



Universitat Ramon Llull

TESI DOCTORAL

Títol Disseny, Síntesi i Activitat Biològica de Sistemes Pirido[2,3-*d*] pirimidínics com a Inhibidors del Virus de l'Hepatitis C.

Realitzada per Marta Camarasa Navarro

en el Centre IQS School of Engineering

i en el Departament de Química Orgànica

Dirigida per Dr. José Ignacio Borrell Bilbao

Al Xavi

*“Són els problemes sense resoldre, no els resolts,
els que mantenen activa la ment.”*

Erwin Guido Kolbenheyer

AGRAÏMENTS

La realització de la Tesi Doctoral és una part molt important de la meua vida i no podria començar d'una altra manera que agraint a totes aquelles persones que heu estat al meu costat. Totes vosaltres m'heu ajudat a arribar fins aquí de la millor manera.

En primer lloc, m'agradaria agrair a l'Iñaki Borrell per obrir-me les portes al laboratori de síntesi i permetre la realització d'aquesta Tesi Doctoral. M'agradaria remarcar que a part de ser el director de tesi, també ha sigut un bon amic. Hem passat per moments més bons i altres no tant bons, però sempre ens hem entès molt bé.

Agrair al IQS per la beca que ha permès la realització d'aquesta tesi. A l'Irsicaixa per l'avaluació de l'activitat biològica dels compostos a sintetitzar.

He d'agrair també al Dr. Teixidó i al Dr. Sánchez per les seves propostes sintètiques en diferents moments de la Tesi.

Al Departament d'Espectroscòpia, especialment al Dr. Batllori per l'ajuda en l'elucidació estructural dels compostos més complexos, concretament aquells amb fluor i/o fòsfor en la seva estructura. Gràcies també a la Núria per la seva dedicació.

Aquests anys han sigut molt especials i molt feliços per mi i això ha sigut gràcies a totes aquelles persones que han passat pel Departament de Síntesi. A les Ercrosines, Gemma, Maia i Montse, les mamis del departament i molt especials per mi. Als Gonzilos, Gonzalo i Maria, disposats ajudar i sempre al dia de tots els cotis. Al Rai, el rei de síntesi, després d'uns anys sabem que els matins són durs i és millor no parlar gaire, encara que això per mi és difícil, però sempre disposat a ajudar en el que faci falta. A la Silvia, amb la que he compartit lleixa al laboratori "molón" i tenim algunes molècules en comú. Al Christian i a l'Anna per haver-me ajudat en la síntesi. Als compus, Agustí i Àlex, per donar-me suport durant la tesi. Al Galve, Miki, Ru, Ire, María, Moles... a tots aquells que han passat pel laboratori de síntesi i em compartit bons moments plegats. Tito que no m'oblido de tu, no estiguis tristito! Agrair a l'Albert, el meu millor amic, pel suport incondicional al llarg de la vida i per tots aquells moments d'alegria, en els que hem rigut, ballat, cantat... i fins i tot aquells moments en els que hem plorat. Però sempre amb un somriure a la cara!

També a totes aquells que hem compartit moments en el laboratori, hem fet cotis al passadís, etc, Adaya, Rubén, Júlia, Alicia. Al grup de dinar Àlex, Anna, Tere, Ragàs, Marta i Manu, els nostres dinars si que molaven. Al Manu el relacions públiques de l'IQS i el que ens posava al dia de tots el cotis. A la María, a qui al principi em feia molt respecte però ara és una molt molt bona amiga! I la Irene, la més feliç del món i a qui aprecio molt.

A les nenes de la UAB, Anna Caballero, Anna Campins i Maria, que encara que passin els anys l'amistat no es perd i sempre ser que puc comptar amb vosaltres.

A les meves nenes, Cata, Cris, Velo, Ivi, Cumi i Jes, agrair-vos el vostre suport incondicional. Sempre esteu disposades a escoltar els meus rotllos de química fent cara d'interessades i sempre animant-me a seguir endavant.

Abans d'acabar m'agradaria donar les gràcies de tot cor a la meva mare i a l'Angel, dos persones molt importants per mi que sempre m'heu donat suport en totes les meves decisions encara que moltes vegades comportessin dificultats. Sense oblidar a la meva tieta i a la Carla, al Sr. Antonio i a la iaia Xelo. També recordar a la família del meu pare, especialment a la iaia Pepita.

No podia tancar aquests agraïments sense mencionar el meu Xavi, no tinc paraules per agrair-te tot el suport que he tingut. En el laboratori de síntesi va ser on ens vàrem conèixer i on els dos hem realitzat la Tesi Doctoral, aquest fet sempre el recordarem amb alegria. Només dir-te que mil gràcies per estar sempre al meu costat. Ets lo millor que m'ha passat a la vida!

Abreviatures

ADN	Àcid desoxiribonucleic
Ar	Aril
ARN	Àcid ribonucleic
CC ₅₀	Concentració citotòxica 50
CCF	Cromatografia de capa fina
CLND1	Claudin1
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
¹³ C RMN	Ressonància magnètica de carboni-13
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DME	1,2-dimetoxietà
DMSO	dimetilsulfòxid
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
Et	Etil
¹ H RMN	Ressonància magnètica nuclear de protó-13
HCVcc	Hepatitis C virus cell culture
HRMS	Espectrometria de masses d'alta resolució
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentració màxima d'inhibició al 50%
IFN- α	Interferó alfa
IPA	2-propanol
IR	Espectroscòpia d'infraroig
IRES	Internal ribosome entry site
<i>J</i>	Constant d'acoblament
M	Molar
Me	Metil
m/z	Relació massa/càrrega
MW	Microones
nM	nanoMolar
NTR	Non translated regions
OBt	Grup benzotriazolil
ORF	Open Reading frame
Peg-ING	Interferó pegilat
Ph	Fenil
RVS	Resposta viral sostinguda
s	Singlet
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
t	Temps
T	Temperatura
T _{amb}	Temperatura ambient
T _{eb}	Temperatura d'ebullició
TEA	Trietilamina
TFA	Àcid trifluoroacètic
VHA	Virus Hepatitis A

VHB	Virus Hepatitis B
VHC	Virus Hepatitis C
1,2-DCE	1,2-dicloroetà
μM	micromolar

SUMARI

En el present treball s'ha desenvolupat una família de 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidines com a inhibidors potencials front el virus de l'Hepatitis C (VHC).

Per accedir a aquests sistemes s'han desenvolupat dues metodologies sintètiques per a l'obtenció de 2-amino-6-*aril*-5,6-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-4,7(3*H*,8*H*)-diones i de 6-*aril*-2-metiltio-5,6-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-4,7(3*H*,8*H*)-diones. Posteriorment, s'ha posat a punt una estratègia sintètica per a la derivatització d'aquests sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics en les posicions C2, C4, C6 i N8 i la deshidrogenació de l'enllaç entre les posicions C5 i C6 del sistema.

Una vegada s'ha desenvolupat satisfactòriament aquesta ruta de síntesi que permet l'obtenció de pirido[2,3-*d*]pirimidines amb fins a quatre punts de diversitat, s'ha emprat per accedir a una quimioteca amplia d'aquests tipus de sistemes dels quals s'ha avaluat l'activitat biològica front el VHC. Els valors EC₅₀ i CC₅₀ determinats han permès modular l'estructura dels compostos a fi de millorar-ne el valor d'activitat i disminuir, a la vegada, la toxicitat dels compostos. Així s'ha obtingut la 2-(*fenilamino*)-6-(4-fluorofenil)pirido[2,3-*d*]pirimidin-4,7(3*H*,8*H*)-diona amb una EC₅₀ = 23 nM i un índex de selectivitat de 393.

SUMARIO

En el presente trabajo se ha desarrollado una familia de 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidinas como inhibidores potenciales frente al virus de la Hepatitis C (VHC).

Para acceder a estos sistemas se han desarrollado dos metodologías sintéticas para la obtención de 2-amino-6-*aril*-5,6-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-4,7(3*H*,8*H*)-dionas y de 6-*aril*-2-metil-5,6-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-4,7(3*H*,8*H*)-dionas. Posteriormente, se ha puesto a punto una estrategia sintética para la derivatización de estos sistemas pirido[2,3-*d*]pirimidínicos en las posiciones C2, C4, C6 y N8 y la deshidrogenación del enlace entre las posiciones C5 y C6 del sistema.

Una vez se ha desarrollado satisfactoriamente esta ruta de síntesis que permite la obtención de pirido[2,3-*d*]pirimidinas con hasta cuatro puntos de diversidad, se ha procedido a acceder a una quimioteca amplia de estos tipos de sistemas los cuales se han evaluado la actividad biológica frente al VHC. Los valores de EC₅₀ y CC₅₀ determinados han permitido modular la estructura de los compuestos con el fin de mejorar el valor de actividad y disminuir, a la vez, la toxicidad de los compuestos. Así se ha obtenido la 2-(*fenilamino*)-6-(4-fluorofenil)pirido[2,3-*d*]pirimidin-4,7(3*H*,8*H*)-diona con una EC₅₀ = 23 nM y un índice de selectividad de 393.

SUMMARY

In the present work a family of 7-oxopyrido[2,3-*d*]pyrimidines has been developed as potential inhibitors against the Hepatitis C Virus (HCV).

To achieve such systems, two synthetic methodologies were developed for the synthesis of 2-amino-6-aryl-5,6-dihydropyrido[2,3-*d*]pyrimidine-4,7(3*H*,8*H*)-diones and 6-aryl-2-(methylthio)-5,6-dihydropyrido[2,3-*d*]pyrimidine-4,7(3*H*,8*H*)-diones. Subsequently, a synthetic strategy was developed to derivatize these pyrido[2,3-*d*]pyrimidines at C2, C4, C6, and N8 positions and carry out the dehydrogenation of the C5-C6 bond.

After the successful development of such synthetic route allowing the preparation of pyrido[2,3-*d*]pyrimidines with up to four diversity centers, a wide library of these compounds was prepared and, subsequently, their biological activity against HCV was evaluated. The EC₅₀ and CC₅₀ values determined have allowed the modulation of the structure of these compounds in order to improve the activity value and lower the toxicity. Thus, the 6-(4-fluorophenyl)-2-(phenylamino)pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-4,7(3*H*,8*H*)-dione was obtained presenting a EC₅₀ = 23 nM and a selectivity index of 393.

ÍNDEX

0.INTRODUCCIÓ	1
0.1. Els virus	3
0.2. Virus de l'Hepatitis C	5
0.2.1. Estructura del virus	6
0.2.2. Estructura del virus	8
0.2.3. Cicle de replicació del virus de l'Hepatitis C	9
0.3. Teràpia antiviral	14
0.3.1. Teràpia antiviral actual	14
0.3.2. Efectes secundaris de la teràpia peg-IFN/RBV	16
0.3.3. Desenvolupament de nous agents antivirals	16
0.3.4. Inhibidors de la polimerasa NS5B	18
0.4. Síntesi de sistemes pirido[2,3- <i>d</i>]pirimidínics en el Grup d'Enginyeria Molecular (GEM)	23
0.4.1. L'estratègia cíclica i la primera estratègia acíclica	23
0.4.2. La segona estratègia acíclica	24
0.4.3. L'estratègia <i>one-pot</i>	24
0.4.4. Síntesi d'halopirido[2,3- <i>d</i>]pirimidines	25
0.4.5. Deshidrogenació de 7-oxopirido[2,3- <i>d</i>]pirimidines	26
0.5. Proposta d'ús de les 7-oxopirido[2,3- <i>d</i>]pirimidines com a substrat per desenvolupar inhibidors del VHC	28
0.6. Objectius	31
0.7. Bibliografia	32
1. RESULTATS I DISCUSSIÓ	37
1.1. Disseny de 7-oxopirido[2,3- <i>d</i>]pirimidines com a inhibidors potencials del VHC	39
1.2. Síntesi de sistemes 2-amino-6-aryl-pirido[2,3- <i>d</i>]pirimidina-7(8 <i>H</i>)-ona 4-substituïts	44
1.2.1. Desenvolupament d'una estratègia sintètica de gran versatilitat per a l'obtenció de 2-amino-6-aryl-5,6-dihidropirido[2,3- <i>d</i>]pirimidin-4,7(3 <i>H</i> ,8 <i>H</i>)-diones	44
1.2.1.1. Síntesi de 2-arylacrilats de metil (1 { <i>x</i> })	50
1.2.1.2. Síntesi de 2-amino-6-aryl-5,6-dihidropirido[2,3- <i>d</i>]pirimidin-4,7(3 <i>H</i> ,8 <i>H</i>)-diones (7 { <i>x</i> })	51
1.2.1.3. Estudi de la reactivitat d'altres acrilats d'alquil en la síntesi de 4-oxopirido[2,3- <i>d</i>]pirimidines	53
1.2.2. Desenvolupament d'una estratègia sintètica per a l'obtenció de sistemes pirido[2,3- <i>d</i>]pirimidínics substituïts en C4	55
1.2.2.1. Síntesi de pirido[2,3- <i>d</i>]pirimidines 4-amino substituïdes (14 { <i>x</i> , <i>y</i> })	57
1.2.2.2. Síntesi de compostos 4-alquiloxi pirido[2,3- <i>d</i>]pirimidínics (15 { <i>x</i> , <i>y</i> })	68

1.2.2.3.	Intents d'obtenció de sistemes pirido[2,3- <i>d</i>]pirimidínics no substituïts en C4 a partir de l'intermedi 4-OBt substituït (18{x})	80
1.2.2.4.	Derivatització en C4 per rendir un compost 4-aminopirido[2,3- <i>d</i>]pirimidínic	85
1.2.3.	Deshidrogenació de sistemes 7-oxopirido[2,3- <i>d</i>]pirimidínics per ser assajats com a inhibidors del VHC	88
1.2.4.	Alquilació en la posició N8 dels sistemes 7-oxopirido[2,3- <i>d</i>]pirimidínics	95
1.3.	Síntesi de sistemes 6-aryl-pirido[2,3- <i>d</i>]pirimidin-7(8 <i>H</i>)-ònics simultàniament substituïts en les posicions C2 i C4	100
1.3.1.	Desenvolupament d'una estratègia sintètica per a l'obtenció de sistemes 6-aryl-2-metiltio-5,6-dihidropirido[2,3- <i>d</i>]pirimidin-4,7(3 <i>H</i> ,8 <i>H</i>)-diones (51{x})	100
1.3.2.	Estudi de la derivatització en C2 dels sistemes 51{x}	108
1.3.3.	Seqüència òptima per a la derivatització de 7-oxopirido[2,3- <i>d</i>]pirimidines en C2, C4, C6, N8 i la deshidrogenació de l'anell piridònic	119
1.4.	Estudi de l'activitat biològica front del virus VHC	122
1.4.1.	Relació dels compostos 7-oxopirido[2,3- <i>d</i>]pirimidínics amb millors activitats antivirals front del virus VHC assajats en el present treball	140
1.5.	Bibliografia	150
2.	EXPERIMENTAL PART	153
2.1.	Instrumentation	155
2.2.	Synthesis of starting material	157
2.2.1.	General procedure for alkyl 2-arylacates	157
2.2.2.	General procedure for alkyl 2-arylacrylates (1{x})	159
2.3.	Synthesis of 4-oxopyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidines	163
2.3.1.	General procedure for 2-amino-5,6-dihydropyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4,7(3 <i>H</i> ,8 <i>H</i>)-diones (7{x})	163
2.3.2.	General procedure for 2-(methylthio)-5,6-dihydropyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidine-4,7(3 <i>H</i> ,8 <i>H</i>)-diones	169
2.4.	Synthesis of C4 substituted pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidines (14{x,y} and 15{x,y})	175
2.4.1.	Synthesis of intermediates for 4-substituted pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidines (18{x})	175
2.4.2.	General procedure for C4 alkoxy substituted 6-aryl-3,4,5,6-tetrahydropyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-7(8 <i>H</i>)-one (15{x,y})	178
2.4.3.	General procedure for C4 amino substituted 6-aryl-3,4,5,6-tetrahydropyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-7(8 <i>H</i>)-one (14{x,y})	181
2.4.4.	2,4-diamino-6-(4-fluorophenyl)-5,6-dihydropyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-7(8 <i>H</i>)-one (6{7})	186
2.5.	Synthesis of C2 substituted pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidines	187
2.5.1.	General procedure for oxidation of 2-(methylthio)-5,6-dihydropyridi[2,3- <i>d</i>]pyrimidine-4,7(3 <i>H</i> ,8 <i>H</i>)-diones	187
2.5.2.	General procedure for synthesis of 2-(arylamino)-5,6-dihydropyridi[2,3- <i>d</i>]pyrimidine-4,7(3 <i>H</i> ,8 <i>H</i>)-diones	190

2.5.3	General procedure for synthesis of 2-(benzylamino)-5,6-dihydropyridi[2,3- <i>d</i>]pyrimidine-4,7(3 <i>H</i> ,8 <i>H</i>)-diones	194
2.5.4	6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(2-hydroxyethoxy)-5,6-dihydropyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidine-4,7(3 <i>H</i> ,8 <i>H</i>)-dione (7{3,7})	196
2.5.5	6-(4-fluorophenyl)-2-hydroxy-5,6-dihydropyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidine-4,7(3 <i>H</i> ,8 <i>H</i>)-dione (56)	197
2.5.6	6-(4-fluorophenyl)-2-phenoxy-5,6-dihydropyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidine-4,7(3 <i>H</i> ,8 <i>H</i>)-dione (53{7,5})	197
2.6.	Pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidines substituted in C2 and C4 position	199
2.7.	General procedure for aromatization of pyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidines	201
2.8.	General procedure for derivatization in N8 of pyridp[2,3- <i>d</i>]pyrimidines	210
2.9.	Bibliography	215
3.CONCLUSIONS		219
4.ANNEX		221

INTRODUCCIÓ

0.INTRODUCCIÓ

0.1. Els virus

Els virus són una entitat infecciosa microscòpica que infecten qualsevol tipus d'hoste cel·lular amb la finalitat de replicar-se emprant els mecanismes cel·lulars d'aquest. Els virus tenen la capacitat d'infectar tot tipus d'organismes, des d'organismes tant complexes com animals fins a plantes i bacteris, aquests han resultat ser els causants de malalties de gran repercussió social i econòmica al llarg de l'història, sent la SIDA un exemple recent d'una malaltia que pot ocasionar danys greus a la població a nivell mundial. Cap organisme queda fóra de l'abast d'aquests agents infecciosos, i la seva virulència presenta un ampli rang de simptomatologia.

L'any 1892 el biòleg rus Dmitri Ivanovski estava investigant sobre una malaltia que afectava a les plantes del tabac, i va atribuir el causant d'aquesta malaltia a un agent infeccios minúscul, associat a les bacteris o a les toxines. Més tard, a l'any 1898, un microbiòleg holandès anomenat Martinus Beijerinck va repetir els experiments realitzats per Ivanovski i va quedar convençut de que es tractava d'una nova forma d'agent infeccios. Més endavant, es va descartar la hipòtesis dels bacteris, ja que els bacteris es difonien en un gel d'Agar, i aquest agent infeccios era soluble en el medi (els bacteris no ho són). Per altra banda, es va refusar la idea que es podia tractar d'una toxina, ja que aquest agent es replicava dins la cèl·lula i tenia la capacitat d'infectar les unes a les altres. L'agent en qüestió es va anomenar com a virus del mosaic del tabac, TMV (*Tobacco Mosaic Virus*), sent aquest el primer virus descobert.

Els virus es poden classificar de diverses maneres donant-los nom i agrupant-los segons les seves semblances o bé ordenant-los segons la classificació de Baltimore. Es tracta, d'una de les classificacions més utilitzades, presentada per primera vegada l'any 1971. Aquesta és una classificació senzilla i àmpliament acceptada i en ella es categoritzen set grans grups segons el tipus d'àcid nucleic present en el seu genoma i els seus intermedis de replicació. Els virus han de generar ARN missatger per a poder sintetitzar les proteïnes i replicar-se, però per fer-ho, cada família de virus utilitza mecanismes diferents. El genoma del virus pot ser monocatenari, bicatenari, d'ARN o ADN, i poden utilitzar o no la transcriptasa inversa. A més, els virus d'ARN poden ser positius o bé negatius (Taula 0.1.1).

Taula 0.1.1: Classificació dels virus

Grup	Descripció	Exemple
I	Virus d'ADN bicatenari (ADNcd)	Adenovirus, herpes, verola
II	Virus d'ADN monocatenari (ADNcs)	Paràsits de plantes i insectes, bacteriòfags
III	Virus d'ARN bicatenari (ARNcd)	Retrovirus, virus de la llengua blava
IV	Virus d'ARN monocatenari de polaritat positiva ((+)ARNcs)	Hepatitis C, febre aftosa, coronavirus
V	Virus d'ARN monocatenari de polaritat negativa ((-)ARNcs)	Galteres, xarampió, èbola
VI	Virus d'ARN monocatenari retrotranscrit amb intermedi de replicació de ADN (ARNcs-RT)	VIH
VII	Virus d'ARN bicatenari retrotranscrit amb intermedi de replicació d'ARN (ADNcd-RT)	Hepatitis B

Degut al gran ventall de virus, ens centrarem en els virus d'ARN, ja que és en aquest grup on es troba classificat el virus de l'Hepatitis C que és l'objecte d'aquesta tesi.

Diferents estudis comparatius de la seva estructura, organització genètica i tipus de replicació, mostren que els virus d'ARN utilitzen estratègies molt dispars per assegurar-se la seva replicació en les cèl·lules i establir-se com a partícules lliures. Aparentment, la gran variabilitat genètica dels virus d'ARN pot ser la base de l'emersió de noves malalties, o bé la ineficiència d'algunes vacunes o tractaments antivirals. Hi ha una sèrie de factors que poden contribuir a la seva elevada variabilitat, com és el cas de les grans poblacions, temps de generació curts i elevades taxes de replicació.

Els virus d'ARN utilitzen àcid ribonucleic com a material genètic o bé el necessiten en el seu procés de replicació. Aquests infecten les cèl·lules de l'hoste mitjançant la seva adhesió al receptor de l'hoste. Una vegada el virus s'ha trobat amb l'hoste, el virus pot induir canvis en la proteïna de l'embolcall víric donant lloc a la fusió de les membranes víriques i cel·lulars, i finalment roman dins el citoplasma de l'hoste on té lloc la replicació del virus.

0.2. Virus de l'Hepatitis C

Es coneixen cinc tipus de virus responsables de l'hepatitis vírica en humans. S'anomenen de la A a la E i, a part de localitzar-se en el fetge i causar la malaltia a l'hoste, aquests virus tenen ben poc en comú i menys si ens centrem en la caracterització molecular dels seus genomes. D'entre els virus d'interès en patologia humana, el virus de l'Hepatitis C és un dels virus amb un major grau de diversitat genètica que s'han estudiat fins al moment.

El virus de la Hepatitis C (VHC) presenta un problema de salut d'abast internacional al haver infectat al voltant de 200 milions de persones al món. La infecció per VHC usualment és conseqüència de^[1] (Figura 0.2.1):

- Ús de drogues intravenoses. Aquesta és una ruta d'infecció bastant comú entre els drogoaddictes que comparteixen xeringues. La majoria (del 50 al 90%) dels pacients usuaris de drogues intravenoses infectats per VIH també estan infectats per VHC.
- Transfusions sanguínies o transplantsaments de teixits. Des de la introducció de les analítiques de rastreig viral, la incidència de les infeccions associades a transfusió han disminuït.
- Exposició laboral a sang i altres fluids. Aquesta via d'infecció és més ineficient, presentant una incidència d'infecció d'un 1,8% després d'haver-se punxat amb una agulla contaminada d'un pacient VHC-positiu.
- Transmissió per inoculació.
- Mare infectada amb el VHC en el moment del part. Casi el 6% dels nadons nascuts de mares amb el VHC s'infecten i aquest fet augmenta si la mare també està infectada amb el VIH.
- Relacions sexuals amb una persona infectada. El risc augmenta amb la promiscuïtat però la transmissió és baixa. La transmissió d'home a dona és més fàcil que d'home a home.

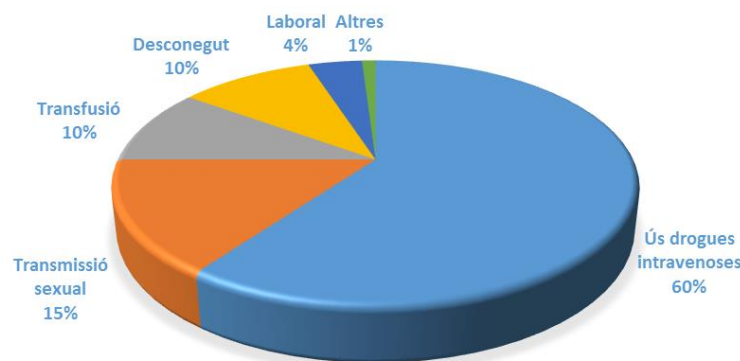


Figura 0.2.1: Fonts d'infecció en gent infectada amb VHC

Desgraciadament les infeccions per VHC es converteixen en malalties cròniques en el 70% dels infectats. Les conseqüències a llarg termini de la replicació d'aquest virus en els hepatòcits provoca progressivament insuficiència hepàtica, aquesta pot donar lloc a cirrosi i sovint desencadena amb carcinoma hepatocel·lular.

0.2.1. Variabilitat genètica del virus

El VHC, com a membre de la comunitat dels virus d'ARN, presenta una gran variabilitat, representada pels diferents genotips i subtipus que circulen pel planeta, i en un subnivell més profund per les quasiespècies que conviuen dins un pacient infectat. Les diferents variants del VHC es presenten en un sistema d'organització basat en genotips (designats amb números, del 1 al 6) i les variants d'aquests genotips es refereixen com a subtipus (designats amb lletres, des de la "a" fins la "k") (Figura 0.2.2). Existeix una subdivisió més profunda en la que podem parlar de quasiespècies, ja que el VHC es dissemina per l'hoste en forma de milions de genomes diferents però altament relacionats entre si. En el VHC hi han reconeguts 6 genotips i més d'un centenar de subtipus diferents^[2]. Les variants de diferents genotips es diferencien des d'un 30% fins a un 50% en la seva seqüència de nucleòtids, mentre que dins dels subtipus les diferències entre les seqüències de nucleòtids són del 10 al 30% i entre quasiespècies del 5 al 10%^[3].

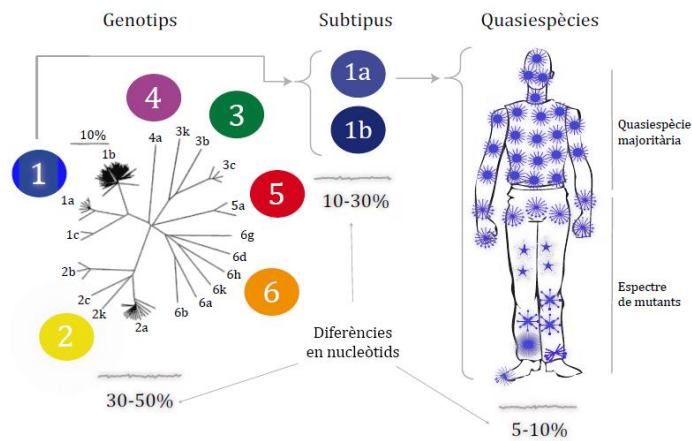


Figura 0.2.2: Variabilitat del VHC

Els genotips i els subtipus del VHC estan distribuïts de manera desigual en diferents parts del planeta, així certs genotips predominen en certes àrees. Els genotips 1, 2 i 3 estan extensament distribuïts arreu del món, mentre que el 4, 5 i 6 es troben en elevada proporció només en determinades zones del planeta. Els genotips 1 i 2 representen els genotips dominants en Nord Amèrica i Europa. El genotip 1 predomina en aquestes àrees, especialment els subtipus 1a i 1b, respecte al genotip 2 i altres subtipus del genotip 1 es presenten en menor proporció. El genotip 3 és el més freqüent en el Sud-est asiàtic, la Índia i Austràlia. El genotip 4 es troba restringit entre l'Àfrica central i del nord. El genotip 5 és el dominant a la zona de Sud Àfrica. Finalment, el genotip 6 es troba majoritàriament a l'Àsia (Figura 0.2.3).

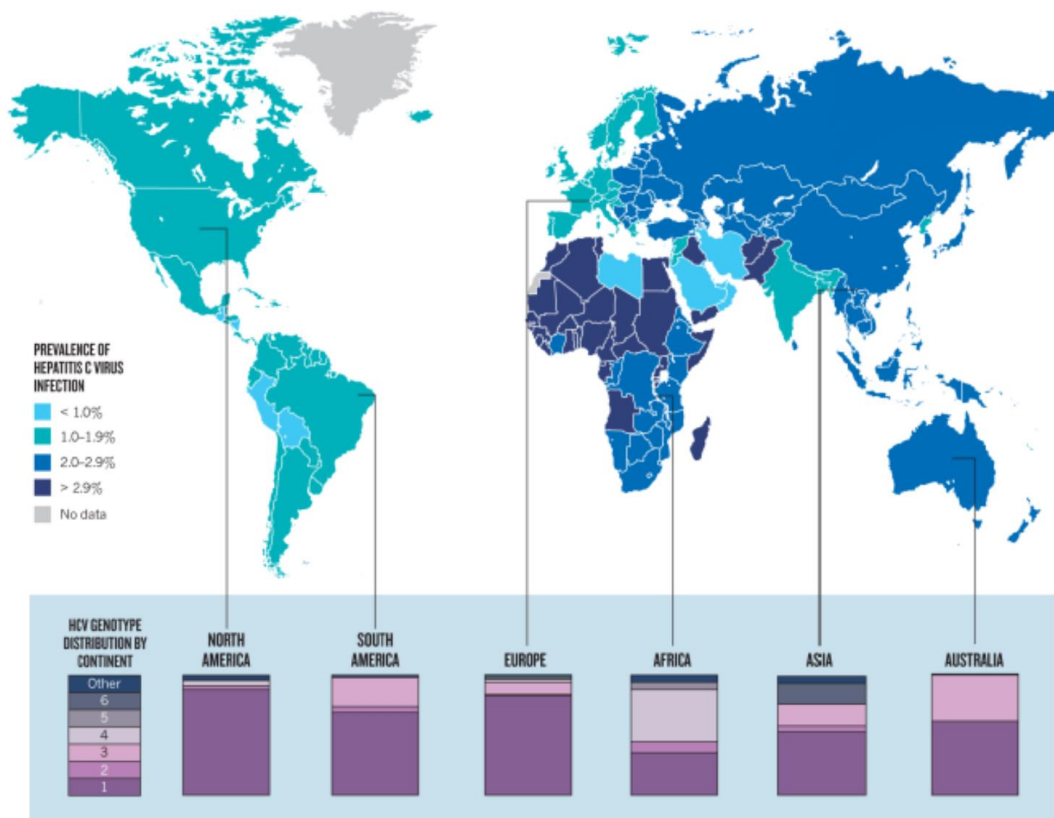


Figura 0.2.3: Distribució geogràfica dels genotips de VHC^[4]

Un dels principals objectius dels estudis clínics, ha estat relacionar els diferents genotips del VHC amb la resposta als diferents tractaments contra la infecció per VHC. Els genotips 1 i 4 han estat relacionats sempre amb respostes més discretes als tractaments utilitzats, que no pas els genotips 2 i 3, tant en monoinfectats com en coinfectats (VIH-1 i VHC). Només un 40-50% dels pacients infectats amb VHC amb el genotip 1 o 4 arriben a obtenir una resposta viral sostinguda (RVS), és a dir, l'ARN del virus és indetectable en sang 6 mesos després d'haver finalitzat el tractament. Per altra banda, el 80% dels pacients infectats amb els genotips 2 i 3, obtenen la RVS^[5]. Respecte als genotips 5 i 6, els quals no són predominants ni als Estats Units ni Europa, no s'ha estudiat a fons la relació entre aquests genotips i la resposta al tractament contra la infecció. Tot i això, existeixen alguns estudis que apunten que els genotips 5 i 6, tindrien més bon pronòstic de resposta que els genotips 1 o 4, però no arribarien als índex de RVS aconseguits pels genotips 2 i 3^[6-7].

Degut a la varietat del virus, s'observen respostes diferents en funció del seu genotip quan aquests són tractats amb teràpia combinada. La rellevància de les infeccions amb el genotip 1 arreu del món i l'existència de limitacions per l'estudi de la replicació dels diferents genotips del virus VHC al laboratori, han centrat l'estudi d'inhibidors front el virus amb el genotip 1. L'eficàcia d'aquestes drogues en altres genotips està poc explorada.

0.2.2. Estructura del virus

El VHC es troba dins de la família *Flaviviridae* sent un virus d'ARN monocatenari de polaritat positiva i és l'únic membre del gènere *Hepacivirus*. Presenta una semblança amb altres virus d'aquesta família pel que fa a la seqüència i a l'organització del genoma, el mode de replicació, estructura i el processat de la poliproteïna. La família *Flaviviridae* conté a més a més els gèneres *Flavivirus* i *Pestivirus*. És important remarcar que, tot i ser l'únic membre del gènere *Hepacivirus*, s'ha vist que presenta una gran diversitat genètica.

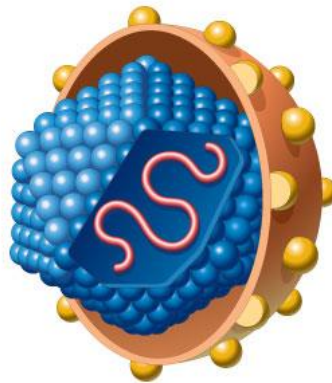


Figura 0.2.4: Estructura dels virus de VHC

El virus de VHC és una partícula viral d'aproximadament 50 nm de diàmetre^[8], composta per una nucleocàpsida icosaèdrica, que envolta el genoma, confinada en un embolcall derivat de la membrana d'una cèl·lula hoste (Figura 0.2.4). El genoma del VHC és una cadena senzilla d'ARN lineal de polaritat positiva, d'aproximadament de 9,6 quilobases, formada per dues zones no codificants, 5' i 3' ("*non-translated regions*", NTRs), altament estructurades, essencials per a la replicació i la maduració de l'ARN, separades per un llarga zona genètica amb marc de lectura obert ("*open reading frame*", ORF), que codifica per una poliproteïna precursora de quasi bé 3000 aminoàcids^[6]. Aquesta poliproteïna conté les proteïnes funcionals del virus, en el seu extrem N-terminal presenta les proteïnes estructurals: core (C), embolcall 1 i 2 (E1 i E2) que formen l'estructura del virus; i en el seu extrem C-terminal les proteïnes no estructurals (NS): NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B, encarregades del cicle biològic del virus (Figura 0.2.5). Les proteïnes estructurals estan separades de les proteïnes no estructurals per un pèptid de membrana anomenat p7, que es creu que podria ser una viroporina, és a dir, una proteïna hidrofòbica que actua de canal iònic^[9].

El genoma del virus posseeix una regió interna d'entrada ribosomal ("*internal ribosome entry site*", IRES), que permet l'ingrés del genoma viral al ribosoma cel·lular, talment com si es tractés d'ARN missatger propi de l'hoste. Un cop la poliproteïna és traduïda, es processa proteolíticament per proteases de l'hoste i per proteases virals, per alliberar-ne les diferents proteïnes del virus. El primer tall el realitzen peptidases cel·lulars de l'hoste donant lloc a les proteïnes de la capsida: la proteïna del core; les proteïnes de l'embolcall E1 i E2 i el pèptid p7. Mentre que les proteïnes no estructurals són processades per proteases virals^[10]. El tall entre NS2 i NS3 es du a terme per una proteïnasa NS2-NS3 de manera autocatalítica. Tot seguit, la serina-proteasa NS3 causa un tall entre NS3 i NS4A, NS4A i NS4B, NS4B i NS5A, NS5A i NS5B. El

tall que es dona entre NS4B i NS5A és lent, per aquest motiu s'acostuma a trobar el complex NS4B/NS5A (Figura 0.2.5).

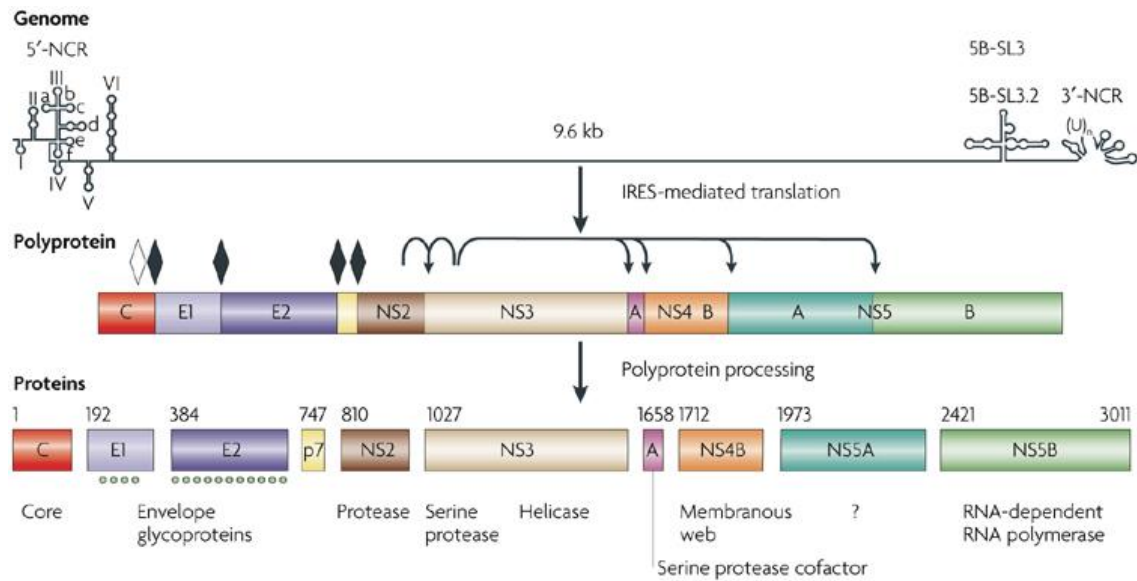


Figura 0.2.5: Processament de la Estructura i funció de les proteïnes de VHC^[11]. Rombes denoten els llocs d'escissió del precursor de la poliproteïna al reticle endoplasmàtic. Els punts en E1 i E2 indiquen la glicosilació de les proteïnes de l'embolcall

0.2.3. Cicle de replicació del virus de l'Hepatitis C

El virus del VHC, després de la seva entrada en l'organisme i d'evadir el sistema immune i adaptatiu, converteix els hepatòcits en el seu nínxol de replicació. El cicle biològic del VHC consta de 4 etapes: entrada del virus a la cèl·lula, replicació del genoma, assemblatge de les proteïnes i sortida de virions al exterior (Figura 0.2.6).

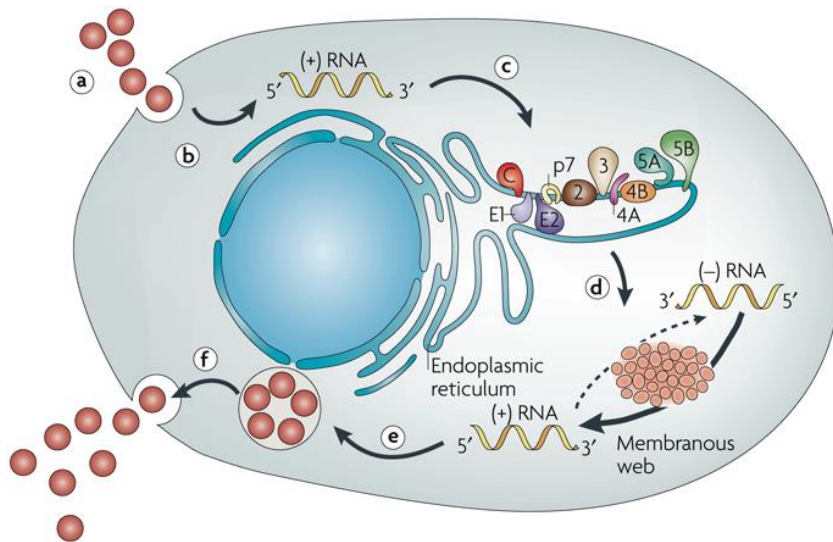


Figura 0.2.6: Ciclo de replicació del virus VHC^[11]. (a) internalització del virus; (b) alliberament al citoplasma, (c) traducció i processament de la poliproteïna (d) replicació de l'ARN; (e) assemblatge; (f) maduració del virió i alliberament

Etapa de reconeixement i entrada

El cicle de replicació del VHC s'inicia amb la infecció d'aquest en el sèrum, el primer pas és el reconeixement de la cèl·lula que serà infectada. En la primera etapa d'aquest procés es creu que els heterodímers E1-E2^[12] són les proteïnes virals implicades en l'enllaç amb els receptors cel·lulars, anomenats *Cluster of Differentiation 81* (CD81) i el receptor Scavenger de classe B i tipus I (SR-BI)^[13-14] que faciliten l'entrada del virus a la cèl·lula hoste. La proteïna de transmembrana CD81 es creu que és un receptor d'unió del VHC als hepatòcits, la qual presenta una baixa capacitat per internalitzar el virus dins la cèl·lula. Molts estudis han encaminat els seus esforços en esbrinar quina és la zona d'interacció més transcendental de la E2 amb aquests receptors per tal de dissenyar inhibidors d'entrada. Alguns estudis apunten que la proteïna viral E1 podria estar involucrada en el procés de fusió del virus a la cèl·lula^[15-16]. A part dels receptors CD81 i SR-BI, s'han trobat altres proteïnes de membrana com ara el receptor de lipoproteïnes de baixa densitat (LDL-R) i els compostos d'unió cel·lular Claudin-1 (CLND1)^[17] i Occludin^[18], els quals podrien actuar de coreceptors d'entrada. El compost d'unió CLND1 està altament expressat en el fetge i actua al final del procés d'entrada del virus. També es creu que el virus podria entrar a la cèl·lula per via endocitosis de manera dependent de clatrines^[19].

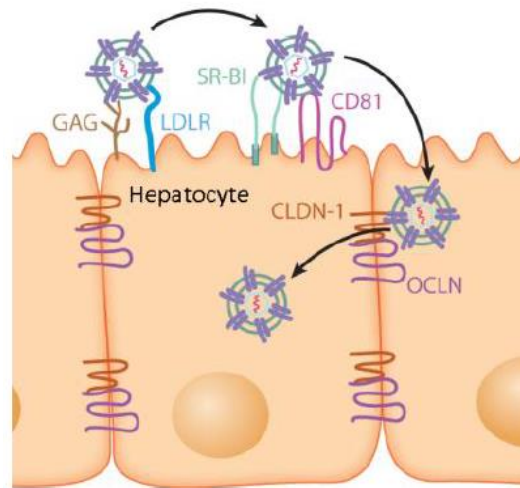


Figura 0.2.7: Reconeixement i entrada del VHC a les cèl·lules hepàtiques^[20]

A la figura 0.2.7 s'observa que les glicoproteïnes E1-E2 del VHC s'uneixen inicialment als glicosaminoglicans (GAGs) i a les LDL-R presents a la superfície dels hepatòcits. Després d'aquesta unió, el virus interacciona amb el receptor SR-BI i la proteïna CD81 a la superfície de la cèl·lula amb la finalitat de passar a través de les juntes estretes formades per CLDN1 i Occludin i entrar d'aquesta manera dins la cèl·lula.

Etapa de traducció, processament de la poliproteïna i replicació

Una vegada el genoma viral es troba dins del citoplasma cel·lular, s'allibera el genoma víric i, en aquest moment, la cèl·lula infectada el reconeix com si fos ARN missatger propi i, per tant, és portat fins al reticle endoplasmàtic (RE) on les proteïnes virals seran sintetitzades. Aquestes restaran associades a la membrana del RE durant el procés de formació del complex replicatiu (CR), compost per proteïnes virals, ARN motlle i factors proteïnics de l'hoste^[21-22] (Figura 0.2.8).

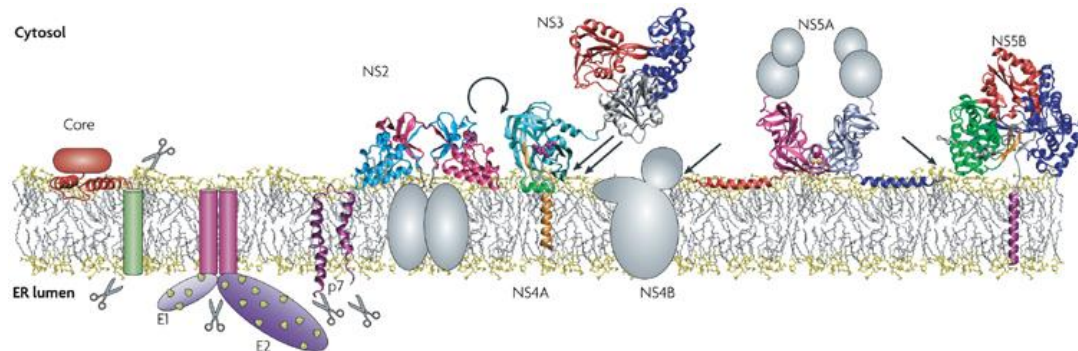


Figura 0.2.8: Topologia de les proteïnes madures de VHC^[11]

El CR es fixa a la membrana del RE i aquí és on s'inicia la replicació del genoma viral dut a terme per la polimerasa dependent (RdRd), la NS5B. La polimerasa s'enganxa a l'extrem 3' del genoma viral d'ARN de polaritat positiva (ARN+), gràcies a les proteïnes NS3/4A i NS5A i factors cel·lulars, generant el genoma d'ARN de cadena negativa (ARN-)^[23]. Aquestes dues cadenes d'ARN de signes contraris serviran de motlle per la polimerasa NS5B a fi de generar múltiples còpies del genoma viral^[24; 11]. Els nous genomes produïts serviran per seguir replicant-se, per ser transcrits o bé per ser empaquetats per proteïnes virals per produir nous virus. La polimerasa NS5B genera repliques que poden ser asimètriques i semiconservatives, produint gran nombre de genomes diferents, però a la vegada altament relacionats entre si^[25].

Etapa d'assemblatge viral i alliberament

El procés d'assemblatge del virus constitueix el procés d'empaquetament dels genomes sintetitzats i l'alliberament dels nous virions. Es tracta doncs de les últimes etapes del cicle biològic del virus. El desenvolupament de sistemes de replicació del VHC generats en cultiu (*HCV cell culture System*, VHCcc), ha permès conèixer més a fons el cicle repliació del virus^[26-27]. Val a dir, que els sistemes VHCcc presenten certes limitacions a l'hora de generar nous virions capaços d'infectar a altres cèl·lules.

Si ens fixem en la figura 0.2.9, aquesta última etapa del cicle biològic del virus té lloc prop dels orgànuls cel·lulars anomenats cossos lipídics (LDs), on gran quantitat de proteïnes del core de la proteïna s'acumulen. Aquests orgànuls presenten una monocapa fosfolipídica a l'exterior derivada de les membranes de RE, i estan involucrades en la mobilitat i l'emmagatzematge^[28]. Normalment els LDs es troben localitzats molt propers al RE i degut a aquesta proximitat es suggereix que els LDs poden facilitar la concentració de les proteïnes del core i altres components virals que indueixen a l'assemblatge viral^[29]. El procés d'assemblatge del core té lloc a la superfície de els LDs en petites vesícules de transport, que es dirigiran cap al RE^[30]. Nous virions es dirigeixen cap al lumen del RE, on resideixen les glicoproteïnes E1-E2 i les LDL-R, per seguir amb el procés d'assemblatge^[31]. Es creu que la formació de la càpsida està íntimament lligada amb la síntesi de les LDL-R, fet que explica la composició de les partícules de VHC i la producció de lipoproteïnes per sortir de la cèl·lula^[32].

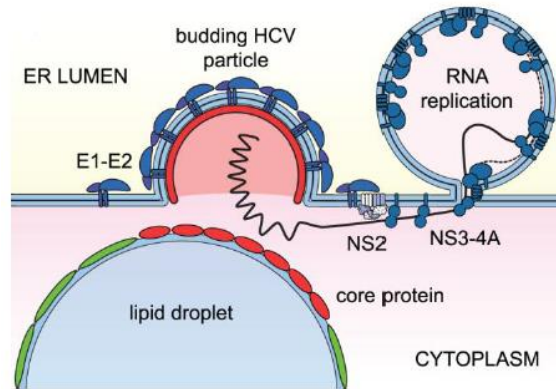


Figura 0.2.9: Etapa d'assemblatge del VHC^[30]

0.3. Teràpia antiviral

0.3.1. Teràpia antiviral actual

El tractament actual per a la infecció del VHC es basa en una teràpia combinada, en la que es tracta al pacient amb Interferó pegilat i Ribavirina. Aquest tractament aconsegueix curar al voltant del 50% dels casos de pacients infectats pel virus VHC amb el genotip 1, que és la forma més comú d'aquest. A continuació, es procedeix a comentar les característiques principals de cada un dels fàrmacs per si sols i la necessitat de l'ús d'una teràpia combinada.

Interferó

En els anys 80, els pacients amb aquesta patologia es tractaven amb l'Interferó alfa (IFN- α), ja que s'havia observat que aquesta proteïna estava implicada en la resposta cel·lular i que administrada en aquest tipus de pacients, normalitzava els nivells de transaminases en sang (indicadors per detectar possibles patologies del fetge)^[33]. No obstant, estudis per avaluar l'eficàcia del tractament de IFN- α per curar la Hepatitis no A no B, van mostrar que en el 50% dels pacients que s'havien tractat amb IFN alfa-2b, els nivells de transaminases baixaven fins al rang de la normalitat però després de deixar el tractament el 50% dels pacients tornaven a presentar els nivells de transaminases previs al tractament^[34-35]. Així doncs, l'IFN per si sol no aconseguia els resultats esperats. No va ser fins el 1998 que es va pensar en combinar-lo amb un anàleg de nucleòsid, la Ribavirina, conegut per la seva gran activitat contra un ampli espectre de virus d'ADN i d'ARN.

Interferó més Ribavirina

L'administració de Ribavirina (RBV) (Figura 0.3.1) en monoteràpia va demostrar tenir poc efecte antiviral^[36], però amb combinació d'IFN durant 6 mesos s'aconseguien elevats nivells de resposta virològica sostinguda (RVS). A principi dels 90, un estudi va demostrar que l'eficàcia d'IFN més RBV era de dues a tres vegades més gran que l'IFN en monoteràpia^[37], però no eren suficients, calia ampliar-los. Estudiant la dinàmica de la resposta viral del VHC amb IFN es va observar que, a 24 hores després d'haver rebut una única injecció d'IFN alfa-2b, la carrega viral del VHC en sang del pacient baixava substancialment, però 48 hores després de la injecció, la càrrega viral es començava a recuperar^[38]. Aquest fet, va fer pensar en la necessitat d'allargar el temps de vida mitjà del medicament. Així, l'any 2001 es va introduir l'IFN pegilat (peg-IFN) en la teràpia contra el VHC. Aquest, es caracteritza per presentar un grup polietilenglicol que protegeix al compost de la degradació proteolítica augmentant així la vida del compost.

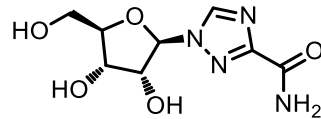


Figura 0.3.1: Estructura Ribavirina

Interferó Pegilat amb i sense Ribavirina

La pegilació de la molècula d'interferó no només augmentava la biodisponibilitat en sang del fàrmac sinó que també disminuïa la necessitat d'injectar la medicació al pacient tres vegades a la setmana en tan sols una vegada, la qual cosa també millorava la qualitat de vida d'aquest (Figura 0.3.2).

Estudis de pacients amb infecció crònica pel VHC que havien rebut tractaments amb peg-IFN alfa-2a i alfa-2b van senyalar la seva superioritat respecte als tractaments convencionals amb IFN alfa^[39-41]. La RVS es va aconseguir en el 25 i 39% dels pacients que van ser tractats amb l'interferó pegilat en monoteràpia, en comparació en només del 7 al 19% dels que van rebre IFN estàndard. De la mateixa manera, estudis amb peg-IFN amb Ribavirina van mostrar uns índex de RVS molt més elevats, d'entre el 48 i el 56%, comparats amb els valors obtinguts amb pacients que havien rebut la combinació però sense IFN pegilat, que van ser del 29 al 47%^[42]. Així el tractament estàndard que es recomana seguir avui en dia, contra la infecció pel VHC, és una injecció subcutània setmanal d'interferó pegilat (peg-IFN) més una dosi diària de RBV durant 48 setmanes o 24 setmanes segons el genotip del VHC amb el que el pacient està infectat. En el cas d'estar infectat amb el genotip 1 o 4 es recomana el tractament de 48 setmanes, i de 24 setmanes quan s'està infectat amb el genotip 2 o 3^[43]. No obstant, els bons índex de RVS que s'han aconseguit amb aquesta teràpia pegilada i de combinació, encara són resultats modestos, sobretot en pacients que es troben coinfectats amb el VIH i el VHC i a la vegada segueix provocant molts efectes secundaris.

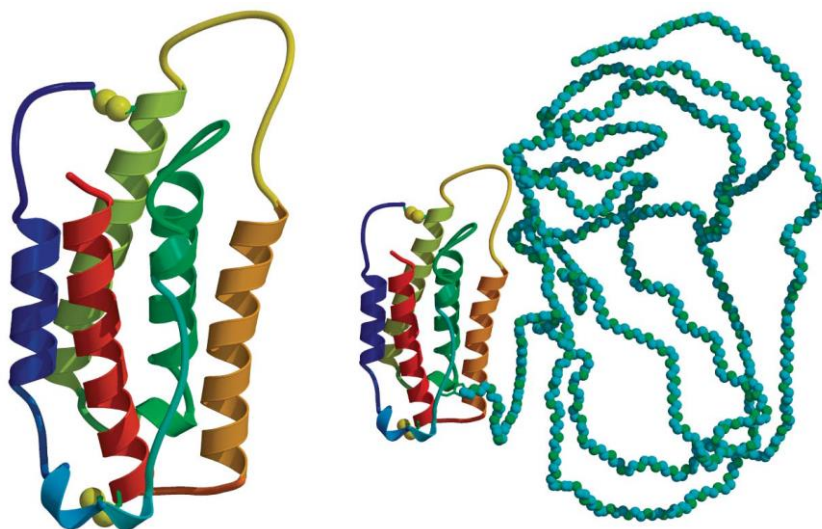


Figura 0.3.2: (A) Interferó alfa-2b. (B) PEG interferó alfa-2b^[44]

0.3.2. Efectes secundaris de la teràpia peg-IFN/RBV

La teràpia peg-IFN/RBV provoca efectes secundaris que poden arribar a reduir l'adherència al tractament, a modificar la dosi dels fàrmacs, fent disminuir la resposta al tractament. Tant l'IFN com la RBV, produeixen efectes secundaris greus que s'han de tenir en compte per tal de garantir una millor qualitat de vida en el pacient i una més elevada probabilitat de curació del mateix. S'ha observat que els efectes secundaris són els culpables en el 10-20% dels abandonaments de la teràpia i el 20-30% dels motius per modificar la dosi del tractament.

Els efectes secundaris relacionats amb l'IFN poden aparèixer com símptomes gripals, hipofunció de la medul·la òssia, trastorns neuropsiquiàtrics i síndromes autoimmunitaris. En el cas de la Ribavirina, el principal problema és que provoca anèmia hemolítica^[45].

Algunes d'aquestes malalties/símptomes poden ser tractades amb medicació estàndard, però en molts casos compliquen més la situació clínica del pacient, que ja és de per si complicada i perillosa. Per tant és necessari, millorar la teràpia existent, explorar nous fàrmacs o bé buscar factors predictius de resposta al tractament per tal d'evitar un mal major a pacients que prèviament se sap, amb una elevada probabilitat, que no arribaran a una resposta viral sostinguda amb el tractament estàndard.

0.3.3. Desenvolupament de nous agents antivirals

L'elevada taxa de replicació i mutació del VHC provoca la ràpida generació de soques resistents a fàrmacs, fent necessari una teràpia amb varis fàrmacs i dirigida a varies dianes. Tal i com s'ha comentat a l'apartat anterior, la teràpia antiviral actual es basa en la combinació de diferents fàrmacs, provocant indesitjables efectes secundaris i una baixa eficàcia en el tractament. És per això, que és imprescindible el desenvolupament de teràpies noves i més efectives.

Des de fa temps, es creu que els factors genètics de l'hoste són determinants pel control de la infecció del VHC. Per això, hi ha un gran interès en l'estudi dels receptors cel·lulars que controlen l'entrada, la replicació i la formació del virus, també en el seu camí intracel·lular involucrat en la biosíntesis de lípids i la seva resposta immunològica. Recentment, hi han hagut avenços en la comprensió del cicle de replicació del virus, fet que ha permès identificar nombroses possibles dianes terapèutiques per combatre aquesta malaltia^[46]. A la següent taula 0.3.1, es mostren nous agents antivirals classificats en relació a la diana en la que actuen, els quals es troben en diferents fases clíniques^[47-48]:

Taula 0.3.1: Nous agents antiviral en fases clíniques

Fàrmac	Empresa	Diana/Centre actiu	Fase
Inhibidors de NS3/4A			
Telaprevir (VX-950)	Vertex	Centre actiu/lineal	IV
Boceprevir (SCH503034)	Merck	Centre actiu/lineal	IV
Simeprevir (TMC435)	Janssen/Medivir	Centre actiu/macrocíclic	III
Danoprevir (R7227)	Roche/InterMune	Centre actiu/macrocíclic	III
Vaniprevir (MK-7009)	Merck	Centre actiu/macrocíclic	III

Fàrmac	Empresa	Diana/Centre actiu	Fase
MK-5172	Merck	Centre actiu/macrocíclic	II
Faldaprevir (BI201335)	Boehringer Ingelheim	Centre actiu/lineal	III
Asunaprevir (BMS-650032)	Bristol-Myers Squibb	Centre actiu	II
GS-9256	Gilead	Centre actiu	II
GS-9451	Gilead	Centre actiu	II
ABT-450	Abbott	Centre actiu	III
IDX320	Indenix	Centre actiu	II
ACH-1625	Achillion	Centre actiu	II
Inhibidors de NS5B, anàlegs de nucleòsids (NI)			
Mericitabine (R7128)	Roche/Pharmasset	Centre actiu	III
Sofosbuvir (GS-7977)	Gilead	Centre actiu	III
ALS-220	Alios/Vertex	Centre actiu	II
Inhibidors de NS5B, anàlegs de no nucleòsids (NNI)			
BI207127	Boehringer Ingelheim	NNI site I	II
BMS-791325	Bristol-Myers Squibb	NNI site I	II
TMC647055	Janssen	NNI site I	I
Filibuvir (PF-00868554)	Pfizer	NNI site II	II
VX-222	Vertex	NNI site II	II
GS-9669	Gilead	NNI site III	II
ABT-333	Abbott	NNI site III	II
Tegobuvir	Gilead	NNI site IV	II
Setrobuvir (ANA598)	Anadys	NNI site IV?	II
Inhibidors de NS5A			
Daclatasvir (BMS-790052)	Bristol-Myers Squibb	Domini 1 de NS5A	III
BMS-824393	Bristol-Myers Squibb	Proteïna NS5A	I
PPI-461	Presidio	Proteïna NS5A	I
GS-5885	Gilead	Proteïna NS5A	II
ABT-267	Abbott	Proteïna NS5A	II
ACH-2928	Achillion	Proteïna NS5A	I
MK-8742	Merck	Proteïna NS5A	I
Host targeting agents			
SCY-635	Scynexis	Inhibidor cyclophilin	II
Miravirsen	Santaris	miARN122 antisense ARN	II

Cal remarcar que la primera generació de fàrmacs contra el VHC actuaven front la diana NS3. A la següent taula, es pot observar com la primera generació de fàrmacs eren força eficaços però, per contra, presentaven una barrera de resistència i una cobertura genotípica baixa (Taula 0.3.2). Aquests fets van crear la necessitat de desenvolupar una segona generació de fàrmacs, els qual han millorat alguns aspectes, però encara existeix la necessitat de trobar nous fàrmacs que cobreixin els altres requeriments de manera satisfactòria.

Taula 0.3.2: Perfil de cobertura de fàrmacs en relació a la seva diana

	NS3*	NS3#	NS5A	NS5B Nucl	NS5B non Nucl
Perfil de resistència	●	●	●	●	●
Activitat genotípica	●	●	●	●	●
Eficàcia	●	●	●	●	●

● Bon perfil
 ● Perfil promig
 ● Perfil menys favorable

* Primera generació # Segona generació

Per altra banda, els nous agents antivirals que actuen front la polimerasa NS5B són candidats òptims per a ser bons fàrmacs, ja que els de tipus nucleòsid presenten un bon perfil front a la barrera de resistència, la cobertura genotípica i l'eficàcia. El fet de presentar una bona cobertura genotípica ens permetria usar el mateix fàrmac pel tractament dels diversos genotips del VHC facilitant, d'aquesta manera, la generalització del tractament.

0.3.4. Inhibidors de la polimerasa NS5B

La polimerasa NS5B és una de les dianes del virus de VHC més interessants, ja que presenta una regió altament conservada en el seu genoma respecte als diferents genotips que presenta el VHC. Actualment, existeixen dos tipus d'inhibidors de la polimerasa NS5B: els nucleòsids i els no nucleòsids^[47-48]. Els inhibidors del tipus nucleòsid (NIs), imiten el lloc d'unió del substrat a la polimerasa i són incorporats al centre actiu de l'enzim. Per altra banda, els inhibidors del tipus no nucleòsid (NNIs) inclouen un grup heterogeni de compostos, els quals poden interaccionar en diferents llocs al·lostèrics de l'enzim^[49] (Figura 0.3.3). Els inhibidors NNI poden ser usats en combinació o bé seqüencialment per aconseguir la màxima resistència. Però la seva aplicació ha portat ràpidament a la resistència de mutants, ja que la unió dels NNIs és relativament distant al centre actiu de NS5B.

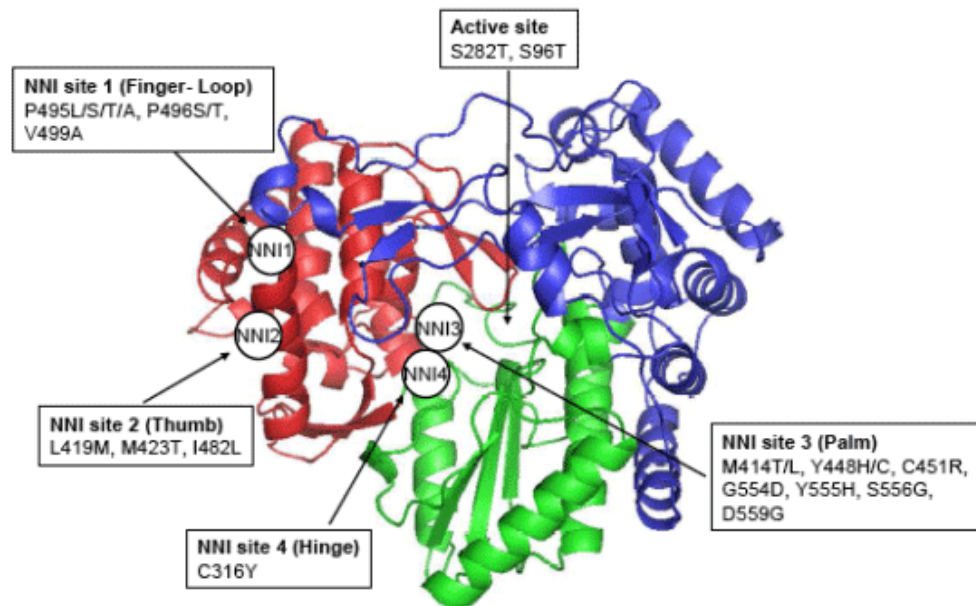


Figura 0.3.3: Estructura de la NS5B del VHC^[50]

Inhibidors nucleòsids de la polimerasa NS5B

Els primers estudis sobre aquest tipus d'inhibidors van desencadenar en l'aparició de dos inhibidors: la Valopicitabine i el R1626. El Valopicitabine va ser el primer inhibidor investigat en pacients amb el VHC crònic, desgraciadament presentava una activitat antiviral baixa. A més a més, causava efectes secundaris gastrointestinals i és per aquest motiu que se'n va aturar l'estudi. El segon inhibidor estudiat va ser el R1626, es va estudiar en pacients infectats amb el genotip 1 i presentava una activitat antiviral elevada, però se'n va parar l'estudi degut a l'aparició de limfocitopènia i altres malalties infeccioses. Més endavant, han sorgit altres inhibidors i a continuació es comentaran els últims fàrmacs desenvolupats.

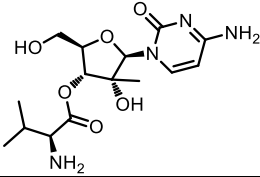
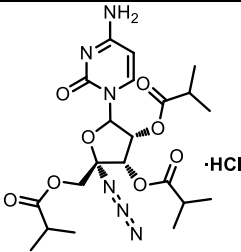
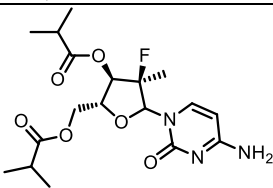
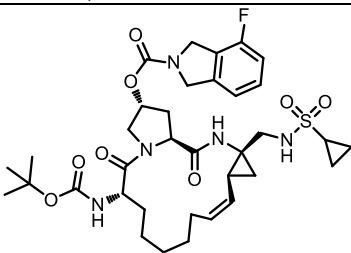
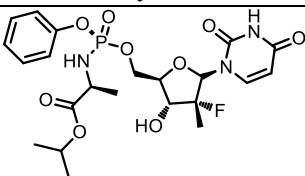
Mericitabine (RG7128) és un fàrmac segur i ben tolerat, és moderadament eficaç contra tots els genotips del VHC, i per aquest fet rarament s'ha observat resistència viral en estudis clínics^[51]. Pacients infectats amb els genotips 1, 2 i 3 tractats amb Mericitabine van revelar valors de RVS superiors al comparats amb peg-INF alfa. En l'administració oral de Mericitabine en combinació amb altres inhibidors de la proteasa, com ara el Danoprevir (R7227) durant 14 dies, es va observar una activitat antiviral sinèrgica d'ambdós fàrmacs^[52].

Recentment s'han publicat dades clíniques molt prometedores pel Sofosbuvir, un anàleg de nucleòsid eficaç front tots els genotips. S'han tractat pacients infectats amb el genotip 1, 2 i 3 amb Sofosbuvir durant període curt de temps amb combinació peg-INF alfa i RBV resultant amb un RVS del 90-100%^[53].

En general, els anàlegs de nucleòsid com el Sofosbuvir demostren elevades activitats antivirals que, juntament amb una gran cobertura genotípica i elevada resistència, suggereixen que són els candidats òptims per a les teràpies orals de combinació.

A la següent taula 0.3.3 es mostra l'estructura de cada un dels fàrmacs esmentats anteriorment:

Taula 0.3.3: Inhibidors de la NS5B anàlegs de nucleòsids

Nom fàrmac	Estructura
Valopicitabine	
Balapiravir (R1626)	
Mericitabine (RG7128)	
Danoprevir (R7227)	
Sofosbuvir (PSI-7977 or GS-7977)	

Inhibidors no anàlegs a nucleòsids de la polimerasa NS5B

L'estructura de la polimerasa NS5B presenta, al menys, quatre llocs d'unió al·lostèrics, els quals causen la inhibició de la polimerasa NS5B per unió amb compostos del tipus no nucleòsids, com ara: inhibidors del *thumb I* (sent els inhibidors més destacats el BI207127 i BMS-791325), inhibidors del *thumb II* (com el filibuvir i VX-222), inhibidors del *palm I* ^[54] (com els compostos ANA598 i ABT-333) i inhibidors del *palm II* (com el tegobuvir i el IDX-375) (veure Taula 0.3.4)

Taula 0.3.4: Inhibidors del tipus no nucleòsid de la NS5B

Nom fàrmac	Estructura
Deleobuvir BI207127	
BMS-791325	
Filibuvir PF-00868554	
Lomibuvir VX-222	
Setrobuvir ANA-598	
ABT-333	-
Tegobuvir GS-9190	
IDX-375	

A més d'aquests compostos, existeixen altres famílies de *small molecules* que presenten activitat antiviral. D'entre elles destaquen les estructures amb *core* pirido[3,2-*d*]pirimidínic. Com exemple a la figura 0.3.4 es mostren les formules de Markush de famílies de pirido[3,2-*d*]pirimidines reivindicades per Gilead Sciences en les patents WO2008/077651, WO2008/077650, WO2010/002998, WO2008/077649, US2011/0123493, US2010/0048559, US2009/0324543, US2008/0182870.

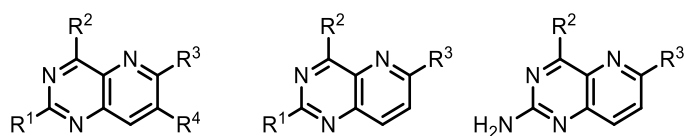


Figura 0.3.4: Formules de Markush reivindicades per Gilead Sciences

En aquest sentit, és interessant senyalar que en el nostre grup hi ha una gran experiència en l'obtenció de sistemes piridopirimidínics, concretament pirido[2,3-*d*]pirimidines amb l'estructura general que es mostra a la figura 0.3.5.

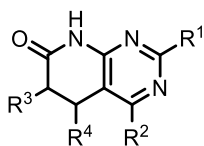


Figura 0.3.5: Estructura pirido[2,3-*d*]pirimidínic

Degut a la gran similitud estructural entre les molècules desenvolupades pel Grup d'Enginyeria Molecular i les desenvolupades per Gilead Sciences, es considera de gran interès estudiar la possible activitat antiviral front al VHC d'estructures amb core pirido[2,3-*d*]pirimidínic.

0.4. Síntesi de sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics en el Grup d'Enginyeria Molecular (GEM)

Com s'ha comentat anteriorment, en el Grup d'Enginyeria Molecular hi ha una gran experiència en la síntesi de sistemes del tipus 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics (Figura 0.4.1) pels quals s'han desenvolupat durant els darrers anys diverses estratègies sintètiques.

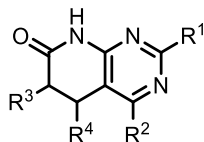


Figura 0.4.1: Estructura 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínica

0.4.1. L'estratègia cíclica i la primera estratègia acíclica

El punt de partida per a l'obtenció d'aquestes estructures 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidíniques és la síntesi per addició de Michael entre un ester α,β -insaturat (**1**) i malonitril (**2**, G = CN) o cianoacetat de metil (**2**, G = COOMe)^[55-56] (Figura 0.4.2).

L'esmentada addició de Michael pot rendir tan un adducte de cadena oberta, que dóna lloc a la piridopirimidina (**7**) mitjançant l'anomenada *estratègia acíclica*, com una piridona (**3**) que rendeix la piridopirimidina (**6**) a través de l'*estratègia cíclica*.

L'*estratègia cíclica* permet l'obtenció de sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics **6** ($R^2 = \text{NH}_2$) per reacció entre un ester α,β -insaturat (**1**) i malonitril (**2**, G = CN) en NaOMe/MeOH donant lloc a la piridona **3**. La condensació directa de les 2-metoxipiridones (**3**) amb sistemes guanidínics o amidínics (**5**, $R^1 = \text{NH}_2, \text{NHR}, \text{H}, \text{alquil}, \text{aril}, \text{heteroaril} \dots$) rendeix les corresponents pirido[2,3-*d*]pirimidines **6** ($R^2 = \text{NH}_2$). Aquesta estratègia és de gran interès quan es volen obtenir sistemes 4-aminopirido[2,3-*d*]pirimidínics.

Per altra banda, l'*estratègia acíclica* permet l'obtenció tant de sistemes 4-aminopiridopirimidínics (**6**, $R^2 = \text{NH}_2$) com de sistemes 4-oxo substituïts (**7**, $R^2 = \text{OH}$). Aquesta reacció es basa en la reacció de Michael entre un ester α,β -insaturat (**1**) i un compost amb un metilè actiu ja sigui malonitril (**2**, G = CN) o cianoacetat d'alquil (**2**, G = COOMe) per rendir el corresponent adducte de Michael (**4**), aquest es tracta amb guanidina (**5**) i després d'una etapa de ciclació rendeix el producte desitjat **7**.

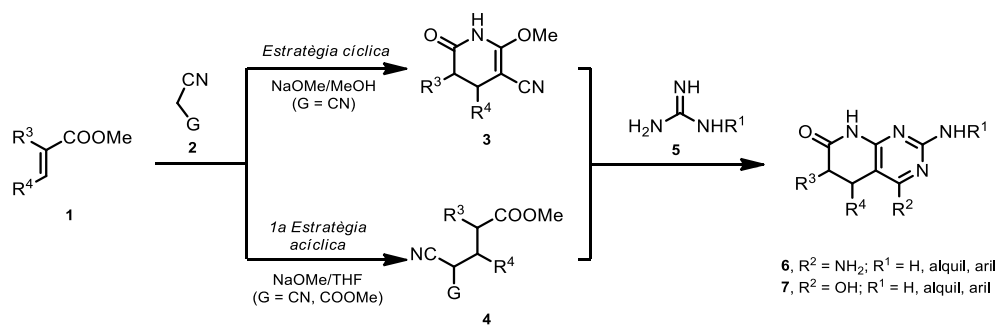


Figura 0.4.2: Estratègia cíclica i 1a estratègia acíclica per a la síntesi de sistemes **6** i **7**

0.4.2. La segona estratègia acíclica

Posteriorment es va desenvolupar una ruta de síntesi per a l'obtenció de piridopirimidinas no substituïdes en C4. Aquesta estratègia es basa en la reacció entre un ester α,β -insaturat (**1**) i 3,3-dimetoxipropionitril^[57] (**2**) donant lloc a una mescla de compostos **8** i **9**, anàlegs de **4**, on G pot ser un acetal dimetilic **8** o bé un enol metilèter **9**, que després del tractament d'aquests amb guanidina rendeix els corresponents sistemes bicíclics no substituïts en C4 (**10**) (Figura 0.4.3).

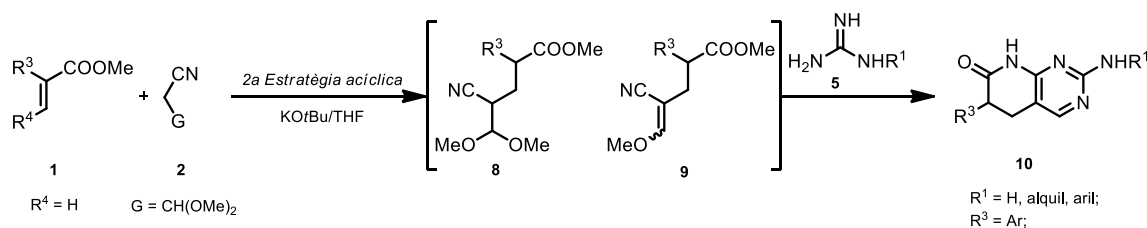


Figura 0.4.3: 2ona estratègia acíclica per a la síntesi de sistemes **10**

Aquesta ruta sintètica presenta una limitació: només es poden utilitzar esters α,β -insaturats (**1**) amb substituents arílics *orto* substituïts en α .

0.4.3. L'estratègia *one-pot*

Recolzant-se amb la síntesi de pirido[2,3-*d*]pirimidines **6** (R² = NH₂) segons l'estratègia cíclica, s'ha desenvolupat una metodologia sintètica en un sol pas de síntesi "*one pot*", on no és necessari aïllar l'intermedi **3**^[58]. Es tracta d'una reacció multicomponent assistida per microones que permet obtenir aquests sistemes amb temps de reacció molt reduïts i rendiments elevats, superiors als obtinguts mitjançant l'estratègia en dos passos de síntesi (Figura 0.4.4)

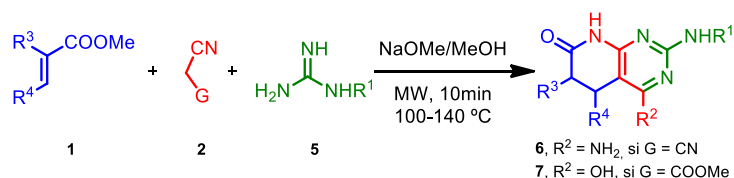


Figura 0.4.4: Estratègia multicomponent per l'obtenció de sistemes **6** i **7**

Aquesta estratègia permet obtenir sistemes 4-aminopirido[2,3-*d*]pirimidínics (**6**) substituïts amb rendiments elevats. Desafortunadament, quan es vol un grup carbonil en C4 (compost **7** representat com el seu tautòmer OH) els rendiments disminueixen dràsticament i la reproductibilitat és molt baixa. Per tant seria interessant trobar una ruta alternativa per a l'obtenció de sistemes 4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics.

0.4.4. Síntesi d'halopirido[2,3-*d*]pirimidines

De cara a augmentar la diversitat de substituents en posició C4, en el grup es va desenvolupar un mètode de transformació dels sistemes 4-oxopiridopirimidínics (**7**) en 4-cloropiridopirimidínics (**11**) a través de la captació de la forma enòlica del compost 4-oxo (**7**) per calefacció a reflux del mateix en excés de POCl₃^[59] (Figura 0.4.5)

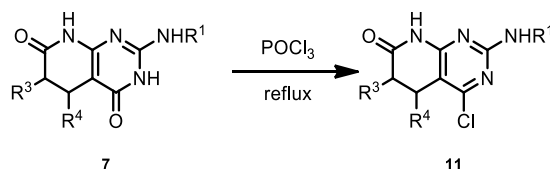


Figura 0.4.5: Obtenció de sistemes 4-cloropirido[2,3-*d*]pirimidínics (**11**)

Aquests sistemes **11** poden ser transformats en estructures d'un alt grau de diversitat mitjançant diferents estratègies: reacció de Suzuki, substitució nucleòfila aromàtica i reducció. Desafortunadament, aquesta reacció presenta problemes de reproductibilitat i en el si de la reacció es generen compostos no esperats difícils d'aïllar per tal d'obtenir el compost desitjat **11** pur.

La reducció del substituent halogenat dels sistemes **11** per tractament amb Zn/AcOH condueix al sistema piridopirimidínc no substituït en C4 **10** corresponent (Figura 0.4.6).

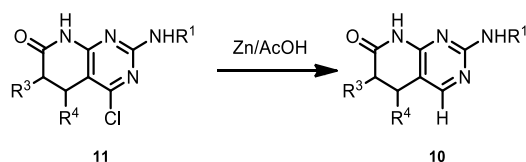


Figura 0.4.6: Obtenció de sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics **10** per reducció de l'halogen en C4 de **11**

Per altra banda, la reacció de Suzuki entre el derivat clorat **11** i un àcid arilborònic rendeix el compost 4-aryl substituït (**12**) (Figura 0.4.7).

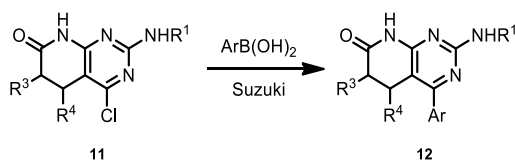


Figura 0.4.7: Obtenció de sistemes 4-aryl substituïts pirido[2,3-*d*]pirimidínics **12** per mitjà de la reacció de Suzuki

0.4.5. Deshidrogenació de 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidines

L'etapa de deshidrogenació de sistemes piridopirimidínics d'estructura general **6** és de gran interès ja que, presumiblement, seran aquests compostos els que presentin activitat antiviral. Per aquest motiu en el Grup d'Enginyeria Molecular es varen desenvolupar dos protocols de deshidrogenació d'aquest tipus de sistemes^[60]. El primer d'ells utilitza una base molt forta, com és NaH en DMSO, per rendir el corresponent compost deshidrogenat desitjat (**13**) quan en la piridopirimidina de partida **6** hi ha un residu arílic en la posició C6 (Figura 0.4.8).

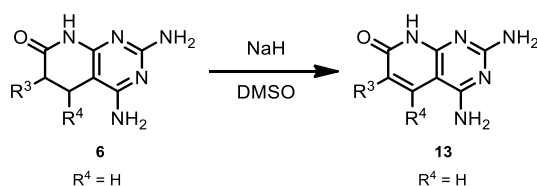


Figura 0.4.8: Deshidrogenació de sistemes **6** amb NaH en DMSO

Per altra banda, el segon procediment de síntesi per a dita deshidrogenació utilitza Na₂SeO₃ en DMSO (Figura 0.4.9). Es tracta d'una estratègia sintètica més general, que permet la deshidrogenació de sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics quan hi ha substituents arílics i alquílics en les posicions C5 i/o C6.

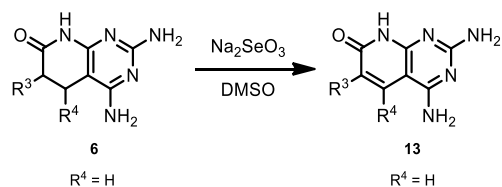


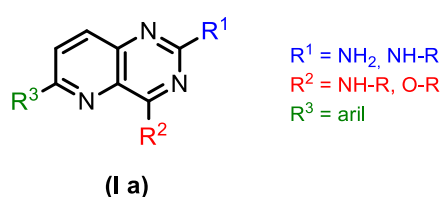
Figura 0.4.9: Deshidrogenació de sistemes **6** amb Na_2SeO_3 en DMSO

Como es pot observar, en el Grup d'Enginyeria Molecular hi ha una gran experiència en la síntesi de sistemes 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics i la introducció de diversitat en diferents punts dels mateixos.

0.5. Proposta d'ús de les 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidines com a substrat per desenvolupar inhibidors del VHC

Com s'ha comentat anteriorment hi ha una important similitud estructural entre els compostos pirido[3,2-*d*]pirimidínics amb activitat inhibidora del VHC desenvolupats per Gilead Sciences i protegits per les corresponents patents i els sistemes 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics desenvolupats pel GEM.

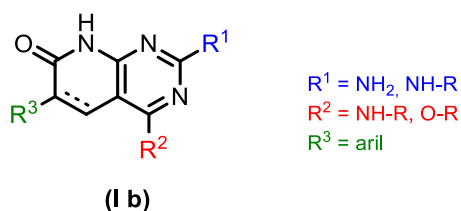
Si ens centrem en les patents WO2008/077651, WO2008/077650, WO2010/002998, WO2008/077649 d'aquests sistemes, cal destacar-ne que tots els compostos que presenten activitat, es poden englobar en una mateixa fórmula de Markush:



La fórmula de Markush **Ia** presenta 3 posicions susceptibles de ser derivatitzades, tant l'anell de piridina, com l'anell pirimidínic són aromàtics i, per tant, es tracta d'un sistema conformacionalment pla i rígid.

Una anàlisi preliminar sobre la naturalesa dels residus introduïts en R¹, R² i R³ indica que el substituent en R¹ és majoritàriament un grup amino o amino-substituït, R² són grups amino substituïts o grups alcoxi i R³ són sistemes arílics.

L'objectiu central de la present Tesi Doctoral és utilitzar les 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidines com a *scaffold* per a l'obtenció d'inhibidors del VHC. Basant-nos amb aquesta idea es procedeix a definir la fórmula de Markush de la família de molècules anàlogues a les **Ia** amb estructura 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínica (**Ib**) objectiu de la present tesi doctoral.



Si es comparen les fórmules de Markush **Ia** i **Ib**, es pot observar que la diferencia més significativa roman en que l'anell de piridina passa a ser un anell de piridona que en el nostre cas pot o no presentar insaturació entre les posicions C5 i C6. Tal i com s'ha mostrat anteriorment les metodologies sintètiques desenvolupades pel nostre grup reneixen, inicialment, els sistemes piridopirimidínics (**6**) saturats entre C5 i C6 que, posteriorment, es poden deshidrogenar per obtenir els termes aromàtics (**13**) corresponents (Figura 0.5.1). Per tant, no sembla problemàtic obtenir sistemes **Ib** anàlegs als **Ia** amb una insaturació entre C5 i C6.

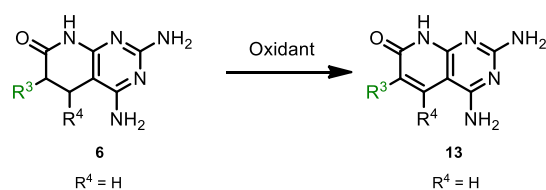


Figura 0.5.1: Deshidrogenació de l'anell de piridona dels sistemes **6** per rendir els compostos **13**

Si ens centrem en analitzar els residus més utilitzats en els compostos patentats per Gilead Sciences, observem que en R^3 són majoritàriament residus arílics. Aquest fet no representa cap problema sintètic en el nostre cas ja que, com s'ha comentat a l'apartat anterior, aquest residu prové de l'èster α,β -insaturat (**1**) utilitzat al fer la reacció de Michael amb el cianoacetat de metil o el malononitril (**2**) per rendir la piridopirimidina **1b** desitjada amb un residu aril en la posició C6 (Figura 0.5.2).

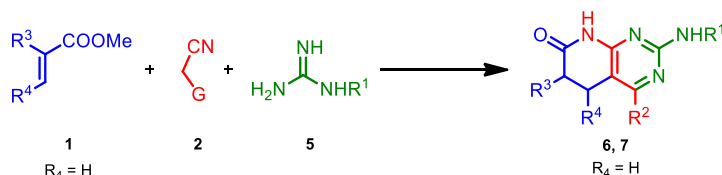


Figura 0.5.2: Metodologia multicomponent per a la síntesi de **6** i **7**

Per altra banda, els substituents en C2 són majoritàriament grups amino o bé amino-substituïts, predominant els grups benzilamino. La introducció d'aquests grups en estructures piridopirimidiniques **1b** en la posició C2 és possible gràcies a les metodologies desenvolupades en el nostre grup, aquest substituent està present en el sistema guanidínic (**5**) utilitzat en l'última etapa de ciclació de la piridopirimidina (Figura 0.5.3). Ara bé, la introducció d'un grup amino substituït en C2 comporta que el grup present en C4 sigui un grup NH_2 (**6**).

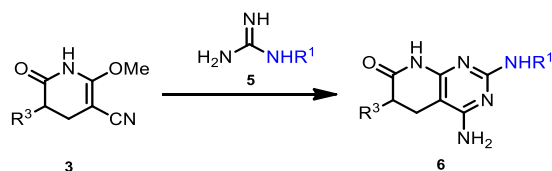


Figura 0.5.3: Estratègia cíclica per a la síntesi de sistemes **6**

En darrer lloc, en R^2 hi ha grups amino substituïts o grups alcoxi. Val a dir, que en el nostre cas l'estratègia sintètica consistent en convertir el grup 4-oxo d'una 4-oxopiridopirimidina (**7**) en el

corresponent cloro-derivat (**11**) permet introduir grups amino-substituïts en C4, però en el nostre grup no hi ha experiència en la introducció de grups alcoxi en C4 (Figura 0.5.4).

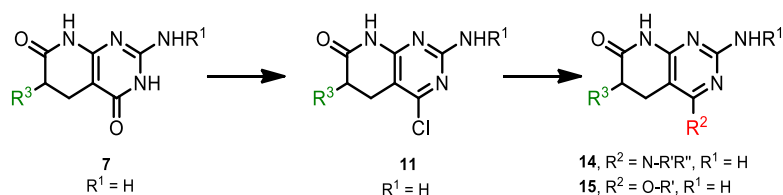


Figura 0.5.4: Derivatització en C2 a partir de una 4-oxopiridopirimidina **7**

Malgrat l'experiència del nostre grup en la derivatització en C2 i C4, la disubstitució simultània en ambdues posicions amb grups amino substituïts presenta una important limitació sintètica, ja que la síntesi dels sistemes 4-oxopiridopirimidínics **7** necessaris com a material de partida presenta rendiments molt baixos a partir dels sistemes guanidínics substituïts (**5**) i depèn, en gran mesura, del substituent que es vol introduir en C6. A més, ja s'ha comentat que la transformació del grup 4-oxo en un substituent cloro transcorre amb rendiments variables depenent de la naturalesa dels substituents presents a la piridopirimidina.

En conseqüència, com a part de la present Tesi Doctoral, serà necessari revisar la metodologia sintètica per a la síntesi de sistemes 4-oxopiridopirimidínics **7** i la posterior transformació d'aquests en uns derivats que facilitin la introducció de substituents amino o alcoxi en la posició C4.

A la Figura 0.5.5 s'exposa una proposta de retrosíntesi en base a lo comentat en el paràgraf anterior.

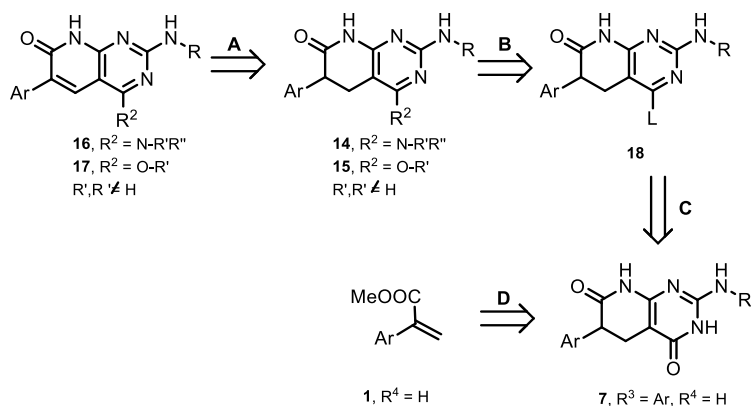


Figura 0.5.5: Proposta de síntesi per a l'obtenció de 2-amino-6-arylpirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ones 4-alkilamino (o arilamino) substituïts (**16**) i 4-alcoxi substituïts (**17**)

Com a conseqüència de l'anteriorment exposat, els objectius de la present Tesi Doctoral són:

0.6. Objectius

1. Disseny d'una quimioteca de nous compostos amb estructura 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínica amb possible activitat antiviral front el virus de l'Hepatitis C.
2. Desenvolupament d'una metodologia sintètica per rendir sistemes 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics disubstituïts en C2 i C4.
3. Anàlisi de l'activitat antiviral d'aquests compostos.

0.7. Bibliografia

- [1] C. W. Shepard; L. Finelli ;M. J. Alter. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* **2005**, 5 (9), 558-567.
- [2] P. Simmonds; E. C. Holmes; T. A. Cha;S. W. Chan; F. McOmish; B. Irvine, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* **1993**, 74 (Pt 11) , 2391-2399.
- [3] P. Simmonds, et.al. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* **2005**, 21 (2), 570-583.
- [4] M. Yahia. Global health: A uniquely Egyptian epidemic. *Nature (London, U. K.)* **2011**, 474 (7350_suppl), S12-S13.
- [5] M. P. Manns; J. G. McHutchison; S. C. Gordon; V. K. Rustgi; M. Shiffman; R. Reindollar, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* **2001**, 358 (9286), 958-965.
- [6] A. Andriulli; A. Mangia; A. Iacobellis; A. Ippolito; G. Leandro; S. Zeuzem. Meta-analysis: the outcome of anti-viral therapy in HCV genotype 2 and genotype 3 infected patients with chronic hepatitis. *J.Viral.hepat.* **2008**, 15 (28) 397-404.
- [7] Verbeeck J; Peigue-Lafeuille H; Ross RS; Abergel A; Nevens F, et al. The official publication of the pan american society for clinical virology. *J. Of clinical virology* **2008**, 41, 170-171.
- [8] M. Kaito; S. Watanabe; K. Tsukiyama-Kohara; K. Yamaguchi; Y. Kobayashi; M. Konishi, et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J. Gen. Virol.* **1994**, 75 (7), 1755-1760.
- [9] S. D. C. Griffin; L. P. Beales; D. S. Clarke; O. Worsfold; S. D. Evans; J. Jaeger, et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* **2003**, 535 (1-3), 34-38.
- [10] S. Rosenberg. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J. Mol. Biol.* **2001**, 313 (3), 451-464.
- [11] D.Moradpour; F. Penin; C. M. Rice. Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology.* **2007**, 5, 453-463.
- [12] H. E. Drummer; A. Maerz; P. Pountourios. Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett.* **2003**, 546 (2-3), 385-390.
- [13] P. Pileri; Y. Uematsu; S. Campagnoli; G. Galli; F. Falugi;R. Petracca, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science (Washington, D. C.)* **1998**, 282 (5390), 938-941.
- [14] E. Scarselli; H. Ansuini; R. Cerino; R. M. Roccasecca; S. Acali; G. Filocamo, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J.* **2002**, 21 (19), 5017-5025.

- [15] R. F. Clayton; A. Owsianka; J. Aitken; S. Graham; D. Bhella; A. H. Patel. Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles. [Erratum to document cited in CA137:244389]. *J. Virol.* **2002**, *76* (18), 9562.
- [16] A. Higginbottom; E. R. Quinn; C. Kuo; M. Flint; L. H. Wilson; E. Bianchi, et al. Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J. Virol.* **2000**, *74* (8), 3642-3649.
- [17] M. J. Evans; T. von Hahn; D. M. Tscherne; A. J. Syder; M. Panis; B. Woelk, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature (London, U. K.)* **2007**, *446* (7137), 801-805.
- [18] S. Liu; W. Yang; L. Shen; J. R. Turner; C. B. Coyne; T. Wang. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J. Virol.* **2009**, *83* (4), 2011-2014.
- [19] E. Blanchard; S. Belouzard; L. Goueslain; T. Wakita; J. Dubuisson; C. Wychowski, et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **2006**, *80* (14), 6964-6972.
- [20] C. M. Rice. New insights into HCV replication: potential antiviral targets. *Top Antivir Med* **2011**, *19* (3), 117-120.
- [21] R. Gosert; D. Egger; V. Lohmann; R. Bartenschlager; H. E. Blum; K. Bienz, et al. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J. Virol.* **2003**, *77* (9), 5487-5492.
- [22] D. Egger; B. Wolk; R. Gosert; L. Bianchi; H. E. Blum; D. Moradpour, et al. Expression of Hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* **2002**, *76* (12), 5974-5984.
- [23] R. Bartenschlager; S. Sparacio. Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture. *Virus Res.* **2007**, *127* (2), 195-207.
- [24] P. Targett-Adams; S. Boulant; J. McLauchlan. Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* **2008**, *82* (5), 2182-2195.
- [25] R. Bartenschlager; V. Lohmann. Replication of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* **2000**, *81* (7), 1631-1648.
- [26] T. Wakita; T. Pietschmann; T. Kato; T. Date; M. Miyamoto; Z. Zhao, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med. (N. Y., NY, U. S.)* **2005**, *11* (7), 791-796.
- [27] J. Zhong; P. Gastaminza; G. Cheng; S. Kapadia; T. Kato; D. R. Burton, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (26), 9294-9299.
- [28] S. Murphy; S. Martin; R. G. Parton. Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2009**, *1791* (6), 441-447.

- [29] B. Boson; O. Granio; R. Bartenschlager; F. Cosset. A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS Pathog.* **2011**, 7 (7), e1002144.
- [30] N. A. Counihan; S. M. Rawlinson; B. D. Lindenbach. Trafficking of hepatitis C virus core protein during virus particle assembly. *PLoS Pathog.* **2011**, 7 (10), e1002302.
- [31] K. E. Coller; N. S. Heaton; K. L. Berger; J. D. Cooper; J. L. Saunders; G. Randall. Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog.* **2012**, 8 (1), e1002466.
- [32] R. Bartenschlager; F. Cosset; V. Lohmann. Hepatitis C virus replication cycle. *J Hepatol* **2010**, 53 (3), 583-585.
- [33] J. H. Hoofnagle; K. D. Mullen; D. B. Jones; V. Rustgi; B. A. Di; M. Peters, et al. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* **1986**, 315 (25), 1575-1578.
- [34] A. M. Di Bisceglie; P. Martin; C. Kassianides; M. Lisker-Melman; Z. Goodman; S. M. Banks, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of recombinant human alpha-interferon therapy for chronic non-A, non-B (type C) hepatitis. *J Hepatol* **1990**, 11 Suppl 1 , S36-42.
- [35] G. L. Davis; L. A. Balart; E. R. Schiff; K. Lindsay; H. C. Bodenheimer Jr; R. P. Perrillo, et al. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant alpha-interferon. A multicentre randomized, controlled trial. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *J Hepatol* **1990**, 11 Suppl 1 , S31-5.
- [36] G. Dusheiko; J. Main; H. Thomas; O. Reichard; C. Lee; A. Dhillon, et al. Ribavirin treatment for patients with chronic hepatitis C: Results of a placebo-controlled study. *J. Hepatol.* **1996**, 25 (5), 591-598.
- [37] S. W. Schalm; B. E. Hansen; L. Chemello; A. Bellobuono; J. T. Brouwer; O. Weiland, et al. Ribavirin enhances the efficacy but not the adverse effects of interferon in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **1997**, 26 (5), 961-966.
- [38] A. U. Neumann; N. P. Lam; H. Dahari; D. R. Gretch; T. E. Wiley; T. J. Layden, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science (Washington, D. C.)* **1998**, 282 (5386), 103-107.
- [39] K. L. Lindsay; C. Trepo; T. Heintges; M. L. Shiffman; S. C. Gordon; J. C. Hoefs, et al. A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology (Philadelphia, PA, U. S.)* **2001**, 34 (2), 395-403.
- [40] S. Zeuzem; S. V. Feinman; J. Rasenack; E. J. Heathcote; M. Lai; E. Gane, et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N. Engl. J. Med.* **2000**, 343 (23), 1666-1672.
- [41] E. J. Heathcote; M. L. Shiffman; W. G. E. Cooksley; G. M. Dusheiko; S. S. Lee; L. Balart, et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **2000**, 343 (23), 1673-1680.

- [42] M. P. Manns; J. G. McHutchison; S. C. Gordon; V. K. Rustgi; M. Shiffman; R. Reindollar, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon α -2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* **2001**, 358 (9286), 958-965.
- [43] A. M. Di Bisceglie; J. H. Hoofnagle. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology* **2002**, 36 (5 Suppl 1), S121-7.
- [44] M. J. Grace; D. Cutler. Pegylating IFNs at His-34 improves the in vitro antiviral activity through the JAK/STAT pathway. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **2004**,15, 287–297
- [45] M. P. Manns; H. Wedemeyer; M. Cornberg. Treating viral hepatitis C: Efficacy, side effects, and complications. *Gut* **2006**, 55 (9), 1350-1359.
- [46] C. Sarrazin; S. Zeumen. Resistance to direct antiviral agents in patients with Hepatitis C virus infection. *Gastroenerology* **2010**, 138 (2), 447-462.
- [47] Mauss; Berg; Rockstroh; Sarrazin; Wedemeyer. *Short Guide of Hepatitis C*. **2013**.
- [48] Mauss; Berg; Rockstroh; Sarrazin; Wedemeyer. *Hepatology*. **2013**, fourth edition.
- [49] J. Vermehren; C. Sarrazin. New hepatitis C therapies in clinical development. *Eur J Med Res* **2011**, 16 (7), 303-314.
- [50] Peggy A. Thompson; Rupal A. Patel; Richard E. Showalter; Cindy Li; James R. Appleman; Kevin R. Steffy. In Vitro Studies Demonstrate that Combinations of Antiviral Agents that Include HCV Polymerase Inhibitor ANA598 have the Potential to Overcome Viral Resistance. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Oct 31-Nov 1 2008. San Francisco, CA
- [51] S. Ali; V. Leveque; S. Le Pogam; H. Ma; F. Philipp;N. Inocencio, et al. Selected replicon variants with low-level in vitro resistance to the hepatitis C virus NS5B polymerase inhibitor PSI-6130 lack cross-resistance with R1479. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52 (12), 4356-4369.
- [52] E. J. Gane; S. K. Roberts; C. A. M. Stedman; P. W. Angus; B. Ritchie; R. Elston, et al. Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet* **2010**, 376 (9751), 1467-1475.
- [53] E. J. Gane; C. A. Stedman; R. H. Hyland; X. Ding; E. Svarovskaia; W. T. Symonds, et al. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. *N. Engl. J. Med.* **2013**, 368 (1), 34-44.
- [54] D. Larrey; A. W. Lohse; V. de Ledinghen; C. Trepo; T. Gerlach; J. Zarski, et al. Rapid and strong antiviral activity of the non-nucleosidic NS5B polymerase inhibitor BI 207127 in combination with peginterferon alfa 2a and ribavirin. *J. Hepatol.* **2012**, 57 (1), 39-46.
- [55] J. L. Falco; J. I. Borrell; J. Teixido. Solid-phase synthesis of 2-substituted 4-amino-7-oxo-5,6,7,8-tetrahydropyrido[2,3-d]pyrimidines. *Mol. Diversity* **2003**, 6 (2), 85-92.
- [56] J. I. Borrell; J. Teixido; J. L. Matallana; B. Martinez-Teipel; C. Colominas; M. Costa, et al. Synthesis and Biological Activity of 7-Oxo Substituted Analogues of 5-Deaza-5,6,7,8-

tetrahydrofolic Acid (5-DATHF) and 5,10-Dideaza-5,6,7,8-tetrahydrofolic Acid (DDATHF). *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (14), 2366-2369.

[57] X. Berzosa; X. Bellatriu; J. Teixido; J. I. Borrell. An Unusual Michael Addition of 3,3-Dimethoxypropanenitrile to 2-Aryl Acrylates: A Convenient Route to 4-Unsubstituted 5,6-Dihydropyrido[2,3-d]pyrimidines. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (2), 487-490.

[58] N. Mont; J. Teixido; C. O. Kappe; J. I. Borrell. A one-pot microwave-assisted synthesis of pyrido[2,3-d]pyrimidines. *Mol. Diversity* **2003**, *7* (2-4), 153-159.

[59] N. Mont; L. Fernandez-Megido; J. Teixido; C. O. Kappe; J. I. Borrell. A diversity-oriented, microwave-assisted synthesis of 4-oxo and 4-chloropyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23* (10), 836-849.

[60] I. Perez-Pi; X. Berzosa; I. Galve; J. Teixido; J. I. Borrell. Dehydrogenation of 5,6-dihydropyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones: a convenient last step for a synthesis of pyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones. *Heterocycles* **2010**, *82* (1), 581-591.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. RESULTATS I DISCUSSIÓ

1.1. Disseny de 7-oxopirido[2,3-d]pirimidines com a inhibidors potencials del VHC

L'objectiu d'aquest apartat és el disseny de compostos 7-oxopirido[2,3-d]pirimidínics com a inhibidors potencials del VHC, les estructures dels quals es basen en les molècules reivindicades en les patents de Gilead Sciences. Per aquest propòsit cal fer una anàlisi exhaustiva de la família de compostos reivindicats en aquestes patents (Figura 1.1.1).

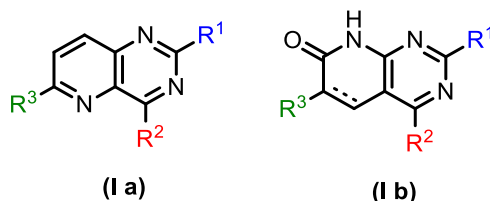


Figura 1.1.1: Estructures pirido[3,2-d]pirimidíniques **Ia** reivindicades per Gilead i, estructures pirido[2,3-d]pirimidíniques **Ib** proposades en aquest treball com a inhibidors del VHC

Aquest estudi s'ha centrat en les molècules contingudes en les patents WO2008/077651, WO2008/077650, WO2010/002998, WO2008/077649 i WO2006/120252. En primer lloc, s'han analitzat les molècules descrites en cada patent, però degut al gran nombre de compostos a tractar (més de 800) es decideix fer una primera selecció en funció dels valors d'activitat antiviral. La majoria de les patents classifiquen els valors d'activitat antiviral en diferents intervals de **EC**₅₀ i **CC**₅₀. Sent **EC**₅₀ la concentració efectiva 50 (o concentració necessària per inhibir el 50% de les cèl·lules infectades) i **CC**₅₀ la concentració citotòxica 50 (o la concentració necessària per induir la mort cel·lular en el 50% de cèl·lules no infectades). S'ha de senyalar que aquestes patents no donen mai el valor concret d'activitat antiviral dels compostos sinó només el rang d'activitat en que es troben compresos.

A mode d'exemple, si ens centrem en la patent WO2008/077651, aquesta classifica els valors d'**EC**₅₀ en tres nivells: en primer lloc els compostos amb millor valor d'activitat (<0,1 μM), en segon lloc aquells amb un valor d'**EC**₅₀ comprès entre 0,1 i 0,25 μM i, finalment, aquells amb valors d'**EC**₅₀ compresos entre 0,25 i 2 μM. Per altra banda, també existeix una classificació de **CC**₅₀ en tres categories: una amb **CC**₅₀ > 25 μM, una altra amb valors compresos entre 5 i 25 μM i, en darrer lloc, quan **CC**₅₀ < 5 μM.

Dit això, es decideix seleccionar les molècules que presenten un valor d'**EC**₅₀ < 0,1 i **CC**₅₀ > 25 μM. D'aquesta manera es redueix dràsticament el nombre de molècules a avaluar, passant de tenir 303 compostos dels quals estudiar la naturalesa dels substituents en R¹, R² i R³ a només 56 compostos.

Es decideix utilitzar aquest protocol per la resta de patents objecte d'estudi. A continuació, a la taula 1.1.1 es mostra el número de compostos seleccionats mitjançant l'esmentat protocol respecte al total de molècules actives contingudes en cadascuna de les patents.

Taula 1.1.1: Selecció de compostos més actius descrits en les corresponent patents

Patents	Molècules descrites	Molècules amb valor activitat	Molècules amb major activitat
WO2008/077651	303	303	56
WO2008/077650	72	38	16
WO2010/002998	316	316	92
WO2008/077649	156	89	35
WO2006/120252*	37	37	37
Total	884		236

*es donen els valors d'activitat en "HCV replicon activity"

Es pot observar que el sistema de selecció utilitzat ens ha permès reduir el nombre de molècules a considerar de 884 molècules descrites en les patents a 236 molècules, les quals presenten els millors valors d'activitat i toxicitats baixes.

A continuació, es realitza una anàlisi rigorosa d'aquestes 236 molècules i es fa una classificació dels substituents més repetits presents en aquests compostos. La següent taula mostra els residus presents en les posicions R¹, R² i R³ ordenats en funció de la freqüència d'aparició de major a menor.

Taula 1.1.2: Classificació dels residus dels compostos descrits en les patents

R ¹	Freqüència d'aparició en patents (%)	R ²	Freqüència d'aparició en patents (%)	R ³	Freqüència d'aparició en patents (%)
NH ₂	36,9		28,0		18,2
	17,8		23,4		5,6
	11,2		10,7		4,7
	7,5		6,1		3,7
	4,7		4,2		3,3

R ¹	Freqüència d'aparició en patents (%)	R ²	Freqüència d'aparició en patents (%)	R ³	Freqüència d'aparició en patents (%)
	2,8		3,3		2,3
	1,9		2,8		2,3
	1,9		2,8		1,9
	0,9		2,3		1,9
	0,9		1,9		1,9
	0,9		1,9		1,4
	0,9		1,4		1,4
	0,9		1,4		1,4
	0,9		0,9		1,4
	0,9		0,9		1,4
	0,9		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9

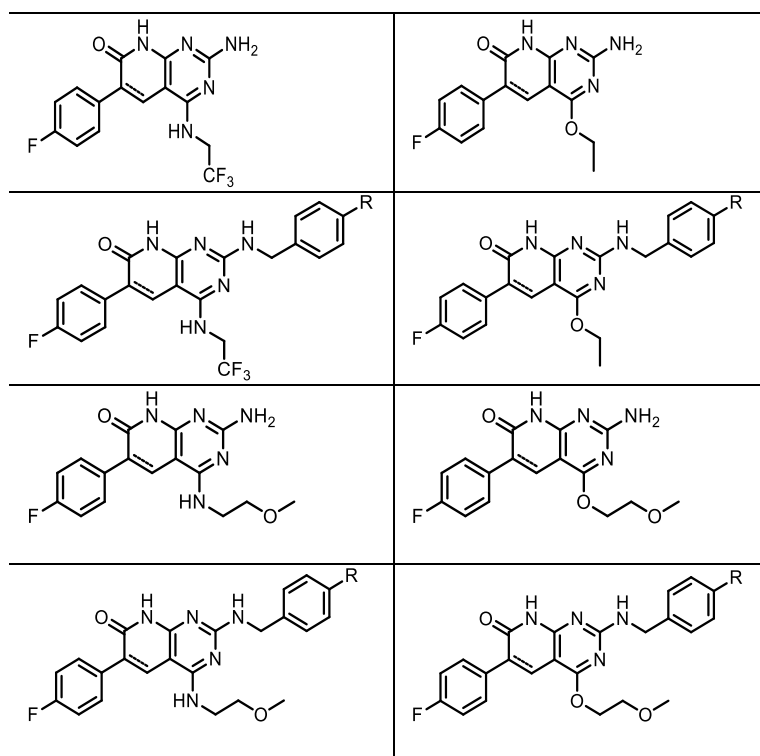
R ¹	Freqüència d'aparició en patents (%)	R ²	Freqüència d'aparició en patents (%)	R ³	Freqüència d'aparició en patents (%)
	0,5		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9
	0,5		0,5		0,9
	0,5				0,9
				Fins a 37 substituents més	

Com es pot observar, el número de substituents potencials en R¹ és 31, el número en R² és 32 i el número en R³ és 89. En conseqüència, la quimioteca virtual potencial de compostos 7-oxopiridopirimidínics **1b** que es podria obtenir fent servir els substituents R¹, R² i R³ anteriors, és de 31 x 32 x 89 = 88288 compostos.

Donada la mida total de la quimioteca potencial, se selecciona un primer *set* reduït de compostos 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics model a sintetitzar que presenten els residus R¹, R² i R³ amb més freqüència d'aparició (Taula 1.1.3).

A la taula 1.1.3 es mostra aquest conjunt inicial i, en ell, s'aprecia la doble substitució en C2 i C4, comentada a la introducció, que obliga a revisar el procés de síntesi d'aquest tipus de molècules.

Taula 1.1.3: Proposta de molècules a sintetitzar com a potencials inhibidors del VHC



Per tal de minimitzar la complexitat es començarà sintetitzant les pirido[2,3-*d*]pirimidines amb un grup NH₂ en C2.

Per a la numeració dels membres de quimiotèques, s'empra el sistema creat pel *J.Comb.Chem.*, segons el qual un compost es numera com a **N** {*x*, *i*, *z*, ...}, on **N** és el nombre de l'estructura general i *x*, *i*, *z* ... són els números corresponents als precursors, sent *x* el número del primer precursor, *i* el del segon i així successivament.

1.2. Síntesi de sistemes 2-amino-6-aryl-pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona 4-substituïts

Tal i com s'ha descrit a la introducció, es planteja la següent anàlisi retrosintètica per a l'obtenció dels sistemes 7-oxopirido[2,3-d]pirimidínics desitjats **16** i **17**.

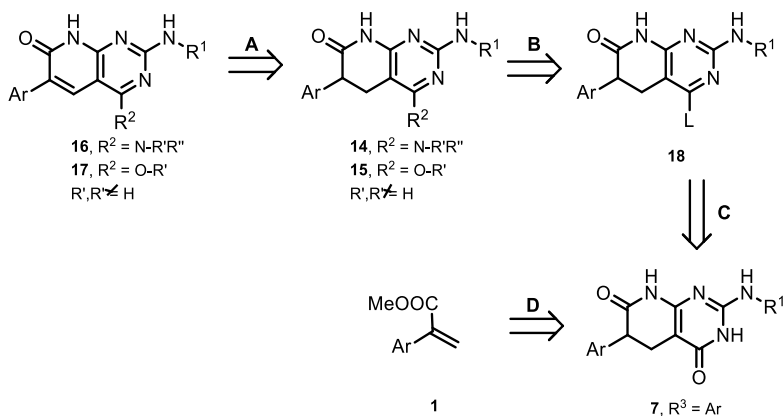


Figura 1.2.1: Anàlisi retrosintètica per a l'obtenció de 2-amino-6-aryl-pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ones **16** i **17**

Com es pot observar a la figura 1.2.1, la primera etapa és la formació del nucli piridopirimidínic 4-oxo substituït (**7**) a partir d'un éster α,β -insaturat (**1**). Per tant, en primer lloc s'abordarà la síntesi de sistemes 4-oxopiridopirimidínics substituïts.

1.2.1. Desenvolupament d'una estratègia sintètica de gran versatilitat per a l'obtenció de 2-amino-6-aryl-5,6-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-4,7(3H,8H)-diones

Les metodologies de síntesi desenvolupades en el GEM per a l'obtenció de sistemes pirido[2,3-d]pirimidínics es basen en la construcció de l'anell pirimidínic sobre un anell piridònic prèviament format. Tal i com es comenta a la introducció, entre altres, es va desenvolupar una metodologia sintètica multicomponent^[1] per a l'obtenció de sistemes 4-oxopirido[2,3-d]pirimidínics.

En un primer assaig es decideix utilitzar el metacrilat de metil (**1{1}**) com a reactiu model, ja que es tracta d'un reactiu comercial, cianoacetat de metil (**2**) i carbonat de guanidina (**5**) en medi MeOH (Figura 1.2.2).

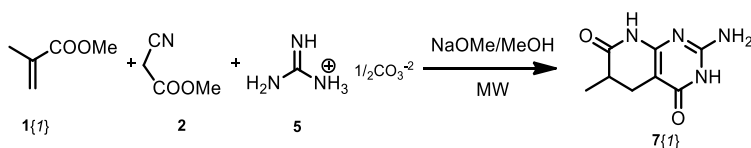


Figura 1.2.2: Estratègia multicomponent per rendir el compost **7{1}**

En primer lloc, s'allibera la guanidina **5** fent reaccionar el carbonat de guanidina amb NaOMe en medi MeOH a 65 °C durant 15 min amb calefacció de microones. A continuació es filtra el Na₂CO₃, sobre el filtrat s'afegeix el cianoacetat de metil (**2**) i el metacrilat de metil (**1{1}**) i es porta el sistema a 140 °C assajant diferents temps de reacció: 10, 20 i 30 minuts. Després de diversos assaigs en els que s'utilitzen les relacions molars 1:1:3:5 corresponents als reactius **1{1}**:**2**:**5**:NaOMe a diferents temps de reacció, no s'obté el producte desitjat **7{1}**.

De cara a determinar el motiu de la no obtenció del compost **7{1}** es proposa utilitzar la metodologia acíclica^[2-3], en la que s'aïlla l'adducte intermedi **4**, producte de la reacció de Michael entre el cianoacetat de metil (**2**) i el metacrilat de metil (**1{1}**). Posteriorment, aquest es fa reaccionar amb carbonat de guanidina **5** en medi bàsic per rendir el compost desitjat **7{1}** (Figura 1.2.3).

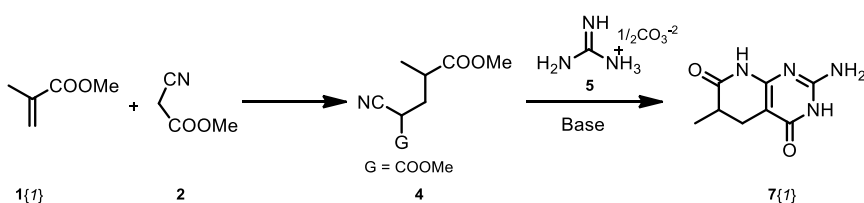


Figura 1.2.3: Estratègia acíclica per rendir el compost **7{1}**

Per abordar aquesta síntesi primer es sintetitza l'adducte **4** fent reaccionar 1,0 equivalent de cianoacetat de metil (**2**) amb 1,1 equivalents de NaOMe en metanol a reflux durant 10 min. Tot seguit, s'addiciona 1,0 equivalent de metacrilat de metil (**1{1}**) i el sistema es porta a reflux durant 90 min. En finalitzar la reacció, es neutralitza el cru amb AcOH i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda, el residu s'extreu amb EtOEt obtenint l'adducte desitjat **4**. Posteriorment, s'allibera la guanidina per tractament del carbonat de guanidina amb NaOMe en metanol a reflux durant 15 min, es filtra el sòlid i sobre el filtrat s'addiciona l'adducte **4** i es porta el sistema a reflux durant 24h.

A la taula 1.2.1 que es mostra a continuació, es pot apreciar que en les condicions de reacció assajades emprant diferents equivalents dels reactius, s'obté el producte desitjat **7{1}** però el rendiment de l'esmentada reacció no supera el 11% en cap dels casos.

Taula 1.2.1: Condicions de reacció assajades per a la síntesi de **7{1}**

Eq 4	Eq 5	Eq NaOMe	Rdt
1,0	3,0	4,0	6%
1,0	6,0	6,0	7%
1,0	3,0	6,0	11%

El baix rendiment obtingut, tant mitjançant la via *one-pot* com la via acíclica, juntament amb el fet de que aquest és el primer pas de l'itinerari proposat per accedir a sistemes piridopirimidínics

disubstituïts en C2 i C4 ens obliga a pensar en una altra estratègia sintètica per a l'obtenció d'aquests sistemes. En conseqüència, es procedeix a revisar metodologies d'obtenció de pirido[2,3-*d*]pirimidines descrits a la bibliografia.

Un dels mètodes d'obtenció més habituals d'aquests heterocicles es basa en la construcció de l'anell piridínic sobre una pirimidina precursora (**20**) a través de varies etapes sintètiques (Figura 1.2.4). L'anell de piridina es construeix per condensació del nitril (**21**) (el qual presenta el substituent que es desitja introduir en C6) amb l'anell de pirimidina preformat resultant el compost pirido[2,3-*d*]pirimidínic^[4].

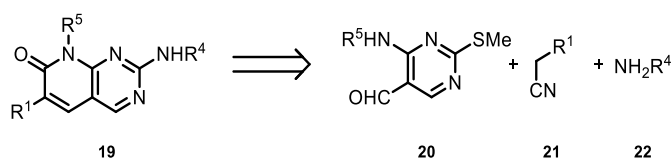


Figura 1.2.4: Retrosíntesi de pirido[2,3-*d*]pirimidines segons Klutchko et al^[4]

En base a aquesta idea, l'any 2006, Shujiang Tu i col·laboradors^[5] van descriure una metodologia sintètica per a la síntesi de pirido[2,3-*d*]pirimidines substituïdes en la posició C5 (Figura 1.2.5). La reacció s'inicia per condensació entre un aldehyd (**23**) i l'àcid de Meldrum (**25**) per obtenir un intermediari, que reacciona amb la pirimidona (**24**) per a, després de varies etapes d'eliminació i ciclació interna, rendir el producte desitjat **7**.

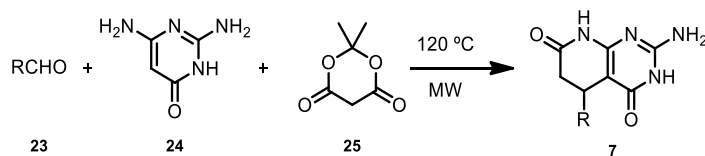


Figura 1.2.5: Síntesi de sistemes **7** substituïts en C5

Aquest mètode de síntesi permet l'obtenció de sistemes 4-oxopiridopirimidínic (**7**) amb rapidesa, ja que la calefacció amb microones permet reduir el temps de reacció, i a la vegada també permet l'obtenció d'aquests compostos amb rendiments elevats. Això facilita la síntesi d'una quimioteca de compostos, els quals presenten diferents residus en la posició C5. Ara bé, aquest mètode té una limitació important: no es poden introduir substituents en la posició C6, ja que el substituent en aquesta posició ha de ser necessàriament un hidrogen en provenir de l'àcid de Meldrum (**25**) utilitzat com a metilè actiu.

A la figura 1.2.6 es pot observar la proposta de mecanisme publicada per l'esmentada reacció. A la primera etapa es proposa la formació d'un éster α,β -insaturat (**26**) per condensació entre l'aldehyd (**23**) i l'àcid de Meldrum (**25**), el qual pateix posteriorment una addició de tipus Michael amb la pirimidona (**24**) per rendir el sistema 4-oxopiridopirimidínic (**7**).

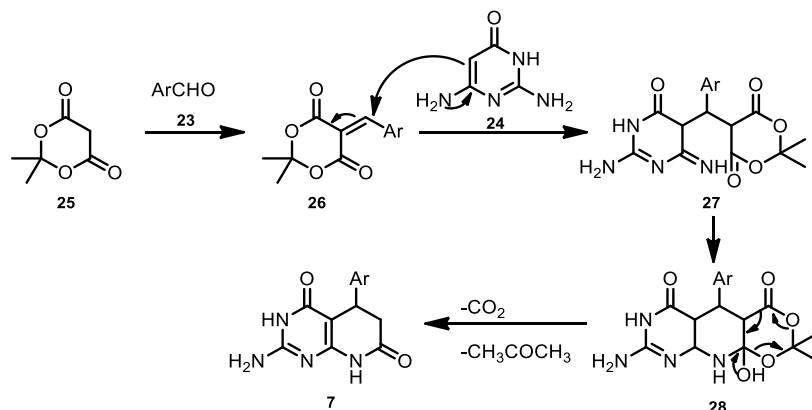


Figura 1.2.6: Proposta de mecanisme per a la formació de pirido[2,3-*d*]pirimidines **7** substituïdes en C5^[6]

Com s'ha destacat a la introducció, la presència d'un substituent arílic en posició C6 és clau per buscar la major similitud estructural amb el sistema desenvolupats per Gilead Sciences. Per tant, amb la finalitat d'introduir substituents en C6, es proposa la possibilitat de substituir en la reacció anterior la combinació àcid de Meldrum (**25**)/aldehid (**23**) per acrilats de metil 2-aril substituïts (**1{x}**) com a èster α,β -insaturat. Aquests acrilats podrien actuar de forma similar a l'intermediari **26**, per tal de condensar-los amb la 2,6-diaminopirimidin-4(3H)-ona (**24**) (Figura 1.2.7). D'aquesta manera, es podria accedir a les corresponents 2-amino-5,6-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-4,7(3*H*,8*H*)-diones (**7{x}**), presentant un residu arílic en la posició C6.

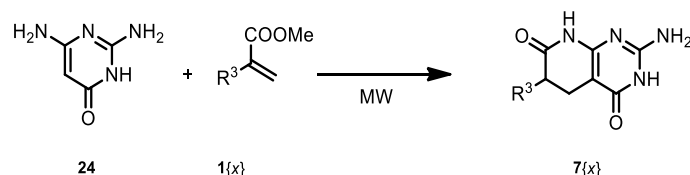


Figura 1.2.7: Proposta sintètica per a l'obtenció de sistemes **7{x}** 6-aril substituïts

Per tal d'assajar la síntesi d'aquests sistemes **7{x}**, es decideix continuar utilitzant metacrilat de metil (**1{x}**) com a reactiu model en les primeres etapes del desenvolupament d'aquesta metodologia ja que és un reactiu comercialment assequible. La pirimidona **24** és també un producte comercial (Figura 1.2.8).

Amb la finalitat de trobar les condicions de reacció per aquest procés s'estudien les següents variables: relació molar, dissolvent, temperatura i temps de reacció.

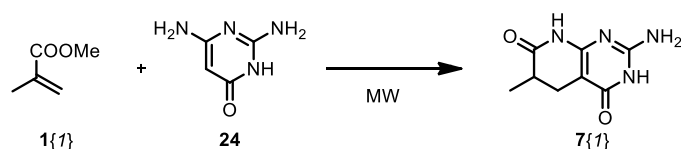


Figura 1.2.8: Estudi de la formació de la piridopirimidina 7{1} a partir de metacrilat de metil 1{1}

Els dissolvents assajats són etilenglicol, dimetilformamida i AcOH pels seus elevats punts d'ebullició, els quals permeten treballar a elevada temperatura amb calefacció de microones. Es decideix treballar a diferents temperatures: 80, 140 i 180 °C i s'estudia la reacció a 30 minuts i a una hora. Malauradament, després de realitzar una desena d'experiments no s'obté en cap cas el producte desitjat 7{1}. Això sembla ser degut a l'elevada reactivitat del metacrilat de metil (1{1}) que dona lloc a reaccions secundàries. Es descarta, per tant, el seu ús com a reactiu model per l'estudi i desenvolupament de la reacció de Michael entre l'acrilat 1{x} i la pirimidona (24).

Es decideix seguir estudiant les condicions adequades per a la síntesi d'aquests compostos piridopirimidínics (7{x}) a partir de l'atropat de metil (1{2}) que no és un reactiu comercialment assequible (Figura 1.2.9). Per a la síntesi de l'atropat de metil es parteix del fenilacetat de metil (29{2}), que es fa reaccionar amb paraformaldehid (30) en medi bàsic en DMF anhidre com a dissolvent, 3h a 100 °C, obtenint-se el producte desitjat 1{2} amb un rendiment del 68%^[7].

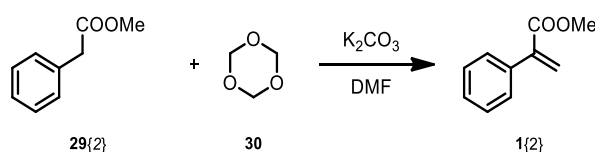


Figura 1.2.9: Síntesi de l'atropat de metil 1{2} a partir del l'èster 29{2}

Una vegada obtingut l'atropat de metil (1{2}) es procedeix a estudiar la seva reactivitat davant de la pirimidona (24) (Figura 1.2.10).

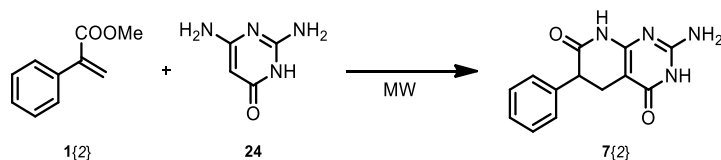


Figura 1.2.10: Síntesi de 7{2} a partir de 1{2} i 24

Després de diversos assajos, únicament en un dels experiments en el que es fa reaccionar l'atropat (1{2}) amb la pirimidona (24) en relacions equimolars emprant etilenglicol com a

dissolvent a 140 °C durant 30 minuts amb calefacció de microones, es va obtenir el producte desitjat **7{2}** amb un rendiment del 2%.

Degut a la no obtenció de resultats satisfactoris, es valora la possibilitat d'incorporar una base, que pogués afavorir la reacció de tipus Michael entre la pirimidona (**24**) i l'acrilat (**1{2}**).

S'examina l'efecte de l'ús d'una base com és el NaOMe. Es procedeix a estudiar la reacció emprant diferents proporcions de NaOMe, utilitzant etilenglicol com a dissolvent a 180 °C durant 3h amb calefacció de microones (Taula 1.2.2).

Taula 1.2.2: Estudi de l'efecte d'una base en la formació del compost **7{2}**

Compost 1{2}	Compost 24	NaOMe	Resultats
1,0	1,0	0,25	Producte 7{2} impurificat
1,0	1,0	1,0	Rdt = 42%
1,0	1,0	1,5	Rdt = 40%

S'observa que és necessari l'ús d'una base per a l'obtenció d'aquests sistemes **7{x}**. Es comprova que l'excés de base (1,5 equivalents respecte a relació equimolar dels altres reactius) no afavoreix la formació de **7{2}**, ja que el rendiment obtingut és del mateix ordre, i també s'observa que es generen certes impureses amb el fet d'utilitzar-ne un defecte. Fins al moment, les millors condicions de reacció per a la formació del compost **7{2}** són condicions equimolars emprant NaOMe a 180 °C durant 3h amb calefacció de microones.

Per tal de millorar el rendiment de la reacció en estudi, s'evalua el possible efecte d'un excés de pirimidona (**24**) o bé d'un excés d'acrilat (**1{2}**) respecte al reactiu limitant a 180 °C durant 3 h amb calefacció de microones.

Taula 1.2.3: Estudi del reactiu limitant en l'avanç de la reacció per rendir **7{2}**

Compost 1{2}	Compost 24	NaOMe	Resultats
1,0	1,0	1,0	Rdt = 42%
1,0	1,4	1,0	Rdt = 68%
1,4	1,0	1,0	Producte 7{2} impurificat

Tal i com es pot veure a la taula 1.2.3, quan l'acrilat (**1{2}**) és el reactiu limitant i per tant es treballa amb un excés de 1,4 equivalents de pirimidona (**24**), el rendiment de la reacció augmenta considerablement d'un 42 a un 68%. L'excés de pirimidona (**24**) no presenta cap problema alhora de realitzar el tractament posterior de la reacció, ja que finalitzada la reacció s'afegeix aigua en el cru de reacció afavorint la precipitació de la pirido[2,3-*d*]pirimidina (**7{2}**), mentre que la pirimidona (**24**) en excés és soluble en medi aquós. Resumint, la formació de la 4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidina (**7{2}**) està afavorida quan es treballa amb un excés de 1,4 equivalents

de pirimidona (**24**) respecte l'acrilat de metil (**1{2}**) en presència d'un equivalent de NaOMe a 180 °C durant 3h amb calefacció de microones en etilenglicol.

A la vista dels resultats obtinguts per a l'atropat de metil (**1{2}**) es procedeix a realitzar una quimioteca de compostos 4-oxopiridopirimídínics (**7{x}**) emprant diferents 2-aril acrilats de metil (**1{x}**) com a productes de partida, amb la finalitat d'estudiar l'abast d'aquesta nova reacció desenvolupada.

1.2.1.1. Síntesi de 2-arilacrilats de metil (**1{x}**)

A l'hora de realitzar una quimioteca de compostos **7{x}** és necessari tenir present la disponibilitat dels acrilats **1{x}**. Amb la finalitat de tenir un gran espectre de compostos, es pensa en la presència de grups acceptors i donadors d'electrons en diferents posicions de l'anell fenílic dels corresponents acrilats (**1{x}**). En el nostre grup hi ha gran experiència en la síntesi de 2-aril acrilats d'alquil.

Per a la síntesi de 2-aril acrilats de metil (**1{x}**) es segueix la metodologia sintètica descrita en l'apartat experimental consistent en el tractament del corresponent arilacetat de metil (**29{x}**) amb paraformaldehid i K_2CO_3 en DMF a 100 °C durant 3 h. En aquells casos en els que els aril acetats (**29{x}**) no són comercials, es sintetitza el mateix a partir de l'àcid aril acètic (**31{x}**) corresponent^[7]. Es tracta d'una esterificació en medi àcid en la que s'obté el producte esterificat (**29{x}**) amb un rendiment pràcticament quantitatiu (Figura 1.2.11).

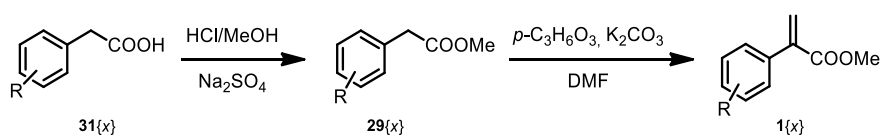
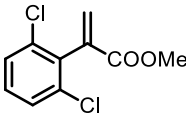
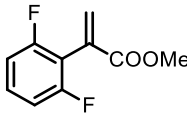
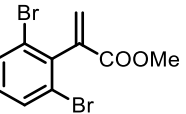
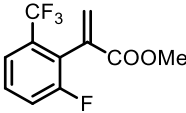
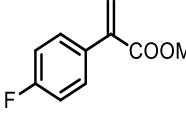
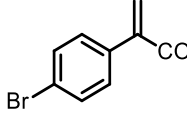
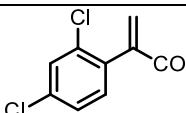
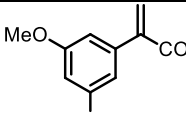
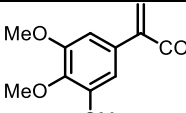
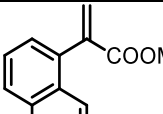


Figura 1.2.11: Metodologia per a la síntesi de 2-arilacrilats de metil (**1{x}**)

En mode resum, a la taula 1.2.4 es mostra una classificació dels 2-aril acrilats de metil (**1{x}**) que s'han sintetitzat, on es pot observar els rendiments obtinguts en l'última etapa de síntesi.

Taula 1.2.4: Classificació dels aril acrilats de metil **1{x}** sintetitzats amb els seus respectius rendiments

Classificació	Estructura
No substituït	<p style="text-align: center;">1{2} Rdt = 68%</p>

Classificació	Estructura		
Orto disubstituïts	 1{3} Rdt = 94%	 1{4} Rdt = 65%	 1{5} Rdt quantitatiu
	 1{6} Rdt = 95%		
Para substituïts	 1{7} Rdt = 52%	 1{8} Rdt = 36%	
	 1{9} Rdt = 90%		
Meta disubstituïts	 1{10} Rdt = 55%		
Meta i para substituïts	 1{11} Rdt = 40%		
Altres	 1{12} Rdt = 88%		

1.2.1.2. Síntesi de 2-amino-6-aryl-5,6-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-4,7(3H,8H)-diones (7{x})

Seguidament, s'assaja la metodologia desenvolupada tractant els diversos 2-arylacrilats de metil (1{x}) amb la pirimidona (24) en presència de NaOMe com a base i etilenglicol com a dissolvent per rendir els corresponents sistemes 4-oxopirido[2,3-d]pirimidínics (7{x}) (Figura 1.2.12).

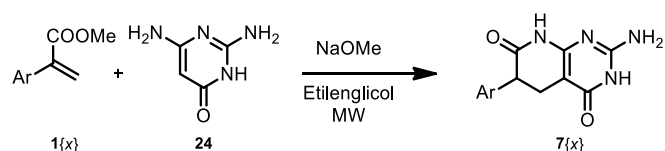


Figura 1.2.12: Síntesi de sistemes 4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics 7{x}

A la següent taula es mostren els rendiments de la família de pirido[2,3-*d*]pirimidines (7{x}) sintetitzada.

Taula 1.2.5: Pirido[2,3-*d*]pirimidines (7{x}) sintetitzades amb el seus respectius rendiments

 7{2}	 7{3}	 7{4}
Rdt = 68%	Rdt = 89%	Rdt = 88%
 7{5}	 7{6}	 7{7}
Rdt = 75%	Rdt = 81%	Rdt = 83%
 7{8}	 7{10}	 7{11}
Rdt = 71%	Rdt = 75%	Rdt = 71%
 7{12}		
Rdt = 93%		

Com es pot observar a la taula 1.2.5, la reacció presenta molt bons rendiments, entre el 68 i el 93%, quan s'utilitzen 2-arylacrilats de metil (1{x}) per rendir els corresponents compostos 7{x}. Es tracta doncs, d'una metodologia que permet obtenir compostos 7{x} derivatitzats en C6 amb rapidesa i amb rendiments elevats.

Dels resultats obtinguts en sintetitzar aquesta quimioteca formada per 10 compostos es pot concloure que, en general, els compostos arílics *orto*-substituïts presenten millors rendiments.

1.2.1.3. Estudi de la reactivitat d'altres acrilats d'alquil en la síntesi de 4-oxopirido[2,3-d]pirimidines

Una vegada s'ha demostrat que la metodologia desenvolupada permet l'obtenció de sistemes 6-aryl-4-oxopirido[2,3-d]pirimidínic amb bon rendiment, es decideix ampliar la metodologia desenvolupada en aquest apartat per 2-àquil, 3-àquil i 3-àril acrilats de metil per a l'obtenció dels corresponents compostos piridopirimidínics **7{x}** (Figura 1.2.13).

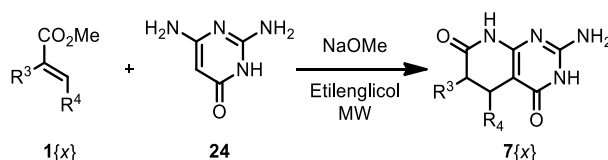


Figura 1.2.13: Proposta de síntesi per a la formació de sistemes **7{x}**

En primer lloc, es decideix començar utilitzant 2-àquil acrilats de metil (**1{x}**), provant de nou el metacrilat de metil (**1{1}**) i el 2-benzilacrilat de metil (**1{13}**). Per a la síntesi del 2-benzilacrilat de metil (**1{13}**) es parteix de l'àcid 2-benzilacrílic (**32**), el qual després d'un procés d'esterificació en medi àcid rendeix el producte desitjat^[8] (**1{13}**) amb un rendiment del 93% (Figura 1.2.14).

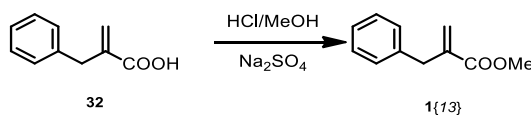


Figura 1.2.14: Síntesi de 2-benzilacrilat de metil **1{13}**

Quan s'utilitza 2-benzilacrilat de metil (**1{13}**) com a producte de partida i es fa reaccionar amb la pirimidona (**24**) en medi bàsic a 180 °C durant 3 h amb calefacció de microones, s'obté el corresponent 4-oxopirido[2,3-d]pirimidina (**7{13}**) amb un grup benzil en C6 amb un rendiment del 78% (Taula 1.2.6). Per contra, quan es parteix del metacrilat de metil (**1{1}**) la reacció presenta un rendiment del 49% en les mateixes condicions. Es confirma que l'ús d'una base és imprescindible per tal que la reacció tingui lloc, ja que com s'ha descrit anteriorment aquesta reacció es va assajar en absència de base sense obtenir-se el producte desitjat (Figura 1.2.15).

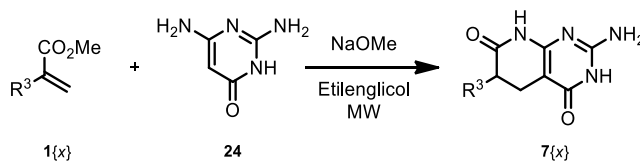


Figura 1.2.15: Esquema per a la síntesi de sistemes **7{x}** substituïts en C6

En segon lloc, es decideix assajar la nova metodologia emprant 3-alkil i 3-aryl acrilats de metil (Figura 1.2.16). Com exemple d'acrilats 3-alkil substituïts s'utilitza el crotonat de metil (**1{14}**). Aquest, es fa reaccionar amb la pirimidona (**24**) rendint la piridopirimidina (**7{14}**) substituïda en la posició C5 amb un rendiment del 30%. Per contra, quan s'utilitza el cinamat de metil (**1{15}**) s'obté el compost piridopirimidínic **7{15}** amb un rendiment del 22%.

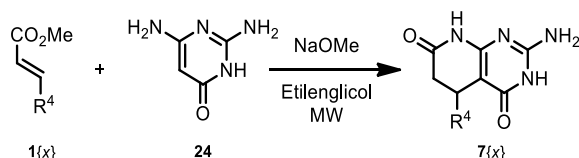


Figura 1.2.16: Esquema per a la síntesi de sistemes **7{x}** substituïts en C5

A continuació es mostra una taula resum amb els rendiments dels sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics (**7{x}**) sintetitzats a partir de 2-alkil, 3-alkil i 3-aryl acrilats (**1{x}**).

Taula 1.2.6: Sistemes piridopirimidínics **7{x}** obtinguts a partir de 2-alkil, 3-alkil i 3-aryl acrilats.

 7{1}	 7{13}
Rdt = 49%	Rdt = 78%
 7{14}	 7{15}
Rdt = 30%	Rdt = 22%

Es demostra, per tant, que la metodologia desenvolupada és vàlida per a l'obtenció de sistemes 4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics amb qualssevol classe de substituents en posició C5 o C6. S'observa, de totes formes, que la reacció de formació de la 4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidina està més afavorida partint de sistemes acrílics 2-substituïts que de 3-substituïts, independentment de que el substituent sigui alquílic o arílic. En qualsevol cas, els rendiments són en general més elevats en el cas dels sistemes acrílics 2-arylsubstituïts.

1.2.2. Desenvolupament d'una estratègia sintètica per a l'obtenció de sistemes pirido[2,3-d]pirimidínics substituïts en C4

Per a l'obtenció de sistemes piridopirimidínics substituïts en C4, el Grup d'Enginyeria Molecular ha desenvolupat una estratègia sintètica a partir del compost 4-oxo corresponent (**7**), consistent en el tractament d'aquest amb POCl_3 rendint el derivat clorat **11** (a través de la captació de la forma enòlica del compost 4-oxo, **7**)^[9] el qual en posteriors etapes de síntesi pot ser derivatitzat (Figura 1.2.17).

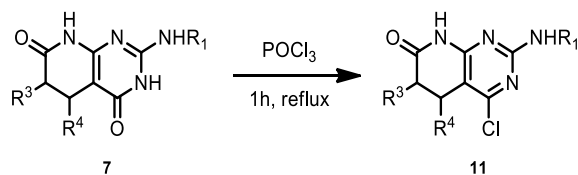


Figura 1.2.17: Obtenció de sistemes 4-cloropirido[2,3-d]pirimidínics (**11**)

Com ja s'havia indicat a la introducció, aquesta estratègia de síntesi presenta algunes dificultats en l'obtenció del cloro-derivat (**11**), ja que en el si de la reacció es generen impureses difícils d'eliminar per tal d'obtenir el compost desitjat pur. A més, el rendiment és altament dependent de la naturalesa dels substituents presents en la 4-oxopiridopirimidina (**7**). Per tant, és necessari el desenvolupament d'una nova estratègia sintètica més robusta per rendir compostos derivatitzats en la posició C4.

Una cerca bibliogràfica revela que és possible l'activació del carbonil en C4 pel tractament amb BOP o PyBOP, i la posterior substitució per un nucleòfil en presència d'una base^[10-12]. Aquesta estratègia de síntesi implica el pas per un intermedi amb un grup benzotriazolil (OBt). Es tracta d'un bon grup sortint, el qual ha de permetre la substitució per un nucleòfil com ara una amina rendint el compost 4-amino substituït. Dit intermedi no s'aïlla, es genera en el si de la reacció i es substitueix degut a la presència del nucleòfil en el mateix.

Aquests tipus d'intermedis es poden sintetitzar a partir de diversos reactius com ara l'hexafluorofosfat de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfoni conegut com a BOP, i hexafluorofosfat de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinfosfoni anomenat PyBOP (Figura 1.2.18).

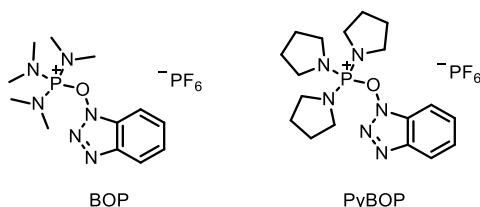


Figura 1.2.18: Estructura del BOP i PyBOP

El BOP és un reactiu utilitzat en síntesi de pèptids però, per desgràcia, el seu ús no és molt aconsellable ja que en l'etapa d'acoblament allibera l'hexametilfosforamida (HMPA). L'hexametilfosforamida, compost organofosforat de fórmula $[(\text{CH}_3)_2\text{N}]_3\text{PO}$, és un líquid apròtic polar soluble en aigua i cancerigen. Encara que es tracta d'un producte nociu per la salut no es descarta el seu ús a petita escala al laboratori. De totes formes, en la mesura del possible es tractarà d'utilitzar el PyBOP com a substitut del reactiu BOP, evitant així la formació d'HMPA (Figura 1.2.19).



Figura 1.2.19: Estructura de la HMPA

Segons el que s'ha trobat en la bibliografia, per dur a terme la reacció entre BOP/PyBOP i el compost carbonílic corresponent és necessari un excés molar de BOP o PyBOP i un excés de base. Es descriuen l'ús de diferents bases, les més utilitzades són bases apròtiques com ara: Cs_2CO_3 , TEA, DIPEA (base de Hünig), *tert*-BuONa i DBU.

A la figura 1.2.20 es mostra una proposta del mecanisme de reacció que es donaria sobre les nostres 4-oxopiridopirimidines (**7**{x}) en utilitzar BOP o PyBOP basada en els estudis realitzats per Zhao-Kui Wan i col·laboradors^[10]. Es creu que la formació dels intermedis **33**{x} i **34**{x} es tracta d'un procés ràpid, el qual té lloc després del tractament de la piridopirimidina amb DBU i BOP. La següent substitució depèn, en gran mesura, de la capacitat nucleòfila del substituent que es desitja introduir. Quan el substituent és una amina, com és el cas d'una amina alquílica, es passa a través de la via 1 i s'obté el producte desitjat (**14**{x,y}) substituït en C4. En canvi, quan s'empra un nucleòfil pitjor es creu que es passa a través de la via 2.

Per rendir el producte desitjat a través de la via 2, es creu que es passa per l'intermedi **33**{x} o **34**{x} i tot seguit s'obté l'intermedi OBT substituït en C4 (**18**{x}), el qual presenta un grup benzotriazolil, 1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-iloxi, en la posició C4. La corresponent amina reacciona amb aquest intermedi **18**{x} per rendir el compost desitjat **14**{x,y}. Es tracta doncs, d'una etapa més lenta que té lloc quan s'empra un residu amb menys capacitat nucleòfila.

Per altra banda, també es planteja un altre possible mecanisme d'actuació del BOP. L'oxigen del carbonil en C4 del sistema piridopirimidínic, a través de la seva forma enòlica, pot atacar nucleòfilament al fòsfor del BOP/PyBOP, formant l'enllaç O-P i d'aquesta manera es podria arribar als intermedis **33**{x} i **34**{x}.

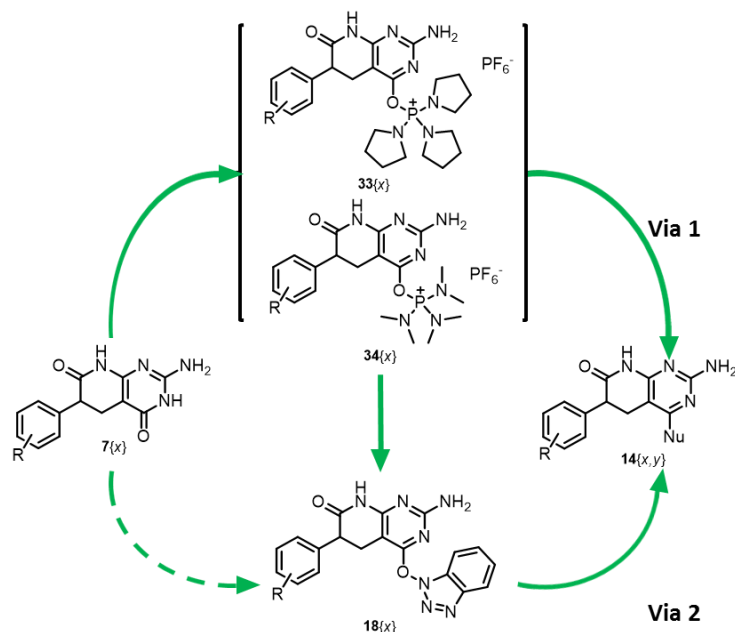


Figura 1.2.20: Possible mecanisme d'acció del BOP i del PyBOP

1.2.2.1. Síntesi de pirido[2,3-*d*]pirimidines 4-amino substituïdes (**14**_{x,y})

Es decideix començar a estudiar aquesta reacció utilitzant 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) com a base, una amidina no nucleòfila. L'estudi de la reacció de substitució del carbonil s'assaja en paral·lel emprant BOP i PyBOP utilitzant el compost **7**_{7} com a producte de partida (Figura 1.2.21), el qual presenta el grup *p*-fluorofenil en la posició C6. Tal i com es comenta a l'inici d'aquest capítol aquest residu és present en molts dels compostos del tipus pirido[3,2-*d*]pirimidínic descrits per Gilead Sciences com a inhibidors del VHC amb bona activitat antiviral.

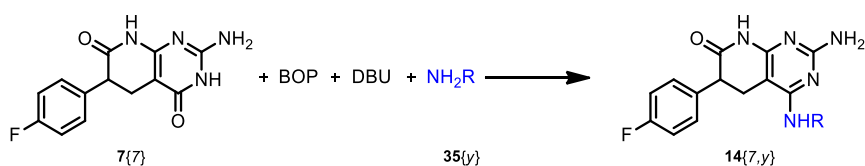


Figura 1.2.21: Derivatització en C4 de la 4-oxopiridopirimidina **7**_{7}

Com a nucleòfils s'utilitzaran les següents amines:

- Amines primàries: isopropilamina (**35**_{1}), ciclopropilamina (**35**_{2}), *N*-etil-*N*-metilamina (**35**_{3}), trifluoroetilamina (**35**_{4}), pentilamina (**35**_{6}), 2-propoxietilamina (**35**_{7})
- Amines secundàries: pirrolidina (**35**_{5})

A continuació, a la taula 1.2.7, es mostra un resum dels primers assaigs realitzats. En tots els casos es manté la mateixa relació entre el reactiu de partida (**7**_{7}), el BOP o PyBOP, i la base

amb les proporcions de 1 : 1,3 : 1,5 equivalents respectivament, canviant només els equivalents d'amina (**35**{y}).

Taula 1.2.7: Condicions de síntesi per a **14**{x,y} emprant diferents amines **35**{y}.

Experiment	Reactius	Nucleòfil	Dv	Condicions	Resultats
1	PyBOP DIPEA	1,3 eq 35 {1}	DMF	24h rt	33 {7} + 7 {7}
2	BOP DBU	1,5 eq 35 {1}	ACN	10min rt, 48h 60 °C	18 {7}
3	BOP DBU	6,0 eq 35 {1}	ACN	10min rt, 5h 90 °C	18 {7} + 7 {7}
4	BOP DBU	6,0 eq 35 {2}	ACN	10min rt, 5h 120 °C	18 {7} + 7 {7}
5	BOP DBU	1,5 eq 35 {3}	ACN	10 min rt, 24h rt	18 {7}
6	PyBOP DIPEA	3,0 eq 35 {4}	DMF	2h rt, 24h rt	33 {7}

En els experiments 1 a 3 s'assagen diferents condicions de reacció en les que s'utilitzen diferents relacions molars d'isopropilamina (**35**{1}). En tots els casos s'obté una mescla de producte de partida (**7**{7}) i dels intermedis **18**{7} i **33**{7}, però en cap dels casos s'obté el producte 4-isopropilamino substituït **14**{7,1} desitjat. El mateix passa en els experiments 4 a 6 en els que es fa reaccionar amb ciclopropilamina (**35**{2}), *N*-etil-*N*-metilamina (**35**{3}) i trifluoretilamina (**35**{4}), no obtenint-se el corresponent producte desitjat **14**{7,y}.

Veient que les diferents proves amb amines primàries no donen els resultats esperats, es decideix provar amb una amina secundària, pirrolidina **35**{5}, millor nucleòfil que els assajats anteriorment (Figura 1.2.22). En els experiments 7 i 8 citats a la taula 1.2.8 s'assaja la reacció en estudi emprant 1,5 equivalents d'amina, observant-se que només en el cas que s'utilitza BOP s'obté el producte desitjat **14**{7,5} amb un rendiment del 55%. Aquest fet, ens fa descartar l'ús de PyBOP com a reactiu, ja que sota les mateixes condicions de reacció la transformació no és completa.

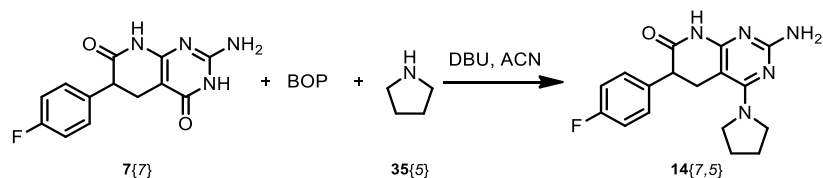


Figura 1.2.22: Síntesi del compost **14{7,5}**

Taula 1.2.8: Condicions de reacció per a l'obtenció de **14{7,5}** emprant pirrolidina **35{5}** com a nucleòfil

Experiment	Reactius	Nucleòfil	Dv	Condicions	Resultats
7	BOP DBU	1,5 eq 35{5}	ACN	10 min rt, 48h rt	Rdt _{14{7,5}} = 55%
8	PyBOP DBU	1,5 eq 35{5}	ACN	10 min rt, 48h rt	7{7} + 14{7,5}

Per tal d'estudiar més detalladament l'evolució de la reacció cal fer-ne un seguiment per ^1H RMN, ja que tant els reactius de partida com els productes a sintetitzar són només solubles en DMSO o bé en TFA, la qual cosa dificulta el seguiment de l'esmentada reacció per CCF. Per poder fer un bon seguiment per ^1H RMN es caracteritzen espectroscòpicament els intermedis **33{7}** i **18{7}**. Els corresponents ^1H RMN es mostren a continuació:

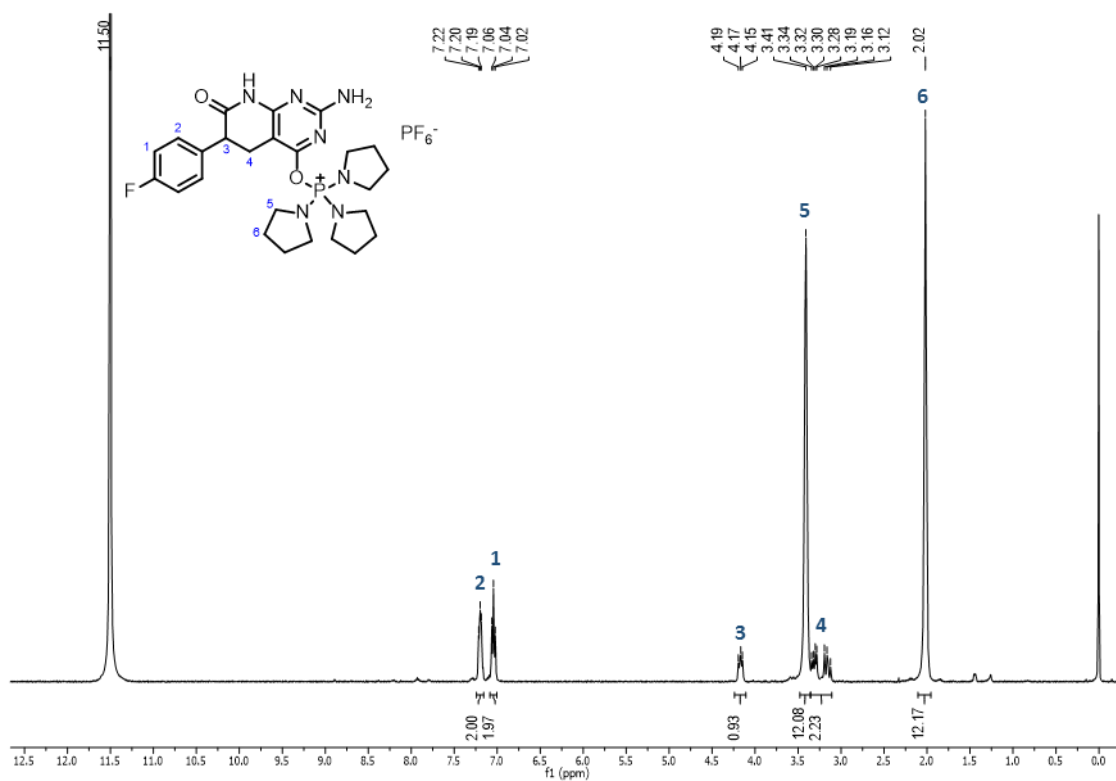


Figura 1.2.23: ¹H RMN de l'intermedi **33{7}** enregistrat en d-TFA

A la figura 1.2.23 s'observen dos senyals molt característics del compost intermedi **33{7}** amb tres grups pirrolidinil, presentant senyals a 3,5 i a 2,0 ppm corresponents als metilens dels anells de pirrolidina, trobant-se a camp més baix els metilens més propers als nitrogen de les amines.

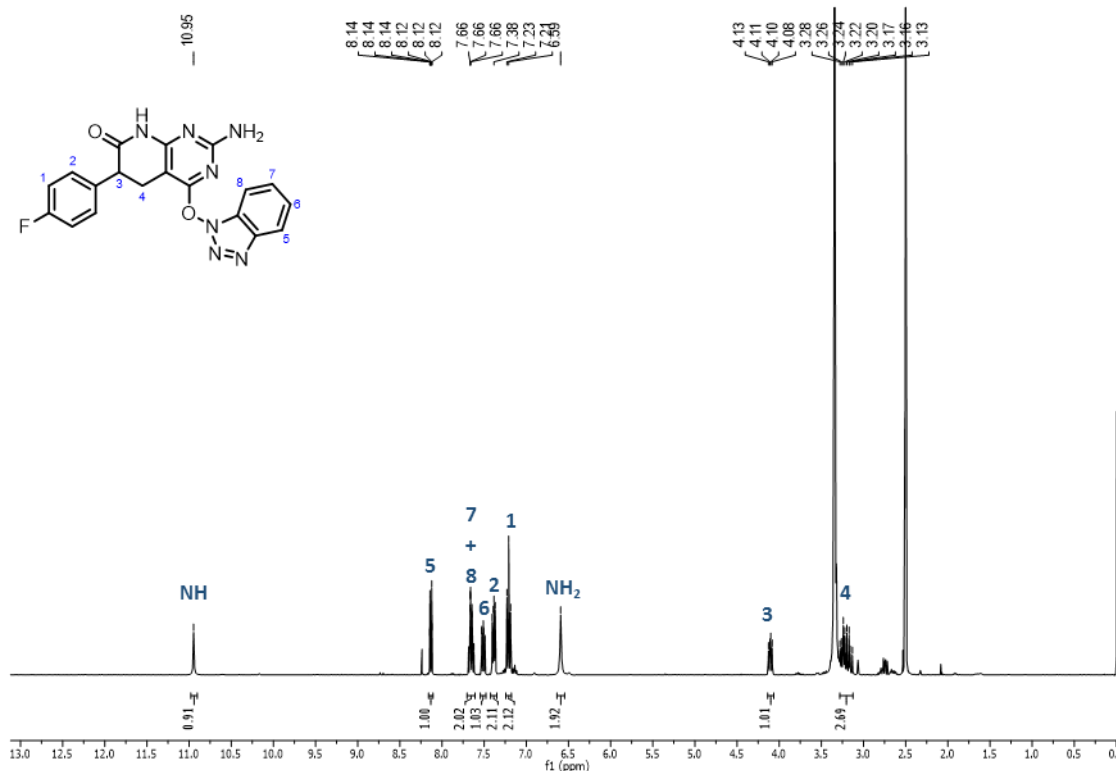


Figura 1.2.24: ^1H RMN de l'intermedi **18{7}** enregistrat en d_6 -DMSO

A la figura 1.2.24 s'observa l' ^1H RMN del compost intermedi **18{7}** que presenta un grup benzotriazolil en la posició C4. Es tracta d'un espectre de RMN més complex, ja que el nombre de senyals aromàtics augmenta, dificultant-ne la seva identificació. Després de realitzar diversos espectres bidimensionals, com ara el COSY, l'HSQC i el ^{13}C RMN es van poder identificar tots els senyals de protó característics del compost **18{7}**.

En darrer lloc, en un dels assajos realitzats emprant BOP com a reactiu, es va aïllar un producte minoritari del qual es mostra l' ^1H RMN a continuació (Figura 1.2.25). En base als senyals de l'espectre es pot deduir que presenta tres grups dimetilamino units directament al fòsfor a 2,6 ppm, també s'observen els senyals aromàtics corresponents a l'anell *p*-substituint en posició C6. Per contra, els senyals del metilè i del metí a C5 i C6 respectivament no s'observen, en canvi s'observa un singlet a 7,8 ppm molt característic del protó en C5 després de la deshidrogenació de l'enllaç entre les posicions C5 i C6. Per a poder assignar de forma inequívoca la seva estructura es va realitzar un masses.

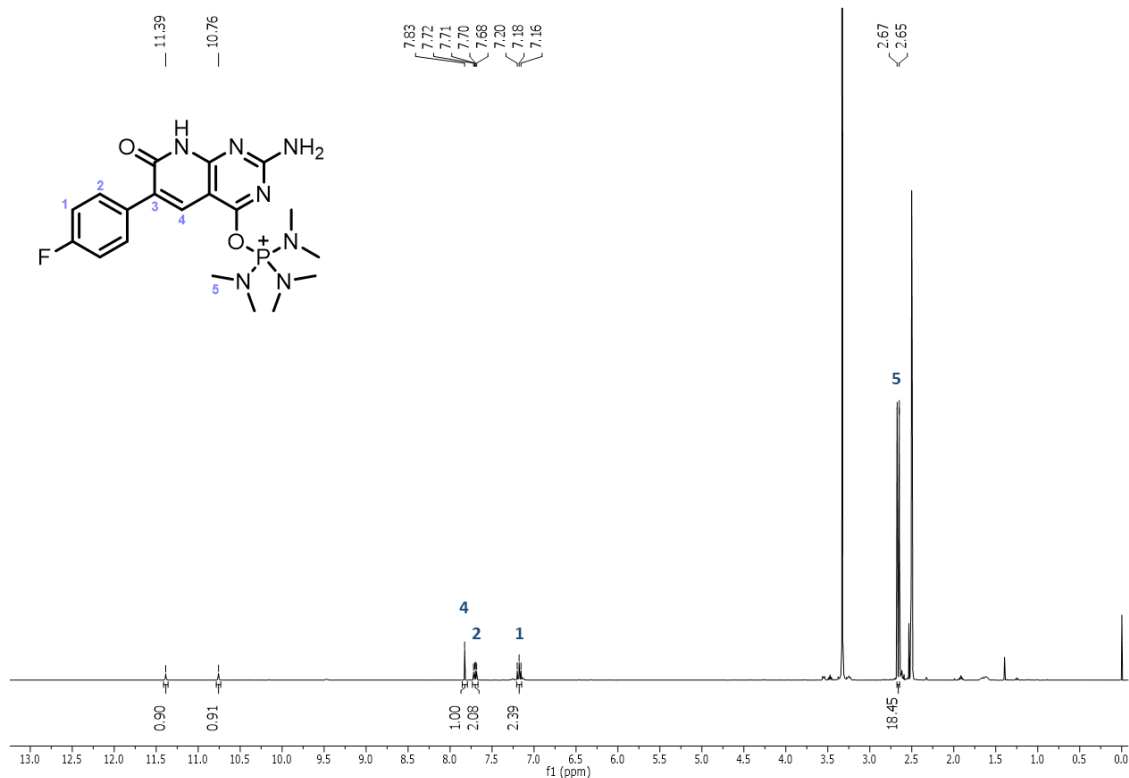


Figura 1.2.25: ^1H RMN de l'intermedi **36** enregistrat en d_6 -DMSO

Una vegada s'han caracteritzat els possibles intermedis, s'estudiarà l'evolució de la reacció entre la 4-oxopiridopirimidina **7{7}**, el BOP o PyBOP i la pirrolidina **35{5}**. A continuació a la figura 1.2.26 es mostren els ^1H RMN del producte de partida **7{7}** (blau), el producte desitjat **14{7,5}** (vermell) i el sòlid obtingut després de fer la reacció (experiment 8) emprant PyBOP, com a reactiu (verd). Quan s'utilitza PyBOP la reacció no és completa ja que en l' ^1H RMN s'observa que hi ha producte de partida (**7{7}**) que no ha reaccionat. Així s'observen uns senyals característics del producte de partida, concretament a 10,7 ppm un singlet corresponent al grup NH en la posició N3, un singlet a 6,5 ppm corresponent al grup amino en C2 i un multiplet a 2,7 ppm del metilè en β de carbonil del producte de partida.

Aquests senyals no s'observen en el ^1H RMN del producte obtingut després de realitzar la reacció amb BOP, la qual cosa indica que la transformació ha estat total. Per contra, s'observa l'aparició de senyals característics del producte 4-pirrolidino substituït com ara: un singlet a 5,9 ppm corresponent al grup amino en C2, multiplets a 3,4 i 1,8 ppm corresponents als grups metilènics de l'anell de pirrolidina i en últim lloc s'observa que el metilè en β de carbonil es troba desplaçat a camp més baix passant d'estar a 2,7 (corresponent al producte de partida **7{7}**) a 3,1 ppm.

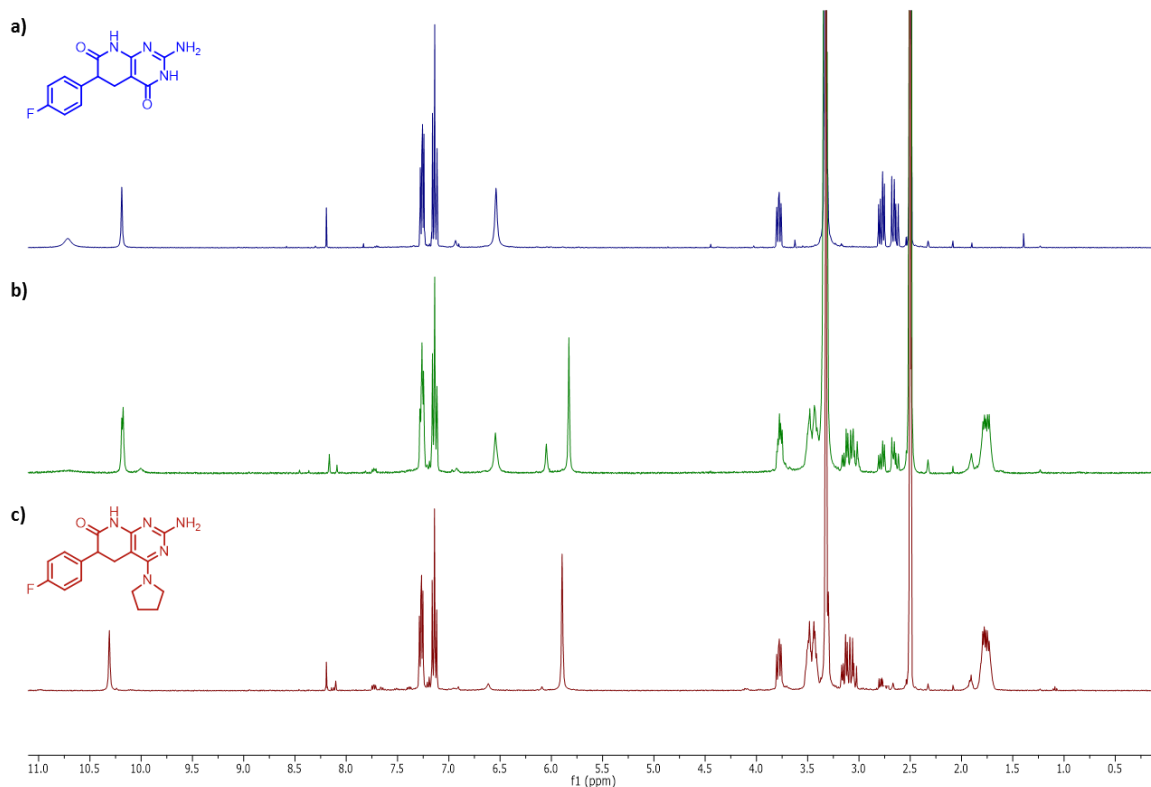


Figura 1.2.26: Seguiment de la reacció per ^1H RMN per rendir el compost pirrolidino substituït en C4 (**14{7,5}**). a) Producte de partida **7{7}**. b) Sòlid obtingut al fer la reacció amb PyBOP. c) Producte (**14{7,5}**) obtingut al fer la reacció amb BOP (^1H RMN enregistrats en d_6 -DMSO)

Per tant, s'ha obtingut satisfactòriament el compost **14{7,5}** substituït en C4 per pirrolidina utilitzant les següents relacions molars: 1,0 : 1,3 : 1,5 : 1,5 (**7{7}**: BOP: DBU : **35{5}**) en acetonitril com a dissolvent, temperatura ambient durant 48 h. Veient que amb aquestes condicions s'obté el producte 4-aminosubstituït (**14{7,5}**) esperat, es prova de nou amb una amina primària, la pentilamina (**35{6}**) (Figura 1.2.27).

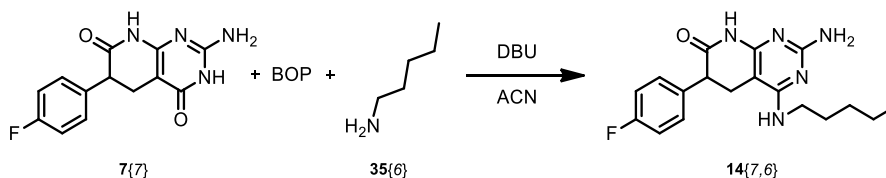


Figura 1.2.27: Síntesi del compost **14{7,6}**

A la taula 1.2.9 es mostren els experiments realitzats amb pentilamina (**35{6}**).

Taula 1.2.9: Condicions de síntesi emprant l'amina **35{6}**

Experiment	Reactius	Nucleòfil	Dv	Condicions	Resultats
9	BOP DBU	1,5 eq 35{6}	ACN	24h 60 °C, 24h 90 °C	18{7} + 14{7,6}
10	BOP DBU	3,0 eq 35{6}	ACN	24h 60 °C, 24h 90 °C	18{7} + 14{7,6}
11	BOP DBU	3,0 eq 35{6}	ACN	2h rt, 48h 90°C	Rdt _{14{7,6}} = 48%

En els experiments 9 a 11, mostrats a la taula 1.2.9, s'observa que és necessari un augment dels equivalents d'amina (**35{6}**), passant de 1,5 a 3 equivalents, i un augment de la temperatura per tal que la reacció sigui completa. En resum, quan es fan reaccionar 1,0 : 1,3 : 1,5 equivalents de **7{7}** : BOP : DBU en ACN a temperatura ambient durant 2 h es forma l'intermedi **18{7}**, després s'addicionen 3 equivalents de la pentilamina (**35{6}**) sobre el cru de reacció i el sistema es porta a 90 °C durant 48 hores. Finalitzat aquest temps i després del tractament posterior de la reacció, s'obté el producte **14{7,6}** 4-pentilamino substituït amb un rendiment del 48%.

Després d'optimitzar unes condicions de reacció per l'ús d'una amina primària es decideix assajar aquestes condicions utilitzant 2-propoxietilamina (**35{7}**), una amina alquílica que presenta un grup èter (Figura 1.2.28). S'esperaria que la reacció estigués afavorida, ja que la reactivitat hauria de ser molt similar. Després de dur a terme la reacció emprant les condicions de síntesi esmentades anteriorment, s'obté el producte desitjat **14{7,7}** amb un rendiment del 63%.

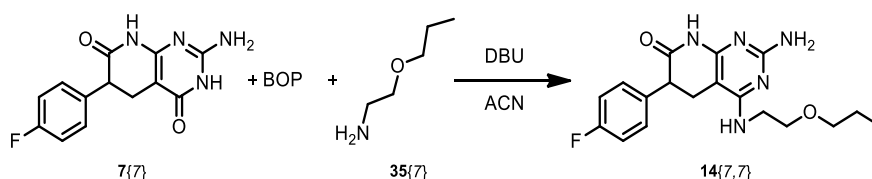
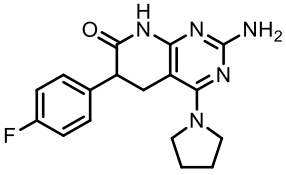
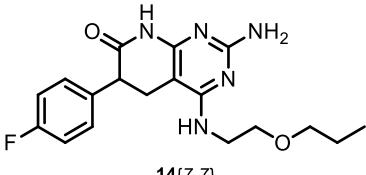
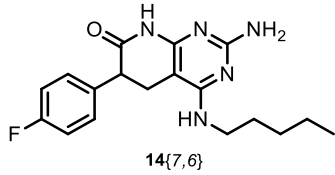
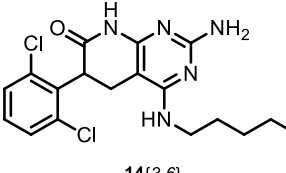
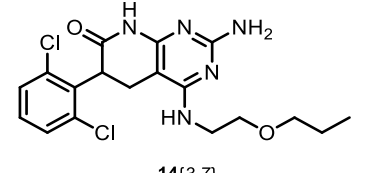
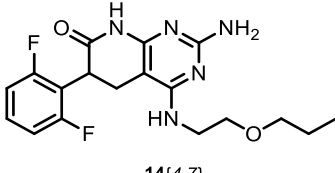
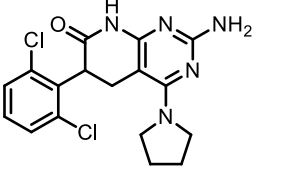
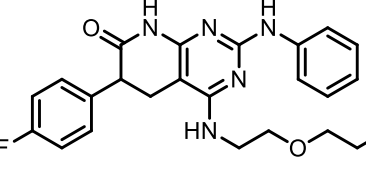
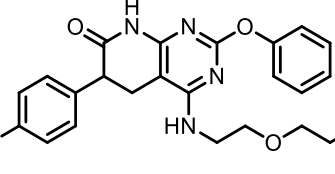
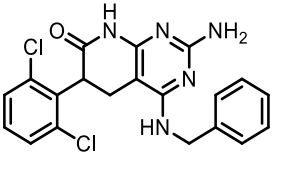


Figura 1.2.28: Síntesi del compost **14{7,7}**

Degut al bon resultat obtingut en la síntesi dels compostos 4-aminosubstituïts **14{x,y}**, es decideix assajar aquesta reacció emprant altres 4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidines de partida (**7{x}**). A la taula 1.2.10 es mostren tots els compostos **14{x,y}** sintetitzats segons aquesta estratègia sintètica i els rendiments obtinguts a partir dels compost 4-oxopiridopirimidínic (**7{x}**) corresponents.

Taula 1.2.10: Compostos **14**{x,y} sintetitzats emprant BOP com a reactiu i una amina alquílica

 <p>14{7,5}</p> <p>Rdt = 44%</p>	 <p>14{7,7}</p> <p>Rdt = 63%</p>	 <p>14{7,6}</p> <p>Rdt = 40%</p>
 <p>14{3,6}</p> <p>Rdt = 62%</p>	 <p>14{3,7}</p> <p>Rdt = 70%</p>	 <p>14{4,7}</p> <p>Rdt = 60%</p>
 <p>14{3,5}</p> <p>Rdt = 78%</p>	 <p>14{7,7,9}</p> <p>Rdt = 64%</p>	 <p>44</p> <p>Rdt = 54%</p>
 <p>14{3,8}</p> <p>Rdt = 60%</p>		

Sobre els compostos disubstituïts en C2 i C4 presents a la taula 1.2.10, es comentarà la seva síntesi a l'apartat 1.3 d'aquest treball.

Per últim es decideix assajar dita reacció aïllant l'intermedi OBt substituït en C4 (**18**{x}), fent-lo reaccionar posteriorment amb l'amina corresponent per rendir el producte desitjat 4-aminosubstituït (Figura 1.2.29).

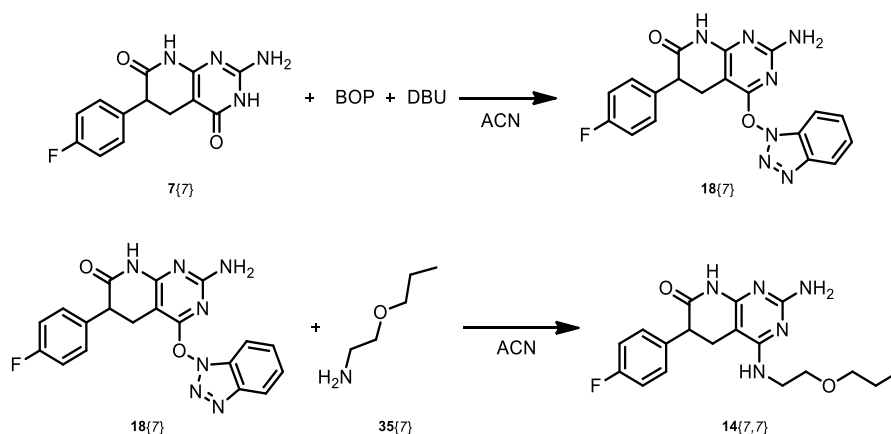


Figura 1.2.29: Estratègia sintètica per rendir **14{7,7}** aïllant el compost intermedi **18{7}**

Per a la síntesi de l'intermedi **18{7}** s'assagen les condicions de reacció descrites prèviament en aquest apartat però sense addicionar-ne l'amina. Per tal d'estudiar l'evolució de la reacció s'agafen alíquotes a diferents temps de reacció: 2 hores, 8 hores, 12 hores, 24 hores, 3 dies i fins a 7 dies. En tots els casos s'observa que a mesura que augmenta el temps de la reacció la formació de l'intermedi augmenta, però no s'aconsegueix tenir conversió completa després de 7 dies de reacció.

A la següent figura 1.2.30 s'observa en vermell el producte de partida **7{7}**, que presenta un doblet de doblets molt característic a 3,78 ppm corresponent al metí de la posició C6 on hi ha el centre quiral de la molècula. Els espectres de ^1H RMN inferiors corresponen als productes aïllats a diferents temps de reacció. En tots ells es pot observar un senyal a 4,10 ppm corresponent al metí en C6 de l'intermedi **18{7}**, que es troba desplaçat a camp més baix respecte el producte de partida **7{7}**. Aquest fet, ens permet fer un seguiment de la reacció per ^1H RMN amb facilitat, observant que ni després de 7 dies de reacció a temperatura ambient la conversió és completa.

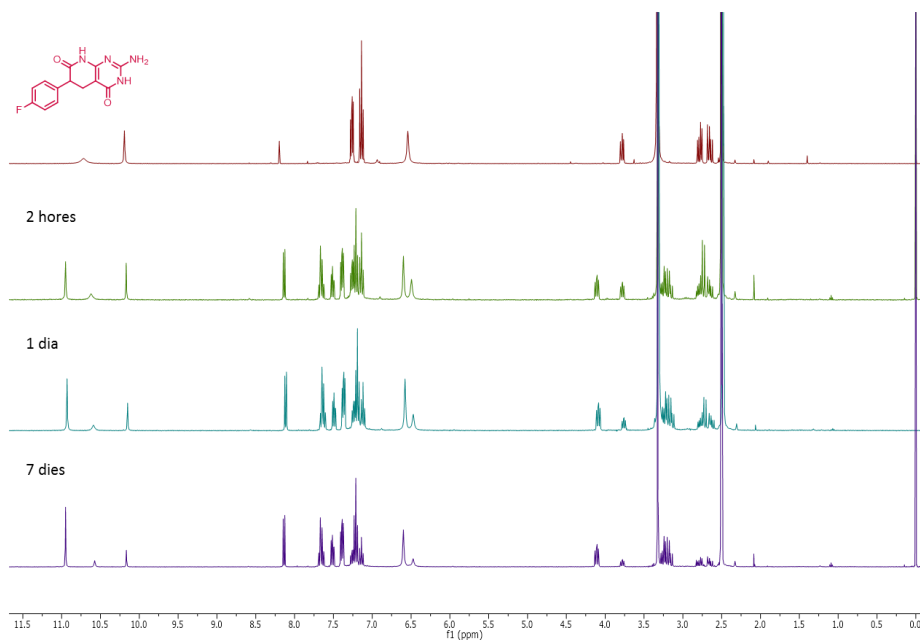


Figura 1.2.30: Estudi de l'evolució de la formació de l'intermedi **18{7}** per ^1H RMN enregistrats en d_6 -DMSO

Després de l'estudi d'aquesta reacció es decideix augmentar la relació de BOP passant de 1,3 a 1,5 equivalents i, els equivalents de DBU de 1,5 a 2,5. Com a resultat d'aquesta modificació en l'estequiometria de la reacció s'obté el producte desitjat **18{7}** satisfactòriament amb un rendiment del 74%.

Aquest intermedi **18{7}** es fa reaccionar directament amb 3 equivalents de la corresponent amina (**35{y}**) en acetonitril amb calefacció de microones. Es decideix utilitzar la calefacció de microones per tal de treballar a temperatura elevada en un sistema tancat, evitant l'evaporació de l'amina, afavorint així l'esmentada reacció. Es fa reaccionar l'intermedi **18{7}** amb 3 equivalents de 2-propoxietilamina (**35{7}**) en ACN a 140 °C durant 5 hores amb calefacció de microones. Després del tractament posterior del cru de reacció, s'obté el producte de substitució **14{7,7}** amb un rendiment del 69%.

Resumint, per a la substitució dels compostos pirido[2,3-*d*]pirimidínics en la posició C4 s'han desenvolupat dues estratègies sintètiques: una de les estratègies es tracta d'una reacció *one pot-two processes* en la que no s'aïlla l'intermedi (**18{x}**) OBt substituït en C4, i la segona metodologia inclou dues etapes de síntesi en la que s'aïlla l'intermedi (**18{x}**) i aquest es fa reaccionar amb la corresponent amina (**35{y}**). Val a dir, que el rendiment global de la reacció en dues etapes és del 51%, mentre que la reacció *one-pot* és del 63% per a la síntesi del compost **14{7,7}**.

1.2.2.2. Síntesi de compostos 4-alkiloxi pirido[2,3-*d*]pirimidínics (**15**{*x,y*})

Seguint la idea esmentada a l'apartat 1.2.2.1 es decideix estudiar l'abast d'aquesta reacció introduint un residu alcoxi en la posició C4. Per dur-ho a terme, el nucleòfil serà un alcohol (**37**{*y*}) o el corresponent alcòxid en lloc d'una amina.

En primer lloc, es decideix estudiar aquesta reacció en dues etapes, ja que el fet de realitzar la síntesi *one pot-two processes* ens dificulta l'estudi de l'evolució d'aquesta. Es tracta d'una reacció en la qual el seu seguiment s'ha de fer per ¹H RMN, ja que els productes involucrats en la reacció només són solubles en DMSO o TFA, fet que dificulta el seguiment per CCF. Quan la reacció no és completa, l'assignació dels senyals de ¹H RMN corresponents als productes involucrats en la reacció presenta dificultat.

Per a la síntesi de l'intermedi **18**{*x*} s'utilitzaran les condicions optimitzades a l'apartat 1.2.2.1, després aquest es farà reaccionar amb el corresponent alcohol **37**{*y*} per rendir el compost 4-alcoxisubstituït **15**{*x,y*}. Amb la finalitat d'estudiar l'abast de la reacció es procedeix a sintetitzar una quimioteca de compostos intermedis **18**{*x*} a partir de diferents piridopirimidines **7**{*x*} (Figura 1.2.31), que presenten diferents residus en la posició C6.

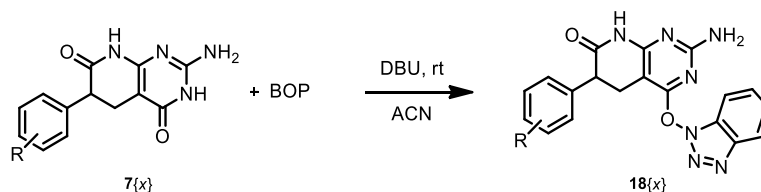
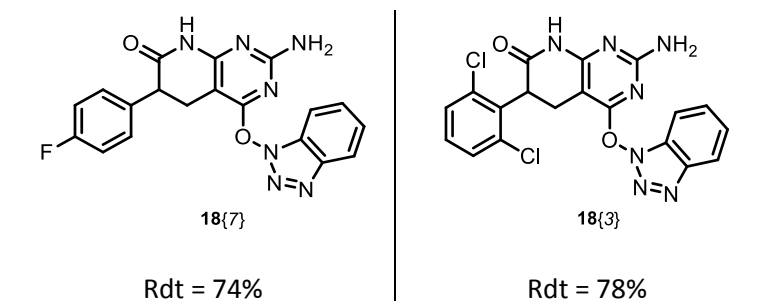
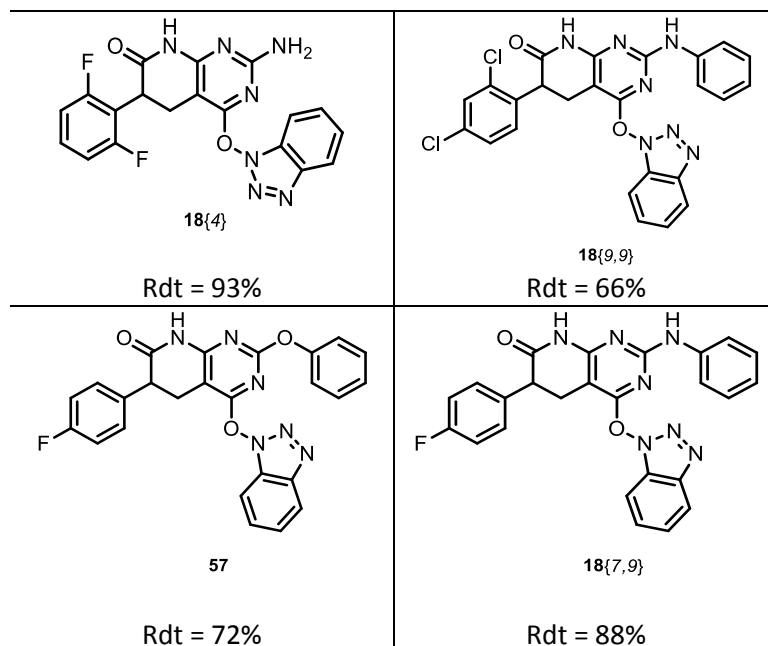


Figura 1.2.31: Síntesi dels compostos intermedis **18**{*x*}

A la taula 1.2.11 es mostren els compostos **18**{*x*} sintetitzats.

Taula 1.2.11: Quimioteca de compostos piridopirimidínics **18**{*x*} amb un grup OBt en C4





Els compostos disubstituïts en C2 i C4 presents a la taula 1.2.11 es comenta la seva síntesi a l'apartat 1.3

Tal i com es pot veure a la taula 1.2.11 s'han obtingut satisfactòriament els productes desitjats a excepció del compost **18{12}** a partir de **7{12}**, on el producte de partida conté un grup naftil en posició alfa de carbonil (Figura 1.2.32). Aquesta diferència de reactivitat podria ser deguda a efectes d'impediment estèric i no de reactivitat ja que es tracta d'un sistema aromàtic com els utilitzats anteriorment.

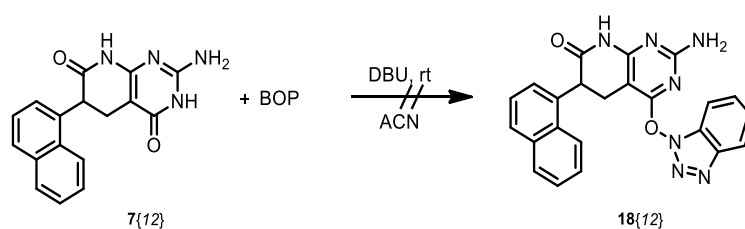


Figura 1.2.32: Intent de síntesi de **18{12}**

Els productes obtinguts contenen un gran nombre de carbonis quaternaris, fet que dificulta l'assignació dels senyals de protó i carboni als respectius espectres de RMN. Per poder fer una assignació correcta s'ha hagut de realitzar diversos espectres de RMN bidimensionals com ara COSY, HSQC i HMBC a part dels de ^1H i ^{13}C RMN.

Com a mostra de la complexitat a l'hora de caracteritzar aquests compostos es descriuen els experiments de resonància que han estat necessaris per a la correcta caracterització del compost **18{4}**.

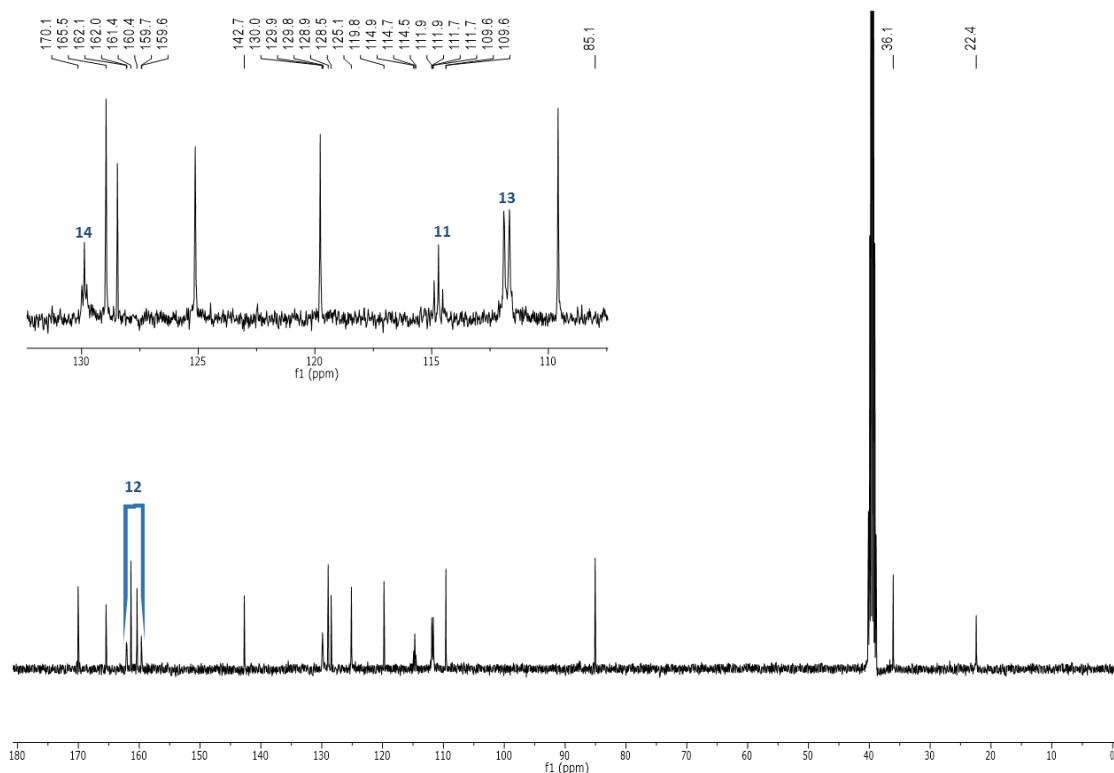


Figura 1.2.33: ^1H i ^{13}C RMN del compost **18{4}** enregistrats en d_6 -DMSO

En el primer espectre es pot observar a 11,0 ppm un senyal bescanviable del NH làctamic; la zona compresa entre 8,1 i 7,1 ppm correspon a la zona dels protons aromàtics; a 6,6 ppm s'observa un altre senyal ample assignable al grup NH₂ en posició C2; el senyal a 4,41 ppm correspon al metí en alfa de carbonil que es presenta com un doblet de doblets. Aquest carboni metínic presenta un centre quiral, fet que fa que els protons del metilè en alfa del mateix siguin diastereotòpics i per tant apareixen diferents entre 3,3 i 3,0 ppm.

En el ^{13}C RMN s'observen els senyals de carboni com a singlet, ja que aquesta tècnica es basa en el desacoblament de protons, excepte quan hi han altres spins com és el cas del fluor. Com que la nostra molècula conté fluors es generen els acoblaments corresponents. Així en el ^{13}C RMN del compost **18{4}** s'observen dos triplets a 129,9 ppm, amb una constant d'acoblament (J) de 10,6 Hz, i a 114,7 ppm, amb una $J = 18,5$ Hz. Aquests dos senyals de triplet corresponen a les posicions C14 i C11, i gràcies als valors de les constants d'acoblament podem assignar-los inequívocament ja que el senyal que presenta una J més gran és el més proper al carboni que està unit directament al fluor, per tant el triplet de 114,7 ppm correspon al C11 i el de 129,9 ppm al C14. Per altra banda, també s'observa un doblet de doblets a 111,8 ppm amb una $J = 22,3$ i 2,5 Hz, corresponent al C13 adjacent al carboni que està unit directament amb el F. En últim lloc, el C que està unit directament al fluor surt a 160,9 i a 160,8 ppm com a dos senyals doblets menys intenses amb una J de 247,2 i 246,8 Hz respectivament.

Tot seguit és necessari l'ús d'una tècnica bidimensional *Heteronuclear Single Quantum Correlation*, conegut com a HSQC, a fi de conèixer quin carboni està enllaçat directament amb el protó. La figura 1.2.34 presenta l'HSQC del compost **18{4}**.

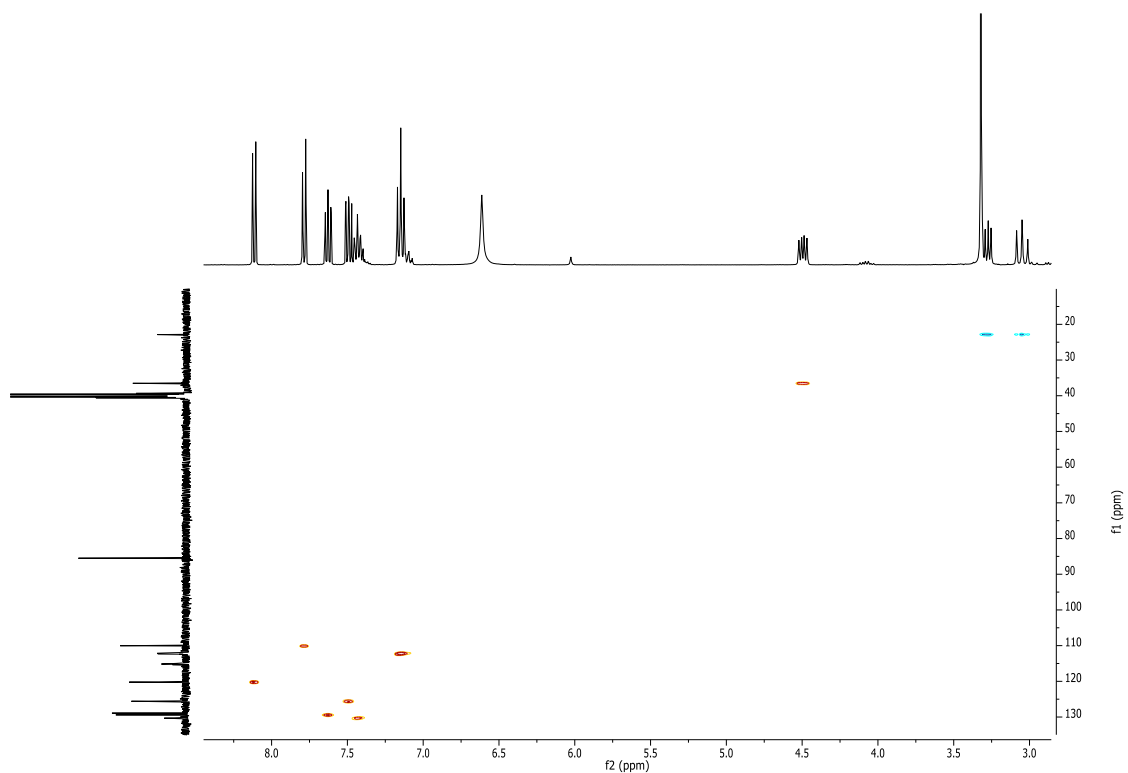


Figura 1.2.34: HSQC del compost **18{4}** enregistrat en d_6 -DMSO

En aquest HSQC es pot correlacionar el senyal de carboni de l'eix de coordenades a 129,9 ppm amb el senyal de protó de l'eix d'abscisses a 7,45 ppm corresponent al protó en *para* de l'anell del difluorfenil. Es procedeix a fer el mateix pels senyals restants, permetent-nos identificar tots els senyals de protó a excepció dels senyals referents a l'anell aromàtic del grup benzotriazolil.

A continuació en la figura 1.2.35, es mostra l'espectre bidimensional de *correlation spectroscopy* conegut com a COSY del compost **18{4}**, on es poden apreciar les correlacions entre protons.

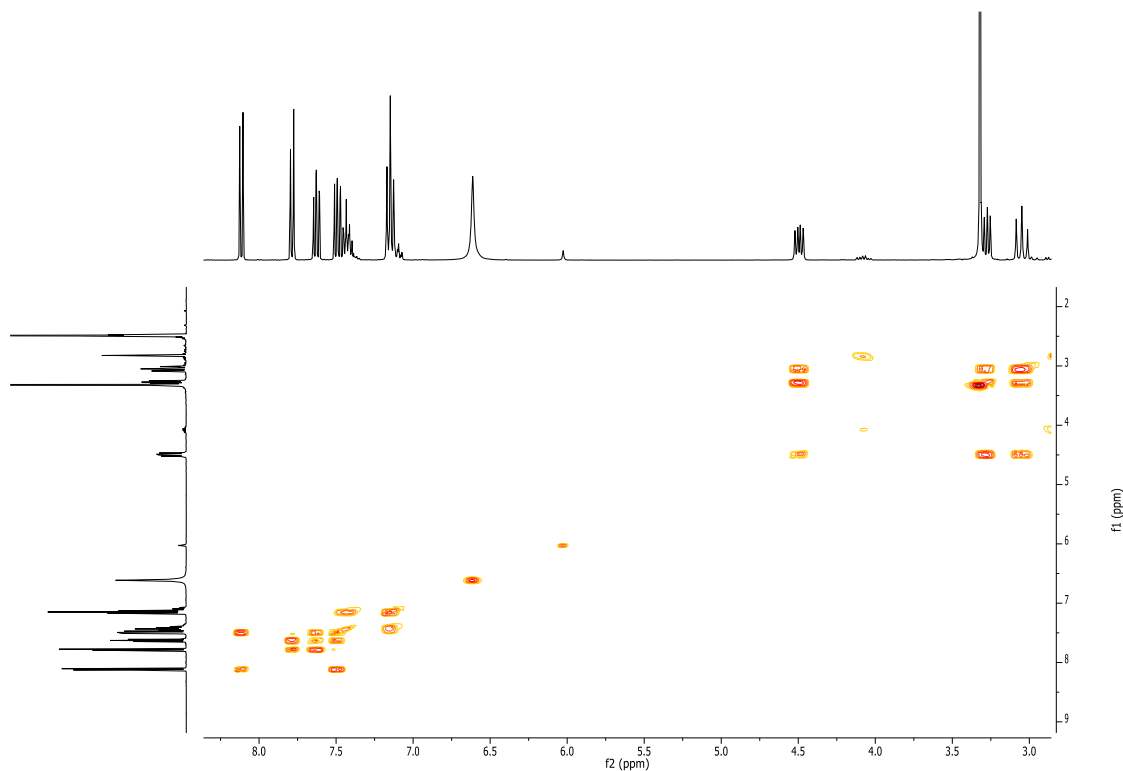


Figura 1.2.35: COSY del compost **18{4}** enregistrat en d_6 -DMSO

Com es pot observar a l'espectre de COSY existeix un correlació entre el metí i el metilè en alfa i beta de carbonil (posicions 7 i 6) respectivament. Per altra banda, els dobles a 8,1 i 7,8 ppm corresponents a les posicions C18 i C15 que correlacionen amb els senyals a 7,6 i 7,5 ppm dels protons aromàtics de les posicions adjacents C17 i C16, els quals també estan correlacionats entre si, però no se sap amb exactitud quin és el senyal de C18 respecte al de C15, o el senyal de C17 respecte al de C16. Després d'assajar diverses tècniques espectroscòpiques no s'han pogut identificar tots els protons de la molècula inequívocament degut a la complexitat de la mateixa.

Una vegada obtinguts els intermedis **18{x}** OBt substituïts en C4, es procedeix a estudiar la reacció de substitució del benzotriazolil per un alcohol **37{y}** (Figura 1.2.36). Després de realitzar una cerca bibliogràfica s'observa que és necessari la presència d'una base i es decideix començar estudiar dita reacció emprant Cs_2CO_3 ^[12]. Es tracta d'una base apròtica soluble en dissolvents polars, que presenta una major solubilitat en dissolvents orgànics que altres carbonats, com ara el K_2CO_3 .

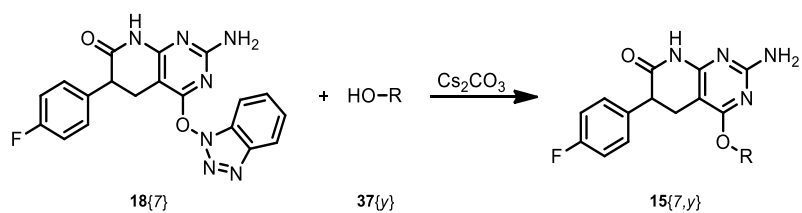


Figura 1.2.36: Síntesi de compostos piridopirimídínics substituïts en C4 per un grup alcoxi (**15**{x,y})

En primer lloc, es comença a estudiar aquesta reacció de substitució del grup benzotriazolil en C4 per MeOH (**37**{1}), el qual s'utilitzarà com a reactiu i dissolvent (Figura 1.2.37).

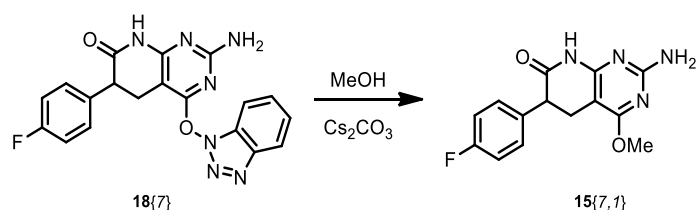


Figura 1.2.37: Substitució del grup OBt de **18**{7} per MeOH **37**{1}

A la taula 1.2.12 es presenten els primers experiments assajats per estudiar la reacció de substitució del benzotriazolil del compost **18**{7} per MeOH (**37**{1}).

Taula 1.2.12: Reacció entre **18**{7} i MeOH amb Cs_2CO_3

Experiment	Nucleòfil i dv	Relació 18 {7}: Cs_2CO_3	Condicions	Resultats
1	MeOH	1 ; 2	24h rt	Recuperació 18 {7}
2	MeOH	1 ; 2	24h 55 °C	Rdt _{15{7,1}} = 39%
3	MeOH	1 ; 2	24h reflux	Rdt _{15{7,1}} = 56%

Com es pot observar a la taula 1.2.12 a temperatura ambient la reacció no evoluciona, recuperant-se el producte de partida **18**{7}. En canvi, quan la reacció es du a terme a 55 °C o a reflux de metanol la conversió és completa i s'obté el producte desitjat **15**{7,1} amb un rendiment del 39 i del 56%, respectivament.

A la vista dels resultats positius obtinguts utilitzant MeOH, es decideix assajar aquesta reacció emprant alcohol etílic (**37**{2}) (Figura 1.2.38).

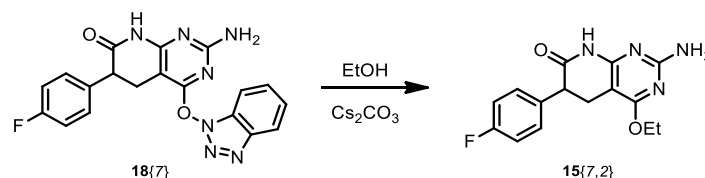
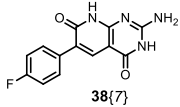


Figura 1.2.38: Substitució del grup OBt de **18{7}** per EtOH

A la taula 1.2.13 es mostren les condicions assajades per l'esmentada reacció.

Taula 1.2.13: Reacció entre **18{7}** i EtOH/ NaOEt amb Cs_2CO_3

Experiment	Nucleòfil i dv	Relació 18{7} :base	Condicions	Resultats
4	EtOH	1 ; 2	24h 60 °C	Recuperació 18{7} + 3 impureses piridopirimidíniques
5	EtOH	1 ; 2	24h reflux	Rdt _{15{7,2}} = 20%
6	EtOH	1 ; 2	2h 120 °C MW	Recuperació 18{7} + 
7	EtONa/EtOH	excés	24h reflux	Rdt _{15{7,2}} = 23%
8	EtONa/EtOH	excés	3h 120 °C MW	Rdt _{15{7,2}} = 22%

Com es pot observar a la taula 1.2.13 en dur a terme la reacció utilitzant les condicions posades a punt pel MeOH no s'obté el producte desitjat (**15{7,2}**). En augmentar la temperatura fins a reflux d'etanol ($P_{\text{eb}} \text{ etanol} = 78,4 \text{ }^\circ\text{C}$) s'obté el producte desitjat (**15{7,2}**) però amb un rendiment baix, al voltant del 20%. Tot seguit, es decideix seguir realitzant més proves per tal de millorar el rendiment. En primer lloc, es decideix incrementar la temperatura passant de treballar a reflux d'etanol a escalfar a 120 °C amb calefacció de microones. Sorprenentment, enlloc de rendir el producte desitjat, sembla que s'obtingui la corresponent 4-oxopiridopirimidina deshidrogenada entre C5 i C6 (**38{7}**). Per tant, sembla que l'augment de la temperatura de reacció afavoreix l'eliminació del grup OBt i a la vegada la deshidrogenació de l'enllaç entre les posicions C5 i C6. Finalment es decideix canviar la base utilitzada (Cs_2CO_3) per una solució d'EtONa/EtOH. Es busca d'aquesta manera veure si s'afavoreix la reacció en utilitzar el corresponent alcòxid com a nucleòfil. Després de treballar a reflux i a 120 °C al MW s'observa que ambdós casos s'obté el producte desitjat amb un rendiment al voltant del 20%. Cal remarcar, que el fet de treballar a temperatura més alta i utilitzar l'alcòxid com a nucleòfil no afavoreix la reacció.

A continuació, es decideix estudiar la reactivitat d'un altre alcohol, com és el cas de l'isopropanol (**37{3}**), IPA (Figura 1.2.39).

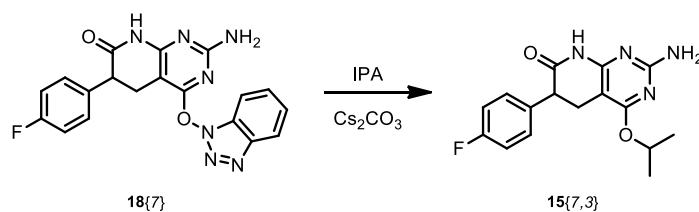


Figura 1.2.39: Substitució del grup OBt de **18{7}** per IPA

Experimentalment, s'observa que aquest no reacciona per donar la substitució en C4, fet que podria ser degut a l'impediment estèric. A la taula 1.2.14 es presenten les condicions de reacció assajades observant-se que el producte obtingut correspon, aparentment, al derivat 4-OBt substituït de partida però deshidrogenat entre C5 i C6.

Taula 1.2.14: Reacció entre **18{7}** i IPA amb Cs_2CO_3

Experiment	Nucleòfil i dv	Relació 18{7} : Cs_2CO_3	Condicions	Resultats
9	IPA	1,0 ; 1,2	24h reflux	<p>39</p>

Tornant a la idea inicial en fer la substitució per un alcohol primari, es proposa el 2-metoxietanol (**37{4}**) (Figura 1.2.40).

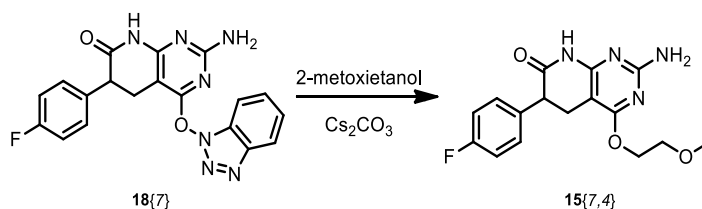
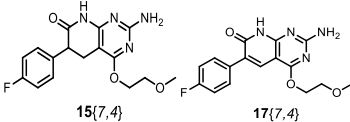
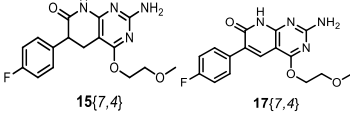


Figura 1.2.40: Substitució del grup OBt de **18{7}** per 2-metoxietanol

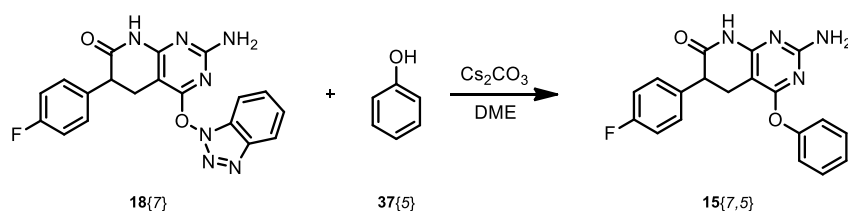
A la taula 1.2.15 es mostren les condicions de reacció assajades amb 2-metoxietanol (**37{4}**).

Taula 1.2.15: Reacció entre **18**{7} i 2-metoxietanol amb Cs_2CO_3

Experiment	Nucleòfil i dv	Relació 18 {7}: Cs_2CO_3	Condicions	Resultats
10	2-metoxietanol	1,0 ; 1,2	24h reflux	 15 {7,4} 17 {7,4}
11	2-metoxietanol	1,0 ; 3,5	24h reflux	 15 {7,4} 17 {7,4}
12	2-metoxietanol	1,0 ; 1,2	24h 80°C	Rdt _{15{7,4}} = 32%

Com es pot observar a la taula 1.2.15 els assajos es realitzen a temperatura de reflux (T_{eb} del 2-metoxietanol = 124-125 °C) i s'assaja amb 1,2 i 3,5 equivalents de carbonat de cesi. En ambdós casos es creu que s'obté una mescla de dos productes: un d'ells és el producte desitjat (**15**{7,4}) i l'altre és el compost 4-substituït (**17**{7,4}) però aromatitzat en l'anell pirodínic entre les posicions C5-C6. Es tracta d'una mescla de compostos molt poc solubles en els dissolvents orgànics convencionals i, a la vegada, són molt polars la qual cosa dificulta la separació per cromatografia de columna. Els experiments realitzats semblen indicar que la deshidrogenació de l'enllaç entre C5 i C6 està afavorida quan la temperatura de reacció és elevada i en presència de medi bàsic. Per aquest motiu es decideix assajar aquesta reacció a menys temperatura, concretament a 80 °C, observant-se que s'obté el producte 4-metoxietoxi substituït amb un rendiment del 32%.

En últim lloc, es decideix estudiar l'abast de la reacció amb un alcohol aromàtic com és el fenol (**37**{5}) (Figura 1.2.41). En aquest cas es necessita un dissolvent, ja que aquest és un sòlid a temperatura ambient. S'escull com a dissolvent per dur a terme les proves el dimetoxietà (DME), dissolvent apròtic que no competirà amb el grups hidroxils de l'alcohol que es vol introduir.

Figura 1.2.41: Substitució del grup OBt del compost **18**{7} per fenol

Es mostren els resultats obtinguts a la taula 1.2.16.

Taula 1.2.16: Reacció entre **18{7}** i fenol amb Cs_2CO_3 en DME

Experiment	Nucleòfil i dv	Relació 18{7} : Cs_2CO_3 : fenol	Condicions	Resultats
10	37{5} /DME	1,0 : 2,0 : 2,0	3h 60 °C	<p>18{7} and 15{7,5}</p>
11	37{5} /DME	1,0 : 2,0 : 2,0	24h 95°C	<p>15{7,5} and 17{7,5}</p>
12	37{5} /DME	1,0 : 3,5 : 2,0	24h reflux	<p>17{7,5} Rdt_{17{7,5}} = 82%</p>

Com es pot observar a la taula 1.2.16 quan la reacció es du a terme a 60 °C aquesta no és completa. Per contra, quan es treballa a 95 °C no s'observa producte de partida (**18{7}**) obtenint-se el producte desitjat (**15{7,5}**) i el producte 4-substituint però amb una insaturació en l'enllaç entre les posicions C5 i C6 (**17{7,5}**). Per últim, quan la reacció s'assaja emprant 3,5 equivalents de base en comptes de 2, s'obté únicament el compost (**17{7,5}**) piridopirimidínic 4-fenoxisubstituint i, al mateix temps, deshidrogenat en l'anell de piridona.

En resum, després de la bateria d'assajos realitzats per tal d'estudiar l'abast d'aquesta reacció es pot concloure que cal treballar a una temperatura elevada per tal d'afavorir la substitució del benzotriazolil per un alcohol i també és necessari l'ús d'un excés de base per dur a terme la reacció. Ara bé, l'ús d'una temperatura elevada també sembla que afavoreixi la deshidrogenació de l'enllaç C5-C6. Malauradament, no s'han trobat unes condicions generals per a aquesta substitució. Per aquest motiu, es decideix estudiar la reacció canviant la piridopirimidina de partida, ja que s'ha vist experimentalment que els compostos fluorats poden presentar problemes en la reactivitat i reproductibilitat de la reacció. Es procedirà a estudiar l'esmentada reacció a partir del compost **18{3}** com a producte de partida (Figura 1.2.42).

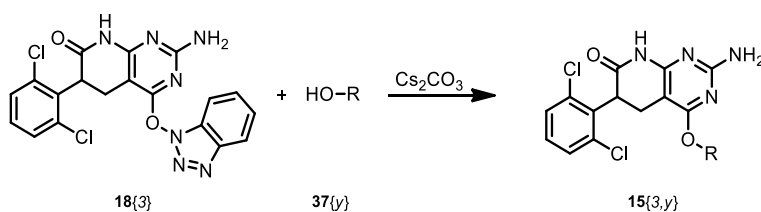


Figura 1.2.42: Síntesi de **15{3,y}** a partir de **18{3}**

Tot seguit, es mostra una taula resum (Taula 1.2.17) on s'observen els diferents experiments realitzats. En tots ells s'ha emprat Cs_2CO_3 com a base i un alcohol alquílic, el qual actua com a reactiu i alhora com a dissolvent. En els experiments en els que s'utilitza MeOH s'estudia l'efecte dels equivalents de base, observant-se que el producte substituït (**15**{3,1}) obtingut en els 3 casos presenta un rendiment al voltant del 90%, indistintament dels equivalents de base utilitzats (1,0 1,2 i 4,0 equivalents).

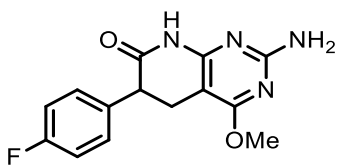
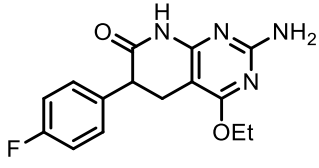
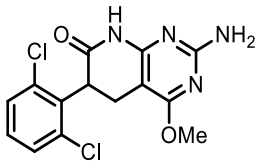
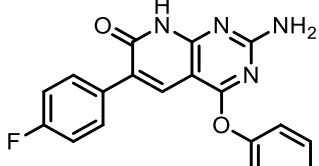
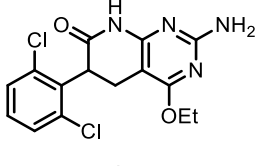
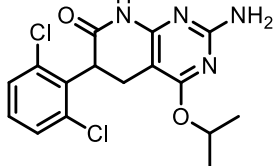
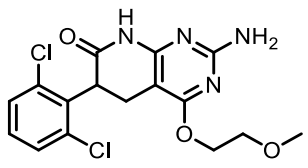
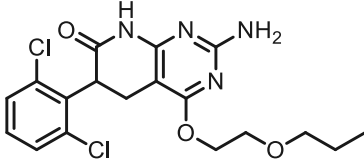
*Taula 1.2.17: Assajos realitzats per estudiar la reacció entre **18**{3} i un alcohol*

Nucleòfil i Dv	Base	Relació 18 {3}: Cs_2CO_3	Condicions	Resultats
2-metoxietanol	Cs_2CO_3	1,0 - 1,2	Reflux a 125 °C 12h	Rdt _{15{3,4}} = 76%
MeOH	Cs_2CO_3	1,0 – 1,0	Reflux a 65 °C 12h	Rdt _{15{3,1}} = 96%
MeOH	Cs_2CO_3	1,0 - 1,2	Reflux a 65 °C 12h	Rdt _{15{3,1}} = 95%
MeOH	Cs_2CO_3	1,0 – 4,0	Reflux a 65 °C 12h	Rdt _{15{3,1}} = 92%
EtOH	Cs_2CO_3	1,0 – 2,0	60 °C 12h	Recuperació 18 {3}
EtOH	Cs_2CO_3	1,0 – 1,2	Reflux a 78 °C 12h	Rdt _{15{3,2}} = 31%
IPA	Cs_2CO_3	1,0 – 1,2	Reflux a 82 °C 12h	Rdt _{15{3,3}} = 17%
IPA	Cs_2CO_3	1,0 – 1,2	Reflux a 82 °C 48h	Rdt _{15{3,3}} ≈ 17%

Aquests resultats experimentals ens permeten afirmar que quan es parteix de **18**{3} i es fa reaccionar amb MeOH, EtOH, IPA i 2-metoxietanol s'obtenen, en tots els casos, els productes desitjats **15**{3,y}, cosa que no passa amb el derivat *p*-fluorosubstituït (**15**{7,y}). És difícil entendre quin pot ser l'efecte d'un substituent *p*-fluorofenil llunyà al punt de substitució.

A la taula 1.2.18 es mostren els productes 4-alcoxisubstituïts (**15**{x,y}) sintetitzats.

Taula 1.2.18: Compostos pirido[2,3-d]pirimidínics 4-alcoxi substituïts (**15**{x,y}) sintetitzats

 <p>15{7,1}</p> <p>Rdt = 39%</p>	 <p>15{7,2}</p> <p>Rdt = 20%</p>
 <p>15{3,1}</p> <p>Rdt = 96%</p>	 <p>17{7,5}</p> <p>Rdt = 82%</p>
 <p>15{3,2}</p> <p>Rdt = 31%</p>	 <p>15{3,3}</p> <p>Rdt = 17%</p>
 <p>17{3,4}</p> <p>Rdt = 76%</p>	 <p>17{3,6}</p> <p>Rdt = 38%</p>

1.2.2.3. Intents d'obtenció de sistemes pirido[2,3-d]pirimidínics no substituïts en C4 a partir de l'intermedi 4-OBt substituït (**18**{x})

S'estudia també la possibilitat de substituir el grup benzotriazolil (OBt) present en la posició C4 per un H a fi d'obtenir compostos piridopirimidínics (**10**{x}) no substituïts en C4. Per a dur a terme aquesta substitució s'assagen diferents condicions de reacció i, en primer lloc, s'utilitza l'hidrur sòdic per tal que actuï com a nucleòfil i substitueixi al grup benzotriazolil (Figura 1.2.43).

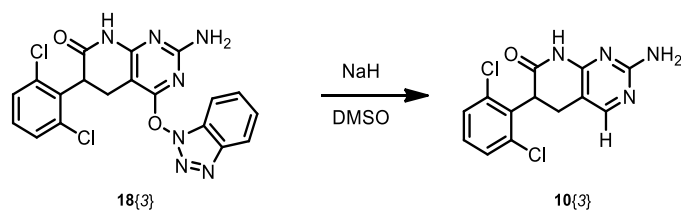


Figura 1.2.43: Proposta de síntesi de **10{3}** amb NaH/DMSO

A la següent taula 1.2.19, es mostren els experiments realitzats per aquesta reacció utilitzant NaH en tots els casos.

Taula 1.2.19: Condicions de reacció emprant NaH

Eq NaH	Condicions de reacció	Resultats
3	100 °C 3h	 38{3}
3	90 °C 3h	Recuperació 18{3} + 7{3}
3	60 °C 3h	Recuperació de 18{3}
3	T ambient 3h	Recuperació de 18{3}

En primer lloc, s'assaja l'esmentada reacció emprant 3 equivalents de NaH en DMSO a 100 °C durant 3h. Tot seguit, s'addiciona aigua i es neutralitza amb àcid acètic, i es recull el sòlid resultant per filtració. El sòlid obtingut es caracteritza mitjançant ^1H RMN i, malauradament, no s'observa el producte desitjat sinó el compost 4-oxopiridopirimidínic (**38{3}**), es a dir s'ha produït la pèrdua del grup OBt en C4 i, al mateix temps, s'ha deshidrogenat entre les posicions C5 i C6 (espectre d' ^1H RMN en color vermell, Figura 1.2.44.). A continuació, es decideix treballar en unes condicions de reacció més suaus i, es repeteix la reacció però a temperatura ambient durant 12 hores, recuperant el producte de partida (**18{3}**) (espectre d' ^1H RMN en color blau, Figura 1.2.44).

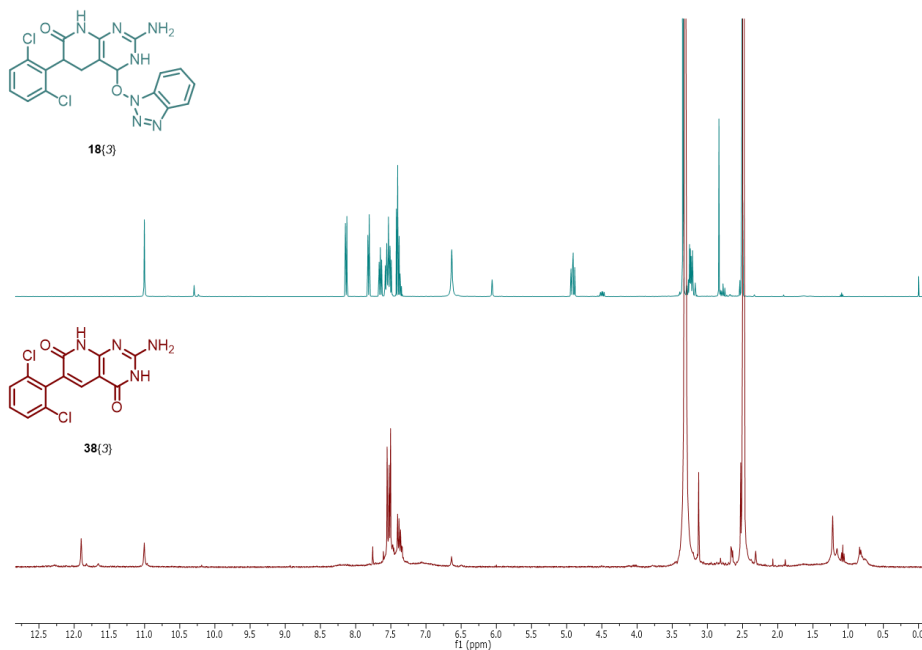


Figura 1.2.44: ^1H RMN dels productes obtinguts al tractar el compost **18{3}** amb NaH i DMSO a T_{amb} (blau) i $100\text{ }^\circ\text{C}$ (vermell) enregistrats en d_6 -DMSO

En darrer lloc, es decideix estudiar aquesta reacció a diferents temperatures entre $100\text{ }^\circ\text{C}$ i temperatura ambient. S'assaja aquesta reacció a 90 i a $60\text{ }^\circ\text{C}$ observant-se que en els dos casos es recupera majoritàriament el producte de partida (**18{3}**) i també s'obté el compost 4-oxopiridopirimidínic (**7{3}**) corresponent.

Es coneix que el DMSO en presència d'una base pot generar l'anió dimsil ($\text{CH}_3\text{SOCH}_2^- \text{Na}^+$), per evitar aquesta reacció secundària i no desitjada es decideix canviar el dissolvent, passant d'utilitzar DMSO a DMF (Figura 1.2.45).

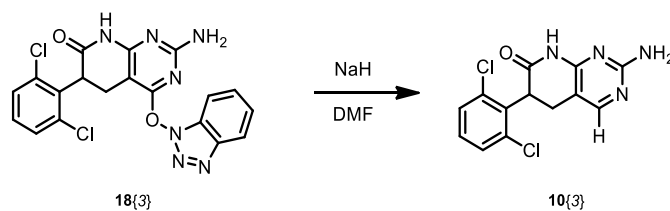
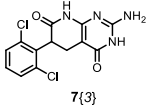


Figura 1.2.45: Proposta de síntesi de **10{3}** amb NaH/DMF

A la taula 1.2.20 es mostren els assajos realitzats amb NaH en DMF.

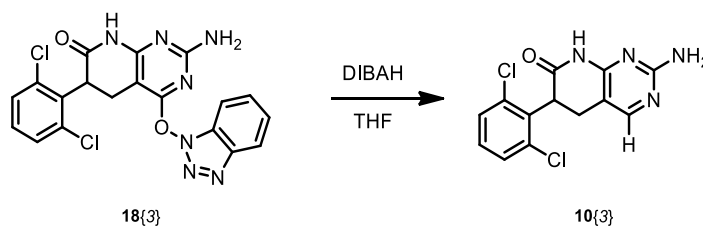
Taula 1.2.20: Condicions de reacció assajades a partir de **18**{3} en NaH/DMF

Eq NaH	Condicions de reacció	Resultats
3	90 °C 3h	Recuperació de 18 {3} +  7 {3}
3	60 °C 3h	Recuperació de 18 {3}

S'assaja aquesta reacció emprant 3 equivalents de NaH en DMF a 60 durant 3h, després del tractament del cru de reacció no s'obté el producte no substituït en C4 (**10**{3}) desitjat, sinó que es recupera el producte de partida (**18**{3}). A continuació, s'assaja la reacció a 90 °C observant-se que es recupera part del producte de partida (**18**{3}) i al mateix temps tot indica que s'obté el compost 4-oxopiridopirimidínic (**7**{3}). Aquest fet també es va observar en assajar aquesta reacció en DMSO.

Cal remarcar que amb aquestes condicions de reacció, emprant DMF com a dissolvent, la reacció no evoluciona quan es treballa a baixa temperatura recuperant el producte de partida. Per contra, quan es treballa a temperatura més elevada el grup OBt és eliminat obtenint-se el compost 4-oxopiridopirimidínic corresponent.

Com s'ha pogut observar, l'ús de NaH a elevada temperatura, indistintament del dissolvent assajat, condueix a la pèrdua del grup OBt i, en cas d'utilitzar DMSO també s'observa la deshidrogenació de l'anell piridònic. La deshidrogenació entre C5 i C6 que es produeix en aquestes condicions és coherent amb el fet de que el nostre grup ha descrit l'ús del NaH en DMSO per aquest tipus de deshidrogenació quan hi ha present un grup amino o un H en C4^[13]. Per aquest motiu, es decideix substituir el NaH per un hidrur amb menys caràcter bàsic com és el cas d'hidrur de isobutil alumini, DIBAH (Figura 1.2.46).

Figura 1.2.46: Proposta de síntesi de **10**{3} emprant DIBAH

A la taula 1.2.21 s'observen les condicions de reacció assajades, observant-se que tant si es treballa a temperatura ambient com a 60 °C, amb 1,2 o 1,5 equivalent de DIBAH, en tots els casos es recupera el producte de partida (**18**{3}).

Taula 1.2.21: Condicions de reacció emprant DIBAH

Eq DIBAH	Condicions de reacció	Resultats
1,2	0 °C, 2h T _{amb}	Recuperació 18 {3}
1,5	0 °C 30 min, 12h 60 °C	Recuperació 18 {3}

A la vista que l'ús d'hidrurs no condueix al compost desitjat **10**{3}, es decideix assajar la reacció emprant un compost organolític com és el BuLi (Figura 1.2.47). Aquests tipus de compostos (**18**{x}) presenten un enllaç C-O fortament polaritzat en C4. Per aquest motiu, es pensa que el BuLi pot reaccionar donant el corresponent liti derivat en la posició C4 i posteriorment procedir a la destrucció del derivat litiat amb un compost amb hidrògens àcids (aigua, alcohol, àcid clorhídric, etc) rendint el corresponent sistema piridopirimidínic no substituït en C4 (**10**{x}).

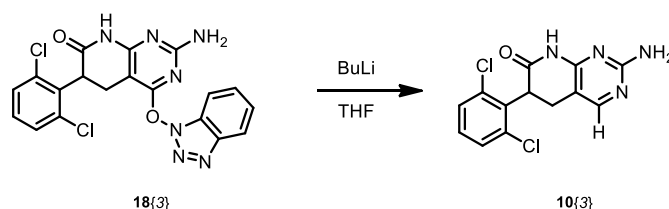


Figura 1.2.47: Proposta de síntesi de **10**{3} emprant BuLi

S'assaja l'esmentada reacció emprant 2 equivalents de BuLi. El producte de partida es suspèn en THF anhidre, s'addiciona la solució de BuLi en hexà lentament sobre el cru de reacció a 0 °C i es deixa 2 h amb agitació a temperatura ambient. S'addiciona MeOH per eliminar l'excés de BuLi i es neutralitza amb AcOH, en segon lloc s'afegeix aigua i s'elimina el THF a pressió reduïda. Una vegada eliminats els dissolvents orgànics es filtra el sòlid obtingut. El sòlid recollit resulta ser el producte de partida (**18**{3}). A continuació, es decideix augmentar els equivalents de BuLi passant de 2 a 6 sota les mateixes condicions de reacció obtenint un sòlid complex d'identificar (no sembla el compost desitjat ni el producte de partida).

Donat que l'augment de la relació de BuLi condueix a la formació de compostos no desitjats, es prova de substituir l'ús de BuLi per *t*-BuLi esperant que es generin menys subproductes (Figura 1.2.48).

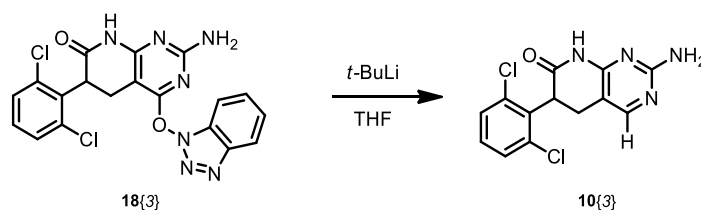


Figura 1.2.48: Proposta de síntesi de **10**{3} emprant *t*-BuLi

S'assaja la reacció utilitzant 5 equivalents de *t*-BuLi sota les mateixes condicions emprades anteriorment, però modificant el tractament a posteriori de la reacció. Finalitzada la reacció, es neutralitza amb HCl en dioxà a 0 °C, a fi de minimitzar el contingut d'aigua, i es deixa 30 min agitant a T_{amb} . S'elimina el THF a pressió reduïda i s'afegeix aigua, es recull el sòlid per filtració. Malauradament, s'obté el compost **7**{3}, presentant el carbonil en C4 en lloc del compost desitjat (**10**{3}).

Els experiments realitzats semblen indicar que el mecanisme de la reacció emprant un compost organolític passa segons la proposta que es presenta a la figura 1.2.49 segons la qual no es produiria la litiació en el carboni en C4 sinó el trencament de l'enllaç N-O per rendir, després de la hidròlisi, el terme 4-oxosubstituït (**7**{x}).

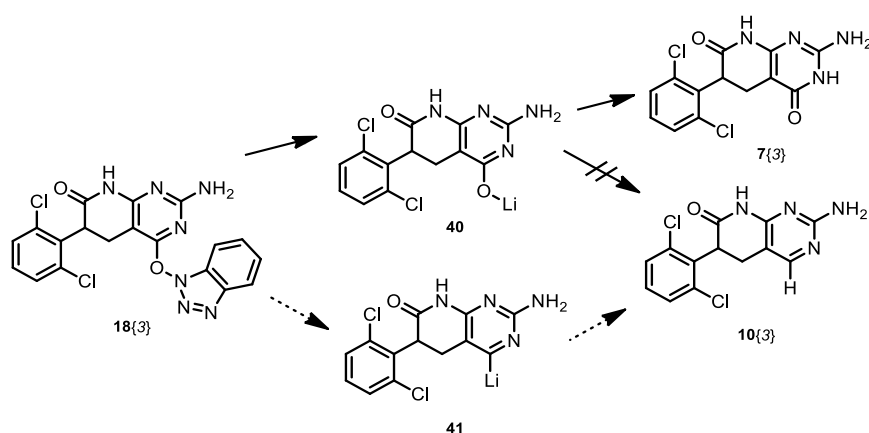


Figura 1.2.49: Possibles mecanismes de reacció emprant un compost organolític

A la vista dels resultats obtinguts, sembla que en tots aquells casos en els que hi ha hagut reacció, independentment de l'ús d'hidrurs o organolítics, es trenca l'enllaç O-N del grup benzotriazolil rendint un compost 4-oxopiridopirimidínic. Per aquest motiu, es descarta en el present treball la possibilitat d'obtenció de piridopirimidines no substituïdes en C4 (**10**{x}) a partir del compost (**18**{x}).

1.2.2.4. Derivatització en C4 per rendir un compost 4-aminopirido[2,3-*d*]pirimidínic

Amb la finalitat d'ampliar la diversitat de la síntesi desenvolupada al llarg d'aquest apartat, on es fa reaccionar un acrilat de metil (**1**{x}) amb una pirimidona (**24**) per rendir un compost 4-oxopiridopirimidínic. S'ha pensat en dues estratègies de síntesi per rendir un grup amino no substituït en la posició C4.

Una primera estratègia sintètica per a l'obtenció dels compostos 4-aminopiridopirimidínics es planteja a partir del compost piridopirimidínic 4-oxo substituït (**7**{x}). En primer lloc, es genera el corresponent compost 4-OBt substituït (**18**{x}) que es fa reaccionar amb benzilamina per rendir el compost 4-benzilamino substituït (**14**{x}). Aquest compost per hidrogenació catalítica

hauria de rendir el compost 4-amino desitjat (**6{x}**). De cara a assajar aquesta proposta sintètica es partirà del compost **18{3}** tal i com es mostra a la següent figura 1.2.50.

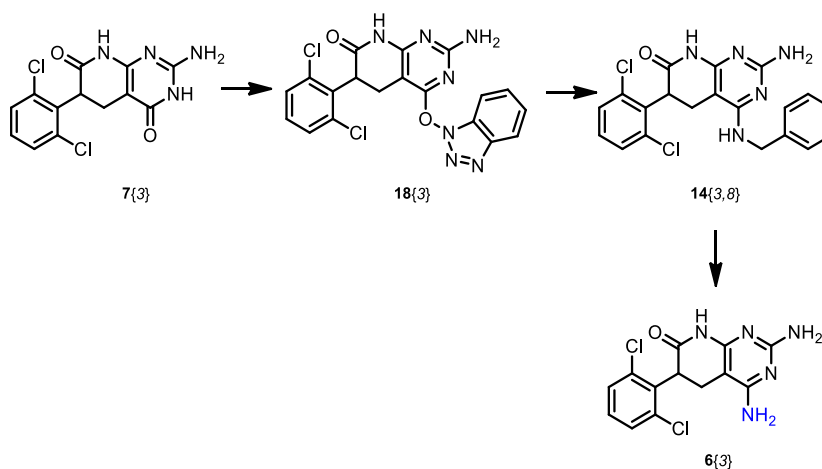


Figura 1.2.50: Proposta de síntesi per a l'obtenció de compostos **6{3}**

Per a l'obtenció del compost **14{3,8}** es segueix la metodologia desenvolupada a l'apartat 1.2.2. Per dur a terme la desbenzilació del compost **14{3,8}** s'han assajat diferents condicions de hidrogenació utilitzant Pd/C com a catalitzador. Els resultats obtinguts utilitzant com a dissolvent una mescla de MeOH/AcOH (80/20) a 50 °C durant 12 h són prometedors observant-se la desaparició del residu benzil. De totes formes, dites condicions de reacció deuran ser optimitzades en el futur.

La segona estratègia sintètica es basa en la mateixa idea que la reacció desenvolupada per a la formació de 4-oxopiridopirimidines, on un sistema pirimidònic condensa amb un sistema acrílic per rendir el compost desitjat. La principal diferència és que es proposa substituir el sistema pirimidònic (**24**) pel compost 2,4,6-triaminopirimidina (**42**) (Figura 1.2.51).

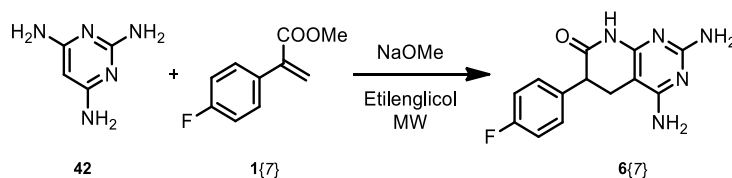


Figura 1.2.51: Proposta de síntesi de compostos **6{7}**

Els primers assajos realitzats per tal d'estudiar dita reacció, es duen a terme emprant quantitats equimolars dels reactius **1{7}** i **42** en etilenglicol com a dissolvent a 180 °C durant 3h amb

calefacció de microones. S'observa que quan es treballa en condicions equimolars, s'obté el producte desitjat **6** amb un rendiment del 26%.

A la vista dels resultats obtinguts es verifica que és viable l'obtenció de compostos pirido[2,3-*d*]pirimidínics 4-NH₂ substituïts seguint les estratègies sintètiques desenvolupades en el present treball.

1.2.3. Deshidrogenació de sistemes 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics per ser assajats com a inhibidors del VHC

L'etapa de deshidrogenació de l'enllaç comprès entre les posicions C5 i C6 dels sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics és clau ja que els sistemes pirido[3,2-*d*]pirimidínics descrits per Gilead Sciences que presenten activitat antiviral són aromàtics (Figura 1.2.52).

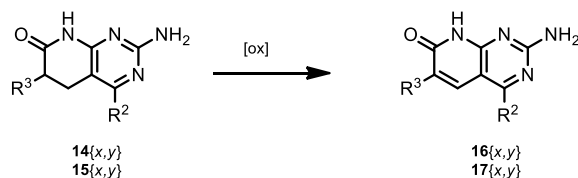


Figura 1.2.52: Deshidrogenació de l'enllaç C5-C6 de 7-oxopiridopirimidines

De cara a la realització de la deshidrogenació s'aborden diverses estratègies amb diferents condicions de reacció i reactius.

En primer lloc, s'assaja la deshidrogenació utilitzant Pd/C^[14] sobre el compost **7{7}** (Figura 1.2.53).

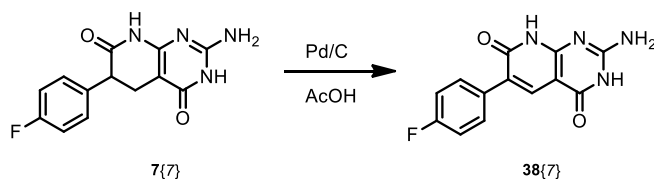


Figura 1.2.53: Deshidrogenació emprant Pd/C

Per a aquest propòsit, es dissol el producte de partida en AcOH glacial i s'afegeixen 0,4 equivalents de Pd/C, el sistema es porta a reflux durant 24 h. Després del tractament posterior del cru de reacció s'obté una mescla de productes, sent el producte esperat (**38{7}**) minoritari. Es creu que s'ha obtingut majoritàriament un possible anàleg al producte de partida, però sense la presència del fluor en la posició *para* de l'anell arílic (**7{2}**) (Figura 1.2.54).

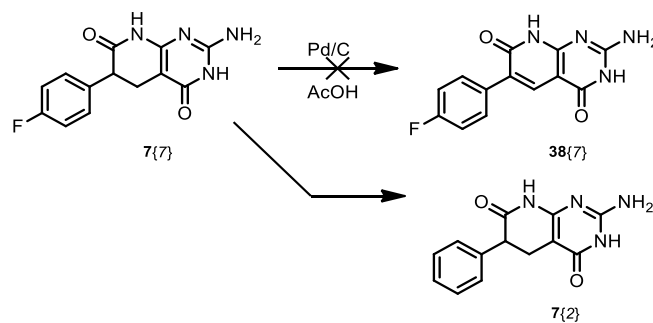


Figura 1.2.54: Tractament de 7{7} amb Pd/C en AcOH

Les condicions de reacció utilitzades són les descrites per Guangyi Jin i col·laboradors^[14], on el substrat utilitzat és una 4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidina, però sense substituents en C6 ni C5. Aquest fet pot ser determinant per poder abordar aquesta reacció sense problemes.

En segon lloc, es procedeix a assajar l'esmentada reacció utilitzant selenit sòdic, Na₂SeO₃, d'acord amb les condicions desenvolupades prèviament pel nostre grup^[13]. Per a aquesta reacció s'utilitza un excés de 1,2 equivalents de selenit en DMSO, mantenint el sistema a 160 °C durant 6 h en presència d'una atmosfera de nitrogen (Figura 1.2.55). Passat aquest temps, s'afegeix aigua al cru de reacció i es filtra el sòlid en suspensió obtenint-se el producte desitjat 38{7}.

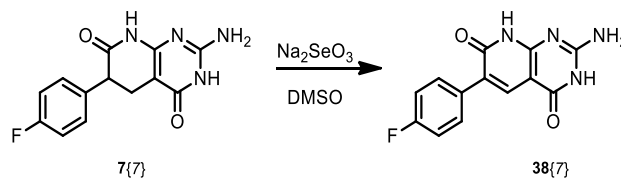


Figura 1.2.55: Deshidrogenació de 7{7} emprant selenit sòdic

Un dels desavantatges d'utilitzar selenit sòdic per a la deshidrogenació d'aquests sistemes és la dificultat d'eliminació d'aquest en el producte obtingut. En aquest cas, l'anàlisi elemental del producte obtingut no coincideix amb els valors teòrics malgrat que el producte presenta un ¹H RMN correcte, aquest fet sembla indicar la presència de traces de selenit sòdic. Es duen a terme diferents intents de purificació, però degut, entre altres coses, a la gran insolubilitat del producte obtingut no s'aconsegueix la completa purificació del mateix. Per aquest motiu es procedeix a la cerca de noves metodologies per a la deshidrogenació de l'enllaç C5-C6.

Com alternativa a l'ús de Na₂SeO₃, es pensa en la possibilitat d'utilitzar un altre oxidant com és l'òxid de manganès seguint una de les metodologies més antigues desenvolupades pel nostre grup^[15].

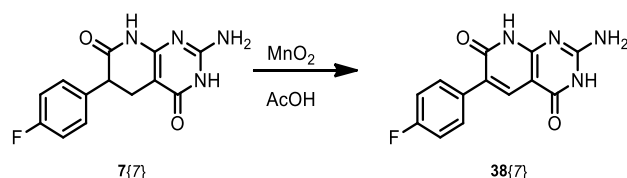


Figura 1.2.56: Deshidrogenació de 7{7} emprant òxid de manganès

S'assaja per tant la reacció utilitzant un excés de 1,5 equivalents MnO_2 activat en àcid acètic glacial a reflux durant 3h (Figura 1.2.56). Tot seguit, es filtra el cru en calent sobre un filtre de plecs, per tal d'eliminar les restes d'òxid de manganès, i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda obtenint un residu que se suspèn en cloroform afavorint la precipitació del producte de reacció, el qual s'aïlla per filtració. El sòlid obtingut correspon al producte desitjat (**38{7}**), però impurificat amb restes d'acetat de manganès i/o òxid de manganès. Aquest fet s'observa clarament per ^1H RMN degut a que la presència d'un metall, en aquest cas manganès, provoca l'eixamplament dels senyals en el corresponent espectre. Es realitzen diverses proves de purificació del producte intentant la complexació del Mn amb EDTA però, sense èxit.

Fins ara, s'han trobat dues estratègies sintètiques que ens permeten deshidrogenar l'enllaç C5-C6 de l'anell de piridona del bicicle però rendint el producte final (**38{7}**) impurificat amb compostos inorgànics que fan difícil obtenir el compost desitjat en un grau elevat de puresa. Això és important ja que si es vol avaluar l'activitat antiviral d'aquests front el virus de l'Hepatitis C, es podrien obtenir valors erronis degut a la presència de compostos inorgànics.

Finalment, s'intenta la deshidrogenació utilitzant 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona, més conegut com a DDQ (Figura 1.2.57).

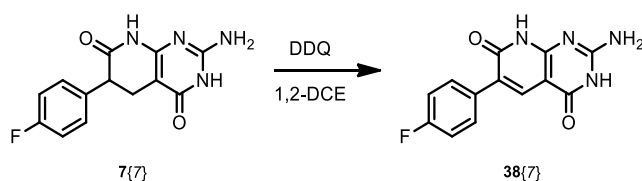


Figura 1.2.57: Deshidrogenació de 7{7} emprant DDQ

La DDQ és un dels oxidants més utilitzats en química orgànica per a la deshidrogenació d'alcohols, fenols i cetones. Com a contrapartida dir que reacciona amb aigua generant àcid cianhídric, que és altament tòxic.

S'assaja aquesta reacció emprant 1,3 equivalents de DDQ en 1,2-dicloroetà a reflux tota la nit. Després del tractament del cru de reacció s'obté el producte desitjat **38{7}** amb un rendiment del 88%.

Una vegada obtingudes unes condicions de reacció que permeten dur a terme la deshidrogenació de manera satisfactòria, es decideix provar aquesta metodologia en front a

altres substrats. Es decideix assajar amb les mateixes condicions de reacció una pirido[2,3-*d*]pirimidina que presenti un substituent en C4, com ara el compost **15**{7,1}, i per altra banda, una altra que exhibeixi un residu en la posició C2 (**7**{7,9}) (Figura 1.2.58). L'obtenció dels compostos substituïts en C2 s'explicarà posteriorment a l'apartat 1.3.

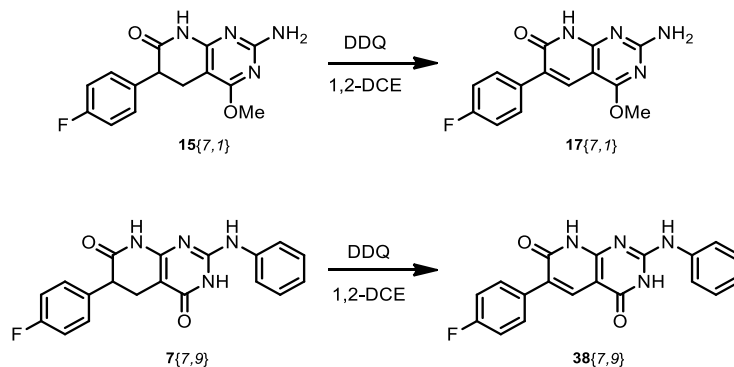


Figura 1.2.58: Estudi de la reacció de deshidrogenació amb DDQ a partir de diferents substrats

En el primer cas, quan la reacció s'assaja a partir del compost **15**{7,1} s'obté el producte desitjat **17**{7,1} satisfactòriament. Per contra, quan es parteix del compost **7**{7,9}, amb un grup fenil unit a l'amino en C2, la reacció de deshidrogenació no evoluciona recuperant-se el producte de partida (**7**{7,9}).

Per tant, per a la deshidrogenació de l'enllaç present entre les posicions C5 i C6 dels sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics, quan aquests estan substituïts en C4, o bé presenten un grup carbonil en C4, i en C2 un grup amino no substituït s'utilitzarà DDQ en 1,2-DCE. Per contra, quan aquests sistemes presenten un grup amino substituït en C2 la reacció no evoluciona i es recupera el producte de partida.

Per abordar la deshidrogenació en compostos que presenten un grup amino substituït en C2 es considera la possibilitat d'utilitzar hidrur sòdic com a reactiu^[13]. Es tracta d'una estratègia desenvolupada en el nostre grup que no s'havia considerat inicialment en aquest estudi per les possibles incompatibilitats entre l'hidrur i els diferents substituents presents en els compostos de partida.

Es va dur a terme la reacció amb hidrur sòdic partint del compost **7**{7,9} que prèviament no havia reaccionat amb DDQ (Figura 1.2.59).

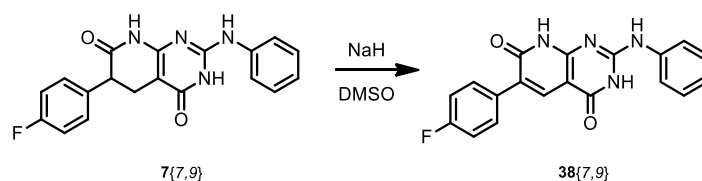


Figura 1.2.59: Deshidrogenació de **7**{7,9} emprant NaH

S'utilitzen 3 equivalents de NaH en DMSO a 100 °C durant 4h i, després del corresponent aïllament, es confirma que el sòlid aïllat correspon al producte deshidrogenat desitjat **38**{7,9}. A la figura 1.2.60 s'observen els ^1H RMN del producte de partida (**7**{7,9}) (en vermell) i el compost (**38**{7,9}) deshidrogenat entre les posicions C5-C6 (en blau). En l' ^1H RMN superior, corresponent al producte deshidrogenat **38**{7,9}, s'observa clarament la desaparició dels senyals a 3,8 i 2,7 ppm corresponents al metí en la posició C6 i al metilè en C5 del producte de partida (**7**{7,9}) i, a la vegada apareix un senyal com a singlet a 7,9 ppm corresponent al metí en la posició C5 del compost **38**{7,9}.

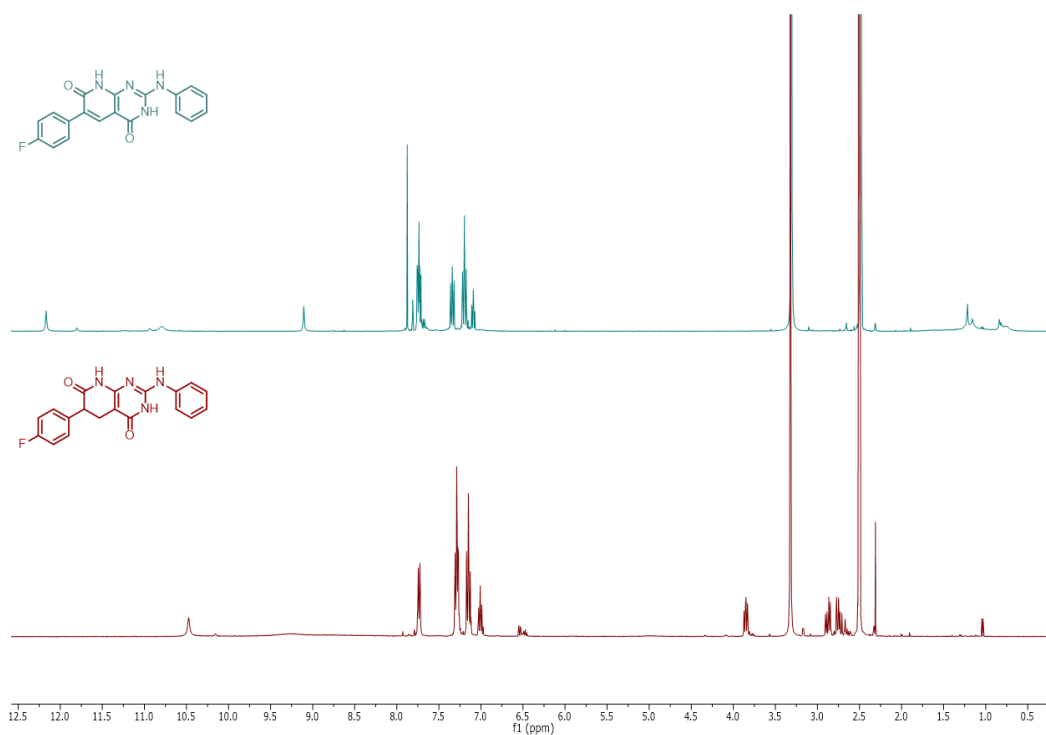
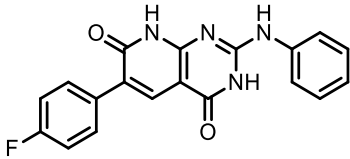
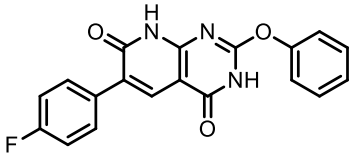
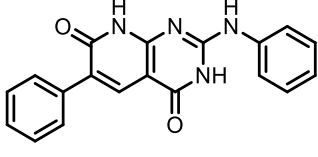
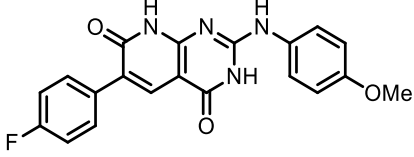
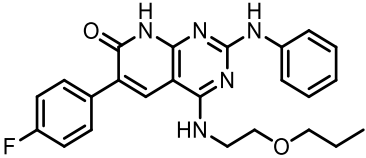
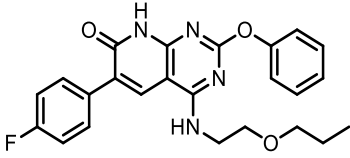
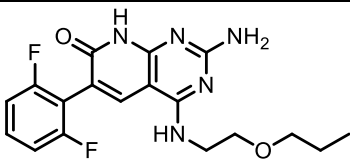
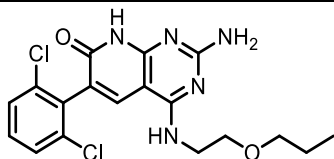
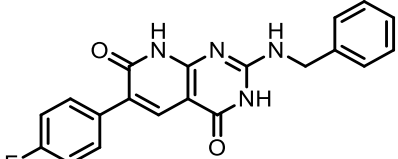


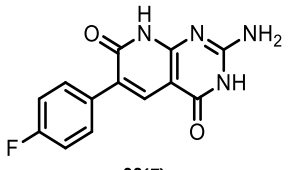
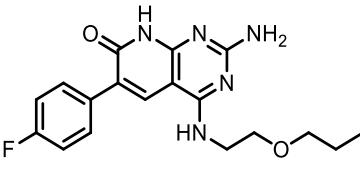
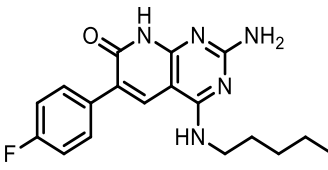
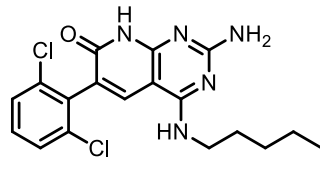
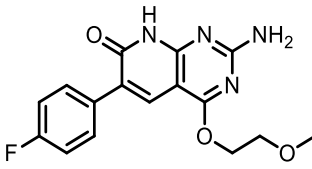
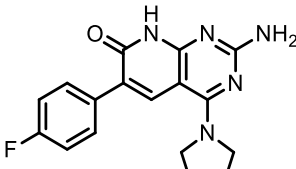
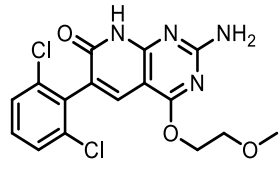
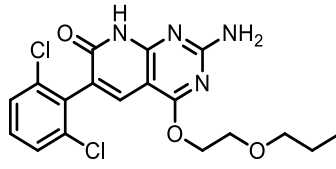
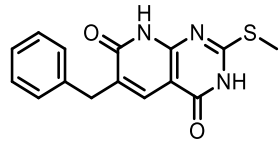
Figura 1.2.60: ^1H RMN del compost **7**{7,9} (vermell) i del corresponent deshidrogenat **38**{7,9} (blau) enregistrats en d_6 -DMSO

És necessari, per tant, emprar dues metodologies diferents per a la deshidrogenació de l'enllaç C5-C6 en funció dels substituents del producte de partida. A continuació, a les taules 1.2.22 i 1.2.23 es mostren els compostos obtinguts a partir de cadascuna de les metodologies sintètiques emprades i els rendiments obtinguts.

Taula 1.2.22: Deshidrogenació amb NaH en DMSO

 <p>38{7,9}</p> <p>Rdt = 78%</p>	 <p>43</p> <p>Rdt = 67%</p>
 <p>38{3,9}</p> <p>Rdt = 30%</p>	 <p>38{7,11}</p> <p>Rdt = 70%</p>
 <p>16{7,7,9}</p> <p>Rdt = 78%</p>	 <p>58</p> <p>Rdt = 75%</p>
 <p>16{4,7}</p> <p>Rdt = 60%</p>	 <p>16{3,7}</p> <p>Rdt = 52%</p>
 <p>38{7,8}</p> <p>Rdt = 55%</p>	

Taula 1.2.23: Deshidrogenació amb MnO₂ i DDQ en 1,2-DCE

 <p>38{7}</p>	 <p>16{7,7}</p>
Rdt = 90% (utilitzant DDQ)	Rdt = 72% (utilitzant MnO ₂)
 <p>16{7,6}</p>	 <p>16{3,6}</p>
Rdt = 73% (utilitzant MnO ₂)	Rdt = 51% (utilitzant DDQ)
 <p>17{7,4}</p>	 <p>16{7,5}</p>
Rdt* = 42%	Rdt = 82% (utilitzant MnO ₂)
 <p>17{3,4}</p>	 <p>17{3,6}</p>
Rdt = 50% (utilitzant DDQ)	Rdt = 82% (utilitzant DDQ)
 <p>51{13}</p>	
Rdt = 54% (utilitzant DDQ)	

*Rendiment global calculat a partir del compost (18{7}) amb el grup benzotriazolil en C4

1.2.4. Alquilació en la posició N8 dels sistemes 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics

L'estratègia de síntesi per a la derivatització del nitrogen lactàmic en la posició N8 de les 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidines consisteix en una etapa sintètica en la que es fa reaccionar un halogenur d'alquil front la pirido[2,3-*d*]pirimidina en presència d'una base.

En el nostre grup hi ha gran experiència en aquesta reacció. Per aquest motiu s'han utilitzat les condicions desenvolupades en el grup en les que s'utilitza NaH com a base en DMSO i un iodur d'alquil, com pot ser el iodur de metil. S'assaja dita reacció emprant quantitats equimolars dels reactius partint del compost 4-aminosubstituint (**15**{3,1}) (Figura 1.2.61). Després del tractament del cru de reacció s'obté el producte desitjat (**45**{3,1,1}) amb un rendiment del 90%.

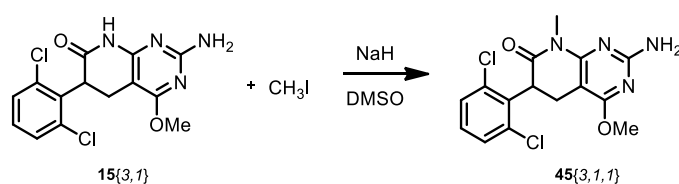


Figura 1.2.61: Metilació de la lactàma a partir del compost **15**{3,1} emprant NaH en DMSO

Tot seguit es decideix assajar aquesta reacció de metilació en el nitrogen lactàmic emprant una base menys forta. Per això, es pensa en substituir el NaH per una base com el *t*-BuOK. Per aquest assaig s'utilitzen les mateixes condicions que les comentades anteriorment però en presència de *t*-BuOK en THF com a dissolvent, obtenint-se el producte metilat **45**{3,1,1} amb un rendiment del 83% (Figura 1.2.62).

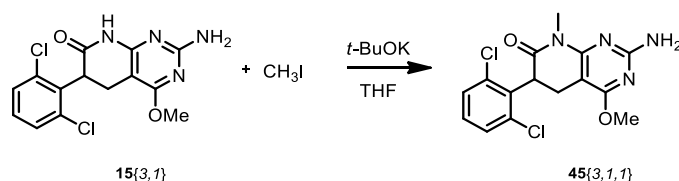


Figura 1.2.62: Metilació de la lactama a partir del compost **15**{3,1} emprant *t*-BuOK en THF

En resum, per a l'alquilació del nitrogen lactàmic en compostos del tipus de **15**{*x*,*y*} no es requereix l'ús d'una base molt forta ja que aquesta posició correspon al protó més àcid de la molècula i, per tant, amb un sol equivalent de base s'aconsegueix arrancar el protó en N8 i que tingui lloc l'alquilació.

Fins al moment, la molècula en estudi només presenta una amina primària i una lactàma, seria interessant assajar aquesta reacció sobre el compost 4-oxopiridopirimidínic (**7**{7}) el qual presenta un segon grup lactàmic en l'anell de pirimidona (Figura 1.2.63)

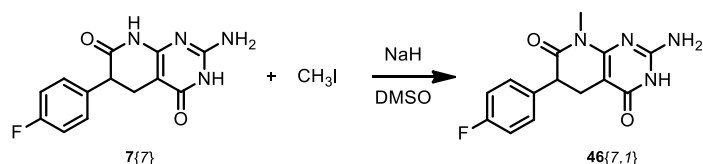


Figura 1.2.63: Intent de metilació del compost 7{7} amb NaH en DMSO

Es dissol el producte de partida (7{7}) en DMSO, s'addiciona NaH i es deixa el sistema agitant a temperatura ambient durant 2 h en absència de llum i sota atmosfera de nitrogen. A continuació, s'addiciona el iodur de metil lentament sobre el cru de reacció i es deixa agitant amb aquestes condicions tota la nit. Després del tractament posterior de la reacció s'analitza el sòlid aïllat per ¹H RMN observant-se el protó corresponent al grup NH en N8, per tant no ha tingut lloc la metilació en N8. La figura 1.2.64 que es mostra a continuació presenta dos ¹H RMN, el producte de partida (7{7}) (en blau) i el del producte aïllat (en vermell). Si ens centrem en l'¹H RMN inferior, corresponent al producte aïllat, es pot observar que hi ha mescla de dos productes ja que entre 10,0 i 10,2 ppm s'observen dos singlets corresponents als protons dels nitrògens lactàmics en posició N8 del producte de partida i del producte de la reacció. La presència de senyals de protó del nitrogen lactàmic de l'anell piridònic indica que la metilació no ha tingut lloc tal i com havíem plantejat. No obstant, a 3,2 ppm s'observa clarament un singlet corresponent al metil resultant de la metilació del producte de partida. Per tant, s'ha de determinar la posició en la que s'ha donat la metilació. A 6,6 i 6,5 ppm s'observen dos singlets corresponents al grup NH₂ en la posició C2 tant del producte de partida com del producte obtingut. Per aquest motiu es pensa que la metilació s'ha pogut donar en la posició N3. Aquesta suposició es confirma mitjançant la realització dels experiments de ¹³C RMN, HSQC i HMBC.

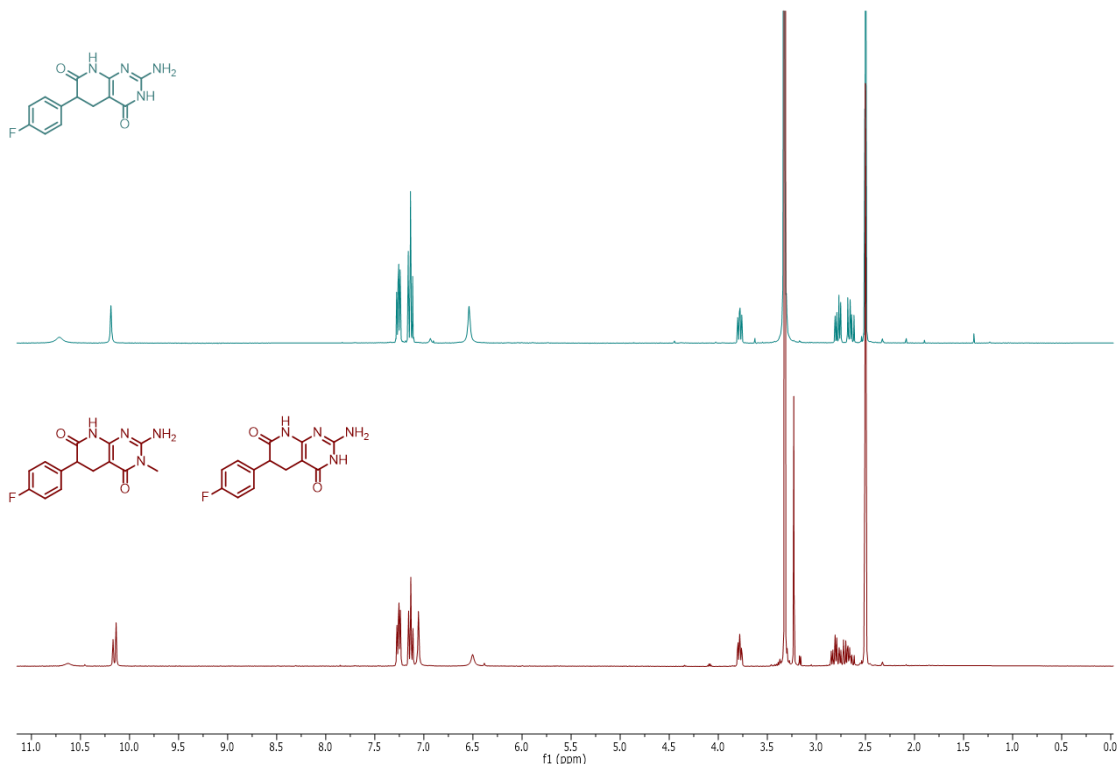


Figura 1.2.64: ^1H RMN del producte de partida **7** (blau) i de la mescla del producte de la reacció (vermell) enregistrats en d_6 -DMSO

A la vista dels resultat obtinguts es realitza un estudi dels valors de pKa teòrics (determinats amb el programari SPARC^[16]) per veure si ens ajuden a explicar aquest comportament. Si ens fixem amb els valors de pKa predits que es mostren a la següent figura 1.2.65 s'observa que el grup NH_2 en la posició C2 presenta un pKa de 11,29, superior al dels nitrògens lactàmics. Aquests presenten un pKa de 10,69 per la posició N8 de l'anell de piridona i de 8,88 per N3 de la pirimidona. Aquests valors ens indiquen que el punt més àcid de la molècula és el protó en N3 i, per tant, el més susceptible a ser ionitzat en presència d'una base com és el cas del NaH.

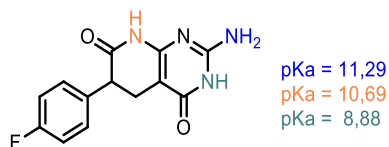


Figura 1.2.65: pKa teòrics

Aquests valors d'acidesa predits donen suport a l'observació de la metilació preferent en N3 respecte a la posició N8 de la 4-oxopiridopirimidina (**7**) (Figura 1.2.66).

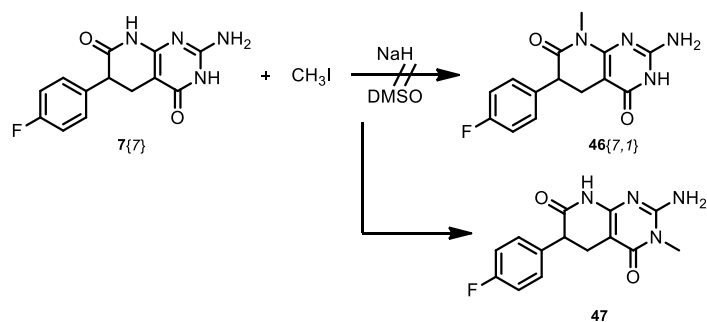
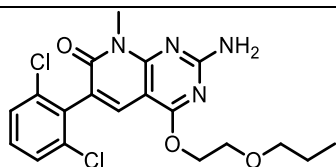


Figura 1.2.66: Tractament de 7{7} amb CH_3I en NaH/DMSO

A continuació es mostra una taula resum amb totes les molècules N8-metil substituïdes obtingudes en el present treball.

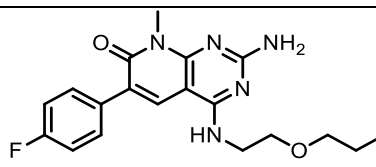
Taula 1.2.24: Compostos alquilats en N8 sintetitzats

<p>48{7,5,1}</p> <p>Rdt = 25%</p>	<p>48{7,6,1}</p> <p>Rdt = 74%</p>
<p>49{7,5,1}</p> <p>Rdt = 59%</p>	<p>49{7,6,1}</p> <p>Rdt = 89%</p>
<p>50{7,1,1}</p> <p>Rdt = 71%</p>	<p>45{7,1,1}</p> <p>Rdt = 50%</p>



50{3,6,1}

Rdt = 26%

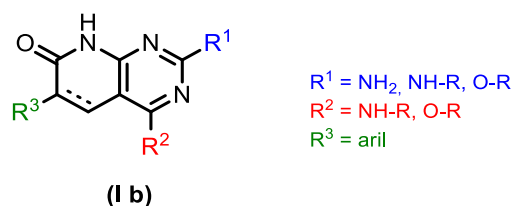


49{7,7,1}

Rdt = 87%

1.3. Síntesi de sistemes 6-*aryl*-*pyrido*[2,3-*d*]*pyrimidin*-7(8*H*)-ònics simultàniament substituïts en les posicions C2 i C4

Una vegada desenvolupades les metodologies sintètiques necessàries per a la funcionalització en C4 i la deshidrogenació de sistemes 7-oxopiridopirimidínics, realitzada en tots els casos amb un grup amino no substituït en C2, cal estudiar la forma d'obtenir sistemes 7-oxopiridopirimidínics simultàniament substituïts en C2 i C4 d'estructura general **1b**.



1.3.1. Desenvolupament d'una estratègia sintètica per a l'obtenció de sistemes 6-*aryl*-2-metiltio-5,6-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-4,7(3*H*,8*H*)-diones (51{x})

La metodologia desenvolupada per a l'obtenció de sistemes 4-oxopiridopirimidínics (**7{x}**) comentada en aquesta treball, està limitada per la presència d'una amina no substituïda en C2. Amb l'objectiu d'augmentar la diversitat, es va pensar en la possibilitat d'introduir un bon grup sortint en aquesta posició per poder ser substituït en posteriors etapes de síntesi per diferents residus. Aquest fet ens hauria de permetre disposar d'un compost (**51{x}**) cap de sèrie fàcilment derivatitzable en C2 i C4 (Figura 1.3.1). De fet, aquesta estratègia ja ha estat utilitzada per altres autors en el passat per sistemes *pyrido*[2,3-*d*]pirimidínics similars obtinguts mitjançant rutes sintètiques de més etapes de síntesi per a la formació del sistema bicíclic^[4]. En particular es va escollir el grup metiltio ja que en la bibliografia es va observar que era molt utilitzat degut a les característiques de bon grup sortint (Figura 1.3.1).

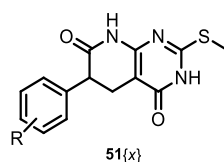


Figura 1.3.1: Compost **51{x}** utilitzat com a cap de sèrie

Per assolir aquest objectiu, es va pensar en modificar l'estratègia desenvolupada en aquest treball per a l'obtenció de sistemes 4-oxopiridopirimidínics (**7{x}**) 2-amino substituïts per tal d'introduir un grup metiltio en C2. Per dur-ho a terme, es va plantejar la possibilitat d'utilitzar el compost 4-amino-2-(metiltio)pirimidin-4(3*H*)-ona (**52**) en comptes de la 2,6-diaminopirimidin-4(3*H*)-ona (**24**) (Figura 1.3.2).

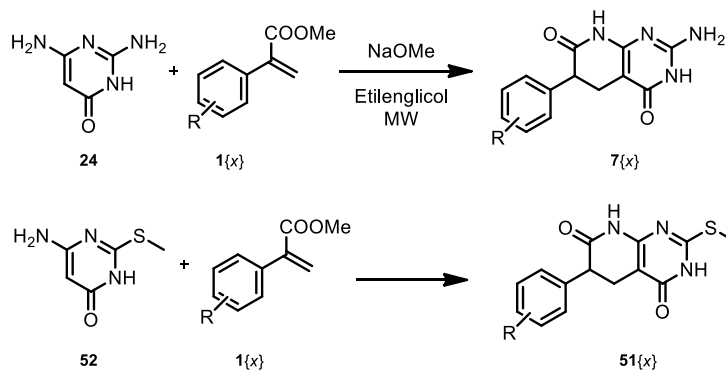


Figura 1.3.2: Proposta de síntesi de sistemes piridopirimidínics (**51{x}**) amb un grup SMe en C2

Per a la síntesi de la 4-amino-2-(metiltio)pirimidin-4(3H)-ona (**52**) es fa reaccionar la 6-amino-2-mercaptopirimidin-4(3H)-ona (**53**) amb iodur de metil en presència d'una base com és NaOH en medi aquós. El medi bàsic és necessari per generar l'anió tiolat, el qual presenta bona capacitat nucleòfila, i aquest reacciona amb un halogenur d'alquil a través d'un mecanisme de substitució nucleòfila S_N2 (Figura 1.3.3)^[14]. El producte (**52**) s'obté satisfactòriament però, segons els autors, és necessari realitzar una columna cromatogràfica per tal de purificar-lo. A fi d'evitar la realització d'aquesta columna cromatogràfica (ja que es tracta d'un producte de partida i es necessari tenir-lo en gran quantitat) es modifiquen les condicions de reacció disminuint els equivalents de iodur de metil, de 1,8 a 1,2 equivalents, obtenint satisfactòriament el producte **52** pur per precipitació amb un rendiment del 88%.

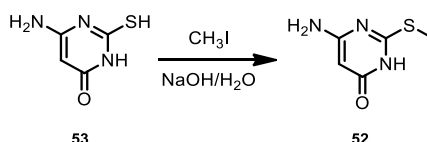


Figura 1.3.3: Síntesi de 4-amino-2-(metiltio)pirimidin-4(3H)-one (**52**)

Una vegada s'ha obtingut el compost **52** satisfactòriament, s'assaja la reacció amb 2-arylacrilats de metil (**1{x}**) fent servir, en principi, les mateixes condicions de reacció desenvolupades per a la formació dels sistemes 4-oxopiridopirimidínics (**7{x}**). Concretament s'utilitzen quantitats equimolars d'ambdós reactius **52** i **1{x}** en presència de NaOMe com a base en etilenglicol amb calefacció de microones a 180 °C durant 3h (Figura 1.3.4).

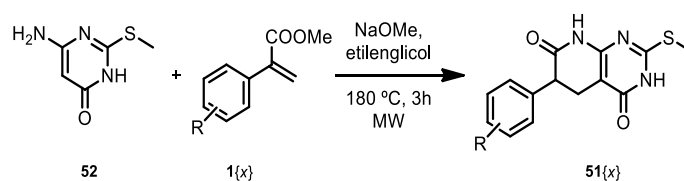


Figura 1.3.4: Condicions de reacció assajades per a l'obtenció dels sistemes **51{x}**

Es realitzen els primers assaigs emprant el 2-amilacrilat de metil (**1{3}**), ja que és el que ha presentat millors rendiments en l'obtenció de 4-oxopiridopirimidines 2-amino substituïdes (**7{x}**). Desafortunadament, no s'ha obtingut el producte desitjat (**51{3}**) (Figura 1.3.5).

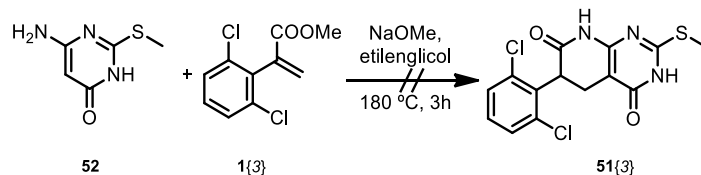


Figura 1.3.5: Reacció assajada per a la formació de **51{3}**

Aparentment les condicions de reacció utilitzades en la síntesi dels sistemes 2-amino substituïts (**7{x}**) no són adequades per a l'obtenció de compostos 2-metiltio substituïts (**51{x}**) per tant, es decideix fer una bateria d'experiments per tal de trobar les condicions òptimes de reacció. En primer lloc, es decideix modificar només una variable, com és la temperatura, treballant a 140, 120 i 100 °C (Taula 1.3.1).

Taula 1.3.1: Estudi de les condicions de reacció per a la síntesi de **51{3}**

Equivalentents				
1{3}:52:NaOMe	Dv	T (°C)	t (h)	Observacions
1:1:1	Etilenglicol	140	3	Substitució SMe per etilenglicol
1:1:1	Etilenglicol	120	3	Mescla productes
1:1:1	Etilenglicol	100	3	No s'ha pogut aïllar cap producte

S'observa que a menor temperatura no es pot aïllar cap producte per precipitació, per tant, no es dona la ciclació entre la pirimidona (**52**) i l'acrilat **1{3}**, ja que els reactius queden solubilitzats en el filtrat. Quan la reacció es realitza a 120 °C s'observa la presència de dos compostos del tipus piridopirimidínic. El producte majoritari sembla correspondre al terme de substitució del grup metiltio per un dels hidroxils de l'etilenglicol. Aquest fet es corrobora en l'assaig realitzat a 140 °C en el que s'obté únicament el terme de substitució del grup metiltio per l'etilenglicol tal com es confirma per ¹H RMN (Figura 1.3.6).

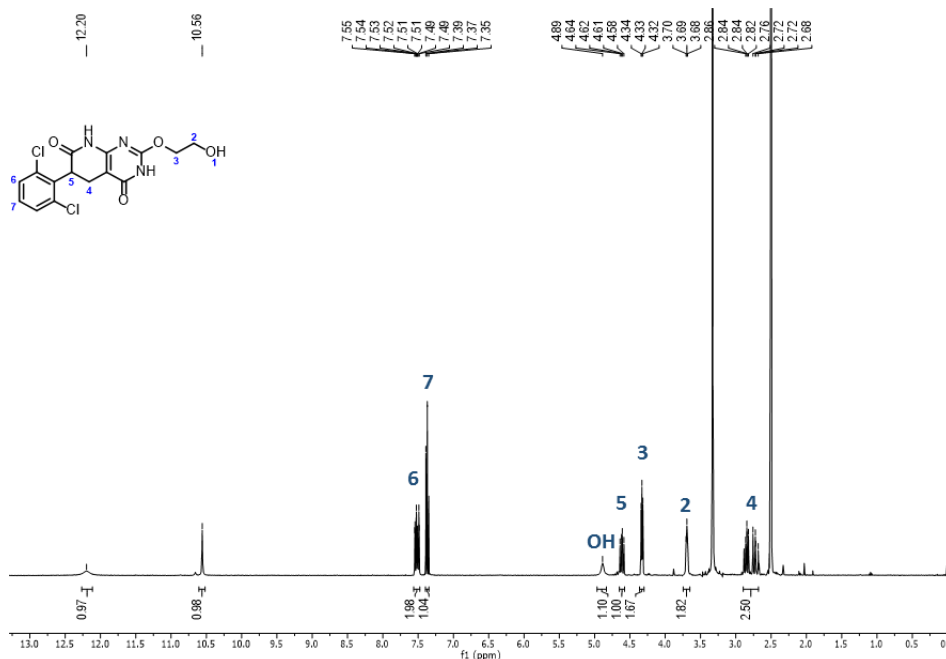


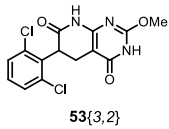
Figura 1.3.6: ^1H RMN del compost $53\{3,7\}$ enregistrat en d_6 -DMSO

Aquest fet, ratifica que el grup metiltio és un bon grup sortint i, per tant, fàcilment substituïble per nucleòfils, fet que ens serà de gran interès en posteriors etapes de síntesi.

Per tal d'evitar la reacció del grup metiltio amb el dissolvent es decideix utilitzar un dissolvent apròtic com el dioxà a 140 °C durant 3 h amb calefacció de microones, però en el cru de reacció només s'observen els reactius de partida. Conseqüentment, es decideix tornar a assajar dita reacció emprant un alcohol com a dissolvent però es busca que el grup hidroxil no sigui tant accessible i, per tant, es pensa en l'isopropanol o *tert*-butanol en els quals el grup hidroxil està més impedit estèricament. A la taula 1.3.2 es mostra el resum dels resultats obtinguts en funció de les condicions de reacció assajades.

Taula 1.3.2: Estudi de les condicions de reacció per la síntesi de $51\{3\}$

Equivalentents				
$1\{3\}:52:\text{NaOMe}$	Dv	T (°C)	t (h)	Resultats
1:1:1	Dioxà	140	3	No reacciona
1:1:1	IPA	150	3	Rdt $_{51\{3\}}$ = 76%
1:1:1	IPA	140	3	Rdt $_{51\{3\}}$ = 51%
1:1:1	IPA	120	3	No reacciona
1:1:1	<i>t</i> -butanol	140	3	Rdt $_{51\{3\}}$ = 24%

Equivalents				
1{3}:52:NaOMe	Dv	T (°C)	t (h)	Resultats
1:1:1	Metanol	140	3	Mescla 51{3} +  53{3,2}

Utilitzant isopropanol com a dissolvent a diferents temperatures, s'observa que a menys temperatura (120 °C) la reacció no evoluciona, ja que es recuperen els reactius de partida. Per contra, a major temperatura (150 °C) s'obté el producte (**51{3}**), 4-oxopiridopirimidina 2-metiltiosubstituït desitjat, amb un rendiment del 76%. D'altra banda, la reacció també es va assajar amb *tert*-butanol però es va obtenir rendiments inferiors als obtinguts amb isopropanol sota les mateixes condicions de reacció, fet que va fer descartar-ne el seu ús. En darrer lloc, es va fer una experiència fent servir MeOH com a dissolvent i es va observar la formació simultània de la piridopirimidina **51{3}** i el terme de substitució del grup metiltio pel metanol rendint el metoxi-derivat **53{3,2}**, la qual cosa corrobora que és necessari un alcohol amb elevat impediment estèric per realitzar aquesta reacció (Figura 1.3.7).

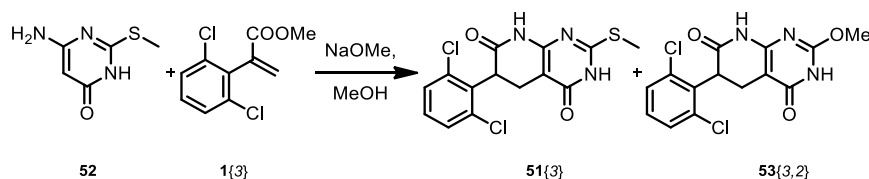


Figura 1.3.7: Reacció entre **52** i **1{3}** amb NaOMe en MeOH

Per tant, les millors condicions de reacció trobades fins al moment per a la síntesis de la 4-oxopiridopirimidina 2-metiltiosubstituïda (**51{3}**) són a 150 °C amb calefacció de microones durant 3 h emprant IPA com a dissolvent i amb una relació equimolar entre els reactius.

Per comprovar l'abast d'aquest mètode es decideix dur a terme les mateixes condicions partint del 2-arilacrilat de metil (**1{7}**) (Figura 1.3.8).

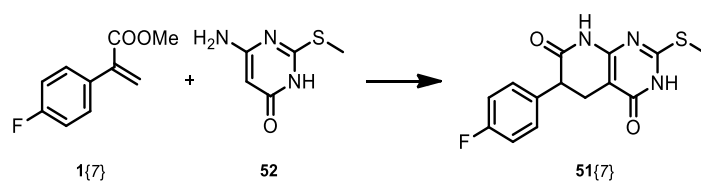


Figura 1.3.8: Reacció per a la formació del compost **51{7}**

Malauradament, el rendiment en aquest cas baixa fins el 36% obtenint-se, a més a més, el producte (**51**{7}) impurificat. Per aquest motiu es decideix seguir experimentant a fi de trobar unes condicions de reacció generals per a dita reacció.

A la taula 1.3.3 es mostren els diferents experiments realitzats a partir de l'acrilat (**1**{7}) amb l'objectiu d'optimitzar la reacció.

*Taula 1.3.3: Condicions de reacció per a la síntesi de **51**{7}*

Equivalentents 1 {7}: 52 :NaOMe	Dv	T (°C)	t (h)	Resultats
1:1:1	IPA	170	5	Rdt _{51{7}} = 47 %
1:1:1 (K ₂ CO ₃)	IPA	170	3	Rdt _{51{7}} = 60%
1:1:1	IPA	170	3	Rdt _{51{7}} = 43 %
1:1:1,4	IPA	170	3	Rdt _{51{7}} = 41%
1:1:1	IPA	150	5	Rdt _{51{7}} ≈ 53% (no pur)
1:1:1	IPA	150	3	Rdt _{51{7}} = 36 %

En primer lloc, es prova d'augmentar el temps de reacció passant de 3 a 5 h a 150 °C observant-se que el rendiment no augmenta considerablement i, a més, s'obté un producte més impur. Tot seguit, es decideix augmentar la temperatura a 170 °C i s'observa com el rendiment de la reacció augmenta fins al 43%. Es decideix aleshores treballar amb un excés de NaOMe però el rendiment no millora. En últim lloc, es pensa que seria interessant canviar la base utilitzada, NaOMe, per una base menys forta i no nucleòfila com és el K₂CO₃, ja que es creu que el NaOMe pot reaccionar amb l'acrilat de metil donant lloc a reaccions secundàries. Afortunadament, l'ús de carbonat potàssic afavoreix la reacció de formació del compost **51**{7} incrementant el rendiment fins al 60%.

Donat que les piridopirimidines obtingudes amb aquesta metodologia de síntesi són el producte de partida d'una ruta sintètica de múltiples etapes, és convenient maximitzar el rendiment amb el que s'obtenen. Per aquest motiu, es va decidir estudiar la relació molar òptima entre els diferents reactius. A la taula 1.3.4 es mostren els experiments realitzats per aquest estudi.

Taula 1.3.4: Optimització de les condicions de reacció per a la síntesi de **51{7}**

Equivalents 1{7}:52: K₂CO₃	Dv	T (°C)	t (h)	Resultats
1,0 : 1,0 : 1,0	IPA	170	3	Rdt _{51{7}} = 60%
1,0 : 2,0 : 1,0	IPA	170	3	Rdt _{51{7}} = 77% (no pur)
1,0 : 1,4 ; 1,0	IPA	170	3	Rdt _{51{7}} = 83%
1,5 : 1,0 : 1,0	IPA	170	3	Rdt _{51{7}} ≈ 46% (no pur)

S'observa que quan es treballa amb un excés d'acrilat (**1{7}**) la reacció presenta un rendiment notablement inferior obtenint-se, a més a més, el producte impurificat. Per altra banda, quan es treballa amb un excés de pirimidona (**52**) (1,4 equivalents respecte a l'acrilat **1{7}**) s'obté el producte desitjat **51{7}** amb millor rendiment (83%).

Després de l'estudi d'optimització realitzat, es pot concloure que les condicions òptimes de reacció per a la síntesi de compostos 4-oxopiridopirimidínics 2-metiliosubstituïts (**51{x}**) són aquelles en que es fa reaccionar l'acrilat corresponent (**1{x}**) amb un excés de 1,4 equivalents de pirimidona (**52**) i, 1 equivalent de carbonat potàssic a 170 °C en isopropanol durant 3h amb calefacció de microones (Figura 1.3.9).

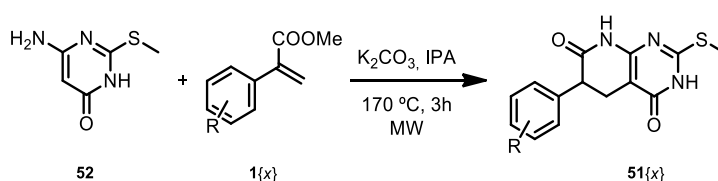
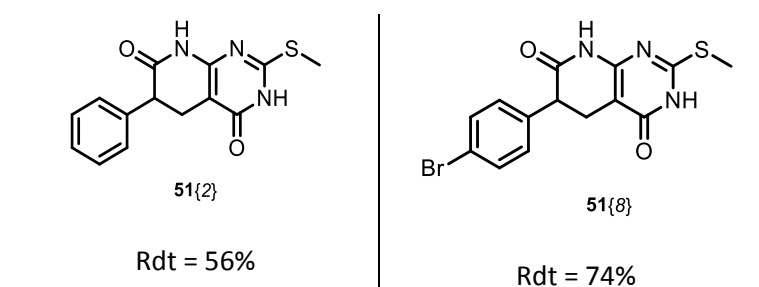
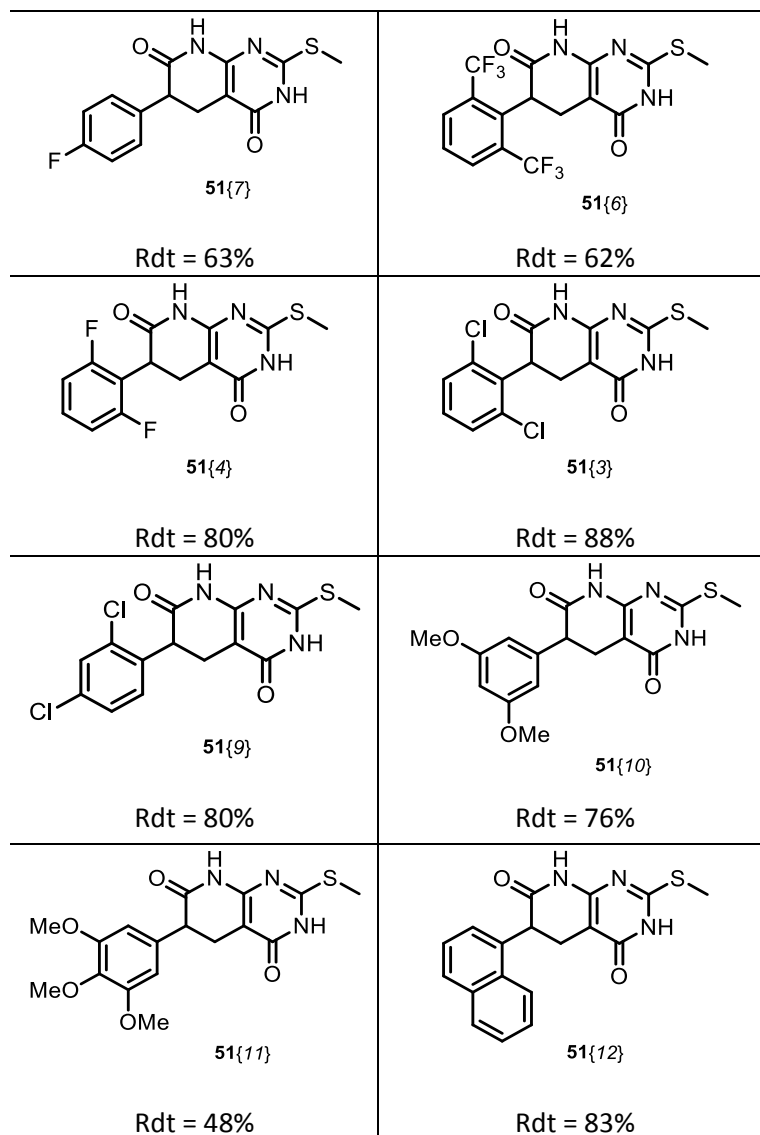


Figura 1.3.9: Condicions òptimes per a la síntesi de **51{x}**

Una vegada s'ha desenvolupat i optimitzat la metodologia per a la síntesi de sistemes **51{x}**, es procedeix a la síntesi d'una quimioteca de compostos que presenten diferents substituents arílics en la posició C6. A la taula 1.3.5 es mostren els compostos (**51{x}**) sintetitzats, presentant rendiments que es troben entre el 48 i el 88%.

Taula 1.3.5: Quimioteca de compostos **51{x}** sintetitzats





Finalment es decideix comprovar l'abast de la reacció provant la seva validesa amb 2-alquilacrilats i 3-alquilacrilats de metil (Figura 1.3.10).

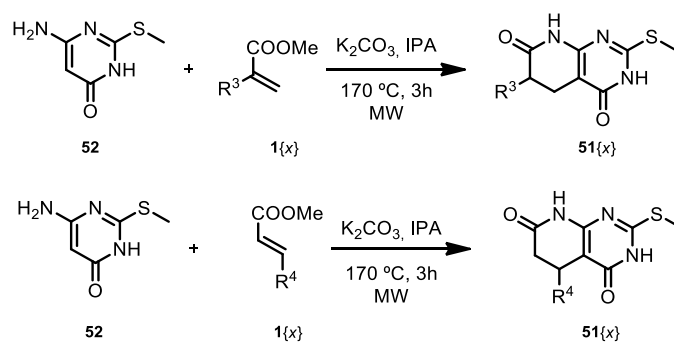
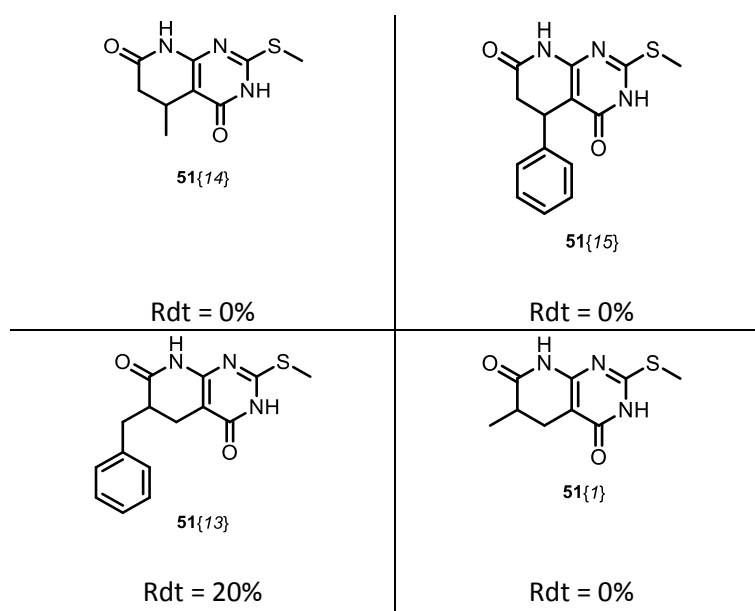


Figura 1.3.10: Estudi de la reacció amb 2-acrilats i 3-acrilats de metil per rendir les piridopirimidines desitjades 51{x}

Com a 2-alkil acrilats de metil s'utilitzen el metacrilat de metil (**1{1}**) i el benzilacrilat de metil (**1{13}**), observant-se que només en el cas en que s'utilitza el compost benzílic (**1{13}**) s'obté el producte desitjat (**51{13}**) amb un rendiment del 20% (Taula 1.3.6).

Per altra banda, els assajos amb crotonat de metil (**1{14}**) i cinamat de metil (**1{15}**) per a rendir els sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics amb un substituent en C5 no són satisfactoris, no rendint els productes desitjats. S'ha de recordar que a l'apartat 1.2 es van utilitzar aquests sistemes acrílics per a la síntesi de sistemes 2-amino substituïts (**7{x}**) rendint el compostos corresponents satisfactòriament, encara que amb rendiments moderats. A la següent taula 1.3.6 es mostra el resum de molècules assajades, en les que només en un dels casos s'ha obtingut el producte corresponent.

Taula 1.3.6: Síntesi dels compostos **51{x}** assajats



1.3.2. Estudi de la derivatització en C2 dels sistemes **51{x}**

Una vegada s'ha desenvolupat amb èxit la síntesi de sistemes 4-oxopiridopirimidínics 2-metiltiosubstituïts (**51{x}**), és de gran interès sintètic el desenvolupament d'una metodologia de síntesi per a la substitució del grup metiltio per nucleòfils.

Derivatització en C2 amb amines

La substitució del grup metiltio per un nucleòfil s'assaja en primer lloc, utilitzant amines com a nucleòfils, aquestes són compostos polars que presenten bona capacitat nucleòfila. Quant major sigui la seva nucleofília major serà la capacitat per reaccionar directament amb el grup metiltio. Tal i com es comenta a l'apartat 1.1, els residus amino d'especial interès a incorporar en C2 són aquells que contenen anells aromàtics, concretament substituents benzilamino o arilamino. Aquestes dues famílies d'amines presenten capacitats nucleòfiles ben diferents, ja que les

primeres són amines alifàtiques mentre que les segones són aromàtiques. Es ben conegut que les arilamines presenten menor nucleofília degut a que poden deslocalitzar el parell electrònic del nitrogen cap a l'anell aromàtic.

Donat que és esperable una major reactivitat de les amines benzíliques, es decideix assajar primerament la substitució directa del grup metiltio per benzilamina. Per dur-ho a terme s'assaja la reacció entre el compost **51{7}** amb excés de benzilamina (**35{8}**) en isopropanol com a dissolvent amb calefacció de microones (Figura 1.3.11).

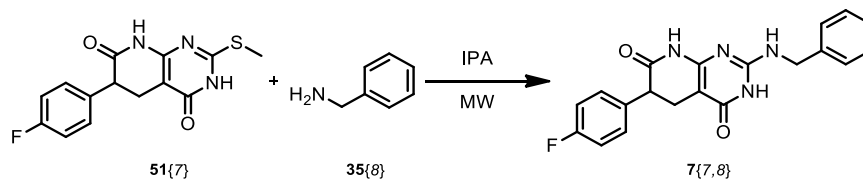


Figura 1.3.11: Síntesi del sistema 2-benzilamino substituït **7{7,8}**

A la taula 1.3.7 es mostren les proves realitzades variant les relacions molars i el temps de reacció, obtenint-se finalment el compost desitjat 2-benzilaminosubstituït (**7{7,8}**) amb un rendiment del 53%.

Taula 1.3.7: Condicions de reacció per a la síntesi de **7{7,8}**

51{7}:7{7,8}	T (°C)	t (h)	Resultats
1 : 5	170	3	Recuperació 51{7}
1 : 10	170	4	Rdt _{7,8} = 53%

Per veure si aquestes condicions són extrapolables al cas de l'anilina (**35{9}**) es prova la substitució directa del grup metiltio del compost **51{7}** per tractament amb 10 equivalents d'anilina (**35{9}**) en IPA a 170°C durant 4 h amb calefacció de microones. Malauradament i tal com era d'esperar, en aquestes condicions es recupera el producte de partida (**51{7}**) inalterat (Figura 1.3.12).

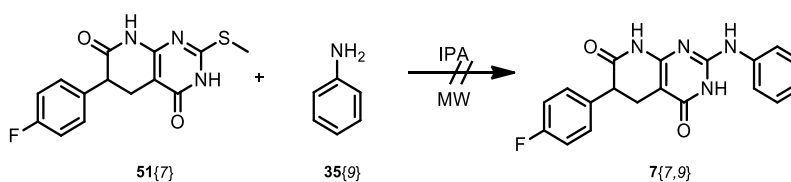


Figura 1.3.12: Intent de síntesi de **7{7,9}** a partir de **51{7}**

Davant l'evidència de que no és possible la substitució directa del grup metil·tio per amines aromàtiques es decideix convertir el grup metil·tio en un millor grup sortint. A la literatura es descriu que l'oxidació d'aquest a sulfòxid o sulfona (Figura 1.3.13) permet la substitució amb major facilitat.

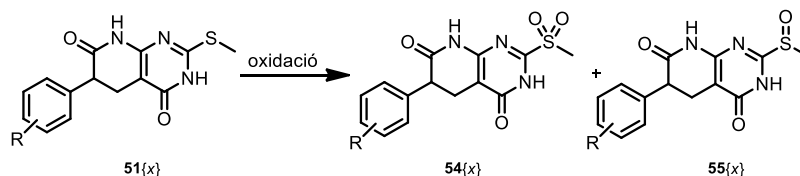


Figura 1.3.13: Oxidació del sulfur de **51{x}** a sulfona (**54{x}**) i/o sulfòxid (**55{x}**)

Per a l'oxidació del sulfur a sulfona i/o sulfòxid existeixen diverses estratègies que utilitzen diferents oxidants.

En primer lloc, es decideix començar assajant la reacció emprant peròxid d'hidrogen en AcOH per la seva capacitat oxidant (Figura 1.3.14).

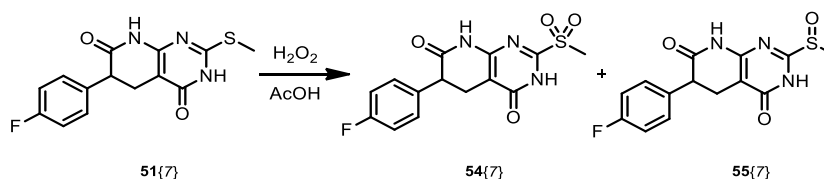


Figura 1.3.14: Tractament de **51{7}** amb H₂O₂ en AcOH

S'addiciona el peròxid d'hidrogen al 30% lentament sobre una dissolució del compost **51{7}** en AcOH a 0 °C, per minimitzar l'exotèrmia de la reacció. Es deixa el cru de reacció agitant 1 h sota aquestes condicions i després s'escalfa a 80 °C durant 3 h. S'addiciona aigua al cru de reacció i es filtra el sòlid obtenint una mescla de la sulfona (**54{7}**) i del sulfòxid (**55{7}**) en una relació 1 a 1. El fet d'obtenir la mescla d'aquests dos productes en principi no ha d'afectar en la següent etapa de síntesi on es substitueix el grup oxidat per anilina, ja que tant el sulfòxid com la sulfona són bons grups sortints. De totes maneres s'exploraran altres condicions d'oxidació de cara a obtenir selectivament un dels dos compostos d'oxidació.

Amb la finalitat d'obtenir la sulfona com a terme d'oxidació, es decideix utilitzar peròxid d'hidrogen en EtOH però en presència d'un catalitzador com és el carbur de niobi^[17] (Figura 1.3.15).

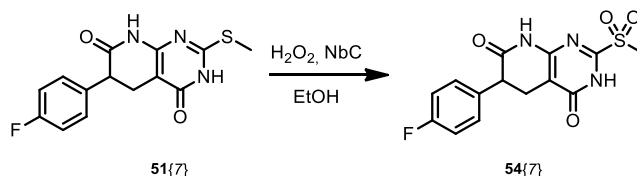


Figura 1.3.15: Oxidació del grup SMe a sulfona amb H_2O_2 i NbC

La reacció es realitza a 60 °C durant 5 h en EtOH. El tractament posterior del cru de reacció consisteix en afegir aigua sobre el cru i aïllar el sòlid per filtració, aquest es dissol en la mínima quantitat de DMSO i es filtra per tal d'eliminar el catalitzador. S'afegeix aigua sobre el filtrat i es filtra el sòlid obtenint el producte desitjat (**54{7}**) amb un rendiment del 30%. Aquest baix rendiment pot ser degut al tractament del sòlid amb DMSO, ja que es perd producte en aquesta etapa.

Amb l'objectiu d'augmentar el rendiment de la reacció d'oxidació del grup tiometil, es tracta el producte **51{7}** amb peròxid d'hidrogen a 60 °C durant 12h en EtOH (el mateix dissolvent que en l'assaig anterior) per tal de disminuir la solubilitat del producte desitjat. Malauradament, la reacció no és completa i es recupera el producte de partida (**51{7}**) inalterat. Aquest fet es pot explicar degut a que el peròxid d'hidrogen per actuar com a agent oxidant precisa d'un medi àcid (Figura 1.3.16) que l'etanol no és capaç d'aportar.

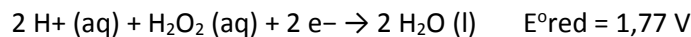


Figura 1.3.16: Semireacció del peròxid d'hidrogen

A la figura 1.3.17 s'observen els 1H RMN dels productes obtinguts en les 3 reaccions esmentades anteriorment. L'espectre de color blau correspon a la mescla de productes (**54{7}** i **55{7}**) obtinguts en fer la reacció amb peròxid d'hidrogen en AcOH, on s'observa clarament que hi ha dues piridopirimidines que corresponen als dos estats d'oxidació del grup metiltio en C2, concretament el sulfòxid (**55{7}**) i la sulfona (**54{7}**). Així, s'observen dos doblets de doblets al voltant de 4,0 i 4,3 ppm corresponents al metí en la posició C6 d'ambdós compostos i dos multiplets al voltant de 3,0 i 3,2 ppm corresponents als metilens en C5 de **55{7}** i **54{7}** respectivament. Aquests senyals són característics dels compostos pirido[2,3-*d*]pirimidínics substituïts en la posició C6, observant-se que quan el grup 2-metiltio (espectre de color verd) es converteix en sulfòxid o sulfona es troben desplaçats a camp més baix. Per últim, l'espectre de color vermell correspon a la sulfona (**54{7}**) obtinguda pel tractament del compost (**51{7}**) amb H_2O_2 i NbC en EtOH. Aquí es pot veure clarament com els senyals bescanviabls de NH, el metí i el metilè en C6 i C5, respectivament, es troben desplaçats a camp més baix degut a la presència de la sulfona.

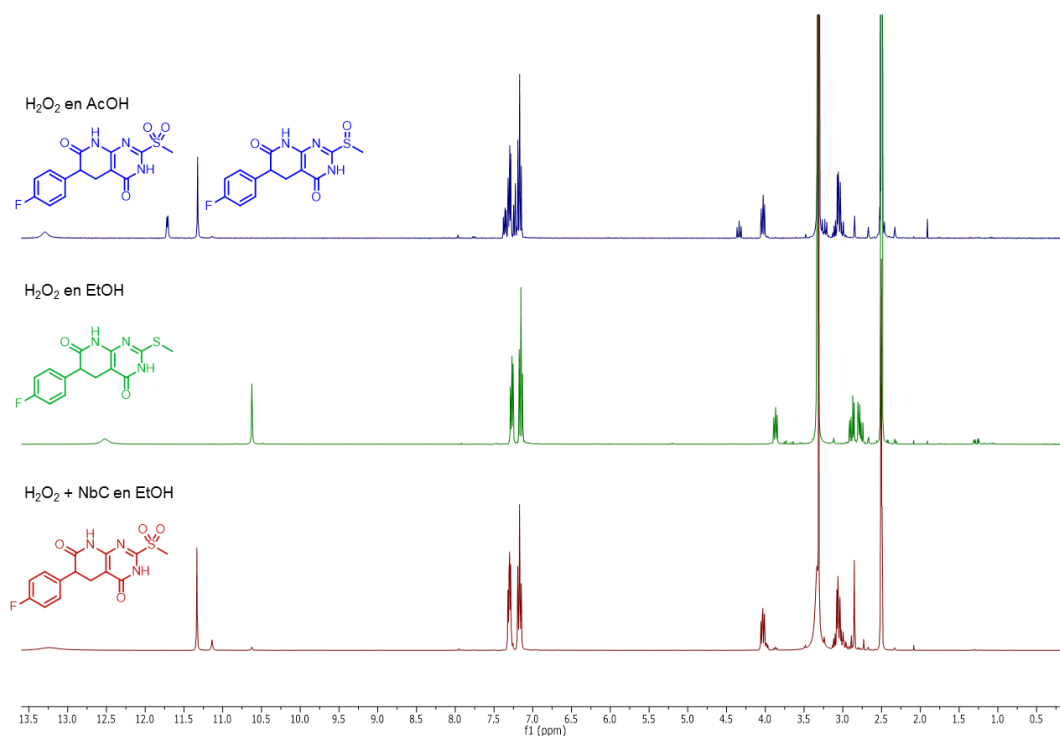


Figura 1.3.17: Espectres d' ^1H RMN dels productes d'oxidació del grup metiltio en C2 obtinguts usant diferents oxidants enregistrats en d_6 -DMSO

Amb l'objectiu de trobar un procediment que presentés més bons rendiments s'assajen altres condicions de reacció:

- L'ús de peròxid de carbamida com a oxidant en MeOH per intentar reduir la formació de peròxids durant el procés, però es recupera el producte de partida.
- L'ús d'oxone® (monopersulfat potàssic) com a oxidant en MeOH/H₂O s'observa que la reacció no evoluciona recuperant-se el producte de partida.

En darrer lloc, l'ús d'àcid *m*-cloroperbenzoic (*m*-CPBA) en DMF com a dissolvent rendeix la sulfona (**54{7}**) amb un rendiment al voltant del 75%. Aquest resultat és coherent amb la bibliografia, la qual indica que l'oxidació de sulfurs amb un peràcid dóna lloc a la corresponent sulfona^[18; 19].

Recapitulant, l'ús de *m*-CPBA en DMF permet obtenir el compost desitjat (**54{7}**) satisfactòriament i amb un bon rendiment, per aquests motius es decideix utilitzar aquesta metodologia per l'oxidació del grup metiltio dels compostos (**51{x}**) a la corresponent sulfona (**54{x}**) (Figura 1.3.18).

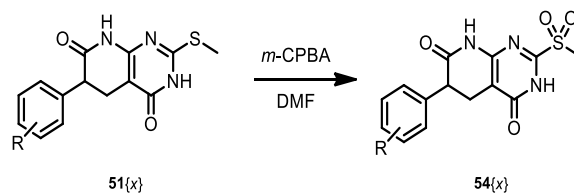
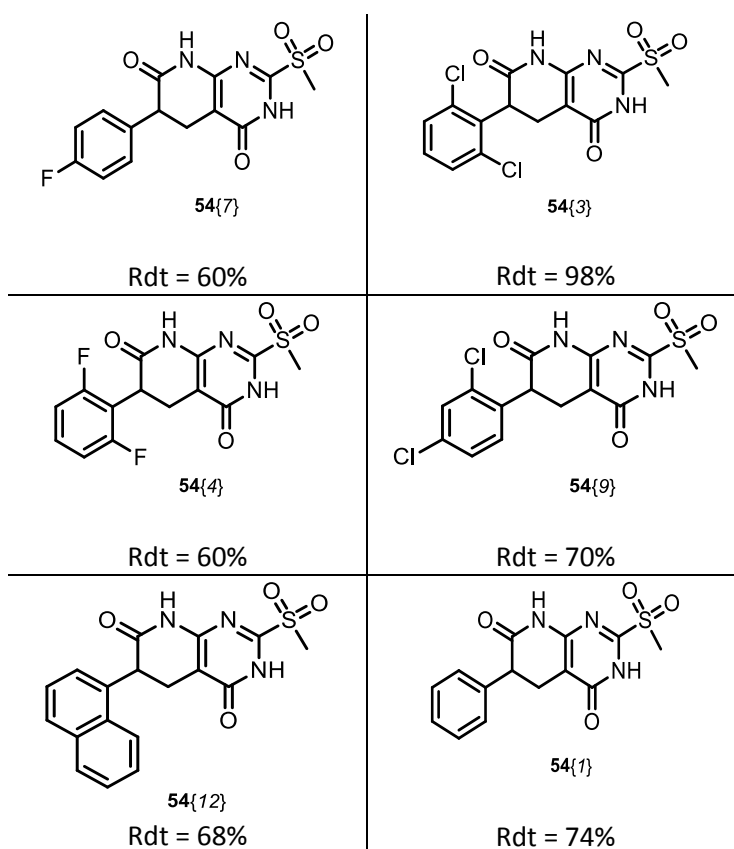


Figura 1.3.18: Reacció d'oxidació del sulfur a sulfona amb *m*-CPBA

Tot seguit, es procedeix a sintetitzar una quimioteca de compostos piridopirimidínics amb un grup sulfona en la posició C2 (taula 1.3.8).

Taula 1.3.8: Quimioteca de compostos $54\{x\}$ sintetitzats emprant *m*-CPBA en DMF



Després de validar aquesta metodologia per a l'obtenció de sistemes $54\{x\}$, es decideix fer reaccionar el compost $54\{7\}$ amb un excés de 10 equivalents d'anilina ($35\{9\}$) en isopropanol a 170 °C amb calefacció de microones durant 5 h (Figura 1.3.19). Finalitzada la reacció es suspèn el cru de reacció en ciclohexà i s'aïlla el sòlid per filtració rendint el producte 2-fenilaminosubstituït ($7\{7,9\}$) amb un rendiment del 94%.

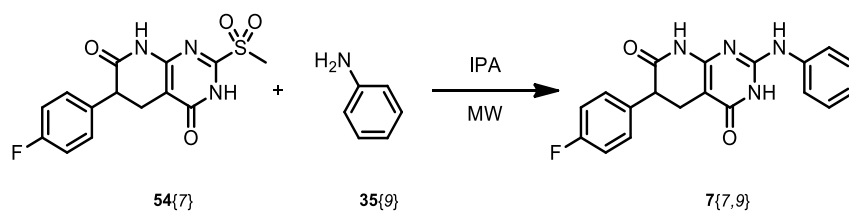


Figura 1.3.19: Síntesi de 7{7,9} a partir de la sulfona (54{7})

A la següent figura, es pot observar l'espectre de ^1H RMN del compost 7{7,9}. Per a l'assignació correcta i inequívoca de cada senyal de protó ha estat necessari la realització de l'espectre de ^{13}C RMN i d'espectres bidimensional com ara l'HSQC i el COSY.

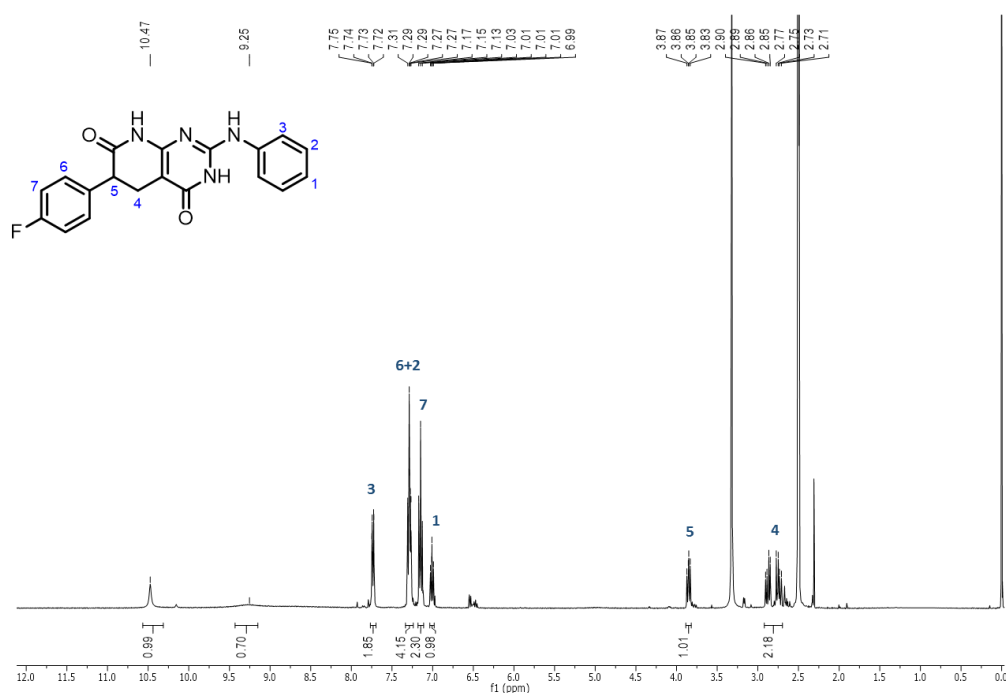
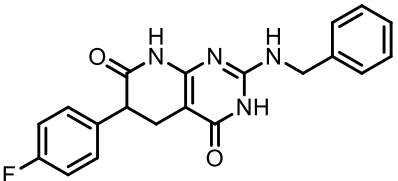
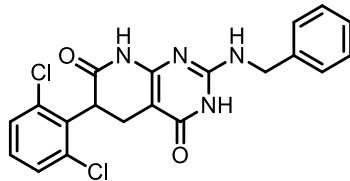
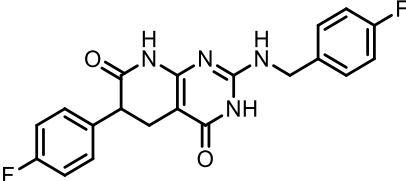
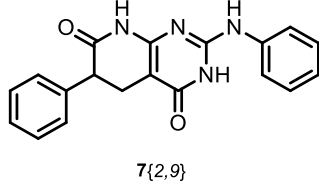
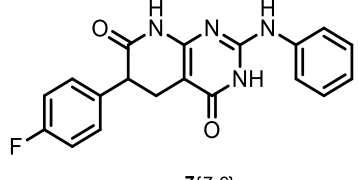
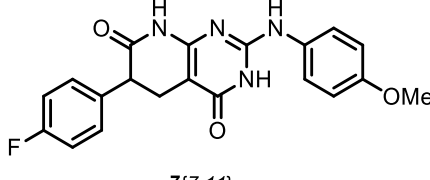
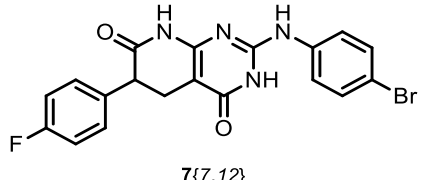
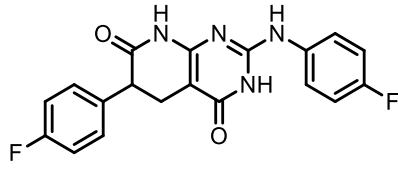
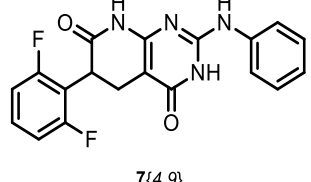
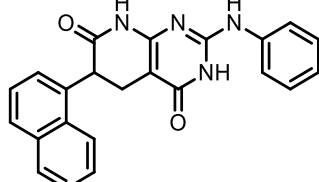


Figura 1.3.20: Espectre de ^1H RMN del compost 7{7,9} enregistrat en d_6 -DMSO

Una vegada s'ha establert una metodologia per introduir substituents benzilamino i arilamino en C2, es procedeix a sintetitzar una quimioteca d'aquest tipus de sistemes 7{x,y} (taula 1.3.9).

Taula 1.3.9: Quimioteca de compostos 2-aminosubstituïts 7{x,y}

 <p>7{7,8}</p> <p>Rdt** = 53%</p>	 <p>7{3,8}</p> <p>Rdt** = 36%</p>
 <p>7{7,10}</p> <p>Rdt** = 40%</p>	 <p>7{2,9}</p> <p>Rdt* = 82%</p>
 <p>7{7,9}</p> <p>Rdt* = 94%</p>	 <p>7{7,11}</p> <p>Rdt* = 79%</p>
 <p>7{7,12}</p> <p>Rdt* = 74%</p>	 <p>7{7,13}</p> <p>Rdt* = 67%</p>
 <p>7{4,9}</p> <p>Rdt* = 83%</p>	 <p>7{12,9}</p> <p>Rdt* = 67%</p>

*Rendiments calculats a partir del compost amb la sulfona en C2 (54{x})

**Rendiments calculats a partir del compost amb el grup metilio en C2 (51{x})

S'ha de remarcar que per a la síntesi de 7{7,12}, compost que presenta el grup *p*-bromoanilina (35{12}) en la posició C2, ha sigut necessari disminuir els equivalents d'amina, ja que es creu que aquesta pot polimeritzar rendint compostos no desitjats. Per tant, per a la seva síntesi s'han emprat 1,5 equivalents de *p*-bromoanilina (35{12}) en isopropanol a 170 °C amb calefacció de microones durant 5 h obtenint-se el compost 7{7,12} amb un rendiment del 74%. La

piridopirimidina 2-(*p*-bromofenilamino) substituïda és molt interessant, ja que permet incorporar altres residus en *para* de l'anell fenílic mitjançant reaccions del tipus Ullmann, Suzuki, etc. D'altra banda també s'ha assajat amb èxit la síntesi d'una amina aromàtica amb un grup donador en *para*, com és la *p*-metoxianilina, rendint el compost (7{7,11}) 2-(*p*-metoxifenilamino) substituït amb un rendiment de 79%.

Derivatització en C2 amb alcohols

Una vegada s'han optimitzats les condicions de reacció per a la substitució de la sulfona en C2 per una amina aríllica o benzílica, es pensa en l'ús d'altres nucleòfils com ara alcohols. Es procedeix a assajar la reacció entre la piridopirimidina **54**{7}, presentant una sulfona en la posició C2, i el fenol (**37**{5}). La reacció s'assaja emprant 2 equivalents de fenol en isopropanol anhidre com a dissolvent a 170 °C durant 12 h sota calefacció a microones. Finalitzada la reacció es suspèn el cru de reacció en ciclohexà i es filtra el sòlid. Després d'analitzar el sòlid obtingut per ¹H RMN s'observa que aquest no presenta senyals aromàtics addicionals corresponents a l'anell del fenol i, a la vegada, no s'observa el grup sulfona en C2 (Figura 1.3.21). Per tant, es tracta d'un compost piridopirimidínic que no correspon al producte de substitució esperat (**53**{7,5}), ni al producte de partida (**54**{7}).

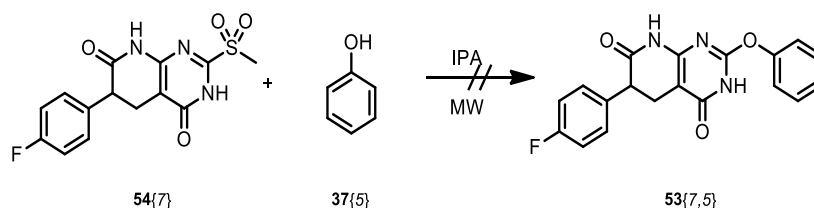


Figura 1.3.21: Reacció entre el compost **54**{7} i fenol en IPA

Per tal d'elucidar l'estructura d'aquest nou compost sintetitzat es comparen els ¹H RMN del producte de partida (**54**{7}) i del compost obtingut (Figura 1.3.22). Si ens centrem en la zona aromàtica del espectre no s'observen senyals addicionals als esperats, per tant el fenol no ha reaccionat tal com ja s'havia comentat. Per contra, s'observa l'aparició d'un senyal bescanviable al voltant de 9,5 ppm i la desaparició del singlet corresponent al metil de la sulfona (aquest fet es confirma per ¹³C RMN). Tot això fa pensar que el fenol no té suficient capacitat nucleòfila per atacar a la sulfona i que, per contra, la presència de traces d'aigua en el medi de reacció han causat la substitució directa de la sulfona donant lloc al compost 2-hidroxipiridopirimidínic (**56**).

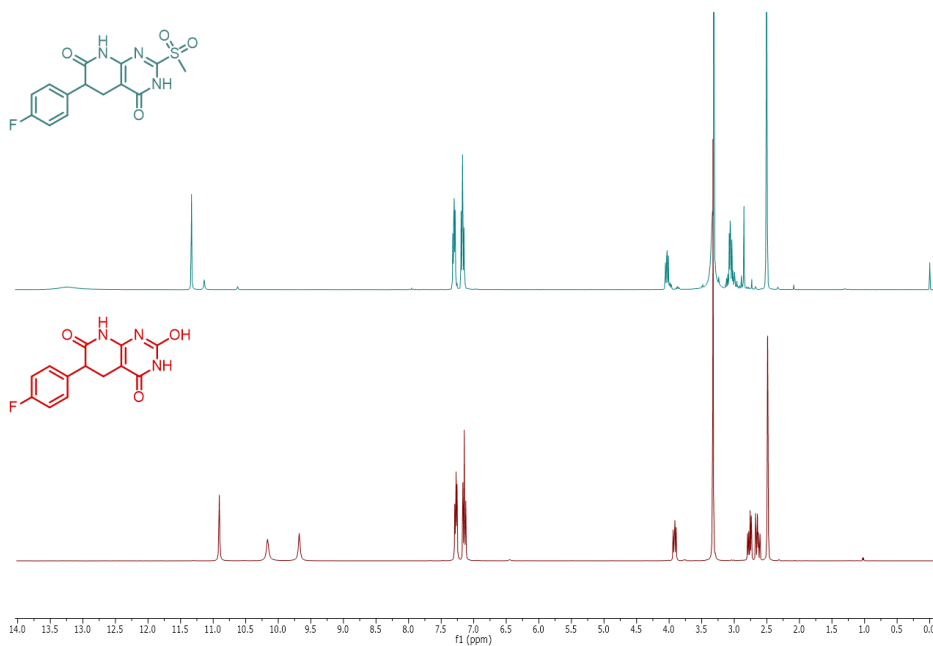


Figura 1.3.22: ^1H RMN del producte de partida (**54{7}**) i el producte obtingut (**56**) enregistrats en d_6 -DMSO

Per tant, la reacció entre el compost **54{7}** i el fenol en IPA a 170 °C amb calefacció de microones rendeix el compost **56** presentant un alcohol en la posició C2 amb un rendiment del 80%. A la següent figura 1.3.23 es presenta ^1H RMN d'aquest nou producte sintetitzat, no esperat.

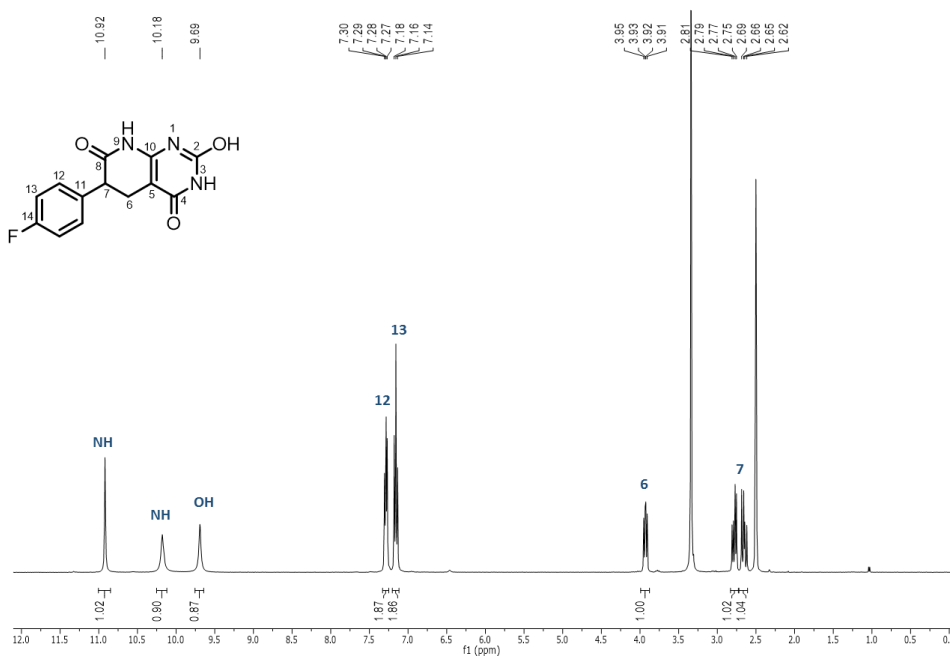


Figura 1.3.23: ^1H RMN del compost 2-hidroxi piridopirimidínic (**56**) enregistrat en d_6 -DMSO

A continuació, es decideix introduir una base, com ara el NaOMe, per formar l'anió fenòxid en IPA a 60 °C amb calefacció de microones durant 20 min. A continuació, s'addiciona la piridopirimidina (**54**{7}) 2-metilsulfonil substituïda i es porta a 170 °C durant 3h amb calefacció de microones. Finalitzat el temps de reacció s'elimina el dissolvent a pressió reduïda, es suspèn el residu amb aigua i es neutralitza amb HCl recollint el sòlid per filtració, obtenint-se el producte 2-fenoxisubstituït (**43**{7,5}) amb un rendiment del 72%

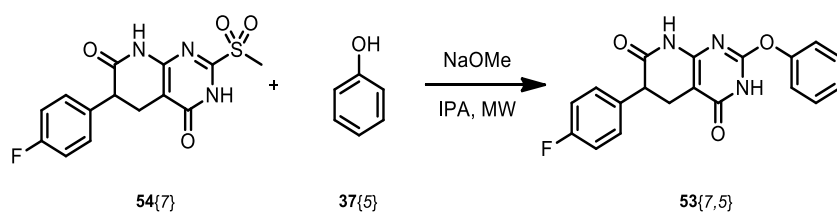


Figura 1.3.24: Síntesi del compost **53**{7,5} en medi bàsic

És important esmentar que el NaOMe també pot fer anhidre el medi de reacció, fent que l'aigua no pugui competir amb el fenol.

1.3.3. Seqüència òptima per a la derivatització de 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidines en C2, C4, C6, N8 i la deshidrogenació de l'anell piridònic

A mode resum de les vies sintètiques posades a punt per a la síntesi de sistemes piridopirimidínics, a continuació es presenten dos esquemes sintètics que pretenen establir la seqüència òptima per a la derivatització de 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidines en C2, C4, C6, N8 i la deshidrogenació de l'anell piridònic. En el primer d'aquests esquemes es descriuen les diferents possibilitats sintètiques que permeten accedir a sistemes 2-amino substituïts, mentre que en el segon s'analitzen les vies que permeten introduir grups alquilamino (o arilamino) o alquiloxi (o ariloxi) en C2.

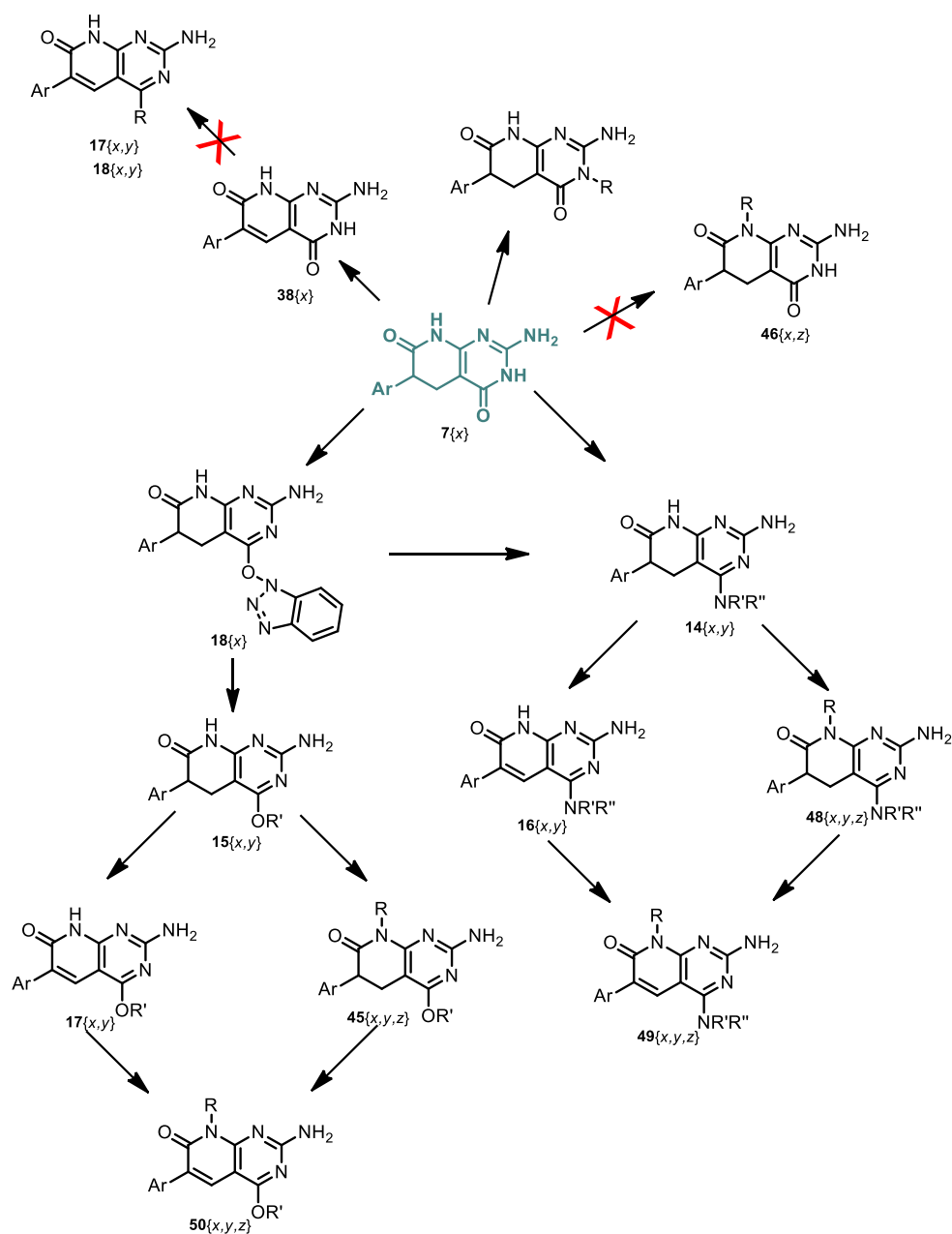


Figura 1.3.25: Esquema general per a la derivatització de sistemes 2-aminopirido[2,3-*d*]pirimidínics

A la figura 1.3.25 s'observa que per a l'obtenció de sistemes piridopirimidínics amb un grup amino en C2 l'estructura de partida correspon a la molècula **7{x}**. A partir d'aquesta es poden fer diverses modificacions en les posicions C4, C5-C6 i N8 com es mostra en la figura 1.3.25. És important ressaltar que no es pot arribar a la derivatització de la posició N8 en sistemes 4-oxopiridopirimidínics, ja que es dona preferentment la derivatització en la posició N3. Per altra banda, l'altre punt important a destacar és que la derivatització en C4 ha de tenir lloc abans de la deshidrogenació entre les posicions C5-C6.

Per a l'obtenció de sistemes piridopirimidíncs 2-substituïts les estructures de partida seran les molècules **51{x}** i **54{x}** (Figura 1.3.26). L'ús d'una o altra com a producte de partida dependrà del residu que es vulgui introduir en C2 i lo bon nucleòfil que sigui el reactiu a utilitzar per la seva introducció. Per a bons nucleòfils serà possible utilitzar com a producte de partida el compost **51{x}**, mentre que per a pitjors nucleòfils serà necessari partir del compost **54{x}**. Això és degut a que el grup sulfona és millor grup sortint que el grup tiometil.

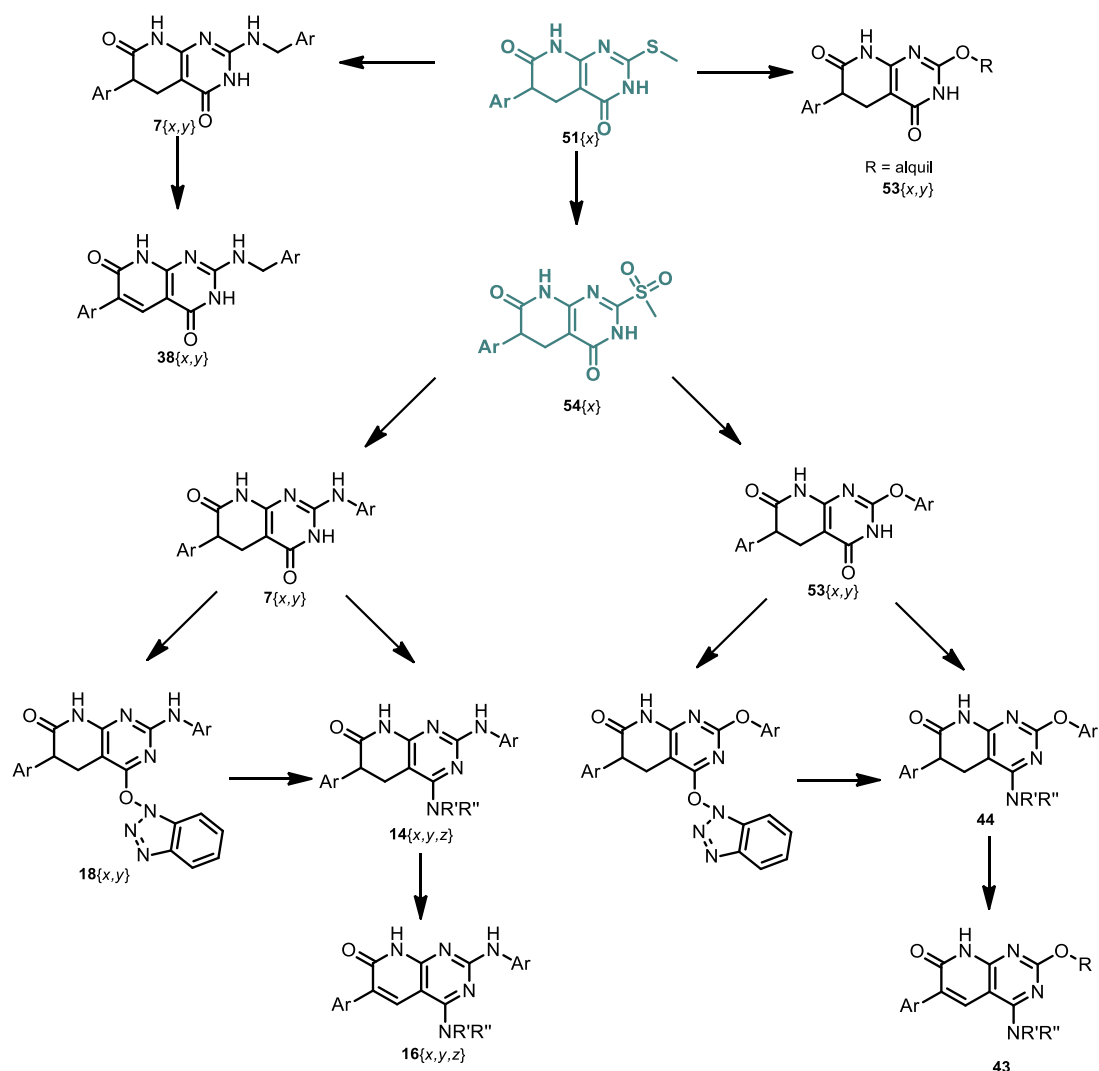


Figura 1.3.26: Esquema general per a la derivatització de sistemes pirido[2,3-d]pirimidínics amb substituents 2-alquilamino (o 2-arilamino) o 2-alcoxi

Aquesta estratègia sintètica permet obtenir compostos piridopirimidínics els quals presenten un gran ventall de substituents en les posicions C2, C4, C6 i N8, fet que ens permet sintetitzar amb facilitat compostos molts diversos. Cal destacar que aquesta metodologia ens permet modificar un posició sense alterar les altres amb la finalitat d'aconseguir selectivitat alhora d'estudiar la relació estructura activitat d'aquests compostos front el VHC.

1.4. Estudi de l'activitat biològica front del virus VHC

Una vegada s'ha sintetitzat una família de pirido[2,3-*d*]pirimidines es procedeix a avaluar-ne la seva activitat antiviral front el VHC. Amb aquest propòsit s'ha col·laborat estretament amb l'institut d'Investigació del Sida IrsiCaixa, el qual ha realitzat tots els assajos d'activitat dels nostres compostos.

A continuació, es procedeix a explicar el protocol que segueix el grup IrsiCaixa per a l'avaluació de l'activitat i la toxicitat dels compostos desenvolupats per inhibir el virus de l'hepatitis C. Per fer-ho, es donaran els valors d'activitat expressats en EC_{50} i CC_{50} . Éssent EC_{50} la concentració efectiva o concentració necessària per inhibir el 50% de les cèl·lules infectades i, CC_{50} és la concentració citotòxica o la concentració necessària per induir la mort cel·lular en el 50% de les cèl·lules no infectades.

Per l'assaig de l' EC_{50} , s'utilitzen unes cèl·lules anomenades LucUbiNeo-ET, les quals porten el replicó VHC subgenòmic 1b que expressa el gen de la Lucifer^[20; 21]. El dia 1 es preparen 10000 cèl·lules/pou en una placa de 96 pous de la columna 2 a la columna 11. El dia 2, s'afegeixen els compostos a la columna 2 a una concentració final de 125µg/ml i es dilueixen 1/5 fins a la columna 10. A la columna 11 tenim les cèl·lules sense compost i, per últim a la columna 12, s'afegeixen les cèl·lules LUNET (són les mateixes cèl·lules però sense el replicó VHC). El dia 4 es fa la lectura de la luciferasa. Els valors obtinguts es tracten matemàticament per obtenir els valors de la EC_{50} . S'avaluen 2 compostos per placa de 96 pous per triplicat. (Figura 1.4.1)

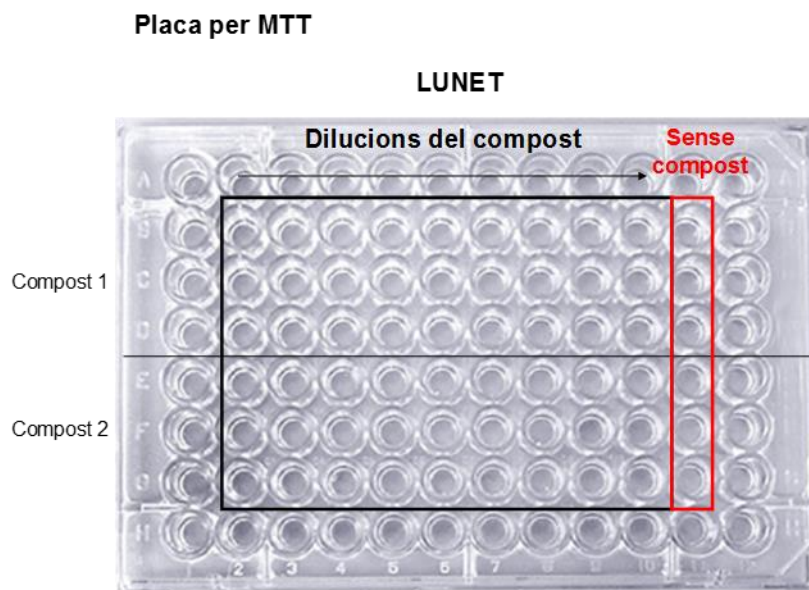


100 ul cèls/pou.

Columna 2 a la 10: dilucions del compost 1/5 (25 ul compost en 100ul medi+cèls).

Figura 1.4.1: Assaig de la EC_{50}

Per l'assaig de la CC_{50} , s'utilitzen les cèl·lules Huh-7/Lunet^[22], les quals no porten el replicó VHC 1b. El dia 1 es preparen 10000 cèl·lules/pou en una placa de 96 pous de la columna 2 a la columna 11 (Figura 1.4.2). El dia 2, s'afegeixen els compostos a la columna 2 a una concentració final de 125µg/ml i es dilueixen 1/5 fins a la columna 10. A la columna 11 tenim les cèl·lules sense compost i, en la columna 12 s'afegeixen les cèl·lules LUNET (són les mateixes cèl·lules però sense el replicó). El dia 4 es fa la lectura amb MTT, és a dir, s'afegeixen 10 µl de MTT per pou (Figura 1.4.3), i es posen les plaques a 37 °C a l'estufa de CO₂ 4h, i després s'afegeix el reactiu per fer la lectura del MTT i es quantifica^[23]. S'avaluen 2 compostos per placa de 96 pous per triplicat.



100 ul cèls/pou.

Columna 2 a la 10: dilucions del compost 1/5 (25 ul compost en 100ul medi+cèls).

Figura 1.4.2: Assaig de la CC_{50}

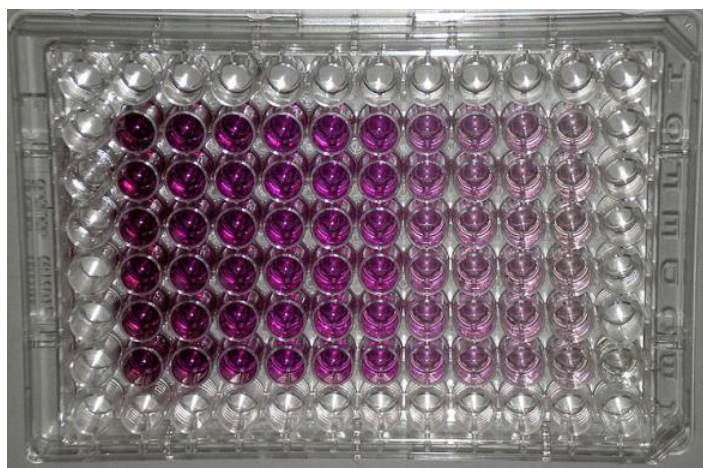
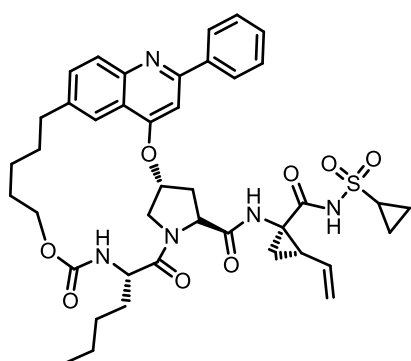


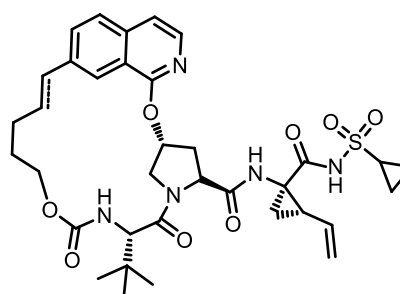
Figura 1.4.3: Placa després d'afegir la MTT en els pous, haver estat a l'estufa i haver afegit DMSO

S'ha de tenir present que és necessari tenir sempre un control positiu en aquests tipus d'experiments, per això s'avaluen dos compostos inhibidors de la proteasa NS3 del VHC (de la casa comercial Merck)^[24], nombrats Inh I i Inh II (Figura 1.4.4).



Inh I

$EC_{50} = 0,0608 \mu M$ i $CC_{50} > 2,0 \mu M$
 $EC_{50} = 0,0469 \mu g/ml$ i $CC_{50} > 1,58 \mu M$



Inh II

$EC_{50} = 0,0032 \mu M$ i $CC_{50} > 2,0 \mu M$
 $EC_{50} = 0,0022 \mu g/ml$ i $CC_{50} > 1,39$

Figura 1.4.4: Inhibidors de la proteasa NS3

Una vegada s'ha descrit el procediment utilitzat per avaluar els compostos desenvolupats en aquesta Tesi Doctoral, es procedirà a estudiar la relació estructura-activitat d'aquests compostos pirido[2,3-*d*]pirimidínics. A més a més dels compostos sintetitzats en la present Tesi Doctoral, s'han avaluat altres molècules del tipus pirido[2,3-*d*]pirimidina desenvolupades en altres programes d'investigació dins el nostre grup.

S'han avaluat 121 compostos amb estructura pirido[2,3-*d*]pirimidínica, els qual s'han classificats en dos grans grups:

- 1- Compostos pirido[2,3-*d*]pirimidínics sense insaturació entre la posició C5 i C6
- 2- Compostos pirido[2,3-*d*]pirimidínics amb una insaturació en l'enllaç C5-C6

En primer lloc, es procedirà a avaluar i estudiar tots aquells compostos que no presenten una insaturació en l'anell piridònic (Figura 1.4.5). Per a fer-ho, s'han establert diverses subdivisions dins aquest gran grup les qual s'aniran comentant al llarg d'aquest apartat.

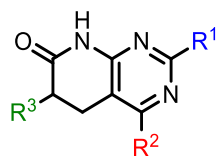
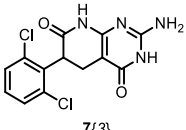
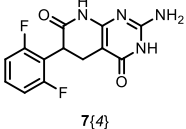
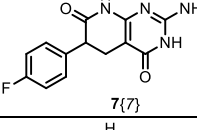
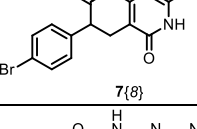
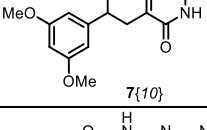
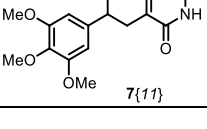
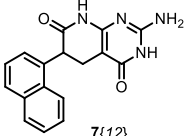
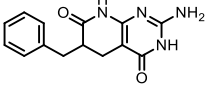
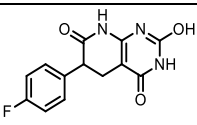


Figura 1.4.5: Estructura general pels sistemes 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics sense insaturació entre C5 i C6

A la taula 1.4.1 es mostren tots els compostos 4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics que presenten un grup amino no substituït en C2 (també s'inclou el compost **56**, que presenta un alcohol en C2). Els seus valors d'activitat es donen expressats com a **EC₅₀** i **CC₅₀** d'acord amb la definició anterior.

Taula 1.4.1: Compostos 4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics

Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 7{3}	>52,41	>125
 7{4}	78,60	83,90
 7{7}	42,53	>125
 7{8}	43,13	68,76
 7{10}	>125	>125
 7{11}	>125	>125

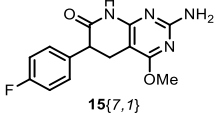
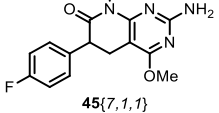
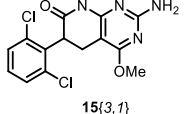
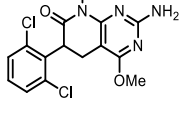
Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 7{12}	INSOLUBLE	
 7{13}	>42,75	42,75
 56	>125	>125

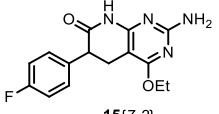
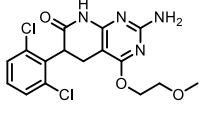
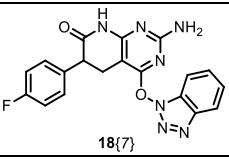
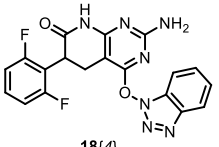
A la taula anterior es pot observar que els compostos bàsicament difereixen en el residu present en la posició C6, essent aquest un anell arílic substituït amb grups halògens o bé amb un grup donador com és el metoxi.

S'observa que cap dels compostos és actiu, però el compost que presenta un millor valor d'activitat (el valor més baix d'EC₅₀) és aquell que té el grup *p*-fluorofenil en la posició C6 del bicicle (**7{7}**). Val a dir que el compost (**7{13}**) amb un benzil en C6 també presenta un valor similar d'EC₅₀ però a la vegada també presenta aquest mateix valor en CC₅₀. Aquest fet ens informa que d'aquest compost no s'ha pogut avaluar l'EC₅₀ per sobre de 42,75 µg/ml ja que abans ha inhibit el creixement del 50% de les cèl·lules.

A continuació, a la taula 1.4.2, es mostren els compostos piridopirimidínics (**15{x,y}**) substituïts en C4 per un grup alcoxi o que presenten el grup OBt (**18{x}**) en aquesta posició.

Taula 1.4.2: Compostos 7-oxopirido[2,3-d]pirimidínics derivatitzats en C4 presentant un grup alcoxi o OBt

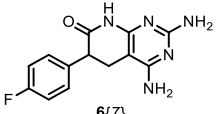
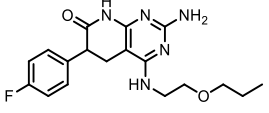
Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 15{7,1}	>58,32	58,32
 45{7,1,1}	21,91	60,56
 15{3,1}	>20,38	20,38
 45{3,1,1}	5,57	30,90

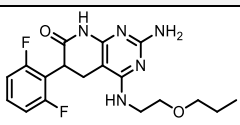
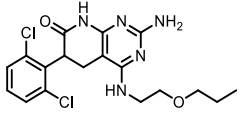
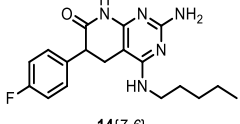
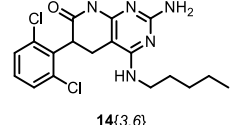
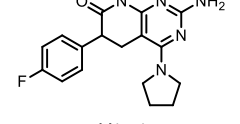
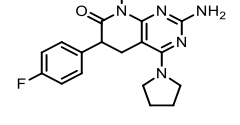
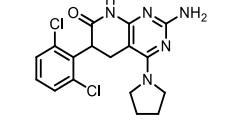
Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 15{7,2}	>125	>125
 15{3,4}	8,45	65,0
 18{7}	>7,19	7,19
 18{4}	>35,56	35,56

Dels valors que es mostren a la taula anterior es pot observar que els compostos (**18**{x}) que presenten el grup OBt en C4 no presenten valors d'EC₅₀ interessants. Respecte als compostos **15**{x,y} que presenten un grup alcoxi en C4, alguns d'ells presenten valors d'EC₅₀ inferiors a 10 µg/ml. S'observa que al compost **45**{3,1,1}, el qual té un grup metoxi en C4 i a la vegada està metilat en el nitrogen lactàmic, li correspon un valor d'EC₅₀ = 5,57 µg/ml. En segon lloc, el segueix el compost **15**{3,4} que presenta el grup 2-metoxietoxi en C4 amb una EC₅₀ = 8,45 µg/ml. Comparant els compostos **15**{7,1}-**45**{7,1,1} amb **15**{3,1}-**45**{3,1,1} sembla observar-se que la metilació en la posició lactàmica millora els valors d'EC₅₀. Com a comentari general la gran majoria d'aquests compostos presenten valors de CC₅₀ baixos i per tant, es consideren en general més tòxics que la família anterior.

Tot seguit a la taula 1.4.3 es mostren els valors d'activitats obtinguts pels sistemes piridopirimidínics 4-amino o 4-alkilamino substituïts.

Taula 1.4.3: : Compostos 7-oxopirido[2,3-d]pirimidínics 4-amino o 4-alkilamino substituïts

Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 6{7}	>31	>31
 14{7,7}	>6,29	6,29

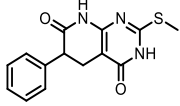
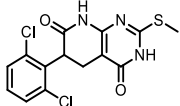
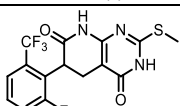
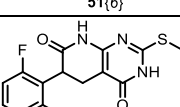
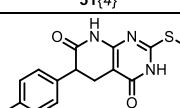
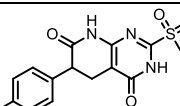
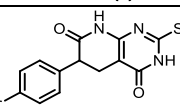
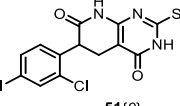
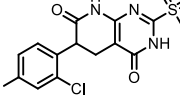
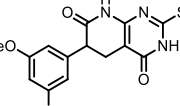
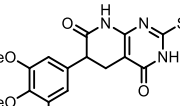
Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 14{4,7}	37,38	93,78
 14{3,7}	>24,66	>125
 14{7,6}	>6,25	6,25
 14{3,6}	13,32	46,13
 14{7,5}	68,1	>125
 48{7,5,1}	>7,45	7,45
 14{3,5}	>30,06	30,06

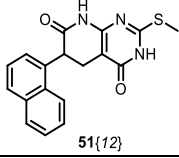
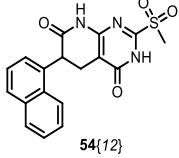
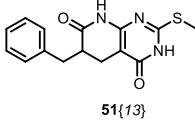
Dels resultats mostrats a la taula anterior es pot observar que el compost que presenta un valor definit d'EC₅₀ inferior és aquell que té un grup pentilamino en C4 i un anell 2,6-diclorofenil en C6, compost **14{3,6}**. La resta de compostos presenten una gran variabilitat principalment en els valors de CC₅₀.

Si ens centrem en el compost **14{7,6}**, el qual presenta un grup *p*-fluorofenil en C6, i el comparem amb el compost **14{3,6}** comentat anteriorment, s'observa que el fet de presentar diferents substituents en l'anell arílic en C6 fa que els valors de CC₅₀ variïn significativament, sent el residu en C6 important per a l'activitat de la molècula. Per altra banda, si es comparen els compostos **14{7,5}** i **48{7,5,1}**, els quals es diferencien en el metil en N8, s'observa que aquest últim presenta un valor de CC₅₀ molt inferior al de **14{7,5}**, fent que no sigui possible avaluar l'EC₅₀ per sobre de 7,45 µg/ml.

A la taula 1.4.4 es mostren els valors d'activitat dels compostos 4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics amb grups metiltio (**51{x}**) o metilsulfonil (**54{x}**) en la posició C2.

Taula 1.4.4: Compostos 4-oxopirido[2,3-d]pirimidínic amb grups metiltio o metilsulfonyl en la posició C2.

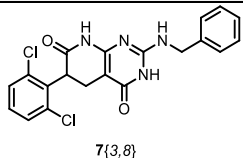
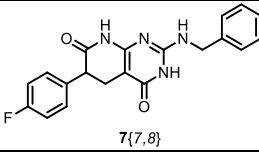
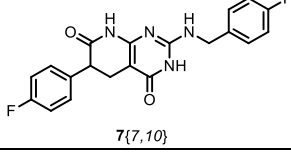
Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 51{2}	>69,05	69,05
 51{3}	>53,85	53,85
 51{6}	40,60	72,59
 51{4}	>22,29	22,29
 51{7}	>65,66	65,66
 54{7}	59,09	>125
 51{8}	>35,75	35,75
 51{9}	>14,59	14,59
 54{9}	26,84	72,08
 51{10}	>19,09	19,09
 51{11}	>125	>125

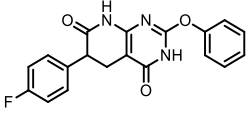
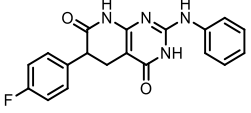
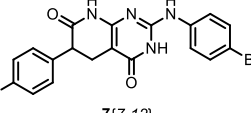
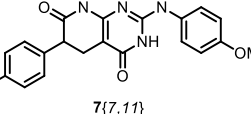
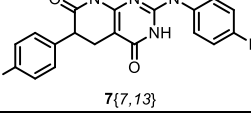
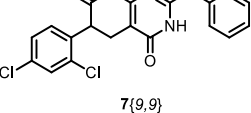
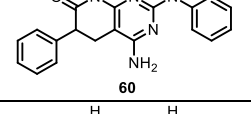
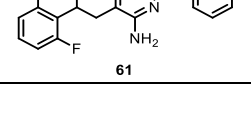
Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 51{12}	32,23	87,00
 54{12}	33,60	86,82
 51{13}	3,38	11,54

De la taula 1.4.4 s'observa que el compost que presenta un menor valor d'EC₅₀ és aquell que té un grup benzil en C6 i a la vegada un grup metiltio en C2 (**51{13}**). Val a dir, que si es comparen aquells sistemes que només difereixen en el grup en C2, és a dir, aquells que presenten un grup tiometil o bé una sulfona, en general no s'observa cap fet a destacar en relació als seus valors d'activitat, simplement el valor de CC₅₀ és lleugerament superior en el cas de la sulfona respecte al que presenta el grup metiltio. En general, es tracta d'un fet no rellevant en l'estudi de l'estructura-activitat d'aquests heterocicles.

A continuació, es comenten els valors d'activitats dels sistemes 7-oxopirido[2,3-d]pirimidínic 2-fenilamino i 2-benzilamino substituïts, amb la finalitat de poder estudiar l'influència en l'activitat de la molècula dels substituents presents en la posició C2 del bicicle. Per la seva similitud també s'inclou en aquesta taula el compost **53{7,5}** que presenta un grup fenoxi en C2.

Taula 1.4.5: Compostos 7-oxopirido[2,3-d]pirimidínic 2-fenilamino i 2-benzilamino substituïts

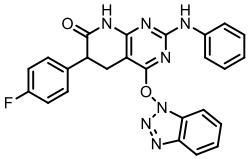
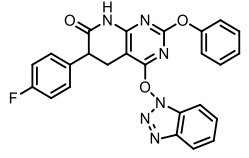
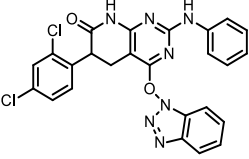
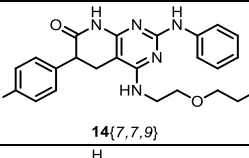
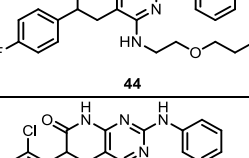
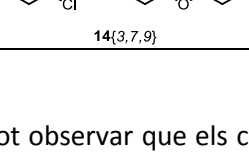
Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 7{3,8}	3,98	28,50
 7{7,8}	INSOLUBLE	
 7{7,10}	INSOLUBLE	

Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 53 {7,5}	>23,7	>23,7
 7 {7,9}	INSOLUBLE	
 7 {7,12}	INSOLUBLE	
 7 {7,11}	INSOLUBLE	
 7 {7,13}	>93,07	93,1
 7 {9,9}	75,6	79,4
 60	>47,49	47,49
 61	10,32	83,07

A la taula 1.4.5 s'observa que el compost 2-(benzilamino)-6-(2,6-diclorofenil)pirido[2,3-*d*]pirimidínic (**7**{3,8}) és el que presenta millor valor d'EC₅₀, corresponent a 3,98 µg/ml i una CC₅₀ de 28,50 µg/ml. També s'han de destacar els valors d'EC₅₀ (10,32 µg/ml) i de CC₅₀ (83,07 µg/ml) del compost **61**. Malauradament, no s'ha pogut avaluar l'activitat d'alguns dels sistemes presents a la taula degut a problemes de solubilitat en la preparació de mostra, fet que dificulta la possibilitat d'extreure més conclusions.

En darrer lloc, es vol estudiar l'efecte de la disubstitució simultània en les posicions C2 i C4 en compostos 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics.

Taula 1.4.6: Compostos 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics derivatitzats en C2 i C4

Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 <p>18{7,9}</p>	0,60	5,68
 <p>57</p>	8,72	29,38
 <p>18{9,9}</p>	0,70	2,83
 <p>14{7,7,9}</p>	>0,91	0,91
 <p>44</p>	56,91	64,64
 <p>14{3,7,9}</p>	6,01	24,55

A la taula 1.4.6 es pot observar que els compostos que presenten el grup benzotriazolil en C4 presenten valors d'EC₅₀ sorprenentment baixos i, per tant, presenten elevada activitat antiviral. Més concretament, els compostos **18{7,9}** i **18{9,9}** els quals presenten el grup fenilamino en C2, són més actius que el que presenta el fenoxi en C2. Per altra banda, quan es comparen els 3 compostos que presenten un grup 2-propoxietilamino en C4, s'observa que el compost 6-(2,6-diclorofenil)-2-(fenilamino)-4-((2-propoxietil)amino)pirido[2,3-*d*]pirimidínic (**14{3,7,9}**) és el que té un valor definit d'EC₅₀ inferior.

Dins aquesta primera família de compostos pirido[2,3-*d*]pirimidínics s'observa que els valors d'EC₅₀ varien des de 0,60 fins a valors superiors a 125 µg/ml i els valors de CC₅₀ varien des de 0,91 fins a valors superiors a 125 µg/ml. En ambdós casos l'interval de valors és molt ampli i no permet arribar a una conclusió clara, però s'observa que els compostos que presenten millors valors d'activitat són aquells que es troben derivatitzats simultàniament en les posicions C2, C4 i C6 del sistema, més en concret quan en C6 hi ha un residu arílic, en C2 un grup fenilamino i, en C4 un grup benzotriazolil o bé un carbonil en dita posició.

Tot seguit, es procedirà a avaluar tots aquells sistemes pirido[2,3-*d*]pirimidínics que presenten una insaturació entre les posicions C5 i C6 de l'anell piridònic (Figura 1.4.6).

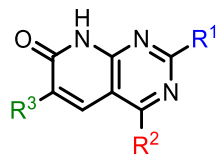
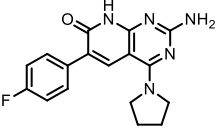
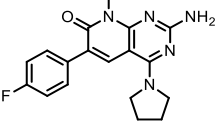
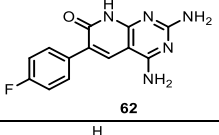
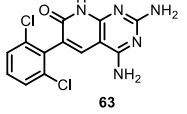
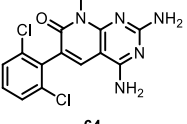


Figura 1.4.6: Estructura general pels sistemes 7-oxopiridopirimidínics amb una insaturació entre C5 i C6

A la següent taula es mostren els valors d'activitat dels compostos 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics 4-aminosubstituïts.

Taula 1.4.7: Compostos 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics 4-aminosubstituïts amb insaturació entre C5 i C6

Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 16{7,6}	38,56	46,18
 49{7,6,1}	7,44	28,37
 16{3,6}	1,24	4,32
 16{7,7}	0,74	46,44
 49{7,7,1}	1,75	20,16
 16{3,7}	>23,84	23,84
 16{4,6}	9,81	25,78

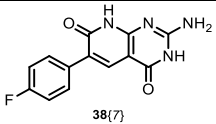
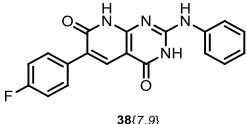
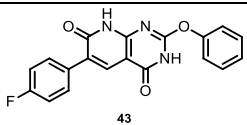
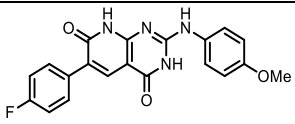
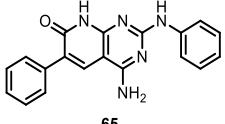
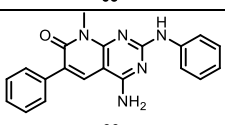
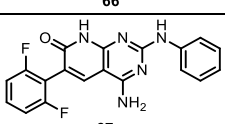
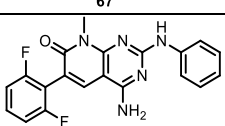
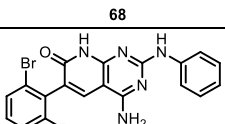
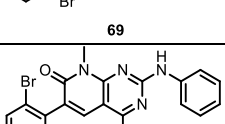
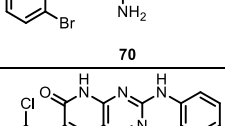
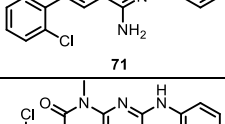
Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 16{7,5}	15,52	69,57
 49{7,5,1}	3,57	37,81
 62	>53,1	53,1
 63	>8,37	8,37
 64	5,6	40,04

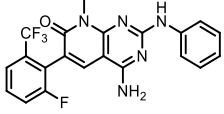
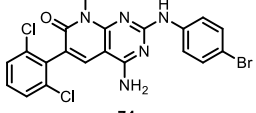
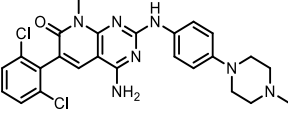
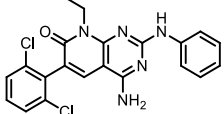
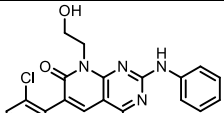
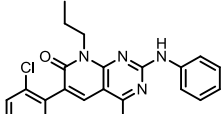
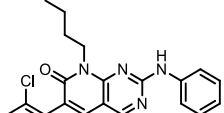
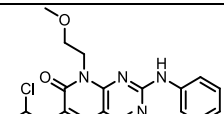
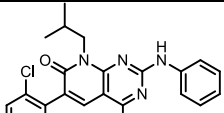
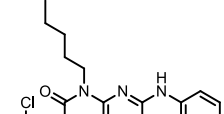
A la taula 1.4.7 es pot observar que el compost més actiu és el **16{7,7}** ($EC_{50} = 0,74 \mu\text{g/ml}$), corresponent a la 2-amino-6-(4-fluorofenil)-4-((2-propoxietil)amino)pirido[2,3-*d*]pirimidina, seguit dels compostos **16{3,6}** ($EC_{50} = 1,24 \mu\text{g/ml}$) i **49{7,7,1}** ($EC_{50} = 1,75 \mu\text{g/ml}$). Si es comparen els valors d' EC_{50} dels compostos **16{7,7}** i **49{7,7,1}**, es pot observar que en aquest cas el fet de metilar el nitrogen lactàmic no millora l'activitat de la molècula (contràriament al que s'havia observat a la taula 1.4.2 quan es tractava de compostos sense insaturació entre C5 i C6) i, a la vegada disminueix el valor de CC_{50} .

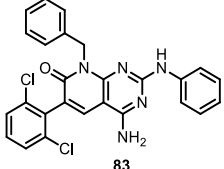
En general es pot observar que si comparem l'activitat dels compostos sense insaturació entre C5-C6 amb l'activitat dels corresponents que presenten insaturació en dita posició s'observa clarament que els que tenen una insaturació en l'anell de piridona presenten valors d' EC_{50} inferiors i, per tant, són més actius.

A continuació, a la taula 1.4.8 es mostren els valors d'activitat dels compostos 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínic 2-amino o 2-amilamino substituïts amb una insaturació entre C5 i C6.

Taula 1.4.8: Compostos 7-oxopirido[2,3-d]pirimidínic 2-amino o 2-aramino substituïts amb una insaturació entre C5 i C6

Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 38(7)	>125	>125
 38(7,9)	0,012	4,71
 43	>23,74	23,74
 38(7,11)	3,55	17,24
 65	0,16	4,54
 66	0,3	8,07
 67	6,39	0,89
 68	0,06	3,94
 69	3,77	81,02
 70	0,15	0,42
 71	47,6	>125
 72	0,10	0,22

Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 <p>73</p>	1,2	2,7
 <p>74</p>	0,11	1,58
 <p>75</p>	0,46	1,32
 <p>76</p>	2,7	>125
 <p>77</p>	1,0	13,0
 <p>78</p>	0,6	79,8
 <p>79</p>	5,4	>125
 <p>80</p>	0,5	109,9
 <p>81</p>	0,10	84,0
 <p>82</p>	16,5	103,0

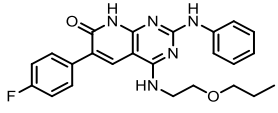
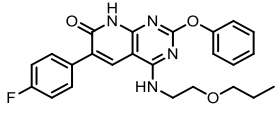
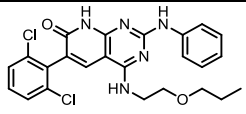
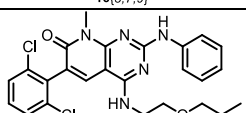
Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 83	>125	>125

Dels primers quatre compostos mostrats a la taula anterior s'observa que un d'ells és molt actiu amb un valor d'EC₅₀ = 0,012 µg/ml, concretament es tracta de la 6-(4-fluorofenil)-2-(fenilamino)pirido[2,3-*d*]pirimidin-4,7(3*H*,8*H*)-diona (**38**{7,9}). Si s'avalua el seu anàleg, en el qual s'ha substituït el grup fenilamino per fenoxi (**43**), s'observa que l'activitat disminueix dràsticament (EC₅₀ > 23,74 µg/ml). Per altra banda, si se substitueix el grup fenilamino per un grup amino no substituït en C2 es pot observar que el compost **38**{7} no presenta activitat. Finalment, l'efecte d'incorporar un substituent metoxi en *para* de l'anell fenilamino (compost **38**{7,11}) no millora el valor d'activitat de la molècula (**38**{7,9}) respecte aquella que no presenta substituents en l'anell fenilic en posició C2.

Pel que fa, als compostos 4-aminopiridopiridimidínics continguts en la taula 1.4.8 s'observa que la gran majoria presenten valors d'EC₅₀ baixos i per tant, són compostos que presenten bons valors d'activitat, però en general presenten valors de CC₅₀ baixos, fet que fa que molts d'aquests compostos siguin citotòxics. Si es comparen els compostos **67-68**, **69-70** i **73-74** (cada parella està formada per un compost amb un grup 2-fenilamino i un sistema aril en C6 i seu anàleg corresponent metilat en N8) s'observa que la molècula que té la posició lactàmica metilada presenta millors valors d'activitat a excepció de la parella de compostos **71-72**, en la que aquest fet no s'observa. A continuació, es procedeix a analitzar com afecta la naturalesa del substituent present en el nitrogen lactàmic a l'activitat biològica (EC₅₀). S'observa que el compost **81**, el qual presenta un grup isobutil en la posició lactàmica, és el que té un millor valor d'activitat dins la família dels compostos 4-amino substituïts (EC₅₀ = 0,10 µg/ml), seguit del compost **80** amb una EC₅₀ = 0,50 µg/ml i del compost **78** presentant una EC₅₀ = 0,60 µg/ml. Aquests tres compostos difereixen en la longitud i/o ramificació del substituent en N8 (alguns substituents inclouen àtoms d'oxigen a la cadena), observant-se que en cap del casos es millora el valor d'activitat respecte els casos en què el substituent en N8 és un grup metil.

A la taula 1.4.9 es mostren els valors d'activitat dels compostos 7-oxopirido[2,3-*d*]pirimidínics disubstituïts en C2 i C4 i al mateix temps amb una insaturació en l'enllaç C5-C6. Aquest grup de productes ens permet estudiar l'efecte de la presència simultània dels dos millors substituents en C2 i C4 en un esquelet pirdopirimidínic. Aquests substituents són el grup 2-propoxietilamino en C4 i el grup fenilamino en C2.

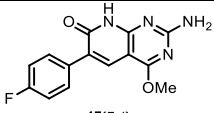
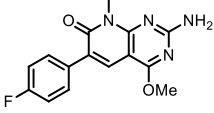
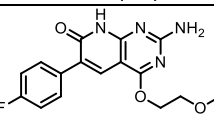
Taula 1.4.9: Compostos 7-oxopirido[2,3-d]pirimidínics derivatitzats en C2 i C4 i amb una insaturació en C5-C6

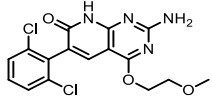
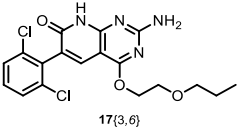
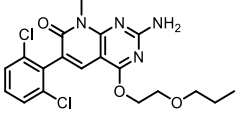
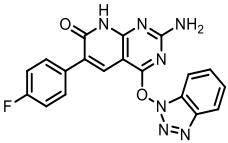
Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 <p>16{7,7,9}</p>	>8,25	8,25
 <p>58</p>	1,43	34,68
 <p>16{3,7,9}</p>	>4,68	4,68
 <p>84</p>	2,54	42,22

En primer lloc, el compost disubstituint **16{7,7,9}** presenta un valor d'EC₅₀ > 8,25 µg/ml, superior a l'esperat ja que el compost **16{7,7}**, el qual presenta els mateixos residus en C4 i C6 presenta una EC₅₀ = 0,74 µg/ml i, el compost **38{7,9}**, el qual presenta els mateixos residus en C2 i C6 presenta una EC₅₀ = 0,012 µg/ml. Per tant, en aquest cas es pot afirmar que la disubstitució en C2 i C4 no incrementa l'activitat antiviral de la molècula.

En darrer lloc, a la taula 1.4.10 s'observen els valors d'activitat dels compostos 7-oxopirido[2,3-d]pirimidínics amb una insaturació entre les posicions C5 i C6 i, derivatitzats en C4 presentant un grup alcoxi o OBt.

Taula 1.4.10: Compostos 7-oxopirido[2,3-d]pirimidínics derivatitzats en C4 presentant un grup alcoxi o OBt

Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 <p>17{7,1}</p>	>125	>125
 <p>50{7,1,1}</p>	20,80	>125
 <p>17{7,4}</p>	>125	>125

Compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 17{3,4}	24,29	57,40
 17{3,6}	53,67	>125
 50{3,6,1}	4,39	21,16
 85	>9,12	9,12

Dels valors presentats a la taula 1.4.10 es pot observar que el millor valor d'activitat el presenta el compost **50**{3,6,1}, 2-amino-6-(2,6-clorofenil)-8-metil-4-(2-propoxietoxi)pirido[2,3-*d*]pirimidina, observant-se que el seu anàleg **17**{3,6} sense el metil en N8 no presenta activitat. Aquesta observació és contrària a l'observat en casos precedents.

Per tant, dins de la família de compostos pirido[2,3-*d*]pirimidínics que presenten una insaturació entre les posicions C5 i C6 s'observa que els valors d'EC₅₀ varien des de 0,012 fins a valors superiors a 125 µg/ml i els valors de CC₅₀ varien des de 0,22 fins a valors superiors a 125 µg/ml. Val a dir que en general els valors d'activitat d'aquesta família de compostos es troben a la banda baixa de les EC₅₀ i, per tant, són molècules que presenten interessants valors d'activitat, els quals es comentaran més detalladament en el següent apartat.

És molt difícil extreure conclusions després de l'anàlisi exhaustiu de la relació estructura-activitat dels compostos pirido[2,3-*d*]pirimidínics desenvolupats en el grup, ja que hi ha gran variabilitat de substituents en les diferents posicions de l'estructura piridopirimidinica que no segueixen un patró clar a l'hora d'analitzar la relació l'estructura-activitat.

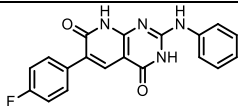
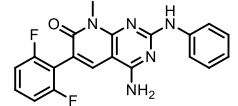
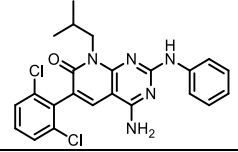
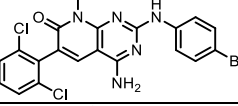
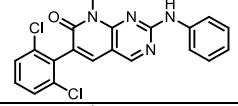
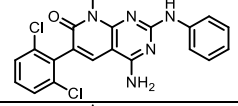
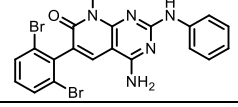
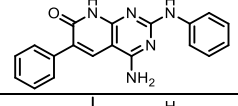
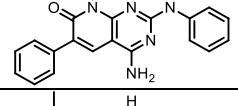
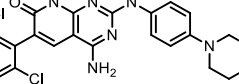
1.4.1. Relació dels compostos 7-oxopirido[2,3-d]pirimidínics amb millors activitats antivirals front el virus VHC assajats en el present treball

Una vegada ja s'han analitzat tots els valors d'activitat dels 121 compostos assajats en el present treball, s'observa que 36 d'ells presenten bons valors d'activitat front del virus de l'Hepatitis C.

A la següent taula es mostren els compostos classificats en tres subdivisions:

- En verd, els compostos que presenten una $EC_{50} < 1 \mu M$
- En groc, els compostos que presenten una $1 < EC_{50} < 5 \mu M$
- En vermell, els compostos que presenten una $5 < EC_{50} \leq 22 \mu M$

Taula 1.4.11: Resum dels compostos pirido[2,3-d]pirimidínics actius front al VHC

Compost	Estructura	EC_{50} ($\mu g/ml$)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	CC_{50} ($\mu g/ml$)
1		0,012	0,034	13,5	4,71
2		0,06	0,16	10,4	3,94
3		0,10	0,22	184,9	84
4		0,11	0,22	3,2	1,58
5		0,09	0,23	0,9	0,34
6		0,10	0,24	0,5	0,22
7		0,15	0,30	0,8	0,42
8		0,16	0,49	13,8	4,54
9		0,30	0,90	23,5	8,07
10		0,46	0,90	2,6	1,32

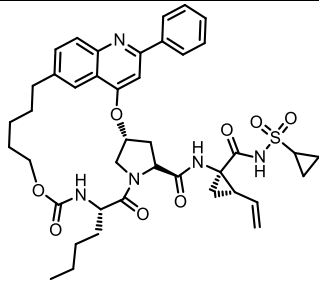
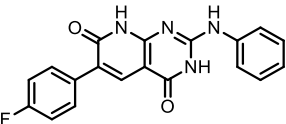
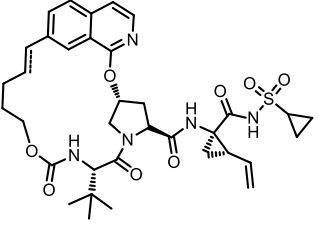
Compost	Estructura	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µg/ml)
11		0,50	0,99	240,9	109,9
12		0,60	1,3	12,2	5,68
13		0,70	1,4	5,5	2,83
14		0,62	1,4	181,1	79,8
15		0,74	2,1	129,9	46,44
16		1,00	2,3	29,3	13
17		1,22	2,8	6,3	2,7
18		1,24	3,2	11,0	4,32
19		1,43	3,3	79,8	24,3
20		1,75	4,7	54,3	20,16
21		2,54	5,1	84,7	42,22
22		2,70	6,3		>125
23		3,77	7,7	166	81,02

Compost	Estructura	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µg/ml)
24		3,55	9,4	46	17,24
25		3,98	9,6	69	28,5
26		4,39	10,4	50,1	21,16
27		3,57	10,5	111,4	37,81
28		3,38	11,2	38,3	11,54
29		5,41	11,9	-	>125
30		6,01	12,4	50,5	24,55
31		5,6	16,7	120,2	40,4
32		5,57	15,8	87,5	30,90
33		6,39	17,5	2,4	0,89
34		8,72	18,6	62,7	3,40
35		7,44	20,9	79,8	28,37
36		8,45	22,0	65,0	24,91

De la taula resum anterior s'observa que hi ha 11 compostos que presenten una EC₅₀ < 1 µM, 9 compostos que presenten 1 < EC₅₀ < 5 µM i 15 compostos amb 5 < EC₅₀ < 22 µM.

Si ens centrem en el primer grup de compostos, s'observa clarament que la molècula 1 presenta una $EC_{50} = 0,034 \mu\text{M}$ i $CC_{50} = 13,5 \mu\text{M}$, es tracta doncs d'un compost pirido[2,3-*d*]pirimidínic amb una molt bona activitat antiviral front del VHC. Per altra banda, és interessant tenir present quin és el seu índex de selectivitat o l'índex terapèutic, que és el quocient entre CC_{50}/EC_{50} i ens dóna una idea de la mesura de seguretat d'aquest possible fàrmac, resultant ser 393.

A la següent taula es mostren els valors d'activitat dels compostos que s'han utilitzat com a patrons de referència i, el compost més actiu desenvolupat al llarg d'aquesta Tesi Doctoral.

Inh I	Compost 1	Inh II
		
$EC_{50} = 0,0608 \mu\text{M}$ $CC_{50} > 2,0 \mu\text{M}$ PM = 771,92	$EC_{50} = 0,034 \mu\text{M}$ $CC_{50} = 13,5 \mu\text{M}$ PM = 348,33	$EC_{50} = 0,0032 \mu\text{M}$ $CC_{50} > 2,0 \mu\text{M}$ PM = 693,81

Els valors d'activitat del **compost I** estan compressos entre els valors d'activitat dels compostos utilitzats com a control positiu en l'assaig d'avaluació biològica. Cal destacar la importància d'aquests resultats ja que a l'inici d'aquesta Tesi Doctoral es partia de compostos amb activitat antiviral pràcticament nul·la i finalment s'ha desenvolupat una família de compostos potencialment actius, assolint així un dels objectius marcats.

Per altra banda, les dades aportades en la present Tesi Doctoral han servit al Laboratori de Disseny Molecular del GEM per desenvolupar dos models de selecció de quimiotèques virtuals per a la polimerasa NS5B del VHC. Aquest dos models treballen de forma conjunta i consecutiva:

- el primer consisteix en un model QSAR (*Quantitative structure-activity relationship*) desenvolupat amb el programari ArIS (*Artificial Intelligence suite*) que utilitza el mètode no lineal de les xarxes neuronals (*Artificial neural network*) per realitzar les prediccions^[25].
- el segon és un model de docking realitzat amb el programari MOE (Molecular Operating Environment)^[26].

A continuació es procedeix a explicar breument en que consisteix cada model:

- Model QSAR:

Consisteix en un model de resposta binària, que classifica les molècules en actives i no actives, donant un valor d'1 a les primeres i un valor de 0 a les segones. El model ha estat construït entrenant un conjunt de molècules contingudes en les patents WO2008077651A1 i WO2010002998A1. Es consideren actives aquelles molècules amb un valor d' $EC_{50} < 0,1 \mu M$. La validació externa utilitzant les molècules sintetitzades en la present Tesi Doctoral proporciona un nivell de predicció del 91%, el 9% restant està format bàsicament per falsos positius mentre que els falsos negatius són pràcticament nuls.

- Model de Docking:

Les molècules classificades com a actives en el model anterior, s'utilitzen per alimentar el model de docking. Aquest model està estructurat en tres parts diferents, cada part està dissenyada per tractar un centre al·lostèric diferent de la polimerasa NS5B (Figura 1.4.7); que són el *site I*, el *site II* i el *site III*. En els *site I* i *II* ha estat necessari adjuntar un farmacòfor degut a la superficialitat dels centres al·lostèrics. D'altra banda, en el *site III* també s'ha dissenyat un farmacòfor però molt més simple que els altres dos, amb l'únic objectiu de millorar el posicionament final del lligand.

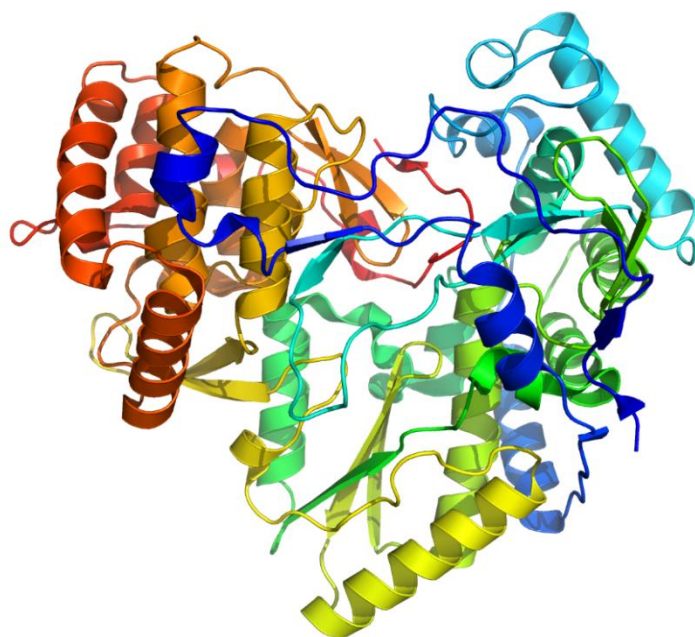


Figura 1.4.7: Estructura de la NS5B del VHC

S'ha dividit el model en tres parts ja que els canvis conformationals que implica la presència d'un lligand en cada un dels centres actius són molt diferents. Conseqüentment, s'han agafat diverses estructures cristal·litzades presents en el PDB per cada centre i s'han alineat agafant com a referència en el cas del *site I* la proteïna amb codi PDB 2DXS, en el *site II* la proteïna amb el codi PDB 3UDL i finalment en el *site III* la proteïna amb el codi PDB 3D28. Previ a l'alineament s'ha eliminat el solvent, es considera la proteïna monomèrica, es protona i es minimitza utilitzant el *forcefield* AMBER12EHT. En la preparació del model, les simulacions han permès deduir que

les molècules del tipus pirido[2,3-*d*]pirimidíniques actuen sobre el *site III* i per tant no s'entrarà a detallar els farmacòfors utilitzats en els altres dos centres.

En referència al farmacòfor utilitzat en el *site III* (Figura 1.4.8) s'han utilitzat com a elements descriptius dos acceptors de pont d'hidrogen o zones hidrofòbiques situades a una distància adequada per interaccionar amb dos aminoàcids essencials (Tyr448 i Ser556)^[27], amb la condició que compleixi un dels dos requisits, també s'ha delimitat un volum d'exclusió al voltant del *pocket* i un volum d'inclusió en el seu interior.

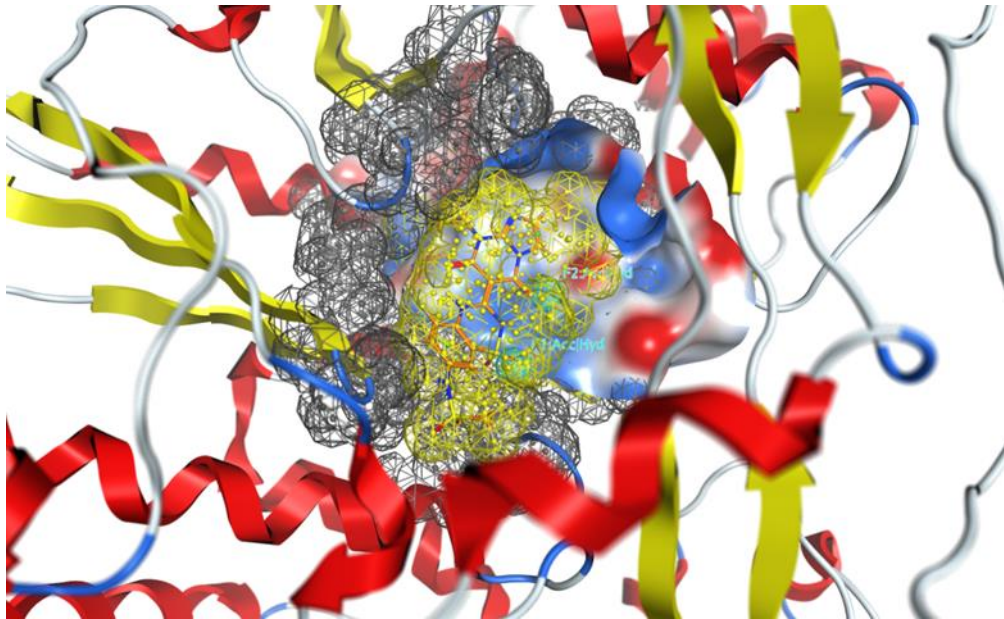


Figura 1.4.8: Farmacòfor utilitzat en el *site III* de la polimerasa NS5B complexada amb el lligand amb que es troba cocrystal·litzada (PDB: 3D28) (zones hidrofòbiques/acceptors representats en blau cel, volum d'inclusió representat en groc i volum d'exclusió representat en gris)

Una vegada preparada la proteïna i el farmacòfor s'inicia un docking amb un protocol d'encaix induït, on tant els lligands com la proteïna es tracten com a flexibles. El docking se centra sobre els àtoms del receptor, utilitzant la metodologia “*triangle matcher*” per a la col·locació del lligand i la funció de *scoring* “*London dG*” utilitzant 100 conformacions per a cada lligand. En la figura 1.4.9 es mostra el panell de control dels paràmetres de docking del programari MOE.

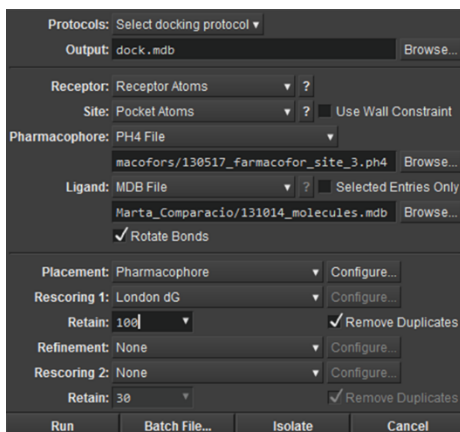


Figura 1.4.9: Panell de control del protocol de Docking en el programari MOE amb els paràmetres utilitzats per a la seva execució.

Per validar el model de docking es comprova que els propis lligands del PDB utilitzats interaccionen del mateix mode en que ho fan en l'estructura cristal·litzada. El resultat obtingut per al lligand inclòs en el PDB ID 3H98 es mostra en la següent figura.

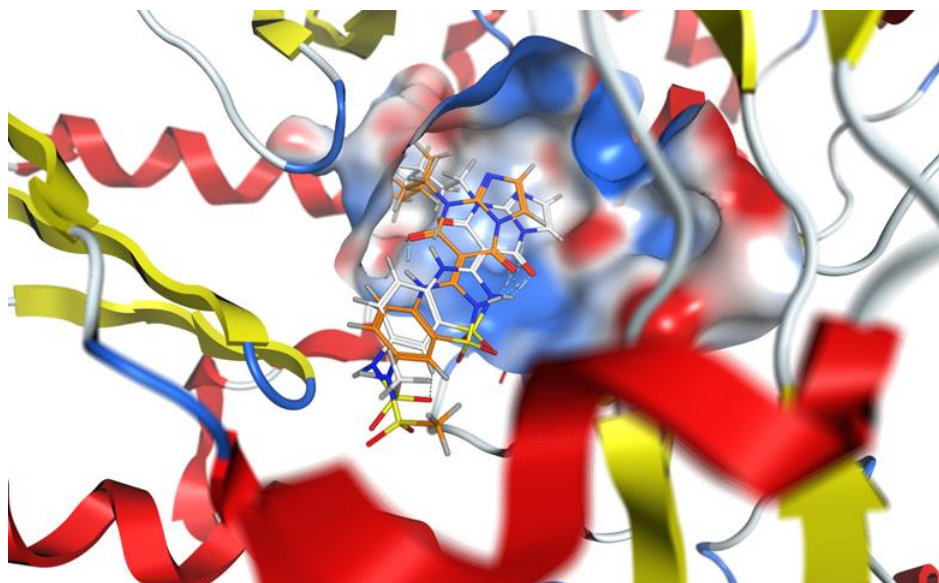
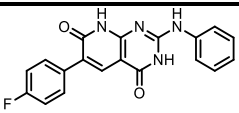
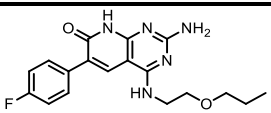
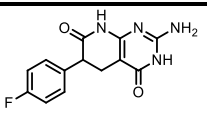


Figura 1.4.10: Comparació entre el lligand extret del PDB, ID: 3H98 (en taronja) i el mateix lligand després de fer el docking (en blanc)

Per tal de veure la validesa del model es va proposar que l'apliquessin a 3 molècules amb valors d'activitat molt diferents (sense tenir coneixement del valor d'activitat antiviral) a fi de veure si les classificava com actives o no actives.

Les molècules escollides es poden observar a la següent taula.

Taula 1.4.12: Compostos amb categories diferents de valors d'activitat

A	B	C
		
$EC_{50} = 0,034 \mu M$ $CC_{50} = 13,5 \mu M$	$EC_{50} = 2,1 \mu M$ $CC_{50} = 129,9 \mu M$	$EC_{50} = 155,1 \mu M$ $CC_{50} > 455,8 \mu M$

Es van analitzar les molècules utilitzant el mètode de QSAR i es va observar que dues d'elles les classifica com actives (A i B) i C la classifica com a inactiva. Les energies d'A i B calculades segons el mètode QSAR indiquen que l'A és significativament millor que la B, la qual cosa coincideix amb el resultat experimental.

D'altra banda, el docking permet apreciar les interaccions proteïna-ligand. En el cas de la molècula A s'observa com es forma 1 pont d'hidrogen entre el carbonil de la piridopirimidina i la Trh448 (Figura 1.4.11).

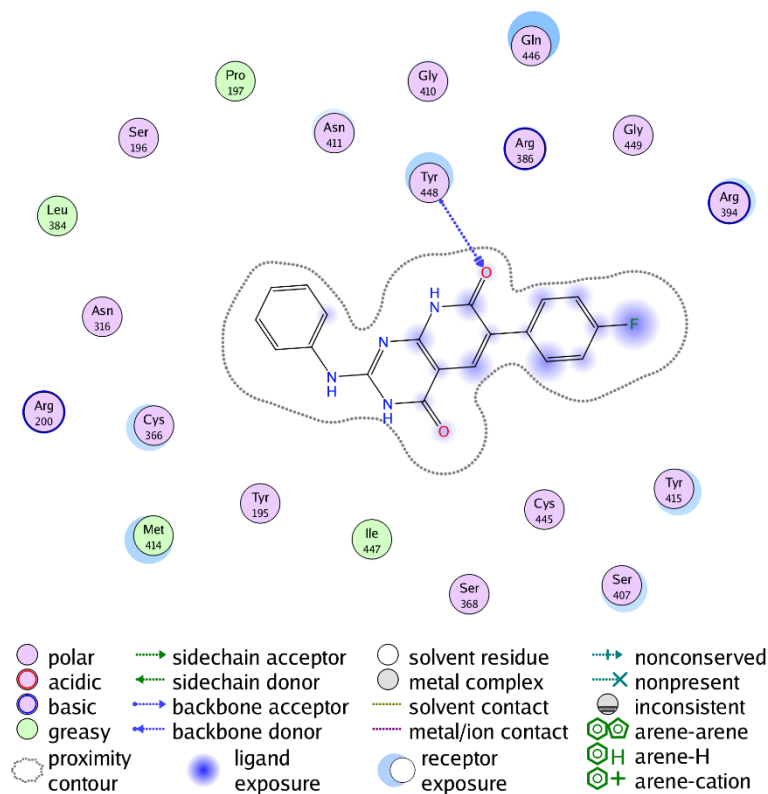


Figura 1.4.11: Interacció del compost A amb el site III de la polimerasa NS5B

En segon lloc, la molècula B mostra un mode d'interacció diferent probablement degut a la diferent distribució de càrrega entre les dos molècules (Figura 1.4.12).

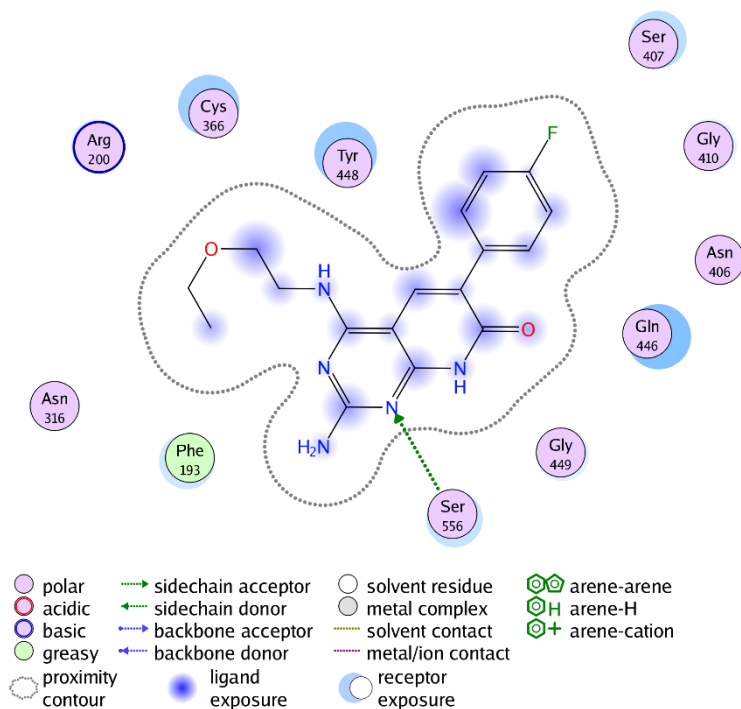


Figura 1.4.12: Interacció del compost B amb el site III de la polimerasa NS5B

A continuació es mostra una imatge, del compost A (2-(fenilamino)-6-(4-fluorofenil)pirido[2,3-*d*]pirimidin-4,7(3*H*,8*H*)-diona) en la qual es pot observar el posicionament del compost en el site III de la polimerasa NS5B.

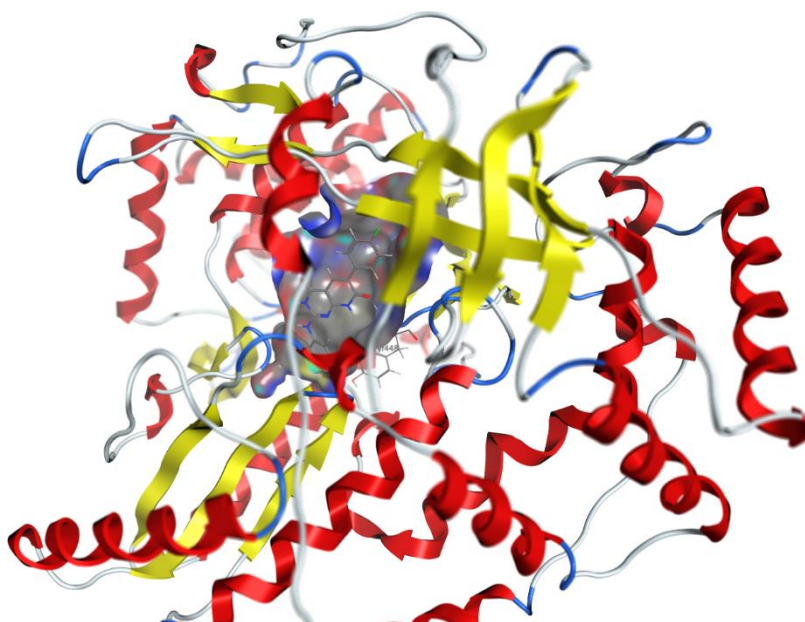


Figura 1.4.13: Posicionament del compost A dins la NS5B

En conseqüència, es disposa aparentment d'una metodologia computacional que hauria de permetre millorar, encara més, l'activitat biològica/selectivitat dels derivats pirido[2,3-*d*]pirimidínics dissenyats com a inhibidors del virus de l'Hepatitis C.

1.5. Bibliografia

- [1] N. Mont; J. Teixido; C. O. Kappe; J. I. Borrell. A one-pot microwave-assisted synthesis of pyrido[2,3-d]pyrimidines. *Mol. Diversity* **2003**, 7 (2-4), 153-159.
- [2] J. L. Falco; J. I. Borrell; J. Teixido. Solid-phase synthesis of 2-substituted 4-amino-7-oxo-5,6,7,8-tetrahydropyrido[2,3-d]pyrimidines. *Mol. Diversity* **2003**, 6 (2), 85-92.
- [3] J. I. Borrell; J. Teixido; J. L. Matallana; B. Martinez-Teipel; C. Colominas; M. Costa, et al. Synthesis and Biological Activity of 7-Oxo Substituted Analogues of 5-Deaza-5,6,7,8-tetrahydrofolic Acid (5-DATHF) and 5,10-Dideaza-5,6,7,8-tetrahydrofolic Acid (DDATHF). *J. Med. Chem.* **2001**, 44 (14), 2366-2369.
- [4] S. R. Klutchko; J. M. Hamby; D. H. Boschelli; Z. Wu; A. J. Kraker; A. M. Amar, et al. 2-Substituted Aminopyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones. Structure-Activity Relationships Against Selected Tyrosine Kinases and in Vitro and in Vivo Anticancer Activity. *J. Med. Chem.* **1998**, 41 (17), 3276-3292.
- [5] S. Tu; J. Zhang; X. Zhu; J. Xu; Y. Zhang; Q. Wang, et al. New potential inhibitors of cyclin-dependent kinase 4: Design and synthesis of pyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives under microwave irradiation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16 (13), 3578-3581.
- [6] D. Shi; J. Shi; S. Rong. An efficient and clean synthesis of pyrido[2,3-d]pyrimidine-4,7-dione derivatives in aqueous media. *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, 46 (6), 1331-1334.
- [7] C. Grosjean; K. Novakovic; S. K. Scott; A. Whiting; M. J. Willis; A. R. Wright. Product identification and distribution from the oscillatory versus non-oscillatory palladium(II) iodide-catalyzed oxidative carbonylation of phenylacetylene. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2008**, 284 (1-2), 33-39.
- [8] C. Peng; Y. Wang; J. Wang. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling of α -Diazocarbonyl Compounds with Arylboronic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (5), 1566-1567.
- [9] N. Mont; J. Teixido; J. I. Borrell. A diversity oriented, microwave assisted synthesis of N-substituted 2-hydro-4-amino-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones. *Mol. Diversity* **2009**, 13 (1), 39-45.
- [10] Z. Wan; S. Wacharasindhu; E. Binnun; T. Mansour. An efficient direct amination of cyclic amides and cyclic ureas. *Org. Lett.* **2006**, 8 (11), 2425-2428.
- [11] S. M. Devine ; P. J. Scammells. Synthesis and Utility of 2-Halo-O6-(benzotriazol-1-yl)-Functionalized Purine Nucleosides. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**(6), 1092-1098, S1092/1-S1092/21.
- [12] M. K. Lakshman ; J. Frank. A simple method for C-6 modification of guanine nucleosides. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7 (14), 2933-2940.
- [13] I. Perez-Pi; X. Berzosa; I. Galve; J. Teixido; J. I. Borrell. Dehydrogenation of 5,6-dihydropyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones: a convenient last step for a synthesis of pyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones. *Heterocycles* **2010**, 82 (1), 581-591.

- [14] G. Jin; C. C. N. Wu; D. A. Carson; H. B. Cottam. Guanosine analog in the pyrido[2,3-d]pyrimidine ring system as a potential toll-like receptor agonist. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2006**, 25 (12), 1391-1397.
- [15] P. Victory; A. Crespo; R. Nomen; J. I. Borrell. New synthesis of pyrido[2,3-d]pyrimidines. V. Dehydrogenation of dihydropyridonic acid ring in 5- or 6-alkyl-substituted systems. *Afinidad* **1989**, 46 (420), 107-113.
- [16] S. H. Hilal; S. W. Karickhoff; L. A. Carreira. *Quant. Struct. Act. Rel.*, 1995, 14, 348.
- [17] M. Kirihaara; A. Itou; T. Noguchi; J. Yamamoto. Tantalum Carbide or Niobium Carbide Catalyzed Oxidation of Sulfides with Hydrogen Peroxide: Highly Efficient and Chemoselective Syntheses of Sulfoxides and Sulfones. *Synlett*. **2010**, 10, 1557–1561.
- [18] Nirmal K. Jana and John G. Verkade. Phase-Vanishing Methodology for Efficient Bromination, Alkylation, Epoxidation, and Oxidation Reactions of Organic Substrates. *Org. Lett.* **2003**, 5 (21), 3787-3790.
- [19] A. Herrera; R. Martínez-Alvarez; P. Ramiro; D. Molero; J. Almy. New Easy Approach to the Synthesis of 2,5-Disubstituted and 2,4,5-Trisubstituted 1,3-Oxazoles. The Reaction of 1-(Methylthio)acetone with Nitriles. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 3026-3032.
- [20] N. Krieger; V. Lohmann; R. Bartenschlager. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J. Virol.* **2001**, 75 (10), 4614-4624.
- [21] M. Frese; K. Barth; A. Kaul; V. Lohmann; V. Schwarzle; R. Bartenschlager. Hepatitis C virus RNA replication is resistant to tumour necrosis factor- α . *J. Gen. Virol.* **2003**, 84 (5), 1253-1259.
- [22] P. Friebe ;J. Boudet; J. Simorre; R. Bartenschlager. Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J. Virol.* **2005**, 79 (1), 380-392.
- [23] C. Pannecouque; D. Daelemans; E. De Clercq. Tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of HIV replication inhibitors: revisited 20 years later. *Nat. Protoc.* **2008**, 3 (3), 427-434.
- [24] N. J. Liverton; M. K. Holloway; J. A. McCauley; M. T. Rudd; J. W. Butcher; S. S. Carroll, et al. Molecular Modeling Based Approach to Potent P2-P4 Macrocyclic Inhibitors of Hepatitis C NS3/4A Protease. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (14), 4607-4609.
- [25] R. Tejedor Estrada. Desenvolupament del programari ArIS (Artificial Intelligence Suite): Implementació d'eines de cribatge virtual per a la química mèdica. . Tesi doctoral. Universitat Ramon Llull, Institut Químic de Sàrria, **2011**.
- [26] *Molecular Operating Environment (MOE). Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910. Montreal, Canada: 2013.*
- [27] Seng-Lai, T. & Yupeng. Hepatitis C: Antiviral Drug Discovery and Development. (Caister Academic Press, 2011).

EXPERIMENTAL PART
