

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



2. SÍNTESI DELS PSEUDODIPÈPTIDS

Tal i com s'ha comentat en el capítol d'Introducció, el principal objectiu de la present Tesi doctoral es basa en la incorporació de pseudodipèptids d'estructura de 3-aminolactam en les cadenes peptídiques d'inhibidors de dimerització de la proteasa del VIH-1. Per a aquest objectiu, inicialment es van escollir dues estructures descrites recentment al nostre grup, que encara no havien estat incorporades en cap pèptid biològicament actiu: l'oxazolopiperidona **80** i l'epirolactam **81**. Com es veurà posteriorment en aquest capítol, arrel de les dificultats que sorgiren a l'hora de reproduir la síntesi descrita de l'estructura d'epirolactam **81** i dels baixos rendiments obtinguts que feien inviable la incorporació d'aquesta estructura en cadenes peptídiques, es va optar per sintetitzar el pseudodipèptid **82** de menor dificultat sintètica (Fig. 47).

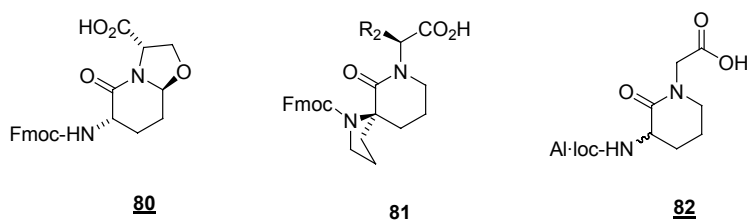


Figura 47: Estructures escollides per a la incorporació en els inhibidors de dimerització de la HIV-1 PR

2.1 Síntesi de l'oxazolopiperidona **80**

2.1.1 Antecedents

Un dels camps d'interès en el terreny dels peptidomimètics és el de la síntesi de dipèptids restringits dins d'una estructura bicíclica.⁷¹ Una de les estructures bicícliques més estudiades en aquest camp és la de la indolizidin-2-ona i els seus derivats. L'interès actual d'aquest tipus d'estructures (tant amb l'esquelet carbonat com amb la presència d'algun heteroàtom com S o O) queda reflectit en la quantitat de síntesis descrites a la literatura en els darrers 5 anys, alguns exemples de les quals es troben representades en la Figura 48.⁷²

Les indolizidin-2-ones i els seus derivats substituïts amb esquelet carbonat s'han incorporat en diferents pèptids biològicament actius i se n'ha estudiat l'aplicació com a inhibidors de caspases,⁷³ com a anàlegs de la gramicidina S (pèptid antibacterial)⁷⁴ i de la Leu-encefalina,⁷⁵

⁷¹ a) Nagai, U.; Sato, K.; *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 647-650. b) Nagai, U.; Sato, K.; Nakamura, R.; Kato, R.; *Tetrahedron*, **1993**, 49, 3577-3592. c) Hanessian, S.; Smith-McNaughton, G.; Lombart, H.G.; Lubell, W.D.; *Tetrahedron*, **1997**, 53, 12789-12854. d) Halab, L.; Gosselin, F.; Lubell, W.D.; *Biopolymers*, **2000**, 55, 101-122.

⁷² a) Cluzeau, J.; Lubell, W.D.; *Biopolymers*, **2005**, 80, 98-150. b) Manzoni, L.; Belvisi, L.; DiCarlo, E.; Forni, A.; Invernizzi, D.; Scolastico, C.; *Synthesis*, **2006**, 7, 1133-1140.

⁷³ Karanewsky, D.S.; Bai, X.; Linton, S.D.; Krebs, J.F.; Wu, J.; Phran, B.; Tomaselli, K.; *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, 8, 2757-2762.

com a agonistes parcials del receptor de tiroliberina (un tripèptid de l'hipotàlem que controla l'alliberament de l'hormona estimulant del tiroides),⁷⁶ com a inhibidors de trombina⁷⁷ i com a agonistes de colecistoquinina i de receptors opioides,⁷⁸ entre d'altres.

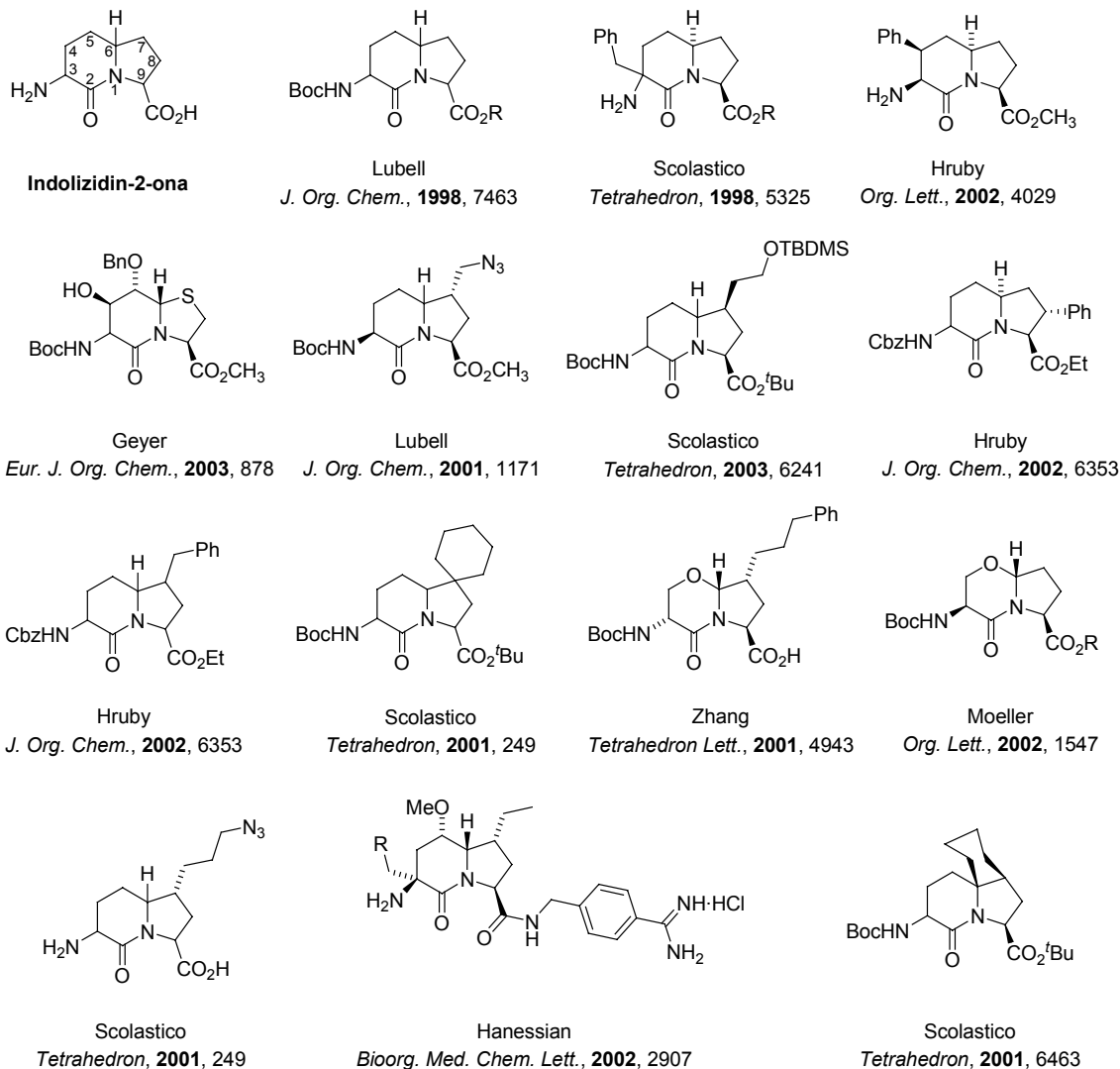


Figura 48: Exemples d'estructures d'indolizidinones i derivats sintetitzades en els darrers 5 anys

Pel que fa a les estructures bicícliques derivades de les indolizidinones i que incorporen un heteroàtom (S, O) en el seu esquelet, es troben diverses aplicacions i síntesis descrites a la

⁷⁴ Roy, S.; Lombart, H.G.; Lubell, W.D.; Hancock, R.E.W.; Farmer, S.W.; *J. Peptide Res.*, **2002**, *60*, 198-214.

⁷⁵ Xiong, C.; Zhang, J.; Davis, P.; Wang, W.; Ying, J.; Porreca, F.; Hruby, V.J.; *Chem. Comm.*, **2003**, *13*, 1598-1599.

⁷⁶ a) Chu, W.; Perlman, J.H.; Gershengorn, M.C.; Moeller, K.D.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 3093-3096. b) O'Dowd, B.F.; Lee, D.; Huang, W.; Nguyen, T.; Cheng, R.; Liu, Y.; Wang, B.; Gershengorn, M.C.; George, S.R.; *Mol. Endocrinol.*, **2000**, *14*, 183-193.

⁷⁷ Hanessian, S.; Therrien, E.; Granberg, K.; Nilsson, I.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 243-247.

⁷⁸ Ndungu, J.M.; Cain, J.P.; Davis, P.; Ma, S.-W.; Vanderah, T.W.; Lai, J.; Porreca, F.; Hruby, V.J.; *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 2233-2236.

literatura. Els treballs pioners de Nagai⁷¹ sobre la preparació del bicicle 3-ftalimido-2-oxo-7,1-tiazabicyclo[4.3.0]nonan-9-carboxilat de metil, l'anomenat BTD (*β-turn dipeptide*) actualment disponible comercialment, i la seva posterior aplicació en el desenvolupament d'inhibidors de metal·loproteases, van impulsar el desenvolupament d'anàlegs tiaindolizídínics per a la seva aplicació en el camp dels peptidomimètics. Recentment, els grups de Hruby⁷⁹ i Geyer⁸⁰ han descrit noves síntesis de 6,5-tiazolidinlactams funcionalitzats, mentre que el grup de González-Muñiz⁸¹ ha descrit la incorporació de inductors de girs β com el BTD i l'IBTM en pèptids conformacionalment restringits derivats dels lligands de la colescistoquinina (Fig. 49).

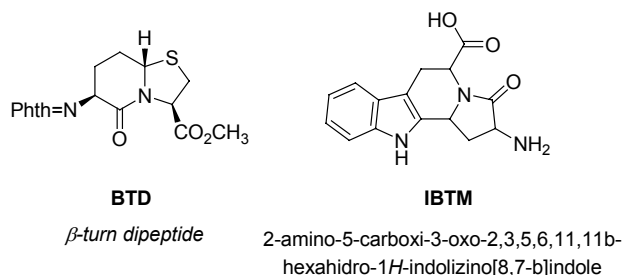


Figura 49: Estructures de dos mimètics de gir β

En canvi, el nombre d'articles publicats referents als anàlegs oxigenats és molt inferior en relació als seus homòlegs de sofre. S'han publicat síntesis d'aquests 3-aminolactams bicíclics amb un àtom d'oxigen incorporat en l'anell de 6 membres del bicicle, concretament en la posició α al cap de pont, com en els treballs de Moeller,⁸² Schofield,⁸³ Baldwin⁸⁴ i Zhang.⁸⁵

Pel que fa a estructures pseudodipeptídiques derivades d'oxaindolizidinones amb l'àtom d'oxigen incorporat a l'anell de 5 membres, la síntesi descrita pel nostre grup és l'única existent fins al moment a la literatura.⁷⁰ La capacitat d'aquesta estructura per induir la formació de girs β de tipus II' ens va empènyer a estudiar-ne la seva aplicació per als nostres inhibidors de dimerització de la proteasa del VIH-1.

⁷⁹ a) Ndungu, J.M.; Gu, X.; Gross, D.E.; Ying, J.; Hruby, V.J.; *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 3245-3247. b) Gu, X.; Tang, X.; Cowell, S.; Ying, J.; Hruby, V.J.; *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 6669-6672.

⁸⁰ Tremmel, P.; Brand, J.; Knapp, V.; Geyer, A.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 878-884.

⁸¹ Martín-Martínez, M.; de la Figuera, N.; LaTorre, M.; García-López, M.T.; Cenarruzabeitia, E.; Del Río, J.; González-Muñiz, R.; *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 7667-7674.

⁸² a) Sun, H.; Moeller, K.D.; *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 1547-15550. b) Cornille, F.; Fobian, Y.M.; Slomczynska, U.; Beusen, D.D.; Marshall, G.R.; Moeller, K.D.; *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 6989-6992. c) Cornille, F.; Slomczynska, U.; Smythe, M.L.; Beusen, D.D.; Moeller, K.D.; Marshall, G.R.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 909-917. d) Slomczynska, U.; Chalmers, D.K.; Cornille, F.; Smythe, M.L.; Beusen, D.D.; Moeller, K.D.; Marshall, G.R.; *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 1198-1204.

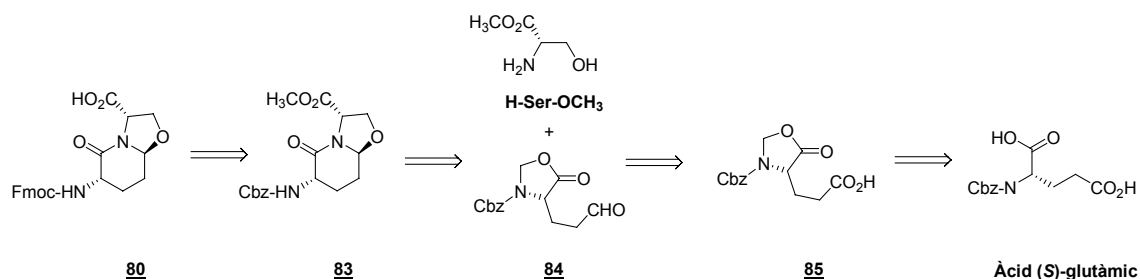
⁸³ Claridge, T.D.W.; Hulme, C.; Kelly, R.J.; Lee, V.; Nash, I.A.; Schofield, C.J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, 935-936.

⁸⁴ Baldwin, J.E.; Hulme, C.; Schofield, C.J.; Edwards, A.J.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, *30*, 4019-4020.

⁸⁵ Zhang, X.; Jiang, W.; Schmitt, A.C.; *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 4943-4935.

2.1.2 Síntesi de l'oxazolopiperidona **80**

La preparació d'aquest derivat oxazolopiperidínic **80** es va realitzar seguint el mètode descrit pel nostre grup.⁷⁰ La formació del bicicle es dugué a terme en una única etapa per condensació de l'éster metílic de la serina i l'aldehid **84**, sintetitzat a partir de l'àcid glutàmic convenientment protegit (Esquema 2).



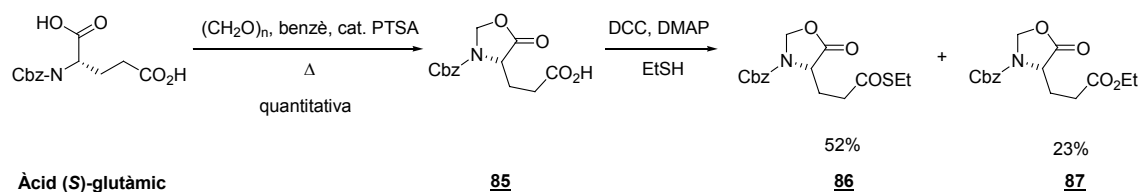
Esquema 2: Retrosíntesi de l'oxazolopiperidona **80**

a) Síntesi de l'aldehid de Fukuyama **84**

Ruta inicial

Per a la síntesi de l'oxazolidionona **85** es va fer reaccionar a reflux durant 2 h l'àcid (S)-glutàmic amb paraformaldehyd, en presència d'àcid *p*-toluensulfònic catalític i benzè com a dissolvent.⁸⁶ Aquesta reacció es reproduí fins a una escala de 25 g i s'utilitzà un sistema Dean-Stark per anar eliminant l'H₂O formada del medi de reacció i desplaçar d'aquesta manera l'equilibri cap a la formació del producte desitjat.

Un cop obtinguda l'oxazolidionona **85** es va abordar la seva transformació a aldehid, seguint l'aproximació de Fukuyama, que ja s'havia utilitzat anteriorment en el nostre grup. Aquesta metodologia es basa en la conversió de l'àcid en tioèster⁸⁷ i la posterior reducció amb Et₃SiH i Pd/C en condicions neutres.⁸⁸ (Esquema 3).



Esquema 3: Síntesi del tioèster **86**

La reacció de l'àcid **85** amb etantiol, DCC i quantitats catalítiques de DMAP va proporcionar el tioèster desitjat **86** amb un 52% de rendiment, juntament amb l'éster **87** com a subproducte, els quals es separaren per cromatografia en columna. Aquests dos productes són clarament

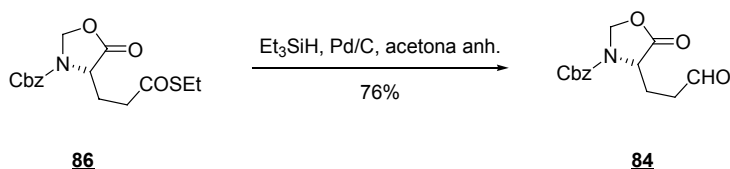
⁸⁶ Ben-Ishai, B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *79*, 5736-5738. b) Itoh, M.; *Chem. Pharm. Bull.*, **1969**, *17*, 1679-1686.

⁸⁷ Neises, B.; Steglich, W.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1978**, *17*, 522-524.

⁸⁸ Fukuyama, T.; Lin, S.; Li, L.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 7050-7051.

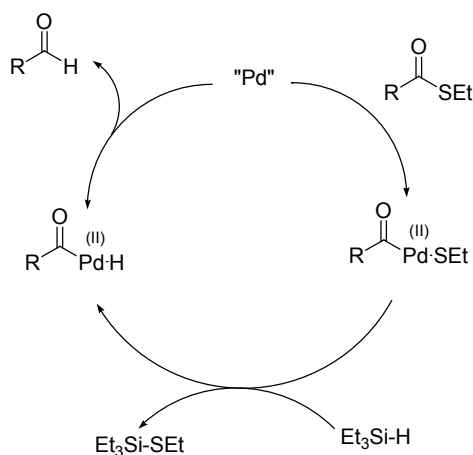
diferenciables pel desplaçament químic del senyal del grup CH₂ en ¹H-RMN: en el cas de l'éster s'observa un quadruplet a δ = 4,10 ppm, mentre que en el cas del tioéster la substitució d'un oxigen per un sofre fa que el senyal s'apantalli a δ = 2,86 ppm. La identitat dels dos productes es corroborà també per espectroscòpia de masses.

La reducció del tioéster **86** amb Et₃SiH i Pd/C procedí sense problemes, obtenint-se l'aldehid desitjat **84** amb un 76% de rendiment, el qual s'utilitzà sense purificar per a la següent reacció (Esquema 4).



Esquema 4: Reducció del tioéster **86** i obtenció de l'aldehid desitjat **84**

El mecanisme d'aquesta reducció s'inicia mitjançant una addició oxidativa del Pd(0) a l'enllaç C(sp²)-S, seguida d'una transferència d'hidrogen del Et₃SiH a l'espècie acilpal·ladi resultant. Finalment, l'eliminació reductiva de l'hidrur d'acilpal·ladi condueix a l'aldehid desitjat (Esquema 5). Aquest compost es detectà fàcilment per RMN, mitjançant el senyal a δ = 9,69 ppm corresponent al protó de l'aldehid en ¹H-RMN i a δ = 200,1 ppm corresponent al grup carbonil de l'aldehid a ¹³C-RMN.



Esquema 5: Mecanisme de reacció de la reducció de Fukuyama

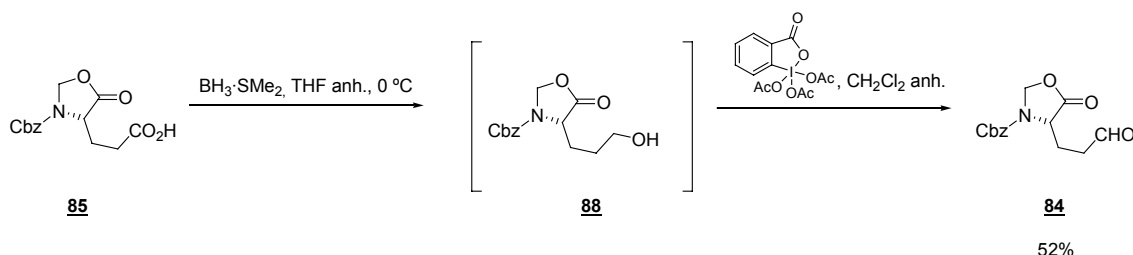
Ruta alternativa

En vista del baix rendiment obtingut en la formació del tioéster es van valorar rutes alternatives que ens permetessin l'obtenció de l'aldehid de forma més efectiva. Per un costat, es va provar la metodologia descrita per Kubasch *et al.*⁸⁹, que es basava en la reducció de l'àcid **85** a alcohol amb BH₃·SMe₂ i la posterior oxidació a aldehid fent ús del periodinà de Dess-Martin.⁹⁰

⁸⁹ Kubasch, N.; Schmidt, R.R.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 2710-2726.

⁹⁰ Dess, D.B.; Martin, J.C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 7277-7287.

Aquestes condicions permeten l'obtenció de l'aldehid amb un rendiment anàleg al del mètode del tioèster (52%). Aquesta estratègia presenta l'avantatge que evita l'ús de reactius pudents com l'etanotiol, però el principal inconvenient és l'elevat preu del reactiu de Dess-Martin que impossibilita el seu ús a gran escala i la dificultat de separació del producte desitjat i el iodina resultant (Esquema 6).

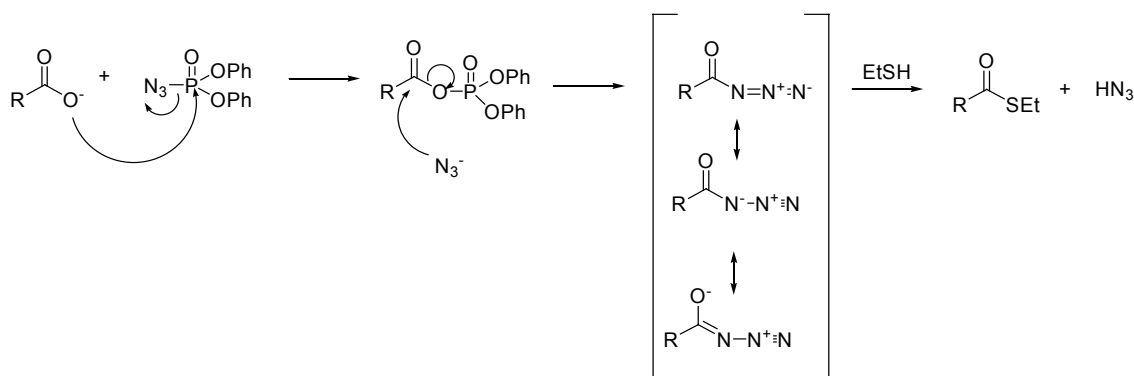


Esquema 6: Formació de l'aldehid **84** per reducció de l'àcid **85** i posterior oxidació amb el reactiu de Dess-Martin

Ruta optimitzada

Per aquest motiu, finalment ens vam decantar per modificar les condicions d'obtenció del tioèster i continuar utilitzant les condicions de reducció de Fukuyama. Per a la formació del tioèster es va utilitzar DPPA⁹¹ com a agent acoblant en lloc de DCC i d'aquesta manera es va obtenir el tioèster amb un 96% de rendiment, sense detectar la presència de l'èster.

Un possible mecanisme de reacció de la DPPA és el que es mostra a l'Esquema 7, passant per l'intermedi acil azida. Aquest tipus de reaccions s'han de fer a baixes temperatures degut a la inestabilitat tèrmica de les acil azides, que fàcilment pateixen una transposició de Curtius per donar lloc a l'isocianat corresponent.



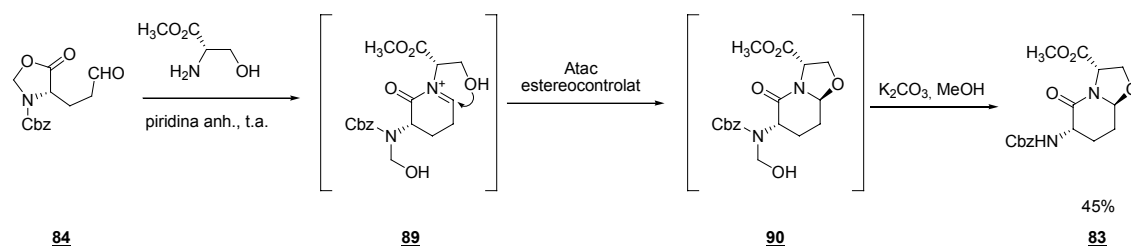
Esquema 7: Mecanisme de reacció de la difosforilazida (DPPA)

⁹¹ a) Shiori, T.; Ninomiya, K.; Yamada, S.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 6203-6205. b) Yamada, S.; Ikota, N.; Shiori, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 7174-7175.

b) Formació de l'oxazolopiperidona **83**

Un cop obtingut l'aldehid **84**, es feu reaccionar amb l'éster metílic de la serina per proporcionar el bicicle [4.3.0] desitjat **83**. Aquest tipus de condensació ha estat també descrita a la literatura pels grups de Johnson⁹² i Baldwin⁹³ i es caracteritza per temps de reacció llargs i rendiments moderats. En el nostre grup, aquesta reacció havia estat anteriorment estudiada i optimitzada⁷⁰ i s'havia observat que l'ús de piridina anhidra com a dissolvent a temperatura ambient conduïa a la formació de l'oxazolopiperidona **83** com a únic diastereòmer, mentre que l'ús de temperatures superiors promovia l'obtenció de mesclades diastereomèriques.⁷⁰

Fent ús d'aquestes condicions descrites, s'obtingué el bicicle **83** com a únic diastereòmer amb un 45% de rendiment (Esquema 8).



Esquema 8: Obtenció de l'oxazolopiperidona **83**

Aquest producte s'identificà per espectrometria de masses i per la presència en l'espectre de ^1H -RMN d'un sistema ABB', corresponent als senyals dels protons de les posicions 3 i 2 de l'anell ($^{AB}J = 7,2 \text{ Hz}$, $^{AB'}J = 8,4 \text{ Hz}$ i $^{BB'}J = 9,2 \text{ Hz}$), així com per la presència en l'espectre de ^{13}C -RMN d'un senyal metílic a $\delta = 88,3 \text{ ppm}$. L'estereoquímica del compost s'assignà per analogia de les dades obtingudes per RMN amb les descrites anteriorment pel nostre grup.

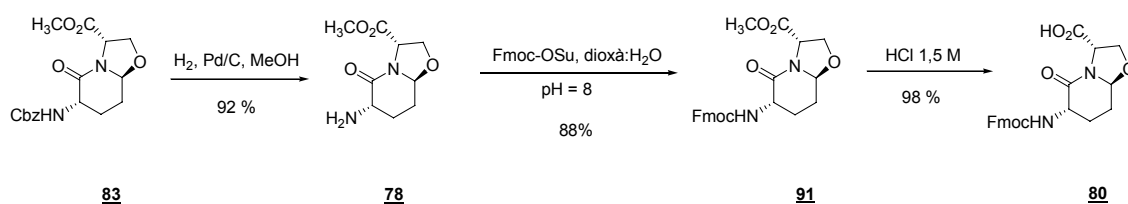
Un possible mecanisme per aquesta reacció transcorreria via l'intermedi de sal d'N-acilimini **89** i posterior atac del grup hidroxil per formar el bicicle **90**, que en contacte amb el K_2CO_3 en MeOH es transforma en el bicicle desitjat **83** (Esquema 8). L'obtenció d'un sol isòmer es justificaria per l'atac preferent del grup hidroxil per la cara menys impedida de l'anell del lactam.

c) Obtenció de la Fmoc-oxazolopiperidona **80**

Per tal de poder adaptar l'estructura bicíclica d'oxazolopiperidona **83** a la síntesi peptídica en fase sòlida, es van dur a terme un seguit de transformacions, que s'iniciaren amb la reducció del grup protector Cbz mitjançant hidrogenació catalítica amb Pd/C 10% (Esquema 9). El producte desprotegit es pogué detectar fàcilment per la desaparició dels senyals aromàtics en l'espectre de ^1H -RMN.

⁹² Subasinghe, N.L.; Bontemps, R.J.; McIntee, E.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L.; *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 2356-2361.

⁹³ Baldwin, J.E.; Lee, E.; *Tetrahedron*, **1986**, *42*, 6551-6554.



Esquema 9: Transformacions per adaptar el compost **83** a la síntesi peptídica en fase sòlida

A continuació es protegí el grup amino lliure amb Fmoc, per tal de possibilitar l'ús de l'estratègia de protecció Fmoc/^tBu per a la síntesi peptídica en fase sòlida dels inhibidors de dimerització. El grup Fmoc gaudeix d'una gran popularitat en la SPPS gràcies a la seva estabilitat en medi àcid i labilitat sota condicions bàsiques suaus, la qual cosa evita l'ús reiterat d'àcid en la seqüència sintètica. Per a aquest objectiu, es va escollir el mètode estàndard que consisteix en fer reaccionar l'amina amb el derivat succinimídic (Fmoc-OSu) a pH = 8.⁹⁴ La introducció d'aquest grup es feu palesa en l'espectre de ¹H-RMN pels senyals aromàtics corresponents al grup fluorenil i l'aparició d'un nou senyal a δ = 4,40 ppm corresponent al nou grup metilè.

Finalment, es duqué a terme la hidròlisi de l'éster metílic en medi àcid per tractament amb HCl 1,5 M. La formació de l'àcid **80** es posà de manifest per l'aparició d'una banda d'absorció ampla en l'espectre d'IR a ~ 3300 cm⁻¹ i la desaparició del senyal corresponent al grup metil tant en l'espectre de ¹H-RMN com en el de ¹³C-RMN.

D'aquesta manera s'obtingué el compost desitjat **80**, apte ja per a la incorporació en les cadenes peptídiques dels potencials inhibidors de dimerització de la proteasa del VIH-1.

⁹⁴ a) Paquet, A.; *Can. J. Chem.*, **1982**, *60*, 976-980. b) Henklein, P.; Heyne, H.-U.; Halatsch, W.-R.; Niedrich, H.; *Synthesis*, **1987**, 166-167.

2.2 Síntesi de l'espírolactam 81

2.2.1 Antecedents

Els nuclis espirànics juguen un paper important en els desenvolupament de noves substàncies bioactives⁹⁵ i es troben presents en una gran quantitat d'esteroides.⁹⁶ Entre les múltiples estratègies desenvolupades per la construcció de mimètics de girs β , la introducció d'un sistema espirànic ha resultat ser una manera útil pel disseny d'una gran varietat de dianes terapèutiques rellevants.⁹⁷

Atès l'interès del grup en els pseudodipèptids basats en l'estructura de 3-aminopiperidona, el nostre grup ha desenvolupat recentment la síntesi d'un espirovalerolactam, el qual ha demostrat induir la formació de gir de tipus " γ - β II distorsionat", segons estudis de RMN i de modelització molecular.⁶⁹

La síntesi d'aquest tipus d'estructures espiràniques amb un anell de piperidona incorporat no ha estat tan estudiada com la dels seus homòlegs de 4 o 5 membres. Alguns exemples de les estructures descrites en la literatura es mostren en la Figura 50.

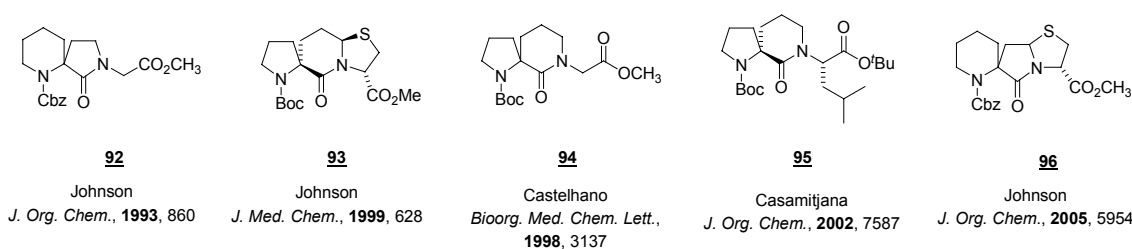


Figura 50: Exemples d'espirovalerolactams descrits a la literatura

El grup de Johnson va sintetitzar l'espírolactam 92 a partir de l'àcid pipecòlic, mitjançant un acoblament peptídic, seguit d'una seqüència de dihidroxilació, ruptura oxidativa, reducció a alcohol i finalment ciclació sota condicions de Mitsunobu (Esquema 10a).⁹⁸ El mateix grup

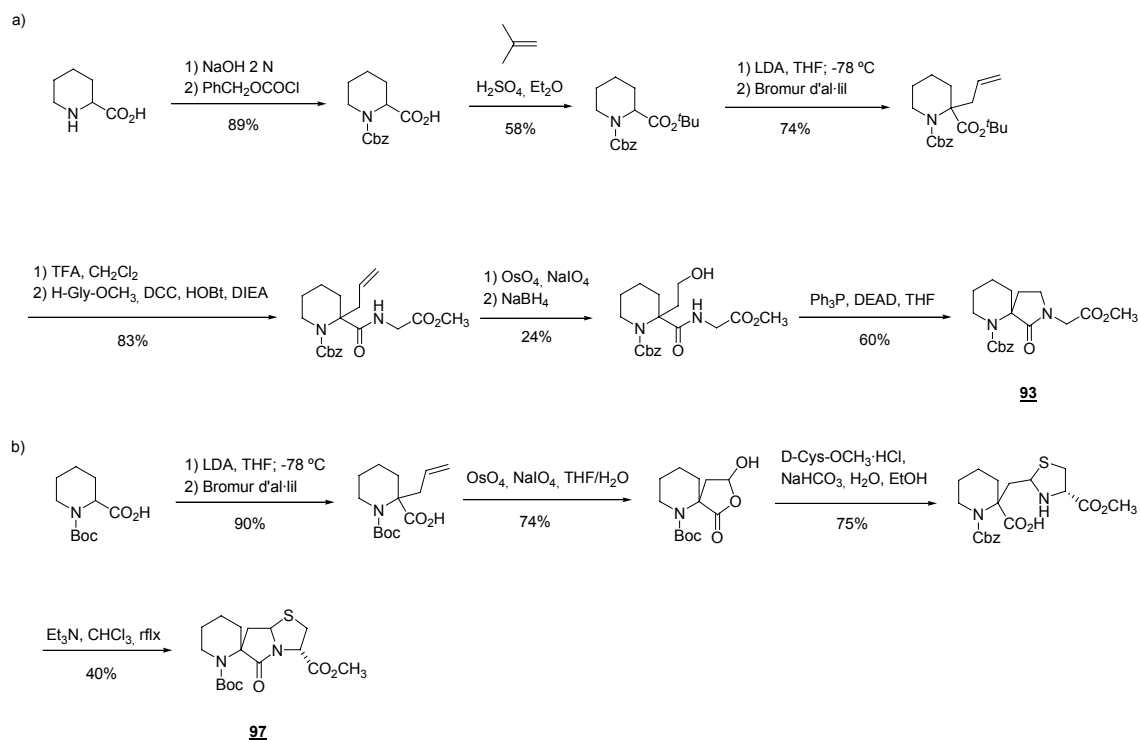
⁹⁵ a) Boivin, T.L.B.; *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 3309-3362. b) Kotha, S.; Deb, A.S.; Kumar, R.V.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 1039-1043.

⁹⁶ a) Kende, A.S.; Hernando, J.I.M.; Milbank, J.B.; *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 61-74. b) Suga, S.; Watanabe, M.; Yoshida, J.I.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 14824-14825.

⁹⁷ a) Mueller, R.; Revesz, L.; *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 4091-4092. b) Reddy, P.; Hsiang, B.; Latifi, T.; Hill, M.; Woodward, K.; Rothman, S.; Ferrendelli, J.; Covey, D.; *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 1898-1906. c) Batey, R.; Mackay, D.; *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 9935-9938. d) Vitry, C.; Vasse, J.L.; Dupas, G.; Levacher, V.; Queguiner, G.; Bourguignon, J.; *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 3087-3098. e) Nagata, T.; Nishida, A.; Nakagawa, M.; *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 8345-8349. f) Herrero, S.; Garcia-Lopez, M.; Latorre, M.; Cenarruzabeitia, E.; Del Rio, J.; Herranz, R.; *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3866-3873.

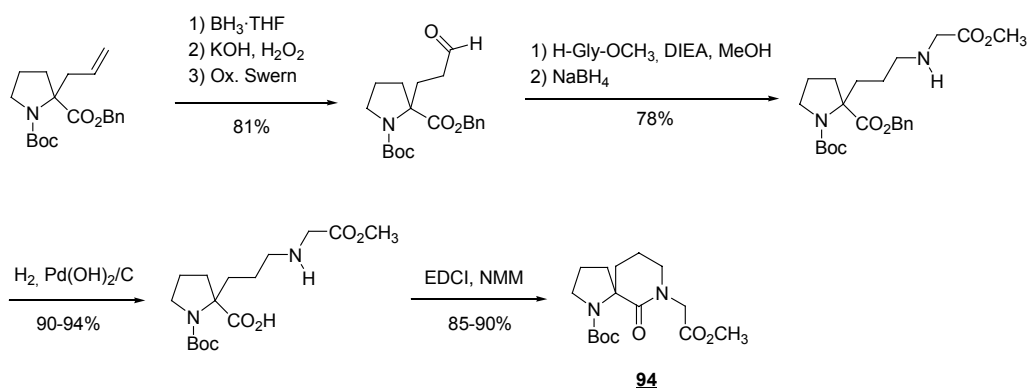
⁹⁸ Genin, M.J.; Gleason, W.B.; Johnson, R.L.; *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 860-866.

també descriu la síntesi de l'espilactam bicíclic **97**⁹⁹ (Esquema 10b) i la seva incorporació en un pseudotripèptid anàleg de Pro-Leu-Gly.¹⁰⁰



Esquema 10: Síntesis de Johnson per els espilactams **92** i **97**

Els únics exemples descrits de 1,7-diazaespiro[4.5]decans els trobem en els treballs de Castelhana¹⁰¹ i Casamitjana.⁶⁹ La síntesi de Castelhana proporciona la mescla racèmica de l'espilactam **94** (Esquema 11), partint de la 2-al·lilprolina i a través d'una seqüència d'hidroxilació anti-Markovnikoff del doble enllaç, oxidació de Swern de l'alcohol resultant, aminació reductiva amb la H-Gly-OME i ciclació mitjançant un agent acoblant.



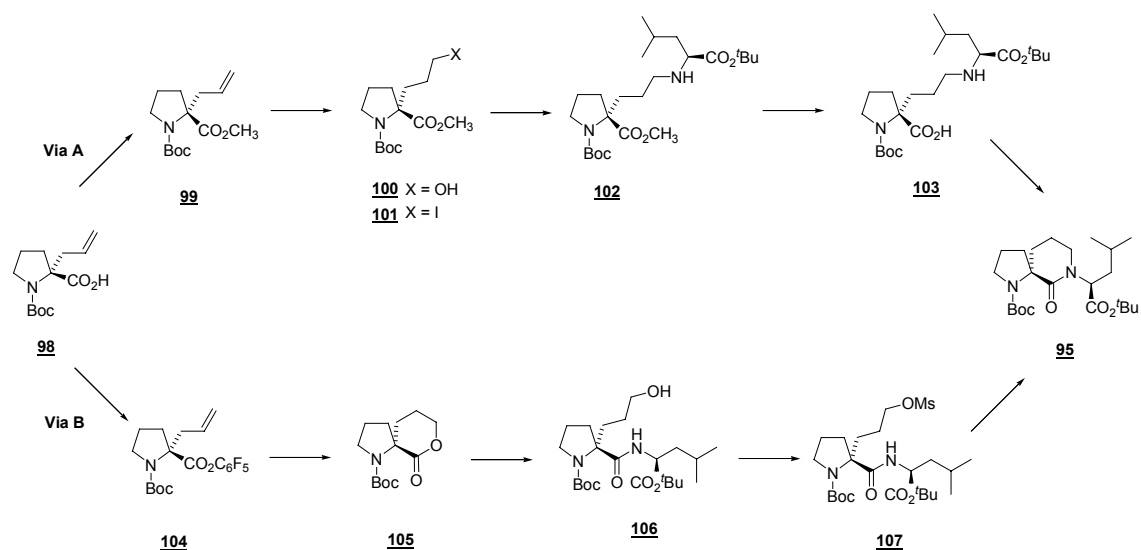
Esquema 11: Síntesi de l'espilactam **94** segons Castelhana

⁹⁹ Somu, R.V.; Johnson, R.L.; *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 5954-5963.

¹⁰⁰ Khalil, E.M.; Ojala, W.H.; Pradhan, A.; Nair, V.D.; Gleason, W.B.; Mishra, R.K.; Johnson, R.L.; *J. Med. Chem.*; **1999**, *42*, 628-637.

¹⁰¹ Witter, D.J.; Famiglietti, S.J.; Cambier, J.C.; Castelhana, A.L.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 3137-3142.

En canvi, l'estratègia desenvolupada en el nostre grup es basa en una síntesi estereoselectiva de l'espilolactam **95**, partint de la 2-al·lilprolina quiral (Esquema 12).



Esquema 12: Rutes sintètiques descrites per Casamitjana per a l'obtenció de l'espilolactam **95**

Tal i com s'observa en l'Esquema 13, l'espilolactam **95** s'obtingué a partir de dues vies alternatives:

- **Via A:** consisteix en la hidròboració-oxidació del doble enllaç de l'éster metílic de la *N*-Boc-al·lilprolina, seguida de la conversió en iodur de l'alcohol **100** resultant i posterior substitució nucleòfila amb la H-Leu-O^tBu. Finalment, la hidròlisi de l'éster metílic **102** i un acoblament intramolecular amb DCC com a agent activant foren l'espilolactam **95**, amb un 11% de rendiment global a partir de la *N*-al·lilprolina.
- **Via B:** es basa en l'activació de l'àcid carboxílic de **98** en forma d'éster pentàfluorofenílic, seguida de la hidròboració-oxidació del doble enllaç, obtenint-se d'aquesta manera l'espilolactona **105**. La conversió de l'espilolactona **105** en l'espilolactam **95** es dugué a terme a través de l'obertura de la lactona per mitjà de la H-Leu-O^tBu, conversió de l'alcohol resultant **106** en el mesilat **107** i posterior alquilació intramolecular. Aquesta ruta proporcionà l'espilolactam desitjat amb un rendiment global del 20%.

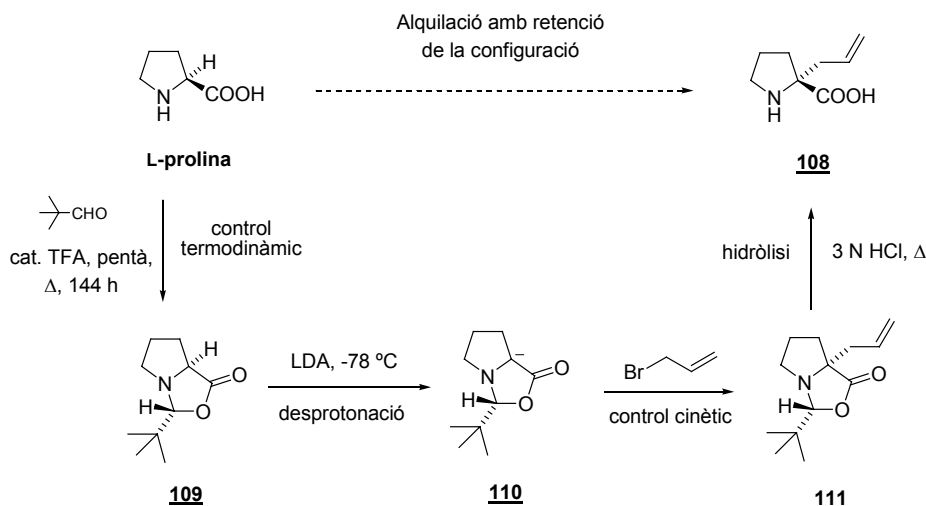
Conegudes aquestes dades, es va procedir a reproduir la síntesi de l'espilolactam **95** descrita pel nostre grup seguint el mètode que proporciona millors rendiments (via B), amb la finalitat d'incorporar-lo en els inhibidors de dimerització de la proteasa del VIH-1.

2.2.2 Síntesi de la (S)-2-al·lilprolina 108

Per a la reproducció de la síntesi de l'espilolactam **95** descrita anteriorment en el nostre grup⁶⁹ (Esquema 12), en primer lloc va ser necessari sintetitzar la (S)-2-al·lilprolina. La síntesi d'aquest compost ens presentà un seguit de dificultats, que ens portaren a analitzar les diferents rutes de síntesi que es troben descrites a continuació.

a) **Síntesi de l'al·lilprolina via l'oxazolidinona 109**

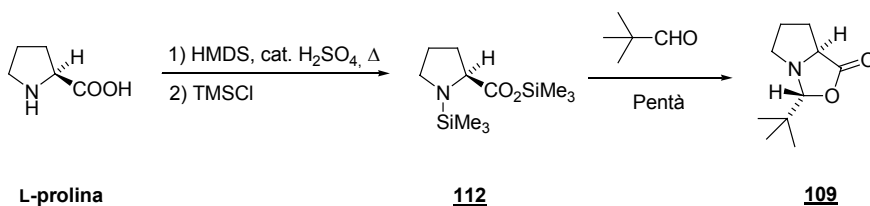
El primer grup en descriure una metodologia per a la síntesi de prolines α -substituïdes enantiòmericament pures fou Seebach¹⁰² l'any 1983. Aquesta estratègia, batejada amb el nom de "autoreproducció de la quiralitat", es caracteritza per ser una substitució electròfila en el C_{α} de la prolina amb retenció de configuració, via l'oxazolidinona **109** i sense fer ús d'un auxiliar quiral tal i com es mostra a l'Esquema 13.



Esquema 13: Estratègia d'autoreproducció de la quiralitat desenvolupada per Seebach

L'any 1997, el grup de Sisti va publicar una síntesi alternativa¹⁰³ de l'oxazolidinona **109** degut a la seva incapacitat per reproduir els resultats descrits anteriorment per Seebach. Aquest mateix problema d'irreproduïbilitat dels resultats descrits per Seebach es manifestà en la tesi de Montserrat Fernández, cosa que ens feu decantar en un primer moment a utilitzar l'aproximació de Sisti per a la protecció de la prolina.

Aquesta estratègia transforma la S-prolina en l'oxazolidinona **109** via l'éster trimetilsilílic de la N-trimetilsililprolina **112** (Esquema 14).



Esquema 14: Estratègia per a la síntesi de l'oxazolidinona **109** desenvolupada per Sisti

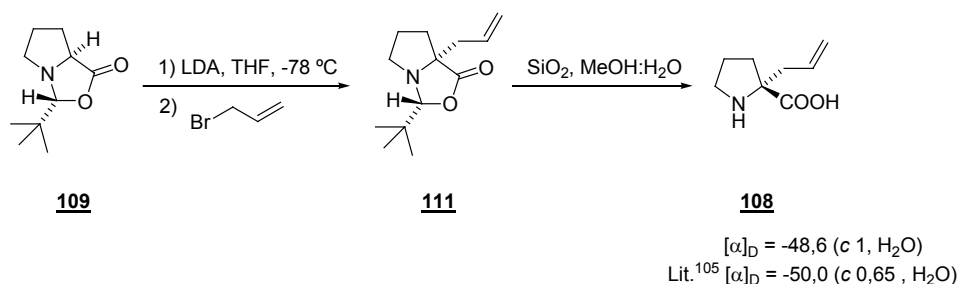
En intentar reproduir aquesta via sintètica vam topiar amb diferents dificultats, principalment provocades per:

¹⁰² a) Seebach, D.; Boes, M.; Naef, R.; Schweizer, W.B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 5390-5398. b) Beck, A.K.; Blank, S.; Job, D.; Seebach, D.; Sommerfeld, T.; *Org. Synth.*, **1992**, *72*, 62-73.

¹⁰³ Annunziata, R.; Ferrari, M.; Papeo, G.; Resmini, M.; Sisti, M.; *Synth. Comm.*, **1997**, *27*, 23-38.

- l'elevada sensibilitat de l'oxazolidinona **109** a l'aire i la humitat. Per resoldre aquest problema s'intentà treballar en tot moment sota atmosfera d'argó i es va adaptar un sistema d'evaporació del dissolvent i de l'excés dels reactius sililants a la vitrina per tal de minimitzar el contacte del producte amb l'exterior.
- la dificultat de purificació de l'oxazolidinona **109**. Seebach descriu la purificació d'aquest compost per destil·lació (70 °C a 0,0005 mm de Hg o 90 °C a 0,04 mm de Hg). Aconseguir un bon buit va resultar ser d'importància crucial per aquesta destil·lació, ja que l'ús de temperatures majors de 100 °C comporta la descomposició del producte i pèrdua de CO₂, per via d'una cicloadició dipolar [3+2] inversa.^{102,104} Com que la difusora de la Facultat de Farmàcia que anteriorment s'havia fet servir per obtenir aquest buit i poder realitzar aquesta síntesi, ja no estava disponible i no se'n va poder trobar cap més a les instal·lacions del Parc Científic ni de la Universitat de Barcelona, després d'obtenir varies vegades mescles de productes de degradació, es va optar per seguir endavant amb el cru de reacció i purificar en una etapa més avançada de síntesi.

Es va tractar el cru de reacció de l'oxazolidinona **109** amb LDA en THF a -78 °C i es va dur a terme l'alquilació de la posició α de la prolina amb bromur d'al·lil. A continuació, tingué lloc la hidròlisi del bicicle seguint el procediment desenvolupat per Johnson,¹⁰⁵ basat en l'agitació en sílica gel en una mescla de MeOH/H₂O (Esquema 15).



Esquema 15: Alquilació i hidròlisi de l'oxazolidinona **109**

Finalment, es dugué a terme una purificació per cromatografia en columna, que rendí la (S)-2-allylprolina desitjada, amb un rendiment total del 20% (en 4 passos). Aquest producte es caracteritzà per ¹H-RMN per la presència dels senyals típics del grup al·lil a $\delta = 5,18$, $5,26$ i $5,79$ ppm. En ¹³C-RMN, es distingí un senyal de C quaternari a $\delta = 73,9$ ppm, un senyal a $\delta = 173,9$ ppm corresponent al grup carboxil i dos senyals a $\delta = 119,2$ ppm i $\delta = 131,8$ ppm del grup al·lil. Aquestes dades i les del poder rotatori observat concorden amb les de la literatura.¹⁰⁵

Tanmateix, donat el baix rendiment obtingut i el fet que el mètode de Seebach fos el més emprat a la literatura, vàrem decidir provar-lo (Esquema 13), però els resultats obtinguts no

¹⁰⁴ Bianchi, G.; De Micheli, C.; Gandolfi, R.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1979**, *18*, 721-738.

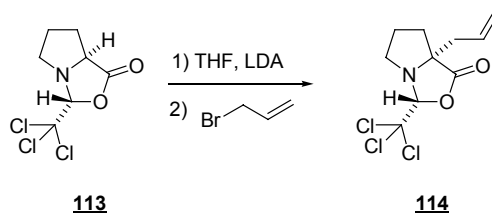
¹⁰⁵ Genin, M.J.; Baures, P.W.; Johnson, R.L.; *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 4967-4968.

substituir el benzè per un dissolvent de menys toxicitat com el toluè va conduir a rendiments inferiors (Taula 5).

Dissolvents	Temperatura (°C)	Rendiment
MeCN	t.a.	-
Benzè	refl	18%
Benzè : DMSO (5 :1)	refl	23%
Benzè : DMSO (10 :1)	refl	46%
Benzè : DMSO (15 :1)	refl	80%
Benzè : DMSO (25 :1)	refl	75%
Toluè	refl	15%
Toluè : DMSO (15 : 1)	refl	64%

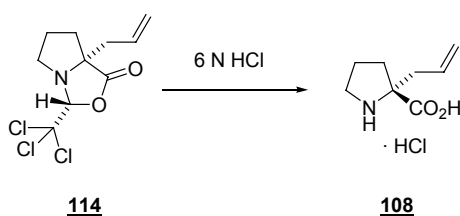
Taula 5: Optimització del dissolvent en la reacció de formació de l'oxazolidinona **113**

L'oxazolidinona **113** es caracteritzà per l'aparició d'un singulet a $\delta = 5,16$ ppm en l'espectre de ^1H -RMN, corresponent al protó metínic i pel senyal de C quaternari (CCl_3) a $\delta = 100,8$ ppm en l'espectre de ^{13}C -RMN.



Esquema 17: Alquilació de la triclòroxazolidinona **113**

L'alquilació de la posició α de la prolina es dugué a terme de manera anàloga a la comentada anteriorment, per tractament de l'oxazolidinona **113** amb LDA en THF a -78°C i posterior addició de bromur d'al·lil (Esquema 17). El rendiment obtingut fou del 66% i el producte es caracteritzà per l'aparició dels senyals típics del grup al·lil (dos dobles dobles a $\delta = 5,18$ i $5,21$ ppm i un multiplet a $\delta = 5,90$ ppm) en l'espectre de ^1H -RMN i en l'espectre de ^{13}C -RMN per l'aparició d'un nou C quaternari a $\delta = 71,5$ i 3 nous senyals corresponents al grup al·lil ($\delta = 41,8$, $120,1$ i $132,2$ ppm).



Esquema 18: Hidròlisi de l'oxazolidinona **114**

El principal problema d'aquesta ruta sintètica fou la hidròlisi de l'oxazolodinona al·lilada **114**. La seva elevada estabilitat respecte el seu anàleg no halogenat feu impossible la hidròlisi en les condicions suaus de SiO_2 en $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ utilitzades en l'estratègia anterior. Per a la hidròlisi d'aquesta oxazolodinona fou necessari el tractament amb HCl 6 N a reflux durant 2,5 h, la qual cosa causà alguns problemes en fer la reacció a gran escala degut a la necessitat d'evaporar grans quantitats d' HCl concentrat.

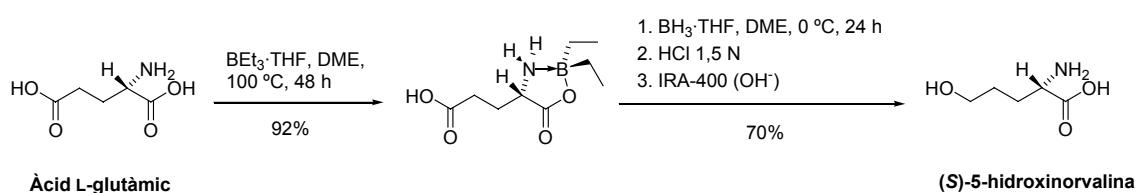
Els intents infructuosos de cristal·lització ens van portar a provar rutes alternatives d'aïllament del producte desitjat. S'intentà neutralitzar la solució amb NaOH per obtenir la forma zwitteriònica de la (S)-2-al·lilprolina, però les espumes que es crearen a l'hora d'intentar evaporar el dissolvent d'aquesta substància feren inviable aquesta ruta.

També es provà de purificar l'hidroclorur obtingut mitjançant una columna d'intercanvi catiònic i tot i obtenir el producte desitjat, aquesta opció no és òptima per a la síntesi en gran escala a causa dels grans volums d' H_2O que s'han d'evaporar procedents de les diferents fraccions i de la poca reproduïbilitat dels rendiments obtinguts.

Com a última opció, es mirà d'utilitzar el cru de reacció en el següent pas sintètic, que consisteix en la protecció de l'àtom de nitrogen de la prolina en forma de Boc. Tot i afegir la quantitat de base necessària per neutralitzar l'hidroclorur, seguida de $(\text{Boc})_2\text{O}$, aquesta reacció tingué lloc amb un rendiment molt baix (29%).

c) Síntesi de l'al·lilprolina via la boroxazolodinona **115**

S'estudià una nova via de formació de la (S)-2-al·lilprolina a través d'un complex de bor. En el nostre grup, s'ha desenvolupat un mètode per a la síntesi de la (S)-5-hidroxinorvalina, basat en la protecció simultània dels grups α -amino i α -carboxil de l'àcid glutàmic per formació d'una boroxazolodinona i posterior reducció selectiva del grup carboxílic de la cadena lateral (Esquema 20).¹⁰⁹

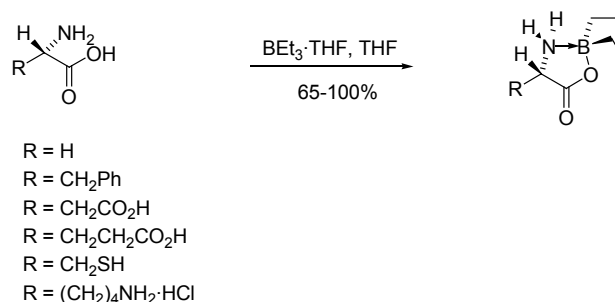


Esquema 19: Síntesi de la 5-hidroxinorvalina desenvolupada en el nostre grup

Nefkens i Zwanenburg¹¹⁰ descriuen la formació de boroxazolidones com a forma de protecció dels grups amino i carboxil de nombrosos aminoàcids però la protecció de la prolina no es troba descrita (Esquema 20).

¹⁰⁹ García, M.; Serra, A.; Rubiralta, M.; Diez, A.; Segarra, V.; Lozoya, E.; Ryder, H.; Palacios, J.M.; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, *11*, 991-994.

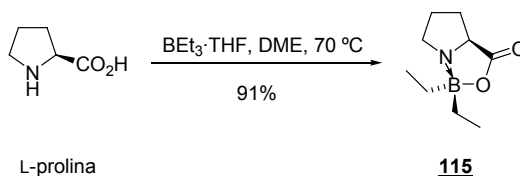
¹¹⁰ Nefkens, G.H.L.; Zwanenburg, B.; *Tetrahedron*, **1983**, *39*, 2995-2998.



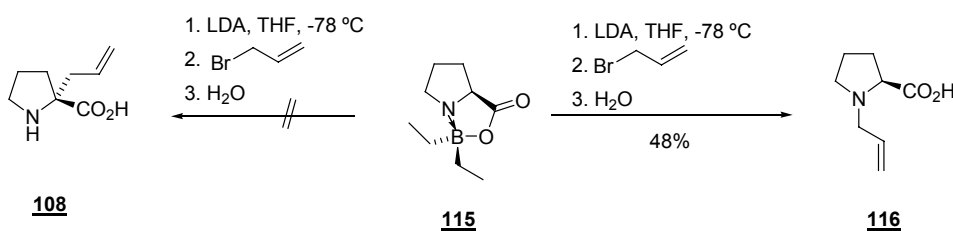
Esquema 20: Formació de boroxazolones a partir de diferents aminoàcids

En el nostre cas, es va voler comprovar si es podia protegir de forma anàloga el grup amino i carboxil de la prolina mitjançant la formació de la boroxazolodionona **115** i si aquesta era resistent a les condicions d'alquilació, permetent d'aquesta manera la formació de l'al·lilprolina i en cas que fos possible, estudiar l'estereoselectivitat del procés.

Amb aquesta finalitat, es va fer reaccionar la L-prolina amb BEt_3 en DME a 70°C , obtenint-se d'aquesta manera la boroxazolodionona **115** desitjada (Esquema 21). El producte s'identificà per ^1H -RMN, on s'observà l'aparició de nous senyals molt apantallats corresponents als 2 grups etil no equivalents units a l'àtom de bor (2 triplets a $\delta = 0,53$ i $0,57$ ppm dels grups CH_3 i un multiplet a $\delta = -0,02$ - $0,17$ ppm dels grups CH_2). En l'espectre de ^{13}C -RMN també s'observà la presència de 4 nous senyals corresponents als dos grups etil ($\delta = 9,5$ i $10,0$ ppm pels CH_3 i $\delta = 10,6$ i $13,3$ ppm pels CH_2).

Esquema 21: Formació de la boroxazolodionona **115** a partir de la L-prolina

A continuació es va sotmetre la boroxazolodionona **115** a un tractament amb LDA en THF a -78°C , seguit de l'addició de bromur d'al·lil. Després d'extreure amb una mescla de CH_2Cl_2 i H_2O i de purificar la fase aquosa mitjançant cromatografia en columna, s'obtingué el producte **116** que s'identificà per les seves dades espectroscòpiques com a *N*-al·lilprolina.

Esquema 22: Síntesi de la *N*-al·lilprolina a través via la boroxazolodionona **115**

Comparant els espectres de ^1H de la (S)-2-al·lilprolina i de la N-al·lilprolina, es pot observar que en el cas d'aquest darrer compost apareixen dos senyals més desapantallats a $\delta = 3,76$ ppm i a $\delta = 3,80\text{-}3,88$ ppm, corresponents als H-1' unit a nitrogen i a l'H-2 respectivament (Fig. 51).

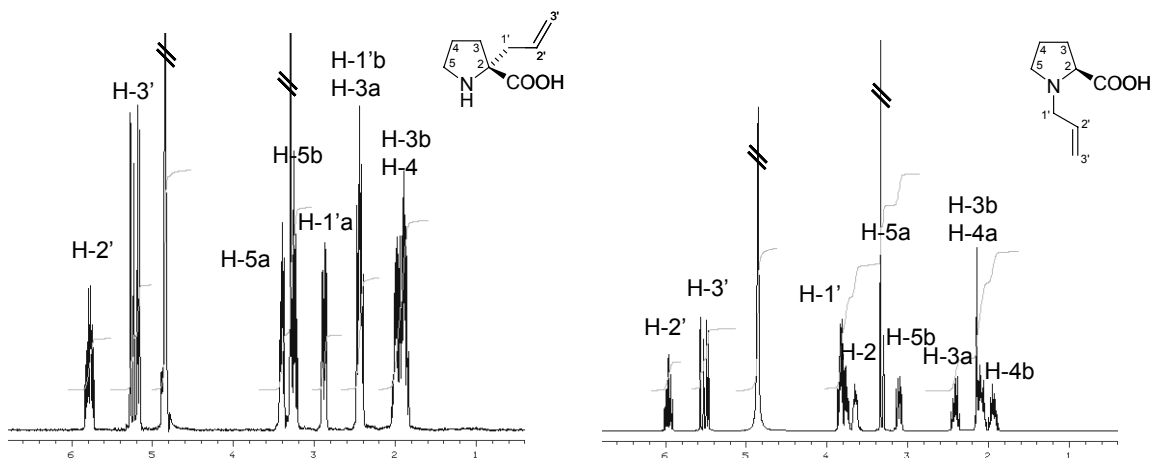


Figura 51: Espectres de ^1H -RMN de la (S)-2-al·lilprolina i de la N-al·lilprolina

Els trets característics que corroboren la identitat d'aquesta substància són l'absència d'un senyal de C quaternari a $\delta = 73,9$ ppm, la presència dels senyals al·lílics ($\delta = 124,8$ i $127,7$ ppm) i la presència d'un senyal metínic a $\delta = 68,6$ ppm corresponent al $\text{C}\alpha$ en l'espectre de ^{13}C -RMN (Fig. 52).

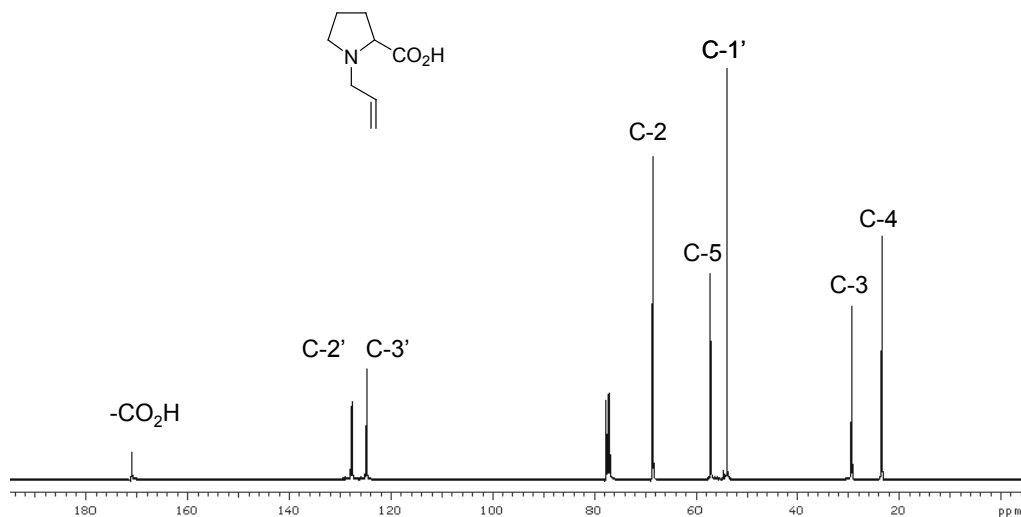
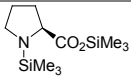

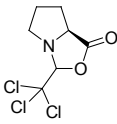
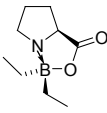


Figura 52: Espectre de ^{13}C -RMN de la N-al·lilprolina

En la Taula 6 es troben resumides les diferents aproximacions que s'han dut a terme per a la síntesi de la (S)-2-al·lilprolina i els resultats obtinguts:

Mètode	Intermedi	Dificultats trobades	Rendiment
Sisti ¹⁰³	 112	<ul style="list-style-type: none"> Inestabilitat de l'oxazolidinona 109 Impossibilitat de purificar els intermedis 	20%
Seebach ¹⁰²	 109	<ul style="list-style-type: none"> Inestabilitat de l'oxazolidinona 109 Impossibilitat de purificar els intermedis 	9%
Orsini ¹⁰⁶	 113	<ul style="list-style-type: none"> Hidròlisi de l'oxazolidinona 114 sota condicions extremes (HCl 6 N) Purificació per columna d'intercanvi iònic 	33%
Via boroxazolidinona	 115	<ul style="list-style-type: none"> Obtenció de la <i>N</i>-al·lilprolina (~44%) 	-

Taula 6: Resum de les diferents aproximacions provades per a la síntesi de la (S)-2-al·lilprolina **108**

2.2.3 Transformacions de la (S)-2-al·lilprolina 108

Tot i els baixos rendiments obtinguts, es va optar per continuar endavant sense invertir més temps en l'optimització de la síntesi ja que l'objectiu principal de la Tesi consistia en l'aplicació d'aquestes estructures pseudodipeptídiques als inhibidors de dimerització de la proteasa.

Amb aquesta finalitat, es van unir els diferents lots de (S)-2-al·lilprolina obtinguda per les diferents vies (després de comprovar-ne la puresa enantiomèrica mitjançant mesures polarimètriques) i es prosseguí amb la síntesi de l'espirolactam desitjat.

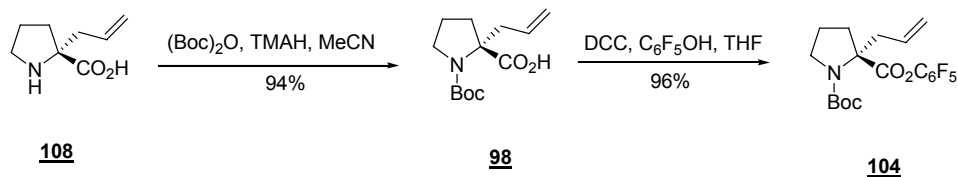
Tal i com s'ha comentat, ens vàrem proposar seguir la ruta que havia donat millors resultats en treball anteriors del nostre grup.⁶⁹ Aquesta ruta passa per la formació de la lactona **105**, la seva obertura per acció de l'amina desitjada i finalment el tancament de l'anell de lactam per formació de l'enllaç N₁-C₆ (Esquema 12).

En primer lloc, es va protegir l'àtom de nitrogen de la (S)-2-al·lilprolina **108** en forma de Boc per tractament amb hidròxid de tetrametilamoni¹¹¹ i (Boc)₂O, obtenint-se el producte desitjat **97** amb un 94% de rendiment.

A continuació, es va fer reaccionar la *N*-Boc-al·lilprolina **98** amb pentafluorofenol i DCC en THF, obtenint l'èster desitjat **104** amb un 96% de rendiment (Esquema 23). El cru obtingut s'utilitzà en la següent reacció sense prèvia purificació, degut a la descomposició de l'èster **104** en SiO₂.

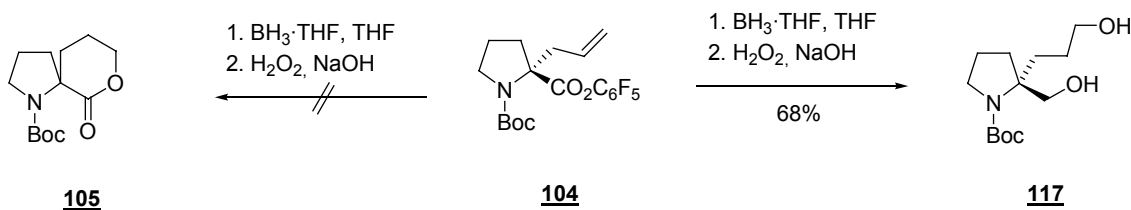
¹¹¹ Khalil, E.M.; Subasinghe, N.L.; Johnson, R.L.; *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 3441-3444.

Aquest compost es caracteritzà per la presència dels senyals corresponents als àtoms de carboni del sistema aromàtic entre $\delta = 136$ - 143 ppm en l'espectre de ^{13}C -RMN.



Esquema 23: Formació de l'èster pentafluorofenílic **104**

El següent pas d'aquesta ruta sintètica descrita anteriorment en el grup consistia en la hidroboració-oxidació del grup al·lil de l'èster de pentafluorofenol **104**. Les condicions de reacció descrites en la tesi de la Montserrat Fernández es basen en l'ús d'un excés d'agent reductor (2,4 eq. de $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, 1 M). Tanmateix, en reproduir aquestes condicions, s'obtingué el diol **117** com a únic producte de reacció (Esquema 24).



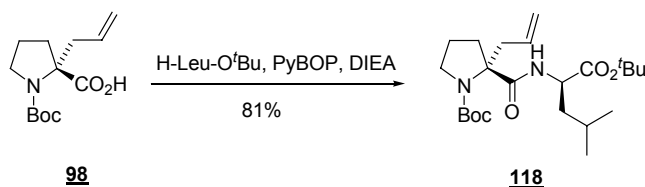
Esquema 24: Hidroboració-oxidació de l'èster de pentafluorofenol **104**

Aquest producte s'identificà per la desaparició dels senyals aromàtics, olefínics i del carbonil en l'espectre de ^{13}C -RMN i per la presència de dos nous senyals metilènics a $\delta = 63,1$ i $69,1$ ppm, corresponents als dos grups CH_2OH formats.

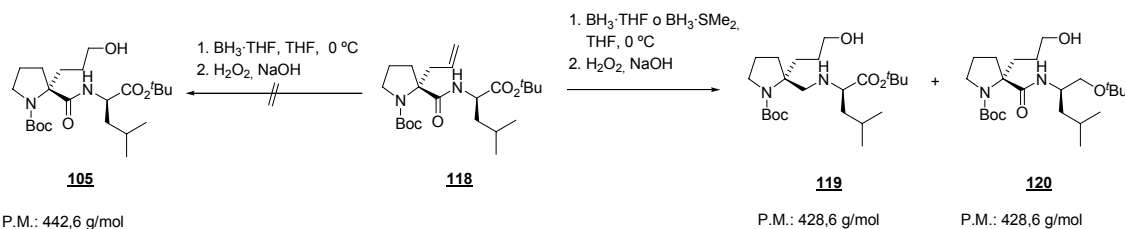
Es van reduir en primer lloc els equivalents de $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ emprats a 1,1 eq., per tal de comprovar si la manca d'un excés de reductor ens permetia l'obtenció del producte desitjat. Malauradament, en aquest cas no s'observà transformació del producte de partida i en anar afegint progressivament més agent reductor es detectà novament la formació del diol **117**.

A la vista d'aquests resultats, ens vam plantejar una nova seqüència sintètica, consistent en fer reaccionar en primer lloc el grup carboxílic de la *N*-Boc-al·lilprolina amb l'aminoàcid H-Leu-O^tBu i dur a terme posteriorment la hidroboració-oxidació del grup al·lilic.

Amb aquest objectiu, es va fer l'acoblament entre la *N*-Boc-al·lilprolina **98** i l'èster *tert*-butílic de la leucina, fent servir PyBOP com a agent acoblant (Esquema 25). D'aquesta manera, després d'una purificació per cromatografia en columna s'obtingué el dipèptid **118** desitjat amb un 81% de rendiment. Aquest producte s'identificà per RMN, on s'observà la presència de rotàmers. En ^1H -RMN s'identificaren el senyal corresponents a l' H_α ($\delta = 4,35$ i $4,48$ ppm) de la Leu i els senyals de l'èster *tert*-butílic ($\delta = 1,46$ ppm) i del grup isobutil de la Leu, mentre que en l'espectre de ^{13}C -RMN s'observà la presència de 3 senyals carbonílics, desdoblats a causa de la presència de rotàmers ($\delta = 153,9$ i $155,4$ ppm, $172,1$ ppm, $174,2$ i $174,4$ ppm).

Esquema 25: Acoblament de la *N*-Boc al·lilprolina amb la H-Leu-O^tBu

A continuació, s'assajaren diferents condicions d'hidroboració-oxidació del dipèptid **118**, variant els equivalents d'agent reductor, així com el tipus de complex de borà ($\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ o $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$) (Taula 7). Tot i que l'agent reductor clàssic utilitzat per a les reaccions de hidroboració d'alquens és el $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, sovint s'utilitza alternativament el $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$, ja que presenta avantatges d'estabilitat, solubilitat en diferents dissolvents i és assequible comercialment a concentracions més elevades (10 M pel $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$ envers 1 M pel $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$).

Esquema 26: Hidroboració-oxidació del dipèptid **118**

Agent reductor	119	120
0,33 eq. $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (1 M)	-	-
1,1 eq. $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (1 M)	-	-
1,5 eq. $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (1 M)	-	-
2 eq. $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (1 M)	20%	-
3 eq. $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (1 M)	37%	-
2 eq. $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$ (10 M)	24%	25%

Taula 7: Condicions de reacció assajades per la hidroboració-oxidació del dipèptid **118**

Tal i com es pot observar en la Taula 7, en sotmetre el dipèptid al·lilat **118** a les condicions d'hidroboració-oxidació utilitzant fins a 1,5 eq. de $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ no s'observà conversió del producte de partida. En canvi, en augmentar el nombre d'equivalents fins a 2, s'obtingué una mescla de productes, de la qual se'n pogué aïllar el compost **119**. En incrementar el nombre d'equivalents fins a 3 eq. s'aconseguí augmentar el rendiment de reacció, cosa que també s'observà en utilitzar el BH_3 complexat amb SMe_2 . En aquest últim cas, s'aïllà el compost **120** juntament amb el compost **119**. Els dos compostos aïllats presentaven la mateixa massa (P.M. = 428 g/mol),

però diferien en 14 unitats amb la massa de l'alcohol desitjat **105** (P.M. = 442 g/mol). Això ens permeté deduir que un dels grups carbonil del compost **118** s'havia reduït. Aquesta hipòtesi es corroborà per la presència d'un únic senyal de carbonil en els espectres de ^{13}C -RMN de les dues substàncies, a part del senyal corresponent al carbamat. Per tal d'esbrinar la identitat d'aquestes dues substàncies, va ser necessari un estudi més detallat dels espectres de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN, així com dels espectres de correlació ^1H - ^1H i ^1H - ^{13}C que ens permeteren l'assignació dels senyals observats (Fig. 53):

- Un dels compostos presenta un singulet ample a $\delta_{\text{H}} = 5,61$ ppm, típic del protó amídic, i un apantallament ($\Delta\delta = -0,72$ ppm) del protó α de la Leu en l'espectre de ^1H -RMN, mentre que en l'espectre de ^{13}C -RMN s'observen els senyals de 2 grups *tert*-butílics ($\delta_{\text{C}} = 28,1$ i $28,6$ ppm i $\delta_{\text{C}} = 80,3$ i $83,0$ ppm) i el senyal de dos carbonis metilènics a $\delta = \sim 62$ ppm. Aquestes dades posen de manifest que es tracta del compost **120**, fruit de la reducció de l'éster *tert*-butílic. Tot i que caldria esperar que el producte de reducció de l'éster *tert*-butílic donés lloc a l'alcohol primari derivat de la leucina, tant l'espectrometria de masses com els espectres de ^1H i ^{13}C ens revelen que es tracta de l'èter *tert*-butílic **120**. Aquest fet es podria explicar tenint en compte la basicitat del medi, que podria potenciar la formació de l'èter *tert*-butílic un cop obtingut reduït l'éster a alcohol.
- Pel que fa a la identitat de l'altra substància, en l'espectre de ^1H -RMN no s'observa el singulet ample típic de les amides entre $\delta = 5-6$ ppm i en l'espectre de ^{13}C -RMN els dos grups metilènics es troben més separats que en el cas de l'altre compost (un a ~ 63 ppm i l'altre a ~ 55 ppm). El senyal més desapantallat ($\delta \sim 63$ ppm) es va assignar al grup CH_2OH procedent de la hidroració-oxidació del doble enllaç, mentre que l'altre senyal ($\delta \sim 55$ ppm) es va assignar al grup $\text{CH}_2\text{-NH}$, procedent de la reducció del grup amida.

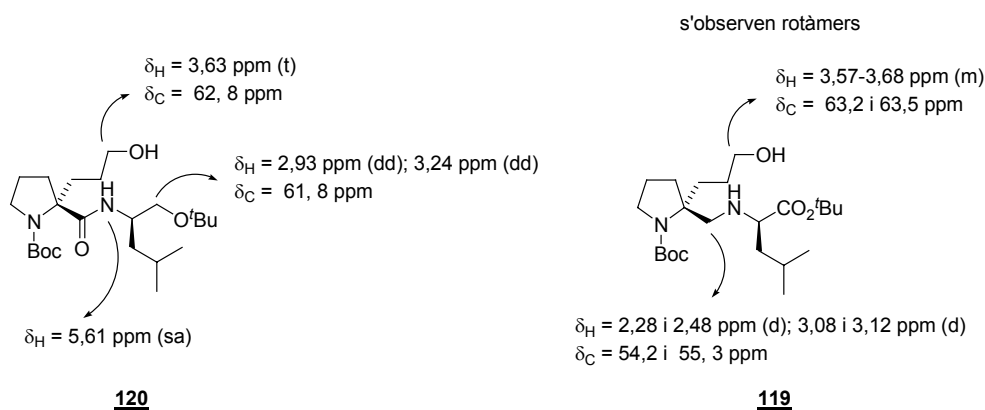


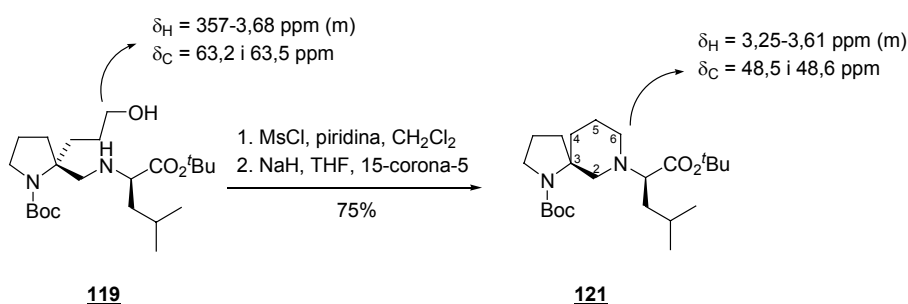
Figura 53: Estructures i desplaçaments químics dels dos compostos obtinguts en la hidroració-oxidació

A la literatura es troba descrita la capacitat del borà per reduir una gran varietat de grups funcionals, seguint generalment el següent ordre de prioritat: àcids carboxílics > olefines >

cetones > nitrils > epòxids > amides > ésters > halurs d'acil,¹¹² per aquest motiu totes les addicions de borà es feren a 0 °C, però tot i així no s'aconseguí que la reacció fos quimiosselectiva envers la hidroboració del grup al·lil.

Arribats a aquest punt, no vam creure convenient invertir més temps i esforços en la síntesi de l'espilactam **81**, ja que les dificultats sintètiques amb les que topàrem feien inviable la incorporació d'aquesta estructura en els inhibidors de dimerització de la proteasa del VIH-1.

Tanmateix, com que encara disposàvem d'una petita quantitat de compost **119**, es va provar d'obtenir l'espilactam **121**, per conversió de l'alcohol en grup mesilat i posterior ciclació per tractament amb NaH i èter 15-corona-5 (Esquema 27).



Esquema 27: Síntesi de l'espilactam **121**

D'aquesta manera, s'obtingué el compost espirànic **121** amb un 75% de rendiment, que es caracteritzà per un pic molecular a $m/z = 411,41$ en EM i en l'espectre de ¹³C-RMN pel senyal d'un grup metilè a $\delta_{\text{C}} = 48,6$ ppm, corresponent al C6 que s'ha apantallat ($\Delta\delta = -15$ ppm) en passar de carbinol a estar unit a nitrogen.

Malauradament, les dificultats sintètiques observades per a la síntesi d'aquestes estructures espilactàmiques no ens van permetre obtenir les estructures desitjades en suficient quantitat com per incorporar-les en la síntesi peptídica dels inhibidors de dimerització de la HIV-1 PR.

Recentment, en el grup s'ha aconseguit desenvolupar una metodologia no esteroesselectiva que proporciona sistemes espirànics anàlegs en 4 passos i amb un rendiment global del 10% a partir de la *N*-Boc-prolina.

¹¹² a) Brown, H.C.; Subba Rao, B.C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 681-686. b) Brown H.C.; Korytnyk, W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 3866-3869. c) Brown, H.C.; Keblyns, K.A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 1795-1801. d) Brown, H.C.; Heim, P.; Yoon, N.M.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 1637-1646. e) Brown, H.C.; Choi, Y.M.; Narasimhan, S.; *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 3153-3163. f) Brown, H.C.; Heim, P.; *J. Org. Chem.*, **1973**, *38*, 912-916.

2.3 Síntesi del lactam de Freidinger 82

Donades les dificultats sintètiques amb les que topàrem durant la síntesi de l'espirolactam **81**, ens vam decantar per un altre 3-aminolactam més fàcilment assequible sintèticament, amb l'objectiu de poder incorporar-lo en els inhibidors de dimerització de la HIV-1 PR i avaluar-ne la seva activitat.

2.3.1 Antecedents

Entre les nombroses estratègies per a la restricció conformational de pèptids, la incorporació de l'esquelet carbonat en una estructura de "lactam de Freidinger"⁶⁸ ha estat àmpliament utilitzada per al disseny d'una gran varietat de dianes terapèutiques rellevants,¹¹³ especialment en el camp dels inhibidors de proteases i peptidases.¹¹⁴

Aquest tipus de ciclació de l'esquelet carbonat fixa l'angle ω fent que l'amida adopti la conformació trans, limita la rotació dels angles ψ_1 i χ_1 i restringeix en certa manera els angles veïns ϕ_1 i ϕ_2 (Fig. 54).

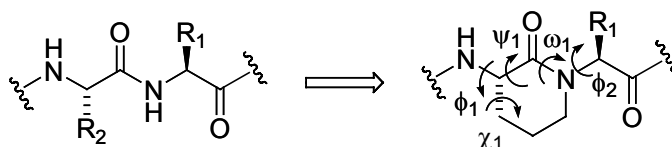


Figura 54: Restriccions conformationals de l'esquelet carbonat per mitjà d'un lactam de Freidinger

De les estratègies existents per a l'obtenció de lactams, les aproximacions més emprades per a la síntesi de lactams dipeptídics es poden resumir en (Fig. 55):

- Tancament de l'enllaç N₁-C₆ de dipèptids **122** (via 1)
- Acoblament intramolecular (via 2)
- Inserció d'una unitat de C per condensació amb formaldehid (via 3)
- N-alquilació del lactam prèviament format a partir de l'ornitina o de la lisina¹¹⁵ (via 4)
- Reacció de metàtesi de tancament d'anell per a l'obtenció de lactams insaturats

Un mètode ideal hauria de ser aplicable a lactams de diferents mides, permetre la inserció de fragments d'aminoàcids cars o estranys en una etapa avançada de la síntesi, incorporar esquemes de protecció compatibles amb la síntesi peptídica estàndard i permetre un control sobre l'estereoquímica relativa o absoluta.

¹¹³ Samanen, J.; Cash, T.; Narindray, D.; Brandeis, E.; Adams, W.Jr.; Weideman, H.; Yellin, T.; *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 3036-3043. b) Ede, N.J.; Rae, I.D.; Hearn, M.T.W.; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 6071-6074.

¹¹⁴ Perdih, A.; Kikelj, D.; *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 1525-1556.

¹¹⁵ Pellegata, R.; Pinza, M.; Pefferi, G.; *Synthesis*, **1978**, 614-616.

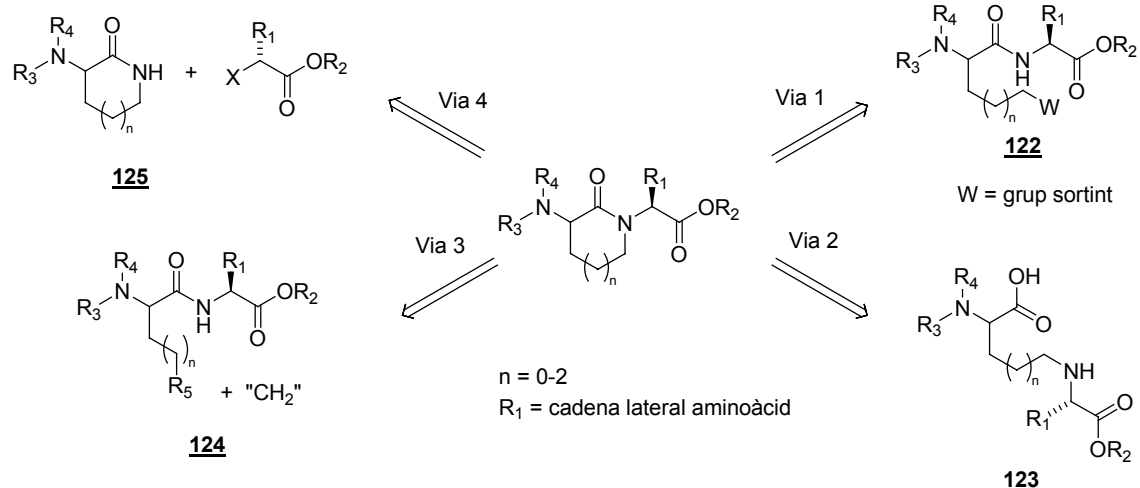


Figura 55: Rutes sintètiques que condueixen a la formació de dipèptids lactàmics saturats

En la Figura 56 es mostren alguns dels 3-aminolactams sintetitzats en els darrers anys seguint alguna de les aproximacions comentades anteriorment.

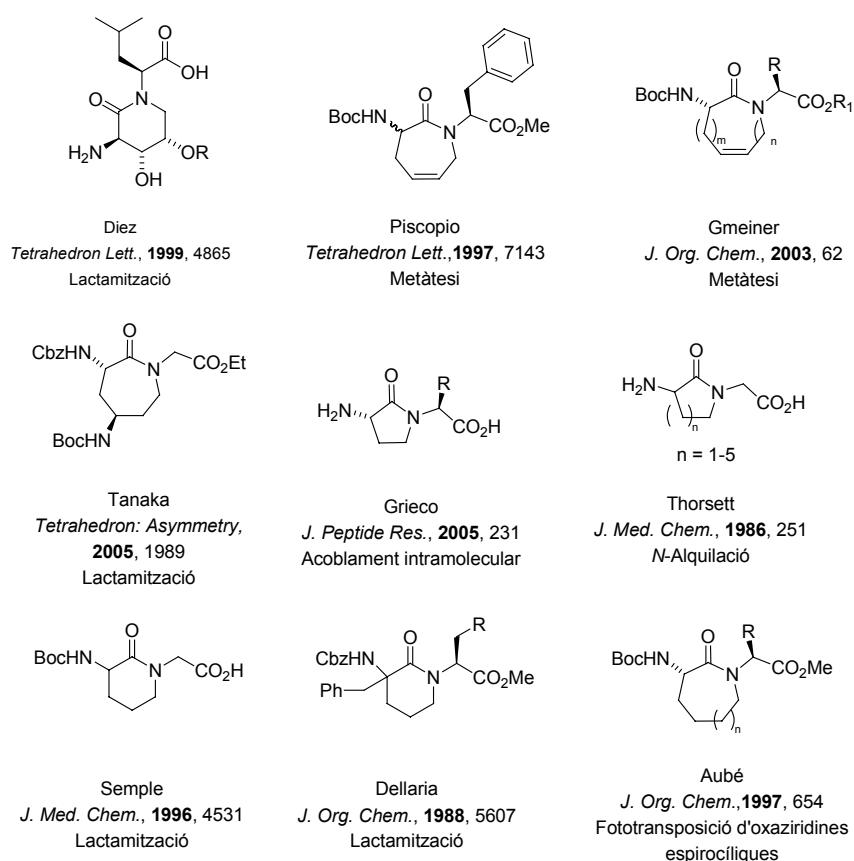
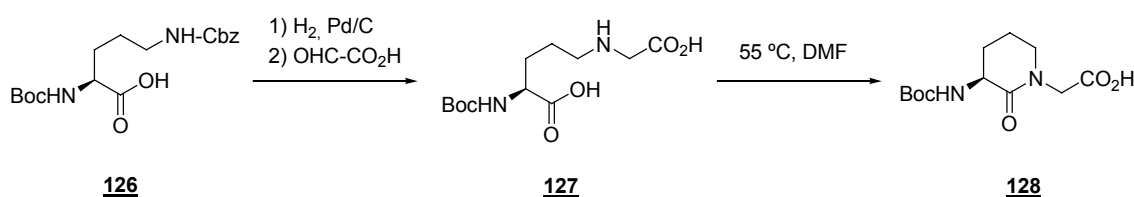


Figura 56: Exemples de 3-aminolactams descrits a la literatura

Tal i com s'ha comentat en la Introducció de la present Tesi doctoral, el nostre grup compta amb l'experiència en la síntesi de lactams de Freidinger de 6 membres i en l'aplicació d'aquestes estructures en compostos d'importància biològica.¹¹⁶

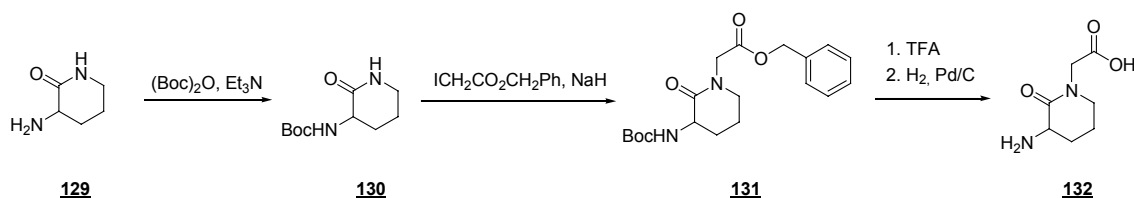
Basant-nos en criteris de simplicitat sintètica, es va optar per sintetitzar la 3-aminopiperidona **132** mimètica del dipèptid {Ala-Gly}, estructura prèviament sintetitzada en el nostre grup^{116a} i també descrita en la literatura pels grups de Freidinger,^{68c} Thorsett¹¹⁷ i O'Donell.¹¹⁸

L'estratègia original de Freidinger s'inicia amb la desprotecció de la cadena lateral de l'ornitina comercial **126** per hidrogenolisi amb Pd/C com a catalitzador, seguida de l'alquilació reductiva *in situ* amb àcid glicòlic per donar el compost dicarboxílic **127**, el qual finalment cicla lentament a temperatura ambient per donar el lactam **128** protegit amb el grup Boc (Esquema 28).^{68c}



Esquema 28: Procediment original de Freidinger per a la síntesi del lactam **128**

Aquest compost ha estat reconegut com a inhibidor de l'enzim conversor d'angiotensina per Thorsett *et al.* Aquest grup ha desenvolupat una estratègia sintètica alternativa per aquesta classe de compostos, basada en l'alquilació de la 3-amino-2-piperidona¹¹⁵ (Esquema 29).¹¹⁷



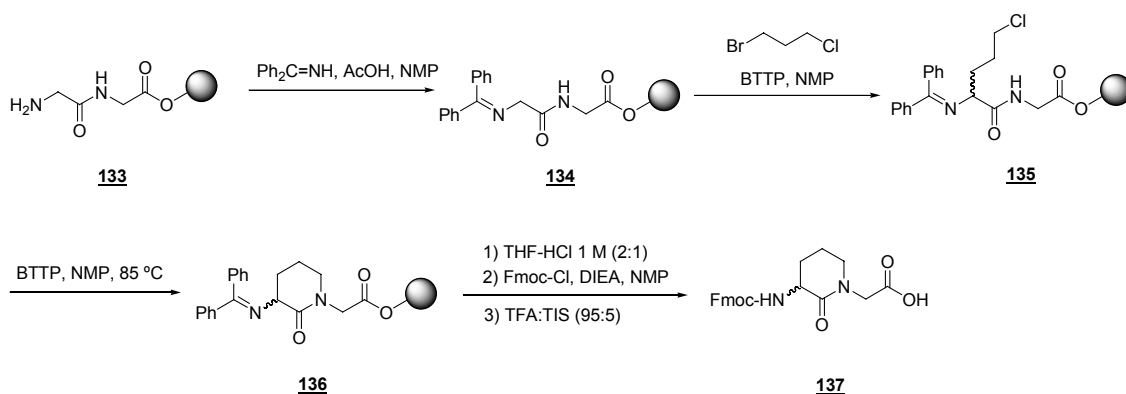
Esquema 29: Estratègia sintètica desenvolupada per Thorsett

O'Donnell en va descriure una síntesi en fase sòlida l'any 2004, partint d'un dipèptid Gly-Gly unit a la resina Wang.¹¹⁸ L'activació de la posició α mitjançant la formació d'una difenilimina, seguida d'alquilació i posterior ciclació promoguda per una base (BTTP), rendiren la piperidona desitjada **137**, que finalment fou protegida amb el grup Fmoc (Esquema 30).¹²⁵

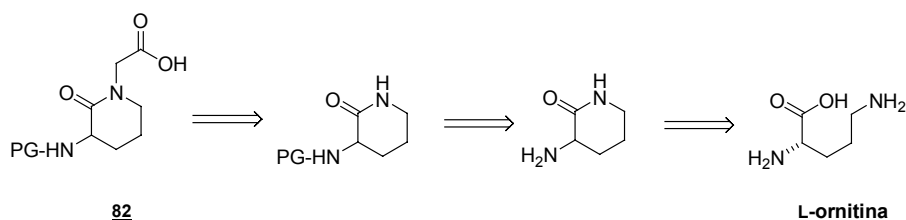
¹¹⁶ a) García, M.; del Río, X.; Silvestre, S.; Rubiralta, M.; Lozoya, E.; Segarra, V.; Fernández, D.; Miralpeix, M.; Aparici, M.; Diez, A.; *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 1633-1642. b) Forns, P.; Piró, J.; Cuevas, C.; García, M.; Rubiralta, M.; Giralt, E.; Diez, A.; *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 5825-5833. c) Ecija, M.; Diez, A.; Rubiralta, M.; Casamitjana, N.; Kogan, M.J.; Giralt, E.; *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 9541-9553. d) Ref. 69

¹¹⁷ Thorsett, E.D.; Harris, E.E.; Aster, S.D.; Peterson, E.R.; Synder, J.P.; Springer, J.P.; Hirshfield, J.; Tristram, E.W.; Patchett, A.A.; Ulm, E.H.; Vassil, T.C.; *J. Med. Chem.*, **1986**, *29*, 251-260.

¹¹⁸ Scott, W.L.; Alsina, J.; Kennedy, J.H.; O'Donell, M.J.; *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 1629-1632.

Esquema 30: Estratègia sintètica d'O'Donnell per a la 3-aminopiperidona **137**

En el nostre cas, es va optar per una síntesi anàloga a la de Thorsett¹¹⁷ a través de la *N*-alquilació de la ciclornitina, ruta que en estudis anteriors en el grup havia presentat millors rendiments (Esquema 31).¹¹⁶

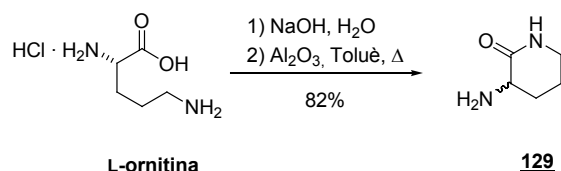
Esquema 31: Anàlisi retrosintètica per a la síntesi de la 3-aminopiperidona **82**

Com a protector del grup amino es va escollir el grup al·liloxicarbonil ja que és compatible amb el medi bàsic necessari per la *N*-alquilació i és un grup ortogonal amb les condicions d'escissió de la resina en la síntesi peptídica en fase sòlida.

2.3.2 Ciclació, protecció i alquilació de la L-ornitina

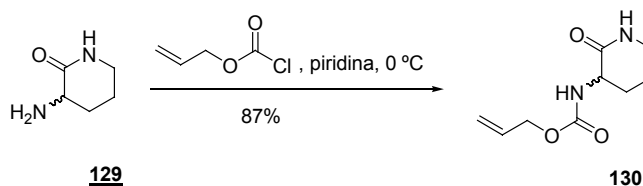
En primer lloc es dugué a terme la ciclació de la L-ornitina mitjançant una deshidratació amb alumina en toluè a reflux (Esquema 32).¹¹⁹ Aquestes condicions van proporcionar el producte desitjat **129** en forma racèmica amb un 82% de rendiment. La 3-aminopiperidona **129** es va identificar per espectroscòpia de masses i per ¹H-RMN, on es van poder distingir dos tipus de senyals diferents pels protons NH, un senyal a $\delta = 1,80$ ppm corresponent al grup NH₂ i un senyal a $\delta = 6,64$ ppm, corresponent al NH del grup amida.

¹¹⁹ a) Blade-Font, A.; *Tetrahedron Lett.*, **1980**, *21*, 2443-2446. b) Hutchinson, I.S.; Matlin, S.A.; Mete, A.; *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 3137-3143.



Esquema 32: Cicllació de la L-ornitina

A continuació, es va protegir el grup amino amb Al·loc, fent reaccionar el lactam obtingut amb cloroformat d'al·lil en THF anhidre i presència de piridina anhidra a 0 °C (Esquema 33).¹²⁰ El producte protegit **130**, obtingut amb un 87% de rendiment, es caracteritzà per la desaparició del senyal del grup amino a $\delta = 1,80$ ppm i l'aparició d'un nou senyal corresponent al NH del carbamat a $\delta = 5,69$ ppm en l'espectre de ¹H-RMN, juntament amb dos dobles dobles a $\delta = 5,21$ i 5,51 ppm i un multiplet a $\delta = 5,88$ -5,97 ppm, característics del grup al·lil.

Esquema 33: Síntesi de la N-Alloc cicloornitina **130**

El següent pas d'aquesta estratègia consistia en l'alquilació del grup amida per tal de mimetitzar el residu de Gly, reacció que es troba àmpliament descrita a la literatura.¹²¹

Quan es va assajar l'alquilació de la cicloornitina **130** emprant NaH coma base,¹¹⁷ únicament es recuperà producte de partida, la qual cosa s'explica per l'acidesa del protó α del bromoacetat d'etil. Per tal d'evitar la transferència de protó entre l'amidat i el bromoacetat d'etil, es dugué a terme l'alquilació de la piperidona en una reacció de transferència de fase per tractament amb K₂CO₃ i TBAB.¹²² L'obtenció del producte desijtat **131** s'identificà pels senyals del grup etil (a $\delta = 1,28$ ppm i $\delta \sim 4,20$ ppm) i la presència d'un sistema AB a $\delta = 3,92$ ppm i $\delta = 4,24$ ppm.

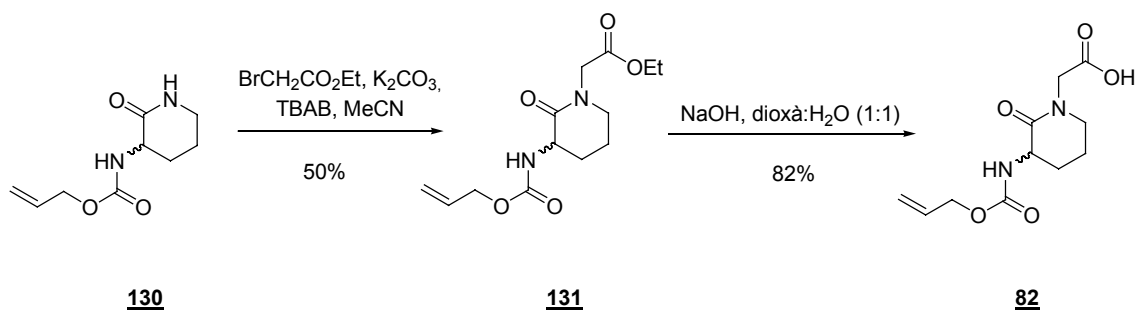
Tot i el rendiment moderat (50%), es pogué recuperar el producte de partida restant, fàcilment separable per cromatografia en columna.

Finalment, es dugué a terme la saponificació de l'èster per tractament amb NaOH, obtenint-se d'aquesta manera l'àcid **82** amb un 82% de rendiment. La identitat d'aquest producte es corroborà per la desaparició dels senyals del grup etil en l'¹H-RMN i per la presència d'una banda ampla en l'espectre d'IR a $\nu = 3319 \text{ cm}^{-1}$. D'aquesta manera s'obtingué el pseudodipèptid {Ala-Gly}, apte per a la síntesi peptídica en fase sòlida.

¹²⁰ Corey, E.J.; Suggs, J.W.; *J. Org. Chem.*, **1973**, *38*, 3223-3224.

¹²¹ Oligaruso, M.A.; Wolfe, J.F.; *Synthesis of lactones and lactams*, Ed. John Wiley and Sons, **1993**, 662-695.

¹²² a) Watthey, J.W.; Stanton, J.L.; Desai, M.; Barbiar, J.E.; Finn, B.M.; *J. Med. Chem.*, **1985**, *28*, 1511-1516. b) Reuschling, D.; Pietsch, H.; Linkies, A.; *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *19*, 615-618. c) Tesi doctoral Marta Ecija.

Esquema 34: Alquilació de la *N*-Al·loc cicloornitina i hidròlisi de l'èster etílic

2.4 Recapitulació

Tot i que la síntesi de l'epirilactam **81** va resultar ser més problemàtica del que es preveia i es va acabar descartant com a estructura viable per als nostres objectius, es van preparar en escala de 2 g les 3-aminopiperidones **80** i **82**. Això ens permeté la continuació del treball amb la síntesi d'inhibidors de la HIV-1 PR (Capítol 4).