



# 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**

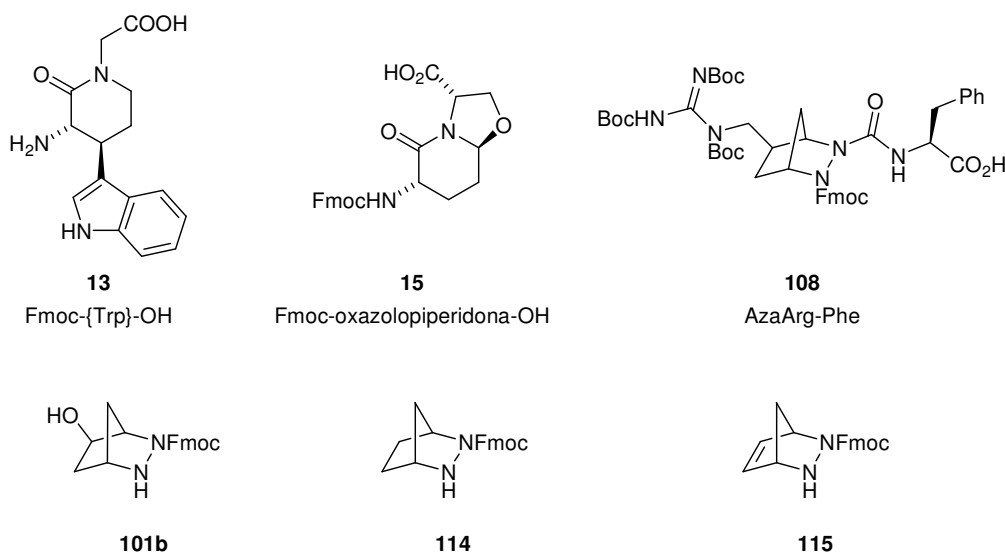
## **SÍNTESI DELS PSEUDOMELANOTANS**

---



## CAPÍTOL 5 SÍNTESI DELS PSEUDOMELANOTANS

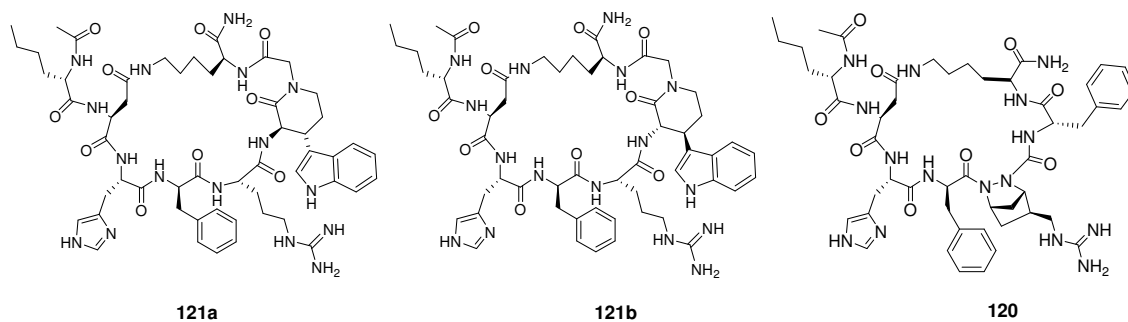
El darrer objectiu de la present tesi doctoral consisteix en la síntesi dels pèptids derivats de l'**MT2**, que incorporin els lactams **13** i **15** o els diazanorbornans **101b**, **108**, **114** i **115**, que mimetitzen dipèptids amb conformació restringida i que hem descrit en els capítols anteriors.



**Figura 5.1.** Sintons utilitzats en la síntesi dels  $\psi$ -melanotans.

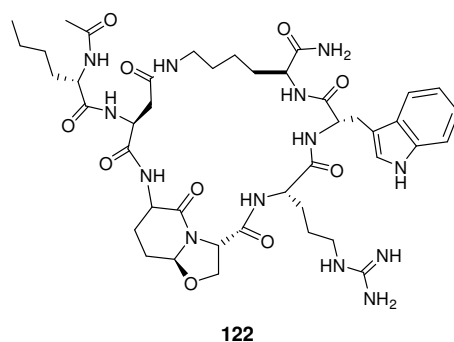
Per abordar la síntesi peptídica, en primer lloc posaríem a punt la metodologia emprant química Fmoc/<sup>t</sup>Bu que permet treballar en condicions més suaus que en el cas d'emprar la metodologia Boc/Bn. Per això, duríem a terme en primer lloc la síntesi del pèptid **MT2**, que ens serviria de referència tant per a la síntesi dels derivats  $\psi$ -melanotans com pels assaigs biològics posteriors. Un cop tinguéssim una estratègia vàlida per a la síntesi d'aquest tipus de pèptids procediríem a la síntesi dels derivats  $\psi$ -MT2 que es descriuran a continuació com als més representatius de l'efecte de la constricció conformacional de l'anell d'**MT2**.

- a) Donat que l'Arg forma part del gir  $\beta$  de la conformació activa de l'**MT2** i que el Trp es troba dintre de la regió activa però queda just al costat d'aquest gir, en primer lloc se substituirien els residus d'Arg i de Trp del pèptid de referència **MT2**, per el compost **108** i el compost **13** respectivament per tal de sintetitzar els  $\psi$ -MT2 **120** i **121**. Amb la introducció del lactam rígid {Trp} s'amplia la zona rígida de la molècula **121** (veure capítol 2).



**Figura 5.2.** Pseudopèptids amb modificacions de la zona activa d'**MT2**.

- b) Es troba descrit a la literatura que el residu  $i+2$  del gir  $\beta$  no té rellevància per l'activitat biològica, doncs quan el residu d'His es reemplaçava per qualsevol altre aminoàcid, els pèptids resultants continuaven tenint activitat. Amb aquesta idea la oxazolopiperidona **15**, que és un mimètic de gir  $\beta$ , es posaria ocupant el lloc del dipèptid His-D-Phe, residus centrals del gir  $\beta$  que forma l'estructura nativa d' **MT2**, obtenint-se el  $\psi$ -melanotan **122**.

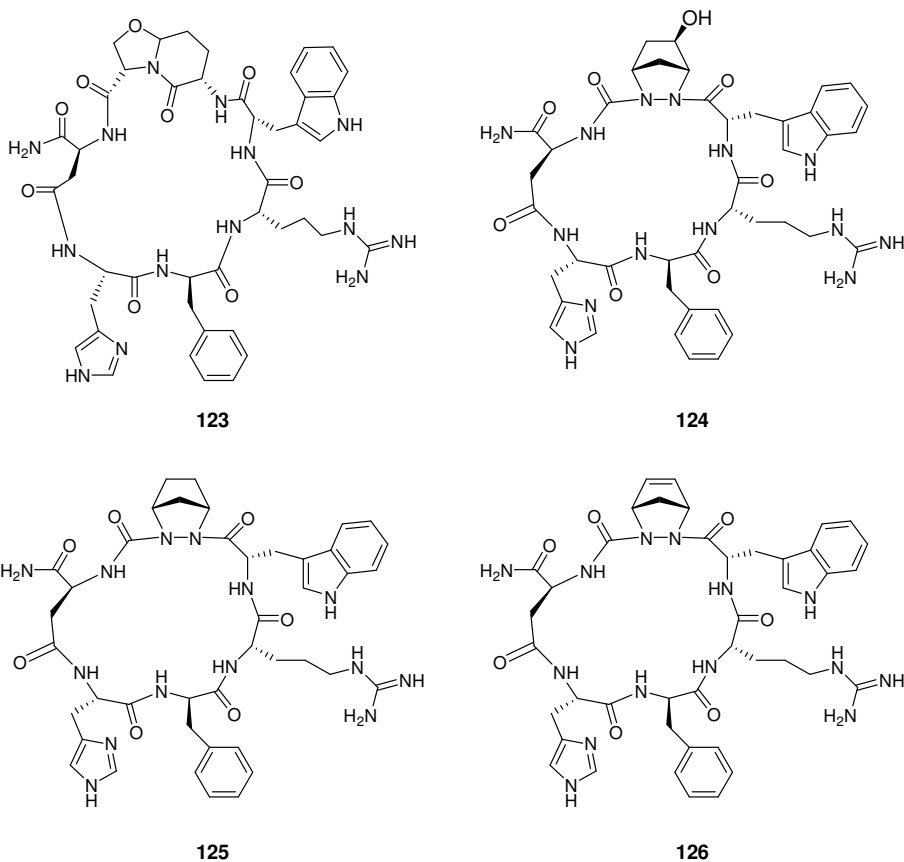


**Figura 5.3.** Substitució de la part central del gir  $\beta$  amb la oxazolopiperidona mimètica **15**.

- c) Finalment, una de les nostres intencions era preparar derivats en els que la zona flexible d'**MT2** quedés restringida per tal d'intentar augmentar la selectivitat dels derivats per un o altre receptor. Cal comentar, que el que ens interessava era estudiar la selectivitat sense especificar si l'efecte era activant o inhibidor.

Per tant, es varen dissenyar els compostos **123**, **124**, **125** i **126** en els que la Lys es substituïa bé per l'oxazolopiperidona **15**, pels diazanorbornans **101b** i **114** o pel diazanorbornè **115**. Cal remarcar que, en el cas dels compostos **124**, **125** i **126** en els que se substituïa la Lys pels compostos **101b**, **114** i **115**, aquests tenen un mida d'anell reduïda en comparació amb l'**MT2**. Mentre que

en **MT2** l'anell està format per 23 membres, en el cas d'aquests  $\psi$ -MT2 l'anell només consta de 18 baules i això pot fer que aquests  $\psi$ -pèptids siguin encara més rígids.



**Figura 5.4.** Pseudopèptids amb modificacions a la part flexible d'**MT2**.

Els pseudomelanotans es poden considerar compostos peptídics tot i que incorporin els diazabornans o les estructures lactàmiques obtingudes amb anterioritat. La síntesi de compostos peptídics es pot dur a terme en dissolució o en fase sòlida. Malgrat tot, l'ús de la fase sòlida en síntesi peptídica ha demostrat molt bons resultats i presenta diversos avantatges respecte els mètodes en dissolució com poden ser l'ús d'un excés de reactius que permet la compleció de la reacció; la possibilitat d'eliminar aquest excés o productes secundaris per simple rentat de la resina; l'estalvi de purificació al final de cada etapa; la possibilitat d'automatitzar el procés i fins i tot la capacitat d'obtenir el producte desitjat en reaccions amb poca quimiosselectivitat mitjançant l'ancoratge a la resina d'un component apropiat.

### 5.1. Introducció a la síntesi en fase sòlida

L'any 1963, el concepte de síntesi peptídica sobre suport sòlid desenvolupat per Robert B. Merrifield<sup>187</sup> va significar un gran avenç per a la química de pèptids. Avui en dia, aquella idea revolucionària en el camp de la química orgànica, que li va fer guanyar el premi Nobel l'any 1984, s'ha estès a altres camps de la síntesi orgànica.

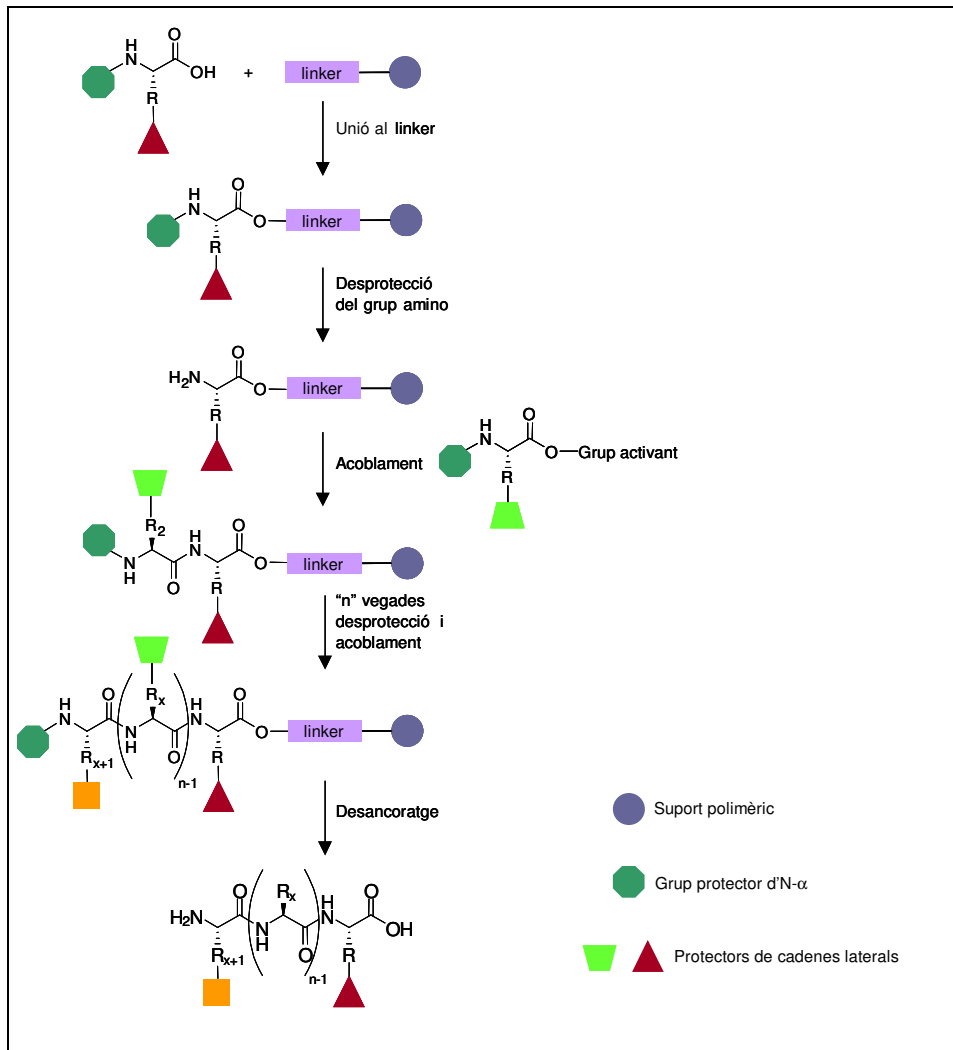
La síntesi en fase sòlida es basa en l'addició seqüencial a un suport polimèric d'aminoàcids que presenten el  $N\alpha$  i la cadena lateral protegits (figura 5.5). D'aquesta manera els dos únics grups lliures són els que estaran involucrats en la formació de l'enllaç peptídic. A més cal triar els grups protectors de manera que aquests puguin ser eliminats sense ruptura dels enllaços peptídics formats. El pèptid resultant, un cop afegits tots els aminoàcids de la seqüència peptídica, queda ancorat a la resina, mitjançant un "linker", a través del seu extrem C-terminal. L'escissió del pèptid de la resina pot donar lloc a un pèptid àcid o amida, depenent de la naturalesa d'aquest "linker". Els protectors de les cadenes laterals sovint es trien per ser desprotegits de manera simultània amb l'escissió del pèptid de la resina tot i que en alguns casos, com en el cas dels pèptids cíclics, pot ser beneficiós desancorar el pèptid mantenint les cadenes laterals dels aminoàcids protegides. Per aquests casos, existeixen diferents resines al mercat que ho possibiliten. Finalment el suport polimèric se separa del producte dissolt per medi d'una filtració.

Respecte als grups que es fan servir per protegir el  $N\alpha$  aquests són el Boc, que és làbil a àcids, i l'Fmoc, làbil a bases. Un cop desprotegit el grup amino s'afegirà el següent aminoàcid protegit. La formació de l'enllaç peptídic en condicions suaus només es pot donar després de l'activació del grup carboxílic d'un aminoàcid. El segon aminoàcid atacarà el grup carboxil activat (atac nucleòfil) formant, així, el dipèptid corresponent. Si el grup amino del primer no estigués protegit, la formació de l'enllaç peptídic tindria lloc de manera desordenada.

---

<sup>187</sup> Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149-2154.





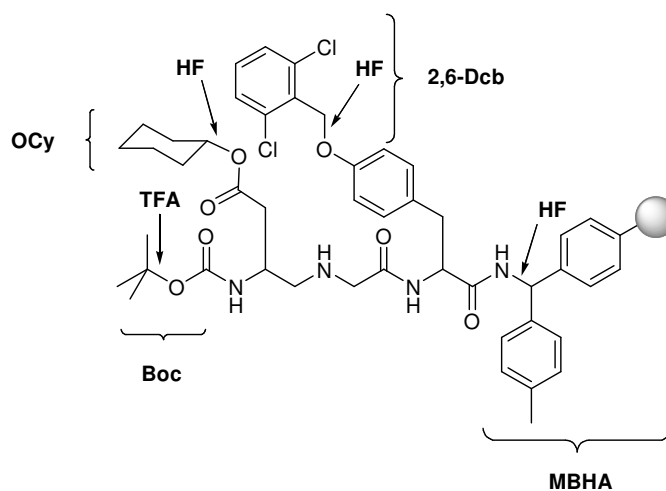
**Figura 5.5.** Esquema general de síntesi en fase sòlida.

Però la síntesi peptídica es complica pel fet que un gran nombre d'aminoàcids presenten grups funcionals a la seva cadena lateral que requereixen ser protegits selectivament. Cal diferenciar els grups protectors entre aquells que són intermedis i els que són semipermanents. Els primers serveixen per protegir grups amino o carboxil que participaran en la formació d'altres enllaços. Aquests han de ser desprotegits selectivament en unes condicions que no afectin l'estabilitat de l'enllaç peptídic o dels altres grups protectors de cadenes laterals, els semipermanents. Els grups semipermanents són aquells que normalment són eliminats al final de la síntesi o, ocasionalment també en una etapa intermèdia. Per tant, és molt important la ortogonalitat de la protecció, és a dir el poder desprotegir un grup sense afectar a cap altre.

### 5.1.1. Estratègies en la SPPS

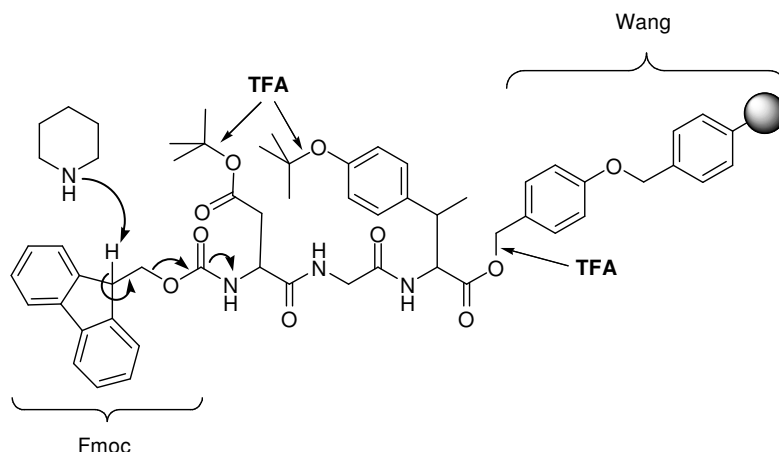
En la síntesi en fase sòlida, dues estratègies de protecció ortogonal han estat ampliament utilitzades.

Boc/Bzl (Figura 5.6): en aquesta el  $N\alpha$  està protegit amb grups de tipus *t*-butil com per exemple el Boc, i les cadenes laterals es protegeixen amb grups benzil. D'aquesta manera es pot desprotegir un o un altre grup de manera selectiva ja que el Boc es desprotegeix amb TFA i el grup benzil mitjançant hidrogenació catalítica. L'escissió de la resina es fa amb un àcid fort com el TFMSA o l'HF que és tòxic i perillós i que requereix unes instal·lacions adients pel seu ús d'un alt cost i per tant no a l'abast de tothom.



**Figura 5.6.** Estratègia Boc/Benzil en síntesi peptídica en fase sòlida.

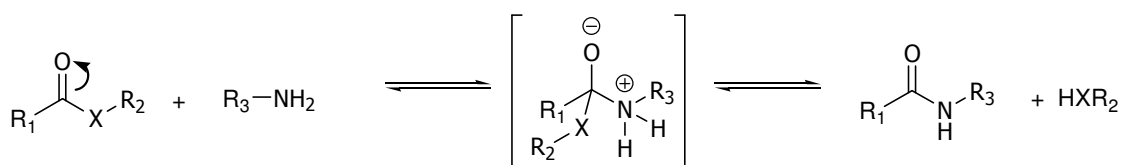
Fmoc/*t*Bu (Fig. 5.7): en aquest cas s'utilitza l'Fmoc com a protector del  $N\alpha$  i protectors de tipus *t*-butil per a les cadenes laterals. El desenvolupament d'aquesta estratègia deriva de l'observació que l'acidòlisi repetida del TFA en les desproteccions del grup Boc podria portar a l'alteració d'enllaços peptídics així com també afavorir reaccions catalitzades per àcids. Usant aquesta estratègia es requereix tractament bàsic suau amb piperidina per a la desprotecció de l'Fmoc mentre que el TFA només es requereix per l'escissió final del pèptid i desprotecció de les cadenes laterals d'aquest. Actualment aquesta estratègia és la més emprada dins del camp de la síntesi peptídica en fase sòlida i és la que nosaltres ens proposem emprar.



**Figura 5.7.** Estratègia Fmoc/t-Bu en la síntesi peptídica.

### 5.1.2. Agents d'acoblament

La formació de l'enllaç peptídic és una substitució nucleòfila de un grup amino (nucleòfil) a un grup carboxil. Malgrat tot, els àcids carboxílics reaccionen amb amines per donar lloc a sals d'amoni enlloc de carboxamides. Per això, com ja hem comentat, el grup carboxílic de l'aminoàcid que afegim a la cadena peptídica en creixement s'ha d'activar i augmentar així el seu caràcter electròfil. Aquesta activació ha de tenir lloc amb uns rendiments alts i sense racemització ni formació de subproductes i s'aconsegueix introduint grups atraients d'electrons.



**Esquema 5.1.** Mecanisme d'acoblament per atac nucleòfil de l'amina sobre el carboxil activat.

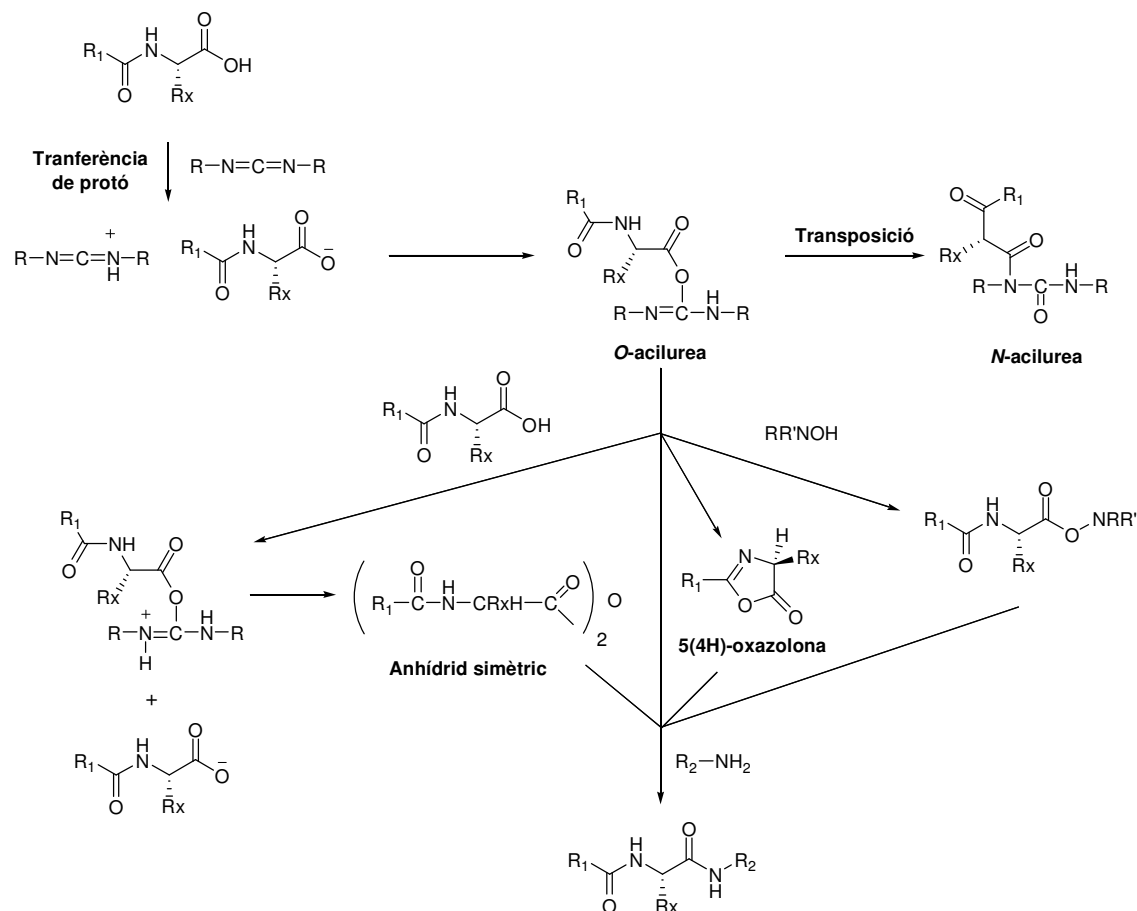
A continuació es troben detallats els principals mecanismes de formació de l'enllaç amida que tenen lloc amb els dos tipus d'agents d'acoblament emprats en el present treball: les carbodiimides i les sals de fosfoni.

### Carbodiimides

Un dels agents d'acoblament més usats són les carbodiimides, perquè són relativament econòmiques i solubles en els dissolvents utilitzats en la síntesi peptídica. El mecanisme d'activació mitjançant carbodiimides és complex, fortament dependent del dissolvent i encara no està totalment clarificat.

En aquest cas el que es forma és una O-acilisourea intermèdia molt més reactiva que

el grup àcid i que pot reaccionar amb el grup amino de la cadena peptídica en creixement.



**Esquema 5.2.** Mecanisme de formació de l'enllaç peptídic a través de carboxidiimides

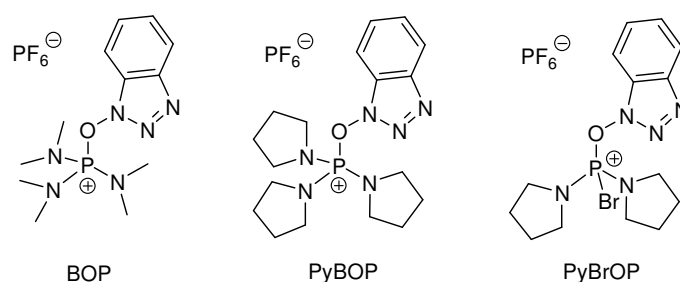
Un problema que presenten aquests agents d'acoblament és la racemització quan són aplicades en aminoàcids N-acilats i pèptids. Alternativament, la O-acilurea pot patir una transposició per donar la N-acilurea, la qual no és reactiva, o bé atacar a un altre àcid carboxílic per donar l'anhidrid simètric, el qual és també un agent acilant excel·lent. Si l'àcid carboxílic és una N-carboxiamida (acetil, benzoïl o una cadena peptídica), o un carbamat d' $\alpha$ -aminoàcid (Boc, Fmoc), la O-acilurea pot patir una ciclació intermolecular per donar una 5(4H)-oxazolona. Aquesta oxazolona també és un agent acilant però no tant potent com la O-acilurea ni l'anhidrid simètric, i a més a més, la tautomerització cap a la forma enòlica provoca racemització. La O-acilurea es pot atrapar per mitjà d'un nucleòfil present al medi, normalment un derivat d'hidroxiimina, per donar el corresponent èster actiu, que normalment és una espècie menys reactiva però més estable. És per això, que normalment s'afegeix com a additiu l'HOBt o HOAt per tal d'evitar la racemització. A més aquests additius tenen altres avantatges com que augmenten la concentració de l'espècie activa i que inhibeixen la

deshidratació de les carboxamides de les cadenes laterals de l'Asn i la Gln per formar els corresponents nitrils.

### Sals de fosfoni

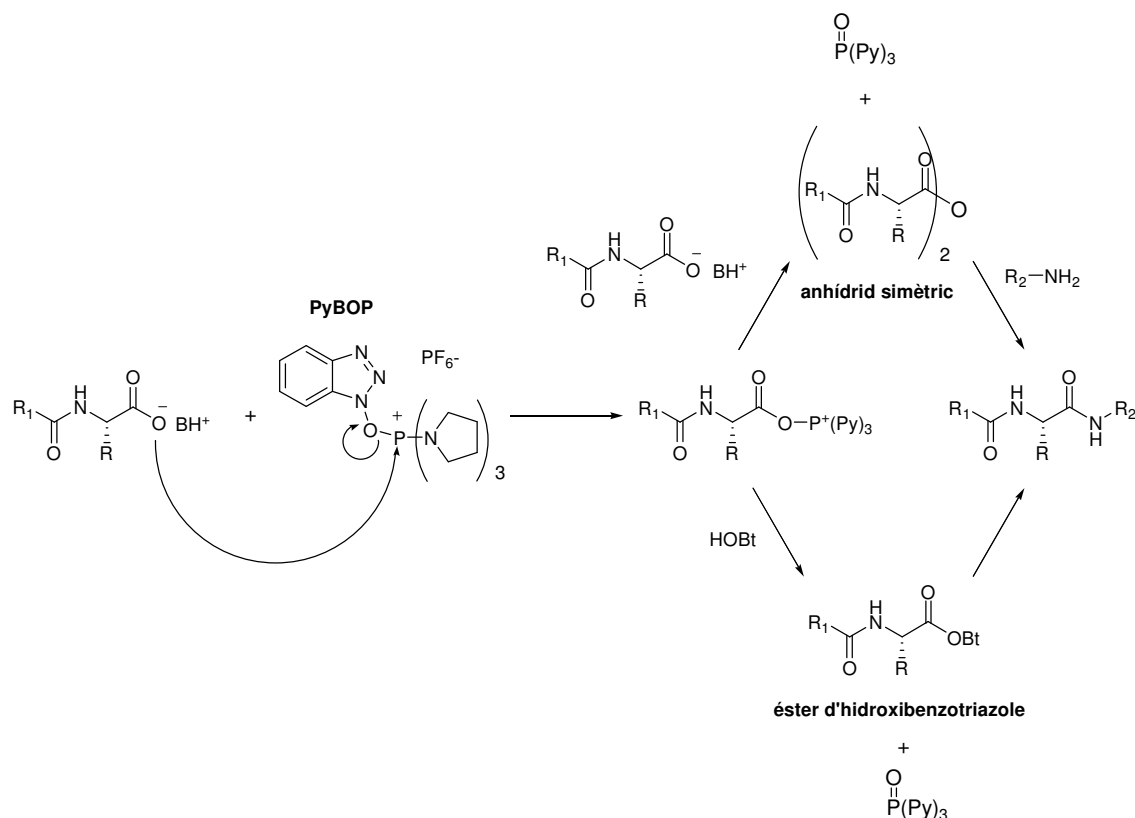
Un altre tipus d'agents d'acoblament que es fan servir habitualment són les sals de fosfoni, que permeten la formació *in situ* dels èsters activats. Castro et al. van desenvolupar, l'any 1975 el BOP (Benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)fosfoni hexafluorofosfat), un reactiu de fosfoni molt eficient per a la síntesi peptídica en fase sòlida, però amb l'important desavantatge de l'elevada toxicitat de l'HMPA format durant la reacció. Aquest reactiu va ser substituït pel seu derivat PyBOP, on els grups amino han estat substituïts per pirrolidines, la qual cosa presenta una alternativa viable ja que els subproductes de la reacció no presenten toxicitat.

Aquests agents d'acoblament són més cars que les carbodiimides però en el cas d'aminoàcids impedits, com pot ser el cas dels nostres lactams, actuen de manera molt eficient. En la figura 5.8 es mostren alguns exemples de sals de fosfoni com a agents d'acoblament.



**Figura 5.8.** Exemples de sals de fosfoni com a agents acoblants.

És necessària l'addició d'una base, normalment una amina terciària (DIEA) per formar l'anió carboxilat de l'aminoàcid que s'està acoblant, el qual duu a terme un atac nucleofílic a la sal d'acilfosfoni, espècie altament reactiva. En absència del nucleòfil, l'espècie reactiva és la sal d'aciloxifosfoni que reacciona immediatament amb els ions carboxilats presents en el medi per donar l'anhidrid simètric. En canvi, en presència d'un nucleòfil (com l'HOBt), l'espècie activa és l'èster d'hidroxibenzotriazole.



**Esquema 5.3.** Mecanisme de reacció amb l'agent d'acoblament PyBOP.

### 5.1.3. Escissió de la resina

Pel que fa a l'escissió final del pèptid de la resina, en el cas d'haver dut a terme una estratègia Fmoc/<sup>t</sup>Bu, aquesta s'assoleix per tractament del pèptid ancorat a la resina amb TFA. Durant aquest procés es poden formar espècies catióniques altament reactives dels grups protectors i aquestes poden reaccionar amb els residus que continguin grups funcionals nucleofílics, com el Trp, Met, Cys i Tyr. Per evitar això és necessària l'addició d'elements nucleòfils anomenats "scavengers" o captadors. Les condicions òptimes per l'escissió i desprotecció del pèptid depenen molt de la seqüència aminoacídica, el nombre d'aminoàcids, els grups protectors de les cadenes laterals i el tipus de linker unit a la resina.

L'escissió dels grups protectors és l'últim pas en el cicle de la síntesi peptídica. Com hem dit, normalment els grups protectors s'escindeixen alhora que el pèptid es desancora de la resina. En altres ocasions interessa tenir el pèptid protegit, per exemple, per poder ciclar-lo en dissolució. Un cop ciclat és quan es procedirà a la desprotecció de les cadenes laterals del pèptid cíclic.

## 5.2. Precedents en la síntesi de l'MT2

La síntesi de l'MT2 es va descriure l'any 1989 seguint una estratègia Boc/Bn.<sup>188</sup> Amb aquesta estratègia es va obtenir el pèptid precursor lineal que van ciclar per les cadenes laterals dels residus 5 i 10 en fase sòlida i també en dissolució (Fig. 5.9). en el cas de la ciclació en fase sòlida, la funcionalització de la resina era de 0,30-0,35 mmol/g de resina, la qual va ser la que els va donar millors resultats pel que fa a rendiment i puresa del producte final. La ciclació en fase sòlida resultava tenir dos grans avantatges sobre la ciclació en dissolució: un "work-up" fàcil i rendiments més alts.

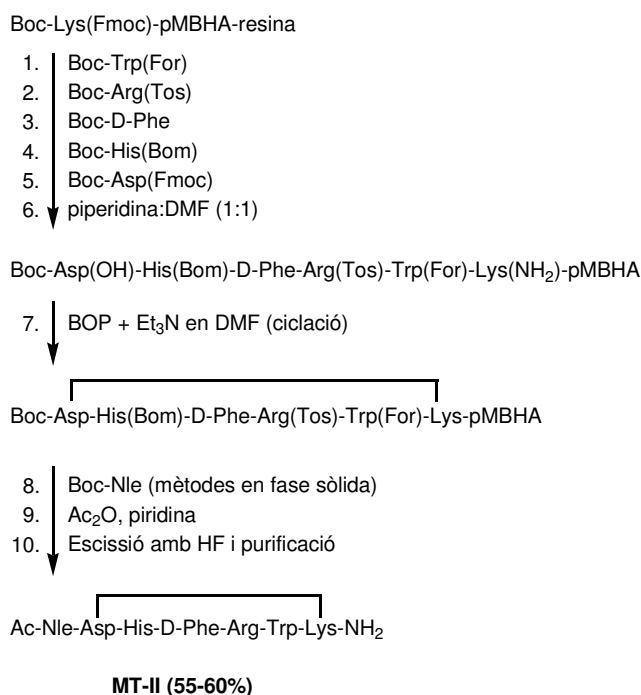
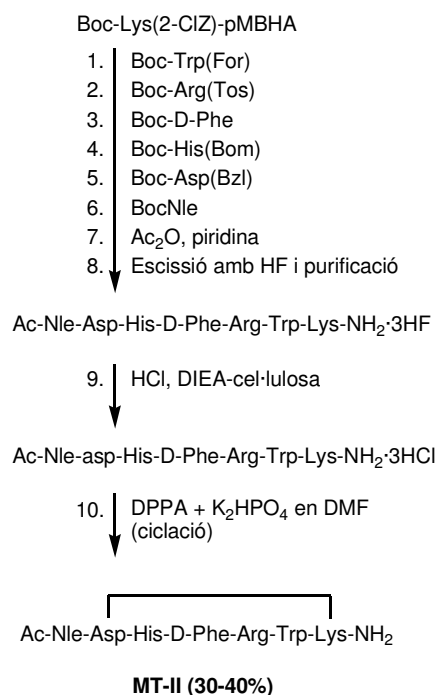
El problema que suposa aquesta síntesi és l'ús d'HF com a agent d'escissió. Com ja s'ha comentat, aquest és perillós i requereix equips específics. A més els equips de que disposem només permeten l'escissió de dos pèptids alhora, la qual cosa fa que el procés s'allargui en els casos d'una síntesi en paral·lel, en la que se sintetitzin un gran nombre de pèptids. Un altre inconvenient és l'ús de TFA en cadascun dels acoblaments per desprotegir el grup amino de l'aminoàcid acoblat, ja que aquest reactiu és perillós i car. Per tots aquests motius seria molt més pràctica una síntesi usant l'estratègia Fmoc/Bu. Aquesta fou descrita per Grieco *et al.* l'any 2001, fent servir la resina Rink amida.<sup>189</sup>

---

<sup>188</sup> a) Al-Obeidi, F., Castrucci, A. M. L., Hadley, M. E., Hruby, V. J., *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 2555-2561.

b) Al-Obeidi, F.; Hadley, M. E.; Pettitt, B. M.; Hruby, V. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, *111*, 3413-3416.

<sup>189</sup> a) Grieco, P., Balse-Srinivasan, P., Han, G., Weinberg, D., MacNeil, T., Van der Ploeg, L. H. T., Hruby, V. J., *J. Pept. Res.*, **2003**, *62*, 199-206. b) Grieco, P.; Gitsu, P. M.; Hruby, V. J., *J. Pept. Res.*, **2001**, *57*, 250-256.

**Mètode A: Cicllació en fase sòlida****Mètode B: Cicllació en dissolució**

**Figura 5.9.** Esquema de síntesi de l'**MT2** emprant l'estratègia Boc amb cicllació en resina i en dissolució.<sup>188</sup>

La síntesi de l'**MT2** descrita per Grieco *et al.* aprofita la desprotecció selectiva dels grups protectors Allyl i Alloc que protegeixen les cadenes laterals del residu d'Asp<sup>5</sup> i de Lys<sup>10</sup>. Usant aquests grups com a protectors de les cadenes laterals que participen en la cicllació del pèptid, aconseguim tenir un sistema ortogonal tridimensional (Fmoc/<sup>t</sup>Bu/Al·lil).

Aquests grups Al·lil/Alloc són eliminats generalment per tractament del pèptid protegit unit a la resina amb pal·ladi(0) tetrakis(trifenilfosfina) [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] en presència d'un nucleòfil al medi que actuï capturant els grups allyl alliberats durant la desprotecció.

La síntesi d'**MT2** consistia en tenir el pèptid protegit ancorat a una resina Rink amida. A partir d'aquest van fer la desprotecció de les cadenes lateral dels dos grups que intervien en la formació del cicle lactàmic, l'Al·lil protector del grup àcid de l'Asp<sup>5</sup> i l'Alloc protector de l'amina de la cadena lateral de Lys<sup>10</sup>. La desprotecció de l'Al·lil i l'Alloc en condicions neutres amb quantitats catalítiques de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> permetia una desprotecció ortogonal per a aquestes cadenes laterals. A continuació cicllaven el pèptid per aquestes cadenes laterals desprotegides. Per acabar escindien el pèptid de la resina i desprotegien la resta de cadenes laterals amb TFA, purificaven i caracteritzaven el pèptid cíclic (esquema 5.4).



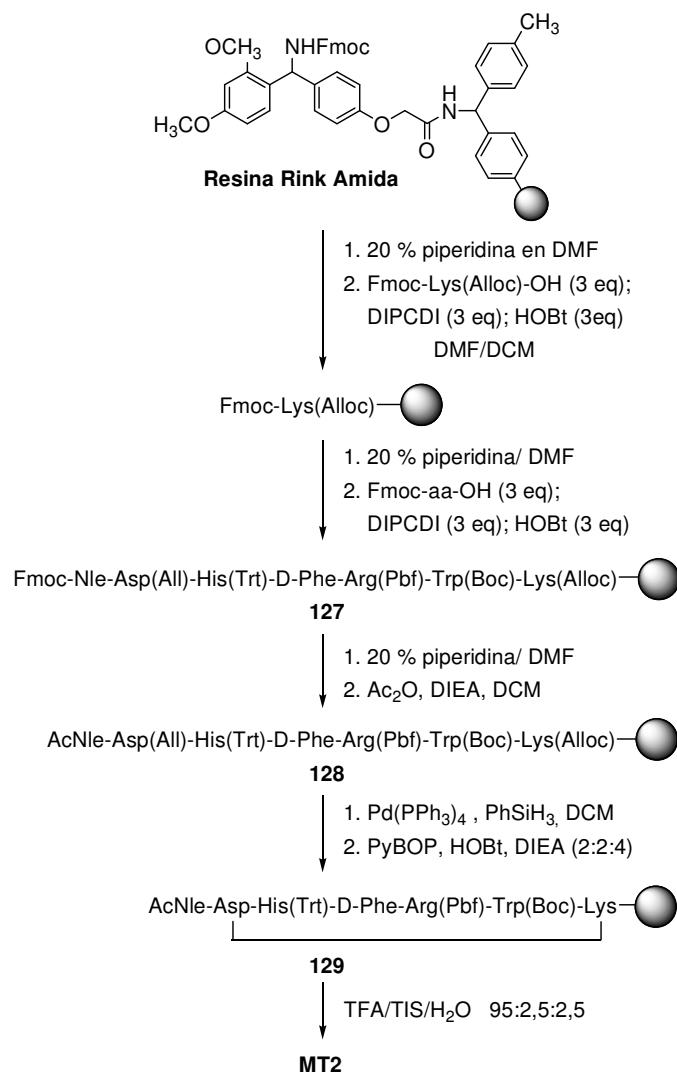


A més en el cas de la ciclació en resina també vàrem provar de reduir la funcionalització de la resina per tal de minimitzar els possibles creuaments entre les diferents cadenes peptídiques que es poden produir al desprotegir les cadenes laterals d'Asp<sup>5</sup> i Lys<sup>10</sup> en cas que la funcionalització de la resina sigui elevada. Per tant es va sintetitzar el pèptid **MT2** per triplicat: 1) ciclació en fase sòlida usant Rink amida amb funcionalització de 0,56 mmol/g de resina; 2) ciclació en fase sòlida reduint la funcionalització a la resina Rink amida fins a 0,2 mmol/g de resina; i 3) ciclació en dissolució emprant una resina sensible a àcid com és la Sieber amida de funcionalització 0,56 mmol/g de resina.

### 5.3.1. Ciclació en fase sòlida

Per fer la ciclació en fase sòlida vàrem seguir l'esquema de Grieco *et al.*, en que fèiem servir la resina Rink amida MBHA i els residus d'Asp<sup>5</sup> i Lys<sup>10</sup> tenien la cadena lateral protegida amb Al·lil i Alloc respectivament de manera que aquests grups protectors eren ortogonals a l'Fmoc i al <sup>t</sup>Bu (fig. 5.10).

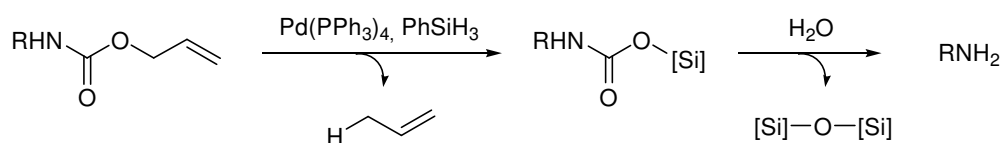
Al tractar-se d'un pèptid que conté exclusivament aminoàcids comercials que generalment no presenten dificultats d'acoblament, es varen escollir com a agents d'acoblament la DIPCDI (3 equivalents) i l'HOBt (3 equivalents) com a additiu, a més de l'aminoàcid que es volia acoblar (3 equivalents), emprant com a dissolvent una barreja DCM:DMF en una proporció de 3:1. D'aquesta manera es van anar acoblant tots els aminoàcids fins a obtenir el pèptid lineal **127** ancorat a la resina i que tenia les cadenes laterals protegides. L'extrem N-terminal del pèptid es va desprotegir amb piperidina al 20% en DMF i es va acetilar per reacció amb anhídrid acètic en medi bàsic de DIEA, emprant DCM com a dissolvent. D'aquesta manera s'obtenia el pèptid intermedi **128**.



**Esquema 5.5.** Esquema de síntesi del pèptid de referència **MT2**.

Posteriorment, es va procedir a la ciclació del pèptid per les cadenes laterals dels residus d'Asp<sup>5</sup> i Lys<sup>10</sup>. Abans, però, calia desprotegir les cadenes laterals d'aquests residus. Com ja hem vist anteriorment, els grups Al·lil i Alloc s'utilitzen com a protectors ortogonals a Fmoc i <sup>t</sup>Bu, ja que es poden desprotegir de manera diferent. Així, per a la desprotecció d'aquestes cadenes laterals vàrem emprar el mètode descrit per Thieriet *et al.*<sup>190</sup> en el que s'utilitza Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> com a catalitzador i PhSiH<sub>3</sub> com a agent atrapador o *scavenger* dels cations al·lílics reactius que es formen en la reacció. Els silil derivats que es formen són hidrolitzats per la pròpia humitat de l'ambient (esquema 5.6), donant lloc a la cadena lateral desprotegida.

<sup>190</sup> Thieriet, N., Alsina, J., Giralt, E., Guibé, F., Albericio, F., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 7275-7278.



**Esquema 5.6.** Mecanisme de desprotecció dels grups Al·lil i Alloc.

Un cop desprotegides les cadenes laterals, el pèptid es va ciclar utilitzant PyBOP (2 equivalents), HOAt (2 equivalents) i DIEA (4 equivalents) donant lloc al pèptid cíclic protegit **129**. Com ja hem comentat en la secció 5.1.2, les sals de fosfoni són agents d'acoblament més enèrgics que les carbodiimides.<sup>191</sup> Per això, es fan servir en aquesta etapa per assegurar una bona ciclació del pèptid.

Finalment, el pèptid **129** es va escindir de la resina i desprotegir simultaneament mitjançant una mescla de TFA, H<sub>2</sub>O i triisopropilsilà (TIS) en unes proporcions de 95:2,5:2,5. El TIS, de la mateixa manera que el PhSiH<sub>3</sub>, actua captant els cations que es formen provinents dels grups protectors de les cadenes laterals, com poden ser cations <sup>t</sup>Bu, tritil, etc.

Els successius acoblaments, així com l'acetilació i ciclació del pèptid, es van controlar amb l'assaig qualitatiu de ninhidrina o test de Kaiser. Aquest test permet determinar de forma qualitativa la presència de grups amino primaris en la resina i ens serveix de control per a la síntesi pèptidica. Es tracta de dos reactius que reaccionen amb els grups amino presents a la cadena peptídica donant coloració. Quan l'aminoàcid s'ha acoblat satisfactòriament no hi ha grups amino lliures i per tant el resultat del test és negatiu. Aquesta és l'única manera que tenim per controlar les reaccions sense necessitat de desancorar el pèptid de la resina. Una altra possibilitat, és la d'escindir una petita porció de pèptid i caracteritzar-lo per HPLC i espectrometria de masses.

### **Assaig de ninhidrina o test de Kaiser**

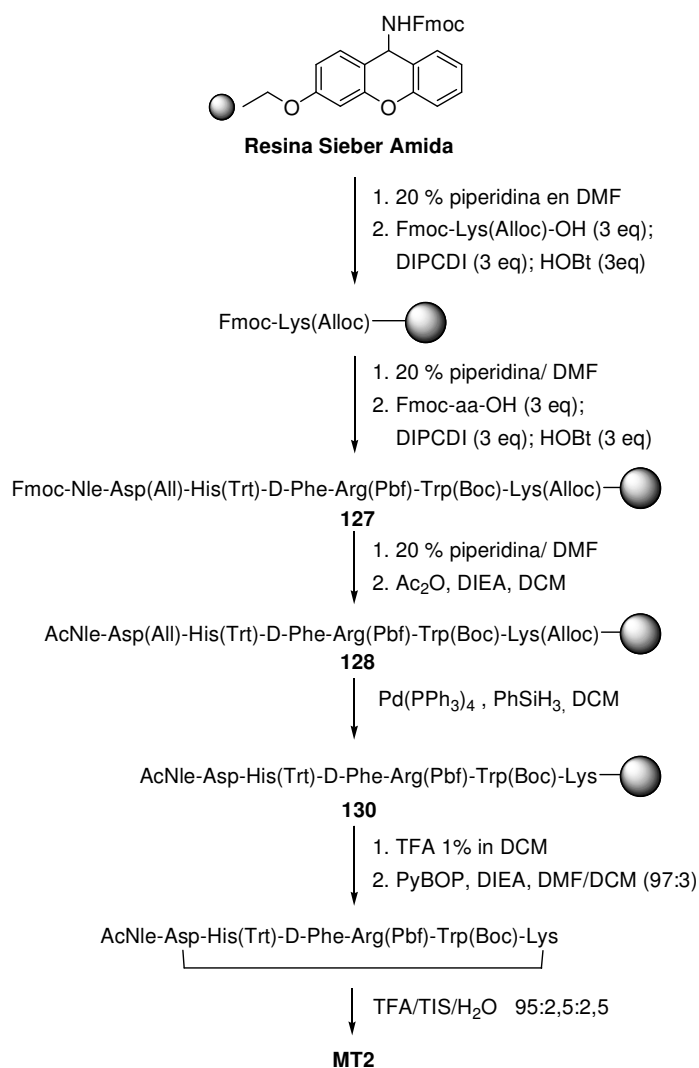
Cada vegada que es finalitza un cicle d'acoblament, o bé a l'hora de ciclar, una petita part de la resina rentada amb DCM i seca, es fa reaccionar amb dos reactius anomenats A i B de ninhidrina. Aquesta mescla s'ha d'escalfar durant 3 minuts a 110°C i a continuació es compara la mostra amb la d'un patró sotmès a les mateixes condicions que consta únicament dels 2 reactius en les mateixes proporcions, però que no conté resina. Un cop refredades aquestes mostres, se'n mira la coloració. Un

<sup>191</sup> Hudson, D.; *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 617-624.

color blau-violeta (assaig positiu) indica l'existència de grups amino lliures i per tant mostra un acoblament incomplet o bé una desprotecció satisfactòria. Un color assaig incolor o groguenc (assaig negatiu) és indicatiu d'un acoblament superior al 99,5%.

### 5.3.2. Ciclació en dissolució

Pel que fa a la ciclació en dissolució, la resina Sieber Amida ens permetia obtenir el pèptid en dissolució amb les cadenes laterals protegides necessari per la ciclació ja que aquest es pot alliberar de la resina amb TFA diluït (TFA 1% en DCM). Així, es va sintetitzar l'intermedi lineal protegit **127** de forma anàloga a la anterior, es va acetilar amb anhídrid acètic en DCM i es van desprotegir les cadenes laterals d'Asp<sup>5</sup> i Lys<sup>10</sup> seguint el mateix procediment per obtenir **130**.



**Esquema 5.7.** Síntesi de l'**MT2** ciclant el pèptid en dissolució.

Posteriorment, a diferència del cas anterior, s'escindí el pèptid de la resina amb condicions àcides suaus d'un 1% de TFA en DCM. El pèptid lineal obtingut no es purificà i es ciclà amb PyBOP (1,5 equivalents) i DIEA (3 equivalents) en una dissolució de DMF/DCM 97:3. La dilució ha de ser d'aproximadament  $10^{-4}$ M per assegurar que la ciclació es produeixi de manera intramolecular i no hi hagi dimerització o polimerització entre diferents molècules de pèptid. Per tal d'eliminar els grups protectors un cop ciclats el pèptid, s'addicionà a la mescla TFA/H<sub>2</sub>O/TIS en una proporció 95:2,5:2,5 durant 2 hores (esquema 5.7).

### 5.3.3. Purificació i caracterització d'MT2

Un cop obtingut el pèptid cíclic **MT2**, tant per una via com per l'altra, es purificà per HPLC preparativa. Previament, però, les condicions d'elució del pèptid s'estableixen per l'HPLC analítica. Concretament, per la purificació de l'**MT2** es va fer servir un gradient de 0 a 23% d'acetonitril en H<sub>2</sub>O durant 1 minut i un gradient de 23% a 25% en 13 minuts. El pèptid obtingut després de la purificació es va caracteritzar per HPLC, AAA i MALDI-TOF i RMN.

Els resultats obtinguts van ser molt semblants tant pels pèptids obtinguts per ciclació en fase sòlida com per l'obtingut per ciclació en dissolució. Així, doncs, a la vista d'aquests resultats, podem dur a terme tot el procés *on-resin* i desancorar al final. A més, quan es duia a terme la ciclació en la resina amb funcionalització elevada no s'observen com a compostos secundaris els productes de reaccions creuades entre les diferents cadenes peptídiques. Per aquest motiu, s'escollirà aquesta metodologia com la d'elecció per dur a terme la síntesi dels nostres  $\psi$ -melanotans.

### 5.4. Síntesi dels $\psi$ -melanotans

Com ja hem comentat en l'apartat anterior, l'estratègia que vàrem escollir per a la síntesi dels  $\psi$ -melanotans va ser la descrita per Grieco et al.,<sup>189</sup> ciclant el pèptid en fase sòlida abans de desprotegir les cadenes laterals i escindir el pèptid de la resina. L'avantatge d'aquesta estratègia és la facilitat per eliminar els agents d'acoblament que es fan servir per a la ciclació, que normalment són difícils de separar quan el pèptid cíclic s'obté en dissolució.

#### 5.4.1 Síntesi dels $\psi$ -MT2 amb anàlegs dipeptídics rígids a la zona activa

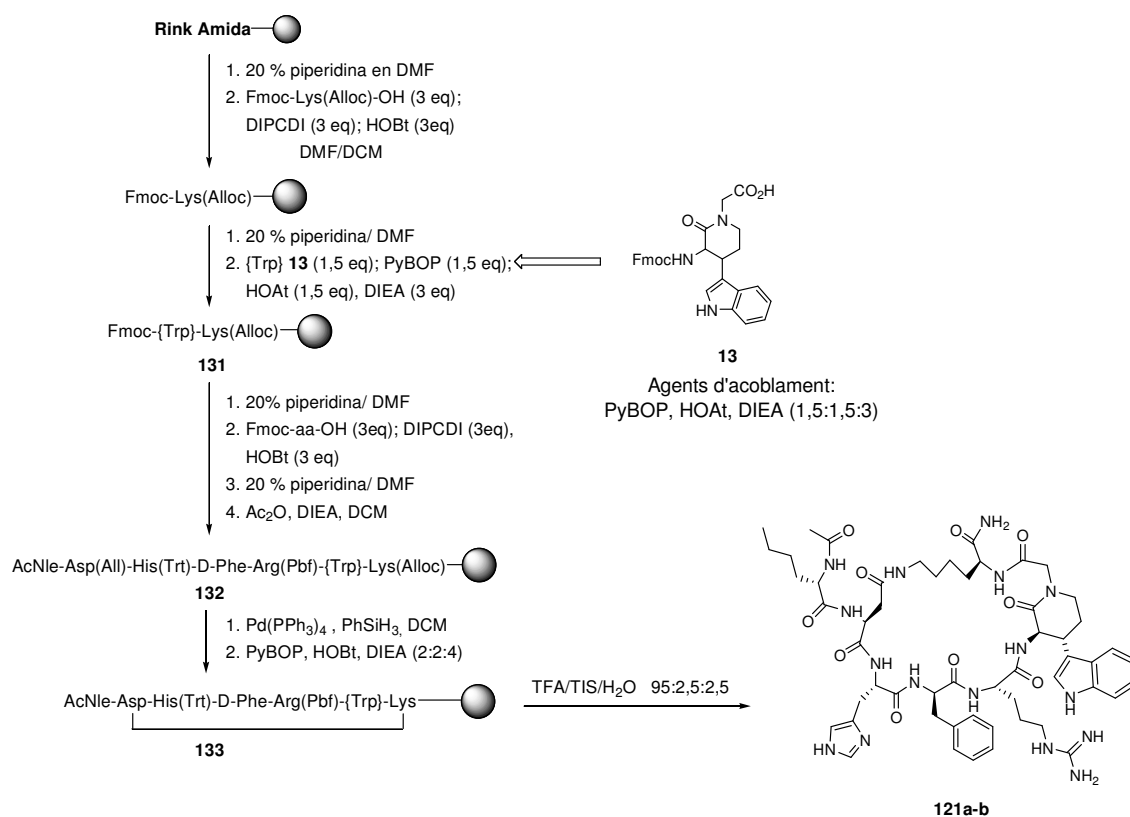
Com ja hem comentat en la introducció del capítol, es pretenien realitzar els pèptids **121a** i **121b** en els que el residu de Trp es substituïria pel lactam **13** i el pèptid **120** en el que el residu d'Arg es reemplaçaria pel nostre anàleg dipeptídic **108**.

##### 5.4.1.1. Síntesi dels $\psi$ -MT2 lactàmics **121a** i **121b**

En el cas dels  $\psi$ -melanotans que inclouen el lactam {Trp} **13** en la seva estructura, aquests se sintetitzaven de manera semblant a l'**MT2**, és a dir, es feia servir DIPCDI com a agent d'acoblament, HOBt com a additiu, i l'aminoàcid que es vol acoblar en proporcions de 3:3:3 respecte al pèptid. L'acoblament dels lactams a cadenes peptídiques en creixement sol funcionar molt bé però per optimitzar les condicions d'acoblament d'aquest sintó de valor afegit, fèiem servir un sistema d'acoblament més eficaç. Així, per tal de poder treballar amb poc excés de lactam es va fer servir PyBOP com a agent d'acoblament, HOAt com a additiu i DIEA en una proporció de 1,5:1,5:3 respecte al pèptid i 1,5 equivalents de lactam **13**. D'aquesta manera s'assolia l'intermedi **131** sobre el qual es van acoblar successivament la resta de residus.

Un cop s'havien acoblat tots els residus, s'acetilà l'extrem N-terminal del pèptid mitjançant l'addició d'anhídrid acètic i DIEA (proporció 1:2) en DCM obtenint-se, així, l'intermedi **132**. A continuació, es desprotegiren les cadenes laterals dels residus d'Asp i Lys emprant el mètode anteriorment descrit, en el que s'emprava Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,1 eq.) i PhSiH<sub>3</sub> (20 eq.) durant 20 minuts. Aquest procés es repetí fins a tres ocasions per tal d'assegurar la total desprotecció de les cadenes laterals dels residus implicats en la ciclació.

De forma anàloga a la descrita per **MT2**, la ciclació tingué lloc emprant PyBOP, HOAt i DIEA en proporcions 2:2:4 després de 2h. El test de Kaiser ens confirmà la formació del pèptid cíclic protegit **133**.

Esquema 5.8. Síntesi del pseudopèptid **121a** i **121b**.

Un cop ciclat, el pèptid s'escindí de la resina i es desprotegien les cadenes laterals de forma simultània, emprant una mescla de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O en proporcions (95:2,5:2,5) durant 1h. El pèptid es filtrà i es recollí en un matràs juntament amb la mescla d'escissió. Després d'evaporar el TFA sota corrent de nitrogen el pèptid es precipità en MTBE fred, es centrifugà i es decantà l'èter. El precipitat obtingut es va redissoldre en una mescla d'H<sub>2</sub>O i ACN i es liofilitzà.

Com que el lactam **13** del que partíem es tractava d'una mescla d'enantiòmers, havíem d'obtenir al final de la síntesi dos epímers. Per HPLC analítica es varen establir les condicions per la separació d'aquests dos diastereòmers que apareixien en una proporció 1:1. Un d'ells es va poder separar quan es feia un gradient de 23 a 26% d'ACN en H<sub>2</sub>O en 20 min. L'altre es va haver de repurificar emprant un gradient de 25 a 27% d'ACN en H<sub>2</sub>O en 20 min. Un cop purificats per HPLC semipreparativa, els diastereòmers **121a** (99% puresa) i **121b** (88% puresa) es varen caracteritzar per HPLC, MALDI i RMN.



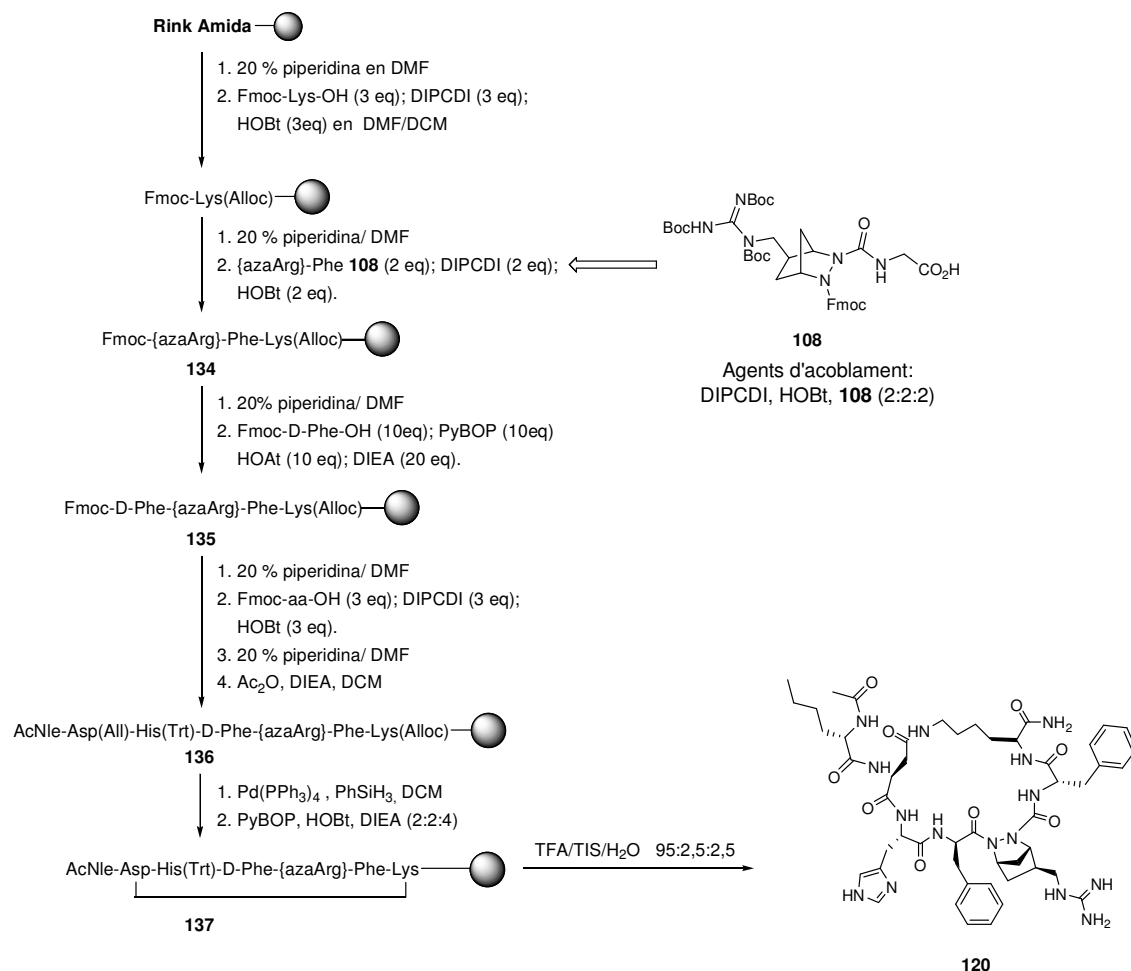
#### 5.4.1.2. Síntesi del $\psi$ -MT2 **120** modificat amb azaArg

La síntesi del  $\psi$ -pèptid **120** es va realitzar de forma anàloga a la descrita pel pèptid **121a** i **121b** però pel que fa a l'acoblament dels diazanorbornans, aquest transcorre normalment amb les condicions estàndard d'acoblament amb carbodiimides. D'acord amb això, l'acoblament tingué lloc amb DIPCDI, HOBt i l'azanorbornà **108** en proporcions 2:2:2 i no va fer falta reacoblar per obtenir el tripèptid **134**. El problema amb que ens vàrem trobar amb aquests bicicles apareixia al fer l'acoblament de l'aminoàcid següent, ja que és el nitrogen del cicle el que actua com a nucleòfil i aquest està molt impedit. Per aquest motiu es va utilitzar PyBOP (10 equivalents) com a agent acoblant, HOAt (10 equivalents) com a additiu en medi bàsic de DIEA (20 equivalents), amb un gran excés de l'aminoàcid a acoblar (10 equivalents) i amb temps de reacció molt més llargs (24 hores). Tot i així en ocasions va ser necessari un segon acoblament en les mateixes condicions per assolir el tetrapèptid **135**. A més el test de Kaiser no ens servia per comprovar si l'acoblament havia funcionat o no ja que aquest test només reacciona amb amines primàries, de manera que el que es feia era escindir una petita aliquota de resina i analitzar-la per HPLC i MALDI.

Un cop s'aconseguí acoblar el residu següent al bicicle, els acoblaments es varen continuar fent amb DIPCDI i HOBt, tot i que la presència del bicicle semblava entorpir els acoblaments i en alguna ocasió va fer falta reacoblar abans d'obtenir el pèptid lineal acetilat **136**. A continuació es van desprotegir les cadenes laterals dels residus d'Asp i Lys de la mateixa manera que en el cas anterior i es va ciclar el pèptid emprant PyBOP, HOAt i DIEA en proporcions 2:2:4 deixant l'acoblament durant 24 h.

Finalment, es desprotegí el pèptid **137**, s'escindí de la resina i es precipità en MTBE. Després de decantar el sobrenedant es resuspengué el precipitat en una mescla d'H<sub>2</sub>O i ACN i es liofilitzà.

El cru resultant es purificà per HPLC preparativa després d'establir les condicions en HPLC analítica. Concretament es va fer servir un gradient de 22 a 25% d'ACN en H<sub>2</sub>O en 20 minuts per obtenir el pseudopèptid **120** amb una puresa superior al 95%. El pèptid pur es va caracteritzar per HPLC, MALDI i RMN.



Esquema 5.9. Síntesi del pseudopèptid **120** amb el residu d'Arg modificat.

#### 5.4.2 Síntesi del $\psi$ -MT2 amb modificació de la zona central del gir $\beta$

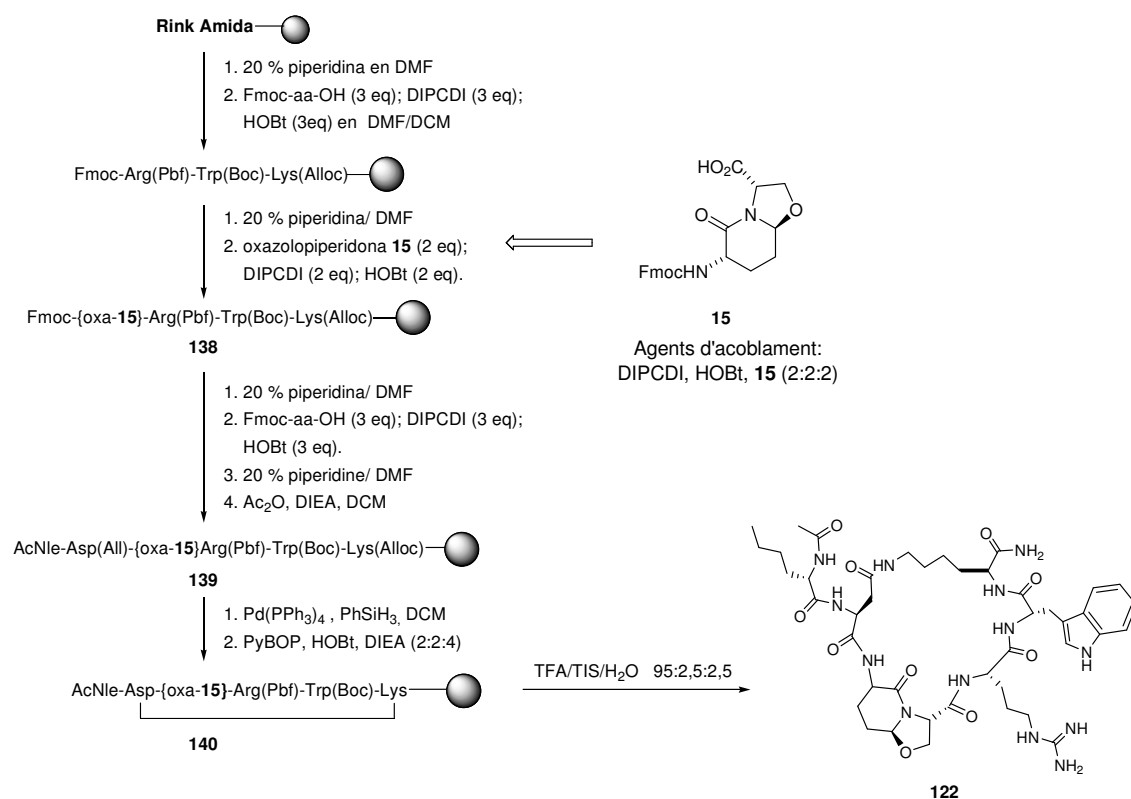
D'acord amb el que s'ha explicat en el capítol de la introducció, la part activa de l'**MT2** està formada pels residus d'His-D-Phe-Arg-Trp, essent els residus d'His i de D-Phe la part central d'un gir  $\beta$  que es forma en la conformació activa. D'altra banda, com ja s'ha comentat en el capítol 3, l'oxazolopiperidona **15** és un mimètic de gir  $\beta$ . És per això, que es va sintetitzar el pseudopèptid **122**, que contenia el bicicle **15** en lloc dels residus d'His-D-Phe en la regió activa de l'**MT2**.

La seva síntesi es realitzà de forma anàloga a la síntesi del pèptid de referència i dels pèptids descrits en l'apartat anterior. Per tant, els residus de Lys(Alloc), Trp(Boc) i Arg(Pbf) s'acoblen successivament fent servir la DIPCPI i l'HOBt com a agents d'acoblament. En aquest cas, el bicicle lactàmic **15** també es va introduir sense complicacions en les mateixes condicions en les que s'introdueixen els aminoàcids comercials però emprant un excés menor (2 equivalents) del compost **15**. A

continuació, s'acoblà l'Asp(Al·lil) i la Nle i el pèptid es va acètilar amb anhidrid acètic i DIEA (10:20) donant lloc al pèptid lineal **139**, que es desprotegí seguint les condicions que havien estat utilitzades en el cas de l'**MT2**, es a dir, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,1 equivalents) i PhSiH<sub>3</sub> (20 equivalents) en DMF. Les cadenes laterals dels residus d'Asp i de Lys es van fer reaccionar amb PyBOP (3 equivalents), HOAt (3 equivalents) i DIEA (6 equivalents) durant 2 hores per obtenir el pèptid cíclic **140**.

Per tal d'escindir el pèptid de la resina i desprotegir les seves cadenes laterals, es va fer servir una mescla TFA/TIS/H<sub>2</sub>O en proporcions 95:2,5:2,5 durant 2 hores. El pèptid **122** recollit es precipità en MTBE, es resuspengué en una mescla d'H<sub>2</sub>O i ACN i es liofilitzà.

El cru resultant es purificà per HPLC semipreparativa segons les condicions establertes per l'HPLC analítica, és a dir, un gradient de 22 a 24 % d'ACN en H<sub>2</sub>O durant 20 minuts per tal d'obtenir el pèptid **122** pur (puresa superior al 99%) el qual es caracteritzà per HPLC, MALDI i RMN.



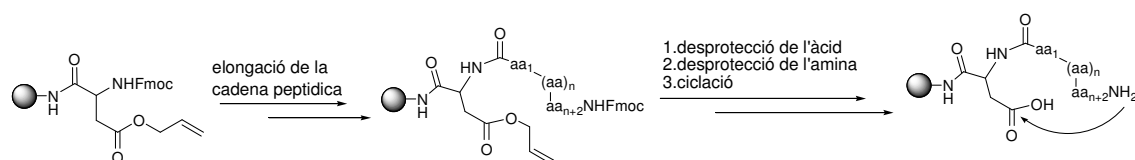
**Esquema 5.10.** Síntesi del pseudopèptid amb modificació al gir β.

### 5.4.3. Síntesi dels $\psi$ -melanotans amb substitucions de la Lys

#### 5.4.3.1. Modificació amb l'oxazolopiperidona **15**

Al tractar-se d'un mimètic de gir  $\beta$ , l'oxazolopiperidona **15** ens donava la possibilitat de sintetitzar un pèptid que tingués dos girs  $\beta$  contraposats. En aquest cas el bicicle lactàmic **15** substituïa a la Lys en la seva funció de connector entre els dos extrems del pèptid lineal.

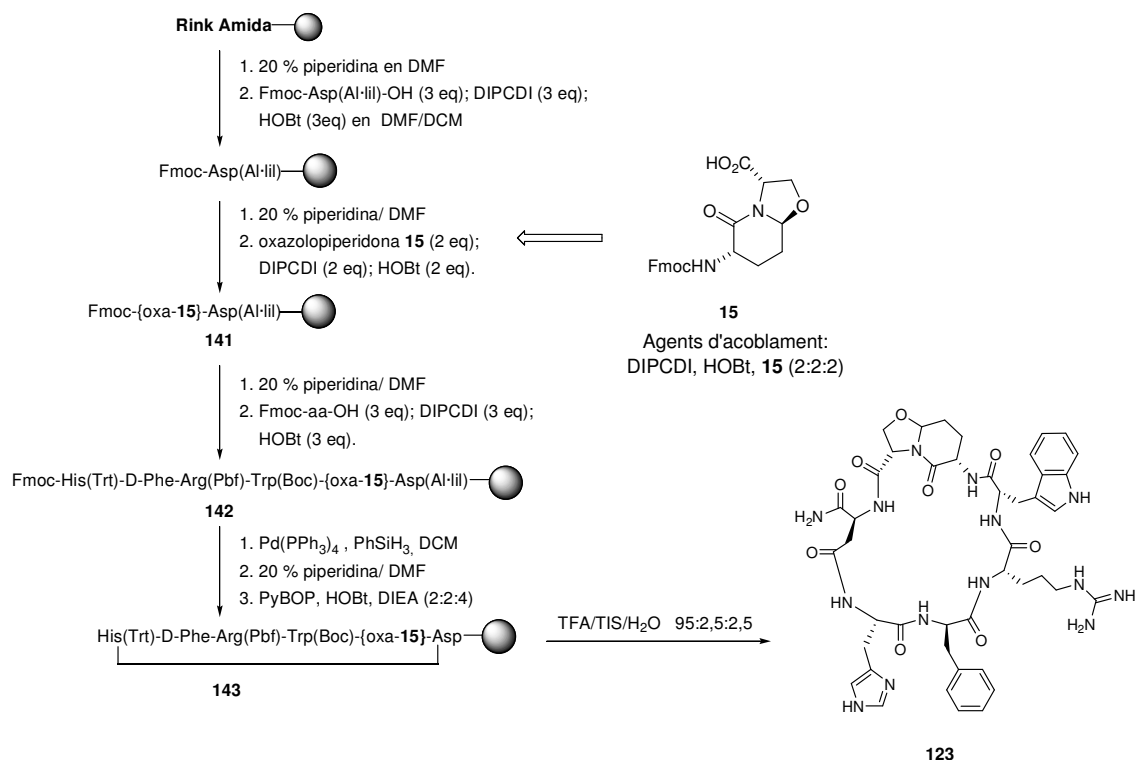
L'estratègia seguida en els casos anteriors no era vàlida en aquest cas ja que l'oxazolopiperidona només tenia dos punts d'unió (pels tres de la Lys) i per tant no es podia fixar a la resina. Per tant, fou el residu d'Asp(Al·lil) el que es fixà a la resina a través del seu grup carboxílic alfa i a partir del qual faríem créixer el pèptid a través del seu grup amino. Un cop sintetitzat el pèptid lineal es tancaria per ciclació del grup amino de l'His amb el grup carboxil de la cadena lateral de l'Asp.



**Esquema 5.11.** Plantejament sintètic del pseudomelanotan **123**.

En primer lloc, sobre el residu d'Asp es va acoblar l'oxazolopiperidona **15**. Com hem vist en la síntesi de **122** aquesta s'acoblava sense dificultats emprant les condicions estàndard de DIPCDI (2 equivalents) i HOBT (2 equivalents) emprant 2 equivalents de l'oxazolopiperidona **15**. La resta dels residus també es varen introduir sense problemes emprant aquests mateixos agents d'acoblament però amb un excés de 3 equivalents respecte el pèptid. Així es va arribar a l'intermedi **142** després de l'acoblament del Trp(Boc), l'Arg(Pbf), la D-Phe i l'His(Trt). En aquest punt teníem el grup carboxil de la cadena lateral de l'Asp protegit en forma d'èster al·lílic i el grup amino de l'His protegit amb Fmoc. La desprotecció, en primer lloc de la funció àcida de l'Asp seguida de la desprotecció de l'His amb piperidina al 20% ens va permetre obtenir l'intermedi desprotegit a punt per la ciclació. En el cas que la desprotecció de l'amino de la His hagués estat prèvia a la escissió de l'al·lil s'hauria pogut obtenir el producte d'alquilació de l'amino de la His impedit la ciclació del pèptid. Un cop desprotegit es va procedir a la ciclació del pèptid emprant PyBOP (2 equivalents), HOAt (2 equivalents) i DIEA (4 equivalents) que donà lloc al pèptid protegit **143**. Aquest es va sotmetre a les condicions de desprotecció i escissió en les que es va

emprar la mescla TFA/TIS/H<sub>2</sub>O en proporcions 95:2,5:2,5 obtenint-se el pèptid **123**, el qual es va precipitar en MTBE i es va liofilitzar.



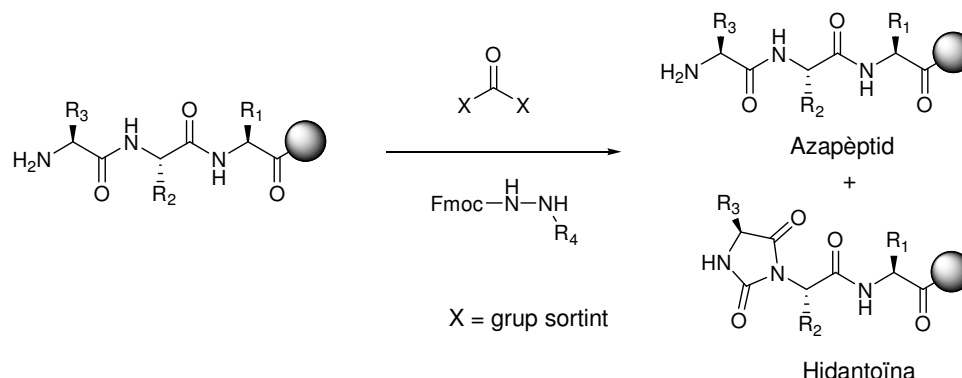
**Esquema 5.12.** Síntesi del  $\psi$ -MT2 amb substitució del residu de Lys per l'oxazolopiperidona **15**.

El pèptid **123** es purificà per HPLC semipreparativa emprant un gradient del 22 al 23% d'ACN en H<sub>2</sub>O en 20 minuts i es va caracteritzar per HPLC, MALDI i RMN.

#### 5.4.3.2. Modificació de la part flexible amb el diazanorbornà **101b**

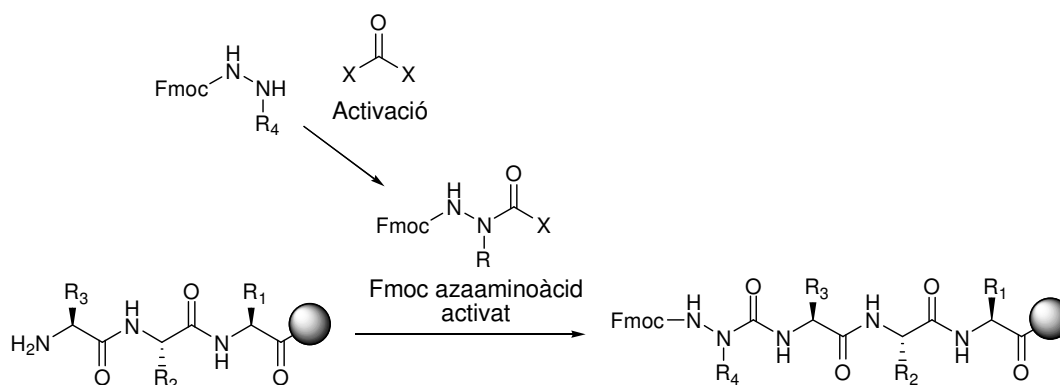
De la mateixa manera que en el cas del pseudopèptid **123**, en aquest cas fou l'Asp el residu que es va ancorar a la resina. Com ja hem comentat anteriorment els diazanorbornans s'acoblaven sense problemes a la cadena peptídica en creixement, però era molt difícil la reacció d'acoblament amb l'aminoàcid posterior i es requerien temps de reacció llargs i un gran excés de reactius. Però, com que el que es volia era sintetitzar un azapèptid, calia formar un enllaç de tipus urea. Per això, calia en primer lloc, transformar l'amina bé de l'Asp, bé del diazanorbornà **101b** en isocianat o en un carbamat activat i normalment aquesta activació es realitza amb trifosgè (BTC) o amb carbodiimidazole (CDI). Quan l'activació té lloc sobre la funció amina de la cadena peptídica en creixement es forma l'azapèptid acompanyat per quantitats importants de l'hidantoïna formada per l'atac nucleòfil de l'amina secundària de

l'aminoàcid precedent,<sup>192</sup> de manera que això només ocorre quan aquesta cadena està formada per dos o més residus.



**Esquema 5.13.** Formació de l'hidantoïna com a subproducte de l'activació de l'extrem N-terminal del pèptid.

Una alternativa consistiria en afegir sobre el pèptid ancorat a la resina, l'Fmoc azaaminoàcid previament activat, però aquest mètode també resultava poc efectiu degut al gran nombre de productes secundaris observats o als llargs temps de reacció requerits.<sup>193</sup>



**Esquema 5.14.** Activació de l'azaaminoàcid previa a l'acoblament en fase sòlida.

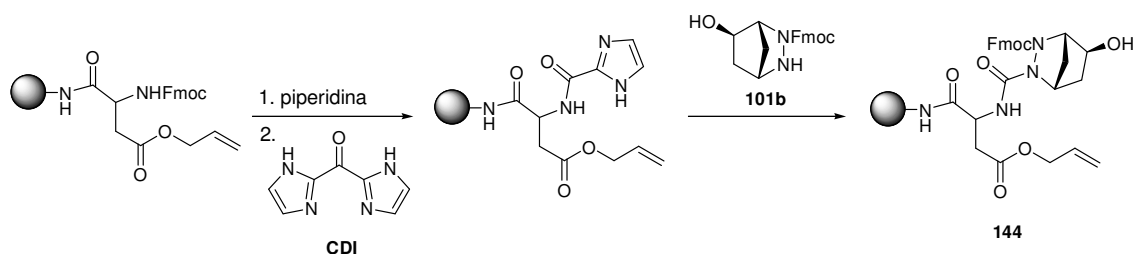
Per solventar aquests inconvenients es podria sintetitzar l'azadipèptid en dissolució, fent reaccionar el diazanorbornà amb un excés de foscó, i acoblar aquest azadipèptid

<sup>192</sup> a) Quibell, M.; Turnell, W. G.; Johnson, T., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1993**, 2843-2849. b) Liley, M.; Johnson, T., *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 3983-3985. c) Melendez, R. E.; Lubell, W. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 6759-6764.

<sup>193</sup> a) Gibson, C.; Goodman, S. L.; Hahn, D.; Hölzemann, G.; Kessler, H., *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 7388-7394. b) Weber, D.; Berger, C.; Eickelmann, P.; Antel, J.; Kessler, H., *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 1918-1930.

a la cadena peptídica en creixement.<sup>194</sup> Aquest era el cas del diazanorbornà **108** que s'havia fet reaccionar amb l'isocianat comercial de Phe i posteriorment s'havia acoblat a la cadena peptídica en creixement.

Degut a que en el nostre cas la formació de l'hidantoïna no suposava cap problema, ja que només teníem ancorat un aminoàcid a la resina, ens vàrem decidir a formar l'especie activada de l'extrem amino terminal del pèptid ancorat a la resina. Així, un cop va estar ancorat el residu d'Asp a la resina, aquesta es va tractar amb un excés de CDI (10 equivalents) durant 20 minuts, repetint el procediment 20 minuts més per tal d'assegurar la formació de l'especie activada. A continuació, es va incorporar el diazanorbornà (3 equivalents) en una mescla de DCM i DMF durant 2 h.



**Figura 5.15.** Activació de la peptidil resina amb CDI per obtenir el diazapèptid **144**.

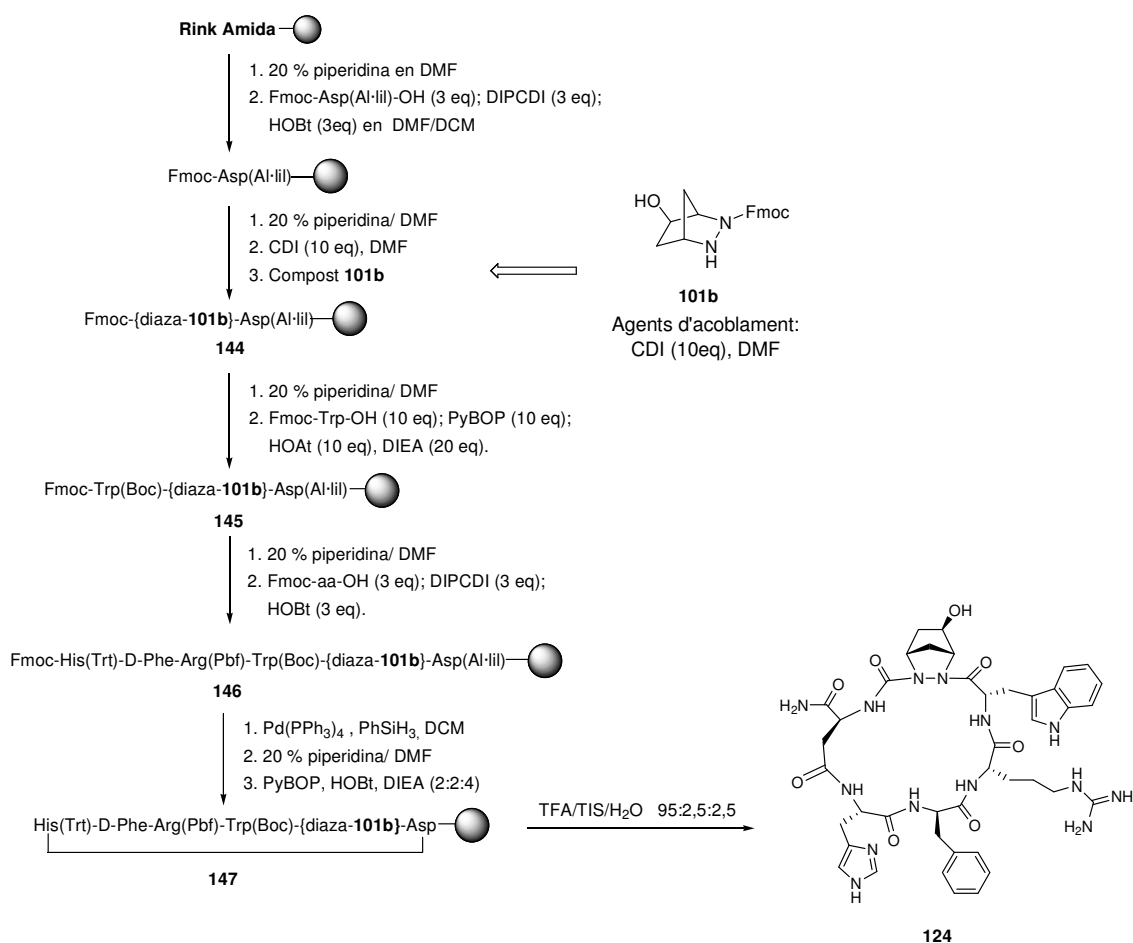
Per controlar l'acoblament i desprotecció del nostre residu **101b** no ens servia l'assaig de ninhidrina ja que aquest test es selectiu d'amines primàries. L'assaig de cloranil que es fa servir pels acoblaments sobre Pro tampoc ens donava cap informació. Per aquest motiu, l'única manera de controlar les reaccions va ser per tractament d'una petita aliquota de resina amb la mescla d'escissió i analitzar-la per HPLC analítica i MALDI. El cromatograma obtingut després de l'acoblament del diazanorbornà **101b** ens indicava la presència del producte d'acoblament juntament amb altres subproductes que no es varen poder identificar. A més semblava que quedava part de pèptid sense reaccionar. Per això es va procedir a capar la resina afegint al medi anhídrid acètic i DIEA en DCM en proporcions 10:20 respecte al pèptid, per tal d'evitar problemes de purificació, un cop acabada la síntesi.

Posteriorment, es duia a terme l'acoblament del residu de Trp però aquest va resultar complicat fins al punt que no estàvem segurs que tot l'aminoàcid s'hagués acoblat. L'ús de PyBOP amb HOAt i DIEA en una proporció de 10:10:20 i un excés de 10 equivalents de Trp(Boc) no van semblar ser suficients per completar l'acoblament. La

<sup>194</sup> Boeglin, D.; Lubell, W. D., *J. Comb. Chem.*, **2005**, *7*, 864-878.

resta d'aminoàcids es van acoblar succesivament però de forma complexa, ja que va ser necessari el reacoblament dels residus d'Arg i D-Phe. Aquests residus no es varen unir a la cadena peptídica en un primer acoblament realitzat amb DIPCDI i HOBT (en proporció 3:3:3) però si quan aquest es va repetir en les mateixes condicions. Finalment, un cop obtingut el pèptid lineal, es van desprotegir per ordre els residus d'Asp i d'His i es va realitzar la ciclació emprant PyBOP, HOAt i DIEA (en proporció 2:2:4).

El cru obtingut era una mescla complexa de compostos i es van necessitar successives purificacions per tal d'obtenir **124**, el qual finalment es pogué aïllar amb una puresa superior al 90% però amb uns rendiments baixos. El pseudopèptid **124** es caracteritzà per HPLC, MALDI i RMN.



Esquema 5.16. Síntesi del pseudopèptid **124**.



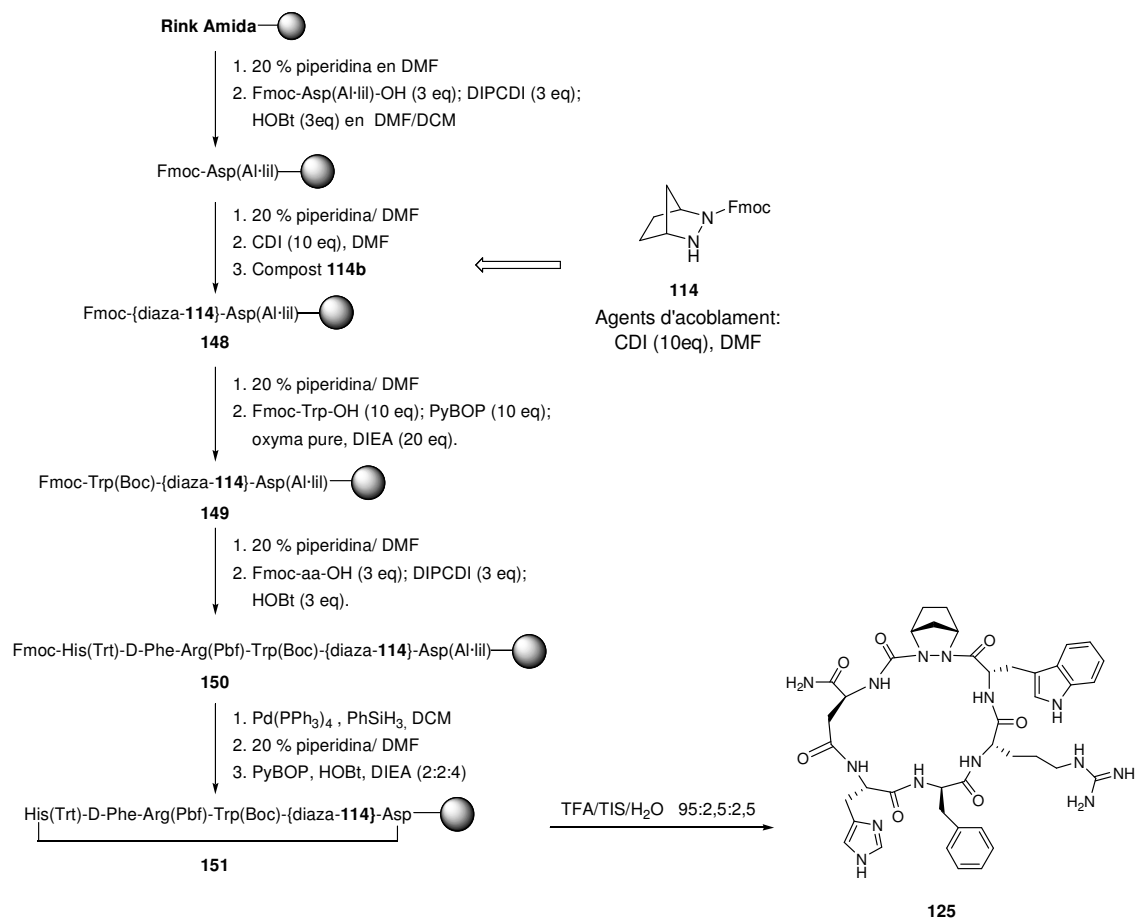
#### 5.4.3.3. Substitució de la Lys pel diazanorbornà **114**

En el cas de la substitució de la Lys amb el diazanorbornà **114**, la síntesi es dugué a terme de forma anàloga a la anterior. En aquest cas, sobre el residu d'Asp s'incorporà el diazanorbornà previa activació de l'extrem amino del pèptid en creixement amb CDI (veure esquema 5.15). En el cas de l'acoblament de **114** ens vàrem trobar amb els mateixos problemes que s'havien observat en el cas de **101b**, és a dir, una gran quantitat de subproductes i presència de producte de partida. Així, per tal d'evitar-se problemes de purificació es decidí acetilar la resina que no havia reaccionat, i per aquest propòsit es va fer servir anhídrid acètic i DIEA (10:20 en relació amb el pèptid).

La síntesi va continuar amb l'acoblament del residu de Trp sobre l'àtom de nitrogen del bicicle però aquest no es produïa ni tan sols quan es van utilitzar PyBOP, HOAt i DIEA en proporció 10:10:20 i un excés de 10 equivalents de l'aminoàcid. També es va assajar l'acoblament emprant cianoglicoxilat-2-oxima d'etil (oxyma pure) que acostuma a reemplaçar l'HOBt donant millors resultats. En el nostre cas, però no s'aconseguí l'acoblament total del residu de Trp i es va haver de capar novament la resina amb anhídrid acètic i DIEA en DCM (2 x 30 min). A continuació es van acoblar els residus d'Arg, D-Phe i His emprant DIPCDI i HOBt com a agents d'acoblament.

Un cop s'havia sintetitzat el pèptid lineal **150**, es va desprotegir la cadena lateral de l'Asp amb el Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,1 equivalents) i PhSiH<sub>3</sub> (20 equivalents) en DMF, i l'amina de l'His i es va procedir a la ciclació del pèptid de la mateixa manera que pel pèptid **124**. A continuació s'escindí i es desprotegiren les cadenes laterals, es precipità en MTBE, es resuspengué i es liofilitzà.

El cru es va purificar per HPLC semipreparativa emprant un gradient de 21 a 23% d'ACN en H<sub>2</sub>O en 20 minuts per a obtenir el pseudopèptid **125** amb una puresa superior al 95% però uns rendiments molt baixos i es va caracteritzar per HPLC, MALDI i RMN.



**Figura 5.17.** Síntesi del pseudopèptid **125** per modificació de la Lys amb el diazanorbornà **114**.

#### 5.4.3.4. Modificació amb el diazanorbornè **115**

Per a la síntesi del pseudopèptid **126**, en el que el residu de Lys es volia substituir pel diazanorbornè **115**, es seguí la mateixa ruta sintètica que en els dos casos anteriors. L'acoblament de **115** es va realitzar per activació de la peptidil resina amb CDI (2 x 20 min) i l'addició del compost **115**. Com passava en els casos anterior, aquest acoblament no va ser total i va caldre capar el pèptid que havia quedat sense reaccionar. L'acoblament del Trp es va assolir parcialment amb PyBOP, oxyma pure i DIEA (10:10:20 en relació amb el pèptid) després d'un reacoblament. La síntesi es va continuar amb la introducció dels residus d'Arg, D-Phe i His. En el cas de l'Arg es va haver d'emprar PyBOP, HOAt i DIEA (proporció 3:3:6) i reacoblar en dues ocasions mentre que en el cas de la D-Phe també va ser necessari un segon acoblament amb PyBOP, HOAt i DIEA (proporció 3:3:6).

A l'hora de ciclar el pèptid també vàrem tenir dificultats. Es va haver de repetir la ciclació en dues ocasions i fins i tot deixar-la durant la nit amb PyBOP, HOAt i DIEA (3:3:6). Finalment es va escindir el pèptid de la resina i es van desprotegir les cadenes

laterals emprant una mescla de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O en proporció 95:2,5:2,5. L'intent de precipitar el pèptid en MTBE no va ser satisfactori, així que es va evaporar l'èter i es va tornar a sotmetre a les condicions de desprotecció. Per espectrometria de masses, però, no s'observava la presència del pèptid **126** ni tampoc el pèptid amb algun dels seus grups protectors. Finalment es va desestimar l'obtenció d'aquest pèptid.

### **5.5. Estudi conformational dels pseudopèptids per RMN**

Un cop sintetitzats els  $\psi$ -melanotans **120**, **121a-b**, **122**, **123**, **124** i **125** es va procedir al seu estudi conformational per RMN. Aquesta tècnica és particularment útil per a l'estudi conformational de pèptids ja que permet determinar la formació d'enllaços d'hidrogen, les distàncies interprotòniques i els angles diedres  $3J(\text{HC}\alpha\text{-NH})$ . A més a més les dades ens serviran com a restriccions per a càlculs de modelització molecular, els quals ens poden permetre conèixer l'estructura de les diferents espècies que participen a l'equilibri conformational en dissolució.

L'anàlisi dels pèptids va començar amb l'assignació dels senyals de RMN als diferents protons dels pèptids, emprant una combinació d'experiments de <sup>1</sup>H, TOCSY i NOESY. Amb això es podrien determinar les distàncies interprotòniques mitjançant l'integració dels senyals de creuament més significatius dels espectres 2D NOESY. Per acabar, es va modelitzar l'estructura del pèptid **121** introduint els valors anteriors com a restriccions en càlculs de dinàmica molecular (Simulated Annealing).

Les mostres es van dissoldre en H<sub>2</sub>O que contenia un 10% de D<sub>2</sub>O en una concentració aproximada de 10  $\mu\text{M}$  i es van portar a un pH de 6,5. Els espectres es van adquirir en un aparell Bruker Avance 600 MHz, emprant TopSpin 1.3 com a software d'adquisició i nmrPipe com a software de processat. Tots els espectres es van realitzar a una temperatura de 293 K. Per tal d'assignar els senyals es va fer servir el programa CARA/NEASY.

#### **5.5.1. Estudi de RMN del pèptid de referència MT2**

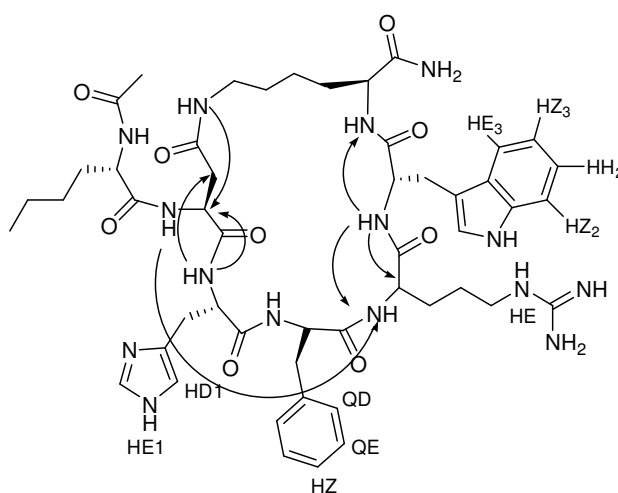
L'assignació dels senyals es va iniciar amb l'identificació del protó HE1 a l'espectre de <sup>1</sup>H del Trp que apareix desapantallat a  $\delta = 9,95$  ppm. Aquest protó només presenta senyals de creuament NOE amb els protons HD1 (posició C-2 de l'indole) i HZ2 (posició C-7 del nucli indòlic) del Trp i aquests es diferencien fàcilment ja que el protó HD1 es troba a prop dels protons  $\alpha$  i  $\beta$  del Trp amb els que presenta NOEs. Així, es van assignar els protons HA, HB, HD1 i HZ2 del Trp. A partir del protó  $\alpha$  del Trp

s'assignà el protó amídic del mateix, ja que aquest presentava senyals de creuament en l'espectre 2D TOCSY. La resta de protons aromàtics del Trp es pogueren assignar gràcies al HZ2, ja que aquest presentava senyals de creuament a l'espectre 2D TOCSY.

A partir del protó NH del Trp es va poder identificar el residu anterior, és a dir, l'Arg de la posició 5, ja que aquest protó NH presentava NOEs amb el protó  $\alpha$  d'aquesta. A través de l'espectre TOCSY s'assignaren la resta de protons de l'Arg.

De forma anàloga el residu de D-Phe<sup>4</sup>, s'identificà per la presència de NOEs entre l'amida de l'Arg<sup>5</sup> i el protó  $\alpha$  del residu 4. A partir de l'amida de la D-Phe<sup>4</sup> es van poder assignar la resta de protons del residu. D'aquesta manera i de forma successiva vàrem anar identificant els diferents residus i es varen poder assignar tots els protons de la molècula.

Respecte la seva estructura, es van poder observar NOEs entre els residus d'Asp<sup>2</sup> i Arg<sup>5</sup>, la qual cosa ens podria indicar l'existència d'un gir beta tal i com es troba descrit a la literatura. Això, ens permetia validar els nostres càlculs inicials (capítol 2). A més també s'observaven NOEs entre els residus d'Arg<sup>2</sup> i Lys<sup>7</sup>.

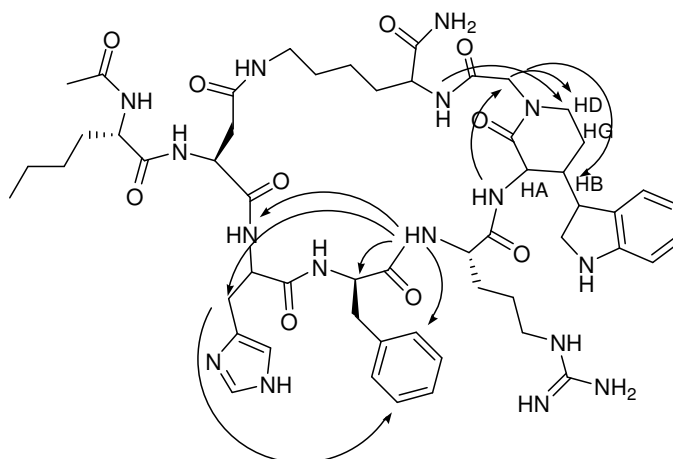


**Figura 5.18.** NOEs observats a l'espectre NOESY del pèptid de referència.

### 5.5.2. Estudi conformacional del $\psi$ -pèptid 121a

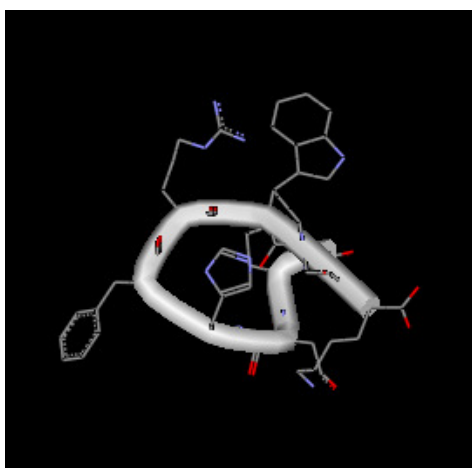
Basant-se en l'assignació dels protons del pèptid **MT2** de referència, es van assignar els protons dels  $\psi$ -melanotans. Pel que fa als pseudopèptids que contenen un anàleg de Trp, sembla que aquests mantinguin el gir beta present en l'**MT2**, ja que

s'observava un senyal NOE entre l'amida de l'Arg<sup>5</sup> i l'amida de la His<sup>3</sup>, la qual cosa podria voler dir que existeix el pont d'hidrogen característic dels girs beta entre el carbonil del residu en posició (*i*) i el grup amino de l'aminoàcid de la posició (*i+3*) fent que els dos residus s'acostin. També s'observà una major presència de NOEs en la zona del Trp que segurament provoca un gir extra en la molècula.

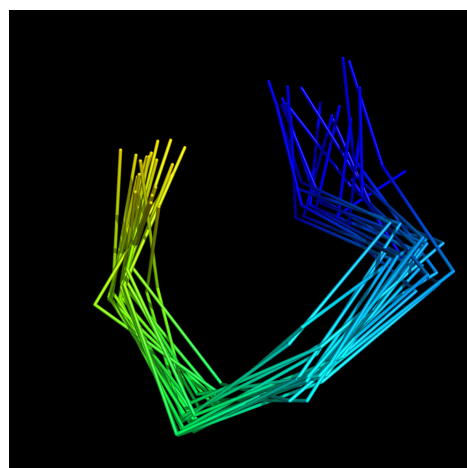


**Figura 5.19.** NOEs més rellevants del compost **121a**.

Aprofitant les dades de RMN com a restriccions es van calcular 9000 estructures, essent la de mínima energia la que es mostra en la figura 5.19.a. En aquesta s'observà que la His es col·loca dintre l'anell. De totes maneres amb les dades de RMN de que disposàvem no podíem restringir gaire l'espai conformacional.



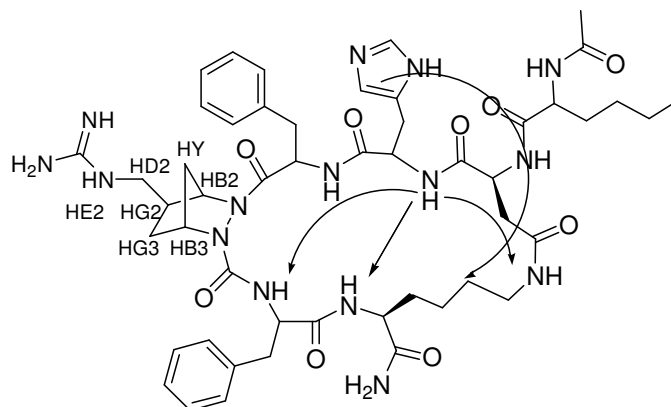
**Fig 5.20.a.** Conformació de mínima energia obtinguda.



**Fig. 5.20.b.** Superposició de les 20 conformacions d'energia més baixa.

### 5.5.3. Estudi conformacional del $\psi$ -pèptid 120

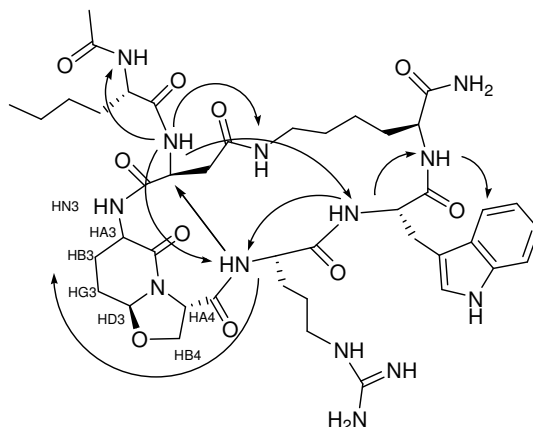
L'assignació del pseudopèptid que contenia el diazanorbornà anàleg d'arginina en la seva estructura ens va revelar l'existència de NOEs entre el protó de l'amida de la His de la posició 3 i diferents protons del residu de lisina de la posició 7, en principi allunyats en la seqüència aminoacídica. Això ens porta a pensar que el nostre bicicle rigidifica l'estructura donant lloc a un gir molt tancat.



**Figura 5.21.** Contactes observats entre els diferents protons del  $\psi$ -melanotan **120**.

### 5.5.4. Estudi del $\psi$ -pèptid 122

En el cas del pseudopèptid **122**, s'observa clarament, que la oxazolopiperidona 15 incorporada en la zona activa del pèptid indueix un gir. Aquest fet es corroborà per la presència de NOEs entre l'amida del residu d'Asp<sup>2</sup> i l'amida de l'Arg<sup>5</sup> així com també amb el protó alfa del Trp, la qual cosa vol dir que aquests residus, allunyats en la seqüència, queden relativament a prop en la estructura tridimensional que adopta el pèptid cíclic. A més a més també s'observà un senyal d'entrecreament NOE entre l'amida de l'Asp<sup>5</sup> i el protó alfa de l'Asp<sup>2</sup>.



**Figura 5.22.** NOEs més significatius entre els diferents residus de **122**.

### 5.5.5. Estudi estructural del $\psi$ -melanotan 123

Pel que fa a l'estructura del pseudopèptid **123**, sembla que la incorporació de l'oxazolopiperidona 15 en la zona flexible de la molècula, fa que aquesta es rigidifiqui. Això s'observà per la presència de múltiples NOEs entre els residus d'Asp<sup>2</sup> i Trp<sup>6</sup> com per exemple els que s'observaven entre l'amida de l'Asp<sup>2</sup> i l'anell aromàtic del Trp<sup>6</sup>, o bé el que existia entre l'amida del Trp<sup>6</sup> i un dels proton beta de l'Asp<sup>2</sup>. L'amida del Trp<sup>6</sup> a més dona NOE amb protons beta de la D-Phe<sup>4</sup>. En la figura es mostren les interaccions més significatives del compost **123**.

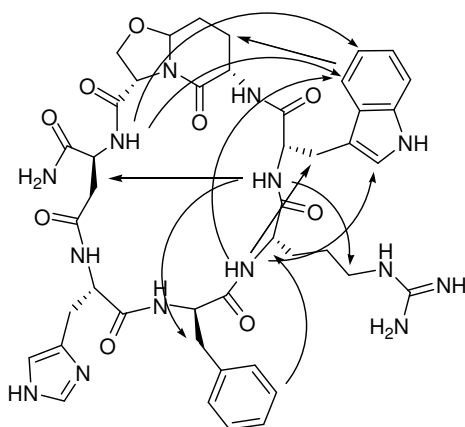


Figura 5.23. NOEs més significatius observats en **123**.

### 5.5.6. Estudi dels pèptids 124 i 125 per RMN

Per estudiar els compostos **124** i **125**, es van fer servir els seus espectres de correlació <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY i NOESY. Donat la complexitat que presentaven els espectres només vàrem poder assignar sense ambigüetat els protons que es descriuen en la part experimental però no es van poder establir les relacions entre ells ni estudiar-ne la seva estructura.