

Tesi doctoral presentada per En/Na

Eulàlia PIÑOL OLLÉ

amb el títol

**" Disseny, síntesi i avaluació d'inhibidors de
dimerització de la proteasa del VIH-1"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

FARMÀCIA

Barcelona, 20 de juny del 2007.

Facultat de Farmàcia
Departament de Farmacologia i Química Terapèutica



UNIVERSITAT DE BARCELONA



3. SÍNTESI I ESTUDI CONFORMACIONAL DE DERIVATS D'AZABICICLO[3.3.0]OCTANONA

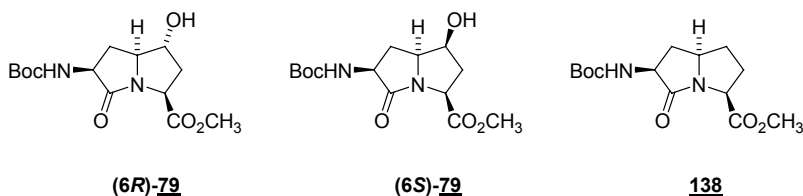
En relació amb la síntesi de 3-aminolactams com a dipèptids restringits i/o com a mimètics de gir, també es va dur a terme la síntesi de derivats d'azabiciclo[3.3.0]octanona.

Aquesta part del treball es va realitzar durant una estada de 6 mesos en el laboratori del Prof. Lubell de la Universitat de Montreal.

El grup del Prof. Lubell ha desenvolupat síntesis efectives d'aminoàcids amb estructura d'indolizidinones,¹²⁴ quinolizidinones,¹²⁵ i pirroloazepinones,¹²⁵ i n'ha estudiat el seu ús com a agents terapèutics potencials.¹²⁶ L'interès en expandir la metodologia desenvolupada anteriorment per proporcionar sistemes heterocíclics d'una grandària d'anell menor per tal d'afavorir geometries alternatives, els ha portat al desenvolupament recent d'aminoàcids d'estructura de pirrolizidinona.¹²⁷

Els objectius concrets que es plantejaren per aquesta estada foren:

- Síntesi dels compostos **(6R)-** i **(6S)-79**, seguint un mètode anàleg al descrit pel grup del Prof. Lubell¹²⁷ pel derivat no substituït **138**



- Estudiar les possibles modificacions funcionals en la posició 6 del bicicle
- Fer un estudi conformacional per RMN i de modelització molecular de les estructures **(6R)-** i **(6S)-79**

¹²⁴ a) Lombart, H.G.; Lubell, W.D.; *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 9437-9446. b) Gosselin, F.; Lubell, W.D.; *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 7463-7471. c) Polyak, F.; Lubell, W.D.; *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 5937-5949. d) Polyak, F.; Lubell, W.D.; *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 1171-1180. e) Feng, Z.; Lubell, W.D.; *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 1181-1185. f) Cluzeau, J.; Lubell, W.D.; *Israel J. Chem.*, **2001**, *41*, 271-281.

¹²⁵ Gosselin, F.; Lubell, W.D.; *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 2163-2171.

¹²⁶ a) Ref. 73d. b) Halab, L.; Becker, J.A.; Darula, Z.; Tourwé, D.; Kieffer, B.L.; Simonin, F.; Lubell, W.D.; *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 5353-5357. c) Ref. 76

¹²⁷ Dietrich, E.; Lubell, W.D.; *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 6988-6996.

3.1 SÍNTESI DE DERIVATS D'AZABICICLO[3.3.0]OCTANONA

3.1.1 Antecedents de la síntesi d'azabicicloalcanes amb estructura de pirrolizidiona

L'aminoàcid pirrolizidin-2-ona presenta l'esquelet peptídic restringit dins d'una estructura bicíclica [5.5] fusionada (Fig. 57).

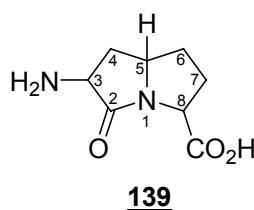


Figura 57: Estructura general de pirrolizidiona aminoàcids

Mentre que la síntesi d'aminoàcids substituïts derivats d'indolizidiona^{131c-e} i la de 4-alquilaminoàcids derivats de la 6-oxa- i 6-tiopirrolizidiona¹²⁸ ha estat àmpliament estudiada, s'han desenvolupat relativament poques síntesi de pirrolizidiones substituïdes com a productes entantiomèricament purs.

Alguns exemples de [3.3.0] azabiciclooctanones desenvolupades en els últims anys i que presenten diferents aplicacions biològiques es troben resumides a la Figura 58:

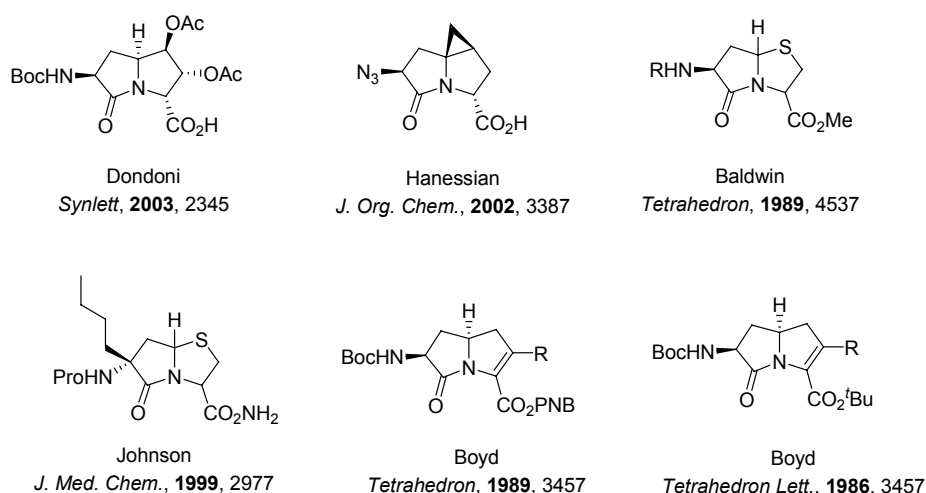


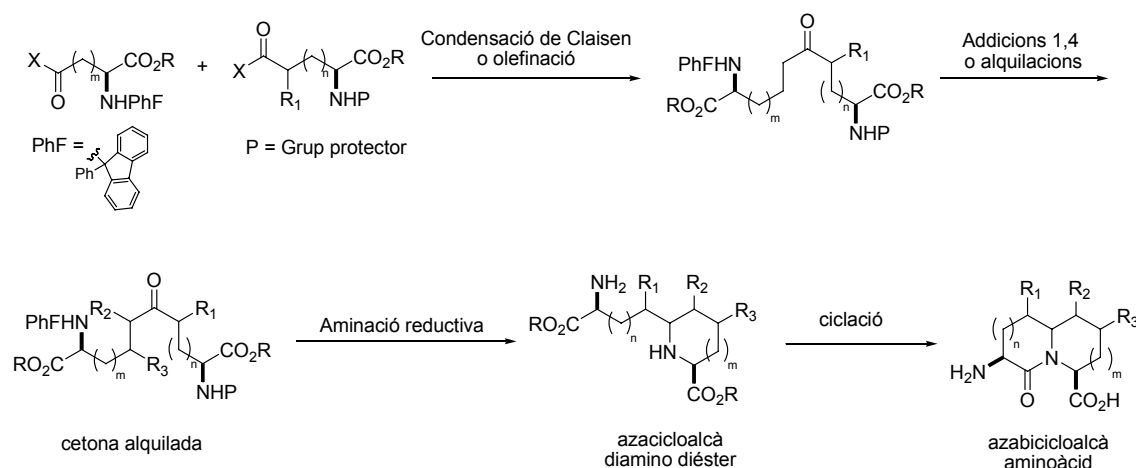
Figura 58: Estructures representatives d'azabiciclo[3.3.0]octanones

¹²⁸ Qiu, W.; Gu, X.; Sooshonok, V.A.; Carducci, M.D.; Hruby, V.J.; *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 145-148.

3.1.2 Antecedents del grup del Prof. Lubell

L'estratègia sintètica que segueixen dins del grup del Prof. Lubell per tal de sintetitzar aminoàcids derivats d'azabiciclo[X.Y.0]alcans intenta assolir 3 reptes principals: el control estèric, la possibilitat d'incorporació de cadenes laterals i el control de la grandària dels anells (el que en anglès es coneix com a les tres S: *Stereochemistry*, *Side chains* i *Size*).

L'aproximació més utilitzada dins del grup es basa en la unió de ω -carboxilats de dos α -aminodicarboxilats per obtenir una cetona linear intermèdia. Les cadenes laterals es poden introduir posteriorment a través d'addicions conjugades i alquilacions de la cetona. El primer anell heterocíclic es tanca mitjançant una aminació reductiva intramolecular o per desplaçament de metanosulfats, i finalment la formació del bicicle té lloc a través d'una lactamització. Partint dels enantiòmers L- i D- de l'àcid aspàrtic i glutàmic s'han pogut sintetitzar diferents aminoàcids derivats d'azabiciclo[X.Y.0]alcans variant les grandàries dels anells (Esquema 35).



Esquema 35: Estratègia general per a la síntesi d' aminoàcids derivats d'azabicicloalcans

Aquesta estratègia ha permès la síntesi d'azabic[X.Y.0]alcanones de diferents grandàries, inclosa la síntesi de la pirrolizidinona **138**.¹²⁷

Anteriorment, el grup de Scolastico ja havia desenvolupat la síntesi d'un derivat molt similar, a partir de la *N*-benzil-2,5-di(etilcarboxilat)-pirrolidina **140**, amb un rendiment global del 26% (Esquema 36).¹²⁹

¹²⁹ Angiolini, M.; Araneo, S.; Belvisi, L.; Cesarotti, E.; Checchia, A.; Crippa, L.; Manzoni, L.; Scolastico, C.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 2571-2581.

protecció del grup amino en forma de Boc van donar lloc a l'éster metílic de la (3*S*,5*R*,8*S*)-*N*-(Boc)amino pirrolizidin-2-ona **138** com a únic diastereòmer, amb un rendiment del 46% en 5 passos a partir de la cetona **150**.

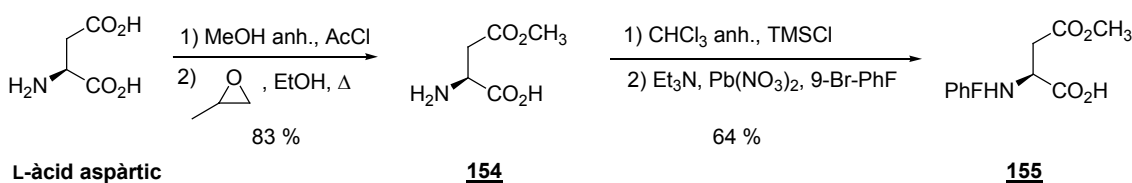
Tot i que s'ha demostrat que la introducció de grups funcionals en l'anell de bicicloalcà presenta sovint més dificultats sintètiques que la síntesi dels anàlegs no funcionalitzats, el potencial d'aquestes estructures com pseudodipèptids que mimetitzen tant la geometria de l'esquelet peptídic com de la cadena lateral, n'incrementa el seu particular interès. Així doncs, ens vam plantejar com a objectiu d'aquesta estada doctoral, la introducció de cadenes laterals a l'anell de pirrolizidinona, partint de la cetona **150**, sense reduir l'acetat amb SmI_2 com s'havia fet anteriorment.

3.1.3 Síntesi d'aminoàcids funcionalitzats amb estructura de pirrolizidinona

a) Síntesi de l'aldehid precursor **146**

L'aldehid **146** es va sintetitzar de manera anàloga a la descrita.¹³⁰ Aquesta síntesi parteix de la formació de l'éster metílic de l'àcid aspàrtic de forma selectiva, basant-se en la diferenciació dels grups carboxílics en α i β .¹³¹ Fent l'addició del clorur d'acetil en MeOH anhidre a 0 °C, s'aconseguí la formació exclusiva de l'éster en posició β , sense detectar per $^1\text{H-RMN}$ la presència de l'éster en α . L'hidroclorur format durant la formació de l'éster s'alliberà per agitació a reflux amb etanol i òxid de propilè (Esquema 38).

Per tal de garantir l'estabilitat configuracional, s'utilitzà 9-fenil-9*H*-fluorenil (PhF) com a protector del grup amino, introduït per Christie i Rapoport en la síntesi d'alcaloides indòlics.¹³² Aquest grup crea un impediment estèric que protegeix el protó α de la desprotonació en condicions bàsiques.¹³³



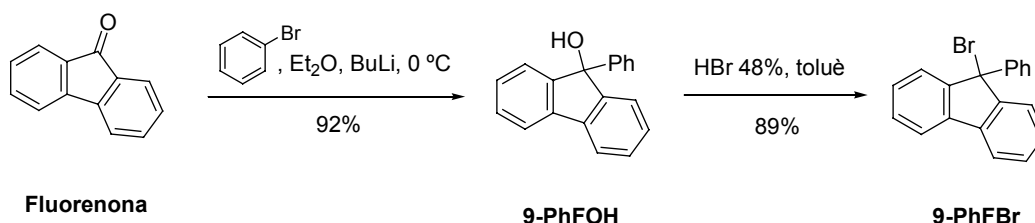
Esquema 38: Síntesi del PhFNH-Asp(OMe)-OH **155**

¹³¹ Gmeiner, P.; Feldman, P.L.; Chu-Moyer, M.Y.; Rapoport, H.; *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 3068-3074.

¹³² Christie, B.D.; Rapoport, H.; *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 1239-1246.

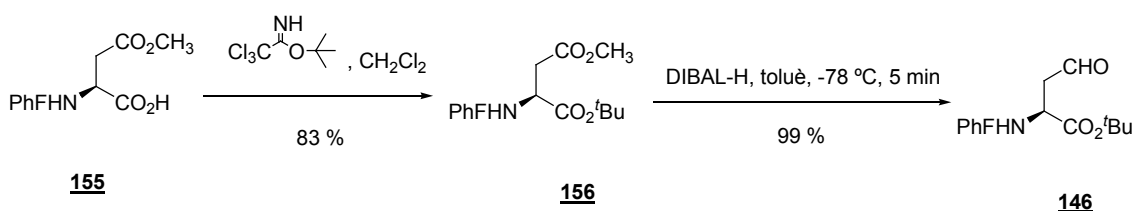
¹³³ a) Lubell, W.D.; Rapoport, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 236-239. b) Humphrey, J.M.; Bridges, R.J.; Hart, J.A.; Chamberlin, A.R.; *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 2467-2472. c) Atfani, M.; Lubell, W.D.; *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 3184-3188. d) Bolton, R.; Chapman, N.B.; Shorter, J.; *J. Chem. Soc.*, **1964**, 1895-1906. e) Jamison, T.F.; Lubell, W.D.; Dener, J.M.; Krisché, M.J.; Rapoport, H.; *Org. Synth.*, **1992**, *71*, 220-225.

El reactiu bromur de 9-bromo-9-fenil-9-*H*-fluorè es preparà a escala d'aproximadament 250 g, per addició de bromobenzè sobre fluorenona (Esquema 39). La transformació de l'alcohol resultant en el bromur desitjat es dugué a terme mitjançant HBr 48% i es monitoritzà per ^{13}C -RMN, observant-se la desaparició del senyal del C-OH a 83,3 ppm i l'aparició d'un nou senyal a 67,3 ppm, corresponent al C-Br del 9-PhFBr.



Esquema 39: Síntesi del bromur de 9-bromo-9-fenil-9-*H*-fluorè

Un cop obtingut l'éster β -metílic de l'àcid *N*-PhF-aspartic **155**, s'esterificà l'àcid carboxílic en α , fent servir tricloroacetamidat de *tert*-butil preparat *in situ* al laboratori a partir de tricloroacetoniuril. Això permeté la reducció posterior de forma quimioselectiva de l'éster metílic en α (Esquema 40).



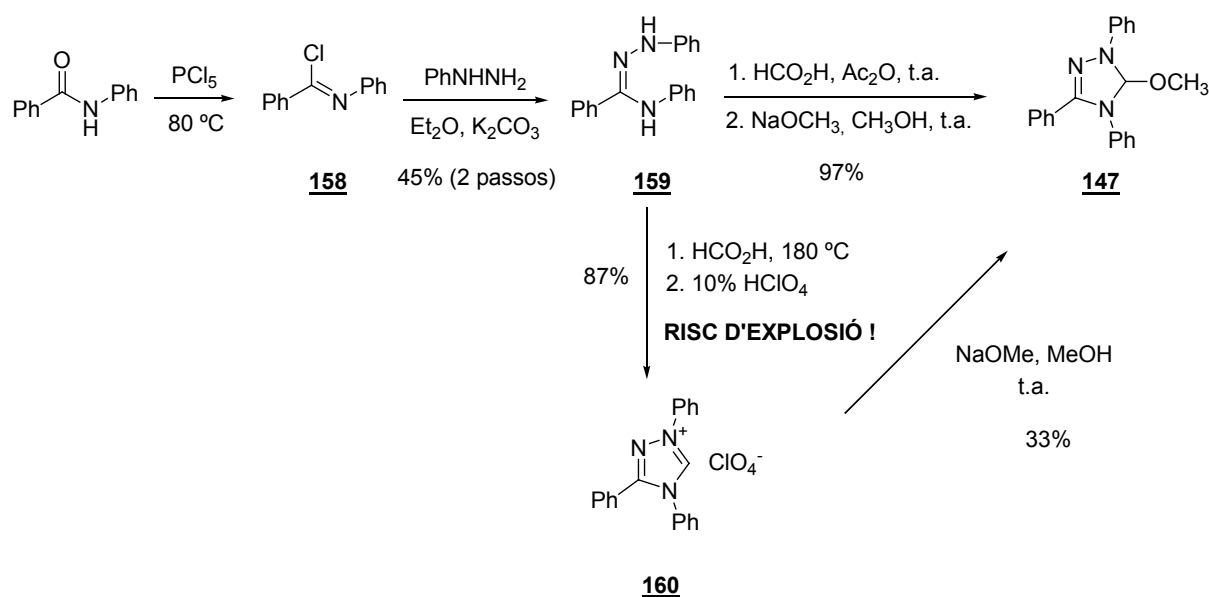
Esquema 40: Síntesi de l'aldehid precursor **146**

La transformació de l'éster metílic a aldehid tingué lloc per tractament amb DIBAL-H durant 5 min a -78°C , la qual cosa es pogué comprovar per l'aparició d'un singulet a 9,54 ppm en l'espectre de ^1H -RMN. Cal remarcar que tot i que l'espectre es feu utilitzant CDCl_3 com a dissolvent, cal fer-ho amb la major rapidesa ja que s'ha observat que l'aldehid és inestable en aquest dissolvent.¹³⁰

En poques hores, l'aldehid **146** es transforma en el compost **157**, hipòtesi corroborada per la desaparició del senyal de l'aldehid, dels protons α i β en l'espectre de ^1H -RMN i per les bandes a 1610 cm^{-1} i 1714 cm^{-1} en l'espectre d'IR, corresponents a una imina i un éster α,β -insaturats. Aquesta hipòtesi també ha estat confirmada per espectrometria de masses i per cristal·lografia de difracció de raigs X. Un possible mecanisme per a l'obtenció d'aquest producte és el que es detalla a l'Esquema 41.

Síntesi del catalitzador

El triazole **147** se sintetitzà seguint la ruta descrita que es mostra a l'Esquema 43, que s'inicia amb la reacció entre la *N*-fenilbenzamida i el PCl_5 i posterior reacció del compost resultant **158** amb fenilhidrazina per donar lloc a la hidrazona **159**. Arribats en aquest punt, es continuà seguint la ruta descrita,¹³⁴ fent reaccionar en un autoclau la hidrazona **159** amb àcid fòrmic a 180 °C, però degut a una explosió, s'optà per l'ús d'una ruta alternativa desenvolupada pel grup d'Enders, que resulta apta per a la síntesi en gran escala i evita reaccions a elevada pressió.¹³⁵ Així, finalment s'aconseguí sintetitzar el triazole **147** en escala de 25 g i amb un 44% de rendiment global en 3 passos.



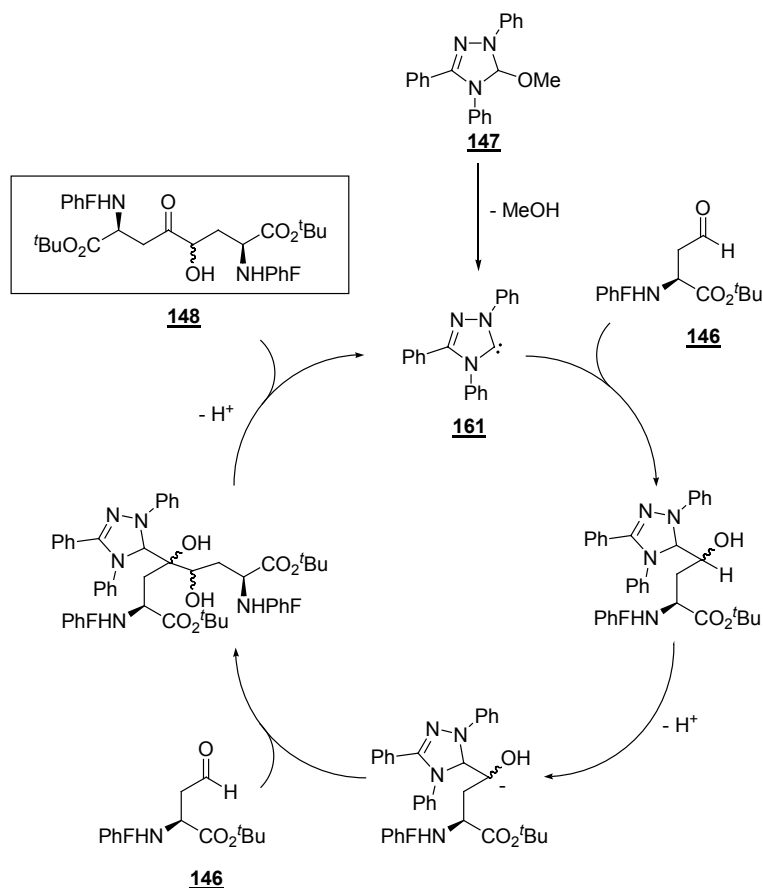
Esquema 43: Síntesi del catalitzador **147** per a la condensació benzoínica

Condensació aciloínica

Un cop obtingut el catalitzador desitjat, es prosseguí amb la condensació aciloínica de l'aldehid **146**, fent servir les condicions optimitzades per Dietrich *et al.*¹²⁷ i que consisteixen en utilitzar el 5-metoxi-4,5-dihidro-1,3,4-trifenil-1*H*-1,2,4-triazole **147** com a catalitzador (25%) en *tert*-butanol a 80 °C durant 4 h. El mecanisme proposat per aquesta condensació és el que es mostra en l'Esquema 44.

D'aquesta manera s'obtingué una mescla diastereomèrica de les aciloïnes **148** amb un 63% de rendiment. La presència dels dos diastereòmers es detectà clarament per ¹H-RMN, gràcies als dos doblets a 4,08 ppm i 4,36 ppm, corresponents al CH-OH de cadascuna de les α-hidroxicetones.

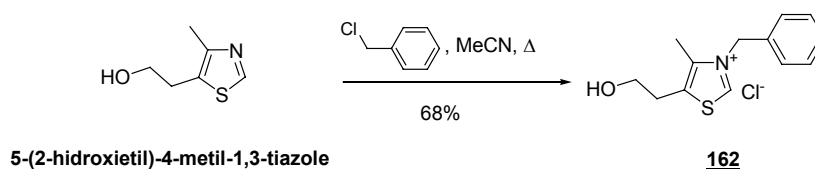
¹³⁵ Enders, D.; Breuer, K.; Kalfass, U.; Balensiefer, T.; *Synthesis*, **2003**, 1292-1295.



Esquema 44: Mecanisme de la condensació acilòica de l'aldehyd **146** fent ús del catalitzador **147**

Amb l'objectiu d'intentar millorar el rendiment d'aquesta reacció, es va provar d'aïllar el carbè actiu **161**, escalfant el catalitzador triazole a 80 °C i amb buit de 0,1 mbar, de manera anàloga a la descrita a la literatura.¹³⁶ Tot i observar-se la formació del carbè, amb la conseqüent desaparició del singulet a 3,12 ppm corresponent al grup -OCH₃, la reacció de condensació tingué lloc amb un rendiment inferior.

Alternativament, també es provà l'ús d'un altre catalitzador, el clorur de 3-benzil-5-(2-hidroxietil)-4-metil-1,3-tiazoli **162**, desenvolupat per Stetter *et al.*,¹³⁷ i que se sintetitzà per benzilació del 5-(2-hidroxietil)-4-metil-1,3-tiazole (Esquema 45).

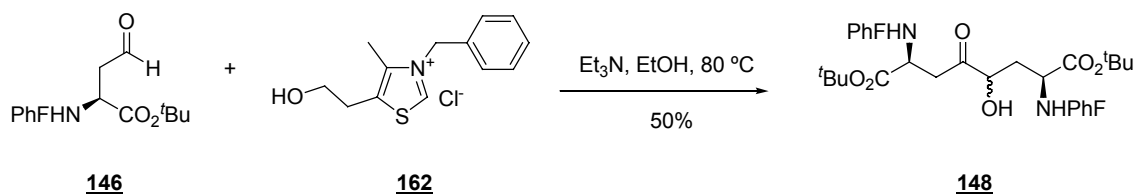


Esquema 45: Síntesi del catalitzador de Stetter **162**

¹³⁶ Enders, D.; Breuer, K.; Raabe, G.; Runsink, J.; Teles, J.H.; Melder, J.P.; Ebel, K.; Brode, S.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, 32, 1021-1023.

¹³⁷ Stetter, H.; Kuhlmann, H.; *Org. Syn.*, **1990**, Coll. Vol. 62, 95-99.

La reacció de l'aldehid **146** i la sal de tiazoli **162** en toluè i fent servir KHMDS com a base proporcionà un mescla de compostos que no s'aconseguien indentificar, mentre que la reacció en EtOH i fent servir Et₃N com a base a 80 °C proporcionà el producte desitjat però amb un rendiment inferior (50%) a l'obtingut amb el triazole **147** (63%) (Esquema 46).

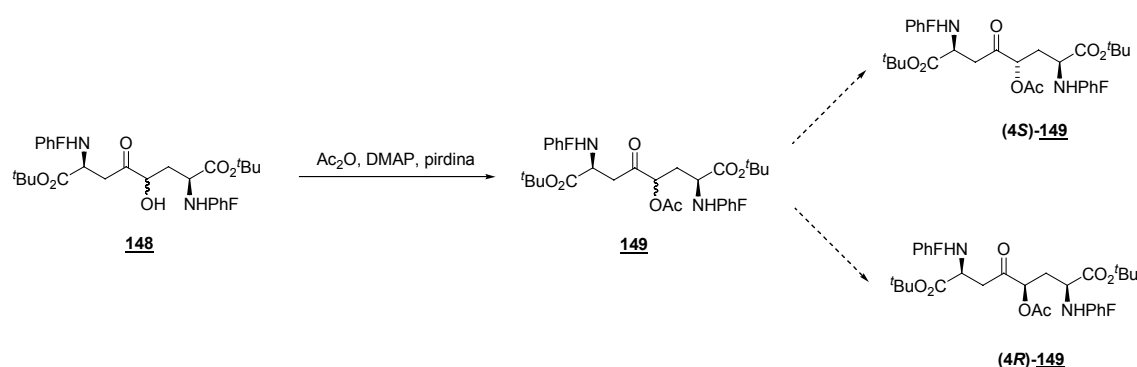


Esquema 46: Obtenció del suberat **48** mitjançant el catalitzador de Stetter **162**

Així doncs, finalment s'optà per l'ús del catalitzador **147**, ja que tot i el rendiment moderat, ens donà accés, en una única reacció, a un intermedi valuós altament funcionalitzat.

Acetilació

Posteriorment, l'acetilació dels alcohols **148** amb anhídrid acètic, DMAP i piridina va proporcionar la mescla separable de diasteròmers **149**. El diasterèomer (**4S**)-**149** s'obtingué per cristal·lització en metanol, mentre que el (**4R**)-**149** s'aïllà per cromatografia en columna (Esquema 47).



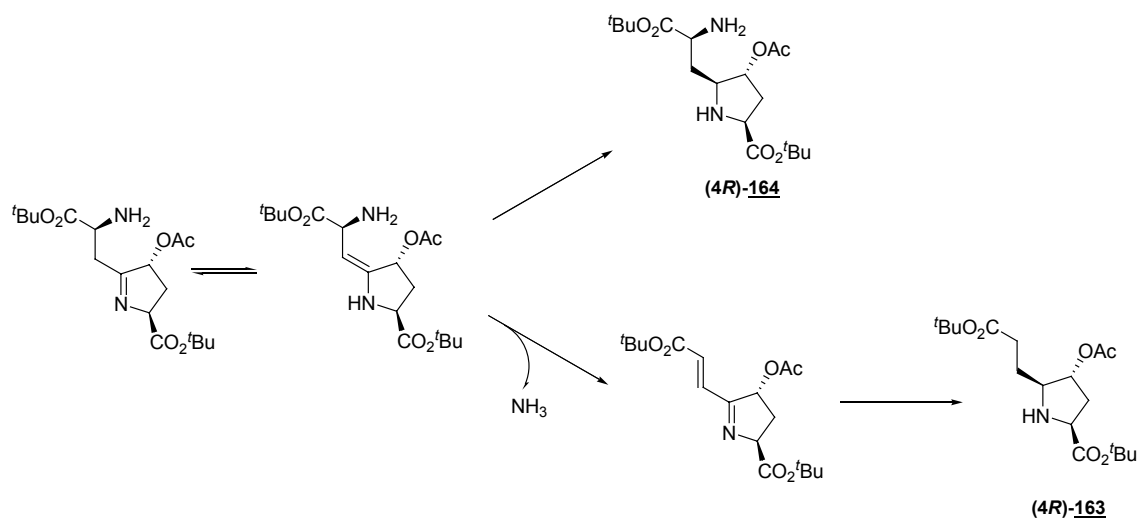
Esquema 47: Acetilació i separació de la mescla diasteromèrica d'aciloïnes **149**

Cal remarcar que en aquest punt de la síntesi no fou possible l'assignació de l'estereoquímica dels acetats **149**, sinó que aquesta es deduí posteriorment a partir de les dades obtingudes pels bicicles **79** (vegeu Apartat 3.1.3b). D'aquesta manera, es continuà la síntesi de forma paral·lela amb els dos diasteròmers per separat.

c) Obtenció de les prolines (**4R**) i (**4S**)-**164**

Els dos diastereòmers **149** van ser sotmesos de manera independent a aminació reductiva intramolecular. D'aquesta manera, la hidrogenació catalítica dels suberats **149** havia de provocar en primer lloc la hidrogenolisi dels grups PhF, seguida de la formació de la imina intramolecular, que es reduiria estereoselectivament en el mateix medi de reacció. Era d'esperar

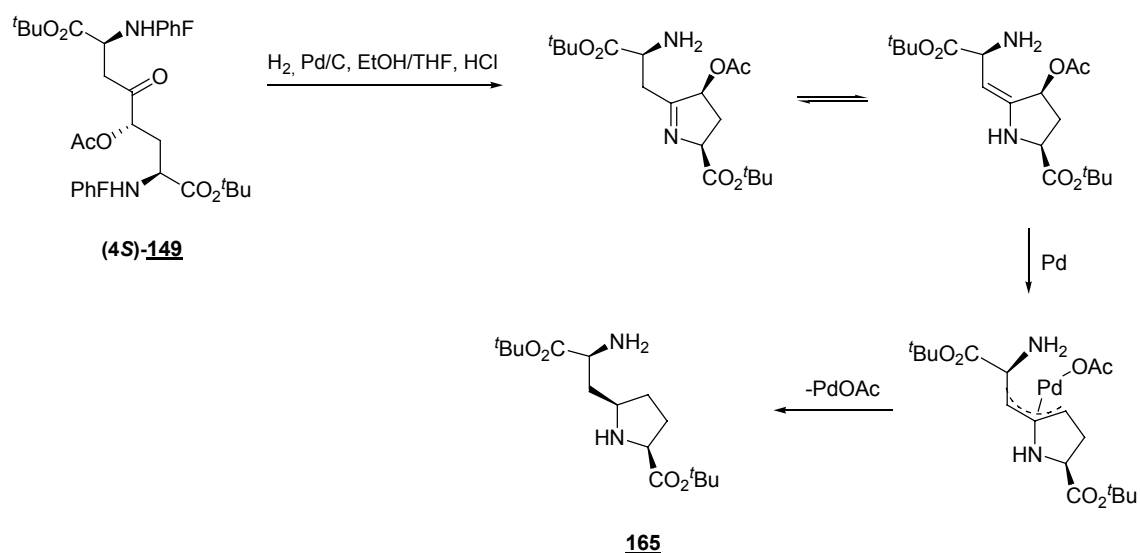
insaturada, que posteriorment es reduïria (Esquema 49). Aquest tipus d'eliminació ja havia estat observada anteriorment en el grup del Prof. Lubell.¹²⁷



Esquema 49: Possible mecanisme de formació del subproducte de β-eliminació **(4R)-163**

Partint del suberat **(4S)-149**

En utilitzar les condicions optimitzades pel suberat **(4R)-149** en el cas del diasteròmer **(4S)-149**, s'observà únicament la formació de l'éster *tert*-butílic de 5-alkilprolina **165**, producte de l'eliminació de l'acetat en C-4. La pèrdua de l'acetat es pot explicar per la formació d'un complex π-al·lil a partir de l'enamina tautòmera, el qual es podria reduir per un mecanisme de transferència d'un electró (Esquema 50). Tot i que fins ara, no s'ha descrit cap complex de Pd-π-2-aminoal·lil, sí que trobem a la literatura l'ús de complexos de Pd-alcoxi-al·lil.¹³⁹



Esquema 50: Possible mecanisme de formació del subproducte d'α-eliminació **165**

¹³⁹ a) Tsuji, J.; Mandai, T.; *Synthesis*, **1996**, 1-24. b) Muzart, J.; *Tetrahedron*, **2005**, 61, 9423-9463.

Després que el Dr. Rao investigués diferents fonts de protons, concentracions d'àcid i catalitzadors (Taula 8), es va optar per l'ús de Pd(OH)₂ com a catalitzador en una mescla d'EtOH/THF (7:1) i 5 mM HCl, condicions que proporcionaven un 43% del producte desitjat **(4S)-164**, acompanyat d'un 5% del subproducte d' α -eliminació **165**. En aquest cas, no s'observà la formació del producte de β -eliminació **(4S)-163**.

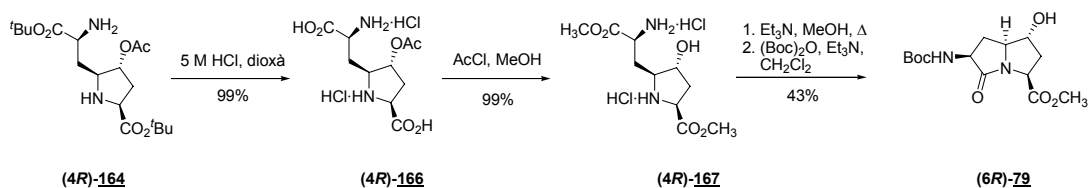
	Font de protons	Catalitzador	Temps (h)	% (4S)-164 : (4S)-163 : 165 *
1	AcOH (0,5 eq.)	Pd/C	24	1 : 4 : 95
2	TFA (1 eq)	Pd/C	5	16 : 53 : 31
3	H ₃ PO ₄ (1 eq)	Pd/C	4	34 : 9 : 57
4	HCOONH ₄ (1 eq)	Pd/C	24	1,5 : 1,5 : 97
5	HCl (0,1 N)	Pd/C	7	44 : 34 : 22
6	HCl (0,01 N)	Pd/C	24	46 : 32 : 22
7	HCl (0,001 N)	Pd/C	24	59 : 23 : 17
8	HCl (0,1 N)	PtO ₂	24	30 : 14 : 56
9	HCl (0,01 N)	PtO ₂	24	14 : 17 : 69
10	HCl (0,001 N)	PtO ₂	24	57 : 28 : 15
11	HCl (0,1 N)	Pd(OH) ₂ /C	14	29 : 35 : 36
12	HCl (0,01 N)	Pd(OH) ₂ /C	24	46 : 29 : 25
13	HCl (0,005 N)	Pd(OH) ₂ /C	24	94 : 1 : 5
14	HCl (0,01 N), NH ₄ Cl	Pd(OH) ₂ /C	4	15 : 31 : 54
15	HCl (0,01 N), NH ₄ OAc	Pd(OH) ₂ /C	7	38 : 13 : 49

Taula 8: Resultats obtinguts de l'estudi metodològic del Dr. Rao. * % obtinguts a partir de l'HPLC-MS.

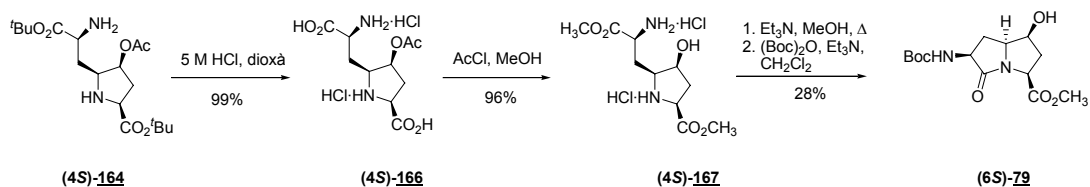
d) Obtenció dels bicicles (6R)- i (6S)-79

Un cop obtingudes les prolines **(4R)-** i **(4S)-164** per aminació reductiva, se sotmeteren a hidròlisi amb HCl 5 M en dioxà, obtenint-se els diàcids **166**, que posteriorment s'esterificaren amb MeOH i AcCl. Sota aquestes condicions, en els dos diastereòmers es produí també la hidròlisi del grup éster en C-4, per tal de donar lloc als alcohols **(4R)-** i **(4S)-167**, respectivament. A continuació, tingué lloc la lactamització per tractament amb Et₃N i MeOH a reflux i finalment es dugué a terme la protecció de l'amina en forma de Boc, tal i com es mostra en l'Esquema 51.

a) Obtenció del bicicle **(6R)-79**



b) Obtenció del bicicle **(6S)-79**



Esquema 51: Síntesi dels bicicles **(6R)-** i **(6S)-79** a partir de les respectives prolines **(4R)-** i **(4S)-164**

L'assignació de cadascun dels senyals d'ambós diastereòmers es va realitzar de manera inequívoca mitjançant l'estudi dels espectres bidimensionals d'homocorrelació $^1\text{H}-^1\text{H}$ i heterocorrelació $^1\text{H}-^{13}\text{C}$. El desplaçament dels protons H-4, H-5, H-7 i H-8 presenta diferències significatives entre els dos diastereòmers ($\Delta\delta = 0,2 - 0,4$ ppm), mentre que la resta de senyals ($\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, OCH_3 , H-3, H-6) no mostren diferències apreciables ($\Delta\delta < 0,1$ ppm) en l'espectre de ^1H -RMN.

Pel que fa als espectres de ^{13}C -RMN, la diferència més significativa entre els dos diastereòmers correspon als senyals del C-4 ($\Delta\delta = 7,6$ ppm) i C-6 ($\Delta\delta = 4,1$ ppm), mentre que la resta de senyals no mostren diferències apreciables ($\Delta\delta < 2$ ppm).

Un cop assignats els senyals corresponents a cada àtom de H i C de cada diastereòmer, l'estereoquímica del C-5 s'assignà basant-se en l'analogia amb el treball precedent en el grup¹²⁷ i assumint que l'estereoquímica dels centres quirals dels productes de partida roman inalterada.

A continuació, s'assignà l'estereoquímica relativa del C-5 (cap de pont) i del C-6 (unit al grup hidroxil) per mitjà d'un experiment de NOESY (Fig. 59).

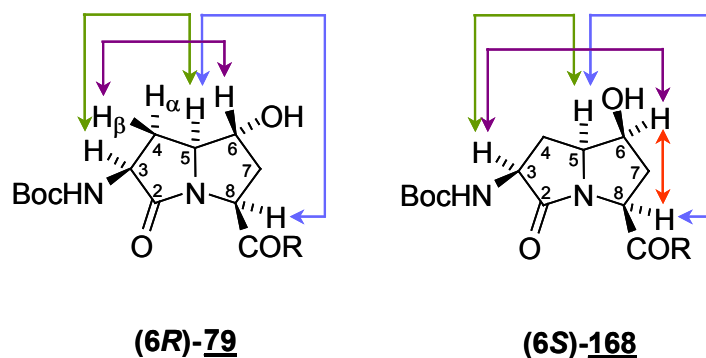


Figura 59: n.O.e observats pels compostos **(6R)-79** i **(6S)-168**

- En el cas de l'isòmer **(6R)-79**, les interaccions de tipus n.O.e entre els protons H-3 i H-5 i entre els protons H-5 i H-8 foren indicatives de la seva posició a la mateixa cara del bicicle, i establiren la geometria còncava de la pirrolizidinona. L'estereoquímica de C-6 s'assignà a partir de la interacció n.O.e. observada entre H-5 i H-4 β i per l'absència d'interacció de H-6 amb H-5, H-3 i H-8. L'obtenció de cristalls del compost **(6R)-79** va permetre l'estudi per raigs X d'aquest isòmer i en va confirmar l'estereoquímica assignada (Fig. 60).

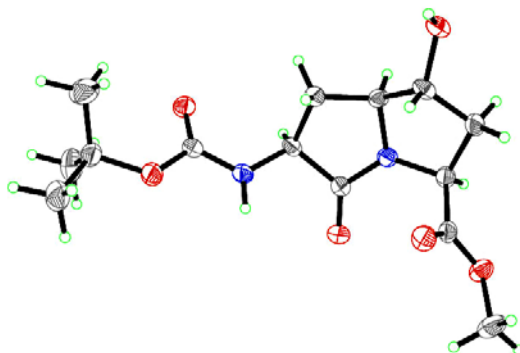


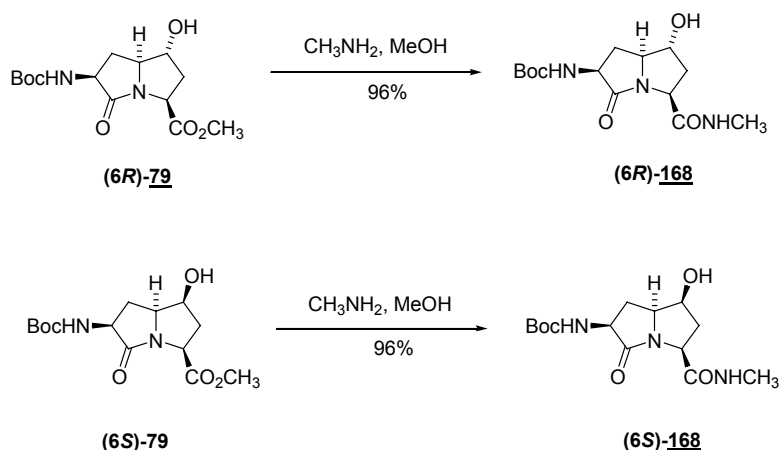
Figura 60: Estructura de raigs X de l'éster **(6R)-160** (C en gris, N en blau i O en vermell)

- En el cas de l'isòmer **(6S)-79**, s'estudià la seva configuració a partir de la metilcarboxamida derivada **(6S)-168** (vegeu Apartat e)). De la mateixa manera que en l'isòmer anterior, s'observà una interacció n.O.e. dels protons H-3 i H-8 amb el protó H-5. A més a més, la interacció n.O.e. de l'H-6 amb els protons H-3 i H-8 confirmen l'estereoquímica designada per C-6.

És a partir d'aquesta assignació mitjançant l'experiment NOESY que es va poder assignar l'estereoquímica relativa dels precursors linials suberats **(4R)-** i **(4S)-149**.

e) Obtenció de les metilcarboxamides (6R)- i (6S)-168

Per tal de posteriorment poder dur a terme l'anàlisi conformacional del sistema bicíclic i veure si aquest és capaç d'induir una estructura secundària determinada, es va derivatitzar la molècula de manera que es pogués establir un pont d'hidrogen entre el CO de l'aminoàcid *i* i l'NH de l'aminoàcid en posició *i*+3. Per simplicitat tant estructural com sintètica, es van preparar les metilcarboxamides derivades **(6S)-** i **(6R)-168**, fent reaccionar els bicicles **(6R)-** i **(6S)-79** amb metilamina 2 M en MeOH (Esquema 52).

Esquema 52: Preparació de les metilamides **(6R)-** i **(6S)-168**

La formació de les amides es va posar de manifest per l'absència del grup metoxycarbonil a $\delta \sim 3,75$ ppm en l'espectre de $^1\text{H-RMN}$ i per l'aparició d'un doblet $\delta \sim 2,75$ ppm, assignable a l' N-CH_3 de l'amida formada, així com la presència d'un singulet ample a $\delta \sim 7$ ppm corresponent al protó de l' NH . A més, en l'espectre de $^{13}\text{C-RMN}$, s'observà un apantallament del senyal metílic ($\Delta\delta \sim 22$ ppm), atribuïble a la transformació d' OCH_3 en NCH_3 .

3.1.4 Estudis de reactivitat sobre la posició C6 del bicicle (6R)-79

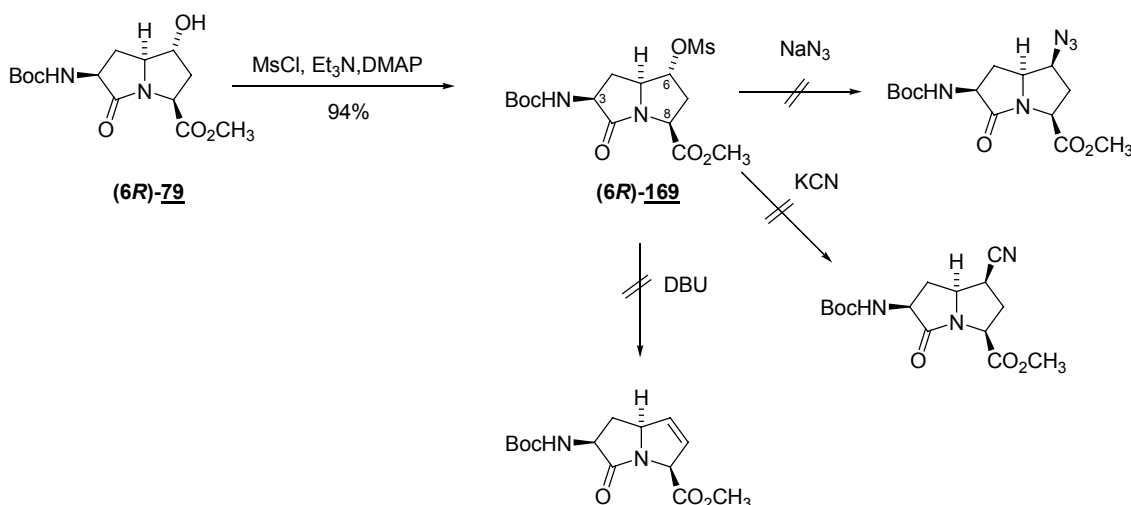
Amb els bicicles **(6R)-** i **(6S)-79** en mà, l'objectiu següent fou estudiar el comportament químic i les possibles transformacions en la posició C6. Per falta de quantitat del diasteròmer **(6S)-79**, aquest estudi es realitzà únicament pel bicicle **(6R)-79**. Concretament, s'estudià la substitució nucleòfila i l'oxidació del grup hidroxil, a més de la derivatització per a síntesi peptídica.

Substitució nucleòfila

Partint el bicicle **(6R)-79**, es va provar la derivatització del compost a través del grup hidroxil. En primer lloc s'investigà la formació del mesilat amb la intenció de convertir el grup hidroxil en un bon grup sortint i poder realitzar diferents substitucions nucleòfiles, de forma anàloga a la descrita anteriorment per d'altres bicicles sintetitzats en el grup.^{124d,e} D'aquesta manera, es podria fer reaccionar el mesilat amb KCN i reduir posteriorment, per tal de tenir un derivat de la glutamina. Alternativament, també es podria fer reaccionar el mesilat amb azida sòdica i reduir a continuació el grup azida, amb la finalitat de tenir un derivat de l'àcid α,γ -diaminobutíric.

En fer reaccionar l'alcohol **(6R)-79** amb MsCl, Et_3N i DMAP catalític en CH_2Cl_2 s'obtingué el corresponent metanosulfonat **(6R)-169** amb un 94% de rendiment. Malauradament, en els posteriors intents de substitució del mesilat amb NaN_3 i amb KCN no es van obtenir resultats satisfactoris. En tots dos casos, tot i provar la reacció a temperatura ambient i a reflux, fent ús de diferents dissolvents (MeCN, DMF i diglime), només s'observà la presència de producte de partida sense reaccionar (Esquema 53).

Finalment, s'optà per investigar l'eliminació del mesilat, fent-lo reaccionar amb DBU, però tampoc s'aconseguí cap tipus de conversió.



Esquema 53: Intents de funcionalització de la (6R)-hidroxipirrolizidiona **79**

Una possible explicació de l'estabilitat inusual d'aquest mesilat podria ser que la conformació rígida i còncava adoptada pel bicicle dificulti l'aproximament des de la cara oposada per part de qualsevol grup nucleòfil (Fig. 61).

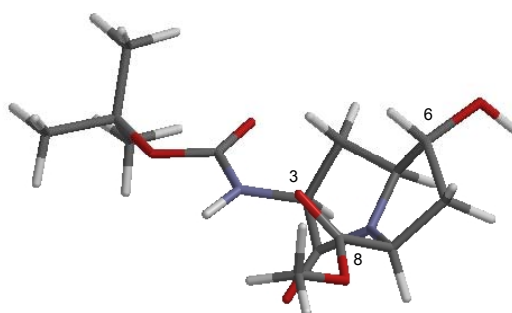


Figura 61: Possible conformació adoptada pel bicicle **(6R)-79**, representada amb el programa Spartan (C en gris, N en blau i O en vermell). L'atac anti sobre C6 queda molt impedit.

Tanmateix, seria d'esperar que el diastèromer **(6S)-79** mostrés una reactivitat diferent, ja que en aquest cas es podria donar l'atac nucleofílic per la cara oposada.

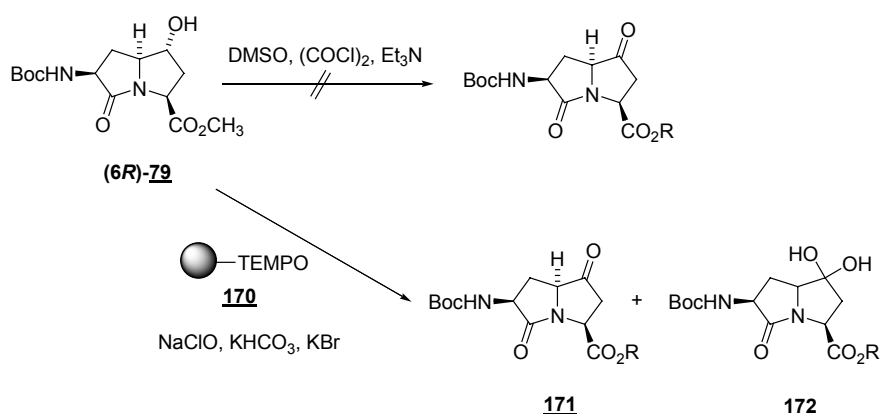
Oxidació

També es va investigar l'oxidació del grup hidroxil a cetona a escala de 10 mg, mitjançant una reacció de Swern i mitjançant una nova resina desenvolupada pels grups de Lubell i Zhu.¹⁴⁰

Mentre que en la reacció amb DMSO i (COCl)₂ no s'observà conversió del producte de partida, en l'oxidació amb la resina unida a TEMPO desenvolupada pel Dr. Juntao Luo, es detectà per

¹⁴⁰ Resultats no publicats del Dr. Juntao Luo

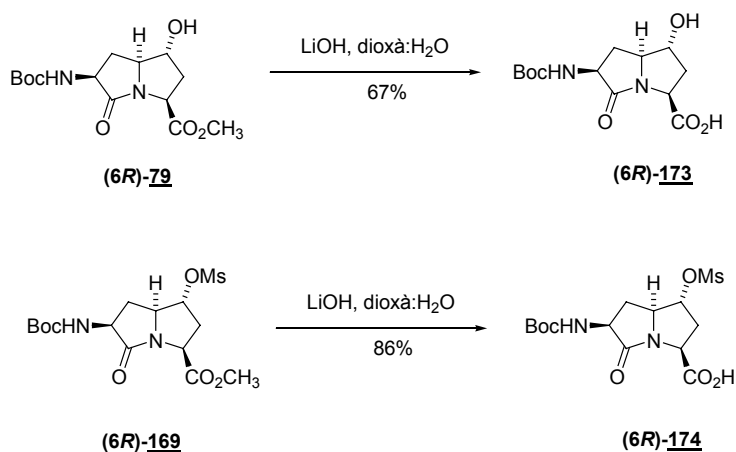
HPLC-MS la presència de la cetona desitjada juntament amb el corresponent hidrat, tot i que no es pogueren aïllar (Esquema 54).



Esquema 54: Intents d'oxidació de la (6R)-hidroxipirrolizidinona **79**

Derivatització per a la síntesi peptídica

Finalment, s'hidrolitzà l'èster metílic per possibilitar la utilització del bicicle en la síntesi peptídica en fase sòlida. El tractament de l'alcohol **(6R)-79** amb LiOH en una mescla de dioxà:H₂O (1:1) proporcionà l'àcid carboxílic **(6R)-173** amb un 67% de rendiment. Anàlogament, també s'assajà la hidròlisi del mesilat **(6R)-169**, el qual proporcionà l'àcid carboxílic **(6R)-174** amb un 86% de rendiment (Esquema 55). Un cop més, es feu evident l'elevada estabilitat del grup mesilat de la posició C6 en el compost **(6R)-169**.



Esquema 55: Hidròlisi dels èsters **(6R)-79** i **(6R)-169**

3.2 ANÀLISI CONFORMACIONAL

Un cop sintetitzats els bicicles (**6R**)- i (**6S**)-**79** i estudiada la seva reactivitat, el següent objectiu fou l'anàlisi conformacional de les metilcarboxiamides derivades (**6R**)- i (**6S**)-**168**, per tal d'estudiar-ne la seva capacitat de formació de gir.

El mimetisme de l'estructura secundària d'un pèptid és una eina important en la recerca de fàrmacs que s'aplica amb la intenció de fixar una determinada conformació bioactiva, que idealment mimetitza la conformació que adopta el pèptid endogen en complexar-se amb el seu receptor.

A part de les estructures d'hèlices α i full β , altres components essencials en els pèptids i les proteïnes són els llaços i girs. Existeixen molts tipus de gir, que s'han anat classificant a mesura que s'han anat descobrint. Tanmateix, els girs principals es divideixen en dos grups (Fig. 62):

- Els **girs β** estan formats per 4 aminoàcids (i fins $i+3$) i s'estabilitzen per un pont d'hidrogen entre el carbonil del primer aminoàcid i el grup NH del quart aminoàcid, generant un pseudocicle de 10 membres.
- Els **girs γ** estan formats per 3 aminoàcids (i fins $i+2$) i s'estabilitzen per un pont d'hidrogen entre el carbonil del primer aminoàcid i el grup NH del segon aminoàcid, generant un pseudocicle de 7 membres.

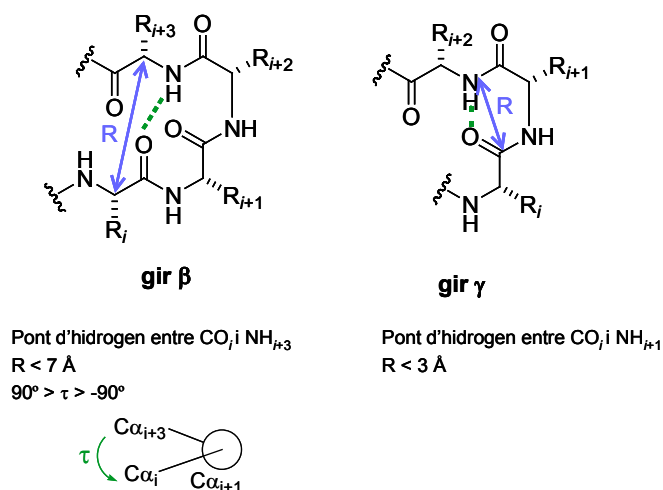
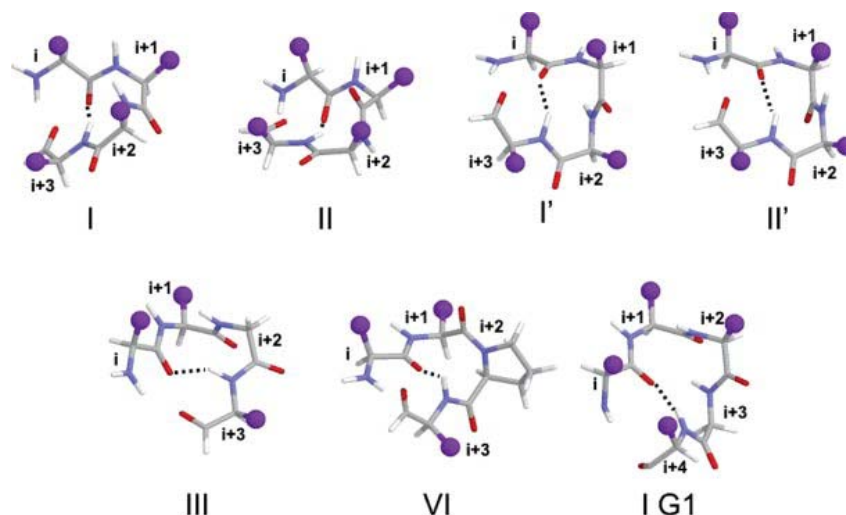


Figura 62: Representacions esquemàtiques dels girs de tipus β i γ

D'aquests girs, el més estudiats han estat els girs β , que es troben subclassificats segons els angles de torsió dels aminoàcids $i + 1$ i $i + 2$ (Taula 9, Fig. 63).¹⁴¹

¹⁴¹ a) Rotondi, K.S.; Gierasch, L.M.; *Biopolymers*, **2006**, *84*, 13-22. b) Venkatachalam, C.M.; *Biopolymers*, **1968**, *6*, 1425-1436.

Angle de torsió	gir β I	gir β I'	gir β II	gir β II'	gir β III	gir β III'	gir γ
ϕ_{i+1}	-60°	60°	-60°	60°	-60°	60°	75°
ψ_{i+1}	-30°	30°	120°	-120°	-30°	30°	-65°
ϕ_{i+2}	-90°	90°	80°	-80°	-60°	60°	-
ψ_{i+2}	0°	0°	0°	0°	-30°	30°	-

Taula 9: Classificació dels girs β en funció dels seus angles de torsióFigura 63: Estructures de diferents tipus de girs β

S'han descrit nombrosos procediments per a determinar si un compost indueix la formació d'una estructura secundària particular.¹⁴² Generalment aquestes tècniques es basen en la cerca d'alguna dada experimental que corrobore la formació d'enllaços d'hidrogen. Entre aquestes tècniques destaquen:

- **Difracció de raigs X:** permet determinar l'estructura tridimensional del pèptid o peptidomimètic en estat cristal·lí. Presenta com a inconvenients la necessitat de l'obtenció d'un cristall i el fet que l'estructura cristal·lina no proporciona la informació de les diferents conformacions que pot adoptar l'estructura en solució.
- **¹H-RMN:** possibilita la identificació de la conformació preferent del pèptid o peptidomimètic en solució, i a més indica quins són els residus que intervenen en aquesta conformació i la fortalesa de les interaccions estabilitzants.
- **Modelització molecular:** permet determinar les conformacions energèticament més favorables i mesurar angles i distàncies teòriques, la qual cosa ens ofereix informació sobre els tipus de girs possibles. Les dades teòriques així obtingudes cal comparar-les amb les obtingudes per mètodes empírics com per exemple la RMN.

¹⁴² a) Kessler, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1982**, *21*, 512-523. b) Gillespie, P.; Cicariello, J.; Olson, G.L.; *Biopolymers*, **1997**, *43*, 191-217.

3.2.1 Estudis de RMN

Amb els experiments de ^1H -RMN, a més de determinar la configuració absoluta dels dos diastereòmers (pg. 80-81), ens vàrem proposar avaluar la capacitat de formació de gir de les pirrolizidinones sintetitzades. Aquest estudi es va realitzar sobre les *N*-metilamides (**6S**)- i (**6R**)-**168** ja que inclouen tots els àtoms necessaris per a la formació d'una estructura de gir β .

La participació en enllaços d'hidrogen dels protons NH (d'amida i carbamat en el nostre cas) es pot determinar en funció del seu desplaçament químic en l'espectre de ^1H -RMN, ja que en cas de formar part d'un pont d'hidrogen es troben desplaçats cap a camps baixos.

Tal i com s'observa en la Figura 64, el protons d'amida i carbamat dels dos diastereòmers presenten un desplaçament químic de $\delta > 7$ ppm a temperatura ambient (298 K), la qual cosa posa de manifest la seva participació en un enllaç d'hidrogen. Això no és d'estranyar si tenim en compte el dissolvent emprat (DMSO- d_6), capaç de formar ponts d'hidrogen amb aquests protons.

Per tal d'esbrinar si aquests enllaços d'hidrogen podien ser intramoleculars i per tant prou forts per establir una conformació de gir, es va estudiar la influència de la temperatura en el desplaçament dels protons NH.

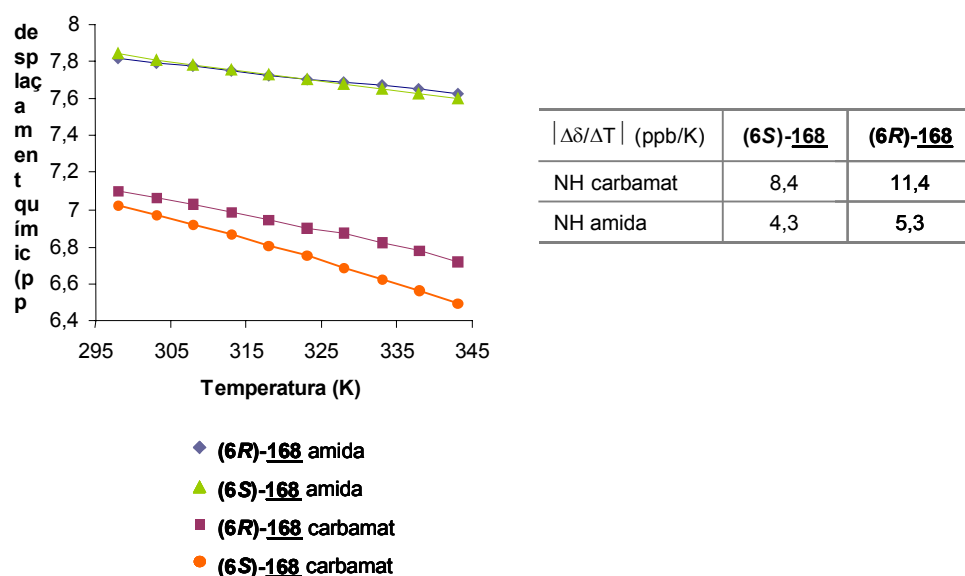


Figura 64: Representació gràfica de $\Delta\delta$ respecte ΔT pels NH d'amida i carbamat dels diastereòmers (**6R**)- i (**6S**)-**168** en DMSO- d_6 i taula amb els valors dels coeficients de temperatura obtinguts

Els canvis de temperatura provoquen un efecte petit en el desplaçament químic dels protons NH que es troben involucrats en un pont d'hidrogen intramolecular.^{142a} Aquesta variació es mesura mitjançant el coeficient de temperatura $\Delta\delta/\Delta T$ (expressat en ppb/K). En DMSO- d_6 , els protons NH que es troben formant part de ponts d'hidrogen intramoleculars estables o que no es troben accessibles al dissolvent per motius estèrics presenten coeficients de temperatura petits ($\Delta\delta/\Delta T < 3$ ppb/K). En canvi, els protons que es troben exposats al dissolvent o que no

formen part d'un pont d'hidrogen presenten un coeficient de temperatura més elevat ($\Delta\delta/\Delta T > 4$ ppb/K).¹⁴³

En la Figura 64 es pot veure la variació respecte la temperatura dels desplaçaments dels NH de les amides i dels carbamats en els compostos **(6R)-** i **(6S)-168** en DMSO- d_6 , així com els valors dels coeficients de temperatura corresponents. Es pot observar que ambós isòmers presenten un comportament similar: els protons NH del carbamat estan totalment accessibles al dissolvent, mentre que els protons NH d'amida queden en la zona on pot haver-hi un equilibri entre un estat pontat i un lliure ($|\Delta\delta/\Delta T| = 3 - 5$ ppb/K).

Per tal d'obtenir més informació sobre la tendència d'aquestes estructures en la formació de girs, es van dur a terme càlculs de modelització molecular.

3.2.2 Estudis de modelització molecular

Aquests estudis es van realitzar amb el programa Spartan, amb el camp de forces MMFF94, desenvolupat per Merck.¹⁴⁴

Per cadascun dels diastereòmers, **(6R)-** i **(6S)-168**, es va fer un primer càlcul que ens proporcionà la conformació de mínima energia i un segon càlcul que per obtenir informació sobre les conformacions més estables.

Isòmer (6R)-168

En aquest cas, s'obtingué una única conformació estable, molt similar a l'estructura obtinguda per raigs X per l'éster **(6R)-79** (Fig. 60), on les distàncies i angles d'enllaç obtinguts s'adeqüen als d'un gir de tipus γ (Fig. 65a).

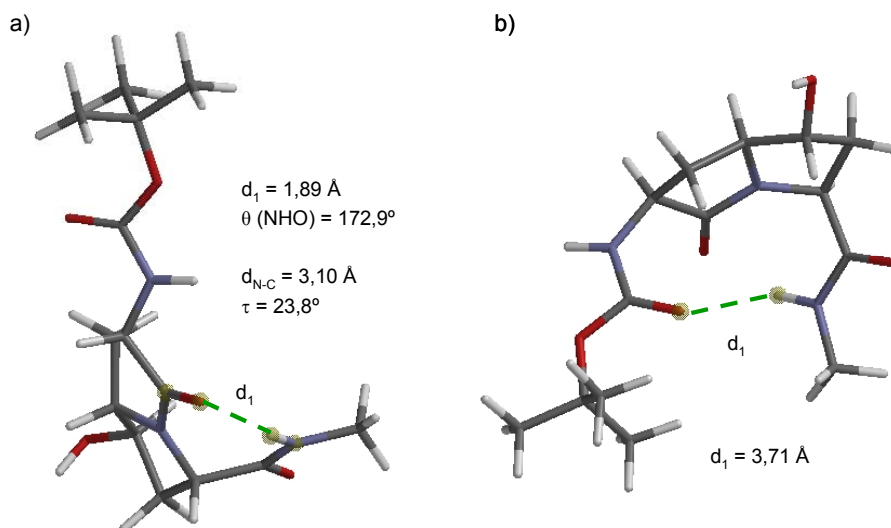


Figura 65: a) Representació de la conformació més estable de l'isòmer **(6R)-168**. b) Conformació obtinguda en fixar l'orientació del CO; tipus gir β .

¹⁴³ Belvisi, L.; Gennari, C.; Mielgo, A.; Potenza, D.; Scolastico, C.; *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 389-400.

¹⁴⁴ Halgren, T.A.; *J. Computational Chem.*, **1996**, 17, 490-519.

Tant el valor de $d_1 = 1,892 \text{ \AA}$ com el de $\theta = 172,9^\circ$ possibiliten la formació d'un pont d'hidrogen de força moderada (on normalment $d_1 = 1,5\text{-}2,2 \text{ \AA}$ i $\theta = 130\text{-}180^\circ$).¹⁴⁵ A més a més, el valor de $\tau = 23,8^\circ$ i la distància entre el CO_i i el NH_{i+2} de $3,099 \text{ \AA}$ s'ajusten a la de la definició de gir γ (on $d_{\text{N-C}} < 3 \text{ \AA}$ i $+90^\circ > \tau > -90^\circ$).

Quan es van buscar totes les conformacions estables possibles, el programa ens conduí únicament a la conformació representada a la Figura 65a.

Tot i així, es restringí l'orientació del carbonil CO_i encarant-lo cap al NH_{i+3} amb la intenció de predeterminar la formació d'un gir de tipus β . En aquest cas, la conformació obtinguda (Fig. 65b) resultà ser molt menys estable que l'anterior ($\Delta E \sim 40 \text{ kcal/mol}$). A més a més, la distància que separa els dos àtoms susceptibles a formar un pont d'hidrogen típic de gir β en aquestes conformacions és de $3,71 \text{ \AA}$, la qual cosa ens indica que la formació d'aquest enllaç d'hidrogen és molt improbable.

Així doncs, es pot concloure que la conformació més estable per aquest diastereòmer és la d'un gir de tipus γ . Aquest fet no descarta la possibilitat de formació d'un gir de tipus β , però en tot cas seria molt menys estable que la conformació anterior.

Isòmer (6S)-168

En aquest cas, s'obtingueren dues conformacions diferents d'estabilitat molt similar ($\Delta E = 0,649 \text{ kcal/mol}$). Les distàncies i angles d'una de les dues conformacions s'ajusten novament a les d'un gir de tipus γ , mentre que en l'altra conformació hi hauria la possibilitat de formació d'un pont d'hidrogen entre NH_{i+3} i l'hidroxil en C-6 (Fig. 66).

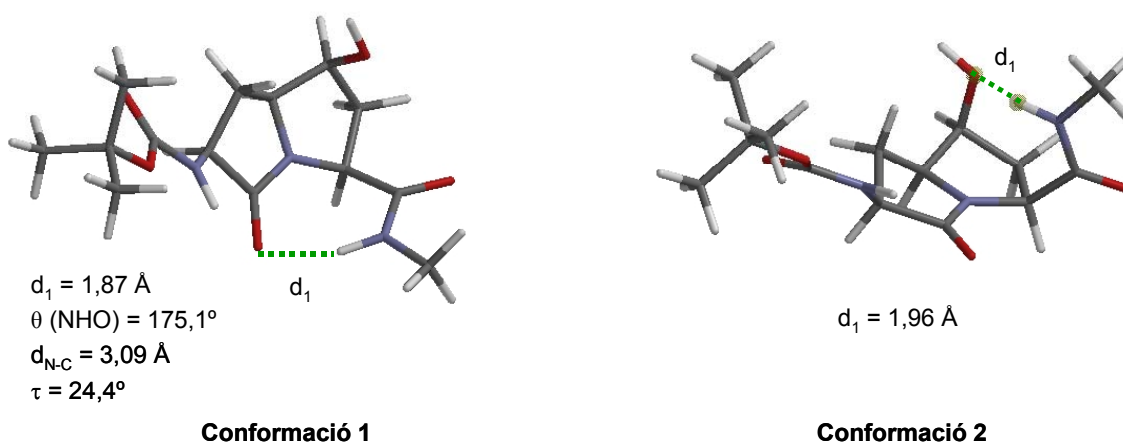


Figura 66: Representació de les dues conformacions més estables de l'isòmer **(6S)-168** calculades per l'Spartan

¹⁴⁵ Jeffrey, G.A.; "An Introduction to Hydrogen Bonding", 1997, Oxford University Press, New York.

3.3 RECAPITULACIÓ

S'ha aconseguit sintetitzar els aminoàcids d'estructura de pirrolizidinona **(6R)-** i **(6S)-79** enantiopurs amb un rendiment global del 23% i 14%, respectivament, partint dels 4-acetoxi diaminosuberats **(4R)** i **(4S)-149**.

En l'intent de derivatitzar el compost **(6R)-79** a través del seu grup hidroxil, vam topat amb l'estabilitat inusual del derivat mesilat **(6R)-169**, probablement a causa de la conformació còncava adoptada pel bicicle que dificulta qualsevol possible atac nucleofílic per la cara oposada del grup mesilat.

Tanmateix, es va aconseguir hidrolitzar l'èster metílic del compost **(6R)-79** i del derivat mesilat **(6R)-169**, la qual cosa permet la utilització d'aquestes estructures en la síntesi peptídica en fase sòlida.

L'anàlisi conformacional de les respectives *N*-metilamides **(6R)-** i **(6S)-168** per RMN i les mesures dels coeficients de temperatura mostra la formació d'un enllaç d'hidrogen, tot i que de força moderada.

La modelització molecular duta a terme amb el programa Spartan ens mostra que la conformació més estable del diastereòmer **(6R)-168** s'ajustaria a la conformació d'un gir γ . En el cas del diastereòmer **(6S)-168** s'observa un equilibri entre dos mínims conformacionals, un que també coincideix amb la formació d'un gir γ i un altre que mostra un possible enllaç d'hidrogen entre el NH-amida i l'hidroxil de la posició C-6.

A més a més, l'anàlisi cristal·logràfic per raigs X de l'estructura **(6R)-79** coincideix amb les dades obtingudes per modelització molecular de l'amida derivada **(6R)-168**.

La capacitat d'inducció de girs γ d'aquestes estructures evidencia el potencial d'aquestes estructures per a l'estudi de relacions estructura-activitat en el camp del peptidomimetisme.

Malauradament, la poca quantitat de producte final obtingut va impossibilitar la introducció d'aquest tipus de peptidomimètics en els inhibidors de dimerització de la HIV-1 PR, per tal d'estudiar-ne la seva influència en l'activitat.