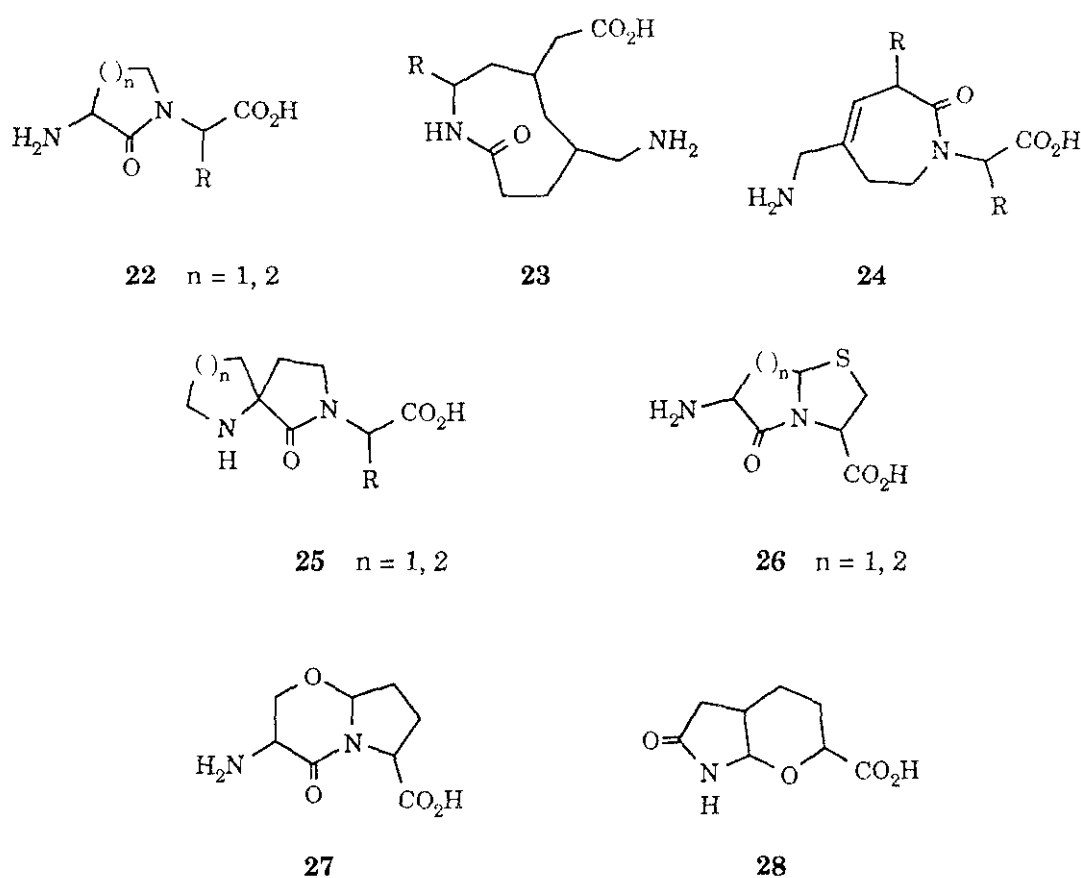


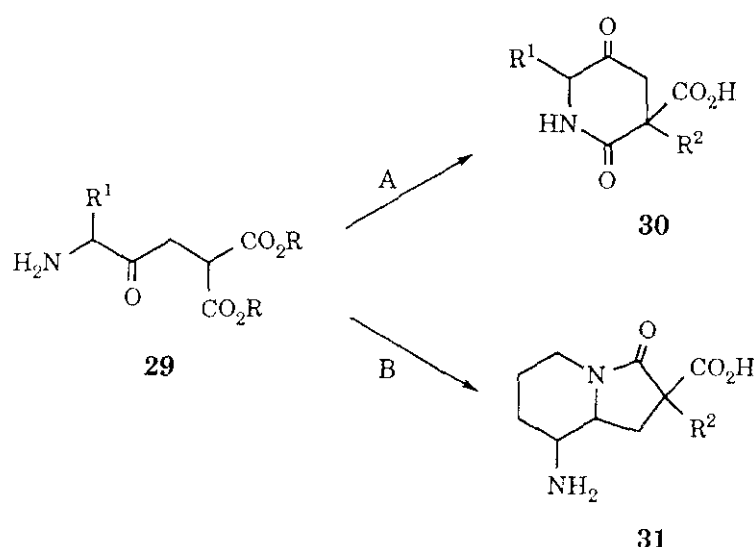
Figura 3. Lactamas de utilidad para la introducción de restricciones conformacionales en péptidos.

La introducción de γ - y δ -lactamas de tipo **22** ha dado lugar a la obtención de agonistas o antagonistas de diferentes péptidos bioactivos^{35,38,39}, así como a interesantes inhibidores enzimáticos⁴⁰. La lactama monocíclica **23** fue diseñada como mimético de giros β por Olson y colaboradores⁴¹, habiéndose

demostrado, tanto por RMN como por modelización molecular, que es un buen mimético de este tipo de estructura secundaria peptídica. Por otra parte, la lactama de siete miembros **24**, ideada para restringir conformacionalmente giros γ , se ha utilizado para estudiar la contribución de estos giros en la conformación bioactiva de antagonistas del receptor del Fibrinógeno y de inhibidores de la proteasa del HIV-1 ^{42,43}. Los derivados de espirolactama **25** son capaces de forzar conformaciones de giro β tras su incorporación en diferentes sistemas peptídicos ⁴⁴⁻⁴⁶. De manera similar, la introducción del BTD (Bicyclic Turned Dipeptide, **26**, $n = 2$) en péptidos de interés biológico induce a éstos a adoptar conformaciones de giro β ⁴⁷⁻⁴⁹. Los buenos resultados obtenidos con el BTD han conducido a un desarrollo espectacular en la búsqueda de lactamas bicíclicas, estructuralmente relacionadas, como miméticos de giros β [**26** ($n = 1$), **27**, **28** y otras] ⁵⁰⁻⁵⁶.

1.3. ANTECEDENTES INMEDIATOS, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Teniendo en cuenta el interés general despertado por los análogos peptídicos conformacionalmente restringidos, y en particular por las estructuras lactámicas referidas en el apartado anterior, se plantearon como objetivos sintéticos principales para este trabajo la obtención de los derivados de 2,5-dicetopiperidina **30** y 3-oxoindolizidina **31**, indicados en el esquema siguiente, como representantes de lactamas monocíclicas y bicíclicas, respectivamente.



Ruta A: R^1, R^2 = cadenas laterales de aminoácidos

Ruta B: $\text{R}^1 = (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$; R^2 = cadenas laterales de aminoácidos

Las 2,5-dicetopiperidinas **30** podrían ser incorporadas posteriormente a péptidos de mayor tamaño para conducir a análogos conformacionalmente restringidos en el pseudodipéptido *N*-terminal, o bien dar paso a los pseudodipéptidos cetometilénicos correspondientes tras una simple descarboxilación. En ambos casos, la presencia del anillo monolactámico vendría a contrarrestar el aumento de flexibilidad conformacional resultante de sustituir el enlace peptídico -CONH- por el isómero cetometilénico -COCH₂-, sustitución generalmente utilizada para proporcionar resistencia frente a peptidasas ²⁴.

La elección de las 3-oxoindolizidinas **31** fue resultado de varias consideraciones. En primer lugar, la presencia de grupos NH₂ y CO₂H las hacía susceptibles de incorporación a cadenas peptídicas tanto en la posición *C*-terminal como en la *N*-terminal. En segundo lugar, dentro del interés generado por las lactamas bicíclicas como posibles miméticos de estructuras secundarias peptídicas, las 3-oxoindolizidinas **31** están particularmente relacionadas con aquéllas cuyo mimetismo está demostrado. Tal es el caso del BTB (**26**) como mimético de giros β, indicado en el apartado anterior ⁴⁷⁻⁴⁹.

Desde el punto de vista de viabilidad sintética, la experiencia reciente de nuestros laboratorios en la preparación de los 4-cetodiésteres derivados de aminoácidos **29** ⁵⁷⁻⁶², productos a utilizar como material de partida común que debería dar acceso a las 2,5-dicetopiperidinas **30** y 3-oxoindolizidinas **31**, constituyó un factor importante en la selección de ambos tipos de lactamas como objetivos de este trabajo. Así, el esqueleto de 2,5-dicetopiperidina 3-carboxi sustituido debería resultar de la δ-lactamización de los aminodiésteres **29** ó de derivados sencillos de éstos (Ruta A). Por su parte, el esqueleto de 3-oxoindolizidina 2-carboxi sustituido debería formarse mediante aminación reductiva del cetodiéster derivado de ornitina **29** [R¹ = (CH₂)₃NH₂], seguida de acilación intramolecular de la piperidina resultante (Ruta B). Una ruta paralela, basada en la conocida capacidad de los derivados de Orn y Arg para experimentar ciclaciones intramoleculares ^{36,63}, había sido puesta a punto en nuestros laboratorios para la preparación de 8-amino-3-oxoindolizidinas 2-aralquil sustituidas, carentes del resto carboxilo, a partir de pseudodipéptidos cetometilénicos derivados de ornitina ⁶⁴. Esta experiencia propia, unida a la referente a la obtención de los compuestos **29**, constituyen los antecedentes sintéticos más inmediatos del trabajo de esta Memoria.

Por último, para empezar a explorar la utilidad en el campo de los peptidomiméticos de los sistemas lactámicos **30** y **31**, se definió también como

objetivo de este trabajo la introducción de los mismos en péptidos de interés biológico, así como la posterior evaluación biológica de los análogos conformacionalmente restringidos obtenidos. Para este fin se eligieron los neuropéptidos Colecistoquinina y Neurotensina, y más concretamente, sus fragmentos mínimos activos CCK₄ (H-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) y NT₈₋₁₃ (H-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH). Además del interés particular que tienen estos péptidos en la búsqueda de nuevos fármacos, como se detallará en el capítulo correspondiente, la elección estuvo basada en sendas colaboraciones que nuestro grupo mantiene con el Departamento de Farmacología de la Universidad de Navarra y la Compañía Novo-Nordisk, interesados en los estudios de CCK y NT, respectivamente. Como se concretará en el capítulo 2.3 de esta Memoria, para el diseño de los análogos conformacionalmente restringidos de estos neuropéptidos se han tenido en cuenta los estudios previos de relaciones estructura-actividad descritos en la bibliografía para la CCK y la NT, así como los estudios de sus análisis conformacionales respectivos.

Para abordar los objetivos anteriormente expuestos, se ha seguido el plan de trabajo que se resume a continuación:

- Derivados de 2,5-dicetopiperidinas como análogos cíclicos de pseudopéptidos cetometilénicos.
Puesta a punto de métodos de aplicación general para la obtención del esqueleto fundamental de 2,5-dicetopiperidina y su extensión a la síntesis de pseudodipéptidos cetometilénicos. Estudio de las propiedades conformacionales de estas lactamas monocíclicas por RMN.
- Derivados de 3-oxoindolizidinas como análogos conformacionalmente restringidos de dipéptidos.
Síntesis de derivados de 8-amino-3-oxoindolizidina-2-carboxilato y estudio de la enantioselectividad del proceso de formación del anillo de 3-oxoindolizidina. Análisis de la capacidad de esta estructura para inducir conformaciones de giro β .
- Análogos conformacionalmente restringidos de Colecistoquinina.
Síntesis y actividad biológica de derivados de 2,5-dicetopiperidinas y 3-oxoindolizidinas análogos de CCK₄.
- Análogos conformacionalmente restringidos de Neurotensina.
Síntesis de análogos de NT₈₋₁₃ que incorporan 3-oxoindolizidinas en sustitución del dipéptido central Pro¹⁰-Tyr¹¹. Ensayos de unión a los receptores centrales de la Neurotensina.

Se pretende, finalmente, que los resultados de actividad biológica obtenidos para los diferentes análogos conformacionalmente restringidos de CCK₄ y NT₈₋₁₃ sirvan para establecer relaciones estructura-actividad, así como para contribuir a perfilar los requisitos estructurales de los receptores de CCK y NT, tanto en lo que se refiere a cadenas laterales imprescindibles para la actividad como a su disposición tridimensional concreta.

Los antecedentes, objetivos y vías de aproximación a estos últimos se recogen de forma esquemática en la figura 4.

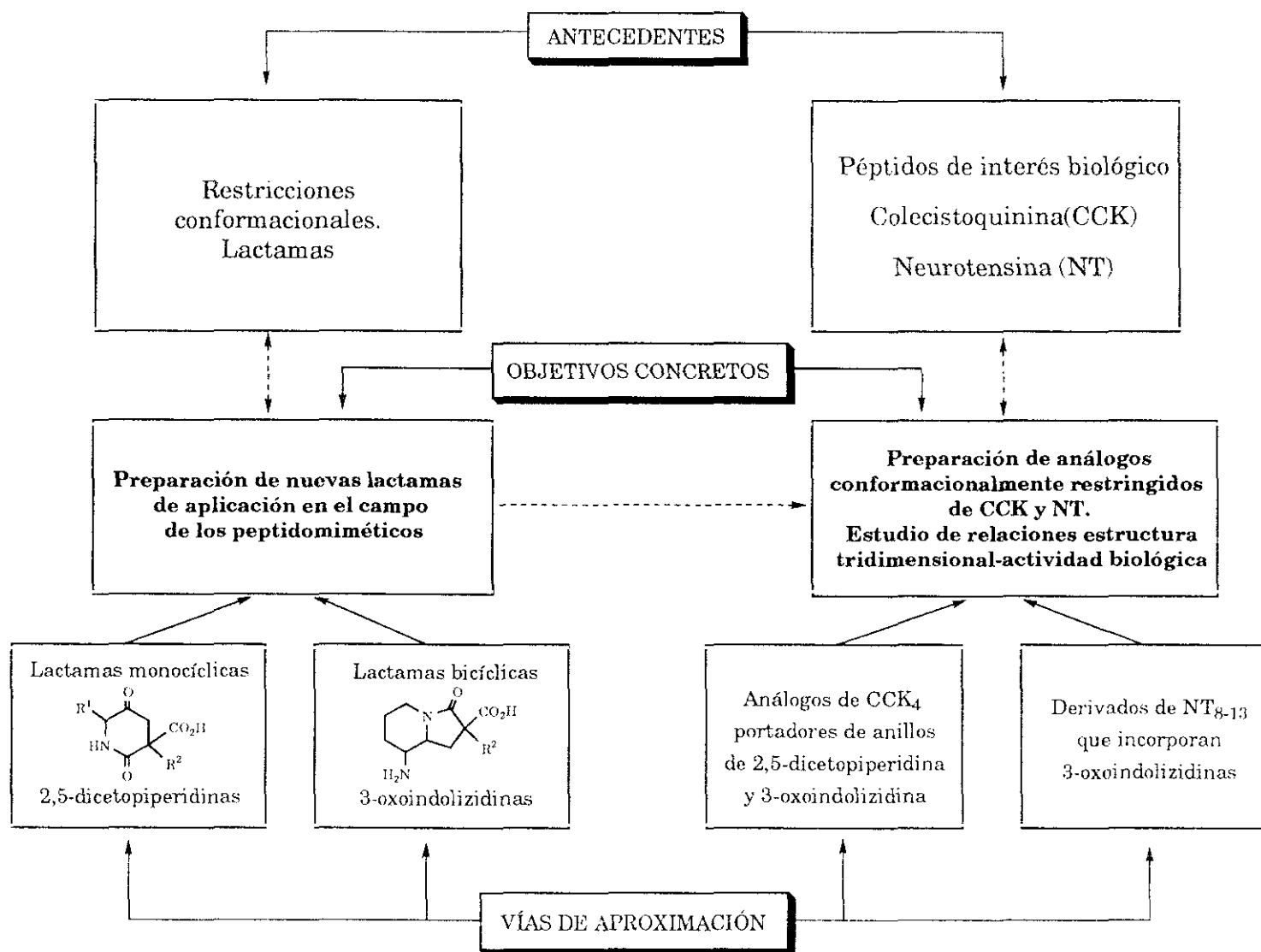
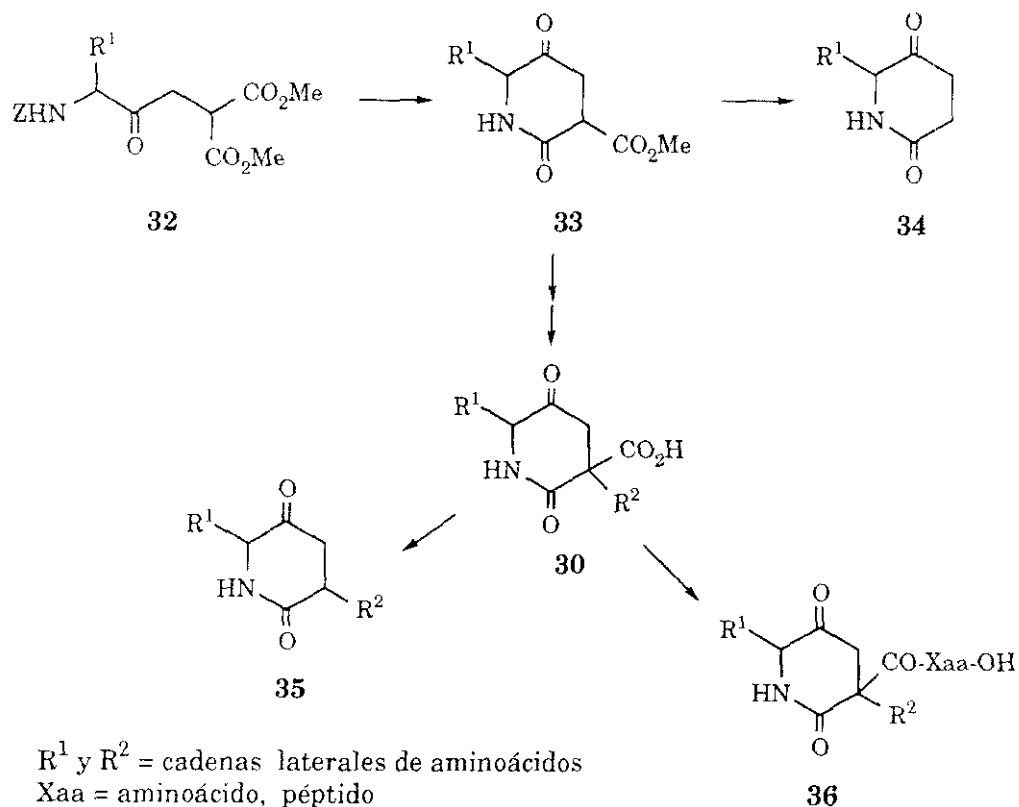


Figura 4. Antecedentes, objetivos y vías de aproximación del trabajo recogido en esta Memoria.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. 2,5-DICETOPIPERIDINAS COMO ANÁLOGOS CÍCLICOS DE PSEUDOPÉPTIDOS CETOMETILÉNICOS

Como se ha comentado en la introducción, la sustitución del enlace amida por el agrupamiento bioisómero cetometileno conlleva la pérdida de rigidez del esqueleto peptídico. Con el fin de contrarrestar este efecto, se dirigió la atención hacia los correspondientes pseudopéptidos cetometilénicos cíclicos como análogos conformacionalmente restringidos. Llevados por este interés, se diseñaron los derivados de 2,5-dicetopiperidina-3-carboxiato **33** como intermediarios comunes, bien para dar acceso a los pseudodipéptidos cíclicos *ciclo*[XaaΨ[COCH₂]Yaa] (**34**: Yaa = Gly; **35**: Yaa ≠ Gly) o bien a los análogos 3-carboxi 3-sustituidos **30**, susceptibles de ser incorporados en los pseudopéptidos de mayor tamaño **36** (Esquema 1).

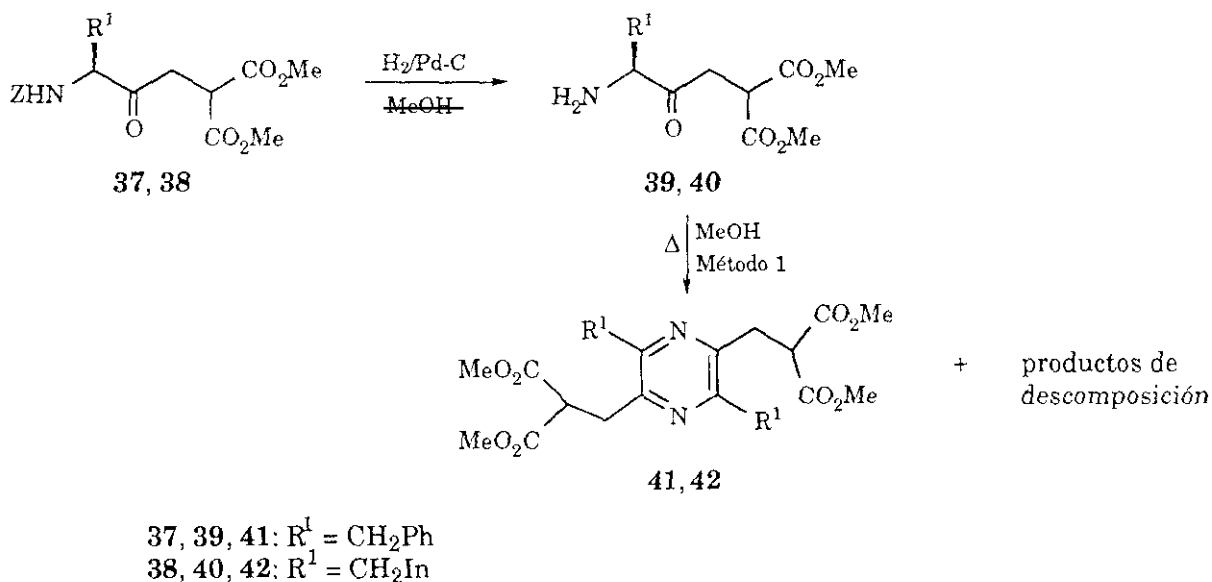


Esquema 1

Los 4-cetodiésteres **32**, a utilizar como productos de partida para la preparación de los intermedios clave **33**, estaban garantizados, dada la experiencia previa de nuestro laboratorio en su síntesis a partir de halometilcetonas derivadas de aminoácidos y malonato de dimetilo ^{57,58}.

2.1.1. 3-METOXICARBONIL-2,5-DICETOPIPERIDINAS 6-SUSTITUIDAS

Para estudiar el método más adecuado para la obtención de estos compuestos mediante lactamización de los correspondientes derivados de 5-amino-4-cetodiésteres, se seleccionaron aquéllos procedentes de fenilalanina y triptófano, ya que la presencia de anillos aromáticos debería facilitar la asignación por RMN del nuevo centro asimétrico creado en posición 3 del anillo de 2,5-dicetopiperidina. Como método conocido ⁶⁵⁻⁷⁰, y en principio más directo, se ensayó en primer lugar la calefacción a reflujo de MeOH de los aminodiésteres **39** y **40**, procedentes de la *N*-desprotección de **37** y **38** (Esquema 2). Sin embargo, este procedimiento condujo, en nuestro caso, a los derivados de pirazina **41** y **42**, respectivamente, junto con productos de descomposición.

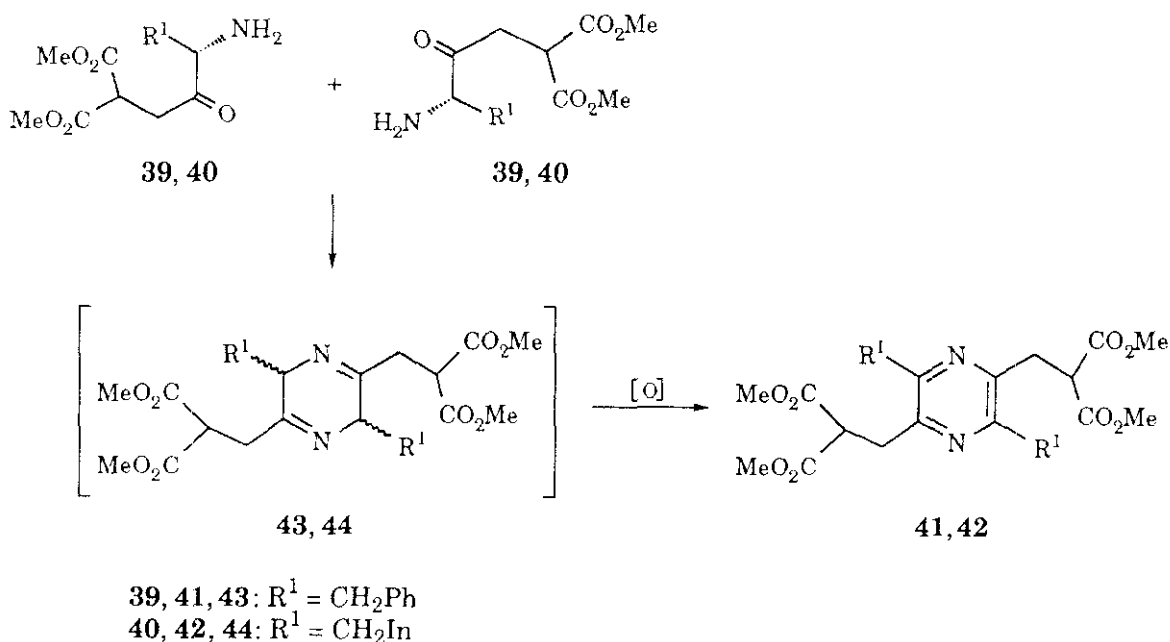


Esquema 2

La estructura de estos derivados fue establecida a partir de sus datos analíticos y espectroscópicos, incluyendo Masas, ¹H RMN y ¹³C RMN. En el espectro de masas de **41** se observa el pico base a m/e 548, correspondiente al

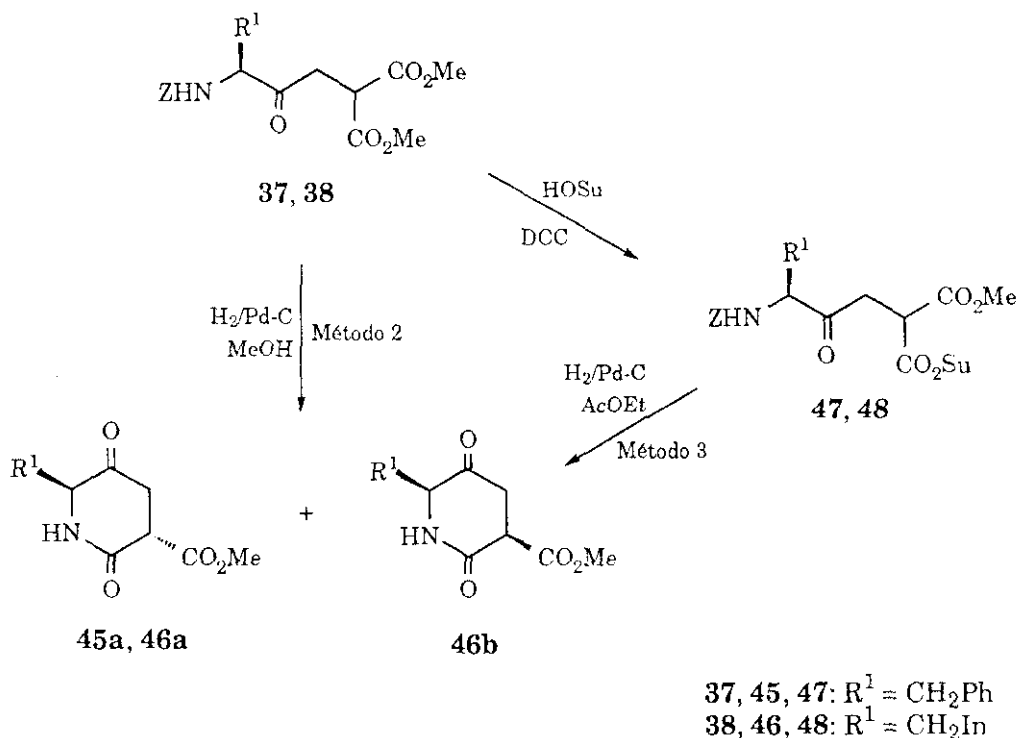
ion molecular, junto con las fragmentaciones características de este tipo de estructuras ^{71,72}. Los espectros de ¹H RMN de los compuestos **41** y **42** muestran una notable simplicidad, observándose, en ambos casos, la desaparición de los protones α -CH y α -NH del aminoácido de partida, junto con un desapantallamiento considerable del grupo β -CH₂ de los correspondientes aminoácidos. Este desplazamiento está de acuerdo con el esperado para un grupo metileno flanqueado por dos anillos aromáticos. Dada la simetría de estas moléculas, las resonancias debidas a los grupos 2- y 5-CH₂ y al CH del resto de malonato, aparecen como únicos doblete y triplete, respectivamente, si bien ligeramente desapantallados en comparación con dichos protones en el γ -cetodiéster de partida. Finalmente, en los espectros de ¹³C RMN de **41** y **42** se observan dos señales de carbono cuaternario a 150,25 y 147,91 ppm y 150,20 y 147,54 ppm, respectivamente, atribuibles a los carbonos 2 (5) y 3 (6), o viceversa, del anillo de pirazina ^{73,74}.

La obtención de estos derivados de pirazina puede explicarse por la autocondensación de dos moléculas de la α -aminocetona correspondiente para dar lugar a las dihidropirazinas **43** y **44**, que, posteriormente, se aromatizan, transformándose en los derivados de pirazina **41** y **42**, respectivamente (Esquema 3). Este proceso constituye uno de los métodos descritos para la preparación de pirazinas 2,5-disustituidas ^{72,75-77}.



Esquema 3

Para intentar obviar este inconveniente, debido a la reactividad de las α -aminocetonas, se recurrió a la utilización de condiciones de reacción más suaves. Para ello se llevó a cabo la hidrogenación catalítica de los 4-ceto-diésteres *Z*-protegidos, esperando que la lactamización tuviera lugar en el propio medio de reacción (Esquema 4). En estas condiciones, los compuestos **37** y **38** condujeron en una sola etapa a los respectivos derivados de 2,5-dicetopiperidina **45** y **46**, aunque se necesitaron tiempos de reacción bastante largos y los rendimientos obtenidos fueron moderados. En cuanto a la estereoquímica del nuevo centro asimétrico en el carbono C-3 del anillo de 2,5-dicetopiperidina, se encontró una estereoselectividad casi total en el caso del derivado de Phe, mientras que en el de Trp se llegó a una mezcla de los dos diastereoisómeros posibles en proporción 5:2. En ambos casos se aisló también una pequeña cantidad del derivado de pirazina correspondiente **41** ó **42**.



Esquema 4

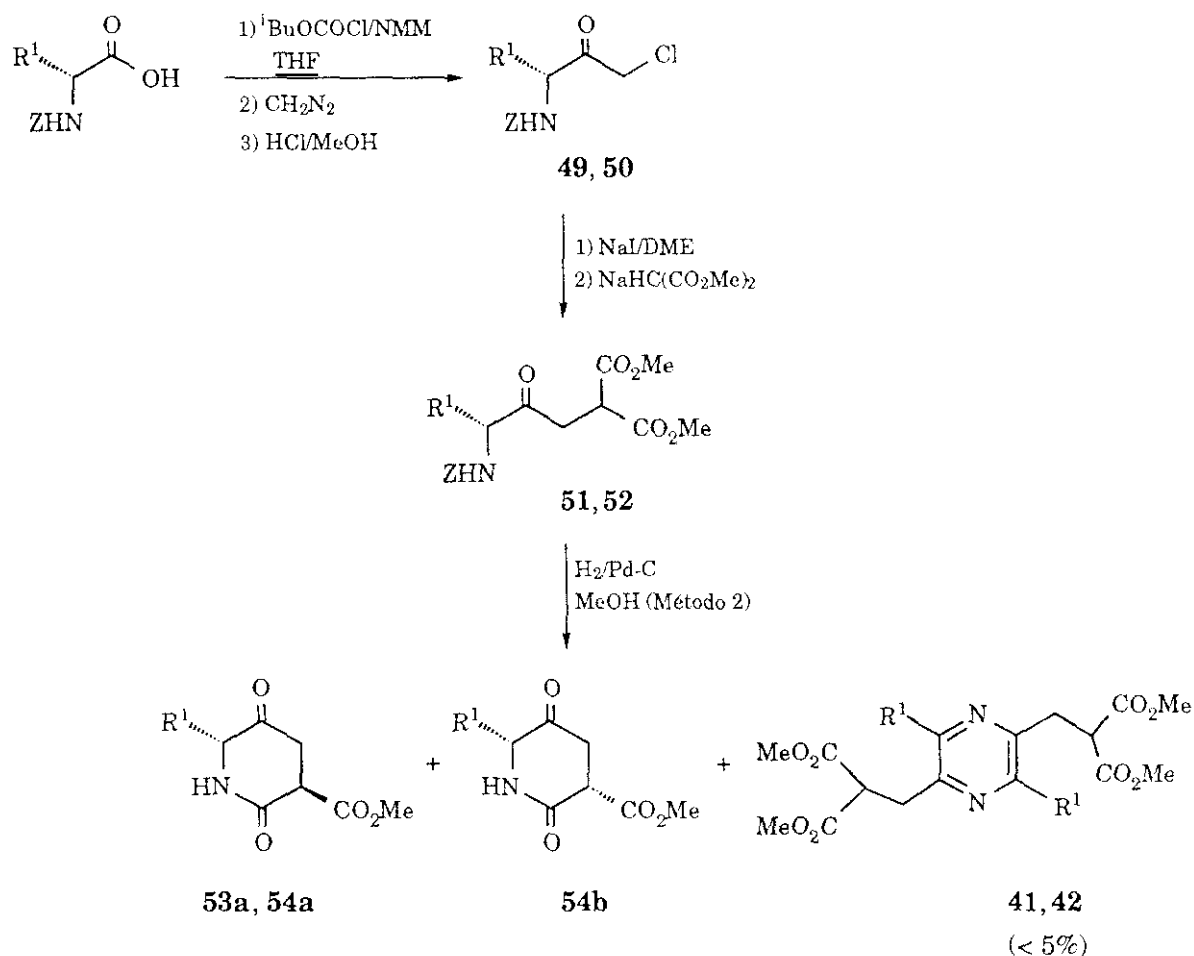
La configuración absoluta en C-3 de estos derivados 3,6-disustituídos se estableció mediante el estudio comparativo de sus espectros de ^1H RMN. En el espectro registrado en DMSO-d_6 de la pareja de diastereoisómeros **46** se observa que el protón H-3 del isómero mayoritario se encuentra

considerablemente desplazado hacia campo más alto respecto al mismo protón del isómero minoritario. Este apantallamiento es debido a la corriente de anillo del indol en posición 6, lo que indica que en el isómero mayoritario el protón H-3 y el anillo aromático están en disposición relativa *cis*⁷⁸. Teniendo en cuenta que la configuración absoluta en C-6 es *S* para ambos isómeros, ya que en la síntesis se partió de L-Trp, al isómero mayoritario le corresponde la estructura **46a**, de configuración absoluta *S* en C-3, mientras que al isómero minoritario **46b** se le asignó la configuración (*3R,6S*). En el caso del derivado de Phe **45**, al obtenerse casi exclusivamente un isómero, la asignación de la configuración en C-3 se efectuó por comparación de su espectro de ¹H RMN con el de los correspondientes derivados de Trp **46ab**.

Una vez sintetizados y caracterizados estos derivados de 2,5-dicetopiperidina, se decidió modificar el método empleado, en un intento de mejorar los rendimientos, así como de reducir los tiempos de reacción. Este tercer método, también indicado en el esquema 4, consiste en utilizar como productos de partida los aminodiésteres mixtos **47** y **48**, en los que una de las funciones carboxilato ha sido previamente activada en forma de éster *N*-hidroxisuccinimídico^{79,80}. De este modo, la hidrogenación en presencia de Pd-C de estos compuestos condujo a las dicetopiperidinas buscadas **45** y **46**, con rendimientos y estereoselectividades similares a los obtenidos siguiendo el método 2. Como se esperaba, la presencia de los ésteres activados redujo el tiempo de reacción, pero no se observó ninguna mejora apreciable en el rendimiento, posiblemente como consecuencia de la gran reactividad y, por tanto, inestabilidad, de los ésteres *N*-hidroxisuccinimídicos.

Con objeto de estudiar la influencia de la estereoquímica del aminoácido de partida en el proceso de lactamización, así como de extender el procedimiento anterior a la obtención de los análogos cetometilénicos cíclicos procedentes de aminoácidos de la serie D, se realizó la síntesis de las 2,5-dicetopiperidinas **53** y **54** derivadas de Z-D-Phe y Z-D-Trp (Esquema 5). La hidrogenación en presencia de Pd-C de los cetodiésteres **51** y **52**, preparados siguiendo el mismo método descrito para sus enantiómeros **37** y **38**, condujo a resultados análogos a los obtenidos en el caso de los derivados de L-Phe y L-Trp, tanto en lo que se refiere a rendimientos como a la estereoselectividad del proceso. La asignación de la configuración absoluta de los compuestos **53a** y **54ab**, enantiómeros de **45a** y **46ab**, respectivamente, se llevó a cabo por comparación de sus espectros de ¹H RMN entre sí, tal y como se ha indicado para los derivados de la serie L. Al efectuar esta comparación se observó una

total coincidencia de los espectros de los compuestos **45a-53a**, **46a-54a** y **46b-54b**, lo que ratifica que se trata de tres parejas de compuestos enantiómeros.



41, 49, 51, 53: $R^1 = CH_2Ph$
42, 50, 52, 54: $R^1 = CH_2In$

Esquema 5

En la tabla 1 se resumen los resultados obtenidos en la síntesis de los derivados de 2,5-dicetopiperidina 3,6-disustituídos, utilizando los métodos 2 y 3. De los datos de la tabla se deduce que ambos métodos conducen a las 2,5-dicetopiperidinas objeto de este capítulo con rendimientos moderados. El tiempo de reacción se reduce en un 50% cuando se utilizan los ésteres monohidroxi-succinimídicos (método 3), no observándose, en ningún caso, mejoras en los rendimientos cuando los tiempos de reacción se prolongan. En cuanto a la proporción de diastereoisómeros, hay que señalar que para los derivados de Phe se obtuvo casi exclusivamente el isómero con disposición *trans* de los

sustituyentes en posiciones 3 y 6, con independencia del método. En el caso de los derivados de Trp, se observaron proporciones variables, si bien el isómero 3,6-*trans* fue siempre mayoritario.

Tabla 1. Resultados obtenidos en la síntesis de los compuestos **45a**, **46ab**, **53a** y **54ab**, utilizando los métodos 2 y 3

Compuesto	Método	Tiempo de reacción (días)	Rendimiento ^a (%)	Proporción de diastereoisómeros ^b a/b
45a	2	6	42	> 10:1
	3	3	60	> 10:1
46ab	2	6	42	5:2
	3	3	40	3:2
53a	2	6	30	> 10:1
54ab	2	6	34	6:5

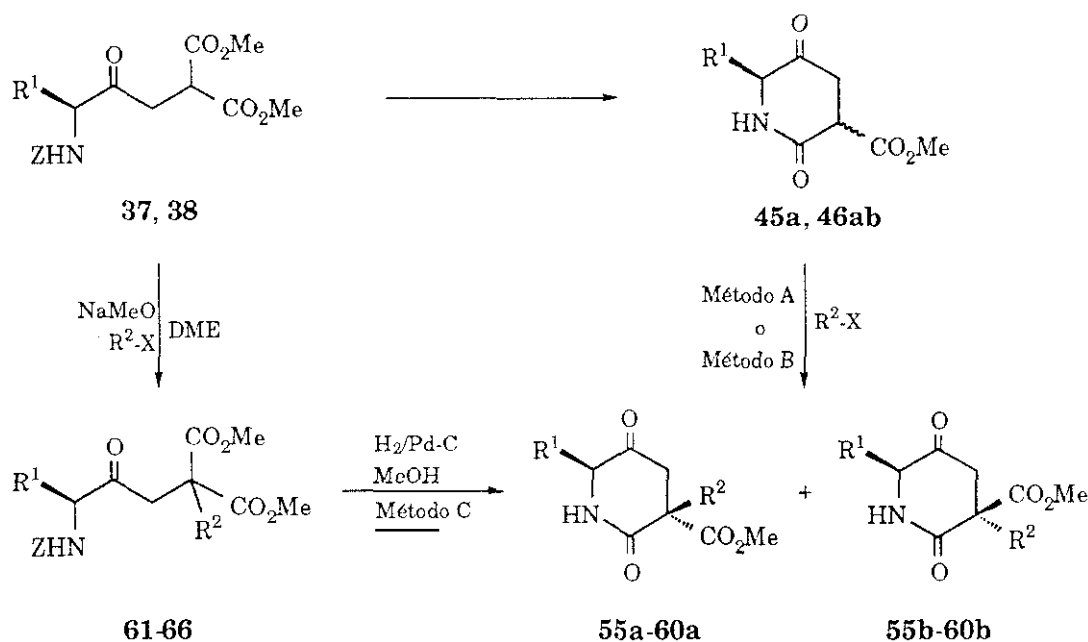
^a Calculado a partir de los correspondientes cetodiestéres **37**, **38**, **51** y **52**.

^b Estimada por ¹H RMN.

2.1.2. 2,5-DICETOPIPERIDINAS 3,3,6-TRISUSTITUIDAS

Una vez puesta a punto la síntesis de las 3-metoxycarbonil-2,5-dicetopiperidinas 6-sustituidas de fórmula general **33**, el paso siguiente para la preparación de los pseudopéptidos cetometilénicos cíclicos propuestos lo constituyó la introducción de la cadena lateral del aminoácido C-terminal o de un precursor de la misma en la posición 3 del anillo de 2,5-dicetopiperidina. Para ello, se planteó en primer lugar estudiar la alquilación directa de los derivados **45a** y **46ab**, eligiéndose tres agentes alquilantes diferentes capaces de suministrar las cadenas laterales de tres aminoácidos de distinta naturaleza, como son la fenilalanina, la alanina y el ácido aspártico. Así, la alquilación de **45a** y **46ab** con bromuro de bencilo y bromoacetato de etilo en DME, utilizando como base metóxido sódico (método A), condujo a los derivados **55ab**, **56ab**, **57ab** y **58ab**, respectivamente (Esquema 6). Un tratamiento similar con yoduro de metilo como agente alquilante llevó a la obtención del derivado correspondiente 3-metil sustituido **60ab** con bajo rendimiento, mientras que el análogo **59ab** no

pudo obtenerse por este método. Los productos **59ab** y **60ab** se prepararon finalmente por alquilación de las dicetopiperidinas **45a** y **46ab** con yoduro de metilo, en condiciones de transferencia de fase, durante seis días, utilizando NaOH como base e hidrogenosulfato de tetrabutilamonio como catalizador (método B) ^{81,82}. En estas condiciones se recuperó entre un 25 y un 30% de producto de partida inalterado. Sin embargo, la prolongación excesiva de los tiempos de reacción hasta desaparición del producto de partida, lleva consigo la saponificación de los ésteres metílicos, lo que dificulta la etapa de aislamiento y purificación de los productos obtenidos.



- 55ab, 61:** $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{Ph}$
56ab, 62: $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{In}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{Ph}$
57ab, 63: $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$
58ab, 64: $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{In}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$
59ab, 65: $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$
60ab, 66: $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{In}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$

Esquema 6

Los derivados de 2,5-dicetopiperidina 3,3,6-trisustituídos **55ab**, **56ab**, **58ab**, **59ab** y **60ab** se obtuvieron como mezclas de dos diastereoisómeros en proporción 2:1, mientras que el compuesto **57ab** se obtuvo también como mezcla de dos diastereoisómeros, pero en proporción 3:1, según se deduce de los espectros de ¹H RMN. La separación cromatográfica de los dos diastereoisómeros

solamente fue posible en el caso de **56ab**. La configuración absoluta en C-3 de todos estos derivados 3,3-disustituídos se estableció una vez más a partir de los datos de ^1H RMN de cada pareja de diastereoisómeros. En los espectros de **55ab** y **56ab** se observa que el protón H-6 de los isómeros minoritarios aparece apantallado con respecto al mismo protón de sus correspondientes diastereoisómeros mayoritarios. Este efecto indica que, en los isómeros minoritarios, el protón H-6 se encuentra en disposición *cis* respecto al anillo aromático en posición 3. Teniendo en cuenta que en todos estos compuestos la configuración absoluta en C-6 es *S*, la de los isómeros minoritarios **55b** y **56b** se asignó como (*3R,6S*), mientras que la de los mayoritarios **55a** y **56a** lo fue como (*3S,6S*). De manera similar, en los espectros de los compuestos **59ab** y **60ab**, se observa que el singlete correspondiente al grupo metilo en posición 3 aparece ligeramente apantallado en el isómero mayoritario comparado con el minoritario. Este hecho puede explicarse, nuevamente, por el efecto de la corriente de anillo del resto aromático en posición 6, lo que indica que en el isómero mayoritario el sustituyente en 6 y el grupo metilo en 3 están dispuestos del mismo lado del anillo de 2,5-dicetopiperidina ^{78,83,84}. Siguiendo el mismo razonamiento, en el caso de los análogos 3-(etoxicarbonil)metil sustituidos **57ab** y **58ab**, el apantallamiento observado para las resonancias del grupo 3-CH₂ en el isómero mayoritario permitió la asignación de la configuración de estos compuestos.

El estudio de los espectros de ^{13}C RMN de todos estos derivados de 2,5-dicetopiperidina ha revelado la existencia de diferencias significativas entre los distintos diastereoisómeros. Así, en los isómeros mayoritarios, los carbonos endocíclicos C-4 y C-6, así como los CH₂ ó CH₃ pertenecientes a las cadenas laterales, aparecen a campo ligeramente más alto que en los isómeros minoritarios, mientras que el carbono C-5 aparece desapantallado en los isómeros mayoritarios respecto a los minoritarios. El hecho de que estas diferencias sean prácticamente constantes a lo largo de la serie de compuestos aquí descritos abre la posibilidad de que estos resultados de ^{13}C RMN puedan ser utilizados como criterios para la asignación de la configuración en otros derivados similares.

Dado que los rendimientos de la alquilación de las 3-metoxicarbonil-2,5-dicetopiperidinas 6-sustituídas no resultaron todo lo buenos que se esperaba, y teniendo en cuenta que la alquilación de 4-cetodiésteres transcurre, en general, con buenos rendimientos ^{57,58}, se consideró conveniente ensayar la secuencia inversa de reacciones. De este modo, la reacción de los

4-cetodiésteres **37** y **38** con bromuro de bencilo, bromoacetato de etilo y yoduro de metilo, en presencia de metóxido sódico, dio lugar a los derivados de malonato disustituidos **61-66**⁵⁷, respectivamente. La hidrogenación catalítica de estos derivados condujo a las 2,5-dicetopiperidinas **55-60**, que se obtuvieron nuevamente como mezclas de dos diastereoisómeros, en proporciones idénticas a las encontradas cuando se siguieron los métodos A y B, pero con rendimientos considerablemente mejores.

Los resultados comparativos obtenidos en la síntesis de los derivados de 2,5-dicetopiperidina 3,3,6-trisustituidos, por los tres procedimientos ensayados, se recogen en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados obtenidos en la síntesis de los compuestos **55-60**, utilizando los métodos A, B y C

Compuesto	Método	Rendimiento global ^a (%)	Proporción de diastereoisómeros ^b a/b
55ab	A	34	2:1
	C	57	2:1
56ab	A	7	2:1
	C	51	2:1
57ab	A	32	3:1
	C	41	3:1
58ab	A	23	2:1
	C	60	2:1
59ab	B	19	2:1
	C	64	2:1
60ab	A	7	2:1
	B	17	2:1
	C	54	2:1

^a Calculado a partir de los cetodiésteres **37** y **38**. ^b Estimada por ¹H RMN.

Estos resultados indican que el método C conduce a rendimientos globales mejores que los métodos A y B, constituyendo así el método de elección para la síntesis de este tipo de derivados heterocíclicos. Por otra parte, la proporción de diastereoisómeros fue muy similar en todos los casos, con independencia del método utilizado. Así, cuando se aplicaron los métodos

A o B, ni la naturaleza del agente alquilante (R^2) ni la estereoquímica en C-3 de la 2,5-dicetopiperidina de partida afectaron, en general, a la estereoselectividad de la alquilación. De manera similar, cuando se aplicó el método C, ni la naturaleza del aminoácido de partida (R^1) ni la del sustituyente (R^2) influyeron en la estereoselectividad de la ciclación. En todos los casos se obtuvo como diastereoisómero mayoritario el derivado de 2,5-dicetopiperidina 3,3,6-trisustituido en el que los sustituyentes alquílicos en posiciones 3 y 6 se encuentran en disposición relativa *cis*.

Se conoce a través de la bibliografía ^{78,83,85-89} que las 2,5-dicetopiperazinas procedentes de dipéptidos en los que uno de los aminoácidos es aromático, adoptan preferentemente una conformación en la que la cadena lateral aromática se pliega sobre el anillo de dicetopiperazina. La preferencia por esta conformación plegada viene apoyada por una serie de estudios de RMN ^{78,83,85}, R-X ^{86,87}, cálculos termodinámicos ^{85,88} y de OM ⁸⁹. En los casos en los que, además, el segundo aminoácido posee una cadena lateral voluminosa, las interferencias estéricas entre las cadenas laterales de los dos aminoácidos condicionan también la adopción de una conformación determinada, llegándose a una situación de compromiso en la que se maximiza la interacción estabilizante entre el anillo aromático y el de 2,5-dicetopiperazina, a la vez que se evita la interferencia estérica entre las cadenas laterales ^{86,87}.

Teniendo en cuenta que para la asignación de la configuración en C-3 de las 2,5-dicetopiperidinas aquí descritas se ha considerado la existencia de conformaciones plegadas, y con el fin de establecer claramente si este tipo de compuestos presenta o no un comportamiento conformacional paralelo al de las 2,5-dicetopiperazinas, se decidió llevar a cabo un estudio detallado a partir de sus espectros de ^1H RMN. Estos estudios conformacionales se realizaron en dos disolventes distintos, DMSO- d_6 y CDCl_3 , ya que se habían observado diferencias notables en los espectros según que el disolvente utilizado fuera uno u otro.

Considerando la existencia de un equilibrio conformacional, debido a la rotación libre alrededor del enlace $\text{C}_6\text{-C}_7$ [‡], entre los tres confórmeros A, B y C indicados (Tabla 3), se pueden calcular las poblaciones relativas de los tres

[‡] Nota sobre nomenclatura: El grupo CH_2 unido a la posición 6 del anillo de 2,5-dicetopiperidina se ha numerado como C-7 para simplificar la notación.

estados rotacionales si se conocen las constantes de acoplamiento correspondientes a cada uno. Como no es posible determinar experimentalmente estas constantes de acoplamiento para cada rotámero, ya que los valores que se obtienen a partir de los espectros de ^1H RMN corresponden al promedio de todos los conformeros que contribuyen al equilibrio, éstas se calcularon utilizando la ecuación de Karplus parametrizada para tres sustituyentes ^{90,91}.

Las fracciones molares de los rotámeros n_A , n_B y n_C se obtuvieron por resolución del siguiente sistema de ecuaciones:

$$n_A + n_B + n_C = 1$$

$$J_{(6,7)\text{exp}} = n_A J_{6,7}^{60} + n_B J_{6,7}^{180} + n_C J_{6,7}^{300}$$

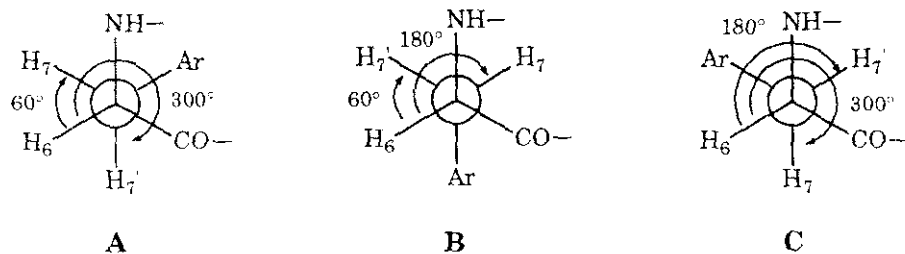
$$J_{(6,7')\text{exp}} = n_A J_{6,7'}^{300} + n_B J_{6,7'}^{60} + n_C J_{6,7'}^{180}$$

Los subíndices A, B y C indican el conformero y los superíndices los ángulos de torsión interprotónicos. Los valores de las constantes de acoplamiento calculados a partir de la ecuación de Karplus se indican a continuación:

$$J_A^{60} = 3,39; J_A^{300} = 2,65; J_B^{60} = 3,62; J_B^{180} = 11,8; J_C^{180} = 11,8; J_C^{300} = 2,87.$$

Puesto que no es posible asignar individualmente las resonancias de los protones H-7 y H-7', los porcentajes de los rotámeros A, B y C se calcularon para las dos posibles soluciones I y II (Tabla 3). De los datos obtenidos en este estudio se deduce que el equilibrio conformacional depende claramente del disolvente. Así, la cadena 6-aralquímica adopta preferentemente la conformación plegada A en DMSO- d_6 , mientras que las conformaciones B o C son las preferidas en CDCl_3 . Estos resultados están de acuerdo con las diferencias observadas entre los espectros de ^1H RMN de los derivados de 2,5-dicetopiperidina estudiados, según que estén registrados en CDCl_3 ó en DMSO- d_6 . Así, para la pareja de diastereoisómeros **46ab**, el apantallamiento observado para el protón H-3 en el isómero mayoritario **46a** es mucho más acusado en DMSO- d_6 que en CDCl_3 , lo que refleja una mayor abundancia de la conformación plegada en el primero de los disolventes. En esta conformación, el protón H-3 y el anillo aromático del sustituyente en posición 6 están más próximos en el espacio, por lo que la influencia de la corriente de anillo es mayor ^{78,83}.

Tabla 3. Porcentajes calculados de los rotámeros A, B, y C para las 2,5-dicetopiperidinas **45**, **46ab**, **55ab-60ab**



Compuesto	Disolvente	%A _I	%B _I	%C _I	%A _{II}	%B _{II}	%C _{II}
45a	DMSO-d ₆	51	20	29	56	26	22
46a	DMSO-d ₆	57	17	26	53	23	24
46a	CDCl ₃	25	2	73	30	70	0
46b	DMSO-d ₆	50	18	32	50	30	20
46b	CDCl ₃	18	7	75	23	74	3
55a	DMSO-d ₆	67	11	22	67	18	15
55a	CDCl ₃	12	8	80	18	79	3
55b	DMSO-d ₆	62	13	25	63	20	17
55b	CDCl ₃	12	2	86	14	84	2
56a	DMSO-d ₆	60	18	22	60	18	22
56a	CDCl ₃	12	5	83	18	82	0
56b	DMSO-d ₆	44	14	42	46	40	14
57a	CDCl ₃	7	8	85	14	85	1
58a	DMSO-d ₆	59	24	17	57	15	28
58a	CDCl ₃	5	8	87	11	87	2
59a	DMSO-d ₆	60	11	29	61	25	14
59b	DMSO-d ₆	52	16	32	53	29	18
60a	DMSO-d ₆	52	16	32	55	26	19
60a	CDCl ₃	8	9	83	15	82	3
60b	DMSO-d ₆	47	21	32	47	30	23

Del mismo modo, se explica que, en el compuesto **60ab**, el apantallamiento ejercido por el anillo aromático sobre el grupo 3-metilo en el isómero **60a**, en el que dicho grupo metilo está en disposición *cis* respecto al anillo, sea también bastante mayor en DMSO- d_6 que en $CDCl_3$. Por el contrario, en los derivados 3-bencil sustituidos **55ab** y **56ab**, el apantallamiento observado para el protón H-6 en los isómeros minoritarios **55b** y **56b** es más acusado en $CDCl_3$ que en DMSO- d_6 . Esto parece indicar que, en los compuestos **55ab** y **56ab**, la contribución de una conformación plegada del grupo bencilo en posición 3 es más importante en $CDCl_3$ que en DMSO- d_6 , mientras que la cadena aromática en 6 adopta preferentemente este tipo de conformación en DMSO- d_6 .

En cuanto a las posibles conformaciones del anillo de dicetopiperidina (Figura 5), en DMSO- d_6 , la adopción de una de las formas de bote torcido IV o V parece ser consistente con el plegamiento de la cadena aromática en posición 6 sobre el anillo de dicetopiperidina y con los valores observados de las constantes de acoplamiento CH-NH (Figura 6, Tabla 4) ^{83,84,92}. Cuando el disolvente es $CDCl_3$, se podría pensar igualmente en las conformaciones IV o V, pero sin descartar las formas bote II o III ^{84,86,87}.

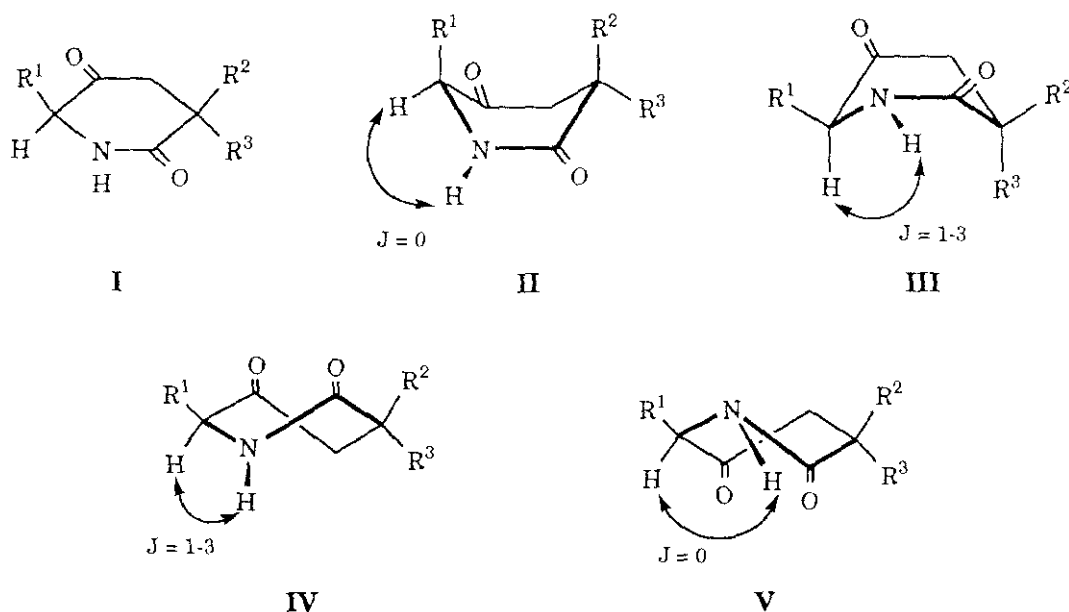
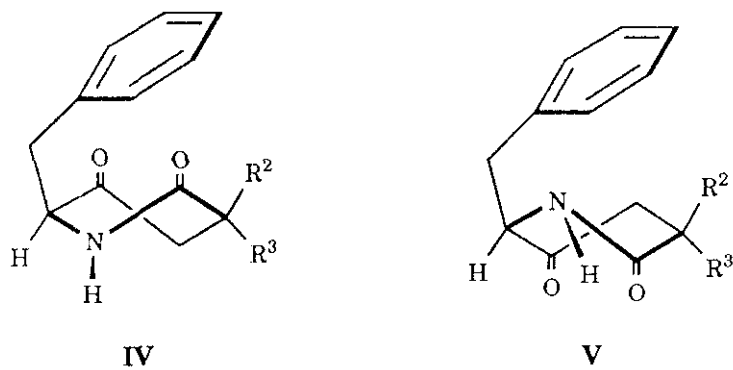


Figura 5. Conformaciones del anillo de 2,5-dicetopiperidina y constantes de acoplamiento CH-NH para los conformeros II, III, IV y V.



$R^2, R^3 = H, CO_2Me, CH_2Ph, CH_2CO_2Et, CH_3$

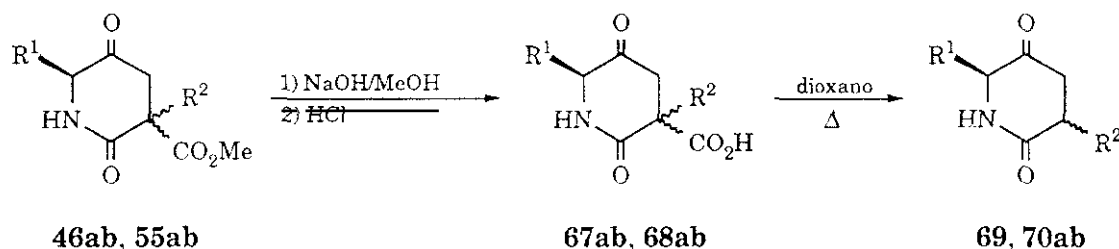
Figura 6. Posibles conformaciones en DMSO- d_6 para los derivados de 2,5-dicetopiperidina relacionados en la tabla 4.

Tabla 4. Constantes de acoplamiento CH-NH y conformaciones posibles en DMSO- d_6 de los derivados de 2,5-dicetopiperidina

Compuesto	$J_{1,6}$ (Hz)	Conformación
45a	2,0	IV
46a	2,0	IV
46b	0	V
55a	0	V
55b	2,4	IV
56a	0	V
56b	2,6	IV
58a	0	V
59a	0	V
59b	1,2	IV
60a	0	V
60b	1,9	IV

2.1.3. PSEUDODIPÉPTIDOS CETOMETILÉNICOS CÍCLICOS

Siguiendo el esquema general de síntesis propuesto en el apartado 2.1, la obtención de pseudodipéptidos cetometilénicos cíclicos *ciclo*[XaaΨ[COCH₂]Gly] (**34**) y *ciclo*[XaaΨ[COCH₂]Yaa] (**35**), requiere la eliminación del grupo 3-metoxicarbonilo de los derivados de 2,5-dicetopiperidina 3,6-di y 3,3,6-trisustituídos, respectivamente. Esta eliminación, que implicó saponificación del éster metílico seguida de descarboxilación, se llevó a cabo únicamente a partir de los compuestos **46ab** y **55ab**, elegidos como respectivos ejemplos representativos de derivados que deberían conducir a pseudodipéptidos cetometilénicos cíclicos en los que el aminoácido C-terminal es Gly y otro aminoácido diferente de éste (Esquema 7). De esta manera, la saponificación de los compuestos **46ab** y **55ab** condujo a los correspondientes ácidos carboxílicos **67ab** y **68ab**, cuya descarboxilación por calefacción a reflujo de dioxano dio lugar a *ciclo*[TrpΨ[COCH₂]Gly] **69** y *ciclo*[PheΨ[COCH₂]-*ambo*-Phe] **70ab**, respectivamente, obteniéndose este último como una mezcla de dos diastereoisómeros en proporción 2:1.



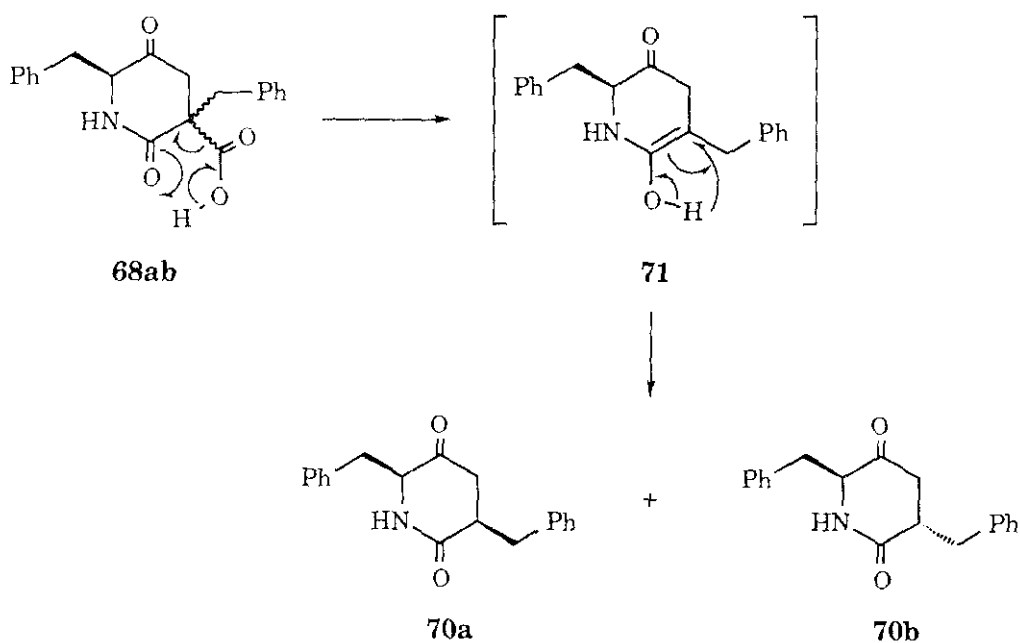
67ab, 69: R¹ = CH₂In, R² = H
68ab, 70: R¹ = R² = CH₂Ph

Esquema 7

La asignación de la configuración absoluta de la pareja de diastereoisómeros **70ab** se realizó a partir de los espectros de ¹H RMN, basándose nuevamente en los efectos de apantallamiento de los anillos aromáticos de las cadenas laterales sobre los protones del anillo de 2,5-dicetopiperidina. Así, en el espectro de ¹H RMN en DMSO-d₆ del compuesto **70ab** se observa que en el isómero minoritario **70b**, tanto el protón H-3 como el H-6 se encuentran apantallados con respecto a esos mismos protones en el isómero mayoritario. Esto indica disposiciones *cis* entre los protones H-3 y H-6 y las cadenas 6- y

3-aralquílicas, respectivamente. Por lo tanto, la configuración absoluta del diastereoisómero mayoritario **70a** se asignó como (3*R*,6*S*) y la de **70b** como (3*S*,6*S*).

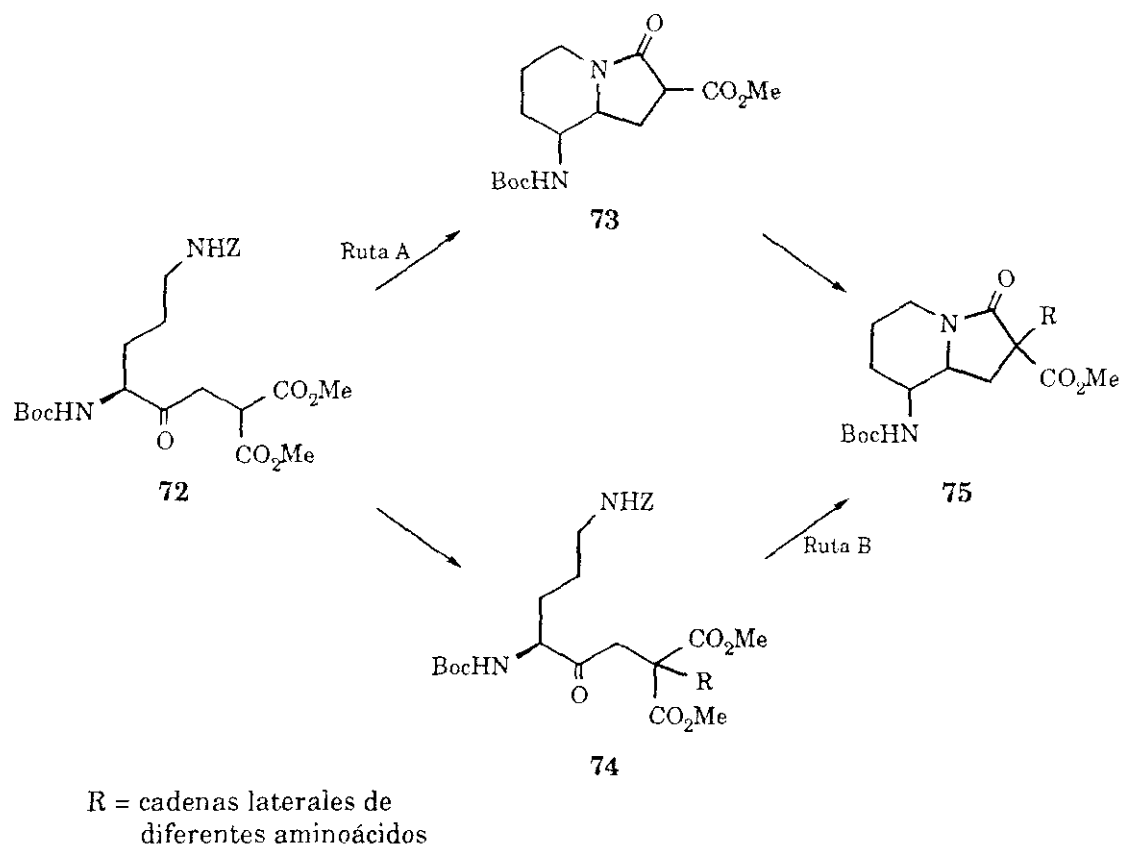
El hecho de que la descarboxilación de **68ab** para dar lugar a **70ab** transcurra de forma estereoselectiva ^{66,93}, podría explicarse suponiendo que la descarboxilación se produce a través de la formación del enol intermedio **71** (Esquema 8). Según este mecanismo propuesto, la protonación del carbono C-3 tiene lugar preferentemente por la cara inferior del anillo, menos impedida, dando lugar mayoritariamente al isómero **70a** ⁹⁴.



Esquema 8

2.2. DERIVADOS DE 3-OXOINDOLIZIDINAS COMO ANÁLOGOS CONFORMACIONALMENTE RESTRINGIDOS DE DIPÉPTIDOS

Como se indicó en el apartado 1.3, el esquema sintético que nos debería permitir la obtención de las 8-amino-3-oxoindolizidina-2-carboxilato 2-sustituidas objeto de este trabajo, se basó en el procedimiento que, previamente, había conducido con facilidad a 8-amino-3-oxoindolizidinas 2-araquil sustituidas a partir de pseudodipéptidos cetometilénicos derivados de ornitina convenientemente protegidos (Boc-Orn(Z) Ψ [COCH₂]Yaa, Yaa = Phe, Trp) ⁶⁴. En este precedente, el procedimiento, consistente en una simple hidrogenación catalítica, condujo directamente a las 3-oxoindolizidinas entonces buscadas a través de un proceso que implica, en un solo paso, la hidrogenolisis del grupo Z, aminación reductiva y γ -lactamización. A la vista de estos resultados, se propusieron las dos rutas sintéticas alternativas indicadas en el esquema general 9, en las que la elaboración del biciclo lactámico, bien en una primera etapa (ruta A), o bien en una segunda (ruta B), constituye el paso fundamental.



Esquema 9

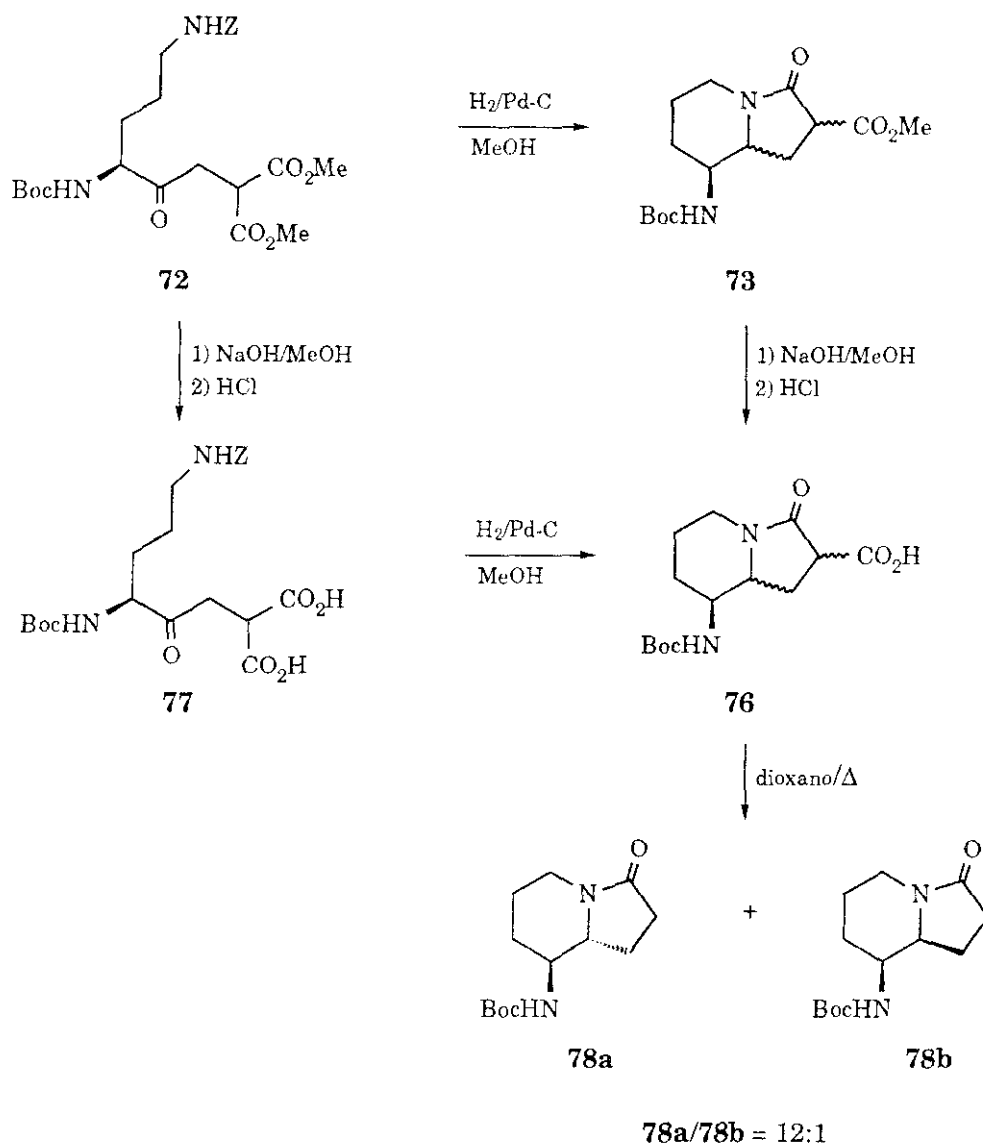
Así, mediante la ruta A, la aplicación del citado procedimiento al cetodiéster derivado de ornitina **72** debería conducir al esqueleto de 8-amino-3-oxoindolizidina-2-carboxilato **73** como intermedio común para la introducción posterior de las cadenas laterales de los diferentes aminoácidos (R), incluidas como sustituyentes en las 3-oxoindolizidinas 2,2-disustituidas **75**. Alternativamente, siguiendo la ruta B, la introducción previa de las cadenas laterales de aminoácidos (R) en el cetodiéster **72** y la subsiguiente formación del bicyclo lactámico deberían dar lugar a las 3-oxoindolizidinas buscadas **75**. La desprotección selectiva de los grupos NH₂ ó CO₂H de los compuestos **75** conduciría a los derivados de 3-oxoindolizidina aptos para ser incorporados a cadenas peptídicas de mayor tamaño.

2.2.1. FORMACIÓN DEL ESQUELETO DE 8-AMINO-3-OXOINDOLIZIDINA-2-CARBOXILATO

Siguiendo la ruta A del esquema general 9, se llevó a cabo la hidrogenación catalítica del 4-cetodiéster derivado de Orn **72**, para dar lugar en un solo paso de reacción, y de acuerdo con lo esperado según el ya citado antecedente ⁶⁴, a la 3-oxoindolizidina **73** (Esquema 10). Este compuesto mostró un espectro de ¹H RMN complejo, en el que, al menos, se podía observar la presencia esperada de dos diastereoisómeros mayoritarios en proporción 1:1 debidos a la creación del centro asimétrico en el carbono C-2. La separación cromatográfica de esta mezcla de 3-oxoindolizidinas isómeras **73** no se intentó, dada la conocida tendencia a racemizarse de los derivados de malonatos monosustituidos, que impide su resolución ^{95,96}.

Con el fin de determinar la estereoselectividad de la aminación reductiva y de asignar la estereoquímica en C-8a, se procedió a eliminar el grupo 2-metoxicarbonilo. Así, la descarboxilación del ácido **76**, procedente de la hidrólisis del éster **73**, condujo a una mezcla de los derivados de 8-amino-3-oxoindolizidina **78a** y **78b** en proporción 12:1, determinada por HPLC. Resultados similares se obtuvieron tanto en la formación de los compuestos **76** a partir del cetodiácido **77** como en la descarboxilación subsiguiente. La asignación de la estereoquímica de los diastereoisómeros **78a** y **78b** se llevó a cabo a partir de sus espectros de ¹H RMN. Así, en el espectro del isómero mayoritario **78a**, se observa una constante de acoplamiento J_{8,8a} de 9,8 Hz, lo que indica una disposición *trans*-diaxial de los protones H-8 y H-8a, mientras

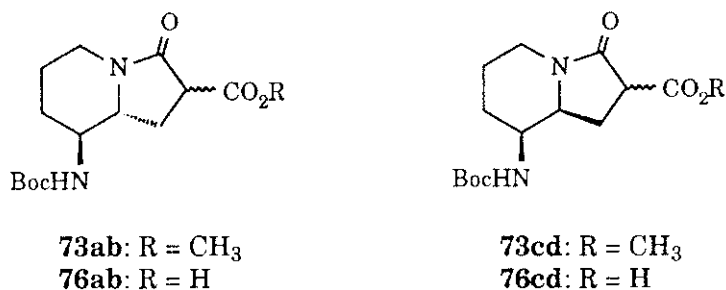
que para el isómero minoritario **78b** el valor de la $J_{8,8a}$ es de 2,9 Hz, indicando una disposición *cis* para los mencionados protones.



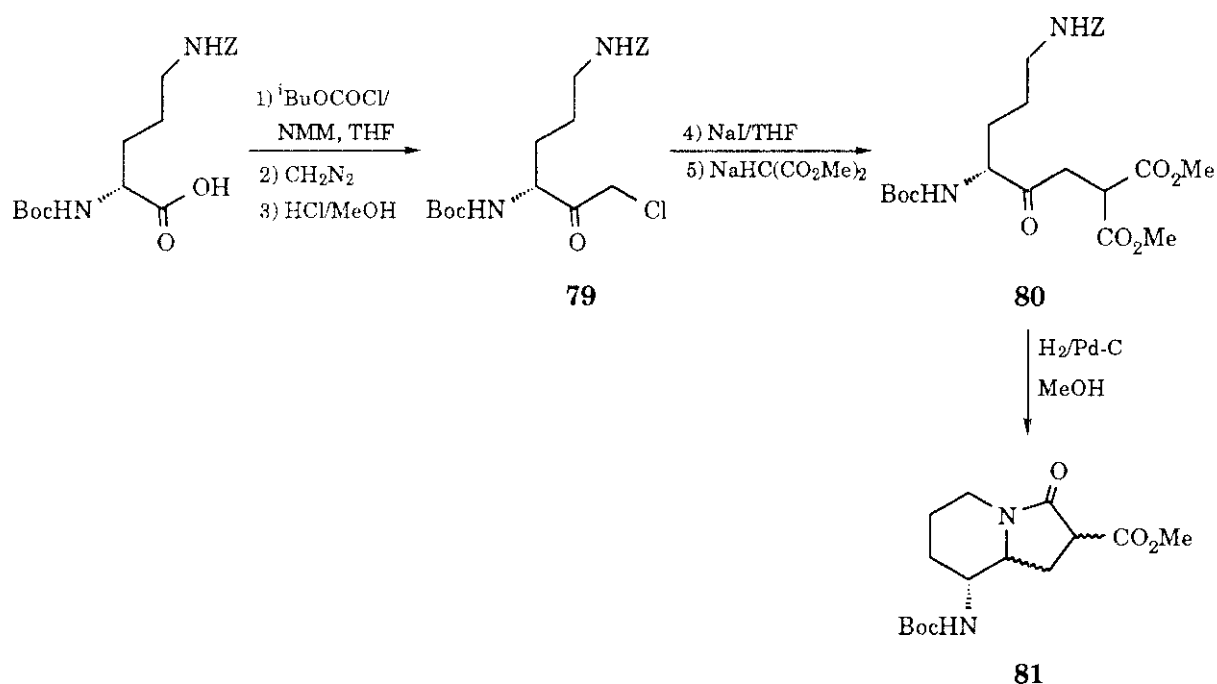
Esquema 10

Estos resultados indican que la aminación reductiva implicada en la elaboración del esqueleto de oxindolizidina transcurre con un alto grado de estereoselectividad, conduciendo muy mayoritariamente a una disposición *trans* de los sustituyentes en 8 y 8a. En cuanto a configuraciones absolutas, a la espera de poder determinar si hay racemización alguna del resto de L-Orn durante la formación de la oxindolizidina, se asignaron de forma tentativa como (8*S*,8a*R*) y (8*S*,8a*S*) para los compuestos **78a** y **78b**, respectivamente. Por

tanto, el compuesto **73** y su análogo **76** estarían constituidos por una mezcla de dos parejas de diastereoisómeros en C-2 de configuraciones (*2RS,8S,8aR*) y (*2RS,8S,8aS*).



Con el fin principal de disponer de una serie de derivados de 8-amino-3-oxoindolizidina-2-carboxilato con distintas configuraciones en sus centros quirales para ser insertados posteriormente en cadenas peptídicas, se decidió preparar los compuestos **81**, análogos de **73**, siguiendo el mismo procedimiento, pero utilizando D-Orn como producto de partida (Esquema 11). La preparación del 4-cetodiéster derivado de Boc-D-Orn(Z) **80** se llevó a cabo siguiendo el mismo método descrito para su enantiómero ⁶⁴. La hidrogenación catalítica de **80** condujo a la obtención del derivado de 3-oxoindolizidina **81** como una mezcla de diastereoisómeros en las mismas proporciones que en el caso de sus respectivos enantiómeros **73**.



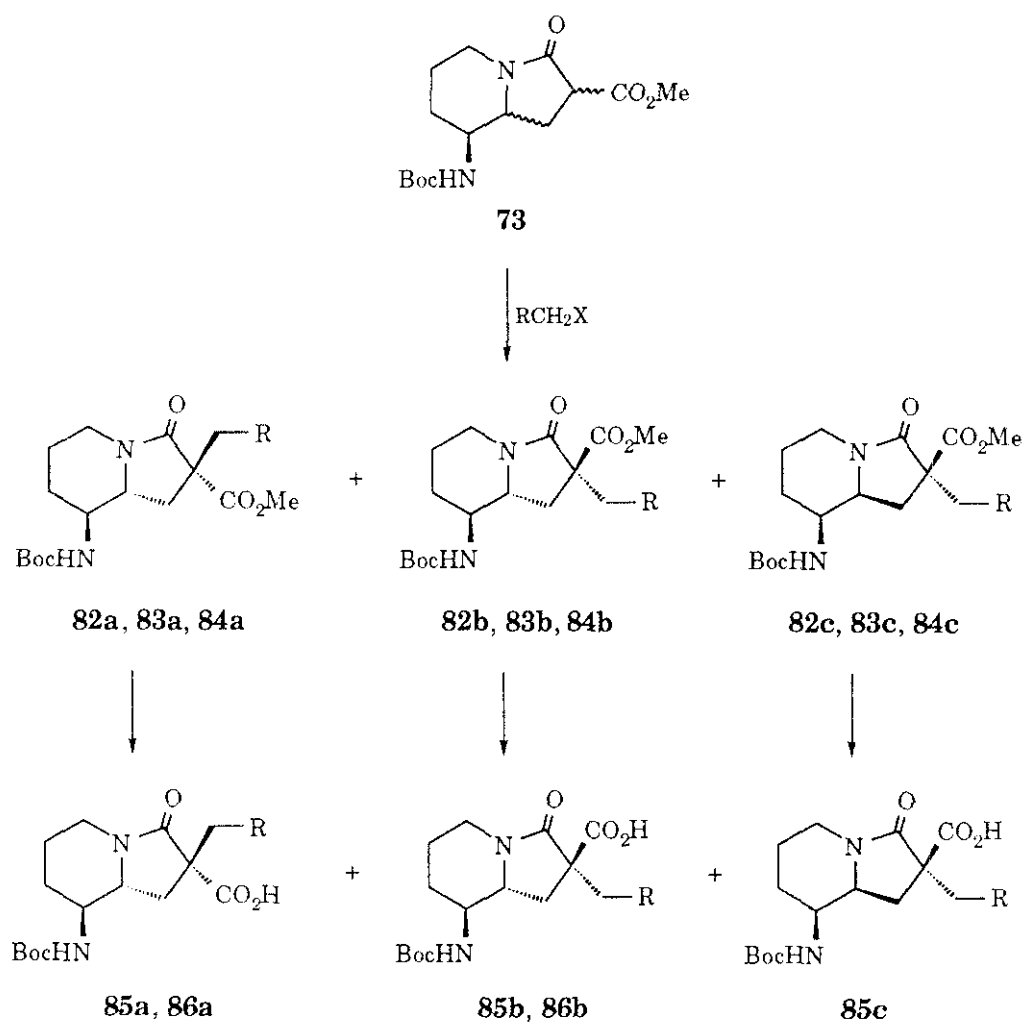
Esquema 11

2.2.2. ALQUILACIÓN DE DERIVADOS DE 8-AMINO-3-OXOINDOLIZIDINA-2-CARBOXILATO

Para estudiar la posibilidad de introducción de cadenas laterales de diferentes aminoácidos en la posición 2 del anillo de 8-amino-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina, se realizó, en primer lugar, un estudio de la alquilación del compuesto **73** con bromuro de bencilo (Esquema 12). Además de la gran reactividad de este agente alquilante, la presencia de una cadena lateral aromática en el anillo de 3-oxoindolizidina podría ser de utilidad para la asignación de la estereoquímica de los productos finales obtenidos. De este modo, se sintetizó el compuesto **82** como mezcla de tres diastereoisómeros, en proporciones 11:2:1, que pudieron ser separados por cromatografía y cuya estereoquímica se estableció a partir de sus datos de ^1H RMN. Los isómeros obtenidos en mayor proporción presentan una disposición *trans* entre los protones H-8 y H-8a, como se deduce de los valores de las constantes de acoplamiento $J_{8,8a}$, de 8,6 y 9,7 Hz, respectivamente. Por otra parte, en el espectro correspondiente al isómero minoritario el valor de la constante $J_{8,8a}$ es de 3,1 Hz, lo que está de acuerdo con una disposición relativa *cis* entre los mencionados protones. Asumiendo \ddagger que la configuración en C-8 es *S* en los tres casos, la configuración en C-8a se asignó como *R* para los isómeros mayoritarios y como *S* para el minoritario. Por otra parte, el protón H-8a del diastereoisómero mayoritario **82a** aparece apantallado con respecto a ese mismo protón en el compuesto **78a**, ambos de configuración *R* en C-8a. Esta diferencia se atribuyó al apantallamiento producido por el anillo aromático del sustituyente en posición 2, por lo que se deduce que el protón H-8a y el grupo 2-bencilo se disponen en la misma cara del anillo heterocíclico. Como era de esperar, el protón H-8a del isómero **82b** presentó un desplazamiento químico muy similar al de ese mismo protón en **78a**. Finalmente, la configuración absoluta del isómero minoritario **82c** se asignó como (2*S*,8*S*,8a*S*), teniendo en cuenta el apantallamiento observado para el protón H-8a de este compuesto en comparación con el de **78b**, que indicaba nuevamente una disposición relativa *cis* entre el grupo bencilo y el mencionado protón.

\ddagger Como ya se ha mencionado en el capítulo anterior, las asignaciones de configuraciones absolutas, tanto en las indolizidinas obtenidas a partir de L-Orn como de D-Orn, se realizaron, en principio, de manera tentativa partiendo de una ausencia total de racemización en el C- α del aminoácido. Este aspecto se resolverá definitivamente tras el estudio de enantioselectividad en el proceso de formación de estos biciclos (Apartado 2.2.3.)

La introducción de la cadena lateral del Trp en la posición 2 del anillo de 3-oxoindolizidina, se llevó a cabo por tratamiento del compuesto **73** con metiyoduro de gramina, utilizando metóxido sódico como base. En estas condiciones se obtuvo el compuesto **83**, también formado por una mezcla de tres diastereoisómeros en proporciones 11:2:1. La asignación de la configuración en C-2 y C-8a se realizó nuevamente a partir de las constantes de acoplamiento $J_{8,8a}$ y los valores de desplazamiento químico de los protones H-8a, siguiendo el mismo razonamiento que en el caso de los derivados **82**.



82a, 82b, 82c, 85a, 85b, 85c: R = Ph

83a, 83b, 83c, 86a, 86b: R = In

84a, 84b, 84c: R = CO₂Et

Esquema 12

La alquilación de **73** con bromoacetato de etilo, agente alquilante portador de un precursor de la cadena lateral del Asp, utilizando metóxido sódico como base, condujo a la obtención de **84** con bajo rendimiento. Sin embargo, una reacción similar utilizando NaH dio lugar al compuesto **84** con un rendimiento aceptable. El espectro de ^1H RMN de **84** indicó la presencia clara de dos diastereoisómeros en proporción aproximada 5:1, detectándose también trazas de un tercer diastereoisómero. Como en este caso no fue posible la separación cromatográfica de los mismos, la asignación de la configuración se realizó a partir de los datos de ^1H RMN de la mezcla. Nuevamente, el isómero mayoritario presenta una constante de acoplamiento $J_{8,8a}$ de 8,5 Hz, concordante con una disposición *trans* entre los protones H-8 y H-8a. Suponiendo que el ataque del agente alquilante tiene lugar preferentemente por la misma cara del anillo que en los casos anteriores, el compuesto mayoritario **84a** se correspondería con el isómero (2*S*,8*S*,8a*R*), mientras que el minoritario **84b** presentaría configuración (2*R*,8*S*,8a*R*).

La desprotección parcial de los compuestos **82a**, **82b**, **82c**, **83a** y **83b** por tratamiento con NaOH, condujo a los correspondientes ácidos carboxílicos **85a**, **85b**, **85c**, **86a** y **86b**, respectivamente (Esquema 12), adecuados para su introducción en péptidos de mayor tamaño, como se detallará en el capítulo 2.3.

La alquilación con bromuro de bencilo del correspondiente derivado de 3-oxoindolizidina **81**, preparado a partir de D-Orn, dio lugar al compuesto **87** (Esquema 13), constituido por una mezcla de tres diastereoisómeros en idénticas proporciones a las descritas para **82**. Los espectros de ^1H RMN de estos tres diastereoisómeros son idénticos a los de sus enantiómeros correspondientes, **82a**, **82b** y **82c**, respectivamente.

Los compuestos **87a** y **87b** fueron saponificados a los ácidos carboxílicos **88a** y **88b**, adecuados para su introducción posterior en la secuencia del hexapéptido C-terminal de la Neurotensina, como se indicará en el capítulo correspondiente.

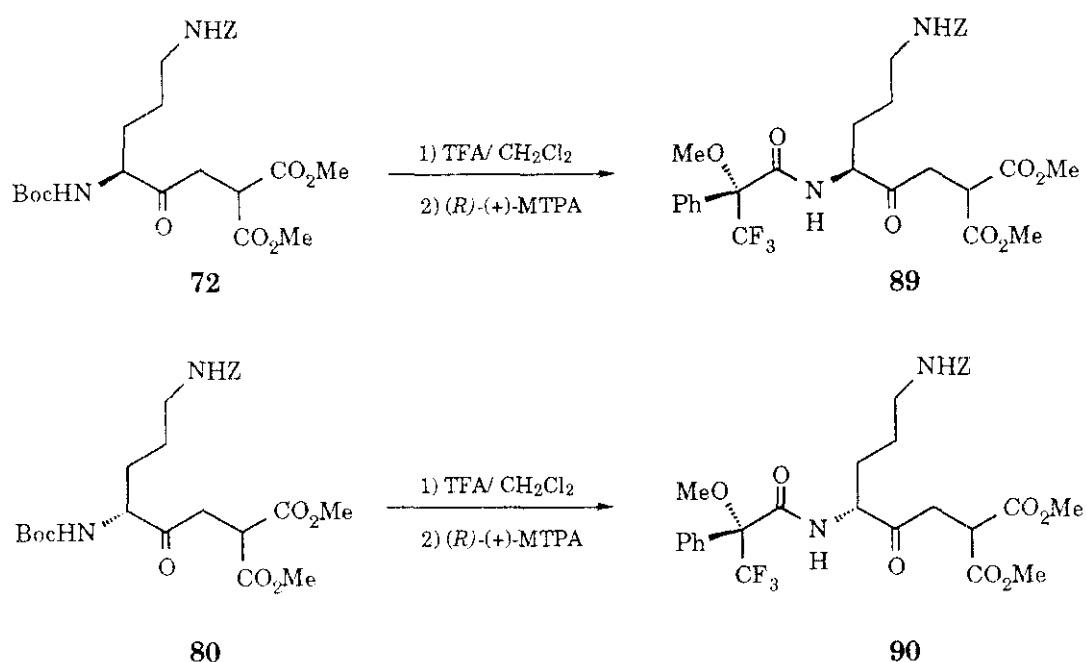
De forma general, la alquilación de las 2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidinas transcurre con rendimientos moderados, que oscilan entre el 58% y el 69%, obteniéndose en todos los casos con estereoselectividades similares, independientemente del agente alquilante utilizado. Se observa también que la entrada del agente alquilante tiene lugar preferentemente por la misma cara del anillo de 3-oxoindolizidina en la que se encuentra el protón H-8a.

fueron elegidos para determinar si durante la etapa de obtención de los 4-cetodiésteres se producía racemización del derivado de Orn de partida. Por otra parte, la determinación del exceso enantiomérico de las 3-oxoindolizidinas 2,2-disustituidas nos daría idea de la enantioselectividad durante el proceso de generación del anillo de 3-oxoindolizidina. En este caso, no se eligieron las 2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidinas intermedias, ya que el hecho de que se obtengan como mezclas de diastereoisómeros interconvertibles en C-2 dificultaría el estudio. Además, es poco probable que la reacción de alquilación en C-2 afecte a los centros asimétricos C-8 y C-8a, previamente creados, por lo que los resultados obtenidos con los derivados 2,2-disustituidos pueden ser extrapolables a las 2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidinas. Para llevar a cabo este estudio se prepararon, en primer lugar y de forma paralela, los 4-cetodiésteres **72** y **80**, derivados de L- y D-Orn, respectivamente. A continuación estos compuestos fueron hidrogenados en idénticas condiciones de concentración y presión de H₂, y a temperaturas de 12-14 °C para **72** y 14-15 °C para **80**, dando lugar a las 2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidinas **73** y **81**. Estos derivados fueron alquilados posteriormente con bromuro de bencilo, en las condiciones ya indicadas, para dar lugar a los compuestos **82** y **87**, respectivamente, procediéndose finalmente a la separación cromatográfica de los correspondientes diastereoisómeros.

Para determinar la pureza enantiomérica de los 4-cetodiésteres **72** y **80**, así como de los derivados **82a**, **82b**, **87a** y **87b**, se recurrió al empleo de auxiliares quirales⁹⁷, para obtener, si fuera el caso, los correspondientes derivados como mezclas de diastereoisómeros, detectables por RMN. Entre los diversos tipos de auxiliares quirales existentes se eligieron, en primer lugar, los agentes quirales de solvatación^{97,98}, dada la rapidez y simplicidad del experimento y la imposibilidad tanto de problemas de resolución cinética como de racemización de la muestra. Los espectros de ¹H RMN de los compuestos **72**, **82a** y **82b** registrados en presencia de cantidades crecientes (de 1 a 4 equivalentes) de (S)-(+)-TFAE y utilizando CDCl₃ como disolvente no presentaron desdoblamiento en ninguna de las señales. Aunque el CDCl₃ es uno de los disolventes más adecuados para este tipo de ensayos, dada su baja polaridad, se registró también el espectro de ¹H RMN del compuesto **82b** junto con 3 equivalentes de (S)-(+)-TFAE en benceno-d₆, por si la menor polaridad de este último pudiera ser un factor decisivo para la eficacia del experimento. Sin embargo, tampoco en este caso se observó desdoblamiento de señales.

Los agentes quirales de derivatización ⁹⁷, de uso muy extendido para determinar excesos enantioméricos, presentan la ventaja de que para los diastereoisómeros obtenidos el $\Delta\delta$ observado suele ser del orden de cinco veces superior al que se observa con los agentes quirales de solvatación. Dentro de estos agentes, se utilizó el ácido α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético (MTPA) ⁹⁹, que es el de aplicación más amplia para derivatizar aminas primarias y secundarias, así como aminoácidos ¹⁰⁰.

La desprotección del grupo 5-amino de los 4-cetodiésteres **72** y **80** con TFA, seguida de tratamiento con (*R*)-(+)-MTPA en presencia de BOP ¹⁰¹, condujo a la obtención de los derivados **89** y **90**, respectivamente (Esquema 14).



Esquema 14

En la evaluación por HPLC de los crudos de reacción se observó que tanto para **89** como para **90** se obtenía un solo pico con idéntico tiempo de retención. Tras una cuidadosa purificación cromatográfica se registraron los espectros de ¹H RMN en CDCl₃. Cada uno de ellos muestra la existencia de un único grupo de señales, con pequeñas diferencias de desplazamientos entre uno y otro. Para determinar si estas diferencias eran debidas a pequeñas variaciones en las condiciones en que se obtuvieron los espectros, se compararon éstos con el espectro de una mezcla preparada con los derivados **89** y **90** en proporción 3:1. En este último se observa el desdoblamiento claro de las señales

correspondientes a los protones H-7 y al OCH₃ del MTPA. Por tanto, se puede concluir que, dentro de los límites de detección de la RMN, la formación de los 4-cetodiésteres derivados de L- y D-Orn transcurre sin racemización. Los valores de $\Delta\delta$ ($\delta_{89}-\delta_{90}$) observados están de acuerdo con las predicciones teóricas del modelo del MTPA, según el cual los derivados de este tipo adoptan, en disolución, una conformación preferente en la que el grupo carbonilo de la amida se encuentra eclipsado con el grupo trifluorometilo y con el hidrógeno H-5 ⁹⁷ (Figura 7). Así, los protones H-7 del compuesto **90** aparecen apantallados por la corriente de anillo del grupo fenilo ⁹⁹, próximo en el espacio ($\Delta\delta = 0,22$ ppm). Por otra parte, el $\Delta\delta$ observado para el grupo α -metoxilo ($-0,13$ ppm) indica que, en el isómero **90**, los protones de dicho grupo están desapantallados por el grupo carbonilo, ya que ambos grupos están orientados hacia el mismo lado del plano del MTPA ⁹⁷.

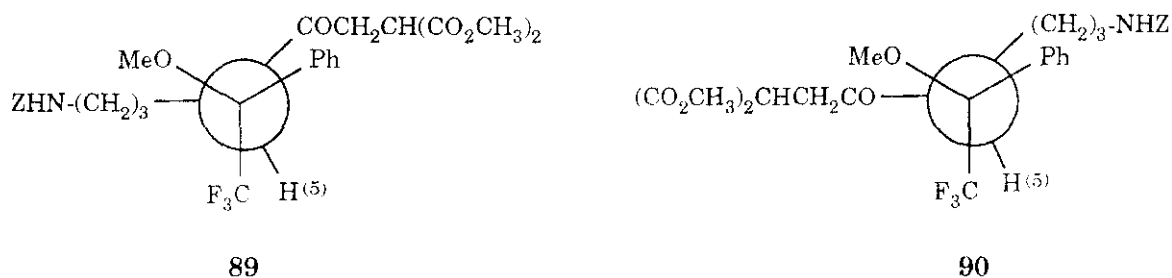


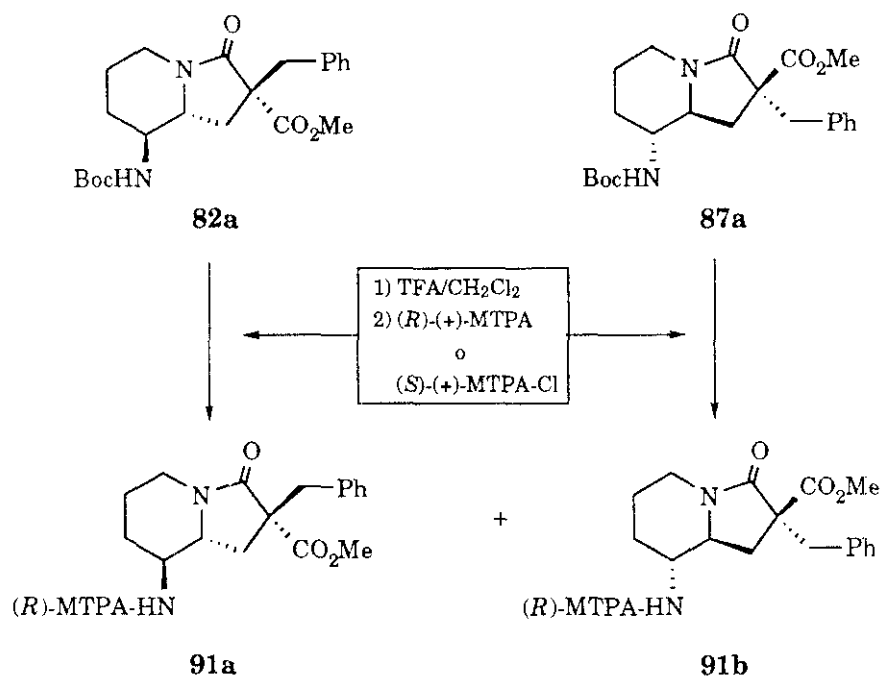
Figura 7. Conformaciones preferentes en disolución, según el modelo del MTPA, de los cetodiésteres derivatizados **89** y **90**.

Seguidamente se derivatizaron con (*R*)-(+)-MTPA los compuestos **82a** y **87a** (Esquema 15) y **82b** y **87b** (Esquema 16), aplicando el mismo procedimiento utilizado para los 4-cetodiésteres.

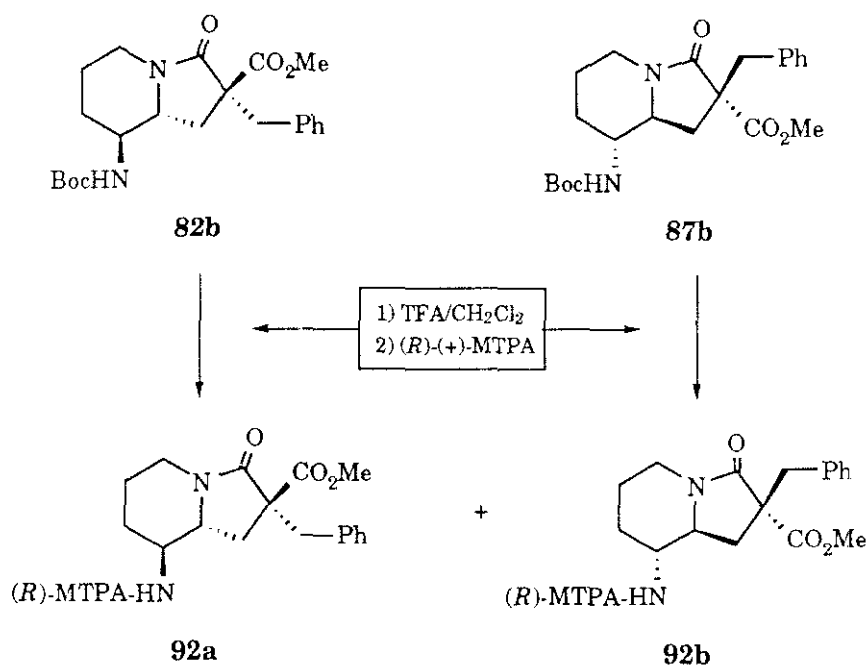
El análisis de HPLC de los crudos de reacción indicó que tanto a partir de **82a** como de **87a** se obtenía la mezcla de diastereoisómeros **91a+91b**, en proporciones 6,3:1 y 1:5,8, respectivamente. Del mismo modo, la derivatización por separado de **82b** y **87b** condujo en ambos casos a la obtención del compuesto **92ab**, en proporciones **a/b** de 5,4:1 y de 1:3,9, respectivamente.

Nuevamente, los valores de $\Delta\delta(\mathbf{a-b})$ encontrados en los espectros de ¹H RMN de las parejas de diastereoisómeros **91ab** y **92ab** presentan una gran concordancia con las predicciones del modelo del MTPA (Tabla 5, Figura 8). Así, los valores de $\Delta\delta$ negativos para los protones H-1 y H-8a son consistentes con el apantallamiento de dichos protones por la corriente de anillo del grupo

fenilo en los isómeros **91a** y **92a**, mientras que los valores positivos para los protones H-7 indican que son éstos los que, en los isómeros **91b** y **92b**, se encuentran del mismo lado que el anillo aromático.



Esquema 15



Esquema 16

Tabla 5. Diferencias de desplazamiento químico (ppm) más significativas de ^1H RMN $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$ de las parejas de diastereoisómeros **91ab** y **92ab**

Compuesto	$\Delta\delta(\mathbf{a-b})$, ppm			
	H-1		H-7	H-8a
91ab	- 0,26		+ 0,11	+ 0,12
92ab	- 0,29	- 0,17	+ 0,11	+ 0,16

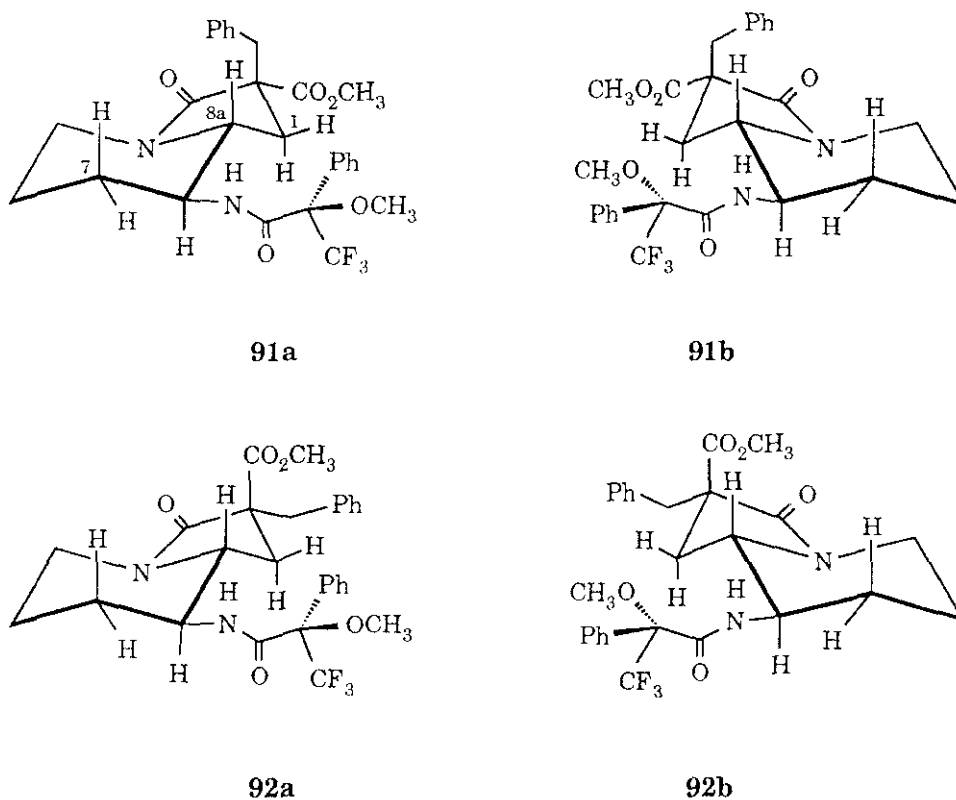
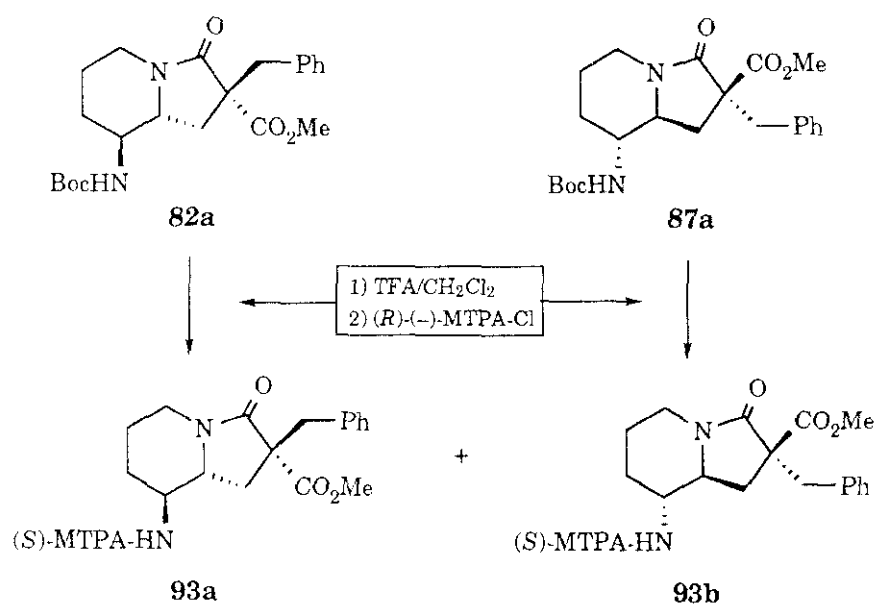


Figura 8. Conformaciones preferentes en disolución, según el modelo del MTPA, de los compuestos **91ab** y **92ab**.

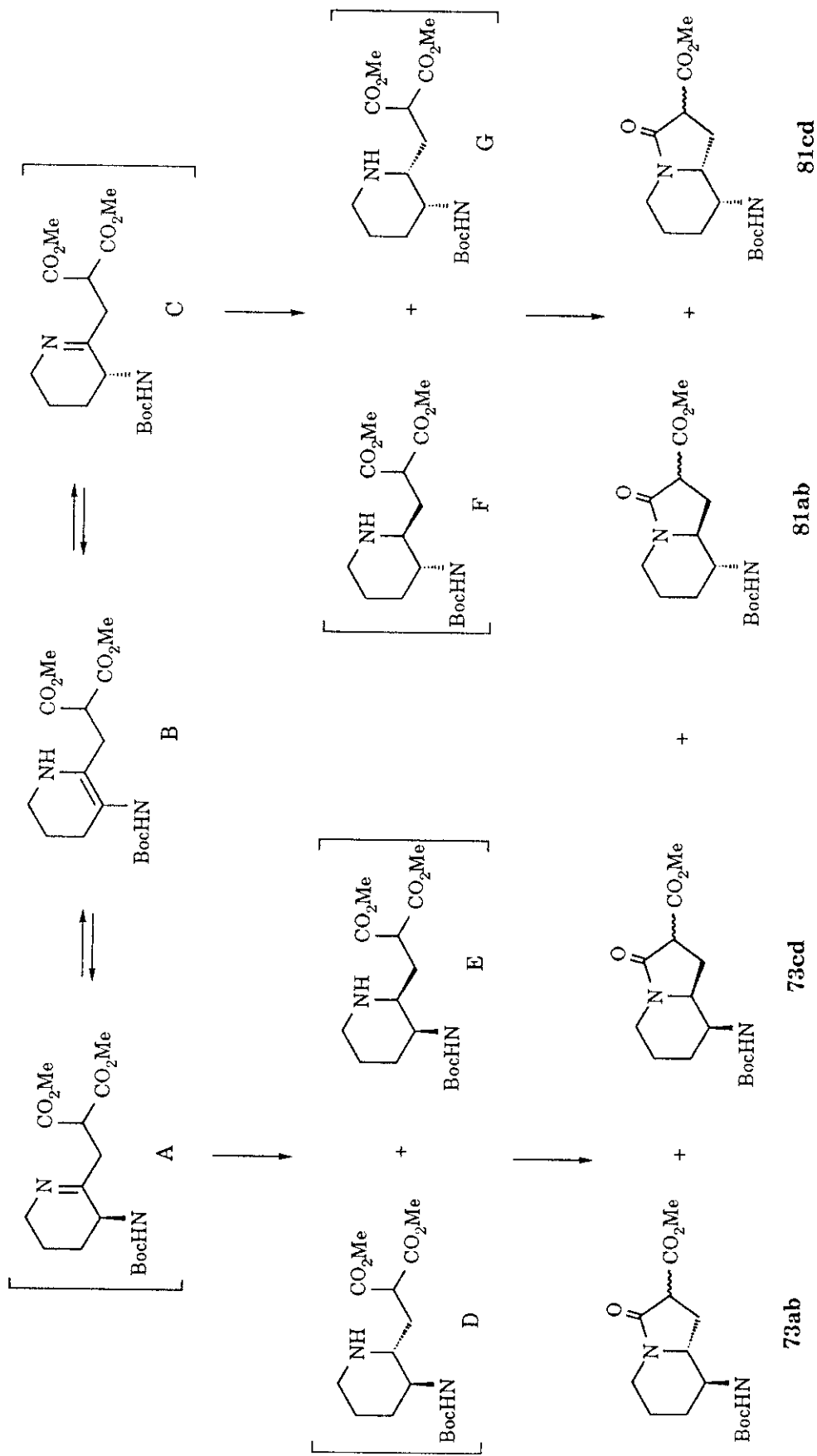
La diferencia en la proporción de diastereoisómeros obtenida a partir de **82a** (6,3:1) y **82b** (5,4:1), en los que, por proceder de la misma reacción, el exceso enantiomérico debe ser idéntico, sugiere la existencia de algún problema de resolución cinética, debido a las diferentes velocidades de reacción de los

sustratos enantiómeros frente al reactivo quiral ⁹⁷. Se obtiene un resultado similar al derivatizar los compuestos **87a** y **87b**, como ya se ha indicado. Para tratar de evitar este problema, se procedió de nuevo a la introducción del MTPA en los derivados de 3-oxoindolizidina, utilizando un gran exceso del cloruro del ácido de Mosher correspondiente, mucho más reactivo ¹⁰⁰. En estas condiciones, los diastereoisómeros **91ab** se obtuvieron en proporciones 5,3:1 y 1:5,3, a partir de **82a** y **87a**, respectivamente. Sin embargo, una derivatización similar de **82a** y **87a** con cloruro de (*R*)-(-)-MTPA condujo a proporciones de la pareja de diastereoisómeros **93ab** de 7,6:1 y de 1:4,9, respectivamente (Esquema 17). Este hecho indica que la utilización de los cloruros de ácido no soluciona el problema de resolución cinética y, por lo tanto, las proporciones de las mezclas de diastereoisómeros obtenidas se deben considerar como aproximadas.



Esquema 17

En cualquier caso, los resultados de este estudio de derivatización con MTPA ponen de manifiesto que los derivados de 3-oxoindolizidina preparados están constituidos por mezclas de dos enantiómeros formados durante el proceso de elaboración del anillo heterocíclico. Teniendo en cuenta que el centro asimétrico en C-8a se forma durante la reacción de aminación reductiva intramolecular, los intermedios de esta reacción han de ser los determinantes de la formación de las mezclas de enantiómeros obtenidas (Esquema 18). Así, si la reacción de hidrogenación del γ -cetodiéster **72** transcurriese a través de la



Esquema 18

imina intermedia A ^{102,103}, se obtendrían las piperidinas D y E que, tras γ -lactamización, darían lugar a los derivados de 3-oxoindolizidina **73ab** y **73cd** mayoritarios. Por otra parte, a través de un equilibrio imina-enamina, la imina A puede convertirse en la imina C, cuya hidrogenación generaría las 3-oxoindolizidinas **81ab** y **81cd**. Dado que las transposiciones imina-enamina están favorecidas por el calor, para comprobar la validez de este mecanismo propuesto, se llevó a cabo la hidrogenación del γ -cetodiéster **72** a 40 °C. La derivatización del compuesto **82a**, preparado por alquilación de la 2-metoxi-carbonil-3-oxoindolizidina **73** así obtenida, condujo a los derivados **91ab** (**a/b** = 2,1:1) y **93ab** (**a/b** = 2,8:1), siendo las proporciones **a/b** muy superiores a las encontradas cuando la hidrogenación de **72** se había llevado a cabo a temperatura más baja (Tabla 6).

Tabla 6. Excesos enantioméricos determinados tras derivatización con MTPA de las 3-oxoindolizidinas **82a**, **82b**, **87a** y **87b**

Prod. de partida	Temp. de hidrogen.	Prod. final derivatizado	Proporción a/b (% exceso enantiomérico)		
			(R)-(+)-MTPA-OH	(S)-(+)-MTPA-Cl	(R)-(-)-MTPA-Cl
L-Orn	12-14 °C	91ab	6,3:1 (73)	5,3:1 (68)	—
L-Orn	40 °C	91ab	2,3:1 (39)	2,1:1 (35)	—
D-Orn	14-15 °C	91ab	1:5,8 (71)	1:5,3 (68)	—
L-Orn	12-14 °C	92ab	5,4:1 (69)	—	—
D-Orn	14-15 °C	92ab	1:3,9 (59)	—	—
L-Orn	12-14 °C	93ab	—	—	7,6:1 (77)
L-Orn	40 °C	93ab	—	—	2,8:1 (47)
D-Orn	14-15 °C	93ab	—	—	1:4,9 (66)

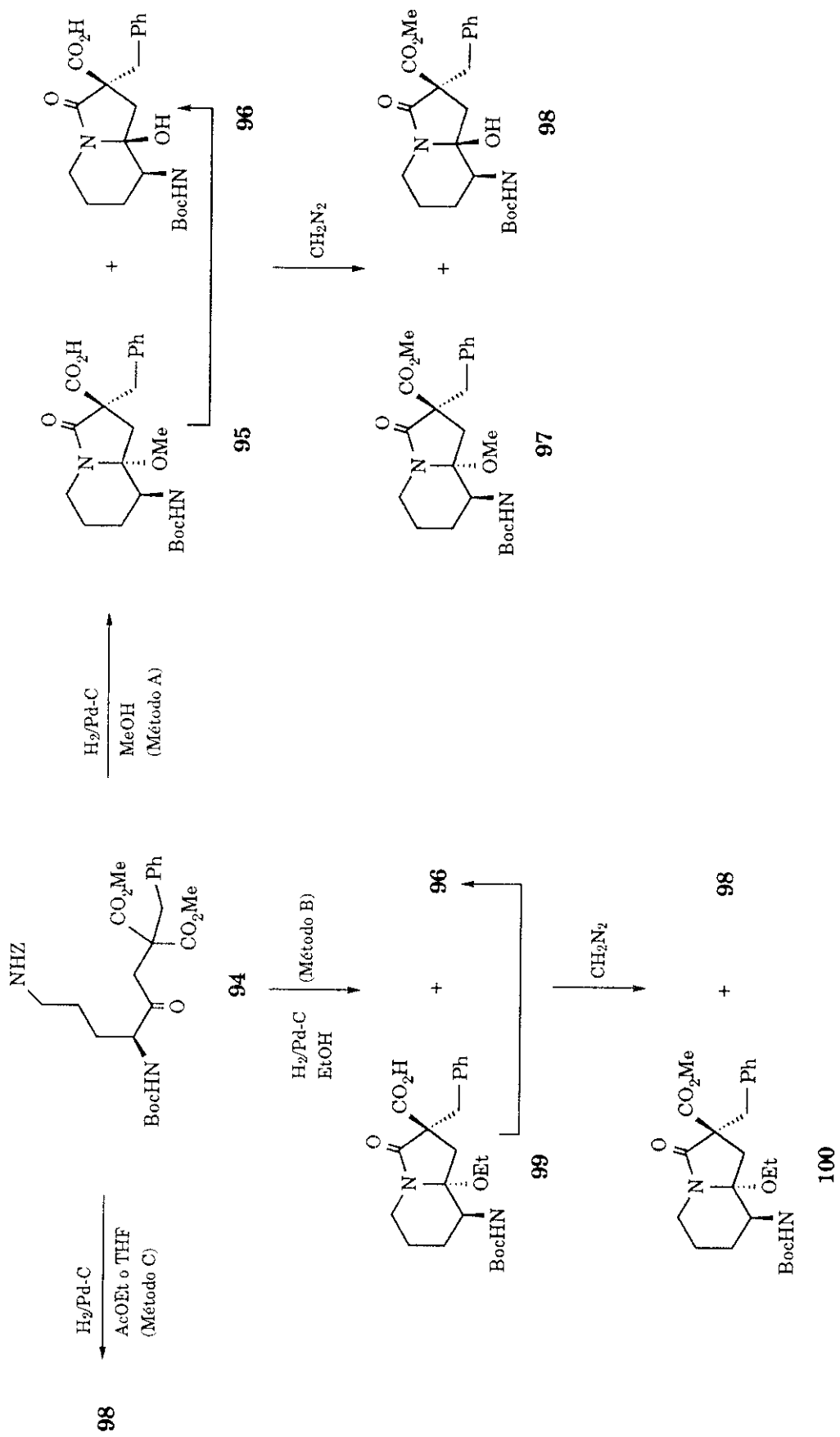
La estereoselectividad obtenida en C-8a se puede explicar también por medio de este mecanismo, ya que es de esperar que la hidrogenación ocurra preferentemente por la cara superior de la imina A o por la inferior de la imina C, para dar lugar al derivado de piperidina con los dos sustituyentes en disposición relativa *trans* diecuatorial (D o F). La pequeña proporción del isómero minoritario podría proceder de la hidrogenación de la imina por el lado menos favorable o bien de la hidrogenación de la enamina. Sin embargo, la gran resistencia a la reducción del doble enlace enamínico observada tanto

en el derivado de hexahidroindolizina **106**, que se describe más adelante, como en el caso de otros sistemas relacionados ^{104,105}, apoya el que la hidrogenación proceda en todos los casos vía la imina intermedia.

2.2.4. FORMACIÓN DE DERIVADOS DE 8a-HIDROXI- Y 8a-ALCOXI-8-AMINO-3-OXOINDOLIZIDINA-2-CARBOXILATO 2-SUSTITUIDOS

De acuerdo con el esquema 9 (Apartado 2.2) se abordó la ruta sintética B, como alternativa a la descrita en el apartado 2.2.1 para la síntesis de los derivados de 8-amino-3-oxoindolizidinas 2,2-disustituidas de fórmula general **75**. Cabría esperar, en principio, que por esta segunda ruta, la reacción de alquilación para introducir las cadenas laterales de los aminoácidos, en este caso, en los derivados malónicos lineales, transcurriera con mayor rendimiento que en el caso de la ruta A, en que se introducían en la oxoindolizidina previamente formada. En una segunda etapa, los 4-cetodiésteres portadores de dichas cadenas deberían conducir, en las condiciones de hidrogenación habituales, a los derivados de 3-oxoindolizidina-2-carboxilato 2-sustituidos, de manera similar a como ocurría en las 3-oxoindolizidinas 2-monosustituidas análogas ⁶⁴.

Para explorar esta segunda ruta, se preparó, con excelente rendimiento, el 4-cetodiéster **94** por alquilación del compuesto **72** con bromuro de bencilo. En contra de lo esperado, la hidrogenación catalítica de **94** utilizando MeOH como disolvente (método A), no dio lugar a las correspondientes 3-oxoindolizidinas 2,2-disustituidas buscadas sino a una mezcla de los derivados 8a-metoxi y 8a-hidroxi sustituidos **95** y **96** (Esquema 19), ambos con el grupo 2-carboxilato como ácido libre. Efectuando el seguimiento de la hidrogenación por HPLC se observa la formación exclusiva del compuesto **95**, mientras que el derivado **96** se obtiene por hidrólisis de **95** durante la manipulación de la reacción. En el espectro de ¹H RMN registrado en DMSO-d₆ de la mezcla de **95** y **96** no se observan las señales correspondientes a los protones H-8a, apareciendo los protones H-1 simplificados en forma de dobletes. Por otra parte, entre las señales atribuibles al derivado mayoritario **95** se observa un singlete a 3,01 ppm, que integra para tres protones y que indica la presencia del hemiaminal O-metilado. El espectro de ¹³C RMN muestra señales características de carbono cuaternario a 90,18 y 85,49 ppm, asignables a los carbonos hemiaminánicos C-8a de **95** y **96**, respectivamente ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.



Esquema 19

Con el fin de minimizar la fácil hidrólisis del compuesto **95** e impedir así su transformación en el derivado 8a-hidroxilado **96**, se trató la mezcla de los dos con CH_2N_2 , lo que dio lugar a la obtención de los ésteres metílicos **97** y **98**, que pudieron ser separados por cromatografía. La asignación de la configuración absoluta de los dos nuevos centros asimétricos generados en el proceso de formación del anillo de 3-oxoindolizidina, C-2 y C-8a, se llevó a cabo a partir de los compuestos **97** y **98** por medio de experimentos de NOE bidimensional (NOESY). El compuesto **98** muestra un fuerte intercambio dipolar de magnetización (NOE) entre los protones H-1 β y H-8, por una parte, y H-1 β y 2-CH₂, por otra (Figura 9), lo que indica que el protón H-8 y el grupo bencilo en posición 2 se encuentran del mismo lado de la molécula. Del mismo modo, se observa un fuerte NOE entre los protones H-1 α y OH, de donde se deduce que el protón H-8 y el grupo OH deben hallarse en disposición relativa *trans*. En el caso del derivado 8a-metoxi sustituido **97**, se observan fuertes NOEs entre los protones H-1 β -OCH₃, H-1 β -2-CH₂ y H-8-OCH₃, indicando que el protón H-8 y los grupos OCH₃ y 2-bencilo se encuentran en disposición relativa *cis*.

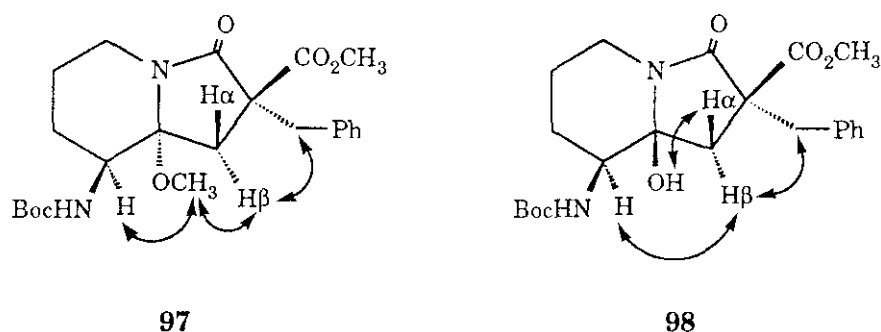
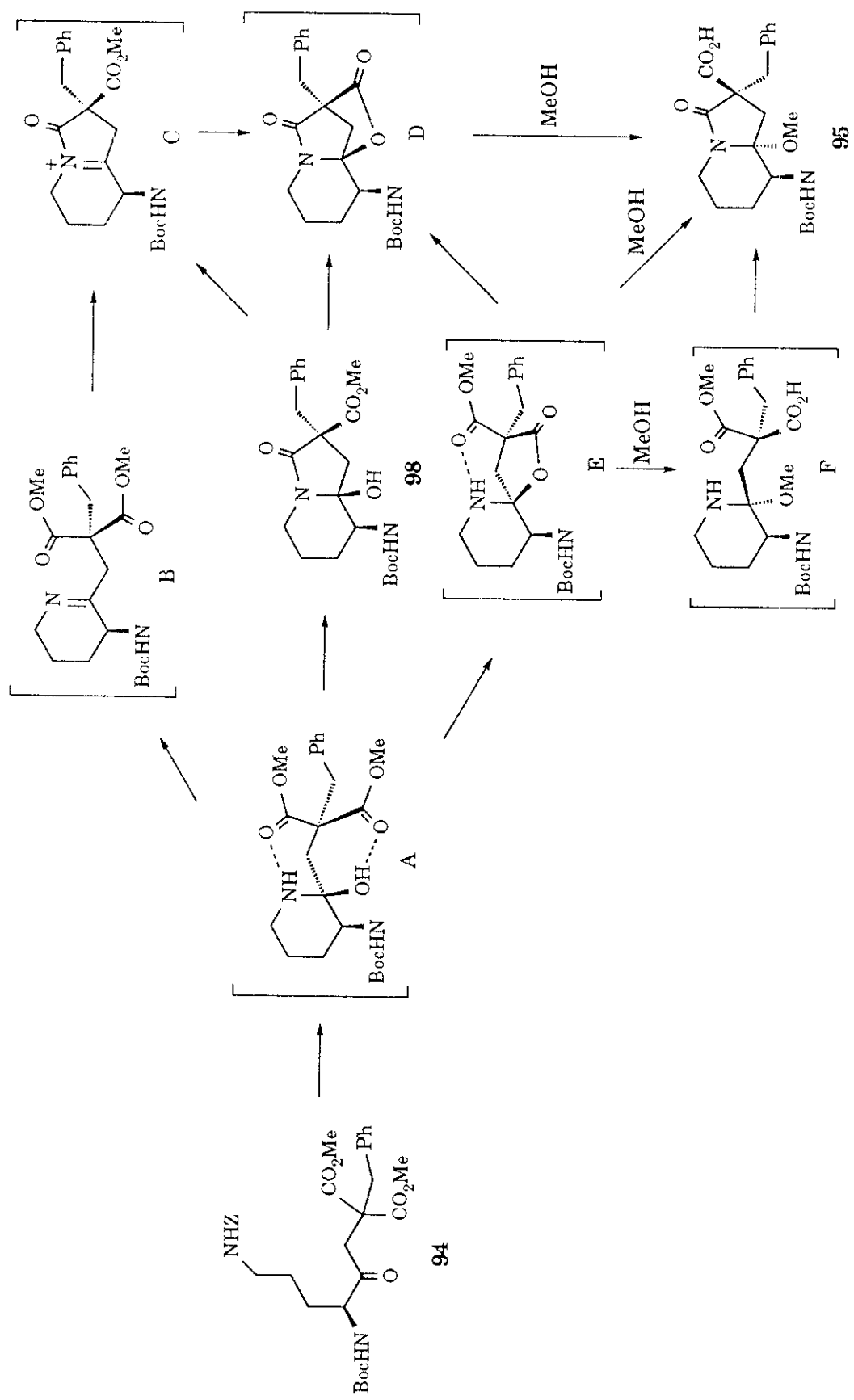


Figura 9. NOEs significativos observados para los compuestos **97** y **98**.

Para intentar explicar la formación del derivado carboxílico **95**, así como los resultados estereoquímicos de la ciclación, se pueden proponer dos posibles mecanismos (Esquema 20). Así, suponiendo la formación inicial del hemiaminal A, en el que el anillo de piperidina adopta una conformación tipo silla con los grupos 2-alquilo y 3-amino en disposición relativa *trans*-diecuatorial, la hidrólisis del éster metílico al correspondiente ácido carboxílico podría tener lugar a través de la lactona D, mediante el desplazamiento del grupo carboxilato por ataque del disolvente (MeOH)¹⁰⁹, para dar lugar directamente



Esquema 20

al derivado 8a-metoxi sustituido **95**. Esta fisión alquil-O ocurre probablemente a través de un mecanismo bimolecular $B_{AL}2$ ¹¹⁰⁻¹¹², ya que se obtiene exclusivamente el isómero que procede de la inversión total de la configuración del carbono C-8a. La lactama tricíclica D podría formarse a partir del ion iminio C, procedente a su vez del derivado 8a-hidroxiado **98**, o de la más improbable acilación intramolecular de la imina intermedia B ^{113,114}. El segundo mecanismo propuesto implica la formación de la espirolactona intermedia E, que podría evolucionar hacia la lactama D o transformarse, por ataque del disolvente, en la metoxipiperidina F, por medio también de un mecanismo $B_{AL}2$. En este último caso, una rápida γ -lactamización de F a través del éster metílico exclusivamente daría lugar al ácido carboxílico **95**. El estereocontrol observado en C-2, al obtenerse únicamente el isómero de configuración 2S, podría estar determinado por la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno ¹¹⁵ en el hemiaminal intermedio A o por la existencia de un mecanismo de tipo concertado, que implicase la formación de la lactama tricíclica D y su hidrólisis por el MeOH o bien la metanolisis de la espirolactona E y su γ -lactamización a través del éster metílico.

Con el fin de comprobar la participación del disolvente alcohólico en el curso de la reacción, se llevó a cabo la hidrogenación del 2-bencil-4-cetodiéster **94**, utilizando EtOH como disolvente (Esquema 19, método B). Se obtuvo así el análogo 8a-etoxi sustituido **99**, junto con la 3-oxoindolizidina 8a-hidroxiada **96**, procedente, también en este caso, de la hidrólisis del alcoxi derivado. El tratamiento de esta mezcla con CH_2N_2 dio lugar a los correspondientes ésteres metílicos **100** y **98**. La caracterización de los compuestos **99** y **100** se efectuó por correlación de sus espectros de 1H RMN y de ^{13}C RMN con los de los 8a-metoxi derivados **95** y **97**, respectivamente.

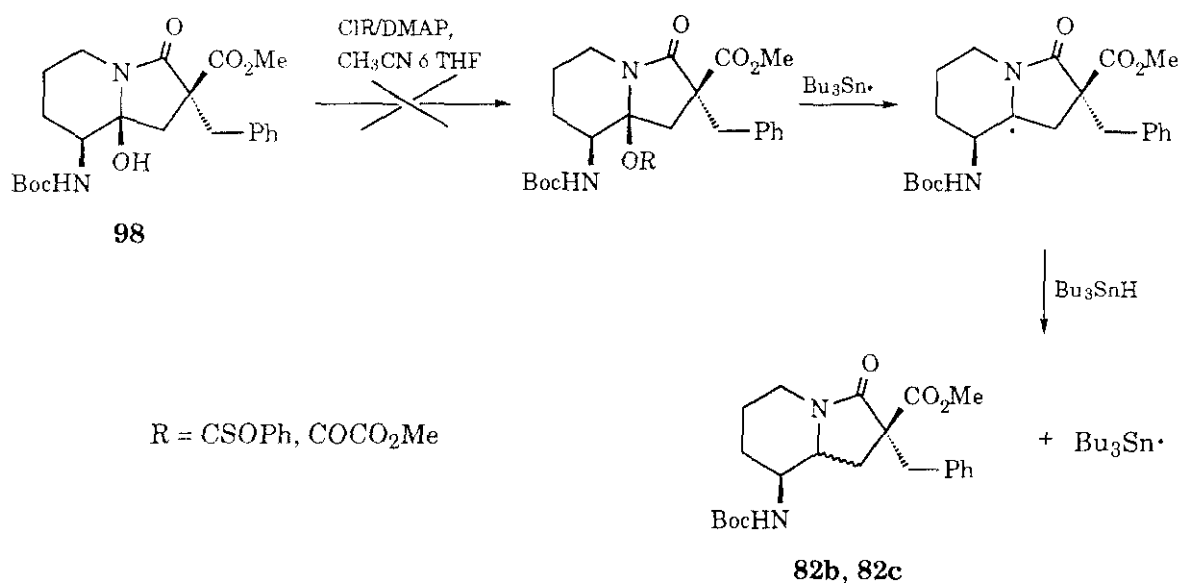
Una vez puesta de manifiesto la implicación del alcohol utilizado como disolvente en esta reacción, se llevaron a cabo dos ensayos más de hidrogenación del 4-cetodiéster **94** en disolventes no alcohólicos, concretamente AcOEt y THF (Esquema 19, método C). La aplicación del procedimiento habitual dio lugar, en ambos casos, a un único producto de reacción, que se identificó como la 8a-hidroxi-3-oxoindolizidina **98**. La formación del hemiaminal A con dos enlaces de hidrógeno intramoleculares podría explicar la estereoespecificidad observada en la formación de este producto. La obtención de este derivado de 3-oxoindolizidina 8a-hidroxi sustituido parece indicar que, en este caso, la γ -lactamización del hemiaminal A es más rápida que su hidrogenólisis para formar la correspondiente piperidina, y que la

N-acilación intramolecular del hemiaminal impide la subsiguiente reducción, al menos en las condiciones de hidrogenación utilizadas.

Para intentar esclarecer la participación del compuesto **98** como intermedio en el proceso de obtención de los derivados 8a-alcoxi sustituidos, se efectuó un seguimiento de las correspondientes disoluciones de **98** en MeOH y EtOH a lo largo de varios días. En estas condiciones el hidroxilado **98** resultó completamente estable, por lo que, de los dos mecanismos propuestos, el que transcurre a través de la espirolactona parece el más probable.

La hidrogenación catalítica de 2-bencil-4-cetodiestéres derivados de Orn conduce, por tanto, de forma totalmente estereoespecífica, a derivados de 8-amino-3-oxoindolizidina 2,2-disustituidos portadores de un grupo hidroxilo o alcoxilo en posición 8a, dependiendo del disolvente utilizado.

Teniendo en cuenta el alto grado de funcionalización de estos compuestos, se consideró su posible utilidad como intermedios para la síntesis de diferentes análogos de indolizidinas. Por una parte, se intentó la desoxigenación radicalica del derivado **98** con hidruro de tributilestaño, previa esterificación del grupo OH con el reactivo adecuado ¹¹⁶ (Esquema 21).



Esquema 21

Con ello se pretendía acceder preferentemente a los derivados **82b** u **82c**, isómeros que se habían obtenido de forma minoritaria al efectuar la alquilación directa del anillo de 2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina. Sin embargo, el tratamiento de **98** con cloruro de feniloxitiocarbonilo en presencia

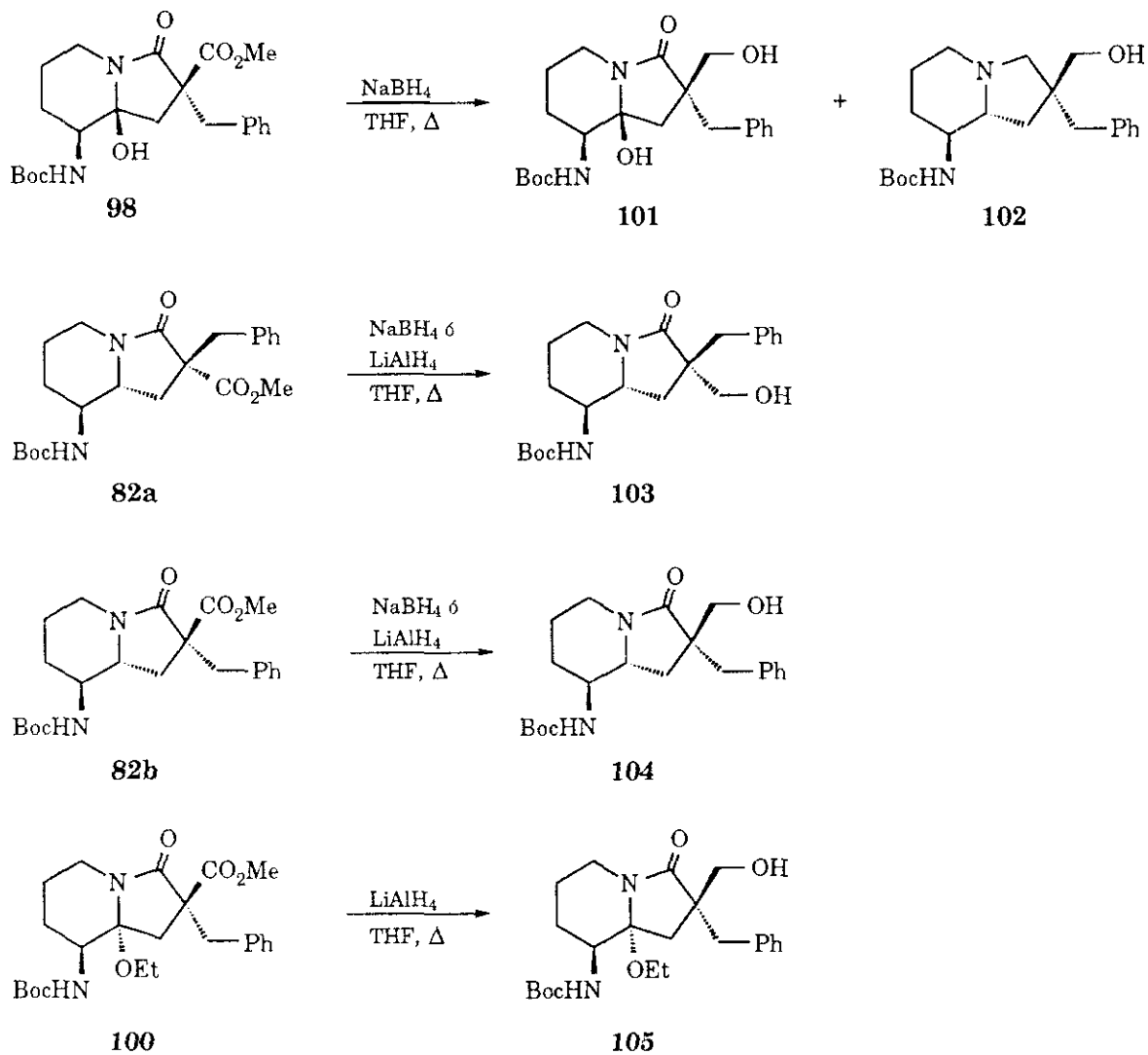
de DMAP no condujo a la obtención del producto de esterificación deseado, probablemente debido a problemas de impedimento estérico. Sin embargo, la utilización de cloruro de metoxalilo ¹¹⁷, menos voluminoso, tampoco dio lugar al resultado esperado, recuperándose el producto de partida inalterado. Este hecho parece indicar que el grupo OH del hemiaminal no es lo suficientemente reactivo frente a los agentes de acilación empleados.

Por otra parte, y ante el fracaso de estos intentos, se procedió a la utilización de métodos más drásticos de reducción. Los ensayos de hidrogenación del compuesto **98**, utilizando como catalizadores Pd(OH)₂ y PtO₂, resultaron también infructuosos. Finalmente, la calefacción a reflujo de THF de **98** en presencia de 3 equivalentes de NaBH₄ (Esquema 22) condujo, tras purificación cromatográfica, a la obtención de dos productos de reducción, **101** y **102**, que fueron caracterizados a partir de sus datos analíticos y espectroscópicos. En ambos casos se observa la transformación del éster metílico en el correspondiente alcohol. Además, el espectro de ¹³C RMN de **101** mantiene el carbono cuaternario del grupo hemiaminal C-8a (85,67 ppm), mientras que en el espectro de ¹³C RMN del producto minoritario **102** se observa la desaparición de las señales correspondientes al carbono hemiaminámico y al carbono carbonílico C-3, lo que indica que ha tenido lugar la reducción de ambos grupos. En el espectro de ¹H RMN de **102**, el valor de la constante de acoplamiento $J_{8,8a}$ es de 10,0 Hz, indicando una disposición relativa *trans* entre los protones H-8 y H-8a.

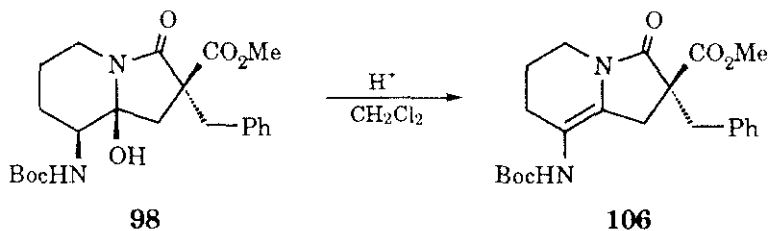
Como vía alternativa para la preparación del compuesto **102**, se ensayó la reducción del derivado de 3-oxoindolizidina **82b** con NaBH₄ y LiAlH₄ (Esquema 22). Sin embargo, en estas condiciones, los compuestos **82a** y **82b** condujeron a los derivados **103** y **104**, respectivamente, en los que únicamente se redujo el grupo metoxicarbonilo. De manera similar, el tratamiento del 8a-etoxi derivado **100** con LiAlH₄ a reflujo de THF dio lugar exclusivamente a la obtención del producto de reducción del éster metílico **105**.

Los derivados 8a-hidroxi y 8a-alcoxi sustituidos anteriormente descritos, pierden fácilmente una molécula de H₂O ó alcohol en presencia de medios ácidos. Así, el tratamiento del compuesto **98** con cantidades catalíticas de TFA (Esquema 23) condujo a la obtención del derivado enamínico **106**. El espectro de ¹H RMN de este producto muestra la desaparición de las señales correspondientes a los protones H-8 y H-8a, mientras que en el espectro de ¹³C RMN se observa una señal de carbono cuaternario a 109,03 ppm, atribuible a los carbonos C-8 y C-8a ¹¹⁸. Todos los intentos de hidrogenación del doble

enlace enamínico, a diferentes presiones y temperaturas y con distintos catalizadores, resultaron infructuosos. El tratamiento con NaBH_3CN en medio ácido ¹¹⁹ tampoco condujo al correspondiente compuesto saturado.



Esquema 22

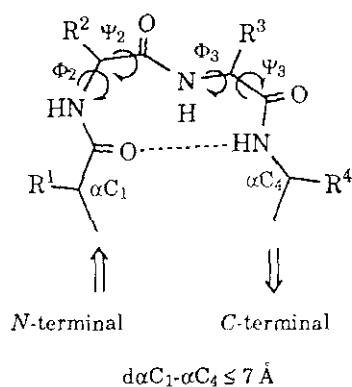


Esquema 23

2.2.5. MODELIZACIÓN MOLECULAR DE DERIVADOS DE 8-AMINO-3-OXOINDOLIZIDINA-2-CARBOXILATO. ANÁLISIS CONFORMACIONAL MEDIANTE DINÁMICA MOLECULAR

Puesto que las 3-oxoindolizidinas aquí descritas se pueden relacionar con otras lactamas bicíclicas capaces de mimetizar giros β ⁴⁷⁻⁵⁶, se consideró de interés efectuar el análisis conformacional de estos derivados con el fin de conocer su capacidad para inducir conformaciones plegadas y, más concretamente, conformaciones de giro β .

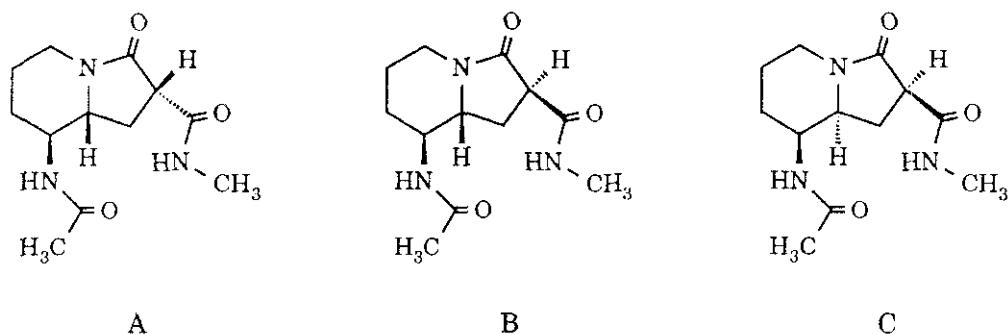
Estructuralmente los giros β pueden definirse como pseudociclos de diez eslabones, estabilizados por un puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo carbonilo del primer residuo y el NH del cuarto, y para los que la distancia $\alpha C_1-\alpha C_4$ es $\leq 7 \text{ \AA}$ (Figura 10) ^{120,121}. Por otra parte, el tipo específico de giro β se clasifica de acuerdo con los ángulos de torsión Φ y Ψ de los residuos 2 y 3 del esqueleto peptídico.



Tipo	Φ_2	Ψ_2	Φ_3	Ψ_3
I	-60	-30	-90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0
III	-60	-30	-60	-30
III'	60	30	60	30

Figura 10. Estructura general de los giros β y principales tipos.

Para llevar a cabo el estudio conformacional se eligieron como modelos sencillos los derivados de 3-oxoindolizidina A, B y C, en los que los grupos *N*-acetilo y *N*-metilcarboxamida constituyen una simplificación usual de los residuos 1 y 4 de los giros β . Por otra parte, la estereoquímica de los diferentes centros asimétricos se corresponde con la de aquellos isómeros que se obtienen tras alquilación en C-2 del esqueleto básico de 2-metoxycarbonil-3-oxoindolizidina.



Las estructuras iniciales de los compuestos modelos A, B y C, se construyeron utilizando distancias y ángulos estándar incluidos en el programa InsightII¹²². Estas geometrías, una vez optimizadas con el campo de fuerza de segunda generación cvff91¹²³, se utilizaron como punto inicial para el minucioso análisis conformacional llevado a cabo con cada una de las moléculas.

La metodología utilizada para el análisis conformacional ha usado las técnicas de dinámica molecular a alta temperatura y posterior minimización. El uso de la dinámica molecular está basado en la idea de que el aumento de la energía de la molécula, por asignación a cada átomo de velocidades al azar, puede ser llevado a cabo de tal forma que le permita superar las barreras energéticas existentes entre los diferentes mínimos, siguiendo las leyes de Newton. La posterior minimización de las estructuras obtenidas por este método proporciona una idea de los diferentes mínimos accesibles para dicha molécula.

La efectividad de esta metodología para explorar el espacio conformacional en función de la temperatura utilizada en la dinámica molecular ha sido estudiada por Kollman¹²⁴, aplicándola al éter 18-corona-6. En este trabajo se llega a la conclusión de que cuando las simulaciones se llevan a cabo entre 700 y 800 K se encuentra un número mayor de conformaciones de mínima energía que a temperaturas más altas o más bajas. Con el fin de

comprobar si éste es un principio general para todo tipo de compuestos o si solamente es aplicable al compuesto estudiado por Kollman, se realizaron tres dinámicas moleculares a 750 K para cada uno de los compuestos antes mencionados. La primera dinámica utilizó como estructura inicial la comentada anteriormente, la segunda, aquélla de mínima energía de la primera dinámica y la tercera, la estructura de menor energía no encontrada en la primera dinámica. Asimismo, se efectuaron tres dinámicas para cada compuesto a 1500 K utilizando las mismas estructuras iniciales que a 750 K.

Las condiciones exactas en que se ha realizado este estudio suponen un primer paso de calentamiento progresivo, en el que se fue elevando la temperatura de las moléculas 5 K cada 0,15 ps (10 K para las dinámicas a 1500 K) hasta llegar a la temperatura deseada. Este proceso fue seguido de 20 ps de estabilización con el fin de que la energía cinética se distribuyera uniformemente en la molécula. Por último, se llevaron a cabo 75 ps de simulación, durante los que se almacenaron 300 estructuras a intervalos regulares de tiempo. Cada una de estas estructuras se optimizó aplicando el campo de fuerza cvff91 durante 500 ciclos del método de minimización Steepest Decent, con el fin de eliminar las interacciones más importantes en las moléculas y, posteriormente, durante los ciclos necesarios del método de minimización Conjugate Gradients hasta que el gradiente alcanzase un valor menor de 0,001. Los mínimos así obtenidos se compararon entre sí con el fin de eliminar aquéllos que se encontraban repetidos.

Los mínimos encontrados en cada una de las dinámicas efectuadas a 750 K y a 1500 K se encuentran recogidos en la tabla 7. El número total de mínimos obtenidos, considerando conjuntamente las dinámicas a 750 K y a 1500 K, fue de 93 para el compuesto A, 76 para B y 88 para C. Dado el elevado número de mínimos, y aunque todos ellos fueron estudiados, para la presentación de los resultados se consideraron únicamente los veinte mínimos de menor energía, tal y como se recoge en las tablas 8-10.

En primer lugar, se observa que en estructuras con pocos grados de libertad, como las estudiadas en este caso, la probabilidad de encontrar el mínimo absoluto es mayor que la de encontrar otros mínimos. Así, en todas las dinámicas se ha llegado al mínimo absoluto, cualquiera que fuese la estructura de partida. En cuanto a la distribución de mínimos, se observa que en las dinámicas a 750 K, la mayoría de las conformaciones obtenidas corresponden a aquéllas de más baja energía, mientras que otros conformeros sólo aparecen cuando se utilizan temperaturas más altas (1500 K). Además, se

comprueba que las dinámicas a 1500 K proporcionan, independientemente de la estructura de partida, un número mayor de confórmeros de baja energía que las dinámicas a 750 K, en contra de lo expuesto por Kollman para el éter 18-corona-6 ¹²⁴. La mayor desventaja de la utilización de temperaturas elevadas es la facilidad con que se produce la isomerización de los enlaces peptídicos a disposiciones *cis*, poco habituales experimentalmente. Esta isomerización no se observa cuando la dinámica se efectúa a 750 K.

Tabla 7. Mínimos encontrados en las diferentes dinámicas moleculares llevadas a cabo con las estructuras A, B y C

Temperatura	Estructura	Número de mínimos		
		1 ^ª Dinámica	2 ^ª Dinámica	3 ^ª Dinámica
750 K	A	20	15 (22)	24 (27)
	B	15	21 (22)	13 (22)
	C	14	15 (16)	13 (17)
1500 K	A	49	62 (72)	72 (92)
	B	51	49 (65)	55 (75)
	C	65	34 (74)	62 (87)

Los números entre paréntesis indican el número total de mínimos teniendo en cuenta las dinámicas anteriores.

Como ya se ha indicado, para cualquier tipo de giro β la distancia $\alpha C_1-\alpha C_4$ debe ser inferior o igual a 7 Å y, por lo tanto, éste es un primer parámetro a tener en cuenta para determinar la presencia de este tipo de giros. Así, de los veinte mínimos de baja energía obtenidos para la estructura A, únicamente los confórmeros A4, A5 y A11 presentaron valores de $\alpha C_1-\alpha C_4$ inferiores a 7 Å (Tabla 8), lo que indica una tendencia moderada de este derivado a adoptar conformaciones plegadas. En el caso de la 3-oxoindolizidina B, se observa la formación prácticamente exclusiva de conformaciones extendidas, ya que en el único confórmero con distancia $\alpha C_1-\alpha C_4$ inferior a 7 Å, B15, uno de los enlaces amida está en disposición *cis* (Tabla 9). En todos los confórmeros encontrados para las estructuras A y B, el anillo de piperidina adopta una conformación de tipo silla con disposición *trans*-diecuatorial de los sustituyentes en posiciones 8 y 8a.

Tabla 8. Confórmeros de mínima energía obtenidos para la estructura A en función de la dinámica llevada a cabo y distancia $\alpha C_1-\alpha C_4$ para cada uno de ellos

Conf.	Energía (Kcal/mol)	$d\alpha C_1-\alpha C_4$ (Å)	Dinámicas (750 K)			Total 750 K	Dinámicas (1500 K)			Total 1500 K
			1	2	3		1	2	3	
A1	-29,28	8,10	x	x	x	x	x	x	x	x
A2	-27,91	7,44	x	x	x	x	x	x	x	x
A3	-27,89	9,85	x	x	x	x	x	x	x	x
A4	-27,80	6,04	x	x	x	x	x	x	x	x
A5	-27,72	6,92	x	x	x	x	x	x	x	x
A6	-27,33	9,49	x	x	x	x	x	x	x	x
A7	-27,31	9,26	x	x	x	x	x	x	x	x
A8	-27,25	8,54	x	x	x	x	x	x	x	x
A9	-26,68	10,04	x	x	x	x	x	x	x	x
A10	-26,39	8,99	x	x	x	x	x	x	x	x
A11	-25,85	6,06		x		x	x	x	x	x
A12	-23,86	9,63	x	x	x	x	x	x	x	x
A13	-23,13	9,37	x		x	x	x	x	x	x
A14	-23,07	8,98	x		x	x	x	x	x	x
A15	-23,06	7,82		x	x	x	x	x	x	x
A16	-22,98	8,96					x	x	x	x
A17	-22,91	7,26						x	x	x
A18	-22,87	8,26	x		x	x	x	x	x	x
A19	-22,83	8,91					x	x	x	x
A20	-22,72	9,94	x		x	x	x	x	x	x

Por otra parte, la obtención de doce confórmeros, incluido el mínimo absoluto, con $d\alpha C_1-\alpha C_4$ dentro del valor establecido (Tabla 10), es indicativo de la gran preferencia de la estructura C por adoptar conformaciones plegadas. También en este caso, el anillo de piperidina de la 3-oxoindolizidina adopta conformaciones tipo silla. Sin embargo, los sustituyentes en posiciones 8 y 8a adoptan exclusivamente disposiciones axial y ecuatorial, respectivamente. La visualización de los doce mínimos de conformación plegada indicó que los confórmeros C1, C2, C10 y C17 presentan un puente de hidrógeno entre el

8-NH y el grupo carbonilo de la posición 2, es decir, entre el NH correspondiente al segundo residuo y el CO del tercero, incompatible con las conformaciones de tipo giro β . Por otra parte, en los confórmeros C8, C13 y C18, uno de los dos enlaces amida está en forma *cis*, manteniendo en los dos primeros casos el puente de hidrógeno anteriormente señalado. Finalmente, los mínimos C5, C9, C12, C16 y C20 son los que poseen *a priori* disposiciones espaciales de los sustituyentes en posiciones 2 y 8 próximas a las esperadas para las conformaciones de tipo giro β .

Tabla 9. Confórmeros de mínima energía obtenidos para la estructura B en función de la dinámica llevada a cabo y distancia $\alpha\text{C}_1\text{-}\alpha\text{C}_4$ para cada uno de ellos

Conf.	Energía (Kcal/mol)	$d\alpha\text{C}_1\text{-}\alpha\text{C}_4$ (Å)	Dinámicas (750 K)			Total 750 K	Dinámicas (1500 K)			Total 1500 K
			1	2	3		1	2	3	
B1	-28,55	9,10	x	x	x	x	x	x	x	x
B2	-28,31	8,74		x	x	x	x	x	x	x
B3	-27,88	9,61	x	x	x	x	x	x	x	x
B4	-27,75	8,55	x	x	x	x	x	x	x	x
B5	-27,49	9,77		x		x	x	x	x	x
B6	-27,43	7,97		x	x	x	x	x	x	x
B7	-27,30	9,35		x	x	x	x	x	x	x
B8	-27,00	9,07	x	x	x	x		x	x	x
B9	-26,88	9,49	x	x	x	x	x	x	x	x
B10	-26,36	9,57	x	x	x	x	x	x	x	x
B11	-24,36	9,24	x	x	x	x	x	x	x	x
B12	-24,21	8,80		x	x	x	x	x	x	x
B13	-23,87	9,71	x	x	x	x	x	x	x	x
B14	-23,09	7,62					x	x	x	x
B15	-23,05	6,02					x	x	x	x
B16	-23,03	8,15	x	x	x	x		x	x	x
B17	-22,99	8,96					x	x	x	x
B18	-22,81	7,47					x	x	x	x
B19	-22,77	7,22						x	x	x
B20	-22,61	9,09					x	x	x	x

Tabla 10. Conforméromos de mínima energía obtenidos para la estructura C en función de la dinámica llevada a cabo y distancia $\alpha\text{C}_1\text{-}\alpha\text{C}_4$ para cada uno de ellos

Conf.	Energía (Kcal/mol)	$d\alpha\text{C}_1\text{-}\alpha\text{C}_4$ (Å)	Dinámicas (750 K)			Total 750 K	Dinámicas (1500 K)			Total 1500 K
			1	2	3		1	2	3	
C1	-35,98	4,98	x	x	x	x	x	x	x	x
C2	-33,54	4,32	x	x	x	x	x	x	x	x
C3	-33,08	7,83	x	x	x	x	x	x	x	x
C4	-32,88	8,57	x	x	x	x	x	x	x	x
C5	-32,02	4,81					x	x		x
C6	-32,01	7,94	x	x	x	x	x	x	x	x
C7	-31,99	8,66	x	x	x	x	x	x	x	x
C8	-31,97	6,26					x	x	x	x
C9	-30,72	4,05					x	x		x
C10	-30,66	5,56	x	x	x	x	x	x	x	x
C11	-30,43	9,66	x	x	x	x	x	x	x	x
C12	-30,36	3,77			x	x	x		x	x
C13	-30,12	6,12					x		x	x
C14	-29,78	9,36	x	x	x	x	x	x	x	x
C15	-29,48	7,38					x	x	x	x
C16	-29,47	3,65		x		x				
C17	-29,28	6,72	x	x		x		x	x	x
C18	-29,14	5,74					x			x
C19	-29,05	10,10					x	x	x	x
C20	-28,75	4,66					x	x		x

En la figura 11 se muestran de forma gráfica las dos clases de conformaciones plegadas obtenidas para el derivado de 3-oxoindolizidina C, el conforméromo C1, como representante de las estructuras con un puente de hidrógeno entre los grupos 8-NH y 2-CO, y el mínimo C5, como ejemplo de las conformaciones que poseen un puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo del primer residuo y el NH del cuarto residuo, característico de los giros β .

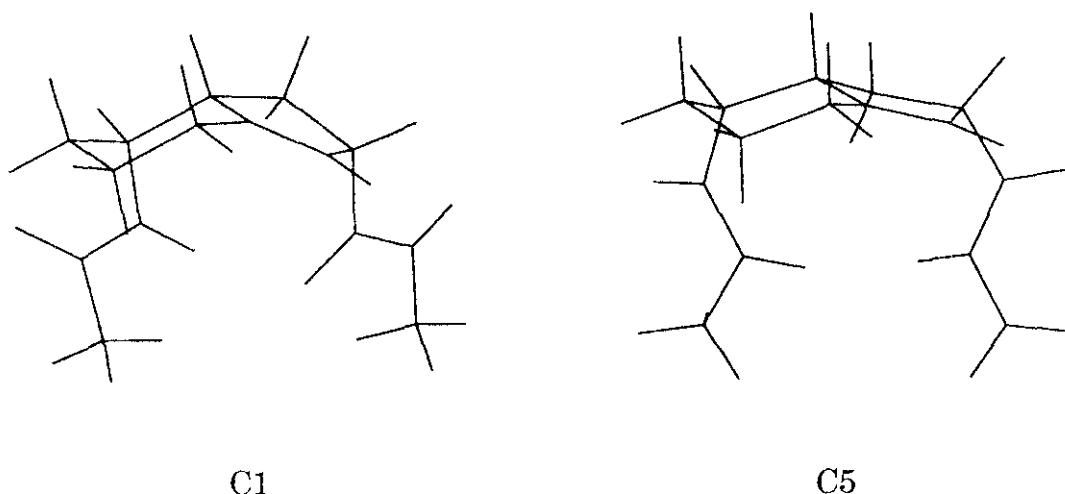
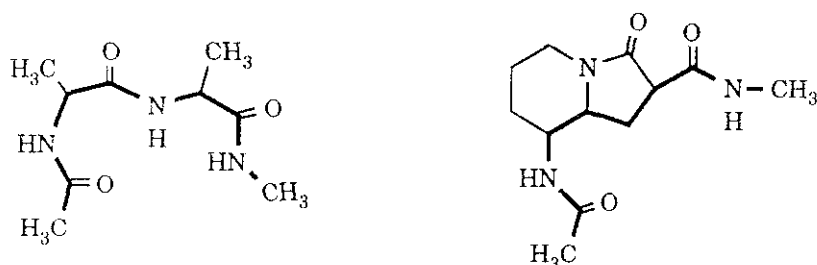


Figura 11. Conformaciones plegadas del derivado de 3-oxoindolizidina C: C1 (8-NH→2-CO) y C5 (giro β tipo II).

Los mínimos encontrados para las tres estructuras estudiadas se compararon con diferentes tipos de giros β , construidos a partir del derivado dipeptídico Ac-Ala-Ala-NHCH₃, utilizando ángulos estándar ^{120,121}. Para ello se efectuó la superposición de los diez átomos que definen el esqueleto peptídico con sus análogos en los derivados de 3-oxoindolizidina, señalados en trazo grueso.



En la tabla 11 se recogen los valores de rms (root mean square) encontrados en estas superposiciones para los conformeros plegados de los derivados A, B y C. Los mínimos con conformaciones extendidas, no reflejados en la tabla, presentan en todos los casos valores de rms muy superiores, como era de esperar. A la vista de los datos de la tabla se puede deducir que los valores más bajos de rms para los conformeros A4, A5 y A11 se obtienen por superposición con los giros β ideales de tipos I y III, tal y como se puede

apreciar en la figura 12. Para los mínimos de conformación plegada de la estructura C, los mejores valores de rms se obtienen con los giros β de tipos I' y II, con preferencia por este último. Así, la superposición del confórmero C5 con estos giros β (Figura 13) muestra una mejor correlación, tanto de los átomos del esqueleto peptídico como de la cadena lateral del tercer residuo, en el caso del giro β de tipo II que en el de tipo I'.

Tabla 11. Valores de rms obtenidos por superposición de los confórmeros plegados de los derivados de 3-oxoindolizidina A, B y C con diferentes tipos de giros β

Confórmero	$d\alpha C_1-\alpha C_4$ (Å)	rms (Å)					
		I	I'	II	II'	III	III'
A4	6,04	0,66	1,11	0,84	0,72	0,64	1,21
A5	6,92	0,82	1,40	1,06	0,99	0,73	1,43
A11	6,06	0,53	1,20	0,82	0,70	0,47	1,29
B15	6,02	0,87	1,13	0,90	0,87	0,84	1,16
C1	4,98	0,87	0,91	0,72	0,85	0,99	1,02
C2	4,32	1,15	0,69	0,82	0,96	1,31	0,81
C5	4,81	0,82	0,52	0,48	0,57	0,97	0,71
C8	6,26	0,96	1,18	0,99	1,06	0,97	1,23
C9	4,05	1,04	0,69	0,80	0,85	1,20	0,88
C10	5,56	1,23	0,72	0,86	0,95	1,33	0,75
C12	3,77	0,94	0,66	0,56	0,76	1,14	0,83
C13	6,12	1,05	0,91	0,82	0,91	1,12	0,93
C16	3,65	0,77	0,85	0,60	0,78	0,98	1,03
C17	6,72	1,49	0,92	1,13	1,21	1,54	0,82
C18	5,74	1,23	0,79	0,87	0,97	1,31	0,82
C20	4,66	0,88	0,45	0,51	0,60	1,03	0,65

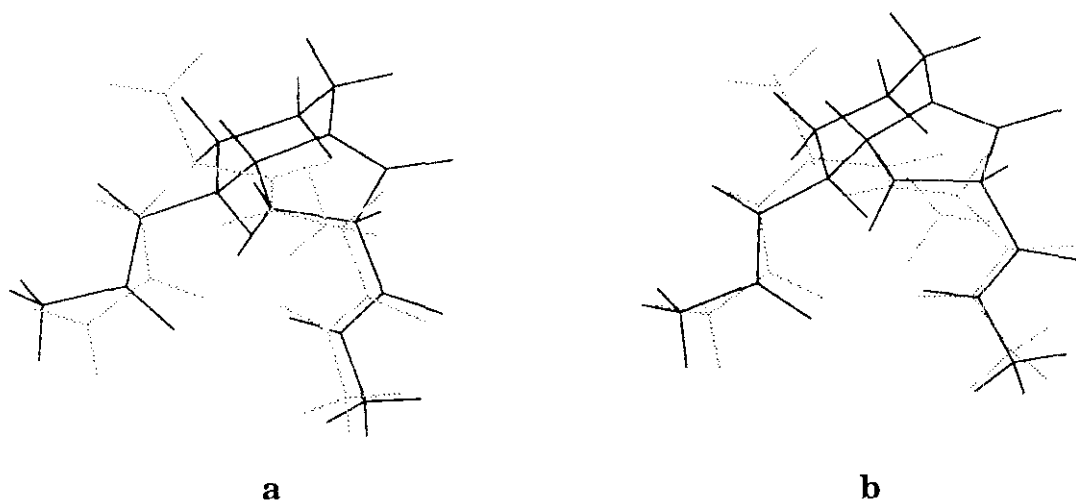


Figura 12. Superposición del conformero A11 (línea continua) con giros β ideales de tipo I (a) y III (b).

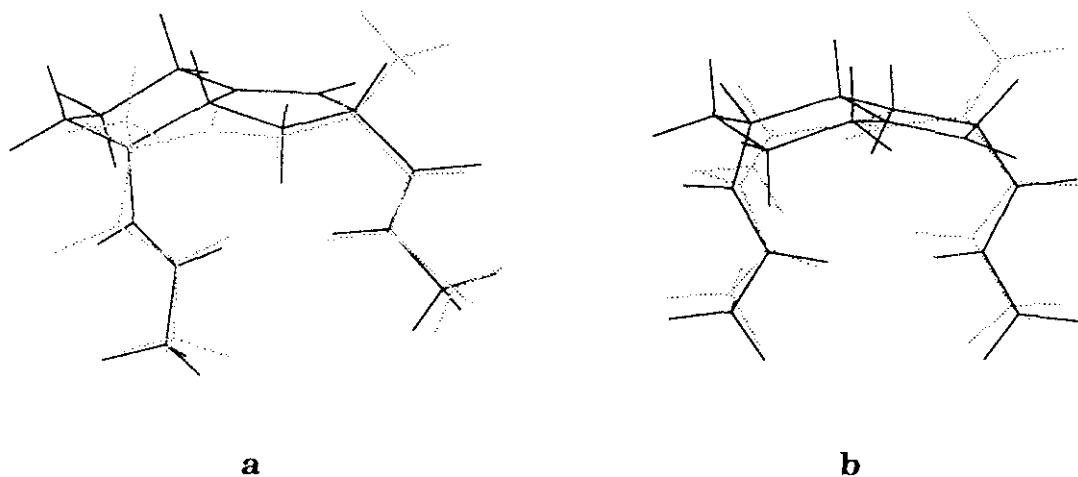


Figura 13. Superposición del conformero C5 (línea continua) con giros β ideales de tipo II (a) y I' (b).

En resumen, los derivados de 3-oxoindolizidina A y B, con disposición *trans* entre los sustituyentes en posiciones 8 y 8a, presentan capacidad moderada y nula, respectivamente, para inducir conformaciones de tipo

giro β . Únicamente un pequeño porcentaje de conformeros de la estructura A se asemeja a los giros β ideales de tipos I y III. Por el contrario, el isómero 8,8a-*cis*, C, mostró una gran tendencia a adoptar dos clases de conformaciones plegadas. Una primera clase originada por la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre los grupos 8-NH y 2-CO, y una segunda constituida por la adopción de conformaciones de giro β , especialmente de tipo II. Por tanto, estos resultados indican que el esqueleto de (2S,8S,8aS)-8-amino-3-oxoindolizidina-2-carboxilato se puede considerar como un nuevo mimético de este último tipo de giros β .

2.3. ANÁLOGOS CONFORMACIONALMENTE RESTRINGIDOS DE COLECISTOQUININA Y NEUROTENSINA

Una vez puestas a punto las vías sintéticas que permiten el acceso a los esqueletos fundamentales de 2,5-dicetopiperidina y 3-oxoindolizidina, se exploró su aplicación a la preparación de análogos conformacionalmente restringidos de péptidos de interés biológico. La colaboración que nuestro grupo de trabajo mantiene con el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra y con la empresa danesa Novo Nordisk A/S, interesados en el estudio de Colecistoquinina (CCK) y Neurotensina (NT), respectivamente, decantaron nuestra elección hacia estos neuropéptidos. Por otra parte, el hecho de que los fragmentos mínimos activos para estos péptidos estén constituidos por un número reducido de residuos de aminoácidos, podría facilitar, en principio, la preparación de los correspondientes análogos restringidos.

2.3.1. ANÁLOGOS CONFORMACIONALMENTE RESTRINGIDOS DE CCK

La CCK es una hormona peptídica ampliamente distribuida en el tracto gastrointestinal y en el sistema nervioso central ¹²⁵. A nivel periférico, la CCK estimula la contracción de la vesícula biliar, la secreción pancreática y la motilidad gastrointestinal. En el sistema nervioso central, donde actúa como neuromodulador y/o neurotransmisor, la CCK induce hipotermia, analgesia y estimula la liberación de las hormonas de la pituitaria, entre otros efectos. Por otra parte, la colocalización de la CCK en el cerebro con Dopamina (DA), Serotonina (5-HT), Encefalinas, GABA y aminoácidos excitatorios, parece indicar que este neuropéptido podría estar involucrado en la modulación de las acciones de estos neurotransmisores ¹²⁶⁻¹³⁰. Se ha demostrado también que tanto la administración central como periférica de CCK produce saciedad, sin que, por el momento, esté claro el mecanismo a través del cual ejerce este efecto.

La CCK se ha aislado en varias formas moleculares, denominadas CCK₅₈, CCK₃₉, CCK₃₃, CCK₈ y CCK₄, provenientes del procesamiento de un precursor común. La CCK₃₃, CCK₈ y CCK₄ son las formas predominantes a nivel periférico, mientras que en el cerebro se encuentra principalmente el octapéptido C-terminal, CCK₈ ¹²⁵.

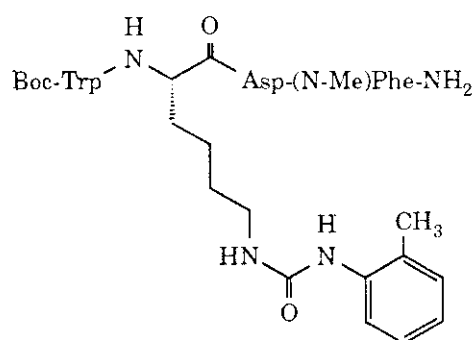


CCK₈

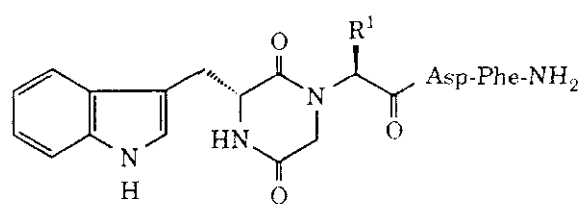
Las actividades biológicas de la CCK están mediadas por dos tipos diferentes de receptores, los receptores centrales CCK_B, ampliamente distribuidos en el cerebro y los receptores periféricos CCK_A, distribuidos en los órganos periféricos, aunque también están presentes en algunas regiones del cerebro ¹³¹. Sin embargo, la participación concreta de uno u otro tipo de receptor en las respuestas farmacológicas inducidas por la CCK mencionadas anteriormente, todavía no ha sido completamente elucidada o es materia de controversia. Teniendo en cuenta el rango de actividades biológicas de la CCK, la disponibilidad de agonistas y antagonistas potentes, altamente selectivos, metabólicamente estables y con propiedades farmacocinéticas adecuadas, podría tener una clara aplicación para el desarrollo de nuevos fármacos ¹³².

La aplicación de la estrategia general de diseño racional de peptidomiméticos, comentada en la introducción, y en la que se han utilizado como puntos de partida la CCK₇, fragmento mínimo activo a nivel periférico, y la CCK₄, H-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, estructura mínima necesaria para la activación de los receptores CCK_B, ha dado lugar a la preparación de agonistas y antagonistas potentes y selectivos, aunque la mayoría conservan gran parte del carácter peptídico inicial ¹³²⁻¹⁴³. Por otra parte, la optimización, mediante estudios de relaciones estructura-actividad, de compuestos surgidos a través del muestreo al azar ha conducido a antagonistas de gran interés, como los derivados benzodiazepínicos **2** y **3** ya comentados ^{14,15}.

Dentro de los agonistas basados en la estructura de la CCK₄ cabe destacar el compuesto A-71623 (**107**), agonista selectivo de los receptores CCK_A con propiedades anoréxicas similares a las inducidas por la CCK₈ ^{144,145}, y los derivados conformacionalmente restringidos **108**, agonistas selectivos de los receptores CCK_B ¹⁴⁶.



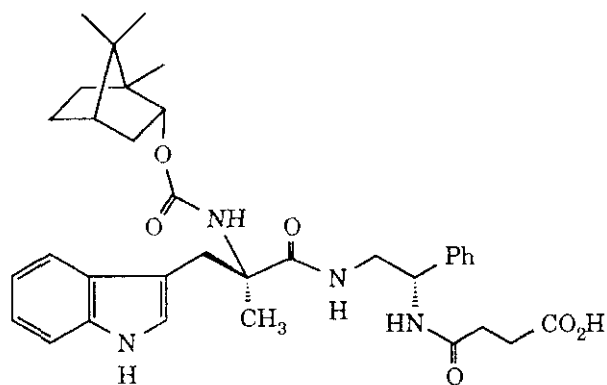
107



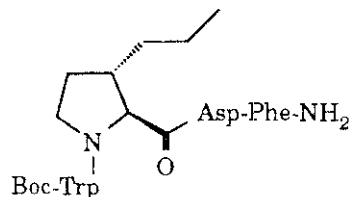
R¹ = n-Pr, n-Bu, ⁱBu

108

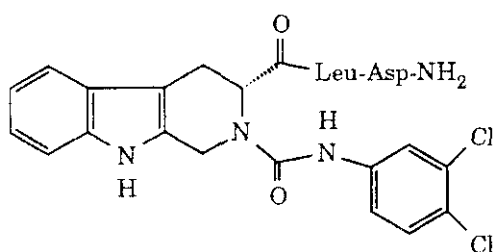
Por otra parte, los derivados **109**, **110** y **111** constituyen ejemplos representativos de antagonistas selectivos de los receptores CCK_B ¹⁴⁷⁻¹⁵², desarrollados tomando como modelo la secuencia peptídica de la CCK₄, mientras que el análogo tripeptídico **112** muestra propiedades antagonistas a nivel periférico ¹⁵³.



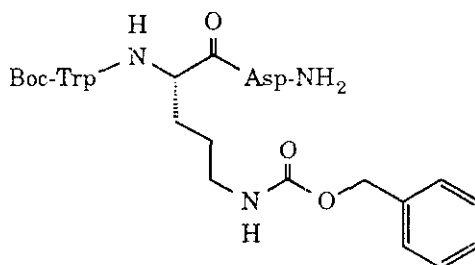
109



110



111

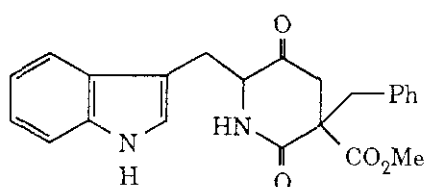


112

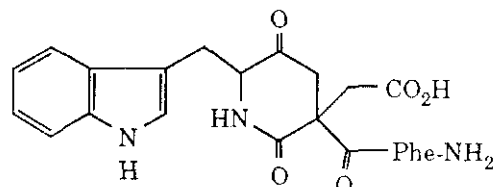
Tomando como antecedentes los estudios conocidos sobre la importancia de las cadenas laterales de los aminoácidos que integran la secuencia de la CCK₄ ¹³², los estudios conformacionales que indican la existencia de conformaciones plegadas para el tetrapéptido C-terminal de la CCK ^{154,155} y los ejemplos anteriormente expuestos, se han diseñado la serie de análogos de CCK₄ **56**, **113**, **114** y **115**, que incorporan anillos de 2,5-diketopiperidina y 3-oxoindolizidina adecuadamente sustituidos.

En los derivados **56** y **114** se ha reemplazado el fragmento Met-Asp por los esqueletos heterocíclicos señalados, mientras que en los análogos **113** y **115** únicamente se ha eliminado el residuo de Met, menos importante para la actividad, manteniendo la cadena lateral ácida del Asp, cuya contribución a la actividad de la CCK es más acusada.

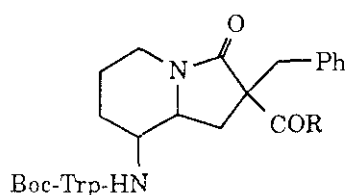
Teniendo en cuenta que la presencia y disposición espacial relativa de las cadenas laterales aromáticas de los residuos de Trp y Phe juegan un papel muy importante en el reconocimiento de los receptores de CCK, en todos los compuestos diseñados se han incorporado dichas cadenas laterales. Además, la introducción de restricciones conformacionales a distintos niveles podría ser de utilidad para intentar establecer los requisitos tridimensionales de las cadenas laterales presentes en estos derivados.



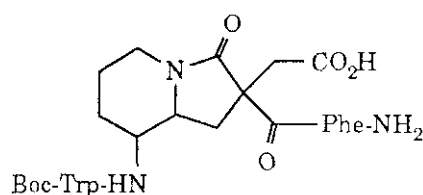
56



113



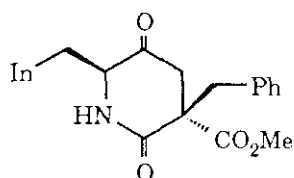
114 R = OCH₃, NH₂



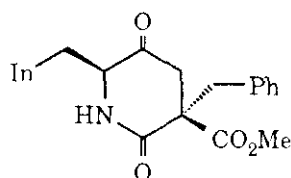
115

2.3.1.1. Análogos de CCK₄ derivados de 2,5-dicetopiperidinas

La síntesis de los compuestos **56a** y **56b**, en los que el anillo de 2,5-dicetopiperidina reemplaza al fragmento dipeptídico Met-Asp y que incorporan restricciones conformacionales tanto de la cadena lateral del Trp como de la Phe, está descrita en el capítulo 2.1.2. Estos compuestos fueron ensayados farmacológicamente en forma de éster metílico, ya que los intentos de obtener las amidas correspondientes, por tratamiento con NH₃/MeOH, dieron lugar a mezclas complejas de reacción.



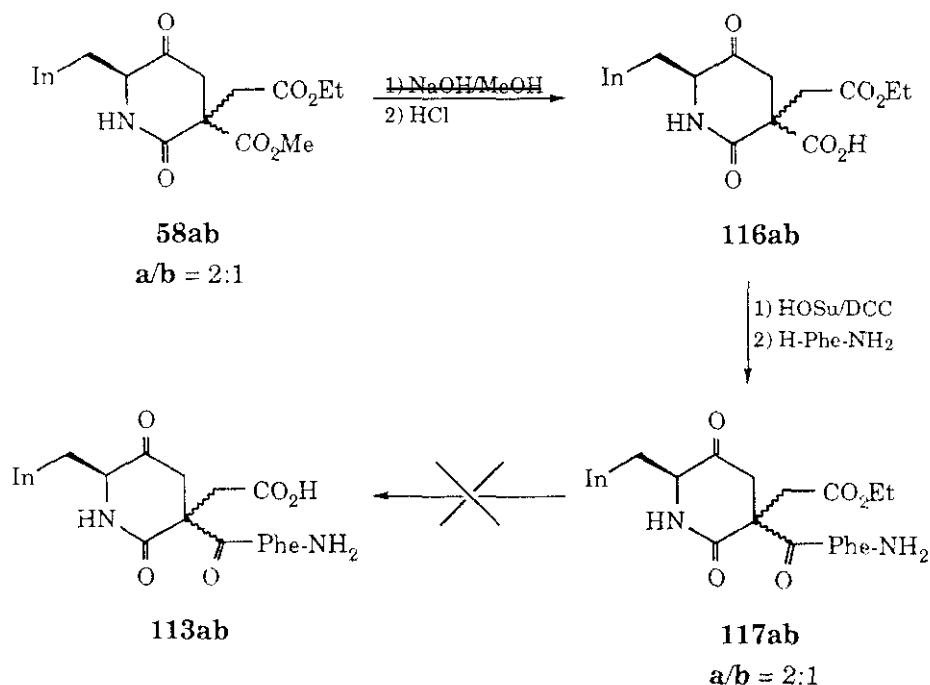
56a



56b

Para abordar la preparación de los derivados **113** se llevó a cabo, inicialmente, la secuencia de reacciones indicadas en el esquema 24. La formación del enlace peptídico, por el método del éster activo *N*-hidroxisuccinimídico ¹⁵⁶, entre el derivado carboxílico **116ab**, obtenido previamente por hidrólisis selectiva del éster metílico de **58ab**, y H-Phe-NH₂, condujo al compuesto **117ab**. Este derivado se obtuvo como una mezcla de dos diastereoisómeros en proporción 2:1, similar a la del producto de partida **58ab**. En el espectro de ¹H RMN de **117ab** se observa que el protón H-6 del isómero mayoritario aparece considerablemente apantallado con respecto al mismo protón del isómero minoritario ($\Delta\delta = 1,57$ ppm). Esta diferencia de desplazamiento químico indica que, en el isómero mayoritario, el protón H-6 y el anillo aromático del residuo de Phe se encuentran en disposición relativa *cis* y que, por tanto, la configuración absoluta de este isómero es (3*R*,6*S*).

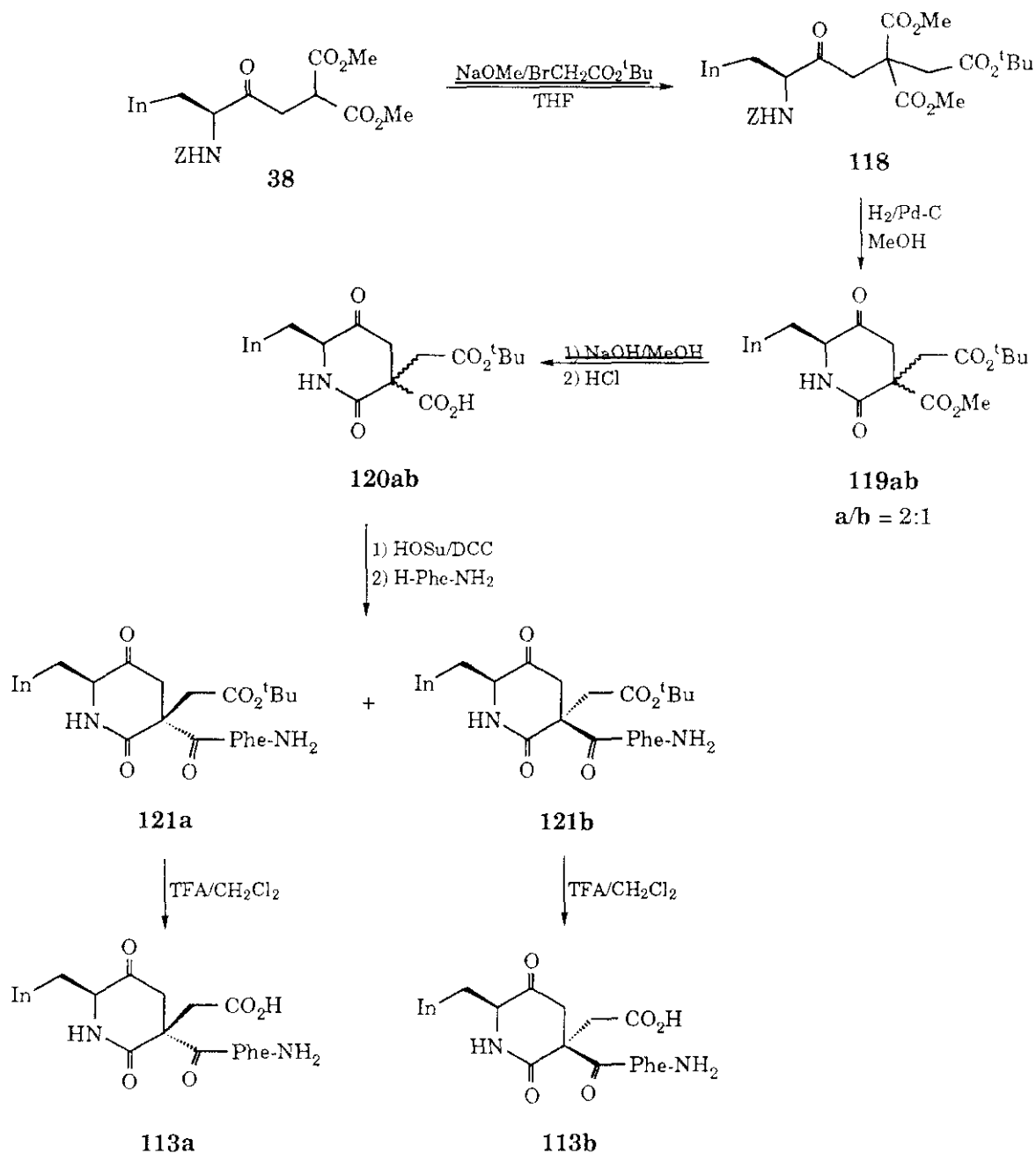
La saponificación del compuesto **117ab**, no condujo al derivado **113ab** esperado, sino que dio lugar a una mezcla compleja de reacción, probablemente debido a la epimerización de alguno de los centros quirales durante el tratamiento prolongado con NaOH.



Esquema 24

Para evitar este inconveniente, se preparó el derivado de 2,5-dicetopiperidina **119ab** (Esquema 25), en el que la cadena lateral del Asp está protegida en

forma de éster *tert*-butílico, lo que permite realizar la desprotección final en medio ácido. A partir de **119ab**, y siguiendo una secuencia de reacciones similar a la indicada para la obtención de **117ab**, se sintetizó el derivado tripeptídico **121ab**, constituido por una mezcla de dos diastereoisómeros en proporción 3:1, que fueron separados por cromatografía. La asignación de la configuración absoluta de los derivados **121a** y **121b** como (3*R*,6*S*) y (3*S*,6*S*), respectivamente, se efectuó siguiendo el mismo razonamiento que para los análogos etil sustituidos **117ab**.

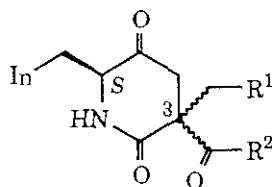


Esquema 25

Finalmente, la eliminación del grupo *tert*-butilo por tratamiento con TFA dio lugar a los análogos de CCK₄ buscados **113a** y **113b**, en los que la restricción conformacional se centra en las cadenas laterales del Trp y del Asp.

La capacidad de unión a los receptores CCK_A y CCK_B de los derivados que incorporan 2,5-dicetopiperidinas **56a**, **56b**, **113a** y **113b**, fue evaluada en homoge- neizados de páncreas y corteza cerebral de rata, utilizando [³H]-propionil-CCK₈ como marcador ¹⁵⁷ (Tabla 12). A efectos comparativos, en la tabla se incluyen también los datos correspondientes a la CCK₈, Boc-CCK₄ y a los antagonistas centrales **3** y **109**.

Tabla 12. Afinidades por los receptores CCK_A y CCK_B de los derivados de 2,5-dicetopiperidinas



Compuesto	R ¹	R ²	Config. C-3	IC ₅₀ ^a (μM)	
				Páncreas (CCK _A)	Cerebro (CCK _B)
56a	Ph	OMe	<i>S</i>	6,7	> 10
56b	Ph	OMe	<i>R</i>	88,0	> 10
113a	CO ₂ H	L-Phe-NH ₂	<i>R</i>	> 100	> 10
113b	CO ₂ H	L-Phe-NH ₂	<i>S</i>	50,0	> 10
CCK ₈				0,0006	0,006
Boc-CCK ₄ ^b				1,8	0,025
3				0,8	0,05
109				1,7	0,01

^a El valor de IC₅₀ representa la concentración capaz de producir una inhibición del 50% de la unión específica de la [³H]-propionil-CCK₈ a los receptores de CCK. Los valores indicados corresponden a la media de los obtenidos en tres experimentos separados.

^b Valores publicados en la referencia 151.

Los valores reflejados en la tabla indican que los análogos de CCK₄ derivados de 2,5-dicetopiperidinas presentan entre sí distinta afinidad por los receptores periféricos, que puede calificarse desde moderada a nula, careciendo de afinidad hacia los receptores CCK_B a concentraciones inferiores a 10⁻⁵ M. El compuesto más efectivo frente a los receptores CCK_A, **56a**, mostró afinidad micromolar, del mismo orden que la Boc-CCK₄. Si se comparan los resultados obtenidos con los diastereoisómeros **56a** y **56b**, se deduce que la disposición *cis* entre las cadenas laterales aromáticas en posiciones 3 y 6 del anillo de 2,5-dicetopiperidina, favorece la unión a los receptores CCK_A. Observación similar resulta de comparar los datos obtenidos para la pareja de diastereoisómeros **113a** y **113b**, en los que las cadenas laterales de Trp y Phe se encuentran en disposiciones *trans* y *cis*, respectivamente. En estos últimos derivados, la presencia de la cadena lateral del Asp no contribuye a mejorar los valores de afinidad, posiblemente debido a una disposición espacial inadecuada, tanto de la mencionada cadena lateral como del grupo fenilo del residuo de Phe.

Por otra parte, ninguno de los compuestos de esta serie fue capaz de inhibir la liberación de amilasa de los acinos pancreáticos inducida por la CCK₈¹⁵⁸, un ensayo funcional que da idea de la capacidad de los derivados evaluados para actuar como antagonistas periféricos.

Finalmente, las 2,5-dicetopiperidinas sintetizadas se ensayaron en preparaciones de músculo longitudinal-plexo mientérico de íleon de cobaya¹³⁰. En este tipo de ensayo la CCK₈ produce un efecto contráctil por estimulación de los receptores CCK_A, mientras que la CCK₄ contrae el íleon a través de la activación de los receptores CCK_B. Estas contracciones pueden ser inhibidas por antagonistas selectivos para uno u otro tipo de receptor y, por lo tanto, el ensayo se puede utilizar para evaluar la capacidad antagonista periférica o central de un compuesto dado. Los porcentajes de inhibición obtenidos para los compuestos **56a**, **56b**, **113a** y **113b**, en la contracción del íleon inducida por CCK₈ ó CCK₄ se recogen en la tabla 13.

Del análisis de estos datos hay que destacar que no existe una correlación clara entre los ensayos de unión al receptor y los de inhibición de la contracción del íleon. Este hecho podría atribuirse a posibles diferencias entre los receptores de distintas especies, rata y cobaya. Además, en el caso de los receptores CCK_B, no existe una evidencia molecular concluyente de la identidad de estos receptores en la periferia y en el cerebro. En cualquier caso, ninguno de los derivados ensayados presenta actividad antagonista significativa.

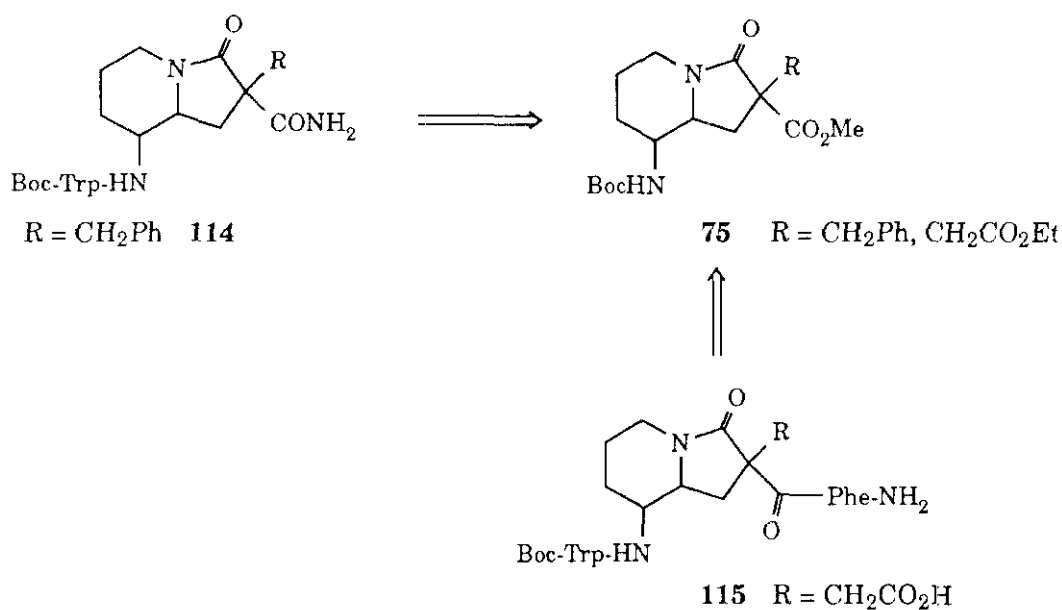
Tabla 13. Inhibición de la contracción inducida por la CCK en plexo mientérico de cobaya

Compuesto (10^{-5} M)	% de inhibición	
	CCK ₈ (10^{-8} M)	CCK ₄ (10^{-7} M)
56a	18,6 ± 5,7	27,8 ± 7,4
56b	+ 16,5 ± 8,0 ^a	+ 5,4 ± 6,6 ^a
113a	21,0 ± 7,5	+ 32,0 ± 19,9 ^a
113b	11,4 ± 7,5	+ 55,6 ± 22,3 ^a
3	85,1 ± 2,7	100
109	60,4 ± 4,8	79,7 ± 14,0

^a El signo + indica potenciación en vez de inhibición.

2.3.1.2. Análogos de CCK₄ portadores del esqueleto de 3-oxoindolizidina

Para la preparación de las series de análogos de CCK₄ representados por las fórmulas generales **114** y **115** se eligieron como productos de partida los derivados de 3-oxoindolizidina 2,2-disustituídos **75** (Esquema 26). La disponibilidad

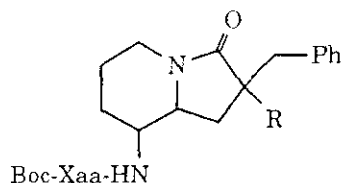


Esquema 26

de diferentes isómeros en el carbono asimétrico C-2, junto con la posibilidad de acoplar un resto de Trp de configuración L o D con el grupo NH-8, permitiría la obtención de derivados con diferentes disposiciones espaciales de las cadenas aromáticas del Trp y de la Phe. Con ello se pretende profundizar en el conocimiento de los requisitos tridimensionales de estas cadenas laterales aromáticas necesarios para la unión a los receptores CCK_A y/o CCK_B y para las actividades biológicas mediadas por dichos receptores.

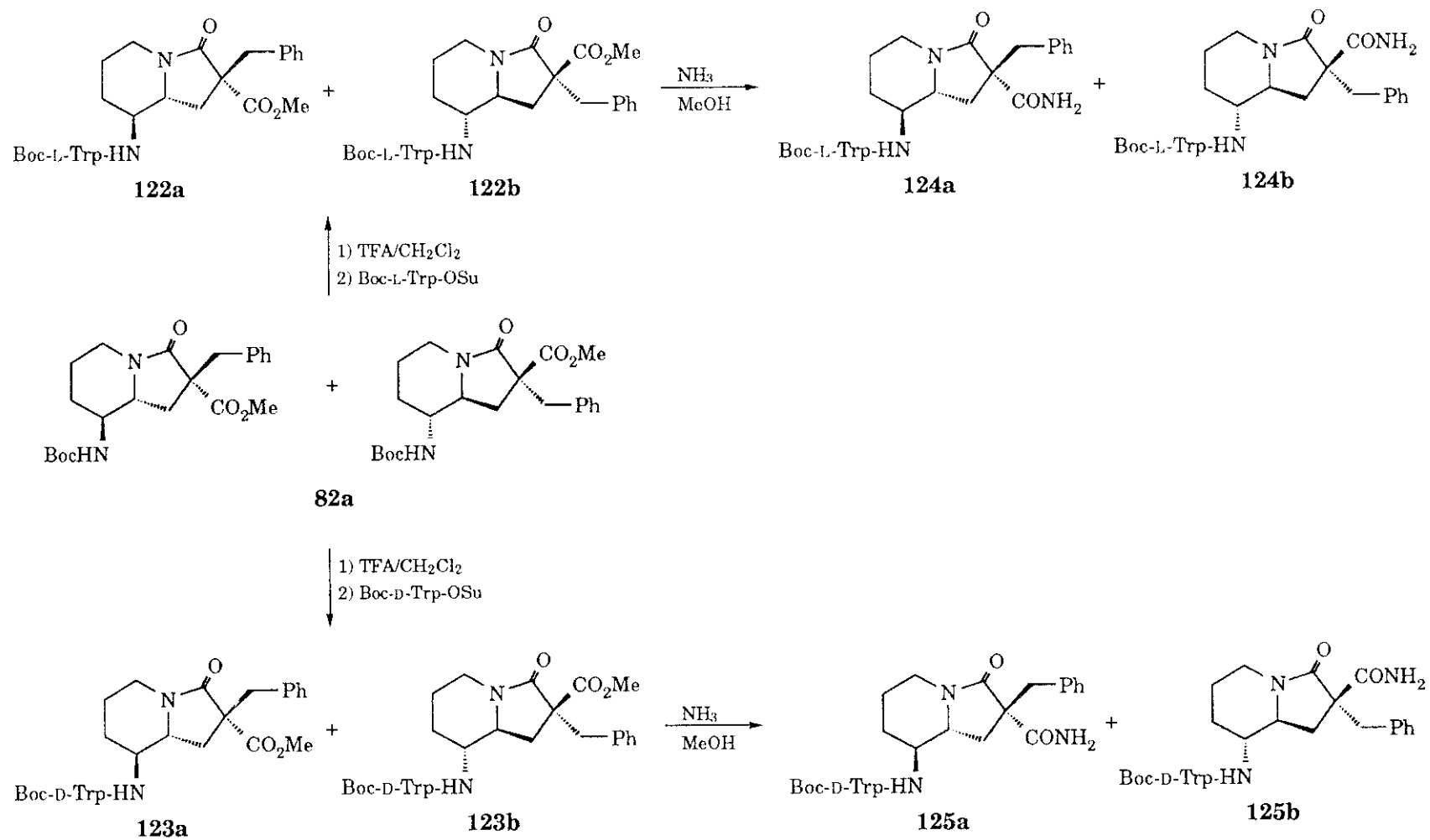
Según se indica en los esquemas 27 y 28, la obtención de los derivados **122**, **123**, **126** y **127** se llevó a cabo por tratamiento con TFA de las 3-oxoindolizidinas **82a** y **82b** y posterior formación del enlace peptídico con Boc-L-Trp ó Boc-D-Trp. Debido a la falta de enantioespecificidad con que se forman las 3-oxoindolizidinas de partida, estos triptofil derivados se obtienen como mezclas de dos diastereoisómeros en las proporciones indicadas en la tabla 14.

Tabla 14. Proporción de diastereoisómeros en los derivados de 3-oxoindolizidina de fórmula general

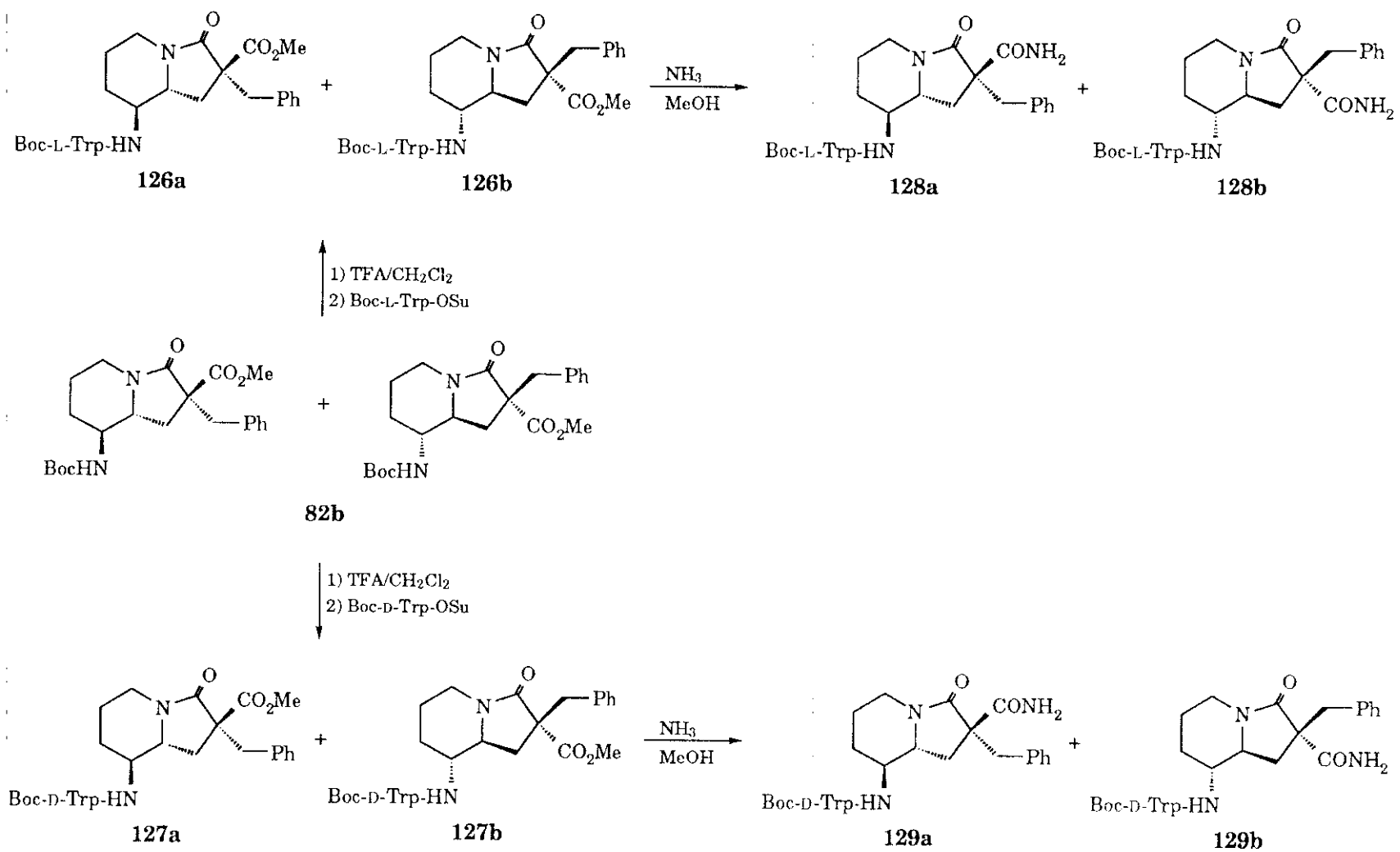


Compuesto	Xaa	R	Configuración 2,8,8a		Proporción de diastereoisómeros a/b ^a
			a	b	
122ab	L-Trp	CO ₂ Me	<i>RSR</i>	<i>SRS</i>	10:1
124ab	L-Trp	CONH ₂	<i>SSR</i>	<i>RRS</i>	10:1
123ab	D-Trp	CO ₂ Me	<i>RSR</i>	<i>SRS</i>	10:1
125ab	D-Trp	CONH ₂	<i>SSR</i>	<i>RRS</i>	10:1
126ab	L-Trp	CO ₂ Me	<i>SSR</i>	<i>RRS</i>	4:1
128ab	L-Trp	CONH ₂	<i>RSR</i>	<i>SRS</i>	4:1
127ab	D-Trp	CO ₂ Me	<i>SSR</i>	<i>RRS</i>	3:1
129ab	D-Trp	CONH ₂	<i>RSR</i>	<i>SRS</i>	3:1

^a Determinada por HPLC.



Esquema 27

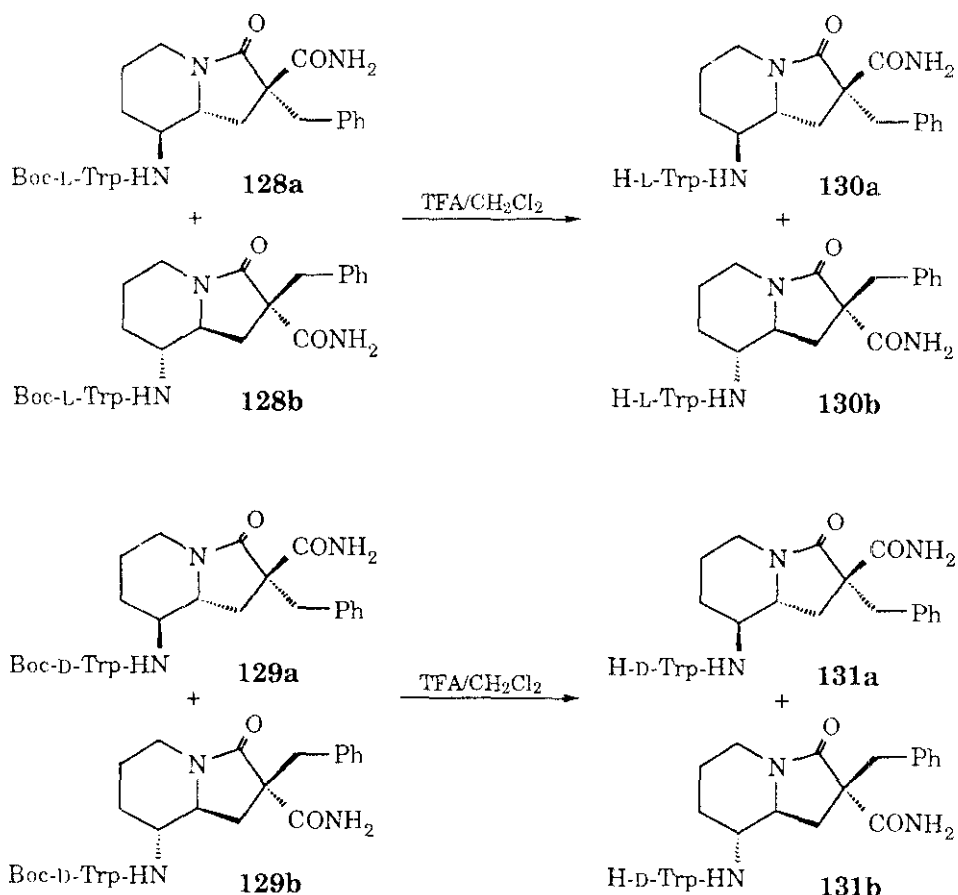


Esquema 28

Como era de esperar, los espectros de ^1H RMN de los isómeros **122a**, **122b**, **126a** y **126b** son idénticos a los de sus enantiómeros **123b**, **123a**, **127b** y **127a**, respectivamente. El tratamiento de los compuestos **122**, **123**, **126** y **127** con NH_3/MeOH condujo a las amidas **124**, **125**, **128** y **129** correspondientes, constituidas también por mezclas de dos diastereoisómeros en proporciones idénticas a las de los ésteres de partida.

Las diferencias en las proporciones de diastereoisómeros observadas para estos derivados podrían ser debidas a la utilización de diferentes partidas de las 3-oxoindolizidinas **82a** y **82b**, o a un problema de resolución cinética durante la condensación con Trp, o bien a una combinación de ambos factores.

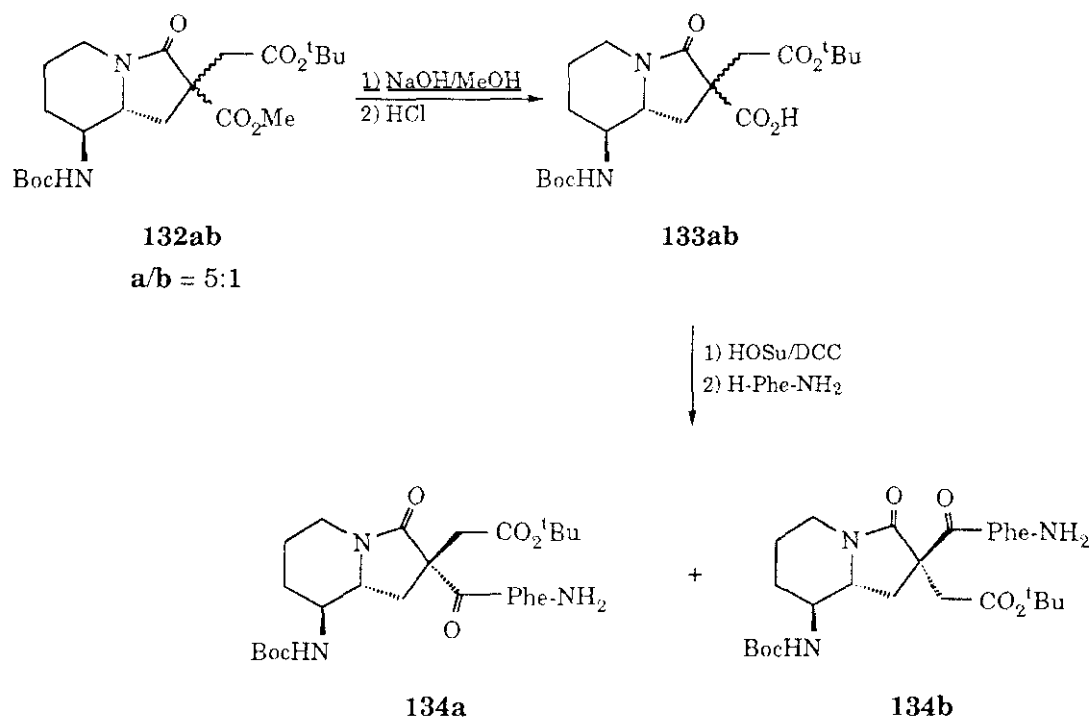
Con objeto de estudiar la influencia del grupo protector Boc en la actividad de estos derivados, se procedió a la *N*-desprotección de los compuestos **128ab** y **129ab** (Esquema 29). Se obtuvieron así las mezclas de diastereoisómeros desprotegidos **130ab** y **131ab**, que pudieron ser separados por HPLC semipreparativo.



Esquema 29

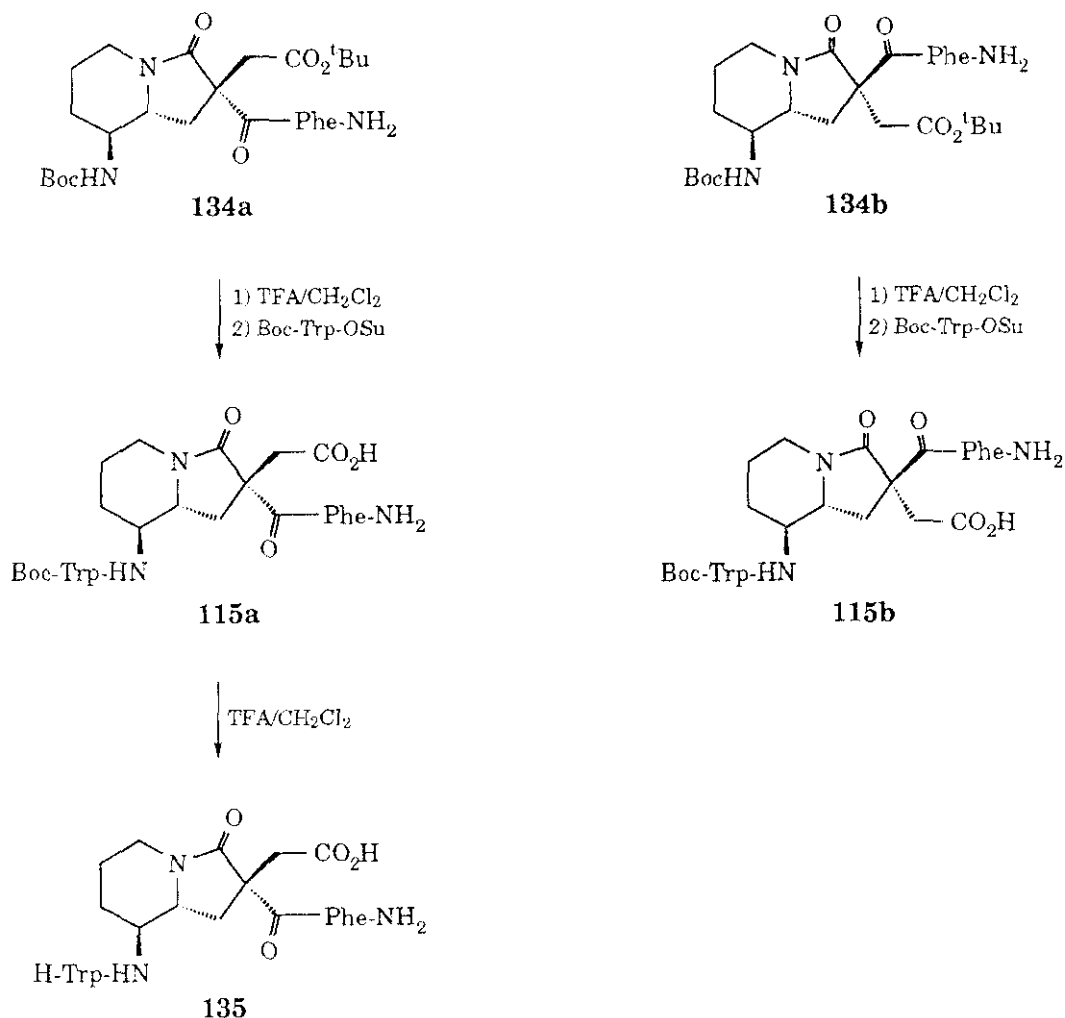
Lógicamente, los espectros de ^1H RMN de **130a** y **131b**, por una parte, y **130b** y **131a**, por otra, son coincidentes, mientras que los valores del poder óptico rotatorio son idénticos y de signo contrario para cada pareja.

Para la preparación de los análogos de CCK_4 **115** se intentó en primer lugar la saponificación selectiva del éster metílico del diéster **84ab** mediante tratamiento con un equivalente de NaOH. Sin embargo, este tratamiento condujo a una mezcla constituida por el producto de partida y los derivados carboxílicos procedentes de la monosaponificación tanto del éster metílico como del etílico. Para evitar esta falta de selectividad se llevó a cabo la saponificación en el diéster análogo **132ab**, obtenido por alquilación del correspondiente derivado 2-monosustituido **73**, en el que el resto de acetato de etilo de **84ab** se ha sustituido por el de acetato de *tert*-butilo (Esquema 30). La reacción de acoplamiento peptídico del ácido carboxílico **133ab** con H-Phe-NH₂ condujo a una mezcla 6,6:1 de los diastereoisómeros **134a** y **134b**, que pudieron ser separados por cromatografía. Cada uno de estos derivados, según se aprecia en el espectro de ^1H RMN, está impurificado con una pequeña cantidad del diastereoisómero proveniente de la mezcla enantiomérica de la 3-oxoindolizidina de partida.



Esquema 30

Finalmente, los análogos de CCK **115a** y **115b** se obtuvieron por tratamiento de **134a** y **134b** con TFA, seguido de acoplamiento con el éster *N*-hidroxisuccinimídico de Boc-L-Trp (Esquema 31). El tratamiento con TFA del derivado **115a** condujo al correspondiente análogo desprotegido **135**.



Esquema 31

La asignación de la configuración absoluta de estos análogos de CCK se realizó por medio de experimentos de NOE bidimensional (ROESY). El compuesto **115a** muestra fuertes NOEs entre los protones H-8a y H-1 α , H-1 α y 2-CH₂, y H-8 y H-1 β , lo que indica que el protón H-8a y el resto de Asp en posición 2 se encuentran en disposición relativa *cis*. Por el contrario, para el isómero **115b** los protones del grupo 2-CH₂ muestran NOE con el protón H-1 β , al igual que el H-8, indicando que el protón H-8 y el sustituyente alquílico de la posición 2 se disponen del mismo lado del anillo de 3-oxoindolizidina (Figura 14).

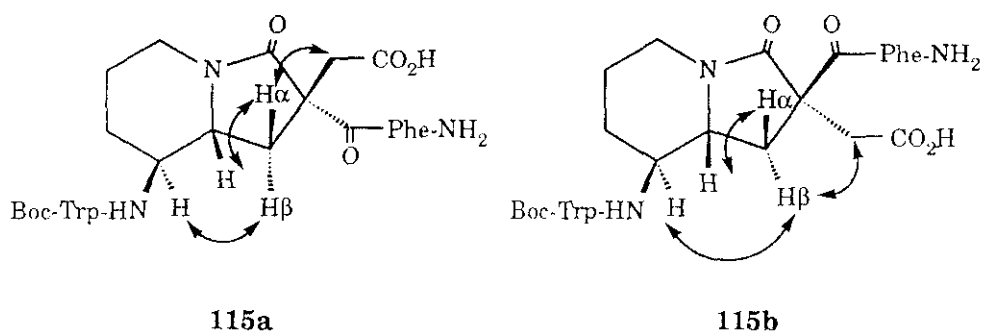


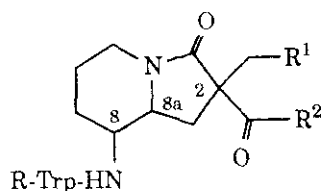
Figura 14. NOEs más significativos observados para los compuestos **115a** y **115b**.

Los valores de afinidad por los receptores CCK_A y CCK_B de los derivados de 3-oxoindolizidina sintetizados se recogen en la tabla 15, junto con los obtenidos para los compuestos de referencia.

Dentro de los análogos conformacionalmente restringidos de CCK₄ en los que se sustituye el fragmento dipeptídico Met-Asp por un resto de 3-oxoindolizidina, los derivados en los que el grupo 2-bencilo y el residuo de Trp se sitúan del mismo lado del anillo de 3-oxoindolizidina presentan mayores afinidades por los receptores CCK_B que por los periféricos. Si se comparan los compuestos **123** y **125** se observa que la sustitución del éster metílico por amida conduce al aumento de un orden de magnitud en la capacidad de unión a los receptores CCK_B. Se produce un resultado similar con la sustitución de L-Trp por D-Trp, como se deduce de la comparación de los valores de afinidad obtenidos para los compuestos **124** y **125**. Por el contrario, cuando el grupo 2-bencilo y el residuo de Trp se encuentran en lados contrarios de la molécula, se observa selectividad por los receptores CCK_A, obteniéndose afinidades de rango micromolar. En este caso, la introducción de Boc-L-Trp en la posición 8 del anillo de 3-oxoindolizidina condujo a mejores resultados (**126**) que la incorporación de Trp de configuración D (**127**). Nuevamente se obtienen mejores afinidades para los carboxamido derivados (ver compuestos **126** y **128**). En esta serie de compuestos la eliminación del grupo Boc dio lugar a la pérdida de afinidad, indicando la importancia del grupo hidrofóbico en la posición N^α del Trp, de manera análoga a la descrita para otros derivados de CCK₄ ¹⁴⁷⁻¹⁵⁰.

Por otra parte, la introducción de la cadena lateral del Asp en la posición 2 del anillo de 3-oxoindolizidina condujo a compuestos inefectivos para ambos receptores.

Tabla 15. Afinidades por los receptores CCK_A y CCK_B
de los derivados de 3-oxoindolizidina



Compuesto	R	R ¹	R ²	Configuración ^a		Proporción a/b	IC ₅₀ (μM) ^b	
				Trp	2,8,8a		CCK _A	CCK _B
123ab	Boc	Ph	OCH ₃	D	<i>RSR</i> (<i>SRS</i>)	10:1	> 10	4,3
124ab	Boc	Ph	NH ₂	L	<i>SSR</i> (<i>RRS</i>)	10:1	> 10	3,9
125ab	Boc	Ph	NH ₂	D	<i>SSR</i> (<i>RRS</i>)	10:1	> 10	0,7
126ab	Boc	Ph	OCH ₃	L	<i>SSR</i> (<i>RRS</i>)	4:1	9,2	> 10
127ab	Boc	Ph	OCH ₃	D	<i>SSR</i> (<i>RRS</i>)	3:1	> 10	> 10
128ab	Boc	Ph	NH ₂	L	<i>RSR</i> (<i>SRS</i>)	4:1	3,9	> 10
130a	H	Ph	NH ₂	L	<i>RSR</i>	—	> 100	> 100
130b	H	Ph	NH ₂	L	<i>SRS</i>	—	> 100	> 100
115a	Boc	CO ₂ H	L-Phe-NH ₂	L	<i>SSR</i>	—	> 10	> 10
115b	Boc	CO ₂ H	L-Phe-NH ₂	L	<i>RSR</i>	—	> 10	> 10
135	H	CO ₂ H	L-Phe-NH ₂	L	<i>SSR</i>	—	> 10	> 10
CCK ₈							0,0006	0,006
Boc-CCK ₄ ^c							1,8	0,025
3							0,8	0,05
109							1,7	0,01

^a Las configuraciones indicadas entre paréntesis corresponden a las del diastereoisómero minoritario presente en la mezcla.

^b El valor de IC₅₀ representa la concentración capaz de producir una inhibición del 50% de la unión específica de la [³H]-propionil-CCK₈ a los receptores de CCK. Los valores indicados corresponden a la media de los obtenidos en tres experimentos separados.

^c Valores publicados en la referencia 151.

En el ensayo de liberación de amilasa de los acinos pancreáticos inducida por CCK₈, el derivado **128ab** inhibió, a una concentración 10⁻⁵ M, la liberación de esta enzima en un 70%. Por lo tanto, el compuesto **128** actúa como antagonista periférico.

La capacidad antagonista de los derivados de 3-oxoindolizidina que habían mostrado afinidades a concentraciones inferiores a 10⁻⁵ M fue evaluada en el ensayo de músculo longitudinal-plexo mientérico de fleon de cobaya (Tabla 16). En este ensayo, los compuestos **126ab** y **128ab** inhibieron la contracción del fleon mediada por los receptores periféricos en porcentajes del 70 y 88%, respectivamente, en consonancia con sus afinidades por dichos receptores. Este resultado está de acuerdo con el obtenido para **128** en el ensayo de liberación de amilasa comentado anteriormente. Se confirma así que estos derivados son antagonistas periféricos, aunque con actividad moderada.

Los D-triptofil-3-oxoindolizidina derivados **123** y **125** no inhibieron significativamente las contracciones del fleon inducidas por la CCK₄, aunque sus afinidades por los receptores centrales son aceptables.

Tabla 16. Inhibición de la contracción inducida por la CCK en plexo mientérico de cobaya

Compuesto (10 ⁻⁵ M)	% de inhibición	
	CCK ₈ (10 ⁻⁸ M)	CCK ₄ (10 ⁻⁷ M)
123ab	25,3 ± 4,2	19,3 ± 0,5
124ab	52,6 ± 7,3	+ 44,1 ± 22,0 ^a
125ab	2,9 ± 7,4	+ 0,8 ± 4,2 ^a
126ab	70,0 ± 6,0	26,1 ± 2,3
128ab	88,2 ± 3,2	+ 17,0 ± 1,5 ^a
130a	27,2 ± 7,3	1,6 ± 11,9
130b	+ 5,6 ± 5,3 ^a	+ 16,7 ± 10,8 ^a
3	85,1 ± 2,7	100
109	60,4 ± 4,8	79,7 ± 14,0

^a El signo + indica potenciación en lugar de inhibición.

La capacidad antagonista periférica del compuesto **124**, capaz de inhibir en un 52% las contracciones del íleon inducidas por CCK₈, no tiene una explicación clara, ya que su afinidad por los receptores CCK_A es muy baja.

Finalmente, la disminución de la potencia antagonista de los derivados **130a** y **130b**, análogos de **128ab**, en los que se ha eliminado el grupo protector Boc, está de acuerdo con la pérdida de afinidad mostrada por estos compuestos.

Teniendo en cuenta que los derivados **123-128** están constituidos por mezclas de diastereoisómeros es difícil establecer relaciones estructura tridimensional-actividad biológica, especialmente en el caso de los tres últimos compuestos donde la proporción de isómeros es más parecida y la contribución del isómero minoritario podría ser más importante. En cualquier caso, el compuesto **128**, un antagonista moderado de los receptores CCK_A, y el derivado **125**, con afinidad 10^{-7} M por los receptores centrales, podrían constituir la base para la preparación de nuevos análogos más potentes y selectivos. Asimismo, en aquellos compuestos de mayor interés, queda pendiente la resolución de las parejas de diastereoisómeros, que sería de gran ayuda para llegar a establecer cuál o cuáles de las muchas disposiciones espaciales de las cadenas aromáticas favorecen la interacción con los diferentes tipos de receptores.

2.3.2. ANÁLOGOS CONFORMACIONALMENTE RESTRINGIDOS DE NT

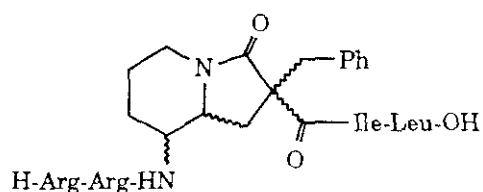
La Neurotensina (NT), H-Pyr-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH, es un tridecapéptido con un extenso perfil farmacológico que incluye acciones tanto en el sistema nervioso periférico como en el central^{159,160}. La administración periférica de NT induce hipotensión, incrementa la permeabilidad vascular y estimula la contracción intestinal. A nivel del sistema nervioso central la NT ejerce potentes acciones de hipotermia y analgesia. Además, este neuropéptido actúa como modulador de la transmisión dopaminérgica y podría tener importantes implicaciones en la etiología de la esquizofrenia y de la enfermedad de Parkinson.

Los estudios de relaciones estructura-actividad biológica han permitido establecer los requisitos estructurales necesarios para la interacción NT-receptor(es)¹⁶¹⁻¹⁶⁵, habiéndose determinado que el hexapéptido C-terminal de la NT, NT₈₋₁₃ (H-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH), es el fragmento mínimo capaz de unirse a los receptores de NT y de expresar la totalidad de las acciones biológicas de este neuropéptido¹⁶⁴. Sin embargo, la existencia o no de diferentes subtipos de

receptores no está todavía bien establecida ¹⁶⁶. Este hecho se debe, principalmente, a la falta de antagonistas específicos y de análogos de NT metabólicamente estables, que constituyen las herramientas necesarias para la caracterización tanto de los receptores como de las implicaciones fisiológicas específicas de dicho neuropéptido.

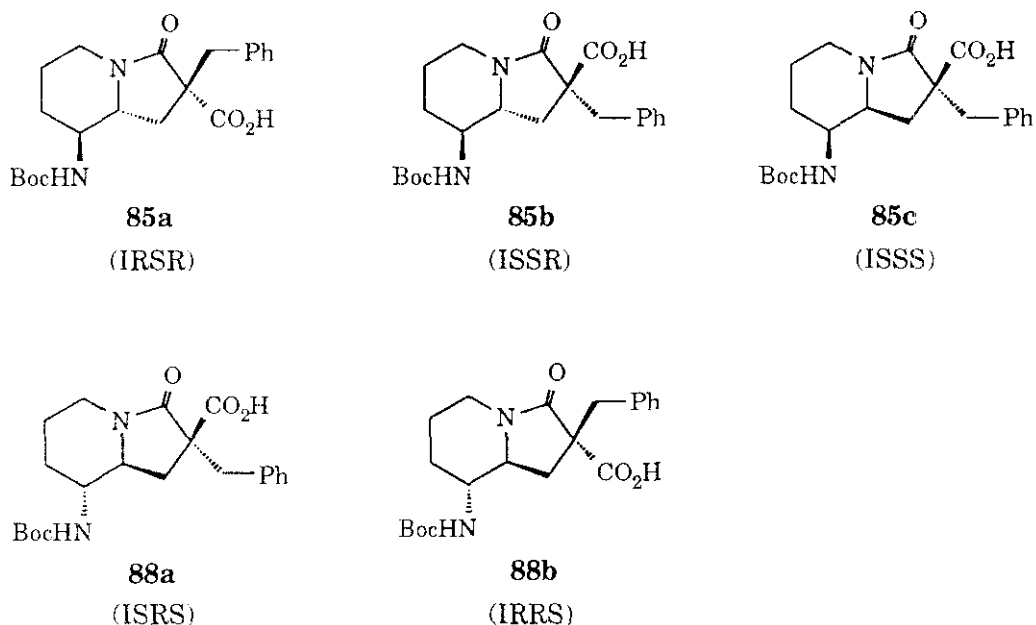
Teniendo en cuenta que la prolina es uno de los residuos que más frecuentemente entran a formar parte de los giros β ¹²⁰, y que la sustitución de la Pro¹⁰ en la NT por D-Pro o por Gly conlleva una disminución acusada de la actividad ¹⁶⁴, diversos autores han postulado que la importancia de este residuo está directamente relacionada con la adopción de conformaciones de tipo giro inverso ^{167,168}. Sin embargo, los análisis conformacionales llevados a cabo con la NT y sus fragmentos activos no han contribuido a esclarecer este punto, ya que, mientras en disolución se puede descartar la existencia de estructuras secundarias concretas ^{169,170}, algunos estudios de cálculos de energía indican la presencia de un giro β de tipo I constituido por el fragmento Arg-Pro-Tyr-Ile ^{167,171}.

Con objeto de intentar aportar nuevos datos acerca de la conformación bioactiva de este neuropéptido, y dentro del marco de colaboración que nuestro grupo de trabajo mantiene con la compañía Novo-Nordisk A/S, se consideró de interés la preparación de una serie de análogos conformacionalmente restringidos de NT₈₋₁₃ de fórmula general **136**. En estos derivados, el dipéptido Pro¹⁰-Tyr¹¹ se sustituyó por esqueletos de 3-oxoindolizidina 2-bencil sustituida con diferentes estereoquímicas, capaces de inducir restricciones conformacionales de índole diversa. Por facilidad sintética, se reemplazó la cadena lateral de la Tyr por Phe, dado que esta sustitución no modifica sustancialmente la actividad de la NT₈₋₁₃.



136

Como derivados de 3-oxoindolizidina de partida para la preparación de los análogos de NT₈₋₁₃ **136**, se utilizaron los compuestos **85a**, **85b**, **85c**, **88a** y **88b**, previamente preparados (Apartado 2.2.2).



I = 8-amino-2-bencil-3-oxoindolizidina-2-carboxilato. Las tres letras siguientes a la letra I indican la configuración de C-2, C-8 y C-8a, respectivamente.

A partir de estos derivados de 2-bencil-3-oxoindolizidina-2-carboxilato, el Dr. Nils L. Johansen (Novo-Nordisk) abordó la síntesis de los derivados hexapeptídicos conformacionalmente restringidos [IRSR^{10,11}]NT₈₋₁₃ (**136a**), [ISSR^{10,11}]NT₈₋₁₃ (**136b**), [ISSS^{10,11}]NT₈₋₁₃ (**136c**), [ISRS^{10,11}]NT₈₋₁₃ (**136d**) e [IRRS^{10,11}]NT₈₋₁₃ (**136e**), utilizando la metodología de péptidos en fase sólida y siguiendo la estrategia Boc/Bzl. En concreto, se utilizó una resina PAM [4-(hidroximetil)fenilacetamidometil resina] como soporte sólido, las cadenas laterales de los residuos de Arg se protegieron en forma de tosilato y los acoplamiento de los diferentes Boc-aminoácidos se realizaron con los correspondientes ésteres de *N*-hidroxibenzotriazol, previamente formados. Para la introducción de los derivados de 3-oxoindolizidinas se empleó BOP como agente de condensación. Finalmente, la separación de los péptidos de la resina y la eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales, por tratamiento con HF, condujo, tras purificación por RP-HPLC, a los derivados **136a-136e** buscados.

Teniendo en cuenta que cada una de las 3-oxoindolizidinas de partida estaba compuesta por una mezcla de enantiómeros, todos los crudos de reacción obtenidos mostraron la existencia de dos derivados hexapeptídicos diastereoisómeros (Tabla 17).

Tabla 17. Proporción de diastereoisómeros obtenidos en la síntesis de los análogos restringidos de NT₈₋₁₃

Producto de partida	Proporción de enantiómeros ^a	producto final	Proporción de diastereoisómeros ^b
85a + 88a	6:1	136a + 136d	9:1
85b + 88b	6:1	136b + 136e	2,5:1
85a + 88a	1:5	136a + 136d	1:3,2
85b + 88b	1:5	136b + 136e	1:8,7

^a Medida por HPLC a partir de los correspondientes análogos derivatizados con MTPA (Apartado 2.2.3).

^b Medida por HPLC en los crudos de reacción.

Las diferencias en las proporciones de diastereoisómeros de los análogos peptídicos finales cuando los productos de partida presentan excesos enantioméricos idénticos, indican nuevamente la existencia de problemas de resolución cinética, tal y como se había puesto de manifiesto en las reacciones de derivatización de las indolizidinas con MTPA. A partir de estos resultados se puede concluir que las indolizidinas **85a** (IRSR) y **88b** (IRRS), ambas de configuración *R* en C-2, reaccionan más rápidamente que sus respectivos enantiómeros **88a** (ISRS) y **85b** (ISSR). Esta diferencia podría atribuirse a un empaquetamiento mayor entre el grupo 2-bencilo y la cadena lateral de la Ile en el caso de las 2*S*-indolizidinas que dificulte la reacción de estos derivados con el fragmento dipeptídico H-Ile-Leu-Resina.

El derivado hexapeptídico correspondiente a la indolizidina de configuración (2*R*,8*R*,8*aR*), enantiómera de **85c**, no pudo ser aislado ya que, por una parte, al ser **85c** el isómero minoritario se trabajaba con pequeñas cantidades y, por otra, existía un pequeño problema de contaminación del compuesto **85c** con el derivado **85a**, debido a la dificultad de separación cromatográfica de sus respectivos compuestos precursores **82c** y **82a**.

Los derivados **136a-136e** fueron caracterizados mediante sus datos analíticos y espectroscópicos, como se detallará en el capítulo correspondiente de la parte experimental.

Los resultados de afinidad por los receptores centrales de NT¹⁷² de los análogos conformacionalmente restringidos incluidos en este capítulo se recogen

en la tabla 18. A efectos comparativos, se incluyen también los datos correspondientes a la NT₈₋₁₃ y sus análogos [Phe¹¹]NT₈₋₁₃ y [Ala¹¹]NT₈₋₁₃.

Tabla 18. Afinidad por los receptores de NT de los análogos 136a-136e

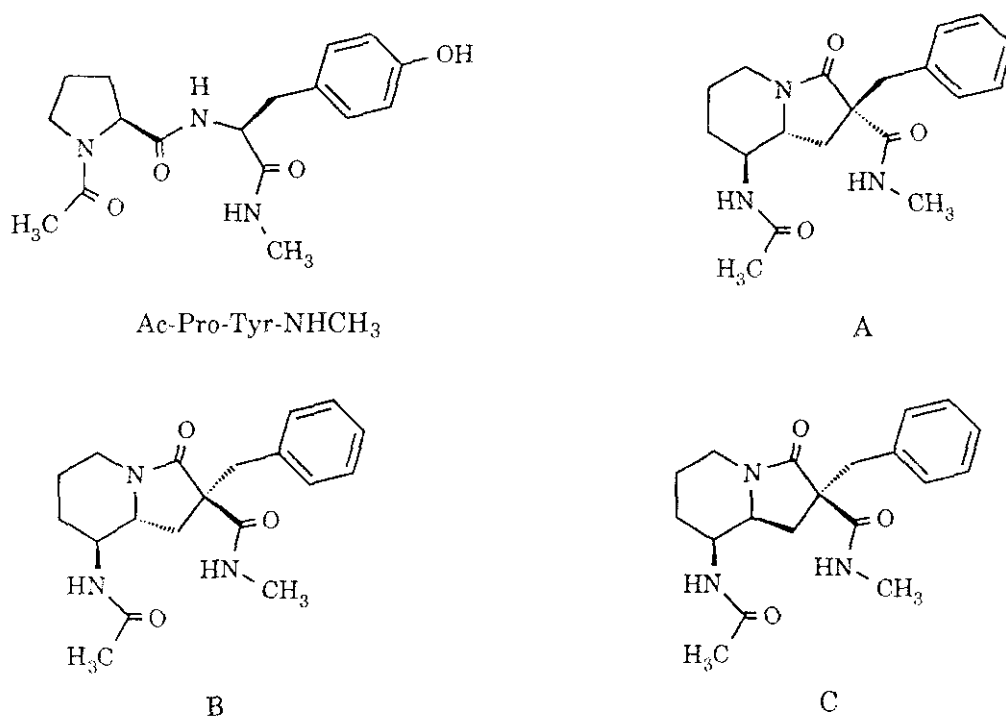
Compuesto		IC ₅₀ (nM) ^a
136a	H-Arg-Arg- IRSR -Ile-Leu-OH	267 ± 79
136b	H-Arg-Arg- ISSR -Ile-Leu-OH	279 ± 129
136c	H-Arg-Arg- ISSS -Ile-Leu-OH	>10000
136d	H-Arg-Arg- ISRS -Ile-Leu-OH	200 ± 62
136e	H-Arg-Arg- IRRS -Ile-Leu-OH	342 ± 127
[Ala ¹¹]NT ₈₋₁₃	H-Arg-Arg-Pro- Ala -Ile-Leu-OH	223 ± 70
[Phe ¹¹]NT ₈₋₁₃	H-Arg-Arg-Pro- Phe -Ile-Leu-OH	39 ± 19
NT ₈₋₁₃	H-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH	10 ± 7

^a Los valores de IC₅₀ indican la concentración a la cual se produce un 50% de inhibición de la unión específica de [³H]-NT a homogeneizados de corteza de cerebro de rata. Estos valores corresponden a la media de al menos tres experimentos realizados por separado.

Como se deduce de los datos de la tabla, los compuestos **136a-136b** y **136d-136e**, en los que el dipéptido Pro-Tyr ha sido reemplazado por derivados de 3-oxo-indolizidinas de configuración (8*S*,8*aR*) y (8*R*,8*aS*), respectivamente, resultaron equipotentes entre sí y aproximadamente un orden de magnitud menos afines por los receptores de NT que el fragmento mínimo activo NT₈₋₁₃ y su análogo [Phe¹¹]NT₈₋₁₃. Sin embargo, el derivado **136c**, con disposición *cis* entre los sustituyentes en posiciones 8 y 8*a* del anillo de indolizidina, fue inactivo a una concentración de 10⁻⁵ M. Estos resultados parecen indicar que, mientras la estereoquímica en C-2 no tiene influencia en la unión a los receptores de NT, la disposición 8,8*a-trans* juega un papel importante en dicha unión. Por lo tanto, las restricciones conformacionales inducidas por las 3-oxoindolizidinas 8,8*a-trans* en los análogos de NT₈₋₁₃ se ajustan mejor a los requisitos topográficos de los receptores que las inducidas por el derivado 8,8*a-cis*. La disminución en un orden de magnitud de la afinidad de los análogos conformacionalmente restringidos **136a**, **136b**, **136d** y **136e**, con respecto a la NT₈₋₁₃ y [Phe¹¹]NT₈₋₁₃, podría deberse a que las cadenas laterales de los diferentes aminoácidos de estos derivados no puedan adoptar en su conjunto las disposiciones espaciales más favorables para

la interacción con los receptores de NT. Teniendo en cuenta que los valores de IC_{50} obtenidos para estos análogos son similares al del derivado $[Ala^{11}]NT_{8-13}$, otra posible explicación, en términos conformacionales, a la disminución de afinidad podría particularizarse en una disposición espacial inadecuada del grupo 2-bencilo, que impediría su interacción con la cavidad hidrofóbica correspondiente al residuo de Tyr¹¹ en el mencionado receptor.

Para intentar profundizar en el conocimiento de las relaciones estructura tridimensional-afinidad por los receptores de NT de estos análogos conformacionalmente restringidos de NT₈₋₁₃, se realizó un estudio de modelización molecular del derivado dipeptídico Ac-Pro-Tyr-NHCH₃, como modelo sencillo de NT₈₋₁₃, y de las 2-bencil-3-oxoindolizidinas A, B y C.



Siguiendo la metodología expuesta en el apartado 2.2.5, se llevaron a cabo tres dinámicas moleculares a 1500 K para el derivado dipeptídico Ac-Pro-Tyr-NHCH₃ y dos para los compuestos A, B y C. En todos los casos, el valor de la constante de rotación del enlace peptídico se aumentó artificialmente durante las dinámicas para evitar la formación de los correspondientes isómeros *cis*. El total de mínimos encontrados fue de 135 para el dipéptido y 74, 78 y 82 para los derivados restringidos A, B, y C, respectivamente.

En la tabla 19 se recogen las energías relativas, las distancias $d_{\alpha C_1-\alpha C_4}$ y los valores de rms obtenidos por superposición con diferentes tipos de giros β para los veinte conformeros de menor energía del derivado Ac-Pro-Tyr-NHCH₃.

Tabla 19. Comparación de los veinte conformeros de mínima energía del derivado dipeptídico Ac-Pro-Tyr-NHCH₃ con diferentes tipos de giros β

Conf.	E relativa (Kcal/mol)	d $\alpha C_1-\alpha C_4$ (Å)	rms (Å)					
			β I	β I'	β -II	β II'	β III	β III'
1	0,00	5,98	0,33	1,25	0,85	0,73	0,17	1,34
2	0,17	8,95	1,62	1,99	1,89	1,84	1,42	1,81
3	0,95	8,92	1,58	2,01	1,85	1,80	1,38	1,84
4	1,02	6,65	0,64	1,08	0,76	0,79	0,61	1,14
5	1,08	4,56	0,66	1,14	0,92	0,80	0,70	1,23
6	1,24	4,54	0,70	1,17	0,96	0,84	0,74	1,26
7	1,28	6,33	1,16	1,07	1,12	1,06	1,21	1,05
8	1,31	9,06	1,47	1,71	1,59	1,59	1,33	1,65
9	1,43	8,64	1,30	1,83	1,58	1,53	1,08	1,80
10	1,43	7,53	0,84	1,36	1,07	1,06	0,70	1,38
11	1,49	7,82	1,92	1,50	1,68	1,69	1,85	1,31
12	1,56	5,91	0,30	1,18	0,78	0,67	0,21	1,28
13	1,61	5,16	0,70	1,27	1,02	0,90	0,67	1,35
14	1,66	6,13	0,46	1,27	0,86	0,78	0,37	1,34
15	1,67	5,02	0,33	0,95	0,58	0,51	0,51	1,07
16	1,74	8,53	1,27	1,60	1,42	1,42	1,14	1,57
17	1,75	6,98	1,32	1,23	1,29	1,23	1,34	1,18
18	1,78	8,81	1,93	2,00	2,00	2,01	1,79	1,87
19	1,79	9,03	1,67	1,98	1,93	1,88	1,47	1,79
20	1,82	6,92	0,89	1,13	0,94	0,93	0,90	1,15

La obtención de 11 conformeros con distancia $\alpha C_1-\alpha C_4$ inferior a 7 Å, incluido el mínimo absoluto, indica la gran tendencia del derivado dipeptídico Ac-Pro-Tyr-NHCH₃ a adoptar conformaciones plegadas de tipo giro β , obteniéndose los mejores valores de rms por superposición de estos conformeros

con giros β ideales de tipos I y III (Figura 15). Además, la mayoría de los conformeros con distancia $\alpha C_1-\alpha C_4$ superior a 7 Å presentan un puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo carbonilo del acetilo y el NH del residuo de Tyr, característico de los giros γ inversos¹²⁰. Por lo tanto, si se realiza una extrapolación de estos resultados a la NT, cabe esperar que los fragmentos peptídicos Arg-Pro-Tyr-Ile y Arg-Pro-Tyr presenten capacidades para adoptar conformaciones de giro β (I o III) y giro γ , respectivamente, similares a las mostradas por el péptido modelo.

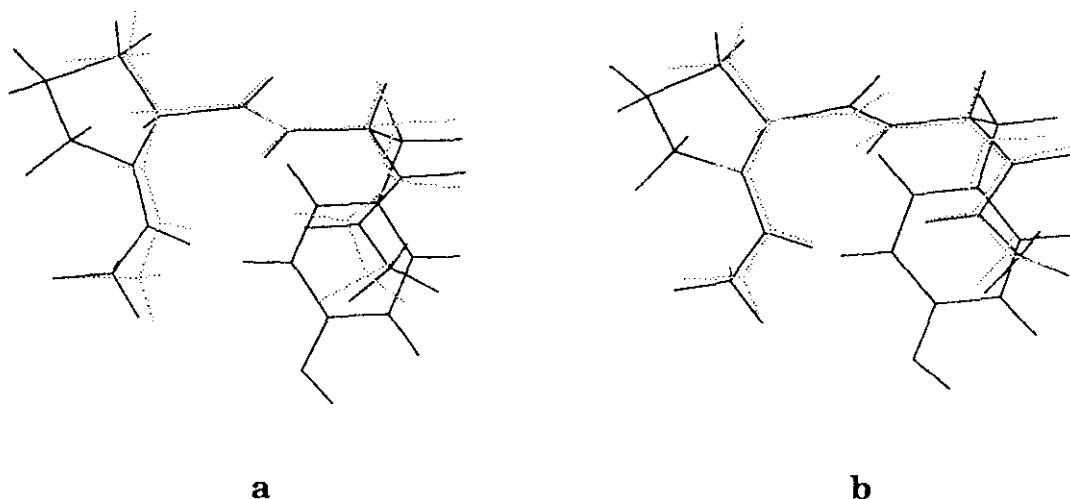


Figura 15. Superposición del mínimo absoluto del derivado *Ac-Pro-Tyr-NHCH₃* (línea continua) con giros β ideales de tipos I (a) y III (b).

Por otra parte, el análisis conformacional efectuado para las 2-bencil-3-oxoindolizidinas A, B y C (Tabla 20) condujo a resultados muy similares a los obtenidos previamente para sus correspondientes derivados desbencilados (Apartado 2.2.5). Así, se puede observar que, mientras la indolizidina A presenta una tendencia moderada a adoptar conformaciones plegadas, las conformaciones extendidas son predominantes en el caso de la estructura B. Sin embargo, aunque los valores de rms de las formas plegadas de A parecen indicar una correlación preferente con los giros β de tipos I y III, en la superposición de los conformeros A20 y A9 con estos tipos de giro β se observa que las disposiciones de los respectivos enlaces peptídicos, especialmente el C-terminal, son muy diferentes (Figura 16). Por lo tanto, no se puede considerar que este derivado de 2-bencil-3-oxoindolizidina actúe como mimético de giros β .

Tabla 20. Confórmeros de las estructuras A, B y C que presentan $d\alpha C_1-\alpha C_4$ inferior a 7 Å y comparación con los diferentes tipos de giros β

Conf. ^a	E relativa (Kcal/mol)	d $\alpha C_1-\alpha C_4$ (Å)	rms (Å)					
			β I	β I'	β -II	β II'	β III	β III'
A4	1,48	6,82	0,81	1,40	1,06	0,98	0,71	1,44
A9	2,16	6,44	0,74	1,37	1,01	0,93	0,66	1,43
A11	2,66	6,57	0,76	1,38	1,03	0,94	0,68	1,43
A18	3,43	6,44	0,88	1,31	1,04	0,92	0,79	1,37
A19	3,47	6,12	0,84	1,30	1,01	0,88	0,76	1,37
A20	3,59	5,18	0,63	1,08	0,75	0,65	0,68	1,20
B20	3,26	6,83	1,12	0,79	0,75	0,86	1,15	0,74
C1	0,00	4,78	1,16	0,69	0,78	0,89	1,29	0,78
C2	1,02	3,91	1,15	0,70	0,79	0,90	1,32	0,84
C3	1,43	4,66	1,16	0,68	0,78	0,88	1,29	0,78
C5	1,84	4,31	1,17	0,68	0,81	0,96	1,33	0,79
C6	1,89	4,39	0,81	0,94	0,69	0,82	0,96	1,08
C9	2,29	4,20	0,79	0,99	0,71	0,84	0,94	1,14
C13	2,81	4,20	1,17	0,68	0,81	0,96	1,34	0,80
C14	3,26	3,97	0,82	0,97	0,70	0,84	0,98	1,12
C16	4,41	5,31	1,26	0,68	0,85	0,95	1,37	0,72
C18	4,93	4,82	0,81	0,52	0,48	0,57	0,96	0,71
C20	5,06	6,92	1,12	0,86	0,90	0,92	1,15	0,87

^a Únicamente se han considerado los veinte confórmeros de mínima energía.

Finalmente, la 3-oxoindolizidina 8,8a-*cis* C adopta preferentemente conformaciones plegadas que se caracterizan por poseer un puente de hidrógeno intramolecular entre los grupos 8-NH y 2-CO (confórmeros C1-C3, C5, C6, C9, C13, C14, C16 y C20). Además, en este caso, el confórmero C18 se corresponde con una conformación de tipo giro β (II, I') idéntica a la del mínimo C5 del correspondiente derivado no sustituido en C-2 (Apartado 2.2.5).

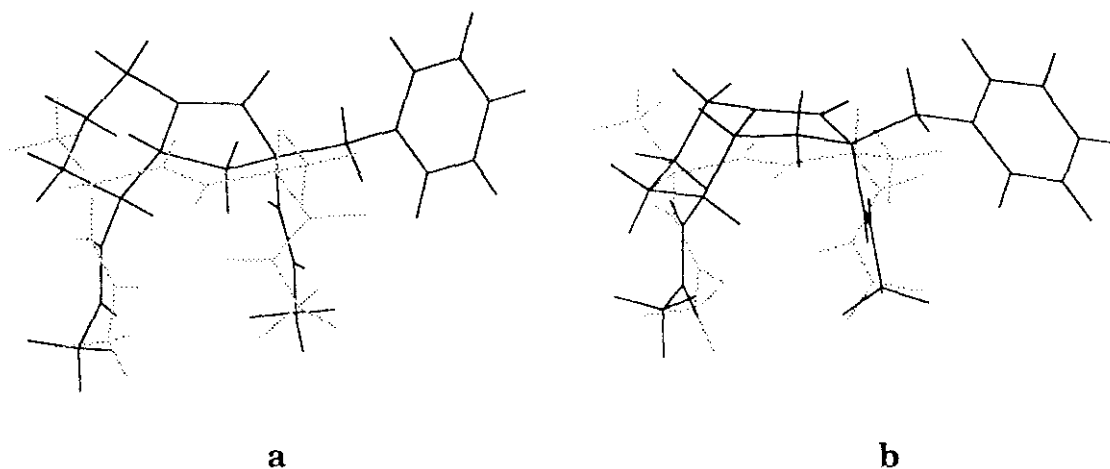


Figura 16. a: Superposición del conformero A20 (línea continua) con un giro β ideal de tipo I. **b:** Superposición del conformero A9 (línea continua) con un giro β ideal de tipo III.

Si, como en el caso de Ac-Pro-Tyr-NHCH₃, el comportamiento conformacional de los análogos restringidos de NT₈₋₁₃ **136a-136c** fuera similar al determinado con los modelos sencillos A, B y C, respectivamente, la falta de afinidad del derivado **136c** indicaría que las conformaciones plegadas de la estructura C (8NH \rightarrow 2CO y giro β II) son incompatibles con la conformación bioactiva de la NT. Por otra parte, la carencia de estructuras secundarias definidas para los derivados de 3-oxoindolizidinas A y B no permite establecer una relación clara entre la moderada afinidad de los análogos restringidos de NT₈₋₁₃ **136a** y **136b** y la conformación preferente de la NT en su unión al receptor.

Para llegar a esclarecer la participación o no de conformaciones de tipo giro β (I o III) y/o γ en la conformación bioactiva de la NT sería necesaria la preparación de análogos conformacionalmente restringidos que incorporen miméticos para estos tipos concretos de giros inversos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Los análisis elementales se efectuaron en el laboratorio de microanálisis del C.N.Q.O. con un analizador Heareus CHN-O-RAPID y se hallan en el rango de $\pm 0,4$ respecto a los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Reichert-Jung Kofler y no están corregidos.

Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro Vacuum Generators VG 12-250.

Los espectros de PD-MS se registraron en un instrumento Bio-Ion 20 (Applied Biosystems).

Los poderes rotatorios se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 141.

Los espectros monodimensionales de ^1H RMN se registraron en un espectrómetro Varian EM-390 (90 MHz), en un Varian Gemini 200 (200 MHz), en un Varian XL-300 (300 MHz), en un Bruker AMX2-400 (400 MHz) o en un Varian Unity 500 (500 MHz), utilizando TMS como referencia interna en el caso de los espectros registrados en CDCl_3 , DMSO-d_6 y $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, y DDS para los registrados en D_2O . Los experimentos de NOESY se registraron en el Varian XL-300, utilizando 1,5 s de tiempo de relajación y 600 ms de tiempo de mezcla. Para los experimentos de ROESY, registrados en el Varian Unity 500, se utilizaron 1 s de tiempo de relajación y 150 ms de tiempo de mezcla.

Los espectros de ^{13}C RMN se registraron en el Varian Gemini 200 (50 MHz), en el Varian XL-300 (75 MHz) o en un espectrómetro Bruker AM-200 (50 MHz).

Las cromatografías analíticas en capa fina se realizaron en cromatofolios de 0,2 mm de espesor, con gel de sílice tipo 60, Merck F₂₅₄. Los

compuestos se detectaron con luz UV de 254 nm, mediante pulverización con disolución de ácido sulfúrico en etanol (3:7), con disolución de ninhidrina en etanol al 2% y calentando o con yodo.

Las separaciones cromatográficas en columna se llevaron a cabo con gel de sílice Merck tipo 60 (230-400 mesh).

Las cromatografías preparativas se realizaron en placas de 2 mm de espesor con gel de sílice HF₂₅₄ Merck o mediante cromatografía circular centrífuga en capa fina (CCTLC) en cromatotrón, en placas de 1 ó 2 mm de espesor con gel de sílice Merck tipo 60 PF-254 con CaSO₄.

Los HPLC analíticos se llevaron a cabo sobre un aparato Waters y utilizando las siguientes columnas de fase reversa:

- Columna núm. 1: Lichrosorb C₁₈ (4 x 250 mm, 5 μm).
- Columna núm. 2: Ultrasphere C₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 μm).
- Columna núm. 3: Novapak C₁₈ (3,9 x 150 mm, 4 μm).
- Columna núm. 4: μ Bondapak C₁₈ (3,9 x 300 mm, 10 μm).

Los sistemas de eluyentes utilizados se indican a continuación:

- Eluyente A: CH₃CN/H₂O (0,05% TFA).
- Eluyente B: CH₃CN/TEAP (TEAP = tampón Et₃N/H₃PO₄, pH = 6,5).
- Eluyente C: CH₃CN/H₂O.

En todos los casos el flujo fue de 1 mL/min y la detección de picos se realizó por UV a 214 nm.

Para el HPLC preparativo se utilizó una columna μ Bondapak C₁₈ (7,8 x 300 mm, 10 μm) y el sistema de eluyentes A, el flujo fue de 3 mL/min y la detección, igual que para el HPLC analítico, se efectuó por UV a 214 nm.

Los análisis de aminoácidos se realizaron por hidrólisis de los péptidos en HCl 6 N a 110 °C durante 22 h, seguido de derivatización con isotiocianato de fenilo y análisis por HPLC.

PRODUCTOS COMERCIALES

Ácido trifluoroacético	FLUKA
BOP	ALDRICH
Bromoacetato de <i>terc</i> -butilo	ALDRICH
Bromoacetato de etilo	ALDRICH
Bromuro de bencilo	FLUKA
Cloroformiato de isobutilo	ALDRICH
DCC	FLUKA
Gramina	SIGMA
Hidrogenosulfato de tetrabutilamonio	MERCK
<i>N</i> -hidroxisuccinimida	FLUKA
LiAlH ₄	ALDRICH
Malonato de dimetilo	ALDRICH
<i>N</i> -metilmorfolina	ALDRICH
(<i>R</i>)-(+)-MTPA	ALDRICH
(<i>R</i>)-(-)-MTPA-Cl	ALDRICH
(<i>S</i>)-(+)-MTPA-Cl	ALDRICH
NaBH ₄	FLUKA
NaH	ALDRICH
NaI	PANREAC
Pd-C	FLUKA
(<i>S</i>)-(+)-TFAE	FLUKA
Trietilamina	SCHARLAU
Yoduro de metilo	QUIMICEN

Los aminoácidos y sus derivados cuya síntesis no se describe proceden de la casa comercial BACHEM AG.

3.1. SÍNTESIS DE CLOROMETILCETONAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS

Procedimiento general:

A una disolución del derivado de aminoácido correspondiente (8 mmoles) en THF (20 mL), enfriada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, se le añaden NMM (1,2 mL, 11 mmoles) y cloroformiato de isobutilo (1,5 mL, 11 mmoles). Después de 30 min de agitación a la temperatura indicada, se adiciona CH_2N_2 , generado sobre éter etílico a partir de *N*-metil-*N*-nitrosourea (3 g), y se deja que la reacción transcurra a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. A continuación, se añade poco a poco y agitando una disolución saturada de HCl en MeOH hasta que cesa el desprendimiento de N_2 . Tras neutralizar el exceso de HCl con TEA, se elimina el disolvente y el residuo resultante se lava con H_2O y con disolución saturada de NaCl, sucesivamente, y se extrae con AcOEt. El extracto orgánico se seca sobre Na_2SO_4 y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando el sistema de eluyentes que se indica en cada caso.

Z-D-Phe-CH₂Cl (49)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:3). Rendimiento: 78%.

Sólido blanco. P.f.: $89\text{-}90\text{ }^{\circ}\text{C}$ (AcOEt-hexano).

¹H RMN (90 MHz, CDCl_3): δ 7,4-7,0 [m, 10 H, C_6H_5 y Ph (Z)], 5,2 (m, 1 H, $\alpha\text{-NH}$), 5,0 [s, 2 H, CH_2 (Z)], 4,7 (m, 1 H, $\alpha\text{-Phe}$), 4,0 (d, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Cl}$), 3,1 (m, 2 H, $\beta\text{-Phe}$).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N	Cl
Calculado ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{ClNO}_3$)	65,16	5,47	4,22	10,69
Encontrado	64,92	5,58	4,17	10,55

Z-D-Trp-CH₂Cl (50)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:3). Rendimiento: 72%.

Sólido blanco. P.f.: $134\text{-}136\text{ }^{\circ}\text{C}$ (AcOEt-hexano).

¹H RMN (90 MHz, CDCl₃): δ 8,1 (s, 1 H, NHⁱ), 7,8-6,8 [m, 10 H, In y Ph (Z)], 5,4 (m, 1 H, α-NH), 5,0 [s, 2 H, CH₂ (Z)], 4,8 (m, 1 H, α-Trp), 4,0 (m, 2 H, CH₂-Cl), 3,2 (d, 2 H, β-Trp).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N	Cl
Calculado (C ₂₀ H ₁₉ ClN ₂ O ₃)	64,78	5,16	7,55	9,56
Encontrado	64,57	5,22	7,30	9,38

Boc-D-Orn(Z)-CH₂Cl (79)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:3). Rendimiento: 82%.

Sólido blanco. P.f.: 80-82 °C (AcOEt-hexano).

HPLC: t_R = 13,60 min; eluyente A (50:50); columna núm. 1.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,36-7,31 [m, 5 H, Ph (Z)], 5,14 (d, 1H, α-NH), 5,09 [s, 2 H, CH₂ (Z)], 4,89 (m, 1 H, δ-NH), 4,51 (m, 1 H, α-Orn), 4,25 (s, 2 H, CH₂-Cl), 3,22 (m, 2 H, δ-Orn), 1,86 (m, 1 H, β-Orn), 1,56 (m, 3 H, β- y γ-Orn), 1,43 [s, 9 H, CH₃ (Boc)].

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N	Cl
Calculado (C ₁₉ H ₂₇ ClN ₂ O ₅)	57,21	6,82	7,02	8,89
Encontrado	57,23	6,62	7,05	9,08

3.2. SÍNTESIS DE 4-CETODIÉSTERES DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS

Procedimiento general:

A una disolución de la clorometilcetona correspondiente (7 mmoles) en DME (10 mL) se le añade NaI (7 mmoles) y se agita a temperatura ambiente durante 15 min. La suspensión obtenida se adiciona sobre una disolución de la sal monosódica del malonato de dimetilo (7,7 mmoles) en DME (10 mL) recientemente preparada a partir de malonato de dimetilo y NaMeO. Tras agitar a temperatura ambiente durante 1 h, se elimina el disolvente y el residuo resultante se extrae con AcOEt y se lava con H₂O y con disolución saturada de NaCl, sucesivamente. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente el sistema que se especifica en cada caso.

(5R)-5-(Benciloxycarbonil)amino-6-fenil-2-metoxicarbonil-4-oxohexanoato de metilo (51)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:3). Rendimiento: 88%. Sirupe.

¹H RMN (90 MHz, CDCl₃): δ 7,4-7,0 [m, 10 H, C₆H₅ y Ph (Z)], 5,2 (m, 1 H, 5-NH), 5,0 [s, 2 H, CH₂ (Z)], 4,5 (m, 1 H, H-5), 3,8 (t, 1 H, H-2), 3,7 (s, 6 H, CO₂CH₃), 3,0 (m, 4 H, H-3 y H-6).

<i>Análisis elemental (%)</i>	<u>C</u>	H	N
Calculado (C ₂₃ H ₂₅ NO ₇)	64,63	5,90	3,28
Encontrado	64,38	5,92	3,15

(5R)-5-(Benciloxycarbonil)amino-6-(indol-3'-il)-2-metoxicarbonil-4-oxohexanoato de metilo (52)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:2). Rendimiento: 90%. Sirupe.

¹H RMN (90 MHz, CDCl₃): δ 8,2 (s, 1 H, NHⁱ), 7,6-6,9 [m, 10 H, In y Ph (Z)], 5,4 (m, 1 H, 5-NH), 5,0 [s, 2 H, CH₂ (Z)], 4,7 (m, 1 H, H-5), 3,8 (t, 1 H, H-2), 3,7 (s, 6 H, CO₂CH₃), 2,6 (m, 4 H, H-3 y H-6).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₇)	64,37	5,62	6,00
Encontrado	64,02	5,79	5,75

(5R)-8-(Benciloxycarbonil)amino-5-(terc-butoxicarbonil)amino-2-metoxicarbonil-4-oxooctanoato de metilo (80)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:2). Rendimiento: 88%.

Sólido blanco. P.f.: 98-99 °C (AcOEt-hexano).

HPLC: t_R = 13,28 min; eluyente A (50:50); columna núm. 1.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,36-7,30 [m, 5 H, Ph (Z)], 5,13 (d, 1 H, 5-NH), 5,09 [s, 2 H, CH₂ (Z)], 4,93 (m, 1 H, 8-NH), 4,34 (m, 1 H, H-5), 3,91 (t, 1 H, H-2), 3,73 (s, 6 H, CO₂CH₃), 3,23 (m, 2 H, H-8), 3,17 (dd, 1 H, H-3, J = 18,3 y 7,8), 3,05 (dd, 1 H, H-3, J = 18,3 y 6,6), 1,92 (m, 1 H, H-6), 1,55 (m, 3 H, H-6 y H-7), 1,43 [s, 9 H, CH₃ (Boc)].

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₄ H ₃₄ N ₂ O ₉)	56,16	7,28	5,95
Encontrado	56,37	7,08	5,68

3.3. OBTENCIÓN DE 4-CETODIÉSTERES 2-SUSTITUIDOS

Procedimiento general:

A una disolución del 4-cetodiéster correspondiente (3 mmoles) en DME o THF (20 mL) se le añaden NaMeO, recientemente preparado (3,3 mmoles) y, después de 10 min de agitación, el agente alquilante apropiado, bromuro de bencilo, bromoacetato de etilo, yoduro de metilo o bromoacetato de *terc*-butilo (9 mmoles). Tras dejar que la reacción transcurra a temperatura ambiente durante toda la noche, se elimina el disolvente y, a continuación, se extrae con AcOEt y se lava con H₂O y con disolución saturada de NaCl, sucesivamente. El extracto orgánico se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando el sistema de eluyentes que se especifica en cada caso.

Los productos obtenidos por este método se describen a continuación, con sus correspondientes datos analíticos y espectroscópicos.

(5S)-2-Bencil-5-(benciloxicarbonil)amino-6-fenil-2-metoxicarbonil-4-oxohexanoato de metilo (61)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:4). Rendimiento: 85%. Sirupe.

¹H RMN (90 MHz, CDCl₃): δ 7,3-6,8 [m, 15 H, C₆H₅ y Ph (Z)], 5,2 (d, 1 H, 5-NH), 5,0 [s, 2 H, CH₂ (Z)], 4,5 (m, 1 H, H-5), 3,6 (s, 6 H, CO₂CH₃), 3,3 (s, 2 H, 2-CH₂), 2,9 (m, 4 H, H-3 y H-6).

<i>Análisis elemental (%)</i>	<u>C</u>	H	N
Calculado (C ₃₀ H ₃₁ NO ₇)	69,62	6,04	2,71
Encontrado	69,71	5,95	2,56

(5S)-2-Bencil-5-(benciloxicarbonil)amino-6-(indol-3'-il)-2-metoxicarbonil-4-oxohexanoato de metilo (62)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:3). Rendimiento: 82%. Sirupe.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,87 (s, 1 H, NHⁱ), 7,88 (d, 1 H, 5-NH, J = 8,1), 7,53-6,87 [m, 15 H, In, C₆H₅ y Ph (Z)], 5,04 [d, 1 H, CH₂ (Z), J = 12,9], 4,98 [d, 1 H, CH₂ (Z)], 4,31 (m, 1 H, H-5), 3,61 (s, 6 H, CO₂CH₃), 3,22 (s, 2 H, 2-CH₂), 3,10 (m, 2 H, H-3 y H-6), 2,98 (d, 1 H, H-3, J = 19,2), 2,89 (dd, 1 H, H-6, J = 14,7 y 9,3).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₂ H ₃₂ N ₂ O ₇)	69,05	5,79	5,03
Encontrado	68,89	5,77	5,22

(6S)-6-(Benciloxicarbonil)amino-7-fenil-3,3-dimetoxicarbonil-5-oxoheptanoato de etilo (63)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:3). Rendimiento: 82%. Sirupe.

¹H RMN (90 MHz, CDCl₃): δ 7,3-7,0 [m, 10 H, C₆H₅ y Ph (Z)], 5,2 (d, 1 H, 6-NH), 5,0 [s, 2 H, CH₂ (Z)], 4,5 (m, 1 H, H-6), 4,0 [c, 2 H, CH₂ (Et)], 3,6 (s, 6 H, CO₂CH₃), 3,3 (s, 2 H, H-2), 3,0 (m, 4 H, H-4 y H-7), 1,1 [t, 3 H, CH₃ (Et)].

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₇ H ₃₁ NO ₉)	63,15	6,08	2,73
Encontrado	63,08	6,27	2,81

(6S)-6-(Benciloxicarbonil)amino-7-(indol-3'-il)-3,3-dimetoxicarbonil-5-oxoheptanoato de etilo (64)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:3). Rendimiento: 89%. Espuma.

¹H RMN (90 MHz, CDCl₃): δ 8,2 (s, 1 H, NHⁱ), 7,6-6,9 [m, 10 H, In y Ph (Z)], 5,4 (d, 1 H, 6-NH), 5,0 [s, 2 H, CH₂ (Z)], 4,6 (m, 1 H, H-6), 4,0 [c, 2 H, CH₂ (Et)], 3,6 (s, 6 H, CO₂CH₃), 3,3 (s, 2 H, H-2), 3,1 (m, 2 H, H-7), 3,0 (s, 2 H, H-4), 1,2 [t, 3 H, CH₃ (Et)].

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₉ H ₃₂ N ₂ O ₉)	63,04	5,84	5,07
Encontrado	62,97	5,77	4,84

(5S)-5-(Benciloxycarbonil)amino-6-(indol-3'-il)-2-metil-2-metoxicarbonil-4-oxohexanoato de metilo (66)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:2). Rendimiento: 88%. Espuma.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,86 (s, 1 H, NHⁱ), 7,80 (d, 1 H, 5-NH, J = 7,8), 7,56-6,96 [m, 10 H, In y Ph (Z)], 5,03 [d, 1 H, CH₂ (Z), J = 12,7], 4,96 [d, 1 H, CH₂ (Z)], 4,30 (m, 1 H, H-5), 3,60 (s, 6 H, CO₂CH₃), 3,23 (d, 1 H, H-3, J = 18,4), 3,10 (dd, 1 H, H-6, J = 14,3 y 5,7), 3,08 (d, 1 H, H-3), 2,89 (dd, 1 H, H-6, J = 14,3 y 9,3), 1,31 (s, 3 H, 2-CH₃).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O ₇)	64,99	5,87	5,83
Encontrado	64,87	5,91	5,55

(6S)-6-(Benciloxycarbonil)amino-7-(indol-3'-il)-3,3-dimetoxicarbonil-5-oxoheptanoato de terc-butilo (118)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:3). Rendimiento: 84%. Espuma.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,10 (s, 1 H, NHⁱ), 7,62-6,99 [m, 10 H, In y Ph (Z)], 5,36 (d, 1 H, 6-NH, J = 6,9), 5,05 [s, 2 H, CH₂ (Z)], 4,68 (m, 1 H, H-6), 3,68 (s, 6 H, CO₂CH₃), 3,40 (s, 2 H, H-2), 3,33 (dd, 1 H, H-7, J = 15,1 y 6,0), 3,15 (dd, 1 H, H-7, J = 15,1 y 5,8), 3,00 (s, 2 H, H-4), 1,39 [s, 9 H, CH₃ (CO₂^tBu)].

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₁ H ₃₆ N ₂ O ₉)	64,13	6,25	4,82
Encontrado	64,41	6,50	5,04

3.4. SÍNTESIS DE 2,5-DICETOPÍPERIDINAS

3.4.1. SÍNTESIS DE 3-METOXICARBONIL-2,5-DICETOPÍPERIDINAS 6-SUSTITUIDAS

Método 1: Calefacción en MeOH de 4-cetodiésteres

Se disuelve el 4-cetodiéster **37** ó **38** (5 mmoles) en MeOH (150 mL) y se añade un 10% de Pd-C (10%). La suspensión así obtenida se hidrogena a temperatura ambiente y 25 psi de presión durante 1 h. Tras comprobar por cromatografía en capa fina la desprotección del grupo amino, se separa el catalizador por filtración y la disolución se calienta a reflujo durante 4 h. A continuación, se elimina el disolvente y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente el sistema que se indica en cada caso.

Aunque este procedimiento no permitió la obtención de las 2,5-dicetopiperidinas buscadas, a continuación se describen los dos derivados de pirazina obtenidos.

3,6-Dibencil-2,5-bis[(2',2'-dimetoxicarbonil)etil]pirazina (41)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:2). Rendimiento: 12%.

Sólido blanco. P.f.: 133-134 °C (EtOH).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,30-7,15 (m, 10 H, C₆H₅), 4,16 (t, 2 H, H-2', J = 7,4), 4,10 (s, 4 H, 3- y 6-CH₂), 3,67 (s, 12 H, CO₂CH₃), 3,37 (d, 4 H, 2- y 5-CH₂, J = 7,4).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 169,76 (CO₂), 150,25, 147,91 (C-2 y C-5, C-3 y C-6), 137,89, 128,76, 128,51, 126,43 (C₆H₅), 52,57 (OCH₃), 49,05 (C-2'), 40,19 (3- y 6-CH₂), 31,95 (2- y 5-CH₂).

EM: 549 (M⁺ + 1, 25,43), 548 (M⁺, 100,00), 489 (M⁺ - 59, 51,24), 457 (M⁺ - 91, 26,18), 430 (M⁺ - 118, 5,83), 3,66 (M⁺ - 182, 2,85), 91 (Bn, 93,92), 59 (CO₂Me, 13,28).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₀ H ₃₂ N ₂ O ₈)	65,68	5,88	5,11
Encontrado	65,34	6,25	5,32

2,5-Bis[(2',2'-dimetoxicarbonil)etil]-3,6-bis[(indol-3''-il)metil]pirazina (42)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:1). Rendimiento: 31%.

Sólido blanco. P.f.: 168-169 °C (AcOEt-hexano).

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,89 (s, 2 H, NHⁱ), 7,52-6,92 (m, 10 H, In), 4,16 (s, 4 H, 3- y 6-CH₂), 4,06 (t, 2 H, H-2', J = 7,2), 3,58 (s, 12 H, CO₂CH₃), 3,35 (d, 4 H, 2- y 5-CH₂, J = 7,2).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆): δ 169,32 (CO₂), 150,20, 147,54 (C-2 y C-5, C-3 y C-6), 136,18, 126,99, 123,12, 121,09, 118,54, 118,44, 111,39, 110,64 (In), 52,35 (OCH₃), 48,69 (C-2'), 31,48, 30,52 (2- y 5-CH₂, 3- y 6-CH₂).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₄ H ₃₄ N ₄ O ₈)	65,17	5,47	8,94
Encontrado	65,33	5,66	8,99

Método 2: Hidrogenación de 4-cetodiésteres

A una disolución del 4-cetodiéster **37**, **38**, **51** ó **52** (5 mmoles) en MeOH (150 mL) se le añade un 10% de Pd-C (10%) y la suspensión se hidrogena a temperatura ambiente y 25 psi de presión durante 6 días. Una vez separado el catalizador por filtración, se elimina el disolvente y el residuo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando el sistema de eluyentes que se especifica en cada caso.

Método 3: Hidrogenación de 4-cetodiésteres monoactivados

A una disolución del 4-cetodiéster **37** ó **38** (5 mmoles) en MeOH (50 mL) se le añade NaOH 2 N (2,5 mL, 5 mmoles) y se agita a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se elimina el disolvente y el residuo obtenido se

disuelve en H₂O (40 mL) y se acidifica hasta pH 3 con HCl 1 N, extrayendo seguidamente el ácido así liberado con AcOEt. El extracto orgánico se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora a sequedad. El nuevo residuo se disuelve en THF (50 mL) y se le añaden HOSu (5 mmoles) y DCC (5 mmoles). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 min, y tras comprobar por cromatografía en capa fina la formación del éster activado, se separa por filtración la DCU formada y se elimina de nuevo el disolvente. El residuo resultante se disuelve en AcOEt (150 mL) y la disolución se hidrogena en presencia de un 10% de Pd-C (10%) a temperatura ambiente y 25 psi de presión durante 3 días. Transcurrido este tiempo, se separa el catalizador por filtración y el disolvente se elimina por evaporación a presión reducida. Finalmente, los productos obtenidos se purifican por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

A continuación se detallan los productos obtenidos por estos dos últimos métodos.

(3S,6S)-6-Bencil-3-metoxicarbonil-2,5-dicetopiperidina (45a)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:1). Rendimiento: 42% (a partir del compuesto **37**, método 2); 60% (a partir de **37**, método 3).

Sólido blanco. P.f.: 151-152 °C (EtOH).

EM: 262 (M⁺ + 1, 8,69), 261 (M⁺, 8,95), 202 (M⁺ - 59, 28,45), 170 (M⁺ - 91, 5,83), 91 (Bn, 100,00), 59 (CO₂Me, 5,93).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₁₄ H ₁₅ NO ₄)	64,36	5,79	5,36
Encontrado	64,10	5,89	5,60

(3S,6S)- y (3R,6S)-6-(Indol-3'-il)metil-3-metoxicarbonil-2,5-dicetopiperidina (46a) y (46b)

Eluyente: AcOEt-hexano (2:1). Rendimiento: 42% (a partir del cetodiéster **38**, método 2); 40% (a partir de **38**, método 3). Espuma. Proporción de diastereoisómeros (3S,6S)/(3R,6S) 5:2 (método 2) y 3:2 (método 3).

EM: 300 (M⁺, 3,96), 130 (C₉H₈N, 100,00).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₄)	63,99	5,37	9,33
Encontrado	64,15	5,60	9,65

(3R,6R)-6-Bencil-3-metoxicarbonil-2,5-dicetopiperidina (53a)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:1). Rendimiento: 30% (a partir de **51**, método 2).
Sólido blanco. P.f.: 151-152 °C (EtOH).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₁₄ H ₁₅ NO ₄)	64,36	5,79	5,36
Encontrado	64,06	5,58	5,43

(3R,6R)- y (3S,6R)-6-(Indol-3'-il)metil-3-metoxicarbonil-2,5-dicetopiperidina (54a) y (54b)

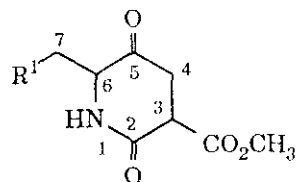
Eluyente: AcOEt-hexano (2:1). Rendimiento: 34% (a partir del cetodiéster **52**, método 2). Espuma. Proporción de diastereoisómeros (3R,6R)/(3S,6R) 6:5.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₄)	63,99	5,37	9,33
Encontrado	63,78	5,46	9,37

Los datos de ¹H RMN de los productos obtenidos por estos dos métodos se encuentran detallados en la tabla 21. Asimismo, en la tabla 22 se recogen los datos de ¹³C RMN de los derivados pertenecientes a la serie L.

Al aplicar el método 2 a la preparación de estas 2,5-dicetopiperidinas, se aislaron pequeñas cantidades de los derivados de pirazina descritos anteriormente **41** y **42**. Así, a partir de los cetodiésteres **37** y **51** se obtuvo un 2 y un 3%, respectivamente, del producto **41**. Del mismo modo, a partir de los cetodiésteres **38** y **52** se obtuvo el derivado **42**, siendo los rendimientos respectivos del 4 y del 3%.

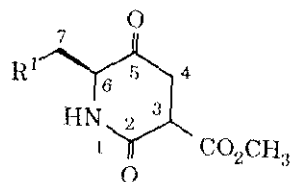
Tabla 21. Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) más significativos de ^1H RMN (300 MHz) de los derivados de 2,5-dicetopiperidina de fórmula general



Comp.	R ¹	Config. 3,6	Disolvente	H-1	H-3	H-4	H-6	H-7	H-7'	CO ₂ CH ₃	J _{1,6}	J _{6,7}	J _{6,7'}
45a (53a)	Ph	SS (RR)	DMSO-d ₆	8,26	3,01	2,79 2,31	4,15	3,10	2,89	3,61	2,0	4,9	5,5
46a ^a (54a) ^a	In	SS (RR)	DMSO-d ₆	8,22	3,03	2,76 2,30	4,12	3,27	3,03	3,60	2,0	4,7	5,2
46a ^a	In	SS	CDCl ₃	6,04	3,52	2,92 2,68	4,27	3,45	2,98	3,77	0	3,2	9,3
46b ^a (54b) ^a	In	RS (SR)	DMSO-d ₆	7,99	3,90	2,64 2,39	4,19	3,12	3,02	3,59	0	4,7	5,8
46b ^a	In	RS	CDCl ₃	5,97	3,73	3,05 2,88	4,16	3,58	2,95	3,81	0,9	3,6	9,6

^a Datos de los espectros de las mezclas de diastereoisómeros.

Tabla 22. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^{13}C RMN (75 MHz) de los compuestos de fórmula general



Comp.	R^1	Config. C-3	Disolvente	^{13}C RMN (δ , ppm)					
				C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7
45a	Ph	S	DMSO- d_6	169,08	45,43	38,18	205,13	61,00	38,42
46a ^a	In	S	CDCl_3	168,87	47,06	38,05	203,87	60,11	28,97
46b ^a	In	R	CDCl_3	168,87	46,52	38,33	203,20	60,74	28,67

^a Datos del espectro de la mezcla de diastereoisómeros.

3.4.2. SÍNTESIS DE 6-ARALQUIL-3-METOXICARBONIL- 2,5-DICETOPIPERIDINAS 3,3-DISUSTITUIDAS

Método A

A una disolución del derivado de 2,5-dicetopiperidina **45a** ó **46ab** (1,5 mmoles) y NaMeO (1,6 mmoles) en DME (10 mL) se le añade el agente alquilante correspondiente, bromuro de bencilo, bromoacetato de etilo o yoduro de metilo (4,5 mmoles). Después de agitar a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 6-7 h, se elimina el disolvente y el residuo obtenido se extrae con AcOEt y se lava, primero con H₂O y después con disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y, tras eliminar el disolvente por evaporación a presión reducida, se purifica el residuo resultante por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente el sistema que se indica en cada caso.

Método B

A una disolución del compuesto **45a** ó **46ab** (1 mmol) y CH₃I (8 mmoles) en CH₂Cl₂ (1 mL) se le añade (*n*-Bu)₄NHSO₄ (1 mmol) previamente disuelto en NaOH 2 N (1 mL, 2 mmoles). Después de 6 días de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se trata con CH₂Cl₂ (50 mL) y H₂O (5 mL), se separa la fase orgánica, se seca sobre Na₂SO₄ y se elimina el disolvente por evaporación. Finalmente, el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente el sistema especificado en cada caso.

Método C

Una disolución del 4-cetodiéster **61-66** ó **118** (2 mmoles) en MeOH (200 mL) se hidrogena a temperatura ambiente, en presencia de un 10% de Pd-C (10%), a 30 psi de presión durante 7 días. Transcurrido este tiempo, se separa el catalizador por filtración y se elimina el disolvente por evaporación a vacío. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

Los productos obtenidos por estos métodos, junto con sus datos analíticos y de espectrometría de masas, se detallan a continuación. Los datos de ^1H RMN y de ^{13}C RMN se recogen en las tablas 23 y 24, respectivamente.

(3S,6S)- y (3R,6S)-3,6-Dibencil-3-metoxicarbonil-2,5-dicetopiperidina (55a) y (55b)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:3). Rendimiento: 57% (a partir del compuesto **45a**, método A); 67% (a partir de **61**, método C). Espuma. Proporción de diastereoisómeros (3S,6S)/(3R,6S) 2:1 (métodos A y C).

EM: 352 ($\text{M}^+ + 1$, 12,32), 351 (M^+ , 19,55), 292 ($\text{M}^+ - 59$, 21,48), 260 ($\text{M}^+ - 91$, 25,32), 91 (Bn, 100,00), 59 (CO_2Me , 6,83).

Análisis elemental (%)	C	H	N
Calculado ($\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4$)	71,78	6,02	3,99
Encontrado	71,51	5,85	4,15

(3S,6S)- y (3R,6S)-3-Bencil-6-(indol-3'-il)metil-3-metoxicarbonil-2,5-dicetopiperidina (56a) y (56b)

La cromatografía en columna con AcOEt-hexano (1:1) condujo a la mezcla de los dos diastereoisómeros. Rendimiento: 17% (a partir de **46ab**, método A); 62% (a partir del cetodiéster **62**, método C). Proporción de diastereoisómeros (3S,6S)/(3R,6S) 2:1 (métodos A y C). La separación de los dos diastereoisómeros se llevó a cabo por cromatografía preparativa en cromatotrón, utilizando como eluyente CH_2Cl_2 -MeOH (200:1).

Isómero (3S,6S): **56a**

Espuma.

EM: 390 (M^+ , 4,30), 130 ($\text{C}_9\text{H}_8\text{N}$, 100,00).

Análisis elemental (%)	C	H	N
Calculado ($\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$)	70,75	5,68	7,17
Encontrado	70,52	5,90	6,89

Isómero (3R,6S): **56b**

Espuma.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₄)	70,75	5,68	7,17
Encontrado	70,46	5,88	6,95

(3R,6S)- y (3S,6S)-6-Bencil-3-(etoxicarbonil)metil-3-metoxicarbonil-2,5-dicetopiperidina (57a) y (57b)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:1). Rendimiento: 54% (a partir del producto **45a**, método A); 50% (a partir de **63**, método C). Sólido blanco. Proporción de diastereoisómeros (3R,6S)/(3S,6S) 3:1 (métodos A y C).

EM: 347 (M⁺, 16,59), 288 (M⁺ – 59, 63,78), 256 (M⁺ – 91, 29,12), 91 (Bn, 100,00), 59 (CO₂Me, 13,68).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₁₈ H ₂₁ NO ₆)	62,24	6,09	4,03
Encontrado	62,01	5,97	4,20

(3R,6S)- y (3S,6S)-3-(Etoxicarbonil)metil-6-(indol-3'-il)metil-3-metoxicarbonil-2,5-dicetopiperidina (58a) y (58b)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:1). Rendimiento: 55% (a partir del compuesto **46ab**, método A); 67% (a partir de **64**, método C). Espuma. Proporción de diastereoisómeros (3R,6S)/(3S,6S) 2:1 (métodos A y C).

EM: 386 (M⁺, 4,56), 130 (C₉H₈N, 100,00).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₆)	62,17	5,74	7,25
Encontrado	62,08	6,00	7,50

**(3S,6S)- y (3R,6S)-6-Bencil-3-metil-3-metoxicarbonil-
2,5-dicetopiperidina (59a) y (59b)**

Eluyente: AcOEt-hexano (1:2). Rendimiento: 31% (a partir de **45a**, método B); 70% (a partir del compuesto **65**, método C). Espuma. Proporción de diastereoisómeros (3S,6S)/(3R,6S) 2:1 (métodos B y C).

EM: 275 (M⁺, 12,23), 260 (M⁺ - 15, 20,41), 216 (M⁺ - 59, 45,23), 184 (M⁺ - 91, 29,62), 91 (Bn, 100,00), 59 (CO₂Me, 7,17).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₁₅ H ₁₇ NO ₄)	65,44	6,22	5,09
Encontrado	65,24	6,18	5,13

**(3S,6S)- y (3R,6S)-6-(Indol-3'-il)metil-3-metil-3-metoxicarbonil-
2,5-dicetopiperidina (60a) y (60b)**

Eluyente: AcOEt-hexano (2:1). Rendimiento: 16% (a partir de **46ab**, método A); 41% (a partir de **46ab**, método B); 61% (a partir de **66**, método C). Espuma. Proporción de diastereoisómeros (3S,6S)/(3R,6S) 2:1 (métodos A, B y C).

EM: 314 (M⁺, 3,38), 130 (C₉H₈N, 100,00).

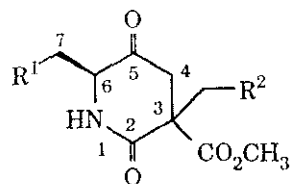
<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₄)	64,96	5,77	8,91
Encontrado	64,79	6,08	8,88

**(3R,6S)-y (3S,6S)-3-(terc-Butoxicarbonil)metil-6-(indol-3'-il)metil-
3-metoxicarbonil-2,5-dicetopiperidina (119a) y (119b)**

Eluyente: AcOEt-hexano (1:1). Rendimiento: 79% (a partir de **118**, método C). Espuma. Proporción de diastereoisómeros (3R,6S)/(3S,6S) 2:1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₆)	63,76	6,32	6,76
Encontrado	63,61	6,60	7,01

Tabla 23. Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) más significativos de ^1H RMN (300 MHz) ^a de los derivados de 2,5-dicetopiperidina de fórmula general



Comp.	R ¹	R ²	Config. C-3	Disolvente	H-1	H-4	H-6	H-7	H-7'	CO ₂ CH ₃	3-CH ₂ ^b		J _{1,6}	J _{6,7}	J _{6,7}	
55a	Ph	Ph	<i>S</i>	DMSO-d ₆	8,32	2,38	1,77	4,11	2,94	2,81	3,65	3,22	3,06	0	4,2	4,8
55a	Ph	Ph	<i>S</i>	CDCl ₃	5,74	2,78	2,34	4,09	3,25	2,55	3,77	3,46	3,26	0	3,7	10,0
55b	Ph	Ph	<i>R</i>	DMSO-d ₆	8,19	2,70	2,40	3,82	2,81	2,65	3,47	3,18	3,08	2,4	4,4	5,0
55b	Ph	Ph	<i>R</i>	CDCl ₃	5,70	2,92	2,67	3,57	3,34	2,59	3,83	3,60	3,16	^c	3,1	10,5
56a	In	Ph	<i>S</i>	DMSO-d ₆	8,15	2,34	1,99	4,06	3,12	2,98	3,65	3,12	3,01	0	4,8	4,8
56a	In	Ph	<i>S</i>	CDCl ₃	5,79	2,73	2,33	4,09	3,36	2,66	3,67	3,36	3,21	0	3,4	10,3
56b	In	Ph	<i>R</i>	DMSO-d ₆	8,09	2,68	2,43	3,87	3,00	2,81	3,50	3,21	3,12	2,6	4,3	6,7
56b	In	Ph	<i>R</i>	CDCl ₃	5,79	2,89	2,62	3,58	3,42	2,70	3,74	3,52	3,09	^c	3,1	10,8
57a	Ph	CO ₂ Et	<i>R</i>	CDCl ₃	5,87	3,04	2,96	4,23	3,37	2,74	3,74	3,12	3,00	0	3,6	10,5

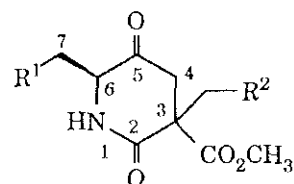
Tabla 23 (continuación)

Comp.	R ¹	R ²	Config.		H-1	H-4	H-6	H-7	H-7'	CO ₂ CH ₃	3-CH ₂ ^b		J _{1,6}	J _{6,7}	J _{6,7'}
			C-3	Disolvente											
57b	Ph	CO ₂ Et	S	CDCl ₃	5,86	3,28 3,00	4,14	3,52	2,74	3,79	3,18 2,97	^c	3,2	^c	
58a	In	CO ₂ Et	R	DMSO-d ₆	8,16	2,75 2,47	4,16	3,22	3,06	3,61	2,97 2,61	0	5,3	4,5	
58a	In	CO ₂ Et	R	CDCl ₃	5,91	3,17 3,11	4,31	3,54	2,92	3,71	3,03	0	3,6	10,7	
58b	In	CO ₂ Et	S	DMSO-d ₆	8,70	3,06 2,76	4,16	3,18	2,93	3,51	3,06 2,81	^c	5,3	7,4	
58b	In	CO ₂ Et	S	CDCl ₃	5,93	3,29 3,04	4,24	3,69	2,93	3,80	3,04	1,0	3,4	^c	
59a	Ph	H	S	DMSO-d ₆	8,21	2,77 2,01	4,25	3,07	2,94	3,62	1,03	0	4,2	5,4	
59b	Ph	H	R	DMSO-d ₆	8,11	2,68 2,54	4,25	3,01	2,85	3,56	1,30	1,2	4,6	5,7	
60a	In	H	S	DMSO-d ₆	8,08	2,69 2,07	4,18	3,20	3,11	3,61	1,04	0	4,6	5,5	
60a	In	H	S	CDCl ₃	5,91	2,95 2,53	4,26	3,50	2,91	3,71	1,49	0	3,7	10,3	
60b	In	H	R	DMSO-d ₆	8,02	2,60 2,61	4,18	3,13	3,02	3,52	1,29	1,9	5,0	5,8	
60b	In	H	R	CDCl ₃	5,91	3,12 2,69	4,15	3,58	2,92	3,79	1,52	^c	3,3	^c	
119a	In	CO ₂ ^t Bu	R	CDCl ₃	5,87	3,07 2,94	4,28	3,53	2,91	3,70	3,09 2,86	0	3,5	10,6	
119b	In	CO ₂ ^t Bu	S	CDCl ₃	5,88	3,26 3,05	4,21	3,66	2,90	3,79	3,05 2,86	^c	3,0	11,2	

^a Datos de los espectros de las mezclas de diastereoisómeros, a excepción de los compuestos **56a** y **56b**, cuyos espectros se han registrado por separado.

^b CH₃ para los compuestos **59ab** y **60ab**. ^c No se han podido medir exactamente.

Tabla 24. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3)^a de los compuestos de fórmula general



Comp.	R ¹	R ²	Config. C-3	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	3-CH ₂ ^b
55a	Ph	Ph	<i>S</i>	170,34	54,85	42,80	203,25	61,39	38,36	38,93
55b	Ph	Ph	<i>R</i>	171,00	54,77	43,57	202,06	62,49	39,30	39,74
56a	In	Ph	<i>S</i>	170,36	54,98	42,72	203,74	60,01	28,60	39,05
56b	In	Ph	<i>R</i>	171,20	54,91	43,60	202,65	61,19	29,42	39,84
58a	In	CO ₂ Et	<i>R</i>	170,49	52,01	43,02	203,21	60,27	28,97	37,67
58b	In	CO ₂ Et	<i>S</i>	170,42	51,57	43,98	201,52	61,86	29,15	37,82
59a	Ph	H	<i>S</i>	171,24	49,96	46,04	203,26	61,79	38,36	20,41
59b	Ph	H	<i>R</i>	171,24	49,71	46,28	202,43	62,83	39,31	20,65
60a	In	H	<i>S</i>	171,31	50,10	45,88	203,79	60,48	28,67	20,49
60b	In	H	<i>R</i>	171,31	49,79	46,27	202,90	61,55	29,43	20,65
119a	In	CO ₂ ^t Bu	<i>R</i>	170,37	52,04	43,08	203,35	60,14	28,78	38,84
119b	In	CO ₂ ^t Bu	<i>S</i>	170,37	51,61	43,99	201,76	60,81	29,14	38,84

^a Datos de los espectros de las mezclas de diastereoisómeros, a excepción de los compuestos **56a** y **56b**, cuyos espectros se han registrado por separado.

^b CH₃ para los compuestos **59ab** y **60ab**.

3.4.3. SÍNTESIS DE PSEUDODIPÉPTIDOS CETOMETILÉNICOS CÍCLICOS

Ácidos (3S,6S)- y (3R,6S)-6-(indol-3'-il)metil-2,5-dicetopiperidina-3-carboxílicos (67a) y (67b)

A una disolución de **46ab** (0,6 g, 2 mmoles) en MeOH (40 mL) se le añade NaOH 2 N (1 mL, 2 mmoles) y se agita a temperatura ambiente durante 3 h. Tras eliminar el disolvente por evaporación a presión reducida, el residuo obtenido se disuelve en H₂O (20 mL) y se acidifica hasta pH 3 con HCl 1 N. A continuación, se extrae con AcOEt, se seca el extracto orgánico sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (8:1) conteniendo 0,1% de AcOH, para dar lugar al producto **67ab** como un sólido blanco (0,24 g, 42%). Proporción de diastereoisómeros (3S,6S)/(3R,6S) 3:1.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆):

Isómero (3S,6S):

δ 10,93 (s, 1 H, NHⁱ), 7,50-6,88 (m, 6 H, In y H-1), 4,07 (m, 1 H, H-6), 3,20 (dd, 1 H, H-7, J = 14,6 y 5,0), 3,02 (m, 2 H, H-3 y H-7), 2,61 (dd, 1 H, H-4, J = 16,4 y 7,0), 2,21 (dd, 1 H, H-4, J = 16,4 y 5,5).

Isómero (3R,6S):

δ 10,75 (s, 1 H, NHⁱ), 7,50-6,88 (m, 6 H, In y H-1), 4,15 (m, 1 H, H-6), 3,72 (dd, 1 H, H-3, J = 10,4 y 5,6), 3,13 (m, 1 H, H-7), 3,02 (m, 1 H, H-7), 2,65 (dd, 1 H, H-4, J = 16,6 y 5,6), 2,41 (dd, 1 H, H-4, J = 16,6 y 10,4).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆):

Isómero (3S,6S):

δ 206,85 (C-5), 177,08 (CO₂H), 170,57 (C-2), 135,96, 127,35, 124,56, 120,87, 118,66, 118,40, 111,36, 108,73 (In), 59,97 (C-6), 50,79 (C-3), 27,59 (C-7).

Isómero (3R,6S):

δ 206,85 (C-5), 177,02 (CO₂H), 171,73 (C-2), 135,96, 127,27, 124,28, 120,77, 118,93, 118,34, 111,22, 108,73 (In), 59,97 (C-6), 50,79 (C-3), 27,59 (C-7).

EM: 242 (M⁺ - 44, 3,64), 130 (C₉H₈N, 100,00).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₄)	62,93	4,93	9,79
Encontrado	62,66	5,15	9,64

ciclo[Trp Ψ [COCH₂]Gly] (69)

Se calienta a reflujo durante 2,5 h una disolución de **67ab** (0,2 g, 0,7 mmoles) en dioxano (20 mL). Después de eliminar el disolvente por evaporación a vacío, el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como sistema de elución CHCl₃-MeOH (10:1), para dar lugar al producto **69** (0,07 g, 41%) en forma de espuma.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,92 (s, 1 H, NHⁱ), 7,73 (d, 1 H, α -NH-Trp, J = 2,1), 7,48-6,93 (m, 5 H, In), 4,07 (m, 1 H, α -Trp), 3,19 (dd, 1 H, β -Trp, J = 15,9 y 5,3), 3,02 (dd, 1 H, β -Trp, J = 15,9 y 5,1), 2,51 (m, 1 H, α -Gly), 2,25 (m, 1 H, COCH₂), 2,11 (m, 1 H, COCH₂), 1,78 (m, 1 H, α -Gly).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆): δ 208,02 (COCH₂), 170,77 (CONH), 135,98, 127,14, 124,55, 120,99, 118,66, 118,50, 111,32, 108,83 (In), 60,77 (α -Trp), 35,38 (COCH₂), 28,51, y 28,21 (α -Gly y β -Trp).

EM: 242 (M⁺, 3,50), 130 (C₉H₈N, 100,00).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₂)	69,41	5,82	11,56
Encontrado	69,35	5,99	11,50

ciclo[Phe Ψ [COCH₂]-ambo-Phe] (70ab)

A una disolución del compuesto **55ab** (0,35 g, 1 mmol) en dioxano (20 mL) se le añade NaOH 2 N (0,5 mL, 1 mmol) y se agita bajo atmósfera de argón durante 3 h. Después de eliminar el disolvente por evaporación a presión reducida, el residuo resultante se disuelve en H₂O (10 mL) y se acidifica hasta pH 3 con HCl 1 N. A continuación se extrae con AcOEt, se seca el extracto orgánico sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a sequedad. El crudo de reacción obtenido se disuelve en dioxano (25 mL) y se calienta a reflujo

durante 5 h. Tras eliminar el disolvente, el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando AcOEt-hexano (1:2) como eluyente, para dar lugar al producto **70ab** como un sólido blanco (0,18 g, 63% a partir de **55ab**). Proporción de diastereoisómeros (3*R*,6*S*)/(3*S*,6*S*) 2:1.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆):

Isómero (3R,6S):

δ 7,87 (s, 1 H, NH), 7,25-6,96 (m, 10 H, C₆H₅), 4,26 (m, 1 H, α-Phe¹), 2,96-2,80 (m, 4 H, α-Phe², β-Phe¹, β-Phe²), 2,28 (dd, 1 H, COCH₂, J = 16,6 y 5,4), 2,10 (m, 1 H, β-Phe²), 1,85 (m, 1 H, COCH₂).

Isómero (3S,6S):

δ 7,92 (d, 1 H, NH, J = 2,0), 7,25-6,96 (m, 10 H, C₆H₅), 4,04 (m, 1 H, α-Phe¹), 3,08 (dd, 1 H, β-Phe¹, J = 13,4 y 4,9), 2,96-2,80 (m, 2 H, β-Phe¹ y β-Phe²), 2,49 (m, 1 H, α-Phe²), 2,41 (dd, 1 H, β-Phe², J = 14,2 y 9,3), 2,32 (m, 1 H, COCH₂), 1,94 (dd, 1 H, COCH₂, J = 16,2 y 4,4).

EM: 293 (M⁺, 44,97), 202 (M⁺ – 91, 5,39), 91 (Bn, 100,00).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₁₉ H ₁₉ NO ₂)	77,79	6,53	4,77
Encontrado	77,60	6,70	4,53

3.5. SÍNTESIS DE 3-OXOINDOLIZIDINAS

3.5.1. SÍNTESIS DE 8-(*terc*-BUTOXICARBONIL)AMINO-2-METOXICARBONIL-3-OXOINDOLIZIDINAS

Procedimiento general:

A una disolución del 4-cetodiéster **72** u **80** (5 g, 10 mmoles) en MeOH (200 mL) se le añade un 10% de Pd-C (10%) y la suspensión se hidrogena a temperatura ambiente y 30 psi de presión durante 4 h. Una vez separado el catalizador por filtración, se elimina el disolvente y el residuo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como sistema de eluyentes AcOEt-hexano (1:1), obteniéndose en cada caso los productos que se describen a continuación.

(2RS,8S*,8aR*)- y (2RS,8S*,8aS*)-8-(*terc*-Butoxicarbonil)amino-2-metoxycarbonil-3-oxoindolizidina (73ab) y (73cd)

Rendimiento: 2,96 g (95%). Espuma blanca.

HPLC: $t_R = 9,95$ y $10,46$ min; eluyente A (30:70); columna núm. 1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₅)	57,68	7,74	8,99
Encontrado	57,50	7,38	8,75

(2RS,8R*,8aS*)- y (2RS,8R*,8aR*)-8-(*terc*-Butoxicarbonil)amino-2-metoxycarbonil-3-oxoindolizidina (81ab) y (81cd)

Rendimiento: 2,92 g (94%). Espuma blanca.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₅)	57,68	7,74	8,99
Encontrado	57,71	7,63	8,67

Los datos de ¹H RMN y ¹³C RMN de estos compuestos se indican en las tablas 25 y 26, respectivamente.

3.5.2. PREPARACIÓN DE 8-(*terc*-BUTOXICARBONIL)AMINO-3-OXOINDOLIZIDINA

Ácidos (2*RS*,8*S**,8*aR**)- y (2*RS*, 8*S**,8*aS**)-8-(*terc*-butoxicarbonil)amino-3-oxoindolizidina-2-carboxílicos (76ab) y (76cd)

Procedimiento 1: Hidrólisis del compuesto 73

A una disolución de **73** (0,72 g, 2,8 mmoles) en MeOH (10mL) se le añade NaOH 2 N (1,5 mL, 3 mmoles) y se agita a temperatura ambiente durante 1 h. Tras eliminar el disolvente por evaporación a presión reducida, el residuo obtenido se disuelve en H₂O (10 mL) y se acidifica hasta pH 3 con HCl 1 N. A continuación se extrae con AcOEt, se seca el extracto orgánico sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a sequedad, obteniéndose el producto **76** en forma de sólido blanco (0,61 g, 90%).

Procedimiento 2: Hidrogenación del 4-cetodiácido 77

A una disolución del 4-cetodiéster **72** (2,5 g, 5 mmoles) en MeOH (50 mL) se le añade NaOH 2 N (5 mL, 10 mmoles) y se agita a temperatura ambiente durante 2 h. Después de eliminar el disolvente por evaporación a presión reducida, el residuo resultante se disuelve en H₂O (30 mL) y se acidifica hasta pH 3 con HCl 1 N. A continuación se extrae con AcOEt, se seca el extracto orgánico sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a sequedad. El crudo de reacción obtenido se disuelve en MeOH (100 mL) y la disolución se hidrogena a temperatura ambiente, en presencia de un 10% de Pd-C (10%), a 30 psi de presión durante 4 h. Transcurrido este tiempo, se separa el catalizador por filtración y se elimina el disolvente por evaporación a vacío para dar lugar al producto **76** (sólido blanco, 1,4 g, 94%).

EM: 299 (M⁺ + 1, 0,05), 298 (M⁺, 0,07), 254 (M⁺ - 44, 1,11), 197 (M⁺ - 101, 2,35), 181 (M⁺ - 117, 22,03), 151 (M⁺ - 147, 1,02), 137 (M⁺ - 161, 100,00), 57 (^tBu, 81,61).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₅)	56,36	7,43	9,39
Encontrado	56,21	7,79	9,07

Los datos de ^1H RMN y ^{13}C RMN de este compuesto se encuentran en las tablas 25 y 26, respectivamente.

(8S*,8aR*)- y (8S*,8aS*)-8-(terc-Butoxicarbonil)amino-3-oxoindolizidina (78a) y (78b)

Se calienta a reflujo durante 15 h una disolución de **76** (0,43 g, 1,4 mmoles) en dioxano (25 mL). Después de eliminar el disolvente por evaporación a vacío, se obtiene el compuesto **78**, constituido por una mezcla de dos diastereoisómeros en proporción 12:1, determinada por HPLC [Eluyente B (25:75); columna núm. 2]. La cromatografía en columna de gel de sílice con el sistema de eluyentes CH_2Cl_2 -MeOH (40:1) conduce a la separación de los dos diastereoisómeros, que se describen a continuación.

Isómero (8S*,8aS*): 78b

Rendimiento: 20 mg (5,5%). Espuma.

HPLC: $t_R = 10,94$ min; eluyente B (25:75); columna núm. 2.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado ($\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$)	61,39	8,72	11,01
Encontrado	61,28	8,80	10,69

Isómero (8S*,8aR*): 78a

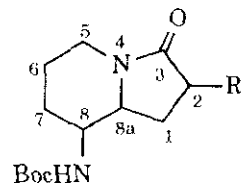
Rendimiento: 260 mg (71%). Espuma.

HPLC: $t_R = 12,39$ min; eluyente B (25:75); columna núm. 2.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado ($\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$)	61,39	8,72	11,01
Encontrado	61,43	8,59	10,75

Los datos de ^1H RMN de estos compuestos están recogidos en la tabla 25.

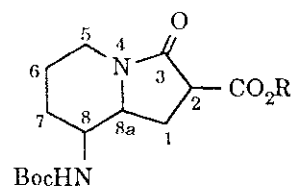
Tabla 25. Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) más significativos de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de los derivados de 3-oxoindolizidina de fórmula general



Comp.	R	Config. C-8	H-1	H-2	H-5 _{ec}	H-5 _{ax}	H-6	H-7	H-8	H-8a	NH	R	CH ₃ (Boc)	J _{8,8a}	
73^a (81)	CO ₂ CH ₃	S (R)	2,49	2,31 2,20	3,42 3,26	4,07	2,59	1,77 1,47	2,07 1,27	3,26 3,10	3,42	4,49	3,76 3,73	1,42	—
76^a	CO ₂ H	S	2,59	2,19	3,26	4,04	2,59	1,75 1,33	2,08 1,33	3,26	3,45	4,72	—	1,43	—
78a	H	S	2,17	1,93	2,36	4,07	2,51	1,74 1,46	2,07 1,26	3,27	3,09	4,47	—	1,43	9,8
78b	H	S	2,05	1,86	2,36	4,13	2,67	1,62 1,42	1,96 1,42	3,93	3,62	4,73	—	1,45	2,9

^a Datos de los espectros de las mezclas de diastereoisómeros.

Tabla 26. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^{13}C RMN (75 MHz) ^a de los compuestos de fórmula general



Comp.	R	Config. C-8	Disolvente	C-1	C-2	C-3	C-5	C-6	C-7	C-8	C-8a	R	CH ₃ (Boc)
73 (81)	CH ₃	S (R)	CDCl ₃	31,37	47,68 48,02	170,57 171,14	39,82	23,68 23,46	26,92 27,51	53,07 53,42	60,93 60,05	52,66	28,27
76	H	S	DMSO-d ₆	30,60	48,26	171,92 172,09	^b	23,61 23,41	27,45	52,70 53,60	59,60 58,61	—	28,22

^a Datos de los espectros de las mezclas de diastereoisómeros. ^b Señal incluida en la del DMSO-d₆.

3.5.3. SÍNTESIS DE 8-(*terc*-BUTOXICARBONIL)AMINO-2-METOXICARBONIL-3-OXOINDOLIZIDINAS 2,2-DISUSTITUIDAS

3.5.3.1. Preparación de derivados 2-bencil, 2-etoxicarbonilmetil y 2-*terc*-butoxicarbonilmetil sustituidos

Procedimiento general:

A una disolución del derivado de 3-oxoindolizidina **73** u **81** (1,56 g, 5 mmoles) y NaMeO o NaH (8,5 mmoles) en DME o THF (40 mL) se le añade el agente alquilante correspondiente, bromuro de bencilo, bromoacetato de etilo o bromoacetato de *terc*-butilo (8,5 mmoles). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 h, se elimina el disolvente y el residuo resultante se extrae con AcOEt y se lava con H₂O y con disolución saturada de NaCl, sucesivamente. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y, tras eliminar el disolvente, se purifica el residuo obtenido por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente el sistema que se especifica en cada caso.

Los productos obtenidos por este procedimiento se detallan a continuación. Los datos de ¹H RMN y ¹³C RMN se recogen en las tablas 27 y 28, respectivamente.

Alquilación de 73 con bromuro de bencilo

(2S*,8S*,8aS*)-2-Bencil-8-(*terc*-butoxicarbonil)amino-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (82c)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:2). Rendimiento: 4,5%. Sirupe.

HPLC: t_R = 17,83 min; eluyente A (45:55); columna núm. 1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₅)	65,65	7,51	6,96
Encontrado	65,48	7,71	6,76

(2R*,8S*,8aR*)-2-Bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (82a)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:2). Rendimiento: 50%. Espuma blanca.

HPLC: $t_R = 15,56$ min; eluyente A (45:55); columna núm. 1.

EM: 402 (M^+ , 0,54), 345 ($M^+ - 57$, 1,57), 285 ($M^+ - 117$, 100,00), 226 ($M^+ - 176$, 9,39), 194 ($M^+ - 208$, 98,70), 91 (Bn, 34,14), 57 (tBu , 31,93).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado ($C_{22}H_{30}N_2O_5$)	65,65	7,51	6,96
Encontrado	65,52	7,70	7,02

(2S*,8S*,8aR*)-2-Bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (82b)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:1). Rendimiento: 10,3%. Espuma blanca.

HPLC: $t_R = 16,63$ min; eluyente A (45:55); columna núm. 1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado ($C_{22}H_{30}N_2O_5$)	65,65	7,51	6,96
Encontrado	65,73	7,38	6,98

Alquilación de 81 con bromuro de bencilo

(2R*,8R*,8aR*)-2-Bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (87c)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:2). Rendimiento: 4,5%. Sirupe.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado ($C_{22}H_{30}N_2O_5$)	65,65	7,51	6,96
Encontrado	65,67	7,65	6,82

(2S*,8R*,8aS*)-2-Bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (87a)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:2). Rendimiento: 55,6%. Espuma blanca.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₅)	65,65	7,51	6,96
Encontrado	65,38	7,69	6,91

(2R*,8R*,8aS*)-2-Bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (87b)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:1). Rendimiento: 10,0%. Espuma blanca.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₅)	65,65	7,51	6,96
Encontrado	65,64	7,63	6,88

Alquilación de 73 con bromoacetato de etilo

(2S*,8S*,8aR*)-, (2R*,8S*,8aR*)- y (2R*,8S*,8aS*)-8-(terc-Butoxicarbonil)amino-2-(etoxicarbonil)metil-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (84a), (84b) y (84c)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:2). Se obtiene una mezcla de tres diastereoisómeros. Rendimiento: 59%. Sólido blanco. Proporción de diastereoisómeros (2S*,8S*,8aR*)/(2R*,8S*,8aR*) 5:1; (2R*,8S*,8aS*), trazas.

HPLC: t_R = 10,55 min; eluyente A (30:70); columna núm. 3.

EM: 367 (M⁺ – 31, 1,20), 353 (M⁺ – 45, 5,38), 281 (M⁺ – 117, 64,10), 222 (M⁺ – 176, 100,00), 194 (M⁺ – 204, 19,76), 150 (M⁺ – 248, 5,61), 57 (tBu, 80,79).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₁₉ H ₃₀ N ₂ O ₇)	57,27	7,59	7,03
Encontrado	57,21	7,41	6,95

Alquilación de **73** con bromoacetato de *tert*-butilo

(2S*,8S*,8aR*)- y **(2R*,8S*,8aR*)-8-(*tert*-Butoxicarbonil)amino-2-(*tert*-butoxicarbonil)metil-2-metoxycarbonil-3-oxoindolizidina (132a) y (132b)**

Eluyente: AcOEt-hexano (1:2). Rendimiento: 70%. Espuma blanca. Proporción de diastereoisómeros (2S*,8S*,8aR*)/(2R*,8S*,8aR*) 5:1.

Análisis elemental (%)	C	H	N
Calculado (C ₂₁ H ₃₄ N ₂ O ₇)	59,14	8,04	6,57
Encontrado	58,97	8,04	6,68

3.5.3.2. Obtención de derivados 2-(indol-3'-il)metil sustituidos

A una disolución de **73** (1,56 g, 5 mmoles) en DME (40 mL) se le añaden NaMeO recientemente preparado (324 mg, 6 mmoles), gramina (871 mg, 5 mmoles) y CH₃I (0,63 mL, 10 mmoles). Tras agitar primero durante 15 min a 0 °C y, después, a temperatura ambiente durante 2,5 h, se elimina el disolvente y el residuo resultante se extrae con AcOEt y se lava, primero con H₂O y después con disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice con el sistema de eluyentes AcOEt-hexano (1:1), obteniéndose una mezcla de tres diastereoisómeros. La cromatografía en placa preparativa, utilizando como eluyente AcOEt-hexano (1:2) conduce a la separación de los mencionados diastereoisómeros.

(2S*,8S*,8aS*)-8-(*tert*-Butoxicarbonil)amino-2-(indol-3'-il)metil-2-metoxycarbonil-3-oxoindolizidina (83c)

Rendimiento: 4,3%. Espuma.

HPLC: t_R = 19,11 min; eluyente A (40:60); columna núm. 1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O ₅)	65,29	7,08	9,52
Encontrado	65,44	6,95	9,26

(2S*,8S*,8aR*)-8-(terc-Butoxicarbonil)amino-2-(indol-3'-il)metil-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (83b)

Rendimiento: 8,5%. Espuma.

HPLC: $t_R = 17,48$ min; eluyente A (40:60); columna núm. 1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O ₅)	65,29	7,08	9,52
Encontrado	65,34	7,19	9,62

(2R*,8S*,8aR*)-8-(terc-Butoxicarbonil)amino-2-(indol-3'-il)metil-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (83a)

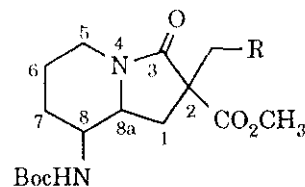
Rendimiento: 45,2%. Espuma.

HPLC: $t_R = 17,18$ min; eluyente A (40:60); columna núm.1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O ₅)	65,29	7,08	9,52
Encontrado	65,13	7,21	9,47

Los datos de ¹H RMN y ¹³C RMN de los tres diastereoisómeros **83a**, **83b** y **83c** se indican en las tablas 27 y 28, respectivamente.

Tabla 27. Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) más significativos de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de los derivados de 3-oxoindolizidina de fórmula general



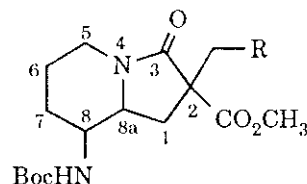
Comp.	R	Config. 2,8,8a	H-1	H-5 _{ec}	H-5 _{ax}	H-6	H-7	H-8	H-8a	NH	CO ₂ CH ₃	2-CH ₂	CH ₃ (Boc)	J _{8,8a}
82a (87a)	Ph	<i>RSR (SRS)</i>	2,40	4,03	2,18	1,66	1,97	3,23	1,77	4,12	3,80	3,42	1,43	8,6
			2,26			1,46	0,95							
82b(87b)	Ph	<i>SSR (RRS)</i>	2,53	4,00	2,47	1,64	1,90	2,62	3,09	4,20	3,66	3,28	1,36	9,7
			1,90			1,18	1,18							
82c (87c)	Ph	<i>SSS (RRR)</i>	2,26	4,04	2,32	1,49	1,93	3,64	2,32	4,95	3,83	3,46	1,44	3,1
			2,15			1,44	1,28							
83a	In	<i>RSR</i>	2,32	3,94	2,00	1,53	1,87	3,18	2,00	4,01	3,73	3,42	1,33	8,9
			2,24			1,35	0,84							
83b	In	<i>SSR</i>	2,60	3,95	2,45	1,53	1,81	2,45	3,07	4,14	3,65	3,44	1,36	9,9
			2,02			1,33	1,10							

Tabla 27 (continuación)

Comp.	R	Config. 2,8,8a	H-1	H-5 _{ec}	H-5 _{ax}	H-6	H-7	H-8	H-8a	NH	CO ₂ CH ₃	2-CH ₂	CH ₃ (Boc)	J _{8,8a}
83c	In	SSS	2,45 2,15	3,95	2,45	1,53 1,33	1,81 1,10	3,50	2,45	4,92	3,77	3,44 3,29	1,38	2,9
84a ^a	CO ₂ Et	SSR	2,64 2,34	4,10	2,64	1,78 1,53	2,14 1,35	3,51	3,22	4,41	3,77	3,08 2,82	1,45	8,5
84b ^a	CO ₂ Et	RSR	2,64 2,34	4,10	2,64	1,62 1,53	2,14 1,35	3,51	3,32	4,47	3,75	3,08 2,82	1,45	^b
132ab ^{a,c}	CO ₂ ^t Bu	SSR (RSR)	2,60 2,26	4,02	2,57	1,71 1,48	2,07 1,27	3,45	3,14	4,33	3,70 3,64	2,97 2,61	^d	8,5

^a Datos de los espectros de las mezclas de diastereoisómeros. ^b No se ha podido medir exactamente. ^c El espectro del compuesto **132b** (2*R*,8*S*,8*aR*) es idéntico al de su isómero **132a**, excepto para la resonancia correspondiente al éster metílico, observándose un singlete a 3,64 ppm. ^d Se observan dos singletes para 9 protones cada uno, a 1,38 y 1,36 ppm, respectivamente, uno de ellos corresponde a los grupos metilo del Boc y el otro a los del éster *terc*-butílico.

Tabla 28. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) de los compuestos de fórmula general



Comp.	R	Config. 2,8,8a	C-1	C-2	C-3	C-5	C-6	C-7	C-8	C-8a	OCH ₃	2-CH ₂	CH ₃ (Boc)
82a	Ph	<i>RSR</i>	32,44	56,55	172,46	39,64	23,22	31,48	53,41	59,09	52,94	39,64	28,26
82b	Ph	<i>SSR</i>	32,53	57,29	171,73	40,02	23,45	31,29	53,90	59,02	52,73	39,64	28,26
82c	Ph	<i>SSS</i>	29,22	56,25	172,50	40,27	18,01	28,49	46,62	57,19	52,93	39,52	28,33
83a	In	<i>RSR</i>	32,54	56,87	172,80	39,80	23,34	31,45	53,22	59,27	52,81	29,32	28,26
83b	In	<i>SSR</i>	32,92	57,35	172,22	39,98	23,28	31,23	53,61	58,86	52,74	29,73	28,29
83c	In	<i>SSS</i>	29,35	56,58	172,87	40,40	18,05	28,44	46,75	57,40	52,91	29,67	28,35
84a ^a	CO ₂ Et	<i>SSR</i>	32,54	53,24	171,54	40,17	23,69	31,86	52,75	59,63	53,07	38,25	28,32
132a ^a	CO ₂ ^t Bu	<i>SSR</i>	32,40	53,41	171,40	40,03	23,64	31,69	52,80	59,29	52,80	39,51	^b
132b ^a	CO ₂ ^t Bu	<i>RSR</i>	32,20	53,85	171,30	40,85	23,50	31,50	52,50 ^c	59,70	52,70 ^c	40,85	^b

^a Datos de los espectros de las mezclas de diastereoisómeros. ^b Se observan dos señales, a 28,23 y 27,92 ppm, respectivamente, una de ellas corresponde a los grupos metilo del Boc y la otra a los del éster *tert*-butílico. ^c Pueden estar intercambiados.

3.5.3.3. Preparación de 8-(*terc*-butoxicarbonil)amino-2-carboxi-3-oxoindolizidinas 2,2-disustituidas

Procedimiento general:

A una disolución del derivado de 3-oxoindolizidina **82a**, **82b**, **82c**, **87a**, **87b**, **83a**, **83b** ó **132ab** (0,3 mmoles) en MeOH (5 mL) se le añade NaOH 2 N (0,23 mL, 0,45 mmoles) y se agita a temperatura ambiente durante 2 días. Tras eliminar el disolvente por evaporación a presión reducida, el residuo obtenido se disuelve en H₂O (10 mL) y se acidifica hasta pH 3 con HCl 1 N. A continuación se extrae con AcOEt, se seca el extracto orgánico sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice en los casos en que se especifica.

Los productos obtenidos por este procedimiento se detallan a continuación. Los datos de ¹H RMN se recogen en la tabla 29.

Ácido (2R,8S*,8aR*)-2-bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-3-oxoindolizidina-2-carboxílico (85a)*

Rendimiento: 98%. Espuma blanca.

HPLC: $t_R = 17,00$ min; eluyente A (35:65); columna núm. 1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₅)	64,93	7,27	7,21
Encontrado	64,94	7,33	7,00

Ácido (2S,8S*,8aR*)-2-bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-3-oxoindolizidina-2-carboxílico (85b)*

Rendimiento: 96%. Espuma blanca.

HPLC: $t_R = 19,03$ min; eluyente A (35:65); columna núm. 1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₅)	64,93	7,27	7,21
Encontrado	64,82	7,43	7,15

Ácido (2S*,8S*,8aS*)-2-bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-3-oxoindolizidina-2-carboxílico (85c)

Rendimiento: 96%. Espuma blanca.

HPLC: $t_R = 18,30$ min; eluyente A (35:65); columna núm. 1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₅)	64,93	7,27	7,21
Encontrado	64,75	6,96	7,45

Ácido (2S*,8R*,8aS*)-2-bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-3-oxoindolizidina-2-carboxílico (88a)

Rendimiento: 97%. Espuma blanca.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₅)	64,93	7,27	7,21
Encontrado	64,75	7,56	7,08

Ácido (2R*,8R*,8aS*)-2-bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-3-oxoindolizidina-2-carboxílico (88b)

Rendimiento: 98%. Espuma blanca.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₅)	64,93	7,27	7,21
Encontrado	64,72	7,03	7,38

Ácido (2R*,8S*,8aR*)-8-(terc-butoxicarbonil)amino-2-(indol-3'-il)metil-3-oxoindolizidina-2-carboxílico (86a)

Purificado por cromatografía en columna. Eluyente: CH₂Cl₂-MeOH (10:1).

Rendimiento: 84%. Espuma.

HPLC: $t_R = 15,38$ min; eluyente A (35:65); columna núm. 1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₃ H ₂₉ N ₃ O ₅)	64,62	6,84	9,83
Encontrado	64,28	6,67	9,50

Ácido (2S*,8S*,8aR*)-8-(terc-butoxicarbonil)amino-2-(indol-3'-il)metil-3-oxoindolizidina-2-carboxílico (86b)

Purificado por cromatografía en columna. Eluyente: CH₂Cl₂-MeOH (10:1).

Rendimiento: 82%. Espuma.

HPLC: $t_R = 16,05$ min; eluyente A (35:65); columna núm. 1.

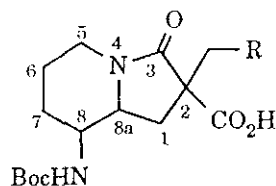
<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₃ H ₂₉ N ₃ O ₅)	64,62	6,84	9,83
Encontrado	64,45	6,72	9,95

Ácidos (2S*,8S*,8aR*)- y (2R*,8S*,8aR*)-8-(terc-butoxicarbonil)amino-2-(terc-butoxicarbonil)metil-3-oxoindolizidina-2-carboxílicos (133a) y (133b)

Rendimiento: 98%. Espuma blanca. Proporción de diastereoisómeros (2S*,8S*,8aR*)/(2R*,8S*,8aR*) 5:1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₀ H ₃₂ N ₂ O ₇)	58,24	7,82	6,79
Encontrado	58,10	8,01	6,90

Tabla 29. Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) más significativos de ^1H RMN (300 MHz) ^a de los derivados de 3-oxoindolizidina de fórmula general



Comp.	R	Config. 2,8,8a	Disolvente	H-1	H-5 _{ec}	H-5 _{ax}	H-6	H-7	H-8	H-8a	NH	2-CH ₂	CH ₃ (Boc)	J _{8,8a}
85a	Ph	<i>RSR</i>	DMSO-d ₆	2,49 2,14	3,76	2,14	1,58 1,18	1,68 1,04	3,00	2,06	6,80	3,07 2,93	1,34	8,5
85b	Ph	<i>SSR</i>	DMSO-d ₆	2,32 1,70	3,80	2,47	1,61 1,20	1,70 1,03	2,47	3,18	6,78	3,09 2,98	1,34	9,5
85c	Ph	<i>SSS</i>	DMSO-d ₆	2,14 1,94	3,73	2,14	1,60 1,25	1,68 1,25	3,47	2,14	6,44	3,06 2,93	1,34	2,3
88a	Ph	<i>SRS</i>	CDCl ₃	2,34	3,97	2,14	1,63 1,41	1,91 0,92	3,06	1,69	4,00	3,30 2,92	1,38	8,1
88b	Ph	<i>RRS</i>	CDCl ₃	2,52 1,95	3,99	2,52	1,63 1,18	1,95 1,18	2,52	3,12	4,37	3,12	1,38	^b

Tabla 29 (continuación)

Comp.	R	Config. 2,8,8a	Disolvente	H-1	H-5 _{ec}	H-5 _{ax}	H-6	H-7	H-8	H-8a	NH	2-CH ₂	CH ₃ (Boc)	J _{8,8a}
86a	In	<i>RSR</i>	DMSO-d ₆	2,49 2,15	3,76	1,99	1,56 1,19	1,67 1,04	3,04	2,25	6,69	3,16	1,33	9,8
86b	In	<i>SSR</i>	DMSO-d ₆	2,22 1,74	3,80	2,52	1,57 1,22	1,72 1,03	2,52	3,16	6,81	3,27 3,03	1,37	b
133ab ^{c,d}	CO ₂ ^t Bu	<i>SSR (RSR)</i>	DMSO-d ₆	2,38 2,24	3,78	2,51	1,68 1,28	1,84 1,28	3,23	3,23	6,95	2,69 2,56	e	b

^a 200 MHz para los compuestos **88a** y **88b**. ^b No se han podido medir exactamente. ^c Datos del espectro de la mezcla de diastereoisómeros. ^d El espectro del compuesto **133b** (*2R,8S,8aR*) es idéntico al de su isómero **133a**. ^e Se observan dos singletes para 9 protones cada uno, a 1,38 y 1,36 ppm, respectivamente, uno de ellos corresponde a los grupos metilo del Boc y el otro a los del éster *tert*-butílico.

3.5.4. PREPARACIÓN DE DERIVADOS DE MTPA

3.5.4.1. Reacciones de derivatización con el ácido

(*R*)-(+)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético

Procedimiento general:

A una disolución del 4-cetodiéster **72** u **80** ó del derivado de 3-oxo-indolizidina **82a**, **87a**, **82b** u **87b** (0,25 mmoles) en CH₂Cl₂ (4 mL) se le añade TFA (2 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 1 h. Tras eliminar el disolvente por evaporación a presión reducida, el residuo obtenido se disuelve en CH₂Cl₂ (5 mL) y se añaden TEA (0,07 mL, 0,5 mmoles) y, a continuación, BOP (122 mg, 0,28 mmoles). Tras 10 min de agitación, se añade el reactivo quiral, (*R*)-(+)-MTPA (64,5 mg, 0,28 mmoles). Después de agitar durante 5 h a temperatura ambiente, se elimina el disolvente y el residuo resultante se extrae con AcOEt y se lava, primero con H₂O y después con disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se elimina el disolvente. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando el sistema de eluyentes que se especifica en cada caso.

Los productos obtenidos por este procedimiento se describen a continuación.

(5*S*,2'*R*)-8-(Benciloxycarbonil)amino-2-metoxicarbonil-5-(2'-metoxi-2'-trifluorometil)fenilacetamido-4-oxooctanoato de metilo (**89**)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:2). Rendimiento: 61%. Sirupe.

HPLC: t_R = 11,69 min; eluyente A (50:50); columna núm. 3.

<i>Análisis elemental (%)</i>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Calculado (C ₂₉ H ₃₃ F ₃ N ₂ O ₉)	57,05	5,45	4,59
Encontrado	57,17	5,63	4,32

(5R,2'R)-8-(Benciloxycarbonil)amino-2-metoxicarbonil-5-(2'-metoxi-2'-trifluorometil)fenilacetamido-4-oxooctanoato de metilo (90)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:2). Rendimiento: 41%. Sirupe.

HPLC: $t_R = 11,69$ min; eluyente A (50:50); columna núm. 3.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₉ H ₃₃ F ₃ N ₂ O ₉)	57,05	5,45	4,59
Encontrado	56,91	5,55	4,47

Los datos de ¹H RMN de los compuestos **89** y **90** se indican en la tabla 30.

(2R,8S,8aR,2'R)- y (2S,8R,8aS,2'R)-2-Bencil-2-metoxicarbonil-8-(2'-metoxi-2'-trifluorometil)fenilacetamido-3-oxoindolizidina (91a) y (91b)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:1). Rendimiento: 62%. Espuma blanca. La proporción de diastereoisómeros obtenida en función de la procedencia del producto de partida se indica en la tabla 6.

HPLC: $t_R = 51,75$ min [isómero (2R,8S,8aR,2'R)]; 56,61 min [isómero (2S,8R,8aS,2'R)]; eluyente A (35:65); columna núm. 3.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₇ H ₂₉ F ₃ N ₂ O ₅)	62,54	5,64	5,40
Encontrado	62,48	5,71	5,39

(2S,8S,8aR,2'R)- y (2R,8R,8aS,2'R)-2-Bencil-2-metoxicarbonil-8-(2'-metoxi-2'-trifluorometil)fenilacetamido-3-oxoindolizidina (92a) y (92b)

Eluyente: AcOEt-hexano (1:1). Rendimiento: 61%. Espuma blanca. La proporción de diastereoisómeros obtenida se indica en la tabla 6.

HPLC: $t_R = 22,53$ min [isómero (2S,8S,8aR,2'R)]; 24,88 min [isómero (2R,8R,8aS,2'R)]; eluyente A (40:60); columna núm. 3.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₇ H ₂₉ F ₃ N ₂ O ₅)	62,54	5,64	5,40
Encontrado	62,61	5,89	5,47

Los datos de ¹H RMN de los compuestos **91ab** y **92ab** se encuentran recogidos en la tabla 31.

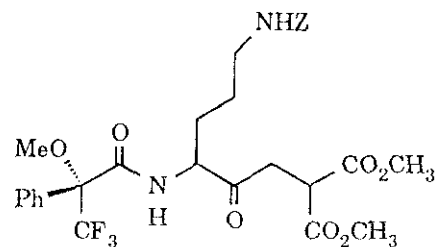
3.5.4.2. Reacciones de derivatización con el cloruro de (S)-(+)- ó (R)-(-)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacetilo

Procedimiento general:

Una disolución del derivado de 3-oxoindolizidina **82a** u **87a** (3,2 mg, 8 μ moles) en TFA (200 μ L) se agita a temperatura ambiente durante 2 h. Tras eliminar el disolvente, el residuo obtenido se disuelve en piridina (0,5 mL), se añade el reactivo quiral correspondiente (30 μ L, 160 μ moles) y la disolución se agita a temperatura ambiente durante 1,5 h. Transcurrido este tiempo, se adiciona H₂O (25 μ L) y, a continuación, se evapora el disolvente. La proporción de diastereoisómeros se determina en el crudo de reacción, mediante HPLC, obteniéndose los resultados que se especifican en la tabla 6.

En las reacciones con (R)-(-)-MTPA-Cl se obtienen los compuestos (2R,8S,8aR,2'S)- y (2S,8R,8aS,2'S)-2-bencil-2-metoxicarbonil-8-(2'-metoxi-2'-trifluorometil)fenilacetamido-3-oxoindolizidina (**93a**) y (**93b**), enantiómeros de **91b** y **91a**, respectivamente.

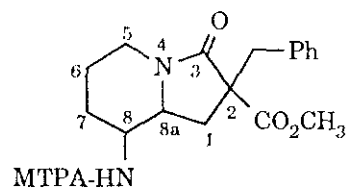
Tabla 30. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de los compuestos de fórmula general



Comp.	Config. C-5	H-2	H-3	H-5	H-6		H-7	H-8	5-NH	8-NH	CH ₂ (Z)	CO ₂ CH ₃	OCH ₃	
89	<i>S</i>	3,89	3,17	2,98	4,68	2,04	1,65	1,55	3,22	^a	4,89	5,08	3,71	3,33
90	<i>R</i>	3,93	3,17	3,03	4,68	1,95	1,56	1,33	3,22	^a	4,78	5,08	3,70	3,46

^a Señal incluida en el multiplete de los protones aromáticos.

Tabla 31. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^1H RMN [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] ^a
de los compuestos de fórmula general



Comp.	Config. 2,8,8a,2'	H-1	H-5 _{ec}	H-5 _{ax}	H-6	H-7	H-8	H-8a	NH	2-CH ₂	CO ₂ CH ₃	OCH ₃
91a	<i>RSRR</i>	2,35 2,10	3,91	2,23	1,72 1,42	1,88 1,42	3,67	2,20	^b	3,19 3,00	3,74	3,45
91b	<i>SRSR</i>	2,36	3,91	2,23	1,72 1,42	1,77 1,30	3,67	2,36	^b	3,26 3,04	3,74	3,45
92a	<i>SSRR</i>	2,26 1,79	3,94	2,53	1,27 0,86	1,90 1,54	3,05	3,37	7,60	3,21 3,13	3,62	3,46
92b	<i>RRSR</i>	2,55 1,96	3,94	2,53	1,67 1,16	1,79 1,38	2,95	3,51	7,60	3,23 3,16	3,67	3,44

^a Datos de los espectros de las mezclas de diastereoisómeros. ^b Señal incluida en el multiplete de los protones aromáticos.

3.5.5. OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE 8a-HIDROXI- Y 8a-ALCOXI-8-AMINO-3-OXOINDOLIZIDINA-2-CARBOXILATO 2-SUSTITUIDOS

3.5.5.1. Reacciones de hidrogenación del 2-bencil-4-cetodiéster derivado de Boc-Orn(Z)-OH

Método A: Reacción en MeOH

A una disolución del compuesto **94** (2,3 g, 4 mmoles) en MeOH (140 mL) se le añaden 230 mg de Pd-C (10%) y la suspensión se hidrogena a temperatura ambiente y 30 psi de presión durante 4 h. Una vez separado el catalizador por filtración, se elimina el disolvente y el residuo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como sistema de eluyentes CH₂Cl₂-MeOH (50:1), obteniéndose los productos que se indican a continuación.

Ácido (2S,8S,8aR)-2-bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-8a-metoxi-3-oxoindolizidina-2-carboxílico (95)

Rendimiento: 1,04 g (63%). Espuma blanca.

HPLC: $t_R = 9,89$ min; eluyente A (70:30); columna núm. 1.

EM: 374 (M⁺ - 44, 0,1), 342 (M⁺ - 76, 7,85), 286 (M⁺ - 132, 100,00), 242 (M⁺ - 176, 24,26), 227 (M⁺ - 191, 1,79), 195 (M⁺ - 223, 14,31), 150 (M⁺ - 268, 18,60), 91 (Bn, 23,59), 57 (tBu, 41,87).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₆)	63,14	7,23	6,69
Encontrado	62,89	7,35	6,70

Ácido (2S,8S,8aS)-2-bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-8a-hidroxi-3-oxoindolizidina-2-carboxílico (96).

Rendimiento: 0,26 g (16%). Espuma blanca.

HPLC: $t_R = 7,48$ min; eluyente A (70:30); columna núm. 1.

EM: 342 ($M^+ - 62$, 6,07), 286 ($M^+ - 118$, 67,32), 242 ($M^+ - 162$, 12,35), 227 ($M^+ - 177$, 100,00), 195 ($M^+ - 209$, 7,04), 150 ($M^+ - 254$, 13,01), 136 ($M^+ - 268$, 6,04), 91 (Bn, 28,05), 57 (tBu , 64,00).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado ($C_{21}H_{28}N_2O_6$)	62,36	6,98	6,93
Encontrado	62,04	7,31	6,85

Método B: Reacción en EtOH

Una disolución del compuesto **94** (0,8 g, 1,4 mmoles) en EtOH (50 mL) se hidrogena en presencia de un 10% de Pd-C (10%) en las mismas condiciones descritas para el método A. Tras la aplicación de un procedimiento totalmente análogo, se obtienen los productos que se indican a continuación.

Ácido (2S,8S,8aR)-2-bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-8a-etoxi-3-oxoindolizidina-2-carboxílico (99)

Rendimiento: 0,37 g (61%). Espuma blanca.

HPLC: $t_R = 12,93$ min; eluyente A (70:30); columna núm. 1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado ($C_{23}H_{32}N_2O_6$)	63,87	7,46	6,48
Encontrado	63,49	7,61	6,36

También se obtiene un compuesto de menor R_f identificado como **96** (116 mg, 21%).

Método C: Reacción en disolventes apróticos

Una disolución del 4-cetodiéster **94** (1g, 1,7 mmoles) en AcOEt o THF (60 mL) se hidrogena durante 20 h en las mismas condiciones descritas para

los métodos A y B. Después de separar el catalizador por filtración y de eliminar el disolvente, el residuo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice con el sistema de eluyentes AcOEt-hexano (1:1), obteniéndose el compuesto que se indica a continuación.

(2S,8S,8aS)-2-Bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-8a-hidroxi-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (98)

Rendimiento: 0,6 g, 83% (AcOEt); 0,57 g, 79% (THF). Espuma blanca.

HPLC: $t_R = 11,56$ min; eluyente A (70:30); columna núm. 1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₆)	63,14	7,23	6,69
Encontrado	63,28	7,42	6,54

Los datos de ¹H RMN y de ¹³C RMN de los productos obtenidos en estas reacciones de hidrogenación se recogen en las tablas 32 y 33, respectivamente.

(2S,8S,8aR)-2-Bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-8a-metoxi-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (97)

A una disolución, enfriada a 0 °C, de una mezcla de los compuestos **95** y **96** en proporción 4:1 (0,9 g, 2,1 mmoles) en THF (20 mL) se le añade una disolución etérea de CH₂N₂ (generado a partir de 0,5 g de *N*-metil-*N*-nitroso-urea). Después de agitar durante 1 h, se eliminan los disolventes por evaporación y el residuo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando AcOEt-hexano (1:2) como eluyente, obteniéndose el producto **97** como una espuma blanca. Rendimiento: 0,53 g (56%).

HPLC: $t_R = 19,25$ min; eluyente A (70:30); columna núm. 1.

EM: 433 (M⁺ + 1, 4,59), 432 (M⁺, 19,59), 400 (M⁺ - 32, 2,52), 376 (M⁺ - 57, 7,87), 345 (M⁺ - 87, 29,70), 317 (M⁺ - 115, 70,33), 149 (M⁺ - 283, 5,05), 91 (Bn, 57,66), 57 (^tBu, 88,15).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₃ H ₃₂ N ₂ O ₆)	63,87	7,46	6,48
Encontrado	63,70	7,57	6,60

También se obtiene el compuesto **98** (0,13 g, 15%).

(2S,8S,8aR)-2-Bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-8a-etoxi-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (100)

A una disolución, enfriada a 0 °C, de una mezcla de los compuestos **99** y **96** en proporción 3:1 aproximadamente (0,18 g, 0,4 mmoles) en THF (5 mL) se le añade una disolución de CH₂N₂ en éter etílico (generado a partir de 0,1 g de *N*-metil-*N*-nitrosourea). Tras agitar durante 1 h a la temperatura indicada, se eliminan los disolventes por evaporación y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando AcOEt-hexano (1:3) como eluyente, para dar lugar al producto **100** en forma de espuma. Rendimiento: 0,12 g (64%).

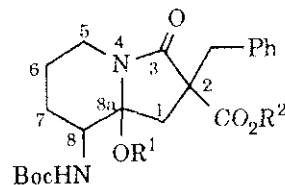
HPLC: t_R = 27,23 min; eluyente A (70:30); columna núm. 1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₄ H ₃₄ N ₂ O ₆)	64,55	7,67	6,27
Encontrado	64,51	7,43	6,12

También se obtiene el compuesto **98** (34 mg, 19%).

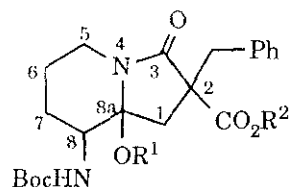
En las tablas 32 y 33 se detallan los datos de ¹H RMN y ¹³C RMN, respectivamente, de los productos obtenidos en estas reacciones de esterificación.

Tabla 32. Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) más significativos de ^1H RMN (300 MHz) de los derivados de 3-oxoindolizidina de fórmula general



Comp.	R ¹	R ²	Config. 2,8,8a	Disolvente	H-1	H-5 _{ec}	H-5 _{ax}	H-6	H-7	H-8	NH	2-CH ₂	R ¹	R ²	CH ₃ (Boc)	J _{1,1'}
95	CH ₃	H	SSR	DMSO-d ₆	2,38 2,26	3,68	2,43	1,57 1,07	1,57 1,35	2,73	6,18	3,21 2,92	3,01	—	1,40	15,7
96	H	H	SSS	DMSO-d ₆	1,99 1,79	3,55	2,69	1,66 1,22	1,54 1,22	2,99	5,78	2,80	—	—	1,35	14,4
97	CH ₃	CH ₃	SSR	CDCl ₃	2,56 2,33	3,92	2,51	1,57 1,14	1,57	2,51	4,72	3,25	3,08	3,81	1,45	15,7
97	CH ₃	CH ₃	SSR	C ₆ D ₆	2,44 2,36	3,84	2,08	1,42 0,86	1,28 0,99	2,61	4,70	3,53 3,19	2,85	3,34	1,45	15,6
98	H	CH ₃	SSS	CDCl ₃	2,43 2,28	3,84	2,90	1,77 1,44	1,77 1,65	3,25	4,93	3,52 3,04	4,50	3,83	1,44	14,4
98	H	CH ₃	SSS	C ₆ D ₆	2,41 2,33	3,80	2,68	1,47 0,95	1,47 1,11	3,30	4,92	3,30	4,72	3,18	1,43	14,3
99	Et	H	SSR	DMSO-d ₆	2,40 2,22	3,69	2,47	1,58 1,10	1,58 1,30	2,65	6,05	3,19 2,91	3,07 (CH ₂) 1,10 (CH ₃)	—	1,40	15,5
100	Et	CH ₃	SSR	CDCl ₃	2,57 2,32	3,90	2,51	1,57 1,14	1,57	2,51	4,75	3,25	3,40 (CH ₂) 3,12 (CH ₂) 1,14 (CH ₃)	3,81	1,46	15,6

Tabla 33. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^{13}C RMN (50 MHz) de los compuestos de fórmula general



Comp.	R ¹	R ²	Config. 2,8,8a	Disolvente	C-1	C-2	C-3	C-5	C-6	C-7	C-8	C-8a	2-CH ₂	R ¹	R ²	CH ₃ (Boc)
95	CH ₃	H	SSR	DMSO-d ₆	31,58	57,10	172,11	40,94	23,49	26,53	55,10	90,18	36,00	47,93	—	28,15
96	H	H	SSS	DMSO-d ₆	35,48	57,27	173,67	^a	23,55	26,60	55,78	85,49	^a	—	—	28,04
97	CH ₃	CH ₃	SSR	CDCl ₃	31,96	57,03	171,60	40,96	23,62	26,87	55,38	90,03	36,72	48,28	52,82	28,25
98	H	CH ₃	SSS	CDCl ₃	38,50	57,22	174,20	41,06	23,61	26,96	56,24	85,94	36,58	—	53,44	28,20
99	Et	H	SSR	CDCl ₃	31,66	56,96	172,28	42,29	23,48	26,68	55,14	90,11	36,89	56,04 (CH ₂) 14,76 (CH ₃)	—	28,23
100	Et	CH ₃	SSR	CDCl ₃	32,46	57,08	171,61	40,92	23,84	26,82	55,50	89,74	36,77	56,03 (CH ₂) 14,96 (CH ₃)	52,83	28,25

^a Señales incluidas en la del DMSO.

3.5.5.2. Reacciones de reducción de 8a-hidroxi- y 8a-alcoxi-3-oxoindolizidinas

Reducción de los compuestos 82a, 82b y 100 con LiAlH₄

Procedimiento general:

A una disolución del correspondiente derivado de 3-oxoindolizidina **82a**, **82b** ó **100** (0,3 mmoles) en THF (10 mL) se le añade LiAlH₄ (0,9 mmoles) y se calienta a reflujo durante 6 h. Tras neutralizar con HCl 1 N, se elimina el disolvente por evaporación y el residuo resultante se extrae con AcOEt y se lava, primero con H₂O y después con disolución saturada de NaCl. El extracto orgánico se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora a sequedad.

Los productos obtenidos por este procedimiento se detallan a continuación. Los datos de ¹H RMN y ¹³C RMN se indican en las tablas 34 y 35, respectivamente.

(2S*,8S*,8aR*)-2-Bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-2-hidroximetil-3-oxoindolizidina (103)

Rendimiento: 90%. Espuma blanca.

HPLC: t_R = 6,12 min; eluyente C (35:65); columna núm. 3.

(2R*,8S*,8aR*)-2-Bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-2-hidroximetil-3-oxoindolizidina (104)

Rendimiento: 80%. Espuma blanca.

HPLC: t_R = 5,51 min; eluyente C (35:65); columna núm. 3.

(2R,8S,8aR)-2-Bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-8a-etoxi-2-hidroxi-3-oxoindolizidina (105)

Rendimiento: 77%. Espuma.

HPLC: $t_R = 12,49$ min; eluyente C (40:60); columna núm. 3.

Reducción del compuesto 98 con $NaBH_4$

A una disolución del derivado de 3-oxoindolizidina **98** (125 mg, 0,3 mmoles) en THF (10 mL) se le añade $NaBH_4$ (34 mg, 0,9 mmoles) y se calienta a reflujo durante 6 h. Tras eliminar el disolvente por evaporación, el residuo obtenido se disuelve en AcOEt y se lava, primero con H_2O y después con disolución saturada de NaCl. El extracto orgánico se seca sobre Na_2SO_4 y se evapora el disolvente. El residuo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice con el sistema de eluyentes que se especifica en cada caso, para dar lugar a los productos que se detallan a continuación.

(2R,8S,8aS)-2-Bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-8a-hidroxi-2-hidroxi-3-oxoindolizidina (101)

Eluyente: CH_2Cl_2 -MeOH (50:1). Rendimiento: 25 mg (20%). Sirupe.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado ($C_{21}H_{30}N_2O_5$)	64,60	7,74	7,17
Encontrado	64,73	7,89	7,02

Los datos de 1H RMN y ^{13}C RMN de este compuesto se indican en las tablas 34 y 35, respectivamente.

(2R,8S,8aR)-2-Bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-2-hidroxi-3-oxoindolizidina (102)

Eluyente: CH_2Cl_2 -MeOH (20:1). Rendimiento: 25 mg (22%). Sirupe.

¹H RMN

(300 MHz, CDCl₃): δ 7,27-7,12 (m, 5 H, C₆H₅), 4,46 (s ancho, 1 H, NH), 3,47 (m, 1 H, H-8), 3,39 (d, 1 H, CH₂-OH, J = 10,5), 3,33 (d, 1 H, CH₂-OH), 3,13 (d, 1 H, H-3, J = 9,4), 3,02 (m, 1 H, H-5_{ec}), 2,89 (d, 1 H, CH₂-Ph, J = 13,3), 2,81 (d, 1 H, CH₂-Ph), 2,27 (d, 1 H, H-3), 2,10 (m, 1 H, H-5_{ax}), 2,01 (m, 2 H, H-7 y H-8a), 1,73 (m, 3 H, H-1 y H-6), 1,45 (m, 1 H, H-6), 1,41 [s, 9 H, CH₃ (Boc)], 1,08 (m, 1 H, H-7).

[300 MHz, (CD₃)₂CO]: δ 7,32-7,17 (m, 5 H, C₆H₅), 5,85 (s ancho, 1 H, NH), 3,50 (m, 1 H, H-8, J = 10,0), 3,33 (d, 1 H, CH₂-OH, J = 10,3), 3,29 (d, 1 H, CH₂-OH), 3,07 (m, 2 H, H-3 y H-5_{ec}), 2,91 (d, 1 H, CH₂-Ph, J = 13,0), 2,83 (d, 1 H, CH₂-Ph), 2,22 (d, 1 H, H-3, J = 9,4), 2,08 (m, 1 H, H-8a), 2,05 (m, 1 H, H-5_{ax}), 2,04 (m, 1 H, H-7), 1,72 (m, 3 H, H-1 y H-6), 1,39 (m, 1 H, H-6), 1,38 [s, 9 H, CH₃ (Boc)], 1,26 (m, 1 H, H-7).

¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 155,28 [CO (Boc)], 138,40, 130,28, 128,15, 126,28 (C₆H₅), 79,40 [C (Boc)], 68,40 (C-8a), 67,21 (CH₂-OH), 61,70 (C-3), 51,80 (C-8), 51,21 (C-5), 44,92 (C-2), 43,25 (C-1), 38,63 (CH₂-Ph), 31,32 (C-7), 28,34 [CH₃ (Boc)], 23,43 (C-6).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₃)	70,76	7,92	7,86
Encontrado	70,58	7,99	7,81

3.5.5.3. Obtención de Δ^{8,8a}-hexahidroindolizinas

A una disolución del compuesto **98** (0,1 g, 0,24 mmoles) en CH₂Cl₂ (10 mL) se le añade TFA (5,7 μL, 0,05 mmoles) y se agita a temperatura ambiente durante 3 h. Después de eliminar el disolvente por evaporación, el residuo resultante se purifica por cromatografía en placa preparativa, utilizando como eluyente Et₂O-AcOEt (40:1), obteniéndose el producto **106** como una espuma blanca. Rendimiento: 53 mg (55%).

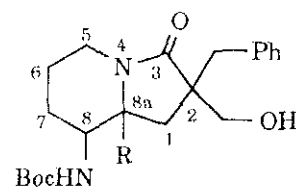
**(2S)-2-Bencil-8-(terc-butoxicarbonil)amino-
2-metoxicarbonil-3-oxo- $\Delta^{8,8\alpha}$ -hexahidroindolizina (106)**

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7,30-7,13 (m, 5 H, C_6H_5), 5,25 (s, 1 H, NH), 3,80 (s, 3 H, CO_2CH_3), 3,40 (m, 1 H, H-5 $_{ec}$), 3,27 (d, 1 H, 2- CH_2 , $J = 14,2$), 3,11 (d, 1 H, H-1, $J = 17,1$), 3,10 (d, 1 H, 2- CH_2), 2,71 (d, 1 H, H-1), 2,04 (m, 2 H, H-5 $_{ax}$ y H-7), 1,75 (m, 2 H, H-6 y H-7), 1,45 [s, 9 H, CH_3 (Boc)], 1,45 (m, 1 H, H-6).

$^{13}\text{C RMN}$ (50 MHz, CDCl_3): δ 171,48 (C-3), 170,76 (CO_2CH_3), 155,80 [CO (Boc)], 135,57, 129,97, 128,22, 127,07 (C_6H_5), 109,03 (C-8 y C-8a), 80,05 [C (Boc)], 56,13 (C-2), 52,93 (OCH_3), 39,59 y 38,77 (C-5 y 2- CH_2), 30,59 (C-1), 28,22 [CH_3 (Boc)], 25,96 (C-7), 20,42 (C-6).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado ($\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$)	65,98	7,04	7,00
Encontrado	66,11	7,29	6,67

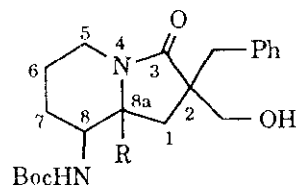
Tabla 34. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3)^a de los derivados de 3-oxoindolizidina de fórmula general



Comp.	R	Config. 2,8,8a											
			H-1	H-5 _{ec}	H-5 _{ax}	H-6	H-7	H-8	R	NH	CH ₂ -OH	CH ₂ -Ph	CH ₃ (Boc)
101	OH	<i>RSS</i>	2,31 1,96	3,65	2,75	1,69 1,38	1,69 1,55	3,06	4,61 (OH)	4,84	3,90 3,35	2,83 2,62	1,38
103	H	<i>SSR</i>	2,02 1,72	3,95	2,14	1,62 1,36	1,91 0,95	3,08	1,91 (H-8a)	4,31	3,70 3,56	3,09 2,53	1,36
104	H	<i>RSR</i>	2,65 1,95	4,05	2,53	1,66 1,24	1,95 1,24	2,65	3,07 (H-8a)	4,39	3,69 3,48	2,91	1,43
105	OEt	<i>RSR</i>	2,16 1,66	3,83	2,45	1,60 1,07	1,60	2,42	3,33 (CH ₂) 3,10 (CH ₂) 1,07 (CH ₃)	4,78	3,70 3,53	2,91 2,78	1,43

^a 300 MHz para el compuesto **101**.

Tabla 35. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) de los derivados de 3-oxoindolizidina de fórmula general



Comp.	R	Config. 2,8,8a	C-1	C-2	C-3	C-5	C-6	C-7	C-8	C-8a	R	CH ₂ -OH	CH ₂ -Ph	CH ₃ (Boc)
101	OH	RSS	39,21	51,28	175,84	41,06	23,55	27,11	55,82	85,67	—	67,26	35,98	28,31
103	H	SSR	31,31	50,79	176,21	39,74	23,36	30,43	53,81	59,12	—	67,75	39,00	28,21
104	H	RSR	31,48	50,67	175,98	39,51	23,69	29,26	53,31	59,30	—	67,28	39,13	28,25
105	OEt	RSR	30,09	50,16	176,06	39,67	23,97	26,93	55,12	90,60	55,78 (CH ₂) 14,94 (CH ₃)	66,23	36,25	28,26

3.6. PREPARACIÓN DE ANÁLOGOS DE COLECISTOQUININA DERIVADOS DE 2,5-DICETOPIPERIDINAS

3.6.1. ACOPLAMIENTO PEPTÍDICO DE DERIVADOS DE 2,5-DICETOPIPERIDINAS CON H-Phe-NH₂

Procedimiento general:

A una disolución del compuesto **58ab** ó **119ab** (1,3 mmoles) en MeOH (15 mL) se le añade NaOH 2 N (0,65 mL, 1,3 mmoles) y se agita a temperatura ambiente durante 3 h. Tras eliminar el disolvente por evaporación a presión reducida, el residuo resultante se disuelve en H₂O (15 mL), se acidifica hasta pH 3 con HCl 1 N y se extrae con AcOEt. El extracto orgánico se seca sobre Na₂SO₄ y el disolvente se evapora a sequedad. El crudo de reacción obtenido se disuelve en THF (8 mL), la disolución se enfría a 0 °C y se le añade HOSu (173 mg, 1,5 mmoles) y DCC (310 mg, 1,5 mmoles). Tras agitar durante 1 h a la temperatura indicada, se adiciona H-Phe-NH₂ (215 mg, 1,3 mmoles) en THF (5 mL) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 días. Transcurrido este tiempo, se filtra para eliminar la DCU formada y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo obtenido se disuelve en AcOEt y se lava con ácido cítrico al 10%, NaHCO₃ al 10% y disolución saturada de NaCl, sucesivamente. El extracto orgánico se seca sobre Na₂SO₄ y se elimina el disolvente por evaporación a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (40:1).

Los productos preparados por este procedimiento se detallan a continuación. Los datos de ¹H RMN y de ¹³C RMN se recogen en las tablas 36 y 37, respectivamente.

(3R,6S,1'S)- y (3S,6S,1'S)-3-(1'-Carbamoíl-2'-feniletíl)carbamoíl-3-(etoxicarbonil)metil-6-(indol-3''-il)metil-2,5-dicetopiperidina (117a) y (117b)

Rendimiento: 275 mg (41%). Sólido amarillo. Proporción de diastereoisómeros (3R,6S,1'S)/(3S,6S,1'S) 2:1, medida por HPLC.

HPLC: t_R = 5,05 min (isómero mayoritario); 6,40 min (isómero minoritario); eluyente A (45:55); columna núm. 1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₈ H ₃₀ N ₄ O ₆)	64,85	5,83	10,80
Encontrado	64,75	6,02	11,01

(3R,6S,1'S)-3-(*tert*-Butoxicarbonil)metil-3-(1'-carbamoíl-2'-feniletíl)carbamoíl-6-(indol-3''-il)metil-2,5-dicetopiperidina (121a)

Purificado por cromatografía preparativa en cromatotrón.
Eluyente: CH₂Cl₂-MeOH (60:1). Rendimiento: 310 mg (44%).
Sólido blanco (amorfo).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₀ H ₃₄ N ₄ O ₆)	65,92	6,27	10,25
Encontrado	66,07	6,43	10,36

(3S,6S,1'S)-3-(*tert*-Butoxicarbonil)metil-3-(1'-carbamoíl-2'-feniletíl)carbamoíl-6-(indol-3''-il)metil-2,5-dicetopiperidina (121b)

Purificado por cromatografía preparativa en cromatotrón. Eluyente:
CH₂Cl₂-MeOH (60:1). Rendimiento: 95 mg (13%). Sólido blanco (amorfo).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₀ H ₃₄ N ₄ O ₆)	65,92	6,27	10,25
Encontrado	65,66	6,63	9,98

3.6.2. ELIMINACIÓN DEL GRUPO PROTECTOR *tert*-BUTILO

A una disolución del derivado de 2,5-dicetopiperidina **121a** ó **121b** (82 mg, 0,15 mmoles) en CH₂Cl₂ (2 mL) se le añade TFA (1 mL) y se agita a

temperatura ambiente durante 1,5 h. Tras eliminar el disolvente por evaporación a presión reducida, el residuo resultante se purifica por cromatografía preparativa en cromatotrón, utilizando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (15:1).

Los productos obtenidos mediante este procedimiento se detallan a continuación, junto con sus datos analíticos. Los datos de ¹H RMN y ¹³C RMN se indican en las tablas 36 y 37, respectivamente.

Ácido (3R,6S,1'S)-3-(1'-carbamoil-2'-feniletil)carbamoil-6-(indol-3''-il)metil-2,5-dicetopiperidina-3-acético (113a)

Rendimiento: 65 mg (88%). Sólido blanco (amorfo).

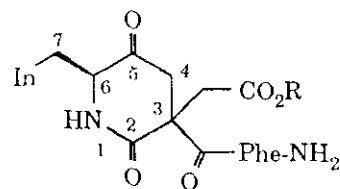
<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₆ H ₂₆ N ₄ O ₆)	63,67	5,34	11,42
Encontrado	63,52	5,61	11,52

Ácido (3S,6S,1'S)-3-(1'-carbamoil-2'-feniletil)carbamoil-6-(indol-3''-il)metil-2,5-dicetopiperidina-3-acético (113b)

Rendimiento: 60 mg (82%). Sólido blanco (amorfo).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₆ H ₂₆ N ₄ O ₆)	63,67	5,34	11,42
Encontrado	63,51	5,69	11,18

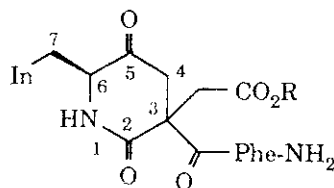
Tabla 36. Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) más significativos de ^1H RMN (300 MHz) de los derivados de 2,5-dicetopiperidina de fórmula general



Comp.	R	Config. C-3	Disolvente	H-1	H-4	H-6	H-7	3-CH ₂	R	H-1'	H-2'	J _{1,6}	J _{6,7}
117a ^a	Et	R	CDCl ₃	4,53	3,40 2,61	2,11	3,25 2,44	3,10 2,44	4,12 (CH ₂) 1,27 (CH ₃)	4,27	3,82 3,08	1,8	1,4 11,1
117b ^a	Et	S	CDCl ₃	5,69	3,02 2,64	3,68	3,35 2,72	2,90 1,96	4,12 (CH ₂) 1,26 (CH ₃)	4,64	3,45	0	b b
121a	^t Bu	R	CDCl ₃	4,52	3,37 2,52	2,11	3,27 2,46	3,23 2,44	1,44 (CH ₃)	4,29	3,86 3,10	2,1	2,0 11,2
121b	^t Bu	S	CDCl ₃	5,79	3,00 2,60	3,68	3,34 2,69	2,88 1,96	1,46 (CH ₃)	4,66	3,43	0	2,3 11,0
113a	H	R	DMSO-d ₆	5,45	2,70 2,63	2,49	2,95 2,53	2,58 2,40	—	4,09	3,30	0	1,8 b
113b	H	S	DMSO-d ₆	^c	2,72 2,51	3,62	3,13 2,73	2,58 2,00	—	4,37	3,39 3,26	b	3,3 7,8

^a Datos del espectro de la mezcla de diastereoisómeros. ^b No se han podido medir exactamente. ^c Señal incluida en el multiplete de los protones aromáticos.

Tabla 37. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^{13}C RMN (50 MHz) de los compuestos de fórmula general



Comp.	R	Config. C-3	Disolvente	C-2 y 3-CO	C-3	C-4	C-6	C-7	3-CH ₂	R	C-1'	C-2'
117a ^a	Et	<i>R</i>	CDCl ₃	171,94 171,54	52,92	37,34	60,07	27,59	31,64	61,11 (CH ₂) 13,96 (CH ₃)	59,10	34,48
117b ^a	Et	<i>S</i>	CDCl ₃	—	53,07	—	59,90	—	31,58	60,77 (CH ₂) 14,05 (CH ₃)	—	—
121a	^t Bu	<i>R</i>	DMSO-d ₆	169,99 169,77	53,04	37,81	58,85	27,76	33,67	27,76 (CH ₃)	57,05	33,84
121b	^t Bu	<i>S</i>	DMSO-d ₆	170,24 169,74	52,79	38,75	59,02	28,20	34,10	27,81 (CH ₃)	56,02	35,54
113a	H	<i>R</i>	DMSO-d ₆	172,23 170,37	53,08	37,70	59,33	27,96	32,65	—	57,46	34,0
113b	H	<i>S</i>	DMSO-d ₆	171,95 170,41	52,51	38,17	59,00	28,10	32,65	—	55,95	35,39

^a Datos del espectro de la mezcla de diastereoisómeros.

3.7. PREPARACIÓN DE ANÁLOGOS DE COLECISTOQUININA DERIVADOS DE 3-OXOINDOLIZIDINAS

3.7.1. ACOPLAMIENTO PEPTÍDICO DE DERIVADOS DE 3-OXOINDOLIZIDINA 2-BENCIL SUSTITUIDOS CON Boc-L-Trp-OH Ó Boc-D-Trp-OH

Procedimiento general:

A una disolución de Boc-L-Trp-OH ó Boc-D-Trp-OH (228 mg, 0,75 mmoles) en THF (4 mL), enfriada a 0 °C, se le añaden HOSu (104 mg, 0,9 mmoles) y DCC (186 mg, 0,9 mmoles) y se agita durante 1 h a la temperatura mencionada. Por otra parte, a una disolución del derivado de 3-oxoindolizidina **82a** u **82b** (300 mg, 0,75 mmoles) en CH₂Cl₂ (5 mL) se le añade TFA (2,5 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 1 h. Tras eliminar el disolvente, el residuo obtenido se disuelve en THF (5 mL), se le añade TEA (0,1 mL, 0,75 mmoles) y, seguidamente, se adiciona esta disolución sobre la que contiene el éster activo de Trp, preparada inmediatamente antes. Después de agitar durante 3 días a temperatura ambiente, la reacción se procesa tal y como se indica en el procedimiento general recogido en el apartado 3.6.1. El residuo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (50:1).

Los productos obtenidos por este procedimiento se detallan a continuación, con sus correspondientes datos analíticos. Los datos de ¹H RMN se recogen en la tabla 38.

(2R,8S,8aR)- y (2S,8R,8aS)-2-Bencil-8-[N^α(terc-butoxicarbonil)-L-triptofil]amino-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (122a) y (122b)

Rendimiento: 250 mg (57%). Sólido blanco. Proporción de diastereoisómeros (2R,8S,8aR)/(2S,8R,8aS) 10:1, medida por HPLC.

HPLC: t_R = 25,89 min (isómero mayoritario); 30,88 min (isómero minoritario); eluyente A (35:65); columna núm. 3.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₃ H ₄₀ N ₄ O ₆)	67,33	6,85	9,52
Encontrado	67,52	7,11	9,83

(2R,8S,8aR)- y (2S,8R,8aS)-2-Bencil-8-[N^α(terc-butoxicarbonil)-D-triptofil]amino-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (123a) y (123b)

Rendimiento: 235 mg (53%). Espuma blanca. Proporción de diastereoisómeros (2R,8S,8aR)/(2S,8R,8aS) 10:1, medida por HPLC. Los tiempos de retención de **123a** y **123b** son idénticos a los de sus enantiómeros **122b** y **122a**, respectivamente.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₃ H ₄₀ N ₄ O ₆)	67,33	6,85	9,52
Encontrado	67,11	6,50	9,52

(2S,8S,8aR)- y (2R,8R,8aS)-2-Bencil-8-[N^α(terc-butoxicarbonil)-L-triptofil]amino-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (126a) y (126b)

Rendimiento: 265 mg (60%). Sólido blanco. Proporción de diastereoisómeros (2S,8S,8aR)/(2R,8R,8aS) 4:1, medida por HPLC.

HPLC: t_R = 32,30 min (isómero mayoritario); 37,68 min (isómero minoritario); eluyente A (40:60); columna núm. 1.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₃ H ₄₀ N ₄ O ₆)	67,33	6,85	9,52
Encontrado	67,58	7,21	9,81

(2S,8S,8aR)- y (2R,8R,8aS)-2-Bencil-8-[N^α(terc-butoxicarbonil)-D-triptofil]amino-2-metoxicarbonil-3-oxoindolizidina (127a) y (127b)

Rendimiento: 210 mg (48%). Sólido blanco. Proporción de diastereoisómeros (2S,8S,8aR)/(2R,8R,8aS) 3:1, medida por HPLC. Los tiempos de retención de **127a** y **127b** son idénticos a los de sus enantiómeros **126b** y **126a**, respectivamente.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₃ H ₄₀ N ₄ O ₆)	67,33	6,85	9,52
Encontrado	67,21	7,15	9,28

3.7.2. TRANSFORMACIÓN DE ÉSTERES METÁLICOS EN AMIDAS

Procedimiento general:

Una disolución del derivado de 3-oxoindolizidina **122ab**, **123ab**, **126ab** ó **127ab** (150 mg, 0,25 mmoles) en MeOH saturado de NH₃ (50 mL) se agita a temperatura ambiente durante 6 días, renovando diariamente el NH₃/MeOH. Transcurrido este tiempo, se evapora el disolvente a sequedad. El residuo resultante se purifica por cromatografía preparativa en cromatotrón, utilizando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (40:1).

Los productos obtenidos por este procedimiento se indican a continuación, con sus correspondientes datos analíticos. En la tabla 38 se encuentran recogidos los datos de ¹H RMN.

(2S,8S,8aR)- y (2R,8R,8aS)-2-Bencil-8-[N^α(terc-butoxicarbonil)-L-triptofil]-amino-2-carbamoil-3-oxoindolizidina (124a) y (124b)

Rendimiento: 135 mg (94%). Sólido blanco. Proporción de diastereoisómeros (2S,8S,8aR)/(2R,8R,8aS) 10:1, medida por HPLC.

HPLC: t_R = 14,82 min (isómero mayoritario); 15,88 min (isómero minoritario); eluyente A (35:65); columna núm. 3.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₂ H ₃₉ N ₅ O ₅)	67,00	6,85	12,21
Encontrado	67,12	7,11	12,28

(2S,8S,8aR)- y (2R,8R,8aS)-2-Bencil-8-[N^α(terc-butoxicarbonil)-D-triptofil]-amino-2-carbamoil-3-oxoindolizidina (125a) y (125b)

Rendimiento: 140 mg (98%). Sólido blanco. Proporción de diastereoisómeros (2S,8S,8aR)/(2R,8R,8aS) 10:1, medida por HPLC. Los tiempos de retención de **125a** y **125b** son idénticos a los de sus enantiómeros **124b** y **124a**, respectivamente.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₂ H ₃₉ N ₅ O ₅)	67,00	6,85	12,21
Encontrado	67,36	6,90	12,33

(2R,8S,8aR)- y (2S,8R,8aS)-2-Bencil-8-[N^α-(terc-butoxicarbonil)-L-triptofil]-amino-2-carbamoil-3-oxoindolizidina (128a) y (128b)

Rendimiento: 138 mg (96%). Sólido blanco. Proporción de diastereoisómeros (2R,8S,8aR)/(2S,8R,8aS) 4:1, medida por HPLC.

HPLC: t_R = 20,11 min (isómero mayoritario); 23,05 min (isómero minoritario); eluyente A (40:60); columna núm. 1.

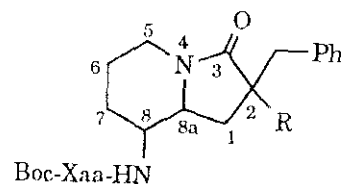
<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₂ H ₃₉ N ₅ O ₅)	67,00	6,85	12,21
Encontrado	66,82	7,14	12,01

(2R,8S,8aR)- y (2S,8R,8aS)-2-Bencil-8-[N^α-(terc-butoxicarbonil)-D-triptofil]-amino-2-carbamoil-3-oxoindolizidina (129a) y (129b)

Rendimiento: 140 mg (98%). Sólido blanco. Proporción de diastereoisómeros (2R,8S,8aR)/(2S,8R,8aS) 3:1, medida por HPLC. Los tiempos de retención de **129a** y **129b** son idénticos a los de sus enantiómeros **128b** y **128a**, respectivamente.

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₂ H ₃₉ N ₅ O ₅)	67,00	6,85	12,21
Encontrado	66,76	7,01	12,45

Tabla 38. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^1H RMN (300 MHz) ^a de los compuestos de fórmula general



Comp.	R	Xaa	Config. 2,8,8a	Disolvente	H-5 _{ec}	H-5 _{ax}	H-8	H-8a	2-CH ₂	R	8-NH	α -NH	α -Trp	CH ₃ (Boc)
122a (123b)	CO ₂ CH ₃	L-Trp (D-Trp)	RSR (SRS)	CDCl ₃	3,92	2,06	3,36	1,37	3,29 2,91	3,82 (CH ₃)	5,21	5,11	4,35	1,44
122b (123a)	CO ₂ CH ₃	L-Trp (D-Trp)	SRS (RSR)	CDCl ₃	3,96	2,11	3,48	1,91	3,30 2,99	3,80 (CH ₃)	5,20	5,15	4,33	1,46
124a (125b)	CONH ₂	L-Trp (D-Trp)	SSR (RRS)	(CD ₃) ₂ CO	3,90	2,12	3,35	1,79	3,18 2,86	7,72 (NH) 6,64 (NH)	6,98	5,96	4,28	1,39
124b (125a)	CONH ₂	L-Trp (D-Trp)	RRS (SSR)	(CD ₃) ₂ CO	3,91	2,17	3,37	2,00	3,17 2,85	7,63 (NH) 6,47 (NH)	6,92	5,83	4,28	1,39
126a (127b)	CO ₂ CH ₃	L-Trp (D-Trp)	SSR (RRS)	CDCl ₃	3,96	2,40	2,92	2,72	3,44 3,00	3,68 (CH ₃)	5,34	5,12	4,35	1,41
126b (127a)	CO ₂ CH ₃	L-Trp (D-Trp)	RRS (SSR)	CDCl ₃	3,96	2,42	2,92	2,92	3,34 3,07	3,68 (CH ₃)	5,50	5,03	4,35	1,41
128a (129b)	CONH ₂	L-Trp (D-Trp)	RSR (SRS)	(CD ₃) ₂ CO	3,93	2,49	2,78	3,10	3,21 2,98	6,50 (NH) b (NH)	b	5,86	4,33	1,35
128b (129a)	CONH ₂	L-Trp (D-Trp)	SRS (RSR)	(CD ₃) ₂ CO	3,94	2,51	2,85	3,13	3,21 3,03	6,47 (NH) b (NH)	b	5,93	4,33	1,37

^a Datos de los espectros de las mezclas de diastereoisómeros. ^b Señales incluidas en el multiplete de los protones aromáticos.

3.7.3. ACOPLAMIENTO PEPTÍDICO DE DERIVADOS DE 3-OXOINDOLIZIDINA 2-*terc*-BUTOXICARBONILMETIL SUSTITUIDOS CON H-Phe-NH₂

A una disolución del compuesto **133ab** (1,57 g, 3,8 mmoles) en THF (20 mL), enfriada a 0 °C, se le añade HOSu (525 mg, 4,6 mmoles) y DCC (940 mg, 4,6 mmoles). La mezcla de reacción se agita durante 1 h a la temperatura mencionada y, a continuación, se le adiciona H-Phe-NH₂ (623 mg, 3,8 mmoles) en THF (5 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 3 días. Tras un procesado similar al indicado en el apartado 3.6.1, el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice con el sistema de eluyentes CH₂Cl₂-MeOH (40:1), seguida de cromatografía preparativa en cromatotrón, utilizando el mismo eluyente, para dar lugar a los productos que se indican a continuación.

(2S,8S*,8aR*,1'S)-8-(terc-Butoxicarbonil)amino-2-(terc-butoxicarbonil)metil-2-(1'-carbamoíl-2'-feniletíl)carbamoíl-3-oxoindolizidina (134a)*

Rendimiento: 1,4 g (66%). Espuma blanca.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,88 (d, 1H, 1'-NH, J = 7,9), 7,32-7,21 (m, 5 H, C₆H₅), 6,96 (s, 1 H, CONH₂), 5,50 (s, 1 H, CONH₂), 4,73 (m, 1 H, H-1'), 4,52 (d, 1 H, 8-NH, J = 8,5), 4,02 (m, 1 H, H-5_{ec}), 3,32 (dd, 1 H, H-2', J = 14,3 y 5,2), 3,22 (m, 1 H, H-8a), 3,03 (dd, 1 H, H-2'), 3,03 (m, 1 H, H-8), 2,69 (d, 1 H, 2-CH₂, J = 15,2), 2,60 (m, 1 H, H-5_{ax}), 2,57 (d, 1 H, 2-CH₂), 2,34 (m, 1 H, H-1), 2,27 (dd, 1 H, H-1, J = 14,1 y 7,5), 2,10 (m, 1 H, H-7), 1,79 (m, 1 H, H-6), 1,46 (m, 1 H, H-6), 1,46 [s, 9 H, CH₃ (Boc ó CO₂^tBu)], 1,41 [s, 9 H, CH₃ (Boc ó CO₂^tBu)], 1,35 (m, 1 H, H-7).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₉ H ₄₂ N ₄ O ₇)	62,35	7,58	10,03
Encontrado	62,05	7,70	10,21

(2R,8S*,8aR*,1'S)-8-(terc-Butoxicarbonil)amino-2-(terc-butoxicarbonil)metil-2-(1'-carbamoíl-2'-feniletíl)carbamoíl-3-oxoindolizidina (134b)*

Rendimiento: 220 mg (10%). Espuma blanca.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,89 (d, 1 H, 1'-NH, J = 7,3), 7,32-7,18 (m, 5 H, C₆H₅), 6,49 (s, 1 H, CONH₂), 5,40 (s, 1 H, CONH₂), 4,68 (m, 1 H, H-1'), 4,43 (d, 1 H, 8-NH, J = 7,3), 3,99 (m, 1 H, H-5_{ec}), 3,25 (m, 1 H, H-8a), 3,12 (m, 3 H, H-8 y H-2'), 2,64 (m, 1 H, H-1), 2,57 (m, 1 H, H-5_{ax}), 2,56 (d, 1 H, 2-CH₂, J = 15,9), 2,37 (d, 1 H, 2-CH₂), 2,20 (dd, 1 H, H-1, J = 14,4 y 7,9), 2,02 (m, 1 H, H-7), 1,72 (m, 1 H, H-6), 1,44 (m, 1 H, H-6), 1,44 [s, 9 H, CH₃ (Boc ó CO₂^tBu)], 1,39 [s, 9 H, CH₃ (Boc ó CO₂^tBu)], 1,29 (m, 1 H, H-7).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₂₉ H ₄₂ N ₄ O ₇)	62,35	7,58	10,03
Encontrado	62,15	7,40	10,10

3.7.4. ACOPLAMIENTO PEPTÍDICO DE DERIVADOS DE 3-OXOINDOLIZIDINA 2-CARBOXIMETIL SUSTITUIDOS CON Boc-L-Trp-OH

A una disolución de Boc-Trp-OH (107 mg, 0,35 mmoles) en THF (3 mL), enfriada a 0 °C, se le añade HOSu (48 mg, 0,42 mmoles) y DCC (87 mg, 0,42 mmoles) y se agita durante 1 h a la temperatura mencionada. Por otra parte, a una disolución del derivado de 3-oxoindolizidina **134a** ó **134b** (195 mg, 0,35 mmoles) en CH₂Cl₂ (3 mL) se le añade TFA (1,5 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 2 h. Después de eliminar el disolvente por evaporación a vacío, el crudo de reacción obtenido se disuelve en THF (3 mL), se le añade TEA (0,05 mL, 0,35 mmoles) y, seguidamente, se adiciona esta disolución sobre la que contiene el éster activo de Trp, preparada inmediatamente antes. Después de agitar durante 3 días a temperatura ambiente y tras un procesado similar al indicado en el apartado 3.6.1, el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (40:1).

Los productos obtenidos por este procedimiento se detallan a continuación. Los datos de ¹H RMN y ¹³C RMN se encuentran recogidos en las tablas 39 y 40, respectivamente.

Ácido (2S*,8S*,8aR*,1'S)-8-[N^α-(terc-butoxicarbonil)-L-triptofil]amino-2-(1'-carbamoíl-2'-feniletil)carbamoíl-3-oxoindolizidina-2-acético (115a)

Rendimiento: 135 mg (56%). Sólido blanco (amorfo).

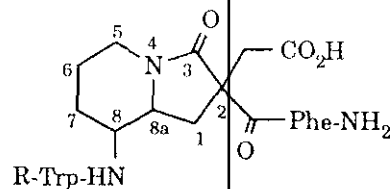
<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₆ H ₄₄ N ₆ O ₈)	62,78	6,44	12,20
Encontrado	62,40	6,30	11,97

Ácido (2R*,8S*,8aR*,1'S)-8-[N^α-(terc-butoxicarbonil)-L-triptofil]amino-2-(1'-carbamoíl-2'-feniletil)carbamoíl-3-oxoindolizidina-2-acético (115b)

Rendimiento: 140 mg (58%). Sólido blanco (amorfo).

<i>Análisis elemental (%)</i>	C	H	N
Calculado (C ₃₆ H ₄₄ N ₆ O ₈)	62,78	6,44	12,20
Encontrado	62,71	6,70	11,78

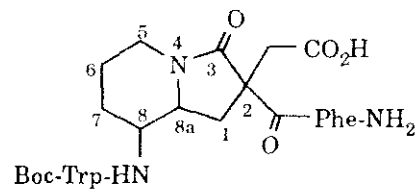
Tabla 39. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^1H RMN (500 MHz)^a de los derivados de 3-oxoindolizidina de fórmula general



Comp.	R	Config. 2,8,8a	Disolvente	H-1	H-5 _{ec}	H-5 _{ax}	H-6	H-7	H-8	H-8a	2-CH ₂	H-1'	H-2'	α -Trp	R
115a	Boc	<i>SSR</i>	CDCl_3	1,79 0,88	3,85	2,47	1,64 1,34	1,88 1,18	3,60	2,73	2,72 2,03	5,09	3,64 3,49	4,48	1,44 [CH_3 (Boc)]
115b	Boc	<i>RSR</i>	CDCl_3	2,01 1,38	3,88	2,52	1,65 1,38	1,81 1,12	3,53	3,04	2,73 2,17	4,98	3,61 3,47	4,41	1,45 [CH_3 (Boc)]
135	H	<i>SSR</i>	D_2O	1,05 0,72	3,58	2,46	1,60 1,18	1,83 1,18	3,40	2,76	2,67 2,09	4,99	3,37 3,12	4,10	—

^a 300 MHz para **135**.

Tabla 40. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) de los compuestos **115a** y **115b**



Comp.	Config. 2,8,8a	C-1	C-2	C-3	C-5	C-6	C-7	C-8	C-8a	2-CH ₂	C-1'	α -Trp	C-2'	β -Trp	CH ₃ (Boc)
115a	<i>SSR</i>	30,38	52,65	171,69	40,22	23,18	30,13	51,68	58,50	33,64	55,89	54,78	39,06	28,81	28,29
115b	<i>RSR</i>	30,40	53,29	170,41	40,29	23,32	29,95	52,15	58,22	33,13	55,54		39,50	28,18	28,31

3.7.5. ELIMINACIÓN DEL GRUPO PROTECTOR *tert*-BUTOXICARBONILO

Una disolución del derivado de 3-oxoindolizidina **128ab**, **129ab** ó **115a** (75 mg, 0,13 mmoles) en CH₂Cl₂ (2 mL) y TFA (1 mL) se agita a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se elimina el disolvente por evaporación a presión reducida y el residuo resultante se purifica por HPLC preparativo, utilizando el eluyente que se especifica en cada caso, obteniéndose, tras liofilización, los productos que se describen seguidamente en forma de trifluoroacetato.

Los datos de ¹H RMN de estos compuestos se encuentran recogidos en las tablas 39 y 41.

Trifluoroacetato de (2R,8S,8aR)-2-bencil-2-carbamoíl-8-(L-triptofil)amino-3-oxoindolizidina (130a)

Eluyente A (23:77). Rendimiento: 58 mg (76%).

Sólido blanco (liofilizado). [α]_D: +51,9° (c = 0,75, MeOH).

HPLC: t_R = 12,85 min; eluyente A (25:75); columna núm. 1.

Trifluoroacetato de (2S,8R,8aS)-2-bencil-2-carbamoíl-8-(L-triptofil)amino-3-oxoindolizidina (130b)

Eluyente A (23:77). Rendimiento: 13 mg (17%).

Sólido blanco (liofilizado). [α]_D: +2,2° (c = 0,85, MeOH).

HPLC: t_R = 24,36 min; eluyente A (25:75); columna núm. 1.

Trifluoroacetato de (2R,8S,8aR)-2-bencil-2-carbamoíl-8-(D-triptofil)amino-3-oxoindolizidina (131a)

Eluyente A (21:79). Rendimiento: 47 mg (58%).

Sólido blanco (liofilizado). [α]_D: -3,2° (c = 0,75, MeOH).

HPLC: El tiempo de retención es igual al de su enantiómero **130b**.

Trifluoroacetato de (2S,8R,8aS)-2-bencil-2-carbamóil-8-(D-triptofil)amino-3-oxoindolizidina (131b)

Eluyente A (21:79). Rendimiento: 17 mg (22%).

Sólido blanco (liofilizado). $[\alpha]_D$: $-36,6^\circ$ (c = 0,675, MeOH).

HPLC: El tiempo de retención es igual al de su enantiómero **130a**.

Ácido (2S*,8S*,8aR*,1'S)-2-(1'-carbamóil-2'-feniletil)carbamóil-8-(L-triptofil)amino-3-oxoindolizidina-2-acético (135)

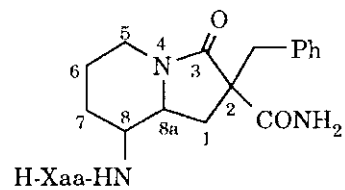
En este caso no fue necesaria la purificación por HPLC.

Rendimiento: 70 mg (93%). Sólido blanco (amorfo).

HPLC: t_R = 7,80 min; eluyente A (30:70); columna núm. 4.

Los datos de ^1H RMN de este compuesto se indican en la tabla 39.

Tabla 41. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^1H RMN (300 MHz, D_2O) de los compuestos de fórmula general



Comp.	Xaa	Config. 2,8,8a	H-5 $_{ec}$	H-5 $_{ax}$	H-8	H-8a	2-CH ₂	α -Trp
130a (131b)	L-Trp (D-Trp)	<i>RSR (SRS)</i>	3,52	2,29	1,63	2,61	2,98 2,39	4,00
130b (131a)	L-Trp (D-Trp)	<i>SRS (RSR)</i>	3,54	2,25	1,86	2,88	2,98 2,73	3,84

3.8. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE NEUROTENSINA PORTADORES DE ESQUELETOS DE 3-OXOINDOLIZIDINAS

Síntesis en fase sólida:

La síntesis en fase sólida se llevó a cabo en un sintetizador de péptidos automático ABI 430A. El acoplamiento de los diferentes Boc-aminoácidos (7,5 eq) se realizó con los ésteres de *N*-hidroxibenzotriazol, previamente formados, en CH₂Cl₂/DMF (9:1) durante 20 h a temperatura ambiente. Los derivados de 3-oxoindolizidina **85a-85c**, **88a** y **88b** (1,6 eq) se incorporaron al fragmento H-Ile-Leu-PAM-resina (1eq) en las mismas condiciones anteriores, utilizando BOP como agente de acoplamiento. En todos los casos, el ensayo cuantitativo con ninhidrina indicó acoplamientos superiores al 99%. Las desprotecciones de los grupos *N*-Boc se realizaron con TFA durante 5 min, seguido de neutralización de la resina con DIEA/DMF al 20% durante 1 min. La separación de los derivados hexapeptídicos de la resina, con eliminación simultánea de los grupos protectores de las cadenas laterales, se llevó a cabo por acidólisis con HF/*m*-cresol (9:1) durante 75 min a 0 °C. Tras precipitación con éter y filtración, los péptidos se extrajeron con AcOH al 1% y se liofilizaron. La purificación de los crudos de reacción, por RP-HPLC, se llevó a cabo en un cromatógrafo Varian equipado con una columna C₁₈ (25 × 250 mm, 7 μm), utilizando como eluyente CH₃CN/(NH₄)₂SO₄ (0,1 M, pH = 2,7) (Gradiente: 0,2% CH₃CN/min) y un flujo de 10 mL/min. Finalmente, los productos puros se aislaron por liofilización. Siguiendo este procedimiento, se prepararon los derivados **136a-136e**, cuyos datos analíticos y espectroscópicos se recogen en las tablas 42 y 43.

Tabla 42. Desplazamientos químicos (δ , ppm) más significativos de ^1H RMN de los derivados **136a-136e** [400 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1)]^a

Residuo	Protón	Compuesto				
		136a	136b	136c	136d	136e
Arg ⁸	α -CH	3,89	3,96	3,93	3,97	3,92
	β -CH ₂	1,74	1,79	1,78	1,81	1,78
	γ -CH ₂	1,51	1,50	1,48	1,48	1,50
	δ -CH ₂	3,04	3,11	3,09	3,08	2,95
Arg ⁹	α -NH	8,64	8,66	8,67	8,71	8,67
	α -CH	4,06	4,08	4,30	4,13	4,06
	β -CH ₂	1,61	1,66	1,62	1,68	1,61
	γ -CH ₂	1,51 1,44	1,53 1,45	1,61 1,51	1,55 1,48	1,50 1,39
	δ -CH ₂	3,08	3,11	3,05	3,08	3,04
Indolizidina	H-1	2,15 1,92	2,50 1,70	2,17 1,90	2,30 1,89	2,47 1,74
	H-5	3,74 2,29	3,82 2,55	3,83 2,41	3,80 2,36	3,76 2,52
	H-6	1,61 1,23	1,60 1,04	1,48 1,38	1,65 1,32	1,57 1,05
	H-7	1,67 1,07	1,64 1,18	1,54 1,38	1,70 1,15	1,61 1,17
	H-8	3,20	2,25	3,83	3,30	2,64
	H-8a	2,12	3,17	2,56	2,36	3,14
	8-NH	8,11	8,10	8,42	8,21	8,09
	2-CH ₂	3,06 2,85	3,20 2,89	3,14 2,92	3,05 2,92	3,08 2,89
Ile ¹²	α -NH	8,25	7,95	8,58	8,45	7,96
	α -CH	4,05	4,08	4,15	4,03	4,02
	β -CH	1,76	1,83	1,92	1,81	1,74
	γ -CH ₂	1,34 1,05	1,39 1,12	1,35 1,10	1,32 1,06	1,29 0,99
	γ -CH ₃	0,79	0,87	0,91	0,83	0,77
	δ -CH ₃	0,72	0,81	0,82	0,79	0,70
Leu ¹³	α -NH	8,22	8,24	8,20	8,31	8,26
	α -CH	4,21	4,25	4,15	4,24	4,23
	β -CH ₂	1,48	1,51	1,55	1,55	1,47
	γ -CH	1,51	1,51	1,55	1,55	1,50
	δ -CH ₃	0,78 0,74	0,81 0,75	0,83 0,79	0,79 0,75	0,78 0,74

^a La asignación de cada uno de los protones se realizó mediante experimentos COSY y TOCSY.

Tabla 43. Datos analíticos de los análogos de NT₈₋₁₃ **136a-136e**

Comp.	Rendimiento (%) ^a	HPLC anal. ^b		Análisis de aminoácidos		
		t _R (min)	PD-MS	Arg	Ile	Leu
136a	53 (57)	25,13	826,9	2,05	0,97	1,01
136b	35 (49)	26,89	827,0	1,95	0,97	0,94
136c	9	30,33	826,7	2,02	1,07	0,89
136d	24 (31)	27,20	826,7	2,03	0,95	0,98
136e	43 (48)	23,55	827,4	1,91	0,88	0,96

^a Los valores entre paréntesis corresponden al rendimiento global considerando en cada caso el segundo diastereoisómero. ^b Columna: Vydac 218 TP54 C₁₈ (4,6 × 250 mm, 5 μm). Eluyente: CH₃CN/(NH₄)₂SO₄ (0,1 M, pH = 2,5): Gradiente de 5% a 60% de CH₃CN en 50 min. Flujo: 1 mL/min. Detección: UV (214 nm).

3.9. MÉTODOS BIOLÓGICOS

3.9.1. ENSAYOS DE UNIÓN A LOS RECEPTORES DE CCK ¹⁵⁷

Los experimentos se llevaron a cabo en corteza de cerebro y páncreas de ratas macho Sprague-Dawley. La preparación de estas membranas y los ensayos de unión a los receptores se realizaron según el método descrito por Dauge *et al.* ¹⁵⁷. El radioligando [³H]pCCK₈ (Amersham) se incubó a concentraciones fijas de 1 nM en homogeneizados de corteza cerebral (1 h, 25 °C) y de 0,5 nM en los homogeneizados de tejido pancreático (2h, 25 °C), en presencia de concentraciones variables del competidor. Las concentraciones anteriores de radioligando representan aproximadamente la K_d del proceso de fijación.

3.9.2. ENSAYOS DE LIBERACIÓN DE AMILASA ¹⁵⁸

Para este ensayo se utilizaron acinos pancreáticos de rata. La liberación de amilasa, medida como la diferencia en la actividad de la amilasa liberada en el medio extracelular al final de la incubación con y sin secretógeno, se expresa como porcentaje de la estimulación máxima obtenida con CCK₈ (35% ± 3 del total de la amilasa contenida en los acinos) menos la secreción basal de amilasa sin secretógeno (7% ± 2 del total de la amilasa contenida en los acinos). Los compuestos a ensayar se administraron a dosis fijas de 10⁻⁵ M junto con la CCK₈.

3.9.3. INHIBICIÓN DE LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS

POR CCK₈ Ó CCK₄ EN EL ÍLEON DE COBAYA:

PREPARACIÓN DE MÚSCULO LONGITUDINAL-PLEXO MIENTÉRICO ¹³⁰

Los segmentos del íleon se sumergen en un baño para tejidos aislados que contiene tampón Krebs y se conectan a un electrodo. Después de equilibrar los tejidos (30 min, a 0,5 g de fuerza pasiva), se procede a su estimulación eléctrica (30 min, 0,1 Hz, 1 ms, 10-15 V) y se tratan con KCl 67 mM para determinar la contracción inicial máxima del músculo. Las curvas de respuesta contráctil-concentración para la CCK₈ y la CCK₄ se obtuvieron por incrementos

progresivos de la concentración del péptido, después de un lavado de la dosis precedente. Para cada tejido sólo se examinó un péptido. Para evaluar los efectos de los distintos productos en la respuesta contráctil de los péptidos, cada tejido se equilibró con el producto correspondiente (10^{-5} M) antes de añadir el péptido [CCK₈ (10^{-8} M), CCK₄ (10^{-7} M)].

3.9.4. ENSAYOS DE UNIÓN A LOS RECEPTORES DE NT ¹⁷²

Los ensayos se llevaron a cabo en homogeneizados de corteza cerebral de rata. La preparación de las membranas y los ensayos de unión a los receptores se realizaron según el método descrito por Mills *et al.* ¹⁷². El radioligando [³H]-NT se incubó a una concentración de 5 nM (1 h, 25 °C) en presencia de concentraciones variables del competidor.

4. CONCLUSIONES

El trabajo que se recoge en esta Memoria describe la síntesis de una serie de derivados de 2,5-dicetopiperidinas y 3-oxoindolizidinas, diseñados para ser aplicados en el campo de los peptoides o peptidomiméticos. Concretamente, se da cuenta de la aplicación de estas lactamas mono y bicíclicas, respectivamente, a la preparación de análogos conformacionalmente restringidos de los neuropéptidos Colecistoquinina (CCK) y Neurotensina (NT), así como de los resultados de afinidad de los compuestos sintetizados por los respectivos receptores de CCK y NT.

Los aspectos más significativos de este trabajo se resumen en las siguientes conclusiones:

1. Se describen dos rutas sintéticas alternativas para la preparación de 6-bencil- y 6-(indol-3'-il)metil-3-metoxicarbonil-2,5-dicetopiperidinas y sus correspondientes derivados 3,3-disustituídos que incorporan en posición 3 las cadenas laterales de los aminoácidos Phe, Ala y Asp. Se discuten las similitudes y diferencias entre ambas rutas, tanto en cuanto a rendimiento como en cuanto a estereoselectividad.
2. Se ha llevado a cabo el estudio conformacional por ^1H RMN de los derivados de 2,5-dicetopiperidina incluidos en el apartado anterior, encontrándose que, en DMSO, la cadena 6-aralquímica adopta preferentemente una conformación en la que dicha cadena se pliega sobre el anillo de 2,5-dicetopiperidina. Asimismo, estos resultados parecen indicar que el anillo de 2,5-dicetopiperidina adopta conformaciones de tipo bote torcido.
3. Se ha puesto a punto un procedimiento para la preparación de pseudodipéptidos cetometilénicos cíclicos.
4. Se describe la síntesis de derivados de 8-amino-3-oxoindolizidina-2-carboxilato por hidrogenación catalítica de γ -cetodiésteres derivados de Boc-L-Orn(Z)-OH y Boc-D-Orn(Z)-OH. Como dato a destacar en esta síntesis, indicar que transcurre en un solo paso

que implica eliminación del grupo protector Z, seguida de aminación reductiva intramolecular y γ -lactamización. Se ha establecido que la elaboración del esqueleto de 3-oxoindolizidina procede con un alto grado de estereoselectividad, conduciendo muy mayoritariamente a los isómeros con disposición *trans* de los sustituyentes en posiciones 8 y 8a.

5. Se han sintetizado una serie de derivados de 8-amino-2-metoxi-carbonil-3-oxoindolizidina portadores de las cadenas laterales de diferentes aminoácidos (Phe, Trp, Asp) en posición 2. La incorporación de estas cadenas, mediante reacción de alquilación con el agente alquilante adecuado, transcurre de forma estereoselectiva.
6. Se ha realizado un estudio de la enantioselectividad en el proceso de formación de las 3-oxoindolizidinas objeto de este trabajo, poniéndose de manifiesto que estas lactamas bicíclicas están constituidas por mezclas de dos enantiómeros formados durante el proceso de elaboración del anillo heterocíclico. Se ha demostrado que la enantioselectividad aumenta al disminuir la temperatura de la reacción de hidrogenación implicada en dicho proceso.
7. Se han preparado de forma estereoespecífica derivados de 8-amino-3-oxoindolizidina 2,2-disustituidos portadores de un grupo hidroxilo o alcoxilo en posición 8a, por hidrogenación catalítica, en diferentes disolventes, de 2-bencil-4-cetodiésteres derivados de Orn.
8. Con el fin de conocer la capacidad de los derivados de 8-amino-3-oxoindolizidina-2-carboxilato para inducir conformaciones de tipo giro β , se ha llevado a cabo un estudio de modelización molecular con modelos sencillos, utilizando la técnica de dinámica molecular. Los resultados de este estudio indicaron que los derivados de 3-oxoindolizidina con disposición *trans* de los sustituyentes en posiciones 8 y 8a adoptan preferentemente conformaciones extendidas. Por el contrario, el isómero 8,8a-*cis* mostró una gran tendencia a adoptar conformaciones plegadas, bien mediante formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre los grupos 8-NH y 2-CO, bien conformaciones de tipo giro β II.

9. Se han preparado una serie de análogos conformacionalmente restringidos de CCK₄, H-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, en los que el residuo de Met o el fragmento dipeptídico Met-Asp se han reemplazado por esqueletos de 2,5-dicetopiperidina convenientemente sustituidos. Los resultados de afinidad por los receptores de CCK indicaron que, en esta serie de compuestos, la disposición relativa *cis* entre las cadenas laterales correspondientes a los aminoácidos Trp y Phe favorece la unión a los receptores periféricos CCK_A, mientras que la disposición *trans* da lugar a compuestos menos efectivos. En el mejor de los casos, las afinidades encontradas fueron moderadas ($\cong 10^{-6}$ M). Estos derivados fueron inefectivos en su unión a los receptores centrales CCK_B. En los ensayos funcionales ninguno de los derivados estudiados presentó actividad antagonista significativa.
10. Se ha llevado a cabo la preparación de diferentes análogos de CCK₄ portadores de esqueletos de 3-oxoindolizidina, encontrándose que los mejores valores de afinidad por los receptores de CCK se obtuvieron para aquellos derivados en los que estas lactamas bicíclicas reemplazan al dipéptido Met-Asp. Asimismo, se ha observado que la disposición espacial relativa del grupo 2-bencilo y el residuo de Trp, así como la estereoquímica del resto de Trp, afectan al grado de selectividad por los receptores CCK_A o CCK_B. La presencia del grupo carboxamida en posición C-terminal de estos derivados aumenta en un orden de magnitud la afinidad por ambos tipos de receptores. Aquellos derivados con afinidad aceptable por los receptores CCK_A se comportaron como antagonistas periféricos moderados.
11. Con objeto de intentar aportar nuevos datos acerca de la conformación bioactiva de la NT, se han sintetizado una serie de análogos conformacionalmente restringidos de NT₈₋₁₃, H-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH, en los que el fragmento dipeptídico Pro-Tyr se ha sustituido por esqueletos de 3-oxoindolizidina con diferentes estereoquímicas. A partir de los datos de afinidad de estos análogos puede deducirse que, mientras la estereoquímica en C-2 no tiene influencia en la unión a los receptores de NT, la disposición relativa, *cis* o *trans*, de los sustituyentes en

posiciones 8 y 8a juega un papel importante. Mediante las diferencias de afinidad observadas puede establecerse que las restricciones conformacionales inducidas por las 3-oxoindolizidinas 8,8a-*trans* en los análogos de NT₈₋₁₃ se ajustan mejor a los requisitos topográficos de los receptores de NT que las inducidas por el derivado 8,8a-*cis*.

12. Se ha realizado un estudio de modelización molecular del derivado dipeptídico Ac-Pro-Tyr-NHCH₃ y de diferentes 8-acetilamino-2-bencil-3-oxoindolizidina-2-(*N*-metil)carboxamido derivados, como modelos sencillos de NT₈₋₁₃ y sus análogos restringidos, respectivamente. Este estudio puso de manifiesto que el derivado dipeptídico tiene una alta tendencia a adoptar conformaciones de giro β , tipos I o III, y de giro γ -inverso. Por otra parte, la 8-amino-2-bencil-2-carboxi-3-oxoindolizidina con disposición 8,8a-*cis*, que fue la única que mostró una gran preferencia por conformaciones plegadas, concretamente de tipos 8NH \rightarrow 2CO y giro β II, dio lugar a un análogo de NT₈₋₁₃ inactivo. Estos resultados indican que estos tipos de conformaciones son incompatibles con la conformación bioactiva de la Neurotensina.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. R. C. Allen. To Market, To Market-1984. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1985**, *20*, 316.
2. H. H. Ong y R. C. Allen. To Market, To Market-1987. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1988**, *23*, 336.
3. H. H. Ong y R. C. Allen. To Market, To Market-1988. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1989**, *24*, 307.
4. P. S. Farmer. Bridging the Gap between Bioactive Peptides and Nonpeptides: Some Perspectives in Design. En "Drug Design"; E. J. Ariëns, Ed.; Academic Press, 1980; Vol. 10, pp 119-143.
5. J. L. Fauchère. Elements for the Rationale Design of Peptide Drugs. *Ad. Drug Res.* **1986**, *15*, 29-69.
6. R. Hirschmann. Medicinal Chemistry in the Golden Age of Biology: Lessons from Steroids and Peptide Research. *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1278-1301.
7. A. Giannis y T. Kolter. Peptidomimetics for Receptor Ligands-Discovery, Development, and Medical Perspectives. *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244-1267.
8. E. T. Kaiser y F. J. Kézdy. Amphiphilic Secondary Structure: Design of Peptide Hormones. *Science* **1984**, *223*, 249-255.
9. B. A. Morgan y J. A. Gainor. Approaches to the Discovery of Nonpeptide Ligands for Peptide Receptors and Peptidases. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1989**, *24*, 243-252.
10. R. A. Wiley y D. H. Rich. Peptidomimetics Derived from Natural Products. *Med. Res. Rew.* **1993**, *13*, 327-384.
11. R. M. Freidinger. Non-Peptide Ligands for Peptide Receptors. En "Medicinal Chemistry for the 21st Century"; C. G. Vermuth, N. Koga, H. König y B. W. Metcalf, Eds.; Blackwell Scientific Publications, 1992; pp 233-245.
12. D. C. Rees. Non-Peptide Ligands for Neuropeptide Receptors. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1993**, *28*, 59-68.
13. R. S. L. Chang, V. J. Lotti, R. L. Monaghan, J. Birnbaum, E. O. Stapley, M. A. Goetz, G. Albers-Schonberg, A. A. Pachett, J. M. Liesch, O. D. Hensens y J. P. Springer. A Potent Nonpeptide Cholecystokinin Antagonist Selective for Peripheral Tissues Isolated from *Aspergillus Alliaceus*. *Science* **1985**, *230*, 177-179.
14. R. S. Chang y V. J. Lotti. Biochemical and Pharmacological Characterization of a New and Extremely Potent and Selective Nonpeptide Cholecystokinin Antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 4923-4926.
15. M. G. Bock, R. M. DiPardo, B. E. Evans, K. E. Rittle, W. L. Whitter, D. F. Veber, P. S. Anderson y R. M. Freidinger. Benzodiazepine Gastrin and Brain Cholecystokinin Receptor Ligands: L-365,260. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 13-16.

16. D. J. Carini, J. V. Duncia, P. E. Aldrich, A. T. Chin, A. L. Johnson, M. E. Pierce, W. A. Price, J. B. Santella III, G. J. Wells, R. R. Wexler, P. C. Wong, S. E. Yoo y P. B. Timmermans. Nonpeptide Angiotensin II Receptor Antagonists: The Discovery of a Series of *N*-(Biphenylmethyl)imidazoles as Potent, Orally Active Antihypertensives. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2525-2547.
17. R. M. Snider, J. W. Constantine, J. A. Lowe III, K. P. Longo, W. S. Lebel, H. A. Woody, S. E. Drozda, M. C. Desai, F. J. Vinick, R. W. Spencer y H. J. Hess. A Potent Nonpeptide Antagonist of the Substance P (NK₁) Receptor. *Science* **1991**, *251*, 435-437.
18. C. Garret, A. Carruette, V. Fardin, S. Moussaoui, J. F. Peyronel, J. C. Blanchard y P. M. Laduron. Pharmacological Properties of a Potent and Selective Nonpeptide Substance P Antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 10208-10212.
19. B. E. Evans, J. L. Leighton, K. E. Rittle, K. F. Gilbert, G. F. Lundell, N. P. Gould, D. W. Hobbs, R. M. DiPardo, D. F. Veber, D. J. Pettibone, B. V. Clineschmidt, P. S. Anderson y R. M. Freidinger. Orally Active, Nonpeptide Oxytocin Antagonists. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3919-3927.
20. G. R. Marshal. A Hierarchical Approach to Peptidomimetic Design. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3547-3558.
21. P. W. Shiller. Rational Design of Peptidomimetics: Structural and Pharmacological Aspects. En "Medicinal Chemistry for the 21st Century"; C. G. Vermuth, N. Koga, H. König y B. W. Metcalf, Eds.; Blackwell Scientific Publications, 1992; pp 215-232.
22. W. F. Huffman. Peptidomimetic Research, Design and Synthesis. En "Medicinal Chemistry for the 21st Century"; C. G. Vermuth, N. Koga, H. König y B. W. Metcalf, Eds.; Blackwell Scientific Publications, 1992; pp 247-257.
23. C. Toniolo. Conformationally Restricted Peptides through Short-Range Cyclizations. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *35*, 287-300.
24. A. F. Spatola. Peptide Backbone Modifications: A Structure-Activity Analysis of Peptides Containing Amide Bond Surrogates, Conformational Constraints, and Related Backbone Replacements. En "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins"; B. Weinstein, Ed.; Marcel Dekker: New York, 1983; Vol. VII, pp 267-357.
25. G. Hölzemann. Peptide Conformation Mimetics (Part 1). *Kontakte* **1991**, 3-12.
26. G. Hölzemann. Peptide Conformation Mimetics (Part 2). *Kontakte* **1991**, 55-63.
27. D. W. Cushman, H. S. Cheung, E. F. Sabo y M. A. Ondetti. Design of Potent Competitive Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Carboxyalkanoyl and Mercaptoalkanoyl Amino Acids. *Biochemistry* **1977**, *16*, 5484-5491.
28. A. A. Patchett, E. Harris, E. W. Tristram, M. J. Wyvratt, M. T. Wu, D. Taub, E. R. Peterson, T. J. Ikeler, J. Ten Broeke, L. G. Payne, D. L. Ondeyka, E. D. Thorsett,

- W. J. Greenlee, N. S. Lohr, R. D. Hoffsommer, H. Joshua, W. V. Ruyle, J. W. Rothrock, S. D. Aster, A. L. Maycock, F. M. Robinson, R. Hirschmann, C. S. Sweet, E. H. Ulm, D. M. Gross, T. C. Vassil y C. A. Stone. A New Class of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Nature* **1980**, *288*, 280-283.
29. M. R. Attwood, J. R. Francis, C. H. Hassall, A. Kroehn, G. Lawton, I. L. Natoff, J. S. Nixon, S. Redshaw y A. W. Thomas. New Potent Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme. *FEBS Lett.* **1984**, *165*, 201-206.
30. C. H. Hassall. Computer Graphics as an Aid to Drug Design. *Chem. Brit.* **1985**, *21*(1), 39-46.
31. R. Hirschmann, K. C. Nicolau, S. Pietranico, J. Salvino, E. M. Leahy, P. A. Sprengeler, G. Furst y A. B. Smith III. Nonpeptidal Peptidomimetics with a β -D-Glucose Scaffolding. A Partial Somatostatin Agonist Bearing a Close Structural Relationship to a Potent, Selective Substance P Antagonist. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9217-9218.
32. R. Hirschmann, P. A. Sprengeler, T. Kawasaki, J. W. Leahy, C. Shakespeare y A. B. Smith III. The First Design and Synthesis of a Steroidal Peptidomimetic. The Potential Value of Peptidomimetics in Elucidating the Bioactive Conformation of Peptide Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9699-9701.
33. W. Schilling, H. Bittiger, F. Brugger, L. Criscione, K. Hauser, S. Ofner, H. R. Olpe, A. Vasout y S. Veenstra. Approaches towards the Design and Synthesis of Nonpeptidic Substance-P Antagonists. En "Perspectives in Medicinal Chemistry"; B. Testa, E. Kyburz, W. Fuhrer y R. Giger, Eds.; Verlag Helvetica Chimica Acta: Basel, 1993; pp 207-220.
34. G. L. Olson, D. R. Bolin, M. P. Bonner, M. Bös, C. M. Cook, D. C. Fry, B. J. Graves, M. Hatada, D. E. Hill, M. Kahn, V. S. Madison, V. K. Rusiecki, R. Sarabu, J. Spinwall, G. P. Vincent y M. E. Voss. Concepts and Progress in the Development of Peptide Mimetics. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3039-3049.
35. R. M. Freidinger, D. F. Veber, D. S. Perlow, J. R. Brooks y R. Saperstein. Bioactive Conformation of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone: Evidence from a Conformationally Constrained Analog. *Science* **1980**, *210*, 656-658.
36. R. M. Freidinger, D. S. Perlow y D. F. Veber. Protected Lactam-Bridged Dipeptides for Use as Conformational Constraints in Peptides. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 104-109.
37. R. M. Freidinger. Synthesis of γ -Lactam-Constrained Tryptophyl-lysine Derivatives. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3631-3633.
38. R. M. Hagan, S. J. Ireland, C. C. Jordan, I. J. M. Beresford, M. J. Deal y P. Ward. Receptor-Selective, Peptidase-Resistant Agonists at Neurokinin NK-1 and NK-2 Receptors: New Tools for Investigating Neurokinin Function. *Neuropeptides* **1991**, *19*, 127-135.

39. J. D. Aebi, D. Guillaume, D. E. Dunlap y D. H. Rich. Synthesis, Conformation and Immunosuppressive Activity of a Conformationally Restricted Cyclosporin Lactam Analogue. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1805-1815.
40. S. Thaisrivongs, D. T. Pals, S. R. Turner y L. T. Kroll. Conformationally Constrained Renin Inhibitory Peptides: γ -Lactam-Bridged Dipeptide Isostere as Conformational Restriction. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1369-1376.
41. G. L. Olson, M. E. Voss, D. E. Hill, M. Kahn, V. S. Madison y C. M. Cook. Design and Synthesis of a Protein β -Turn Mimetic. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 323-333.
42. J. F. Callahan, J. W. Bean, J. L. Burgess, D. S. Eggleston, S. M. Hwang, K. D. Kopple, P. F. Koster, A. Nichols, C. E. Peishoff, J. M. Samanen, J. A. Vasko, A. Wong y W. F. Huffman. Design and Synthesis of a C₇ Mimetic for the Predicted γ -Turn Conformation Found in Several Constrained RGD Antagonists. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3970-3972.
43. K. A. Newlander, J. F. Callahan, M. L. Moore, T. A. Tomaszek, Jr., y W. F. Huffman. A Novel Constrained Reduced-Amide Inhibitor of HIV-1 Protease Derived from the Sequential Incorporation of γ -Turn Mimetics into a Model Substrate. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2321-2331.
44. P. Ward, G. B. Ewan, C. C. Jordan, S. J. Ireland, R. M. Hagan y J. R. Brown. Potent and Highly Selective Neurokinin Antagonists. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1848-1851.
45. M. G. Hinds, J. H. Welsh, D. M. Brennand, J. Fisher, M. J. Glennie, N. G. J. Richards, D. L. Turner y J. A. Robinson. Synthesis, Conformational Properties, and Antibody Recognition of Peptides Containing β -Turn Mimetics Based on α -Alkylproline Derivatives. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1777-1789.
46. M. J. Genin, W. H. Ojala, W. B. Gleason y R. L. Johnson. Synthesis and Crystal Structure of a Peptidomimetic Containing the (*R*)-4.4-Spiro Lactam Type-II β -Turn Mimetic. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2334-2337.
47. U. Nagai y K. Sato. Synthesis of a Bicyclic Dipeptide with the Shape of a β -Turn Central Part. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 647-650.
48. K. Sato y U. Nagai. Synthesis and Antibiotic Activity of a Gramicidin S Analogue Containing Bicyclic β -Turn Dipeptides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* **1986**, 1231-1234.
49. U. Nagai, K. Sato, R. Nakamura y R. Kato. Bicyclic Turned Dipeptide (BTD) as a β -Turn Mimetic: Its Design, Synthesis and Incorporation into Bioactive Peptides. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3577-3592.
50. N. L. Subasinghe, R. J. Bontemps, E. McIntee, R. K. Mishra y R. L. Johnson. Bicyclic Thiazolidine Lactam Peptidomimetics of the Dopamine Receptor Modulating Peptide Pro-Leu-Gly-NH₂. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2356-2361.

51. J. E. Baldwin, C. Hulme, C. J. Schofield y A. J. Edwards. Synthesis of Potential β -Turn Bicyclic Dipeptide Mimetics. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 935-936.
52. B. L. Currie, J. L. Krstenansky, Z. L. Lin, J. Ungwitayatorn, Y. H. Lee, M. del Rosario-Chow, W. S. Sheu y M. E. Johnson. Design and Synthesis of a Bicyclic Non-Peptide β -Bend Mimetic of Enkephalin. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3489-3500.
53. J. E. Baldwin, V. Lee y C. J. Schofield. Synthesis of a Bicyclic γ -Lactam Dipeptide Analogue. *Heterocycles* **1992**, *34*, 903-906.
54. J. E. Baldwin, C. Hulme, A. J. Edwards y C. J. Schofield. Synthesis of a Bicyclic γ -Lactam Dipeptide Analogue. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1665-1668.
55. M. J. Genin y R. L. Johnson. Design, Synthesis, and Conformational Analysis of a Novel Spiro-Bicyclic System as a Type II β -Turn Peptidomimetic. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8778-8783.
56. M. J. Genin, R. K. Mishra y R. L. Johnson. Dopamine Receptor Modulation by a Highly Rigid Spiro Bicyclic Peptidomimetic of Pro-Leu-Gly-NH₂. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3481-3483.
57. M. T. García-López, R. González-Muñiz y J. R. Harto. A Simple and Versatile Route to Ketomethylene Dipeptide Analogs. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1577-1580.
58. M. T. García-López, R. González-Muñiz y J. R. Harto. Synthesis of Ketomethylene Dipeptides Containing Basic Amino Acid Analogues at C-Terminus. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 5131-5138.
59. M. T. García-López, R. González-Muñiz, J. R. Harto, I. Gómez-Monterrey, C. Pérez, M. L. de Ceballos, E. López y J. del Río. Synthesis and Inhibitory Activities against Aminopeptidase B and Enkephalin-Degrading Enzymes of Ketomethylene Dipeptide Analogues of Arphamenines. *Arch. Pharm.* **1992**, *325*, 3-8.
60. M. L. de Ceballos, A. E. López, J. R. Harto, A. Bravo, I. Gómez-Monterrey, R. González-Muñiz, M. T. García-López y J. del Río. Prolongued Antinociceptive Activity of Pseudopeptide Analogues of Lys-Trp(Nps) and Trp(Nps)-Lys. *Peptides* **1992**, *13*, 63-67.
61. I. Gómez-Monterrey, R. González-Muñiz, C. Pérez-Martín, M. L. de Ceballos, J. del Río y M. T. García-López. Ketomethylene Analogues of Phosphoryl Dipeptides Related to Phosphoramidon: Synthesis and Inhibition of Proteases. *Arch. Pharm.* **1992**, *325*, 261-265.
62. R. Herranz, J. Castro-Pichel, M. T. García-López, I. Gómez-Monterrey, C. Pérez y S. Vinuesa. Ketomethylenebestatin: Synthesis and Aminopeptidase Inhibition. *Arch. Pharm.* **1993**, *326*, 395-398.
63. F. G. Salituro, N. Argawal, T. Hofmann y D. H. Rich. Inhibition of Aspartic Proteinases by Peptides Containing Lysine and Ornithine Side-Chain Analogues of Statine. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 286-295.

64. I. Gómez-Monterrey, M. J. Domínguez, R. González-Muñiz, J. R. Harto y M. T. García-López. A Facile Synthesis of 8-Amino-3-oxoindolizidine Derivatives as Conformationally Restricted Ornithyl Pseudodipeptides. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1089-1092.
65. R. Ritchie y J. E. Saxton. Studies on Indolic Mould Metabolites. Total Synthesis of L-Prolyl-2-methyltryptophan Anhydride and Deoxybrevianamide E. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 4295-4303.
66. T. Kametani, N. Kanaya y M. Ihara. Studies on the Syntheses of Heterocyclic Compounds. Part 876. The Chiral Total Synthesis of Brevianamide E and Deoxybrevianamide E. *J. Chem. Soc. Perkin I* **1981**, 959-963.
67. H. T. Openshaw y N. Whittaker. The Synthesis of Emetine and Related Compounds. Part VII. The Utility of Bi-functional Catalysts in Amine-Ester Interactions. *J. Chem. Soc. (C-)* **1969**, 89-91.
68. K. Suzuki, Y. Sasaki, N. Endo e Y. Mihara. Acetic Acid-Catalyzed Diketopiperazine Synthesis. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*(1), 233-237.
69. J. P. Wolf y H. Rapoport. Conformationally Constrained Peptides. Chiroselective Synthesis of 4-Alkyl-Substituted γ -Lactam-Bridged Dipeptides from L-Aspartic Acid. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3164-3173.
70. T. M. Zydowsky, J. F. Dellaria, Jr., y H. N. Nellans. Efficient and Versatile Synthesis of Dipeptide Isosteres Containing γ - or δ -Lactams. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5607-5616.
71. A. E. A. Porter. Pyrazines and Their Benzo Derivatives. En "Comprehensive Heterocyclic Chemistry"; A. R. Katritzky y C. W. Rees, Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1984; Vol. 3, pp 157-197.
72. S. Rajappa y R. Sreenivasan. Nitroenamines-7. Synthesis of 2,5-bis- ω -Aminoalkyl Pyrazines through a Novel Reductive Cyclodimerization. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 2217-2220.
73. M. Matsuo, S. Matsumoto, T. Kurihara, Y. Akita, T. Watanabe y A. Ohta. ^{13}C NMR Spectra of Alkyl- and Phenylpyrazines and Their N-Oxides. *Org. Mag. Res.* **1980**, *13*, 172-179.
74. C. J. Turner y G. W. H. Cheeseman. Carbon-13 NMR Spectra of Monosubstituted Pyrazines. *Org. Mag. Res.* **1974**, *6*, 663-666.
75. G. W. H. Cheeseman y E. S. G. Werstiuk. Recent Advances in Pyrazine Chemistry. En "Advances in Heterocyclic Chemistry"; A. R. Katritzky y A. J. Boulton, Eds.; Academic Press: New York, 1972; Vol.14, pp 114-115.
76. N. Vinot y J. Pinson. Synthèse de Pyrazines. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1968**, 4970-4974.
77. M. J. Wiemann, N. Vinot y M. Villadary. Synthèse de Difuryl-2,5 Pyrazines. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1965**, 3476-3478.

78. R. W. Woodard. Stereochemistry of Cyclic Dipeptides. Assignment of the Prochiral Methylenes of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 4796-4799.
79. H. Ogura y T. Kazuyoshi. Studies on Lactams IX. A Convenient Synthesis of Lactam Rings. *Heterocycles* **1981**, *15*, 467-468.
80. M. Bodanszky y A. Bodanszky. En "The Practice of Peptide Synthesis"; K. Hafner, C. W. Rees, B. M. Trost, J. M. Lehn, P. von Ragué Schleyer y R. Zahradník, Eds.; Springer-Verlag: New York, 1984; Vol. 21, p 125.
81. A. Brändström y U. Junggren. Ion Pair Extraction in Preparative Organic Chemistry VIII. Alkylation of Some Weak Acids. *Tetrahedron Lett.* **1972**, 473-474.
82. E. V. Dehmlow. Phase-Transfer Catalyzed Two-Phase Reactions in Preparative Organic Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1974**, *13*, 170-179.
83. K. D. Kopple y M. Ohnishi. Conformations of Cyclic Peptides. II. Side-Chain Conformation and Ring Shape in Cyclic Dipeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*(4), 962-970.
84. T. Shiba y K. Nunami. Structure of a Bitter Peptide in Casein Hydrolyzate by Bacterial Proteinase. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 509-512.
85. K. D. Kopple y D. H. Marr. Conformations of Cyclic Peptides. The Folding of Cyclic Dipeptides Containing an Aromatic Side Chain. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 6193-6200.
86. C. F. Lin y L. E. Webb. Crystal Structures and Conformations of the Cyclic Dipeptides *cyclo*-(Glycyl-L-tyrosyl) and *cyclo*-(L-Seryl-L-tyrosyl) Monohydrate. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*(20), 6803-6811.
87. L. E. Webb y C. F. Lin. Conformations of Cyclic Dipeptides. Structure of *cyclo*-Glycyl-L-tyrosyl(L-3-(4-Hydroxybenzyl)-2,5-piperazinedione). *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*(15), 3818-3819.
88. Ziauddin y K. D. Kopple. Conformations of Cyclic Peptides. Stability of Folded Conformations of *para*-Substituted 3-Benzylpiperazine-2,5-diones. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 253-255.
89. J. Caillet, B. Pullman y B. Maigret. Molecular Orbital Calculations on the Folding of Cyclic Dipeptides with Aromatic and Aliphatic Side Chains. *Biopolymers* **1971**, *10*, 221-224.
90. C. A. G. Haasnoot, F. A. A. M. de Leeuw y C. Altona. The Relationship between Proton-Proton NMR Coupling Constants and Substituent Electronegativities-I. An Empirical Generalization of the Karplus Equation. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2783-2792.
91. O. Jardetzky. Amino Acids and Peptides. En "NMR in Molecular Biology"; G. C. K. Roberts, Ed.; Academic Press: New York, 1981; pp 143-186.

92. M. Tanihara, T. Hiza, Y. Imanishi y T. Higashimura. Solution Conformation of Cyclic Dipeptides Having Alifatic Side Chains. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 1155-1160.
93. L. Duhamel, P. Duhamel, J. C. Launay y J. C. Plaquevent. Asymmetric Protonations. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1984**, *II*, 421-430.
94. Y. Kishi, S. Nakatsuka, T. Fukuyama y T. Goto. A Stereoselective Decarboxylation of 1,6-Dimethyl-3-(3'-indolyl)methyl-3-carboxy-2,5-piperazinedione. *Tetrahedron Lett.* **1971**, 4657-4660.
95. M. K. Hargreaves y M. A. Khan. Asymmetric Transformations in Salts of Phenylmalonic and Phenylmalonanilic Acids. The Kinetics of Racemisation of Phenylmalonic Acid. *J. Chem. Soc. Perkin II* **1973**, 1204-1207.
96. M. C. Fournié-Zaluski, E. Lucas-Soroça, J. Devin y B. P. Roques. ¹H NMR Configurational Correlation for Retro-Inverso Dipeptides: Application to the Determination of the Absolute Configuration of 'Enkephalinase' Inhibitors. Relationships between Stereochemistry and Enzyme Recognition. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 751-757.
97. D. Parker. NMR Determination of Enantiomeric Purity. *Chem Rev.* **1991**, *91*, 1441-1457.
98. W. H. Pirkle y D. J. Hoover. NMR Chiral Solvating Agents. *Top. Stereochem.* **1982**, *13*, 263-331.
99. J. A. Dale y H. S. Mosher. Nuclear Magnetic Resonance Enantiomer Reagents. Configurational Correlations *via* Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shifts of Diastereomeric Mandelate, *O*-Methylmandelate, and α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*(2), 512-519.
100. T. Kusumi, T. Fukushima, I. Ohtani y H. Kakisawa. Elucidation of the Absolute Configurations of Amino Acids and Amines by the Modified Mosher's Method. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2939-2942.
101. B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin y C. Selve. Reactifs de Couplage Peptidique IV-L'Hexafluorophosphate de Benzotriazolyl *N*-Oxytrisdiméthylamino Phosphonium (B.O.P.). *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1219-1222.
102. L. G. Barry, M. Pugnère, B. Castro y A. Previero. Racemization of α -Amino Acid Esters by Aliphatic Ketones in the Presence of Carboxylic Acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1993**, *41*, 323-325.
103. M. J. Deal, R. M. Hagan, S. J. Ireland, C. C. Jordan, A. B. McElroy, B. Porter, B. C. Ross, M. Stephens-Smith y P. Ward. Conformationally Constrained Tachykinin Analogues: Potent and Highly Selective Neurokinin NK-2 Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4195-4204.

104. M. Martín Martínez. Péptidos Conformationalmente Restringidos. Síntesis de Perhidro-3,6-dioxopirrolol[1,2-a]pirazinas. Tesina de Licenciatura, Universidad Complutense de Madrid, 1991.
105. M. Martín-Martínez, M. T. García-López y R. González-Muñiz. 3,6-Dioxoperhydro-pyrrolol[1,2-a]pyrazines. A New Approach to Conformationally Restricted Tripeptides. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2187-2190.
106. H. Takechi, S. Tateuchi, M. Machida, Y. Nishibata, K. Aoe, Y. Sato e Y. Kanaoka. Photoreactions of Succinimides with an *N*-Acyl Group in the Side Chain. Synthesis and Stereochemistry of Tricyclic Pyrrolo[1,2-*a*]pyrazine Ring Systems. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*(8), 3142-3152.
107. S. Bajusz, E. Szell, D. Bagdy, E. Barabas, G. Horvath, M. Dioszegi, Z. Fittler, G. Szabo, A. Juhasz, E. Tomori y G. Szilagyi. Highly Active and Selective Anticoagulants: D-Phe-Pro-Arg-H, a Free Tripeptide Aldehyde Prone to Spontaneous Inactivation, and Its Stable *N*-Methyl Derivative, D-MePhe-Pro-Arg-H. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1729-1735.
108. I. Han, D. J. Russell y H. Kohn. Studies on the Mechanism of Mitomycin C(1) Electrophilic Transformations: Structure-Reactivity Relationships. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1799-1807.
109. T. L. Gresham, J. E. Jansen, F. W. Shaver, J. T. Gregory y W. L. Bears. β -Propiolactone. V. Reaction with Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 1004-1006.
110. F. A. Long y M. Purchase. The Kinetics of Hydrolysis of β -Propiolactone in Acid, Neutral and Basic Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 3267-3273.
111. P. Müller y B. Siegfried. 107. S_N2 Reactions with Carboxylic Esters. Selective Cleavage of Methyl Esters. *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57*, 987-994.
112. C. K. Ingold. En "Structure and Mechanism in Organic Chemistry"; Cornell University Press: Ithaca, 1969; pp 1142-1144.
113. H. Frauenrath, T. Arenz, G. Raabe y M. Zorn. A Diastereoselective Synthesis of β -(*N*-Acylamino)aldehydes by Rearrangement of *O*-Vinyl-*N,O*-Acetals. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 83-85.
114. W. N. Speckamp y H. Hiemstra. Intramolecular Reactions of *N*-Acyliiminium Intermediates. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 4367-4416.
115. A. Hajós y P. Sohár. Über Neue Geminale Aminocarbinole. *Experientia* **1965**, *XXI*/8, 434-435.
116. W. Hartwig. Modern Methods for the Radical Deoxygenation of Alcohols. *Tetrahedron* **1983**, *39*, 2609-2645.
117. Y. Yoshimura, T. Iino y A. Matsuda. Nucleosides and Nucleotides. 102. Stereoselective Radical Deoxygenation of *tert*-Propargyl Alcohols in Sugar Moiety of Pyrimidine

- Nucleosides: Synthesis of 2'-C-Alkynyl-2'-Deoxy-1- β -D-Arabinofuranosyl-pyrimidines. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 6003-6006.
118. M. Lounasmaa y E. Karvinen. Easy Preparation of Indoloquinazolidine Enamines. *Heterocycles* **1991**, 32, 489-497.
119. R. F. Borch, M. D. Bernstein y H. D. Durst. The Cyanohydridoborate Anion as a Selective Reducing Agent. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93(12), 2897-2904.
120. G. D. Rose, L. M. Gierasch y J. A. Smith. Turns in Peptides and Proteins. *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 1-109.
121. J. B. Ball, R. A. Hughes, P. F. Alewood y P. R. Andrews. β -Turn Topography. *Tetrahedron* **1993**, 49, 3467-3478.
122. InsightII versión 2.2.0, Biosym Tech., San Diego, CA, USA.
123. J. R. Maple, U. Dinur y A. T. Hagler. Derivation of Force Fields for Molecular Mechanics and Dynamics from *ab Initio* Energy Surfaces. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 5350-5354.
124. Y. Sun y P. Kollman. Conformational Sampling and Ensemble Generation by Molecular Dynamics Simulations: 18-Crown-6 as a Test Case. *J. Comp. Chem.* **1992**, 13, 33-40.
125. J. Martínez. Gastrointestinal Regulatory Peptide Receptors. En "Comprehensive Medicinal Chemistry"; J. C. Emmett, Ed.; Pergamon Press: Oxford, 1990; Vol. 3, pp 929-939.
126. J. Harro, E. Vasar y J. Bradwejn. CCK in Animal and Human Research of Anxiety. *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, 14, 244-249.
127. J. M. Studler y J. P. Tassin. Aspects Anatomiques et Fonctionnels de la Colocalisation Cholécytokinine/Dopamine. *L'Encéphale* **1989**, XV, 79-84.
128. S. Ravard y C. T. Dourish. Cholecystokinin and Anxiety. *Trends Pharmacol. Sci.* **1990**, 11, 271-273.
129. D. Pelaprat, V. Dauge, C. Durieux, B. Charpentier y B.P. Roques. Colocalisation CCK-Dopamine: Aspects Biochimiques et Pharmacologiques. *L'Encéphale* **1989**, XV, 85-89.
130. V. L. Lucaites, L. G. Mendelsohn, N. R. Mason y M. L. Cohen. CCK-8, CCK-4 and Gastrin-Induced Contractions in Guinea Pig Ileum: Evidence for Differential Release of Acetylcholine and Substance P by CCK-A and CCK-B Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, 256, 695-703.
131. C. Durieux, M. Coppey, J. M. Zajac y B. P. Roques. Occurrence of Two Cholecystokinin Binding Sites in Guinea-Pig Brain Cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, 137, 1167-1173.
132. A. M. Nadzan y J. F. Kerwin, Jr. Cholecystokinin Agonists and Antagonists. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1991**, 26, 191-200.

133. W. H. Parsons, A. A. Patchett, M. K. Holloway, G. M. Smith, J. L. Davidson, V. J. Lotti y R. S. L. Chang. Cholecystokinin Antagonists. Synthesis and Biological Evaluation of 3-Substituted Benzolactams. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1681-1685.
134. J. F. Kerwin, Jr, A. M. Nadzan, H. Kopecka, C. W. Lin, T. Miller, D. Witte y S. Burt. Hybrid Cholecystokinin (CCK) Antagonists: New Implications in the Design and Modification of CCK Antagonists. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 739-742.
135. R. M. Freidinger, W. L. Whitter, N. P. Gould, M. K. Holloway, R. S. L. Chang y V. J. Lotti. Novel Glutamic Acid Derived Cholecystokinin Receptors Ligands. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 591-595.
136. M. Rodríguez, M. Rolland, M. F. Lignon, M. C. Galas, J. Laur, A. Aumelas y J. Martínez. Synthesis and Biological Activities of Some Cholecystokinin Analogues Substituted in Position 29 by a β -Alanine. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1989**, *34*, 394-404.
137. A. G. S. Blommaert, J. H. Weng, A. Dorville, I. McCort, B. Ducos, C. Durieux y B. P. Roques. Cholecystokinin Peptidomimetics as Selective CCK-B Antagonists: Design, Synthesis, and *in Vitro* and *in Vivo* Biochemical Properties. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2868-2877.
138. I. McCort-Tranchepain, D. Ficheux, C. Durieux y B. P. Roques. Replacement of Tyr-SO₃H by a *p*-Carboxymethylphenylalanine in a CCK₈-Derivative Preserves Its High Affinity for CCK-B Receptor. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1992**, *39*, 48-57.
139. I. Marseigne, P. Roy, A. Dor, C. Durieux, D. Pélaprat, M. Reibaud, J. C. Blanchard y B. P. Roques. Full Agonists of CCK₈ Containing a Nonhydrolyzable Sulfated Tyrosine Residue. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 445-449.
140. M. Amblard, M. Rodríguez, M. F. Lignon, M. C. Galas, N. Bernad, A. M. Artis-Noël, L. Hauad, J. Laur, J. C. Califano, A. Aumelas y J. Martínez. Synthesis and Biological Evaluation of Cholecystokinin Analogs in Which the Asp-Phe-NH₂ Moiety Has Been Replaced by a 3-Amino-7-phenylheptanoic Acid or a 3-Amino-6-(phenyloxy)hexanoic Acid. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3021-3028.
141. P. J. Corringer, J. H. Weng, B. Ducos, C. Durieux, P. Boudeau, A. Bohme y B. P. Roques. CCK-B Agonist or Antagonist Activities of Structurally Hindered and Peptidase-Resistant Boc-CCK₄ Derivatives. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 166-172.
142. V. J. Hruby, S. Fang, R. Knapp, W. Kazmierski, G. K. Lui y H. I. Yamamura. Cholecystokinin Analogs with High Affinity and Selectivity for Brain Membrane-Receptors. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *35*(6), 566-573.
143. B. Charpentier, A. Dor, P. Roy, P. England, H. Pham, C. Durieux y B. P. Roques. Synthesis and Binding Affinities of Cyclic and Related Linear Analogues of CCK₈ Selective for Central Receptors. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1184-1190.

144. K. Shiosaki, C. W. Lin, H. Kopecka, R. Craig, F. L. Wagenaar, B. Bianchi, T. Miller, D. Witte y A. M. Nadzan. Development of CCK-Tetrapeptide Analogues as Potent and Selective CCK-A Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2950-2952.
145. K. Shiosaki, C. W. Lin, H. Kopecka, D. M. Tufano, B. R. Bianchi, T. R. Miller, D. G. Witte y A. M. Nadzan. Boc-CCK-4 Derivatives Containing Side-Chain Ureas as Potent and Selective CCK-A Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2837-2842.
146. K. Shiosaki, R. Craig, C. W. Lin, R. W. Barret, T. Miller, D. Witte, C. A. Wolfram y A. M. Nadzan. Toward Development of Peptidomimetics: Diketopiperazine Templates for the Trp-Met Segment of CCK-4. En "Peptides, Chemistry and Biology"; J. Rivier Ed.; ESCOM Science Publishers: B. V. Leiden, 1990; pp 978-980.
147. D. C. Horwell, J. Hughes, J. C. Hunter, M. C. Pritchard, R. S. Richardson, E. Roberts y G. N. Woodruff. Rationally Designed 'Dipeptoid' Analogues of CCK. α -Methyltryptophan Derivatives as Highly Selective and Orally Active Gastrin and CCK-B Antagonists with Potent Anxiolytic Properties. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 404-414.
148. J. Hughes, P. Boden, B. Costall, A. Domeney, E. Kelly, D. C. Horwell, J. C. Hunter, R. D. Pinnock y G. N. Woodruff. Development of a Class of Selective Cholecystokinin Type B Receptor Antagonists Having Potent Anxiolytic Activity. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* **1990**, *87*, 6728-6732.
149. P. R. Boden, J. M. Eden, M. Higginbottom, D. R. Hill, D. C. Horwell, J. C. Hunter, K. Martin, M. C. Pritchard, R. S. Richardson y E. Roberts. Rationally Designed 'Dipeptoid' Analogues of Cholecystokinin (CCK): C-Terminal Structure-Activity Relationships of α -Methyltryptophan Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **1993**, *28*, 47-61.
150. M. Higginbottom, C. Kneen y G. S. Ratcliffe. Rationally Designed 'Dipeptoid' Analogues of CCK. A Free-Wilson/Fujita-Ban Analysis of Some α -Methyltryptophan Derivatives as CCK-B Antagonists. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1572-1577.
151. M. W. Holladay, C. W. Lin, C. S. May, D. S. Garvey, D. G. Witte, T. R. Miller, C. A. W. Wolfram y A. M. Nadzan. *trans*-3-*n*-Propyl-L-proline is a Highly Favorable, Conformationally Restricted Replacement for Methionine in the C-Terminal Tetrapeptide of Cholecystokinin. Stereoselective Synthesis of 3-Allyl- and 3-*n*-Propyl-L-proline Derivatives from 4-Hydroxy-L-proline. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 455-457.
152. W. R. Ewing, B. F. Molino, C. Pendley, P. R. Darkes y B. J. Kosmider. Novel CCK-4 Analogs with Selectivity for Gastrin Receptors. En "Peptides 1990"; E. Giralt y D. Andreu, Eds.; ESCOM Science Publishers: B. V. Leiden, 1991; pp 700-701.
153. R. González-Muñiz, F. Bergeron, I. Marseigne, C. Durieux y B. P. Roques. Boc-Trp-Orn(Z)-Asp-NH₂ and Derivatives: A New Family of CCK Antagonists. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 3199-3204.

154. M. C. Fournié-Zaluski, J. Belleney, B. Lux, C. Durieux, D. Gérard, G. Gacel, B. Maigret y B. P. Roques. Conformational Analysis of Cholecystokinin CCK₂₆₋₃₃ and Related Fragments by ¹H NMR Spectroscopy, Fluorescence-Transfer Measurements, and Calculations. *Biochemistry* **1986**, *25*, 3778-3787.
155. M. Kreissler, M. Pesquer, B. Maigret, M. C. Fournié-Zaluski y B. P. Roques. Computer Simulation of the Conformational Behavior of Cholecystokinin Fragments: Conformational Families of Sulfated CCK₈. *J. Computer-Aided Mol. Design* **1989**, *3*, 85-94.
156. M. Bodanszky y A. Bodanszky. En "The Practice of Peptide Synthesis"; K. Hafner, C. W. Rees, B. M. Trost, J. M. Lehn, P. von Ragué Schleyer y R. Zahradník, Eds.; Springer-Verlag: New York, 1984; Vol. 21, pp 146-147.
157. V. Dauge, G. A. Bohme, J. N. Crawley, C. Durieux, J. M. Stutzmann, J. Feger, J. C. Blanchard y B. P. Roques. Investigation of Behavioral and Electrophysiological Responses Induced by Selective Stimulation of CCK_B Receptors by Using a New Highly Potent CCK Analog, BC 264. *Synapse* **1990**, *6*, 73-80.
158. C. Mendre, M. Rodríguez, M. F. Lignon, M. C. Galas, C. Gueudet, P. Worms y J. Martínez. Pharmacological Activity of Cholecystokinin Analogues Modified in the Met²⁸-Gly²⁹ Region. *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, *186*, 213-222.
159. J. Martínez. Gastrointestinal Regulatory Peptide Receptors. En "Comprehensive Medicinal Chemistry"; J. C. Emmet, Ed.; Pergamon Press: Oxford, 1990; Vol. 3, pp 944-946.
160. G. Bissette, P. Manberg, C. B. Nemeroff y A. J. Prange, Jr. Neurotensin, a Biologically Active Peptide. *Life Sci.* **1978**, *23*, 2173-2182.
161. J. E. Rivier, L. H. Lazarus, M. H. Perrin y M. R. Brawn. Neurotensin Analogues. Structure-Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 1409-1412.
162. L. H. Lazarus, M. H. Perrin, M. R. Brawn y J. E. Rivier. Mast Cell Binding to Neurotensin II. Molecular Conformation of Neurotensin Involved in the Stereospecific Binding to Mast Cell Receptor Sites. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 7180-7183.
163. R. Quirion, D. Regoli, F. Rioux y S. St-Pierre. Structure-Activity Studies with Neurotensin: Analysis of Positions 9, 10 and 11. *Brit. J. Pharmacol.* **1980**, *69*, 689-692.
164. S. St-Pierre, J. M. Lalonde, M. Gendreau, R. Quirion, D. Regoli y F. Rioux. Synthesis of Peptides by the Solid-Phase Method. 6. Neurotensin, Fragments and Analogues. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 370-376.
165. J. A. Henry, D. C. Horwell, K. G. Meecham y D. C. Rees. A Structure-Affinity Study of the Amino Acid Side-Chains in Neurotensin: N- and C-Terminal Deletions and Ala-Scan. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 949-952.

166. P. Kitabgi, W. Rostène, M. Dussailant, A. Schotte, P. Laduron y J. P. Vincent. Two Populations of Neurotensin Binding Sites in Murine Brain: Discrimination by the Antihistamine Levocabastine Reveals Markedly Different Radioautographic Distribution. *Eur. J. Pharmacol.* **1987**, *140*, 285-293.
167. M. Cotrait y M. Ptak. Conformational Energy Calculation on the Neurotensin C-Terminal Pentapeptide Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH. *J. Comp. Chem.* **1981**, *2*, 460-469.
168. W. L. Cody, J. X. He, D. L. Heyl, A. M. Thieme-Seffler, D. J. Wustrow, T. K. Sawyer, H. Akunne, T. A. Pugsley, A. E. Corbin y M. D. Davis. Neurotensin: Structure-Activity Relationships of the C-Terminal Hexapeptide (Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu). En "Peptides 1992"; C. H. Schneider y A. N. Eberle, Eds.; ESCOM: Leiden, 1993; pp 677-678.
169. J. L. Nieto, M. Rico, J. Santoro, J. Herranz y F. J. Bermejo. Assignment and Conformation of Neurotensin in Aqueous Solution by ^1H NMR. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1986**, *28*, 315-323.
170. G.-Y. Xu y C. M. Deber. Conformations of Neurotensin in Solution and in Membrane Environments Studied by 2-D NMR Spectroscopy. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 528-535.
171. M. Cotrait. Conformation Study of Neurotensin C-Terminal Heptapeptide Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1984**, *23*, 355-360.
172. A. Mills, C. D. Demoliou-Mason y E. A. Barnard. Characterization of Neurotensin Binding Sites in Intact and Solubilized Bovine Brain Membranes. *J. Neurochem.* **1988**, *50*, 904-911.