

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

<b>Abreviacions</b>	
<b>INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS</b>	<b>5</b>
<b>RESULTATS I DISCUSSIÓ</b>	
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
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>279</b>
<b>PART EXPERIMENTAL</b>	<b>287</b>
<b>Annex 1.</b> Taules d'aminoàcids, reactius i grups protectors emprats	
<b>Annex 2.</b> Nomenclatura abreviada per pèptids cíclics, ramificats, homo- o heterodètics	
<b>Annex 3.</b> Espectres de RMN del didehidropèptid Fmoc-Thr('Bu)-(Z)-Dhb-OH	
<b>Annex 4.</b> Articles publicats i acceptats	





## ABREVIACIONS

---

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

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

<b>OMS</b>	Organització Mundial de la Salut
<b>oNBS</b>	o-Nitrobenzenesulfonyl
<b>OSu</b>	Èster de <i>N</i> -hidroxisuccinimida
<b>PDA</b>	Fotodiode array
<b>Pip</b>	piperidina
<b><i>p</i>NZ</b>	<i>p</i> -Nitrobenziloicarbonil
<b><i>p</i>NZ-Cl</b>	Cloroformiat de <i>p</i> -nitrobenzil
<b>PPh<sub>3</sub></b>	Trifenilfosfina
<b>ppm</b>	Parts per milió
<b>PS</b>	Poliestirè
<b>PTSA</b>	Àcid <i>p</i> -toluensulfònic
<b>PyOAP</b>	Hexafluorofosfat de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidin)fosfoni
<b>QNA</b>	Àcid quinàldic
<b>QXA</b>	Àcid 2-quinoxalinecarboxilic
<b>R<sub>f</sub></b>	Factor de retenció a la cromatografia de capa fina
<b>s</b>	Singulet
<b>Scm-Cl</b>	Clorur de metoxicarbonilsulfenil
<b><sup>t</sup>Bu</b>	<i>tert</i> -Butil
<b>TBAF</b>	Fluorur de <i>n</i> -butilamoni
<b>TBDMS</b>	<i>tert</i> -Butildimetilsilil
<b>TBME</b>	<i>tert</i> -Butilmetilèter
<b>TBTU</b>	Tetrafluoroborat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(1 <i>h</i> -benzotriazol-1-il)-dimetilaminometilen]- <i>N</i> -metilmetanamini
<b>Tce</b>	Èster de 2,2,2-tricloroetanol
<b>TFA</b>	Àcid trifluoroacètic
<b>THF</b>	Tetrahidrofurà
<b>TES</b>	Trietilsilà
<b>TGI</b>	Concentració de mostra que causa la inhibició total del creixement
<b>TIS</b>	Triisopropilsilà
<b>TMS</b>	Trimetilsilil
<b>TMS-Cl</b>	Clorur de trimetilsilil
<b>t<sub>R</sub></b>	Temps de retenció
<b>Troc</b>	2,2,2-tricloroetoxicarbonil
<b>Troc-Cl</b>	Cloroformiat de 2,2,2-tricloroetil
<b>Trt</b>	Tritil
<b>Trt-Cl</b>	Clorur de tritil
<b>Ts</b>	Tosil
<b>UV</b>	Ultraviolat
<b>Z</b>	Benziloxicarbonil
<b>&amp;</b>	Enllaç





## Capítol 2

Síntesi de l'azatiocoralina,  
un pèptid bicíclic i simètric,  
anàleg de la tiocoralina

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

---



<b>2.1</b>	<b>LA TIOCORALINA, UN NOU DEPSIPÈPTID BICÍCLIC MARÍ AMB ACTIVITAT ANTITUMORAL</b>	<b>83</b>
2.1.1	Aïllament i caracterització de la tiocoralina	85
2.1.2	Activitat antitumoral de la tiocoralina com a bisintercalador del DNA	88
2.1.3	Biosíntesi de la tiocoralina	91
2.1.4	Antecedents sintètics	93
2.1.5	De producte natural a fàrmac antitumoral	97
<b>2.2</b>	<b>DESENVOLUPAMENT DE LA SÍNTESI EN FASE SÒLIDA DE L'AZATIORALINA</b>	<b>99</b>
2.2.1	Consideracions generals prèvies al disseny de l'estratègia de síntesi	100
2.2.2	Disseny de l'estratègia de síntesi de l'azatiocoralina	103
2.2.3	Obtenció del monòmer tetrapeptídic d'azatiocoralina en fase sòlida	111
2.2.4	Obtenció de la cadena peptídica lineal d'azatiocoralina en fase sòlida. Acoblament de fragments front elongació seqüencial	116
2.2.5	Primera ciclació: formació del pont disulfur. Solució front fase sòlida	119
2.2.6	Segona ciclació: obtenció del producte bicíclic. Ús de les carbodiimides	122
2.2.7	Incorporació dels heterocicles intercaladors. Obtenció de l'azatiocoralina i derivats	125
2.2.8	La síntesi en fase sòlida de l'azatiocoralina	131
<b>2.3</b>	<b>DUES CICLACIONS EN FASE SÒLIDA. SÍNTESI ALTERNATIVA PER A L'AZATIORALINA</b>	<b>132</b>
2.3.1	Plantejament de la nova estratègia de síntesi	132
2.3.2	Definició de l'estratègia de síntesi	134
2.3.3	Desenvolupament de l'estratègia de síntesi	135
<b>2.4</b>	<b>L'AZATIORALINA I ELS DERIVATS OBTINGUTS SÓN POSSIBLES CANDIDATS A FÀRMACS ANTITUMORALS?</b>	<b>137</b>
<b>2.5</b>	<b>OBTENCIÓ DELS AMINOÀCIDS FMOC-NME-CYS(ME)-OH I FMOC-NME-CYS(ACM)-OH</b>	<b>142</b>
2.5.1	Obtenció de <i>N</i> -metil aminoàcids	142
2.5.2	Derivatització dels grups tiol de la H <sub>N</sub> Me-Cys-OH	150
2.5.3	Protecció d'amines secundàries amb el grup Fmoc	150





## 2.1 LA TIOCORALINA, UN NOU DEPSIPÈPTID BICÍCLIC MARÍ AMB ACTIVITAT ANTITUMORAL

L'any 1997 Pérez Baz i col. de l'Institut BioMar de Lleó van aïllar i caracteritzar un depsi(tio)pèptid bicíclic bioactiu, la tiocoralina, (Figura 2.1) extret d'una actinomiceta marina.<sup>70,71</sup> El nou compost es va obtenir del creixement per fermentació del microorganisme L-13-ACM2-092 del gènere de les *micromonospora marina*, que va ser col·lectat del corall tou a les costes de Moçambic.

El nou pèptid va atreure ràpidament l'atenció de grups científics degut a la seva complexa estructura bicíclica, simètrica i rica en cisteïnes i, especialment, a l'elevada activitat antiproliferativa que va presentar en diverses línies cel·lulars tumorals i a l'activitat antibiòtica contra bacteris Gram Positiu.

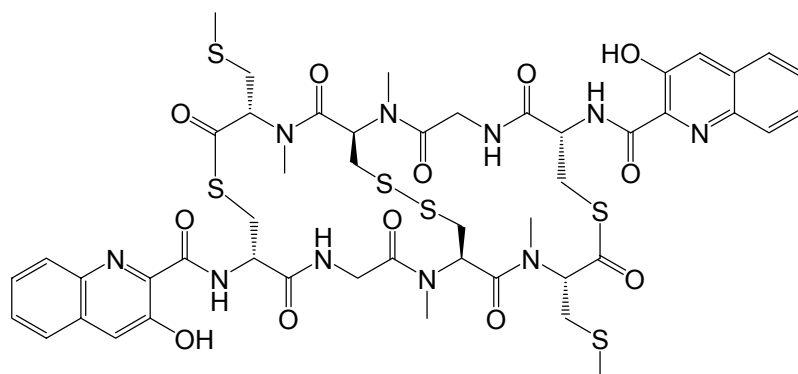


Figura 2.1 Estructura de la tiocoralina

<sup>70</sup> Romero, F.; Espliego, F.; Pérez Baz, J.; García de Quesada, T.; Grávalos, D.; De la Calle, F.; Fernández-Puentes, J. L., Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities, *J. Antibiotics*, **1997**, *50*, 734-737.

<sup>71</sup> Pérez Baz, J.; Cañedo, L. M.; Fernández Puentes, J. L., Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. II. Physico-chemical properties and structure determination, *J. Antibiotics*, **1997**, *50*, 738-741.

La tiocoralina pertany a una família de pèptids d'origen marí coneguda per la seva activitat antibiòtica i capacitat d'intercalar-se en el DNA (Figura 2.2). A finals dels anys 50 es va aïllar el primer depsipèptid bicíclic d'aquesta família, l'equinomycin.<sup>72</sup> Poc després es va aïllar el triostin A, al 1961.<sup>73</sup> Tres dècades més tard va aparèixer a la bibliografia l'aïllament i caracterització del BE-22179;<sup>74</sup> seguidament de la tiocoralina, l'objectiu de la present tesi. Després, es van aïllar altres depsipèptids cíclics també relacionats però de talla més gran: el sandramicin, els luzopeptins A-C i els quinoxapeptins A-C. Tots ells tenen en comú una estructura cíclica de simetria elevada, la presència d'heterocicles intercaladors del DNA, una elevada composició d'aminoàcids *N*-metilats, i un enllaç no peptídic a la cadena amb un residu de configuració D (D-Ser o D-Cys). La tiocoralina i el BE-22179 són els únics que tenen un enllaç tioèster a la cadena peptídica.

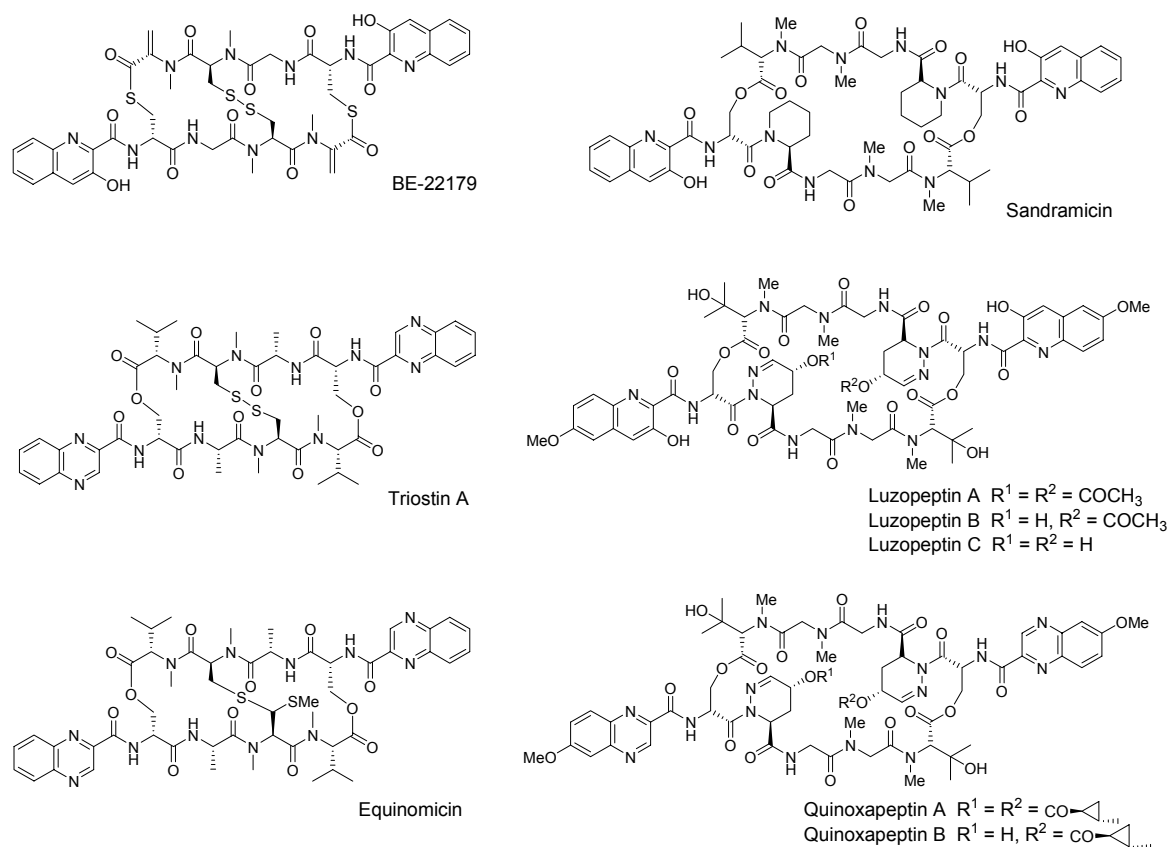


Figura 2.2 Família de depsipèptids cíclics bisintercaladors del DNA

<sup>72</sup> Ishihara, S.; Utahara, R.; Suzuki, M.; Okami, Y.; Umezawa, H., Studies on actinoleukin; relation to echinomycin and levomycin, *J. Antibiotics.*, **1958**, *11*, 160-161.

<sup>73</sup> Shoji, J.; Katagiri, K., Quinoxaline antibiotics. III. New antibiotics, triostins A, B, C., *J. Antibiotics*, **1961**, *14*, 335- 339.

<sup>74</sup> Okada, H.; Suzuki, H.; Yoshinari, T.; Arakawa, H.; Okura, A.; Suda, H., A new topoisomerase II inhibitor, BE-22179, produced by a streptomycete. I. Producing strain, fermentation, isolation and biological activity, *J. Antibiotics*, **1994**, *47*, 129-35.

L'existència d'aquesta família de pèptids permet obtenir un coneixement més ampli sobre les possibilitats de síntesi de la tiocoralina i anàlegs, així com del seu mecanisme d'acció, processos d'obtenció i tècniques d'anàlisi.

### 2.1.1 AÏLLAMENT I CARACTERITZACIÓ DE LA TIOCORALINA

Com ja s'ha comentat, la tiocoralina s'obté per un procés de creixement fermentatiu del microorganisme marí L-13-ACM2-092 seguit d'un esquema d'aïllament<sup>70</sup>, tal i com es troba descrit a la següent figura (Figura 2.3). El diagrama de flux es basa en una primera filtració amb terres de diatomea, extraccions amb AcOEt, dues separacions per cromatografia en columna; una primera de fase normal amb gel de sílice i una segona de fase reversa amb rebliment *prepex* C<sub>18</sub>, i una última purificació per cromatografia en capa fina preparativa. S'obtenen 40 mg de tiocoralina per 4.5 L de cultiu tractat. El procés de fermentació del microorganisme permet obtenir suficient quantitat de tiocoralina per poder realitzar els primers estudis d'estructura i d'activitat.

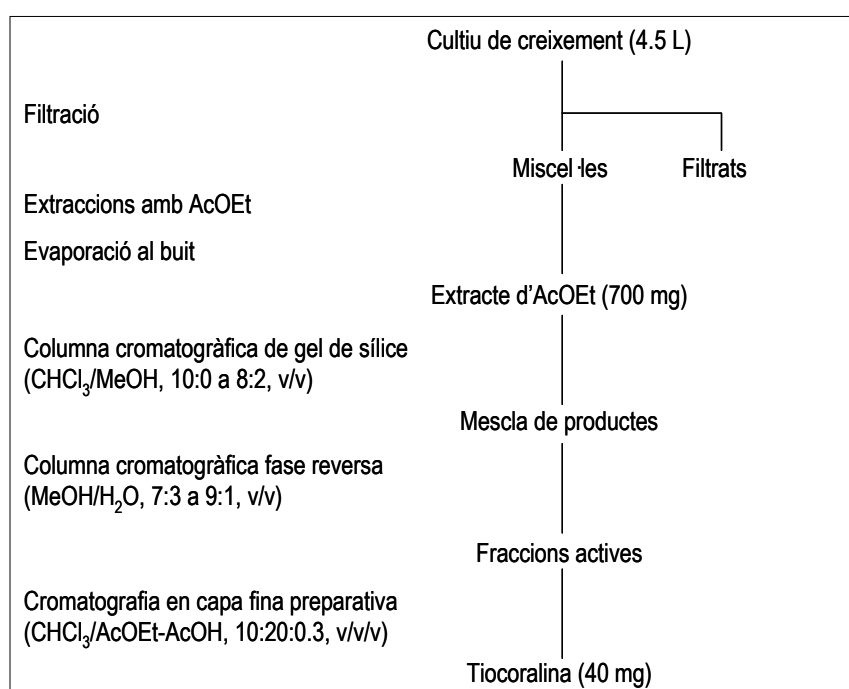
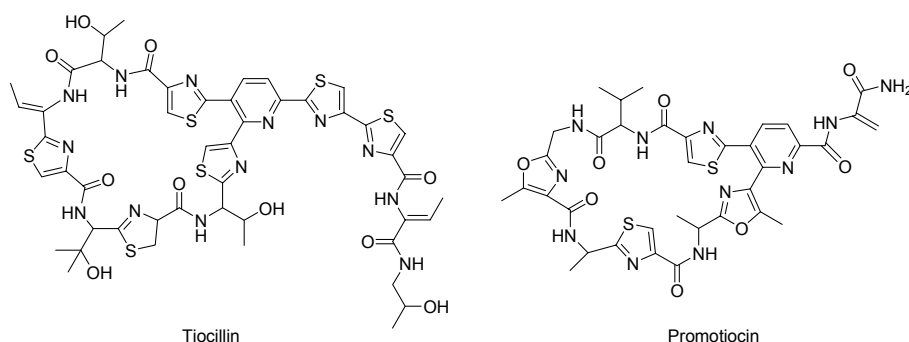


Figura 2.3 Procés d'aïllament per la tiocoralina seguit per Romero i col.<sup>70</sup>







**Figura 2.6** Exemples de pèptids naturals que contenen tiazols

Des del punt de vista sintètic, l'estructura de la tiocoralina és un repte. En un primer anàlisi, la simetria de la molècula ens transmet un cert grau de senzillesa, tot i l'estructura bicíclica i el pont disulfur que divideix la molècula per parts iguals; en un segon anàlisi, més acurat, se'ns revela la presència d'un alt contingut de residus derivats de la cisteïna, un aminoàcid amb una reactivitat especial, així com l'alt contingut de residus *N*-metil, coneguts en la síntesi de pèptids pel tractament especial que requereixen. La presència de l'heterocicle intercalador amb el grup hidroxil li addiciona, a la seva síntesi, un nou grau de dificultat. I és en el darrer anàlisi, quan al recórrer la cadena peptídica, ens adonem de la presència de dos enllaços tioèster responsables d'unir les dues cadenes peptídiques antiparal·leles. La tiocoralina, doncs, és en sí mateixa un repte sintètic en el que cal resoldre, per una banda, l'obtenció dels elements no assequibles comercialment (els residus no proteïnogènics i l'heterocicle intercalador) i, per altra banda, resoldre la complexitat estructural mitjançant el disseny d'una bona estratègia de síntesi.

### 2.1.2 ACTIVITAT ANTITUMORAL DE LA TIOCORALINA COM A BISINTERCALADOR DEL DNA

La tiocoralina inhibeix el cicle cel·lular a una concentració de  $IC_{50}$  15 nM. Estudis realitzats *in vitro* a l'Institut Nacional del Càncer (NCI, EEUU) demostren que la tiocoralina presenta activitat antiproliferativa contra tumors humans de fetge, còlon, pulmó, ronyó i varis tipus de melanoma. La tiocoralina també ha mostrat ser, *in vivo*, un agent efectiu antitumoral contra el carcinoma humà. El triostin A, l'equinomycin i el BE-22179 tenen capacitat d'inhibir l'enzim topoisomerasa II. En canvi, la diana terapèutica de la

tiocoralina és l'enzim DNA polimerasa- $\alpha$ .<sup>78</sup> En l'etapa de replicació del DNA (fase S del cicle cel·lular) es forma un complex ternari DNA–tiocoralina–polimerasa- $\alpha$  que inhibeix l'activitat de l'enzim i evita l'elongació de la cadena de DNA i, per tant, la cèl·lula no es pot dividir. La unió de la tiocoralina al DNA no és una unió inespecífica i pot estar relacionada amb la proteïna p53.<sup>78</sup>

La complexa estructura peptídica i, especialment, la presència dels dos heterocicles donen a la tiocoralina la propietat d'interaccionar amb el DNA. Així, mentre els dos heterocicles són els responsables d'establir les interaccions d'apilament amb les bases nitrogenades de la cadena de desoxiribonucleobases, l'estructura peptídica actua de bastida, necessària per aconseguir la correcta orientació dels heterocicles i donar rigidesa i estabilitat a la molècula. La presència dels *N*-metil aminoàcids a la cadena peptídica inhibeix la formació de ponts d'hidrògen intramoleculars de tipus full- $\beta$  i així el pèptid s'uneix amb ponts d'hidrogen a les bases del DNA.<sup>79</sup> Per el cas del pèptid triostin A s'ha descrit que l'eliminació dels grups *N*-metils implica un canvi en els ponts d'hidrogen establerts entre el pèptid i el DNA que passen de tipus Watson i Crick al tipus Hoogsteen, i l'especificitat de bases varia de GC a AT.

La simetria de la tiocoralina no és sorprenent tenint en compte la seva diana terapèutica. S'han descrit treballs on es remarca la importància de la simetria per aquells compostos que reconeixen seqüències del DNA: repressors, enzims de restricció, factors de transcripció i se suggereix que pot ser una qualitat rellevant per aquell compost que hagi d'interaccionar amb el DNA.<sup>80,81</sup>

A finals de l'any 2005, l'empresa Pharma Mar S.A., obtingué l'estructura cristal·lina de la tiocoralina en presència d'una cadena de DNA. L'estructura resolta mostra una unió perfecta tiocoralina-DNA en forma de "grapa" amb els grups intercaladors insertats de forma plana entre les nucleobases de la cadena, fet que reafirmà el mode d'interacció de la tiocoralina amb el DNA.

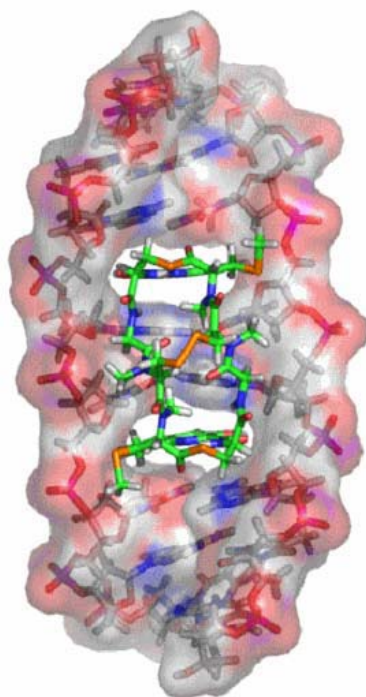
---

<sup>78</sup> Erba, E.; Bergamashi, D.; Ronzoni, S.; Faretta, M.; Taverna, S.; Bonfanti, M.; Catapano, C. V.; Faircloth, G.; Jimeno, J.; D'Incalci, M., Mode of action of thiocoraline, a natural marine compound with anti-tumor activity, *Br. J. Cancer*, **1999**, *80*, 971-980.

<sup>79</sup> Address, K. J.; Sinsheimer, J. S.; Feigon, J., Solution structure of a complex between [N-MeCys3, N-Me-Cys7]TANDEM and [d(GATATC)]<sub>2</sub>, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 2498-2508.

<sup>80</sup> Waring, M. J.; Wakelin, L. P. G., Echinomycin: a bifunctional intercalating antibiotic, *Nature*, **1974**, *252*, 653-657.

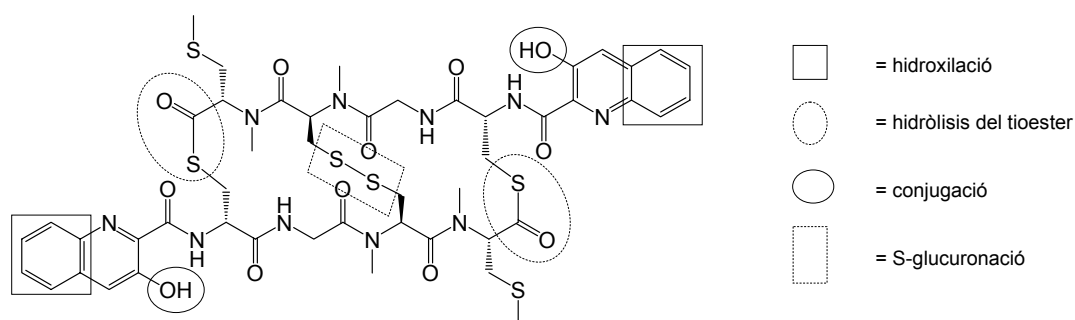
<sup>81</sup> Maniatis, T.; Ptashne, M.; Barrell, B. G.; Donelson, J., Sequence of a repressor-binding site in the DNA of bacteriophage lambda, *Nature*, **1974**, *250*, 394-397.



**Figura 2.7** Estructura cristal·lina de la tiocoralina interaccionant amb el DNA.  
Estructura resolta per Federico Gago (Pharma Mar S.A)

### 2.1.2.1 Estabilitat de la tiocoralina en plasma humà

Brandon i col. han realitzat estudis de la biotransformació i toxicologia de la tiocoralina per conèixer la seva potencial implicació sobre la farmacologia humana.<sup>82</sup> S'ha determinat una curta vida mitjana en plasma humà de 4.3 h. El punt més susceptible de bioatransformació es postula que pot ser l'enllaç tioèster (Figura 2.8).



**Figura 2.8** Biotransformació de la tiocoralina.<sup>82</sup>

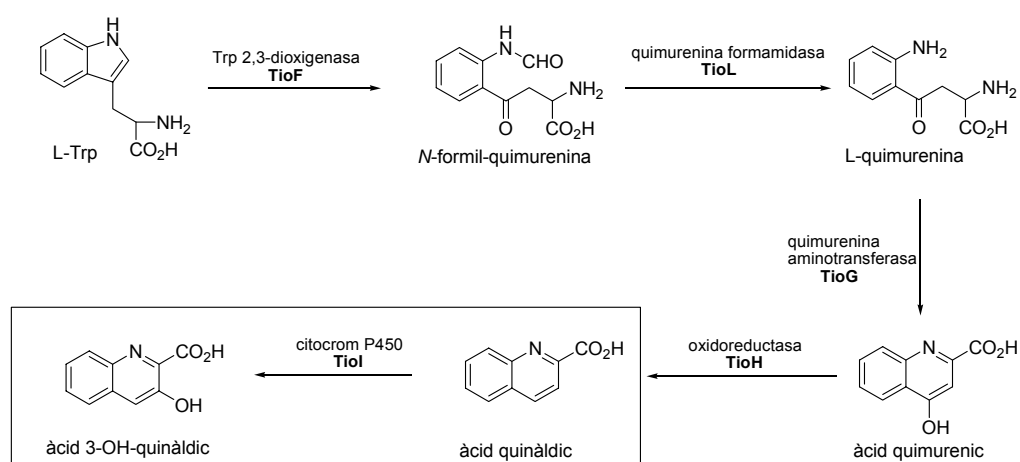
<sup>82</sup> Brandon, E. F. A.; Sparidans, R. W.; Meijerman, I.; Manzanares, I.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M., In vitro characterization of the biotransformation of thiocoraline, a novel marine anti-cancer drug, *Investigational New Drugs*, **2004**, *22*, 241-251.



### 2.1.3 BIOSÍNTESI DE LA TIOCORALINA

Recentment, Lombó i col. han identificat el grup de gens responsable de la biosíntesi de la tiocoralina del microorganisme *micromonospora sp* ML1.<sup>83</sup> La biosíntesi de la tiocoralina i dels pèptids de la seva família es duu a terme a través de peptidil sintetases no-ribosomals, que són enzims multifuncionals que disposen d'un centre actiu organitzat per mòduls d'activitat. Cada mòdul s'encarrega d'un cicle d'elongació del pèptid: *mòdul 1- domini d'adenilació*, selecciona l'aminoàcid adient i l'activa; *mòdul 2- peptidil-transportador*, genera un enllaç tioèster; *mòdul 3- domini de condensació*, crea el nou enllaç peptídic.

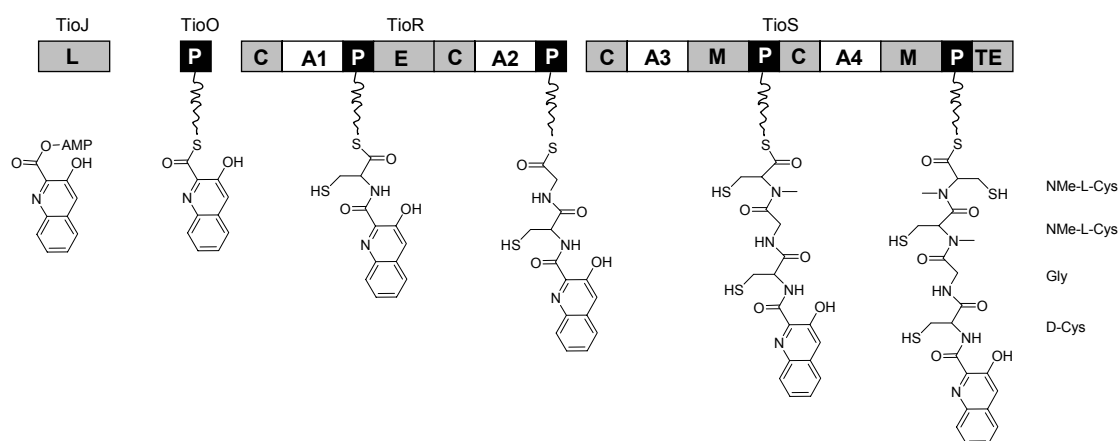
Alguns d'aquests enzims disposen de dominis extres amb activitats específiques: epimeritzacions per formar D-aminoàcids, N- o C-metilacions i ciclacions sobre residus de Cys o Ser. Al final de la cadena hi ha un domini de tioesterasa encarregat de l'alliberament de la cadena peptídica en la forma lineal o bé formant un cicle. Lombó i col. proposen també la ruta biosintètica per a la unitat àcid 3-hidroxiquinàldic que tindria com a punt de partida l'aminoàcid proteïnogènic, L-triptòfan<sup>83</sup> (Figura 2.9). La biosíntesi proposada de l'heterocicle seria una branca de la ruta de degradació aeròbica de l'aminoàcid. A la ruta destaca l'actuació del darrer enzim, el citocrom P450 sobre l'àcid quinàldic (heterocicle que és assequible comercialment) per transformar-lo en l'àcid 3-hidroxiquinàldic.



**Figura 2.9** Ruta biosintètica per a l'àcid 3-hidroxiquinàldic proposada per Lombó i col.<sup>83</sup>

<sup>83</sup> Lombó, F.; Velasco, A.; Castro, A.; De La Calle, F.; Braña, A.F.; Sánchez-Puelles, J. M.; Méndez, C.; Salas, J. A., Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from the marine actinomycete and its expression in two streptomyces species, *ChemBioChem*, **2006**, 7, 366-376.

Per a la biosíntesi de la tiocoralina es postula que l'àcid 3-hidroxiquinàndic és l'iniciador de la cadena peptídica. Després de la unió de l'heterocicle activat al complex enzimàtic, es succeïxen quatre enzims multifuncionals encarregats de l'elongació de la cadena peptídica (A<sub>1-4</sub>) (Figura 2.10). Cada enzim conté les funcions específiques necessàries per a la modificació dels aminoàcids. L'elongació de la cadena peptídica es realitza en el sentit N → C.



**Figura 2.10** Estructura de l'organització dels enzims peptidil-sintetasas no-ribosomals per a l'obtenció de la tiocoralina. L– AMP-ligasa, P–domini peptidil-transportador, C–domini de condensació, A(1-4)–domini d'adenilació, E i M, dominis de N-metil transferasa, TE–domini de tiotransferasa

La identificació del grup de gens s'ha realitzat mitjançant dues vies: la primera és a través de l'eliminació de troços de gens en els microorganismes productors de tiocoralina i observar aquells que n'han eliminat la producció del pèptid i, la segona, és mitjançant la introducció del conjunt de gens identificats en microorganismes no productors de tiocoralina i obtenir el pèptid. També s'han identificat gens codificants de proteïnes encarregades de la secreció de la tiocoralina a través de la membrana i altres de reparar els possibles danys al cromosoma causats per la tiocoralina abans de ser secretada.

## 2.1.4 ANTECEDENTS SINTÈTICS

La síntesi de depsipèptids cíclics de la família, així com la mateixa tiocoralina, ha estat àmpliament estudiada per diferents grups d'investigació en els darrers vint anys. Els pèptids estructuralment similars a la tiocoralina són el BE-22179, l'equinomicin i el triostin A perquè tots tenen el pont disulfur. El BE-22179 s'obté a partir de la tiocoralina mitjançant un tractament oxidant amb NaIO<sub>4</sub>.<sup>75</sup> L'equinomicin actualment és assequible comercialment (Sigma-Aldrich, Ref. 44659, 25 mg, puresa > 97 %, 321.6 €). Al 1978, Olsen i col. van descriure la primera síntesi d'un pèptid de la família, el triostin A.<sup>84</sup> Sis anys més tard Otsuka i col. van descriure una síntesi més eficient per el triostin A.<sup>85</sup> Un canvi en el punt d'inici de la cadena peptídica reduí la racemització en l'acoblament de fragments i en la ciclació, i millorà notablement els rendiments de la síntesi. Es canvia el punt d'inici del residu Ala per el de D-Ser i el pont disulfur es formà en la darrera etapa de síntesi, després d'incorporar els heterocicles intercaladors.

La síntesi en solució de la tiocoralina obtinguda per Boger i col. al 2000<sup>75,76</sup> serà una bona pauta i ens aportarà molta informació sobre la reactivitat i estabilitat dels intermitjos sintètics. Cal dir que totes les síntesis descrites han estat realitzades en solució i seguint una química Boc. A finals del 2005, es va publicar la primera síntesi en fase sòlida de dos anàlegs del triostin A, el TANDEM<sup>86</sup> i l'azatandem.<sup>87</sup> El tandem és un depsipèptid bicíclic en el qual s'han substituït els quatre *N*-metil aminoàcids per els corresponents aminoàcids proteïnogènics, reduint així notablement la dificultat sintètica. L'azatandem conté, a més a més, la substitució dels enllaços èster per enllaços amida.

### 2.1.4.1 Síntesi en solució de la tiocoralina per Boger i col. (2000)

La síntesi de la tiocoralina descrita per Boger i col. es realitza íntegrament en solució i segueix la química Boc/Bzl.<sup>75</sup> La ruta sintètica consta de 13 etapes a partir dels aminoàcids degudament protegits i té un rendiment global del 10 %. L'esquema sintètic es basa en l'acoblament de dos fragments tetrapeptídics simètrics, formació del pont disulfur, ciclació i, finalment, la incorporació de l'heterocicle

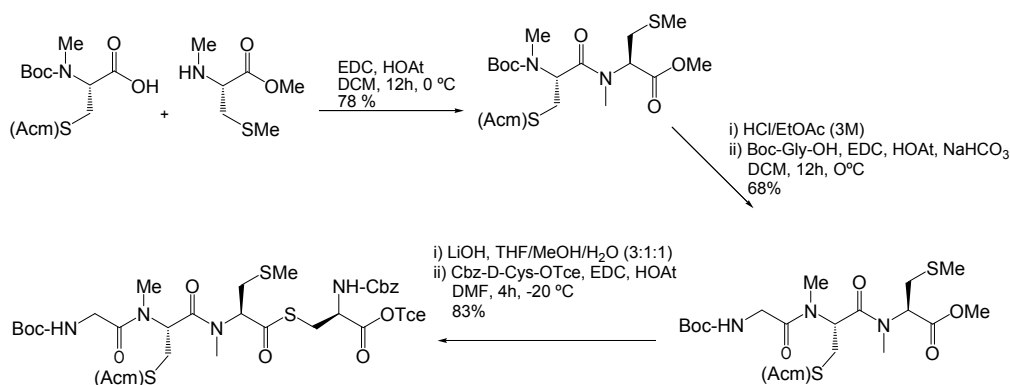
<sup>84</sup> Chakravarty, P. K.; Olsen, R. K., Synthesis of triostin A, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1613-1616.

<sup>85</sup> Shin, M.; Inouye, K.; Otsuka, H., Synthetic studies on quinoxaline antibiotics. II. Synthesis of triostin A, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1984**, *57*, 2203-2210.

<sup>86</sup> Malkinson, J. P.; Anim, M. K.; Zlob, M.; Searcey, M. Efficient solid-phase-based total synthesis of the bisintercalator TANDEM, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 7654-7661.

<sup>87</sup> Dietrich, B.; Diederichsen, U., Synthesis of cyclopeptidic analogues of triostin A with quinoxalines or nucleobases as chromophores, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 147-153.

àcid 3-hidroxiquinàldic. Un factor a destacar és que la formació de l'enllaç tioèster és el darrer a formar-se en la síntesi del fragment (Esquema 2.1).



**Esquema 2.1** Síntesi del fragment tetrapeptídic de la síntesi de la tiocoralina descrita per Boger i col.<sup>75</sup>

#### 2.1.4.2 Síntesi de derivats amb potencial activitat antitumoral

A la literatura es troben exemples de compostos dissenyats que s'han basat en l'estructura dels pèptids de la família de la tiocoralina. Els podem classificar en tres grups:

##### 1.-Compostos que mantenen l'heterocicle intercalador i contenen modificacions en l'esquelet peptídic

Les modificacions es donen, especialment, en l'enllaç no peptídic i en els grups *N*-metil. En aquest sentit, el pèptid més estudiat ha estat el triostin A. S'ha descrit la síntesi del tandem, pèptid anàleg del triostin A, en el qual s'han substituït els quatre *N*-metil aminoàcids per els corresponents residus proteïnogènics<sup>88</sup> i la síntesi del (NMeAla)TANDEM que conté només dos *N*-metil aminoàcids respecte el pèptid natural.<sup>89</sup> L'any 2000, Boger i col. van obtenir l'Azatriostin, pèptid que conté un enllaç amida heterodètic en substitució de l'enllaç èster.<sup>90</sup>

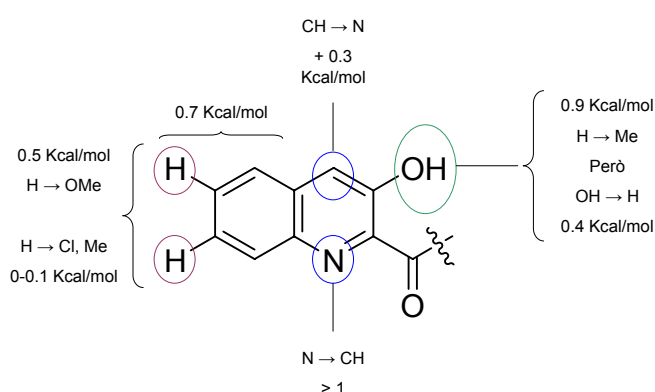
<sup>88</sup> Ciardelli, T. L.; Chakravarty, P. K.; Olsen, R.K., Des-*N*-tetramethyltriostrin A and bis-L-seryl-des-*N*-tetramethyltriostrin A, synthetic analogs of the quinoxaline antibiotics, *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 7684-90.

<sup>89</sup> Dahon, M. K.; Olsen, R. K., Synthesis of (NMeAla)TANDEM, the bis(*N*-methylalanine) analogue of des-*N*-tetramethyltriostrin A, *J. Org. Chem.*, **1981**, *46*, 3436-3440.

<sup>90</sup> Boger, D.L.; Lee, J. K., Development of a solution-phase synthesis of minor groove binding bis-intercalators based on triostin a suitable for combinatorial synthesis, *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 5996-6000.

## 2-. Compostos que mantenen la mateixa estructura peptídica i varien els heterocicle intercaladors

S'han sintetitzat famílies de compostos basats en els pèptids: tiocoralina, BE-22179, sandramicin, triostin A i tandem. S'han aprofitat els pèptids tiocoralina, BE-22179 i sandramicin per derivatitzar-los amb grups cromòfors basats en l'estructura de l'àcid 3-hidroxiquinàldic.<sup>91</sup> En el cas del sandramicin s'ha realitzat un estudi sistemàtic per a avaluar l'efecte en l'energia d'enllaç de l'àcid 3-hidroxiquinàldic, i els diferents elements que el constitueixen (anell aromàtic, hidroxil, nitrògen) amb una cadena de DNA model;<sup>92</sup> Els resultats obtinguts es representen a la següent figura i constatan que l'heterocicle natural és el més actiu dels que s'han provat:



**Figura 2.11** Representació dels efectes en les energies d'enllaç amb la cadena de DNA dels diferents elements que componen l'àcid 3-hidroxiquinàldic

Al 1985, es va estudiar la interacció amb el DNA d'un compost basat en el pèptid tandem que contenia dues molècules d'aminoacridina com a elements intercaladors.<sup>93</sup> El nou compost va mostrar interacció com a intercalador del DNA. Recentment, Diederichsen i col. han introduït heterocicles basats en les nucleobases com a elements intercaladors en els pèptids TANDEM<sup>94</sup> i azatandem.<sup>95</sup>

<sup>91</sup> Boger, Dale L., Preparation of analogs of thiocoraline and BE-22179, *PCT Int. Appl.*, **2002**, WO 2002049577.

<sup>92</sup> Boger, D. L.; Saionz, K. W., DNA binding properties of key sandramycin analogues: systematic examination of the intercalation chromophore, *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 315-321.

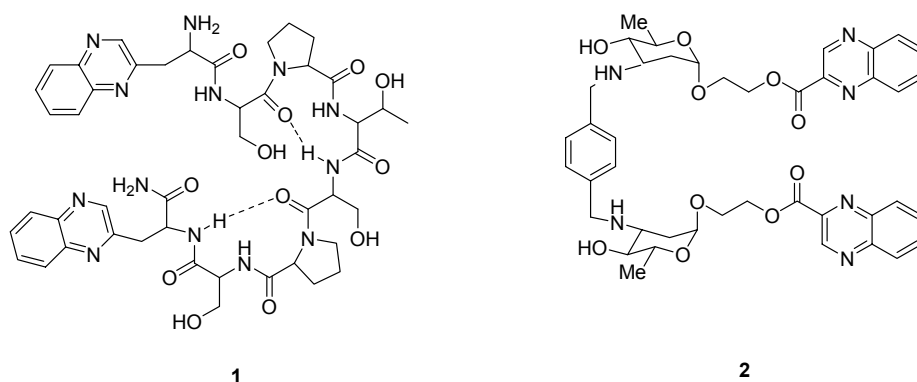
<sup>93</sup> Helbecque, N.; Bernier, J. L.; Hénichart, J. P., Design of a new DNA-polyintercalating drug, a bisacridinyl peptidic analogue of triostin A, *Biochem. J.*, **1985**, 225, 829-832.

<sup>94</sup> Lorenz, K. B.; Diederichsen, U., Solution-phase synthesis of nucleobases-substituted analogues of triostin A, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 3917-3927.

<sup>95</sup> Dietrich, B.; Diederichsen, U., Synthesis of cyclopeptidic analogues of triostin A with quinoxalines or nucleobases as chromophores, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 147-153.

### 3-. Compostos que han adoptat els heterocicles intercaladors i han variat l'esquelet peptídic

A la bibliografia es troba un conjunt de compostos que estan formats per dues unitats d'àcid quinoxàlic, l'element intercalador del DNA, i un braç que fa de bastida per millorar la unió a la cadena de DNA. S'ha descrit un braç de tipus peptídic, com és el cas del compost **1**<sup>96</sup> (Figura 2.12) que simula un gir- $\beta$  i un braç de tipus carbohidrat, com és el cas del compost **2**<sup>97</sup> (Figura 2.12). Oshima i col han demostrat que els compostos quinoxàlics són capaços de trencar la cadena de DNA per irradiació amb una longitud d'ona llarga (365 nm).<sup>97</sup>



**Figura 2.12** Compostos inspirats en els intercaladors de DNA naturals, triostin A i equinomicin

Aquests compostos són més assequibles químicament, però encara no s'ha trobat cap derivat que presenti una activitat antitumoral comparable als pèptids quinoxàlics naturals.

<sup>96</sup> Huang, X.; Long, E. C. Chemoenzymatic synthesis and incorporation of L-2-quinoxalylalanine into tandem  $\beta$ -turn peptide motif, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 5, 1937-1940.

<sup>97</sup> Toshima, K.; Kimura, T.; Takano, R.; Ozawa, T.; Ariga, A.; Shima, Y.; Umezawa, K.; Matsumura, S. Molecular design, chemical synthesis and biological evaluation of quinoxaline-carbohydrate hybrids as novel and selective photo-induced DNA cleaving and cytotoxic agents, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 7057-7066.

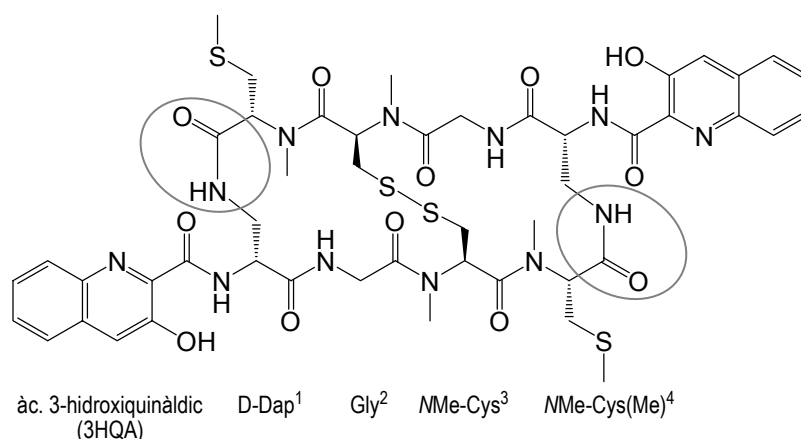
## 2.1.5 DE PRODUCTE NATURAL A FÀRMAC ANTITUMORAL

L'aïllament i caracterització de la tiocoralina i els resultats obtinguts en els assaigs d'activitat situen el pèptid natural en la línia de sortida (projecte de fàrmac) per la llarga travessia que finalitzarà, si supera totes les proves, amb el seu ús en la teràpia antitumoral (fàrmac).

La tiocoralina es caracteritza per una baixa solubilitat i inestabilitat en plasma humà.<sup>82</sup> Fet que fa necessari un esforç sintètic per millorar les propietats farmacocinètiques alhora que mantingui o millori la seva farmacodinàmica. Aquest esforç sintètic pot anar dirigit en tres direccions: la primera és el desenvolupament de nous sistemes d'administració que permetin solubilitzar, transportar i, finalment, alliberar el compost; la segona és la realització de modificacions químiques del producte natural a fi d'augmentar-ne la solubilitat, però aquesta opció està limitada per la disponibilitat del producte de partida; i la darrera direcció és el disseny d'un anàleg basat en el producte natural que augmenti la solubilitat, mantingui l'activitat biològica i sigui assequible químicament. Cal tenir sempre en compte que en el procés de desenvolupament d'un nou fàrmac és convenient que l'etapa de rastreig de nous anàlegs sigui el més breu possible per iniciar el més aviat possible els assaigs clínics amb la nova molècula.

### 2.1.5.1 Azatiocoralina, un anàleg del producte natural

D'acord amb el marc de treball i l'experiència del nostre grup d'investigació es planteja contribuir en el desenvolupament d'un nou fàrmac mitjançant la síntesi en fase sòlida d'un nou anàleg de la tiocoralina, l'azatiocoralina (Figura 2.13).



**Figura 2.13** Estructura i composició de l'azatiocoralina

El nou compost prové de la substitució dels enllaços tioèster per enllaços amida. La modificació s'obté per l'ús de l'àcid (R)-2,3-diaminopropiònic (D-Dap) en comptes de la D-Cys. L'enllaç amida és més resistent i soluble i pot millorar les propietats farmacocinètiques de la tiocoralina. Es creu oportú conservar l'estructura global, els heterocicles intercaladors i el nombre de residus *N*-metilats, doncs entenem que tenen una funció important en la interacció amb el DNA. El nou anàleg ha de ser un bon punt de partida per a la síntesi de nous compostos derivats de la tiocoralina amb potencial activitat antitumoral. La menor labilitat de l'enllaç amida també hauria de facilitar l'esquema sintètic del pèptid i permetre la seva obtenció amb bons rendiments.

El treball de desenvolupament de la síntesi de l'azaticoralina s'inicia amb l'etapa prèvia d'obtenció dels elements no assequibles comercialment. En el cas de l'azaticoralina cal resoldre la síntesi de l'àcid 3-hidroxiquinàldic i dels aminoàcids GP<sup>1</sup>-NMe-Cys(Me)-OH i GP<sup>2</sup>-NMe-Cys(S-GP<sup>3</sup>)-OH (essent GP<sup>1</sup>, GP<sup>2</sup> i GP<sup>3</sup> els diferents grups protectors necessaris per a incorporar els aminoàcids a la cadena peptídica). L'àcid 3-hidroxiquinàldic va ser obtingut en el nostre grup en col·laboració amb la Dra. Riego en el transcurs de la present tesi.<sup>98</sup> La nova ruta sintètica permet obtenir el producte amb major rendiment i de forma més ràpida que la síntesi descrita a la bibliografia per Boger i col.<sup>99</sup> El desenvolupament de la síntesi dels aminoàcids no comercials es recull al final del present capítol (*Capítol 2, 2.5*).

Així doncs, en el present capítol es desenvoluparà la síntesi en fase sòlida de l'azaticoralina, un anàleg del producte natural tiocoralina per millorar-ne les propietats farmacocinètiques i poder esdevenir així, un fàrmac antitumoral. La complexitat del pèptid proposat permetrà ampliar el coneixement i desenvolupar noves eines necessàries per afrontar la síntesi en fase sòlida de nous depsipèptids cíclics naturals. La informació obtinguda en aquest capítol serà una bona base per a la síntesi en fase sòlida de la tiocoralina.

---

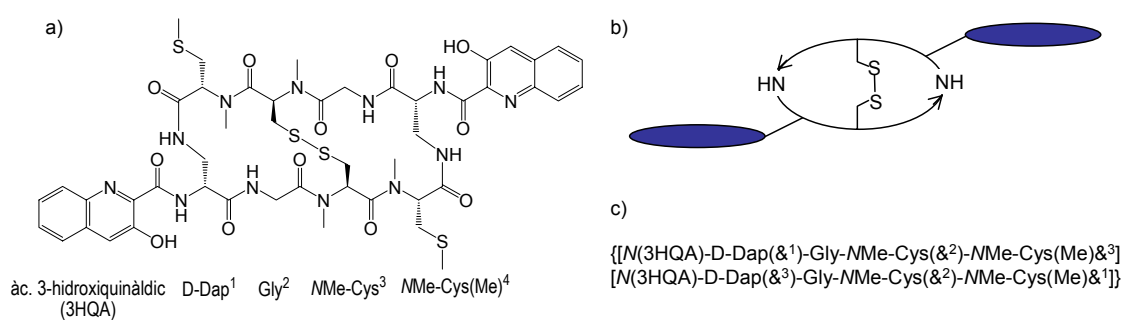
<sup>98</sup> Riego, E.; Bayó, N.; Cuevas, C.; Albericio, F.; Álvarez, M., A new approach to 3-Hydroxyquinoline-2-carboxylic acid, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 1407-1411.

<sup>99</sup> Boger, D. L.; Chen, J. H. A modified Friedlander condensation for the synthesis of 3-Hydroxyquinoline-2-carboxylates, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 7369-7371.



## 2.2 DESENVOLUPAMENT DE LA SÍNTESI EN FASE SÒLIDA DE L'AZATIOCORALINA

El pèptid objectiu d'aquest capítol és l'azatiocoralina, on l'enllaç tioèster de la tiocoralina és substituït per un enllaç amida. La formació del nou enllaç heteropeptídic es dona entre l'extrem àcid d'una cadena i el grup amino de la cadena lateral del residu no proteïnogènic D-Dap. El nom sistemàtic del nou compost és  $\{[N(3HQA)-D-Dap(\&^1)-Gly-NMe-Cys(\&^2)-NMe-Cys(Me)\&^3] [N(3HQA)-D-Dap(\&^3)-Gly-NMe-Cys(\&^2)-NMe-Cys(Me)\&^1] \}$ .



**Figura 2.14** Azatiocoralina: a) estructura i composició, b) representació gràfica i c) nom sistemàtic

Abans de plantejar l'estratègia de síntesi en fase sòlida per a l'obtenció de l'azatiocoralina cal fer unes consideracions generals en referència a l'alt contingut de residus *N*-metilats, la presència de residus derivats de la cisteïna i les possibilitats de formació del pont disulfur intramolecular.

La simetria és una propietat que ha estat àmpliament usada per la natura per crear estructures altament complexes i optimitzar els recursos. L'azatiocoralina és un compost on la simetria es presenta com una qualitat que cal tenir present alhora de dissenyar l'estratègia de síntesi perquè pot permetre una síntesi més ràpida i eficient.

## 2.2.1 CONSIDERACIONS GENERALS PRÈVIES AL DISSENY DE L'ESTRATÈGIA DE SÍNTESI

### 2.2.1.1 Síntesi en fase sòlida de pèptids rics en *N*-metil aminoàcids

No és gens estrany la presència de *N*-metil aminoàcids en la composició de la tiocoralina perquè es tracta d'una modificació *post*-traduccional molt comú realitzada pels microorganismes. Els *N*-metil aminoàcids es troben sovint en seqüències de pèptids lineals o cíclics produïts a la natura que tenen activitat biològica. Així trobem l'exemple de les ciclosporines, produïdes per un fong (*Beauveria nivea*), que presenten activitats antiinflamatòries, antifúngiques i immunosupresores.<sup>100,101</sup> Entre els pèptids bioactius d'origen marí també trobem molts exemples, com la keramamida A, la jaspamida o les didemnines,<sup>102,103,104</sup> entre molts d'altres.

Els pèptids que contenen *N*-metil aminoàcids a la seva seqüència han demostrat una millor estabilitat metabòlica, augment de la hidrofobicitat i aportació de rigidesa al pèptid. La presència del grup metil modifica l'enllaç peptídic: el fa menys reconeixible a les proteases de l'organisme, fa perdre la capacitat de formar ponts d'hidrogen i té menor tendència a adoptar la conformació *trans*,<sup>105</sup> fet que pot afectar a l'estructura secundària i terciària de la molècula.

En molts casos també s'ha emprat l'ús de *N*-metil aminoàcids en la síntesi d'anàlegs peptídics per tal d'introduir rigidesa a la molècula, eliminar els enllaços d'hidrogen intermoleculars i, amb ells, els processos d'agregació.<sup>106,107</sup> També s'ha emprat en el disseny de pèptids que siguin capaços d'atravesar la barrera hematoencefàlica.<sup>108,109</sup>

---

<sup>100</sup> Wenger, R. M., Synthesis of cyclosporin and its analogs: relation between structure and immunosuppressive activity, *Ang. Chem. Int.*, **1985**, 97, 88-96.

<sup>101</sup> Raman, P.; Stokes, S. S.; Angell, Y. M.; Flentke, G. R.; Rich, D. H., Methods to circumvent a difficult coupling in the solid-phase synthesis of cyclosporine analogues, *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 5734-5735.

<sup>102</sup> Fusetami, N.; Matsunaga, S., Bioactive sponge peptides, *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1793-1806.

<sup>103</sup> Davinson, B. S., Ascidiarians: producers of amino acids derived metabolites, *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1771-1791.

<sup>104</sup> Wipf, P., Synthetic studies of biologically active marine cyclopeptides, *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 2115-2134.

<sup>105</sup> Smith, J. A.; Pease, L. G., Reverse turns in peptides and proteins, *Crit. Rev. Biochem.*, **1980**, 8, 315-399.

<sup>106</sup> Cruz, M.; Tusell, J. M.; Grillo-Bosch, D.; Albericio, F.; Serratos, J.; Rabanal, F.; Giral, E., Inhibition of  $\beta$ -amyloid toxicity by short peptides containing *N*-methyl amino acids, *J. Pep. Res.*, **2004**, 63, 324-328.

<sup>107</sup> Hughes, E.; Burke, R.M.; Doig, A.J., Inhibition of toxicity in the  $\beta$ -amyloid peptide fragment  $\beta(25-35)$  using *N*-methylated derivatives, *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 25109-25115.

<sup>108</sup> Kaiser, E. T.; Kadzy, F. J., Peptides with affinity for membranes, *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, **1987**, 16, 561-581.

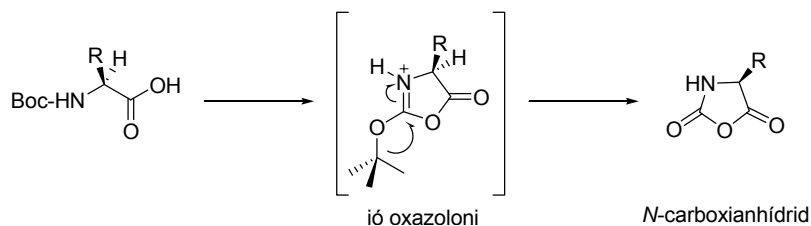
<sup>109</sup> Teixidó, M.; Belda, I.; Zurita, E.; Llorca, X.; Fabre, M.; Vilaró, S.; Albericio, F.; Giral, E., Evolutionary combinatorial chemistry, a novel tool for SAR studies on peptide transport across the blood-brain barrier. Part 2. Design, synthesis and evaluation of a first generation of peptides, *J. Pep. Sci.*, **2005**, 11, 789-804.

Els *N*-metil aminoàcids però, són susceptibles de tenir diverses reaccions secundàries, entre les quals destaquen: la racemització i la formació de dicetopiperazines (DKPs). S'han dedicat molts esforços a l'estudi de la síntesi de pèptids rics en *N*-metil aminoàcids.<sup>110</sup>

### 2.2.1.1.1 Racemització de *N*-metil aminoàcids

Durant l'activació dels *N*-metil aminoàcids protegits existeix un elevat risc de racemització. La racemització té lloc perquè l'aminoàcid pot evolucionar cap a la forma tautòmera de l'ió oxazoloni (5-oxo- $\Delta^2$ -oxazoloni) que té una estructura pseudoaromàtica.<sup>111</sup> Aquesta forma pot donar l'aminoàcid racèmic i també la forma inactiva estabilitzada de l'ió.

La protecció del grup  $\alpha$ -amino en forma de carbamat redueix el risc de racemització mentre que la presència d'un *N*-acil en facilita la transformació. Per això, quan es realitza la síntesi de pèptids amb un alt contingut de *N*-metil aminoàcids és preferible una estratègia lineal en comptes d'una aproximació per fragments. La protecció amb el grup Fmoc és preferible respecte l'ús del grup Boc perquè l'ió Boc-oxazoloni pot descompondre a un derivat *N*-carboxianhídril que pot polimeritzar (Esquema 2.2). A més, els pèptids amb successius *N*-metils aminoàcids sovint no són estables en medi àcid.



**Esquema 2.2** Mecanisme de descomposició de l'ió Boc-oxazoloni cap al derivat *N*-carboxianhídril

### 2.2.1.1.2 Formació de dicetopiperazines (DKPs) amb *N*-metil aminoàcids

En el capítol dedicat a la síntesi d'un anàleg de la sirengotoxina s'ha comentat la formació de dicetopiperazines (DKPs) a nivell de resina i les situacions en que la seva formació era favorable (Capítol 1, 1.4.1). La formació de DKPs està especialment afavorida quan el segon aminoàcid és un *N*-metil aminoàcid. L'amina secundària és més nucleòfila i la formació de l'anell de sis baules compensa l'impediment estèric que ofereix el grup metil.

<sup>110</sup> Teixidó, M.; Albericio, F.; Giralt, E., Solid-phase synthesis and characterization of *N*-methyl-rich peptides, *J. Pep. Res.*, **2005**, 65, 153-166.

<sup>111</sup> Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E., Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. *CRC Press Inc*, Boca Raton, Florida, USA, **1997**, ISBN: 0-8493-9142-3

L'ús de la resina 2-clorotritil (CTC-PS) minimitza el risc de formació de DKPs a nivell de resina. També l'ús de grups protectors (Alloc, Boc, Trt, *p*NZ) que impliquen una eliminació amb medi neutre o lleugerament àcid poden ajudar a reduir la formació de DKPs.<sup>112</sup> En el cas de la química Boc/<sup>t</sup>Bu, la realització de l'acoblament sobre el segon aminoàcid després d'un enllaç èster fent servir la neutralització *in situ* també ofereix millors rendiments.

Cal dir, que la formació d'aquest producte secundari ha estat ampliament estudiada perquè s'han aïllat un gran nombre de DKPs amb interessants activitats biològiques.<sup>113,114</sup>

### 2.2.1.2 Cisteïnes i ponts disulfur

El nombre de pèptids naturals que contenen residus de cisteïnes és elevat, especialment degut a la seva capacitat per formar ponts disulfurs intramoleculars. La presència de ponts disulfurs ofereix al pèptid un augment de la rigidesa i la resistència front les proteases. En molts casos, la pèrdua del pont disulfur està relacionada amb la pèrdua de l'activitat biològica. A la natura existeixen pèptids bioactius que contenen més d'un pont disulfur, com la família de les conotoxines<sup>115,116</sup> i de les tionines.<sup>117</sup> Molts grups d'investigació han treballat en el desenvolupament de grups protectors per al tiol de la Cys per poder formar varis ponts disulfurs de forma selectiva. Una altre aplicació molt important en la que s'ha vist implicada la cisteïna és en la unió de proteïnes de gran talla i en la ciclació de seqüències difícils mitjançant la tècnica coneguda com a Lligació Química Nativa (*Native Chemical Ligation*).<sup>118,119</sup>

---

<sup>112</sup> Isidro-Llobet, A.; Guasch-Camell, J.; Álvarez, M.; Albericio, F., *p*-Nitrobenzyloxycarbonyl (*p*NZ) as a temporary N<sup>α</sup>-protecting group in orthogonal solid-phase peptide synthesis. Avoiding diketopiperazine and aspartimide formation, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, *14*, 3031-3039.

<sup>113</sup> Kwon, O. S.; Park, S. H.; Yun, B. S.; Pyun, Y. R.; Kim, C. J., Cyclo(dehydroala-L-Leu), an alpha-glucosidase inhibitor from *Penicillium sp.* F70614, *J. Antibiot.*, **2001**, *54*, 179-181.

<sup>114</sup> Fu, X.; Ferreira, M. L. G.; Schmitz, F. J.; Kelly-Borges, M., New diketopiperazines from the sponge *Dysidea chlorea*, *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 1226-1231.

<sup>115</sup> Adams, D. J.; Alewood, P. F.; Craik, D.J.; Drinkwater, R. D.; Lewis, R. J., Conotoxins and their potential pharmaceutical applications, *Drug Development Research*, **1999**, *46*, 219-234.

<sup>116</sup> Atherton, E.; Sheppard, R. C.; Ward, P., Peptide synthesis. Part 7. Solid-phase synthesis of conotoxin G1, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1985**, 2065-2073.

<sup>117</sup> Vila-Perelló, M.; Sánchez-Vallet, A.; García-Olmedo, F.; Molina, A.; Andreu, D., Synthetic and structural studies on *Pyricularia pubera* thionin: a single-residue mutation enhances activity against Gram-negative bacteria, *FEBS Letters*, **2003**, *536*, 215-219.

<sup>118</sup> Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, L.; Kent, S.B.H., Synthesis of proteins by native chemical ligation, *Science*, **1994**, *776-779*.

<sup>119</sup> Tulla-Puche, J.; Getun, I. V.; Alsina, J.; Albericio, F.; Barany, G., Synthetic circularized analogues of bovine pancreatic trypsin inhibitor, *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 4541-4544.

Les cisteïnes, però, també són susceptibles de tenir reaccions secundàries: racemització del C<sup>α</sup>, β-eliminació i oxidació del sofre. La racemització de la cisteïna es dona principalment en l'etapa d'activació i acoblament a la resina, i serà més important quan el grup amino estigui en la forma *N*-acil, tal i com s'ha comentat prèviament. També s'ha descrit que la racemització es dona quan la cisteïna està integrada a la cadena peptídica degut als tractaments bàsics d'eliminació del grup Fmoc. La racemització és especialment important quan la cisteïna té el grup àcid formant un enllaç èster amb la resina o dins de la seqüència peptídica. A la bibliografia es descriuen estudis sistemàtics per a determinar les millors condicions d'acoblament per minimitzar la racemització de la cisteïna durant l'etapa d'acoblament,<sup>120,121</sup> i són:

- 1- Emprar com a dissolvent el DCM amb la mínima quantitat de DMF.
- 2- Emprar bases més dèbils que la DIEA, com la colidina (2,4,6-trimetilpiridina).
- 3- En cas d'emprar les sals d'amini o de fosfoni, no realitzar l'etapa de preactivació.

## 2.2.2 DISSENY DE L'ESTRATÈGIA DE SÍNTESI DE L'AZATIOCORALINA

L'azatiocoralina, com ja s'ha comentat anteriorment, conté a la seva seqüència aminoàcids especialment modificats que en poden dificultar la síntesi. A més, quan es treballa amb la síntesi d'un pèptid simètric i altament ramificat es poden dibuixar sobre el paper un gran nombre d'estratègies sintètiques possibles. Per direccionar l'exploració de les estratègies es definirà, primer, una seqüència d'etapes de síntesi, després, els grups protectors, suport polimèric i mètodes d'acoblament per a la síntesi de la cadena peptídica lineal i, finalment, aquells elements que cal obtenir prèviament en solució per tal de dur a terme la síntesi de la cadena peptídica en fase sòlida. Els requisits que s'imposen a les estratègies de síntesi són els següents:

- **Màxim nombre d'etapes de síntesi en fase sòlida.** La fase sòlida agilitza en gran mesura el procés de desenvolupament de la síntesi i permet, de forma ràpida, el canvi d'estratègies. Cada etapa realitzada en solució representa un temps de síntesi més llarg.

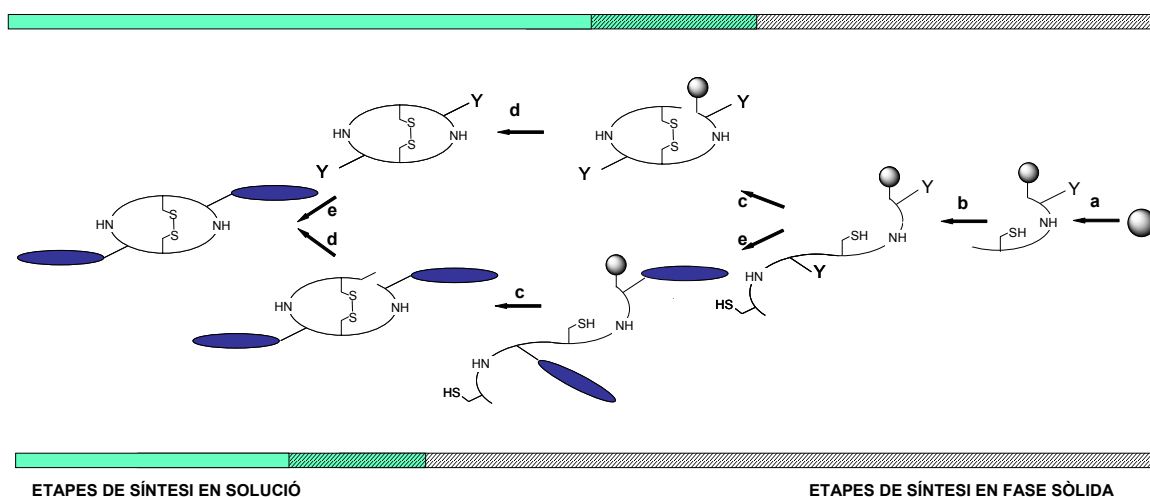
---

<sup>120</sup> Han, Y.; Albericio, F.; Barany, G., Occurrence and minimization of cysteine racemization during stepwise solid-phase peptide synthesis, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 4307-4312.

<sup>121</sup> Angell, Y. M.; Alsina, J.; Albericio, F.; Barany, G., Practical protocols for stepwise solid-phase synthesis of cysteine-containing peptides, *J. Pep. Res.*, **2002**, *60*, 292-299.

- **Elongació de la cadena mitjançant l'acoblament de fragments.** Ens proposem treure profit de la simetria del producte natural per reduir el cost i el temps de síntesi.
- **Realitzar primer el pont disulfur i després la ciclació cadena-cua.** La formació del pont disulfur i seguidament la ciclació cadena-cua és afavorida per un efecte "cremallera"; primer es forma el cycle petit i aquest facilita la ciclació més gran aproximant els extrems entre si. L'ordre de ciclacions va ser estudiat per Boger i col. per al cas de la tiocoralina.<sup>75,76</sup> La ciclació gran deixa els tiols de les MMe-Cys allunyats. En canvi, la síntesi del triostin A i derivats des-metilats s'ha descrit fent primer la ciclació cadena-cua.
- **Incorporació de l'heterocicle intercalador al final de la síntesi.** La incorporació dels heterocicles en les darreres etapes és compatible amb l'obtenció d'una llibreria de compostos basats en la diversitat de l'element intercalador; component rellevant i, generalment, de disponibilitat reduïda. Per al cas de l'àcid 3-hidroxiquinàldic, a més, la incorporació al final de la síntesi permet ser introduït sense necessitat de protegir el grup hidroxil, facilitant l'esquema sintètic en solució.

Si es té en compte les premisses anteriors es poden obtenir un conjunt d'estratègies vàlides. Les possibilitats que ens plantejem estudiar es troben representades gràficament a la Figura 2.15:



**Figura 2.15** Representació gràfica de la seqüència d'etapes de síntesi triades per a la síntesi de l'azatiocoralina on Y representa els punts d'anclatge dels heterocicles; a) síntesi del monòmer tetrapeptídic, b) síntesi de la cadena peptídica lineal per acoblament de fragments, c) primera ciclació per formació del pont disulfur, d) segona ciclació per enllaç amida, e) incorporació dels hèterocicles intercaladors

Hi ha encara uns aspectes que deixem que es defineixin durant l'evolució de la síntesi del pèptid: la formació del pont disulfur pot realitzar-se en fase sòlida o en solució i els heterocicles intercaladors poden incorporar-se en fase sòlida o en la darrera etapa de síntesi en solució. Caldrà una exploració sintètica d'aquestes possibilitats per triar-ne la més òptima.

Totes les seqüències d'etapes plantejades necessiten de la síntesi en fase sòlida de la cadena peptídica lineal (Figura 2.15.b). L'obtenció de la cadena lineal es donaria per la unió dels dos fragments monòmers (Figura 2.15.a) aprofitant la simetria del producte natural. Més endavant, s'estudiarà la via d'acoblament de fragments front una elongació seqüencial. El següent pas en el disseny de l'estratègia és la definició de la síntesi de la cadena peptídica. Cal considerar els següents aspectes: elecció del punt d'inici de la cadena, dels grups protectors temporals, permanents i suport polimèric, i dels agents d'acoblament.

### 2.2.2.1 Elecció del punt d'inici de la cadena peptídica

El punt d'inici de la cadena peptídica determina el punt de ciclació del pèptid. L'etapa de ciclació és l'etapa de síntesi més important. La bona elecció d'aquest punt pot determinar l'èxit de la síntesi. Caldrà triar el punt de ciclació que ofereixi menor impediment estèric, major reactivitat i menor formació de productes secundaris. En el cas dels pèptids ramificats, caldrà tenir present que el punt d'inici de la síntesi ha de ser el més adient per a la correcta elongació i ramificació de la cadena peptídica. En el cas de l'azatiocoralina es disposa de quatre opcions, referents als quatre aminoàcids diferents que formen part del cicle (Figura 2.16): D-Dap, Gly, NMe-Cys(Acm) i NMe-Cys(Me).

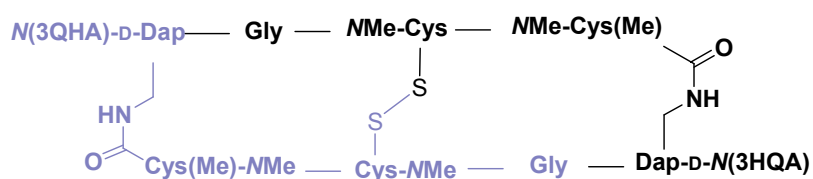
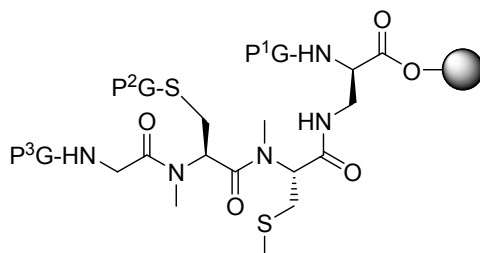


Figura 2.16 Composició 4&4 de l'azatiocoralina

De les quatre possibilitats d'inici de la cadena, el residu D-Dap és el més afavorit. La ciclació es dona per la formació de l'enllaç amida (D-Dap-Gly) més reactiu i menys impedit estèricament. La síntesi iniciada en el residu D-Dap implica l'elongació de la cadena peptídica a través del grup  $\beta$ -amino i evita la formació de dicetopiperazines a nivell de resina. La següent figura (Figura 2.17) mostra l'estructura del

monòmer iniciat pel residu D-Dap; on GP<sup>1</sup> és un grup protector permanent, GP<sup>2</sup> és el grup protector de la Cys que ha de permetre la formació del pont disulfur i GP<sup>3</sup> indica el grup protector temporal dels grups amino de la cadena lineal.



**Figura 2.17** Estructura del monòmer iniciat en D-Dap.  
GP<sup>n</sup> (n=1-3) indica els diferents grups protectors

La introducció de l'aminoàcid trifuncional D-Dap com a primer aminoàcid ofereix un avantatge addicional: la possibilitat de realitzar les dues ciclacions (formació del pont disulfur i ciclació cadena-cua) en fase sòlida si s'introdueix l'aminoàcid degudament protegit.

### 2.2.2.2 Elecció del suport polimèric i grups protectors temporals i permanents

Per tal de dur a terme l'esquema general de síntesi es planteja l'ús de la química Fmoc/<sup>t</sup>Bu i la resina CTC-PS com a suport polimèric. Aquesta combinació permetrà obtenir els fragments tetrapeptídics degudament protegits per poder realitzar l'acoblament de fragments en fase sòlida. El grup protector temporal dels aminoàcids (GP<sup>1</sup>) serà el grup Fmoc. La mesura de l'absorbància dels filtrats en l'etapa d'eliminació del grup Fmoc ( $\lambda$  290 nm,  $\epsilon$  5800) permetrà quantificar els rendiments dels acobaments i avaluar l'evolució en l'elongació de la cadena peptídica. La composició i presència de *N*-metil aminoàcids de l'azatiocoralina no permet quantificar les etapes mitjançant l'anàlisi d'aminoàcids. Per a la protecció permanent del grup  $\alpha$ -amino de l'aminoàcid D-Dap (GP<sup>3</sup>) hi ha dues opcions, depenent del moment d'incorporació de l'heterocicle:

- **En fase sòlida** es pot emprar el grup protector Alloc. El grup Alloc és ortogonal al grup temporal Fmoc i pot ser eliminat en presència de l'enllaç pèptid-resina (CTC-PS).
- **En solució** es proposa el grup Boc. El grup protector permanent Boc restarà estable en les condicions d'escissió de la resina CTC-PS i és ortogonal al grup Fmoc. D'aquesta forma es pot



realitzar l'acoblament i la ciclació amb el D-Dap protegit i eliminar els grups Boc en la penúltima etapa de la síntesi, just abans de la incorporació dels heterocicles intercaladors.

Els dos aminoàcids Alloc-D-Dap(Fmoc)-OH i Boc-D-Dap(Fmoc)-OH són assequibles comercialment i en podem disposar per a provar totes dues aproximacions.

De tots els grups protectors de cisteïna (GP<sup>2</sup>) descrits a la bibliografia, es tria el grup Acm<sup>122</sup> com a grup protector del tiol perquè permet formar el pont disulfur en fase sòlida.<sup>123</sup> La desprotecció i la formació del pont disulfur es donen en una mateixa etapa, utilitzant condicions suaus compatibles amb la resina i la resta del pèptid.

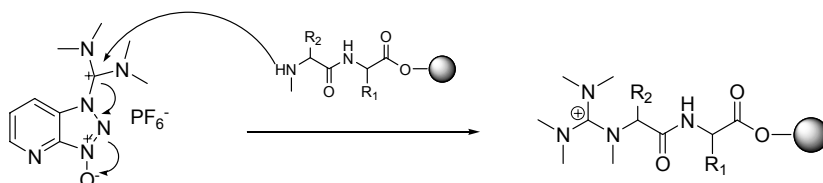
### 2.2.2.3 Elecció dels agents d'acoblament

Tal i com s'ha comentat en apartats anteriors, la síntesi de pèptids amb un elevat contingut de *N*-metil aminoàcids no és senzilla degut, en part, a la poca reactivitat dels grups amino perquè es troben impedits estèricament. L'acoblament de fragments és també una reacció difícil degut a l'impediment estèric que ofereixen les cadenes reaccionants i al risc de racemització de l'extrem C-terminal. Per aquests motius es decideix emprar agents d'acoblament basats en les sals d'amini i les sals de fosfoni, espècies més reactives que les habituals carbodiimides. Es realitzaran els acoblaments en DCM–DMF (98:2) per minimitzar el perill de racemització associat a la presència de cisteïnes a la cadena peptídica.

- **Elongació de la cadena amb l'agent HATU/DIEA.** Per tal de compensar la menor reactivitat dels *N*-metil aminoàcids es decideix emprar com a agent d'acoblament la sal d'amini HATU en combinació amb la base DIEA en una relació 1:2. L'HATU és molt més reactiu que la corresponent parella DIPCDI/HOAt perquè l'èster actiu d'HOAt es forma més ràpidament. La presència d'un tercer nitrogen en l'anell aromàtic el fa més reactiu que el corresponent agent HBTU, tal i com passa amb l'HOAt i l'HOBt. L'ús d'aquest reactiu està associat amb una reacció secundària que comporta la guanilidació del grup amino lliure (Esquema 2.3). Per evitar-ho, s'addiciona l'agent d'acoblament en defecte i es fa una preactivació de 5 min de l'aminoàcid amb l'agent d'acoblament i la base. El temps d'acoblament no supera els 35 min perquè l'HATU es degrada amb el temps. La sal d'amini es farà servir per a tots els acoblaments de la cadena per homogenitzar la síntesi, que es farà a petita escala.

<sup>122</sup> Veber, D. F.; Milkowski, J. D.; Varga, S. L.; Denkewalter, R. G.; Hirschmann, R., Acetamidomethyl. A novel thiol protecting group for cysteine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 5456-5461.

<sup>123</sup> Albericio, F.; Hammer, R. P.; García-Echeverría, C.; Molins, M. A.; Chang, J. L.; Munson, M. C.; Giralt, E.; Barany, G., Cyclization of disulfide-containing peptides in solid-phase synthesis, *In. Pep. Prot. Res.*, **1991**, *37*, 402-413.



**Esquema 2.3** Reacció secundària de guanilació emprant HATU com a agent d'acoblament

- **Acoblament de fragments amb l'agent PyOAP/DIEA.** Un acoblament ben diferent és el que té lloc entre els dos fragments tetrapeptídics. En aquest cas, la reacció necessita més temps per completar-se. La sal de fosfoni es presenta com una bona alternativa a la sal d'amini perquè tenen reactivitats equiparables però el PyOAP és més estable. El reactiu PyOAP no té el grup guanidil susceptible de reaccionar amb els grups amino. La sal de fosfoni es reserva per a acoblaments especials degut al seu elevat cost. Per l'acoblament de fragments s'empra la sal de fosfoni PyOAP i DIEA com a agents d'acoblament: Fmoc-tetrapèptid-OH (2 eq)/PyOAP (2 eq)/DIEA (6 eq), DMF, 25 °C. La reacció se segueix pel test de ninhidrina sense filtrar, i si el resultat és positiu, s'addiciona més agent d'acoblament fins a obtenir un test de ninhidrina negatiu.

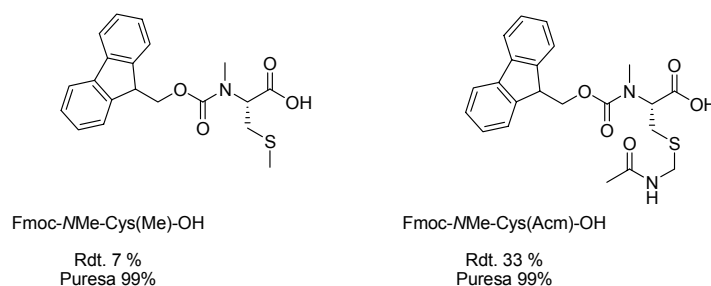
Després de seleccionar els diferents paràmetres que configuren la síntesi en fase sòlida de la cadena peptídica de l'azatiocoralina s'inicia l'exploració sintètica de les estratègies seleccionades. El primer repte sintètic és l'obtenció de les *N*-metil cisteïnes: *NMe*-Cys(Me) i *NMe*-Cys(Acm).

#### 2.2.2.4 Obtenció de les *N*-metil cisteïnes

Existeix un gran nombre de *N*-metil aminoàcids que són assequibles comercialment. Es disposa d'aminoàcids protegits amb el grup Fmoc i amb el grup Boc i, preferentment en la forma L. En cap cas es troba un derivat de *N*-metil cisteïna. A la bibliografia hi ha descrits molts mètodes de síntesi de *N*-metil aminoàcids en solució. La major part d'aquests mètodes i les seves aplicacions a la cisteïna s'explicaran al final del present capítol (Capítol 2, 2.5). De tots els mètodes emprats, cal destacar el mètode de la reducció de l'àcid *R*-(-)-tiazolidina-4-carboxílic (tioprolina) amb sodi i amoníac,<sup>124</sup>

<sup>124</sup> Blondeau, P.; Berse, C.; Gravel, D., Dimerization of an intermediate during the sodium in liquid ammonia reduction of L-thiazolidine-4-carboxylic acid, *Can. J. Chem.*, **1967**, *45*, 49-52.

i la *N*-metilació de Boc-aminoàcids amb hidrur de sodi i iodur de metil.<sup>125</sup> Tal i com es comentarà més endavant, aquests mètodes permeten l'obtenció de les *N*-metil cisteïnes convenientment protegides i derivatitzades: Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH i Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH (Figura 2.18).



**Figura 2.18** *N*-metil cisteïnes convenientment protegides derivatitzades per la síntesi de l'azatiocoralina

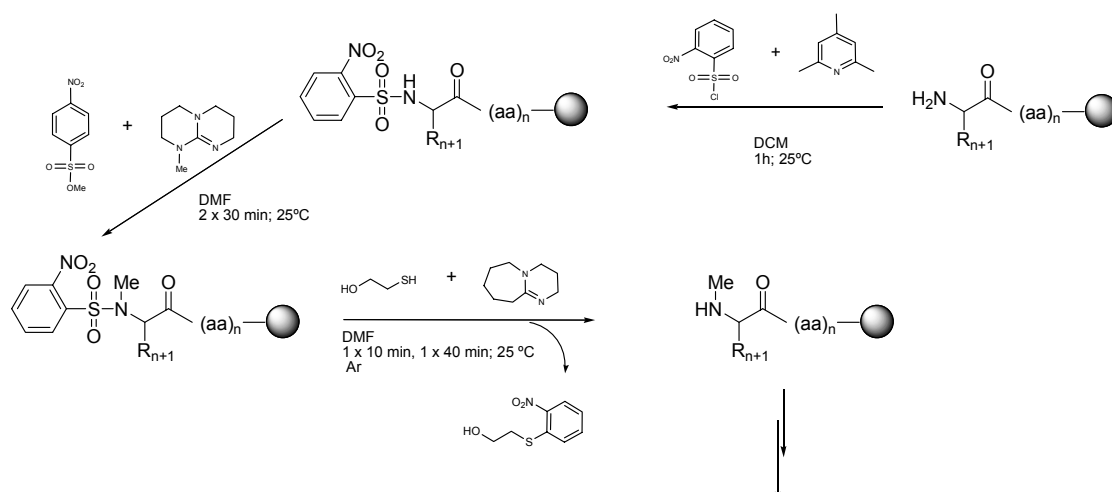
També es troben descrits mètodes per a la *N*-metilació d'aminoàcids en fase sòlida. L'obtenció d'aquests derivats directament sobre el suport polimèric suposa una reducció de temps de síntesi i major llibertat en el disseny de noves estratègies i nous anàlegs. Dörner i col. van descriure un mètode basat en l'impediment estèric que ofereix el grup Trt per a tenir selectivitat en l'etapa de *N*-metilació front els altres enllaços amida de la cadena.<sup>126</sup> Miller i Scanlan juguen amb el diferent caràcter àcid del protó del grup  $\alpha$ -amino que està protegit amb determinats grups que els fan ser selectiu front la resta de protons amida de la cadena peptídica.<sup>127</sup> Nosaltres ens interessem per aquest darrer mètode perquè es pot aplicar a la nostra estratègia de síntesi realitzada sobre la resina CTC-PS.

<sup>125</sup> Coggins, J. R.; Benoiton, N. L., Synthesis of *N*-methylamino acid derivatives from amino acid derivatives using sodium hydride/methyl iodide, *Can. J. Chem.*, **1971**, 49, 1968-1971.

<sup>126</sup> Dörner, B.; Husar, G. M.; Ostresh, J. M.; Houghten, R. A., The synthesis of peptidomimetic combinatorial libraries through successive amide alkylations, *Bioorg. Med. Chem.*, **1996**, 4, 709-715.

<sup>127</sup> Miller, S. C.; Scanlan, T. S., oNBS-SPPS: a new method for solid-phase peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 2690-2691.

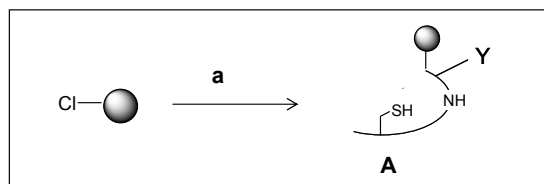
El mètode descrit per Miller i Scanlan es basa en la protecció del darrer aminoàcid d'una peptidil-resina amb el grup *o*-nitrobenzensulfonyl (*o*NBS).<sup>127</sup> L'especial acidesa del protó amida permet una *N*-metilació selectiva amb l'ús de l'agent alquilant metil-4-nitrobenzèsulfonat i la base MTBD (7-metil-1,5,7-triazabicycle[4.4.0]dec-5-è). L'eliminació del grup protector es realitza en presència de  $\beta$ -mercaptoetanol i la base DBU (1,8-diazabicycle[5.4.0]undec-7-è). L'alliberació del grup protector unit al  $\beta$ -mercaptoetanol dóna una coloració taronjosa que permet seguir qualitativament la desprotecció de l'aminoàcid. Després es pot proseguir amb l'elongació de la cadena peptídica (Esquema 2.4).



**Esquema 2.4** Esquema de la *N*-metilació en fase sòlida proposada per Miller i Scanlan.<sup>127</sup>

L'operació es pot repetir tantes vegades com residus es vulguin modificar i és aplicable tant a la química Fmoc/<sup>t</sup>Bu com a la química Boc/Bzl, sempre que no hi hagi cap element làbil a bases. S'han realitzat diversos intents d'emprar el mètode descrit per a *N*-metilar residus ancorats directament a la resina. S'ha assajat amb l'aminoàcid Fmoc-Cys(Acm)-OH i amb un de model, la Fmoc-Phe-OH. Si se segueix el procediment descrit per Miller i Scanlan no s'obté producte final, tant si s'empra la resina CTC-PS com la resina Wang com a suports polimèrics. En canvi, si s'empra l'aminoàcid model Fmoc-Phe-OH i en l'etapa de sulfonació se substitueix la base DIEA per la collidine i s'empra el doble d'equivalents de la base MTBD en l'etapa de *N*-alquilació, s'obté el producte final (Fmoc-NMe-Phe-OH) amb una puresa del 85 %. Però s'observa en el HPLC-EM la presència del dipèptid Fmoc-NMe-Phe-Phe-OH en un 15 %.

### 2.2.3 OBTENCIÓ DEL MONÒMER TETRAPEPTÍDIC D'AZATIOCORALINA EN FASE SÒLIDA



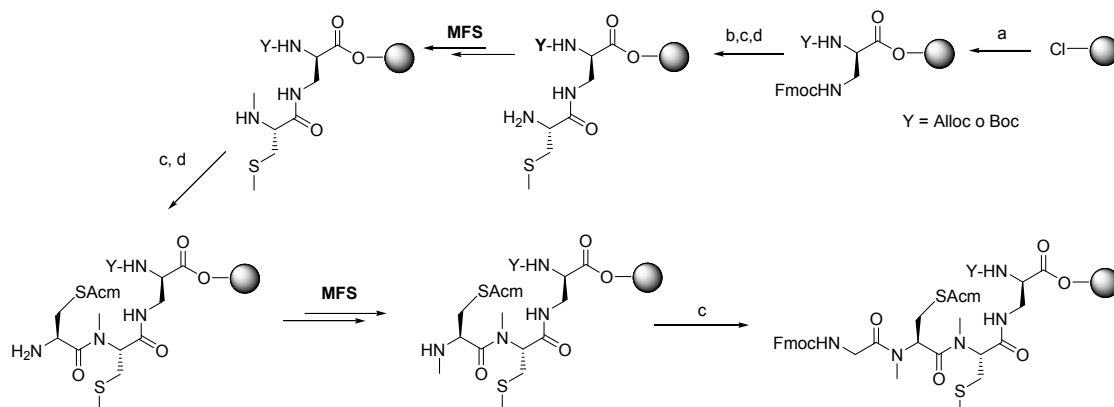
**Figura 2.19** Representació gràfica de l'obtenció, sobre el suport polimèric, del monòmer (A):  $\{[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)]&[Y-D-Dap(&)-CTC-PS]\}$  (siguent Y = Boc o Alloc)

El primer repte sintètic és l'obtenció del monòmer  $\{[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)]&[Y-D-Dap(&)-CTC-PS]\}$  (siguent Y = Boc o Alloc) (Figura 2.19.A). És essencial obtenir el monòmer amb una puresa superior al 90 % per realitzar l'acoblament de fragments. El grup protector del grup  $\alpha$ -amino del residu D-Dap determinarà si la incorporació de l'heterocicle té lloc en fase sòlida o en solució. En un principi, es decideix incorporar l'heterocicle sobre el suport polimèric per reduir el nombre d'etapes en solució. Però la dificultat d'obtenció de l'àcid 3-hidroxiquinàldic ens redirigeix cap a la incorporació de l'heterocicle en l'última etapa, en solució. L'estratègia plantejada permet la creació d'una biblioteca per explorar l'efecte de diversos elements intercaladors amb un mateix esquelet peptídic.

Per a la síntesi del monòmer  $\{[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)]&[Y-D-Dap(&)-CTC-PS]\}$  (siguent Y = Boc o Alloc) es disposen de dos mètodes d'obtenció de *N*-metil aminoàcids:

- 1-. Introduir els residus de Cys(X) (X = Me, Acm) i derivatitzar-los en fase sòlida seguint el mètode de Miller i Scanlan. Cada procés de *N*-metilació consta de 3 etapes addicionals.
- 2-. Introduir els aminoàcids derivatitzats i degudament protegits Fmoc-*NMe*-Cys(Me)-OH i Fmoc-*NMe*-Cys(Acm)-OH. Els aminoàcids requereixen d'un esforç sintètic en solució important.

Es prefereix la síntesi del monòmer introduint els aminoàcids comercials Fmoc-Cys(Me)-OH i Fmoc-Cys(Acm)-OH i realitzant les *N*-metilacions corresponents en fase sòlida. Aquesta estratègia augmenta el nombre d'etapes en fase sòlida, però permet treballar a major escala i es redueix considerablement el temps de síntesi.



**Esquema 2.5** Síntesi de la tetrapeptidil-resina [Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&][Y-D-Dap(&)-CTC-PS] (Y = Alloc o Boc) on MFS és el mètode de *N*-metilació en fase sòlida proposat per Miller i Scanlan; a) Y-D-Dap(Fmoc)-OH (0.7 eq), DIEA (7 eq), DCM; b) Pip-DMF (1:4), pip-DBU-DMF-toluè; c) Fmoc-AA-OH, HATU, DIEA en DCM-DMF (98:2); d) Pip-DMF(1:4)

Es realitza una prova de síntesi del monòmer fent les *N*-metilacions de Cys(Me) i Cys(Acm) en fase sòlida segons Miller i Scanlan. En un primer intent, s'empra la resina CTC-PS com a suport polimèric. Els acoblaments es realitzen emprant DCM-DMF (98:2) per reduir el perill de racemització de les cisteïnes però cal realitzar sempre més d'un acoblament. El DCM no seria tan bon dissolvent per a acoblaments sobre *N*-metil aminoàcids. S'obté el tetrapèptid esperat amb una puresa del 68 % i un rendiment del 30 % (Taula 2.1, monòmer 1). La puresa es determina a partir d'una anàlisi per HPLC del monòmer escindit de la resina, i el rendiment per la mesura de l'absorbància de l'eliminació del grup Fmoc del monòmer ancorat a la resina. A continuació es realitza una altra prova emprant la resina Wang perquè l'enllaç pèptid-resina és més resistent, doncs un possible problema és la labilitat de l'enllaç pèptid-resina CTC. S'obtenen, però, pitjors resultats.

A continuació, es fan varies proves per optimitzar la síntesi del monòmer i obtenir-lo amb una puresa acceptable (del 90 %). Es canvia el solvent en les reaccions d'acoblament; s'emprarà DMF en comptes de DCM i caldrà estar pendent del grau de racemització de les cisteïnes. Les proves es basen en la reducció progressiva del nombre de *N*-metilacions realitzades sobre el suport polimèric; en el monòmer 2 es substitueix el residu NMe-Cys(Me) per el NMe-Ala que s'incorpora en la forma comercial Fmoc-NMe-Ala-OH i es realitza únicament la MFS de la segona cisteïna [Fmoc-Cys(Acm)-OH], en el monòmer 3 es repeteix la síntesi anterior però ara s'introdueix l'aminoàcid obtingut prèviament en solució Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH i, en el darrer monòmer (monòmer 4), no es realitza cap MFS perquè s'introdueixen les dues Cys prèviament derivatitzades i protegides en solució [Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH i Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH]. En tots els casos, el darrer aminoàcid que s'incorpora és la Fmoc-Gly-OH.

La composició dels monòmers, així com el nombre de *N*-metilacions en fase sòlida realitzades i els resultats de puresa i rendiments es detallen a la següent (Taula 2.1)

Monòmer	Resina (mg)	GP <sup>3</sup>	2on AA	3er AA	Núm. MFS	Puresa (%)	Rend. (%)
1	250	Alloc	Cys(Me)	Cys(Acm)	2	68	38
2	500	Boc	NMe-Ala	Cys(Acm)	1	88	75
3	500	Boc	NMe-Cys(Me)	Cys(Acm)	1	75	73
4	150	Boc	NMe-Cys(Me)	NMe-Cys(Acm)	0	96	89

Monòmer 1: {[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&} [Alloc-D-Dap(&)-OH]

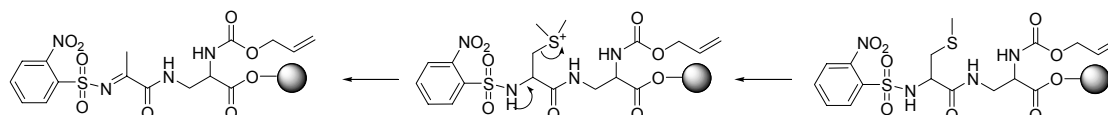
Monòmer 2: {[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Ala&} [Boc-D-Dap(&)-OH]

Monòmer 3 i 4: {[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&} [Boc-D-Dap(&)-OH]

**Taula 2.1** Monòmers sintetitzats: composició, nombre de *N*-metilacions realitzades en fase sòlida, puresa i rendiment del producte final.

Dels resultats obtinguts en la síntesi del monòmer obtenim la següent informació:

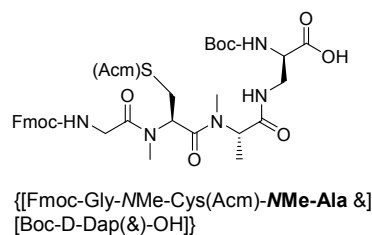
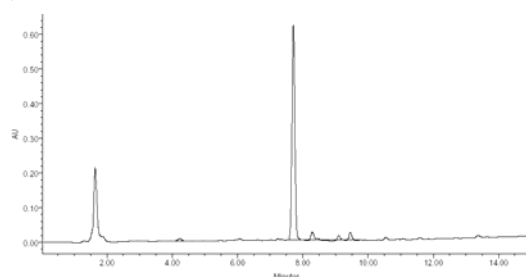
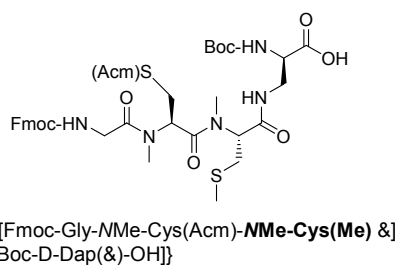
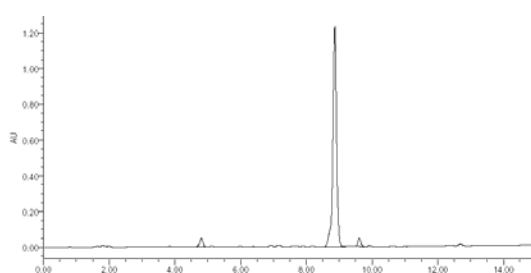
- *La Cys(Me) no es pot N-metilar segons el mètode de Miller i Scanlan.* Els rendiments obtinguts en el monòmer 1 són molt baixos i els crús molt complexos. Es proposa un problema de polialquilació de la primera cisteïna que condueix a l'eliminació del grup tioèter i formació d'un producte estable en les condicions d'eliminació del grup 2-nitrosulfonil aturant el creixement de la cadena peptídica (Figura 2.20):



**Figura 2.20** Formació del subproducte en la *N*-metilació de la Cys(Me) en fase sòlida

- *La Cys(Acm) es pot N-metilar en fase sòlida si la resta d'aminoàcids s'introdueixen derivatitzats.* En aquest cas, el monòmer (monòmer 2 i 3) s'obté amb una puresa que permetria continuar amb la seqüència d'etapes, però el rendiment és baix.
- *Les condicions de N-metilació segons Miller i Scanlan podrien escindir parcialment el pèptid de la resina.* Això explicaria els rendiments baixos obtinguts. Els resultats indiquen que el procés de *N*-metilació en fase sòlida pot escindir parcialment el pèptid de la resina CTC-PS.
- *Els millors resultats s'obtenen quan s'introdueixen els aminoàcids derivatitzats i convenientment protegits.*
- *La DMF és millor solvent que el DCM per a l'acoblament sobre N-metil aminoàcids.*

Els monòmers 2 i 4 s'han obtingut amb una puresa acceptable i permetran explorar les següents etapes sintètiques. El monòmer 2 (Figura 2.21.a) ofereix la possibilitat d'obtenir un derivat de l'azatiocoralina sintetitzat exclusivament en fase sòlida i el monòmer 4 (Figura 2.21.b) permetrà continuar endavant amb la síntesi de l'azatiocoralina.

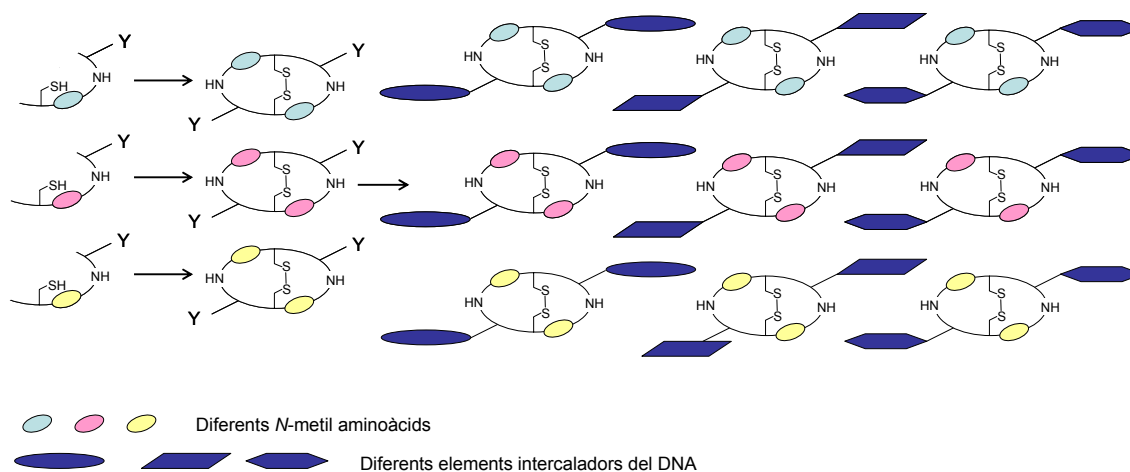
a) **Monòmer 2**b) **Monòmer 4**

**Figura 2.21** Anàlisi per HPLC de a) el tetrapèptid [[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Ala &] [ Boc-D-Dap(&)-OH]] b) [[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me) &] [ Boc-D-Dap(&)-OH]]. Condicions HPLC: gradient de 7:3 a 0:10 en 15 min (H<sub>2</sub>O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

El monòmer 2, [[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Ala &] [Boc-D-Dap(&)-CTC-PS]], és capaç de generar un derivat, el qual manté tots els elements estructurals de l'azatiocoralina i varia únicament en la composició de dos residus. La síntesi de derivats d'azatiocoralina en fase sòlida permet treballar a major escala perquè tots els aminoàcids i reactius són assequibles comercialment i això permetrà avançar en l'exploració de les següents etapes sintètiques: acoblament de fragments o elongació seqüencial, formació del pont disulfur, ciclació i incorporació de l'heterocicle intercalador.



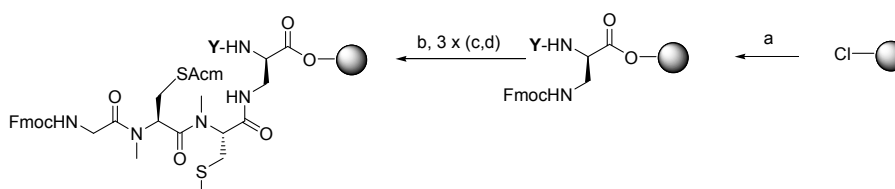
La síntesi plantejada esdevé, també, un bon mètode per a generar llibreries de compostos derivats de l'azatiocoralina basades en diferents composicions de la cadena peptídica que es poden combinar a la vegada amb diferents elements intercaladors (Figura 2.22).



**Figura 2.22** Construcció teòrica d'una llibreria de derivats de l'azatiocoralina basada en l'ús de diferents *N*-metil aminoàcids i elements intercaladors del DNA

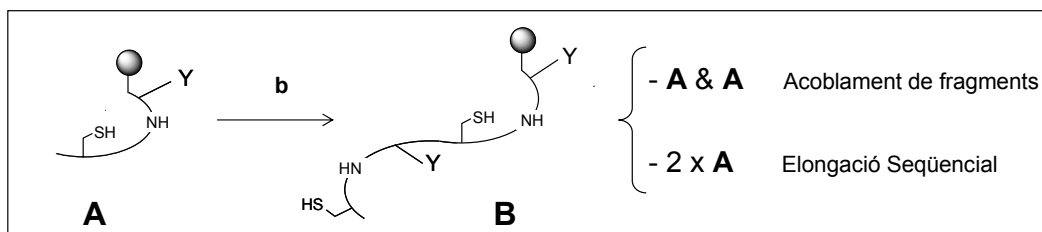
### Síntesi optimitzada del monòmer d'azatiocoralina

La síntesi del monòmer de l'azatiocoralina {[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&][Boc-D-Dap(&)-CTC-PS]} està basada en la incorporació dels aminoàcids prèviament modificats i convenientment protegits (Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH i Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH) sobre el suport polimèric CTC-PS. S'obté amb un rendiment de síntesi del 86 % i una puresa del 96 %. L'esquema de síntesi redueix el nombre de reaccions realitzades sobre la peptidil-resina i augmenta el rendiment i la puresa del producte final (Esquema 2.6).



**Esquema 2.6** Síntesi de la tetrapeptidil-resina [Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&][Boc-D-Dap(&)-CTC-PS]; a) Boc-D-Dap(Fmoc)-OH (0.7 equiv), DIEA (7 equiv), DCM; b) Pip 20 % en DMF, pip/DBU/DMF/toluè; c) Fmoc-AA-OH, HATU, DIEA en DMF; d) pip 20 % en DMF.

## 2.2.4 OBTENCIÓ DE LA CADENA PEPTÍDICA LINEAL D'AZATIORALINA EN FASE SÒLIDA. ACOBLAMENT DE FRAGMENTS FRONT ELONGACIÓ SEQÜENCIAL



**Figura 2.23** Representació gràfica de l'obtenció de la cadena peptídica lineal B a partir del monòmer A

Es planteja l'obtenció de la cadena peptídica lineal  $\{[\text{Boc-D-Dap}(\&^1)\text{-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)\&^2}][\text{Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)\&^1}][\text{Boc-D-Dap}(\&^2)\text{-CTC-PS}]\}$  a partir del monòmer 4 (Figura 2.23). L'elongació de la cadena pot ser per acoblament dels fragments tetrapeptídics (4&4) o per elongació seqüencial, és a dir, repetint les etapes de la síntesi del monòmer tetrapeptídic (2 x 4).

Des del punt de vista del cost sintètic, la síntesi per acoblament de fragments és més cara. Si es considera un únic acoblament de 3 eq per cada aminoàcid i un excés de 2 en l'acoblament del fragment, s'obté una relació respecte la síntesi seqüencial de 3:1 de la resina, 1:1 del primer aminoàcid i 3:2 de la resta d'aminoàcids. Aquestes diferències es fan més evidents a gran escala. Es vol estudiar igualment totes dues aproximacions perquè les pureses obtingudes i el temps emprat poden diferir significativament entre ambdues. En el cas d'obtenir el monòmer mitjançant el mètode de Miller i Scanlan per a la *N*-metilació d'aminoàcids sobre suport polimèric les diferències de rendiments i puresa poden ser més significatives.

L'elongació seqüencial es duu a terme repetint el protocol seguit per a la síntesi del monòmer. En canvi, per a dur a terme l'acoblament de fragments, es divideix la tetrapeptidil-resina en dues fraccions: en la primera fracció (1/3 part) s'elimina el grup Fmoc de la peptidil-resina i, en la segona fracció (2/3 parts), s'escindeix el fragment protegit de la resina. Cal recollir els filtrats de l'escissió amb un contingut d'aigua per evitar l'eliminació dels grups Boc. Per a l'acoblament dels fragments s'empra PyOAP i DIEA com a agents d'acoblament. La reacció se segueix per test de ninhidrina sense filtrar i s'addiciona més agent d'acoblament fins a obtenir un test negatiu. L'acoblament de fragments en fase sòlida requereix obtenir el monòmer amb una puresa superior al 90 % perquè els fragments no es purifiquin.

Amb el monòmer 1 es va decidir explorar la síntesi de la cadena lineal seguint les dues aproximacions: acoblament per fragments (4&4) i elongació seqüencial (2 x 4). Ja que la síntesi dels monòmers 2 i 3 presenten resultats similars es decideix provar, primer, pel monòmer 2 l'elongació

seqüencial i pel monòmer 3 l'acoblament de fragments, perquè l'elongació seqüencial permet obtenir més quantitat de pèptid lineal i l'acoblament de fragments necessita de menys Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH. El monòmer 4, que s'ha obtingut amb bons rendiments i puresa elevada es prova també seguint les dues aproximacions. Els resultats obtinguts es mostren en la següent taula:

Monòmer	Núm. MFS	4&4 (%)			2x4 (%)		
		Puresa	Rndt. acobl	Rndt. global	Puresa	Rndt. 2 <sup>a</sup> elong	Rndt. global
1	2	63	-	15	≤ 10	-	≤ 20
2	1	-	-	-	70	40	30
3	1	76	83	61	-	-	-
4	0	91	81	72	83	87	78

Monòmer 1: {[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&][Alloc-D-Dap(&)-OH]}

Monòmer 2: {[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Ala&][Boc-D-Dap(&)-OH]}

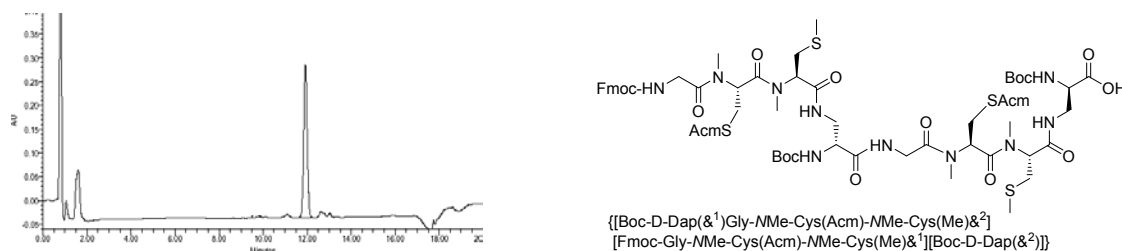
Monòmer 3 i 4: {[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&][Boc-D-Dap(&)-OH]}

**Taula 2.2** Resultats de puresa i rendiments de les cadenes peptídiques lineals a partir dels monòmers 1-4.

Dels resultats obtinguts es podet extreure la següent informació:

- El nombre de *N*-metilacions realitzades en fase sòlida està directament relacionat amb la puresa i el rendiment obtingut en la cadena peptídica lineal.
- L'acoblament de fragments ofereix millors rendiments i pureses en els casos en els que es realitzen 1 o 2 *N*-metilacions en fase sòlida degut als baixos rendiments i pureses dels monòmers. L'acoblament de fragments redueix el nombre d'etapes realitzades sobre el suport polimèric.
- En el cas d'introduir tots els aminoàcids derivatitzats (monòmer 4), l'acoblament de fragments ofereix una puresa lleugerament superior en detriment d'un rendiment lleugerament inferior respecte l'elongació seqüencial.
- El temps de síntesi per l'acoblament de fragments és inferior respecte l'elongació seqüencial, en el cas de realitzar 1 o 2 *N*-metilacions en fase sòlida i, equivalent, si s'introdueixen els aminoàcids derivatitzats.
- L'ús de la sal de fosfoni PyOAP i DIEA possibilita l'acoblament llarg de fragments. L'addició successiva dels agents d'acoblament permet obtenir la conversió total del monòmer de partida.

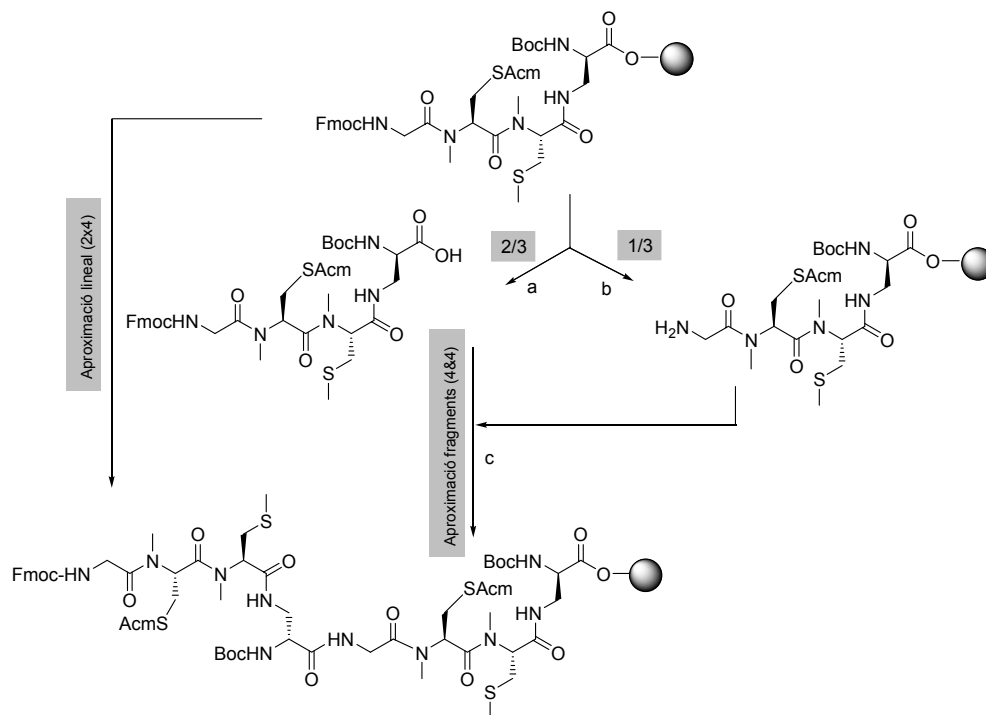
La peptidil-resina {[Boc-D-Dap(&<sup>1</sup>)-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&<sup>2</sup>] [Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&<sup>1</sup>] [Boc-D-Dap(&<sup>2</sup>)-CTC-PS]} obtinguda a partir de l'acoblament de fragments (4&4) del monòmer 4 és un bon punt de partida per les etapes d'estructuració de la cadena peptídica(Figura 2.24).



**Figura 2.24** Anàlisi per HPLC de la cadena lineal d'azitacoralina. Condicions HPLC: gradient de 7:3 a 3:7 en 15 min ( $\text{H}_2\text{O}$  amb 0.045 % TFA:MeCN amb 0.036 % TFA)

### Síntesi optimitzada de la cadena peptídica lineal de l'azitacoralina

La síntesi de la cadena peptídica lineal de l'azitacoralina a partir del monòmer anteriorment optimitzat es pot dur a terme a través d'una elongació seqüencial o per acoblament de fragments. L'acoblament de fragments es realitza amb un excés de monòmer protegit de 2 i PyOAP i DIEA (2:6) com a agents d'acoblament (DCM, 25 °C, 24 h) (Esquema 2.7). En tots dos casos s'obtenen resultats similars.



**Esquema 2.7** Síntesi de la cadena lineal  $\{[\text{Boc-D-Dap}(\&^1)\text{-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)\&^2}]\text{[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)\&^1][Boc-D-Dap}(\&^2)\text{-CTC-PS]}\}$ ; a) 1 % de TFA en DCM (5 x 30 s), b) pip-DMF (1:4) (1 x 1 min, 3 x 5 min, 1 x 10 min), c) PyOAP/DIEA (1:3) (DCM, 24 h)

## 2.2.5 PRIMERA CICLACIÓ: FORMACIÓ DEL PONT DISULFUR. SOLUCIÓ FRONT FASE SÒLIDA

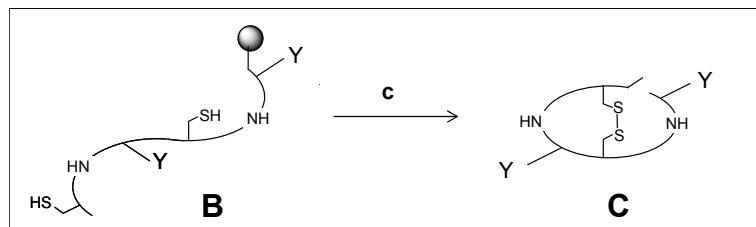


Figura 2.25 Representació gràfica de la formació del pont disulfur a partir de la cadena peptídica lineal.

S'arriba al punt d'iniciar la tanda d'etapes sintètiques relacionades, es podria dir, amb l'estructuració de la cadena. La primera etapa és la formació del pont disulfur, {[Boc-D-Dap(&<sup>1</sup>)-Gly-NMe-Cys(&<sup>3</sup>)-NMe-Cys(Me)&<sup>2</sup>] [Fmoc-Gly-NMe-Cys(&<sup>3</sup>)-NMe-Cys(Me)&<sup>1</sup>][Boc-D-Dap(&<sup>2</sup>)-OH]}, on &<sup>3</sup> marca el nou enllaç (Figura 2.25). La formació del pont disulfur es realitza, generalment, en solució a alta dilució (1mM) per afavorir el correcte plegament de la molècula i la reacció intramolecular respecte la intermolecular. A la bibliografia hi ha descrits molts mètodes de formació de ponts disulfurs en funció dels grups protectors de tiols emprats. En el nostre cas, el pont disulfur es forma per addició de iode. El iode elimina els grups Acm i forma el pont disulfur en una mateixa etapa. L'èxit de la formació del pont disulfur depèn de paràmetres relacionats amb la conformació de la cadena lineal.

La formació del pont disulfur es durà a terme amb el grup  $\alpha$ -amino de la cadena peptídica lineal lliure; el grup amino no interfereix en la formació del pont disulfur amb iode i, en canvi, les condicions bàsiques emprades en l'eliminació del grup Fmoc poden interferir en l'estabilitat del producte ciclitzat.

Primer es prova la formació del pont disulfur en solució perquè és el mètode descrit més general i permet seguir l'evolució de la reacció i avaluar el comportament de la cadena per acció del iode. La reacció s'assaja primer amb la cadena peptídica lineal obtinguda a partir del monòmer 1. L'escissió del pèptid de la resina es dona per tractaments amb una solució 1 % de TFA en DCM (5 x 30 s). Els filtrats es recullen en aigua per evitar l'eliminació dels grups protectors permanents Boc. Per a la formació del pont disulfur en solució es proven els dos mètodes generals descrits a la bibliografia:

- Iode en una solució de DCM–MeOH (4:1). L'excés de iode s'elimina per l'addició d'una solució aquosa de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> i rentats amb aigua.
- Iode en una solució d'àcid acètic–aigua (4:1). L'excés de iode s'elimina per extraccions amb CCl<sub>4</sub>.

Es proven les dues condicions de reacció amb una alíquota de la cadena peptídica lineal perquè es desconeix la solubilitat del producte ciclat. S'observa una formació relativament ràpida del pont disulfur; en 40 min la conversió del producte lineal és total. S'obtenen, però, crus molt complexos i les etapes d'extraccions no aconsegueixen aïllar el producte final de l'excés de iode en cap de les dues proves realitzades.

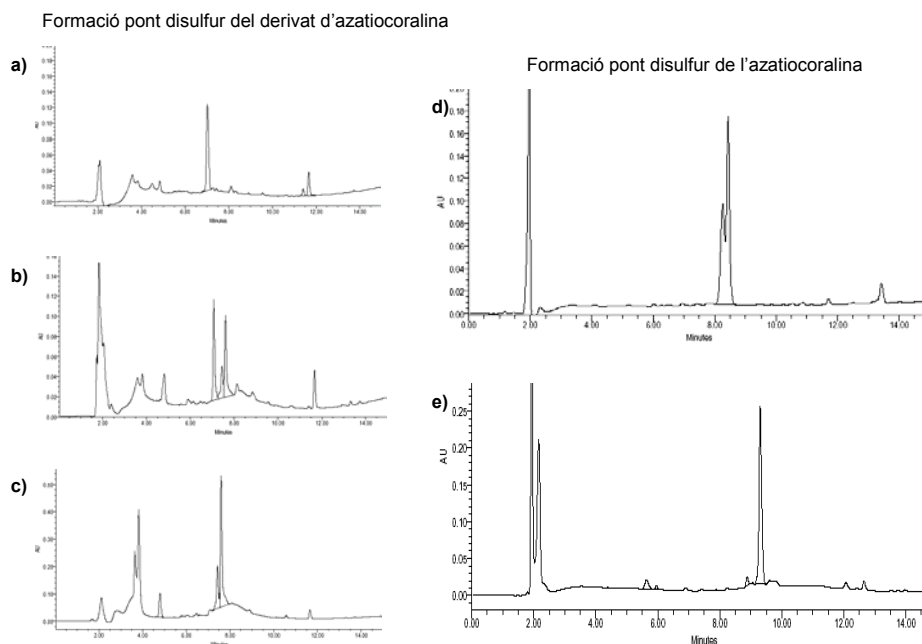
L'obtenció de la cadena peptídica lineal que conté una *N*Me-Ala en substitució de la *N*Me-Cys(Me) (monòmer 2) ofereix l'oportunitat d'explorar la formació del pont disulfur en fase sòlida. La fase sòlida presenta l'efecte de *pseudo*-dilució que afavoreix les ciclacions intramoleculares i alhora permet eliminar fàcilment els excessos de iode independentment de la solubilitat del pèptid.

Es prova l'addició de iode (2.5 eq per Acm) dissolt en DMF sobre la peptidil-resina. Després de 10 min es filtra la solució de iode i s'analitza una alíquota de la peptidil resina per HPLC-EM. S'observa l'evolució de la reacció i la presència d'un 50 % de la cadena lineal (Figura 2.26.b). Es repeteix el mateix tractament dues vegades més fins a observar la conversió total del producte de partida (Figura 2.26.c).

La cadena lineal d'azatiocoralina (a partir del monòmer 4) se sotmet al mateix tractament de iode descrit anteriorment. En aquest cas, s'observa la formació del producte ciclat en només 10 min (Figura 2.26.e). Sembla que la seqüència més proxima al pèptid natural té més tendència a la ciclació. El iode s'elimina de la resina amb nombrosos rentats de DCM, CH<sub>3</sub>Cl i CCl<sub>4</sub>. A vegades s'obté una peptidil-resina amb forma de pic bifid (en l'anàlisi per HPLC) (Figura 2.26.d). Segurament existeix un equilibri de dues conformacions diferents degut a la presència de *N*-metil aminoàcids a la seqüència. La formació del pont disulfur restringeix la conformació del pèptid i s'obté un pic únic.

Finalitzada la formació del pont disulfur es duu a terme l'escissió del pèptid de la resina amb una solució 1 % de TFA en DCM. Els filtrats es recullen igualment en aigua per evitar l'eliminació dels grups protectors Boc.

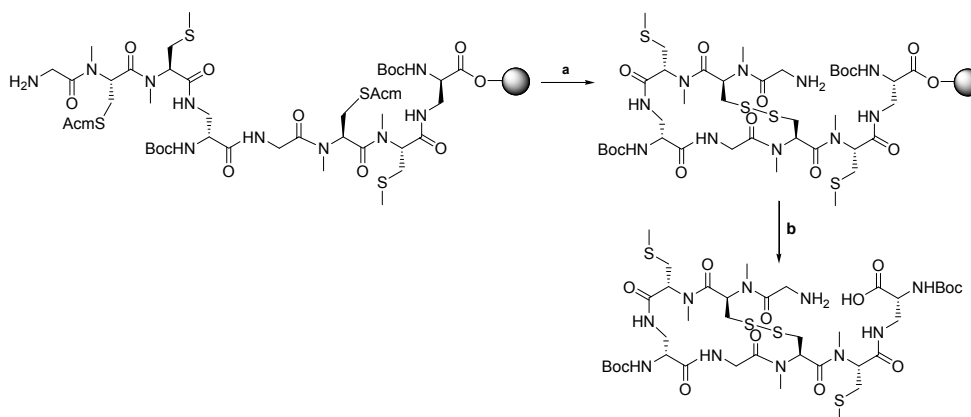
La fase sòlida facilita enormement l'eliminació del iode i l'aïllament del producte ciclat. A més, s'obtenen temps de reacció més curts que indiquen que la formació del pont disulfur ha estat ràpida.



**Figura 2.26** Anàlisi per HPLC de a) cadena lineal del derivat d'azatiocoralina amb N-terminal lliure, b) producte de formació del pont disulfur després d'un tractament amb iode i c) després de 2 tractaments amb iode i d) cadena lineal amb l'extrem N-terminal lliure de l'azatiocoralina, b) producte de formació del pont disulfur després de 10 min amb iode. Condicions HPLC: gradient de 10:0 a 0:10 en 15 min per a-c i de 9:1 a 3:7 en 15 min per d i e (H<sub>2</sub>O amb 0.045 % TFA:MeCN amb 0.036 % TFA)

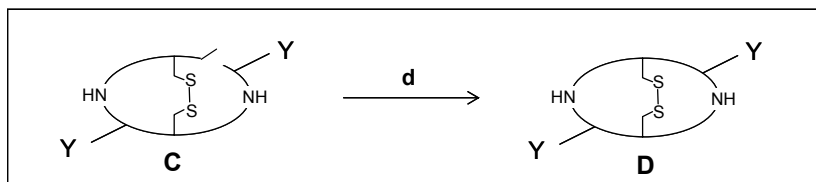
### Formació optimitzada del pont disulfur en la cadena de l'azatiocoralina

La formació del pont disulfur a partir de la cadena lineal s'aconsegueix fàcilment per addició sobre la peptidil resina d'una solució de iode (2.5 eq per AcM) dissolt en DMF durant 10 min (Esquema 2.8). Rentant amb DCM, CHCl<sub>3</sub> i CCl<sub>4</sub> s'eliminen les restes de iode d'una forma còmode i eficient.



**Esquema 2.8** Formació del pont disulfur en fase sòlida. a) I<sub>2</sub> (2.5 eq per AcM) (DMF, 10 min), b) 1 % de TFA en DCM (5 x 30 s)

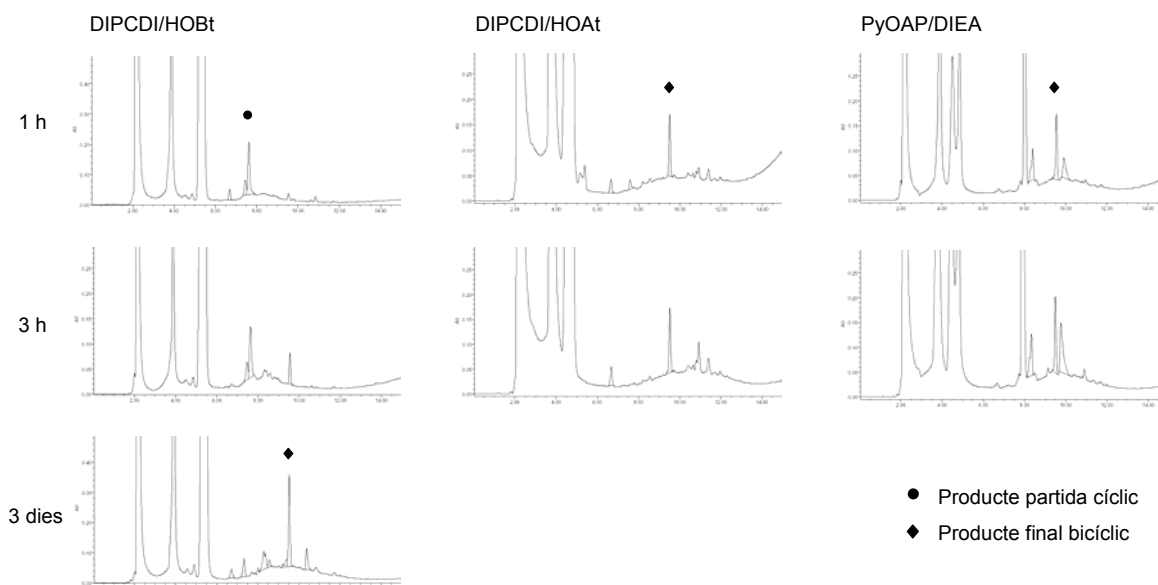
## 2.2.6 SEGONA CICLACIÓ: OBTENCIÓ DEL PRODUCTE BICÍCLIC. ÚS DE LES CARBODIIMIDES



**Figura 2.27** Representació gràfica de l'etapa de formació del producte bicíclic en solució

La ciclació és l'etapa de síntesi més complicada en l'obtenció de depsipèptids cíclics. No existeix un agent d'acoblament universal per a les ciclacions i sovint cal tantejar el comportament del pèptid lineal en una bateria de proves amb diferents agents d'acoblament. La segona ciclació en solució es realitza a alta dilució (1 mM) per afavorir l'atac intramolecular front l'intermolecular (Figura 2.27).

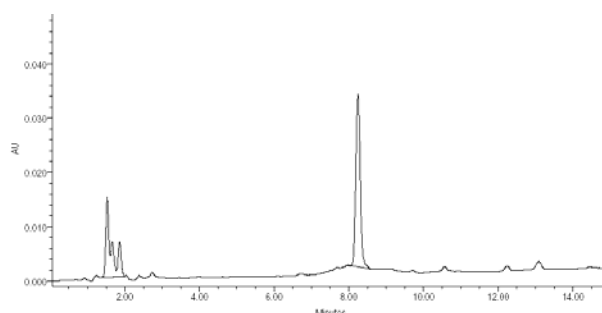
Es disposa de pèptid lineal anàleg de l'azatiocoralina, obtingut a partir del monòmer 2: [Boc-D-Dap(&sup1)-Gly-NMe-Cys(&sup2)-NMe-Ala(&sup3)] [H-Gly-NMe-Cys(&sup2)-NMe-Ala(&sup1)][Boc-D-Dap(&sup1)-OH], que servirà per avaluar la ciclació en solució emprant els agents d'acoblament: DIPCDI/HOBt, DIPCDI/HOAt i PyOAP/DIEA. Les diferents proves de ciclació es realitzen en paral·lel, a alta dilució, i amb alíquotes del producte liofilitzat (5 mg). Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 2.28:



**Figura 2.28** Cromatogrames de les proves de la segona ciclació de l'anàleg de l'azatiocoralina emprant tres parelles d'agents d'acoblament diferents. Condicions HPLC: gradient de 0:1 a 1:0 en 15 min (H<sub>2</sub>O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)



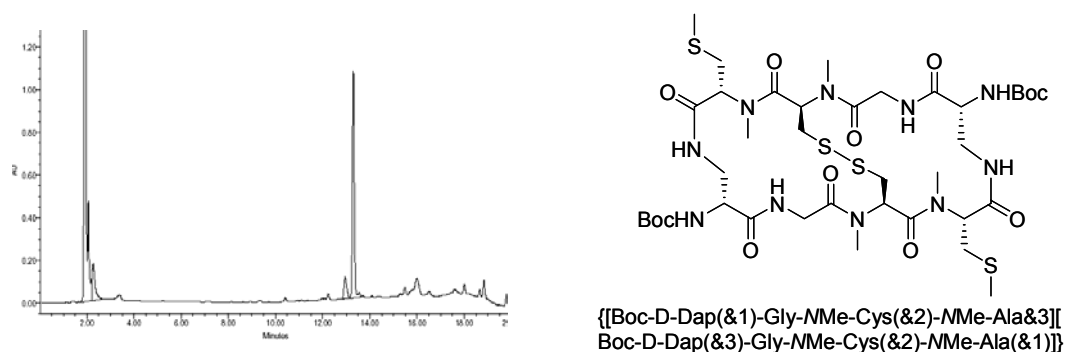
De les condicions provades, les que millor resultat han donat són: la carbodiimida DPCDI i l'HOAt en presència de DIEA. Si s'empra DPCDI i HOAt el producte bicíclic s'obté en una hora de reacció i no es detecta formació de productes secundaris com en el cas d'usar la sal de fosfoni. En canvi, si es fa servir la parella d'acoblament DPCDI/HOBt la reacció és incompleta als 3 dies de reacció. Es comprova que la ciclació amb DPCDI i HOAt és reproduïble a major escala (2 x 25 mg de pèptid). Els productes ciclats es purifiquen en un sistema HPLC-semipreparatiu perquè no es poden eliminar les restes d'agents d'acoblament mitjançant rentats aquosos (Figura 2.29). S'obtenen 26 mg de producte ciclats pur, que suposa un rendiment del 44 % (formació pont disulfur, escissió de la resina, purificació). L'obtenció del producte pur facilitarà l'estudi de la incorporació de l'heterocicle.



**Figura 2.29** Cromatograma del producte bicíclic derivat de l'azatiocoralina protegit i purificat. Condicions HPLC: gradient de 7:3 a 5:5 en 15 min (H<sub>2</sub>O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 %

Posteriorment, es prenen també alíquotes del pèptid lineal d'azatiocoralina escindit (5 mg) provinents del monòmer 4 i es cicla en les mateixes condicions emprades en el derivat d'azatiocoralina i s'obtenen comportaments pràcticament idèntics. L'ús de la carbodiimida DPCDI però, ens marca una etapa de purificació addicional.

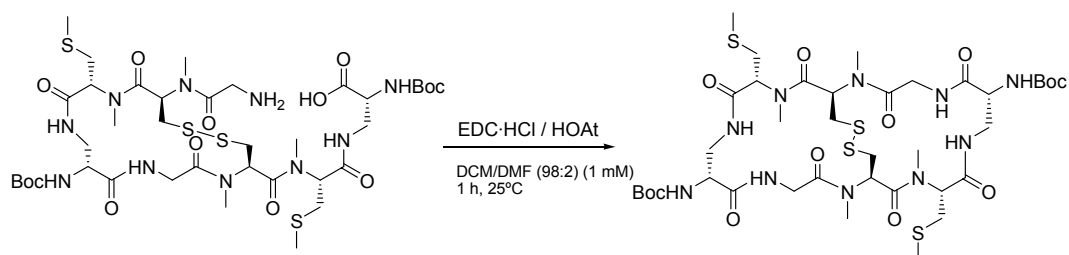
Es tanteja l'ús de la carbodiimida soluble EDC·HCl emprant, igualment, HOAt. L'EDC·HCl pot ser eliminada del medi de reacció mitjançant rentats de solucions aquoses àcides. Es prenen 5 mg de pèptid i s'assaja l'ús de la carbodiimida EDC·HCl i HOAt com a agents de ciclació. El resultat és molt positiu perquè la ciclació es dona de forma similar i els rentats aquosos de la reacció eliminen les restes d'agents d'acoblament. Així, s'obté el producte amb una puresa del 88 % (Figura 2.30) i s'ha aconseguit, per tant, eliminar l'etapa de purificació.



**Figura 2.30** Anàlisi per HPLC, estructura i nom sistemàtic del pèptid bicíclic d'azatiocoralina. Condicions HPLC: gradient de 9:1 a 3:7 en 15 min (H<sub>2</sub>O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

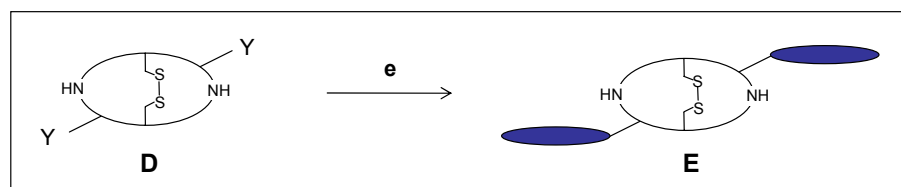
### Ciclació optimitzada en solució de l'azatiocoralina

Finalment, la ciclació de l'azatiocoralina en solució per l'enllaç amida s'ha aconseguit fent ús de la carbodiimida soluble EDC·HCl i HOAt com a agents d'acoblament. La reacció es duu a terme a alta dilució en una solució de DCM–DMF (98:2) (1 mM) durant 1 h (Esquema 2.9). Els rentats amb solucions aquoses àcides aïllen el producte ciclat amb una puresa del 88 %.



**Esquema 2.9** Etapa de ciclació en solució de l'azatiocoralina

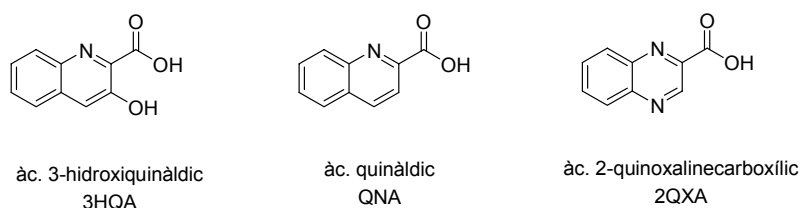
## 2.2.7 INCORPORACIÓ DELS HETEROCICLES INTERCALADORS. OBTENCIÓ DE L'AZATIOCORALINA I DERIVATS



**Figura 2.31** Representació gràfica de l'obtenció del producte final (E) a partir del bicicle protegit (D)

Amb el producte ciclat ja només resta l'eliminació dels grups protectors permanents Boc i la incorporació dels heterocicles intercaladors (Figura 2.31). Per a l'eliminació dels grup Boc existeixen dos mètodes generals; mitjançant una solució comercial de HCl·1,4-dioxà (4 M) o bé, emprant TFA en una solució al 50 % en DCM o al 95 % en aigua. El solvent s'elimina en ambdós casos sota pressió reduïda i és essencial realitzar diverses coevaporacions amb 1,4-dioxà o eter per eliminar les traces d'àcid. És preferible realitzar l'eliminació dels grups Boc amb la solució de HCl perquè les restes d'àcid no poden interferir en el posterior acoblament dels heterocicles. La incorporació de l'heterocicle intercalador es realitza mitjançant una preactivació amb els agents d'acoblament i després l'addició del pèptid bicíclic desprotegit. En aquest cas, al tractar-se d'un acoblament sobre amines primàries, també es fa ús de les carbodiimides.

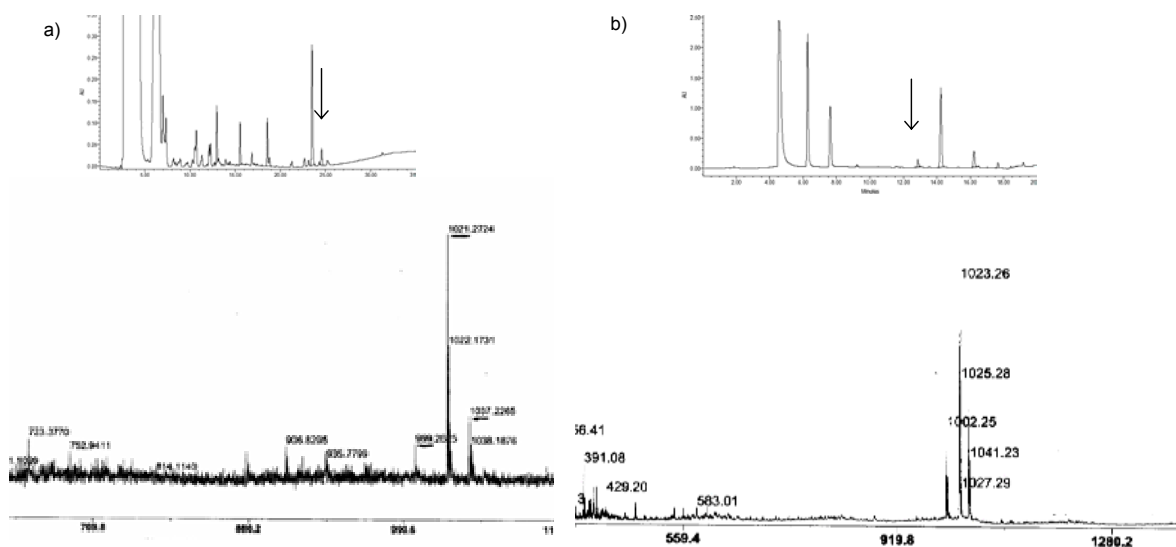
Es realitzen les primeres proves sobre el pèptid bicíclic anàleg de l'azatiocoralina {[Boc-D-Dap(&sup1)-Gly-NMe-Cys(&sup2)-NMe-Ala(&sup3)] [Boc-D-Dap(&sup3)-Gly-NMe-Cys(&sup2)-NMe-Ala(&sup1)]} i s'empen heterocicles comercials: l'àcid 2-quinoxalinecarboxílic (2QXA) i l'àcid quinàldic (QNA). El primer és l'heterocicle que es troba en altres pèptids de la família, com el triostin A i l'equinomicin. L'àcid quinàldic és el precursor biosintètic de l'heterocicle natural de la tiocoralina. Després es farà una prova amb el bicicle peptídic de l'azatiocoralina i l'àcid 2-quinoxalinecarboxílic (2QXA) i, finalment, amb l'àcid 3-hidroxiquinàldic (Figura 2.32).



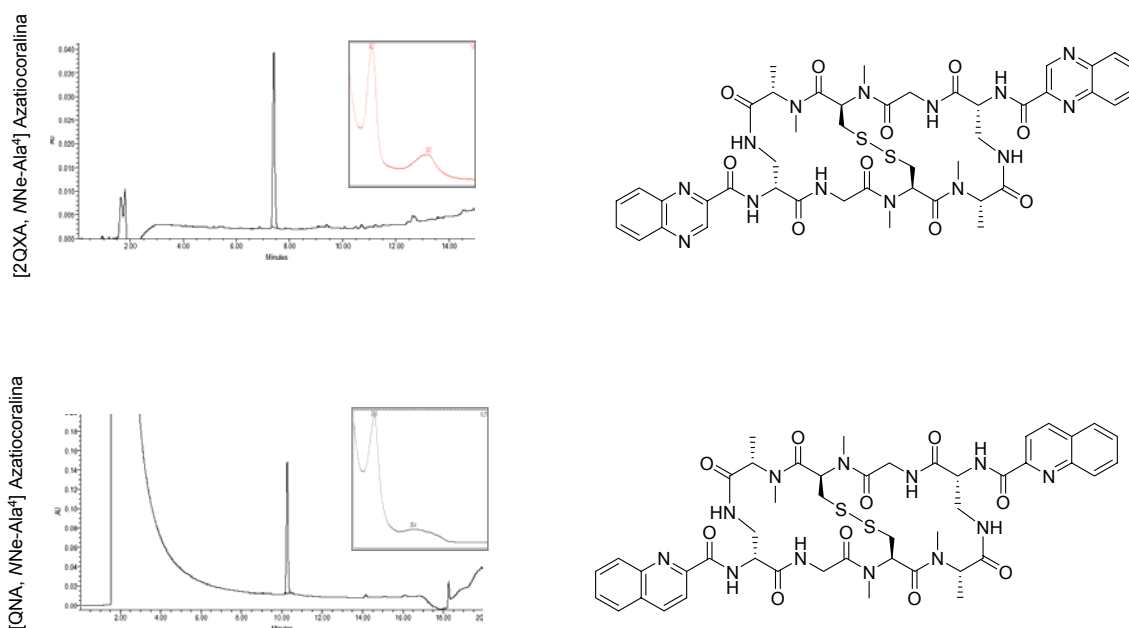
**Figura 2.32** Heterocicles que s'incorporaran als pèptids bicíclics obtinguts

### 2.2.7.1 Obtenció dels primers derivats de l'azatiocoralina: [2QXA, NMe-Ala<sup>4</sup>] azatiocoralina i [QNA, NMe-Ala<sup>4</sup>] azatiocoralina.

Per a l'eliminació dels grups Boc s'empren dues condicions diferents en dues fraccions del pèptid bicíclic lliure del derivat d'azatiocoralina: una solució de HCl-1,4-dioxà (4 M) durant 1 hora i una solució 50 % de TFA en DCM durant 1 h. A continuació, s'introdueix a cada fracció un heterocicle comercial diferent, 2QXA en la primera, i QNA en la segona, i es prova la DIPCDI i HOAt com a agents d'acoblament. La reacció té lloc en DCM-DMF (5:1) durant 3 dies. En tots dos casos s'obtenen cromatogrames complexos, tot i que els espectres de MALDI ofereixen la massa del producte esperat de forma neta (Figura 2.33). Les masses que s'obtenen en el HPLC-EM són petites, de l'ordre de 100-300 i es poden correspondre a derivats dels heterocicles. Els crus de reacció es purifiquen mitjançant un sistema HPLC-semipreparatiu (Figura 2.34). S'obté 1 mg del derivat [2QXA, NMe-Ala<sup>4</sup>] azatiocoralina d'una puresa del 97 % amb un rendiment global de síntesi del 1.2 % i 0.2 mg de [QNA, NMe-Ala<sup>4</sup>] azatiocoralina de puresa del 98 % i un rendiment global de síntesi del 1.0 %.



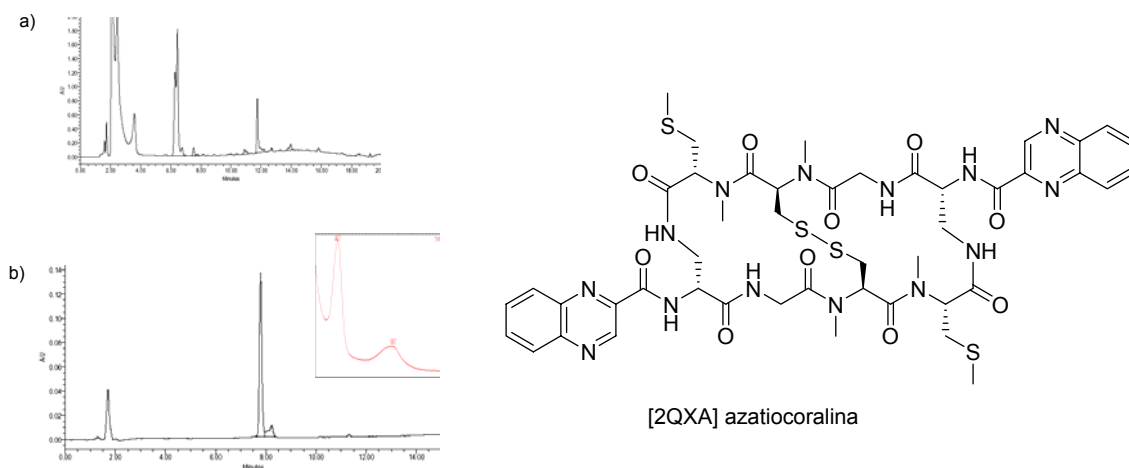
**Figura 2.33** Anàlisi per HPLC i MALDI-TOF del cru de reacció de la incorporació de l'heterocicle intercalador a) [QNA, NMe-Ala<sup>4</sup>] azatiocoralina, b) [2QXA, NMe-Ala<sup>4</sup>] azatiocoralina. Condicions HPLC: gradient (a) de 10:0 a 0:10 en 30 min, C<sub>4</sub> i (b) de 10:0 a 0:10 en 15 min, C<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)



**Figura 2.34** Cromatogrames d'HPLC i UV dels derivats d'azatiocoralina finals. Condicions HPLC: gradient de 8:2 a 3:7 en 15 min (H<sub>2</sub>O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

### 2.2.7.2 Obtenció de l'anàleg [2QXA] azatiocoralina.

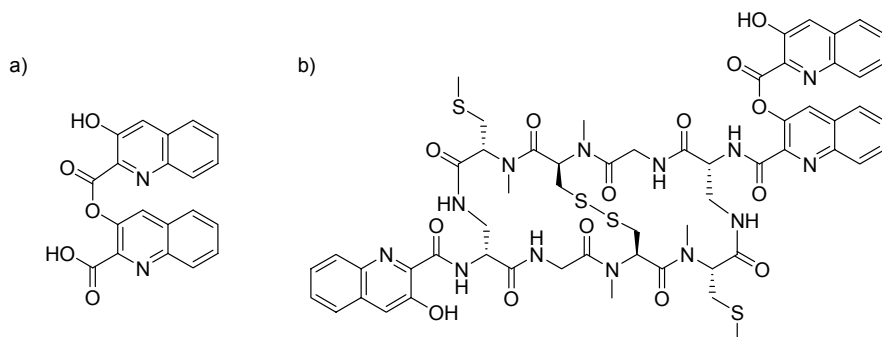
S'obté un derivat de l'azatiocoralina per introducció de l'àcid 2-quinoxalinecarboxílic al bicicle d'azatiocoralina. Es provarà l'eliminació dels grups Boc amb una solució 95 % de TFA en aigua durant 1 h en una bany aigua-gel i per a la incorporació de l'heterocicle es fa servir la carbodiimida soluble EDC·HCl per facilitar l'etapa de purificació del producte final. Es prenen 10 mg del bicicle desprotegit i es fan reaccionar amb l'àcid 2-quinoxalinecarboxílic (1.2 eq) prèviament activat amb la carbodiimida soluble EDC·HCl i HOAt com a agents d'acoblament. Una anàlisi per HPLC-EM, a les 24 h de reacció, mostra la presència de producte final i també de producte de partida i com la reacció no evoluciona després de 6 h més. Llavors, s'addiciona més heterocicle (1.2 eq) i els mateixos agents d'acoblament i després de dos dies de reacció s'observa la conversió total del producte de partida i s'obté el producte final com a producte majoritari (Figura 2.35.a). El producte es purifica en el sistema HPLC-analític i s'obté el pèptid [2QXA] azatiocoralina amb un 87 % de puresa (Figura 2.35.b).



**Figura 2.35** a) Cromatogrames d'HPLC del cru de reacció de la incorporació de l'heterocicle i b) cromatogrames d'HPLC i estructura de [2QXA] azatiocoralina. Condicions HPLC: gradient de 8:2 a 3:7 en 15 min ( $\text{H}_2\text{O}$  amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

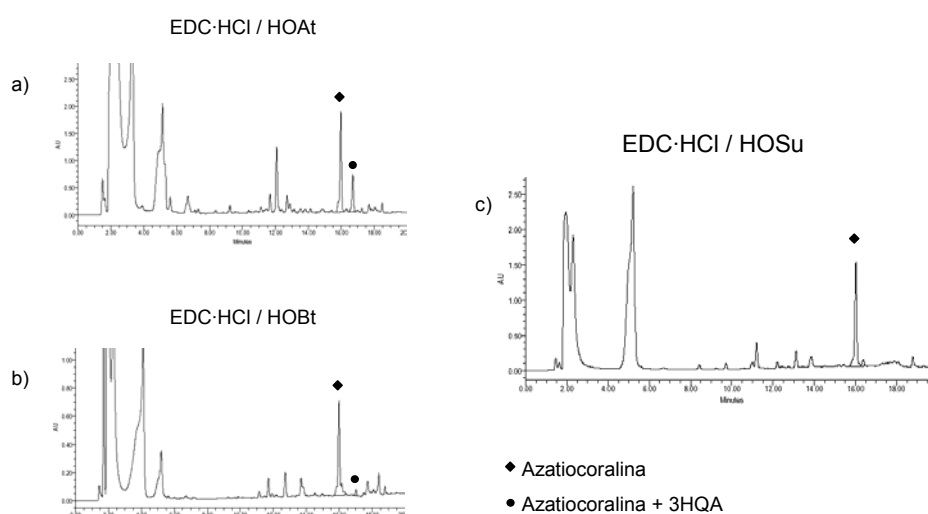
### 2.2.7.3 Obtenció de l'azatiocoralina

Es pren el bicicle d'azatiocoralina desprotegit i s'introdueix l'heterocicle natural, l'àcid 3-hidroxiquinàldic, seguint el mateix procediment descrit anteriorment. Després de dos dies de reacció s'obté el producte final com a producte majoritari (Figura 2.37.a). Però també es detecta la presència d'un producte similar a l'azatiocoralina més apolar, i per masses es determina que es correspon amb una sobreincorporació de l'àcid 3-hidroxiquinàldic. A més, s'obté la massa 359, corresponent al dímer de l'àcid 3-hidroxiquinàldic (Figura 2.36). Això indica que durant l'etapa de pre-activació de l'heterocicle es donaria la formació del dímer al reaccionar el grup hidroxil amb l'èster activat de l'àcid 3-hidroxiquinàldic i, posteriorment, l'èster actiu del dímer reaccionaria amb el bicicle peptídic.



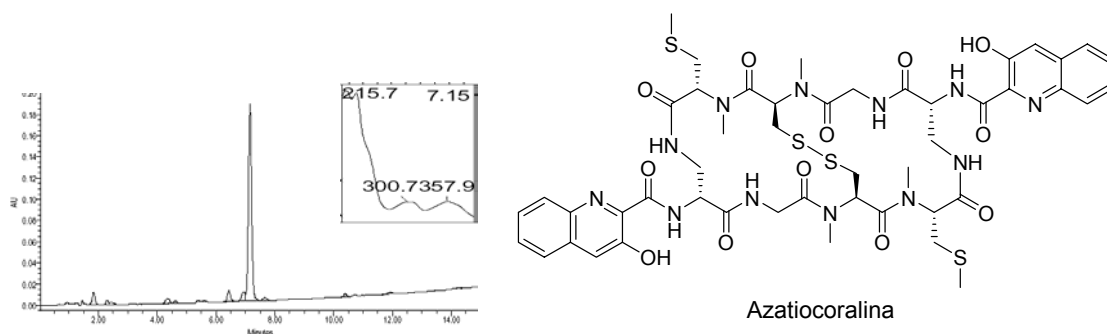
**Figura 2.36** Estructura de a) el producte secundari per sobre incorporació de l'àcid 3-hidroxiquinàldic i b) el dímer de l'àcid 3-hidroxiquinàldic format durant l'etapa de preactivació amb EDC HCl i HOAt

Per tal d'evitar la formació del producte secundari es realitza la incorporació de l'heterocicle substituint l'HOAt per l'HOBt perquè és menys reactiu. Es comprova com la formació del subproducte ha disminuït significativament (Figura 2.37.b). Finalment, es prova l'acoblament de l'heterocicle amb l'HOSu, encara menys reactiu que l'HOBt. En aquest cas s'observa com, després de dos dies de reacció i amb una addició d'heterocicle i agents d'acoblament addicional, ja no resta pèptid de partida i tampoc s'ha format el producte de sobreincorporació de l'heterocicle (Figura 2.37.c).



**Figura 2.37** Anàlisi per HPLC dels crus de reacció d'incorporació de l'àcid 3-hidroxiquinàldic al bicicle desprotegit d'azatiocoralina emprant diferents agents d'acoblament a) EDC·HCl/HOAt, b) EDC·HCl/HOBt, c) EDC·HCl/HOSu. Condicions HPLC: gradient de 9:1 a 3:7 en 15 min (H<sub>2</sub>O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

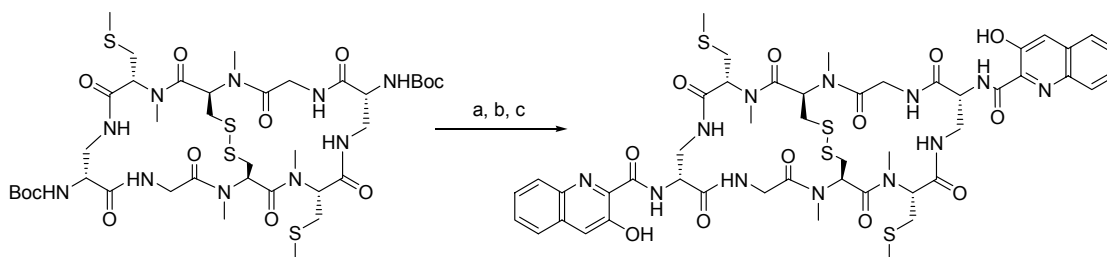
Es repeteixen les mateixes condicions amb més quantitat de bicicle desprotegit (12.7 mg). El cru obtingut no és completament soluble en aigua, acetonitril ni en metanol. Per això s'opta per la purificació en capa fina preparativa (5 % MeOH en DCM). I s'obté el producte en tres fraccions: 2.4 mg amb una puresa del 80 % (Figura 2.38), 5.4 mg amb una puresa del 75 % i 10.1 mg amb una puresa del 40 %. I un rendiment global del 3.5 %.



**Figura 2.38** Cromatograma d'HPLC i UV i estructura de l'azatiocolina obtinguda. Condicions HPLC: gradient de 5:5 a 1:9 en 15 min (A: H<sub>2</sub>O amb 0.045 % TFA i B: ACN amb 0.036 % TFA)

### Incorporació optimitzada de l'àcid 3-hidroxiquinàldic

Les condicions òptimes per a la incorporació de l'àcid 3-hidroxiquinàldic són emprant EDC-HCl i HOSu com a agents d'acoblament. La reacció transcorre durant 2 dies i el producte final es purifica per capa fina preparativa amb 5 % MeOH en DCM com eluents (Esquema 2.10).

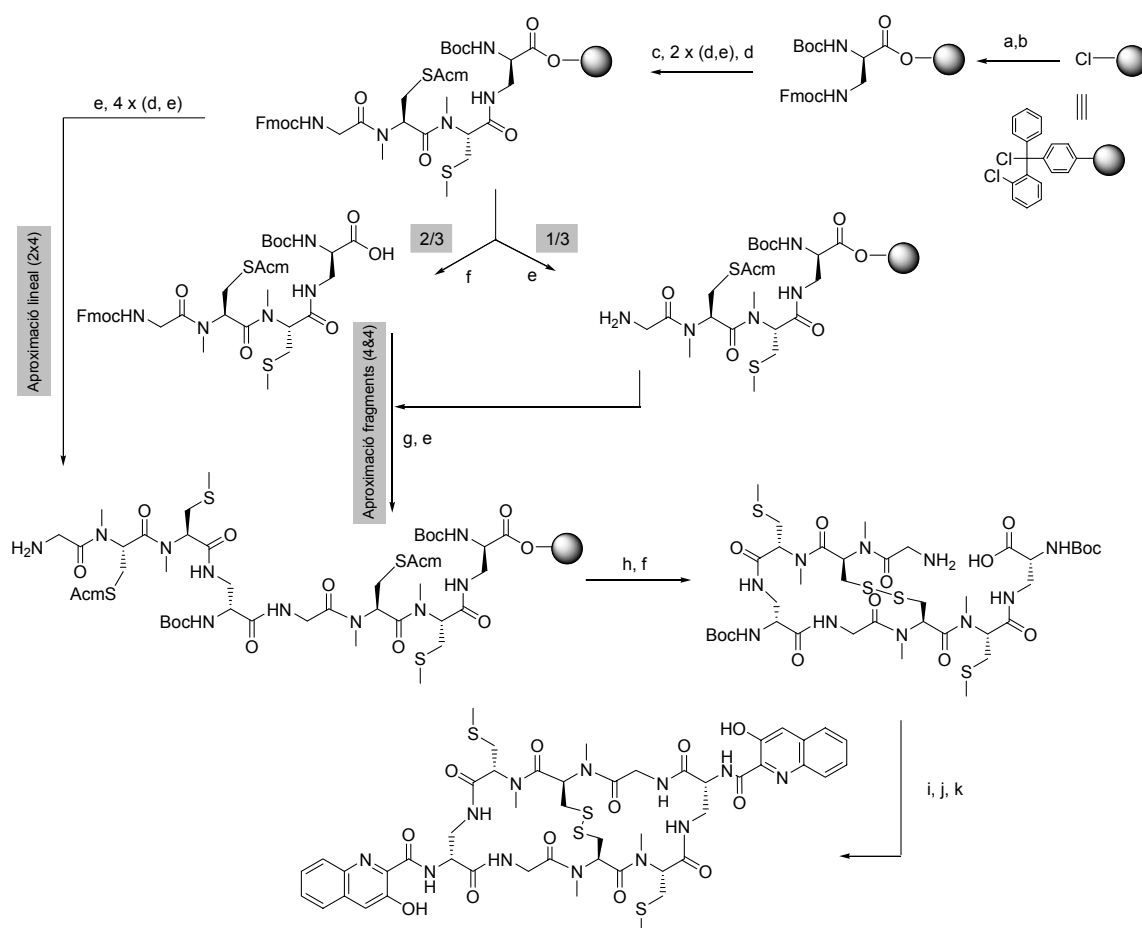


**Esquema 2.10** Obtenció de l'azatiocolina a partir del bicicle protegit. a) 95 % de TFA en H<sub>2</sub>O, 1 h, b) àc. 3-hidroxiquinàldic, EDC HCl, HOSu, DCM-DMF (98:2), 2 dies, c) purificació per capa fina preparativa (MeOH-DCM, 5:95)



## 2.2.8 LA SÍNTESI EN FASE SÒLIDA DE L'AZIOTICORALINA

El treball realitzat permet establir l'estratègia de síntesi en fase sòlida de l'azatiocoralina. El següent esquema recull l'estratègia de síntesi i les millors condicions que s'han trobat per a cada una de les etapes (Esquema 2.11). L'estratègia plantejada permet la síntesi de derivats de l'azatiocoralina que contenen heterocicles intercaladors diferents tot i que les condicions d'incorporació de l'heterocicle dependran de la seva reactivitat. L'estratègia també contempla la possibilitat d'obtenir una biblioteca de derivats que contenen un *N*-metil aminoàcid diferent al *N*Me-Cys(Me) i heterocicles diferents. En aquests casos, la síntesi de l'esquelet peptídic pot realitzar-se íntegrament sobre suport polimèric.



**Esquema 2.11** Definició de l'estratègia de síntesi en fase sòlida per l'azatiocoralina. a) Boc-D-Dap(Fmoc)-OH, DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; b) MeOH; c) piperidina-DMF (1:4), piperidina-DBU-toluè-DMF (1:1:4:14); d) Fmoc-AA-HO/HATU/DIEA, DMF; e) piperidina-DMF (1:4); f) TFA-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99); g) PyOAP/DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; h) I<sub>2</sub>, DMF; i) EDC HCl/HOAt/DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mM); j) TFA-H<sub>2</sub>O (19:1); k) 3-hidroxiquinàdic/EDC HCl/HOSu/DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

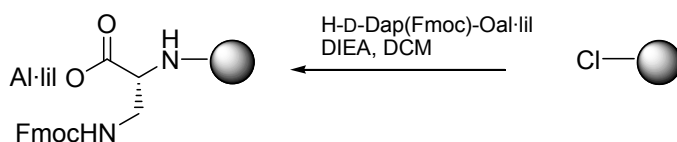
La síntesi de l'azatiocoralina, seguint l'estratègia definida, no presenta problemes de formació de DKPs i l'aproximació lineal dóna resultats molt semblants a la realitzada per acoblament de fragments. L'èxit de l'estratègia radica en la tria del primer aminoàcid incorporat a la resina CTC-PS i en el concurs dels diferents agents d'acoblament emprats en cada una de les etapes de la síntesi.

Després d'obtenir una bona estratègia de síntesi per l'azatiocoralina en fase sòlida volem provar de realitzar les dues ciclacions (formació del pont disulfur i formació del bicicle per unió cadena-cua) sobre el suport polimèric. Aquest canvi, a més, permet obtenir un producte amb dos heterocicles intercaladors diferents.

## 2.3 DUES CICLACIONS EN FASE SÒLIDA. SÍNTESI ALTERNATIVA PER A L'AZATIOCORALINA

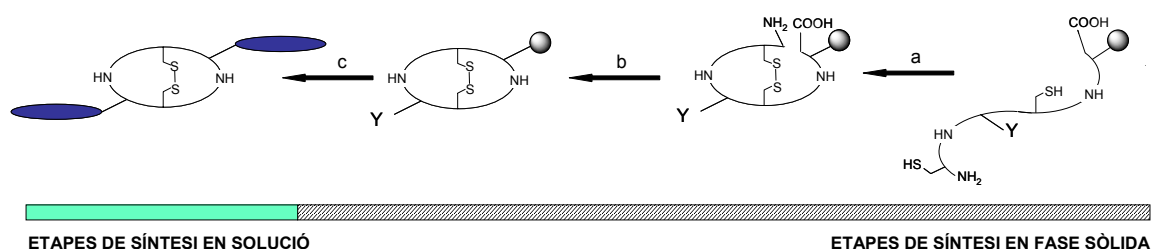
### 2.3.1 PLANTEJAMENT DE LA NOVA ESTRATÈGIA DE SÍNTESI

Es planteja la possibilitat d'incorporar l'aminoàcid D-Dap per el seu grup  $\alpha$ -amino a la resina CTC-PS i amb el grup àcid protegit com a èster al·lilic (Figura 2.39).



**Figura 2.39** Incorporació de l'aminoàcid H-D-Dap(Fmoc)-Oal·lil a la resina CTC-PS

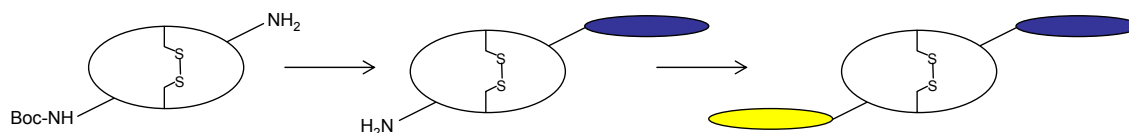
Aquesta modificació permetrà realitzar les dues ciclacions en fase sòlida. En aquest cas, la cadena peptídica lineal s'ha d'obtenir per elongació seqüencial. Una vegada es desprotegeixen els dos extrems de la cadena peptídica es procedeix a la formació del pont disulfur primer i, tot seguit, es fa la ciclació cadena-cua. La major part de les etapes de síntesi ja han estat explorades i optimitzades anteriorment, només la segona ciclació en fase sòlida és l'etapa novedosa. I després d'escindir el producte bicíclic de la resina es realitza l'única etapa en solució, que és la incorporació dels heterocicles intercaladors (Figura 2.40).



**Figura 2.40** Representació gràfica de la seqüència d'etapes de síntesi per a l'obtenció de l'azatiocoralina realitzant les dues ciclacions sobre el suport polimèric; a) formació del pont disulfur sobre el suport polimèric, b) unió cadena-cua sobre el suport polimèric i c) escissió de la resina, i introducció dels heterocicles intercaladors

### 2.3.1.1 Producte asimètric

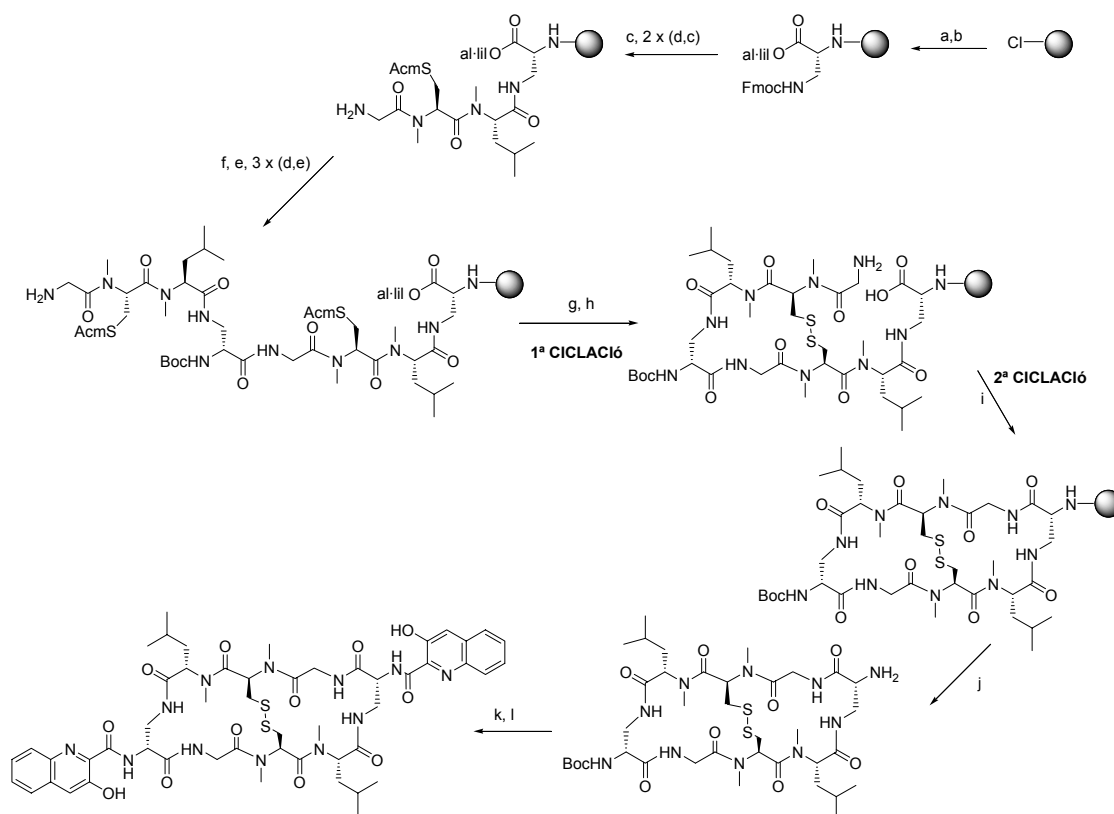
L'estratègia plantejada ofereix la possibilitat d'obtenir un derivat de l'azatiocoralina asimètric. Així, el pèptid estaria format per un esquelet peptídic simètric amb dos heterocicles diferents. El producte que s'obté de l'escissió de la resina té lliure només un grup  $\alpha$ -amino i, per tant, és susceptible de ser derivatitzat amb un grup intercalador selectivament respecte l'altre grup  $\alpha$ -amino (Figura 2.41). L'eliminació posterior del grup Boc permet la incorporació d'un segon grup intercalador a la molècula peptídica. L'estratègia de síntesi plantejada és la primera descrita que permet explorar l'efecte de la simetria en l'activitat d'un derivat aza de la família de la tiocoralina, tant per tenir només un grup intercalador com dos grups intercaladors diferents.



**Figura 2.41** Possibilitats d'asimetria en la síntesi alternativa plantejada

### 2.3.2 DEFINICIÓ DE L'ESTRATÈGIA DE SÍNTESI

Es proposa l'estratègia de síntesi d'acord amb els resultats obtinguts en la síntesi de l'azatiocoralina. S'empra el mateix quadre de grups protectors. En aquest cas, però, és necessari un grup protector addicional per l'àcid carboxílic del residu D-Dap que sigui ortogonal al grup Fmoc, al grup Boc i a la resina CTC-PS. Es pensa en el grup èster al·lílic perquè ha estat àmpliament usat en la síntesi de pèptids sobre la resina CTC-PS. També se segueix el mateix criteri pel que fa a l'ús d'agents d'acoblament. Es provarà l'estratègia amb la síntesi d'un derivat de l'azatiocoralina el qual conté el residu comercial NMe-Leu en comptes del residu NMe-Cys(Me). L'estratègia es resumeix a l'Esquema 2.12:



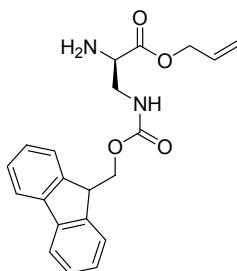
**Esquema 2.12** Esquema de síntesi per l'azatiocoralina on es realitzen les dues ciclacions en fase sòlida.

- a) H-D-Dap(Fmoc)-Oal·lil, DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; b) MeOH; c) piperidina-DMF (1:4), piperidina-DBU-toluè-DMF (1:1:4:14); d) Fmoc-AA-OH/HATU/DIEA, DMF; e) piperidina-DMF (1:4); f) Boc-D-Dap(Fmoc)-OH/HATU/DIEA, DMF; g) [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], PhSiH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; h) I<sub>2</sub>, DMF; i) DIPCDI/HOAt, DMF; j) TFA-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99); k) TFA-H<sub>2</sub>O (19:1); l) àc. 3-hidroxiquinàldic/EDC-HCl/HOSu/DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

## 2.3.3 DESENVOLUPAMENT DE L'ESTRATÈGIA DE SÍNTESI

### 2.3.3.1 Incorporació de l'aminoàcid H-D-Dap(Fmoc)-Oal·lil a la resina CTC-PS

Barlos i col. van descriure l'ús de la resina per a la incorporació de molècules a través de grups amino i, posteriorment, en van descriure la unió amb grups tiol.<sup>128,129,130</sup> En el nostre cas, ens interessa la unió de l'aminoàcid trifuncional D-Dap a la resina per el grup  $\alpha$ -amino. El grup  $\beta$ -amino de la cadena lateral es protegeix amb el grup Fmoc per permetre l'elongació de la cadena peptídica. El grup àcid es protegeix amb el grup èster al·lílic, ortogonal al grup Fmoc, Boc i resina CTC-PS. Aquest quadre de grups protectors permetrà l'eliminació del grup al·lil, la formació del pont disulfur i la formació del bicicle sobre el suport polimèric. L'estratègia de síntesi plantejada requereix de la síntesi prèvia de l'aminoàcid H-D-Dap(Fmoc)-Oal·lil (Figura 2.42).



**Figura 2.42** Primer aminoàcid de la nova estratègia de síntesi: H-D-Dap(Fmoc)-Oal·lil

L'aminoàcid H-D-Dap(Fmoc)-Oal·lil s'obté en dues etapes a partir del mateix aminoàcid emprat en la síntesi de l'azatiocoralina Boc-D-Dap(Fmoc)-OH: la primera etapa és la protecció del grup àcid com a èster al·lílic mitjançant un reflux amb bromur d'al·lil i DIEA (AcOEt, 16 h) i la segona és l'eliminació del grup Boc amb una solució de TFA-H<sub>2</sub>O (95:5) durant 1.5 h.

S'inicia la síntesi amb 50 mg de resina CTC-PS i la incorporació del primer aminoàcid es realitza seguint el procediment habitual. La mesura de l'absorbància en l'eliminació del grup Fmoc de la cadena lateral determina una funcionalització inicial de 0.43 mmol/g resina, que és lleugerament inferior a l'obtinguda quan s'incorpora l'aminoàcid per el seu grup àcid (0.45-0.60 mmol/g resina).

<sup>128</sup> Karavoltsos, M.; Mourtas, S.; Gatos, D.; Barlos, K., SPPS of protected peptidyl aminoalkyl amides, *J. Peptide Sci.*, **2002**, *8*, 615-620.

<sup>129</sup> Mourtas, S.; Katakalous, C.; Nicolettou, A.; Tzavara, C.; Gatos, D.; Barlos, K., Resin-bound aminothiols: synthesis and application, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *44*, 179-182.

<sup>130</sup> Prats-Alfonso, E.; García-Martín, F.; Bayó, N.; Cruz, L. J.; Pla-Roca, M.; Samitier, J.; Errachid, A.; Albericio, F., Facile solid-phase synthesis of biotinylated alkyl thios, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 6876-6881.

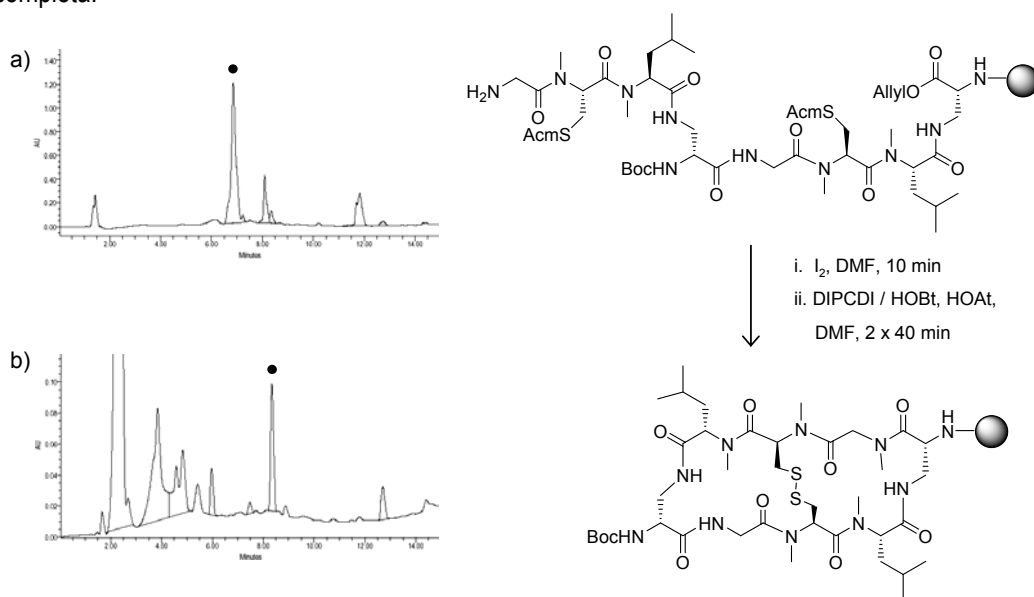
### 2.3.3.2 Elongació seqüencial de la cadena peptídica

L'elongació de la cadena es dona de forma similar a la realitzada per a la síntesi de l'azatiocoralina. En aquest cas, se substitueix l'aminoàcid Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH pel comercial Fmoc-NMe-Leu-OH. Els acoblaments es realitzen emprant HATU i DIEA com a agents d'acoblament i s'obté un rendiment global de l'elongació de la cadena de 81 %. Una anàlisi per HPLC-EM determina la presència de la cadena lineal amb una de puresa del 79 %.

### 2.3.3.3 Les dues ciclacions en fase sòlida

Les ciclacions es fan després d'haver desprotegit el grup  $\alpha$ -amino de l'extrem N-terminal i el grup àcid de l'extrem C-terminal. La primera ciclació que es duu a terme sobre el suport polimèric és la formació del pont disulfur i, a continuació, és realitza la ciclació cadena-cua, aconseguint l'anomenat efecte cremallera. Així, el pont disulfur es forma, com en els casos anteriors, per addició de iode (2.5 eq per Acm) en DMF durant 10 min i una anàlisi per HPLC-EM indica la total conversió del producte lineal.

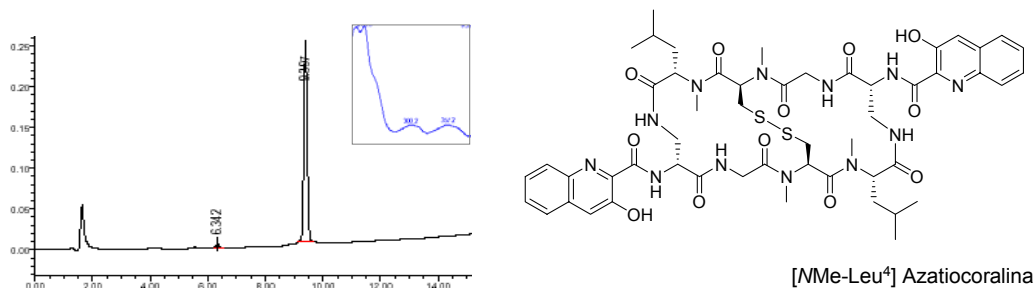
Per a la segona ciclació es prova l'ús de la carbodiimida DICPDI (2 eq) i HOBt (2 eq) com a agents d'acoblament per a valorar la facilitat de la reacció. El test de ninhidrina és clarament positiu després de 40 min de reacció. Així, es realitza un segon tractament amb DIPCDI (2 eq) i HOAt (2 eq) durant 40 min que dona un test de ninhidrina lleugerament positiu. Un segon tractament amb DIPCDI (2 eq) i HOAt (2 eq) de 40 min i un adicional amb HATU (1 eq) i DIEA (2 eq) de 20 min aconsegueix la ciclació completa.



**Figura 2.43** Anàlisi per HPLC i estructura de a) cadena lineal desprotegida, b) producte bicíclic ancorat a la resina. Condicions HPLC: gradient de 9:1 a 3:7 en 15 min (H<sub>2</sub>O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

### 2.3.3.4 Producte asimètric i obtenció del derivat [NMe-Leu<sup>4</sup>] azatiocoralina

El producte s'escindeix de la resina seguint el procediment habitual perquè el grup 2-clorotritil és molt làbil també quan està protegint amines primàries. A continuació es realitza un tractament àcid més fort (TFA-H<sub>2</sub>O, 95:5) per a eliminar el grup protector Boc. La incorporació de l'àcid 3-hidroxiquinàldic segueix el procediment descrit per a la síntesi de l'azatiocoralina i el producte es purifica en el HPLC-semipreparatiu dissolent la mostra en MeCN i addicionant unes gotes d'AcOH, obtenint-se el producte [NMeLeu<sup>4</sup>] azatiocoralina amb una puresa del 98 % (Figura 2.44). Tot i que no es disposa de suficient quantitat per a realitzar l'assaig d'activitat antitumoral.



**Figura 2.44** Cromatograma d'HPLC i estructura de la [NMeLeu<sup>4</sup>] azatiocoralina. Condicions HPLC: gradient de 5:5 a 1:9 en 15 min (H<sub>2</sub>O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

## 2.4 L'AZATIOCORALINA I ELS DERIVATS OBTINGUTS SÓN POSSIBLES CANDIDATS A FÀRMACS ANTITUMORALS?

El treball del present capítol s'ha centrat principalment en el desenvolupament d'un mètode de síntesi que permetés l'obtenció de l'azatiocoralina i derivats. Durant el transcurs de les síntesis s'han obtingut els productes amb una puresa acceptable i amb quantitats suficients per a poder realitzar un primer estudi d'activitat antitumoral, a excepció del darrer derivat. Els estudis d'activitat antitumoral han estat realitzats per l'empresa Pharma Mar, S.A. La següent taula mostra els resultats dels assaigs biològics obtinguts per l'azatiocoralina en comparació amb el producte natural (Taula 2.3).

Els derivats de l'azatiocoralina que no contenen l'àcid 3-hidroxiquinàldic, en combinació amb la substitució del residu NMe-Cys(Me) pel NMe-Ala ([QNA, NMe-Ala<sup>4</sup>] azatiocoralina i [2QXA, NMe-Ala<sup>4</sup>] azatiocoralina) no han donat una activitat apreciable (> IC<sub>50</sub> 9.99 E-6).

Càncer	línia cel·lular	Paràmetres	Azatiocoralina <sup>(1)</sup>	Tiocoralina <sup>(2)</sup>
NSCL	A549	GI50	2.58 E-6	5.57 E-9
		TGI	> 2.67 E-6	2.49 E-8
		LC50	> 2.67 E-6	2.09 E-7
Còlon	HT29	GI50	2.67 E-6	5.63 E-9
		TGI	> 2.67 E-6	1.31 E-7
		LC50	> 2.67 E-6	8.64 E-6
	LOVO	GI50	1.84 E-6	4.64 E-9
		TGI	> 2.67 E-6	1.88 E-8
		LC50	> 2.67 E-6	7.85 E-8
LOVO-DOX	GI50	2.67 E-6	3.62 E-8	
	TGI	> 2.67 E-6	1.05 E-6	
	LC50	> 2.67 E-6	n.d	
Pròstata	DU-145	GI50	2.64 E-6	2.33 E-9
		TGI	> 2.67 E-6	1.20 E-8
		LC50	> 2.67 E-6	3.42 E-6
Ovari	IGROV	GI50	7.08 E-7	2.01 E-9
		TGI	> 2.67 E-6	2.40 E-8
		LC50	> 2.67 E-6	2.45 E-6
	IGROV-ET	GI50	2.52 E-6	6.66 E-8
		TGI	> 2.67 E-6	4.77 E-7
		LC50	> 2.67 E-6	n.d
Mama	SK-BR3	GI50	3.49 E-7	1.38 E-9
		TGI	> 2.67 E-6	2.04 E-9
		LC50	> 2.67 E-6	1.77 E-8
Melanoma	SK-MEI-28	GI50	5.67 E-6	4.15 E-9
		TGI	> 2.67 E-6	1.81 E-8
		LC50	> 2.67 E-6	8.33 E-8
Leucèmia	K-562	GI50	7.93 E-7	1.05 E-9
		TGI	> 2.67 E-6	8.57 E-9
		LC50	> 2.67 E-6	n.d
Pàncreas	PANC 1	GI50	1.99 E-6	4.47 E-9
		TGI	> 2.67 E-6	7.41 E-8
		LC50	> 2.67 E-6	7.20 E-7
Cèrvix	HELA	GI50	3.54 E-7	1.56 E-9
		TGI	> 2.67 E-6	8.81 E-9
		LC50	> 2.67 E-6	4.95 E-8
	HELA-AP2	GI50	2.58 E-7	2.10 E-9
		TGI	> 2.67 E-6	1.34 E-8
		LC50	> 2.67 E-6	6.67 E-8

(1) Codi i data assaig biològic de l'azatiocoralina: SINT003753 (11/12/03)

(2) Codi i data assaig biològic de la tiocoralina: PM93135 (18/10/02)

**Taula 2.3** Resultats dels assaigs biològics de l'azatiocoralina i la tiocoralina



Els assaigs biològics realitzats donen tres paràmetres diferents per a cada línia cel·lular testada: IC<sub>50</sub> és la concentració que inhibeix un 50 % el creixement total del nombre de cèl·lules, TGI és la concentració a la que es produeix la inhibició total del creixement i LC<sub>50</sub> és la concentració a la que es produeix un 50 % de la mort cel·lular. Aquests tres paràmetres mesuren l'efecte d'inhibició del creixement, l'efecte citostàtic i l'efecte citotòxic, respectivament.

Dels resultats de la taula s'observa com l'activitat de l'azatiocoralina se situa en la majoria de les línies tumorals en l'ordre dels micromolar. En els casos del càncer de mama, ovari, leucèmia i cèrvix, arriba a l'ordre dels 100 nmolar. Els resultats però, mostren un descens significatiu en l'activitat de l'azatiocoralina respecte la tiocoralina. El pèptid natural presenta una activitat de l'ordre dels nanomolars en la majoria de les línies tumorals. També es determina la pèrdua d'activitat en intercanviar conjuntament l'heterocicle i un dels aminoàcids de la cadena peptídica [NMe-Cys(Me)]. La introducció de l'enllaç amida podria haver modificat el mapa de ponts d'hidrogen intramoleculars del compost, variant així la conformació i la correcta disposició dels heterocicles en la unió amb el DNA. Els resultats obtinguts disten de ser concluent, tot i que denoten una significativa pèrdua d'activitat antitumoral respecte el producte natural. L'azatiocoralina i derivats tampoc no han experimentat un augment considerable de la seva solubilitat respecte el producte natural. La següent taula mostra el temps de retenció i el % de H<sub>2</sub>O en el que els pèptids elueixen en comparació a la tiocoralina com una mostra orientativa de les diferents solubilitats (Taula 2.4).

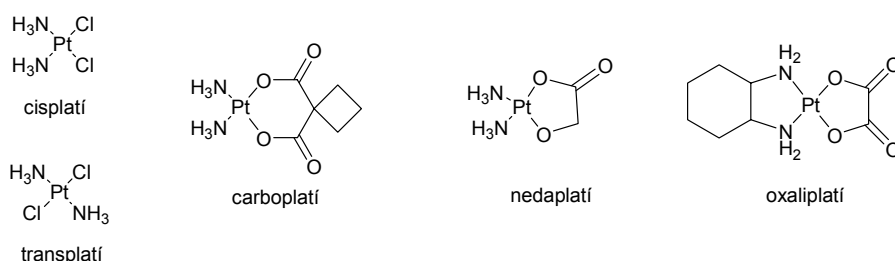
Compost	Cromatograma HPLC		% H <sub>2</sub> O
	t <sub>R</sub> (min)	Grad. en 15 min	
Tiocoralina	10.7	5:5 a 1:9	21
Azatiocoralina	7.1	5:5 a 1:9	31
[NMe-Leu <sup>4</sup> ] azatiocoralina	8.8	5:5 a 1:9	27
[2QXA] azatiocoralina	7.8	7:3 a 3:7	49
[2QXA, NMe-Ala <sup>4</sup> ] azatiocoralina	7.4	8:2 a 2:8	50
[QNA, NMe-Ala <sup>4</sup> ] azatiocoralina	10.3	8:2 a 3:7	46

**Taula 2.4** Solubilitats dels compostos obtinguts en comparació amb la tiocoralina a través dels resultats d'HPLC

L'activitat biològica de l'azatiocoralina, en combinació amb la baixa solubilitat que presenta en H<sub>2</sub>O, no la fan ser, *a priori*, un bon candidat a fàrmac antitumoral. L'azatiocoralina té, però, unes característiques que la fan ser encara interessant, com a potencial fàrmac antitumoral:

- És un producte que es pot obtenir sintèticament de forma ràpida i es pot sotmetre a modificacions en l'esquelet peptídic i en l'heterocicle intercalador.
- La diana terapèutica del pèptid està estudiada i és la doble cadena de DNA.
- El pèptid conté dos grups tioèters a l'esquelet peptídic que es troben allunyats en la unió pèptid-DNA. I el grup sofre té una reactivitat especial front determinats metalls com el platí i l'or.

Una de les teràpies antitumorals més estudiada i aplicada actualment està basada en compostos de *cis*-diaminodicloroplatí (II), conegut com cisplatí (Figura 2.45). La molècula de cisplatí, i en general els compostos que presenten activitat antitumoral, són capaços d'unir-se al DNA mitjançant un enllaç covalent. La unió es produeix a través dels nitrògens de les bases púriques i pirimidíniques. Preferentment s'estableixen adductes bifuncionals bicatenaris amb les bases púriques del DNA. Des del descobriment de l'activitat antitumoral del cisplatí per Rosenberg i col.,<sup>131</sup> s'han sintetitzat i estudiat nombrosos compostos de platí amb la intenció de millorar la solubilitat, disminuir la toxicitat i augmentar l'espectre d'actuació i la seva selectivitat. Actualment només el cisplatí i el carboplatí s'empren en el tractament d'algun tipus de càncer a escala mundial; el nedaplatí està aprovat en el Japó i l'oxaliplatí a Europa, Sud-Amèrica i Àsia (Figura 2.45).<sup>132</sup>



**Figura 2.45** Compostos de platí usats en teràpies antitumorals i en estudi d'aplicació

<sup>131</sup> Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T., Inhibition of cell division in *Escherichia Coli* by electrolysis products from a platinum electrode, *Nature*, **1965**, 205, 698-699.

<sup>132</sup> Galanski, M.; Yasemi, A.; Slaby, S.; Jakupec, M. A.; Arion, V. B.; Raush, M.; Nazarov, A. A.; Keppler, B. K., Synthesis, crystal structure and cytotoxicity of new oxaliplatin analogues indicating that improvement of anticancer activity is still possible, *Eur. J. Med. Chem.*, **2004**, 39, 707-714.

Un dels mecanismes de resistència front el cisplatí és la seva inactivació a través biomolècules que contenen grups tiol, la més coneguda és el glutatió (GSH). El complex de cisplatí amb el glutatió és eliminat mitjançant una bomba dependent d'adenosina trifosfat. En els darrers anys s'ha estudiat la unió del transplatí amb el residu de metionina inserida en un híbrid pèptid-oligonucleòtid<sup>133</sup> i s'han dissenyat elaborades estratègies antisèntit basades en la unió d'oligonucleòtids modificats amb grups tioèter que són capaços d'interaccionar, primer amb una molècula de *trans*-platí, i després amb la cadena complementaria i formar adductes intercatenaris.<sup>134</sup> En aquest context, es planteja l'estudi de la conjugació de l'azatiocoralina amb el cisplatí i el transplatí a través dels seus grups tioèter de les Cys(Me) a fi d'obtenir un fàrmac amb una acció sinèrgica contra la mateixa diana terapèutica.

Paral·lelament a l'obtenció d'una metodologia per a la síntesi de l'azatiocoralina i derivats en fase sòlida, finalitza, als laboratoris de Pharma Mar S.A., l'estudi d'una nova formulació per la tiocoralina. La nova formulació permet la solubilització del fàrmac, alhora que preserva la integritat de la tiocoralina i, per tant, la seva activitat antitumoral. La formulació proposada, però, necessita d'un nou mètode d'obtenció del producte natural que millori els rendiments i el temps de la síntesi descrita per Boger i col. desenvolupada en solució.

Les eines de síntesi desenvolupades per a l'obtenció de les *N*-metil cisteïnes i de l'azatiocoralina ens permeten acceptar el nou repte de síntesi. L'existència a la natura d'un gran nombre de depsipèptids cíclics (que contenen un enllaç èster a la cadena) amb importants activitats biològiques antibacterianes, antibiòtiques i antitumorals ens planteja optimitzar l'esforç sintètic desenvolupant, paral·lelament, un nou anàleg del pèptid natural, l'oxatiocoralina. El nou anàleg es caracteritza per tenir un enllaç èster en lloc de l'enllaç tioèster i hauria de millorar les propietats farmacocinètiques del pèptid natural i mostrar un augment de l'activitat antitumoral respecte l'azatiocoralina. La principal dificultat en la síntesi de l'oxatiocoralina i la tiocoralina és la presència dels enllaços làbils en el si de la cadena peptídica (èster, tioèster) que augmenta el risc de formació de dicetopiperazines. Primer es desenvoluparà la síntesi de l'oxatiocoralina perquè l'enllaç èster no és tan làbil i ens oferirà informació i eines per afrontar la síntesi de la tiocoralina.

---

<sup>133</sup> Marchán, V.; Pedroso, E.; Grandas, A., Insights into the Reaction of Transplatin with DNA and proteins: methionine-mediated formation of histidine-guanine trans-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> cross-links, *Chem. Eur. J.*, **2004**, *10*, 5369-5375.

<sup>134</sup> Berta Algueró Cama, *Tesi Doctoral*, Universitat de Barcelona, **2006**.

## 2.5 OBTENCIÓ DELS AMINOÀCIDS Fmoc-NME-CYS(ME)-OH I Fmoc-NME-CYS(ACM)-OH

### 2.5.1 OBTENCIÓ DE *N*-METIL AMINOÀCIDS

Els *N*-metil aminoàcids són molt abundants en pèptids d'origen bacterià biològicament actius. Les propietats físiques i especialment l'estabilitat química que presenten els pèptids que contenen *N*-metil aminoàcids ha impulsat un intens estudi en mètodes sintètics per a la seva obtenció. La majoria dels mètodes descrits s'apliquen en solució i una petita part s'han adaptat a la fase sòlida. Els mètodes es poden dividir en tres grups:<sup>135</sup>

- 1- *N*-metilació per *N*-alquilació
- 2- *N*-metilació per aminació reductiva
- 3- *N*-metilació per nous mètodes

Els mètodes de *N*-metilació per *N*-alquilació recullen els mètodes basats en la substitució nucleòfila de  $\alpha$ -bromoàcids amb un excés de metilamina i canvi de configuració; la *N*-metilació de sulfonamides aplicant la reacció de Mitsunobu (PPh<sub>3</sub>, DEAD, MeOH) o una alquilació bàsica (MTBD, metil-4-nitrobenzènsulfonat); la *N*-metilació de carbamats i d'amides que es realitza mitjançant Ag<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>I o NaH/CH<sub>3</sub>I. La *N*-alquilació de sulfonamides seguint la reacció de Mitsunobu ha estat adaptada per ser realitzada a la fase sòlida per Yang i col.<sup>136</sup> i mitjançant condicions bàsiques per Miller i Scanlan.<sup>137</sup>

La *N*-metilació per aminació reductiva és un mètode molt suau i està lliure de racemització. És basada en una reacció equimolecular entre l'amina i l'aldehid corresponent, i una posterior reducció. Una limitació important és que, generalment, la reacció amb formaldehid dona productes *N,N'*-dimetilats o mesclats amb *N*-metilats. Les reduccions es poden donar per catàlisi amb un metall de transició, per reaccions de tipus Leuckart, per quaternització d'espècies imino o per reduccions amb borhidrurs o mitjançant borans.

<sup>135</sup> Aurelio, L.; Brownlee, R. T. C.; Hughes, A. B., Synthetic preparation of *N*-methyl- $\alpha$ -amino acids, *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 5823-5846.

<sup>136</sup> Yang, L.; Chiu, K., Solid phase synthesis of Fmoc *N*-methyl amino acids: application of the Fukuyama amine synthesis, *Tetrahedron. Let.*, **1997**, *38*, 7307-7310.

<sup>137</sup> Miller, S. C.; Scanlan, T. S., oNBS-SPPS : a new method for solid-phase peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 2690-2691.

S'han descrit nous mètodes per a obtenir *N*-metil aminoàcids. El més estès és la formació d'una oxazolidinona per reacció de l'aminoàcid amb formaldehid i àcid *p*-toluensulfònic (PTSA) (cat.) i posterior tractament reductiu.<sup>138</sup> La reacció s'ha provat emprant el grup Z, Ts, Boc i el grup Fmoc com a grups protectors del grup  $\alpha$ -amino. En el cas d'emprar els grups Z, Ts i el grup Boc, l'etapa de reducció es pot realitzar mitjançant NaCNBH<sub>3</sub> i clorur de trimetilsilil (TMSCl) en MeCN durant 15 h ( amb rendiments de 90-94 %).<sup>139</sup> Freidinger i col. varen reduir Fmoc-oxazolidinones mitjançant l'ús de trietilsilà i TFA en DCM.<sup>140</sup> Més tard, Zhang i col. van millorar el mètode per introducció d'un àcid de Lewis (AlCl<sub>3</sub>) en el medi de reacció i van obtenir rendiments del 90 % i temps de reacció de 2 h front les 24 h de l'anterior mètode.<sup>141</sup> Spengler i col. han desenvolupat un nou mètode de *N*-metilació basat en la formació d'un amina cíclic, el 2,2-bis-(trifluoromethyl)-1,3-oxalidin-5-ones per reacció de l'aminoàcid lliure amb l'hexafluoroacetona.<sup>142</sup>

A banda dels mètodes generals descrits per als aminoàcids proteïnogènics, es troba a la bibliografia el mètode de reducció de l'àcid (R)-(-)-tiiazolidina-4-carboxílic per a l'obtenció específica de l'aminoàcid derivat de la cisteïna H-NMe-Cys-OH.<sup>143</sup>

Per a la síntesi dels *N*-metil aminoàcids H-NMe-Cys(Me)-OH i H-NMe-Cys(Acm)-OH s'assagen els mètodes descrits més convenients i més robusts: a través de la formació d'oxazolidinones de Boc i Fmoc aminoàcids, protecció de la cisteïna lliure amb l'hexafluoroacetona i derivatització, *N*-metilació de carbamats en solució i, finalment, a través de la reducció de l'àcid (R)-(-)-tiiazolidina-4-carboxílic.

Les primeres proves que es realitzen per a la *N*-metilació de les cisteïnes es basen en el mètode de la formació d'una oxazolidinona de les Fmoc cisteïnes [Fmoc-Cys(Me)-OH i Fmoc-Cys(Acm)-OH]. Però no s'obté cap resultat positiu. Tampoc quan s'empren les Boc cisteïnes [Boc-Cys(Me)-OH i Boc-Cys(Acm)-OH] en condicions bàsiques.

---

<sup>138</sup> Ben-Ishai, D., Reaction of acylamino acids with paraformaldehyde, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *79*, 5736-5738.

<sup>139</sup> Reddy, G. V.; Iyengar, D. S., A simple and rapid protocol for *N*-methyl- $\alpha$ -amino acids, *Chem. Lett.*, **1999**, 299-300.

<sup>140</sup> Freidinger, R. M.; Hinkle, J. S.; Perlow, D. S.; Arison, B. H., Synthesis of 9-fluorenylmethoxycarbonyl-protected *N*-alkyl amino acids by reduction of oxazolidinones, *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 77-81.

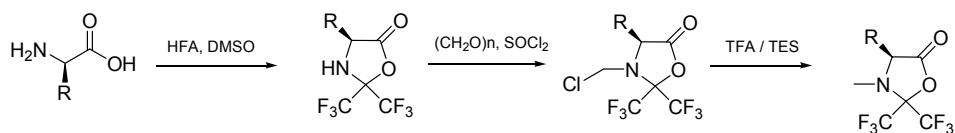
<sup>141</sup> Zhang, S.; Govender, T.; Norstrom, T.; Arvidsson, P. I., An improved synthesis of Fmoc-*N*-methyl- $\alpha$ -amino acids, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 6918- 6920.

<sup>142</sup> Spengler, J.; Burger, K., An efficient synthesis of *N*-methylamino acids and some of their derivatives, *Synthesis*, **1998**, 67-70.

<sup>143</sup> Blondeau, P.; Berse, C.; Gravel, D., Dimerization of an intermediate during the sodium in liquid ammonia reduction of L-thiazolidine-4-carboxylic acid, *Can. J. Chem.*, **1967**, *45*, 49-52.

### 2.5.1.1 Prova d'ús de la hexafluoroacetona en la *N*-metilació de cisteïnes

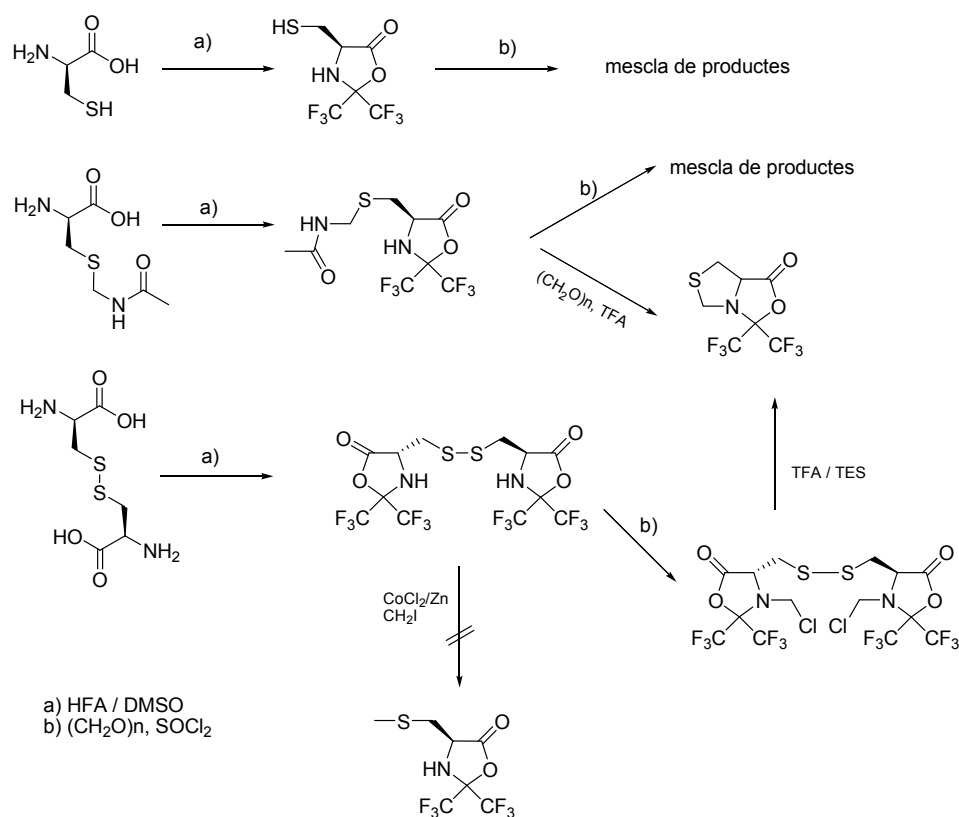
L'hexafluoroacetona ha estat àmpliament usada en el nostre laboratori per a la protecció-activació de hidroxiàcids en la síntesi de depsipèptids en fase sòlida.<sup>144</sup> L'hexafluoroacetona també s'ha usat per a l'obtenció de *N*-metil aminoàcids (Figura 2.47).<sup>142</sup> L'aminoàcid lliure reacciona amb l'hexafluoroacetona per formar una lactona de cinc baules. Primer es derivatitza el nitrogen en forma de clorur de metilè i posteriorment es redueix per obtenir el grup *N*-metil. Seguidament, el compost HFA-aminoàcid pot reaccionar amb el grup amino/hidroxil de la cadena peptídica creixent o bé es pot eliminar el grup HFA i protegir el *N*-metil aminoàcid amb el grup Fmoc.



**Figura 2.47** Etapes de *N*-metilació d'una aminoàcid lliure amb l'ús de la hexafluoroacetona

Es realitzen diferents proves de protecció de la cisteïna lliure amb el grup HFA i s'obté el producte esperat determinat per RMN (<sup>1</sup>H i <sup>19</sup>F). Quan es fa reaccionar el compost HFA-Cys amb paraformaldehyd i clorur de tionil s'obté una mescla de productes complexa, i es creu que la presència del tiol lliure pot haver causat una polimerització. Es realitza la mateixa prova però ara fent servir cisteïnes amb el grup tiol protegit: la H-Cis-OH i la H-Cys(Acm)-OH. En aquest cas, s'obtenen els corresponents derivats amb l'HFA, tot i que no es poden obtenir a gran escala (4.5 g) i els productes no són estables. El derivat HFA-Cys(Acm) dóna una mescla de productes si es fa reaccionar amb (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> i SOCl<sub>2</sub>. En canvi, si reacciona en absència de SOCl<sub>2</sub> s'obté únicament un compost bicíclic basat en l'eliminació del grup Acm (Esquema 2.13). Amb el derivat de la Cis, en canvi, s'obté el producte *N*-acilat però, deriva al bicicle obtingut anteriorment al reaccionar amb el TFA i el silà. Els productes obtinguts en l'estudi de l'estrategia per a l'obtenció de HFA-Cys *N*-alquilades es resumeix al següent Esquema 2.13:

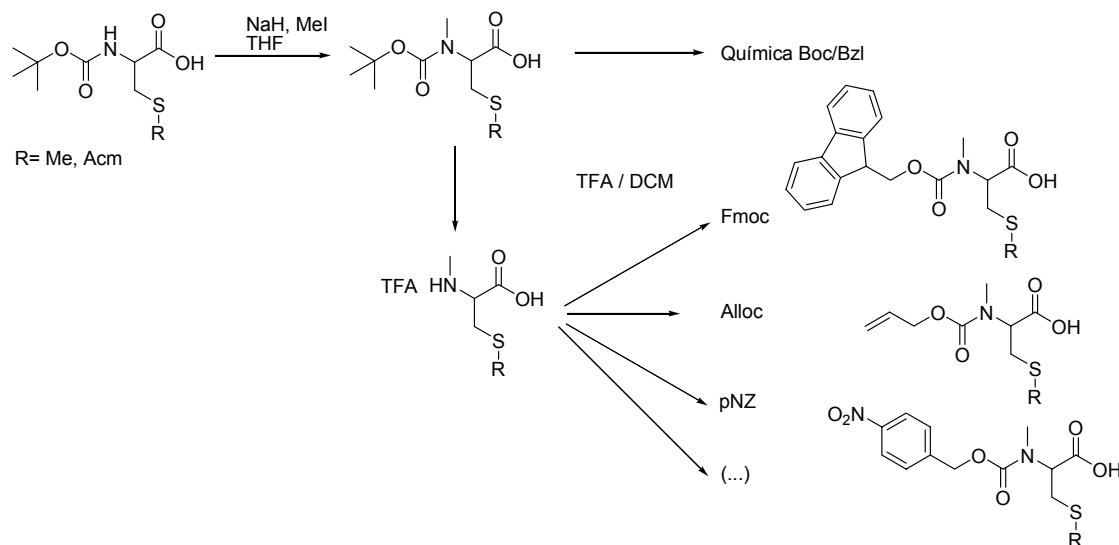
<sup>144</sup> Albericio, F.; Burger, K.; Ruiz-Rodriguez, J.; Spengler, J., A New Strategy for Solid-Phase Depsipeptide Synthesis Using Recoverable Building Blocks, *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 597-600.



Esquema 2.13 Reaccions provades emprant la HFA per derivatitzar les cisteïnes

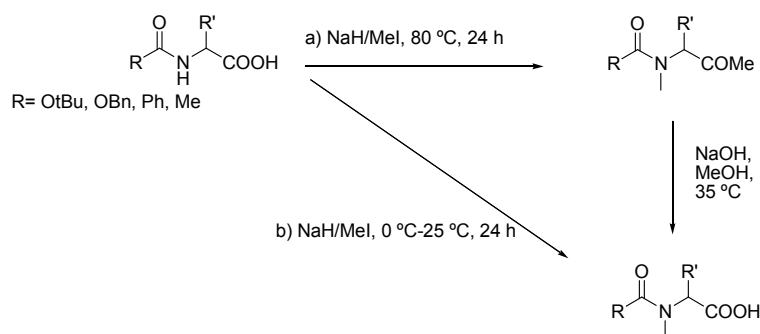
### 2.5.1.2 N-Metilació de carbamats de cisteïna en solució

La *N*-metilació per *N*-alquilació de carbamats es prova amb aminoàcids protegits amb el grup Boc perquè el grup protector Boc és compatible amb les condicions bàsiques de *N*-alquilació, NaH i MeI. En aquest cas, l'aminoàcid resultant es pot emprar en les estratègies de síntesi Boc/Bzl o, es pot eliminar el grup Boc fàcilment en solució i protegir després amb el grup protector adient, tal i com es representa al següent Esquema 2.14:



**Esquema 2.14** N-alquilació de Boc cisteïnes i canvi del grup protector temporal

A principis dels anys setanta, Benoiton i col. van explorar la N-alquilació emprant N-acil, N-tosil i N-carbamoil- $\alpha$ -aminoàcids.<sup>145</sup> Els aminoàcids protegits es tractaven amb un excés de NaH i MeI en THF/DMF a 80 °C durant 24 h. En aquest cas es produïa, simultàniament, la N-metilació i la formació de l'èster metílic (Esquema 2.15.a) i, llavors, les condicions bàsiques de l'etapa de N-alquilació i d'eliminació de l'èster metílic causaven un elevat grau de racemització en el producte final. I van determinar la temperatura com a factor directament relacionat amb la formació de l'èster metílic. En canvi, si la reacció es duu a terme entre 0 °C i 25 °C no s'observa formació d'èster metílic i el producte final s'obté lliure de racemització. (Esquema 2.15.b). La presència de l'èster metílic accentua l'efecte bàsic sobre el protó  $\alpha$  durant l'etapa de N-metilació.

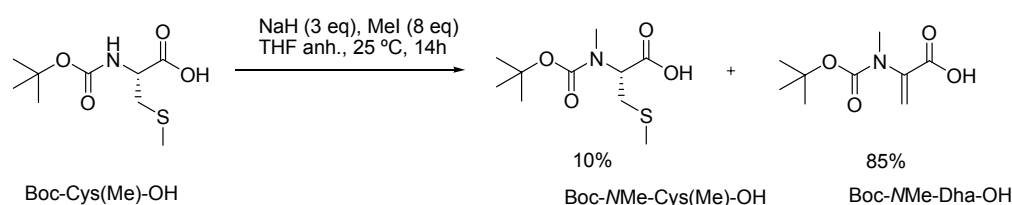


**Esquema 2.15** N-alquilació bàsica segons Benoiton i col.<sup>145</sup>

<sup>145</sup> a) McDermott, J. R.; Benoiton, N. L., N-methylamino acids in peptide synthesis. II. New synthesis of N-benzyloxycarbonyl-N-methylamino acids, *Can. J. Chem.*, **1973**, *51*, 1915-1919 b) McDermott, J. R.; Benoiton, N. L., N-Methylamino acids in peptide synthesis. IV. Racemization and yields in peptide-bond formation, *Can. J. Chem.*, **1973**, *51*, 2555-2561.



En el nostre cas, primer es realitza una prova de *N*-alquilació de Boc-Ala-OH seguint el procediment general descrit a la bibliografia: NaH (3 eq), Mel (8 eq), Boc-AA-OH (1 eq), THF (anhidre), 25 °C, 14 h. En aquest cas, s'obté una conversió del 100 % i un rendiment final del 65 %. L'eliminació del grup Boc s'obté per tractament de l'aminoàcid amb una solució de HCl-1,4- dioxà (4M) durant 1.5 h a temperatura ambient. Per la protecció del grup amino s'empra Fmoc-OSu (1.1 eq), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 eq) en una solució H<sub>2</sub>O-acetona (1:1) durant 16 h a 25 °C. S'obté el producte amb un rendiment del 50 %. Si es repeteixen les condicions de *N*-alquilació sobre l'aminoàcid Boc-Cys(Me)-OH s'obté una conversió del 95 %, però en aquest cas, només un 10 % es correspon al producte esperat, ja que el 85 % restant es correspon a l'aminoàcid Boc-NMe-Dha-OH, producte format per eliminació del grup SMe (Esquema 2.16).



**Esquema 2.16** *N*-alquilació de Boc-Cys(Me)-OH seguint les condicions generals descrites

A continuació es realitzen diverses proves de *N*-alquilació de la Boc-Cys(Me)-OH a fi de minimitzar la formació del producte secundari. Després del resultat de la primera prova, es realitza una segona prova en la qual es tracta primer l'aminoàcid amb la base. Després de 20 min s'addiciona 1 eq de Mel per observar l'ordre d'alquilació (*N*-Metil front S-Metil). A les 4 h s'obté una conversió del 50 % i 42 % del producte esperat. S'addiciona 1 eq més de Mel i després de quatre hores la reacció no ha evolucionat. Si la reacció es deixa en agitació tota la nit a temperatura ambient s'observa una conversió del 97 % i un 34 % del producte esperat. L'aminoàcid en el medi de reacció i a temperatura ambient es transforma al producte secundari, Dha. Si la reacció es prova a -78 °C no s'obté cap conversió del producte de partida. Per tant, es determina la temperatura com un paràmetre rellevant i serà important realitzar la reacció a 5 °C. Després, es realitzen dues proves en paral·lel a baixa temperatura; amb 8 i 2 eq de Mel, respectivament. Els millors resultats s'obtenen quan s'empren únicament 2 eq de Mel. Totes les proves es fan emprant la mateixa concentració d'aminoàcid, 3 eq de NaH, THF anhidre com a solvent i 16 h de reacció. En general la conversió de l'aminoàcid de partida és total i varia la composició de Boc-NMe-Cys(Me)-OH i Boc-NMe-Dha-OH. Les condicions de reacció i els resultats obtinguts es detallen en la següent taula (Taula 2.5):

Prova	Boc-Cys(Me)-OH (mg)	Mel (eq)	Temp. (°C)	Temps (h)	Resultat	
					Cys(Me)	Dha
1	250	8	25	16	10	85
2	150	2	25	16	34	63
3	150	8	5	24	33	66
4	150	2	5	16	59	31
5	150	2	-78	16	-	-
5	500	2	5	16	50	25
6	2000	2	5	16	45	27

**Taula 2.5** Condicions de reacció i resultats obtinguts en la *N*-metilació de la Boc-Cys(Me)-OH

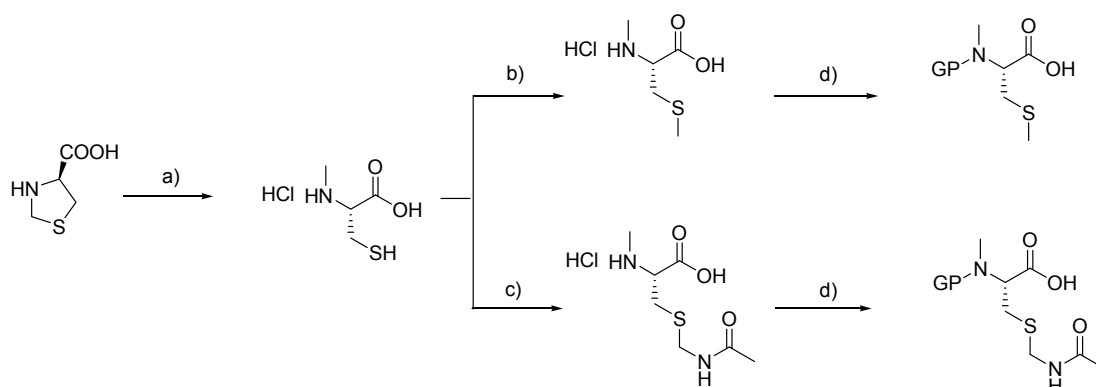
Es prova també l'ús de la base  $K_2CO_3$  en presència d'èter corona, emprada en la *N*-metilació de la tentoxina,<sup>146</sup> en substitució del NaH, però s'obté únicament el producte èster metílic Boc-Cys(Me)-OMe. Així, el rendiment màxim obtingut per Boc-NMe-Cys(Me)-OH és del 50 %. S'obté suficient quantitat per a continuar endavant amb la síntesi. Per a la separació dels dos productes s'opta per l'ús del sistema HPLC preparatiu perquè la separació per columna cromatogràfica amb gel de sílice dona rendiments i pureses molt baixos. El grup Boc s'elimina per tractament amb una solució comercial de HCl-1,4-dioxà (4 M) durant 1.5 h. L'aminoàcid està a punt per ser protegit amb el grup protector convenient.

Intents de *N*-metilar la Boc-Cys(Acm)-OH no han donat bons resultats degut a la presència de l'amida del grup Acm que té més tendència a *N*-metilar-se.

### 2.5.1.3 Reducció de l'àcid (R)-(-)-tiazolidina-4-carboxílic per a l'obtenció de HNMe-Cys-OH

Una altra possibilitat d'obtenir els aminoàcids H-NMe-Cys(X)-OH (X = Me, Acm) és mitjançant la reducció de l'àcid (R)-(-)-tiazolidina-4-carboxílic, posterior derivatització del grup tiol i protecció final del grup amino amb el grup protector convenient (GP), tal i com es mostra a l'Esquema 2.17.

<sup>146</sup> Jimenez, J. C.; Chavarria, B.; Lopez-Macia, A.; Royo, M.; Giralt, E.; Albericio, F., Tentoxin as a Scaffold for Drug Discovery. Total Solid-Phase Synthesis of Tentoxin and a Library of Analogues, *Org. Lett.*, **2003**, 5, 2115-2118.



**Esquema 2.17** Obtenció dels aminoàcids GP-NMe-Cys(Me)-OH i GP-NMe-Cys(Acm)-OH per reducció de l'àcid (R)(-)-tiazolidina-4-carboxílic (a), derivatització del grup tiol (b) derivatització amb el grup Me i (c) protecció amb el grup Acm, i introducció del grup protector en el grup N-metil (d).

Blondeau i col. van descriure al 1961 l'obtenció de l'aminoàcid H-NMe-Cys-OH per reducció de l'àcid (R)(-)-tiazolidina-4-carboxílic amb  $\text{NH}_3$  i  $\text{Na}$ .<sup>143</sup> Aquest àcid, conegut també com tioprolina, s'obté fàcilment per reacció de la cisteïna amb formaldehid<sup>147</sup> i, actualment, és assequible comercialment. La seva reducció amb amoníac líquid i sodi pot donar un producte secundari de resultes de la formació d'un dímer de N-metil cisteïna. Per tal d'evitar la formació del dímer, Blondeau va descriure la reducció de la tioprolina addicionant el sodi i l'amoníac en petites porcions i de forma simultània, mantenint sempre un excés de sodi, indicat per la coloració blava de la solució. Aquest procediment és seguit per Boger i per Liu.<sup>148</sup> Yamashiro i col. van obtenir els mateixos resultats addicionant una petita quantitat d'aigua en el medi de reacció.<sup>149</sup>

En el nostre cas, es prenen 8 g de tioprolina i se segueix el procediment descrit per Blondeau i col. i s'obtenen 6.9 g (rendiment 66 %) d'un sòlid blanc, corresponent a l'aminoàcid HCl-H-NMe-Cys-OH.

<sup>147</sup> Ratner, S.; Clarke, H. T., The action of formaldehyde upon cysteine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1937**, 59, 200-206.

<sup>148</sup> Liu, J. F.; Tang, X. X.; Jiang, B., A convenient synthesis of N-fluorenylmethoxycarbonyl-N-methyl-L-[n]cysteine derivatives [Fmoc,Me-Cys(R)-OH], *Synthesis*, **2002**, 1499-1501.

<sup>149</sup> Yamashiro, D.; Aanning, H. L.; Branda, L. A.; Cash, W. D.; Murti, V. V. S.; Vigneaud, V., A synthesis of [1-(N-Methyl-hemi-L-cysteine)]-oxytocin and a study of its reaction with acetone, *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 46, 4141-4144.

## 2.5.2 DERIVATITZACIÓ DELS GRUPS TIOL DE LA HMME-CYS-OH

La reacció de S-metilació per a l'obtenció de l'aminoàcid HMe-Cys(Me)-OH (Esquema 2.17.b) es duu a terme seguint el procediment de Boger i col.: solució de l'aminoàcid H-NMe-Cys-OH en THF-H<sub>2</sub>O (1:1) i addició seqüencial de NaHCO<sub>2</sub> (3 eq) i MeI (1.4 eq) en una bany d'aigua-gel, i la reacció es deixa durant 4 h a temperatura ambient i s'obté un 100 % de conversió. El producte no s'aïlla, sinó que es realitza, seguidament, la protecció del grup amino amb el grup adient.

Per a la protecció del grup tiol amb el grup Acm (Esquema 2.17.c) se segueix el procediment descrit per Albericio i col. que empra N-hidroxiacetamida en una solució de TFA i àcid metansulfònic (cat.).<sup>150</sup> I es prossegueix amb la protecció del grup amino amb el grup protector adient.

## 2.5.3 PROTECCIÓ D'AMINES SECUNDÀRIES AMB EL GRUP FMOC

Per a la protecció del grup amino d'un aminoàcid amb el grup Fmoc es disposa de varis reactius possibles que, ordenats per ordre de reactivitat, són: Fmoc-Cl, Fmoc-OSu i Fmoc-N<sub>3</sub>. El darrer no és suficient reactiu per a la reacció amb N-metil aminoàcids. Així que es prova la protecció amb el Fmoc-Cl i amb el Fmoc-OSu. Els rendiments que s'obtenen són equivalents però la puresa obtinguda amb el Fmoc-Cl és més elevada, encara que el medi bàsic de la reacció degrada el reactiu i és necessari addicionar més quantitat. Els productes obtinguts Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH i Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH (Figura 2.48) es purifiquen en un sistema HPLC-preparatiu perquè la purificació per columna de gel de sílice dona rendiments molt baixos degut a la presència de l'àcid carboxílic lliure.

Els rendiments dels dos aminoàcids a partir de l'àcid (R)(-)-tiazolidina-4-carboxílic són baixos però permeten millorar la síntesi de la cadena peptídica de l'azatiocoralina. Els productes es caracteritzen mitjançant RMN, HPLC i EM.

---

<sup>150</sup> Albericio, F.; Grandas, A.; Porta, A.; Pedrosa, E.; Giralt, E., One-pot synthesis of S-acetamidomethyl-N-fluorenylmethoxycarbonyl-L-cysteine (Fmoc-Cys(Acm)-OH), *Synthesis*, **1987**, 271-273.

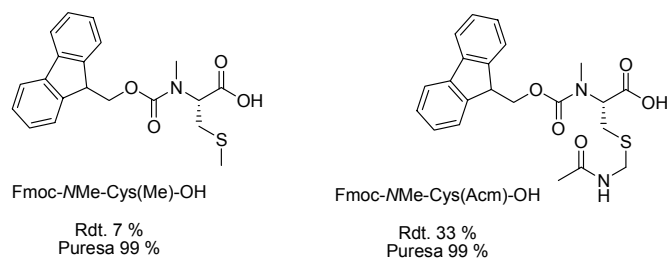


Figura 2. 48 Fmoc aminoàcids obtinguts per a la síntesi de la tiocoralina i anàlegs

Part del treball presentat en aquest capítol s'ha publicat en els següents articles (veure Annex 4):

- Riego, E.; **Bayó, N.**; Cuevas, C.; Albericio, F.; Álvarez, M., A New approach to 3-Hydroxyquinoline-2-carboxylic Acid, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 1407-1411.
- **Bayó-Puxan, N.**; Fernández, A.; Tulla-Puche, J.; Riego, E.; Cuevas, C.; Álvarez, M.; Albericio, F., Total solid-phase synthesis of the azathiocoraline class of the symmetric bicyclic peptides, *Chem. Eur. J.*, *In press*.

