

## Síntesi total de productes marins amb l'estructura triptòfan-pirroloindole

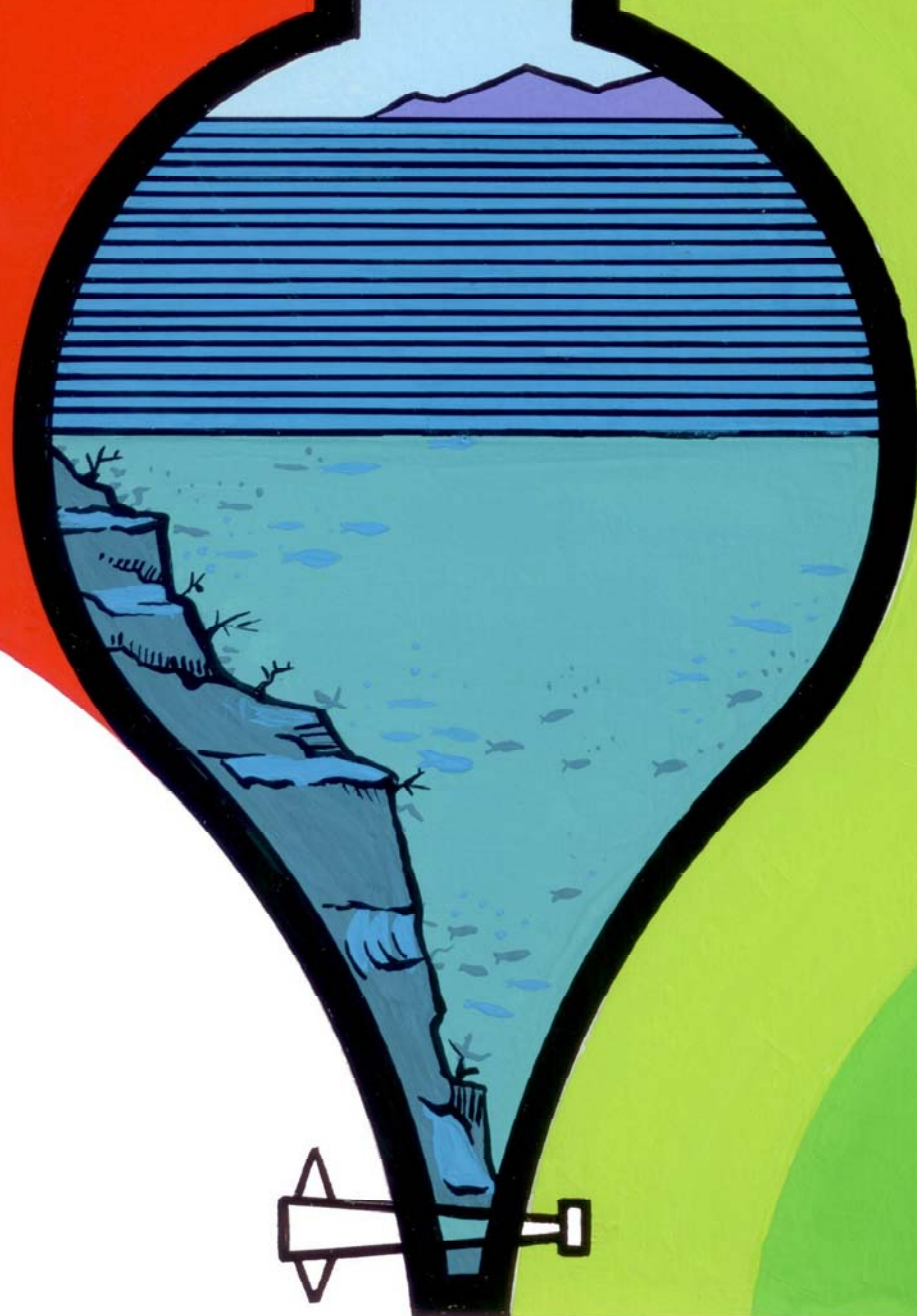
Pau Ruiz Sanchis

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

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

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

**PAU RUIZ SANCHIS**



**SÍNTESI TOTAL  
DE PRODUCTES MARINS  
AMB L'ESTRUCTURA  
TRIPTÒFAN-PIRROLOINDOLE**



**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**FACULTAT DE FARMÀCIA**

**DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA**

**SÍNTESI TOTAL DE PRODUCTES MARINS AMB  
L'ESTRUCTURA TRIPTÒFAN-PIRROLOINDOLE**

Pau Ruiz Sanchis

2011







**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**FACULTAT DE FARMÀCIA**

**DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA**

**SÍNTESI TOTAL DE PRODUCTES MARINS AMB L'ESTRUCTURA**

**TRIPTÒFAN-PIRROLOINDOLE**

Memòria presentada per:

**Pau Ruiz Sanchis**

per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona.

Programa de doctorat: QUÍMICA ORGÀNICA EN LA INDÚSTRIA QUÍMICO FARMACÈUTICA

Bienni 2006-2008

Dirigida per:

**Dra. Mercedes Álvarez Domingo**

**Dr. Fernando Albericio Palomera**

Barcelona, 2011



*Al meu abuelo,  
a mos pares, a Llam  
i a Lore.*





El treball descrit en aquesta memòria s'ha realitzat a l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRBB) ubicat al Parc Científic de Barcelona. Aquest treball ha gaudit dels següents ajuts:

Projecte "Combiestrategias para el Descubrimiento de Nuevos Fármacos Peptídicos y/o Heterocíclicos" finançat per la Comissió de Ciència i Tecnologia (CTQ2009-07758/BQU). Grup de recerca reconegut per la Generalitat de Catalunya, Química Combinatòria per al Desenvolupament de Nous Compostos (2009SGR 1024). Centro de Investigación Biomédica en Red, de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN 0074) finançat pel Ministerio de Sanidad y Consumo a través de l'Instituto de Salud Carlos III. Conveni PharmaMar S.A. – Parc Científic de Barcelona amb el projecte "Síntesis de Nuevos Agentes Terapéuticos".

P.R.S. ha rebut una beca predoctoral de l'IRBB (02/06-IRB).



# ÍNDEX GENERAL

ÍNDEX D'ABREVIATURES.....	v
ÍNDEX DE COMPOSTOS .....	vii
AMINOÀCIDS, AGENTS D'ACOBLEMENT I GRUPS PROTECTORS .....	xi

## INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

1	Introducció .....	3
1.1	Productes naturals d'origen marí.....	6
1.2	Estructures dels productes naturals amb l'hexahidropirrolo[2,3- <i>b</i> ]indole.....	9
1.3	Mayotlida .....	14
2	Objectius .....	17

## CAPÍTOL 1. Grups Protectors Ortogonals en la Síntesi del Triptòfan-Hexahidropirroloindole

1	Introducció .....	21
2	Síntesi del Br-HPI.....	21
2.1	Ruta A .....	24
2.2	Ruta B .....	26
2.3	Comparació de les rutes A i B.....	27
3	Sistema Trp-HPI.....	29

## CAPÍTOL 2. Síntesi Total de la Mayotlida

1	Introducció .....	37
2	Síntesi i estereoquímica de l'anell A .....	37
2.1	Ciclació per l'enllaç Trp-HPI.....	38
2.2	Ciclació per l'enllaç lle-HPI .....	41
2.3	Ciclació per l'enllaç Trp-lle .....	42

2.4	Estereoquímica de l'anell A.....	44
3	Síntesi de la cadena pentapeptídica .....	45
4	Ciclació de l'anell B i formació de la mayotlida.....	47
4.1	Aproximació sintètica a la mayotlida amb <b>26</b> . Desprotecció del Moc.....	48
4.2	Aproximació sintètica a la mayotlida amb <b>29</b> .....	49

### CAPÍTOL 3. Estudi de la Relació Estructura-Activitat de la Mayotlida

1	Introducció .....	55
2	Activitat de la mayotlida .....	56
2.1	Anell A .....	56
2.2	Anàlegs de la mayotlida .....	57

CONCLUSIONS .....	63
-------------------	----

### EXPERIMENTAL

1	Materials .....	67
1.1	Instruments .....	67
1.2	Dissolvents .....	68
1.3	Reactius .....	68
2	Mètodes .....	68
2.1	Cromatografia .....	68
2.2	Tests d'identificació en fase sòlida.....	69
2.3	Espectrometria de masses .....	70
2.4	Espectrometria d'RMN.....	71
2.5	Espectrometria d'infraroig .....	71
3	Capítol 1 . .....	71
3.1	Síntesi de <b>2</b> .....	71
3.2	Síntesi dels anàlegs $N^\alpha, N^i$ -protegit-Trp esters alquílics ( <b>3</b> ) .....	75
3.3	Síntesi d' 1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrolo[2,3- <i>b</i> ]indole .....	80
3.4	Síntesi de <b>6</b> .....	82

---

3.5	Síntesi dels anàlegs $N^{\beta}$ -protegits-HPI-2-carboxilat de metil ( <b>7</b> ) .....	82
3.6	Procediment general per a la síntesi de 3a-bromo-HPI-2-carboxilat d'alquil.....	84
3.7	Síntesi de <b>19</b> .....	92
3.8	Mètode general per a la síntesi de <b>20</b> .....	94
3.9	Síntesi de <b>21</b> .....	100
4	Capítol 2. ....	101
4.1	Síntesi de l'anell A .....	101
4.2	Síntesi del $N^{\alpha}$ -Boc-Val-Phe-Pro-Val-Ala-OAl·lil ( <b>33</b> ).....	109
4.3	Ciclació de l'anell B i formació de la mayotlida.....	111
5	Capítol 3. ....	114
5.1	Assaig de GI50 .....	114
5.2	Síntesi de <b>38</b> .....	115
5.3	Síntesi de Trp-Ile-Trp-Val-Phe-Pro-Val-Ala-OH ( <b>42</b> ) .....	116
5.4	Síntesi del cicle Trp-Ile-Trp-Val-Phe-Pro-Val-Ala ( <b>40</b> ).....	117
	ANNEX 1. Article publicat .....	119
	ANNEX 2. Article enviat per a publicar.....	143
	ANNEX 3. Espectres d'RMN.....	CD



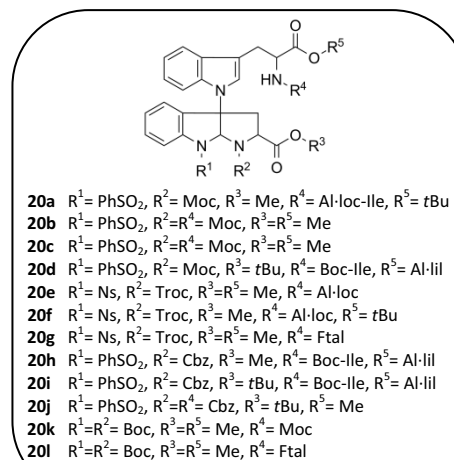
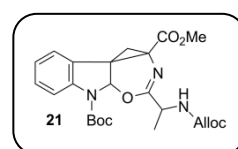
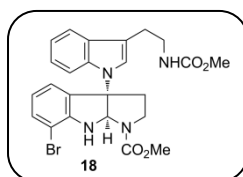
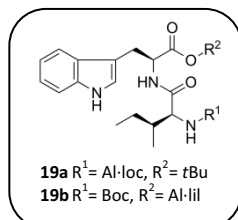
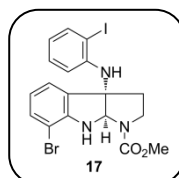
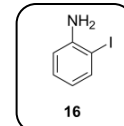
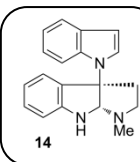
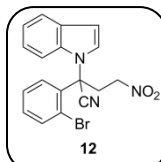
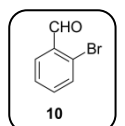
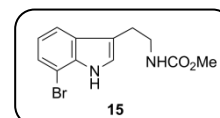
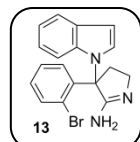
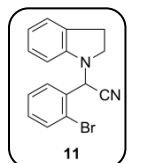
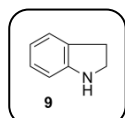
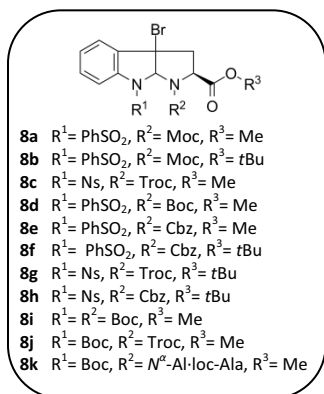
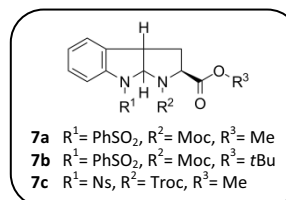
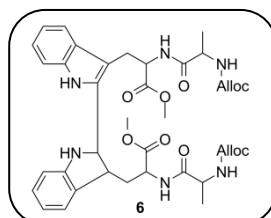
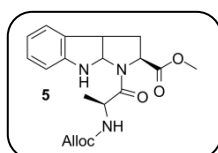
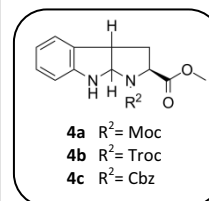
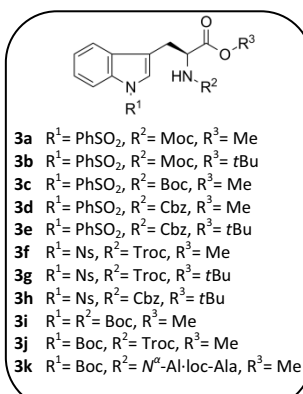
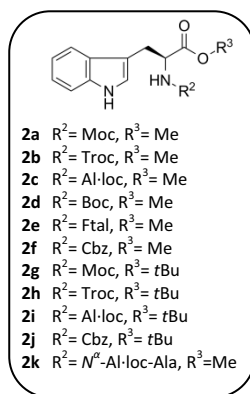
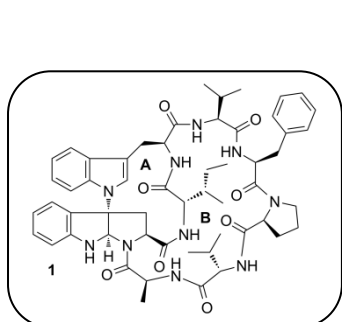
## ÍNDEX D'ABREVIATURES

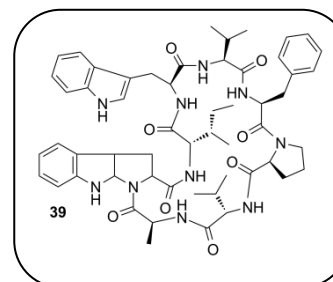
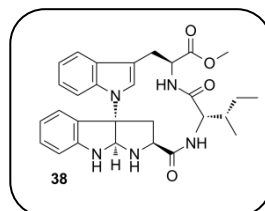
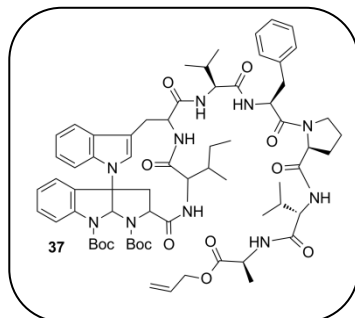
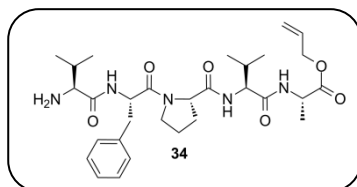
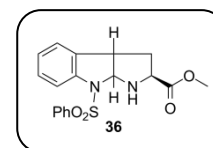
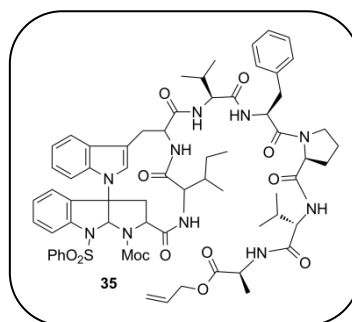
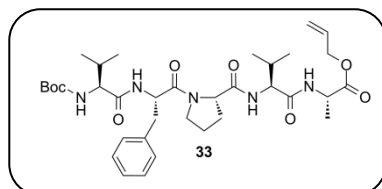
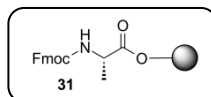
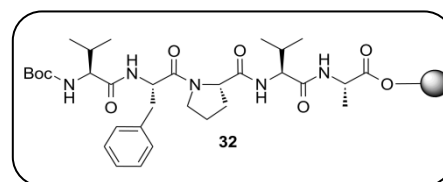
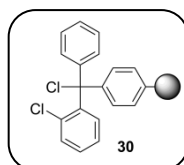
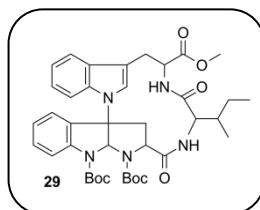
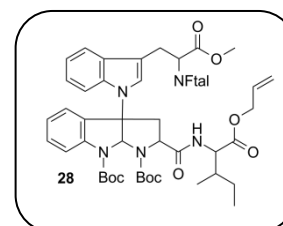
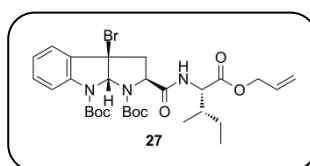
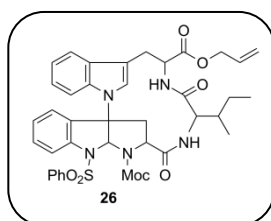
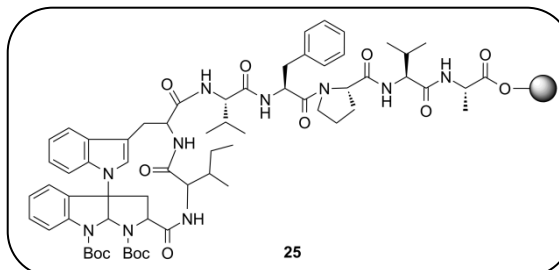
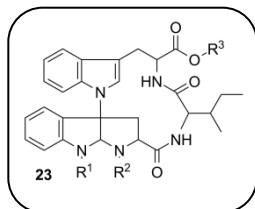
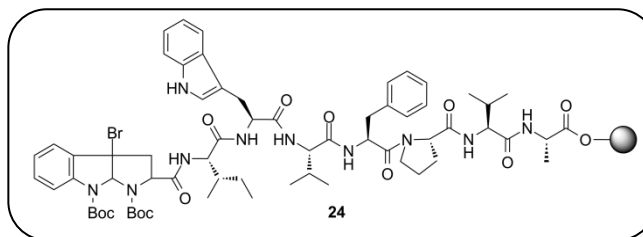
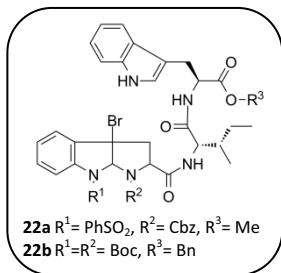
A-549	Línia cel·lular humana de càncer de pulmó	EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
aa	Aminoàcid	EMEA	European Medicines Agency
abs.	Absolut	ESI	Ionització amb electroesprai
AIBN	2,2'-Azobisisobutironitril	FDA	Food and Drug Administration
Ala	L-Alanina	Fmoc	Fluorenilmetiloxicarbonil
Al·loc	Al·liloxicarbonil	Ftal	Ftalimida
anh.	Anhidre	gHSQC	Heterocorrelació via detecció inversa
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonil	HATU	Hexafluorofosfat de 2-(1 <i>H</i> -7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni
Br-HPI	3a-Bromo-HPI	HBTU	Hexafluorofosfat de 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni
bs	Senyal ampla	HMPA	Hexametilfosforamida
Cbz	Benziloxicarbonil	HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
CCF	Cromatografia de capa fina	HOBt	Hidroxibenzotriazol
d	Doblet	HPI	1,2,3,3a,8,8a-Hexahidropirrol[2,3- <i>b</i> ]indole
DCM	Diclorometà	HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
DCP	Dicetopiperazina	HRMS	Espectroscòpia de masses d'alta resolució
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-dicianobenzoquinona		
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina		
DIPC	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida		
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida		
DMSO	Dimetilsulfòxid		

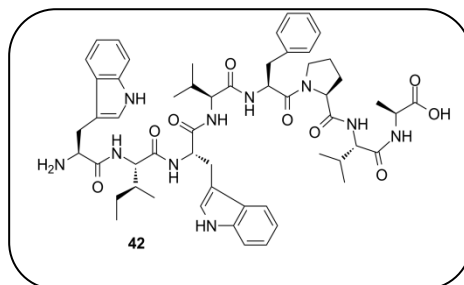
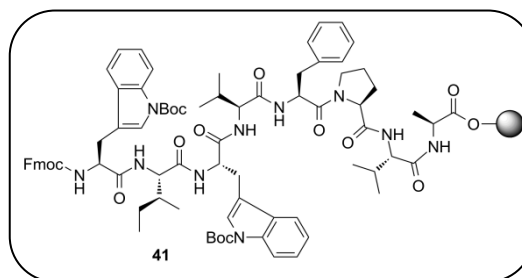
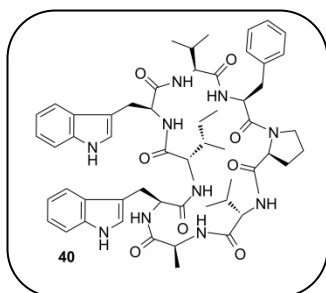


HT-29	Línia cel·lular humana de càncer de colon	PyAOP	Hexafluorofosfat de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)-trispírrolidinofosfoni
HTS	Bioanàlisi d'alt rendiment		
Ile	L-Isoleucina	PyOxP	Hexafluorofosfat de O-[(ciano-(etoxicarbonil)metiliden)-amino]-iloxitripírrolidinofosfoni
IR	Infraroig		
LIMS	Sistema de gestió d'informació del laboratori	Red-Al	Bis(2-metoxietoxi)aluminhidrur de sodi
m	Multiplet	RMN	Ressonància magnètica nuclear
MDA-MB-231	Línia cel·lular humana de càncer de mama	RPMI	Medi Roswell Park Memorial Institute
Moc	Metoxicarbonil	s	Singlet
MTBE	Metil <i>terc</i> -butil èter	sat.	Saturat
MW	Microones	SRB	Sulfurodamina B
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida	t	Triplet
NHMDS	Bis(trimetilsilil)amidur de sodi	t.a.	Temperatura ambient
NIS	<i>N</i> -Iodosuccinimida	TEA	Trietilamina
NOE	Efecte nuclear Overhauser	TFA	Àcid trifluoroacètic
Ns	2-Nitrofenilsulfonil	THF	Tetrahidrofurà
PDA	Photodiode array	TMSI	Iodur de trimetilsilil
Phe	L-Fenilalanina	Tr	Trifenilmetil (tritol)
Pip	Piperidina	Troc	2,2,2-Tricloroetoxicarbonil
PNZ	<i>p</i> -Nitrobenziloxicarbonil	Trp	L-Triptòfan
PPTS	<i>p</i> -Toluensulfonat de piridini	UV	Ultraviolat
Pro	L-Prolina	Val	L-Valina
py	Piridina	VLC	Cromatografia líquida amb buit

# ÍNDICE DE COMPOSTOS



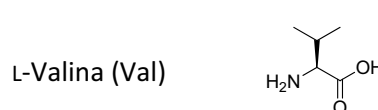
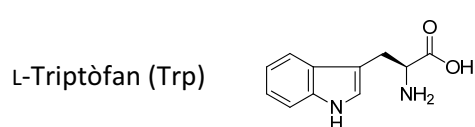
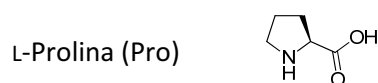
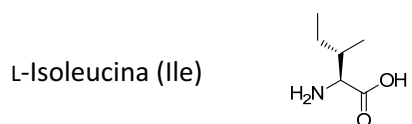
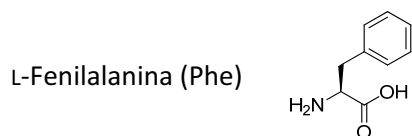
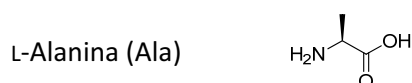






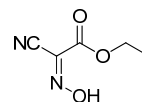
# AMINOÀCIDS, AGENTS D'ACOBLEMENT I GRUPS PROTECTORS

## 1.1 Aminoàcids



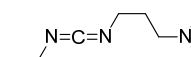
## 1.2 Agents d'acoblament

**2-Ciano-2-hidroximinoacetat d'etil**



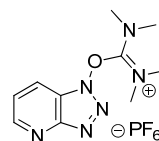
**EDC**

1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida



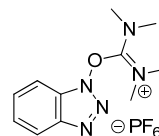
**HATU**

Hexafluorofosfat de 2-(1*H*-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni



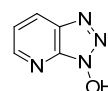
**HBTU**

Hexafluorofosfat de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni

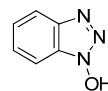


**HOAt**

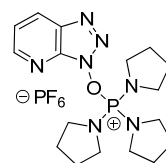
1-Hidroxí-7-azabenzotriazol



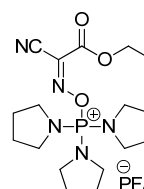
**HOBt**  
Hidroxibenzotriazol



**PyAOP**  
Hexafluorofosfat de (7-azabenzotriazol-1-  
iloxi)-tripirrolidinofosfoni

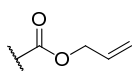


**PyOxP**  
Hexafluorofosfat de *O*-[(ciano-  
(etoxicarbonil)metiliden)-amino]-  
iloxitripirrolidinofosfoni

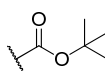


### 1.3 Grups protectors

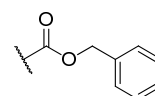
**Al-loc**  
Al·liloxicarbonil



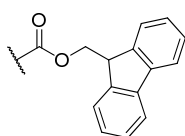
**Boc**  
*tert*-Butoxicarbonil



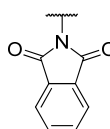
**Cbz**  
Benziloxicarbonil



**Fmoc**  
Fluorenilmetiloxicarbonil



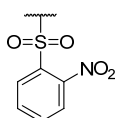
**Ftal**  
Ftalimida



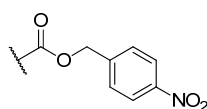
**Moc**  
Metoxicarbonil



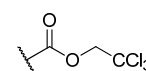
**Ns**  
2-Nitrofenilsulfonil



**PNZ**  
*p*-Nitrobenziloxicarbonil



**Troc**  
2,2,2-Tricloroetoxicarbonil



# Introducció i Objectius





## 1 Introducció

L'ésser humà ha buscat en la Naturalesa la solució a les seves necessitats des dels seus orígens. Els remeis naturals han estat la base per curar i prevenir les malalties de l'home des dels primers escrits coneguts en les civilitzacions antigues; com documents trobats en l'antiga Mesopotàmia que inventariaren al voltant de 1.000 substàncies derivades de les plantes, o l'*Ebers Papyrus* que recollí fins 700 medicaments en l'any 1.500 a.C. Les civilitzacions xinesa, hindú i grecoromana de forma paral·lela augmentaren aquests coneixements; i foren els àrabs els que ajuntaren i desaren tota aquesta saviesa durant l'edat mitjana.

El perquè els remeis naturals poden curar es respongué en 1.805 quan Friedrich Serturmer aïllà la morfina d'un cru d'opi,<sup>1</sup> fou el primer en isolar un producte natural farmacològicament actiu. Començava una era on es prenia consciència de l'existència dels productes naturals: els podrien aïllar, purificar i estudiar. La prova es tingué pocs anys després, en 1.827 Merck tragué al mercat la morfina, primer producte natural comercialitzat, i Bayer feu el mateix amb l'aspirina en 1.899, primer fàrmac semisintètic anàleg d'un producte natural. Però el verdader detonador de la recerca farmacèutica fou el descobriment de la penicil·lina per A. Fleming en 1.928.<sup>2</sup> Així s'inicià, després de la 2ª Guerra Mundial, l'estudi massiu de microorganismes que poguessin generar nous antibiòtics.

Cap a l'any 1.990, el 80% dels medicaments eren productes naturals o anàlegs d'ells; amb distints tipus d'activitats: antibiòtics, com la penicil·lina o la tetraciclina, antiparasitaris, com l'ivermectina, antimalària, com la quinina o l'artemisinina, anticancerígens. En poc més d'un segle, els productes naturals havien revolucionat la medicina i augmentat l'esperança de vida de l'ésser humà en més de 30 anys.

---

<sup>1</sup> F.W. Serturmer *Trommsdorff's J. Pharm. f. Arzte. Apoth. Chem.*, **1805**, 13, 229

<sup>2</sup> A. Fleming *Br. J. Exp. Path.*, **1929**, 10, 226

Fou al llarg d'aquesta dècada dels 90 quan l'interès per la química dels productes naturals es frenà. Els factors que provocaren l'allunyament de l'estudi dels productes naturals per part de les companyies farmacèutiques foren:<sup>3</sup>

- L'aparició de la bioanàlisi d'alt rendiment ("high-throughput screening", HTS) davant de dianes terapèutiques concretes juntament amb el desenvolupament de la química combinatòria facilitava la creació de quimiotèques de productes sintètics amb major diversitat química i que podien ser avaluats biològicament en dies, i alhora induïa a abandonar les quimiotèques d'extractes de productes naturals.
- Avanços en la biologia molecular, la biologia cel·lular i la genòmica que augmentaven el nombre de dianes moleculars i demanaven temps més curts en el descobriment dels medicaments.
- La minva d'interès de les companyies farmacèutiques en el tractament de les malalties infeccioses (diana terapèutica clàssica dels productes naturals).<sup>4</sup>

Afortunadament, sembla que aquest allunyament dels productes naturals fou un petit entrebanc. Alguns d'aquells factors que provocaren la desil·lusió en la química de productes naturals, també han permès el reviscolament d'aquesta:

- Avanços en la tecnologia analítica, l'espectroscòpia i l'HTS.
- La impotència de la química combinatòria per sintetitzar un nombre significant de nous fàrmacs amb certa complexitat molecular.

Així es donà un pas en fals al pensar que les noves tècniques aparegudes en els anys 90 competien i venien a substituir a la química anterior. Realment, havien de combinar-se per potenciar la química dels productes naturals.

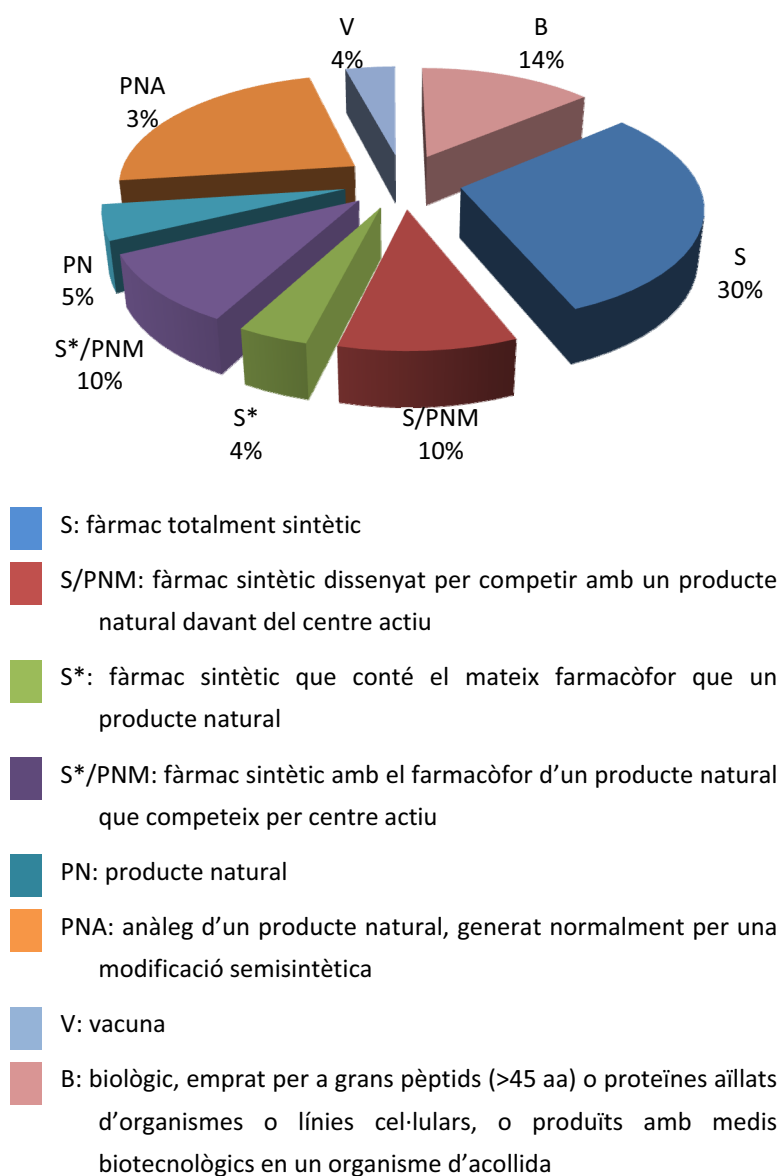
L'anàlisi dels nous fàrmacs aprovats en el món entre gener de 1.981 i juny de 2.006 remarca la importància dels productes naturals no sols com font directa de nous medicaments sinó, i més important, com font i inspiració de noves estructures. Un 52% de les 1.184 noves substàncies publicades correspon a compostos que són productes naturals o les seves estructures deriven dels productes naturals d'alguna manera: són anàlegs d'un producte natural, tenen el farmacòfor d'un producte natural o imiten al producte natural inhibidor d'una diana terapèutica (Figura i.1).<sup>5</sup>

---

<sup>3</sup> F.E. Koehn, G.T. Carter *Nat. Rev. Drug Disc.*, **2005**, 4, 206

<sup>4</sup> S.J. Projan *Cur. Opin. Pharmacol.*, **2003**, 3, 457

<sup>5</sup> D.J. Newman, G.M. Cragg *J. Nat. Prod.*, **2007**, 70, 461



**Figura i.1.** Nous fàrmacs aprovats en el món entre 01/1.981 i 06/2.006, segons la seva font d'obtenció (N = 1.184 fàrmacs).<sup>5</sup>

Diversos investigadors han comparat les característiques moleculars dels productes naturals front a productes purament sintètics.<sup>6,7,8,9</sup> En les estructures dels productes naturals cal destacar:

- Elevada diversitat química, pel que fa a grups funcionals.
- Estructures químiques complexes.
- Major nombre d'estereocentres.

<sup>6</sup> M. Feher, J.M. Schmidt *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **2003**, *43*, 218

<sup>7</sup> M.-L. Lee, G. Schneider *J. Comb. Chem.*, **2001**, *3*, 284

<sup>8</sup> F.L. Stahura, J.W. Godden, L. Xue, J. Bajorath *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **2000**, *40*, 1245

<sup>9</sup> T. Henkel, R.M. Brunne, H. Müller, F. Reichel *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 643

- Major nombre d'àtoms d'oxigen i, en general, d'heteroàtoms.
- Menor ràtio d'àtoms en anells aromàtics front àtoms pesats.
- Major nombre d'àtom donadors i acceptors per formar enllaços d'hidrogen.
- Major rigidesa molecular.

A més, els productes naturals tenen activitats biològiques diverses, que freqüentment són selectives, específiques i han permès conèixer els mecanismes d'acció.<sup>10</sup> Així, en conjunt, es pot veure als productes naturals com un grup d'estructures privilegiades seleccionades per l'evolució per a interactuar amb una ampla varietat de proteïnes i altres dianes biològiques amb finalitats molt concretes; és a dir, es poden considerar un potencial grup de candidats a fàrmacs.

### 1.1 Productes naturals d'origen marí

L'estudi del mar com a font de productes naturals començà a mitjans del segle XX. En 1.951, W. Bergmann va presentar dos nucleòsids aïllats d'una esponja marina d'estructura desconeguda fins aquella data.<sup>11</sup> Endemés, la derivatització d'aquests compostos donà dos nous nucleòsids amb importants propietats anticancerígenes. Els posteriors treballs de J. Faulkner, P.J. Scheuer, M.H.G. Munro, W. Fenical entre d'altres han accelerat l'estudi i, per tant, el coneixement d'aquest camp.

La química dels productes naturals marins és més complexa que la dels terrestres perquè presenta unes dificultats addicionals. Així, els inconvenients que es troben al treballar amb productes marins són:

- Díficil reproductibilitat, perquè canvis en l'entorn de l'ésser viu poden modificar el seu organisme i alterar la producció del producte natural que busquem.
- Possible extinció de la font d'extracció i les restriccions sobre la recol·lecció de biomaterials, tal i com va quedar patent en la Convenció de Diversitat Biològica de Rio en 1.992.<sup>12</sup>
- Dificultats per accedir als llocs on viuen els organismes portadors dels productes naturals. En la terra pot ser difícil accedir a certes plantes per la seva altura, però en el mar aquesta dificultat s'accentua. La immersió a grans profunditats requereix de sofisticats equips de submarinisme o, fins i tot, d'equips submergibles equipats amb braços robòtics.

---

<sup>10</sup> D.J. Newman, G.M. Cragg, D.G.I. Kingston *The Practice of Medicinal Chemistry* (Ed.: C.G. Wermuth), Elsevier, **2008**, 159

<sup>11</sup> W. Bergmann, R.J. Feeney *J. Org. Chem.*, **1951**, *16*, 981

<sup>12</sup> B.E. Kirsop *J. Ind. Microbiol. & Biotech.*, **1996**, *17*, 505

- Dificultats associades amb la reproducció del medi de cultiu del producte natural. Lligades amb la impossibilitat de cultivar molts organismes, com les esponges i la seva fauna microbial, que han de ser recol·lectades per poder obtenir els valuosos compostos que sintetitzen.
- Elevada quantitat inicial de la font del producte natural, necessària per obtenir una quantitat analitzable d'extracte que contingui la substància bioactiva pura. A més de les dificultats pròpies de l'aïllament i la purificació del producte.
- Dificultats en la síntesi del producte natural, degudes a la complexitat de les seves estructures i la presència d'un gran nombre de centres quirals.

L'oceà és l'origen de moltes de les dificultats citades anteriorment, però també és l'al·licient per treballar amb els productes naturals marins, ja que és un entorn on viu una àmplia varietat de flora i fauna, incloent microorganismes. La quantitat d'espècies marines conegudes ascendeix a gairebé 275.000 i cada any es descriuen al voltant de 1.400 espècies noves.<sup>13</sup> A més, els productes marins presenten una sèrie de factors que els potencien davant dels productes naturals d'origen terrestre.

- El mar ocupa el 71% de la superfície del planeta i conté major biodiversitat que el conjunt d'espècies terrestres i d'aigua dolça.<sup>14</sup>
- L'hàbitat marí porta més temps evolucionant que el terrestre perquè és on nasqué la vida.
- La pressió evolutiva que trobem en molts ecosistemes marins, com els esculls de coral. L'elevada densitat d'espècies provoca una competitivitat molt intensa entre elles, afavorint la supervivència d'aquelles que milloren contínuament els seus sistemes d'atac i defensa.

El nombre de productes naturals s'estima en 153.000, dels quals al voltant de 22.000 són d'origen marí.<sup>15</sup> Aquesta inferioritat numèrica dels productes marins es contraresta amb els resultats de la bioanàlisi de les quimioteques de productes naturals, perquè hi ha un percentatge major de productes marins que presenten activitat *in vitro*.

Els productes marins són responsables del ressorgiment dels productes naturals durant els darrers anys. Prova d'açò es troba en tres fàrmacs aprovats per la *Food and Drug*

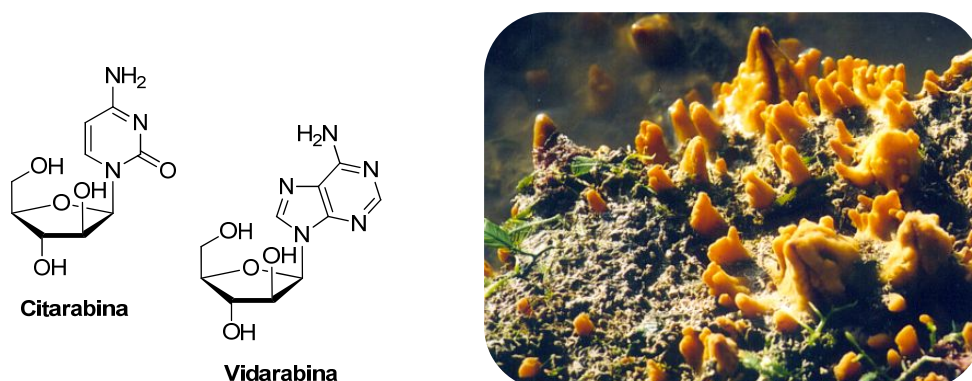
<sup>13</sup> P. Bouchet *The Exploration of Marine Biodiversity: Scientific and Technological Challenges* (Ed. Duarte CM), Fundació BBVA, 2006, 33

<sup>14</sup> J.S. Gray *Biodivers. Conserv.*, 1997, 6, 153

<sup>15</sup> J.W. Blunt, B.R. Copp, M.H.G. Munro, P.T. Northcote, M.R. Prinsep *Nat. Prod. Rep.*, 2011, 28, 196

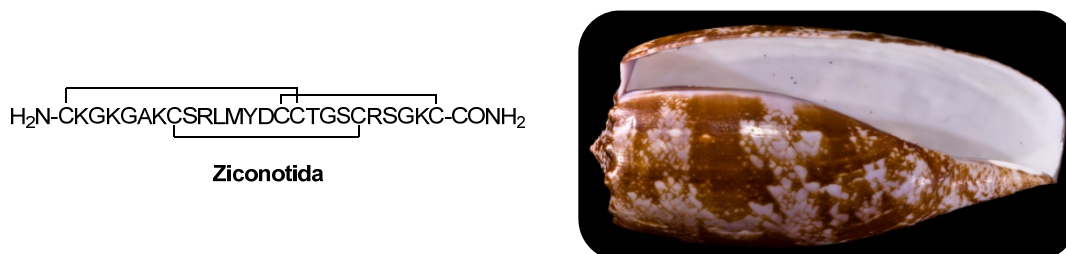
Administración (FDA) i un altre en l'Agència Europea per a l'Avaluació de Productes Mèdics (EMA):<sup>16</sup>

- Citarabina (Ara-C): és un nucleòsid pirimidínic sintètic desenvolupat a partir de l'espongotimidina, un nucleòsid aïllat de l'esponja caribenya *Tethya crypta* (Figura i.2). La FDA l'aprovà en 1.969 per al seu ús de forma convencional (Cytosar-U®), per al tractament de diversos tipus de leucèmia, o de forma liposomal (Depocyt®), indicat per al tractament intratecal de la meningitis limfomatoso.
- Vidarabina (Ara-A): és un nucleòsid purínic sintètic anàleg de l'espongouridina, un nucleòsid aïllat originàriament de l'esponja caribenya *Tethya crypta* (Figura i.2) i actualment de la *Streptomyces antibioticus*. El medicament Vira-A®, receptat per a diversos tipus de queratitis, fou aprovat per la FDA en 1.976, encara que la seva presència al mercat ha estat discontinua.



**Figura i.2.** Estructures de la citarabina i la vidarabina (esquerra) i l'esponja *Tethya crypta* (dreta).

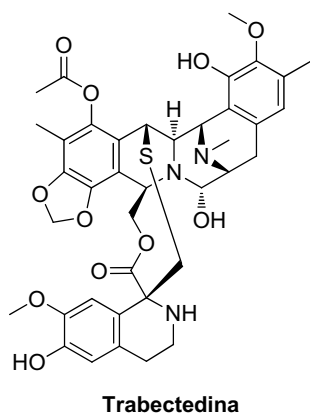
- Ziconotida (Prialt®): és l'equivalent sintètic d'un pèptid natural, ω-conotoxina MVIIA, extret del verí d'un cargol cònic tropical marí, *Conus magus* (Figura i.3). Aprovat en 2004 per la FDA. És un potent analgèsic emprat en el tractament del dolor crònic en les lesions de la medul·la espinal.



**Figura i.3.** Estructura de la ziconotida (esquerra) i cargol marí *Conus magus* (dreta).

<sup>16</sup> A.M.S. Mayer, K.B. Glaser, C. Cuevas, R.S. Jacobs, W. Kem, R.D. Little, J.M. McIntosh, D.J. Newman, B.C. Potts, D.E. Shuster *Trends Pharmacol. Sci.*, **2010**, *31*, 255

- Trabectedina (Yondelis®, ET-743): és un alcaloide derivat de la tetrahydroisoquinolina, fou aïllat del tunicat *Ecteinascidia turbinata* i aprovat en 2007 per l'EMEA (Figura i.4). S'empra per al tractament de sarcomes en teixits tous.



**Figura i.4.** Estructura de la trabectedina (esquerra) i tunicat *Ecteinascidia turbinata* (dreta).

A més, aquests quatre productes naturals sols representen la punta de l'iceberg del conjunt de productes marins amb diferents activitats (antitumoral, analgèsica, antiviral, etc.) que estan sent avaluats en les distintes fases clíniques. Tot i que la gama d'activitats trobada entre els productes naturals és molt amplia, l'activitat antitumoral és la més estudiada. En la Taula i.1 (pàgina següent) es veu l'augment piramidal del nombre de productes anticancerígens a mesura que es retrocedeix en les fases clíniques; així, després de la citarabina i la trabectedina que ja estan aprovades, es troben tres compostos més en fase III, set en fase II i vuit en fase I. Les estructures i grups químics són molt variats: nucleòsids, alcaloides, macròlids, per exemple, i destacar una important quantitat de derivats peptídics. El mode d'acció d'aquests compostos és variat, hi ha inhibidors de l'ADN polimerasa, agents que detenen el cicle cel·lular, agents interferents dels microtúbuls, etc. A més, els organismes que contenen aquests compostos van des de petits, com bacteries o fongs, a grans, com taurons.

## 1.2 Estructures dels productes naturals amb l'hexahidropirrolo[2,3-*b*]indole

Dins de la varietat estructural que presenten els productes naturals, es poden trobar agrupacions de nuclis que es repeteixen d'un a un altre organisme, o dins mateix de l'organisme, amb la presència de distints anàlegs d'un producte natural. L'hexahidropirrolo[2,3-*b*]indole (HPI) és una d'aquestes estructures que es repeteixen (Figura i.5).<sup>17</sup>

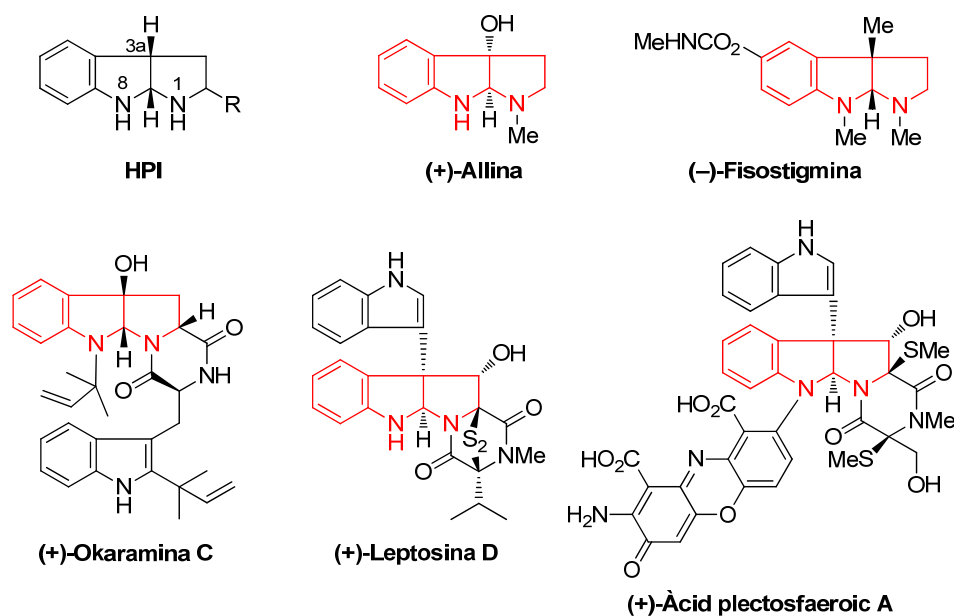
<sup>17</sup> P. Ruiz-Sanchis, S.A. Savina, F. Albericio, M. Álvarez *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 1388



Taula i.1. Situació clínica de compostos derivats marins antitumorals.<sup>18</sup>

Nom compost	Família	Organisme	Mode d'acció	Companyia	Situació
<b>Citarabina, Ara-C</b>	Nucleòsid	Esponja	Inhibidor de l'ADN polimerasa	Berford, Enzon	Aprovat
<b>Trabectedina (ET-743)</b>	Alcaloide	Tunicat	Detenció del cicle cel·lular	PharmaMar	Aprovat
<b>Eribulina mesilada (E7389)</b>	Macròlid	Esponja	Agent interferent dels microtúbuls	Eisai Inc.	Fase III
<b>Soblidotina (TZT 1027)</b>	Pèptid	Bacteri	Interferent dels microtúbuls i agent interruptor vascular	Aska Pharmaceuticals	Fase III
<b>Lactat d'escualamina</b>	Aminoesterioide	Tauró	Antagonista de la proteïna vinculada al Ca	Genaera	Fase II
<b>Cemadotina</b>	Pèptid	Llimac marí	Agent interferent dels microtúbuls	Knoll	Fase II
<b>Plinabulina (NPI-2358)</b>	Dicetopiperazina	Fong	Agent interruptor vascular	Nereus Pharmaceuticals	Fase II
<b>Plitidepsina</b>	Depsipèptid	Tunicat	Inductor de l'apoptosi	PharmaMar	Fase II
<b>Elisidepsina</b>	Depsipèptid	Molusc	-	PharmaMar	Fase II
<b>Zalypsis®</b>	Alcaloide	Nudibranqui	Detenció del cicle cel·lular	PharmaMar	Fase II
<b>Tasidotina, Sintadotina (ILX-651)</b>	Pèptid	Bacteri	Agent interferent dels microtúbuls	Genzyme Corporation	Fase II
<b>Discodermolida</b>	Policètid	Esponja	Agent interferent dels microtúbuls	Novartis	Fase I
<b>HT1286</b>	Dipèptid	Esponja	Agent interferent dels microtúbuls	Wyeth	Fase I
<b>LAF389</b>	Derivat d'aminoàcid	Esponja	Inhibidor de la metionina aminopeptidasa	Novartis	Fase I
<b>Kahalalida F</b>	Depsipèptid cíclic	Llimac marí / alga	Lisosomotropic	PharmaMar	Fase I
<b>KRN7000</b>	$\alpha$ -Galactosilceramida	Esponja	Immunoestimulador	Kirin	Fase I
<b>Briostatina 1</b>	Policètid	Bacteri / briozou	Inhibidor de la PKC isozima	National Cancer Institute	Fase I
<b>Hemiassterlina (E7974)</b>	Tripèptid	Esponja	Agent interferent dels microtúbuls	Eisai Inc.	Fase I
<b>Marizomib, Salinosporamida A; NPI-0052</b>	$\beta$ -lactona- $\gamma$ -lactama	Bacteri	Inhibidor del proteasoma	Nereus Pharmaceuticals	Fase I
<b>LY355703, CRYPTO 52</b>	Criptoficina	Cianobacteri	Agent interferent dels microtúbuls	-	Preclínica
<b>NSC 630176</b>	Pèptid bicíclic	Cianobacteri	Inhibidor de la histona deacetilasa	-	Preclínica

<sup>18</sup> I. Bhatnagar, S.-K. Kim *Mar. Drugs*, **2010**, *8*, 2702



**Figura i.5.** Productes naturals que contenen un unitat d'HPI (en vermell).

Els primers productes naturals descrits que contenen l'HPI foren alcaloides, però les millores en l'aïllament i la caracterització dels productes naturals permeteren trobar altres estructures peptídiques i amb distintes activitats. Biosintèticament, l'estructura HPI deriva d'un Trp mitjançant una ciclació intramolecular.

(+)-Allina és el producte natural més petit amb el nucli d'HPI; presenta un grup hidroxil en la posició C<sup>3a</sup> i un metil en N<sup>1</sup>.<sup>19,20</sup> (-)-Fisostigmina és un important alcaloide aïllat de les llavors de les faves de la planta de Calabar, *Physostigma venenosum*. Aquest alcaloide, inhibidor de la colinesterasa, s'ha utilitzat en el tractament de la miastènia greu, el glaucoma, l'Alzheimer i, més recentment, en el tractament de la hipotensió ortostàtica (Figura i.5).<sup>21</sup>

Altres estructures més complexes contenen l'HPI condensat amb un nou aminoàcid formant una dicetopiperazina (DCP). Aquest és el cas de l'okaramina C<sup>22</sup> i la resta de la seva família, aïllades del fong *Penicillium simplicissimum*, la leptosina D,<sup>23</sup> l'àcid plectosfaeroic A,<sup>24</sup> entre d'altres (Figura i.5).

<sup>19</sup> B. Tashkhodzhaev, K. Samikov, M.R. Yagudaev, T.P. Antsupova, R. Shakirov, S.Y. Yunusov *Khim. Prir. Soedin.*, **1985**, 5, 687

<sup>20</sup> K. Samikov, R. Shakirov, T.P. Antsupova, S.Y. Yunusov *Khim. Prir. Soedin.*, **1986**, 3, 383

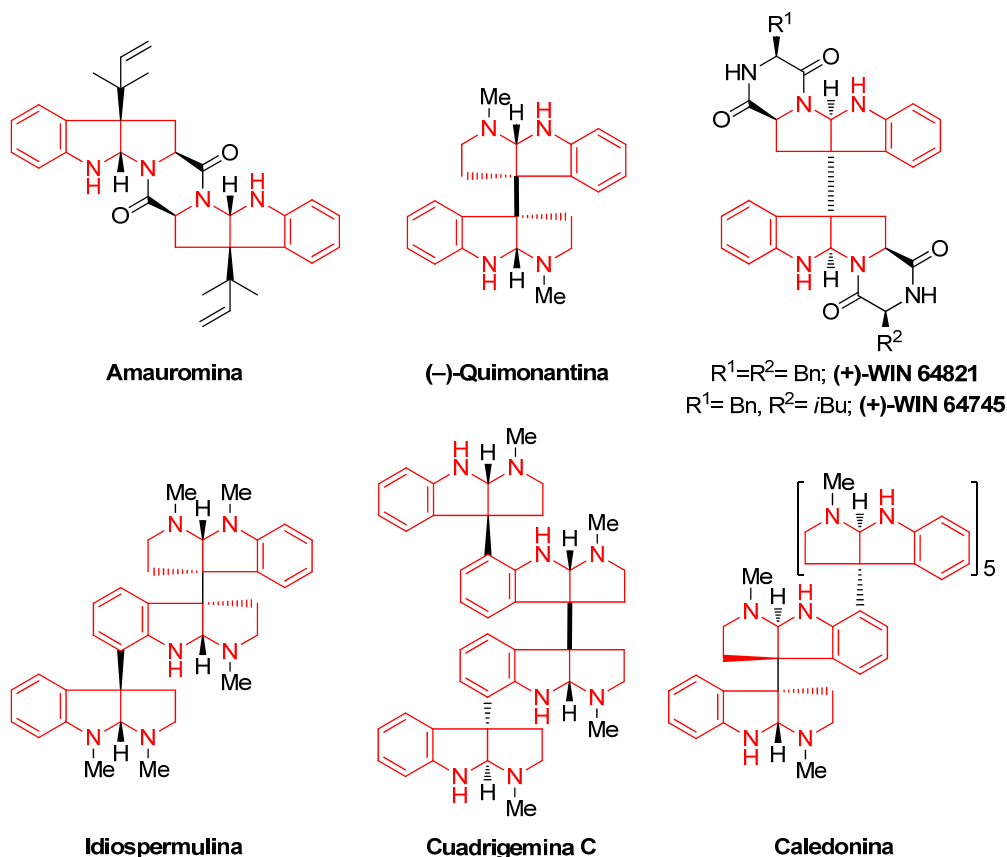
<sup>21</sup> B. Witkop *Heterocycles*, **1998**, 49, 9

<sup>22</sup> H. Hayashi, T. Fujiwara, S. Murao, M. Arai *Agric. Biol. Chem.*, **1991**, 55, 3143

<sup>23</sup> C. Takahashi, A. Numata, Y. Ito, E. Matsumura, H. Araki, H. Iwaki, K. Kushida *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1994**, 1859

<sup>24</sup> G. Carr, W. Tay, H. Bottriell, S.K. Andersen, A.G. Mauk, R.J. Andersen *Org. Lett.*, **2009**, 11, 2996

Productes naturals amb més d'un nucli HPI en la seva estructura com l'amauromina,<sup>25,26</sup> que presenta dues unitats HPI condensades mitjançant una DCP, o la família de les quimonantines,<sup>27</sup> que tenen els dos HPI units pels respectius C<sup>3a</sup> de cada unitat. Els antagonistes de la neuroquinina (+)-WIN64821 i (+)-WIN64745 contenen, a més, una DCP en cada unitat HPI.<sup>28,29,30</sup> Idiospermulina conté tres unitats HPI; la cuadrígemina C amb quatre,<sup>31</sup> fins la caledonina<sup>32</sup> amb set unitats d'HPI (Figura i.6).



**Figura i.6.** Productes naturals que contenen més d'una unitat HPI (en vermell).

En els darrers anys s'han aïllat un grup de compostos que a més de la unitat HPI, presenten un enllaç entre el C<sup>3a</sup> de l'HPI i el N<sup>1</sup> d'una triptamina o Trp modificats. Així es presenta en

<sup>25</sup> S. Takase, M. Iwami, T. Ando, M. Okamoto, K. Yoshida, H. Horiai, M. Kohsaka, H. Aoki, H. Imanaka *J. Antibiot.*, **1984**, 37, 1320

<sup>26</sup> S. Takase, Y. Kawai, I. Uchida, H. Tanaka, H. Aoki *Tetrahedron*, **1985**, 41, 3037

<sup>27</sup> H.F. Hodson, B. Robinson, G.F. Smith *Proc. Chem. Soc.*, **1961**, 465

<sup>28</sup> C.J. Barrow, P. Cai, J.K. Snyder, D.M. Sedlock, H.H. Sun, R. Cooper *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 6016

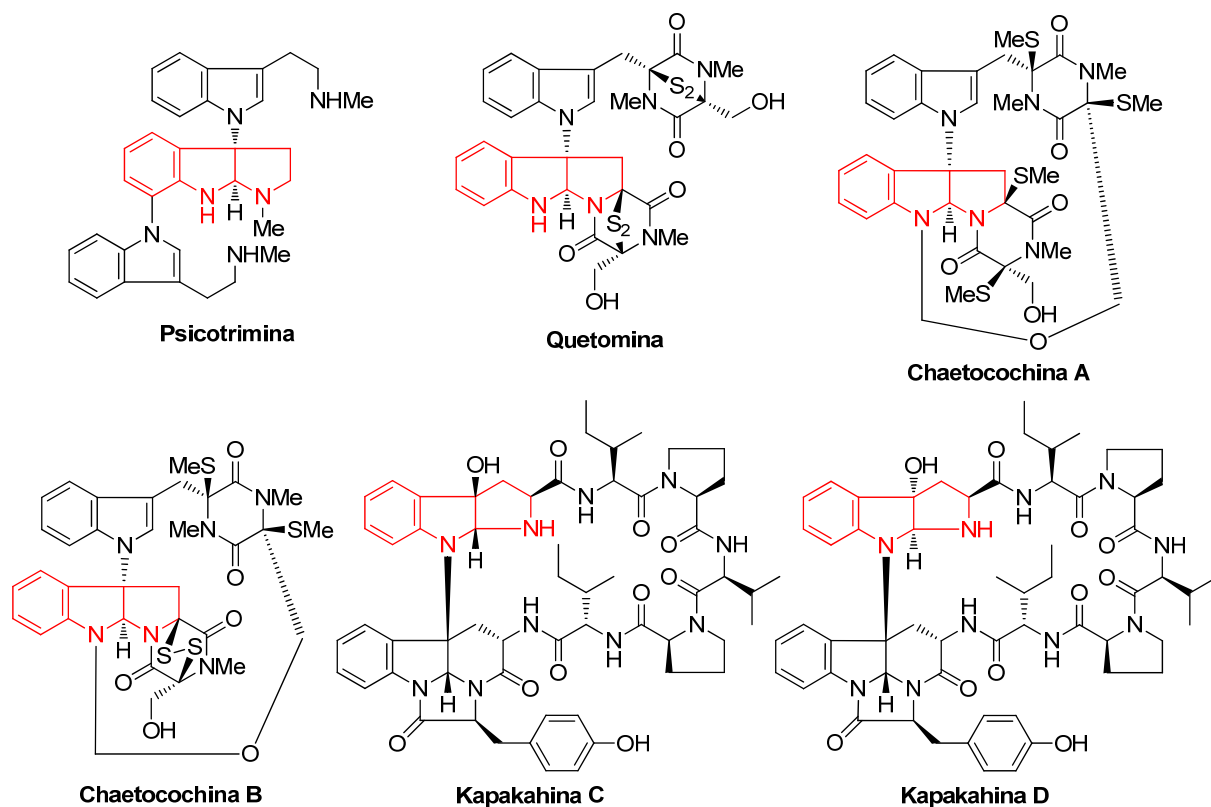
<sup>29</sup> D.M. Sedlock, C.J. Barrow, J.E. Brownell, A. Hong, A.M. Gillum, D.R. Houck *J. Antibiot.*, **1994**, 47, 391

<sup>30</sup> J.J. Oleynek, D.M. Sedlock, C.J. Barrow, K.C. Appell, F. Casiano, D. Haycock, S.J. Ward, P. Kaplita, A.M. Gillum *J. Antibiot.*, **1994**, 47, 399

<sup>31</sup> F. Libot, C. Miet, N. Kunesch, J.E. Poisson, J. Pusset, T. Sévenet *J. Nat. Prod.*, **1987**, 50, 468

<sup>32</sup> V. Jannic, F. Gueritte, O. Laprevote, L. Serani, M.-T. Martin, T. Sévenet, P. Potier *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 838

l'alcaloide psicotrimina<sup>33</sup> o la família de les epipolítidioxopiperazines, amb la quetomina<sup>34,35</sup> i les chaetocochines A i B,<sup>36</sup> entre d'altres. Novament els membres d'aquesta família presenten diverses bioactivitats: antitumoral, antimicrobial, antinematodal i citotoxicitat. Unes estructures similars exhibeixen les kapakahines C i D,<sup>37</sup> que són pèptids macrocíclics formats mitjançant un enllaç entre el N<sup>8</sup> d'un HPI localitzat en la posició N-terminal d'una estructura lineal i el C<sup>4a</sup> d'una unitat  $\alpha$ -carbolina pròxima al C-terminal (Figura i.7).



**Figura i.7.** Productes naturals amb una unitat HPI (en vermell) i l'enllaç C<sup>3a</sup>-N<sup>i</sup> o C<sup>4a</sup>-N<sup>8</sup>.

En altres productes naturals l'HPI està integrat en una cadena peptídica, com l'omphalotina D,<sup>38</sup> la phakellistatina 3<sup>39</sup> o la himastatina<sup>40,41</sup> (Figura i.8).

<sup>33</sup> H. Takayama, I. Mori, M. Kitajima, N. Aimi, N.H. Lajis *Org. Lett.*, **2004**, 6, 2945

<sup>34</sup> S.A. Waksman, E. Bugie *J. Bacteriol.*, **1944**, 48, 527

<sup>35</sup> W.B. Geiger, J.E. Conn, S.A. Waksman *J. Bacteriol.*, **1944**, 48, 531

<sup>36</sup> G.-Y. Li, B.-G. Li, T. Yang, J.-F. Yan, G.-Y. Liu, G.-L. Zhang *J. Nat. Prod.*, **2006**, 69, 1374

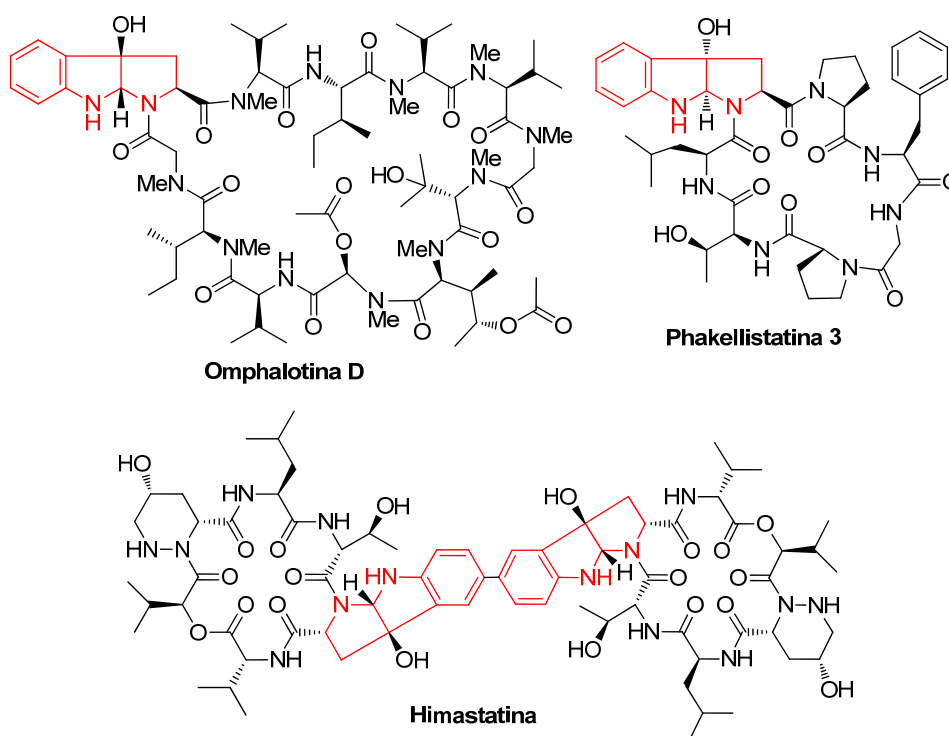
<sup>37</sup> B.K.S. Yeung, Y. Nakao, R.B. Kinnel, J.R. Carney, W.Y. Yoshida, P.J. Scheuer, M. Kelly-Borges *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 7168

<sup>38</sup> E. Büchel, U. Martini, A. Mayer, H. Anke, O. Sterner *Tetrahedron*, **1998**, 54, 5345

<sup>39</sup> G.R. Pettit, R. Tan, D.L. Herald, R.L. Cerny, M.D. Williams *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 1593

<sup>40</sup> J.E. Leet, D.R. Schroeder, B.S. Krishnan, J.A. Matson *J. Antibiot.*, **1990**, 43, 961

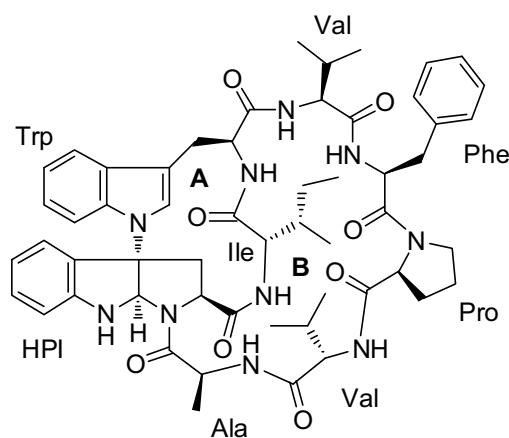
<sup>41</sup> J.E. Leet, D.R. Schroeder, J. Golik, J.A. Matson, T.W. Doyle, K.S. Lam, S.E. Hill, M.S. Lee, J.L. Whitney, B.S. Krishnan *J. Antibiot.*, **1996**, 49, 299



**Figura i.8.** Productes naturals amb l'HPI (en vermell) formant part d'una cadena peptídica.

### 1.3 Mayotlida

Mayotlida (**1**) és un nou pèptid heterocíclic aïllat recentment per PharmaMar, com a un compost minoritari durant la purificació (VLC, Lichroprep®; HPLC, SymmetryPrep™ C<sub>18</sub>) de fraccions actives extreïdes amb *iso*-propanol d'una mostra de *Spongia* sp (Figura i.9). La mayotlida presenta activitat citotòxica davant de tres línies cel·lulars de càncer humà: MDA-MB-231, A-549 i HT-29, en concentracions micromolars. La seva estructura es determinà amb tècniques d'espectrometria de masses, ressonància magnètica nuclear i estudis de degradació de Marfey, els quals demostraren la configuració L dels aminoàcids.<sup>42</sup>



**Figura i.9.** Mayotlida (**1**).

<sup>42</sup> R. Bhushan, H. Brückner *Aminoacids*, **2004**, 27, 231

L'estructura de la mayotlida presenta dos macrocicles peptídics. El cicle homodètic (anell B) està constituït per 8 aminoàcids, amb dos residus de Trp en les posicions  $i$  i  $i+2$ , un dels quals està ciclats intramolecularment formant una unitat HPI. El cicle heterodètic (anell A), que és el petit, està format per tres aminoàcids: els dos Trp i una lle; com a característica estructural s'ha de destacar una unió interessant entre el  $C^{3a}$  de l'HPI i el  $N$  indòlic de l'altre Trp. Aquest enllaç  $C^{3a}$ - $N$  ja s'ha vist anteriorment en altres productes naturals, però mayotlida és el primer exemple d'un pèptid bis-macrocíclic que el conté.

Distints grups han estudiat les aproximacions sintètiques a aquest sistema Trp-Trp i fins el moment han sigut descrites poques síntesis de productes naturals semblants. El grup de H. Takayama fou el primer en sintetitzar la psicotrimina,<sup>43</sup> seguit de prop per P. S. Baran amb una alternativa de síntesi per al mateix producte.<sup>44</sup> D'altra banda, J. D. Rainier i V. R. Espejo descriviren estratègies alternatives per a la formació de l'enllaç  $N^1$ - $C^{3a}$ , a partir de la reacció entre un 3a-bromo-HPI i un anàleg de l'indole.<sup>45,46</sup> Tant el grup de P. S. Baran com el de J. D. Rainier han aconseguit la síntesi d'alguns membres de la família de les kapakahines.<sup>47,48</sup> L'últim producte natural semblant descrit fins la data és la (+)-psicotetramina.<sup>49</sup> Tots aquests treballs sintètics s'han publicat durant el desenvolupament de la present tesi doctoral.

### 1.3.1 Aproximació sintètica

L'anàlisi retrosintètica de mayotlida desenvolupada en aquest treball comença amb la desconexió de la cadena pentapeptídica, des de la Val fins l'Ala. D'aquesta manera ens queda el cicle heterodètic, on es pot escindir la lle per qualsevol dels dos enllaços peptídics, quedant finalment el sistema Trp-HPI. Aquí es troben els majors reptes sintètics de la síntesi total de mayotlida: la ciclació intramolecular del Trp formant l'HPI, i la unió entre el  $C^{3a}$  de l'HPI i el  $N$  de l'indole del Trp (Figura i.10, pàgina següent).

En aquesta tesi presentem l'aproximació a la síntesi total de la mayotlida, aturant-nos al llarg de la via sintètica per fer una especial anàlisi, primer, en l'obtenció de l'HPI i, segon, en la unió de l'HPI amb l'indole del segon Trp. A més, també busquem explicar la relació entre l'estructura i l'activitat de la mayotlida amb la síntesi i estudi d'anàlegs.

<sup>43</sup> Y. Matsuda, M. Kitajima, H. Takayama *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 125

<sup>44</sup> T. Newhouse, C.A. Lewis, P.S. Baran *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 10886

<sup>45</sup> V.R. Espejo, J.D. Rainier *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 12894

<sup>46</sup> V.R. Espejo, X.-B. Li, J.D. Rainier *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 8282

<sup>47</sup> T. Newhouse, C.A. Lewis, P.S. Baran *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6360

<sup>48</sup> V.R. Espejo, J.D. Rainier *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 2154

<sup>49</sup> K. Foo, T. Newhouse, I. Mori, H. Takayama, P.S. Baran *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 2716

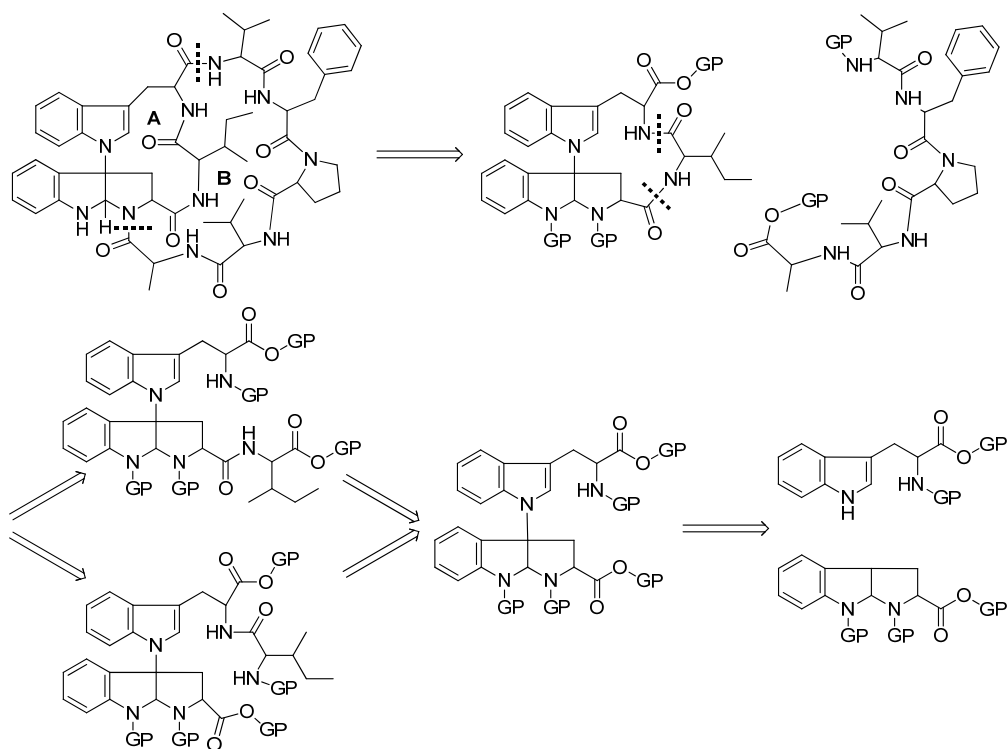


Figura i.10. Anàlisi retrosintètica de maytollida.

## 2 Objectius

L'objectiu fonamental d'aquesta tesi és la síntesi total de la mayotlida per a confirmar la seva estructura, tant pel que fa a la constitució com a la seva configuració. A més, el desenvolupament i estudi de la metodologia sintètica per a la formació de l'enllaç entre el C<sup>3a</sup> de l'HPI i el N de l'indole del Trp; i la síntesi d'anàlegs per estudiar la relació entre l'estructura i l'activitat de la mayotlida. Cronològicament, els objectius que s'han plantejat són:

- **Síntesi del sistema Trp-HPI.** Per a la formació d'aquest sistema cal estudiar la reacció entre un Trp i un anàleg halogenat de l'HPI. Així, s'ha d'estudiar la ruta sintètica i els grups protectors més idonis per a l'obtenció del 3a-bromo-HPI (Br-HPI), a més de la seva estereoquímica. En l'elaboració de l'enllaç entre el C<sup>3a</sup> del Br-HPI i el N indòlic del Trp, els grups protectors escollits han de possibilitar un creixement ordenat i selectiu del sistema Trp-HPI; així que s'ha d'estudiar la seva ortogonalitat.
- **Síntesi de l'anell A de la mayotlida.** S'ha d'investigar el punt més adient per al tancament de l'anell, tenint en compte els resultats obtinguts en la síntesi del sistema Trp-HPI. S'ha de realitzar la determinació estructural de l'anell i estudiar la seva probable activitat, buscant l'origen de l'activitat de la mayotlida.
- **Síntesi de la mayotlida.** S'ha de sintetitzar la cadena lineal pentapeptídica de la mayotlida, com es veu en l'anàlisi retrosintètica (Figura i.10), seleccionant la millor tècnica per aconseguir-ho. S'ha d'acoblar, primer, el pentapèptid a l'anell A i, després, ciclar l'anell B. Finalment, s'ha de comparar la mayotlida sintètica amb la natural.
- **Estudi de la relació estructura-activitat de la mayotlida.** S'han de sintetitzar anàlegs de la mayotlida i assajar la seva activitat per justificar l'origen de l'activitat del producte natural.





# Capítol 1

Grups Protectors Ortogonals

en la Síntesi del

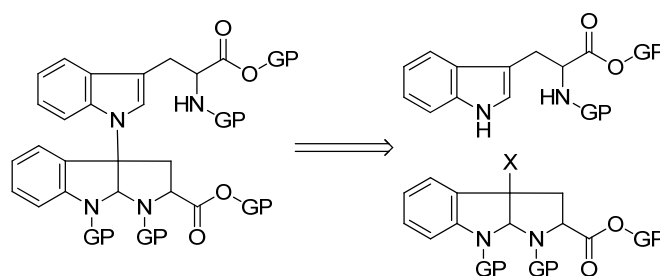
Triptòfan-Hexahidropirroloindole



## 1 Introducció

Una característica estructural important i atractiva de la mayotlida és la unitat HPI i l'enllaç entre el  $C^{3a}$  d'aquest HPI i el  $N$  indòlic del Trp. L'anàlisi retrosintètica plantejada (Veure Introducció, Figura i.10) es basa en la desconexió de l'anell B de la mayotlida entre els enllaços de la cadena pentapeptídica i l'anell A. Aquesta estructura de l'anell A és l'única part de la mayotlida on dos aminoàcids no estan units per un enllaç peptídic i presenta els reptes sintètics que es descriuen en aquest capítol.

La formació de l'enllaç entre el  $C^{3a}$  de l'HPI i el  $N$  de l'indole del Trp s'ha plantejat fent ús d'una reacció de substitució nucleòfila entre l'HPI halogenat i el Trp. A més, ambdós compostos necessiten de grups protectors ortogonals que permetin el creixement selectiu i controlat de la molècula des de l'aminoàcid inicial fins la mayotlida final (Figura 1.1).

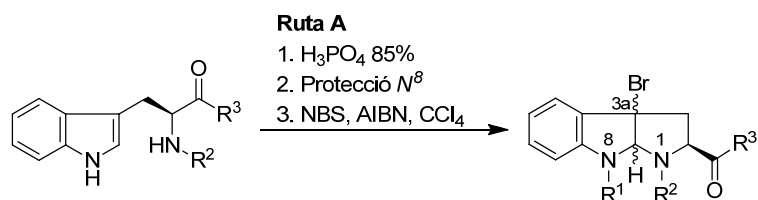


**Figura 1.1.** Anàlisi retrosintètica del sistema Trp-HPI

## 2 Síntesi del Br-HPI

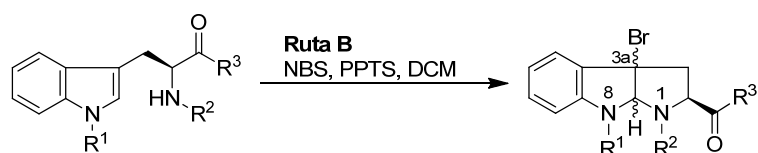
La síntesi de l'alquil 3a-bromo-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrolo[2,3-*b*]indole-2-carboxilat s'ha realitzat seguint dos procediments diferents, que han sigut comparats per rendiment i

estereoquímica. La primera ruta, descrita per Taniguchi i Hino,<sup>1</sup> es basa en la ciclació àcida d'un Trp, seguida per la protecció de l'anilina i la bromació benzílica de l'HPI-2-carboxilat d'alquil (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Ruta A per l'obtenció del Br-HPI.

La segona ruta parteix d'un Trp totalment protegit, per aconseguir una bromació-ciclació del Trp en un sol pas, emprant *N*-bromosuccinimida (NBS) i el medi lleugerament àcid generat per la sal de *p*-toluensulfonat de piridini (PPTS) (Figura 1.3).<sup>2</sup>



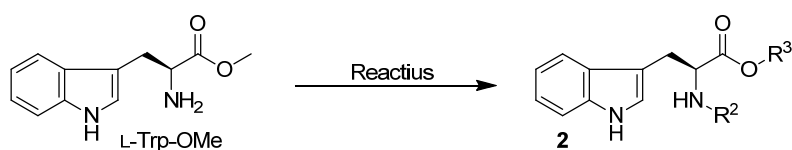
**Figura 1.3.** Ruta B per l'obtenció del Br-HPI.

La protecció de l'amina del Trp ha sigut necessària en nombroses ocasions al llarg de la present tesi. Així, partint de l'L-Trp-OMe s'ha fornit **2**, en condicions bàsiques de TEA o NaOH, bé formant un carbamat al reaccionar amb el cloroformat del grup protector desitjat o el dicarbonat de di-*tert*-butil (quan R<sup>2</sup>= Boc), o bé formant l'ftalimida al reaccionar amb l'anhidrid ftàlic. També, s'ha provat de protegir el N<sup>α</sup> del Trp amb una Ala protegida. En alguns casos, l'ester metílic s'ha substituït per ester *tert*-butílic per ortogonalitat amb altres grups protectors. D'aquesta manera, l'ester metílic s'ha hidrolitzat en medi bàsic i la sal de l'àcid resultant s'ha fet reaccionar amb el bromur de *tert*-butil per obtenir l'ester desitjat (Taula 1.1, pàgina següent).

La protecció de l'indole del Trp **2** per obtenir **3**, s'ha dut a terme amb l'halogenur o l'anhidrid d'àcid, una base forta com NaOH amb Bu<sub>4</sub>NHSO<sub>4</sub>, com a agent de transferència de fase, i DCM per dissoldre-ho (Taula 1.2, pàgina següent). El PhSO<sub>2</sub>, el Ns i el Boc són els grups protectors que s'han emprat per protegir l'indole, donant els millors rendiments per al primer d'ells.

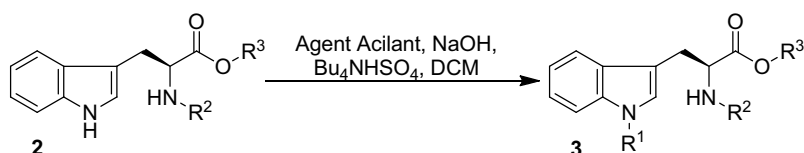
<sup>1</sup> M. Taniguchi, T. Hino *Tetrahedron*, **1981**, 37, 1487

<sup>2</sup> C. Silva-López, C. Pérez-Balado, P. Rodríguez-Granja, A.R. de Lera *Org. Lett.*, **2008**, 10, 77

**Taula 1.1.** Síntesi de **2**.


Compost	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Reactius	Rendiment (%)
<b>2a</b>	Moc	Me	CIMoc, TEA, DCM	95
<b>2b</b>	Troc	Me	CITroc, TEA, DCM	99
<b>2c</b>	Al·loc	Me	CIAl·loc, TEA, DCM	84
<b>2d</b>	Boc	Me	Boc <sub>2</sub> O, TEA, DCM	78
<b>2e</b>	Ftal	Me	1. TEA, DCM 2. Anhídrid ftàlic, 150 °C	88
<b>2f</b>	Cbz	Me	CICbz, NaOH, dioxà	95
<b>2g</b>	Moc	<i>t</i> Bu	3 etapes	58 <sup>[a]</sup>
<b>2h</b>	Troc	<i>t</i> Bu	"	55 <sup>[a]</sup>
<b>2i</b>	Al·loc	<i>t</i> Bu	"	40 <sup>[a]</sup>
<b>2j</b>	Cbz	<i>t</i> Bu	"	84 <sup>[a]</sup>
<b>2k</b>	N <sup>α</sup> -Al·loc-Ala	Me	N <sup>α</sup> -Alloc-Ala-OH, EDC, HOBt, DIEA, DCM	58

[a] El rendiment engloba: la hidròlisi del corresponent N<sup>α</sup>-R<sup>2</sup>-Trp-OMe amb LiOH en THF:H<sub>2</sub>O (10:1), i l'esterificació de l'àcid resultant amb BnEt<sub>3</sub>NCl, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, *t*BuBr en MeCN.

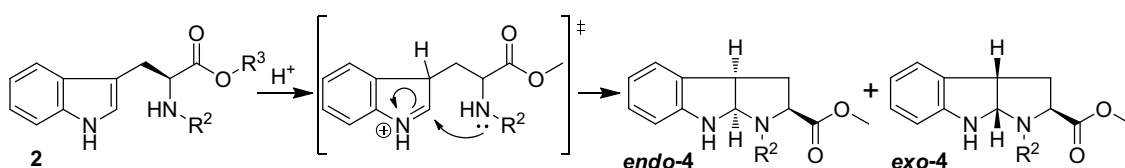
**Taula 1.2.** Protecció de l'indole de **2**.


Compost	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Agent Acilant	Rendiment (%)
<b>3a</b>	PhSO <sub>2</sub>	Moc	Me	PhSO <sub>2</sub> Cl	82
<b>3b</b>	PhSO <sub>2</sub>	Moc	<i>t</i> Bu		93
<b>3c</b>	PhSO <sub>2</sub>	Boc	Me		87
<b>3d</b>	PhSO <sub>2</sub>	Cbz	Me		92
<b>3e</b>	PhSO <sub>2</sub>	Cbz	<i>t</i> Bu		80
<b>3f</b>	Ns	Troc	Me	NsCl	43
<b>3g</b>	Ns	Troc	<i>t</i> Bu		46
<b>3h</b>	Ns	Cbz	<i>t</i> Bu		80
<b>3i</b>	Boc	Boc	Me	Boc <sub>2</sub> O	88
<b>3j</b>	Boc	Troc	Me		42
<b>3k</b>	Boc	N <sup>α</sup> -Al·loc-Ala	Me		16

## 2.1 Ruta A

El primer pas de la ruta A és la ciclació intramolecular catalitzada per àcid, bé amb  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% o amb TFA, del Trp protegit **2**. El mecanisme d'aquesta reacció transcorre mitjançant la protonació de l'indole en la posició  $\text{C}^3$ , seguida de la captura de la sal d'imini resultant per l'amina protegida de la cadena lateral, resultant dos diastereòmers de l'HPI amb una proporció termodinàmica molt favorable al producte **endo-4** (Taula 1.3). La formació del compost **4** s'ha comprovat fàcilment amb un  $^1\text{H}$ -RMN perquè apareix una senyal característica amb un desplaçament químic dins de l'interval 6-7 ppm, que correspon al protó d'aminal de la posició  $\text{C}^{8\alpha}$  de l'HPI.

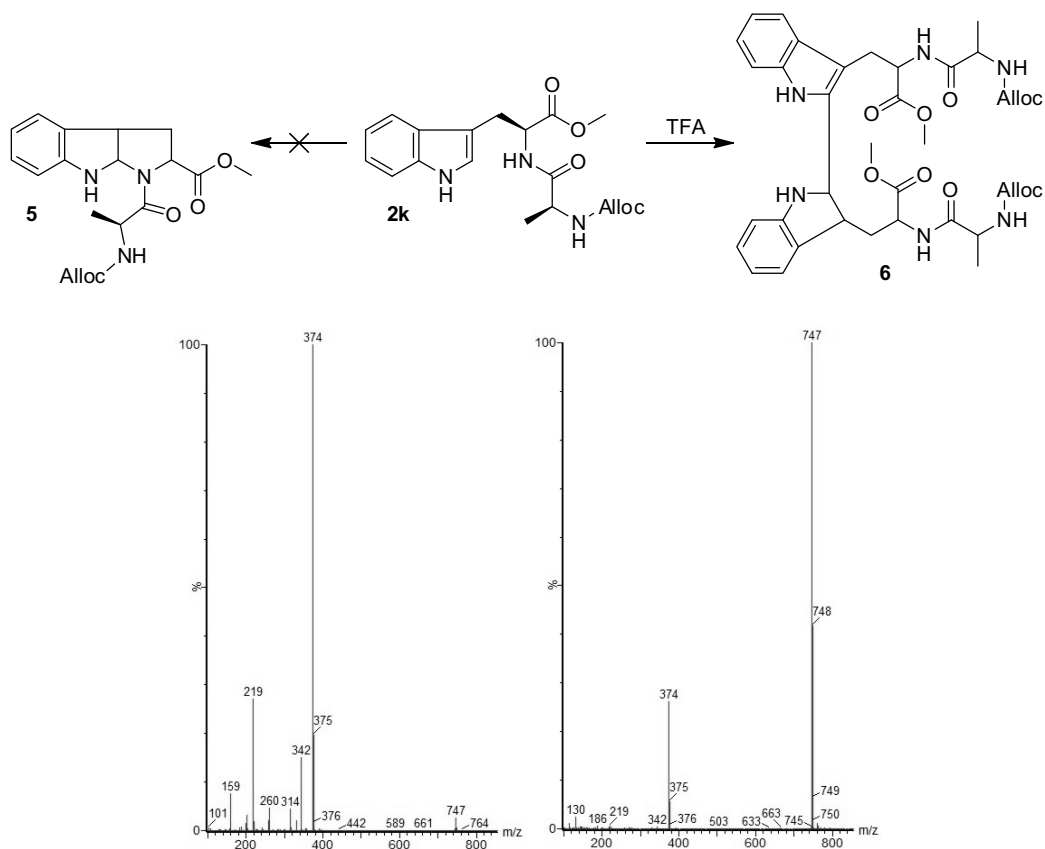
**Taula 1.3.** Reacció i mecanisme de la ciclació catalitzada per àcid del Trp.



Compost	R <sup>2</sup>	H <sup>+</sup>	Rendiment (%)	endo:exo <sup>[a]</sup>
<b>4a</b>	Moc	$\text{H}_3\text{PO}_4$ 85%	quant.	90:10
<b>4b</b>	Troc	TFA	quant.	52:48
<b>4c</b>	Cbz	TFA	73	61:39

[a] Relació determinada per  $^1\text{H}$ -RMN.

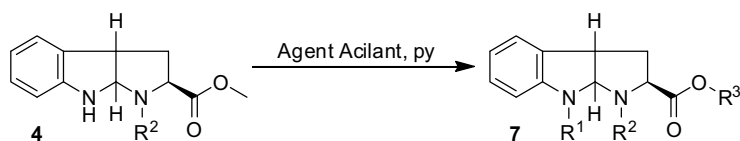
El fet d'utilitzar un medi fortament àcid condiona els grups protectors que es poden utilitzar per protegir el  $\text{N}^\alpha$ . El metoxicarbonil (Moc) ha sigut el grup protector que millor resultat ha donat perquè s'obté amb bon rendiment i un elevat percentatge de producte *endo*. En canvi, el 2,2,2-tricloroetoxicarbonil (Troc) i el benziloxicarbonil (Cbz) han resultat amb una proporció *endo:exo* més igualada (Taula 1.3). Altres grups protectors com l'Fmoc, el PNZ o l'Al·loc no han donat el producte de ciclació. El  $\text{N}^\alpha$  del Trp també s'ha protegit amb una  $\text{N}^\alpha$ -Al·loc-L-Ala, per tenir afegit un aminoàcid més de la mayotlida buscant una convergència de la ruta total, però al reaccionar amb l'àcid ha donat el producte de dimerització **6**, enlloc del compost esperat **5**. La dimerització de **6** s'ha determinat per RMN, però es comprova més ràpidament al realitzar un espectre de masses (ESI+) i veure que hi ha més proporció de la massa del dímer que de la del monòmer; a més, la formació del dímer no s'ha produït quan s'ha repetit la reacció en condicions molt diluïdes (1 mM). Aquesta dimerització es deu a la falta de nucleofília del  $\text{N}^\alpha$  protegit en forma d'amida (Figura 1.4), fet que no ocorre quan el  $\text{N}^\alpha$  forma part d'un carbamat. Aquest resultat és important a nivell sintètic perquè elimina la possibilitat d'utilitzar un dipèptid per a la formació de l'HPI.



**Figura 1.4.** Síntesi de **6** (superior) i espectres de masses de **2k** (inferior esquerra) i **6** (inferior dreta).

El següent pas de la ruta sintètica és la protecció de la indolina de **4** (Taula 1.4). Una base com la piridina i l'halogenur d'àcid corresponent han permès obtenir **7** a partir de **4**. L'èster *terc*-butílic **7b** s'ha sintetitzat mitjançant la hidròlisi de l'èster metílic **7a** i posterior esterificació.

**Taula 1.4.** Protecció de la indolina de **4**.



Compost	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Agent Acilant	Rendiment (%)
<b>7a</b>	PhSO <sub>2</sub>	Moc	Me	PhSO <sub>2</sub> Cl	80
<b>7b</b>	PhSO <sub>2</sub>	Moc	<i>t</i> Bu	3 etapes	81 <sup>[a]</sup>
<b>7c</b>	Ns	Troc	Me	NsCl	65

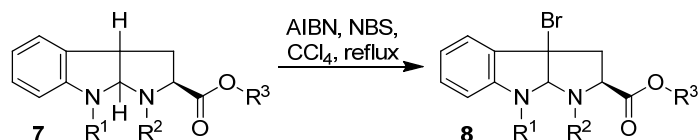
[a] El rendiment correspon a: la saponificació de **7a** i esterificació de l'àcid resultant.

L'última etapa d'aquest mètode és la bromació benzílica de **7** mitjançant un procediment radicalari (Taula 1.5). Els reactius emprats han sigut AIBN, com a iniciador radicalari, NBS, que



és la font de brom, i  $\text{CCl}_4$  de dissolvent. La reacció s'ha escalfat a temperatura de reflux per furnir **8** a partir de **7**. La combinació de grups protectors  $\text{R}^1=\text{PhSO}_2$ ,  $\text{R}^2=\text{Moc}$  i  $\text{R}^3=\text{Me}$ , ha sigut la que millor rendiment ha donat, amb un 49%, a més de recuperar producte de partida.

**Taula 1.5.** Bromació radicalària de l'HPI.

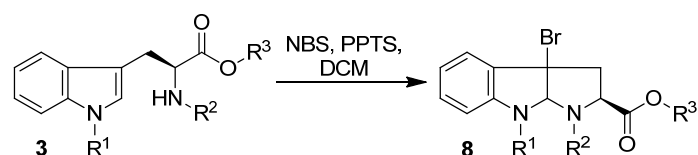


Compost	$\text{R}^1$	$\text{R}^2$	$\text{R}^3$	Rendiment (%)
<b>8a</b>	$\text{PhSO}_2$	Moc	Me	49
<b>8b</b>	$\text{PhSO}_2$	Moc	<i>t</i> Bu	46
<b>8c</b>	Ns	Troc	Me	14

## 2.2 Ruta B

Amb el Trp totalment protegit (**3**) s'ha realitzat la reacció de bromació i ciclació en un sol pas seguint les condicions descrites per A.R. de Lera i col·laboradors;<sup>2</sup> els resultats assolits estan indicats a la Taula 1.6. En el treball desenvolupat per Lera s'empraren algunes de les combinacions de grups protectors de la Taula 1.6, però els compostos resultants foren diferents perquè el producte de partida fou el D-Trp, mentre que en el nostre projecte s'ha utilitzat l'L-Trp.

**Taula 1.6.** Bromociclació del Trp.

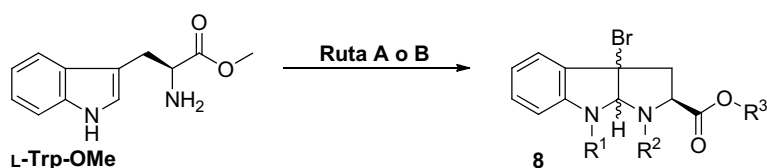


Compost	$\text{R}^1$	$\text{R}^2$	$\text{R}^3$	Rendiment (%)
<b>8a</b>	$\text{PhSO}_2$	Moc	Me	96
<b>8b</b>	$\text{PhSO}_2$	Moc	<i>t</i> Bu	58
<b>8c</b>	Ns	Troc	Me	57
<b>8d</b>	$\text{PhSO}_2$	Boc	Me	92
<b>8e</b>	$\text{PhSO}_2$	Cbz	Me	82
<b>8f</b>	$\text{PhSO}_2$	Cbz	<i>t</i> Bu	83
<b>8g</b>	Ns	Troc	<i>t</i> Bu	59
<b>8h</b>	Ns	Cbz	<i>t</i> Bu	80
<b>8i</b>	Boc	Boc	Me	86
<b>8j</b>	Boc	Troc	Me	77
<b>8k</b>	Boc	$N^\alpha$ -Alloc-Ala	Me	47

## 2.3 Comparació de les rutes A i B

En la Taula 1.7 es poden comparar els rendiments assolits per les dues vies, que tenen en comú l'elevat cost de la transformació global des d'L-Trp-OMe fins el Br-HPI; la mitjana dels rendiments gairebé arriba al 50%. La ruta B té menys etapes de reacció, fet que afavoreix que tinguin majors rendiments globals, com queda patent al arribar al mateix Br-HPI seguint camins diferents (Entrades 1, 2 i 3). El millors rendiments de la ruta B els presenten els compostos **8a**, **8d**, **8e** i **8i**. Mentre que en la ruta A es troben quan R<sup>s</sup> és el grup Moc, enlloc del Troc (Entrades 1 i 2, i 3 respectivament). D'altra banda, les condicions suaus emprades en la ruta B permeten la utilització d'una major varietat de grups protectors per al N<sup>α</sup> del Trp.

Taula 1.7. Anàlegs del Br-HPI.



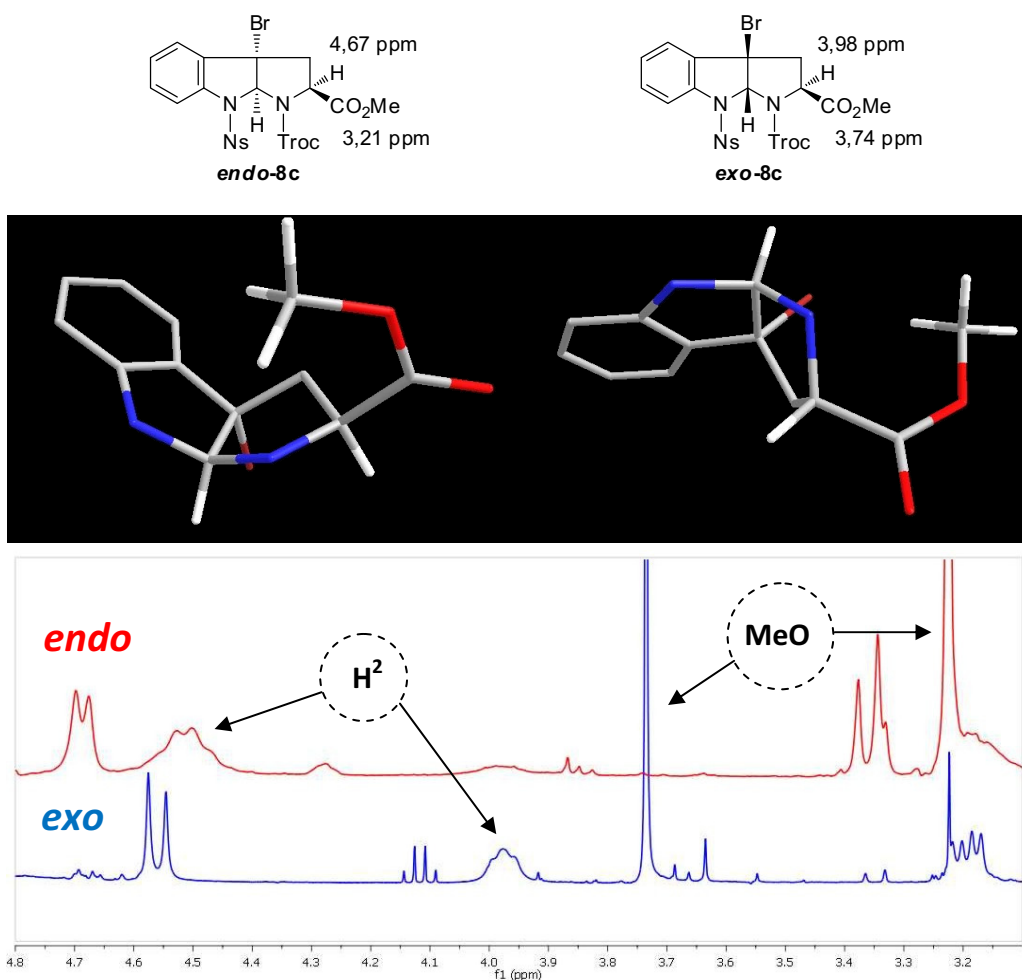
#	Compost	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Mètode (Rendiment)	<i>endo:exo</i>
1	<b>8a</b>	PhSO <sub>2</sub>	Moc	Me	A (37%)	<i>endo</i> <sup>[b]</sup>
					B (75%)	5:95 <sup>[a]</sup>
2	<b>8b</b>	PhSO <sub>2</sub>	Moc	<i>t</i> Bu	A (28%)	91:9 <sup>[b]</sup>
					B (30%)	25:75 <sup>[b]</sup>
3	<b>8c</b>	Ns	Troc	Me	A (9%)	<i>endo</i> <sup>[b]</sup>
					B (24%)	8:92 <sup>[b]</sup>
4	<b>8d</b>	PhSO <sub>2</sub>	Boc	Me	B (79%)	7:93 <sup>[a]</sup>
5	<b>8e</b>	PhSO <sub>2</sub>	Cbz	Me	B (72%)	4:96 <sup>[a]</sup>
6	<b>8f</b>	PhSO <sub>2</sub>	Cbz	<i>t</i> Bu	B (53%)	<i>exo</i> <sup>[b]</sup>
7	<b>8g</b>	Ns	Troc	<i>t</i> Bu	B (15%)	6:94 <sup>[a]</sup>
8	<b>8h</b>	Ns	Cbz	<i>t</i> Bu	B (51%)	7:93 <sup>[b]</sup>
9	<b>8i</b>	Boc	Boc	Me	B (75%)	4:96 <sup>[a]</sup>
10	<b>8j</b>	Boc	Troc	Me	B (32%)	11:89 <sup>[b]</sup>
11	<b>8k</b>	Boc	N <sup>α</sup> -Alloc-Ala	Me	B (4%)	<i>exo</i> <sup>[b]</sup>

[a] Relació determinada per HPLC.<sup>3</sup> [b] Relació determinada per <sup>1</sup>H-RMN.

El fet més important que diferencia ambdues rutes és l'obtenció de diferents diastereòmers del producte final; mentre la ruta A forneix el producte *endo*-Br-HPI majoritàriament (proporció diastereomèrica determinada en el pas de la ciclació àcida del Trp), la ruta B dona el producte cinètic *exo*-Br-HPI, principalment. La diferència entre aquests diastereòmers es pot veure al comparar els espectres de <sup>1</sup>H-RMN del compost **8c** obtingut pels dos camins; hi ha un

<sup>3</sup> Columna Waters XBridge C<sub>18</sub> (75 x 4,6 mm, 2,5 μm), MeCN:H<sub>2</sub>O (des de 30:70 fins 100:0 en 8 min). λ = 254 nm.

important canvi en els desplaçaments químics de les senyals corresponents al protó de la posició  $C^2$  ( $\delta$  4,67 o 3,98 ppm) i al metil de l'ester ( $\delta$  3,21 o 3,74 ppm) (Figura 1.5). Les variacions en els desplaçaments químics són degudes a l'efecte d'anisotropia de l'anell de benzè que apantalla al metil en el producte *endo* ( $\delta$  3,21 ppm) i al protó en el producte *exo* ( $\delta$  3,98 ppm), que, tal i com es pot veure en la Figura 1.5, cauen en la zona diamagnètica creada per les corrents d'anell.<sup>4</sup> Així s'ha determinat l'estereoquímica del producte obtingut per la ruta A com *endo-8c*, i l'obtingut pel camí B, *exo-8c*. El mateix fet s'ha comprovat en les parelles de compostos **8a** i **8b** (entrades 1 i 2). En els diastereòmers **8a**, aquest canvi es veu en els desplaçaments químics de les senyals corresponents al metil ester i el protó alfa, les quals s'han trobat en  $\delta$  3,17 i 4,61 ppm, respectivament, en el producte *endo* i en  $\delta$  3,75 i 3,87 ppm, respectivament, en el producte *exo*. En els **8b**, el desplaçament químic corresponent al *terc*-butil ester varia entre  $\delta$  1,08 i 1,45 ppm, i el del protó alfa entre  $\delta$  4,47 i 3,75 ppm, per a *endo*- i *exo-8b*, respectivament.



**Figura 1.5.** Comparació dels desplaçaments en els productes *endo/exo-8c* i simulació 3D dels isòmers.<sup>5</sup>

<sup>4</sup> N.H. Martin, N.W. Allen III, K.D. Moore, L. Vo *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **1998**, 454, 161

<sup>5</sup> Model 3D de Br-HPI calculat amb Gaussian® 03W V 6.0 (Gaussian Inc.) i construït amb ChemBio3D V 11.0 (CambridgeSoft).

La relació *endo:exo* dels compostos **8d-8k**, que sols s'han sintetitzat per un camí, s'ha determinat per combinació de les dades obtingudes en  $^1\text{H-RMN}$  i HPLC. En els compostos **8d**, **8e**, **8g** i **8i**, els desplaçaments químics de les senyals corresponents al substituent i el protó de  $\text{C}^2$  han revelat la presència majoritària de l'isòmer *exo*, però el cromatograma de l'HPLC ha mostrat dos pics que tenen temps de retenció molt pròxims, el mateix espectre d'UV i la mateixa massa; així, la relació *endo:exo* s'ha establert amb les àrees d'aquests pics. L'estereoquímica *exo* dels compostos **8f** i **8k** s'ha determinat pels desplaçaments químics de les senyals del protó alfa i  $\text{R}^3$ . Els espectres de  $^1\text{H-RMN}$  dels compostos **8h** i **8j** han mostrat les senyals corresponents als dos diastereòmers i han permès determinar la seva relació.

### 3 Sistema Trp-HPI

Durant la realització de la present tesi, es sintetitzà el primer producte natural que presenta la unió entre el  $\text{C}^{3a}$  de l'HPI i el  $\text{N}$  d'un indole, la (+)-psicotrimina.<sup>6</sup> La ruta sintètica comença amb la formació de l'enllaç entre els futurs  $\text{N}^1\text{-C}^{3a}$ , utilitzant com a precursors la indolina (**9**) i el 2-bromobenzaldehyd (**10**) a través d'una reacció de Strecker que dóna el nitril **11**. L'elaboració posterior dels dos anells heterocíclics pentagonals proporciona el compost **14**, precursor de la (+)-psicotrimina (Figura 1.6).

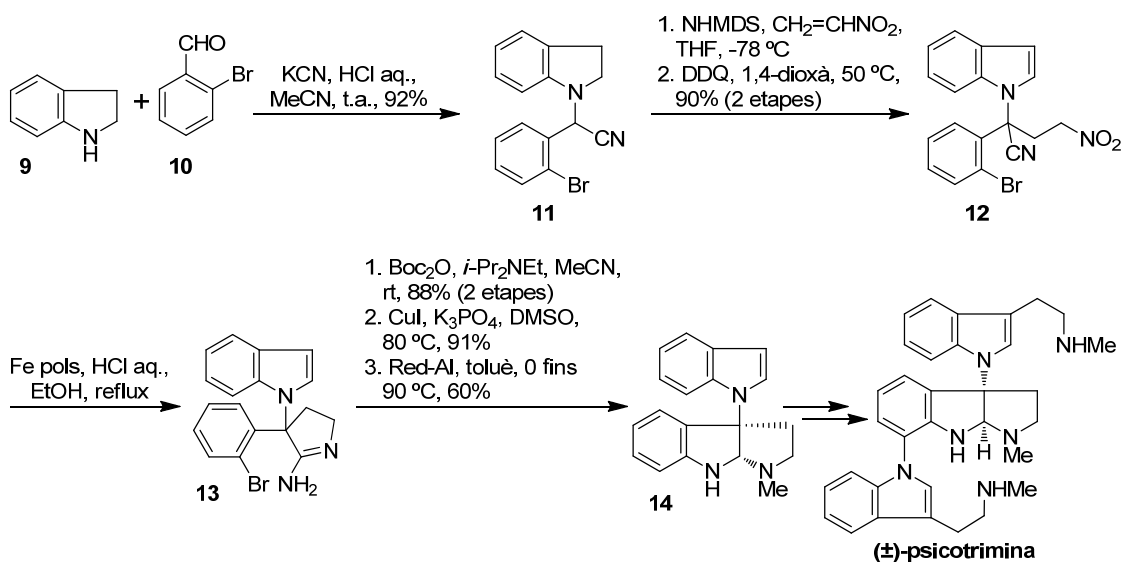
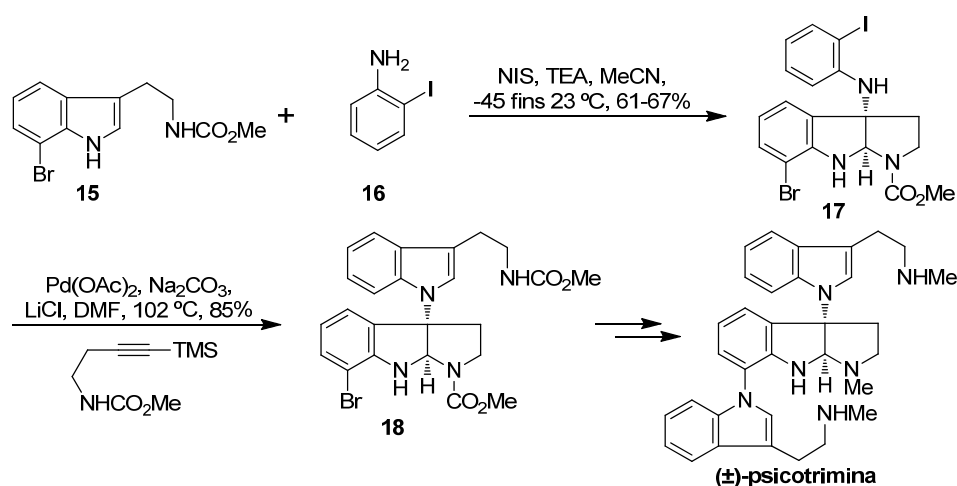


Figura 1.6. Síntesi de **14**, intermedi de la síntesi total de la (±)-psicotrimina.<sup>6</sup>

<sup>6</sup> Y. Matsuda, M. Kitajima, H. Takayama; *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 125

Una segona proposta fou presentada per P.S. Baran i col. casi alhora que el treball comentat de H. Takayama, i per a la síntesi del mateix producte natural.<sup>7</sup> En aquest cas es mostra una elegant reacció entre una triptamina **15** i el N d'una iodoanilina **16** que aconseguix la unió N-C<sup>3a</sup> al mateix temps que forma el sistema HPI **17**. A continuació, la triptamina es fa créixer sobre la iodoanilina emprant un anellatge quimiosselectiu de Larock, fornint **18** (Figura 1.7).<sup>8</sup>



**Figura 1.7.** Síntesi de **18**, intermedi en la síntesi total de la (+)-psicotrimina.<sup>7</sup>

Una aproximació sintètica molt propera a la presentada en aquesta tesi fou publicada per J.D. Rainier i V.R. Espejo, basada en una reacció de substitució nucleòfila entre un derivat de l'indole, nucleòfil, i l'HPI bromat en la posició benzílica, C<sup>3a</sup>.<sup>9</sup> Pel que fa a les condicions de reacció, tant J.D. Rainier<sup>9</sup> com A.R. de Lera<sup>10</sup> conclouen que el KOtBu i el MeCN són la millor combinació de base i dissolvent, respectivament, per arrencar el protó de l'indole d'un anàleg de Trp i dirigir la reacció de substitució nucleòfila cap a la formació de l'enllaç N<sup>i</sup>-C<sup>3a</sup>.

Els productes de partida que s'han emprat en el present treball per formar la unió N<sup>i</sup>-C<sup>3a</sup> són el Br-HPI **8** i un Trp amb N i C protegits. Aquests grups protectors del Trp han de ser ortogonals entre si i amb els grups protectors que porta el Br-HPI, per permetre una reactivitat selectiva del sistema Trp-HPI. A més dels anàlegs de Trp **1**, se n'han sintetitzat dos més que tenen el N<sup>α</sup> del Trp protegit amb una L-Ile, així s'ha buscat una major convergència de la ruta sintètica. Els dipèptids sintetitzats han sigut **19a** i **19b** (Taula 1.8).

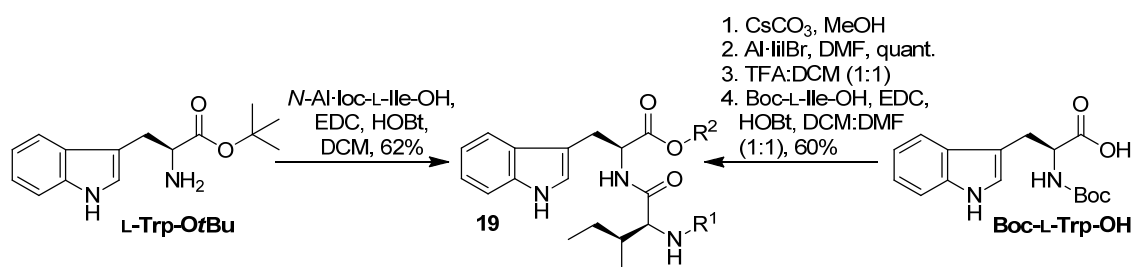
<sup>7</sup> T. Newhouse, P.S. Baran *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 10886

<sup>8</sup> R.C. Larock, E.K. Yum *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 6689

<sup>9</sup> V.R. Espejo, J.D. Rainier *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 12894

<sup>10</sup> C. Pérez-Balado, A.R. de Lera *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 5179

Taula 1.8. Síntesi de 19.



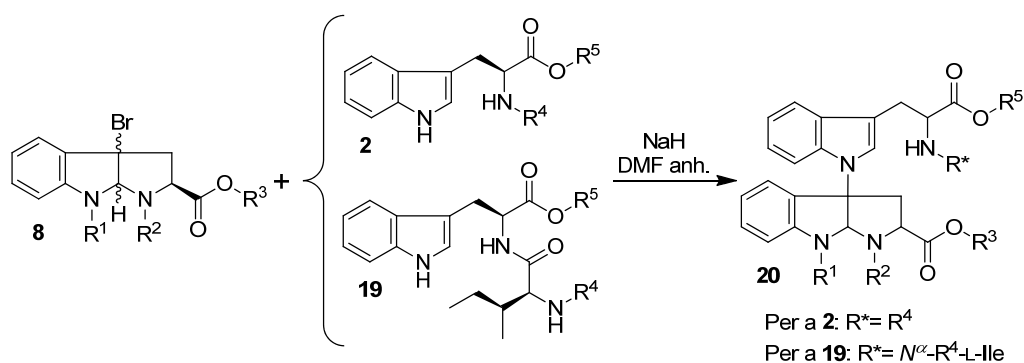
Compost	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Rendiment (%)
<b>19a</b>	Al·loc	<i>t</i> Bu	62
<b>19b</b>	Boc	Al·lil	60

En la present tesi s'han provat diverses combinacions de base i dissolvent, com: NaH i THF, NHMDS i THF, o esponja de protons i THF, inclòs s'han provat les condicions descrites per Rainier i col.;<sup>9</sup> però cap d'elles ha aconseguit millorar els rendiments obtinguts per la combinació de NaH i DMF anhidra (les condicions de sequedat tant del dissolvent com dels reactius són importants per al correcte funcionament de la reacció), escalfant la reacció a 70 °C durant 1,5 hores (més enllà de l'hora i mitja de reacció, el sistema arriba a un equilibri i no avança més). La Taula 1.9 (en la pàgina següent) presenta la reacció entre el Trp i el Br-HPI, i resumeix les combinacions de grups protectors que han donat millors rendiments en aquesta reacció de substitució nucleòfila.

Els millors rendiments de la reacció de substitució nucleofílica els han donat els bromurs **8a** i **8b** (Entrades 1,2 i 4 en la Taula 1.9). Rendiments més moderats han tingut els bromurs **8c** i **8i** (Entrades 5, 6, 11 i 12 en la Taula 1.9). La resta de bromurs **8d**, **8g**, **8h**, **8j** i **8k** han reaccionat amb diferents Trp que contenen dos grups protectors addicionals, però no han donat el producte desitjat.

Els resultats obtinguts amb el dipèptid protegit Ile-Trp (Entrades 1, 4, 8 i 9) són interessants perquè obren un nou camí en la síntesi de productes naturals que contenen pèptids; endemés permet replantejar la síntesi del sistema Trp-HPI, buscant una ruta més convergent al portar la Ile acoblada al Trp o a l'HPI abans de fer la reacció de substitució.

Taula 1.9. Síntesi del sistema Trp-HPI (20).



#	8	2 o 19	8 <sup>[a]</sup>	2 o 19 <sup>[a]</sup>	20 <sup>[a]</sup>	Compost (%) <sup>[b]</sup>
1	<i>endo</i> -8a	19a	-	24	50	<b>20a</b> (41)
2	<i>endo</i> -8a	2a	-	1	91	<b>20b</b> (77)
3	8a	2a	37	9	42	<b>20c</b> <sup>[c]</sup>
4	8b	19b	29	20	48	<b>20d</b> (30)
5	<i>endo</i> -8c	2c	24	21	48	<b>20e</b> (29)
6	8c	2i	62	22	15	<b>20f</b> (22)
7	8c	2e	48	23	3	<b>20g</b> <sup>[c]</sup>
8	8e	19b	49	18	33	<b>20h</b> <sup>[c]</sup>
9	8f	19b	5	40	16	<b>20i</b> <sup>[c]</sup>
10	8f	2f	37	13	5	<b>20j</b> <sup>[c]</sup>
11	8i	2a	49	22	29	<b>20k</b> (20)
12	8i	2e	66	11	24	<b>20l</b> (21)

[a] Percentatge de cada compost en el cru de reacció, mesurat per HPLC.<sup>3</sup> [b] Rendiment de compost aïllat. [c] Compost caracteritzat per HPLC<sup>3</sup> i ESI+.

Cal mencionar la reacció entre el bromur **8k** i **2e** que ha donat l'inesperat compost **21** amb les condicions emprades per a la substitució nucleòfila. Aquest producte s'ha caracteritzat amb espectres mono- i bidimensionals d'RMN i HRMS. Les dades espectrals del compost **21** indiquen que no hi ha Br ni el protó  $\alpha$  del Trp, a més, els dos protons del ciclopropà CH<sub>2</sub> (2d,  $J = 15,4$  Hz, a  $\delta$  3,43 i 3,91 ppm) sols presenten una constant d'acoblament geminal. D'altra banda, el diferent desplaçament químic que presenta el protó  $\alpha$  de l'Ala en els compostos **8k** ( $\delta$  5,02 ppm) i **21** ( $\delta$  4,11 ppm) es pot deure a els diferent efectes electrònics de cada compost. Un mecanisme hipotètic que pot seguir **8k** per transformar-se en **21** comença amb la desprotonació del C<sup>2</sup> de l'HPI, permès per les condicions bàsiques de la reacció, seguit d'un desplaçament intramolecular del Br i formació del ciclopropà. La alta tensió del sistema **B** podria originar l'obertura de l'aminal i posterior ciclació, formant un ciclohexà més relaxat (Figura 1.8).

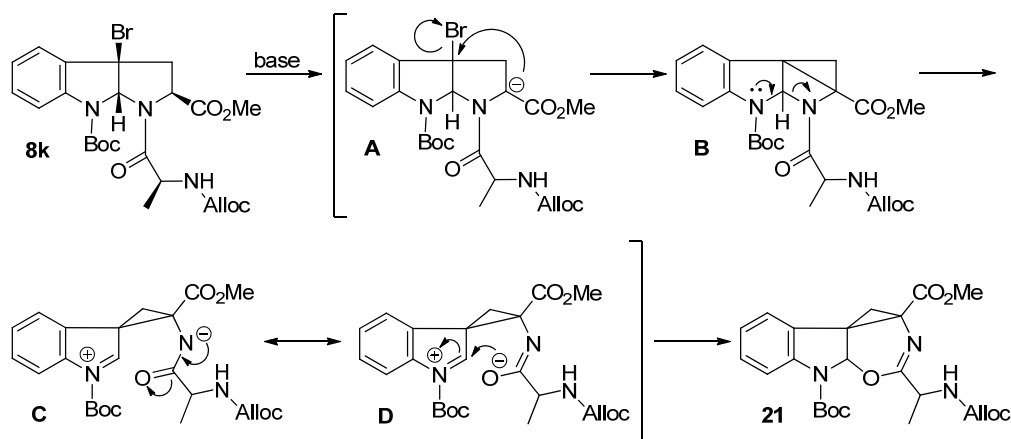


Figura 1.8. Mecanisme proposat per a la formació de **21**.

Els compostos **20a**, **20b**, **20d**, **20e**, **20f**, **20k** i **20l** s'han aïllat i caracteritzat amb espectres d'RMN, IR i masses exactes; la forma més ràpida per comprovar que són el compost desitjat es trobar les senyals d'RMN corresponents al grups protectors (Figura 1.9 i 1.10). Com a senyal representativa i indicativa de la substitució està el desplaçament químic del carboni quaternari  $C^{3a}$ , el què en **20** ( $\delta$  72,4-82,2 ppm) es troba més desapantallat que en el bromur **8** ( $\delta$  53,7-67,9 ppm). Tanmateix la reacció s'ha seguit amb un HPLC-PDA perquè **20** té un temps de retenció i un espectre d'UV diferent dels productes de partida; d'aquesta manera, juntament a un espectre masses ionitzat amb ESI+, s'han caracteritzat els compostos **20c**, **20g**, **20h**, **20i** i **20j**.

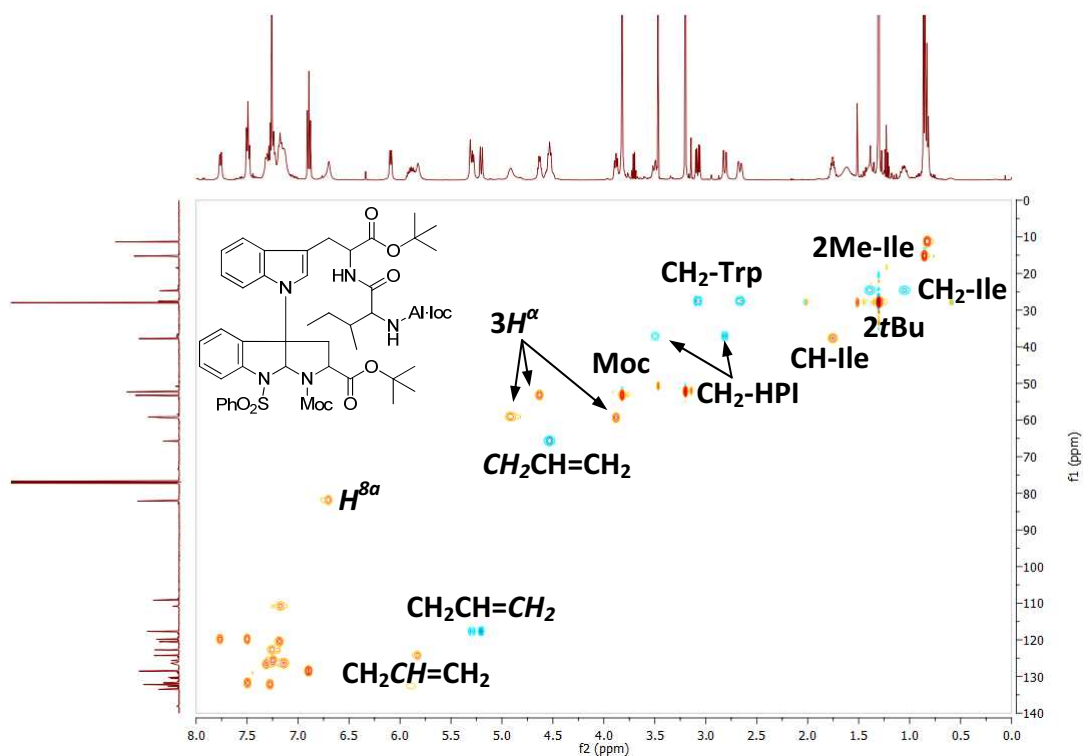


Figura 1.9. Espectre de correlació gHSQC de **20a**.



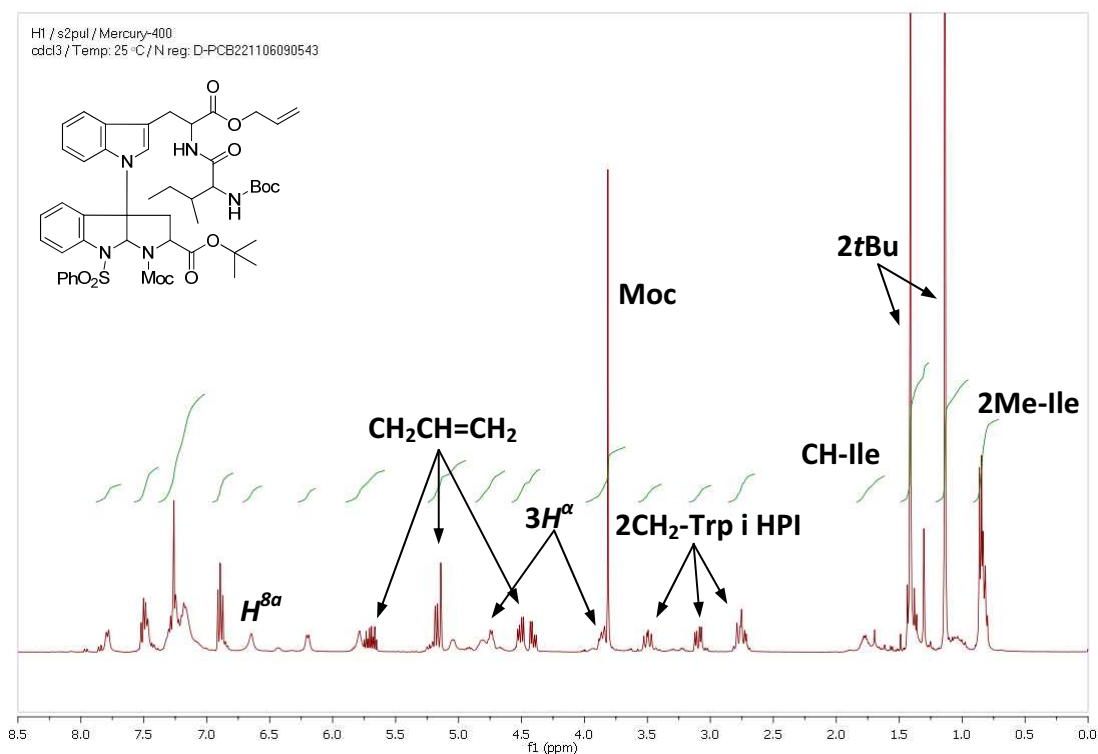


Figura 1.10. Espectre d' $^1\text{H}$ -RMN del compost **20d**.

En aquest capítol s'han desenvolupat les passes prèvies a la formació de l'anell A de la mayotlida. D'una banda s'han comparat els dos camins possibles per l'obtenció del Br-HPI, sent conscients que cada ruta condueix a un diastereòmer diferent, i escollint els grups protectors que major rendiment donen i, alhora, són els més idonis per continuar la síntesi del sistema Trp-HPI. També, s'han optimitzat les condicions de la reacció de formació de l'enllaç  $\text{C}^{3\alpha}$ -N; s'han estudiat els grups protectors que permeten la reacció i són els més adequats per continuar amb la síntesi de la mayotlida. Els compostos **20a**, **20f** i **20h** contenen cinc grups protectors ortogonals; altres compostos com **20d**, **20e**, **20g**, **20i** i **20j** contenen quatre grups protectors ortogonals perquè: bé perquè el següent pas de la via sintètica seria la desprotecció simultània dels dos grups que no són ortogonals, o bé, perquè la desprotecció simultània dels grups Boc en les posicions  $\text{N}^1$  i  $\text{N}^8$  forneix dues amines amb una reactivitat diferenciada.<sup>11,12</sup> Finalment, la possibilitat de realitzar la reacció amb la Ile ja enganxada a un dels Trp, permet plantejar una ruta més convergent cap a la formació de l'anell A.

<sup>11</sup> T.M. Kamenecka, S.J. Danishefsky *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 2993

<sup>12</sup> T.M. Kamenecka, S.J. Danishefsky *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 2995

# Capítol 2

## Síntesi Total de la Mayotlida



## 1 Introducció

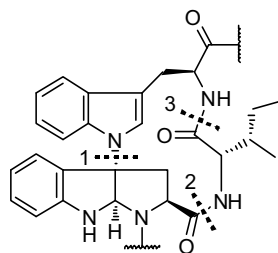
La química dels productes naturals amb unitats HPI enllaçades per la seva posició  $C^{3a}$  al *N*-indòlic d'un Trp ha començat a desenvolupar-se en els darrers anys. El nombre de grups que han estudiat la formació de l'enllaç  $C^{3a}$ -*N* o la síntesi d'un producte natural amb aquesta característica és bastant reduït. L'actualitat del tema juntament amb l'estructura complexa de la mayotlida emfatitza la importància de la seva síntesi.

La síntesi de la mayotlida busca complir dos objectius: un, és la cerca d'un camí sintètic per assolir la mayotlida sense haver de recórrer a l'extracció de la seva font natural; dos, la confirmació de l'estructura i l'estereoquímica proposades per a la mayotlida.

En aquest capítol s'aborda la segona part de la síntesi de la mayotlida: la formació i l'estereoquímica de l'anell A, la síntesi de la cadena pentapeptídica i el tancament de l'anell B.

## 2 Síntesi i estereoquímica de l'anell A

L'anell A de la mayotlida està compost per tres aminoàcids que estan units per dos enllaços peptídics i un enllaç  $C^{3a}$ -*N*. En aquesta tesi s'han estudiat tres vies alternatives de macrociclació utilitzant els esmentats enllaços com a possibles punts de ciclació de l'anell A (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Punts de tancament de l'anell A.

## 2.1 Cicllació per l'enllaç Trp-HPI

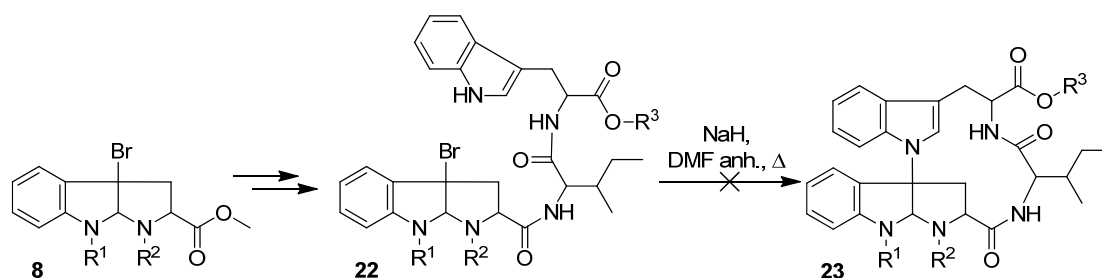
Els assajos de ciclació de l'anell A pel punt d'unió entre l'HPI i el Trp s'han estudiat en dissolució i en fase sòlida, emprant la metodologia desenvolupada en l'anterior capítol per a la formació d'aquest enllaç.

### 2.1.1 En dissolució

Partint del Br-HPI **8e** o **8i** (Veure Capítol 1, Apartat 2.2), s'han acoblat successivament els altres dos aminoàcids que constitueixen l'anell A per proporcionar el corresponent compost **22** (Taula 2.1). La síntesi de **22a** ha començat amb la hidròlisi de l'èster metílic de **8e** en medi bàsic de LiOH, seguit de l'acoblament de la L-Ile-OAl·lil, emprant EDC i HOBT com a agents d'acoblament, després s'ha desprotegit l'àcid de la Ile amb PhSiH<sub>3</sub> i Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> i s'ha acoblat el L-Trp-OMe amb EDC i HOBT, obtenint un cru que s'ha purificat amb columna cromatogràfica de gel de sílice i ha proporcionat **22a** amb un 34% de rendiment global. D'altra banda, **8i** ha sigut el producte de partida de la síntesi de **22b**. Així, s'ha preparat el dipèptid L-Ile-L-Trp-OBn, a partir de l'acoblament de la N<sup>α</sup>-Boc-L-Ile sobre el L-Trp-OBn amb EDC i HOBT, i posterior eliminació del grup Boc en un medi àcid de TFA. Paral·lelament, s'ha hidrolitzat l'èster metílic de **8i** i se li ha acoblat el dipèptid L-Ile-L-Trp-OBn, emprant EDC i HOBT com a agents d'acoblament; després de la purificació s'ha obtingut **22b** amb un 35% de rendiment. Els compostos **22a** (Figura 2.2) i **22b** (Figura 2.3) s'han caracteritzat amb espectres de masses i d'RMN.

Ambdós compostos, **22a** i **22b**, s'han sotmès a les condicions de reacció estudiades per a la substitució nucleòfila, però els assajos no han permès obtenir l'anell A **23**.

**Taula 2.1.** Reacció de substitució nucleòfila per intentar proporcionar l'anell A **23**.



8	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	22	R <sup>3</sup>
e	PhSO <sub>2</sub>	Cbz	a	Me
i	Boc	Boc	b	Bn

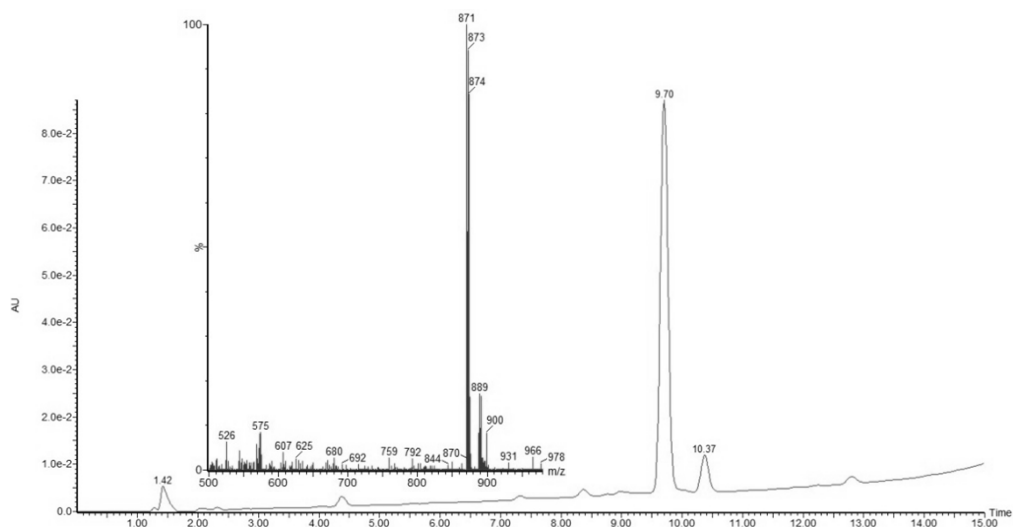


Figura 2.2. Cromatograma<sup>1</sup> d'HPLC i espectre de masses de **22a**.

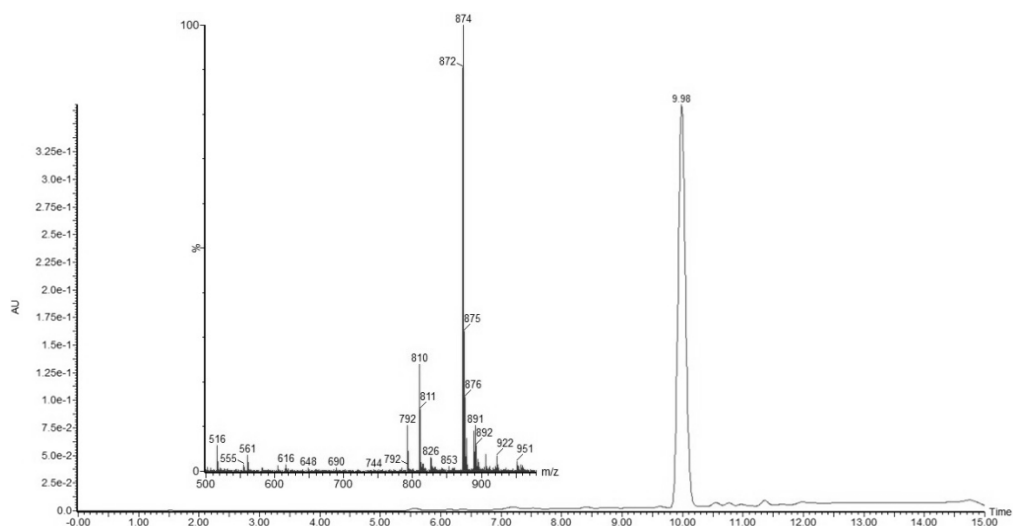


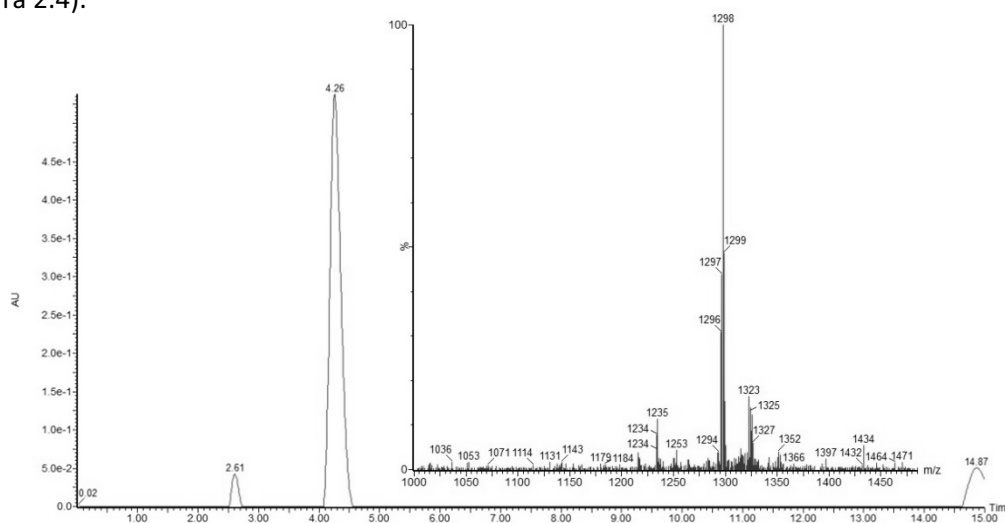
Figura 2.3. Cromatograma<sup>1</sup> d'HPLC i espectre de masses de **22b**.

### 2.1.2 En fase sòlida

Proves semblants a les descrites en l'anterior apartat s'han desenvolupat en fase sòlida. En aquest cas, s'ha sintetitzat la seqüència peptídica de l'anell B manualment sobre la resina 2-clorotritil, amb una funcionalització d'1 mmol/g, s'ha seguit una estratègia d'Fmoc-aminoàcid, escollint l'EDC i la DIPC com a agents d'acoblament, i emprant un excés de 3 equivalents. El Br-HPI ha sigut l'últim aminoàcid en acoblar-se amb les mateixes condicions de reacció que els anteriors. A continuació, s'ha pres una petita quantitat de resina **24** per escindir el peptid

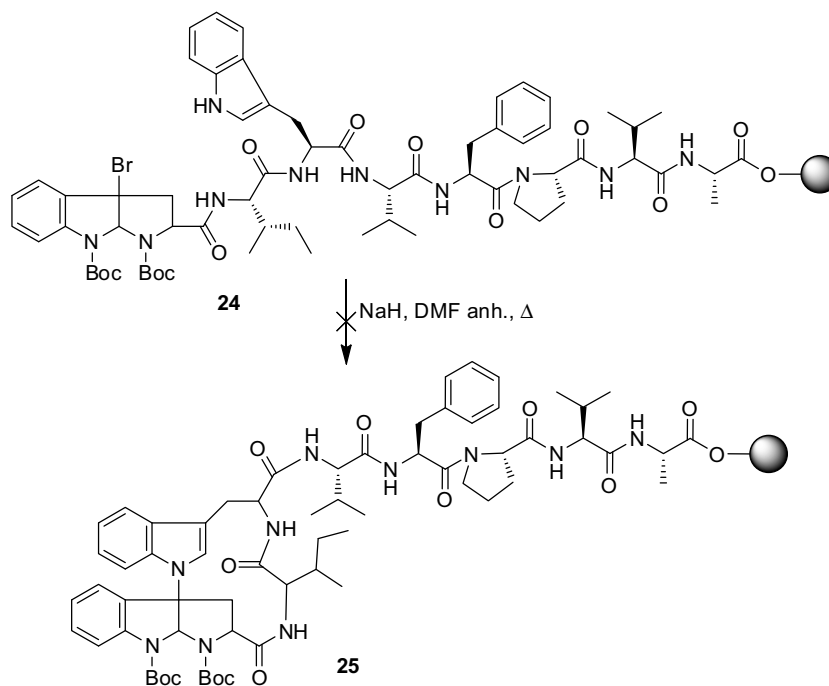
<sup>1</sup> Columna Symmetry C18 (5 µm, 4,6 x 150 mm) MeCN:H<sub>2</sub>O gradient des de 50:50 fins to 100:0 en 15 minuts. λ= 254 nm.

sintetitzat i comprovar la seva puresa en un HPLC, abans de continuar fent assajos amb ell (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Cromatograma<sup>2</sup> d'HPLC i espectre de masses del pèptid escindit de **24**.

Aleshores, el pèptid ancorat a la resina s'ha sotmès a les condicions optimitzades de la reacció de formació de l'enllaç C<sup>3a</sup>-N: DMF anhidra i escalfant a 70 °C; s'han provant diferents excessos de NaH, aplicant-los en tractaments de 30 minuts. Lamentablement, aquests intents per formar l'anell A no han resultat amb el producte desitjat **25** (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Prova de ciclació de l'anell A en fase sòlida.

<sup>2</sup> Columna Symmetry C18 (5 μm, 4,6 x 150 mm) MeCN:H<sub>2</sub>O gradient des de 70:30 fins to 80:20 en 15 minuts. λ= 220 nm.

## 2.2 Cicllació per l'enllaç Ile-HPI

Aquesta aproximació a la síntesi de la mayotlida parteix del compost **20d** (Veure Capítol 1, Apartat 3) i consisteix en la macrociclació per formació de l'enllaç amida entre el  $N^{\alpha}$  de la Ile i l'àcid de la posició 2 de l'HPI. **20d** s'ha tractat amb una barreja de TFA:DCM (1:1) per eliminar alhora el grup Boc de la Ile i l'èster *tert*-butílic de l'HPI; el producte resultant d'aquesta reacció, directament, s'ha dissolt en una barreja de DCM:DMF (9:1), amb suficient quantitat per tenir una concentració de 3 mM, i s'han afegit HOAt, PyAOP i DIEA. Després de 18 h de reacció s'ha obtingut un cru que s'ha purificat amb un columna  $C_{18}$  i ha fornit **26** amb un rendiment del 45% (Figura 2.6). El compost **26** ha mostrat dos pics en el cromatograma d'HPLC, els quals tenen temps de retenció similars, idèntics espectres d'UV i mateixa massa. L'experiment de RMN de gHSQC ha estat la principal eina per caracteritzar el compost **26**; ha permès identificar els metils de la Ile, els  $CH_2$  corresponents al Trp i de l'HPI, el metil del grup Moc, els protons alfa dels tres aminoàcids, el  $H^{8a}$  i les senyals pertanyents a l'al·lil (Figura 2.7).

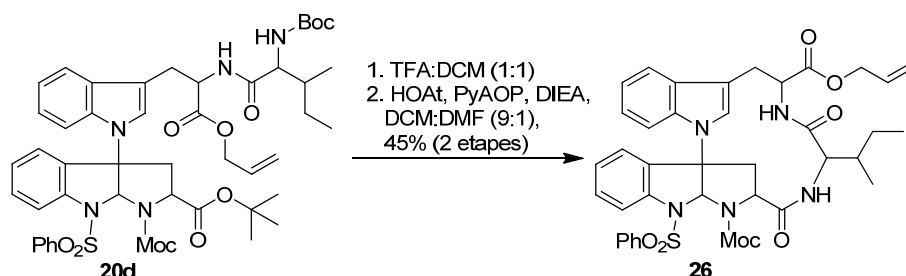


Figura 2.6. Cicllació de l'anell A **26**.

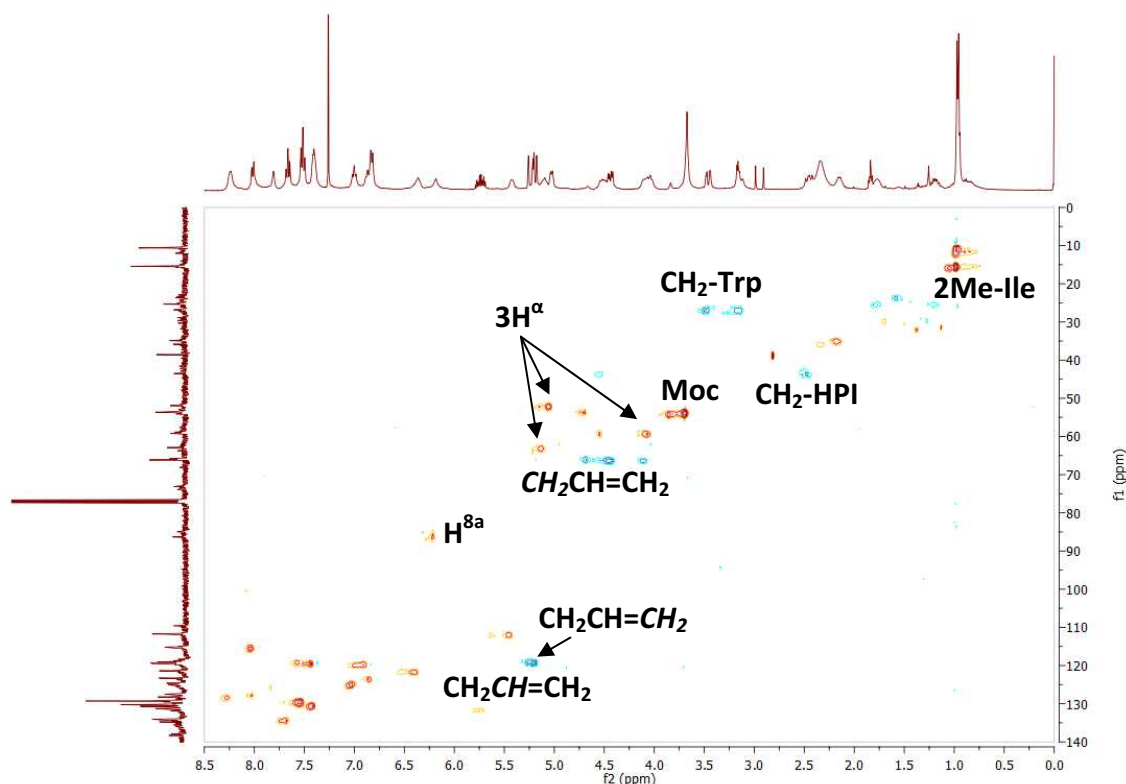


Figura 2.7. Espectre de correlació gHSQC del compost **26**.



## 2.3 Cicllació per l'enllaç Trp-Ile

Un nou intent de síntesi de la mayotlida comença amb l'elecció del bromur **8i** perquè s'ha obtingut amb un bon rendiment i té les dues amines protegides amb el mateix grup protector, que poden ser desprotegides alhora just abans de l'última macrociclació per obtenir la mayotlida. Com ja s'ha comentat en el Capítol 1, una vegada desprotegides ambdues amines tenen diferent reactivitat, perquè una pertany a una amina secundària, mentre que  $N^8$  és una anilina. Així, partint del **8i**, s'ha hidrolitzat l'èster metílic i s'ha acoblat la Ile, emprant HBTU com a agent d'acoblament, DIEA com a base i DCM com a dissolvent, fornint **27** (Figura 2.8).

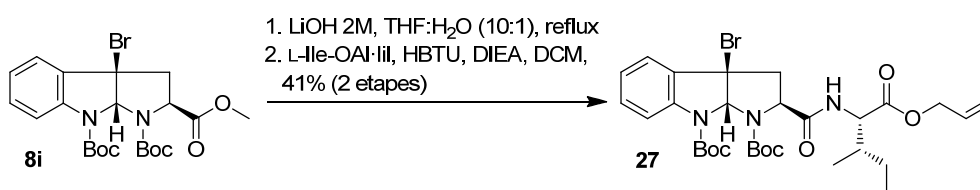


Figura 2.8. Síntesi de **27**.

D'altra banda, la presència d'un grup protector com la ftalimida protegint l'amina del Trp permet dirigir cap al  $N$  de l'indole la reacció entre el Trp i la base escollida. D'aquesta manera, **2e** reacciona amb NaH, emprant DMF anhidra com a dissolvent, i després s'ha afegit **27**. La mescla de reacció s'ha escalfat a 70 °C durant 1,5 hores; transcorregut aquest temps, la reacció no ha avançat més. Llavors, el cru obtingut s'ha purificat amb una columna cromatogràfica de gel de sílice, emprant una barreja d'hexà:EtOAc (70:30), i ha fornint **28** amb un rendiment del 30% (Figura 2.9), el qual s'ha caracteritzat amb espectres d'RMN i masses. El cromatograma d'HPLC de **28** ha presentat quatre pics amb temps de retenció molt pròxims (Figura 2.10), idèntics espectres d'UV i mateixa massa. Aquests pics poden correspondre a distints isòmers del compost **28** que es deuen a la presència de la Ile enganxada en el  $C^2$  del Br-HPI, ja que sols s'han obtingut dos pics quan s'ha trobat un metil ester en aquesta posició. Probablement, al emprar el bromur **27** s'han produït no sols els isòmers *endo* i *exo*, sinó també l'epimerització del  $C^\alpha$  de la Ile. Davant la impossibilitat d'aïllar els quatre compostos, s'ha decidit continuar endavant en la via sintètica amb la barreja d'isòmers.

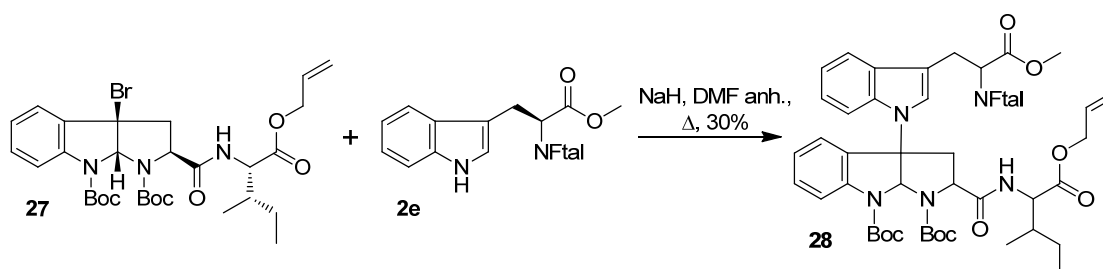
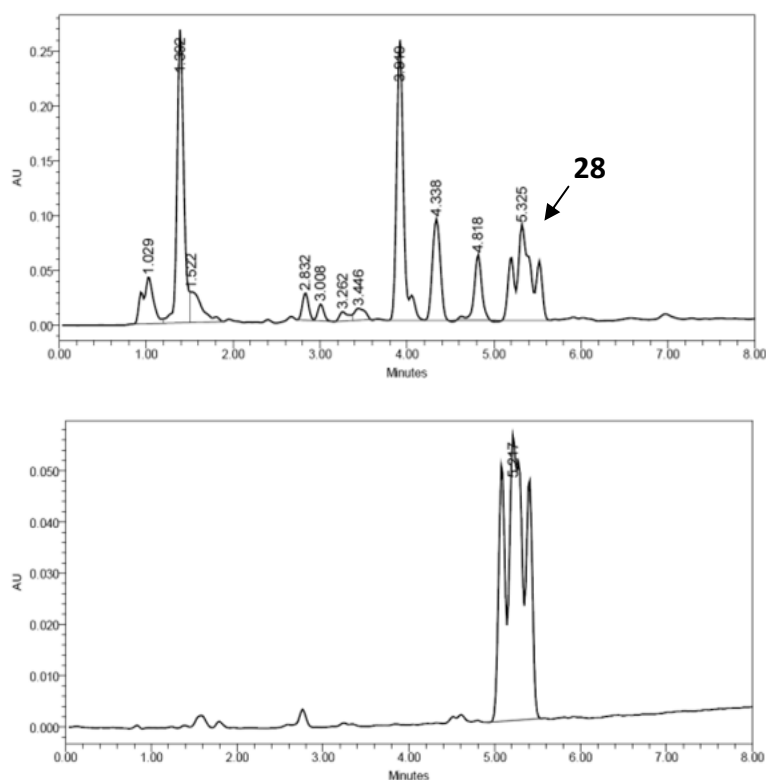


Figura 2.9. Síntesi de **28**.



**Figura 2.10.** Cromatogrames<sup>3</sup> del cru de la reacció de substitució (superior) i de la purificació de **28** (inferior).

La desprotecció de l'amina per eliminació del grup ftalimida s'ha assolit al tractar un dissolució de **28** en EtOH abs. amb una dissolució  $\text{H}_2\text{NNH}_2$  1M en THF. Sense purificar, s'ha desprotegit l'àcid carboxílic de la lle amb  $\text{PhSiH}_3$  i  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ . El compost desprotegit s'ha sotmès directament a la macrociclació per construir l'anell A, la qual s'ha aconseguit amb PyAOP i HOAt, com a agents d'acoblament, i DIEA en una solució molt diluïda (3 mM) de DCM:DMF (9:1). Després de 23 hores de reacció a temperatura ambient i la purificació amb una columna  $\text{C}_{18}$ -semipreparativa, amb un gradient d'eluent MeCN: $\text{H}_2\text{O}$ , s'ha obtingut **29** amb 37% de rendiment (Figura 2.11). El cromatograma d'HPLC de l'anell A després de la primera purificació presenta quatre pics que corresponen a distints isòmers de l'anell A (Figura 2.12, superior). Una segona purificació, novament amb una columna  $\text{C}_{18}$ -semipreparativa, ha permès aïllar un d'aquests isòmers (Figura 2.12, inferior) i estudiar la seva estereoquímica.

<sup>3</sup> Waters SunFire  $\text{C}_{18}$  (100 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ). Gradient MeCN: $\text{H}_2\text{O}$  des de 70:30 fins 100:0 en 8 min,  $\lambda=254$  nm.

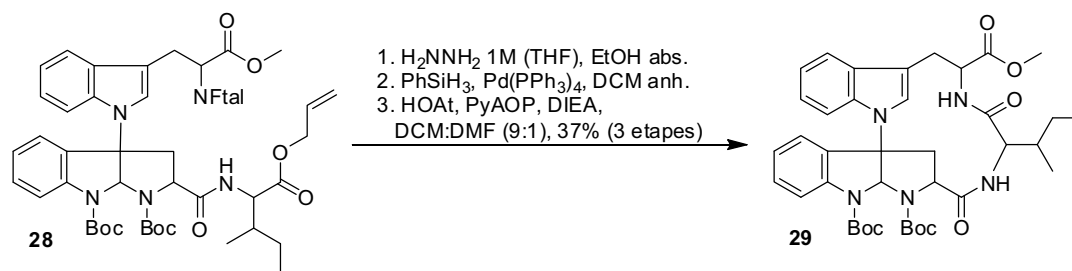


Figura 2.11. Eliminació de la ftalimida i l'al·lil de **28** i formació de l'anell A **29**.

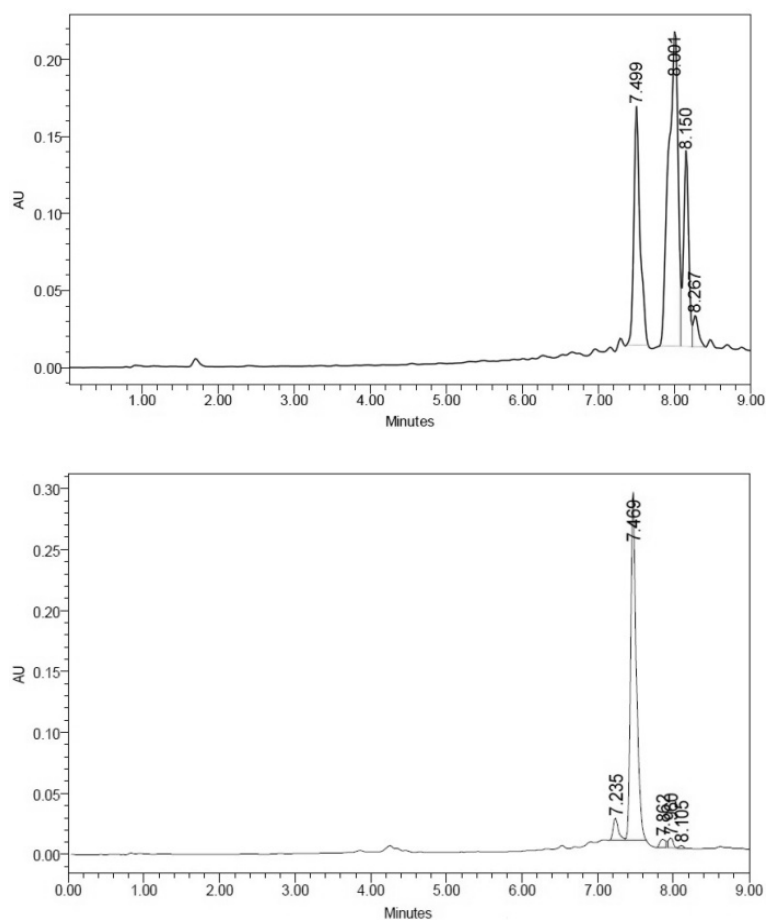


Figura 2.12. Cromatogrames<sup>3</sup> d'HPLC de l'anell A després de la primera purificació (superior) i de **29** després de la segona purificació (inferior).

## 2.4 Estereoquímica de l'anell A

L'estereoquímica del producte **28** no fou estudiada, però es coneix la configuració dels productes de partida i s'ha estudiat la configuració del producte **29**, mitjançant espectres monodimensionals de NOE que irradiaven en el protó de la posició  $\text{C}^2$  de l'HPI. Aquests experiments han permès veure que existeix NOE entre els protons de les posicions  $\text{C}^2$  i  $\text{C}^{8a}$ ;

aquest NOE es indicatiu d'una estereoquímica trans entre els substituents de les posicions  $C^2$  i  $C^{3a}$  de l'HPI. També s'observa NOE entre el protó del  $C^2$  i un dels protons de la posició  $C^3$  i un dels protons del  $CH_2$  de la lle (Figura 2.13). Així doncs, la configuració del Br-HPI **8i** ha canviat al llarg d'aquests processos de reacció per a l'obtenció de l'anell A amb el substituent *endo* en el  $C^2$  de l'HPI.

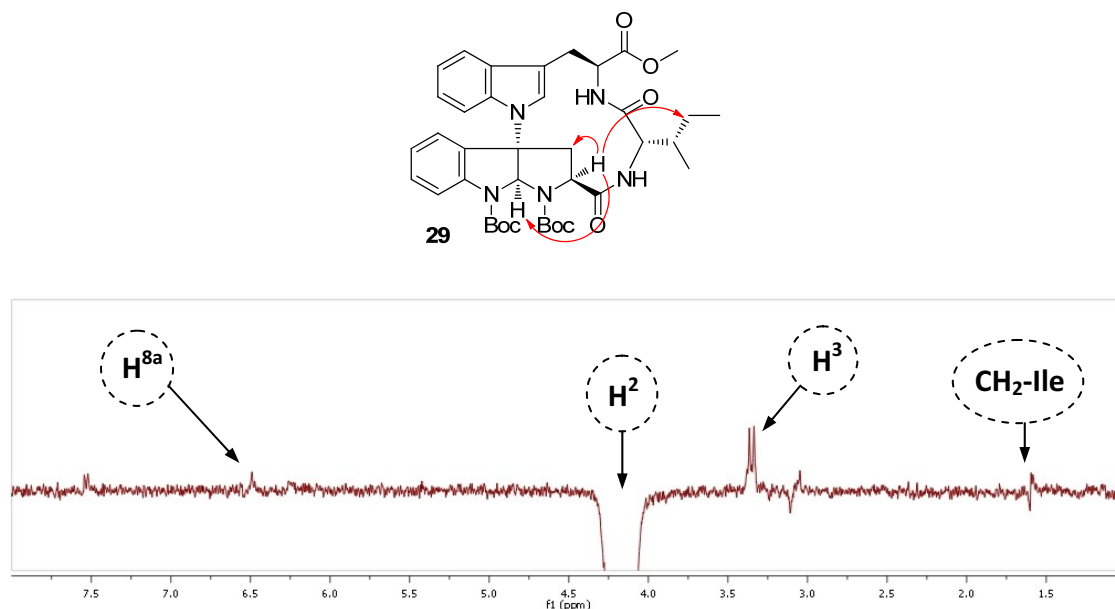


Figura 2.13. Senyals de NOE vistes per al protó de  $C^2$  de l'HPI en el producte **29**.

### 3 Síntesi de la cadena pentapeptídica

Paral·lelament a la síntesi de l'anell A, s'ha preparat la cadena pentapeptídica que forma part de l'anell B de la mayotlida. La síntesi en fase sòlida ha sigut el mètode escollit per a obtenir aquest pèptid, perquè és la forma més ràpida, eficient i neta per sintetitzar aquesta classe de pèptids.

La resina escollida ha sigut el clorur de 2-clorotritil (**30**) i s'ha seguit una estratègia d'Fmoc-aminoàcid per elongar el pèptid; amb l'EDC i la DIPC com a agents d'acoblament. Els excessos d'aminoàcid han sigut de tres equivalents per cadascú i els tractaments d'acoblament han durat dues hores. Després de cada acoblament s'ha realitzat el test de la ninhidrina o del cloranil (segons correspongui) per comprovar que no quedava aminoàcid desprotegit ancorat a la resina. Així, començant per la Fmoc-L-Ala i continuant amb la Fmoc-L-Val, la Fmoc-L-Phe, la Fmoc-L-Pro i, l'últim, la Boc-L-Val s'ha obtingut la seqüència desitjada (Figura 2.14). El procés es pot seguir fàcilment amb un HPLC-MS, per a lo qual s'han de prendre petites mostres de la

resina i escindir el pèptid intermedi. A la fi, la resina s'ha tractat amb 1% TFA:DCM per escindir el pèptid **32**; l'àcid del qual s'ha protegit formant l'ester al·lílic **33** en dissolució. La presència de les senyals de l'al·lil i el *terc*-butil en l'espectre d'<sup>1</sup>H-RMN, juntament amb la massa donada per ESI+, ha permès una ràpida identificació del compost **33** (Figura 2.15). Després **33** s'ha dissolt amb TFA:DCM (1:1) per eliminar el grup Boc i s'ha obtingut **34**, que s'ha d'acoblar sobre l'anell A.

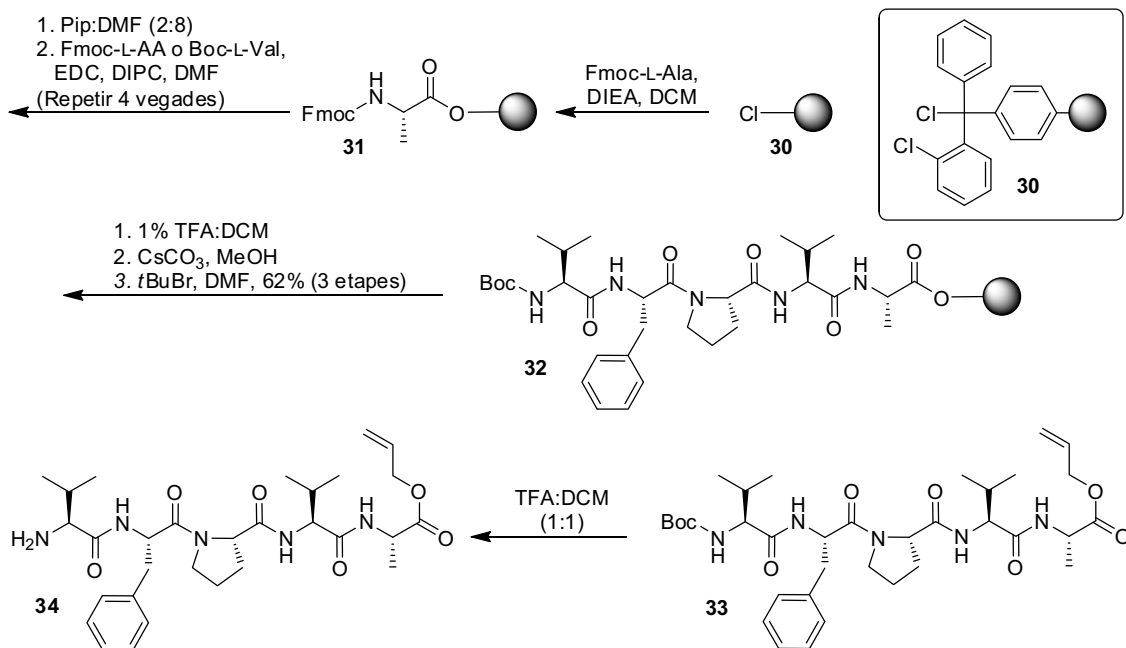


Figura 2.14. Síntesi en fase sòlida i solució de **34**.

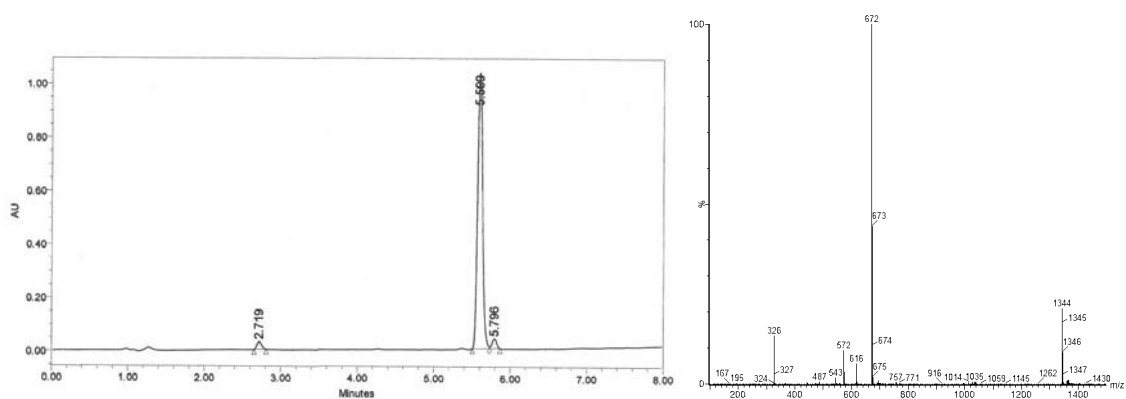


Figura 2.15. Cromatograma<sup>4</sup> i espectre de masses de **33**

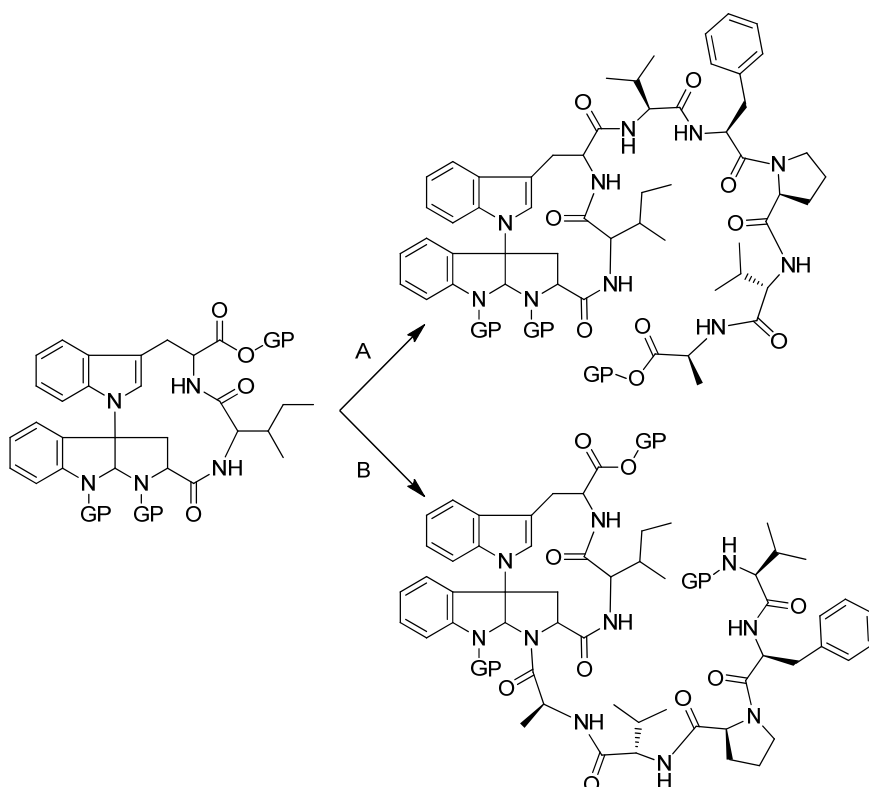
Una vegada aconseguida la síntesi d'aquesta cadena peptídica manualment, s'ha adaptat el procés per realitzar-lo en un sintetitzador automàtic de pèptids assistit per microones. Així, primer s'ha acoblat manualment la Fmoc-L-Ala a la resina **30** i després s'ha portat al

<sup>4</sup> Waters SunFire C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 3,5 μm). Gradient MeCN:H<sub>2</sub>O des de 30:70 fins 100:0 en 8 min, λ= 220 nm.

sintetitzador on s'ha elongat el pèptid, emprant HBTU i DIEA per a realitzar els acoblaments. El sintetitzador automàtic realitza acoblaments de duració més curta que quan es realitzen manualment, reduint així, el temps total necessari per obtenir el pèptid; a més, permet a l'investigador desenvolupar uns altres quefers durant el temps que es realitza la síntesi.

#### 4 Cicllació de l'anell B i formació de la mayotlida

Un cop obtinguts l'anell A, compostos **26** o **29**, i la cadena pentapeptídica **34** (Veure Apartats 2.2, 2.3 i 3, respectivament, d'aquest capítol) hi ha dues possibilitats de continuar la síntesi de la mayotlida: fent l'acoblament pel *N*-terminal del pentapèptid sobre l'àcid carboxílic de l'anell A (Opció A) o bé pel *C*-terminal del pentapèptid sobre el *N*<sup>1</sup> de l'HPI (Opció B) (Figura 2.16). Per evitar impediments estèrics en la macrociclació final, s'ha decidit que l'enllaç entre el Trp i la Val és l'òptim per introduir la cadena pentapeptídica en l'anell A.



**Figura 2.16.** Possibilitats d'acoblament de la cadena pentapeptídica sobre l'anell A.

## 4.1 Aproximació sintètica a la mayotlida amb 26. Desprotecció del Moc.

Cronològicament, el primer intent d'aproximació a la síntesi de la mayotlida s'ha realitzat amb **26**. Així, després de l'eliminació del protector al·lil de **26**, el pentapeptid **34** s'ha acoblat sobre l'àcid, emprant HOAt i PyAOP. El cru obtingut s'ha purificat amb una columna C<sub>18</sub>, amb una barreja de MeCN:H<sub>2</sub>O, i ha donat el compost **35** (Figura 2.17), que s'ha caracteritzat amb espectroscòpia de masses i RMN. L'espectre de gHSQC ha mostrat les senyals corresponents als metils de la lle, la Ala i les Val, el CH<sub>2</sub> de l'HPI, el metil del grup Moc, els protons alfa i un CH<sub>2</sub> de l'al·lil (Figura 2.18).

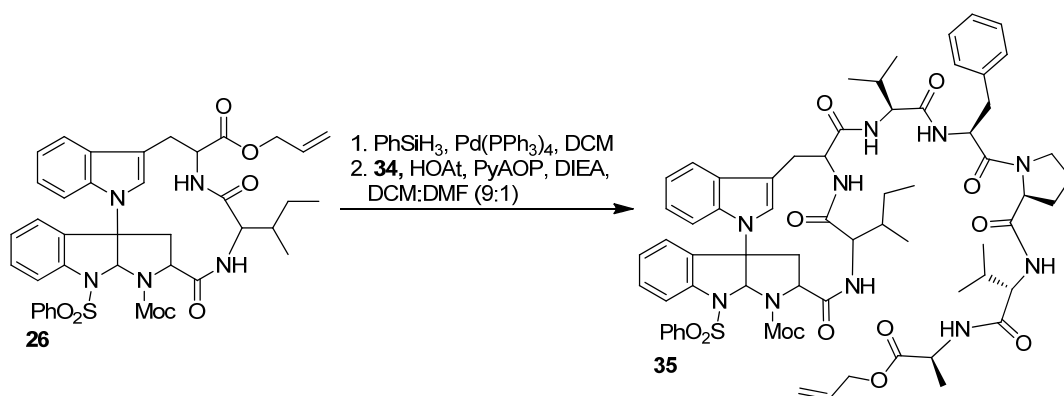


Figura 2.17. Acoblament de la cadena pentapeptídica sobre l'anell A **26**.

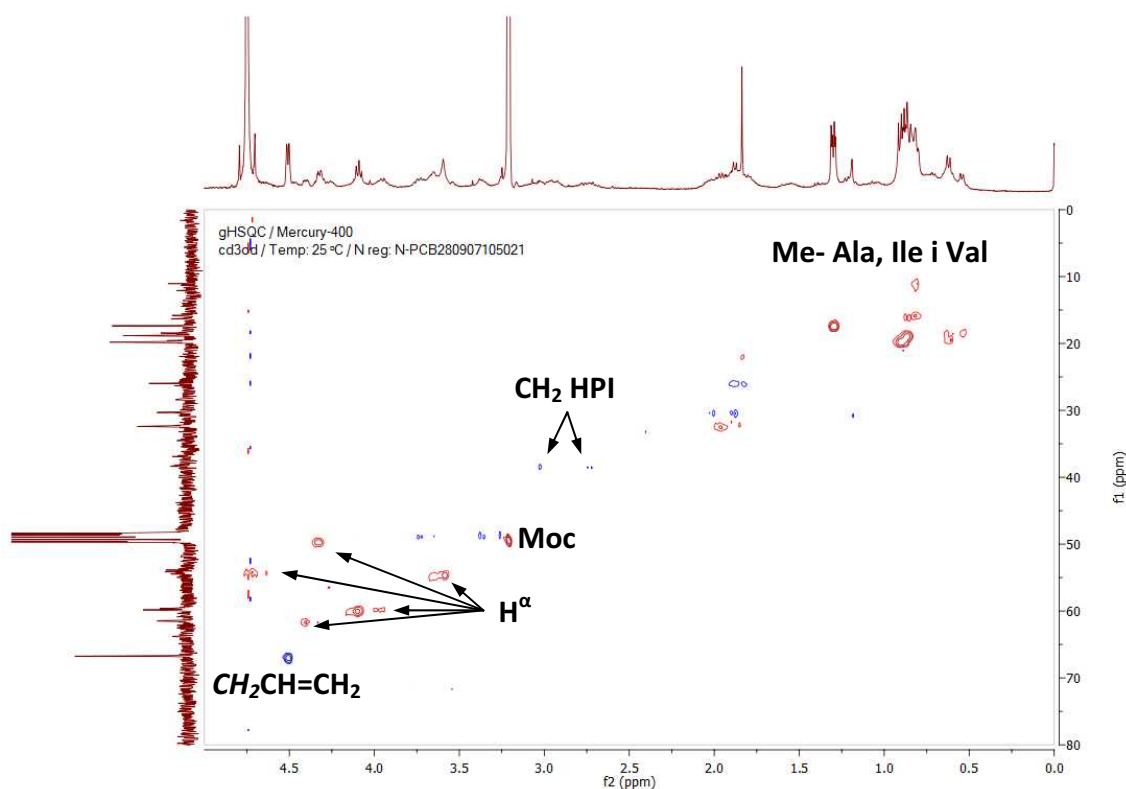
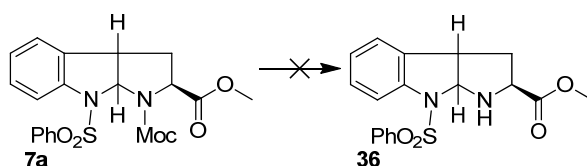


Figura 2.18. Ampliació de l'espectre de correlació gHSQC del compost **35**

Els següents passos de la via sintètica impliquen les desproteccions de l'àcid carboxílic de la cadena peptídica i el  $N^1$  de l'HPI. Però, ha sigut impossible treure el grup Moc de la posició  $N^1$  de l'HPI.

Per a resoldre aquest problema, s'ha intentat posar a punt la desprotecció del  $N^1$ -Moc, utilitzant una molècula sintèticament més accessible com el compost **7a**. S'han provat distints tipus de reaccions: medis bàsics per hidrolitzar el Moc, o distints nucleòfils que acomplexin al Moc i el converteixin en un millor grup sortint. També s'ha assajat amb diversos dissolvents, com THF, dioxà, HMPA, etc., i distintes condicions de reacció, des de temperatura ambient fins escalfar a la temperatura de reflux del dissolvent, o provar reaccions amb el microones. Lamentablement tots els intents han estat infructuosos (Taula 2.2). Aquest entrebanc ha provocat la necessitat de canviar el Moc per un altre grup protector i, per tant, el replantejament de tota la via sintètica.

**Taula 2.2.** Condicions de reacció assajades per la hidròlisi del carbamat de metil **7a**.



Reactius	Dissolvent	T (°C)
<b>LiOH</b>	THF:H <sub>2</sub> O	reflux
	Dioxà:H <sub>2</sub> O	reflux
	MeOH:H <sub>2</sub> O	reflux
	Dioxà:H <sub>2</sub> O	50-150 (MW)
<b>BnSLi</b>		t.a.
<b>LiSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH</b>	HMPA	50
		50-150 (MW)
<b>TMSI</b>	DCM	reflux
	MeCN	reflux

## 4.2 Aproximació sintètica a la mayotlida amb **29**

El compost **29** s'ha emprat per a la darrera aproximació sintètica a la mayotlida. D'aquesta forma, s'ha hidrolitzat l'èster metílic de **29**, per poder acoblar sobre l'àcid lliure el pèptid **34** amb la 2-ciano-2-hidroximinoacetat d'etil, PyOxP i DIEA en una mescla de DCM:DMF (1:1). Després de 4,5 hores, s'ha parat la reacció. El cru s'ha purificat amb una columna C<sub>18</sub>, per obtenir **37** (Figura 2.19), que fou caracteritzat per RMN i masses d'alta resolució. En els espectres d'RMN de correlació <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (Figura 2.20) s'han identificat les senyals corresponents



als metils de la Ile, Ala i Vals, els *terc*-butils dels grups Boc, el CH<sub>2</sub> de l'HPI, fins quatre protons alfa, els CH<sub>2</sub> de l'al·lil i el protó de la posició C<sup>8a</sup> de l'HPI; així s'ha continuat amb la via sintètica.

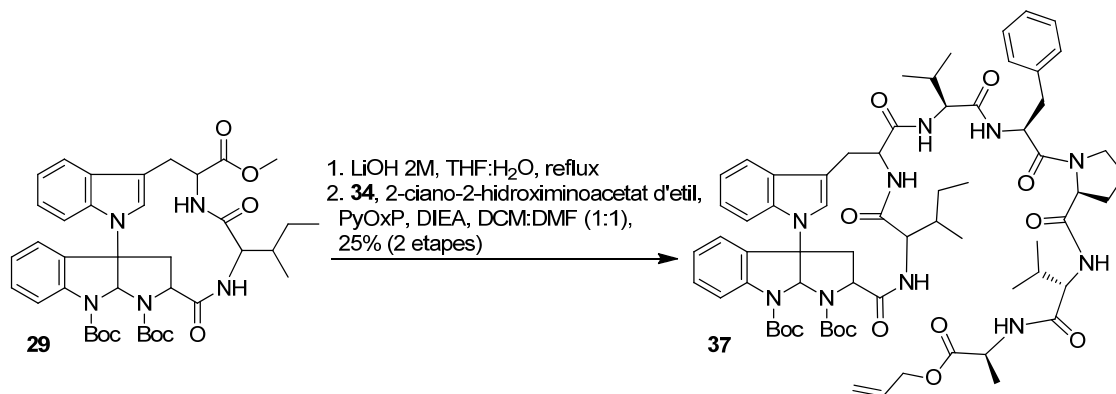


Figura 2.19. Acoblament de la cadena pentapeptídica en l'anell A **29**.

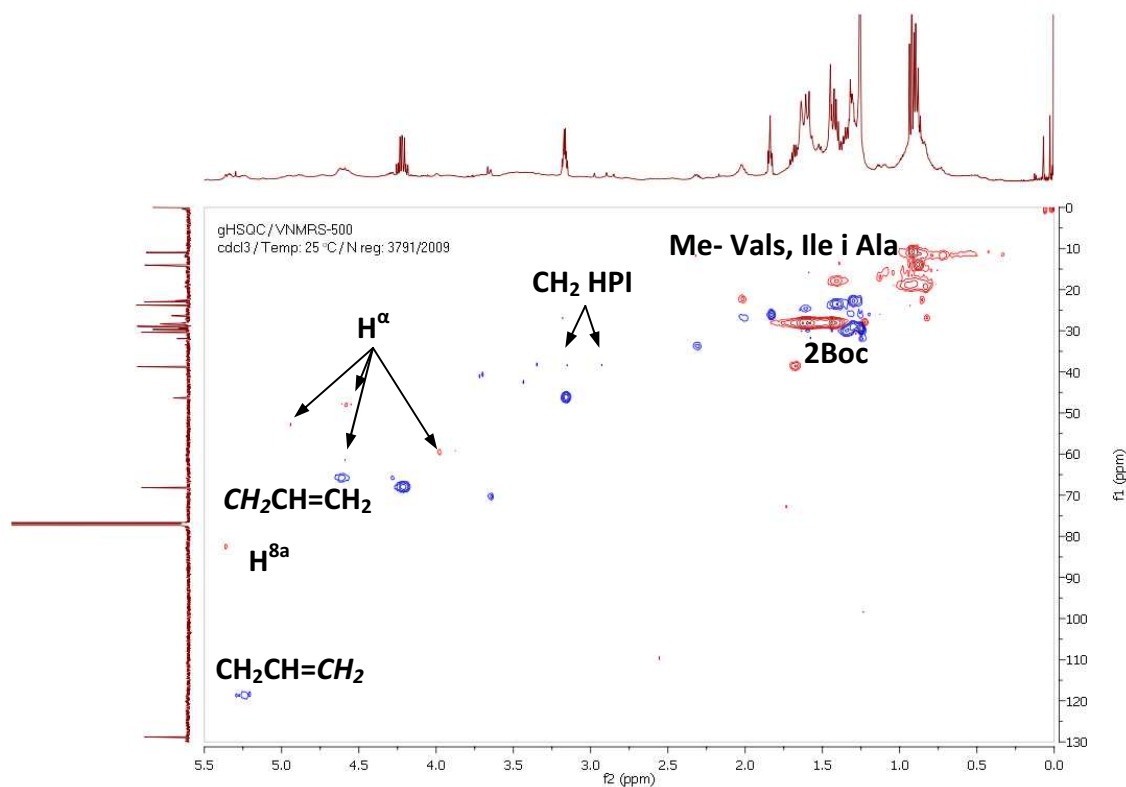
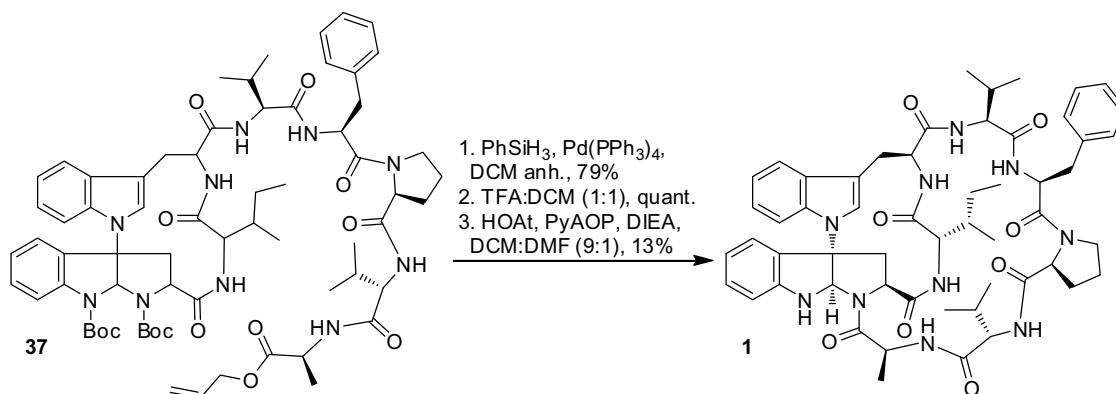


Figura 2.20. Ampliació de l'espectre de correlació gHSQC de **37**.

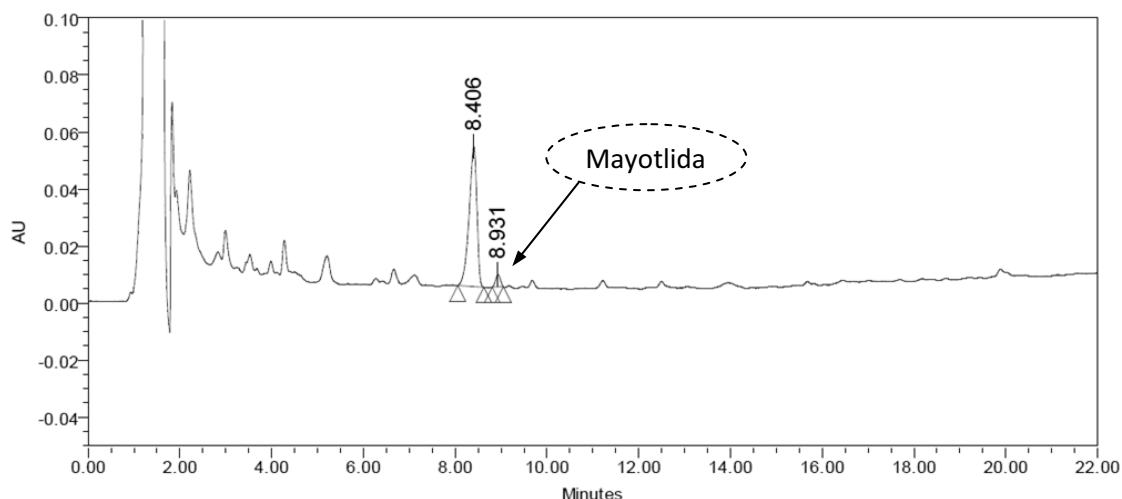
El següent pas ha sigut la desprotecció de l'al·lil ester de **37**, seguint el procediment descrit anteriorment, amb l'ús de PhSiH<sub>3</sub> i Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. L'àcid obtingut s'ha dissolt en una barreja de

TFA:DCM (1:1) per eliminar els dos grups Boc, fornint així el precursor del producte final. Aquest s'ha dissolt en una barreja de DCM:DMF (9:1) fins obtenir una concentració 4 mM; s'ha afegit HOAt, PyAOP i DIEA, i s'ha agitat durant 16 hores a temperatura ambient. El cru de reacció s'ha purificat amb una columna de fase inversa per fornir finalment **1** amb un 10% de rendiment (Figura 2.21).



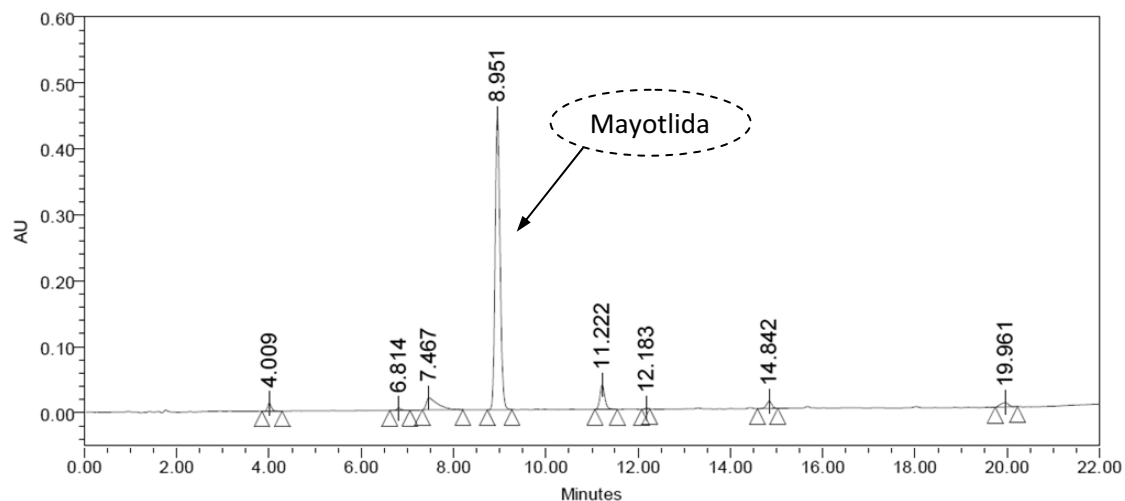
**Figura 2.21.** Ciclació de l'anell B i obtenció d'**1**.

El compost **1** i una fracció de mayotlida natural s'han comparat mirant els seus temps de retenció en un HPLC;<sup>5</sup> ambdós compostos han coel·luit al mateix temps, 8,94 minuts (Figures 2.22, 2.23 i 2.24). Llavors, es pot pensar que s'ha sintetitzat la mayotlida; amb lo qual s'hauria corroborat la seva estructura i la seva estereoquímica proposades. Per aconseguir aquest fi, s'ha seguit una via sintètica basada en una combinació de metodologies de fase sòlida i solució.

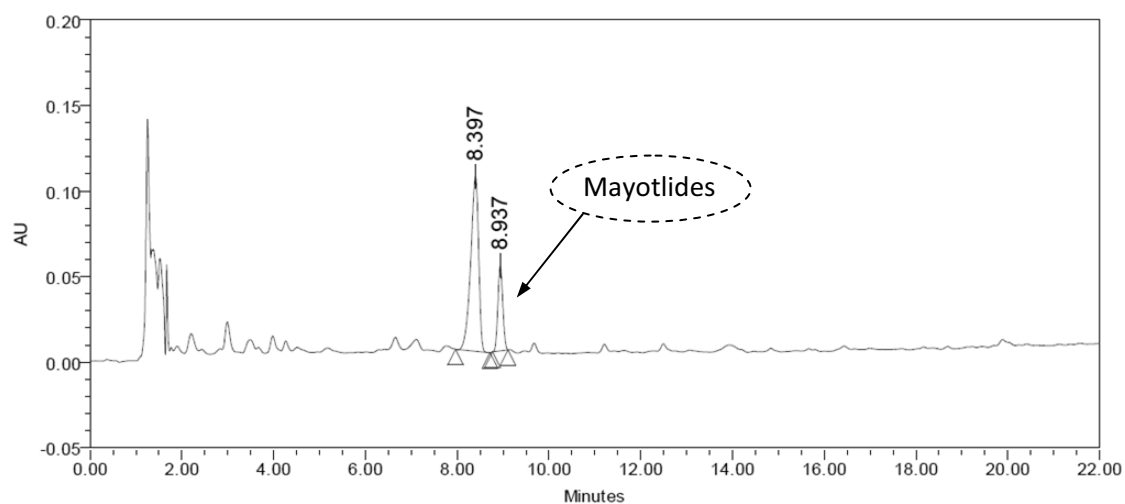


**Figura 2.22.** Cromatograma d'HPLC<sup>5</sup> de l'extracte de la mayotlida natural.

<sup>5</sup> Columna Symmetry C18 (5 µm, 4,6 x 150 mm) MeCN:H<sub>2</sub>O gradient des de 30:70 fins to 100:0 en 22 minuts. λ= 220 nm.



**Figura 2.23.** Cromatograma d'HPLC<sup>5</sup> de la maytllida sintètica.



**Figura 2.24.** Coelució<sup>5</sup> de la maytllida natural i la sintètica.

Aquesta reacció s'ha realitzat a petita escala, aïllant-se 11 mg d'1 un cop purificat. Aquesta quantitat, juntament amb el tamany i la complexitat de la molècula han fet que les dades espectroscòpiques siguin difícils d'assignar.

Així doncs, es continua treballant en la síntesi total de la maytllida, intentant:

- Millorar la síntesi de l'anell A, amb els grups protectors dels  $N^1$  i  $N^8$  diferenciats.
- Millorar la preparació de l'anell B, canviant l'enllaç pel que es produeix la macrociclació.



# Capítol 3

Estudi de la Relació

Estructura-Activitat de la Mayotlida



## 1 Introducció

Freqüentment el descobriment d'un nou producte natural actiu va lligat a la troballa d'una família de compostos estructuralment relacionats, és a dir, anàlegs del producte que es troben dins del mateix organisme, però que poden tenir activitat o no. S'han invertit molts esforços en respondre el perquè els organismes sintetitzen compostos semblants, independentment de la seva activitat. El punt de partida de la discussió és que la producció de qualsevol producte natural origina un cost energètic a l'organisme, per tant, aquest producte hauria de suposar un benefici d'una o una altra forma per a qui el produeix.

Un primer aproximament evolutiu diu que qualsevol producte sintetitzat per l'organisme ha de tenir una funció que repercuteixi en la millora de la salut de l'ésser viu; després la selecció natural triarà i donarà continuïtat a aquells compostos que més afavoreixin a l'organisme productor. Però aquest raonament no és prou per explicar l'existència de la diversitat química que es pot trobar dins d'un sol ésser viu, el perquè genera compostos semblants i el perquè els manté, malgrat no tinguin una funció concreta.

La hipòtesi més acceptada per explicar la diversitat química dins dels organismes és la hipòtesi de la bioanàlisi. És un model basat en una simple proposta: l'activitat biològica potent és una propietat excepcional per a una única molècula;<sup>1</sup> així es necessita un elevat nombre de compostos per trobar-ne un que sigui actiu. Aquesta teoria assumeix que la selecció natural tindria un inconvenient important si totes les noves molècules biosintetitzades, fruit de les mutacions, tinguessin activitat biològica, perquè seria més difícil descartar-les. Llavors, l'evolució afavoreix a aquells organismes que són capaços de crear una elevada diversitat química amb un baix cost energètic, perquè quant major sigui la quantitat de compostos creats, major serà la probabilitat de crear un que tingui una activitat biològica potent.<sup>2</sup> I d'aquesta manera els organismes creen la seva pròpia diversitat química, en busca d'uns metabòlits on la relació estructura-activitat sigui òptima.

---

<sup>1</sup> C.G. Jones, R.D. Firm *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*, **1991**, 333, 273

<sup>2</sup> R.D. Firm, C.G. Jones *Recent Advances in Phytochemistry* (Ed.: J.T. Romeo, J.A. Saunders, P. Barbosa) Plenum Press, **1996**, 295

La química dels productes naturals intenta emular a aquests organismes. Així, el descobriment d'un nou compost biològicament actiu, continua amb l'estudi de la seva síntesi i la dels seus anàlegs, buscant crear una quimioteca on es pugui escollir el compost que tingui el perfil farmacològic més adequat. En el present capítol es pretén aprofundir en el coneixement de la relació entre l'estructura i l'activitat de la mayotlida amb l'assaig de l'activitat de l'anell A i la síntesi d'un anàleg de la mayotlida.

## 2 Activitat de la mayotlida

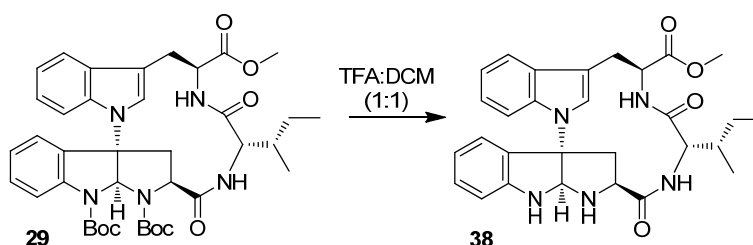
La mayotlida presenta una activitat inhibidora del creixement (GI 50)<sup>3</sup> de l'ordre nanomolar en tres línies tumorals: HT-29 (colon), A-549 (pulmó) i MDA-MB-231 (mama) (Taula 3.1). Una de les característiques de la mayotlida és que està composta per dos anells peptídics; així, s'ha estudiat l'activitat d'ambdós anells.

**Taula 3.1.** Activitat inhibidora del creixement de la mayotlida.

	HT-29 Colon (10 <sup>-6</sup> )	A-549 Pulmó (10 <sup>-6</sup> )	MDA-MB-231 Mama (10 <sup>-6</sup> )
<b>GI50</b>	3,81	3,91	3,91

### 2.1 Anell A

Un cop preparat el compost **29** (Capítol 2, Apartat 2.3), el qual conté l'anell A de la mayotlida, s'ha estudiat la seva activitat; per a lo qual s'han eliminat els grups Boc que presenta **29** i s'ha obtingut el compost **38** (Figura 3.1). El compost **38** s'ha caracteritzat amb espectroscòpia de masses i d'RMN (Figura 3.2).



**Figura 3.1.** Síntesi de **38**.

<sup>3</sup> Assajos de GI50 detallats en la part Experimental.

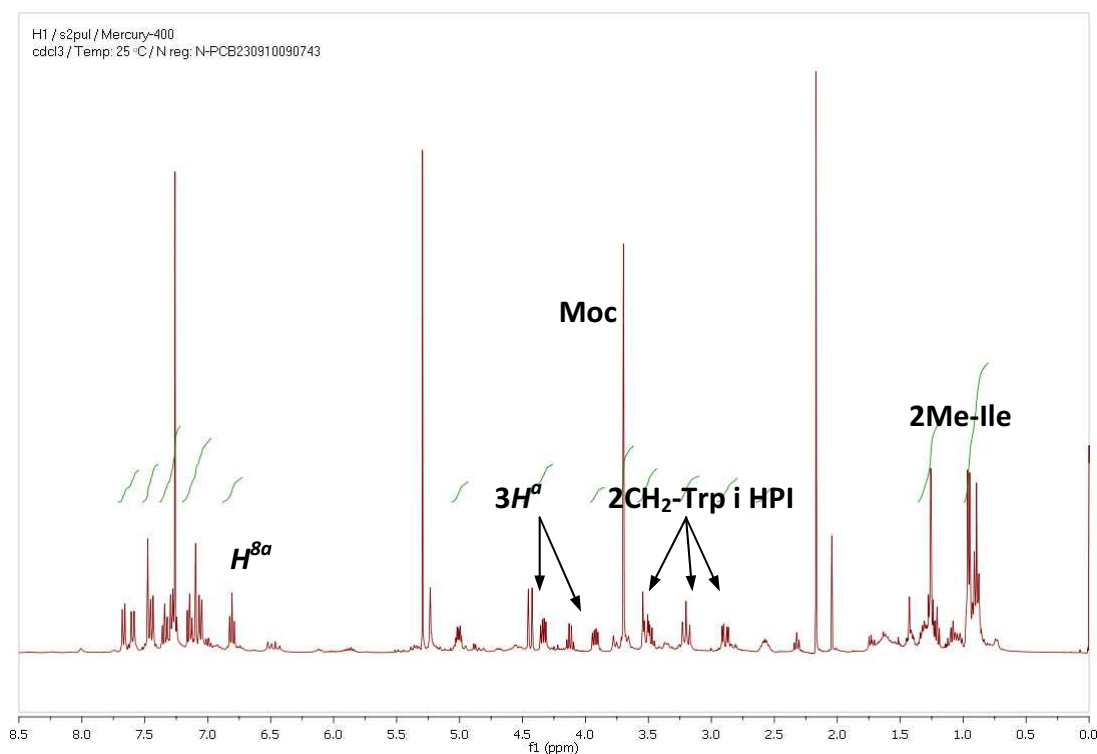


Figura 3.2. Espectre d' $^1\text{H}$ -RMN de **38**.

L'activitat dels compostos **29** i **38** ha sigut assajada pels laboratoris de la companyia PharmaMar en les tres línies tumorals esmentades, però en cap d'elles els compostos han resultat actius (Taula 3.2). Aleshores, podem descartar que l'anell A sigui, per ell mateix, responsable de l'activitat antitumoral de la mayotlida.

Taula 3.2. Assajos d'activitat (GI50) dels compostos **29** i **38**.

Compost	HT-29 Colon ( $10^{-5}$ )	A-549 Pulmó ( $10^{-5}$ )	MDA-MB-231 Mama ( $10^{-5}$ )
<b>29</b>	> 1,40	> 1,40	> 1,40
<b>38</b>	> 1,94	> 1,94	> 1,94

## 2.2 Anàlegs de la mayotlida

Enfront dels resultats de no activitat de l'anell A, cab la possibilitat de que l'activitat de la mayotlida (**1**) resideixi en l'anell B; així, s'ha plantejat la síntesi de dos anàlegs **39** i **40**. El compost **39** reproduïx la seqüència peptídica de l'anell B d'**1**, però no té l'enllaç  $C^{3a}-N^i$  entre l'HPI i el Trp. El compost **40** és un octapèptid cíclic que presenta la mateixa seqüència d'aminoàcids que la mayotlida, amb els dos Trps sense modificar i, per tant, sense l'enllaç  $C^{3a}-N^i$  (Figura 3.3).



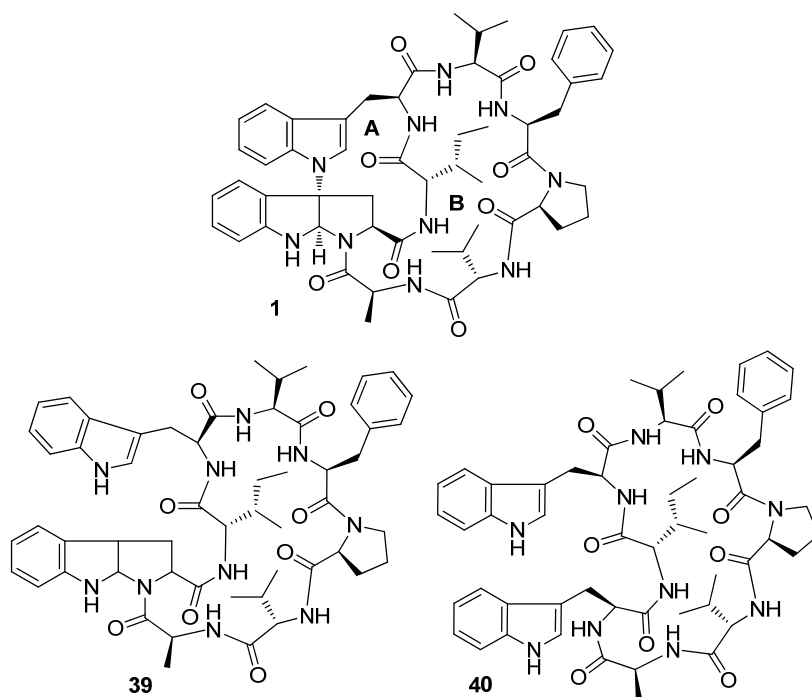


Figura 3.3. Estructura de la mayotlida (1) i dels anàlegs 39 i 40.

### 2.2.1 Síntesi de l'anàleg 39

La ruta sintètica plantejada per a l'obtenció de l'anàleg **39** ha requerit la síntesi de l'HPI en dissolució i el seu posterior acoblament sobre la resta de cadena peptídica, sintetitzada en fase sòlida. En **39** no hi ha unió Trp-HPI, per tant, s'ha optat per obtenir l'HPI mitjançant la ciclació amb àcid perquè no cal sintetitzar el Br-HPI.

La ciclació en medi àcid que ha funcionat molt bé amb el  $N^\alpha$  protegit en forma de carbatat de metil, ha donat problemes de desprotecció d'aquest grup Moc un cop format l'HPI (Veure Capítol 2, Apartat 4.1) impossibles de resoldre. Aquests problemes juntament amb la recerca d'una via sintètica convergent han conduït a assajar el dipèptid **2k** per a aconseguir la seva ciclació amb àcid. El resultat no ha sigut l'esperat **5** i com s'explica en el Capítol 1 (Apartat 2.1) s'ha obtingut el producte de dimerització **6** (Figura 3.4), fet que ha truncat la síntesi de **39**.

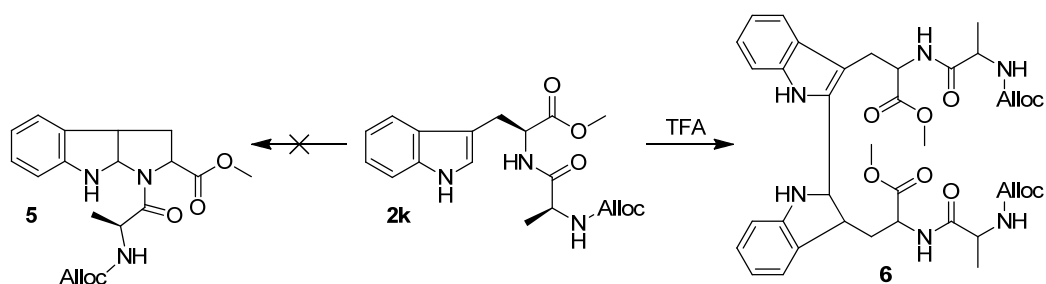


Figura 3.4. Reacció de dimerització de l' $N^\alpha$ -Al·loc-L-Ala-L-Trp-OMe.

Aleshores, per a aconseguir la ciclació del Trp amb àcid no podem fer servir una amida per protegir el  $N^\alpha$  del Trp, perquè fem que aquest N sigui menys nucleòfil que l'indole; hem de recórrer a la formació de carbamats per protegir-lo. Possiblement la ciclació del Trp-OMe amb el  $N^\alpha$  protegit amb Cbz, seguit de la protecció del  $N^\delta$  de l'HPI format amb un grup protector ortogonal, permetria la preparació d'un HPI-carboxilat de metil sintèticament adient per a la preparació de **39**.

### 2.2.2 Síntesi de l'anàleg **40**

Per sintetitzar l'anàleg **40** s'han combinat procediments de fase sòlida i dissolució. La síntesi ha començat amb l'ancoratge manual d'un equivalent de l'Fmoc-L-Ala sobre la resina 2-clorotritil (**30**). L'experiència prèvia en la síntesi la cadena peptídica de la mayotlida ha permès elongar el pèptid **41** directament en el sintetitzador automàtic assistit per microones. Així, s'han emprat Fmoc-L-aminoàcids, amb un excés de 3 eq, i s'ha escollit l'HATU com a agent d'acoblament; l' $N^\alpha$ -Fmoc-L-Trp(Boc)-OH ha sigut l'últim aminoàcid en acoblar-se. Després de l'eliminació del grup Fmoc del Trp i l'escissió del pèptid de la resina, aquest s'ha dissolt en una barreja de TFA:DCM (1:1), per treure els grups Boc dels Trp de la cadena, fent **42** amb rendiment quantitatiu. La macrociclació de **42** s'ha realitzat en solució molt diluïda, concentració 3 mM, i s'han emprant 2 eq de cadascun dels agents d'acoblament HOAt i PyAOP, per obtenir l'anàleg **40** (Figura 3.5). **40** ha sigut caracteritzat per HPLC-masses (ESI+) (Figura 3.6).

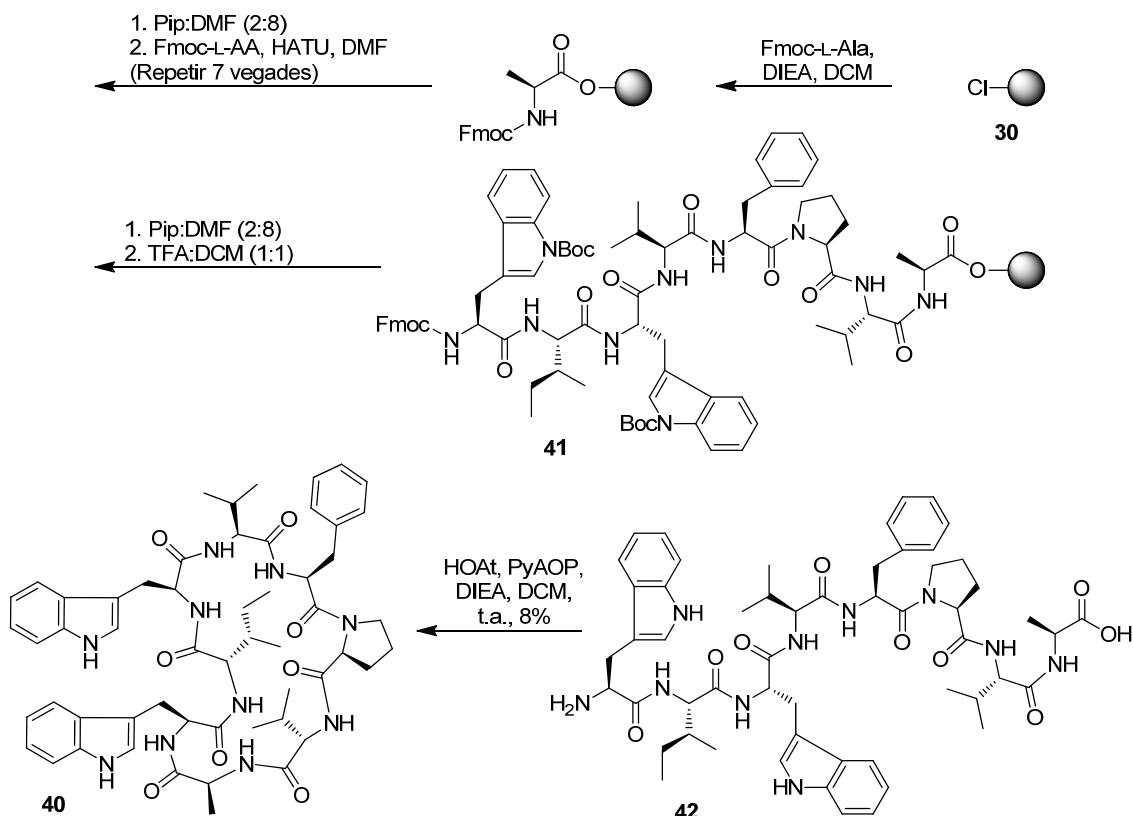
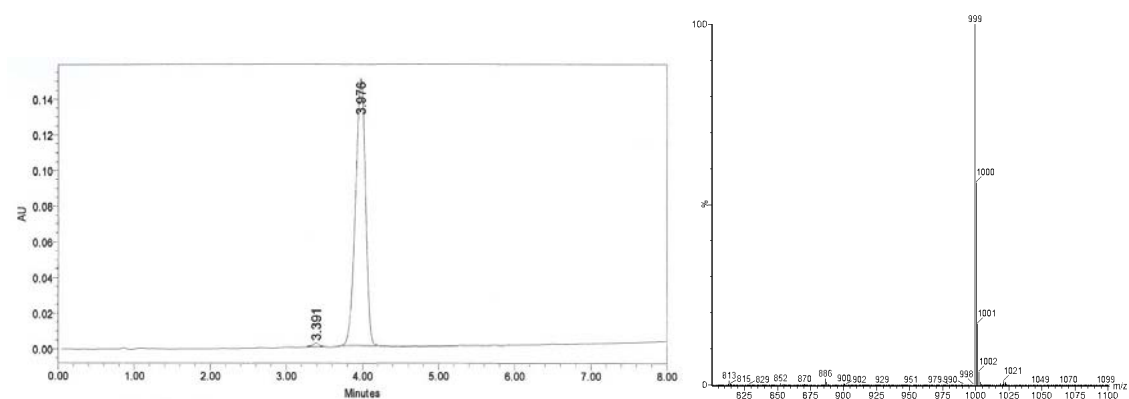


Figura 3.5. Síntesi de l'anàleg **40**.



**Figura 3.6.** Cromatograma<sup>4</sup> i espectre de masses de **40**.

L'activitat del compost **40** s'ha estudiat en tres línies tumorals: HT-29, A-549 i MDA-MB-231, però no ha resultat actiu en cap d'elles (Taula 3.3). Així doncs, la seqüència peptídica i ciclada que conforma l'anell B no és l'origen de l'activitat de la mayotlida.

**Taula 3.3.** Assajos d'activitat (GI 50) del compost **40**.

	HT-29 Colon ( $10^{-5}$ )	A-549 Pulmó ( $10^{-5}$ )	MDA-MB-231 Mama ( $10^{-5}$ )
<b>GI50</b>	> 1,00	> 1,00	> 1,00

Els resultats obtinguts porten a pensar que l'activitat de la mayotlida es deguda al conjunt de tota l'estructura. Així, els posteriors estudis de la relació estructura-activitat de la mayotlida haurien de sintetitzar anàlegs que mantinguessin l'estructura Trp-HPI dins de la molècula: canviant aminoàcids de l'estructura original, sintetitzant compostos biomimètics que mantinguessin bé l'estructura monocíclica o la policíclica per dirigir l'estereoquímica o el plegament de la conformació molecular.

<sup>4</sup> Waters XBridge C<sub>18</sub> (75 x 4,6 mm, 2,5 μm). Gradient MeCN:H<sub>2</sub>O des de 50:50 fins 100:0 en 8 min, λ= 254 nm.

# Conclusions



## 1 Conclusions

- En l'estratègia sintètica proposada per a l'obtenció de la mayotlida, el Br-HPI és el seu precursor i el de molts altres productes naturals que contenen l'HPI en la seva estructura. S'han assajat dues vies alternatives per a la síntesi del Br-HPI amb diferents grups protectors en les dues amines i el carboxilat.
  - Comparant les dues rutes per arribar al Br-HPI a partir del Trp s'ha comprovat que la ruta A condueix, majoritàriament, a l'isòmer *endo* del Br-HPI, que és el producte de control termodinàmic; mentre que les condicions de reacció de la ruta B afavoreixen la formació del producte de control cinètic, l'isòmer *exo*.
  - L<sup>1</sup>H-RMN ha servit com a eina per a la diferenciació dels isòmers *endo* i *exo* del Br-HPI. L'estereoquímica dels anàlegs de Br-HPI sintetitzats s'ha establert comparant una parella d'isòmers del Br-HPI sintetitzats per les dues vies anomenades A i B. S'ha comprovat que hi ha una variació en els desplaçaments químics del protó de la posició C<sup>2</sup> de l'HPI i de l'alquil (Me o tBu) que esterifica el carboxilat, segons sigui *exo* o *endo*, per l'efecte d'anisotropia de l'anell aromàtic de l'HPI.
  - L'ortogonalitat dels grups protectors per sintetitzar el Br-HPI és important perquè ha de permetre el creixement quimiosselectiu de la molècula per arribar al producte natural; però sense oblidar que la pròpia unitat HPI presenta quimiosselectivitat al tenir diferent reactivitat les amines N<sup>1</sup> i N<sup>8</sup> de l'HPI.
- S'ha estudiat la formació de l'enllaç entre el C<sup>3a</sup> de l'HPI i el N indòlic del Trp, per furnir el sistema Trp-HPI.
  - Les condicions de reacció òptimes s'han aconseguit amb NaH com a base, DMF anhidra com a dissolvent, escalfant la reacció a 70 °C durant 1,5 hores.

- La protecció de l'àcid del Br-HPI en forma de metil ester en la reacció de substitució ha donat majors rendiments que quan estava protegit amb un *terc*-butil ester.
- Al buscar la convergència de la ruta sintètica, la formació de l'enllaç  $C^{3a}$ - $N^j$ , tenint acoblada la lle a l'HPI i protegint l'amina del Trp amb l'ftalimida, ha originat quatre isòmers del producte de substitució.
- S'ha assolit la síntesi de l'anell A que forma part de la mayotlida. Aquest estudi ha permès:
  - Comprovar que els dos enllaços amida de l'anell són els idonis per tancar l'anell A.
  - L'estudi de la seva estereoquímica mitjançant experiments NOE ha indicat una estereoquímica trans entre els substituents de les posicions  $C^2$  i  $C^{3a}$  de l'HPI.
- S'ha estudiat la ruta sintètica que condueix a la mayotlida i s'ha aïllat la quantitat suficient per comparar el producte natural amb el sintètic.
  - La fase sòlida és la tècnica més adient per la síntesi de la cadena pentapeptídica. A més, s'ha adaptat la seva síntesi per realitzar-la en un sintetitzador automàtic de pèptids, amb la resina 2-Cl-Tr, seguint una estratègia de Fmoc-aminoàcid i amb HBTU com a agent d'acoblament.
  - S'ha sintetitzat un compost que presenta el mateix temps de retenció i la mateixa massa que la mayotlida natural, amb lo qual s'ha corroborat l'estructura proposta de la mayotlida.
- S'han realitzat estudis preliminars de la relació entre l'estructura i l'activitat de la mayotlida.
  - L'activitat de la mayotlida no es deu sols a l'anell A, perquè l'assaig de l'activitat de l'anell A, tant protegit com desprotegit en les amines de l'HPI, no presenta cap activitat.
  - L'anell B tampoc és el responsable de l'activitat de la mayotlida per ell mateix. Tal i com demostra l'assaig de l'activitat d'un anàleg de la mayotlida que presenta la seva mateixa seqüència peptídica, però no conté la unitat HPI ni la unió entre el  $C^{3a}$  d'aquesta i el  $N$  indòlic de l'altre Trp.
  - L'activitat de la mayotlida és deguda al conjunt de tota l'estructura. Per tant, l'estudi d'anàlegs s'ha de dirigir cap a modificacions dels aminoàcids que constitueixen l'anell B o compostos biomimètics que mantinguin l'essència de l'estructura de la mayotlida: la unió entre el  $C^{3a}$  de l'HPI i el  $N$  indòlic del Trp.