



## Síntesi i aplicació de $\psi$ -dipèptids amb estructura de 3 aminopiperidona. Síntesi de $\psi$ -melanotans

Jordi Mas Pons

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**FACULTAT DE FARMÀCIA**

**DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA**

**SÍNTESI I APLICACIÓ DE  $\psi$ -DIPÈPTIDS AMB**

**ESTRUCTURA DE 3-AMINOPIPERIDONA.**

**SÍNTESI DE  $\psi$ -MELANOTANS**

**JORDI MAS PONS**

**2010**

## **SÍNTESI DELS LACTAMS**

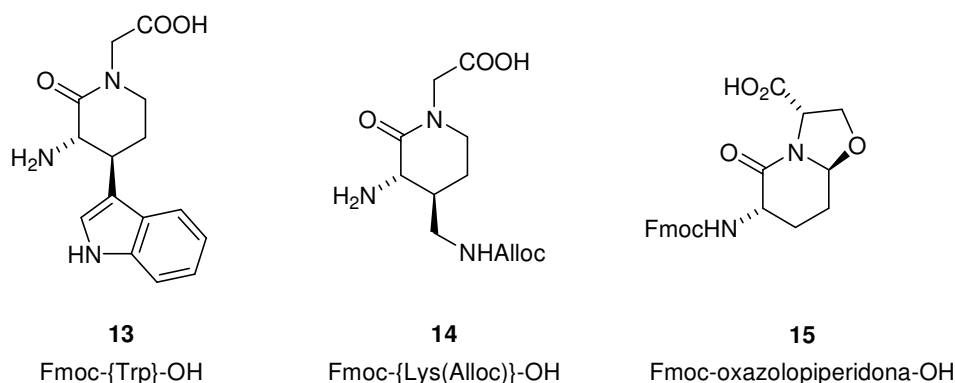
---



### CAPÍTOL 3. SÍNTESI DELS LACTAMS

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 l'heptapeptid melanocortínic **MT2** per tal d'obtenir anàlegs amb la intenció d'avaluar-ne l'activitat biològica i poder establir relacions entre estructura i activitat. Igualment, s'ha comentat que el disseny dels nostres pseudomelanotans es basa en les dades ja descrites a la literatura sobre aquest tipus de compost, i que la nostra intenció es introduir els lactams dipeptídics per rigidificar la part més flexible de la molècula.

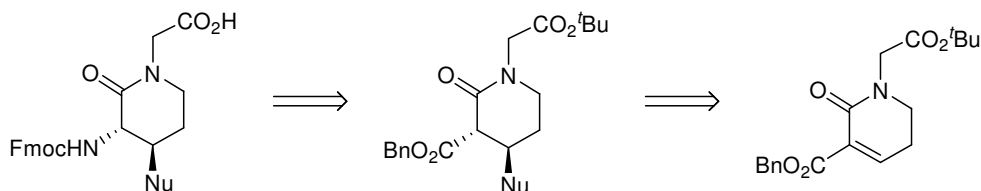
Per assolir aquest objectiu, cal primerament sintetitzar els lactams funcionalitzats. Concretament, es volen modificar els residus de Trp i de Lys i substituir-los pels nostres anàlegs rígids del triptòfan {Trp}, i de la lisina {Lys} (vegeu figura 3.1). A més a més també volem substituir la zona flexible de la molècula pel nostre mimètic de gir bicíclic, l'oxazolopiperidona **15**.



**Figura 3.1.** Lactams utilitzats per rigidificar l'**MT2**.

Per dur a terme la síntesi ens vàrem basar en un treball precedent del grup en el qual s'havia descrit la síntesi del derivat 3-amino-4-indolil-2-piperidona-1-acetat de metil per addició conjugada de l'indole sobre un substrat insaturat.<sup>45</sup> Perquè l'addició conjugada tingui lloc de forma satisfactòria és necessari que la substitució de la posició C<sub>3</sub> sigui amb un grup electroattractiu. Això es va comprovar en estudis anteriors en què s'havia assajat l'addició conjugada sobre derivats 3-amino protegits en forma de carbamat i doble carbamat (Z i diZ). Per tant la funcionalització d'aquesta posició s'havia de fer en una etapa posterior mitjançant una transposició de tipus Curtius.

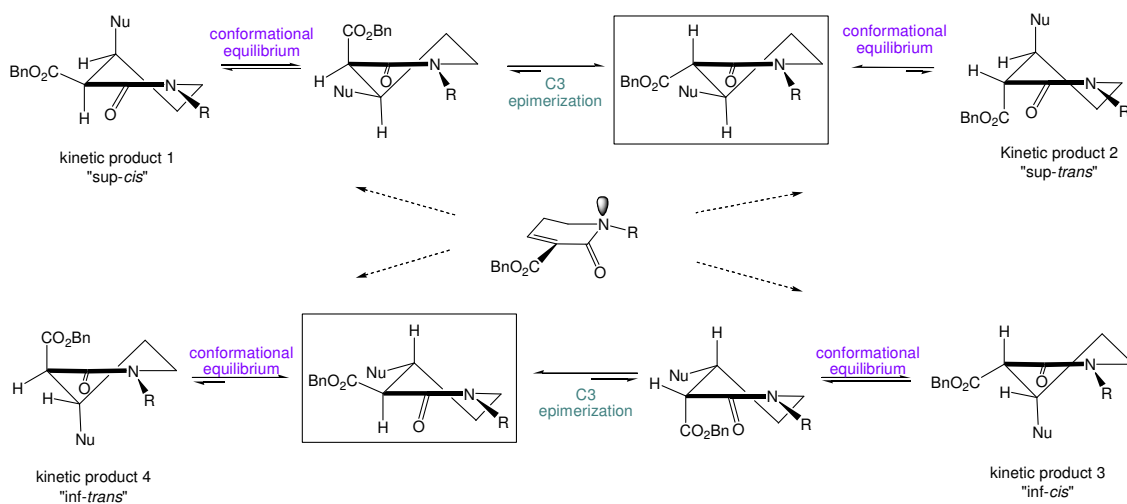
La preparació dels derivats {Lys} es va plantejar seguint una estratègia similar, on es faria l'addició d'un nucleòfil precursor del grup aminometil, abans de dur a terme l'aminació de la posició C<sub>3</sub>.



**Esquema 3.1.** Anàlisi retrosintètica dels lactams **13** i **14**.

Cal comentar, que l'addició conjugada a aquests sistemes pot conduir a mescles isomèriques, però que tal com s'havia previst i estudiat anteriorment, s'observa sempre la predominància de l'isòmer 3,4-*trans* per control termodinàmic.

Així, si considerem l'entrada del nucleòfil per la cara beta (vegeu figura 3.2), el benziloxicarbonil es pot disposar *cis* o *trans* respecte al nucleòfil, de la qual cosa en resulten els isòmers "sup-*cis*" i "sup-*trans*". Per una banda la molècula adoptarà la conformació més estable, amb el màxim nombre de substituents equatorials; per altra banda, com que l'àtom C<sub>3</sub> és epimeritzable, l'equilibri final queda desplaçat cap a la formació de l'isòmer 3,4-*trans*. Si l'atac del nucleòfil és per la cara alfa, s'estableix un equilibri similar, i l'isòmer més afavorit és el 3,4-*trans*, enantiòmer de l'anterior.



**Figura 3.2.** Estereoquímica de l'addició conjugada.

A efectes pràctics s'observa que efectivament la mescla racèmica 3,4-*trans* és el producte majoritari de les reaccions, però la proporció *cis:trans* depèn de les característiques del nucleòfil.

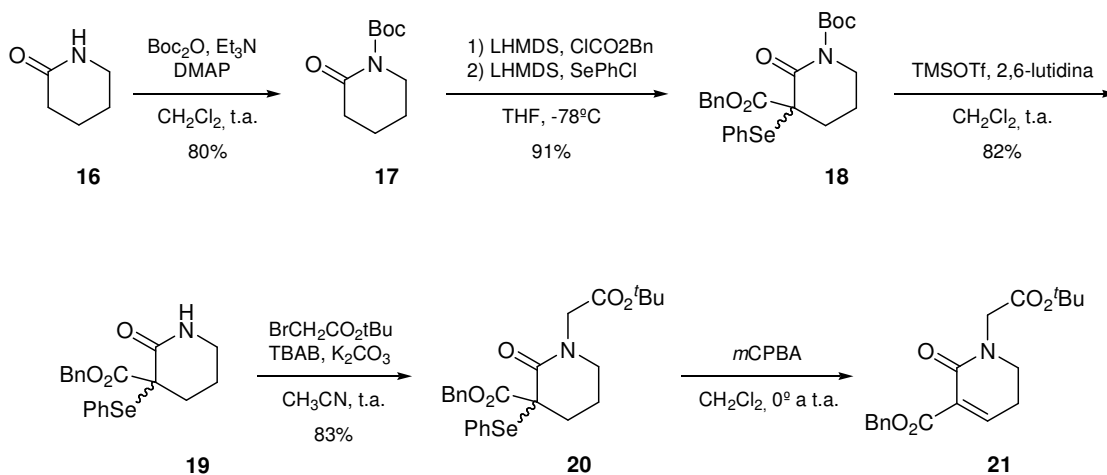
En el present treball hem de tenir en compte, doncs, que estarem emprant la mescla racèmica per a l'obtenció posterior dels pèptids objectiu, la qual cosa vol dir que estarem preparant pèptids diastereòmers, que ens plantegem de separar al final de la síntesi, quan es purifiquen els pèptids per HPLC.

Una altra consideració important és que si el residu R és quiral (en lloc de l'acetat de *tert*-butil que utilitzem per començar), s'obtindran diastereòmers, que ja es poden separar en aquesta etapa. Finalment, una altra possibilitat per tal d'obtenir lactams òpticament purs seria dur a terme l'addició conjugada de forma estereoselectiva, possibilitat que no es va contemplar per al present treball.

### 3.1. Síntesi de la 3-amino- $\Delta^3$ -piperideinona de partida (21)

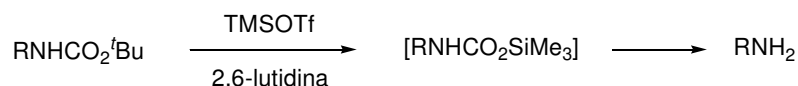
Seguint el procediment descrit anteriorment en el nostre grup, es va preparar el substrat insaturat necessari per a l'obtenció dels lactams objectiu de la present tesi doctoral.

Així, la protecció de la  $\delta$ -valerolactama comercial **16** es dugué a terme per tractament amb  $\text{Boc}_2\text{O}$  en presència de  $\text{Et}_3\text{N}$  i DMAP, emprant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  com a dissolvent. En aquest cas calia afegir la DMAP com a catalitzador degut a que el que es volia protegir era una amida. Al finalitzar la reacció es liofilitzà l'excés de *tert*-butanol per a que aquest no interferís en la següent etapa. La reacció rendí la lactama protegida **17** amb un 80% de rendiment. La introducció dels substituents en  $\text{C}_3$  es feu en dues etapes consecutives, utilitzant LHMDS com a base i l'addició de cloroformiat de benzil en primer lloc, i clorur de fenilselenil en segon terme. D'aquesta manera s'obtingué el compost **18** amb un 91% de rendiment, en un procés que es realitzà a l'escala de 8,8 g de **17**.



**Esquema 3.2.** Síntesi de l'intermedi insaturat clau **21**.

A continuació es desprotegí l'àtom de nitrogen per alquilar l'amida. En treballs previs<sup>106</sup> s'havia observat que la desprotecció amb TFA conduïa a la deselenització del compost **18**. Per aquest motiu la desprotecció es duia a terme mitjançant la formació de carbamats de silici. El TMSOTf en presència de 2,6-lutidina transformà el grup Boc en un grup *N*-[(trimetilsilil)oxi]carbonil sense que aquest s'arribés a aïllar i conduí directament al compost amb el grup amino desprotegit (figura 3.3). En el nostre cas el tractament de **18** amb TMSOTf i 2,6-lutidina conduí a l'amida desprotegida **19** amb un 82% de rendiment.



**Figura 3.3.** Desprotecció de l'amida per medi de carbamats de silici inestables.

Pel que fa a l'alquilació de l'amida per obtenir el compost **20**, aquesta reacció s'ha de fer amb  $\text{K}_2\text{CO}_3$  com a base i en condicions de transferència de fase. D'aquesta manera s'evita la formació completa de l'amidat, i l'intercanvi de protó amb el bromoacetat de *tert*-butil. En aquestes condicions l'alquilació donava bons resultats i s'arribà a rendiments del 83% després de purificar el producte per cromatografia. L'alquilació es posà de manifest per la presència, en l'espectre de  $^1\text{H}$ , dels senyals dels protons metilènics de  $\text{CH}_2\text{-CO}_2^t\text{Bu}$  com un sistema *AB* de dos doblets, a  $\delta = 3.87$  i  $4.13$  ppm amb una  $J = 17,0$  Hz i d'un singlet corresponent al grup *tert*-butil a  $\delta = 1,5$  ppm, i de la presència de dos nous senyals a l'espectre de  $^{13}\text{C}$  corresponents als metils del grup  $^t\text{Bu}$  a  $\delta = 28,3$  ppm, i al metilè  $\text{CH}_2\text{-CO}_2^t\text{Bu}$  a  $\delta = 49,2$  ppm.

<sup>106</sup> Tesi doctoral de Marta Ecija, Síntesi d'anàlegs dipeptídics de Trp-Gly amb l'estructura de 3-amino-2-piperidona. Estudi conformacional del tripèptid Trp-Gly-Leu. **2003**.



Finalment, l'oxidació del seleni, seguida d'eliminació en el mateix medi de la reacció conduí de forma satisfactòria al sistema insaturat **21**, el qual no es purificà i fou el nostre substrat per a les addicions conjugades.

En la resta dels casos els compostos es van purificar per cromatografia en columna i es van identificar per comparació de les dades espectroscòpiques amb les ja descrites. Concretament, els senyals més característics del compost **21** son dos sistemes AB corresponents als protons metilènics units al nitrogen N-1, i al metilè del benzil en l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN. Els protons corresponents al sistema olefínic queden emmascarats pels senyals dels protons aromàtics.

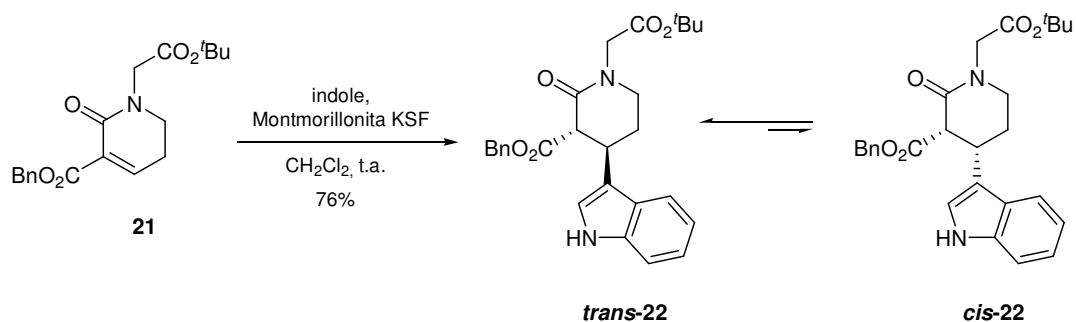
### 3.2. Síntesi del lactam derivat de Trp 13

Per tal d'obtenir l'anàleg dipeptídic de Trp amb estructura de 3-amino-4-indolil-2-piperidona a partir del compost insaturat **21** es van dur a terme tres etapes clau: l'addició conjugada de l'indole, una transposició de Curtius i la funcionalització adient per la síntesi del pseudopèptid en fase sòlida.

#### 3.2.1. Addició conjugada

L'addició conjugada de l'indole tingué lloc amb un rendiment del 76%, en addicionar montmorilonita KSF al medi de reacció.

D'aquesta manera, s'observà la formació dels racèmics **3,4-cis-22** i **3,4-trans-22** en una proporció de 4:1 en el cru de la reacció. Tal com s'ha comentat anteriorment, aquests isòmers estableixen un equilibri termodinàmic entre ells, per la qual cosa, després de purificar la mescla per cromatografia en columna, s'observà la transformació de l'isòmer *cis* a *trans*, que a efectes pràctics fou completa (proporció *trans:cis* 9:1). Per tant l'isòmer *cis* s'identificà de la mescla de reacció, però només el *trans* es pugué caracteritzar de forma completa. La diferència principal entre l'isòmer 3,4-*cis* i 3,4-*trans* en l'espectre de  $^1\text{H}$  és la constant d'acoblament del protó H-3 que en el cas del compost **trans-22** ( $\delta = 4.01$  ppm) és de  $J = 10.5$  Hz mostrant un acoblament *trans*-diaxial, mentre que pel compost **cis-22** ( $\delta = 4.11$  ppm) és de  $J = 6.3$  Hz mostrant un acoblament amb el H-4 axial:equatorial.

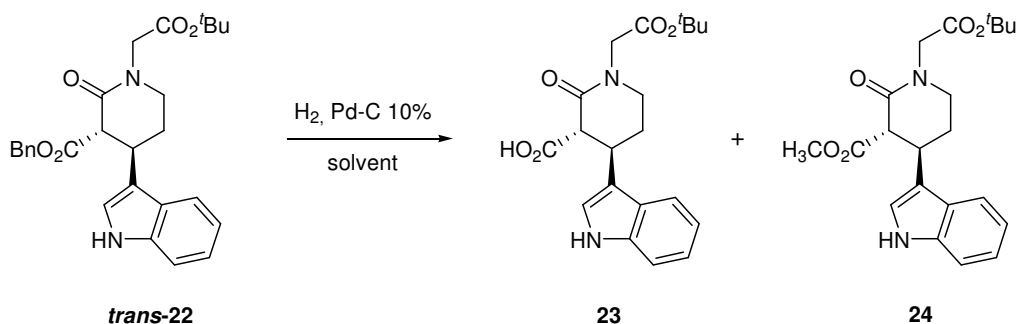


**Esquema 3.3.** Equilibri cis-trans en l'addició conjugada.

### 3.2.2. Transposició de Curtius

A partir de la mescla anterior dels èsters **22**, es dugué a terme una transposició de tipus Curtius per tal d'introduir la funció amina en C-3. Per això, en primer lloc éra necessària la desbenzilació de l'èster. Aquesta etapa fou la més delicada del procés, ja que el cetoàcid resultant té tendència a descarboxilar. Les condicions òptimes per dur a terme aquest procés consisteixen en fer la hidrogenació catalítica en un dissolvent de baix punt d'ebullició, i després de filtrar el catalitzador no escalfar per evaporar el dissolvent.

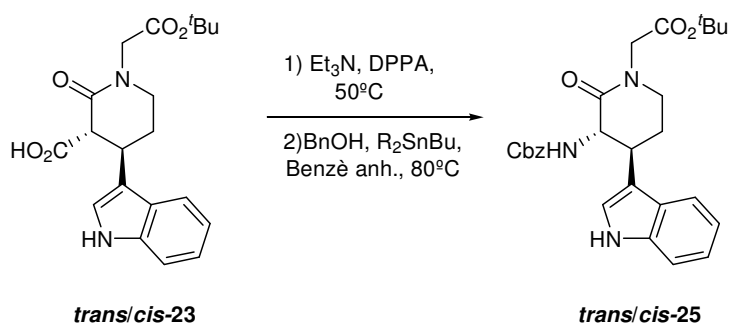
Els millors resultats es van obtenir emprant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  com a dissolvent, ja que quan es feia servir metanol, s'obtenia el producte de transesterificació, donant lloc a l'èster metílic **24**.



**Esquema 3.4.** Hidrogenació catalítica de l'èster **22**.

Per tant, la hidrogenolisi de la mescla **trans/cis-22** en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  va donar lloc als corresponents àcids **trans/cis-23**, que no es purificaren i el cru resultant s'utilitzà directament per la reacció de Curtius. La desaparició del senyal del  $\text{CH}_2$  benzílic i dels senyals aromàtics del grup benzil a l'espectre de RMN de  $^1\text{H}$  de **trans/cis-23**, ens van confirmar l'obtenció dels corresponents àcids carboxílics. En aquest cas, aquests s'obtenien en una proporció **trans/cis** 6:4 (determinats en el cru de reacció).

Per la transposició dels àcids carboxílics **trans** i **cis-23** a les corresponents amines **26**, es va fer servir la reacció de Curtius modificada descrita per Shioiri,<sup>107</sup> al 1972. Per a aquesta reacció s'emprà DPPA en presència de Et<sub>3</sub>N, seguit de l'addició de BnOH i dilaurat de dibutilestany com a catalitzador, emprant benzè anhidre com a dissolvent. (Esquema 3.5)



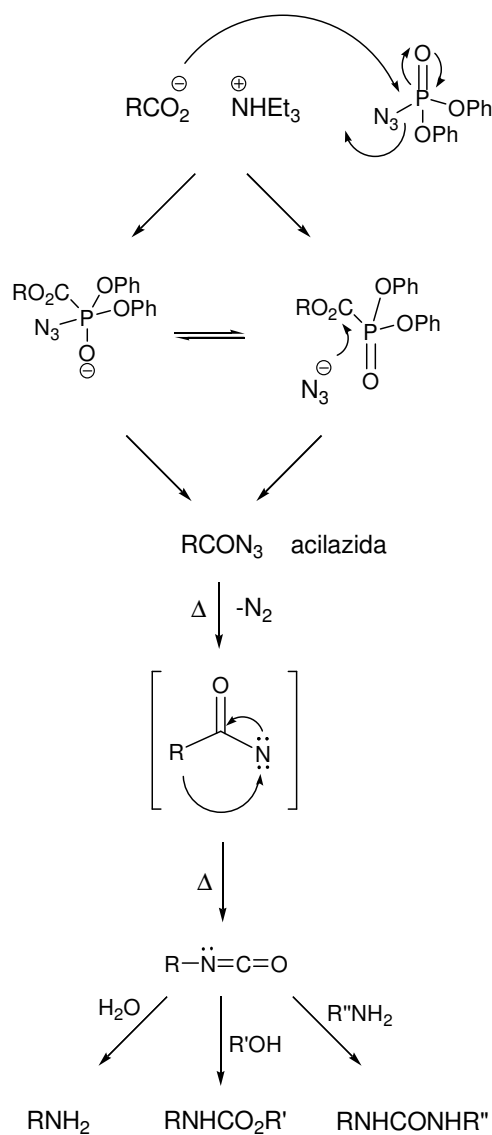
**Esquema 3.5.** Reacció de Curtius modificada.

El curs general de la reacció és el següent: 1) transferència del grup azido des de la DPPA al carboxilat de trimetilamoni per a donar l'acilazida intermèdia, 2) generació de l'acilnitrè per pèrdua de N<sub>2</sub> de l'acilazida, 3) transposició tèrmica de l'acilnitrè per a donar l'isocianat i 4) hidròlisi de l'isocianat per donar l'amina, el carbamat o la urea.

La transposició és un procés en el que no hi ha inversió de configuració, no obstant això, donat que pot haver-hi un nou equilibri conformacional/configuracional, cal remarcar que s'obtingué el racèmic **3,4-trans-25** com a únic producte amb un 56% de rendiment, i que no s'observà la formació del 3,4-*cis*.

Per tal d'obtenir l'amina lliure calia desprotegir el carbamat obtingut **trans-25** i posteriorment protegir-la amb els grups protectors útils per a la posterior síntesi peptídica. Per aquest motiu es va procedir a la hidrogenolisi del carbamat **trans-25** emprant les condicions utilitzades per a la desbenzilació de l'èster **trans-22**, obtenint-se l'amina racèmica **trans-26** de forma gairebé quantitativa, després de l'aïllament mitjançant un rentat amb dissolució aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La desaparició dels senyals corresponents al grup benzil tant a l'espectre de <sup>1</sup>H com al de <sup>13</sup>C de l'amina **trans-26** va ser indicativa de l'èxit de la reacció.

<sup>107</sup> a) Shioiri, T., Ninomiya, K., Yamada, S.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 6203-6205. b) Yamada, S., Ninoyima, K., Shioiri, T.; *Tetrahedron Lett.*, **1973**, *26*, 2343-2346.



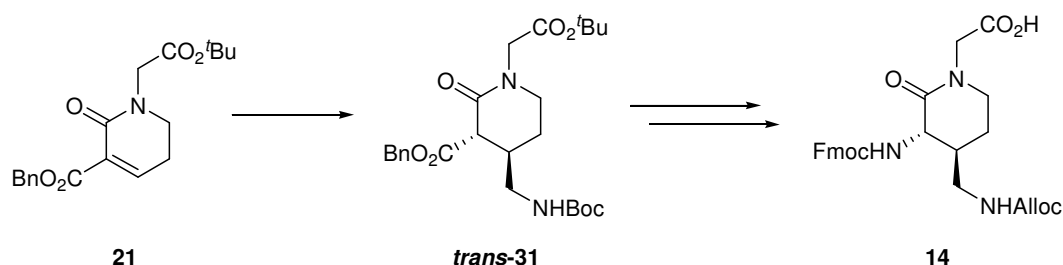
**Figura 3.4.** Mecanisme de la transposició de Curtius modificada.

### 3.2.3. Funcionalització per la síntesi peptídica Fmoc/<sup>t</sup>Bu

Finalment, es va dur a terme la protecció del grup amino en forma d'Fmoc, i l'alliberació de la funció àcida, per tal de tenir el lactam Fmoc-{Trp}-OH **13** a punt per la síntesi peptídica posterior. Les dues reaccions es van efectuar seguint els protocols clàssic establerts, i es va obtenir el compost objectiu **13** amb un 62 % de rendiment.



estratègia similar a l'emprada pel derivat de Trp. Per la qual cosa es pretén realitzar l'addició conjugada d'un precursor del grup amino de la cadena lateral com el nitril o el nitrometà, que posteriorment caldria reduir a la corresponent amina. Posteriorment s'assajaria la transposició de Curtius i finalment s'haurà de modificar la molècula adaptant-la a la síntesi peptídica.

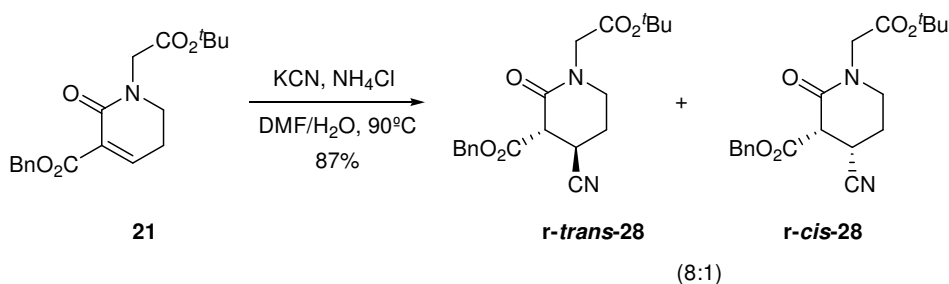


**Esquema 3.7.** Plantejament sintètic per a l'obtenció del compost **14**.

### 3.3.1. Addició conjugada del precursor del grup aminometil

#### 3.3.1.1. Addició de nitril

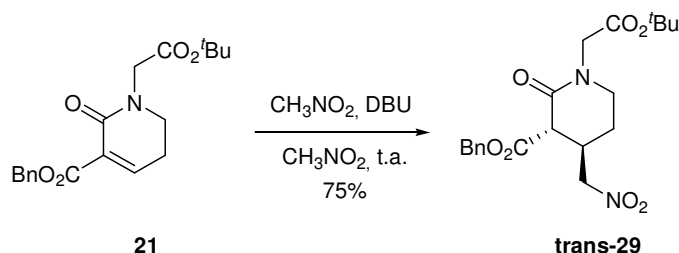
A partir del substrat insaturat **21**, ens varem proposar l'addició conjugada del nitril, que es duia a terme amb KCN i NH<sub>4</sub>Cl emprant DMF com a dissolvent. D'aquesta manera es va obtenir una barreja **trans:cis-28** amb unes proporcions 8:1 calculades sobre l'espectre <sup>1</sup>H-RMN del cru de la reacció. De la mateixa manera que en l'addició conjugada de l'indole, s'estableix un equilibri termodinàmic entre ells, per la qual cosa, després de purificar la mescla per cromatografia en columna, s'observa la transformació de l'isòmer *cis* en *trans*, obtenint-se a la pràctica només el racèmic **trans-28** (proporcions *trans:cis* 20:1). Les dades espectroscòpiques de <sup>1</sup>H-RMN ens confirmen la presència majoritària de *trans*. Concretament la constant d'acoblament observada pel H-3 del senyal majoritari, correspon a un acoblament *trans* diaxial ( $J = 8,5$  Hz) la qual cosa vol dir que els substituents voluminosos es troben en posició equatorial *trans*. Les constants d'acoblament del compost minoritari per H-3 corresponen a un acoblament equatorial-axial i per tant confirmen que el producte minoritari és el compost **cis-28**.



**Esquema 3.8.** Addició conjugada de nitril.

### 3.3.1.2. Addició de nitrometà

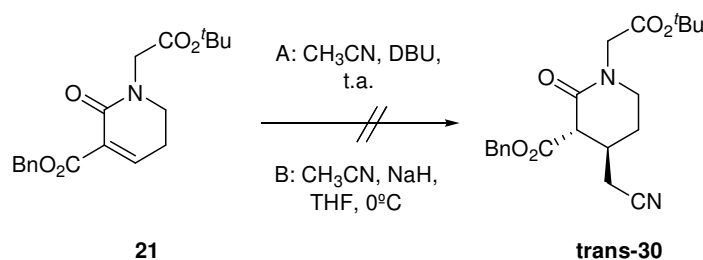
També es va dur a terme l'addició conjugada de nitrometà mitjançant un procediment diastereoselectiu descrit a la literatura,<sup>111</sup> emprant DBU en quantitats catalítiques com a base i un excés de nitrometà que actuava com a nucleòfil i alhora era el dissolvent de la reacció. En aquest cas, s'obtingué únicament el racèmic **trans-29** de forma satisfactòria, amb un rendiment del 75%. El compost **trans-29** mostra com a senyals més característics un multiplet a  $\delta=4,36\text{-}4,39$  ppm corresponent al  $\text{CH}_2\text{-NO}_2$  i un doblet corresponent a l'H-3 ( $\delta=3,36$  ppm) amb una  $J = 9,1$  Hz *trans* diaxial.



**Esquema 3.9.** Addició diastereoselectiva de nitrometà.

Seguint el mateix raonament, vàrem decidir assajar l'addició conjugada d'acetonitril sobre el compost **21**. D'aquesta manera es podria obtenir el compost **30** i així homologar la cadena en un àtom de carboni. Es van fer servir les mateixes condicions emprades anteriorment per la síntesi de **trans-29**, amb DBU en quantitats catalítiques com a base i un excés d'ACN. En aquest cas, però, no es va obtenir el producte desitjat. Per aquest motiu, vàrem provar de fer l'addició emprant NaH com a base, i THF com a dissolvent, però els resultats obtinguts tampoc van ser satisfactoris.

<sup>111</sup> Rosso, G. B.; Pilli, R. A., *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47,185-188.



**Esquema 3.10.** Procediments A i B per a l'obtenció del producte d'addició d'acetonitril **18**.

### 3.3.2. Reducció del grup precursor d'aminometil.

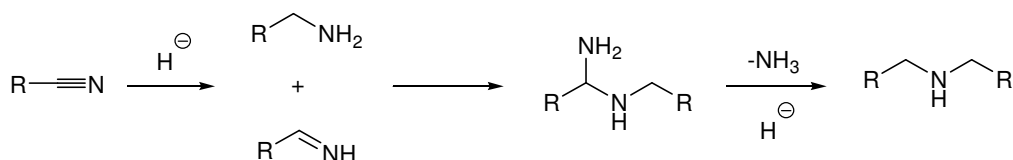
#### *A partir del nitril 28*

Un cop s'havien obtingut els precursors de l'amina calia reduir-los amb mètodes prou suaus que fossin selectius pel grup nitril i no afectessin a la resta de grups funcionals presents a la molècula. Els mètodes més freqüents per reduir nitrils és l'ús d'hidrurs forts, com l' $\text{LiAlH}_4$  o bé la hidrogenació catalítica, però aquests no es podien emprar degut a la poca selectivitat que presentaven. Per això, a partir de **trans-28**, es va procedir a la reducció del grup nitril en posició C-4 i protecció simultània de l'amina resultant amb Boc fent servir un mètode descrit en la literatura,<sup>112</sup> que emprava  $\text{NaBH}_4$  en presència de  $\text{NiCl}_2$  com a catalitzador i  $\text{Boc}_2\text{O}$  al medi de reacció. Així, es va obtenir l'amina protegida **trans-31** amb rendiments d'entre el 15 i el 32%. En aquesta reacció el veritable agent reductor és el borur de níquel format en el medi de reacció. L'excés de níquel s'eliminà amb l'addició de dietilentriamina al final de reacció degut a que aquesta coordina de manera molt potent les espècies de níquel.

Els requisits perquè es doni aquesta transformació són les següents: 1) el nitril de partida ha d'estar al medi de reacció abans de la formació del borur reductor; 2) el borur de níquel s'ha de preparar en el medi de reacció a partir de  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{NaBH}_4$  en metanol; 3) hi ha d'haver un excés de  $\text{NaBH}_4$  i 4) requereix de la presència d'un agent captador que eviti la formació de dímers. El producte de dimerització seria el producte majoritari en condicions normals però l'addició d'un agent captador, com és el cas del  $\text{Boc}_2\text{O}$  permet l'aïllament de les amines primàries protegides. Sembla ser, que l'addició de l'amina primària a les imines intermèdies és més ràpida que l'atac de l'hidrur, i que l'hemiaminal format pot alliberar amoníac per donar lloc a una altra imina que es redueix a l'amina secundària corresponent (Fig. 3.5).

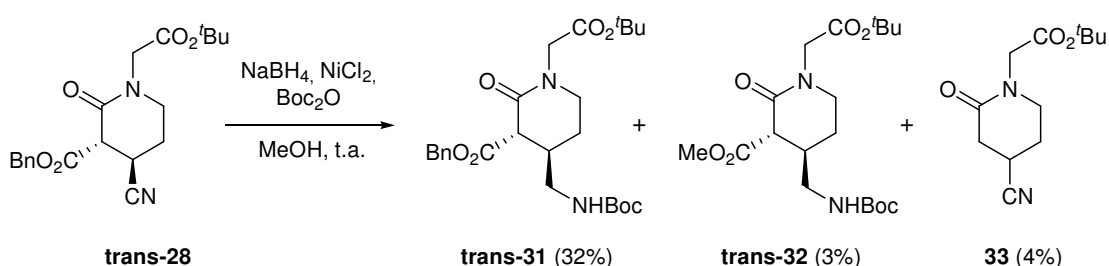
<sup>112</sup> Caddick, S., Judd, D. B., Lewis, A. K. K., Reich, M. T., Williams, M. R. V., *Tetrahedron*, **2003**, 59, 5417-5423.





**Figura 3.5.** Reacció secundària de dimerització en absència d'un captador o *scavenger*.

Un dels problemes amb el que ens vam trobar era l'obtenció del producte descarboxilat **33** (esquema 3.9) a l'afegir 7 equivalents de  $\text{NaBH}_4$ .<sup>112</sup> Això podria ser degut a que el desprendiment d' $\text{H}_2$  que es produïa provoqués la desbenzilació del compost **28** i doné lloc al  $\beta$ -cetoàcid que descarboxilaria.



**Esquema 3.11.** Reducció del nitril a la corresponent amina protegida **31** i subproductes.

Per aquest motiu, vàrem reduir els equivalents de  $\text{NaBH}_4$ , a més d'afegir-los de mica en mica i molt a poc a poc. Així vàrem provar diferents condicions i temperatures d'addició (Taula I).

Ent.	Dissolvent	Ag. Reductor	Eq	Temp.	temps	31:32:33
1	MeOH	$\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$	5 eq	0°C	24 h	<b>31</b> (19%) + <b>28</b>
2	MeOH	$\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$	6 eq	0°C	24 h	<b>31</b> (32%): <b>32</b> (3%): <b>33</b> (4%)
3	MeOH	$\text{NaCNBH}_3$	5 eq	0°C	24 h	<b>28</b>
4	THF	$\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$	6 eq	-40°C	36 h	<b>31</b> (10%) + <b>28</b>
5	THF	$\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$	7 eq	-40°C	24 h	<b>31</b> (16 %): <b>32</b> (23%)

**Taula I.** Condicions per la reducció del grup nitril del compost *trans-28*.

El producte de descarboxilació **33** s'identificà per la desaparició dels senyals aromàtics i per l'aparició d'un nou protó H-3 com a doblet. Aquests dos H-3 es troben apantallats respecte a l'H-3 del producte no descarboxilat **31** ( $\Delta\delta = 0.9\text{-}1\text{ppm}$ ).

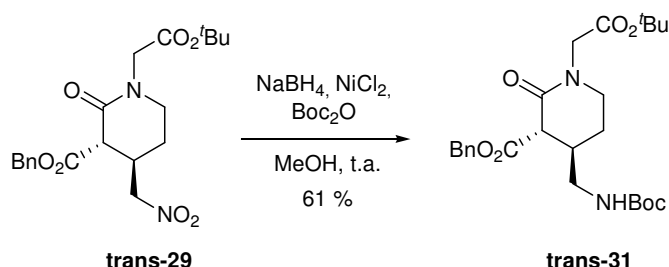
A més, quan fèiem servir metanol com a dissolvent apareixia com a subproducte de la reacció el compost *trans-32* resultat de la transesterificació de l'èster benzílic amb el metanol. Per aquest motiu, vàrem provar altres dissolvents com THF o DME amb els

que obteníem rendiments més baixos. Per tant, tot i la formació de l'èster metílic i de petites quantitats de producte descarboxilat, el metanol va ser el dissolvent que vàrem escollir per dur a terme la reacció.

#### *A partir del nitro derivat 29*

Amb tot això, i vist que els rendiments obtinguts eren baixos, vam optar per modificar la nostra estratègia, i vàrem pensar que podíem obtenir el grup amino per reducció d'un grup nitro. Introduint el nitrometà a la posició C-4, s'aconseguia allunyar el grup atraient de l'anell i per tant podria ser que es reduís el problema de la descarboxilació. Per això, com hem comentat anteriorment, vam realitzar l'addició conjugada de nitrometà, amb la qual s'obtenien bons rendiments i a més únicament es formava un dels dos racèmics, concretament el racèmic **trans-29**.

A partir d'aquest racèmic **trans-29**, vàrem provar de reduir el grup nitro en les mateixes condicions que havíem fet servir per reduir el nitril, però mirant d'ajustar al màxim els equivalents per tal de no desbenzilar l'èster. En aquest cas, només van caldre 3 equivalents de NaBH<sub>4</sub>, en presència de NiCl<sub>2</sub> i Boc<sub>2</sub>O al medi per obtenir de manera acceptable l'amina protegida **trans-31**, amb un 61% de rendiment (esquema 3.12). A més, no s'observà producte descarboxilat.



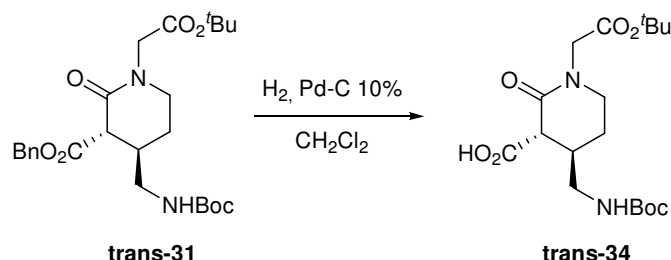
**Esquema 3.12.** Reducció del grup nitro i protecció de l'amina resultant en un procés *one-pot*.

Per tant havíem obtingut un dels intermedis per a la síntesi de l'anàleg de Lys **14** per addició conjugada del nitrometà i posterior reducció del grup nitro i protecció de l'amina resultant amb Boc.

#### **3.3.3. Transposició de Curtius**

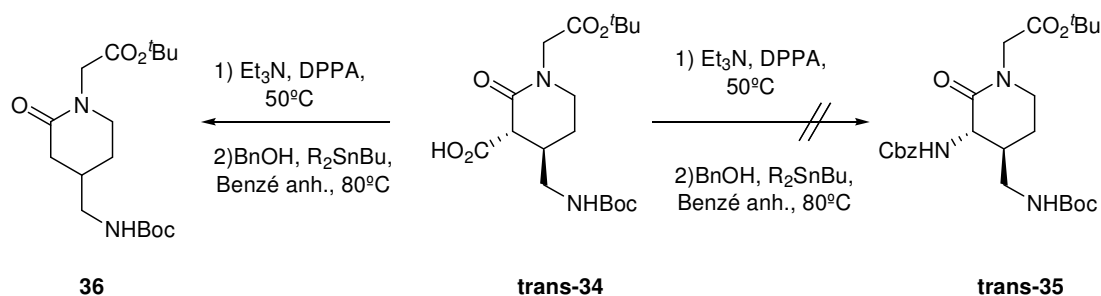
Un cop obtingut l'intermedi **31**, calia transformar el grup benziloxicarbonil de la posició C-3 en un grup amino. Per això, es procedí de forma anàloga a com ho havíem fet en el cas del derivat de Trp **trans-22**, mitjançant la transposició de Curtius modificada.

Primer de tot, calia desbenzilar l'èster de la posició C-3. Com ja hem comentat anteriorment, aquests compostos descarboxilen amb una gran facilitat quan a la posició C-3 hi ha un àcid carboxílic.



**Esquema 3.13.** Hidrogenolisi de l'èster benzílic **31**.

La reacció de desbenzilació en aquest cas resultà més complicada que en el cas dels derivats de Trp. L'espectre de RMN de  $^1\text{H}$  del cru de reacció era més brut que en el cas del compost **trans-22**, però qualsevol intent de purificació per cromatografia en columna va resultar en la degradació del producte **34**. Malgrat això, vàrem continuar la síntesi amb el cru de reacció. En primer lloc vàrem fer la reacció de transposició de Curtius en les mateixes condicions que havíem utilitzat pel derivat de Trp **21**, és a dir, amb difenilfosforilazida i trietilamina, emprant benzè anhidre com a dissolvent i escalfant a  $50\text{ }^\circ\text{C}$  per la formació de l'azida carboxílica intermèdia i posteriorment afegir-hi l'alcohol benzílic i escalfar a  $80\text{ }^\circ\text{C}$ . Amb aquest procediment s'observà únicament el producte de descarboxilació **36**.



**Esquema 3.14.** Transposició de Curtius sobre l'intermedi **34**.

Posteriorment, es van assajar diferents condicions per tal d'obtenir el producte desitjat **35**. Cap de les condicions ens va permetre arribar a l'intermedi **35**, obtenint en tot moment el producte descarboxilat **36** i en alguns casos productes de degradació. En la següent taula es resumeixen les condicions que es van assajar per la transposició de Curtius del compost **trans-34**.

Ent	Reactius	Catalitzador	Dissolvent	Temperatura	Producte
1	1. DPPA, Et <sub>3</sub> N 2. BnOH	Dilaurat de dibutil estany	Benzè	1. 50 ° <sup>a</sup> 2. 80 °C	36
2	1. DPPA, Et <sub>3</sub> N 2. BnOH	Dilaurat de dibutil estany	Toluè	1. 50 ° <sup>a</sup> 2. 80 °C	36
3	1. DPPA, Et <sub>3</sub> N 2. BnOH	CuCl	Benzè	1. 50 °C 2. 80 °C	36
4	1. DPPA, Et <sub>3</sub> N 2. BnOH	-	1. THF 2. ACN	1. t.a 2. 60 °C	36
5	1. ClCO <sub>2</sub> Et, DIEA, NaN <sub>3</sub> 2. BnOH	-	1. Acetona 2. Toluè	1. -10 °C-t.a. 2. 85 °C	Degradació
6	1. Clorur d'oxal·lil 2. TMSN <sub>3</sub>	-	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	t.a.	Degradació

**Taula II.** Condicions assajades per la transposició de Curtius de **trans-34**.

Una de les possibles causes del fracàs d'aquesta reacció pot ser la presència de l'amina protegida amb Boc. Es conegut que el grup Boc és poc estable a altes temperatures, la qual cosa fa pensar que es podria desprotegir l'amina a l'escalfar i aquesta amina ens podria interferir en la reacció.

Degut a la impossibilitat d'assolir el compost **14** amb un temps raonable, es va desestimar la seva síntesi i es varen buscar altres alternatives per a substituir el residu de Lys de l'**MT2**, com l'oxazolopiperidona **15**.

### 3.4. Síntesi de l'oxazolopiperidona 15

#### 3.4.1. Antecedents

Un dels camps amb més interès en el terreny dels peptidomimètics és el de la síntesi de dipèptids restringits amb estructura bicíclica.<sup>113</sup> Una de les estructures cícliques més estudiades és la indolizidin-2-ona i els seus derivats. La gran quantitat de síntesis per a aquests compostos sorgides en els darrers anys demostra l'interès d'aquest tipus

<sup>113</sup> 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.

d'estructures.<sup>114</sup> En la figura 3.7 trobem alguns dels exemples amb estructura d'indolizidin-2-ona.

Aquestes estructures s'han incorporat a diferents pèptids biològicament actius i se n'han estudiat la seva activitat com a inhibidors de caspases,<sup>115</sup> com a anàlegs de gramicidina S,<sup>116</sup> i de la Leu-encefalina, com a agonistes parcials del receptor de la tiroliberina (pèptid de l'hipotalem que controla l'alliberament de l'hormona estimulant de tiroides),<sup>117</sup> com a inhibidors de trombina,<sup>118</sup> i com a agonistes de colecistoquinina i de receptors opioides,<sup>119</sup> entre d'altres.

---

<sup>114</sup> 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.

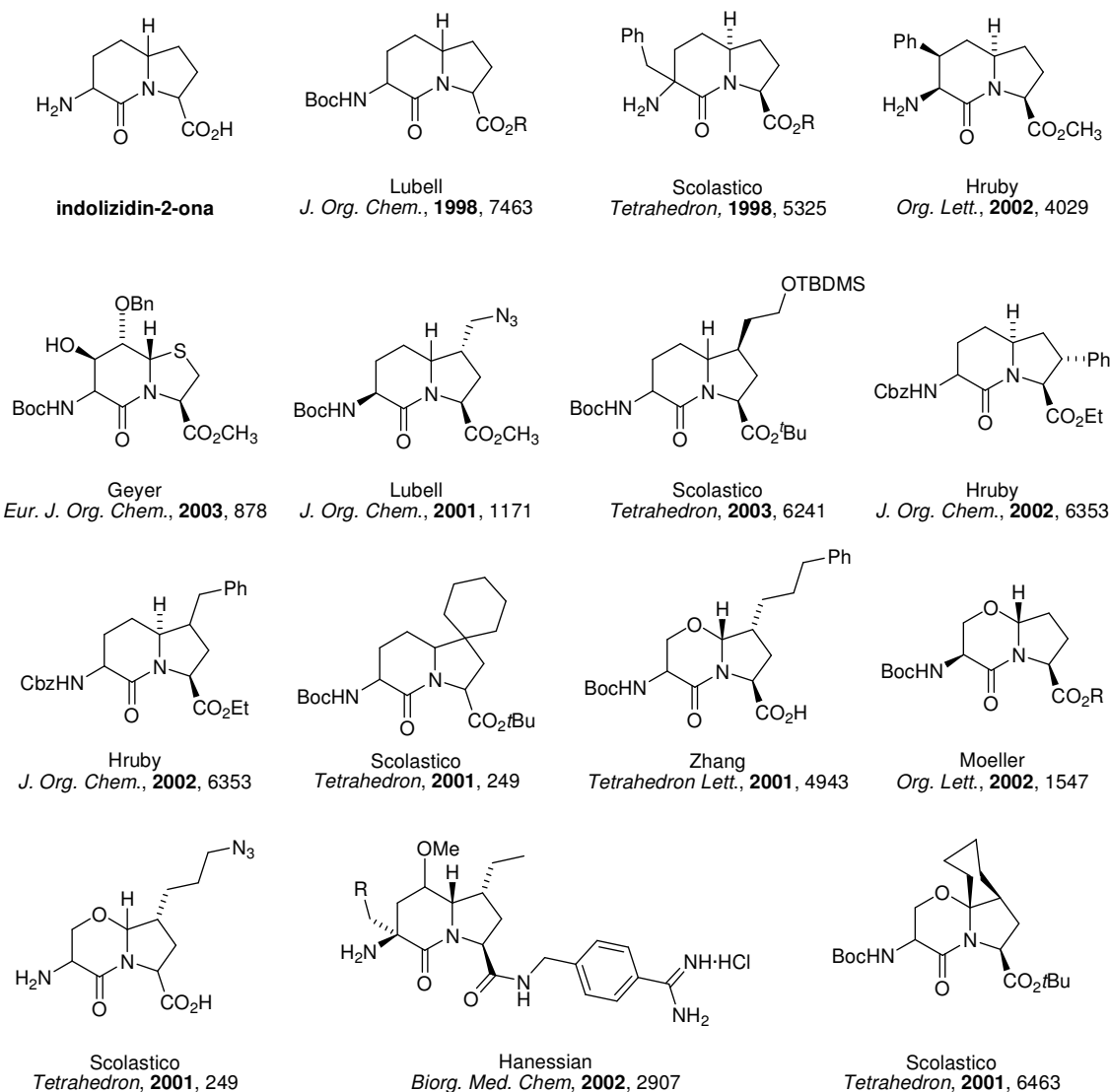
<sup>115</sup> Karanewsky, D. S.; Bai, X.; Linton, S. D.; Krebs, J. F.; Wu, J.; Paran, B.; Tomaselli, K., *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 2757-2762.

<sup>116</sup> Roy, S.; Lombart, H. G.; Lubell, W. D.; Hancock, R. E. W.; Farmer, S. W., *J. Peptide Res.*, **2002**, *60*, 198-214.

<sup>117</sup> 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.

<sup>118</sup> Hanessian, S.; Therrien, E.; Granberg, K.; Nilsson, I., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 243-247.

<sup>119</sup> 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.



**Figura 3.7.** Exemples d'estructures d'indolizidinones i derivats sintetitzats.

Referent als derivats amb heteroàtoms en la seva estructura (S, O) es troben diverses síntesis i aplicacions descrites en la literatura. Els treballs pioners de Nagai<sup>113</sup> sobre la preparació del bicicle anomenat BTD ( $\beta$ -turn dipeptide) actualment disponible comercialment, i la seva posterior aplicació en el desenvolupament d'inhibidors de metal·loproteases, van impulsar el desenvolupament d'anàlegs tiaindolizidínics per a la seva aplicació en el camp dels peptidomimètics. Recentment, els grups de Hruby<sup>120</sup> i Geyer<sup>121</sup> han descrit noves síntesis de 6,5-tiazolidinlactams funcionalitzats, mentre que el grup de Gonzalez-Muñiz<sup>122</sup> ha descrit la incorporació d'inductors de gir  $\beta$  com el

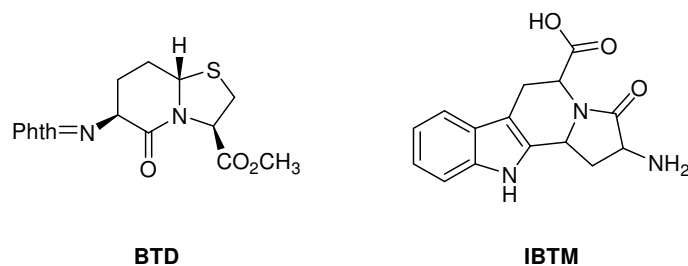
<sup>120</sup> A) Ndungu, J. M.; Gu, X.; Gross, D. E.; Ying, J.; Hruby, V. J., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 3245-3247.

b) Gu, X.; Tang, X.; Cowell, S.; Ying, J.; Hruby, V. J., *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 6669-6672.

<sup>121</sup> Tremmel, P.; Brand, J.; Knapp, V.; Geyer, A., *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 878-884.

<sup>122</sup> Martín-Martínez, M.; de la Figuera, N.; LaTorre, M.; García-López, M. T.; Cenarruzabeitia, E.; Del Río,

BTD i l'IBTM en pèptids conformacionalment restringits derivats dels lligands de la colecistoquinina.



**Figura 3.8.** Estructures de dos mimètics de gir  $\beta$ .

En canvi, el nombre nombre d'articles de compostos oxigenats és molt menor en relació amb els seus homòlegs de sofre. Hi ha publicada la síntesi de 3-aminolactams bicíclics amb un àtom d'oxigen incorporat a l'anell de 6 membres del bicicle, concretament en la posició  $\alpha$  al cap de pont. És el cas dels treballs de Moeller,<sup>123</sup> Schofield,<sup>124</sup> Baldwin<sup>125</sup> i Zhang.<sup>126</sup>

Pel que fa a estructures pseudodipeptídiques derivades d'oxaindolizidinones amb l'àtom d'oxigen en l'anell de 5 membres, la síntesi descrita pel nostre grup és l'única existent fins al moment a la literatura.<sup>50</sup> La capacitat d'aquesta estructura per induir la formació de girs  $\beta$  de tipus II' ens va empenyer a estudiar-ne la seva aplicació per a restringir la part flexible de l'**MT2** intentant sintetitzar un heptapèptid cíclic amb 2 girs  $\beta$  encarats i estudiar la seva influència en la selectivitat d'aquests derivats d'**MT2** en front els receptors de melanocortina.

---

J.; González-Muñiz, R., *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 7667-7674.

<sup>123</sup> A) Sun, H.; Moeller, K. D., *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 1547-1550. 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.

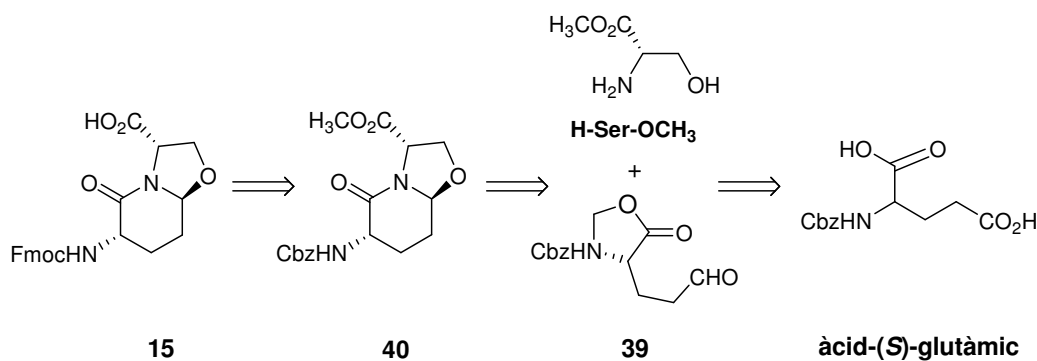
<sup>124</sup> Claridge, T. D.W.; Hulme, C.; Kelly, R. J.; Lee, V.; Nash, I. A.; Schofield, C. J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 935-936.

<sup>125</sup> Baldwin, J. E.; Hulme, C.; Schofield, C. J. Edwards, A. J., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, *30*, 4019-4020.

<sup>126</sup> Zhang, X.; Jiang, W.; Schmitt, A. C., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 4943-4935.

### 3.4.2. Síntesi

Per la síntesi del derivat oxazolopiperidínic **15** es va seguir el protocol descrit en el grup.<sup>50</sup> La síntesi es basa en tres etapes claus: 1) la síntesi de l'aldehid de Fukuyama **39** a partir de l'àcid glutàmic protegit; 2) la formació del bicicle per condensació de l'èster metílic de la serina amb l'aldehid **39**; 3) la modificació dels grups funcionals per obtenir l'oxazolopiperidona **15** convenientment funcionalitzada per la síntesi peptídica.



Esquema 3.15. Retrosíntesi de l'oxazolopiperidona **15**.

#### 3.4.2.1. Formació de l'aldehid de Fukuyama

Per la formació de l'aldehid de Fukuyama **39** es feia reaccionar l'àcid (S)-glutàmic amb paraformaldehyd a reflux durant 2 hores, en presència de l'àcid *p*-toluensulfònic catalític i benzè com a dissolvent.<sup>127</sup> Aquesta reacció es va fer a una escala de 25 g utilitzant un sistema Dean-Stark per tal d'eliminar l'H<sub>2</sub>O del medi i desplaçar l'equilibri cap a la formació de l'àcid carboxílic desitjat **37**.

Un cop obtinguda l'oxazolidinona intermèdia **37**, es va seguir l'aproximació de Fukuyama per la seva transformació a aldehid. Aquesta metodologia es basa en la conversió de l'àcid a tioèster<sup>128</sup> i la seva posterior reducció a aldehid.<sup>129</sup> Per la preparació del tioèster **38** es va seguir el procediment optimitzat anteriorment al grup,<sup>130</sup> en el que s'emprà la DPPA com a agent acoblant en lloc del DCC que donava rendiments moderats i en la que s'obtenia com a subproducte l'èster etílic. L'obtenció del tioèster (en lloc de l'èster) s'observà per la presència en <sup>1</sup>H-RMN dels senyals del

<sup>127</sup> a) En-Ishai, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *79*, 5736-5738. b) Itoh, M., *Chem. Pharm. Bull.*, **1969**, *17*, 1679-1686.

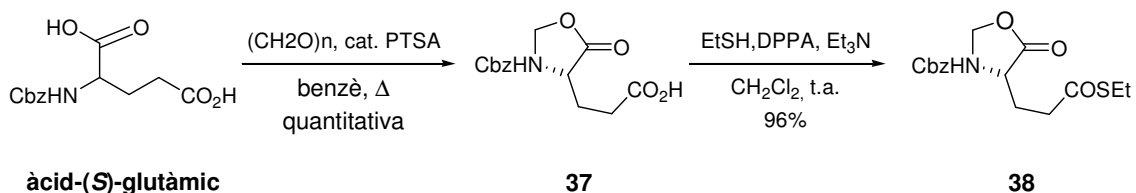
<sup>128</sup> Neises, B.; Steglich, W.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1978**, *17*, 522-524.

<sup>129</sup> Fukuyama, T.; Lin, S.; Li, L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 7050-7051.

<sup>130</sup> Tesi doctoral de Eulalia Pinyol, "Disseny, síntesi i avaluació d'inhibidors de dimerització de la proteasa del VIH-1", **2007**.

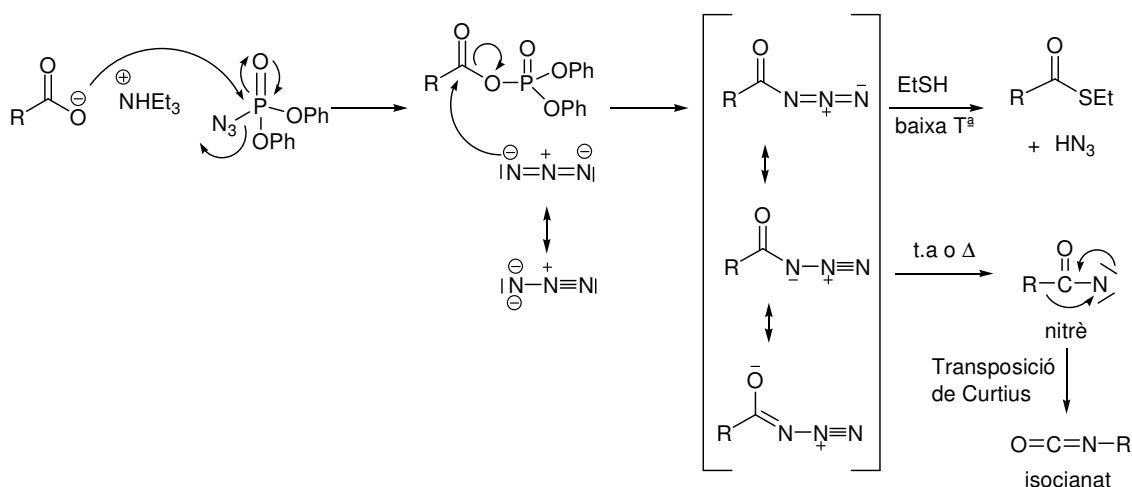


CH<sub>2</sub> de l'etil a un desplaçament  $\delta = 2,86$  ppm en contraposició als èsters en que aquests senyals apareixen a un desplaçament proper a 4 ppm. La identitat del compost **38** es confirmà per espectroscòpia de masses.



**Esquema 3.16.** Síntesi del tioèster intermedi **38**.

Un possible mecanisme de la reacció és el que es descriu en la figura 3.9 en el que es formaria com a intermedi l'acilazida com el que es forma en la transposició de Curtius. Com ja s'ha comentat (veure apartat 3.2.2) aquests intermedis azídics descomponen a temperatures elevades per donar lloc a un nitrè que transposa al corresponent isocianat. Degut a aquesta inestabilitat tèrmica les reaccions s'han de fer a temperatures baixes.

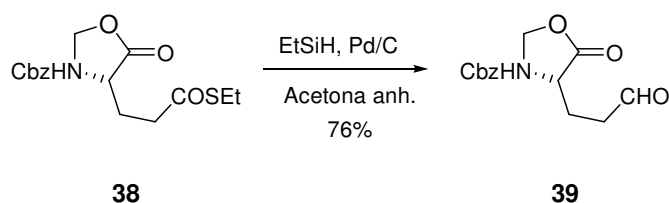


**Figura 3.9.** Mecanisme de la formació del tioèster a partir d'un intermedi acilazida.

Un cop s'havia sintetitzat el tioèster **38**, aquest es va reduir seguint les condicions de Fukuyama, és a dir, emprant Et<sub>3</sub>SiH i Pd/C en condicions neutres.<sup>129</sup> La reducció tingué lloc sense problemes, obtenint-se l'aldehid **39** amb un 73% de rendiment, el qual es va utilitzar sense purificar per la reacció següent.

En aquesta reacció hi ha una addició del Pd(0) sobre l'enllaç C(sp<sup>2</sup>)-S i posteriorment una transferència d'hidrogen del Et<sub>3</sub>SiH a l'acilpal·ladi resultant. Finalment l'eliminació reductiva de l'hidrur d'acilpal·ladi condueix a l'aldehid desitjat. Aquest compost es

detectà per RMN pel senyal a  $\delta = 9,69$  ppm corresponent al protó de l'aldehid en  $^1\text{H}$ -RMN i a  $\delta = 200,1$  ppm corresponent al carbonil d'aquest en  $^{13}\text{C}$ -RMN.

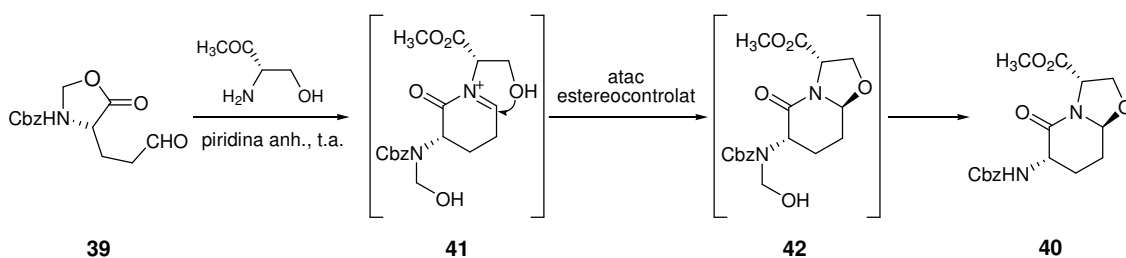


**Esquema 3.17.** Reducció del tioèster **38** per obtenir l'aldehid de Fukuyama **39**.

### 3.4.2.2. Formació del bicicle **40**

Un cop obtingut l'aldehid **39** amb bons rendiments, es condensà amb l'èster de la serina donant el bicicle [4.3.0] desitjat **40**. Aquestes condensacions estan descrites a la literatura pels grups de Johnson<sup>131</sup> i Baldwin<sup>132</sup> i es caracteritzen per temps de reacció llargs i rendiments moderats. Previament, al nostre grup s'havia optimitzat aquesta reacció i s'havia observat que l'ús de piridina anhidra com a dissolvent a temperatura ambient conduïa a la formació de l'oxazolopiperidona **40** com a únic diastereòmer. Si la reacció es feia a temperatures superiors es promovia l'obtenció de mesclades diastereomèriques.<sup>50</sup>

Així, doncs, seguint les condicions descrites, es va obtenir el bicicle **40** com a únic diastereòmer amb un rendiment del 45%, després de dues cromatografies en columna consecutives per a la seva purificació.



**Esquema 3.18.** Obtenció de l'oxazolopiperidona **40**.

L'obtenció del bicicle es comprovà per la presència en l'espectre de RMN de  $^1\text{H}$  dels senyals corresponents als H-2 i H-3 de l'anell com un sistema de tipus ABB' ( $^{AB}J = 7,2$  Hz,  $^{AB'}J = 8,4$  Hz i  $^{BB'}J = 9,2$  Hz) i la presència en el  $^{13}\text{C}$ -RMN del senyal metínic a  $\delta =$

<sup>131</sup> Subasinghe, N. L.; Bontemps, R. J.; McIntee, E.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L., *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 2356-2361.

<sup>132</sup> Baldwin, J. E.; Lee, E., *Tetrahedron*, **1986**, *42*, 6551-6554.

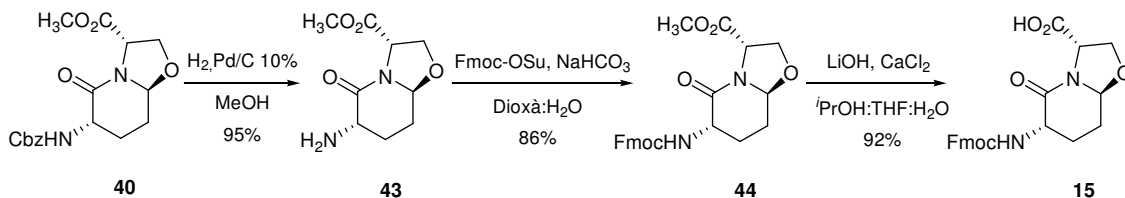
88,3 ppm. L'estereoquímica del compost s'assignà per analogia amb les dades anteriorment descrites al grup.

Probablement la reacció transcorre via l'intermedi sal d'N-acilimini **41** i un posterior atac de l'hidroxil donant lloc a l'intermedi **42** que en medi bàsic en MeOH es transforma en el bicicle desitjat **40**. El fet que s'observi un sol isòmer es podria explicar per la predilecció del grup hidroxil a atacar per la cara menys impedida de l'anell lactàmic.

### 3.4.2.3. Funcionalització del bicicle per a la síntesi peptídica

Tal com ho havíem fet anteriorment pel derivat de Trp, per poder sintetitzar pèptids derivats d'**MT2** amb l'estratègia Fmoc, calen un seguit de modificacions de l'oxazolopiperidona **40**.

Primerament es va canviar el grup Cbz protector de l'amina pel grup Fmoc habitual en la síntesi de pèptids Fmoc/<sup>t</sup>Bu. El grup Cbz de l'amina es va reduir mitjançant una hidrogenació catalítica amb Pd/C 10%. La pèrdua del grup Cbz es confirmà per la manca de senyals aromàtics en l'espectre de <sup>1</sup>H-RMN.



**Esquema 3.19.** Funcionalització del bicicle adaptant-lo per la síntesi en fase sòlida.

Posteriorment es protegí el grup amino amb el grup Fmoc mitjançant el procediment estandard<sup>108</sup> utilitzat anteriorment pel derivat de Trp, emprant el derivat succinimídic (Fmoc-OSu) a pH = 8. La introducció d'aquest grup es constatà per la presència en l'espectre de <sup>1</sup>H de RMN dels senyals de CH<sub>2</sub>-O i de CH de l'anell del grup fluorenil.

Finalment vàrem alliberar la funció àcida. La hidròlisi de l'èster metílic en medi àcid, emprada anteriorment en el grup, no ens va donar bons resultats. Per aquest motiu vàrem aplicar un procediment per la saponificació d'èsters metílics que tenen una amina protegida amb Fmoc.<sup>133</sup> Per això, es sotmeté el compost **44** a reacció amb LiOH

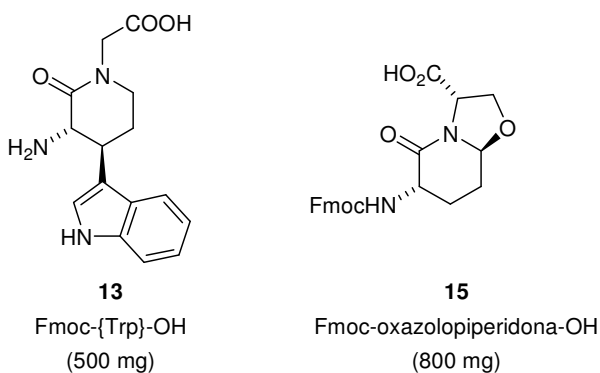
<sup>133</sup> a) Himes, R. A. Young Park, G., Barry, A. N., Blackburn, N. J., Karlin, K. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 5352-5353. b) Kelleman, A.; Mattern, R.-H.; Pierschbacher, M. D.; Goodman, M., *Biopolymers*, **2003**,

en presència de  $\text{CaCl}_2$ . La presència del  $\text{CaCl}_2$  evita la desprotecció que patiria l'amina en les condicions bàsiques de la reacció. D'aquesta manera es va obtenir el compost **15** amb un rendiment del 92%. La obtenció d'aquest compost es posà de manifest per la desaparició dels senyals del metil, tant en l'espectre de RMN de  $^1\text{H}$  com de  $^{13}\text{C}$ . Mitjançant espectrometria de masses es va confirmar que el producte obtingut era el bicicle desitjat **15**, que està preparat per a la síntesi peptídica en fase sòlida.

### 3.5. Recapitulació

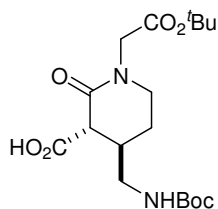
En aquest tercer capítol es descriu l'estudi sobre la síntesi dels sintons lactàmics **13**, **14** i **15**.

- Així, s'han assolit els objectius per **13** i **15** dels quals es disposa de quantitats de l'ordre de 500 mg i 800 mg per dur a terme la síntesi peptídica posterior.



**Figura 3.20.** Sintons lactàmics obtinguts **13** i **15**.

- Malauradament, el compost **14** no es va poder obtenir donat que el seu precursor *trans*-**34** donava lloc al producte de descarboxilació i productes de degradació.



**trans-34**

**Figura 3.21.** Intermedi lactàmic obtinguts **34**.