

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I



**ANÁLOGOS DE VEGF Y VAMMIN: NUEVA
APROXIMACIÓN EN LA BÚSQUEDA DE
INHIBIDORES DE ANGIOGÉNESIS.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Isabel García-Aranda Ángel

Bajo la dirección de los doctores

M^a Jesús Pérez de Vega
Rosario González Muñiz

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-3762-9

© María Isabel García-Aranda Ángel, 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I



ANÁLOGOS DE VEGF Y VAMMIN:
NUEVA APROXIMACIÓN EN LA BÚSQUEDA
DE INHIBIDORES DE ANGIOGÉNESIS

TESIS DOCTORAL

MARÍA ISABEL GARCÍA-ARANDA ÁNGEL

Directoras: Dras. M^a Jesús Pérez de Vega y Rosario González Muñiz
Madrid, 2010

A mi tio Nene

El trabajo realizado en esta Memoria ha sido llevado a cabo en el Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y ha sido posible gracias a la concesión por parte del CSIC de una beca asociada a un Proyecto Intramurales de Frontera de dicho organismo y una beca I3P Predoctoral.

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras, las Doctoras Rosario González Muñiz y M^a Jesús Pérez de Vega por la confianza que han depositado en mí desde el primer momento hasta ahora. Por su dedicación y sus consejos a la hora de mostrarme todo lo que ahora sé. Por ayudarme en todo momento y guiarme en los inicios de mi vida en la investigación. Gracias por ser tan cercanas, me lo habeis hecho fácil.

También agradecer al resto de miembros del grupo por su interés y ayuda, las Doctoras M^a Teresa García López, Rosario Herranz Herranz y Marta Gutierrez. De manera especial quisiera agradecer a la Doctora Mercedes Martín Martínez toda su ayuda con la modelización molecular; quien me iba a decir a mi hace unos años que iba a entender un poco este lenguaje tan raro que siempre me ha sonado a chino.

A la Dra. M^a Ángeles Jiménez del Instituto de Química Física Rocasolano por ayudarme con la asignación de los espectros de RMN y gracias a la que hoy puedo decir que comprendo un poco más esta técnica que me trajo por la calle de la amargura en la carrera. Al final, creo que me ha dejado un buen sabor de boca.

A la Dra. Pilar Goya, directora del Instituto de Química Médica, por las facilidades dadas en todo momento. A M^a Ángeles Cano, Juan Carlos y M^a Luisa, por su ayuda con los papeleos y por ayudarme en las gestiones administrativa.

De forma especial quiero mencionar, y espero no olvidar a nadie, a todos aquellos que han pasado por mi vida durante estos cuatro años, unos con más y otros con menos huella pero todos han dejado su marca, de eso estoy segura. A Sergio, mi primer compañero con el que me dio tiempo a echar alguna risa, a Susana y a Patricia por su compañía y por la aportación de su trabajo a esta tesis y ahora a Bea que me recuerda a mis primeros pasos, no te agobies que todos empezamos así!!!! A Pili por todo lo que hemos vivido juntas, como pasa el tiempo... A Ángel y Magda por esas risas en Lisboa y a M^a Ángeles.

Y como voy a pasar por alto al laboratorio 352, que hubiera hecho yo sin vosotros. La verdad que no me sale decir nada pero es por todo lo que tengo que decir. A Paula por ser mi compañera de fatigas en congresos, charlas, ensayos... e incluso en la escritura de la tesis, lo

que nos hemos reído!!! A Mayte por sus sabios consejos, a Jose por ser tan especial y a Diego porque aunque no lo parezca a veces hablas y se te coge cariño, lo que te hemos enseñado, jaja!!!!. También a Jose Cumella que, aunque no esté en el 352 es uno más y aunque ya sabes que al principio no eras santo de mi devoción, al final te has hecho un hueco en mi corazón, jaja. !!!El lado oscuro unido jamás será vencido!!!

A toda esa gente que ha estado menos cerca pero no lejos y con la que he compartido algunas cosas, Cristina, Ángela, Felipe...y todos los que se me olvidan. Os prometo que no lo hago con ninguna intención es que esto no es fácil.

A mi gente de fuera, que aunque no entienden nada de lo que hago ni saben a lo que me dedico me han permitido evadirme de los momentos más duros.

Por último y como más importante a mi familia. A mis padres por darme todo lo que he necesitado y por hacerme llegar a donde he llegado, sin vosotros nada de todo lo que hago sería posible. A mi hermano y a Vicky por ser como son y ser parte importante de mi vida y a mis abuelos por seguir ahí.

Y a ti, Rafa, por haber sido, ser y espero sigas siéndolo todo el resto de mi vida.

Muchas gracias

INDICE

	Página
NOTA SOBRE NOMENCLATURA	13
NOTA SOBRE PUNTUACIÓN	13
ABREVIATURAS UTILIZADAS	14
ANEXOS	16
1. INTRODUCCIÓN	25
1.1. EL SISTEMA VEGF/VEGFRs: ESTRATEGIAS PARA LA INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS	27
1.2. INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA EN EL SISTEMA VEGF/VEGFRs	31
1.2.1. Generalidades sobre interacciones proteína-proteína	31
1.2.2. Identificación de los residuos importantes para la interacción VEGF/VEGFRs	33
1.2.3. Péptidos moduladores de la interacción VEGF/VEGFRs	36
1.3. ELEMENTOS DE ESTRUCTURA SECUNDARIA PROTEICA	37
1.3.1. Horquillas β	37
1.3.1.1. Estabilización a través de la fijación del giro	40
1.3.1.2. Estabilización a través de interacciones entre las hebras	44
1.3.1.2.1. Interacciones no covalentes	44
1.3.1.2.2. Interacciones covalentes	46
1.3.2. Hélices α	48
1.3.2.1. Estabilización mediante el uso de plantillas	50
1.3.2.2. Estabilización mediante interacciones no covalentes	53
1.3.2.3. Estabilización mediante interacciones covalentes	54
1.3.2.3.1. Puentes hidrocarbonados	54
1.3.2.3.2. Puentes amida	55

1.3.2.4. Otras estrategias	58
2. OBJETIVOS	61
3. ANÁLOGOS DEL FRAGMENTO VEGF₈₁₋₉₁	65
3.1. DISEÑO	65
3.2. SÍNTESIS	70
3.2.1. Péptidos cíclicos con puentes HC=CH y CH ₂ -CH ₂ y sus análogos lineales	70
3.2.1.1. Péptidos lineales	71
3.2.1.2. Péptidos cíclicos de la Serie 1	75
3.2.1.3. Péptidos cíclicos de las Series 2 y 3	84
3.2.1.4. Péptidos cíclicos de las Series 4 y 5	89
3.2.2. Péptidos cíclicos con puente disulfuro	93
3.2.3. Péptidos cíclicos con puentes amida y sus análogos lineales	96
3.2.3.1. Derivados de Pro	96
3.2.3.1. Derivados de α -MePro	100
3.3. ANÁLISIS CONFORMACIONAL	102
3.3.1. Estudios de RMN	102
3.3.1.1. Desviación de los desplazamientos químicos ($\Delta\delta$)	103
3.3.1.2. Coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$)	111
3.3.1.3. NOEs secuenciales y no secuenciales	117
3.3.2. Estudios de modelización molecular	119
3.3.2.1. Péptidos con puentes hidrocarbonados	120
3.3.2.2. Péptidos con puentes amida	124
3.4. ENSAYOS DE AFINIDAD POR EL RECEPTOR Flt-1	127

4. ANÁLOGOS DE LOS FRAGMENTOS VEGF₁₃₋₂₅ Y VAMMIN₁₋₁₃	135
4.1. PÉPTIDOS LINEALES	135
4.1.1. Síntesis	139
4.1.2. Análisis conformacional	140
4.1.2.1. Dicroísmo circular	140
4.1.2.1.1. Análogos de VEGF ₁₃₋₂₅	142
4.1.2.1.2. Análogos de Vammin ₁₋₁₃	144
4.1.2.2. RMN	146
4.1.2.2.1. Análogos de VEGF ₁₃₋₂₅	146
4.1.2.2.2. Análogos de Vammin ₁₋₁₃	152
4.2. PÉPTIDOS CÍCLICOS DERIVADOS DEL FRAGMENTO VEGF ₁₃₋₂₅	158
4.2.1. Síntesis	159
4.2.2. Análisis conformacional	162
4.2.2.1. Dicroísmo circular	162
4.2.2.2. RMN	166
4.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS	170
4.3.1. Ensayos de proliferación celular	170
4.3.2. Ensayos de afinidad por KDR	172
5. CONCLUSIONES	177
6. MATERIALES Y MÉTODOS	183
6.1. INSTRUMENTACIÓN GENERAL	183
6.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES	184
6.3. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA	184
6.3.1. Síntesis Manual	184
6.3.1.1. Soporte polimérico	184
6.3.1.2. Elongación del péptido	184

6.3.1.3. Acetilación de aminas	186
6.3.1.4. Desprotección de grupos alilo (All) y aliloxicarbonilo (Alloc)	186
6.3.1.5. Escisión de los productos de la resina	187
6.3.2. Métodos analíticos	187
6.3.2.1. Ensayo cualitativo de ninhidrina	187
6.3.2.2. Ensayo cualitativo de cloranilo	188
6.3.3. Métodos cromatográficos	188
6.3.3.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	188
6.3.3.2. Cromatografía de extracción en fase sólida	189
6.4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL	189
6.4.1. Resonancia magnética nuclear	189
6.4.2. Dicroísmo circular	190
6.5. MODELIZACIÓN MOLECULAR	190
6.6. ENSAYOS BIOLÓGICOS	191
6.6.1. Ensayos de afinidad por el receptor Flt-1	191
6.6.2. Ensayos de proliferación celular	192
6.6.3. Ensayos de afinidad por el receptor KDR	192
7. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ANÁLOGOS DEL FRAGMENTO VEGF₈₁₋₉₁	193
7.1. PÉPTIDOS CÍCLICOS CON PUENTES HIDROCARBONADOS Y ANÁLOGOS LINEALES	193
7.1.1. Reacciones de metátesis	193
7.1.2. Reacción de hidrogenación	194
7.2. PÉPTIDO CÍCLICO CON PUENTE DISULFURO	202
7.3. PÉPTIDOS CÍCLICOS CON PUENTES AMIDA Y ANÁLOGOS LINEALES	203

8. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ANÁLOGOS DE LOS FRAGMENTOS DE VEGF₁₃₋₂₅ Y VAMMIN₁₋₁₃	252
8.1. PÉPTIDOS LINEALES	252
8.1.1. Análogos de VEGF ₁₃₋₂₅	252
8.1.2. Análogos de Vammin ₅₋₁₃	255
8.2. ANÁLOGOS CÍCLICOS DEL FRAGMENTO VEGF ₁₃₋₂₅	257
9. ESTUDIO DE HIDROGENACIÓN EN FASE SÓLIDA: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS MODELO	281
9.1. PROCEDIMIENTO GENERAL	281
9.2. ESCISIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA RESINA	281
9.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS	282
10. BIBLIOGRAFÍA	295

NOTA SOBRE NOMENCLATURA

A lo largo de esta Memoria se ha utilizado la nomenclatura y simbolismos 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 una o tres letras y pertenecen a la serie natural L, salvo que se indique lo contrario. Los sustituyentes de los grupos funcionales de las cadenas laterales se indican entre paréntesis, inmediatamente después del símbolo de una o tres letras del aminoácido.

En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene el grupo amino libre, o acetilado, se denomina N-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre o en forma de amida 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.

NOTA SOBRE PUNTUACIÓN

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso del sistema inglés de puntuación en la numeración, se ha utilizado este sistema en la Memoria de esta Tesis. Así, las cifras decimales se indican con punto en lugar de con coma, habiendo sido aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el diccionario panhispánico de dudas, desde su primera edición en Octubre de 2005.

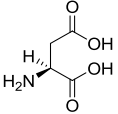
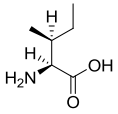
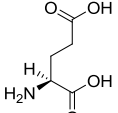
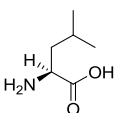
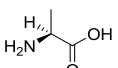
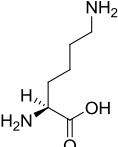
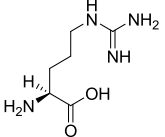
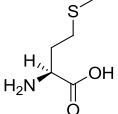
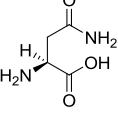
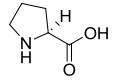
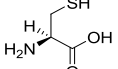
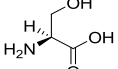
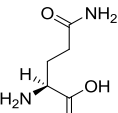
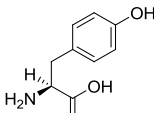
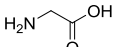
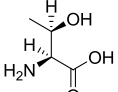
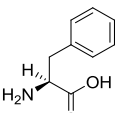
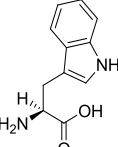
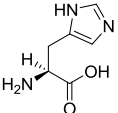
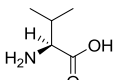
ABREVIATURAS UTILIZADAS

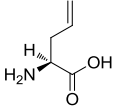
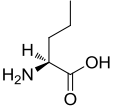
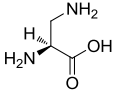
En esta Memoria se han empleado los acrónimos y abreviaturas recomendados en *Guidelines for Authors (J. Org. Chem. 2010)*. Las abreviaturas no recogidas en esta guía se indican a continuación:

Acm	Acetamidometil
All	Alilo
Alloc	Aliloxicarbonil
BSA	Albúmina de suero bovino
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
cpm	Cuentas por minuto
DC	Dicroísmo circular
DCB	Diclorobenceno
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DVB	Divinilbenceno
DIEA	Diisopropiletilamina
ECD	Dominio Extracelular
EM-ES	Espectrometría de masas con ionización por electrospray
FCS	Suero fetal bovino
FIt-1	Fms-like domain
HATU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
HCTU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(6-Clorobenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
HOAt	1-Hidroxiazabenzotriazol
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrómetro de masas
HRP	Peroxidasa de rábano

HUVEC	Células de cordón umbilical humano
KDR	Kinase Domain Receptor
MBHA	Metilbencidrilamina
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
PBS	Tampón fosfato salino
PyAOP	Hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)-tris-(pirrolidino)fosfonio
TEA	Trietilamina
TFE	Trifluoroetanol
Trt	Tritilo
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
Z	Benciloxicarbonilo

ANEXO I: AMINOÁCIDOS

Ácido Aspártico	Asp	D		Isoleucina	I	Ile	
Ácido Glutámico	Glu	E		Leucina	L	Leu	
Alanina	Ala	A		Lisina	K	Lys	
Arginina	Arg	R		Metionina	M	Met	
Asparagina	Asn	N		Prolina	P	Pro	
Cisteína	Cys	C		Serina	S	Ser	
Glutamina	Gln	Q		Tirosina	Y	Tyr	
Glicina	Gly	G		Treonina	T	Thr	
Fenilalanina	Phe	F		Triptófano	W	Trp	
Histidina	His	H		Valina	V	Val	

AlilGlicina	alilGly		Norvalina	Nva	
Ácido α,β -diaminopropiónico	Dap				

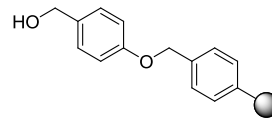
Las abreviaturas de los aminoácidos siguen la regla de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC- IUB: *Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 9-37 y *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 633-6

ANEXO II: GRUPOS PROTECTORES

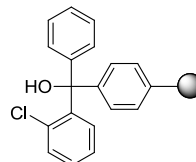
Alilo	OAl	
Aliloxicarbonilo	Alloc	
Acetamidometilo	Acm	
Bencilo	Bz	
<i>tert</i> -Butilo	<i>t</i> Bu	
<i>tert</i> -Butoxicarbonilo	Boc	
Benciloxicarbonilo	Z	
9-Fluorenilmetoxicarbonilo	Fmoc	
Tritilo	Trt	
2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo	Pbf	

ANEXO III: RESINAS

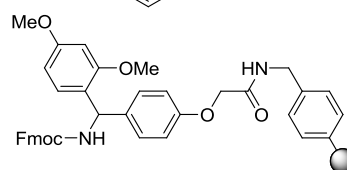
Wang



2-Clorotritil

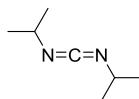


Rink Amida

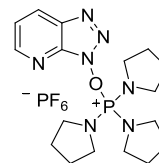


ANEXO IV: AGENTES DE ACOPLAMIENTO Y ADITIVOS

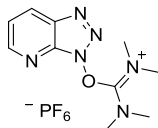
DIC



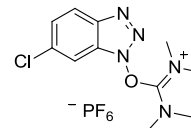
PyAOP



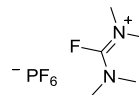
HATU



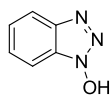
HCTU



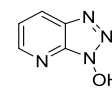
TFFH



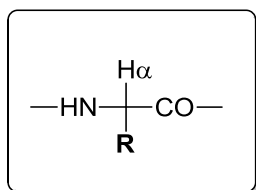
HOBt



HOAt



ANEXO V: NOMENCLATURA UTILIZADA EN RMN



Asp		Gly	H $\alpha\alpha'$	Pro	
Glu		Phe		Ser	HO-CH2-beta
Ala	CH3-beta	His		Tyr	
Arg		Ile	$\delta\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2\gamma-\text{CH}\beta-\text{CH}_3\gamma'$	Thr	
Asn		Leu	$\delta\text{H}_3\text{C}-\text{CH}\gamma-\text{CH}_2\beta$	Trp	
Cys	HS-CH2-beta	Lys		Val	$\gamma\text{H}_3\text{C}-\text{CH}\beta-\text{CH}_3\gamma'$
Gln		Met	$\epsilon\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2\gamma-\text{CH}_2\beta$		

Esta Tesis ha sido realizada en el Instituto de Química Médica (CSIC). Se enmarca dentro de los proyectos: Intramurales de Frontera del CSIC (2005-80F0161), SAF 2006-01205 y SAF 2009- 09323, subprograma NEF.

La autora agradece la financiación otorgada por el CSIC mediante la concesión de una beca I3P, gracias a la que ha sido posible la realización de este trabajo.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Se conoce como angiogénesis al fenómeno de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, siendo importante en procesos fisiológicos como la cicatrización de heridas, el ciclo menstrual y el desarrollo embrionario, pero también en el establecimiento y progresión de diversas situaciones patológicas en el adulto, cuando el crecimiento de esta nueva red de vasos es anormal. La angiogénesis juega un papel clave en la patogénesis de la retinopatía diabética y el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide, y es esencial para el desarrollo tumoral y la formación de metástasis. La relación entre la progresión del tumor o el establecimiento de metástasis y el grado de vascularización del mismo, así como el hecho de que el endotelio vascular esté formado por células genéticamente estables, ha llevado a diseñar nuevas estrategias terapéuticas antiangiogénicas dirigidas hacia el tratamiento tumoral¹⁻³.

Es conocido que los mecanismos que rigen la angiogénesis fisiológica son diferentes a aquellos que rigen la angiogénesis patológica. Por lo tanto, el conocimiento de las bases moleculares que desencadenan el proceso de angiogénesis patológica puede llevar a identificar biomoléculas que puedan servir como dianas terapéuticas⁴.

Uno de los principales factores proangiogénicos es el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF, “Vascular Endothelial Growth Factor”), un mitógeno específico de las células del endotelio vascular capaz de regular múltiples funciones biológicas. Se han descrito diversos miembros de la familia de VEGF que poseen distinta especificidad de receptor: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PlGF (“Placenta Growth Factor”)⁵, así como un VEGF viral, VEGF-E⁶⁻⁸, y dos VEGF aislados de venenos de serpiente, Vammin y VR-1^{9,10}. Los miembros de la familia de VEGF ejercen su acción biológica a través de su unión a diferentes receptores específicos, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR) y VEGFR-3 (Flt-4)¹¹. Cada uno de estos receptores presenta una funcionalidad diferente, así Flt-1 y KDR están involucrados fundamentalmente en la formación de vasos sanguíneos, mientras que Flt-4 está implicado principalmente en linfangiogénesis. Por lo tanto, las diferentes rutas activadas por cada uno de los miembros de la familia de VEGF están directamente relacionadas con la diferente afinidad que éstos

muestran por los receptores. Flt-1 es reconocido por VEGF-A, -B y PlGF, KDR por VEGF-A, -B y -C, y Flt-4 es específico de VEGF-C y D^{12, 13}. Además, VEGF interacciona con proteoglicanos que contienen derivados de la heparina y con los co-receptores de neuropilina, NP-1 y NP-2 (Fig. 1).

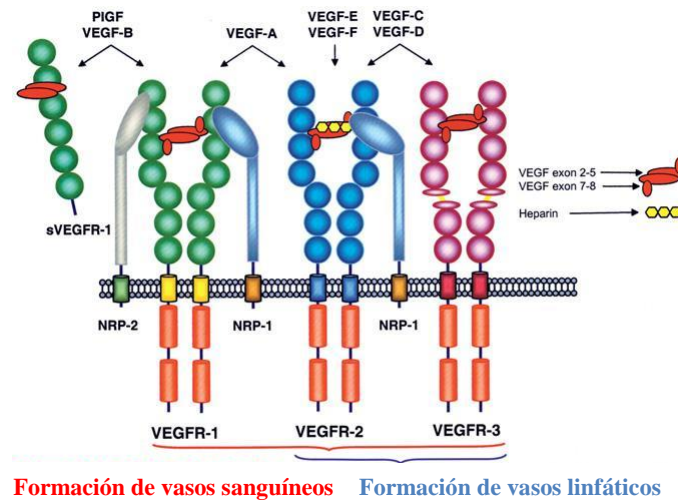


Figura 1. Representación esquemática de los distintos receptores de VEGF y de la afinidad de los distintos miembros de la familia de VEGF por cada uno de ellos.

Es conocido que VEGF-A, el miembro más estudiado y mejor caracterizado de la familia, juega un papel muy importante tanto en angiogénesis fisiológica como patológica. El gen que codifica la síntesis de VEGF-A se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 y está formado por 8 exones. El procesamiento alternativo del mRNA de estos exones da lugar a su vez a diferentes isoformas^{14, 15}, de las cuales VEGF-A₁₆₅ es la más abundante y se encuentra sobreexpresada en la mayoría de tumores sólidos. Recientemente se ha comprobado que VEGF-A₁₆₅ se puede utilizar como un indicador biológico de la invasividad en la recurrencia post-operatoria del hepatocarcinoma celular¹⁶.

La función biológica del VEGF-A está mediada por su unión a los receptores específicos de membrana VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR), que poseen un dominio intracelular de tirosina-quinasa y se expresan selectivamente en las células del endotelio vascular. También se une a los receptores de neuropilina NP-1 y NP-2, que se expresan

en células endoteliales y neuronales. La interacción de VEGF con sus receptores provoca la dimerización de éstos, lo que desencadena la autofosforilación de los residuos de Tyr del dominio intracelular. De este modo se activa una cascada de transducción de señales que promueve diversos procesos biológicos como la proliferación y migración de las células endoteliales, así como el aumento de la permeabilidad vascular^{11,17}.

Distintos estudios apuntan a que el principal receptor implicado en angiogénesis patológica es KDR, existiendo evidencias experimentales del papel esencial que juega en la diferenciación de las células endoteliales y en la formación de vasos sanguíneos¹⁸⁻²¹. Sin embargo, el papel que desempeña Flt-1 es más complejo. Bajo determinadas circunstancias este receptor actúa como regulador negativo de la angiogénesis, ya que es capaz de atrapar VEGF-A evitando que éste se una a KDR²². Sin embargo, existen evidencias de que también juega un papel importante en hematopoyesis, durante la vascularización de tumores, promoviendo la angiogénesis¹³. También se ha comprobado la presencia de este receptor en células tumorales, lo que podría indicar que desempeña algún tipo de papel en el crecimiento tumoral^{5,21}.

El VEGF-A₁₆₅, que se une con alta afinidad a los receptores Flt-1 y KDR, está sobreexpresado en todos los casos de angiogénesis patológica descritos hasta el momento, incluyendo los asociados a las principales causas de muerte en los países desarrollados, como el cáncer. En los procesos tumorales se ha comprobado que la neutralización de la interacción de VEGF con sus receptores inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis. Además, se han observado niveles altos de KDR durante la vasculogénesis embrionaria y la angiogénesis, y principalmente en los procesos patológicos asociados con neovascularización, como la angiogénesis tumoral²³. Por todo esto, impedir la interacción entre VEGF y sus receptores podría presentarse como una estrategia válida en la búsqueda de inhibidores del proceso de angiogénesis.

1.1. EL SISTEMA VEGF/VEGFRs: ESTRATEGIAS PARA LA INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

A nivel molecular y estructural, el VEGF-A₁₆₅ es una proteína homodimérica de 46KDa cuya estructura se ha determinado tanto en estado cristalino como en disolución. Los dos monómeros se encuentran situados de forma antiparalela, y unidos entre sí a

través de dos puentes disulfuro entre los residuos de Cys51 y Cys60. En la estructura de cada monómero se observan siete segmentos de lámina β y 2 de hélice α , además de 3 puentes disulfuro (Fig.2)²⁴. Asimismo, se han identificado las estructuras de VEGF-A₁₆₅ en sus complejos con un antígeno²⁵ y con el dominio 2 del receptor Flt-1²⁶.

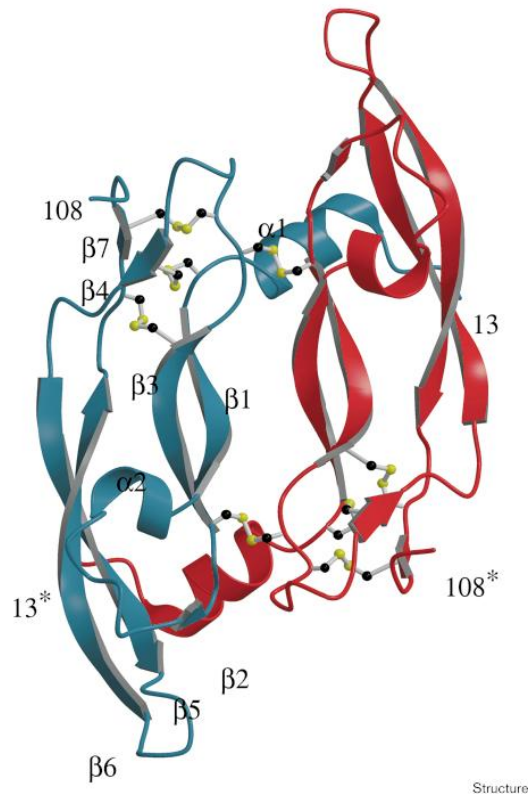


Figura 2. Estructura de VEGF-A₁₆₅. Los elementos de estructura secundaria de uno de los monómeros se encuentran etiquetados. Uno de los monómeros se muestra en rojo y el otro en azul mientras que los puentes disulfuro están en gris con los átomos de azufre en amarillo. Los extremos N- y C-terminales se encuentran etiquetados, siendo los marcados con el asterisco los del monómero señalado en rojo.

Por su parte, los receptores de VEGF, Flt-1 y KDR, contienen una región extracelular formada por siete dominios de tipo inmunoglobulina (Ig) unidos al dominio intracelular de tipo tirosina-quinasa a través de una hélice transmembrana. Diferentes trabajos han demostrado que los dominios 2 y 3 de tipo Ig de los receptores Flt-1 y KDR son los directamente implicados en la unión de éstos con VEGF.

Las estrategias terapéuticas descritas hasta el momento que utilizan el VEGF o los receptores de VEGF como dianas biológicas pueden clasificarse en tres grupos diferenciados:

✓ *Anticuerpos monoclonales capaces de neutralizar la acción del VEGF*: Todos estos anticuerpos se unen a VEGF bloqueando su unión con los receptores. El Bevacizumab (Avastin®, Genentech) es un anticuerpo monoclonal humanizado aprobado en 2004 como terapia de primera línea para el cáncer colorectal metastásico, siendo el primer antiangiogénico lanzado al mercado para el tratamiento del cáncer^{27, 28}. Más recientemente, en 2007, ranibizumab (Lucentis®, Genentech) ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad²⁹.

✓ *Inhibidores de la actividad tirosina-quinasa de los receptores de VEGF*: La mayoría de las estrategias terapéuticas dirigidas a la inhibición de la angiogénesis tienen como objetivo la inhibición de la actividad tirosina-quinasa de los receptores de VEGF^{30, 31}. Existen diversos productos de estructura heterocíclica que se encuentran en fases clínicas avanzadas para el tratamiento de la angiogénesis tumoral y cuatro, sunitib, sorafenib, lapatinib y pazopanib (**1-4**), que han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de distintos tipos de cáncer (Fig.3), aunque son inhibidores no específicos.

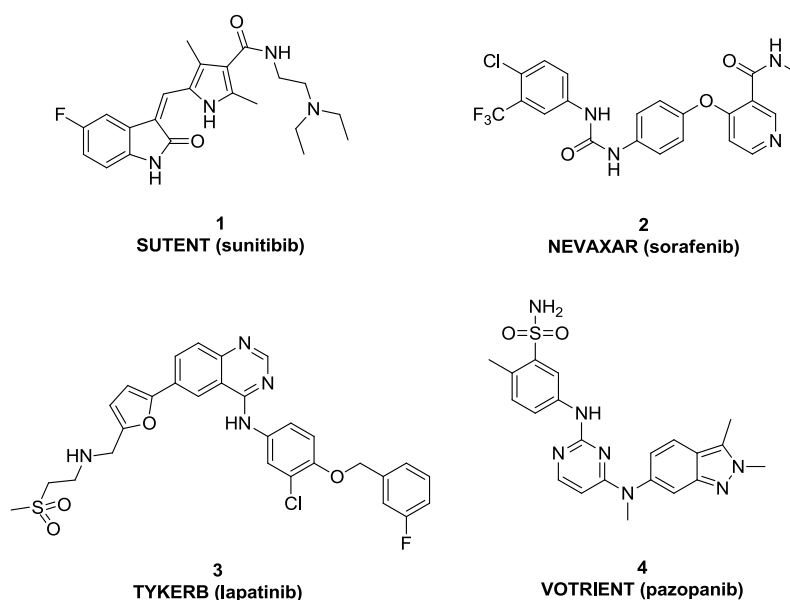


Figura 3. Inhibidores del dominio tirosina-quinasa de los receptores de VEGF.

✓ *Inhibidores de la interacción VEGF-receptores de VEGF*: Incluye diversos compuestos, en general de carácter peptídico, que bien se unen directamente al VEGF e impiden o dificultan la unión de éste a los receptores correspondientes (**5**, **6** y **7**)³²⁻³⁴, o bien interaccionan directamente con los receptores de VEGF, compitiendo con el factor de crecimiento nativo (**8** y **9**, Fig. 4)³⁵⁻³⁷.

a) Compuestos que interaccionan directamente con VEGF:

5: v107: GGNECDAIRMWEWECFERL

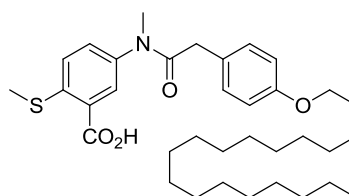
6: Anginex: ANIKLSVQMQLFDRHLWKIIVKLNDGRELSLD

7: RRKRRR

b) Compuestos que interaccionan con los receptores de VEGF:

ATLWPPR

8



9

Figura 4. Inhibidores de la interacción VEGF/VEGFRs.

La mayoría de estos compuestos provienen de la evaluación masiva de colecciones de moléculas diversas, habiéndose prestado muy poca atención al diseño racional de moléculas que puedan actuar como inhibidores de las interacciones proteína-proteína implicadas en el reconocimiento entre el VEGF y sus receptores. Hasta el momento sólo existen algunos grupos que han trabajado en este sentido y que han obtenido resultados prometedores, como se expondrá en el apartado 1.2.3^{38,39}.

1.2. INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA EN EL SISTEMA VEGF/VEGFRs

1.2.1. Generalidades sobre interacciones proteína-proteína

Un gran número de procesos celulares implican interacciones específicas péptido-proteína o proteína-proteína, como las interacciones antígeno-anticuerpo, o la organización de sitios activos de enzimas oligoméricas o receptores. Además, estas interacciones participan en numerosos procesos biológicos, desde la comunicación intercelular hasta la muerte celular programada^{40, 41}. Hoy en día, se sabe que muchas proteínas no ejercen su acción de forma aislada, sino formando parte de complejos proteicos cuya función viene determinada por la especificidad de esta unión^{42, 43}. Por todo ello, el entendimiento de las bases moleculares del reconocimiento péptido-proteína y proteína-proteína es uno de los retos más importantes en investigación biomédica. Además, estas interacciones se han convertido en dianas terapéuticas relevantes para el desarrollo de herramientas farmacológicas y para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos⁴⁴.

Hasta hace una década, los sistemas proteína-proteína se consideraban dianas difíciles de abordar con péptidos convencionales, peptidomiméticos o moléculas pequeñas, debido a que estas interacciones normalmente ocurren entre superficies relativamente extensas y a menudo planas de la estructura proteica, que consisten frecuentemente en fragmentos de unión discontinuos de la secuencia primaria de las proteínas⁴⁵. Sin embargo, estudios estructurales de RMN y cristalografía de rayos X, combinados con mutagénesis dirigida, han mostrado que, en muchos casos, sólo pequeños segmentos de la interfaz de interacción (hot-spots^{*}) son responsables de la mayoría de la energía libre de unión⁴⁶. Estos hot-spots o zonas esenciales para la interacción son generalmente zonas de accesibilidad elevada, relativamente hidrófobas, muy empaquetadas y con una secuencia relativamente conservada⁴⁷. Por tanto, se puede pensar que las cavidades y protuberancias definidas por estos hot-spots pueden ocuparse o mimetizarse, respectivamente, por moléculas de bajo peso molecular. En este sentido,

* A lo largo de esta memoria se ha mantenido el uso del término inglés por no encontrar una traducción aceptable al castellano que se ajuste al significado real del término.

** Al igual que con hot-spot, se ha mantenido el uso del término inglés por no encontrar una

se ha dedicado un gran esfuerzo a la caracterización de los aminoácidos importantes en las interacciones proteína-proteína, a la identificación de los motivos estructurales comunes en la interfaz de interacción de diferentes proteínas y al mapeo de las superficies de contacto, lo que posibilitaría abordar la búsqueda de moduladores externos⁴⁸. El conocimiento de la estructura tridimensional de los complejos péptido-proteína o proteína-proteína permite utilizar aproximaciones de diseño racional en la búsqueda de moléculas sintéticas capaces de mimetizar, estructural y funcionalmente, la región de interacción de la proteína diana⁴⁹⁻⁵¹. Así, a partir de los datos estructurales de proteínas aisladas, se pueden predecir sitios potenciales de unión mediante el cribado virtual de bases de datos de moléculas pequeñas. Alternativamente, los estudios de modelización molecular pueden guiar la búsqueda de esqueletos moleculares restringidos donde anclar los residuos esenciales implicados en la unión, proporcionándoles la orientación apropiada (diseño de novo).

Dentro de las metodologías de diseño racional, una aproximación útil es el diseño y síntesis de esqueletos que sean capaces de reproducir la conformación y propiedades electrónicas de los fragmentos funcionales presentes en los péptidos bioactivos o en la interfaz de interacción de las proteínas nativas. Dado que en las interfaces de interacción proteína-proteína se han encontrado todos los elementos más comunes de la estructura secundaria proteica como son las hélices α , las láminas β y los giros inversos, y que muchos de ellos forman parte de determinados hot-spots, una aproximación útil para modular la interacción entre dos proteínas sería la obtención de miméticos de los elementos de la estructura secundaria peptídica. Cabe destacar el éxito obtenido utilizando este tipo de estrategias en la modulación de algunas interacciones proteína-proteína de relevancia terapéutica⁵¹. Entre otros, los antagonistas de la interacción p53/hDM2⁵², implicada en procesos tumorales y los moduladores, con actividad *in vivo*, del proceso de apoptosis regulado por la familia de proteínas Bcl-2⁵³, ambos miméticos de una hélice α descritos por Verdine y colaboradores.

1.2.2. Identificación de los residuos importantes para la interacción VEGF/VEGFRs

Estudios de mutagénesis dirigida y de difracción de rayos X del complejo formado por VEGF-A y el dominio 2 del receptor Flt-1 han permitido la identificación de zonas de interacción del VEGF con dicho receptor. Por otra parte, estos estudios han mostrado que únicamente son necesarios los dominios 2 y 3 de los receptores Flt-1 y KDR para la interacción con VEGF^{54, 55}. Estos datos se encuentran en consonancia con los datos de microscopía electrónica descritos para el complejo VEGF-A/KDR⁵⁶ y las estructuras de rayos-X recientemente publicadas de los complejos VEGF-C/KDR_{D2-D3}⁵⁷ y VEGF-B/Flt-1_{D2}⁵⁸. Por otra parte, los estudios de mutagénesis también han indicado que existe una elevada similitud entre las zonas de interacción de ambos receptores con VEGF^{26, 57}.

VEGF sólo es capaz de unirse a sus receptores cuando se encuentra en forma de dímero y la zona de interacción con éstos se encuentra en la interfaz entre los monómeros⁵⁵, participando en la unión un 65% del monómero 1 y un 35% del monómero 2. Así, se han identificado tres posibles hot-spots en la zona de interacción de VEGF con sus receptores: a) el fragmento VEGF₇₉₋₉₁ situado en el loop^{**} 3 del monómero 2, b) el fragmento VEGF₁₇₋₂₅ situado en el extremo N-terminal del monómero 1 y c) el loop 61-68 también situado en el monómero 1^{24, 33, 59-61} (Fig.5).

^{**} Al igual que con hot-spot, se ha mantenido el uso del término inglés por no encontrar una traducción aceptable al castellano que se ajuste al significado real del término.

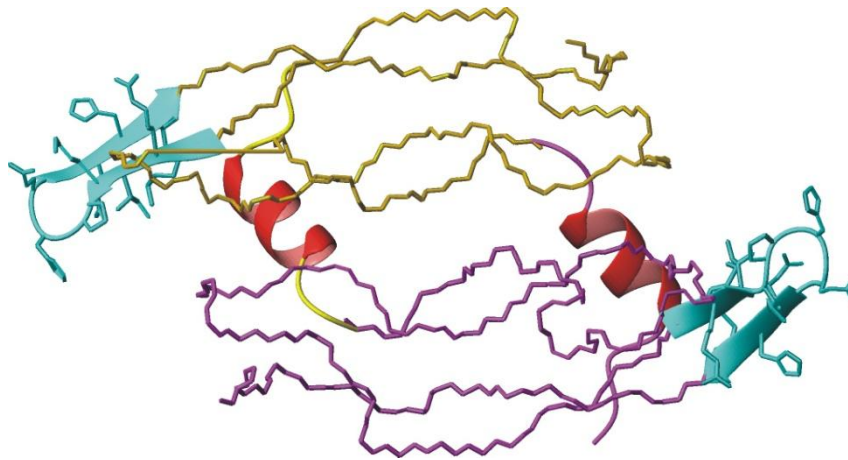


Figura 5. Estructura cristalina de VEGF en la que está representado el esqueleto peptídico que lo constituye. En amarillo y morado se distinguen los dos monómeros y en cada uno de ellos se encuentran marcadas dos de las zonas importantes para la interacción con los receptores, el fragmento 81-91 en azul y el fragmento 17-25 en rojo.

Los primeros experimentos de mutagénesis dirigida se realizaron mediante una triple mutación secuencial por alanina en VEGF^{59, 60}. Estos estudios permitieron identificar como residuos importantes para la interacción las triadas Arg⁸², Lys⁸⁴ e His⁸⁶ y Asp⁶³, Glu⁶⁴ y Glu⁶⁷. Estudios de mutagénesis posteriores combinados con datos de cristalografía de rayos X apuntaron también a la importancia de los residuos de Gln⁷⁹, Ile⁸³, Lys⁸⁴ y Pro⁸⁵, así como de los residuos de Phe¹⁷, Ile⁴⁶ y Glu⁶⁴, esenciales para la interacción^{24, 26, 55, 60}. Los últimos datos publicados de las estructuras cristalinas de los complejos VEGF-C/KDR_{D2-D3}⁵⁷ y VEGF-B/Flt-1_{D2}⁵⁸ confirman la similitud en la interacción entre los distintos miembros de la familia de VEGF con estos receptores y señalan las posibles diferencias que podrían ser la causa de su especificidad.

Por otra parte, es conocido que muchos ligandos proteicos utilizan un hot-spot común para interactuar con distintas proteínas⁶². Esto lleva a asumir la similitud entre la interacción de VEGF con sus receptores y con diferentes anticuerpos monoclonales, que han sido utilizados como herramienta para conocer la interacción que nos ocupa. Estudios basados en la estructura cristalina del complejo de VEGF-A con el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal Bevacizumab²⁵, en comparación con la estructura cristalina del complejo de VEGF con el dominio 2 de Flt-1, pusieron también de manifiesto la importancia de los residuos Ile⁸³ y Gln⁸⁹ del loop 3 y de los residuos de

Met¹⁸, Phe¹⁷, Tyr²¹, Gln²² y Tyr²⁵ del extremo N-terminal en la interacción de VEGF con dicho anticuerpo^{28, 33, 54, 61}. Los últimos estudios realizados en este campo se han llevado a cabo mediante cribado de una colección de anticuerpos anti-erbB2 desarrollada por Lee y colaboradores por medio de fagos^{28, 63}. En este cribado, dos anticuerpos, G6 y B20-4, mostraron una alta afinidad por VEGF, utilizando una zona de interacción similar a la descrita para la interacción con los receptores.

En base a estos estudios se definieron tres fragmentos esenciales en la interacción de VEGF/VEGFRs. El fragmento VEGF₇₉₋₉₁ (MRIKPHQGQHI), que se encuentra situado en el loop 3 de VEGF formando parte de una horquilla β , ligeramente distorsionada en el giro según los datos obtenidos de la estructura de rayos-X (Fig.6). El fragmento VEGF₁₇₋₂₅ (FMDVYQRSY), que se encuentra situado en el extremo N-terminal de la proteína y presenta estructura de hélice α , con una cara hidrofóbica en la que se sitúan los residuos aromáticos Phe¹⁷, Tyr²¹ y Tyr²⁵, y una cara más polar en la que se encuentran los residuos de Glu¹⁹ y Arg²³. La cara hidrofóbica se encuentra en la interfaz de unión de los dos monómeros, y está involucrada en la interacción de VEGF con sus receptores^{26, 60} (Fig.7). El tercer fragmento, VEGF₆₁₋₆₈ (CNDEGLEC) se encuentra situado en el loop 2 y presenta un puente disulfuro entre los residuos de Cys que lo flanquean, sin mostrar una estructura definida.

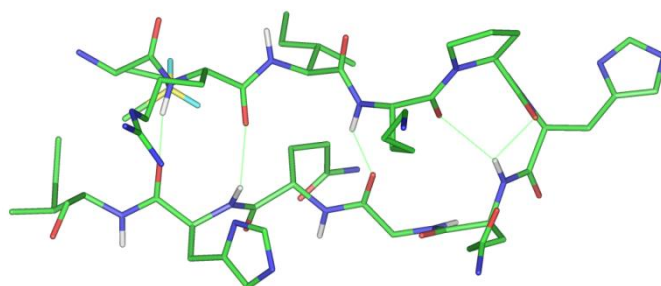


Figura 6. Estructura tridimensional del fragmento VEGF-A₈₁₋₉₁ conseguida a partir de la estructura cristalina del complejo VEGF-Flt-1_{D2} (código pdb: 1flt).

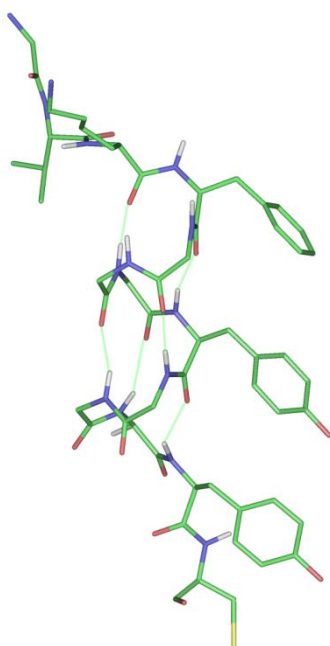


Figura 7. Estructura tridimensional del fragmento VEGF-A₁₃₋₂₅ conseguida a partir de la estructura cristalina del complejo VEGF-Flt-1_{D2} (código pdb: 1flt). Únicamente se representan las cadenas laterales de los residuos de la cara hidrofóbica.

1.2.3. Péptidos moduladores de la interacción VEGF/VEGFRs

Existen pocos ejemplos en la bibliografía, basados en estos hot-spots, que respondan a un diseño racional en la búsqueda de moduladores de la interacción VEGF/VEGFRs. Una primera aproximación fue descrita por Jia *et al.*⁶⁴ mediante la síntesis de péptidos de 12 aminoácidos de distintas partes de la secuencia de VEGF-A. De esta manera logró identificar el fragmento 11-22 (**10**), capaz de competir con VEGF en ensayos de desplazamiento de VEGF marcado, con una CI_{50} de 42 μ M (Fig.8).

Por otra parte, basándose en la secuencia del loop 3, VEGF₇₉₋₉₃, Zilberberg *et al.* prepararon el péptido cíclico **11**³⁸, que presentó actividad antiangiogénica en un ensayo CAM (Chick Chorioallantoic Membrane), comportándose como antagonista e inhibiendo la unión de VEGF con sus receptores expresados en células CHO (Chinese Hamster Ovary). En agua, este péptido no presentó una estructura definida, pero en mezclas TFE/agua, los estudios de RMN apuntaron a un cierto carácter helicoidal en el segmento 1-8.

En cuanto al hot-spot situado en la hélice α del extremo N-terminal, D'Andrea *et al.* propusieron un péptido que mimetiza el segmento VEGF₁₆₋₂₇⁶⁵. Tras varias modificaciones para intentar fijar la estructura de hélice del fragmento en disolución, llegaron al péptido **12** que adopta estructura de hélice α en disolución acuosa y que actúa como agonista de los receptores Flt-1 y KDR.

Por último, Inguibert y colaboradores han descrito una serie de péptidos que incluyen residuos de los fragmentos VEGF₆₁₋₆₈ y la hélice terminal VEGF₁₇₋₂₅, que son dos de los hot-spots del monómero. Algunos de estos péptidos fueron capaces de unirse al receptor Flt-1 a concentraciones de 20-40 μ M, comportándose como antagonistas en ensayos celulares³⁹. Estudios más recientes de la interacción del péptido más activo de la serie, **13**, con el dominio 2 del receptor Flt-1 han demostrado que dicho péptido se une en la misma zona que lo hace el VEGF-A⁶⁶.

10: HHEVVKFMDVYQ

11: c[f¹PQIMRIK⁸PHQGQHIGE]-NH₂

12: Ac-KVKFMDVYQRSYCHP-NH₂

13: c[YYDEGLEE]-NH₂

Figura 8. Péptidos con afinidad por los receptores de VEGF derivados del diseño racional.

1.3. ELEMENTOS DE ESTRUCTURA SECUNDARIA PROTEICA

Algunos de los ejemplos presentados en el apartado anterior se basan no sólo en la secuencia de los hot-spots de VEGF, sino también en la estructura que éstos adoptan dentro de la proteína, llegando a resultados exitosos como en el caso descrito por D'Andrea *et al.* (**12**, Fig. 8)⁶⁵. Por esto y por la importancia de mimetizar los elementos de la estructura secundaria proteica para la modulación de interacciones proteína-proteína, es necesario conocer las características de dichos elementos y qué estrategias se pueden seguir para mimetizarlos. A continuación se resumen aquellos implicados en este trabajo.

1.3.1. Horquillas β

Una horquilla β es un elemento de la estructura secundaria de las proteínas formado por 2 hebras β adyacentes que transcurren en sentido antiparalelo, unidas entre sí por un loop y que establecen un patrón de enlaces de hidrógeno característico entre ambas (Fig.9). A su vez, la hebra β consiste en dos o más aminoácidos unidos entre sí, que adoptan ángulos diedros ϕ y ψ de -140° y $+130^\circ$, respectivamente. La longitud del loop que une las dos hebras es variable, aunque generalmente está formado por un mínimo de dos y un máximo de cinco residuos⁶⁷. Las horquillas β se pueden clasificar en función del patrón de enlaces de hidrógeno y dependiendo del número de residuos en el giro. Siguiendo estos criterios, en los años 80, Sibanda *et al.* realizaron un estudio sobre las diferentes horquillas β presentes en proteínas de estructura conocida, describiendo una clasificación en función de estos dos parámetros^{68, 69}. En proteínas, las más abundantes son las horquillas β 2:2, que poseen dos residuos en el giro, y dentro de éstas, se encontró que los giros predominantes son los β de tipo I' y II'⁶⁷.

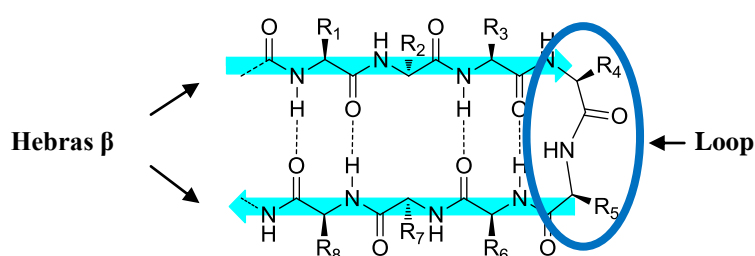


Figura 9. Ejemplo de horquilla β .

El giro β es el elemento que se encuentra más frecuentemente conectando dos hebras β y se puede clasificar en función de sus ángulos diedros (Fig.10). El giro β está formado por cuatro aminoácidos con un enlace de hidrógeno entre el CO del residuo situado en la posición i y el NH del residuo situado en la posición $i+3$. De forma general, todos deben cumplir que la distancia entre los $C\alpha$ de los residuos en posiciones i e $i+3$ sea $< 7\text{\AA}$ ⁷⁰. Dependiendo de los ángulos ϕ y ψ adoptados por los residuos centrales del giro, existe una clasificación obtenida mediante el estudio estadístico de los distintos giros β presentes en las proteínas cuya estructura se encuentra depositada en el Protein Data Bank (PDB)⁷¹.

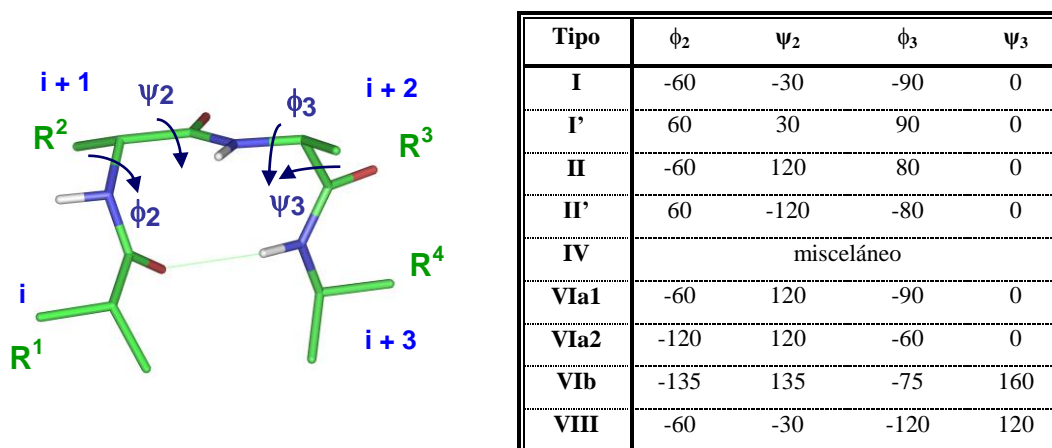


Figura 10. Ejemplo de giro β . En la tabla se muestran los ángulos diedros definidos para cada uno de los tipos de giro β presentes en proteínas.

Hasta hace pocos años no había evidencia de que las secuencias peptídicas que en la proteína estaban estructuradas pudieran formar horquillas β una vez aisladas en disolución, puesto que la mayoría de los fragmentos proteicos que adoptan dichas estructuras una vez aislados tienden a agregar o a desestructurarse⁷². Este cambio estructural podría ser debido fundamentalmente a cambios en su entorno que provocan la pérdida de las fuerzas internas que mantienen su estructura. Sin embargo, en la pasada década fue posible aislar y estudiar algunas horquillas β que sí conservaban su estructura espacial en disolución, como por ejemplo el fragmento N-terminal de la ubiquitina⁷³ (U_{1-21} y U_{1-35}) o un fragmento de 16 aminoácidos del dominio B1 de la proteína G^{74, 75}.

En la búsqueda de fragmentos proteicos capaces de modular interacciones proteína-proteína es importante preservar la estructura espacial que posee el fragmento cuando está formando parte de la proteína nativa, ya que ésta puede ser determinante de su actividad biológica.

Así, cuando se aísla un fragmento peptídico de una proteína, puede ocurrir:

- que la alta flexibilidad del mismo haga que la energía liberada en el proceso de unión no sea suficiente para que adopte la estructura adecuada para la interacción, dando lugar a procesos entrópicamente desfavorables y por tanto a pérdida de la actividad biológica, o bien

- que el proceso de unión sea tan favorable que la energía liberada permita que el péptido se estructure dando lugar a procesos entrópicamente favorables y por tanto que mantenga la función biológica de la proteína nativa⁷⁶.

Con el fin de facilitar los procesos de unión entrópicamente desfavorables, en los últimos años ha aumentado el interés por intentar fijar la conformación espacial de fragmentos peptídicos con estructuras secundarias definidas, similares a las que poseen estos fragmentos dentro de las proteínas de origen. Todas las estrategias utilizadas hasta el momento para favorecer conformaciones de horquilla β se centran en intentar favorecer de algún modo las fuerzas que fijan este tipo de estructura en la naturaleza. En este sentido, una posibilidad es fijar el giro β , dada la importancia que la estabilización del mismo tiene para la reorganización correcta del resto de residuos de la horquilla. El estudio de diferentes horquillas β en proteínas de estructura conocida ha puesto de manifiesto que la mayoría poseen secuencias de aminoácidos comunes en la zona del giro β , del tipo Pro-Gly o Asx-Gly^{77, 78} que favorecen la formación de este tipo de giros. Por otra parte, también se ha demostrado la frecuente estabilización de esta estructura a través de interacciones, tanto hidrofóbicas como polares, entre las cadenas laterales de los residuos de las hebras^{75, 79}.

1.3.1.1. Estabilización a través de la fijación del giro

Existen algunos ejemplos de introducción de aminoácidos que facilitan la adopción de la conformación de horquilla a través de la estabilización del giro β ⁸⁰⁻⁸⁵. Como se comentó anteriormente, en la naturaleza existe una mayor prevalencia de determinados aminoácidos en las diferentes posiciones del giro, como por ejemplo Pro o Asx (Asn o Asp) en posición $i+2$, o Gly en posición $i+3$. Otra posibilidad es la introducción de D-aminoácidos⁷⁸ o aminoácidos α,α -disustituidos, como el ácido α -aminoisobutírico (Aib)^{82, 83} o la α -MePro⁸⁶. Un claro ejemplo de la validez de esta estrategia es el descrito por Masterson *et al.* utilizando la secuencia Arg-Tyr-Val-Glu-Val-Yyy-Xxx-Orn-Lys-Ile-Leu-Gln, en el que evaluaron la capacidad de fijación de la estructura con distintos aminoácidos en las posiciones Yyy-Xxx. Los autores llegaron a la

conclusión de que las secuencias capaces de estabilizar la estructura de horquilla β , en este caso, eran D-Pro-Gly, Aib-Gly y Aib-D-Ala⁸¹.

En esta misma línea, el uso de la secuencia D-Pro-L-Pro descrito por Robinson y colaboradores, ha sido una de las estrategias que mejores resultados ha mostrado hasta el momento en la búsqueda de miméticos de horquilla β ⁸⁷. Se ha utilizado con éxito en fragmentos de anticuerpos⁸⁸, péptidos antimicrobianos y antivirales⁸⁹⁻⁹³, inhibidores de proteasas⁹⁴ o moduladores de interacciones proteína-proteína⁹⁵. Ya en 1979, este dipéptido fue descrito por Balaram y colaboradores como inductor de giros β ⁹⁶, pero no fue hasta finales de los años 90 cuando el grupo de Robinson comenzó a utilizar esta estrategia para fijar estructuras de horquilla β (Fig.11a).

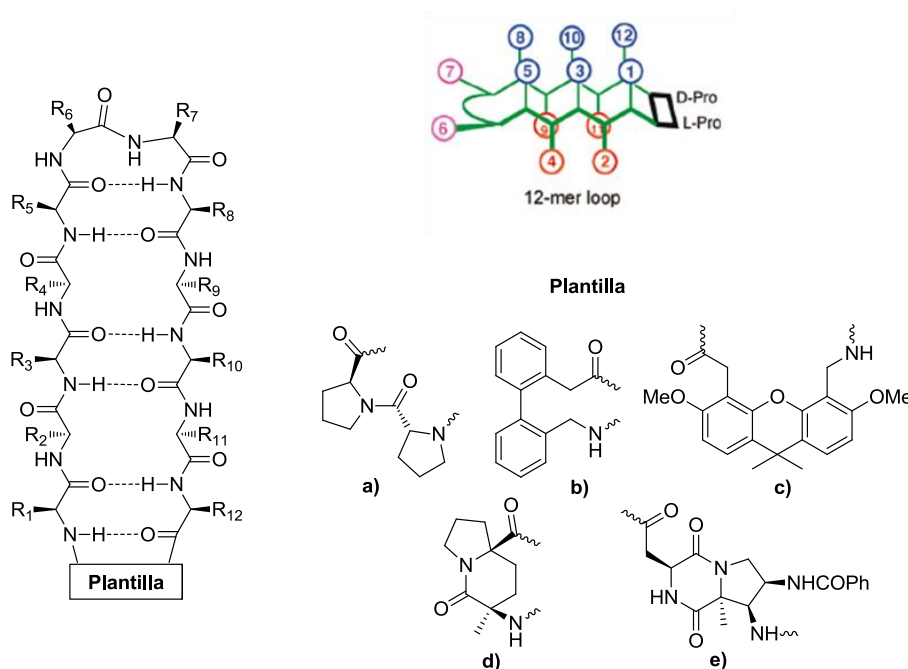


Figura 11. Estrategia en la que se utilizan plantillas con el fin de estabilizar el giro β de la horquilla.

Un ejemplo interesante del uso de esta estrategia, lo constituye el diseño de miméticos de horquilla β de la familia de inhibidores de la serina proteasa de Bowman-Birk (BB). Uno de los miembros más pequeños de esta familia es un péptido cíclico aislado de pipas de girasol (**14**, c[DGRC[CTKSIPPIC]FP])⁹⁷. En base a la estructura cristalina de este péptido unido al sitio activo de la tripsina, se diseñaron miméticos que

incorporaban la secuencia del dipéptido D-Pro-L-Pro, **15** y **16** (Fig. 12). Estudios conformacionales por RMN revelaron que los péptidos diseñados eran capaces de adquirir la estructura de horquilla β deseada e idéntica a la del péptido patrón. Los ensayos enzimáticos confirmaron la actividad biológica de estos análogos.

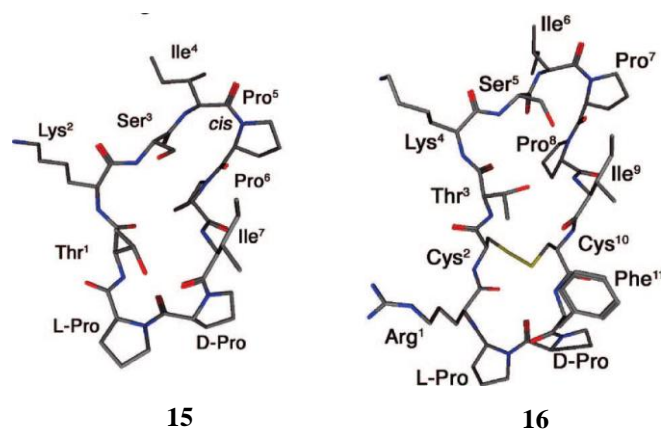
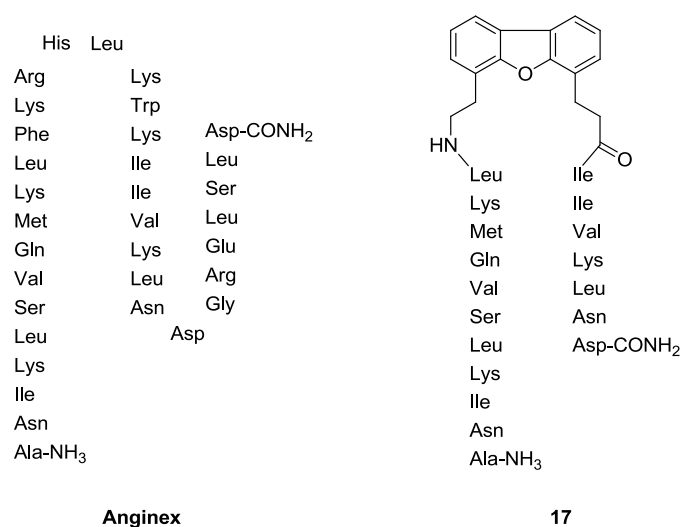


Figura 12. Análogos del inhibidor de serina proteasa **14**.

Dentro de esta misma línea, también se ha descrito una serie de plantillas de carácter no peptídico que han permitido generar horquillas β (Fig.11b-e)⁹⁸. En gran parte se trata de anillos aromáticos (Fig.11b), heterociclos (Fig.11c) o biciclos derivados de Pro (Fig.11d, e), que confieren rigidez a la zona del giro. Esta estrategia ha sido validada por Mayo *et al.* con el diseño de análogos del Anginex³⁴ (**17**, Fig. 13), un péptido de 33 aminoácidos con estructura de lámina β que actúa como un potente inhibidor del crecimiento tumoral y la angiogénesis.

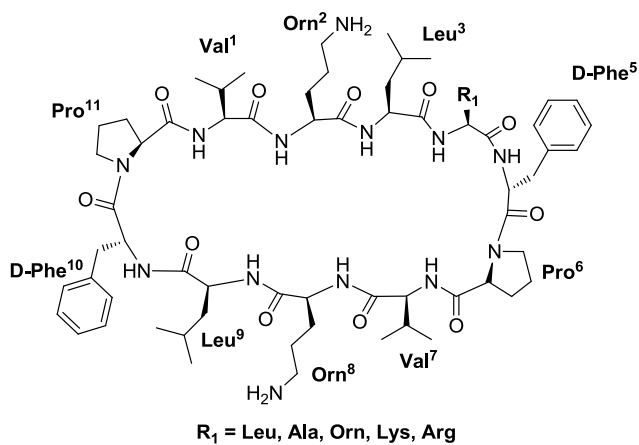


Anginex

17

Figura 13. Anginex y un análogo de menor tamaño.

Por otra parte, existen también algunos ejemplos que utilizan la secuencia *cis*D-Phe-Pro en la zona del giro, aunque es una estrategia menos frecuente. Concretamente, se ha utilizado en la búsqueda de miméticos con actividad biológica mejorada del antimicrobiano Gramicidina S⁹⁹ (Fig.14).

**Figura 14.** Análogos del antimicrobiano Gramicidina S en el que contienen la secuencia *cis*D-Phe-Pro.

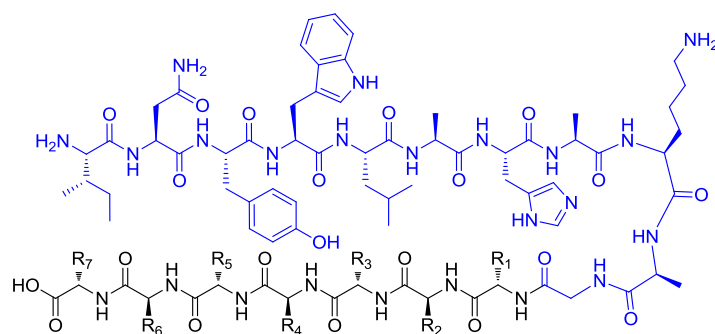
1.3.1.2. Estabilización a través de interacciones entre las hebras

Si se atiende a las fuerzas que de forma natural estabilizan la estructura de horquilla β podemos comprobar que en su mayoría son enlaces de hidrógeno. Por lo tanto, una forma de estabilizar esta estructura es intentar imitar este tipo de estabilización mediante la introducción de enlaces covalentes u otro tipo de interacciones entre las dos hebras de la horquilla.

1.3.1.2.1. Interacciones no covalentes

Una forma muy estudiada y extendida es la estabilización de la estructura de horquilla β a través de la introducción en la secuencia de residuos hidrofóbicos, generalmente Trp, enfrentados entre sí generando interacciones hidrofóbicas que favorecen la adopción de la estructura de horquilla¹⁰⁰⁻¹⁰⁹. Es importante destacar también la importancia de las interacciones entre un residuo alifático y uno aromático diferente de Trp, que en algunos modelos han resultado ser más estabilizantes que las propias interacciones aromático-aromático¹¹⁰.

Un ejemplo ilustrativo es el descrito por Tamura y colaboradores en el que, introduciendo una secuencia adicional en el extremo C-terminal de la α -lactoalbúmina, fragmento 101-111 (IDYWLAHKALA), que adopta estructura de hélice α a pH ácido, han conseguido que éste adquiriera conformación de horquilla β ¹¹¹ (**18-22**, Fig.15).



	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	R₆	R₇
18	Ser	Ile	Val	Lys	Leu	Thr	Ala
19	Tyr	Ile	Val	Lys	Leu	Thr	Ala
20	Ser	Ile	Val	His	Trp	Thr	Ala
21	Tyr	Ile	Val	Lys	Trp	Thr	Ala
22	Tyr	Ile	Val	His	Trp	Thr	Ala

Figura 15. Análogos de α -lactalbúmina. En azul se marcan los residuos pertenecientes a la secuencia nativa y en negro aquellos que se han introducido con el fin de favorecer la estructura de horquilla β .

Cabe destacar también un trabajo previo, directamente relacionado con el tema objeto de esta memoria, desarrollado en nuestro grupo de investigación en colaboración con la Dr. M^a Ángeles Jiménez. El estudio parte del fragmento 68-79 del loop 3 de Vammin (**23**, MRVNPRTQSSKM), un VEGF aislado de veneno de serpiente que se une específicamente al receptor KDR¹¹². Este fragmento presenta estructura de horquilla β , distorsionada en la zona del giro, en la proteína nativa. La introducción de residuos de Trp en las posiciones 3 y 10 del fragmento ha permitido que el derivado **24** adopte la estructura de horquilla β deseada (Fig.16).

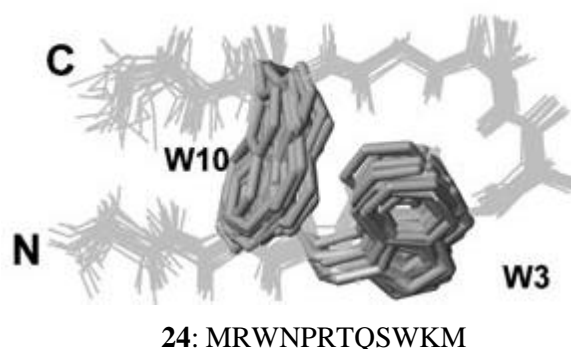


Figura 16. Superposición de estructuras obtenidas por RMN del análogo **24**. En gris claro se representa el esqueleto peptídico y en gris más oscuro las cadenas laterales de los residuos de Trp.

Otro tipo de interacciones no covalentes que estabilizan la estructura de horquilla β son las interacciones catión- π entre cadenas laterales de aminoácidos aromáticos y aminoácidos cargados positivamente como Lys o Arg¹¹³⁻¹¹⁵, o los puentes salinos formados entre cadenas laterales de aminoácidos con carga opuesta situados en posiciones enfrentadas de distintas hebras¹¹⁶⁻¹¹⁸. Todas estas interacciones son dependientes del pH del medio, por lo que han sido menos utilizadas.

1.3.1.2.2. Interacciones covalentes

Otra posible alternativa en la estabilización de horquillas β es la introducción de enlaces covalentes generados entre las cadenas laterales de los aminoácidos de dos hebras opuestas. De esta forma se generaría un ciclo que, si es capaz de aportar la restricción necesaria sin disminuir en exceso la flexibilidad del péptido, debería ayudar en la reorganización del patrón de puentes de hidrógeno de la horquilla.

El elemento de estabilización más utilizado en este sentido es el puente disulfuro, muy común en la naturaleza^{119, 120}. Este puente presenta una longitud y unos ángulos diedros idóneos para la estabilización de horquillas β ^{121, 122}, lo que ha llevado a obtener resultados exitosos en la fijación de estructuras de este tipo^{112, 123-128}. No obstante, su facilidad de reducción y la susceptibilidad de sufrir ataques nucleófilos por grupos sulfidrilo libres ha hecho que este tipo de puentes tienda a ser sustituido por otros con mayor estabilidad metabólica. Recientemente, Santiveri *et al.* han descrito un estudio

sobre la influencia de la posición del puente disulfuro dentro de la horquilla β ¹²⁷, utilizando como modelo un péptido cuya estructura había sido descrita previamente por el mismo grupo (**25**, SESYINSDGTWVTE)^{105, 129}. Este estudio ha concluido que el puente disulfuro estabiliza mejor la estructura de horquilla β cuando se encuentra en posiciones no unidas por enlace de hidrógeno (Fig. 17). Adicionalmente, del mismo modo que ocurría con las interacciones hidrofóbicas, la estabilización es mayor si el puente disulfuro se encuentra próximo al giro.

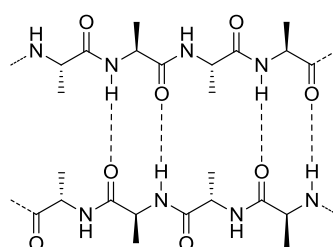


Figura 17. Representación de 2 hebras β enfrentadas en las que se marcan las posiciones unidas por enlace de hidrógeno.

Un ejemplo de la utilización de puentes disulfuro para generar restricción conformacional en péptidos bioactivos es el reportado por McDonnell y colaboradores en la búsqueda de inhibidores de la interacción IgE-Fc ϵ RI, importante en el desarrollo de procesos alérgicos^{124, 130}. Partiendo de la zona de interacción entre estas dos proteínas los autores se plantearon el diseño de miméticos del fragmento C-C' de dicho receptor (**26**, YKLAEGDKYYI). Para ello, introdujeron dos residuos de Cys en los extremos N- y C-terminales con el fin de generar una restricción conformacional que permitiese la adopción de la estructura requerida para la interacción con IgE (compuestos **27-30**, Fig.18)¹²⁴.

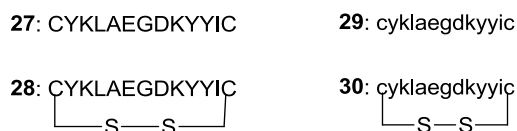


Figura 18. Análogos del fragmento C-C' del receptor Fc ϵ RI diseñados por McDonnell.

1.3.2. Hélices α

Una hélice α se define como cualquier secuencia de al menos 5 aminoácidos consecutivos con ángulos ϕ y ψ de -57° y -47° , respectivamente. La adopción de estos ángulos permite que se establezca un patrón de enlaces de hidrógeno característico entre el grupo carbonilo del residuo en posición i y el grupo NH del residuo en posición $i+4$. En cada vuelta de la hélice participan 3.6 aminoácidos, que avanzan 5.4 Å a lo largo del eje. Estas características se pierden en los extremos de la hélice, denominados N-cap y C-cap, respectivamente. De forma general, las hélices α contienen un promedio de 12 residuos, aunque las hélices transmembrana pueden ser más largas.

Este tipo de estructura secundaria es la más abundante en la naturaleza. Aproximadamente un 30% de los residuos presentes en las proteínas adoptan esta conformación y por ello ha sido ampliamente estudiada. El primer fragmento de proteína aislado con estructura de hélice α en disolución acuosa fue el péptido C, un péptido de 13 residuos del extremo N-terminal de la ribonucleasa A, que dentro de la proteína presenta esta estructura¹³¹. No fue hasta 10 años después, en los años 80, cuando comenzaron a publicarse diferentes estudios estructurales sobre este mismo péptido¹³²⁻¹³⁶, que junto con distintas aportaciones de estudios de RMN¹³⁷⁻¹³⁹, permitieron definir su estructura de forma precisa.

Existen múltiples factores que determinan la estabilidad de una hélice α . Se consideran muy importantes los aminoácidos que la forman, así como la posición que los mismos ocupan dentro de la secuencia, las interacciones entre cadenas laterales, la disposición las cadenas laterales de sus extremos N-cap y C-cap, etc¹⁴⁰. Todos éstos son factores a tener en cuenta a la hora de diseñar péptidos helicoidales en disolución acuosa. En este sentido, diferentes estudios de los residuos que componen las proteínas naturales han permitido establecer una preferencia por determinados residuos en según qué posiciones de la hélice. Así, es común encontrar residuos de Ala y Leu en el interior de la secuencia, mientras que es poco probable encontrar Gly o Pro ya que dificultan la adopción de los ángulos diedros característicos de esta estructura^{141, 142}. También es común el uso de aminoácidos α , α -disustituidos, como el Aib, en la zona central de la hélice para aumentar el contenido helicoidal de ésta^{143, 144}.

Por otra parte, la hélice tiene carácter dipolar debido a la orientación de los NH, hidrógenos positivos, hacia el extremo N-terminal y los oxígenos negativos hacia el C-terminal. Por esto, lo más común es encontrar residuos cargados negativamente en el extremo N-terminal y positivamente en el extremo C-terminal. En el caso de los residuos que tienden a colocarse en el extremo C-terminal no existe una tendencia clara, mientras que sí parece que en el extremo N-terminal es común encontrar residuos como el Asn, Asp, Ser y Thr que de forma general son aminoácidos que pueden aceptar enlaces de hidrógeno de los grupos NH de residuos cercanos en la secuencia¹⁴⁵⁻¹⁵⁰. Una forma sencilla pero efectiva de estabilizar estructuras de hélice α es la acetilación del extremo N-terminal¹⁵¹. De este modo se elimina la carga positiva del extremo de la hélice y además, el grupo carbonilo extra proporcionado por el acetilo puede generar algún enlace de hidrógeno estabilizante con algún grupo NH de los residuos próximos. Lo mismo ocurre cuando el extremo C-terminal se encuentra en forma de amida, produciéndose un efecto similar al de la acetilación del extremo N-terminal. Por último, también es común el uso de codisolventes orgánicos que facilitan la estructuración de los derivados peptídicos en disolución acuosa. Es el caso del trifluoroetanol (TFE), un disolvente que actúa protegiendo del agua los grupos C=O y NH, a la vez que favorece la interacción entre ellos¹⁵²⁻¹⁵⁵.

Se han generado distintos modelos matemáticos que permiten establecer el carácter helicoidal de una secuencia peptídica. Entre ellos se encuentra AGADIR, un algoritmo matemático desarrollado por Serrano, Muñoz y colaboradores, que tras varias mejoras es capaz de predecir con bastante fiabilidad la helicidad de un péptido lineal cualquiera. Para ello, este algoritmo tiene en cuenta diversos factores como el tipo y la posición de los aminoácidos, posibles enlaces de hidrógeno, interacciones entre cadenas laterales en posiciones adecuadas, el carácter dipolar de la hélice, la dependencia con el pH, etc¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

Uno de los aspectos que no contemplan los algoritmos matemáticos como AGADIR es la solubilidad acuosa, que resulta un factor determinante a la hora de estudiar los péptidos diseñados. De forma general, como ya se ha visto, el contenido elevado de aminoácidos alifáticos como la Ala o la Leu aumenta la helicidad de los péptidos, pero el carácter hidrófobo de estos residuos provoca que sean poco solubles en agua. Para

mejorarla, es necesaria la introducción de residuos polares o cargados en posiciones ($i, i+5$) para evitar la interacción entre ellos¹⁵⁹. El espaciado entre las cadenas laterales de los residuos implicados en una hélice α se visualiza fácilmente con el uso de la rueda helicoidal (Fig. 19). Esta representación esquemática de las hélices permite apreciar cómo quedan distribuidas en la superficie las cadenas laterales de sus residuos, teniendo en cuenta que el ángulo que forman dos residuos consecutivos en una hélice α es de 100° .

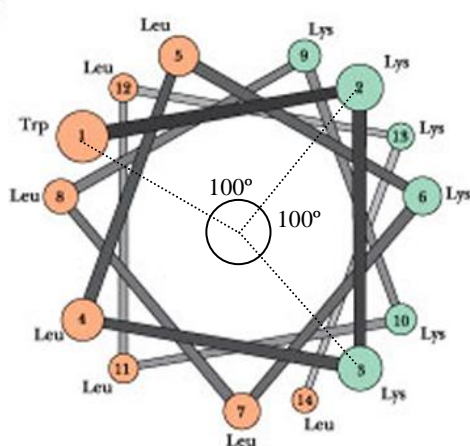


Figura 19. Rueda helicoidal utilizada para el diseño de hélices α . En el ejemplo presentado se puede observar una cara hidrófoba en naranja y una cara hidrófila en verde.

1.3.2.1. Estabilización mediante el uso de plantillas

La mayor penalización a la hora de formar una hélice α viene dada por la pérdida de entropía que conlleva el proceso de iniciación de la hélice, es decir, la colocación de los tres primeros aminoácidos en la disposición adecuada para formar el primer enlace de hidrógeno. Una vez traspasada esta barrera energética, la propagación está más favorecida. Una manera de eliminar esta barrera es sintetizar una molécula plantilla que facilite la formación del primer enlace de hidrógeno. Esta plantilla podría iniciar la hélice si se coloca en el extremo N-terminal, C-terminal o en el centro del péptido, aunque los requisitos necesarios en cada caso serían diferentes. La nucleación en el centro del péptido se consigue más fácilmente usando restricciones en cuanto a las cadenas laterales de los aminoácidos. La nucleación en el extremo C-terminal no es fácil de conseguir, pero

en el extremo N-terminal se pueden introducir restricciones conformacionales capaces de establecer una geometría adecuada, que disponga los átomos de la forma necesaria para iniciar la hélice.

En la bibliografía aparecen numerosos ejemplos que utilizan este tipo de estrategia para inducir estructura de hélice, recurriendo a plantillas de diversa naturaleza (Fig. 20)¹⁶⁰⁻¹⁶⁸.

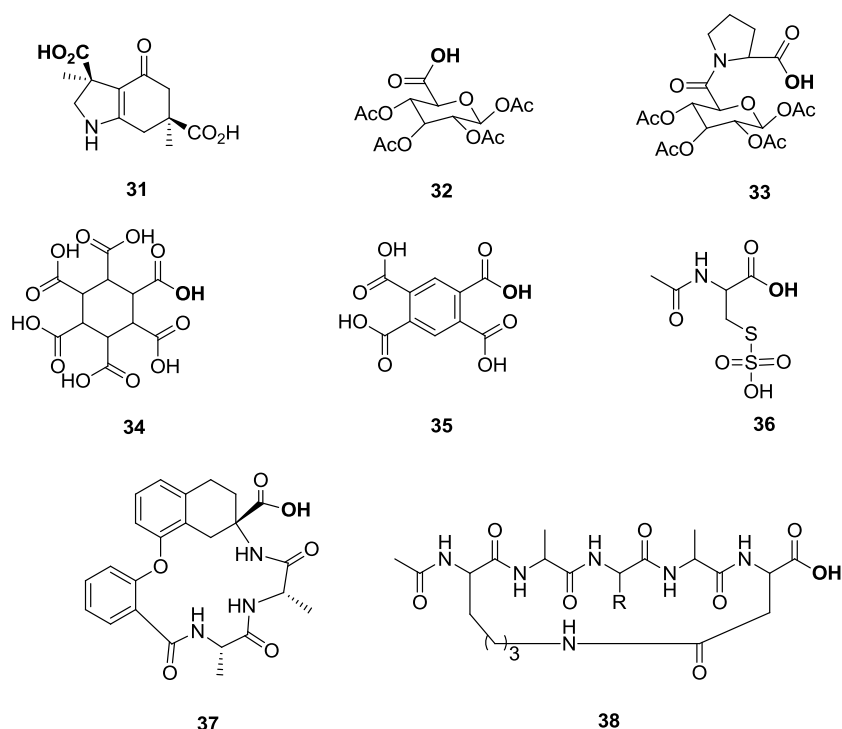


Figura 20. Diferentes plantillas utilizadas para iniciar la hélice α al introducirlas en el extremo N-terminal de un péptido. En negrita se marca el grupo por el cual se une el péptido.

Un ejemplo interesante dentro de la introducción de plantillas en el extremo N-terminal que permitan superar la barrera energética para producir la iniciación de la hélice es lo que Arora y colaboradores denominan HBS (“hydrogen bond surrogate”)¹⁶⁹. Como ya se ha comentado anteriormente, las hélices α se caracterizan por presentar un enlace de hidrógeno entre las posiciones $(i, i+4)$. Esta estrategia se basa en la sustitución del primer enlace de hidrógeno por un enlace covalente, que en este caso es un enlace hidrocarbonado, aprovechando la versatilidad y la tolerancia de diferentes grupos funcionales a la reacción de metátesis (Fig.21). La ventaja de esta estrategia es que

permite conservar las cadenas laterales de todos los residuos, lo cual es importante a la hora de sintetizar hélices que participen en interacciones proteína-proteína.

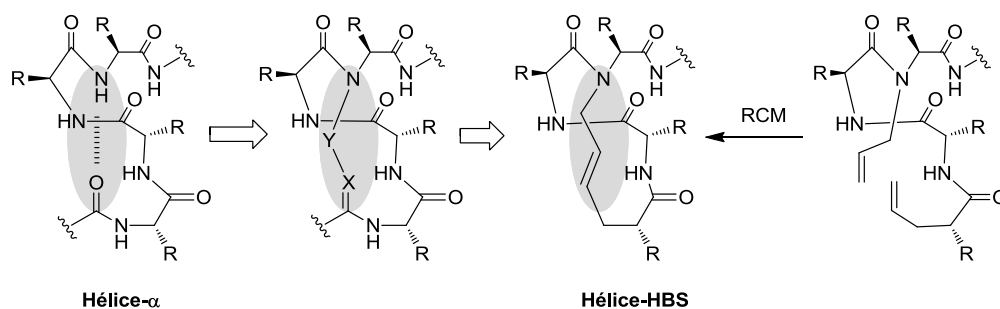


Figura 21. Estrategia HBS.

Basados en el trabajo de Satterhwait, que estudió el uso de hidrazonas para la fijación de hélices α ¹⁷⁰, Arora y colaboradores describieron en 2004 el primer estudio de estabilización de hélice α usando esta estrategia^{171, 172} y continuaron realizando diferentes estudios con el fin de validarla^{173, 174}. Para demostrar la eficacia del HBS en la estabilización de conformaciones de hélice α biológicamente relevantes, aplicaron con éxito la estrategia a un péptido de 16 aminoácidos procedente del dominio BH3 de Bak, **39** (Fig.22), que adopta conformación helicoidal cuando se une a Bcl-xL¹⁷⁵. Tras varias modificaciones llegaron a los compuestos HBS **40** y **41**, que presentaron una helicidad del 46 y del 65%, respectivamente, frente al 20% presentado por **39**. Los ensayos de afinidad de estos compuestos demostraron que el derivado con más helicidad **41** ($K_D = 69 \pm 16$ nM) era dos veces más potente que su análogo lineal **39** ($K_D = 154 \pm 23$ nM).

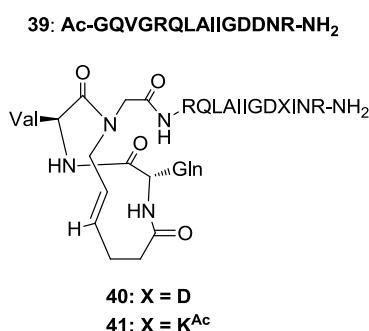


Figura 22. Secuencias patrón y análogos HBS del dominio BH3 de Bak.

1.3.2.2. Estabilización mediante interacciones no covalentes

Numerosos estudios se han centrado en la búsqueda de la estabilización de la estructura de hélice α a través de interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos de la secuencia. Estos estudios han identificado diferentes tipos de interacciones como puentes salinos¹⁷⁶⁻¹⁸⁴, enlaces de hidrógeno^{177, 185-188}, interacciones hidrofóbicas¹⁸⁹⁻¹⁹⁴ e interacciones aromático-básico^{156, 195-198}. Las interacciones más comunes se producen entre cadenas laterales de aminoácidos que se encuentran en posiciones $(i, i+3)$ o $(i, i+4)$, siendo estas últimas las más estabilizantes.

La estabilización aportada por los puentes salinos se ha estudiado generalmente en sistemas que contienen residuos de Lys y Glu en las posiciones adecuadas para la interacción. Así, se ha comprobado que puentes salinos Lysⁱ-Gluⁱ⁺⁴ en posiciones centrales de la secuencia son más estabilizantes que si se encuentran en los extremos¹⁷⁶. Los pares His-Asp son más estabilizantes que Asp-His¹⁷⁸, especialmente cuando se encuentran en posiciones $(i, i+4)$. Del mismo modo, existen estudios de triadas de aminoácidos que estabilizan interacciones de este tipo como Arg-Glu-Arg¹⁸⁴. En cuanto a enlaces de hidrógeno entre grupos funcionales de cadenas laterales de aminoácidos implicados en un hélice α , lo más común es encontrarlos entre Gln y Asx situados en posiciones $(i, i+4)$ ^{185, 186}. Residuos de cadena corta, como Thr, Ser, Asn o Asp, tienden también a favorecer este tipo de estabilización cuando se encuentran en el extremo N-terminal de la secuencia¹⁸⁸. Del resto de interacciones estudiadas cabe destacar que las observadas entre residuos de Phe o Tyr y residuos de Lys o Arg, que en principio se

consideraron de tipo aromático-básico (π -catión), son en realidad de tipo hidrófobo entre los anillos aromáticos y los metilenos de las cadenas laterales de los residuos básicos¹⁹⁵.

1.3.2.3. Estabilización mediante interacciones covalentes entre cadenas laterales

Otra de las posibilidades a la hora de intentar estabilizar la estructura de hélice α es la introducción de enlaces covalentes entre cadenas laterales de residuos situados en la misma cara de la hélice. Así, se pueden unir una (Fig.23a-b) o más vueltas de hélice (Fig.23c) o hacer varias uniones en una misma secuencia, siempre intentando que los puentes covalentes queden en la cara opuesta a la cara de interacción, cuando lo que se busca es la fijación de la conformación bioactiva de péptidos con actividad biológica. En este sentido, las uniones se pueden realizar a través de enlaces hidrocarbonados, enlaces amida o puentes disulfuro, o incluso recientemente ha aparecido un ejemplo del uso de la “química click” para crear este tipo de puentes¹⁹⁹. Aunque hay algunos ejemplos descritos²⁰⁰⁻²⁰², los puentes disulfuro son los menos utilizados debido a la baja estabilidad metabólica y la facilidad de reducción del enlace disulfuro.

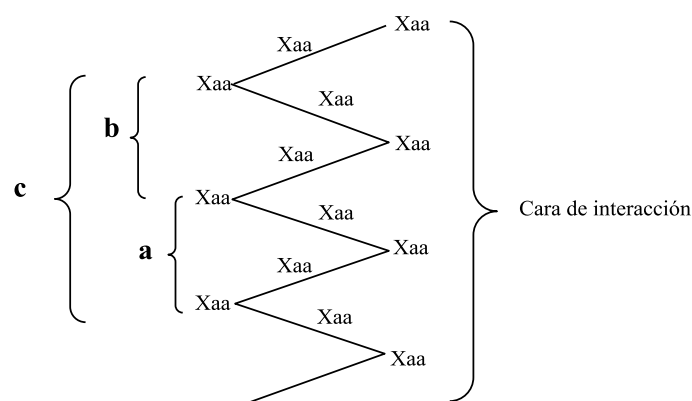


Figura 23. Modelo de fijación de la estructura a través de enlaces covalentes. a y b) Unión de una vuelta de hélice ($i, i+4$), c) Unión de dos vueltas de hélice ($i, i+7$).

1.3.2.3.1. Puentes hidrocarbonados

La introducción de enlaces hidrocarbonados como restricción conformacional en estructuras de hélice α fue iniciada por el grupo de Grubbs a finales de los noventa, a la vista del potencial de la reacción de metátesis y de la elevada tolerancia de la mayoría de los grupos funcionales a los catalizadores desarrollados en esos momentos²⁰³. Mediante la

introducción de aminoácidos modificados en su cadena lateral con grupos alqueno de longitud adecuada consiguieron estabilizar la estructura de un péptido, que en disolución no presentaba estructura pero en estado sólido se comportaba como una hélice α . En base a estos primeros datos, Verdine y colaboradores realizaron un estudio más profundo en el que exploraron la importancia de la posición, la longitud del puente y la estereoquímica de los aminoácidos que se van a unir en el péptido C de la RNAsa A²⁰⁴. Observaron que la longitud es determinante para que la reacción de metátesis tenga lugar y que en este caso, la estabilización que une dos vueltas de hélice, $(i, i+7)$, es más efectiva que la que une una única vuelta, $(i, i+4)$.

La aplicación de esta metodología a moléculas con actividad biológica ha sido exitosa, como así lo ha mostrado el grupo de Verdine al utilizarla en la búsqueda de promotores de la apoptosis. Para ello, sintetizaron una serie de péptidos que mimetizaban el fragmento BH3 de la proteína proapoptótica Bcl-2, (**42-45**, Fig.24)^{52, 53, 205}. Otro ejemplo de aplicación de esta estrategia a moléculas bioactivas es el descrito por el grupo de Debnath, que han diseñado un péptido con estructura de hélice α capaz de impedir la unión de las partículas de la cápsida del virus del VIH-1²⁰⁶⁻²⁰⁸.

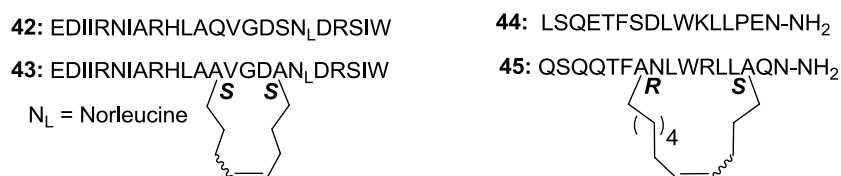


Figura 24. Hélices estabilizadas mediante enlaces hidrocarbonados.

1.3.2.3.2. Puentes amida

La introducción de enlaces amida como restricción conformacional para facilitar la formación de hélices α en disolución es la estrategia más común en este sentido²⁰⁹⁻²²³. Los primeros estudios de estabilización de hélices a través de este tipo de enlaces vinieron de la mano de Felix *et al.*, que incorporaron pares Asp^{*i*}-Lys^{*i+4*} y Lys^{*i*}-Asp^{*i+4*} en análogos del fragmento GRF₁₋₂₉, consiguiendo un aumento en el contenido helicoidal del péptido sin distorsionar la estructura²²⁴. Estudios posteriores en esta misma línea indicaron que el ciclo de 20 átomos formado utilizando Lys y Asp es óptimo para la

estabilización, mientras que si el ciclo es de 19 átomos se desestabiliza²²⁵. La adición de un metileno en el ciclo, utilizando Glu en vez de Asp, da lugar a un ciclo de 21 átomos que resulta poco estabilizante si la dirección es $\text{Lys}^i\text{-Glu}^{i+4}$ pero que parece funcionar mejor si la orientación del ciclo es $\text{Glu}^i\text{-Lys}^{i+4}$ ^{209, 211}. Estas características en el tamaño del ciclo y en la posición de los residuos del puente dentro de la secuencia de la hélice no se pueden asumir como una generalidad, ya que como se ha comentado anteriormente, la helicidad de un péptido depende en gran medida de los aminoácidos que lo forman y de la posición que estos ocupan dentro de la secuencia^{226, 227}.

Lo mismo se podría decir sobre estudios que unen dos vueltas de hélice, si en este caso situamos los residuos cuyas cadenas laterales se van a ciclar en posiciones $(i, i+7)$. Phelan *et al.*²¹⁶ introdujeron este tipo de enlaces amida para poder compararlos con la estabilidad generada por los puentes disulfuro descritos por Schultz y colaboradores a principios de los 90²⁰⁰. El estudio determinó una mayor estabilización de la hélice si el puente utilizado era amida en vez de disulfuro.

Esta estrategia ha sido aplicada en la búsqueda de miméticos de péptidos bioactivos cuya actividad viene determinada por la estructura. Así, en 1997 McDowell y colaboradores presentaron una serie de miméticos de un segmento de la proteína gp41, **47**, implicada en la entrada del virus HIV-1 en la célula huésped (**48-50**, Fig.25), que presentaron una clara correlación entre la estructura de hélice α de los péptidos y su capacidad de disminuir la infectividad del virus²²⁸. Los resultados obtenidos indicaron estabilización de la estructura de hélice en todos los casos, siendo mayor cuando se introducen dos puentes dentro de la misma secuencia (**49**, **HIV-31**).

47 (DP178): YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQEELLELDKWASLWNWF

46 (HIV35): YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQEELLELD

48 (HIV24): YTSLIHSLIXESQNQQXKNEQEELLELD

49 (HIV31): YTXLIHSLIXESQNQQXKNEQELXELD

50 (HIV30): YTSLIHSXIEESQNXQEKNQEELLELD

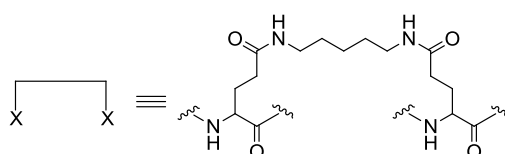


Figura 25. Secuencias de los péptidos diseñados por McDowell y colaboradores y del péptido patrón. Los puentes amida se representan mediante líneas.

Otro ejemplo dentro de la inhibición de interacciones proteína-proteína es el descrito por Mills *et al.*²²⁹. Tomando como patrón el péptido R₆QR₇ (**51**) (Fig.26), que es capaz de inhibir la interacción Rev-RRE esencial para la replicación del virus HIV-1, sintetizaron una serie de derivados en los que introdujeron un puente amida como restricción conformacional, uniendo los residuos ($i, i+4$) de la secuencia (**52**). El uso de dos puentes en posiciones ($i, i+4$) dentro de la misma secuencia, **54**, lo ejemplificaron Shepherd y colaboradores en la búsqueda de miméticos del fragmento HR-C₄₈₃₋₄₉₅ (**53**) con actividad antiviral frente al virus respiratorio sincitial (RSV). Como patrón utilizaron el péptido **55** que contiene residuos de Ala en las posiciones ocupadas por los puentes

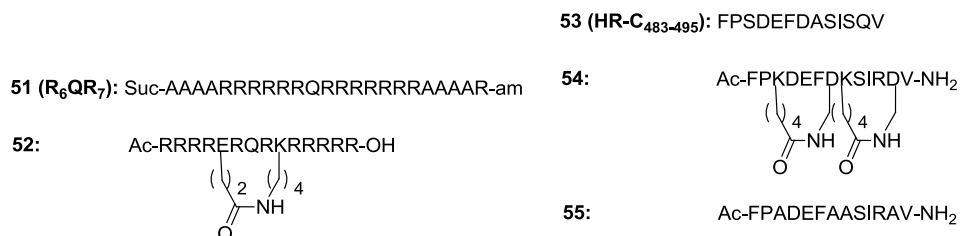


Figura 26. Secuencias de péptidos diseñados con puente amida en posiciones ($i, i+4$).

1.3.2.4. Otras estrategias

Además de las estrategias comentadas hasta el momento existen otras muchas. Una de ellas es el uso de esqueletos no peptídicos que mimetizan la disposición de las cadenas laterales en una hélice²³⁰. Es el caso de la estrategia del grupo de Hamilton, basada en esqueletos de bi- o tri-fenilos^{231, 232} (Fig.27a-c), y la de Rebek, que utiliza esqueletos de piperazina o piridazina como armazón para disponer adecuadamente los residuos i , $i+3$ o $i+4$, e $i+7$ de hélices α ^{233, 234} (Fig.27d-e).

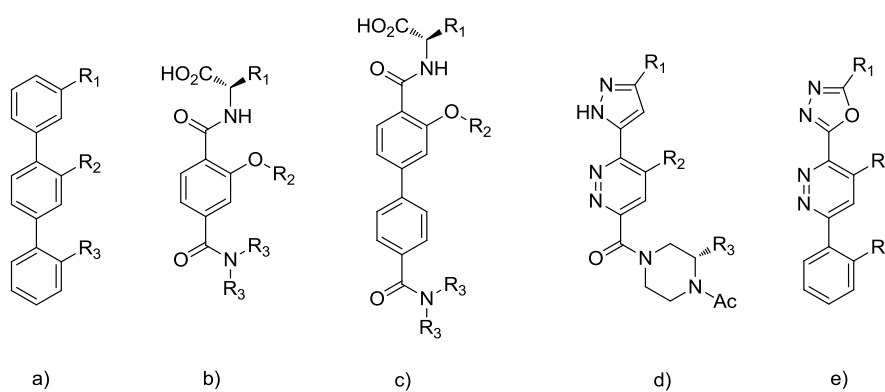


Figura 27. Esqueletos no peptídicos utilizados por Hamilton (a-c) y Rebek (d-e) para mimetizar hélices α .

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

En base a los antecedentes expuestos en la Introducción, y con el objetivo general de intentar interferir en la interacción entre VEGF y sus receptores, se planteó el diseño racional de inhibidores peptídicos análogos de este factor. Para ello, en la memoria se propone la búsqueda de análogos de dos de los hot-spots de VEGF identificados hasta el momento: VEGF₈₁₋₉₁ y VEGF₁₃₋₂₅, capaces de bloquear dicha interacción. Por otra parte, teniendo en cuenta la similitud con Vammin, un VEGF aislado de veneno de serpiente, se pretende también utilizar como punto de partida el fragmento Vammin₁₋₁₃, homólogo de VEGF₁₃₋₂₅, para comprobar si Vammin utiliza los mismos sitios de unión que VEGF en su interacción con el receptor KDR.

Partiendo de estas consideraciones generales, los objetivos concretos del presente trabajo son:

- Diseño de derivados peptídicos de los fragmentos 81-91 y 13-25 de VEGF, así como del fragmento 1-13 de Vammin, atendiendo tanto a la estructura espacial como a los residuos determinantes para su interacción con los receptores de VEGF.
- Preparación de los péptidos diseñados, utilizando las rutas sintéticas apropiadas en fase sólida.
- Análisis conformacional de los péptidos preparados, para determinar su capacidad para mimetizar la estructura secundaria observada para los fragmentos nativos dentro de la proteína.
- Determinación de la afinidad por los receptores de VEGF de los péptidos obtenidos y evaluación de su actividad antiangiogénica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:
análogos del fragmento VEGF₈₁₋₉₁

3. ANÁLOGOS DEL FRAGMENTO VEGF₈₁₋₉₁

Con el fin de intentar inhibir la interacción entre VEGF y sus receptores y como consecuencia el proceso de angiogénesis, se planteó la preparación de derivados de naturaleza peptídica capaces de interferir en el reconocimiento entre estas dos proteínas. El diseño de los mismos se realizó atendiendo a la secuencia y estructura tridimensional de los fragmentos de la molécula de VEGF identificados como hot-spots. Este capítulo se centra en la búsqueda de análogos del fragmento VEGF₈₁₋₉₁, que dentro de la proteína se encuentra formando parte de una horquilla β .

3.1. DISEÑO

Teniendo en cuenta los antecedentes para estabilizar horquillas β , la estrategia seguida en la búsqueda de moduladores de la interacción VEGF-VEGFRs se centra en la incorporación de restricciones conformacionales en el fragmento 81-91 de VEGF, mediante la formación de ciclos a través de enlaces covalentes entre las cadenas laterales de aminoácidos situados en hebras distintas de la horquilla. Así, se plantearon tres posibilidades de ciclación: a través de puentes disulfuro (Fig. 28A), a través de puentes amida (Fig. 28B) y como opción más novedosa, la ciclación a través de puentes hidrocarbonados (Fig. 28C). La estabilización de horquillas β a través de interacciones covalentes resultó ser una estrategia atractiva, aunque, como se ha visto en la Introducción, son escasos los ejemplos existentes en la bibliografía en los que se presta atención a la fijación de esta estructura secundaria en péptidos con actividad biológica relevante.

La ciclación a través de puentes disulfuro ya ha sido estudiada como estrategia para fijar conformaciones de horquilla β . Sin embargo, existen pocos ejemplos de ciclaciones cadena lateral-cadena lateral con los otros dos tipos de puente.

Junto con el disulfuro, el puente amida se puede considerar un puente clásico, que en general aporta mayor estabilidad al péptido. Además, este tipo de puentes confiere mayor restricción conformacional debido a la configuración *trans* planar del enlace amida frente a configuraciones *gauche*⁻ o *gauche*⁺ del puente disulfuro, que le aporta mayor flexibilidad²³⁵. Existen numerosos ejemplos en la bibliografía de péptidos ciclados

mediante enlace amida, aunque la mayoría son péptidos unidos por los extremos N y C-terminales, llamadas uniones cabeza-cola, que no atienden demasiado a la búsqueda de una estructura espacial concreta²³⁶⁻²³⁹. No obstante, con ciclaciones entre cadenas laterales y utilizando este tipo de puente se ha conseguido fijar la conformación de ciertos péptidos lineales desestructurados en disolución, logrando que adquieran conformaciones preferentes de giros β ^{235, 240, 241} e incluso de horquillas β . Este es el caso de ciertos antagonistas de gonadotropina, donde este tipo de ciclación apuntó a que la conformación bioactiva de dicha hormona es de tipo horquilla β ²⁴².

Por otra parte, la formación de estructuras cíclicas mediante la generación de enlaces hidrocarbonados a través de una reacción de metátesis cruzada de olefinas, es una estrategia novedosa y cada vez más utilizada para introducir restricción conformacional en derivados peptídicos^{243,244}. Existen numerosos ejemplos descritos en la literatura que usan esta estrategia dentro del campo de la química de péptidos bioactivos con el fin de fijar diferentes elementos de estructura secundaria²⁴⁵, disminuyendo el carácter peptídico de los derivados cíclicos^{203,204}. Cabe destacar, que hasta el momento, ninguno de los ejemplos descritos se ha usado para intentar fijar estructura de horquilla β .

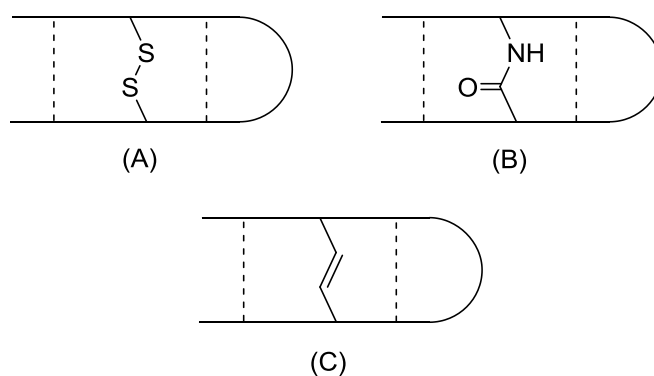


Figura 28. Estrategias de ciclación seleccionadas para intentar la restricción de la conformación de horquillas β en el VEGF₈₁₋₉₁.

Partiendo del fragmento VEGF₈₁₋₉₁ se diseñaron análogos en los que se introdujeron en las posiciones adecuadas modificaciones que permitieran la ciclación a través de la formación de los tres tipos de puente indicados anteriormente. Se ha pretendido de esta manera comparar la influencia tanto en la estructura como en la

actividad biológica del tipo de restricción generada por cada uno de estos puentes. Por otra parte, las posiciones de ciclación se eligieron procurando conservar el mayor número posible de residuos importantes para la interacción VEGF/VEGFRs, en base a los estudios de mutagénesis dirigida y de cristalografía de rayos X mencionados en la introducción de esta memoria (Fig. 29).

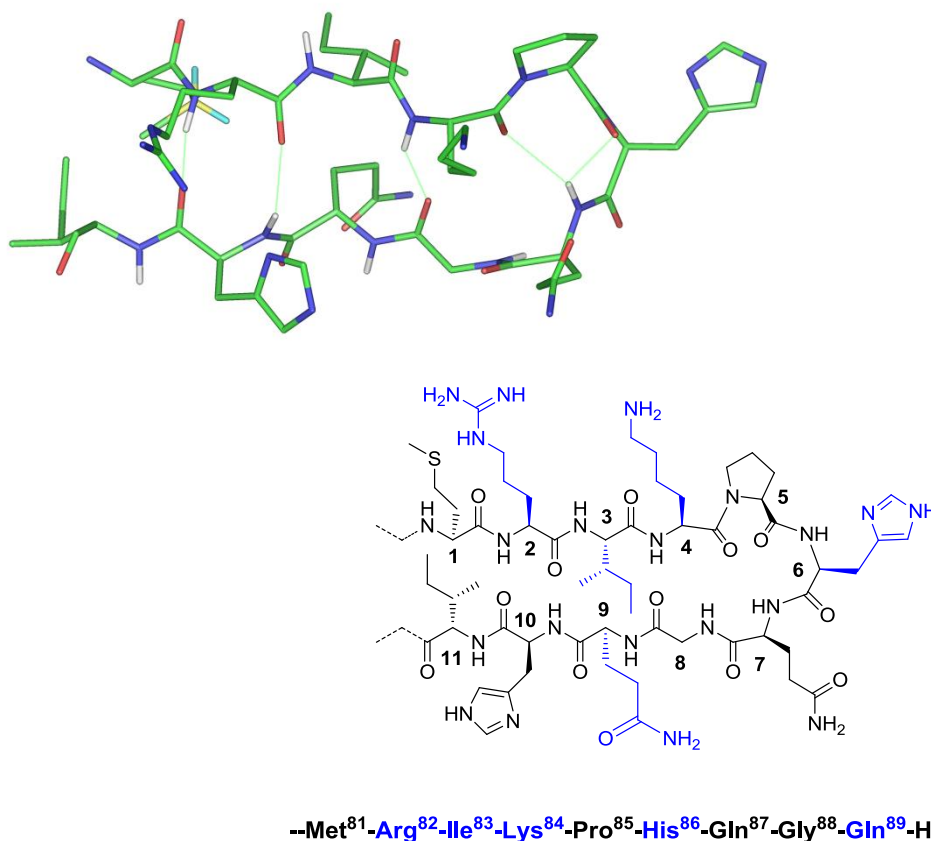
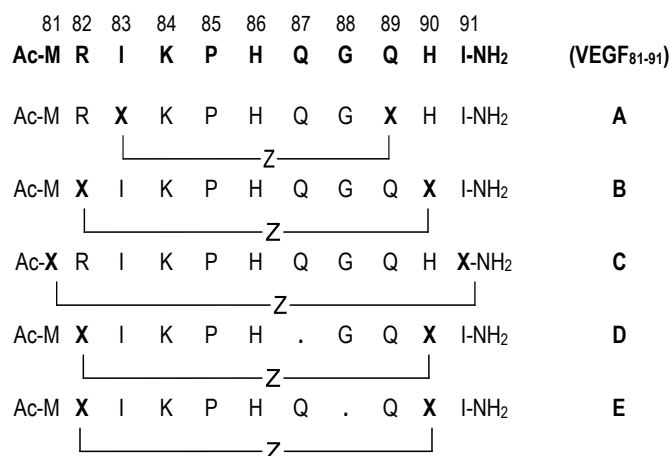


Figura 29. Fragmento natural de VEGF₈₁₋₉₁. En azul se indican los residuos que se han descrito como importantes para la interacción VEGF/VEGFRs.

Así, en principio, existían tres opciones para introducir las modificaciones necesarias para generar los puntos de ciclación: las posiciones 3 y 9 del fragmento seleccionado (**A**, Fig.30), en las que se sustituirían los residuos Ile83 y Gln89, las posiciones 2 y 10 que afectaría a los residuos de Arg82 e His90 (**B**, Fig.30), y por último las posiciones 1 y 11 en las que se eliminarían los residuos de Met81 e Ile91 (**C**, Fig.30).

Por otra parte, la estructura de horquilla β que presenta este fragmento dentro de la proteína nativa está distorsionada por la presencia de un residuo extra en la zona del giro, cinco aminoácidos en vez de cuatro, como es habitual en un giro β (Fig. 29). Este hecho nos llevó a plantear la síntesis de derivados en los que se eliminase éste residuo extra para intentar favorecer la estabilización de la estructura de horquilla β deseada. Se diseñaron así análogos conformacionalmente restringidos en los que se eliminó, bien el residuo de Gln87 (**D**, Fig.30) o bien el de Gly88 (**E**, Fig.30) y de esta manera poder comprobar la relevancia de uno y otro residuo dentro de la estructura.



A, C, D, E: Z : CH=CH, CH₂-CH₂

B: Z : S-S, CONH, NHCO, CH=CH, CH₂-CH₂

Figura 30. Péptidos diseñados. Con una **X** se marcan los residuos susceptibles de modificación.

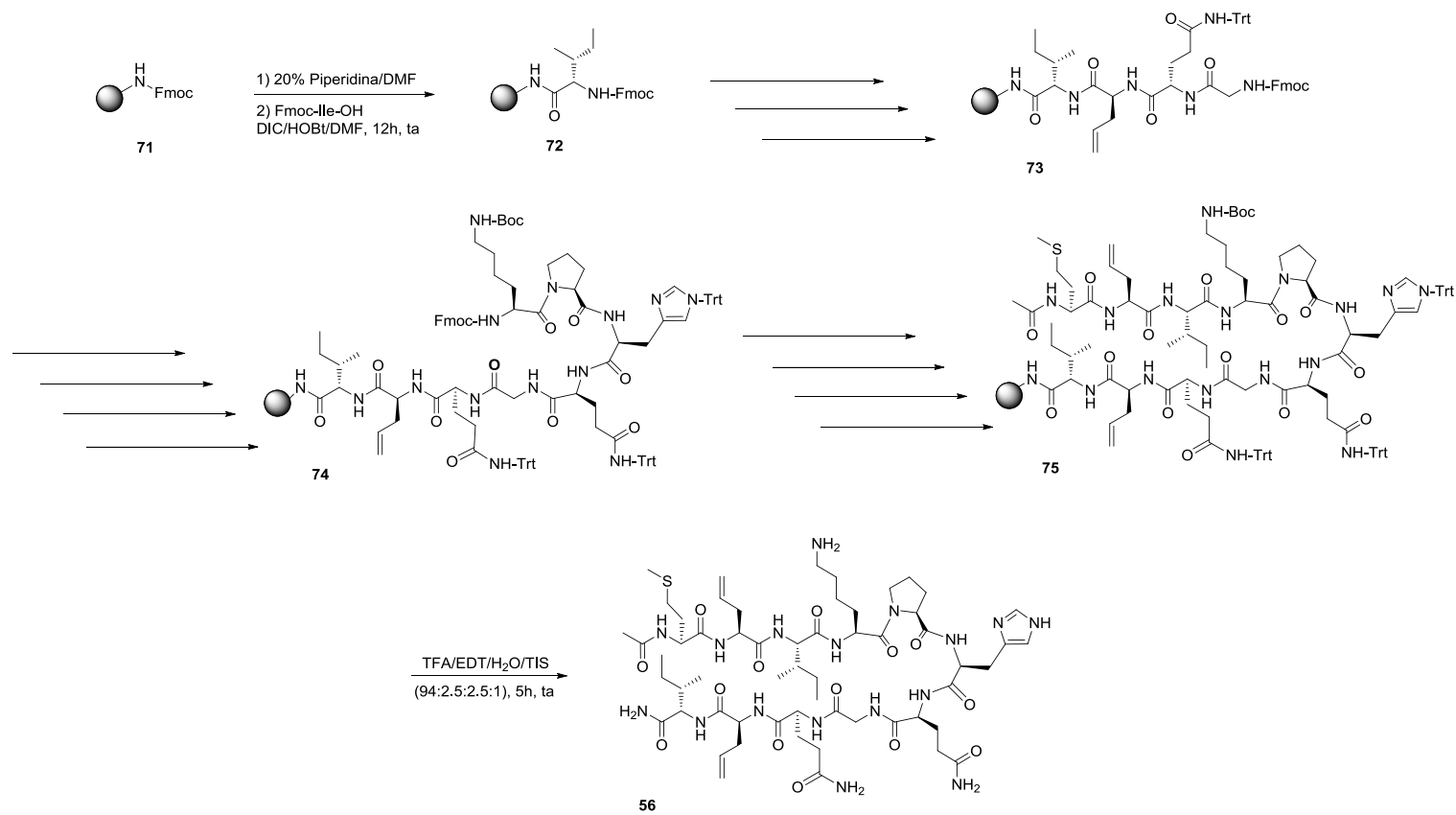
Por tanto, se diseñaron los cinco tipos de derivados del fragmento VEGF₈₁₋₉₁ **A-E** con objeto de evaluar la importancia, tanto en relación a la estructura como a la actividad biológica, de los residuos modificados, el papel de la posición y naturaleza del puente y por último la relevancia del aminoácido extra en la zona del giro. Teniendo en cuenta consideraciones de facilidad sintética a priori, la variación en el tipo de puente se realizó en los ciclos de tipo B, mientras que el resto de derivados, A, C-E, únicamente portan puentes hidrocarbonados.

Para aumentar la estabilidad química de los productos y su resistencia frente a proteasas, todos los compuestos diseñados cuentan con grupos acetilo en posición N-terminal y carboxamida en C-terminal.

3.2. SÍNTESIS

3.2.1. Péptidos cíclicos con puentes HC=CH y CH₂-CH₂ y sus análogos lineales

En primer lugar, se abordó la síntesis de los péptidos con puentes CH=CH, mediante la generación de ciclos a través de reacción de metátesis cruzada de olefinas entre cadenas laterales de aminoácidos modificados con grupos alqueno. La cadena lateral elegida fue la de la alilGly. Por lo tanto, en base a nuestro diseño inicial, se sintetizaron los correspondientes derivados lineales que contienen alilGly en las posiciones de ciclación, para posteriormente llevar a cabo la reacción de metátesis que generaría el enlace covalente entre las dos hebras de la horquilla. Dado que la reducción del doble enlace generado en la metátesis conferiría mayor flexibilidad al ciclo, y con el fin de explorar un mayor espacio conformacional, se planteó obtener también los productos de hidrogenación del doble enlace. Esto además podría simplificar los estudios conformacionales por RMN, ya que era previsible la obtención de mezclas de isómeros *Z/E* en el doble enlace del puente (Fig. 31).



Esquema 1. Síntesis del péptido lineal 56.

Una vez completada la elongación de los péptidos se procedió a la protección del extremo N-terminal en forma de N-acetilo. El siguiente paso fue la escisión de los productos finales de las resinas de tipo **75**. Para ello se utilizó un cóctel de desanclaje compuesto por TFA:EDT:H₂O:TIPS en proporciones volumétricas 94:2.5:2.5:1. El EDT se utilizó para evitar/minimizar la oxidación de la Met, y el H₂O y el TIPS para atrapar los cationes formados a partir de los grupos protectores Trt y Boc. Tras precipitación con Et₂O y liofilización de los crudos de reacción, éstos se purificaron por HPLC-semipreparativo, lo que permitió aislar los péptidos lineales **56**, **59**, **62**, **65** y **68** con buenos rendimientos (Tabla 1) y con purezas superiores al 98% (Esquema 1).

Tabla 1. Rendimientos obtenidos en la síntesis de los compuestos lineales de la serie 1.

Compuesto	56	59	62	65	68
%Rendimiento global (%)	12	12	18	17	36

3.2.1.2. Péptidos cíclicos de la Serie 1

Para la obtención de los péptidos cíclicos de la serie 1 con puente CH=CH se realizó una reacción de metátesis a través de las cadenas laterales de alilGly convenientemente situadas.

Como es conocido la reacción de metátesis cruzada de olefinas tiene lugar entre dos moléculas que contienen un enlace doble carbono-carbono cada una, o una molécula con dos grupos alqueno, produciéndose un intercambio entre los carbonos olefínicos para dar lugar a la formación de un nuevo enlace C=C, siendo necesaria la presencia de un catalizador organometálico de Ru o Mo de tipo carbenoide^{247,248}. Los primeros catalizadores desarrollados por Grubbs y Schrock han ido evolucionando, apareciendo distintas variantes que mejoran la reactividad de sus antecesores. El mecanismo de esta reacción es sencillo (Fig. 33): la primera molécula que contiene el enlace múltiple C=C (a) se une al catalizador organometálico (b) dando lugar al ciclo de cuatro miembros (c). La apertura de este ciclo libera una molécula de etileno, (d), dejando libre el complejo metálico (e) que se une a la segunda molécula con enlace C=C, (f). De nuevo se forma un ciclo de cuatro miembros, (g), cuya apertura conduce a la nueva molécula (h), regenerando el catalizador.

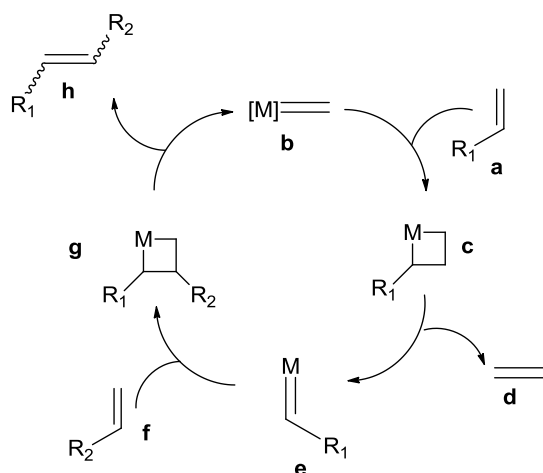


Figura 33. Mecanismo de la reacción de metátesis.

La síntesis del derivado cíclico **57** se realizó en fase sólida a través de una reacción de metátesis a partir del correspondiente derivado lineal protegido anclado a la

resina, **75** (Esquema 2). Los primeros ensayos de metátesis se realizaron utilizando catalizadores de Grubbs (G) y de Hoveyda-Grubbs (HG), ambos de segunda generación (Fig.34), en DCM anhidro como disolvente, a 40°C durante 48 h, y haciendo una nueva adición de catalizador a las 24h de reacción²⁴³. Dado que la cantidad de producto de ciclación observada mediante HPLC-MS fue pequeña, se decidió optimizar las condiciones de esta reacción. Para ello se evaluó la influencia del disolvente, la cantidad de catalizador, la temperatura y el tiempo, así como el uso de aditivos, con objeto de mejorar la conversión del producto lineal al cíclico (Tabla 2).

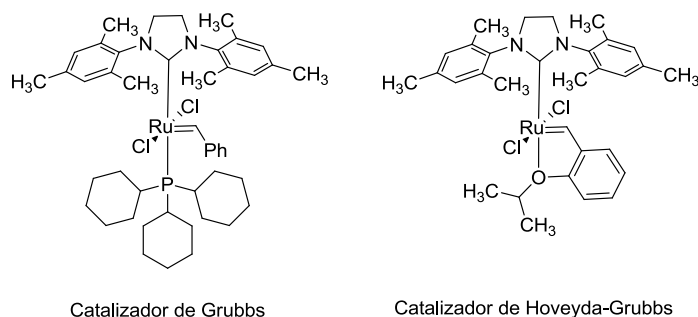
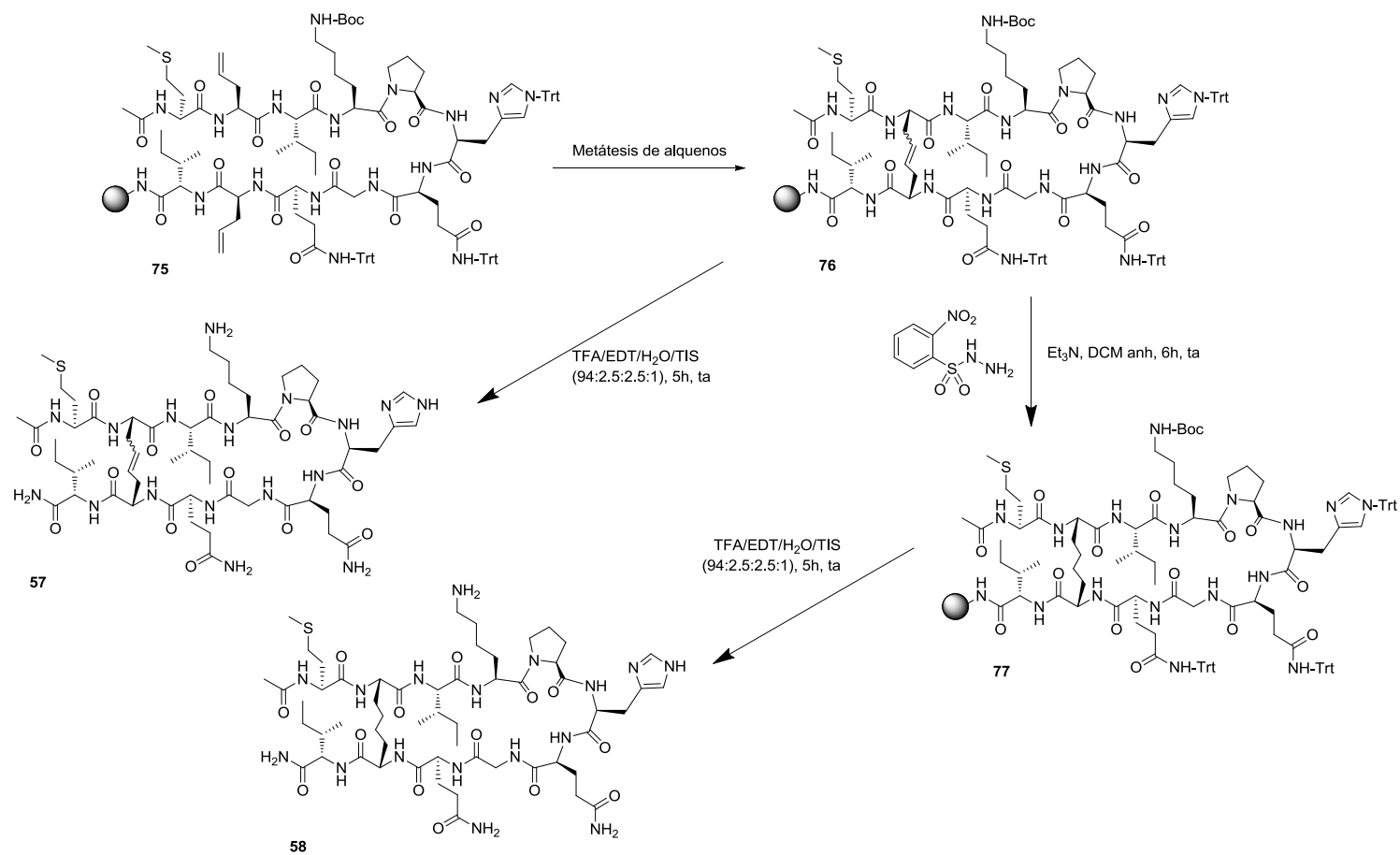


Figura 34. Estructura de los catalizadores de segunda generación utilizados en este trabajo.



Esquema 2. Síntesis de los péptidos cíclicos **57** y **58**.

Tabla 2. Optimización de la reacción de metátesis para la obtención del compuesto **57**.

Ensayo	Catalizador	Disolv.	T(°C)	t (h)	LiCl	DMSO	Cíclico ^a (57)		Lineal ^a (56)	
							M ^b	M(O) ^c	M ^b	M(O) ^c
1	15% G	DCM	40	48	-	-	18	-	70	8
2	15% HG	DCM	40	48	-	-	20	-	63	16
3	30% G	DCE	65	72	-	Si	8	16	12	61
4	30% HG	DCE	65	72	-	Si	28	28	10	31
5	30% HG	DCE	65	72	Si	Si	70	28	-	-
6	30% HG	DCE	65	48	Si	Si	70	14	14	-
7	30% HG	DCE	65	24	Si	Si	64	9	22	-

^a% Determinado por HPLC-MS; Columna: Waters X-Bridge; A=CH₃CN + 0.08 % Ácido Fórmico, B=H₂O + 1% Ácido Fórmico, Gradiente: de 5 a 80% de A en 15min. ^bCompuesto con el residuo de Met intacto. ^cCompuesto con la cadena lateral del residuo de Met en forma de sulfóxido.

En los ensayos 3 y 4 se aumentó la cantidad de catalizador, y se modificaron el disolvente, la temperatura y el tiempo de reacción²⁴⁹. Transcurrido el tiempo oportuno se realizó un lavado de la reacción y un posterior tratamiento con DMSO anhidro para eliminar los residuos generados por el catalizador²⁵⁰. De acuerdo con la mayoría de los casos descritos en la bibliografía, el porcentaje de producto cíclico observado mediante HPLC-MS fue mayor utilizando catalizador de Hoveyda-Grubbs²⁵¹, por lo que se decidió continuar con éste en la optimización del proceso.

En el ensayo 5 se utilizaron las mismas condiciones que en el ensayo 4 haciendo un tratamiento previo de la resina con LiCl 0.8M en DMF²⁵². Esta sal se utiliza como agente caotrópico, para evitar la agregación del producto y facilitar la accesibilidad de los reactivos²⁵³. En el seguimiento de la reacción por HPLC-MS, se observó la desaparición total del producto lineal por lo que se eligieron estas condiciones como las óptimas para realizar la reacción. Los intentos para reducir el tiempo de reacción fueron infructuosos (ensayos 6 y 7) ya que se observaron cantidades significativas de péptido lineal.

Después de estos ensayos, las condiciones de reacción del ensayo 5 se eligieron por ser las más ventajosas: 30% de catalizador de Hoveyda-Grubbs en DCE, 65°C de temperatura durante 24 h, tras las que se repite la adición de la misma cantidad de

catalizador 2 veces más. Además, se realizó un tratamiento previo con LiCl y un lavado posterior con DMSO anhidro.

Tras el desanclaje, y con el fin de facilitar la purificación por HPLC-semipreparativo, fue necesario un tratamiento previo del compuesto mediante extracción en fase sólida, utilizando un cartucho de fase reversa. En el cromatograma del crudo de reacción se observó la presencia de dos especies con el mismo peso molecular (HPLC-MS) en proporciones (7:3). Como era de esperar, se había obtenido, una mezcla de isómeros *Z/E*, que se consiguió separar mediante HPLC-semipreparativo, para dar lugar a los productos **57a** y **57b** (Fig. 35). Como se verá posteriormente en el análisis conformacional por RMN, estos compuestos no pudieron ser asignados como *Z* o *E* debido a la complejidad de los espectros y al solapamiento de la zona de cruce de los protones olefínicos con la señal del disolvente en el espectro NOESY. Ambos productos se obtuvieron con purezas muy elevadas.

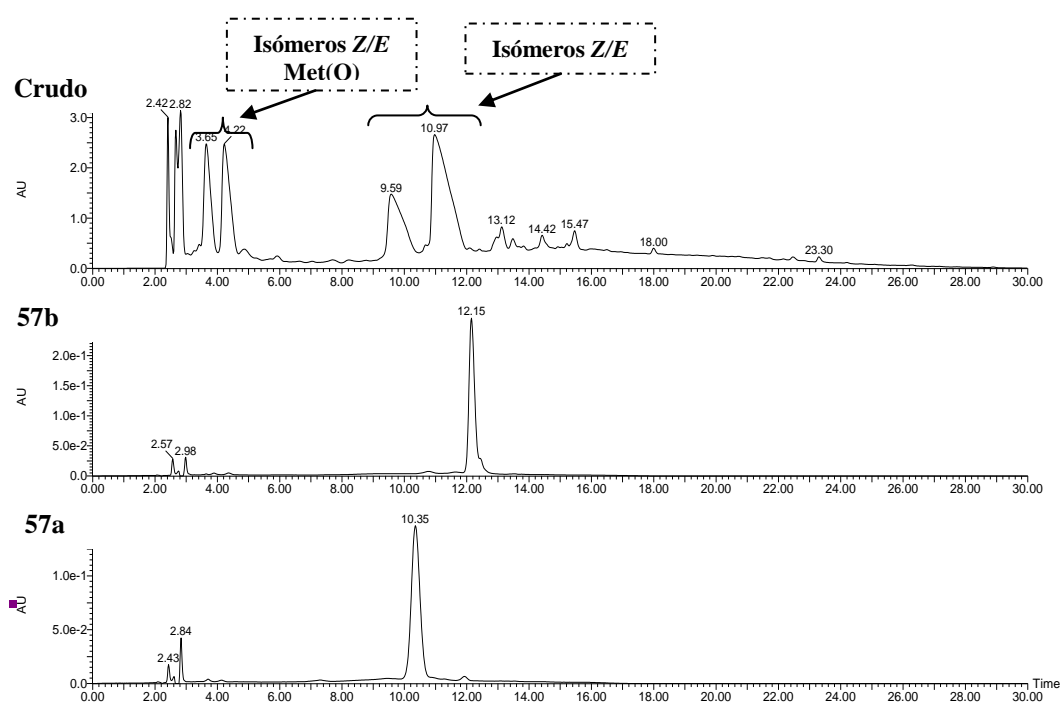


Figura 35. Ejemplo de purificación por HPLC-semipreparativo. El primer cromatograma corresponde al crudo de reacción de **57** y los dos inferiores a cada uno de los isómeros componentes de la mezcla, una vez aislados.

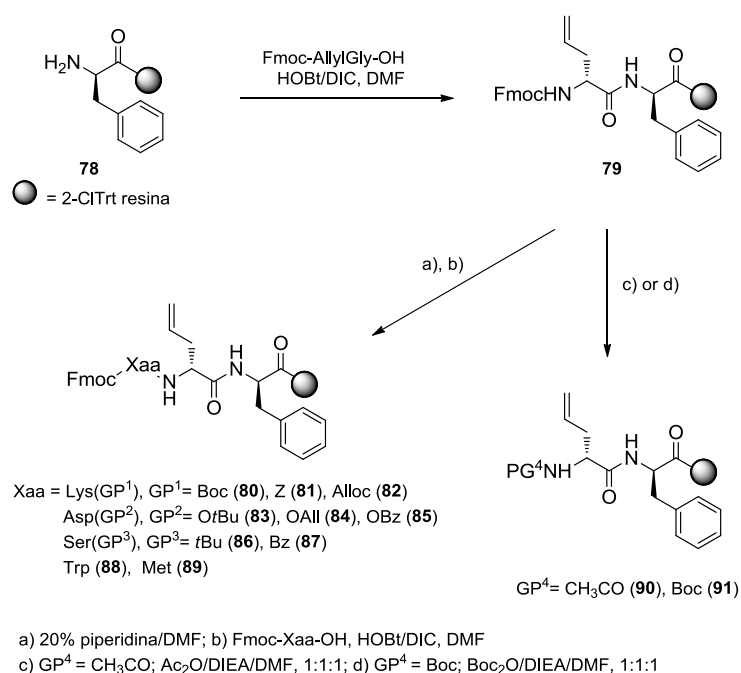
Para la obtención de los análogos con puente hidrocarbonado saturado existen dos posibilidades: llevar a cabo la reducción del doble enlace en fase sólida y después desanclar el producto de la resina o bien reducir el doble enlace en disolución, tras haber realizado el desanclaje. Se decidió intentar en primer lugar la reducción en fase sólida por las ventajas que supone en cuanto a la purificación y el aislamiento de los productos finales.

Los métodos generales de hidrogenación de dobles enlaces en disolución llevan consigo la mayoría de las veces la utilización de catalizadores metálicos de Pd, Pt o Rh, que, en el caso de la síntesis en fase sólida, no pueden utilizarse debido a la imposibilidad para llevar a cabo procesos heterogéneos en este tipo de metodología. Hoy por hoy existen muy pocos métodos descritos en la bibliografía para la hidrogenación de dobles enlaces en fase sólida. Uno de ellos implica el uso del catalizador de Wilkinson, aunque no siempre resulta efectivo^{254, 255}. Otro ejemplo, que conlleva el uso de resinas solubles, ha permitido realizar la hidrogenación parcial de acetileno utilizando 5% Pd/BaSO₄²⁵⁶. Sin embargo, el método que mejores resultados ha dado es la generación de diimina *in situ*, a partir de sulfonilhidrazidas, que actúan como agentes dadores de hidrógeno. Los primeros intentos de hidrogenación en fase sólida con este tipo de reactivo fueron desarrollados por Lacombe *et al.* en 1998, utilizando bencenosulfonilhidrazina²⁵⁷. Este método ha sido mejorado más recientemente por Brown y colaboradores que describieron la utilización de 2-nitrobenzenosulfonilhidrazina (NBSH)²⁵⁸ en fase sólida para la hidrogenación de moléculas sencillas no peptídicas. El método es selectivo de dobles y triples enlaces respetando funcionalidades como grupos carbonilo, hidroxilo, éteres, etc.

Para comprobar si este método era extensible a la síntesis de péptidos en fase sólida, y compatible con los grupos protectores habituales, se decidió realizar un estudio previo utilizando péptidos modelo. Se pretendía evaluar la compatibilidad del método con la presencia de los diferentes tipos de aminoácidos en la molécula, con los distintos grupos funcionales y sus respectivos grupos protectores, así como con las resinas utilizadas más comúnmente en este tipo de metodologías.

Así, a partir de la resina **79** (Esquema 3), que contiene un residuo de alilGly, se sintetizaron los tripéptidos **80-89** que presentan en la secuencia los aminoácidos Lys(GP¹) [GP¹ = Boc (**80**), Z (**81**), y Alloc (**82**)], Asp(GP²) [GP² = OtBu (**83**), OAll (**84**), y OBz

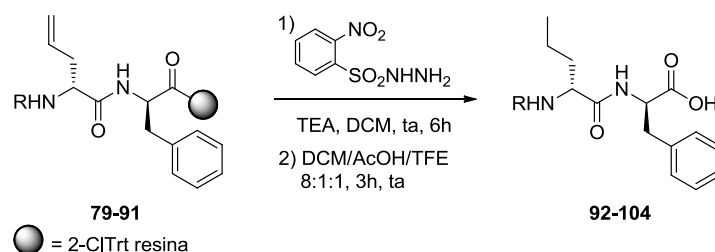
(85)], Ser(GP³) [GP³ = *t*Bu (86) y Bz (87)], Trp (88) y Met (89). Del mismo modo, para explorar la compatibilidad del método de reducción con los diferentes grupos protectores del extremo N-terminal, el grupo Fmoc de la resina **79** se sustituyó por los grupos Ac y Boc obteniéndose los derivados **90** y **91**. Como soporte sólido inicial se eligió una 2-clorotritilresina, ya que las condiciones necesarias para desanclar los productos permiten mantener los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos de la secuencia inalterados. De este modo se pudo comprobar la estabilidad de todos ellos en las condiciones de reducción.



Esquema 3. Síntesis de los péptidos modelo **79-91**.

El tratamiento de **79-91** con la diimina generada a partir de NBSH, bajo las condiciones de Buszek y Brown durante 6 h, condujo a la conversión total del residuo de alilGly en Norvalina (Nva) (Esquema 4). Aunque se realizaron algunos ensayos con el fin de intentar reducir el tiempo de reacción, éstos no dieron buenos resultados. Tras el desanclaje y la purificación, se obtuvieron los productos de reducción **92-104** con buenos rendimientos (Tabla 3). Como era de esperar, los grupos protectores de cadenas laterales

Alloc y OAll presentes en los productos **82** y **84** también se redujeron, obteniéndose los productos **95** y **97**. Sin embargo, el resto de grupos protectores permanecieron sin alterar.



Esquema 4. Síntesis de los productos **92-104**.

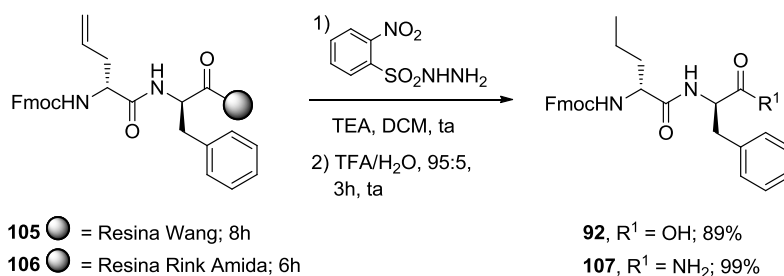
Tabla 3. Rendimientos obtenidos en la síntesis de los derivados **92-104**.

Producto	R	Rendimiento global (%)
92	Fmoc-	86
93	Fmoc-Lys(Boc)-	98
94	Fmoc-Lys(Z)-	83
95	Fmoc-Lys(COOPr)-	95
96	Fmoc-Asp(O ^t Bu)-	91
97	Fmoc-Asp(OPr)-	90
98	Fmoc-Asp(OBz)-	77
99	Fmoc-Ser(^t Bu)-	78
100	Fmoc-Ser(Bz)-	87
101	Fmoc-Trp-	60
102	Fmoc-Met-	75
103	Ac-	98
104	Boc-	97

Debido a que la estrategia Fmoc/tBu es una de las más usadas en la síntesis en fase sólida, se mostró especial atención a la estabilidad del grupo Fmoc en las condiciones de reducción. Afortunadamente, excepto en el caso del derivado de Trp **88**, en el que se formó un 25% del análogo Fmoc-desprotegido de **101**, en el resto de los casos la desprotección del grupo Fmoc no fue superior al 15% e incluso en la reducción del derivado **80** no llegó a detectarse (HPLC-MS). Por otro lado, al no observarse desanclaje de producto durante la reacción de reducción, se puede asumir también la

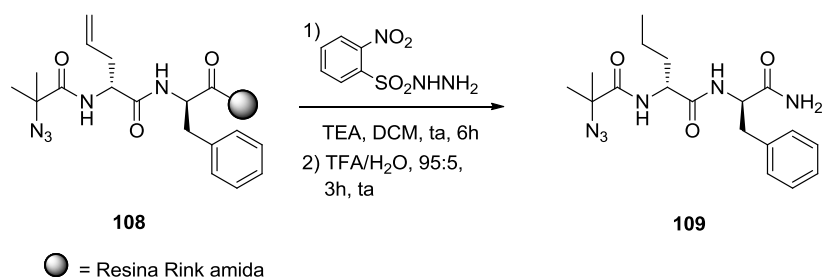
estabilidad del grupo Trt como protector de cadenas laterales en estas condiciones de reducción.

Por otra parte, se llevó a cabo la reacción de reducción sobre el dipéptido Fmoc-alilGly-Phe anclado a diferentes resinas: Wang (**105**) y Rink amida (**106**), del mismo modo que en los ensayos anteriores (Esquema 5). En el caso de la resina Rink amida, las condiciones de reducción resultaron ser las mismas que cuando se utilizó la 2-clorotritil resina. Sin embargo, en el caso de la resina Wang se necesitó prolongar la reacción durante 8 h para conseguir la reducción total del producto.



Esquema 5. Síntesis de los productos **92** y **107** utilizando las resinas Wang y Rink amida.

Teniendo en cuenta el interés de preparar derivados peptídicos modificados a través de la introducción de puntos de ciclación mediante la llamada “química click”, se pensó en evaluar la estabilidad de un triple enlace C≡C y un grupo azida. Así, el dipéptido Fmoc-propargilGly-Phe anclado a la 2-clorotritilresina se trató en las condiciones estándar de reducción, obteniéndose el producto inalterado con un 70% de rendimiento. Tras un segundo tratamiento con NSBH el producto de reducción completa del triple enlace, **92**, se obtuvo en un 50% (HPLC-MS), a pesar de que Buszek y Brown describieron una reducción total de triples enlaces en sustratos no peptídicos. Por otra parte, a partir de la resina **106** por desprotección del grupo Fmoc y posterior acoplamiento con el ácido α-azidoisobutírico (N₃-Aib) se obtuvo **108** (Esquema 6). La reducción posterior condujo al derivado de Nva **109** con un 80% de conversión. La estabilidad de los grupos alquino y azida frente a la reacción de reducción permite la posibilidad de usar química click con posterioridad a la hidrogenación del doble enlace.



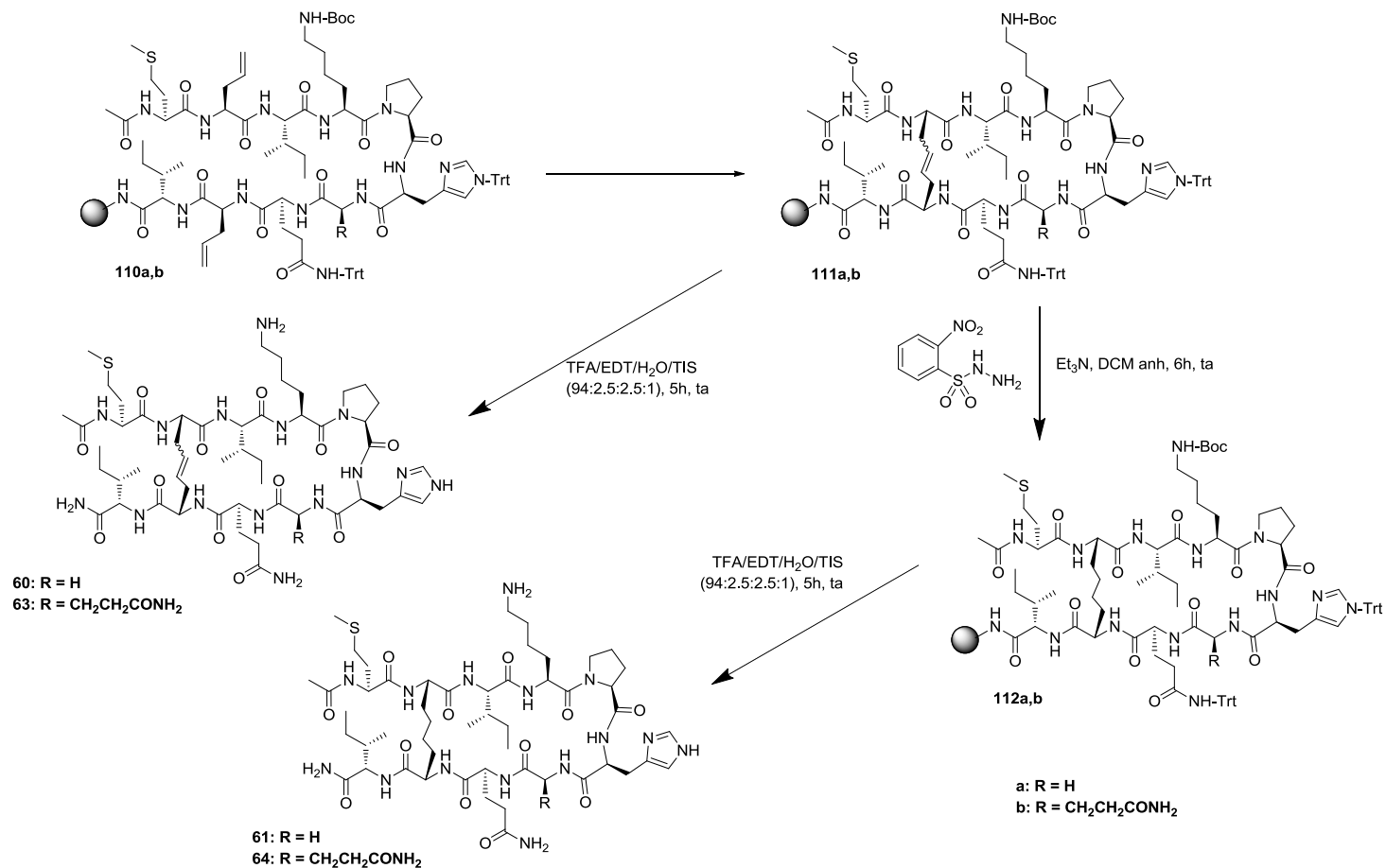
Esquema 6. Síntesis del producto **109**.

Los resultados de este estudio mostraron la aplicabilidad del método propuesto usando las estrategias habituales de síntesis de péptidos en fase sólida (Boc/Bz y Fmoc/tBu)²⁵⁹.

Una vez validado el método de reducción para la síntesis de péptidos en fase sólida, éste se aplicó en la obtención del compuesto **58** partiendo del correspondiente péptido cíclico anclado a la resina, **76** (Esquema 2). Una vez transcurrido el tiempo de reacción se procedió a la escisión del producto de la resina por el método habitual, que tras extracción en fase sólida y posterior purificación por HPLC-semipreparativo dio lugar al producto deseado **58** con un rendimiento global del 12% y una pureza superior al 98%.

3.2.1.3. Péptidos cíclicos de las Series 2 y 3

Una vez optimizadas las condiciones de reacción para los derivados de la serie 1, se decidió aplicar la misma metodología a los derivados de las series 2 y 3. Así, las condiciones del ensayo 5 (Tabla 2) fueron utilizadas para la síntesis de los cicloalquenos **60** y **63** (Esquema 7), aunque en el caso de **60** hubo que aumentar la temperatura de reacción a 85°C y utilizar DMF anhidra como disolvente para que la ciclación se completara con éxito.



Esquema 7. Síntesis de los péptidos cíclicos **60**, **61**, **63** y **64**.

Tras el desanclaje y purificación mediante cartucho de fase reversa, ambos derivados fueron purificados mediante HPLC-semipreparativo, observándose que el derivado **60** era, aparentemente, una mezcla de isómeros *Z/E* en proporciones (6.5:3.5), según los datos de HPLC-MS, mientras que el compuesto **63** parecía ser un único producto. Al igual que ocurrió con **57**, en el caso de **60** se consiguieron separar los isómeros pero de nuevo no fue posible realizar una asignación inequívoca de la estereoquímica en cada uno de ellos. En el caso de **63** se pudo comprobar por RMN que este derivado también se había obtenido como una mezcla de isómeros *Z/E* en proporciones (6.5:3.5), identificando las señales correspondientes a cada uno de ellos, a pesar de la complejidad de los espectros bidimensionales (Fig. 36).

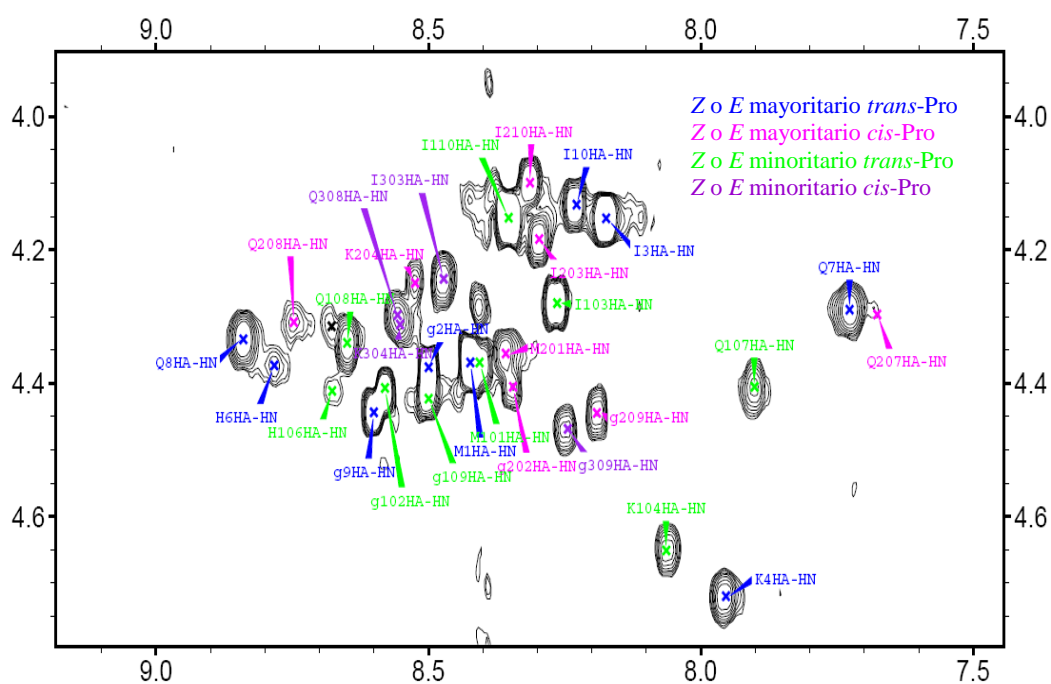


Figura 36. Detalle del espectro TOCSY a 5°C del compuesto **63** donde se pueden observar bien diferenciadas las señales para cada uno de los isómeros *Z/E* junto con sus respectivos rotámeros alrededor del enlace Lys-Pro.

Una vez sintetizados los productos comentados anteriormente se pudo tener acceso a la tecnología de microondas por lo que se decidió hacer un estudio de optimización de la reacción usando esta técnica, ya que podría suponer una mejora en los

tiempos de reacción y en la cantidad de catalizador utilizada. En este caso las pruebas se realizaron con la resina **110b**, precursora del compuesto **63** (Esquema 7). Los ensayos llevados a cabo se resumen en la Tabla 4. En todos los casos, excepto en 10 y 12, se utilizó DCE como disolvente y se realizó el tratamiento posterior con DMSO para eliminar los restos de catalizador. En los 6 primeros ensayos se evaluó tanto el tipo de catalizador, como el porcentaje a usar. Se puede observar que en todos los casos el catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2^a generación condujo a los mejores resultados, como había ocurrido en la síntesis convencional. En cuanto a la cantidad de catalizador a utilizar, el uso de un 20% proporcionó los resultados más satisfactorios (ensayo 4). En paralelo se evaluó la influencia del tiempo y del uso de LiCl como agente caotrópico, comprobando que el aumento de tiempo no mejoraba los rendimientos obtenidos, como tampoco lo hacía el uso de la sal de litio. La propia radiación microondas ejerce un efecto similar a los agentes caotrópicos, al disponer todas las moléculas presentes en la resina con sus momentos dipolares en la misma dirección, evitando que éstas agreguen o se estructuren. El aumento de la temperatura en los ensayos 10 y 12, usando como disolvente 1,2-diclorobenceno (DCB), mejoró los resultados de conversión, pero probablemente debido a la temperatura tan elevada se obtuvieron crudos muy sucios y rendimientos muy bajos. Por último, se evaluó la influencia del número de adiciones de catalizador, llegando así a las condiciones óptimas en el ensayo 16.

El resultado de este proceso de optimización permitió una considerable reducción en el tiempo de reacción, que pasó de 3 días a 60 min, y en la cantidad de catalizador que se consiguió reducir a un 60% en total entre las 3 adiciones, frente al 90% del proceso convencional. En el aislamiento del producto final también se consiguió una mejora considerable, pasando de obtener un 5% de rendimiento global a un 12%, quizá también debido a la disminución del subproducto generado por la oxidación de la Metionina. Esta nueva metodología se aplicó en la obtención de los otros dos péptidos cíclicos, **57** y **60**, que habíamos obtenido por síntesis convencional. Aunque en el caso de **60** hubo que utilizar DCB para poder realizar la reacción a una temperatura más alta, en ambos casos se obtuvieron los productos finales buscados. El péptido cíclico **57** se obtuvo con una conversión del 85%, consiguiendo una disminución en la formación del subproducto con

Met(O) (15% frente al 28% sin microondas). El compuesto **60** se obtuvo con una conversión del 75%, quedando un 25% de producto lineal sin reaccionar.

La síntesis de los cicloalcanos **61** y **64** se llevó a cabo en las mismas condiciones que para la preparación de **58**, a partir de las resinas **111a** y **111b** (Esquema 7). Tras la reducción en fase sólida, se aplicó el cóctel de desanclaje sobre las resinas **112a** y **112b**. La purificación posterior permitió obtener los productos deseados con rendimientos del 8 y del 7%, respectivamente, y purezas superiores al 98%.

Tabla 4. Optimización de la reacción de metátesis en microondas para la obtención de **63**.

Ensayo	Catalizador	%	Nº de adiciones	t (min)	T (°C)	LiCl	%Lineal	%Ciclado	Lin:Cicl
1	G	10	1	20	120	-	61	3	20:1
2	HG	10	1	20	120	-	52	40	4:3
3	G	20	1	20	120	-	81	10	8:1
4	HG	20	1	20	120	-	40	52	3:4
5	G	30	1	20	120	-	88	5	17:1
6	HG	30	1	20	120	-	50	50	1:1
7	HG	10	1	40	120	-	65	28	7:3
8	HG	10	1	60	120	-	61	27	2:1
9	HG	10	1	40	120	Si	81	11	8:1
10	HG	10	1	40	200	Si	46	4	10:1
11	HG	20	1	40	120	Si	83	7	12:1
13	HG	20	2	20	120	-	63	26	5:2
14	HG	20	2	20	120	-	59	38	3:2
15	HG	20	2	20	120	Si	52	36	3:2
16	HG	20	3	20	120	-	0	100	0:1
17	HG	10	4	20	120	-	74	11	7:1

^a% Determinado por HPLC-MS; Columna: Waters X-Bridge; A = CH₃CN + 0.08 % Ácido Fórmico, B = H₂O + 1% Ácido Fórmico, Gradiente: de 5 a 80% de A en 15min.

3.2.1.4. Péptidos cíclicos de las Series 4 y 5

Como se ha visto hasta ahora, debido a la complejidad que entraña la mezcla de isómeros *Z/E*, tanto en cuanto a su separación como a la asignación de los espectros de RMN, en el caso de estas dos últimas series se decidió aislar únicamente los correspondientes cicloalcanos. No obstante, aunque los derivados con doble enlace en el ciclo no fueron aislados, fue necesaria también la optimización de la reacción de metátesis.

En un principio se decidió utilizar las condiciones obtenidas en la optimización con microondas, es decir, adicionando un total de 60% de catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2^a generación en tres adiciones consecutivas. Tras la primera adición se calentó la muestra a 120°C en microondas durante 20 min, transcurridos los cuales el proceso de adición y calentamiento se repitió dos veces más. En ambos casos se consiguió observar por HPLC-MS al menos el 50% de producto lineal sin reaccionar, por lo que se decidió añadir la misma cantidad de catalizador total, pero adicionándolo en 6 veces en lugar de en 3. De esta manera, a partir del derivado **113**, que presenta los grupos reactivos en las posiciones 1 y 11, (Esquema 8) se consiguió disminuir la presencia del péptido lineal hasta el 13%. Sin embargo, en el caso de la resina **116**, que tiene los grupos alilo en las posiciones 3 y 9, (Esquema 9) se seguía observando un 40% de producto sin reaccionar. Además, en este último caso, se obtenía el ciclo con la Met en forma de sulfóxido en mayor proporción que el ciclo con la cadena lateral sin oxidar. Se decidió, por tanto, aumentar la cantidad de catalizador. Tras varios intentos, las mejores condiciones obtenidas se corresponden con la adición de 1 equivalente de catalizador en 10 adiciones consecutivas, aunque seguía quedando un 25% de producto lineal sin reaccionar. Las condiciones elegidas finalmente para cada producto se muestran en la Tabla 5.

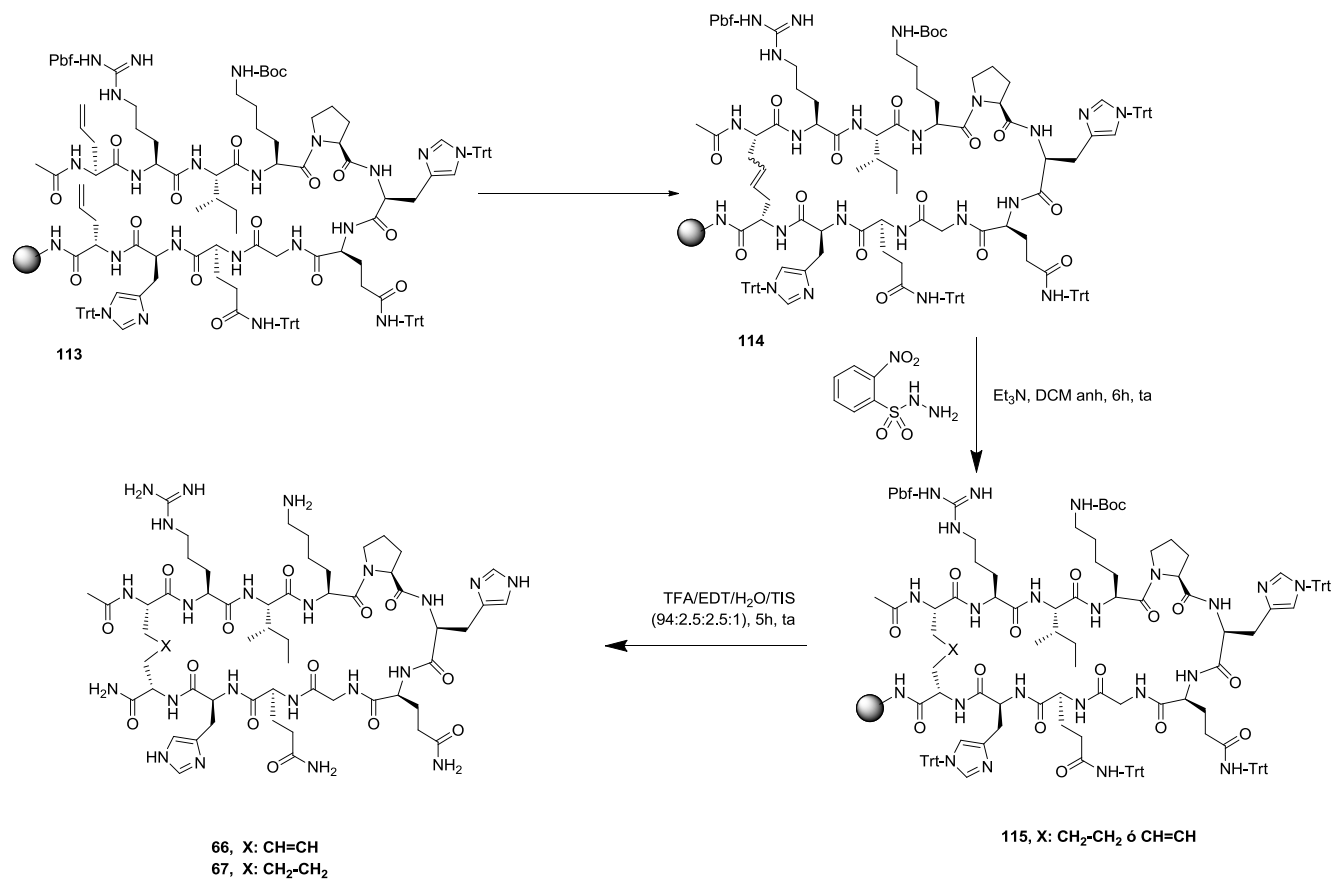
Tabla 5. Optimización de la reacción de metátesis para la obtención de los derivados **66** y **69**.

Compuesto	Catalizador	%	Nº de adiciones	t (min)	T (°C)	%Lineal	%Ciclado	%Ciclado (Met(O))
66	HG	10	6	20	120	13	77	10
69	HG	10	10	20	120	25	30	13

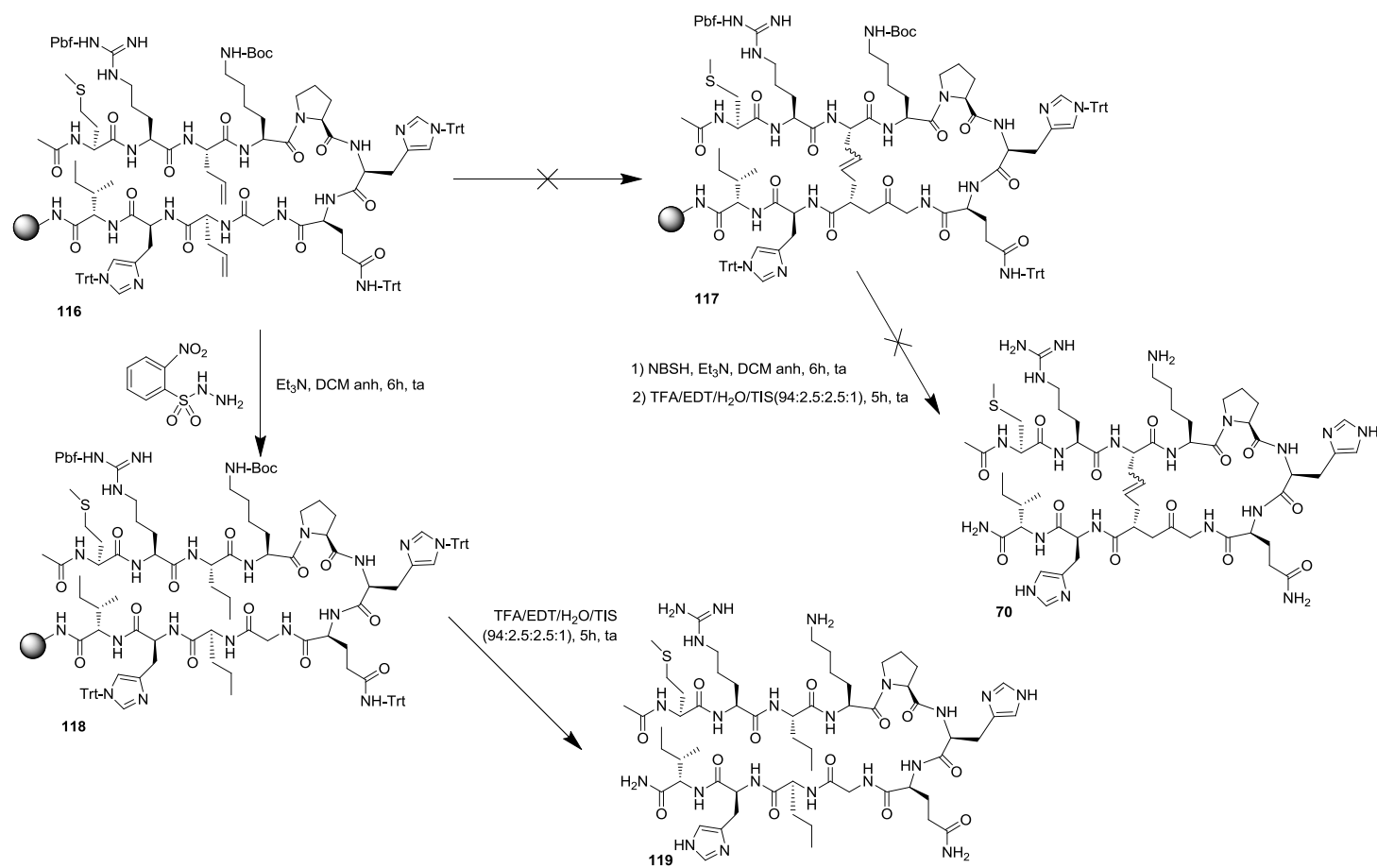
Como se puede comprobar, las condiciones de ciclación en estos dos casos son más drásticas que en el caso de los ciclos en la posición (2,10). En el caso del derivado con el puente en la posición (1,11) la ciclación puede estar impedida por una menor proximidad en la secuencia de los aminoácidos implicados y a que la obtención de ciclos de gran tamaño está energéticamente más impedida. En el caso del derivado con el puente en (3,9) a pesar de que, a priori, debería ser más fácil por ser un ciclo de menor tamaño, el péptido cíclico se detectó en menor porcentaje.

Una vez obtenidos los derivados **114** y **117** se llevó a cabo la reducción del doble enlace aplicando el mismo método que había dado buenos resultados en el caso de las series 1-3. Sin embargo, en estos dos últimos casos los resultados no fueron los esperados. En el caso de **67** (Esquema 8) no se consiguió la reducción completa de todo el producto, obteniéndose tras el desanclaje una mezcla de compuesto reducido (**67**)/no reducido (**66**) (7:3). El compuesto deseado, **67**, se aisló de la mezcla por HPLC-semipreparativo. Estos resultados hacen pensar que la disposición espacial que adquiere el ciclo con el puente en esta posición es diferente a la de las otras series descritas, siendo más dificultoso el acceso de los reactivos al doble enlace para su reducción.

En el caso de los intentos de obtención de **70** (Esquema 9), después de escalar la reacción de metátesis sobre la resina **116**, utilizando las condiciones descritas en la Tabla 5, se llevó a cabo la reducción en fase sólida por el método habitual. Tras el desanclaje y purificación por HPLC-semipreparativo se obtuvo únicamente el derivado lineal **119**, con las cadenas laterales de la alilGly reducidas, no detectándose la formación de producto de ciclación por HPLC-MS, debido a que el escalado de la reacción no fue del todo satisfactorio.



Esquema 8. Síntesis de los péptidos cíclicos **66** y **67**.



Esquema 9. Síntesis del péptido **119**.

3.2.2. Péptidos cíclicos con puente disulfuro

Como se ha comentado al principio del capítulo, con el fin de comparar la influencia del tipo de puente, tanto en la conformación tridimensional como en la actividad biológica de estos derivados, se decidió llevar a cabo la síntesis de un péptido cíclico con puente disulfuro. Para ello, se introdujeron residuos de Cys en las posiciones 2 y 10, cuyas cadenas laterales son susceptibles de oxidación formándose un enlace disulfuro. (Fig. 37).

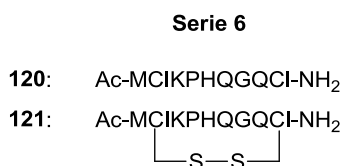
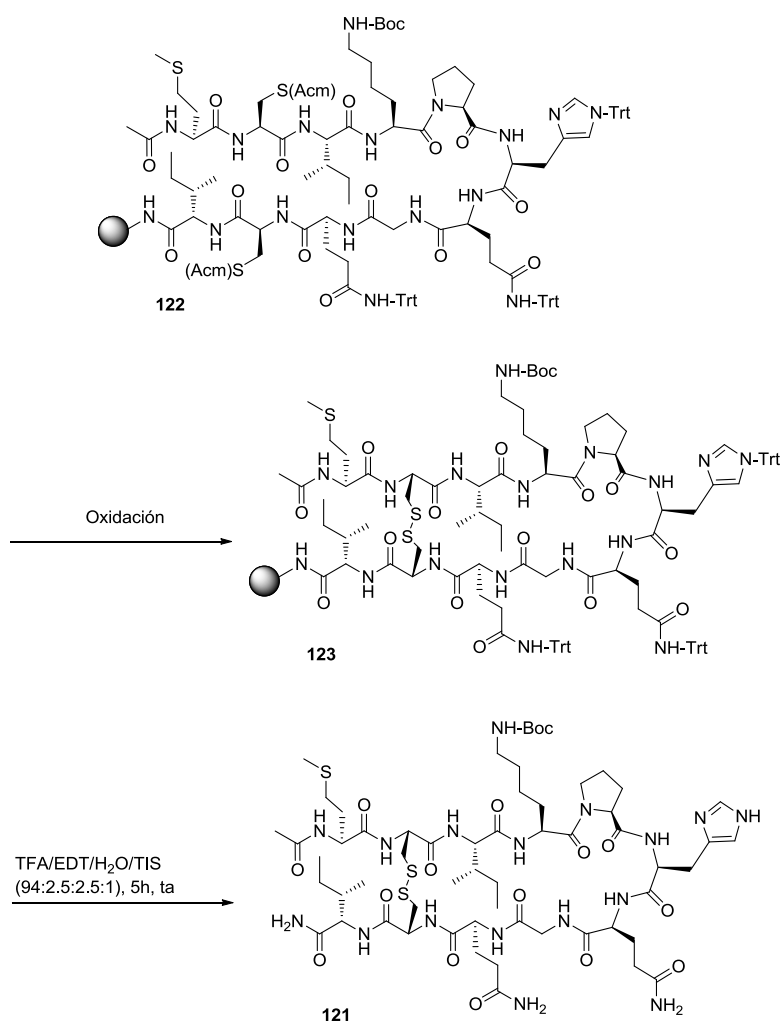


Figura 37. Péptido diseñado con puente disulfuro.

La síntesis del derivado lineal anclado a la resina se llevó a cabo siguiendo una estrategia similar a la utilizada en el apartado 3.2.1.1 para la síntesis de los derivados lineales con alilGly. Los grupos protectores de cadenas laterales fueron los mismos anteriormente señalados, y en el caso de la Cys se utilizó el grupo acetamidometilo (Acm). Este grupo protector se caracteriza por ser estable en condiciones ácidas y básicas suaves²⁶⁰ y por ser atacado por determinados agentes electrófilos, lo que permitiría la desprotección selectiva frente a los demás grupos protectores del péptido. La mayoría de los reactivos utilizados para la desprotección del grupo Acm, como sales de Hg, haluros de sulfenilo, I₂, sales de Tl, etc²⁶¹⁻²⁶³, permiten la ciclación S-S de forma instantánea. Una vez terminada la elongación del péptido se llevó a cabo la acetilación del extremo N-terminal para posteriormente realizar la ciclación (Esquema 10).



Esquema 10. Síntesis del disulfuro cíclico **121**.

A priori, según reflejan los datos descritos en la bibliografía, en condiciones oxidantes adecuadas este tipo de ciclo debería ser fácil de obtener. Sin embargo, fue necesario llevar a cabo varios intentos de oxidación hasta llegar a obtener el producto deseado (Tabla 6). En principio se comenzó utilizando I_2 como agente oxidante, que desprotegería la cadena lateral de la Cys y llevaría, en un solo paso, a la formación del enlace disulfuro. Tras varios intentos modificando la cantidad de I_2 utilizada y el tiempo de reacción, sólo se obtuvo producto lineal con las cadenas laterales de Cys desprotegidas (Tabla 5, entradas 1-4). Teniendo en cuenta la posibilidad de que el EDT utilizado en el

cóctel de desanclaje estuviera atacando al puente disulfuro formado y fuera el causante de la obtención del ditiol lineal **120**²⁶⁴, se decidió entonces hacer pruebas utilizando un cóctel sin EDT. Sin embargo, el resultado fue el mismo, obteniéndose de nuevo el derivado lineal **120**, con los grupos SH libres (entradas 5-6).

Otra posibilidad recogida en la bibliografía para la formación de enlaces S-S es la utilización de cócteles de desanclaje capaces de desproteger las cadenas laterales de Cys, de producir la oxidación y la ciclación, y por último de desanclar el producto, todo en un solo paso²⁶⁴. Utilizando un coctel de este tipo, que incluye NH₄I (entrada 7, Tabla 6) se obtuvo un crudo de reacción muy sucio en el que mayoritariamente se encontraba el derivado en forma de ditiol **120** y sólo en muy baja proporción el derivado con el puente disulfuro **121** (HPLC-MS). Por tanto, a pesar de que por primera vez se conseguía observar la formación del derivado cíclico buscado, se desistió en el intento de usar este método debido a la cantidad de impurezas generadas y al bajo porcentaje de producto final.

Como última opción se decidió utilizar Tl(tfa)₃ como agente oxidante^{265, 266}. Tras varios ensayos se consiguió la formación del disulfuro cíclico deseado. Las mejores condiciones fueron las obtenidas utilizando 1.2 equivalentes de Tl(tfa)₃ en DMF durante 90 min (entrada 10), en las que se obtuvo el mejor porcentaje de conversión a producto final.

Una vez obtenido el disulfuro cíclico, se desancló de la resina. Las sales de Tl formadas en el transcurso de la reacción, solubles en éter, fueron eliminadas en los lavados²⁶². Tras purificación mediante HPLC-semipreparativo se obtuvo el compuesto deseado, **121**, con buen rendimiento global (6%) y una pureza superior al 98%.

Tabla 6. Optimización de la reacción de formación del disulfuro cíclico **121**.

Ensayo	Condiciones	Cóctel de desanclaje	%Lineal*	%120	%121	%Otros
1	5 eq. I ₂ /DMF, 10 min	TFA:EDT:H ₂ O:TIPS 94:2.5:2.5:1	-	98	-	2
2	2 x (10 eq. I ₂ /DMF, 10 min)	TFA:EDT:H ₂ O:TIPS 94:2.5:2.5:1	-	50	-	50
3	10 eq. I ₂ /DMF, 4h	TFA:EDT:H ₂ O:TIPS 94:2.5:2.5:1	-	70	-	30
4	10 eq. I ₂ /DMF, 4h + 1día	TFA:EDT:H ₂ O:TIPS 94:2.5:2.5:1	-	80	-	20
5	10 eq. I ₂ /DMF, 4h	TFA:H ₂ O:TIPS 80:10:10	-	89	-	-
6	2 x (10 eq. I ₂ /DMF, 10 min)	TFA: H ₂ O:TIPS 80:10:10	-	96	-	-
7		TFA/PhOH/TA/EDT/H ₂ O/DMSO/NH ₄ I (81:5:5:2.5:3:2:1.5)	-	-	-	65
8	1.2 eq Tl(tfa) ₃ /DMF, 30 min	TFA:EDT:H ₂ O:TIPS 94:2.5:2.5:1	38	-	43	19
9	1.2 eq Tl(tfa) ₃ /DMF, 1 h	TFA:EDT:H ₂ O:TIPS 94:2.5:2.5:1	27	-	48	25
10	1.2 eq Tl(tfa) ₃ /DMF, 90 min	TFA:EDT:H ₂ O:TIPS 94:2.5:2.5:1	-	-	67	33

* %Lineal: indica el péptido lineal con las Cys protegidas en forma de Acm.

3.2.3. Péptidos cíclicos con puentes amida y sus análogos lineales

3.2.3.1. Derivados de Pro

Una tercera posibilidad para restringir la conformación de horquilla β es la formación de un enlace amida entre las cadenas laterales de dos residuos, en este caso Asp y Dap (ácido α,β -diaminopropiónico). Dependiendo de la posición en que se coloquen estos aminoácidos se puede formar un enlace CO-NH o NH-CO. Debido a que, en este caso, los grupos NH y carbonilo del puente pueden intervenir en la formación de

enlaces de hidrógeno que, de alguna manera, modifiquen la estructura tridimensional, la dirección de éste puede modificar los resultados finales. Por lo tanto, se decidió sintetizar los derivados con los dos tipos de puente, introduciendo los aminoácidos adecuados para la ciclación en las posiciones 2 y 10 (Fig. 38).

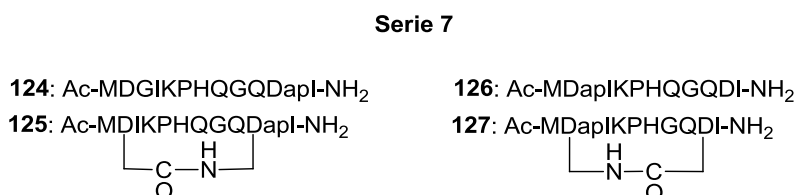


Figura 38. Péptidos con puentes amida diseñados.

Dada la mayor dificultad de formar de enlaces amida a través de las cadenas laterales de aminoácidos en la obtención de péptidos cíclicos, es necesario el uso de agentes de acoplamiento más efectivos como es el caso de las sales de “onio” (uronio o fosfonio)^{246, 267}. Así, se decidió hacer pruebas con los dos tipos de agentes de acoplamiento para comprobar cuál de los dos era más efectivo en este caso particular, ya que no existen datos en la literatura que permitan discernir entre uno u otro.

La síntesis de los derivados lineales anclados a la resina se llevó a cabo siguiendo una estrategia similar a la utilizada en el apartado 3.2.1.1 para la síntesis de los derivados lineales con alilGly. En este caso, fue necesario realizar un paso previo de desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos implicados en la ciclación. Para ello, se siguió una estrategia de protección ortogonal de las cadenas laterales del ácido aspártico y el diaminopropiónico, que permitiera llevar a cabo la desprotección de éstas antes de desanclar el péptido, manteniendo protegidas el resto de cadenas laterales de la secuencia, de modo que la ciclación pudiera llevarse a cabo en fase sólida. Se eligieron los grupos protectores alilo para la cadena lateral del Asp y aliloxycarbonilo para la cadena lateral del Dap. La desprotección de ambas se llevó a cabo utilizando PhSiH₃ como fuente dadora de hidrógeno en presencia de Pd(PPh₃)₄ como catalizador. Tras la desprotección de las resinas **128a** y **128b** para dar lugar a **129a** y **129b** se procedió a aislar los derivados lineales **124** y **126**, que se obtuvieron tras el desanclaje y purificación de los respectivos crudos de reacción por HPLC semipreparativo (Esquema 11).

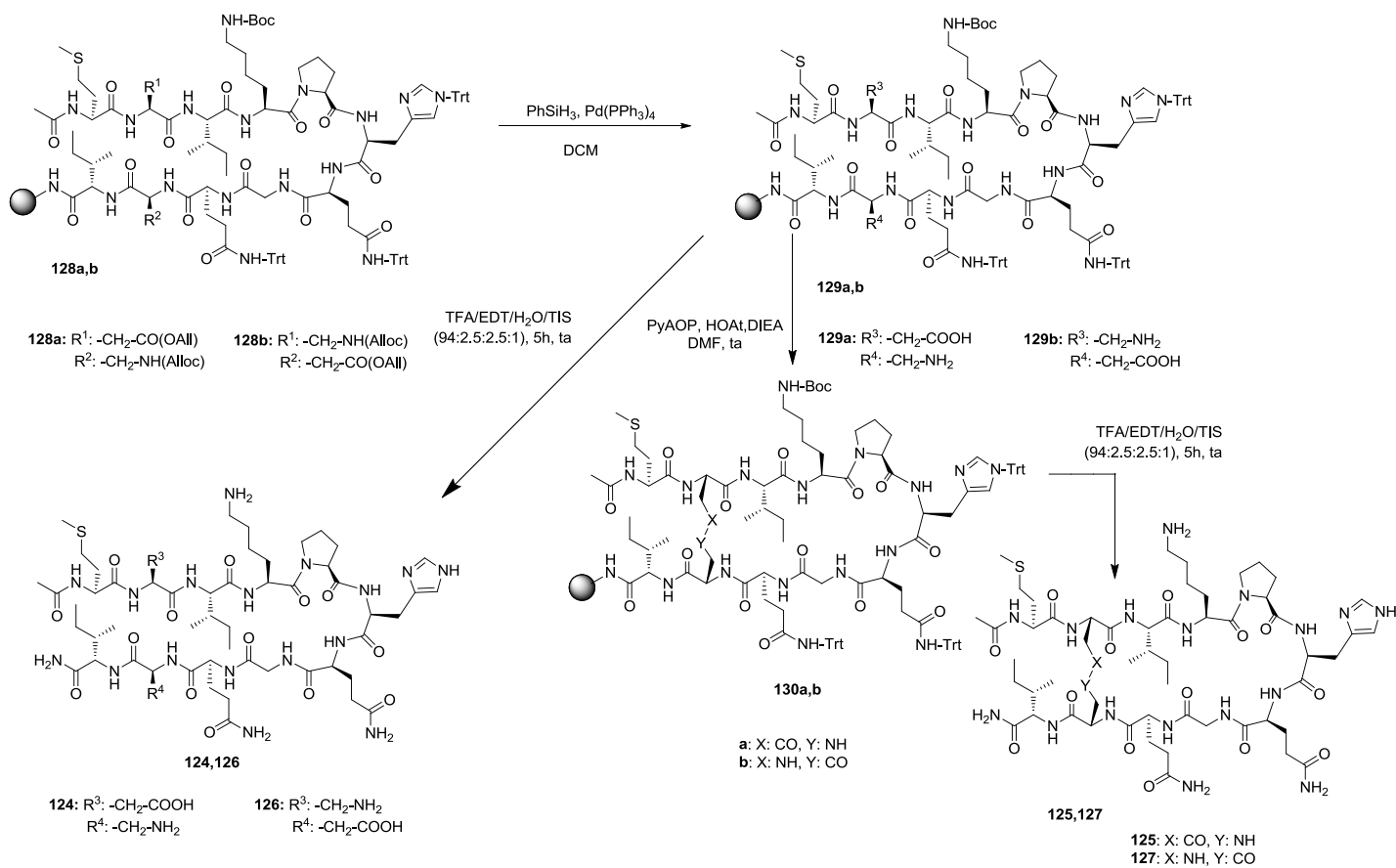
A continuación se estudió la lactamización de **128a** para la obtención del péptido cíclico con el puente CONH, **125**. Como ya se ha mencionado anteriormente, se utilizaron una sal de fosfonio (PyAOP) y una sal de uronio (HATU) a efectos comparativos. Las condiciones utilizadas y los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 7. El curso de la reacción se siguió mediante el test de Kaiser para detección de aminas primarias. En ambos casos el test resultó negativo tras 12 h de reacción. Además del producto deseado, se formó también el correspondiente péptido cíclico con la cadena lateral del residuo de Met en forma de sulfóxido. Según los datos de HPLC-MS, con el uso de la sal de fosfonio se obtuvo un 8% de Met(O) y con la sal de uronio un 14%. Finalmente, debido a la diferencia en efectividad de estos agentes de acoplamiento en el caso que nos ocupa, se decidió utilizar PyAOP para la ciclación (Esquema 11).

Tabla 7. Optimización de la reacción de lactamización a partir de **129a**.

Ensayo	Agente acoplante		Aditivo		DIEA	t (h)	T	% 125	% 125 (Met(O))
	PyAOP	HATU	HOAt	HOBt					
1	10 equiv	-	10 equiv	-	20 equiv	12	rt	92	8
2	-	10 equiv	-	10 equiv	20 equiv	12	rt	76	14

Esta misma metodología fue aplicada para la síntesis del péptido **127**, a partir del derivado lineal anclado a la resina **129b**. En este caso, la reacción se completó tras 2 horas en las mismas condiciones anteriormente señaladas, lo que corrobora que la dirección del puente, CONH o NHCO, juega un papel importante a la hora de facilitar la ciclación.

Una vez obtenidos, los péptidos cíclicos anclados a la resina, **130a,b**, se desanclaron y purificaron por HPLC-semipreparativo para dar lugar a los péptidos cíclicos buscados **125** y **127** con rendimientos del 8 y el 6% respectivamente y purezas superiores al 98%.



Esquema 11. Síntesis de los análogos 124-127.

3.2.3.2. Derivados de α -MePro

Con el objetivo de aumentar la restricción conformacional en estos péptidos cíclicos, se decidió sintetizar también análogos que incorporasen en el giro un aminoácido α,α -disustituido, como la α -MePro. Como se comentó en los antecedentes, es sabido que este tipo de residuos facilitan la formación de giros β , lo que podría a su vez favorecer la adopción de la estructura de horquilla β deseada⁸⁶. Por otra parte, la presencia de rotamería alrededor del enlace Xaa-Pro es bastante habitual, y como consecuencia de la mezcla de rotámeros el análisis conformacional de estos péptidos es en general difícil. La sustitución del residuo de Pro por α -MePro consigue minimizar el porcentaje de rotámero *cis*, facilitando la elucidación de la estructura. En base a estas consideraciones, se planteó la síntesis de dos nuevos péptidos cíclicos con el puente amida CONH y NHCO, respectivamente, que contuviesen α -MePro en la posición 5 de la secuencia (Fig. 39).

Serie 8

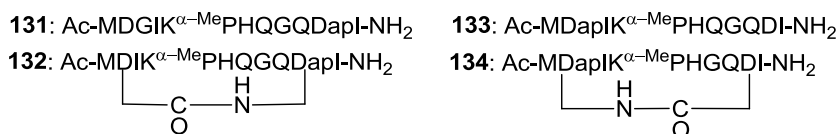
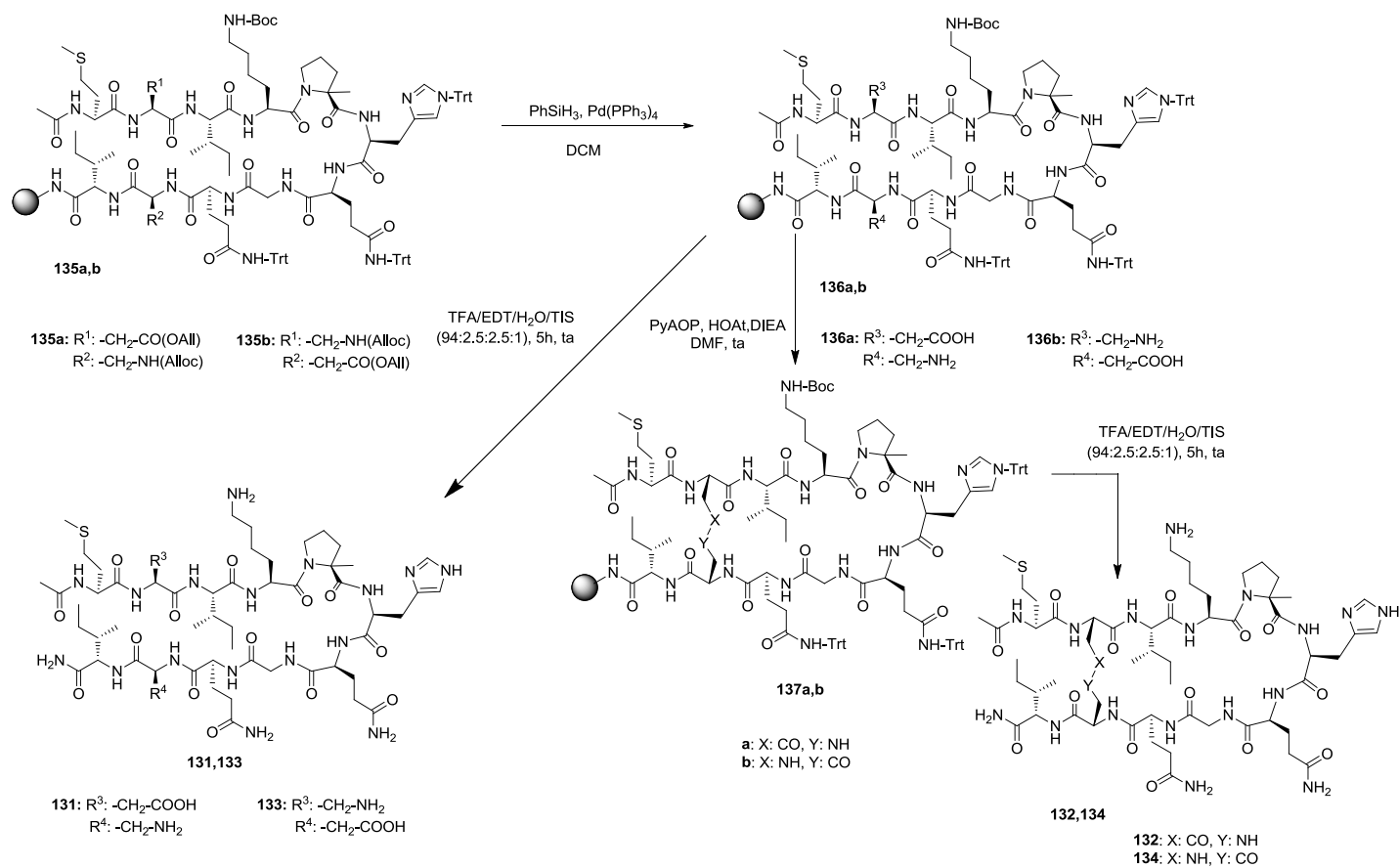


Figura 39. Derivados peptídicos con puente amida y α MePro diseñados.

La metodología de síntesis de los péptidos de esta nueva serie fue idéntica a la de sus análogos con Pro en posición 5 (Esquema 12). En la síntesis de los correspondientes derivados lineales **131** y **133** cabe destacar la dificultad del acoplamiento a α -MePro, que además de ser un acoplamiento a amina secundaria, menos reactiva que una amina primaria, estéricamente se encuentra más impedido por la presencia del metilo en posición α . En cuanto a la síntesis de los derivados cíclicos **132** y **134**, hay que señalar la rapidez de la ciclación de **136** a **137**, que se completó en un tiempo de 2h. Los productos finales **131**, **132**, **133** y **134** se obtuvieron con rendimientos globales del 29, 4, 12 y 8%, respectivamente, y purezas superiores al 95%.



Esquema 12. Síntesis de los análogos 131-134.

3.3. ANÁLISIS CONFORMACIONAL.

Una vez sintetizados los análogos de VEGF₈₁₋₉₁ tanto lineales como cíclicos se procedió a realizar su análisis conformacional para estudiar qué tipo de estructura tridimensional eran capaces de adoptar. Para ello se hicieron estudios de RMN en disolución y estudios teóricos mediante modelización molecular.

3.3.1. Estudios de RMN.

Los estudios de RMN se realizaron en disolución acuosa, tanto en D₂O como en una mezcla de H₂O/D₂O en proporciones volumétricas (9:1).

Los parámetros utilizados para la elucidación de la estructura fueron:

- Desviación de desplazamiento químico ($\Delta\delta$).
- Coeficiente de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$).
- NOEs no secuenciales.

Para la determinación de todos estos parámetros fue necesaria la asignación previa de todas las señales en los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN de cada uno de los compuestos (Ver Tablas 23-65 en la parte experimental). La asignación en el caso de los péptidos cíclicos no fue fácil debido a la existencia de dos conformeros en disolución, que pudieron asignarse como los conformeros *cis* y *trans* alrededor del enlace Lys-Pro. La asignación de estas conformaciones fue posible ya que es conocido que en el caso de *trans*-Pro, el C β aparece a menor desplazamiento químico que en *cis*-Pro, mientras que el C γ aparece a menor desplazamiento químico en el caso de *cis*-Pro²⁶⁸. Esta asignación de rotámeros se pudo confirmar adicionalmente en el espectro NOESY. Para los conformeros con *trans*-Pro aparecen señales de NOE entre H α de Lys4 y H δ de Pro5, mientras que en los *cis*-Pro aparece una señal de NOE entre H α de Lys4 y H α de Pro5 (Fig.40)²⁶⁹. En los derivados que contienen el puente hidrocarbonado, también se detectó la presencia de una tercera especie en disolución, que no pudo asignarse por completo. El cambio en el porcentaje de esta tercera especie con la temperatura, es indicativo de un tercer conformero y no de una impureza. Todos los datos que se presentarán a partir de ahora para el análisis conformacional son los del rotámero mayoritario, que en todos los casos se corresponde con el conformero *trans* alrededor del enlace Lys-Pro.

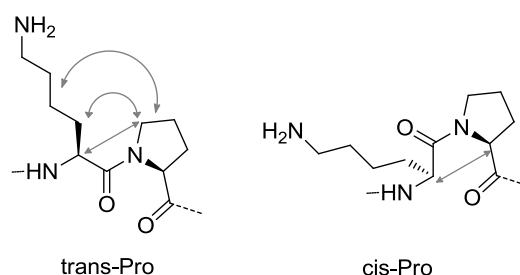


Figura 40. Señales NOE en los rotámeros Lys-Pro.

En los péptidos derivados del fragmento VEGF₈₁₋₉₁ con puente hidrocarbonado insaturado, además del problema de la rotamería alrededor del enlace Lys-Pro, se presentó el problema de la isomería *Z/E* alrededor del doble enlace. Como ya se comentó anteriormente, en el caso de los compuestos **57** y **60** fue posible separar físicamente los dos isómeros, pero no fue posible asignar la configuración *Z* o *E* debido al solapamiento de las señales olefínicas con la señal del disolvente. Para el derivado **60** solo se realizó el análisis conformacional de uno de los isómeros *Z/E*, **60b**. En el caso de **63**, que se obtuvo como una mezcla de isómeros *Z/E*, se pudieron asignar inequívocamente las señales correspondientes a las 4 especies existentes en la mezcla, aunque de aquí en adelante únicamente se presentan los datos para el isómero mayoritario de la mezcla, *Z* o *E*, y *trans*-Pro.

3.3.1.1. Desviación de los desplazamientos químicos ($\Delta\delta$)

La desviación del desplazamiento químico de un determinado heteronúcleo con respecto a los mismos valores en péptidos desestructurados es un parámetro que da idea de la estructura secundaria de un determinado fragmento peptídico. En los últimos años, a partir del análisis estadístico de los valores de δ del gran número de proteínas cuya estructura se ha descrito por RMN, se ha encontrado que existe una correlación entre los ángulos ϕ y ψ del esqueleto de la proteína y las desviaciones de los δ observados para H α , C α o C β . Puesto que los elementos de estructura secundaria vienen definidos por unos ángulos ϕ y ψ característicos, dependiendo del valor obtenido se puede determinar si un residuo se encuentra en una lámina β o en una hélice α . El valor se calcula con las

siguientes fórmulas, dependiendo de si nos fijamos en los $\Delta\delta$ de H α , C α o C β , y donde los valores de $\delta^{\text{random coil}}$ para ^1H y ^{13}C han sido tomados de Wishart *et al.*²⁷⁰.

$$\Delta\delta_{\text{H}\alpha} = \delta_{\text{H}\alpha}^{\text{observado}} - \delta_{\text{H}\alpha}^{\text{random coil}}, \text{ ppm}$$

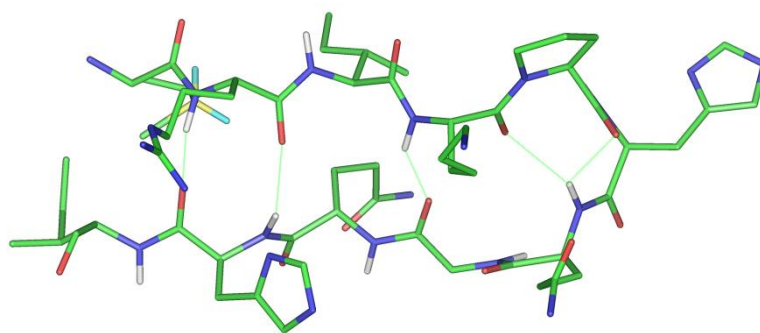
$$\Delta\delta_{\text{C}\alpha} = \delta_{\text{C}\alpha}^{\text{observado}} - \delta_{\text{C}\alpha}^{\text{random coil}}, \text{ ppm}$$

$$\Delta\delta_{\text{C}\beta} = \delta_{\text{C}\beta}^{\text{observado}} - \delta_{\text{C}\beta}^{\text{random coil}}, \text{ ppm}$$

random coil = estructuras al azar

Los criterios seguidos para evaluar la existencia o no de aminoácidos estructurados en una lámina β son: valores positivos de $\Delta\delta$ para H α y C β , y valores negativos de $\Delta\delta$ para C α ²⁶⁸. Se considera que los residuos se encuentran en un péptido desestructurado cuando $|\Delta\delta_{\text{H}\alpha}| < 0.1$ ppm, $|\Delta\delta_{\text{C}\alpha}| < 0.5$ ppm y $|\Delta\delta_{\text{C}\beta}| < 0.5$ ppm.

Si los péptidos adoptasen la estructura de horquilla β que presenta el fragmento VEGF₈₁₋₉₁ en la proteína nativa (Fig.41), todos los aminoácidos que se encuentran en las dos hebras de la lámina β mostrarían valores de acuerdo con los criterios descritos. Los residuos que forman parte del giro (Lys4, Pro5, His6, Gln7) tendrían, en general, valores de signo opuesto.



--MRIKPHQGQHI--

Figura 41. Conformación del fragmento de VEGF₈₁₋₉₁ en la estructura nativa (de la estructura cristalina de VEGF-Flt-1_{D2}, código pdb: flt-1).

En las Figuras 42 y 43 se puede observar la desviación de desplazamiento químico para Ha y Ca de los péptidos cíclicos de las series 1-3 con puente CH=CH y CH₂-CH₂ y sus respectivos derivados lineales, **56-64**. En el caso de los residuos en las posiciones 2 y 10 de la serie 1 y en posiciones 2 y 9 de las series 2 y 3, no se puede calcular el $\Delta\delta$ porque, al ser la aliIGly un aminoácido no natural, no existen valores de referencia.

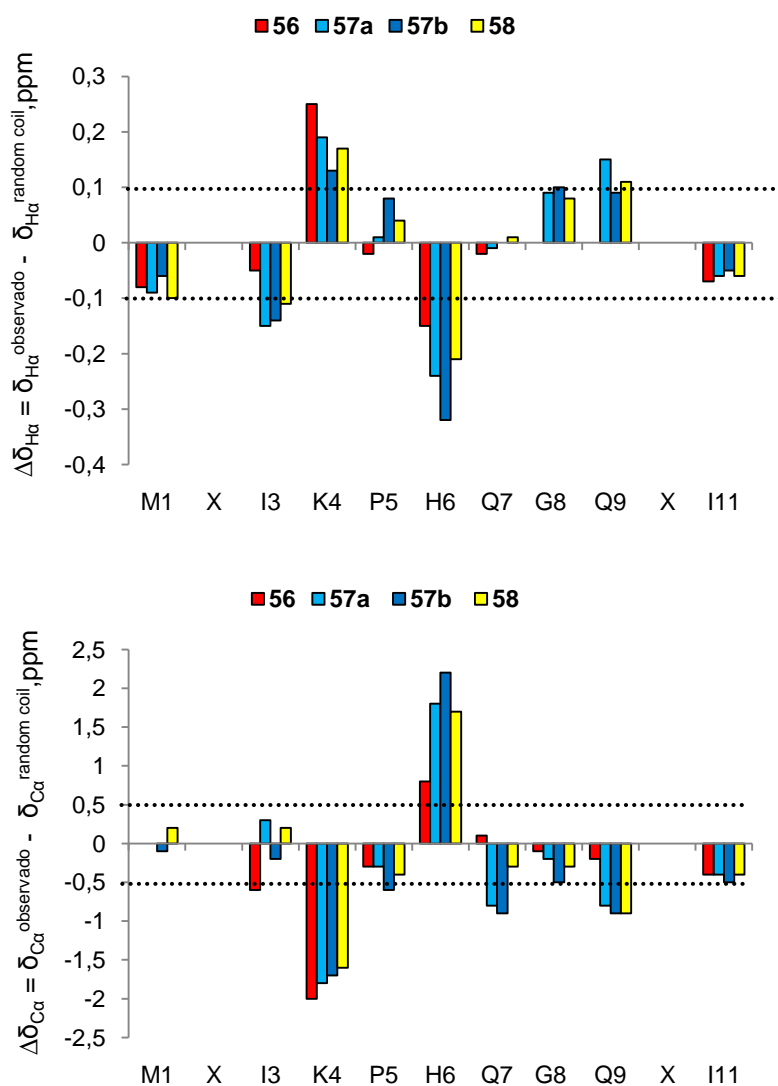


Figura 42. Desviación de desplazamiento para los derivados de la serie 1, donde X= aliIGly o puente HC=CH (**57**) o CH₂-CH₂ (**58**).

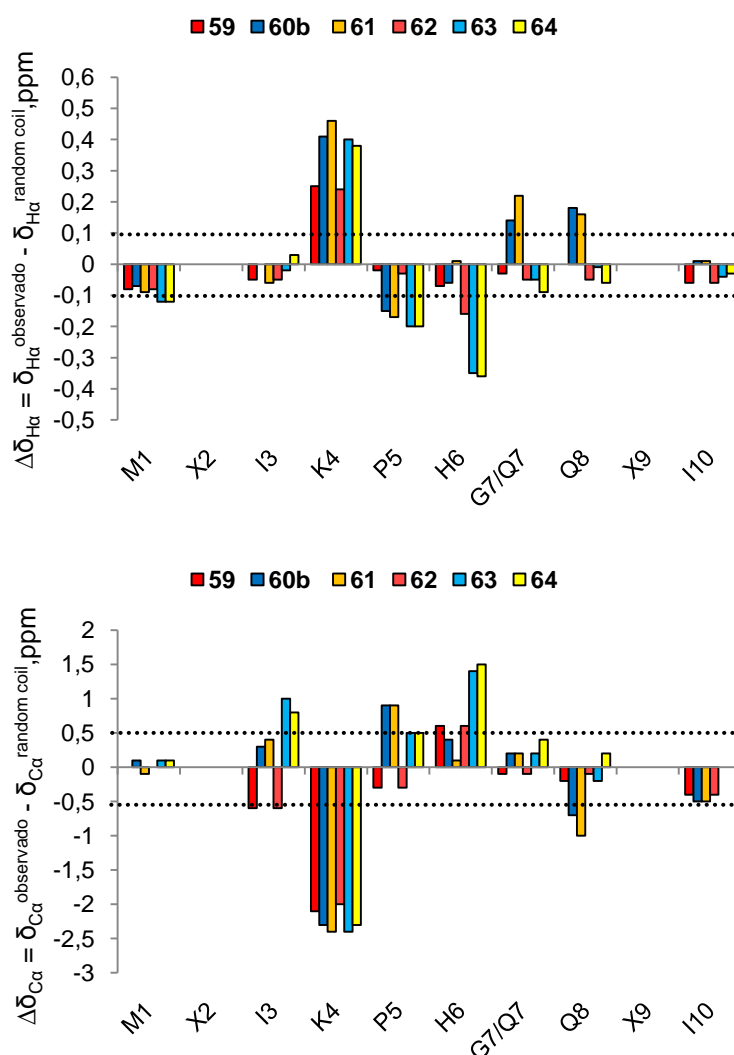


Figura 43. Desviación de desplazamiento para los derivados de las series 2 y 3, donde X= alilGly (**59**, **62**) o puente HC=CH (**60b**, **63**) o CH₂-CH₂ (**61**, **64**).

De forma general, los valores de desplazamiento químico tanto de H α como de C α de todos los derivados con residuos de alilGly y puente hidrocarbonado, **56-64**, son pequeños en valor absoluto, excepto para los residuos de Lys4, que presentan el comportamiento característico de residuos precedentes a Pro²⁷⁰, e His6. En el caso de algunos de los péptidos cíclicos también aparece algún residuo con valores ligeramente superiores al límite que indica estructuración, pero ninguno de ellos parecen revelar una

preferencia clara por la estructura de horquilla β . En resumen, a la vista de los datos obtenidos, se puede decir que los derivados lineales presentan un perfil de péptidos sin estructura en disolución acuosa, mientras que los derivados cíclicos parecen estar un poco más estructurados. En el caso de los péptidos de las series 4 y 5, **65**, **67**, **68** y **70**, se obtuvieron resultados similares.

Con el fin de obtener algún dato más concluyente a partir de los desplazamientos químicos obtenidos para los compuestos de la serie 1, **56-58**, se realizó un estudio en más detalle utilizando el programa TALOS²⁷¹. El estudio consiste en comparar los desplazamientos químicos obtenidos para $H\alpha$, $C\alpha$ and $C\beta$ en los péptidos estudiados con aquellos presentes en la base de datos de proteínas cuya estructura es conocida, obteniendo así un valor promedio de los ángulos ϕ y ψ en función de los desplazamientos químicos experimentales. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 8, en la que se indican aquellos ángulos diedros compatibles con los datos experimentales obtenidos para cada uno de los residuos. El superíndice es indicativo de la fiabilidad de los datos, siendo 10 el valor de máxima fiabilidad. Estos datos indican que el residuo de Lys4 se encuentra en la región β del mapa de Ramachandran, mientras que el residuo de Pro5 se encontraría predominantemente, en la posición $i+1$ de un giro β tipo II, tal y como ocurre en la estructura cristalina de VEGF. Este mismo residuo, también podría encontrarse en la posición $i+1$ de un giro β tipo I, aunque la probabilidad es menor. En el caso del residuo de His6 también se observa cierta compatibilidad con alguna de las estructuras de la base de datos, pero sus valores no coinciden con los encontrados en la estructura cristalina de VEGF.

Tabla 8. Ángulos ϕ y ψ en la estructura de Rayos X de VEGF y aquellos compatibles con los desplazamientos químicos experimentales (¹H α , ¹³C α , ¹³C β , ¹⁵NH) en los péptidos **56-58**, para el rotámero mayoritario (X-Pro *trans*), obtenidos usando TALOS.

Residuo	VEGF ₈₁₋₉₁ (Rayos X)	56	57a	57b	58
K4	-103.1, +106.2	-77, +141 ¹⁰	-78, +141 ¹⁰	-80, +134 ⁹	-78, +140 ⁹
P5	-49.9, +128.5	-62, +147 ⁸ (-59, -30) ²	-60, +148 ⁷ (-60, -23) ³	-63, +148 ⁸ (-59, -30) ²	-62, +146 ⁹ (-62, -25) ¹
H6	+69.4, +8.0	-109, +132 ⁷ (-73, -36) ³	-70, -30 ⁵ (-125, +126) ⁴	-95, +139 ⁶ (-78, -20) ³	-102, +126 ⁵ (-72, -22) ⁴
Q7	-138.9, +16.6	-122, +149 ⁶ (-64, -36) ⁴	-77, -16 ⁵ (-97, +160) ⁴	-112, +135 ⁶ (-67, -24) ⁴	-74, -17 ⁵ (-127, +171) ³
G8	+144.7, +156.2	(+86, -5) ² (-72, -25) ² (-115, +124) ²	(+100, +2) ³ (-81, -4) ¹ (-85, +135) ³	+82, +17 ⁷ (-72, -25) ²	+99, +4 ⁵ (-81, -4) ¹ (-88, -106) ¹

Los valores de desplazamiento químico de H α y C α obtenidos para el compuesto con puente disulfuro **121** se muestran en la Figura 44, en comparación con los obtenidos para los péptidos cíclicos con puentes CH=CH (**57a**) y CH₂-CH₂ (**58**) en las mismas posiciones de la cadena. Como se puede observar, la tendencia presentada por **121** es muy similar a la mostrada por los derivados hidrocarbonados, con valores en la zona indicativa de presencia de estructura para determinados residuos, como es el caso de Lys4 e His6. Los dos residuos de Ile en posiciones 3 y 11 presentan valores que indican cierta tendencia a la adopción de algún tipo de estructura secundaria, pero en ningún caso, acorde con la estructura de horquilla β observada en la proteína natural.

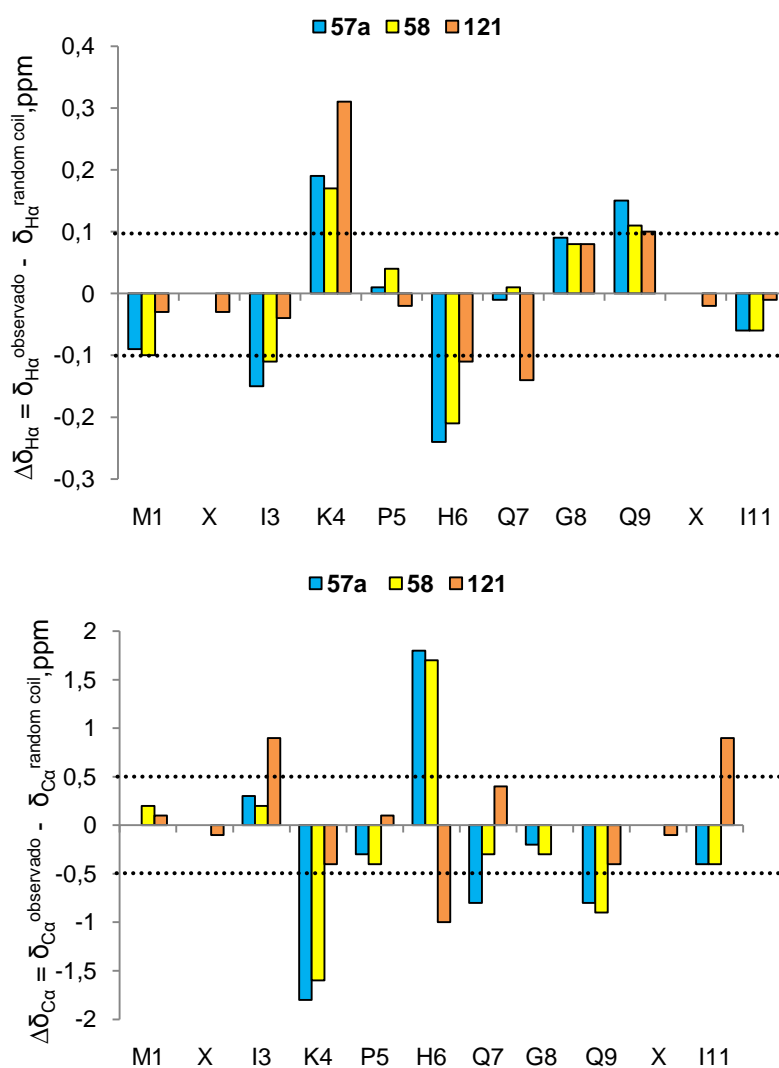


Figura 44. Desviación de desplazamiento químico de los protones $H\alpha$ y los carbonos $C\alpha$, donde X= puente hidrocarbonado (**57a**, **58**) o puente disulfuro (**121**).

En la Figura 45 se recogen los datos de desviación de desplazamiento químico de los protones $H\alpha$ y de los carbonos $C\alpha$ de todos los derivados cíclicos que contienen un puente amida para restringir la conformación (**125**, **127**, **132** y **134**) y de sus correspondientes análogos lineales (**124**, **126**, **131** y **133**). La mayoría de los valores obtenidos son indicativos de ausencia de estructura tridimensional concreta. Cabe

destacar de nuevo, el comportamiento de los residuos de Lys4 e His6, que en líneas generales siguen un patrón similar al presentado hasta ahora por el resto de los análogos estudiados. En particular, en los compuestos lineales, representados en rojo en los histogramas de la Figura 45, el residuo de Lys4 se encuentra en región β pero el resto de los residuos parecen estar en regiones sin estructura definida. En el caso de los derivados cíclicos, representados en azul, este comportamiento es más acusado, encontrándose algún residuo adicional que presenta valores de desviación de desplazamiento químico indicativos de un posicionamiento en región β . Sin embargo, en ningún caso, los resultados son concluyentes en cuanto a la adopción de una estructura concreta. Por otra parte, la introducción en la secuencia de un residuo de α -MePro, no produjo cambios significativos en los datos de desviación de desplazamiento químico con respecto a sus análogos con Pro.

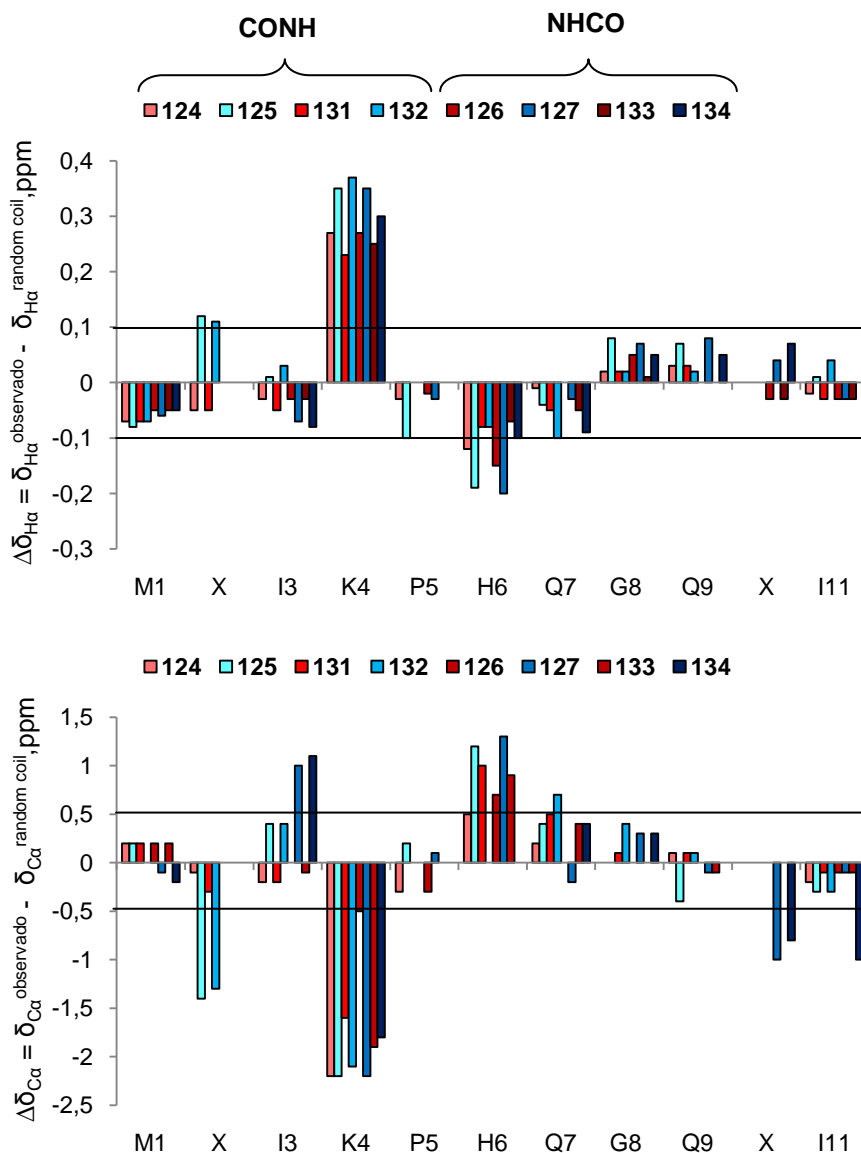


Figura 45. Desviación de desplazamiento químico de los protones H α , donde X2=Asp (**124**, **131**), Dap (**126**, **133**), X10=Dap (**124**, **131**), Asp (**126**, **133**), X2-X10= puente CH₂CONHCH₂ (**125**, **132**), puente CH₂NHCOCH₂ (**127**, **134**).

3.3.1.2. Coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$)

El coeficiente de temperatura de un protón amida es una medida de si éste se encuentra o no protegido del disolvente. En péptidos pequeños se puede asumir que un protón amida protegido del disolvente está involucrado en la formación de un enlace de

hidrógeno intramolecular. La información que aporta este parámetro es importante ya que permite determinar el grado de restricción conformacional de la molécula. En el caso que nos ocupa, si el péptido estuviera estructurado como en el estado nativo, cabría esperar que varios NH amida estuvieran formando enlaces de hidrógeno intramoleculares, contribuyendo a estabilizar la estructura de horquilla β (Fig. 46).

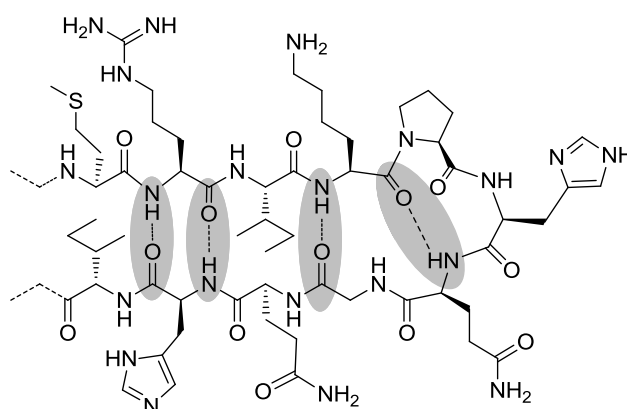


Figura 46. Estructura del fragmento natural VEGF₈₁₋₉₁. En azul se marcan los enlaces de hidrógeno que estabilizan la estructura de horquilla β y el giro del loop en la proteína nativa.

Está descrito que, para péptidos pequeños y en disolución acuosa, valores de $\Delta\delta/\Delta T > 5$ ppb/K (en valor absoluto) son indicativos de que el NH amida está expuesto al disolvente, mientras que valores < 4 ppb/K en valor absoluto sugieren que el NH amida está protegido del disolvente y posiblemente involucrado en un enlace de hidrógeno intramolecular²⁷².

Los resultados obtenidos para los compuestos de las 3 primeras series diseñadas, que poseen un puente hidrocarbonado, se presentan en la Tabla 9. En el caso de los péptidos lineales, los valores de $\Delta\delta/\Delta T$ indican que no existe ningún NH amida involucrado en la formación de enlaces de hidrógeno. Estos resultados son consistentes con los obtenidos a partir de los valores de $\Delta\delta$, que indicaban que estos péptidos no estaban estructurados. En el caso de los péptidos cíclicos, todos los derivados muestran el NH del residuo situado en la posición 7 protegido del disolvente, por lo que podríamos asumir que éste se encuentra involucrado en la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular. Para el compuesto **60a** este NH posee un valor de $\Delta\delta/\Delta T$ en la zona de

incertidumbre que no permite afirmar ni descartar su implicación en un enlace de hidrógeno. En los péptidos en los que este NH está protegido, éste podría estar estabilizando un giro β si formase el enlace de hidrógeno con el CO de la Lys4, o un giro γ si estuviese formando enlace de hidrógeno con el CO de la Pro5. El resto de NHs no se encuentran protegidos del disolvente y por tanto no están involucrados en la estabilización de la estructura, salvo el del NH de la Gln8 en el derivado **61** y algunos otros que presentan valores en la zona de incertidumbre. La presencia en **61** de otro NH protegido además del del giro podría ser debida a que la ausencia del residuo de Gly permite una mayor estructuración de las hebras en la parte próxima al giro, aunque no en los extremos terminales. Los péptidos de las series 4 y 5, **65**, **67**, **68** y **119**, no presentan ningún NH protegido del disolvente, coincidiendo así con los datos de desviación de desplazamiento químico obtenidos, que apuntaban a que estos péptidos estaban desestructurados. La falta de estructura en el péptido **67** podría ser debida al mayor tamaño del ciclo, que produciría una mayor libertad conformacional en la zona del giro dificultando la estabilización de éste a través de la formación de un enlace de hidrógeno.

Los resultados de coeficiente de temperatura obtenidos para el compuesto con enlace S-S **121** se muestran en la Tabla 10, en comparación con los datos obtenidos para el cicloalcano **58**, con puente C-C. Como se puede observar, el péptido con puente disulfuro no presenta ningún NH protegido del disolvente, sugiriendo que **121** no está estructurado, en consonancia con los datos de desviación de los desplazamientos químicos. Este resultado indica que la ciclación a través de un enlace S-S en posición 2-10 es todavía menos adecuada para la estabilización de la estructura de horquilla que los puentes carbonados, aunque ninguno fue capaz de fijar la conformación global que presenta el fragmento 81-91 en la proteína nativa. Esto puede ser debido a que el puente disulfuro se encuentra uniendo residuos que forman enlaces de hidrógeno en la estructura de horquilla β (Fig.41).

Tabla 9. Coeficientes de temperatura para los NHs amida de los péptidos **56-64**.

$\Delta\delta/\Delta T$ (ppb/K) ^a												
SERIE 1	56	57a	57b	58	SERIE 2	59	60b	61	SERIE 3	62	63	64
Met 1	-7.4	-7.6	-7.9	-7.9	Met 1	-7,4	-	-	Met 1	-7,4	-7,9	-8,3
X ^b 2	-7.5	-7.9	-6.2	-6.9	X ^b 2	-7,4	-8,5	-7,8	X ^b 2	-7,4	-8,7	-8,7
Ile 3	-9.8	-6.7	-7.9	-7.1	Ile 3	-9,6	-6,6	-8,4	Ile 3	-9,5	-6,1	-4,6
Lys 4	-10.5	-8.8	-10.1	-9.4	Lys 4	-10,3	-6,5	-8,6	Lys 4	-10,0	-5,6	-6,6
Pro 5	-	-	-	-	Pro 5	-	-	-	Pro 5	-	-	-
His 6	-8.1	-9.5	-10.6	-10.1	His 6	-8,6	-8,6	-8,9	His 6	-8,7	-9	-8,9
Gln 7	-7.6	-3.0	-2.25	-2.7	Gly 7	-7,7	-4,2	-0,9	Gln 7	-7,8	-2,6	-2
Gly 8	-7.4	-6.7	-6.5	-6.8	Gln 8	-7,5	-4,9	-1,9	Gln 8	-8,1	-8,1	-7,9
Gln 9	-6.5	-7.2	-7.4	-7.2	X ^b 9	-7,9	-5,6	-7,9	X ^b 9	-8,9	-8	-8,2
X ^b 10	-7.8	-12.5	-11.2	-10.8	Ile 10	-9,6	-8,9	-9,5	Ile 10	-10,1	-7,6	-10,4
Ile 11	-9.7	-11.1	-9.2	-11.5		-	-	-		-	-	-

^aCalculados a partir de los desplazamientos químicos de los NHs medidos en disolución acuosa H₂O/D₂O (9:1) a 5°C y a 25°C. ^bX= alilGly o puente hidrocarbonado, según corresponda.

Tabla 10. Coeficientes de temperatura para los péptidos cíclicos **121y 58**.

$\Delta\delta/\Delta T$ (ppb/K) ^a											
	Met1	X2 ^b	Ile3	Lys4	Pro5	His6	Gln7	Gly8	Gln9	X10 ^b	Ile11
121	-8.4	-5.8	-5.3	-6.6	-	-7.9	-6.5	-6.9	-6.9	-6.4	-8.7
58	-7.9	-6.9	-7.1	-9.4	-	-10.1	-2.7	-6.8	-7.2	-10.8	-11.5

^aCalculados a partir de los desplazamientos químicos de los NHs medidos en disolución acuosa H₂O/D₂O (9:1) a 5°C y a 25°C. ^bX = Puente disulfuro (**121**), Puente hidrocarbonado (**58**).

En la Tabla 11 se recogen los valores de los coeficientes de temperatura obtenidos para todos los péptidos que contienen un puente tipo amida como restricción conformacional y sus correspondientes análogos lineales (**124-134**). Si se observan los datos para los derivados con puente CONH se puede concluir que los compuestos que contienen Pro en la posición 5, tanto cíclico, **125**, como lineal, **124**, no presentan ningún NH protegido del disolvente. Esto indica falta de estructura, tal y como sugerían los

valores de desviación de los desplazamientos químicos. La introducción de α -MePro en posición 5 en los péptidos **131** y **132** permitió la estabilización del giro en ambos compuestos, como se deduce de la protección del NH de la Gln7. Esta estabilización del giro, producida por la presencia de α -MePro, podría explicar el menor tiempo necesario para la reacción de ciclación, que en el caso de **124** fueron 12 h, mientras que en el caso de **131** se redujo a 2h. Por otra parte, el NH del puente amida, Dap10 H γ , del péptido cíclico **132** se encuentra en la zona de incertidumbre, por lo que podría estar participando en la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular.

Para el péptido lineal **126**, que contiene Pro en posición 5, no se observa ningún NH protegido del disolvente, lo que indica de nuevo ausencia de enlaces de hidrógeno y por tanto de estructura. Al ciclar con el puente NHCO, derivado **127**, se observa la protección del NH de la Gln7 que estaría estabilizando el giro. Esto supone una diferencia respecto a lo que ocurría con su análogo con el puente en el sentido contrario (CONH), **125**, en el que no se logró estabilizar dicho giro. Como en el caso de **132**, el valor del coeficiente de temperatura del NH del puente, Dap2 H γ , se encuentra en la zona de incertidumbre, lo que sugiere pero no permite afirmar su participación en un enlace de hidrógeno intramolecular. De nuevo, la introducción de un residuo de α -MePro en posición 5 promueve la estabilización del giro, tanto en el péptido lineal, **133**, como en el cíclico, **134**, ya que ambos tienen el NH del residuo de Gln7 protegido. Además, el derivado cíclico **134** presenta un patrón de enlaces de hidrógeno diferente al obtenido hasta ahora. En este caso, el NH del puente se encuentra protegido del disolvente e involucrado en un enlace de hidrógeno intramolecular. Además, para los NH amida de los residuos Lys4, Gly8 y Asp10 se obtuvieron valores de coeficiente de temperatura en la zona de incertidumbre. Estos últimos NHs pertenecen a aminoácidos que, de estar protegidos, podrían contribuir a estabilizar la estructura de horquilla β , como es el caso del NH de la Lys4 y del NH del Asp10 (Fig.46).

Tabla 11. Coeficientes de temperatura para los análogos con puente amida.

$\Delta\delta/\Delta T$ (ppb/K) ^a									
CONH	124	125	131	132	NHCO	126	127	133	134
Met 1	-7,8	-7,7	-7,7	-7,7	Met 1	-7,7	-8,3	-7,8	-7,8
Asp 2	-6,1	-5,7	-6	-5,9	Dap 2 (H γ)		-4,5		-0,9
-	-	-	-	-	Dap 2 (HN)		-6,5		-5,6
Ile 3	-7,6	-7,1	-7,4	-6,9	Ile 3	-9,2	-5,8	-9,1	-7,6
Lys 4	-9,1	-6,8	-8,5	-6,7	Lys 4	-9,9	-6,8	-9,1	-4,5
X ^b 5					X ^b 5				
His 6	-8,5	-7,6	-7,6	-6,4	His 6	-8,7	-5,8	-5,9	-6,2
Gln 7	-8,2	-5,3	-3,8	-3,7	Gln7	-7,6	-2,6	-3,6	-1,4
Gly 8	-8,4	-6,3	-7,6	-5,1	Gly 8	-7,8	-7,4	-6,9	-4
Gln 9	-6,8	-6,8	-6,4	-6,9	Gln 9	-6,4	-7,9	-6,1	-9,7
Dap10 (H γ)		-5,7		-4,5	Asp 10		-5,9	-6,2	-4,8
Dap10 (HN)		-5,4	-6,5	-5	-	-	-	-	-
Ile 11	-8,9	-7,8	-9	-8,5	Ile 11	-8,8	-8,8	-8,7	-9,1

^aCalculados a partir de los desplazamientos químicos de los NHs medidos en disolución acuosa H₂O/D₂O (9:1) a 5°C y a 25°C. ^bX = Pro en **124, 125, 126, 127**; α -MePro en **131, 132, 133, 134**.

A modo de resumen, se podría concluir que los péptidos lineales **56, 59, 62, 124** y **126**, de forma general, no poseen ningún NH protegido del disolvente, en consonancia con los datos previos de desviación de desplazamiento químico. Por lo tanto, todo parece indicar que estos péptidos están totalmente desestructurados. Únicamente la introducción de α -MePro, como residuo inductor de giros β , en **131** y **133**, ha permitido que estos péptidos lineales presenten el NH de la Gln7 protegido del disolvente, probablemente formando un enlace de hidrógeno con el CO de la Lys4, que fijaría el giro β . En cuanto a los péptidos cíclicos, la gran mayoría, (**57, 58, 60, 61, 63, 64, 127, 132** y **134**), tienen

protegido el NH de la Gln7 que estaría estabilizando el giro β , pero no presentan ningún otro NH protegido característico de estructura de horquilla β . La excepción la constituyen el derivado con puente disulfuro, **121**, y con puente CONH, **125**, con todos los enlaces amida por encima de 5 ppb/K, y el péptido con puente NHCO y con α -MePro en la secuencia, **134**, con un conjunto de protones amida protegidos que indica mayor estructuración y a priori una posible conformación de horquilla β .

3.3.1.3. NOEs secuenciales y no secuenciales.

En péptidos y proteínas, la información proporcionada por las señales de NOE acerca de las distancias entre los protones de una molécula, es clave para el cálculo de su estructura tridimensional, ya que las señales de NOE entre protones alejados en la secuencia (NOEs no secuenciales) indican que éstos se encuentran espacialmente próximos. Por lo tanto, la presencia de señales de NOE tanto secuenciales como no secuenciales es importante a la hora de confirmar la secuencia de aminoácidos del péptido y de proponer plegamientos de estructura secundaria del mismo, respectivamente. La correcta asignación secuencial de los diferentes sistemas de espín presentes en un péptido se lleva a cabo a partir de las señales de NOEs $d_{NN(i, i+1)}$, $d_{\alpha N(i, i+1)}$, $d_{\beta N(i, i+1)}$ entre protones de residuos contiguos en la secuencia del péptido (Fig.47A). La geometría de las láminas β da lugar a NOEs del tipo $d_{NN(i, j)}$, $d_{\alpha N(i, j)}$, $d_{\alpha\alpha(i, j)}$, siendo i y j residuos de dos hebras contiguas de la lámina (Fig. 47B).

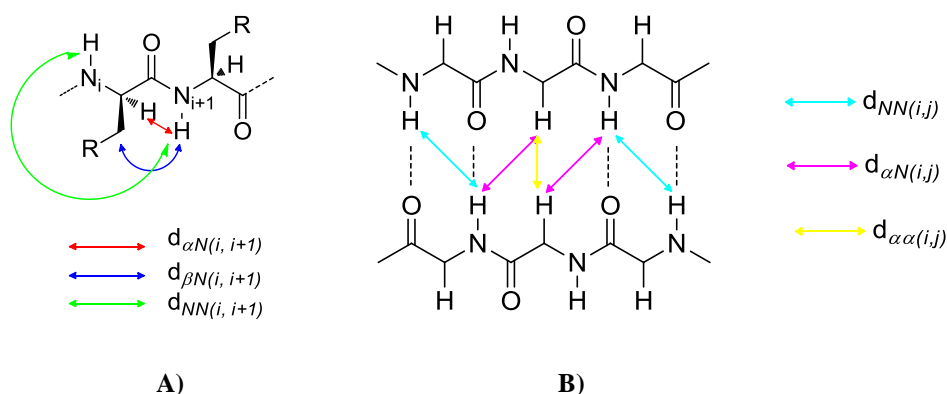


Figura 47. A) NOEs secuenciales en una cadena peptídica. B) NOEs no secuenciales esperables en una lámina β antiparalela.

En todos los péptidos se observaron NOEs secuenciales que permitieron la asignación sin ambigüedad de las señales correspondientes a los residuos repetidos en la secuencia (Gln, alilGly, Cys e Ile) (Fig.48). Lamentablemente, la búsqueda de señales de NOE no secuenciales fue infructuosa debido a la complejidad de los espectros, como consecuencia de la mezcla de rotámeros. Por tanto, no se pudieron llevar a cabo cálculos de dinámica molecular restringida, que permitieran conocer la estructura tridimensional de estos péptidos en disolución.

En el caso de los péptidos **132** y **134** se observaron algunas señales de NOE no secuenciales débiles, pero ninguna de ellas significativa ni indicativa de la estructura de horquilla β , a pesar de que el patrón de enlaces de hidrógeno obtenido en el caso de **134** parecía sugerirla. Las señales débiles se dan entre los protones de la cadena lateral del residuo de Lys4 y los de los residuos situados en posición 10, Dap y Asp respectivamente, y entre el residuo de Pro5 y el situado en posición 2, lo que podría sugerir un acercamiento entre la zona del giro y el puente que produciría un achatamiento de la estructura (Fig. 46).

A la vista de estos resultados, se puede concluir que la formación de péptidos cíclicos, a través de la introducción de diferentes tipos de puente, ha dado lugar a análogos restringidos del fragmento de VEGF₈₁₋₉₁ que en disolución acuosa estabilizan un giro β , aunque no son capaces de adoptar la estructura global de horquilla β buscada.

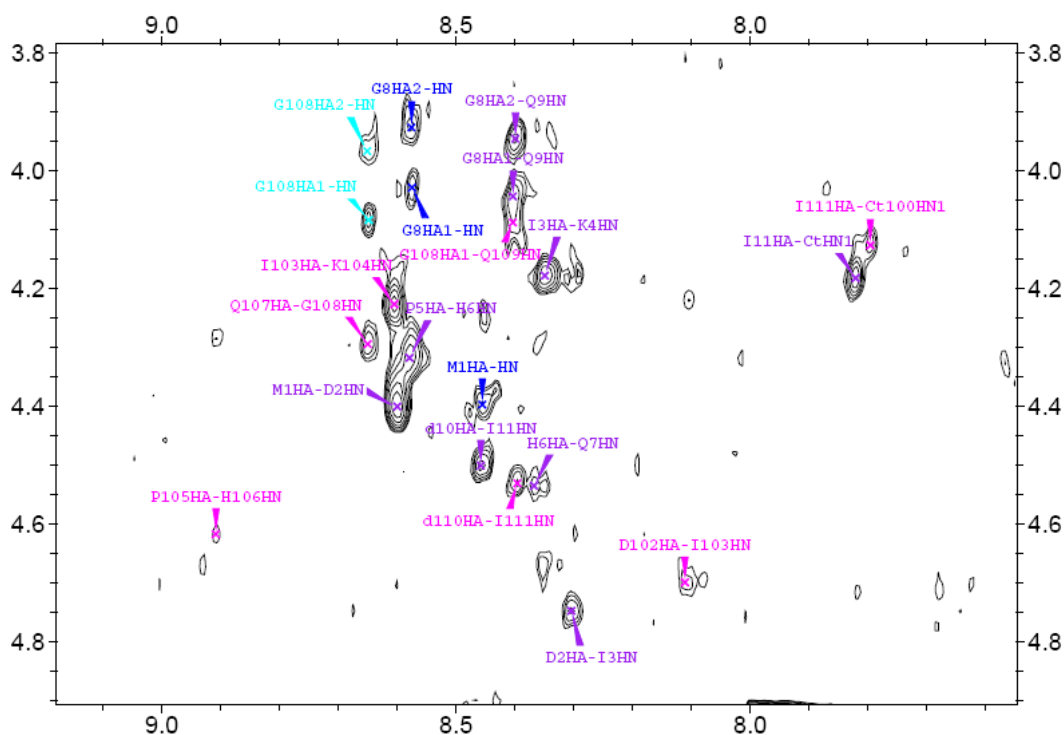


Figura 48. Detalle del espectro NOESY del derivado **125**. En tonos de azul se encuentran marcados los NOEs intrarresiduo para los rotámeros de *trans* y *cis*-Pro, en tonos de morado los NOEs secuenciales interresiduo para los rotámeros de *trans* y *cis*-Pro.

3.3.2. Estudios de modelización molecular

Debido a la falta de datos concluyentes en los estudios de RMN, y con el fin de intentar elucidar la estructura tridimensional de los péptidos sintetizados, se llevó a cabo un estudio de dinámica molecular en el que se eligieron los derivados de la serie 1, **56**, **57** y **58** como punto de partida. Posteriormente, en base a los resultados de la actividad biológica, que se comentarán más adelante, se incorporaron a estos estudios todos aquellos péptidos que presentaron una afinidad significativa por el receptor Flt-1, **59**, **61** y **62**, así como el péptido lineal **124**, que contiene Asp en posición 2 y Dap en posición 10, y los péptidos cíclicos que contienen puentes amida **125**, **127**, **132** y **134**. A efectos comparativos, se estudió también el fragmento natural VEGF₈₁₋₉₁.

Para explorar el espacio conformacional de los péptidos se realizó un proceso de templado simulado de dinámica molecular, utilizando el paquete de programas AMBER10²⁷³. Los confórmeros seleccionados para ser estudiados posteriormente se eligieron entre aquellos de mínima energía, en un rango de + 3 Kcal mol⁻¹. De forma general, estos estudios mostraron que todas las estructuras estudiadas presentan variabilidad conformacional, tanto para los péptidos lineales como para sus análogos cíclicos.

3.3.2.1. Péptidos con puentes hidrocarbonados

Los estudios de modelización molecular de los derivados lineales **56**, **59** y **62** mostraron una gran flexibilidad conformacional, consistente con la ausencia de NOEs y enlaces de hidrógeno en los estudios de RMN. Así, en los confórmeros de mínima energía, tan solo se observó cierta estructuración en la zona del giro β de la horquilla, centrado en los residuos Pro5-His6. En este sentido, la distancia entre el Ca del residuo i (Lys4) y del $i+3$ (Gln7) del giro es inferior a 7 Å en al menos el 83% de los confórmeros, lo que sugiere la existencia de estructuras con giro β (Tabla 12). Si se consideran los ángulos diedros de los residuos centrales de dicho giro (Fig. 10, apartado 1.3.1), se observa que los ángulos ϕ_5 , ψ_5 y ϕ_6 están dentro de los valores esperados para giros β ideales ($\pm 30^\circ$) en más del 77% de los confórmeros de mínima energía. Por el contrario, el ángulo ψ_6 no se ajusta a estos valores, lo que podría deberse a que el giro β se encuentra distorsionado. Aunque los estudios de modelización indicaron la existencia del enlace de hidrógeno característico de este tipo de giros, este enlace no se observó en los experimentos de RMN. A continuación se analizó el ángulo diedro ω_5 , correspondiente al enlace peptídico que implica el N secundario de la Pro, para estudiar la posible existencia de rotamería *cis-trans* alrededor de este enlace. Se observó que el porcentaje de rotámero *cis* está comprendido entre un 16 y 21%, proporción algo superior a la determinada en los estudios de RMN. A modo de ejemplo, en la Figura 49 se recoge la superposición de los átomos que forman el giro de los confórmeros de mínima energía del derivado **62**, en los que el enlace amida precedente al residuo de Pro es *trans*, y cuyos ángulos ϕ_5 , ψ_5 y ϕ_6 se encuentran dentro de los valores esperados para un giro β . Se puede apreciar la

flexibilidad conformacional de los extremos N- y C-terminales del péptido, mientras que se conserva la estructura secundaria del giro β de la horquilla.

Tabla 12. Porcentajes de algunos parámetros representativos obtenidos en los cálculos teóricos.

	$\phi 5, \psi 5, \phi 6$ (%) ^a	Distancia	Cis (%) Teórico	Cis (%) RMN
		(%) $\alpha C^4-\alpha C^7$ $\leq 7\text{\AA}$		
VEGF _{81,91}	83	92	14	5
56	68	83	21	<1
Z, 57a ó b^b	44	78	23	23
E, 57a ó b^b	59	83	27	23
58	0	43	26	24
59	63	93	16	<1
61	58	93	22	25
62	54	86	16	5

^aPorcentaje de conformeros con valores de los ángulos diedros $\phi 5, \psi 5, \phi 6$ dentro de lo esperado para giros β . ^bLos compuestos **57a** y **57b** pueden estar intercambiados en relación con los estudios de RMN en cuanto a la isomería Z/E.

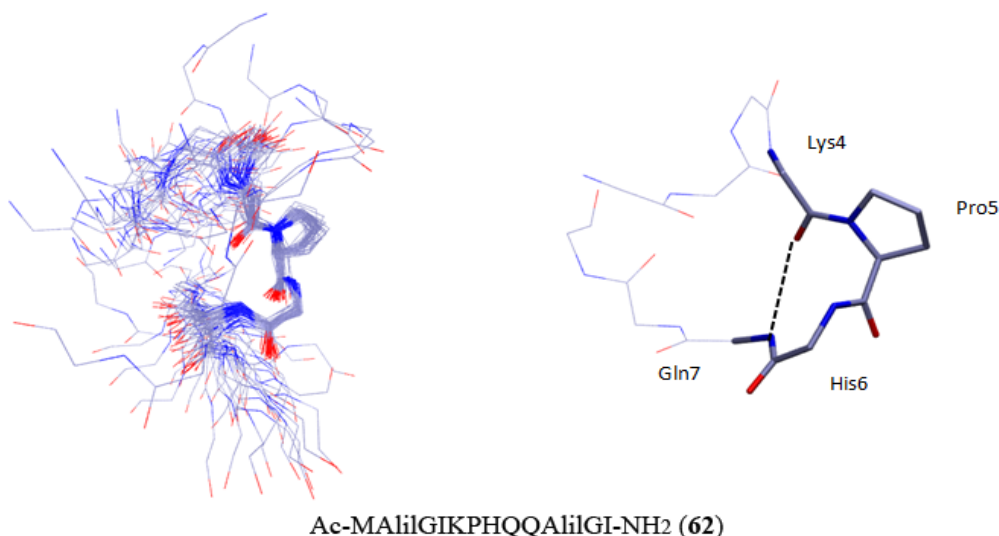


Figura 49. Superposición de conformeros *trans* cuyos ángulos diedros $\phi 5, \psi 5, \phi 6$ están dentro de lo esperados para giros β del compuesto **62**. Superposición en base a los átomos pesados del esqueleto peptídico de los residuos Pro5 e His6. Con la excepción del residuo de Pro, solo está representado el esqueleto peptídico. Para facilitar la visualización se representa un conformero representativo.

Los resultados de la modelización molecular de los péptidos cíclicos también reflejaron una alta flexibilidad conformacional, aunque en general con una mayor conservación de la estructura en la zona del giro β . Es de señalar que, en este caso, el porcentaje de rotámeros *cis* alrededor del enlace Lys-Pro se correlaciona perfectamente con los datos obtenidos mediante RMN. El análisis de los compuestos **57a**, **57b** y **58** mostró que el porcentaje de estructuras con distancia inferior a 7 Å entre los C α del residuo *i* y del *i*+3 del giro era del 78, 83 y 43%, respectivamente. Por tanto, el porcentaje de giro β es mayor cuando existe un puente HC=CH, derivado **57**, que para el compuesto **58**, análogo reducido de **57**. Además, solo los isómeros *Z* y *E*, **57a,b**, poseen valores dentro de lo esperado para un giro β en tres de los cuatro ángulos diedros de los residuos centrales del giro, mientras que en el caso del péptido **58** sólo se cumplen dos de estos ángulos.

Por otra parte, el péptido **61**, en el que se ha suprimido el residuo de Gln, presentó una mayor estructuración del giro β . Para este compuesto el porcentaje de confórmers con una distancia entre los C α de los residuos primero (*i*) y cuarto (*i*+3) inferior a 7 Å fue del 93%. Además, un 58% de estos confórmers posee tres de los ángulos diedros del giro dentro de lo esperado para un giro β ideal.

En relación a la existencia de enlaces de hidrógeno, los estudios de RMN habían mostrado protección del NH del residuo en posición 7, ya sea Gln en los derivados **57** y **58** o Gly en el derivado truncado **61**. Los estudios de modelización molecular de estos compuestos indicaron la existencia de un enlace de hidrógeno entre este NH y el carbonilo del residuo de Lys4, que se corresponde con el característico del giro β de la horquilla. El porcentaje de confórmers estabilizados por este enlace fue del 29% para el del undecapéptido **58** y mayor para el péptido truncado **61** (48%). Por otra parte, también existía protección del disolvente del NH del residuo de Gln en posición 8 en el compuesto **61**. Los estudios de modelización molecular indicaron que este NH puede estar implicado en dos enlaces de hidrógeno, bien con el carbonilo de la Lys4 (27%) o bien con el carbonilo de la Pro5 (5%). Este último enlace de hidrógeno se correspondería con un giro β entre los residuos de Pro5 y Gln8. Este giro entre los residuos en posiciones 5 y 8, también se ha observado en los otros derivados cíclicos, como **57** y **58**, siendo el

porcentaje mayor para los cicloalquenos **57a** y **57b** (14 % y 19 %, respectivamente). La presencia de este último giro genera un doble giro β , que produce un cambio de dirección en la cadena peptídica (Fig. 50). Como se puede observar, el isómero *Z* del compuesto **57**, que posee un mayor porcentaje del segundo giro β (centrado en los residuos de His6-Gln7), presenta un cambio de dirección tras el primer giro, distorsionando notoriamente las dos hebras de la horquilla. Esta distorsión se observa en menor medida en el análogo reducido **61**.

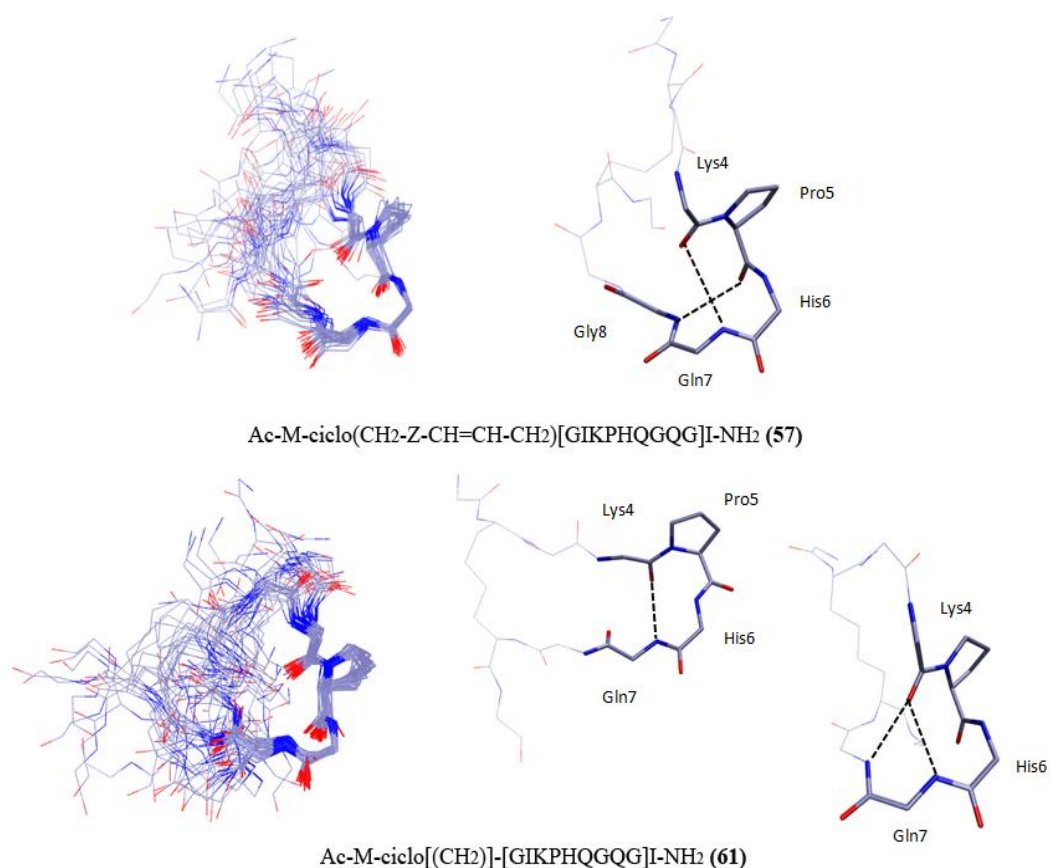


Figura 50. Superposición de conformeros *trans* cuyos ángulos diedros ϕ_5 , ψ_5 , ϕ_6 están dentro de los esperados para giros β de los compuestos *Z*-**57** y **61**. Superposición en base a los átomos pesados del esqueleto peptídico de los residuos Pro5 e His6. Con la excepción del residuo de Pro, solo está representado el esqueleto peptídico. A modo de ejemplo se han elegido uno o dos conformeros representativos.

3.3.2.2. Péptidos con puentes amida.

Los resultados de los estudios de modelización molecular realizados con los péptidos con enlaces amida en el puente y sus precursores lineales fueron similares a los obtenidos para los péptidos con puentes hidrocarbonados y análogos (Tabla 13).

Tabla 13. Porcentajes de algunos parámetros representativos obtenidos en los cálculos teóricos.

	$\phi 5, \psi 5, \phi 6$ (%) ^a	Distancia (%) $\alpha C^4 - \alpha C^7$ $\leq 7 \text{ \AA}$	Cis (%) Teórico	Cis (%) RMN
124	62	72	27	6
125	1	87	18	34
132	72	88	8	28
127	69	81	17	0
134	14	56	19	0

El péptido lineal **124**, al igual que aquellos que presentaban los residuos de alilGly en posiciones 2 y 10, mostró gran flexibilidad conformacional, consistente con la inexistencia de NOEs y enlaces de hidrógeno en los estudios de RMN. Del mismo modo, la distancia entre el C α del residuo *i* (Lys4) y del *i*+3 (Gln7) del giro fue inferior a 7 Å en al menos el 72% de los conforméromos, lo que indica la existencia de un giro β . Si, como se comentó anteriormente, se consideran los ángulos diedros de los residuos centrales de dicho giro, se observa que éstos están dentro de los valores de un giro β ideal ($\pm 30^\circ$) en el 62% de los conforméromos de mínima energía.

En los péptidos cíclicos se encontró de nuevo una elevada flexibilidad conformacional, con una mayor o menor tendencia a estabilizar el giro β . En el caso del péptido **125**, con Pro5, no existen apenas conforméromos que posean valores de los tres ángulos diedros correspondientes a los de un giro β . Sin embargo, la introducción de un residuo de α -MePro en posición 5 (**132**) produjo una estabilización de dicho giro, con un 72% de conforméromos que cumplen estos valores. Todos estos datos están en consonancia con los resultados de RMN, que para el derivado **125** indicaban que no existía ningún enlace de hidrógeno estabilizando la estructura, mientras que en el caso del derivado **132**

mostraban la protección del NH del residuo de Gln7. El enlace de hidrógeno de este NH con el carbonilo de la Lys4, tal y como se refleja en los resultados de modelización molecular, está presente en un 63% de los conformeros.

Si se analizan los resultados de los péptidos cíclicos **127** y **134**, con el puente amida NHCO, se observa que el derivado con Pro5 **127** presentó una estabilización del giro β (Fig.51). Así, un 69% de los conformeros de mínima energía cumplieron los tres primeros ángulos diedros del giro. Además, el 48% de estos conformeros mostró un enlace de hidrógeno entre el NH de la Gln7 y el carbonilo de la Lys4, en concordancia con los estudios de RMN, que indicaban la existencia de protección del disolvente para este NH. Sorprendentemente, la introducción de una α -MePro en posición 5, compuesto **134**, no mejoró la estructura. Por el contrario, el porcentaje de conformeros que presentó valores de los ángulos diedros dentro de los esperados para un giro β disminuyó hasta un 14%, aunque el 56% de las estructuras cumplía el requisito de que la distancia entre el C α del residuo i (Lys4) y del $i+3$ (Gln7) del giro sea inferior a 7 Å. En RMN, esta lactama presentaba el NH de la Gln7 protegido del disolvente, lo que probablemente indica que se encuentra formando parte de un enlace de hidrógeno con el carbonilo de la Lys4, tal y como se observó en el 16% de los conformeros de mínima energía. Por otra parte, los datos de RMN de este mismo derivado también mostraron que el NH del residuo de Gly8 presentaba valores pequeños de $\Delta\delta/\Delta T$. Los resultados de los estudios teóricos indicaron que en el 26% de los conformeros este NH se encuentra formando un enlace de hidrógeno con el carbonilo de la Lys4, generando un giro α . Por otra parte, el 21% presentó un enlace de hidrógeno entre el NH del puente y el carbonilo del residuo de Met1, dato también consistente con los resultados de RMN, que mostraban protección del disolvente para este NH.

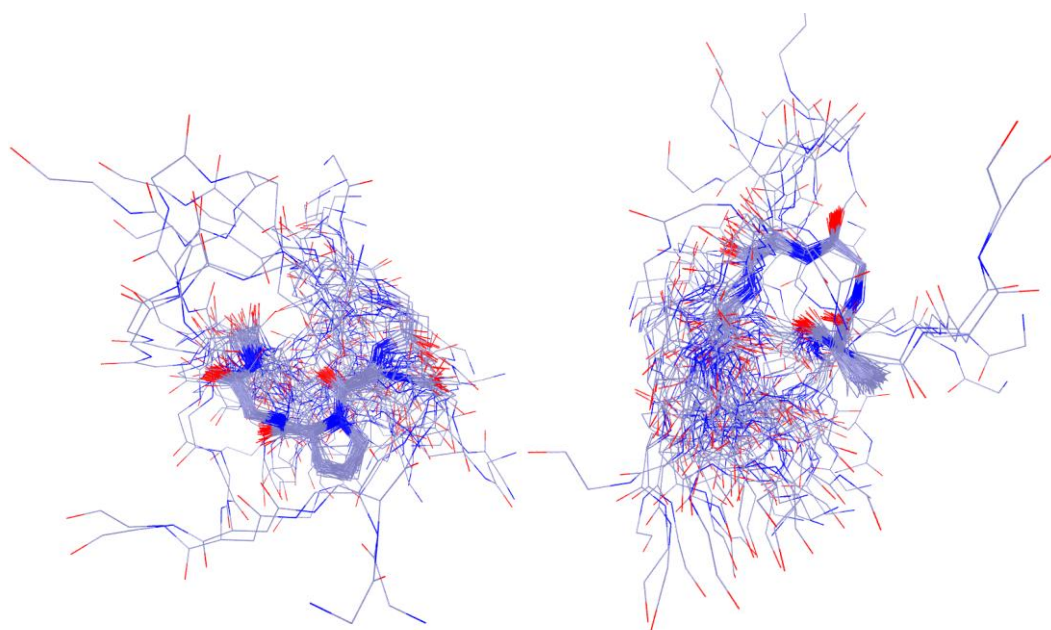


Figura 51. Dos vistas de la superposición de conformeros *trans* cuyos ángulos diedros ϕ_5 , ψ_5 , ϕ_6 están dentro de los esperados para giros β del compuesto **127**. Superposición en base a los átomos pesados del esqueleto peptídico de los residuos Pro5 e His6. Con la excepción del residuo de Pro, solo está representado el esqueleto peptídico.

3.4. ENSAYOS DE AFINIDAD POR EL RECEPTOR Flt-1

Para conocer si los péptidos derivados del fragmento VEGF₈₁₋₉₁ preparados son capaces de unirse al receptor Flt-1 se llevaron a cabo ensayos de afinidad por dicho receptor. Estos ensayos, realizados en la Universidad Paris-Descartes por el grupo de los Prof. Michel Vidal y Nicholas Inguibert, se basaron en la competición de los péptidos en estudio con VEGF biotinilado (bt-VEGF) por la unión al receptor²⁷⁴.

En la Figura 52 se muestran los datos de afinidad obtenidos para todos los péptidos, expresados como porcentaje de inhibición de la interacción de bt-VEGF con el dominio extracelular completo (D1-D7) del receptor Flt-1. Los ensayos se realizaron a una concentración de péptido de 100µM y se compararon con el valor obtenido para el fragmento 81-91 de VEGF (MHIKPHQGQHI) a la misma concentración. Para los péptidos con alilGly o puentes hidrocarbonados **56-119** (Series 1-5), la afinidad fue mejor en el caso de los péptidos lineales (**56, 59, 62 y 65**), a excepción del compuesto con los residuos de alilGly en posiciones (3,9) **68**. De forma general, los compuestos con doble enlace en el puente **57, 60 y 63** presentaron mejores datos de afinidad que sus análogos reducidos **58 y 64**, a excepción del péptido truncado **61**. Por otra parte, el comportamiento de los derivados con la secuencia completa de VEGF (**57-59**) fue muy similar al de los péptidos truncados (**59-64**). El péptido con un puente disulfuro en la estructura, **121**, perdió toda la capacidad inhibitoria presentada por el fragmento natural VEGF₈₁₋₉₁. En el caso de los análogos con puentes amida y sus respectivos precursores lineales (**124-134**), los valores obtenidos para los péptidos cíclicos fueron, en general, mejores que para sus precursores acíclicos, excepto en el caso de los compuestos **133 y 134** que no mostraron ningún tipo de afinidad.

Para los compuestos que presentaron un porcentaje de inhibición igual o superior al del fragmento natural se calculó la CI₅₀ (Tabla 14). Dado que la interacción de VEGF con sus receptores tiene lugar a través de los dominios extracelulares 2 y 3^{55, 275}, con objeto de confirmar que nuestros péptidos se unían a la misma zona del dominio extracelular del receptor que VEGF, con los mejores compuestos se realizaron también ensayos de afinidad utilizando únicamente los dominios 1-3 (D1-D3) del receptor (Tabla 14). Los valores de CI₅₀ obtenidos fueron totalmente comparables a los que se obtuvieron

utilizando el dominio extracelular completo. Por lo tanto, se puede concluir que los péptidos derivados de VEGF₈₁₋₉₁ se unen al receptor Flt-1 en la misma zona en la que interacciona la proteína completa, compitiendo con VEGF en la unión al mismo.

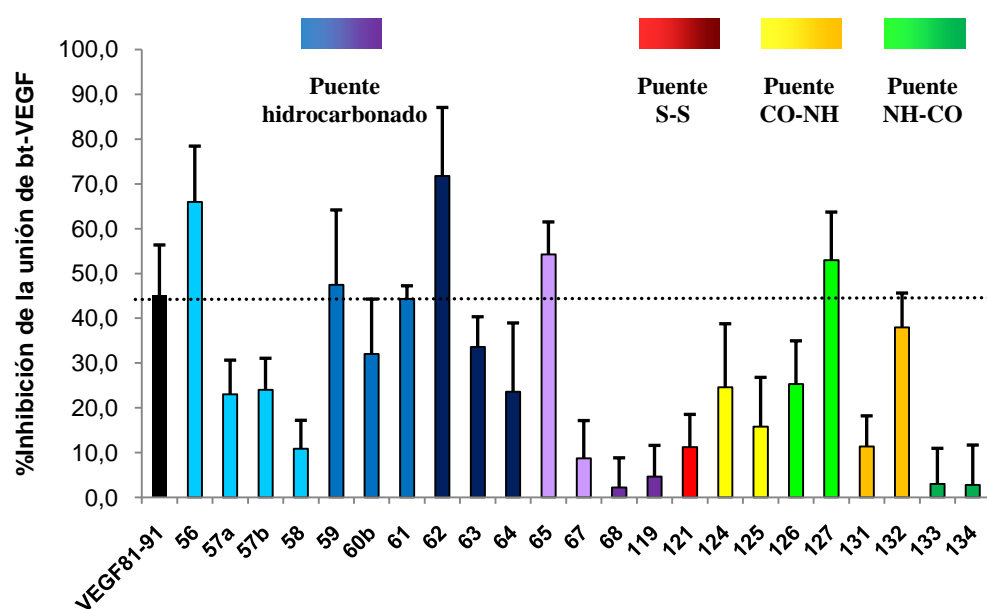


Figura 52. Datos de afinidad de los análogos de VEGF₈₁₋₉₁ por el receptor Flt-1.

Tabla 14. Valores de CI₅₀ para los péptidos con mayor afinidad por el receptor Flt-1.

	VEGF ₈₁₋₉₁	56	59	61	62	65	127
CI ₅₀ D1-D7 Flt-1(μM)	102.7±9.3	61.2±10.1	90.3±8.1	105.5±2.4	42.3±17.1	98.8±8.7	93.2±14.1
CI ₅₀ D1-D3 Flt-1 (μM)	160.0±20.7	61.8±8.3	109.5±13.6	91.6±5.6	36.5±3.2	76.8±12.3	87.6±8.7

Aunque de acuerdo con los estudios conformacionales los péptidos evaluados no presentan estructura de horquilla β, algunos de ellos son capaces de unirse al receptor Flt-1. En este sentido, la afinidad parece estar ligada a la capacidad de estos derivados de adoptar la estructura de giro β del fragmento nativo.

En general, los péptidos lineales con alilGly **56**, **59**, **62** y **65** presentaron más afinidad por el receptor Flt-1 que sus correspondientes análogos cíclicos **57**, **58**, **60**, **61**, **63**, **64** y **67**. Esto parece indicar que la restricción aportada por los puentes hidrocarbonados no permite al péptido estructurarse de manera adecuada para interactuar con el receptor, mientras que los precursores lineales, quizá por su mayor flexibilidad, pueden reestructurarse al interactuar, adquiriendo la conformación adecuada. Además, es posible que en la reorganización de los péptidos lineales se pueda producir algún tipo de interacción estabilizante entre las cadenas laterales de alilGly. Esta posibilidad ya fue sugerida por Vederas y colaboradores para explicar los resultados obtenidos en análogos cíclicos de Leucocin con puente hidrocarbonado, en comparación con los resultados de sus precursores lineales con dos residuos de alilGly en la secuencia ^{252, 276}. En nuestro caso, hay que señalar que los datos de modelización molecular no mostraron ningún tipo de interacción entre las cadenas laterales de los residuos de alilGly.

Como se comentó anteriormente, los cicloalquenos **57a** y **57b** presentaban un segundo giro β , centrado en los residuos de His6-Gln7. Este segundo giro puede contribuir a la pérdida de actividad con respecto al péptido lineal ya que produce un cambio en la dirección de la cadena que impide la formación de la horquilla β . El péptido cíclico **61**, con un residuo menos en la parte del giro, presentó una afinidad que, aunque no muy elevada, era del mismo orden que la de su precursor lineal **59** y un poco mayor que la de su análogo insaturado **60**. El análisis conformacional de este derivado concluyó que presentaba una estructura más rígida debido a la presencia de un enlace de hidrógeno adicional con respecto al resto de análogos. Los datos de modelización molecular permitieron comprobar que para este compuesto no se observaba el segundo giro β (Pro5-Gln8), causante del cambio de dirección de las hebras, y que en el caso de los análogos **57a** y **57b** parece correlacionar con la pérdida de afinidad. En cuanto a la geometría del doble enlace en los derivados **57a** y **57b**, los isómeros *Z* y *E* aislados mostraron unos porcentajes de inhibición muy similares, lo que está en consonancia con los estudios de modelización molecular que no indicaban diferencias conformacionales significativas entre dichos isómeros.

Por otra parte, si comparamos los datos de los péptidos lineales en los que se ha modificado la posición de los residuos de alilGly, **65** y **68**, se observa que la sustitución de las posiciones 3 y 9 (compuesto **68**) da lugar a una pérdida total de la afinidad, debido muy probablemente a que se eliminan dos de los residuos más importantes para la interacción. En el caso de **65** la capacidad de unión al receptor se mantiene por encima de la del fragmento natural, ya que se conservan los residuos que participan en el proceso de reconocimiento. La ciclación de **65** al cicloalcano **67** supone una disminución considerable de la afinidad, posiblemente relacionada con su falta de estructura y la dificultad para fijar el giro de la horquilla β .

En el caso del análogo con puente disulfuro, **121**, que no presentaba el NH de la Gln7 protegido, la afinidad por el receptor Flt-1 es menor que la del péptido correspondiente al fragmento natural y que la de los análogos con puentes hidrocarbonados. Esto puede ser debido a que, a pesar de que el puente disulfuro adopta ángulos diedros adecuados para estabilizar la estructura de horquilla β , la presencia del aminoácido extra (Gly) en la zona del giro dificulta la adopción de la estructura de horquilla y de ahí la pérdida de la afinidad.

Para los derivados con el puente amida se pueden hacer varias observaciones. Los péptidos lineales **124** y **126** presentaron una afinidad similar, lo que parece indicar que la posición del ácido y de la amina libre, correspondientes a los residuos de Asp y Dap, no influye significativamente en la unión al receptor. Sin embargo, su afinidad fue inferior a la mostrada por el péptido nativo, indicando que estas cadenas polares no son la mejor opción en las posiciones 2 y 10 del péptido. En el caso de los derivados cíclicos **125** y **127** el comportamiento fue muy diferente. En **125** (puente CONH), se observa una pérdida de afinidad con respecto a su precursor lineal, debido probablemente a la falta de estructura, tal y como indicaba el análisis conformacional por RMN y la modelización molecular. Por el contrario, en el caso de **127** (puente NHCO), se observa un aumento del porcentaje de inhibición de la unión de VEGF a Flt-1, mejorando incluso la afinidad presentada por el fragmento natural. Esto podría explicarse en base a la mayor estructuración de éste derivado frente a su análogo **125**, tal y como mostraron los estudios conformacionales. De esta manera se confirma que el sentido del enlace amida del puente

es importante tanto para la estructuración del péptido cíclico como para la actividad biológica. Los péptidos lineales **131** y **133**, con un residuo de α -MePro, mostraron menor afinidad que sus análogos con Pro, **124** y **126**, a pesar de tener protegido el NH de la Gln7, estabilizando el giro β . Esto podría ser debido a que la sustitución en el residuo de Pro, reivindicado como importante para la interacción^{24, 277}, esté dificultando la unión al receptor. Si comparamos ahora los análogos cíclicos **125**, **127**, **132** y **134**, el compuesto **132** parece aumentar la afinidad con respecto al análogo de Pro **125**, debido probablemente a una mayor estabilización de la estructura global, tal y como mostraron los datos de RMN y de modelización molecular. Sin embargo, el análogo **134** presentó una pérdida total de afinidad, a pesar de ser el derivado conformacionalmente más restringido de todos los preparados. Los cálculos teóricos realizados para este compuesto indicaron una baja estabilización del giro β , aparentemente importante para la interacción con el receptor Flt-1. Además, los estudios de RMN sugirieron una conformación muy diferente a la de horquilla β deseada.

Por otra parte, aunque está descrita la importancia del residuo de Arg82 en la interacción de VEGF con sus receptores, la mayoría de los derivados peptídicos en los que se ha eliminado este residuo presentaron afinidad por el receptor Flt-1. Estos datos están en consonancia con los resultados reportados recientemente, basados en la estructura cristalina del complejo VEGF-C/KDR_{D2-D3}⁵⁷ y del complejo VEGF-B/Flt-1_{D2}⁵⁸, que no indican que este residuo en particular sea clave en la interacción.

En resumen, a pesar de que la introducción de enlaces covalentes en el fragmento VEGF₈₁₋₉₁ no ha permitido fijar la estructura de horquilla β deseada, se han conseguido algunos péptidos lineales capaces de unirse al receptor Flt-1 con mayor afinidad que el fragmento natural. También se ha descrito un péptido cíclico, **127**, que mejora la afinidad por Flt-1 con respecto al fragmento nativo, indicando que posiblemente se haya estabilizado una conformación preferida por el receptor. Este trabajo ha puesto de manifiesto la dificultad de fijar conformaciones de horquilla β en fragmentos de proteínas naturales, así como la importancia que juega la estructura tridimensional de los péptidos en la interacción con los receptores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:
análogos de los fragmentos VEGF₁₃₋₂₅ y
VAMMIN₁₋₁₃

4. ANÁLOGOS DE LOS FRAGMENTOS VEGF₁₃₋₂₅ Y VAMMIN₁₋₁₃

Este segundo capítulo se centra en el diseño, preparación y estudio de análogos del fragmento 13-25 de VEGF, situado en el extremo N-terminal y que presenta estructura de hélice α . Como se ha comentado en la Introducción, este fragmento constituye también un hot-spot dentro de la proteína, importante para la interacción VEGF/VEGFRs. Adicionalmente, teniendo en cuenta que Vammin, un VEGF aislado de veneno de serpiente, se une específicamente al receptor KDR, se consideró también de interés iniciar la búsqueda de posibles zonas de interacción con dicho receptor, suponiéndole un modo de unión similar al del VEGF.

4.1. PÉPTIDOS LINEALES

En base a los antecedentes comentados previamente y teniendo en cuenta que el fragmento 13-25 de VEGF presenta estructura de hélice α dentro de la proteína, se propuso el diseño de una colección de péptidos, análogos de dicho fragmento, en los que se introdujeron residuos que aumentaban la tendencia a adoptar la estructura de hélice α deseada. De esta manera se podría comprobar si la estructura espacial es determinante de su actividad.

La proteína Vammin fue aislada de un veneno de serpiente por Morita y colaboradores, que lograron establecer cierto patrón de similitudes y diferencias entre esta proteína y el VEGF-A¹⁰. Sin embargo, no prestaron atención a los residuos situados en el extremo N-terminal y que en VEGF-A son determinantes de la interacción con los receptores de VEGF. Un alineamiento de secuencias indicó que los fragmentos VEGF₁₃₋₂₅ y Vammin₁₋₁₃ son homólogos y en rayos X ambos poseen estructura de hélice α dentro de la proteína nativa (Fig. 53). Debido a esta similitud y con objeto de comprobar si la interacción Vammin-KDR tiene lugar a través de los mismos fragmentos que lo hace el VEGF-A, se diseñaron también análogos peptídicos de la secuencia Vammin₁₋₁₃.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
VEGF₁₃₋₂₅	E	V	V	K	F	M	D	V	Y	Q	R	S	Y
Vammin₁₋₁₃	E	V	R	P	F	L	E	V	H	E	R	S	A

Figura 53. Alineamiento de secuencia de los fragmentos de los extremos N-terminales de VEGF-A y Vammin.

El diseño de los péptidos se realizó con la ayuda del programa de predicción AGADIR¹⁵⁸. El porcentaje de helicidad que predice este programa para los fragmentos naturales aislados de la proteína son del 2.5% en el caso de VEGF₁₃₋₂₅ (**138**) y del 0.3% en el caso de Vammin₁₋₁₃ (**139**). En ambos casos, para proteger los péptidos frente a la degradación enzimática y a su vez aumentar su carácter helicoidal, el extremo N-terminal está en forma de acetilo y el C-terminal de amida (Fig.54).

Para la selección de los péptidos a sintetizar, se mantuvieron fijos los residuos de Phe¹⁷, Tyr²¹ y Tyr²⁵, que en el caso de VEGF₁₃₋₂₅, habían sido identificados como importantes para el reconocimiento por el receptor, y los correspondientes residuos homólogos de Vammin₁₋₁₃, Phe⁵, His⁹ y Ala¹³. Para el resto de las posiciones se generaron colecciones virtuales, considerando los 20 aminoácidos proteinogénicos en cada posición, calculando la helicidad en cada caso. La combinación de los residuos que proporcionaron las mejores helicidad en cada posición dio lugar a nuevas colecciones de compuestos de las que se eligieron dos péptidos para cada fragmento, uno que presentó una helicidad intermedia cercana al 30%, **140** y **141**, y otro con una helicidad elevada, en torno al 60%, **142** y **143** (Fig.54).

Análogos del fragmento VEGF₁₃₋₂₅

- 138 (VEGF₁₃₋₂₅):** Ac-EVVKFMDVYQRSY-NH₂ **Helicidad 2.5% Logs -4.9**
- 140:** Ac-EV**Q**K**F**LE**V**Y**Q**R**L**Y-NH₂ **Helicidad 35% Logs -4.9**
- 142:** Ac-EV**Q**K**F**LE**V**Y**L**R**L**Y-NH₂ **Helicidad 65% Logs -5.0**

Análogos del fragmento Vammin₅₋₁₃

- 139 (Vammin₁₋₁₃):** Ac-EVRPFLEVHERSA-NH₂ **Helicidad 0.3% Logs -4.7**
- 141:** Ac-D**V**R**R**F**L**E**A**HER**L**A-NH₂ **Helicidad 30% Logs -4.9**
- 143:** Ac-D**V**R**R**F**L**E**V**H**L**R**L**A-NH₂ **Helicidad 60% Logs -5.0**

Figura 54. Fragmento natural y derivados de VEGF₁₃₋₂₅ y Vammin₁₋₁₃ seleccionados inicialmente. En azul se marcan los residuos modificados con respecto al fragmento natural.

Dado que AGADIR no tiene en cuenta la solubilidad en medio acuoso de los péptidos, los compuestos diseñados presentaron, a la vez que una alta helicidad, un alto porcentaje de residuos apolares lo que provocó baja solubilidad en agua. Por este motivo se decidió diseñar una segunda serie de péptidos en los que se introdujeron residuos que aumentaran la solubilidad, sin comprometer en exceso la helicidad. Para ello, se calcularon los valores de logS mediante el programa ALOGPS 2.1, de libre acceso en la web²⁷⁸⁻²⁸⁰ (Tabla 15). La combinación de este programa con AGADIR permitió el diseño de péptidos con una solubilidad en agua teóricamente más alta que la de los péptidos iniciales (logS > -5), de los cuales se seleccionaron otros cuatro derivados para la síntesis, dos análogos de VEGF₁₃₋₂₅, **144** y **145**, y dos de Vammin₁₋₁₃ **146** y **147** (Fig. 55).

Tabla 15. Equivalencia aproximada entre datos teóricos de logS y solubilidad en agua²⁸¹.

Solubilidad	logS
Óptima	-2 < logS < 0
Buena	-4 < logS < -2
Aceptable	-6 < logS < -4
Baja	-8 < logS < -6
Nula	logS < -8

Análogos del fragmento VEGF₁₃₋₂₅

138 (VEGF₁₃₋₂₅): Ac-EVVKFMDVYQRSY-NH₂ *Helicidad* 2.5% *Logs* -4.9

144: Ac-SSQKFLEVYQRLYN-NH₂ *Helicidad* 27% *Logs* -4.7

145: Ac-SSQKFLEVYLRLYN-NH₂ *Helicidad* 32% *Logs* -4.8

Análogos del fragmento Vammin₅₋₁₃

139 (Vammin₁₋₁₃): Ac-EVRPFLEVHERSA-NH₂ *Helicidad* 0.3% *Logs* -4.7

146: Ac-DLRAFLEQLRSA-NH₂ *Helicidad* 32% *Logs* -4.8

147: Ac-SVRRFLEAHLRLA-NH₂ *Helicidad* 41% *Logs* -4.7

Figura 55. Fragmento natural y derivados de VEGF₁₃₋₂₅ y Vammin₁₋₁₃ diseñados combinando los programas AGADIR y ALOGPS. En azul se marcan las modificaciones con respecto al fragmento natural.

4.1.1. Síntesis

La síntesis de todos los compuestos diseñados se llevó a cabo en fase sólida, utilizando un procedimiento similar al empleado para la obtención de los derivados lineales en el capítulo anterior (apartado 3.2.1.1). Nuevamente, se partió de una resina Rink amida de carga 0.34 mmol/g y como agentes de acoplamiento se utilizaron bien diisopropilcarbodiimida (DIC) o bien HCTU.

Debido a la gran cantidad de residuos apolares introducidos para aumentar la helicidad, la mayoría de los productos finales fueron parcial o totalmente insolubles en agua. Sin embargo, aquellos en los que se tuvo en cuenta en el diseño el valor de logS (**144-147**), la solubilidad resultó mejorada con respecto al resto de los derivados. Así, se purificaron mediante HPLC semipreparativo los compuestos **138**, **139** y **141**, obteniéndose con purezas superiores al 98% y rendimientos del 7, 8 y 30%, respectivamente. El resto de péptidos no se purificaron por HPLC, pero se lavaron repetidas veces con éter etílico para intentar eliminar el mayor número posible de impurezas. De esta manera se obtuvieron crudos con purezas entre el 70 y el 92% (Fig. 56), que se consideraron suficientes para realizar los estudios de análisis conformacional y los primeros ensayos de actividad biológica. Todos estos péptidos se obtuvieron con rendimientos entre el 58 y el 98%.

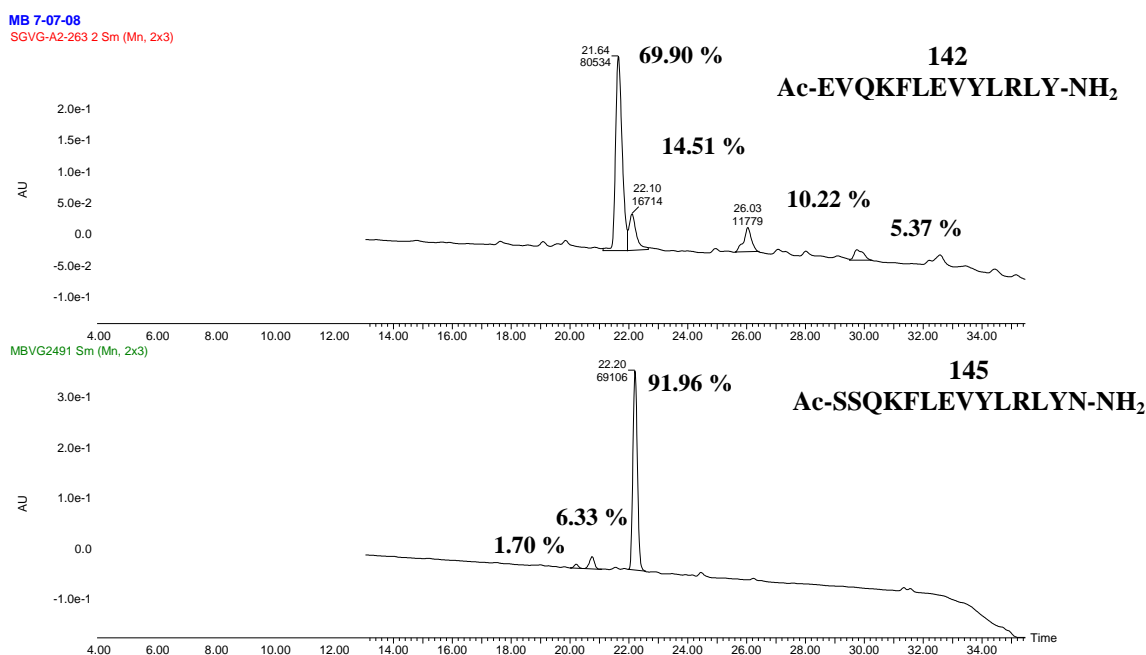


Figura 56. Cromatograma de los compuestos **142** y **145**, no purificados.

4.1.2. Análisis conformacional

Una vez sintetizados los productos se llevó a cabo su análisis conformacional. Para estudiar su tendencia a adoptar estructura de hélice α se realizaron primeramente experimentos de dicroísmo circular, a 5°C en H₂O y en mezclas TFE/H₂O al 30%. Por otra parte, se llevaron a cabo experimentos de RMN en mezclas TFE/D₂O al 30% y en mezclas H₂O/D₂O (9:1) con un 30% de TFE a 25°C. Se analizaron las desviaciones de desplazamiento químico y los NOEs. Adicionalmente, la estructura tridimensional de aquellos péptidos que presentaron numerosas señales de NOE no secuenciales se determinó mediante dinámica molecular restringida.

4.1.2.1. Dicroísmo circular

La actividad óptica de las proteínas es un parámetro de gran utilidad a la hora de determinar su estructura espacial. Así, aunque el enlace peptídico “*per se*” no es una estructura quiral, la interacción entre grupos peptídicos adyacentes dispuestos en determinadas orientaciones determina que las proteínas presenten actividad óptica en la región del ultravioleta lejano donde absorbe el enlace peptídico (180-240nm). Así, cada

elemento de estructura secundaria de las proteínas presenta un perfil de dicroísmo circular característico (Fig. 57)²⁸². Los datos de dicroísmo circular se representan en términos de elipticidad en grados (θ) o en diferencia de absorbancia (ΔA), pero este dato debe normalizarse teniendo en cuenta la concentración de la proteína o el péptido que se está estudiando y el número de unidades repetidas que generan dicha señal, que en el caso de proteínas es el enlace peptídico y por extensión el número de residuos que lo conforman. Así se define la elipticidad molar por residuo que se calcula con la siguiente fórmula:

$$[\theta] = \theta / (10 \cdot l \cdot c \cdot N),$$

donde $[\theta]$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$), θ (mdeg), $l = 0.1 \text{ cm}$, c (M) y N es el número de residuos.

Por tanto, para poder determinar la elipticidad molar por residuo es necesario conocer la concentración exacta del péptido en estudio. Para ello, existen varios métodos, siendo el más común la medida de absorbancia a 280 nm, siempre y cuando el péptido contenga residuos de Tyr o Trp. Con el valor obtenido se aplica la ley de Lambert-Beer en función del número de cromóforos presentes y se determina la concentración exacta²⁸³.

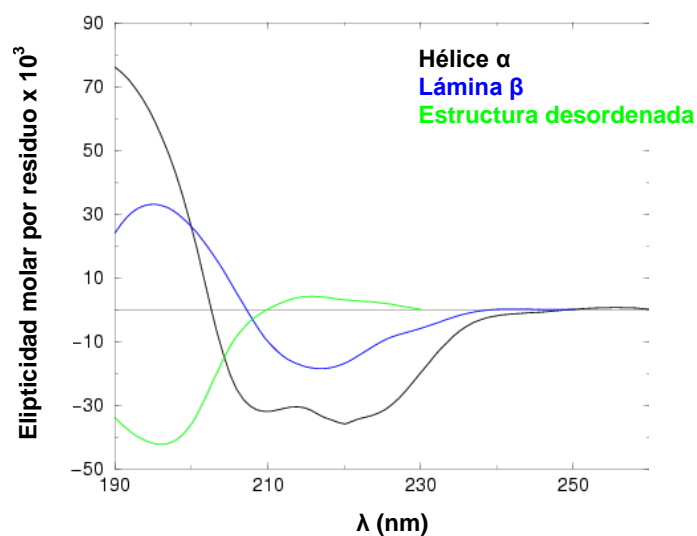


Figura 57. Curvas de dicroísmo circular características de las diferentes estructuras secundarias de péptidos/proteínas.

El perfil de dicroísmo circular de una hélice α viene caracterizado por la presencia de un doble mínimo a 208 y 222 nm y un máximo a 190 nm. El porcentaje relativo de helicidad de un péptido puede ser estimado a través del valor de la elipticidad

molar por residuo a 222 nm, aunque este valor es orientativo en el caso de péptidos pequeños²⁸⁴. Para hacer estos cálculos se ha utilizado la ecuación descrita por Baldwin¹⁵⁴ y modificada por Fairlie²⁸⁴ para calcular el porcentaje de helicidad en péptidos pequeños a partir de la relación $[\theta]_{222}/[\theta]_{\max}$, donde $[\theta]_{\max} = (-44000 + 250T)(1 - k/n)$. El valor de $k = 4$, en nuestro caso ha sido tomado de los estudios de Arora y colaboradores¹⁷², ya que este valor es difícil de definir cuando se trata de péptidos pequeños.

4.1.2.1.1. Análogos de VEGF₁₃₋₂₅

En la Figura 58 se recogen los experimentos de dicroísmo circular para el fragmento VEGF₁₃₋₂₅, **138**, y sus derivados **140**, **142**, **144** y **145**, a 5°C, tanto en disolución acuosa como utilizando una mezcla al 30% de TFE en agua. Ninguno de los péptidos estudiados presentó estructura clara de hélice α cuando se encuentra en disolución acuosa. Sin embargo, cuando a esta disolución se le añade un 30% de TFE el carácter helicoidal aumenta en todos los casos, pudiéndose observar los dos mínimos característicos a 208 y 222 nm y el máximo a 190 nm. Cabe destacar que los primeros péptidos diseñados **140** y **142**, más insolubles en agua, presentaron unos perfiles de dicroísmo en agua peores que los encontrados para los derivados más solubles **144** y **145**, diseñados teniendo en cuenta el valor de logS. Este hecho podría atribuirse a la escasa solubilidad de los primeros compuestos en las condiciones del ensayo y no a la falta de estructura. Esto viene a confirmar la importancia de considerar el valor de logS a la hora de diseñar péptidos para realizar estudios conformacionales posteriores.

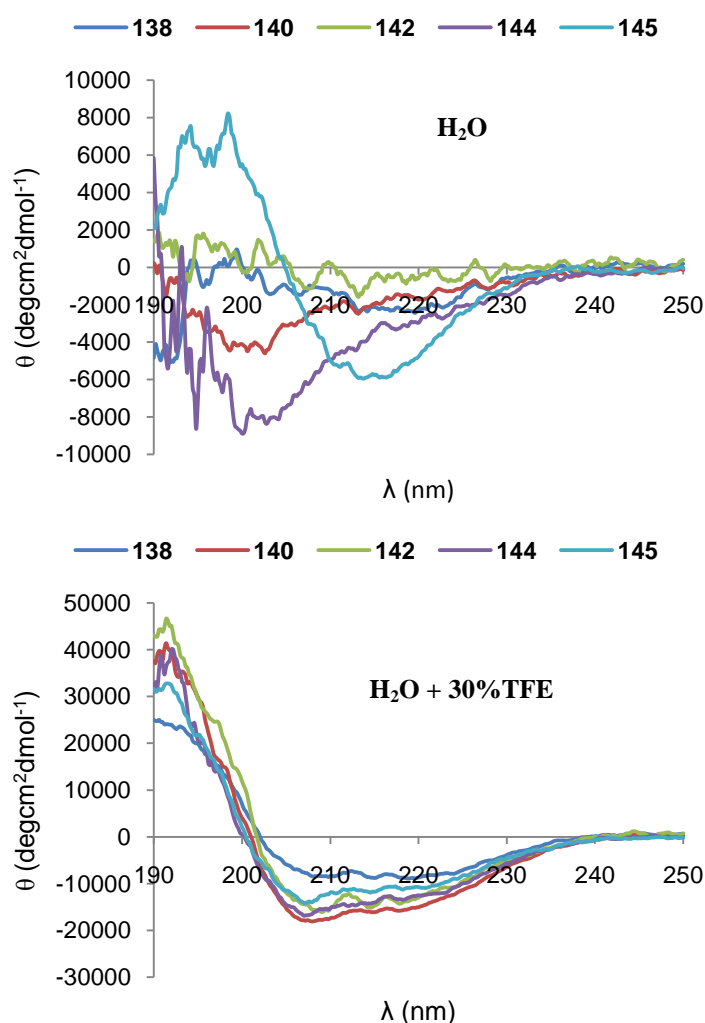


Figura 58. Curvas de dicroísmo circular para los derivados del fragmento VEGF₁₃₋₂₅, en agua (gráfico superior) y en una mezcla al 30% de TFE en agua (gráfico inferior).

Con los datos de elipticidad molar obtenidos a 222 nm, aplicando la ecuación correspondiente, se estimaron los porcentajes de helicidad para cada uno de los péptidos (Tabla 16). Hay que tener en cuenta que para péptidos pequeños este porcentaje es orientativo. Como se puede observar, los porcentajes de helicidad teórica calculados con AGADIR fueron diferentes a los porcentajes en disolución acuosa, probablemente debido a la baja solubilidad de los péptidos. De hecho, los péptidos más solubles, **144** y **145**, mostraron mejor helicidad en agua que sus análogos **140** y **142**, mucho más insolubles.

Cuando la medida se realizó en presencia de TFE, los porcentajes de helicidad aumentaron, gracias a la capacidad de este disolvente para favorecer estructuras de hélice α . Tampoco en este caso se observó una total correlación entre los valores predichos y los calculados experimentalmente, aunque ésta fue notoriamente mejor. El valor que presentó mayor desviación fue nuevamente el del compuesto con mayor helicidad teórica, **142**, que también es el más insoluble.

Tabla 16. Datos de helicidad teóricos calculados con AGADIR y experimentales calculados a partir de la $[\theta]_{222}$ obtenida de los espectros de DC.

Producto	% Helicidad		
	Teórica (AGADIR)	Experimental (H ₂ O)	Experimental (H ₂ O + 30% TFE)
138	2.5	6.8	27
140	35	4.1	46
142	65	0.4	39
144	27	8.3	40
145	32	12.0	35

4.1.2.1.2. Análogos de Vammin₁₋₁₃.

Del mismo modo que con los derivados de VEGF₁₃₋₂₅, se realizaron experimentos de dicroísmo circular con los derivados de Vammin₁₋₁₃, tanto en disolución acuosa como en una mezcla al 30% de TFE en agua (Fig. 49). Todos los derivados estudiados presentaron un perfil característico de péptidos desestructurados en disolución acuosa. En presencia de un 30% de TFE, el carácter helicoidal de todos estos compuestos aumentó, pudiéndose observar claramente la estructura de hélice α en todos los casos.

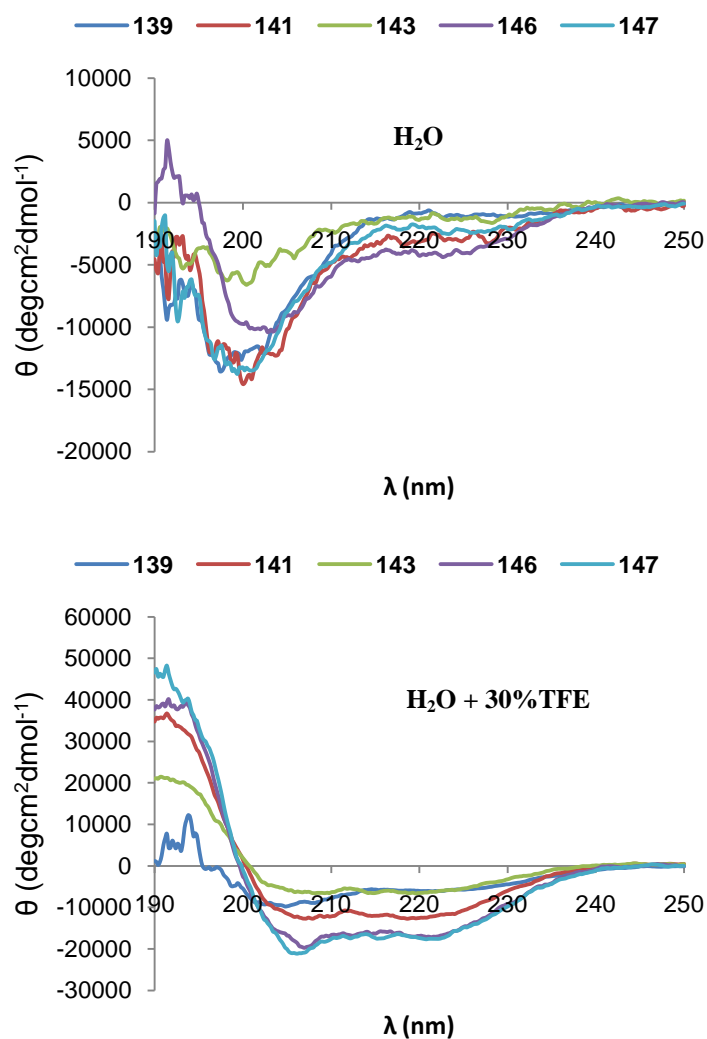


Figura 59. Curvas de dicroísmo circular para los derivados del fragmento Vammin₁₋₁₃, en agua (gráfico superior) y en una mezcla al 30% de TFE en agua (gráfico inferior).

Del mismo modo que para los derivados del fragmento de VEGF, se calculó la helicidad a partir de la elipticidad molar por residuo obtenida a 222 nm (Tabla 17). Debido posiblemente a la baja solubilidad de los compuestos en agua, los valores obtenidos experimentalmente no se parecen demasiado, ni en valor ni en orden, a los porcentajes teóricos calculados con AGADIR. Además, en estos compuestos hay que tener en cuenta la ausencia en la secuencia de residuos con un coeficiente de extinción significativo como la Tyr o Trp, lo que pudo producir errores en los cálculos de

concentración y por lo tanto en el cálculo de la helicidad a partir de los datos de dicroísmo. En presencia de TFE se observan, en general, valores de helicidad superiores a los teóricos, excepto para el compuesto **143**, nuevamente el péptido menos soluble.

Tabla 17. Datos de helicidad teóricos calculados con AGADIR y experimentales calculados a partir de la $[\theta]_{222}$ obtenida de los espectros de DC.

Producto	% Helicidad		
	Teórica (AGADIR)	Experimental (H ₂ O)	Experimental (H ₂ O + 30% TFE)
139	0.3	3.2	21
141	30	8.7	43
143	60	3.3	23
146	32	13.8	57
147	41	7.1	59

4.1.2.2. RMN

4.1.2.2.1. Análogos de VEGF₁₃₋₂₅

Tal y como se explicó más extensamente en el apartado 3.3, los datos obtenidos en los experimentos de RMN proporcionan información acerca de la estructura conformacional de los péptidos estudiados. Entre otros, uno de los parámetros que aporta este tipo de información es la desviación de desplazamiento químico (apartado 3.3.1.1). Era de esperar que, por los resultados obtenidos en los experimentos de dicroísmo circular utilizando mezclas de H₂O/TFE como disolvente, los perfiles estructurales correspondieran a los de una hélice α .

Para considerar que un péptido presenta estructura de hélice α , los valores de desplazamiento químico de los H α deben ser < -0.1 ppm y los de C α > 0.5 ppm (Fig. 60). Los datos obtenidos para todos los compuestos de esta serie confirmaron la existencia de estructura helicoidal en disolución acuosa al 30% de TFE, como también habían indicado los experimentos de dicroísmo circular. Todos los péptidos mostraron un comportamiento similar, aumentando el carácter helicoidal en la zona central de la secuencia mientras que éste fue menos acusado en los extremos. El péptido **142**, para el que el programa

AGADIR predecía una helicidad del 65%, presentó unos valores de desviación de desplazamiento químico más elevados en el extremo N-terminal que en el resto de los análogos, lo que sería indicativo de una mayor helicidad.

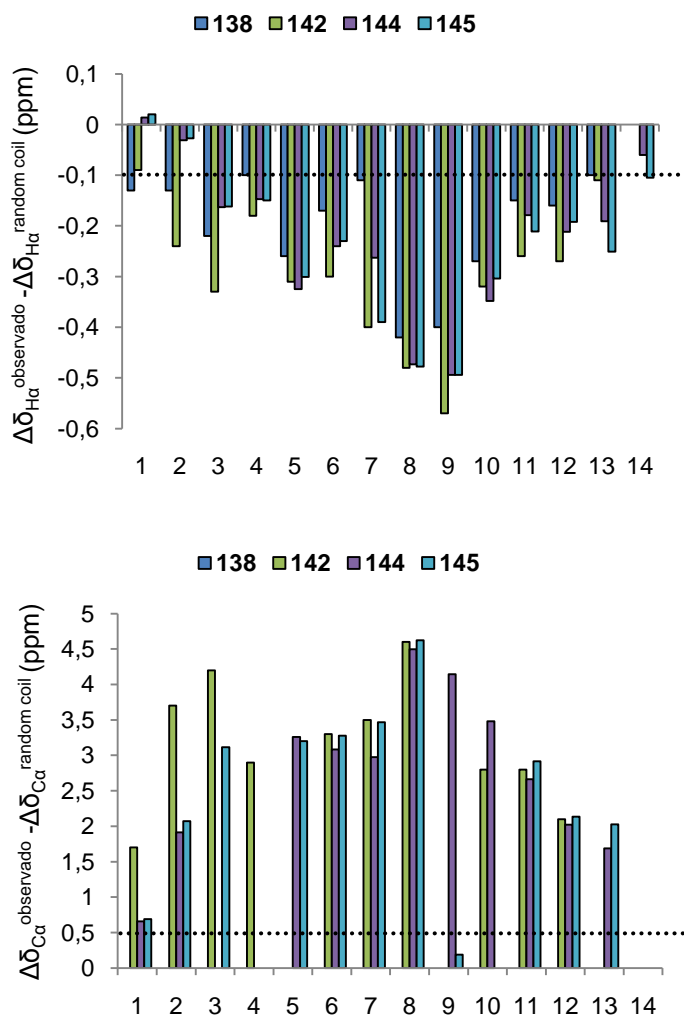


Figura 60. Desviación de los desplazamientos químicos de los péptidos derivados del fragmento VEGF₁₃₋₂₅. En los casos en que no se ha podido asignar inequívocamente la señal en los espectros de RMN no se ha calculado el valor correspondiente.

Otro de los parámetros de RMN que nos puede dar información acerca de la estructura de un péptido es el efecto NOE, que como ya se comentó en el apartado 3.3.1.3 del capítulo anterior, puede proporcionar información acerca de la distancia entre

protones de la secuencia. Las señales de NOEs secuenciales permiten asignar los aminoácidos consecutivos en la secuencia, siendo característico de las hélices α una mayor intensidad en las señales de tipo $d_{NN(i, i+1)}$ que en las de tipo $d_{aN(i, i+1)}$, donde $d_{NN(i, i+1)}$ es la distancia que separa los protones NH de residuos situados en posiciones i e $i+1$ (Fig.47, apartado 3.3.1.3). Por otra parte, los NOEs no secuenciales dan una idea de la disposición de los residuos en el espacio. En el caso de hélices α los más comunes son $d_{aN(i, i+3)}$, $d_{aN(i, i+4)}$ y $d_{a\beta(i, i+3)}$. La forma típica de representar los NOEs secuenciales y de medio alcance (no secuenciales hasta $(i, i+4)$) es en función de la secuencia peptídica, mediante el denominado resumen de NOEs. En la Figura 61 se muestra el resumen de NOEs para los cuatro péptidos derivados del fragmento VEGF₁₃₋₂₅ estudiados. Si se observan las señales de NOEs características de hélice α ($d_{aN(i, i+3)}$, $d_{aN(i, i+4)}$, $d_{a\beta(i, i+3)}$) para los cuatro compuestos de esta serie se puede extraer la conclusión de que el péptido **142** es el que presenta más señales de este tipo. Este compuesto muestra estructura de hélice a lo largo de toda la secuencia, tal y como indicaban los datos de desviación de desplazamiento químico. Es de señalar que **142** se corresponde al compuesto con una helicidad teórica más alta, 65%. El resto de análogos presentó un patrón de NOEs no secuenciales diferente, con menos señales en general. El número de NOEs no secuenciales observados sigue el orden **145** > **138** > **144**, indicando que para los péptidos diseñados con AGADIR (**142**, **144**, **145**), un mayor número de estas señales se correlaciona con una mayor helicidad teórica.

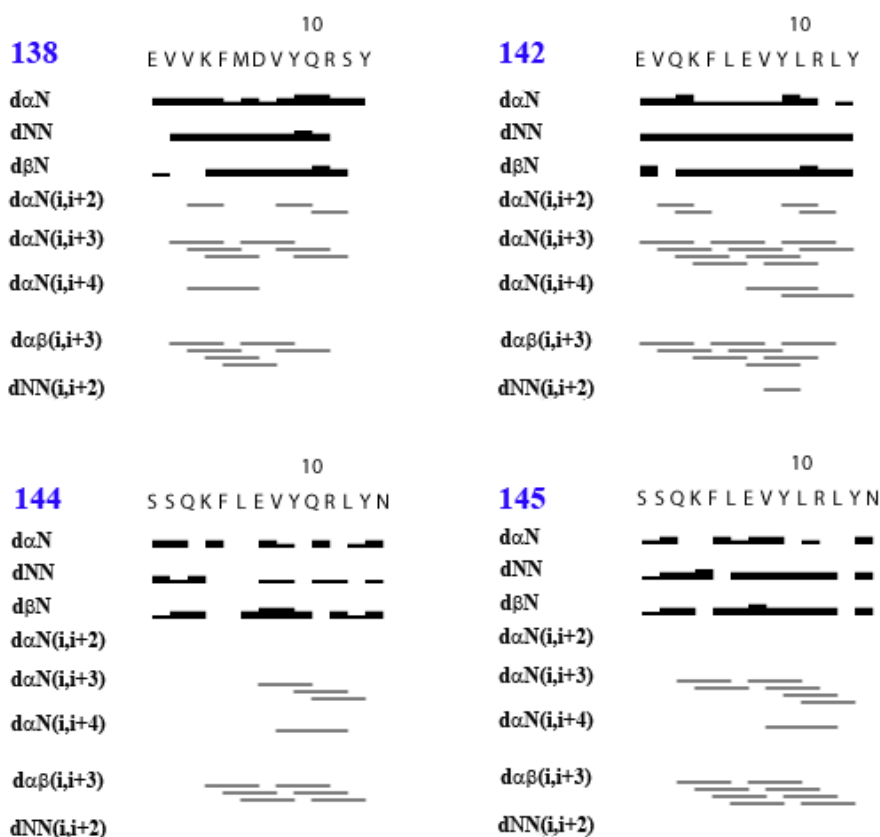


Figura 61. Resumen de NOEs para los péptidos derivados del fragmento VEGF₁₃₋₂₅ estudiados. En las señales de NOE secuenciales, el grosor de las líneas refleja la intensidad de las mismas. Aunque no se indica en la Figura, los extremos N- y C-terminales se encuentran en forma de acetilo y amida respectivamente.

Una vez asignadas las señales de NOE, éstas se pueden utilizar para realizar cálculos de dinámica molecular restringida que permitan visualizar la estructura de los péptidos estudiados. Este cálculo consiste en encontrar el conjunto de estructuras cuyas coordenadas atómicas satisfagan todas las restricciones experimentales de distancia, angulares y de orientación proporcionadas por los parámetros de RMN. Los parámetros de restricción utilizados en la práctica son generalmente las cotas superiores de las distancias interatómicas, derivadas a partir de la intensidad de los NOEs. Así, a partir de las intensidades de los picos de correlación NOE entre protones, asignados en el espectro

NOESY, se obtienen las restricciones de distancia que los separa. Estas restricciones pueden asignarse de forma cualitativa o cuantitativa.

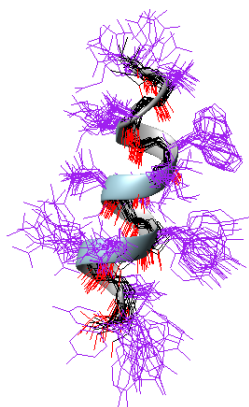
- *Asignación cualitativa:* La intensidad de las señales de NOE se clasifica cualitativamente como fuerte, media o débil mediante inspección visual de los espectros, lo que se traduce en cotas superiores para las distancias entre protones de $<3.0\text{\AA}$, $<4.0\text{\AA}$ y $<5.0\text{\AA}$, respectivamente.
- *Asignación cuantitativa:* Se integran los picos de correlación NOE del espectro NOESY y las intensidades resultantes se traducen en restricciones de distancia mediante calibración con señales de NOE observadas entre protones situados a distancias conocidas.

Una vez obtenidas las restricciones de distancia de forma cuantitativa, se utilizó el programa CYANA, para obtener las estructuras del péptido que cumplen dichas distancias. Se incluyeron también restricciones de los ángulos diedros ϕ y ψ derivados a partir de los desplazamientos químicos de $H\alpha$, $C\alpha$ y $C\beta$ utilizando el programa TALOS²⁷¹. Para que la estructura resultante sea válida, el número y la magnitud de las denominadas violaciones de las restricciones debe ser mínimo (las violaciones de distancia deben ser menores de $0.2\text{-}0.3\text{\AA}$). La existencia de violaciones grandes puede ser síntoma de una asignación errónea de las señales de NOE. Puesto que al final se obtiene un conjunto de estructuras, la estructura calculada por RMN se representa como la superposición de las 20 mejores, entendiéndose como tales aquellas que mejor satisfagan las restricciones experimentales.

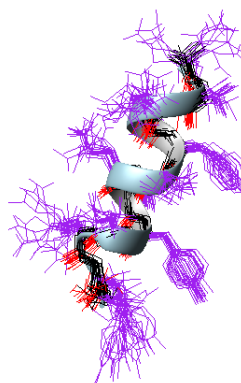
Las estructuras obtenidas para los análogos del fragmento VEGF₁₃₋₂₅ se recogen en la Figura 62. Todos los péptidos presentaron un esqueleto más o menos helicoidal con los grupos carbonilo del enlace peptídico dirigido hacia el extremo C-terminal. La introducción de los dos residuos de Ser en el extremo N-terminal, péptidos **144** y **145**, produce una mayor libertad conformacional en esa zona, desestabilizando el comienzo de la hélice, mientras que la presencia de un residuo de Glu N-terminal, derivados **138** y **142**, favorece la iniciación de la hélice, ya que es uno de los residuos considerados como buen N-cap. Si se atiende a la disposición de las cadenas laterales, se puede observar una variabilidad bastante elevada en la mayoría de los péptidos, a excepción de **142**, en el que

los residuos de Phe5 y Tyr9 poseen una disposición relativamente fija. Este hecho podría ser indicativo de una estabilización adicional de la estructura helicoidal por interacciones aromáticas entre las cadenas laterales de estos residuos. En el resto de estos análogos, también es probable que estas interacciones existan, pero parecen ser menos frecuentes/relevantes a la vista de los resultados del cálculo.

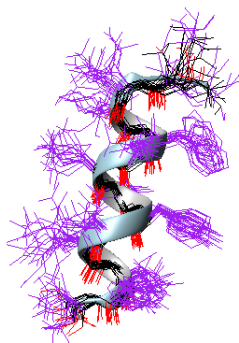
138 Ac-EVVKFMDVYQRSY-NH₂



142 Ac-EVQKFLEVYLRLY-NH₂



144 Ac-SSQKFLEVYQRLYN-NH₂



145 Ac-SSQKFLEVYLRLYN-NH₂

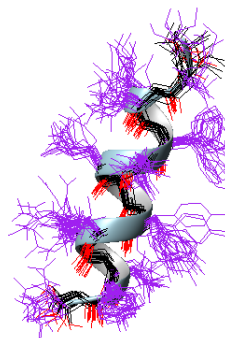


Figura 62. Superposición de las 20 mejores estructuras calculadas por dinámica molecular restringida a partir de los datos de RMN. En negro se representa el esqueleto peptídico, en rojo los carbonilos del enlace peptídico y en violeta las cadenas laterales de los residuos de la secuencia. Los hidrógenos han sido eliminados para facilitar la visualización.

4.1.2.2.2. Análogos de Vammin₁₋₁₃.

En la Figura 63 se representa la desviación de desplazamiento químico, tanto de H α como de C α , para los péptidos derivados del fragmento Vammin₁₋₁₃. La mayoría de los péptidos estudiados cumplen con un perfil claro de hélice α , con excepción del fragmento nativo Vammin₁₋₁₃, **139**. En este último compuesto, los valores de desviación de desplazamiento químico se quedaron en los límites de la ausencia de estructura ($|\Delta\delta_{H\alpha}| < 0.1$ ppm, $|\Delta\delta_{C\alpha}| < 0.5$ ppm). Esto es posiblemente debido a la presencia del residuo de Pro en posición 4, que produce la distorsión de los ángulos ϕ y ψ característicos de la hélice α y no permite la formación del primer enlace de hidrógeno entre el carbonilo del residuo de Glu1 y el NH del residuo en posición 4, que no existe por ser la Pro una amina secundaria. Entre los péptidos diseñados con AGADIR, es **143** el que posee valores más acusados de $\Delta\delta$ indicativos de hélice, especialmente en la parte N-terminal. Nuevamente este péptido es el que posee mayor helicidad teórica.

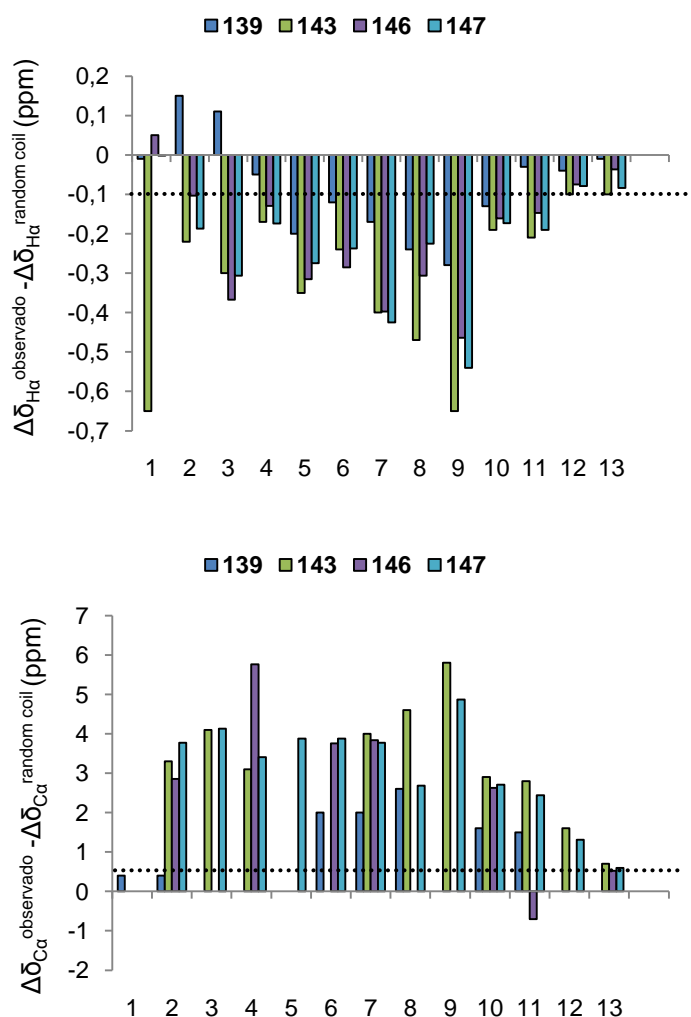


Figura 63. Desviación de desplazamiento químico de los derivados del fragmento Vammin₁₋₁₃. En los casos en que no se ha podido asignar inequívocamente la señal en los espectros de RMN, no se ha calculado el valor correspondiente.

Las señales de NOE encontradas para los péptidos derivados de Vammin se recogen en su resumen de NOEs (Fig.64). En consonancia con los valores de desviación de desplazamiento químico, el péptido **139** vuelve a ser el péptido que menor número de señales de NOE características de hélice α presentó, especialmente hacia el extremo N-terminal. Como ya se ha comentado, este comportamiento se puede atribuir a la presencia del residuo de Pro. De igual manera que ocurría para los péptidos derivados de

VEGF, el compuesto **143**, para el que AGADIR asignaba el mayor porcentaje de helicidad, fue el que mostró el número más alto de señales de NOE características de hélice α .

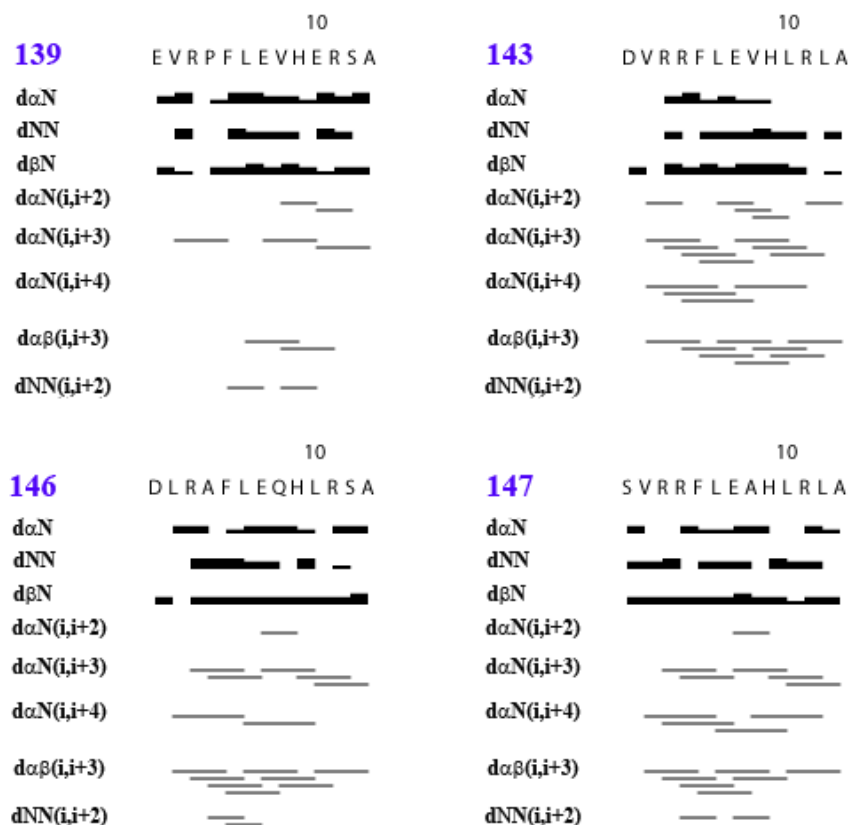


Figura 64. Resumen de NOE para los derivados del fragmento VEGF₁₃₋₂₅ estudiados. En las señales de NOE secuenciales el grosor de las líneas refleja la intensidad de las mismas. Los extremos N- y C-terminal se encuentran protegidos en forma de acetilo y amida respectivamente.

Con el fin de comprobar si existía una relación entre el número de NOEs no secuenciales, característicos de conformación helicoidal, y la helicidad teórica calculada con el programa AGADIR, se realizaron las correspondientes correlaciones (Fig 65). Como se observa en la Figura, la interrelación es buena o muy buena para todos los péptidos diseñados y para el fragmento natural Vammin₁₋₁₃. Sin embargo, en los péptidos derivados de VEGF, esta correlación entre valores calculados y experimentales disminuye notoriamente si se incluyen los datos del fragmento nativo VEGF₁₃₋₂₅. En 30% TFE, el

número de NOEs no secuenciales (13) para este fragmento, **138**, es superior al que sería esperable para su valor teórico de helicidad (<3%). Hay que tener en cuenta que la variabilidad en los desplazamientos químicos entre los distintos péptidos puede hacer que en algunos casos existan señales de NOEs no secuenciales que no se hayan observado debido al solapamiento con otra señales de NOE bien intrarresiduales o bien secuenciales.

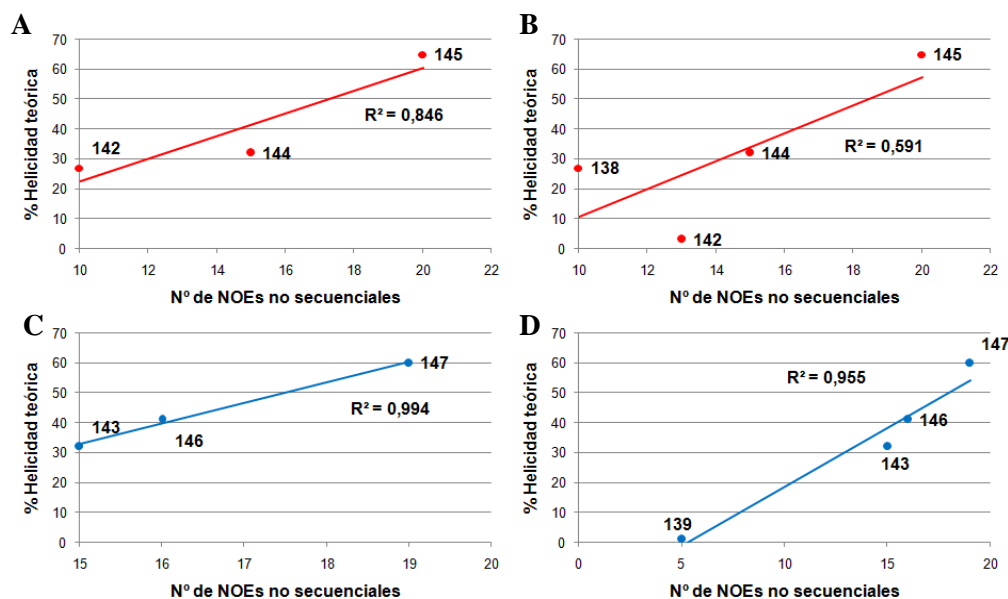


Figura 65. Correlaciones entre n° total de NOEs no secuenciales y helicidades teóricas. **A:** Análogos de VEGF₁₃₋₂₅ diseñados con AGADIR. **B:** Análogos de VEGF₁₃₋₂₅, incluido el fragmento nativo **138**. **C:** Análogos de Vammin₁₋₁₃ diseñados con AGADIR. **D:** Análogos de Vammin₁₋₁₃, incluido el fragmento nativo **139**.

También se realizó una correlación utilizando las helicidades calculadas a partir de los datos de desviación de desplazamiento químico obtenidos en RMN (Fig.66). Para obtener este valor de helicidad se utilizó el valor promedio de los valores de desviación de desplazamiento químico de H α . Se tomó como valor correspondiente al 100% de helicidad -0.39 ppm, valor estimado a partir de estructuras de proteínas conocidas²⁸⁵. De nuevo, la correlación entre estos valores de helicidad experimental y los obtenidos con AGADIR es muy buena para todos los péptidos diseñados, tanto para los análogos de VEGF como de Vammin.

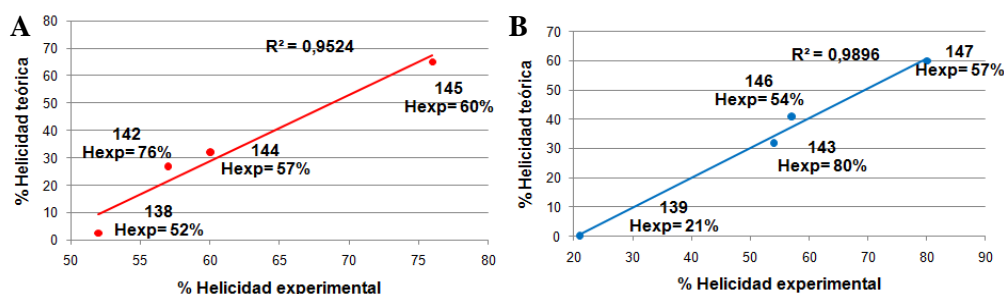
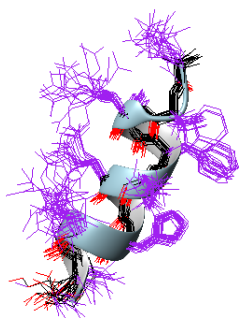


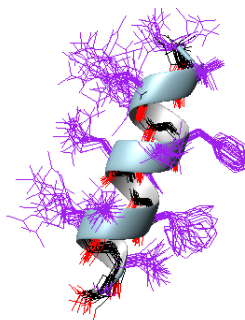
Figura 66. Correlaciones entre la helicidad experimental y la teórica. **A:** Análogos de VEGF₁₃₋₂₅, incluido el fragmento nativo **138**. **B:** Análogos de Vammin₁₋₁₃, incluido el fragmento nativo **139**.

Con las señales de NOE obtenidas para los péptidos derivados de Vammin se calcularon las restricciones de distancia necesarias para llevar a cabo la dinámica molecular restringida utilizando el programa CYANA. Las representaciones obtenidas se recogen en la Figura 67. Como puede observarse, los resultados coinciden con los obtenidos hasta el momento. Todos los esqueletos peptídicos se disponen en conformación helicoidal, a excepción del derivado **139** que presentó una hélice distorsionada en el extremo N-terminal, debido probablemente a la presencia del residuo de Pro en posición 4. Lo mismo ocurre con la flexibilidad de las cadenas laterales, que fue más elevada en el péptido **139** que para el resto de análogos, en los existe menor variabilidad entre conformeros. La disposición de las diferentes cadenas laterales está especialmente conservada en el péptido **146**, probablemente debido a interacciones entre las cadenas laterales aromáticas, como ya se comentó en el caso de los derivados de VEGF.

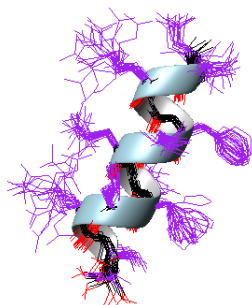
139 Ac-EVRPFLEVHERSA-NH₂



143 Ac-DVRRFLEVHLRLA-NH₂



146 Ac-DLRAFLEQHLRSA-NH₂



147 Ac-SVRRFLEAHLRLA-NH₂

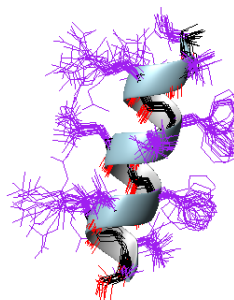


Figura 67. Superposición de las 20 mejores estructuras calculadas a través de dinámica molecular restringida a partir de los datos de RMN. En negro se representa el esqueleto peptídico, en rojo los carbonilos del enlace peptídico y en violeta las cadenas laterales de los residuos de la secuencia. Los hidrógenos han sido eliminados para facilitar la visualización.

4.2. PÉPTIDOS CÍCLICOS DERIVADOS DEL FRAGMENTO VEGF₁₃₋₂₅

De forma paralela a la serie de péptidos anteriormente comentada y con el mismo fin de fijar la estructura de hélice α , se decidió aplicar una estrategia alternativa, consistente en la generación de análogos conformacionalmente restringidos. Para ello, se diseñaron compuestos con un enlace covalente entre las cadenas laterales de dos residuos de la secuencia situados en posiciones ($i, i+4$). Teniendo en cuenta que los residuos postulados como importantes para la interacción VEGF/VEGFRs (Phe¹⁷, Tyr²¹, Tyr²⁵) están situados en la misma cara de la hélice, se decidió insertar el puente en la cara opuesta a estos residuos, y explorar dos posiciones diferentes dentro de la secuencia (Fig. 68). El puente elegido fue el enlace amida, por ser un enlace fácil de generar a partir de aminoácidos naturales, y por haber mostrado buenos resultados en cuanto a fijación de la estructura de hélice según los antecedentes bibliográficos²⁰⁹⁻²²³. Basados en los resultados obtenidos por otro grupo de investigación²²⁹, los aminoácidos elegidos fueron Gluⁱ y Lysⁱ⁺⁴, aunque hay que considerar que los resultados finales en este caso pueden ser diferentes a los descritos, debido a la gran influencia de la secuencia global en la estabilización de este tipo de estructuras. Se eligieron dos posiciones de ciclación para evaluar cual de las dos generaría mayor estabilización de la estructura del péptido. En el primer caso se sustituyeron los residuos de Val3 y Asp7 de VEGF₁₃₋₂₅ por Glu y Lys, respectivamente, dando lugar al péptido lineal **148**, precursor del análogo cíclico **149**. En el segundo caso, se sustituyeron los residuos de Asp7 y Arg11 por los residuos mencionados, generando los péptidos **150** (lineal) y **151** (cíclico) (Fig.68).

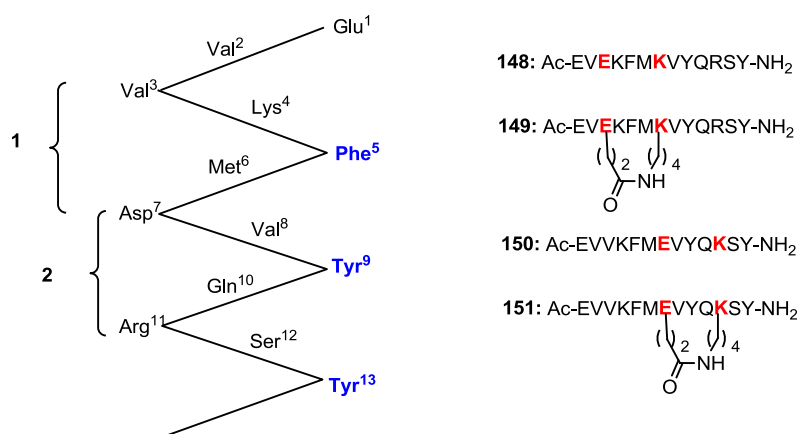
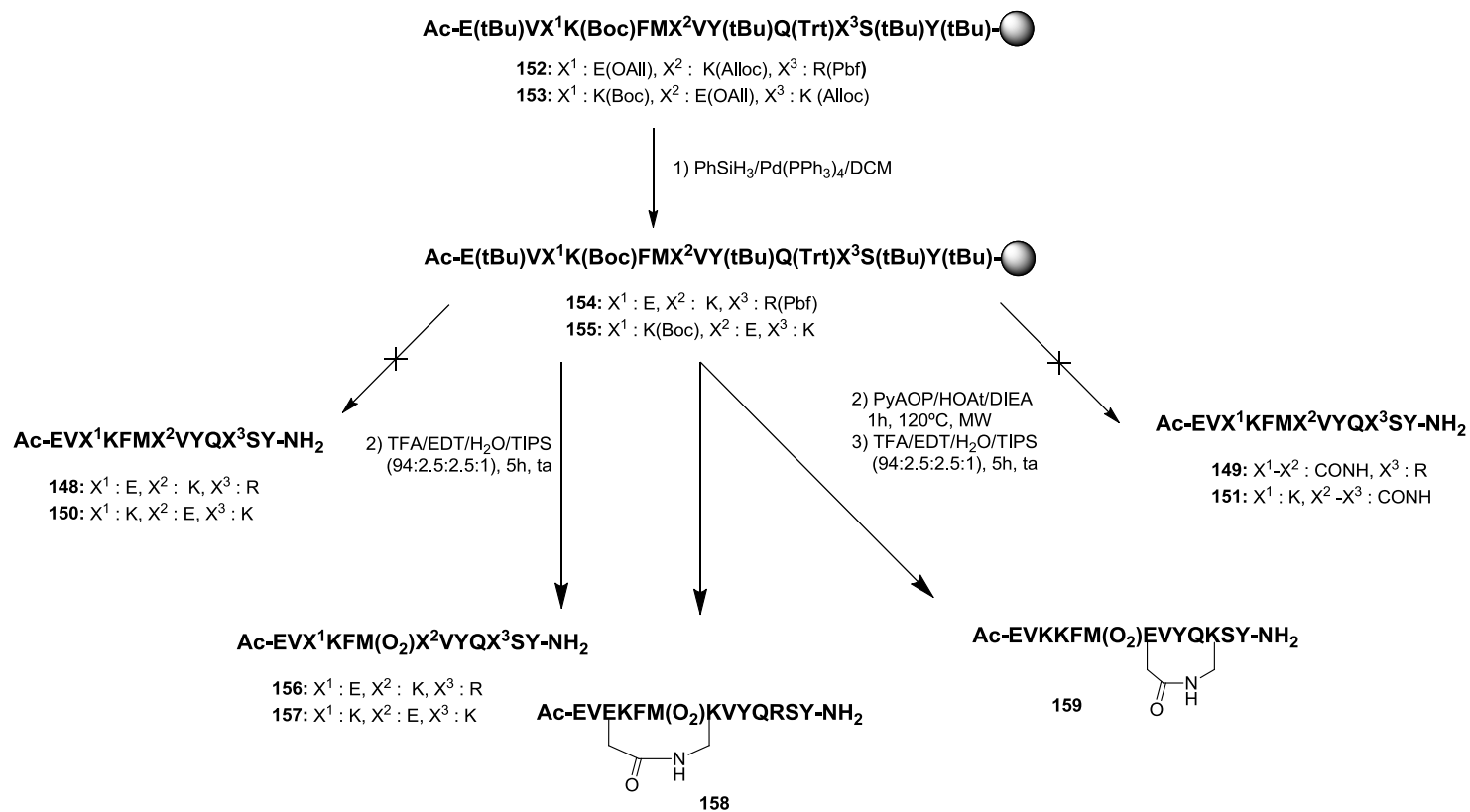


Figura 68. Secuencias de los miméticos del fragmento VEGF₁₃₋₂₅ diseñados. En azul se marcan los residuos importantes para la interacción. Con los números 1 y 2 se indican las dos localizaciones seleccionadas para formar los puentes.

4.2.1. Síntesis

En primer lugar se llevó a cabo la elongación de la cadena peptídica, para obtener las resinas **152** y **153** (Esquema 13), siguiendo los protocolos de síntesis en fase sólida ya descritos. Puesto que se pretendía realizar la reacción de ciclación entre las cadenas laterales de los residuos de Glu y Lys previo al desanclaje, fue necesaria una desprotección ortogonal de los grupos funcionales de las cadenas laterales de estos residuos. Como grupos protectores para estas cadenas se eligieron los grupos alilo y aliloxicarbonilo, respectivamente. Así, para la obtención de las resinas parcialmente desprotegidas **154** y **155** se utilizó PhSiH₃ como dador de hidrógeno y Pd(PPh₃)₄ como catalizador. Una vez desanclados de la resina por el método habitual los productos obtenidos no fueron los esperados **148** y **150**, según se determinó por HPLC-MS, sino los derivados de la oxidación a sulfona de la cadena lateral del residuo de Met **156** y **157**. Estos péptidos lineales finales (Esquema 13) se obtuvieron con rendimientos aceptables y con purzas superiores al 98%, tras purificación por HPLC-semipreparativo.



Esquema 13. Síntesis de los productos 156-159.

Para la lactamización entre los grupos funcionales de las cadenas laterales de los residuos de Glu y Lys se partió de las resinas parcialmente desprotegidas **154** y **155**. Utilizando el mismo razonamiento que para la ciclación a través de enlaces amida en el caso de horquillas β , se decidió utilizar PyAOP como agente acoplante. Además, puesto que el TFE posee un efecto estabilizante de hélices α , y podría facilitar la ciclación al aproximar en el espacio las cadenas laterales a reaccionar, se añadió un 15% de este disolvente en todas las pruebas. A partir de la resina **155** se realizaron varios ensayos, trabajando a temperatura ambiente y utilizando DMF como disolvente (Tabla 18). Todos ellos dieron lugar a crudos de reacción muy sucios no llegándose a encontrar unas condiciones de reacción adecuadas para la ciclación. Finalmente, el uso de calefacción por microondas permitió solventar el problema, obteniéndose crudos de reacción más limpios y como consecuencia mejores resultados en el aislamiento del producto final.

Tabla 18. Ensayos de ciclación de la resina **155**.

Ensayo	Agente acoplante	Disolvente	Temp, t	Ciclación
1	PyAOP/HOAt/DIEA (3.5:3.5:7)	DMF + 15% TFE	t.a., 48h	NO
2	PyAOP/TFFH/HOAt/DIEA (3.0:0.5:3.5:7)	DMF + 15% TFE	t.a., 48h.	NO
3	PyAOP/HOAt/DIEA (10:10:20)	DMF + 15% TFE	t.a., 24h.	NO
4	PyAOP/HOAt/DIEA (10:10:20)	DMF + 15% TFE	t.a., 48h.	NO
5	PyAOP/HOAt/DIEA (10:10:20)	DMF + 15% TFE	t.a., 24h+24h	NO
6	PyAOP/HOAt/DIEA (10:10:20)	DCE + 15% TFE	120°C(MW), 1h	SI (60%)

Al igual que ocurría con los compuestos lineales, el producto buscado **151** no se aisló, obteniéndose en su lugar el compuesto **159**, que también contiene la cadena lateral del residuo de Met oxidada a sulfona. Para la síntesis de **149** se aplicaron las condiciones que mejores resultados dieron en la obtención de **159**, controlando el fin de la reacción en ambos casos por HPLC (Fig. 69). De nuevo, el péptido buscado no se obtuvo, aislando en su lugar el derivado con Met(O₂), **158**. Como se observa en los cromatogramas, el

compuesto **159** se formó con menos subproductos que el análogo **158**. Después de purificar los crudos mediante HPLC-semipreparativo, los péptidos cíclicos **158** y **159** se obtuvieron con elevada pureza y rendimientos del 1 y 2%, respectivamente.

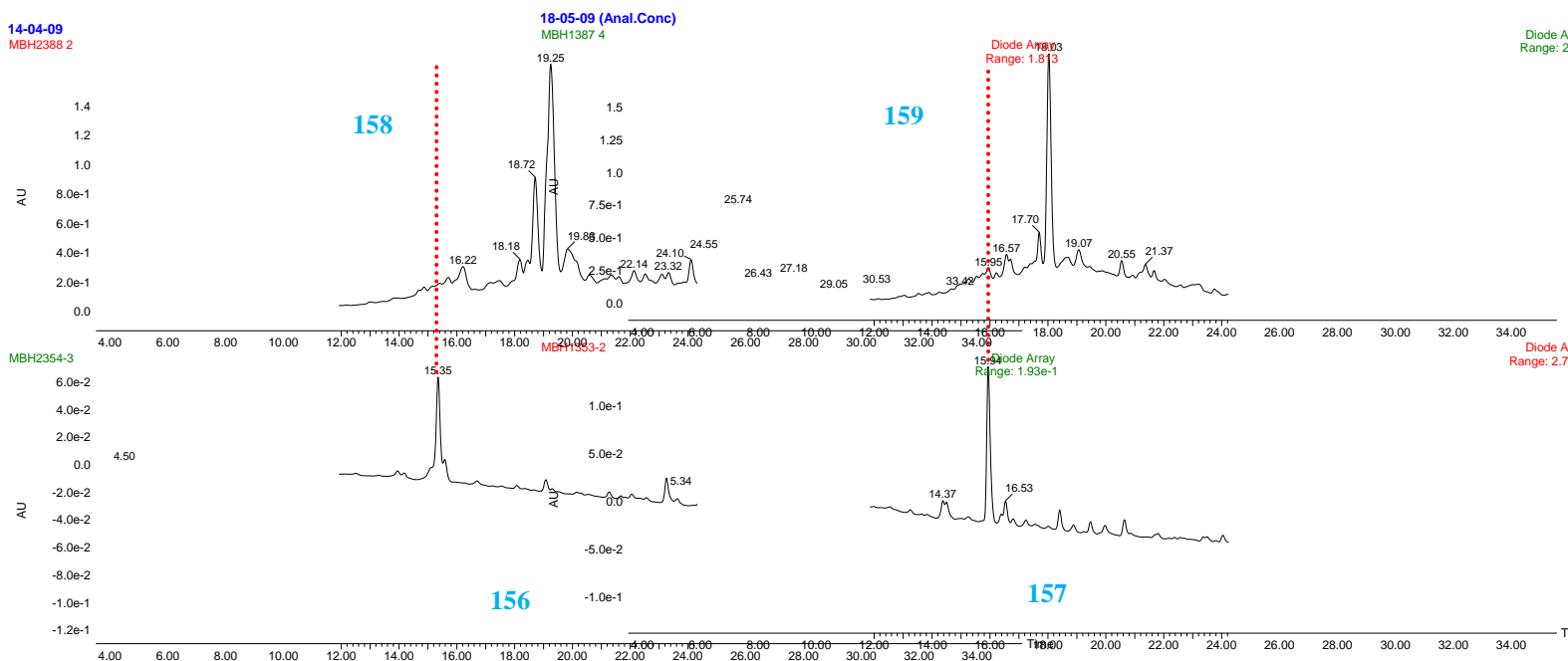


Figura 69. Cromatogramas de HPLC utilizados para el seguimiento de las reacciones de ciclación. La línea roja marca el producto de partida.

4.2.2. Análisis conformacional

4.2.2.1. Dicroísmo circular.

Todos los péptidos sintetizados tanto lineales como cíclicos, **156-159**, se sometieron a un análisis de dicroísmo circular en disolución acuosa y en una disolución al 30% de TFE en agua (Fig. 70). Si se observan los datos obtenidos para los derivados estudiados en disolución acuosa, los compuestos lineales **156** y **157** parecen no presentar estructura. Sin embargo, en el caso de los péptidos cíclicos, tanto **158** como **159** presentaron un perfil característico, aunque no muy acusado, de hélice α , siendo más marcado el del compuesto **158**. Al añadir TFE como inductor de hélices se observa un perfil definido de hélice α para todos los productos estudiados. A la vista de los

resultados, cabe destacar que la posición de la restricción es importante, generándose una estructura más estable cuando el enlace covalente se encuentra situado más próximo al extremo N-terminal. Este comportamiento es similar al observado por otros autores en secuencias totalmente diferentes²²⁹. A modo de conclusión, se puede indicar que la estrategia de ciclación ($i, i+4$) aplicada ha permitido aumentar la helicidad en agua de estos péptidos (del 2.5 al 23% en el caso de la pareja **156-158**) (Tabla 19).

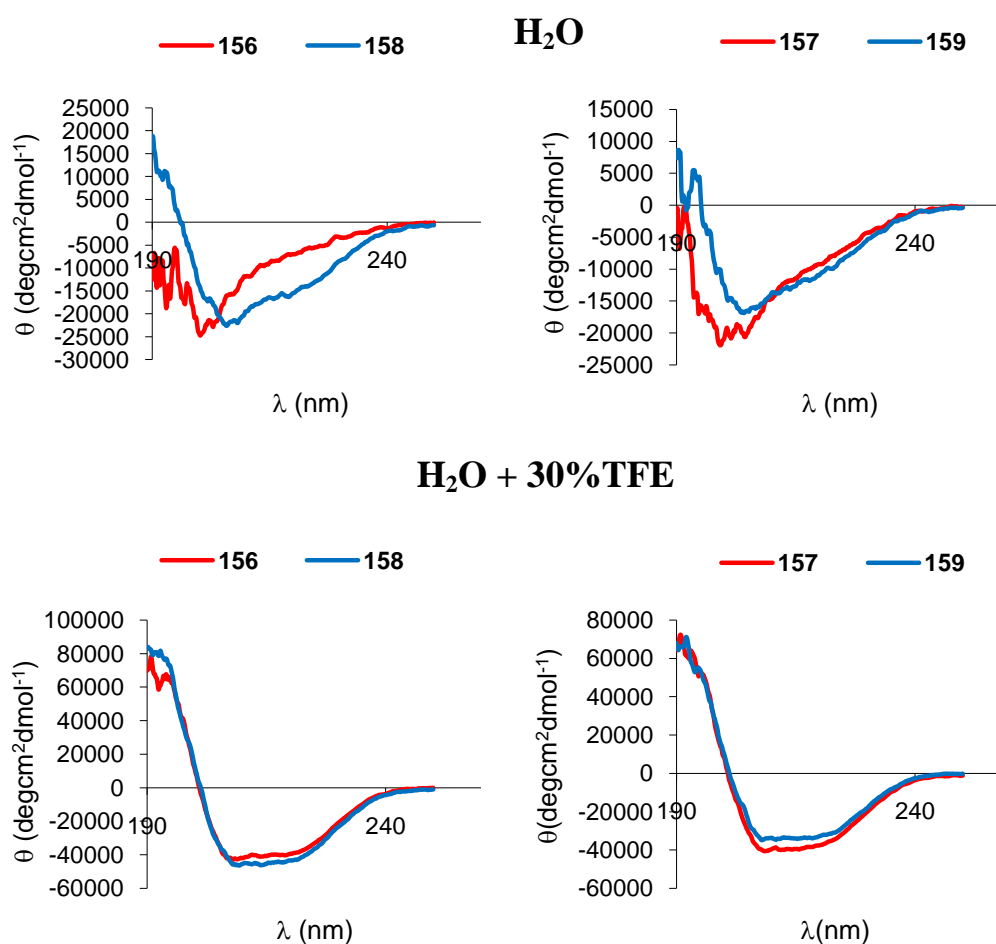


Figura 70. Espectros de dicroísmo circular para los derivados del fragmento de VEGF₁₃₋₂₅ estabilizados mediante un enlace covalente (**158-159**) y sus correspondientes análogos lineales (**156-157**). En la parte superior, espectros en disolución acuosa, en la parte inferior, espectros en disolución al 30% de TFE.

Tabla 19. Datos de helicidad experimentales calculados a partir de la $[\theta]_{222}$ obtenida de los espectros de DC.

Producto	% Helicidad	
	Experimental (H ₂ O)	Experimental (H ₂ O + 30% TFE)
156	2.5	72
158	23	56
157	3.2	68
159	15	42

Para comprobar la cantidad de TFE necesaria para obtener el mayor % de helicidad tanto en los derivados cíclicos como en los lineales, se realizó un estudio añadiendo cantidades progresivas de TFE. Para estos estudios se eligieron los compuestos **156** y **158**, por ser los que presentaron mayor porcentaje de helicidad en agua. En la Figura 71 se recogen los espectros de dicroísmo circular registrados para el péptido lineal **156** y su ciclo derivado **158**. En el caso del compuesto lineal **156** el perfil que determina el carácter helicoidal de una molécula comienza a aparecer cuando se le añade un 15% de TFE, mientras que el derivado cíclico **158**, como ya se había indicado, muestra un cierto carácter helicoidal en ausencia de TFE (22%). Al introducir una restricción conformacional, como un enlace covalente entre las cadenas laterales de aminoácidos en posiciones ($i, i+4$), se ha conseguido aumentar, por tanto, el carácter helicoidal en ausencia del disolvente inductor.

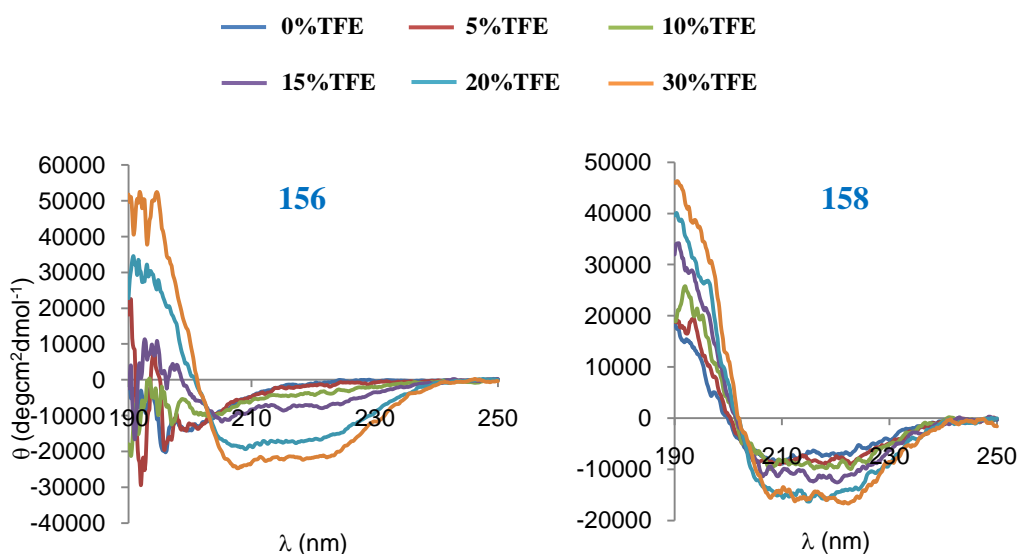


Figura 71. Espectros de dicroísmo circular para los derivados del fragmento de VEGF₁₃₋₂₅ **156** y **158**, utilizando cantidades crecientes de TFE.

Con los datos de elipticidad molar por residuo a 222 nm se calculó la helicidad de ambos péptidos en las distintas disoluciones (Fig.72). Como se había observado en los espectros de dicroísmo circular, el carácter helicoidal de los dos péptidos aumenta al aumentar la cantidad de TFE utilizada. En el caso del péptido lineal (**156**) el aumento es sigmoideo con un punto de inflexión alrededor del 15% de TFE, indicativo del cambio de péptido no estructurado a péptido con cierto carácter helicoidal. Sin embargo, el péptido cíclico (**158**) presenta un aumento de la helicidad más lineal pero menos acusado que **156**. Probablemente, la restricción conformacional que se ha introducido en el compuesto cíclico **158**, y que le confiere mayor helicidad en ausencia de TFE, también le aporta cierto grado de penalización que no permite a este péptido aumentar la helicidad de la misma manera que el péptido lineal, más flexible.

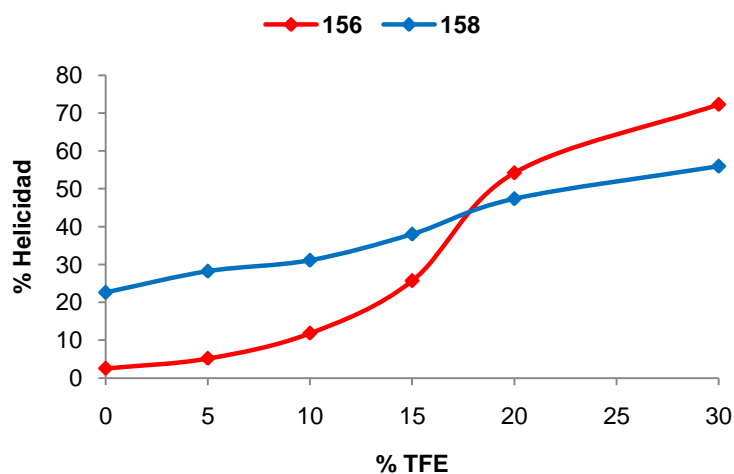


Figura 72. Helicidad calculada a partir de la elipticidad molar por residuo de los derivados **156** y **158** en disolución acuosa utilizando cantidades crecientes de TFE como inductor de helicidad.

4.2.2.2. RMN

Como se ha hecho hasta ahora con el resto de los derivados peptídicos, los espectros de RMN de los péptidos cíclicos **158** y **159** se realizaron en disolución acuosa al 30% de TFE. Primeramente, tras la asignación de las señales, se llevó a cabo el cálculo de la desviación de los desplazamientos químicos de H α y C α (Fig.73). Como se puede observar en la Figura, ambos compuestos presentaron el perfil típico de una hélice α , en consonancia con los datos previos de dicroísmo circular. Al contrario que en DC, los valores de desviación de desplazamiento químico parecen indicar una mejor estructuración de **159** en comparación con **158**, al menos para los residuos que se extienden desde el centro del fragmento hacia el extremo C-terminal.

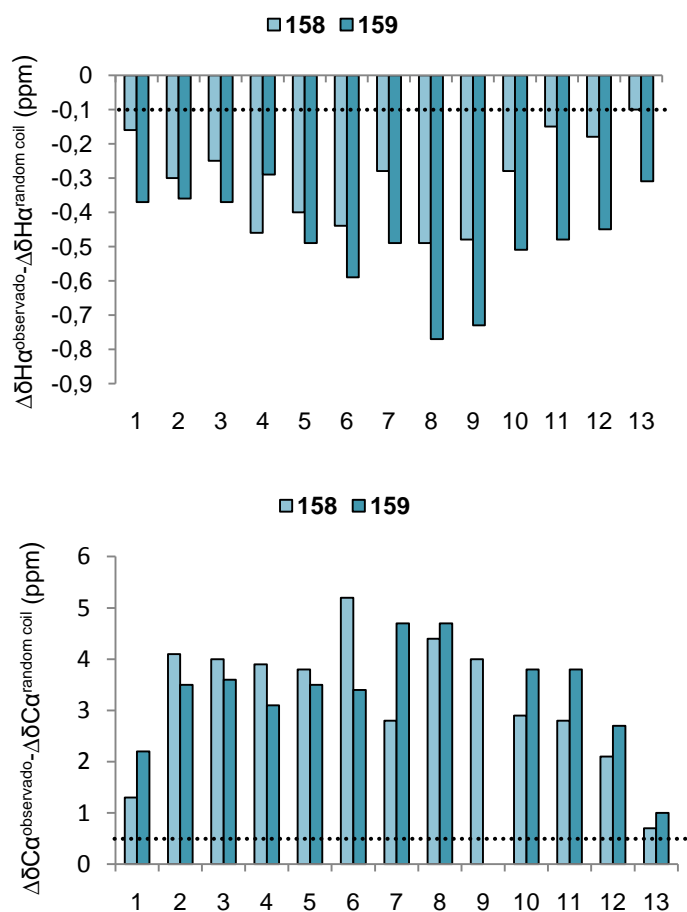


Figura 73. Desviación de desplazamiento químico de los derivados **158** y **159**. En los casos que no se ha podido asignar la señal correspondiente en los espectros de RMN, no se ha calculado el valor correspondiente.

Con las señales de NOE encontradas para los péptidos **158** y **159** se realizaron los respectivos resúmenes de NOE (Fig. 74). Ambas representaciones corresponden claramente a estructuras helicoidales, lo que vendría a ratificar todos los datos presentados hasta ahora, en cuanto al comportamiento de estos derivados en disolución acuosa al 30% de TFE en agua.

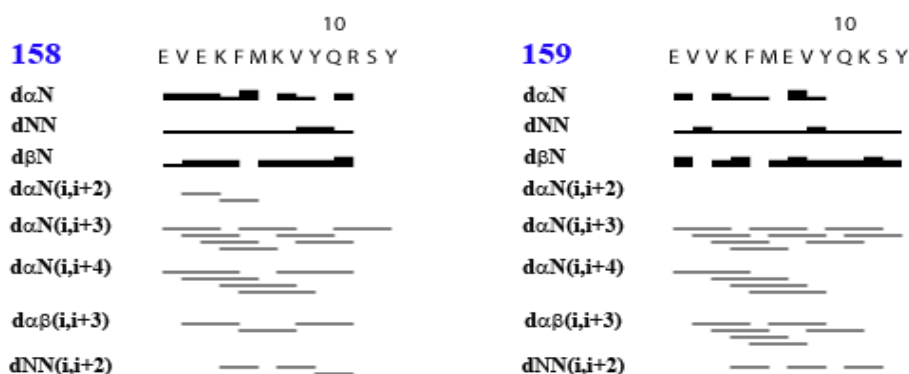
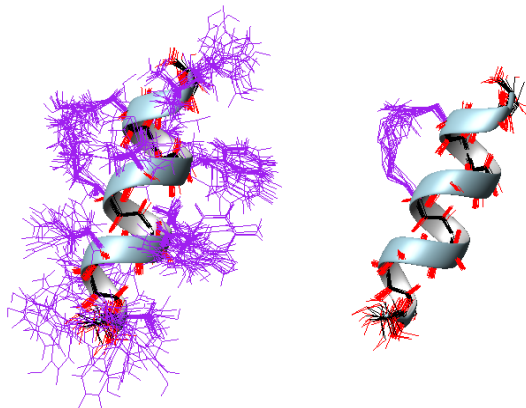


Figura 74. Resumen de NOE para los péptidos derivados del fragmento VEGF₁₃₋₂₅ **158** y **159**. En las señales de NOE no secuenciales el grosor de las líneas refleja la intensidad de las mismas. Los extremos N- y C-terminal se encuentran en forma de acetilo y amida, respectivamente.

Para llevar a cabo las dinámicas moleculares restringidas se utilizaron todas las señales de NOE obtenidas a partir de los espectros NOESY de **158** y **159**. Tras los cálculos se obtuvieron las estructuras correspondientes a ambos péptidos cíclicos en disolución (Fig.75). Como se puede observar en la Figura, ambos péptidos mantienen la estructura deseada de hélice α . En el caso de **159** parece que las cadenas laterales superponen mejor que en **158**, en el que se observa mayor libertad conformacional a este nivel.

158 Ac-EV_{c3-7}[EKFM(O₂)K]-VYQRSY-NH₂



159 Ac-EVVKFM(O₂)-_{c7-11}[EVYEK]-SY-NH₂

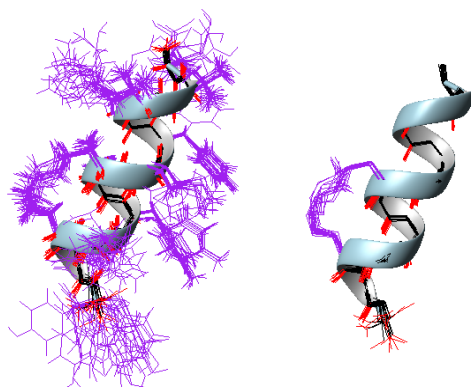


Figura 75. Superposición de las 20 mejores estructuras calculadas a través de dinámica molecular restringida a partir de los datos de RMN de los derivados **158** y **159**, manteniendo todas las cadenas laterales (izquierda) y mostrando únicamente las cadenas laterales involucradas en el puente (derecha). En negro se representa el esqueleto peptídico, en rojo los carbonilos del enlace peptídico y en violeta las cadenas laterales de los residuos de la secuencia. Los hidrógenos han sido eliminados para facilitar la visualización.

4.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS

Para evaluar la actividad biológica de los péptidos de este capítulo, miméticos de los extremos N-terminales de VEGF y de Vammin, hasta el momento se han llevado a cabo dos tipos de ensayos:

- Medida de la capacidad antiangiogénica en ensayos de proliferación celular, mediante medidas de incorporación de timidina tritiada (³H-Thy) al ADN.
- Ensayos de afinidad por el receptor VEGFR2 (KDR) recombinante, mediante estudios de competición con la unión de ¹²⁵I-VEGF.

4.3.1. Ensayos de proliferación celular

Una de las principales acciones biológicas que el VEGF lleva a cabo en células endoteliales, a través de su unión a KDR, es la inducción de la proliferación celular, que juega un papel fundamental en los procesos de angiogénesis. Para determinar si los péptidos en estudio eran capaces de interferir con este proceso, se decidió llevar a cabo ensayos de proliferación celular. Entre las diversas técnicas que permiten evaluar el grado de proliferación de un cultivo celular, la más sensible es la medida de la incorporación de ³H-Thy al ADN. Un aumento del porcentaje de ³H-Thy se puede correlacionar con el aumento de la proliferación celular, mientras que una disminución de este parámetro indicaría inhibición de la proliferación.

En la Figura 76 se puede observar el comportamiento de los péptidos estudiados hasta el momento en el ensayo de proliferación de células HUVEC (células endoteliales humanas de cordón umbilical). En azul se representa la proliferación basal de las células en ausencia de VEGF y en presencia de cantidades crecientes de cada péptido. Como se observa en la Figura, el comportamiento de las células fue el mismo tanto en ausencia como en presencia de los péptidos a estudiar, un indicativo de que por sí mismos no ejercen ningún tipo de efecto en la proliferación de las células HUVEC. Tampoco parecen presentar toxicidades significativas. Cuando a las mismas células se les añade VEGF (columna violeta), en ausencia de péptido (0 μM) se produce un aumento en la proliferación celular. La adición conjunta de VEGF y cantidades crecientes de los péptidos en estudio nos deberían dar idea de si éstos son capaces o no de disminuir la

proliferación inducida por VEGF. Lo que se observa de forma general para todos los compuestos estudiados es que, a bajas concentraciones, producen un aumento en la proliferación, hasta alcanzar una concentración en la que se comportan como inhibidores. Puesto que en ausencia de VEGF los péptidos no aumentan la proliferación celular, el fenómeno observado a bajas concentraciones ha de estar mediado por un comportamiento de los péptidos como moduladores alostéricos positivos de la unión VEGF/VEGFR o por algún mecanismo no relacionado con dicha interacción. Para la mayoría de los compuestos estudiados la concentración inhibitoria fue de 50 μM , a excepción de **143**, que fue capaz de producir inhibición de la proliferación inducida por VEGF a 10 μM , siendo el compuesto más potente de los ensayados hasta el momento. Los compuestos **146**, **147**, **158** y **159**, a 50 μM , producen una inhibición casi total de la proliferación o disminución a niveles basales, aunque **159** podría presentar algún tipo de toxicidad, ya que en ausencia de estímulo también disminuyeron los niveles de proliferación basal. Como se había comentado, el compuesto **158** era el único que presentaba cierta estructura de hélice en disolución acuosa, mientras que el resto necesitaba de la adición de TFE para adoptar esta conformación. Por otra parte, es bien conocida la capacidad de ciertos péptidos para adoptar conformaciones helicoidales al interactuar con membranas celulares y el hecho de considerar el TFE como un mimético de membrana para estudios conformacionales en disolución²⁸⁶⁻²⁸⁹. Por lo tanto, no es descabellado pensar que los péptidos derivados de VEGF y Vammin aquí descritos puedan también adoptar este tipo de estructuras durante los ensayos en cultivos celulares.

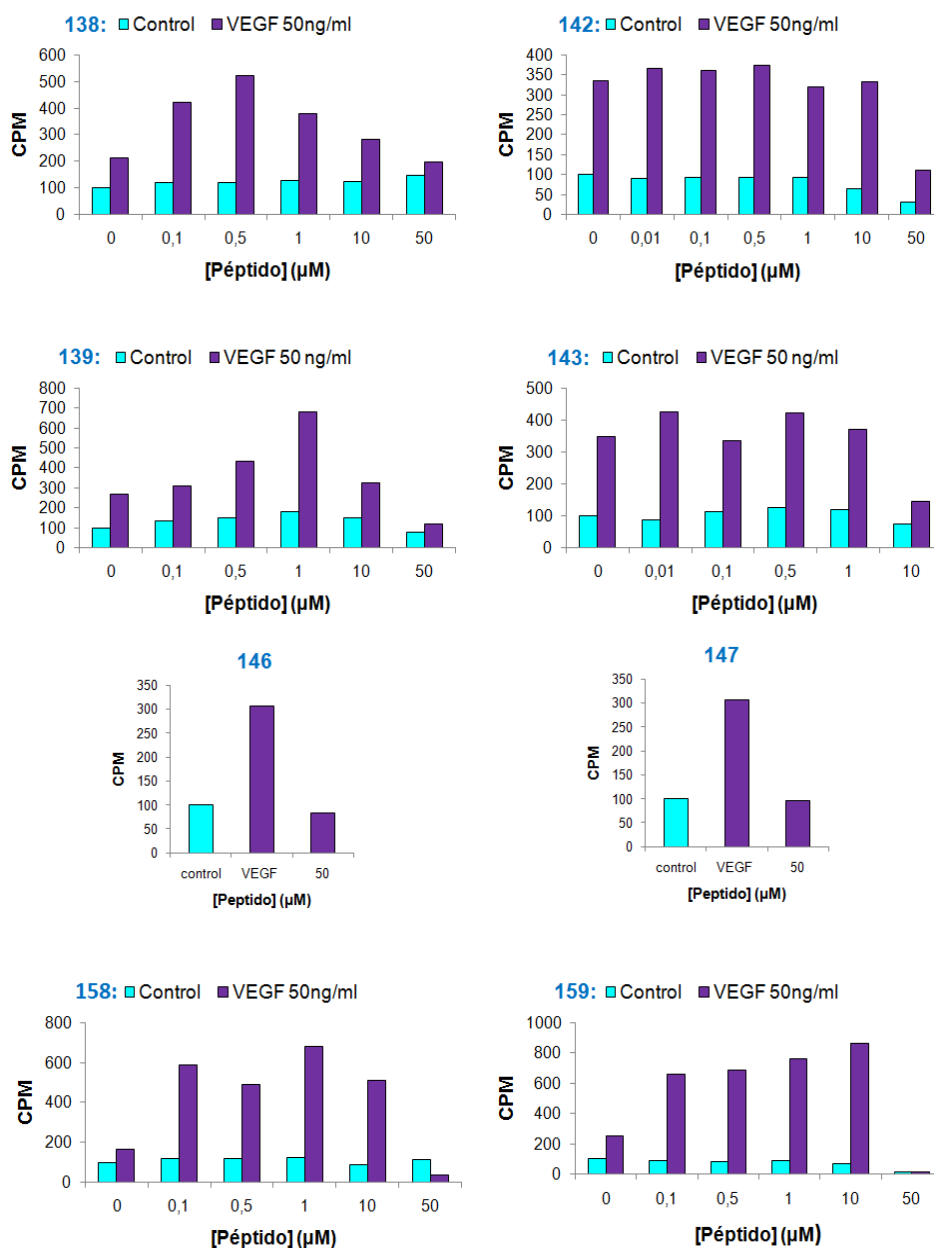


Figura 76. Resultados obtenidos en los ensayos de proliferación celular.

4.3.2. Ensayos de afinidad por KDR

Este tipo de ensayo permite evaluar la capacidad de los distintos péptidos para unirse al receptor VEGFR-2 (KDR). Para ello se mide la capacidad de los compuestos

para competir con la unión de la proteína marcada, ¹²⁵I-VEGF, al receptor KDR recombinante.

Para poner a punto este ensayo se eligió el compuesto **147**, derivado del fragmento de Vammin₁₋₁₃, que presentaba un buen balance entre los valores de inhibición de la proliferación y la solubilidad experimental en agua. Los resultados preliminares obtenidos indican que este péptido se une al receptor KDR, desplazando al VEGF marcado, de manera concentración dependiente (Fig. 77).

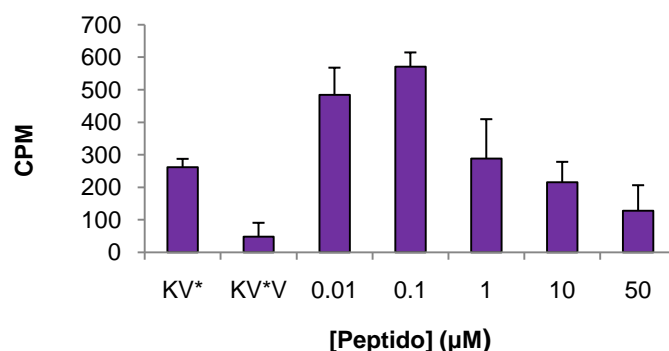


Figura 77. Resultados del ensayo de afinidad por el receptor KDR de **147**, donde KV* representa la afinidad por el receptor de VEGF marcado y KV*V representa la misma afinidad pero en competición con VEGF frío.

Aunque está pendiente el ensayo con el resto de los péptidos, este resultado preliminar sugiere que la secuencia de Vammin₁₋₁₃ se puede considerar como un hot-spot de esta proteína para su interacción con el receptor KDR. Por otra parte, están pendientes también de realizar los estudios de afinidad por el receptor Flt-1, que permitirán determinar si el fragmento Vammin₁₋₁₃ contribuye o no a la selectividad de la proteína nativa por el receptor KDR.

Los resultados que se obtengan del conjunto de todos estos ensayos biológicos deberían permitir dirigir los estudios y modificaciones posteriores de estos péptidos, en busca de nuevos agentes antiangiogénicos alternativos a los existentes.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES.

En esta memoria se aborda el diseño, síntesis y estudio de análogos de los fragmentos VEGF₈₁₋₉₁, VEGF₁₃₋₂₅ y Vammin₁₋₁₃ como herramientas farmacológicas para interferir en las interacciones VEGF/VEGFRs y explorar nuevas estrategias antiangiogénicas.

En lo referente a la búsqueda de análogos del fragmento 81-91 de VEGF que dentro de la proteína nativa presenta estructura de horquilla β , se puede decir que:

✓ Se han diseñado varias series de péptidos cíclicos con el fin de intentar fijar la estructura de horquilla β del fragmento de VEGF₈₁₋₉₁. Para ello se introdujeron modificaciones en la secuencia de este hot-spot que nos permitieran la ciclación a través de las cadenas laterales de los aminoácidos adecuados, para generar puentes hidrocarbonados (CH=CH, CH₂-CH₂), disulfuro y amida (CONH y NHCO).

✓ Se han puesto a punto diferentes rutas sintéticas en fase sólida para la obtención de los análogos cíclicos mencionados, aplicándose con éxito la reacción de metátesis en fase sólida, la formación de puentes disulfuro y la generación de un enlace amida entre cadenas laterales de aminoácidos alejados en la secuencia. La reacción de metátesis en fase sólida se ha visto favorecida por el uso de la técnica de microondas.

✓ Se ha realizado un estudio de compatibilidad de un método de reducción de dobles enlaces en fase sólida, basado en la generación de imida, con derivados de naturaleza peptídica y los grupos protectores más comúnmente utilizados en este tipo de metodología. Este método permitió generar los análogos cíclicos de VEGF₈₁₋₉₁ con puente hidrocarbonado saturado (CH₂-CH₂).

✓ Se ha realizado el análisis conformacional exhaustivo de los péptidos sintetizados utilizando diferentes herramientas, como RMN y modelización molecular. De estos estudios se puede concluir que la mayoría de los péptidos cíclicos análogos del fragmento VEGF₈₁₋₉₁, y algunos de sus análogos lineales, son capaces de formar el

giro β de la horquilla nativa, aunque la estructura global no se consiguió fijar correctamente.

✓ Algunos derivados del fragmento VEGF₈₁₋₉₁, tanto lineales como cíclicos, han mostrado mayor afinidad por el dominio extracelular completo (D1-D7) del receptor Flt-1 que el fragmento natural. Además, los mejores compuestos se unen también a los dominios D1-D3 del mismo receptor con afinidades similares a las mostradas por el dominio extracelular completo. Dado que los dominios D1-D3 son los implicados en la interacción VEGF/Flt-1, se podría sugerir que nuestros compuestos interaccionan con el receptor compitiendo con VEGF por el mismo sitio de unión. Por otra parte, los resultados obtenidos son indicativos de que la rigidez aportada por el ciclo en la mayoría de los casos no permitió a los péptidos adaptarse correctamente a la estructura del receptor, lo que en general ha llevado a la pérdida de afinidad de los análogos cíclicos con respecto a los lineales.

En relación a los fragmentos VEGF₁₃₋₂₅ y Vammin₁₋₁₃, que presentan estructura de hélice α dentro de la proteína nativa, se puede concluir que:

✓ Se han diseñado varias series de péptidos análogos de los fragmentos VEGF₁₃₋₂₅ y Vammin₁₋₁₃ con objeto de que éstos fueran capaces de adoptar estructura de hélice α en disolución. Para ello se ha hecho uso del programa de predicción de helicidad AGADIR. Además, para garantizar una cierta solubilidad de los compuestos diseñados, se ha utilizado en combinación con el programa ALOGPS, que permite estimar la solubilidad en agua. De forma paralela se han diseñado compuestos cíclicos, análogos del fragmento VEGF₁₃₋₂₅, en los que se ha introducido un puente amida generado a través de las cadenas laterales de residuos situados en posiciones $(i, i+4)$.

✓ Se han aplicado las estrategias de fase sólida necesarias para la síntesis de los derivados peptídicos diseñados. En el caso de la obtención de los péptidos cíclicos derivados del fragmento VEGF₁₃₋₂₅ fue necesario el uso de la tecnología microondas para el proceso de ciclación intramolecular.

✓ Se ha realizado el análisis conformacional de la mayoría de los péptidos preparados, utilizando técnicas como RMN, dicroísmo circular y modelización molecular. Todos los péptidos análogos de los fragmentos helicoidales de VEGF₁₃₋₂₅ y

Vammin₁₋₁₃ presentan estructura de hélice α en disolución acuosa al 30% de TFE. Por otra parte, los péptidos cíclicos con puentes generados a través de las cadenas laterales de residuos situados en posiciones $(i, i+4)$ muestran estructura helicoidal en agua.

✓ En ensayos de proliferación celular, los péptidos helicoidales derivados de los fragmentos de VEGF₁₃₋₂₅ y Vammin₁₋₁₃ han mostrado un comportamiento distinto dependiendo de la concentración. A bajas concentraciones parecen comportarse como reguladores alostéricos positivos aumentando la angiogénesis inducida por VEGF, mientras que a altas concentraciones actúan como inhibidores de la angiogénesis. Por otra parte, estudios preliminares han indicado que estos péptidos se unen al receptor KDR, presentando un perfil similar al mostrado en los ensayos de proliferación celular.

PARTE EXPERIMENTAL

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. INSTRUMENTACIÓN GENERAL

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C han sido realizados en un aparato Bruker Avance 600 ubicado en el Instituto de Química-Física Rocasolano, operando a una frecuencia de protón de 600.13 MHz y equipado con una criosonda. Los desplazamientos químicos se determinaron en partes por millón (δ) relativos a la sal sódica del ácido 2,2-dimetil-2-silapenta-5-sulfónico, (DSS). Para los péptidos modelo utilizados en el estudio de hidrogenación en fase sólida los espectros de ^1H y ^{13}C se registraron en un espectrómetro Varian INOVA-300 (300 MHz) o Bruker 300 (300 MHz), utilizando TMS como referencia interna.

Los espectros de dicroísmo circular se registraron en un espectropolarímetro Jasco J-810 equipado con una unidad de control de temperatura Peltier.

Los espectros de masas (Electrospray, modo positivo) se registraron en un espectrómetro Hewlett-Packard 1100SD o en un HPLC-MS WATERS integrado por un módulo de separación 2695, un detector Photodiodo Array 2996 y un espectrómetro de masas Micromass ZQ 2000. Los espectros de masa exacta, HRMS (EI+), se registraron en un equipo Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS.

Los experimentos de HPLC, tanto analíticos como semipreparativos se realizaron en un aparato WATERS integrado por una bomba Delta 600, un detector de absorbancia dual 2487 y un colector de fracciones Fraction Collector III. Las extracciones en fase sólida se llevaron a cabo utilizando cartuchos de fase reversa C18 Discovery SPE y de fase normal DSC-Si de SUPELCO. Las reacciones se sometieron a agitación orbital en un equipo GERHARDT.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrífuga termostatzada Universal 320R de Hettich, utilizando tubos falcon. La liofilización de las disoluciones acuosas se llevó a cabo en un aparato Telstar Lioalfa-6.

6.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES.

Los disolventes anhidros utilizados se adquirieron a casas comerciales o bien se prepararon por destilación según métodos estándar. Los aminoácidos comerciales se compraron a NeoMPS, IrisBiotech o Sanghai Biotech. El resto de reactivos fueron adquiridos a las casas comerciales habituales.

6.3. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA

6.3.1. Síntesis Manual

La síntesis se realizó empleando jeringas de polipropileno, de volumen variable según la cantidad de resina empleada, equipadas con una placa filtrante de polietileno poroso. De forma general, la resina se mantuvo en la jeringa añadiendo los reactivos y disolventes adecuados en cada caso de modo que se mantuviera cubierta y solvatada. La agitación del soporte polimérico se realizó con varillas de teflón y/o con un agitador orbital. Los excesos de reactivos, disolventes y posibles subproductos se eliminaron por filtración.

6.3.1.1. Soporte polimérico.

En el presente trabajo se utilizó una única resina del tipo MBHA-PS (1% DVB) de carga 0.34 mmol/g, común para todos los productos sintetizados, funcionalizada con el espaciador Rink amida.

6.3.1.2. Elongación del péptido

Para la elongación de los péptidos lineales se utilizó una estrategia Fmoc/tBu, utilizando como agentes acoplantes bien DIC/HOBt, o bien HCTU, dependiendo del péptido. En primer lugar, fue necesario hacer un tratamiento previo a la resina para que ésta se hinchase. La incorporación de cada aminoácido se llevó a cabo mediante el protocolo descrito en la Tabla 20. La etapa 4 del protocolo fue la indicada en cada caso para cada producto. En el caso de acoplamiento a Pro, siempre se utilizó DIC/HOBt como agente acoplante. Para controlar los acoplamientos se utilizó el test de ninhidrina

para aminas primarias descrito en el apartado 6.3.2.1. Cuando el resultado del ensayo fue negativo se prosiguió con la síntesis desde la etapa 1 añadiendo el siguiente aminoácido. Cuando el ensayo fue positivo se repitió el protocolo exceptuando las etapas 2 y 3. Para controlar el acoplamiento a Pro se utilizó el ensayo de cloranilo, descrito en el punto 6.3.2.2 de esta memoria.

Tabla 20. Protocolo general para el acoplamiento de aminoácidos.

Etapas	Reactivos	Operación	Tiempo
1	DCM/DMF/DCM/DMF	Hinchado	4 x 0.5 min
2	20% Piperidina/DMF ^a	Desprotección Fmoc	1 x 1 min, 3 x 10 min
3	DMF/DCM/DMF/DCM/DMF	Lavado	4 x 0.5 min
4	Fmoc-AA-OH(1.5 eq) /DIC(1.5 eq) /HOBt(1.5 eq)/DMF	Acoplamiento	12 h
	Fmoc-AA-OH(2 eq) /HCTU(2 eq) /DIEA (2 eq) /DMF	Acoplamiento	1 h
5	DMF/DCM/DMF/DCM	Lavado	5 x 0.5 min
6	Ensayo ninhidrina o cloranilo	Control	-

^a Las proporciones entre reactivos y disolventes son volumétricas.

6.3.1.3. Acetilación de aminas

El protocolo a seguir en estos casos fue el expuesto en la Tabla 21.

Tabla 21. Protocolo general de acetilación de aminas.

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo
1	DCM/DMF/DCM/DMF	Hinchado	4 x 0.5 min
2	20% Piperidina/DMF ^a	Desprotección Fmoc	1 x 1 min, 3 x 10 min
3	DMF/DCM/DMF/DCM/DMF	Lavado	4 x 0.5 min
4	Ac ₂ O:DMF:DIEA (1:1:1)	Acetilación	1 x 1 min, 4 x 10 min
5	DMF/DCM/DMF/DCM	Lavado	4 x 0.5 min
6	Ensayo ninhidrina	Control	-

^aLas proporciones entre reactivos y disolventes son volumétricas.

6.3.1.4. Desprotección de grupos alilo(OAll) y aliloxicarbonilo(Alloc)

Para la desprotección ortogonal de los grupos protectores de cadenas laterales con ésteres de alilo y grupos aliloxicarbonilo se utilizó como reactivo dador de hidrógeno el PhSiH₃ en presencia de Pd(PPh₃)₄ como catalizador, según el protocolo indicado en la Tabla 22. El proceso se realizó bajo atmósfera de Ar. Para eliminar los restos de Pd presentes tras la reacción se utilizó una disolución de Et₂NCS₂Na (0.02M) en DMF.

Tabla 22. Protocolo general de desprotección de grupos alilo y aliloxicarbonilo.

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo
1	DCM/DMF/DCM/DMF	Hinchado	4 x 0.5 min
2	Pd(PPh ₃) ₄ (0.25 eq)/ PhSiH ₃ (24 eq)/DCM	Desprotección grupos alilo y aliloxicarbonilo	2 x 45 min
3	DCM/DMF	Lavado	4 x 0.5 min
4	Et ₂ NCS ₂ Na (0.02M) en DMF	Eliminación Pd	4 x 0.5 min
5	DMF/DCM	Lavado	4 x 0.5 min

6.3.1.5. Escisión de los productos de la resina.

Sobre la resina, dispuesta en la jeringa, se añadió la mezcla acidolítica formada por (TFA:EDT:H₂O:TIPS) en proporciones (94:2.5:2.5:1), aproximadamente 1 ml de disolución por 100 mg de resina. Tras la adición de la disolución, se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 5 horas. Posteriormente, se recogieron los filtrados en un tubo falcon y se le añadió éter frío para provocar la precipitación del péptido. La mezcla se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm y a -10 °C. Se decantó el sobrenadante y se repitió el proceso dos veces más. El precipitado seco obtenido se disolvió en agua o en mezcla agua/acetonitrilo y se liofilizó para obtener el crudo final.

6.3.2. Métodos analíticos

6.3.2.1. Ensayo cualitativo de ninhidrina²⁹⁰

Este ensayo colorimétrico permite detectar la presencia de aminas primarias y se utiliza para evaluar cualitativamente la extensión de una reacción sobre la resina, cuando el grupo reactivo es un grupo amino primario. Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

- ✓ Disolución A: Se disolvieron 40 g de fenol en 10 ml de EtOH absoluto. Paralelamente se preparó una disolución de 65 mg de KCN en 100 ml de H₂O y 2 ml de la disolución resultante se diluyó en 100 ml de piridina recién destilada sobre ninhidrina. Tanto la disolución de fenol como esta última se agitaron por separado durante 45 minutos con 4 g de resina Amberlite MB-3, se filtraron y se mezclaron.
- ✓ Disolución B: Se disolvieron 2.5 g de ninhidrina en 50 ml de EtOH absoluto. La disolución resultante se conservó en un recipiente cerrado protegido de la luz.

El ensayo consiste en añadir 3 gotas de la disolución A y una gota de la disolución B a una alícuota de resina (0.5-2 mg) seca. Posteriormente se calienta la muestra a 110°C durante 3 min. Una coloración amarilla de la disolución indica la ausencia de aminas primarias en la resina (ensayo negativo) mientras que el color azul indica la presencia de aminas primarias (ensayo positivo).

6.3.2.2. *Ensayo cualitativo de cloranilo*²⁹¹

El ensayo permite detectar aminas secundarias en una resina. Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

- ✓ Disolución A: Se disolvió 1 ml de acetaldehído en 49 ml de DMF y se almacenó a 4°C en un recipiente protegido de la luz.
- ✓ Disolución B: Se disolvió 1 g de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloranilo) en 49 ml de DMF y se almacenó a 4°C.

El ensayo consiste en añadir una gota de cada disolución a una alícuota de resina (0.5-2 mg) seca. Se deja reaccionar durante 5 min a temperatura ambiente. Una coloración amarilla de la resina indica la ausencia de aminas secundarias (ensayo negativo) mientras que una coloración azul de la resina es indicativo de la presencia de aminas secundarias (ensayo positivo).

6.3.3. *Métodos cromatográficos*

6.3.3.1. *Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).*

✓ HPLC analítico: Se realizó en fase reversa utilizando una columna ACE 5 C18-300 de dimensiones 4.6 mm x 250 mm. Las muestras se analizaron utilizando diferentes gradientes lineales durante 25 min, utilizando como fase móvil A (CH₃CN) y fase móvil B (H₂O + 0.05% TFA), a un flujo de 1.3 ml/min y con una detección en continuo a longitudes de onda de 214 y 256 nm.

✓ HPLC-MS: Se realizó en fase reversa utilizando una columna X-Bridge (3.5 μm) de dimensiones 2.1 mm x 100 mm. Las muestras se analizaron utilizando diferentes gradientes lineales durante 15 min, utilizando como fase móvil A (CH₃CN + 0.08% ácido fórmico) y fase móvil B (H₂O + 0.1% ácido fórmico), a un flujo de 0.25 ml/min y con una detección en continuo entre 190-400 nm.

✓ HPLC semipreparativo: Se realizó en fase reversa utilizando una columna ACE 5 C18-300 de dimensiones 10 mm x 250 mm. Las muestras se purificaron utilizando diferentes gradientes lineales durante 25 min, utilizando como fase móvil A (CH₃CN) y fase móvil B (H₂O + 0.05% TFA), a un flujo de 6 ml/min y con una detección en

continuo a longitudes de onda de 214 y 256 nm. Para la inyección del crudo de reacción todos los compuestos se disolvieron en la mínima cantidad posible de H₂O o mezclas CH₃CN/H₂O. En los casos en que el compuesto no se solubilizó en estos disolventes se le añadió ácido acético en proporciones que oscilan entre el 5 y el 10%.

En todos los casos el gradiente utilizado para la purificación de cada uno de los productos fue el mismo que el utilizado en HPLC analítico.

6.3.3.2. Cromatografía de extracción en fase sólida.

La cromatografía se llevó a cabo en cartuchos de fase reversa C18 Discovery SPE de tamaño adecuado, utilizando un manifold de vacío SUPELCO. Las muestras se purificaron utilizando una mezcla de H₂O/CH₃CN (9:1). Para ello, se disolvieron en la mínima cantidad de H₂O. La purificación se siguió por cromatografía en capa fina utilizando como agente revelador ninhidrina en EtOH.

Cuando la cromatografía se realizó en fase normal se utilizaron cartuchos DSC-Si utilizando como eluyentes mezclas de DCM/MeOH.

6.4. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL

6.4.1. Resonancia magnética nuclear

Los espectros de RMN para todos los heteronúcleos observables se registraron en disolución acuosa tanto en D₂O como en una mezcla H₂O/D₂O (9:1 v/v). La concentración utilizada fue de 1-2 mM y el pH se ajustó a 5.5 por adición de la mínima cantidad de NaOD o DCl, medido con un microelectrodo de vidrio y sin corrección de efecto isotópico. La temperatura de la criosonda se calibró usando una muestra de metanol. Los espectros monodimensionales de ¹H se adquirieron utilizando 32 K puntos que fueron rellenados con 0 hasta 64 K antes de llevar a cabo la transformada de Fourier. Los espectros bidimensionales homonucleares (COSY, TOCSY y NOESY) se registraron mediante técnicas estándar usando presaturación de la señal del H₂O y el modo de incremento del tiempo proporcional de fase¹²⁹. Los tiempos de mezcla para el espectro NOESY fueron de 150 ms y el espectro TOCSY se registró utilizando una secuencia de 60 ms DIPSI2 con un filtro z de spin-lock. El espectro ¹H-¹³C-HSQC se registró en

abundancia natural de ^{13}C con muestras 1-2 mM de péptido en D_2O . Las matrices de adquisición se definieron con 2018 x 512 puntos en t_2 y t_1 , respectivamente. Los datos se procesaron usando el programa TOPSPIN²⁹². Para el procesado de los espectros bidimensionales, se duplicó el número de puntos en ambas dimensiones y se utilizaron funciones seno o seno cuadrado desplazadas, optimizándose el desplazamiento para cada espectro. Una vez realizada la transformada de Fourier, se corrigió la línea base en ambas dimensiones. El valor de $\delta = 0$ ppm en ^{13}C se obtuvo indirectamente por multiplicación de la frecuencia del espectrómetro que corresponde a 0 ppm en el espectro de ^1H , asignado a la referencia interna DSS, por 0.25144953²⁹³. Para la asignación de las señales de ^1H de los péptidos se utilizaron métodos de asignación secuencial estándar utilizando el programa Sparky²⁹⁴⁻²⁹⁶.

6.4.2. Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se registraron en disolución acuosa. La concentración utilizada fue de 50-100 mM y el pH se ajustó a 5.5 mediante adición de la mínima cantidad de NaOH o HCl. Se hicieron medidas entre 190-250 nm usando una celda de 0.1 cm de paso óptico. Los experimentos se llevaron a cabo a una velocidad de barrido de 50 nm/min, un tiempo de respuesta de 2 s y 1 nm de anchura de banda. Los espectros obtenidos son el promedio de 8 barridos a los que se corrigió la línea base.

6.5. MODELIZACIÓN MOLECULAR

Todos los cálculos y simulaciones se realizaron utilizando el paquete de programas AMBER10²⁷³, usando como campo de fuerzas AMBER ff99SB y el campo de fuerzas generalizado de AMBER (gaff) para generar los parámetros de los puentes. Los péptidos se construyeron inicialmente en conformación extendida. Para modelizar los efectos de la solvatación se utilizó el modelo de solvente implícito de Born generalizado GB/SA (Generalized Born-Solvent Accessible) (igb = 0). Se aplicó un tiempo de integración de 1.0 fs y una distancia de cutoff para las interacciones no enlazantes de 24 Å. A menos que se indique lo contrario, se utilizó el algoritmo SHAKE. Cada estructura fue sometida inicialmente a 5000 pasos de minimización con el algoritmo de descenso

“steepest descent” y a 5000 pasos de gradiente conjugado y como criterio de convergencia 0.001 Kcal/Å mol, seguido de equilibrado de 40 ps donde se ajustó la temperatura a 300 K. La estructura resultante se calentó hasta alcanzar 1000 K aumentando la temperatura gradualmente a 600 K, 800 K y 1000 K, durante 50 ps cada una, y equilibrando durante 50 ps a 600 K y 800K, y durante 100 ps a 1000 K. Posteriormente, el sistema se enfrió lentamente hasta 300K. En cada paso, la temperatura se disminuyó 100K (50 ps), y se mantuvo a la nueva temperatura durante 50 ps. Tras enfriar a 300K se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular a dicha temperatura durante 200 ps, sin utilizar el algoritmo SHAKE. El conformero obtenido se almacenó y se utilizó para iniciar una nueva simulación a alta temperatura. Las conformaciones resultantes se optimizaron utilizando 5000 pasos de minimización con el algoritmo “steepest descent” y 5000 pasos de gradiente conjugado. De esta manera, se obtuvieron 100 conformaciones de mínima energía, de las que se analizaron las que poseían una energía inferior a 3 Kcal/mol con respecto al mínimo global.

6.6. ENSAYOS BIOLÓGICOS

6.6.1. Ensayos de afinidad por el receptor Flt-1

Sobre una microplaca de 96 pocillos se añadieron 100 µl de tampón fosfato (PBS, pH 7.4) que contiene VEGFR-1 ECD/Fc Chimera (20 ng/pocillo) o VEGFR-1 D1-D3/Fc chimera (15 ng/pocillo) y se incubaron a 4°C durante una noche. Tras lavar tres veces con 250 µl de PBS 0.1 %, (v/v) Tween 20 (buffer A), la placa se bloqueó con 200 µl de PBS con 3 % (w/v) de BSA y se agitó durante 2h a 37°C. La placa se lavó de nuevo con buffer A. A continuación, se añadieron en cada pocillo 100 µl de una disolución que contiene 131 pM de btVEGF₁₆₅ y los péptidos a ensayar a varias concentraciones diluidos en PBS con 1%DMSO. Tras 3h de agitación a 37°C, la placa se lavó de nuevo con buffer A y se adicionaron sobre cada pocillo 100 µl del complejo streptavidina-HRP diluido 1:8000 en PBS con 0.1 % (v/v) de Tween 20 y 0.3% (w/v) BSA. Después de 1h de incubación a 37°C en oscuridad la placa se lavó con 250 µl de buffer A y se añadieron 100 µl de sustrato quimioluminiscente. El bt-VEGF₁₆₅ anclado se cuantificó por medidas de quimioluminiscencia.

6.6.2. Ensayos de proliferación celular

Se sembraron las células endoteliales (HUVEC, células humanas de cordón umbilical) subconfluentes, y una vez adheridas a la placa se sometieron a condiciones de bajo suero durante 16h (0.1% FCS, suero de ternera fetal) para reducir el grado de proliferación basal. A continuación se añadió VEGF 50ng/ml, junto con ^3H -Thy 1 $\mu\text{Ci/ml}$, en presencia o ausencia de los distintos péptidos (0.01-50 μM). Después de 48h de incubación, se lisaron las células y se cuantificó la cantidad de ^3H -Thy incorporada en las distintas condiciones experimentales en un contador de centelleo beta.

6.6.3. Ensayos de afinidad por el receptor KDR

Se utilizaron placas recubiertas de proteína A, que se incubaron con KDR recombinante 1 $\mu\text{g/ml}$ y ^{125}I -VEGF 5-10ng/ml, tanto en ausencia como en presencia de cantidades crecientes de los distintos péptidos (entre 0.01 y 100 μM). Tras lavar los pocillos para eliminar el ^{125}I -VEGF no unido, se cuantificó la radiactividad remanente en un contador gamma.

7. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANÁLOGOS DEL FRAGMENTO VEGF₈₁₋₉₁

7.1. PÉPTIDOS CÍCLICOS CON PUENTES HIDROCARBONADOS Y ANÁLOGOS LINEALES.

La síntesis de los péptidos lineales se realizó a partir de 100 mg de resina Rink-Amida (0.034 mmol/g) siguiendo los métodos generales descritos en el apartado 6.3.1, con el extremo N-terminal acetilado, utilizando como aminoácidos de partida Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH o Fmoc-AlilGly-OH, según proceda.

La síntesis de los péptidos cíclicos con puentes hidrocarbonados se llevó a cabo por reacción de metátesis, a partir de los correspondientes análogos lineales anclados a la resina (0.034 mmol) con residuos de alilGly en las posiciones de ciclación.

7.1.1. Reacciones de metátesis

➤ *Método A:* El péptido lineal acetilado anclado a la resina (0.034 mmol), previamente hinchada, se trató con 2 ml de una disolución de LiCl 0.8M en DMF durante 2 min y se lavó con DMF/DCM (4 x 0.5 min). Este proceso se repitió una vez más. A continuación se adicionó, bajo Ar, una disolución del catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2ª generación (6 mg, 0.01 mmol) en DCE (2 ml). La mezcla se calentó a 65°C y se mantuvo en estas condiciones durante 24 h con agitación suave. La adición de catalizador se repitió dos veces más, manteniendo la mezcla 24 h a 65°C. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se lavó varias veces con DCE y DMF y, a continuación, se le añadieron 0.73 ml (300 equivalentes) de DMSO anhidro en DMF. La mezcla se dejó agitando durante 12 h a temperatura ambiente. Por último la resina se lavó con DMF/DCM/MeOH (3 x 0.5 min).

➤ *Método B:* Procedimiento análogo al descrito en el método A pero usando DMF a 85°C en lugar de DCE a 65°C.

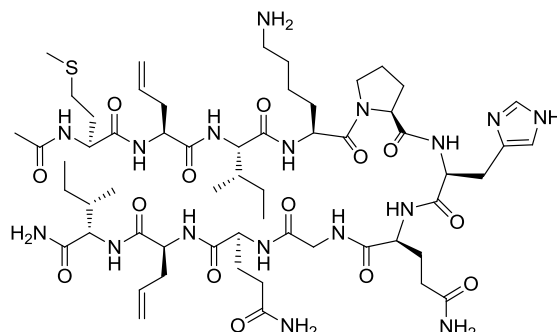
- *Método C:* El péptido acetilado anclado a la resina (0.034 mmol), bajo atmósfera de Ar en un tubo de microondas, se trató con una disolución del catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2^a generación (4 mg, 0.007 mmol) en DCE (2 ml). La mezcla se calentó en un sintetizador de microondas a 120°C durante 20 min. La adición de catalizador se repitió dos veces más manteniendo la mezcla bajo radiación microondas a 120°C durante 20 min cada vez. A continuación, la mezcla de reacción se lavó varias veces con DCE y DMF y después se le añadieron 0.73 ml (300 equivalentes) de DMSO anhidro en DMF. La mezcla se dejó agitando durante 12 h a temperatura ambiente. Por último la resina se lavó con DMF/DCM/MeOH (3 x 0.5 min).
- *Método D:* Procedimiento análogo al descrito en el método C pero añadiendo 2 mg de catalizador (0.003 mmol) y repitiendo la adición 5 veces más hasta completar un total de 0.6 equivalentes de catalizador.

Una vez completada la reacción se llevó a cabo el desanclaje del producto de la resina utilizando el método descrito en el apartado 6.3.1.5. El crudo de reacción se prepurificó utilizando un cartucho de fase reversa como se indica en el apartado 6.3.3.2.

7.1.2. Reacción de hidrogenación²⁵⁹

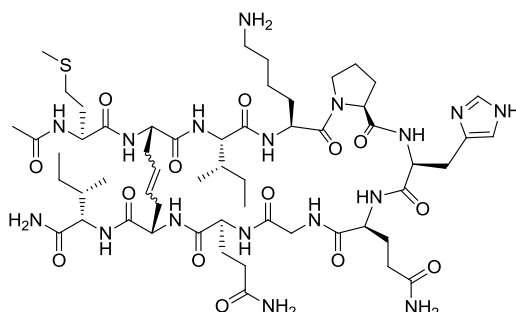
Sobre una disolución de 2-nitrobenzenosulfonohidracina (0.147 mg, 0.68 mmol) en DCM (2 ml) se añadió Et₃N (0.188 ml, 1.36 mmol). La mezcla se adicionó inmediatamente sobre la resina (0.034 mmol) bajo atmósfera de Ar. La reducción se completó después de 6 h a temperatura ambiente. A continuación la resina se drenó y se lavó con DCM/DMF/DMF:H₂O(1:1)/THF/DCM (4 × 0.5 min). Una vez completada la reacción se llevó a cabo el desanclaje del producto utilizando el método descrito en el apartado 6.3.1.5. El crudo de reacción se prepurificó utilizando un cartucho de fase reversa (apartado 6.3.3.2) o fase normal dependiendo del caso.

Ac- Met¹-alilGly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-alilGly¹⁰-Ile¹¹-NH₂ (56):



Tras la elongación del péptido por los métodos descritos anteriormente, utilizando DIC/HOBt como agente acoplante (Tabla 20, 4A), el péptido anclado a la resina **75** se desancló y se purificó por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 55% A en 25 min, 55 a 100% A en 3 min) obteniéndose 5.2 mg de un sólido blanco (12% rendimiento global). RMN: Tablas 23 y 24. HPLC: $t_R = 12.60$ min. EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 644.0$.

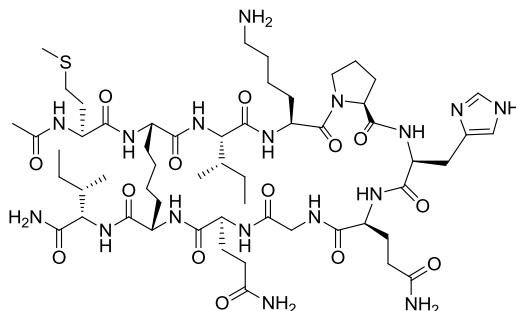
Ac-Met¹-ciclo(CH₂-CH=CH-CH₂)^{2,10}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Gly¹⁰]-Ile¹¹-NH₂ (57):



Sobre la resina **75** se llevó a cabo una reacción de metátesis siguiendo el método A descrito en el apartado 7.1.1. Tras el desanclaje, el compuesto **57** se obtuvo como mezcla de isómeros *Z/E* que pudieron ser separados por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 45% A en 25 min, 45 a 100% A en 3 min). **57a**: Sólido blanco (1.3 mg, 3% rendimiento global). RMN: rotamería *cis:trans* Lys-Pro (2:7), Tablas 25 y 26. HPLC: $t_R = 10.35$ min. EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 630.0$. HRMS (EI+) *m/z* encontrada 1257.6652 ($[M]^+$ C₅₆H₉₁N₁₇O₁₄S, calculada 1257.6645). **57b**: Sólido blanco (2.1 mg, 5% rendimiento

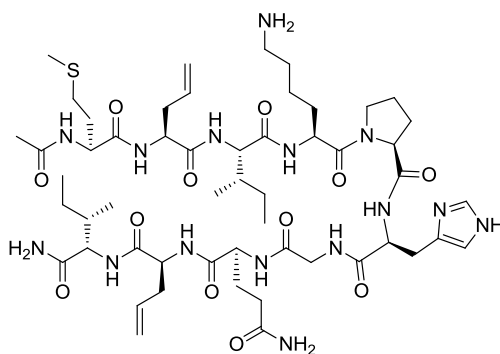
global). RMN: rotamería *cis:trans* Lys-Pro (1:4), Tablas 27 y 28. HPLC: $t_R = 12.15$ min. EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 630.0$.

Ac-Met¹-ciclo[(CH₂)₄]^{2,10}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Gly¹⁰]-Ile¹¹-NH₂ (58):



Tras la síntesis del correspondiente cicloalqueno anclado a la resina, **76**, se llevó a cabo la reducción del doble enlace siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.1.2. Tras el desanclaje, el crudo de reacción se purificó por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 45% A en 25 min, 45 a 100% A en 3 min) y el compuesto **58** se aisló como un sólido blanco (6 mg, 12% rendimiento global). RMN: rotamería *cis:trans* Lys-Pro (1:4), Tablas 29 y 30. HPLC: $t_R = 10.70$ min. EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 631.0$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1259.6816 ($[M]^+$ C₅₆H₉₃N₁₇O₁₄S, calculada 1259.6809).

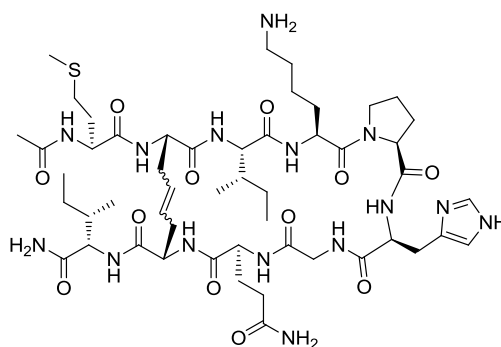
Ac-Met¹-alilGly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gly⁷-Gln⁸-alilGly⁹-Ile¹⁰-NH₂ (59):



Tras la elongación del péptido por los métodos descritos anteriormente utilizando DIC/HOBt como agente acoplante (Tabla 20, 4A), el compuesto anclado a la resina **110a** se desancló y se purificó por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 55% A en 25

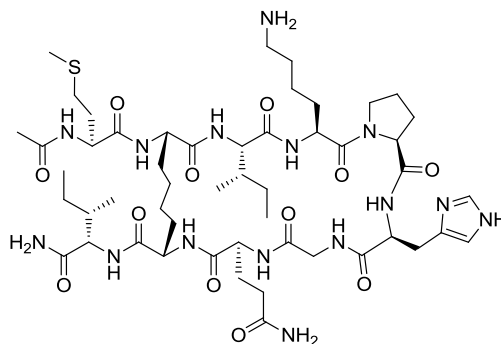
min, 55 a 100% A en 3 min) obteniendo 4.7 mg de un sólido blanco (12% rendimiento global). RMN: Tablas 31 y 32 HPLC: $t_R = 12.53$ min. EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 580.0$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1157.6379 ($[M]^+$ $C_{53}H_{87}N_{15}O_{12}S$, calculada 1157.6379).

Ac-Met¹-ciclo(CH₂-CH=CH-CH₂)^{2,9}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gly⁷-Gln⁸-Gly⁹]-Ile¹⁰-NH₂ (60):



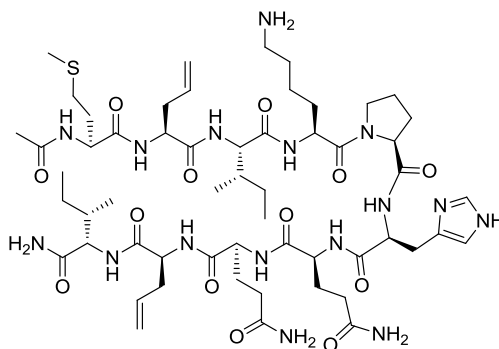
Sobre la resina **110a** se llevó a cabo una reacción de metátesis siguiendo el método B descrito en el punto 7.1.1. Tras el desanclaje, el compuesto **60** se obtuvo como mezcla de isómeros *Z/E* que se separaron por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 25% A en 25 min, 25 a 100% A en 3 min). **60a**: Sólido blanco (1.2 mg, 3% rendimiento global). HPLC: $t_R = 13.52$ min. EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 566.0$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1129.6088 ($[M]^+$ $C_{51}H_{83}N_{15}O_{12}S$, calculada 1129.6066). **60b**: Sólido blanco (2.0 mg, 5% rendimiento global). RMN: rotamería *cis:trans* Lys-Pro (2:3), Tablas 33 y 34. HPLC: $t_R = 14.70$ min. EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 566.0$.

Ac-Met¹-ciclo[(CH₂)₄]^{2,9}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gly⁷-Gln⁸-Gly⁹]-Ile¹⁰-NH₂ (61):



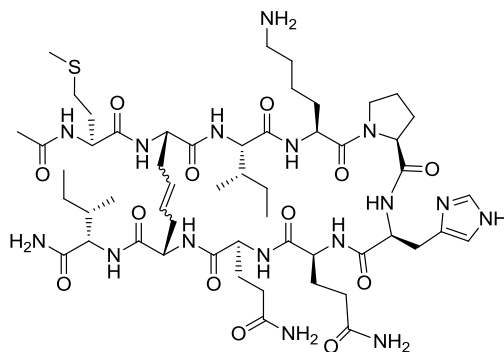
Tras la síntesis del correspondiente cicloalqueno anclado a la resina, **111a**, se llevó a cabo la reducción del doble enlace siguiendo el procedimiento descrito. Tras el desanclaje, el crudo de reacción se purificó por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 25% A en 25 min, 25 a 100% A en 3 min) y el compuesto **61** se aisló como un sólido blanco (3.1 mg, 8% rendimiento global). RMN: rotamería *cis:trans* Lys-Pro (1:3), Tablas 35 y 36. HPLC: $t_R = 14.34$ min. EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 567.0$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1131.6216 ($[M]^+$ C₅₁H₈₅N₁₅O₁₂S, calculada 1131.6223).

Ac-Met¹-alilGly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gln⁸-alilGly⁹-Ile¹⁰-NH₂ (62):



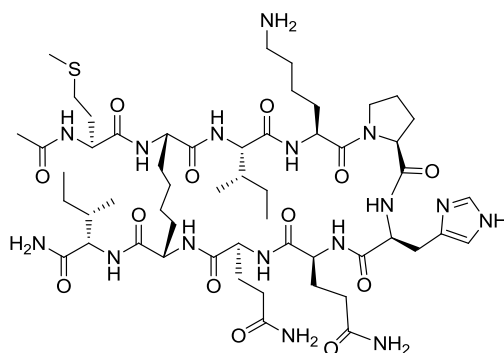
Tras la elongación del péptido por los métodos descritos anteriormente utilizando DIC/HOBt como agente acoplante (Tabla 20, 4A), el compuesto anclado a la resina **110b** se desancló y se purificó por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 55% A en 25 min, 55 a 100% A en 3 min), obteniéndose 7.5 mg de un sólido blanco (18% rendimiento global). RMN: Tablas 37 y 38. HPLC: $t_R = 12.09$ min. EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 616.0$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1228.6741 ($[M]^+$ C₅₆H₉₂N₁₆O₁₃S, calculada 1228.6750).

Ac-Met¹-ciclo(CH₂-CH=CH-CH₂)^{2,9}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gln⁸-Gly⁹]-Ile¹⁰-NH₂ (63):



Sobre el péptido anclado a la resina **110b** se llevó a cabo la reacción de metátesis siguiendo el método C descrito en el apartado 7.1.1. Tras la etapa de escisión, el crudo de reacción se purificó por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 45% A en 25 min, 45 a 100% A en 3 min), obteniéndose el compuesto **63** como un sólido blanco, mezcla de isómeros *Z/E* (4.9 mg, 12% rendimiento global) RMN: Isomería *Z/E* (7:3), rotamería *cis:trans* Lys-Pro (1:4/1:3), Tablas 39 y 40. HPLC: $t_R = 11.20$ min. EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 602.0$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1200.6429 ($[M]^+$ C₅₄H₈₈N₁₆O₁₃S, calculada 1200.6437).

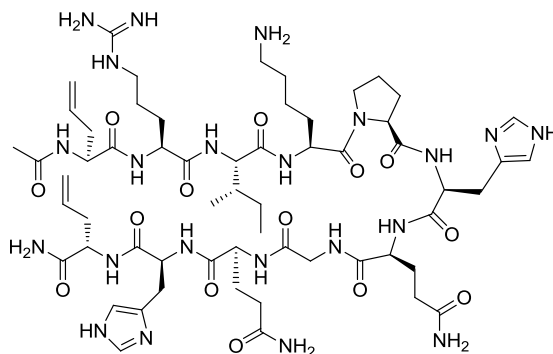
Ac-Met¹-ciclo[(CH₂)₄]^{2,9}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gln⁸-Gly⁹]-Ile¹⁰-NH₂ (64):



Tras la síntesis del correspondiente cicloalqueno anclado a la resina, **111b**, se llevó a cabo la reducción del doble enlace siguiendo el procedimiento descrito. El crudo de reacción obtenido tras el desanclaje se purificó por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 35% A en 25 min, 35 a 100% A en 3 min) y el compuesto **64** se aisló como un

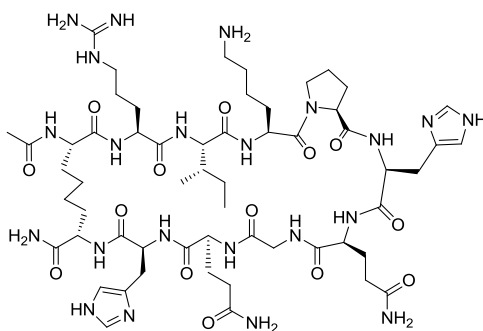
sólido blanco (2.8 mg, 7% rendimiento global). RMN: rotamería *cis:trans* Lys-Pro (1:4), Tablas 41 y 42. HPLC: $t_R = 11.53$ min. EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 603.0$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1202.6627 ($[M]^+$ C₅₄H₉₀N₁₆O₁₃S, calculada 1202.6594).

Ac-alilGly¹-Arg²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-His¹⁰-alilGly¹¹-NH₂ (65):



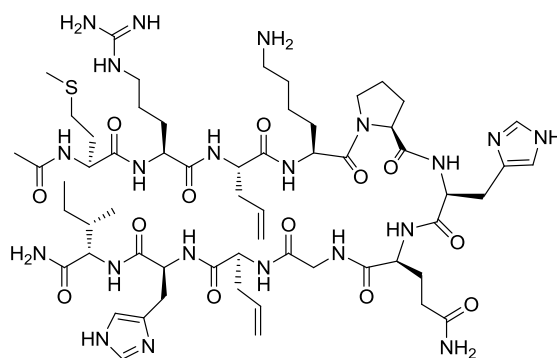
Tras la elongación del péptido por los métodos descritos anteriormente utilizando DIC/HOBt como agente acoplante (Tabla 20, 4A), el compuesto anclado a la resina **113** se desancló y se purificó por HPLC semipreparativo (10% A 2 min, 10 a 50% A en 25 min, 50 a 100% A en 3 min), obteniéndose 7.7 mg de un sólido blanco (17% rendimiento global). RMN: Tabla 43. HPLC: $t_R = 9.62$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1336.3$, $[M + 2H]^{2+} = 668.7$, $[M + 3H]^{3+} = 446.1$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1334.7310 ($[M]^+$ C₅₉H₉₄N₂₂O₁₄, calculada 1334.7320).

Ac-ciclo[(CH₂)₄]^{2,11}[Gly¹-Arg²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-His¹⁰-Gly¹¹]-NH₂ (67):



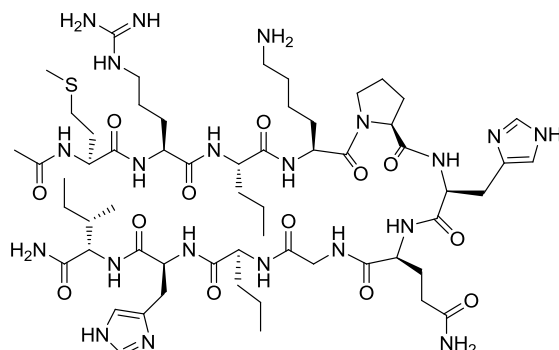
Sobre el correspondiente péptido lineal anclado a la resina, **113**, se llevó a cabo la reacción de metátesis siguiendo el método D descrito en 7.1.1. Sobre la resina obtenida **114** se realizó la reducción del doble enlace, de acuerdo con el procedimiento habitual. Tras el desanclaje, el crudo de reacción se obtuvo como una mezcla de derivado reducido (**67**)/no reducido(**66**) (7:3) que fue separada por HPLC semipreparativo (5% A 2 min, 5 a 15% A en 25 min, 15 a 100% A en 3 min), obteniéndose 1.3 mg del compuesto **67** en forma de sólido blanco (3% rendimiento global). RMN: rotamería *cis:trans* Lys-Pro (1:9), Tablas 44 y 45. HPLC: $t_R = 15.90$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1310.2$, $[M + 2H]^{2+} = 655.8$, $[M + 3H]^{3+} = 437.5$.

Ac-Met¹-Arg²-alilGly³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-alilGly⁹-His¹⁰-Ile¹¹-NH₂ (68**):**



Tras la elongación del péptido por los métodos descritos anteriormente utilizando DIC/HOBt como agente acoplante (Tabla 20, 4A), el compuesto anclado a la resina **116** se desancló y se purificó por HPLC semipreparativo (10% A 2 min, 10 a 50% A en 25 min, 50 a 100% A en 3 min), obteniéndose 22 mg de un sólido blanco (36% rendimiento global). RMN: Tabla 46. HPLC: $t_R = 13.23$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1339.3$, $[M + 2H]^{2+} = 670.2$, $[M + 3H]^{3+} = 447.1$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1337.7134 ($[M]^+$ C₅₉H₉₅N₂₁O₁₃S, calculada 1337.7139).

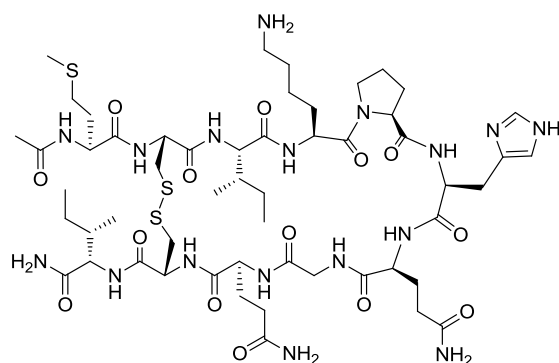
Ac-Met¹-Arg²-Nva³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Nva⁹-His¹⁰-Ile¹¹-NH₂ (119):



Sobre el correspondiente compuesto lineal anclado a la resina, **116**, se llevó a cabo la reacción de metátesis siguiendo el método E descrito en 7.1.1. Sobre la resina obtenida **117** se realizó la reducción del doble enlace, de acuerdo con el procedimiento habitual. El derivado se purificó por HPLC (10% A 2 min, 10 a 30% A en 25 min, 30 a 100% A en 3 min), obteniéndose 2.7 mg de un sólido blanco (6% rendimiento global), que se corresponde con el péptido lineal reducido indicado en el epígrafe. RMN: Tabla 47. HPLC: $t_R = 17.37$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1343.2$, $[M + 2H]^{2+} = 672.2$, $[M + 3H]^{3+} = 448.5$. HRMS (EI⁺) m/z encontrada 1341.7410 ($[M]^+$ C₅₉H₉₉N₂₁O₁₃S, calculada 1341.7452).

7.2. PÉPTIDO CÍCLICO CON PUENTE DISULFURO

Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Cys²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Cys¹⁰]-Ile¹¹-NH₂ (121):



La síntesis del péptido con puente disulfuro se realizó a partir del correspondiente derivado lineal anclado a la resina con residuos de Cys(Acm) en las posiciones de

ciclación, previamente sintetizado por los métodos generales descritos en el apartado 6.3.1, con el extremo *N*-terminal acetilado (0.034 mmol). Los aminoácidos de partida utilizados fueron Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH y Fmoc-Cys(Acm)-OH. Tras la elongación del péptido, se llevó a cabo la desprotección de las cadenas laterales de Cys y la ciclación en un solo paso. Para ello, se trató la resina (0.034 mmol), previamente hinchada, con una disolución de Tl(tfa)₃ (22 mg, 0.408 mmol) en DMF (2 ml). La mezcla se mantuvo con agitación orbital durante 90 min. A continuación, la resina se lavó con DMF/DCM/DMF/DCM (4 × 0.5 min). Tras el desanclaje en las condiciones habituales se llevó a cabo la purificación del producto por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 45% A en 25 min, 45 a 100% A en 3 min), obteniéndose 2.6 mg de un sólido blanco (6% rendimiento global). RMN: rotamería *cis:trans* Lys-Pro (1:3), Tablas 48 y 49. HPLC: $t_R = 12.42$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1297.2$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1295.5939 ($[M]^+ C_{56}H_{94}N_{18}O_{16}S$, calculada 1295.5937).

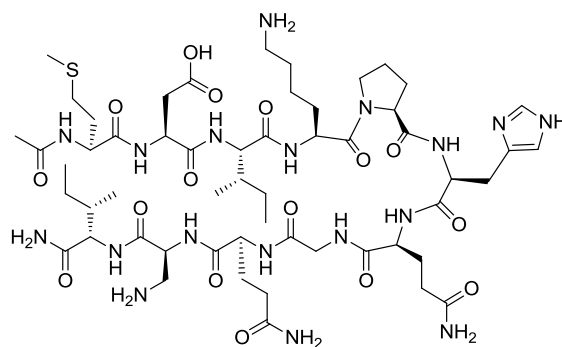
7.3. PÉPTIDOS CÍCLICOS CON PUENTES AMIDA Y ANÁLOGOS LINEALES

La síntesis de los péptidos lineales se realizó a partir de 100 mg de resina Rink-amida (0.034 mmol/g) siguiendo los métodos generales descritos en el apartado 6.3.1, con el extremo *N*-terminal acetilado, utilizando como aminoácidos de partida Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc- α MePro-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asp(OAll)-OH y Fmoc-Dap(Alloc)-OH, según proceda

La preparación de los péptidos cíclicos con puente amida se llevó a cabo a partir de los correspondientes análogos lineales anclados a la resina (0.034 mmol) con Asp(OAll) y Dap(Alloc) en las posiciones de ciclación. Tras la eliminación de los grupos protectores Alloc y OAll tal como se describe en el apartado 6.3.1.4, la resina cargada con el correspondiente péptido lineal (0.034 mmol), previamente hinchada, se trató con una disolución de PyAOP (177 mg, 0.34 mmol), HOAt (46 mg, 0.34 mmol) y DIEA (0.12 ml, 0.68 mmol) en DMF anhidra (2 ml). La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente

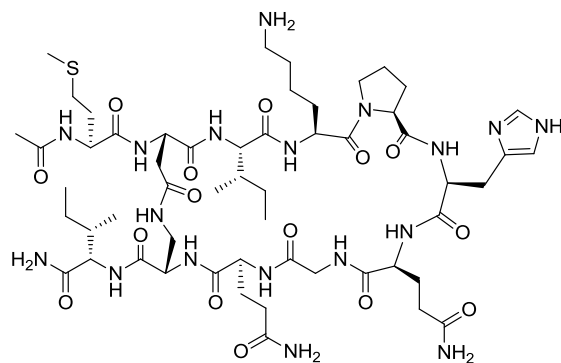
hasta que el test de Kaiser resultó negativo. A continuación la resina se lavó con DMF/DCM/DMF/DCM (4 × 0.5 min).

Ac-Met¹-Asp²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Dap¹⁰-Ile¹¹-NH₂ (124):



Tras la elongación del péptido por los métodos descritos anteriormente utilizando DIC/HOBt como agente acoplante (Tabla 20, 4A), se eliminaron los grupos protectores Alloc y OAll. A continuación el péptido parcialmente desprotegido se desancló y se purificó por HPLC semipreparativo (10% A 2 min, 10 a 40% A en 25 min, 40 a 100% A en 3 min), obteniéndose 4.4 mg de un sólido blanco (10% rendimiento global). RMN: Tablas 50 y 51. HPLC: $t_R = 13.98$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1294.2$, $[M + 2H]^{2+} = 647.8$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1292.6663 ($[M]^+$ C₅₅H₉₂N₁₈O₁₆S, calculada 1292.6659).

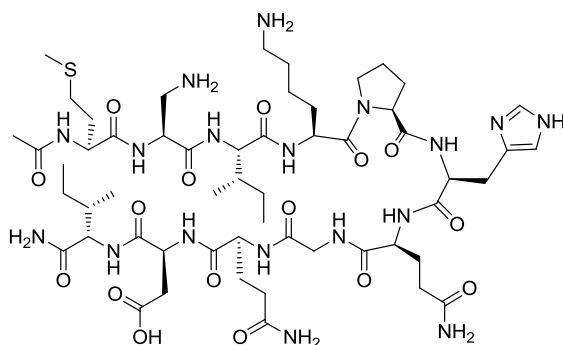
Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Asp²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Dap¹⁰]-Ile¹¹-NH₂ (125):



Sobre el péptido lineal convenientemente desprotegido en los residuos de Asp y Dap, **129a**, se llevó a cabo la reacción de ciclación siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.2.1. La reacción se completó después de 12 h con agitación orbital. Tras el

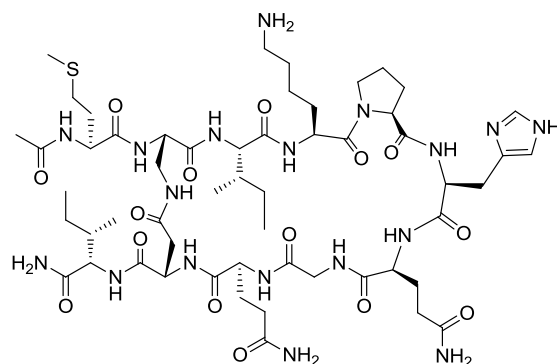
desanclaje, se realizó la purificación del producto por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 45% A en 25 min, 45 a 100% A en 3 min), obteniéndose 3.5 mg de un sólido blanco (8% rendimiento global). RMN: rotamería *cis:trans* Lys-Pro (1:2), Tablas 52 y 53. HPLC: $t_R = 10.69$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1276.2$, $[M + 2H]^{2+} = 638.7$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1274.6562 ($[M]^+ C_{55}H_{90}N_{18}O_{15}S$, calculada 1274.6554).

Ac-Met¹-Dap²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Asp¹⁰-Ile¹¹-NH₂ (126):



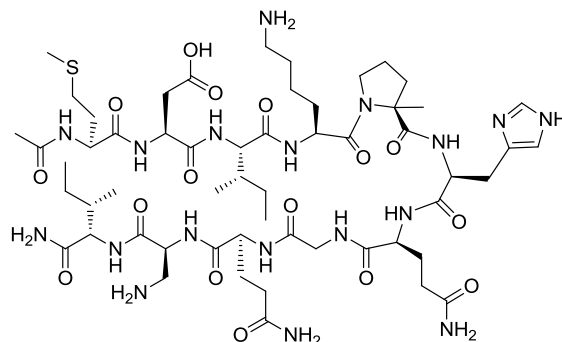
Tras la elongación del péptido por los métodos descritos anteriormente utilizando DIC/HOBt como agente acoplante (Tabla 20, 4A), se eliminaron los grupos protectores Alloc y OAll. A continuación el péptido parcialmente desprotegido se desancló y se purificó por HPLC semipreparativo (10% A 2 min, 10 a 40% A en 25 min, 40 a 100% A en 3 min), obteniéndose 8.8 mg de un sólido blanco (20% rendimiento global). RMN: Tablas 54 y 55 (EI+) m/z encontrada 1292.6657 ($[M]^+ C_{55}H_{92}N_{18}O_{16}S$, calculada 1292.6659).

Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Dap²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Asp¹⁰]-Ile¹¹-NH₂ (127):



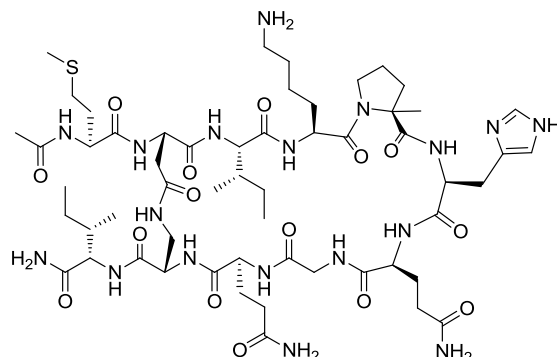
Sobre el péptido lineal convenientemente desprotegido en los residuos de Asp y Dap, **129b**, se llevó a cabo la reacción de ciclación siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.2.1. La reacción se completó después de 2 h con agitación orbital. Tras el desanclaje se llevó a cabo la purificación del producto por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 35% A en 25 min, 35 a 100% A en 3 min) obteniendo 2.6 mg de un sólido blanco (6% rendimiento global). RMN: rotamería *cis:trans* Lys-Pro (2:5), Tablas 56 y 57. HPLC: $t_R = 10.19$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1276.2$, $[M + 2H]^{2+} = 638.7$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1274.6553 ($[M]^+$ C₅₅H₉₀N₁₈O₁₅S, calculada 1274.6554).

Ac-Met¹-Asp²-Ile³-Lys⁴- α MePro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Dap¹⁰-Ile¹¹-NH₂ (131):



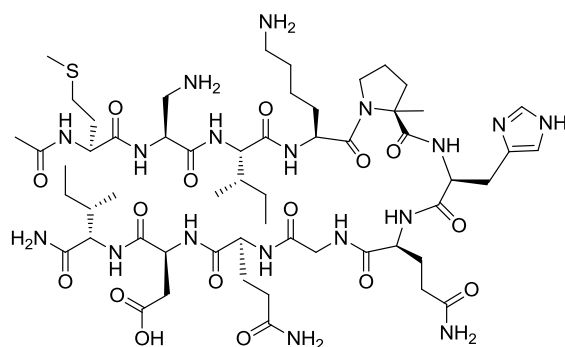
Tras la elongación del péptido por los métodos descritos anteriormente utilizando HCTU como agente acoplante (Tabla 20, 4B), se eliminaron los grupos protectores Alloc y OAll. A continuación el péptido parcialmente desprotegido se desancló y se purificó por HPLC semipreparativo (10% A 2 min, 10 a 30% A en 25 min, 30 a 100% A en 3 min) obteniendo 12.8 mg de un sólido blanco (29% rendimiento global). RMN: Tablas 58 y 59. HPLC: $t_R = 17.35$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1308.2$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1306.6819 ($[M]^+$ C₅₆H₉₄N₁₈O₁₆S, calculada 1306.6816).

Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Asp²-Ile³-Lys⁴- α MePro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Dap¹⁰]-Ile¹¹-NH₂ (132):



Sobre el derivado lineal convenientemente desprotegido en los residuos de Asp y Dap, **136a**, se llevó a cabo la reacción de ciclación siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.2.1. La reacción se completó después de 2 h con agitación orbital. Tras el desanclaje, se llevó a cabo la purificación del producto por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 35% A en 25 min, 35 a 100% A en 3 min) obteniendo 1.8 mg de un sólido blanco (4% rendimiento global). RMN: rotámetro *trans* Lys-Pro, Tablas 60 y 61. HPLC: t_R = 14.20 min. EM-ES: $[M + H]^+$ = 1290.2, $[M + 2H]^{2+}$ = 645.8. HRMS (EI+) m/z encontrada 1288.6717 ($[M]^+$ C₅₆H₉₂N₁₈O₁₅S, calculada 1288.6710).

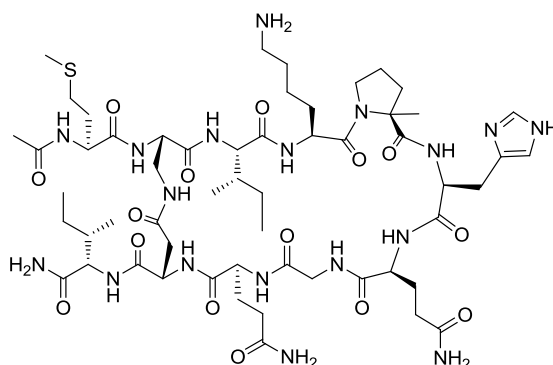
Ac-Met¹-Dap²-Ile³-Lys⁴- α MePro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Asp¹⁰-Ile¹¹-NH₂ (133):



Tras la elongación del péptido por los métodos descritos anteriormente, utilizando HCTU como agente acoplante (Tabla 20, 4B), se eliminaron los grupos protectores Alloc y OAll. A continuación el péptido parcialmente desprotegido se desancló y se purificó por HPLC semipreparativo (10% A 2 min, 10 a 30% A en 25 min, 30 a 100% A en 3 min), obteniéndose 5.3 mg de un sólido blanco (12% rendimiento global). RMN: Tablas 62 y

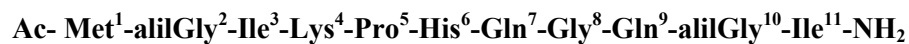
63. HPLC: $t_R = 16.80$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1308.2$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1306.6811 ($[M]^+ C_{56}H_{94}N_{18}O_{16}S$, calculada 1306.6816).

Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Dap²-Ile³-Lys⁴- α MePro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Asp¹⁰]-Ile¹¹-NH₂ (134):



Sobre el derivado lineal convenientemente desprotegido en los residuos de Dap y Asp, **136b**, se llevó a cabo la reacción de ciclación siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.2.1. La reacción se completó después de 2 h con agitación orbital. Tras el desanclaje se llevó a cabo la purificación del producto por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 35% A en 25 min, 35 a 100% A en 3 min), obteniéndose 3.6 mg de un sólido blanco (8% rendimiento global). RMN: rotámero *trans* Lys-Pro, Tablas 64 y 65. HPLC: $t_R = 13.40$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1290.2$, $[M + 2H]^{2+} = 645.8$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1288.6719 ($[M]^+ C_{56}H_{92}N_{18}O_{15}S$, calculada 1288.6710).

Tabla 23. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **56^a**.



	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.02
Met 1	8.45	4.40	2.02 y 1.97	2.59	CH ₃ ϵ = 2.10
AlilGly 2	8.39	4.37	2.48	5.73	CH δ = 5.14
Ile 3	8.34	4.12	1.81	1.48 y 1.18	CH ₃ γ = 0.90 CH ₃ δ = 0.86
Lys 4	8.59	4.57	1.82 y 1.71	1.50 y 1.46	CH δ = 1.70 CH ₃ ϵ = 3.00
Pro 5		4.40	2.26 y 1.82	2.00	CH δ = 3.87 y 3.65
His 6	8.69	4.58	3.18		CH δ = 7.18 CH ϵ = 8.25
Gln 7	8.55	4.32	2.08 y 1.98	2.34	CONH ₂ = 7.68 y 6.97
Gly 8	8.69	3.96			
Gln 9	8.37	4.34	2.08 y 1.96	2.34	CONH ₂ = 7.66 y 7.00
AlilGly 10	8.50	4.39	2.50	5.74	CH δ = 5.14
Ile 11	8.37	4.10	1.83	1.49 y 1.18	CH ₃ γ = 0.92 CH ₃ δ = 0.85
CONH₂	7.74 y 7.23				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1).

Tabla 24. Desplazamientos químicos de ^{13}C - y ^{15}N -RMN para **56**^a.

Ac- Met¹-alilGly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-alilGly¹⁰-Ile¹¹-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.2
Met 1	126.3	55.4	32.9	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8
AlilGly 2	122.6	56.0	37.9	- ^b	
Ile 3	123.8	60.5	38.4	27.1	CH ₃ γ = 17.3 CH ₃ δ = 12.6
Lys 4	128.4	54.2	32.4	24.8	CH δ = 29.1 CH ₃ ϵ = 41.8
Pro 5		63.0	32.2	27.4	CH δ = 50.7
His 6	119.8	55.8	29.4	- ^b	
Gln 7	122.8	55.8	29.4	33.5	N ϵ = 113.0
Gly 8	111.2	45.0			
Gln 9	120.3	55.5	29.6	33.7	N ϵ = 113.1
AlilGly 10	- ^c	56.0	37.9	- ^b	
Ile 11	123.8	60.7	38.4	27.2	CH ₃ γ = 17.3 CH ₃ δ = 12.5
CONH₂	- ^c				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. ^bLas señales de ^{13}C > 65 ppm no han sido registradas. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 25. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **57a**^a.

Ac-Met¹-ciclo(CH₂-CH=CH-CH₂)^{2,10}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Gly¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.01 (1.91)
Met 1	8.42 (8.55)	4.39	1.99 y 1.96 (2.09 y 1.98)	2.58 y 2.53	CH ₃ ϵ = 2.08
Gly 2	8.50 (8.32)	4.32 (4.41)	2.49 y 2.35 (2.40)	5.47 (5.38)	
Ile 3	8.33 (8.31)	4.02 (4.24)	1.82 (1.88)	1.48 y 1.19 (1.18)	CH ₃ γ = 0.86 (0.97) CH ₃ δ = 0.86 (0.88)
Lys 4	8.35 (8.51)	4.51 (4.42)	1.80 y 1.71 (1.74 y 1.67)	1.48 (1.56 y 1.34)	CH δ = 1.69 (1.65) CH ₃ ϵ = 3.01 (2.98)
Pro 5		4.43 (4.68)	2.18 y 1.89 (2.19)	1.90 (1.90 y 1.36)	CH δ = 3.79 y 3.57 (3.46 y 3.40)
His 6	8.68 (8.85)	4.49 (4.80)	3.24 (3.30 y 3.17)		CH δ = 7.18 CH ϵ = 8.30
Gln 7	8.31 (8.83)	4.33 (4.23)	2.09 y 1.95 (2.05 y 1.97)	2.24 y 2.19 (2.35)	CONH ₂ = 7.61 y 6.97 (7.72 y 6.97)
Gly 8	8.51 (8.88)	4.05 y 3.86 (4.00 y 3.90)			
Gln 9	8.41 (8.33)	4.49 (4.32)	2.09 y 1.92 (2.12 y 2.01)	2.35 (2.39)	CONH ₂ = 7.68 y 6.97 (7.66 y 6.99)
Gly 10	8.80 (8.05)	4.32 (4.44)	2.49 y 2.34 (2.43)	5.47 (5.38)	
Ile 11	8.40 (8.17)	4.11 (4.12)	1.83 (1.84)	1.49 y 1.18 (1.19)	CH ₃ γ = 0.92 (0.93) CH ₃ δ = 0.85 (0.86)
CONH₂	7.74 y 7.24 (7.75 y 7.25)				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1). Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro.

Tabla 26. Desplazamientos químicos de ^{13}C -y ^{15}N -RMN para **57a**^a.

Ac-Met¹-ciclo(CH₂-CH=CH-CH₂)^{2,10}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Gly¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.2 (24.4)
Met 1	126.3	55.4	33.0	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8
Gly 2	123.6	55.7	31.7 (31.8)	- ^b	
Ile 3	124.7	61.4 (60.4)	38.3 (39.6)	27.5	CH ₃ γ = 17.4 (17.4) CH ₃ δ = 12.8 (13.0)
Lys 4	126.1	54.4 (55.0)	32.6 (32.6)	24.7 (24.9)	CH δ = 29.2 (29.3) CH ₃ ϵ = 41.9 (41.8)
Pro 5		63.0 (63.4)	32.1 (33.5)	27.2 (24.5)	CH δ = 50.6 (50.0)
His 6	- ^c	56.8 (55.4)	29.0 (29.8)	- ^b	
Gln 7	- ^c	54.9 (56.9)	29.5 (28.7)	33.7	N ϵ = 112.9
Gly 8	109.9	44.9 (45.3)			
Gln 9	124.9	54.9	30.3 (29.1)	33.6 (33.9)	N ϵ = 112.5
Gly 10	123.0	55.7 (55.6)	32.3	- ^b	
Ile 11	124.9	60.7 (61.0)	38.4	27.2	CH ₃ γ = 17.3 (17.4) CH ₃ δ = 12.6 (13.0)
CONH₂	- ^c				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro. ^bLas señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 27. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **57b**^a.

Ac-Met¹-ciclo(CH₂-CH=CH-CH₂)^{2,10}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Gly¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH ₃ CO					CH ₃ = 2.01 (1.93)
Met 1	8.44 (8.42)	4.42 (4.37)	2.02 y 1.97	2.59 y 2.55	CH ₃ ϵ = 2.08 (2.03)
Gly 2	8.30 (8.31)	4.40 (4.36)	2.44 (2.43 y 2.34)	5.42 (5.37)	
Ile 3	8.44 (8.28)	4.03 (4.21)	1.81 (1.85)	1.50 y 1.19 (1.44 y 1.20)	CH ₃ γ = 0.86 (0.98) CH ₃ δ = 0.86 (0.88)
Lys 4	8.52 (8.54)	4.45 (4.37)	1.78 y 1.74 (1.75)	1.49 (1.57 y 1.38)	CH δ = 1.71 (1.68) CH ₃ ϵ = 3.02 (2.99)
Pro 5		4.50 (4.64)	2.21 y 1.91 (2.22 y 2.16)	1.89 y 1.79 (1.92 y 1.49)	CH δ = 3.86 y 3.56 (3.47 y 3.42)
His 6	8.74 (8.85)	4.41 (4.66)	3.22 (3.20)		CH δ = 7.16 (7.16) CH ϵ = 8.18 (8.15)
Gln 7	8.14 (8.65)	4.34 (4.34)	2.08 y 1.94 (2.06 y 1.93)	2.19 (2.32)	CONH ₂ = 7.68 y 6.98 (7.70 y 6.98)
Gly 8	8.50 (8.77)	4.06 y 3.89 (4.04 y 3.89)			
Gln 9	8.41	4.43 (4.41)	2.07 y 1.92 (2.11 y 2.00)	2.36	CONH ₂ = 7.60 y 6.97 (7.65 y 6.97)
Gly 10	8.73 (8.26)	4.27 (4.34)	2.44 y 2.37 (2.33 y 2.22)	5.44 (5.37)	
Ile 11	8.48 (8.30)	4.12 (4.12)	1.83 (1.84)	1.51 y 1.19 (1.46 y 1.20)	CH ₃ γ = 0.92 (0.93) CH ₃ δ = 0.86 (0.93)
CONH ₂	7.75 y 7.24 (7.78 y 7.23)				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1). Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro.

Tabla 28. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **57b**^a.

Ac-Met¹-ciclo(CH₂-CH=CH-CH₂)^{2,10}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Gly¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.2 (24.4)
Met 1	126.4	55.3	33.0	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8
Gly 2	122.1 (122.1)	55.8 (55.5)	36.8 (36.3)	- ^b	
Ile 3	123.9 (121.4)	60.9 (60.4)	38.2 (39.4)	27.2	CH ₃ γ = 17.4 (17.3) CH ₃ δ = 12.6 (12.8)
Lys 4	- ^c	54.5 (55.1)	32.7 (32.4)	24.6 (25.0)	CH δ = 29.3 (29.3) CH ₃ ϵ = 41.9 (41.8)
Pro 5		62.7 (63.3)	32.2 (33.5)	27.1 (24.4)	CH δ = 50.6 (50.0)
His 6	- ^c	57.2 (55.9)	28.5 (29.4)	- ^b	
Gln 7	- ^c	54.8 (56.1)	29.9 (29.3)	33.6 (33.6)	N ϵ = 113.0 (112.9)
Gly 8	- ^c	44.6 (44.9)			
Gln 9	- ^c	54.8	30.4 (29.3)	33.6	N ϵ = 112.6 (112.6)
Gly 10	- ^c	56.4	37.0 (36.9)	- ^b	
Ile 11	- ^c	60.6	38.4	27.4	CH ₃ γ = 17.3 (17.4) CH ₃ δ = 12.5
CONH₂	112.3 (112.1)				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro. ^bLas señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 29. Desplazamientos químicos de ¹H-RMN para 58^a.

Ac-Met¹-ciclo[(CH₂)₄]^{2,10}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Gly¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH ₃ CO					CH ₃ = 2.01
Met 1	8.43	4.38	1.99	2.59 y 2.55	CH ₃ ϵ = 2.09
Gly 2	8.41 (8.45)	4.30 (4.29)	1.69 (1.61)	1.26 y 1.21 (1.32)	
Ile 3	8.37 (8.26)	4.06 (4.18)	1.83 (1.85)	1.49 y 1.22 (1.49 y 1.19)	CH ₃ γ = 0.88 (0.97) CH ₃ δ = 0.87 (0.88)
Lys 4	8.43 (8.59)	4.49 (4.41)	1.77 (1.82 y 1.73)	1.48 (1.57 y 1.34)	CH δ = 1.70 (1.67) CH ₃ ϵ = 3.01 (2.98)
Pro 5		4.46 (4.67)	2.22 y 1.88 (2.20 y 2.17)	1.88 y 1.85 (1.91 y 1.49)	CH δ = 3.84 y 3.60 (3.46 y 3.39)
His 6	8.70 (8.86)	4.52 (4.76)	3.22 (3.26 y 3.20)		CH δ = 7.18 CH ϵ = 8.34
Gln 7	8.27 (8.79)	4.35 (4.29)	2.08 y 1.95 (2.04 y 1.95)	2.23 (2.31)	CONH ₂ = 7.69 y 6.99 (7.71 y 6.99)
Gly 8	8.60 (8.85)	4.04 y 3.86 (4.00 y 3.90)			
Gln 9	8.41 (8.38)	4.45 (4.38)	2.08 y 1.91 (2.14 y 2.00)	2.36 (2.39)	CONH ₂ = 7.62 y 6.97 (7.66 y 6.98)
Gly 10	8.70 (8.23)	4.18 (4.23)	1.74 y 1.58 (1.83 y 1.64)	1.26 y 1.21 (1.21 y 1.11)	
Ile 11	8.46 (8.24)	4.11 (4.10)	1.83 (1.84)	1.52 y 1.21 (1.32 y 1.20)	CH ₃ γ = 0.94 (0.93) CH ₃ δ = 0.87
CONH ₂	7.84 y 7.21				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1). Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro.

Tabla 30. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **58**^a.

Ac-Met¹-ciclo[(CH₂)₄]^{2,10}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Gly¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.2
Met 1	126.1	55.6	32.9	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8
Gly 2	118.8 (123.7)	55.9 (56.4)	33.2 (33.3)	27.1	
Ile 3	124.0 (122.6)	61.3 (60.4)	38.1 (39.3)	27.5 (27.1)	CH ₃ γ = 17.4 (17.4) CH ₃ δ = 12.8 (15.5)
Lys 4	126.4 (125.6)	54.6 (55.1)	32.5	24.6 (25.1)	CH δ = 29.3 (29.3) CH ₃ ϵ = 41.9 (41.7)
Pro 5		62.9 (63.2)	32.2 (33.5)	27.2 (24.5)	CH δ = 50.7 (50.0)
His 6	123.8	56.7 (55.7)	29.1 (29.1)		
Gln 7	118.0 (122.8)	55.4	29.8 (29.1)	33.6 (33.6)	N ϵ = 113.1 (113.0)
Gly 8	110.2 (110.9)	44.8 (45.2)			
Gln 9	123.5 (120.0)	54.8	30.3 (29.3)	33.6 (33.8)	N ϵ = 112.7 (112.7)
Gly 10	118.7 (122.9)	56.9 (56.7)	33.7	27.1	
Ile 11	125.7	60.7 (60.9)	38.3	27.2	CH ₃ γ = 17.3 CH ₃ δ = 12.6
CONH₂					

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro. Las señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas.

Tabla 31. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **59^a**.

Ac-Met¹-AlilGly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gly⁷-Gln⁸-AlilGly⁹-Ile¹⁰-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.02
Met 1	8.45	4.40	2.02 y 1.97	2.59 y 2.54	CH ₃ ϵ = 2.09
AlilGly 2	8.39	4.38	2.50 y 2.46	5.73	CH δ = 5.14
Ile 3	8.34	4.12	1.82	1.48 y 1.18	CH ₃ γ = 0.88 CH ₃ δ = 0.85
Lys 4	8.60	4.57	1.80 y 1.71	1.51 y 1.45	CH δ = 1.70 CH ₃ ϵ = 3.00
Pro 5		4.40	2.27 y 1.84	2.01	CH δ = 3.88 y 3.64
His 6	8.72	4.66	3.22		CH δ = 7.26 CH δ = 8.39
Gly 7	8.57	3.93			
Gln 8	8.47	4.34	2.08 y 1.96	2.35	CONH ₂ = 7.68 y 6.99
AlilGly 9	8.48	4.38	2.52 y 2.48	5.75	CH δ = 5.15
Ile 10	8.37	4.11	1.83	1.48 y 1.19	CH ₃ γ = 0.92 CH ₃ δ = 0.86
CONH₂	7.74 y 7.24				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1).

Tabla 32. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **59^a**.

Ac-Met¹-AlilGly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gly⁷-Gln⁸-AlilGly⁹-Ile¹⁰-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.2
Met 1	126.3	55.4	32.9	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8
AlilGly 2	122.6	55.9	37.9	- ^b	
Ile 3	123.7	60.5	38.4	27.2	CH ₃ γ = 17.3 CH ₃ δ = 12.5
Lys 4	128.4	54.1	32.4	24.7	CH δ = 29.1 CH ₃ ϵ = 41.8
Pro 5		63.0	32.2	27.4	CH δ = 50.7
His 6	119.6	55.6	29.4	- ^b	
Gly 7	110.5	45.0			
Gln 8	120.4	55.5	29.6	33.6	N ϵ = 113.0
AlilGly 9	123.1	56.0	38.0	- ^b	
Ile 10	123.8	60.7	38.4	27.2	CH ₃ γ = 17.3 CH ₃ δ = 12.5
CONH₂	112.3				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. ^bLas señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas.

Tabla 33. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **60b**^a.

Ac-Met¹-ciclo(CH₂-CH=CH-CH₂)^{2,9}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gly⁷-Gln⁸-Gly⁹]-Ile¹⁰-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH ₃ CO					CH ₃ = 2.02
Met 1	8.41	4.41	2.01 y 1.96	2.59 y 2.54	CH ₃ ϵ = 2.08
Gly 2	8.40 (8.39)	4.43 (4.36)	2.45 (2.38 y 2.29)	5.52 (5.48)	
Ile 3	8.41 (8.40)	4.17 (4.14)	1.88 (1.82)	1.45 y 1.21 (1.50 y 1.20)	CH ₃ γ = 0.89 (0.96) CH ₃ δ = 0.88 (0.89)
Lys 4	8.12 (8.55)	4.73 (4.34)	1.68 y 1.58 (1.72)	1.41 y 1.28 (1.51 y 1.38)	CH δ = 1.65 (1.66) CH ₃ ϵ = 2.96 (2.98)
Pro 5		4.27 (4.58)	2.19 y 1.67 (2.14 y 1.95)	2.00 (1.89 y 1.41)	CH δ = 3.69 (3.45 y 3.35)
His 6	8.67 (8.71)	4.67 (4.76)	3.34 y 3.18 (3.29 y 3.22)		CH δ = 7.19 (7.17) CH ϵ = 8.36
Gly 7	8.14 (8.43)	4.10 y 3.83 (3.94 y 3.89)			
Gln 8	8.28 (8.75)	4.52 (4.37)	2.10 y 1.93 (2.11 y 1.97)	2.33 (2.36)	CONH ₂ = 7.66 y 6.96
Gly 9	8.53 (8.37)	4.45 (4.47)	2.42 (2.51 y 2.35)	5.49 (5.47)	
Ile 10	8.52 (8.22)	4.18 (4.11)	1.85 (1.84)	1.50 y 1.20 (1.50 y 1.19)	CH ₃ γ = 0.94 (0.94) CH ₃ δ = 0.87 (0.87)
CONH ₂	7.81 y 7.24 (7.80 y 7.27)				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1). Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro.

Tabla 34. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **60b**^a.

Ac-Met¹-ciclo(CH₂-CH=CH-CH₂)^{2,9}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gly⁷-Gln⁸-Gly⁹]-Ile¹⁰-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.2
Met 1	126.2	55.5	32.9	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8
Gly 2	123.0	55.9 (55.6)	36.6 (36.1)	- ^b	
Ile 3	122.6	61.4 (60.4)	38.7 (38.7)	27.2 (27.3)	CH ₃ γ = 17.7 (17.3) CH ₃ δ = 12.8
Lys 4	- ^c (126.7)	53.9 (54.9)	32.9 (32.4)	24.8 (24.9)	CH δ = 29.2 CH ₃ ϵ = 41.8 (41.7)
Pro 5		64.2 (63.5)	31.7 (33.7)	27.5 (24.2)	CH δ = 50.4 (49.8)
His 6	- ^c	55.4 (55.9)	28.5 (29.4)	- ^b	
Gly 7	- ^c (110.5)	45.3 (45.9)			
Gln 8	- ^c (121.9)	55.0 (55.3)	30.4 (29.3)	33.7 (33.8)	N ϵ = 112.8
Gly 9	- ^c	56.2 (55.3)	36.5 (36.9)	- ^b	
Ile 10	122.0	60.6 (61.0)	38.6 (38.5)	27.1	CH ₃ γ = 17.4 CH ₃ δ = 12.6
CONH₂	112.0 (111.7)				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro. ^bLas señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 35. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **61**^a.

Ac-Met¹-ciclo[(CH₂)₄]^{2,9}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gly⁷-Gln⁸-Gly⁹]-Ile¹⁰-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.01
Met 1	8.41	4.39	2.01 y 1.96	2.59 y 2.55	CH ₃ ϵ = 2.08
Gly 2	8.42 (8.42)	4.33 (4.25)	1.79 y 1.69 (1.57 y 1.48)	1.53 y 1.34 (1.47 y 1.29)	
Ile 3	8.50 (8.38)	4.11 (4.10)	1.89 (1.82)	1.49 y 1.23 (1.50 y 1.22)	CH ₃ γ = 0.91 (0.93) CH ₃ δ = 0.86 (0.86)
Lys 4	8.31 (8.60)	4.78 (4.55)	1.60 y 1.52 (1.72 y 1.65)	1.42 y 1.14 (1.52 y 1.37)	CH δ = 1.61 (1.66) CH ₃ ϵ = 2.94 (2.98)
Pro 5		4.25 (4.55)	2.19 y 1.66 (2.20 y 1.87)	2.00 (1.88 y 1.49)	CH δ = 3.71 y 3.63 (3.45)
His 6	8.85 (8.72)	4.74 (4.81)	3.37 y 3.12 (3.31 y 3.19)		CH δ = 7.21 (7.16) CH ϵ = 8.42 (8.38)
Gly 7	8.00 (8.42)	4.18 y 3.76 (4.00 y 3.85)			
Gln 8	8.06 (8.74)	4.50 (4.33)	2.09 y 1.90 (2.09 y 2.02)	2.32 (2.36)	CONH ₂ = 7.68 y 6.96 (6.98)
Gly 9	8.65 (8.55)	4.36 (4.50)	1.79 y 1.68 (1.75 y 1.69)	1.35 (1.33)	
Ile 10	8.45 (8.34)	4.18 (4.12)	1.82 (1.84)	1.50 y 1.25	CH ₃ γ = 0.94 (0.93) CH ₃ δ = 0.87 (0.87)
CONH₂	7.82 y 7.25				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1). Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro.

Tabla 36. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **61**^a.

Ac-Met¹-ciclo[(CH₂)₄]^{2,9}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gly⁷-Gln⁸-Gly⁹]-Ile¹⁰-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.2
Met 1	126.4	55.3	32.9	31.8	CH ₃ ϵ = 16.8
Nva 2	124.4 (126.4)	56.1 (56.1)	33.5 (33.5)	27.0	
Ile 3	123.9 (124.0)	61.5 (60.5)	38.1 (38.3)	27.2	CH ₃ γ = 17.6 CH ₃ δ = 12.6
Lys 4	- ^c (126.8)	53.8 (55.8)	33.1 (32.4)	24.5 (25.0)	CH δ = 29.5 (29.1) CH ₃ ϵ = 41.9 (41.7)
Pro 5		64.2 (63.3)	31.8 (34.0)	27.5 (24.2)	CH δ = 50.4 (50.0)
His 6	116.7	55.1 (55.8)	28.5 (29.6)	- ^b	
Gly 7	- ^c	45.3 (45.7)			
Gln 8	119.1 (122.6)	54.7 (54.6)	30.6 (28.9)	33.5 (33.7)	N ϵ = 112.8 (113.0)
Nva 9	124.6 (124.7)	55.9 (55.0)	33.0 (33.4)	(26.5)	
Ile 10	124.5 (122.6)	60.6 (60.8)	38.3 (38.4)	27.0	CH ₃ γ = 17.4 CH ₃ δ = 12.6
CONH₂	112.1				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro. ^bLas señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 37. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para 62^a .

Ac-Met¹-alilGly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gln⁸-alilGly⁹-Ile¹⁰-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH ₃ CO					CH ₃ = 2.02
Met 1	8.45	4.40	2.02 y 1.96	2.60 y 2.55	CH ₃ ϵ = 2.10
AlilGly 2	8.39	4.38	2.51 y 2.47	5.74	CH δ = 5.15
Ile 3	8.34	4.12	1.81	1.47 y 1.17	CH ₃ γ = 0.86 CH ₃ δ = 0.86
Lys 4	8.59	4.56	1.81 y 1.70	1.50 y 1.45	CH δ = 1.70 CH ₃ ϵ = 3.00
Pro 5		4.39	2.27 y 1.83	1.83	CH δ = 3.87 y 3.65
His 6	8.67	4.57	3.16		CH δ = 7.14 CH ϵ = 8.18
Gln 7	8.46	4.29	2.03 y 1.95	2.30	CONH ₂ = 7.67 y 7.00
Gln 8	8.66	4.29	2.06 y 1.97	2.37	CONH ₂ = 7.68 y 7.00
AlilGly 9	8.48	4.39	2.52 y 2.48	5.75	CH δ = 5.14
Ile 10	8.38	4.11	1.83	1.49 y 1.18	CH ₃ γ = 0.93 CH ₃ δ = 0.86
CONH ₂	7.75 y 7.24				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1).

Tabla 38. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **62**^a.

Ac-Met¹-alilGly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gln⁸-alilGly⁹-Ile¹⁰-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.2
Met 1	126.3	55.4	32.9	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8
AlilGly 2	122.6	55.9	37.9	- ^b	
Ile 3	123.7	60.5	38.4	27.2	CH ₃ γ = 17.3 CH ₃ δ = 12.7
Lys 4	128.4	54.2	32.4	24.8	CH δ = 29.1 CH ₃ ϵ = 41.8
Pro 5		63.0	32.2	27.4	CH δ = 50.7
His 6	119.7	55.6	29.2	- ^b	
Gln 7	122.5	55.6	29.6	33.6	N ϵ = 113.3
Gln 8	122.9	55.6	29.5	33.6	N ϵ = 112.9
AlilGly 9	123.2	55.9	37.9	- ^b	
Ile 10	123.9	60.7	38.3	27.2	CH ₃ γ = 17.3 CH ₃ δ = 12.5
CONH₂	112.3				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. ^bLas señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 39. Desplazamientos químicos de $^1\text{H-RMN}$ para $63^{a,b}$.

Ac-Met¹-ciclo(CH₂-CH=CH-CH₂)^{2,9}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gln⁸-Gly⁹]-Ile¹⁰-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH ₃ CO					CH ₃ = 2.01
Met 1	8.42, 8.41 (8.36)	4.36, 4.37 (4.36)	1.99, 1.94	2.60 y 2.51, 2.55 (2.47)	CH ₃ ϵ = 2.08, 2.03
Gly 2	8.50, 8.58 (8.35)	4.38, 4.41 (4.41)	2.53 y 2.42, 2.49 (2.42)	5.45, 5.48 (5.42)	
Ile 3	8.17, 8.27 (8.28, 8.47)	4.15, 4.28 (4.18, 4.24)	1.95, 1.96 (1.81, 1.85)	1.43 y 1.21 1.36 y 1.16 (1.16, 1.17)	CH ₃ γ = 0.91, 0.87 (0.96, 0.98) CH ₃ δ = 0.86, 0.87
Lys 4	7.96, 8.06 (8.53, 8.55)	4.72, 4.65 (4.25, 4.31)	1.82 y 1.62, 1.79 y 1.58 (1.73, 1.75 y 1.56)	1.45, 1.48 y 1.42 (1.56 y 1.37)	CH δ = 1.70, 1.69 (1.70) CH ₃ ϵ = 2.98, 3.00 (2.99, 3.02)
Pro 5		4.22, 4.25 (4.59, 4.59)	2.13 y 1.67, 2.15 y 1.69 (2.16, 2.19)	2.02 y 1.99, 2.02 (1.91 y 1.41, 1.90 y 1.38)	CH δ = 3.79 y 3.64, 3.84 y 3.64 (3.48 y 3.38, 3.47 y 3.34)
His 6	8.78, 8.68 (8.73, 8.60)	4.38, 4.41 (4.65, 4.51)	3.39 y 3.35, 3.38 y 3.31 (3.24, 3.26)		CH δ = 7.15, 7.15 (7.24) CH ϵ = 8.37, 8.32 (8.36)
Gln 7	7.73, 7.90 (7.68, 8.41)	4.29, 4.41 (4.30, 4.29)	1.99, 1.99 (2.03, 1.91)	2.29 y 2.23, 2.24 y 2.29 (2.18)	CONH ₂ = 7.67 y 6.98, 7.65 y 6.95)
Gln 8	8.84, 8.65 (8.7, 8.56)	4.33, 4.34 (4.31, 4.30)	2.06 y 2.01, 2.07 y 1.99 (2.09 y 2.01, 2.05 y 1.96)	2.36, 2.33 (2.36, 2.32)	CONH ₂ = 7.69 y 6.96, 7.60 y 6.92
Gly 9	8.60, 8.50 (8.19, 8.24)	4.44, 4.42 (4.44, 4.47)	2.49 y 2.34 (2.43)	5.54, 5.50 (5.43, 5.40)	
Ile 10	8.23, 8.35 (8.31)	4.13, 4.28 (4.10)	1.85, 1.96 (1.84)	1.49 y 1.19, 1.36 y 1.16 (1.19)	CH ₃ γ = 0.93, 0.94 (0.93) CH ₃ δ = 0.85, 0.86
CONH ₂	7.81 y 7.25, 7.82 y 7.25 (7.79 y 7.27)				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1). Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro. ^b En cursiva se indican las señales correspondientes al isómero del doble enlace minoritario.

Tabla 40. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **63**^{a,b}.

Ac- Met¹-ciclo(CH₂-CH=CH-CH₂)^{2,9}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gln⁸-Gly⁹]-Ile¹⁰-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.2
Met 1	126.0, 126.2	55.5, 55.8	33.0, 32.9	31.9, 32.5 (31.2)	CH ₃ ϵ = 16.8, 16.8
Gly 2	122.7 (122.3)	56.6	35.9 (36.4)	- ^c	
Ile 3	119.8, 120.0	62.1, 61.4 (60.5)	39.1	27.3, 27.0	CH ₃ γ = 17.7, 17.7 (17.3) CH ₃ δ = 12.7
Lys 4	121.9, 123.9	53.8, 54.1 (55.4)	32.6, 32.6 (32.2, 32.4)	25.2, 25.2 (25.1)	CH δ = 29.2 CH ₃ ϵ = 41.8
Pro 5		63.8, 63.8 (63.4)	31.9, 32.0 (33.7, 33.7)	27.6, 27.6 (24.2)	CH δ = 50.6, 50.6 (49.9, 49.9)
His 6	122.9, 116.6	56.4, 55.8	27.4	- ^c	
Gln 7	120.1, 118.6	55.9	30.1, 30.4	33.5, 33.9	N ϵ = 112.4 (112.5)
Gln 8	116.7, 120.9	55.5	28.8, 29.1 (29.8)	33.7, 33.8	N ϵ = 113.1 (112.6)
Gly 9	125.5, 123.7 (122.5)	55.5 (57.3)	36.1, 36.6	- ^c	
Ile 10	122.1, 123.2 (122.3)	60.9, 60.7 (61.1)	38.5, 39.0	27.2	CH ₃ γ = 17.4 CH ₃ δ = 13.1, 13.3
CONH₂	112.2, 112.1				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro. Las señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas. ^bEn cursiva se indican las señales correspondientes al isómero del doble enlace minoritario. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 41. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **64^a**.

Ac-Met¹-ciclo[(CH₂)₄]^{2,9}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gln⁸-Gly⁹]-Ile¹⁰-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.01 (1.91)
Met 1	8.44 (8.42)	4.36 (4.38)	2.02 y 1.98 (2.01 y 1.95)	2.59 y 2.54 (2.58 y 2.55)	CH ₃ ϵ = 2.09 (2.03)
Gly 2	8.58 (8.42)	4.34 (4.29)	1.77 y 1.73 (1.64 y 1.59)	1.37 y 1.28 (1.29 y 1.22)	
Ile 3	8.16 (8.28)	4.20 (4.20)	1.95 (1.82)	1.39 y 1.20 (1.39 y 1.16)	CH ₃ γ = 0.96 CH ₃ δ = 0.89
Lys 4	8.01 (8.57)	4.70 (4.26)	1.80 y 1.63 (1.73 y 1.54)	1.47 y 1.43 (1.37)	CH δ = 1.68 (1.68) CH ₃ ϵ = 2.99
Pro 5		4.22 (4.60)	2.14 y 1.68 (2.17)	2.00 (1.90 y 1.42)	CH δ = 3.86 y 3.63 (3.47 y 3.39)
His 6	8.85	4.37	3.37		CH δ = 7.17 CH ϵ = 8.39
Gln 7	7.78 (7.73)	4.25 (4.29)	2.03 y 1.96 (1.99)	2.30	CONH ₂ = 7.71 y 6.98
Gln 8	8.83	4.28 (4.30)	2.06 y 2.02 (2.11 y 2.03)	2.36 (2.36)	CONH ₂ = 7.68 y 6.97
Gly 9	8.62 (8.37)	4.40 (4.38)	1.77 y 1.73 (1.77 y 1.64)	1.37 y 1.29 (1.27 y 1.20)	
Ile 10	8.31 (8.29)	4.14 (4.11)	1.85 (1.84)	1.47 y 1.20 (1.33 y 1.31)	CH ₃ γ = 0.93 (0.92) CH ₃ δ = 0.88 (0.87)
CONH₂	7.80 y 7.24 (7.82 y 7.24)				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1). Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro.

Tabla 42. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **64**^a.

Ac-Met¹-ciclo[(CH₂)₄]^{2,9}[Gly²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gln⁸-Gly⁹]-Ile¹⁰-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.2 (25.7)
Met 1	126.1	55.5	32.8	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8 (16.8)
Gly 2	124.0	55.7	32.4	27.0	
Ile 3	120.2	61.9 (60.2)	39.3	27.1	CH ₃ γ = 17.8 CH ₃ δ = 13.1
Lys 4	122.3	53.9 (56.3)	32.6	25.2	CH δ = 29.1 CH ₃ ϵ = 41.8
Pro 5		63.8 (63.4)	31.9 (33.7)	27.6 (24.2)	CH δ = 50.6 (49.9)
His 6	- ^c	56.5 (56.7)	27.4	- ^b	
Gln 7	119.6	56.1	29.9	33.4	N ϵ = 112.4
Gln 8	124.3	55.9	28.6 (29.5)	33.8	N ϵ = 113.0
Gly 9	126.3	55.7 (55.6)	33.6	- ^c	
Ile 10	122.2	60.7 (60.8)	38.4	27.2	CH ₃ γ = 17.4 CH ₃ δ = 13.1
CONH₂	112.1				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro. ^bLas señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 43. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **65^a**.

Ac-alilGly¹-Arg²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-His¹⁰-alilGly¹¹-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					
AlilGly 1	8.35	4.32	2.52 y 2.45	5.72	CH δ = 5.14
Arg 2	8.55	4.36	1.82 y 1.74	1.65 y 1.58	CH δ = 3.19 CH ₃ ϵ = 7.25
Ile 3	8.30	4.11	1.81	1.47 y 1.18	CH ₃ γ = 0.88 CH ₃ δ = 0.85
Lys 4	8.63	4.57	1.81 y 1.70	1.46	CH δ = 1.51 CH ₃ ϵ = 3.00
Pro 5		4.39	2.26 y 1.82	1.99	CH δ = 3.86 y 3.65
His 6	8.71	4.67	3.18 y 3.12		CH δ = 7.16 CH ϵ = 8.26
Gln 7	8.54	4.33	2.08 y 1.97	2.33	CONH ₂ = 7.65 y 7.00
Gly 8	8.68	3.95			
Gln 9	8.40	4.28	2.01 y 1.92	2.29	CONH ₂ = 7.64 y 6.96
His 10	8.66	4.58	3.15		CH δ = 7.14 CH ϵ = 8.16
AlilGly 11	8.30	4.29	2.47	5.75	CH δ = 5.16
CONH₂	7.71 y 7.22				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1).

Tabla 44. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **67**^a.

Ac-ciclo[(CH₂)₄]^{1,11}[Gly¹-Arg²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-His¹⁰-Gly¹¹]-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH ₃ CO					CH ₃ = 2.00
Gly 1	8.69	4.17 (4.17)	1.77 y 1.69	1.38	
Arg 2	8.64 (8.60)	4.27 (4.35)	1.84 y 1.76 (1.71)	1.68 y 1.60 (1.59)	CH δ = 3.19 (3.17) CH ϵ = 7.25
Ile 3	7.96 (7.94)	4.16 (4.20)	1.80 (1.88)	1.39 y 1.12	CH ₃ γ = 0.84 (0.93) CH ₃ δ = 0.81 (0.86)
Lys 4	8.46 (8.27)	4.54 (4.32)	1.78 y 1.68 (1.70)	1.46 (1.45)	CH δ = 1.65 CH ₃ ϵ = 2.99 (2.96)
Pro 5		4.33 (4.60)	2.10 y 1.78 (2.24 y 2.14)	1.94 (1.91 y 1.57)	CH δ = 3.82 y 3.64 (3.45)
His 6	8.60 (8.74)	4.52 (4.63)	3.20 (3.17)		CH δ = 7.25
Gln 7	8.39 (8.64)	4.28 (4.35)	2.12 y 2.00 (2.10 y 1.95)	2.29 (2.32)	CONH ₂ = 7.65 y 6.95
Gly 8	8.77 (8.64)	4.07 y 3.82 (4.01 y 3.89)			
Gln 9	8.22 (8.42)	4.37 (4.27)	2.08 y 1.93 (2.00)	2.28 (2.30)	CONH ₂ = 7.64 y 6.99
His 10	8.58 (8.70)	4.70 (4.61)	3.19 y 3.09 (3.17)		CH δ = 7.17 CH ϵ = 8.25
Gly 11	8.35 (8.35)	4.17	1.70	1.38	
CONH ₂	7.79 y 7.26				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1). Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro.

Tabla 45. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **67**^a.

Ac-ciclo[(CH₂)₄]^{1,11}[Gly¹-Arg²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-His¹⁰-Gly¹¹]-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.1
Gly 1	124.8	56.9	33.5	27.8	
Arg 2	123.4	55.9	30.3	27.2	CH δ = 43.0
Ile 3	120.7	60.5 (60.6)	38.8 (39.1)	27.2	CH ₃ γ = 17.5 (17.4) CH ₃ δ = 12.6 (12.8)
Lys 4	126.9	54.2 (54.5)	32.4	24.8	CH δ = 29.1 CH ϵ = 41.8
Pro 5		63.2 (63.1)	32.2	27.5	CH δ = 50.7 (50.0)
His 6	117.8	56.1 (56.4)	29.4	- ^b	
Gln 7	- ^c	56.4 (55.9)	28.9	33.6	N ϵ = 113.0
Gly 8	111.4	45.3 (45.2)			
Gln 9	119.1	55.2	29.8	33.6	N ϵ = 112.7
His 10	119.6	55.1 (56.0)	30.7	- ^b	
Gly 11	127.9	56.8	33.3	27.8	
CONH₂	109.5				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro. ^bLas señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 46. Desplazamientos químicos de ¹H-RMN para 68^a.

Ac-Met¹-Arg²-alilGly³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-alilGly⁹-His¹⁰-Ile¹¹-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH ₃ CO					
Met 1	8.49	4.37	2.00	2.60 y 2.55	
Arg 2	8.58	4.35	1.83 y 1.74	1.64	CH δ = 3.20 CH ϵ = 7.25
AlilGly 3	8.31	4.35	2.50 y 2.46	5.73	CH δ = 5.12
Lys 4	8.54	4.60	1.81 y 1.70	1.44	CH δ = 1.51 CH ₃ ϵ = 3.02
Pro 5		4.37	2.26 y 1.83	1.99	CH δ = 3.83 y 3.64
His 6	8.68	4.65	3.13		CH δ = 7.13 CH ϵ = 8.24
Gln 7	8.50	4.34	2.01 y 1.96	2.33	CONH ₂ = 7.65 y 6.99
Gly 8	8.63	3.95			
AlilGly 9	8.23	4.34	2.46	5.69	CH δ = 5.11
His 10	8.67	4.57	3.14		CH δ = 7.12 CH ϵ = 8.12
Ile 11	8.26	4.07	1.77	1.43 y 1.13	CH ₃ γ = 0.89 CH ₃ δ = 0.84
CONH ₂	7.74 y 7.20				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1).

Tabla 47. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **119^a**.

Ac-Met¹-Arg²-Nva³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Nva⁹-His¹⁰-Ile¹¹-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					
Met 1	8.49	4.37	2.00	2.60 y 2.55	
Arg 2	8.58	4.34	1.84 y 1.76	1.64	CH δ = 3.20 CH ϵ = 7.25
Nva 3	8.38	4.26	1.69	1.36	CH ₃ δ = 0.88
Lys 4	8.53	4.58	1.81 y 1.70	1.46	CH δ = 1.51 CH ₃ ϵ = 3.02
Pro 5		4.38	2.26 y 1.83	1.99	CH δ = 3.84 y 3.64
His 6	8.70	4.66	3.14		CH δ = 7.14 CH ϵ = 8.26
Gln 7	8.50	4.33	2.08 y 1.96	2.33	CONH ₂ = 7.65 y 7.00
Gly 8	8.62	3.95			
Nva 9	8.26	4.23	1.65	1.27	CH ₃ δ = 0.88
His 10	8.66	4.56	3.15		CH δ = 7.12 CH ϵ = 8.12
Ile 11	8.26	4.09	1.78	1.43 y 1.13	CH ₃ γ = 0.89 CH ₃ δ = 0.83
CONH₂	7.75 y 7.21				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1).

Tabla 48. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **121**^a.

Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Cys²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Cys¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.03 (1.92)
Met 1	8.51 (8.46)	4.45 (4.44)	2.06 y 1.99 (2.03 y 1.97)	2.61 y 2.54 (2.59)	CH ₃ ϵ = 2.09
Cys 2	8.64 (8.63)	4.68 (4.64)	3.20 y 3.05 (3.01 y 2.83)		
Ile 3	8.40 (8.39)	4.13 (4.20)	1.91 (1.86)	1.45 y 1.22	CH ₃ γ = 0.92 CH ₃ δ = 0.87
Lys 4	8.16 (8.55)	4.63 (4.62)	1.82 y 1.69 (1.72)	1.42 (1.55 y 1.32)	CH δ = 1.66 (1.67) CH ₃ ϵ = 2.99
Pro 5		4.40 (4.57)	2.15 y 1.75 (2.22 y 2.14)	1.96 (1.92 y 1.67)	CH δ = 3.71 y 3.61 (3.48)
His 6	8.63 (8.75)	4.62 (4.70)	3.20 (3.18)		CH δ = 7.14
Gln 7	8.57 (8.68)	4.20 (4.45)	2.12 y 1.97 (2.11 y 1.95)	2.26 y 2.16 (2.34)	CONH ₂ = 7.67 y 6.98 (7.62 y 6.97)
Gly 8	8.65 (8.74)	4.04 y 3.87 (4.09 y 3.86)			
Gln 9	8.36 (8.60)	4.44 (4.36)	2.14 y 2.01 (2.09 y 2.01)	2.35 (2.37)	CONH ₂ = 7.69 y 6.98 (7.64 y 6.96)
Cys 10	8.69 (8.56)	4.69 (4.62)	3.15 y 2.96 (3.03 y 2.90)		
Ile 11	8.42 (8.53)	4.16 (4.13)	1.87 (1.84)	1.48 y 1.19	CH ₃ γ = 0.92 CH ₃ δ = 0.87
CONH₂	7.88 y 7.26 (7.78 y 7.24)				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1). Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro.

Tabla 49. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **121**^a.

Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Cys²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Cys¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.3 (25.8)
Met 1	126.1	55.5	32.9	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8
Cys 2	120.1	55.3 (55.5)	40.9 (41.3)		
Ile 3	- ^c	62.0 (60.5)	38.4 (39.1)	27.4	CH ₃ γ = 17.6 CH ₃ δ = 12.7
Lys 4	122.9	54.0 (55.0)	32.8 (32.4)	24.9 (25.2)	CH δ = 29.2 CH ₃ ϵ = 41.9
Pro 5		63.4 (63.0)	32.1 (33.7)	27.4 (24.6)	CH δ = 50.6 (50.1)
His 6	118.0	55.8	29.3	- ^b	
Gln 7	121.2	56.1	29.8	33.7	N ϵ = 112.9
Gly 8	109.2	45.1 (45.0)			
Gln 9	- ^c	55.3 (55.8)	29.9 (29.8)	33.7	N ϵ = 112.6
Cys 10	- ^c	55.3	41.0 (41.4)		
Ile 11	- ^c	62.0 (61.0)	38.5	27.3	CH ₃ γ = 17.4 CH ₃ δ = 12.7
CONH₂	- ^c				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro. ^bLas señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 50. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **124^a**.

Ac-Met¹-Asp²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Dap¹⁰-Ile¹¹-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.05
Met 1	8.50	4.41	2.06 y 1.97	2.61 y 2.55	CH ₃ ϵ = 2.09
Asp 2	8.64	4.59	2.70 y 2.57		
Ile 3	8.11	4.14	1.89	1.44 y 1.18	CH ₃ γ = 0.88 CH ₃ δ = 0.86
Lys 4	8.51	4.59	1.80 y 1.73	1.50 y 1.45	CH δ = 1.69 CH ₃ ϵ = 3.00
Pro 5		4.39	2.25 y 1.81	1.99	CH δ = 3.84 y 3.63
His 6	8.69	4.61	3.18		CH δ = 7.19 CH ϵ = 8.26
Gln 7	8.56	4.33	2.11 y 2.00	2.35	CONH ₂ = 7.65 y 7.01
Gly 8	8.72	3.98			
Gln 9	8.48	4.37	2.13 y 1.99	2.36	CONH ₂ = 7.66 y 6.99
Dap10		4.75	3.47 y 3.29		
Ile 11	8.46	4.15	1.85	1.44 y 1.16	CH ₃ γ = 0.92 CH ₃ δ = 0.84
CONH₂	7.92 y 7.30				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1).

Tabla 51. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **124**^a.

Ac-Met¹-Asp²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Dap¹⁰-Ile¹¹-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.3
Met 1	127.4	55.6	32.9	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8
Asp 2	121.2	54.1	40.7		
Ile 3	121.4	60.9	38.3	27.1	CH ₃ γ = 17.5 CH ₃ δ = 12.8
Lys 4	125.9	54.0	32.1	24.7	CH ₃ δ = 28.9 CH ₃ ϵ = 41.8
Pro 5		63.0	32.2	27.4	CH ₃ δ = 50.6
His 6	119.5	55.5	29.3	- ^b	
Gln 7	122.3	55.9	29.4	33.6	N ϵ = 113.1
Gly 8	110.9	45.1			
Gln 9	119.7	55.8	29.5	33.7	N ϵ = 112.9
Dap 10		53.4	42.3		
Ile 11	122.8	60.9	38.5	27.1	CH ₃ γ = 17.4
CONH₂	112.5				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. ^bLas señales de ^{13}C > 65 ppm no han sido registradas. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 52. Desplazamientos químicos de ¹H-RMN para 125^a.

Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Asp²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Dap¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH ₃ CO					CH ₃ = 2.02 (1.92)
Met 1	8.47 (8.43)	4.40 (4.37)	1.99 (1.95)	2.59 y 2.53 (2.58 y 2.51)	CH ₃ ϵ = 2.09 (2.05)
Asp 2	8.60 (8.61)	4.76 (4.71)	2.76 y 2.65 (2.74 y 2.65)		
Ile 3	8.30 (8.11)	4.18 (4.23)	1.93 (1.86)	1.40 y 1.18 (1.44 y 1.18)	CH ₃ γ = 0.90 (0.97) CH ₃ δ = 0.88 (0.87)
Lys 4	8.34 (8.61)	4.67 (4.29)	1.80 y 1.71 (1.74)	1.45 y 1.41 (1.54 y 1.35)	CH δ = 1.69 (1.67) CH ₃ ϵ = 3.00 (2.98)
Pro 5		4.32 (4.62)	2.16 y 1.76 (2.20 y 2.14)	1.95 (1.91 y 1.38)	CH δ = 3.78 y 3.62 (3.47 y 3.41)
His 6	8.57 (8.90)	4.54 (4.76)	3.25 (3.23 y 3.20)		CH δ = 7.16 (7.14) CH ₃ ϵ = 8.26
Gln 7	8.36 (8.68)	4.30 (4.30)	2.14 y 1.96 (2.07 y 1.94)	2.25 y 2.20 (2.33)	CONH ₂ = 7.62 y 6.97
Gly 8	8.58 (8.65)	4.04 y 3.93 (4.07 y 3.97)			
Gln 9	8.40 (8.41)	4.41 (4.37)	2.14 y 1.98 (2.16 y 2.00)	2.36 (2.37)	CONH ₂ = 7.66 y 6.98
Dap 10	8.60 (8.59)	4.51 (4.53)	3.49 (3.62 y 3.35)	8.19 (8.20)	
Ile 11	8.45 (8.40)	4.18 (4.13)	1.85 (1.85)	1.48 y 1.18 (1.19)	CH ₃ γ = 0.93 (0.93) CH ₃ δ = 0.86 (0.87)
CONH ₂	7.79 y 7.25				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1). Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro.

Tabla 53. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **125^a**.

Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Asp²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Dap¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.3 (25.8)
Met 1	- ^b	55.6 (55.8)	32.9	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8 (16.8)
Asp 2	- ^c	52.8 (52.9)	39.4 (38.9)		
Ile 3	- ^c	61.5 (60.3)	38.7 (38.7)	27.2 (26.8)	CH ₃ γ = 17.7 (17.3) CH ₃ δ = 13.2
Lys 4	- ^c	54.0 (55.5)	33.6 (32.2)	24.9 (24.9)	CH δ = 29.2 (29.3) CH ₃ ϵ = 41.9 (41.8)
Pro 5		63.5 (63.6)	32.0 (33.3)	27.4 (24.3)	CH δ = 50.6 (50.0)
His 6	- ^c	56.2 (55.6)	28.9	- ^b	
Gln 7	- ^c	56.1 (56.4)	29.2 (29.2)	33.8 (33.7)	
Gly 8	- ^c	45.1 (45.1)			
Gln 9	- ^c	55.3 (55.5)	29.7 (29.0)	33.7 (33.9)	N ϵ = 112.8
Dap 10	- ^c	55.7	42.7 (42.8)		
Ile 11	- ^c	60.8 (61.0)	38.7 (38.5)	27.2	CH ₃ γ = 17.4 CH ₃ δ = 12.9
CONH₂	- ^c				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro. ^bLas señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 54. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **126^a**.

Ac-Met¹-Dap²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Asp¹⁰-Ile¹¹-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.04
Met 1	8.59	4.43	2.05	2.63 y 2.57	CH ₃ ϵ = 2.10
Dap 2		4.73	3.46 y 3.27		
Ile 3	8.43	4.14	1.83	1.43 y 1.16	CH ₃ γ = 0.89 CH ₃ δ = 0.85
Lys 4	8.69	4.59	1.82 y 1.73	1.51 y 1.47	CH δ = 1.70 CH ₃ ϵ = 3.00
Pro 5		4.40	2.26 y 1.82	2.00	CH δ = 3.88 y 3.65
His 6	8.70	4.58	3.19		CH δ = 7.19 CH ϵ = 8.28
Gln 7	8.54	4.34	2.08 y 1.98	2.33	CONH ₂ = 7.67 y 6.99
Gly 8	8.70	4.01 y 3.94			
Gln 9	8.42	4.34	2.10 y 1.96	2.34	CONH ₂ = 7.67 y 6.96
Asp 10	8.63	4.61	2.73 y 2.59		
Ile 11	8.23	4.14	1.91	1.44 y 1.18	CH ₃ γ = 0.92 CH ₃ δ = 0.87
CONH₂	7.77 y 7.23				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1).

Tabla 55. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **126^a**.

Ac-Met¹-Dap²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Asp¹⁰-Ile¹¹-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.3
Met 1	126.0	55.6	32.8	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8
Dap 2		53.4	42.3		
Ile 3	122.6	61.1	38.7	27.2	CH ₃ γ = 17.4 CH ₃ δ = 12.6
Lys 4	124.0	55.7	32.5	24.7	CH δ = 29.2 CH ₃ ϵ = 41.8
Pro 5		63.0	32.2	27.4	CH δ = 50.8
His 6	- ^c	- ^c	29.2	- ^b	
Gln 7	122.6	55.7	29.6	33.7	N ϵ = 113.1
Gly 8	111.3	45.1			
Gln 9	120.0	55.7	29.6	33.6	N ϵ = 112.9
Asp 10	122.4	54.2	40.9		
Ile 11	121.7	61.0	38.4	27.1	CH ₃ γ = 17.6 CH ₃ δ = 13.1
CONH₂	111.3				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. ^bLas señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 56. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **127^a**.

Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Dap²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Asp¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.04 (1.92)
Met 1	8.49 (8.46)	4.42 (4.40)	2.04 y 1.96 (2.02 y 1.96)	2.61 y 2.54	CH ₃ ϵ = 2.08
Dap 2	8.59 (8.55)	4.55 (4.57)	3.69 y 3.43 (3.56 y 3.20)	8.12 (8.11)	
Ile 3	8.41 (8.41)	4.10 (4.23)	1.90 (1.86)	1.43 y 1.21 (1.16)	CH ₃ γ = 0.91 (0.97) CH ₃ δ = 0.86 (0.88)
Lys 4	8.28 (8.52)	4.67 (4.35)	1.81 y 1.70 (1.73)	1.46 (1.55 y 1.32)	CH δ = 1.68 (1.67) CH ₃ ϵ = 3.00 (2.99)
Pro 5		4.39 (4.63)	2.19 y 1.77 (2.19)	1.96 (1.92 y 1.55)	CH δ = 3.85 y 3.65 (3.48 y 3.44)
His 6	8.41 (8.78)	4.53 (4.70)	3.24 (3.20)		CH δ = 7.10
Gln 7	8.15 (8.67)	4.31 (4.35)	2.11 y 1.93 (2.08 y 1.94)	2.24 y 2.16 (2.32)	CONH ₂ = 7.61 y 6.98 (7.64 y 6.96)
Gly 8	8.61 (8.69)	4.03 y 3.83 (4.04 y 3.89)			
Gln 9	8.54 (8.51)	4.42 (4.38)	2.14 y 1.94 (2.13 y 1.98)	2.36 (2.36)	CONH ₂ = 7.68 y 6.97
Asp 10	8.63 (8.58)	4.68 (4.71)	2.80 y 2.71 (2.63)		
Ile 11	8.32 (8.23)	4.14 (4.14)	1.89 (1.85)	1.18	CH ₃ γ = 0.93 CH ₃ δ = 0.87
CONH₂	7.81 y 7.24				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1). Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro.

Tabla 57. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **127^a**.

Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Dap²-Ile³-Lys⁴-Pro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Asp¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.4 (25.7)
Met 1	- ^c	55.3	32.7	32.0	CH ₃ ϵ = 16.8
Dap 2	- ^c	55.6 (55.0)	42.8 (43.0)		
Ile 3	- ^c	62.1 (60.5)	38.6 (39.5)	27.4	CH ₃ γ = 17.6 (18.0) CH ₃ δ = 13.0
Lys 4	- ^c	54.0 (55.6)	32.6 (32.6)	24.9	CH δ = 29.2 (29.3) CH ₃ ϵ = 41.9 (41.7)
Pro 5		63.4 (63.3)	32.1 (33.6)	27.3	CH δ = 50.7 (50.0)
His 6	- ^c	56.3 (55.8)	28.8 (29.6)	- ^b	
Gln 7	- ^c	55.5 (55.9)	29.5	33.7 (33.7)	N ϵ = 112.5
Gly 8	- ^c	45.4 (45.0)			
Gln 9	- ^c	55.6 (55.2)	29.5 (29.3)	33.7	N ϵ = 113.0
Asp 10	- ^c	53.2 (53.1)	38.9 (39.3)		
Ile 11	- ^c	61.0	38.5	27.1	CH ₃ γ = 17.5 (17.4) CH ₃ δ = 13.0
CONH₂	111.6				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. Entre paréntesis se indican los valores de desplazamiento químico para el conformero *cis*-Pro. ^bLas señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 58. Desplazamientos químicos de ¹H-RMN para 131^a.

Ac-Met¹-Asp²-Ile³-Lys⁴-αMePro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Dap¹⁰-Ile¹¹-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH ₃ CO					CH ₃ = 2.04
Met 1	8.51	4.41	2.06 y 1.97	2.61 y 2.54	CH ₃ ϵ = 2.09
Asp 2	8.63	4.59	2.68 y 2.58		
Ile 3	8.07	4.12	1.87	1.43 y 1.17	CH ₃ γ = 0.87 CH ₃ δ = 0.86
Lys 4	8.58	4.55	1.69	1.47 y 1.40	CH δ = 1.70 y 1.65 CH ₃ ϵ = 2.99
α-MePro 5			1.93	2.08 y 1.96	CH ₃ β = 1.43 CH δ = 3.86 y 3.75
His 6	8.06	4.65	3.19		CH δ = 7.11 CH ϵ = 8.06
Gln 7	8.14	4.29	2.11 y 2.05	2.34 y 2.22	CONH ₂ = 7.67 y 7.01
Gly 8	8.52	3.98			
Gln 9	8.43	4.37	2.14 y 2.00	2.38	CONH ₂ = 7.66 y 6.98
Dap10	8.38	4.74	3.47 y 3.29		
Ile 11	8.44	4.14	1.85	1.43 y 1.15	CH ₃ γ = 0.92 CH ₃ δ = 0.85
CONH ₂	7.91 y 7.29				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1).

Tabla 59. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **131**^a.

Ac-Met¹-Asp²-Ile³-Lys⁴- α MePro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Dap¹⁰-Ile¹¹-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.3
Met 1	125.9	55.6	32.7	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8
Asp 2	121.2	53.9	40.7		
Ile 3	121.2	60.9	38.4	27.1	CH ₃ γ = 17.5
Lys 4	127.1	54.6	31.7	24.7	CH δ = 28.9 CH ₃ ϵ = 41.9
α-MePro 5			41.0	26.1	CH ₃ β = 22.4 CH δ = 50.9
His 6	113.6	56.0	29.2	- ^b	
Gln 7	121.2	56.2	29.2	33.7	N ϵ = 112.8
Gly 8	110.1	45.2			
Gln 9	119.2	55.8	29.5	33.7	N ϵ = 112.9
Dap 10		53.4	42.3		
Ile 11	122.6	61.0	38.5	27.1	CH ₃ γ = 17.4 CH ₃ δ = 12.8
CONH₂	112.4				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. ^bLas señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas.

Tabla 60. Desplazamientos químicos de ¹H-RMN para 132^a.

Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Asp²-Ile³-Lys⁴-αMePro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Dap¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	H _α	H _β	H _γ	Otros
CH ₃ CO					CH ₃ = 2.02
Met 1	8.46	4.41	2.00 y 1.96	2.59 y 2.54	CH ₃ ε = 2.08
Asp 2	8.57	4.75	2.79 y 2.67		
Ile 3	8.23	4.20	1.93	1.38 y 1.19	CH ₃ γ = 0.90
Lys 4	8.34	4.69	1.62	1.44 y 1.34	CHδ = 1.70 y 1.63 CH ₃ ε = 2.99
α-MePro 5			1.95	2.09 y 1.98	CH ₃ β = 1.38 CHδ = 3.82
His 6	8.07	4.65	3.21 y 3.17		CHδ = 7.09
Gln 7	8.13	4.24	2.15 y 2.04	2.28 y 2.10	CONH ₂ = 7.66 y 6.96
Gly 8	8.36	3.98			
Gln 9	8.43	4.36	2.12 y 1.99	2.36	CONH ₂ = 7.66 y 6.96
Dap 10	8.52	4.50	3.57 y 3.47	8.18	
Ile 11	8.47	4.21	1.87	1.48 y 1.18	CH ₃ γ = 0.93 CH ₃ δ = 0.87
CONH ₂	7.81 y 7.24				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1).

Tabla 61. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **132**^a.

Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Asp²-Ile³-Lys⁴- α MePro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Dap¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.3
Met 1	125.9	55.4	32.9	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8
Asp 2	120.8	52.9	39.3		
Ile 3	119.6	61.5	38.9	27.2	CH ₃ γ = 17.8
Lys 4	123.6	54.1	32.2	24.8	CH δ = 29.3 CH ₃ ϵ = 42.0
α-MePro 5			41.0	26.1	CH ₃ β = 22.3 CH δ = 50.9
His 6	112.6	- ^c	- ^c	- ^b	
Gln 7	119.3	56.4	28.8	34.1	N ϵ = 112.7
Gly 8	109.0	45.5			
Gln 9	120.2	55.8	29.3	33.8	N ϵ = 112.7
Dap 10	118.2	55.8	42.5		N γ = 115.3
Ile 11	- ^c	60.8	38.8	27.1	CH ₃ γ = 17.4 CH ₃ δ = 13.1
CONH₂	111.7				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. ^bLas señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas. ^cEstas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 62. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para 133^a.

Ac-Met¹-Dap²-Ile³-Lys⁴- α MePro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Asp¹⁰-Ile¹¹-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH ₃ CO					CH ₃ = 2.04
Met 1	8.59	4.43	2.06 y 2.01	2.63 y 2.57	CH ₃ ϵ = 2.10
Dap 2		4.74	3.44 y 3.27		
Ile 3	8.38	4.14	1.83	1.39 y 1.15	CH ₃ γ = 0.88 CH ₃ δ = 0.87
Lys 4	8.67	4.57	1.76 y 1.64	1.49 y 1.42	CH δ = 1.70 CH ₃ ϵ = 3.00
α -MePro 5			1.94	2.00	CH ₃ β = 1.44 CH δ = 3.92 y 3.76
His 6	8.00	4.66	3.18		CH δ = 7.12 CH ϵ = 8.16
Gln 7	8.27	4.29	2.10 y 2.04	2.36 y 2.25	CONH ₂ = 7.71 y 6.99
Gly 8	8.60	3.97			
Gln 9	8.38	4.34	2.10 y 1.97	2.35	CONH ₂ = 7.67 y 6.95
Asp 10	8.61	4.61	2.73 y 2.60		
Ile 11	8.22	4.14	1.91	1.43 y 1.18	CH ₃ γ = 0.92 CH ₃ δ = 0.85
CONH ₂	7.76 y 7.23				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1).

Tabla 63. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **133**^a.

Ac-Met¹-Dap²-Ile³-Lys⁴- α MePro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Asp¹⁰-Ile¹¹-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.3
Met 1	126.0	55.6	32.8	32.0	CH ₃ ϵ = 16.8
Dap 2		53.4	42.4		
Ile 3	- ^c	61.0	38.9	27.1	CH ₃ γ = 17.5 CH ₃ δ = 13.1
Lys 4	127.8	54.3	32.2	24.8	CH δ = 29.2 CH ₃ ϵ = 41.9
α-MePro 5			41.1	26.0	CH ₃ β = 22.3 CH δ = 51.0
His 6	113.9	55.9	29.4	- ^b	
Gln 7	121.6	56.1	29.3	33.7	N ϵ = 113.1
Gly 8	110.8	45.1			
Gln 9	- ^c	55.6	29.5	33.7	N ϵ = 112.9
Asp 10	122.3	54.2	40.8		
Ile 11	121.7	61.0	38.4	27.0	CH ₃ γ = 17.6 CH ₃ δ = 12.8
CONH₂	111.3				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. ^b Las señales de ^{13}C > 65 ppm no han sido registradas. ^c Estas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

Tabla 64. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **134**^a.

Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Dap²-Ile³-Lys⁴- α MePro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Asp¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.02
Met 1	8.46	4.43	1.99 y 1.96	2.62 y 2.56	CH ₃ ϵ = 2.08
Dap 2	8.53	4.53	3.71 y 3.35	8.02	
Ile 3	8.39	4.09	1.90	1.44 y 1.21	CH ₃ γ = 0.92 CH ₃ δ = 0.85
Lys 4	8.20	4.62	1.64	1.45 y 1.42	CH δ = 1.68 CH ₃ ϵ = 2.99
α-MePro 5			1.95	2.10 y 2.00	CH ₃ β = 1.41 CH δ = 3.95 y 3.81
His 6	8.06	4.63	3.20		CH δ = 7.08 CH ϵ = 8.05
Gln 7	7.98	4.25	2.08 y 2.01	2.27	CONH ₂ = 7.65 y 6.95
Gly 8	8.24	4.01 y 3.85			
Gln 9	8.59	4.39	2.10 y 1.95	2.35	CONH ₂ = 7.64 y 6.98
Asp 10	8.53	4.71	2.79 y 2.66		
Ile 11	8.33	4.17	1.88	1.46 y 1.17	CH ₃ γ = 0.93 CH ₃ δ = 0.87
CONH₂	7.82 y 7.25				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1).

Tabla 65. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **134^a**.

Ac-Met¹-ciclo^{2,10}[Dap²-Ile³-Lys⁴- α MePro⁵-His⁶-Gln⁷-Gly⁸-Gln⁹-Asp¹⁰]-Ile¹¹-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.3
Met 1	125.7	55.2	32.6	31.9	CH ₃ ϵ = 16.8
Dap 2	119.0	55.4	42.9		N γ = 116.9
Ile 3	- ^c	62.2	41.0	27.4	- ^c
Lys 4	122.5	54.4	31.9	24.9	CH δ = 29.2 CH ₃ ϵ = 41.9
α-MePro 5			- ^c	26.0	CH ₃ β = 22.6 CH δ = 51.0
His 6	112.1	- ^c	29.0	- ^b	
Gln 7	119.3	56.1	29.2	34.1	N ϵ = 112.8
Gly 8	- ^c	45.4			
Gln 9	121.3	55.7	29.2	33.8	N ϵ = 112.4
Asp 10	120.6	53.4	39.6		
Ile 11	121.1	60.1	38.6	27.1	CH ₃ γ = 17.6 CH ₃ δ = 13.1
CONH₂	111.8				

^a Experimentos realizados en D₂O, las señales se han asignado a partir de espectros bidimensionales. ^b Las señales de ^{13}C > 65 ppm no han sido registradas. ^c Estas señales no han podido asignarse debido a problemas de solapamiento.

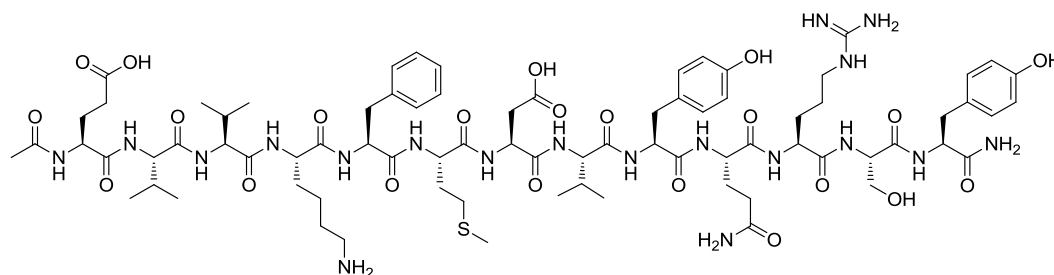
8. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANÁLOGOS DE LOS FRAGMENTOS VEGF₁₃₋₂₅ Y VAMMIN₁₋₁₃.

8.1. PÉPTIDOS LINEALES

La síntesis de estos péptidos lineales se llevó a cabo siguiendo la metodología de descrita en el apartado 6.3.1 de esta tesis, a partir de 100 mg de resina (0.034 mmol) en cada caso utilizando como aminoácidos de partida Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH y Fmoc-Ser(tBu)-OH, según proceda. Todos los derivados se obtuvieron con el extremo N-terminal acetilado. Tras la elongación del péptido, el compuesto anclado a la resina se desancló y se purificó por HPLC-semipreparativo, si no se indica lo contrario, utilizando un gradiente adecuado para cada producto.

8.1.1. Análogos de VEGF₁₃₋₂₅

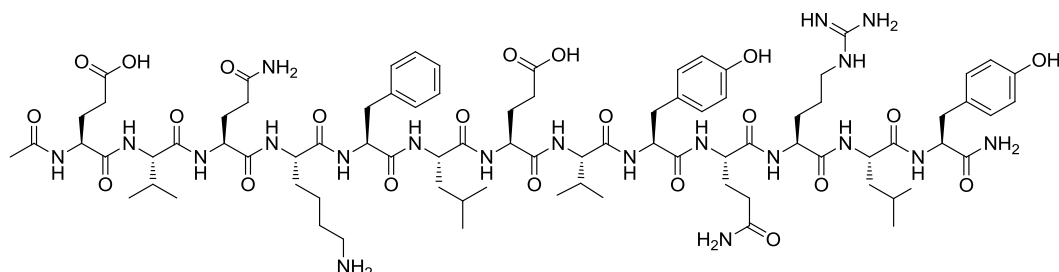
Ac-Glu¹-Val²-Val³-Lys⁴-Phe⁵-Met⁶-Asp⁷-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Ser¹²-Tyr¹³-NH₂
(138):



Agente acoplante: DIC/HOBt. Gradiente: 15% A 2 min, 15 a 40% A en 25 min, 40 a 100% A en 3 min). Tras la purificación se obtuvieron 4.1 mg de un sólido blanco (7% rendimiento global). RMN: Tablas 66 y 67. HPLC: $t_R = 22.14$ min. EM-ES: $[M + H]^{2+} = 853.10$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1703.8321 ($[M]^+$ C₇₈H₁₁₇N₁₉O₂₂S, calculada 1703.8341).

Ac-Glu¹-Val²-Gln³-Lys⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Tyr¹³-NH₂

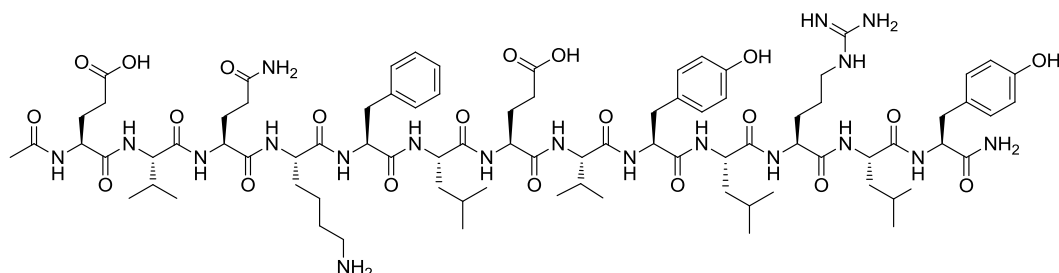
(140):



Agente acoplante: DIC/HOBt. Tras el desanclaje se obtuvieron 46 mg de un sólido blanco (77% rendimiento global) con una pureza del 75%. HPLC: $t_R = 20.90$ min (15% A 2 min, 15 a 55% A en 25 min, 55 a 100% A en 3 min). EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 879.88$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1756.9514 ($[M]^+$ C₈₃H₁₂₈N₂₀O₂₂, calculada 1756.9512).

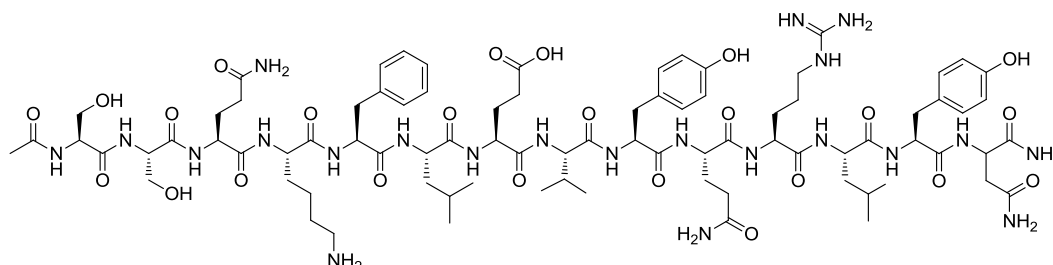
Ac-Glu¹-Val²-Gln³-Lys⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-Tyr⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Tyr¹³-NH₂

(142):



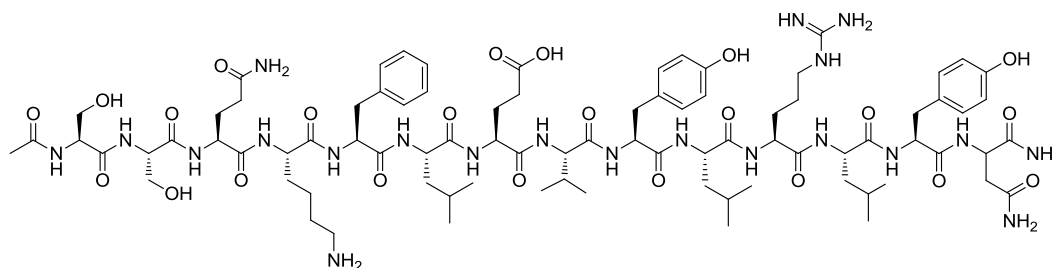
Agente acoplante: DIC/HOBt. Tras el desanclaje se obtuvieron 34 mg de un sólido blanco (58% rendimiento global) con una pureza del 70%. RMN: Tablas 68 y 69. HPLC: $t_R = 21.64$ min (20% A 2 min, 20 a 55% A en 25 min, 55 a 100% A en 3 min). EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 871.68$, $[M + 3H]^{3+} = 581.66$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1741.9780 ($[M]^+$ C₈₄H₁₃₁N₁₉O₂₁, calculada 1741.9767).

Ac-Ser¹-Ser²-Gln³-Lys⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Tyr¹³-Asn¹⁴-NH₂ (144):



Agente acoplante: HCTU. Tras el desanclaje se obtuvieron 50 mg de un sólido blanco (80% rendimiento global) con una pureza del 83%. RMN: Tablas 70 y 71. HPLC: $t_R = 20.43$ min (10% A 2 min, 10 a 50% A en 25 min, 50 a 100% A en 3 min). EM-ES: $[M + H]^+ = 1817.6$, $[M + 2H]^{2+} = 909.3$, $[M + 3H]^{3+} = 606.5$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1814.9302 ($[M]^+ C_{83}H_{126}N_{22}O_{24}$, calculada 1814.9315).

Ac-Ser¹-Ser²-Gln³-Lys⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-Tyr⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Tyr¹³-Asn¹⁴-NH₂ (145):

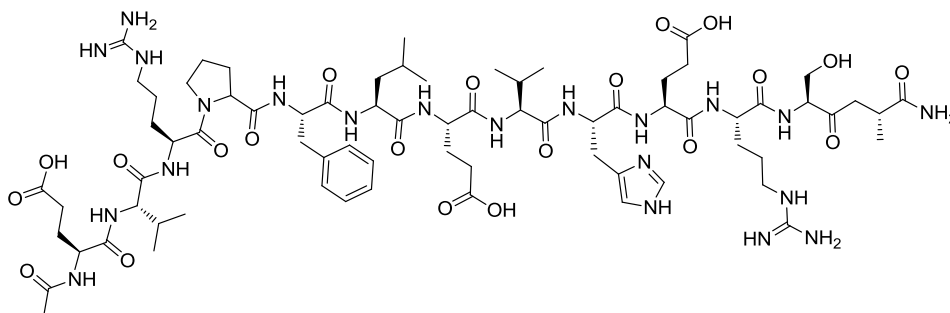


Agente acoplante: HCTU. Tras el desanclaje se obtuvieron 57 mg de un sólido blanco (95% rendimiento global) con una pureza del 92%. RMN: Tablas 72 y 73 HPLC: $t_R = 22.20$ min (10% A 2 min, 10 a 50% A en 25 min, 50 a 100% A en 3 min). EM-ES: $[M + H]^+ = 1802.8$, $[M + 2H]^{2+} = 901.3$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1799.9615 ($[M]^+ C_{84}H_{129}N_{21}O_{23}$, calculada 1799.9570).

8.1.2. Análogos de Vammin₅₋₁₃

Ac-Glu¹-Val²-Arg³-Pro⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-His⁹-Glu¹⁰-Arg¹¹-Ser¹²-Ala¹³-NH₂

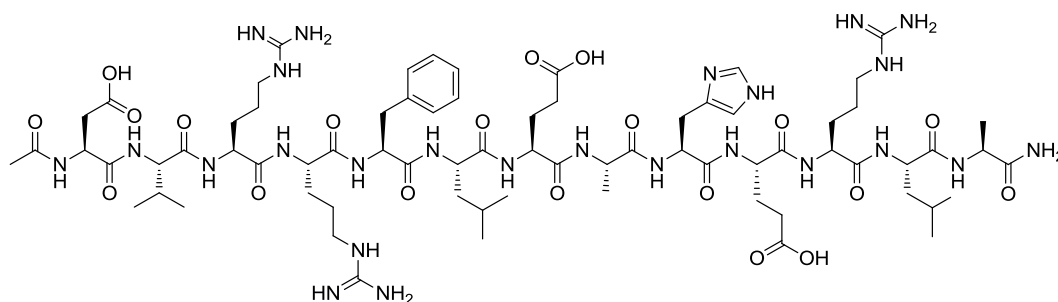
(139):



Agente acoplante: HCTU. Gradiente: 15% A 2 min, 15 a 30% A en 25 min, 30 a 100% A en 3 min. Tras la purificación se obtuvieron 4.4 mg de un sólido blanco (8% rendimiento global). RMN: Tablas 74 y 75. HPLC: $t_R = 18.42$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1610.6$, $[M + 2H]^{2+} = 806.0$, $[M + 3H]^{3+} = 537.7$. HRMS (EI⁺) m/z encontrada 1607.8448 ($[M]^+ C_{72}H_{113}N_{21}O_{21}$, calculada 1607.8420).

Ac-Asp¹-Val²-Arg³-Arg⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Ala⁸-His⁹-Glu¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Ala¹³-NH₂

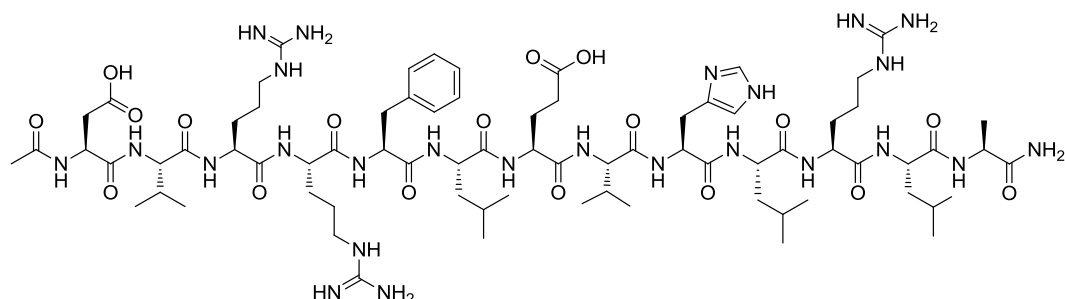
(141):



Agente acoplante: DIC/HOBt. Gradiente: 20% A 2 min, 20 a 35% A en 25 min, 35 a 100% A en 3 min. Tras la purificación se obtuvieron 16.8 mg de un sólido blanco (30% rendimiento global). HPLC: $t_R = 14.20$ min. EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 827.66$, $[M + 3H]^{3+} = 552.21$, $[M + 4H]^{4+} = 414.36$, HRMS (EI⁺) m/z encontrada 1651.8898 ($[M]^+ C_{72}H_{117}N_{25}O_{20}$, calculada 1651.8907).

Ac-Asp¹-Val²-Arg³-Arg⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-His⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Ala¹³-NH₂

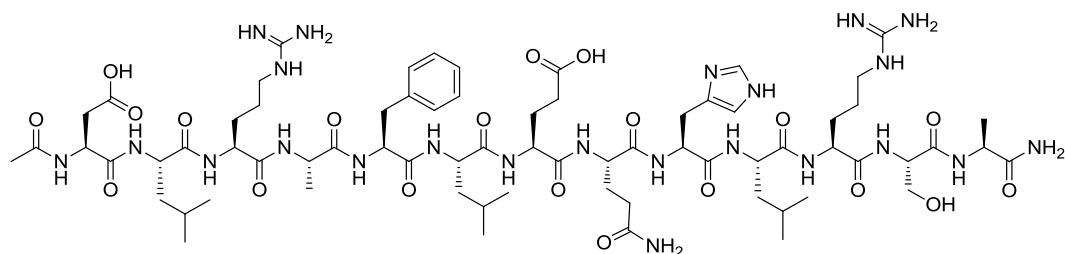
(143):



Agente acoplante: DIC/HOBt. Tras el desanclaje se obtuvieron 55 mg de un sólido blanco (98% rendimiento global) con una pureza del 87%. RMN: Tablas 76 y 77. HPLC: $t_R = 18.02$ min (15% A 2 min, 15 a 55% A en 25 min, 55 a 100% A en 3 min). EM-ES: $[M + 2H]^{2+} = 834.17$, $[M + 3H]^{3+} = 556.39$, $[M + 4H]^{4+} = 417.63$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1663.9631 ($[M]^+$ C₇₅H₁₂₅N₂₅O₁₈, calculada 1663.9634).

Ac-Asp¹-Leu²-Arg³-Ala⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Gln⁸-His⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Ser¹²-Ala¹³-NH₂

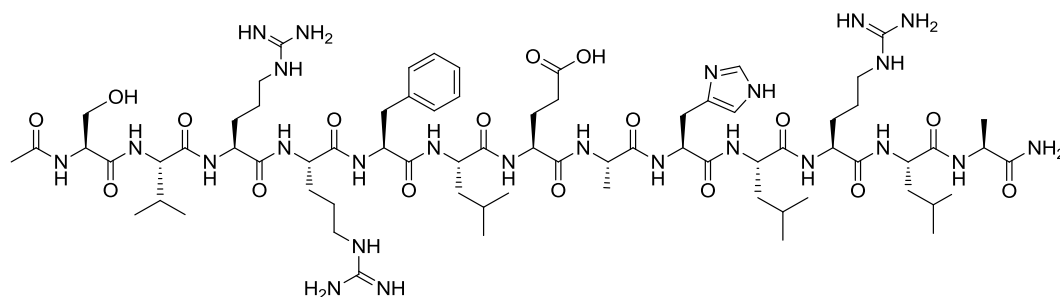
(146):



Agente acoplante: HCTU. Tras el desanclaje se obtuvieron 53 mg de un sólido blanco (98% rendimiento global) con una pureza del 90%. RMN: Tablas 78 y 79 HPLC: $t_R = 21.33$ min (10% A 2 min, 10 a 50% A en 25 min, 50 a 100% A en 3 min). EM-ES: $[M + H]^+ = 1597.3$, $[M + 2H]^{2+} = 799.3$, $[M + 3H]^{3+} = 533.3$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1595.8508 ($[M]^+$ C₇₀H₁₁₃N₂₃O₂₀, calculada 1595.8532).

Ac-Ser¹-Val²-Arg³-Arg⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Ala⁸-His⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Ala¹³-NH₂

(147):



Agente acoplante: HCTU. Tras el desanclaje se obtuvieron 54 mg de un sólido blanco (98% rendimiento global) con una pureza del 90%. RMN: Tablas 80 y 81. HPLC: $t_R = 21.02$ min (10% A 2 min, 10 a 50% A en 25 min, 50 a 100% A en 3 min). EM-ES $[M + 2H]^{2+} = 805.3$, $[M + 3H]^{3+} = 537.3$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1607.9374 ($[M]^+$ $C_{72}H_{121}N_{25}O_{17}$, calculada 1607.9372).

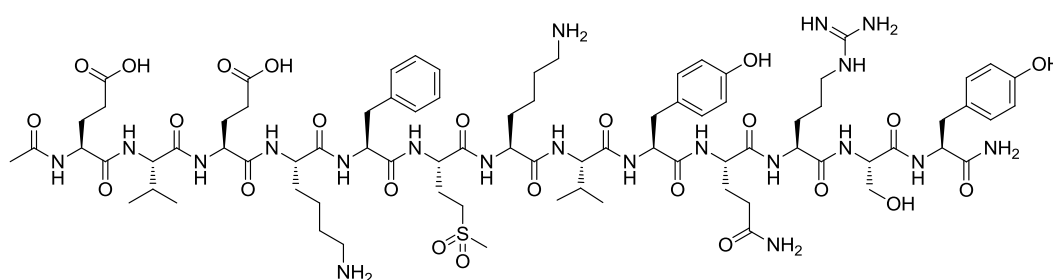
8.2. ANÁLOGOS CÍCLICOS DEL FRAGMENTO VEGF₁₃₋₂₅.

La síntesis de los péptidos lineales se realizó a partir de 100 mg de resina Rink-amida (0.034 mmol/g) siguiendo los métodos generales descritos en el apartado 6.3.1, con el extremo N-terminal acetilado, utilizando como aminoácidos de partida Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OAll)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH y Fmoc-Ser(tBu)-OH, según proceda.

La síntesis de los derivados ciclados mediante enlace amida a través de las cadenas laterales de Glu y Lys se llevó a cabo a partir de los correspondientes derivados lineales anclados a la resina (0.034 mmol) con Glu(OAll) y Lys(Alloc) en las posiciones de ciclación. Tras la eliminación de los grupos protectores Alloc y OAll tal como se describe en el apartado 6.3.1.4, la resina cargada con el correspondiente derivado lineal (0.034 mmol), previamente hinchada, se trató con una disolución de PyAOP (177 mg, 0.34 mmol), HOAt (46 mg, 0.34 mmol) y DIEA (0.12 ml, 0.68 mmol) en DCE con un 15% de TFE (2 ml). La mezcla se dejó reaccionar en microondas durante 1h a 120°C

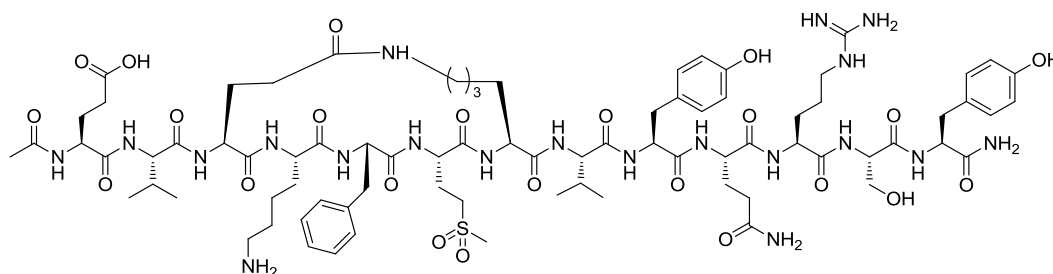
hasta que el test de Kaiser resultó negativo. A continuación la resina se lavó con DMF/DCM/DMF/DCM (4×0.5 min). Una vez concluida la reacción, el péptido anclado a la resina se desancló en las condiciones habituales y se purificó por HPLC semipreparativo, si no se indica lo contrario, utilizando el gradiente indicado en cada caso.

Ac-Glu¹-Val²-Glu³-Lys⁴-Phe⁵-Met(O₂)⁶-Lys⁷-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Ser¹²-Tyr¹³-NH₂ (156):



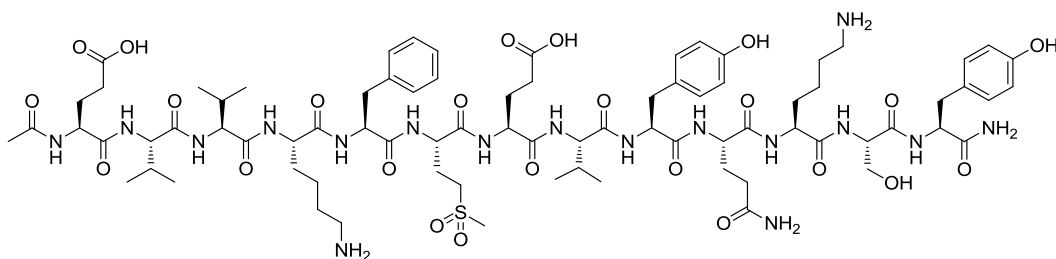
Agente acoplante: HCTU. Gradiente: 15% A 2 min, 15 a 25% A en 25 min, 25 a 100% A en 3 min. Tras la purificación se obtuvieron 1.2 mg de un sólido blanco (2% rendimiento global) que fue identificado como el derivado que contiene la Met oxidado a sulfona. HPLC: $t_R = 23.74$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1780.6$, $[M + 2H]^{2+} = 890.8$, $[M + 3H]^{3+} = 594.3$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1778.8666 ($[M]^+$ C₈₀H₁₂₂N₂₀O₂₄S, calculada 1778.8662).

Ac-Glu¹-Val²-ciclo³⁻⁷[Glu³-Lys⁴-Phe⁵-Met(O₂)⁶-Lys⁷]-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Ser¹²-Tyr¹³-NH₂ (158):



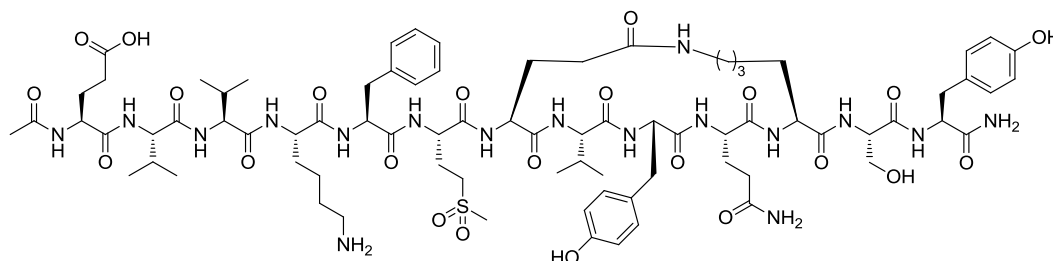
Sobre el péptido lineal convenientemente desprotegido en las cadenas laterales de Glu y Lys, **154**, se llevó a cabo la reacción de ciclación siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 8.2.1. Tras el desanclaje se llevó a cabo la purificación del producto por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 45% A en 25 min, 45 a 100% A en 3 min), obteniéndose 0.6 mg de un sólido blanco (1% rendimiento global) que fue identificado como el derivado que contiene la Met oxidada a sulfona. RMN: Tablas 82 y 83. HPLC: $t_R = 19.30$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1763.3$, $[M + 2H]^{2+} = 881.7$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1760.8536 ($[M]^+$ $C_{80}H_{120}N_{20}O_{23}S$, calculada 1760.8556).

Ac-Glu¹-Val²-Val³-Lys⁴-Phe⁵-Met(O₂)⁶-Glu⁷-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Lys¹¹-Ser¹²-Tyr¹³-NH₂ (157):



Agente acoplante: HCTU. Gradiente: 15% A 2 min, 15 a 45% A en 25 min, 45 a 100% A en 3 min. Tras la purificación se obtuvieron 2.9 mg de un sólido blanco (5% rendimiento global) que fue identificado como el derivado que contiene la cadena lateral de la Met en forma de sulfona. HPLC: $t_R = 17.64$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1724.6$, $[M + 2H]^{2+} = 862.8$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1721.8350 ($[M]^+$ $C_{79}H_{119}N_{17}O_{24}S$, calculada 1721.8335).

Ac-Glu¹-Val²-Val³-Lys⁴-Phe⁵-Met(O₂)⁶-ciclo⁷⁻¹¹[Glu⁷-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Lys¹¹]-Ser¹²-Tyr¹³-NH₂ (159):



Sobre el péptido lineal convenientemente desprotegido, **155**, se llevó a cabo la reacción de ciclación siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 8.2.1. Tras el desanclaje se llevó a cabo la purificación del producto por HPLC semipreparativo (15% A 2 min, 15 a 55% A en 25 min, 55 a 100% A en 3 min) obteniendo 1.2 mg de un sólido blanco (2% rendimiento global) que fue identificado como el derivado que contiene la Met en forma de sulfona. RMN: Tablas 84 y 85. HPLC: $t_R = 18.08$ min. EM-ES: $[M + H]^+ = 1705.6$, $[M + 2H]^{2+} = 853.3$, $[M + 3H]^{3+} = 543.5$. HRMS (EI+) m/z encontrada 1703.8227 ($[M]^+$ C₇₉H₁₁₇N₁₇O₂₃S, calculada 1703.8229).

Tabla 66. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **138^a**.

Ac-Glu¹-Val²-Val³-Lys⁴-Phe⁵-Met⁶-Asp⁷-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Ser¹²-Tyr¹³-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.10
Glu 1	8.39	4.22	2.10 y 2.00	2.36	
Val 2	7.96	3.99	2.13		CH ₃ γ 1 = 1.04 CH ₃ γ 2 = 0.99
Val 3	7.56	3.90	2.14		CH ₃ γ 1 = 1.02 CH ₃ γ 2 = 0.98
Lys 4	7.79	4.22	1.86	1.46 y 1.40	CH δ = 1.71 CH ₃ ϵ = 2.96
Phe 5	8.04	4.39	3.20		CH δ = 7.22 CH ϵ = 7.26
Met 6	8.31	4.31	2.22 y 2.15	2.76 y 2.64	CH ₃ ϵ = 2.08
Asp 7	8.07	4.53	2.84		
Val 8	7.78	3.70	2.14		CH ₃ γ 1 = 1.01 CH ₃ γ 2 = 0.88
Tyr 9	8.48	4.15	3.07 y 2.84		CH δ = 7.06 CH ϵ = 6.77
Gln 10	8.40	4.07	2.26 y 2.22	2.62 y 2.48	CONH ₂ = 7.26 y 6.70
Arg 11	7.95	4.19	1.87	1.82 y 1.68	CH δ = 3.21 y 3.14 CH ϵ = 7.40
Ser 12	7.88	4.31	3.72 y 3.58		
Tyr 13	7.87	4.45	3.03 y 2.61		CH δ = 7.00 CH ϵ = 6.77
CONH₂	7.26 y 6.96				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1) + 30% TFE.

Tabla 67. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **138**^a.

Ac-Glu¹-Val²-Val³-Lys⁴-Phe⁵-Met⁶-Asp⁷-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Ser¹²-Tyr¹³-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.5
Glu 1	127.1	- ^b	30.1	36.5	
Val 2	118.4	64.7	32.5		CH ₃ γ 1 = 21.1 CH ₃ γ 2 = 20.7
Val 3	120.2	65.0	32.2		CH ₃ γ 1 = 21.3 CH ₃ γ 2 = 21.1
Lys 4	121.1	58.3	32.7	25.2	CH δ = 29.5 CH ₃ ϵ = 42.4
Phe 5	119.3	- ^b	39.2		
Met 6	118.4	- ^b	32.4	32.6	CH ₃ ϵ = 16.5
Asp 7	120.1	- ^b	41.7		
Val 8	118.8	66.0	32.3		CH ₃ γ 1 = 21.8 CH ₃ γ 2 = 20.9
Tyr 9	122.3	61.6	38.7		
Gln 10	118.2	58.6	29.0	34.6	N ϵ = 109.9
Arg 11	- ^b	58.1	30.7	28.1	CH δ = 43.7 N ϵ = 85.5
Ser 12	114.5	60.3	64.0		
Tyr 13	121.1	- ^b	39.2		
CONH₂	106.9				

^a Experimentos realizados en D₂O + 30% TFE, las señales se han asignado a través de espectros bidimensionales. Las señales de ^{13}C > 65 ppm no han sido registradas. ^b Estos valores no han podido asignarse debido al solapamiento de señales.

Tabla 68. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **142**^a.

Ac-Glu¹-Val²-Gln³-Lys⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-Tyr⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Tyr¹³-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.12
Glu 1	8.36	4.26	2.14 y 2.03	2.39	
Val 2	8.07	3.88	2.10		CH ₃ γ 1 = 1.06 CH ₃ γ 2 = 0.99
Gln 3	8.32	4.01	2.15 y 2.11	2.47 y 2.44	CONH ₂ = 7.42 y 6.70
Lys 4	7.72	4.14	1.91	1.52 y 1.45	CH δ = 1.71 CH ₃ ϵ = 2.96
Phe 5	7.81	4.34	3.27 y 3.23		CH δ = 7.21 CH ϵ = 7.14
Leu 6	8.34	4.04	1.87 y 1.63	1.88	CH ₃ δ 1 = 0.90 CH ₃ δ 2 = 0.92
Glu 7	7.98	3.95	2.25 y 2.14	2.55 y 2.33	
Val 8	7.59	3.64	2.19		CH ₃ γ 1 = 1.08 CH ₃ γ 2 = 0.93
Tyr 9	8.45	3.98	3.01 y 2.77		CH δ = 6.96 CH ϵ = 6.67
Leu 10	8.73	4.02	1.95 y 1.49	2.00	CH ₃ δ 1 = 0.96 CH ₃ δ 2 = 0.93
Arg 11	7.69	4.08	1.99 y 1.91	1.84 y 1.67	CH δ = 3.18 CH ϵ = 7.36
Leu 12	8.02	4.07	1.44 y 0.87	1.55	CH ₃ δ 1 = 0.76 CH ₃ δ 2 = 0.70
Tyr 13	8.16	4.44	2.97 y 2.31		CH δ = 6.90 CH ϵ = 6.72
CONH₂	7.21 y 6.84				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1) + 30% TFE.

Tabla 69. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **142**^a.

Ac-Glu¹-Val²-Gln³-Lys⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-Tyr⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Tyr¹³-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.6
Glu 1	127.0	58.3	29.8	36.1	
Val 2	119.9	65.9	32.1		CH ₃ γ 1 = 21.6 CH ₃ γ 2 = 20.6
Gln 3	119.4	59.9	28.2	34.4	N ϵ = 110.3
Lys 4	118.2	59.1	32.3	- ^b	CH δ = 29.2 CH ₃ ϵ = 42.4
Phe 5	118.6	- ^b	39.1		
Leu 6	119.8	58.4	42.1	27.2	CH ₃ δ 1 = 23.1 CH ₃ δ 2 = 25.1
Glu 7	116.9	60.1	29.4	36.0	
Val 8	118.8	66.8	32.2		CH ₃ γ 1 = 22.3 CH ₃ γ 2 = 21.1
Tyr 9	121.1	- ^b	39.0		
Leu 10	117.3	57.9	42.0	27.4	CH ₃ γ 1 = 22.4 CH ₃ γ 2 = 24.5
Arg 11	- ^b	58.8	30.3	28.0	CH δ = 43.5 N ϵ = 84.8
Leu 12	118.8	57.2	43.1	26.9	CH ₃ γ 1 = 24.9 CH ₃ γ 2 = 22.6
Tyr 13	117.5	- ^b	39.2		
CONH₂	106.2				

^a Experimentos realizados en D₂O + 30% TFE, las señales se han asignado a través de espectros bidimensionales. Las señales de ^{13}C > 65 ppm no han sido registradas. ^b Estos valores no han podido asignarse debido al solapamiento de señales.

Tabla 70. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **144**^a.

Ac-Ser¹-Ser²-Gln³-Lys⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Tyr¹³-Asn¹⁴-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.10
Ser 1	8.06	4.48	4.01 y 3.90		
Ser 2	8.47	4.44	4.02 y 3.97		
Gln 3	8.34	4.18	2.12	2.44	CONH ₂ = 7.42 y 6.73
Lys 4	7.95	4.17	1.86	1.46	CH δ = 1.71 CH ₃ ϵ = 2.96
Phe 5	7.89	4.32	3.20		CH δ = 7.27 CH ϵ = 7.22
Leu 6	7.89	4.10	1.86 y 1.67	1.79	CH ₃ δ 1 = 0.97 CH ₃ δ 2 = 0.92
Glu 7	7.95	4.09	2.26 y 2.17	2.54 y 2.37	
Val 8	7.79	3.65	2.16		CH ₃ γ 1 = 1.05 CH ₃ γ 2 = 0.91
Tyr 9	8.38	4.06	3.02 y 2.85		CH δ = 7.00 CH ϵ = 6.71
Gln 10	8.30	3.99	2.27 y 2.18	2.61 y 2.44	CONH ₂ = 7.07 y 6.68
Arg 11	7.80	4.16	1.97	1.83 y 1.72	
Leu 12	8.13	4.13	1.54 y 1.20	1.64	
Tyr 13	8.09	4.36	2.93 y 2.61		CH δ = 6.99 CH ϵ = 6.78
Asn 14	7.81	4.68	2.89 y 2.78		CONH ₂ = 7.58 y 6.77
CONH₂	7.10 y 6.93				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1) + 30% TFE.

Tabla 71. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **144^a**.

Ac-Ser¹-Ser²-Gln³-Lys⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Tyr¹³-Asn¹⁴-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.6
Ser 1	120.8	59.0	64.2		
Ser 2	117.9	60.2	63.5		
Gln 3	121.6	^b	28.7	34.1	N ϵ = 110.7
Lys 4	118.3	^b	32.2	24.9	CH δ = 29.0 CH ₃ ϵ = 42.3
Phe 5	118.0	61.0	39.0		
Leu 6	119.2	58.2	42.0	27.3	CH ₃ δ 1 = 24.6 CH ₃ δ 2 = 23.3
Glu 7	119.5	59.6	29.3	35.5	
Val 8	118.4	66.7	32.1		CH ₃ γ 1 = 22.1 CH ₃ γ 2 = 20.8
Tyr 9	120.3	62.0	38.6		
Gln 10	116.2	59.2	29.1	34.6	N ϵ = 111.6
Arg 11	120.0	58.7	30.2	27.7	CH δ = 43.4 N ϵ = 84.6
Leu 12	119.4	57.1	42.6	26.9	CH ₃ γ 1 = 24.9 CH ₃ γ 2 = 22.6
Tyr 13	117.6	59.6	38.7		
Asn 14	^b	^b	39.5		N δ = 109.2
CONH₂	105.8				

^a Experimentos realizados en D₂O + 30% TFE, las señales se han asignado a través de espectros bidimensionales. Las señales de ^{13}C > 65 ppm no han sido registradas. ^b Estos valores no han podido asignarse debido al solapamiento de señales.

Tabla 72. Desplazamientos químicos de ¹H-RMN para **145**^a.

Ac-Ser¹-Ser²-Gln³-Lys⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-Tyr⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Tyr¹³-Asn¹⁴-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.10
Ser 1	8.03	4.49	4.02 y 3.90		
Ser 2	8.46	4.44	4.02 y 3.98		
Gln 3	8.35	4.18	2.13	2.45	CONH ₂ = 7.40 y 6.70
Lys 4	7.91	4.17	1.86	1.46	CH δ = 1.71 CH ₃ ϵ = 2.96
Phe 5	7.83	4.35	3.20		CH δ = 7.23 CH ϵ = 7.22
Leu 6	7.87	4.11	1.78	1.79	CH ₃ δ 1 = 0.99 CH ₃ δ 2 = 0.95
Glu 7	7.98	3.96	2.26 y 2.16	2.53 y 2.36	
Val 8	7.67	3.64	2.18		CH ₃ γ 1 = 1.07 CH ₃ γ 2 = 0.93
Tyr 9	8.30	4.06	3.06 y 2.88		CH δ = 7.00 CH ϵ = 6.70
Leu 10	8.63	4.04	1.98 y 1.50	2.00	CH ₃ δ 1 = 0.94 CH ₃ δ 2 = 0.94
Arg 11	7.84	4.13	2.02 y 1.95	1.86 y 1.71	CH δ = 3.20 CH ϵ = 7.35
Leu 12	8.18	4.15	1.70 y 1.26	1.70	CH ₃ δ 1 = 0.84 CH ₃ δ 2 = 0.80
Tyr 13	8.19	4.30	2.93 y 2.67		CH δ = 7.03 CH ϵ = 6.82
Asn 14	7.81	4.64	2.86 y 2.76		CONH ₂ = 7.54 y 6.66
CONH₂					

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1) + 30% TFE.

Tabla 73. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **145^a**.

Ac-Ser¹-Ser²-Gln³-Lys⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-Tyr⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Tyr¹³-Asn¹⁴-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.6
Ser 1	120.7	59.0	64.2		
Ser 2	118.0	60.4	63.5		
Gln 3	121.7	58.8	28.7	34.2	N ϵ = 110.4
Lys 4	119.3	- ^b	32.2	- ^b	CH δ = 29.0 CH ₃ ϵ = 42.4
Phe 5	- ^b	60.9	39.0		
Leu 6	119.9	58.4	42.2	27.3	CH ₃ δ 1 = 23.8 CH ₃ δ 2 = 24.0
Glu 7	116.6	60.1	29.3	35.6	
Val 8	118.8	66.8	32.2		CH ₃ γ 1 = 22.3 CH ₃ γ 2 = 20.9
Tyr 9	120.6	58.1	38.7		
Leu 10	117.3	- ^b	42.1	27.3	CH ₃ δ 1 = 25.2 CH ₃ δ 2 = 22.5
Arg 11	118.1	58.9	30.1	28.0	CH δ = 43.5 N ϵ = 84.8
Leu 12	118.0	57.2	42.5	26.9	CH ₃ γ 1 = 24.9 CH ₃ γ 2 = 22.7
Tyr 13	119.5	59.9	38.9		
Asn 14	- ^b	- ^b	39.7		N δ = 110.4
CONH₂	- ^b				

^a Experimentos realizados en D₂O + 30% TFE, las señales se han asignado a través de espectros bidimensionales. Las señales de ^{13}C > 65 ppm no han sido registradas. ^b Estos valores no han podido asignarse debido al solapamiento de señales.

Tabla 74. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **139^a**.

Ac-Glu¹-Val²-Arg³-Pro⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-His⁹-Glu¹⁰-Arg¹¹-Ser¹²-Ala¹³-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.07
Glu 1	8.24	4.34	2.07 y 1.98	2.31	
Val 2	7.92	4.27	2.21		CH ₃ γ 1 = 0.99 CH ₃ γ 2 = 0.97
Arg 3	8.28	4.45	1.86	1.74 y 1.70	CH δ = 3.23 CH ϵ = 7.56
Pro 4		4.37	2.25 y 1.75	1.99	CH δ = 3.71 y 3.63
Phe 5	7.57	4.45	3.22		CH δ = 7.25 CH ϵ = 7.34
Leu 6	7.96	4.22	1.81 y 1.63	1.72	CH ₃ δ 1 = 0.96 CH ₃ δ 2 = 0.92
Glu 7	8.27	4.18	2.08	2.38 y 2.28	
Val 8	7.86	3.88	2.12		CH ₃ γ 1 = 1.00 CH ₃ γ 2 = 0.90
His 9	8.24	4.45	3.30 y 3.15		CH δ = 7.23 CH ϵ = 8.33
Glu 10	8.45	4.22	2.14	2.38	
Arg 11	8.22	4.31	1.96 y 1.89	1.79 y 1.73	CH δ = 3.22 CH ϵ = 7.38
Ser 12	8.06	4.43	3.96 y 3.91		
Ala 13	7.98	4.31	1.42		
CONH₂	7.34 y 6.94				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1) + 30% TFE.

Tabla 75. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **139**^a.

Ac-Glu¹-Val²-Arg³-Pro⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-His⁹-Glu¹⁰-Arg¹¹-Ser¹²-Ala¹³-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.4
Glu 1	126.6	57.0	30.6	36.5	
Val 2	119.1	62.6	33.1		CH ₃ γ 1 = 20.1 CH ₃ γ 2 = 21.0
Arg 3	123.5	57.5	29.5	27.5	CH δ = 43.6 N ϵ = 84.7
Pro 4		65.1	31.5	27.8	CH δ = 50.5
Phe 5	116.8	59.5	39.2		
Leu 6	121.3	57.1	42.4	27.2	CH ₃ δ 1 = 24.9 CH ₃ δ 2 = 23.0
Glu 7	119.9	58.6	30.1	36.4	
Val 8	119.0	64.8	32.4		CH ₃ γ 1 = 21.4 CH ₃ γ 2 = 20.9
His 9	120.0	58.1	29.1		
Glu 10	120.5	58.2	30.1	36.0	
Arg 11	119.7	57.5	30.8	27.6	N ϵ = 84.8
Ser 12	115.1	59.3	64.4		
Ala 13	125.8	52.8	19.5		
CONH₂	104.8				

^a Experimentos realizados en D₂O + 30% TFE, las señales se han asignado a través de espectros bidimensionales. Las señales de ^{13}C > 65 ppm no han sido registradas. ^bEstos valores no han podido asignarse debido al solapamiento de señales.

Tabla 76. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **143**^a.

Ac-Asp¹-Val²-Arg³-Arg⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-His⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Ala¹³-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.05
Asp 1	7.90	3.99	2.90 y 2.65		
Val 2	8.15	3.90	2.17		CH ₃ γ 1 = 1.06 CH ₃ γ 2 = 1.03
Arg 3	8.16	4.04	1.98	1.79 y 1.71	CH δ = 3.26 CH ϵ = 7.70
Arg 4	7.80	4.17	1.92	1.71	CH δ = 3.25 CH ϵ = 7.30
Phe 5	7.91	4.30	3.38 y 3.23		CH δ = 7.22 CH ϵ = 7.14
Leu 6	8.65	4.10	2.00 y 1.68	1.96	CH ₃ δ 1 = 0.96 CH ₃ δ 2 = 0.95
Glu 7	8.38	3.95	2.28 y 2.16	2.52 y 2.30	
Val 8	8.09	3.65	2.09		CH ₃ γ 1 = 1.07 CH ₃ γ 2 = 0.79
His 9	7.87	4.08	3.21 y 3.02		CH δ = 6.99 CH ϵ = 7.83
Leu 10	8.61	4.15	1.93 y 1.55	1.83	CH ₃ δ 1 = 0.91 CH ₃ δ 2 = 0.90
Arg 11	7.96	4.13	1.95	1.86 y 1.71	CH δ = 3.18 CH ϵ = 7.48
Leu 12	7.94	4.24	1.78 y 1.53	1.80	CH ₃ δ 1 = 0.84 CH ₃ δ 2 = 0.79
Ala 13	7.80	4.22	1.43		
CONH₂	7.13 y 6.91				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1) + 30% TFE.

Tabla 77. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **143**^a.

Ac-Asp¹-Val²-Arg³-Arg⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Val⁸-His⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Ala¹³-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.5
Asp 1	126.1	- ^b	41.4		
Val 2	123.2	65.5	32.3		CH ₃ γ 1 = 22.4 CH ₃ γ 2 = 20.5
Arg 3	119.8	60.1	30.0	27.6	CH δ = 43.5 N ϵ = 84.6
Arg 4	118.2	59.1	30.1	27.5	N ϵ = 84.4
Phe 5	118.9	61.6	39.3		
Leu 6	122.0	58.8	42.1	27.2	CH ₃ δ 1 = 24.5 CH ₃ δ 2 = 22.9
Glu 7	119.1	60.6	29.7	36.4	
Val 8	117.4	66.8	32.2		CH ₃ γ 1 = 21.1 CH ₃ γ 2 = 20.7
His 9	116.1	60.8	28.2		
Leu 10	119.9	58.0	42.0	27.2	CH ₃ δ 1 = 24.9 CH ₃ δ 2 = 22.7
Arg 11	118.4	58.8	30.1	28.0	CH δ = 43.4 N ϵ = 84.7
Leu 12	118.9	56.7	42.5	27.0	CH ₃ δ 1 = 22.5 CH ₃ δ 2 = 25.1
Ala 13	122.1	53.2	19.1		
CONH₂	103.8				

^a Experimentos realizados en D₂O + 30% TFE, las señales se han asignado a través de espectros bidimensionales. Las señales de ^{13}C > 65 ppm no han sido registradas. ^bEstos no han podido asignarse debido al solapamiento de señales.

Tabla 78. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **146^a**.

Ac-Asp¹-Leu²-Arg³-Ala⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Gln⁸-His⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Ser¹²-Ala¹³-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.04
Asp 1	7.82	4.69	2.88 y 2.68		
Leu 2	8.20	4.24	1.77 y 1.66	1.73	CH ₃ δ 1 = 0.97 CH ₃ δ 2 = 0.90
Arg 3	8.14	3.97	1.98	1.77 y 1.68	CH δ = 3.25 CH ϵ = 7.66
Ala 4	7.87	4.19	1.51		
Phe 5	8.01	4.33	3.38 y 3.27		CH δ = 7.23 CH ϵ = 7.14
Leu 6	8.85	4.05	2.01 y 1.63	1.97	CH ₃ δ 1 = 0.95 CH ₃ δ 2 = 0.96
Glu 7	8.66	3.95	2.22 y 2.12	2.53 y 2.29	
Gln 8	7.97	4.03	2.14 y 2.07	2.46 y 2.36	CONH ₂ = 7.26 y 6.63
His 9	8.02	4.27	3.26 y 2.98		CH δ = 6.98 CH ϵ = 8.02
Leu 10	8.53	4.18	1.88 y 1.58	1.82	CH ₃ δ 1 = 0.90 CH ₃ δ 2 = 0.91
Arg 11	8.01	4.19	1.92	1.83 y 1.69	CH δ = 3.20 CH ϵ = 7.44
Ser 12	7.78	4.39	3.97 y 3.93		
Ala 13	7.83	4.28	1.43		
CONH₂	7.28 y 6.95				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1) + 30% TFE.

Tabla 79. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **146**^a.

Ac-Asp¹-Leu²-Arg³-Ala⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Gln⁸-His⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Ser¹²-Ala¹³-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.6
Asp 1	125.9	- ^b	41.8		
Leu 2	125.0	57.9	42.5	27.3	CH ₃ δ 1 = 23.4 CH ₃ δ 2 = 24.3
Arg 3	118.0	- ^b	29.8	27.4	CH δ = 43.6 N ϵ = 84.6
Ala 4	120.8	58.3	18.2		
Phe 5	117.9	- ^b	39.4		
Leu 6	122.7	58.9	41.9	27.2	CH ₃ δ 1 = 22.7 CH ₃ δ 2 = 24.6
Glu 7	119.1	60.4	29.5	36.5	
Gln 8	116.3	- ^b	28.6	34.0	N ϵ = 110.2
His 9	119.1	- ^b	28.6		
Leu 10	121.0	57.7	42.1	27.3	CH ₃ δ 1 = 22.7 CH ₃ δ 2 = 24.9
Arg 11	117.1	55.3	30.6	27.9	CH δ = 43.7 N ϵ = 84.8
Ser 12	114.1	- ^b	64.0		
Ala 13	125.5	53.0	19.3		
CONH₂	104.4				

^a Experimentos realizados en D₂O + 30% TFE, las señales se han asignado a través de espectros bidimensionales. Las señales de ^{13}C > 65 ppm no han sido registradas. ^bEstos valores no han podido asignarse debido al solapamiento de señales.

Tabla 80. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **147^a**.

Ac-Ser¹-Val²-Arg³-Arg⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Ala⁸-His⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Ala¹³-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.13
Ser 1	8.02	4.47	4.03 y 3.93		
Val 2	8.28	3.93	2.15		CH ₃ γ 1 = 1.08 CH ₃ γ 2 = 1.02
Arg 3	7.98	4.03	1.92 y 1.88	1.74 y 1.67	CH δ = 3.23 CH ϵ = 7.45
Arg 4	7.86	4.17	1.94	1.77 y 1.70	CH δ = 3.24 CH ϵ = 7.28
Phe 5	7.18	4.37	3.41 y 3.28		CH δ = 7.25 CH ϵ = 7.18
Leu 6	8.73	4.10	1.98 y 1.68	1.94	CH ₃ δ 1 = 0.95 CH ₃ δ 2 = 0.94
Glu 7	8.64	3.92	2.23 y 2.10	2.58 y 2.28	
Ala 8	7.98	4.09	1.45		
His 9	7.89	4.19	3.26 y 3.04		CH δ = 7.02 CH ϵ = 7.75
Leu 10	8.42	4.17	1.91 y 1.58	1.83	CH ₃ δ 1 = 0.92 CH ₃ δ 2 = 0.90
Arg 11	7.97	4.15	1.92	1.81 y 1.67	CH δ = 3.21 CH ϵ = 7.37
Leu 12	7.73	4.26	1.77 y 1.59	1.57	CH ₃ δ 1 = 0.88 CH ₃ δ 2 = 0.88
Ala 13	7.79	4.24	1.43		
CONH₂	7.19 y 6.90				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1) + 30% TFE.

Tabla 81. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **147**^a.

Ac-Ser¹-Val²-Arg³-Arg⁴-Phe⁵-Leu⁶-Glu⁷-Ala⁸-His⁹-Leu¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Ala¹³-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.7
Ser 1	121.0	- ^b	64.0		
Val 2	123.6	66.0	32.0		CH ₃ γ 1 = 21.6 CH ₃ γ 2 = 20.5
Arg 3	120.0	60.1	30.2	- ^b	CH δ = 43.6 N ϵ = 84.6
Arg 4	117.5	59.4	30.3	27.7	CH δ = 43.6 N ϵ = 84.4
Phe 5	120.5	61.6	39.4		
Leu 6	122.7	59.0	42.1	27.2	CH ₃ δ 1 = 24.6 CH ₃ δ 2 = 22.8
Glu 7	119.0	60.3	29.7	37.0	
Ala 8	119.7	55.1	18.0		
His 9	114.1	59.9	28.5		
Leu 10	120.7	57.8	42.1	27.2	CH ₃ δ 1 = 24.9 CH ₃ δ 2 = 22.7
Arg 11	118.0	58.4	30.3	27.9	CH δ = 43.6 N ϵ = 84.6
Leu 12	119.3	56.4	42.5	27.2	CH ₃ δ 1 = 24.8 CH ₃ δ 2 = 22.9
Ala 13	122.3	53.1	19.2		
CONH₂	104.0				

^a Experimentos realizados en D₂O + 30% TFE, las señales se han asignado a través de espectros bidimensionales. Las señales de ^{13}C > 65 ppm no han sido registradas. ^b Estos valores no han podido asignarse debido al solapamiento de señales.

Tabla 82. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **158^a**.

Ac-Glu¹-Val²-ciclo³⁻⁷[Glu³-Lys⁴-Phe⁵-Met(O₂)⁶-Lys⁷]-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Ser¹²-Tyr¹³-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 2.17
Glu 1	8.46	4.19	2.13 y 2.03	2.42	
Val 2	8.03	3.82	2.10		CH ₃ γ 1 = 1.07 CH ₃ γ 2 = 1.02
Glu 3	7.88	4.10	2.44 y 1.94	2.60 y 2.41	
Lys 4	7.56	3.86	1.96 y 1.90	1.61 y 1.46	CH δ = 1.73 CH ₃ ϵ = 2.99
Phe 5	8.14	4.25	3.26		CH δ = 7.18
Met(O₂) 6	8.46	4.04	2.70 y 2.45	3.71 y 3.28	CH ₃ ϵ = 3.00
Lys 7	7.97	4.04	1.92 y 1.87	1.94 y 1.24	CH δ = 1.57 y 1.43 CH ₃ ϵ = 3.57 y 2.69 NH ζ = 7.57
Val 8	8.10	3.63	2.10		CH ₃ γ 1 = 1.05 CH ₃ γ 2 = 0.83
Tyr 9	8.63	4.07	2.98 y 2.69		CH δ = 6.99 CH ϵ = 6.72
Gln 10	8.30	4.06	2.25 y 2.21	2.59 y 2.47	CONH ₂ = 7.29 y 6.68
Arg 11	7.88	4.19	1.95 y 1.91	1.76 y 1.72	CH δ = 3.19 CH ϵ = 7.21
Ser 12	7.89	4.29	3.67 y 3.53		
Tyr 13	7.90	4.45	3.01 y 2.54		CH δ = 6.95 CH ϵ = 6.75
CONH₂	7.26 y 6.96				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1) + 30% TFE.

Tabla 83. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **158**^a.

Ac-Glu¹-Val²-ciclo³⁻⁷[Glu³-Lys⁴-Phe⁵-Met(O₂)⁶-Lys⁷]-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Ser¹²-Tyr¹³-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.7
Glu 1	127.4	57.9	29.4	35.4	
Val 2	119.0	66.3	32.2		CH ₃ γ 1 = 22.0 CH ₃ γ 2 = 21.0
Glu 3	122.0	60.6	27.5	34.9	
Lys 4	117.6	60.1	32.3	25.5	CH δ = 29.4 CH ϵ = 42.5
Phe 5	118.8	61.5	38.8		
Met(O₂) 6	116.7	60.6	25.3	53.6	CH ₃ ϵ = 42.9
Lys 7	120.2	59.0	33.7	26.6	CH δ = 31.0 CH ϵ = 42.6 N ζ = 119.4
Val 8	119.9	66.6	32.0		CH ₃ γ 1 = 22.2 CH ₃ γ 2 = 20.9
Tyr 9	122.4	61.9	38.6		
Gln 10	118.0	58.6	28.8	34.4	N ϵ = 109.8
Arg 11	118.1	58.8	30.4	27.4	CH δ = 43.5 N ϵ = 84.6
Ser 12	114.3	60.4	64.0		
Tyr 13	120.8	58.6	39.2		
CONH₂	107.0				

^a Experimentos realizados en D₂O + 30% TFE, las señales se han asignado a través de espectros bidimensionales. Las señales de $^{13}\text{C} > 65$ ppm no han sido registradas.

Tabla 84. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN para **159^a**.

Ac-Glu¹-Val²-Val³-Lys⁴-Phe⁵-Met(O₂)⁶-ciclo⁷⁻¹¹[Glu⁷-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Lys¹¹]-Ser¹²-Tyr¹³-NH₂

	NH	H α	H β	H γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 1.96
Glu 1	8.24	3.98	1.92 y 1.86	2.24	
Val 2	7.80	3.76	1.97		CH ₃ γ 1 = 0.91 CH ₃ γ 2 = 0.86
Val 3	7.28	3.75	1.98		CH ₃ γ 1 = 0.88 CH ₃ γ 2 = 0.83
Lys 4	7.48	4.03	1.77	1.36 y 1.28	CH δ = 1.65 y 1.53 CH ₃ ϵ = 2.77
Phe 5	8.02	4.16	3.07		CH δ = 7.02 CH ϵ = 7.10
Met(O₂) 6	8.22	3.89	2.41 y 2.23	3.48 y 3.06	CH ₃ ϵ = 2.79
Glu 7	8.00	3.86	2.56 y 1.86	2.37 y 2.23	
Val 8	7.83	3.35	1.99		CH ₃ γ 1 = 0.98 CH ₃ γ 2 = 0.78
Tyr 9	8.40	3.82	2.93 y 2.65		CH δ = 6.85 CH ϵ = 6.54
Gln 10	8.16	3.83	2.21 y 2.15	2.51 y 2.34	CONH ₂ = 7.06 y 6.50
Lys 11	7.87	3.84	1.70 y 1.61	1.74 y 1.07	CH δ = 1.34 y 1.28 CH ϵ = 3.34 y 2.53 NH ζ = 7.34
Ser 12	7.66	4.02	3.47 y 3.24		
Tyr 13	7.76	4.24	2.82 y 2.22		CH δ = 6.70 CH ϵ = 6.54
CONH₂	7.09 y 6.78				

^a Experimentos realizados en una mezcla de H₂O/D₂O (9:1) + 30% TFE.

Tabla 85. Desplazamientos químicos de ^{13}C y ^{15}N -RMN para **159**^a.

Ac-Glu¹-Val²-Val³-Lys⁴-Phe⁵-Met(O₂)⁶-ciclo⁷⁻¹¹[Glu⁷-Val⁸-Tyr⁹-Gln¹⁰-Lys¹¹]-Ser¹²-Tyr¹³-NH₂

	NH	C α	C β	C γ	Otros
CH₃CO					CH ₃ = 24.5
Glu 1	127.2	58.8	29.3	35.2	
Val 2	117.5	65.7	32.1		CH ₃ γ 1 = 21.5 CH ₃ γ 2 = 20.8
Val 3	120.5	65.8	32.0		CH ₃ γ 1 = 21.8 CH ₃ γ 2 = 20.9
Lys 4	120.4	59.3	32.3	25.1	CH δ = 29.5 CH ϵ = 42.4
Phe 5	118.9	61.2	38.9		
Met(O₂) 6	116.6	58.8	25.7	53.7	CH ₃ ϵ = 42.7
Glu 7	122.5	61.3	28.0	35.4	
Val 8	119.2	66.9	- ^b		CH ₃ γ 1 = 22.7 CH ₃ γ 2 = 21.0
Tyr 9	123.5	- ^b	38.5		
Gln 10	119.1	59.5	28.6	34.5	N ϵ = 109.7
Lys 11	119.1	60.0	34.2	26.6	CH δ = 30.9 CH ϵ = 42.4 N ζ = 120.5
Ser 12	113.6	61.0	64.0		
Tyr 13	120.5	58.9	39.3		
CONH₂	106.8				

^a Experimentos realizados en D₂O + 30% TFE, las señales se han asignado a través de espectros bidimensionales. Las señales de ^{13}C > 65 ppm no han sido registradas. ^b Estos valores no han podido asignarse debido al solapamiento de señales.

9. ESTUDIO DE HIDROGENACIÓN EN FASE SÓLIDA: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS MODELO

9.1. PROCEDIMIENTO GENERAL

A partir de 100 mg de la resina apropiada (0.034 mmol de Rink amida, 0.015 mmol de 2-clorotritil resina) se sintetizaron los correspondientes péptidos anclados a la resina utilizando los protocolos generales indicados en el apartado 6.3.1.2 de esta memoria (Tabla 20, 4A). En los casos en que el extremo N-terminal se preparó protegido en forma de Ac se siguió el protocolo de la Tabla 21. En el caso del derivado Boc protegido se utilizó el mismo protocolo sustituyendo el anhídrido acético (Ac_2O) por di-*tert*-butil dicarbamato (Boc_2O). Una vez obtenidos los productos a reducir **79-91**, se sometió a la resina a la reacción de reducción tal y como se describe en el apartado 7.1.2. Tras el desanclaje de los compuestos finales de la resina utilizando el método adecuado en cada caso, los péptidos **92-109** se purificaron a través de un cartucho de extracción en fase sólida de gel de sílice utilizando DCM/MeOH en proporciones 99:1.

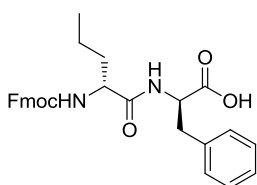
9.2. ESCISIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA RESINA

✓ **2-Clorotritil resina:** El derivado anclado a la resina se trató con una mezcla de AcOH/TFE/DCM (1:1:8) durante 3h a temperatura ambiente. Tras varios lavados con DCM, el disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo de reacción se liofilizó.

✓ **Rink amida:** El derivado anclado a la resina se trató con una mezcla TFA/H₂O (95:5) durante 5h a temperatura ambiente. Tras varios lavados con DCM, el disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo de reacción se liofilizó.

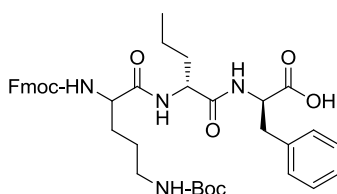
9.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS MODELO

Fmoc-Nva-Phe-OH (92): Resina 2-clorotritilo. Sólido blanco (6 mg, 86% rendimiento



global). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.04 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, NH Phe); 7.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.70 (dd, $J = 7.0$ and 5.0 Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.40 (m, 3H, 2 Ar-H Fmoc, 1 NH Nva); 7.30 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.20 (m, 5H, Ar-H Phe); 4.40 (m, 1H, α -H Phe); 4.23 (m, 3H, CH Fmoc, CH_2 Fmoc); 3.99 (m, 1H, α -H Nva); 3.04 (dd, $J = 13.8$ and 5.0 Hz, 1H, β -H Phe); 2.90 (dd, $J = 13.8$ and 8.4 Hz, 1H, β -H Phe); 1.48 (m, 2H, β -H Nva); 1.24 (m, 2H, γ -H Nva); 0.84 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, δ -H Nva). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 172.8 (CO); 171.9 (CO); 155.8 (CO); 143.9 (Ar-C Fmoc); 143.7 (Ar-C Fmoc); 140.7 (Ar-C Fmoc); 137.5 (Ar-C Phe); 129.2 (Ar-CH Phe); 128.1 (Ar-CH Phe); 127.6 (Ar-CH Fmoc); 127.1 (Ar-CH Fmoc); 126.3 (Ar-CH Phe); 125.3 (Ar-CH Fmoc); 120.1 (Ar-CH Fmoc); 65.6 (CH_2 Fmoc); 54.3 (α -C Nva); 53.4 (α -C Phe); 46.7 (CH Fmoc); 36.7 (β -C Phe); 34.1 (β -C Nva); 18.6 (γ -C Nva); 13.6 (δ -C Nva). HPLC-MS: $t_R = 5.85$ min (Gradiente: 50 a 100% A en 15 min). EM-ES: $[\text{M} + 1]^+ = 487.54$. ($\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$) calculada: C 71.59, H 6.21, N 5.76, encontrada C 71.63, H 6.15, N 5.83.

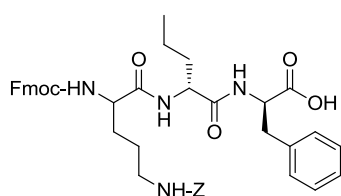
Fmoc-Lys(Boc)-Nva-Phe-OH (93): Resina 2-clorotritilo. Sólido blanco (11 mg, 98%



rendimiento global). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.00 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, NH Phe); 7.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.81 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH Lys); 7.70 (dd, $J = 7.1$ and 4.1 Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.40 (m, 3H, 2 Ar-H Fmoc, 1 NH Nva); 7.31 (m, 2H, Ar-H Fmoc); 7.19 (m, 5H, Ar-H Phe); 6.75 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, ϵ -NH Lys); 4.36 (m, 1H, α -H Phe); 4.23 (m, 4H, 1 α -H Lys, 1 CH Fmoc, 1 CH_2 Fmoc); 3.94 (m, 1H, α -H Nva); 3.02 (dd, $J = 14.0$ and 5.4 Hz, 1H, β -H Phe); 2.87 (m, 3H, 1 β -H Phe, 2 ϵ -H Lys); 1.55-1.50 (m, 4H, 2 β -H Nva, 2 β -H Lys); 1.35-1.22 (m, 15H, 9 $-\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2 γ -H Nva, 2 γ -H Lys, 2 δ -H Lys); 0.79 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, δ -H Nva). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ

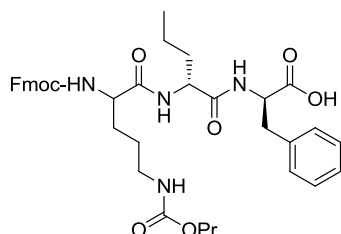
173.1 (CO); 172.1 (CO); 171.7 (CO); 156.3 (CO); 155.9 (CO); 144.2 (Ar-C Fmoc); 144.1 (Ar-C Fmoc); 141.0 (Ar-C Fmoc); 137.9 (Ar-C Phe); 129.5 (Ar-CH Phe); 129.3 (Ar-CH Phe); 128.4 (Ar-CH Phe); 128.0 (Ar-CH Fmoc); 127.6 (Ar-CH Fmoc); 127.4 (Ar-CH Fmoc); 126.6 (Ar-CH Phe); 125.7 (Ar-CH Fmoc); 121.7 (Ar-CH Fmoc); 120.4 (Ar-CH Fmoc); 77.7 (-CO₂C(CH₃)₃); 66.0 (CH₂ Fmoc); 54.9 (α-C Nva); 53.9 (α-C Phe); 52.4 (α-C Lys); 47.0 (CH Fmoc); 40.1 (ε-C Lys); 37.0 (β-C Phe); 34.8 (β-C Nva); 32.0 (β-C Lys); 29.6 (δ-C Lys); 28.6 (-CO₂C(CH₃)₃); 23.3 (γ-C Lys); 18.7 (γ-C Nva); 14.1 (δ-C Nva). HPLC-MS: t_R = 7.67 min (Gradiente: 50 a 100% A en 15 min). EM-ES: [M+1]⁺ = 715.83. (C₄₀H₅₀N₄O₈) calculada: C 67.21, H 7.05, N 7.84, encontrada C 67.34, H 6.94, N 7.99.

Fmoc-Lys(Z)-Nva-Phe-OH (94): Resina 2-clorotritilo. Sólido blanco (9 mg, 83%



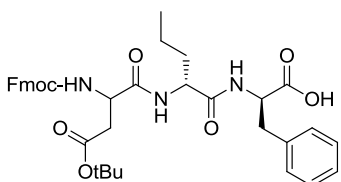
rendimiento global). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.08 (d, J = 7.7 Hz, 1H, NH Phe); 7.87 (d, J = 7.5 Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.79 (d, J = 8.1 Hz, 1H, NH Lys); 7.69 (dd, J = 7.2 and 4.2 Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 1H, NH Nva); 7.39 (t, J = 7.3 Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.32-7.27 (m, 8H, 2 Ar-H Fmoc, 5 Ar-H Z, 1 ε-NH Lys); 7.20 (m, 5H, Ar-H Phe); 4.98 (s, 2H, CH₂ Z); 4.40 (m, 1H, α-H Phe); 4.26-4.21 (m, 4H, 1 α-H Lys, 1 CH Fmoc, 2 CH₂ Fmoc); 3.94 (m, 1H, α-H Nva); 3.05-2.84 (m, 4H, 2 β-H Phe, 2 ε-H Lys); 1.53-1.22 (m, 10H, 2 β-H Nva, 2 β-H Lys, 2 γ-H Nva, 2 γ-H Lys, 2 δ-H Lys); 0.79 (t, J = 7.1 Hz, 3H, δ-H Nva). ¹³C-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 173.1 (CO); 172.0 (CO); 171.9 (CO); 156.4 (CO); 156.3 (CO); 144.2 (Ar-C Fmoc); 144.1 (Ar-C Fmoc); 141.0 (Ar-C Fmoc); 137.8 (Ar-C); 137.6 (Ar-C); 129.4 (Ar-CH Phe); 128.7 (Ar-CH Phe); 128.5 (Ar-CH Z); 128.1 (Ar-CH Z); 128.0 (Ar-CH Fmoc); 127.4 (Ar-CH Z); 126.7 (Ar-CH Phe); 125.6 (Ar-CH Fmoc); 120.4 (Ar-CH Fmoc); 65.9 (CH₂ Fmoc); 65.5 (CH₂ Z); 54.9 (α-C Nva); 53.7 (α-C Phe); 52.4 (α-C Lys); 47.0 (CH Fmoc); 39.3 (ε-C Lys); 36.7 (β-C Phe); 34.8 (β-C Nva); 31.9 (β-C Lys); 29.5 (δ-C Lys); 23.2 (γ-C Lys); 18.7 (γ-C Nva); 14.1 (δ-C Nva). HPLC-MS: t_R = 7.87 min (Gradiente: 50 a 100% A en 15 min). EM-ES: [M+1]⁺ = 749.84. (C₄₃H₄₈N₄O₈) calculada: C 68.97, H 6.46, N 7.48, encontrada C 69.02, H 6.42, N 7.55.

Fmoc-Lys(COOPr)-Nva-Phe-OH (95): Resina 2-clorotritilo. Sólido blanco (10 mg,



95% rendimiento global). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.01 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH Phe); 7.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.81 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NH Lys); 7.70 (dd, $J = 7.2$ and 4.2 Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.45 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, NH Nva); 7.40 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.31 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.19 (m, 5H, Ar-H Phe); 7.04 (t, $J = 5.25$ Hz, 1H, ϵ -NH Lys); 4.37 (m, 1H, α -H Phe); 4.26-4.20 (m, 4H, 1 α -H Lys, 1 CH Fmoc, 1 CH_2 Fmoc); 3.95 (m, 1H, α -H Nva); 3.85 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3.03 (dd, $J = 13.9$ and 5.2 Hz, 1H, β -H Phe); 2.96-2.88 (m, 3H, 1 β -H Phe, 2 ϵ -H Lys); 1.54-1.22 (m, 12H, 2 β -H Nva, 2 β -H Lys, 2 $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, 2 γ -H Nva, 2 γ -H Lys, 2 δ -H Lys); 0.84 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 0.80 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, δ -H Nva). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 173.2 (CO); 172.1 (CO); 171.8 (CO); 156.7 (CO); 156.3 (CO); 144.2 (Ar-C Fmoc); 144.1 (Ar-C Fmoc); 141.0 (Ar-C Fmoc); 137.1 (Ar-C Phe); 129.5 (Ar-CH Phe); 128.4 (Ar-CH Phe); 128.0 (Ar-CH Fmoc); 127.4 (Ar-CH Fmoc); 126.6 (Ar-CH Phe); 125.6 (Ar-CH Fmoc); 120.4 (Ar-CH Fmoc); 66.0 (CH_2 Fmoc); 65.4 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 54.9 (α -C Nva); 53.4 (α -C Phe); 52.4 (α -C Lys); 47.0 (CH Fmoc); 39.3 (ϵ -C Lys); 37.0 (β -C Phe); 34.8 (β -C Nva); 31.9 (β -C Lys); 29.5 (δ -C Lys); 23.3 (γ -C Lys); 22.4 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 18.7 (γ -C Nva); 14.1 (δ -C Nva); 10.6 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). HPLC-MS: $t_R = 6.65$ min (Gradiente: 50 a 100% A en 15 min). EM-ES: $[\text{M}+1]^+ = 701.83$. ($\text{C}_{39}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_8$) calculada: C 66.84, H 6.90, N 7.99, encontrada C 66.88, H 6.85, N 8.15.

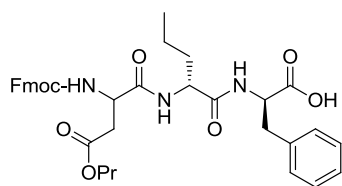
Fmoc-Asp(OtBu)-Nva-Phe-OH (96): Resina 2-clorotritilo. Sólido blanco (9 mg, 91%



rendimiento global). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.11 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH Phe); 7.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.7 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, NH Nva); 7.67 (m, 3H, 2 Ar-H Fmoc, 1 NH Asp); 7.45 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.29 (m, 2H, Ar-H Fmoc); 7.22 (m, 5H, Ar-H Phe); 4.36 (m, 2H, 1 α -H Phe, 1 α -H Asp); 4.27-4.18 (m, 4H, 1 α -H Nva, 1 CH Fmoc, 1 CH_2 Fmoc); 3.02 (dd, $J =$

13.9 and 5.3 Hz, 1H, β -H Phe); 2.87 (dd, $J = 13.9$ and 8.8 Hz, 1H, β -H Phe); 2.60 (dd, $J = 16.2$ and 4.7 Hz, 1H, β -H Asp); 2.40 (dd, $J = 16.2$ and 9.6 Hz, 1H, β -H Asp); 1.6-1.1 (m, 13H, 2 β -H Nva, 2 γ -H Nva, 9 -OC(CH₃)₃); 0.77 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, δ -H Nva). ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.8 (CO); 171.4 (CO); 170.3 (CO); 169.4 (CO); 155.8 (CO); 143.8 (Ar-C Fmoc); 143.7 (Ar-C Fmoc); 140.2 (Ar-C Fmoc); 137.5 (Ar-C Phe); 129.1 (Ar-CH Phe); 128.2 (Ar-CH Phe); 127.7 (Ar-CH Fmoc); 127.1 (Ar-CH Fmoc); 126.4 (Ar-CH Phe); 125.3 (Ar-CH Fmoc); 120.2 (Ar-CH Fmoc); 80.1 (Asp(C(CH₃)₃)); 65.8 (CH₂ Fmoc); 53.5 (α -C Phe); 52.2 (α -C Nva); 51.3 (α -C Asp); 46.6 (CH Fmoc); 37.5 (β -C Asp); 36.6 (β -C Phe); 34.3 (β -C Nva); 27.7 (-OC(CH₃)₃); 18.2 (γ -C Nva); 13.7 (δ -C Nva). HPLC-MS: $t_R = 14.18$ min (Gradiente: 20 a 100% A en 15 min). EM-ES: $[M+1]^+ = 658.81$. (C₃₇H₄₃N₃O₈) calculada: C 67.56, H 6.59, N 6.39, encontrada C 67.65, H 6.48, N 6.50.

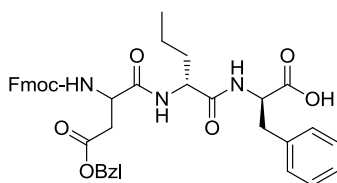
Fmoc-Asp(OPr)-Nva-Phe-OH (97): Resina 2-clorotritilo. Sólido blanco (9 mg, 90%



rendimiento global). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.05 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, NH Phe); 7.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NH Nva); 7.68-7.58 (m, 3H, 2 Ar-H Fmoc, 1 NH Asp); 7.40 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.19 (m, 5H, Ar-H Phe); 4.40-4.35 (m, 2H, 1 α -H Phe, 1 α -H Asp); 4.26-4.13 (m, 4H, 1 α -H Nva, 1 CH Fmoc, 1 CH₂ Fmoc); 3.94 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H, -OCH₂CH₂CH₃); 3.03 (dd, $J = 13.6$ and 4.8 Hz, 1H, β -H Phe); 2.87 (dd, $J = 13.6$ and 8.7 Hz, 1H, β -H Phe); 2.69 (dd, $J = 16.5$ and 4.8 Hz, 1H, β -H Asp); 2.53 (m, 1H, β -H Asp); 1.53 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₃); 1.44-1.34 (m, 2H, β -H Nva); 1.22 (m, 2H, γ -H Nva); 0.83 (t, 3H, -OCH₂CH₂CH₃); 0.76 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, δ -H Nva). ¹³C-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.7 (CO); 171.3 (CO); 170.2 (CO); 155.8 (CO); 143.7 (Ar-C Fmoc); 140.7 (Ar-C Fmoc); 137.5 (Ar-C Phe); 129.0 (Ar-CH Phe); 128.1 (Ar-CH Phe); 127.6 (Ar-CH Fmoc); 127.0 (Ar-CH Fmoc); 126.3 (Ar-CH Phe); 125.2 (Ar-CH Fmoc); 120.1 (Ar-CH Fmoc); 65.8 (CH₂ Fmoc); 65.6 (-OCH₂CH₂CH₃); 53.4 (α -C Phe); 52.3 (α -C Nva); 51.1 (α -C Asp); 46.6 (CH Fmoc); 36.6 (β -C Phe); 36.2 (β -C Asp); 34.2 (β -C Nva); 21.4 (-OCH₂CH₂CH₃); 18.2 (γ -C Nva); 13.6 (-

OCH₂CH₂CH₃); 10.2 (δ-C Nva). HPLC-MS: t_R = 13.61 min (Gradiente: 20 a 100% A en 15 min). EM-ES: [M+1]⁺ = 644.72. (C₃₆H₄₁N₃O₈) calculada: C 67.17, H 6.42, N 6.53, encontrada C 67.30, H 6.30, N 6.61.

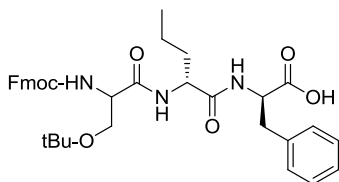
Fmoc-Asp(OBzl)-Nva-Phe-OH (98): Resina 2-clorotritilo. Sólido blanco (8 mg, 77% rendimiento global). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ



8.05 (d, J = 6.8 Hz, 1H, NH Phe); 7.86 (m, 3H, 2 Ar-H Fmoc, 1 NH Nva); 7.74-7.66 (m, 3H, 2 Ar-H Fmoc, 1 NH Asp); 7.42-7.37 (m, 4H, Ar-H Fmoc); 7.32 (m, 5H, Ar-H Bz); 7.18 (m, 5H, Ar-H Phe); 5.07 (s, 2H, CH₂

Bz)); 4.40-4.36 (m, 2H, 1 α-H Phe, 1H α-H Asp); 4.26-4.19 (m, 4H, 1 α-H Nva, 1 CH Fmoc, 1 CH₂ Fmoc); 3.02 (dd, J = 13.8 and 4.9 Hz, 1H, β-H Phe); 2.89 (dd, J = 13.8 and 8.9 Hz, 1H, β-H Phe); 2.68 (dd, J = 16.2 and 4.8 Hz, 1H, β-H Asp); 2.49 (dd, J = 16.2 and 9.2 Hz, 1H, β-H Asp); 1.6-1.40 (m, 2H, β-H Nva); 1.20 (m, 2H, γ-H Nva); 0.76 (t, J = 7.2 Hz, 3H, δ-H Nva). ¹³C-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.7 (CO); 171.3 (CO); 170.2 (CO); 170.1 (CO); 155.2 (CO); 143.1 (Ar-C Fmoc); 140.1 (Ar-C Fmoc); 136.9 (Ar-C); 135.4 (Ar-C); 129.1 (Ar-CH Phe); 128.5 (Ar-CH Phe); 127.8 (Ar-CH Phe); 127.5 (Ar-H Bz); 127.4 (Ar-H Bz); 127.0 (Ar-CH Fmoc); 126.8 (Ar-H Bz); 125.7 (Ar-H Bz); 124.6 (Ar-CH Fmoc); 119.5 (Ar-CH Fmoc); 65.2 (CH₂ Fmoc); 65.1 (CH₂ Bz)); 52.8 (α-C Phe); 51.7 (α-C Nva); 50.5 (α-C Asp); 46.0 (CH Fmoc); 36.0 (β-C Phe); 35.6 (β-C Asp); 33.6 (β-C Nva); 17.6 (γ-C Nva); 13.1 (δ-C Nva). HPLC-MS: t_R = 8.63 min (Gradiente: 50 a 100% A en 15 min). EM-ES: [M+1]⁺ = 692.73. (C₄₀H₄₁N₃O₈) calculada: C 69.45, H 5.97, N 6.07, encontrada C 69.34, H 5.90, N 6.21.

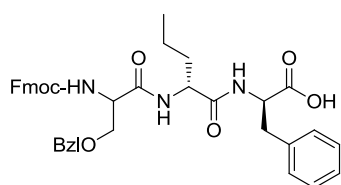
Fmoc-Ser(*t*Bu)-Nva-Phe-OH (99): Resina 2-clorotritilo. Sólido blanco (7 mg, 78%



rendimiento global). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.05 (d, J = 7.6 Hz, 1H, NH Phe); 7.87 (d, J = 7.5 Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.78 (d, J = 8.2 Hz, 1H, NH Nva); 7.70 (m, 2H, Ar-H Fmoc); 7.40 (m, 3H, 1 NH Ser, 2 Ar-H Fmoc); 7.30 (m, 2H, Ar-H Fmoc); 7.18 (m, 5H, Ar-H Phe); 4.35-4.22 (m, 5H, 1 α-

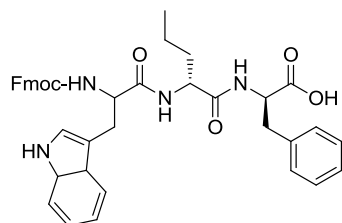
H Phe, 1 α -H Nva, 1 CH Fmoc, 2 CH₂ Fmoc); 4.10 (m, 1H, α -H Ser); 3.03 (dd, J = 13.5 and 5.0 Hz, 1H, β -H Phe); 2.87 (dd, J = 13.5 and 8.5 Hz, 1H, β -H Phe); 1.55-1.39 (m, 2H, β -H Nva); 1.22 (m, 2H, γ -H Nva); 1.07 (s, 9H, -C(CH₃)); 0.79 (t, J = 6.9 Hz, 3H, δ -H Nva). ¹³C-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 173.0 (CO); 171.6 (CO); 169.8 (CO); 156.3 (CO); 144.2 (Ar-C Fmoc); 144.1 (Ar-C Fmoc); 141.1 (Ar-C Fmoc); 138.0 (Ar-C Phe); 129.5 (Ar-CH Phe); 128.4 (Ar-CH Phe); 128.0 (Ar-CH Phe); 127.4 (Ar-CH Fmoc); 126.6 (Ar-CH Phe); 125.7 (Ar-CH Fmoc); 120.5 (Ar-CH Fmoc); 73.2 (-C(CH₃)); 66.1 (CH₂ Fmoc); 62.3 (β -C Ser); 55.8 (α -C Ser); 54.0 (α -C Phe); 52.5 (α -C Nva); 47.0 (CH Fmoc); 37.1 (β -C Phe); 35.0 (β -C Nva); 27.5 (-C(CH₃)); 18.5 (γ -C Nva); 14.1 (δ -C Nva). HPLC-MS: t_R = 11.35 min (Gradiente: 40 a 100% A en 15 min). EM-ES: [M+1]⁺ = 630.72. (C₃₆H₄₃N₃O₇) calculada: C 66.86, H 6.88, N 6.67, encontrada C 66.75, H 6.96, N 6.75.

Fmoc-Ser(Bzl)-Nva-Phe-OH (100): Resina 2-clorotritilo. Sólido blanco (8 mg, 87%



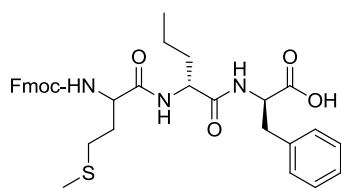
rendimiento global). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.06 (d, J = 7.2 Hz, 1H, NH Phe); 7.92 (d, J = 8.1 Hz, 1H, NH Nva); 7.87 (d, J = 7.5 Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.70 (m, 2H, Ar-H Fmoc); 7.62 (d, 1H, NH Ser); 7.39 (t, J = 7.6 Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.28-7.21 (m, 7H, 2 Ar-H Fmoc, 5 Ar-H Bz); 7.19 (m, 5H, Ar-H Phe); 4.45 (s, 2H, CH₂ Bz); 4.37-4.21 (m, 6H, 1 α -H Phe, 1 α -H Nva, 1 α -H Ser, 1 CH Fmoc, 1 CH₂ Fmoc); 3.55 (m, 2H, β -H Ser); 3.01 (dd, J = 13.8 and 5.3 Hz, 1H, β -H Phe); 2.85 (dd, J = 13.8 and 8.4 Hz, 1H, β -H Phe); 1.6-1.40 (m, 2H, β -H Nva); 1.22 (m, 2H, γ -H Nva); 0.78 (t, J = 7.1 Hz, 3H, δ -H Nva). ¹³C-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 173.1 (CO); 171.6 (CO); 169.6 (CO); 156.3 (CO); 144.2 (Ar-C Fmoc); 144.1 (Ar-C Fmoc); 141.1 (Ar-C Fmoc); 138.6 (Ar-C); 137.9 (Ar-C); 129.5 (Ar-CH Phe); 128.5 (Ar-CH); 128.5 (Ar-CH); 128.0 (Ar-CH); 127.8 (Ar-CH); 127.7 (Ar-CH); 126.7 (Ar-CH); 125.6 (Ar-CH Fmoc); 120.5 (Ar-CH Fmoc); 72.4 (CH₂ Bz); 70.3 (β -C Ser); 66.2 (CH₂ Fmoc); 55.2 (α -C Ser); 53.8 (α -C Phe); 52.6 (α -C Nva); 47.0 (CH Fmoc); 37.0 (β -C Phe); 34.8 (β -C Nva); 18.6 (γ -C Nva); 14.1 (δ -C Nva). HPLC-MS: t_R = 11.49 min (Gradiente: 40 a 100% A en 15 min). EM-ES: [M+1]⁺ = 664.74. (C₃₉H₄₁N₃O₇) calculada: C 70.57, H 6.23, N 6.33, encontrada C 70.48 H 6.31, N 6.42.

Fmoc-Trp-Nva-Phe-OH (101): Resina 2-clorotritilo. Sólido blanco (6 mg, 60%



rendimiento global). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 10.84 (1H, s, Ar-NH Trp); 8.06 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NH Phe); 7.84 (m, 3H, 2 Ar-H Fmoc, 1 NH Nva); 7.67 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, Ar-H Trp); 7.60 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.52 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, NH Trp); 7.41-7.15 (m, 10H, 4 Ar-H Fmoc, 1 Ar-H Trp, 5 Ar-H Phe); 7.04 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, Ar-H Trp); 6.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, Ar-H Trp); 6.26 (s, 1H, Ar-H Trp); 4.24 (m, 3H, 1 α -H Phe, 1 α -H Nva, 1 α -H Trp); 4.12 (m, 3H, 1 CH Fmoc, 1 CH_2 Fmoc); 3.13-2.88 (m, 4H, 2 β -H Phe 2 β -H Trp); 1.60-1.39 (m, 2H, β -H Nva); 1.22 (m, 2H, γ -H Nva); 0.80 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, δ -H Nva). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 172.1 (CO); 171.4 (CO); 171.0 (CO); 156.1 (CO); 144.1 (Ar-C Fmoc); 140.7 (Ar-C); 138.5 (Ar-C); 136.4 (Ar-C); 129.7 (Ar-CH Phe); 128.3 (Ar-CH); 128.0 (Ar-CH); 127.7 (Ar-CH); 127.4 (Ar-CH); 126.4 (Ar-CH Phe); 125.7 (Ar-CH Fmoc); 124.2 (Ar-CH); 121.8 (Ar-C); 121.1 (Ar-CH Trp); 120.4 (Ar-CH Fmoc); 119.1 (Ar-CH Trp); 111.6 (Ar-CH Trp); 110.5 (Ar-C); 66.0 (CH_2 Fmoc); 55.8 (α -C Phe); 54.5 (α -C Trp); 53.0 (α -C Nva); 46.9 (CH Fmoc); 37.2 (β -C Phe); 34.7 (β -C Nva); 28.1 (β -C Trp); 18.8 (γ -C Nva); 14.1 (δ -C Nva). HPLC-MS: $t_R = 10.32$ min (Gradiente: 40 a 100% A en 15 min). EM-ES: $[\text{M}+1]^+ = 673.76$. ($\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_6$) calculada: C 71.41, H 5.99, N 8.33, encontrada C 71.52 H 5.85, N 8.47.

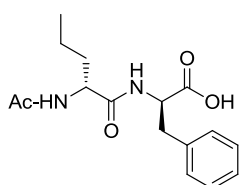
Fmoc-Met-Nva-Phe-OH (102): Resina 2-clorotritilo. Sólido blanco (7 mg, 75%



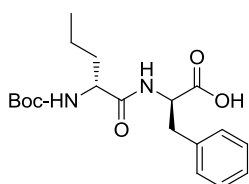
rendimiento global). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.00 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, NH Phe); 7.86 (m, 3H, 2H Ar-H Fmoc, 1H NH Nva); 7.70 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.55 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NH Met); 7.40 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.31 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.18 (m, 5H, Ar-H Phe); 4.34-4.07 (m, 6H, 1 α -H Phe, 1 α -H Nva, 1 α -H Met, 1 CH Fmoc, 1 CH_2 Fmoc); 3.03 (dd, $J = 13.9$ and 5.1 Hz, 1H, β -H Phe); 2.87 (dd, $J = 13.9$ and 8.2 Hz, 1H, β -H Phe); 2.41 (m, 2H, γ -H Met); 2.01 (s, 3H, ϵ -H Met); 1.80 (m, 2H, β -H Met); 1.55-1.41 (m, 2H, β -H Nva); 1.22 (m, 2H, γ -H Nva); 0.80 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, δ -H

Nva). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 172.6 (CO); 171.3 (CO); 171.7 (CO); 155.9 (CO); 143.9 (Ar-C Fmoc); 143.7 (Ar-C Fmoc); 140.7 (Ar-C Fmoc); 137.7 (Ar-C Phe); 129.1 (Ar-CH Phe); 128.0 (Ar-CH Phe); 127.6 (Ar-CH Fmoc); 127.0 (Ar-CH Fmoc); 126.2 (Ar-CH Phe); 125.3 (Ar-CH Fmoc); 120.1 (Ar-CH Fmoc); 65.6 (CH_2 Fmoc); 53.8 (α -C Met); 53.6 (α -C Phe); 52.2 (α -C Nva); 46.6 (CH Fmoc); 36.7 (β -C Phe); 34.4 (β -C Nva); 31.7 (β -C Met); 29.7 (γ -H Met); 18.4 (γ -C Nva); 14.6 (ϵ -H Met); 13.7 (δ -C Nva). HPLC-MS: $t_R = 9.98$ min (Gradiente: 40 a 100% A en 15 min). EM-ES: $[\text{M}+1]^+ = 618.69$. ($\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$) calculada: C 66.10, H 6.36, N 6.80, encontrada C 66.22 H 6.25, N 6.98.

Ac-Nva-Phe-OH (103): Resina 2-clorotritilo. Sólido blanco (5 mg, 98% rendimiento global). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.05 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, NH Phe); 7.88 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, NH Nva); 7.21 (m, 5H, Ar-H Phe); 4.37 (m, 1H, α -H Phe); 4.23 (m, 1H, α -H Nva); 3.03 (dd, $J = 13.8$ and 5.2 Hz, 1H, β -H Phe); 2.88 (dd, $J = 13.8$ and 8.7 Hz, 1H, β -H Phe); 1.79 (s, 3H, $-\text{COCH}_3$); 1.52 (m, 1H, β -H Nva); 1.41 (m, 1H, β -H Nva); 1.23 (m, 2H, γ -H Nva); 0.82 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, δ -H Nva). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 173.2 (CO); 172.2 (CO); 169.4 (CO); 137.9 (Ar-C Phe); 129.5 (Ar-CH Phe); 128.5 (Ar-CH Phe); 126.7 (Ar-CH Phe); 53.8 (α -C Phe); 52.7 (α -C Nva); 36.9 (β -C Phe); 34.3 (β -C Nva); 22.8 ($-\text{COCH}_3$); 18.8 (γ -C Nva); 14.0 (δ -C Nva). HPLC-MS: $t_R = 9.98$ min (Gradiente: 5 a 80% A en 15 min). EM-ES: $[\text{M}+1]^+ = 307.37$. ($\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$) calculada: C 62.73, H 7.24, N 9.14, encontrada C 62.79 H 7.18, N 9.25.

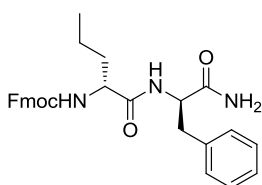


Boc-Nva-Phe-OH (104): Resina 2-clorotritilo. Sólido blanco (5 mg, 97% rendimiento global). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7.91 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH Phe); 7.21 (m, 5H, Ar-H Phe); 6.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH Nva); 4.41 (m, 1H, α -H Phe); 3.87 (m, 1H, α -H Nva); 3.03 (dd, $J = 13.8$ and 5.0 Hz, 1H, β -H Phe); 2.88 (dd, $J = 13.8$ and 8.6 Hz, 1H, β -H Phe); 1.43 (m, 2H, β -H Nva); 1.35 (s, 9H, $-\text{COC}(\text{CH}_3)_3$); 1.23 (m, 2H, γ -H Nva); 0.79 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, δ -H Nva). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 173.2 (CO);



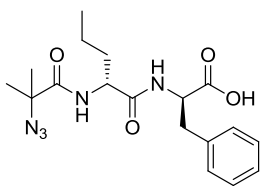
172.4 (CO); 155.5 (CO); 137.7 (Ar-C Phe); 129.5 (Ar-CH Phe); 128.5 (Ar-CH Phe); 126.7 (Ar-CH Phe); 78.4 (-COC(CH₃)₃); 54.4 (α-C Nva); 53.5 (α-C Phe); 37.1 (β-C Phe); 34.5 (β-C Nva); 28.5 (-COC(CH₃)₃); 18.9 (γ-C Nva); 14.0 (δ-C Nva). HPLC-MS: t_R = 13.67 min (Gradiente: 5 a 80% A en 15 min). EM-ES: [M+1]⁺ = 365.45.(C₁₉H₂₈N₂O₅) calculada: C 62.62, H 7.74, N 7.69, encontrada C 62.75 H 7.61, N 7.86.

Fmoc-Nva-Phe-NH₂ (107): Resina Rink amida. Sólido blanco (16 mg, 99% rendimiento global). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.59 (d, J = 8.2 Hz,



1H, Ct-NH₂); 8.03 (m, 1H, NH Phe); 7.91 (d, J = 7.4 Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.85 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ct-NH₂); 7.72 (m, 2H, Ar-H Fmoc); 7.44 (m, 3H, 2 Ar-H Fmoc, 1 NH Nva); 7.35 (t, J = 7.4 Hz, 2H, Ar-H Fmoc); 7.20 (m, 5H, Ar-H Phe); 4.47 (m, 1H, α-H Phe); 4.26 (m, 3H, CH Fmoc, CH₂ Fmoc); 3.91 (m, 1H, α-H Nva); 3.02 (dd, J = 13.7 and 4.7 Hz, 1H, β-H Phe); 2.84 (dd, J = 13.8 and 8.8 Hz, 1H, β-H Phe); 1.47 (m, 2H, β-H Nva); 1.21 (m, 2H, γ-H Nva); 0.84 (t, J = 7.2 Hz, 3H, δ-H Nva). HPLC-MS: t_R = 5.33 min (Gradiente: 5 a 100% A en 15 min). EM-ES: [M + 1]⁺ = 486.54. (C₂₉H₃₀N₂O₅) calculada: C 71.73, H 6.43, N 8.65, encontrada C 71.63, H 6.15, N 8.32.

α-Azidoisobutiril-Nva-Phe-NH₂ (109): Resina Rink amida. Sólido blanco (9 mg, 70% rendimiento global). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.88



(d, J = 8.3 Hz, 1H, NH Phe); 7.75 (d, J = 8.1 Hz, 1H, NH Nva); 7.42 (s, 1H, C_T-NH₂); 7.21 (m, 5H, Ar-H Phe); 7.07 (s, 1H, C_T-NH₂); 4.42 (m, 1H, α-H Phe); 4.16 (m, 1H, α-H Nva); 2.97 (dd, J = 13.8 and 5.1 Hz, 1H, β-H Phe); 2.78 (dd, J = 13.8 and 9.0 Hz, 1H, β-H Phe); 1.54 (m, 2H, β-H Nva); 1.37 (s, 3H, C[(CH₃)₂(N₃)]); 1.36 (s, 3H, C[(CH₃)₂(N₃)]); 1.24-1.09 (m, 2H, γ-H Nva); 0.80 (t, J = 7.3 Hz, 3H, δ-H Nva). ¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.7 (CO); 171.6 (CO); 171.1 (CO); 137.7 (Ar-C Phe); 129.3 (Ar-CH Phe); 128.0 (Ar-CH Phe); 126.3 (Ar-CH Phe); 63.9 (C[(CH₃)₂(N₃)]); 53.5 (α-C Phe); 53.0 (α-C Nva); 37.7 (β-C Phe); 33.7 (β-C Nva); 24.2 (C[(CH₃)₂(N₃)]); 18.6 (γ-C Nva); 13.6 (δ-C Nva).

HPLC-MS: $t_R = 12.63$ min (Gradiente: 5 a 80% A en 15 min). EM-ES: $[M+1]^+ = 375.47$.
($C_{18}H_{26}N_6O_3$) calculada: C 57.74, H 7.00, N 22.44, encontrada C 57.65 H 6.92, N 22.58.

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferrara, N., VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, 2, 795-803.
2. Mazitschek, R.; Giannis, A., Inhibitors of angiogenesis and cancer-related receptor tyrosine kinases. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2004**, 8, 432-441.
3. Otrrock, Z. K.; Mahfouz, R. A. R.; Makarem, J. A.; Shamseddine, A. I., Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol. Dis.*, **2007**, 39, 212-220.
4. Carmeliet, P., Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.*, **2000**, 6, 389-395.
5. Takahashi, H.; Shibuya, M., The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Sci.*, **2005**, 109, 227-241.
6. Ogawa, S.; Oku, A.; Sawano, A.; Yamaguchi, S.; Yazaki, Y.; Shibuya, M., A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 31273-31282.
7. Meyer, M.; Clauss, M.; Lepple-Wienhues, A.; Waltenberger, J.; Augustin, H. G.; Ziche, M.; Lanz, C.; Buttner, M.; Rziha, H.-J.; Dehio, C., A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*, **1999**, 18, 363-374.
8. Wise, L. M.; Ueda, N.; Dryden, N. H.; Fleming, S. B.; Caesar, C.; Roufail, S.; Achen, M. G.; Stacker, S. A.; Mercer, A. A., Viral vascular endothelial growth factors vary extensively in amino acid sequence, receptor-binding specificities, and the ability to induce vascular permeability yet are uniformly active mitogens. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 38004-38014.
9. Yamazaki, Y.; Takani, K.; Atoda, H.; Morita, T., Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF Receptor 2). *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 51985-51988.
10. Suto, K.; Yamazaki, Y.; Morita, T.; Mizuno, H., Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms. *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 2126-2131.
11. Neufeld, G.; Cohen, T.; Gengrinovitch, S.; Poltorak, Z., Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.*, **1999**, 13, 9-22.
12. Cébe-Suarez, S.; Zehnder-Fjällman, A.; Ballmer-Hofer, K., The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2006**, 63, 601-615.
13. Stuttfeld, E.; Ballmer-Hofer, K., Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life*, **2009**, 61, 915-922.
14. Tischer, E.; Mitchell, R.; Hartman, T.; Silva, M.; Gospodarowicz, D.; Fiddes, J. C.; Abraham, J. A., The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 11947-11954.
15. Houck, K. A.; Leung, D. W.; Rowland, A. M.; Winer, J.; Ferrara, N., Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 26031-26037.
16. Otrrock, Z. K.; Makarem, J. A.; Shamseddine, A. I., Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cells Mol. Dis.*, **2007**, 38, 258-268.
17. Ferrara, N.; Davis-Smyth, T., The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.*, **1997**, 18, 4-25.

18. Araújo Cautero Horta, B.; Rennó Sodero, A. C.; Bicca de Alencastro, R., Investigating the differential activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors. *J. Mol. Graph. Model.*, **2009**, 28, 287-296.
19. Ellis, L. M.; Hicklin, D. J., VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat. Rev. Cancer*, **2008**, 8, 579-591.
20. Kanno, S.; Oda, N.; Abe, M.; Terai, Y.; Ito, M.; Shitara, K.; Tabayashi, K.; Shibuya, M.; Sato, Y., Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene*, **2000**, 19, 2138-2146.
21. Gille, H.; Kowalski, J.; Li, B.; LeCouter, J.; Moffat, B.; Zioncheck, T. F.; Pelletier, N.; Ferrara, N., Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 3222-3230.
22. Ferrara, N.; Kerbel, R. S., Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, **2005**, 438, 967-974.
23. Waltenberger, J.; Claesson-Welsh, L.; Siegbahn, A.; Shibuya, M.; Heldin, C. H., Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 26988-26995.
24. Muller, Y. A.; Christinger, H. W.; Keyt, B. A.; de Vos, A. M., The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure*, **1997**, 5, 1325-1338.
25. Muller, Y. A.; Chen, Y.; Christinger, H. W.; Li, B.; Cunningham, B. C.; Lowman, H. B.; de Vos, A. M., VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure*, **1998**, 6, 1153-1167.
26. Wiesmann, C.; Fuh, G.; Christinger, H. W.; Eigenbrot, C.; Wells, J. A.; de Vos, A. M., Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell*, **1997**, 91, 695-704.
27. Ferrara, N.; Hillan, K. J.; Gerber, H.-P.; Novotny, W., Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2004**, 3, 391-400.
28. Fuh, G.; Wu, P.; Liang, W.-C.; Ultsch, M.; Lee, C. V.; Moffat, B.; Wiesmann, C., Structure-function studies of two synthetic anti-vascular endothelial growth factor Fabs and comparison with the AvastinTM-Fab. *J. Biol. Chem.*, **2006**, 281, 6625-6631.
29. Lowe, J.; Araujo, J.; Yang, J.; Reich, M.; Oldendorp, A.; Shiu, V.; Quarmby, V.; Lowman, H.; Lien, S.; Gaudreault, J.; Maia, M., Ranibizumab inhibits multiple forms of biologically active vascular endothelial growth factor in vitro and in vivo. *Exp. Eye. Res.*, **2007**, 85, 425-430.
30. Dancey, J.; Sausville, E. A., Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov*, **2003**, 2, 296-313.
31. Feron, O., Targeting the tumor vascular compartment to improve conventional cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2004**, 25, 536-542.
32. Bae, D.-G.; Gho, Y.-S.; Yoon, W.-H.; Chae, C.-B., Arginine-rich anti-vascular endothelial growth factor peptides inhibit tumor growth and metastasis by blocking angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 13588-13596.
33. Pan, B.; Li, B.; Russell, S. J.; Tom, J. Y. K.; Cochran, A. G.; Fairbrother, W. J., Solution structure of a phage-derived peptide antagonist in complex with vascular endothelial growth factor. *J. Mol. Biol.*, **2002**, 316, 769-787.
34. Mayo, K. H.; Dings, R. P. M.; Flader, C.; Nesmelova, I.; Hargittai, B.; van der Schaft, D. W. J.; van Eijk, L. I.; Walek, D.; Haseman, J.; Hoye, T. R.; Griffioen, A. W., Design of a

partial peptide mimetic of Anginex with antiangiogenic and anticancer activity. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 45746-45752.

35. Aviezer, D.; Cotton, S.; David, M.; Segev, A.; Khaselev, N.; Galili, N.; Gross, Z.; Yayon, A., Porphyrin analogues as novel antagonists of fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor receptor binding that inhibit endothelial cell proliferation, tumor progression, and metastasis. *Cancer Res.*, **2000**, 60, 2973-2980.

36. Binetruy-Tournaire, R.; Demangel, C.; Malavaud, B.; Vassy, R.; Rouyre, S.; Kraemer, M.; Plouet, J.; Derbin, C.; Perret, G.; Mazie, J. C., Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO J.*, **2000**, 19, 1525-1533.

37. Ueda, Y.; Yamagishi, T.; Samata, K.; Ikeya, H.; Hirayama, N.; Takashima, H.; Nakaike, S.; Tanaka, M.; Saiki, I., A novel low molecular weight antagonist of vascular endothelial growth factor receptor binding: VGA1155. *Mol. Cancer Ther.*, **2003**, 2, 1105-1111.

38. Zilberberg, L.; Shinkaruk, S.; Lequin, O.; Rousseau, B.; Hagedorn, M.; Costa, F.; Caronzolo, D.; Balke, M.; Canron, X.; Convert, O.; Laïn, G.; Gionnet, K.; Gonçalves, M.; Bayle, M.; Bello, L.; Chassaing, G.; Deleris, G.; Bikfalvi, A., Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 35564-35573.

39. Goncalves, V.; Gautier, B.; Coric, P.; Bouaziz, S.; Lenoir, C.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguibert, N., Rational design, structure, and biological evaluation of cyclic peptides mimicking the vascular endothelial growth factor. *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 5135-5146.

40. Klemm, J. D.; Schreiber, S. L.; Crabtree, G. R., Dimerization as a regulatory mechanism in signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.*, **1998**, 16, 569-592.

41. Huang, Z., The chemical biology of apoptosis: Exploring protein-protein interactions and the life and death of cells with small molecules. *Chem. Biol.*, **2002**, 9, 1059-1072.

42. Stelzl, U.; Worm, U.; Lalowski, M.; Haenig, C.; Brembeck, F. H.; Goehler, H.; Stroedicke, M.; Zenkner, M.; Schoenherr, A.; Koeppen, S.; Timm, J.; Mintzlauff, S.; Abraham, C.; Bock, N.; Kietzmann, S.; Goedde, A.; Toksöz, E.; Droege, A.; Krobitsch, S.; Korn, B.; Birchmeier, W.; Lehrach, H.; Wanker, E. E., A human protein-protein interaction network: A resource for annotating the proteome. *Cell*, **2005**, 122, 957-968.

43. Ruffner, H.; Bauer, A.; Bouwmeester, T., Human protein-protein interaction networks and the value for drug discovery. *Drug Discov. Today*, **2007**, 12, 709-716.

44. Ryan, D. P.; Matthews, J. M., Protein-protein interactions in human disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2005**, 15, 441-446.

45. Stites, W. E., Protein-protein interactions: Interface structure, binding thermodynamics, and mutational analysis. *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1233-1250.

46. Reichmann, D.; Rahat, O.; Cohen, M.; Neuvirth, H.; Schreiber, G., The molecular architecture of protein-protein binding sites. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2007**, 17, 67-76.

47. Halperin, I.; Wolfson, H.; Nussinov, R., Protein-protein interactions: Coupling of structurally conserved residues and of hot spots across interfaces. Implications for docking. *Structure*, **2004**, 12, 1027-1038.

48. Russell, R. B.; Alber, F.; Aloy, P.; Davis, F. P.; Korkin, D.; Pichaud, M.; Topf, M.; Sali, A., A structural perspective on protein-protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2004**, 14, 313-324.

49. Berg, T., Modulation of protein-protein interactions with small organic molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 2462-2481.

50. Yin, H.; Hamilton, A. D., Strategies for targeting protein-protein interactions with synthetic agents. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 4130-4163.

51. Pérez de Vega, M. J.; Martín-Martínez, M.; González-Muniz, R., Modulation of protein-protein interactions by stabilizing/mimicking protein secondary structure elements. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2007**, *7*, 33-62.
52. Bernal, F.; Tyler, A. F.; Korsmeyer, S. J.; Walensky, L. D.; Verdine, G. L., Reactivation of the p53 tumor suppressor pathway by a stapled p53 peptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 2456-2457.
53. Walensky, L. D.; Kung, A. L.; Escher, I.; Malia, T. J.; Barbuto, S.; Wright, R. D.; Wagner, G.; Verdine, G. L.; Korsmeyer, S. J., Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science*, **2004**, *305*, 1466-1470.
54. Wiesmann, C.; Christinger, H. W.; Cochran, A. G.; Cunningham, B. C.; Fairbrother, W. J.; Keenan, C. J.; Meng, G.; de Vos, A. M., Crystal structure of the complex between VEGF and a receptor-blocking peptide. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 17765-17772.
55. Fuh, G.; Li, B.; Crowley, C.; Cunningham, B.; Wells, J. A., Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 11197-11204.
56. Ruch, C.; Skiniotis, G.; Steinmetz, M. O.; Walz, T.; Ballmer-Hofer, K., Structure of a VEGF-VEGF receptor complex determined by electron microscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2007**, *14*, 249-250.
57. Leppänen, V.-M.; Prota, A. E.; Jeltsch, M.; Anisimov, A.; Kalkkinen, N.; Strandin, T.; Lankinen, H.; Goldman, A.; Ballmer-Hofer, K.; Alitalo, K., Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, 2425-2430.
58. Iyer, S.; Darley, P. I.; Acharya, K. R., Structural insights into the binding of vascular endothelial growth factor-B by VEGFR-1D2. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 23779-23789.
59. Keyt, B. A.; Nguyen, H. V.; Berleau, L. T.; Duarte, C. M.; Park, J.; Chen, H.; Ferrara, N., Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 5638-5646.
60. Müller, Y. A.; Li, B.; Christinger, H. W.; Wells, J. A.; Cunningham, B. C.; de Vos, A. M., Vascular endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 7192-7197.
61. Li, B.; Fuh, G.; Meng, G.; Xin, X.; Gerritsen, M. E.; Cunningham, B.; de Vos, A. M., Receptor-selective variants of human vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 29823-29828.
62. DeLano, W. L.; Ultsch, M. H.; de Vos, A. M.; Wells, J. A., Convergent solutions to binding at a protein-protein interface. *Science*, **2000**, *287*, 1279-1283.
63. Lee, C. V.; Liang, W.-C.; Dennis, M. S.; Eigenbrot, C.; Sidhu, S. S.; Fuh, G., High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *J. Mol. Biol.*, **2004**, *340*, 1073-1093.
64. Jia, H.; Jezequel, S.; Löhr, M.; Shaikh, S.; Davis, D.; Soker, S.; Selwood, D.; Zachary, I., Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, *283*, 164-173.
65. D'Andrea, L. D.; Iaccarino, G.; Fattorusso, R.; Sorriento, D.; Carannante, C.; Capasso, D.; Trimarco, B.; Pedone, C., Targeting angiogenesis: Structural characterization and biological properties of a de novo engineered VEGF mimicking peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 14215-14220.
66. Gautier, B.; Goncalves, V.; Diana, D.; Di Stasi, R.; Teillet, F.; Lenoir, C.; Huguenot, F.; Garbay, C.; Fattorusso, R.; D'Andrea, L. D.; Vidal, M.; Inguibert, N., Biochemical and

structural analysis of the binding determinants of a vascular endothelial growth factor receptor peptidic antagonist. *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 4428-4440.

67. Ramírez-Alvarado, M.; Kortemme, T.; Blanco, F. J.; Serrano, L., β -Hairpin and β -sheet formation in designed linear peptides. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 93-103.

68. Sibanda, B. L.; Thornton, J. M., β -Hairpin families in globular proteins. *Nature*, **1985**, 316, 170-174.

69. Sibanda, B. L.; Blundell, T. L.; Thornton, J. M., Conformation of β -hairpins in protein structures: A systematic classification with applications to modelling by homology, electron density fitting and protein engineering. *J. Mol. Biol.*, **1989**, 206, 759-777.

70. Kabsch, W.; Sander, C., Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **1983**, 22, 2577-2637.

71. Venkatachalam, C. M., Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units. *Biopolymers*, **1968**, 6, 1425-1436.

72. Gómez-Moreno, C.; Sancho, J., *Estructura de proteínas*. Ariel Ciencia: Barcelona, **2003**; p 492-503.

73. Cox, J. P. L.; Evans, P. A.; Packman, L. C.; Williams, D. H.; Woolfson, D. N., Dissecting the structure of a partially folded protein: circular dichroism and nuclear magnetic resonance studies of peptides from Ubiquitin. *J. Mol. Biol.*, **1993**, 234, 483-492.

74. Blanco, F. J.; Jimenez, M. A.; Pineda, A.; Rico, M.; Santoro, J.; Nieto, J. L., NMR solution structure of the isolated N-terminal fragment of protein-G B1 domain. Evidence of trifluoroethanol induced native-like β -hairpin formation. *Biochemistry*, **1994**, 33, 6004-6014.

75. Blanco, F. J.; Rivas, G.; Serrano, L., A short linear peptide that folds into a native stable β -hairpin in aqueous solution. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **1994**, 1, 584-590.

76. Hoyer, W.; Grönwall, C.; Jonsson, A.; Stahl, S.; Hard, T., Stabilization of a β -hairpin in monomeric Alzheimer's amyloid- β peptide inhibits amyloid formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105, 5099-5104.

77. Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M., A revised set of potentials for β -turn formation in proteins. *Protein Sci.*, **1994**, 3, 2207-2216.

78. Stanger, H. E.; Gellman, S. H., Rules for antiparallel β -sheet design: D-Pro-Gly is superior to L-Asn-Gly for β -Hairpin Nucleation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 4236-4237.

79. deAlba, E.; Jimenez, M. A.; Rico, M.; Nieto, J. L., Conformational investigation of designed short linear peptides able to fold into β -hairpin structures in aqueous solution. *Fold. Des.*, **1996**, 1, 133-144.

80. Blanco, F. J.; Jimenez, M. A.; Herranz, J.; Rico, M.; Santoro, J.; Nieto, J. L., NMR evidence of a short linear peptide that folds into a β -hairpin in aqueous solution *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 5887-5888.

81. Masterson, L. R.; Etienne, M. A.; Porcelli, F.; Barany, G.; Hammer, R. P.; Veglia, G., Nonstereogenic α -aminoisobutyryl-glycyl dipeptidyl unit nucleates type I' β -Turn in linear peptides in aqueous solution. *Biopolymers*, **2007**, 88, 746-753.

82. Dutt, A.; Dutta, A.; Kar, S.; Koley, P.; Drew, M. G. B.; Pramanik, A., Stabilization of two smallest possible diastereomeric β -hairpins in a water soluble tetrapeptide containing non-coded α -amino isobutyric acid (Aib) and m-amino benzoic acid. *J. Mol. Struct.*, **2009**, 928, 138-143.

83. Aravinda, S.; Shamala, N.; Rajkishore, R.; Gopi, H. N.; Balaram, P., A crystalline β -hairpin peptide nucleated by a type I' Aib-D-Ala β -turn: Evidence for cross-strand aromatic interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 3863-3865.

84. Rai, R.; Raghothama, S.; Sridharan, R.; Balaram, P., Tuning the β -turn segment in designed peptide β -hairpins: Construction of a stable type I' β -turn nucleus and hairpin-helix transition promoting segments. *Biopolymers*, **2007**, 88, 350-361.
85. Giddu, S.; Subramanian, V.; Yoon, H. S.; Satyanarayanajois, S. D., Design of β -hairpin peptides for modulation of cell adhesion by β -turn constraint. *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 726-736.
86. Bisang, C.; Weber, C.; Inglis, J.; Schiffer, C. A.; van Gunsteren, W. F.; Jelesarov, I.; Bosshard, H. R.; Robinson, J. A., Stabilization of type-I β -turn conformations in peptides containing the NPNA-repeat motif of the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein by substituting proline for (S)- α -methylproline. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 7904-7915.
87. Robinson, J. A., β -Hairpin peptidomimetics: Design, structures and biological activities. *Accounts Chem. Res.*, **2008**, 41, 1278-1288.
88. Favre, M.; Moehle, K.; Jiang, L.; Pfeiffer, B.; Robinson, J. A., Structural mimicry of canonical conformations in antibody hypervariable loops using cyclic peptides containing a heterochiral diproline template. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 2679-2685.
89. Shankaramma, S. C.; Athanassiou, Z.; Zerbe, O.; Moehle, K.; Mouton, C.; Bernardini, F.; Wrijbloed, J. W.; Obrecht, D.; Robinson, J. A., Macrocyclic hairpin mimetics of the cationic antimicrobial peptide protegrin I: A new family of broad-spectrum antibiotics. *ChemBioChem*, **2002**, 3, 1126-1133.
90. Athanassiou, Z.; Dias, R. L. A.; Moehle, K.; Dobson, N.; Varani, G.; Robinson, J. A., Structural mimicry of retroviral Tat proteins by constrained β -hairpin peptidomimetics: Ligands with high Affinity and selectivity for viral TAR RNA regulatory elements. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 6906-6913.
91. Davidson, A.; Leeper, T. C.; Athanassiou, Z.; Patora-Komisarska, K.; Karn, J.; Robinson, J. A.; Varani, G., Simultaneous recognition of HIV-1 TAR RNA bulge and loop sequences by cyclic peptide mimics of Tat protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, 106, 11931-11936.
92. Athanassiou, Z.; Patora, K.; Dias, R. L. A.; Moehle, K.; Robinson, J. A.; Varani, G., Structure-guided peptidomimetic design leads to nanomolar β -hairpin inhibitors of the Tat-TAR Interaction of Bovine Immunodeficiency Virus. *Biochemistry*, **2006**, 46, 741-751.
93. Moehle, K.; Athanassiou, Z.; Patora, K.; Davidson, A.; Varani, G.; Robinson, J. A., Design of β -hairpin peptidomimetics that inhibit binding of alpha-helical HIV-1 rev protein to the rev response element RNA. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 9101-9104.
94. Descours, A.; Moehle, K.; Renard, A.; Robinson, J. A., A new family of β -hairpin mimetics based on a trypsin inhibitor from sunflower seeds. *ChemBioChem*, **2002**, 3, 318-323.
95. Dias, R. L. A.; Fasan, R.; Moehle, K.; Renard, A.; Obrecht, D.; Robinson, J. A., Protein ligand design: From phage display to synthetic protein epitope mimetics in human antibody Fc-binding peptidomimetics. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 2726-2732.
96. Nair, C. M.; Vijayan, M.; Venkatachalapathi, Y. V.; Balaram, P., X-ray crystal structure of pivaloyl-D-Pro-L-Pro-L-Ala-N-methylamide: Observation of a consecutive β -turn conformation. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1979**, 1183-1184.
97. Korsinczky, M. L. J.; Schirra, H. J.; Rosengren, K. J.; West, J.; Condie, B. A.; Otvos, L.; Anderson, M. A.; Craik, D. J., Solution structures by H-1 NMR of the novel cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds and an acyclic permutant. *J. Mol. Biol.*, **2001**, 311, 579-591.
98. Robinson, J. A., The Design, Synthesis and Conformation of Some New β -Hairpin Mimetics: Novel Reagents for Drug and Vaccine Discovery. *Synlett*, **2000**, 2000, 429-441.

99. Tamaki, M.; Sasaki, I.; Kokuno, M.; Shindo, M.; Kimura, M.; Uchida, Y., Antimicrobially active cycloundecapeptides related to gramicidin S having a novel turn structure with *cis*D-Phe-Pro peptide bond. *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 1791-1797.
100. Liu, X. H.; Fraga, S.; Otter, A.; Scott, P. G.; Kotovych, G., Effect of a hydrophobic amino-acid at position (i-1) on the stability of β -turns in hydrophilic pentapeptides as studied by NMR and molecular mechanics. *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.*, **1995**, *73*, 972-980.
101. Cochran, A. G.; Starovasnik, M. A.; Skelton, N. Hairpin peptides with a novel structural motif useful as model systems for structure-activity relationship analysis of peptide and protein molecules involved in important biological processes. US2003175799-A1; US6914123-B2, US2003175799-A1 18 Sep 2003 G01N-033/53 200379.
102. Cochran, A. G.; Starovasnik, M. A.; Skelton, N. Construction of library of constrained peptides by synthesizing several peptides having scaffold for β -turn display comprising turn sequence flanked by two opposite strands with defined backbone hydrogen-bonding pattern. US2005196810-A1; US7229777-B2, US2005196810-A1 08 Sep 2005 G01N-033/53 200565.
103. Cochran, A. G.; Skelton, N. J.; Starovasnik, M. A., Tryptophan zippers: Stable, monomeric β -hairpins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 5578-5583.
104. Andersen, N. H.; Olsen, K. A.; Fesinmeyer, R. M.; Tan, X.; Hudson, F. M.; Eidenschink, L. A.; Farazi, S. R., Minimization and optimization of designed β -hairpin folds. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 6101-6110.
105. Santiveri, C. M.; Rico, M.; Jiménez, M. A., Position effect of cross-strand side-chain interactions on β -hairpin formation. *Protein Sci.*, **2000**, *9*, 2151-2160.
106. Eidenschink, L.; Crabbe, E.; Andersen, N. H., Terminal sidechain packing of a designed β -hairpin influences conformation and stability. *Biopolymers*, **2009**, *91*, 557-564.
107. Riemen, A. J.; Waters, M. L., Stabilization of the N-terminal β -hairpin of ubiquitin by a terminal hydrophobic cluster. *Biopolymers*, **2008**, *90*, 394-398.
108. Butterfield, S. M.; Waters, M. L., A designed β -hairpin peptide for molecular recognition of ATP in water. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 9580-9581.
109. Syud, F. A.; Stanger, H. E.; Gellman, S. H., Interstrand side chain-side chain interactions in a designed β -hairpin: Significance of both lateral and diagonal pairings. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 8667-8677.
110. Pastor, M. T.; Gimenez-Giner, A.; Perez-Paya, E., The role of an aliphatic-aromatic interaction in the stabilization of a model β -hairpin peptide. *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 1753-1756.
111. Araki, M.; Tamura, A., Transformation of an α -helix peptide into a β -hairpin induced by addition of a fragment results in creation of a coexisting state. *Proteins*, **2007**, *66*, 860-868.
112. Mirassou, Y.; Santiveri, C. M.; Pérez de Vega, M. J.; González-Muñiz, R.; Jiménez, M. A., Disulfide bonds versus Trps-Trp pairs in irregular β -hairpins: NMR structure of vamin loop 3-derived peptides as a case study. *ChemBioChem*, **2009**, *10*, 902-910.
113. Hughes, R. M.; Waters, M. L., Effects of lysine acetylation in a β -hairpin peptide: Comparison of an amide- π and a cation- π interaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 13586-13591.
114. Hughes, R. M.; Waters, M. L., Arginine methylation in a β -hairpin peptide: Implications for Arg- π interactions, Delta Cp degrees, and the cold denatured state. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 12735-12742.
115. Eidenschink, L.; Kier, B. L.; Huggins, K. N. L.; Andersen, N. H., Very short peptides with stable folds: Building on the interrelationship of Trp/Trp, Trp/cation, and Trp/backbone-amide interaction geometries. *Proteins*, **2009**, *75*, 308-322.

116. Ciani, B.; Jourdan, M.; Searle, M. S., Stabilization of β -hairpin peptides by salt bridges: Role of preorganization in the energetic contribution of weak interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 9038-9047.
117. Ramirez-Alvarado, M.; Blanco, F. J.; Serrano, L., Elongation of the BH8 β -hairpin peptide: Electrostatic interactions in β -hairpin formation and stability. *Protein Sci.*, **2001**, 10, 1381-1392.
118. De Alba, E.; Rico, M.; Jimenez, M. A., The turn sequence directs β -strand alignment in designed β -hairpins. *Protein Sci.*, **1999**, 8, 2234-2244.
119. Bode, C. A.; Bechet, T.; Prodhomme, E.; Gheysen, K.; Gregoir, P.; Martins, J. C.; Muller, C. P.; Madder, A., Towards the conformational mimicry of the measles virus HNE loop: design, synthesis and biological evaluation of a cyclic bile acid-peptide conjugate. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, 7, 3391-3399.
120. Lee, J. U.; Park, K. H.; Lee, J. Y.; Kim, J.; Shin, S. Y.; Park, Y.; Hahm, K. S.; Kim, Y., Cell selectivity of arenicin-1 and its derivative with two disulfide bonds. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2008**, 29, 1190-1194.
121. Karle, I. L.; Kishore, R.; Raghothama, S.; Balam, P., Cyclic cystine peptides. Antiparallel β -sheet conformation for the 20-membered ring in Boc-Cys-Val-Aib-Ala-Leu-Cys-NHMe. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 1958-1963.
122. García-Echeverría, C.; Albericio, F.; Pons, M., Convenient synthesis of a cyclic peptide disulfide: A type II β -turn structural model. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 2441-2444.
123. Cochran, A. G.; Tong, R. T.; Starovasnik, M. A.; Park, E. J.; McDowell, R. S.; Theaker, J. E.; Skelton, N. J., A minimal peptide scaffold for β -turn display: Optimizing a strand position in disulfide-cyclized β -hairpins. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 625-632.
124. McDonnell, J. M.; Fushman, D.; Cahill, S. M.; Sutton, B. J.; Cowburn, D., Solution structures of Fc ϵ RI α -chain mimics: A β -hairpin peptide and its retroenantiomer. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 5321-5328.
125. Syud, F. A.; Espinosa, J. F.; Gellman, S. H., NMR-based quantification of β -sheet populations in aqueous solution through use of reference peptides for the folded and unfolded states. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 11577-11578.
126. Blandl, T.; Cochran, A. G.; Skelton, N. J., Turn stability in β -hairpin peptides: Investigation of peptides containing 3:5 type I G1 bulge turns. *Protein Sci.*, **2003**, 12, 237-247.
127. Santiveri, C. M.; Leon, E.; Rico, M.; Jimenez, M. A., Context-dependence of the contribution of disulfide bonds to β -hairpin stability. *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, 488-499.
128. Stroup, A. N.; Gierasch, L. M., Reduced tendency to form a β -turn in peptides from the P22 tailspike protein correlates with a temperature-sensitive folding defect. *Biochemistry*, **1990**, 29, 9765-9771.
129. Santiveri, C. M.; Pantoja-Uceda, D.; Rico, M.; Jimenez, M. A., β -Hairpin formation in aqueous solution and in the presence of trifluoroethanol: a ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance conformational study of designed peptides. *Biopolymers*, **2005**, 79, 150-62.
130. McDonnell, J. M.; Beavil, A. J.; Mackay, G. A.; Jameson, B. A.; Korngold, R.; Gould, H. J.; Sutton, B. J., Structure based design and characterization of peptides that inhibit IgE binding to its high-affinity receptor. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **1996**, 3, 419-426.
131. Brown, J. E.; Klee, W. A., Helix-coil transition of the isolated amino terminus of ribonuclease. *Biochemistry*, **1971**, 10, 470-476.
132. Bierzynski, A.; Kim, P. S.; Baldwin, R. L., A salt bridge stabilizes the helix formed by isolated C-peptide of RNase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1982**, 79, 2470-2474.

133. Kim, P. S.; Baldwin, R. L., A helix stop signal in the isolated S-peptide of ribonuclease A. *Nature*, **1984**, 307, 329-334.
134. Strehlow, K. G.; Baldwin, R. L., Effect of the substitution Ala---Gly at each of five residue positions in the C-peptide helix. *Biochemistry*, **1989**, 28, 2130-2133.
135. Shoemaker, K. R.; Fairman, R.; Schultz, D. A.; Robertson, A. D.; York, E. J.; Stewart, J. M.; Baldwin, R. L., Side-chain interactions in the C-peptide helix: Phe 8-His 12⁺. *Biopolymers*, **1990**, 29, 1-11.
136. Fairman, R.; Shoemaker, K. R.; York, E. J.; Stewart, J. M.; Baldwin, R. L., The Glu 2⁻-Arg 10⁺ side-chain interaction in the C-peptide helix of ribonuclease A. *Biophys. Chem.*, **1990**, 37, 107-119.
137. Rico, M.; Nieto, J. L.; Santoro, J.; Bermejo, F. J.; Herranz, J., ¹H NMR parameters of the N-terminal 13-residue C-peptide of ribonuclease in aqueous solution. *Org. Magn. Res.*, **1983**, 21, 555-563.
138. Gallego, E.; Herranz, J.; Nieto, J. L.; Rico, M.; Santoro, J., ¹H NMR parameters of the N-terminal 19-residue S-peptide of ribonuclease in aqueous solution. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1983**, 21, 242-253.
139. Santoro, J.; Rico, M.; Bermejo, F. J.; Nieto, J. L.; Herranz, J.; Gallego, E., ¹³C NMR spectral assignment of ribonuclease S-peptide. Some new structural information about its low-temperature folding. *J. Mol. Struct.*, **1986**, 141, 243-248.
140. Doig, A. J.; Conn, P. M., Chapter 1. Stability and Design of α -Helical Peptides. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Academic Press: 2008; Vol. 83, pp 1-52.
141. Guzzo, A. V., The Influence of Amino Acid Sequence on Protein Structure. *Biophys. J.*, **1965**, 5, 809-822.
142. Davies, D. R., A correlation between amino acid composition and protein structure. *J. Mol. Biol.*, **1964**, 9, 605-609.
143. Silva, R. A. G. D.; Sritana, C. Y.; Jan, K.; Fernando, F.; Marco, C.; Claudio, T.; Timothy, A. K., Discriminating 3_{10} from α -helices: Vibrational and electronic CD and IR absorption study of related Aib-containing oligopeptides. *Biopolymers*, **2002**, 65, 229-243.
144. Karle, I. L.; Gopi, H. N.; Balaram, P., Crystal structure of a hydrophobic 19-residue peptide helix containing three centrally located D-amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 13946-13951.
145. Serrano, L.; Fersht, A. R., Capping and α -helix stability. *Nature*, **1989**, 342, 296-299.
146. Andrew, J. D.; Robert, L. B., N- and C-capping preferences for all 20 amino acids in α -helical peptides. *Protein Sci.*, **1995**, 4, 1325-1336.
147. Lyu, P. C.; Zhou, H. X.; Jelveh, N.; Wemmer, D. E.; Kellenbach, N. R., Position-dependent stabilizing effects in α -helices: N-terminal capping in synthetic model peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 6560-6562.
148. Sun, J. K.; Penel, S.; Doig, A. J., Determination of alpha-helix N1 energies after addition of N1, N2, and N3 preferences to helix/coil theory. *Protein Sci.*, **2000**, 9, 750-754.
149. Cochran, D. A. E.; Penel, S.; Doig, A. J., Effect of the N1 residue on the stability of the alpha-helix for all 20 amino acids. *Protein Sci.*, **2001**, 10, 463-470.
150. Viguera, A. R.; Serrano, L., Stable proline box motif at the N-terminal end of α -helices. *Protein Sci.*, **1999**, 8, 1733-1742.
151. Sean, M. D., IR spectroscopy of isotope-labeled helical peptides: Probing the effect of N-acetylation on helix stability. *Biopolymers*, **2000**, 54, 180-185.

152. Cammers-Goodwin, A.; Allen, T. J.; Oslick, S. L.; McClure, K. F.; Lee, J. H.; Kemp, D. S., Mechanism of stabilization of helical conformations of polypeptides by water containing trifluoroethanol. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 3082-3090.
153. Rajan, R.; Balaram, P., A model for the interaction of trifluoroethanol with peptides and proteins. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1996**, 48, 328-336.
154. Luo, P.; Baldwin, R. L., Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: A framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry*, **1997**, 36, 8413-8421.
155. Baginska, K.; Makowska, J.; Wiczak, W.; Kasprzykowski, F.; Chmurzynski, L., Conformational studies of alanine-rich peptide using CD and FTIR spectroscopy. *J. Pept. Sci.*, **2008**, 14, 283-289.
156. Fernández-Recio, J.; Vázquez, A.; Civera, C.; Sevilla, P.; Sancho, J., The Tryptophan/Histidine interaction in α -helices. *J. Mol. Biol.*, **1997**, 267, 184-197.
157. Lacroix, E.; Viguera, A. R.; Serrano, L., Elucidating the folding problem of α -helices: local motifs, long-range electrostatics, ionic-strength dependence and prediction of NMR parameters. *J. Mol. Biol.*, **1998**, 284, 173-191.
158. Muñoz, V.; Serrano, L., Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. α -Helix macrodipole effects and rational modification of the helical content of natural peptides. *J. Mol. Biol.*, **1995**, 245, 275-296.
159. Marqusee, S.; Robbins, V. H.; Baldwin, R. L., Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86, 5286-5290.
160. Kemp, D. S.; Curran, T. P., (2S,5S,8S,11S)-1-Acetyl-1,4-diaza-3-keto-5-carboxy-10-thia-tricyclo-[2.8.04,8]-tridecane, 1, synthesis of prolyl-proline-derived, peptide-functionalized templates for α -helix formation. *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 4931-4934.
161. Kemp, D. S.; Curran, T. P., (2S,5S,8S,11S)-1-Acetyl-1,4-diaza-3-keto-5-carboxy-10-thia-tricyclo-[2.8.04,8]-tridecane, 1, the preferred conformation of 1 (1 = α Temp-OH) and its peptide conjugates α Temp-L-(Ala) $_n$ -OR (n=1 to 4) and α -Temp-L-Ala-L-Phe-L-Lys(ϵ Boc)-L-Lys(ϵ -Boc)-NHMe studies of templates for α -helix formation. *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 4935-4938.
162. Kemp, D. S.; Curran, T. P.; Boyd, J. G.; Allen, T. J., Studies of N-terminal templates for α -helix formation. Synthesis and conformational analysis of peptide conjugates of (2S,5S,8S,11S)-1-acetyl-1,4-diaza-3-keto-5-carboxy-10-thia-tricyclo[2.8.1.04,8]tridecane (Ac-Hel₁-OH). *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 6683-6697.
163. Kemp, D. S.; Curran, T. P.; Davis, W. M.; Boyd, J. G.; Muendel, C., Studies of N-terminal templates for α -helix formation. Synthesis and conformational analysis of (2S,5S,8S,11S)-1-acetyl-1,4-diaza-3-keto-5-carboxy-10-thia-tricyclo[2.8.1.04,8]tridecane (Ac-Hel₁-OH). *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 6672-6682.
164. Maison, W.; Arce, E.; Renold, P.; Kennedy, R. J.; Kemp, D. S., Optimal N-caps for N-terminal helical templates: Effects of Changes in H-Bonding Efficiency and Charge. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 10245-10254.
165. Lewis, A.; Rutherford, T. J.; Wilkie, J.; Jenn, T.; Gani, D., Design, construction and properties of peptide N-terminal cap templates devised to initiate alpha-helices. Part 3. Caps derived from N-[(2S)-2-chloropropionyl]-(2S)-Pro-(2R)-Ala-(2S,4S)-4-thioPro-OMe. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 3795-3806.
166. Lewis, A.; Wilkie, J.; Rutherford, T. J.; Gani, D., Design, construction and properties of peptide N-terminal cap templates devised to initiate alpha-helices. Part 2. Caps derived from N-

[(2S)-2-chloropropionyl]-(2S)-Pro-(2S)-Pro-(2S,4S)-4-thioPro-OMe. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1998**, 3777-3793.

167. Austin, R. E.; Maplestone, R. A.; Seffler, A. M.; Liu, K.; Hruzewicz, W. N.; Liu, C. W.; Cho, H. S.; Wemmer, D. E.; Bartlett, P. A., A template for stabilization of a peptide α -helix: Synthesis and evaluation of conformational effects by Circular Dichroism and NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 6461-6472.

168. Mimna, R.; Tuchscherer, G.; Mutter, M., Toward the design of highly efficient, readily accessible peptide N-caps for the induction of helical conformations. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **2007**, 13, 237-244.

169. Patgiri, A.; Jochim, A. L.; Arora, P. S., A hydrogen bond surrogate approach for stabilization of short peptide sequences in α -helical conformation. *Accounts Chem. Res.*, **2008**, 41, 1289-1300.

170. Cabezas, E.; Satterthwait, A. C., The hydrogen bond mimic approach: solid-phase synthesis of a peptide stabilized as an α -helix with a hydrazone link. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 3862-3875.

171. Chapman, R. N.; Dimartino, G.; Arora, P. S., A highly stable short α -helix constrained by a main-chain hydrogen-bond surrogate. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 12252-12253.

172. Wang, D.; Chen, K.; Kulp, J. L.; Arora, P. S., Evaluation of biologically relevant short α -helices stabilized by a main-chain hydrogen-bond surrogate. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 9248-9256.

173. Wang, D.; Chen, K.; Dimartino, G.; Arora, P. S., Nucleation and stability of hydrogen-bond surrogate-based α -helices. *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 4074-4081.

174. Chapman, R.; Kulp, J. L.; Patgiri, A.; Kallenbach, N. R.; Bracken, C.; Arora, P. S., Trapping a folding intermediate of the α -helix: Stabilization of the π -helix. *Biochemistry*, **2008**, 47, 4189-4195.

175. Wang, D.; Liao, W.; Arora, P. S., Enhanced metabolic stability and protein-binding properties of artificial α helices derived from a hydrogen-bond surrogate: application to Bcl-xL. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 6525-6529.

176. Stellwagen, E.; Park, S.-H.; Shalongo, W.; Jain, A., The contribution of residue ion pairs to the helical stability of a model peptide. *Biopolymers*, **1992**, 32, 1193-1200.

177. Marqusee, S.; Sauer, R. T., Contributions of a hydrogen bond/salt bridge network to the stability of secondary and tertiary structure in λ repressor. *Protein Sci.*, **1994**, 3, 2217-2225.

178. Huyghues-Despointes, B. M. P.; Baldwin, R. L., Ion-pair and charged hydrogen-bond interactions between histidine and aspartate in a peptide helix *Biochemistry*, **1997**, 36, 1965-1970.

179. Lazo, N. D.; Downing, D. T., Stabilization of amphipathic α -helical and β -helical conformations in synthetic peptides in the presence and absence of ionic interactions. *J. Pept. Res.*, **1998**, 51, 85-89.

180. Smith, J. S.; Scholtz, J. M., Energetics of polar side-chain interactions in helical peptides: Salt effects on ion pairs and hydrogen bonds *Biochemistry*, **1998**, 37, 33-40.

181. Iqbalsyah, T. M.; Doig, A. J., Anticooperativity in a Glu-Lys-Glu salt bridge triplet in an isolated α -helical peptide. *Biochemistry*, **2005**, 44, 10449-10456.

182. Cheng, R. P.; Girinath, P.; Ahmad, R., Effect of lysine side chain length on intra-helical glutamate-lysine ion pairing interactions *Biochemistry*, **2007**, 46, 10528-10537.

183. Walker, K.; Causgrove, T., Contribution of arginine-glutamate salt bridges to helix stability. *J. Mol. Mod.*, **2009**, 15, 1213-1219.

184. Olson, C. A.; Spek, E. J.; Shi, Z.; Vologodskii, A.; Kallenbach, N. R., Cooperative helix stabilization by complex Arg-Glu salt bridges. *Proteins*, **2001**, 44, 123-132.
185. Huyghues-Despointes, B. M. P.; Klingler, T. M.; Baldwin, R. L., Measuring the strength of side-chain hydrogen bonds in peptide helices: The Gln⁺Asp (i, i + 4) Interaction. *Biochemistry*, **1995**, 34, 13267-13271.
186. Stapley, B. J.; Doig, A. J., Hydrogen bonding interactions between glutamine and asparagine in α -helical peptides. *J. Mol. Biol.*, **1997**, 272, 465-473.
187. Fernández-Recio, J.; Romero, A.; Sancho, J., Energetics of a hydrogen bond (charged and neutral) and of a cation- π interaction in apoflavodoxin. *J. Mol. Biol.*, **1999**, 290, 319-330.
188. Vijayakumar, M.; Hong, Q.; Huan-Xiang, Z., Hydrogen bonds between short polar side chains and peptide backbone: Prevalence in proteins and effects on helix-forming propensities. *Proteins*, **1999**, 34, 497-507.
189. Padmanabhan, S.; Baldwin, R. L., Helix-stabilizing interaction between tyrosine and leucine or valine when the spacing is i,i + 4. *J. Mol. Biol.*, **1994**, 241, 706-713.
190. Viguera, A. R.; Serrano, L., Side-chain interactions between sulfur-containing amino acids and phenylalanine in α -helices. *Biochemistry*, **1995**, 34, 8771-8779.
191. Andrew, C. D.; Penel, S.; Jones, G. R.; Doig, A. J., Stabilizing nonpolar/polar side-chain interactions in the α -helix. *Proteins*, **2001**, 45, 449-455.
192. Luo, P.; Baldwin, R. L., Origin of the different strengths of the (i,i+4) and (i,i+3) leucine pair interactions in helices. *Biophys. Chem.*, **2002**, 96, 103-108.
193. Stapley, B. J.; Rohl, C. A.; Doig, A. J., Addition of side chain interactions to modified Lifson-Roig helix-coil theory: Application to energetics of Phenylalanine-Methionine interactions. *Protein Sci.*, **1995**, 4, 2383-2391.
194. Iqbalsyah, T. M.; Doig, A. J., Pairwise coupling in an Arg-Phe-Met triplet stabilizes α -helical peptide via shared rotamer preferences. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 5002-5003.
195. Andrew, C. D.; Bhattacharjee, S.; Kokkoni, N.; Hirst, J. D.; Jones, G. R.; Doig, A. J., Stabilizing interactions between aromatic and basic side chains in α -helical peptides and proteins. Tyrosine effects on helix circular dichroism. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 12706-12714.
196. Shi, Z.; Olson, C. A.; Kallenbach, N. R., Cation π interaction in model α -helical peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 3284-3291.
197. Tsou, L. K.; Tatko, C. D.; Waters, M. L., Simple cation π interaction between a phenyl ring and a protonated amine stabilizes an α -helix in water. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 14917-14921.
198. Padmanabhan, S.; Jimenez, M. A.; Laurents, D. V.; Rico, M., Helix-stabilizing nonpolar interactions between tyrosine and leucine in aqueous and TFE solutions: 2D-¹H NMR and CD Studies in alanine-lysine peptides. *Biochemistry*, **1998**, 37, 17318-17330.
199. Scrima, M.; Chevalier-Isaad, A. L.; Rovero, P.; Papini, A. M.; Chorev, M.; D'Ursi, A. M., Cu^I-catalyzed azide-alkyne intramolecular *i*-to-(*i*+4) side-chain-to-side-chain cyclization promotes the formation of helix-like secondary structures. *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 446-457.
200. Jackson, D. Y.; King, D. S.; Chmielewski, J.; Singh, S.; Schultz, P. G., General approach to the synthesis of short α -helical peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 9391-9392.
201. Pellegrini, M.; Royo, M.; Chorev, M.; Mierke, D. F., Conformational consequences of i, i + 3 cystine linkages: nucleation for α -helicity? *J. Pept. Res.*, **1997**, 49, 404-414.
202. Leduc, A.-M.; Trent, J. O.; Wittliff, J. L.; Bramlett, K. S.; Briggs, S. L.; Chirgadze, N. Y.; Wang, Y.; Burris, T. P.; Spatola, A. F., Helix-stabilized cyclic peptides as selective

inhibitors of steroid receptor-coactivator interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 11273-11278.

203. Blackwell, H. E.; Grubbs, R. H., Highly efficient synthesis of covalently cross-linked peptide helices by ring-closing metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 3281-3284.

204. Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L., An all-hydrocarbon cross-linking system for enhancing the helicity and metabolic stability of peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 5891-5892.

205. Walensky, L. D.; Pitter, K.; Morash, J.; Oh, K. J.; Barbuto, S.; Fisher, J.; Smith, E.; Verdine, G. L.; Korsmeyer, S. J., A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Molecular Cell*, **2006**, 24, 199-210.

206. Sticht, J.; Humbert, M.; Findlow, S.; Bodem, J.; Müller, B.; Dietrich, U.; Werner, J.; Kräusslich, H.-G., A peptide inhibitor of HIV-1 assembly in vitro. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2005**, 12, 671-677.

207. Bhattacharya, S.; Zhang, H.; Debnath, A. K.; Cowburn, D., Solution structure of a hydrocarbon stapled peptide inhibitor in complex with monomeric C-terminal domain of HIV-1 capsid. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 16274-16278.

208. Zhang, H.; Zhao, Q.; Bhattacharya, S.; Waheed, A. A.; Tong, X.; Hong, A.; Heck, S.; Curreli, F.; Goger, M.; Cowburn, D.; Freed, E. O.; Debnath, A. K., A cell-penetrating helical peptide as a potential HIV-1 inhibitor. *J. Mol. Biol.*, **2008**, 378, 565-580.

209. Osapay, G.; Taylor, J. W., Multicyclic polypeptide model compounds. 2. Synthesis and conformational properties of a highly α -helical uncosapeptide constrained by three side-chain to side-chain lactam bridges. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 6966-6973.

210. Arttamangkul, S.; Murray, T. F.; Delander, G. E.; Aldrich, J. V., Synthesis and opioid activity of conformationally constrained dynorphin-A analogs. 1. Conformational constraint in the message sequence. *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 2410-2417.

211. Houston, M. E.; Gannon, C. L.; Kay, C. M.; Hodges, R. S., Lactam bridge stabilization of α -helical peptides: ring size, orientation and positional effects. *J. Pept. Sci.*, **1995**, 1, 274-82.

212. Houston, M. E.; Campbell, A. P.; Lix, B.; Kay, C. M.; Sykes, B. D.; Hodges, R. S., Lactam bridge stabilization of α -helices: The role of hydrophobicity in controlling dimeric versus monomeric α -helices. *Biochemistry*, **1996**, 35, 10041-10050.

213. Houston, M. E.; Wallace, A.; Bianchi, E.; Pessi, A.; Hodges, R. S., Use of a conformationally restricted secondary structural element to display peptide libraries: A two-stranded α -helical coiled-coil stabilized by lactam bridges. *J. Mol. Biol.*, **1996**, 262, 270-282.

214. Yu, C. X.; Taylor, J. W., A new strategy applied to the synthesis of an α -helical bicyclic peptide constrained by two overlapping i, i+7 side-chain bridges of novel design. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 1731-1734.

215. Kirby, D. A.; Britton, K. T.; Aubert, M. L.; Rivier, J. E., Identification of high-potency neuropeptide Y analogues through systematic lactamization. *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 210-215.

216. Phelan, J. C.; Skelton, N. J.; Braisted, A. C.; McDowell, R. S., A general method for constraining short peptides to an α -helical conformation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 455-460.

217. Cervini, L. A.; Donaldson, C. J.; Koerber, S. C.; Vale, W. W.; Rivier, J. E., Human growth hormone-releasing hormone hGHRH(1-29)-NH₂: Systematic structure-activity relationship studies. *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 717-727.

218. Yu, C. X.; Taylor, J. W., Synthesis and study of peptides with semirigid i and i+7 side-chain bridges designed for α -helix stabilization. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 161-175.

219. Zhang, M.; Wu, B.; Zhao, H.; Taylor, J. W., The effect of C-terminal helix stabilization on specific DNA binding by monomeric GCN4 peptides. *J. Pept. Sci.*, **2002**, 8, 125-136.
220. Tsomaia, N.; Pellegrini, M.; Hyde, K.; Gardella, T. J.; Mierke, D. F., Toward parathyroid hormone minimization: Conformational studies of cyclic PTH(1-14) analogues. *Biochemistry*, **2004**, 43, 690-699.
221. Yang, B.; Liu, D. X.; Huang, Z. W., Synthesis and helical structure of lactam bridged BH3 peptides derived from pro-apoptotic Bcl-2 family proteins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 1403-1406.
222. Camerino, M. A.; Kong, D. C. M.; Chalmers, D. K.; Thompson, P. E., Solid phase synthesis and circular dichroism analysis of (i -> i+4) cyclic lactam analogues of kisspeptin. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **2008**, 14, 323-331.
223. Vaz, E.; Pomerantz, W. C.; Geyer, M.; Gellman, S. H.; Brunsveld, L., Comparison of design strategies for promotion of β -peptide 14-helix stability in water. *ChemBioChem*, **2008**, 9, 2254-2259.
224. Felix, A. M.; Heimer, E. P.; Wang, C.-T.; Lambros, T. J.; Fournier, A.; Mowles, T. F.; Maines, S.; Campbell, R. M.; Wegrzynski, B. B.; Toome, V.; Fry, D.; Madison, V. S., Synthesis, biological activity and conformational analysis of cyclic GRF analogs. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1988**, 32, 441-454.
225. Kapurniotu, A.; Kayed, R.; Taylor, J. W.; Voelter, W., Rational design, conformational studies and bioactivity of highly potent conformationally constrained calcitonin analogues. *Eur. J. Biochem.*, **1999**, 265, 606-618.
226. Kaiser, E. T.; Kezdy, F. J., Amphiphilic secondary structure: design of peptide hormones. *Science*, **1984**, 223, 249-255.
227. Taylor, J. W.; Jin, Q. K.; Sbacchi, M.; Wang, L.; Belfiore, P.; Garnier, M.; Kazantzis, A.; Kapurniotu, A.; Zaratini, P. F.; Scheideler, M. A., Side-chain lactam-bridge conformational constraints differentiate the activities of salmon and human calcitonins and reveal a new design concept for potent calcitonin analogues. *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1108-1121.
228. Judice, J. K.; Tom, J. Y. K.; Huang, W.; Wrin, T.; Vennari, J.; Petropoulos, C. J.; McDowell, R. S., Inhibition of HIV type 1 infectivity by constrained α -helical peptides: Implications for the viral fusion mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 13426-13430.
229. Mills, N. L.; Daugherty, M. D.; Frankel, A. D.; Guy, R. K., An α -helical peptidomimetic inhibitor of the HIV-1 Rev-RRE interaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 3496-3497.
230. Davis, J. M.; Tsou, L. K.; Hamilton, A. D., Synthetic non-peptide mimetics of α -helices. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 326-334.
231. Rodriguez, J., M.; Nevola, L.; Ross, N. T.; Lee, G.-i.; Hamilton, A. D., Synthetic inhibitors of extended helix-protein interactions based on a biphenyl 4,4'-dicarboxamide scaffold. *ChemBioChem*, **2009**, 10, 829-833.
232. Saraogi, I.; Hebda, J. A.; Becerril, J.; Estroff, L. A.; Miranker, A. D.; Hamilton, A. D., Synthetic α -helix mimetics as agonists and antagonists of islet amyloid polypeptide aggregation. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 736-739.
233. Volonterio, A.; Moisan, L.; Rebek, J., Synthesis of Pyridazine-Based Scaffolds as α -Helix Mimetics. *Org. Lett.*, **2007**, 9, 3733-3736.
234. Restorp, P.; Rebek Jr, J., Synthesis of α -helix mimetics with four side-chains. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 5909-5911.

235. Du, A. P. C.; Limal, D.; Semetey, V.; Dali, H.; Jolivet, M.; Desgranges, C.; Cung, M. T.; Briand, J.-P.; Petit, M.-C.; Muller, S., Structural and Immunological Characterisation of Heteroclitic Peptide Analogues Corresponding to the 600-612 Region of the HIV Envelope gp41 Glycoprotein. *J. Mol. Biol.*, **2002**, 323, 503-521.
236. Odagami, T.; Tsuda, Y.; Kogami, Y.; Kouji, H.; Okada, Y., Identification of new agonists of urotensin-II from a cyclic peptide library. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 6742-6747.
237. Feng, Y.; Wang, Z.; Jin, S.; Burgess, K., S_NAr Cyclizations To Form Cyclic Peptidomimetics of β -Turns. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 10768-10769.
238. Kranz, M.; Murray, P. J.; Taylor, S.; Upton, R.; Clegg, W.; Elsegood, M., R. J. , Solution, solid phase and computational structures of apicidin and its backbone-reduced analogs. *J. Pept. Sci.*, **2006**, 12, 383-388.
239. Cudic, M.; Wade, J. D.; Otvos, J. L., Convenient synthesis of a head-to-tail cyclic peptide containing an expanded ring. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 4527-4531.
240. McGaughey, G. B.; Citron, M.; Danzeisen, R. C.; Freidinger, R. M.; Garsky, V. M.; Hurni, W. M.; Joyce, J. G.; Liang, X.; Miller, M.; Shiver, J.; Bogusky, M. J., HIV-1 vaccine development: Constrained peptide immunogens show improved binding to the anti-HIV-1 gp41 MAb. *Biochemistry*, **2003**, 42, 3214-3223.
241. Ying, J.; Gu, X.; Cai, M.; Dedek, M.; Vagner, J.; Trivedi, D. B.; Hruby, V. J., Design, synthesis, and biological evaluation of new cyclic melanotropin peptide analogues selective for the human melanocortin-4 receptor. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 6888-6896.
242. Bienstock, R. J.; Rizo, J.; Koerber, S. C.; Rivier, J. E.; Hagler, A. T.; Gierasch, L. M., Conformational-analysis of a highly potent dicyclic gonadotropin-releasing-hormone antagonist by nuclear-magnetic-resonance and molecular-dynamics. *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 3265-3273.
243. Wels, B.; Kruijtzter, J. A. W.; Garner, K.; Nijenhuis, W. A. J.; Gispen, W. H.; Adan, R. A. H.; Liskamp, R. M. J., Synthesis of a novel potent cyclic peptide MC4-ligand by ring-closing metathesis. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13, 4221-4227.
244. Oishi, S.; Shi, Z.-D.; Worthy, K. M.; Bindu, L. K.; Fisher, R. J.; Burke-Jr, T. R., Ring-closing metathesis of C-terminal allylglycine residues with an N-terminal -vinyl-substituted phosphotyrosyl mimetic as an approach to novel Grb2 SH2 domain-binding macrocycles. *ChemBioChem*, **2005**, 6, 668-674.
245. Pérez de Vega, M. J.; García-Aranda, M. I.; González-Muñiz, R., A role for ring-closing metathesis in medicinal chemistry: Mimicking secondary architectures in bioactive peptides. *Med. Res. Rev.*, **2009**, DOI:10.1002/med.20199
246. Kates, S. A.; Albericio, F., *Solid-Phase Synthesis*. Marcel Dekker, Inc. ed.; New York, **2000**.
247. Connon, S. J.; Blechert, S., Recent developments in olefin cross metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 1900-1923.
248. Schrodi, Y.; Pederson, R. L., Evolution and applications of second-generation ruthenium olefin metathesis catalysts. *Aldrichim. Acta*, **2007**, 40, 45-52.
249. Chaleix, V.; Sol, V.; Guilloton, M.; Granet, R.; Krausz, P., Efficient synthesis of RGD-containing cyclic peptide-porphyrin conjugates by ring-closing metathesis on solid support. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 5295-5299.
250. Stymiest, J. L.; Mitchell, B. F.; Wong, S.; Vederas, J. C., Synthesis of biologically active dicarba analogues of the peptide hormone oxytocin using ring-closing metathesis. *Org. Lett.*, **2003**, 5, 47-49.
251. Dimartino, G.; Wang, D.; Chapman, R. N.; Arora, P. S., Solid-phase synthesis of hydrogen-bond surrogate-derived α -helices. *Org. Lett.*, **2005**, 7, 2389-2392.

252. Derksen, D. J.; Stymiest, J. L.; Vederas, J. C., Antimicrobial leucocin analogues with a disulfide bridge replaced by a carbocycle or by noncovalent interactions of allyl glycine residues. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 14252-14253.
253. *Synthesis Notes 3.5 Novabiochem catalog*. EMD Biosciences: San Diego CA, **2006-2007**.
254. Whelan, A. N.; Elaridi, J.; Harte, M.; Smith, S. V.; Jackson, W. R.; Robinson, A. J., A tandem metathesis-hydrogenation route to dicarba analogues of cystine-containing cyclic peptides. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 9545-9547.
255. Whelan, A. N.; Elaridi, J.; Mulder, R. J.; Robinson, A. J.; Jackson, W. R., Metal-catalysed tandem metathesis-hydrogenation reactions for the synthesis of carba analogues of cyclic peptides. *Can. J. Chem.*, **2005**, 83, 875-881.
256. Chen, S.; Janda, K. D., Synthesis of Prostaglandin E2 Methyl Ester on a Soluble-Polymer Support for the Construction of Prostanoid Libraries. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 8724-8725.
257. Lacombe, P.; Castagner, B.; Gareau, Y.; Ruel, R., Reduction of olefins on solid support using diimide. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 6785-6786.
258. Buszek, K. R.; Brown, N., Improved method for the diimide reduction of multiple bonds on solid-supported substrates. *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 3125-3128.
259. García-Aranda, M. I.; González-Muñiz, R.; García-López, M. T.; Pérez de Vega, M. J., Diimine reduction of C=C double bonds: Scope and limitations of the application to solid-phase peptide synthesis. *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 4149-4157.
260. Veber, D.; Milkowski, J.; Varga, S.; Denkwalter, R.; Hirschmann, R., Acetamidomethyl. A novel thiol protecting group for cysteine. *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 5456-5461.
261. Lamthanh, H.; Roumestand, C.; Deprun, C.; Ménez, A., Side reaction during the deprotection of (S-acetamidomethyl)cysteine in a peptide with a high serine and threonine content. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1993**, 41, 85-95.
262. Fujii, N.; Otaka, A.; Funakoshi, S.; Kiyoshi, B.; Watanabe, T.; Akaji, K.; Yajima, H., Studies on peptides. CLI. Synthesis of cysteine-peptides by oxidation of S-protected cysteine-peptides with thallium(III) trifluoroacetate. *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35, 2339-2347.
263. Hargittai, B.; Annis, I.; Barany, G., Application of solid-phase Ellman's reagent for preparation of disulfide-paired isomers of α -conotoxin SI. *Lett. Pept. Sci.*, **2000**, 7, 47-52.
264. Singh, P. R.; Rajopadhye, M.; Clark, S. L.; Williams, N. E., Effect of scavengers in acidolytic cleavage of Cys(Acm)-containing peptides from solid support: Isolation of an ethanedithiol disulfide adduct. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 4117-4120.
265. Joseph, M. S.; Gillian, M. H.; Brian, M. A., Solid-phase synthesis and cyclization of a large branched peptide from IgG Fc with affinity for Fc γ RI. *J. Pept. Sci.*, **1999**, 5, 555-562.
266. Karen, P.; Christina, A. H.; Hirendra, P.; German, F.; Mahendra, M.; Jae, H. P., Fast Fmoc synthesis of hAmylin₁₋₃₇ with pseudoproline assisted on-resin disulfide formation. *J. Pept. Sci.*, **2007**, 13, 833-838.
267. Valeur, E.; Bradley, M., Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 606-631.
268. Gómez-Moreno, C.; Sancho, J., *Estructura de proteínas*. Ariel Ciencia: Barcelona, **2003**; p 311-331.
269. Schubert, M.; Labudde, D.; Oschkinat, H.; Schmieder, P., A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on ¹³C chemical shift statistics. *J. Biomol. NMR*, **2002**, 24, 149-154.

270. Wishart, D.; Bigam, C.; Holm, A.; Hodges, R.; Sykes, B., ¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. Investigations of nearest-neighbor effects. *J. Biomol. NMR*, **1995**, *5*, 67-81.
271. Cornilescu, G.; Delaglio, F.; Bax, A., Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR*, **1999**, *13*, 289-302.
272. Cierpicki, T.; Otlewski, J., Amide proton temperature coefficients as hydrogen bond indicators in proteins. *J. Biomol. NMR*, **2001**, *21*, 249-261.
273. AMBER10 D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, M. Crowley, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, D.H. Mathews, M.G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, and P.A. : University of California, San Francisco, 2008.
274. Goncalves, V.; Gautier, B.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguibert, N., Development of a chemiluminescent screening assay for detection of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligands. *Anal. Biochem.*, **2007**, *366*, 108-110.
275. Wiesmann, C.; Fuh, G.; Christinger, H. W.; Eigenbrot, C.; Wells, J. A.; de Vos, A. M., Crystal Structure at 1.7 Å Resolution of VEGF in Complex with Domain 2 of the Flt-1 Receptor *Cell*, **1997**, *91*, 695-704.
276. Derksen, D. J.; Boudreau, M. A.; Vederas, J. C., Hydrophobic interactions as substitutes for a conserved disulfide linkage in the type IIa bacteriocins, leucocin A and pediocin PA-1. *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 1898-1901.
277. Muller, Y. A.; Li, B.; Christinger, H. W.; Wells, J. A.; Cunningham, B. C.; de Vos, A. M., Vascular endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1997**, *94*, 7192-7197.
278. Tetko, I.; Gasteiger, J.; Todeschini, R.; Mauri, A.; Livingstone, D.; Ertl, P.; Palyulin, V.; Radchenko, E.; Zefirov, N.; Makarenko, A.; Tanchuk, V.; Prokopenko, V., Virtual computational chemistry laboratory – Design and description. *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, **2005**, *19*, 453-463.
279. Tetko, I. V., Computing chemistry on the web. *Drug Discov. Today*, **2005**, *10*, 1497-1500.
280. VCCLAB Virtual Computational Chemistry Laboratory. www.vcclab.org
281. Cheng, A.; Merz, K. M., Prediction of aqueous solubility of a diverse set of compounds using quantitative structure-property relationships. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 3572-3580.
282. Gómez-Moreno, C.; Sancho, J., *Estructura de proteínas*. Ariel Ciencia: Barcelona, **2003**; p 148-152.
283. Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C., How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta*, **2005**, *1751*, 119-139.
284. Shepherd, N. E.; Hoang, H. N.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P., Single turn peptide α helices with exceptional stability in water. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 2974-2983.
285. Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M., Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.*, **1991**, *222*, 311-333.
286. Houston, M.; Kondejewski, L.; Karunaratne, D.; Gough, M.; Fidai, S.; Hodges, R.; Hancock, R., Influence of preformed α -helix and α -helix induction on the activity of cationic antimicrobial peptides. *J. Pept. Res.*, **1998**, *52*, 81-88.

287. Halsall, A.; Dempsey, C. E., Intrinsic helical propensities and stable secondary structure in a membrane-bound fragment (S4) of the shaker potassium channel. *J. Mol. Biol.*, **1999**, 293, 901-915.
288. Raj, P. A.; Soni, S. D.; Levine, M. J., Membrane-induced helical conformation of an active candidacidal fragment of salivary histatins. *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 9610-9619.
289. Arunkumar, A. I.; Kumar, T. K. S.; Yu, C., Non-specific helix-induction in charged homopolypeptides by alcohols. *BBA - Prot. Struct. Mol. Enzym.*, **1997**, 1338, 69-76.
290. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.*, **1970**, 34, 595-598.
291. Christensen, T., A qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil. *Acta Chem. Scand. B*, **1979**, 33, 763-766.
292. TOPSPIN *NMR data acquisition and processing software*, Bruker Biospin: Karlsruhe (Germany).
293. Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Yao, J.; Abildgaard, F.; Dyson, H. J.; Oldfield, E.; Markley, J. L.; Sykes, B. D., ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. . *J. Biomol. NMR*, **1995**, 6, 135-40.
294. Wuthrich, K.; Billeter, M.; Braun, W., Polypeptide secondary structure determination by nuclear magnetic resonance observation of short proton-proton distances. *J. Mol. Biol.* , **1984**, 180, 715-740.
295. Wuthrich, K., *NMR of proteins and nucleic acids*. John Wiley & Sons: New York, **1986**.
296. SPARKY Goddard, T. D. Kneller, D. G.: University of California, San Francisco.