

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



4. DISSENY I SÍNTESI DELS INHIBIDORS DE DIMERITZACIÓ DE LA HIV-1 PR

Tal i com s'ha comentat en la Introducció de la present Tesi Doctoral, un dels objectius d'aquest treball consistia en la preparació d'una quimioteca d'inhibidors de la HIV-1 PR que incorporessin els 3-aminolactams descrits en el Capítol 2.

En aquest Capítol, es detalla el disseny, síntesi i purificació dels nous inhibidors de dimerització de la HIV-1 PR, i al final, en forma d'Annex es troben descrits els fonaments bàsics de la síntesi peptídica en fase sòlida.

4.1 DISSENY DELS INHIBIDORS

Basant-nos en els precedents explicats a la Introducció (pg.19-37), es van dissenyar 3 col·leccions diferents d'inhibidors, inspirades en els resultats obtinguts pel grup de Chmielewski (Fig. 67).⁴⁷

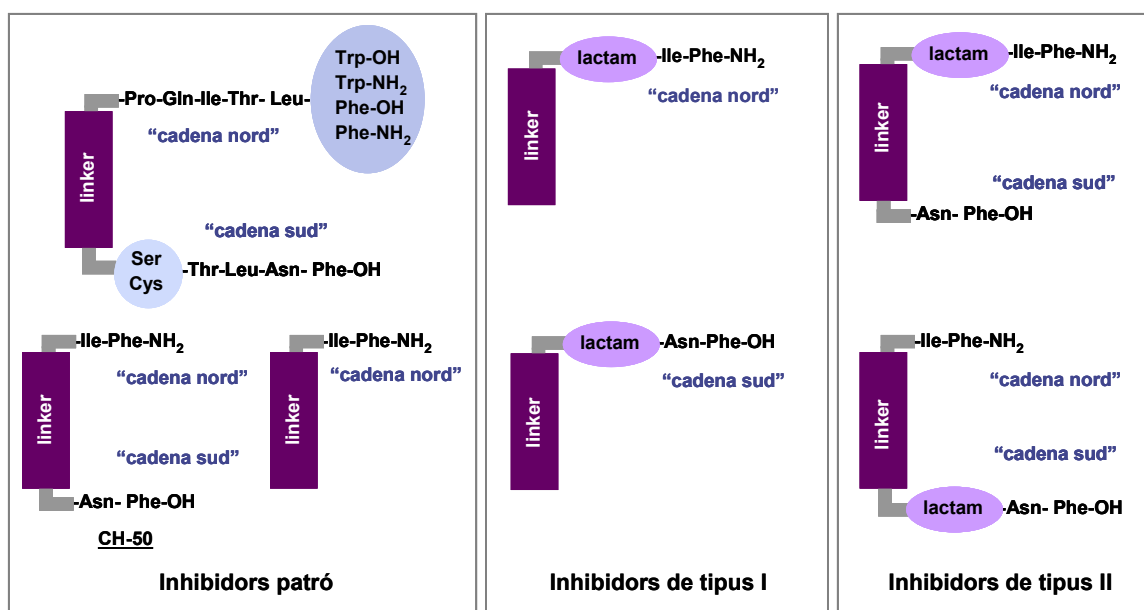


Figura 67: Representació de les 3 col·leccions d'inhibidors de dimerització de la HIV-1 PR

Els **inhibidors "patró"** estan formats per aminoàcids naturals i un *linker* hidrocarbonat. La utilitat de la seva síntesi rau en el fet de poder validar i optimitzar l'estratègia sintètica i a més a més, servir-nos de patró a l'hora d'assajar-ne l'activitat i comparar-los amb la resta d'inhibidors.

Dins d'aquesta col·lecció trobem els inhibidors patró inicials formats per cadenes peptídiques de 5 i 6 residus aminoacídics i l'inhibidor d'estructura minimitzada **CH-50**.⁶⁰ La minimització de l'estructura peptídica permet augmentar l'estabilitat biològica dels inhibidors i disminuir-ne el

pes molecular, amb la finalitat de millorar d'aquesta manera el potencial terapèutic d'aquestes estructures.

Els **inhibidors de tipus I** inclouen en la seva estructura els 3-aminolactams **80** i **82** descrits en el Capítol 2. Aquest tipus d'inhibidor amb anàlegs de dipèptids restringits només presenten una cadena peptídica, ja que estudis anteriors del grup de Schramm havien evidenciat la capacitat inhibidora dels compostos formats per una única cadena peptídica amb un grup palmitoïl en l'extrem *N*-terminal.⁴²

Els **inhibidors de tipus II** també contenen 3-aminolactams **80** i **82** i estan formats per dues cadenes peptídiques (nord i sud).

En aquestes dues noves col·leccions d'inhibidors, el pseudodipèptid es va incorporar en la frontissa entre la cadena peptídica i l'espaiador, per tal que la possible inducció de formació de gir β ajudés a la disposició paral·lela de les dues cadenes peptídiques i possibilitar d'aquesta manera la formació de la làmina β antiparal·lela amb el monòmer de la proteasa.

Amb la finalitat d'observar la influència de la llargada de l'espaiador en l'activitat dels compostos, es van utilitzar *linkers* de dues llargades diferents (àcid hexadecandioic i àcid adípic) (Fig. 68).

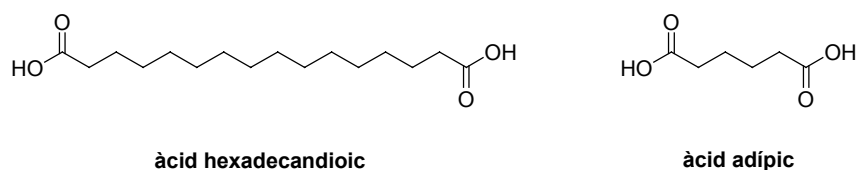


Figura 68: Estructures dels diàcids hexadecandioic i adípic

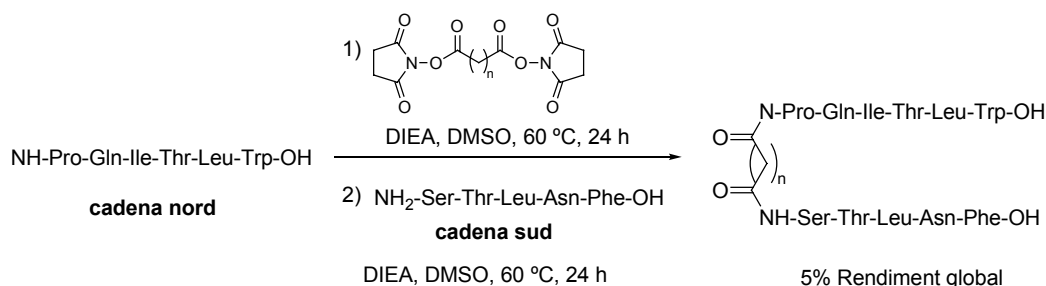
Una possible hipòtesi es basaria en el fet que la incorporació d'un pseudopèptid requereixi que la distància de l'espaiador sigui menor per tal d'assolir la distància necessària de separació entre les dues cadenes peptídiques.

4.2 ANTECEDENTS SINTÈTICS

En iniciar aquest projecte l'any 2002, a la literatura es trobaven descrits els primers inhibidors de dimerització de la proteasa del VIH-1 basats en els fragments peptídics dels extrems *N*- i *C*-terminals de la proteasa retroviral.²³ La majoria d'aquestes estructures estaven formades per dues cadenes peptídiques, la corresponent a l'extrem *N*-terminal (anomenada també "cadena nord") i la corresponent a l'extrem *C*-terminal (o "cadena sud"), unides a través d'un espaiador. El grup de Chmielewski havia desenvolupat dues estratègies diferents per a la síntesi d'aquest tipus d'estructura:

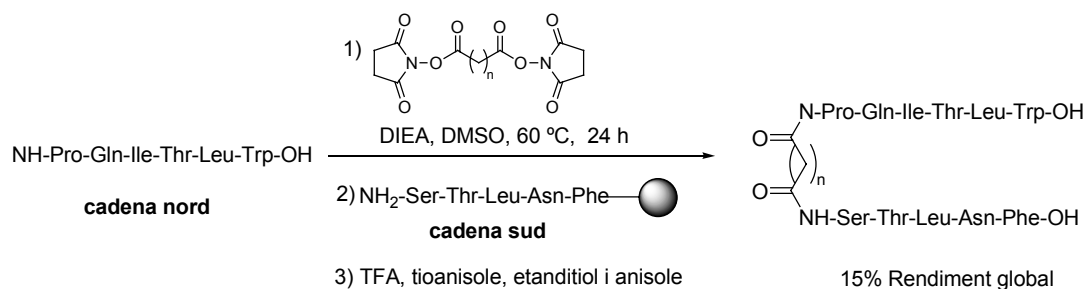
- **Síntesi en solució:** consistia en fer reaccionar 1 eq. de la cadena nord, sintetitzada prèviament en fase sòlida, amb un 1 eq. de DIEA i 1 eq. de l'espaiador diacídic activat en

forma d'éster *N*-hidroxisuccinimídic¹⁴⁶ en DMSO a 60 °C durant 24 h. A continuació, s'hi afegia 1 eq. de la cadena sud i 1 eq. de DIEA i es feia reaccionar durant 24 h en DMSO a 60 °C. D'aquesta manera, després d'una purificació mitjançant HPLC semipreparativa obtenien els compostos desitjats amb un 5% de rendiment global (Esquema 56).



Esquema 56: Estratègia sintètica en solució d'inhibidors de dimerització de la HIV-1 PR⁴⁵

- **Síntesi en fase sòlida:** consistia en fer reaccionar la cadena nord amb l'espaiador activat, en presència de DIEA en DMSO i a 60 °C durant 24 h, i a continuació afegir-hi la cadena sud unida a la resina Wang. El pas final consistia en escindir el pèptid de la resina i en purificar-lo per HPLC semipreparativa. D'aquesta manera, obtenien els compostos desitjats amb un 15% de rendiment global (Esquema 57).



Esquema 57: Estratègia sintètica en fase sòlida dels primers inhibidors de dimerització de la VIH-1 PR⁴⁵

4.3 PLANIFICACIÓ DE LA SÍNTESI DELS INHIBIDORS

Des d'un primer moment, ens vam plantejar de dur a terme la síntesi dels inhibidors en fase sòlida, degut a la facilitat de manipulació que presenten els acoblaments peptídics sobre resina i als millors rendiments observats.

Vam decidir començar per la síntesi dels inhibidors "patró" formats per aminoàcids naturals per tal de validar la metodologia sintètica descrita i adaptar-la per a la síntesi dels nostres inhibidors amb estructures pseudodipeptídiques.

¹⁴⁶ Anderson, G.W.; Zimmerman, J.E.; Callahan, F.M.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 1839-1842.

En termes generals, la síntesi descrita d'aquest tipus d'inhibidors es pot resumir en:

- Síntesi de les cadenes nord en fase sòlida i escissió de la resina
- Síntesi de les cadenes sud en fase sòlida i mantenir-les unides a la resina
- Síntesi de l'espaiador activat
- Unió de les cadenes nord i sud a través de l'espaiador
- Escissió de la resina
- Purificació per HPLC semipreparativa

Abans de començar la síntesi, calgué planificar el tipus de resina necessària, així com la tria dels agents acoblants i els grups protectors per a les cadenes laterals dels aminoàcids.

4.3.1 Resines

D'entre les nombroses resines existents en el mercat varem escollir les següents en funció de la terminació de l'extrem C-terminal i dels aminoàcids de la cadena peptídica:

- Per als pèptids de la cadena nord acabats amb terminació en carboxiamida s'utilitzà la **resina Rink amida MBHA** (4-MetilBenzHidrilAmina). Aquesta resina està derivatitzada amb norleucina i incorpora l'espaiador Rink amida,¹⁴⁷ que es troba unit a la resina MBHA a través d'un grup electroatraient acetamida (Fig. 69).

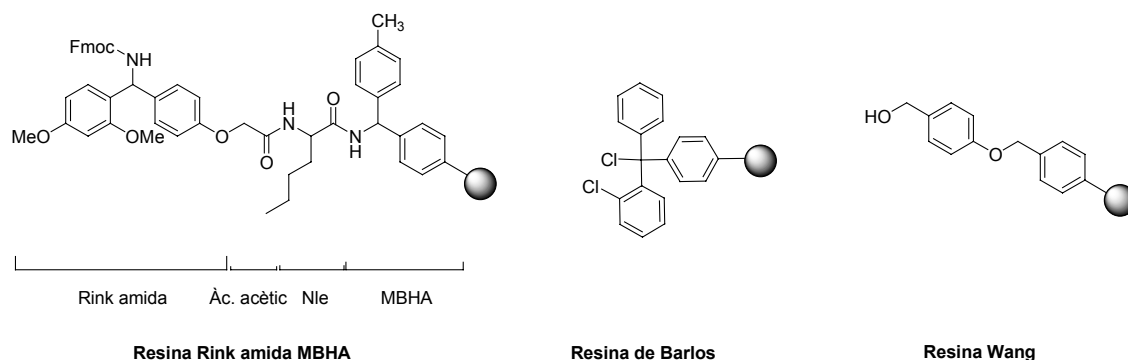


Figura 69: Representació de la resines Rink amida MBHA, Barlos i Wang

- Per les cadenes peptídiques amb Trp en l'extrem C-terminal es va fer ús de la **resina de Barlos** o **clorur de 2-clorotritil**.¹⁴⁸ Aquesta resina permet minimitzar l'alquilació dels residus de Trp per part dels cations generats durant el procés de desancoratge amb TFA, ja que l'elevat impediment estèric dificulta aquesta reacció. A més a més, l'impediment estèric del grup *o*-clorotritil impedeix també la formació de dicetopiperazines, que d'altra banda es produeixen fàcilment quan el primer aminoàcid és Trp o Pro. Aquesta resina possibilita l'escissió del pèptid final sota condicions suaus, gràcies a l'elevada estabilitat dels cations tritil. Això fa possible l'escissió del pèptid de la resina mantenint els grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids (Fig. 69).

¹⁴⁷ Rink, H.; *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 3787-3790.

¹⁴⁸ a) Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, J.; Papaphotiu, G.; Sotiriu, P.; Wenqing, Y.; Schäfer, W.; *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 3943-3946. b) Barlos, K.; Gatos, D.; Kapolos, S.; Papaphotiu, G.; Schäfer, W.; Wenqing, Y.; *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 3947-3950. c) Barlos, K.; Gatos, D.; Schäfer, W.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, *30*, 590-593.

- Per a la resta de pèptids es va utilitzar la **resina Wang**. Aquesta resina és el suport estàndard més utilitzat per a la síntesi peptídica seguint l'estratègia de protecció Fmoc/^tBu (Fig. 69).

4.3.2 Grups protectors de les cadenes laterals

La protecció dels grups funcionals de les cadenes laterals dels aminoàcids és d'importància cabdal per tal d'aconseguir una elevada eficàcia en la síntesi peptídica. Els residus que es van protegir foren:

- **Asn i Gln:** Aquests dos aminoàcids es poden incorporar sense protecció de la cadena lateral, però sovint tenen lloc reaccions secundàries, entre les quals destaca la formació de nitril via deshidratació de la carboxiamida terminal.¹⁴⁹ Per tal de bloquejar l'amida terminal de la cadena lateral, el grup protector més utilitzat en química Fmoc és el grup **Trt**¹⁵⁰, que és el que es va escollir en el nostre cas.
- **Trp:** Hi ha dues reaccions secundàries principals que poden tenir lloc amb el Trp: per una banda l'oxidació del Trp durant la síntesi i per l'altra l'aquilació del nucli indòlic a través dels carbocations generats durant el desancoratge. Amb l'objectiu de minimitzar aquestes reaccions secundàries, en el nostre cas es va protegir el residu Trp amb el grup **Boc**.¹⁵¹
- **Ser i Thr:** En principi, la protecció de l'alcohol primari i secundari de la Ser i la Thr no és necessària, tot i que a vegades s'observa una acilació parcial d'aquest grup en SPPS. Un dels grups més utilitzats en l'estratègia Fmoc per a la protecció de l'hidroxil de la cadena lateral és el grup **^tBu** i fou l'escollit en el nostre cas.
- **Cys:** Finalment, també es va protegir la Cys amb el grup **Trt** degut a l'elevada nucleofília, la facilitat d'oxidació i el caràcter acídic del grup tiol de la cadena lateral.

4.3.3 Agents acoblants

La formació de l'enllaç amida és una de les reaccions crucials en la síntesi peptídica i el fet que sigui quantitativa és una de les condicions bàsiques per a la formació d'un producte final homogeni.

L'ampli ventall de mètodes d'acoblament disponibles en l'actualitat es pot subdividir en diferents categories:

- Ús de carbodiimides
- Ús d'anhídrids simètrics
- Ús d'ésters actius
- Ús d'agents acoblants de tipus uroni
- Ús d'agents acoblants de tipus fosfoni

¹⁴⁹ a) Katsoyannis, P.G.; Gish, D.T.; Hess, G.P.; du Vigneaud, V.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 2558-2562. b) Gausepohl, H.; Kraft, M.; Frank, R.W.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1989**, *34*, 287-294.

¹⁵⁰ Sieber, P.; Riniker, B.; *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 739-742.

¹⁵¹ Franzen, H.; Grehn, L.; Ragnarsson, U.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1984**, *24*, 1699-1700.

Els agents acoblants s'acostumen a escollir en funció de la dificultat de l'acoblament i del valor de l'aminoàcid utilitzat. D'aquesta manera, si es tracta d'aminoàcids comercials s'acostumen a utilitzar agents acoblants senzills i barats, mentre que per aminoàcids de més valor afegit s'utilitzen agents acoblants més sofisticats.

Acoblament d'aminoàcids naturals en SPPS

Per a la síntesi de les cadenes nord i sud, formades en la seva totalitat per aminoàcids naturals, es va optar per utilitzar el mètode clàssic de les carbodiimides, fent servir com a reactius DIPCDI i HOBt.

Acoblament dels 3-aminolactams en SPPS

Els acoblaments dels lactams es dugueren a terme fent servir un agent acoblant més potent com és el cas del PyBOP, agent que es basa en la generació *in situ* d'ésters actius¹⁵² i que ha adquirit una importància considerable en la química de pèptids més recent.

4.4 SÍNTESI DELS INHIBIDORS PATRÓ

4.4.1 Inhibidors patró amb cadenes peptídiques de 5 i 6 aminoàcids

Reproducció de l'estratègia sintètica descrita

En base als resultats descrits a la literatura,⁴⁷ s'escolliren les cadenes nord i sud més significatives. D'aquesta manera, es van escollir 4 cadenes nord, que diferien en l'últim aminoàcid (Trp o Phe) i en el grup funcional terminal (carboxiàcid o carboxiamida) i 2 cadenes sud, que diferien en un aminoàcid (Ser o Cys) (Fig. 70).

Segons l'estudi dut a terme per Chmielewski,⁴⁷ la substitució del Trp terminal per Phe duplica l'activitat inhibidora del compost. Una possible explicació d'aquest augment d'activitat es deu al fet que només una part de la cadena lateral del Trp es trobi endinsada dins una cavitat hidrofòbica. D'aquesta manera, la menor grandària de la cadena lateral de la Phe, li permetria acomodar-se millor a la superfície hidrofòbica i crear una millor interacció. En aquest mateix estudi, també s'havia observat que la modificació de la funció àcida final per una amida produïa un augment de la inhibició. La substitució de la Cys de la cadena sud per Ser es feu amb l'objectiu de simplificar la síntesi i evitar els problemes provocats per l'oxidació dels grups tiol de la Cys.¹⁵³

¹⁵² Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B.; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 205-208.

¹⁵³ Albericio, F.; Annis, I.; Royo, M.; Barany, G.; *Fmoc solid phase peptide synthesis*; Chan, W.C i White, P.D. (Eds.), Oxford University Press, Oxford, **2000**, 77-114.

Cadenes nord	Resina	Grups protectors
N1 NH-Pro-Gln-Ile-Thr-Leu-Trp-CO ₂ H	Barlos	Gln(Trt), Thr(^t Bu), Trp(Boc)
N2 NH-Pro-Gln-Ile-Thr-Leu-Trp-CONH ₂	Rink amida MBHA	Gln(Trt), Thr(^t Bu), Trp(Boc)
N3 NH-Pro-Gln-Ile-Thr-Leu-Phe-CO ₂ H	Wang	Gln(Trt), Thr(^t Bu)
N4 NH-Pro-Gln-Ile-Thr-Leu-Phe-CONH ₂	Rink amida MBHA	Gln(Trt), Thr(^t Bu)

Cadenes sud	Resina	Grups protectors
C1 NH ₂ -Ser-Thr-Leu-Asn-Phe-C(=O)-O-●	Wang	Ser(^t Bu), Thr(^t Bu), Asn(Trt)
C2 NH ₂ -Cys-Thr-Leu-Asn-Phe-C(=O)-O-●	Wang	Cys(Trt), Thr(^t Bu), Asn(Trt)

Figura 70: Seqüències de les cadenes nord i sud sintetitzades i descripció de les resines i grups protectors utilitzats

a) Síntesi de les cadenes nord i escissió de la resina

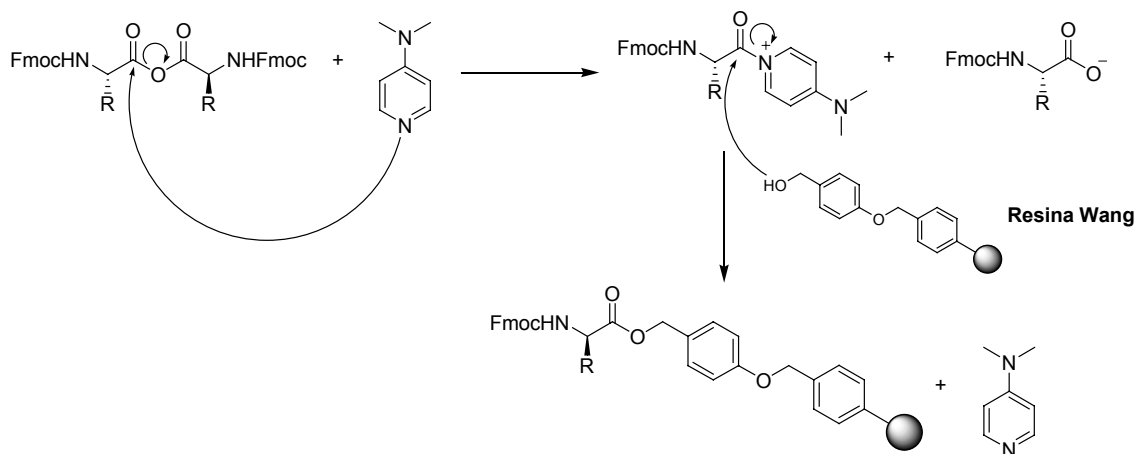
En primer lloc es van sintetitzar les cadenes nord (Fig. 70), fent ús de les resines, els grups protectors i els agents acoblats comentats en l'Apartat 4.3.

La síntesi es va dur a terme en paral·lel, fent ús de xeringues de polipropilè equipades amb una placa filtrant que permet filtrar els excessos de reactius.

Les condicions d'acoblament van ser les mateixes per tres tipus de resines (3 eq. de Fmoc-Aa, 3 eq. de DIPCDI i 3 eq. d'HOBt), però en canvi, l'acoblament del primer aminoàcid a la resina difereix en els tres casos, depenent del tipus de resina (vegeu Apartat 7.3.4).

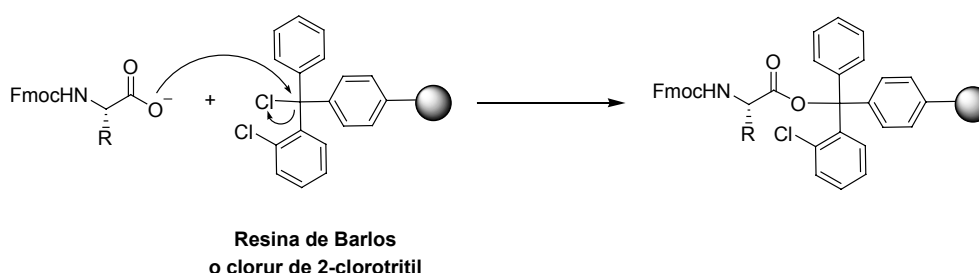
Pel que fa a les cadenes nord **N2** i **N4** sintetitzades fent ús de la resina Rink amida MBHA, les condicions d'acoblament del primer aminoàcid foren anàlogues a les de qualsevol acoblament peptídic ja que l'espaiador Rink amida conté un grup amino protegit amb Fmoc.

En canvi, en el cas de la cadena nord **N3**, sintetitzada amb la resina Wang com a suport sòlid, el primer acoblament va tenir lloc mitjançant una esterificació amb el corresponent anhidrid simètric, catalitzada per DMAP (Esquema 58).



Esquema 58: Unió del primer aminoàcid a la resina Wang

En el cas de la cadena nord **N1** sintetitzada fent servir la resina de Barlos com a suport sòlid, l'acoblament del primer aminoàcid tingué lloc per mitjà d'un atac nucleofílic sota condicions suaus (1,2 eq. Fmoc-Aa i 4 eq. de DIEA) (Esquema 59).



Esquema 59: Unió del primer aminoàcid a la resina de Barlos

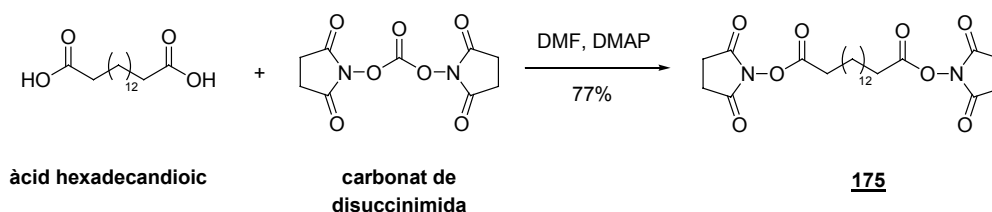
Un cop obtinguda la seqüència d'aminoàcids desitjada, les cadenes nord **N1**, **N2**, **N3** i **N4** es van escindir de la resina, per tractament amb un còctel de TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5). D'aquesta manera, s'obtingueren finalment els pèptids desitjats de les cadenes nord amb uns rendiments d'entre el 50 i el 60% i una puresa superior al 90%, la qual cosa ens feu decidir per utilitzar-los per a les següents reaccions sense purificació prèvia.

b) Síntesi de les cadenes sud unides a la resina

Les cadenes sud **C1** i **C2** se sintetitzaren amb la resina Wang de forma anàloga a la descrita per **N3** i romangueren ancorades a la resina.

c) Síntesi de l'espaiador activat

Per tal d'unir les cadenes peptídiques nord i sud, s'utilitzà un espaiador diacídic de 14 unitats metilè, que proporcionava la distància requerida per mimetitzar la distància de 10 Å que separa la Pro¹ de la Cys⁹⁵ en la proteasa del VIH-1. Per tal d'activar els grups carboxílics de l'espaiador i possibilitar la reacció amb el grup amino terminal de la cadena nord i sud, es transformaren els grups carboxílics en ésters de *N*-hidroxisuccinimida. Així doncs, el tractament de l'àcid hexadecandioic amb carbonat de disuccinimida i DMAP com a catalitzador rendí el diàcid activat **181** amb un 77% de rendiment (Esquema 60).



Esquema 60: Reacció de formació de l'éster *N*-hidroxisuccinimídic de l'àcid hexadecandioic

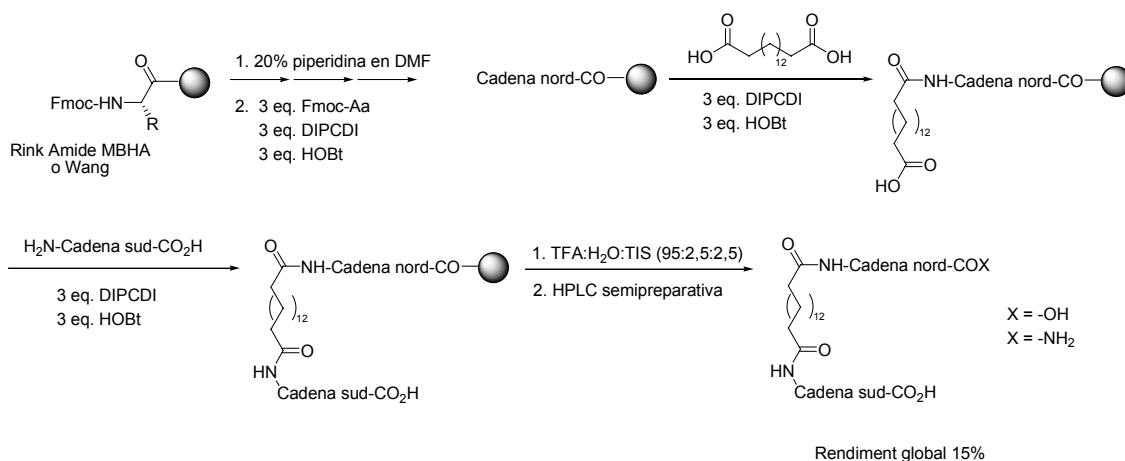
d) Unió de les cadenes nord i sud a través de l'espaiador

La reproducció de l'estratègia sintètica descrita per Chmielewski, basada en fer reaccionar la cadena nord amb l'espaiador i DIEA en DMSO a 60 °C i a continuació afegir-hi la cadena sud

ancorada a la resina, va donar lloc a mescles de productes de difícil separació, resultats que ens van conduir al desenvolupament d'una estratègia alternativa.

Nova estratègia sintètica

La nova ruta sintètica desenvolupada es basa en el creixement de la cadena nord a la resina Wang o Rink amida (depenent de la terminació en carboxiàcid o en carboxiamida), seguida de la unió de l'espaiador diàcid (activat *in situ* amb agents acoblants) i finalment la unió de la cadena sud amb les cadenes laterals protegides, sintetitzada prèviament amb la resina de Barlos (Esquema 61). El dissolvent emprat en aquest cas fou una mescla de DMF i DCM, i les reaccions tingueren lloc a temperatura ambient i no a 60 °C com en la síntesi anterior. El seguiment dels acoblaments entre aminoàcids i entre la cadena nord i l'espaiador es va fer per mitjà del test colorimètric de Kaiser, mentre que l'acoblament de la cadena sud se seguí mitjançant el test de verd de malaquita, que permet la detecció dels àcids carboxílics lliures.¹⁵⁴



Esquema 61: Nova estratègia sintètica desenvolupada per a la síntesi d'inhibidors de dimerització de la VIH-1 PR

Per tal de comprovar la viabilitat d'aquesta nova estratègia i amb la intenció d'utilitzar els compostos resultants com a referència en els assaigs d'activitat, s'escolliren 3 de les possibles combinacions entre les cadenes nord i sud, i se sintetitzaren els productes **N2C1**, **N3C1** i **N4C1** (Fig. 71a). En els tres casos, es detectà per MALDI la presència d'un producte secundari, que s'identificà com el producte d'entrecruament (*cross-coupling*) (Fig. 71b).

¹⁵⁴ Vázquez, J.; Qushair, G.; Albericio, F.; "Qualitative colorimetric tests for solid phase synthesis", *Methods in Enzymology*, **2003**, 369, (Combinatorial Chemistry, Part B), 21-35.

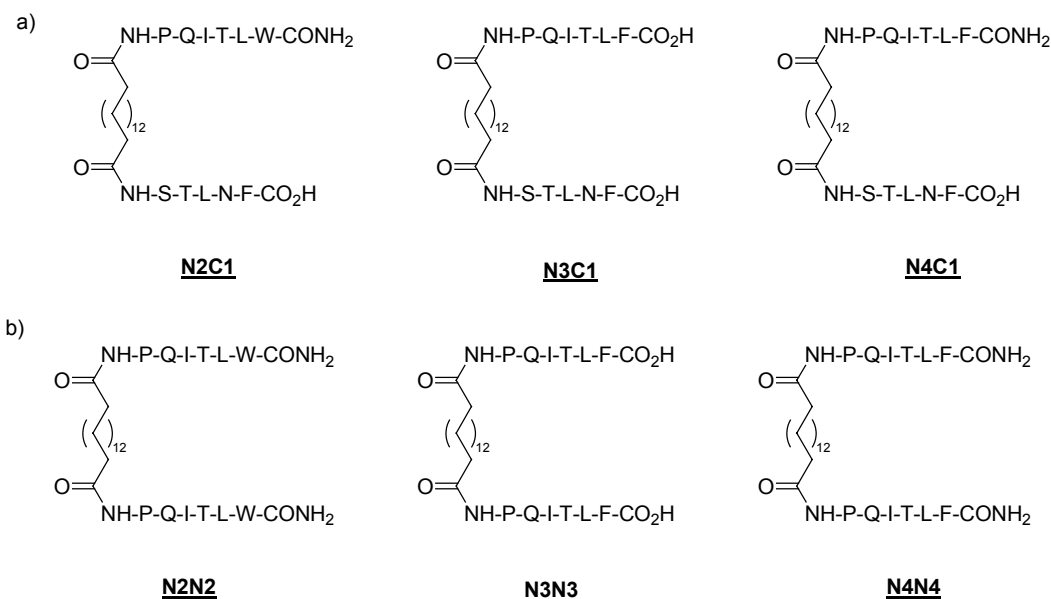
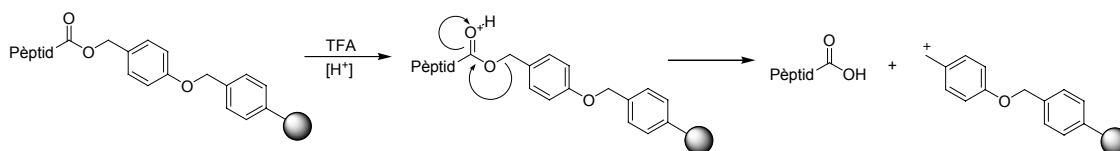


Figura 71: Estructures dels inhibidors sintetitzats (a) i dels productes secundaris de *cross-coupling* (b)

Aquests productes d'entrecruament es formen en el moment d'acoblar l'espaiador amb la cadena nord, ja que es pot donar el cas en què els dos extrems carboxílics del *linker* s'activin i reaccionin simultàniament amb dues cadenes nord unides a la resina. Aquest problema es podria solucionar fent ús d'un espaiador en forma d'anhídrid simètric cíclic, però la dificultat d'obtenció d'aquest anhídrid degut a la possible polimerització, ens va decidir a continuar amb l'estratègia sintètica establerta. A més a més, la possible separació mitjançant l'HPLC semipreparativa del producte desitjat i el producte secundari ens va fer decantar per aïllar tots dos compostos i provar-ne independentment l'activitat envers la proteasa del VIH-1.

e) Desancoratge de la resina i purificació

L'escissió dels inhibidors de les resines Wang i Rink amida MBHA tingué lloc per acidòlisi amb TFA, en presència de TIS i H₂O com a capturadors de carbocacions (Esquema 62).



Esquema 62: Desancoratge dels inhibidors units a la resina Wang

Un cop sintetitzats els inhibidors desitjats, aquests es van purificar mitjançant HPLC semipreparativa. Cal destacar la baixa solubilitat d'aquests compostos en les condicions estàndard d'anàlisi i purificació de pèptids (MeCN i H₂O), que en dificulta la purificació.

D'aquesta manera, s'obtingueren els inhibidors **N2C1**, **N3C1** i **N4C1** amb aproximadament un 15% de rendiment. La identitat dels productes es confirmà per MALDI i anàlisi d'aminoàcids, i la seva puresa es determinà a través de l'HPLC.

4.4.2 Inhibidor patró minimitzat CH-50

Un cop desenvolupada la nova estratègia de síntesi, s'aplicà també per a la síntesi de l'inhibidor patró d'estructura minimitzada **CH-50**, format pels 4 residus essencials per a l'activitat inhibidora (Esquema 61).

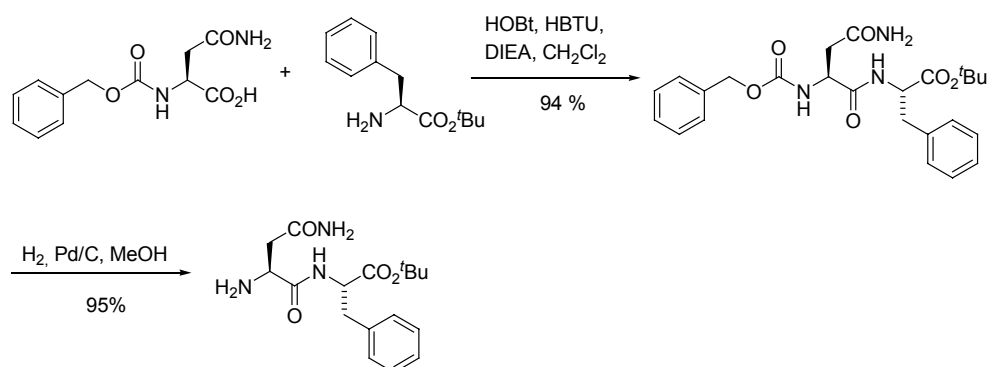
a) Síntesi de la cadena nord ancorada a la resina

Per a la síntesi en fase sòlida, s'utilitzà la resina Rink amida MBHA, per tal d'obtenir la carboxiamida terminal. S'hi acoblaren la Phe i la Ile, fent servir l'estratègia Fmoc^tBu amb DIPCDI com a agent acoblant.

b) Síntesi de la cadena sud en solució

Aquest punt és l'únic que es diferencia de la síntesi explicada anteriorment, ja que en aquest cas, com que la cadena sud estava formada únicament per 2 aminoàcids (NH₂-Asn-Phe-O^tBu), es va sintetitzar en solució de forma anàloga a la descrita a la literatura.⁶⁰

Es feu reaccionar l'aminoàcid Cbz-NH-Asn-CO₂H (protegit en forma de Cbz per evitar la reacció amb una altra molècula d'Asn) amb l'aminoàcid NH₂-Phe-CO₂^tBu, fent servir com a agent acoblant HBTU en presència de DIEA, obtenint-se el dipèptid desitjat amb un 94% de rendiment després d'una purificació en columna. A continuació es desprotegí el grup amino de l'Asn per hidrogenació catalítica amb Pd/C amb un 95% de rendiment, cosa que s'observà per la desaparició del senyal a $\delta = 5,10$ ppm corresponent al CH₂ benzílic en l'espectre de ¹H-RMN (Esquema 63).



Esquema 63: Síntesi del dipèptid NH₂-Asn-Phe-CO₂^tBu

Cal remarcar que en aquesta síntesi, s'utilitzà l'Asn sense protecció a la cadena lateral i que tot i així no es detectà la formació de cap producte secundari.

c) Acoblament del linker a la cadena nord

La cadena nord es va fer reaccionar amb l'àcid hexadecandioic i arribats a aquest punt, es decidí dividir la resina en dues parts: una de les parts s'escindí de la resina i a l'altra, se li acoblà la cadena sud.

En el primer cas, s'obtingué el compost **176** format per la cadena nord unit a l'àcid hexadecandioic, producte d'especial interès per analogia al inhibidor de dimerització de la proteasa del VIH descrit pel grup de Reboud-Ravaux format per una única cadena peptídica i una cua de palmitoil (Fig. 72, **RR-3b**).^{42,43}

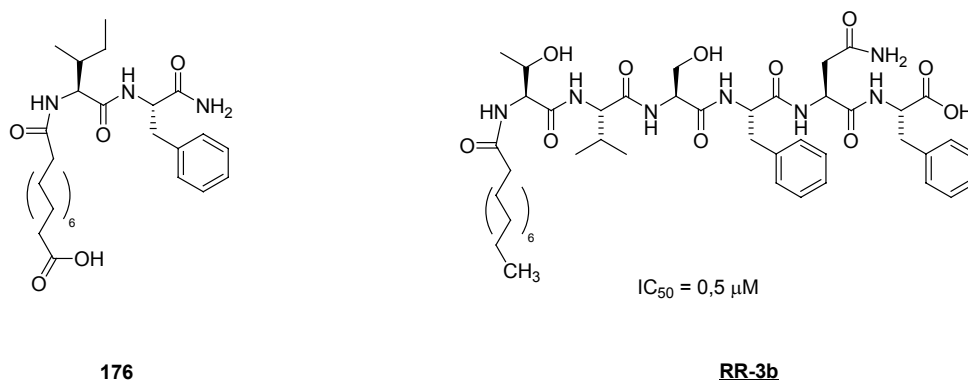


Figura 72: Estructures de l'inhibidor **176** i de l'inhibidor **RR-3b** desenvolupat pel grup de Reboud-Ravaux

d) Acoblament de la cadena sud

Amb la resta de producte, es provaren diferents condicions per a l'acoblament de la cadena sud (PyBOP o HBTU com agents acoblants i DMF o DMSO com a dissolvents), i finalment s'optà per l'ús de PyBOP en DMF.

e) Desancorament de la resina i purificació

L'escissió dels 2 productes, **176** i **CH-50**, tingué lloc per tractament amb TFA:H₂O (95:5) i la posterior purificació del cru obtingut per HPLC semipreparativa rendí els productes desitjats amb un 19 i 14% de rendiment, respectivament.

Tant en la síntesi del compost **176** com **CH-50** s'observà per MALDI la presència del producte de *cross-coupling* **176cc** (4%) que s'aconseguí aïllar per HPLC semipreparativa.

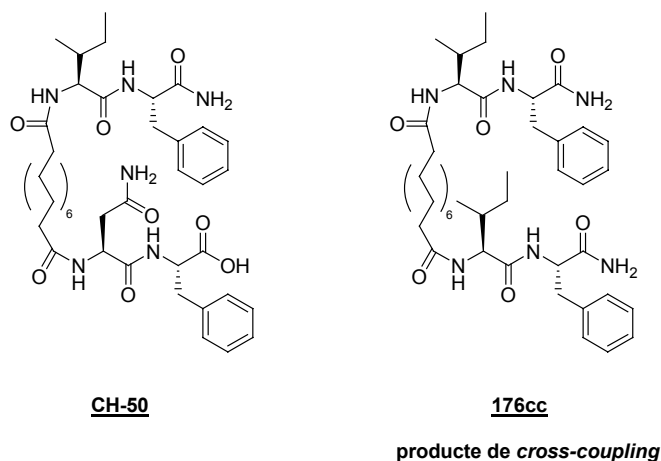


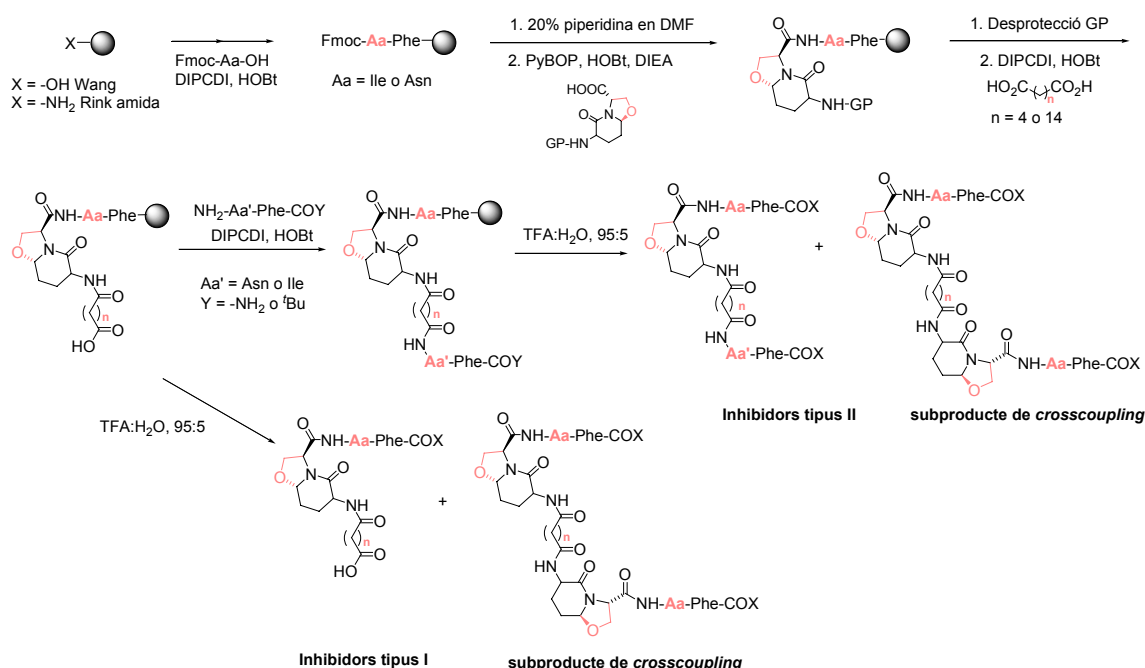
Figura 73: Estructures de l'inhibidor **CH-50** i del producte de *cross-coupling* **176cc**

4.5 SÍNTESI DELS INHIBIDORS DE TIPUS I i II

Un cop validada l'estratègia sintètica dels inhibidors formats per aminoàcids naturals, es va voler abordar la incorporació de les dues estructures pseudodipeptídiques sintetitzades, per tal de poder assajar l'activitat dels nous inhibidors i comparar-la amb la dels inhibidors formats per aminoàcids naturals.

L'estratègia sintètica utilitzada per a la síntesi d'aquests compostos és anàloga a la desenvolupada per a la síntesi dels inhibidors patró, però incloent-hi l'acoblament dels 3-aminolactams **80** i **82** i la variació de llargada del *linker*.

La incorporació del pseudodipeptid tingué lloc tant a la frontissa de la cadena nord com a la de la cadena sud, la qual cosa comporta petites variacions en l'estratègia sintètica. Tal i com es mostra en l'Esquema 64, en el cas que el 3-aminolactam es vulgui incorporar en la cadena nord, cal sintetitzar el dipèptid NH₂-Ile-Phe-CONH₂ ancorat a la resina Rink amida MBHA, a continuació acoblar-hi el 3-aminolactam i el linker desitjat, i finalment fer-ho reaccionar amb el dipèptid de la cadena sud (NH₂-Asn-Phe-CO₂^tBu). En canvi, per a la incorporació del 3-aminolactam en la cadena sud, cal sintetitzar el dipèptid NH₂-Asn-Phe-CO₂H ancorat a la resina Wang, a continuació acoblar-hi el 3-aminolactam i el linker desitjat, i finalment fer-ho reaccionar amb el dipèptid de la cadena nord (NH₂-Ile-Phe-CONH₂).

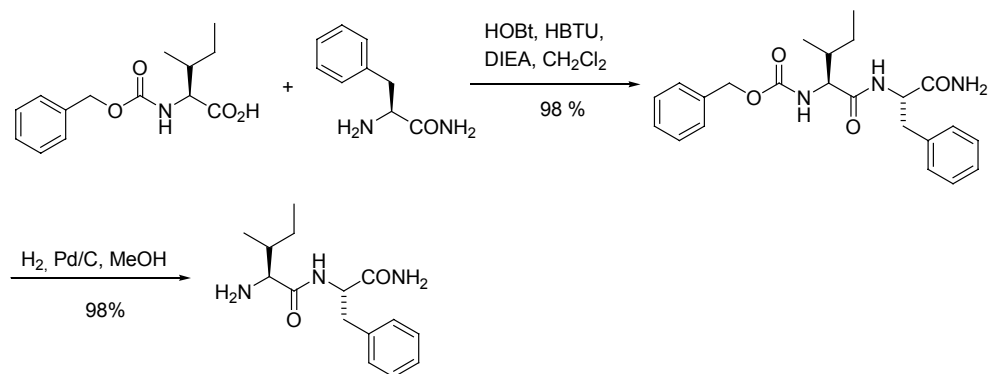


Esquema 64: Estratègia per a la síntesi dels inhibidors amb l'estructura pseudodipeptídica incorporada

Per tant, abans de començar la síntesi dels inhibidors calia disposar dels dipèptids NH₂-Ile-Phe-CONH₂ i NH₂-Asn-Phe-CO₂^tBu, corresponents a la cadena nord i sud respectivament. El

dipèptid $\text{NH}_2\text{-Asn-Phe-CO}_2^t\text{Bu}$ ja havia estat sintetitzat en la preparació de l'inhibidor **CH-50**, o sigui que es procedí de manera anàloga per a la síntesi del dipèptid $\text{NH}_2\text{-Ile-Phe-CONH}_2$.

Fent reaccionar l'aminoàcid $\text{Cbz-NH-Ile-CO}_2\text{H}$ amb el derivat de Phe i amb HBTU com a agent acoblant, s'obtingué el dipèptid desitjat amb un 98% de rendiment. A continuació, es desprotegí el grup amino de l'Ile per hidrogenació catalítica amb Pd/C amb un 98% de rendiment. En l'espectre de $^1\text{H-RMN}$ del producte obtingut, s'observà la desaparició del senyal a $\delta = 5,01$ ppm corresponent al CH_2 benzílic (Esquema 65).



Esquema 65: Síntesi en solució del dipèptid $\text{NH}_2\text{-Ile-Phe-CONH}_2$

4.5.1 Inhibidors amb l'oxazolopiperidona 80

Seguint l'estratègia sintètica descrita en l'Esquema 64 se sintetitzaren inhibidors amb l'estructura d'oxazolopiperidona **80** incorporada. Dins d'aquest grup es poden distingir dues classes diferents: els inhibidors de tipus I, formats per una única cadena peptídica i els inhibidors de tipus II, formats per dues cadenes peptídiques.

Inhibidors de tipus I

Es van sintetitzar 3 compostos de tipus I amb l'estructura d'oxazolopiperidona **80** incorporada (Fig. 73). Aquests compostos es purificaren per HPLC semipreparativa i s'obtingueren amb uns rendiments del 36%, 22% i 38%, respectivament. En cap cas es detectà la presència del producte de *cross-coupling*.

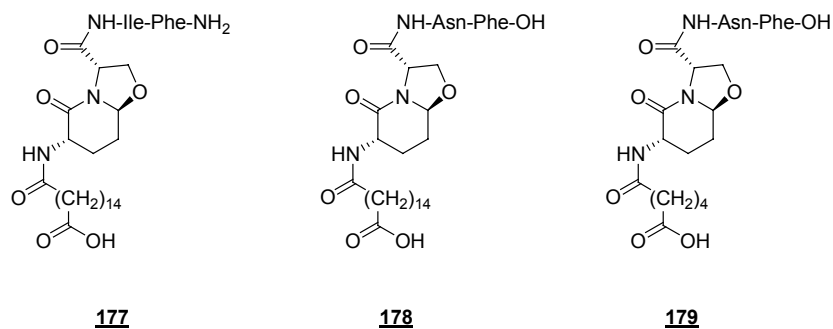


Figura 73: Estructures dels inhibidors sintetitzats amb terminació en carboxiàcid

Inhibidors de tipus II

Dins d'aquest grup trobem els inhibidors **180** i **181**, sintetitzats amb un 16% i 42% de rendiment, respectivament (Fig. 74). En aquests casos es detectà la presència dels productes de *cross-coupling*, **180cc** i **181cc**, que es pogueren aïllar (amb un 4% i 3% de rendiment, respectivament) per mitjà d'HPLC semipreparativa.

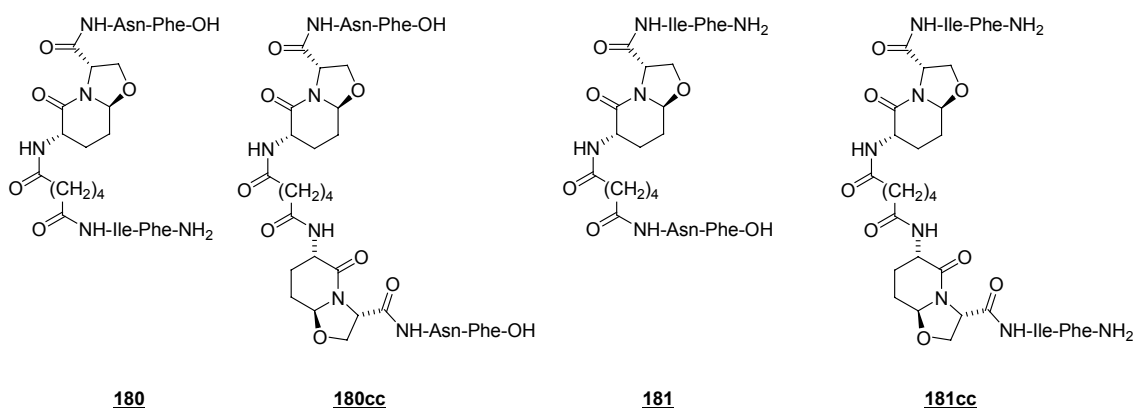


Figura 74: Estructures dels inhibidors de tipus II i dels productes de *cross-coupling*

4.5.2 Inhibidors amb el lactam de Freidinger 82

En primer lloc, cal destacar que en aquest cas el 3-aminolactam **82** era una mescla racèmica i que, per tant, els inhibidors sintetitzats estaven formats forçosament per mescles diastereomèriques que s'intentaren separar en la purificació final.

En aquest grup d'inhibidors que incorporen el lactam de Freidinger **82**, hi trobem també inhibidors de tipus I (formats per una sola cadena peptídica) i inhibidors de tipus II (formats per 2 cadenes peptídiques).

Inhibidors de tipus I

Terminació en Al-loc

En aquests compostos, no s'hi incorporà cap *linker* amb la finalitat d'observar l'efecte del grup *N*-Al-loc en l'activitat inhibidora (Fig. 75).

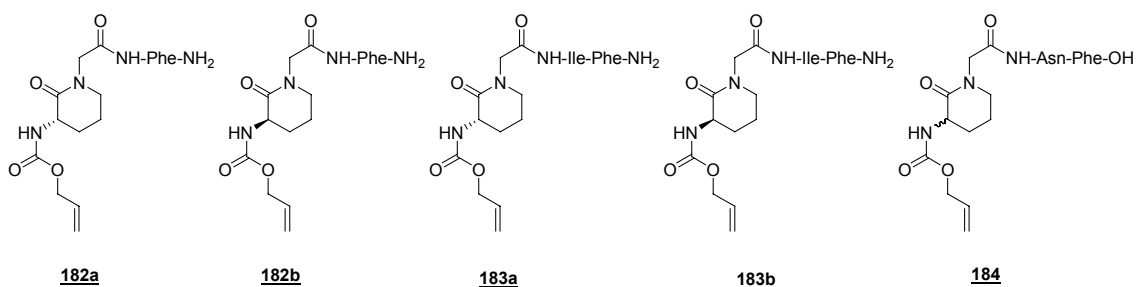


Figura 75: Estructures dels inhibidors de tipus I amb terminació amb el grup Al-loc

En el cas dels compostos **182** i **183** s'aconseguí la separació dels diastereòmers per mitjà de HPLC semipreparativa (Fig. 76), després d'optimitzar les condicions d'elució per tal de permetre la màxima resolució dels dos pics. En el cas de la mescla diastereomèrica **182**, la separació tingué lloc fent servir un gradient de 25% a 32% de MeCN en 15 min i en el cas de **183**, s'utilitzà un mètode isocràtic de 27% de MeCN durant 15 min, però l'assignació de l'estructura a cadascun dels diastereòmers no fou possible per $^1\text{H-RMN}$.

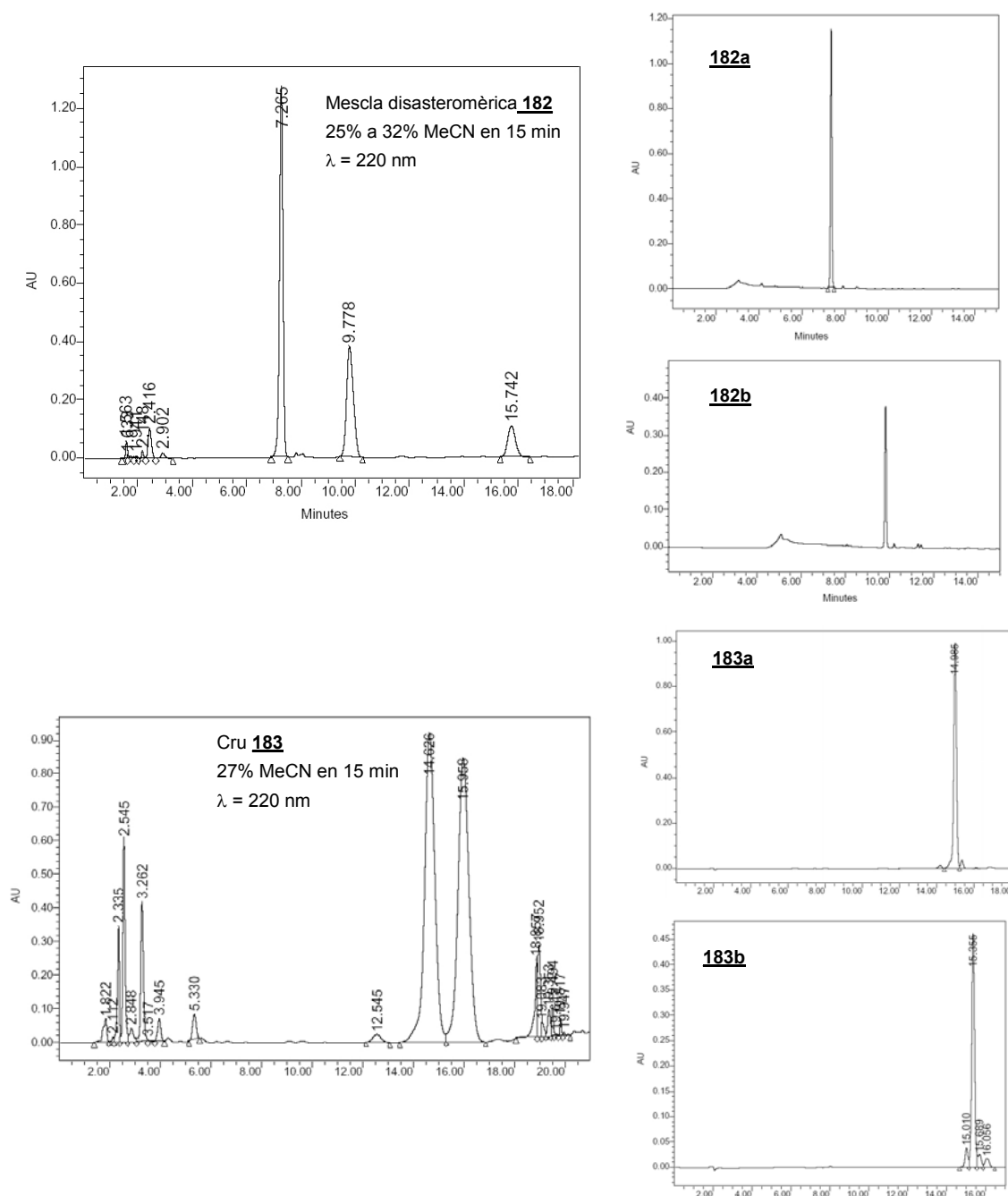
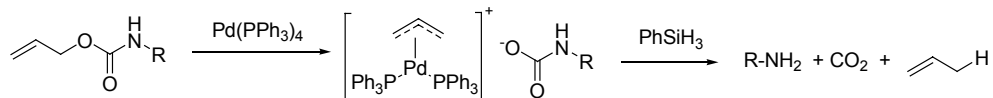


Figura 76: Cromatogrames corresponents a la separació de les mescles diastereomèriques **182** i **183**

En el cas del compost **184**, tot i assajar diferents condicions experimentals, la separació dels diastereòmers no fou possible. Els inhibidors **182**, **183** i **184** s'obtingueren amb rendiments globals entre el 25-30%.

Terminació amb el linker

En aquest tipus d'inhibidors, un cop incorporat el lactam de Freidinger **82**, es va haver de desprotegir el grup amino protegit amb Al-loc per tal de poder acoblar l'espaiador. Aquesta reacció que es dugué a terme mitjançant una transferència d'hidrogen catalitzada per $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ en presència de PhSiH_3 (Esquema 66).¹⁵⁵



Esquema 66: Mecanisme de desprotecció del grup N^t -al·liloxicarbonil

Un cop desprotegit el grup amino, es pogué procedir amb l'acoblament dels *linkers* corresponents. D'aquesta manera s'obtingueren els compostos **185**, **186** i **187** (Fig. 76).

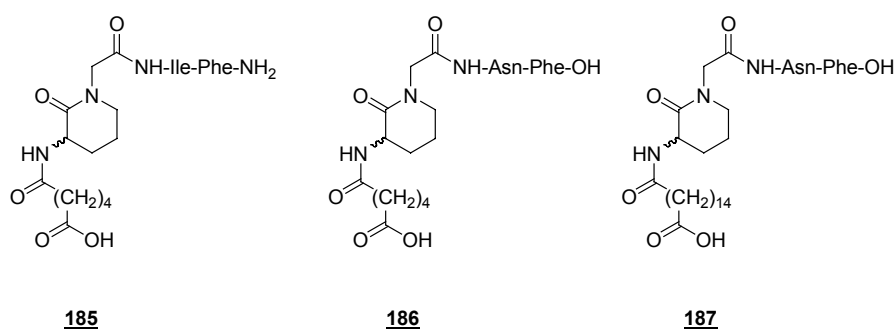


Figura 76: Estructures dels inhibidors sintetitzats amb terminació en carboxiàcid

En cap d'aquests casos, no s'aconseguí la separació per HPLC semipreparativa de les mesclades diastereomèriques **185**, **186** i **187**, que se sintetitzaren amb uns rendiments globals del 34%, 16% i 18%, respectivament (Fig. 77).

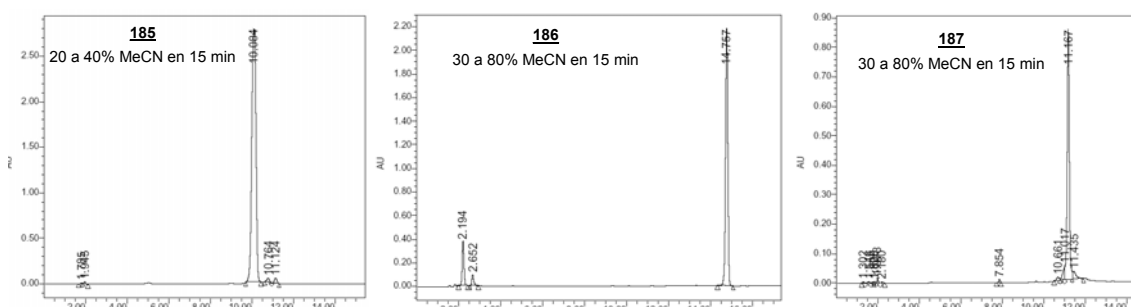


Figura 77: Cromatogrames dels productes **185**, **186** i **187**

En els dos darrers casos, es pogué aïllar un 3% del producte de *cross-coupling* **186cc** i **187cc** per HPLC semipreparativa (Fig. 78).

¹⁵⁵ Gómez-Martínez, P.; Dessolin, M.; Guibé, F.; Albericio, F.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**, 2871-2874.

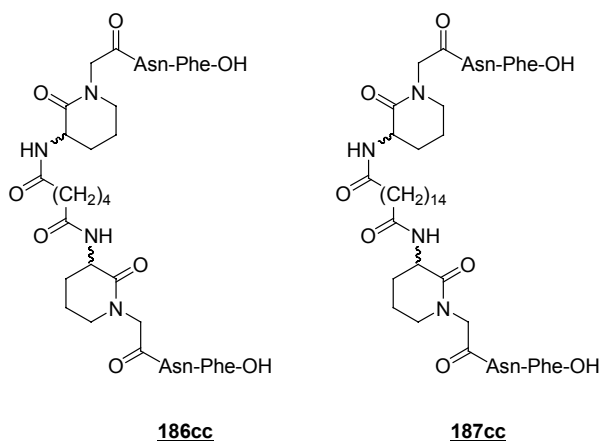


Figura 78: Estructures dels productes de *cross-coupling* **186cc** i **187cc**

Inhibidors de tipus II

Els inhibidors de tipus II sintetitzats amb el lactam de Freidinger **82** incorporat són els que es mostren a la Figura 78.

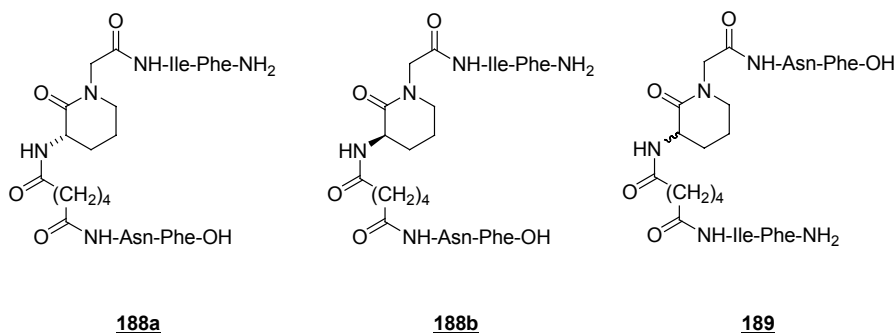


Figura 78: Estructures dels inhibidors sintetitzats amb la cadena nord i sud

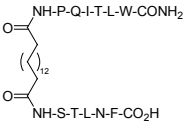
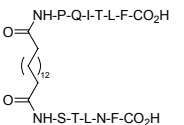
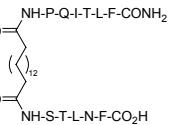
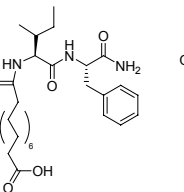
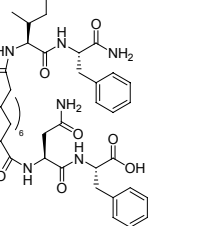
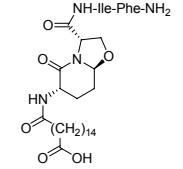
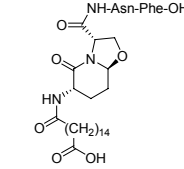
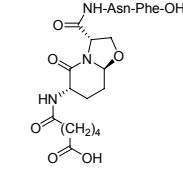
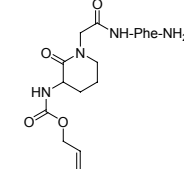
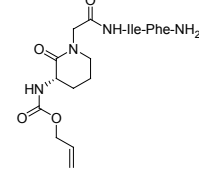
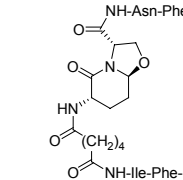
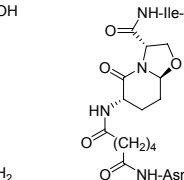
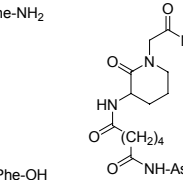
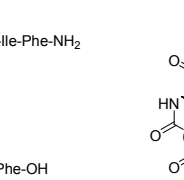
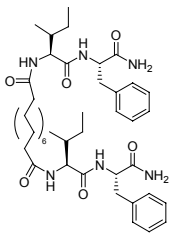
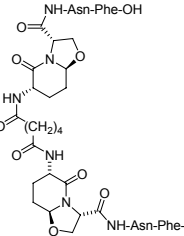
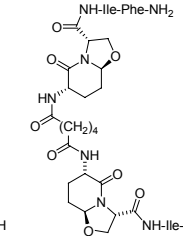
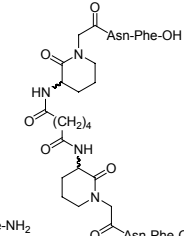
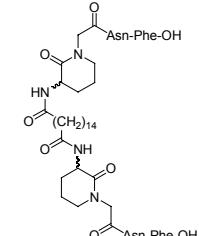
En aquest cas, la separació dels diastereòmers **188a** i **188b** fou possible, emprant un mètode isocràtic de 26% de MeCN en 15 min. D'aquesta manera s'aïllaren els diastereòmers amb un 27% i un 24% de rendiment global. En canvi, el compost **189** s'obtingué com a mescla diastereomèrica amb un 34% de rendiment, sense poder-ne separar els diastereòmers.

4.5.3 Purificacions i caracterització

Les purificacions de les mescles obtingudes es dugueren a terme en tots els casos mitjançant HPLC semipreparativa, havent-ne optimitzat prèviament el gradient de separació amb un aparell d'HPLC analític. La puresa de tots els productes s'analitzà per HPLC i la identitat del compost es corroborà per MALDI. Les cadenes nord i sud formades únicament per 2 residus, i sintetitzades en solució es caracteritzaren per RMN, per la qual cosa no considerarem necessari realitzar l'anàlisi d'aminoàcids d'aquest tipus d'inhibidors reduïts.

4.6 RECAPITULACIÓ

Mitjançant l'estratègia sintètica desenvolupada, s'han sintetitzat, purificat i analitzat (Taula 10):

<p>Inhibidors patró</p>	 <p>N2C1</p>	 <p>N3C1</p>	 <p>N4C1</p>	 <p>176</p>	 <p>CH-50</p>
<p>Inhibidors tipus I</p>	 <p>177</p>	 <p>178</p>	 <p>179</p>	 <p>182a i 182b</p>	 <p>183a i 183b</p>
<p>Inhibidors tipus II</p>	 <p>180</p>	 <p>181</p>	 <p>188a i 188 b</p>	 <p>189</p>	
<p>Productes de crosscoupling</p>	 <p>176cc</p>	 <p>180cc</p>	 <p>181cc</p>	 <p>186cc</p>	 <p>187cc</p>

Taula 10: Estructures dels inhibidors de dimerització de la HIV-1 PR sintetitzats

- **5 inhibidors patró** formats per aminoàcids naturals, 2 dels quals presenten una estructura peptídica reduïda.
- **11 inhibidors de tipus I**: 3 amb l'oxazolopiperidona **80** i 8 amb el lactam de Freidinger **82**. En aquest últim grup, en alguns casos s'han pogut separar la mescla de diastereòmers obtinguts, mentre que d'altres es troben en forma de mescla diastereomèrica.
- **5 inhibidors de tipus II**: 2 amb l'oxazolopiperidona **80** i 3 amb el lactam de Freidinger **82**.
- En alguns casos, s'ha pogut detectar i aïllar els productes fruit de l'entrecruament de cadenes peptídiques, subproductes que en general es formen amb un rendiment $\leq 4\%$.

4.7 ANNEX

4.7.1 Introducció a la síntesi peptídica en fase sòlida

L'any 1963, el concepte de síntesi peptídica sobre suport sòlid desenvolupat per Robert B. Merrifield va significar un gran avenç per a la química de pèptids.¹⁵⁶ Avui en dia, aquella idea revolucionària en el camp de la química orgànica, que li va fer guanyar el premi Nobel l'any 1984, s'ha estès a altres camps de la síntesi orgànica.

La síntesi peptídica en fase sòlida (SPPS) està basada en l'addició seqüencial d'aminoàcids amb la cadena lateral protegida o desprotegida a un suport polimèric (Fig. 79).

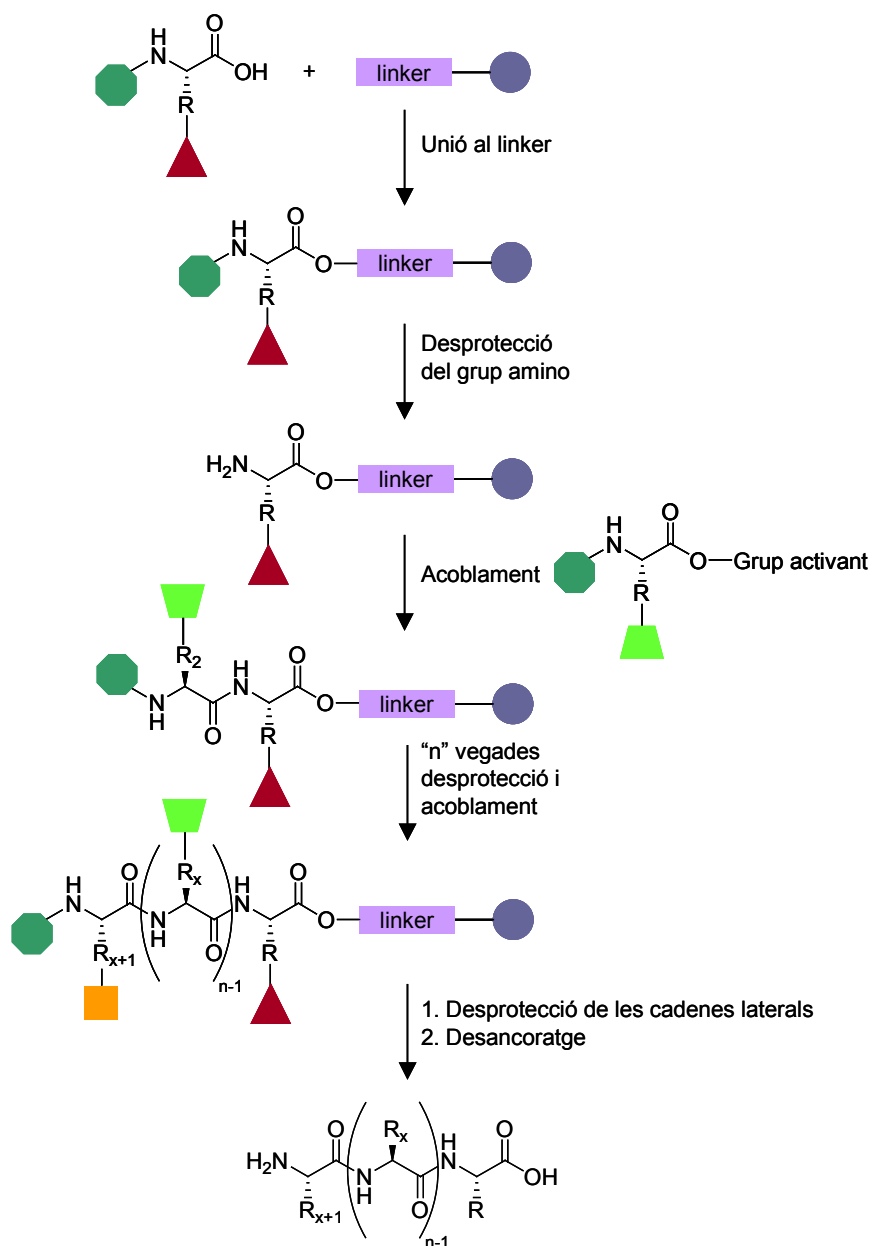


Figura 79: Esquema general de la síntesi peptídica en fase sòlida

¹⁵⁶ Merrifield, R.B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149-2154.

Tal i com s'observa en la Figura 79, en primer lloc cal ancorar el primer aminoàcid al suport polimèric. Després de la desprotecció del grup α -amino, té lloc l'addició del següent aminoàcid N^{α} -protegit, per mitjà d'un agent acoblant o bé a través d'un aminoàcid pre-activat. Aquest procés de desprotecció i acoblament es repeteix tantes vegades com siguin necessàries fins a obtenir el pèptid desitjat. El pèptid resultant es troba unit a la resina per l'extrem C-terminal a través d'un *linker*. Depenent de la naturalesa del *linker*, el pèptid resultant serà un carboxiàcid o una carboxiamida. Generalment, la desprotecció dels grups laterals té lloc simultàniament amb el desancoratge de la resina, tot i que en determinats casos, com és el cas de la síntesi de pèptids cíclics, pot ser beneficiós desanclar la resina mantenint les cadenes laterals dels aminoàcids protegides. Per aquests casos, existeixen diferents resines al mercat que ho possibiliten. Finalment, el suport polimèric insoluble és separat del producte dissolt via filtració.

Avantatges i inconvenients de la SPPS

Aquest mètode gaudeix dels avantatges inherents a una síntesi mancada de purificació i aïllament dels productes intermedis. A més a més, la possibilitat d'eliminar l'excés de reactius afegits per filtració, la facilitat de manipulació i el potencial d'automatització són algunes altres de les característiques que fan tan atractiva aquesta metodologia.

Tanmateix, la síntesi peptídica en fase sòlida també va associada a un seguit de desavantatges:

- Es treballa amb un gran excés de reactius
- Existeix un risc permanent de reaccions secundàries durant els passos d'activació, acoblament i desprotecció
- Fenòmens d'agregació del pèptid creixent sobre el suport poden complicar la síntesi
- El solvament de la resina polimèrica i la difusió dels reactius són dos paràmetres importants per l'èxit de la síntesi peptídica en fase sòlida, fet que limita els dissolvents adequats per a la SPPS
- Si les reaccions d'acoblament no tenen lloc de forma quantitativa, el pèptid resultant pot estar impurificat amb altres pèptids de menor nombre d'aminoàcids

Estratègies en la SPPS

Existeixen dues estratègies principals en la SPPS, depenent del tipus de protector del grup N^{α} -amino (Fig. 80):

- **Boc/Bzl:** en aquesta estratègia els aminoàcids tenen el grup α -amino protegit com a Boc i els grups funcionals de les cadenes laterals generalment es troben protegits com a Bzl. La desprotecció del grup Boc té lloc amb TFA i l'escissió final de la peptidil resina es duu a terme amb un àcid fort com és l'HF o TFMSA.
- **Fmoc/Bu:** en aquesta estratègia els aminoàcids tenen el grup α -amino protegit com a Fmoc. Actualment, aquesta estratègia és una de les més emprades dins del camp de la síntesi peptídica en fase sòlida. La desprotecció del grup temporal Fmoc sota condicions bàsiques suaus possibilita l'ús de grups protectors làbils en medi àcid per a les cadenes

laterals, com és el cas del grup *tert*-butil. Per això aquesta estratègia rep sovint el nom de Fmoc/^tBu.

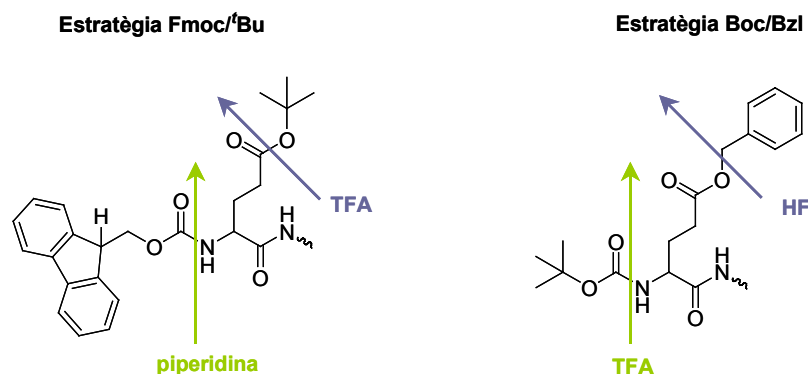
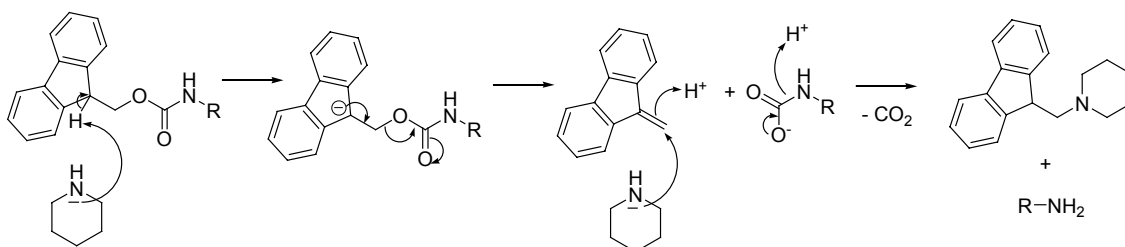


Figura 80: Estratègies de protecció en la síntesi peptídica en fase sòlida

La reacció de desprotecció del Fmoc té lloc a través d'un mecanisme d'eliminació E1cB, que s'inicia per l'extracció d'un protó per donar lloc a l'anion estabilitzat de dibenzociclopentadienil (Esquema 67). El dibenzofulvè format reacciona amb la piperidina per formar un adducte estable com a producte secundari de la reacció de desprotecció.



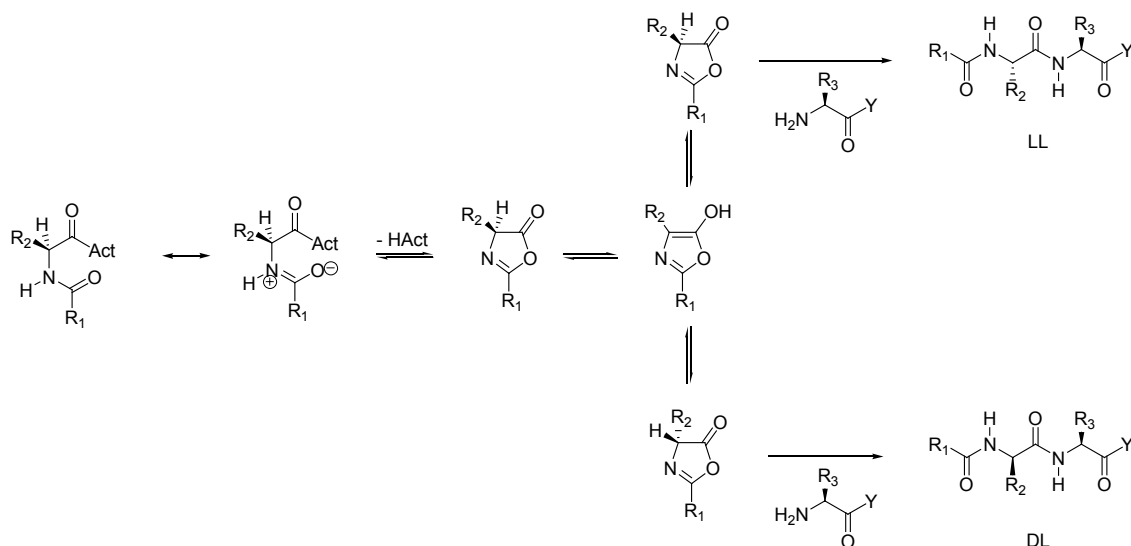
Esquema 67: Mecanisme de desprotecció del grup Fmoc

En l'estratègia Fmoc/^tBu, el desancoratge finals de la resina té lloc normalment per acidolisi, mitjançant un tractament amb TFA, que en la majoria dels casos serveix per desprotegir simultàniament els grups protectors de les cadenes laterals.

Mecanismes d'epimerització

Un dels principals riscos inherents al treball amb grups funcionals directament units a centres estereogènics és la pèrdua parcial o total d'esteroquímica. Com que l'activitat biològica dels pèptids i proteïnes depèn fortament de la configuració dels centres quirals dels aminoàcids, és necessari minimitzar el risc d'epimerització durant la síntesi peptídica.

En la síntesi peptídica en fase sòlida, un cop activada la funció àcida, s'observen 2 mecanismes diferents d'epimerització: l'enolització directa i la formació de la corresponent 5(4*H*)-oxazolona (Esquema 68).

Enolització**Formació de la 5(4*H*)-oxazolona**

Esquema 68: Principals mecanismes d'epimerització en la síntesi peptídica en fase sòlida

La combinació d'un bon rendiment i l'absència d'epimerització és l'objectiu principal per una reacció d'acoblament. Aquest objectiu a vegades resulta difícil d'aconseguir, ja que els mètodes que proporcionen millors rendiments requereixen la conversió de la funció àcida en un bon grup activant. Aquests grups tendeixen a augmentar l'acidesa del protó α , la qual cosa afavoreix l'enolització i la formació de la 5(4*H*)-oxazolona corresponent. A més a més, la presència d'una base (com el DIEA) en algunes condicions d'acoblament també contribueix a l'epimerització, ja que afavoreix l'extracció del protó en α .

Per això, cal tenir en ment que, tot i que la presència d'una base i/o un bon grup sortint afavoreixen el rendiment de l'acoblament, cal trobar un bon balanç entre rendiment i nivell d'epimerització.

Formació de l'enllaç peptídic

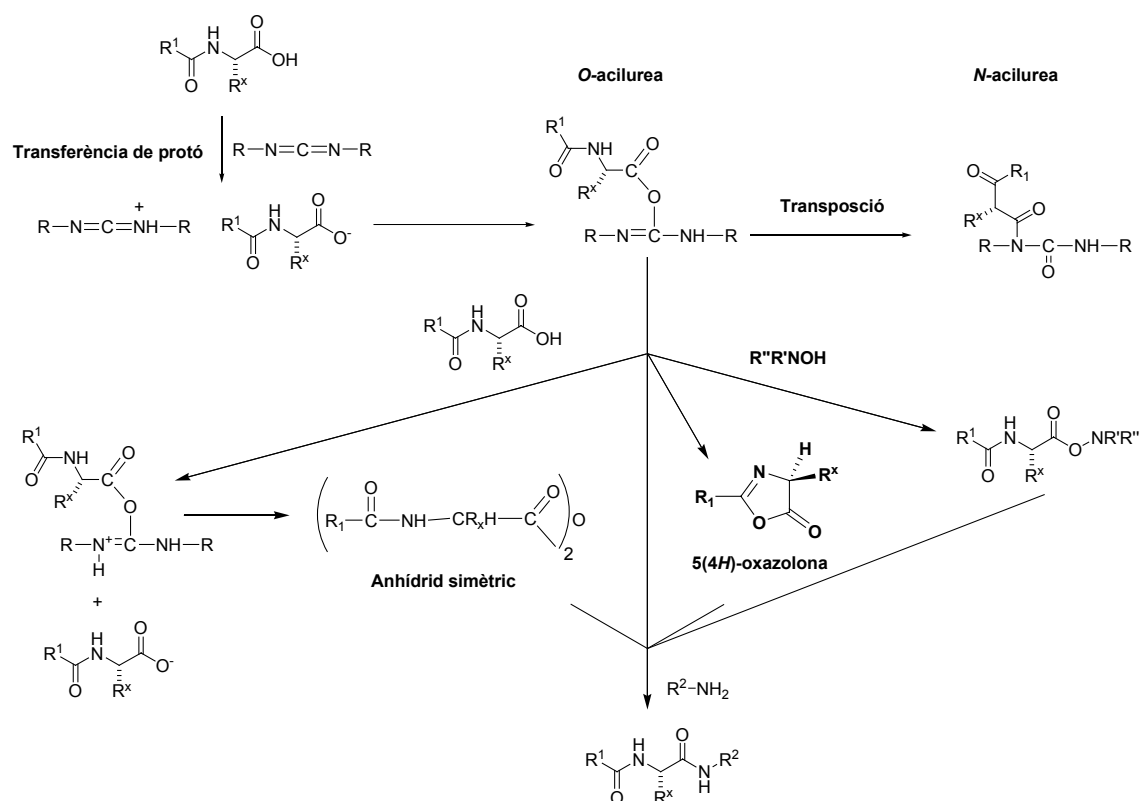
Tal i com s'ha comentat en l'Apartat 4.3.3, la formació de l'enllaç amida representa una de les reaccions essencials en la síntesi peptídica.

A continuació es troben detallats els principals mecanismes d'aquesta reacció que tenen lloc amb els dos tipus d'agents acoblants utilitzats en aquest treball: les carbodiimides i les sals de fosfoni.

Carbodiimides

El mecanisme d'activació mitjançant carbodiimides és complex, fortament dependent del dissolvent i encara no està totalment clarificat (Esquema 69).

El primer pas requereix una transferència de protó, seguida de l'addició de l'àcid carboxílic per formar la *O*-acilurea. Aquest intermediari és molt reactiu i ataca el component amino per donar la corresponent amida. Alternativament, la *O*-acilurea pot patir una transposició per donar la *N*-acilurea, la qual no és reactiva, o bé atacar un altre àcid carboxílic per donar l'anhídrid simètric, el qual és també un agent acilant excel·lent. Si l'àcid carboxílic és una *N*-carboxiamida (acetil, benzoil o una cadena peptídica), o un carbamat d' α -aminoàcid (Boc, Fmoc), la *O*-acilurea pot patir una ciclació intermoleuclar per donar un 5(4*H*)-oxazolona.

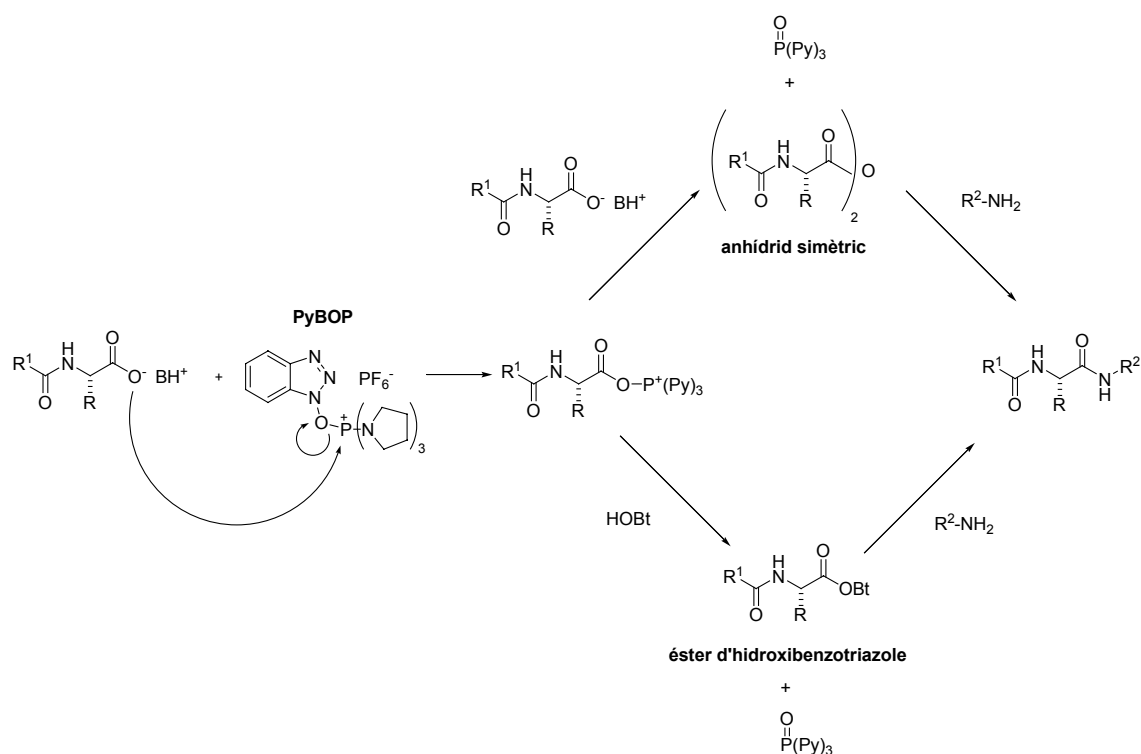


Esquema 69: Mecanisme de formació de l'enllaç peptídic a través de carbodiimides

La formació de l'oxazolona és més ràpida en el cas d'una carboxiamida ja que el grup carbonil de les amides és més nucleòfil que el dels uretans. Les 5(4*H*)oxazolones també són agents acilants, però no tan potents com l'*O*-acilurea ni l'anhídrid simètric, i a més a més, la tautomerització cap a la forma enòlica provoca racemització. La *O*-acilurea es pot atrapar per mitjà d'un nucleòfil present en el medi, normalment un derivat d'hidroxilamina, per donar el corresponent éster actiu, que normalment és una espècie menys reactiva però més estable. És per això que s'afegeix normalment HOBt o HOAt. El principal avantatge d'aquests additius és augmentar la concentració d'espècie activa, reduir la racemització i inhibir la deshidratació de les carboxamides de les cadenes laterals de l'Asn i el Gln per formar els corresponents nitrils.

Agents acoblant de tipus fosfoni

Els agents acoblants que permeten la generació *in situ* d'èsters actius han adquirit una importància considerable en la química de pèptids més recent. Castro *et al.*¹⁵⁷ van desenvolupar l'any 1975 el BOP (Benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)fosfoni hexafluorofosfat), un reactiu de fosfoni molt eficient per la síntesi peptídica en fase sòlida, però amb l'important desavantatge de l'elevada toxicitat de l'HMPA format durant la reacció. Aquest reactiu va ser substituït pel seu derivat PyBOP,¹⁵⁸ on els grups amino han estat substituïts per pirrolidines, la qual cosa presenta una alternativa viable ja que els subproductes de reacció no presenten toxicitat. En l'Esquema 70 es mostra el mecanisme de reacció d'aquest agent acoblant.



Esquema 70: Mecanisme de reacció amb l'agent d'acoblament PyBOP

L'addició d'una base (normalment DIEA) és necessària per a la formació del carboxilat de l'aminoàcid, el qual duu a terme un atac nucleofílic a la sal d'acilfosfoni, espècie altament reactiva. En absència de nucleòfil, l'espècie activa és la sal d'aciloxifosfoni que reacciona immediatament amb els ions carboxilats presents en el medi per donar l'anhídrid simètric. En canvi, en presència d'un nucleòfil (com l'HOBt), l'espècie activa és l'éster d'hidroxi-benzotriazole.

¹⁵⁷ Castro, B.; Dormoy, J.R.; Evin, G.; Selve, C.; *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 16, 1219-1222.

¹⁵⁸ Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B.; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 205-208.