

Tesi doctoral

PRODUCTES NATURALS COM A FONT DE NOUS FÀRMACS:
SÍNTESI EN FASE SÒLIDA DE DEPSIPÈPTIDS CÍCLICS I AÏLLAMENT
D'AGENTS ANTITUMORALS D'ESPONGES MARINES

Núria Bayó Puxan

Departament de Química Orgànica
Facultat de Química. Universitat de Barcelona

Institut de Recerca Biomèdica
Parc Científic de Barcelona. Universitat de Barcelona

Barcelona, 1 Setembre 2006

Memòria presentada per

Núria Bayó Puxan

Per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi Doctoral dirigida per :

Dr. Ernesto Nicolás Galindo

Dr. Fernando Albericio Palomera



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Programa de Doctorat: Bienni 2002-2004

Departament de Química Orgànica.

Facultat de Química. Universitat de Barcelona

Per a vosaltres, família

Índex General

Abreviacions	
INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	5
RESULTATS I DISCUSSIÓ	
CAPÍTOL 1:	
Síntesi d'un anàleg de la sirengotoxina, un depsipèptid cíclic anti-Leishmania	33
CAPÍTOL 2:	
Síntesi de l'azatiocoralina, un pèptid simètric i bicíclic anàleg de la tiocoralina	79
CAPÍTOL 3:	
La tiocoralina, nova síntesi en fase sòlida	151
CAPÍTOL 4:	
Aïllament i caracterització de compostos antitumorals d'esponges marines	241
CONCLUSIONS	279
PART EXPERIMENTAL	287
Annex 1. Taules d'aminoàcids, reactius i grups protectors emprats	
Annex 2. Nomenclatura abreviada per pèptids cíclics, ramificats, homo- o heterodètics	
Annex 3. Espectres de RMN del didehidropèptid Fmoc-Thr('Bu)-(Z)-Dhb-OH	
Annex 4. Articles publicats i acceptats	

ABREVIACIONS

AA; aa*	Aminoàcid
AAA	Anàlisi d'aminoàcids
Acm	Acetamidometil
Ac₂O	Anhídrid d'acètic
AcOEt	Acetat d'etil
AcOH	Àcid acètic
Alloc	Al·liloxycarbonil
Alloc-Cl	Cloroformiat d'al·lil
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
Boc₂O	Anhídrid de <i>tert</i> -butoxicarbonil
CCF	Cromatografia en cap fina
Cis	Cistina
COSY	Espectrometria de correlació
¹³C-RMN	Ressonància magnètica nuclear de carboni 13
CTC-PS	Resina 2-clorotritil o resina de Barlos
d	Dublet
δ	Desplaçament químic
DAST	Trifluorur de dietilaminosulfur
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCM	Diclorometà
DEAD	Dietilazodicarboxilat
Dhb	Àcid α,β-didehidroaminobutíric
DHB	Àcid 2,5-dihidroxibenzoic
DIEA	<i>N,N'</i> -Diisopropiletilamina
DIPCDI	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida
DKP	2,5-Dicetopiperazina
CMB	Center of Molecular Biodiversity (Brisbane, Australia)
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N'</i> -Dimetilformamida
DSC	Carbonat de <i>N,N'</i> -disuccinimil
DTT	Ditiotreitol
EDC-HCl	Hidroclorur de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>n'</i> -etilcarbodiimida
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
EM	Espectrometria de masses
EM-IQ	Espectroscopia de masses amb ionització química
eq	Equivalent

* Les abreviacions emprades per als aminoàcids i pèptids segueixen les regles de la IUPAC-IUB descrites al *J. Pep. Sci.*, **2003**, 9, 1-8. Tot i que les abreviacions de la IUPAC-IUB per un *N*-metil aminoàcid és MeXX, per evitar confusions amb els *N*-metil aminoàcids, emprarem l'abreviació NMe-XX.

ESI	Ionització per electrospai
Et₃N	Trietilamina
Et₂O	Èter dietílic
EtOH	Etanol
f	Funcionalització del suport polimèric
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonil
Fmoc-Cl	Clorur de 9-fluorenilmetoxicarbonil
GP	Grup protector
HATU	Tetrafluorofosfat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i>]piridin-1-il-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamini
HBTU	Hexafluorofosfat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamini
HFA	Hexafluoroacetona
HOAt	7-Aza-1-hidroxibenzotriazol
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
HOPfp	Pentafluorofenol
HPLC	Cromatografia líquida d'alta pressió
HPLC-EM	Cromatografia líquida d'alta pressió amb detecció per espectrometria de masses
HPLC-ELSD	Cromatografia líquida d'alta pressió amb detecció per dispersió de la llum
3HQA	Àcid 3-hidroxiquinàldic
¹H-RMN	Ressonància magnètica nuclear de protó
Hz	Herz
IC₅₀	Concentració de mostra que causa el 50 % de mort cel·lular
IG₅₀	Concentració de mostra que inhibeix el 50 % del creixement cel·lular
IR	Espectroscopia d'infraroig
<i>J</i>	Constant d'acoblament
λ	Longitud d'ona
<i>m</i>	Multiplet
MALDI-TOFF	Espectrometria de masses de desorció iònica provocada per làser, assistida per matriu i anàlisi de temps de vol
MeCN	Acetonitril
MeOH	Metanol
MFS	<i>N</i> -metilació en fase sòlida segons Miller i Scanlan
MS	Espectrometria de masses
Me	Metil
Mmt	Metoxitritil
MSNT	1-(mesitilè-2-sulfonil)-3-nitro-1,2,4-triazol
MST	Àcid mirístic (àcid tetradecanoic)
MTBD	Metil-4-nitrobenzenesulfonat
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -Butanol
NMe	Aminometil
NMeI	<i>N</i> -metilimidazol
NOESY	Espectrometria d'efecte nuclear Overhauser
Npys	3-nitro-2-piridilsulfenil

OMS	Organització Mundial de la Salut
oNBS	o-Nitrobenzenesulfonyl
OSu	Èster de <i>N</i> -hidroxisuccinimida
PDA	Fotodiode array
Pip	piperidina
<i>p</i>NZ	<i>p</i> -Nitrobenziloxycarbonil
<i>p</i>NZ-Cl	Cloroforniat de <i>p</i> -nitrobenzil
PPh₃	Trifenilfosfina
ppm	Parts per milió
PS	Poliestirè
PTSA	Àcid <i>p</i> -toluensulfònic
PyOAP	Hexafluorofosfat de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidin)fosfoni
QNA	Àcid quinàldic
QXA	Àcid 2-quinoxalinecarboxilic
R_f	Factor de retenció a la cromatografia de capa fina
s	Singulet
Scm-Cl	Clorur de metoxicarbonilsulfenil
^tBu	<i>tert</i> -Butil
TBAF	Fluorur de <i>n</i> -butilamoni
TBDMS	<i>tert</i> -Butildimetilsilil
TBME	<i>tert</i> -Butilmetilèter
TBTU	Tetrafluoroborat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(1 <i>h</i> -benzotriazol-1-il)-dimetilaminometilen]- <i>N</i> -metilmetanamini
Tce	Èster de 2,2,2-tricloroetanol
TFA	Àcid trifluoroacètic
THF	Tetrahidrofurà
TES	Trietilsilà
TGI	Concentració de mostra que causa la inhibició total del creixement
TIS	Triisopropilsilà
TMS	Trimetilsilil
TMS-Cl	Clorur de trimetilsilil
t_R	Temps de retenció
Troc	2,2,2-tricloroetoxycarbonil
Troc-Cl	Cloroforniat de 2,2,2-tricloroetil
Trt	Tritil
Trt-Cl	Clorur de tritil
Ts	Tosil
UV	Ultraviolat
Z	Benziloxycarbonil
&	Enllaç



Capítol 1

Síntesi d'un anàleg de la
sirengotoxina, un depsipèptid
cíclic anti-Leishmania

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1.1	UNA NOVA FAMÍLIA DE PÈPTIDS D'ORIGEN BACTERIÀ	37
1.1.1	Activitat citotòxica. Acció sobre la membrana plasmàtica	38
1.1.2	El liponadepsipèptid cíclic [MST, D-Ser ⁴ , Thr ⁶ , Asp ⁹] sirengotoxina	39
1.2	ELS α,β-DIDEHIDROAMINOÀCIDS	41
1.2.1	Antecedents sintètics dels α,β -didehidroaminoàcids	43
1.2.2	El didehidropèptid: Fmoc-Thr(^t Bu)-(Z)-Dhb-OH	45
1.3	OBTENCIÓ DEL DIDEHIDROPÈPTID FMOC-THR(^tBU)-(Z)-DHB-OH	45
1.3.1	Síntesi del didehidropèptid Fmoc-Thr(^t Bu)-(Z)-Dhb-OSu	47
1.3.2	Síntesi del didehidropèptid Fmoc-Thr(^t Bu)-(Z)-Dhb-OH	49
1.3.3	Noves propostes del didehidropèptid	57
1.4	SÍNTESI DEL LIPONADEPSIPÈPTID CÍCLIC [MST,D-SER⁴, THR⁶, ASP⁸, THR⁹] SIRENGOTOXINA	60
1.4.1	Definició de l'estratègia de síntesi	61
1.4.2	Síntesi de l'Alloc-Ser-OH	68
1.4.3	Prova de síntesi de la seqüència {[MST-Ser(&)-D-Lys(Boc)-Gly-OH][Fmoc-Thr&]}	69
1.4.4	Síntesi de [MST, D-Ser ⁴ , Thr ⁶ , Asp ⁸ , Thr ⁹] sirengotoxina	71
1.5	ACTIVITAT COM ANTI-LEISHMANIA	75

1.1 UNA NOVA FAMÍLIA DE PÈPTIDS D'ORIGEN BACTERIÀ

A inicis dels anys noranta, es va descobrir una família de liponadepsipèptids cíclics produïts per la bacteria patògena *Pseudomona Syringae* pv. *Syringae* aïllada en diverses espècies d'arbres cítrics.²² L'elevada citotoxicitat que presenten aquests nous pèptids ha suscitat un elevat interès pel seu estudi: biosíntesi, mecanisme d'acció, determinació estructural, caracterització de nous membres de la família.²³ Els liponadepsipèptids cíclics naturals es caracteritzen per ser un macrocicle lactàmic format per una seqüència d'aminoàcids i tenir una cadena alifàtica llarga (Figura 1.1).

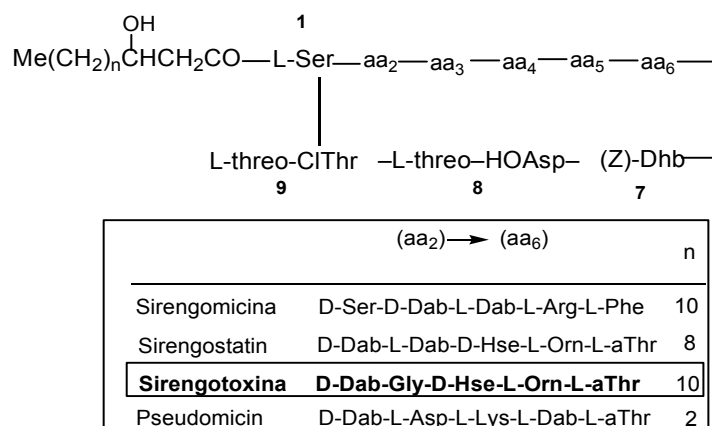


Figura 1.1 Liponadepsipèptids cíclics aïllats de la *Pseudomona* Sy. Sy.

²² Isogai, A.; Fukuchi, N.; Yamashita, S.; Suyama, K.; Suzuki, A., Structures of syringostatins A and B, novel phytotoxins produced by *Pseudomonas Syringae* pv. *Syringae* isolated from lilac blights, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 695-698.

²³ Bender, C.L.; Alarcón-Chaidez, F.; Gros, D.C., *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **1999**, 63, 266-292.

L'àcid 3-hidroxitetradecanoic (MST) es troba enllaçat a la cadena peptídica a través d'una serina amb un enllaç amida. Aquesta, a la vegada, tanca el cicle peptídic formant un enllaç èster amb una (Cl)treonina. Cal destacar la tríada d'aminoàcids poc usuals de l'extrem C-terminal: ClThr, OHAsp i Dhb i la presència de residus de configuració D (Hse i Dab). Grgurina i col. van estudiar l'origen dels aminoàcids no proteïnogènics en la producció del pèptid sirengomicina. Van emprar aminoàcids marcats amb ^{14}C per determinar que la treonina era la precursora dels aminoàcids α,β -didehidroaminobutíric i 4-cloro-treonina, i l'aspàrtic es transformava en en l'aminoàcid diaminobutíric i 3-hidroxiaspàrtic. La cadena alifàtica de l'àcid 3-hidroximirístic sembla que podria derivar del metabolisme de reservori de carbó i energia.²⁴

1.1.1 ACTIVITAT CITOTÒXICA. ACCIÓ SOBRE LA MEMBRANA PLASMÀTICA

Els liponadepsipèptids cíclics són citotòxics perquè tenen la capacitat de formar, conjuntament amb sis monòmers més, un canal d'ions a la membrana plasmàtica, permetent la sortida d'ions K^+ , i l'entrada d'ions H^+ i Ca^{2+} .²⁵ Com a conseqüència del moviment incontrolat d'ions, es basifica el medi extracel·lular, s'acidifica el citoplasma i es desencadena una cascada de reaccions citoplasmàtiques que porten a la inevitable mort cel·lular. Recentment també s'ha demostrat la seva elevada activitat hemolítica²⁶ i una interessant activitat antifúngica en molts fongs patògens dels cítrics, com el *Penicillium digitatum* i en un ampli espectre de fongs filamentosos, com el *Geotrichum candidum*, la *Rhodotorula pilimanae*, i espècies de *Fusarium* importants en la propagació de malalties infeccioses.²⁷ Aquests darrers han adquirit resistència a l'antibiòtic convencional Amfotericina B.

²⁴ Grurina, I. D.; Gross, D. C.; Iacobellis, N. S.; Lavermicocca, P.; Takemoto, J. Y., Phytotoxin production by *Pseudomonas syringae* syringae: syringopeptin production by syr mutants defective in biosynthesis or secretion of syringomycin, *FEMS Microbiol. Lett.*, **1996**, 138, 35-39.

²⁵ Hutchison, M.L.; Tèster, M.A.; Gros, D.C., Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction, *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, **1995**, 610-620.

²⁶ Agner, G.;Kaulin, Y.A.; Gurnev, P.A.; Szabo, Z.; Schagina, L.V.; Takemoto, J.Y.; Blasko, K., Membrane-permeabilizing activities of cyclic lipodepsipeptides, syringopeptin 22A and syringomycin E from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in human red blood cells and in bilayer lipid membranes, *Bioelectrochemistry*, **2000**, 52, 161-167.

²⁷ De Lucca, A.J.; Jacks, T.J.; Takemoto, J.; Vinyard, J.; Peter, J.; Navarro, E.; Walsh, T.J., Fungal lethality, binding, and cytotoxicity of syringomycin-E, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 371-373.

Aquesta nova família de pèptids, vastament estudiada a nivell biològic, no disposa de cap intent de síntesi descrit a la bibliografia.

1.1.2 EL LIPONADEPSIPÈPTID CÍCLIC [MST, D-SER⁴, THR⁶, ASP⁹] SIRENGOTOXINA

En el present capítol es planteja la síntesi d'un liponadepsipèptid cíclic amb una potencial activitat antibacteriana. El pèptid objectiu és un anàleg de la sirengotoxina, pèptid de la família dels liponadepsipèptids cíclics d'origen bacterià (*Pseudomonas Syringae* pv. *Syringae*) que ha demostrat tenir una important activitat contra el paràsit *Leishmania* i com a agent antibacterià.

El pèptid objectiu conserva tots els elements estructurals del pèptid natural (cadena alifàtica, enllaç depsipeptídic, pèptid cíclic) i l'èstereoquímica de la cadena peptídica. Conté els elements que són assequibles comercialment i un residu no proteïnogènic, el α,β -didehidroaminobutítric [(Z)-Dhb]. La resta d'elements estructurals del pèptid natural (CIThr, OHAsp i àc. β -hidroxitetradecanoic) tenen síntesis descrites a la bibliografia.^{28,29,30} El disseny de l'estratègia té en compte la possible síntesi del pèptid natural.

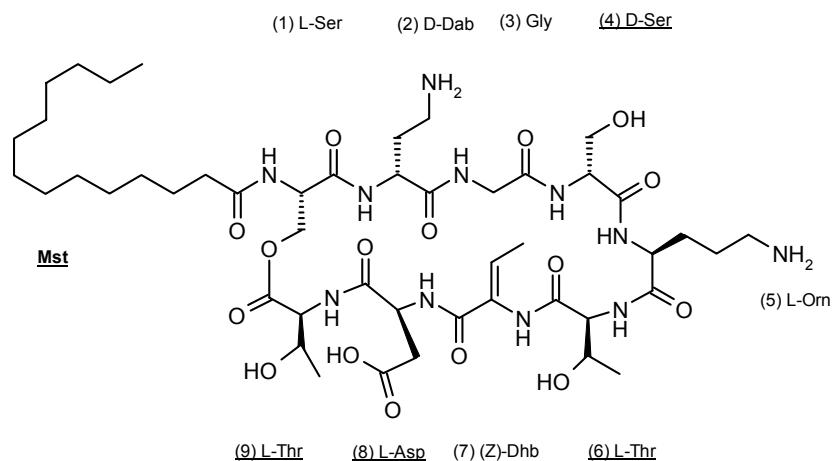
L'obtenció d'aquest anàleg de la sirengotoxina suposaria una primera aproximació a la síntesi de la sirengotoxina i a la família dels liponadepsipèptids produïts per la *Pseudomonas*. Degut al seu origen, el pèptid objectiu es denominarà al llarg del treball [MST, D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁹] sirengotoxina (Figura 1.2). On MST és l'àcid mirístic o àcid tetradecanoic, i els diferents aminoàcids que s'han substituït respecte el pèptid natural es col·loquen indicant la posició que ocupen a la cadena dins dels claudàtors. El nom sistemàtic, segons la nomenclatura de Spengler i col.³¹ és [MST-Ser(&)-D-Dab-Gly-D-Ser-Orn-Thr-(Z)-Dhb-Asp-Thr&] (veure annex 2).

²⁸ Fukuchi, N.; Isogai, A.; Nakayama, S.; Yamashita, S.; Suyama, K.; Takemoto, J.Y.; Suzuki, A., Structure and stereochemistry of three phytotoxins, syringomycin, syringotoxin and syringostatin, produced by *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, *J. Chem. Perkin Trans. I*, **1992**, 1149-1157.

²⁹ Biogen Científica S.L (www.biogenc.com).

³⁰ Huang, G.; Hollingsworth, R.I., An efficient synthesis of (R)-3-hydroxytetradecanoic acid, *Tetrahedron Asym.*, **1998**, 9, 4113-4115.

³¹ Spengler, J.; Jimenez, J.C.; Burger, K.; Giral, E.; Albericio, F., Abbreviated nomenclature for cyclic and branched homo- and hetero-detic peptides, *J. Pep. Res.*, **2005**, 65, 550-555.



Anàleg de sirengotoxina	MST	Ser	D-Dab	Gly	D-Ser	Orn	Thr	(Z)-Dhb	Asp	Thr
Sirengotoxina	Àc. β -HOTetradecanoic	Ser	D-Dab	Gly	D-Hse	Orn	aThr	(Z)-Dhb	treo-HOAsp	treo-CIThr

Figura 1.2 Estructura de [MST, D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁹] sirengotoxina i comparació amb la seqüència del pèptid natural

El nostre grup d'investigació té experiència en la síntesi de pèptids naturals d'elevada complexitat mitjançant la química en fase sòlida: la trunkamida³² i la kahalalide F³³ en són un exemple. Aquest darrer és també un lipodepsipèptid cíclic i, per tant, molta de la investigació realitzada en la seva obtenció podrà aplicar-se al [MST, D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁹] sirengotoxina, consolidant alhora la metodologia de síntesi de lipodepsipèptids cíclics en fase sòlida.

³² Caba, J.M.; Rodriguez, I.; Manzanares, I.; Giral, E.; Albericio, F., Solid-phase total synthesis of Trunkamide A, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 7568-7574.

³³ López-Macià, A.; Jiménez, J.C.; Royo, M.; Giral, E.; Albericio, F., Synthesis and structure determination of Kahalalide F, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 11398-11401.

1.2 ELS α,β -DIDEHIDROAMINOÀCIDS

Per a l'obtenció del pèptid cal resoldre prèviament la síntesi del residu no proteïnogènic contingut en la seqüència, el α,β -didehidroaminobutíric (Dhb) amb isomeria Z.³⁴ El Dhb és un tipus de α,β -didehidroaminoàcid caracteritzat per la presència d'un doble enllaç entre el C $_{\alpha}$ i el C $_{\beta}$ (Figura 1.3).

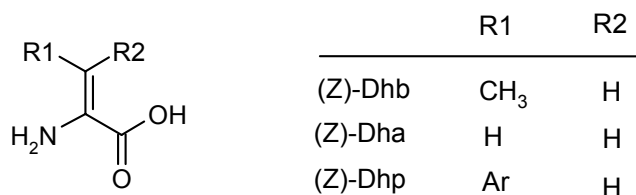


Figura 1.3 Estructura dels α,β -didehidroaminoàcids

Els α,β -didehidroaminoàcids estan presents en pèptids naturals de pes molecular relativament baix, els didehidropèptids, aïllats de diferents fonts naturals (bacteris, fongs, organismes marins) que tenen generalment estructura cíclica i presenten una elevada diversitat d'activitats biològiques: antibacterial,³⁵ antitumoral.³⁴ En aquests compostos naturals, predomina també la isomeria Z quan aquesta s'aplica (Figura 1.4).

Els α,β -didehidroaminoàcids tenen un paper important en l'estructura peptídica; són forts inductors del plegament i introdueixen rigidesa a la cadena,³⁶ i també augmenten la hidrofobicitat, la reactivitat electrofílica i la resistència enfront la degradació enzimàtica,³⁷ característiques importants en la farmacocinètica del pèptid.

³⁴ Hamann, M. T.; Scheuder, P.J., Kahalalide F: a bioactive depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysia rufescens* and the green alga *Bryopsis* sp., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 5825-5826.

³⁵ a) Morris, S.L.; Walsh, C.; Hansen, J.N.; Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action, *J. Biol. Chem.*, **1984**, *259*, 13590-13594; b) Mackintosh, R.B.; Dalby, K.N.; Campbell, D.G.; Cohen, P.T.W.; Mackintosh, C., The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1, *FEBS Letters*, **1995**, *371*, 236-240.

³⁶ Jain, R.; Chauhan, V.S., Conformational characteristics of peptides containing alpha, beta-dehydroamino acid residues, *Biopolymers (Peptide Science)*, **1996**, *40*, 105-119.

³⁷ English, M.L.; Stammer, C.H., The enzyme stability of dehydropeptides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1978**, *83*, 1464-1467.

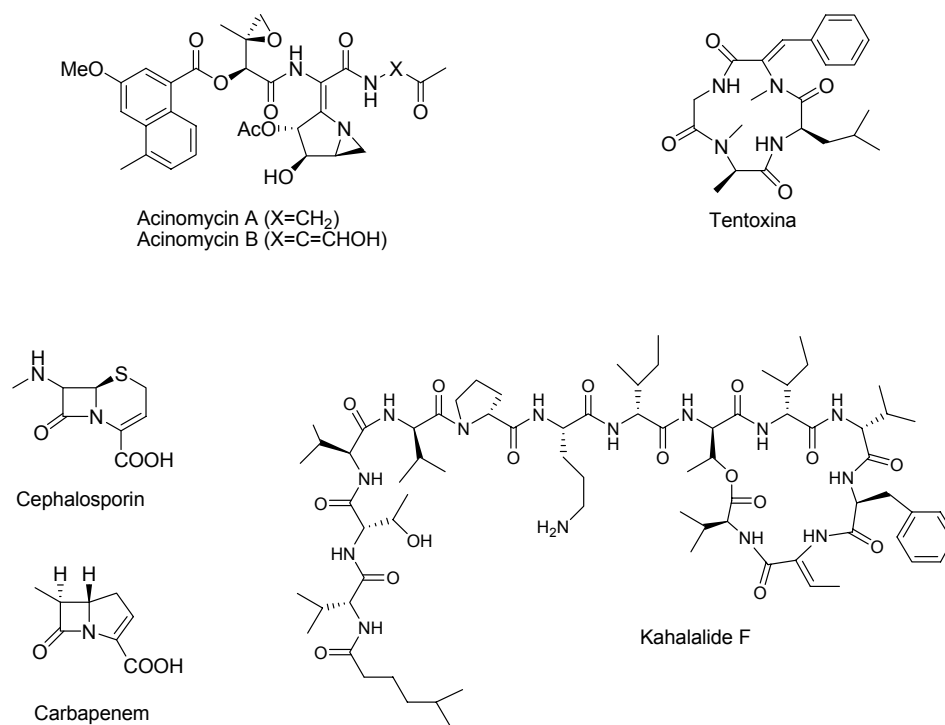


Figura 1.4 Didehidropèptids naturals

S'han realitzat estudis de la reactivitat d'aquests derivats aminoacídics en formar enllaços amida. L'acoblament sobre un didehidroaminoàcid com a component amino és inviable; existeix un equilibri tautomèric entre la forma amino-imino que resta densitat electrònica al N (Figura 1.5).³⁸ En canvi, el seu acoblament com a component àcid pot fer-se en les condicions habituals, tot i que el grup carboxil està conjugat amb el doble enllaç i presenta menor reactivitat que un aminoàcid estàndard.

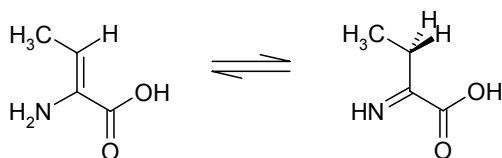


Figura 1.5 Tautomeria amino-imino

³⁸ Shin, C.; Yonezawa, Y.; Yamada, T., Dehydrooligopeptides. V. Synthesis of N-carboxy α -dehydroamino acid anhydrides and their transformation to α -dehydroamino acid and dehydrooligopeptide derivatives, *Chem. Pharm. Bull.*, **1984**, 32, 2825.

El creixent descobriment d'estructures biològicament actives que contenen aquest residu ha potenciat la recerca de mètodes d'obtenció d'aquests didehidropèptids i, des de l'inici dels anys vuitanta s'han sintetitzat químicament molts didehidropèptids naturals.³⁹

1.2.1 ANTECEDENTS SINTÈTICS DELS α,β -DIDEHIDROAMINOÀCIDS

Per a l'obtenció dels α,β -didehidroaminoàcids existeixen dues vies sintètiques principals: via reaccions d'eliminació, especialment importants les β -eliminacions, i via formació d'enllaços C-C.⁴⁰ La majoria de les vies sintètiques dels α,β -didehidroaminoàcids descrites a la bibliografia es realitzen en solució. Només es coneixen tres metodologies d'obtenció d'aquests dirigides a la síntesi de didehidropèptids en fase sòlida.^{41,42,43}

El nostre laboratori ha realitzat alguns estudis en la síntesi de α,β -didehidroaminoàcids i didehidropèptids en fase sòlida. Sempre s'han obtingut els derivats mitjançant reaccions de deshidratació, partint dels corresponents β -hidroxiderivats: de la treonina per a l'obtenció del Dhb, i de la serina i la β -hidroxifenilalanina per obtenir la α,β -didehidroalanina (Dha) i la α,β -didehidrofenilalanina (Dhp), respectivament. S'han provat les reaccions de β -eliminació descrites a la bibliografia de mètodes d'obtenció de l'isòmer Z.⁴⁴

³⁹ a) Fukase, K.; Kitazawa, M.; Sano, A.; Shimbo, K.; Horimoto, S.; Fujita, H.; Kubo, A.; Wakamiya, T.; Shiba, T., Synthetic study on peptide antibiotic nisin. V. Total synthesis of nisin, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1992**, 65, 2227-2240.; b) Li, K.; Wu, J.; Xing, W.; J.; Simon, J. A., Total synthesis of the antitumor depsipeptide FR-901,228, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 7237-7238.; c) Bagley, M. C.; Bashford, K. E.; Hesketh, C. L.; Moody, C. J., Total synthesis of the thiopeptide Promothiocin A, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 3301-3313.

⁴⁰ Bonauer, C.; Walenzyk, T.; König, B., α,β -dehydroamino acids, *Synthesis*, **2006**, 1, 1-20.

⁴¹ Okeley, N. M.; Zhu, Y.; Van der Donk, W. A., Facile chemoselective synthesis of dehydroalanine-containing peptides, *Org. Lett.*, **2000**, 23(2), 3603-3606.

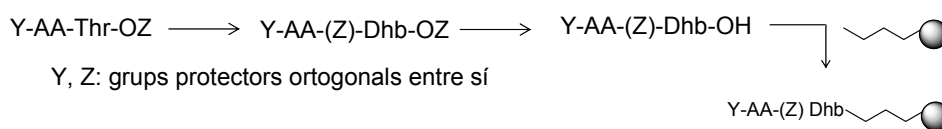
⁴² Yamada, M.; Miyajima, T.; Horikawa, H., Solid-phase synthesis of dehydroalanine derivatives, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 289-292.

⁴³ Royo, M.; Jiménez, J.C.; López-Macià, A.; Giral, E.; Albericio, F., Solid-phase synthesis of peptides containing α,β -Didehydroamino acids, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 45-48.

⁴⁴ a) Fukase, K.; Kitazawa, M.; Sano, A.; Shimbo, F.; Horimoto, S.; Fujita, H.; Kubo, A., Synthetic study on peptide antibiotic nisin. V. Total synthesis of nisin, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1992**, 65, 2227-2240. b) Srinivasan, A.; Stephenson, R.W.; Olsen, R.K., Conversion of threonine derivatives to dehydroamino acids by elimination of β -chloro and O-tosyl derivatives, *J. Org. Chem.*, **1977**, 42, 2256-2259.

Es van elaborar dues estratègies diferents per a l'obtenció de didehidropèptids per tal de resoldre l'ineficient caràcter nucleòfil del grup enamino (Figura 1.6).^{43,45} La primera, a partir de la síntesi d'un dipèptid, amb el corresponent β -hidroxiderivat, deshidratant en solució i incorporant posteriorment a una peptidil-resina. Així es va obtenir el didehidropèptid Boc-AA-(Z)-Dhb-OH, compatible amb la metodologia en fase sòlida Boc/Bzl, i el didehidropèptid Alloc-AA-(Z)-Dhb-OH, compatible amb la metodologia en fase sòlida Fmoc/^tBu. La segona estratègia està basada en la deshidratació *in situ* del corresponent β -hidroxiderivat contingut en una peptidil-resina. Aquest darrer mètode permet la síntesi total del didehidropèptid en fase sòlida. En tots dos casos, el sistema de deshidratació que ha donat millors resultats ha estat la carbodiimida soluble (EDC·HCl) activada amb el CuCl.^{46,47}

1ª estratègia: en solució



2ª estratègia: en fase-sòlida

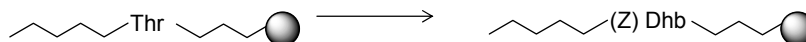


Figura 1.6 Dues estratègies per la síntesi de didehidropèptids en fase sòlida

⁴⁵ José Carlos Jiménez, *Màster en química orgànica*, Universitat de Barcelona, **1999**.

⁴⁶ Alexandre, C.; Rouessac, D., Preparation of α, β -unsaturated and cyclopropyl ketones by the action of some alkyl carbodiimides on β - and γ -ketols, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1971**, 1837-1840.

⁴⁷ Schimdt, E.; Moosmuller, F., Aliphatic carbodiimides. IX., *Annalen*, **1955**, 597, 235-240.

1.2.2 EL DIDEHIDROPÈPTID: FMOC-THR(^tBu)-(Z)-DHB-OH

En la síntesi del [MST, D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁹] sirengotoxina es planteja l'obtenció prèvia en solució del didehidropèptid Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH (Figura 1.7).

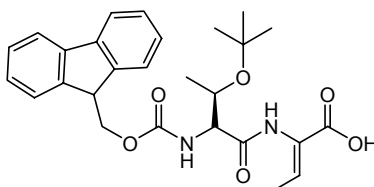


Figura 1.7 Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH.

És convenient utilitzar l'estratègia de la síntesi del didehidropèptid en solució perquè el pèptid natural conté varis residus susceptibles també de donar β -eliminacions (CIThr, OHAsp, Thr, Ser) en cas de fer-se la reacció *in situ* en la cadena peptídica. Aquest mètode permet purificar i caracteritzar el producte abans de la seva incorporació a la peptidil-resina, alhora que és més econòmic quan es tracta de síntesis de didehidropèptids a gran escala.

Fins ara no s'ha descrit la síntesi d'un didehidropèptid protegint el *N*-terminal en forma Fmoc. La seva obtenció suposa un avenç en la síntesi de didehidropèptids en fase sòlida Fmoc/^tBu perquè empra un grup protector temporal adient a la seva incorporació a la peptidil-resina, no suposant cap limitació en l'esquema de protecció del pèptid.

1.3 OBTENCIÓ DEL DIDEHIDROPÈPTID FMOC-THR(^tBu)-(Z)-DHB-OH

La via d'incorporació del residu no proteïnogènic (Z)-Dhb en la síntesi del [MST, D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁹] sirengotoxina, serà mitjançant la síntesi en solució del didehidropèptid Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH i posterior incorporació a la cadena peptídica segons la química en fase sòlida Fmoc/^tBu.

Es tria el grup Fmoc com a grup protector de l'extrem *N*-terminal perquè el seu ús segueix el procediment estàndard de la química en fase sòlida Fmoc/^tBu. Tot i així, la inestabilitat del grup Fmoc en medi bàsic redueix considerablement el nombre de sistemes de deshidratació descrits a la bibliografia compatibles amb el nostre producte.

La reacció de deshidratació es durà a terme sobre un residu de Thr. La Thr és un precursor β -hidroxiderivat, assequible comercialment i els senyals de $^1\text{H-RMN}$ del metil i del C_β són fàcilment assignables, i ajudaran al seguiment de la reacció de deshidratació i a l'assignació de l'isòmer obtingut.

El plantejament general que se segueix en la síntesi en solució del didehidropèptid és el següent: síntesi del dipèptid corresponent amb el grup hidroxil de la treonina C-terminal lliure [Fmoc-Thr(t Bu)-Thr-OX, X: H o grup protector], posterior reacció de β -eliminació, obtenint el residu deshidratat (Z)-Dhb acoblat a través del grup amino al següent aminoàcid Thr(t Bu) i, finalment, desprotecció de l'extrem C-terminal si X és grup protector. D'aquesta manera es resol la impossibilitat del α,β -didehidroaminoàcid de formar enllaços amida com a component amino.

La reacció de deshidratació és l'etapa clau en l'obtenció del didehidropèptid. Es provaran dos mètodes amb mecanismes de reacció diferents: el mètode del carbonat de *N,N'*-disuccinimidil (DSC), que transcorre a través d'intermedis aïllables, i el mètode de la carbodiimida soluble (EDC \cdot HCl) activada amb CuCl,⁴⁷ en el que l'activació i la deshidratació es donen simultàniament i és necessari que el grup carboxil del dipèptid estigui protegit. Aquest darrer sistema ha estat el que ha donat millors resultats en els treballs fets anteriorment en el grup d'investigació. El mètode del DSC presenta l'avantatge de permetre un esquema de síntesi del dipèptid i d'acoblament a la peptidil-resina més senzill; es parteix del dipèptid amb el grup hidroxil lliure i s'obté el didehidropèptid amb l'extrem C-terminal activat amb l'èster de succinimidil (OSu), i els reactius que s'empren són menys tòxics i més assequibles econòmicament. Aquest mètode va ser utilitzat en l'obtenció del didehidroaminoàcid Fmoc-(Z)-Dhb-OSu,⁴⁸ que no va tenir utilitat sintètica perquè no va poder ser acilat. En els didehidropèptids anteriorment sintetitzats, es realitzava la deshidratació del dipèptid corresponent amb l'extrem C-terminal protegit amb el grup O t Bu o el grup OMe. En el nostre cas, aquests grups protectors són incompatibles amb els grups protectors del didehidropèptid objectiu: O t Bu/ t Bu i OMe/Fmoc (tot i que l'èster metílic es pot eliminar amb LiOH en presència del grup Fmoc emprant únicament 1 eq de base). El mètode del DSC, al no necessitar cap grup protector a l'extrem C-terminal, és compatible amb el nostre dipeptid Fmoc-Thr(t Bu)-Thr-OH. Per al mètode de la deshidratació amb EDC \cdot HCl i CuCl caldrà trobar un grup protector ortogonal als grups protectors Fmoc i t Bu, i veure com influeix en la reacció de deshidratació.

⁴⁸ Àngel López i Macià, "Síntesi total i determinació estructural de la kahalalide F", *Tesi doctoral en Química Orgànica*, Universitat de Barcelona, 1997.

1.3.1 SÍNTESI DEL DIDEHIDROPÈPTID FMOC-THR(^tBu)-(Z)-DHB-OSU

Primer es prova la síntesi del didehidropèptid emprant el DSC com a agent deshidratant. Se sintetitza el dipèptid amb el grup carboxil lliure [Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-OH] en dues etapes; en una primera etapa s'activa el grup carboxil de la Fmoc-Thr(^tBu)-OH com a èster de succinimidil [Fmoc-Thr(^tBu)-OSu] i, en una segona, s'acobla la treonina totalment desprotegida (H-Thr-OH). Finalment, es deshidrata la treonina lliure del dipèptid amb el DSC, obtenint el didehidropèptid activat com a èster de succinimidil [Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OSu] (Figura 1.8).

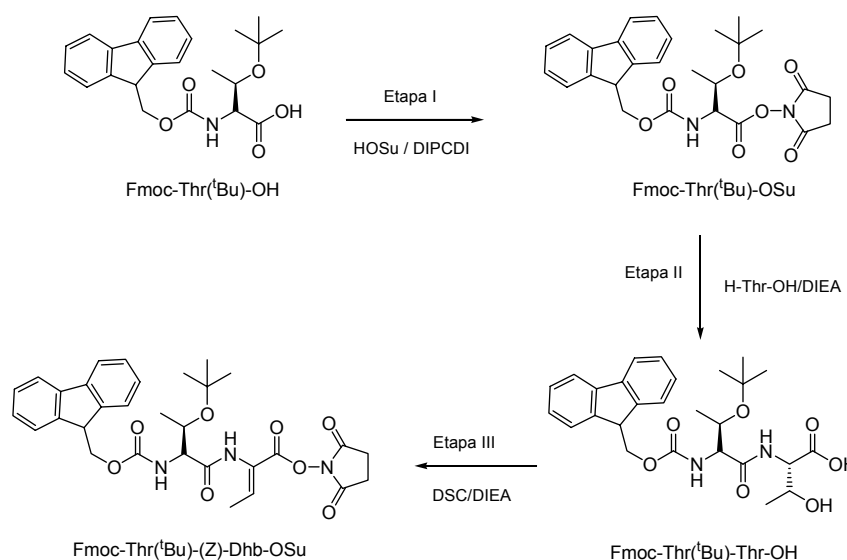


Figura 1.8 Esquema de síntesi de Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OSu

L'èster de succinimidil de la Fmoc-Thr(^tBu)-OH s'obté en fer reaccionar l'aminoàcid amb el grup carboxil lliure i l'hidroxil del succinimidil en presència de DIPCDI. La reacció es duu a terme en DCM, a temperatura ambient, durant 16 h i amb una relació de reactius de Fmoc-Thr(^tBu)-OH/DIPCDI/HOSu (1:1.8:1.3). Amb aquestes condicions s'aconsegueix una conversió completa al producte esperat amb un rendiment global del 90 %. En proves realitzades amb una relació de reactius (1:1:1) s'obté un subproducte (20 %) que no evoluciona en afegir-hi més reactiu de partida (HOSu) ni en afegir-hi, posteriorment, un excés de HCl-H-Thr-OH. Per RMN i per MALDI-TOF es caracteritza com una espècie inactiva de la carbodiimida, una *N*-acilurea. L'èster actiu entre l'aminoàcid i la carbodiimida format per activar el grup carboxil pot evolucionar cap a la forma isomèrica inactiva (Figura 1.9).

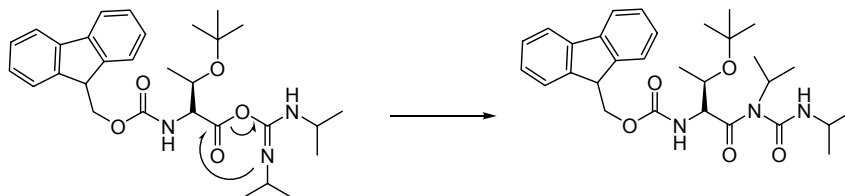


Figura 1.9 Mecanisme proposat per a la formació de la forma inactiva *N*-acilurea

Les primeres proves realitzades amb la carbodiimida soluble (EDC-HCl) i amb una relació de reactius de 1:1:1 donen una proporció de la forma inactiva encara més elevada (30 %). El problema que presenta aquest mètode és que la urea de la DIPCDI és més difícil d'eliminar que la urea de la EDC. L'estructura de la molècula Fmoc-Thr(^tBu)-OSu es confirma amb les tècniques de ¹H-RMN, ¹³C-RMN i MALDI-TOF.

La síntesi del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-OH es realitza amb l'acoblament de l'anterior aminoàcid activat [Fmoc-Thr(^tBu)-OSu] i la treonina totalment desprotegida (HCl·H-Thr-OH) en presència de DIEA. La reacció es duu a terme amb una relació de reactius de Fmoc-Thr(^tBu)-OSu/HCl·H-Thr-OH/DIEA (1:1.5:3), en 1,4-dioxà, a 25 °C, 15 h. El rendiment final és del 85 %. La caracterització es fa per ¹H-RMN, ¹³C-RMN i MALDI-TOF, confirmant l'estructura del producte obtingut.

L'obtenció del dihidropèptid final [Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OSu] es duu a terme amb la deshidratació del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-OH mitjançant l'agent deshidratant DSC. La reacció transcorre a través de varis intermedis, seguint un mecanisme complex i basat en l'efecte del pirocarbonat que acidifica el H^α (Figura 1.10):

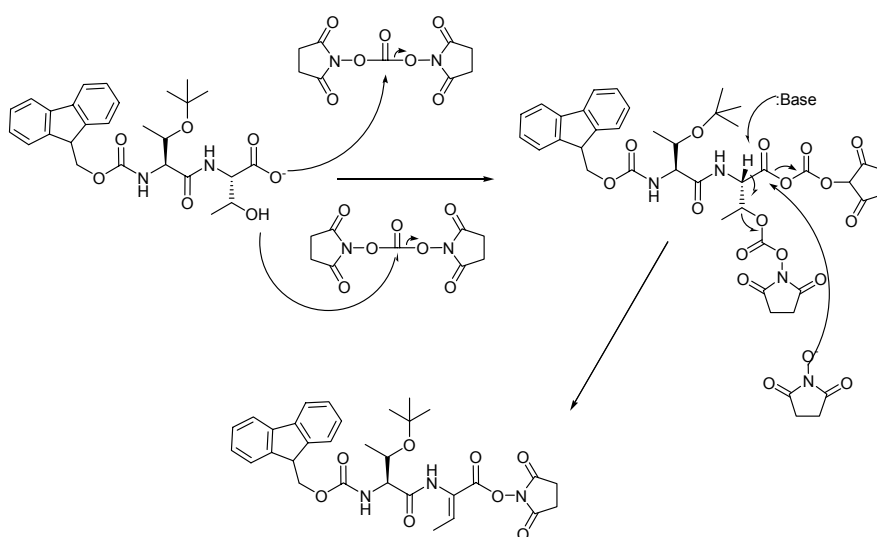


Figura 1.10 Mecanisme proposat de la reacció de deshidratació amb DSC

Per HPLC s'observa com la reacció evoluciona passant per varis intermedis de reacció, fins que al quart dia la reacció ja no evoluciona i es detecta la presència d'un producte majoritari (85 %). El producte, però, s'hidrolitza l'èster actiu en l'etapa de purificació per cromatografia en columna de gel de sílice, disminuint dràsticament el rendiment global de la síntesi a un 10 %.

Degut als resultats obtinguts, es decideix canviar de mètode de deshidratació i intentar la síntesi del didehidropèptid Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH mitjançant la reacció de deshidratació amb el sistema EDC·HCl/CuCl.

1.3.2 SÍNTESI DEL DIDEHIDROPÈPTID FMOC-THR(^tBU)-(Z)-DHB-OH

El mètode de deshidratació amb EDC·HCl/CuCl és el que s'ha consolidat en el grup com a mètode de deshidratació, tant en solució de dipèptids Boc-AA-Thr-OX, Alloc-AA-Thr-OX (essent X grups protectors: OMe, ^tBu), com en fase sòlida de treonines, serines i β-hidroxifenilalanines, contingudes en peptidil-resines. Aquest mètode és compatible *a priori* amb el grup protector Fmoc del nostre dipèptid.

Aquest mètode requereix d'un grup protector per l'extrem C-terminal del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-OX. Aquest grup protector (X) ha de ser estable en les condicions de reacció i la seva eliminació en la darrera etapa de síntesi ha de ser compatible amb l'estabilitat dels grups protectors Fmoc i ^tBu. El grup al·lil, que s'elimina amb Pd es presenta com un bon candidat per a la protecció de l'extrem C-terminal (Figura 1.11).

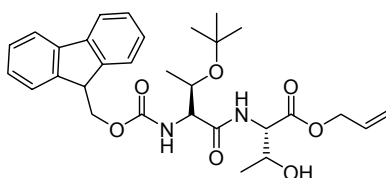
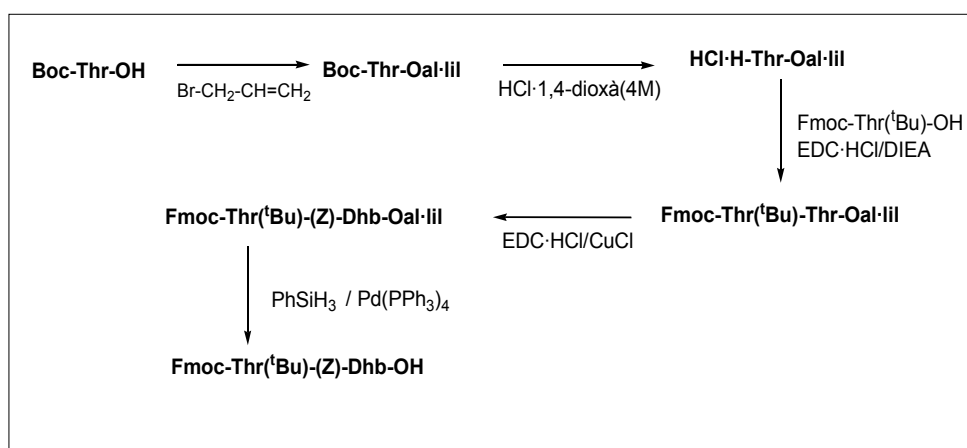


Figura 1.11 Fmoc-Thr(^tBu)-Thr -Oal·lil

Cal també modificar l'esquema de síntesi per obtenir el nou dipèptid protegit. La treonina lliure s'incorpora a la Fmoc-Thr(^tBu)-OH en la forma protegida H-Thr-Oal·lil. Aquesta s'obté en dues etapes a partir de la Boc-Thr-OH. Es prefereix treballar en solució amb Boc-AA-OH perquè la reacció d'eliminació del grup Boc és més neta (formació d'alcohol *tert*-butílic i CO₂), alhora que són compostos més estables i amb major solubilitat. En la primera etapa es protegeix el grup carboxil amb la formació de l'èster al·lilic i en la segona etapa s'elimina el grup Boc en medi àcid (HCl-1,4-dioxà (4 M)). Una vegada sintetitzat el

dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-Oal·lil, es duu a terme la deshidratació amb EDC·HCl i el CuCl. Finalment, cal una darrera etapa d'eliminació del grup al·lil, que es realitza mitjançant una transferència del catió al·lílic catalitzada pel complex de Pd [Pd(PPh₃)₄] i un captador de cations al·lílics, com el PhSiH₃.

L'esquema de síntesi que se segueix és el següent (Esquema 1.1):



Esquema 1.1 Esquema de síntesi del Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH mitjançant la deshidratació amb EDC·HCl

La Boc-Thr-Oal·lil s'obté a partir de la Boc-Thr-OH i el bromur d'al·lil (1:13). La reacció es duu a terme a reflux (75 °C) i s'aconsegueix un rendiment del 93 %.

L'etapa d'eliminació del grup Boc es fa en medi àcid (HCl·1,4-dioxà (4M)) i és quantitativa (98 %). Els productes obtinguts es caracteritzen per ¹H-RMN, ¹³C-RMN, IR i MALDI-TOF.

L'acoblament entre les dues treonines Fmoc-Thr(^tBu)-OH i HCl·H-Thr-Oal·lil no és fàcil perquè es dona entre dos residus β-ramificats que ofereixen impediment estèric. Es proven diferents condicions de reacció i diferents agents d'acoblament. A continuació es resumeix en una taula les proves realitzades (Taula 1.1):

Les proves A-C es realitzen amb una relació Fmoc-Thr(^tBu)-OH/HCl·H-Thr-Oal·lil (1:1.3). Les proves D-F es realitzen amb una relació Fmoc-Thr(^tBu)-OH/HCl·H-Thr-Oal·lil (1:1).

	Reactius*	Dissolvent	Temp.-Temps	% acoblament
A ¹	EDC-HCl (1.3 eq) / DIEA (2.6 eq)	DCM (15 mL)	25 °C – 18 h	48 %
B ¹	EDC-HCl (1.3 eq) / DIEA (2.6 eq)	DCM (15 mL)	reflux – 18 h	55 %
C ²	EDC-HCl (1.3 eq) / DIEA (2.6 eq)	DCM (10 mL)	reflux – 18 h	65 %
D ¹	DIPCDI (1 eq) / DIEA (1 eq)	DCM (10 mL)	25 °C – 24 h	37 %
E ²	DIPCDI (1 eq) / DIEA (1 eq)	DCM (10 mL)	25 °C – 24 h	55 %
F ²	DIPCDI(1 eq) / HOBt(1eq) / DIEA (1 eq)	DCM (10 mL)	25 °C – 24 h	72 %

* S'empra 1 eq de Fmoc-Thr(^tBu)-OH

¹ Ordre d'addició dels reactius: primer el HCl-H-Thr-Oal·lil amb la DIEA, segon la Fmoc-Thr(^tBu)-OH i finalment la carbodiimida

² S'ha invertit l'ordre d'addició dels reactius: primer s'addiciona la Fmoc-Thr(^tBu)-OH i la carbodiimida, i posteriorment el HCl-H-Thr-Oal·lil amb la DIEA.

Taula 1.1 Condicions de reacció per la formació del dipèptid

En general, en totes les proves realitzades s'obtenen cruds de reacció molt bruts. S'observa una lleugera millora en els acoblaments realitzats amb la carbodiimida DIPCDI.

Veient que no s'obtenen bons resultats en l'acoblament mitjançant una carbodiimida, es decideix canviar d'estratègia: preparació de la espècie activa del grup carboxilat amb l'èster de succinimidil, tal i com s'ha fet en l'acoblament de la treonina lliure en l'anterior apartat, i posterior reacció amb el HCl-H-Thr-Oal·lil (1.3 eq) i amb DIEA (2.6 eq).

Tot i que el nou esquema de síntesi conté una etapa addicional, els resultats obtinguts en l'acoblament són prou bons (94 %). L'activació prèvia del grup carboxilat permet que a la reacció d'acoblament només hi participin dues espècies: el grup amino com a nucleòfil i el grup carboxilat com a electròfil. És una reacció més dirigida.

La deshidratació del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-Oal·lil amb el sistema EDC-HCl transcorre sense cap intermedi aïllable; l'activació del grup hidroxil amb la carbodiimida complexada amb el CuCl i la deshidratació es donen simultàniament. El mecanisme de reacció proposat es troba detallat a la següent figura (Figura 1.12):⁴⁶

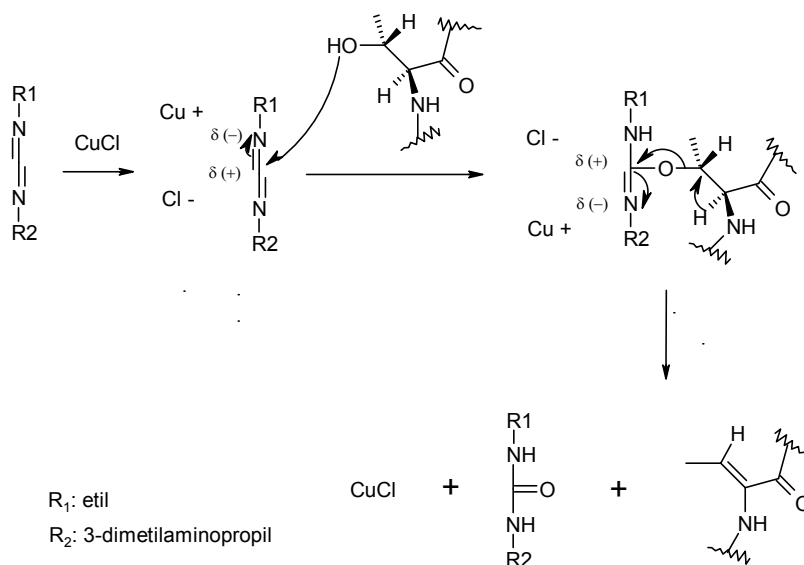


Figura 1.12 Esquema d'activació de la carbodiimida en la reacció de deshidratació segons Alexandre i Rovessac⁴⁶

Per obtenir rendiments òptims, la proporció molar de carbodiimida respecte el CuCl ha de ser de 1.7, i amb 2 eq de carbodiimida respecte el dipèptid ja és suficient per completar-se la reacció. La reacció es duu a terme amb una mescla de dissolvents DCM–DMF (98:2), a 25 °C i sota atmosfera d'argó.⁴³ La reacció es completa en 20 h. Per HPLC i MALDI-TOF es detecta un producte secundari de massa molecular 635 (18 %) (Figura 1.13.i).

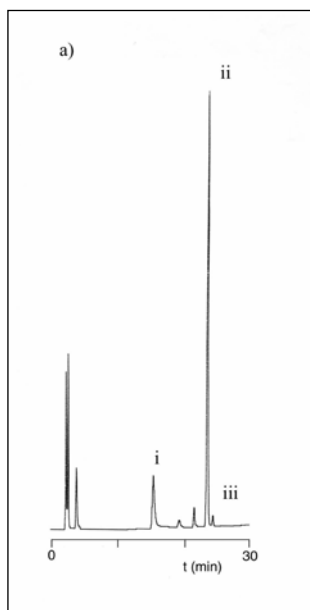


Figura 1.13 Anàlisi per HPLC del cru de la reacció de deshidratació de Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-OH, i) producte de massa molecular 635, ii) Fmoc-Thr(^tBu)-Dhb-Oal·Hil, iii) producte amb la mateixa massa molecular que el producte majoritari. Condicions HPLC: gradient de 7:3 a 0:10 en 30 min (H₂O amb 0.045 % de TFA:MeCN amb 0.036 % de TFA)

El tractament posterior d'aquest cru és molt tediós. S'elimina el coure fent rentats amb solució aquosa saturada de EDTA, però es redueix el rendiment, possiblement degut a la formació de complexos de coure amb el producte. En un altre intent de reacció de deshidratació, es decideix purificar directament el cru per cromatografia en columna de gel de sílice. El coure es queda retintut a la fase estacionària i s'obté un rendiment més elevat del dipèptid deshidratat: 70 %. No es pot aïllar el subproducte de massa 635. Tot això ve dificultat per la presència del grup Fmoc, que és voluminós i confereix molta insolubilitat al producte. El producte desitjat es caracteritza per $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$ i MALDI-TOF. La massa del subproducte es correspon amb l'espècie cíclica del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-OH i la carbodiimida soluble. Possiblement, la presència de coure en el medi podria permetre el desplaçament del grup al·lil per la carbodiimida (Figura 1.14).

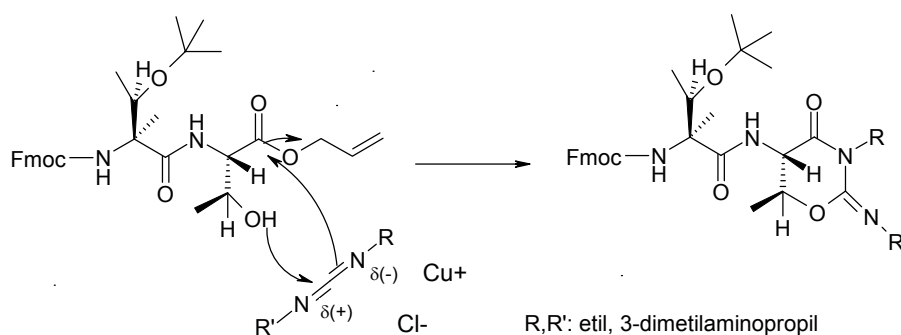


Figura 1.14 Desplaçament del grup al·lil per la carbodiimida

Ja només resta la darrera etapa, la reacció d'eliminació del grup al·lil. Aquesta es fa utilitzant el complex Pd [Pd(PPh₃)₄] com a catalitzador i un captador de cations al·lílics, el fenilsilà (PhSiH₃).

La purificació del cru de reacció mitjançant extraccions en medi àcid i bàsic no funciona, degut altre cop a la presència del grup Fmoc que dificulta la solubilització del producte final desprotegit en solució aquosa bàsica. Alternativament, es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice. Les anàlisis mitjançant EM (MALDI-TOF i IQ) de les diferents fraccions indiquen que el producte esperat es troba en tres fraccions consecutives. Totes tres fraccions donen únicament la massa del producte esperat. La primera fracció és la més important en quantitat, un 60 % en pes de les tres fraccions, es troba impurificada amb un 13 % d'un compost que s'identifica per $^1\text{H-RMN}$ com a dibenzofulvè, fet que també explicaria que no es detectés la seva massa per MALDI-TOF. La segona fracció s'identifica com a producte pur (Figura 1.15.b); per HPLC s'obté un únic pic i per $^1\text{H-RMN}$ un sol joc de senyals. En la darrera fracció es detecta per HPLC un pic secundari (25 %) (Figura 1.15.b). L'anàlisi per $^1\text{H-RMN}$ l'identifica com a l'isòmer del producte esperat, ja que es detecten dos jocs de senyals del residu deshidratat.

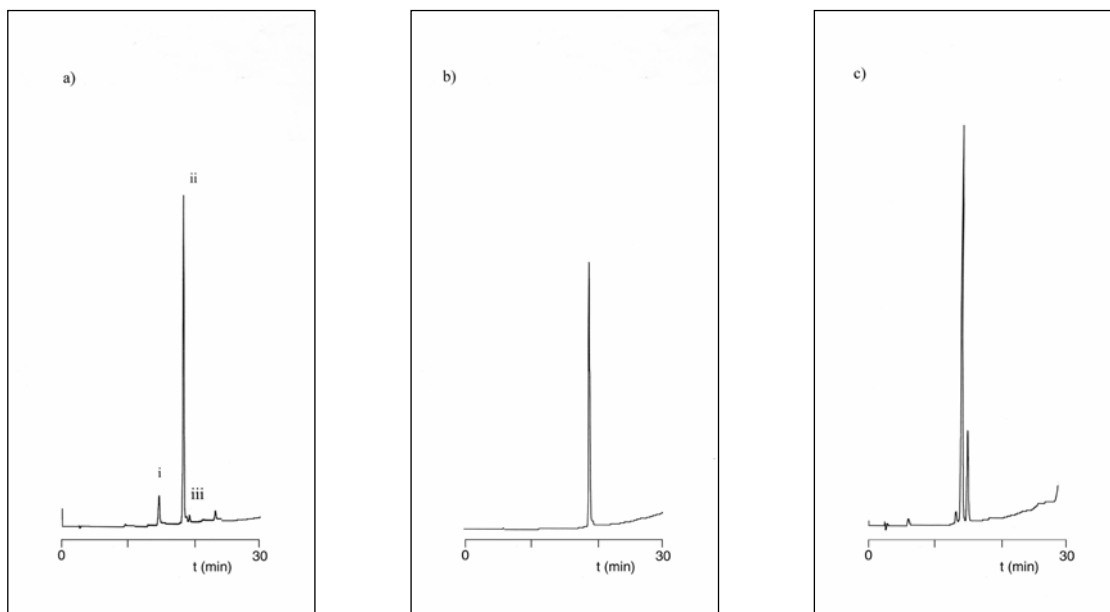


Figura 1.15 Anàlisi per HPLC de a) cru obtingut en la reacció d'eliminació del grup al·lil, i) dibenzofulvè, ii) Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH, iii) Fmoc-Thr(^tBu)-(E)-Dhb-OH; b) isòmer Z ; c) mescla d'isòmers Z/E. Condicions HPLC: gradient de 7:3 a 0:10 en 30 min. en les anàlisis a) i b), i de 65:35 a 0:100 en 30 min en l'anàlisi c). (H₂O amb 0.045 % de TFA : MeCN amb 0.036 % de TFA)

Ara resta per verificar que el producte majoritari obtingut es correspongui amb l'isòmer Z desitjat.

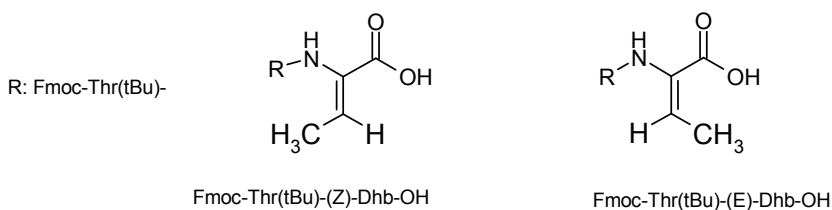


Figura 1.16 L'isòmer Z i E del didehidropèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Dhb-OH

Per tal de definir l'isòmer obtingut, s'analiza la fracció mescla d'isòmers Z/E per ¹H-RMN. En un espectre de ¹H-RMN (300 MHz) s'identifiquen els senyals del residu Dhb: el protó amida (singulet a 8.6 ppm), el protó olefínic (quadruplet a 6.8 ppm) i el grup metil (doblet a 1.8 ppm) (figura 1, annex 3). Posteriorment es realitza un experiment NOE que permet conèixer quins nuclis estan propers a l'espai. En el nostre cas, es determina quin nucli, entre els protons del grup metil i el protó olefínic del residu Dhb, està més proper al protó amida del mateix residu, per determinar la isomeria Z/E del producte

obtingut. L'experiment NOE realitzat es basa en irradiar un dels protons del residu Dhb i observar com es modifiquen els altres senyals del residu. Els protons que estan propers en l'espai del protó irradiat experimenten, generalment, un augment d'intensitat del senyal. Per tal d'analitzar els resultats, es realitza un espectre diferència de l'espectre irradiat menys l'espectre original. En l'espectre diferència, el senyal del protó irradiat té intensitat negativa, els protons propers a l'espai tenen intensitat positiva i la resta no dona senyal.

En l'espectre (Figura 1.17.a) s'irradia el protó amida; el senyal del grup metil té intensitat positiva i no hi ha senyal del protó olefínic. En l'espectre (Figura 1.17.b) s'irradien els protons del grup metil; tant el senyal del protó amida com el del protó olefínic tenen intensitat positiva. I, finalment, en l'espectre (Figura 1.17.c), s'irradia el protó olefínic i s'observa només un augment d'intensitat del senyal dels protons del grup metil. Així, es pot confirmar que el grup metil es troba proper a l'espai del protó amida i, per tant, es pot determinar que el producte majoritari obtingut és l'isòmer Z (Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH) (3 % d'isòmer E).

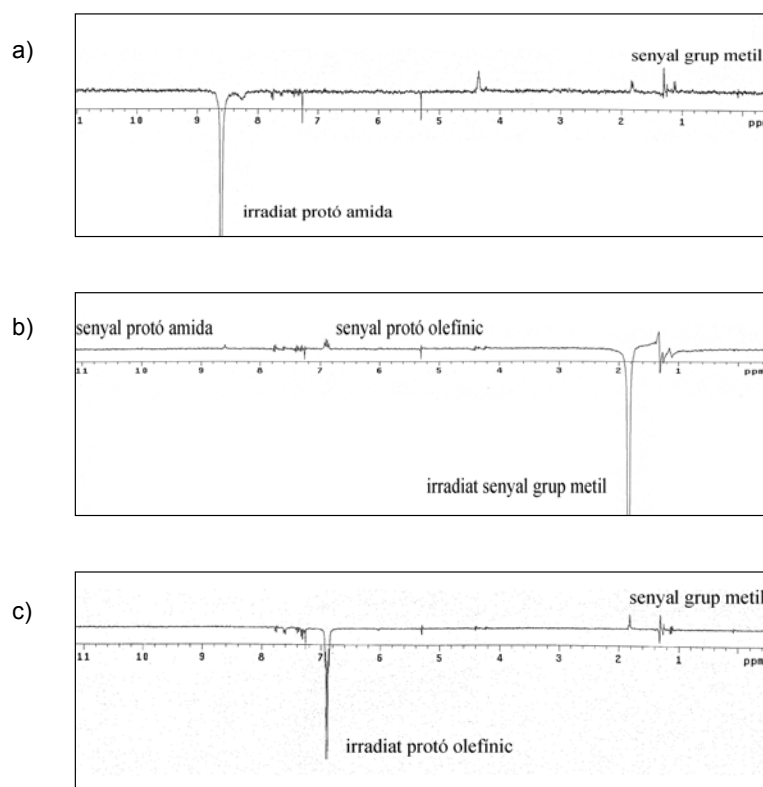


Figura 1.17 Espectres de RMN irradiant diferents protons del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH. a) irradiació del protó amida, b) irradiació dels protons del grup metil, c) irradiació del protó olefínic

A continuació, s'analitza per RMN la tercera fracció obtinguda en la purificació del producte final per tal de determinar que el producte secundari és l'isòmer *E*. Es realitza a la mostra un espectre de ^1H -RMN de 300 MHz i s'observa el doblet a 1.8 ppm del producte isòmer *Z*,⁴⁹ i un altre doblet més desapantallat a 2.2 ppm (Figura 1.18). Amb l'ajuda d'un espectre COSY, es localitza el quadruplet de l'isòmer *E* sota els senyals del grup Fmoc (7.3 ppm) (Figura 1.18).

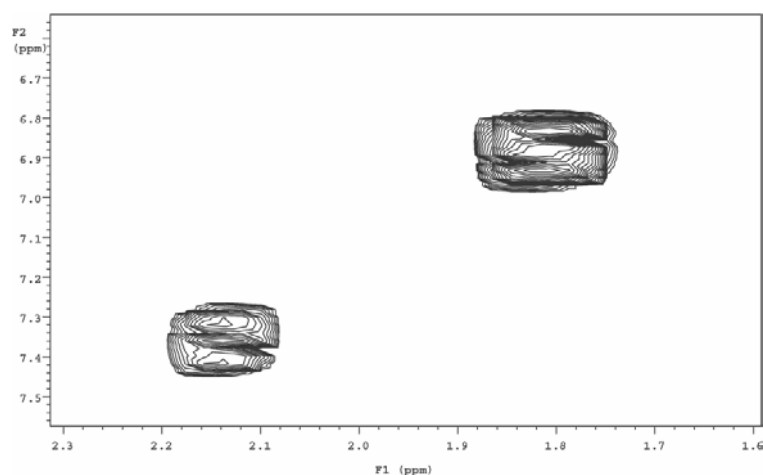


Figura 1.18 Ampliació de l'espectre COSY realitzat a la fracció mescla d'isòmers *Z/E* de la zona d'acoblament entre els protons olefínics i els grups metils dels dos isòmers.

Si es compara aquest resultat amb els obtinguts en la síntesi del didehidropèptid Alloc-Phe-(*Z*)-Dhb-O^tBu,⁴⁸ en la qual només es va obtenir l'isòmer *Z*, la presència de l'isòmer *E* podria ser deguda a l'impediment estèric del grup ^tBu que dificulta la formació de l'isòmer *Z* o bé a la presència del grup al·lil, encara que el producte clarament majoritari continua sent el producte termodinàmicament estable.

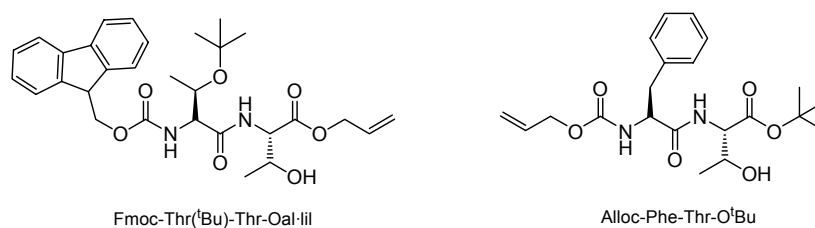


Figura 1.19 Estructura dels reactius de la deshidratació

⁴⁹ Srinivasan, A.; Stephenson, R.W.; Olsen, R.K., Conversion of threonine derivatives to dehydroamino acids by elimination of beta-chloro and O-tosyl derivatives, *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, 2256-2259.

Finalment s'ha obtingut el didehidropèptid Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH amb uns rendiments globals acceptables.

1.3.3 NOVES PROPOSTES D'OBTENCIÓ DEL DIDEHIDROPÈPTID

Assolint un mètode d'obtenció del Fmoc-didehidropèptid amb bons rendiments, es planteja la síntesi de dos dipèptids més amb grups protectors de l'extrem C-terminal diferents: un èster metílic i un èster de fenacil (Figura 1.20).

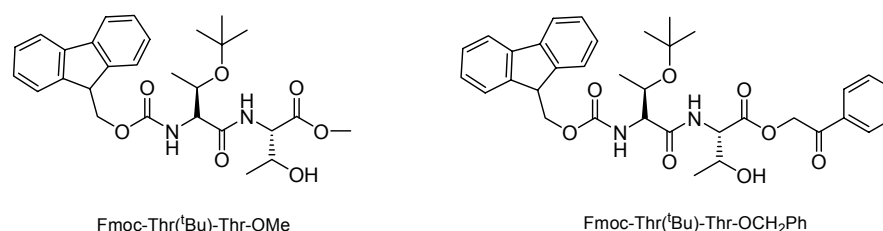
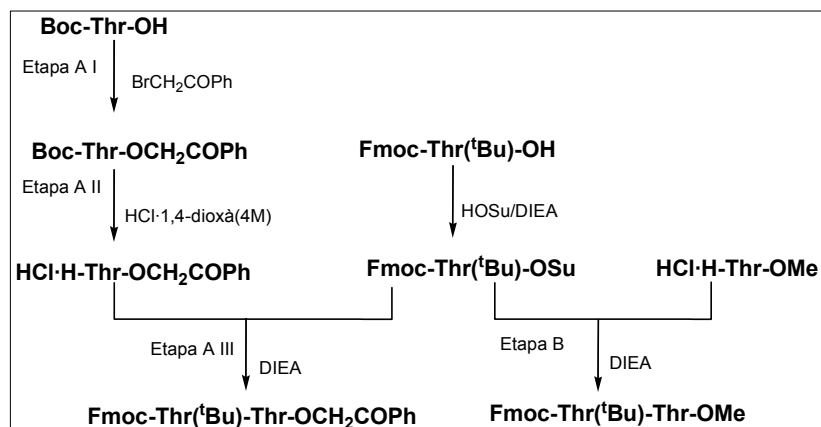


Figura 1.20 Estructura dels dos nous dipèptids

La síntesi d'aquests nous productes té com a finalitat el poder estudiar millor la reacció de deshidratació amb EDC·HCl/CuCl, determinant com influeix l'extrem C-terminal en la reacció de deshidratació. Es compara un grup al·lílic, un grup metílic i un grup fenacil. Amb aquest darrer grup protector es planteja trobar un altre grup protector vàlid que no impliqui l'ús de Pd en la seva eliminació, aconseguint així un mètode sintètic del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH més compatible amb la síntesi a gran escala i amb finalitats terapèutiques. L'eliminació del grup OMe no és del tot compatible amb l'estabilitat del grup Fmoc, sobretot a gran escala. Aquest dipèptid és vàlid només per l'estudi de la reacció de deshidratació.

La síntesi dels dos dipèptids segueix el mateix esquema sintètic que el realitzat per l'èster al·lílic (Esquema 1.2):



Esquema 1.2 Esquema de síntesi dels dipèptids Fmoc-Thr(tBu)-Thr-OCH₂COPh i Fmoc-Thr(tBu)-Thr-OMe

En la següent taula es resumeix l'evolució de les síntesis (Taula 1.2):

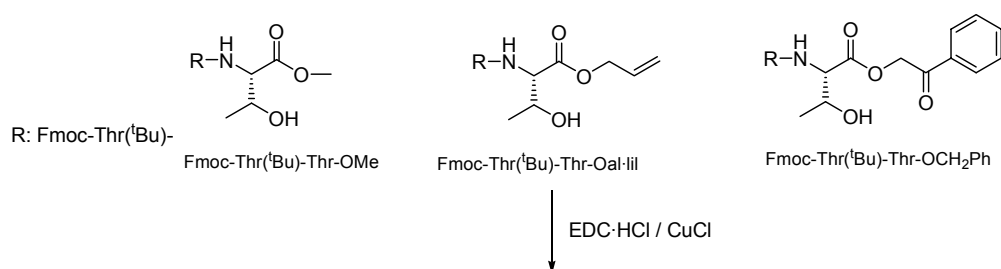
	Reactius	Cond. Reacció	% conv.	% obtenció
-OCH₂COPh				
Etapa A I	Boc-Thr-OH(1.3 eq)/ β -Bromoacetofenona (1 eq)/DIEA (1eq)	AcOEt, reflux (77 °C), 16 h	100	85
Etapa A II	HCl-1,4-Dioxà (4 M)	25 °C, 15 h	100	98
Etapa A III	Fmoc-Thr(tBu)-OSu (1 eq) / H-Thr-OCH ₂ COPh (1.3 eq) /DIEA (2.6 eq)	1,4-Dioxà, 25 °C, 24 h	100	96
-OMe				
Etapa B (i)	Fmoc-Thr(tBu)-OSu (1 eq) / HCl H-Thr-OMe (1.3 eq)/DIEA (2.6 eq)	1,4-Dioxà, 25 °C, 20 h	68	55
Etapa B (ii)	Fmoc-Thr(tBu)-OSu (1 eq) / HCl H-Thr-OMe (2.6 eq)/DIEA (5.2 eq)	1,4-Dioxà, 25 °C, 20 h	97	90

Taula 1.2 Condicions de reacció per a la síntesi dels dipèptids Fmoc-Thr(tBu)-Thr-OX (X = CH₂COPh, Me)

El dipèptid Fmoc-Thr(tBu)-Thr-OCH₂COPh s'obté amb bon rendiment. La reacció d'acoblament amb l'èster metílic necessita de més reactiu (HCl·H-Thr-OMe/DIEA) per completar-se. El mètode d'acoblament amb el grup carboxil activat com a èster de succimidinil també dona bons resultats en les síntesis d'aquests dipèptids.

1.3.3.1 Reacció de deshidratació:

Es realitza la reacció de deshidratació dels dos dipèptids amb EDC-HCl i CuCl fent servir les mateixes condicions de reacció en els dos casos per poder fer un estudi comparatiu i es completa també amb els resultats obtinguts en la deshidratació de l'èster al·lílic. Mitjançant anàlisis per HPLC-EM s'observa com en la deshidratació amb el dipèptid protegit amb el grup fenacil hi ha presència del mateix producte secundari obtingut en la deshidratació del dipèptid Fmoc-Thr(tBu)-Thr-Oal·lil de massa 635 en un 35 % mentres que aquest producte es detecta només en un 4 % en la deshidratació del dipèptid protegit amb l'èster metílic. Aquests resultats confirmen la hipòtesi de formació d'un subproducte, resultat del desplaçament del grup protector (OCH₂COPh, Oal·lil, OMe) per la carbodiimida EDC-HCl en presència de coure. La formació d'aquest subproducte és tant més important com més bon grup sortint sigui el grup protector de l'extrem C-terminal: fenacil > al·lil > metil.



Prod. Desh.			
Prod. de massa molecular 635			
% determinat per HPLC	4 %	18 %	35 %

Taula 1.3 Producte de massa molecular 635 obtingut en la reacció de deshidratació dels tres dihidropèptids d'estudi. R és Fmoc-Thr(tBu)-, R' i R'' són etil, 3-dimetilaminopropil

1.4 SÍNTESI DEL LIPONADEPSIPÈPTID CÍCLIC [MST,D-SER⁴, THR⁶, ASP⁸, THR⁹] SIRENGOTOXINA

Tal i com s'ha comentat, l'objectiu del present capítol és la síntesi d'un liponadepsipèptid cíclic anàleg de la sirengotoxina (Figura 1.21).

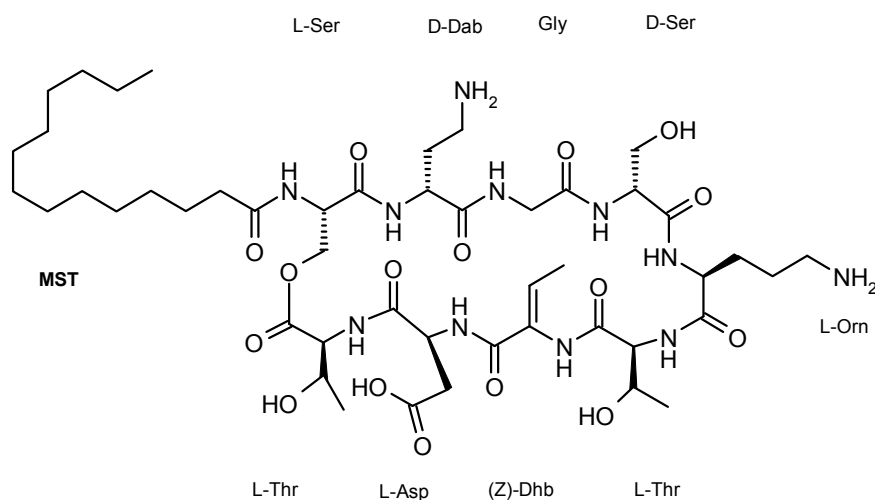


Figura 1.21 Estructura del [MST,D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁸, Thr⁹] sirengotoxina

El fet de ser un pèptid cíclic, la presència de la cadena alifàtica, l'enllaç depsipeptídic i el residu no proteïnogènic (Z)-Dhb, fa que sigui un pèptid sintèticament complex.

La síntesi es duu a terme sobre suport polimèric seguint la metodologia Fmoc/^tBu. Els tractaments suaus en les eliminacions dels grups protectors temporals Fmoc (20 % de piperidina en DMF, 20 min, 25 °C) permet la síntesi de pèptids complexos i amb un alt contingut de residus làbils a tractaments àcids forts.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, la introducció del residu (Z)-Dhb es fa mitjançant el dihidropèptid Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH, sintetitzat prèviament en solució. Aquest mètode permet dissenyar una estratègia de síntesi més senzilla perquè la seva incorporació és com la resta d'aminoàcids comercials (Fmoc-AA-OH) i sense que tingui lloc l'etapa de deshidratació sobre la peptidil-resina.

El disseny de l'estratègia té en compte la possible síntesi de la sirengotoxina, de manera que la síntesi d'aquest anàleg de sirengotoxina sigui una primera aproximació de la síntesi del pèptid natural.

1.4.1 DEFINICIÓ DE L'ESTRATÈGIA DE SÍNTESI

La forma més convenient de sintetitzar un (depsi)pèptid cíclic és sintetitzar la cadena peptídica protegida sobre suport polimèric, escindir de la resina mantenint els grups protectors de les cadenes laterals, ciclar en solució i desprotegir. Alternativament, també es pot fer la ciclació en fase sòlida, i en aquest cas s'inicia l'elongació de la cadena peptídica a través de la cadena lateral d'un aminoàcid o pel grup α -amino, si s'empra una resina de tipus BAL.⁵⁰

És important l'elecció del punt de ciclació perquè generalment és l'etapa clau de la síntesi. La ciclació d'un pèptid depèn de molts factors: conformació del pèptid en solució, concentració, dissolvents, temperatura. A més, si el pèptid sintetitzat és un pèptid natural, es considera que l'etapa de ciclació es dona amb relativa facilitat; no passa el mateix amb pèptids que són anàlegs de productes naturals, que no tenen assegurada la ciclació. En qualsevol cas, es tria el punt de ciclació que sigui més favorable: el de menor impediment estèric i menor risc de racemització. En el cas dels depsipèptids cíclics, la ciclació és convenient que es realitzi amb un enllaç amida i no mitjançant l'enllaç èster perquè el grup amino és més nucleòfil.

Es dissenyen tres estratègies de síntesi diferents (Figura 1.22 ,Figura 1.23 i Figura 1.24):

⁵⁰ Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vagner, J.; Albericio, F.; Barany, G., Backbone amide linker strategy for solid-phase synthesis of C-terminal-modified and cyclic peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 5441-5452.

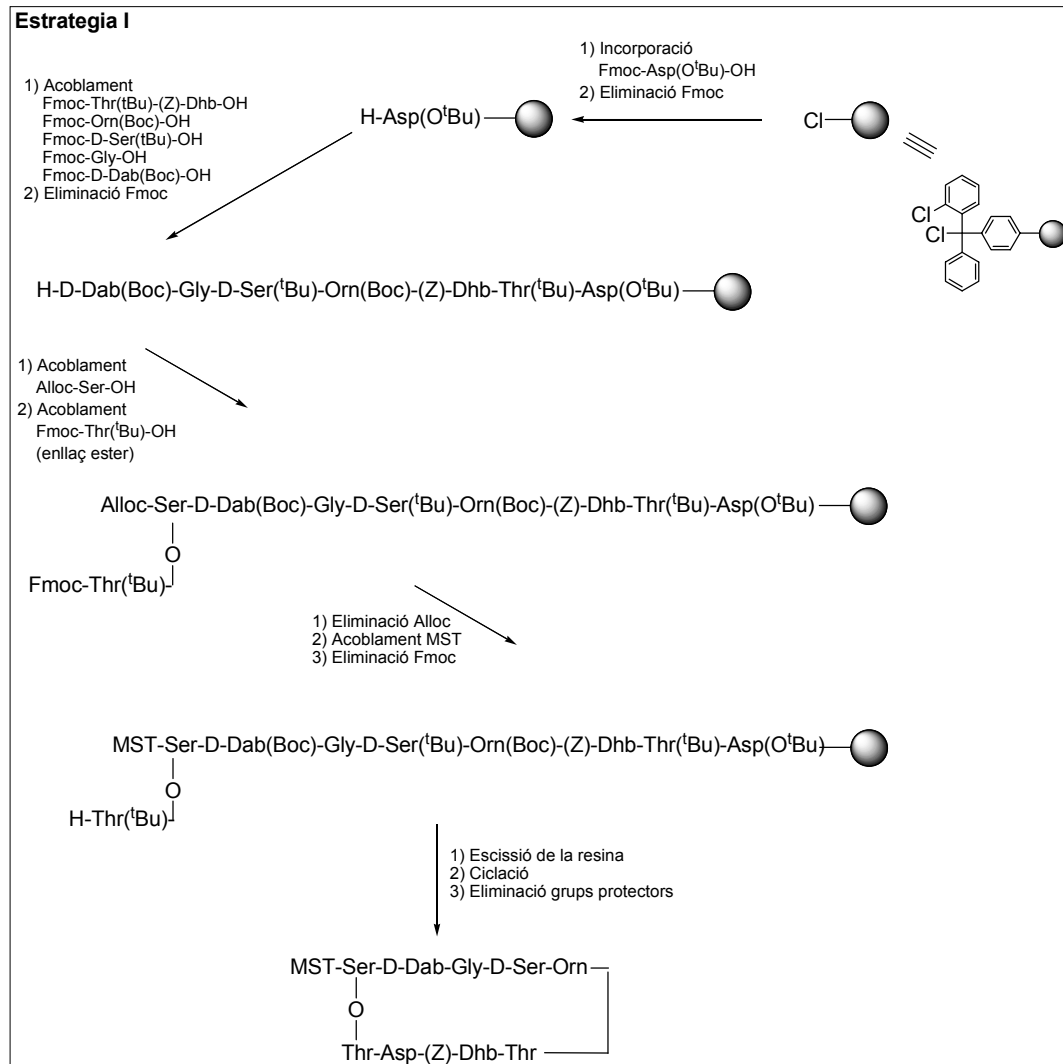


Figura 1.22 Disseny de l'estratègia I per a la síntesi del [MST, D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁸, Thr⁹] sirenogotoxina

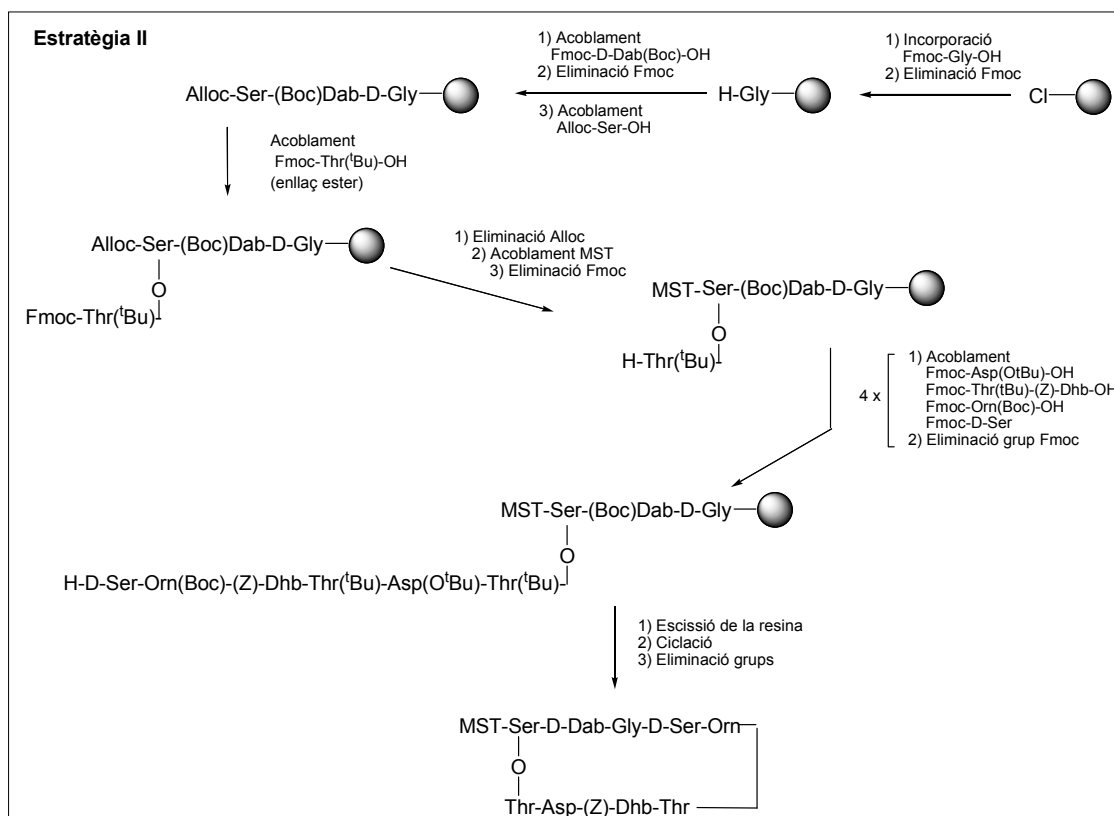


Figura 1.23 Disseny de l'estratègia II per a la síntesi del [MST, D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁸, Thr⁹] sirengotoxina

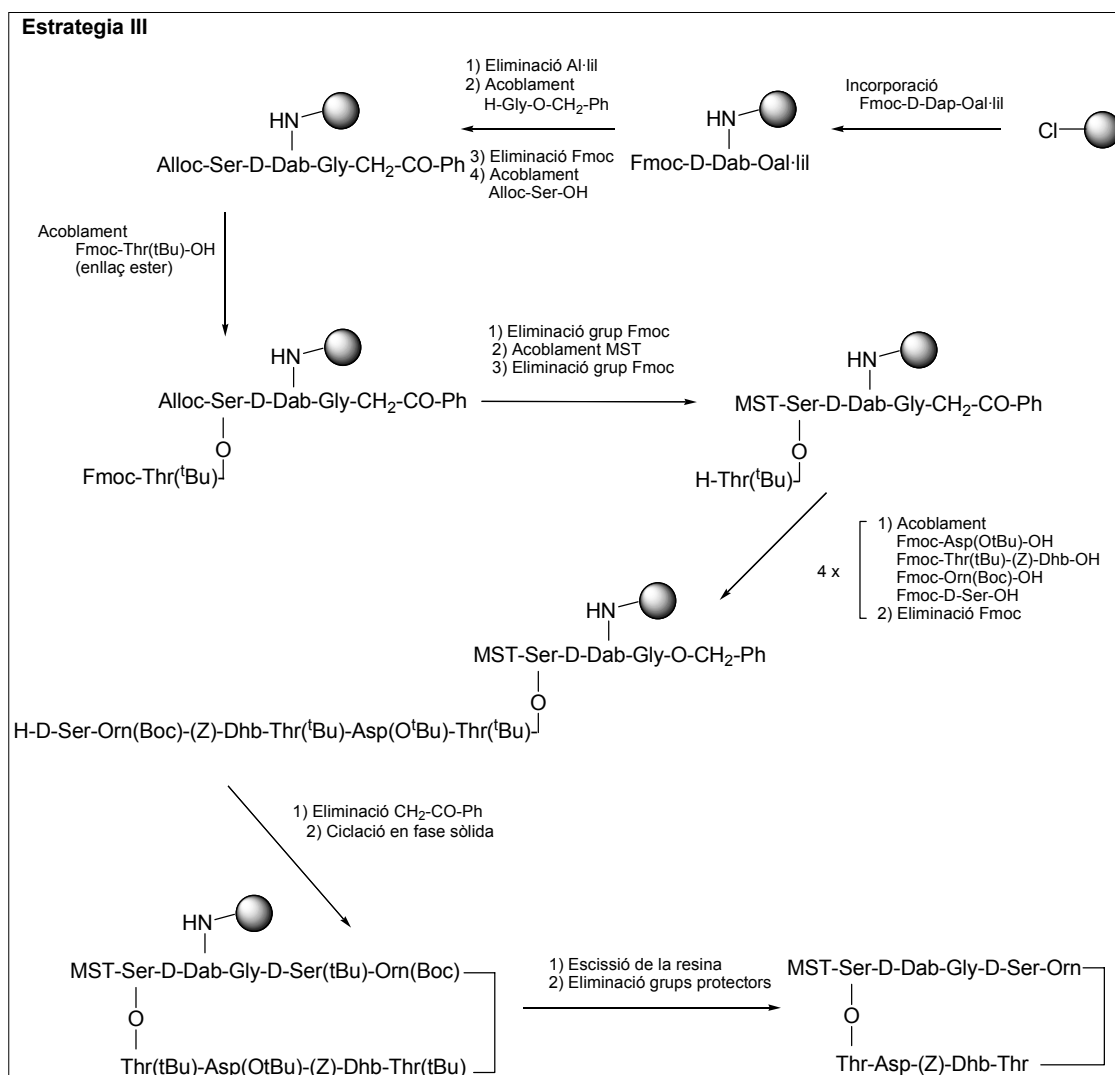


Figura 1.24 Disseny de l'estratègia III per a la síntesi del [MST, D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁸, Thr⁹] sirenogotoxina

L'estratègia II és perfilada com l'estratègia òptima en la síntesi del [MST, D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁸, L-Thr⁹] sirenogotoxina pels següents motius:

- El punt de ciclació està entre una Gly i una Ser; és un enllaç amida, no hi ha risc de racemització de l'extrem C-terminal i és l'enllaç que presenta menor impediment estèric.
- La formació de l'enllaç èster i la incorporació de l'àcid mirístic (MST), dos dels punts claus en l'elongació de la cadena peptídica, es realitzen a l'inici. Es poden optimitzar aquestes etapes, minimitzant temps i pèptid. L'enllaç èster pot ser estable en les condicions d'eliminació del grup

Fmoc al llarg de la síntesi de la cadena peptídica lineal i pot ser més làbil a aminolisis quan es troba en la forma ciclada.⁵¹

- L'esquema de protecció és més senzill que per al cas de l'estratègia III. Se simplifica l'etapa de síntesi en solució dels residus específicament protegits.

Establerta l'estratègia de síntesi a seguir, es detalla a continuació l'esquema de protecció, els aminoàcids protegits i reactius necessaris per a la síntesi del pèptid.

Tal i com es mostra a l'esquema sintètic, aquesta estratègia implica la necessitat de tenir el precursor lineal en solució amb els grups amino i carboxil protegits (Dab, Orn i Asp). Així mateix, cal una resina que permeti l'obtenció de la cadena lineal protegida per a poder efectuar la ciclació en solució i, posteriorment, la desprotecció total del pèptid.

Es tria la metodologia Fmoc/^tBu per fer l'elongació de la cadena peptídica, amb la qual cosa, els grups protectors del D-Dab i la Orn són el Boc i de l'Asp el O^tBu. Una resina compatible amb l'escissió del pèptid i la conservació d'aquests grups protectors és la resina clorotritil (CTC-PS).⁵²

La resina CTC-PS permet aquesta desprotecció selectiva depenent del tractament àcid emprat; un tractament àcid suau (1 % de TFA en DCM, 25 °C, 1 min) permet l'escissió del pèptid de la resina, mentre que amb un tractament àcid més fort (95 % de TFA en aigua, 25 °C, 1.5 h) s'eliminen els grups protectors Boc, ^tBu.⁵³ La resina CTC-PS forma amb el primer aminoàcid un enllaç èster de 2-clorotritil. Aquest grup voluminós (2-clorotritil) ajuda a reduir la formació de dicetopiperazines (DKPs)^{54,55}. Les DKPs es formen a nivell de dipèptid degut a una reacció intramolecular catalitzada principalment per base entre l'extrem N-terminal i l'enllaç èster del primer aminoàcid de la resina (Figura 1.25).

⁵¹ García, C.; Isidro-Llobet, A.; Cruz, L. J.; Acosta, G. A.; Álvarez, M.; Cuevas, C.; Giralt, E.; Albericio, F., Convergent approaches for the synthesis of the antitumoral peptide, kahalalide F. Study of orthogonal protecting groups, *J. Org. Chem.*, **2006**, *in press*.

⁵² a) Barlos, K.; Chatzi, O.; Gatos, D.; Stavropoulos, G.; 2-Chlorotrityl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1991**, *37*, 513-520; b) Barlos, K.; Chatzi, O.; Gatos, D.; Papaphotiu, G.; Schäfer, W., Synthesis of calcitonin derivatives by fragment condensation in solution and on 2-chlorotrityl resin, *Liebigs Ann.Chem.*, **1993**, *30*, 215-220.

⁵³ Barlos, K.; Gatos, D.; Schäfer, W., Synthesis of prothymosin α (Pro T α), a 109 amino acid residue protein, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, *30*, 590-593.

⁵⁴ Rovero, P.; Vigano, S.; Pegoraro, S.; Quartara, L., Synthesis of the bradykinin B1 antagonist [desArg¹⁰]HOE 140 on 2-chlorotrityl resin, *Lett. Pept. Sci.*, 1996, *2*, 319-323.

⁵⁵ Chiva, C.; Vilaseca, M.; Giralt, E.; Albericio, F., An HPLC-ESMS study on the solid-phase assembly of C-terminal proline peptides, *J. Pept. Sci.*, **1999**, *5*, 131-140.

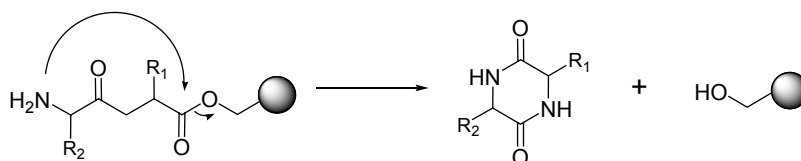


Figura 1.25 Formació de diketopiperazines

La formació de DKPs està especialment afavorida en les següents situacions:

- El primer o segon aminoàcid pugui adoptar fàcilment una conformació *cis* en l'enllaç resultant (Gly, Pro, *N*-alquil).
- Un aminoàcid sigui L i l'altre D, ja que poden formar DPKs amb menor impediment estèric.

L'estratègia de síntesi suposa iniciar la síntesi de la cadena peptídica amb una Gly i, per tant, caldrà tenir present el possible risc de formació de DKPs.

Cal tenir en compte que l'enllaç que estableix la resina CTC-PS amb la cadena peptídica és molt làbil a àcids; qualsevol traça d'àcid pot desancorar el pèptid i fer disminuir notablement el rendiment de la síntesi. Per aquest motiu, durant la síntesi és convenient deixar guardada la peptidil-resina després d'eliminar el grup protector Fmoc ja que aquest procés implica un tractament bàsic que neutralitza la presència de traces d'àcid.

1.4.1.1 L'estratègia de síntesi té altres aspectes més específics que cal analitzar:

- La primera Thr de la seqüència peptídica i la Ser, residus que formen l'enllaç èster, han de tenir els grups amino protegits ortogonalment entre sí. La posterior desprotecció de la Ser ha de ser selectiva perquè la cadena alifàtica (MST) s'ha d'incorporar únicament sobre el grup amino de la Ser. La següent desprotecció del grup amino de la Thr permetrà l'elongació de la cadena peptídica. Es tria el grup Alloc com a protector de la Ser i el grup Fmoc com a protector de la Thr. Els grups protectors Fmoc, Boc, ^tBu i l'enllaç peptidil-resina són estables en les condicions d'eliminació del grup Alloc, que s'elimina amb Pd. Aquest esquema comporta la síntesi prèvia en solució de l'aminoàcid protegit Alloc-Ser-OH (Figura 1.23).

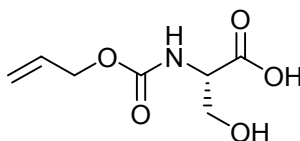


Figura 1.23 Alloc-Ser-OH

- Per triar l'ordre d'addició de la primera treonina i l'àcid gras es té en compte la possible síntesi de la sirengotoxina; la formació de l'enllaç èster abans de la incorporació de l'àcid gras hidroxilat permet que aquest no estigui protegit.
- Es fa una aproximació de la incorporació de la primera treonina en la seva forma desprotegida perquè en el cas del pèptid natural, aquest aminoàcid (H-CIThr-OH) s'hauria de sintetitzar en solució. D'aquesta manera, es reduiria el nombre d'etapes de la síntesi.
- La darrera Ser que s'incorpora, i que és l'encarregada de tancar el cicle, té la cadena lateral desprotegida. El motiu és minimitzar l'impediment estèric en la reacció de ciclació, suposant que la formació de l'enllaç amida és més favorable que l'enllaç èster en les condicions de ciclació (DIPCDI, HOBt, DIEA). A més a més, l'aminoàcid original en la sirengotoxina és H-D-Hse-OH i és assequible comercialment amb la cadena lateral i el grup amino desprotegits. Així, que de ser vàlida l'aproximació, es reduiria el nombre d'etapes en la síntesi en solució de l'aminoàcid (Fmoc-D-Hse-OH).
- La presència d'un residu d'Asp a la seqüència peptídica implica un risc de formació d'aspartimides. No es prenen mesures especials *a priori* a la espera dels resultats.

Els acoblaments es fan, de manera general, amb DIPCDI/HOBt, però hi ha la incorporació del didehidropèptid i la formació de l'enllaç èster que necessiten de condicions d'acoblament especials.

La incorporació de didehidropèptids sobre peptidil-resines ha estat optimitzada en el nostre grup d'investigació, trobant les condicions òptimes d'acoblament: DIPCDI/HOAt (1:1).⁵⁶ L'àcid carboxílic del residu deshidratat és menys reactiu que un aminoàcid proteïnogènic i necessita d'agents més reactius per acoblar-se a la peptidil-resina. El compost 7-aza-1-hidroxi-1H-benzotriazol-7-ol (HOAt) té un N en la posició 7 del sistema aromàtic (respecte el compost HOBt) que té dos efectes: estabilitzar el grup sortint i realitzar una catàlisi bàsica mitjançant un intermedi cíclic de set baules (Figura 1.24).⁵⁷

⁵⁶ Jose Carlos Jiménez, *Màster Experimental*, Universitat de Barcelona, 1999.

⁵⁷ Carpino, L.A., 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive, *J.Am.Chem.Soc.*, 1993, 115, 4397-4398.

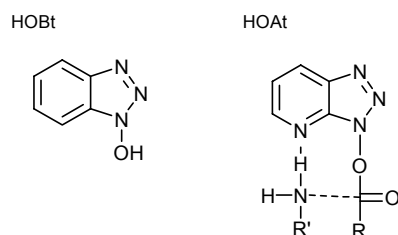


Figura 1.24 Estructura del HOBT i catalisi àcid-base del HOAt

En l'acoblament del didehidropèptid no hi ha perill d'epimerització; per això, el temps de reacció pot ser més llarg que en els acoblaments estàndards. Per a la formació de l'enllaç èster en la síntesi de depsipèptids s'empra DPCDI i DMAP (cat.), tal i com es troba descrit a la literatura.⁵⁸ La DMAP actua com a catalitzador i la DPCDI s'encarrega de formar l'anhidrid d'àcid necessari perquè pugui complexar-se amb la DMAP i reaccionar, així, amb l'alcohol.

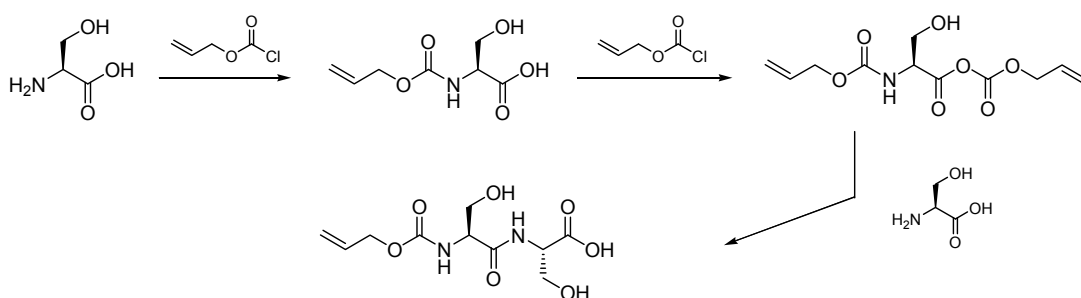
Resumint, s'utilitza un esquema que requereix la síntesi prèvia en solució del didehidropèptid Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH i de l'aminoàcid Alloc-Ser-OH. La síntesi del didehidropèptid ha estat resolta en l'anterior apartat.

1.4.2 SÍNTESI DE L'ALLOC-SER-OH

L'aminoàcid ocupa una posició clau dins la cadena peptídica: a través del grup amino s'enllaça amb l'àcid gras (MST), pel grup carboxil s'uneix a la cadena peptídica i amb el grup hidroxil permet l'elongació de la cadena mitjançant un enllaç èster amb el següent aminoàcid [Fmoc-Thr(^tBu)-OH]. Com ja s'ha comentat anteriorment, la Ser requereix d'un grup protector ortogonal al grup Fmoc que permeti solucionar aquest punt sintètic. La introducció de l'Alloc es fa mitjançant el seu cloroformat seguint l'esquema general de la incorporació dels grups protectors més habituals (Fmoc, Z, Boc, Trt, Bzl,...). Aquesta reacció, però, té com a possibles productes secundaris la formació de dipèptids i fins i tot tripèptids, subproductes que dificultarien la purificació del pèptid (Figura 1.25). Per tal d'evitar-ho, s'ha

⁵⁸ a) Kuisle, O.; Quiñoá, E.; Riguera, R., A general methodology for automated solid-phase synthesis of depsides and depsipeptides. preparation of a Valinomycin analogue, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 8063-8075. b) Latypov, S.K.; Seco, J.M.; Quiñoá, E.; Riguera, R., Are both the (R)- and the (S)-MPA èsters really needed for the assignment of the absolute configuration of secondary alcohols by NMR. The use of a single derivative, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 877-882. c) Hassner, A.; Alexanian, V., Synthetic methods. 12. Direct room temperature èsterification of carboxylic acids, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 46, 4475-4478.

descriu una protecció temporal prèvia amb TMS-Cl.⁵⁹ La facilitat d'incorporació del grup TMS en els aminoàcids i el tractament suau d'hidròlisi que requereix, el fa ser un grup idoni per a realitzar proteccions temporals. En la reacció de l'aminoàcid amb tres equivalents de TMS-Cl (un per cada grup funcional de la H-Ser-OH) s'obté el producte totalment protegit i, en el mateix medi de reacció, s'addiciona únicament 1 equivalent de cloroformiat d'al·lil, que serà atacat pel parell d'electrons lliures del grup amino. La hidròlisi dels altres dos grups protectors de TMS es fa mitjançant l'addició d'aigua durant el tractament posterior del cru de reacció.



1.4.3 PROVA DE SÍNTESI DE LA SEQÜÈNCIA {[MST-SER(&)-D-LYS(BOC)-GLY-OH] [FMOC-THR&]}

Abans d'iniciar la síntesi total de l'anàleg es realitza una prova de síntesi del primer fragment, que inclou l'enllaç èster entre la Ser i la Thr desprotegida, l'eliminació del grup Alloc i la incorporació de l'àcid mirístic. La prova té la finalitat d'estudiar aquesta zona i poder optimitzar el procés en la síntesi total. Se substitueix l'aminoàcid Fmoc-D-Dab(Boc)-OH de la seqüència de [MST, D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁸, Thr⁹] sirengotoxina per Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, més assequible econòmicament i ja vàlid per a realitzar aquesta prova.

Després de la incorporació del primer aminoàcid en defecte (0.7 mmol/g resina) s'aconsegueix una funcionalització inicial de la resina de 0.42 mmols/g resina. Per a fer la síntesi del pèptid se segueix el protocol general descrit (*Part Experimental*, 1.5). En els acoblaments dels aminoàcids s'utilitzen Fmoc-AA-OH (5 eq), i DIPCDI (5 eq) i HOBt (5 eq) com a agents d'acoblament.

⁵⁹ Bolin, D.R.; Sytwu, I.; Humiec, F.; Meienhofer, J., Preparation of oligomer-free N α -Fmoc and N α -urethane amino acids, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1989**, 33, 353-359.

Per a la incorporació de la Fmoc-D-Lys(Boc)-OH cal un reacoblament de 5 eq d'aminoàcid i de cada un dels reactius; per l'acoblament total de l'Alloc-Ser-OH es fa un primer acoblament de 3 eq, un reacoblament de 3 eq i un segon reacoblament de 3 eq més, però aquest darrer es fa de 30 min amb TBTU (3 eq) i DIEA (6 eq) com a agents d'acoblament més actius.

1.4.3.1 Formació de l'enllaç èster

La incorporació de la Fmoc-Thr-OH mitjançant la formació d'un enllaç èster es fa amb dos tractaments consecutius de Fmoc-Thr-OH/DMAP/DIPCDI (1:0.1:1), 25 °C, 30 min. Després de cada acoblament es pren una alíquota de la peptidil-resina, s'escindeix amb un 1 % de TFA en DCM i s'analitza per HPLC i MALDI-TOF. Les anàlisis per HPLC mostren uns crús molt bruts, sense presència de producte majoritari. Per MALDI-TOF s'obtenen les masses del tripèptid Alloc-Ser-D-Lys(Boc)-Gly-OH, de la incorporació de treonina i la massa del tetrapèptid més una sobreincorporació de Fmoc-treonina. L'AAA es determina una funcionalització de 0.16 mmol/g resina. En aquest punt es decideix interrompre la síntesi.

D'aquesta prova se'n fan les següents observacions:

- La pèrdua de funcionalització pot ser deguda a la formació de DKPs. Tot i ser una reacció desfavorida per la utilització de la resina CTC-PS, el temps que la peptidil-resina està a nivell de dipèptid és força elevat, degut al tractament llarg d'eliminació del grup Fmoc del segon aminoàcid i a la necessitat de fer dos reacoblaments del tercer.
- La incorporació de la treonina a la peptidil-resina en la forma desprotegida implica una sobreincorporació d'aquesta.
- La formació de l'enllaç èster és difícil i el procés que se segueix per a controlar la reacció no és ràpid ni gaire efectiu.

Així, abans d'iniciar la síntesi total del pèptid, es plantegen les següents modificacions de l'estratègia:

- Eliminació del grup amino terminal (Fmoc) del segon aminoàcid [Fmoc-D-Dab(Boc)-OH] amb DMF-piperidina-DBU-Toluè (70:5:5:20), que requereix d'un tractament més curt (11 min). En l'acoblament de l'Alloc-Ser-OH, ús de TBTU, agent d'acoblament més actiu.
- Incorporació de la treonina en la seva forma protegida [Fmoc-Thr(^tBu)-OH] per evitar una deleció d'aquesta.
- Realització del test d'alcohols en resina com a control de la incorporació de la treonina.

1.4.4 SÍNTESI DE [MST, D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁸, Thr⁹] SIRENGOTOXINA

1.4.4.1 Síntesi de la cadena lineal protegida sobre suport polimèric

Es parteix de la resina CTC-PS (150 mg, f = 1.5 mmol/g resina). S'aconsegueix una funcionalització inicial de la resina de 0.59 mmol/g per la introducció en defecte del primer aminoàcid (0.7 mmol/g resina). L'elongació de la peptidil-resina és difícil, ja que cada component necessita de reacoblaments. L'eliminació del grup Fmoc del segon aminoàcid amb DMF–piperidina–DBU–Toluè (70:5:5:20) i la incorporació de l'Alloc-Ser-OH amb TBTU i DIEA permet reduir el temps en què la resina es troba a nivell de dipèptid, evitant la formació de DKPs. El rendiment de la síntesi és del 55 %, calculat a partir de la funcionalització final teòrica i la obtinguda per AAA corregida amb el pes molecular del pèptid. L'AAA indica un excés en el contingut de Gly. El baix rendiment de la síntesi i l'excés de Gly, pot indicar l'eliminació del grup Fmoc durant la reacció d'eliminació del grup Alloc⁶⁰ i conseqüent incorporació del MST sobre la treonina en el següent acoblament, quedant la peptidil-resina bloquejada amb una disminució de la funcionalització i augment de proporció de Gly, únic residu fiable en l'AAA del diàcid format no detectat per EM. Aquest problemes es podria solucionar introduint la Ser protegida amb el grup Fmoc, la Thr(^tBu) amb el grup Alloc i mantenint la seqüència d'etapes.

1.4.4.1.1 Escissió del pèptid de la resina

La resina CTC-PS permet fer l'escissió del pèptid mantenint els grups protectors de les cadenes laterals. S'obtenen 55.7 mg de pèptid i per HPLC s'observa un producte majoritari a 27.8 min (grad 8:2 a 0:10 en 30 min) amb una puresa del 61 % (Figura 1.26. a). Per MALDI-TOF es comprova que el pic majoritari es correspon al nostre pèptid. S'obté un rendiment d'escissió del 80 % (determinat per AAA).

1.4.4.1.2 Ciclació de la cadena protegida

L'etapa de ciclació és clau en la síntesi d'aquest tipus de pèptids i depèn de molts factors. És per això que no hi ha unes condicions estàndards per dur a terme aquesta reacció, i s'opta per l'ús *a priori* de les mateixes condicions emprades en les reaccions d'acoblament en fase sòlida (DIPCDI 4 eq, HOBt 4 eq) i afegir-hi DIEA (4 eq) per tal de neutralitzar possibles restes de TFA i impedir així la trifluoroacetilació del pèptid. La dilució és un dels factors més importants i estudiats en les reaccions de

⁶⁰ Farrera-Sinfreu, J.; Royo, M.; Albericio, F., Undesired removal of the Fmoc group by the free ε-amino function of a lysine residue, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 7813-7815.

ciclació. Es fa servir una concentració de 1 mM que és la determinada com a òptima en la bibliografia.⁶¹ La ciclació es completa en 1 h i 30 min. Per HPLC s'obté un pic majoritari a 23.3 min (grad 65:35 a 0:100 en 30 min) i 44 % de puresa (Figura 1.26.b). Per MALDI-TOF es comprova que el pic majoritari es correspon amb el producte i per IR es determina que la ciclació s'ha fet mitjançant un enllaç amida.

1.4.4.1.3 Eliminació dels grups protectors

L'eliminació de tots els grups protectors del pèptid (tBu, Boc) es fa amb una solució del 95 % de TFA en aigua durant 1 h i 30 min. S'elimina el TFA a pressió reduïda i es liofilitza el pèptid. Per HPLC s'obté un pic majoritari a 12.8 min (grad 7:3 a 0:10 en 30 min) i 43 % de puresa (Figura 1.26.c), que per MALDI-TOF es correspon amb la massa de [MST, D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁸, Thr⁹] sirengotoxina. No s'observen indicis de formació d'aspartimides.

El pèptid presenta poca solubilitat en els dissolvents emprats normalment en les purificacions fetes amb el sistema HPLC-semipreparatiu de fase reversa. Les diferents proves de solubilitat realitzades es presenten a la taula següent (Taula 1.3). Els dissolvents estan triats en funció de la seva compatibilitat amb el sistema de purificació. Totes les proves s'han fet amb un tractament previ amb TFA durant 5 min i evaporació amb nitrogen, per tal d'eliminar qualsevol forma d'agregació inicial i, posteriorment, s'ha intentat solubilitzar la mostra amb 5 mL de la mescla de dissolvents corresponent.

Dissolvents	Solubilitat	Precipitat
H ₂ O (0.1 % TFA) MeCN (0.1 % TFA) (0:1) → (1:1)	No	Filamentós
H ₂ O (0.1 % TFA)/MeCN (0.1 % TFA) (0:1) → (1:1)+ 500µL DMF	No	Filamentós
AcOH Glacial	No	Filamentós
DMF	No	Filamentós
solució sat. Guanidina en AcOH 10 %	No	Filamentós
H ₂ O (0.1 % TFA)/MeCN (0.1 % TFA) (1:0) → (7:3)	No	Suspensió
H ₂ O (0.1 % TFA)/ MeCN (0.1% TFA) (1:0) → (7:3) + 500 µL AcOH 10 %	No	Suspensió
H ₂ O (0.1 % TFA) /MeCN (0.1% TFA) (1:0) → (7:3) + 500 µL DMSO	No	Suspensió
AcOH 10 %	No	Suspensió
AcOH 10 % /MeOH (1:1)	No	Suspensió
THF	No	Filamentós
TFA	Sí	

Taula 1.3 Condicions provades per a la solubilització del pèptid final

⁶¹ Illuminati, G.; Mandolini, L., Ring closure reactions of bifunctional chain molecules, *Acc. Chem. Res.*, **1981**, *14*(4), 95-102.

El fet que el pèptid no sigui soluble ni en dissolvents aquosos ni en dissolvents orgànics, pot respondre al seu caràcter amfipàtic: un cicle de nou residus, set dels quals tenen cadenes laterals polars (D-Dab, Orn, Asp, dues Ser i dues Thr) i una cadena alifàtica de catorze àtoms de carboni (MST). El pèptid natural també presenta una solubilitat especial: per una banda és capaç de solubilitzar-se en un medi alifàtic (membrana lipídica) formant agregats de 6 monòmers (canal de ions), i per altra banda se solubilitza en solució adoptant una conformació especial com de pilota de tennis, encarant els enllaços carbonil i els grups polars de les cadenes laterals cap enfora, quedant estabilitzada per dos ponts d'hidrogen intramoleculars que a més estan protegits dels dissolvents aquosos per la cadena alifàtica.⁶² S'ha determinat per a la sirengotoxina una concentració miscel·lar crítica de 1.25 mg/mL.⁶³

Degut a la impossibilitat de poder dissoldre la mostra, s'opta per fer la ciclació d'una alíquota del pèptid lineal protegit i purificar-lo abans de la desprotecció total, quan el pèptid presenta caràcter únicament alifàtic. Posteriorment es realitza la desprotecció total de les cadenes laterals.

1.4.4.1.4 Purificació del pèptid cíclic protegit

El pèptid cíclic protegit és soluble en una mescla d'H₂O–MeCN (2:3) i es purifica amb el sistema de HPLC-semipreparatiu. S'obté el producte amb una puresa del 70 % (Figura 1.29, d).

1.4.4.1.5 Eliminació dels grups protectors

Es realitza la desprotecció del pèptid de la mateixa forma que en el cas anterior (95 % de TFA en aigua, 25 °C, 1 h i 30 min) i la reacció és quantitativa. Es dissol una petita alíquota del producte final en una solució aquosa d'AcOH al 10 %, s'analitza per HPLC i per AAA, i es realitza una quantificació aproximada.

⁶² Ballio, A.; Collina, A.; Di Nola, A.; Manetti, C.; Paci, M.; Segre, A., Determination of structure and conformation in solution of syringotoxin, a lipodepsipeptide from *Pseudomonas Syringae* pv. *Syringae* by 2D NMR and molecular dynamics, *Stru. Chem.*, **1999**, 5, 43-50.

⁶³ Hutchison, M.L.; Tester, M.A.; Gross, D.C., Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction, *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **1995**, 8, 610-620.

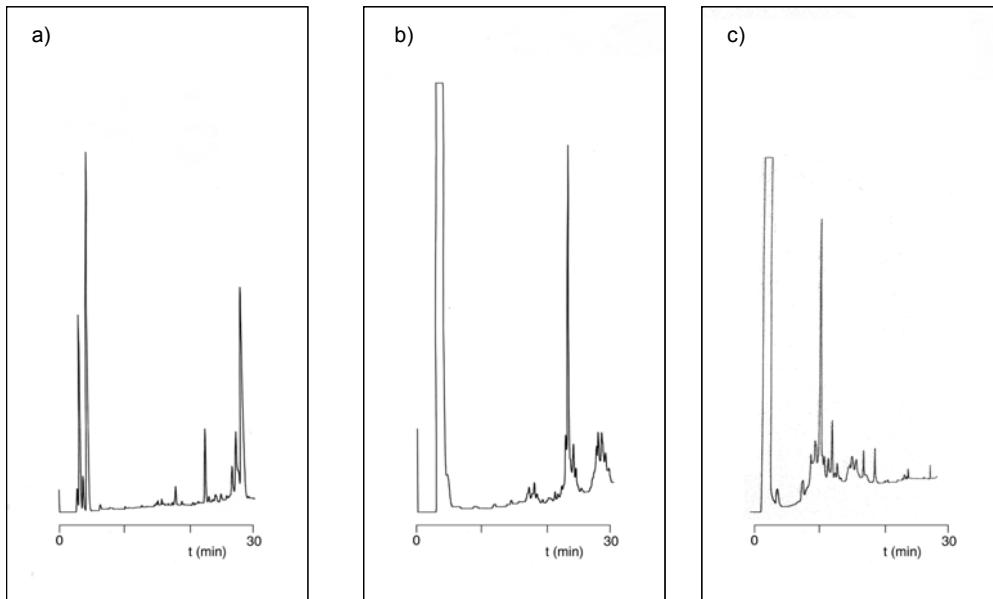
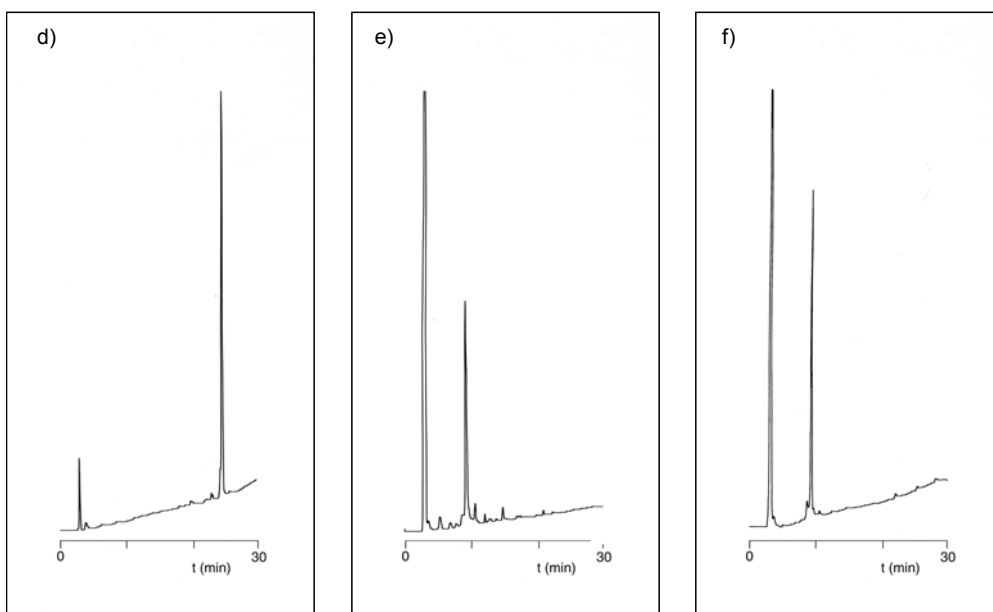


Figura 1.26 Anàlisi per HPLC de a) cru del lipodepsipèptid lineal protegit. Condicions: C₁₈, gradient lineal de 8:2 a 0:10 en 30 min. b) cru de la reacció de ciclació del lipodepsipèptid lineal protegit; condicions: C₄, gradient lineal de 65:35 a 0:100 en 30 min. c) cru de la reacció de desprotecció del lipodepsipèptid cíclic protegit, d) lipodepsipèptid cíclic protegit purificat; e) cru de la reacció de desprotecció del lipodepsipèptid cíclic; f) lipodepsipèptid cíclic final. Condicions HPLC: gradient de 7:3 a 0:10 en 30 min per a-c i de 65:35 a 0:100 en 30 min per d-f (H₂O amb 0.045 % de TFA : MeCN amb 0.036 % de TFA)



S'obtenen 2 mg de pèptid amb una puresa del 90 % (Figura 1.29, e i Figura 1.29, f) i amb un rendiment global de síntesi del 3 %. Així, s'aconsegueix el pèptid [MST, D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁸, Thr⁹] sirengotoxina pur, tot i no ser totalment soluble.

1.5 ACTIVITAT COM ANTI-LEISHMANIA

S'avalua l'activitat anti-Leishmania del pèptid final front el promastigot *Leishmania donovani*. Per determinar l'activitat es mesura l'activitat de la deshidrogenasa mitocondrial, capaç de reduir un substrat addicionat prèviament al medi en un producte insoluble i detectable per ultraviolat. Els assaigs biològics són realitzats pel grup del Dr. Luis Rivas del Centro de Investigaciones Biològicas (CSIC-Madrid).

El liponadepsipèptid sintètic mostra només una lleugera activitat leishmanicida. El valor de la dosi letal 50 (LD₅₀), que és la concentració que redueix al 50 % la proliferació del paràsit (95 % interval de confiança), per el pèptid natural sintètic és de 3.9 (14.8–3.1) μ M i augmenta fins a 19.4 (51.2–0.13) μ M en el compost sintètic. L'estudi de la mostra pel microscòpic òptic a una concentració de 25 μ M, primer mostra els paràsits inflats i després d'una hora mostra la seva lisi, comportament que revela un efecte de xoc osmòtic similar al descrit per a la sirengotoxina.

El descens de l'activitat Leishmanicida respecte el pèptid natural es pot explicar per aproximacions no excloents. La primera, és que degut a les condicions àcides fortes emprades en la desprotecció del pèptid es poden formar agregats, una possibilitat que és consistent amb la poca solubilitat que presenta el producte sintètic en el medi aquós. El tractament àcid sofert pel producte pot dificultar la formació dels agregats amb una estequiometria òptima per a la seva intrusió a la membrana del paràsit. En qualsevol cas, el resultat deriva cap a una reducció de la concentració efectiva del compost.

La segona aproximació està relacionada amb les modificacions introduïdes a l'estructura del pèptid natural. La inclusió de l'aminoàcid natural L-treonina en comptes de l'anàleg 4-clorat pot ser parcialment responsable de la pèrdua d'activitat. No hi ha una explicació general clara sobre el paper dels ions clorur en els pèptids bioactius. Els àtoms de clor augmentarien la hidrofobicitat de l'estructura i, conseqüentment, la seva habilitat per introduir-se a les membranes. Per altra banda, al ser àtoms voluminosos, podrien imposar restriccions estèriques que afectarien la població de molècules en la conformació activa. S'ha fet créixer la *Pseudomonas Sy. Sy.* en un cultiu absent de clor i s'ha obtingut el

compost desclorosirengotoxina. Aquest anàleg redueix tres vegades l'activitat antifúngica respecte el pèptid natural.⁶⁴

La substitució de l'àcid 3-hidroximirístic per la cadena alifàtica no sembla que afecti en gran mesura la hidrofobicitat o l'amfipacitat global del compost. L'acilació dels àcids grassos comporta, sovint, un augment de la seva activitat antibiòtica.^{65,66} Les diferències d'activitats leishmanicides són menys pronunciades per a les cadenes de més de 12 C.⁶⁵ Tot i així, el grup hidroxil és comú a tots els pèptids de la família de la sirengotoxina a diferència de la llargària de la cadena alifàtica. Fet que indica que segurament té un paper específic independentment de la variació dels paràmetres fisico-químics.

A priori, no es pensaria que la substitució dels aminoàcids D-Hse i L-*allo*Thr pels proteionogènics D-Ser i L-Thr fos significativa si l'activitat antileishmania es degué a la pertorbació de la membrana. L'activitat antifúngica del pèptid Sirengomicina (pèptid molt similar a la sirengotoxina) necessita d'ergosterol i d'esfingolípids amb cadenes llargues d'àcids grassos α -hidroxilades a les membranes dels organismes hostes.⁶⁷ Actualment no està clar si els lipodepsipèptids actuen per alteració de les propietats físiques de la membrana o per interaccions específiques amb determinants components de la membrana. Si la segona hipòtesi és certa, a l'anàleg sintetitzat li mancarien trets de reconeixement necessaris per a la seva interacció. A més, tot i que l'estructura cíclica amb l'àcid gras a l'extrem *N*-terminal podria relentir l'activitat degradativa de les exonucleasas,⁶⁸ la inserció d'aminoàcids proteionogènics podria debilitar l'estructura del depsipèptid i fer-lo més vulnerable a la degradació de les endopeptidasas. Una de les proteïnes més abundants en la membrana plasmàtica del promastigot *Leishmania* és la leishmaniolisin,⁶⁹ una endopeptidasa amb un ampli espectre de especificitat de substrat que podria degradar l'activitat de la sirengotoxina i de l'anàleg sintètic.

⁶⁴ Grgurina, I.; Barca, S.; Cervingj, M.; Gallo, M.; Scaloni, A.; Pucci, P., Relevance of chlorine-substituent for the antifungal activity of syringomycin and syringotoxin, metabolites of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, *Experientia*, **1994**, *50*, 130-133.

⁶⁵ Chicharro, C.; Granata, C.; Lozano, R.; Andreu, D.; Rivas, L., *N*-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, *45*, 2441-2449.

⁶⁶ Wakabayashi, H.; Matsumoto, H.; Hashimoto, K.; Teraguchi, S.; Takase, M.; Hayasawa, H., *N*-Acylation and D enantiomer derivatives of a nonamer core peptide of lactoferricin B showing improved antimicrobial activity, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, *43*, 1267-1269.

⁶⁷ a) Hemmi, K.; Julmanop, C.; Hirata, D.; Tsuchiva, E.; Takemoto, J. Y.; Miyakawa, T., The physiological roles of membrane ergosterol as revealed by the phenotypes of *syr1/erg3* null mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1995**, *159*, 482-486. b) Hama, H.; Young, D. A.; Radding, J. A.; Ma, D.; Tang, J.; Stock, S. D.; Takemoto, J. Y., Requirement of sphingolipid α -hydroxylation for fungicidal action of syringomycin E, *FEBS Lett.*, **2000**, *478*, 26-28.

⁶⁸ Trabi, M.; Craik, D. J., Circular proteins-no end in sight, *Trends. Biochem. Sci.*, **2002**, *27*, 132-138.

⁶⁹ Ilgoutz, S. C.; Mcconville, M. J., Function and assembly of the *Leishmania* surface coat, *Int. J. Parasitol.*, **2001**, *31*, 899-908.

El treball presentat en aquest capítol s'ha publicat en dos articles (veure annex 4).

- **Bayó, N.**; Jiménez, J.C.; Nicolás, E.; Albericio, F., Solid-Phase Synthesis of the Cyclic [N-Mst(Ser¹), D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁸] Syringotoxin, *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 1096-1103.
- Jiménez, J. C.; **Bayó, N.**; Chavarría, B.; López-Macià, A.; Royo, M.; Nicolás, E.; Giralt, E.; Albericio, F., Synthesis of Peptides Containing α,β -Didehydroamino Acids. Scope and Limitations, *LIPS*, **2002**, 9, 135-141.

