

Tesi doctoral

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

Núria Bayó Puxan

Departament de Química Orgànica
Facultat de Química. Universitat de Barcelona

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

Barcelona, 1 Setembre 2006

Memòria presentada per

Núria Bayó Puxan

Per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi Doctoral dirigida per :

Dr. Ernesto Nicolás Galindo

Dr. Fernando Albericio Palomera



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Programa de Doctorat: Bienni 2002-2004

Departament de Química Orgànica.

Facultat de Química. Universitat de Barcelona

Per a vosaltres, família

Índex General

Abreviacions

INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS 5

RESULTATS I DISCUSSIÓ

CAPÍTOL 1:

Síntesi d'un anàleg de la sirengotoxina, un depsipèptid cíclic anti-Leishmania 33

CAPÍTOL 2:

Síntesi de l'azatiocoralina, un pèptid simètric i bicíclic anàleg de la tiocoralina 79

CAPÍTOL 3:

La tiocoralina, nova síntesi en fase sòlida 151

CAPÍTOL 4:

Aïllament i caracterització de compostos antitumorals d'esponges marines 241

CONCLUSIONS 279

PART EXPERIMENTAL 287

Annex 1. Taules d'aminoàcids, reactius i grups protectors emprats

Annex 2. Nomenclatura abreviada per pèptids cíclics, ramificats, homo- o heterodètics

Annex 3. Espectres de RMN del didehidropèptid Fmoc-Thr('Bu)-(Z)-Dhb-OH

Annex 4. Articles publicats i acceptats

ABREVIACIONS

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

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

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

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



Capítol 3

La tiocoralina, nova síntesi
en fase sòlida

RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1	NOUS REPTES SINTÈTICS	155
3.1.1	Definició de l'estratègia de síntesi	156
3.2	OXATIORALINA, EXPLORACIÓ DE LA SÍNTESI EN FASE SÒLIDA	160
3.2.1	Estudi de la síntesi de la cadena lineal iniciada en <i>NMe-Cys(Acm)</i>	161
3.2.2	Estudi de la síntesi de la cadena lineal iniciada en <i>Gly</i>	167
3.2.3	Estudi de la síntesi de la cadena lineal iniciada en <i>D-Ser</i>	170
3.2.4	Obtenció dels primers derivats d'oxatiocoralina	184
3.2.5	Perspectives de futur per a l'oxatiocoralina	187
3.3	TIORALINA, DESENVOLUPAMENT DE LA SÍNTESI EN FASE SÒLIDA	188
3.3.1	Replantejament dels grups protectors	189
3.3.2	Estudi de la síntesi de la tiocoralina iniciada en <i>D-Cys</i> mitjançant química <i>Boc/Bzl</i>	195
3.3.3	4+3+1, nova estratègia per a la síntesi de la tiocoralina iniciada en <i>NMe-Cys(Me)</i>	203
3.3.4	Estratègia 1+3+4, nova estratègia combinada per a la síntesi de la tiocoralina iniciada en <i>D-Cys/ NMe-Cys(Me)</i>	218
3.3.5	Síntesi de la tiocoralina seguint l'estratègia 4+3+1 iniciada en <i>NMe-Cys(Me)</i> i emprant química <i>Alloc</i> i resina <i>CTC-PS</i>	220
3.3.6	El futur de la tiocoralina com a fàrmac antitumoral	226
3.4	AMINOÀCIDS CONVENIENTMENT PROTEGITS I NOVES EINES DE SÍNTESI EN FASE SÒLIDA	227
3.4.1	Protecció del grup α -amino d'aminoàcids	227
3.4.2	Protecció de la <i>D-Serina</i> : <i>Boc-D-Ser(TBDMS)-OH</i>	230
3.4.3	Protecció de la <i>D-Cisteïna</i>	231
3.4.4	Obtenció dels dipèptids <i>Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH</i> i <i>Alloc-NMe-Cys(Acm)-OH</i>	233
3.4.5	Obtenció de l'aminoàcid <i>Fmoc-Gly-F</i>	235
3.4.6	Optimització de la incorporació de la <i>Boc-D-Ser-OH</i> com a primer aminoàcid a la resina <i>CTC-PS</i>	235
3.4.7	Química de fragments sobre la resina <i>Wang</i>	237

3.1 NOUS REPTES SINTÈTICS

L'obtenció dels pèptids oxatiocoralina i tiocoralina en fase sòlida plantegen nous reptes sintètics respecte a la síntesi de l'azatiocoralina i derivats (Figura 3.1). La presència dels enllaços èster i tioèster, respectivament, poden alterar en bona mesura el quadre de grups protectors i l'estratègia de síntesi. El nombre de *N*-metil aminoàcids a la seqüència peptídica en combinació amb els enllaços làbils representa un risc elevat per a la formació de dicetopiperazines. Aquest problema serà més greu per al cas de la tiocoralina perquè que conté l'enllaç més làbil.

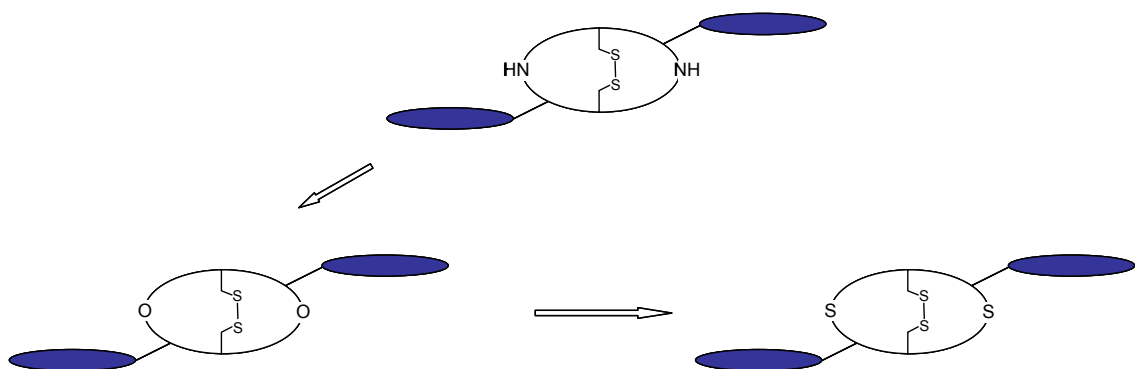


Figura 3.1 Azatiocoralina (NH), oxatiocoralina (O) i tiocoralina (S)

No hi ha cap exemple a la bibliografia de síntesi en fase sòlida d'un pèptid natural que contingui un enllaç tioèster en el sí de la seqüència. En canvi, hi ha nombrosos casos de pèptids que han estat modificats en la darrera etapa de síntesi amb un enllaç tioèster per poder-se unir a cadenes peptídiques que contenen una Cys a l'extrem *N*-terminal segons la reacció de Lligació Química Nativa.¹⁵⁵ La incorporació de l'enllaç tioèster en la darrera etapa de síntesi respon a la seva incompatibilitat amb una estratègia Fmoc/*t*Bu àmpliament usada en la química de pèptids en fase sòlida.

3.1.1 DEFINICIÓ DE L'ESTRATÈGIA DE SÍNTESI

La presència dels enllaços èster i tioèster demana un replantejament de l'estratègia de síntesi. Per una banda es mantindrà la seqüenciació d'etapes; sobre el suport polimèric es realitza l'elongació de la cadena peptídica i la formació del pont disulfur i, en solució, es duu a terme la segona ciclació i la introducció dels heterocicles intercaladors del DNA (Figura 3.2).

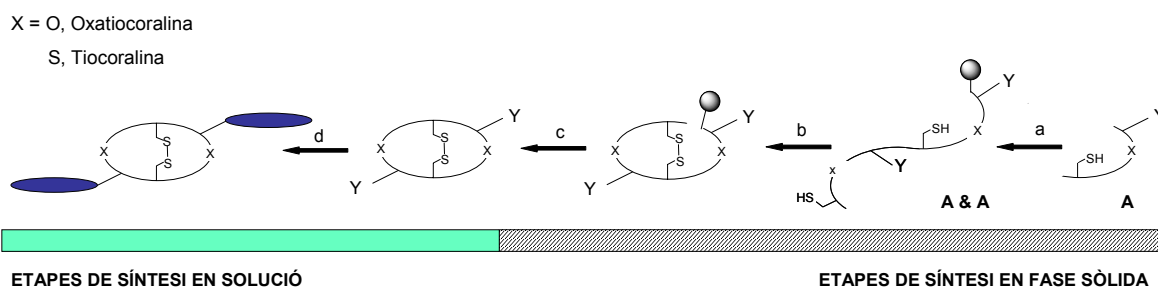


Figura 3.2 Seqüència d'etapes de síntesi proposada per a l'obtenció de l'oxatiocoralina i la tiocoralina

En canvi, és necessària una revisió de l'elecció del primer aminoàcid de la cadena peptídica perquè cap aminoàcid és, *a priori*, un candidat idoni i pot ser determinant per l'èxit de la síntesi. També cal tornar a definir el quadre de grups protectors temporals, permanents i suports polimèrics perquè l'enllaç tioèster és incompatible amb la química Fmoc i desconeixem l'estabilitat de l'enllaç èster. A més, els aminoàcids D-Ser i D-Cys necessiten grups protectors per a poder-se incorporar a la cadena i continuar l'elongació a través de la seva cadena lateral.

¹⁵⁵ Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, L., Kent, S.B.H., Synthesis of proteins by native chemical ligation, *Science*, **1994**, 776-779.

La presència de l'enllaç èster i tioèster representa un obstacle a superar en l'elongació de la cadena peptídica degut a les dues *N*-metil cisteïnes consecutives que el precedeixen. La simetria de la molècula permetrà haver de solucionar només un enllaç làbil perquè l'altre quedarà solventat per l'acoblament de fragments. L'aproximació de fragments A&A pot donar millors resultats que la lineal perquè minimitza les etapes realitzades en presència de l'enllaç èster i pot ajudar a esquivar la formació de DKPs. Ara, la simetria té un paper més crític que en el cas de l'azatiocoralina.

L'oxatiocoralina i la tiocoralina no tenen, *a priori*, cap posició preferencial d'inici de la cadena. Per als dos pèptids es disposa de quatre opcions, referents als quatre aminoàcids diferents que formen part del cicle: *N*Me-Cys(Me), *N*Me-Cys(Acm), Gly i D-Ser/D-Cys. Per tant, es fa una avaluació de la síntesi peptídica iniciada per cadascun dels quatre aminoàcids. La següent figura (Figura 3.3) mostra cada una de les possibilitats d'inici i s'indica el monòmer tetrapeptídic i la cadena lineal final. Se senyala amb una fletxa la possibilitat de formació de DKPs tant si se segueix una síntesi lineal com si es fa l'acoblament de fragments. La localització de l'enllaç èster o tioèster es marca de color blau i l'enllaç format en la ciclació i en l'acoblament 4&4 (dels dos tetrapèptids) de color vermell.

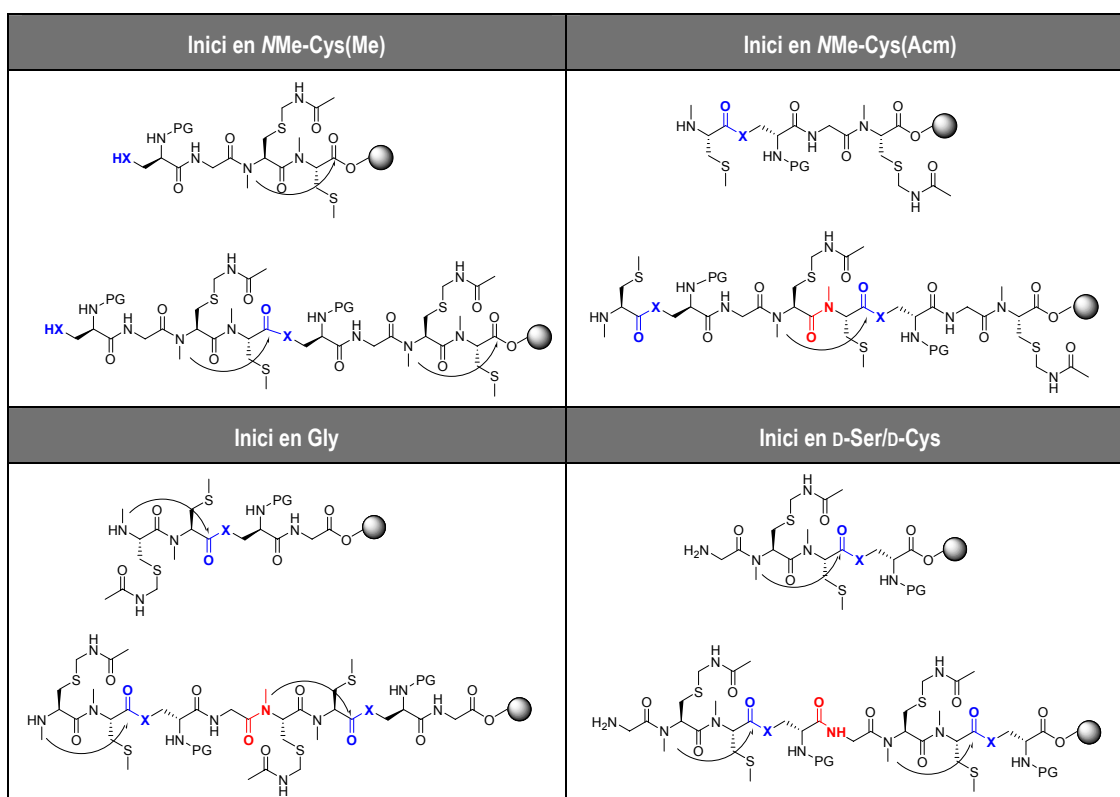
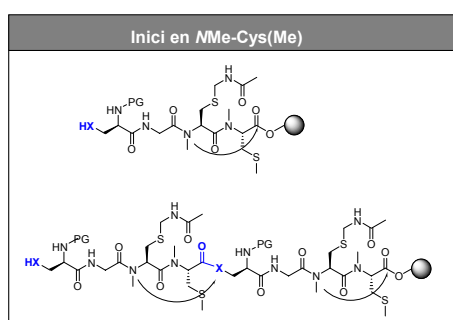


Figura 3.3 Les diferents opcions del punt d'inici de la síntesi de l'oxatiocoralina (si X = O) i de la tiocoralina (si X = S)

Cada possibilitat d'inici ha de ser analitzada amb cura perquè hi ha varis factors que poden intervenir en l'èxit d'un depsipèptid tan ramificat. La valoració dels avantatges i inconvenients de cadascuna de les opcions d'inici seran equivalents, en la major part dels casos, per als dos pèptids. Cal tenir en consideració que el problema de la formació de DKPs està accentuat en el cas de l'enllaç tioèster. Només l'opció d'inici per al residu *NMe-Cys(Me)* és clarament diferent per ambdós pèptids perquè l'acoblament 4&4 i la ciclació és a través del grup hidroxil i tiol, respectivament. A continuació es descriuen els diferents avantatges i inconvenients de les opcions d'inici en base a tres paràmetres: formació de DKPs, D-racemització i punt de ciclació.

3.1.1.1 Inici en *NMe-Cys(Me)*

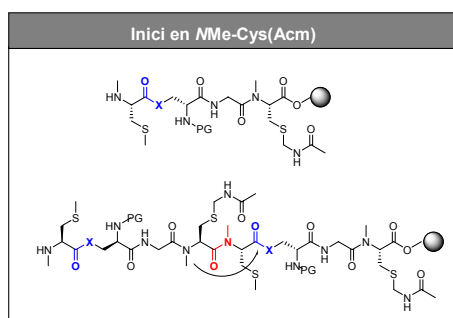


- Problemes de formació de DKPs a nivell de resina quan es desprotegeixi l'amino del segon *N*-metil aminoàcid.

- La cisteïna a l'extrem C-terminal té tendència a racemitzar durant l'elongació de la cadena, l'acoblament de fragments i la ciclació, també afavoreix la formació de productes de β -eliminació en condicions bàsiques.

- El darrer aminoàcid és la D-Ser o D-Cys. Això implica que seguint una estratègia 4&4 l'acoblament es realitzaria sobre el grup hidroxil o el grup tiol, respectivament. El mateix passaria en l'etapa de ciclació. Per al cas de l'oxatiocoralina aquesta opció està desafavorida per la poca reactivitat del grup hidroxil, al contrari que pel cas de la tiocoralina.

3.1.1.2 Inici en *NMe-Cys(Acm)*



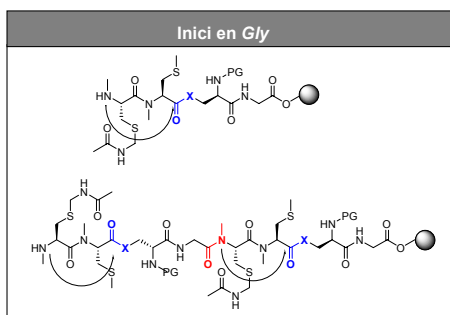
- Seguint aquesta seqüència no hi ha problemes de formació de DKPs a nivell de resina, però sí a nivell de l'enllaç èster/tioèster de la D-Ser/D-Cys en cas de seguir l'estratègia lineal.

- La cisteïna es troba en l'extrem C-terminal.

- L'acoblament per fragments i la darrera etapa de ciclació es donaria entre dos *N*-metil aminoàcids.

- L'enllaç èster/tioèster es troba al final del monòmer i només hauria de suportar l'acoblament del quart aminoàcid.

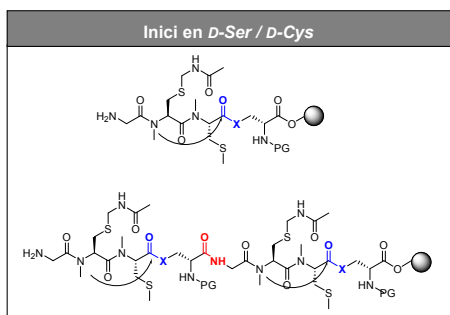
3.1.1.1.3 Inici en Gly



- No hi ha possibilitat de formació de DKPs a nivell de resina però sí a nivell de l'èster/tioèster de la primera D-Ser/D-Cys si se segueix una estratègia lineal o per acoblament 4&4. L'etapa de ciclació és especialment problemàtica.

- La Gly no dona racemització en l'extrem C-terminal

3.1.1.1.4 Inici en D-Ser/D-Cys



- No hi ha formació de DKPs a nivell de resina perquè l'elongació de la cadena es realitza a través de la cadena lateral i, per tant, l'anell que es formaria és de set baules i no està afavorit. En canvi, hi ha perill de formació de DKPs a nivell de l'enllaç èster/tioèster.

- La formació de l'enllaç èster/tioèster a l'inici de la seqüència pot dificultar l'elongació de la cadena peptídica degut a la seva labilitat.

- La ciclació es realitzaria mitjançant el grup amino de la Gly i l'acid carboxílic de la D-Ser/D-Cys. Aquest és, potser, un dels enllaços més favorables de tota la seqüència.

Es comprova com cada una de les opcions d'inici de la cadena tenen associades possibles reaccions secundàries. Així, el desenvolupament de la síntesi en fase sòlida dels pèptids oxatiocoralina i tiocoralina es basarà en l'exploració sintètica de les diferents possibilitats dels punts d'inici per valorar la millor opció.

Es decideix afrontar, primer, la síntesi de l'oxatiocoralina perquè és el pèptid amb menor tendència a la formació de DKPs, es pot emprar la química Fmoc i es disposa dels aminoàcids Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH i Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH. D'aquesta manera, l'exploració de la síntesi de l'oxatiocoralina servirà per avaluar el seu comportament en la fase sòlida i extreure informació per a la síntesi de la tiocoralina.

3.2 OXATIORCORALINA, EXPLORACIÓ DE LA SÍNTESI EN FASE SÒLIDA

Tal i com ja s'ha comentat, l'oxatiocoralina és un depsipèptid bicíclic i dimèric que difereix únicament del pèptid azatiocoralina en la substitució de l'enllaç amida no peptídica per un enllaç èster. Aquest canvi s'obté per la substitució del residu D-Ser en el lloc del D-Dap i el nom sistemàtic del nou compost és $\{[3\text{HQA-D-Ser}(\&^1)\text{-Gly-NMe-Cys}(\&^2)\text{-NMe-Cys(Me)}\&^3]$ $[3\text{HQA-D-Ser}(\&^3)\text{-Gly-NMe-Cys}(\&^2)\text{-NMe-Cys(Me)}\&^1]$ (Figura 3.4).

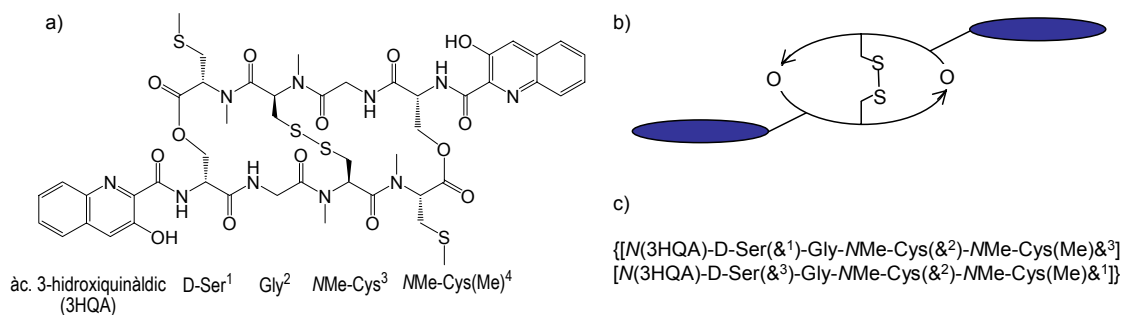
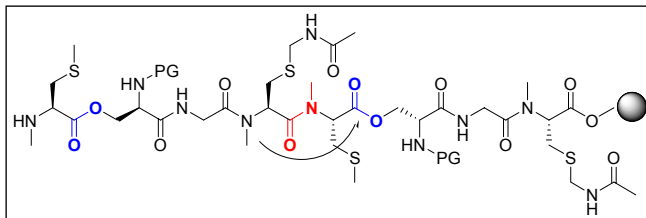


Figura 3.4 Oxatiocoralina: a) estructura i composició, b) representació gràfica i c) nom sistemàtic

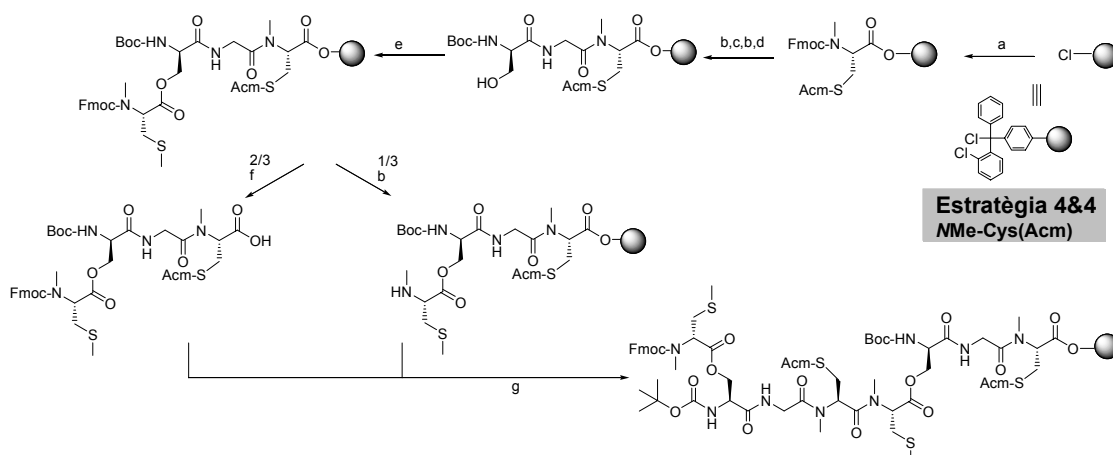
L'oxatiocoralina té risc de formació de DKPs i l'enllaç èster és més difícil d'obtenir respecte el corresponent enllaç amida per la menor reactivitat del grup hidroxil. Així s'avaluaran les diferents possibilitats d'iniciar la cadena peptídica i el proper objectiu serà aconseguir una síntesi de la cadena peptídica lineal a partir de l'acoblament de monòmers tetrapeptídics de puresa elevada. En aquest cas, l'acoblament 4&4 serà indicatiu del comportament del pèptid en l'etapa de ciclació.

Es decideix afrontar la síntesi de l'oxatiocoralina iniciant l'elongació de la cadena peptídica amb l'aminoàcid Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH perquè és l'opció on l'enllaç èster és el darrer a formar-se en la síntesi del monòmer i que ofereix menys perill de formació de DKPs. En canvi, caldrà tenir especial atenció en l'acoblament de fragments que es dona per la unió : NMe-Cys(Me)-NMe-Cys(Acm). Per aquesta etapa complicada es compta amb els agents d'acoblament de sals de fosfoni, com el PyAOP, molt més reactius que les carbodiimides i que poden compensar la menor reactivitat dels *N*-metil aminoàcids. També caldrà seguir també la possible racemització i reacció de β -eliminació de la cisteïna en l'extrem C-terminal.

3.2.1 ESTUDI DE LA SÍNTESI DE LA CADENA LINEAL INICIADA EN NME-CYS(ACM)



L'estratègia de síntesi que es proposa per la cadena peptídica lineal segueix el següent esquema (Esquema 3.1). La síntesi es basa en la química Fmoc/tBu i la resina CTC-PS com a suport polimèric. Es realitza un acoblament 4&4 per minimitzar les possibles reaccions secundàries degudes a la presència de l'enllaç èster.



Esquema 3.1 Esquema de síntesi proposat per a la síntesi de la cadena peptídica lineal de l'oxatiocoralina iniciada en NMe-Cys(Acm). a) Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH, DIEA, MeOH, DCM; b) piperidina-DMF (4:1); c) Fmoc-Gly-OH/HATU/DIEA, DMF; d) Boc-D-Ser-OH/HATU/DIEA, DMF; e) Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH/DIPCDI/DMAP (cat.), DMF; f) TFA-DCM (1:99); g) PyOAP/DIEA, DMF

L'estratègia proposada (Esquema 3.1) té uns altres aspectes específics que cal analitzar:

- La formació de la DKP a nivell de resina està minimitzada per l'ús de la resina CTC-PS perquè el grup Trt de la resina ofereix impediment estèric a l'atac nucleòfil del grup amino sobre l'extrem C-terminal.
- L'estratègia 4&4 evita la formació de DKPs a nivell de l'enllaç èster de la D-Ser (Esquema 3.1.g).

- El tercer acoblament es realitza amb HATU perquè ajuda a minimitzar la formació de DKPs a nivell de resina (Esquema 3.1.d).
- S'empra HATU i DIEA com a agents d'acoblament per a la incorporació d'aminoàcids sobre *N*-metil aminoàcids i se seguirà el mateix procediment descrit en la síntesi de l'azatiocoralina.
- La formació de l'enllaç èster es realitza amb DIPCDI i DMAP (cat.) (Figura 3.1.e) i se segueix el mateix procediment que el descrit per a la formació de l'enllaç èster en la síntesi de l'anàleg de la sirengotoxina.
- L'acoblament sobre el grup amino de la Gly es controla pel test de ninhidrina, i sobre els *N*-metil aminoàcids pel test de De Clercq. La formació de l'enllaç èster se segueix per anàlisi d'una alíquota de la peptidil-resina escindida i analitzada en el HPLC.
- La divisió de la resina (fraccions 1/3 i 2/3) es realitzarà fent alíquotes d'un volum conegut de solució de la peptidil-resina en DMF.
- Per a la unió de fragments s'empra la sal de fosfoni PyOAP i DIEA com a agents d'acoblament: Fmoc-tetrapèptid-OH (2 eq)/PyOAP/DIEA (1:1:3) (Figura 3.1.g). La reacció se segueix per test de ninhidrina sense filtració.

3.2.1.1 Prova de síntesi de la cadena lineal iniciada en *NMe-Cys(Acm)* i emprant química Fmoc/^tBu

La síntesi es realitza emprant 150 mg de resina CTC-PS i, abans que finalitzin els tractaments d'eliminació del grup Fmoc del segon aminoàcid es pre-activa el tercer aminoàcid Boc-D-Ser-OH amb HATU i DIEA. En aquest cas, s'observa la formació d'una solució heterogènia. Possiblement s'ha produït una polimerització del residu amb la cadena lateral desprotegida. Com a alternativa s'addiciona l'aminoàcid i la DIEA com a dissolució de DMF sobre la resina i, immediatament després, l'HATU. L'anàlisi de l'escissió d'una alíquota de la tripèptidil-resina Boc-D-Ser-Gly-*NMe-Cys(Acm)*-OH per HPLC-EM revela la presència del producte (Figura 3.5.a) i també d'un producte secundari (18 %) amb massa molecular de 20 unitats menys (Figura 3.5.b). El subproducte correspon a la substitució del residu *NMe-Cys(Acm)* pel residu *NMe-3-(1-piperidinil)alanina*.

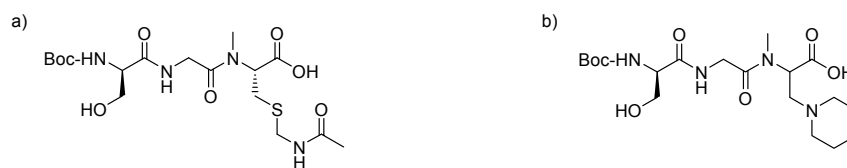
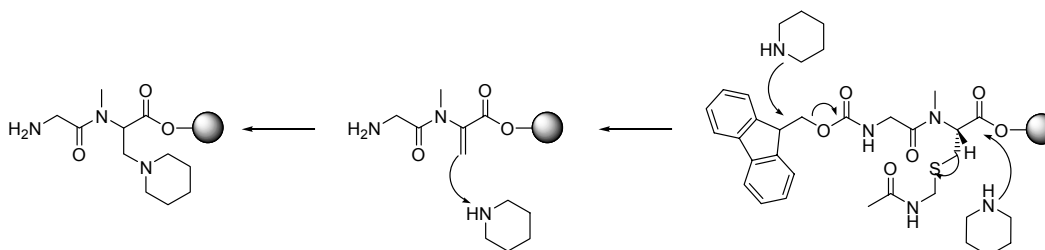


Figura 3.5 Productes obtinguts en la síntesi del tripèptid Boc-D-Ser-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH.
a) producte esperat; b) producte secundari d'eliminació del grup S-Acm i addició de piperidina

La formació del subproducte es deuria a un primer atac bàsic de la piperidina sobre el H^α de la Cys situada en l'extrem C-terminal i la conseqüent eliminació del grup S-Acm formant el residu de NMe-didehidroalanina (NMe-Dha). Un atac nucleòfil d'una segona molècula de piperidina originaria el residu de 3-(1-piperidinil)alanina. Aquesta reacció secundària està descrita quan la cisteïna es troba en la posició C-terminal.¹⁵⁶ El subproducte es formaria, preferentment, durant l'eliminació del grup Fmoc de la Gly perquè el H^α de la NMe-Cys(Acm) és més bàsic quan el grup amino es troba en la forma *N*-acil que quan està en la forma lliure o *N*-uretà.



Esquema 3.2 Mecanisme de formació del residu NMe-3-(1-piperidinil)alanina

A continuació té lloc la formació de l'enllaç èster per incorporació de l'aminoàcid Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH amb DIPCDI/DMAP (cat.) com a agents d'acoblament. Un cop obtingut el monòmer tetrapeptídic, es divideix la peptidil-resina en 1/3 i 2/3 parts i s'elimina el grup Fmoc de la peptidil-resina de la fracció menor (1/3). S'analitza per HPLC-EM una alíquota de la peptidil-resina i es comprova que la proporció del tetrapèptid que incorpora el residu NMe-3-(1-piperidinil)alanina ha augmentat respecte a la del tetrapèptid esperat (30 %), aquest fet confirma que la formació del subproducte es dona en l'eliminació del grup Fmoc quan la NMe-Cys(Acm) està protegida en forma de *N*-acil. La mesura de l'absorbància en l'eliminació del grup Fmoc determina un rendiment baix de la síntesi del monòmer tetrapeptídic {[Boc-D-Ser(&)-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH] [H-NMe-Cys(Me)&]} del 30 %, fet que indica que, segurament, no s'ha pogut evitar la formació de la DKP Gly-NMe-Cys(Acm) a nivell de resina.

¹⁵⁶ Lukszo, J.; Patterson, D.; Albericio, F.; Kates, S. A., 3-(1-Piperidinyl)alanine formation during the preparation of C-terminal cysteine peptides with the Fmoc^tBu strategy, *Lett. Pept. Sci.*, **1996**, 3, 157-166.

Dels resultats obtinguts de la primera prova de síntesi del monòmer de l'oxatiocoralina s'observa que:

- La cadena peptídica iniciada en *N*Me-Cys(Acm) no és compatible amb la química Fmoc/^tBu. Per tant, si es vol continuar amb aquesta aproximació cal canviar els grups protectors dels aminoàcids. Per al primer aminoàcid es pot conservar el grup Fmoc com a grup protector perquè permet calcular la funcionalització inicial de la peptidil-resina i es creu que la formació del subproducte per atac de la piperidina no es dona quan l'amina està lliure o en forma de carbamat.
- Les condicions bàsiques d'eliminació del grup Fmoc poden afavorir la formació de la DKP. Per tant, es necessita d'un grup protector que no s'elimini en condicions bàsiques i sigui compatible amb l'esquema de síntesi proposat.

Així, es planteja l'ús del grup Alloc com a grup protector temporal de la cadena peptídica a excepció del primer aminoàcid. Les condicions neutres d'eliminació del grup Alloc ([Pd(PPh₃)₄] (cat.), PhSiH₃) haurien de minimitzar la formació del subproducte d'eliminació del grup S-Acm i alhora reduir la formació de DKPs.

3.2.1.2 Prova de síntesi de la cadena lineal iniciada en *N*Me-Cys(Acm) i emprant química Alloc

Per a dur a terme aquesta síntesi és necessari obtenir prèviament els aminoàcids no assequibles comercialment: Alloc-Gly-OH i Alloc-*N*Me-Cys(Me)-OH (Figura 3.6). Les síntesis es realitzen en solució i es troben descrites al final del present capítol (Capítol 3, 3.4.1).

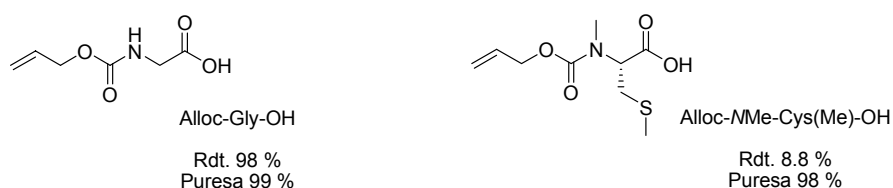


Figura 3.6 Aminoàcids sintetitzats en solució per a la síntesi de la cadena lineal de l'oxatiocoralina iniciada en *N*Me-Cys(Acm) amb química Alloc: Alloc-Gly-OH i Alloc-*N*Me-Cys(Me)-OH

S'inicia la síntesi amb 150 mg de resina CTC-PS ($f = 1.5$ mmol/g resina) i, després d'introduir el primer aminoàcid en defecte (0.7 mmol/g resina), s'obté una funcionalització inicial de la resina de 0.55 mmol/g resina. Es realitza la síntesi del monòmer tetrapeptídic seguint la metodologia descrita en l'anterior prova. L'anàlisi en el HPLC de l'escissió d'una alíquota de la dipeptidil-resina Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-CTC-PS i de la tripeptidil-resina Boc-D-Ser-Gly-NMe-Cys(Acm)-CTC-PS mostren l'absència del subproducte d'eliminació del grup S-Acm. Això ens indica que la protecció del primer aminoàcid amb el grup Fmoc és vàlida i que l'ús del grup Alloc soluciona el problema de l'eliminació del grup S-Acm de la primera Cys. Després de la incorporació de l'aminoàcid Alloc-NMe-Cys(Me)-OH que forma l'enllaç èster, s'obté el monòmer tetrapeptídic. Seguidament es divideix la peptidil-resina en 1/3 i 2/3 parts, s'elimina el grup Alloc de la primera fracció (1/3) i es realitza l'escissió del pèptid de la resina de la segona fracció (2/3). Per a l'acoblament de fragments s'empra PyOAP i DIEA com a agents d'acoblament i després de 4 h de reacció, un test de De Clercq sense filtrar positiu indica que l'acoblament no és complet. En aquest cas, s'addiciona un equivalent més de PyOAP i dos de DIEA i es deixa en agitació tota la nit. L'anàlisi per HPLC-EM d'una alíquota de la peptidil-resina indica que l'acoblament no ha finalitzat. S'observa un 66 % d'octapèptid final i un 34 % de tetrapèptid inicial. Després d'addicionar un equivalent més de PyOAP i DIEA i deixar la reacció 4 h, s'observa com la proporció pràcticament no ha variat (69 % octapèptid i 31 % tetrapèptid). I a més, no s'obté cap millora després de deixar l'acoblament una nit més.

S'analitzen per HPLC-EM els filtrats de l'acoblament de fragments (Figura 3.7). I s'obté, com a producte majoritari, un producte de massa molecular 647, que es correspon amb 18 unitats menys que la massa del tetrapèptid esperat. Amb aquesta dada i els resultats de l'acoblament es dedueix l'existència d'una reacció secundària que portaria a la formació d'una ciclació intramolecular que inactivaria l'àcid carboxílic. La reacció seria la formació d'un cicle intramolecular i es basaria en l'atac del nitrogen de l'amida de la Gly a l'èster activat del primer aminoàcid. Si l'atac es produís per l'amida del grup protector de l'Acm també es formaria un cicle de sis baules però aquest no seria tan estable .

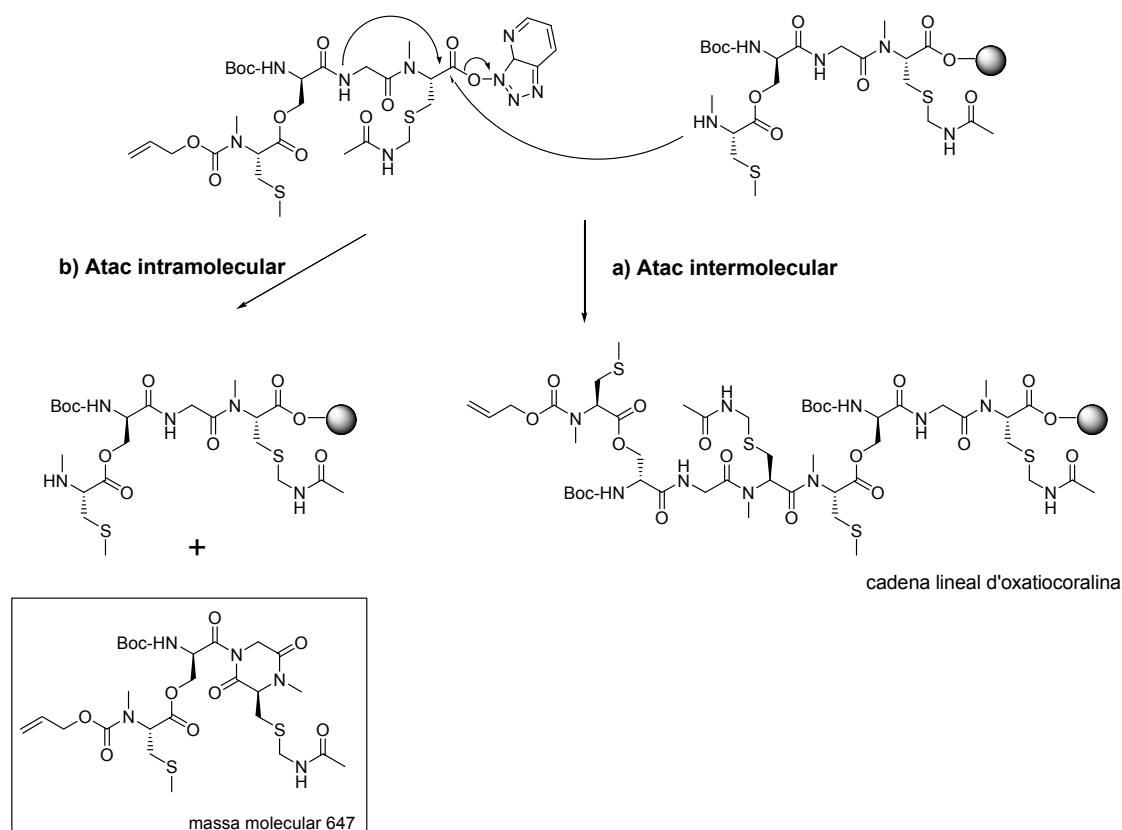


Figura 3.7 Productes formats en l'acoblament 4&4 de la síntesi de l'oxatiocoralina iniciada en NMe-Cys(Acm)

Es realitza una altra síntesi iniciant la cadena amb més resina CTC-PS per poder realitzar dos acoblaments de fragments de 2 eq cada un. Tot i així, no s'aconsegueix un acoblament total sinó que s'obté un acoblament màxim del 75 %.

Així, de les síntesis realitzades iniciant la cadena en el residu de NMe-Cys(Acm) no s'obtenen bons resultats. La formació del producte secundari es podria eliminar mitjançant l'ús d'un nou grup protector ortogonal per l'amida de la glicina. A la literatura es troben exemples de grups protectors per a amides d'enllaços peptídics com el grup 2-hidroxí-4-metoxibenzil (Hmb)^{157,158} o les pseudo-prolines.¹⁵⁹ Aquests grups protectors s'empren per a evitar agregacions entre cadenes peptídiques alifàtiques.

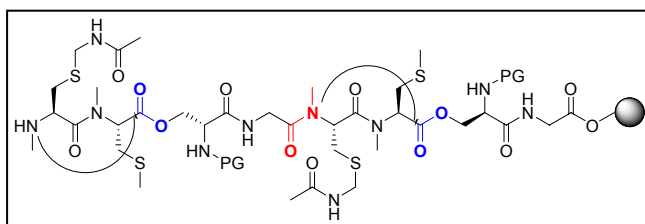
¹⁵⁷ Simmonds, R. G., Use of the Hmb backbone-protecting group in the synthesis of difficult sequences, *Int. J. Pep. Prot. Res.*, **1996**, 36-41.

¹⁵⁸ Nicolás, E., Pujades, M., Bacardit, J., Giralt, E., Albericio, F., A new approach to Hmb-backbone protection of peptides: synthesis and reactivity of N^α-Fmoc-N^α-(Hmb)amino acids, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 2317-2320.

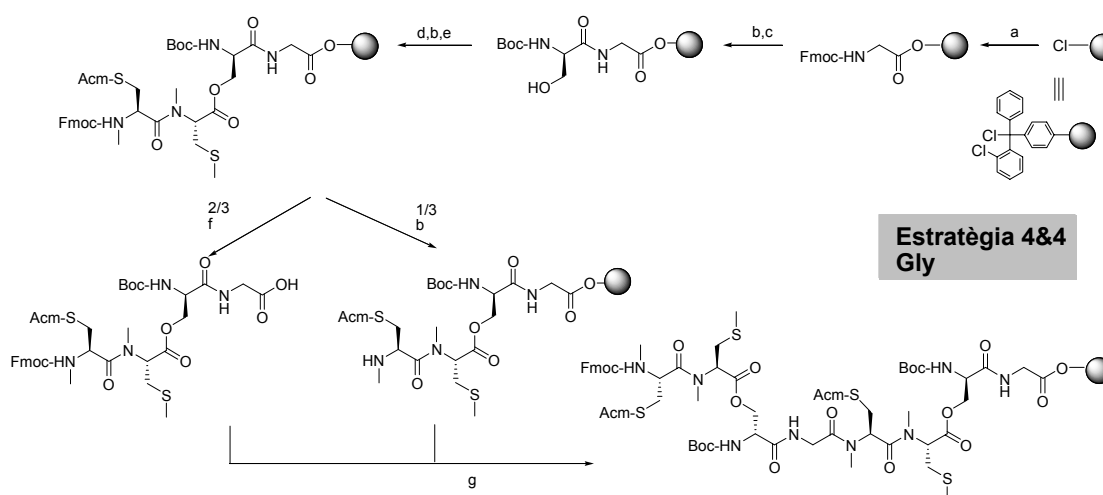
¹⁵⁹ Wöhr, T., Wahl, F., Nefzi, A., Rohwedder, B., Sato, T., Sun, X., Mutter, M., Pseudo-prolines as a solubilizing, structure-disrupting protection technique in peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 9218-9227.

A banda de l'exploració de nous grups protectors per al grup amida, s'inicia una nova aproximació per a la síntesi de l'oxatiocoralina, canviant el punt d'inici de l'elongació de la cadena peptídica. A continuació s'explorarà la Gly com a punt d'inici de la cadena.

3.2.2 ESTUDI DE LA SÍNTESI DE LA CADENA LINEAL INICIADA EN GLY



L'estratègia de síntesi proposada es detalla en el següent esquema (Esquema 3.3). La síntesi es basa en la química Fmoc/^tBu i la resina CTC-PS com a suport polimèric i es realitza una acoblament 4&4 per tal de minimitzar les reaccions secundàries per la presència de l'enllaç èster.



Esquema 3.3 Esquema de síntesi proposat per a la síntesi de la cadena peptídica lineal de l'Oxatiocoralina iniciada en Gly, a) Fmoc-Gly-OH, DIEA, DCM; b) piperidina-DMF (4:1); c) Boc-D-Ser-OH/DIPCDI/HOBt, DMF; d) Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH/DIPCDI/DMAP (cat.), DMF; Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH/HATU/DIEA, DMF; f) TFA-DCM (1:99); g) PyOAP/DIEA, DMF

L'estratègia plantejada elimina la possibilitat de formació de DKPs a nivell de resina perquè l'amina del segon aminoàcid resta protegit amb un grup protector permanent (Boc) i l'elongació de la cadena es dóna a través de la cadena lateral (Esquema 3.3.d). En aquest cas, s'empra el grup protector temporal Fmoc perquè la Cys no està en l'extrem C-terminal i permet quantificar les etapes de síntesi.

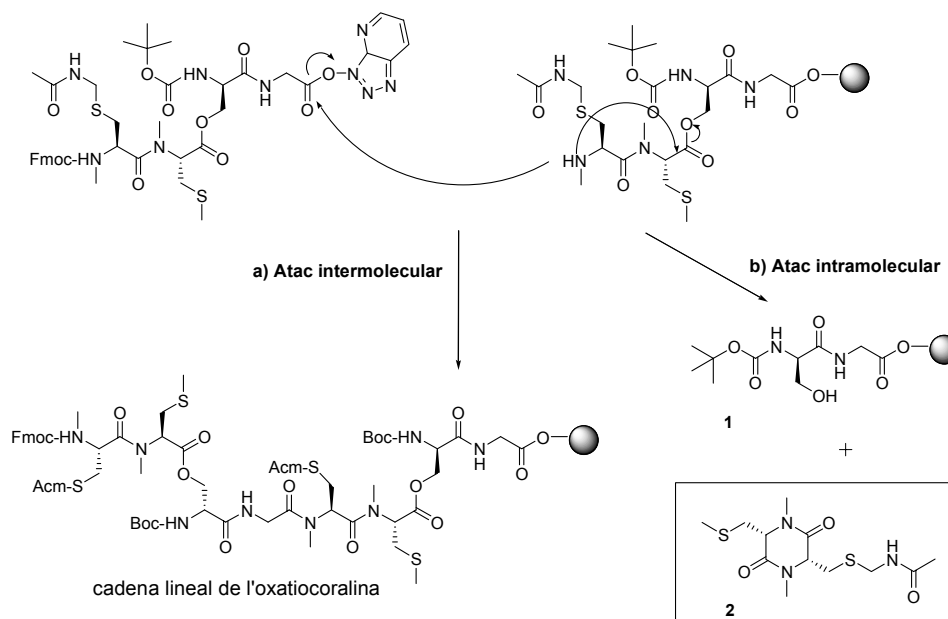
3.2.2.1 Prova de síntesi de la cadena lineal iniciada en Gly i emprant química Fmoc/^tBu

S'inicia la síntesi amb 150 mg de resina CTC-PS i s'obté una funcionalització inicial de la resina de 0.57 mmol/g resina. Es determina un rendiment de síntesi del tripèptid {[Fmoc-NMe-Cys(Me)&][Boc-D-Ser(&)-Gly-CTC-PS]} del 91 %. A continuació, l'acoblament del quart aminoàcid [Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH] per obtenir el monòmer es realitza amb HATU i DIEA com a agents d'acoblament. Seguidament, es divideix la peptidil-resina en 1/3 i 2/3 parts i es realitza l'eliminació del grup Fmoc de la primera fracció (1/3), que ens permet determinar el rendiment de síntesi del fragment tetrapeptídic, inclosa l'etapa de divisió de la resina, del 77 %.

Per a l'acoblament de fragments es fa servir PyOAP i DIEA com a agents d'acoblament. A les 4 h de reacció el test de De Clercq és positiu. Llavors s'addiciona més PyOAP i DIEA i es deixa la reacció 12 h, i s'obté un test de De Clercq negatiu. El rendiment de l'acoblament de fragments és molt baix, 39 %. S'analitzen per HPLC-EM una alíquota de la peptidil-resina i els filtrats de l'acoblament (Esquema 3.4):

- En l'alíquota de la peptidil-resina s'observa la massa molecular de la cadena lineal de vuit aminoàcids i un producte amb una massa molecular de 262.
- Els filtrats de l'acoblament contenen un producte de massa molecular 319.

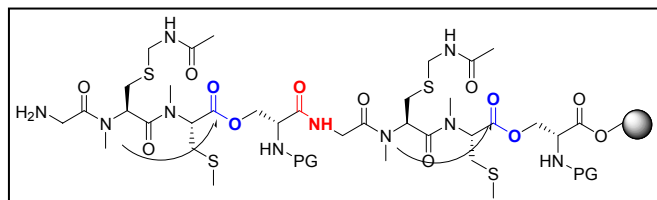
Els resultats indiquen la competència de dues reaccions; la formació de la cadena lineal de vuit aminoàcids a través d'un atac intermolecular del grup amino de la peptidil-resina amb l'èster activat del fragment lliure i la formació d'una DKP per l'atac intramolecular del grup amino de la peptidil-resina a l'enllaç èster de la D-Ser.



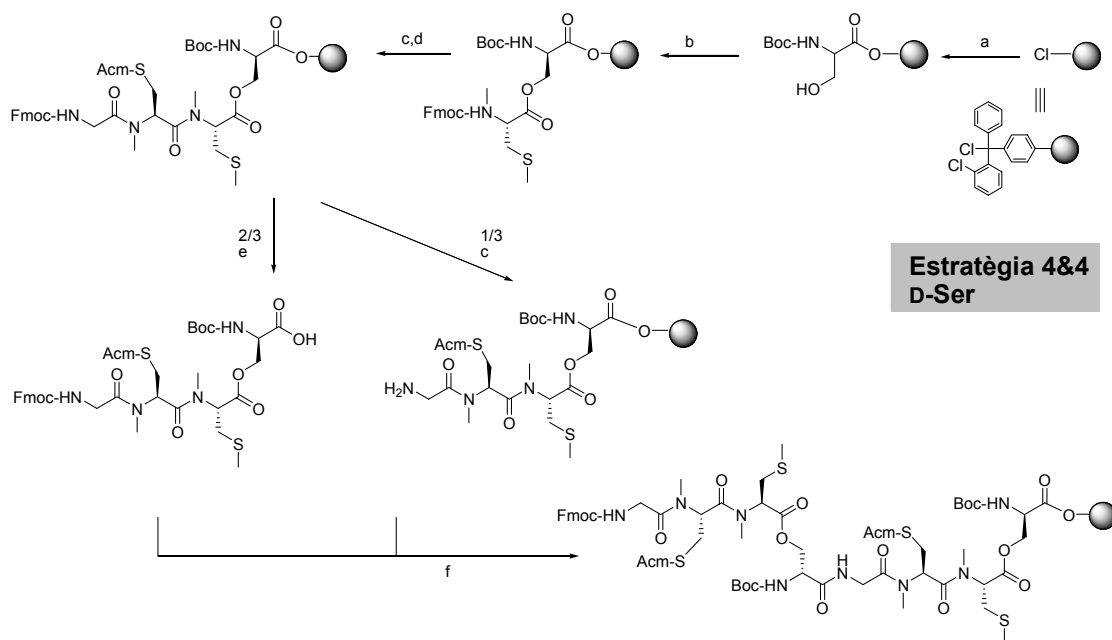
Esquema 3.4 Productes de l'acoblament 4&4 en la síntesi de l'oxatioralinalina iniciada en Gly

Els resultats obtinguts en aquesta aproximació indiquen que la Gly tampoc és un bon punt d'inici de la cadena peptídica. Es podria pensar en seguir una estratègia lineal. El residu NMe-Cys(Acm) es podria introduir protegit amb el grup Alloc o bé introduir el dipèptid Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH. En aquests casos es podria, potser, eliminar la formació de la DKP a nivell de l'enllaç èster del tetrapèptid. En canvi, en l'etapa de ciclació, hi hauria competència entre dos atacs intramoleculars: un entre els extrems cap-cua donant lloc al producte bicicle desitjat i, un altre, donant lloc a la formació d'una DKP, trencant el cicle format i de forma anàloga a la produïda en l'acoblament 4&4. Es desconeix però, l'efecte estabilitzador que pot jugar el pont disulfur en la formació del bicicle. Així, es decideix explorar la darrera possibilitat de punt d'inici: el residu D-Ser.

3.2.3 ESTUDI DE LA SÍNTESI DE LA CADENA LINEAL INICIADA EN D-SER



L'estratègia de síntesi que inicia la cadena peptídica pel residu D-Ser és anàloga a l'estratègia que ha permès obtenir l'azatiocoralina. És l'opció on l'acoblament 4&4 i ciclació estan més afavorits i on no hi ha formació de DKPs a nivell de resina. L'estratègia de síntesi proposada es detalla en el següent esquema (Esquema 3.5). La síntesi es basa en la química Fmoc/tBu i la resina CTC-PS com a suport polimèric i es realitza una acoblament 4&4 per tal de minimitzar les reaccions secundàries per la presència de l'enllaç èster.



Esquema 3.5 Esquema de síntesi proposat per a la síntesi de la cadena peptídica lineal de l'oxatiocoralina iniciada en D-Ser, a) Boc-D-Ser-OH, DIEA, DCM; b) Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH/DIPCDI/DMAP (cat.), DMF; c) piperidina-DMF (1:4); d) Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH/HATU/DIEA, DMF; f) PyOAP/DIEA, DMF.

L'estratègia proposada té uns altres aspectes específics que cal analitzar:

- Tant el punt d'acoblament 4&4 com el de ciclació és el més favorable; es dona per formació d'un enllaç amida amb l'única amina primària de la seqüència (Esquema 3.5.d).
- La protecció del grup amino de la D-Ser en forma de carbamat al llarg de l'elongació de la cadena minimitza el risc d'epimerització (Esquema 3.5.a).
- La introducció de la D-Ser com a primer aminoàcid es pot realitzar amb el grup hidroxil lliure o protegit amb un grup protector ortogonal a la resina.
- La introducció de la D-Ser com a primer aminoàcid evitarà la formació de DKP a nivell de resina perquè l'elongació de la cadena peptídica es realitza mitjançant el grup hidroxil de la cadena lateral.
- Per tal d'evitar la DKP a nivell de l'enllaç èster, s'introdueix el residu NMe-Cys(Acm) com a dipèptid: Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH (Esquema 3.5.f). En l'acoblament del dipèptid hi ha risc de racemització perquè la Cys està en l'extrem C-terminal i, per tant, caldrà estudiar bé les condicions d'acoblament.
- Es redueix l'escala de treball.

Així, per tal de dur a terme l'estratègia plantejada, és necessari disposar d'un mètode per a la introducció de l'aminoàcid Boc-D-Ser-OH sobre la resina CTC-PS o obtenir un grup protector per al grup hidroxil, i disposar del dipèptid Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH.

- **Introducció de la Boc-D-Ser-OH sobre la resina CTC-PS.** La introducció de l'aminoàcid Boc-D-Ser-OH sobre la resina CTC-PS pot donar problemes per la reacció del grup hidroxil lliure sobre la resina, reduint el rendiment de la síntesi i alliberant Boc-D-Ser-OH durant l'etapa d'escissió. Es pensa en una reducció de la funcionalització prèvia a l'addició de l'aminoàcid lliure. Així, a reducció de la funcionalització es duria a terme mitjançant una quantitat determinada de MeOH i DIEA. Els resultats obtinguts en l'optimització de la incorporació de la Boc-D-Ser-OH sobre la resina CTC-PS es troben detallats al final del capítol (*Capítol 3*, 3.4.6). El procés de reducció de la funcionalització però, provoca la inactivació dels centres més reactius de la resina. Per això, es decideix introduir l'aminoàcid degudament protegit i actuar segons el protocol habitual d'incorporació del primer aminoàcid sobre la resina CTC-PS.

- **Un grup protector per a la Boc-D-Ser-OH, el TBDMS.** En un primer moment es pensa en l'ús del grup Alloc per a la protecció del grup hidroxil. L'obtenció de l'aminoàcid protegit Boc-D-Ser(Alloc)-OH no dona bons resultats i la seva eliminació no és fàcil. Es decideix fer ús del grup protector *tert*-butil-dimetilsilil (TBDMS). El TBDMS és un grup àmpliament usat en la química orgànica en solució però es coneixen molt pocs casos d'aplicacions en la síntesi de pèptids en fase sòlida. L'ús d'un grup protector de la Ser compatible amb la resina CTC-PS és molt útil per a la síntesi de depsipèptids cíclics. L'eliminació del TBDMS es realitza mitjançant l'addició d'una solució comercial de fluorur de tetra-*n*-butilamoni (TBAF) en THF (1 M). És un mecanisme selectiu i es creu que serà compatible amb la resina CTC-PS. La síntesi de l'aminoàcid Boc-D-Ser(TBDMS)-OH (Figura 3.8) s'obté amb bons rendiments i es troba descrita al final del capítol (*Capítol 3, 3.4.2*).

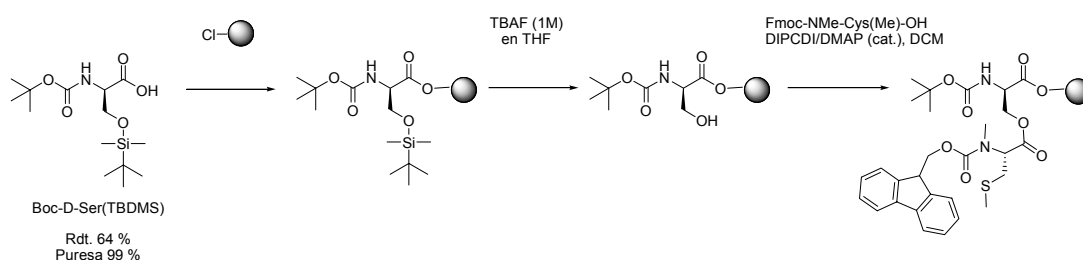


Figura 3.8 Aminoàcid Boc-D-Ser(TBDMS)-OH i el seu ús en la síntesi de depsipèptids.

- **Síntesi del dipèptid Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH en fase sòlida.** La síntesi d'un dipèptid es realitza, generalment, en solució i es reserva el suport polimèric per a la síntesi de cadenes peptídiques més llargues. La dificultat de l'acoblament sobre un *N*-metil aminoàcid i la possibilitat de regeneració de la resina CTC-PS explorada en el nostre laboratori, ens han fet plantejar l'ús de la resina CTC-PS com a grup protector temporal.¹⁶⁰ I així s'ha pogut obtenir la síntesi del dipèptid de forma ràpida, amb bons rendiments i sense necessitat de purificar el producte final. Les condicions de la síntesi del dipèptid Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH (Figura 3.9) en fase sòlida es detallen al final del capítol (*Capítol 3, 3.4.4*).

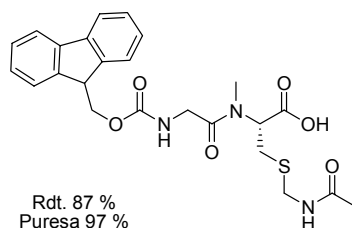


Figura 3.9 Dipèptid Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH

¹⁶⁰ García-Martín, F.; Bayó-Puxan, N.; Albericio, F., Chlorotriyl Chloride resin as a convenient reusable protecting group, *en preparació*

3.2.3.1 Prova de síntesi de la cadena lineal iniciada en D-Ser i emprant química Fmoc/^tBu

En aquest cas, es decideix substituir l'aminoàcid Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH per l'aminoàcid comercial Fmoc-NMe-Leu-OH per tal d'estalviar esforços sintètics. S'inicia la síntesi amb 50 mg de resina CTC-PS i s'aplica la reducció prèvia de funcionalització de la resina. L'eliminació i mesura de l'absorbància del grup Fmoc del segon aminoàcid Fmoc-NMe-Leu-OH determina una funcionalització de 0.34 mmol/g resina. Per l'acoblament del dipèptid Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH s'empra HATU i DIEA com a agents d'acoblament i es fa servir com a dissolvent una mescla DMF-DCM (1:1) per minimitzar el risc d'epimerització de la Cys.¹⁶¹ Als 45 min de reacció s'obté test de De Clerq negatiu i l'anàlisi per HPLC-EM de l'escissió d'una alíquota de la peptidil-resina mostra una mescla complexa de productes. S'obté el monòmer tetrapeptídic esperat {[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Leu]& [Boc-D-Ser(&)]} i el tripèptid resultant de la pèrdua del residu de NMe-Leu, {[Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)& [Boc-D-Ser(&)]} (Figura 3.10). Els productes tenen forma bífida i tenen pics relacionats de temps de retenció menors i massa molecular -2, els quals no s'han pogut identificar.

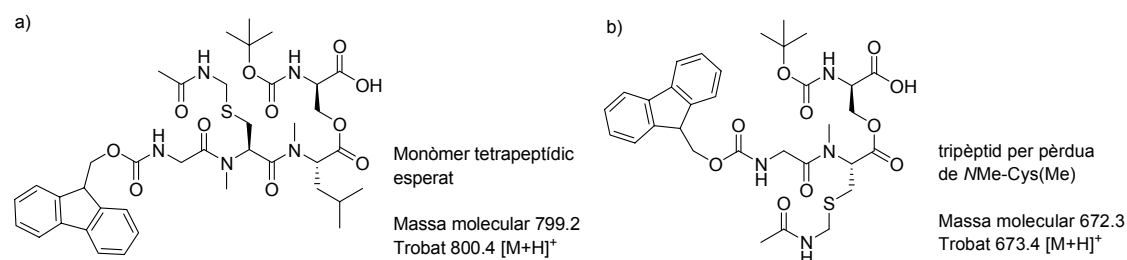


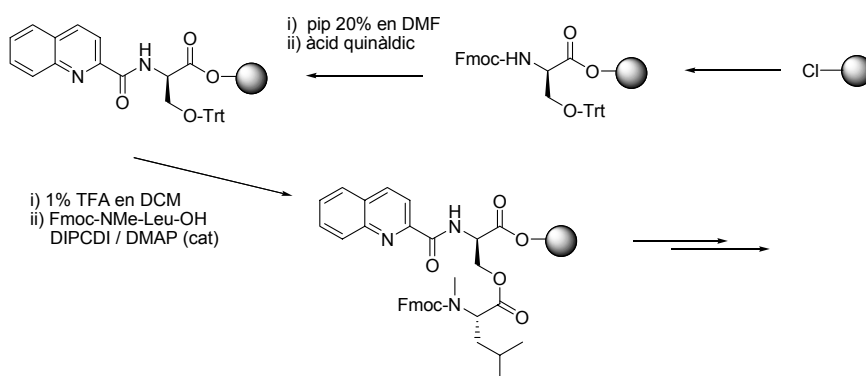
Figura 3.10. Productes obtinguts en la prova de síntesi del monòmer d'oxatiocoralina iniciat en D-Ser.

La mescla i composició dels productes obtinguts ens indica que:

- L'enllaç èster no és estable en les condicions d'eliminació del grup Fmoc quan la Boc-D-Ser-OH està en l'extrem C-terminal. En aquesta posició l'enllaç èster pateix aminòlisi amb els tractaments amb piperidina, i el dipèptid Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH, mitjançant els reactius HATU i DIEA, forma l'enllaç èster per donar el tripèptid.
- La presència de pics bífids pot respondre a l'existència d'isòmers conformacionals degut a la manca de llibertat de rotació de l'enllaç amida entre N-metil aminoàcids més que a un problema d'epimerització.

¹⁶¹ 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.

A continuació, es prova la mateixa síntesi però ara s'incorpora l'heterocicle intercalador àcid quinàldic (QNA) en el grup amino de la D-Ser, d'aquesta forma el grup amino quedarà protegit com a *N*-acil. A més, l'àcid quinàldic permetrà temptejar la seva incorporació a la cadena peptídica en fase sòlida actuant, alhora, com a grup protector de l'amino, i avaluar el seu efecte en l'estabilitat de l'enllaç èster (Esquema 3.6). Per tal de realitzar aquesta síntesi es fa servir la resina Wang perquè resisteix tractaments àcids moderats (fins el 20 % de TFA). S'incorpora l'aminoàcid Fmoc-D-Ser(Trt)-OH i, després d'eliminar el grup Fmoc, es realitza l'acoblament amb l'àcid quinàldic, i DIPCDI i HOAt com a agents d'acoblament. Després de l'eliminació del grup Trt de la cadena lateral amb condicions àcides suaus (1 % de TFA en DCM), es realitza la formació de l'enllaç èster mitjançant l'acoblament amb Fmoc-NMe-Leu-OH i DIPCDI/DMAP (cat.) com a agents d'acoblament.



Esquema 3.6 Introducció en fase sòlida de l'àcid quinàldic a la cadena peptídica iniciada en D-Ser

Després de l'eliminació del grup Fmoc s'obté un pic únic corresponent al producte QNA-D-Pip-OH com a resultat de la incorporació de la piperidina a un residu de Dha originat en l'escissió total de l'enllaç èster (Figura 3.10)

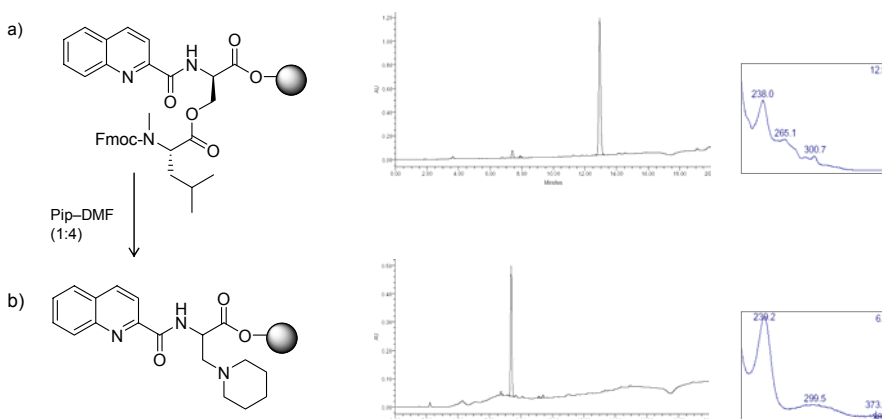


Figura 3.10 Productes i cromatogrames obtinguts en la síntesi del monòmer d'oxatiocoralina iniciada en Boc-D-Ser-OH i introducció del QNA en fase sòlida a) dipèptid i b) producte de tractar (a) amb pip-DMF (1:4). Condicions HPLC: gradient de 7:3 a 10:0 en 15 min (A: H₂O amb 0.045 % TFA i B: MeCN amb 0.036 % TFA)

Els resultats obtinguts mostren que és incompatible la química Fmoc amb la síntesi de la cadena peptídica iniciada en D-Ser perquè l'enllaç èster format és làbil a les condicions d'eliminació del grup Fmoc.

Per tal de millorar l'estratègia plantejada es proposen les següents modificacions:

- Per la D-Ser, es manté l' α -amino en forma de carbamat amb la protecció permanent del grup Boc per augmentar l'estabilitat de l'enllaç èster i el grup hidroxil es protegeix amb el grup TBDMS.
- Ús del grup protector temporal Alloc. D'aquesta forma es redueix el risc de formació de DKPs i al mateix temps s'evita el trencament de l'enllaç èster.
- Ús dels aminoàcids NMe-Leu com a substituents de les NMe-Cys en les proves preliminars per reduir el cost sintètic.

A continuació es duu a terme la síntesi que recull les indicacions anteriors. I el proper objectiu serà la síntesi d'una cadena peptídica lineal on s'han substituït les cisteïnes Alloc-NMe-Cys(Acm)-OH i Alloc-NMe-Cys(Me)-OH per Alloc-NMe-Leu-OH. Així, el monòmer objectiu és {[Alloc-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&] [Boc-D-Ser(&)-CTC-PS]} (Figura 3.11.a) i la cadena peptídica lineal: {[Boc-D-Ser(&¹)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&²] [Alloc-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&¹] [Boc-D-Ser(&²)-OH]} (Figura 3.11.b). Si es continua endavant, es podria obtenir un depsipètid cíclic derivat de l'oxatiocoralina, [QNA,NMe-Leu³,NMe-Leu⁴] oxatiocoralina (Figura 3.11.c).

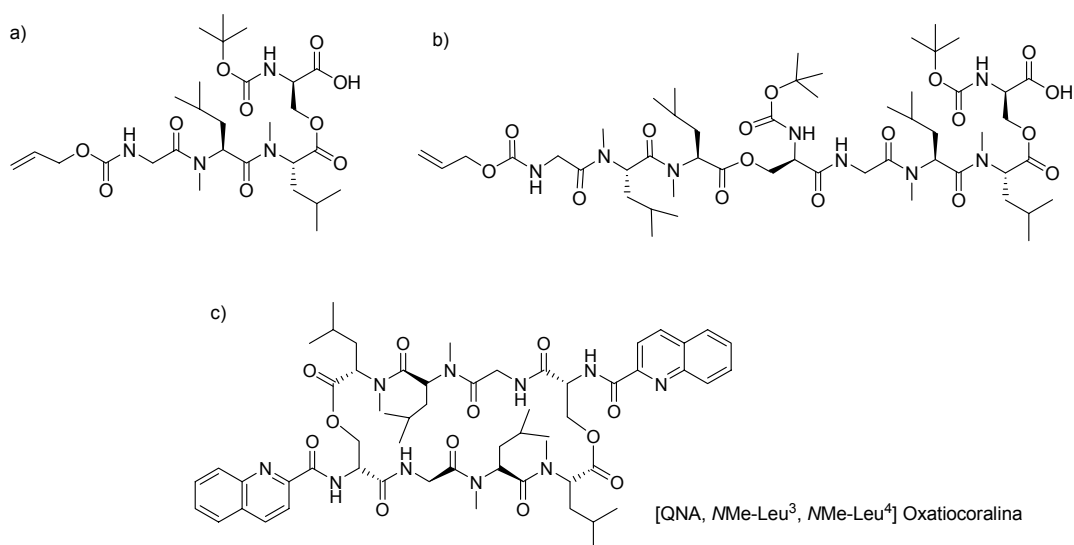


Figura 3.11 Estructura de a) monòmer, b) cadena lineal i c) producte final del derivat de l'oxatiocoralina [QNA, NMe-Leu³, NMe-Leu⁴] oxatiocoralina

3.2.3.2 Síntesi de la cadena lineal del derivat [QNA, NMe-Leu³, NMe-Leu⁴] oxatiocoralina iniciada en D-Ser i emprant química Alloc

L'estratègia plantejada requereix disposar dels aminoàcids Boc-D-Ser(TBDMS)-OH (Figura 3.13.a) i Alloc-NMe-Leu-OH (Figura 3.13.b). Al final del present capítol es detallen les síntesis d'aquests aminoàcids (Capítol 3, 3.4).

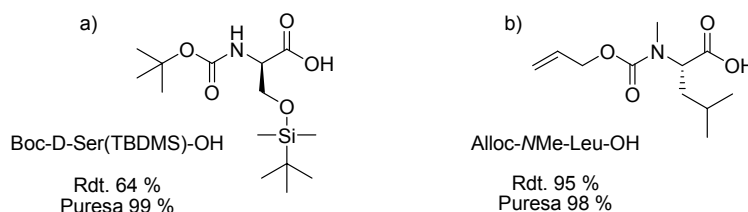


Figura 3.12 Aminoàcids obtinguts: Boc-D-Ser(TBDMS)-OH i Alloc-NMe-Leu-OH

Cal tenir en compte que la protecció temporal amb el grup Alloc no permet seguir l'evolució de l'elongació de la cadena peptídica per mesures d'absorbància. I en aquest cas, l'anàlisi d'aminoàcids tampoc és útil degut a l'abundància de *N*-metil aminoàcids i perquè els únics aminoàcids proteïnogènics no són fiables (Gly i Ser). Així, es considerarà una funcionalització inicial de resina de 0.50 mmol/g resina i es calcularà el rendiment final de la cadena peptídica per pesada del producte final.

S'inicia la síntesi amb 100 mg de resina CTC-PS i l'anàlisi per HPLC-EM de l'escissió d'una alíquota de la tetrapeptidil-resina revela la presència d'un únic producte corresponent al monòmer esperat {[Alloc-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&] [Boc-D-Ser(&)-OH]}. Així doncs, la síntesi plantejada hauria solucionat els problemes d'hidròlisi de l'enllaç èster i la formació de DKPs.

Amb els bons resultats de puresa obtinguts en la síntesi del monòmer del derivat d'oxatiocoralina es decideix continuar el creixement de la cadena mitjançant una elongació seqüencial per poder obtenir més producte lineal i assajar les següents etapes de síntesi.

La segona D-Ser s'introdueix amb la cadena lateral desprotegida i mitjançant agents d'acoblament suaus (DIPCDI/HOBt). S'analitzen per HPLC-EM les mostres de peptidil-resina recollides al llarg de la síntesi i s'obtenen les següents informacions:

- Després de l'acoblament del setè aminoàcid, Alloc-MMe-Leu-OH, s'observa un producte majoritari (85% puresa) corresponent al producte esperat (Figura 3.14.a), però s'obté un nou subproducte (7 %) de massa molecular 787 (Figura 3.14.b). La massa, de 254 unitats menor que el producte majoritari, correspon al producte de cinc aminoàcids i addició d'una molècula d'al·lil al grup hidroxil lliure.

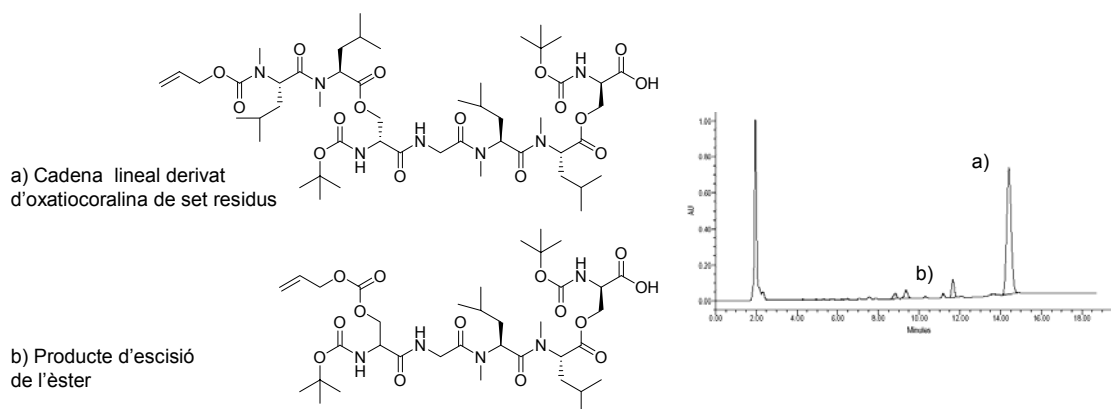


Figura 3.13 Anàlisi per HPLC de la peptidil-resina després de la incorporació del setè aminoàcid; a) estructura del producte esperat de set residus, b) estructura del producte secundari. Condicions HPLC: gradient de 7:3 a 10:0 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

- L'anàlisi de la cadena peptídica lineal de vuit residus revela un problema de formació de DKPs a nivell del segon enllaç èster. En aquest cas, s'obtenen dos productes amb una proporció 1:1; el producte final esperat (Figura 3.15.a) i un producte de massa molecular equivalent al producte final menys dos residus de MMe-Leu (Figura 3.14.b).

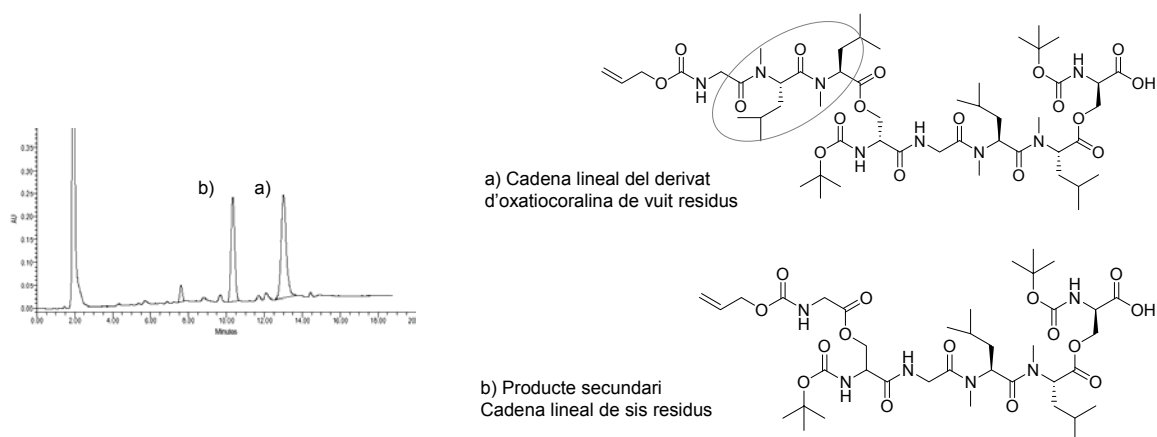


Figura 3.14 Anàlisi per HPLC de la peptidil-resina després de la incorporació del darrer aminoàcid; a) cadena de vuit residus del derivat d'oxatiocoralina, b) cadena de sis residus per la formació d'una DKP a nivell del segon enllaç èster. Condicions HPLC: gradient de 7:3 a 10:0 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

La formació del primer subproducte (massa molecular 787) (Figura 3.14.b) es pot obtenir per dues vies:

- l'enllaç èster no és complet i en l'eliminació del grup Alloc del sisè aminoàcid els grups hidroxils lliures actuen també de capturadors del grup al·lil sortint
- o bé, després de l'eliminació del grup Alloc del sisè aminoàcid, el producte resultant és làbil, s'hidrolitza, i el grup hidroxil desprotegit captura el grup al·lil.

La formació de la DKP NMe-Leu-NMe-Leu, només en el segon enllaç èster de la cadena peptídica lineal (Figura 3.15.b), determina una major labilitat d'aquest quan es troba integrat a la cadena peptídica en comparació a quan la D-Ser està formant un enllaç èster amb la resina. Un factor que també pot afavorir a la formació de la DKP és la major flexibilitat de la cadena creixent, ja que en anteriors síntesis no s'havia donat aquesta reacció secundària tan extensa, tot i haver emprat la química Fmoc.

Després de l'eliminació en fase sòlida del grup Alloc de la cadena peptídica lineal es realitza l'escissió del pèptid de la resina, obtenint-se 45 mg de pèptid lineal amb una proporció d'octapèptid i hexapèptid 1:1. Així, el rendiment de síntesi de la cadena lineal ha estat del 50 %. Si es té en compte que un 50 % del producte s'ha perdut per la formació de la DKP a nivell del segon enllaç èster, es pot dir que la resta d'etapes de la síntesi es produeixen de forma quasi quantitativa.

Els resultats obtinguts són molt positius. S'ha obtingut el producte final amb un 50 % de puresa i això permet explorar les següents etapes de ciclació, eliminació dels grups permanents Boc i la incorporació dels heterocicles. En una posterior síntesi sembla evident la necessitat de sintetitzar la cadena lineal mitjançant l'aproximació d'acoblament de fragments.

El producte lineal no es purifica perquè el segon producte està caracteritzat i no pot interferir en les següents etapes de síntesi; la reacció de ciclació és intramolecular i es realitza a alta dilució i en la incorporació de l'heterocicle s'esperen obtenir dos derivats de l'oxatiocoralina. Els dos productes finals, a més, es preveu que tindran temps de retenció en el HPLC prou diferenciats per poder aïllar-los en la darrera etapa de purificació.

A continuació, i amb els resultats obtinguts en la síntesi de la cadena peptídica del derivat d'oxatiocoralina, es provaran les condicions de síntesi per a l'obtenció del monòmer de l'oxatiocoralina {[Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&] [Boc-D-Ser(&)-CTC-PS]}.

3.2.3.3 Prova de síntesi del monòmer d'oxatiocoralina iniciat en D-Ser i emprant química Alloc

S'inicia la síntesi del monòmer de l'oxatiocoralina seguint la metodologia descrita anteriorment. Per aquesta síntesi és necessari obtenir prèviament l'aminoàcid Alloc-NMe-Cys(Acm)-OH (Figura 3.15). La síntesi del qual es detalla al final del capítol (Capítol 3, 3.4.1).

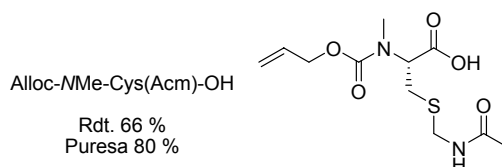
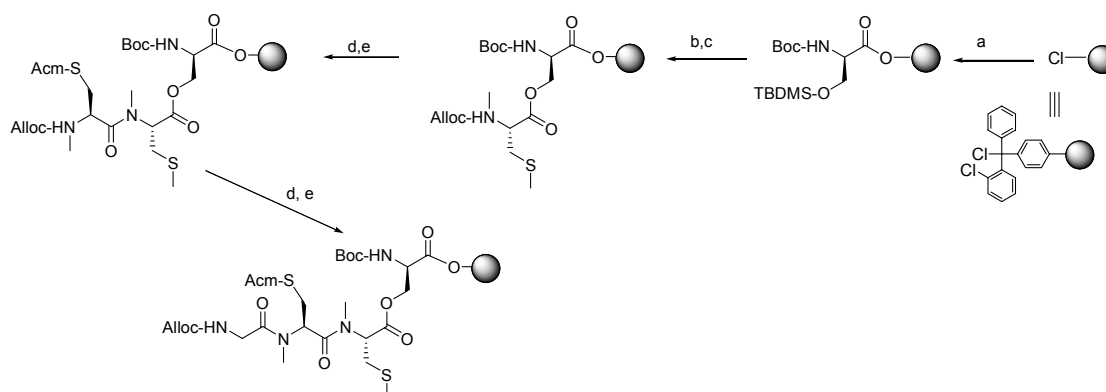


Figura 3.15 Nou aminoàcid obtingut: Alloc-NMe-Cys(Acm)-OH

Aquest cop s'inicia la síntesi amb 300 mg de resina CTC-PS. La incorporació del primer aminoàcid i eliminació del grup protector de la D-Ser es realitza de forma idèntica a l'anàleg d'oxatiocoralina.



Esquema 3.7 Esquema de síntesi plantejat per a la síntesi del monòmer de l'oxatiocoralina emprant la resina CTC-PS i la química Alloc, a) Boc-D-Ser(TBDMS)-OH, DIEA, DCM; b) TBAF (1M) en THF; c) Alloc-NMe-Cys(Me)-OH/DIPCDI/DMAP (cat.), DMF; d) [Pd(PPh₃)₄], PhSiH₃, DCM; e) Alloc-AA-OH/HATU/DIEA, DMF.

S'analitza per HPLC-EM una alíquota de la tripeptidil-resina i s'observa la presència del producte esperat com a majoritari (79 % puresa), i també producte que ha epimeritzat (7 %) i producte oxidat (10 %). Per EM-ES(+) es detecta la presència de dipèptid que no s'ha acoblat amb el tercer aminoàcid.

L'acoblament del quart aminoàcid Alloc-Gly-OH es realitza, en un primer tractament, per formació de l'anhídrid simètric. La modificació respon a l'intent de minimitzar la formació de DKPs de la seqüència natural que ja s'ha vist anteriorment que és de perillositat elevada. Una anàlisi per HPLC-EM de l'escissió d'una alíquota de la peptidil-resina mostra un cromatograma bastant complex (Figura 3.17). Es caracteritzen els productes de la mescla i s'obté la següent composició:

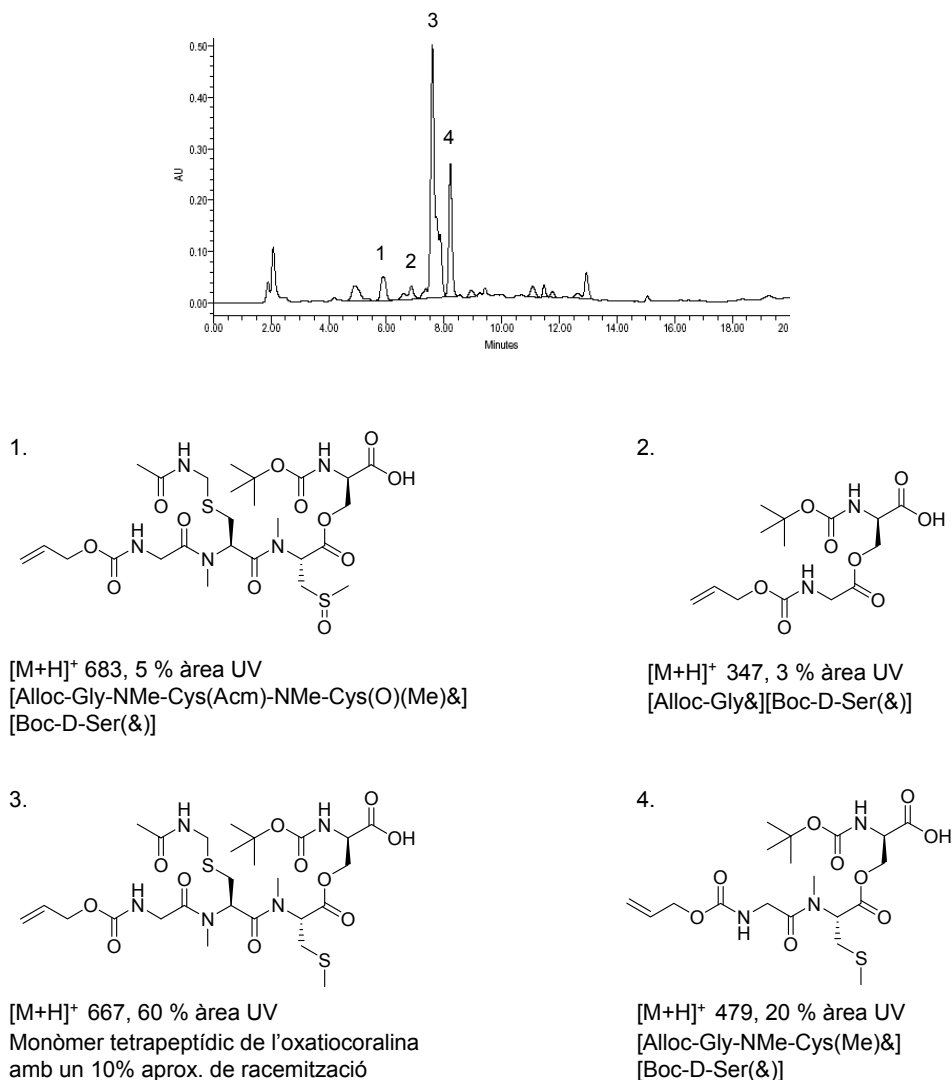


Figura 3.16 Anàlisi per HPLC del producte de la síntesi del monòmer de l'oxatiocoralina iniciat en D-Ser. Nom i estructura dels productes obtinguts. Condicions HPLC: gradient de 8:2 a 0:10 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

L'elevada proporció de tripèptid per pèrdua d'un residu de NMe-Cys(Acm) (Figura 3.17.4) en relació al tetrapèptid (Figura 3.17.3) i en comparació a la situació de l'obtenció del tripèptid, pot indicar la formació de DKPs a nivell de l'enllaç èster.

La seqüència de l'oxatiocoralina implica un seguit de reaccions secundàries que provoquen una disminució considerable de la puresa respecte a l'anàleg sintetitzat prèviament. En aquest cas, s'obté racemització i oxidació, probablement, de la NMe-Cys que forma l'enllaç èster. S'observa també que la DKP NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me) és molt més favorable que la DKP NMe-Leu-NMe-Leu.

3.2.3.4 Optimització de l'acoblament del quart aminoàcid

Per poder realitzar l'etapa de síntesi d'acoblament de fragments és necessari obtenir els monòmers amb una puresa elevada. Es sintetitza de nou la tripeptidil-resina {[Alloc-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&][Boc-D-Ser(&)-CTC-PS]} (Figura 3.17) i es faran proves per optimitzar la incorporació del quart aminoàcid per poder superar la formació de DKPs. Es provaran dues estratègies: la primera, realitzar l'etapa eliminació i acoblament Tandem i, la segona, optimitzar el temps d'eliminació del grup Alloc i fer un acoblament reactiu neutre.

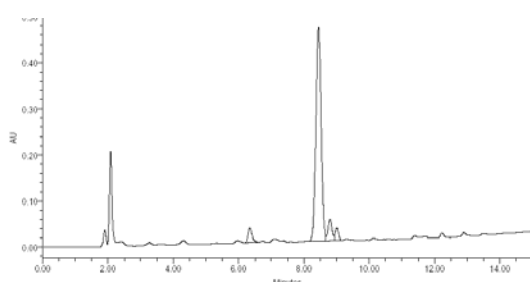


Figura 3.17 Anàlisi per HPLC del tripeptid d'oxatioralinala {[Alloc-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&][Boc-D-Ser(&)-OH]}. Condicions HPLC: gradient de 5:5 a 0:10 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

3.2.3.4.1 Mitjançant el mètode Eliminació-Acoblament Tandem

Thieret i col.¹⁶² van desenvolupar al 1997 un nou mètode per evitar la formació de DKPs. La tècnica consisteix en realitzar l'etapa d'eliminació del grup protector i acoblament del següent aminoàcid de forma simultània en una reacció que anomenen reacció Tandem. L'aminoàcid, tan bon punt es desprotegeix, s'acobra amb el següent aminoàcid activat que es troba en el medi. Així, la peptidil-resina protegida amb el grup Alloc es tracta amb les condicions habituals d'eliminació del grup Alloc ([Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃) i amb un excés del següent aminoàcid protegit amb el grup Fmoc i activat com a fluorur d'àcid (Fmoc-AA-F). La reacció Tandem és ràpida i es dona en condicions neutres (DCM durant 30 min).

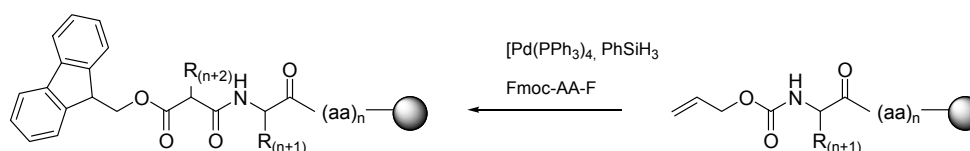


Figura 3.18 Eliminació-Acoblament Tandem

¹⁶² Thieret, N.; Alsina, J.; Giralt, E.; Guibé, F.; Albericio, F., Use of Alloc-amino acids in solid-phase peptide synthesis. Tandem deprotection-coupling reactions using neutral conditions, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 7275-7278.

En la seqüència de l'oxatiocoralina, l'ús del grup Fmoc no està molt recomanat, però es provarà si l'enllaç èster també és làbil en les condicions d'eliminació del grup Fmoc quan aquest es troba lluny de l'enllaç pèptid-resina. Per dur a terme l'eliminació-acoblament en la nostra seqüència, cal obtenir prèviament l'aminoàcid no comercial Fmoc-Gly-F (Figura 3.19). La síntesi del qual, es troba detallada al final del present capítol (Capítol 3, 3.4.5).

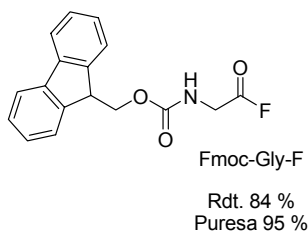
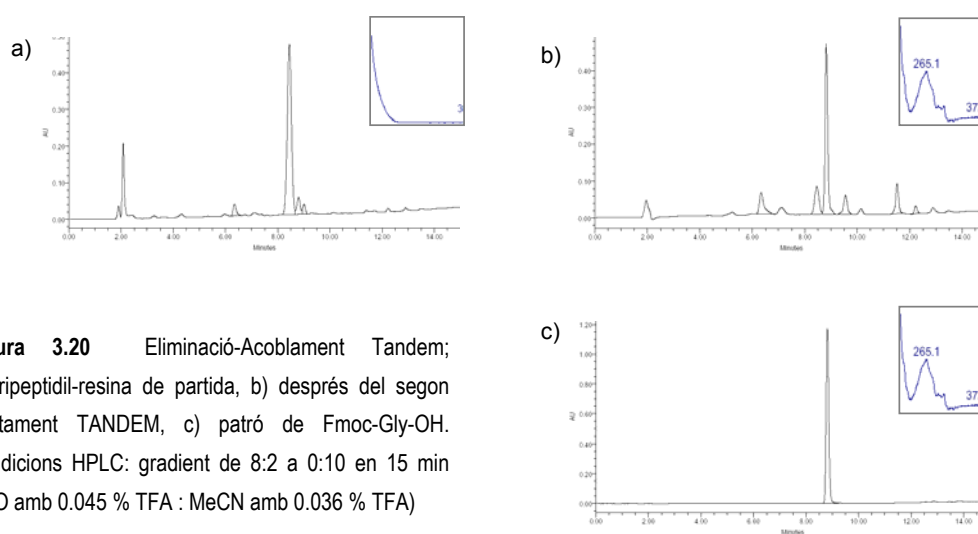


Figura 3.19 Fmoc-Gly-F

Es realitza la reacció Tandem sobre una alíquota de la tripeptidil-resina (25 mg) i es prova la reacció Tandem emprant les condicions descrites a l'article: $[Pd(PPh_3)_4]$ (0.2 eq), $PhSiH_3$ (12 eq) i Fmoc-Gly-F (5 eq) en DCM durant 30 min. En aquest cas, s'obté el producte amb un 54 % de puresa. Llavors es realitza una altra prova augmentant la quantitat de Fmoc-Gly-F fins a 7 eq amb menor temps de reacció (15 min) i una segona addició només de Fmoc-Gly-F per afavorir l'acoblament, obtenint-se un producte majoritari que correspon a l'aminoàcid comercial Fmoc-Gly-OH (Figura 3.20). Els resultats obtinguts demostrarien que el mètode d'eliminació-acoblament Tandem, tal i com està descrit, no és compatible amb l'ús de la resina CTC-PS. La resina no seria estable a l'àcid alliberat en l'acoblament de l'aminoàcid Fmoc-Gly-OH i els grups hidroxils lliures de la resina reaccionarien amb l'aminoàcid activat Fmoc-Gly-F.



A continuació es prova la incorporació del quart aminoàcid ajustant el temps d'eliminació del grup Alloc i la quantitat de base addicionada en l'acoblament per aconseguir un acoblament reactiu i neutre, intentant minimitzar, així, la formació de la DKP.

3.2.3.4.2 Emprant el mètode Eliminació-Acoblament optimitzat

El grup Alloc s'elimina de forma estàndard amb tres tractaments de 15 min. A les anteriors proves, però, s'ha observat que amb un tractament de 10 min l'eliminació del grup Alloc era quasi completa (95 %), i en 30 min quantitativa. Per tant, es provarà l'eliminació del grup Alloc amb dos tractaments consecutius de 10 min. Per altra banda, la sal d'amini HATU s'empra amb addició del doble d'equivalents de base DIEA. La funció de la base és assegurar que l'àcid carboxílic està desprotonat perquè pugui reaccionar amb l'HATU. Així, es proposa un acoblament amb un excés de Fmoc-aminoàcid (5 eq) i HATU (5 eq), però en comptes d'addicionar el doble d'equivalents de base (DIEA, 10 eq), addicionar-ne en defecte (DIEA, 4.8 eq). Això vol dir que si la reacció d'activació és quantitativa s'addicionaran sobre la resina 4.8 eq d'aminoàcid activat i, en principi, suficient per a produir-se l'acoblament amb èxit.

Aplicant les condicions proposades sobre una altra alíquota de la peptidil-resina (25 mg), s'obté el monòmer com a producte majoritari (73 %) (Figura 3.21.1), el qual conté un cert grau de racemització. Com a subproductes també es detecta el tripèptid amb pèrdua del residu NMe-Cys(Acm) (11%) (Figura 3.21.2) i el tetrapèptid oxidat (8 %) (Figura 3.21.3). Aquestes condicions milloren en gran mesura els acoblaments obtinguts en la síntesi anterior seguint l'eliminació-acoblament Tandem. El següent tractament de la peptidil-resina amb piperidina–DMF (1:4) porta a l'eliminació del producte. Així l'enllaç èster no és estable a l'acció de la piperidina, en cap cas, quan hi ha la Boc-D-Ser-OH ancorada directament a la resina CTC-PS.

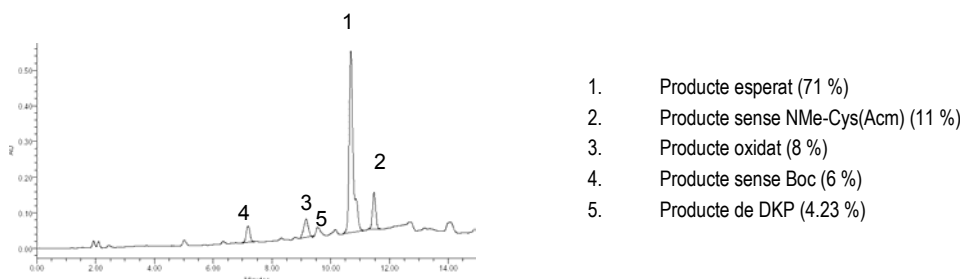


Figura 3.21 Anàlisi per HPLC de la Fmoc-tetrapeptidil-resina de l'oxatiocoralina incorporant el quart aminoàcid amb una acoblament reactiu i neutre. Condicions HPLC: gradient de 8:2 a 0:10 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

A continuació, es provaran les mateixes condicions que les emprades anteriorment, però incorporant el quart aminoàcid protegit amb el grup Alloc (Alloc-Gly-OH). Després dels tractaments ràpids d'eliminació del grup Alloc, es fan rentats amb la solució de ditiocarbamat de sodi 0.02 M en DMF per eliminar tot el Pd i evitar que aquest interfereixi en el següent acoblament. Tot i que es realitza l'operació de la mateixa forma, s'obtenen resultats diferents en dues fraccions diferents, indicant que l'operació no és molt reproduïble. L'anàlisi per HPLC-EM mostra un cromatograma complex però es caracteritzen tots els productes i es pot provar l'acoblament de fragments per extreure el màxim d'informació en vistes a una nova síntesi. La resina es divideix en dues fraccions, 1/3 i 2/3 parts. El grup Alloc s'elimina de la primera fracció i es fa l'escissió de la segona fracció.

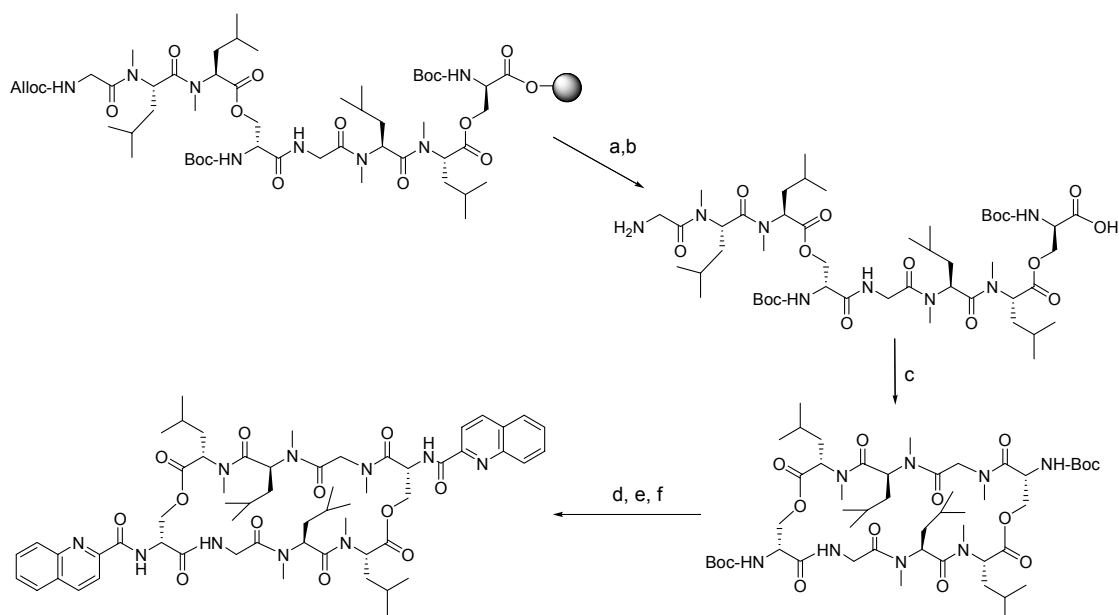
Es provarà l'acoblament de fragments seguint dos mètodes diferents: acoblament neutre i lent (DIPCDI/HOAt) i acoblament bàsic i ràpid (PyOAP/DIEA). L'acoblament entre fragments necessita d'agents més reactius perquè té un gran impediment estèric i es realitza amb menor excés d'equivalents. Per altra banda, el tractament bàsic implicat en l'ús del PyOAP pot no ser compatible amb l'estabilitat dels enllaços èster. Així, la peptidil-resina i el producte escindit se separen en dues meitats.

Es duen a terme els acoblaments seguint el procediment general. Un test de ninhidrina a les 6 h indica que els dos acoblaments han finalitzat, però l'anàlisi per HPLC-EM després d'eliminar el grup Alloc indica que cap dels dos acoblaments ha estat exitós. Tampoc es detecten els productes de partida.

L'única cadena que s'ha obtingut amb rendiment i puresa acceptables és la constituïda per NMe-Leu en substitució a les dues NMe-Cys(X) (X = Acn, Me) i iniciada en la D-Ser. Per tant, es decideix continuar amb la seqüència d'etapes proposada per extreure el màxim d'informació sobre la síntesi de l'oxatiocoralina. Es farà servir l'heterocicle comercial àcid quinàldic en comptes de l'àcid 3-hidroxiquinàldic.

3.2.4 OBTENCIÓ DELS PRIMERS DERIVATS D'OXATIOCORALINA

La síntesi de la cadena peptídica lineal de l'anàleg d'oxatiocoralina permet continuar amb la seqüenciació d'etapes plantejades: ciclació en solució a alta dilució, eliminació dels grups permanents Boc i incorporació de l'heterocicle comercial àcid quinàldic, tal i com s'indica en el següent esquema (Esquema 3.8):



Esquema 3.8 Síntesi del derivat [QNA, NMe-Leu³, NMe-Leu⁴] oxatiocoralina a partir de la cadena peptídica lineal.

a) Eliminació del grup Alloc ([Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, DCM), b) escissió de la resina (TFA-DCM (1:99)), c) ciclació (EDC-HCl, HOAt, DCM), d) eliminació dels grups permanents Boc (TFA-H₂O (95:5), e) incorporació de l'àcid quinàldic (QNA/EDC-HCl/HOAt, DCM i f) purificació del producte final

La presència de la cadena de sis aminoàcids no hauria d'interferir en les reaccions i hauria de resultar un altre derivat d'oxatiocoralina de menor talla. Per a la ciclació es fan servir condicions d'alta dilució (1 mM) i la carbodiimida soluble EDC-HCl i HOAt com a agents de ciclació. Després d'una hora de reacció s'observa en una anàlisi per HPLC-EM la desaparició dels productes lineals i es detecta, de forma clara, el pic corresponent al cycle de sis aminoàcids. En canvi, la formació del cycle esperat de vuit residus no ha estat igual d'efectiva. La ciclació de sis residus estaria més afavorida que la ciclació gran entre vuit residus. Possiblement, el producte lineal és més inestable que el producte ciclat. Aquest resultat enforteix la seqüència d'etapes de síntesi plantejada inicialment, ja que la formació del cycle gran no està molt afavorida i la formació del pont disulfur pot ajudar a restringir la conformació per facilitar la darrera ciclació.

L'eliminació dels grups protectors permanents Boc es realitza amb una solució 95 % de TFA en aigua durant 1 h i per a l'acoblament de l'àcid quinàldic s'empra la carbodiimida DIPCDI i HOAt com a agents d'acoblament. Es realitza la preactivació de l'heterocicle (3 eq) amb els agents d'acoblament i, seguidament, s'addiciona el pèptid cíclic. Després de dos dies de reacció es comprova per HPLC-EM la presència dels dos primers anàlegs d'oxatiocoralina. Els dos productes obtinguts es purifiquen mitjançant el HPLC analític sense obtenir suficient quantitat de producte per a poder determinar la seva activitat biològica.

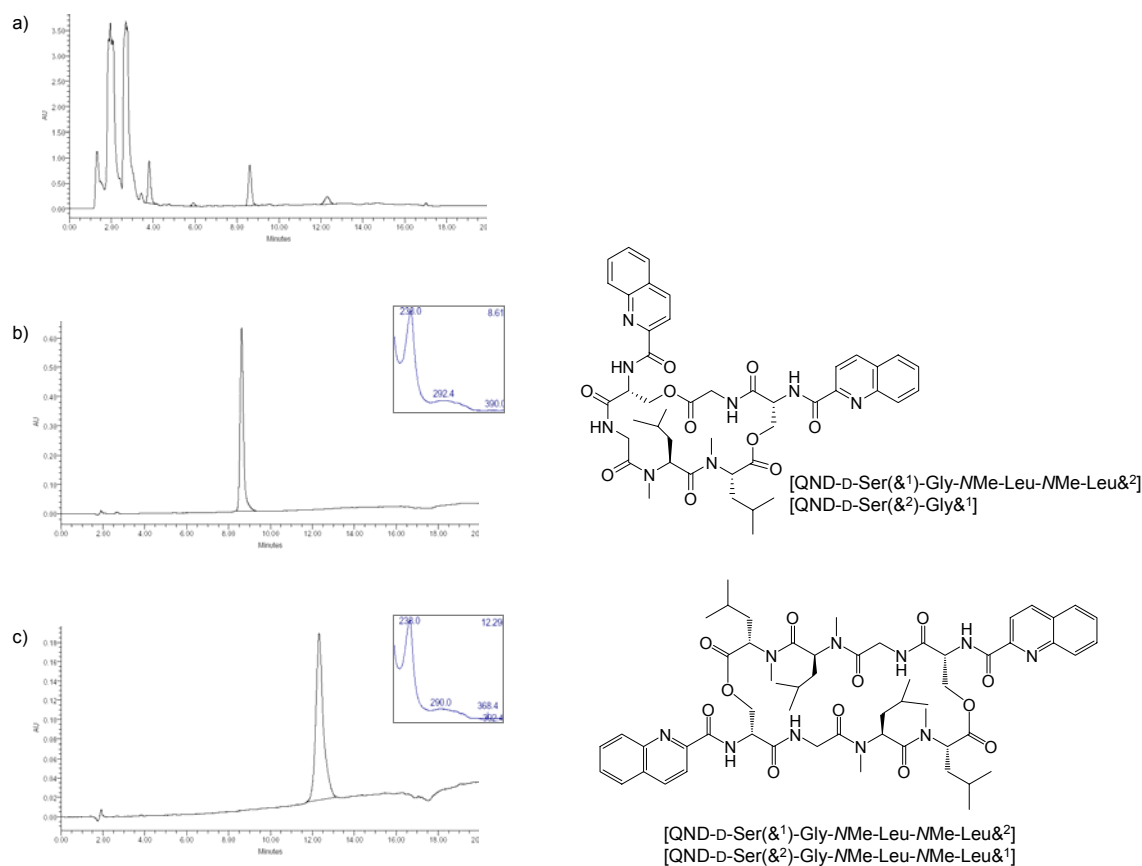


Figura 3.22 a) Anàlisi per HPLC del cru de reacció d'incorporació de l'àcid quinàndic sobre els productes ciclats, b) cromatograma, ultraviolat, estructura i nom del depsipèptid cíclic de sis residus que conté dues unitats d'àcid quinàndic, c) cromatograma, ultraviolat, estructura i nom del primer anàleg d'oxatiocoralina obtingut. Condicions HPLC: gradient de 1:0 a 0:1 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

Els resultats obtinguts fins ara comencen a perfilar el comportament de l'oxatiocoralina en l'aproximació de la síntesi en fase sòlida. Aquest es caracteritza per un fort caràcter en la formació de DKPs, especialment quan es treballa amb la seqüència NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me). La mínima possibilitat de formació de DKPs es converteix en una realitat i, per tant, caldrà sempre tenir-les en consideració i desenvolupar estratègies de síntesi que evitin la seva formació. L'estabilitat de l'enllaç èster és molt sensible a la posició de la D-Ser en la cadena peptídica, i és més làbil quan la D-Ser està situada a l'extrem C-terminal i té el grup α -amino en forma de N-acil. L'acoblament de fragments és més difícil en l'oxatiocoralina que en l'azatiocoralina. De moment, es pot atribuir la dificultat de l'etapa a la inestabilitat dels fragments implicats o de la cadena lineal formada. La ciclació de la cadena de vuit residus no està afavorida, possiblement també per un problema d'inestabilitat de la cadena lineal. Segurament, la presència del pont disulfur a la meitat de la molècula ajuda a estabilitzar la cadena, alhora que en facilita la unió cap-cua.

3.2.5 PERSPECTIVES DE FUTUR PER A L'OXATIORCORALINA

Treballs posteriors realitzats en el nostre grup d'investigació apunten una nova estratègia de síntesi per a l'obtenció de l'oxatiocoralina en fase sòlida. L'acoblament dels monòmers mitjançant la formació d'un pont disulfur intermolecular ajudaria a reduir la formació de DKPs i augmentaria l'estabilitat de la cadena peptídica lineal. A més, l'etapa de dimerització podria realitzar-se sobre el suport polimèric. La nova estratègia plantejada torna a obrir un gran nombre de possibilitats d'obtenció de l'oxatiocoralina en fase sòlida i caldrà estudiar-ne els punts d'inici i els quadres de grups protectors.

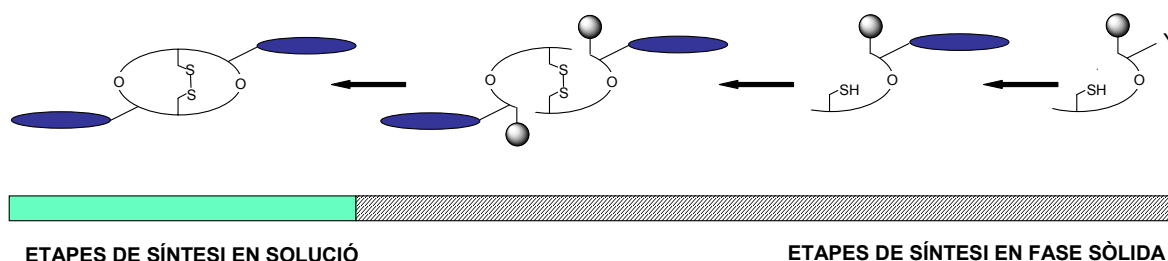


Figura 3.23 Nova estratègia plantejada per a l'obtenció de l'oxatiocoralina en fase sòlida basada en la unió dels monòmers per un pont disulfur intermolecular en fase sòlida.

Tota la informació obtinguda en l'exploració de la síntesi de l'oxatiocoralina ajudarà a afrontar la síntesi en fase sòlida de la tiocoralina, el pèptid natural amb un gran potencial com a agent antitumoral. Per a la síntesi del pèptid natural es plantegen canvis substancials en el disseny de l'estratègia: esquema de protecció basat en la química Boc/Bzl i formació de la cadena peptídica lineal mitjançant una aproximació 4+3+1.

3.3 TIOCORALINA, DESENVOLUPAMENT DE LA SÍNTESI EN FASE SÒLIDA

Els estudis realitzats en el desenvolupament de la síntesi en fase sòlida de l'azatiocoralina i, especialment, les darreres proves de síntesi de l'oxatiocoralina serviran de base per al disseny de l'estratègia de síntesi de la tiocoralina. La tiocoralina és un depsi(tio)peptid bicíclic dimèric que conté sis cisteïnes i dues glicines a la seva seqüència peptídica (Figura 3.24).

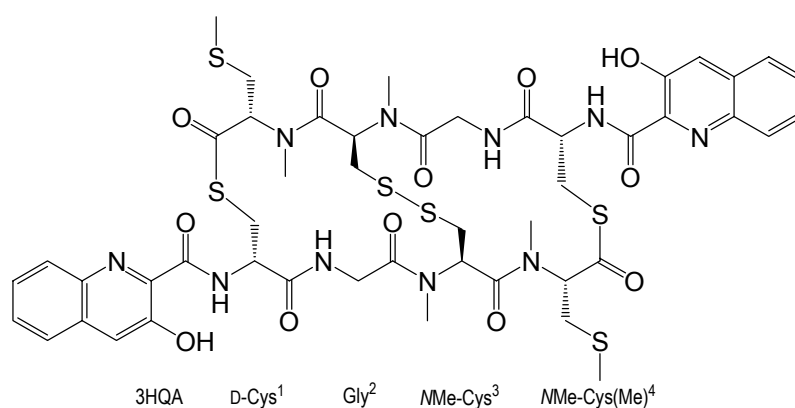


Figura 3.24 Estructura i composició de la tiocoralina

A diferència de l'oxatiocoralina, el peptid natural té dos enllaços tioèster per unir les dues cadenes tetrapeptídiques antiparaleles. Els enllaços tioèster són molt més làbils front a nucleòfils que els corresponents èsters. Si la formació de DKPs era una constant en la síntesi de l'oxatiocoralina, en el cas de la tiocoralina el problema serà encara més greu. En canvi, i a diferència de l'enllaç èster, es podrà comptar amb el grup tiol per a la formació de l'enllaç no peptídic entre fragments o en la darrera ciclació perquè el grup tiol és molt més reactiu que el corresponent grup hidroxil.

El canvi de la D-Cys per la D-Ser requereix un grup protector per al grup tiol que sigui compatible amb el grup AcM i subseqüent formació del pont disulfur, alhora que possibiliti la formació de l'enllaç tioèster. La presència de tres cisteïnes a la cadena peptídica, cadascuna amb una funció específica, demana fer un estudi dels grups protectors presents a la literatura que siguin ortogonals entre ells i permetin realitzar els enllaços de forma selectiva i eficient (amida, pont disulfur, dos enllaços tioèster). La presència de l'enllaç tioèster i el risc de formació de DKPs fa replantejar el quadre de grups protectors en les anteriors síntesis. Així doncs, la síntesi en fase sòlida de la tiocoralina necessita

resoldre el quadre dels diferents grups protectors del grup tiol per a poder realitzar de forma controlada l'enllaç tioèster i el pont disulfur, a més a més de buscar les estratègies que impossibilitin la formació de DKPs, especialment, a nivell de l'enllaç tioèster.

3.3.1 REPLANTEJAMENT DELS GRUPS PROTECTORS

Per establir el nou esquema de grups protectors (GP) es seleccionen tots els elements del pèptid que necessiten de protecció i s'estudia quins requeriments han de complir els seus grups protectors per dur a terme la síntesi del pèptid. El resultat es resumeix en la següent figura (Taula 3.1):

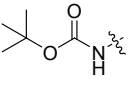
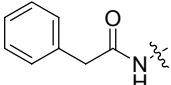
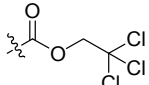
Suport Polimèric	GP Temporal
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Estable a l'eliminació dels GP temporals ▪ Estable a l'eliminació GP tiol D-Cys ▪ Condicions d'escissió que preservin la integritat de la cadena peptídica i GP permanents 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ortogonal a la resina ▪ Condicions d'eliminació estables a l'enllaç tioèster ▪ Ortogonal a GP tiol D-Cys ▪ Condicions d'eliminació no bàsiques per a minimitzar la formació de DKPs
GP Permanent	GP Tiol D-Cys
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Estable al llarg de tota la síntesi i a l'escissió de la resina ▪ Fàcil eliminació en solució i compatible amb l'enllaç tioèster i el pont disulfur 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Selectiu per formar seqüencialment pont disulfur i enllaç tioèster, i a la inversa

Taula 3.1 Requeriments que han de complir els diferents grups protectors necessaris per a la síntesi de la tiocoralina en fase sòlida

El grups protectors temporals i el grup protector de les D-Cys seran els punts de partida i determinaran el suport polimèric i el grups protector permanent.

3.3.1.1 GP temporals compatibles amb l'enllaç tioèster

Per tal d'afrontar la síntesi de la tiocoralina cal saber amb quins grups protectors temporals es pot comptar que siguin compatibles amb l'estabilitat de l'enllaç tioèster. En primer lloc, es té present els grups protectors emprats per Boger i col. en la síntesi de la tiocoralina en solució després de la formació de l'enllaç tioèster.¹⁶³ Aquests grups protectors i les condicions d'eliminació emprades es mostren a la següent Taula 3.2:

Estructura			
Nom comú	Boc	Z	Tce
Condicions d'eliminació	HCl (3 M)-AcOEt, 25 °C, 30 min	TFA-tioanisol (10:1), 25 °C, 6 h	Zn, 90 % d'AcOH en H ₂ O, 0 °C, 2 h

Taula 3.2 Grups protectors emprats per Boger i col. eliminats en presència de l'enllaç tioèster¹⁶³

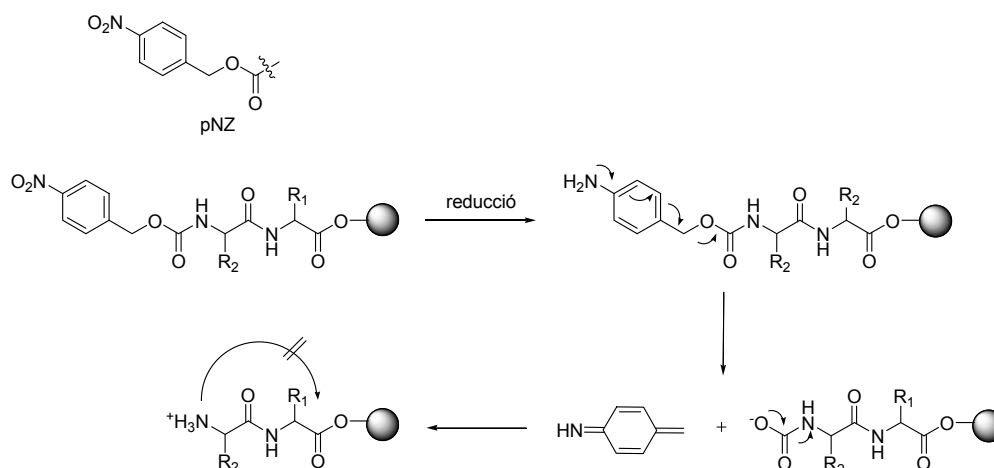
També es pot pensar en l'ús del grup Trt perquè s'elimina en condicions àcides més suaus (1 % de TFA en DCM) i inhibeix la formació de DKPs al deixar el grup amino protonat. Les condicions d'eliminació emprades el fa compatible amb la presència de l'enllaç tioèster. El grup Trt no és vàlid per la resina CTC-PS però sí que es pot emprar sobre la resina Wang. El problema del grup Trt és la dificultat en l'obtenció de Trt-MMe-AA-OH. S'han realitzat proves de protecció de l'aminoàcid comercial HCl-H-MMe-Leu-OH amb el grup Trt emprant el reactiu Trt-Cl (Et₃N, MeCN-CHCl₃ (1:5), 30 h, 25 °C) i el Trt-Br (Et₃N, DMF-DCM (1:1), 20 h, 25 °C), però en cap cas s'ha obtingut la conversió del producte de partida.

A més dels grups emprats per Boger i col., també és interessant conèixer la compatibilitat del grup Alloc i del grup pNZ amb l'estabilitat de l'enllaç tioèster. El grup Alloc és un dels grups més estudiats en la química de pèptids per la seva ortogonalitat respecte als grups Fmoc i Boc. El grup pNZ és, actualment, objecte d'estudi en el nostre laboratori. El pNZ és un nou grup protector¹⁶⁴ (Esquema 3.9) que amplia el ventall de possibilitats de grups ortogonals al grup Fmoc, Alloc i Boc i és molt valuós en

¹⁶³ Boger, D.L.; Ichikawa, S., Total synthesis of thiocoraline and BE-22179: establishment of relative and absolute stereochemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 2956-2957.

¹⁶⁴ a) Carpenter, F. H.; Gish, D. T., The application of *p*-nitrobenzyl chloroformate to peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 3818-3821. b) Gish, D. T.; Carpenter, F. H., *p*-Nitrobenzyloxycarbonyl derivatives of amino acids, *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 950-952.

les síntesis de pèptids molt ramificats i amb un complex quadre de grups protectors.¹⁶⁵ El grup *p*NZ s'elimina mitjançant una reducció en un medi lleugerament àcid [SnCl_2 (6 M), HCl (1.6 mM), 2 x 30 min] (Esquema 3.9).



Esquema 3.9 Mecanisme d'eliminació del grup protector *p*NZ en un dipèptid en fase sòlida que inhiuix la formació de DKPs

Isidro-Llobet i col.¹⁶⁶ han demostrat la seva eficàcia per evitar la formació de DKPs si s'empra com a segon aminoàcid perquè el grup α -amino resta protonat després de l'eliminació del grup *p*NZ. Es va comprovar, però, que l'enllaç peptídil-resina CTC-PS és làbil en les condicions d'eliminació del grup *p*NZ, fet que va fer canviar el suport polimèric cap a la resina Wang.

Per tal de conèixer la compatibilitat de la química Alloc i *p*NZ amb la presència d'un enllaç tioèster es prepara la dipeptídil-resina {[Fmoc-Cys(&)-Wang] [Boc-Ala&]}. A continuació es divideix la resina en dues fraccions; la primera fracció es tracta amb les condicions d'eliminació del grup Alloc ($[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, PhSiH_3) i la segona amb les condicions d'eliminació del grup *p*NZ (SnCl_2 , HCl). Després dels tractaments d'eliminació les peptídil-resines s'analitzen per HPLC-EM i s'observa com s'ha preservat la integritat de la dipeptídil-resina. Sembla, doncs, que es podrà fer ús dels grups protectors Alloc i *p*NZ en la síntesi de la tiocoralina.

¹⁶⁵ Isidro-Llobet, A., Guash-Camell, J., Álvarez, M., Albericio, F., *p*-Nitrobenzyloxycarbonyl (*p*NZ) as a temporary N^α -protecting group in orthogonal solid-phase synthesis avoiding diketopiperazine and aspartime formation, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 3031-3039.

¹⁶⁶ López, E. P.; Isidro-Llobet, A.; Gracia, C.; Cruz, L. J.; García-Granados, A.; Parra, A.; Álvarez, M.; Albericio, F., Use of *p*-nitrobenzyloxycarbonyl (*p*NZ) as a permanent protecting group in the synthesis of Kahalalide F analogs, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 7737-7741.

3.3.1.2 Cerca d'un GP tiol D-Cys

A la literatura hi ha descrit un ampli ventall de grups protectors del tiol de la cisteïna classificats segons el seu mecanisme d'eliminació i ús en la formació de ponts disulfurs.¹⁶⁷ La tiocoralina conté la cisteïna en la forma no proteïnogènica D, fet que limitarà en gran mesura el nombre d'aminoàcids específicament protegits disponibles comercialment o, en cas de trobar-los, els seus preus seran més elevats que els de configuració L.

Es necessita trobar un grup protector que sigui ortogonal al grup Acm i permeti la formació de l'enllaç tioèster. Els grups protectors de la cisteïna que són ortogonals al grup Acm són aquells que el seu mecanisme d'eliminació es dona en un medi àcid o bé es basa en la reducció d'un pont disulfur. A més, per a la formació de l'enllaç tioèster, el grup protector s'ha d'eliminar en condicions que deixi el grup tiol lliure.

3.3.1.2.1 GP tiol D-Cys làbil a àcid: Mmt i Trt

Si es decideix fer servir un grup protector làbil en medi àcid no es pot fer servir la resina CTC-PS. En canvi, es podria emprar la resina Wang, però amb algunes limitacions; el grup metoxitritil (Mmt) (Figura 3.27.a) és el grup protector més làbil de la família però no és assequible comercialment en la forma D, i el grup tritil (Trt) (Figura 3.27.b) quan protegeix un tiol no és tan làbil com en el cas de protegir un grup amino, un alcohol o un àcid, i s'haurien d'optimitzar les condicions perquè fossin compatibles amb l'estabilitat de l'enllaç pèptid-resina Wang. També cal tenir en compte que el grup Trt no és estable en les condicions de formació del pont disulfur entre dues Cys(Acm).¹⁶⁸

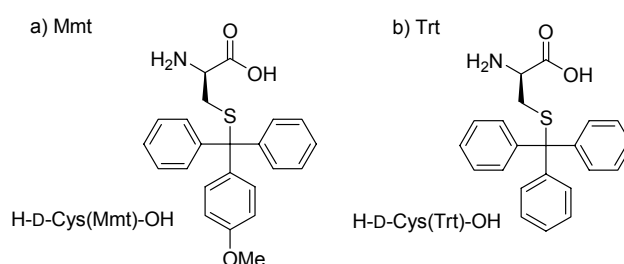


Figura 3.25 Grups protectors a) Mmt i b) Trt de tiol de la Cys làbils en condicions àcides

¹⁶⁷ Andreu, D.; Albericio, F.; Solé, N. A.; Munson, M. C.; Ferrer, M.; Barany, G., Formation of disulfide bonds in synthetic peptides and proteins, *Met. Mol. Biol.*, **1994**, 35, 91-173.

¹⁶⁸ Kamer, B.; Hartmann, A.; Eisler, K.; Riniker, B.; Rink, H.; Sieber, P.; Rittel, W., The synthesis of cystine peptides by iodine oxidaton of S-trityl-cysteine and S-acetamidomethyl-cysteine peptides, *Helv. Chim. Acta*, **1980**, 63, 899-915.

Igualment, en tots els casos cal buscar un nou grup protector permanent per al grup α -amino de la D-Cys que sigui ortogonal al grup protector del tiol de la D-Cys i a la resina Wang per poder realitzar l'acoblament de l'heterocicle després de la ciclació en solució.

3.3.1.2.2 GP tiol D-Cys làbil a agents reductors: S^tBu i Npys

El grup S^tBu és un grup protector del tiol que s'ha emprat molt en l'obtenció de tiols lliures per a posteriors formacions de ponts disulfurs. El grup 3-nitro-2-piridilsulfenil (Npys) és un grup activador que ha estat molt usat en la química del pont disulfur per la seva capacitat de reaccionar amb grup tiol lliure i formar un pont disulfur molt selectiu. Aquest mètode és ortogonal a la formació d'un altre pont disulfur mitjançant els grups Acm i, per tant, és molt útil en la síntesi de pèptids que contenen més d'un pont disulfur.¹⁶⁹

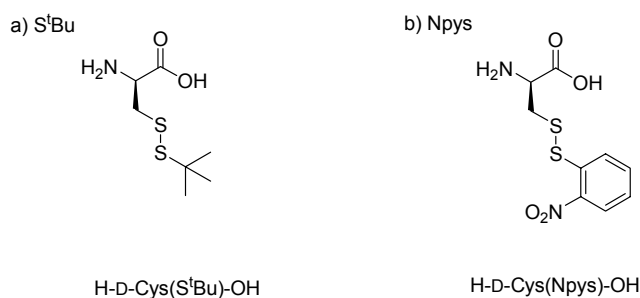


Figura 3.26 Grups protectors a) S^tBu i b) Npys de tiols de les Cys àmpliament emprats en la formació de ponts disulfur

L'aminoàcid Boc-D-Cys(S^tBu)-OH no és assequible comercialment i el Boc-D-Cys(Npys)-OH sí, encara que a un preu elevat. Per tant, per una banda en busca un mètode d'eliminació del grup Npys que permeti l'obtenció del tiol lliure i permeti utilitzar-lo en el desenvolupament de l'estratègia de síntesi. I paral·lelament, es treballa en la preparació en solució de l'aminoàcid Boc-D-Cys(S^tBu)-OH.

El grup Npys protegeix el tiol de la cisteïna mitjançant un pont disulfur amb un bon grup sortint. Per a obtenir el tiol lliure es provaran diferents tractaments amb agents reductors: ditiotreitòl (DTT), β -mercaptoetanol, NaBH₃, PPh₃, Bu₃P. En una primera aproximació es duen a terme les proves de reducció sobre la tripeptidil-resina model Boc-D-Cys(Npys)-Gly-NMe-Cys(Acm)-CTC-PS.

¹⁶⁹ Royo, M., Contreras, M. A., Giral, E., Albericio, F., Pons, M., An easy entry to a new high-symmetry, large molecular framework for molecular recognition studies and de novo protein design. Solvent modulation of the spontaneous formation of a cyclic monomer, dimer, or trimer from bis-cysteine peptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 6639-6650.

Per tant, a continuació es sintetitza la tripeptidil-resina Boc-D-Cys(Npys)-Gly-NMe-Cys(Acm)-CTC-PS mitjançant la incorporació de Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH a la resina CTC-PS i successius acoblaments de Alloc-Gly-OH i Boc-D-Cys(Npys)-OH, i es realitza l'assaig del tractament reductor de prova. Per tal d'avaluar l'eliminació del grup Npys s'observarà l'aparició de color groc corresponent al grup Npys alliberat i es formarà un enllaç tioèster per incorporació de l'aminoàcid Fmoc-Gly-OH amb DIPCDI i HOBt com a agents d'acoblament durant 1 h, i es determinarà per HPLC-EM la presència del tetrapèptid format {Boc-D-Cys(&)-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH}[Fmoc-Gly&]}. A la següent Taula 3.3 es resumeixen les diferents proves realitzades i els resultats obtinguts:

Prova	Condicions		Observacions	Anàlisi HPLC
1	2 eq DTT DMF/H ₂ O (4:1) 1 x 1 min, 3 x 10 min, 16 h	Fmoc-Gly-OH (3 eq) DIPCDI (3 eq) HOBt (3 eq) DMF, 1 h	Apareix el color groc en el darrer tractament	
2	100 eq DTT DMF-H ₂ O (4:1) 1 x 1 min, 3 x 10 min, 16 h	Fmoc-Gly-OH (3 eq) DIPCDI (3 eq) HOBt (3 eq) DMF, 1 h	Els tractaments curts no donen color i el llarg dona una lleugera coloració groguenca	
3	10 eq β-mercaptoetanol DMF-H ₂ O (4:1) 1 x 1 min, 3 x 10 min, 16 h	Fmoc-Gly-OH (3 eq) DIPCDI (3 eq) HOBt (3 eq) DMF, 1 h	Coloració groga intensa.	S'obté la incorporació de mercaptoetanol a la cisteïna lliure
4	Pip-DMF (1:4) 1 x 1 min, 3 x 10 min		Coloració groga intensa.	Producte majoritari corresponent al dímer per formació del pont disulfur intermolecular
5	10 eq NaBH ₃ CN 5 eq H ₂ O, DMF, 1 x 1 min, 3 x 10 min, 1 x 16 h		Coloració groga tènue	Obtenim una família de productes de masses +16, +32,...
6	100 eq PPh ₃ DMF-H ₂ O (4:1) 1 x 1 min, 3 x 10 min, 16 h	Fmoc-Gly-OH (3 eq) DIPCDI (3 eq) HOBt (3 eq) DMF, 1 h	Coloració groga intensa en tots els tractaments	Producte majoritari corresponent al producte esperat
7	100 eq Bu ₃ P DMF-H ₂ O (4:1) 1 x 1 min, 3 x 10 min	Fmoc-Gly-OH (3 eq) DIPCDI (3 eq) HOBt (3 eq) DMF, 1 h	Coloració groga intensa en tots els tractaments	Producte majoritari corresponent al producte esperat

Taula 3.3. Condicions assajades per l'eliminació del grup Npys del tiol de la Cys

Els resultats obtinguts mostren la necessitat d'emprar un agent reductor fort i sense grups tiol. Els millors resultats s'obtenen en emprar Bu₃P (100 eq), DMF–H₂O (1:1), 1 x 1 min, 3 x 10 min (Prova 7).

La síntesi en solució de l'aminoàcid Boc-D-Cys(S^tBu)-OH es realitza a partir de la cisteïna lliure H-D-Cys-OH i consta de tres etapes. El rendiment de síntesi global és de 65 % i s'obté el producte amb una puresa del 90 %. La síntesi es troba detallada al final del capítol (Capítol 3,3.4). Es realitzen dues proves d'eliminació del grup protector emprant PPh₃ (100 eq) en DMF–H₂O (4:1) i amb Bu₃P en DMF–H₂O (4:1). La trifenilfosfina no és suficient per eliminar el grup protector en 24 hores de reacció i, en canvi, la tributilfosfina permet l'obtenció del tiol lliure de forma quantitativa en tres tractaments de 10 minuts.

Així, es disposa de dos grups protectors del tiol que es poden eliminar sobre la resina CTC-PS i permeten la posterior formació de l'enllaç tioèster. L'aminoàcid Boc-D-Cys(Npys)-OH es farà servir en el desenvolupament de l'estratègia i l'aminoàcid Boc-D-(S^tBu)-OH en posteriors treballs.

A continuació, es decideix iniciar l'exploració de la síntesi en fase sòlida de la tiocoralina fent un canvi dràstic d'estratègia. Es farà ús de la química Boc/Bzl. A més, l'aminoàcid triat per iniciar la cadena peptídica és la D-Cys perquè, fins ara, és la posició que ha permès l'obtenció de l'azatiocoralina i dels primers derivats de l'oxatiocoralina.

3.3.2 ESTUDI DE LA SÍNTESI DE LA TIOCORALINA INICIADA EN D-CYS MITJANÇANT QUÍMICA BOC/BZL

En la síntesi de l'oxatiocoralina hi ha hagut molts problemes de formació de DKPs. La química Boc/Bzl es planteja com a una bona alternativa perquè el tractament àcid d'eliminació del grup temporal Boc redueix la reactivitat del grup amino. Per emprar la química Boc/Bzl es farà ús de la resina Merrifield-OH que necessita d'àcid fluorhídric per a l'escissió del pèptid. En aquest cas, cal un grup protector permanent per al grup α -amino de la D-Cys que sigui ortogonal al grup Boc (50 % de TFA en DCM) i a l'enllaç pèptid–resina (HF). A més, la seva eliminació ha de preservar l'estabilitat de l'enllaç tioèster i del pont disulfur. Es pensa en el grup Troc (2,2,2-tricloro-etoxicarbonil) perquè s'elimina mitjançant una reducció suau en medi àcid (Zn en 10 % de AcOH en H₂O). Boger i col. utilitzen el grup protector Tce (èster de 2,2,2-tricloroetanol) com a grup protector de l'àcid carboxílic del darrer aminoàcid i l'eliminen amb Zn en una solució aquosa 90 % AcOH (Figura 3.27.a). A més, el grup Troc s'ha descrit que és ortogonal al grup Boc¹⁷⁰ i permetria l'eliminació selectiva i la introducció dels heterocicles

¹⁷⁰ Bergeron, R. J.; McManis, J. S., Reagents for the stepwise functionalization of Spermine, *J.Org.Chem.*, **1988**, 53, 3108-3111.

intercaladors en fase sòlida. El grup tiol de la D-Cys es protegeix amb el grup Trt perquè és làbil en medi àcid i s'obté el tiol lliure. Així doncs, el primer aminoàcid de la cadena peptídica és el Troc-D-Cys(Trt)-OH (Figura 3.29.a)

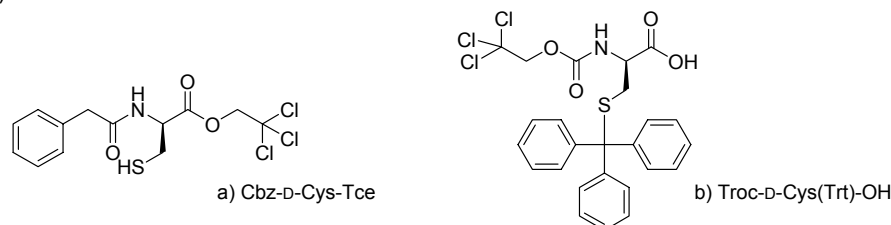
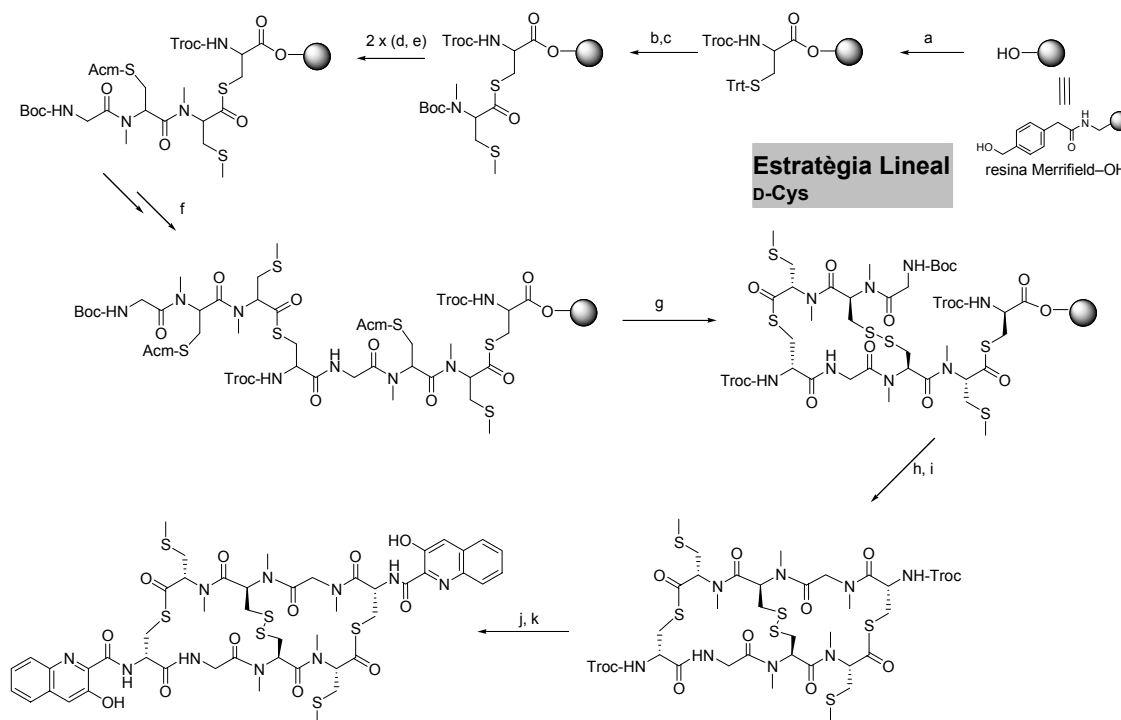


Figura 3.27 Aminoàcids D-Cys emprats en la química Boc/Bzl per Boger i col. (a) i en la present Tesi (b)

L'estratègia de síntesi proposada es detalla en el següent esquema (Esquema 3.10). La síntesi es basa en la química Boc/Bzl i amb la resina Merrifield-OH com a suport polimèric. S'inicia la cadena peptídica en el residu D-Cys perquè és el que ha donat millors resultats. En aquest cas, se segueix una aproximació lineal per minimitzar l'ús de l'àcid fluorhídric.



Esquema 3.10 Estratègia de síntesi per a la tiocoralina iniciada en D-Cys i emprant la química Boc/Bzl. a) Troc-D-Cys(Trt)-OH/DIPCDI/DMAP (cat.), DMF; b) 2 % TFA, 30 % TES en DCM; c) Boc-NMe-Cys(Me)-OH/DIPCDI/HOBt, DMF; d) TFA 40 % en DCM; e) Boc-AA-OH/HATU/DIEA, DMF; f) repetició de les etapes del primer monòmer; g) Iode en DMF; h) àcid fluorhídric; i) EDC-HCl/HOAt en DCM; j) Zn, AcOH; k) 3HQA/EDC-HCl/HOSu, DCM

L'estratègia proposada té uns altres aspectes específics que cal analitzar:

- Els acoblaments es realitzen seguint la metodologia de preactivació i neutralització *in situ* per tal de reduir la formació de DKPs. Així, després de l'etapa d'eliminació del grup Boc de la peptidil-resina amb una solució de TFA no es realitza cap tractament bàsic, i l'aminoàcid a incorporar es dissol prèviament en la mínima quantitat de DMF i amb l'agent d'acoblament (HATU) i un excés de base (DIEA) durant 10 min. Quan l'aminoàcid s'addiciona sobre la peptidil-resina aquest està en la forma èster activat i va reaccionant a mesura que l'excés de base va neutralitzant els grups amino.
- La introducció del primer aminoàcid Troc-D-Cys(Trt)-OH se segueix mitjançant el test d'alcohols en resina.
- El grup Trt s'elimina amb una solució al 30 % de TFA en DCM i 5% de TIS que actua com a captador del catió Trt per desplaçar l'equilibri de la reacció.
- La formació de l'enllaç tioèster es realitza emprant DIPCDI/HOBt com a agents d'acoblament. Un acoblament neutre és preferible front un de bàsic per tal de minimitzar la formació de ponts disulfurs i per evitar reaccions secundàries amb els nous enllaços tioèsters formats. S'empra el test colorimètric qualitatiu d'Ellmans en fase sòlida per detectar grups tiol lliures i determinar la finalització de l'acoblament.
- Se segueix la síntesi mitjançant els tests colorimètrics disponibles i al final de la síntesi es realitza un anàlisi per HPLC-EM del producte obtingut.

Els aminoàcids necessaris per a afrontar la nova estratègia són: Troc-D-Cys(Trt)-OH, Boc-NMe-Cys(Me)-OH i Boc-NMe-Cys(Acm)-OH (Figura 3.28). Els tres aminoàcids s'obtenen prèviament en solució i la seva síntesi es detalla al final del capítol.

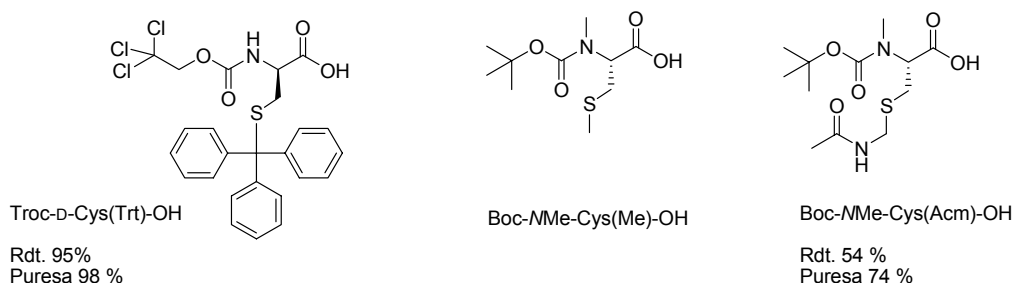


Figura 3.28 Aminoàcids necessaris per a afrontar la síntesi de la tiocoralina amb la química Boc/Bzl

3.3.2.1 Incorporació de l'aminoàcid Troc-D-Cys(Trt)-OH a la resina Merrifield

La resina Merrifield-OH té una funcionalització de 0.98 mmol/g resina. Primer es fa una prova en paral·lel d'incorporació de l'aminoàcid Troc-D-Cys(Trt)-OH i l'aminoàcid Fmoc-Cys(Trt)-OH (Figura 3.29) emprant MSNT i NMeI, parella d'agents d'acoblament descrits per reduir la racemització en la formació d'enllaços èster. L'aminoàcid Fmoc-Cys(Trt)-OH, que és assequible comercialment, permet avaluar el grau d'incorporació per mesures d'absorbància. El grup Fmoc és més voluminós i, per tant, el valor obtingut serà un valor aproximat i amb tendència a la baixa. S'obté una funcionalització molt baixa de 0.05 mmol/g resina (Taula 3., prova 1). Seguidament es proven 3 mètodes més per tal de millorar la funcionalització inicial de la síntesi. Els resultats obtinguts es troben recollits a la següent Taula 3.4:

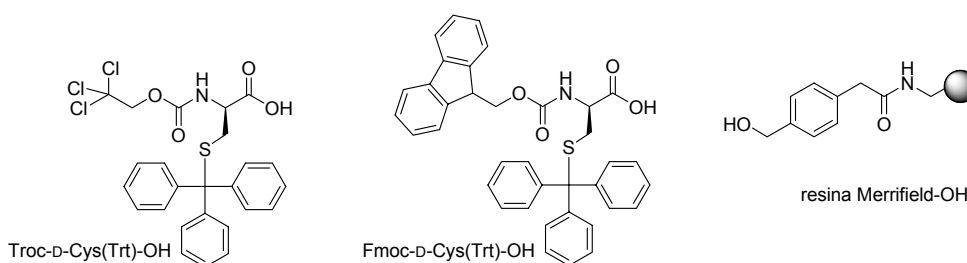


Figura 3.29 Primers aminoàcids en la química Boc/Bzl i resina emprada, la Merrifield-OH

Prova	Fmoc-Cys(Trt)-OH mg, mmols, eq	Agents acoblament (eq)	Condicions acoblament	Funcionalització (mmol/g resina)
1	58, 0.1, 2	MSNT (2) NMeI (1.5)	DMF, 1 h	0.05
2	144, 0.25, 5	MSNT (5) NMeI (3.8)	DMF, 2 x 2 h	0.11
3	144, 0.25, 5	DIPCDI (5) DMAP (0.5)	DMF, 2 x 45 min	0.07
4	288, 0.50, 10	DIPCDI (5) DMAP (0.5)	DMF, 2 x 45 min	0.48

Taula 3.4 Mètodes d'incorporació de Fmoc-Cys(Trt)-OH a la resina Merrifield-OH i funcionalització obtinguda

El mètode de l'anhidre simètric amb presència de DMAP catalític és, doncs, el que millor resultats ha donat per a la incorporació de l'aminoàcid voluminós Fmoc-Cys(Trt)-OH. A més, s'ha descrit que l'aminoàcid Fmoc-Cys(Trt)-OH té molta tendència a racemitzar quan s'activa en condicions bàsiques per incorporar-se a la resina o a la cadena peptídica.¹⁷¹

El mètode de l'anhidre simètric era el mètode emprat a l'inici de la síntesi de pèptids en fase sòlida. El mètode necessita el doble d'equivalents d'aminoàcid i sovint hi ha problemes de sobreincorporació i racemització. L'ús dels nous additius com l'HOBt, HOSu i HOAt substitueix un equivalent d'aminoàcid, alhora que es formen èsters actius menys reactius i minimitzen els problemes de sobreincorporació i racemització que els corresponents anhídrids simètrics.

Arribats a aquest punt, es planteja la possibilitat d'obtenir l'aminoàcid Troc-D-Cys(Trt)-OH directament en fase sòlida a partir de la incorporació de l'aminoàcid Fmoc-D-Cys(Trt)-OH a la resina Merrifield-OH. L'eliminació del grup Fmoc i posterior protecció en fase sòlida amb el cloroformat de 2,2,2-tricloroetil i DIEA, controlat per test de ninhidrina hauria de permetre obtenir de forma còmode i ràpida l'aminoàcid no comercial. Abans, però, es realitza una prova de síntesi sobre la resina CTC-PS per poder seguir la reacció per anàlisi en el HPLC.

3.3.2.2 Ús del suport polimèric com a grup protector temporal per a l'obtenció de l'aminoàcid Troc-D-Cys(Trt)-OH

Generalment, l'obtenció d'aminoàcids modificats no assequibles comercialment es realitza en solució, reservant el suport polimèric per a l'elongació de cadenes peptídiques. En l'exploració d'estratègies de síntesi sovint és necessari l'obtenció d'aminoàcids amb grups protectors especials en petites quantitats. Els treballs en solució necessiten de més temps de reacció i d'etapes de purificació. Per aquest motiu, la resina CTC-PS es presenta com un bon mètode per a l'obtenció ràpida d'aminoàcids modificats, especialment per a provar les noves estratègies de síntesi plantejades. En el nostre cas, el mètode es basa en l'ús d'un Fmoc-aminoàcid comercial, la incorporació a la resina CTC-PS, l'eliminació del grup Fmoc, protecció amb el grup protector Troc, mitjançant el corresponent cloroformat i, finalment, l'escissió del producte (Figura 3.30).

¹⁷¹ Kaiser, T.; Nicholson, G. J.; Kolbau, H. J.; Voelter, W., Racemization studies of Fmoc-Cys(Trt)-OH during stepwise Fmoc-solid phase peptide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 1187-1190.

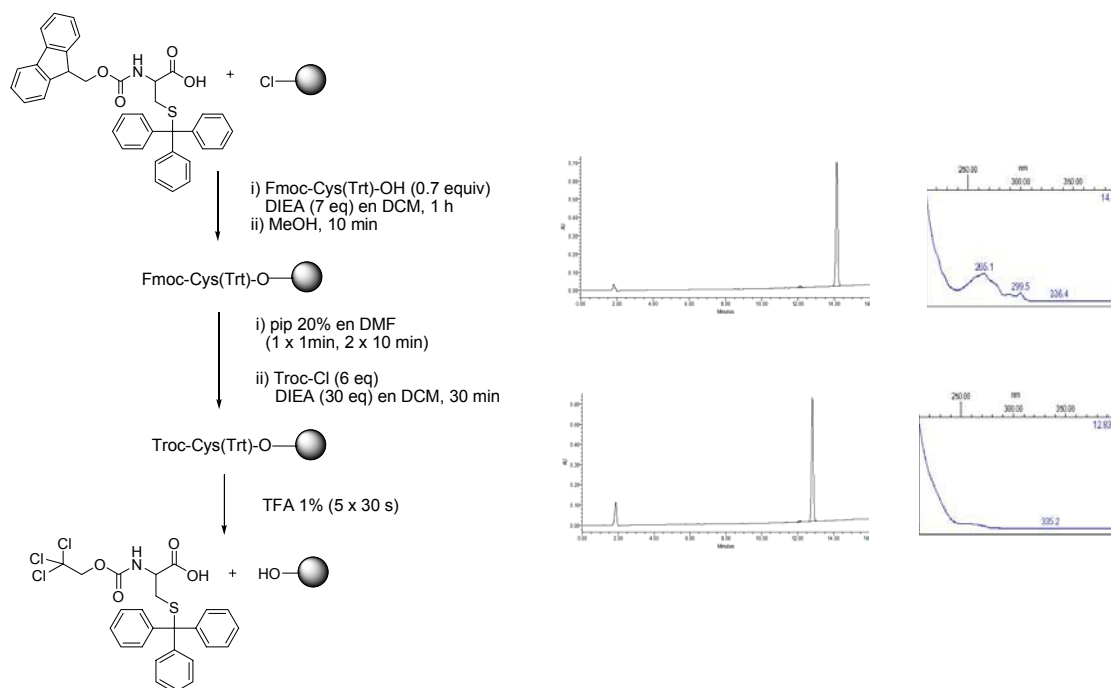


Figura 3.30 Esquema de síntesi d'obtenció en fase sòlida de l'aminoàcid Troc-D-Cys(Trt)-OH a partir de l'aminoàcid comercial Fmoc-D-Cys(Trt)-OH i anàlisi per HPLC del producte de partida i del producte final. Condicions HPLC: gradient de 7:3 a 0:10 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

L'ús de la resina CTC-PS com a grup protector temporal permet obtenir, en menys de 3 h l'aminoàcid protegit amb el grup Troc a partir d'un aminoàcid comercial. La síntesi de dipèptids, aminoàcids protegits de forma específica i altres productes obtinguts anteriorment en solució es poden sintetitzar ràpidament fent ús de la resina CTC-PS i aprofitant els avantatges de la fase sòlida.

3.3.2.3 Síntesi del fragment {[H-Gly-NMe-Phe-NMe-Ala&] [Troc-Cys(&)-OH]} emprant la química Boc/Bzl

Per avaluar la síntesi de la tiocoralina seguint la química Boc/Bzl es prova la síntesi del fragment {[H-Gly-NMe-Phe-NMe-Ala&] [Troc-Cys(&)-OH]}. La incorporació de Fmoc-Cys(Trt)-OH, l'eliminació del grup Fmoc i la posterior protecció amb el grup Troc es realitza tal i com s'ha descrit en l'anterior apartat. Després de l'eliminació del grup Trt se segueix amb l'elongació del pèptid i els aminoàcids s'incorporen emprant el mètode de la preactivació i neutralització *in situ*, i l'HATU i la DIEA com a agents d'acoblament. Els grups Boc s'eliminen per tractament de la peptidil-resina amb una solució 40 % de TFA en DCM (2 x 30 min) i un tractament addicional de TFA (2 x 1 min) en cas de desprotegir un Boc-NMe-AA-OH. Una vegada s'ha introduït el darrer aminoàcid, se seca la resina amb MeOH i es

procedeix a l'escissió del pèptid de la resina amb àcid fluorhídric per avaluar la síntesi mitjançant HPLC-EM. El cru obtingut és net amb presència de dos productes majoritaris: el producte més polar es correspon al dipèptid H-Gly-NMe-Phe-OH (Figura 3.31.a) (massa calculada per $C_{12}H_{16}N_2O_3$ 236.1, trobada 237.1 [M+H]⁺, 235.1 [M-H]⁻ i l'espectre de masses revela l'absència de Cl a la mostra) i el segon producte es correspon al dipèptid {[Troc-Cys(&)-OH] [H-Gly&]} (Figura 3.31.b) (massa calculada per $C_8H_{11}Cl_3N_2O_5S$ 352.0, trobada 353.0 1 [M+H]⁺ (98 %), 355.0 1 [M+H]⁺ (100 %), 357.0 1 [M+H]⁺ (35 %) i la distribució isotòpica del pic molecular revela la presència de tres àtoms de Cl a la molècula). També s'observa com a producte minoritari el dipèptid [Troc-Cys(&)-OH] [H-NMe-Phe&]. El dipèptid H-Gly-NMe-Phe-OH (Figura 3.31a) s'hauria generat per la fragmentació entre els dos *N*-metil aminoàcids durant l'etapa d'escissió o durant els tractaments d'eliminació del grup Boc. En canvi, el dipèptid {[Troc-Cys(&)-OH] [H-Gly&]} (b), s'hauria generat com a resultat de la formació de la DKP entre els dos *N*-metil aminoàcids (H-NMe-Phe-NMe-Ala-OH) i conseqüent addició de Boc-Gly-OH sobre el tiol lliure. Ni el medi àcid en les desproteccions del grup amino ni la neutralització *in situ* haurien servit per evitar la formació de la DKP, clarament afavorida per la seqüència de *N*-metil aminoàcids i la labilitat de l'enllaç tioèster.

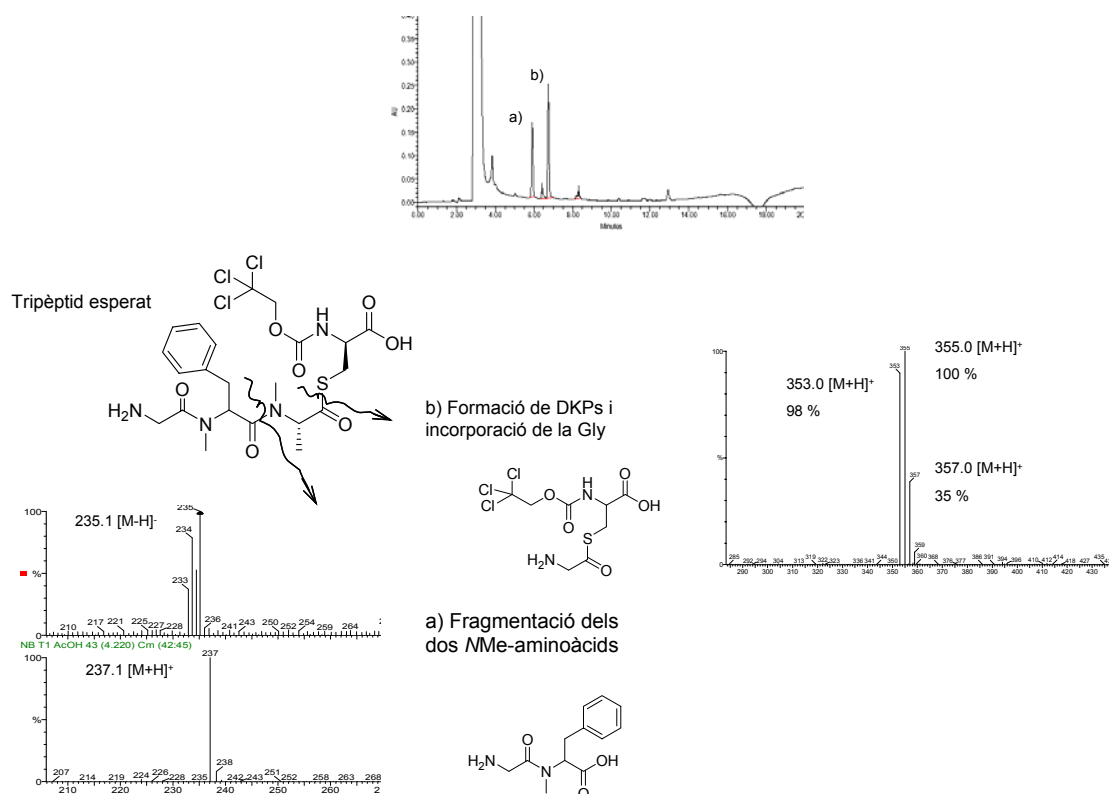


Figura 3.31 Anàlisi per HPLC de la mescla de productes obtinguts en la síntesi del tetrapèptid [H-Gly-NMe-Phe-NMe-Ala&] [Troc-Cys(&)-OH] segons la química Boc/Bzl i estructura i espectre EM dels dipèptids obtinguts. Condicions HPLC: gradient de 1:1 a 1:0 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

Al 1988, Antenius i col. al van proposar que la fragmentació entre *N*-metil aminoàcids podria tenir lloc via l'ió dicetopiperazini, tal i com es mostra a la Figura 3.32.¹⁷² I, més tard, al 1996 Urban i col. van proposar un altre mecanisme basat en l'existència d'un intermedi del tipus oxazolona (Figura 3.32).¹⁷³

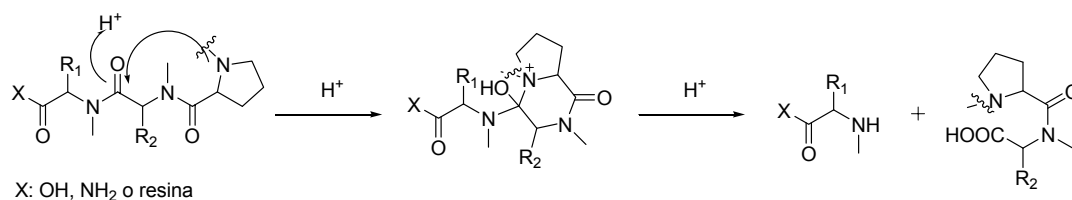


Figura 3.32 Mecanisme de fragmentació entre *N*-metil aminoàcids via ió dicetopiperazini

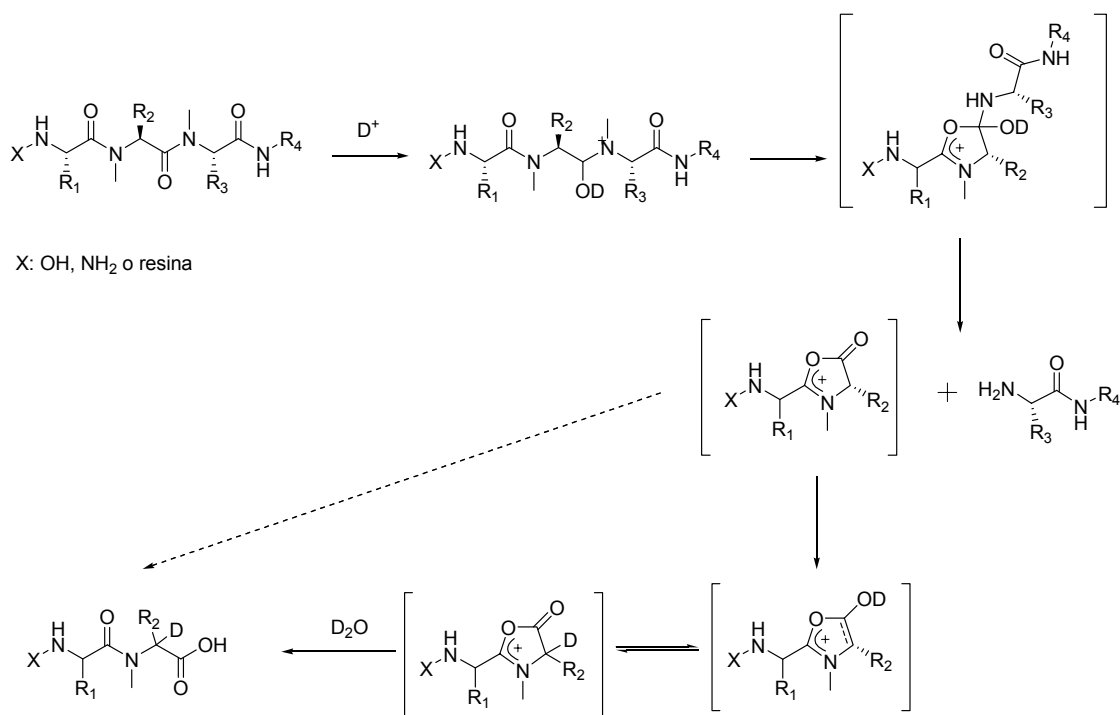


Figura 3.33 Mecanisme de fragmentació entre *N*-metil aminoàcids via l'oxazolona

¹⁷² Antenius, M. J.; Van der Auwera, C., The remarkable sensitivity to acid-catalyzed peptolysis of peptide chains (endopeptolysis) having a succession of three *N*-alkylated amino acid residues, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1988**, 31, 301-310.

¹⁷³ Urban, J.; Vaisar, T.; Shen, R.; Lee, M. S., Lability of *N*-alkylated peptides towards TFA cleavage, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1996**, 47, 182-189.

Les fragmentacions de la cadena peptídica obtinguda en aquesta síntesi invaliden l'estratègia de síntesi de la tiocoralina sobre la resina Merrifield-OH seguint una química Boc/Bzl i amb Fmoc-Cys(Trt)-OH com a primer aminoàcid. La informació extreta d'aquesta síntesi permet també descartar, *a priori*, una aproximació equivalent però iniciant la síntesi en el residu NMe-Cys(Me) o NMe-Cys(Acm). Una altra reacció secundària descrita per a pèptids amb un alt contingut en *N*-metil aminoàcids es dona quan un *N*-metil aminoàcid es troba en la posició C-terminal i aquest està en forma d'àcid carboxílic. En aquest cas, es pot observar la pèrdua del residu en C-terminal durant l'escissió del pèptid de la resina, que té lloc en condicions fortament àcides.¹⁷⁴ A més, treballs realitzats en el grup mostren com l'inici de la cadena pel residu NMe-Cys(Acm) condueixen a un monòmer molt inestable per tenir el grup *N*-terminal lliure continuu a l'enllaç tioèster.¹⁷⁵

Com s'ha comentat anteriorment, la darrera possibilitat d'inici, la Gly, no és viable perquè la formació de DKPs a nivell de l'enllaç tioèster en l'etapa de ciclació impossibilitaria l'obtenció del producte final.

A continuació, es decideix explorar la síntesi de la cadena iniciada en el residu de NMe-Cys(Me), opció encara no provada en la síntesi de la tiocoralina. A més, es considerarà l'ús de la química *p*NZ i la química Alloc.

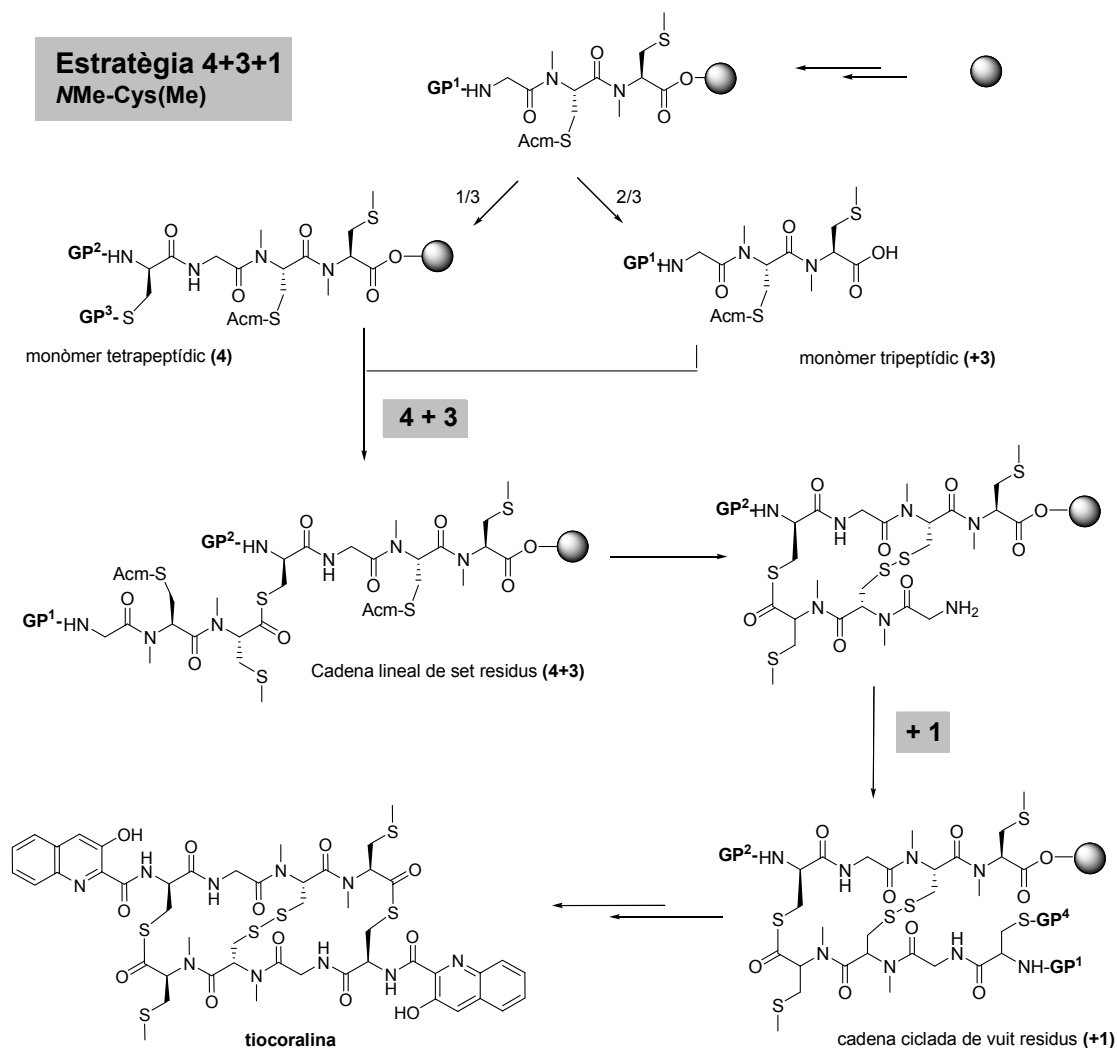
3.3.3 4+3+1, NOVA ESTRATÈGIA PER A LA SÍNTESI DE LA TIOCORALINA INICIADA EN NME-CYS(ME)

Tal i com s'ha comentat, la tiocoralina conté una seqüència amb una elevada tendència a la formació de DKPs degut a la presència de dues NMe-Cys consecutives i contigües a un enllaç tioèster. L'enllaç tioèster és una unió molt làbil a la presència de nucleòfils, però és alhora un enllaç molt fàcil de formar degut a l'elevada reactivitat del grup tiol. Si s'inicia la cadena en el residu NMe-Cys(Me) es té profit de l'existència de l'enllaç tioèster per a fer l'acoblament de fragments i la ciclació final. Si es continués amb l'estratègia 4&4 emprada fins ara ens trobaríem amb un quadre de grups protectors complex per al grup tiol. Per tal de simplificar l'esquema sintètic es pensa en l'estratègia 4+3+1 (Esquema 3.11).

La següent figura resumeix l'esquema sintètic general seguint una aproximació 4+3+1, iniciant la cadena peptídica en el residu NMe-Cys(Me) (Esquema 3.11). En el qual, GP¹ fa referència a un grup protector temporal, GP² a un grup protector permanent, GP³ al grup protector del tiol de la primera D-Cys i GP⁴ al de la darrera D-Cys.

¹⁷⁴ Van der Auwera, C.; Antenius, M. J. O., Easy cleavage of C-terminal aminoàcids from peptide acids through acidic hydrolysis, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1988**, *31*, 186-191.

¹⁷⁵ Juan Antonio Moreno, *Màster Experimental en Química Orgànica*, **2005**, Universitat de Barcelona.



Esquema 3.11 Esquema de síntesi general per una aproximació 4+3+1 per a la tiocoralina iniciada en NMe-Cys(Me)

La nova estratègia 4+3+1 es basa en la síntesi d'un tripèptid protegit [GP₁-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-resina] i divisió de la resina en dues fraccions; a una tercera part de la peptidil-resina s'incorporaria un quart aminoàcid, una D-Cys per obtenir el monòmer tetrapeptídic (**4**) i l'altra fracció s'escindiria de la resina, obtenint-se el monòmer tripeptídic (**+3**). A continuació tindria lloc el primer acoblament de fragments 4+3 sobre el grup tiol de la D-Cys. Seguidament, es formaria el pont disulfur i s'incorporaria la darrera D-Cys per obtenir ja una cadena ciclada peptídica de vuit residus (**+1**). D'aquesta manera s'evita l'ús d'un grup protector del tiol de la segona D-Cys que sigui estable a la formació del pont disulfur i que, a més a més, es pugui eliminar en condicions compatibles amb l'estabilitat de l'enllaç tioèster i el pont disulfur.

L'estratègia proposada té altres característiques que cal analitzar:

- És la primera síntesi plantejada amb el residu NMe-Cys(Me) com a punt d'inici.
- El primer aminoàcid s'introdueix en la forma Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH, igual que l'estratègia de síntesi de l'oxatiocoralina iniciada en Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH (Capítol 3, 3.2.1).
- De forma anàloga a les síntesis de l'oxatiocoralina iniciades en el residu de NMe-Cys(Acm), l'inici de la cadena peptídica amb el residu NMe-Cys(Me) no és compatible amb l'ús del grup protector temporal Fmoc per als següents aminoàcids. I caldrà buscar un grup protector temporal adient (GP¹).
- L'estratègia proposada implica el risc de formació de DKPs a nivell de resina. Caldrà plantejar bones alternatives als procediments estàndards per a minimitzar-ne el risc.
- L'ús d'un residu de NMe-Cys en l'extrem C-terminal implica també un risc de racemització al llarg de la síntesi i durant l'etapa final de ciclació en solució.
- El grup protector del tiol de la primera D-Cys (GP³) s'ha de poder eliminar i deixar el tiol lliure per a la següent formació de l'enllaç tioèster.
- El grup protector del tiol de la segona D-Cys (GP⁴) s'ha de poder eliminar en condicions compatibles amb l'estabilitat de l'enllaç tioèster i el pont disulfur ja formats. A més, és preferible que sigui estable a les condicions d'escissió del pèptid de la resina per a poder controlar millor l'etapa de ciclació en solució.
- L'èxit de l'estratègia està lligat a la puresa que es pugui aconseguir en la síntesi del monòmer tripeptídic GP₁-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH (+3).
- Les etapes difícils d'acoblament de fragments en fase sòlida i de la ciclació en solució estan, ara, afavorides per la reactivitat del grup tiol.

3.3.3.1 Estratègia 4+3+1 iniciada en NMe-Cys(Me) emprant química pNZ i la resina Wang

Tenint en compte totes aquestes consideracions, es planteja estudiar l'ús del grup protector pNZ per a la protecció temporal dels aminoàcids de la cadena peptídica (GP¹) amb un intent de minimitzar la formació de DKPs a nivell de resina. S'ha estudiat també la ortogonalitat del grup pNZ amb els grups protectors més habituals en la química de pèptids en fase sòlida i s'ha vist que és comptatible amb l'ús del grup Fmoc, Alloc i Boc.¹⁶⁶ La resina també és Wang és vàlida com a suport polimèric. El grup Alloc seria un bon grup protector permanent per la D-Cys en aquesta estratègia (GP²), però la seva eliminació implica l'ús de complexos de Pd de difícil eliminació en solució. Per això ens plantejem la possibilitat

d'introduir els heterocicles en fase sòlida. El tiol de la D-Cys es pot protegir amb el grup metoxitritil, Mmt (GP³). Tots dos grups protectors són ortogonals als grups pNZ i Alloc i poden eliminar-se sobre la resina Wang per donar el tiol lliure. Els aminoàcids amb els diferents grups protectors i la resina proposada es troben representats en la següent figura (Figura 3.34):

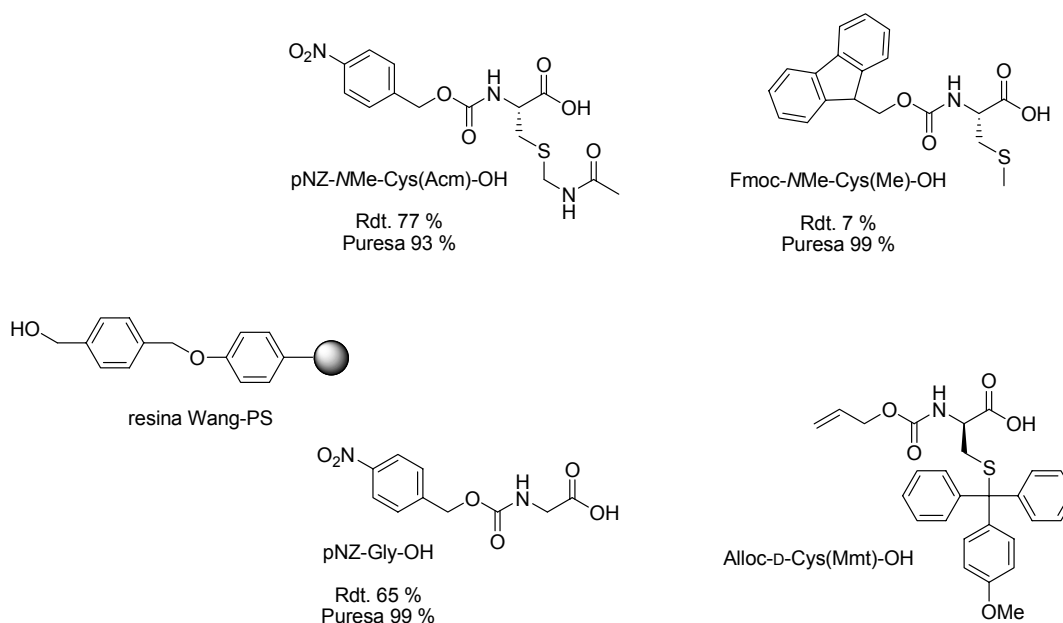


Figura 3.34 Resina Wang i aminoàcids necessaris per a la síntesi de la tiocoralina seguint una estratègia 4+3+1

L'estratègia 4+3+1 plantejada demana un esforç sintètic previ per obtenir tots els aminoàcids convenientment protegits. Es necessita, també, plantejar-se l'ús de la resina Wang en la síntesi de fragments i pèptids cíclics perquè, fins ara, la resina més emprada amb aquest propòsit ha estat la resina CTC-PS.

La resina CTC-PS s'ha usat àmpliament en la síntesi de fragments o de pèptids lineals per fer la ciclació en solució, al contrari de la resina Wang. Després d'incorporar el primer aminoàcid sobre la resina Wang, es realitza un tractament amb àcid acètic, DIPCDI i DIEA, per tal d'inactivar les posicions actives restants. Estem interessats en evitar l'ús de l'àcid acètic perquè aquest s'allibera en l'etapa d'escissió de la resina i pot interferir en l'etapa d'acoblament de fragments o en la ciclació. Per aquest motiu, es pensa en la inactivació de les posicions reactives restants amb l'anhidre de Boc i DIEA. El producte alliberat (tBuOH) s'eliminarà fàcilment per evaporació i no interferirà en etapes de síntesi posteriors. Al final d'aquest capítol es detallen els resultats obtinguts amb l'ús de l'anhidre de Boc en l'etapa de bloqueig de la resina Wang (Capítol 3, 3.4.7).

El següent pas per a valorar l'estratègia 4+3+1 és l'obtenció, amb una puresa elevada del monòmer tripeptídic *p*NZ-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH (**+3**) emprant la química *p*NZ i la resina Wang.

3.3.3.1.1 Prova de síntesi del monòmer tripeptídic *p*NZ-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH (+3) de la tiocoralina, emprant química *p*NZ i resina Wang

Per a dur a terme aquesta síntesi es necessita disposar dels aminoàcids *p*NZ-Gly-OH i *p*NZ-NMe-Cys(Acm)-OH. S'inicia la síntesi amb 150 mg de resina Wang i els *p*NZ-aminoàcids s'incorporen a la cadena amb HATU i DIEA com a agents d'acoblament, i fent pre-activació i neutralització *in situ*. L'anàlisi per HPLC-EM del monòmer tripeptídic escindit *p*NZ-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH dóna un cromatograma amb dos productes majoritaris: el producte esperat amb un 41% de puresa (Figura 3.38.a) i la presència d'un producte més polar amb un 32 %, que correspon al dipèptid *p*NZ-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH (Figura 3.35.b), i que s'hauria format per la pèrdua del *N*-metil aminoàcid NMe-Cys(Me) situat en l'extrem C-terminal.

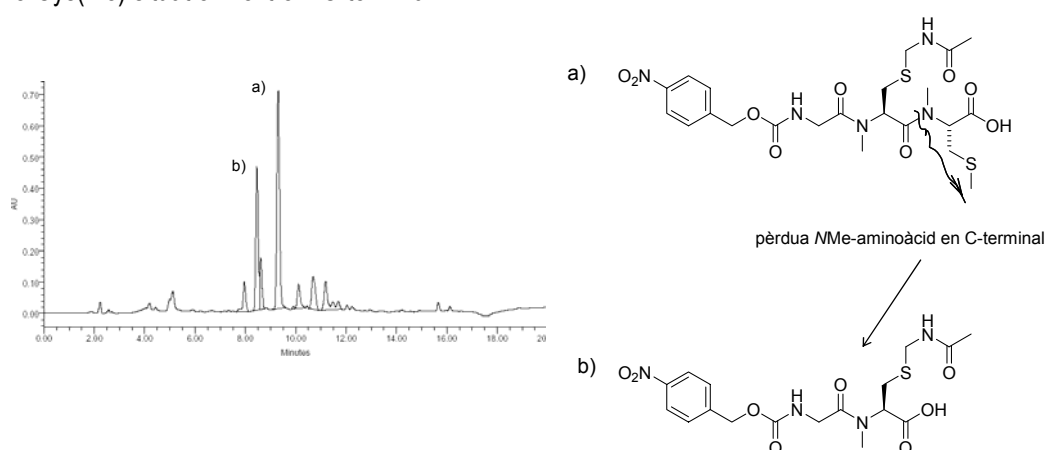


Figura 3.35 Productes obtinguts en la síntesi del monòmer tripeptídic de la tiocoralina iniciat en NMe-Cys(Me) i seguint la química *p*NZ. a) tripeptídic esperat i b) producte secundari per pèrdua del residu NMe-Cys(Me), situat en l'extrem C-terminal. Condicions HPLC: gradient de 1:0 a 0:1 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

El tractament àcid emprat en l'escissió del pèptid de la resina (95 % de TFA, 2.5 % de H₂O, 2.5 % de TES, 1.5 h) és suficient per provocar la pèrdua del *N*-metil aminoàcid en l'extrem C-terminal. La pèrdua d'aquest residu es troba descrita a la bibliografia¹⁷⁴ i el mecanisme d'aquesta reacció secundària es troba representat a la següent figura (Figura 3.36):

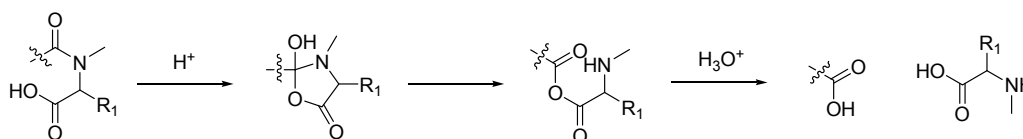


Figura 3.36 Mecanisme de fragmentació i pèrdua del residu C-terminal

En vistes a aquests resultats es podria intentar optimitzar les condicions d'escissió de la resina, reduint la concentració d'àcid en la mescla d'escissió i reduir així la pèrdua del residu *NMe-Cys(Me)* en l'extrem C-terminal, malgrat això, es prefereix explorar l'aplicació de l'estratègia 4+3+1 en la resina CTC-PS. L'escissió de la resina CTC-PS es realitza en condicions àcides molt suaus (1 % de TFA en DCM). Aquest canvi de suport polimèric implica canviar doncs els grups protectors temporals i tornar a l'ús de la química Alloc.

3.3.3.2 Estratègia 4+3+1 emprant química Alloc i resina CTC-PS. Exploració de l'estratègia amb la síntesi de dos derivats de la tiocoralina

D'acord amb l'estratègia 4+3+1 proposada es planteja l'ús de la resina CTC-PS com a suport polimèric. L'ús de la resina CTC-PS està descrita per a la reducció de la formació de DPKs. Però com ja s'ha vist en anteriors síntesis, la presència de dues *N*-metil cisteïnes contigües a un enllaç èster/tioèster eleva el risc de formació de DKPs. Si s'inicia la síntesi en el residu de *NMe-Cys(Me)*, la formació de la DKP implica una reducció de la funcionalització sense alterar la puresa del producte obtingut.

El grup protector temporal dels aminoàcids pot ser el grup Alloc (GP¹) (Alloc-*NMe-Cys(Me)*-OH, Alloc-*NMe-Cys(Acm)*-OH i Alloc-Gly-OH) i el permanent el grup Boc (GP²). Amb aquest esquema de grups protectors es pot incorporar l'heterocicle en la darrera etapa de síntesi. L'ús del grup protector Alloc i unes condicions controlades d'incorporació del tercer aminoàcid poden ajudar a minimitzar la formació de la DKP. El grup Alloc també servirà per elongar la cadena peptídica en presència de l'enllaç tioèster. El grup protector del tiol de la primera *D-Cys* podria ser el grup *Npys* i el grup *S^tBu* (GP³) (Boc-*D-Cys(Npys)*-OH i Boc-*D-Cys(S^tBu)*-OH), mentre que, la segona *D-Cys* necessita d'un grup protector pel tiol addicional (GP⁴) que sigui compatible la seva eliminació amb l'estabilitat de l'enllaç tioèster i el pont disulfur. Els grups protectors emprats en la primera *D-Cys* no són útils perquè s'eliminen amb agents reductors forts. Per aquest motiu, es pensa en l'ús del grup *Trt* (GP⁴) [Boc-*D-Cys(Trt)*-OH], perquè s'elimina en condicions àcides i és ortogonal al grup Boc i a la resina CTC-PS. L'aminoàcid Boc-*D-Cys(Trt)*-OH és també assequible comercialment a preus elevats. Per això també es va decidir desenvolupar la seva síntesi en solució per a posteriors aplicacions.

L'obtenció del monòmer tripeptídic Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH (**+3**) amb una puresa elevada serà essencial per l'èxit de l'estratègia. Així com l'acoblament 4+3 per formar l'enllaç tioèster, que serà un dels punts claus per a determinar la validesa d'aquest nou punt d'inici.

L'estratègia plantejada és complexa i conté molts elements novedosos. Per aquest motiu, abans d'iniciar la síntesi amb la seqüència natural de la tiocoralina, es realitza una exploració progressiva de l'estratègia amb la síntesi de dos derivats simplificats de la tiocoralina. La següent figura (Figura 3.37) mostra els derivats plantejats i assenjala les diferències en la composició d'aminoàcids (color blau) i en els heterocicles (color verd) respecte el pèptid natural.

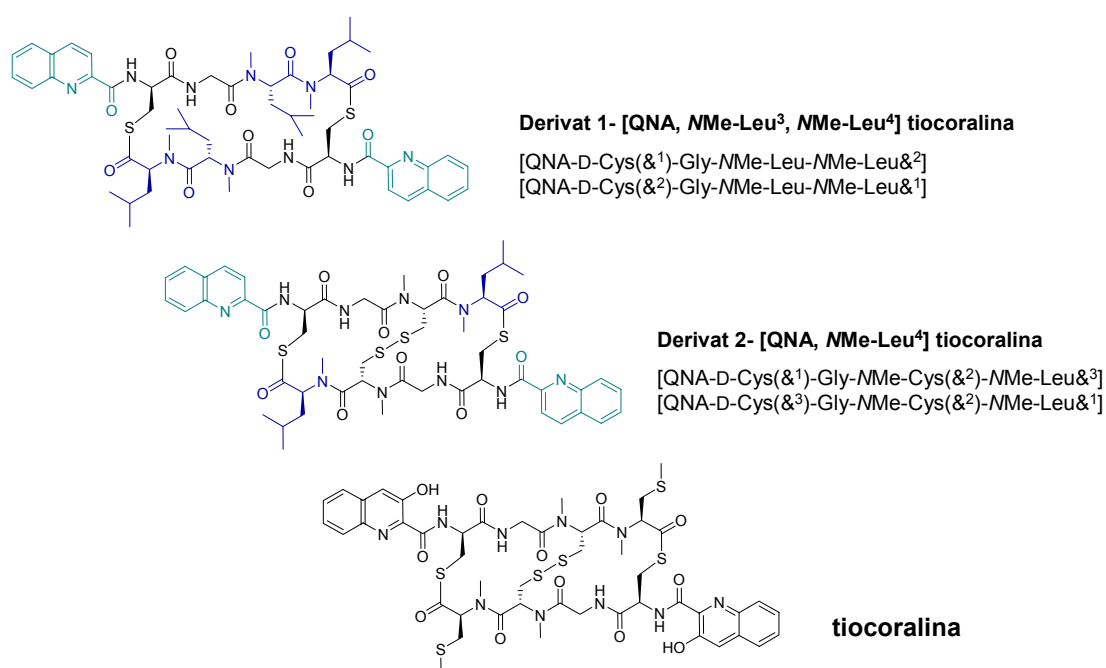


Figura 3.37 Estructura i composició dels pèptids objectius derivats de la tiocoralina. El color blau assenjala els aminoàcids i el color verd els heterocicles diferents respecte al pèptid natural

- El primer derivat proposat conté el residu de NMe-Leu en comptes de cada una de les NMe-Cys, i l'heterocicle comercial àcid quinàldic (QNA) en comptes de l'àcid 3-hidroxiquinàldic. Així, el primer pèptid objectiu és el [QNA, NMe-Leu³, NMe-Leu⁴] tiocoralina i el seu nom sistemàtic és [QNA-D-Cys(&¹)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&²] [QNA-D-Cys(&²)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&¹]. L'objectiu de la síntesi del derivat és temptejar l'estratègia, especialment pel que fa referència a la divisió de resines, l'acoblament 4+3,

la incorporació del darrer aminoàcid, l'escissió de la resina amb el grup Trt inalterat, la seva eliminació en solució i la posterior ciclació. També són interessants les darreres etapes d'eliminació dels grups Boc i la incorporació de l'heterocicle cromòfor en presència de l'enllaç tioèster.

- El segon derivat plantejat conté un grau més de ramificació, el pont disulfur, i difereix només del pèptid natural per la substitució de la NMe-Cys(Me) per la NMe-Leu i l'àcid 3-hidroxiquinàldic per l'heterocicle comercial àcid quinàldic. Amb aquest derivat es podrà avaluar l'efecte de la formació del pont disulfur en l'estratègia plantejada. El segon pèptid objectiu conté tots els elements estructurals del pèptid natural, s'anomena [QNA, NMe-Leu⁴] tiocoralina i el seu nom sistemàtic és {[QNA-D-Cys(&¹)-Gly-NMe-Cys(&²)-NMe-Leu&³] [QNA-D-Cys(&³)-Gly-NMe-Cys(&²)-NMe-Leu&¹]}.

L'ús d'aminoàcids i heterocicles comercials en substitució dels elements originals permetrà realitzar les síntesis dels tiodepsipèptids cíclics a major escala i optimitzar les etapes de síntesi.

3.3.3.3 Cap a la síntesi del primer derivat, [QNA, NMe-Leu³, NMe-Leu⁴] tiocoralina

Tal i com s'ha comentat, el pèptid objectiu de la següent síntesi és el [QNA-D-Cys(&¹)-NMe-Leu-NMe-Leu&²] [QNA-D-Cys(&²)-NMe-Leu-NMe-Leu&¹]. El grup protector temporal per a les dues NMe-Leu és el grup Fmoc, perquè l'aminoàcid Fmoc-NMe-Leu-OH és comercial i l'optimització del tripèptid de la tiocoralina només té sentit si es realitza sobre la seqüència natural. En treballs anteriors del grup, s'ha vist com la seqüència NMe-Leu-NMe-Leu no té tendència a la formació de DKPs usant la química Fmoc i la resina CTC-PS. El principal objectiu d'aquest pèptid és l'avaluació del joc d'acoblements que comporta l'estratègia plantejada.

3.3.3.3.1 Síntesi dels monòmers: tripèptid (+3) i tetrapèptid (4)

Per a la síntesi del monòmer tripeptídic Alloc-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu-OH (**+3**) i el tetrapeptídic Boc-D-Cys(Npys)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu-OH (**4**), s'incorpora el primer aminoàcid Fmoc-NMe-Leu-OH en defecte sobre la resina CTC-PS (300 mg). Per l'acoblament dels aminoàcids, Fmoc-NMe-Leu-OH i Alloc-Gly-OH, s'empra HATU i DIEA com a agents d'acoblament. Una vegada obtingut el tripèptid, es divideix la tripeptidil-resina en dues fraccions de 2/3 i 1/3, i la primera fracció es tracta amb una solució TFA-DCM (1:99) per obtenir el monòmer tripeptídic Alloc-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu-OH (**+3**). El producte s'analitza per HPLC-EM i es comprova gratament l'obtenció del tripèptid desitjat com a producte majoritari (83 % puresa). Per tal d'obtenir el monòmer tetrapeptídic, es pren la segona fracció de la

tripeptidil-resina, s'elimina el grup Alloc ($[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, PhSiH_3 , DCM) i s'incorpora el quart aminoàcid Boc-D-Cys(Npys)-OH, emprant carbodiimida DIPCDI i HOAt com a agents d'acoblament per obtenir el monòmer tetrapeptídic Boc-D-Cys(Npys)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu-OH (**4**).

3.3.3.2 Acoblament 4+3. Obtenció de la cadena lineal de set residus

Per a l'acoblament del monòmer tetrapeptídic (**4**) i el tripeptídic (**+3**), prèviament es realitza l'eliminació del grup S^tBu de la D-Cys mitjançant Bu_3P en una solució DMF-H₂O (4:1). Per a l'acoblament de fragments es fa servir la carbodiimida DIPCDI i HOAt com a agents d'acoblament i s'addiciona DIEA per neutralitzar les restes d'àcid trifluoroacètic provinents de l'escissió del tripeptíd. Després de 3 hores de reacció, una anàlisi per HPLC-EM d'una alíquota de la peptidil-resina revela la finalització, amb èxit, de l'acoblament i s'obté el producte lineal de set residus [Boc-D-Cys(&)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu-CTC-PS] [Alloc-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&] amb una puresa superior al 90 % (Figura 3.38) i per EM es determina la presència d'un producte secundari (9 %) resultat de l'addició d'una molècula de Bu_3P al grup tiol durant els tractaments d'eminació del grup Npys Boc-D-Cys(Bu_2PO)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu-OH).

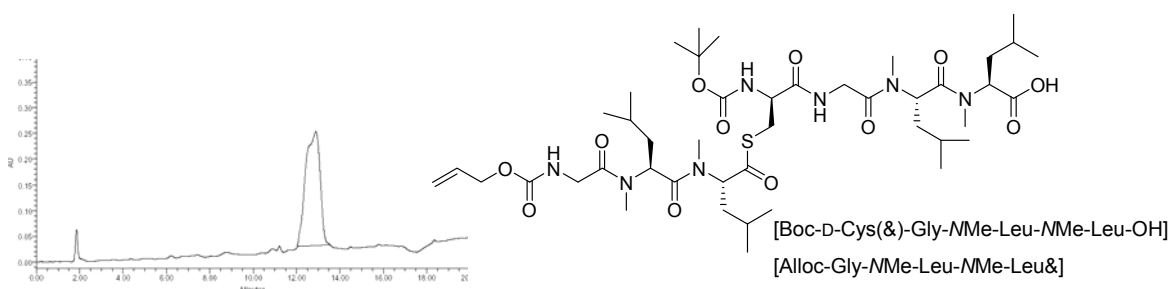


Figura 3.38 Cromatograma de l'etapa d'acoblament de fragments 4+3 i estructura i nom dels productes obtinguts. Condicions HPLC: gradient de 7:3 a 0:10 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

3.3.3.3 Acoblament +1. Obtenció de la cadena lineal final

El grup Alloc de la cadena lineal de set residus (4+3) s'elimina ($[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, PhSiH_3 , DCM) seguint els procediments estàndards i es comprova, mitjançant l'anàlisi d'una alíquota per HPLC-EM, com l'enllaç tioèster és estable en les condicions d'eliminació del grup Alloc d'un aminoàcid que no forma part de l'enllaç tioèster. El darrer aminoàcid Boc-D-Cys(Trt)-OH s'incorpora amb DIPCDI i HOAt i en l'escissió del pèptid s'obtenen 84 mg de la cadena lineal amb una puresa del 95 % (Figura 3.39), determinant-se el rendiment de la cadena lineal per pesada del producte final del 93 %.

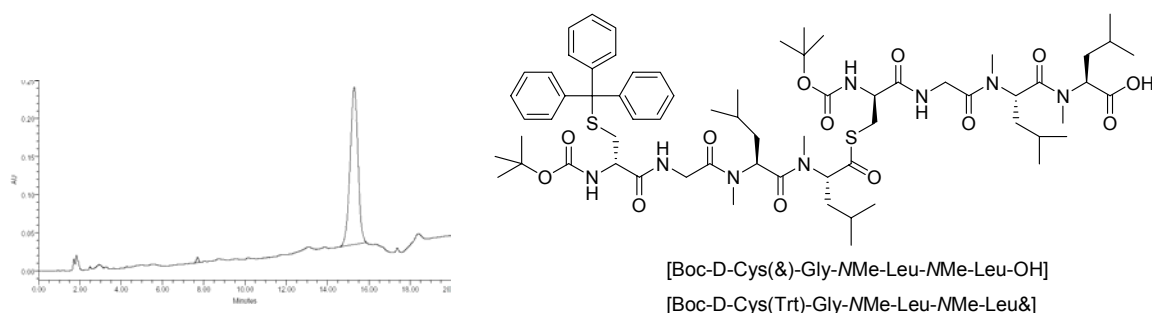


Figura 3.39 Cromatograma de la cadena peptídica lineal protegida del primer derivat de la tiocoralina. Condicions HPLC: gradient de 5:5 a 0:10 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

3.3.3.3.4 Ciclació en solució

L'eliminació del grup Trt es realitza sobre una alíquota del pèptid lineal (4.5 mg) i per addició de 2 mL d'una solució 2 % de TFA, 2 % TES en DCM. A les 1.5 h de reacció s'observa la desaparició del producte protegit i la presència del producte sense el grup Trt i, també, un producte que correspon a l'eliminació addicional d'un grup Boc. La reacció no es pot seguir per UV perquè el senyal del grup Trt enmascara el cromatograma.

Pensant en la posterior síntesi de la tiocoralina i, per tal de millorar l'etapa de ciclació, es pensa en la possibilitat de formar un èster actiu estable de l'extrem C-terminal de la cadena, previ a l'eliminació del grup Trt. D'aquesta forma, l'eliminació i la ciclació es donarien simultàniament, minimitzant així possibles reaccions secundàries degut a la presència del tiol lliure, com l'atac a l'enllaç tioèster format. Les proves realitzades es mostren a la Taula 3.5, però en cap cas s'obté l'èster actiu desitjat.

Èster format	Pèptid lineal	Reactius	Condicions
 R-OSu	5 mg (0.004 mmol)	DIPCDI (1.3 eq) HOSu (1.8 eq)	dioxà (1 mL) H ₂ O (100 µL) 16 h, 25 °C
		DIPCDI (3.9 eq) HOSu (5.4 eq)	48 h, 25 °C
 R-pfp	5 mg (0.004 mmol)	DIPCDI (1.3 eq) HOPfp (1.8 eq)	dioxà (1 mL) H ₂ O (100 µL) 16 h, 25 °C
		DIPCDI (3.9 eq) HOPfp (5.4 eq) DIEA (2 eq)	48 h, 25 °C

Taula 3.5 Proves de formació de l'èster activat de la cadena peptídica lineal

Per tant, la ciclació finalment es realitza a partir de la cadena lineal desprotegida. Així, la reacció té lloc a alta dilució (1 mM) i s'empra EDC·HCl i HOAt com a agents d'acoblament, i també s'addiciona DIEA per a neutralitzar traces d'àcid trifluoroacètic. A les dues hores es comprova la desaparició del producte lineal i s'observa la presència del producte ciclat i un subproducte que correspon al producte final oxidat. L'eliminació dels grups permanents Boc i posterior incorporació dels heterocicles intercaladors no es prova perquè els resultats poden variar en funció de tenir o no el pont disulfur format.

Els resultats obtinguts en la síntesi del primer derivat de tiocoralina, [QNA, NMe-Leu³, NMe-Leu⁴] tiocoralina són molt positius i mostren la viabilitat dels acoblaments de fragments per la construcció de la cadena lineal. A continuació s'afrontarà la síntesi del segon derivat de tiocoralina, [QNA, NMe-Leu⁴] tiocoralina que conté a la seva seqüència el pont disulfur.

3.3.3.4 Síntesi del segon derivat [QNA, NMe-Leu⁴] tiocoralina

Tal i com s'ha comentat, el segon derivat de tiocoralina és el resultat de substituir la NMe-Cys(Me) i l'heterocicle 3-hidroxiquinàldic per NMe-Leu i l'àcid quinàldic, respectivament, per obtenir el pèptid {[QNA-D-Cys(&¹)-NMe-Cys(&²)-NMe-Leu&³] [QNA-D-Cys(&³)-NMe-Cys(&²)-NMe-Leu&¹]}. En aquest cas, es necessita la incorporació del residu no comercial Alloc-NMe-Cys(Acm)-OH. En canvi, una alternativa a la seva síntesi en solució és la incorporació de l'aminoàcid comercial Fmoc-Cys(Acm)-OH a la cadena peptídica, i realitzar la *N*-metilació en fase sòlida descrita per Miller i Scanlan,¹⁷⁶ tal i com s'ha fet en la síntesi dels anàlegs d'azatiocoralina. Aquesta alternativa permetria, altre cop, obtenir un derivat de tiocoralina sintetitzat totalment sobre el suport polimèric, i seria un bon mètode per a la generació d'anàlegs de tiocoralina en fase sòlida.

3.3.3.4.1 Síntesi dels monòmers tripeptídic (+3) i tetrapeptídic (4). *N*-metilació en fase sòlida de Cys(Acm)

Per obtenir el monòmer tripeptídic Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Leu-OH (+3) es parteix de 600 mg de resina CTC-PS, i l'elongació de la cadena es realitza emprant HATU i DIEA com a agents d'acoblament. Després de l'eliminació del grup Fmoc de l'aminoàcid Fmoc-Cys(Acm)-OH es prossegueix a realitzar la *N*-metilació en fase sòlida i, seguidament, s'incorpora el tercer aminoàcid Alloc-Gly-OH. Un cop obtingut el tripèptid, la tripeptidil-resina es divideix en dues fraccions de 2/3 i 1/3. La primera fracció (2/3) s'escindeix de la resina i els filtrats es recullen en 1,4-dioxà. La utilització de 1,4-dioxà enlloc de

¹⁷⁶ Miller, S. C.; Scanlan, T. S., oNBS-SPPS: a new method for solid-phase peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 2690-2691.

d'aigua, servirà per evitar l'etapa de liofilització i també la possible hidròlisi àcida de la cadena per l'alt contingut de *N*-metil aminoàcids. S'obtenen 83 mg del tripèptid Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Leu-OH amb un 93 % de puresa, i amb un 90 % de rendiment (Figura 3.40). La síntesi del tripèptid és reproduïble, tot i que la puresa final varia entre 70-95 %. A més, s'ha observat que les condicions d'escissió són importants per la puresa del monòmer tripeptídic i que la formació del dímer per formació del pont disulfur intermolecular és la impuresa més important.

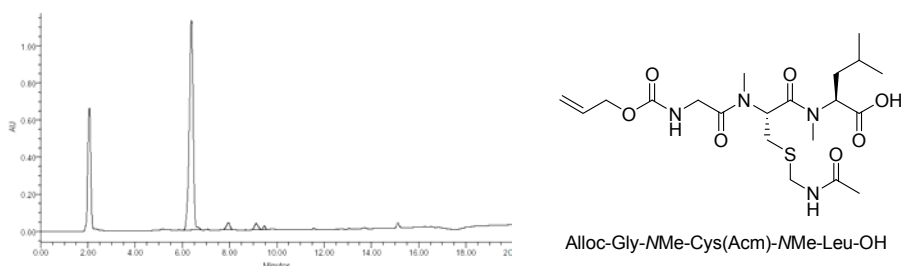


Figura 3.40 Anàlisi per HPLC de la síntesi del tripèptid Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Leu-OH. Condicions HPLC: gradient de 8:2 a 0:10 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 %

Per l'obtenció del monòmer tetrapeptídic Boc-D-Cys(Npys)-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH (**4**), es pren la segona fracció (1/3) de la tripeptidil-resina, s'elimina el grup Alloc i s'incorpora el quart aminoàcid, el Boc-D-Cys(Npys)-OH amb DIPCDI i HOAt com a agents d'acoblament.

3.3.3.4.2 Acoblament 4+3. Obtenció de la cadena lineal de set residus

L'acoblament del monòmer tetrapeptídic i tripeptídic (4+3) es realitza emprant DIPCDI, HOAt i DIEA com a agents d'acoblament. A les 3 hores de reacció es comprova per HPLC-EM la finalització de l'acoblament i l'obtenció d'un producte majoritari, amb un 91 % de puresa, que correspon a la cadena lineal de 7 residus del segon derivat de la tiocoralina (Figura 3.41). També es detecta la presència d'un producte més polar (9 %) que correspon al producte d'oxidació, segurament format en l'etapa d'escissió.

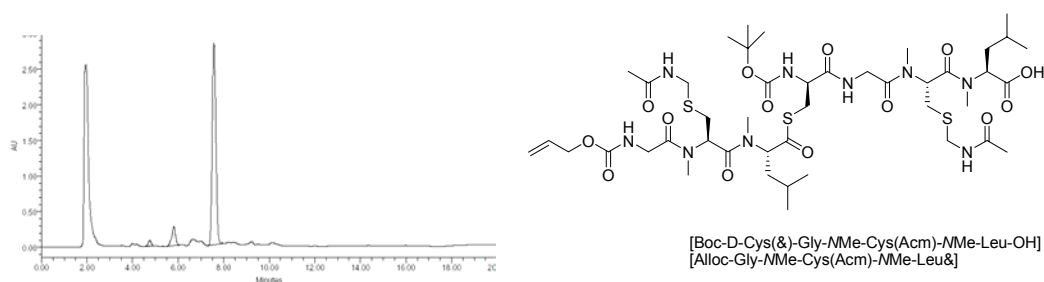


Figura 3.41 Anàlisi per HPLC de l'acoblament 4+3 del segon derivat de la tiocoralina. Condicions HPLC: gradient de 8:2 a 0:10 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

3.3.3.4.3 Formació del pont disulfur en fase sòlida i elongació de la cadena (+1)

La formació del pont disulfur sobre el suport polimèric es forma en presència de iode en DMF i una anàlisi per HPLC-EM de l'escissió d'una alíquota de la peptidil-resina mostra, amb èxit, la formació del pont disulfur després de 10 minuts de reacció (Figura 3.45). Després de la formació del pont disulfur, s'han d'eliminar les traces de iode de la resina i, per aquest motiu, la peptidil-resina es renta amb CHCl₃ repetides vegades i amb una solució aquosa de Na₂SO₃ (1 M) en DMF (1:4). En aquest cas, és especialment important eliminar completament el iode perquè el següent aminoàcid a incorporar és el Boc-D-Cys(Trt)-OH que pot reaccionar amb iode per formar un enllaç disulfur

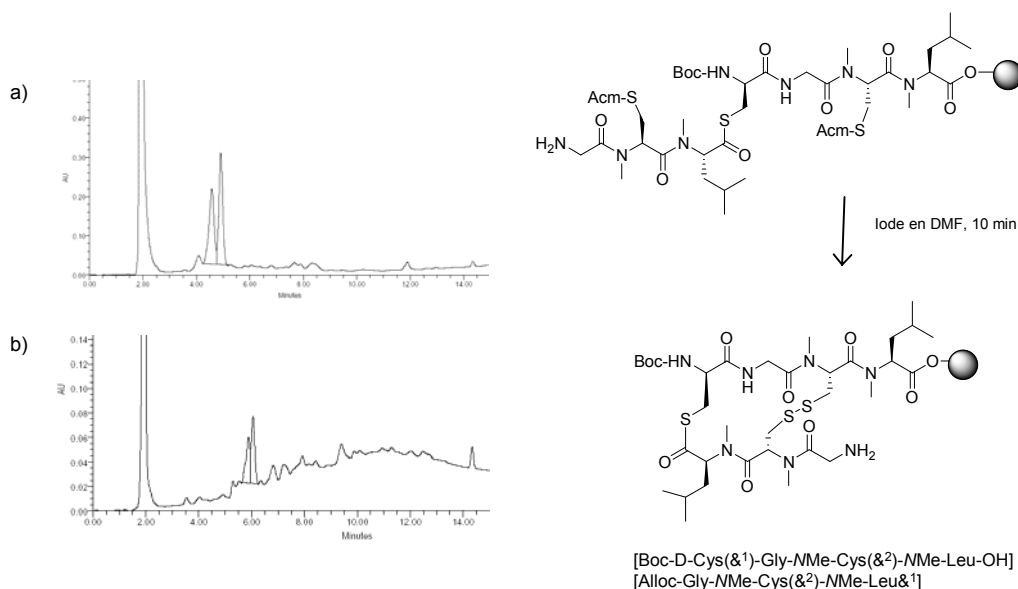


Figura 3.42 Anàlisi per HPLC de a) cadena de 7 residus desprotegida i b) formació del pont disulfur en fase sòlida. Condicions HPLC: gradient de 7:3 a 0:10 en 15 min (A: H₂O amb 0.045 % TFA i B: MeCN amb 0.036 %

El darrer aminoàcid de la cadena, el Boc-D-Cys(Trt)-OH, s'incorpora emprant DIPCDI i HOAt per evitar el medi bàsic i preservar l'enllaç tioèster.

3.3.3.4.4 Segona ciclació en solució

L'octapèptid del segon derivat de tiocoralina (4+3+1) s'escindeix de la resina, s'elimina el grup Trt del tiol de la segona D-Cys amb una solució 2 % de TFA, 2 % TES en DCM, 1 h i el cromatograma del producte desprotegit mostra una mescla complexa de productes, tal i com es pot observar a la Figura 3.43.a.

La ciclació té lloc a alta dilució (1 mM) i emprant EDC·HCl i HOAt com a agents d'acoblament i DIEA per neutralitzar traces de TFA i després d'una hora de reacció, s'observa per HPLC-EM la conversió del producte de partida (Figura 3.43.b).

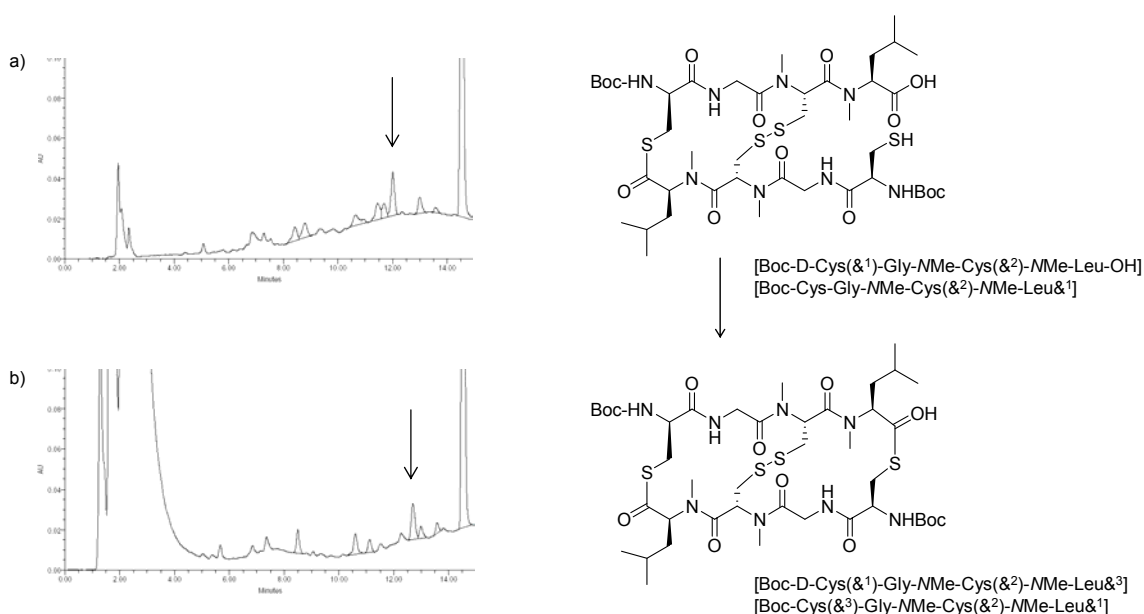


Figura 3.43 Anàlisi per HPLC de a) producte sense el grup Trt i b) producte de la segona ciclació en solució.

Condicions HPLC: gradient de 7:3 a 0:10 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

3.3.3.4.5 Incorporació de l'àcid quinàldic. Obtenció de la [QNA, NMe-Leu⁴] tiocoralina

En aquest punt es divideix el producte obtingut de la ciclació en dues fraccions. La primera fracció es tracta amb una solució de HCl-1,4-dioxà (4 M) durant una hora i la segona amb una solució de TFA 95 % en aigua durant una hora. Després d'eliminar el dissolvent i fer coevaporacions amb 1,4-dioxà, el producte es liofilitza per eliminar les traces d'àcid trifluoroacètic i la segona fracció es redissol amb

una solució aquosa HCl (0.5 N) per tal de substituir el contraió trifluoroacetat per l'ió clorur, que és inactiu. A continuació es procedeix a la incorporació dels heterocicles d'igual forma en ambdues mostres. Per a la incorporació de l'heterocicle s'empren 2.5 eq d'àcid quinàldic i DIPCDI (2.5 eq) i HOAt (2.5 eq) com a agents d'acoblament i s'addiciona DIEA (1 eq).

Als dos dies s'observa uns cromatogrames molt complexos i només en la segona mostra es detecta la presència del producte final (Figura 3.47.a). El segon derivat de tiocoralina, [QNA, NMe-Leu⁴] tiocoralina, es purifica en el HPLC analític (Figura 3.44.b) sense obtenir suficient mostra per a determinar la seva activitat biològica.



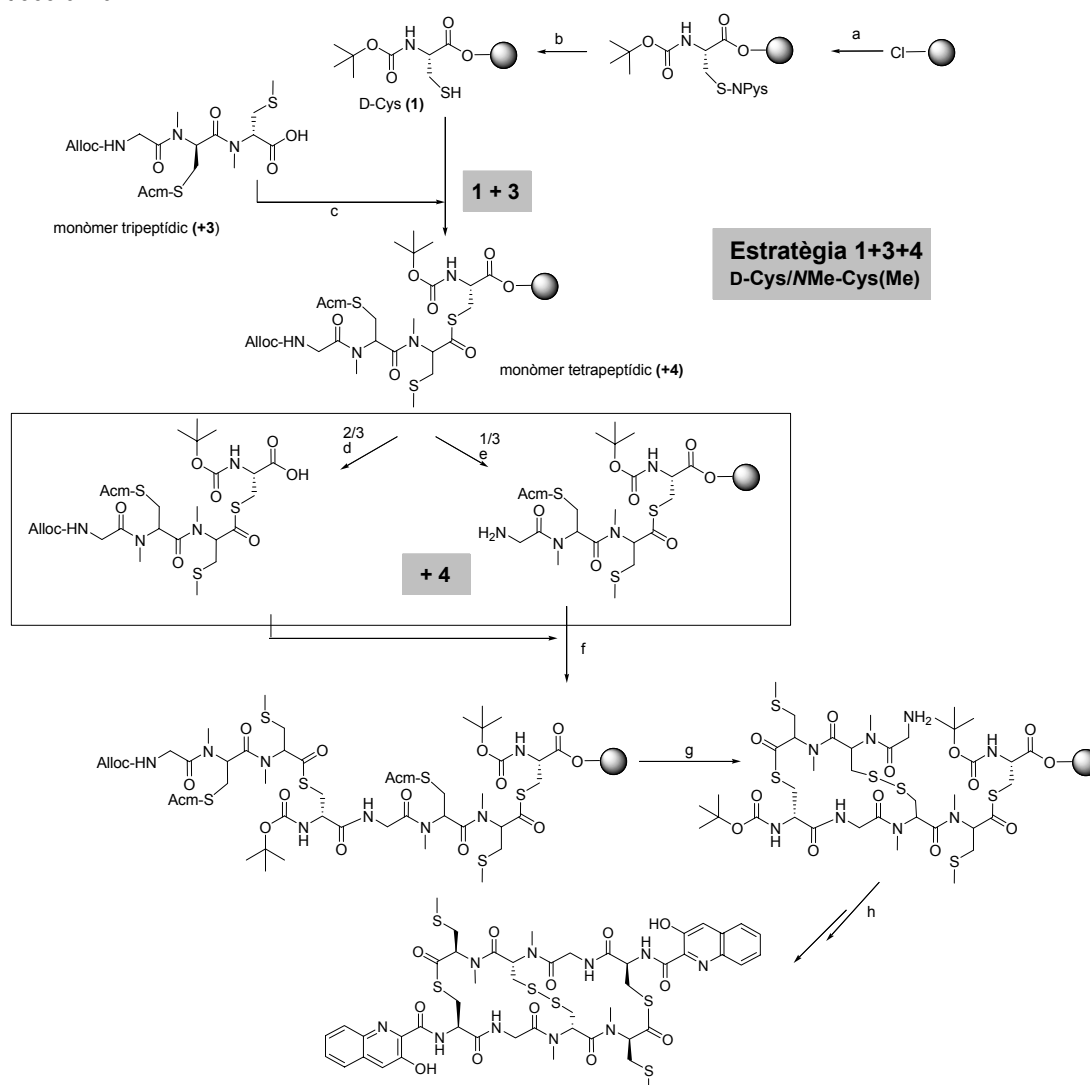
Figura 3.44 Anàlisi per HPLC de a) cru de reacció de la incorporació de l'àcid quinàldic i b) producte purificat en un sistema HPLC analític. Espectre UV i estructura del segon derivat de tiocoralina. Condicions HPLC: gradient de 5:5 a 0:10 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

L'estratègia de síntesi seguint l'aproximació 4+3+1 permet l'obtenció del producte final. I és un bon inici per a l'optimització d'un mètode sintètic que possibiliti l'obtenció d'anàlegs de tiocoralina sintetitzats totalment en fase sòlida i que mantenen els enllaços tioèster i els elements estructurals del pèptid natural. La síntesi, però, cal optimitzar-la perquè tot i que evoluciona correctament fins a la formació del pont disulfur en fase sòlida, les etapes realitzades en solució no han donat bons resultats.

A més a més, els resultats obtinguts en la síntesi del monòmer tripeptídic del segon derivat de la tiocoralina Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Leu-OH (90 % rendiment i 93 % puresa) (+3) plantegen la possibilitat d'explorar una nova estratègia: l'estratègia 1+3+4. Aquesta estratègia consistiria en adaptar la síntesi de la tiocoralina en solució descrita per Boger i col.¹⁶³ a l'ús del suport polimèric.

3.3.4 ESTRATÈGIA 1+3+4, NOVA ESTRATÈGIA COMBINADA PER A LA SÍNTESI DE LA TIOCORALINA INICIADA EN *D*-CYS/ *N*ME-CYS(ME)

Tal i com s'ha comentat, l'estratègia 1+3+4 està basada en la síntesi descrita per Boger i col.¹⁶³ L'estratègia es detalla en el següent esquema (Esquema 3.12). Aquesta estratègia es basa en l'ús de la resina CTC-PS com a suport polimèric, en la incorporació de la *D*-Cys a la resina amb el grup tiol lliure (**1**), en la síntesi del monòmer tripeptídic Alloc-Gly-*N*Me-Cys(Acm)-*N*Me-Cys(Me)-OH i acoblament sobre la *D*-Cys (**+3**), divisió de la resina (1/3 i 2/3) i un acoblament 4+4 formant un enllaç peptídic favorable. Posteriorment, la formació del pont disulfur i la segona ciclació del pèptid conduiran a l'obtenció de la tiocoralina.



Esquema 3.12 Estratègia 1+3+4 per a la síntesi de la tiocoralina iniciada en *D*-Cys/*N*Me-Cys(Me).

a) Boc-*D*-Cys(Npys), DIEA, DCM; b) Bu₃P en DMF-H₂O; c) DIPCDI/HOBt, DMF; d) TFA-DCM (1:99), e) [Pd(PPh₃)₄], PhSiH₃, DCM; f) PyOAP, DIEA, DMF; g) iode en DMF; h) obtenció de la tiocoralina

En l'estratègia 1+3+4 s'ha buscat que la formació de l'enllaç tioèster es doni en la darrera etapa de síntesi del monòmer tetrapeptídic (**+4**) i que l'acoblament 4+4 es doni pel mateix punt que el realitzat en solució. Aquesta estratègia però, està associada a un elevat cost sintètic per cada una de les *N*-metil cisteïnes.

Es realitzarà la prova de síntesi emprant la *N*Me-Leu en substitució de l'aminoàcid original *N*Me-Cys(Me) i realitzant la *N*-metilació en fase sòlida segons Miller i Scanlan de l'aminoàcid Cys(Acm). Així doncs, per a la prova de síntesi seguint l'estratègia 1+3+4 es partirà del tripèptid Alloc-Gly-*N*Me-Cys(Acm)-*N*Me-Leu-OH, obtingut en la síntesi del segon derivat de tiocoralina.

3.3.4.1.1 Acoblament 1+3: Obtenció del monòmer tetrapeptídic (+4)

Per l'obtenció del monòmer tetrapeptídic s'incorpora el tripèptid Alloc-Gly-*N*Me-Cys(Acm)-*N*Me-Leu-OH en una peptidil-resina que conté l'aminoàcid Boc-D-Cys-CTC-PS obtingut per la incorporació de Boc-D-Cys(Npys)-OH i posterior eliminació del grup Npys. L'acoblament 1+3 es realitza amb un excés de tripèptid de 2 i amb DIPCDI i HOAt com a agents d'acoblament. També s'addiciona DIEA per a neutralitzar les traces d'àcid provinents de l'escissió del tripèptid. Després de 1.5 hores, s'analitza per HPLC-EM l'escissió d'una alíquota de la tetrapeptidil-resina i es comprova que l'acoblament ha finalitzat amb èxit i que s'obté el tetrapèptid {[Alloc-Gly-*N*Me-Cys(Acm)-*N*Me-Leu&][Boc-D-Cys(&)-OH]} amb una puresa del 86 % que conté un 8 % del producte oxidat.

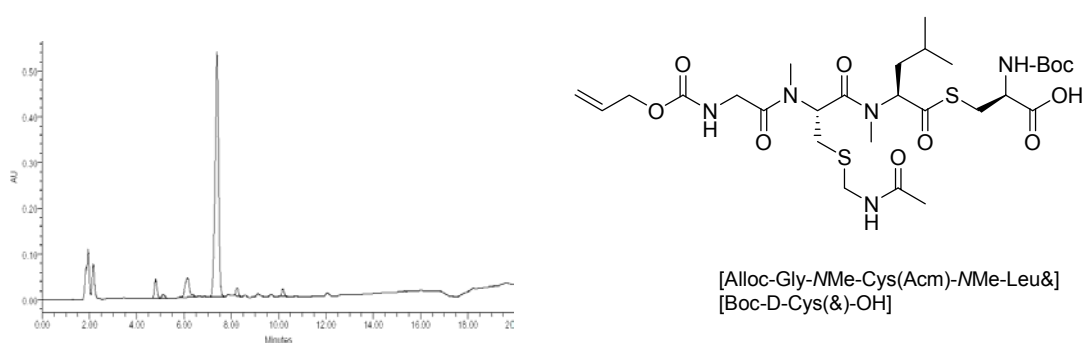


Figura 3.45 Anàlisi per HPLC del tetrapèptid producte de l'acoblament 1+3, {[Alloc-Gly-*N*Me-Cys(Acm)-*N*Me-Leu&][Boc-D-Cys(&)-OH]}. Condicions HPLC: gradient per a) de 8:2 a 0:10 en 15 min i per b) de 7:3 a 0:10 (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

3.3.4.1.2 Acoblament 4+4

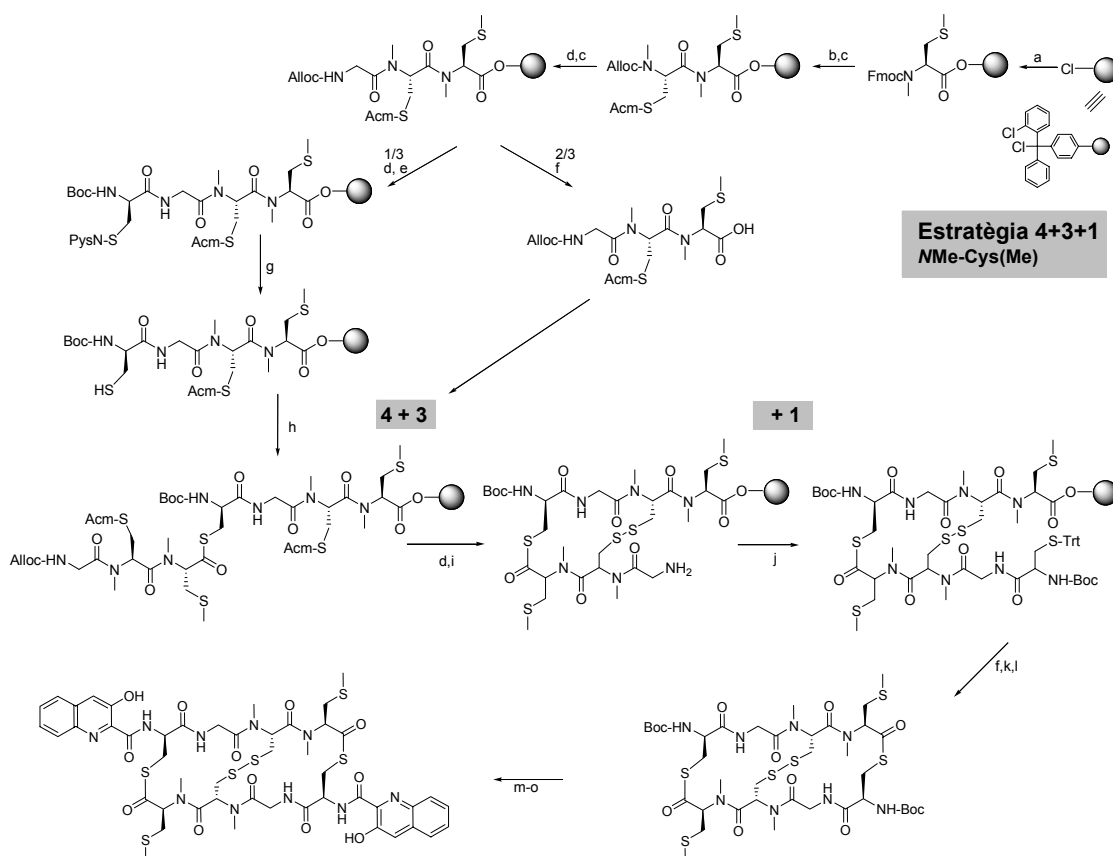
La tetrapeptidil-resina de l'acoblament 1+3 es divideix en dues fraccions (2/3 i 1/3), s'escideix el tetrapèptid de la primera fracció i s'elimina el grup Alloc de la segona. Per realitzar l'acoblament dels dos tetrapèptids es provaran dues condicions d'acoblament diferents: per una banda es farà ús de la sal de fosfoni PyOAP i DIEA com a agents d'acoblament i, per l'altra, es farà ús de la carbodiimida DIPCDI i HOAt. Les primeres condicions ofereixen un acoblament més ràpid però en un medi bàsic, mentre que amb les segones el medi és neutre encara que l'acoblament és més lent. Les anàlisis per HPLC-EM de les dues proves d'acoblament després de 16 h de reacció no mostren ni el producte final de vuit residus ni els monòmers tetrapeptídics de partida.

Els resultats no han estat bons i el cost sintètic de l'estratègia 1+3+4 és massa elevat com per apostar per ella, i per tant, es descarta. Altre cop sembla que una baixa estabilitat de la cadena peptídica seria la responsable dels rendiments tan baixos de l'acoblament de fragments 4+4.

Com que l'estratègia 4+3+1 ha permès l'obtenció de les cadenes peptídiques dels dos derivats de tiocoralina, es tornarà a provar la mateixa estratègia emprant, ara, la seqüència natural del pèptid natural.

3.3.5 SÍNTESI DE LA TIOCORALINA SEGUINT L'ESTRATÈGIA 4+3+1 INICIADA EN NME-CYS(ME) I EMPRANT QUÍMICA ALLOC I RESINA CTC-PS

L'estratègia de síntesi proposada es detalla en el següent esquema (Esquema 3.13). La síntesi es basa en l'aproximació 4+3+1 ja descrita anteriorment. Els grups protectors queden també definits d'acord amb la síntesi realitzada del segon derivat de tiocoralina, [QNA, NMe-Leu⁴] tiocoralina: GP¹ = Alloc, GP² = Boc, GP³ = Npys, GP⁴ = Trt.



Esquema 3.13 Estratègia de síntesi per a la tiocoralina seguint una aproximació 4+3+1 iniciada en NMe-Cys(Me) sobre la resina CTC-PS, a) Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH, DIEA, DCM; b) pip-DMF (1:4); c) Alloc-AA-OH/HATU/DIEA, DMF; d) $[Pd(PPh_3)_4]$, PhSiH₃, DCM; e) Boc-D-Cys(Npys)-OH/DIPCDI/HOAt, DMF; f) TFA-DCM (1:99), DCM; g) Bu₃P, DMF-H₂O (4:1); h) DIPCDI/HOBT, DMF; i) iode en DMF; j) Boc-D-Cys(Trt)-OH/DIPCDI/HOAt, DMF; k) 2 % TFA, 2 % TES en DCM; l) EDC HCl/HOAt, DCM (1mM); m) TFA-H₂O (95:5); n) 3HQ/EDC HCl/HOAt, DCM; o) purificació del producte final

El primer pas per a l'obtenció de la tiocoralina és la síntesi del monòmer tripeptídic Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH (+3) amb una puresa acceptable. La formació de la DKPs a nivell de resina pot fer baixar el rendiment de la síntesi però, segurament, no intervinrà en la puresa del producte final.

3.3.5.1 Síntesi del tripèptid de la tiocoralina Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH (+3)

La seqüència natural, com s'ha vist fins ara, té una elevada tendència a la formació de la DPK NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me) i aquesta elevada tendència es deu a la conjunció de les dues N-metil cisteïnes, ja que en l'anterior síntesi s'ha pogut treballar amb la dipeptidil-resina H-NMe-Cys(Acm)-NMe-Leu-CTC-PS resina amb rendiments acceptables. Treballs posteriors del grup han demostrat que l'elevada tendència de formar la DPK NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me) es deu a la presència de les dues Cys consecutives, independentment que es trobin en la forma N-metil.

Per evitar la formació de la DKP, es proven dues estratègies: la primera es basa en la introducció de la NMe-Cys(Acm) en la forma de dipèptid, Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH, i la segona estratègia es basa en la síntesi per incorporació seqüencial dels aminoàcids i realitzant les etapes eliminació-acoblament del segon i tercer aminoàcid, respectivament, de forma anàloga al realitzat en el cas de l'oxatiocoralina.

3.3.5.1.1 Síntesi del tripèptid de la tiocoralina emprant el dipèptid Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH

Per a aquesta síntesi es necessita disposar prèviament del dipèptid Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH (Figura 3.46). I aquest s'obté emprant la fase sòlida com a grup protector de l'extrem C-terminal, i la seva síntesi es descriu al final del capítol (Capítol 3, 3.4.4).

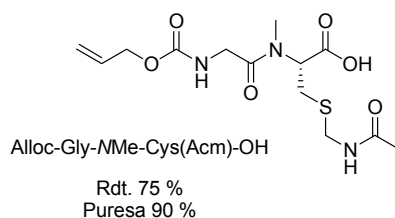


Figura 3.46 Alloc dipèptid emprat per a eliminar la formació de DKP

Per a l'obtenció del tripèptid de la tiocoralina Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH (**+3**), s'inicia la síntesi amb 90 mg de resina CTC-PS. La primera N-metil Cys s'introdueix en la forma protegida Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH (funcionalització inicial de 0.66 mmol/g resina) i el dipèptid s'acobla fent servir la sal de fosfoni PyOAP i DIEA, i la reacció es completa després de 16 hores de reacció. Una anàlisi per HPLC-EM de la tripeptidil-resina revela la presència del tripèptid desitjat en un 54 %, amb un alt contingut de racemització i producte oxidat. En l'anàlisi de l'espectre per EM també s'observa la presència del producte de substitució del residu de 3-(1-piperidinil)alanina en la posició de la NMe-Cys(Me). El residu de NMe-Cys(Me) seria més susceptible de donar la reacció secundària que el de residu de NMe-Cys(Acm) quan aquests estan en C-terminal i protegits per el grup Fmoc.

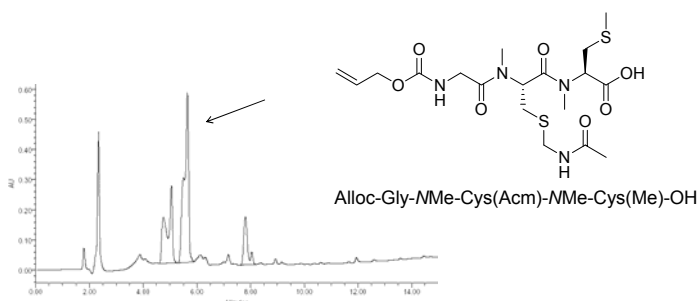


Figura 3.47 Anàlisi per HPLC del monòmer de tiocoralina obtingut per acoblament del dipèptid Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH. Condicions HPLC: gradient de 10:0 a 0:10 en 15 min (H₂O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

L'acoblament del dipèptid sobre un *N*-metil aminoàcid és difícil i l'elevat grau de racemització de la Cys en l'extrem C-terminal fa inviable aquesta aproximació.

3.3.5.1.2 Síntesi del tripèptid de la tiocoralina amb eliminació-acoblament optimitzat

La síntesi del tripèptid de la tiocoralina s'inicia amb 150 mg de resina CTC-PS i els tres aminoàcids s'incorporen amb el grup protector temporal Alloc. Després de la incorporació del segon aminoàcid, Alloc-NMe-Cys(Acm)-OH, es fan dos tractaments curts (10 min) amb el complex de pal·ladi $[Pd(PPh_3)_4]$ i $PhSiH_3$, i seguidament, s'addiciona el tercer aminoàcid Alloc-Gly-OH (5 eq) amb HATU (5 eq) i un defecte de DIEA (4.8 eq) per tal de tenir un acoblament molt reactiu, però neutre. Una anàlisi per HPLC-EM de l'escissió d'una alíquota de la tripeptidil-resina revela la presència del producte esperat com un producte majoritari (Figura 3.52). També es detecta restes d'agent d'acoblament i una petita impuresa degut a la formació del dímer enllaçat per un pont disulfur intermolecular. L'alt contingut de restes d'agent d'acoblament es deu a la manca de rentats bàsics, propis de l'eliminació del grup Fmoc. Per aquest motiu, es realitzen rentats addicionals de la peptidil-resina amb dissolvents que inflin la resina (DCM), combinats amb dissolvents que la comprimeixin (DMF, MeOH) però no s'aconsegueix eliminar les restes d'agent d'acoblament. Aquestes, no permeten conèixer el rendiment de la síntesi del tripèptid Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH.

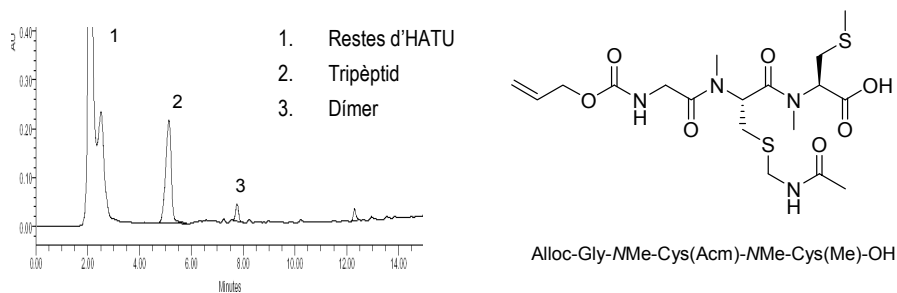
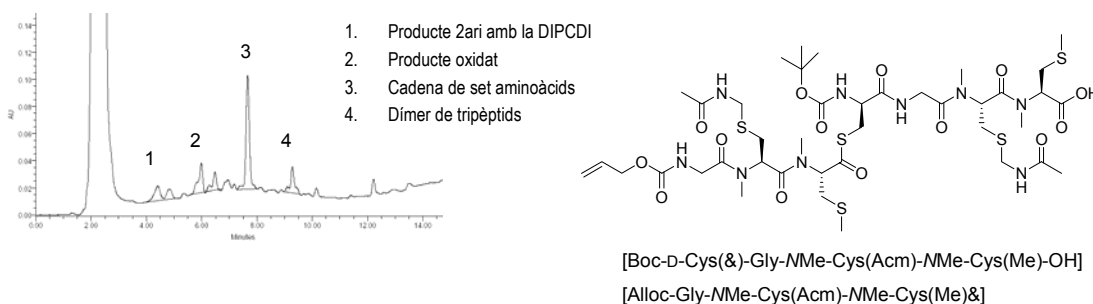


Figura 3.48 Anàlisi per HPLC del tripèptid Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH. Condicions HPLC: gradient de 8:2 a 0:10 en 15 min (H_2O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

Tot i la presència de les restes de l'agent d'acoblament, es continua endavant amb la síntesi de la tiocoralina perquè la formació del tripèptid s'ha donat de forma satisfactòria i les restes d'agent d'acoblament poden no interferir en les següents etapes de síntesi.

3.3.5.2 Acoblament de fragments 4+3. Obtenció de la cadena peptídica lineal de 7 residus.

Es parteix de la tripeptidil-resina que conté el tripèptid de la tiocoralina i es divideix en dues fraccions (2/3 i 1/3). La fracció 1/3 es tracta amb $[Pd(PPh_3)_4]$ i $PhSiH_3$ i a continuació s'incorpora el Boc-D-Cys(Npys)-OH amb DIPCDI i HOAt com a agents d'acoblament. El grup Npys s'elimina amb tractaments reductors de Bu_3P . L'acoblament del tripèptid Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH es realitza sobre la tetrapeptidil-resina Boc-D-Cys-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH amb DIPCDI i HOAt com a agents d'acoblament i DIEA per ajudar a neutralitzar les traces d'àcid provinents de l'escissió. Després de 3 hores de reacció s'analitza per HPLC-EM l'escissió d'una alíquota de la peptidil-resina i es comprova la presència de la cadena lineal de set residus com a producte majoritari. També s'obté el producte oxidat, el dímer i un nou producte secundari com a resultes de la reacció del tiol lliure amb la carbodiimida.



Esquema 3.14 Anàlisi per HPLC de l'acoblament 4+3 de la tiocoralina. Condicions HPLC: gradient de 8:2 a 0:10 en 15 min (H_2O amb 0.045 % TFA : MeCN amb 0.036 % TFA)

La presència del producte de reacció del tiol lliure amb la carbodiimida s'explica per la presència de base en el medi de reacció que augmenta la reactivitat del grup tiol front al carboni electròfil de la carbodiimida. Per aquest motiu, es realitza una altra prova d'acoblament 4+3, però en absència de base i es comprova com, després de 1.5 h, la peptidil-resina no evoluciona. Seguidament s'addiciona 1 eq de DIEA i després de 1.5 h tampoc s'observa cap evolució. Una anàlisi del sobrenedant de l'acoblament mostra la descomposició del tripèptid. El tripèptid en aquestes condicions seria inestable. Per avaluar l'estat de la peptidil-resina s'addiciona Boc-Leu-OH, DIPCDI i HOAt i, després de 1.5 h, s'observa la formació del pentapèptid corresponent $\{[Boc-D-Cys(&)-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH][Boc-Leu&]\}$. Sembla doncs, que la presència de base és important perquè neutralitza les traces d'àcid que poden inactivar la carbodiimida no permetent la formació de l'èster actiu del tripèptid i que aquest s'incorpori, ràpidament, sobre la peptidil-resina.

Es realitza una tercera prova d'acoblament realitzant una preactivació del tripèptid en presència d'un lleuger excés de HOAt (1.3 eq) respecta la carbodiimida DIPCDI (1 eq). En aquest cas, s'addiciona la DIEA (1 eq) abans de la carbodiimida i, transcorreguts 15 min, s'addiciona el tripèptid activat a la peptidil-resina. Així s'obté el producte d'acilació del grup tiol però en menor proporció.

Tot i no poder millorar la puresa de la cadena peptídica de set aminoàcids, se segueix endavant amb la síntesi de la tiocoralina.

3.3.5.3 Obtenció de la tiocoralina

La formació del pont disulfur, la incorporació del vuitè aminoàcid i l'escissió del pèptid de la resina i la seva desprotecció es realitza de forma anàloga a la síntesi del segon derivat de tiocoralina.

Per a la ciclació també se segueixen les mateixes condicions emprades anteriorment. En aquest cas, l'eliminació dels grups Boc es realitza mitjançant un tractament amb una solució 95 % de TFA en aigua durant una hora i s'intercanvia el contraió tractant el producte amb una solució de HCl (1 N). Per EM es comprova la presència del producte desprotegit. L'heterocicle 3-hidroxiquinàndic es preactiva en presència de DIPCDI i HOAt en DMF i s'addiciona sobre la solució del pèptid desprotegit. Es tria l'ús de l'agent HOAt en substitució del HOSu ja que es prefereix que la incorporació de l'heterocicle sigui més ràpida perquè es desconeix la inestabilitat del grup amino lliure en presència del tioèster en la cadena lateral (intermedi de la reacció de Lligadura Química Nativa). Després de dos dies de reacció s'observa per EM la presència del producte final (Figura 3.53).

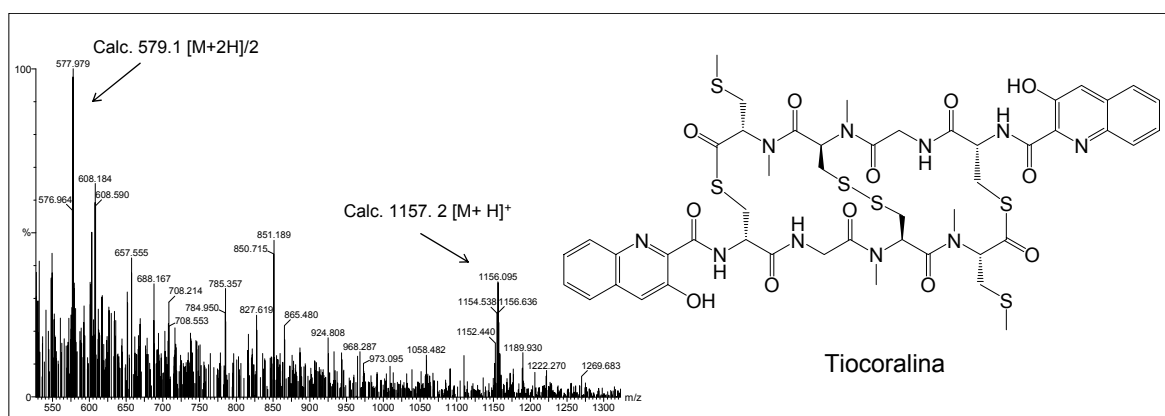


Figura 3.53 Espectre ES(+) del producte obtingut de la síntesi de la tiocoralina seguint l'estratègia 4+3+1

Així, es pot dir, que la cadena peptídica de la tiocoralina es pot obtenir amb una puresa acceptable fins al setè aminoàcid. La formació del pont disulfur sembla disminuir la funcionalització perquè en la incorporació del darrer aminoàcid (amb el grup Trt com a bon grup cromòfor) no s'obté un producte majoritari. Altre cop, sembla que el producte en solució no sigui estable i és difícil arribar al producte final. Caldria optimitzar les darreres etapes de síntesi. L'estratègia, però, es perfila com una via per obtenir la tiocoralina en fase sòlida.

3.3.6 EL FUTUR DE LA TIOCORALINA COM A FÀRMAC ANTITUMORAL

En el transcurs del desenvolupament de la síntesi en fase sòlida de la tiocoralina, l'empresa Pharma Mar S.A. ha avançat en l'estudi de la biosíntesi del pèptid natural i en els mètodes de fermentació del microorganisme que es capaç de produir la tiocoralina en major quantitat.

Així doncs, el treball químic en aquest projecte s'està redireccionant cap a la realització de modificacions químiques del producte natural que permetin la formulació dissenyada per a l'administració del fàrmac. I des del punt de vista sintètic, s'està plantejant d'optimitzar la síntesi de la tiocoralina en fase sòlida a través de l'estratègia 4+3+1 o a partir d'una nova aproximació, on la dimerització es realitzaria a través del pont disulfur, de forma anàloga a l'estratègia que està donant bons resultats en la síntesi de l'oxatiocoralina. L'obtenció de la tiocoralina en fase sòlida permetrà la consolidació dels coneixements de síntesi de depsi(tio)pèptids en fase sòlida i obre la porta cap a l'obtenció d'anàlegs de tiocoralina que puguin ser necessaris en el transcurs del projecte de la tiocoralina com a nou fàrmac antitumoral.

3.4 AMINOÀCIDS CONVENIENTMENT PROTEGITS I NOVES EINES DE SÍNTESI EN FASE SÒLIDA

El desenvolupament de la síntesi de la tiocoralina està lligada a un esforç sintètic per a obtenir els aminoàcids protegits segons les exigències de les estratègies de síntesi que es van plantejant durant el procés. La síntesi dels aminoàcids es realitza, generalment, en solució i sempre són el coll d'ampolla en la síntesi de pèptids naturals. L'alt contingut d'aminoàcids no comercials que presenta la tiocoralina i els anàlegs plantejats, així com les diferents estratègies dissenyades, demana de mètodes robusts que permetin optimitzar el temps i els rendiments de les síntesis en solució. En aquest cas, l'esforç sintètic es concentra en l'obtenció de:

- 1) Protecció convenient dels aminoàcids (grup α -amino d'aminoàcids i *N*-metil aminoàcids, grup hidroxil de la serina i grup tiol de la cisteïna)
- 2) Obtenció d'aminoàcids i dipèptids especials, com Fmoc-Gly-F i els dipèptids Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH i Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH
- 3) Estudi de modificacions en el protocol general de síntesi de pèptids en fase sòlida per adaptar-lo a les necessitats de l'oxatiocoralina i la tiocoralina.

A continuació es passarà a comentar els resultats obtinguts en cada un dels aspectes anteriorment esmentats.

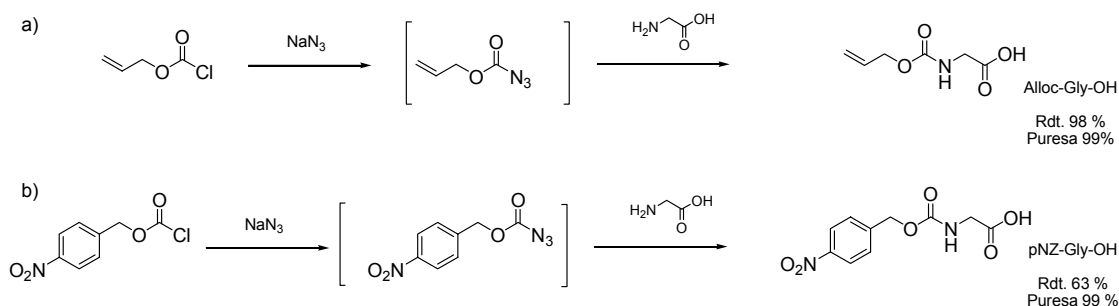
3.4.1 PROTECCIÓ DEL GRUP α -AMINO D'AMINOÀCIDS

3.4.1.1 Protecció d'amines primàries. El mètode de l'azida

En el capítol dedicat al desenvolupament de la síntesi de la sirengotoxina s'ha descrit l'obtenció del pèptid protegit Alloc-Ser-OH. En aquest cas la síntesi es basa en una protecció temporal prèvia del grup àcid i del grup alcohol per evitar la formació de dipèptids al reaccionar amb l'agent Alloc-Cl. En els darrers anys s'ha consolidat el mètode de l'azida com alternativa a la protecció d'aminoàcids.¹⁷⁷ El mètode es basa en la modificació de l'agent Alloc-Cl per l'espècie menys reactiva Alloc-N₃.

¹⁷⁷ Cruz, L. J.; Beteta, N. G.; Ewenson, A.; Albericio, F., "One-Pot" preparation of *N*-carbamate protected amino acids via the Azide, *Org. Proc. Res. Dev.*, **2004**, 8, 920-924.

La nova espècie és capaç de reaccionar amb amines primàries i poc impedides, i impossibilita la formació de dipèptids. En aquest cas, la reacció és més lenta però el producte final s'obté amb pureses elevades (80-99 %) mitjançant rentats de la fase aquosa bàsica i extraccions a la fase orgànica prèvia acidificació de la fase aquosa. El mètode s'ha provat per a la protecció d'aminoàcids amb el grup Fmoc, Alloc i *p*NZ i ha donat molt bons resultats amb tots els aminoàcids proteïnogènics provats, tant a petita com a gran escala. D'acord amb els requeriments de les estratègies de síntesi plantejades, es realitza la síntesi dels aminoàcids Alloc-Gly-OH (Esquema 3.15.a) i *p*NZ-Gly-OH (Figura 3.54.b) seguint el procediment de l'azida. Pel primer cas, s'inicia la síntesi amb 950 mg de H-Gly-OH i s'obtenen 1.98 g d'aminoàcid protegit Alloc-Gly-OH amb una puresa del 99 % i amb un rendiment del 98 %. Per a obtenir l'aminoàcid *p*NZ-Gly-OH s'inicia la síntesi amb 730 mg de l'aminoàcid lliure H-Gly-OH, i s'obtenen 1.57 g d'aminoàcid protegit *p*NZ-Gly-OH, com un sòlid blanc amb una puresa del 99 %, després de cristal·litzar el producte, i amb un rendiment del 63 %.

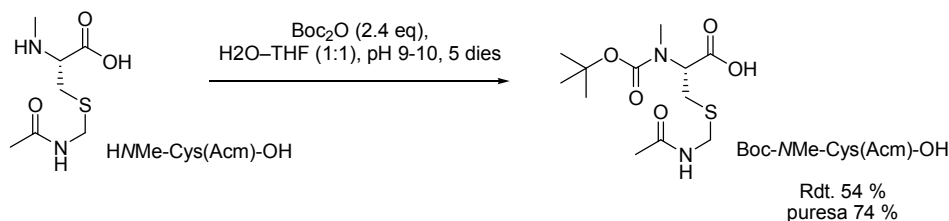


Esquema 3.15 Protecció del grup amino primari amb el grup Alloc seguint el mètode de l'azida¹⁷⁷

3.4.1.2 Protecció d'amines secundàries, *N*Me-Aminoàcids

3.4.1.2.1 Protecció amb el grup Boc: Boc-*N*Me-Cys(Acm)-OH

La protecció amb el grup Boc es realitza únicament a l'aminoàcid H-*N*Me-Cys(Acm)-OH (3.3 g), obtingut a partir de la reducció de la tiazolidina (Capítol 2, 2.5.1.3) i posterior protecció del grup tiol (Capítol 2, 2.5.2). S'empra l'anhidrid de Boc (Boc₂O, 2.4 eq) en una dissolució H₂O-THF (1:2) basificada fins a pH = 9-10 amb una solució aquosa de NaOH (50 %). Després de cinc dies, el producte s'obté amb una puresa del 74 % i un rendiment del 54 % (Esquema 3.16).



Esquema 3.16. Boc-NMe-Cys(Acm)-OH obtingut per a la síntesi de la tiocoralina

3.4.1.2.2 Protecció amb el grup Alloc, pNZ

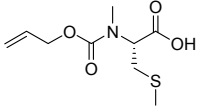
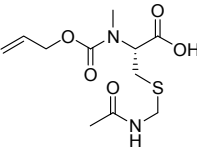
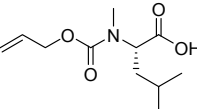
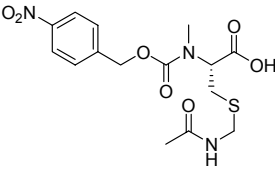
Per a la protecció de *N*-metil aminoàcids la protecció prèvia amb el grup temporal TMS i el mètode de l'azida no són vàlids. En el primer cas, el grup metil impossibilita que l'amina reaccioni amb el reactiu Alloc-Cl i, en el segon cas, el grup *N*-metil no pot reaccionar amb el reactiu desactivat Alloc-N₃. L'impediment estèric que ofereix el grup metil dificulta també la formació del dipèptid com a producte secundari.

Es proven dues condicions de protecció amb el grup Alloc per a l'aminoàcid HMe-Cys(Me)-OH:

1. DCM, DIEA, 3 dies. Es parteix de 500 mg d'aminoàcid lliure i s'obté l'aminoàcid amb un rendiment del 8.0 %.
2. H₂O (2 % Na₂CO₃)-dioxà (1:1), 3 dies. Es parteix d'un gram de d'aminoàcid lliure i s'obté l'aminoàcid amb un rendiment del 26 %. Quan es parteix de més quantitat (6.30 g) el rendiment baixa fins a 8.8 %

Els rendiments tan baixos són equivalents als obtinguts en les síntesis dels Fmoc-NMe-Cys(X)-OH (siguent X = Me, Acm). La dificultat en l'extracció de l'aminoàcid HMe-Cys-OH i la purificació per columna de l'aminoàcid amb el grup àcid lliure poden explicar aquests resultats.

S'aplica el segon procediment per a la protecció dels *N*-metil aminoàcids necessaris per a dur a terme les síntesis de la tiocoralina i anàlegs plantejades en aquest capítol. Els resultats es troben resumits en la següent Taula 3.6:

Grup protector	Aminoàcid		Rendiment, pureza
	Nom	Estructura	
Alloc	Alloc-NMe-Cys(Me)-OH		8.8 %, 98 %
	Alloc-NMe-Cys(Acm)-OH		66 %, 80 %
	Alloc-NMe-Leu-OH		95 %, 98 %
pNZ	pNZ-NMe-Cys(Acm)-OH*		77 %, 93 %

* L'aminoàcid pNZ-NMe-Cys(Acm)-OH s'obté de l'aminoàcid Boc-NMe-Cys(Acm)-OH prèvia eliminació del grup Boc amb una solució HCl-1,4 dioxà (4 M).

Taula 3. 6 Resultats en la protecció dels N-metil aminoàcids

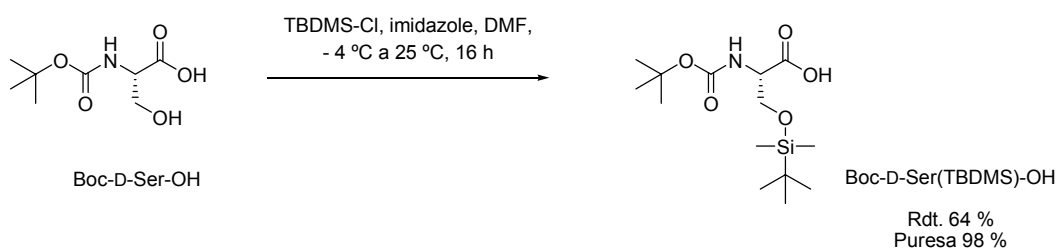
3.4.2 PROTECCIÓ DE LA D-SERINA: BOC-D-SER(TBDMS)-OH

La síntesi de l'oxatiocoralina necessita d'una D-Ser que tingui el grup hidroxil protegit amb un grup protector ortogonal al grup protector Boc i que s'elimini en condicions d'estabilitat per la resina CTC-PS. Es planteja l'ús del grup *tert*-butildimetilsilil (TBDMS). Des de la seva introducció al 1972,¹⁷⁸ ha estat el grup protector basat en silici més emprat en la protecció d'alcohols. El grup TBDMS és estable a les condicions cromatogràfiques emprades (H₂O amb un 0.045 % de TFA i MeCN amb un 0.036 % TFA) i a 0 °C front bases fortes no pròtiques. També és relativament estable front bases febles, però làbils front condicions àcides suaus. L'elevada afinitat del silici pels fluorurs permet l'eliminació del grup TBDMS selectivament emprant fluorurs en condicions àcides (HF, MeCN) i, especialment emprat, en condicions bàsiques mitjançant el fluorur de tetra-n-butilamoni (TBAF). És interessant validar el grup protector

¹⁷⁸ Corey, E. J.; Venkateswarlu, A., Protection of hydroxyl groups as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 6190-6191.

TBDMS per a la química de pèptids en fase sòlida. El grup hidroxil de la serina no disposa de molts grups protectors específics i sovint és un punt de ramificació en la síntesi de depsipèptids naturals.

A diferència de la protecció del grup tiol de la cisteïna, en el cas de la serina, caldrà protegir prèviament el grup amino abans de la protecció del grup hidroxil. El grup TBDMS s'introdueix a l'aminoàcid Boc-D-Ser-OH mitjançant el clorur de *tert*-butildimetilsilil en presència d'un activador bàsic com l'imidazole o el DMAP.¹⁷⁹ El producte s'obté amb un 64 % de rendiment (Esquema 3.17).



Esquema 3.17 Síntesi de l'aminoàcid Boc-D-Ser(TBDMS)-OH

3.4.3 PROTECCIÓ DE LA D-CISTEÏNA

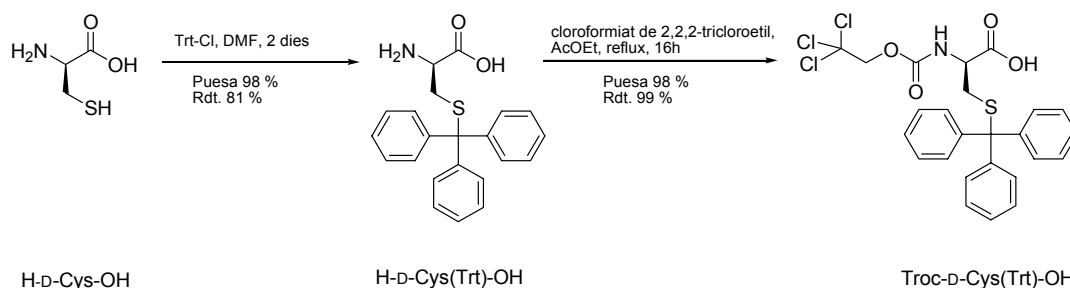
La tiocoralina conté dos enllaços tioèster que es formen amb el grup tiol de la D-Cys. En l'elongació de la cadena peptídica és necessari introduir la D-Cys amb el grup tiol protegit adequadament. En el nostre cas estem interessats en la síntesi de Troc-D-Cys(Trt)-OH i Boc-D-Cys(S^tBu)-OH. La síntesi del primer aminoàcid es realitzarà en solució, però també s'obtindrà en el suport polimèric a partir de la Fmoc-D-Cys(Trt)-OH.

Per a la síntesi de derivats de la cisteïna es parteix, generalment, de la cisteïna lliure, es protegeix primer el grup tiol i després s'introdueix el grup protector del grup α -amino.

¹⁷⁹ Chaudhary, S. C.; Hernández, O., 4-Dimethylaminopyridine: an efficient and selective catalyst for the silylation of alcohols, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 2, 99-102.

3.4.3.1.1 Obtenció de Troc-D-Cys(Trt)-OH en solució

La protecció del grup tiol de la cisteïna amb el grup Trt es realitza per reacció de la cisteïna lliure i el compost Trt-Cl en DMF durant 2 dies.¹⁸⁰ S'inicia la síntesi amb 3.0 g de H-D-Cys-OH i s'obtenen 5.5 g de H-D-Cys(Trt)-OH (rendiment 81 %, puresa 99 %). Kruse i col. van descriure la protecció d'amines d'aminoàcids amb cadenes laterals voluminoses mitjançant l'addició del cloroformat corresponent i reacció amb AcOEt a reflux durant 16 h.¹⁸¹ Així es proven les condicions descrites per a la H-D-Cys(Trt)-OH (2 g) i s'obté l'aminoàcid Troc-D-Cys(Trt)-OH (2.87 g) amb una puresa del 98 % i un rendiment del 95 % (Esquema 3.18).



Esquema 3.18 Síntesi de l'aminoàcid Troc-D-Cys(Trt)-OH

3.4.3.1.2 Obtenció de Boc-D-Cys(S^tBu)-OH

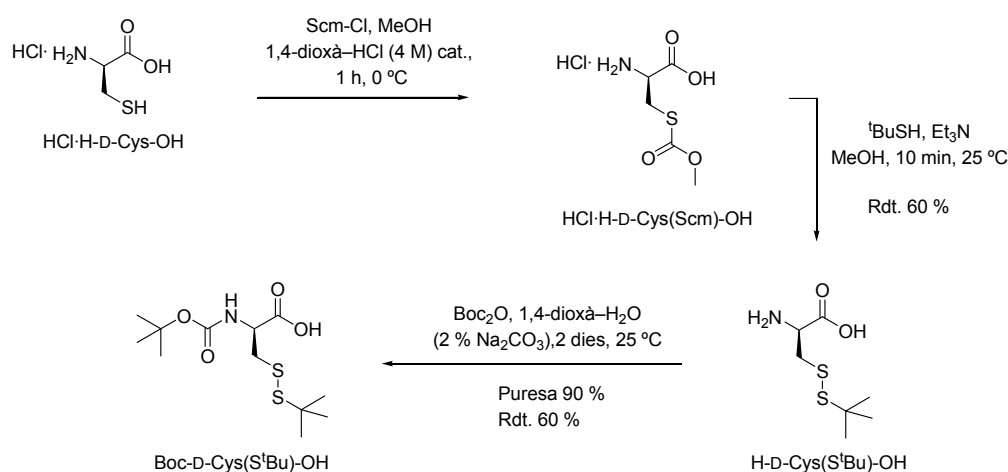
Per a la protecció del grup tiol formant un pont disulfur amb el grup S^tBu s'aplica el procediment experimental descrit per Rietman i col.¹⁸² La protecció amb el grup S^tBu s'estableix en dues etapes; una primera d'activació del grup tiol per reacció de la D-cisteïna lliure amb el clorur de metoxicarbonilsulfenil (Scm-Cl) en MeOH, a 0 °C durant 1 h. És important que el grup amino es trobi sempre protonat per tal d'evitar la seva reactivitat front el grup Scm-Cl. Es substitueix un bombogeig de la solució amb HCl gas per l'addició d'un 5 % del volum de solvent d'una solució d'HCl:1,4-dioxà (4 M).

¹⁸⁰ Rudolph, J.; Theis, H.; Hanke, R.; Endermann, R.; Johannsen, L.; Geschke, F., seco-cyclothialidines: new concise synthesis, inhibitory activity toward bacterial end human DNA topoisomerases, and antibacterial proprieties, *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 619-626.

¹⁸¹ Kruse, C. H.; Holden, K. G., A convenient method for the preparation of N-blocked amino acids, *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 2792-2794.

¹⁸² Rietman, B. H.; Pèters, R. F. R.; Tesser, G. I., A facile method for the preparation of S-(alkylsulfenyl)cysteines, *Synthetic Communications*, **1994**, *24*, 1323-1332.

L'etapa de formació del pont disulfur es procedeix sense cap etapa de purificació de l'aminoàcid activat. I, és en aquest punt, on es podria fer servir l'aminoàcid activat per a protegir el grup tiol amb un elevat nombre de grups protectors. Com que es necessita la protecció amb el grup S^tBu, s'addiciona el corresponent tiol, ^tBuSH. La reacció transcorre en MeOH i amb addició de trietilamina en la solució del tiol. El rendiment de les dues etapes és del 92 %. Per a la protecció del grup amino amb el grup Boc s'aplica la metodologia anteriorment descrita per a la protecció d'amines secundàries. L'aminoàcid H-D-Cys(S^tBu)-OH es fa reaccionar amb l'anhidrid de Boc amb una solució H₂O (2 % Na₂CO₃)-1,4-dioxà (1:1), durant 3 dies. El rendiment de l'etapa de protecció és del 70 % i s'obté el producte amb una puresa del 90 %. En el HPLC-EM s'identifiquen productes secundaris: 2.5 % correspon a Boc-Cis-OH i un 7 % a l'aminoàcid protegit doblement oxidat. La presència del dímer es pot explicar per dues situacions: l'etapa d'activació no és complerta i l'aminoàcid lliure reacciona amb l'aminoàcid activat, o bé, l'etapa de protecció del grup tiol que no és complerta i el tiol activat amb el grup Scm es pot haver hidrolitzat i reaccionat amb un altre grup tiol en el medi bàsic de la reacció de protecció del grup amino.



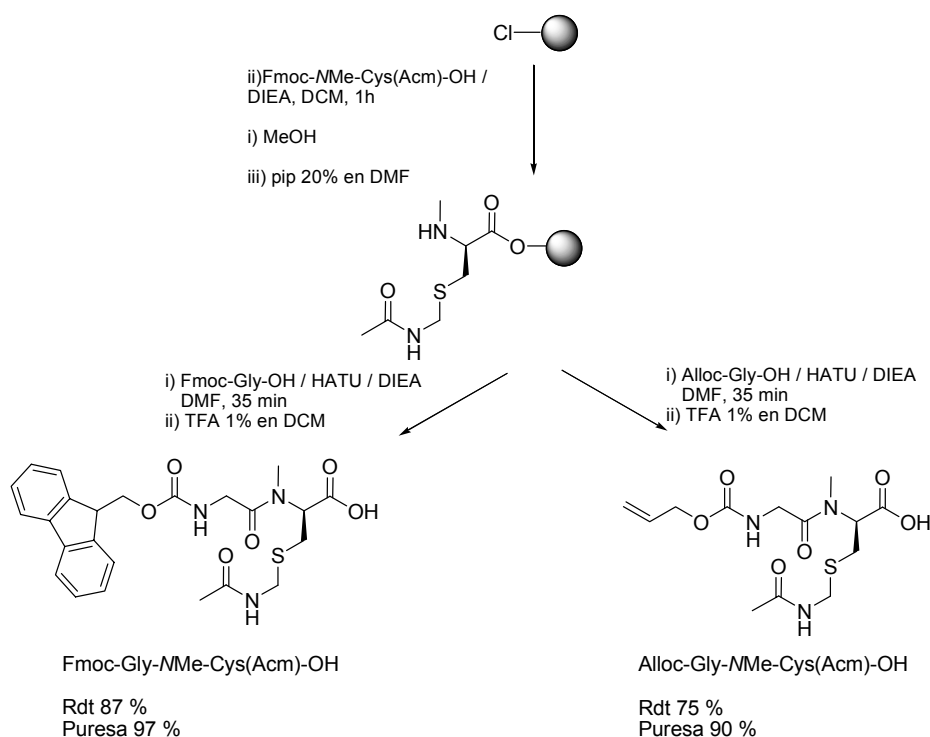
Esquema 3.19 Síntesi de l'aminoàcid Boc-D-Cys(S^tBu)-OH

3.4.4 OBTENCIÓ DELS DIPÈPTIDS Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH I Alloc-NMe-Cys(Acm)-OH

La síntesi de petits sintons ha estat, tradicionalment, lligada a la síntesi en solució, reservant-se el suport polimèric únicament per a les síntesis llargues. En el cas del desenvolupament de la síntesi d'un pèptid natural, disposar de forma ràpida dels sintons necessaris per a valorar una determinada estratègia de síntesi és vital per agilitzar el procés d'exploració d'estratègies. La fase sòlida ajuda a minimitzar el temps de preparació dels nous components per a la nova síntesi. Els treballs realitzats en el nostre grup d'investigació en la regeneració de la resina CTC-PS enforteix el seu ús com a nou grup protector temporal que aprofita els avantatges de la fase sòlida.

La síntesi dels dipèptids Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH i Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH responen al disseny d'estratègies que intenten evitar la formació de DKPs a nivell de l'enllaç èster/tioèster. L'obtenció dels dipèptids a petita escala sobre el suport polimèric permetrà un accés ràpid i poder valorar el seu ús en la síntesi del pèptid. En cas que l'aproximació fos correcta i calgués més quantitat del dipèptid es valoraria una síntesi en solució.

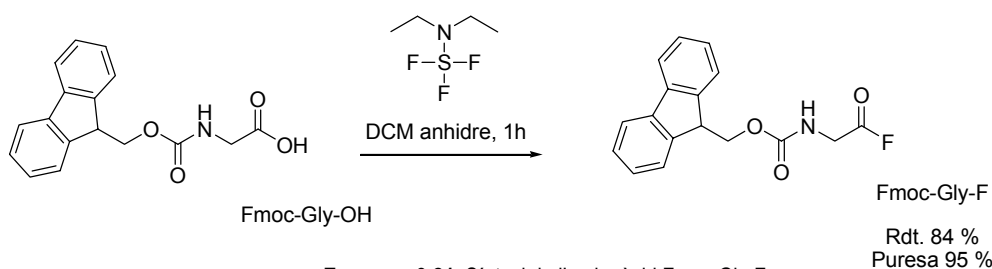
En aquest cas no es pot introduir l'aminoàcid comercial Fmoc-Gly-OH i protegir-lo amb el grup Alloc en fase sòlida perquè el residu de NMe-Cys(Acm) no és estable a la piperidina quan està en la posició C-terminal i N-acilat. L'acoblament es duu a terme amb HATU i DIEA com agents d'acoblament i, després del tractament de la dipeptidil-resina amb una solució 1 % de TFA en DCM (5 x 30 s) i evaporació del dissolvent, s'obtenen els dipèptids a punt per ser incorporats en l'estratègia de síntesi. Per a l'obtenció del primer dipèptid, Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH, s'han emprat 600 mg de resina CTC-PS i 220 mg de Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH. S'han obtingut 218 mg de dipèptid amb una puresa del 97 % que suposa un rendiment de síntesi del 87 %. Per a l'obtenció del segon dipèptid, Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH, s'han emprat 250 mg de resina CTC-PS i 75 mg de Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH, i s'han obtingut 46 mg de dipèptid amb una puresa del 90 % que suposa un rendiment del 75 %.



Esquema 3.20 Esquema i resultats de la síntesi dels dipèptids emprats en la síntesi de l'oxatiocoralina i la tiocoralina

3.4.5 OBTENCIÓ DE L'AMINOÀCID FMOC-GLY-F

L'activació de l'aminoàcid Fmoc-Gly-OH com a fluorur d'àcid serveix per a realitzar un acoblament TANDEM amb una peptidil-resina protegida el grup *N*-terminal amb el grup Alloc. També s'ha descrit els fluorurs d'àcid com espècies estables i especialment reactives per a la síntesi de pèptids tan en solució com sobre suport polimèric. El fluorurs d'àcid són solubles es la majoria de solvents orgànics i s'ha demostrat la seva efectivitat en absència d'amines terciàries i amb acoblaments entre aminoàcids amb un important impediment estèric. Kaduk i col. descriuen l'ús del reactiu triflorur de (dietilamino)sulfur (DAST) en l'obtenció de fluorurs d'aminoàcid.¹⁸³ La reacció és ràpida i el producte s'obté amb una elevada puresa. Finalitzada la reacció, uns rentats amb aigua-gel eliminen les restes de DAST i preserven la integritat del fluorur d'àcid. La reacció se segueix per IR (C=O st a ν 1843 cm^{-1}) i la puresa del producte final es determina per reacció d'una alíquota del producte en una solució 5 % de piridina en MeOH anhidre i comparant les àrees de l'aminoàcid lliure i l'aminoàcid metil èster. S'obté una conversió del 95 % de l'aminoàcid si s'augmenta la quantitat de DAST de 1.2 a 1.5 eq i el temps de reacció de 30 min a 1 h. El producte s'obté com un sòlid blanc.



Esquema 3.21 Síntesi de l'aminoàcid Fmoc-Gly-F

3.4.6 OPTIMITZACIÓ DE LA INCORPORACIÓ DE LA BOC-D-SER-OH COM A PRIMER AMINOÀCID A LA RESINA CTC-PS.

La incorporació del primer aminoàcid en la resina CTC-PS es realitza mitjançant l'addició de l'aminoàcid en defecte (0.7 eq per aconseguir una funcionalització final de 0.5 mmol/g resina) i un excés de 10 eq de DIEA. En aquestes condicions, és probable que la Boc-D-Ser-OH s'incorpori a la resina i que una proporció reaccioni també pel grup hidroxil de la cadena lateral. Es pensa en realitzar una disminució prèvia de la funcionalització amb MeOH i DIEA, i després una addició en excés de la Boc-D-Ser-OH de forma que només s'incorpori a través del grup àcid.

¹⁸³ Kaduk, C.; Wenshuh, H.; Beyermann, M.; Forner, K.; Carpino, L. A.; Bienert, M., Synthesis of Fmoc-amino acid fluorides via DAST, an alternative fluorating agent, *Lett. Pep. Sci.*, **1995**, 2, 285-288.

Es realitzen quatre assaigs, resumits a la Taula 3.7, per tal d'avaluar l'efecte de la incorporació de la Boc-D-Ser-OH seguint el procediment habitual (Prova A) i comparar-lo amb la incorporació de l'aminoàcid prèvia reducció de la funcionalització (Proves B-D). Així, es sintetitza el dipèptid {[Fmoc-Ser(&)-OH][Boc-Leu&]} seguint dos procediments diferents d'incorporació del primer aminoàcid: Prova A addició del primer aminoàcid en defecte i Proves B-D reducció prèvia de la funcionalització amb quantitats variables de MeOH (de 0.8 a 1.2 mmol MeOH/g resina) i addició de l'aminoàcid en excés. L'escissió de la resina i anàlisi per HPLC ens revelarà la presència de Fmoc-Ser-OH resultant d'una doble incorporació (àcid carboxílic i grup hidroxil) a la resina i, per tant, que no ha pogut reaccionar amb la Boc-Leu-OH. L'ús del grup Fmoc permet seguir per HPLC la síntesi. La quantificació del grup Fmoc permet conèixer el grau d'incorporació del primer residu.

Per realitzar els experiments es prenen 50 mg de resina CTC-PS per cada prova i, després de realitzar els tractaments habituals d'acondicionament, es procedeix al tractament de MeOH i DIEA en DCM en la proporció indicada per cada prova. La reacció es deixa 30 min a temperatura ambient. A continuació es filtra i s'addiciona en la prova A un defecte de Fmoc-Ser-OH (0.7 mmol/g resina) i DIEA (7 mmol/g resina) i en les proves B-D un excés de Fmoc-Ser-OH (2 mmol/g resina) i DIEA (20 mmol/g resina). Es deixa l'acoblament durant 1 h i a continuació s'addiciona MeOH i DIEA en excés per inactivar els centres reactius sobrants. L'acoblament de Boc-Leu-OH es realitza de forma paral·lela en les quatre proves amb DIPCDI i DMAP (cat.) com a agents d'acoblament (5 eq, 3 x 45 min). La formació de l'enllaç èster se segueix pel test colorimètric qualitatiu de grups hidroxils en fase sòlida.

Prova	Quantitat MeOH (mmol/ g resina)	% subproducte Fmoc-Ser-OH	Funcionalització (mmol/ g resina)
A	-	8,7	0,48
B	0.8	2,9	0,71
C	1.0	3,0	0,58
D	1.2	2,6	0,53

Taula 3.7 Resultats de l'optimització de la introducció del primer aminoàcid sobre la resina CTC-PS inactivant prèviament els centres reactius

Els resultats de la taula indiquen:

- 1-. La introducció normal de l'aminoàcid Fmoc-Ser-OH comporta la presència de l'aminoàcid lliure al finalitzar la síntesi (8.7 %).
- 2-. Tractaments amb quantitats de MeOH (0.8-1.2 mmol/g resina) comporten una disminució de l'aminoàcid Fmoc-Ser-OH al finalitzar la síntesi (2.6-3.0 %). La proporció d'aminoàcid lliure no és proporcional a la quantitat de MeOH emprada.
- 3-. Quantitats creixents de MeOH en el tractament previ de la resina impliquen una disminució de la funcionalització.

Per tant, el mètode convencional d'introducció del primer aminoàcid no seria vàlid per el cas de la Fmoc-Ser-OH. I el mètode de inactivació prèvia dels centres reactius tampoc és adequat perquè els punts 2 i 3 indiquen que el MeOH pot estar inactivant les posicions més reactives de la resina i això dificulta tant la introducció posterior del primer aminoàcid com la formació del següent enllaç èster.

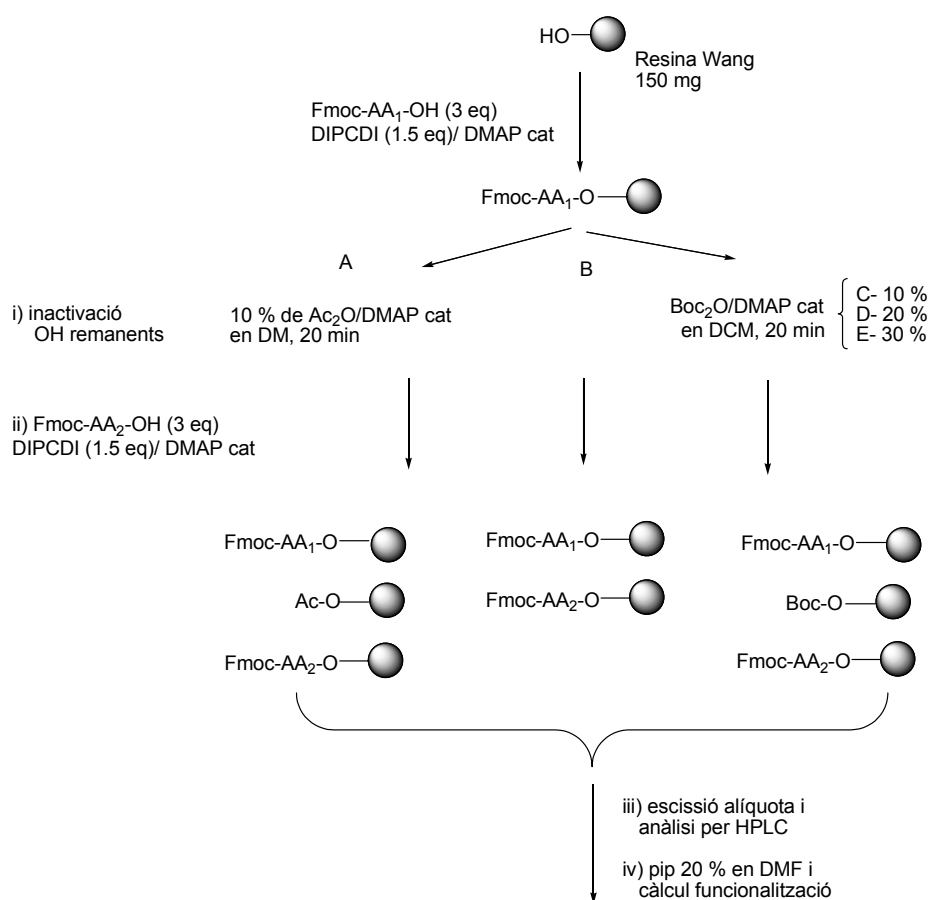
La introducció de la Ser amb el grup hidroxil protegit amb un grup protector convenient, com el TBDMS es perfila com l'opció més vàlida.

3.4.7 QUÍMICA DE FRAGMENTES SOBRE LA RESINA WANG

El suport polimèric més emprat en la síntesi de fragments o de pèptids cíclics és la resina CTC-PS. Ara, es planteja l'ús de la resina Wang per a la síntesi de fragments. En el nostre cas, es necessita de dos grups protectors ortogonals a l'enllaç pèptid-resina Wang que són el grup Alloc i el grup p NZ. La incorporació del primer aminoàcid sobre la resina Wang es realitza mitjançant un excés del primer aminoàcid respecte la resina perquè la funcionalització inicial (0.8 mmol/g resina) és correcte per a la síntesi de pèptids i, per tant, se suposa que els centres actius remanents són mínims i no són molt accessibles. A més, l'enllaç que es forma amb el primer aminoàcid és de tipus èster. Els reactius emprats per als següents acoblaments no haurien de possibilitar la incorporació dels aminoàcids sobre els centres actius remanents. En la síntesi de depsipèptids, com és el cas de l'oxatiocoralina, la formació d'un altre enllaç èster a la cadena peptídica i la presència de centres reactius en la resina poden interferir en la síntesi. En general, després de la incorporació del primer aminoàcid es realitza un tractament amb $Ac_2O/DIEA$ o $AcOH/DPCDI$ o Ac_2O i DMAP (cat.) per tal d'inactivar aquests centres actius remanents i assegurar-se que no intervenen al llarg de la síntesi. L'àcid acètic alliberat en l'escissió del pèptid de la resina pot interferir greument si es vol utilitzar el pèptid obtingut per acoblar-lo sobre una peptidil-resina desprotegida o es vol fer la ciclació del pèptid.

Per tal d'evitar l'ús de l'anhídrid d'àcid acètic es planteja avaluar la influència de la presència dels centres reactius i remanents i l'ús d'una alternativa en l'etapa d'inactivació dels centres reactius. Es proposa l'ús de l'anhídrid de Boc mitjançant un tractament de Boc_2O i DMAP (cat.). En aquest cas, l'etapa d'escissió alliberarà el pèptid i ${}^t\text{BuOH}$ que és inocuo i de fàcil eliminació en el procés d'evaporació.

El disseny de l'experiment es troba esquematitzat en l'Esquema 3.22:



Esquema 3.22 Disseny de l'experiment per avaluar l'etapa d'inactivació dels centres reactius de la resina Wang

L'anàlisi per HPLC de Fmoc-AA₂-OH després de la seva incorporació ens indicarà el % de centres que han quedat reactius després de la incorporació del primer aminoàcid i del tractament amb A) 10 % Ac_2O /DMAP (cat.), B) absència de tractament o tractament amb Boc_2O /DMAP (cat.), C) 10 %, D) 20 % i E) 30 %. Els resultats obtinguts són els següents:

Prova	A	B	C	D	E
Tractament amb DMAP	10 % Ac ₂ O		10 % Boc ₂ O	20 % Boc ₂ O	30 % Boc ₂ O
% AA ₁ *	99	66	85	98	98
% AA ₂ **	1	34	15	-	-

* Fmoc-Met-OH en A, B i C i Fmoc-Leu-OH en C i D. ** Fmoc-Ala-OH

Taula 3.8 Resultats de la inactivació dels centres reactius remanents de la resina Wang amb Boc₂O i DMAP (cat.) en DCM

Els resultats de la taula indiquen que el tractament de la resina Wang amb Boc₂O i DMAP (cat.) és un bon mètode per a la inactivació dels centres reactius remanents després de la incorporació del primer aminoàcid.

A partir del treball d'exploració de la resina CTC i de la reactivitat del grup tiol, s'ha publicat un article on es descriu l'ús de la resina CTC-PS com a suport polimèric per a l'obtenció de compostos que contenen un cadena alifàtica amb un grup tiol. Aquests compostos són àmpliament emprats en la nanobiotecnologia per crear capes monoensamblades sobre or, i fins ara, el mètode general emprat per a la seva obtenció es basa en la química en solució. També s'està preparant un article que recull el treball realitzat en la regeneració de la resina CTC-PS i que permet el seu ús com a nou grup protector temporal (Veure annex 4).

- Prats-Alonso, E.; García-Martín, F.; **Bayó, N.**; Cruz, L. J., Pla-Roca, M.; Samititer, J.; Errachid, A.; Albericio, F., Facile solid-phase synthesis of biotinylated alkyl tiols, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 6876-6881
- García-Martín, F.; **Bayó-Puxan, N.**; Albericio, F., Chlorotriyl Chloride resin as a convenient reusable protecting group, *en preparació*.

