

Síntesis de fragmentos claves y estructuras análogas a Aeruciclámidas como potenciales quimioterápicos

Trabajo presentado por la Q.F. Stella Peña para aspirar al título de
Doctora en Química

Directora: Dra. Gloria Serra

Co-directora: Dra. Laura Scarone

Tribunal:

Dra. Mercedes Álvarez

Dr. Enrique Pandolfi

Dr. Diver Sellanes



**Cátedra de Química Farmacéutica,
DQO, FQ, UdelaR.
Montevideo, Abril 2015**

Agradecimientos

A Gloria, mi directora de tesis, por toda la paciencia y todo lo que me ha enseñado durante todos estos años. Por ser tan comprensiva, dedicada y sensible. Por estar en todos los detalles y asegurarse que todo estuviera bien cuando estaba de pasantía o de viaje a congresos.

A Laurita, por ser mi co-tutora, más compinche y más rezongona. Por enseñarme a trabajar en el laboratorio y por sentarse a pensar conmigo.

A mis compañeros de laboratorio, Ceci, Vero, Cathe, Vale, Jaime, Guillo, Carlitos, Chiara, Lucía, Valentina, Anderson por la buena onda, por ayudarme cuando metía la pata, por bancarse mis rayes, por compartir muchos momentos juntos químicos y de la vida, por las cervezas y las pizzas, por escucharme en los momentos de crisis existenciales, por volver el laboratorio de QF un lugar divertido, con música de viernes!

A Graciela y Danilo, por la buena onda, por compartir charlas y por bancarme todo el tiempo que estuve abajo en la oficina. A Marcelo por las charlas deportivo-nutricionales. A Diver por los consejos y la ayuda con la SPPS. A Eduardo por ser el creador del laboratorio.

A Fernando Albericio y Mercedes Álvarez por haberme recibido afectuosamente en dos oportunidades en sus laboratorios en Barcelona.

A mis compañeros de Barcelona, Paolo, Adriana, Xavi y Janire por toda la buena onda, por ayudarme en el laboratorio e integrarme al grupo haciéndome sentir como en casa.

A la Tana y a Caro por haberme alojado en sus hogares, por los encuentros y paseos juntas, y por haber compartido más de una cervecita por distintos lugares de Europa.

A Horacio y Gumo por los espectros, en especial a Vero por dejarlos siempre tan lindos :). A Alejandra Rodríguez por los espectros de masa.

A Jenny Saldaña del Laboratorio de Experimentación Animal de FQ, Andrea Medeiros y Marcelo Comini del Instituto Pasteur, Vanessa Yardley, Lindsay Stewart y Simon Croft de LSHTM, a todos por los ensayos biológicos.

A los vecinos de Orgánica, por la buena onda, por organizar fiestas copadas del departamento y por fomentar siempre la integración.

A mis padres, que hasta el día de hoy no entienden mucho lo que hago pero siempre me apoyaron y se pusieron contentos cada vez que me iba de viaje por la facultad.

A Mica, que se fue de viaje tempranito y que la extraño mucho.

A mis amigas de la vida, Maca, Sabri y Marian, por coparse con mis historias de viajes químicos y estar siempre ahí en las buenas y en las malas.

A Rami, que me acompañó tanto y sostuvo durante este largo camino, lástima que no llegamos al final pero igualmente no puedo dejar de agradecerte!

A mis amigos del Circo y de la Danza por coparse en tratar de entender mi trabajo y por sostener el "ahora no puedo, estoy con las tesis" y "cuando termine la tesis me pongo las pilas".

Agradecimientos Institucionales:

Facultad de Química

PEDECIBA

ANII: Beca de Maestría, Beca de Doctorado y proyectos FCE (6916 y 2720)

CSIC: CISC-grupos (654) y CSIC-pasantías y congresos

ÍNDICE

Capítulo 1: Introducción

1.1 Introducción	3
1.2 Antecedentes	4
1.3 Objetivos	
1.3.1 Objetivo General	15
1.3.2 Objetivos Específicos	17

Capítulo 2: Síntesis de building blocks heterocíclicos

2.1 Introducción	21
2.1.1 Antecedentes del grupo	21
2.2 Antecedentes bibliográficos de la síntesis de oxazoles y tiazoles	22
2.2.1 Biosíntesis de oxa/tiazolinas y oxa/tiazoles	22
2.2.2 Metodologías sintéticas	
2.2.2.1 Metodologías de obtención de tiazolinas y oxazolinas	25
2.2.2.2 Síntesis de oxa/tiazoles por oxidación de oxa/tiazolinas	29
2.2.2.3 Síntesis de oxazoles y tiazoles por Hantzsch	30
2.3 Estrategia sintética	31
2.4 Resultados	32
2.4.1 Síntesis de oxazoles	32
2.4.2 Síntesis de tiazoles	33
2.5 Conclusiones	37
2.6 Parte Experimental	38

Capítulo 3: Síntesis de precursores abiertos de macrociclos análogos a Aeruciclámidas

3.1 Introducción/antecedentes	51
3.1.1 Formación de enlace amida	51
3.1.2 GP del grupo amino	52
3.1.3 GP del grupo ácido carboxílico	53
3.2 Estrategia Sintética	57
3.3 Discusión y resultados	58
3.4 Conclusiones	60
3.5 Parte Experimental	61

Capítulo 4: Síntesis de péptidos en fase sólida

4.1 Introducción/antecedentes	71
4.1.1 Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS)	73
4.2 Estrategia Sintética	77
4.3 Discusión y resultados	79
4.4 Conclusiones	84
4.5 Parte Experimental	84

Capítulo 5: Macrociclos peptídicos

5.1 Introducción/antecedentes	91
5.1.1 Estrategias Sintéticas	95
5.1.2 Macrociclaciones	99
5.1.3 Conformación espacial de péptidos conteniendo heterociclos aromáticos	100
5.2 Estrategia Sintética	101
5.3 Discusión y resultados	103
5.4 Conclusiones	112
5.5 Parte Experimental	113
5.6 Espectroscopia	125

Capítulo 6: Síntesis total de Aeruciclamida B

6.1 Introducción/antecedentes	145
6.2 Estrategia Sintética	146
6.3 Discusión y resultados	149
6.4 Conclusiones	158
6.5 Parte Experimental	159
6.6 Espectroscopia	171

Capítulo 7: Evaluación biológica

7.1 Introducción	177
7.2 Discusión y resultados	179
7.3 Conclusiones	196

Capítulo 8: Conclusiones y Perspectivas

8.1 Conclusiones	199
8.2 Perspectivas a futuro	201

Anexo 1: Tabla de Abreviaturas	205
---------------------------------------	-----

Anexo 2: Lista de Publicaciones	209
--	-----

Anexo 3: Lista de presentaciones en Congresos	211
--	-----

Capítulo 1:

INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

Los productos naturales juegan un rol muy importante en el desarrollo de nuevos fármacos. Actualmente, alrededor del 60 % de los nuevos fármacos de uso clínico son derivados o están inspirados en productos naturales, según la última revisión de Newman y Cragg que abarca el período 1981-2010.¹ Dichos autores siguen confiando en la exploración de la naturaleza como fuente de nuevos fármacos y alientan las investigaciones que se basan en ella y la toman como referencia.

En el 2008 Harvey publica que más de 100 nuevos productos naturales se encuentran en desarrollo clínico, especialmente anticancerígenos y anti-infecciosos.² Además de la importancia que tienen en el desarrollo de nuevos fármacos, los productos naturales representan un gran desafío sintético para los químicos orgánicos, siendo muchas veces fuente de inspiración para el desarrollo de nuevas metodologías.

Muchos grupos de investigación trabajan en la síntesis de productos naturales con el objetivo de obtener cantidades adecuadas para realizar estudios más avanzados de evaluación biológica y ensayos “*in vivo*” en el caso de productos con actividad biológica, así como para confirmar las estructuras propuestas.

¹ Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–335.

² Harvey, A. L. Natural Products in Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 894–901.

Capítulo 1

1.2 Antecedentes

En los últimos años, se han aislado un gran número de productos naturales bioactivos cuyas estructuras son macrociclos. Estos compuestos presentan una gran diversidad estructural y un amplio abanico de actividades biológicas. En la actualidad poseen un papel importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos debido a que presentan una serie de propiedades deseables. Entre ellas destacamos, sus características estructurales que favorecen las conformaciones bioactivas, su selectividad a los receptores, su permeabilidad celular y estabilidad metabólica.³

Actualmente existen 68 macrociclos en el mercado farmacéutico de los cuales 19 tienen buena biodisponibilidad por vía oral; 30 son péptidos cíclicos y la ciclosporina que contiene algunos aminoácidos N-metilados es el único macrociclo peptídico administrado por vía oral. Basándose en esto, muchos grupos han utilizado la estrategia de sustituir tres ó cuatro aminoácidos (dependiendo del tamaño del ciclopeptido) por sus análogos N-metilados de manera de mejorar la biodisponibilidad por vía oral ó sus propiedades farmacocinéticas.^{3a,4}

Dentro de la diversidad estructural de los macrociclos, se encuentran los péptidos cíclicos que contienen heterociclos azólicos: tiazoles y oxazoles y sus respectivos análogos reducidos, los cuales son llamados ciclamidas. Estas

³ (a) Giordanetto, F.; Kihlberg, J. Macrocyclic Drugs and Clinical Candidates: What Can Medicinal Chemists Learn from Their Properties? *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 278–295. (b) Driggers, E. M.; Hale, S. P.; Lee, J.; Terrett, N. K. The Exploration of Macrocycles for Drug Discovery--an Underexploited Structural Class. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 608–624. (c) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Chapter 1: Bioactive Macrocycles from Nature in *Macrocycles in Drug Discovery*; **2014**, 1-36 Royal Society of Chemistry. (d) Peña, S.; Scarone, L.; Serra, G. Macrocycles as potential therapeutic agents in neglected diseases. *Future. Med. Chem.* **2015**, *in press*.

⁴ (a) White, T.R.; Renzelman, C. M., Rand, A. C.; Rezai, T.; McEwen, C. M.; Gelev, V. M.; Turner, R. A.; Linington, R. G.; Leung, S. S.; Kalgutkar, A. S.; Bauman, J. N.; Zhang, Y.; Liras, S.; Price D. A.; Mathiowetz, A. M.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S. On-resin N-methylation of cyclic peptides for discovery of orally bioavailable scaffolds *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 810-817. (b) Rand, A. C.; Leung, S. S. F.; Eng, H.; Rotter, C. J.; Sharma, R.; Kalgutkar, A. S.; Zhang, Y.; Varma, M. V.; Farley, K. A.; Khunte, B.; Limberakis, C.; Price, D. A.; Liras, S.; Mathiowetz, A. M.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S. Optimizing PK properties of cyclic peptides: the effect of side chain substitutions on permeability and clearance. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1282-1289.

Capítulo 1

estructuras cíclicas se encuentran presentes en animales marinos⁵ y cianobacterias.⁶ Generalmente estos compuestos son hexa u octapéptidos cíclicos alternando aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos (Ser, Thr, Cys). Las cadenas laterales de estos aminoácidos polares, pueden ciclar para formar oxazolininas o tiazolininas y posteriormente oxidarse a oxazoles y tiazoles respectivamente.⁷

Ejemplos de este tipo de compuestos son: las Venturamidinas A (**1**) y B (**2**), las cuales fueron aisladas de la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp., presentan actividad antimalárica contra *P. falciparum* con un IC₅₀ de 8.2 y 5.2 μM respectivamente y moderada actividad antichagásica contra *T. cruzi* (IC₅₀ = 14.6 y 15.8 μM respectivamente);⁸ la Dendroamida A (**3**) un péptido cíclico aislado de la cianobacteria *Stigonema dendroideum fremy* que revierte la resistencia a múltiples fármacos en células tumorales;⁹ y las Balgaciclaminas A (**4**) y B (**5**).

⁵ (a) Degnan, B. M.; Hawkins, C. J.; Lavin, M. F.; McCaffrey, E. J.; Parry, D. L.; Watters, D. J. New cyclic peptides with cytotoxic activity from the ascidian *Lissoclinum patella*. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1349-1354. (b) Foster, M. P.; Concepcion, G. P.; Caraan, G. B.; Ireland, C. M. Bistratamides C and D. Two New Oxazole-Containing Cyclic Hexapeptides Isolated from a Philippine *Lissoclinum bistratum* Ascidian. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6671-6675. (c) Ojika, M.; Nemoto, T.; Nakamura, M.; Yamada, K. Stereochemistry and Total Synthesis of Dolastatin E. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5059-5062. (d) Sone, H.; Kigoshi, H.; Yamada, K. Isolation and stereostructure of dolastatin I, a cytotoxic cyclic hexapeptide from the Japanese sea hare *Dolabella auricularia*. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 8149-8154. (e) Perez, L. J.; Faulkner, D. J. Bistratamides E-J, modified cyclic hexapeptides from the Philippines ascidian *Lissoclinum bistratum*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 247-250. (f) Rudi, A.; Chill, L.; Akin, M.; Kashman, Y. Didmolamide A and B, two new cyclic hexapeptides from the marine ascidian *Didemnum molle*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 575-577.

⁶ (a) Sivonen, K.; Leikoski, N.; Fewer, D. P.; Jokela, J. Cyanobactins-Ribosomal Cyclic Peptides Produced by Cyanobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 1213-1225. (b) Gademann, K. Out in the Green: Biologically Active Metabolites Produced by Cyanobacteria. *Chim. Int. J. Chem.* **2011**, *65*, 416-419.

⁷ Sivonen, K.; Leikoski, N.; Fewer, D. P.; Jokela, J. Cyanobactins-Ribosomal Cyclic Peptides Produced by Cyanobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 1213-1225

⁸ Linington, R. G.; Gonzalez, J.; Ureña, L.-D.; Romero, L. I.; Ortega-Barría, E.; Gerwick, W. H. Venturamidins A and B: Antimalarial Constituents of the Panamanian Marine Cyanobacterium *Oscillatoria* Sp. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 397-401.

⁹ Ogino, J.; Moore, R. E.; Patterson, G. M. L.; Smith, C. D. Dendroamides, new cyclic hexapeptides from a blue-green alga. Multidrug-resistance reversing activity of dendroamide A. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 581-586.

Capítulo 1

que fueron aisladas en 2014 por Gademann y colaboradores de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* EAWAG 251, las cuales poseen actividad antimalárica ($IC_{50} = 9.0$ y $8.2 \mu\text{M}$ respectivamente) contra la cepa cloroquina resistente K1 de *P. falciparum*, ver figura 1.1.¹⁰

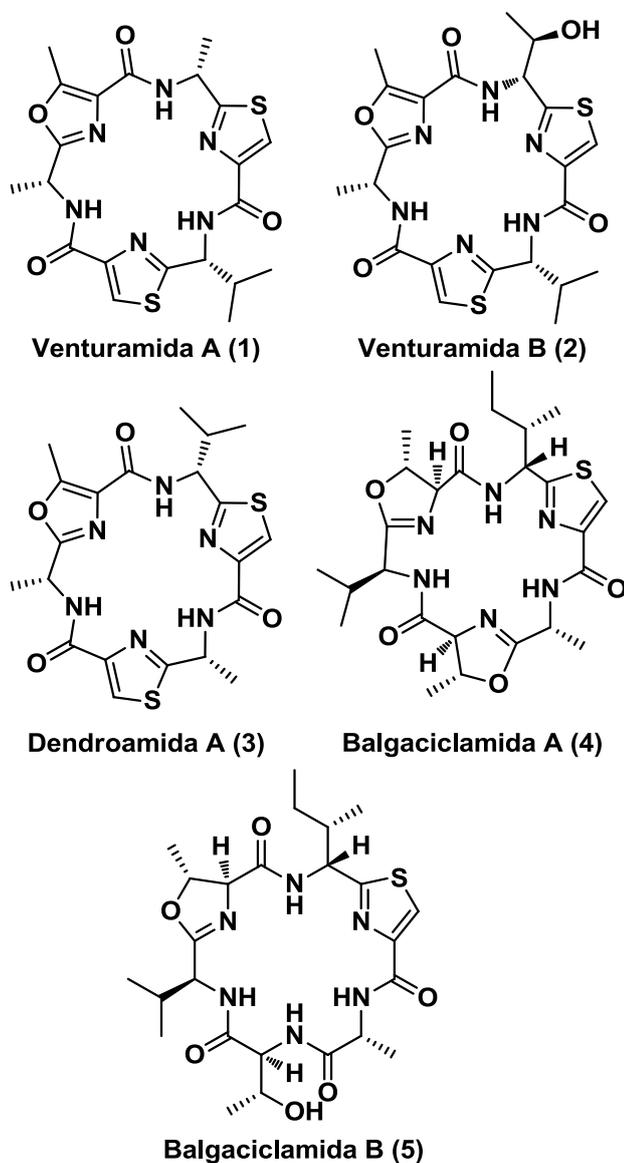


Figura 1.1. Ciclamidas heterocíclicas derivados de productos naturales

Poco tiempo antes de comenzar con este proyecto, Gademann y colaboradores habían aislado de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, las

¹⁰ Portmann, C.; Sieber, S.; Wirthensohn, S.; Blom, J. F.; Da Silva, L.; Baudat, E.; Kaiser, M.; Brun, R.; Gademann, K. Balgacyclamides, Antiplasmodial Heterocyclic Peptides from *Microcystis Aeruginosa* EAWAG 251. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 557–562.

Capítulo 1

Aeruciclamidas A (6), B (7), C (8) y D (9) (Figura 1.2).¹¹ En las estructuras de las Aeruciclamidas se destaca la presencia en todas ellas, de un heterociclo 5-metil-oxazolina, un tiazol y además un tercer anillo que puede variar de una a otra: tiazol, oxazol ó tiazolina. Estos heterociclos están unidos por diferentes restos aminoácídicos entre sí: Gly, L-Ala, L-Val, L-Ile, D-*allo*-Ile, L-Phe ó L-Met.

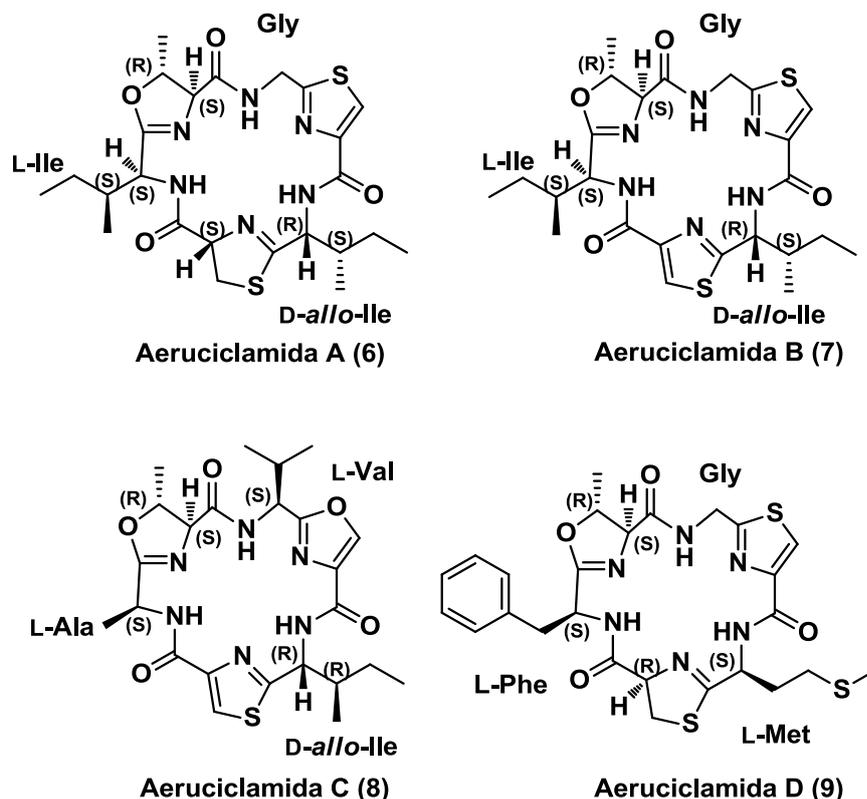


Figura 1.2 – Aeruciclamidas

En la evaluación biológica de estos productos contra *Plasmodium falciparum* K1 y *Trypanosoma brucei rhodesiense*, la Aeruciclamida B, que presenta dos anillos de tiazol, mostró una actividad submicromolar (0.7 μM) selectiva para *P. falciparum*, mientras que Aeruciclamida C, que contiene un tiazol y un oxazol, resultó ser el más activo frente a *T. rhodesiense* (9.2 μM).

¹¹ (a) Portmann, C.; Blom, J. F.; Gademann, K.; Jüttner, F. Aerucyclamides A and B: Isolation and Synthesis of Toxic Ribosomal Heterocyclic Peptides from the *Cyanobacterium Microcystis Aeruginosa* PCC 7806. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1193–1196. (b) Portmann, C.; Blom, J. F.; Kaiser, M.; Brun, R.; Jüttner, F.; Gademann, K. Isolation of Aerucyclamides C and D and Structure Revision of Microcyclamide 7806A: Heterocyclic Ribosomal Peptides from *Microcystis Aeruginosa* PCC 7806 and Their Antiparasite Evaluation. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1891–1896.

Capítulo 1

La constante búsqueda de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria es un campo de la Química Farmacéutica que está ampliamente justificado, tanto desde un punto de vista sanitario como económico.

Nuevos fármacos antiparasitarios son urgentemente necesarios para el control de enfermedades, tales como malaria, leishmaniasis, enfermedad del sueño, mal de chagas, helmintiasis, las cuales afectan a millones de personas en el mundo. Los productos terapéuticos con que se dispone actualmente, no resultan efectivos para el tratamiento de dichas enfermedades, dada la resistencia generada a los mismos.

La mayoría de estas afecciones son llamadas “enfermedades huérfanas” o “neglected diseases” dado que la mayoría de los países que presentan riesgo para dichas enfermedades son sub-desarrollados o en vías de desarrollo, no existe el apoyo económico o el interés de la industria farmacéutica para financiar la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios para el tratamiento de estas enfermedades. Esto hace que la mayoría de las investigaciones en este campo esté en manos de la academia.¹² Un dato que pone en evidencia el estado de olvido que transitaron por décadas estas enfermedades es que la mayoría de los fármacos empleados para el tratamiento de las mismas fueron desarrollados hace más de 50 años. Por otro lado, varios de estos compuestos no superarían las exigencias actuales de seguridad farmacológica en ensayos clínicos.

La malaria o paludismo, causada por *Plasmodium spp.* y transmitida a humanos por la picadura del mosquito *Anopheles*, constituye un problema mayor de salud en gran parte de los países tropicales y subtropicales, Figura 1.3. Del último reporte de la OMS, actualizado a Diciembre de 2014, se estiman 584000 muertes causadas por malaria en 2013 (con un rango poco preciso que va de 367000 a 755000) y 3.3 billones de personas en riesgo de ser infectadas. La cloroquina (1945) es un antipalúdico que se utilizaba con frecuencia, pero dada la alta resistencia de *P. falciparum* a este fármaco (más del 90% de en algunas áreas) la terapia recomendada por la OMS (Organización Mundial de la Salud)

¹² Pink, R.; Hudson, A.; Mouriès, M.A.; Bendig, M., Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Rev. Drug Disc.* **2005**, 4, 727-740.

Capítulo 1

ha sido modificada. Actualmente se emplean tratamientos combinados con Artemisinina ó Artesunato. Lamentablemente, en los últimos años, también se ha observado resistencia a estos últimos fármacos, principalmente en el sudeste asiático: Camboya, Myanmar, Tailandia y Vietnam.¹³

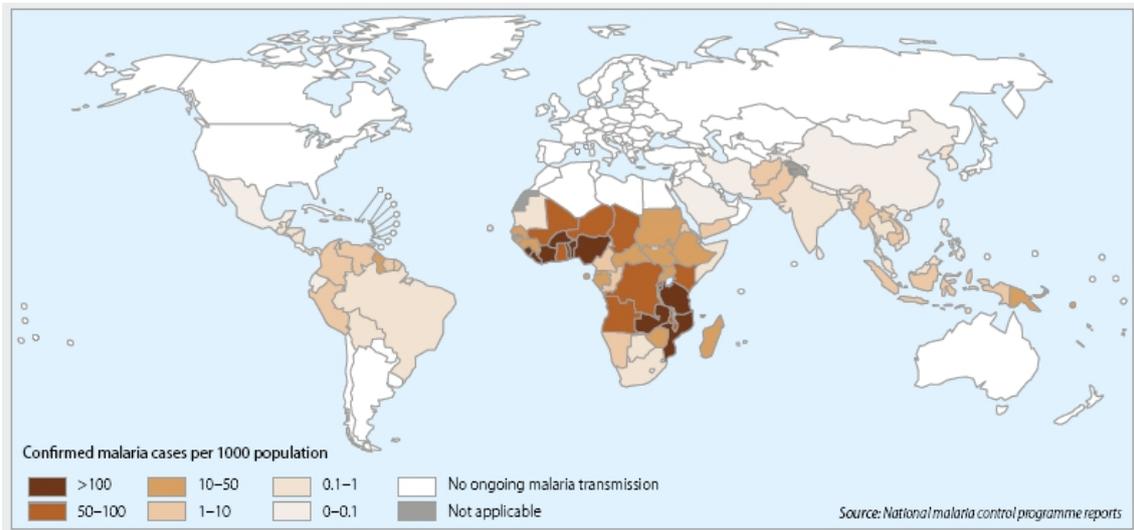


Fig. 1.3 Países con trasmisión de malaria (imagen extraída de World Malaria Report 2014, WHO)

Una vez que la persona es picada por el mosquito *Anopheles*, los parásitos toman las células del hígado rápidamente (15-20 minutos) y se convierten en "shcizonts" (esquizontes), se multiplican y atacan a las células sanguíneas (estadio asexual). Actualmente, la mayoría de los fármacos que se usan en el tratamiento de malaria, atacan al parásito en esta etapa. En dicho estadio el parásito se encuentra en mayor proporción, cerca de 10^{12} parásitos por persona y es el estadio que da los síntomas clínicos de malaria. Algunos de los esquizontes, se dividen en gametocitos masculinos y femeninos. Estos gametocitos son tomados por el mosquito cuando se alimenta de sangre. En el intestino del parásito se transforman en gametos y se fusionan. Este es el estadio sexual del parásito, Figura 1.4. Para erradicar la malaria, son necesarios fármacos que ataquen también el estadio sexual en humanos del *Plasmodium spp.* y de este modo bloquear la transmisión al mosquito.

¹³ (a) World Malaria Report 2014, WHO. (b) Fact sheet N°94, WHO Diciembre 2014. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>)

Capítulo 1

En la búsqueda de nuevos fármacos antimaláricos, el estadio del parásito en el mosquito se presenta como un blanco interesante de estudiar. En este punto los "sporozoites" (esporozoitos) presentes deben sobrevivir al sistema inmune del mosquito. La variedad de sobrevivencia de las distintas cepas de *P. falciparum* en el mosquito está dada por las diferencias genéticas, por ejemplo las cepas 3D7 y NF-54 son más resistentes al sistema inmune del mosquito; por lo que es relevante evaluar los candidatos a fármacos en estas cepas de *Plasmodium*.¹⁴

¹⁴ Molina-Cruz, a.; DeJong, R. J.; Ortega, C.; Haile, A.; Abban, E.; Rodrigues, J.; Jaramillo-Gutierrez, G.; Barillas-Mury, C. Some Strains of Plasmodium Falciparum, a Human Malaria Parasite, Evade the Complement-like System of Anopheles Gambiae Mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, E1957–E1962.

Capítulo 1

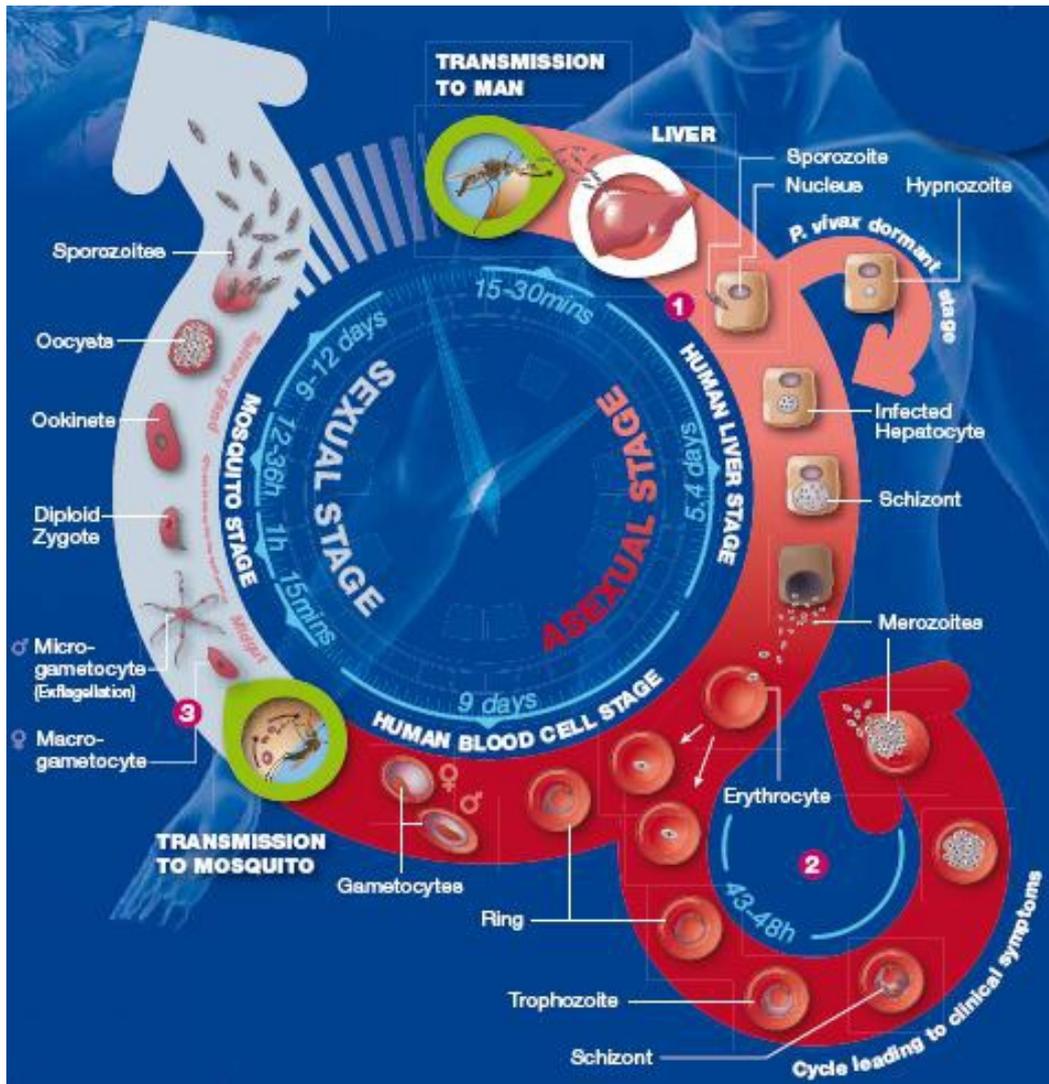


Figura 1.4 Ciclo de vida del parásito del género *Plasmodium*. (Extraído de la página web de Medicine for Malaria Venture)

Capítulo 1

La tripanosomiasis africana (HAT) o enfermedad del sueño existe en la región sub-sahariana y afecta a 36 países, Figura 1.5.

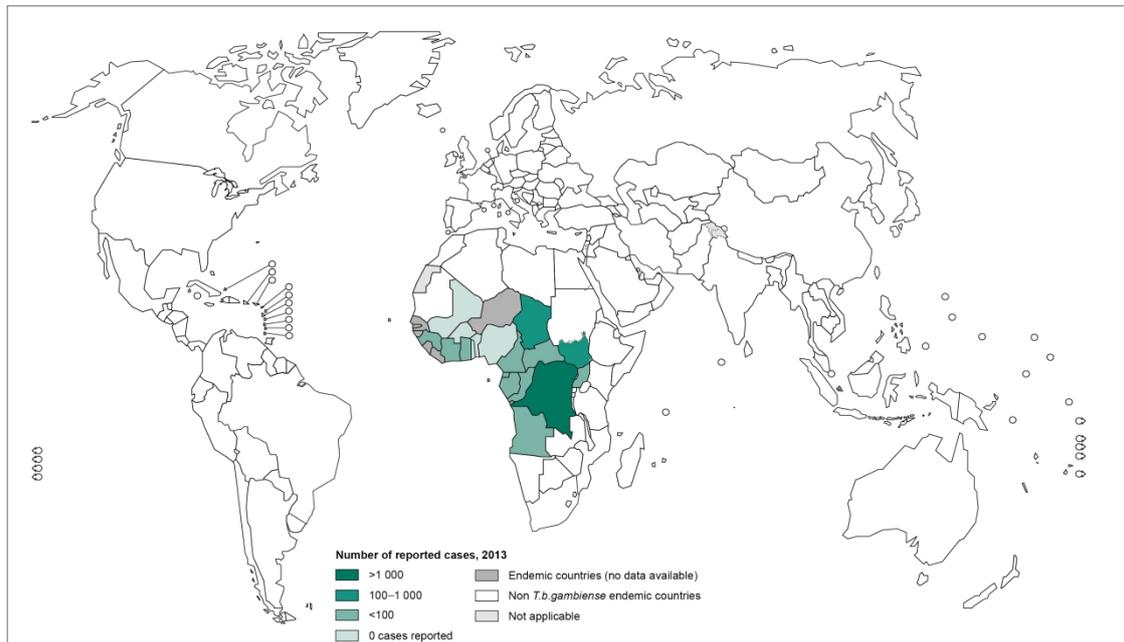


Fig. 1.5 Distribución mundial de HAT (*T.b.gambiense*) 2013 (imagen extraída de National HAT control programmes. Annual country reports, 2013, WHO)

Es causada por parásitos del género *Trypanosoma brucei* y transmitida por la mosca *tsetse*. La especie *T.b. gambiense* es la responsable del 80% de los casos de HAT crónica y *T. b. rhodesiense* representa el 2% de los casos de HAT aguda. La HAT posee dos fases, la primera llamada fase hemolinfática; y la segunda llamada fase neurológica, la cual afecta al sistema nervioso central. Las alteraciones del ciclo de sueño son una característica importante de la segunda etapa de la tripanosomiasis africana, y es lo que le da el nombre a la enfermedad.

El ciclo entero del parásito consta de una etapa intracelular (dentro de las células del mamífero hospedero) y otra extracelular (dentro del aparato digestivo de la mosca vector). El ciclo intracelular comienza cuando una mosca *tsetse* infectada inyecta los tripomastigotos metacíclicos en la piel. Los parásitos entran al sistema linfático y pasan al torrente sanguíneo (1). Dentro del huésped, se transforman en tripomastigotos sanguíneos (2) y son transportados a través del cuerpo, llegando a otros fluidos sanguíneos (por ejemplo, linfa y

Capítulo 1

líquido cefalorraquídeo) continuando su replicación por fisión binaria (3 y 4). Cuando los parásitos atraviesan la barrera hematoencefálica, se dice que el paciente se encuentra en la segunda fase de la enfermedad y es cuando se altera el ciclo del sueño, la persona siente somnolencia durante el día e insomnio durante la noche.

En la etapa extracelular del ciclo, la mosca es infectada cuando toma sangre de un mamífero huésped infectado (5). En el intestino de la mosca, los parásitos se transforman en su forma procíclica y se multiplican por fisión binaria (6), abandonan el intestino y se transforman en epimastigotos (7). Los epimastigotos alcanzan las glándulas salivales de la mosca y continúan multiplicándose (8), el ciclo en la mosca dura aproximadamente tres semanas, figura 1.6.

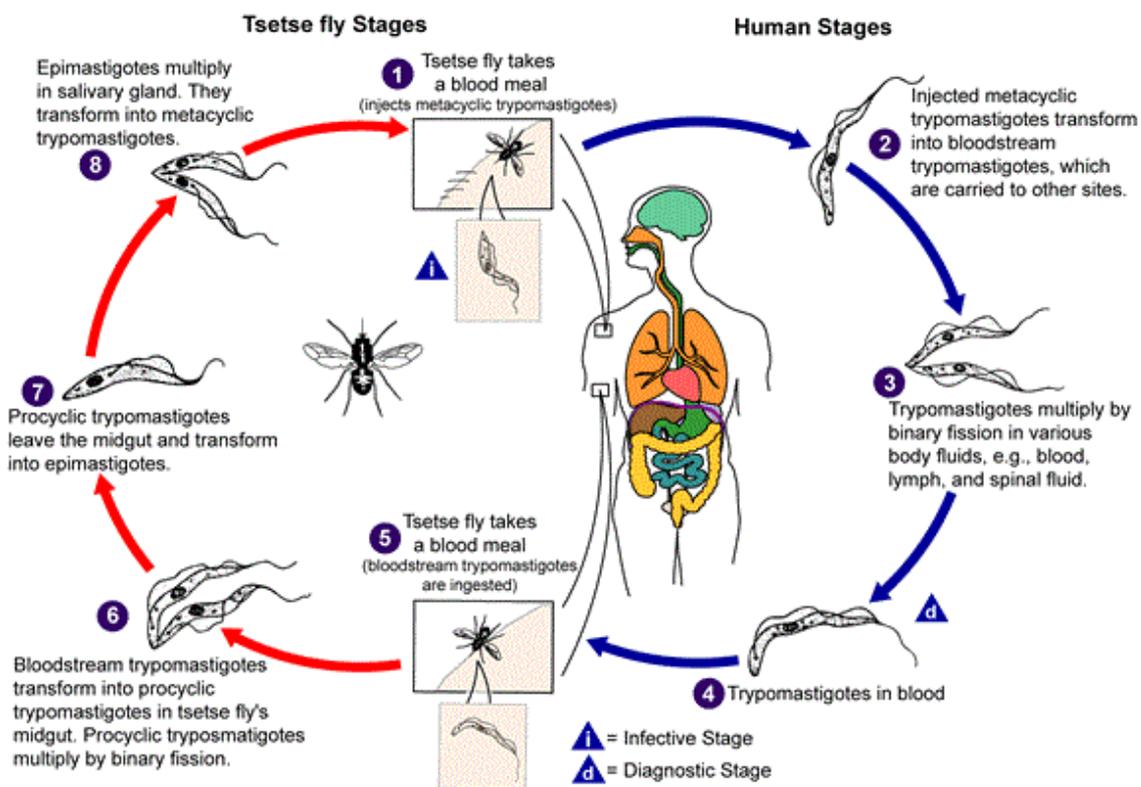


Fig. 1.6 Ciclo de vida del parásito *Trypanosoma brucei* (imagen extraída de CDC – Center for Disease Control and Prevention cortesía de DPDx.)¹⁵

¹⁵ <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAfrican/index.html>

Capítulo 1

El tipo de tratamiento que se administra depende de la etapa de la enfermedad. Los medicamentos que se usan en la primera etapa tienen poca toxicidad y se administran fácilmente, Pentamidina (1941) y Suramina (1921). Para la fase neurológica de la enfermedad, se requiere que el fármaco atraviese la barrera hematoencefálica. En esta fase se administra Melarsoprol (1949) que presenta efectos adversos muy severos por ser derivado de arsénico y Eflornitina (1990) que si bien es menos tóxico no actúa frente a *T. b. rhodesiense*, es muy costoso y se requiere de personal capacitado para su administración. En 2009, se comenzó a utilizar la combinación: Nifurtimox-Eflornitina, que no es eficaz contra *T. b. rhodosiense*. Nifurtimox está registrado como fármaco anti-chagásico (Tripanosomiasis americana). Los ensayos clínicos arrojaron datos de inocuidad y eficacia en combinación con Eflornitina, por eso se ha aceptado y se ha incluido en la lista de medicamentos esenciales de la OMS.¹⁶

Las helmintiasis son enfermedades parasitarias que pueden afectar tanto a humanos,¹⁷ como animales. En nuestro país, cuya economía está sustentada principalmente por la producción agropecuaria, la helmintiasis ganadera resulta un problema mayor. Entre las principales consecuencias, se destacan: pérdidas de peso, pérdida de lana, disminución de la producción lechera, etc. Si bien existe un gran número de fármacos desarrollados y comercializados, de alta eficacia antihelmíntica para el tratamiento de estas parasitosis, diversas causas, entre otras malos regímenes posológicos (dosis y tiempo de tratamiento), falta de diagnóstico apropiado, falta de seguimiento de la eficacia del tratamiento, etc. produjeron la aparición de fenómenos de resistencia y tolerancia desde la década de los 80. En particular un estudio con parásitos nemátodos de ovejas realizado en Uruguay, demostró que solo un 7.5% de las granjas ó estancias no tienen niveles de resistencia apreciables a estos tres tipos de fármacos. La

¹⁶ (a) WHO, Fact Sheet N° 259, Marzo de 2014 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>) (b) Simarro, P. P.; Diarra, A.; Ruiz Postigo, J. a; Franco, J. R.; Jannin, J. G. The Human African Trypanosomiasis Control and Surveillance Programme of the World Health Organization 2000-2009: The Way Forward. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1007.

¹⁷ WHO, Fact Sheet N° 366, Abril de 2014. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/es/>)

Capítulo 1

pérdida de productividad representa un serio problema económico en América del Sur, Sudáfrica, Australia, etc.¹⁸

Desde hace varios años, nuestro grupo viene trabajando en un programa general de búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos con actividad antihelmíntica y/o citotóxica tomando como modelos productos naturales bioactivos tal cual lo evidencian nuestras publicaciones¹⁹, Tesis de Maestría y Doctorado.²⁰

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General:

El objetivo general de esta tesis es desarrollar una metodología sintética que nos permita obtener fragmentos claves y macrociclos análogos a las Aeruciclamidas, ver Figura 1.7.

A los compuestos obtenidos se les realizarán estudios de sus potenciales actividades quimioterápicas *in vitro* sobre los parásitos responsables de malaria, de la enfermedad del sueño y sobre nemátodos utilizados como modelo en el *screening* primario de compuestos antihelmínticos. También se estudiarán sus potenciales actividades citotóxicas sobre líneas tumorales humanas y sobre macrófagos murinos. Sobre alguno de los compuestos más prometedores se realizarían ensayos de actividad biológica *in vivo*.

¹⁸ (a) Torres-Acosta, J. F. J.; Mendoza-de-Gives, P.; Aguilar-Caballero, a. J.; Cuéllar-Ordaz, J. a. Anthelmintic Resistance in Sheep Farms: Update of the Situation in the American Continent. *Vet. Parasitol.* **2012**, *189*, 89–96. (b) Nari, A.; Salles, J.; Gil, A.; Waller, P. J.; Hansen, J. W. The Prevalence of Anthelmintic Resistance in Nematode Parasites of Sheep in Southern Latin America: Uruguay. *Vet. Parasitol.* **1996**, *62*, 207–212.

¹⁹ (a) Peña, S.; Scarone, L.; Manta, E.; Serra, G. An Efficient Synthesis of 2,4'-Bi-1,3-Oxa(thia)zoles as Scaffolds for Bioactive Products. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2011**, *47*, 703–709. (b) Martínez, V.; Davyt, D.; Total syntheses of bacillamide C and neobacillamide A; revision of their absolute configurations. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 1572-1575.

(c) Sellanes, D.; Campot, F.; Núñez, I.; Lin, G.; Espósito, P.; Dematteis, S.; Saldaña, J.; Domínguez, L.; Manta, E.; Serra, G. Preparation and Biological Evaluation of Key Fragments and Open Analogs of Scleritodermin A. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 5384–5395.

²⁰ (a) Martínez, V. Tesis de Maestría, UDELAR, Uruguay, 2014. (b) Sellanes, D. Tesis de Doctoral, UDELAR, Uruguay, 2009. (c) Scarone, L. Tesis Doctoral, UDELAR, Uruguay, 2008. (d) Incerti, M. Tesis doctoral, UDELAR, Uruguay, 2006. (f) Sellanes, D. Tesis de Maestría, UDELAR, Uruguay, 2004. (g) Mahler, S. G. Tesis Doctoral, UDELAR, Uruguay, 2002. (h) Serra, G. L. Tesis Doctoral, UDELAR, Uruguay, 1998.

Capítulo 1

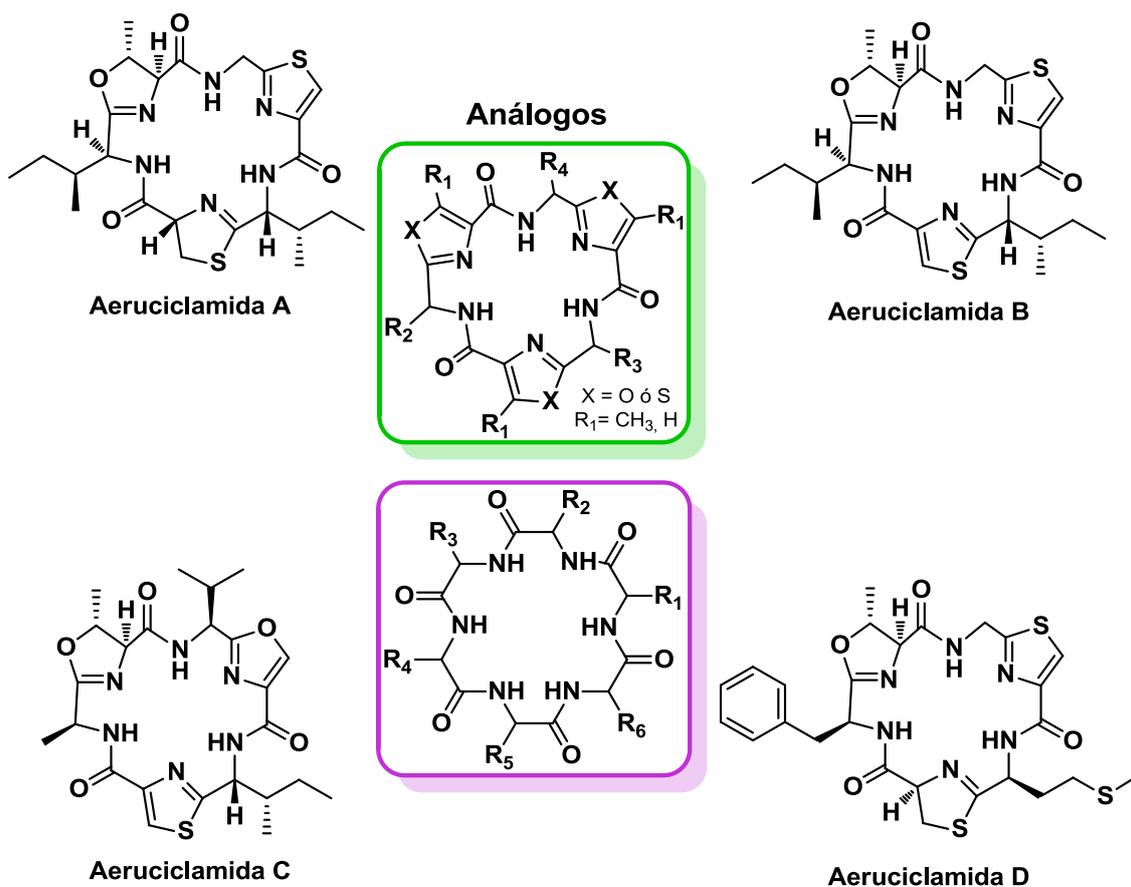


Figura 1.7. Macrociclos análogos de Aeruciclamidas

Para llevar adelante este objetivo general, hemos planteado los siguientes objetivos específicos que serán descriptos a continuación.

Capítulo 1

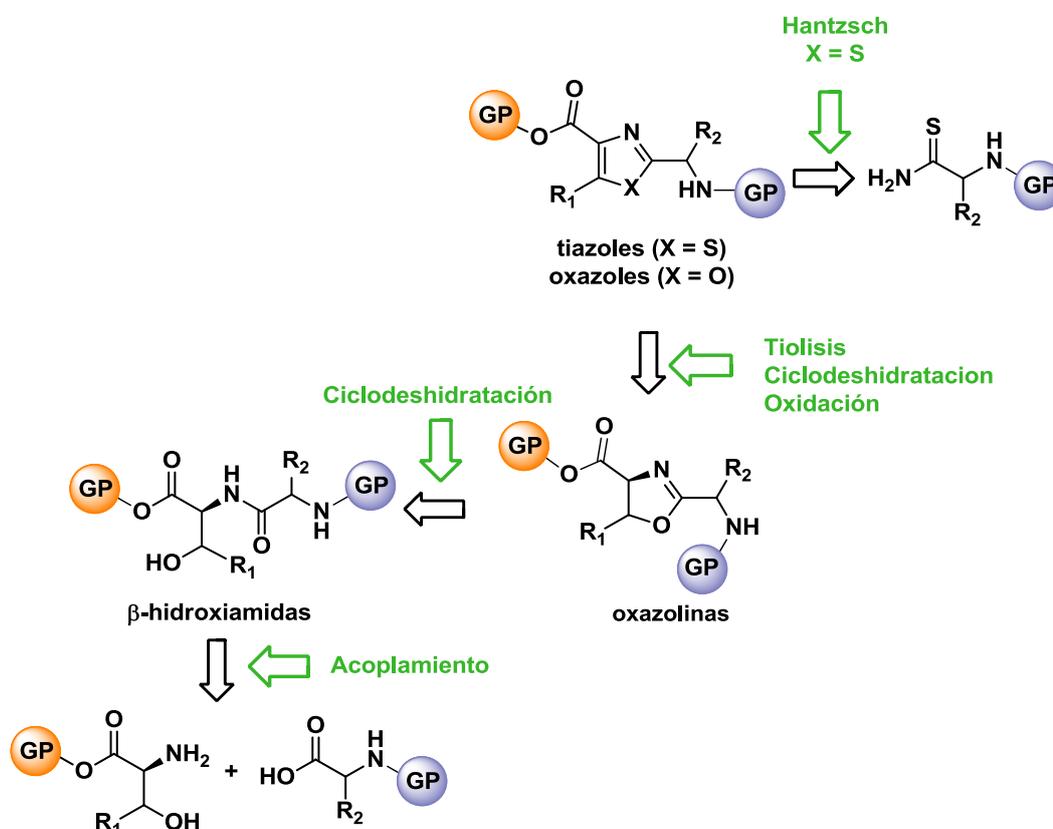
1.3.2 Objetivos específicos:

1. Síntesis de building blocks heterocíclicos.

Este objetivo específico es fundamental debido a que la estrategia que seguiremos para la construcción de los macrociclos azólicos es la de elongación de la cadena azólica peptídica paso a paso y macrociclación en solución. El análisis retrosintético de los building blocks heterocíclicos nos indica las etapas fundamentales que deberán ser consideradas en la propuesta sintética, ver Esquema 1.1.

- Síntesis de fragmentos peptídicos
- Síntesis de tioamidas
- Síntesis de los heterociclos 2,4-disustituídos: por ciclodeshidratación y oxidación ó por síntesis de Hantzsch

El heteroátomo de los anillos puede variar entre O o S, las cadenas R_1 pueden ser H o Metilo. Las cadenas R_2 dependerán del aminoácido hidrofóbico en cuestión.

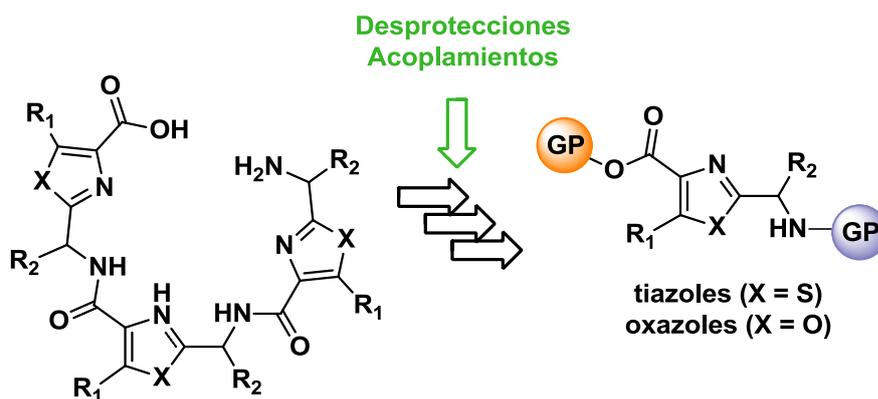


Esquema 1.1 Retrosíntesis de building blocks heterocíclicos.

Capítulo 1

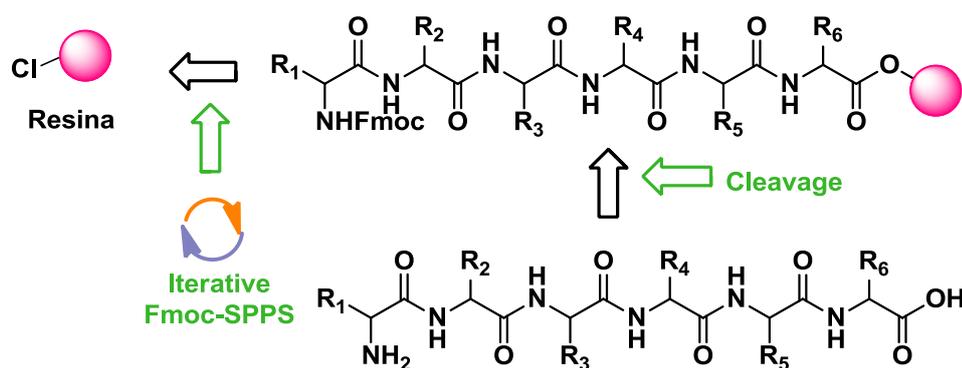
2. Acoplamiento de building blocks para formar bis y tris heterociclos

Se realizarán los acoplamiento mediante formación de enlaces amidas de los distintos building blocks sintetizados, ver esquema 1.2. Se estudiarán diversos agentes acoplantes.



3. Síntesis de hexapéptidos no azólicos precursores de análogos a Aeruciclámidas utilizando como metodología la síntesis de péptidos en fase sólida.

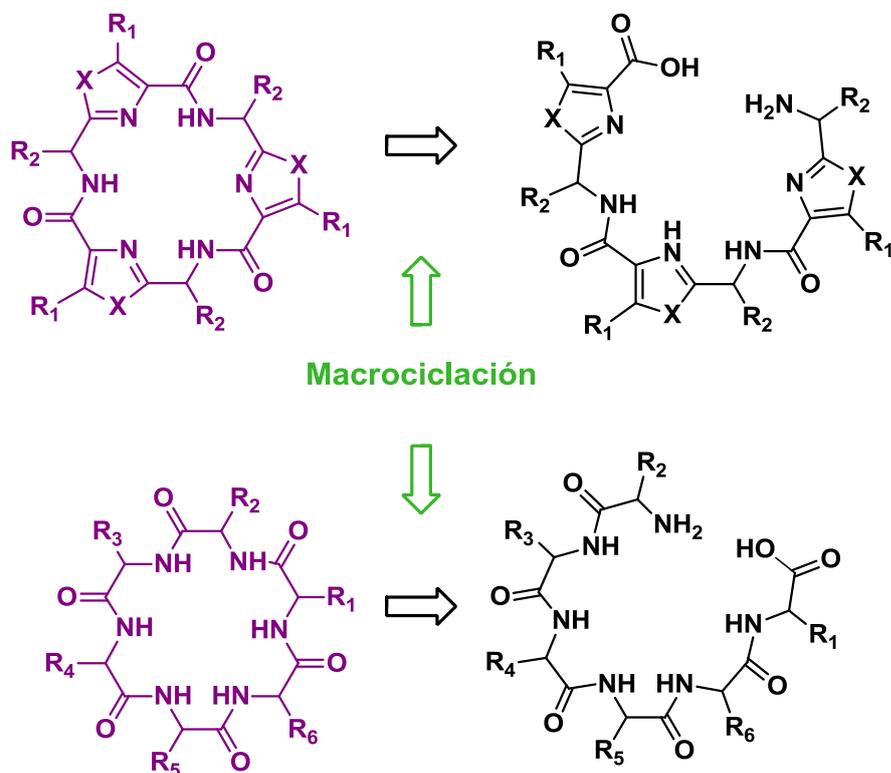
Se sintetizarán hexapéptidos cuya secuencia aminoacídica tendrá una relación biosintética con los productos naturales en estudio.



Capítulo 1

4. Macrociclaciones de precursores abiertos para obtener análogos de Aeruciclámidas

Se estudiarán las reacciones de macrociclación de tris-heterociclos y de los hexapéptidos no azólicos sintetizados en fase sólida, Esquema 1.4.



Esquema 1.4

5. Síntesis total de Aeruciclámida B

Se pretende obtener la Aeruciclámida B, dada su interesante actividad biológica y el desafío que una síntesis total de un producto natural que no fue sintetizado previamente implica.

Capítulo 1

6. Ensayos de actividad biológica:

Se realizarán los ensayos de evaluación biológica en colaboración con otros grupos de investigación, determinándose las siguientes actividades:

- antimalárica sobre *Plasmodium falciparum* K1
- anti-HAT sobre *Trypanosoma brucei brucei*
- antihelmíntica sobre *Nippostrongylus brasiliensis*
- citotóxicas sobre líneas tumorales humanas: HT29 y MCF7
- citotóxica sobre macrófagos murinos

Con estos datos se estudiará la relación estructura-actividad de los compuestos.

En los capítulos siguientes desarrollaremos cada uno de estos objetivos específicos, profundizando en el análisis retrosintético, describiendo la ruta sintética seguida en cada caso y analizando y discutiendo los resultados obtenidos.

Capítulo 2.

SÍNTESIS DE BUILDING BLOCKS HETEROCÍCLICOS

2.1 INTRODUCCIÓN

Dado el gran número de productos naturales bioactivos que presentan motivos azólicos en sus estructuras,¹ en las últimas décadas se han desarrollado una gran variedad de metodologías sintéticas. La complejidad y diversidad estructural de los productos naturales que contienen anillos de oxazol/tiazol y sus análogos reducidos ha llevado a la búsqueda de métodos cada vez más eficientes para la construcción de estos anillos.²

2.1.2 Antecedentes del grupo

Desde hace algunos años, nuestro grupo viene desarrollando un programa general de síntesis de heterociclos, de productos naturales y de análogos con heterociclos azólicos en sus estructuras, ver Capítulo 1 y Figura 2.1.

¹ (a) Jin, Z. Muscarine, imidazole, oxazole and thiazole alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 869-915. (b) Davyt, D.; Serra, G. Thiazole and Oxazole Alkaloids: Isolation and Synthesis. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2755–2780.

² (a) Wipf, P. Synthetic Studies of Biologically Active Marine Cyclopeptides. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2115–2134. (b) Michael, N.; Pattenden, G. Synthetic Studies towards Cyclic Peptides. Concise Synthesis of Thiazoline and Thiazole Containing Amino Acids. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 8267–8290. (c) Pattenden, G. Synthetic Studies with Natural Oxazoles and Thiazoles. *J. Heterocyclic Chem.* **1992**, *29*, 607–618. (d) Gant, T. G.; Meyers, A. I. The Chemistry of 2-Oxazolines. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2297–2360. (e) Just-Baringo, X.; Albericio, F.; Alvarez, M. Chiral Thiazoline and Thiazole Building Blocks for the Synthesis of Peptide-Derived Natural Products. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 1244–1256.

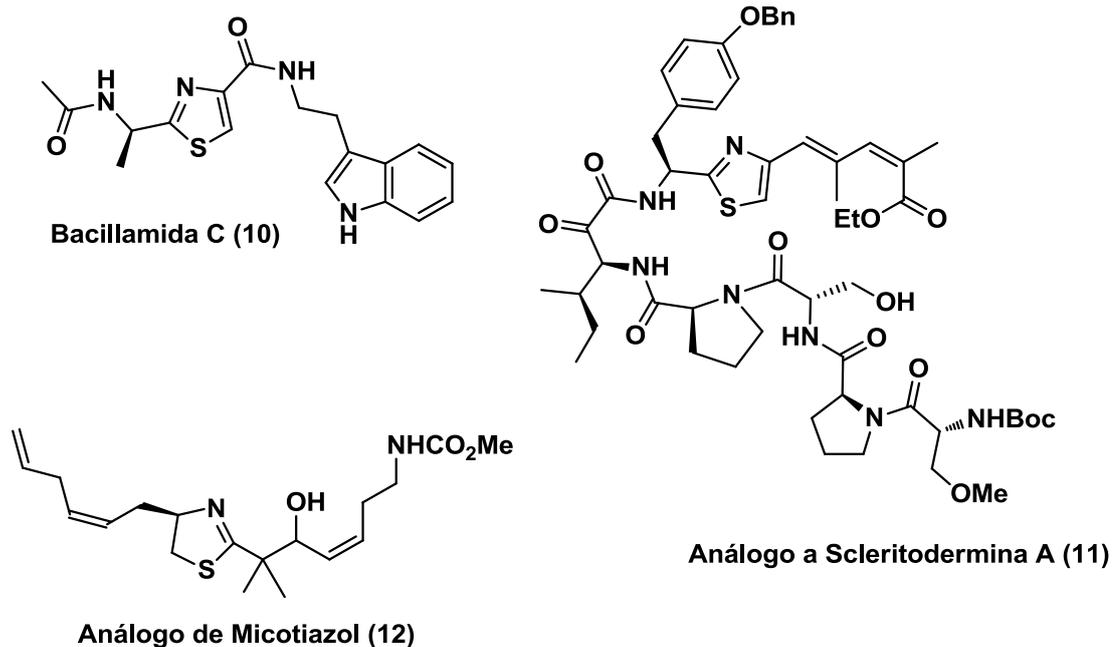


Figura 2.1. Estructuras sintetizadas por el grupo de Química Farmacéutica

Se ha profundizado en el uso de metodologías sintéticas como pueden ser el uso de grupos protectores para la obtención de péptidos, y la preparación de heterociclos del tipo oxazol, tiazol ó sus correspondientes heterociclos reducidos.

2.2 ANTECEDENTES bibliográficos de la SÍNTESIS DE OXAZOLES Y TIAZOLES

2.2.1 BIOSÍNTESIS de oxa/tiazolinas y oxa/tiazoles

La biosíntesis de azoles y sus análogos reducidos ocurre a través de la ciclación y posterior oxidación de residuos de Cys, Ser ó Thr. Las cianobacterias contienen un grupo de genes que heterociclan dichos residuos aminoacídicos

para dar tiazolinas y oxazolinas; las cuales pueden ser oxidadas para dar tiazoles y oxazoles respectivamente (ver figura 2.2).³

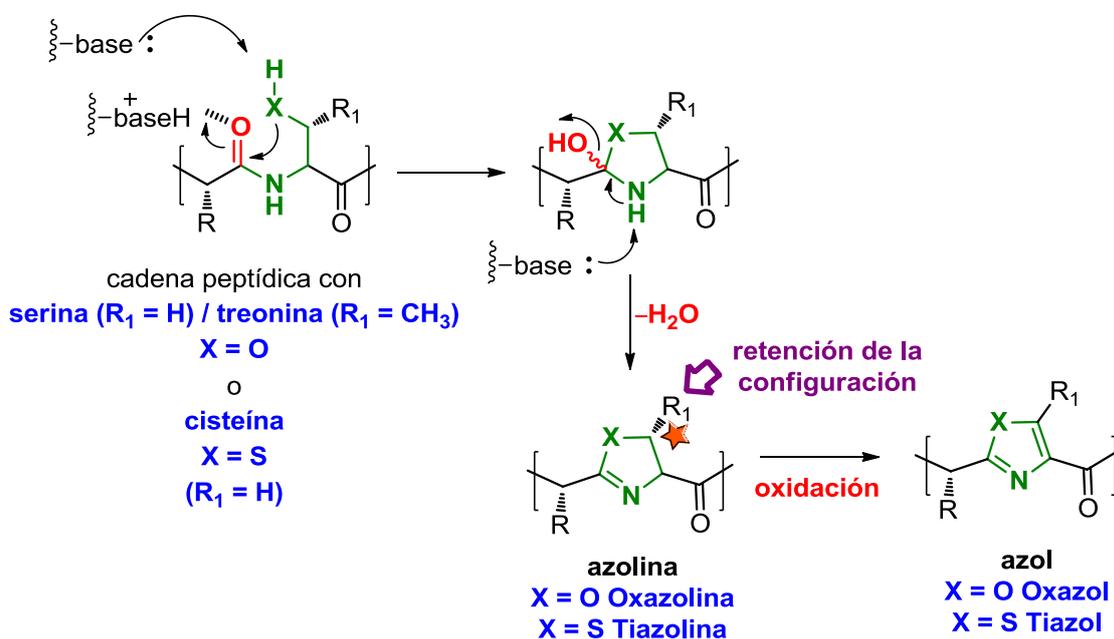


Figura 2.2. Biosíntesis de Azoles.

2.2.2 METODOLOGÍAS SINTÉTICAS

Existe una gran variedad de metodologías para la obtención de oxazoles y tiazoles. Una de las más ampliamente usadas y de la cual el grupo cuenta con una gran experiencia es la ciclodeshidratación de β-hidroxi(tio)amidas para la obtención de oxazolinas/tiazolinas y posterior oxidación (ver Figura 2.3).⁴

³ (a) Sivonen, K.; Leikoski, N.; Fewer, D. P.; Jokela, J. Cyanobactins-Ribosomal Cyclic Peptides Produced by Cyanobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 1213–1225. (b) Roy, R. S.; Gehring, A. M.; Milne, J. C.; Belshaw, P. J.; Walsh, C. T. Thiazole and Oxazole Peptides: Biosynthesis and Molecular Machinery. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 249–263.

⁴ a) Mahler, S. G.; Serra, G. L.; Antonow, D.; Manta, E. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8143. b) Scarone, L.; Sellanes, D.; Manta, E.; Wipf, P.; Serra, G. *Heterocycles* **2004**, *63*, 773. c) Mahler, G.; Serra, G.; Dematteis, S.; Saldaña, J.; Domínguez, L.; Manta, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1309. d) Sellanes, D.; Scarone, L.; Mahler, G.; Manta, E.; Baz, A.; Dematteis, S.; Saldaña, J.; Domínguez, L.; Serra, G. *Lett. Drug Design Discovery* **2006**, *3*, 625. e) Sellanes, D.; Scarone, L.; Manta, E.; Wipf, P.; Serra, G. *Letters in Organic Chemistry*, **2006**, *3*, 309. f) Sellanes, D.; Manta, E.; Serra, G. *Tetrahedron Letters*, **2007**, *48*, 1827. g) Scarone, L., Fajardo, J., Saldaña, J., Domínguez, L., Espósito, P., Dematteis, S.; Wipf, P., Manta, E., Serra, G. *Letters in Drug Design and Discovery*, **2009**, *6*, 413.

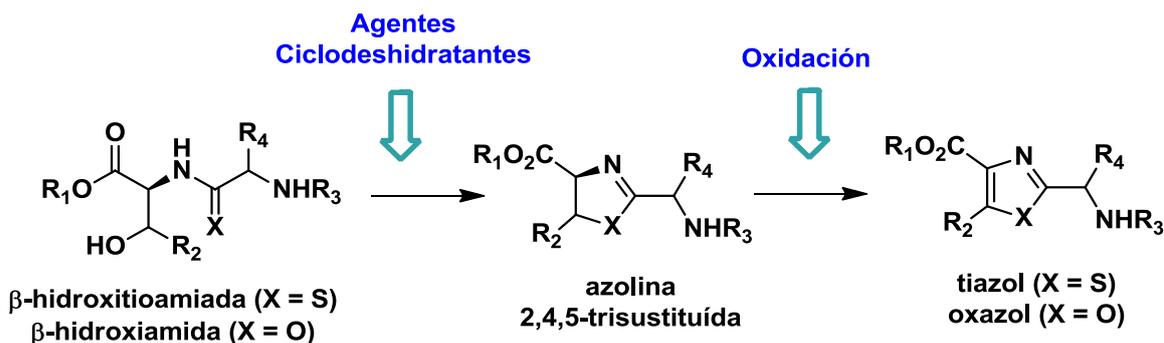


Figura 2.3

Las β -hidroxiamidas se obtienen por acoplamiento de β -aminoalcoholes (por ej. ésteres del aminoácido Ser o Thr) con ácidos carboxílicos (por ej. aminoácidos *N*-protegidos) (ver Figura 2.4). Para la formación del enlace amida, es necesario trabajar con grupos protectores con el fin de evitar reacciones de polimerización y reacciones secundarias que pueden ocurrir cuando se trabaja con aminoácidos conteniendo grupos funcionales en sus cadenas. Los grupos protectores utilizados varían según la estrategia sintética y si se trabaja en solución o en fase sólida. A su vez, es necesario tener en cuenta la labilidad de los mismos en las distintas condiciones de reacción.⁵

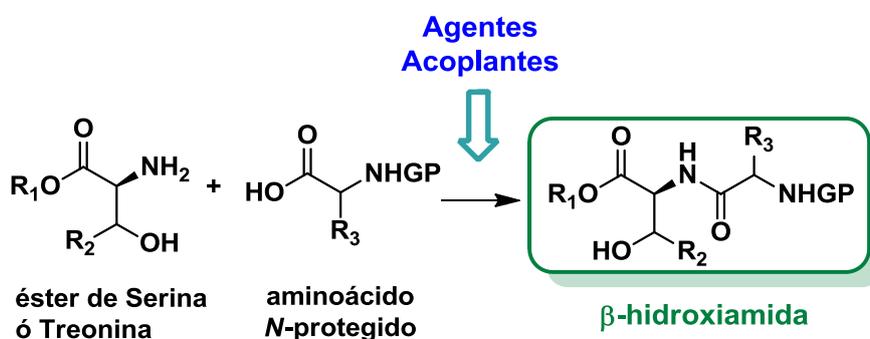


Figura 2.4

Para la formación del enlace amida, existe una gran variedad de agentes acoplantes y de estrategias posibles.⁶

⁵ Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504.

⁶ El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602.

2.2.2.1 Metodologías de obtención de Tiazolinas y Oxazolinas

Existen diversas metodologías para obtener oxa(tia)zolinas, una de ellas es a partir de β-hidroxi(tio)amidas por medio de reacciones de ciclodeshidratación; donde el grupo hidroxilo es activado convirtiéndose en un buen grupo saliente para posterior ataque nucleofílico del oxígeno ó azufre de la amida ó tioamida respectivamente en sus formas imidas (ver figura 2.5).

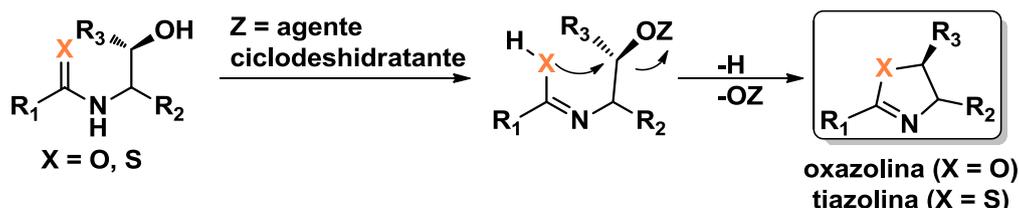


Figura 2.5

Los agentes ciclodeshidratantes comúnmente utilizados son: DAST (**13**),⁷ Deoxo-Fluor (**14**),⁸ Reactivo de Burgess.⁹

DAST y Deoxo-Flúor a bajas temperaturas, han sido muy utilizados en la última década para la síntesis de oxazolinas¹⁰ y tiazolinas.¹¹ Ambos son agentes fluorantes, que forman un buen grupo saliente en el alcohol, Figura 2.6, y luego el OH ó SH resultante del equilibrio amida-imida ó tioamida-tioimida ataca al carbono con dicho grupo saliente y cicla en oxa(tia)zolinas. Ambos agentes ciclodeshidratantes son compatibles con un rango muy amplio de grupos funcionales, dan reacciones muy limpias, se obtienen compuestos enantioméricamente puros y muy buenos rendimientos. El uso de Deoxo-Flúor fue reportado en el año 2000 por Williams, Wipf y colaboradores como alternativa al uso de DAST en la obtención de oxazolinas. El uso de Deoxo-Flúor

⁷ Straatmannand, M.; Welch, M. Fluorine-18-Labeled Diethylaminosulfur Trifluoride (DAST): An F-for-OH Fluorinating Agent. *J. Nucl. Med.* **1976**, *18*, 151–158.

⁸ Lal, G. S.; Pez, G. P.; Pesaresi, R. J.; Prozonic, F. M.; Cheng, H. Bis (2-Methoxyethyl) Aminosulfur Trifluoride: A New Broad-Spectrum Deoxofluorinating Agent with Enhanced Thermal Stability. *J. Org. Chem.* **1999**, 7048–7054.

⁹ Ejemplo de uso como agente ciclodeshidratantes: Wipf, P.; Miller, C. P. Total Synthesis of westiellamide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114* (27), 10975–10977.

¹⁰ Phillips, A. J.; Uto, Y.; Wipf, P.; Reno, M. J.; Williams, D. R. Synthesis of Functionalized Oxazolines and Oxazoles with DAST and Deoxo-Fluor. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1165–1168.

¹¹ Mahler, S. G.; Serra, G. L.; Manta, E. Deoxo-Fluor-Mediated Cyclodehydration of β-Hydroxy Thioamides to the Corresponding Thiazolines. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8143–8146.

en la síntesis de tiazolinas fue reportado en 2001 por Mahler *et. al.* Deoxo-Fluor tiene la ventaja sobre DAST de ser térmicamente más estable.

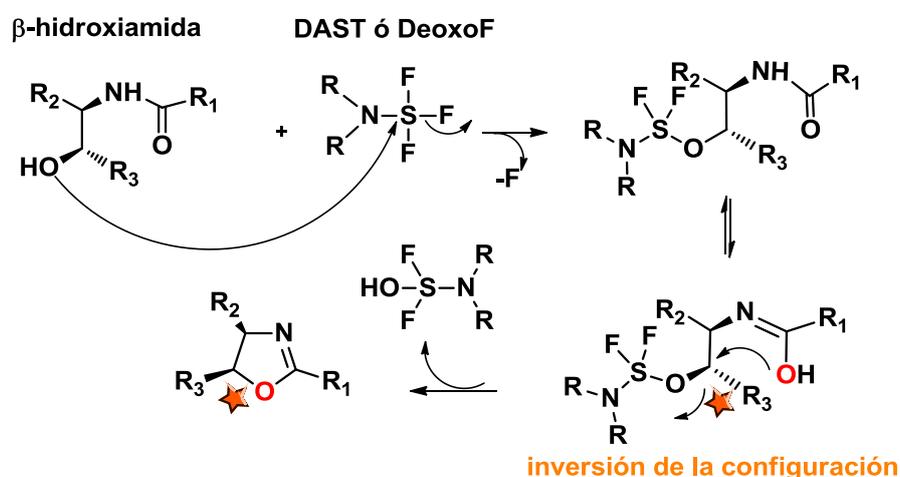


Figura 2.6. Mecanismo de formación de oxazolinas con agentes ciclodeshidratantes.

Tanto DAST como Deoxo-Fluor tienen la desventaja de reaccionar violentamente con agua, dando gases tóxicos, explosivos y corrosivos (HF libre). Recientemente, se han desarrollado nuevos agentes fluorantes que buscan sortear estas desventajas: XtalFluor-E (**15**) y XtalFluor-M (**16**),¹² (ver Figura 2.7) los cuales son sólidos cristalinos térmicamente más estables que DAST y Deoxo-Fluor (estabilidad térmica: DAST < Deoxo-Fluor < XtalFluor), y se ha comprobado su efectividad en la obtención de oxazolinas.¹³

¹² (a) L'heureux, A.; Beaulieu, F.; Bennett, C.; Bill, D. R.; Clayton, S.; Laflamme, F.; Mirmehrabi, M.; Tadayon, S.; Tovell, D.; Couturier, M. Aminodifluorosulfonium Salts: Selective Fluorination Reagents with Enhanced Thermal Stability and Ease of Handling. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3401–3411. (b) Beaulieu, F.; Beaugard, L.-P.; Courchesne, G.; Couturier, M.; Laflamme, F.; L'Heureux, A. Aminodifluorosulfonium Tetrafluoroborate Salts as Stable and Crystalline Deoxofluorinating Reagents. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5050–5053.

¹³ Pouliot, M.-F.; Angers, L.; Hamel, J.-D.; Paquin, J.-F. Synthesis of 2-Oxazolines and Related N-Containing Heterocycles Using [Et₂NSF₂]⁺BF₄⁻ as a Cyclodehydration Agent. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4121–4123.

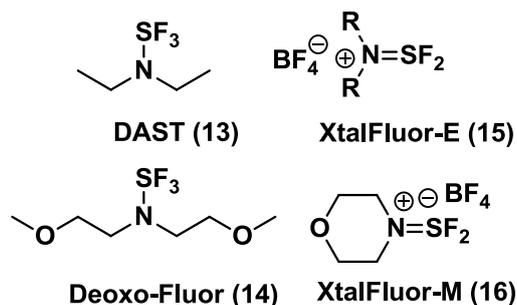


Figura 2.7 Agentes ciclodeshidratantes fluorantes

Las β -hidroxitioamidas, pueden obtenerse a partir de las β -hidroxiamidas utilizando una de las siguientes estrategias:

- 1) Sustituyendo el oxígeno carbonílico de la amida por azufre mediante la utilización por ejemplo de Reactivo de Lawesson (**17**), ver Figura 2.8.¹⁴ Dicho reactivo cuando es calentado, sufre apertura en su anillo central de azufre y fósforo, dando lugar a dos ditiofosfinas reactivas las cuales intercambian el oxígeno de la amida por un azufre.

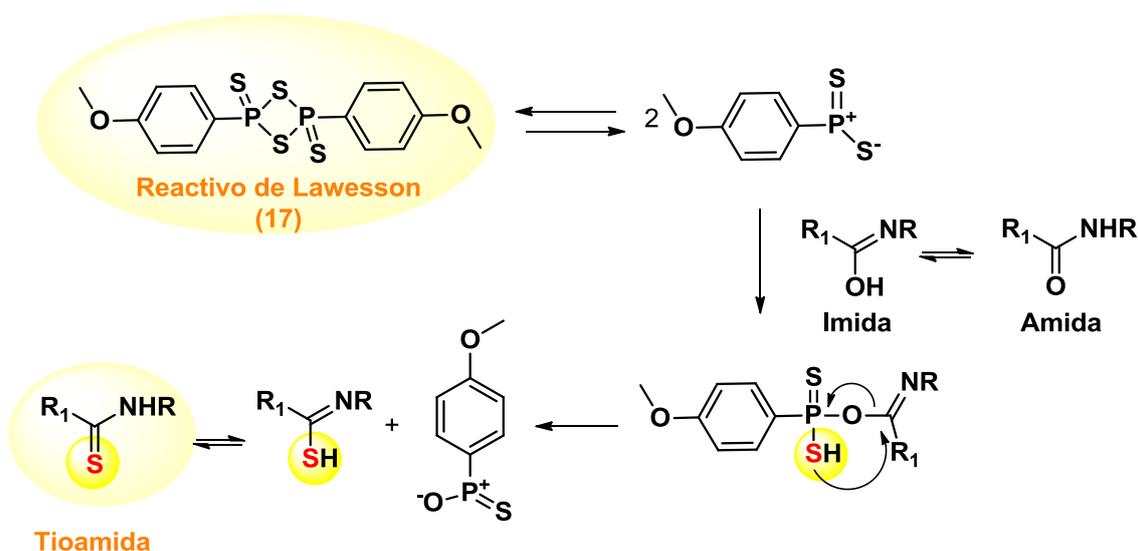


Figura 2.8. Mecanismo de obtención de tioamidas con Reactivo de Lawesson

¹⁴ Pedersen, B. S.; Scheibye, S.; Clausen, K.; Lawesson, S.-O. Studies on organophosphorus compounds. XXII. The dimer of p-methoxyphenylthionophosphine sulfide as thiation reagent. A new route to O-substituted thioesters and dithioesters *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1978**, *87*, 293.

- 2) Realizando una apertura de la oxazolina correspondiente a través de una tiólisis con H₂S (Figura 2.9).¹⁵

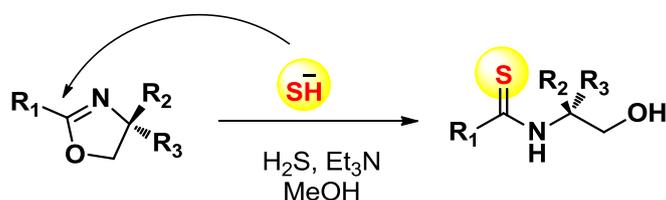


Figura 2.9. Formación de tioamidas a partir de oxazolinas

Dicha metodología plantea la apertura de la oxazolina en el C₂ en medios moderadamente ácidos o básicos usando solventes próticos (Figura 2.10)

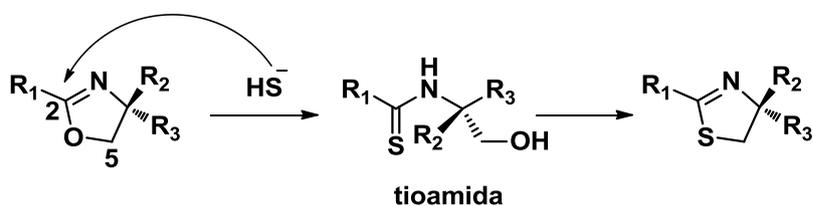


Figura 2.10. Mecanismo de obtención de tioamidas mediante tiólisis de oxazolinas

Otra de las estrategias sintéticas para obtener oxa(tia)zolinas, es a partir de amidas derivadas de β-aminoalcoholes ó β-aminotioles, respectivamente, utilizando TiCl₄.¹⁶ Dicha metodología tiene la desventaja de necesitar una gran cantidad de equivalentes de TiCl₄. Además se ha observado racemización en el C-α de aminoácidos, lo cual limita la utilidad de este método para la formación de una tiazolina dentro de un péptido.¹⁷

Kelly y colaboradores, han desarrollado una metodología biomimética de obtención de tiazolinas a partir de amidas derivadas de β-aminotioles utilizando

¹⁵ Wipf, P.; Miller, C. P.; Venkatraman, S.; Fritch, P. C. Thiolysis of Oxazolines: A New, Selective Method for the Direct Conversion of Peptide Oxazolines into Thiazolines. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6395–6398.

¹⁶ Akaji, K.; Kiso, Y. Total Synthesis of Thiangazole. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 10685–10694.

¹⁷ Raman, P.; Razavi, H.; Kelly, J. W. Titanium(IV)-Mediated Tandem Deprotection-Cyclodehydration of Protected Cysteine N-Amides: Biomimetic Syntheses of Thiazoline- and Thiazole-Containing Heterocycles. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3289–3292.

Tf₂O y Ph₃PO.¹⁸ Reportan la formación de un reactivo fosforado derivado de Tf₂O y Ph₃PO el cual convierte Cys protegida en la correspondiente tiazolina, manteniendo la configuración absoluta del C4 de la tiazolina (Figura 2.11).

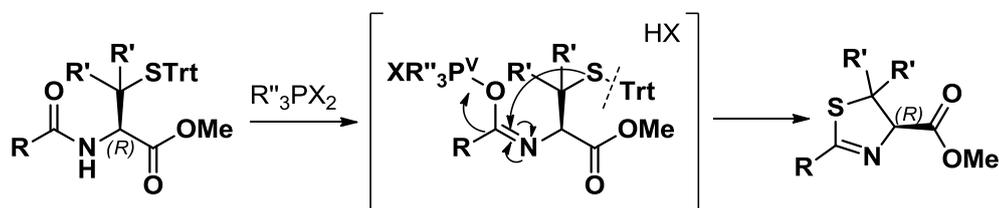


Figura 2.11 Mecanismo propuesto por Kelly para la formación de tiazolinas.

2.2.2.2 Síntesis de oxa/tiazoles por oxidación de oxa/tiazolinas

Las oxazolinas o tiazolinas son oxidadas para obtener así oxazoles y tiazoles respectivamente. La oxidación de tia/oxazolinas puede realizarse utilizando distintos reactivos; por ejemplo MnO₂, NiO₂, BrCCl₃C/DBU, NBS, Br₂, etc.

El agente oxidante más ampliamente utilizado es BrCCl₃/DBU por ser un método suave, limpio, sin reacciones secundarias y con altos rendimientos. La única limitante es que la 1,3-azolina debe poseer un sustituyente éster en la posición 4.

En el mismo trabajo sobre el uso de Deoxo-Fluor para la obtención de oxazolinas, Wipf *et al.* presentaron un procedimiento para realizar la oxidación *in situ* de la oxazolina obtenida, utilizando la mezcla BrCCl₃/DBU.¹⁰

El mecanismo de la oxidación con BrCCl₃/DBU involucra la halogenación por parte del BrCCl₃ y posterior deshidrohalogenación asistida por la base DBU.

¹⁸ You, S.; Razavi, H.; Kelly, J. W. A Biomimetic Synthesis of Thiazolines Using Hexaphenyloxodiphosphonium Trifluoromethanesulfonate. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 83–85.

2.2.2.3 Síntesis de Oxazoles y Tiazoles por Hantzsch

Otro de los métodos muy utilizados para obtención de tiazoles es la síntesis de Hantzsch partiendo de tioureas y bromopiruvato de etilo, Figura 2.12.¹⁹ Esta metodología también ha sido empleada para la obtención de oxazoles, pero son necesarias altas temperaturas y se obtienen bajos rendimientos.

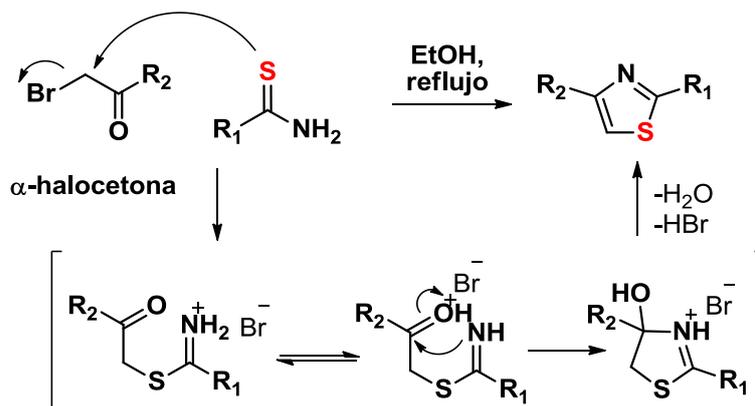


Figura 2.12 Síntesis de Hantzsch

La síntesis convencional de Hantzsch no es adecuada para tioamidas que presenten C- α quiral, dado que se produce racemización, resultado de la formación de un equivalente de HBr, Figura 2.13. Con el fin de evitar esta racemización de los reactivos quirales, Holzapfel, Meyers y Nicolau en forma independiente han desarrollado variaciones sobre la metodología tradicional.²⁰ Empleando bases débiles y bajas temperaturas han obtenido tiazoles quirales partiendo de aminoácidos ópticamente puros con buenos rendimientos y buenos excesos enantioméricos.

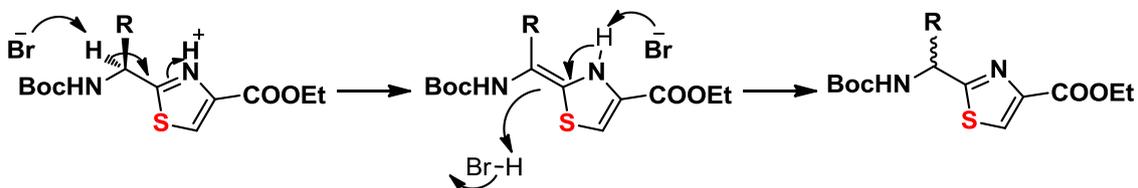


Figura 2.13 Mecanismo de racemización en tiazoles derivados de aminoácidos.

¹⁹ Hantzsch, A. *Ann. Chem.* **1888**, 249, 1.

²⁰ Merritt, E.; Bagley, M. Holzapfel-Meyers-Nicolaou Modification of the Hantzsch Thiazole Synthesis. *Synthesis* **2007**, 22, 3535–3541.

2.3 ESTRATEGIA SINTÉTICA

Para poder obtener los building blocks deseados hemos planteado el plan sintético de la Figura 2.14

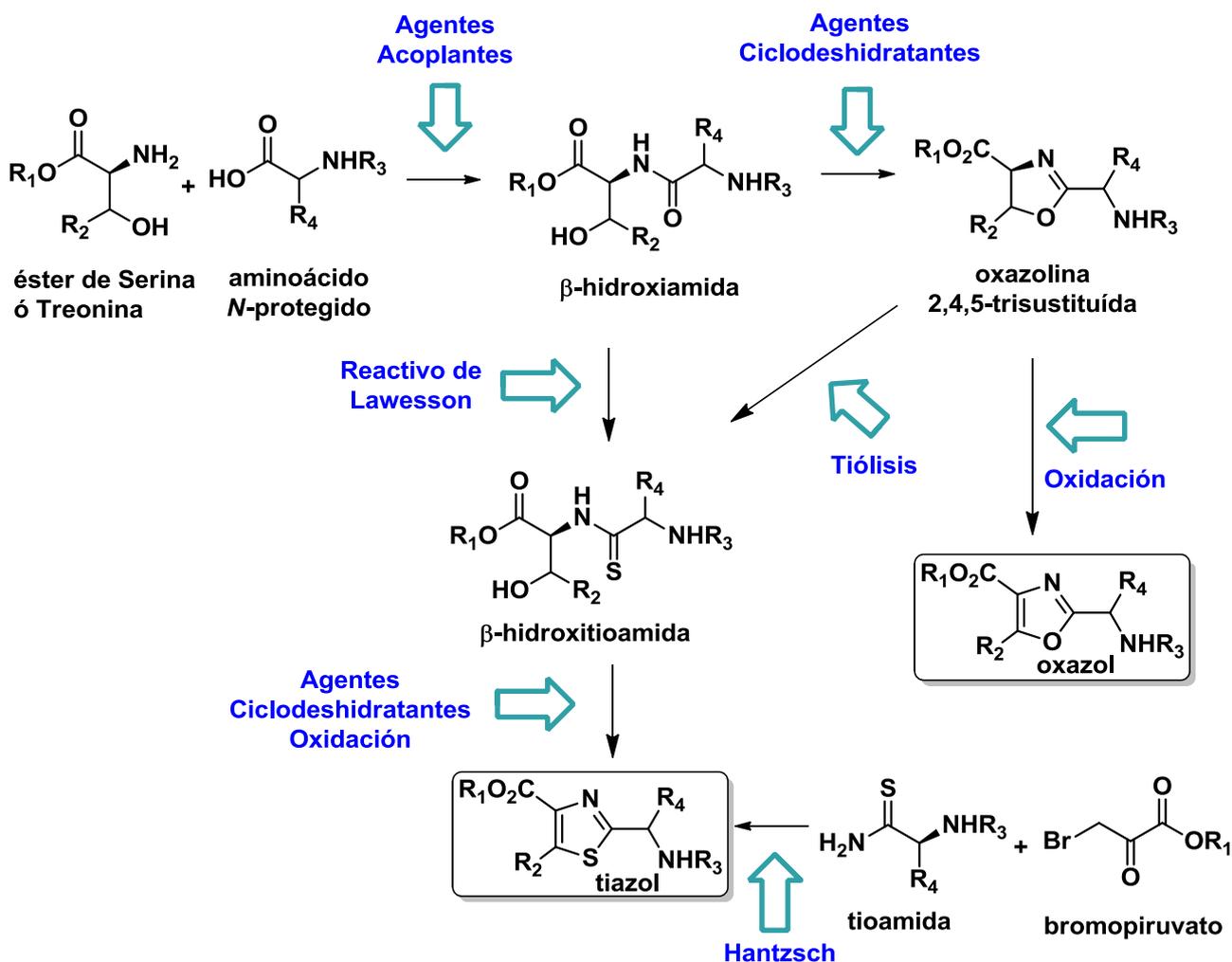


Figura 2.14

Basándonos en la experiencia del grupo, proponemos la síntesis de los building blocks heterocíclicos partiendo de aminoácidos ópticamente puros para dar β -hidroxiamidas que posteriormente serán ciclodeshidratadas para dar oxazolinas y oxidadas para dar los correspondientes oxazoles. Las oxazolinas serán sometidas a condiciones de tiólisis para obtener la correspondientes β -hidroxitioamidas para su posterior ciclodeshidratación y oxidación. Los tiazoles derivados de glicina se obtendrán siguiendo la metodología tradicional de Hantzsch.

2.4 RESULTADOS

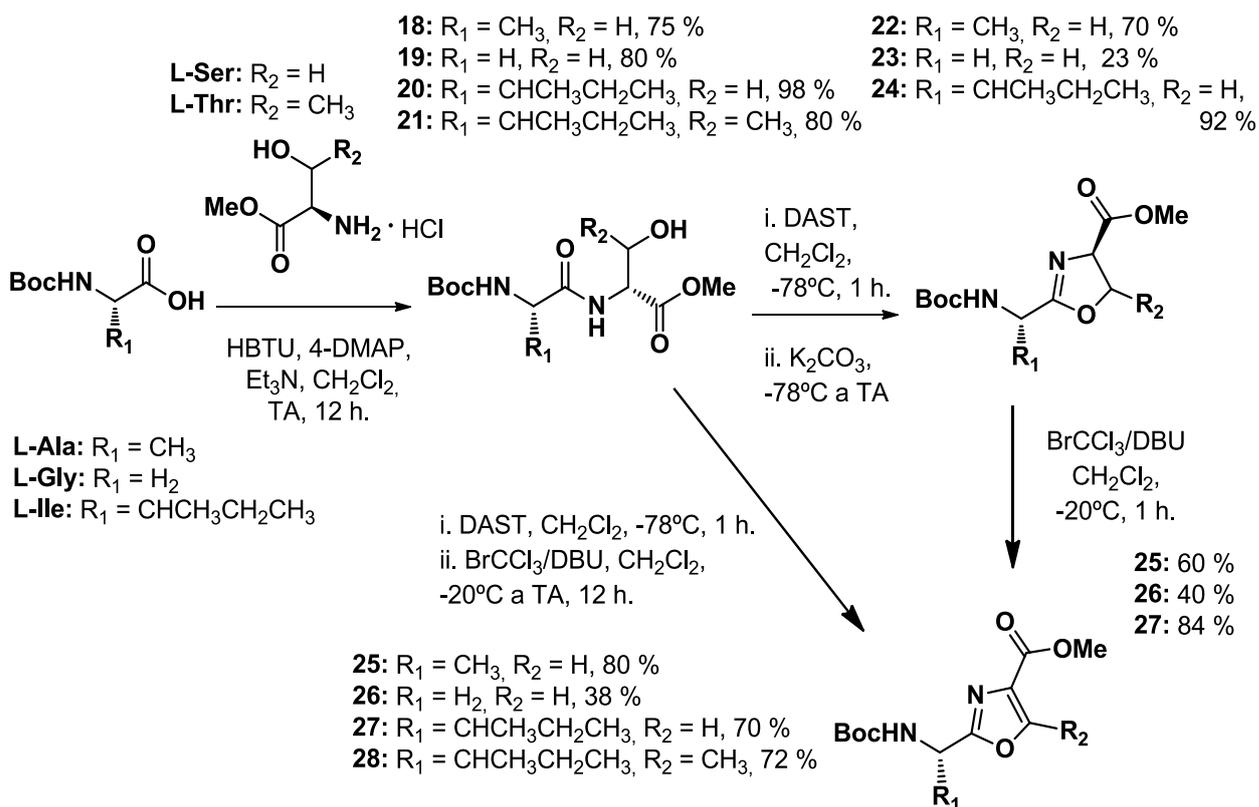
Se obtuvieron tiazoles y oxazoles derivados de distintos aminoácidos (ver Esquemas 2.1 y 2.2) siguiendo las estrategias anteriormente planteadas.

2.4.1 Síntesis de OXAZOLES

Para la síntesis de oxazoles, se partió del éster metílico de Ser o Thr y se acopló utilizando HBTU con Boc-Ala, Boc-Gly ó Boc-Ile; todos los aminoácidos son enantioméricamente puros y comercialmente disponibles. Se obtuvieron las β -hidroxiamidas correspondientes con muy buenos y excelentes rendimientos. A continuación estas β -hidroxiamidas fueron ciclodeshidratadas con DAST para obtener la oxazolina correspondiente. Los rendimientos fueron buenos excepto para el caso de la Gly, dado que la oxazolina es inestable durante el proceso de purificación.

Posteriormente, se oxidó con $\text{BrCCl}_3/\text{DBU}$ y se obtuvieron los oxazoles con buenos rendimientos.

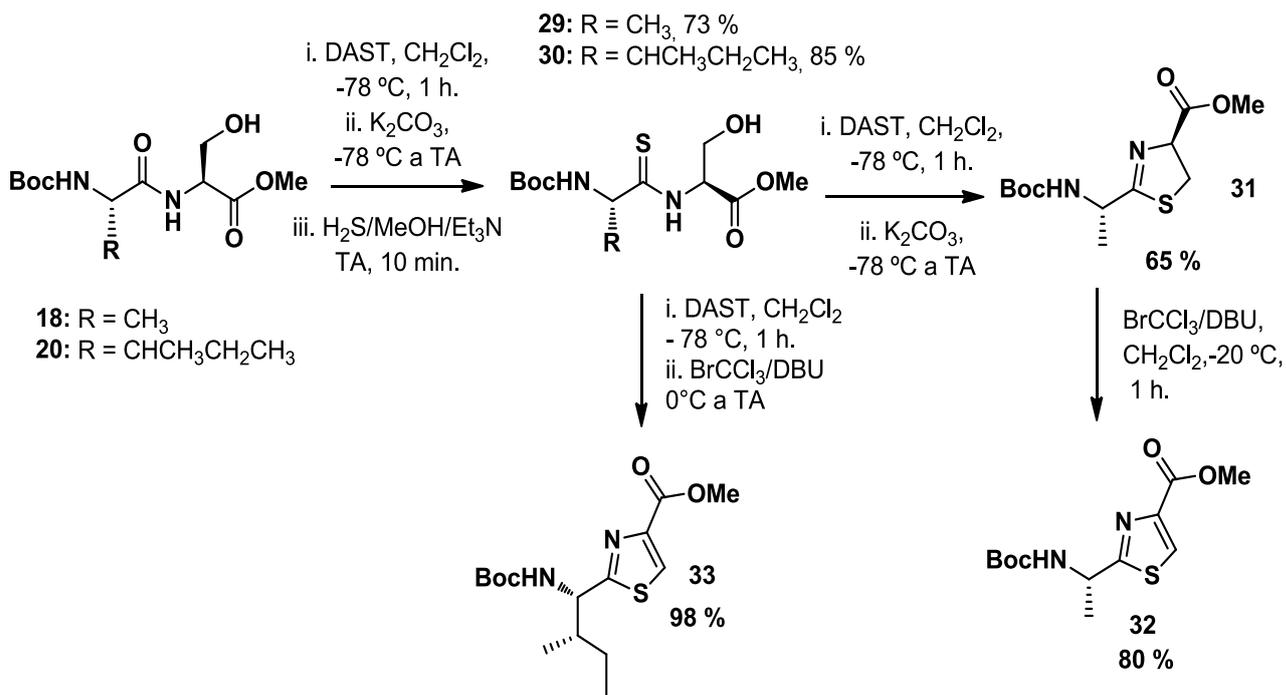
También se realizó la síntesis de oxazoles en un paso, partiendo de β -hidroxiamidas. Al ciclodeshidratar y oxidar *in situ*, se mejoraron los rendimientos; principalmente para el caso de Gly (**26**), ya que se evita el paso de purificación de la oxazolina (**23**), y por lo tanto su apertura. A su vez, se redujeron los tiempos de manipulación, evitando un paso de purificación lo cual economiza tiempo e insumos, esquema 2.1.



Esquema 2.1 – Síntesis de oxazoles

2.4.2 Síntesis de TIAZOLES

Para la síntesis de tiazoles, se partió de las β -hidroxiamidas Boc-Ala-Ser-OMe **18** y Boc-Ile-Ser-OMe **20** las cuales fueron ciclodeshidratadas con DAST y luego se barbotó H₂S(g) en la solución de oxazolona en Et₃N/ MeOH para obtener por tiólisis las tioamidas correspondientes **29** y **30**. Una vez obtenida la tioamida **29**, se ciclodeshidrató aislando la tiazolina **31** y luego se oxidó para obtener el tiazol **32**. Para el caso de la tioamida **30**, se oxidó *in situ*, obteniendo el tiazol **33** con excelente rendimiento, esquema 2.2.



Esquema 2.2 – Síntesis de tiazoles

En el ¹H-RMN de Boc-L-TioAla-Ser-OMe (**29**) se observan las señales de los protones alfa al tiocarbonilo duplicadas, esto nos llevó a pensar que podría tratarse de una mezcla de confórmeros o que hubiera epimerizado durante la tiólisis y que estuviéramos ante una mezcla de diasterómeros. Con el fin de determinar si se trata de confórmeros o no, se realizó el experimento ¹H-RMN a mayor temperatura. Al aumentar la temperatura la proporción de las señales que estaban duplicadas se modificó, y el desplazamiento también; por lo que podemos concluir que se trata de una mezcla de confórmeros favorecidos probablemente por la presencia del grupo protector Boc, ver Figura 2.15. Peregrina y colaboradores observaron en el estudio del aldeído de Garner que los compuestos con Boc pueden presentar un equilibrio dinámico generado por la rotación del enlace C-N del carbamato.²¹

²¹ Avenoz, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Jiménez-Osés, G.; Peregrina, J. M. Conformational Analysis of N-Boc-N,O-Isopropylidene-A-Serinals. A Combined DFT and NMR Study. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5713–5718.

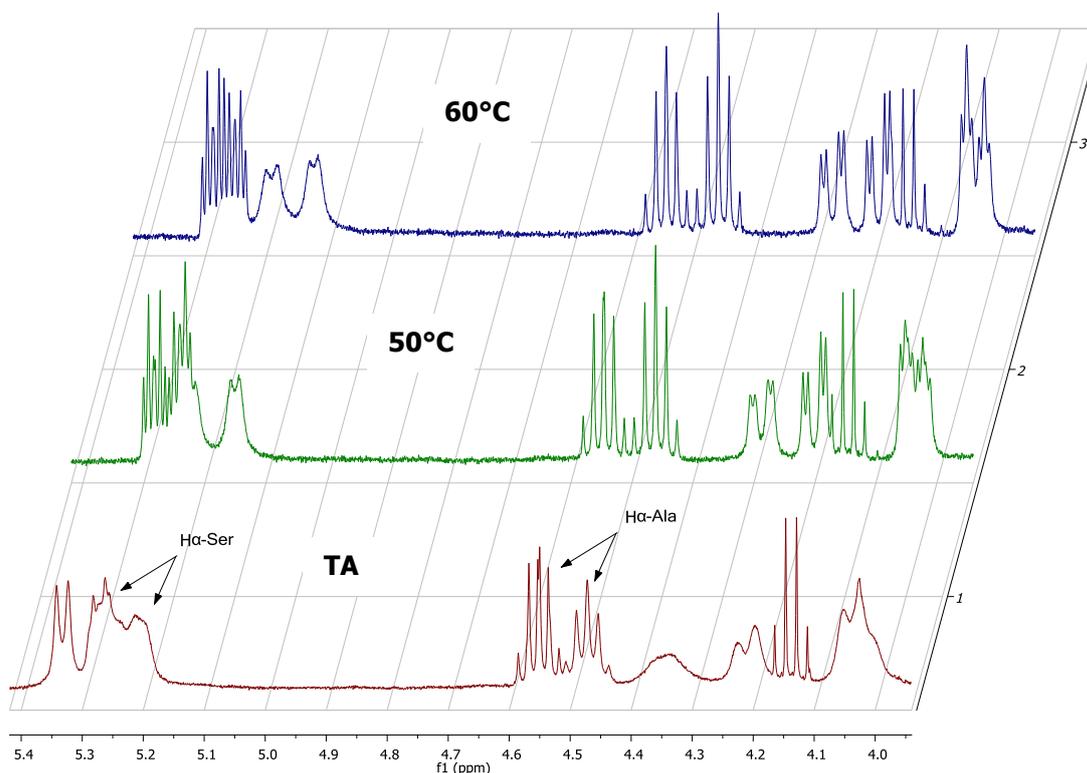
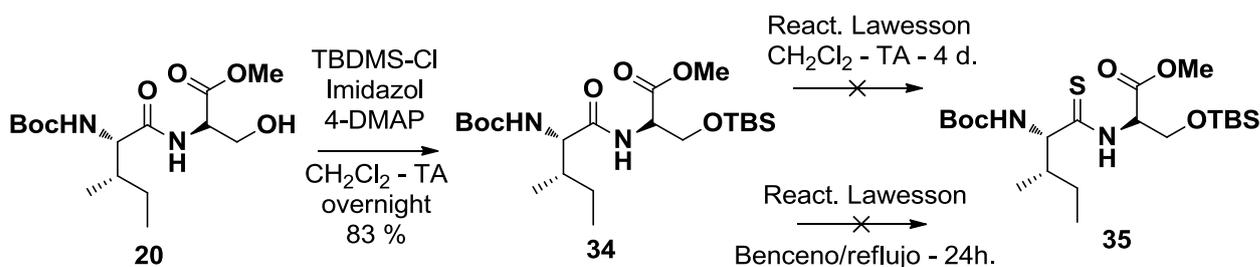


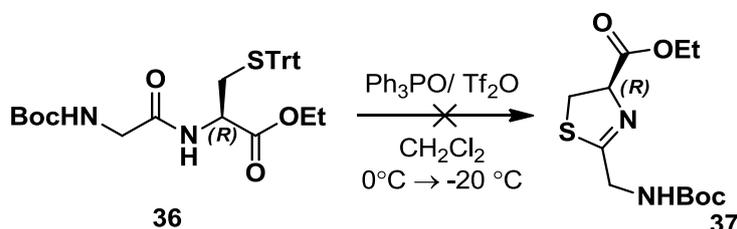
Figura 2.15. ^1H -RMN de Boc-L-TioAla-Ser-OMe **29**. Rojo: Temperatura Ambiente, Verde: 50 °C, Azul: 60 °C.

También nos propusimos investigar nuevas metodologías para obtener tiazolinas, dado que muchas veces la tiólisis resultaba engorrosa, debido al hecho de trabajar con H_2S . Para ello, nos planteamos realizar la tioamida derivada del dipéptido Boc-L-Ile-L-Ser-OMe **20**, para luego a partir de Hantzsch modificada obtener el tiazol correspondiente. Se sintetizó el dipéptido **20** se protegió el OH de Ser con TBS (**34**) y se realizó la tionación utilizando reactivo de Lawesson. Luego de dos intentos, no se obtuvo el producto deseado probablemente debido a que el reactivo de Lawesson que disponíamos en el momento no se encontraba en buenas condiciones (ver Esquema 2.3).



Esquema 2.3

También probamos las condiciones de Kelly¹⁸ de formación de tiazolidinas a partir de dipéptidos derivados de Cys. Se estudió la reacción con Boc-Gly-L-Cys(Trt)-OEt (**36**) pero sin obtener el producto deseado (**37**) (Esquema 2.4). Dada la ausencia de la señal correspondiente a los metilos de GP Boc en el espectro H-RMN, suponemos que una de las razones por la cual no se obtuvo la tiazolidina puede deberse a la labilidad del grupo protector Boc en medio ácido. Dado que durante el mecanismo de formación de la tiazolidina se forma ácido tríflico (ver Figura 2.11) y este fue suficiente para desproteger el grupo amino.²²

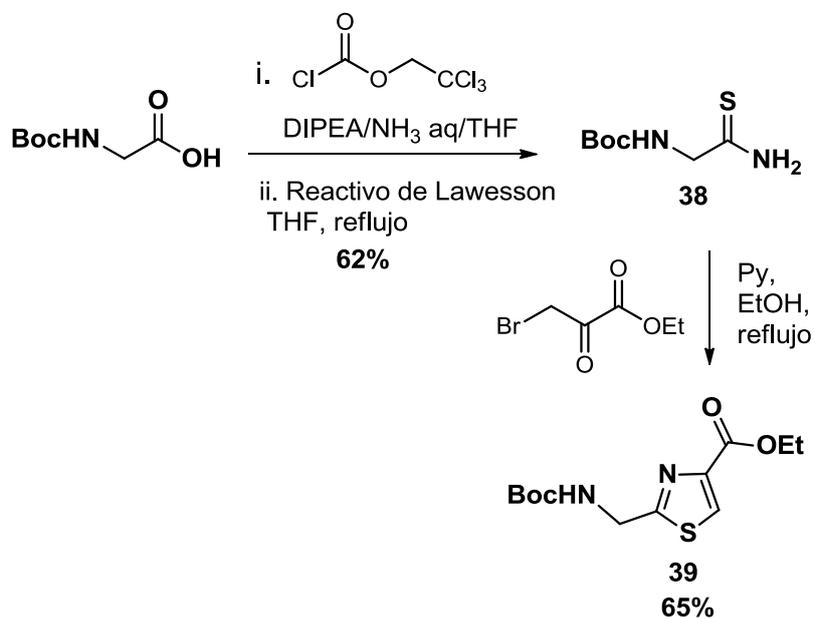


Esquema 2.4. Metodología de Kelly para obtener tiazolidinas

Dado que la oxazolidina **23** (derivada de Gly) resultaba inestable, decidimos emplear la metodología de Hantzsch que produce directamente el tiazol de manera de evitar este contratiempo. Para obtener el tiazol derivado de Gly, partimos de Gly-Boc y convertimos el ácido en amida utilizando cloroformiato de etilo/NH₃ y luego con reactivo de Lawesson en THF convertimos la amida en tioamida **38**. Partiendo de la tioamida **38** y siguiendo las condiciones de Hantzsch tradicionales utilizando bromo piruvato de etilo obtuvimos el tiazol **39**.

²² Fagúndez, C.; Serra, G. Heterocyclic Letters **2013**, 3(4), 415-426.

En este caso fue posible utilizar Hantzsch convencional ya que no tenemos un centro quiral en el carbono alfa (Esquema 2.5).



Esquema 2.5. Síntesis de Tiazol por Hantzsch

2.5 CONCLUSIONES

Se sintetizaron doce building blocks con rendimientos desde buenos a excelentes.

Se estudiaron diversas metodologías de obtención de los mismos.

2.6 PARTE EXPERIMENTAL

La cromatografía en capa fina se realizó utilizando placas de sílica gel sobre plástico de 0.20 mm de espesor (Macherey-Nagel, Polygram[®], silG/UV 254 nm) y revelado con lámpara UV a 254 nm, vapores de yodo, spray de ninhidrina o fosfomolibdico.

Diclorometano seco se obtuvo de CaH₂.²³ Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en sistemas secos y bajo atmósfera de nitrógeno.

La cromatografía en columna se realizaron utilizando Sílica gel 60 (J.T. Baker, 40 µm diámetro promedio de partícula).

Los espectros de RMN (¹H NMR y ¹³C NMR) se realizaron en un equipo Bruker Advance DPX-400, los desplazamientos químicos se relacionan con el desplazamiento de tetrametilsilano (0 ppm).

Los espectros de masa se realizaron en un espectrómetro de masa microQTOF-G (Bruker Daltonics) mediante ionización de electrospray.

Los espectros infrarrojos se realizaron en un espectrofotómetro FT-IR Shimadzu 8101A en film sobre pastillas de NaCl.

Las medidas de punto de fusión fueron realizadas en Fischer-Johns de Fischer Scientific Comp.

El ángulo de rotación óptica fue medido en un polarímetro Kruss Optronic GmbH P8000 con una celda de 0.5 mL

PROCEDIMIENTOS GENERALES

Formación de enlace amida: obtención de β-Hidroxiamidas

HBTU (1.2 eq), DIPEA (3.4 eq) y 4-DMAP (0.2 eq) se agregan en dicho orden a una solución en agitación de la respectiva amina (1.0 eq) y ácido (1.0 eq) bajo atmósfera de N₂ en CH₂Cl₂ seco a 0 °C. La mezcla de reacción se deja alcanzar TA y se deja con agitación toda la noche. Se filtra a través de celite, se lava con CHCl₃ y se evapora *in vacuo*. El crudo se redisuelve en AcOEt, se lava con HCl

²³ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", 3th Ed. Pergamon Press, Oxford, **1988**.

5% y con solución saturada de NaHCO_3 , se seca con MgSO_4 , filtra y concentra a presión reducida. El crudo se purifica por columna cromatográfica utilizando el eluyente correspondiente para dar la respectiva amina.

Ciclodeshidratación con DAST: obtención de oxa/tiazolinas

Trifluoruro de dietilaminosulfuro (DAST) (1.1 eq) se añade gota a gota a una solución a -78°C de la β -hidroxiamida/tioamida en CH_2Cl_2 . Luego de agitar por 1 h a -78°C , K_2CO_3 (1.5 eq) se añade en una porción y la mezcla se deja alcanzar TA. Se agrega una solución saturada de NaHCO_3 y se extrae con CH_2Cl_2 . Las capas orgánicas combinadas se secan con MgSO_4 , se filtran y concentran a presión reducida. El residuo se purifica por columna cromatográfica dando la oxazolina/tiazolina deseada.

Tiólisis: obtención de β -hidroxitioamidas

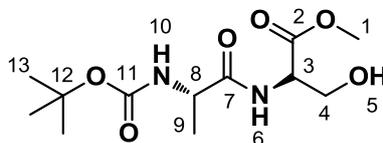
Una solución de oxazolina (3.0 mmol, pura o crudo de reacción) en 9 mL de $\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$ seco (2:1), se satura con H_2S y agita a temperatura ambiente hasta observar desaparición de reactivo. ¡CUIDADO! H_2S es un gas tóxico y tiene que ser manejado en una campana bien ventilada. El exceso de H_2S , MeOH y Et_3N se elimina por evaporación a presión reducida a través de una solución con hipoclorito de sodio. El residuo se disuelve en AcOEt , HCl ac. (5%) se añade hasta alcanzar pH 6, y las capas orgánicas se extraen con AcOEt . Las fases orgánicas combinadas se secan con MgSO_4 , se filtra, se concentra a presión reducida y se purifica por cromatografía flash.

Oxidación de oxa/tiazolinas: obtención de oxa/tiazoles

A la mezcla de reacción de la oxa/tiazolina obtenida utilizando DAST, se le añade gota a gota BrCCl_3 (4 eq.), seguido por DBU (4 eq.). La reacción se agita a TA durante toda la noche. Se agrega NaHCO_3 saturado acuoso y la mezcla se extrae con AcOEt . Las capas orgánicas combinadas se secan sobre MgSO_4 , se filtra, y se concentra a presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía flash para obtener el oxazol/tiazol deseado.

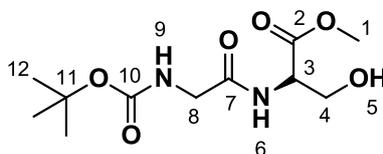
***β*-Hidroxiámidas:**

Boc-L-Ala-L-Ser-OMe (18):



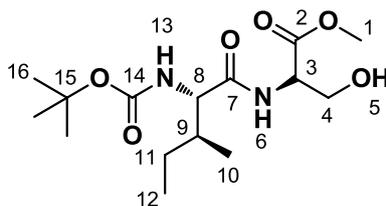
Aceite transparente (1.15 mg, 75 %), $R_f = 0.56$ (AcOEt), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.39 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H_9), 1.44 (s, 9H_{13}), 3.79 (s, 3H_1), 3.96 (bs, 2H_4), 4.21 (m, 1H_8), 4.66 (m, 1H_3), 5.32 (bs, 1H_{10}), 7.25 (bs, 1H_6). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 18.2 (C_9), 28.3 (3C_{13}), 50.3 (C_8), 52.7 (C_1), 54.8 (C_3), 62.6 (C_4), 80.5 (C_{12}), 155.9 (C_{11}), 170.8 (C_2), 173.2 (C_7). **HRMS** calculada para $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 313.1376 observada 313.1379.

Boc-Gly-L-Ser-OMe (19):



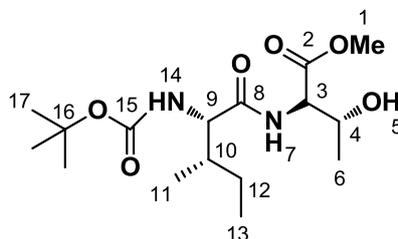
Aceite transparente (1.12 g, 80 %), $R_f = 0.55$ (AcOEt), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.47 (s, 9H_{12}), 3.82 (s, 3H_1), 3.86 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H_8), 3.99 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H_4), 4.69 (m, 1H_3), 5.29 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H_9), 7.08 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H_6). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 28.3 (3C_{12}), 44.3 (C_8), 52.9 (C_1), 54.8 (C_3), 62.8 (C_4), 80.7 (C_{11}), 156.4 (C_{10}), 169.8 (C_7), 171.3 (C_2). **HRMS** calculada para $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_6$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 299.1219, observada 299.1212

Boc-L-Ile-L-Ser-OMe (20):



Aceite transparente (1.61 g, 91 %), $R_f = 0.55$ (AcOEt:EP, 4:1), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H_{12}), 0.98 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H_{10}), 1.22 – 1.17 (m, 1H_{11}), 1.44 (s, 3H_{16}), 1.60 – 1.55 (m, 1H_{11}), 1.85 (s, H_9), 3.54 – 3.52 (m, H_5), 3.80 (s, 3H_1), 3.95 - 3.97 (m, 2H_4 , 1H_8), 4.69 (ddd, 1H_3 , $J_1 = 3.5$ Hz, $J_2 = 3.9$ Hz, $J_3 = 7.5$ Hz), 5.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H_{13}), 7.03 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H_6). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 11.2 (C_{12}), 15.4 (C_{10}), 24.9 (C_{11}), 28.3 (3C_{16}), 37.1 (C_9), 52.7 (C_1), 54.7 (C_3), 59.6 (C_8), 62.7 (C_4), 80.3 (C_{15}), 156.3 (C_{14}), 170.8 (C_7), 172.2 (C_2). **HRMS** calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{NaO}_6$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 355.1845, observada 355.1849

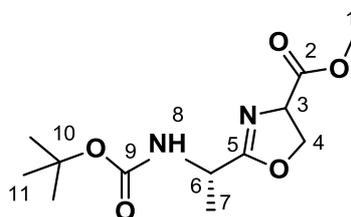
Boc-L-Ile-L-Thr-OMe (21):



Sólido blanco (1.50 g, 80 %). $R_f = 0.67$ (AcOEt:EP, 4:1), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.94 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H_{13}), 0.98 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H_{11}), 1.12 – 1.20 (m, 1H_{12}), 1.23 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H_6), 1.45 (s, 9H_{17}), 1.51 – 1.62 (m, 1H_{12}), 1.80 – 1.91 (m, 1H_{10}), 3.12 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H_5), 3.79 (s, 3H_1), 3.98 (dd, $J = 7.7, 8.7$ Hz, 1H_9), 4.33 – 4.40 (m, 1H_4), 4.64 (dd, $J_1 = 2.5$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz, 1H_3), 5.19 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H_{14}), 6.85 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H_7). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 11.2 (C_{13}), 15.4 (C_{11}), 19.9 (C_6), 24.8 (C_{12}), 28.3 (3C_{17}), 36.9 (C_{10}), 52.6 (C_1), 57.2 (C_3), 59.4 (C_9), 68,1 (C_4), 80.1 (C_{16}), 156.4 (C_{15}), 171.2 (C_2), 172.3(C_8).

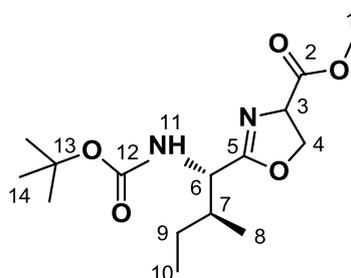
Oxazolinas:

Boc-L-Ala-Ozl-OMe (22):



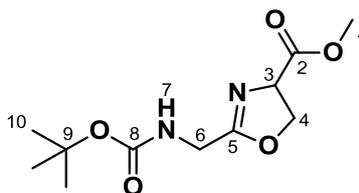
Aceite naranja-marrón (242 mg, 70 %), $R_f = 0.52$ (AcOEt/EP, 80:20), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.43 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H₇), 1.46 (s, 9H₁₁), 3.82 (s, 3H₁), 4.47-4.61 (m, 2H₄, 1H₆), 4.78 (dd, $J = 1.4$ Hz, $J = 8.0$ Hz, 1H₃), 5.14 (s, 1H₈). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 19.6 (C₇), 28.3 (3C₁₁), 44.7 (C₆), 52.8 (C₁), 67.7 (C₄), 70.3 (C₃), 79.8 (C₁₀), 154.7 (C₉), 171.3 (C₂). **HRMS** calculada para $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_6$ ($[\text{M}+\text{Na}+\text{H}_2\text{O}]^+$) 313.3026, observada 313.1345

Boc-L-Ile-L-Ozl-OMe:



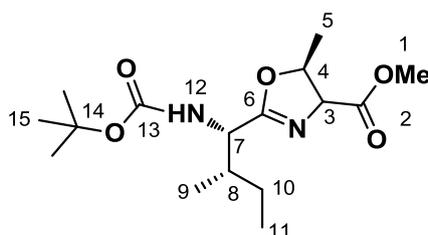
Aceite amarillento (563 mg, 98 %), $R_f = 0.62$ (EtOAc:hexane, 3:2), $[\alpha]_D = -65.7$ (c 1.8, CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.91 - 0.94 (m, 3H₁₀, 3H₈), 1.10 - 1.23 (m, 1H₉), 1.44 (s, 9H₁₄), 1.45 - 1.55 (m, 1H₉), 1.80 - 1.89 (m, 1H₇), 3.80 (s, 3H₁), 4.40 (dd, $J_1 = 4.6$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz, 1H₆), 4.42 - 4.54 (m, 2H₄), 4.76 (dd, $J_1 = 1.3$ Hz, $J_2 = 7.7$ Hz, 1H₃), 5.22 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H₁₁). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 11.7 (C₁₀), 15.1 (C₈), 24.8 (C₉), 28.3 (3C₁₄), 38.6 (C₇), 52.7 (C₁), 53.1 (C₆), 67.7 (C₃), 70.0 (C₄), 79.6 (C₁₃), 155.4 (C₁₂), 170.0 (C₅), 171.4 (C₂).

Boc-Gly-Ozl-OMe (23):



Mezcla de epímeros ó de confórmeros (como el siguiente paso es la oxidación no nos detuvimos en determinar si son epímeros o confórmeros), aceite naranja-marrón (90mg, 23%) , $R_f = 0.55$ (AcOEt). **HRMS** calculada para $C_{11}H_{18}N_2NaO_5$ ($[M+Na]^+$) 281.1113 observada 281.1093

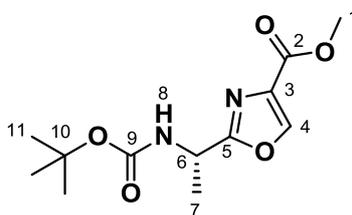
Boc-L-Ile-Ozl(Met)-OMe (24):



Aceite transparente (1.26 g, 95 %), $R_f = 0.70$ (AcOEt:EP, 3:2), **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H₁₁), 0.95 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H₉), 1.14 (m, 1H₁₀), 1.25 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H₅), 1.39 (s, 9H₁₅), 1.54 (m, 1H₁₀), 1.83 (m, 1H₈), 3.71 (s, 3H₁), 4.33 (dd, $J_1 = 4.0$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz, 1H₇), 4.76 (dd, $J_1 = 1.3$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz, 1H₄), 4.91 (m, 1H₃), 5.24 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H₁₂). **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 11.7 (C₁₁), 15.0 (C₉), 16.0 (C₅), 24.5 (C₁₀), 28.2 (3C₁₅), 38.3 (C₈), 52.9 (C₁), 60.2 (C₇), 70.6 (C₃), 78.2 (C₄), 79.4 (C₁₄), 155.3 (C₁₃), 169.7 (C₆), 170.1 (C₂).

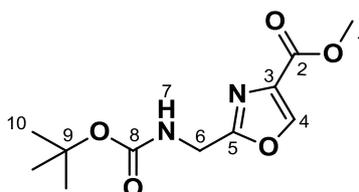
OXAZOLES:

Boc-L-Ala-Oxz-OMe (25):



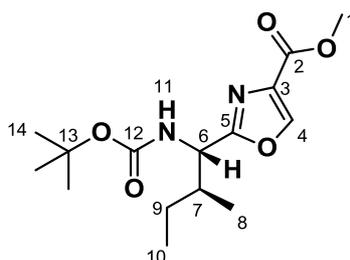
Sólido blanco cristalino (254 mg, 80 %), $R_f = 0.57$ (AcOEt/EP, 1:1), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.45 (s, 9H₁₁), 1.57 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H₇), 3.93 (s, 3H₁), 5.02 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H₆), 5.23 (s, 1H₈), 8.20 (s, 1H₄). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 20.2 (C₇), 28.3 (3C₁₁), 44.7 (C₆), 52.2 (C₁), 80.2 (C₁₀), 133.2 (C₃), 144.1 (C₄), 154.9 (C₉), 161.6 (C₂), 166.0 (C₅). **HRMS** calculada para C₁₂H₁₈N₂NaO₅ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 293.1113, observada 293.1096

Boc-Gly-Oxz-OMe (26):



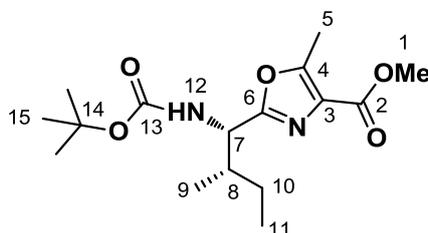
Sólido blanco (32 mg, 38 %), $R_f = 0.54$ (AcOEt/EP, 70:30), $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ ppm 1.45 (s, 9H₁₀), 3.92 (s, 3H₁), 4.50 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H₆), 5.23 (bs, 1H₇), 8.20 (bs, 1H₄). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 28.3 (3C₁₀), 37.9 (C₆), 52.3 (C₁), 80.2 (C₉), 133.3 (C₃), 144.3 (C₄), 155.5 (C₈), 161.4 (C₈), 162.3 (C₅).

Boc-L-Ile-Oxz-OMe (27):



Sólido blanco (576 mg, 70 %), $R_f = 0.50$ (AcOEt/EP, 2:3), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.84 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H_8), 0.93 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H_{10}), 1.19 (m, 1H_9), 1.45 (s, 9H_{14}), 1.50 (m, 1H_9), 1.95 (m, 1H_7), 3.94 (s, 3H_1), 4.88 (dd, $J_1 = 9.3\text{Hz}$, $J_2 = 6.2$ Hz, 1H_6), 5.33 (d, $J = 9.0$ Hz, H_{11}), 8.20 (s, 1H_4). $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3) δ ppm 11.4 (C_{10}), 15.2 (C_8), 25.1 (C_9), 28.3 (C_{14}), 39.5 (C_7), 52.3 (C_1), 53.4 (C_6), 80.1 (C_{13}), 133.2, (C_3), 143.8 (C_4), 155.3 (C_{12}), 161.6, (C_2), 165.2 (C_5). **HRMS** calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 313.1685, observada 313.1759

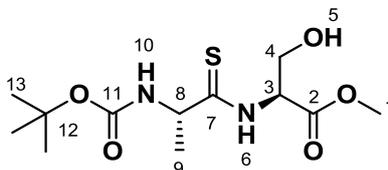
Boc-L-Ile-Oxz(Met)-OMe (28):



Sólido blanco (954 mg, 72 %), $R_f = 0.48$ (AcOEt:EP, 2:3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.87 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H_9), 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H_{11}), 1.11 – 1.22 (m, 1H_{10}), 1.44 (s, 9H_{15}), 1.46 – 1.51 (m, 1H_{10}), 1.89-1.94 (m, 1H_8), 2.62 (s, 3H_5), 3.91 (s, 3H_1), 4.79 (dd, $J_1 = 6.2$ Hz, $J_2 = 9.1\text{Hz}$, 1H_7), 5.29 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H_{12}). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 11.4 (C_{11}), 12.0 (C_5), 15.2 (C_9), 25.0 (C_{10}), 28.3 (3C_{15}), 39.4 (C_8), 52.0 (C_1), 53.2 (C_7), 79.9 (C_{14}), 127.3 (C_3), 155.3 (C_{13}), 156.3 (C_{13}), 162.1 (C_6), 162.7 (C_2).

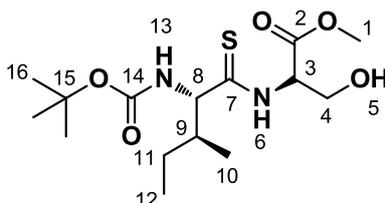
β-Hidroxitioamidas:

Boc-L-TioAla-L-Ser-OMe (29):



Aceite amarillento (82 mg, 73%), mezcla de confórmers, $R_f = 0.50$ (AcOEt/EP, 80:20), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 9H_{13} : 1.44 (s), 1.46 (s), 3H_9 : 1.49 (d, $J = 6.9$ Hz), 1.54 (d, $J = 7.0$ Hz), 3H_1 : 3.84 (s), 3.85 (s), 2H_4 : 4.04 (d, $J = 10.1$ Hz), 4.21 (d, $J = 11.6$ Hz), 4.33 (bs), 1H_8 : 4.51 – 4.43 (m, 1H), 4.59 – 4.51 (m, 1H), 5.21 (bs, 1H_3), 1H_{10} : 5.27 (d, $J = 7.9$ Hz), 5.33 (d, $J = 7.6$ Hz), 1H_6 : 8.83 (d, $J = 6.2$ Hz), 8.76 (d, $J = 7.2$ Hz). **HRMS** calculada para $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_5\text{S}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 329,1147, observada 329.1127

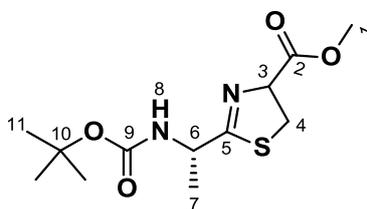
Boc-L-TioIle-L-Ser-OMe (30):



Sólido blanco (329 mg, 85 %), $R_f = 0.38$ (EtOAc:hexane, 2:3). $[\alpha]_D = +153.5$ (c 2.5, CH_2Cl_2). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89–0.99 (m, 3H_{10} , 3H_{12}), 1.05–1.29 (m, 1H_{11}), 1.44 (s, 9H_{16}), 1.61–1.77 (m, 1H_{11}), 1.89–1.99 (m, 1H_9), 3.83 (s, 3H_1), 4.04–4.18 (m, 1H_8 , 2H_4), 5.28–5.32 (m, 1H_3), 5.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H_{13}), 8.8 (bs, 1H_6). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 11.0 (C_{12}), 15.4 (C_{10}), 24.8 (C_{11}), 28.3 (3C_{16}), 39.1 (C_9), 52.9 (C_1), 59.7 (C_3), 61.4 (C_4), 66.0 (C_8), 80.6 (C_{15}), 156.4 (C_{14}), 170.0 (C_2), 205.7 (C_7).

TIAZOLINAS

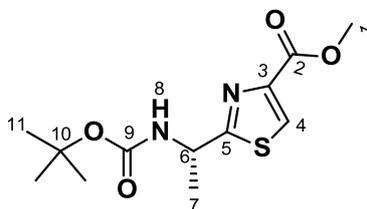
Boc-L-Ala-Tzl-OMe (31):



Aceite amarillento (46 mg, 65 %), $R_f = 0.52$ (AcOEt/EP, 70:30), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.43 (s, 3H₇), 1.45 (s, 9H₁₁), 3.50 – 3.65 (m, 2H₄), 3.82 (s, 3H₁), 4.60 (bs, 1H₆), 5.11 (dd, $J = 9.3$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H₃), 5.28 (s, 1H₈). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 20.3 (C₇), 28.3 (3C₁₁), 35.2 (C₄), 49.3 (C₆), 52.8 (C₁), 77.3 (C₃), 79.8 (C₁₀), 154.8 (C₉), 171.1 (C₂), 177.2 (C₅). **HRMS** calculada para C₉H₈N₂O₃S ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 224.0256, observada 225.0334

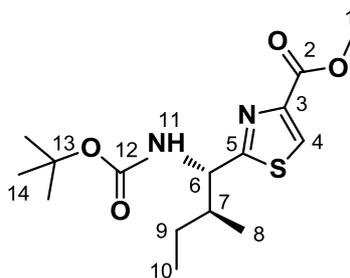
TIAZOLES

Boc-L-Ala-Thz-OMe (32):



Sólido blanco cristalino (26.4 mg, 80%), $R_f = 0.50$ (AcOEt/EP, 70:30), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.47 (s, 9H₁₁), 1.64 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H₇), 3.97 (s, 3H₁), 5.13 (s, 1H₆), 5.21 (s, 1H₈), 8.13 (s, 1H₄). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 28.3 (3C₁₁), 21.8 (C₇), 48.9 (C₆), 52.5 (C₁), 127.5 (C₄), 146.8 (C₃), 161.9 (C₂), 175.2 (C₅). **HRMS** calculada para C₁₂H₁₈N₂NaO₄S ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 309.0885, observada 309.0879

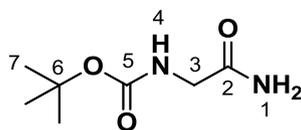
Boc-L-Ile-Thz-OMe (33):



Aceite amarillento (94 mg, 99 %). $R_f = 0.35$ (EtOAc:EP, 7:3), $[\alpha]_D = -65.7$ (c 1.8, CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.91 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H₁₀), 0.95 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H₈), 1.10–1.22 (m, 1H₉), 1.44–1.53 (bs, 9H₁₄, 1H₉), 2.14–2.24 (m, 1H₇), 3.96 (s, 3H₁), 4.90–4.98 (m, 1H₆), 5.32 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H₁₁), 8.1 (s, 1H₄). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 11.6 (C₁₁), 15.8 (C₈), 24.4 (C₉), 28.3 (3C₁₄), 39.7 (C₇), 52.5 (C₁), 57.5 (C₆), 80.1 (C₁₃), 127.1 (C₄), 147.0 (C₃), 155.3 (C₁₂), 161.9 (C₂), 173.3 (C₅).

Tiazol derivado de Gly:

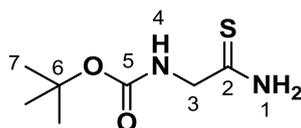
Boc-Glicinamida



Se agrega DIPEA (1.2 mL, 6.84 mmol) a una solución de Boc-Gly-OH OH (1.00 g, 5.70 mmol) en THF seco (16 mL) bajo atmósfera de N₂ a 0 °C y se agita por 30 min. A continuación se agrega rápidamente 2,2,2-tricloroetil cloroformiato (0.94 mL, 6.84 mmol), se continúa agitando por 30 min. a 0 °C. Se agrega una solución acuosa de amoníaco (2.0 mL) en THF (2.0 mL), se agita a TA por 16 h. La mezcla de reacción se concentra al vacío y el residuo resultante se retoma con AcOEt (40 mL) y H₂O (40 mL). Las capas acuosas se extraen con AcOEt (2 x 30 mL). Las capas orgánicas se lavan con solución saturada de NaHCO₃ (30 mL), H₂O (30 mL) y brine (30 mL). Se secan con Na₂SO₄, se filtra y se concentra bajo presión reducida. El crudo de reacción se purifica por columna cromatográfica con SiO₂, utilizando AcOEt como fase móvil.

Aceite transparente (796 mg, 80 %), $R_f = 0.55$ (AcOEt), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.44 (s, 9H₇), 3.80 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H₃), 5.31 (m, 1H₄), 5.93 (s, 1H₁), 6.28 (s, 1H₁). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 28.3 (3C₇), 43.9 (C₃), 80.3 (C₆), 156.1 (C₅), 172.3 (C₂).

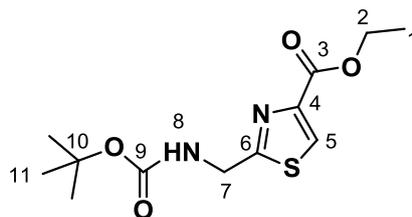
Boc-Tioglicinamida (38):



Se agita una solución de Boc-Glicinamida (740 mg, 4.25 mmol) y reactivo de Lawesson (893 mg, 4.25 mmol) en CH_2Cl_2 seco (50 mL) a TA por 16 h. bajo atmósfera de N_2 . Se agrega solución saturada de NaHCO_3 (15 mL), se deja con agitación a TA por 1 h y se extrae. Se agrega AcOEt (15 mL) se extrae, y se lava con Brine (15 mL). Se secan con MgSO_4 , se filtra y se concentra a vacío. El crudo de reacción se purifica por columna cromatográfica con SiO_2 , utilizando AcOEt/EP (1:1) como fase móvil. Se obtuvieron 466 mg del producto deseado.

Sólido blanco (466 mg, 60 %). $R_f = 0.51$ (AcOEt:EP, 1:1), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.46 (s, 9H₇), 4.16 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H₃), 5.33 (m, 1H₄), 7.66 (m, 1H₁), 7.89 (m, 1H₁). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 28.3 (3C₇), 51.4 (C₃), 81.1 (C₆), 156.4 (C₅), 205.1 (C₂).

Boc-Gly-Thz-OEt (38):



Se agrega bromoetil piruvato (1.75 mL, 13.99 mmol) a una solución de Boc-tioglicinamida (1.33 g, 6.99 mmol) y piridina (1.69 mL, 21.0 mmol) en EtOH seco (60 mL). La mezcla de reacción se refluxa toda la noche. Se elimina bajo vacío el EtOH, se retoma con AcOEt (40 mL), se lava con H₂O y brine. La capa orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se concentra a vacío. El crudo de reacción se purifica por columna cromatográfica con SiO₂, utilizando AcOEt/EP (1:1) como fase móvil.

Sólido marrón (1.31 g, 65%). **Rf** = 0.5 (AcOEt:EP, 1:1), **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 1.39 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H₁), 1.46 (s, 9H₇), 4.14 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H₂), 4.64 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H₇), 5.31 (bs, 1H₈), 8.11 (s, 1H₅). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 14.3 (C₁), 28.3 (3C₁₁), 42.4 (C₇), 61.5 (C₂), 80.5 (C₁₀), 127.9 (C₅), 146.9 (C₄), 155.6 (C₉), 161.3 (C₃), 170.0 (C₆).

Capítulo 3

SÍNTESIS DE PRECURSORES ABIERTOS DE MACROCICLOS ANÁLOGOS A AERUCICLAMIDAS

3.1 INTRODUCCIÓN/ ANTECEDENTES

En los últimos años, la síntesis de péptidos ha entrado en auge (ver Capítulo 4), dada la aprobación de nuevos fármacos peptídicos por la FDA, y de la gran cantidad y variedad de productos naturales bioactivos peptídicos o derivados de estos. Tal es el caso de estructuras heterocíclicas unidas mediante enlaces peptídicos, como por ejemplo, Aeruciclámidas, Venturamidas, Dendroamidas (ver Figuras 1.1 y 1.2, Capítulo 1). Estos hechos han impulsado al desarrollo de nuevos reactivos para la síntesis de péptidos, principalmente agentes acoplantes¹ y grupos protectores² lo que ha posibilitado el desarrollo de distintas estrategias sintéticas.

3.1.1 Formación de ENLACE AMIDA

Para la formación del enlace amida, es necesario utilizar grupos protectores (GP) con el fin de evitar reacciones de polimerización y guiar nuestra secuencia sintética hacia nuestro objetivo; así como también proteger grupos funcionales que estén presentes en la molécula (por ejemplo en cadenas laterales de aminoácidos) que puedan reaccionar con el grupo amino o ácido.³ Los GP deben ser químicamente estables en las condiciones de reacción y fácilmente removibles en condiciones suaves para que no alteren al enlace peptídico

¹ (a) Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. Recent Development of Peptide Coupling Reagents in Organic Synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447–2467. (b) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602.

² Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504.

³ T. W. Greene; P.G.M. Wuts; Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed. Wiley-Interscience

formado y al resto de la molécula; y en caso de existir centros quirales que éstos no racemicen.

3.1.2 GP del grupo amino:

Existen diversos grupos protectores para el grupo amino, entre ellos se encuentran los carbamatos como el BOC.

t-Butoxicarbonil (Boc). El NH₂ se protege a partir del anhídrido del Boc (Boc₂O). Este GP es estable en medio básico y en condiciones de hidrogenación catalítica. Dada su labilidad en medio ácido suave, la desprotección del Boc se hace con TFA o con HCl(g) en Dioxano, ambas a TA, produciendo CO₂ por descarboxilación espontánea e isobuteno, ambos volátiles, por lo que rotavaporando a presión reducida la desprotección es una reacción limpia, ver Figura 3.1.

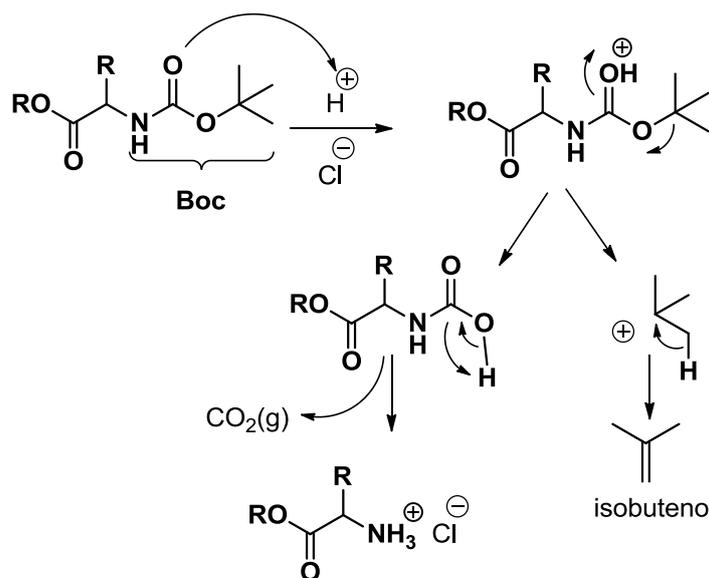


Figura 3.1. Desprotección del NH-Boc

Existen diversos GP de aminas además de Boc, por ejemplo Cbz (carboxibencilo), Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo, ver capítulo 4)

3.1.3 GP del grupo ácido carboxílico:

Ésteres de metilo y etilo: proteger al grupo ácido como éster es una de las formas más utilizadas dado que el éster es estable en condiciones de hidrogenación catalíticas y en medio ácido débil. El éster es hidrolizado fácilmente en condiciones básicas; se debe tener precaución con la base a utilizar para evitar la racemización de centros estereogénicos. En general se utilizan condiciones básicas suaves como por ejemplo solución acuosa con soda ó potasa al 10 %.

Otros GP del grupo ácido carboxílico que suelen utilizarse, son ésteres de bencilo, y *tert*-butilo.

3.1.4 Agentes acoplantes

Tradicionalmente, la formación del enlace amida se realizaba activando el grupo ácido carboxílico con cloruros de ácido o anhídridos mixtos. Actualmente, el auge de la síntesis de péptidos tanto en solución como en fase sólida ha llevado al desarrollo de nuevos reactivos acoplantes con el fin de aumentar la reactividad, disminuir tiempos y evitar la racemización de los centros quirales. Tal es el caso de la combinación de una carbodiimida **43-45** (activante) con un benzotriazol **40-42** (aditivo); si bien las carbodiimidias se han utilizado solas como reactivos en la formación del enlace amida, actualmente se combinan con benzotriazoles para mejorar rendimientos y disminuir el grado de racemización provocado por la ciclación de la *O*-acilurea en oxazolona como se observa en la figura 3.2.

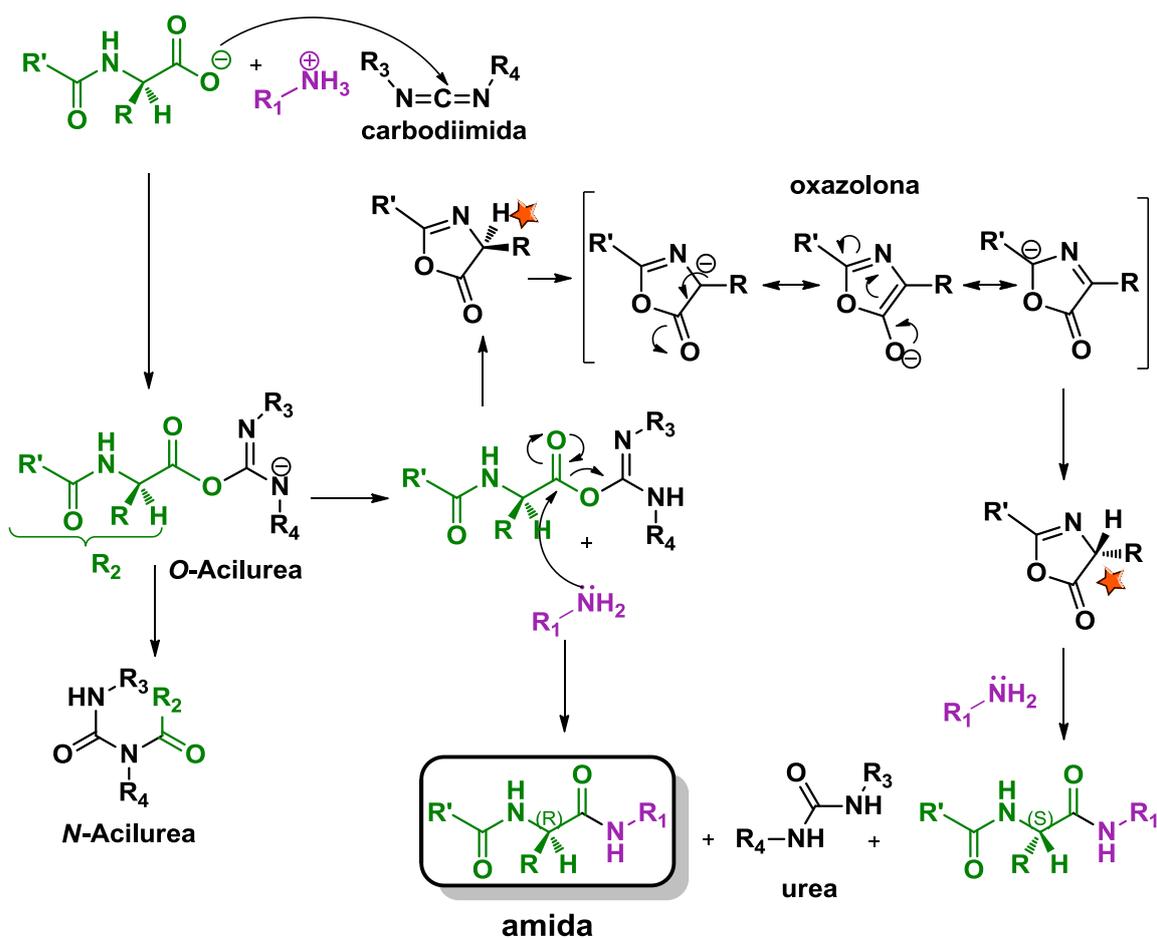


Figura 3.2 Mecanismo de formación de enlace amida con carbodiimidas.
 Racemización por formación de oxazolona.

Al utilizar benzotriazoles, como HOBt (**40**, Figura 3.5), se disminuye la formación de dicha oxazolona, disminuyendo así la racemización del ácido carboxílico; y evitando así también la formación del producto secundario *N*-acilurea. Los aditivos benzotriazólicos ampliamente utilizados son HOAt (**41**), HOBt y Cl-HOBt (**42**), siendo HOAt el más efectivo de ellos.⁴ Sin embargo, Cl-HOBt presenta una serie de ventajas a nivel industrial, es menos peligroso que HOAt y su reactividad es similar a HOBt.⁵

⁴ Carpino, L. A. 1-Hydroxy-7-Azabenzotriazole. An Efficient Peptide Coupling Additive. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397–4398.

⁵ Marder, O.; Albericio, F. Industrial Application of Coupling Reagents in Peptides. *Chim. Oggi* **2004**, *35*, 6–11.

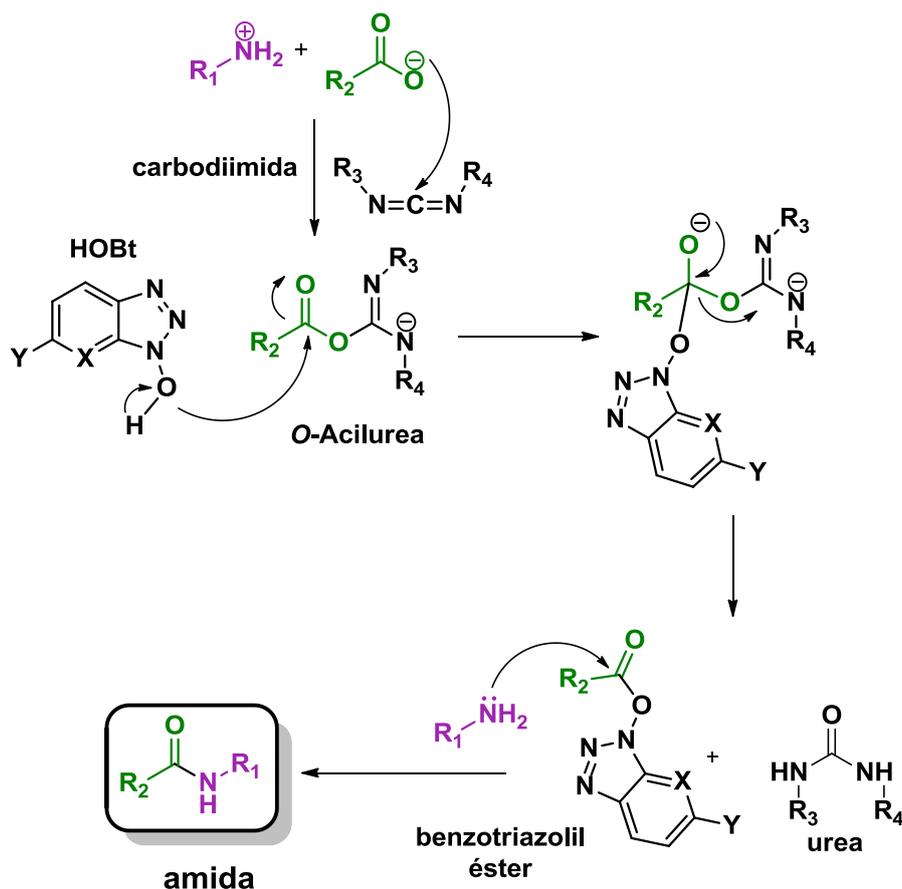


Figura 3.3. Formación de enlace amida utilizando carbodiimida y HOBt (aditivo benzotriazólico).

Se han desarrollado agentes acoplantes que poseen activante y aditivo juntos los cuales se conocen como *one-pot coupling reagents*; tal es el caso de las sales de uronio **46-48** y las sales de fosfonio **49-51**; y otros como los organofosforados (**52**, FDPP), Figura 3.5.

Las sales de uronio, son agentes acoplantes donde el activante y aditivo se encuentran juntos. Los ejemplos más utilizados son HATU (**47**), la sal *N*-guanidium de HOAt, HBTU (**46**) de HOBt, y HCTU (**48**) de Cl-HOBt, Figura 3.5

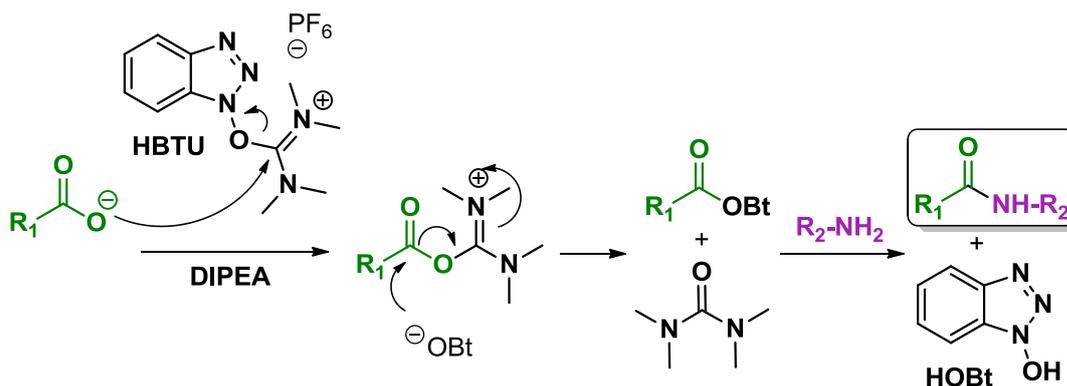


Figura 3.4. Mecanismo de formación de enlace amida con HBTU

Algunos ejemplo de sales de fosfonio comúnmente utilizados son PyBOP (**49**), PyAOP (**50**) y PyBrOP (**51**); sus estructuras pueden verse en la figura 3.5.

Los organofosforados, como el FDPP (**52**),⁶ han sido usados principalmente como agentes acoplantes en reacciones de macrociclación impedidas, obteniendo muy buenos resultados.¹

La combinación de un benzotriazol y su respectiva sal de uronio, es ampliamente utilizada debido a su gran efectividad y escasa racemización, principalmente en SPPS (ver Capítulo 4). El orden de efectividad, según diversos estudios, es el siguiente: HATU/HOAt > HCTU/Cl-HOBt > HBTU/HOBt.⁷ En la siguiente figura se muestran las estructuras de algunos de los agentes acoplantes más utilizados dentro de los grupos nombrados anteriormente.

⁶ Shaoging, C.; Xu, J. Pentafluorophenyl Diphenylphosphinate a New Efficient Coupling Reagent in Peptide Chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6711–6714.

⁷ (a) Marder, O.; Albericio, F. Industrial Application of Coupling Reagents in Peptides. *Chim. Oggi* **2004**, *35*, 6–11. (b) Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Albericio, F. Racemization Studies during Solid-Phase Peptide Synthesis Using Azabenzotriazole-Based Coupling Reagents. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279–2282.

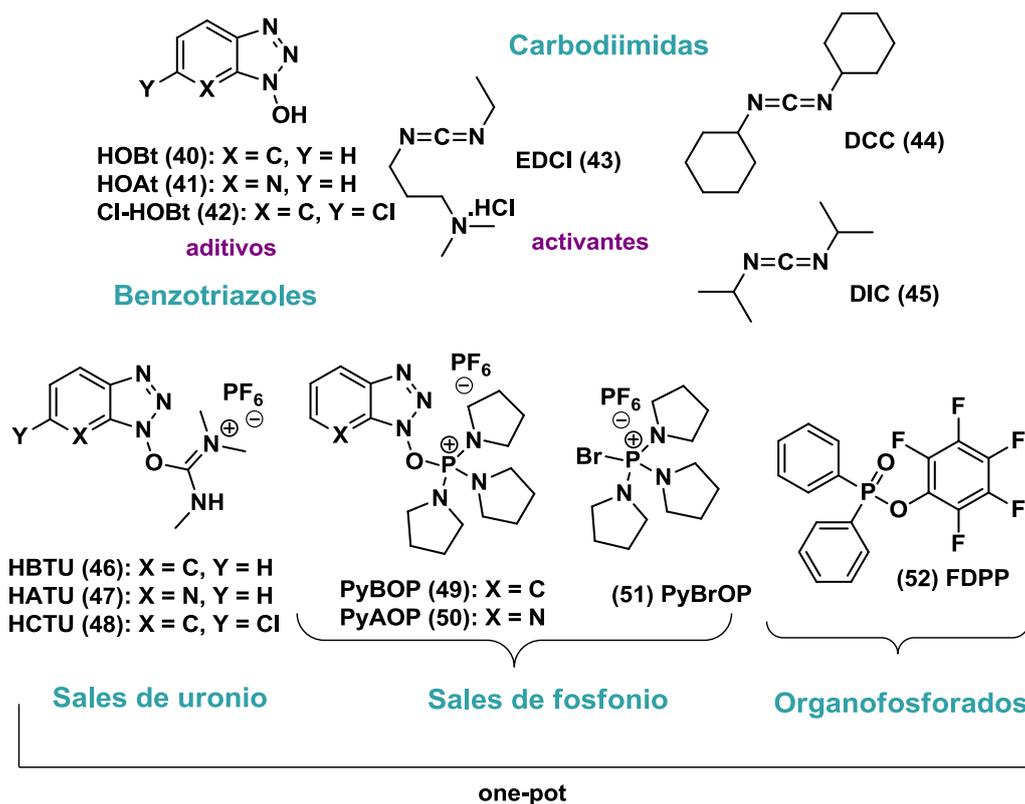
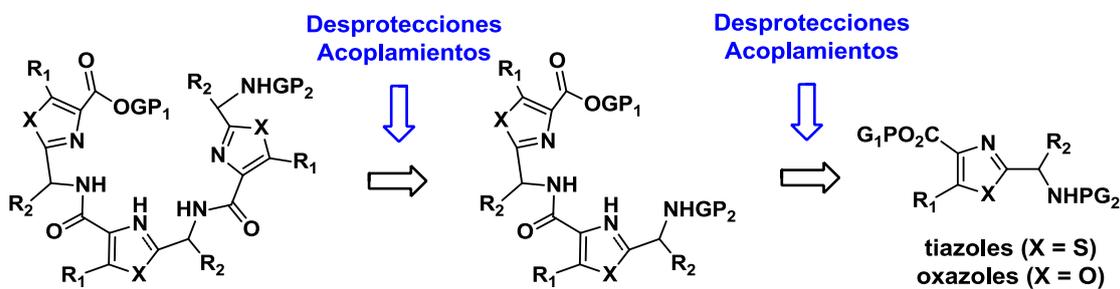


Figura 3.5 Agentes Acoplantes

3.2 ESTRATEGIA SINTÉTICA

Siguiendo uno de nuestros objetivos, el de obtener análogos a Aeruciclamidas heterocíclicos, es que mediante desprotecciones de GP y acoplamiento de los building blocks anteriormente sintetizados (ver capítulo 2) obtendremos los bis y tris heterociclos (Esquema 3.1). Los tris heterociclos serán los precursores abiertos de los macrociclos heterocíclicos análogos a Aeruciclamidas.



Esquema 3.1 Análisis retrosintético

3.3 DISCUSIÓN Y RESULTADOS

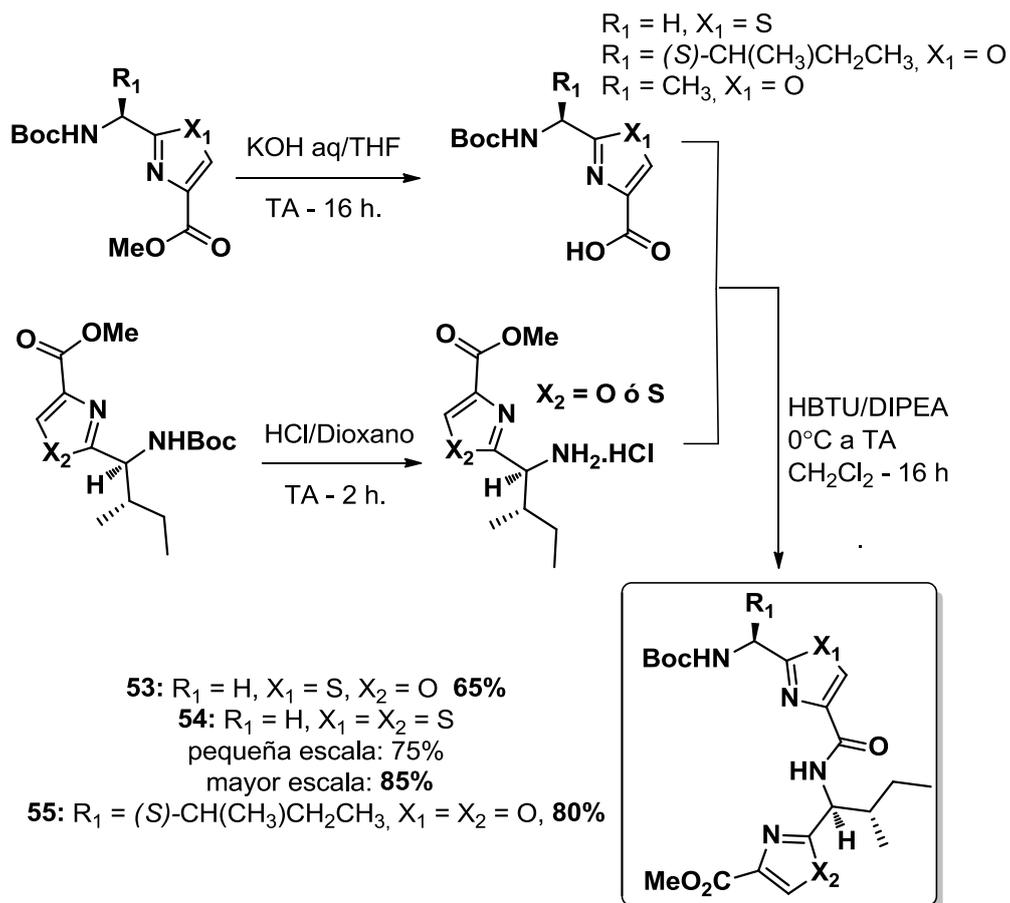
A lo largo de este proyecto hemos investigado la combinación de distintos agentes acoplantes. Hemos trabajado principalmente con HBTU, dado que no es explosivo como los benzotriazoles HOBt y HOAt, los cuales son muy eficientes pero dada sus propiedades explosivas no son enviados por los proveedores a nuestro país. A su vez, el HBTU posee muy bajo costo, y hemos obtenido muy buenos rendimientos, en cortos tiempos de reacción y sin observar racemización.

Una vez obtenidos los distintos heterociclos, se procedió con las desprotecciones correspondientes para posteriormente realizar los acoplamientos con HBTU/DIPEA y obtener los bis-heterociclos (esquema 3.2) y tris-heterociclos (esquema 3.3).

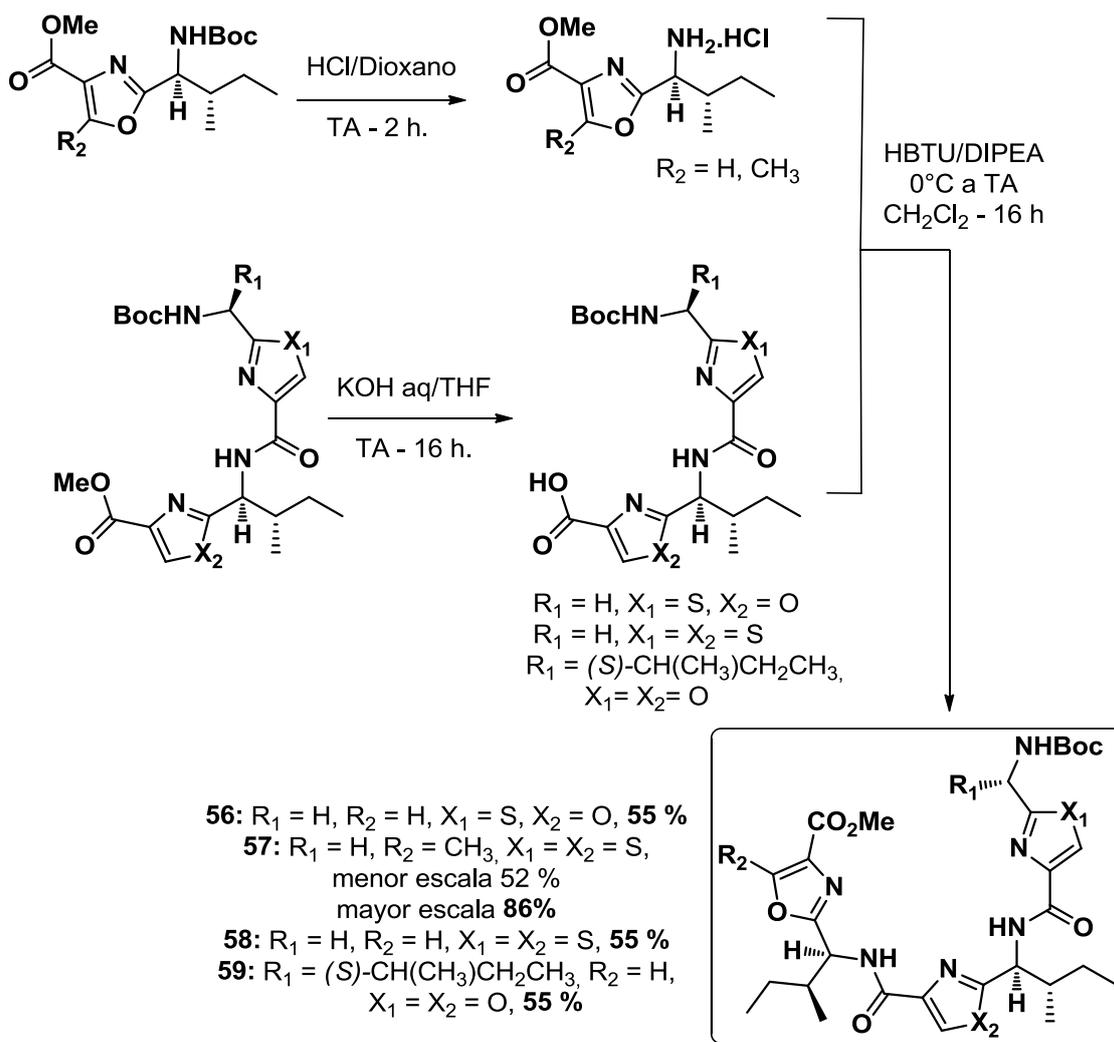
El grupo éster se hidrolizó con KOH aq/THF y el grupo amino se desprotegió con HCl(g) en dioxano previamente preparado en el laboratorio.

La síntesis del bis heterociclo Boc-NH-Gly-Thz-L-Ile-Thz-OMe (**54**) se realizó en dos oportunidades, primero en micro escala (partiendo de 64 mg de HCl.NH₂-L-Ile-Thz-OMe y de 63 mg de Boc-NH-Gly-Thz-COOH) y la segunda vez en mayor escala (partiendo de 529 mg de HCl.NH₂-L-Ile-Thz-OMe y de 423 mg de Boc-NH-Gly-Thz-COOH) observándose un mejor rendimiento a mayor escala.

Lo mismo sucedió con la síntesis del tris heterociclo Boc-NH-Gly-Thz-L-Ile-Thz-L-Ile-Oxz(Met)-OMe (**57**), primero se trabajó en micro escala (partiendo de 55 mg Boc-NH-Gly-Thz-L-Ile-Thz-OH y 53 mg de HCl.NH₂-L-Ile-Oxz(Met)-OMe) y luego se escaló (partiendo de 568 mg Boc-NH-Gly-Thz-L-Ile-Thz-OH y 338 mg de HCl.NH₂-L-Ile-Oxz(Met)-OMe) mejorando en un 30% el rendimiento.



Esquema 3.2 – Obtención de péptidos bis-heterocíclicos



Esquema 3.3 – Obtención de péptidos tris-heterocíclicos

3.4 CONCLUSIONES

Se obtuvieron cuatro precursores abiertos análogos de Aeruciclamidas con muy buenos rendimientos.

Se trabajó a mayor escala con un bis y tris-heterociclo obteniendo mejores resultados.

3.5 PARTE EXPERIMENTAL

La cromatografía en capa fina se realizó utilizando placas de sílica gel sobre plástico de 0.20 mm de espesor (Macherey-Nagel, Polygram[®], silG/UV 254 nm) y revelado con lámpara UV a 254 nm, vapores de iodo, spray de ninhidrina o fosfomolibdico.

Diclorometano seco se obtuvo de CaH_2 .⁸ Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en sistemas secos y bajo atmósfera de nitrógeno.

La cromatografía en columna se realizaron utilizando Sílica gel 60 (J.T. Baker, 40 μm diámetro promedio de partícula).

Los espectros de RMN (^1H NMR y ^{13}C NMR) se realizaron en un equipo Bruker Advance DPX-400, los desplazamientos químico se relacionan con el desplazamiento de tetrametilsilano (0 ppm).

Los espectros de masa se realizaron en un espectrómetro de masa microQTOF-G (Bruker Daltonics) mediante ionización de electrospray.

Los espectros infrarrojos se realizaron en un espectrofotómetro FT-IR Shimadzu 8101A en film sobre pastillas de NaCl.

Las medidas de punto de fusión fueron realizadas en Fischer-Johns de Fischer Scientific Comp.

El ángulo de rotación óptica fue medido en un polarímetro Kruss Optronic GmbH P8000 con una celda de 0.5 mL

⁸ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", 3th Ed. Pergamon Press, Oxford, **1988**.

PROCEDIMIENTOS GENERALES

Hidrólisis de un éster

El éster etílico/metílico se disuelve en THF y se agrega una solución acuosa al 10% de KOH y se deja con agitación a TA hasta desaparición del reactivo confirmada por TLC. Se destila a presión reducida el THF y la solución resultante se lleva a pH 5 con HCl 5%. La capa acuosa se extrae con AcOEt, se seca con MgSO₄, se filtra y el solvente se destila a presión reducida. Se obtiene el ácido carboxílico correspondiente el cual se utiliza en los próximos pasos sin purificación adicional.

Desprotección de Boc:

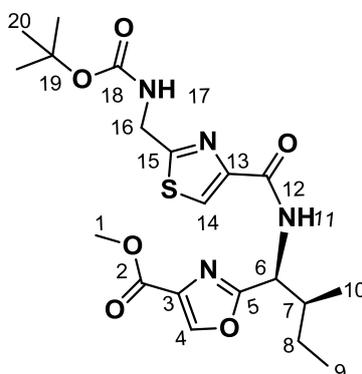
El compuesto a desproteger se disuelve en una solución 4 M de HCl(g) en dioxano preparada previamente en nuestro laboratorio. La mezcla de reacción se agita a TA hasta desaparición del reactivo confirmada por TLC. Se destiló el solvente a presión reducida. Se obtiene la amina-clorhidrato que se utiliza en los próximos pasos sin purificación adicional.

Acoplamiento de building blocks

Se disuelve el ácido y el clorhidrato de la amina correspondiente en CH₂Cl₂ y se enfría a 0 °C. Se agrega HBTU (1.2 eq.), seguido de DIPEA (2.3 eq.) y una punta de espátula de 4-DMAP. La reacción se deja alcanzar TA y se continua con agitación hasta observar desaparición de reactivos (16 – 48 hs). Se filtra la tetrametil urea (producto secundario) con *celite*, se lava varias veces con CHCl₃, se concentra y se repite este procedimiento varias veces. Se destilan a presión reducida los solventes, se retoma en AcOEt, se particiona con solución saturada de NaHCO₃, se extrae varias veces. Las capas orgánicas se seca con MgSO₄, se filtran y se concentran a presión reducida. El crudo se purifica en columna cromatográfica utilizando como fase móvil mezcla AcOEt/hexanos.

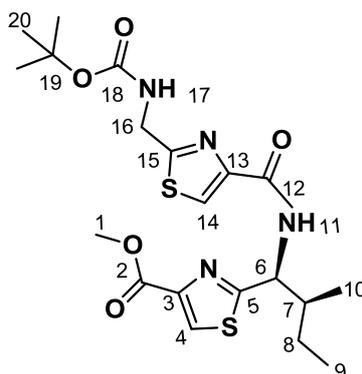
Bis-Heterociclos

Boc-NH-Gly-Thz-L-Ile-Oxz-OMe (53):



Siguiendo el procedimiento general de acoplamiento de building blocks, partiendo de la amina oxazólica (140 mg, 0.562 mmol) y del tiazol ácido (145 mg, 0.562 mmol) se obtuvo el bis-azole en cuestión.

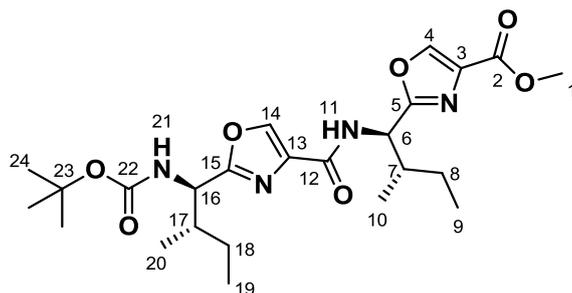
Aceite blancuzco (156 mg, 62 %), $R_f = 0.54$ (AcOEt:hexano, 3:2). $\alpha_D = + 19.8$ ($C_{1.14}$, MeOH). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.90 - 0.97 (m, 3H₁₀, 3H₈), 1.20 - 1.32 (m, 1H₉), 1.48 (s, 9H₂₀), 1.53 - 1.63 (m, 1H₉), 2.08 - 2.19 (m, 1H₇), 3.91 (s, 3H₁), 4.61 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H₁₆), 5.29 - 5.32 (m, 1H₁₇), 5.35 (dd, $J = 9.4, 7.0$ Hz, 1H₆), 7.87 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H₁₁), 8.04 (s, 1H₁₄), 8.20 (s, 1H₄). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 11.2 (C₁₀), 15.4 (C₈), 25.2 (C₉), 28.3 (3C₂₀), 39.2 (C₇), 42.3 (C₁₆), 51.7 (C₆), 52.3 (C₁), 80.5 (C₁₉), 124.3 (C₁₄), 133.3 (C₃), 143.8 (C₄), 149.0 (C₁₃), 155.3 (C₁₈), 160.6 (C₁₂), 161.6 (C₂), 164.6 (C₅), 169.5 (C₁₅). IR ν (cm⁻¹) 1172, 1250, 1288, 1489, 1532, 1581, 1674, 1693, 2878, 2936, 3132, 3367, 3414. HRMS calculada para C₂₀H₂₈N₄NaO₆S ([M+Na⁺]) 475.1627, observada 475.1604

Boc-NH-Gly-Thz-L-Ile-Thz-OMe (54):

El éster etílico del tiazol **Boc-NH-Gly-Thz-OEt** fue hidrolizado siguiendo el procedimiento general. El grupo protector Boc de **Boc-L-Ile-Thz-OMe** fue removido con HCl 4M/Dioxano. Siguiendo el procedimiento general de acoplamiento de building blocks, partiendo de **HCl.NH₂-L-Ile-Thz-OMe** (529 mg, 2.0 mmol) y de **Boc-NH-Gly-Thz-OH** (423 mg, 1.6 mmol), luego de purificar por columna cromatográfica utilizando AcOEt:EP (1:1) como fase móvil, se obtuvo el bis-tiazol deseado.

Aceite amarillento (586 mg, 76 %). $R_f = 0.3$ (EtOAc:hexane, 1:1), $[\alpha]_D = -2.8$ (c 2.45, CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.95 (t, 3H₉, $J = 7.4$ Hz), 0.97 (d, 3H₁₀, $J = 6.8$ Hz), 1.22 - 1.33 (m, 1H₈), 1.47 (s, 9H₂₀), 1.56 - 1.67 (m, 1H₈), 2.32 - 2.42 (m, 1H₇), 3.94 (s, 3H₁), 4.63 (d, 2H₁₆, $J = 5.9$ Hz), 5.32 - 5.40 (m, 1H₆, 1H₁₇), 7.97 (d, 1H₁₁, $J = 9.3$ Hz), 8.05 (s, 1H₁₄), 8.11 (s, 1H₄). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 11.3 (C₉), 16.0 (C₁₀), 24.8 (C₈), 28.3 (3C₂₀), 39.4 (C₇), 42.3 (C₁₆), 52.5 (C₁), 55.6 (C₆), 80.6 (C₁₉), 124.3 (C₄), 127.3 (C₁₄), 147.1 (C₃), 149.1 (C₁₃), 155.6 (C₁₈), 160.7 (C₁₂), 161.8 (C₂), 169.6 (C₁₅), 171.8 (C₅). **HRMS** m/z calculada para C₂₀H₂₈N₄NaO₅S₂ ([M+Na]⁺) 491.1399, observada 491.141. n_{max} (film líquido) 2968, 2933, 1718, 1701, 1670, 1481, 1276, 1248, 1217, 1167 cm⁻¹

Boc-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz-OMe (55):

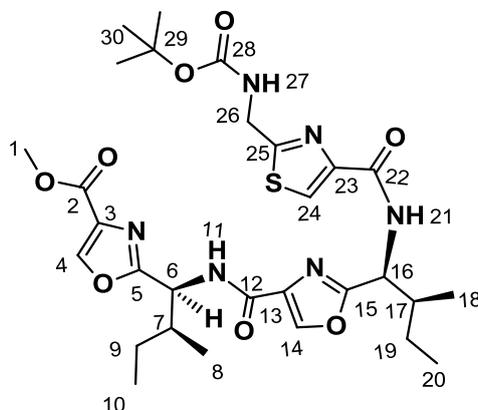


Siguiendo las metodologías generales de desprotección del NH-Boc e hidrólisis del éster se obtiene el clorhidrato de la amina **HCl.NH₂-L-Ile-Oxz-OMe** (95 mg, 0.384 mmol) y el ácido **Boc-NH-L-Ile-Oxz-OH** (126 mg, 0.422 mmol) los cuales son acoplados siguiendo el procedimiento general de acoplamiento de building blocks. Se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt:EP, 1:1) y se obtiene bis-oxazol deseado.

Aceite transparente (142 mg, 88 %), **R_f** = 0.48 (AcOEt:EP, 1:1), **[α]_D** = - 112.6 (c 0.6, MeOH). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.80 - 0.98 (m, 3H₉, 3H₁₀, 3H₁₉, 3H₂₀), 1.10 - 1.32 (m, 1H₈, 1H₁₈), 1.44 (m, 9H₂₄), 1.52 - 1.64 (m, 1H₈, 1H₁₈), 1.86 - 2.00 (m, 1H₁₇), 2.08 - 2.16 (m, 1H₇), 3.93 (s, 3H₁), 4.80 - 4.88 (m, 1H₁₆), 5.18 (d, *J* = 9.2 Hz, H₂₁), 5.32 (dd, *J*₁ = 7.2 Hz, *J*₂ = 9.2 Hz, 1H₆), 7.45 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H₁₁), 8.12 (s, 1H₁₄), 8.20 (s, 1H₄). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 11.1(C₉), 11.4 (C₁₀), 15.2 (C₁₉), 15.3(C₂₀), 25.1 (C₈), 25.2 (C₁₈), 28.3 (C₂₄), 39.1(C₇), 39.3 (C₁₇), 51.3 (C₁₆), 52.3 (C₁), 53.4 (C₆), 80.2 (C₂₃), 133.4 (C₃), 135.4 (C₁₃), 141.3 (C₄), 143.8 (C₁₄), 155.3 (C₂₂), 160.2 (C₂), 161.6 (C₁₂), 163.9 (C₅), 164.4 (C₁₅). **IR** ν(cm⁻¹) 1252, 1367,1458, 1509, 1584, 1597, 1702, 878, 2934, 2969, 3157, 3327. **HRMS** *m/z* calculada para C₂₄H₃₇N₄O₇ ([M+H]⁺) 493.2662, observada 493.2657

Tris-heterociclos

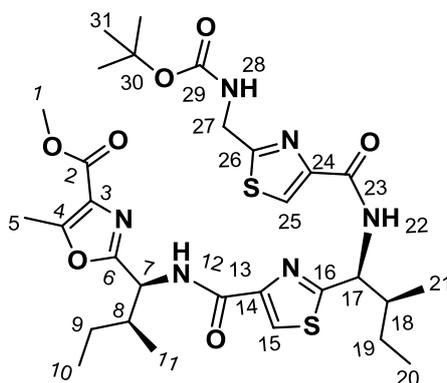
Boc-Gly-Thz-L-Ile-Oxz-L-Ile-Ozx-OMe (56):



El éster metílico de **Boc-Gly-Thz-L-Ile-Oxz-OMe** es hidrolizado y el grupo protector Boc de **BocNH-L-Ile-Oxz-OMe** es removido. Los crudos de amino oxazol (140 mg, 0.562 mmol) y bis-azole (117 mg, 0.267 mmol) se someten al proceso general de acoplamiento de building blocks para dar el tris-azole deseado.

Aceite amarillento (87 mg, 55 %), $R_f = 0.43$ (AcOEt:hexano, 3:2). **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.90 - 0.99 (m, 3H₈, 3H₁₀, 3H₁₈, 3H₂₀), 1.21 - 1.32 (m, 1H₉, 1H₁₉), 1.48 (s, 9H₃₀), 1.54 - 1.63 (m, 1H₉, 1H₁₉), 2.07 - 2.17 (m, 1H₇, 1H₁₇), 3.90 (s, 3H), 4.59 - 4.69 (m, 2H₂₆), 5.27 - 5.35 (m, 1H₆, 1H₁₆), 5.45 (t, $J = 5.34$ Hz, 1H₂₇), 7.51 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H₁₁), 7.81 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H₂₁), 8.07 (s, 1H₂₄), 8.14 (s, 1H₄), 8.18 (s, 1H₁₄). **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 11.1 (C₁₀), 11.3 (C₂₀), 15.3 (C₈), 15.3 (C₁₈), 25.2 (C₉), 25.3 (C₁₉), 28.3 (3C₃₀), 39.0 (C₇), 39.1 (C₁₇), 42.4 (C₂₆), 51.4 (C₆), 51.7 (C₁₆), 52.3 (C₁), 80.5 (C₂₉), 124.3 (C₂₄), 133.3 (C₁₃), 135.6 (C₃), 141.5 (C₄), 143.8 (C₁₄), 149.0 (C₂₃), 155.7 (C₂₈), 160.1 (C₁₂), 160.6 (C₂₂), 161.6 (C₂), 163.3 (C₅), 164.5 (C₁₅), 169.9 (C₂₅). **HRMS** calculada para $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{NaO}_8\text{S}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 655.2526, observada 655.2537. $\alpha_D = -4.8$ (c 1.28, MeOH) **IR** $\nu(\text{cm}^{-1})$ 1111, 1169, 1250, 1277, 1439, 1513, 1535, 1597, 1670, 1721, 2878, 2832, 2967, 3125, 3314, 3399.

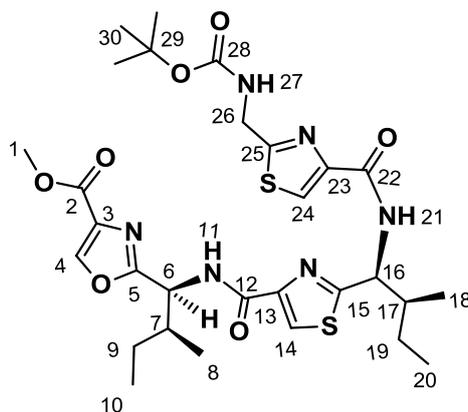
Boc-NH-Gly-Thz-L-Ile-Thz-L-Ile-Oxz(Met)-OMe (57):



Se hidrolizó el éster metílico de bis-tiazol **Boc-NH-Gly-Thz-L-Ile-Thz-OMe** y se desprotegió el NH-Boc del **Boc-NH-L-Ile-Oxz(Met)-OMe** siguiendo los respectivos procedimientos generales. Se partió del amino oxazol (338 mg, 1.37 mmol) y del bis-tiazol-COOH (568 mg, 1.25 mmol), siguiendo la metodología general de acoplamiento de building blocks y luego de purificar por columna cromatográfica utilizando AcOEt:EP (1:1) como fase móvil, se obtuvo el tris-azol deseado.

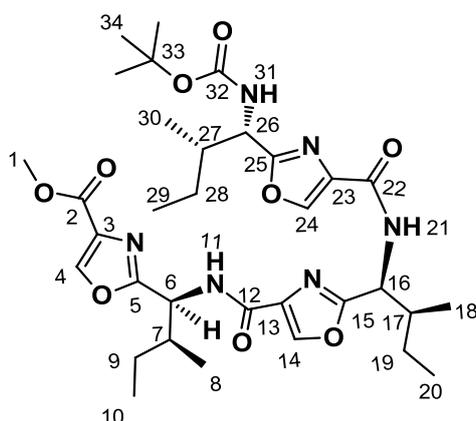
Sólido blanco (684 mg, 86%), $R_f = 0.38$ (EtOAc:hexane, 3:2), $[\alpha]_D = -5.0$ (c 0.4, MeOH). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.92-1.02 (m, 3H_{10} , 3H_{11} , 3H_{20} , 3H_{21}), 1.24-1.33 (m, 1H_9 , 1H_{19}), 1.46 (s, 9H_{31}), 1.58-1.66 (m, 1H_9 , 1H_{19}), 2.11-2.18 (m, 1H_8), 2.24-2.34 (m, 1H_{18}), 2.62 (s, 3H_5), 3.89 (s, 3H_1), 4.62-4.67 (m, 2H_{27}), 5.26 (dd, 1H_7 , $J = 7.6$ Hz, $J = 9.3$ Hz), 5.40 (dd, 1H_{17} , $J = 6.2$ Hz, $J = 9.1$ Hz), 5.54 (dd, $J_1=J_2 = 5.8$ Hz, 1H_{28}), 7.91 (dd, $J_1=J_2 = 9.6$ Hz, 1H_{12} , 1H_{22}), 8.03 (s, 1H_{25}), 8.09 (s, 1H_{15}). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 11.2, 11.5 (C_{10} , C_{20}), 12.1 (C_5), 15.5, 15.9 (C_{11} , C_{21}), 24.8, 25.3 (C_9 , C_{19}), 28.3 (3C_{31}), 39.1 (C_{18}), 39.5 (C_8), 42.4 (C_{27}), 51.5 (C_7), 52.0 (C_1), 55.5 (C_{17}), 80.5 (C_{30}), 123.6 (C_{15}), 124.5 (C_{25}), 127.5 (C_3), 149.0 (C_{24}), 149.4 (C_{14}), 155.7 (C_{29}), 156.2 (C_4), 160.6, 160.7 (C_{13} , C_{23}), 161.8 (C_6), 162.7 (C_2), 170.1 (C_{26}), 171.1 (C_{16}). **HRMS** m/z calculada para $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{NaO}_7\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 685.2454, observada 685.2447. n_{max} (film liquido) 2959, 2928, 2872, 2857, 1719, 1654, 1544, 1182, 1130, 1101 cm^{-1} .

Boc-Gly-Thz-L-Ile-Thz-L-Ile-Oxz-OMe (58):



Aceite amarillento (87 mg, 55 %), $R_f = 0.32$ (AcOEt:hexano, 3:2). $\alpha_D = + 17$ (c 1.3, MeOH). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.94 - 1.04 (m, 3H_8 , 3H_{10} , 3H_{18} , 3H_{20}), 1.25 - 1.33 (m, 1H_9 , 1H_{19}), 1.49 (s, 9H_{30}), 1.57 - 1.69 (m, 1H_9 , 1H_{19}), 2.14 - 2.22 (m, 1H_7), 2.26 - 2.34 (m, 1H_{17}), 3.92 (s, 3H_1), 4.60 - 4.73 (m, 2H_{26}), 5.36 (dd, $J = 9.3, 7.3$ Hz, 1H_6), 5.41 (dd, $J = 9.1, 6.4$ Hz, 1H_{16}), 5.54 (t, $J = 4.60$ Hz, 1H_{27}), 7.93 - 7.98 (m, 1H_{11} , 1H_{21}), 8.04 (s, 1H_{14}), 8.09 (s, 1H_{24}), 8.20 (s, 1H_4). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 11.2 (C_{10}), 11.4 (C_{20}), 15.4 (C_8), 15.9 (C_{18}), 24.9 (C_9), 25.3 (C_{19}), 28.3 (3C_{30}), 39.2 (C_7), 39.6 (C_{17}), 42.4 (C_{26}), 51.7 (C_6), 52.2 (C_1), 55.5 (C_{16}), 80.5 (C_{29}), 123.7 (C_{14}), 124.5 (C_{24}), 133.3 (C_3), 143.7 (C_4), 149.0 (C_{23}), 149.3 (C_{13}), 155.7 (C_{28}), 160.6 (C_{22}), 160.7 (C_{12}), 161.6 (C_2), 164.7 (C_5), 170.09 (C_{25}), 171.10 (C_{15}). **HRMS** calculada para $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{NaO}_7\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 671.2298, observada 671.2315. **IR** $\nu(\text{cm}^{-1})$ 1111, 1165, 1250, 1277, 1323, 1493, 1535, 1597, 1667, 1721, 2878, 2932, 2967, 3117, 3314, 3395.

Boc-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz-OMe (59):



Boc-NH-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz-OMe fue tratado de acuerdo al procedimiento general de desprotección del NH-Boc. El ester metílico de **Boc-NH-L-Ile-Oxz-OMe** fue hidrolizado de acuerdo a la metodología general. Partiendo del amino bis-oxazole **HCl.NH₂-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz-OMe** (113 mg, 0.263 mmol) y del ácido **Boc-NH-L-Ile-Oxz-OH** (92 mg, 0.308 mmol), se obtuvo el tris-oxazol correspondiente.

Sólido blanco (50 mg, 40 %), $R_f = 0.45$ (AcOEt:hexano, 1:1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 - 1.00 (m, 3H₈, 3H₁₀, 3H₁₈, 3H₂₀, 3H₂₉, 3H₃₀); 1.19-1.34 (m, 1H₉, 1H₁₉, 1H₂₈); 1.46 (s, 9H₃₄); 1.51-1.64 (m, 1H₉, 1H₁₉, 1H₂₈); 2.09-2.18 (m, 1H₇, 1H₁₇, 1H₂₇); 3.92 (s, 3H₁); 4.81- 4.88 (m, 1H₂₆); 5.16-5.21 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H₃₁); 5.28-5.35 (m, 1H₆, 1H₁₆); 7.33-7.38 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H₁₁ o 21); 7.44-7.50 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H₁₁ o 21); 8.15 (s, 1H₄ o 14 o 24); 8.17 (s, 1H₄ o 14 o 24); 8.21 (s, 1H₄ o 14 o 24). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 11.1 (C₁₀, 20, 29); 14.8 (C₈, 18, 30); 24.9 (C₉, 19, 28); 28.4 (C₃₄); 39.0 (C₇, 17, 27); 51.4 (C₆, 16); 52.3 (C₁); 53.5 (C₂₆); 80.3 (C₃₃); 133.4 (C₄ o 14 o 24); 141.5 (C₄ o 14 o 24); 143.3 (C₄ o 14 o 24); 161.3 (C₂). Asignados por HMBC y HSQC porque se utilizó toda la muestra en la reacción siguiente.

Capítulo 4

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA

4.1. INTRODUCCIÓN/ANTECEDENTES

En la actualidad existen más de 40 péptidos disponibles en el mercado farmacéutico y más de 100 en etapas clínicas. En el periodo 2009-2011 fueron aprobados 18 fármacos peptídicos incluyendo proteínas, anticuerpos monoclonales y enzimas, que corresponde a un 25% del total de los fármacos aprobados por la FDA en este período.^{1,2}

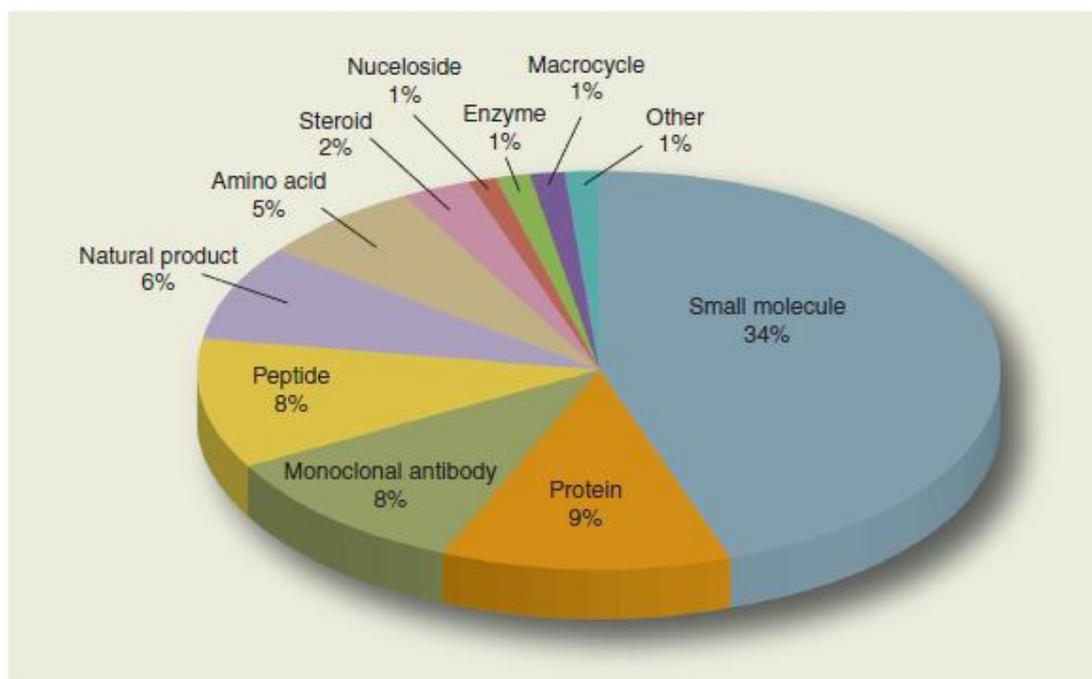


Figura 4.1 Distribución de fármacos aprobados por la FDA (Imagen extraída de *Future Med. Chem.* 2012, 4, 1527)

¹ Zompra, A. a; Galanis, A. S.; Werbitzky, O.; Albericio, F. Manufacturing Peptides as Active Pharmaceutical Ingredients. *Future Med. Chem.* **2009**, 1, 361–377.

Los péptidos ofrecen ciertas ventajas como fármacos como pueden ser: importante actividad biológica, alta especificidad y baja toxicidad. Uno de los mayores obstáculos que impide que sean utilizados como fármacos es la falta de biodisponibilidad oral y la baja estabilidad que poseen a pH fisiológico. Sin embargo, los recientes avances tecnológicos en la formulación y distribución de fármacos peptídicos hacen que se puedan sortear las restricciones de este tipo de compuestos. A su vez, en los últimos años se han desarrollado estrategias robustas en la química de péptidos, las cuales incluyen metodologías en fase sólida y solución así como también la automatización de la síntesis de péptidos en fase sólida. Estos avances, permiten una preparación más sencilla de análogos hits, favoreciendo y acelerando las fases de descubrimiento de fármacos. Por lo tanto, la elección de candidato y la entrada a las fases clínicas es, en comparación con las moléculas pequeñas, más rápida y más económica.²

² Albericio, F.; Kruger, H. G. Therapeutic Peptides. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 1527–1531.

4.1.1 Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS)

En 1959, Merrifield escribió en su cuaderno de laboratorio *"hay una necesidad de un método rápido, cuantitativo y automático para la síntesis de largas cadenas peptídicas"*; cuatro años después reporta la primera síntesis de un tetra-péptido realizado en fase sólida.³

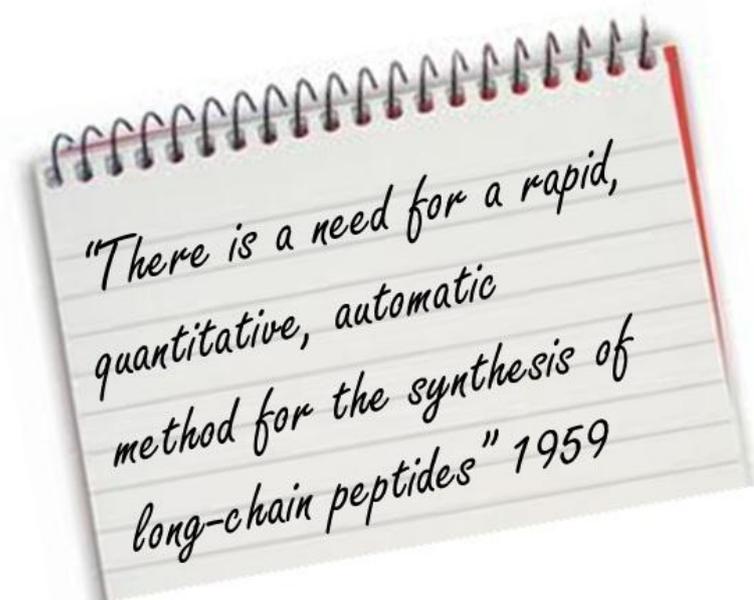


Figura 4.2 Merrifield

En términos generales, la SPPS consiste en el anclaje de un aminoácido protegido a un soporte sólido (resina), donde a través de ciclos de desprotección y acoplamiento se adicionan aminoácidos hasta lograr la secuencia peptídica deseada. Existen dos estrategias generales de SPPS, según el grupo protector de la amina que se emplee, una es la estrategia Boc y la otra Fmoc. En los últimos años, la Fmoc-SPPS ha ganado gran popularidad, debido a que emplea reactivos ambientalmente más seguros y condiciones de reacciones más suaves si se la compara con la estrategia Boc-SPPS que utiliza HF y 50% de TFA en cada desprotección del grupo Boc. A su vez, existe un gran rango de Fmoc-AA-OH comercialmente disponibles y a bajos costos. Otra ventaja de dicha estrategia, es que el grupo Fmoc presenta alta absorbancia al UV, lo cual

³ Merrifield R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85 (14), 2149–2154.

permite estudios analíticos más detallados y el seguimiento más fácil de las reacciones de acoplamiento y desprotección. Esto ha permitido el desarrollo de métodos de flujo y de sintetizadores automáticos de péptidos.



Figura 4.3 Sintetizador automático de péptidos acoplado a microondas

En el presente trabajo, nos centraremos en la SPPS que sigue la estrategia Fmoc. El esquema general de SPPS-Fmoc se presenta esbozado en la figura 4.4. Las resinas generalmente utilizadas en esta estrategia, cuando el aminoácido se une desde el extremo C-terminal, son 2-Clorotritilo ó resina de Wang, las cuales son polímeros sintéticos que presentan grupos funcionales capaces de reaccionar covalentemente con el grupo ácido de un aminoácido NH protegido con Fmoc (Fmoc-AA-OH). Luego del bloqueo ó "capping" de los sitios activos de la resina que no reaccionaron con el primer aminoácido, el Fmoc puede ser eliminado fácilmente utilizando piperidina 20% en DMF y así un segundo Fmoc-AA-OH puede ser acoplado al primer aminoácido anclado en la resina utilizando un agente acoplante. Mientras el péptido está siendo sintetizado todos los reactivos solubles son removidos del soporte sólido por filtración y lavado luego de cada acoplamiento. Estos pasos se pueden repetir hasta obtener la secuencia deseada. Al final de la síntesis, se "cliva" ó se escinde el péptido, utilizando TFA en distintas proporciones según la resina en cuestión para romper el enlace entre el C-terminal y el soporte sólido y de esta

forma, dejar el péptido libre; y según los GP de las cadenas lateras que se quieran conservar .

Las ventajas de esta metodología frente a la síntesis en solución de péptidos, incluye la eficiencia del proceso, facilidad en el work-up y en la purificación dado que no se aíslan los péptidos intermedios.⁴

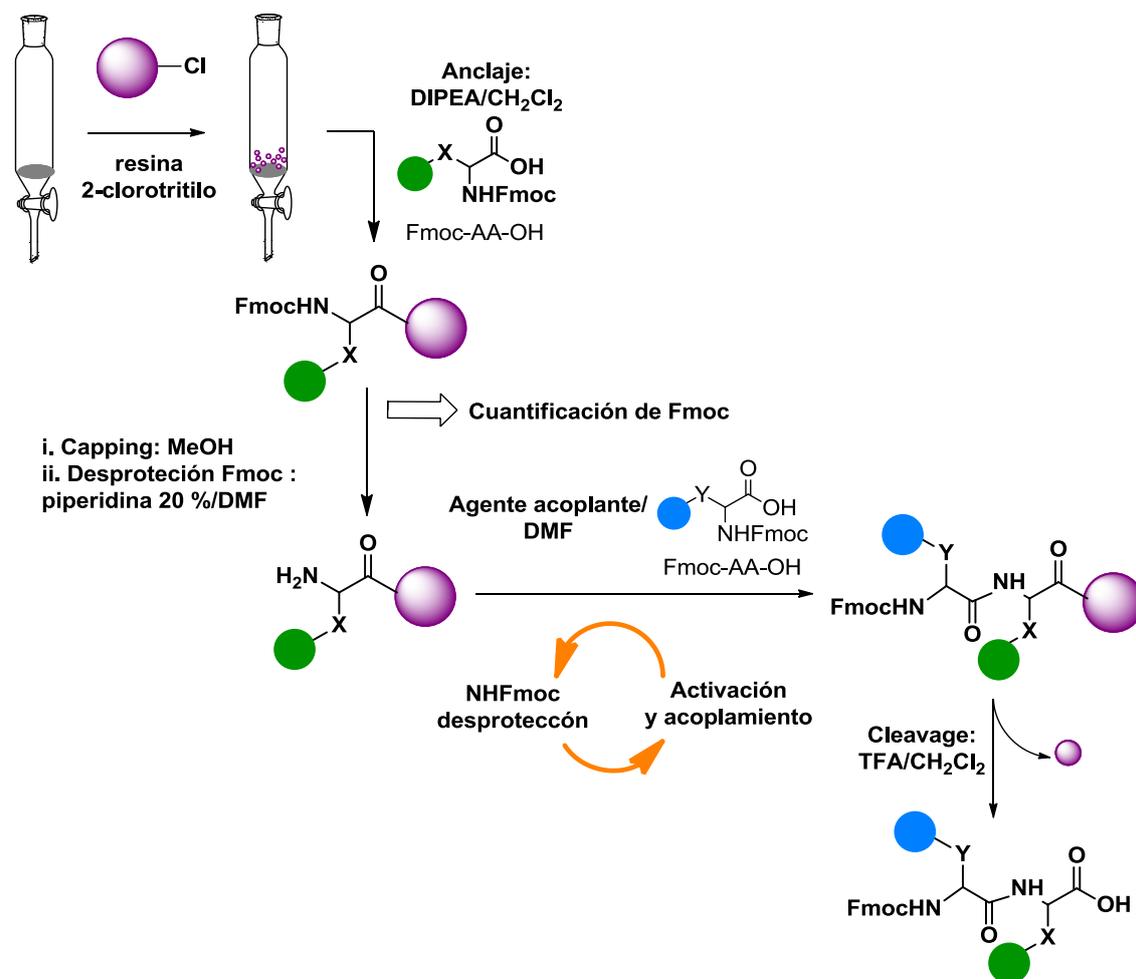


Figura 4.4. Esquema general de SPPS (estrategia Fmoc)

Desprotección y cuantificación de Fmoc

Luego del "capping" o el bloqueo de los sitios activos, se lava la resina con CH₂Cl₂ y DMF, se desprotege con Piperidina 20% en DMF pero los lavados se recogen en un matraz aforado para realizar la cuantificación del Fmoc y

⁴ Kates, S. A.; Albericio, F. Solid-phase synthesis. A Practical Guide Editores. Marcel Dekker. New York USA (2000), ISBN:0-8247-0359-6

determinar la cantidad de Fmoc-AA-OH que se unió a la resina. Se realizan las diluciones correspondientes y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a la longitud de onda que absorbe el aducto Fmoc-piperidina, $\lambda = 290 \text{ nm}$ ($\epsilon = 5800$), ver Figura 4.5.

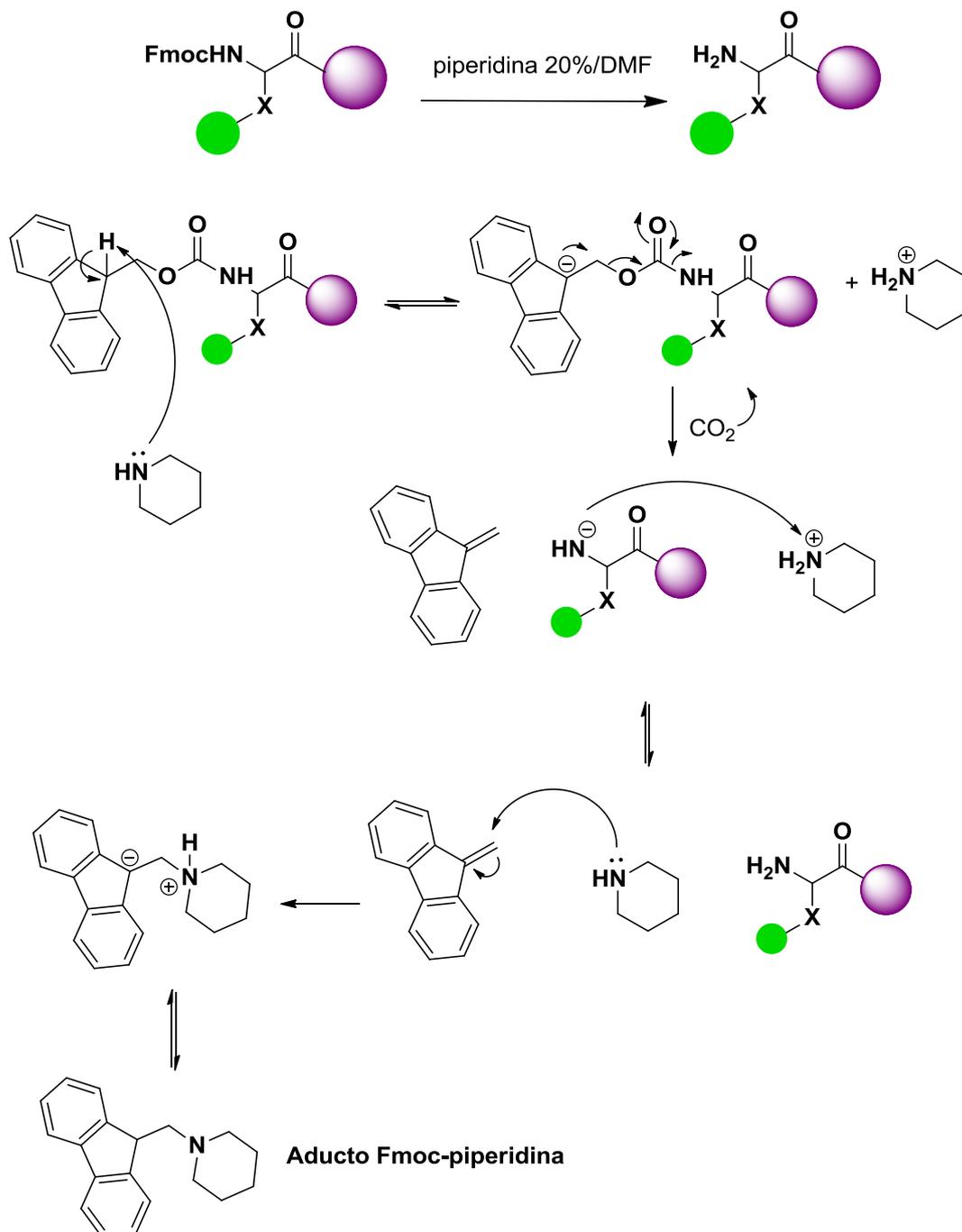
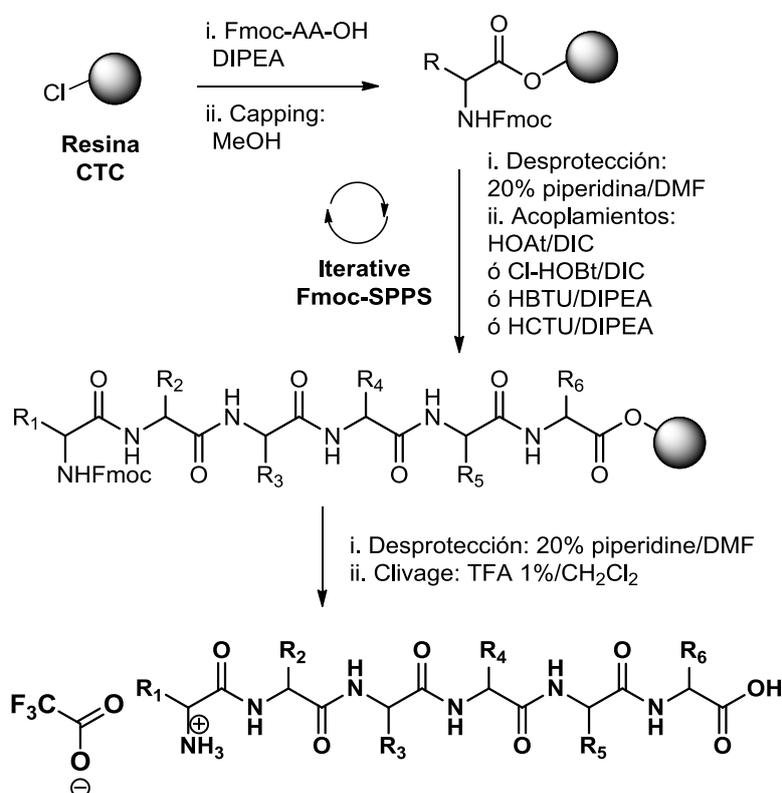


Figura 4.5 Desprotección del NH-Fmoc

4.2 ESTRATEGIA SINTÉTICA

Se siguió el esquema general de trabajo mostrado en el Esquema 4.1, siguiendo la metodología general de SPPS planteada en la Figura 4.4



Esquema 4.1 Esquema general de trabajo

Se eligieron secuencias de aminoácidos con el fin de obtener precursores hexapeptídicos de análogos a Aeruciclamidas, ver Esquema 4.2. Se substituyó la *D-allo-Ile* por *D-Ile* ó *L-Ile* dado el alto costo de Fmoc-*D-allo-Ile*-OH. Por otro lado, si bien un resto de Gly sería un punto favorable para realizar la macrociclación (ver Capítulo 5) debido a que hay menor impedimento estérico, para el caso de los análogos de Aeruciclamida A (**60**) y D (**65**), se comenzó la síntesis uniendo el carboxilato del tiazol **66** a la resina. El hecho de que el tiazol **66** fuera sintetizado por nosotros determinó dicha decisión, ya que la cantidad requerida para unir el primer Fmoc-AA-OH a la resina (1 eq.) es menor que la requerida en los siguientes acoplamientos (3 eq.) por tratarse de una sustitución nucleofílica.

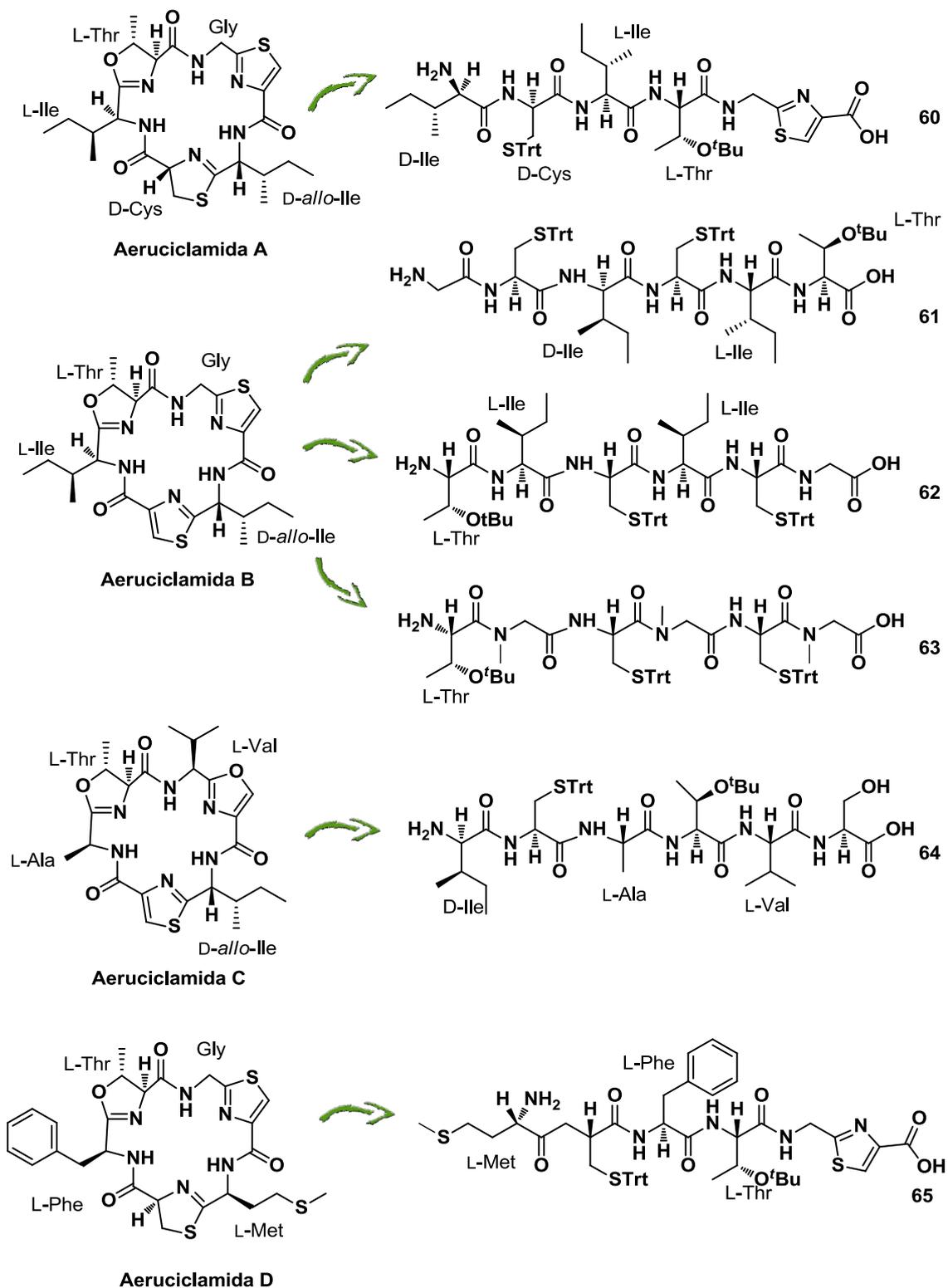


Figura 4.6. Hexapéptidos precursores de análogos de Aeruciclamidas

4.3 DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Se sintetizaron hexapéptidos precursores de análogos a Aeruciclámidas utilizando la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) con resina 2-clorotritilo, siguiendo la estrategia Fmoc y utilizando diversos agentes acoplantes.

Durante los meses de junio y julio del año 2011, se realizó una pasantía de investigación en el Institute for Research in Biomedicine del Parc Científic de Barcelona en los laboratorios a cargo del Dr. Fernando Albericio.⁵ Durante este período se realizó la síntesis de cuatro hexapéptidos precursores de análogos a los productos naturales en estudio.

Para la preparación de los hexapéptidos presentados en esta tesis, se siguió el procedimiento general mostrado en el esquema 4.1. Se trabaja sobre la resina 2-clorotritilo dado que el clivado del péptido se realiza en condiciones muy suaves (1% TFA en CH₂Cl₂) lo cual permite trabajar en presencia de otros grupos protectores ácido-lábiles. La formación de dicetopiperazina es una reacción secundaria no deseada muy frecuente en la Fmoc-SPPS, favorecida cuando el extremo C-terminal es una Gly; luego de la desprotección del Fmoc del segundo AA, el extremo NH₂ libre puede atacar al grupo éster que une el péptido con la resina, y clivarlo. El hecho de que la resina 2-Cl tritilo posea grupos funcionales muy voluminosos (grupos clorotritilo), evita la formación de dicetopiperazina entre el C-terminal de Gly y el segundo aminoácido, ver figura 4.7.⁶ A su vez, el uso de dicha resina evita la racemización del primer aminoácido.

⁵ Instituto de Investigación en Biomedicina, Parque Científico de Barcelona, España.

⁶ (a) Barlos, K.; Gatos, D.; Schafer, W. Synthesis of Prothymosin α (ProT α)- a Protein Consisting of 109 Amino Acid Residues **. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *990*, 590–593. (b) Fischer, P. M. Diketopiperazines in Peptide and Combinatorial Chemistry. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 9–35.

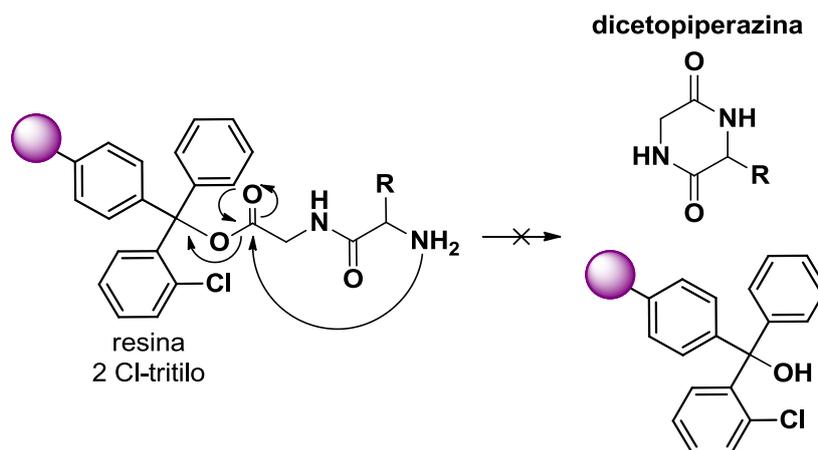


Figura 4.7 Formación de diketopiperazina

Otra de las ventajas que presenta la resina 2-Cl tritilo es el rápido y alto rendimiento del acoplamiento del extremo C-terminal a la resina; a su vez, se trata de una resina económica.⁶ El primer acoplamiento entre la resina y el primer Fmoc-AA-OH se realizó utilizando un exceso de DIPEA y los sitios que no reaccionaron fueron bloqueados utilizando MeOH.⁷

Los hexapéptidos **61** y **64** fueron obtenidos a partir de la activación con DIC y HOAt en DMF, esquema 4.2. En el caso del hexapéptido **62** se utilizó HBTU y DIPEA en DMF para los acoplamientos. En estos compuestos, el enlace amida entre la secuencia peptídica y Fmoc-L-Cys(Trt)-OH se llevó a cabo utilizando HCTU, dada su mayor reactividad comparada con HBTU, esquema 4.4.⁸

El acoplamiento de aminoácidos N-metilados es relativamente dificultoso debido al impedimento estérico de la amina metilada. Para ello se deben emplear agentes acoplantes más eficientes, tiempos de reacción prolongados y re-acoplamientos.⁹ Por dicha razón, para el caso del hexapéptido **63** se utilizó Cl-HOBt/DIC dado que posee similar reactividad que HCTU, se ha descrito que no produce racemización dado que se trabaja en condiciones neutras. Para la

⁷ López-Macià, a; Jiménez, J. C.; Royo, M.; Giralt, E.; Albericio, F. Synthesis and Structure Determination of Kahalalide F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11398–11401.

⁸ (a) Hood, C. A.; Fuentes, G.; Patel, H.; Page, K.; Menakuru, M.; Park, J. A. E. H. Fast Conventional Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis with. *J. Pept. Sci* **2008**, 97–101. (b) Marder, O.; Albericio, F. Industrial Application of Coupling Reagents in Peptides. *Chim. Oggi* **2004**, *35*, 6–11.

⁹ Angell, Y. M.; Thomas, T. L.; Flentke, G. R.; Rich, D. H.; Wisconsin-madison, U.; Street, N. C. Solid-Phase Synthesis of Cyclosporin Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7279–7280.

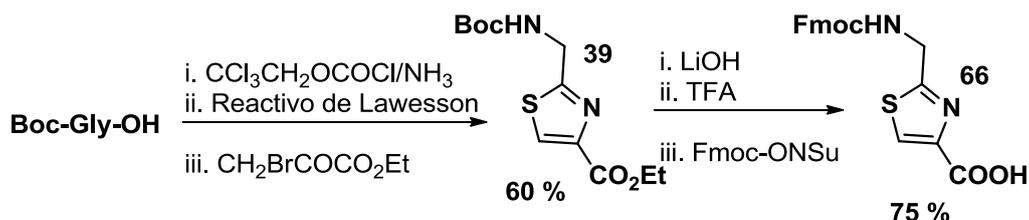
formación del enlace amida entre NMe-Gly y Fmoc-L-Cys(Trt)-OH se realizaron re-acoplamientos de una hora cada uno, analizando por HPLC que se haya producido el acoplamiento completo.

La elongación de la cadena de cada hexapéptido obtenido, se siguió por HPLC o usando el test de ninhidrina ó Kaiser.¹⁰ Luego de la última desprotección del Fmoc con 20% de piperidina en DMF, el hexapéptido deseado es escindido de la resina utilizando 1% de TFA en CH₂Cl₂. Bajo estas condiciones, los grupos protectores *tert*-butil y tritilo permanecen intactos.¹¹

¹⁰ Vázquez, J.; Qushair, G.; Albericio, F. *Methods in enzymology*, **2003**, vol. 369, 21-26, Elsevier

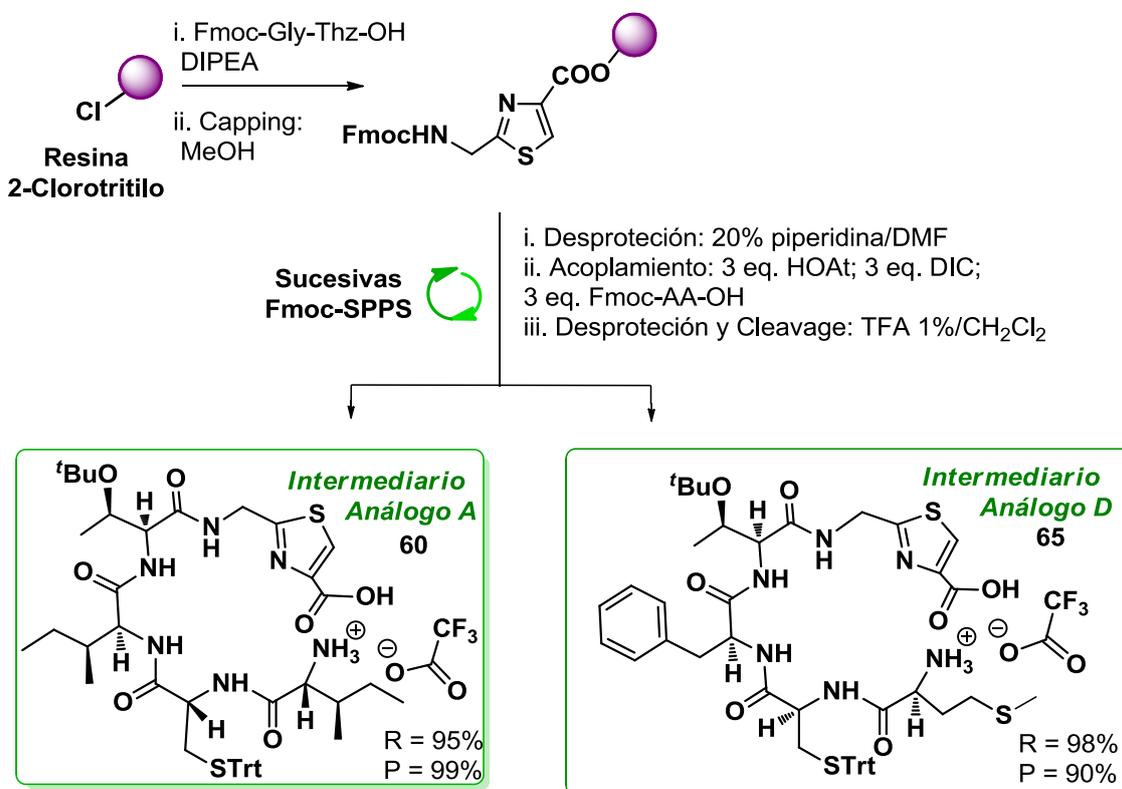
¹¹ Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F. *Amino Acid-Protecting Groups. Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504.

Para la obtención de los precursores abiertos de análogos de Aeruciclámidas A (**60**) y D (**65**) previamente se sintetizó el heterociclo Fmoc-Thz-OH (**66**). Dicho tiazol se obtuvo a partir de Boc-Gly-Thz-COOEt (**39**), la obtención del mismo es descrita en el capítulo 2. El grupo protector N-Boc fue removido y reemplazado por N-Fmoc como se muestra en el esquema 4.3. La unión de Fmoc-Thz-OH a la resina 2-Cl tritilo se llevó a cabo en CH₂Cl₂ usando DIPEA.



Esquema 4.3. Síntesis de tiazol

El Fmoc-Thz-OH se incorpora directamente en la Fmoc-SPPS y se elonga la cadena peptídica como se describe en el esquema 4.4 siguiendo lo descrito anteriormente.



Esquema 4.4 SPPS de hexapéptidos

4.4 CONCLUSIONES

Durante la pasantía en el Parc Cientific de Barcelona se adquirió formación y experiencia en la técnica de SPPS, la cual fue aplicada en la instalación de un laboratorio de SPPS en nuestro espacio.

La metodología de SPPS empleado nos permitió obtener seis hexapéptidos precursores de Aeruciclamidas. Los mismos fueron obtenidos con muy buenos rendimientos y alta pureza según los datos obtenidos por HPLC.

4.5 PARTE EXPERIMENTAL

HPLC se realizó en un Waters 2695 Separation Module equipado con una columna Waters XBridge C18 (75 x 4,6 mm, 2,5 μm tamaño de partícula) y Waters 996 detector de matriz de fotodiodos o en un Shimadzu (LC-10AT Pump) equipada con un Waters $\mu\text{Bondapak}^{\text{TM}}$ columna C18 (150 x 3,9 mm, 10 μm) y un detector de SPD20A prominence UV / Vis.

Los espectros de masa se realizaron en un espectrómetro de masa LTQ-FT Ultra (NanoESI) (Thermo Scientific).

Las medidas de punto de fusión fueron realizadas en Büchi Melting Point B540 en capilares abiertos.

El ángulo de rotación óptica fue medido en un polarímetro 241 Perkin Elmer con una celda de 0.5 mL

Procedimiento general SPPS 1:

La síntesis se realiza en una jeringa de plástico equipada con filtros de teflón conectados a un colector de vacío para permitir la rápida eliminación de reactivos y disolventes. La resina de 2-clorotritilo (carga = 1,0 mmol / g; 100 mg) se lavó con CH_2Cl_2 (5 x 30 sec), DMF (5 x 30 seg) y luego con CH_2Cl_2 (5 x 30 seg). Se agrega una solución de Fmoc-AA-OH (1 mmol / g de resina) en la mínima cantidad de CH_2Cl_2 y DIPEA (7 eq.). Se agita suavemente durante 1 h, y se agrega 3 eq extra. de DIPEA y se continua agitando durante 5 min. MeOH (0,08 ml / g de resina) se añade con el fin de limitar los grupos funcionales sin reaccionar sobre la resina; la mezcla se agita durante 20-30 min. La resina se filtra y se lava con CH_2Cl_2 y DMF

(5 x 30 seg. Cada uno). El NH-Fmoc se desprotege utilizando 20% de piperidina en DMF (2 x 5 min y 1 x 10 min). La resina se lava con DMF, CH₂Cl₂ y DMF (5 x 30 seg. cada uno). El Fmoc-AA-OH (3 eq.) se pre-activa con agitación vigorosa durante 4 min en presencia de DIC (3 eq.) y HOAt (3 eq.) en un mínimo de DMF, y después se vierte sobre la resina y la mezcla resultante se agita suavemente durante 1-2 h. Después de completarse el acoplamiento (seguido por el Test de ninhidrina), la resina se lava con CH₂Cl₂ y DMF (5 x 30 seg. cada uno). Ciclos de desprotección y acoplamiento se repiten con los aminoácidos apropiados para proporcionar el péptido deseado.

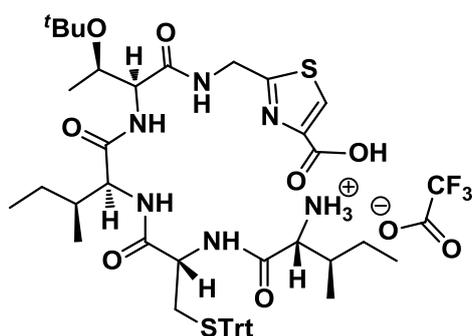
El péptido se escinde de la resina mediante tratamiento con 1% TFA en CH₂Cl₂ durante 2-3 minutos a temperatura ambiente seguido por filtración y recogida del filtrado en agua. El tratamiento se repitió 4-5 veces. Los disolventes se retiran bajo presión reducida y el péptido bruto se lava dos veces con CH₂Cl₂, se enfría con N₂ líquido y se liofiliza para así obtener el hexapéptido deseado.

Procedimiento general SPPS 2:

La síntesis se realiza en una jeringa de plástico equipado con filtros de teflón conectados a un colector de vacío para permitir la rápida eliminación de reactivos y disolventes. La resina de 2-clorotritilo (malla 100-300, 1.43 mmol / g) se hincha en CH₂Cl₂ (3 x 30 seg). Una solución del primer aminoácido protegido (Fmoc-Gly-OH, 2,0 eq) en CH₂Cl₂ y DIPEA (3,0 eq) se agita suavemente durante 10 min, se agregan 7.0 eq extra. de DIPEA y se continua agitando durante 45 min. Se añade MeOH (0,8 ml / g de resina) y se agita durante 10 min. La resina se filtra y luego se lava con CH₂Cl₂ (3 x 30 seg. cada uno) y DMF (3 x 30 seg. cada uno). El NH-Fmoc se desprotege utilizando 20% de piperidina en DMF (2 x 5 min y 1 x 10 min). Después, la resina se lava con DMF (3 x 30 seg. cada uno). Una solución de Fmoc-AA-OH (3 eq.) Y DIPEA (6 eq.) en DMF se añade a la resina, seguido por una solución de HBTU o HCTU (2,9 eq) en DMF ó DIC (3 eq.) y HOBt (3 eq.). La mezcla se agita durante 90 min. Después de completarse el acoplamiento (seguido por desaparición de reactivo HPLC), la resina se lava con DMF (3 x 30 seg. cada uno). Estos ciclos de desprotección y acoplamiento se repiten con los aminoácidos apropiados para proporcionar el compuesto deseado. El péptido se escinde de la

resina mediante tratamiento con 1% TFA en CH₂Cl₂ durante 2-3 minutos a temperatura ambiente seguido por filtración y recogida del filtrado en MeOH. El tratamiento se repite tres veces y después la resina se lava con CH₂Cl₂ (5 x 30 seg. cada uno). Se eliminan los disolventes a presión reducida para obtener el hexapéptido bruto.

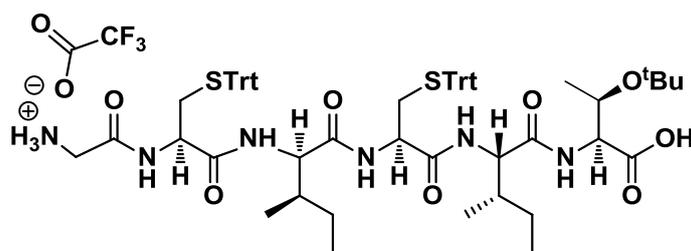
H₂N-D-Ile-D-Cys-L-Ile-L-Thr(^tBu)-Gly-Thz-OH (60):



El trifluoro acetato de H₂N-D-Ile-D-Cys-L-Ile-L-Thr(^tBu)-Gly-Thz-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general de SPPS 1

Sólido blanco (470 mg, 95%) Pureza: 99% determinada por HPLC (Gradiente lineal: 50 a 100% ACN (0.036% TFA) en H₂O (0.045% TFA) por 8 min; flujo = 1.0 mL/min; t_R = 3.69 min). **PF** = 189-191 °C. **[α]_D** = + 9.29 (c 0.53, DMSO). **HRMS** calculada para C₄₇H₆₃N₆O₇S₂ ([M+H]⁺) 887.41956 observada 887.41942

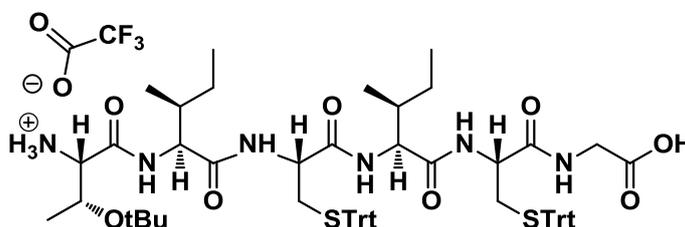
H₂N-Gly-L-Cys(Trt)-D-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(^tBu)-OH (61):



El trifluoro acetato de H₂N-Gly-L-Cys(Trt)-D-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(^tBu)-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general de SPPS 1.

Sólido blanco (1.25 g, 98%) Pureza: 89% determinada por HPLC (Gradiente lineal: 70 a 100% ACN (0.036% TFA) en H₂O (0.045% TFA) por 8 min; flujo = 1.0 mL/min; tR = 5.08 min). **PF** = 159-160 °C. **[α]_D** = - 8.25 (c 0.667, MeOH:CH₂Cl₂, (1:1)). **HRMS** calculada para C₆₆H₈₁N₆O₈S₂ ([M+H]⁺) 1149.5557 observada 1149.55652

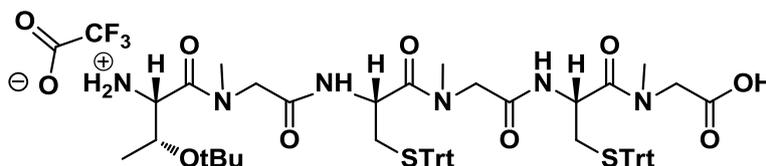
H₂N-L-Thr(^tBu)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-Gly-OH (62):



El trifluoro acetato de H₂N-L-Thr(^tBu)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-Gly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general de SPPS 2.

Sólido (320 mg, 75%) Pureza: 95 % determinada por HPLC (Gradiente lineal: 8 a 100% ACN en H₂O (0.1% TFA) por 20 min; flujo = 1.0 mL/min; tR =11.9 min).

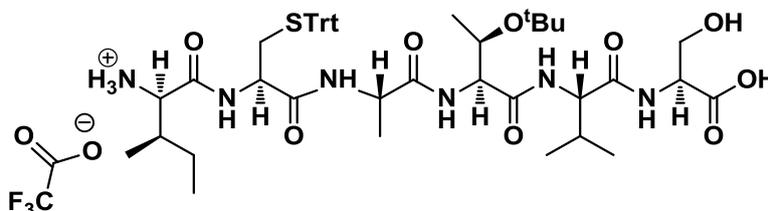
H₂N-L-Thr(^tBu)-NMeGly-L-Cys(Trt)-NMeGly-L-Cys(Trt)-NMeGly-OH (63):



El trifluoro acetato de H₂N-L-Thr(^tBu)-NMeGly-L-Cys(Trt)-NMeGly-L-Cys(Trt)-NMeGly-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general de SPPS 2. Realizando reacoplamiento de 1 h. entre cada NMeGly

Sólido (124 mg, 75%) Pureza: 95% determinada por HPLC (Gradiente lineal: 8 a 100% ACN en H₂O (0.1% TFA) por 20 min; flujo = 1.0 mL/min; t_R = 13.5 min).

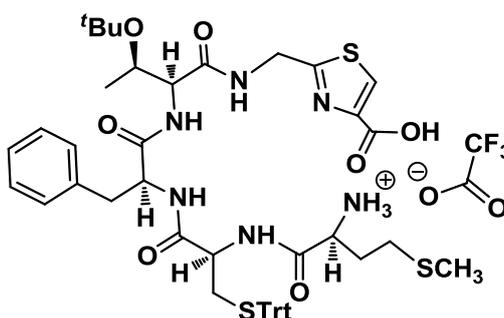
H₂N-D-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ala-L-Thr(^tBu)-L-Val-L-Ser-OH (64):



El trifluoro acetato de H₂N-D-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ala-L-Thr(^tBu)-L-Val-L-Ser-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general de SPPS 1.

Sólido blanco (825 mg, 96%) Pureza: 91% determinada por HPLC (Gradiente lineal: 70 a 100% ACN (0.036% TFA) en H₂O (0.045% TFA) por 8 min; flujo = 1.0 mL/min; t_R = 2.78 min). **PF** = 215-217 °C. **[α]_D** = + 3.04 (c 0.67, MeOH/CHCl₃ (1:1)). **HRMS** calculada para C₄₇H₆₇N₆O₉S₁ ([M+H]⁺) 891.46963 observada 891.46848

H₂N-L-Met-L-Cys-L-Phe-L-Thr(O^tBu)-Thz(Gly)-OH (65):



El trifluoro acetato de H₂N-L-Met-L-Cys-L-Phe-L-Thr(O^tBu)-Thz(Gly)-OH se obtuvo siguiendo el procedimiento general de SPPS 1

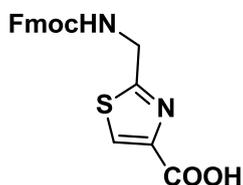
Sólido amarillento pálido (372 mg, 98%) Pureza: 90% determinada por HPLC (Gradiente lineal: 40 a 90% ACN (0.036% TFA) en H₂O (0.045% TFA) por 8

min; flujo = 1.0 mL/min; tR = 5.19 min). **PF** = 89-91 °C. **[α]_D** = - 5.24 (c 0.67, MeOH:CH₂Cl₂, (1:1)). **HRMS** calculada para C₄₉H₅₉N₆O₇S₃ ([M+H]⁺) 939.3629 observada 939.36019.

NOTA:

No se detalla el análisis de espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN porque se continúa trabajando con el crudo y se aísla y caracteriza completamente el derivado macrocíclico.

Fmoc-Gly-Thz-COOH (66):



Al compuesto NH-Boc-Gly-Thz-COOH (7.09 mmol, 1.83 g) se lo trata con TFA/CH₂Cl₂ (1:1, v/v, 52 mL) por 1 h y luego se concentra a presión reducida. La sal de trifloro acetato se disuelve dioxano-H₂O (3:2, 130 mL) y luego NaHCO₃ (1.2 eq.) se agrega seguido de Fmoc-OSu (2.0 eq.) en dioxano (40 mL) y se agita por 16 h. El dioxano se remueve bajo presión reducida, 10% aq. KHSO₄ (10% aq.) se agrega hasta pH 3 y luego la mezcla se extrae con CHCl₃:i-PrOH (3:1). Las capas orgánicas se lavan con brine y se secan MgSO₄. El solvente se elimina bajo presión reducida para dar el compuesto deseado.

Sólido blanco (1.99 g, 74%). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO) δ ppm 4.23 (t, *J* = 6.73 Hz, 1H), 4.37 (d, *J* = 6.79 Hz, 2H), 4.45 (d, *J* = 5.94 Hz, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.36 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.39 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 7.42 Hz, 2H), 7.88 (d, *J* = 7.49 Hz, 2H), 8.34-8.24 (m, 2H).

Capítulo 5

MACROCICLOS PEPTÍDICOS

5.1 INTRODUCCIÓN/ANTECEDENTES

Recientemente se han aislado una gran variedad de péptidos cíclicos de distintas fuentes naturales, como son plantas, bacterias, organismos marinos, etc. Este tipo de compuestos presenta un amplio rango de actividades biológicas (ver Capítulo 1).¹

Comparando con el péptido lineal, las ventajas que ofrece el péptido cíclico estimulan los esfuerzos y las investigaciones para poder realizar exitosamente este tipo de reacción. La ciclación generalmente se emplea para restringir al péptido adoptando su conformación bioactiva y aumentando así la especificidad y la potencia.² Por otro lado, los péptidos cíclicos son metabólicamente más estables, presentando mayor resistencia *in vivo* a la degradación enzimática. A su vez, la ausencia de C- y N- terminal ionizables y la formación de puentes de hidrógeno internos facilita el cruce de membranas.³ Estos péptidos cíclicos también presentan la propiedad de complejear metales,⁴ característica que resulta interesante para el transporte de iones a través de membranas,⁵ formando además, estructuras supramoleculares.⁶ Este tipo de propiedades,

¹ Marsault, E.; Peterson, M. L. Macrocycles Are Great Cycles: Applications, Opportunities, and Challenges of Synthetic Macrocycles in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1961–2004.

² Davies, J. S. The Cyclization of Peptides and Depsipeptides. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 471–501.

³ Wipf, P. Synthetic Studies of Biologically Active Marine Cyclopeptides. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2115–2134.

⁴ Grøndahl, L.; Sokolenko, N.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P.; Hanson, G. R.; Gahan, L. R. Interaction of Zinc (II) with the Cyclic Octapeptides, cyclo[Ile(Oxn)-D-Val(Thz)]₂ and Ascidiacyclamide, a Cyclic Peptide from *Lissoclinum Patella*. *J. Chem. Soc., Dalt. Trans.* **1999**, 1227–1234.

⁵ Ishida, H.; Qi, Z.; Sokabe, M.; Donowaki, K.; Inoue, Y. Molecular Design and Synthesis of Artificial Ion Channels Based on Cyclic Peptides Containing Unnatural Amino Acids. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2978–2989.

⁶ Jolliffe, K. a. Backbone-Modified Cyclic Peptides: New Scaffolds for Supramolecular Chemistry. *Supramol. Chem.* **2005**, *17*, 81–86.

hace a los ciclopéptidos, moléculas prometedoras y posibles candidatos en el descubrimiento de nuevos fármacos.¹

Los productos naturales cuyo estructura base son péptidos cíclicos que contienen heterociclos azólicos, son comúnmente llamados ciclamidas. Varias de estas ciclamidas han sido aisladas de organismos marinos como esponjas y cianobacterias. Generalmente se trata de hexa u octapéptidos cíclicos que alternan aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos en su esqueleto. Las cadenas laterales de estos aminoácidos polares, pueden ciclar para formar oxazolininas o tiazolininas y posteriormente oxidarse a oxazoles y tiazoles respectivamente (ver Capítulo 2 - 2.2.1).

Ejemplos de estos compuestos son: Aeruciclamidas (**1-2**) (ver Capítulo 1), Venturamidinas (**6-9**) (ver Capítulo 1), Dendroamida A (**3**) (ver Capítulo 1), Balgacilamidinas (**4-5**) (ver Capítulo 1), Didmolamida A (**69**),⁷ Tenuociclamida C (**68**),⁸ Bistratamida C (**67**),⁹ Westiellamida (**70**),¹⁰ Figura 5.1.

⁷ Rudi, A.; Chill, L.; Akinin, M.; Kashman, Y. Didmolamide A and B, Two New Cyclic Hexapeptides from the Marine Ascidian *Didemnum Molle*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 575–577.

⁸ Banker, R.; Carmeli, S. Tenuocyclamides A-D, Cyclic Hexapeptides from the Cyanobacterium *Nostoc Spongiaeforme* Var. *Tenue*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1248–1251.

⁹ Foster, M.P.; Concepcion, G.P.; Caraan, G.; Ireland, C.M. Bistratamides C and D. Two new oxazole-containing cyclic hexapeptides isolated from a Philippine *Lissoclinum bistratum* ascidian. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, (24), 6671-6675.

¹⁰ Prinsep, M.; Moore, R.; Levine, I.; Patterson, G. Westiellamide, a Bistratamide-Related Cyclic Peptide from the Blue-Green Alga *Westiellopsis prolifica*. *J. Nat. Prod.*, **1992**, *55* (1), 140–142.

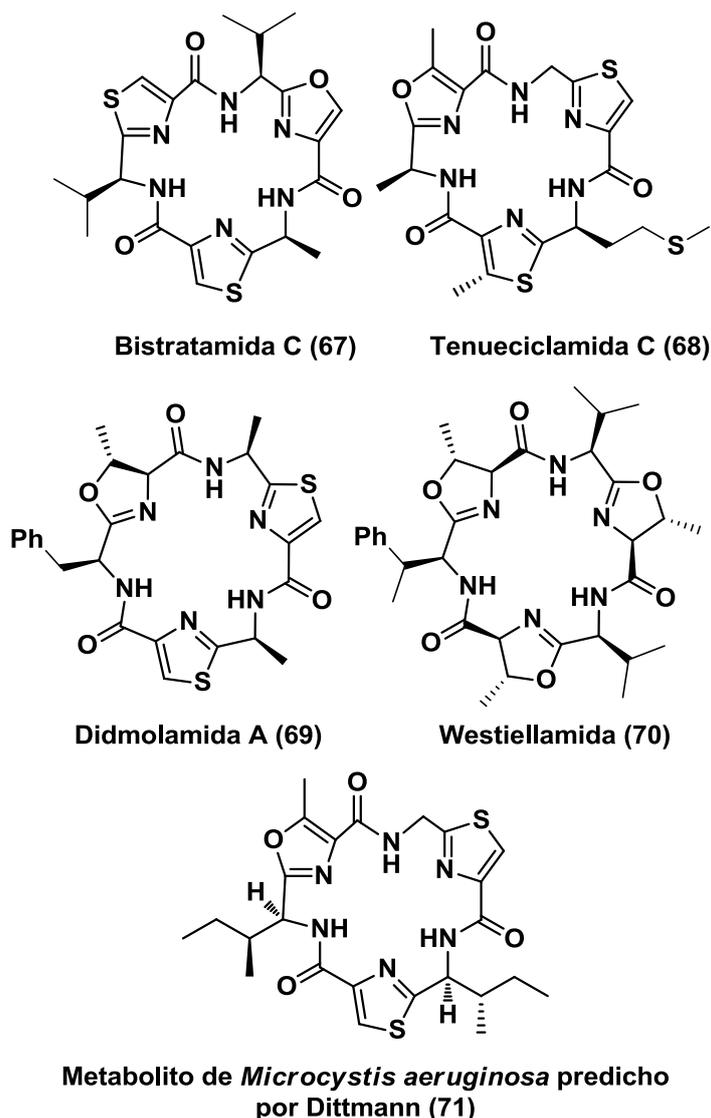


Figura 5.1 Macrociclos azólicos

Del análisis de la información genómica de *M. aeruginosa* PCC 7806, Dittmann y colaboradores predijeron tres hexapéptidos cíclicos con tiazoles y oxazoles. Uno de ellos es el análogo de Aeruciclamida B oxidado (**71**), ver Figura 5.1, que contiene un oxazol y L-Ile en vez de una oxazolina y D-*allo*-Ile respectivamente.¹¹

Muchas de estas ciclámidas presentan interesantes actividades biológicas, (ver Capítulo 1) como es el caso de las Aeruciclámidas (**6-9**), Venturámidas (**1-2**), y Balgaciclámidas (**3-4**) que poseen actividades antimaláricas; Dendroamida A

¹¹ Ziemert, N.; Ishida, K.; Quillardet, P.; Bouchier, C.; Hertweck, C.; de Marsac, N. T.; Dittmann, E. Microcyclamide Biosynthesis in Two Strains of *Microcystis Aeruginosa*: From Structure to Genes and Vice Versa. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 1791–1797.

(**3**) que revierte la múltiple resistencia a fármacos y Westiellamida (**70**) que es citotóxico contra las células MRC5CV1 y T24.¹² Además de las ciclamidas, se han aislado ciclopéptidos no azólicos como Mahafacyclin B (**72**),¹³ Chevalierin A (**73**),¹⁴ y Malformina C (**74**),¹⁵ los cuales presentan actividades antiparasitarias contra *P. falciparum* (IC₅₀ = 2.2 μM, 8.9 μM y 70 ng/mL respectivamente), ver figura 5.2. Además, se encuentran los péptidos N-Me como es el caso de la ciclosporina, fármaco inmunosupresor ampliamente utilizado en el trasplante de órganos administrado oralmente, cuyo estudio revela la importancia de metilar algunos residuos aminoacídicos con el fin de mejorar la biodisponibilidad oral de este tipo compuestos.¹⁶

¹² Hambley, T. W.; Hawkins, C. J.; Lavin, M. F.; van den Brenk, A.; Watters, D. J. Cyclohexazoline: A Cytotoxic Cyclic Hexapeptide from the Ascidian *Lissoclinum Bistratum*. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 341–348.

¹³ Baraguey, C.; Blond, A.; Cavelier, F.; Pousset, J.-L.; Bodo, B.; Auvin-Guette, C. Isolation, Structure and Synthesis of Mahafacyclin B, a Cyclic Heptapeptide from the Latex of *Jatropha Mahafalensis*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 2098–2103.

¹⁴ Baraguey, C.; Auvin-guette, C.; Blond, A.; Cavelier, F.; Lezenven, F.; Pousset, J.; Bodo, B. Isolation, Structure and Synthesis of Chevalierins A, B and C, Cyclic Peptides from the Latex of *Jatropha Chevalieri*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, *1*, 3033–3040.

¹⁵ Anderegg R.J.; Biemann K.; Buechi G.; Cushman M.; Malformin C, a new metabolite of *Aspergillus niger*. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*(11), 3365–3370.

¹⁶ Rügger A.; Kuhn M.; Lichti H.; Loosli H.R.; Huguenin R.; Quiquerez C.; von Wartburg A. Cyclosporin A, a Peptide Metabolite from *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai, with a remarkable immunosuppressive activity. *Helv Chim Acta.* **1976**, *59*(4), 1075–1092.

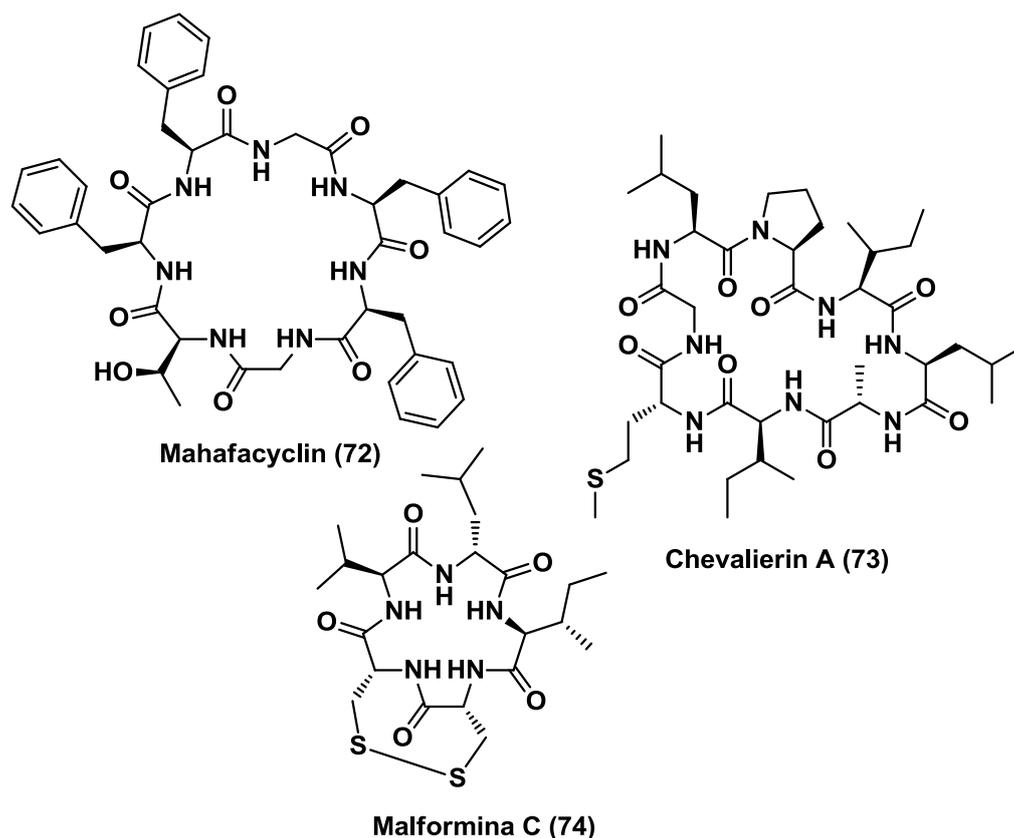


Figura 5.2 Ciclopéptidos con actividad antimalárica

5.1.1 Estrategias Sintéticas

Como se mencionó anteriormente, la idea de rigidizar péptidos para lograr la conformación activa es un objetivo que entusiasma mucho a los químicos sintéticos, de ahí es que se han desarrollado una gran cantidad de metodologías. Existen diversas estrategias para obtener macrociclos peptídicos que varían de acuerdo al punto de macrociclación. Entre ellas se encuentran las metodologías que realizan la unión entre:

- a) grupos funcionales de las cadenas de AA (side chain-to-side chain),
- b) cadena de AA – cola (side chain-to-tail),
- c) cadena de AA – cabeza (side chain-to-head),
- d) cabeza – cola (head- to-tail).¹⁷

¹⁷ White, C. J.; Yudin, A. K. Contemporary Strategies for Peptide Macrocyclization. *Nature Chem.* **2011**, *3*, 509–524.

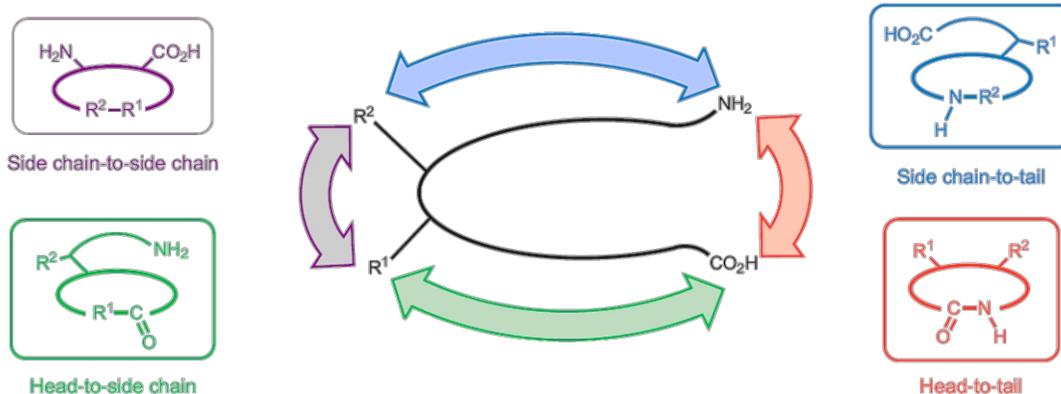


Figura 5.3. Estrategias generales para la construcción de péptidos cíclicos
(Imagen extraída de *Nature Chem.* **2011**, *3*, 509.)

En consecuencia, se han desarrollado varias metodologías y estrategias, tanto en solución como en fase sólida. Algunas de las principales estrategias de macrociclación cabeza-cola en solución, Figura 5.4, se enumeraran a continuación:

A – Elongación de la cadena azólica peptídica paso a paso y macrociclación en solución. Para el caso de Dendroamidas¹⁸ y Bistratamida C,¹⁹ se sintetizaron los building blocks azólicos por separado, luego se fueron acoplando uno a uno y posteriormente se macrocicló la cadena tris-heterocíclica en solución.

B – Ciclooligomerización: homociclación de un solo building block en solución. Este tipo de estrategia generalmente da una mezcla de trímeros y tetrámeros junto con pequeñas trazas de polímeros mayores.²⁰ Esta metodología es aplicable a la síntesis de productos naturales como Westiellamide que posee tres oxazolininas iguales en su estructura.²¹

¹⁸ You, S.-L.; Kelly, J. W. Total Synthesis of Dendroamide a: Oxazole and Thiazole Construction Using an Oxodiphosphonium Salt. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9506–9509.

¹⁹ Aguilar, E.; Meyers, A. I. Total Synthesis of (-)-Bistratamide C. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2477–2480.

²⁰ (a) Mink, D.; Mecozzi, S.; Rebek, J. Natural Products Analogs as Scaffolds for Supramolecular and Combinatorial Chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5709–5712. (b) Black, R.; Dungan, V.; Li, R.; Young, P.; Jolliffe, K. A Cyclooligomerisation Approach to Backbone-Modified Cyclic Peptides Bearing Guanidinium Arms. *Synlett* **2010**, *4*, 551–554.

²¹ Wipf, P.; Miller, C. P.; Grant, C. M. Synthesis of Cyclopeptide Alkaloids by Cyclooligomerization of Dipeptidyl Oxazolines. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9143–9150.

C – Síntesis híbrida: elongación de la cadena azólica peptídica en fase sólida y posterior macrociclación en solución. Tal es el caso de las síntesis totales de Didmolamida A²² y Tenueciclamida²³ que se llevaron a cabo por Kelly y colaboradores acoplado los building blocks azólicos en fase sólida y macrociclado en solución.

D – Síntesis de la cadena peptídica en fase sólida, macrociclación y posterior ciclodeshidratación de los residuos de Thr y/o Ser y oxidación en solución. Para el caso de Urukthapelstatin A, Kim y McAlpine comparan la síntesis de todos los building blocks y la macrociclación en solución con la síntesis de la cadena peptídica en SPPS y la macrociclación y formación de los heterociclos de oxazol sobre el macrociclo en solución.²⁴

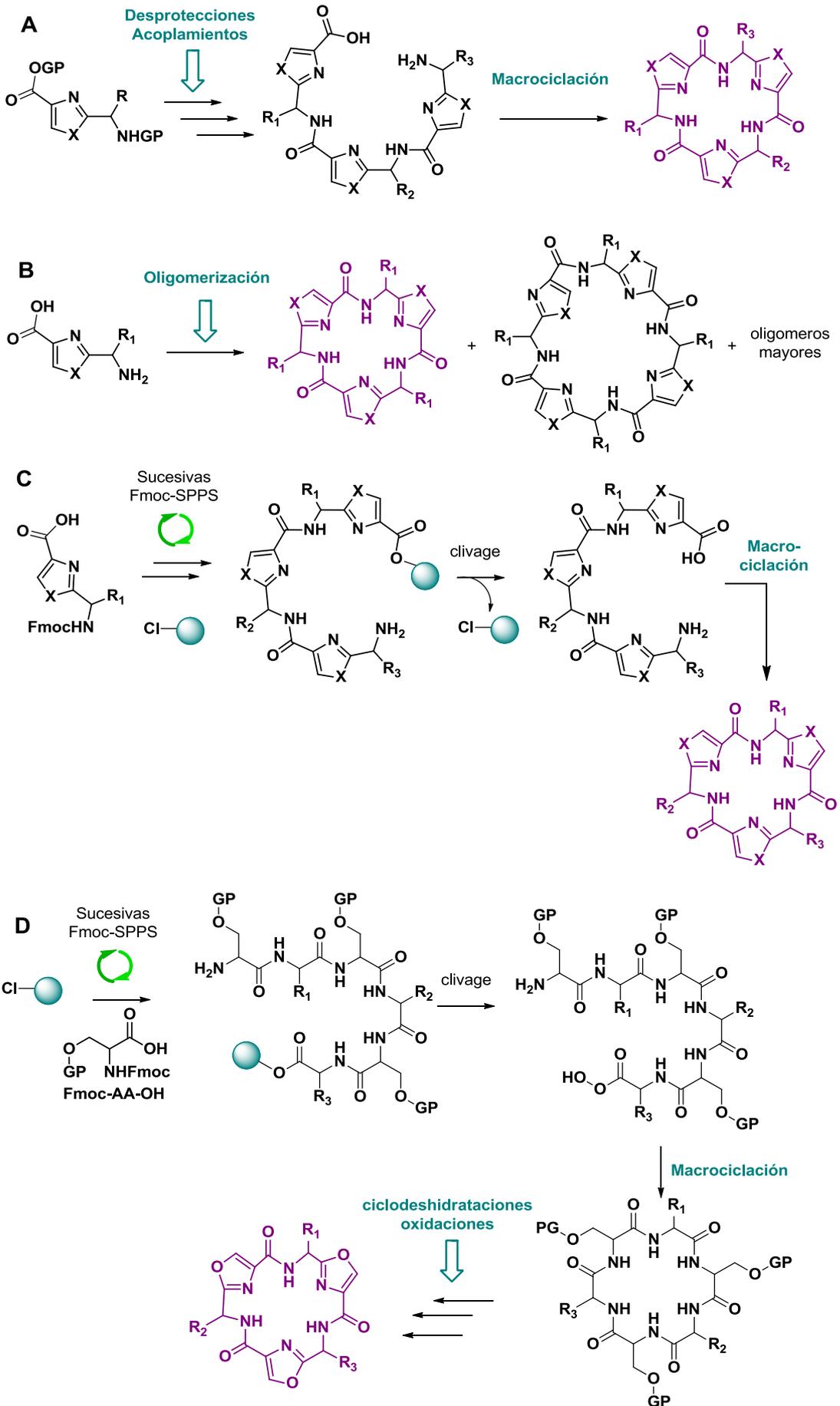
E – Macrociclación asistida por metales. Ye y colaboradores han estudiado la utilización de iones metálicos como auxiliares no-covalentes para facilitar la macrociclación de penta y heptapéptidos. Los iones de sodio se usan para mejorar la ciclación cabeza-cola de un pentapéptido e iones de cesio para heptapéptidos; en ambos casos los mejores resultados fueron observados con DEPBT como agente acoplante. Estos iones metálicos promueven la ciclación a través de coordinaciones en tándem a lo largo de la cadena peptídica induciendo un giro en la estructura que acerca el extremo N- y C-terminal.²⁵

²² You, S.-L.; Kelly, J. W. Total Synthesis of Didmolamides A and B. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2567–2570.

²³ You, S.-L.; Deechongkit, S.; Kelly, J. W. Solid-Phase Synthesis and Stereochemical Assignments of Tenuecyclamides A-D Employing Heterocyclic Amino Acids Derived from Commercially Available Fmoc Alpha-Amino Acids. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2627–2630.

²⁴ Kim, S. J.; McAlpine, S. R. Solid Phase versus Solution Phase Synthesis of Heterocyclic Macrocycles. *Molecules* **2013**, *18*, 1111–1121.

²⁵ Ye, Y.-H., Gao, X.-M., Liu, M., Tang, Y.-C. & Tian, G.-L. Studies of the synthetic methodology of head to tail cyclization of linear peptides. *Let. Pept. Sci.* **2003**, *10*, 571–579.



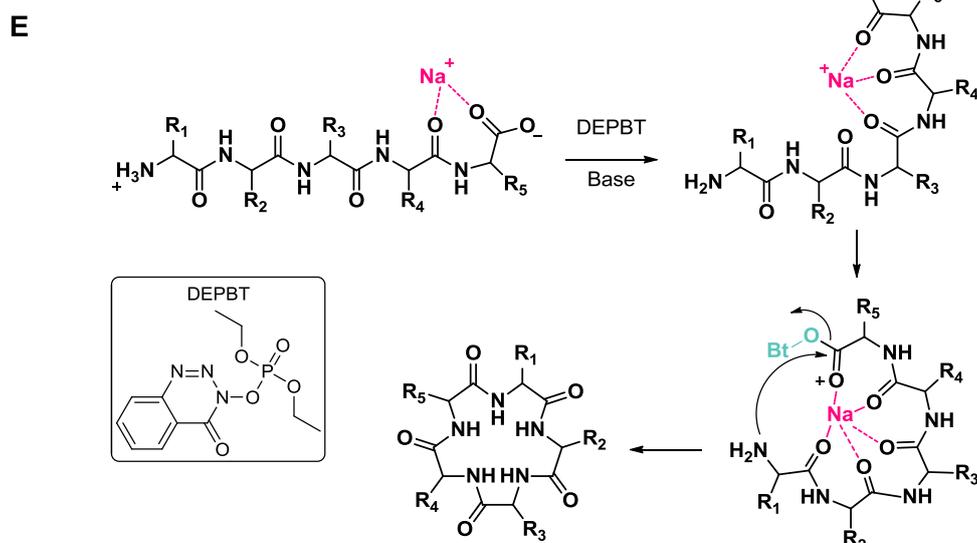


Figura 5.4 Estrategias de macrociclación cabeza-cola en solución

5.1.2 Macrociclaciones

Las reacciones de macrociclación de péptidos pequeños (de tres a seis aminoácidos) que no poseen *turn inducers* por lo general son lentas, dan bajos rendimientos y reacciones secundarias como dimerización ó polimerización y epimerización. Esto se debe a que el enlace amida adopta la conformación *s-transoide* y resulta un enlace con fuerte carácter π ; lo que dificulta la capacidad de ciclarse.²⁶ La incorporación de β -*turn inducers* como prolinas, pseudoprolinas, oxa(tia)zolininas y/o oxa(tia)zoles favorece la conformación *cisoide* del enlace amida que facilita la ciclación, Figura 5.5.²⁷

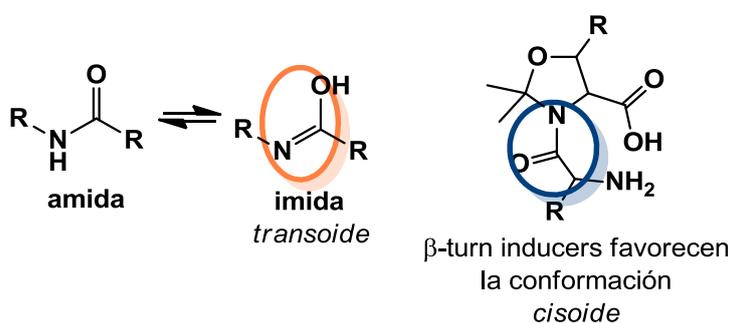


Figura 5.5

²⁶ Sayyadi, N.; Skropeta, D.; Jolliffe, K. A. N, O-Isopropylidenated Threonines as Tools for Peptide Cyclization: Application to the Synthesis of Mahafacyclin B. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5497–5499.

²⁷ Skropeta, D.; Jolliffe, K. a; Turner, P. Pseudoprolines as Removable Turn Inducers: Tools for the Cyclization of Small Peptides. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8804–8809.

Por otro lado, los rendimientos de las reacciones de macrociclación están muy influenciados por la secuencia peptídica, por lo que cada macrociclación es casi impredecible. De todas formas, se conoce que en general, la ciclación de un péptido formado exclusivamente por L-aminoácidos es difícil de realizar; sin embargo si uno de esos aminoácidos es sustituido por su análogo D-aminoácido, la reacción transcurre con un mejor rendimiento.²⁸

5.1.3 Conformación espacial de péptidos conteniendo heterociclos aromáticos

Estos compuestos adoptan una conformación espacial determinada por las características planas de los anillos heterocíclicos y la unión *trans* amida que existe entre ellos.

El hecho de que se alternen dadores de enlace de hidrógeno con aceptores, hace que en el interior de la molécula se forme una red de enlaces de hidrógeno bifurcados que de cierta forma, rigidiza el macrociclo. La orientación de las cadenas aminoacídicas depende de la configuración absoluta del C- α . Si todos los sustituyentes poseen la misma configuración absoluta, las cadenas se orientan en la misma cara del macrociclo.²⁹

Romminger y colaboradores estudiaron la conformación espacial de ciclohexapéptidos heterocíclicos análogos a Westiellamida. Concluyeron que este tipo de compuestos presenta una conformación casi plana cuando se basa en oxazoles; y que si presenta tiazoles la conformación tiende a ser cónica.³⁰

²⁸ Ehrlich, A.; Heyne, H.-U.; Winter, R.; Beyermann, M.; Haber, H.; Carpino, L. a.; Bienert, M. Cyclization of All-L-Pentapeptides by Means of 1-Hydroxy-7-Azabenzotriazole-Derived Uronium and Phosphonium Reagents. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8831–8838.

²⁹ Jolliffe, K. a. Backbone-Modified Cyclic Peptides: New Scaffolds for Supramolecular Chemistry. *Supramol. Chem.* **2005**, *17*, 81–86.

³⁰ Haberhauer, G.; Drosdow, E.; Oeser, T.; Rominger, F. Structural Investigation of Westiellamide Analogues. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1853–1859.

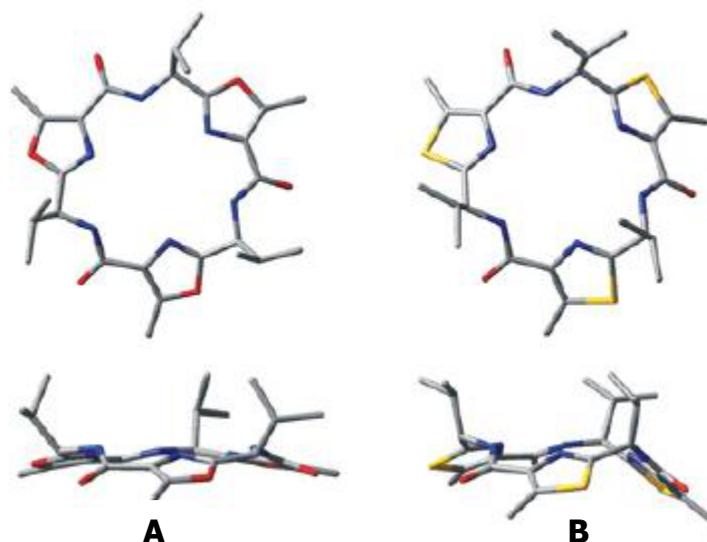
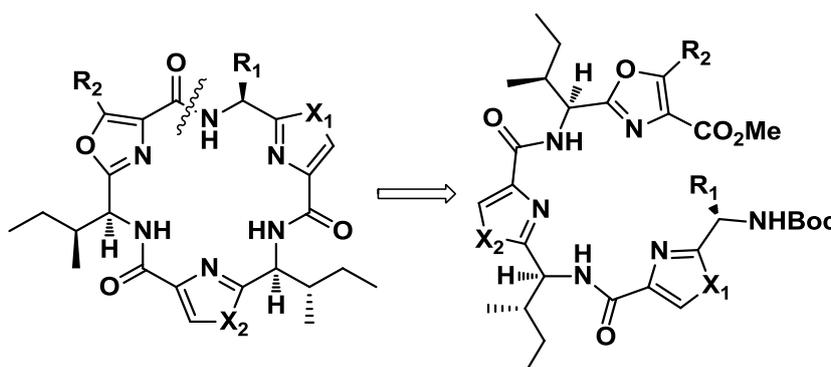


Figura 5.6 Estructuras moleculares en estado sólido. Análogos de Westiellamida. A: análogo oxazólico, B: análogo tiazólico (imagen extraída de *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1853)

5.2 ESTRATEGIA SINTÉTICA

A – Macrociclos azólicos

Para la síntesis de macrociclos azólicos, se siguió la estrategia A de la Figura 5.4.



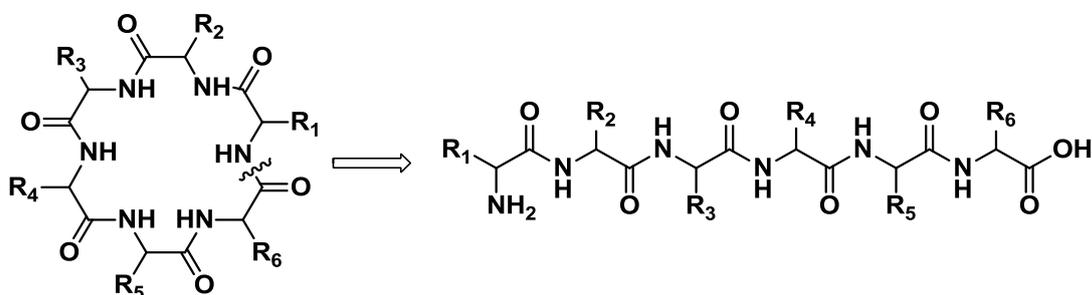
Esquema 5.1 Análisis retrosintético

Una vez obtenidos los precursores abiertos heterocíclicos y luego de realizar las correspondientes desprotecciones, se realiza la macrociclación de los mismos. La presencia de heterociclos en los precursores abiertos, habilita a una conformación más rígida del hexapéptido; facilitando así la formación del

macrociclo. Este hecho también disminuye los tiempos de reacción así como también la formación de productos secundarios, mejorando significativamente los rendimientos.²⁶

En los casos en que $R_1 = H$ (residuo de Gly) ese punto de macrociclación no posee impedimento estérico si se lo compara con los otros posibles puntos donde los residuos derivan de Ile. Por dicha razón sería esperable obtener mejores rendimientos y menores tiempos de reacción para el caso de $R_1 = H$.

B – Macrociclos hexapeptídicos



Esquema 5.2 Análisis retrosintético

Luego de obtener los hexapéptidos por SPPS se procede a realizar la macrociclación de los mismos en solución. La elección de Gly como extremo C-terminal evita la racemización y facilita la reacción de macrociclación dado que no presenta impedimento estérico.

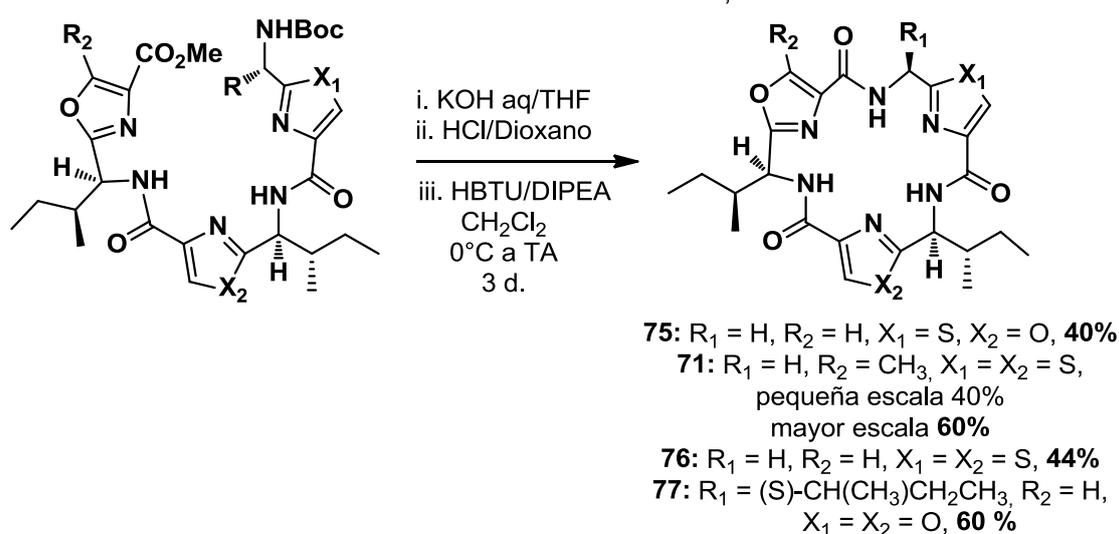
C – Estudio de reacciones sobre macrociclos peptídicos obtenidos por SPPS

Se estudiarán las condiciones de obtención de tiazolinas descritas por Kelly y colaboradores a partir de residuos de Cys presentes en los macrociclos no azólicos obtenidos en **B**. A su vez, se desprotegerán las Cys con el fin de metilarlas. También se estudiará la síntesis de puentes disulfuro descrita para la Malformina C en compuestos con dos residuos de Cys.

5.3 DISCUSIÓN Y RESULTADOS

A – Macrociclos azólicos

Con el fin de obtener los análogos a Aeruciclámidas, una vez obtenidos los tris-heterociclos, realizamos la desprotección del grupo ácido y el grupo amino con KOH(aq)/THF y HCl(g)/dioxano respectivamente. El último paso es la macrociclación de los tris-heterociclos desprotegidos utilizando HBTU como agente activante del grupo carboxilo. La reacción de macrociclación se lleva a cabo en condiciones diluidas (1 - 5 mM) y durante 3 días o hasta observar desaparición de reactivo (Esquema 5.3). La importancia de la dilución radica en el hecho de favorecer la reacción intramolecular frente a la intermolecular, con el fin de disminuir las dimerizaciones o polimerizaciones y favorecer la macrociclación.



Esquema 5.3 – Macrociclaciones de tris-azoles

El compuesto **71**, *Cyclo-Gly-Oxz(Met)-L-Ile-Thz-L-Ile-Thz* fue sintetizado en dos ocasiones, al igual que sus precursores. Primero se trabajó en micro-escala (partiendo de 30 mg del precursor abierto) y luego se escaló (partiendo de 556 mg) logrando aumentar el rendimiento de la macrociclación en un 20 %.

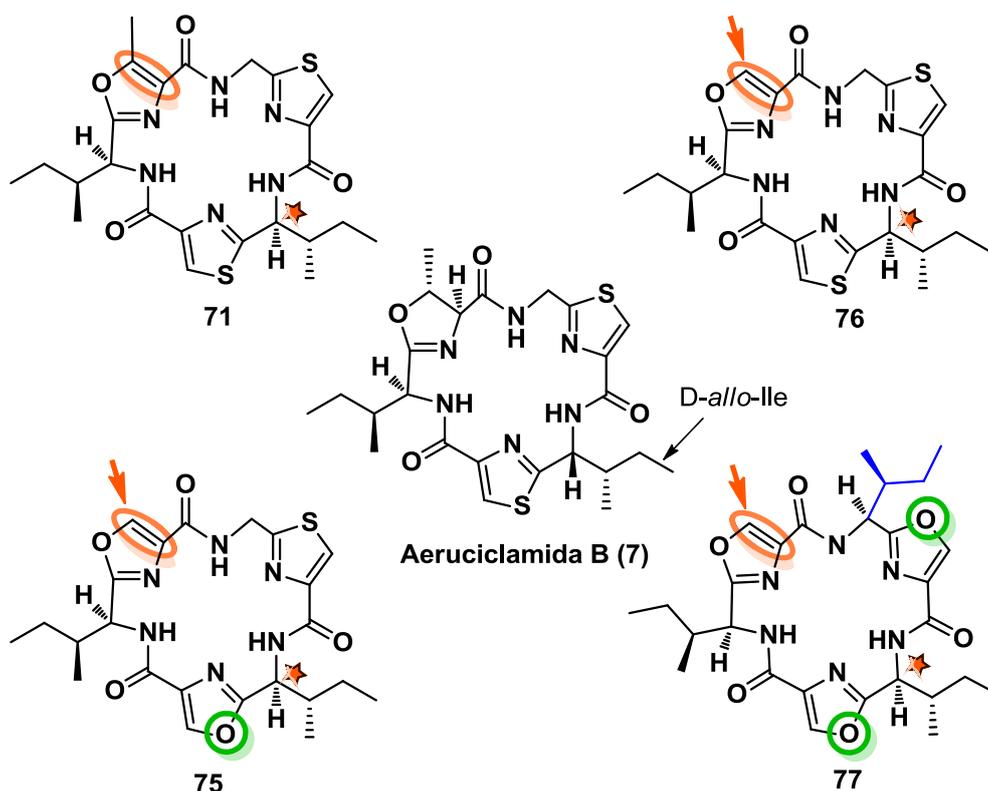
Como se mencionó anteriormente, todos los heterociclos son aromáticos, sustituyéndose la oxazolona presente en Aeruciclámidas por un oxazol dada la

mayor estabilidad de este último, al compararla con la oxazolina.³¹ Esto ha sido corroborado por la estabilidad de los heterociclos aromáticos a temperatura ambiente durante meses.

Además, se sustituyó el aminoácido *D-allo*-Ile presente en Aeruciclamidas por *L*-Ile, obteniendo así análogos significativamente más económicos.³²

También se realizó el reemplazo isostérico del tiazol por oxazol para estudiar la incidencia del mismo en la actividad biológica.

Para la obtención del compuesto **77**, *Ciclo-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz*, donde la macrociclación se realiza con la amina derivada de Ile (significativamente más impedida que Gly), se esperaba un rendimiento menor, sin embargo los resultados obtenidos han sido muy buenos (60%).



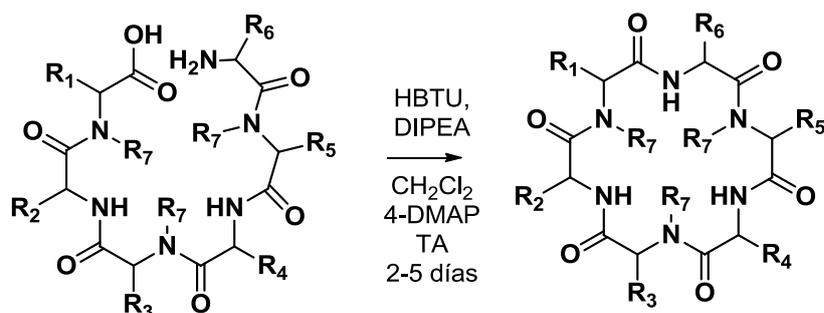
Esquema 5.4

³¹ E. C. Taylor, P. Wipf ed., *Oxazoles. The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Vol. **60**, Part B. Wiley: New Jersey, 2003.

³² *D-allo*-Ile: \$176 (5 g). *L*-Ile: \$12 (25 g). ChemImpex.

B – Macrociclos a partir de hexapéptidos sintetizados por SPPS

Se realizaron las macroclicaciones de los hexapéptidos obtenidos en fase sólida. Los rendimientos fueron muy buenos, incluso para el macrociclo N-metilado, para el cual se esperaba un menor rendimiento debido al impedimento estérico que el extremo N-terminal presenta.

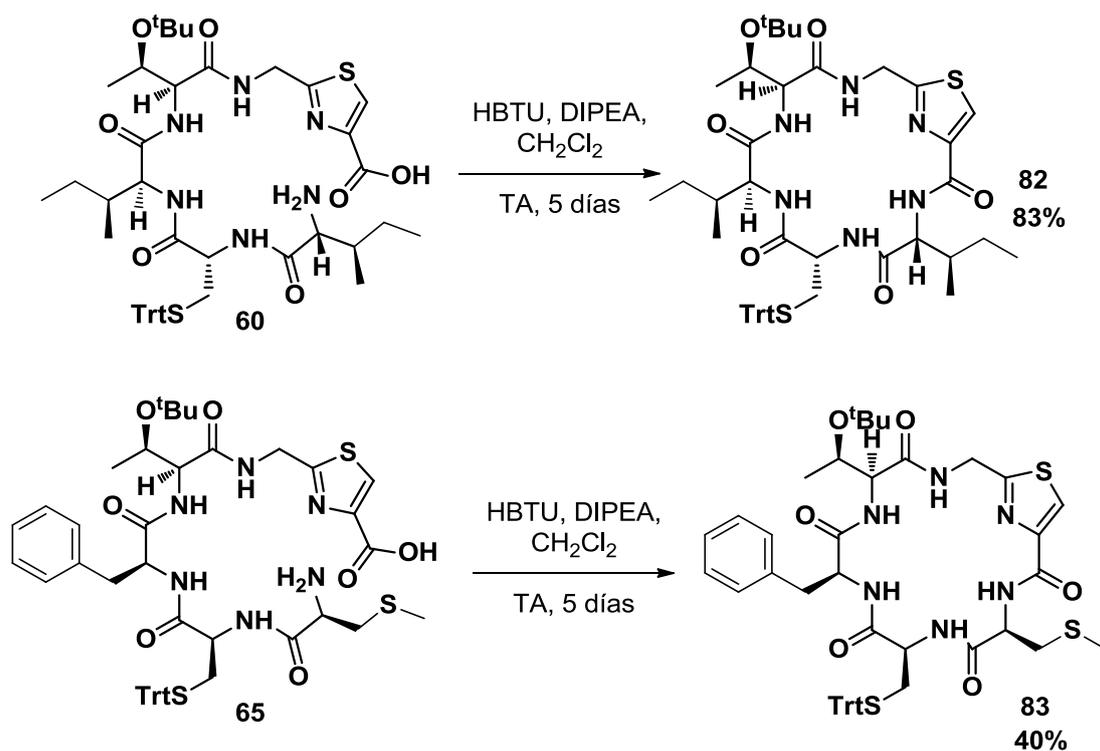


R correspondientes a las cadenas laterales de los siguientes aminoácidos:

- 78:** R₁ = L-Thr(O^tBu), R₂ = L-Ile, R₃ = L-Cys, R₄ = D-Ile, R₅ = L-Cys (Trt), R₆ = Gly, R₇ = H, **59%**
79: R₁ = Gly, R₂ = L-Cys (Trt), R₃ = L-Ile, R₄ = L-Cys (Trt), R₅ = L-Ile, R₆ = L-Thr(O^tBu), R₇ = H, **66%**
80: R₁ = L-Ser, R₂ = L-Val, R₃ = L-Thr(O^tBu), R₄ = L-Ala, R₅ = L-Cys (Trt), R₆ = D-Ile, R₇ = H, **55%**
81: R₁ = R₃ = R₅ = Gly, R₂ = R₄ = L-Cys (Trt), R₆ = L-Thr(O^tBu), R₇ = CH₃, **35%**

Esquema 5.5

Los hexapéptidos conteniendo un solo tiazol, **82** y **83**, Esquema 5.6 fueron macroclicados estudiando diversas condiciones de macroclicación, variando los agentes acoplantes, los disolventes, y las diluciones, ver tabla 5.1 y 5.2.



Esquema 5.6

Este tipo de compuestos presenta la ventaja de tener un tiazol en su estructura, el cual oficia de *turn inducer* favoreciendo la ciclación. La diferencia de rendimientos se puede atribuir a que el compuesto análogo D presenta todos L-AA y como vimos anteriormente, un péptido formado exclusivamente por L-aminoácidos es más difícil de ciclar. Para estos casos, no se observa un aumento del rendimiento al realizar la reacción a mayor escala como se observó con los macrociclos tris-azólicos.

Tabla 5.1 *Ciclo-Gly-L-Thr(^tBu)-L-Ile-D-Cys(Trt)-D-Ile-Thz (82)*

Masa (mg)	Ag. Acoplante (eq.)	DIPEA (eq.)	solvente	t (días)	Dilución (mM)	R(%)
50	HBTU (2.26)	2.26	CH ₂ Cl ₂	5	1	83
400	HBTU (2.26)	2.26	DCM	5	1	25
50	FDPP (1.7)	3.4	ACN/ CH ₂ Cl ₂	3	5	47
70	HBTU (2.0)	3.0	CH ₂ Cl ₂	3	1	61

Tabla 5.2 *Ciclo-Gly-L-Thr(^tBu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-Thz (83)*

Masa (mg)	Ag. Acoplante (eq.)	DIPEA (eq.)	solvente	t (días)	Dilución (mM)	R(%)
100	HBTU (2.24)	2.24	CH ₂ Cl ₂	5	1	40
100	HBTU (2.26)	2.26	CH ₂ Cl ₂	7	1	25
50	FDPP (1.7)	3.4	ACN/ CH ₂ Cl ₂ /DMF	5	1	40

En la Figura 5.7, se muestran los macrociclos obtenidos a partir de precursores sintetizados por SPPS. Las estrellas indican las diferencias en cuanto a la configuración absoluta con el producto natural.

Como puede verse, todos los macrociclos sintetizados contienen el dipéptido L-Thr(^tBu)-L-Ile, que utilizando las condiciones de ciclodeshidratación con DAST ó Deoxo-Fluor daría lugar a la oxazolina con configuración absoluta invertida en el C-5 si la comparamos con la oxazolina presente en las Aeruciclamidas. El

mecanismo de reacción de estos agentes ciclodeshidratantes invierte la configuración del C-OH, ver esquema 5.7 y Capítulo 2.

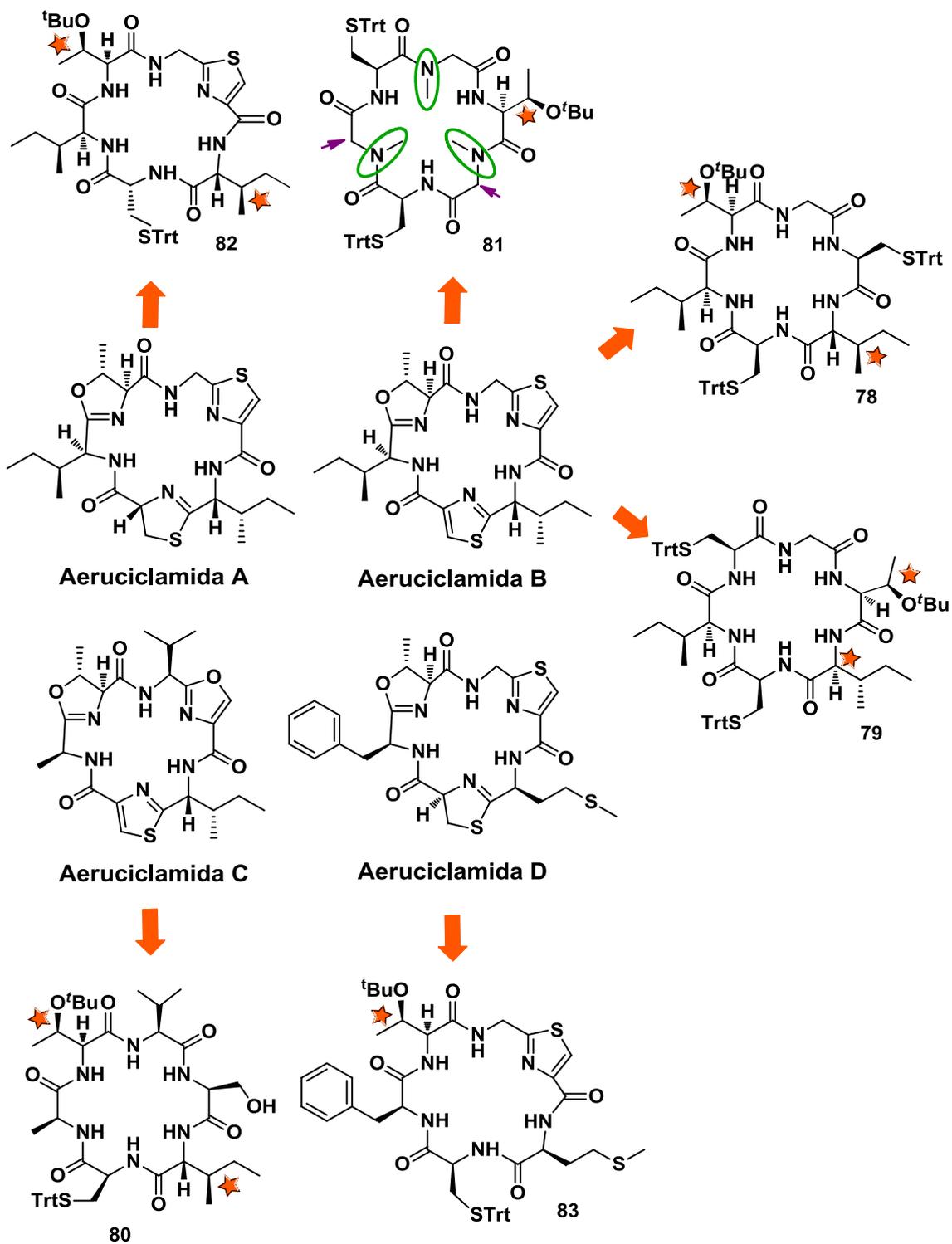
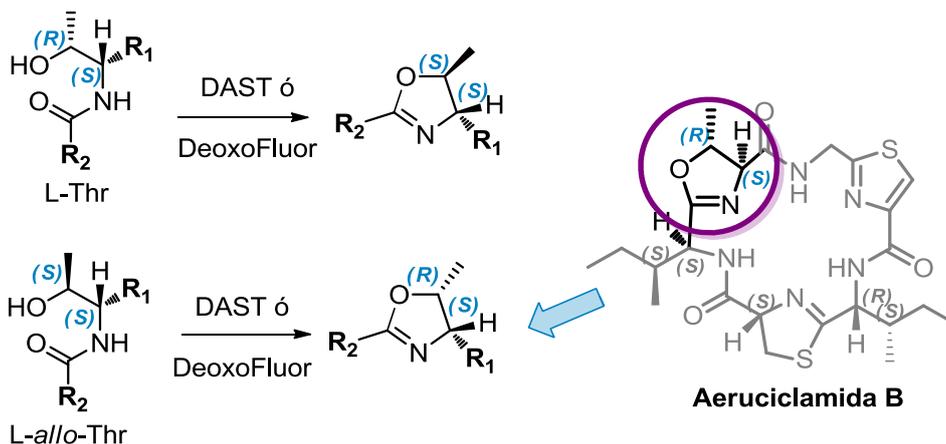


Figura 5.7

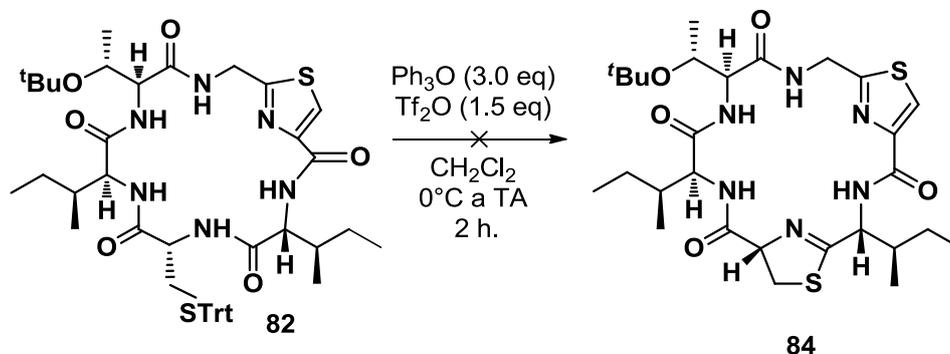


Esquema 5.7

C- Estudio de reacciones sobre macrociclos sintetizados por SPPS

I. Metodología de Kelly

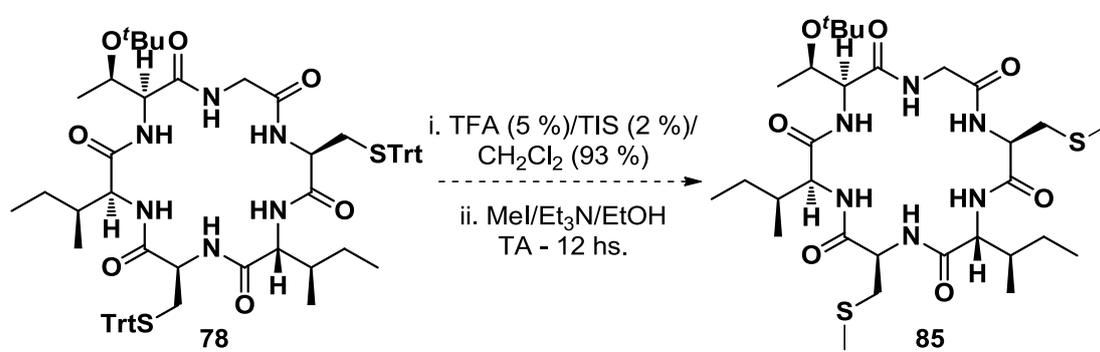
Por otro lado basándonos en la estrategia D descrita anteriormente, que obtiene oxazoles posteriormente a la macrociclación, se estudiaron sobre estos compuestos las reacciones de ciclodeshidratación con $\text{Tf}_2\text{O}/\text{PPh}_3\text{O}$ para obtener tiazolinas descritas por Kelly y colaboradores (ver capítulo 2) (ver figura 5.4). Se intentó obtener la tiazolina aplicando las condiciones de Kelly para la porción L-Cys(Trt)-L-Ile del macrociclo **82**. Luego de varios intentos con esta metodología no se logró aislar el producto deseado **84**. Sería importante adquirir mayor experiencia en la reacción de Kelly, con sustratos menos costosos, y posteriormente retomar los estudios sobre ciclohexapéptidos.



Esquema 5.8 Utilización de la metodología de Kelly *et. al.*

II. S-Metilación

Se removieron los grupos protectores de Cys con TFA 5% y utilizando TIS como "scavenger" (colector) de carbocationes muy reactivos que se generan luego de la desprotección de los tritilos.³³ Es necesario atrapar estos carbocationes para evitar reacciones secundarias no deseadas. Una vez desprotegido el macrociclo, se realizó la S-Metilación utilizando MeI, se observaron rastros del macrociclo **85** pero no podemos informar con total certeza la obtención del mismo dado que se trabajó con una cantidad muy pequeña, por lo que se deberán realizar nuevos experimentos.

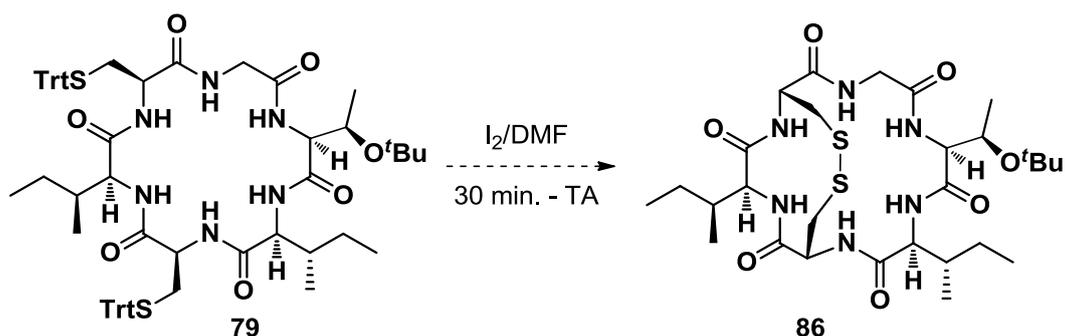


Esquema 5.9 Metilación de residuos de Cys.

³³ Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, L.; Guindon, C. a. Trialkylsilanes as Scavengers for the Trifluoroacetic Acid Deblocking of Protecting Groups in Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739–2742.

III. Formación de enlace disulfuro

Por otro lado, se estudió la reacción de formación de enlace disulfuro empleada por Julfakyan y colaboradores para la síntesis de Malformina C (**74**).³⁴ La reacción se llevó a cabo, utilizando condiciones oxidativas de formación del enlace disulfuro con iodo en DMF. Desafortunadamente, no se obtuvo el macrociclo **86**.



Esquema 5.10 Formación de enlace disulfuro

³⁴ (1) Kojima, Y.; Sunazuka, T.; Nagai, K.; Julfakyan, K. Malformin C, an Inhibitor of Bleomycin- Induced G2 Arrest. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2008**, *61*, 297–302.

5.4 CONCLUSIONES

Se desarrolló una metodología adecuada para la obtención de la primera serie de cuatro macrociclos (**71**, **76-78**) azólicos análogos a Aeruciclamidas simplificados y estables, con buenos rendimientos y a través de una ruta convergente.

Se realizó la síntesis total del análogo oxidado de Aeruciclamida B, *Cyclo-Gly-Oxz(Met)-L-Ile-Thz-L-Ile-Thz* **71**, el cual fue anteriormente predicho por Dittman y colaboradores como metabolito de *Microcystis aeruginosa*.¹¹ Ésta síntesis se repitió a mayor escala logrando poner a punto condiciones y mejorar rendimientos.

Se prepararon seis macrociclos (**78-83**) análogos a Aeruciclamidas obtenidos a partir de precursores sintetizados por SPPS.

Los rendimientos obtenidos en las macrociclaciones son muy buenos si se los compara con los reportados para compuestos similares.^{19, 30}

Se obtuvo el macrociclo **81** con residuos N-Metilados con el fin de estudiar su actividad biológica dado el interés que este tipo de compuestos presenta debido a que presentan mejoras en las propiedades de biodisponibilidad, ver Capítulo 1.

Se realizaron las primeras investigaciones, dentro del grupo de Química Farmacéutica, de reacciones de macrociclación. A su vez, se realizaron los primeros intentos de ciclodeshidrataciones, S-metilaciones y formación de enlace disulfuro en macrociclos. Si bien en estos últimos casos no se obtuvieron los productos deseados, este tipo de estudios abre las puertas a nuevas investigaciones futuras.

5.5 PARTE EXPERIMENTAL

La cromatografía en capa fina se realizó utilizando placas de sílica gel sobre plástico de 0.20 mm de espesor (Macherey-Nagel, Polygram[®], silG/UV 254 nm) y revelado con lámpara UV a 254 nm, vapores de iodo, spray de ninhidrina o fosfomolibdico.

Diclorometano seco se obtuvo de CaH_2 .³⁵ Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en sistemas secos y bajo atmósfera de nitrógeno.

La cromatografía en columna se realizaron utilizando Sílica gel 60 (J.T. Baker, 40 μm diámetro promedio de partícula).

Los espectros de RMN (^1H NMR y ^{13}C NMR) se realizaron en un equipo Bruker Advance DPX-400, los desplazamientos químico se relacionan con el desplazamiento de tetrametilsilano (0 ppm).

Los espectros de masa se realizaron en un espectrómetro de masa microQTOF-G (Bruker Daltonics) mediante ionización de electrospray.

Los espectros infrarrojos se realizaron en un espectrofotómetro FT-IR Shimadzu 8101A en film sobre pastillas de NaCl.

Las medidas de punto de fusión fueron realizadas en Fischer-Johns de Fischer Scientific Comp.

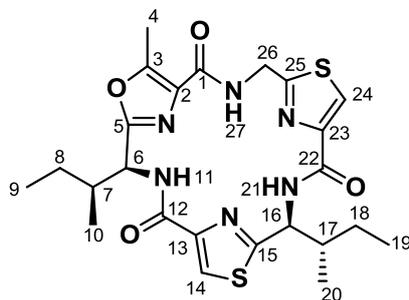
El ángulo de rotación óptica fue medido en un polarímetro Kruss Optronic GmbH P8000 con una celda de 0.5 mL

Procedimiento general de macrociclación:

En un balón de dos bocas se prepara una solución (1 – 5 mM) en CH_2Cl_2 seco del aminoácido a ciclar bajo atmósfera de nitrógeno y en baño de agua-hielo. Se agrega HBTU (2.0 eq.), luego DIPEA (2.0 eq.) y 4-DMAP (punta de espátula). Se deja con agitación (2 – 3 días) hasta desaparición de reactivo. Se rotavapora el CH_2Cl_2 , se retoma con AcOEt, se lava con HCl 5 %, se lava con solución saturada de NaHCO_3 , se seca con MgSO_4 filtra y concentra. El crudo se purifica en columna cromatográfica usando como fase móvil mezcla AcOEt/hexanos.

³⁵ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", 3th Ed. Pergamon Press, Oxford, **1988**.

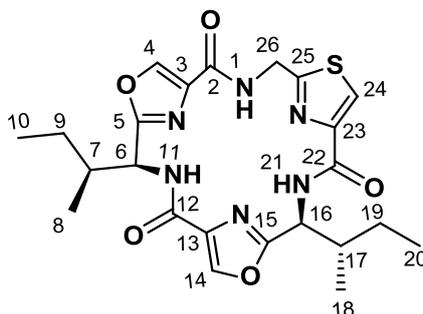
Cyclo-Gly-Oxz(Met)-L-Ile-Thz-L-Ile-Thz (71):



Se hidroliza el éster y se desprotege el NH-Boc de Boc-NH-Gly-Thz-L-Ile-Thz-L-Ile-Oxz(Met)-OMe siguiendo las metodologías generales para obtener el aminoácido libre. A partir de HCl.NH₂-Gly-Thz-L-Ile-Thz-L-Ile-Oxz(Met)-OH (556 mg, 0.95 mmol) y siguiendo el procedimiento general de macrociclación se obtiene el macrociclo deseado luego de purificar por columna cromatográfica utilizando AcOEt:EP (3:2) como fase móvil.

Aceite transparente (303 mg, 60 %) **R_f** = 0.37 (AcOEt:hexano, 3:2), **[α]_D** = -56.0 (*c* 0.4, MeOH). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 0.93-1.04 (m, 3H₉, 3H₁₀, 3H₁₉, 3H₂₀), 1.26–1.37 (m, 1H₈, 1H₁₈), 1.50-1.59 (m, 1H₈), 1.63- 1.74 (m, 1H₁₈), 2.10-2.18 (m, 1H₇, 1H₁₇), 2.68 (s, 3H₄), 4.71 (dd, 1H₂₆, *J*₁ = 2.6 Hz, *J*₂ = 18.0 Hz), 5.07 (dd, 1H₂₆, *J*₁ = 5.6 Hz, *J*₂ = 18.0 Hz), 5.31 (dd, 1H₆, *J*₁ = 3.8 Hz, *J*₂ = 8.5 Hz), 5.44 (dd, 1H₁₆, *J*₁ = 6.0 Hz, *J*₂ = 8.5 Hz), 8.08 (s, 1H₂₅), 8.16 (s, 1H₁₅), 8.42 – 8.50 (m, 1H₁₁, 1H₂₁, 1H₂₇). **¹³C NMR** (100MHz, CDCl₃) δ 11.6, 11.7, 11.8 (C₉, C₁₉, C₄), 14.8, 15.2 (C₁₀, C₂₀), 25.1, 26.0 (C₈, C₁₈), 39.9, 40.8 (C₇, C₁₇), 41.0 (C₂₆), 52.1 (C₆), 55.0 (C₁₆), 123.1 (C₁₄), 124.3 (C₂₄), 128.3 (C₂), 148.7, 149.5 (C₁₃, C₂₃), 153.8 (C₃), 159.5, 160.0, 160.6, 161.1 (C₁, C₅, C₁₂, C₂₂), 165.2 (C₂₅), 167.7 (C₁₅). **HRMS** *m/z* calcd for C₂₄H₃₀N₆NaO₄S₂ (M+Na) 553.1668, found 553.1649. **n_{max}** (liquid film) 3400, 3123, 2965, 2930, 2860, 1670, 1539, 1491 cm⁻¹.

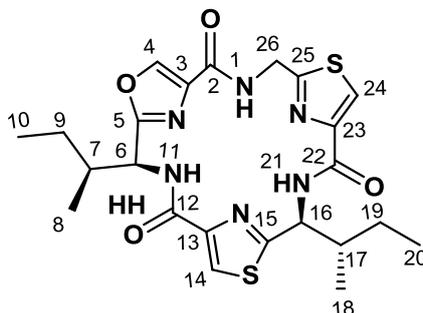
Cyclo-Gly-Oxz-L-Ile-Oxz-L-Ile-Thz (75):



Se hidroliza el ester y se desproteje el NH-Boc de Boc-NH-Gly-Thz-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz-OME siguiendo las metodologías generales para obtener el aminoácido libre. A partir de HCl.NH₂-Gly-Thz-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz-OH (54 mg, 0.098 mmol) y siguiendo el procedimiento general de macrociclación se obtiene el macrociclo deseado luego de purificar por columna cromatográfica utilizando AcOEt:EP (3:2) como fase móvil.

Sólido Blanco (19 mg, 40 %) **PF** = 92 °C, **R_f** = 0.43 (AcOEt:hexano, 3:2), **α_D** = - 55.4 (C = 1.3 g/100 mL, Acetona). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H₈), 0.95 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H₁₈), 1.01 (dd, *J* = 16, 7.9 Hz, 3H₁₀), 1.03 (dd, *J* = 16, 7.5 Hz, 3H₂₀), 1.28 – 1.38 (m, 1H₉, 1H₁₉), 1.47 – 1.58 (m, 1H₁₉), 1.59 – 1.71 (m, 1H₉), 2.14 – 2.28 (m, 1H₇, 1H₁₇), 4.68 (dd, *J*₁ = 18, *J*₂ = 2.0 Hz, 1H₂₆), 5.21 (dd, *J*₁ = 12.5, *J*₂ = 5.2 Hz, 1H₂₆), 5.24 (dd, *J*₁ = 7.3, *J*₂ = 3.7 Hz, 1H₆), 5.29 (dd, *J*₁ = 7.6, *J*₂ = 5.0 Hz, 1H₁₆), 8.16 (s, 1H₂₄), 8.20 (s, 1H₄), 8.25 (s, 1H₁₄), 8.47 – 8.39 (m, 1H₁, 1H₁₁, 1H₂₁). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 11.7 (C₁₀), 11.8 (C₂₀), 14.5 (C₈), 15.0 (C₁₈), 25.3 (C₉), 25.4 (C₁₉), 39.8 (C₇), 39.9 (C₁₇), 40.7 (C₂₆), 52.4 (C₆), 52.5 (C₁₆), 124.2 (C₂₄), 135.0 (C₁₃), 135.6 (C₃), 140.9 (C₄) 141.7 (C₁₄), 148.9 (C₂₃), 159.4, 159.5, 159.74 (C₂, C₁₂, C₂₂), 163.3 (C₅), 163.5 (C₁₅), 164.9 (C₂₅). **HRMS** calculada para C₂₃H₂₈N₆NaO₅S ([M+Na]⁺) 523.1740, observada 523.1723. **IR** ν (cm⁻¹) 1096, 1146, 1381, 1512, 1601, 1674, 2878, 2932, 2963, 3125, 3395.

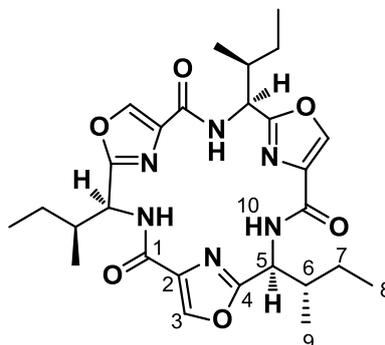
Cyclo-Gly-Oxz-L-Ile-Thz-L-Ile-Thz (76):



Se hidroliza el éster y se desprotege el NH-Boc de Boc-NH-Gly-Thz-L-Ile-Thz-L-Ile-Oxz-OME siguiendo las metodologías generales para obtener el aminoácido libre. A partir de HCl.NH₂-Gly-Thz-L-Ile-Thz-L-Ile-Oxz-OH (62 mg, 0.106 mmol) y siguiendo el procedimiento general de macrociclación se obtiene el macrociclo deseado luego de purificar por columna cromatográfica utilizando AcOEt:EP (3:2) como fase móvil.

Sólido blanco (24 mg, 44 %), **PF** = 207 °C. **R_f** = 0.6 (AcOEt:hexano, 7:3). **α_D** -92 (*c* 0.95, MeOH). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 1.05 - 0.93 (m, 3H₈, 3H₁₀, 3H₁₈, 3H₂₀), 1.24 - 1.31 (m, 1H₁₉), 1.32 - 1.39 (m, 1H₉), 1.46 - 1.51 (m, 1H₉), 1.62 - 1.72 (m, 1H₁₉), 2.10 - 2.20 (m, 1H₇, 1H₁₇), 4.75 (dd, *J*₁ = 18 Hz, *J*₂ = 2.6 Hz, 1H₂₆), 5.10 (dd, *J*₁ = 18, *J*₂ = 5.6 Hz, 1H₂₆), 5.39 (dd, *J*₁ = 8.6, *J*₂ = 4.0 Hz, 1H₆), 5.45 (dd, *J*₁ = 8.6, *J*₂ = 6.1 Hz, 1H₁₆), 8.10 (s, 1H₁₄), 8.18 (s, 1H₂₄), 8.25 (s, 1H₄), 8.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H₁₁), 8.52 - 8.48 (m, 1H₂₁, 1H₁). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 11.6 (C₂₀), 11.7 (C₁₀), 14.8 (C₁₈), 15.2 (C₈), 25.1 (C₉), 26.0 (C₁₉), 40.0 (C₇), 40.9 (C₁₇), 50.0 (C₂₆), 52.1 (C₆), 55.0 (C₁₆), 123.2 (C₁₄), 124.4 (C₂₄), 135.1 (C₃), 141.4 (C₄), 148.7 (C₂₃), 149.5 (C₁₃), 159.5 (C₂₂), 159.6 (C₁₂), 160.0 (C₂), 163.6 (C₅), 164.9 (C₂₅), 167.7 (C₁₅). **HRMS** calculada para C₂₃H₂₈N₆NaO₄S₂ ([M+Na]⁺) 539.1511, observada 539.1524. **IR** ν(cm⁻¹) 1096, 1146, 1231, 1381, 1493, 1539, 1601, 1674, 2878, 2932, 2967, 3121, 3399.

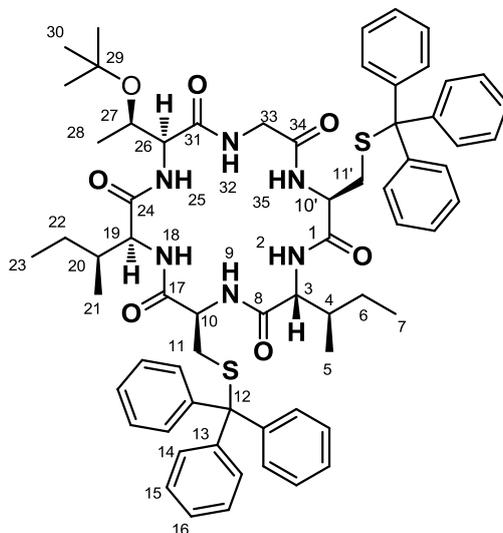
Ciclo-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz (77):



El crudo de la hidrólisis y amino desprotección de Boc-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz-OMe (34 mg, 0.057 mmol) se trata según el procedimiento general de macrociclación. Se purifica por columna cromatográfica utilizando AcOEt:EP 1:3 como fase móvil.

Aceite transparente (18 mg, 60 %). $R_f = 0.3$ (AcOEt:EP, 1:3), $[\alpha]_D^{25} = -32.6$ (c 0.3, MeOH). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 0.98 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H₉), 1.02 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H₈), 1.31 – 1.38 (m, 1H₇), 1.64 – 1.67 (m, 1H₇), 2.13 – 2.19 (m, 1H₆), 5.21 (dd, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz, 1H₅), 8.21 (s, 1H₃), 8.28 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H₁₀). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 11.7 (3C₈), 14.9 (3C₉), 25.6 (3C₇), 40.1 (3C₆), 52.5 (3C₅), 135.4 (3C₂), 141.3 (3C₃), 159.4 (3C₁), 163.5 (3C₄). $\text{IR } \nu(\text{cm}^{-1})$ 1379, 1518, 1599, 1686, 2876, 2930, 2963, 3127, 3387. HRMS calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_6$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 541.2696, observada 541.2769.

Ciclo-Gly-L-Cys(Trt)-D-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(^tBu) (78):

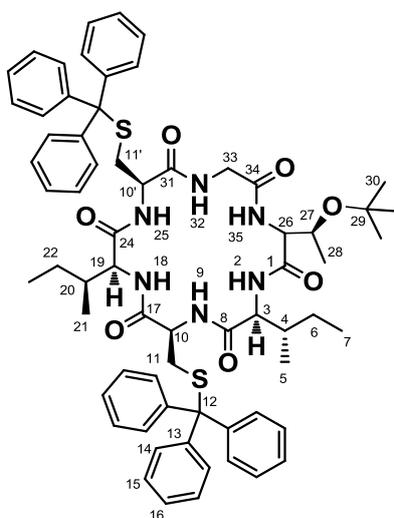


La macrociclación se realizó siguiendo el procedimiento general partiendo de la sal trifluoro acetato del aminoácido H₂N-Gly-L-Cys(Trt)-D-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(^tBu)-OH (100 mg, 0.079 mmol). Luego de purificar por columna cromatográfica se obtuvo el macrociclo deseado.

Sólido blancuzco (53 mg, 59 %). **PF** descompone por encima de 210 °C, **R_f** = 0.3 (AcOEt:EP, 3:2), **α_D** = + 10,7 (C 0.9, CH₂Cl₂), **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.76 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H_{21 ó 5}), 0.88 - 0.96 (m, 3H₂₃, 3H₇, 3H₅), 1.07 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H₂₈), 1.11 - 1.15 (m, 1H_{22 ó 6}), 1.21 (s, 9H₃₀), 1.23 - 1.26 (m, 1H_{6 ó 22}), 1.45 - 1.55 (m, 1H_{20 ó 4}, 1H_{22 ó 6}), 1.62 - 1.67 (m, 1H_{6 ó 22}), 2.19-2.27 (m, 1H_{4 ó 20}), 2.37 (dd, *J*₁ = 12.6 Hz, *J*₂ = 4.4 Hz, 1H_{11'}), 2.40 (dd, *J*₁ = 13.1 Hz, *J*₂ = 5.4 Hz, 1H₁₁), 3.07 (dd, *J*₁ = 12.5 Hz, *J*₂ = 5.8 Hz, 1H_{11'}), 3.12 (dd, *J*₁ = 13.3 Hz, *J*₂ = 9.7 Hz, 1H₁₁), 3.34 (dd, *J*₁ = 17.0 Hz, *J*₂ = 2.6 Hz, 1H₃₃), 3.49 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H₁₉), 3.67 (ddd, *J*₁ = 3.5 Hz, *J*₂ = 5.8 Hz, *J*₃ = 9.1 Hz, 1H_{10'}), 4.05 - 4.17 (m, 1H₃, 1H₁₀, 1H₂₆, 1H₂₇), 4.61 (dd, *J*₁ = 17.0 Hz, *J*₂ = 9.9 Hz, 1H₃₃), 5.83 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H₉), 6.25 (dd, *J*₁ = 2.7 Hz, *J*₂ = 9.6 Hz, 1H₃₂), 6.62 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H₁₈), 7.09 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H₉), 7.16 (d, *J* = 2.01 Hz, 1H₂₅), 7.18 - 7.34 (m, 1H₂, 3H₁₆, 3H_{16'}, 6H₁₅, 6H_{15'}), 7.39 - 7.44 (m, 6H₁₄, 6H_{14'}). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 10.3 (C_{23 ó 7}), 10.7 (C_{7 ó 23}), 15.5 (C₂₁), 16.0 (C₅), 18.4 (C₂₈), 24.7 (C₆), 25.5 (C₂₂), 28.3 (3C₃₀), 28.9 (C₁₁), 31.2 (C₄), 32.4 (C_{11'}), 35.4 (C₂₀), 42.5

(C₃₃), 51.7 (C_{10'}), 53.2 (C₁₀), 56.8 (C₃), 60.3 (C₁₉), 61.9 (C₂₆), 65.5 (C₂₇), 66.9 (C₁₂), 67.2 (C_{12'}), 74.9 (C₂₉), 126.8 (3C₁₆), 127.1 (3C_{16'}), 128.0 (6C₁₅), 128.2 (6C_{15'}), 129.4 (6C₁₄), 129.6 (6C_{14'}), 144.2 (2C), 144.6 (2C), 146.9 (2C), 169.1 (C₃₁), 169.95 (C₁), 172.1 (C₃₄), 172.8 (C₂₄), 173.3 (C₈), 173.4 (C₁₇). **IR** $\nu(\text{cm}^{-1})$ 1381, 1543, 1640, 2854, 2927, 2966, 3059, 3286, 3402. **HRMS** calculada para C₆₆H₇₈N₆NaO₇S₂ ([M+Na]⁺) 1153.5271 observada 1153.52258.

Ciclo-Gly-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(^tBu) (79)



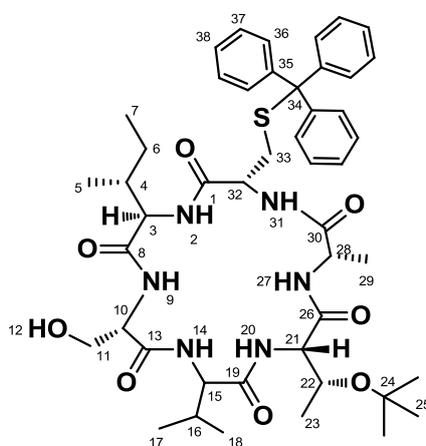
La macrociclación se realizó siguiendo el procedimiento general partiendo de la sal trifluoro acetato del aminoácido H₂N-Gly-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(^tBu)-OH (300 mg, 0.235 mmol). Luego de purificar por columna cromatográfica se obtuvo el macrociclo deseado.

Sólido incoloro (177 mg, 66%). **PF** = 150-152 °C, **Rf** = 0.5 (AcOEt:EP, 4:1).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.83 - 0.94 (m, 3H₂₃, 3H₇, 3H₅, 3H₂₁, 1H_{22 ó 6}), 1.07 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H₂₈), 1.11 - 1.19 (m, 1H_{22 ó 6}), 1.23 (s, 9H₃₀), 1.44 - 1.33 (m, 1H_{22 ó 6}), 1.62 - 1.50 (m, 1H_{22 ó 6}), 1.80 (bs, 1H_{20 ó 4}), 1.90 (bs, 1H_{20 ó 4}), 2.58-2.75 (m, 1H₁₁, 1H_{11'}), 2.87 (bs, 1H₁₁ ó 1H_{11'}), 3.35 (dd, *J* = 16.2, 4.3 Hz, 1H₃₃), 3.75 (s, 1H_{10 ó 1H_{10'}}), 3.91 (bs, 1H_{10 ó 1H_{10'}}), 3.98 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H₁₉ ó 1H₃), 4.27 - 4.15 (m, 1H₃₃, 1H₂₇, 1H₁₉ ó 1H₃), 4.35 (s, 1H₂₆), 7.12 (s, 1H₃₂), 7.45 - 7.17 (m, 30H de Trt, 1H₃₅, 1H₂, 1H₉, 1H₁₈), 7.70 (s, 1H₂₅). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 11.1 (C_{23 ó 7}), 12.0 (C_{7 ó 23}), 15.1 (C₂₁), 15.6 (C₅), 18.3 (C₂₈ por HSQC), 25.1 (C₆), 25.4 (C₂₂), 28.3 (3C₃₀), 32.5 (C₁₁), 33.5 (C_{11'}), 36.1 (C₂₀),

37.5 (C₄), 43.6 (C₃₃), 54.3 (C_{10'} ó C₁₀), 54.9 (C_{10'} ó C₁₀), 57.4 (C₂₆ por HSQC), 58.1 (C₃), 59.4 (C₁₉), 66.6 (C₂₇), 67.0 (C₁₂), 67.4 (C_{12'}), 75.9 (C₂₉), 126.9 (3C₁₆), 127.1 (3C_{16'}), 128.1 (6C₁₅), 128.2 (6C_{15'}), 129.4 (6C₁₄), 129.5 (6C_{14'}), 144.1 (2C), 144.2 (2C), 146.9 (2C), 169.3 (C₃₁), 169.8 (C₁), 170.6 (C₃₄), 170.8 (C₂₄), 171.0 (C₈), 172.1 (C₁₇). **HRMS** calculada para C₆₆H₇₈N₆NaO₇S₂ ([M+Na]⁺) 1153.5271 observada 1153.5051.

Ciclo-L-Ala-L-Cys(Trt)-D-Ile-L-Ser-L-Val-L-Thr(^tBu) (80):

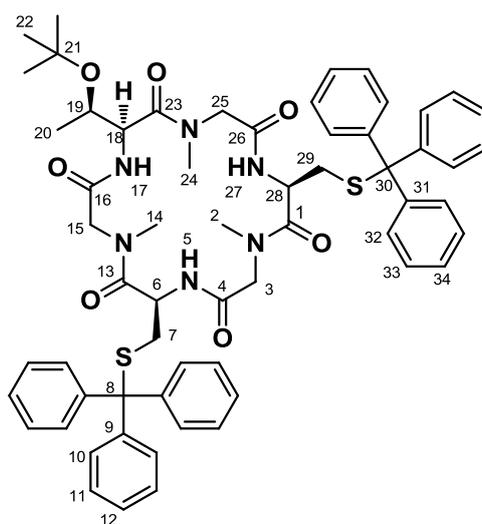


La macrociclación se realizó siguiendo el procedimiento general (dilución 5 mM, 4 días), partiendo de la sal trifluoro acetato del aminoácido H₂N-L-Ala-L-Cys(Trt)-D-Ile-L-Ser-L-Val-L-Thr(^tBu)-OH (100 mg, 0.099 mmol). Luego de purificar por columna cromatográfica se obtuvo el macrociclo deseado.

Sólido blanco (48 mg, 55 %). **PF** = 108 °C, **Rf** = 0.45 (AcOEt:EP, 3:2). **α_D** = -20.5 (C = 1.3 g/100 mL, MeOH). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.90 – 1.00 (m, 3H₇, 3H₁₈, 3H₂₃), 1.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H₁₇), 1.10 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H₅), 1.21 - 1.15 (m, 1H₆), 1.32 (s, 9H), 1.35 - 1.41 (m, 1H₆), 1.56 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H₂₉), 2.23 - 2.18 (m, 1H₄), 2.29 (dd, *J*₁ = 12.8 Hz, *J*₂ = 6.3 Hz, 1H₃₃), 2.41 - 2.34 (m, 1H₁₆), 2.75 (dd, *J*₁ = 12.8, *J*₂ = 5.2 Hz, 1H₃₃), 3.47 (dd, *J*₁ = 9.9, *J*₂ = 3.5 Hz, 1H₁₁), 3.72 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H₂₈), 3.97 (t, *J* = 4.12 Hz, 1H₁₅), 3.99 (dd, *J*₁ = 9.9 Hz, *J*₂ = 1.9 Hz, 1H₁₁), 4.21 (m, 1H₃₂, 1H₂₁), 4.44 - 4.39 (m, 1H₁₀), 4.47 (dd, *J*₁ = 6.5, *J*₂ = 4.6 Hz, 1H₂₂), 4.83 (dd, *J*₁ = 9.8 Hz, *J*₂ = 3.6 Hz, 1H₃), 6.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H₉), 6.94 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H₃₁), 7.03 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H₂₇),

7.12 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H₂₀), 7.37 - 7.23 (m, 3H₃₈, 6H₃₇, 6H₃₆), 7.54 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H₂), 8.16 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H₁₄). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 11.9 (C₇), 14.8 (C₂₃), 15.3 (C₃), 17.5 (C₁₇), 17.7 (C₁₈), 19.8 (C₅), 26.6 (C₆), 28.3 (3C₂₄), 29.1 (C_x), 29.7 (C₁₆), 31.8 (C₃₃), 35.9 (C₄), 51.5 (C₂₈), 52.11 (C₃₂), 54.7 (C₁₀), 55.6 (C₃), 57.5 (C₃₂), 61.8 (C₁₅), 62.8 (C₁₁), 65.5 (C₂₂), 67.4 (C₃₄), 76.3 (C₂₄), 127.1 (3C), 127.3 (2C₃₈), 127.9 (6C), 128.2 (2C₃₆), 129.6 (2C₃₇), 144.3 (2C₃₅), 146.9 (1C₃₅), 170.1 (C₁₉), 170.4 (C₈), 170.5 (C₁), 170.9 (C₃₀), 172.3 (C₁₃), 172.5 (C₂). **IR** ν (cm⁻¹) 1080, 1150, 1265, 1385, 1447, 1516, 1628, 1655, 2878, 2932, 2970, 3059, 3306, 3406. **HRMS** calculada para C₄₇H₆₄N₆NaO₈S ([M+Na]⁺) 895.4404, observada 895.43962

ciclo-L-Thr(^tBu)-NMeGly-L-Cys(Trt)-NMeGly-L-Cys(Trt)-NMeGly (81):

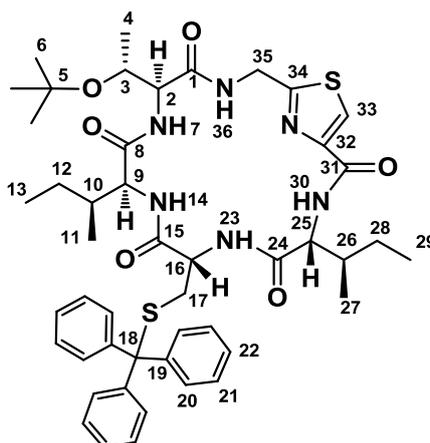


La macrociclación se realizó siguiendo el procedimiento general (5 mM, 2 días) partiendo de la sal trifluoro acetato del aminoácido H₂N-L-Thr(^tBu)-NMeGly-L-Cys(Trt)-NMeGly-L-Cys(Trt)-NMeGly-OH (78 mg, 0.065 mmol). Luego de purificar por columna cromatográfica se obtuvo el macrociclo deseado.

Sólido blanco (26 mg, 35%). **PF** = 108-110 °C, **Rf** = 0.55 (AcOEt:EP, 4:1). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.02 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H₂₀), 1.24 (s, 9H₂₂), 2.42–2.53 (m, 1H₇, 1H₂₉), 2.60 – 2.71 (m, 1H₇, 1H₂₉), 2.80 (s, 3H₂ ó 14), 2.82 (s, 3H₂ ó 14), 2.95– 3.16 (m, 1H₃, 1H₁₅, 1H₂₅), 3.27 (s, 3H₂₄), 3.93 (dd, $J = 6.4$ Hz, $J =$

3.8 Hz, 1H₁₉), 4.54 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H₃ ó 15 ó 25), 4.63 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H₃ ó 15 ó 25), 4.64 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H₃ ó 15 ó 25), 4.72 – 4.80 (m, 1H₆, 1H₂₈, 1H₁₈), 7.14 – 7.63 (m, 3H₁₂, 3H₃₄, 6H₁₀, 6H₃₂, 6H₁₁, 6H₃₃), 7.54 – 7.63 (m, 7.67, 1H₅ ó 27, 1H₁₇), 7.67 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H₅ ó 27). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 18.0. (C₂₀), 28.0 (3C₂₂), 34.4 (C₇ y C₂₉), 36.6 (C₂ ó C₁₄ ó C₂₄), 36.9 (C₂ ó C₁₄ ó C₂₄), 38.4 (C₂ ó C₁₄ ó C₂₄), 48.5 (bs, C₂₈, C₆), 53.3 (C₁₈), 53.8 (C₂₅ ó C₃ ó C₁₅), 54.0 (C₂₅ ó C₃ ó C₁₅), 54.5 (C₂₅ ó C₃ ó C₁₅), 66.9 (C₃₀ y C₈), 68.2 (C₁₉), 75.5 (C₂₁), 126.8 (3C₁₂ y 3C₃₄), 128.0 (6C₁₁ y 6C₃₃), 129.6 (6C₁₀ y 6C₃₂), 144.4 (C₉ y C₃₁), carbonilos: 167.1, 167.4, 167.6, 169.8, 170.2, 170.3. **HRMS** calculada para C₆₁H₆₈N₆NaO₇S₂ ([M+Na]⁺) 1083.4489 observada 1083.4447

Ciclo-Gly-L-Thr(tBu)-L-Ile-D-Cys(Trt)-D-Ile-Thz (82):

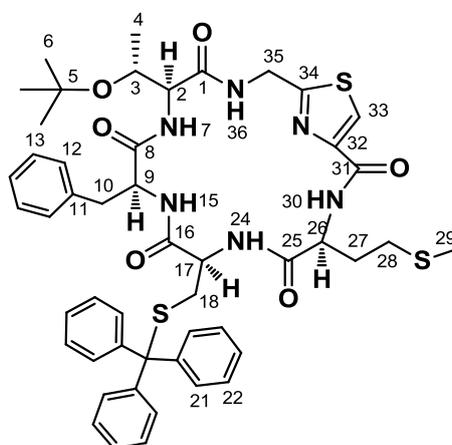


La macrociclación se realizó siguiendo el procedimiento general partiendo de la sal trifluoro acetato del aminoácido H₂N-Gly-L-Thr(^tBu)-L-Ile-D-Cys(Trt)-D-Ile-Thz-OH (50 mg, 0.05 mmol). Luego de purificar por columna cromatográfica se obtuvo el macrociclo deseado.

Sólido amarillento (36 mg, 83%), **PF** = 136 °C, **Rf** = 0.5 (AcOEt:EP, 4:1). **α_D** = + 34.8 (C = 1.27 g/100 mL, MeOH). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 0.84 (s, 9H₆), 0.85 - 0.93 (m, 3H₁₃, 3H₂₇, 3H₂₉), 0.99 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H₁₁), 1.05 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H₄), 1.22 - 1.29 (m, 1H₁₂, 1H₂₈), 1.39 - 1.45 (m, 1H₁₂, 1H₂₈), 1.86 – 1.94 (m, 1H₁₀), 1.95 – 2.01 (m, 1H₂₆), 2.65 (dd, $J_1 = 12.5$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz, 1H₁₇), 2.81 (dd, $J_1 = 12.5$ Hz, $J_2 = 6.3$ Hz, 1H₁₇), 4.08 - 4.15 (m, 1H₁₆, 1H₂₅),

4.25 (dd, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H₂), 4.29 (dd, $J_1 = 2.1$ Hz, $J_2 = 6.3$ Hz, 1H₃), 4.37 (dd, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 15.4$ Hz, 1H₃₅), 4.48 (dd, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz, 1H₉), 4.97 (dd, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 15.4$ Hz, 1H₃₅), 6.34 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H₁₄), 6.79 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H₂₃), 6.87 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H₇), 7.21 – 7.33 (m, 6H₂₁, 3H₂₂), 7.39 – 7.42 (m, 6H₂₀), 7.63 (dd, $J_1 = 4.7$ Hz, $J_2 = 7.7$ Hz, 1H₃₆), 7.78 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H₃₀), 7.90 (s, 1H₃₃). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) 11.3 (C₁₃), 11.7 (C₂₉), 15.5 (C₁₁ ó 27), 15.9 (C₂₇ ó 11), 21.1 (C₄), 24.6 (C₁₂ ó 28), 24.8 (C₂₈ ó 12), 27.9 (3C₆), 33.5 (C₁₇), 36.4 (C₂₆ ó 10), 37.7 (C₁₀ ó 26), 39.5 (C₃₅), 52.8 (C₁₆), 58.6, 59.1 (C₂₅), 59.5 (C₉), 65.6 (C₂), 67.4 (C₁₈), 74.6 (C₃), 123.5 (C₃₃), 127.0 (3C₂₂), 128.2 (6C₂₀), 129.4 (6C₂₁), 144.1 (3C₁₉), 149.4 (C₃₂), 161.2 (C₃₄), 165.8 (C₃₁), 170.4 (C₈ ó 24), 170.6 (C₂₄ ó 8), 170.7 (C₁), 171.2 (C₁₅). **IR** film $\nu(\text{cm}^{-1})$ 1080, 1188, 1267, 1356, 1449, 1491, 1499, 1640, 2876, 2930, 3057, 3309, 3325, 3337. **HRMS** calculada para C₄₇H₆₀N₆NaO₆S₂ ([M+Na]⁺) 891.3913 observada 891.39247.

Ciclo-Gly-L-Thr(tBu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-Thz (83):



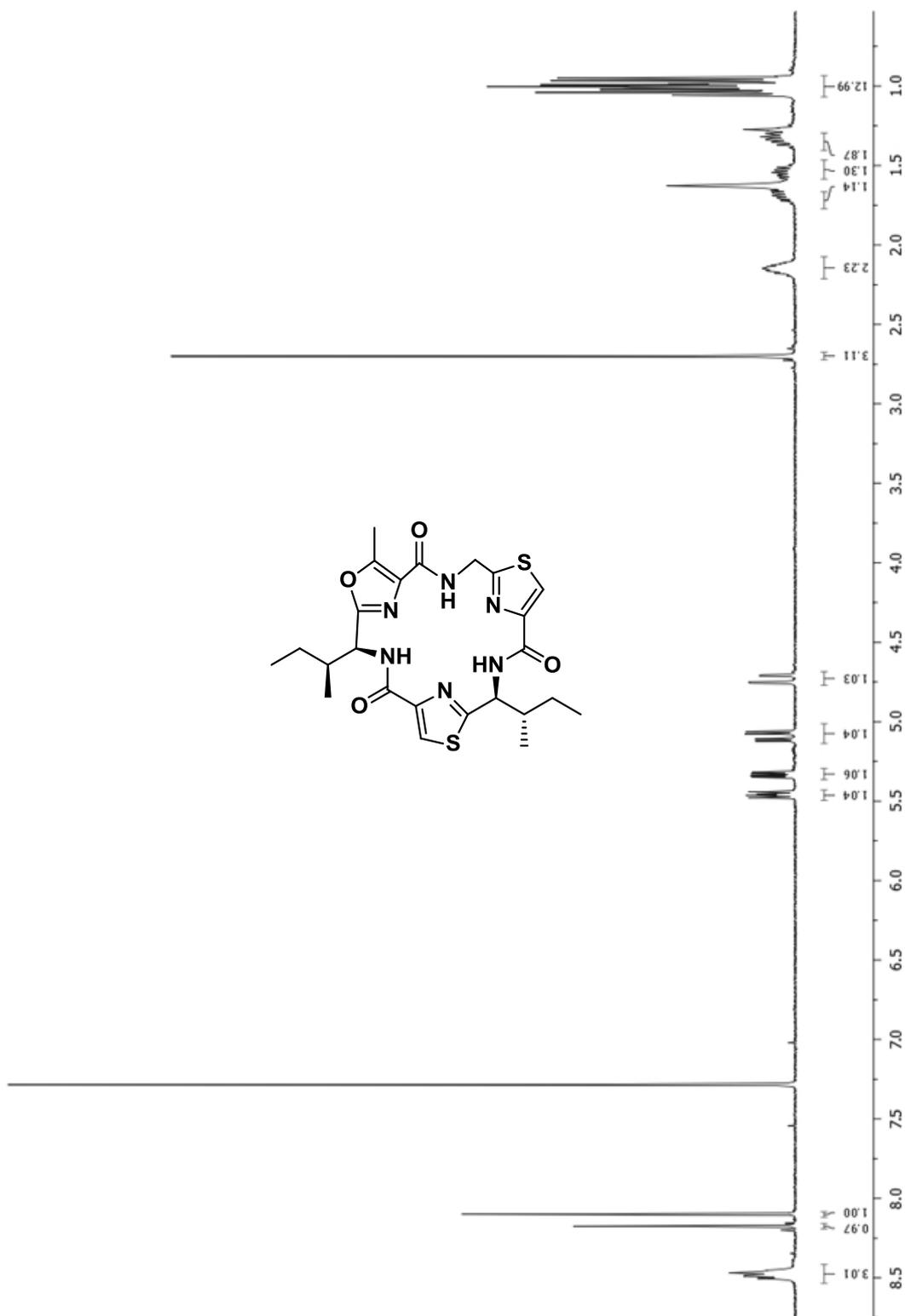
La macrociclación se realizó siguiendo el procedimiento general (1 mM, 5 días) partiendo de la sal trifluoro acetato del aminoácido H₂N-Gly-L-Thr(^tBu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-Thz-OH (100 mg, 0.095 mmol). Luego de purificar por columna cromatográfica se obtuvo el macrociclo deseado.

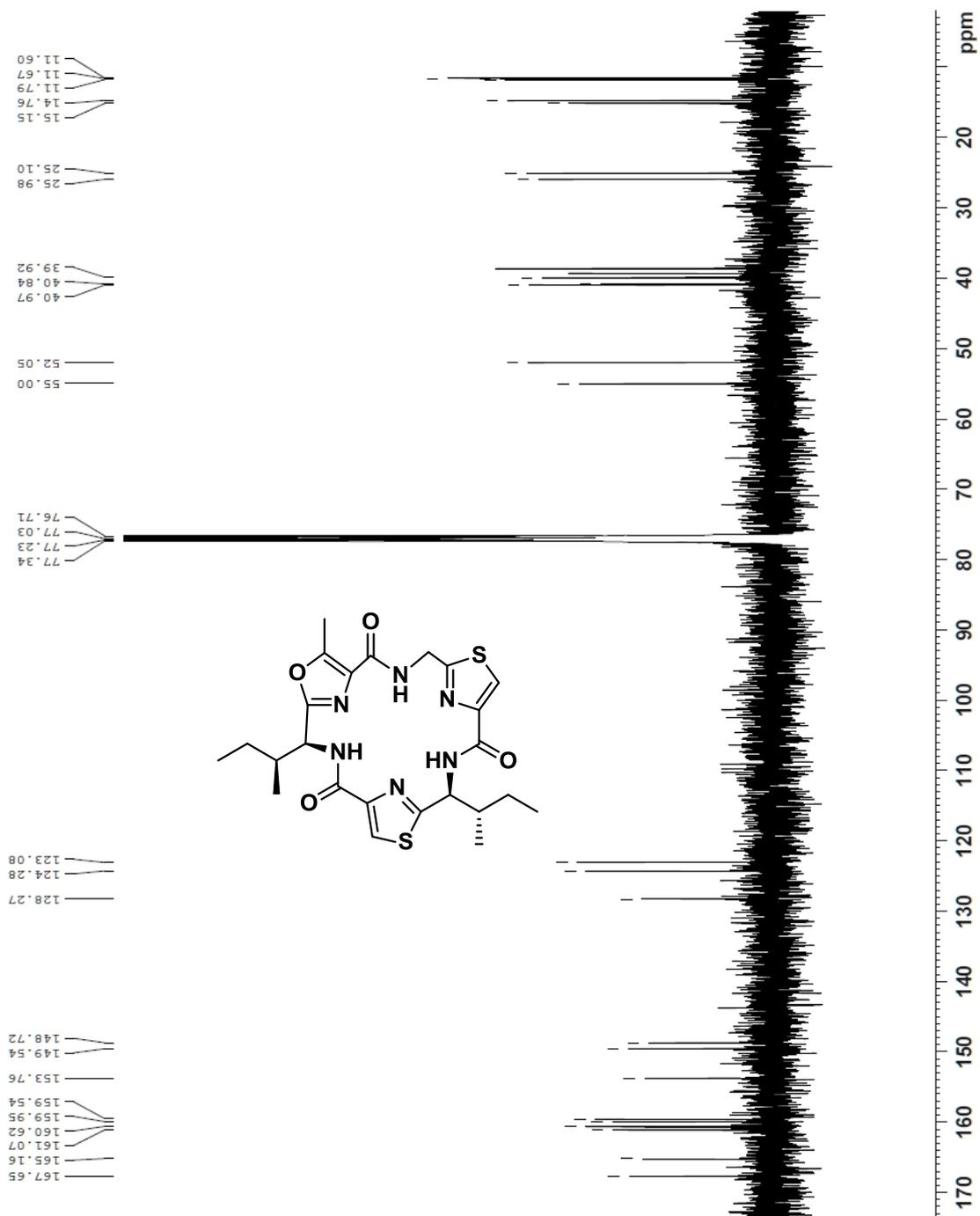
Sólido blancuzco (35 mg, 40 %), **PF** = 107 °C, **Rf** = 0.5 (AcOEt:EP, 4:1). **α_D** = - 42.8 (C = 1.0 g/100 mL, MeOH). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.79 -

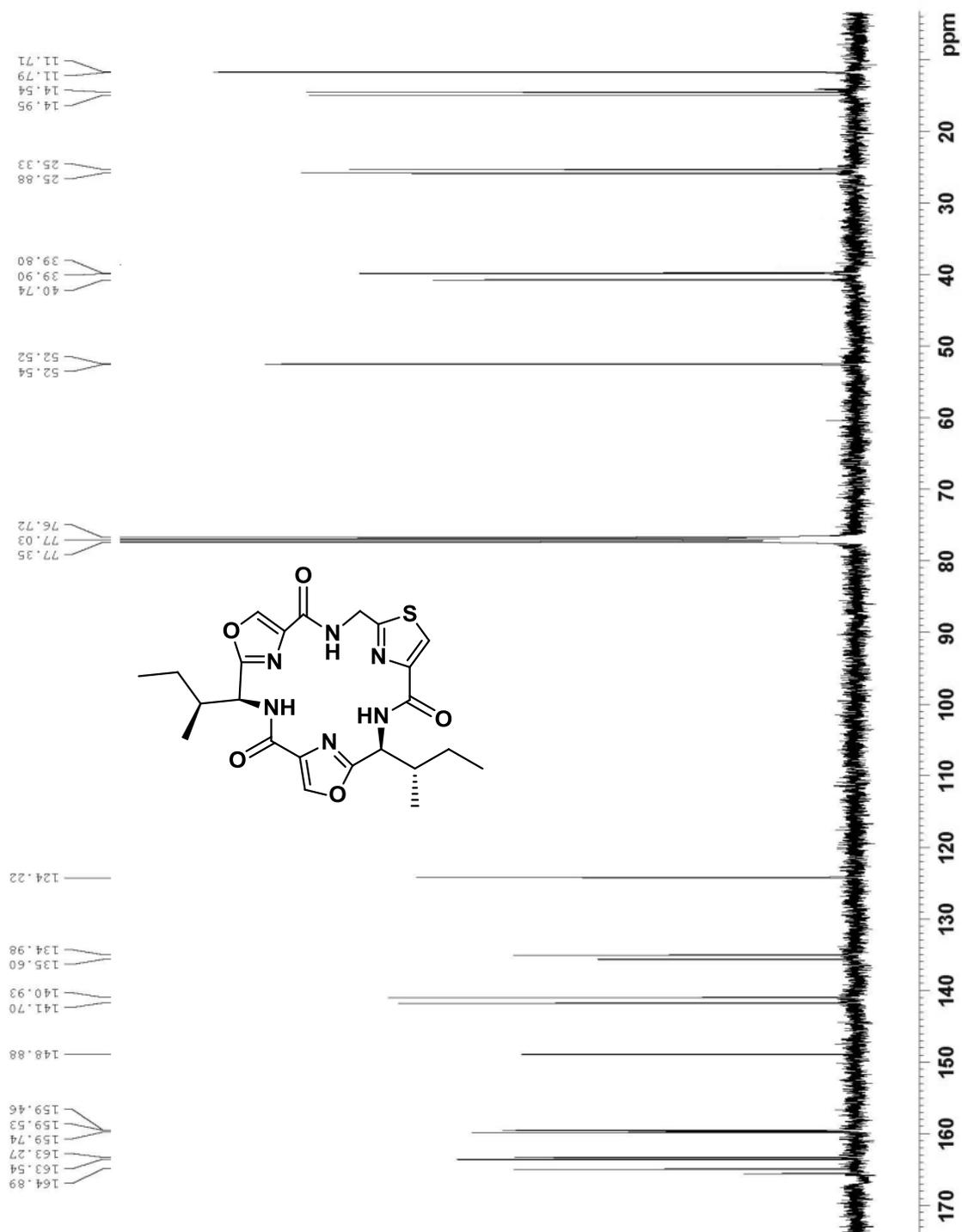
0.91 (m, 1H), 1.13 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H₄), 1.22-1.24 (m, 9H₆), 1.82 -1.93 (m, 1H₂₇), 2.09 (s, 3H₂₉), 2.14 - 2.23 (m, 1H₂₇), 2.28 (dd, $J_1 = 14.1$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, 1H₁₈), 2.54 (t, $J_1 = 7.6$ Hz, 1H₂₈),), 2.58-2.66 (m, 1H₁₇), 2.87 (dd, $J_1 = 14.1$ Hz, $J_2 = 8.5$ Hz, 1H₁₈), 3.26 (dd, $J_1 = 14.1$ Hz, $J_2 = 10.7$ Hz, 1H₁₀), 3.42 (dd, $J_1 = 14.1$ Hz, $J_2 = 4.3$ Hz, 1H₁₀), 3.96-4.03 (m, 1H₉), 4.21-4.29 (m, 1H₃), 4.40 (dd, $J_1 = 16.6$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, 1H₃₅), 4.43-4.52 (m, 1H₂, 1H₂₆), 4.88 (dd, $J_1 = 16.6$ Hz, $J_2 = 6.3$ Hz, 1H₃₅), 6.4 (bs, 1H₁₅), 6.6 (bs, 1H₂₄), 6.99 - 7.02 (m, 2H₁₂, 1H₁₄), 7.05 - 7.10 (m, 2H₁₃), 7.23-7.30 (m, 3H₂₃, 6H₂₁), 7.31-7.37 (m, 6H₂₂, 1H₇) 7.87 (s, 1H₃₃), 7.94 (bs, 1H₃₆), 8.49 (bs, 1H₃₀). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.5 (C₂₉), 19.1 (C₄), 28.2 (3C₆), 30.1 (C₂₈), 31.9 (C₁₈), 32.5 (C₂₇), 35.0 (C₁₀), 41.1 (C₃₅), 52.2 (C₂₆), 54.3 (C₁₇), 57.9 (C₉), 58.4 (C₂), 66.7 (C₃), 67.9 (C₁₉) 75.6 (C₅), 122.9 (C₃₃), 126.9 (C₁₄), 127.1 (3C₂₃), 128.2 (6C₂₁), 128.8 (2C₁₂), 129.1 (2C₁₃), 129.5 (6C₂₂), 137.4 (C₁₁) (determinado por HMBC), 143.9 (3C₂₀), 149.3 (C₃₂), 160.7 (C₃₁), 164.9 (C₃₄), 169.3 (C₂₅), 170.5 (C₈), 170.7 (C₁₆), 171.0 (C₁). **IR** ν (cm⁻¹) 1032, 1082, 1155, 1186, 1265, 1370, 1379, 1445, 1491, 1508, 1528, 1545, 1655, 1676, 2849, 2918, 3055, 3345. **HRMS** calculada para C₄₉H₅₆N₆NaO₆S₂ ([M+Na]⁺) 943.3221 observada 943.32791

5.6 ESPECTROSCOPIA

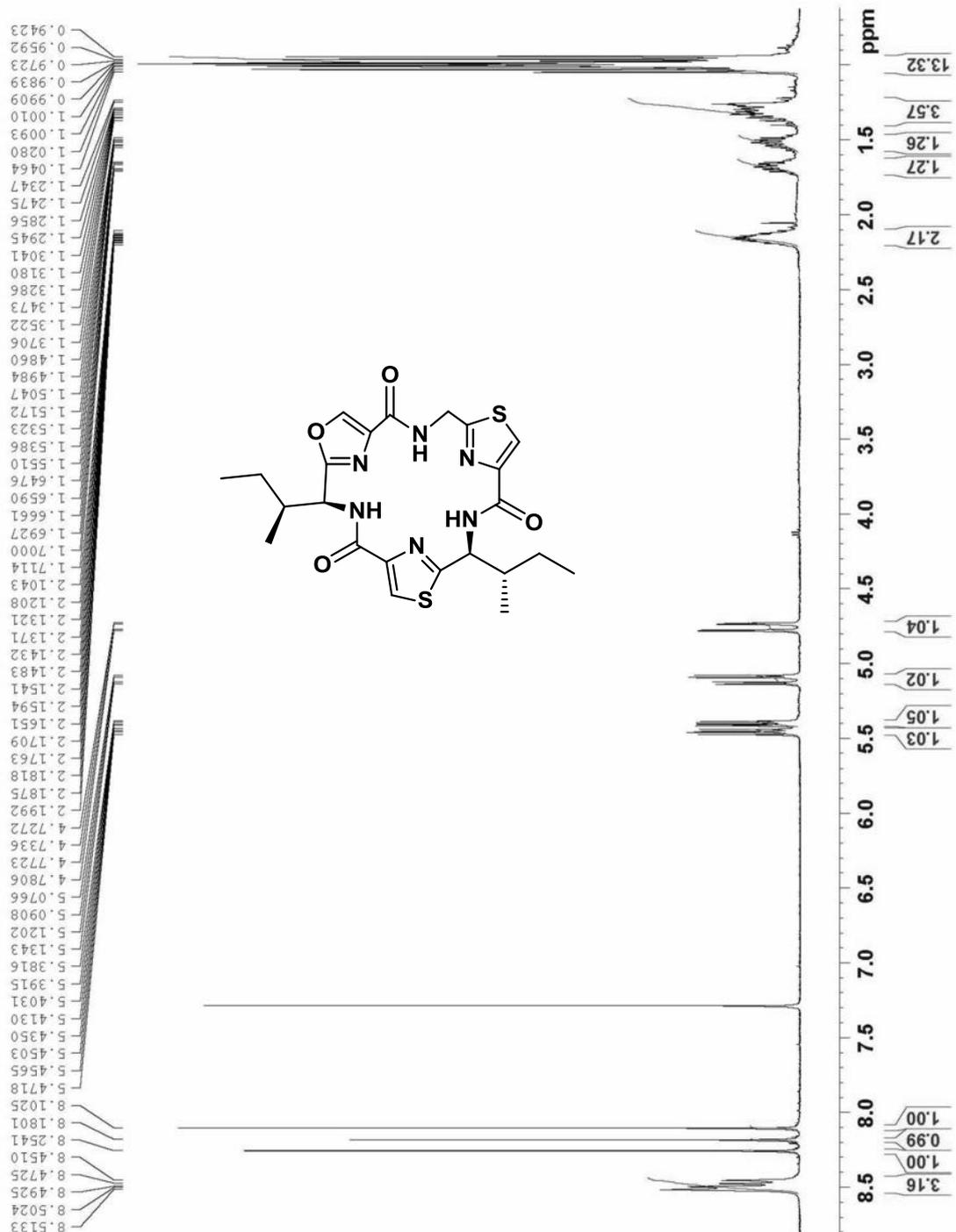
Cyclo-Gly-Oxz(Met)-L-Ile-Thz-L-Ile-Thz (71):

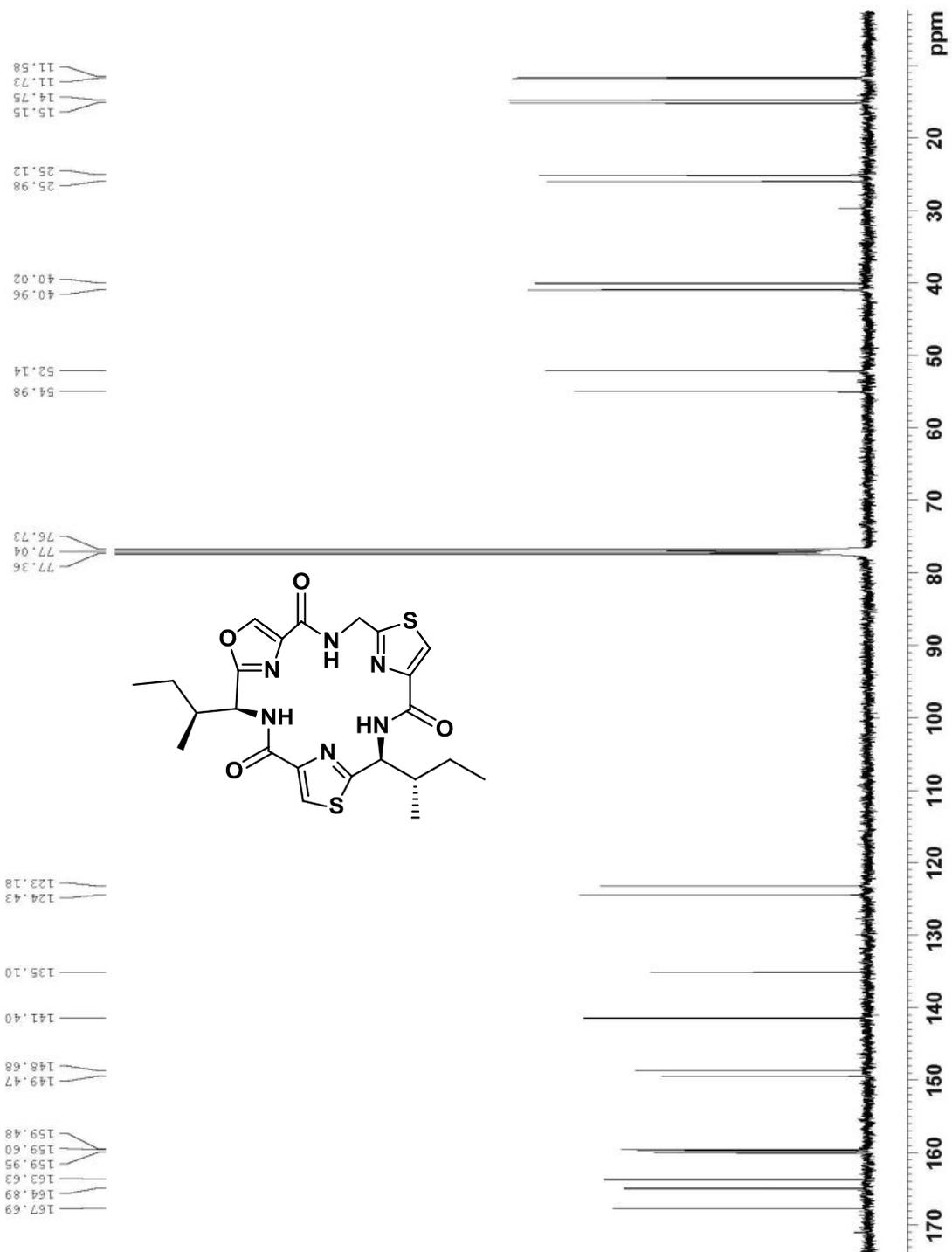




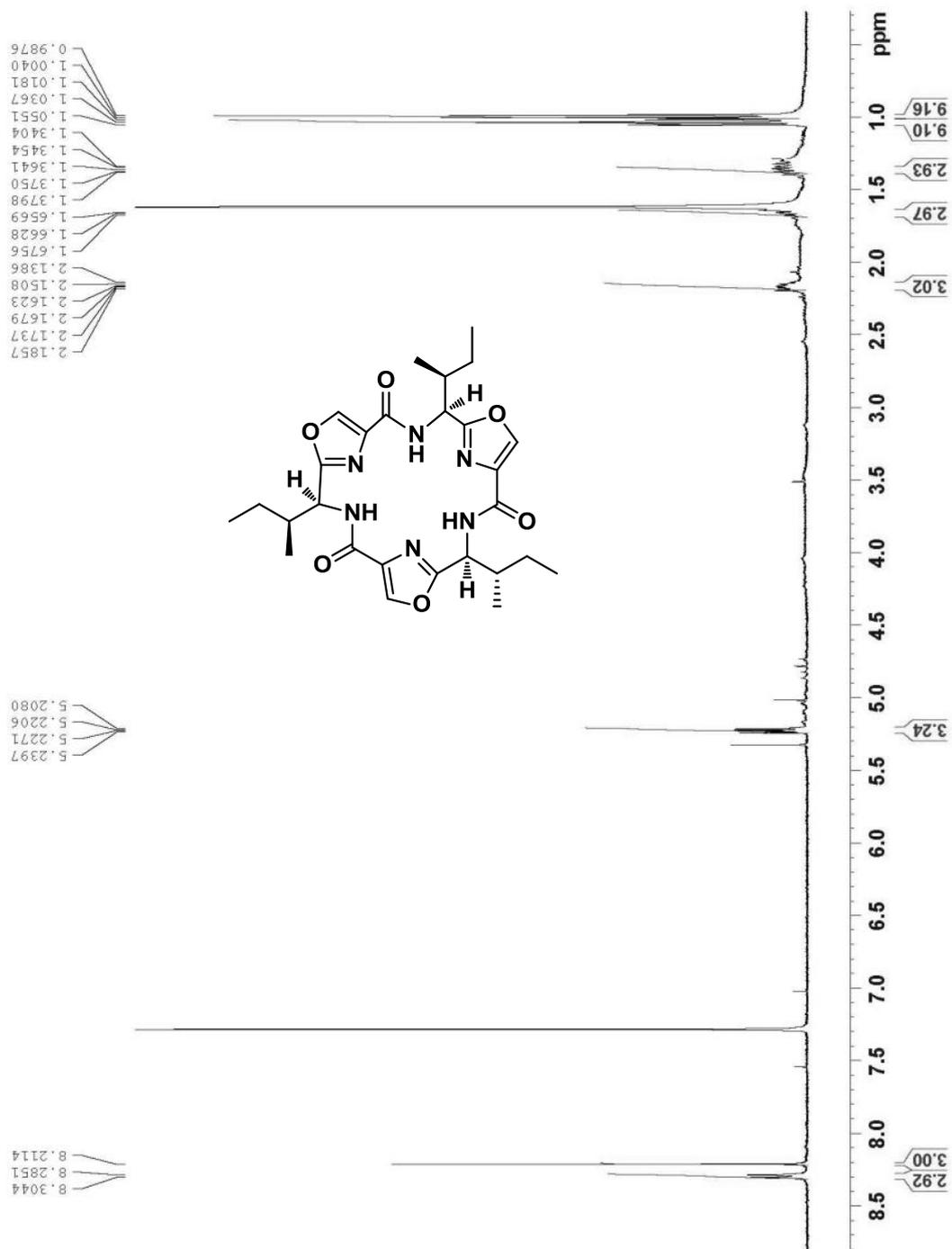


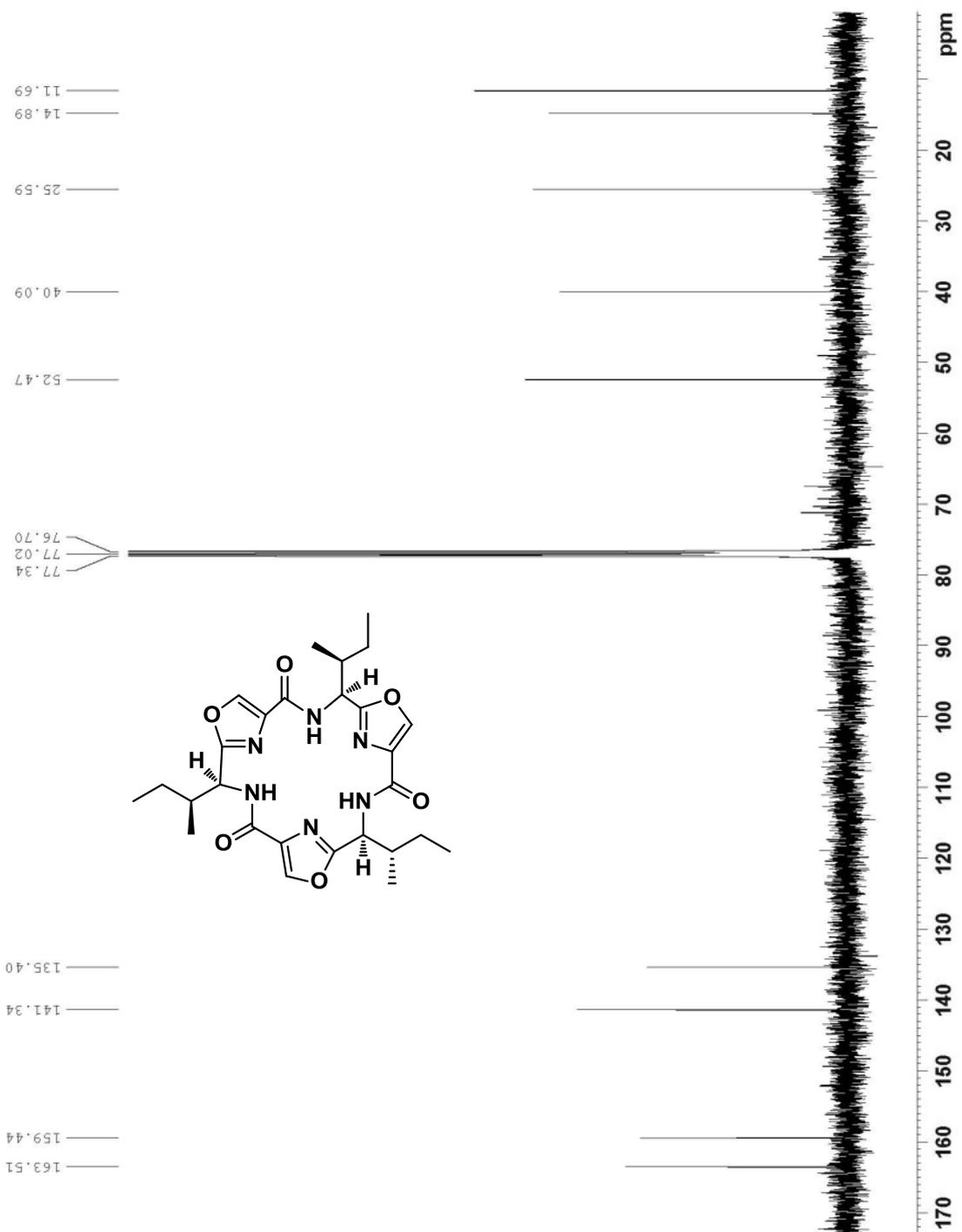
Cyclo-Gly-Oxz(Ser)-L-Ile-Thz(Ser)-L-Ile-Thz (76):

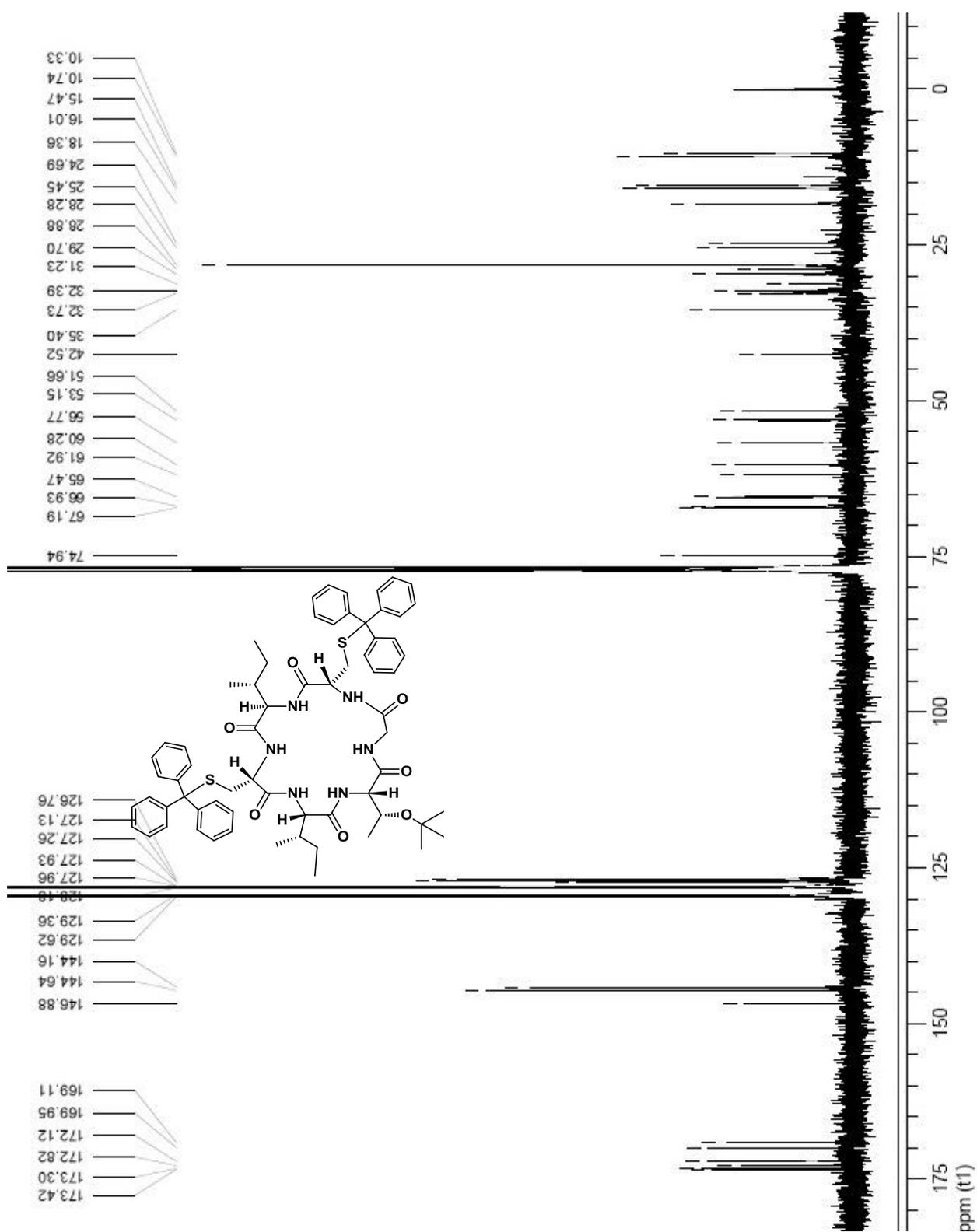




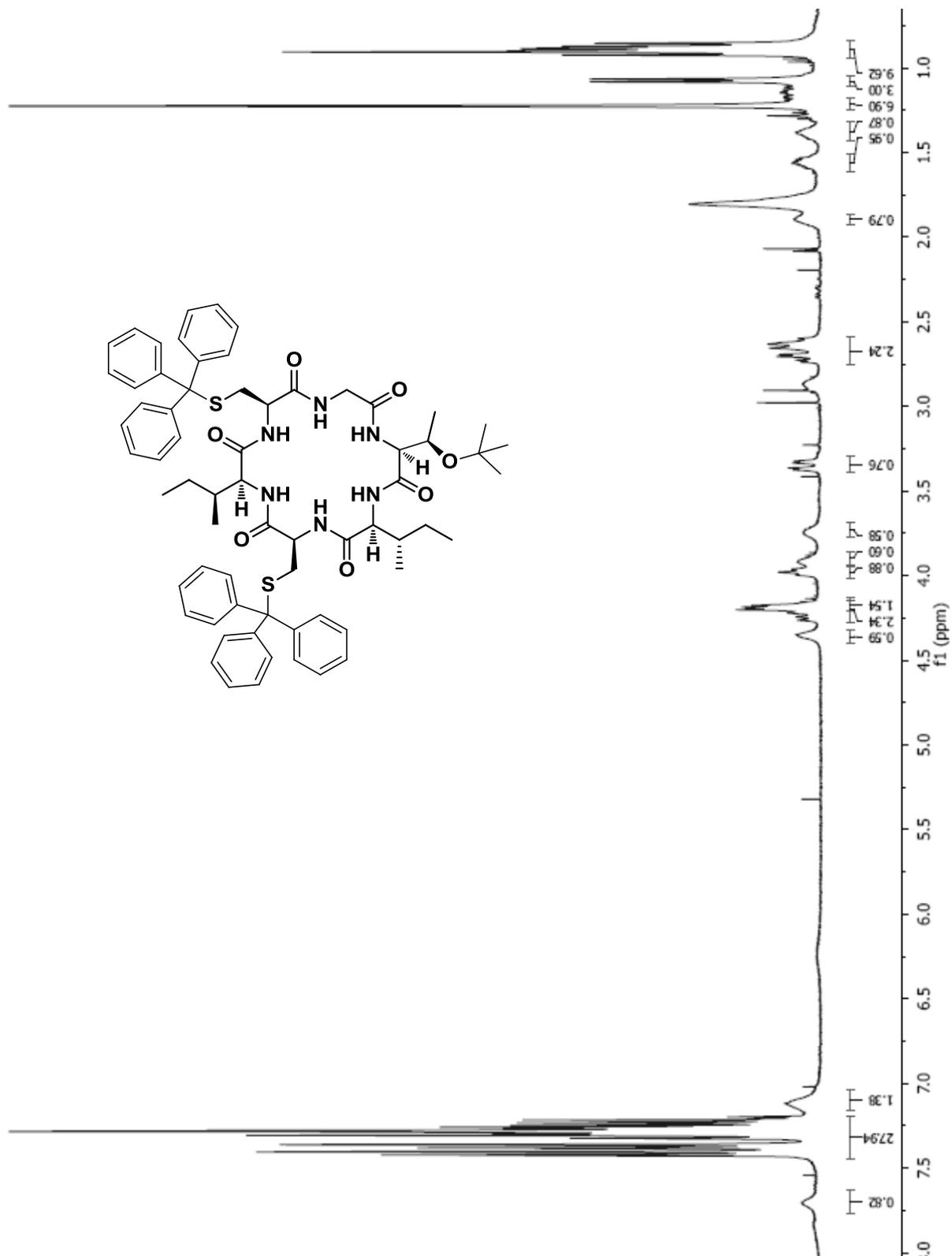
Ciclo-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz-L-Ile-Oxz (77):

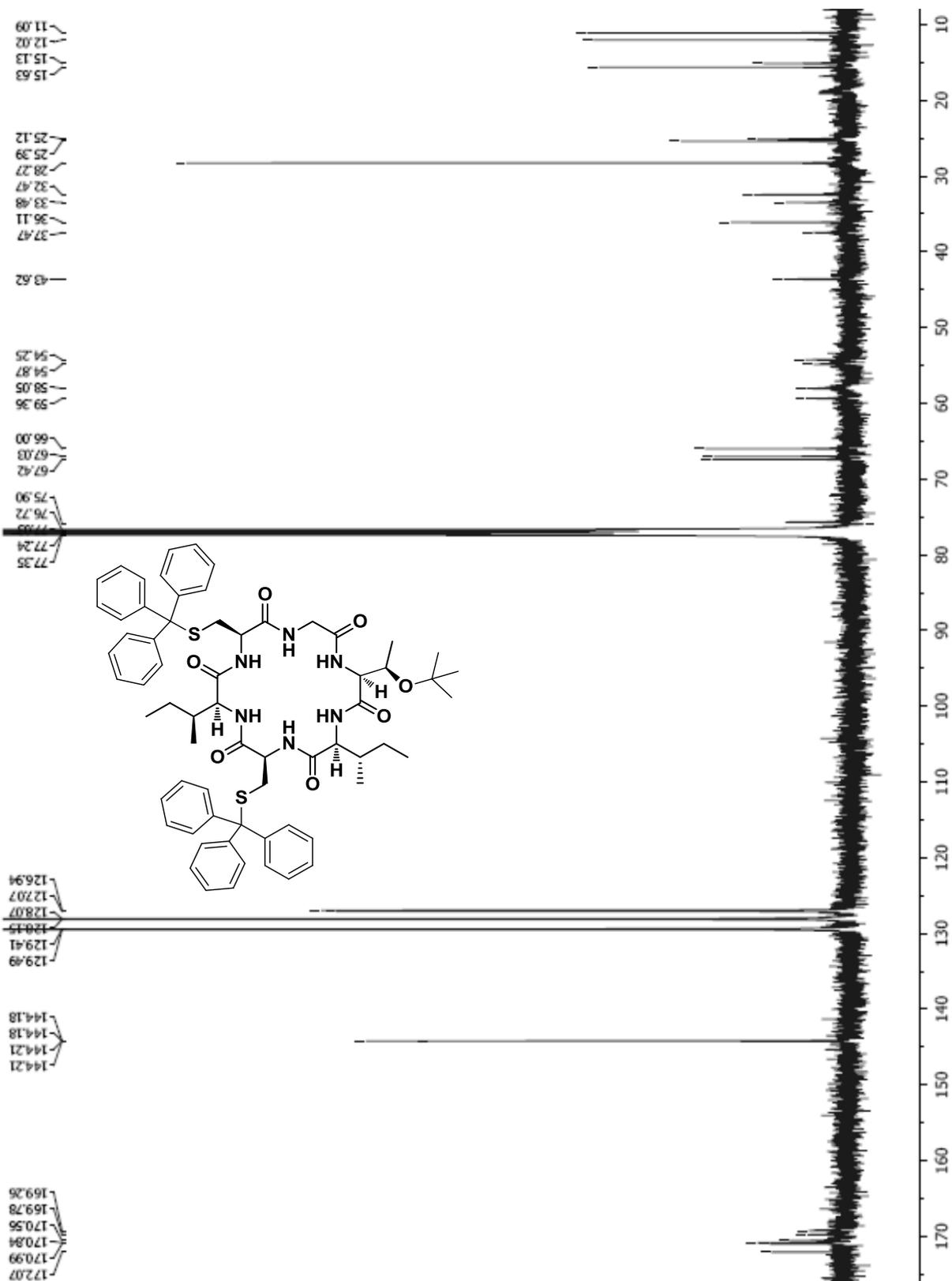




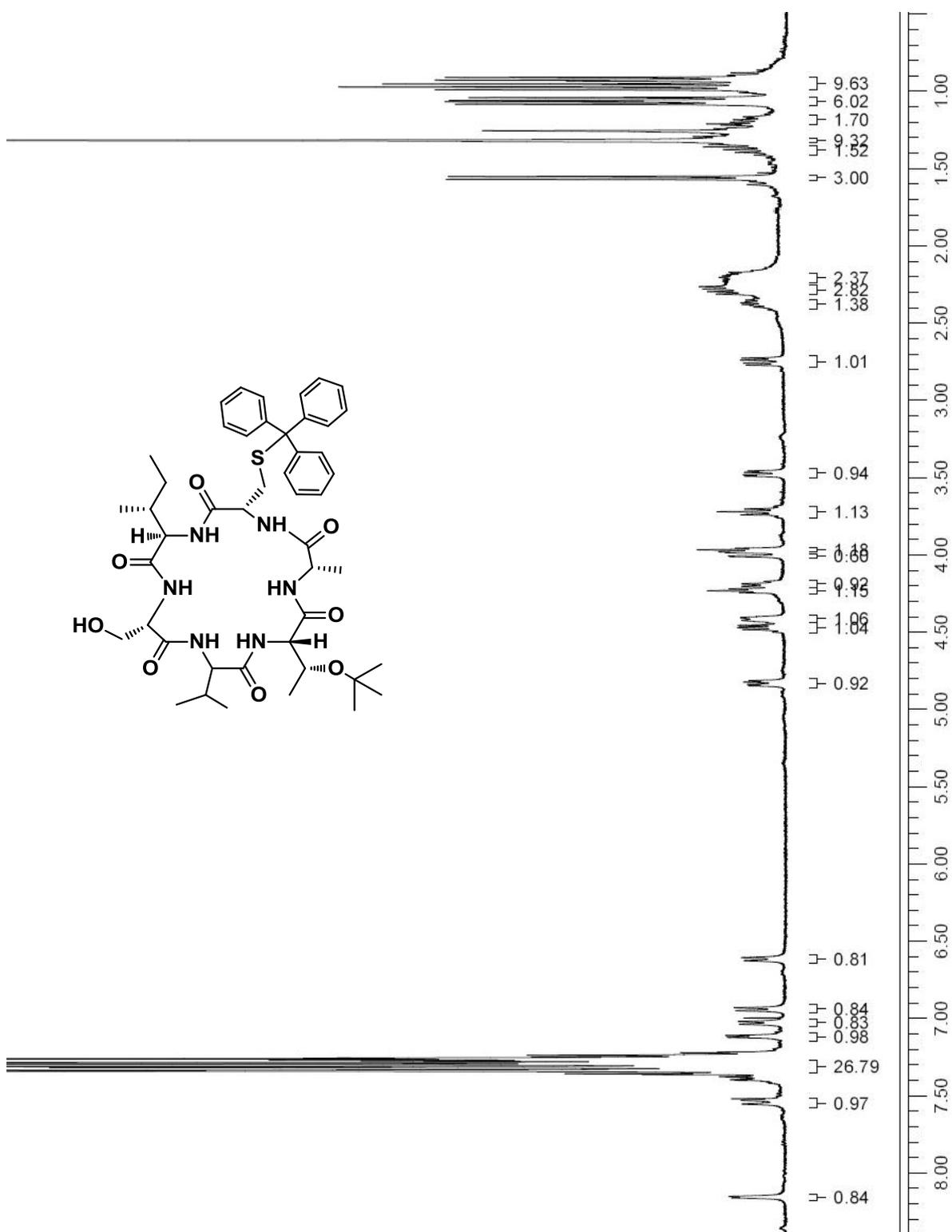


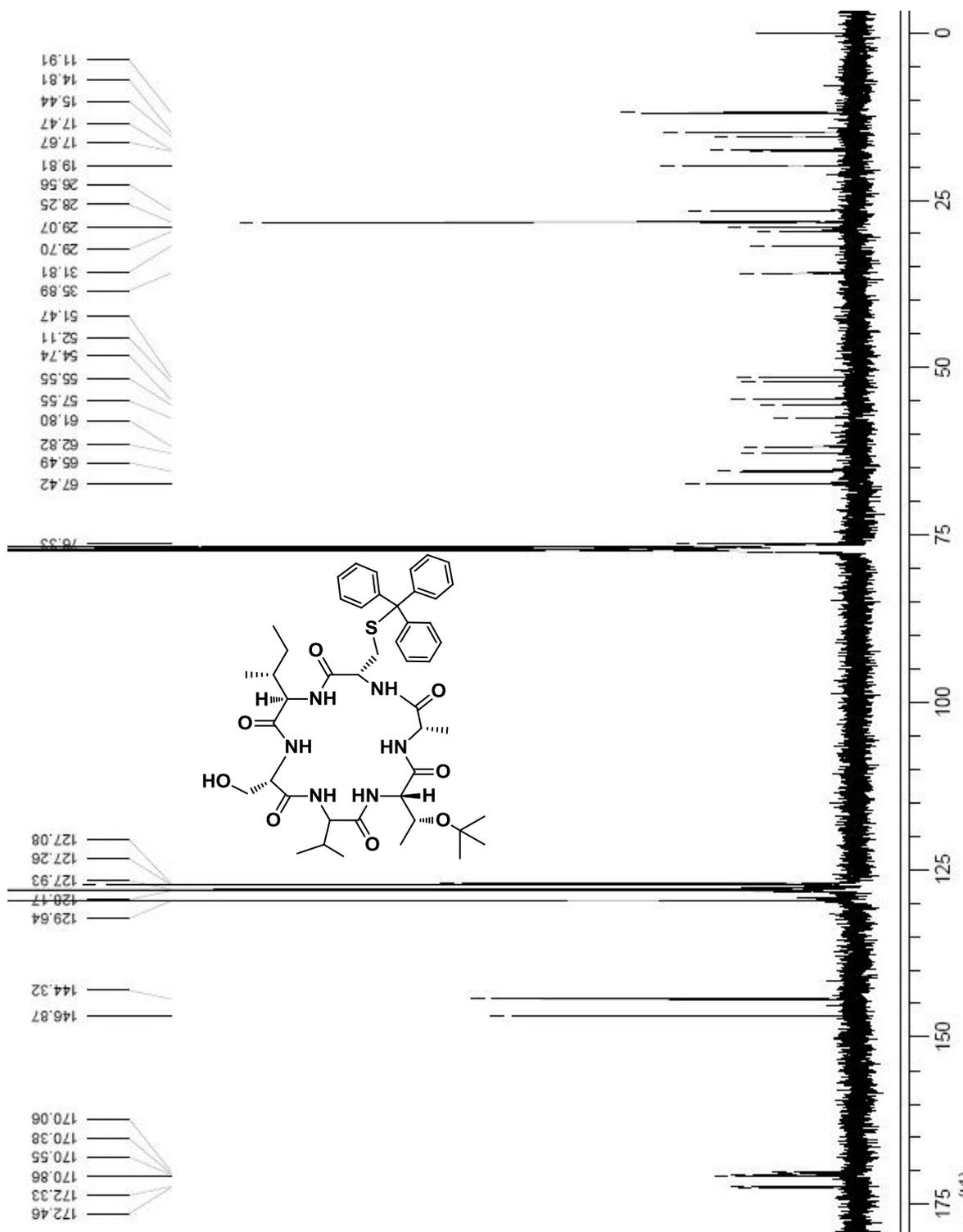
Ciclo-Gly-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Cys(Trt)-L-Ile-L-Thr(^tBu) (79):



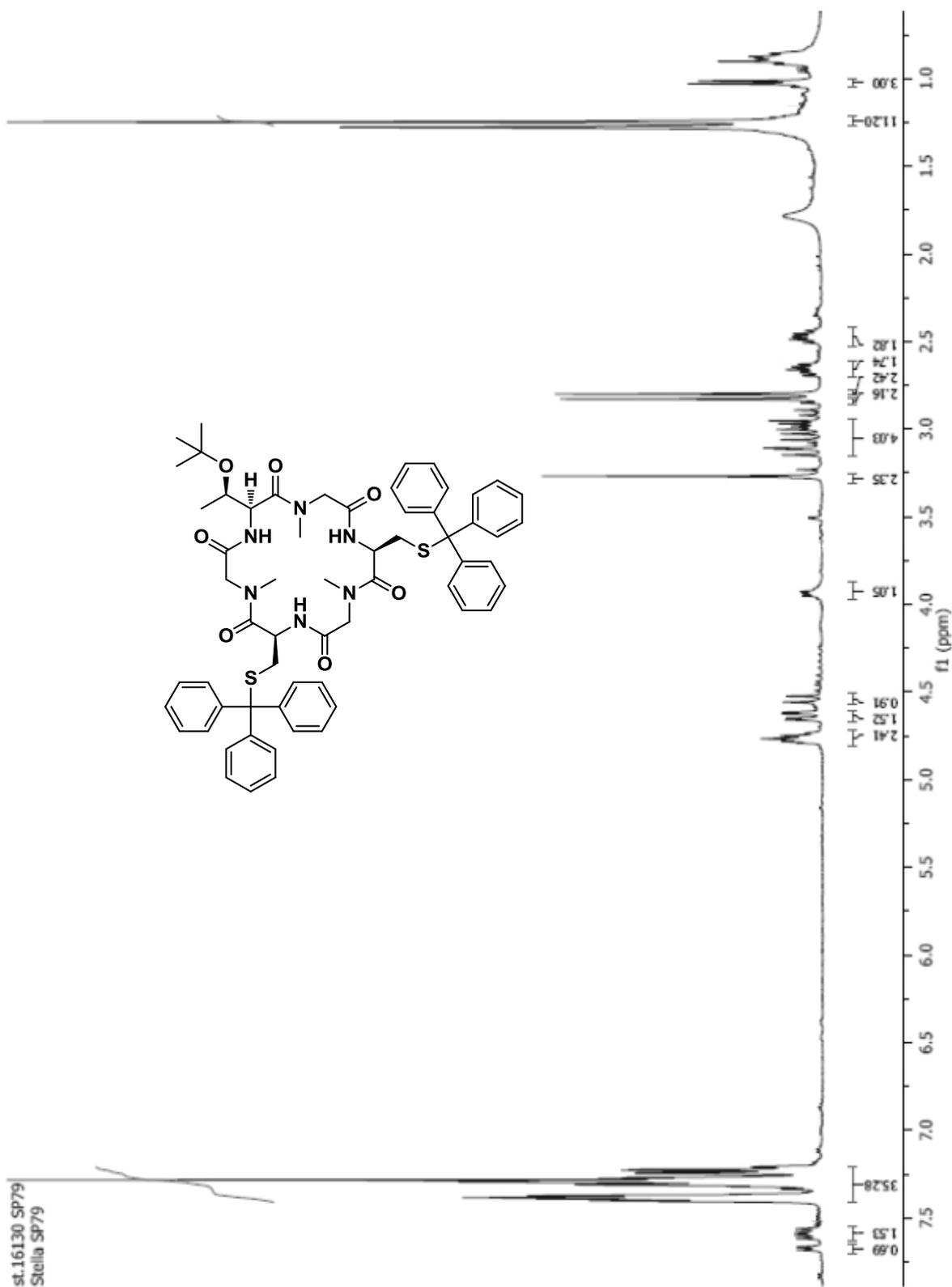


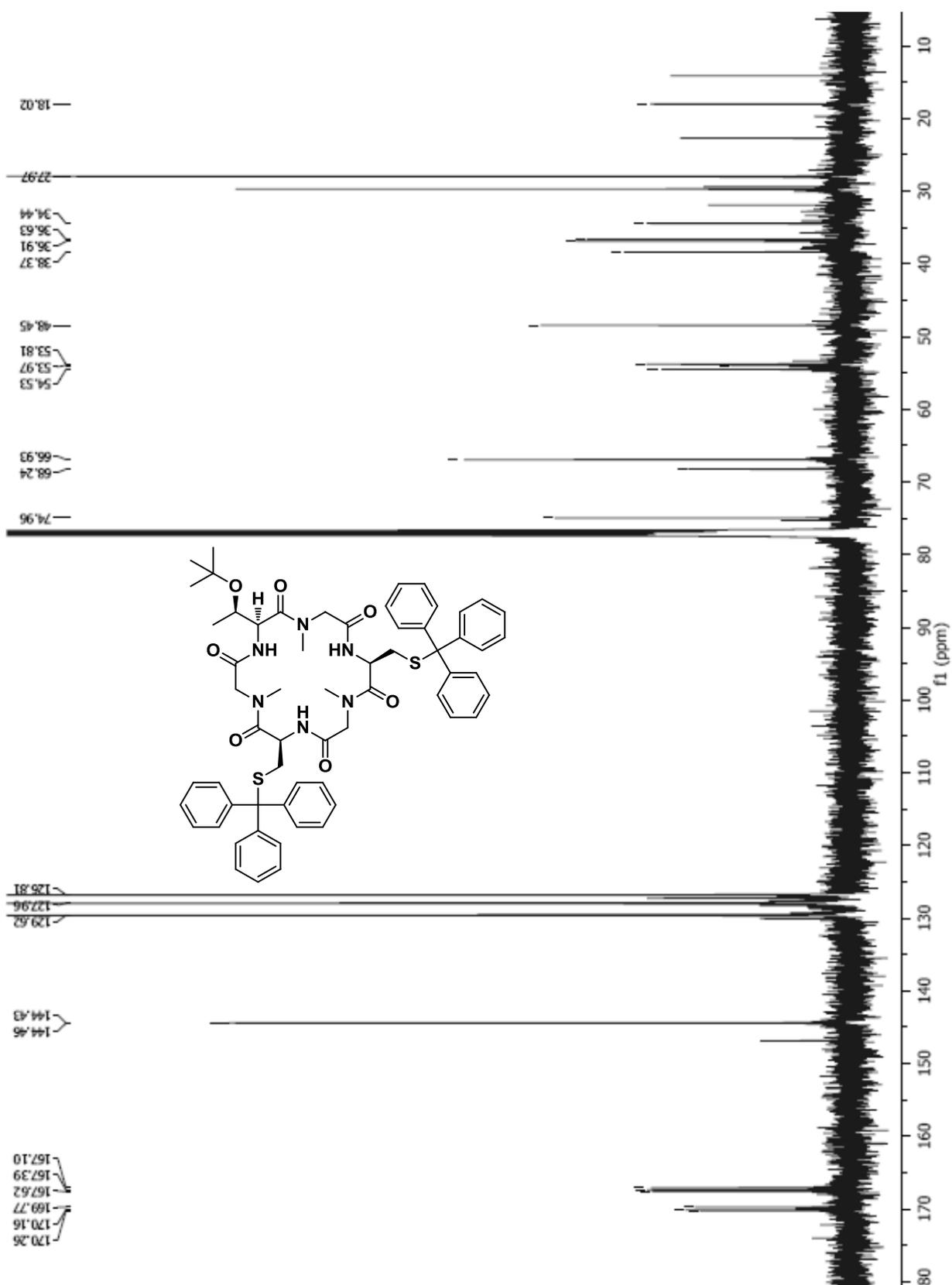
Ciclo-L-Ala-L-Cys(Trt)-D-Ile-L-Ser-L-Val-L-Thr(^tBu)(80):



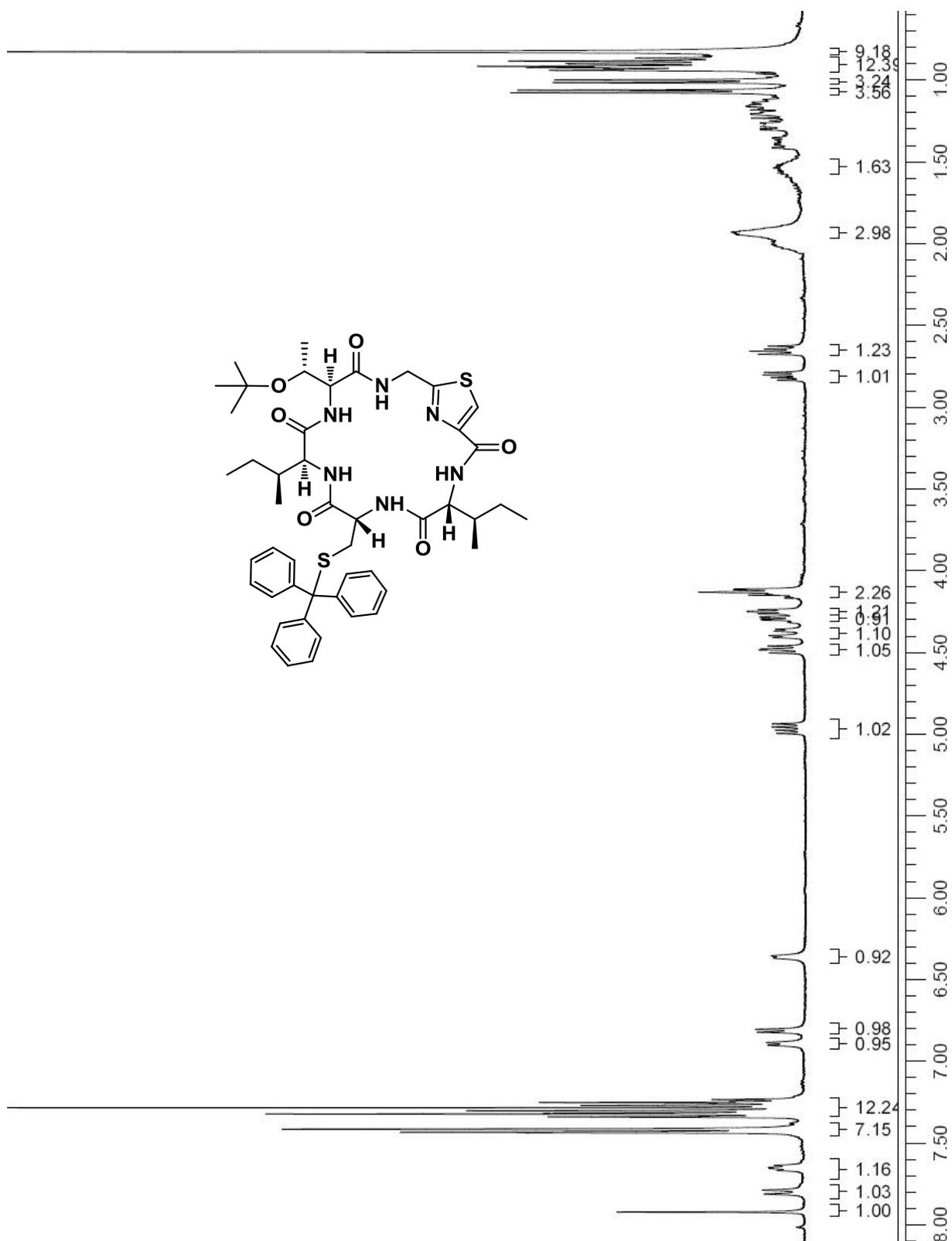


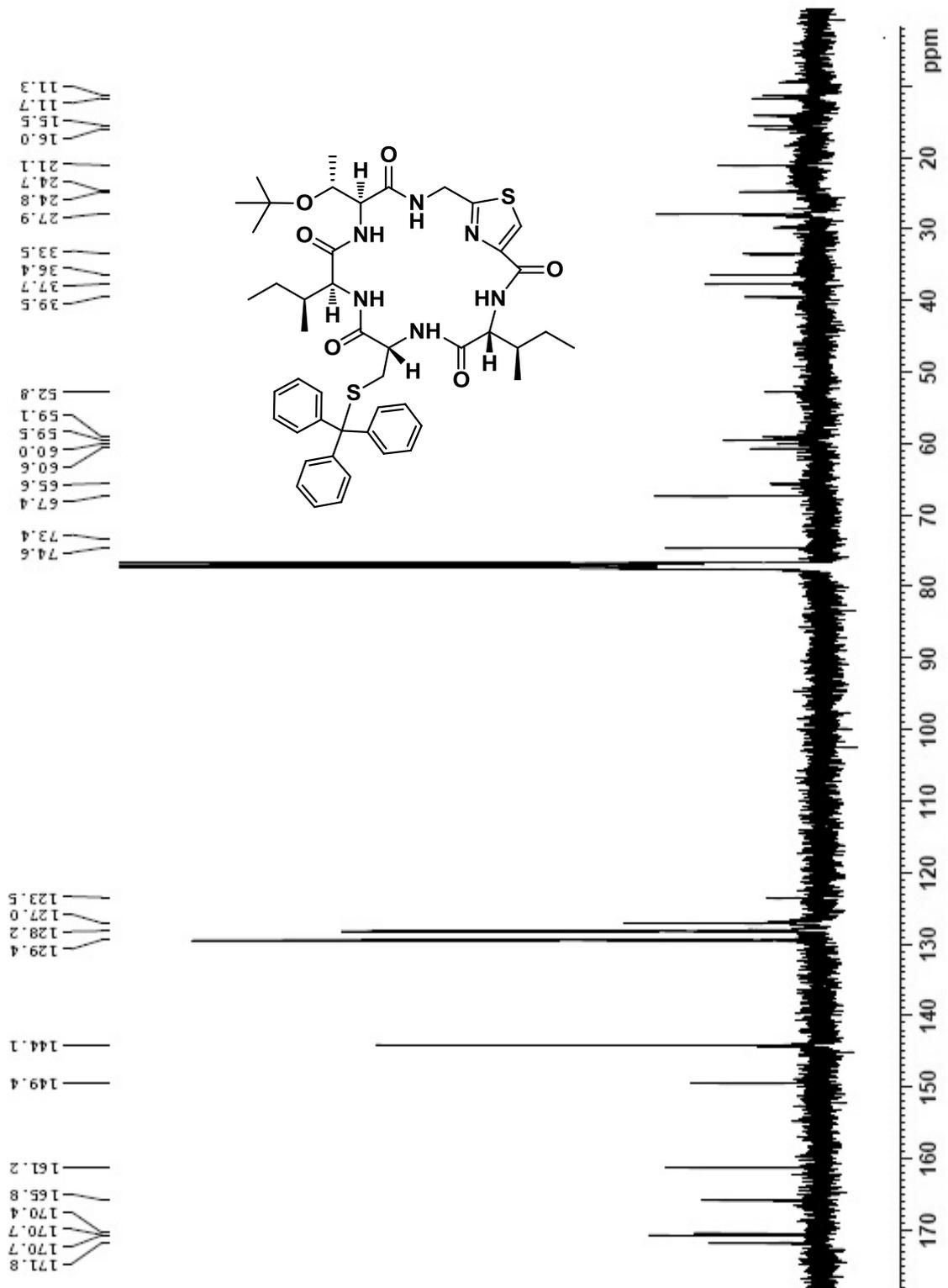
ciclo-L-Thr(^tBu)-NMeGly-L-Cys(Trt)-NMeGly-L-Cys(Trt)-NMeGly (81):



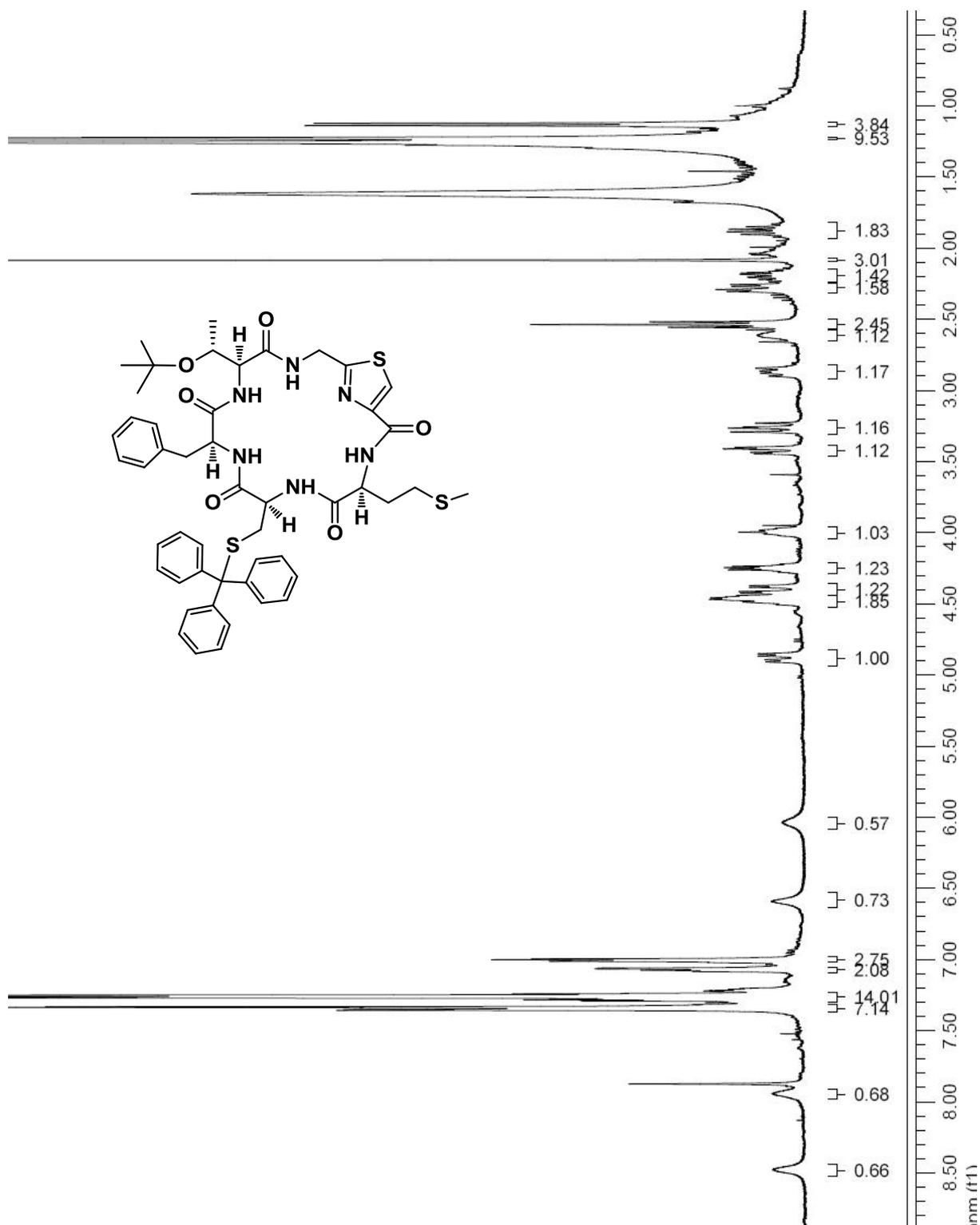


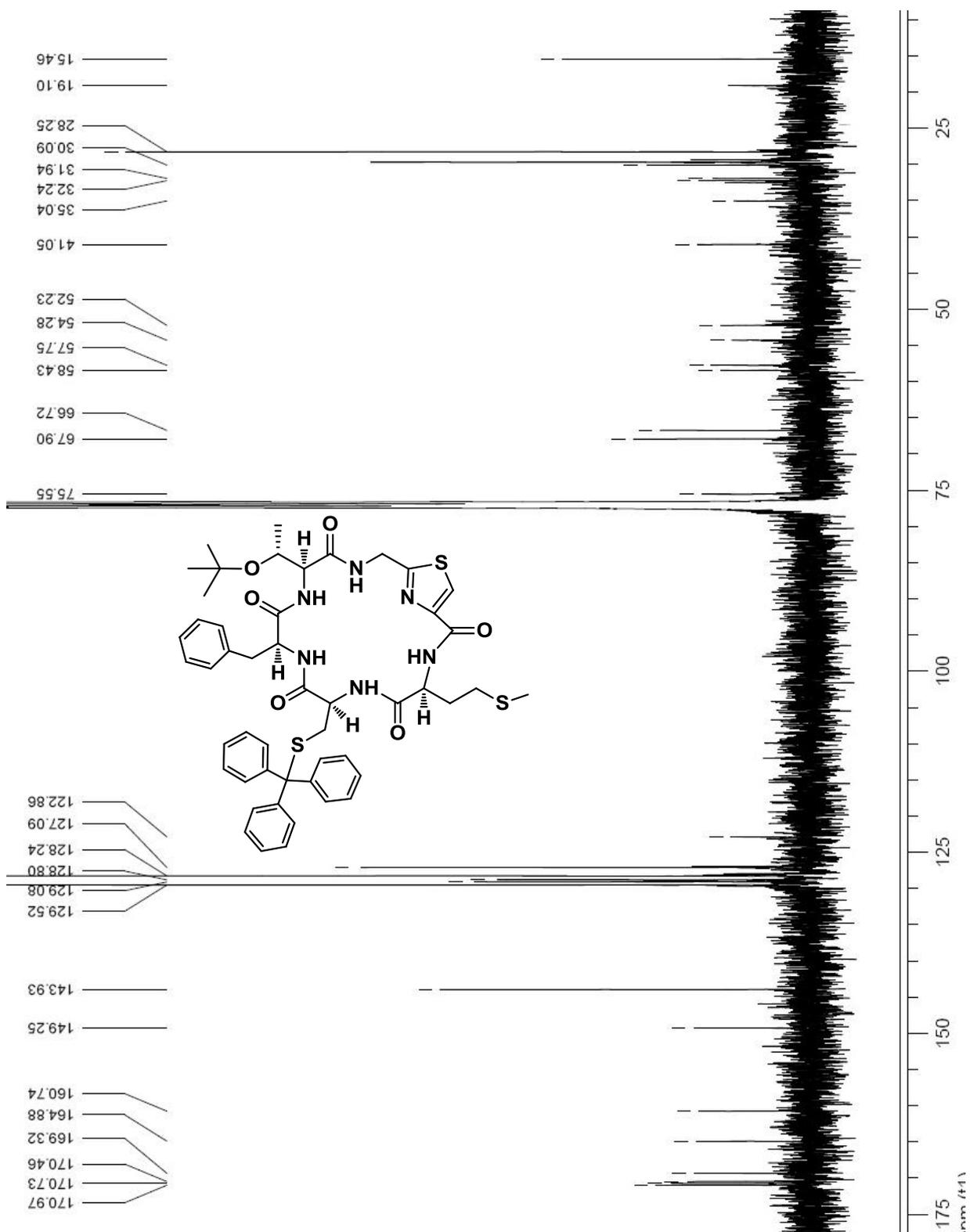
Ciclo-Gly-L-Thr(^tBu)-L-Ile-D-Cys(Trt)-D-Ile-Thz (82):





Ciclo-Gly-L-Thr(tBu)-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Met-Thz (83):





Capítulo 6

SÍNTESIS TOTAL DE AERUCICLAMIDA B

6.1 INTRODUCCIÓN/ANTECEDENTES

La naturaleza ha sido capaz de crear una gran variedad de compuestos, en muchas ocasiones presentando estructuras muy complejas. Desde hace muchos años, los químicos sintéticos han centrado su atención en los productos naturales, debido al interés que despiertan por su amplio campo de aplicaciones, principalmente aquellos que poseen propiedades medicinales. Realizar la síntesis total de un producto natural es un desafío atractivo para todo químico sintético ya que implica realizar una copia exacta de la naturaleza en las condiciones del laboratorio. Pero el interés en la síntesis total de productos naturales no radica solamente en la satisfacción personal de los investigadores, sino que también posibilita: i) la confirmación ó no de la estructura y/o estereoquímica propuesta para los mismos; ii) la obtención de cantidades importantes de un producto natural que generalmente se aísla en pequeñas cantidades de una fuente natural de difícil renovación; iii) la realización de estudios más avanzados de actividad biológica; iv) el desarrollo de nuevas metodologías de síntesis y v) la obtención de nuevos análogos con propiedades biológicas mejoradas lo cual es de gran interés para la industria farmacéutica.¹ Sumado a esto, cuando la obtención a partir de la fuente natural resulta un proceso poco práctico o muy costoso, la síntesis de un producto natural presenta ventajas desde el punto de vista comercial. La Aeruciclamida B fue obtenida por Gademann y colaboradores a partir de la oxidación de la tiazolina presente en la Aeruciclamida A aislada por ellos, Figura 6.1.²

¹ Molecules that changed the world. A brief history of the art and science of synthesis and its impact on society K.C. Nicolaou and T. Montagnon Wiley-VCH 2008

² Portmann, C.; Blom, J. F.; Gademann, K.; Jüttner, F. Aerucyclamides A and B: Isolation and Synthesis of Toxic Ribosomal Heterocyclic Peptides from the Cyanobacterium *Microcystis Aeruginosa* PCC 7806. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1193–1196.

Sin embargo, ninguna síntesis total se había publicado hasta el momento de nuestra divulgación.³ El grupo de Gademann oxidó Aeruciclamida A (**6**) con MnO₂ en benceno a 50°C, obteniendo Aeruciclamida B (**7**) con un 16% de rendimiento en un 50% de conversión por purificación en HPLC preparativo.

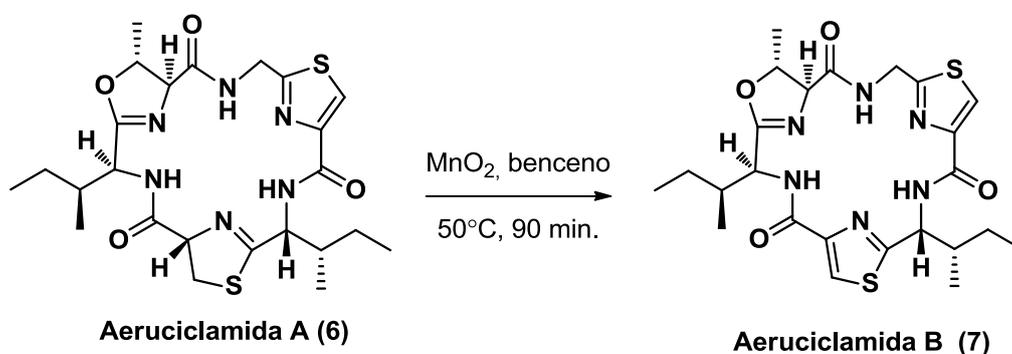
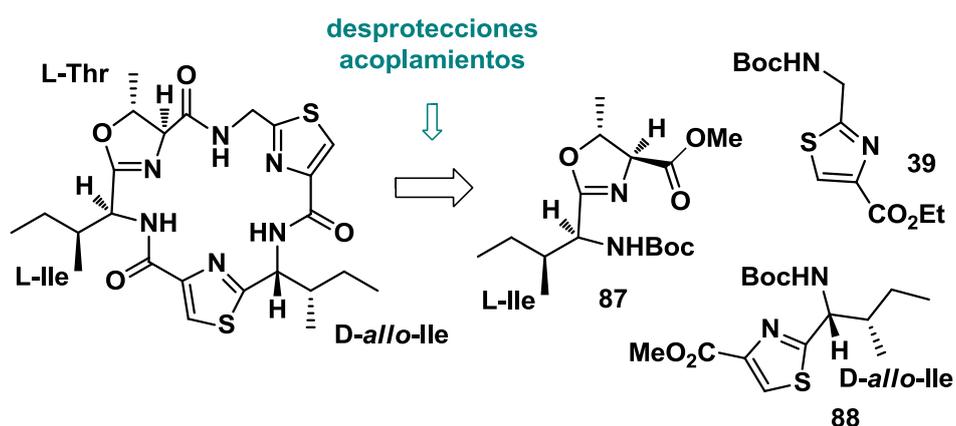


Fig. 6.1 Oxidación de Aeruciclamida A

6.2 ESTRATEGIA SINTÉTICA

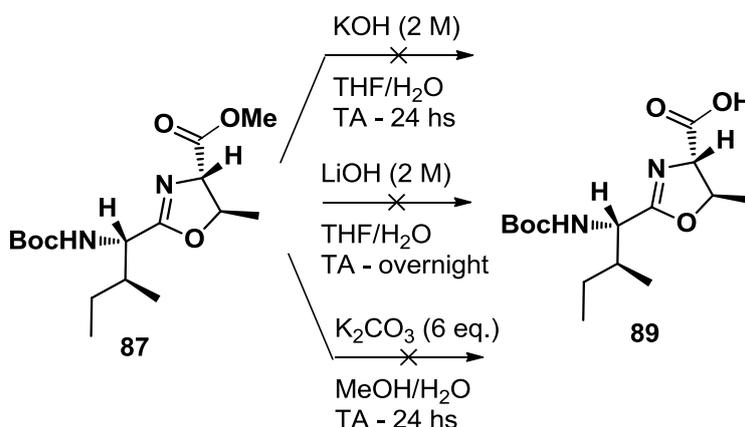
En un primer momento, planificamos la síntesis de la Aeruciclamida B a partir del acoplamiento de los building blocks azólicos: Boc-Gly-Thz-OEt (**39**), Boc-D-*allo*-Ile-Thz-OMe (**88**), y Boc-L-Ile-L-Oxz(*allo*-Thr)-OMe (**87**), siguiendo la misma estrategia convergente de obtención de macrociclos planteada en el capítulo 5, ver esquema 6.1.



Esquema 6.1

³ Peña, S.; Scarone, L.; Manta, E.; Serra, G. First Total Synthesis of Aerucyclamide B. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2806–2808.

Los building blocks tiazólicos (**39** y **88**) se obtuvieron con rendimientos de muy buenos a excelentes (ver Discusión y resultados), pero los resultados obtenidos para la oxazolina **87** no fueron tan favorables, si bien la oxazolina **87** fue obtenida con buenos rendimientos, ésta daba una serie de productos de descomposición luego de la reacción de desprotección del grupo éster metílico utilizando condiciones básicas ($\text{KOH}_{\text{aq}}/\text{THF}$, $\text{LiOH}_{\text{aq}}/\text{THF}$), por lo que no fue posible obtener **89**, esquema 6.2.



Esquema 6.2

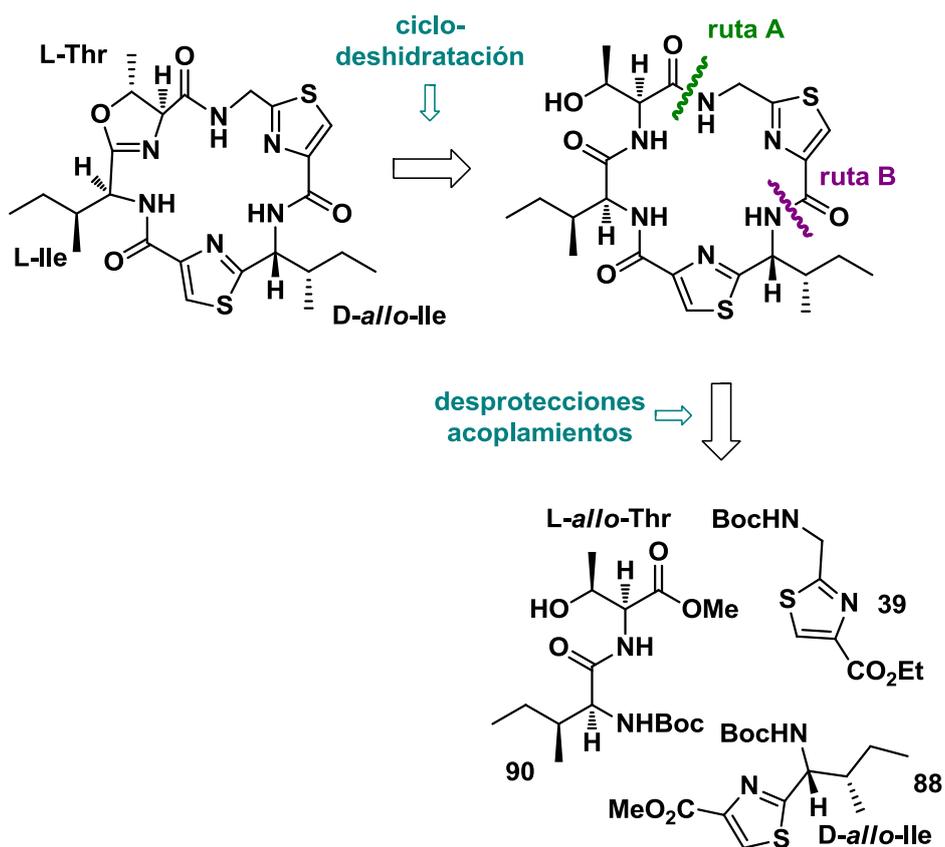
A su vez, se ha reportado que dicha oxazolina presenta problemas de estabilidad también en condiciones ácidas, produciéndose su apertura, por lo que la desprotección del grupo Boc también ocasionaría inconvenientes.⁴

Basándonos en estos datos, es que nos replanteamos la estrategia sintética, proponiendo para ello el acoplamiento de los building blocks tiazólicos: **39** y **88** y del dipéptido: Boc-L-Ile-L-*allo*-Thr-OH (**90**) siguiendo la misma estrategia convergente ya estudiada en el capítulo 5. El último paso de reacción de esta nueva ruta sintética consistiría en la ciclodeshidratación de la β -hidroxiamida presente en el macrociclo para formar la oxazolina correspondiente, ver esquema 6.3.

⁴ (a) Hamada, Y.; Kato, S.; Shiori, T. New methods and reagents in organic synthesis. A synthesis of ascidiacyclamide, a cytotoxic cyclic peptide from ascidian - determination of its absolute configuration. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 3223-3226. (b) Downing, S. V.; Aguilar, E.; Meyers, a. I. Total Synthesis of Bistratamide D. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 826-831.

Dado que la reacción de macrociclación generalmente procede con bajos rendimientos y depende del punto de ciclación seleccionado es que nos planteamos dos rutas sintéticas. El punto de macrociclación de la ruta A se seleccionó basándonos en el menor impedimento estérico que ese punto presenta debido a la presencia de un residuo de Gly, aunque presenta la desventaja de tener un centro quiral en el extremo *C*-terminal. La ruta B se seleccionó con el fin de estudiar el efecto de dos anillos tiazólicos en el punto de macrociclación en comparación con un anillo tiazólico y un dipéptido (ruta A). Esta ruta presenta la ventaja de no presentar centro quiral en el extremo *C*-terminal pero el extremo *N*-terminal está más impedido.

A su vez, contamos con el hecho de que el precursor abierto contiene anillos tiazólicos los cuales ofician de *turn-inducers* que facilitarían la macrociclación (ver capítulo 5).



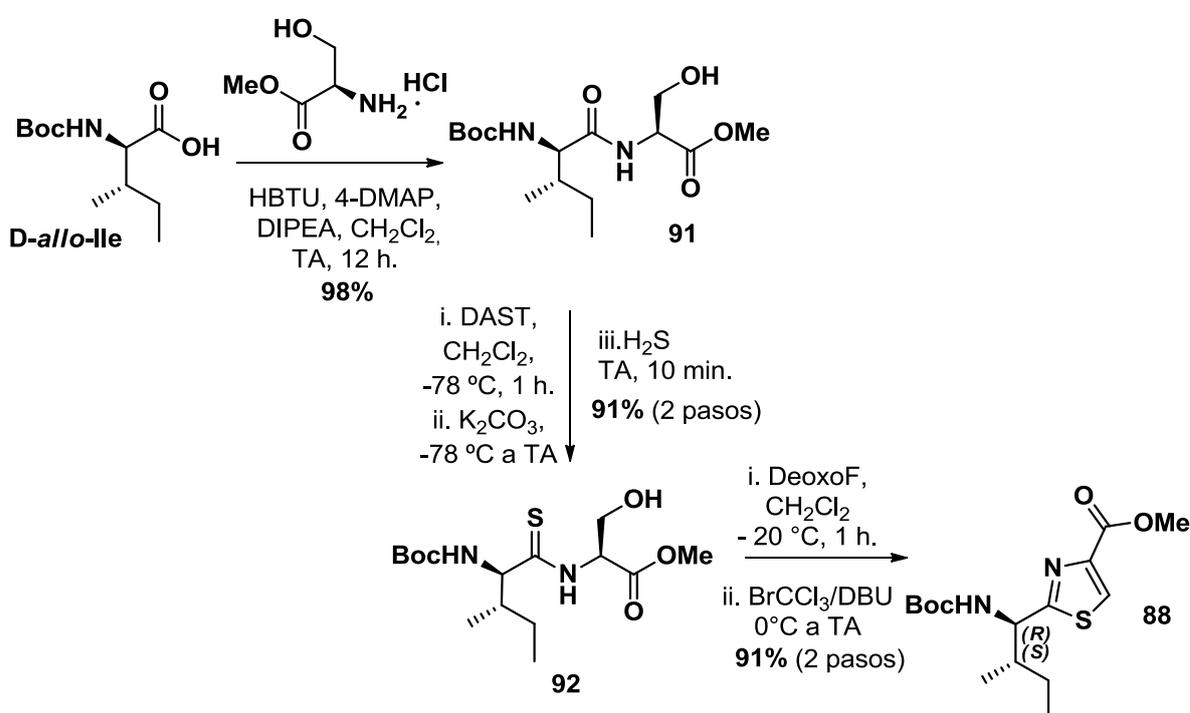
Esquema 6.3 Análisis retrosintético para obtener Aeruciclamicida B

6.3 DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Primera Síntesis Total de Aeruciclamida B.

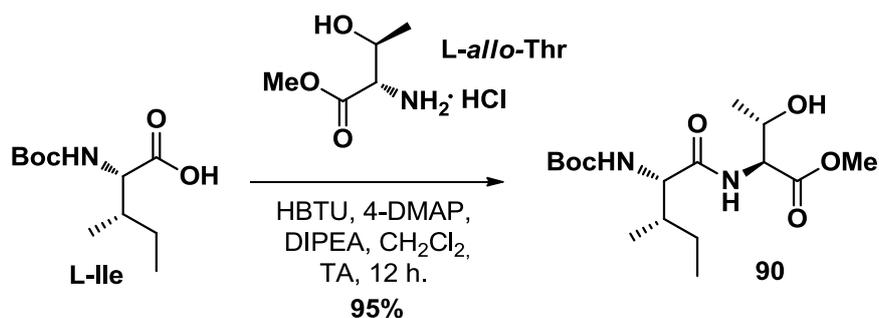
Se sintetizaron los building bloks: Boc-D-*allo*-Ile-Thz-OMe, Boc-Gly-Thz-OEt y Boc-L-Ile-L-*allo*-Thr-OH necesarios para la obtención de dicho producto natural como se muestra en el análisis retrosintético, ver esquema 6.3

El tiazol **39** se obtuvo siguiendo la metodología de Hantzsch convencional de obtención de tiazoles (ver Capítulo 2). La síntesis del tiazol **88** se realizó siguiendo la misma estrategia que se empleó para su análogo Boc-L-Ile-Thz-OMe (**33**), la cual se describe en el capítulo 2. Para ello, se sintetizó el dipéptido D-*allo*-Ile-Ser-OH (**91**), se ciclodeshidrató con DAST y sobre el crudo de la oxazolina se realizó la tiónólisis para obtener la tioamida **92**, la cual fue posteriormente ciclodeshidratada y oxidada para dar el tiazol **88**. Este building block se obtuvo con excelentes rendimientos.



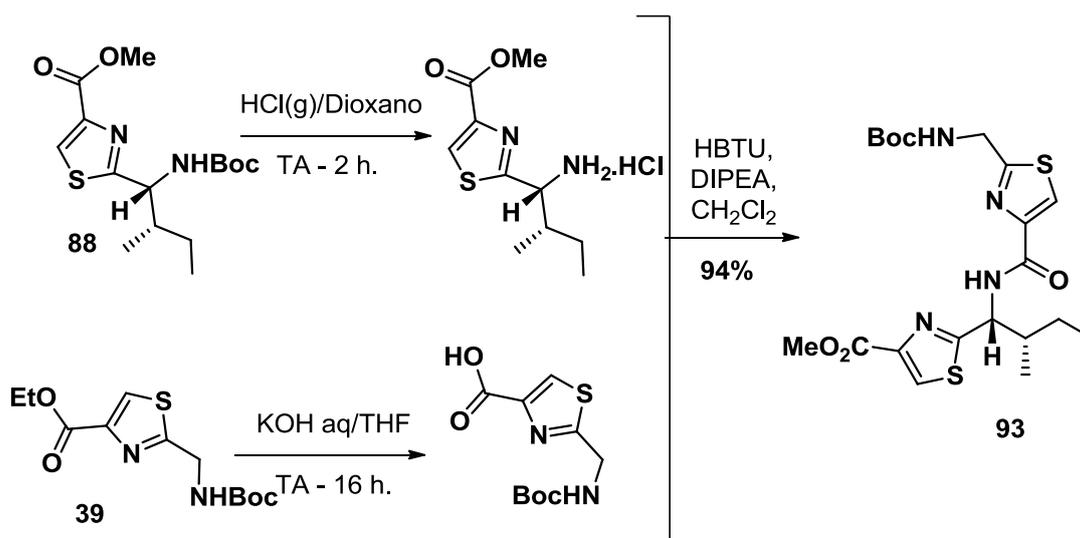
Esquema 6.4 Tiazol derivado de D-*allo*-Ile y L-Ser

Se sintetizó el dipéptido Boc-L-Ile-L-*allo*-Thr-OH (**90**) utilizando HBTU como agente acoplante, con excelente rendimiento. Si bien la oxazolina presente en el producto natural es derivada de L-Thr, como utilizaremos agentes ciclodeshidratantes que invierten la configuración del C-OH, se debe de trabajar con el precursor con la configuración absoluta opuesta en dicho carbono, ver capítulo 5, esquema 5.7.

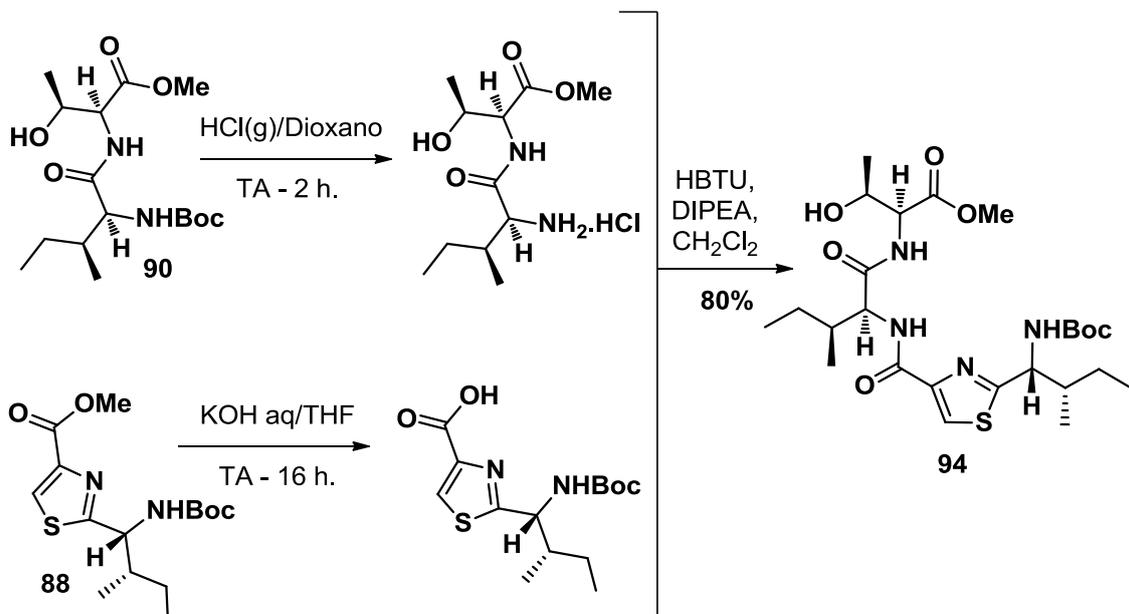


Esquema 6.5 Dipeptido L-Ile-L-*allo*-Thr

Una vez obtenidos los distintos building blocks, se procedió con las desprotecciones correspondientes para posteriormente realizar los acoplamiento con HBTU/DIPEA. Aunque la complejidad de los acoplamiento va en aumento, la obtención de los compuestos acoplados se realizó con muy buenos rendimientos.



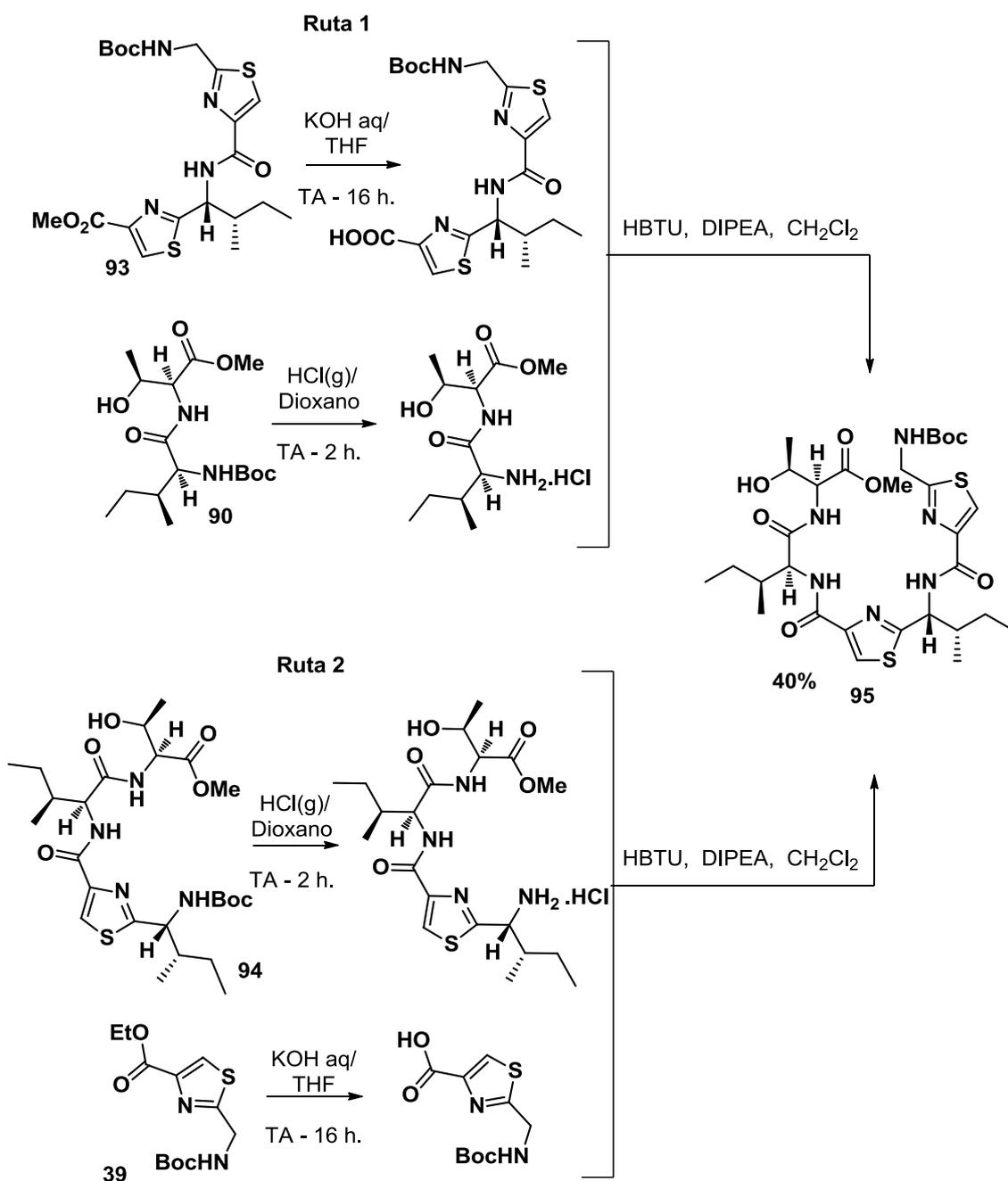
Esquema 6.6 Obtención del bis-building block Boc-Gly-Thz-D-*allo*-Ile-Thz-OMe, ruta A.



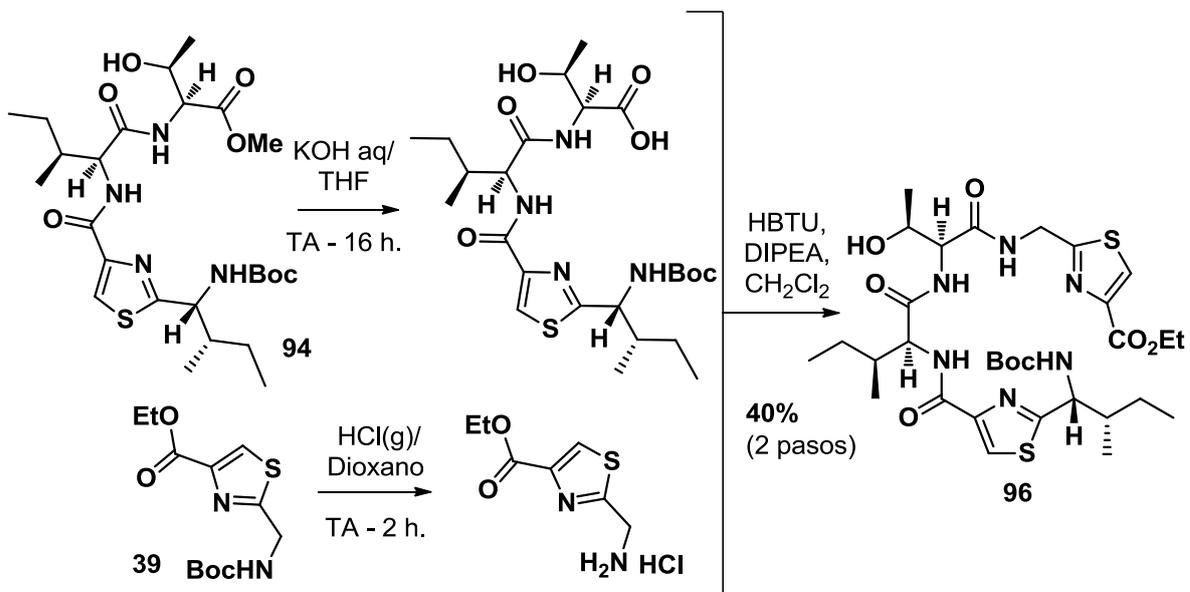
Esquema 6.7 Obtención del bis-building block Boc-D-*allo*-Ile-Thz-L-Ile-L-*allo*-Thr-OMe, ruta B.

Una vez obtenidos los bis-heterociclos **93** y **94** se continuó con las desprotecciones correspondientes y los acoplamiento para obtener los precursores abiertos de Aeruciclámda B.

El compuesto **95** se prepara a partir de dos caminos diferentes pero obteniendo en ambos casos igual rendimiento global (R = 40 %).



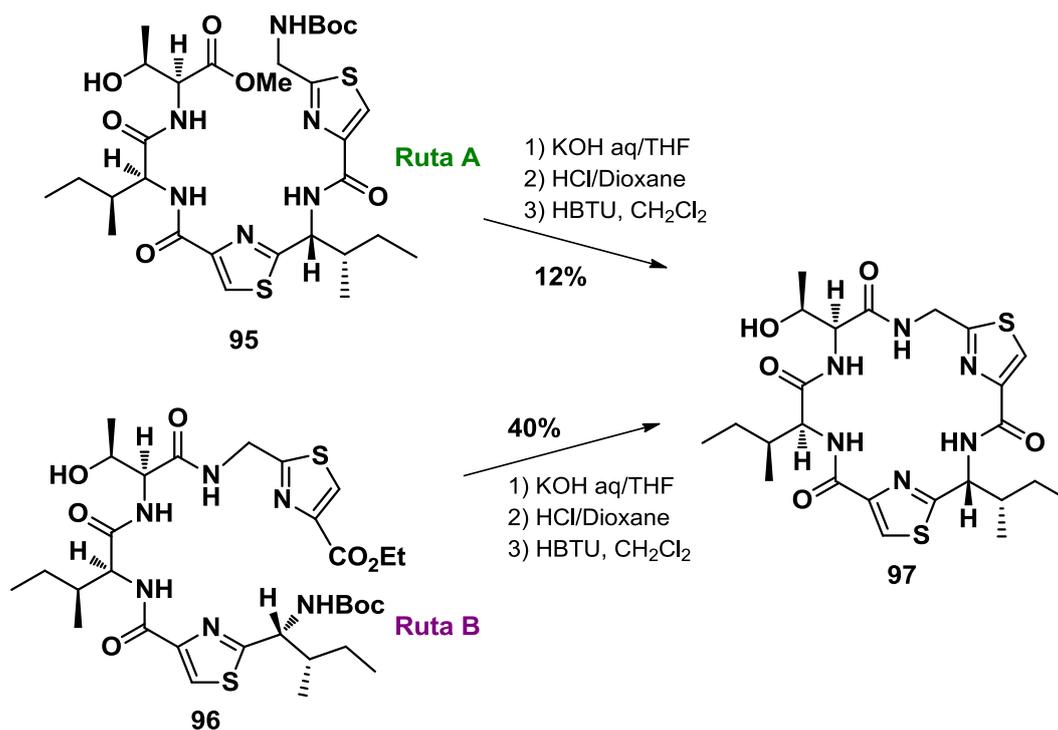
Esquema 6.8 Obtención de tris-building block Boc-Gly-Thz-D-*allo*-Ile-Thz-L-Ile-L-*allo*-Thr-OMe precursor de Aeruciclámda B, ruta A.



Esquema 6.9 Obtención de tris-building blocks Boc-D-*allo*-Ile-Thz-L-Ile-L-*allo*-Thr-Gly-Thz-OEt precursor de Aeruciclámda B, ruta B.

Macro ciclación

Se estudiaron las reacciones de macro ciclación según el punto de unión. Los resultados empíricos demostraron que el punto de macro ciclación de la ruta B (R = 40 %) es más favorable para este macrociclo que el de la ruta A (R = 12 %).



Esquema 6.10 Obtención del macrociclo precursor de Aeruciclámda B

Se realizaron los cálculos teóricos de las conformaciones de los precursores abiertos **95** y **96** utilizando el programa Spartan.⁵ Los resultados obtenidos para las conformaciones de mínima energía podrían llegar a explicar los resultados empíricos, ya que el precursor de la ruta A (**95**) presenta los grupos carboxilo y amino que deberían reaccionar, más alejados que los del precursor de la ruta B (**96**), Figuras 6.2 y 6.3.

⁵ Cálculos realizados en Spartan 10 (Molecular Mechanics, MMFF). Versión 1.0.1. Wavefunction Inc.

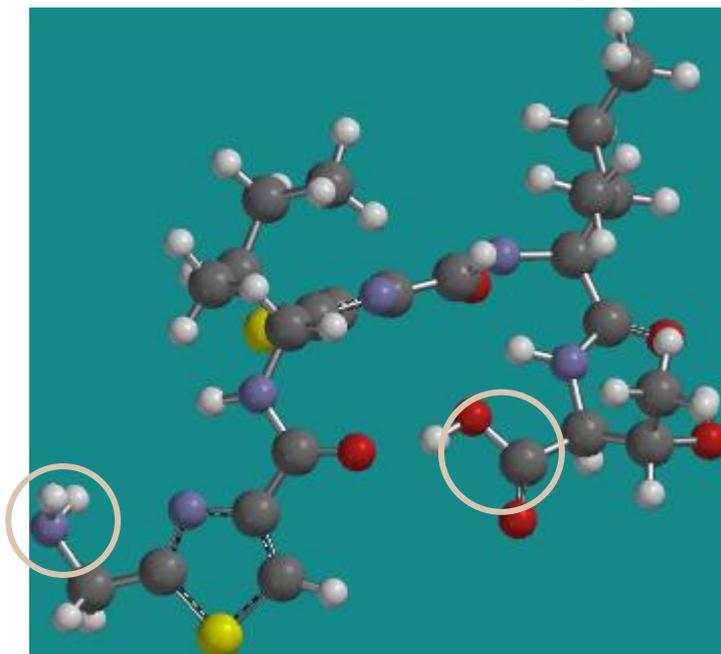


Fig 6.2 Cálculo teórico de mínima energía, compuesto **95**,
Ruta A: $E_{\min} = 228.5161$ kJ/mol

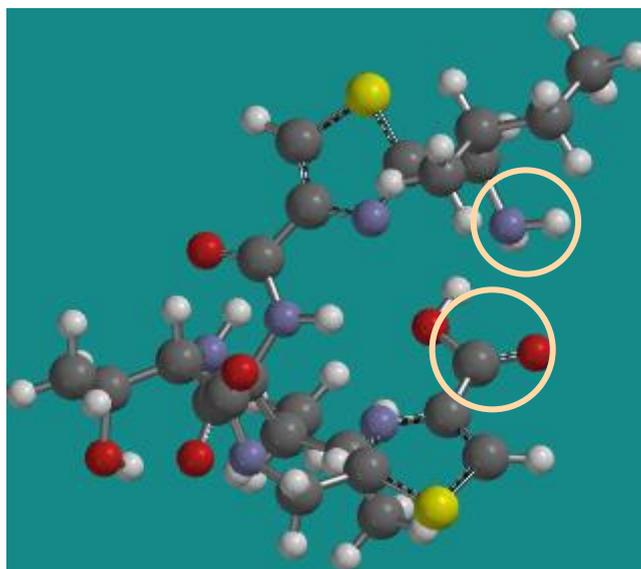
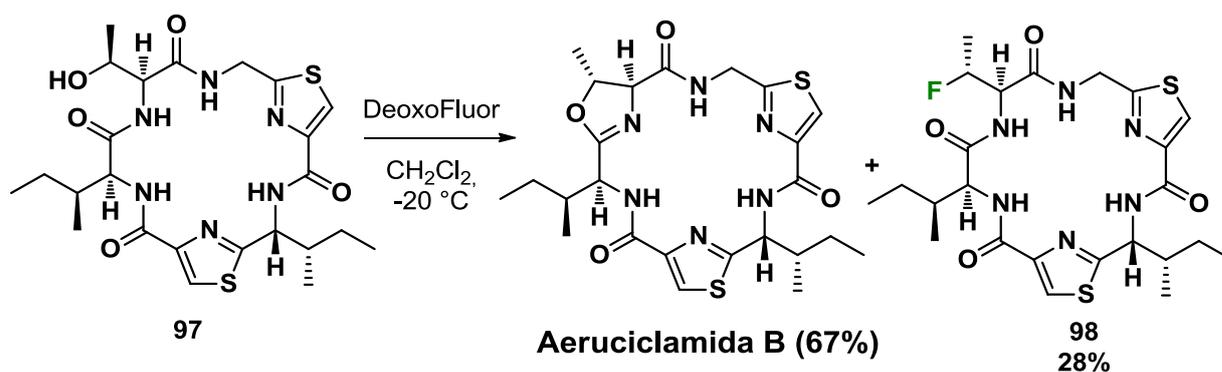


Fig 6.3 Cálculo teórico de mínima energía, compuesto **96**,
Ruta B: $E_{\min} = 88.1782$ kJ/mol

Ciclodeshidratación

Luego de ensamblar convergentemente los building blocks y macroclicar, el último paso de reacción es la ciclodeshidratación de la β -hidroxiamida para obtener el anillo de oxazolina en el macrociclo **97** y así poder alcanzar nuestro objetivo sintético: la síntesis total del producto natural en estudio.



Esquema 6.11 Obtención de Aeruciclamida B

Debido a que DAST no es más enviado a nuestro país, ya que está catalogado como '*hazardous material*', hemos decidido utilizar el Deoxo-Fluor disponible en nuestro laboratorio (el cual también es *hazardous material* y ya no es enviado a nuestro país). De trabajos previos se conoce que la reactividad de ambos agentes ciclodeshidratantes es similar, salvo por el hecho que Deoxo-Fluor es térmicamente más estable (ver capítulo 2). El uso de Deoxo-Fluor para ciclodeshidratar una β -hidroxiamida derivada de *allo*-Thr en un macrociclo ha sido reportado por Taunton y Deng en la síntesis de *cis,cis*-Ceratospongamida.⁶ Siguiendo estas condiciones de reacción es que obtuvimos Aeruciclamida B con un rendimiento del 67%, y además un producto secundario no esperado en un 28% de rendimiento. El espectro ^1H -RMN de dicho producto secundario presenta una señal dqd a 4.98 ppm con una constante de acoplamiento $J = 48.3\text{ Hz}$ asignable a un H adyacente a un F y el espectro ^{13}C -RMN presenta una señal a 89.9 ppm (d, $J = 171.5\text{ Hz}$) la cual es asignable a un enlace C-F. Del

⁶ Deng, S.; Taunton, J. Kinetic Control of Proline Amide Rotamers: Total Synthesis of Trans, Trans-and Cis, Cis-Ceratospongamide. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 916–917.

análisis de toda la espectroscopía podemos concluir que se trata del derivado fluorado (**98**) mostrado en el Esquema 6.9; el cual se produjo por la reacción intermolecular entre el fluoruro y el intermediario activado por Deoxo-Fluor. Basándonos en que esta reacción transcurre por un mecanismo de tipo SN_2 se propone la inversión de la estereoquímica en el compuesto fluorado.

Si bien DAST⁷ y Deoxo-Fluor⁸ se utilizan para la obtención de compuestos fluorados a partir de alcoholes,⁹ y la reacción de eliminación ha sido descrita como una reacción que puede competir con la síntesis de oxazolininas; la competencia entre la formación de oxazolinas y la fluoración, no habría sido descrita en bibliografía antes de nuestra publicación. La formación del producto fluorado puede explicarse por una pérdida de nucleofilicidad de la β -hidroxiamida del precursor cíclico. La conformación del macrociclo y la formación de enlaces de hidrógeno puede restringir la reacción deseada, permitiendo que se produzca una reacción intermolecular por el ataque del fluoruro para dar el producto secundario **98**.

La información espectroscópica de la Aeruciclámida B sintética está en concordancia con la reportada para el producto natural aislado por Gademann.

⁷ Yokokawa, F.; Shioiri, T. Total Synthesis of Somamide A, an Ahp (3-Amino-6-Hydroxy-2-Piperidone)-Containing Cyclic Depsipeptide. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8673–8677.

⁸ Scarone, L.; Sellanes, D.; Manta, E.; Wipf, P.; Serra, G. Use of Deoxo-Fluor for Double Cyclization to Bis-Thiazolines. Limitations of This Agent for the Synthesis of Oxazolines. *Heterocycles* **2004**, *63*, 773–778.

⁹ (a) Straatmannand, M.; Welch, M. Fluorine-18-Labeled Diethylaminosulfur Trifluoride (DAST): An F-for-OH Fluorinating Agent. *J. Nucl. Med.* **1976**, *18*, 151–158. (b) Lal, G. S.; Pez, G. P.; Pesaresi, R. J.; Prozonc, F. M.; Cheng, H. Bis (2-Methoxyethyl) Aminosulfur Trifluoride : A New Broad-Spectrum Deoxofluorinating Agent with Enhanced Thermal Stability. **1999**, 7048–7054.

6.4 CONCLUSIONES

No fue posible trabajar con la oxazolina **89** derivada del dipéptido Ile-Thr por los problemas de estabilidad que presentó en las condiciones de desprotección del grupo ácido carboxílico y por la inestabilidad en medio ácido anteriormente reportada.

Se obtuvieron dos precursores abiertos de Aeruciclamida B, **95** y **96** a partir de dos building blocks tiazólicos y un dipéptido, con muy buenos rendimientos.

Se estudiaron dos rutas alternativas de macrociclación según el punto de corte para obtener el precursor macrocíclico **97**, y se observó que la ruta B transcurre con mejor rendimiento (40%) que la ruta A (12%).

Se realizó la primer síntesis total de Aeruciclamida B con un rendimiento total de 9% (ruta B) y 3% (ruta A) y obteniéndose de forma inesperada un derivado fluorado (**98**) del precursor macrocíclico (**97**), describiéndose por primera vez que la formación de este producto secundario puede competir con la formación de oxazolinas en macrociclos de este tipo.

Se realizó la confirmación de la estructura propuesta por Gademann y colaboradores para la Aeruciclamida B.

6.5 PARTE EXPERIMENTAL

La cromatografía en capa fina se realizó utilizando placas de sílica gel sobre plástico de 0.20 mm de espesor (Macherey-Nagel, Polygram[®], silG/UV 254 nm) y revelado con lámpara UV a 254 nm, vapores de iodo, spray de ninhidrina o fosfomolibdico.

Diclorometano seco se obtuvo de CaH_2 .¹⁰ Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en sistemas secos y bajo atmósfera de nitrógeno.

La cromatografía en columna se realizaron utilizando Sílica gel 60 (J.T. Baker, 40 μm diámetro promedio de partícula).

Los espectros de RMN (^1H NMR y ^{13}C NMR) se realizaron en un equipo Bruker Advance DPX-400, los desplazamientos químico se relacionan con el desplazamiento de tetrametilsilano (0 ppm).

Los espectros de masa se realizaron en un espectrómetro de masa microQTOF-G (Bruker Daltonics) mediante ionización de electrospray y en un espectrómetro de masa Thermo Scientific Exactive Orbitrap equipado con sonda atmosférica para análisis de sólidos (ASAP)

Los espectros infrarrojos se realizaron en un espectrofotómetro FT-IR Shimadzu 8101A en film sobre pastillas de NaCl.

Las medidas de punto de fusión fueron realizadas en Fischer-Johns de Fischer Scientific Comp.

El ángulo de rotación óptica fue medido en un polarímetro Kruss Optronic GmbH P8000 con una celda de 0.5 mL

Procedimiento General de desprotección de Boc:

Método A: El compuesto a desproteger se disuelve en una solución 4 M de HCl en dioxano. La mezcla de reacción se agita a TA hasta desaparición del reactivo confirmada por TLC. Se destiló el solvente a presión reducida. Se obtiene la amina-clorhidrato que se utiliza en los próximos pasos sin purificación adicional.

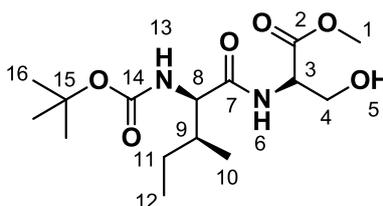
¹⁰ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", 3th Ed. Pergamon Press, Oxford, **1988**.

Método B: TFA se agrega a una solución del aminoácido protegido en CH₂Cl₂, la mezcla se agita a TA por 1h. Todos los compuestos volátiles son removidos bajo presión reducida

Procedimiento general de ciclodeshidratación con Deoxo-Fluor:

En un balón de dos bocas, bajo atmósfera de N₂, se añade gota a gota Deoxo-Fluor (1.2 eq) a una solución a – 20 °C de la β-hidroxi amida/tioamida en CH₂Cl₂. Luego de agitar por 1 h a -20°C, se agrega solución saturada de NaHCO₃, y se deja alcanzar TA. Se extrae con CH₂Cl₂, las capas orgánicas combinadas se secan con MgSO₄, se filtran y concentran a vacío. El residuo se purifica por columna cromatográfica dando la oxazolina/tiazolina deseada.

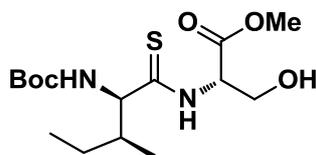
Boc-D-*allo*-Ile-L-Ser-OMe (91):



A partir de Boc-D-*allo*-Ile (3.20 g, 13.9 mmol) y L-Ser-OMe (2.58 g, 16.6 mmol), y siguiendo el procedimiento general para la formación de enlace amida y luego de purificar por columna cromatográfica (AcOEt:EP, 4:1) se obtuvo el dipéptido deseado.

Sólido blanco (4.50 g, 98 %), $R_f = 0.55$ (EtOAc:EP, 4:1). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 0.90 (d, 3H₁₀, $J = 6.9$ Hz), 0.94 (t, 3H₁₂, $J = 7.4$ Hz), 1.20–1.29 (m, 1H₁₁), 1.39–1.48 (m, 1H₁₁, 3H₁₆), 1.97 – 2.05 (m, 1H₉), 3.42 – 3.50 (m, 1H₅), 3.80 (s, 3H₁), 3.90-4.01 (bs, 2H₄), 4.16 (dd, 1H₈, $J_1 = 6.9$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz), 4.66 (bs, 1H₃), 5.17 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H₃), 7.19 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H₆). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 11.7 (C₁₂), 14.2 (C₁₀), 26.4 (C₁₁), 28.3 (3C₁₆), 36.7 (C₉), 52.8 (C₁), 54.7 (C₃), 58.6 (C₈), 62.7 (C₄), 80.7 (C₁₅), 156.4 (C₁₄), 171.0 (C₇)

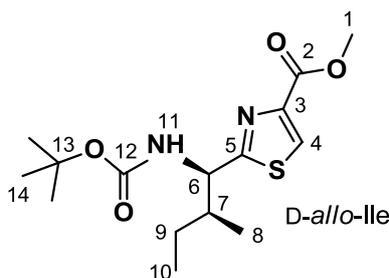
Boc-D-*allo*-TioIle-L-Ser-OMe (92):



Se ciclodeshidrató con DAST el dipéptido Boc-D-*allo*-Ile-L-Ser-OMe (1.0 g, 3.01 mmol) siguiendo el procedimiento general para obtener la respectiva oxazolina. A partir del crudo y siguiendo la metodología de obtención de b-hidroxitioamidas (tiolisis) se obtiene la tioamida correspondiente luego de purificar por columna cromatográfica (AcOEt:EP, 2:3).

Aceite amarillento (954 mg, 91 %). $R_f = 0.45$ (EtOAc:hexane, 2:3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.87 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.97 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 1.27–1.35 (m, 1H), 1.40–1.52 (m, 10H), 2.31–2.43 (m, 1H), 2.98–3.10 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 4.00–4.09 (m, 1H), 4.23–4.33 (m, 1H), 4.39–4.47 (m, 1H), 5.23 – 5.29 (m, 1H), 8.79 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 11.7, 13.5, 26.9, 28.3 (3C), 38.8, 52.9, 59.4, 61.2, 65.9, 81.1, 156.4, 170.3, 205.7.

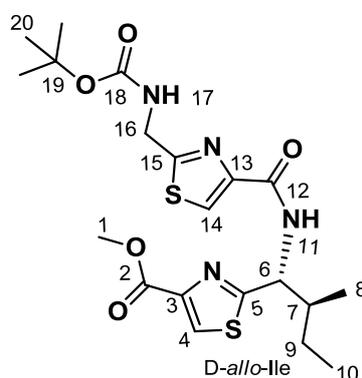
Boc-D-*allo*-Ile-Thz-OMe (88):



Se ciclodeshidrató la tioamida Boc-D-*allo*-TioIle-L-Ser-OMe (50 mg, 0.144 mmol) siguiendo el procedimiento general con DeoxoFluor, se obtuvo la respectiva tiazolina. Se oxidó con DBU/ BrCCl_3 siguiendo el procedimiento general. El crudo se purificó por columna cromatográfica (AcOEt:EP, 1:4) para obtener el compuesto deseado.

Sólido blanco (47 mg, 91%). $R_f = 0.35$ (EtOAc:hexane, 4:1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.83 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 1.22–1.31 (m, 1H), 1.40–1.54 (m, 10H), 2.21–2.34 (m, 1H), 3.95 (s, 3H), 5.06 (dd, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 8.9$ Hz, 1H), 5.24 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.1 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 11.6, 13.8, 26.6, 28.3 (3C), 39.5, 52.5, 56.6, 80.2, 127.1, 147.1, 155.5, 161.9, 174.6.

Boc-Gly-Thz-D-*allo*-Ile-Thz-OMe (93):



Boc-Gly-Thz-OEt se trató de acuerdo al procedimiento general de hidrólisis de ésteres proporcionando el tiazol ácido Boc-Gly-Thz-OH. Boc-D-*allo*-Ile-Thz-OMe se trató siguiendo el metodología para la desprotección de NH-Boc, para obtener la amina $\text{HCl.NH}_2\text{-D-}i\text{allo-Ile-Thz(Ser)-OMe}$. Siguiendo el procedimiento general de formación de enlace amida, a partir de $\text{HCl.NH}_2\text{-D-}i\text{allo-Ile-Thz(Ser)-OMe}$ (186 mg, 0.701 mmol) y Boc-Gly-Thz-OH (225 mg, 0.874 mmol), se obtuvo luego de la purificación por columna cromatográfica se obtuvo el producto deseado.

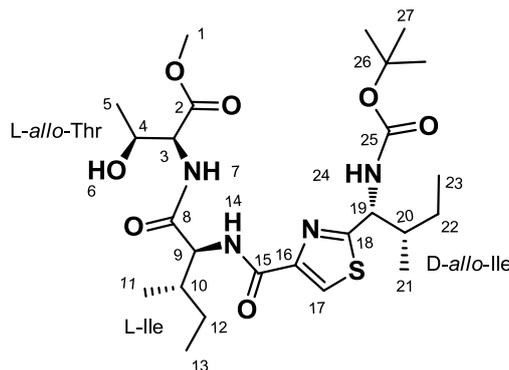
Aceite amarillento (310 mg, 94%), $R_f = 0.25$ (AcOEt:EP, 1:1), $[\alpha]_D = -31.3$ (c 0.6, MeOH). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.97 (t, $J = 7.42$ Hz, 3H₁₀), 0.99 (d, $J = 6.85$ Hz, 3H₈), 1.24–1.32 (m, 1H₉), 1.49 (m, 1H₉, 9H₂₀), 2.41–2.50 (m, 1H₇), 3.96 (s, 3H₁), 4.63 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H₁₆), 5.32–5.39 (m, 1H₁₇), 5.52 (dd, $J = 9.3$ Hz, $J = 5.6$ Hz, 1H₆), 7.93 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H₁₁), 8.08 (s, 1H₁₄), 8.11 (s, 1H₄). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) 11.5 (C₁₀), 14.3 (C₈), 26.6 (C₉), 28.3 (3C₂₀), 39.4 (C₇), 42.3 (C₁₆), 52.5 (C₁), 54.9 (C₆), 80.6 (C₁₉), 124.4 (C₁₄), 127.2 (C₄), 147.2

(C₃), 149.0 (C₁₃), 155.6 (C₁₈), 160.8 (C₁₂), 161.9 (C₂), 169.8 (C₁₅), 172.9 (C₅).

HRMS *m/z* calcd for C₂₀H₂₈N₄NaO₅S₂ (M+Na) 491.1399, observada 491.1406.

IR film $\nu(\text{cm}^{-1})$ 1169, 1219, 1246, 1267, 1325, 1345, 1367, 1483, 1535, 1662, 1720, 2878, 2932, 2969, 3055, 3121, 3329, 3345, 3385.

Boc-D-*allo*-Ile-Thz-L-Ile-L-*allo*-Thr-OMe (94):

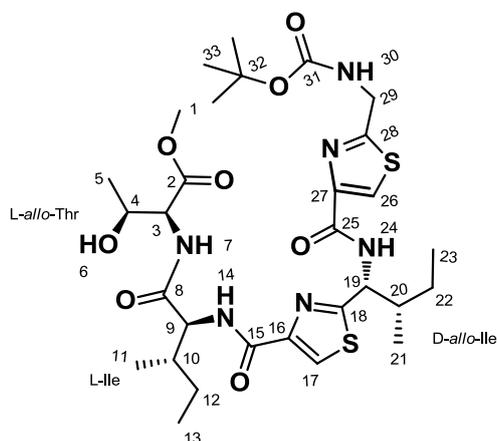


Boc-D-*allo*-Ile-Thz-OMe se trató de acuerdo al procedimiento general de hidrólisis de ésteres proporcionando el tiazol ácido Boc-D-*allo*-Ile-Thz-OH. Boc-L-Ile-L-*allo*-Thr-OMe se trató siguiendo el método A para la desprotección de NH-Boc, para obtener la amina HCl.NH₂-L-Ile-L-*allo*-Thr-OMe. Siguiendo el procedimiento general de formación de enlace amida, a partir de HCl.NH₂-L-Ile-L-*allo*-Thr-OMe (437 mg, 1.546 mmol) y Boc-D-*allo*-Ile-Thz-OH (373 mg, 1.189 mmol), se obtuvo luego de purificar por columna cromatográfica el producto deseado.

Sólido blanco (915 mg, 78%), **R_f** = 0.45 (AcOEt:EP, 7:3), **PF** 71 – 73 °C, **[α]_D** = + 20.2 (*c* 1.1, MeOH). **¹H NMR** (400MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H₁₁), 0.92 - 1.07 (m, 3H₂₁, 3H₂₃, 3H₁₃), 1.19 - 1.24 (m, 3H₅), 1.24 - 1.35 (m, 1H₁₂, 1H₂₂), 1.49 (s, 9H), 1.50 - 1.57 (m, 1H₁₂), 1.58 - 1.69 (m, 1H₂₂), 2.01 - 2.10 (m, 1H₁₀), 2.11 - 2.21 (m, 1H₂₀), 3.81 (s, 3H₁), 4.15 - 4.26 (m, 1H₄), 4.49 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H₉), 4.68 (dd, *J* = 7.7, 3.4 Hz, 1H₃), 5.02 - 5.08 (m, 1H₁₉), 5.16 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H₂₄), 7.24 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H₇), 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H₁₄), 8.08 (s, 1H₁₇). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 14.1 (C₁₁), 15.5 (C₂₁), 18.9 (C₅), 25.1 (C₁₂), 26.5 (C₂₂), 28.3 (3C₂₇), 36.9 (C₁₀), 39.8 (C₂₀), 52.4 (C₁), 56.3 (C₁₉), 58.2

(C₃), 58.3 (C₉), 68.6 (C₄), 80.2 (C₂₆), 123.7 (C₁₇), 149.1 (C₁₆), 155.5 (C₂₅), 161.4 (C₁₅), 170.4 (C₁₈), 171.6 (C₈), 173.8 (C₂).

Boc-Gly-Thz-D-*allo*-Ile-Thz(Ser)-L-Ile-L-*allo*-Thr-OMe (95):



Ruta 1:

Se realizó la hidrólisis del éster de Boc-Gly-Thz-D-*allo*-Ile-Thz-OMe siguiendo el procedimiento general. Se realizó la desprotección del N-Boc de Boc-L-Ile-L-*allo*-Thr-OMe siguiendo el procedimiento general A. El compuesto deseado se preparó a partir de la amina HCl.NH₂-L-Ile-L-*allo*-Thr-OMe (169 mg, 0.61 mmol) y del tiazol ácido Boc-Gly-Thz-D-*allo*-Ile-Thz-OH (250 mg, 0.55 mmol) siguiendo el procedimiento general de formación de enlace amida y posterior purificación por columna cromatográfica.

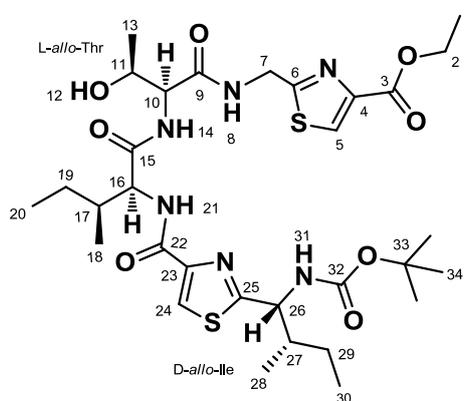
Ruta 2:

Siguiendo los procedimientos generales, se realizó la hidrólisis del éster de Boc-Gly-Thz-OMe y la N-desprotección de Boc-D-*allo*-Ile-Thz-L-Ile-L-*allo*-Thr-OMe. El compuesto deseado fue preparado a partir de la amina HCl.NH₂-D-*allo*-Ile-Thz-L-Ile-L-*allo*-Thr-OMe (107 mg, 0.23 mmol) y del ácido Boc-Gly-Thz-OH (55 mg, 0.23 mmol) siguiendo el procedimiento general de formación de enlace amida y posterior purificación por columna cromatográfica.

Aceite transparente (40 % utilizando ruta 1 ó ruta 2.), **R_f** = 0.35 (AcOEt:EP, 3:2), **[α]_D** = + 30.0 (c 0.4, MeOH), **[α]_D²⁵** = + 24.0 (c 1.15, CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.91 (t, J = 7.4 Hz, 3H₁₃), 0.98 (d, J = 6.81 Hz,

$3H_{11}$, $3H_{21}$), 1.02 (t, $J = 7.4$ Hz, $3H_{23}$), 1.23 (d, $J = 6.4$ Hz, $3H_5$), 1.26 - 1.36 (m, $1H_{12}$, $1H_{22}$), 1.48 (s, 9H), 1.64-1.52 (m, $1H_{12}$, $1H_{22}$), 2.01-1.94 (m, $1H_{20}$), 2.31-2.21 (m, $1H_{10}$), 3.80 (s, $3H_1$), 4.20 (bs, $1H_4$), 4.57-4.50 (m, $1H_9$), 4.65-4.60 (m, $2H_{29}$), 4.71-4.65 (m, $1H_3$), 5.54 (dd, $J = 9.4$, 4.6 Hz, $1H_{19}$), 5.70 (t, $J = 6.1$ Hz, $1H_{30}$), 7.34 (d, $J = 7.7$ Hz, $1H_7$), 7.87 (d, $J = 8.5$ Hz, $1H_{14}$), 8.00 (d, $J = 9.5$ Hz, $1H_{24}$), 8.09 (bs, $1H_{17}$, $1H_{27}$). **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 11.3 (C_{13}), 11.7 (C_{23}), 14.3 (C_{11}), 15.3 (C_{21}), 19.1 (C_5), 25.1 (C_{22}), 26.6 (C_{12}), 28.3 ($3C_{33}$), 37.5 (C_{10}), 40.4 (C_{20}), 42.3 (C_{29}), 52.5 (C_1), 54.7 (C_{19}), 57.9 (C_9), 58.3 (C_3), 68.4 (C_4), 80.4 (C_{32}), 124.0 (C_{27}), 124.4 (C_{17}), 148.9 (C_{26}), 149.1 (C_{16}), 155.8 (C_{31}), 161.0 (C_{25}), 161.1 (C_{15}), 169.9 (C_{28}), 170.4 (C_{18}), 171.5 (C_2). **HRMS** m/z calcd for $C_{30}H_{46}N_6NaO_8S_2$ (M+Na) 705.2716, observada 705.2738. **IR film** ν (cm^{-1}) 1055, 1169, 1267, 1367, 1491, 1535, 1649, 1719, 2878, 2934, 2970, 3055, 3385.

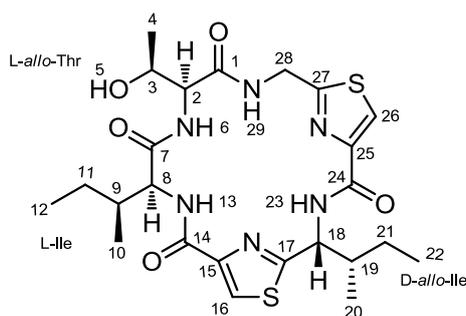
Boc-D-*allo*-Ile-Thz-L-Ile-L-*allo*-Thr-Gly-Thz-OEt (96):



Boc-D-*allo*-Ile-Thz-L-Ile-L-*allo*-Thr-OMe se trató de acuerdo al procedimiento general de hidrólisis de ésteres proporcionando el tiazol ácido Boc-D-*allo*-Ile-Thz-L-Ile-L-*allo*-Thr-OH. Boc-Gly-Thz-OEt se trató siguiendo el método A para la desprotección de NH-Boc, para obtener la amina $HCl.NH_2$ -Gly-Thz-OEt. Siguiendo el procedimiento general de formación de enlace amida, a partir de $HCl.NH_2$ -Gly-Thz-OEt (255 mg, 1.06 mmol) y D-*allo*-Ile-Thz(Ser)-L-Ile-L-*allo*-Thr-OH (465 mg, 0.88 mmol), se obtuvo luego de purificar por columna cromatográfica el producto deseado.

Aceite transparente (240 mg, 40 %). $R_f = 0.5$ (EtOAc), $[\alpha]_D = + 34.0$ (c 0.8, MeOH). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H_{18}), 1.07-0.93 (m, 3H_{20} , 3H_{28} , 3H_{30}), 1.28 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H_{13}), 1.37-1.29 (m, 1H_{29} , 1H_{19}), 1.41 (t, $J = 7.13$ Hz, 3H_1), 1.48 (s, 9H_{34}), 1.56-1.49 (m, 1H_{29} o 19), 1.72-1.63 (m, 1H_{29} o 19), 2.17-2.03 (m, 1H_{17} , 1H_{27}), 3.56 (d, $J = 3.1$ Hz, OH), 4.15 (dd, $J = 8.8$, 6.6 Hz, 1H_{16}), 4.41 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H_2), 4.49 (dd, $J = 8.7$, 1.5 Hz, 1H_{10}), 4.74-4.65 (m, 1H_7 , 1H_{11}), 4.90-4.79 (m, 1H_7), 5.06-5.00 (m, 1H_{26}), 5.13 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H_{31}), 7.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H_{14}), 7.72 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H_{21}), 7.95 (s, 1H_{24}), 8.00 (s, 1H_5), 8.31 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H_8). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) 10.8 (C_{20}), 11.6 (C_{30}), 14.1 (C_1), 14.3 (C_{18}), 15.6 (C_{28}), 19.5 (C_{13}), 25.4 (C_{19}), 26.4 (C_{29}), 28.3 (3C_{34}), 35.7 (C_{17}), 39.8 (C_{27}), 41.3 (C_7), 56.2 (C_{26}), 58.6 (C_{10}), 59.6 (C_{16}), 61.4 (C_2), 66.5 (C_{11}), 80.2 (C_{33}), 124.0 (C_{24}), 127.8 (C_5), 146.4 (C_4), 148.3 (C_{23}), 155.4 (C_{32}), 161.1 (C_3), 162.1 (C_{22}), 169.4 (C_6), 171.4 (C_{25}), 172.2 (C_9), 173.9 (C_{15}). **HRMS** m/z calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 697.3054, found 697.3074. **IR film** $\nu(\text{cm}^{-1})$ 1099, 1169, 1238, 1369, 1493, 1547, 1659, 1709, 2932, 2970, 3086, 3306.

Cyclo-Gly-L-*allo*-Thr-L-Ile-Thz-D-*allo*-Ile-Thz (97):



Ruta A

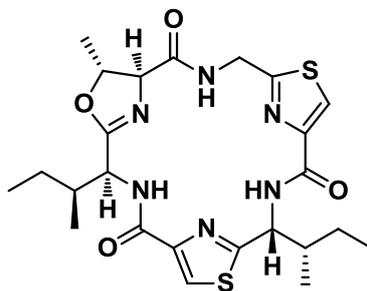
Siguiendo los procedimientos generales de hidrólisis de éster y N-desprotección, se obtuvo el aminoácido libre bis-azólico. La macrociclación se realizó siguiendo el procedimiento general, partiendo de $\text{HCl.NH}_2\text{-Gly-Thz-D-*allo*-Ile-Thz-L-Ile-L-*allo*-Thr-OH}$ (97 mg, 0.16 mmol). Luego de purificar por columna cromatográfica se obtuvo el compuesto deseado (10 mg, 12 %).

Ruta B

Siguiendo los procedimientos generales de hidrólisis de éster y N-desprotección, se obtuvo el aminoácido libre tris-azole. La macrociclación se realizó siguiendo el procedimiento general, partiendo de HCl.NH₂-D-*allo*-Ile-Thz-L-Ile-L-*allo*-Thr-Gly-Thz-OH (176 mg, 0.293 mmol). Luego de purificar por columna cromatográfica se obtuvo el compuesto deseado (64 mg, 40%).

Sólido blanco (64 mg, 40 %). **R_f** = 0.5 (AcOEt:MeOH, 10 : 0.5). **PF** = 175 – 177 °C. **[α]_D** = + 32.7 (*c* 0.6, CH₂Cl₂). **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 0.83 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H₂₀), 0.86-0.92 (m, 3H₁₀, 3H₁₂), 1.00-1.06 (m, 1H₂₁), 1.10 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H₂₂), 1.22 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H₄), 1.30-1.38 (m, 1H₂₁, 1H₁₁), 1.66-1.74 (m, 1H₁₁), 2.03-2.11 (m, 1H₁₉), 2.30-2.38 (m, 1H₉), 3.2 (s, OH), 4.40 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H₃), 4.48 (dd, *J* = 3.6, 15.4 Hz, 1H₂₈), 4.58-4.64 (m, 1H₄), 4.71 (dd, *J* = 4.3, 8.7 Hz, 1H₈), 4.98 (dd, *J* = 5.5, 15.4 Hz, 1H₂₈), 5.68 (dd, *J* = 2.6, 9.1 Hz, 1H₁₈), 7.15 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H₆), 7.33-7.38 (m, 1H₂₉), 7.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H₁₃), 8.13 (s, 1H_{26 o16}), 8.15 (s, 1H_{26 o16}), 8.26 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H₂₃). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 11.9 (C₂₂), 12.1 (C₁₂), 13.5 (C₂₀), 15.0 (C₁₀), 19.0 (C₄), 25.0 (C₂₁), 27.0 (C₁₁), 37.2 (C₉), 40.7 (C₂₈), 43.4 (C₁₉), 54.8 (C₁₈), 57.2 (C₂), 58.3 (C₈), 65.6 (C₃), 124.1 (C₁₆), 124.3 (C₂₆), 148.0 (C₁₇), 150.7 (C₂₇), 160.6 (C₁₅), 161.0 (C₂₅), 164.4 (C₇), 171.0 (C₂₄), 171.3 (C₁), 172.6 (C₁₄). **HRMS** *m/z* calcd for C₂₄H₃₄N₆NaO₅S₂ ([M+Na]⁺) 573.1930, found 573.2061. **IR film** ν(cm⁻¹) 1153, 1265, 1381, 1497, 1547, 1655, 2878, 2932, 2967, 3090, 3306, 3383.

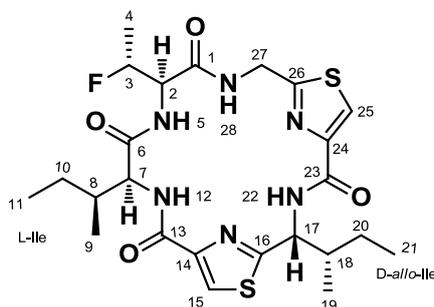
Aeruciclamida B



Aeruciclamida B se preparó a partir del macrociclo *Cyclo*-Gly-L-*allo*-Thr-L-Ile-Thz-D-*allo*-Ile-Thz (27 mg, 0.049 mmol) siguiendo el procedimiento general de ciclodeshidratación con DeoxoFluor y luego de purificar por columna cromatográfica.

Sólido blanco (18 mg, 69 %). $R_f = 0.6$ (CHCl_3 :MeOH, 10:0.8). **PF** 164 – 166 °C. $[\alpha]_D^{25} = +149.0$ (c 0.13, CH_2Cl_2). **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.06 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.14-1.30 (m, 2H), 1.36-1.48 (m, 1H), 1.60 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.63–1.77 (m, 1H), 1.99-2.09 (m, 1H), 2.09–2.18 (m, 1H), 4.31 (dd, $J_1 = 7.9$, $J_2 = 2.1$ Hz, 1H), 4.76 (dd, $J_1 = 18.0$, $J_2 = 3.6$ Hz, 1H), 4.87 (dd, $J_1 = 18.0$, $J_2 = 4.5$ Hz, 1H), 4.87 (m, 1H) 5.00 (dq, $J_1 = 7.9$, $J_2 = 6.3$ Hz, 1H), 5.71 (dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 2.9$ Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.16 (m, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.47 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.57 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H). **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, DMSO) δ ppm 0.73 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.76-0.81 (m, 6H), 0.95 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.06-1.11 (m, 2H), 1.10–1.13 (m, 2H), 1.30-1.32 (m, 1H), 1.42 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.49-1.55 (m, 1H), 1.92–2.03 (m, 2H), 4.36 (dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H), 4.62–4.69 (m, 2H), 4.86 (dd, $J_1 = 17.8$, $J_2 = 5.0$ Hz, 1H), 4.96 (dq, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 6.4$ Hz, 1H), 5.70 (dd, $J_1 = 9.2$, $J_2 = 3.3$ Hz, 1H), 8.33 (m, 1H), 8.35 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.39 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H). **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3) δ 11.9, 12.1, 14.0, 15.0, 21.8, 25.0, 26.4, 38.6, 41.2, 43.6, 52.3, 54.9, 73.5, 81.1, 123.7, 124.3, 148.5, 149.0, 159.7, 159.9, 164.9, 168.4, 169.8, 170.7. **HRMS** m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 533.2005, found 533.2042. **IR film** $\nu(\text{cm}^{-1})$ 1381, 1497, 1543, 1655, 2874, 2932, 2963, 3090, 3395.

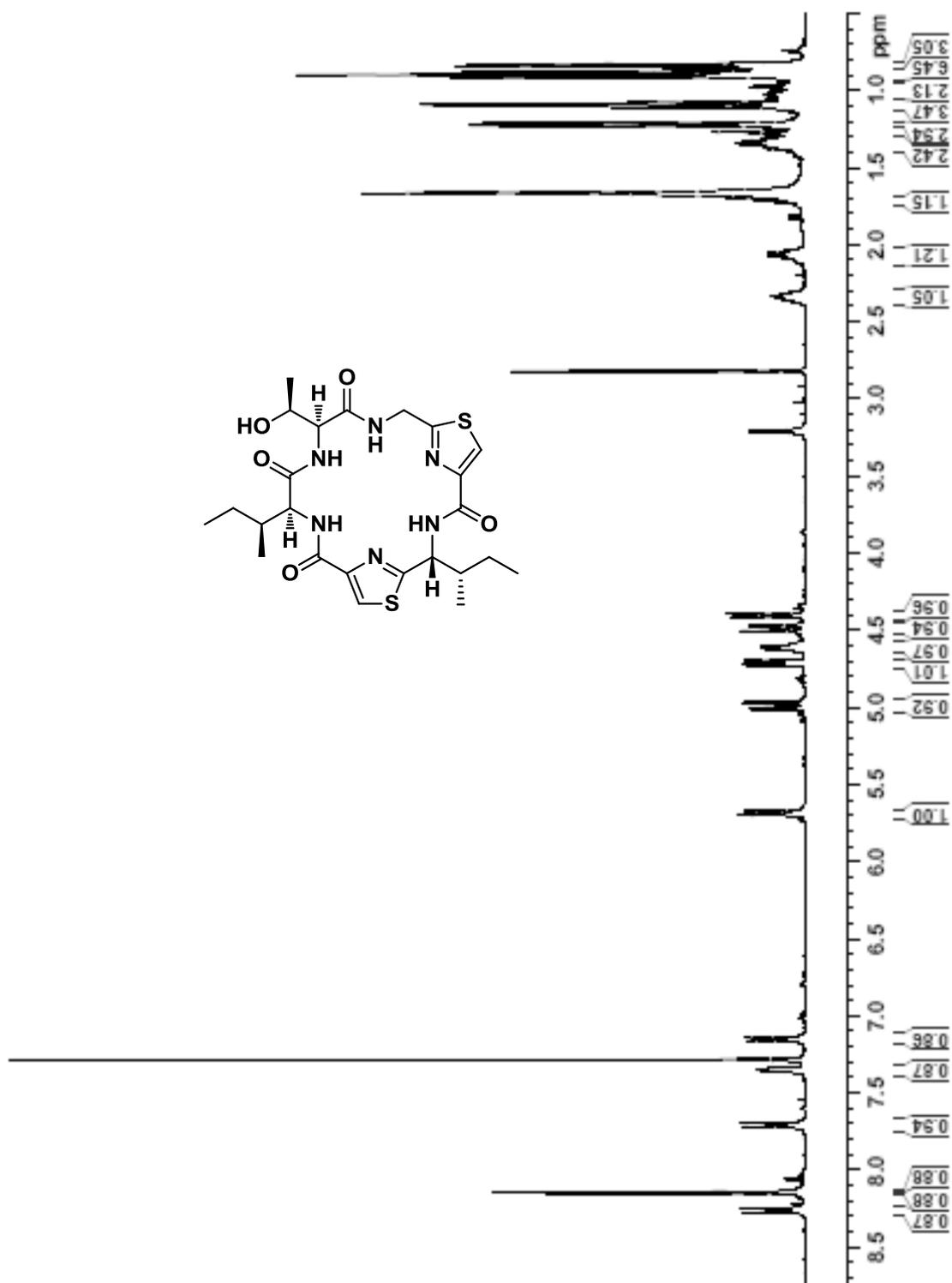
Derivado Fluorado (98):

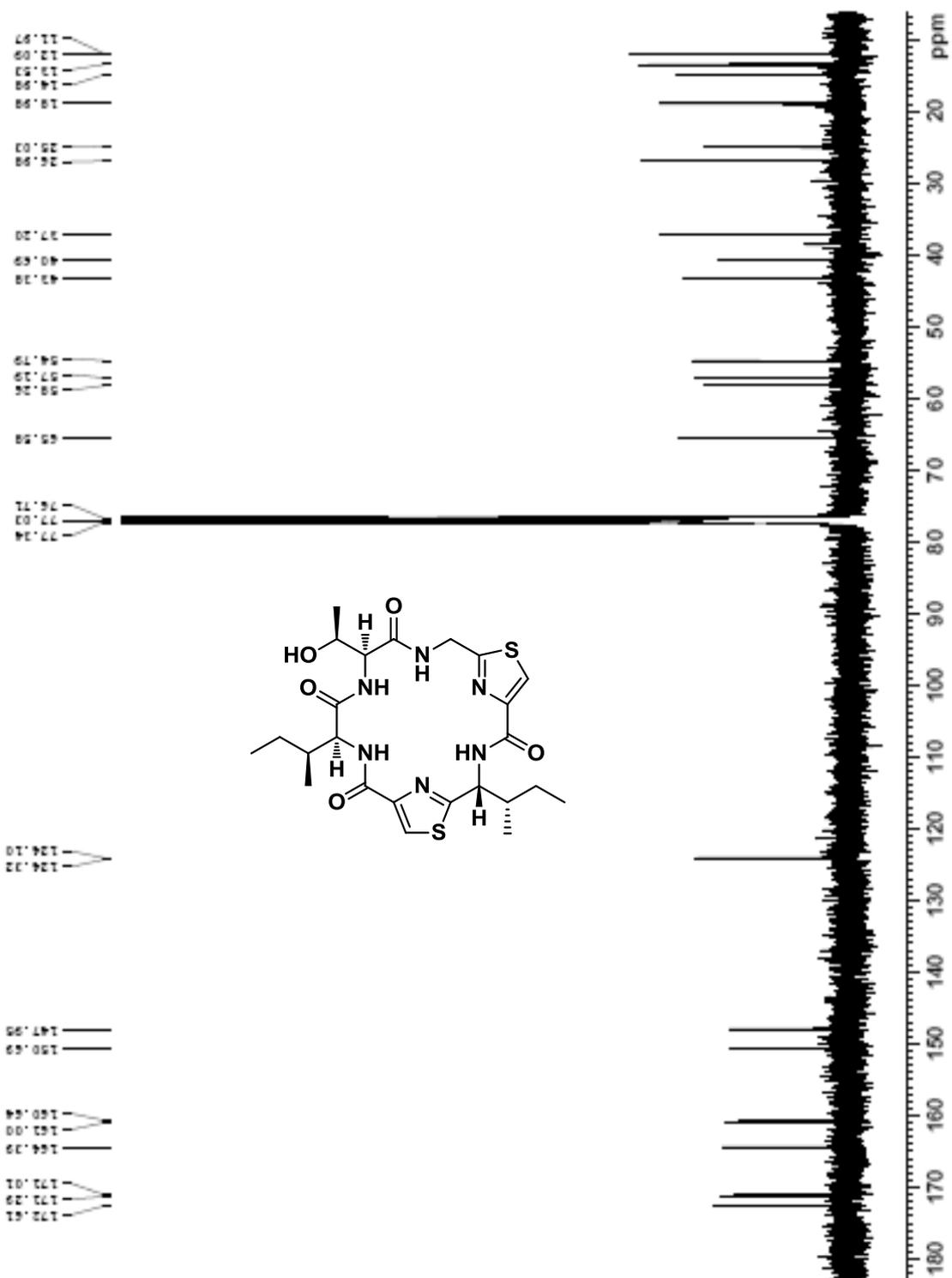


Aceite amarillento (7 mg, 28%). $R_f = 0.47$ (CHCl₃:MeOH, 10:0.8). $[\alpha]_D = +18.0$ (*c* 0.3, MeOH). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.73 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H₂₁), 0.85 (d, $J = 5.4$ Hz, 3H₉), 0.86 (d, $J = 5.5$ Hz, 3H₁₉), 1.09 (t, $J = 7.35$ Hz, 3H₁₁), 1.27-1.39 (m, 1H₁₀, 1H₂₀), 1.53 (dd, $J_1 = 24.7$ Hz, $J_2 = 6.5$ Hz, 3H₄), 1.64-1.73 (m, 1H₁₀, 1H₂₀), 2.02-2.10 (m, 1H₈), 2.34-2.44 (m, 1H₁₈), 4.68 (ddd, $J_1 = 27.7$ Hz, $J_2 = 7.7$ Hz, $J_3 = 3.2$ Hz, 1H₂), 4.73 (dd, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 4.4$ Hz, 1H₂₇), 4.81 (dd, $J_1 = 10.5$ Hz, $J_2 = 3.3$ Hz, 1H₇), 4.85 (dd, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, 1H₂₇), 4.98 (dq, $J_{\text{H-F}} = 48.3$ Hz, $J_1 = 6.5$ Hz, $J_2 = 3.2$ Hz, 1H₃), 5.71 (dd, $J_1 = 9.5$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, 1H₁₇), 6.98 (m, 1H₂₈), 7.05 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H₅), 7.55 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H₁₂), 8.15 (s, 1H₂₅), 8.18 (s, 1H₁₅), 8.21 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H₂₂). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl₃) δ 11.8 (C₂₁), 12.1 (C₁₁), 13.4 (C₉), 15.8 (C₁₉), 17.19 (d, $J = 21.9$ Hz, C₄), 23.7 (C₂₀), 26.9 (C₁₀), 37.0 (C₁₈), 40.8 (C₂₇), 43.2 (C₈), 54.7 (C₁₆), 57.6 (C₇), 57.8 (d, $J = 19.7$ Hz, C₂), 89.9 (d, $J = 171.5$ Hz, C₃), 124.2 (C₂₅), 124.8 (C₁₅), 147.5 (C₁₆), 149.5 (C₂₆), 160.5 (C₁₄), 161.1 (C₂₄), 165.1 (C₆), 167.3 (C₁), 171.0 (C₁₃), 171.8 (C₂₃). **HRMS** m/z calcd for C₂₄H₃₄FN₆O₄S₂ ([M+H]⁺) 553.1989, found 553.1995. **IR film** $\nu(\text{cm}^{-1})$ 1153, 1238, 1265, 1381, 1493, 1547, 1659, 2875, 2928, 2963, 3086, 3291, 3383.

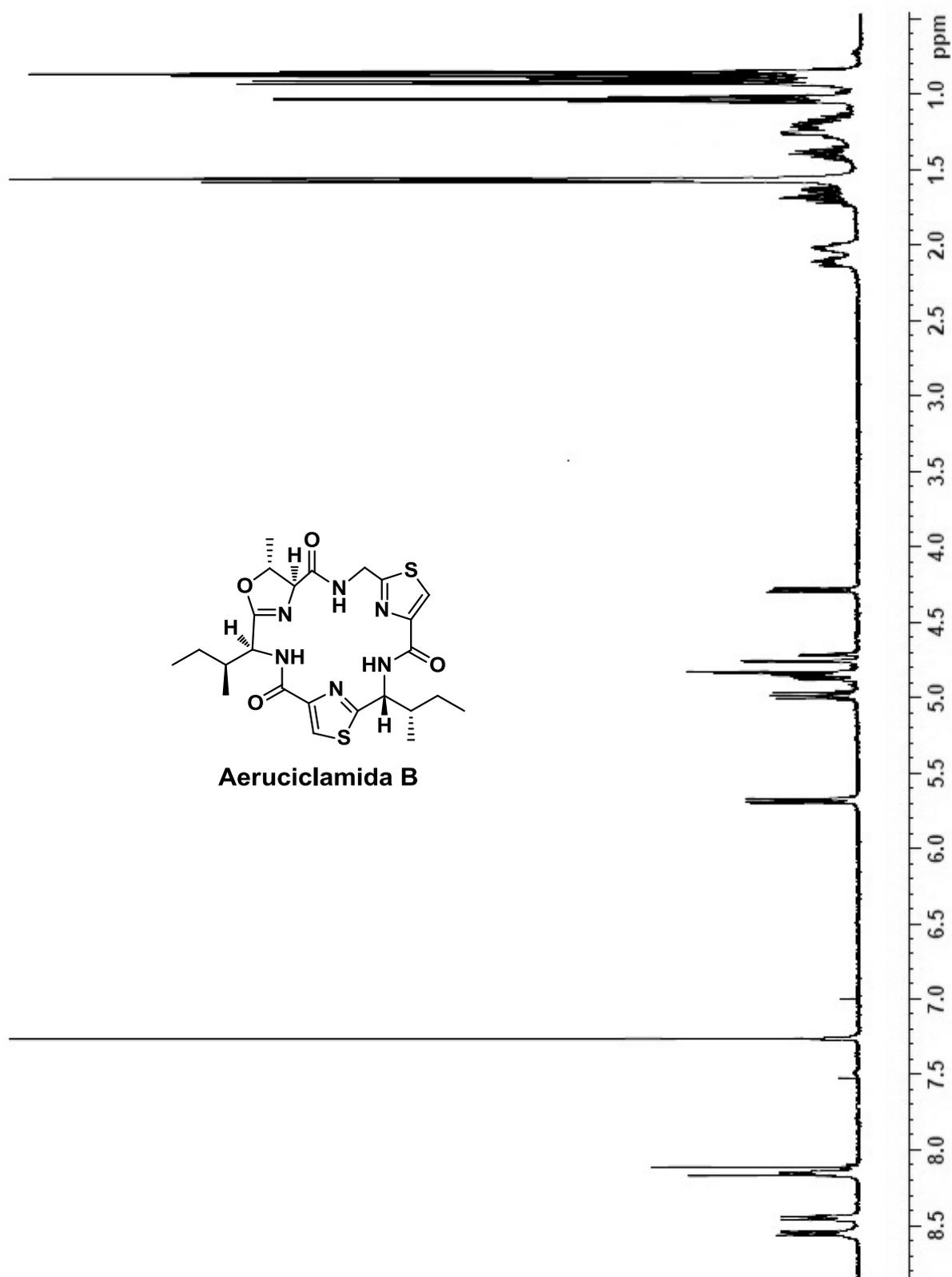
6.6 ESPECTROSCOPIA

Cyclo-Gly-L-allo-Thr-L-Ile-Thz-D-allo-Ile-Thz (97):

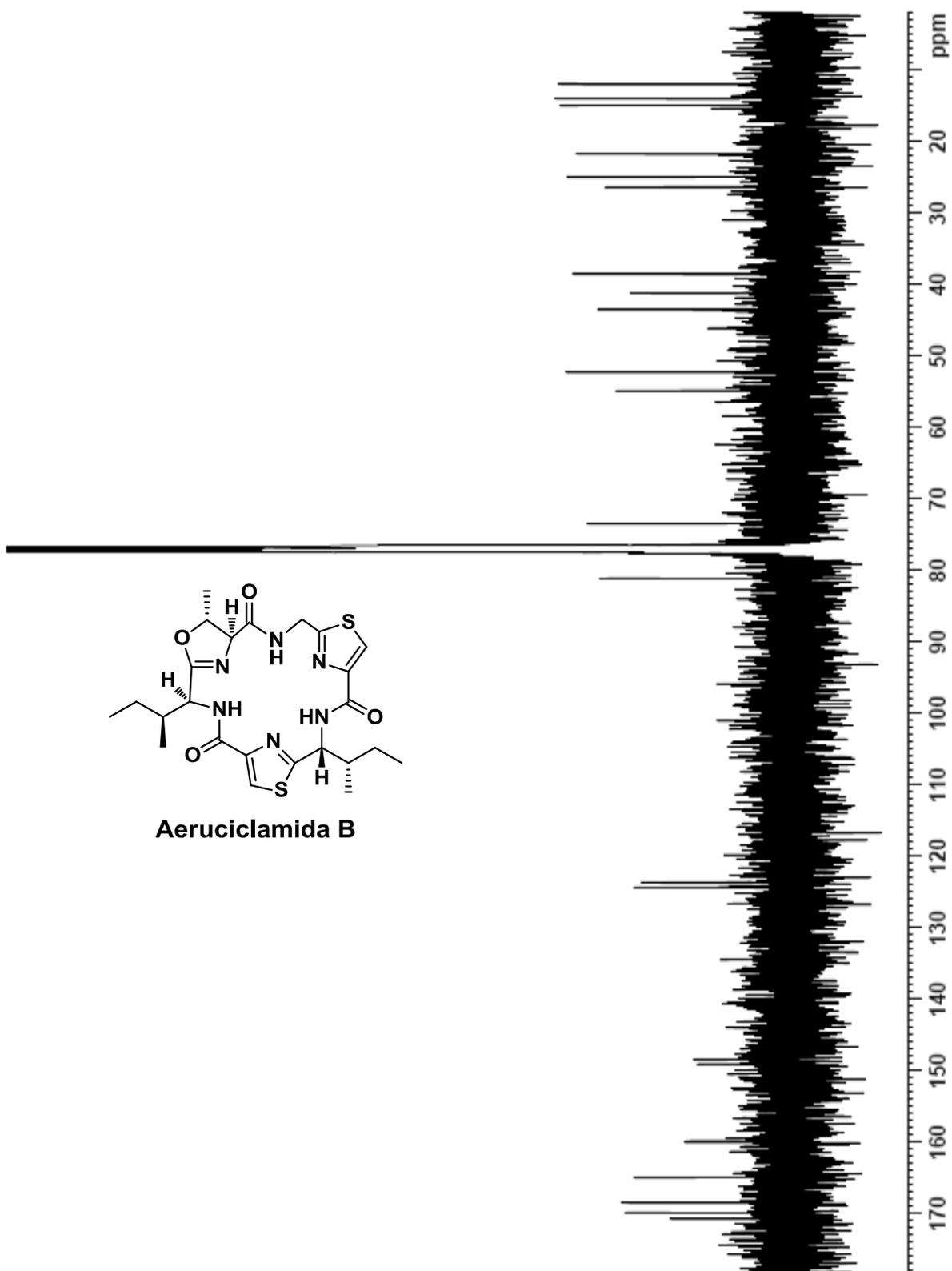




Aeruciclamida B

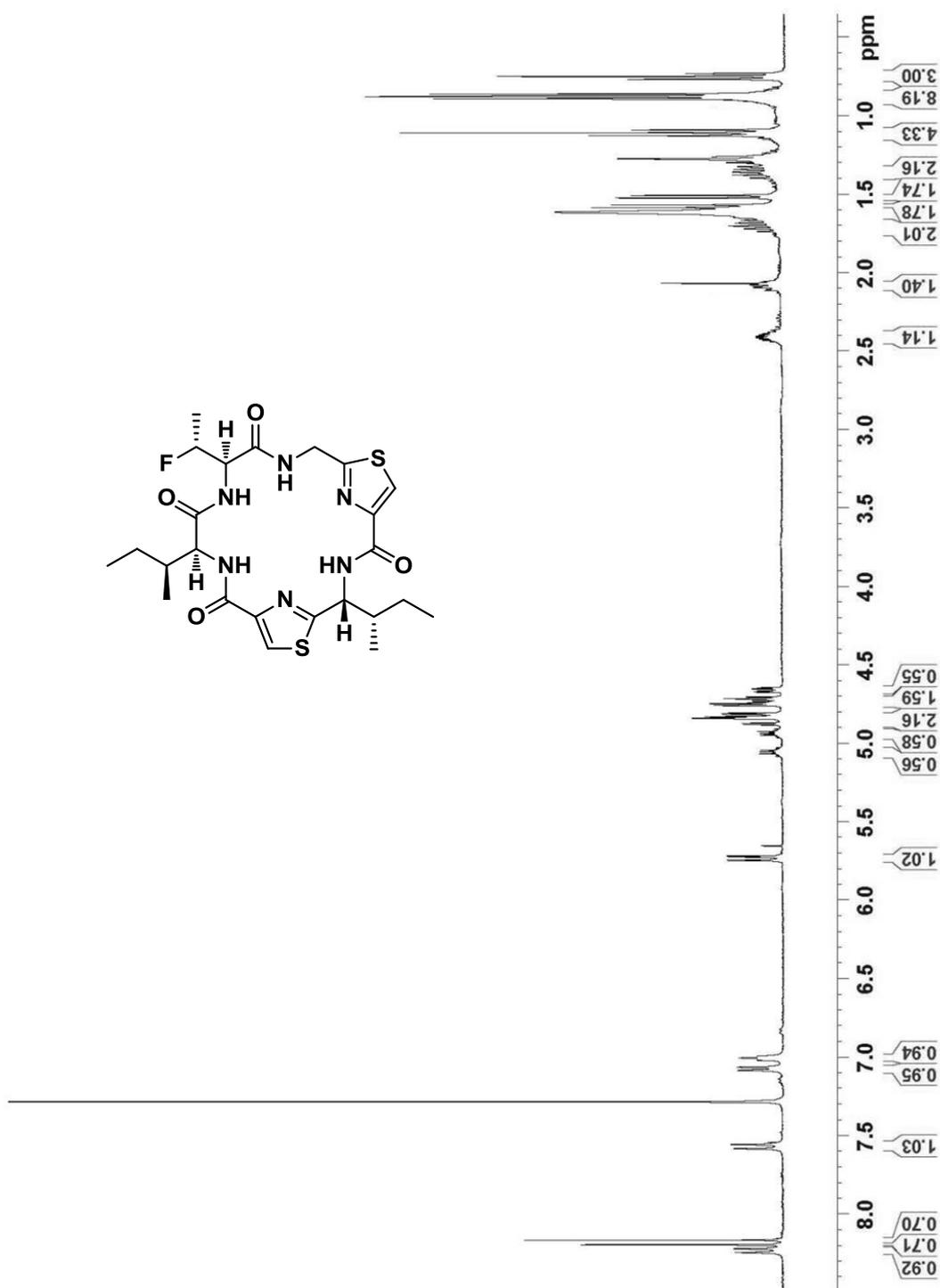


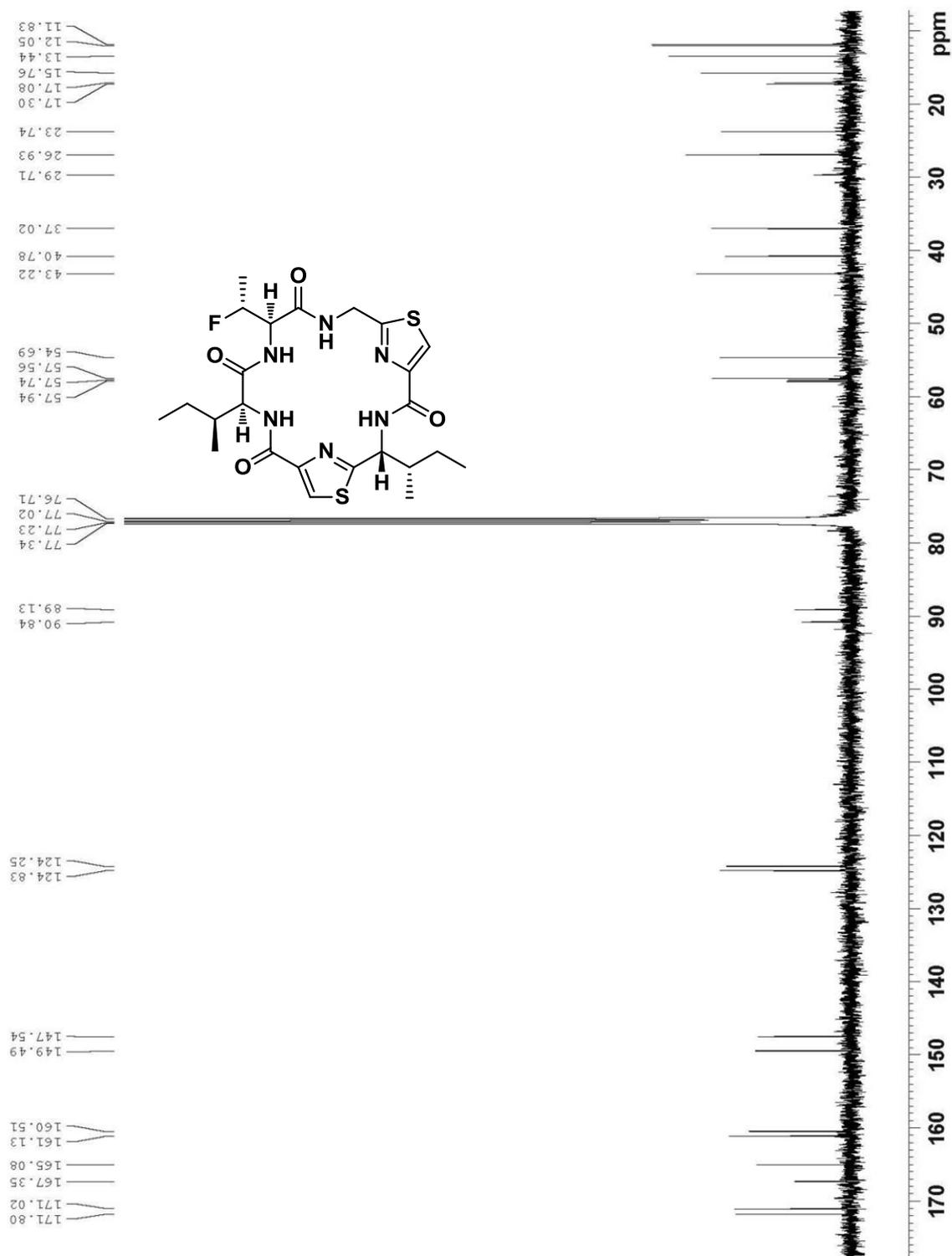
Aeruciclamida B



Aeruciclamida B

Derivado Fluorado (98):





Capítulo 7

EVALUACIÓN BIOLÓGICA

7.1 INTRODUCCIÓN

Dentro de nuestra búsqueda de compuestos análogos a Aeruciclamidas con potenciales actividades quimioterápicas, es que se realizaron los ensayos preliminares *in vitro* para determinar cuáles de los compuestos obtenidos presentan actividad biológica. Para esto se realizaron los estudios de actividad antiparasitaria *in vitro* sobre *Plasmodium falciparum* K1 (Cloroquina resistente) y *Trypanosoma brucei brucei*. A su vez, también se plantearon ensayos *in vitro* de inhibición de crecimiento frente a diversas líneas celulares de tumores humanos (MCF-7 y HT29) y estudio de actividad antihelmíntica *in vitro* frente al nemátodo *Nippostrongylus brasiliensis*. Se realizaron ensayos de citotoxicidad en macrófagos murinos (línea celular J774) con el fin de estudiar los índices de selectividad para cada parásito.

Actividad anti-malárica

El Prof. Simon Croft y la Dra. Vanessa Yardely directores del Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine¹ dirigieron los ensayos de actividad contra *P. falciparum*.

Las actividades antimaláricas de los compuestos mostrados en la Tabla 7.1 fueron determinadas *in vitro* contra la cepa K1 resistente a la Cloroquina de *P. falciparum*, usando la incorporación de [³H]-hipoxantina reportada por Desjardins y colaboradores.² Como controles positivos se utilizaron Cloroquina y Artemisinina. Los compuestos fueron evaluados en el estadio asexuado del parásito dentro los glóbulos rojos humanos (ver Figura 1.4).

¹ Faculty of Infectious & Tropical Disease at the London School of Hygiene & Tropical Medicine, LSHTM, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK.

² R. E. Desjardins, C. J. Canfield, D. E. Haynes and J. D. Chulay, Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1979**, *16*, 710–718.

Actividad anti-tripanosoma brucei:

Los ensayos de actividad biológica contra *Trypanosoma brucei brucei* fueron realizados en el Institut Pasteur de Montevideo por la Dra. Andrea Medeiros bajo la dirección del Dr. Marcelo Comini.³

Los compuestos mostrados en la Tabla 7.2 fueron evaluados *in vitro* contra la forma infectiva de *T. b. brucei*, el agente etiológico de la enfermedad Nagana del ganado, que es un modelo adecuado de laboratorio de las especies que causan HAT. Como controles positivos se utilizó azul de metileno y nifurtimox.

Actividad anti-helmíntica

El ensayo “*in vitro*” contra *Nippostrongylus brasiliensis* es un modelo utilizado para screening primario de compuestos con actividad antihelmíntica. Se utiliza el nematodo *N. brasiliensis* en su estadio parasitante L4 según el protocolo reportado por Gordon y colaboradores.⁴ Los ensayos fueron realizados por la Dra. Jenny Saldaña del Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de la Facultad de Química. Los medios de cultivo y el protocolo experimental para la preparación de los parásitos han sido previamente descritos por Jenkins y colaboradores.⁵ Como control positivo se utilizó Albendazol.

Citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares de cáncer: MCF-7 (adenocarcinoma mamario) y HT29 (adenocarcinoma de colon) fueron realizados por la Dra. Andrea Medeiros en el Institut Pasteur Montevideo.³

Como controles positivos se utilizó Docetaxel para las células MCF-7 y Mitomicina para las células HT29.

³ Group Redox Biology of Trypanosomes, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, CP 11400, Montevideo, Uruguay

⁴ Gordon, S.; Costa, L.; Incerti, M.; Manta, E.; Saldaña, J.; Domínguez, L.; Mariezcurrena, R.; Suescum, L. “Synthesis and *in vitro* antihelmintic activity against *Nippostrongylus brasiliensis* of new 2-amino-4-hidroxy- δ -valerolactam derivatives”. *Il Farmaco* 1997, 52 (10), 603

⁵ Jenkins, D.; Armitage, R.; Carrington, T. Z. *Parasitenkd.* 1980, 63, 261.

Índice de Selectividad

La selectividad de los compuestos fue evaluada en macrófagos murinos (línea celular J774) por la Dra. Andrea Medeiros en el Institut Pasteur Montevideo.³

El índice de selectividad se define como:

EC_{50} macrófagos murinos / EC_{50} Agente en estudio

7.2 DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Actividad anti-malárica

Los resultados de actividad biológica antimalárica se encuentran resumidos en la tabla 7.1.

Los compuestos más activos contra la cepa resistente de *P. falciparum* K1 que presentan un IC_{50} menor que Aeruciclámid B son los macrociclos **71**, **81**, **82**, **83** y **97**. A su vez, estos compuestos no presentaron toxicidad en macrófagos murinos, con índices de selectividad mayores a 240. Los compuestos **71**, **82**, **83** y **97** son más bioactivos que los productos naturales en cuestión, pero son menos potentes que la Artemisinina usada como control positivo. Sin embargo, en el 2012, luego de la divulgación de la síntesis y de la actividad antimalárica del compuesto **71**,⁶ este fue catalogado como "hit" en la Química Medicinal contra malaria, dada su buen EC_{50} y su alto índice de selectividad.⁷

El compuesto **81**, presenta una actividad antimalárica 28 veces mayor que Artemisinina ($EC_{50} = 0.02 \mu\text{m}$) y 257 veces mayor que **71**, por lo que podemos catalogarlo como el líder del grupo de compuestos obtenidos en este trabajo.

Al comparar los compuestos **78** y **79**, se observa que la actividad disminuye casi 3 veces al cambiar D-Ile por L-Ile.

Los macrociclos **76** y **77** presentan actividad antiplasmódica muy similar a **7** pero para el caso de **76** el índice de selectividad es considerablemente menor.

⁶ Peña, S.; Scarone, L.; Manta, E.; Stewart, L.; Yardley, V.; Croft, S.; Serra, G. Synthesis of a Microcystis Aeruginosa Predicted Metabolite with Antimalarial Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4994–4997.

⁷ <http://www.malarianexus.com/articles/synthesis-of-a-microcystis-aeruginosa-predicted-metabolite-with>

Comparando los IC₅₀ de los compuestos que contienen tres heterociclos, destacamos el impacto negativo que tiene la ausencia del grupo metilo en el oxazol presente en **71**, disminuyendo tres veces la potencia contra *P. falciparum* K1 y aumentando dos veces la citotoxicidad en macrófagos murinos. Además, la sustitución de un anillo de tiazol por su isómero oxazol (compuesto **75**) disminuye casi seis veces la actividad antiplasmódica. En contraste, al cambiar el residuo Gly-Thz presente en **75** por L-Ile-Oxazol (**77**), la actividad es mejorada en cinco veces.

Comparando los compuestos **71** y **97** podemos concluir que la presencia de un anillo de 5-metil oxazol y una L-Ile en vez de L-*allo*-Thr y D-*allo*-Ile respectivamente, poseen el mismo efecto en la actividad antiplasmódica. En contraste, la Aeruciclámida B sintética es diez veces menos activa que su precursor macrocíclico. Estos resultados sugieren que ciclohexapéptidos más flexibles conteniendo al menos dos azoles, como el **97**, pueden presentar buenas actividades antimaláricas al igual que los macrociclos tris-azólicos.

Cabe destacar, que la sustitución del grupo alcohol presente en **97** por un fluoruro en **98** disminuye casi 140 veces la actividad antiparasitaria.

Uno de los macrociclos más activos de este trabajo es el ciclopéptido **82** que difiere de **78** por la presencia del residuo Gly-Thz en lugar de su precursor Gly-L-Cys(Trt) y en la configuración absoluta de uno de los residuos de Cys(Trt), **82** es diez veces más activo que **78** frente a *P. falciparum* K1.

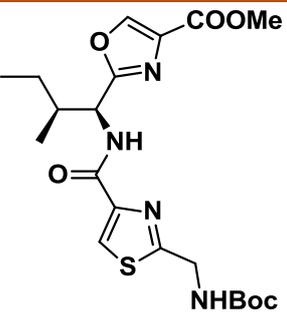
Los péptidos no azólicos sintetizados (exceptuando el hexapéptido N-Me **81**) no presentan actividad sub-micromolar, lo cual puede sugerir la relevancia de los residuos azólicos en la actividad antiplasmódica.

De la evaluación biológica de los bis-heterociclos y tris-heterociclos se observa la importancia de la estructura macrocíclica en la actividad biológica. Ninguno de los precursores bis o tris- azólicos presentó mejor actividad que sus respectivos macrociclos. Tal es el caso del bis-tiazol **93** y tris-azol **95** precursores de Aeruciclámida B que presenta una actividad biológica considerablemente menor que su respectivo macrociclo **97**. Por lo que, en este caso, podemos suponer que lo que rige la actividad biológica en la Aeruciclámida B es la estructura macrocíclica y que este compuesto no presenta

un farmacóforo que determine su actividad biológica. Una situación similar se puede observar en el precursor abierto **57** del compuesto **71**, donde luego de desproteger y macroclicar, la actividad antiplasmódica aumentó más de nueve veces.

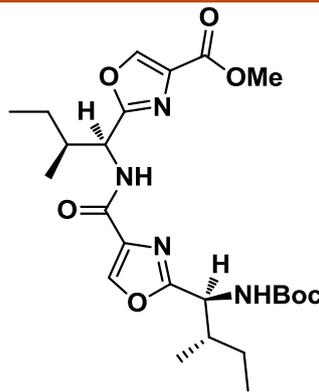
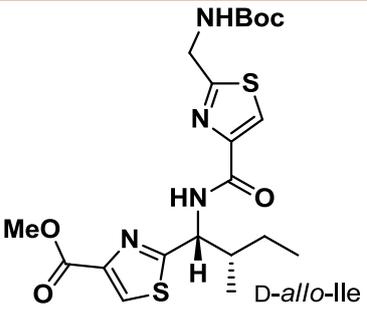
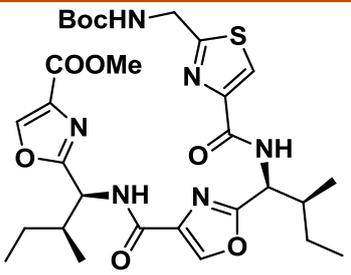
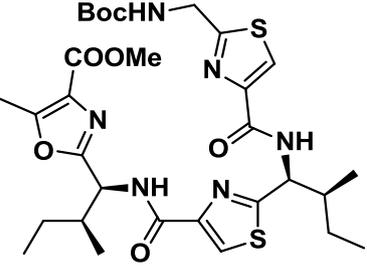
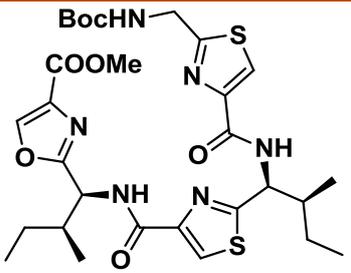
A su vez, se puede observar que la ciclación del residuo Thr-Ile no es tan relevante en la actividad contra *P. falciparum*, dado que el compuesto **97** ($EC_{50} = 0.18 \mu\text{M}$) es más activo que la Aeruciclamida B aislada por Gademan ($EC_{50} = 0.7 \mu\text{M}$) y que la Aeruciclamida B sintética ($EC_{50} = 1.84 \mu\text{M}$). Algo similar sucede con las Balgaciclámidas A (**4**) y B (**5**) las cuales muestran actividad micromolar (IC_{50} de 9,0 y 8,2 μM , respectivamente).⁸ Los autores señalaron que la apertura del anillo de oxazolina en **4** para dar **5** no resultó en una pérdida significativa de la bioactividad.

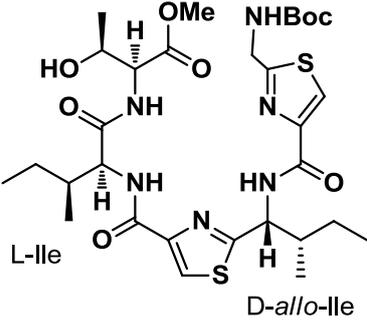
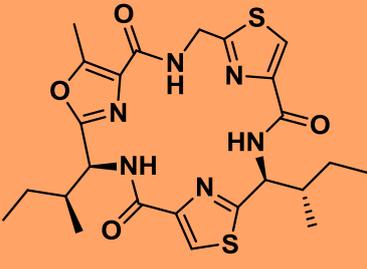
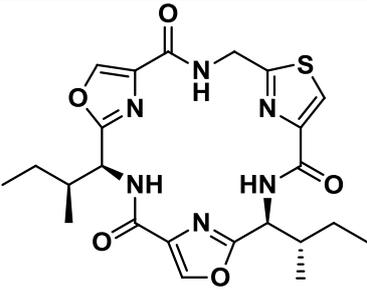
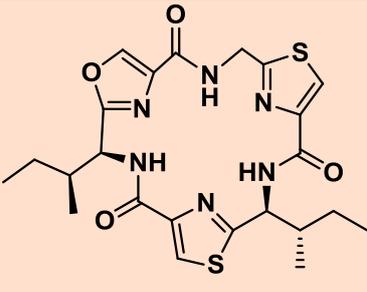
Tabla 7.1 Actividad antimalárica *in vitro*

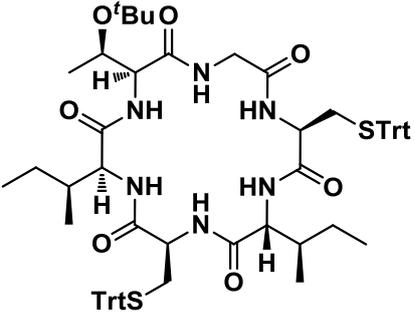
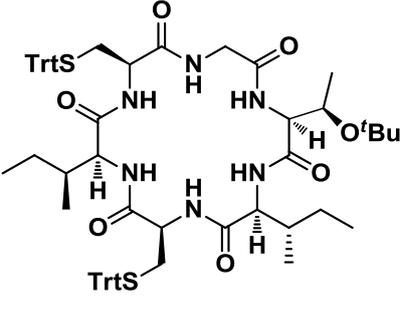
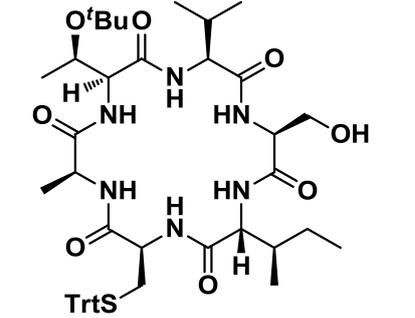
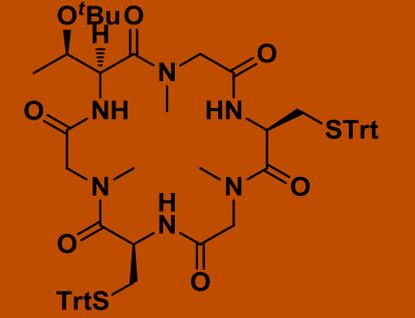
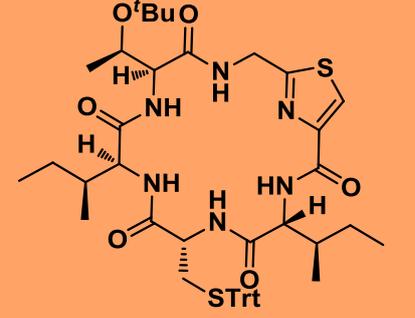
Compuestos sintetizados	N°	<i>P. falciparum</i> <i>K1</i> EC_{50} (μM)	Macrófagos Murinos EC_{50} (μM)	I.S. ⁹
Bis-building blocks				
	53	34.21	ND	ND

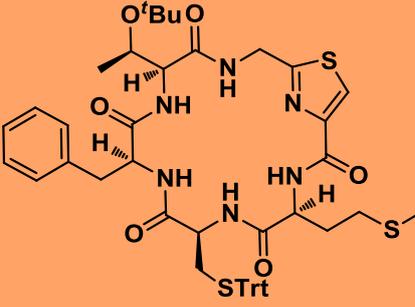
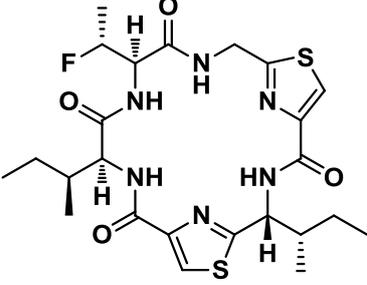
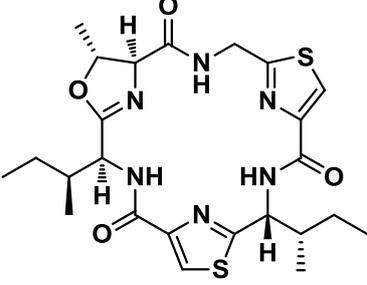
⁸ Portmann, C.; Sieber, S.; Wirthensohn, S.; Blom, J. F.; Da Silva, L.; Baudat, E.; Kaiser, M.; Brun, R.; Gademann, K. Balgacyclamides, Antiplasmodial Heterocyclic Peptides from *Microcystis Aeruginosa* EAWAG 251. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 557–562.

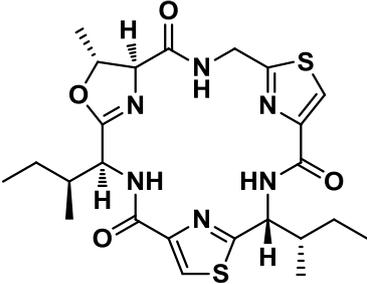
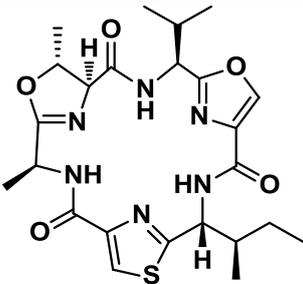
⁹ Índice de selectividad: EC_{50} macrófagos murinos / EC_{50} *P. falciparum*

	<p>55</p>	<p>2.36</p>	<p>>100</p>	<p>>10</p>
	<p>93</p>	<p>8.04 ± 1.18</p>	<p>>100</p>	<p>>12</p>
<p>Tris-building blocks</p>				
	<p>56</p>	<p>44.39</p>	<p>ND</p>	<p>ND</p>
	<p>57</p>	<p>1.69</p>	<p>915 ± 20</p>	<p>541</p>
	<p>58</p>	<p>3.55</p>	<p>ND</p>	<p>ND</p>

<p>L-<i>allo</i>-Thr</p>  <p>L-Ile</p> <p>D-<i>allo</i>-Ile</p>	<p>95</p>	<p>1.15</p>	<p>>100</p>	<p>>87</p>
<p>Macrociclos</p>				
	<p>71</p>	<p>0.18 ± 0.02</p>	<p>>100</p>	<p>> 556</p>
	<p>75</p>	<p>3.7 ± 0.1</p>	<p>ND</p>	<p>ND</p>
	<p>76</p>	<p>0.6 ± 0.02</p>	<p>48.8 ± 0.1</p>	<p>79</p>
	<p>77</p>	<p>0.80 ± 0.02</p>	<p>>100</p>	<p>>125</p>

	78	1.97 ± 0.08	87.4 ± 3.8	44
	79	5.75	>100	>17
	80	1.00 ± 0.02	>100	>100
	81	0.0007	>100	>142857
	82	0.19 ± 0.03	>100	>526

	<p>83</p>	<p>0.41 ± 0.02</p>	<p>>100</p>	<p>>244</p>
	<p>97</p>	<p>0.18 ± 0.01</p>	<p>>100</p>	<p>>588</p>
	<p>98</p>	<p>24.85 ± 0.09</p>	<p>ND</p>	<p>ND</p>
	<p>Aer uB sin- tética</p>	<p>1.84 ± 0.3</p>	<p>ND</p>	<p>ND</p>
<p>Control Positivo</p>				
<p>Cloroquina</p>	<p>--</p>	<p>0.47</p>	<p>---</p>	<p>---</p>
<p>Artemisinina</p>	<p>--</p>	<p>0.02</p>	<p>---</p>	<p>---</p>

	7	0.7	120	171
	8	2.3	106	46

Ensayos 'in vivo'

Dada la interesante actividad biológica contra *P. falciparum* del compuesto **71**, se repitió la síntesis a mayor escala con el fin de realizarle ensayos *'in vivo'*. Desafortunadamente este compuesto no fue soluble en las condiciones requeridas para el ensayo *in vivo*, por lo que no fue posible vehicularlo para su administración en animales.

Nota:

Los resultados de actividad biológica del macrociclo **81** fueron recibidos 15 días antes de entregar la tesis al tribunal.

Actividad anti-tripansomal

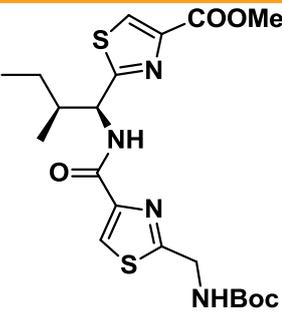
Los resultados de actividad en *T. b. brucei* se encuentran resumidos en la tabla 7.2.

Los macrociclos más potentes contra *T. b. brucei* son los macrociclos **78**, **79**, **81**, **82** y **83** siendo más potentes y selectivos que Nifurtimox ($EC_{50} = 13 \mu M$, $SI = 13$). Los macrociclos **76** y **97** presentan una actividad moderada contra *T.b. brucei*, del orden de las Aeruciclámidas B y C.

Para *T.b. brucei*, los valores más altos se observaron en los macrociclos sin residuos azólicos **78**, **79** y **81** o con un solo residuo tiazólico **82** y **83**.

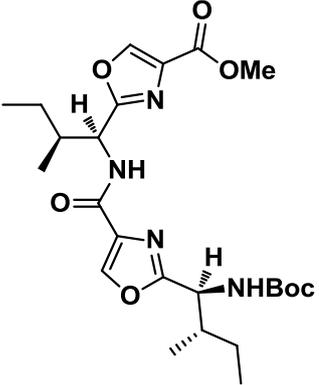
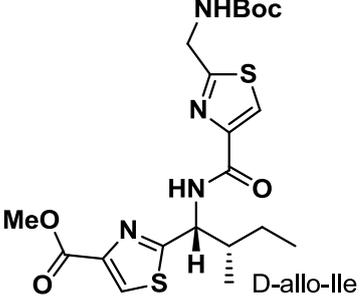
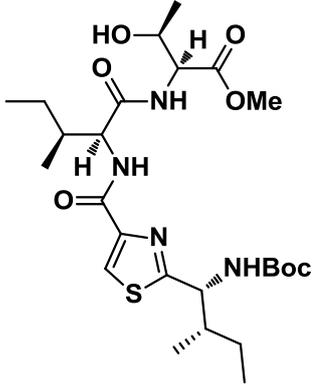
Se vuelve a observar la importancia de la macrociclación en la actividad anti-tripanosomal como ocurría con la actividad contra *P. falciparum*, salvo para el caso de **57** donde la actividad anti-brucei es mejor en el precursor abierto (**57**) que en el macrociclo correspondiente (**71**).

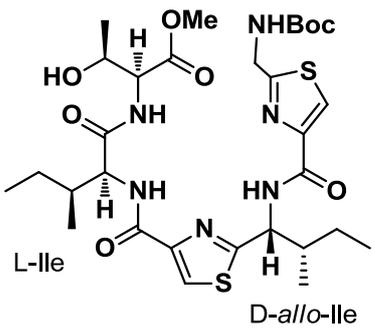
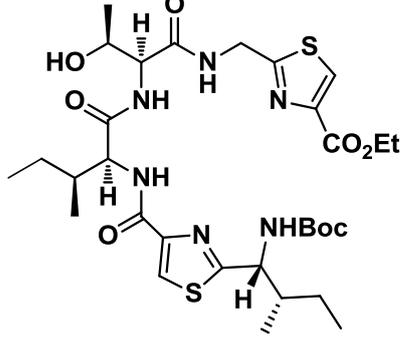
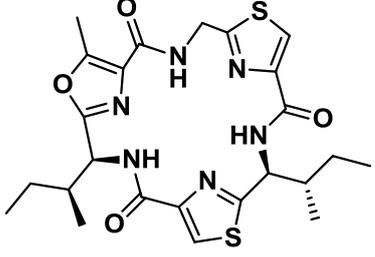
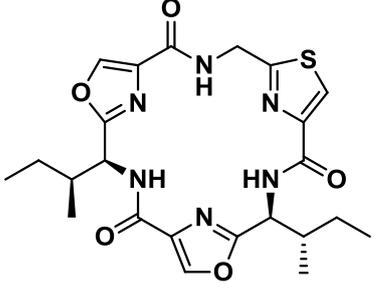
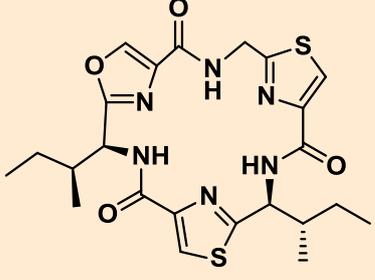
Tabla 7.2 Actividad anti-HAT *in vitro*.

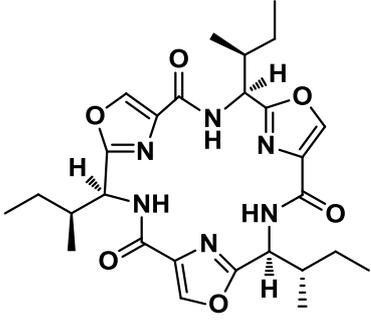
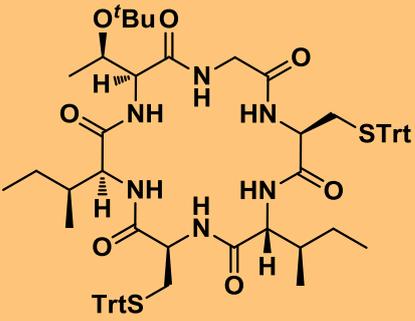
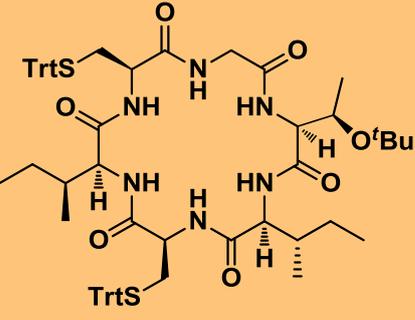
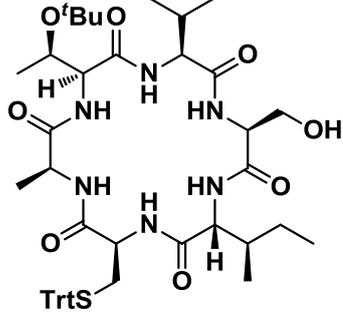
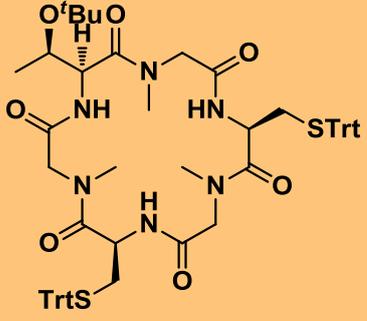
Compuestos sintetizados	N°	<i>T. b.</i>	Macrófagos	I.S ₁₀
		<i>brucei</i>	Murinos	
		EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	
Bis-building blocks				
	54	$> 25^{11}$	>100	> 4

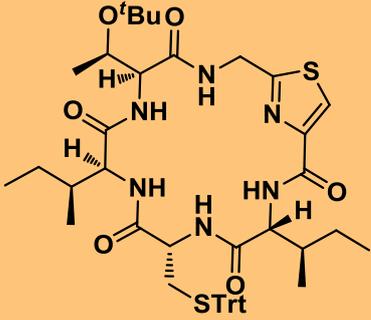
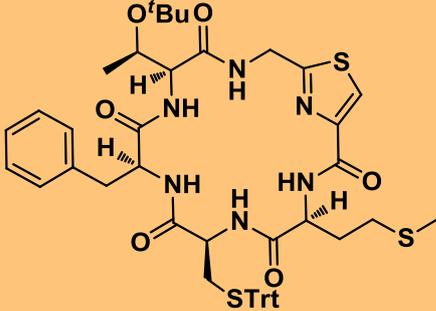
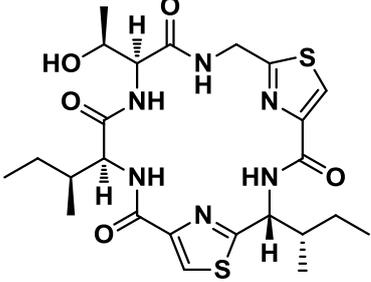
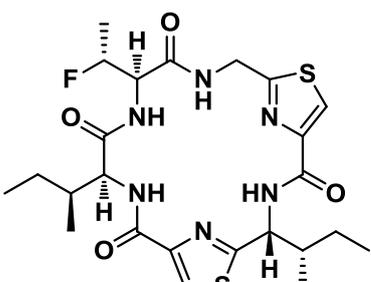
¹⁰ Índice de selectividad 1: EC_{50} macrófagos murinos / EC_{50} *T. b. brucei*

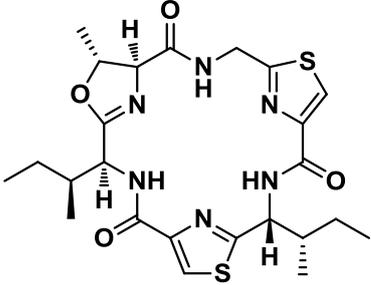
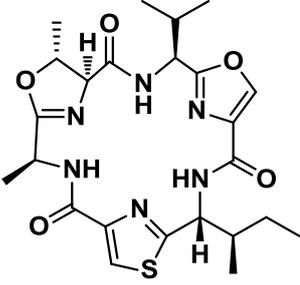
¹¹ Se determinó el % de citotoxicidad celular que para estos casos fue menor al 50% a una concentración de 25 μM .

	<p>55</p>	<p>$> 25^{11}$</p>	<p>>100</p>	<p>>4</p>
	<p>93</p>	<p>$>25^{11}$</p>	<p>>100</p>	<p>>4</p>
	<p>94</p>	<p>$> 25^{11}$</p>	<p>ND</p>	<p>ND</p>
<p>Tris-building blocks</p>				
	<p>57</p>	<p>6.0 ± 1.3</p>	<p>915 ± 20</p>	<p>150</p>

<p>L-<i>allo</i>-Thr</p>  <p>L-Ile</p> <p>D-<i>allo</i>-Ile</p>	<p>95</p>	<p>15.2</p>	<p>>100</p>	<p>>6.5</p>
	<p>96</p>	<p>>25¹¹</p>	<p>ND</p>	<p>ND</p>
<p>Macrociclos</p>				
	<p>71</p>	<p>>25¹¹</p>	<p>>100</p>	<p>>4</p>
	<p>75</p>	<p>>25¹¹</p>	<p>ND</p>	<p>ND</p>
	<p>76</p>	<p>11.4 ± 0.2</p>	<p>48.8 ± 0.1</p>	<p>4</p>

	<p>77</p>	<p>$>25^{11}$</p>	<p>>100</p>	<p>>4</p>
	<p>78</p>	<p>1.06 ± 0.01</p>	<p>87.4 ± 3.8</p>	<p>82</p>
	<p>79</p>	<p><5</p>	<p>>100</p>	<p>>20</p>
	<p>80</p>	<p>23.8 ± 1.5</p>	<p>>100</p>	<p>>4</p>
	<p>81</p>	<p><5</p>	<p>>100</p>	<p>>20</p>

	<p>82</p>	<p>3.0 ± 0.1</p>	<p>>100</p>	<p>>33</p>
	<p>83</p>	<p>2.8 ± 0.2</p>	<p>>100</p>	<p>>36</p>
	<p>97</p>	<p>14.5 ± 1.2</p>	<p>>100</p>	<p>>7</p>
	<p>98</p>	<p>$>25^{11}$</p>	<p>ND</p>	<p>ND</p>
<p>Control Positivo</p>				
<p>Azul de metileno</p>	<p>--</p>	<p>0.400</p>	<p>---</p>	<p>---</p>
<p>Nifurtimox</p>		<p>13.0</p>	<p>169</p>	<p>13</p>

Aeruciclamidas aisladas		<i>T.b. rhodesiense</i> ⁹	Células de mioblastos L6 de rata ⁹	IS ¹²
	7	15.9	120	7.6
	8	9.2	106	11.2

Ensayos 'in vivo'

Dada la interesante actividad biológica contra *T. b. brucei* del compuesto **78**, este se sintetizó en mayores cantidades para poder realizarle ensayos '*in vivo*'. Desafortunadamente este compuesto no es soluble en los solventes y a las concentraciones necesarias para el ensayo *in vivo*.

¹² Índice de selectividad: EC₅₀ Células de mioblastos L6 de rata / EC₅₀ *T. b. rhodesiense*

N. brasiliensis

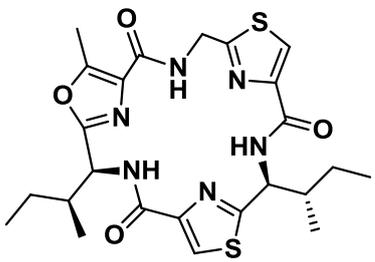
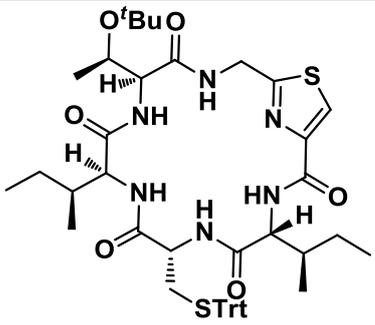
Se realizó el *screening* primario con una única concentración y se estudió el porcentaje de muerte de los nematodos. En la tabla 7.3, se presentan las diluciones evaluadas y los porcentajes de muerte respectivos. Los compuestos no presentaron porcentajes de muerte significativos para las concentraciones evaluadas por lo que no se continuó con los estudios en *N. brasiliensis*. A los compuestos **71** y **82** se les determinó el EC₅₀, Tabla 7.4. Los resultados obtenidos muestran una actividad anti-helmíntica 100 veces menor que el Albendazol.

Tabla 7.3

Producto	Concentración (mM)	% de muerte
Bis-building block		
54	0.13	53.3
55	0.13	30.4
93	0.13	36.7
94	0.12	72.1
Tris-building block		
56	0.11	42.05
57	0.12	36.4
58	0.11	37.4
95	0.12	33.9
96	0.11	19.8
Macro ciclo		
75	0.12	77.6
76	0.12	67.7
78	0.03	54.2
80	0.04	47.6
83	0.04	54.9

97	0.11	52.4
Albendazol	0.00034	50

Tabla 7.4

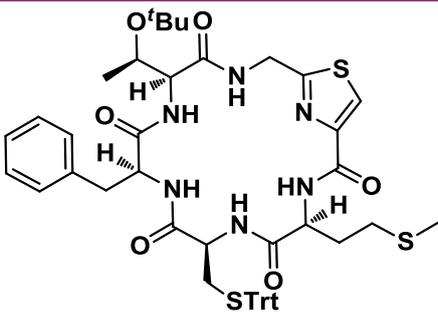
Compuestos sintetizados	N°	<i>N. brasiliensis</i>	Macrófagos Murinos	I.S ₁₃
		EC ₅₀ (mM)	EC ₅₀ (μM)	
	71	0.031	>100	>3
	82	0.03	>100	>3
Control Positivo				
Albendazol	--	0.00034	ND	ND

¹³ Índice de selectividad: EC₅₀ macrófagos murinos/ EC₅₀ *N. brasiliensis*

Ensayos de Citotoxicidad en Células de Cáncer

Se realizaron los estudios de citotoxicidad en los compuestos **53-58, 71, 75, 76, 78, 80, 82, 83, 93, 95, 97**, ninguno de los compuestos evaluados presento actividad citotóxica contra las líneas celulares MCF-7. Los mismos compuestos fueron evaluados sobre las líneas celulares HT29, sólo el compuesto **83** presento actividad citotóxica moderada, aunque éste compuesto es 20 veces menos activo que el control positivo: Mitomicina ($EC_{50} = 0.23 \mu\text{M}$), ver Tabla 7.5.

Tabla 7.5

Compuestos sintetizados	Nº	EC_{50} (μM) HT29
	83	4.6
Control Positivo		
Mitomicina	--	0.23

7.3 CONCLUSIONES

Los compuestos evaluados no presentan actividad antihelmíntica contra *N. brasiliensis* que pueda ser considerada significativa.

Ninguno de los compuestos evaluados presenta actividad citotóxica relevante.

Se sintetizaron seis macrociclos con actividades contra *P. falciparum* superiores o del orden de la más activa de las Aeruciclamidas, Aeruciclamida B.

Con respecto a la evaluación contra *P. falciparum* K1, podemos concluir que:

a_ la N-Metilación de residuos de Gly (**81**) ó la presencia de tres residuos de N-MetilGly (en lugar de una Gly y dos Ile como en el compuesto **78**) favorecen notablemente la actividad antimalárica. En efecto, el compuesto **81** es 257 veces más activo que el control positivo Artemisinina y 1000 veces más activo que el producto natural tomado como modelo originalmente: Aeruciclamida B.

b_ un tiazol en vez de L-Cys en el macrociclo aumenta la potencia (compuesto **82**, más activo que **78**)

c_ el reemplazo de un 5-metil oxazol por su correspondiente β -hidroxiamida no afecta la bioactividad (compuestos **71** y **97**).

d_ los macrociclos no azólicos, excepto **81** que posee tres residuos de Gly N-metilada, son menos potentes que los que presentan por lo menos un residuo azólico.

e_ la presencia del macrociclo es muy relevante en la actividad biológica (macrociclo **97** es más activo que su precursor abierto **95**, ídem **71** con **57**)

Se sintetizaron seis compuestos con actividad anti-tripanosómica superior a Aeruciclamida C.

Con respecto a la evaluación contra *T. b. brucei*, podemos concluir que:

a_ la presencia de dos o tres heterociclos en los macrociclos disminuyen la actividad biológica

b_ la presencia del macrociclo no es tan relevante en la actividad biológica como lo es para *P.falciparum*, por ejemplo el tris-heterociclo abierto **57** es más activo que su respectivo macrociclo **71**

c_ los ciclohexapéptidos no azólicos presentaron mejores actividades biológicas.

Los ciclohexapéptidos con un solo tiazol como **82** y **83** presentan actividades satisfactorias tanto para malaria como para HAT con buenos índices de selectividad en ambos casos. Compuestos con esta propiedad son muy necesarios para intervenir varias enfermedades en áreas multiendémicas como es el caso de malaria y la HAT en África.

No fue posible realizar los ensayos *in vivo* en *P. falciparum* y *T. b. brucei* dada las dificultades para solubilizar los compuestos **71** y **78** respectivamente.

Los resultados de la actividad biológica de varios de los compuestos aquí presentados así como de su síntesis fueron divulgados en importantes revistas del área Química Medicinal.¹⁴

¹⁴ (a) Peña, S.; Scarone, L.; Manta, E.; Stewart, L.; Yardley, V.; Croft, S.; Serra, G. Synthesis of a Microcystis Aeruginosa Predicted Metabolite with Antimalarial Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4994–4997. (b) Peña, S.; Scarone, L.; Medeiros, A.; Manta, E.; Comini, M.; Serra, G. Synthesis of Precursors and Macrocyclic Analogs of Aerucyclamides as Anti-Trypanosomal Agents. *Medchemcomm* **2012**, *3*, 1443–1448. (c) Peña, S.; Fagundez, C.; Medeiros, A.; Comini, M.; Scarone, L.; Sellanes, D.; Manta, E.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F.; Stewart, L.; Yardley, V.; Serra, G. Synthesis of Cyclohexapeptides as Antimalarial and Anti-Trypanosomal Agents. *Medchemcomm* **2014**, *5*, 1309–1316.

Capítulo 8

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

8.1 CONCLUSIONES

A lo largo de este proyecto de Tesis se trabajó en la síntesis y en la evaluación biológica de estructuras análogas a Aeruciclamidas obteniendo resultados alentadores tanto en la síntesis como en los ensayos biológicos. En cada capítulo se realizaron las conclusiones específicas de cada etapa. En este capítulo se resumen los resultados y las actividades biológicas más relevantes obtenidas a lo largo de esta tesis.

Se obtuvo una serie de building blocks con rendimientos de muy buenos a excelentes. Se realizaron los acoplamientos de los mismos para dar bis y tris azoles también con muy buenos rendimientos.

Durante la pasantía realizada en el Parc Científic de Barcelona bajo la dirección del Prof. Albericio se estudió la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida. La experiencia y los conocimientos adquiridos fueron aplicados en la instalación de un laboratorio de síntesis en fase sólida y en la obtención de hexapéptidos sintetizados en nuestro país.

En cuanto a la síntesis de macrociclos hexapeptídicos azólicos y no azólicos se abrió un nuevo campo de estudio dentro del grupo de QF. Se sintetizaron doce nuevos macrociclos, no reportados anteriormente. Uno de ellos es el macrociclo **71**, metabolito predicho por Dittman. Además, se realizó la primera síntesis total del producto natural Aeruciclamida B

A su vez, se comenzaron los estudios de reacciones sobre macrociclos. Este tipo de avances fomenta las investigaciones dentro del grupo de QF en esta clase de compuestos.

Los datos aportados por los ensayos de actividad biológica son muy alentadores e interesantes. Varios de los compuestos sintetizados presentaron mejor actividad biológica que los productos naturales en estudio con muy buenos índices de selectividad. Destacamos: 1) al compuesto **71** por tener actividad antimalárica mayor que Aeruciclamida B y por tratarse de un compuesto más económico de obtener y estable; 2) al compuesto **81** por haber presentado actividad muy potente, del orden sub-nanomolar contra *P. falciparum K1*, la cual es 257 veces superior al antimalárico artemisinina y 1000 veces mayor que la actividad del producto natural tomado como modelo en este trabajo, la Aeruciclamida B. Con respecto a esto, destacamos este resultado como un ejemplo notable dentro de lo que se conoce como la búsqueda de análogos de productos naturales utilizando la estrategia de "síntesis total diversificada" (DTS: Diverted Total Synthesis). Esta estrategia obtiene análogos potencialmente más activos introduciendo "cambios profundos" mientras se trabaja en estrategias sintéticas para la síntesis total.¹

A su vez, se obtuvieron ciclohexapéptidos con actividades interesantes tanto para malaria como para HAT, como los compuestos **82** y **83**. Considerando que estos hexapéptidos son una nueva clase de compuestos con actividad antiplasmódica y/o anti-tripanosómica, los datos presentados en esta tesis proporcionan una base valiosa para una mayor optimización.

¹ Njardarson, J.; Gaul, C.; Shan, D.; Huang, X.; Danishefsky, S. J. Discovery of Potent Cell Migration Inhibitors through Total Synthesis: Lessons from Structure–Activity Studies of (+)-Migrastatin. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1038-1040.

Gran parte del trabajo realizado en esta tesis fue publicado en revistas de prestigio en el área de Química Orgánica y Química Medicinal (ver Anexo 2). A su vez, los resultados fueron presentados en formato poster y en conferencias en congresos relevantes del área (ver Anexo 3). En dos ocasiones el trabajo fue seleccionado para su presentación oral por parte de la postulante al Doctorado y se obtuvo en dos oportunidades la mención a mejor poster.

La postulante al Doctorado obtuvo la financiación del proyecto "Síntesis de nuevos quimioterápicos análogos a Aeruciclámidas" (FCE 6916), lo que permitió solventar gastos de parte del trabajo y adquirir experiencia como responsable científico en la gestión de un proyecto.

8.2 PERSPECTIVAS A FUTURO

Como perspectivas a futuro, nos planteamos:

Continuar con el estudio de reacciones sobre macrociclos, en especial la metilación de residuos de Cys y la formación de enlaces disulfuro, ver Figura 8.1 compuestos **99** y **100**.

Obtener nuevos macrociclos de manera de poder determinar cuáles son las modificaciones que hacen a **81** el compuesto más activo contra *P. falciparum* dentro de los obtenidos en esta tesis. Para ello, planteamos la síntesis del compuesto **101**, ver Figura 8.1, y determinar si lo que realmente incide en la actividad biológica es la N-Metilación de tres residuos aminoacídicos (**101**), o el cambio de dos Ile por Gly (**102**), o la combinación de ambos como se dio para el macrociclo **81**.

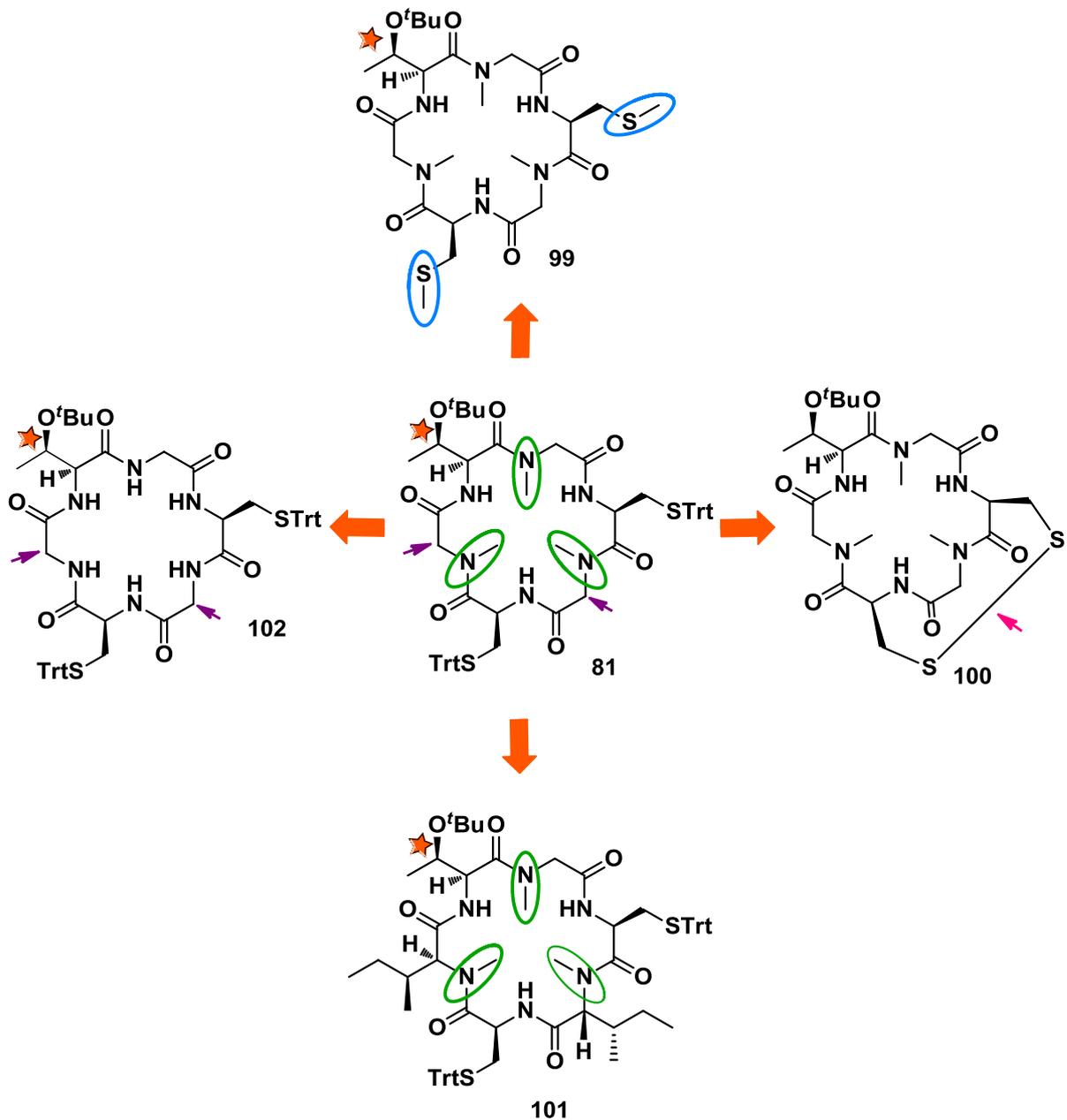


Figura 8.1

Sería importante realizar ensayos biológicos de los candidatos más activos en el estadio sexual del parásito donde estos se dividen en gametocitos, al atacar este punto se estaría evitando la transmisión. A su vez, se podrían realizar los ensayos en las líneas 3D7 y NF-54 (africanas) de *Plasmodium* dado que son cepas que sobreviven mejor al sistema inmune del mosquito y por lo tanto es

deseable que los nuevos fármacos sean activos contra de manera de disminuir la transmisión al hombre.

Por otro lado, sería deseable estudiar propiedades fisicoquímicas de los compuestos, principalmente la solubilidad con el fin de realizar ensayos *in vivo*. Pretendemos colaborar con otros grupos de investigación para estudiar la farmacocinética, la biodisponibilidad de los compuestos y la posibilidad de vehiculizarlos con el fin de desarrollar un producto activo *in vivo*.

Otro trabajo a realizar en el futuro será el estudio del mecanismo de acción de este tipo de compuestos como antimaláricos y anti- HAT. Dada la capacidad de los macrociclos de complejear metales y debido a que el mecanismo de acción de varios fármacos antimaláricos es a través de la complejación de iones Fe^{+2} ó $\text{Zn}^{+2, 2,3}$ se trabajará en ensayos que puedan indicarnos si la complejación con metales es el modo de acción de estos compuestos.

² (a) Fong, K. Y.; Wright, D. W. Hemozoin and Antimalarial Drug Discovery. *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 1437–1450. (b) Salas, P. F.; Herrmann, C.; Orvig, C. Metalloantimalarials. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 3450–3492.

³ Flipo, M.; Beghyn, T.; Leroux, V; Florent, I.; Deprez, B. P.; Deprez-Poulain, R. F. Novel selective inhibitors of the zinc aminopeptidase PfA-M1 as potential antimalarial agents. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 1322-1334.

Anexo 1

TABLA DE ABREVIATURAS

¹H-RMN – Resonancia Magnética Nuclear de protón

¹³C-RMN - Resonancia Magnética Nuclear de carbono

4-DMAP – 4-dimetilaminopiridina

AA - Aminoácido

AcOEt – Acetato de etilo

ACN – Acetonitrilo

Boc – *t*-butoxicarbonil

Cl-HOBt - 6-Cloro-1-Hidroxi-1H-Benzotriazol

DAST – Trifluoruro de *N,N*-dietilaminosulfuro

DBU – 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno

DCC – *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida

DeoxoFluor – Trifluoruro de [bis(2-metoxietil)amino]sulfuro

DEPBT – 3-(dietoxifosforiloxi)-1,2,3-benzotriazin-4(3 H)-one

DIC – *N,N'*- Diisopropil carbodiimida

DIPEA – *N,N'*- Diisopropiletilamina

DMF – *N,N'*- Dimetilformamida

DMSO – Dimetil sulfóxido

EP – Éter de petróleo

FDA – Food and Drug Administration

FDPP - Pentafluorofenil Difenilfosfinato

Fmoc – 9-Fluorenilmetiloxycarbonilo

GP – Grupo protector

HAT – Human African Trypanosomiasis

HATU - 1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazol[4,5-b]piridinium 3-oxido de hexafluorofosfato

HBTU – O-(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato

HCTU - *N*-oxido de *N*-[(1*H*-6-cloro-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metileno]-*N*-metilmetanaminio hexafluorofosfato

HOAt - 1-Hidroxi-7-azabenzotriazol

HOBt – 1-Hidroxibenzotriazol

ND – No determinado

OMS – Organización Mundial de la Salud

Ozl – Oxazolina

Oxz – Oxazol

PF – Punto de fusión

ppm – partes por millón

PyBOP - Benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino fosfonium hexafluorofosfato

PyAOP – 3-Hidroxi-3H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinato-O)tri-1-pirrolidinil-fosforus hexafluorofosfato

PyBrOP - Bromo-tris-pirrolidino fosfoniumhexafluorofosfato

QF – Química Farmacéutica

SPPS – Solid Phase Peptide Synthesis (Síntesis de Péptidos en Fase Sólida)

TA – Temperatura ambiente

^tBu – *tert*-butilo

TFA – Ácido trifluoroacético

THF – Tetrahidrofurano

Thz - Tiazol

Trt – Tritilo

Tzl - Tiazolina

AMINOÁCIDOS

Ala – Alanina

Cys – Cisteína

Gly – Glicina

Ile – Isoleucina

Met - Metionina

Phe - Fenilalanina

Ser – Serina

Thr– Treonina

Anexo 2

PUBLICACIONES

Macrocycles as Potential Therapeutic Agents in Neglected Diseases - Review

S. Peña; L. Scarone; G. Serra.

Future Med. Chem. **2015**, *7*, 355-382.

Synthesis of cyclohexapeptides as antimalarial and anti-trypanosomal agents

S. Peña; C. Fagúndez; A. Medeiros, M. Comini, L. Scarone; D. Sellanes; E.

Manta; J. Tulla-Puche; F. Albericio; L. Stewart; V. Yardley ; G. Serra.

Med. Chem. Commun. **2014**, *5*, 1309-1316.

First Total Synthesis of Aerucyclamide B

S. Peña; L. Scarone; E. Manta; G. Serra.

Tetrahedron Lett. **2013**, *54*, 2806-2808

Synthesis of precursors and macrocycle analogs of aerucyclamides as anti-trypanosomal agents.

S. Peña; L. Scarone; E. Manta; A. Medeiros, M. Comini, G. Serra.

Med. Chem. Commun. **2012**, *3*, 1443-1448.

Synthesis of a Microcystis aeruginosa predicted metabolite with antimalarial activity.

S. Peña; L. Scarone; E. Manta; L. Stewart; V. Yardely; S. Croft; G. Serra.

Bioorg. Med. Chem. Lett. **2012**, *22*, 4994-4497.

Approach to the Synthesis of Aerucyclamides Analogs as Potential Antiparasitic Drugs.

S. Peña; L. Scarone; E. Manta; G. Serra.

Drug Future **2010**, *35*, 213.

Anexo 3

PRESENTACIONES en CONGRESOS

Macrocyclic analogs of natural products as promising antimalarial and anti-trypanosomal agents: synthesis and biological evaluation

Gloria Serra (conferencia)

Drug Discovery Chemistry, San Diego, USA. Abril, 23-25, **2014**

Síntesis de Macrociclos Análogos a Aeruciclamidas como Potenciales Antimaláricos y Anti-tripanosómicos

Stella Peña (presentación oral)

3er ENAQUI, Montevideo, Uruguay. Noviembre, 4-6, **2013**.

Trabajo seleccionado para ser presentado oralmente

Synthesis, Antimalarial and Anti-Trypanosomal Evaluation of Macrocyclic Analogs of Natural Products

Gloria Serra (conferencia)

International Congress of Medicchem, Haikou, China. Noviembre, 13-16, **2013**.

First Total Synthesis of Aerucyclamide B and Macrocyclic Analogs as Antimalarial and Anti-Trypanosomal Agents

Stella Peña (presentación oral)

15th Brazilian Meeting on Organic Synthesis (15th BMOS) Campos do Jordao, San Pablo, Brasi. Noviembre 10-13, **2013**.

Trabajo seleccionado para ser presentado oralmente

Primera Síntesis Total de Aeruciclamida B. Síntesis de Macrociclos análogos a aeruciclamidas con potenciales actividades antimalárica y antitripanosómica

Stella Peña, Laura Scarone, Gloria Serra. (Poster)

XXI Jornadas de Jóvenes Investigadores – AUGM – Corrientes, Argentina.
Octubre 14-15, **2013**.

Solid Phase Peptide Synthesis of Key Intermediates for the Preparation of Analogs Aerucyclamides

Stella Peña, Laura Scarone, Judit Tulla-Puche, Fernando Albericio, Gloria Serra*
(Poster)

11th ACS Summer School on Green Chemistry and Sustainable Energy,
Colorado School of Mines, Golden, Colorado, USA. Julio 22-29, **2013**

First Total Synthesis of Aerucyclamide B and Antiparasitic Macrocyclic Analogs

Stella Peña, Laura Scarone, Andrea Medeiros, Marcelo Comini, Lindsay Stewart,
Vanessa Yardley, Fernando Albericio, Gloria Serra*

2nd ESPCA - São Paulo Advanced School on Bioorganic Chemistry – UNESP –
Araraquara, SP, Brasil. Junio 30 – Julio 5, **2013**.

Trabajo premiado como mejor poster por la RSC.

Synthesis, Antimalarial and Anti-Trpanosomal Evaluation of Aerucyclamides Analogs

Gloria Serra* (conferencia plenaria)

6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, Canela, RS, Brasil. Octubre 28-
31, 2012.

Synthesis of Aerucyclamides Analogs with Antimalarial or Antitrypanosomal Activity. Gloria Serra*, Stella Peña, Laura Scarone,

Eduardo Manta, Andrea Medeiros, Marcelo Comini, Lindsay Stewart, Vanessa Yardley. (Poster)

EFMC-ISMC, 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry, Berlin,
Germany. September 2-6, 2012.

Síntesis en Fase Sólida de Intermediarios Claves para la Obtención de Análogos de Aeruciclamidas.

Stella Peña*, Laura Scarone, Judit Tulla-Puche, Fernando Albericio, Gloria Serra.
2do ENAQUI, Montevideo, Uruguay. October 24-26, **2011**.

Trabajo premiado como mejor poster.

Towards the Total Synthesis of Aerucyclamide B.

Stella Peña*, Laura Scarone, Gloria Serra. (Poster)

14th BMOS, Brazilian Meeting on Organic Synthesis, Brasilia, Brasil. September 1-5, **2011**.

Synthesis of a Macrocyclic Marine Natural Product Analogs.

Gloria Serra*, Stella Peña, Laura Scarone. (Poster)

14th BMOS, Brazilian Meeting on Organic Synthesis, Brasilia, Brasil. September 1-5, **2011**.

Approch to the synthesis of Aeurucyclamides analogs as potencial antiparasitic drugs. Stella Peña, Laura Scarone, Eduardo Manta, and Gloria Serra*.

EFMC-ISMC 2010. 21st International Symposium on Medicinal Chemistry, Brussels, Belgium. September 5-9, **2010**.

"How I wish, how I wish you were here.
We're just two lost souls swimming in a fish bowl, year after year,
Running over the same old ground.
What have you found? The same old fears.
Wish you were here".

Pink Floyd

