

**2. MODIFICACIONS DEL CAP
DE SÈRIE ANTERIORMENT
DESCRIT AL GEM**

2.1. Disseny de síntesi

Una de les tasques dutes a terme durant el projecte de la sida al GEM ha estat el disseny d'una quimioteca combinatòria de compostos polinitrogenats no ciclàmics amb estructura genèrica **1**, anàlegs a l'AMD3100, el qual es pren típicament de referència en la cerca d'inhibidors de les etapes extracel·lulars del cicle víric. El repte ha estat corregir les limitacions que presenta el cap de sèrie (essent la toxicitat la més remarcable, generalment associada a la basicitat dels heterocicles ciclàmics, que es troben carregats a pH fisiològic) però mantenint les seves característiques estructurals: dos àtoms de nitrogen separats per un espaiador *p*-xililènic que, simultàniament, formen part d'un sistema polinitrogenat.

La substitució dels grups ciclám per amines **5** comercials ha permès al nostre grup de recerca no només disminuir la basicitat del compostos finals, sinó també demostrar que els vuit àtoms de nitrogen presents en l'AMD3100 no són necessaris per a la inhibició del coreceptor CXCR4^{145,146}.

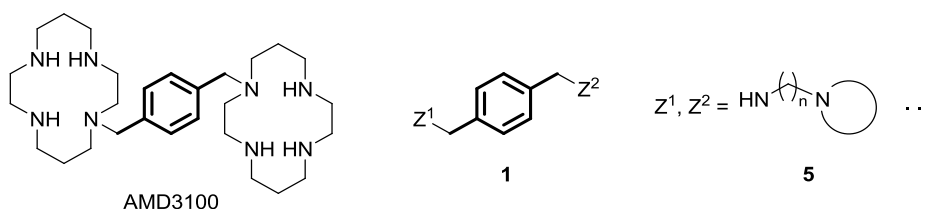


Figura 2.1 Estratègia sintètica del GEM en la cerca d'inhibidors d'entrada del VIH

Concretament, es dissenyà i sintetitzà una quimioteca combinatòria de diamines **2**_{x,y} amb la substitució dels anells ciclàmics per les amines **5**_{1} a **5**_{11}, les quals contenen un grup amina primària i una amina terciària cíclica (pirrolidina, piperidina, piperazina, morfolina o imidazole) separades per una cadena hidrocarbonada lineal de fins a tres àtoms de carboni (Figura 2.2). L'anàlisi retrosintètica dels compostos objectiu **2**_{x,x} simètricament disubstituïts dugué a les diïmines **3**, que podien desconectar-se en tereftaldehid (**4**) i dos equivalents d'una amina primària **5**_{x} (Figura 2.3). L'ús del monoacetal dietílic del tereftaldehid (**6**) permetia, a més, l'obtenció de les diamines **2**_{x,y} asimètricament disubstituïdes.

Mitjançant el programari PRALINS, desenvolupat al Laboratori de Disseny Molecular del propi grup de recerca^{124,126,128}, es va fer una primera selecció en diversitat de la quimioteca virtual reduïda a 66 estructures per simetria (el compost **2**_{5,7} és equivalent al **2**_{7,5}). La posterior síntesi i avaluació

front a cèl·lules infectades amb VIH de les molècules candidates dugueren a productes **2** amb activitats prometedores (EC_{50} de 0,9 a 18 $\mu\text{g/ml}$). Una selecció focalitzada sobre els millors compostos resultants de la primera selecció, seguida d'una segona emprant tècniques de cribratge virtual (tant basades en l'estructura com en els lligands), permeteren arribar a diamines **2** amb activitats submicromolars^{145,146,187}.

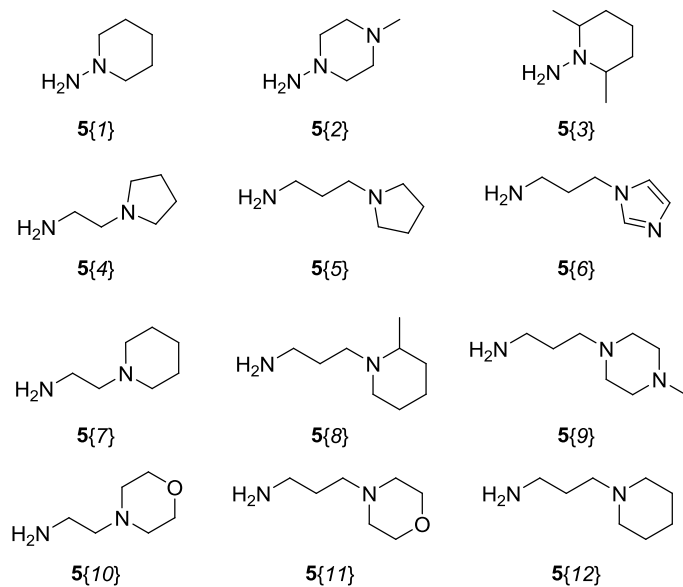


Figura 2.2 Amines **5** emprades en anteriors treballs del GEM

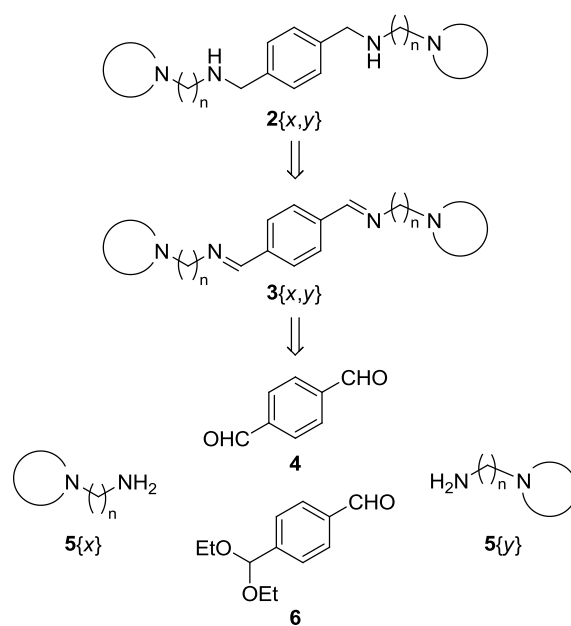


Figura 2.3 Anàlisi retrosintètica per a l'obtenció de les diamines **2**

Tota la família de diamines **2** es patentà l'any 2006 i la sol·licitud fou estesa a PCT i llicenciada l'any 2008 a Janus Development S.L.¹⁴⁷. El compost més actiu de la família, la diamina **2{8,8}**, presenta una $EC_{50} = 0,050 \mu\text{g/ml}$ i una concentració citotòxica (*cytotoxic concentration*, CC_{50}) superior als 25 $\mu\text{g/ml}$ front al VIH. Cal remarcar que l'anell de pipercolina (2-metilpiperidina) present en **5{8}** conté un

centre quiral, la configuració del qual no s'ha especificat en el cap de sèrie, però que caldria fixar per al seu possible desenvolupament com a fàrmac en un futur pròxim.

La presència del grup metil i la quiralitat que comporta en el compost **2{8,8}** esdevé, doncs, una dificultat afegida a una possible explotació posterior. Per tal de comprovar la vertadera necessitat d'aquest grup pel que fa a l'activitat antiviral es va afegir al conjunt d'amines comercials la **5{12}** (Figura 2.2), que conté l'heterocicle piperidínic de **5{8}** però sense el substituent metil. La diamina **2{12,12}** que se n'obté se sintetitzà amb la mateixa aproximació sintètica que la resta de la família i se n'avaluà l'activitat antiviral, que va resultar molt inferior a la de **2{8,8}** ($EC_{50} = 0,14 \mu\text{g/ml}$, $CC_{50} > 25 \mu\text{g/ml}$) (Figura 2.4).

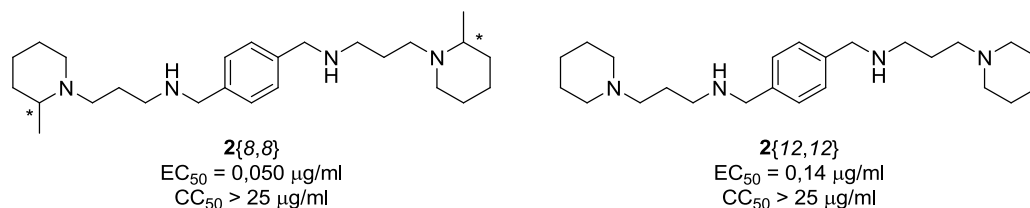
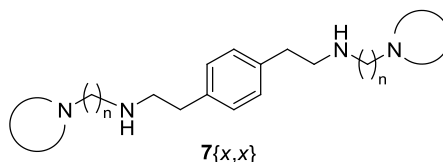


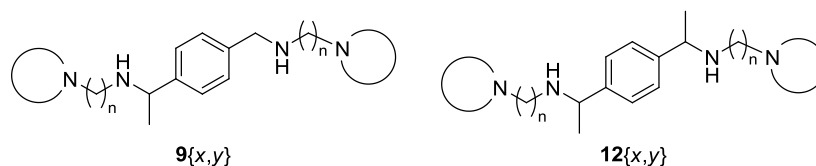
Figura 2.4 Cap de sèrie obtingut anteriorment al GEM i anàleg sense centres quirals

Una vegada constatat que el grup metil pot tenir un gran efecte sobre l'activitat antiviral d'un compost amb estructura **2**, seria interessant avaluar la transcendència de petites modificacions estructurals sobre l'activitat antiviral d'aquests compostos. Sorgeixen així diferents propostes:

1. Introducció d'una baula metilènica (espaiador etilènic) entre l'anell aromàtic i els àtoms de nitrogen més propers a ell, mantenint la distància de dos o tres àtoms de carboni entre els dos nitrògens provinents de l'amina **5**.



2. Introducció d'un grup metil en les posicions benzíliques, mantenint també en aquestes posicions un àtom de nitrogen com és el cas per a l'AMD3100.



3. Introducció d'una baula metilènica entre els dos àtoms de nitrogen procedents de l'amina **5**, ampliant la distància entre ells fins a una cadena lineal de quatre àtoms de carboni (compostos **2**, **9** o **12** amb $n = 4$).

Pel que fa a la primera proposta, en un treball paral·lel, s'ha estudiat recentment al GEM l'efecte sobre l'activitat antiviral d'allargar en una baula metilènica la distància entre l'espaiador aromàtic i els àtoms de nitrogen més propers a ell. Per això es dissenyà i se sintetitzà una quimioteca combinatòria de diamines simètricament substituïdes **7{x,x}** (Figura 2.5). La seva anàlisi retrosintètica posà de manifest la inviabilitat de passar per les imines **46{x,x}** per manca de disponibilitat comercial del dialdehid **47**.

Aquest inconvenient es resolgué a través de les amides **8** $\{x,x\}$, que poden obtenir-se a partir del diclorur d'àcid **48**¹³⁰.

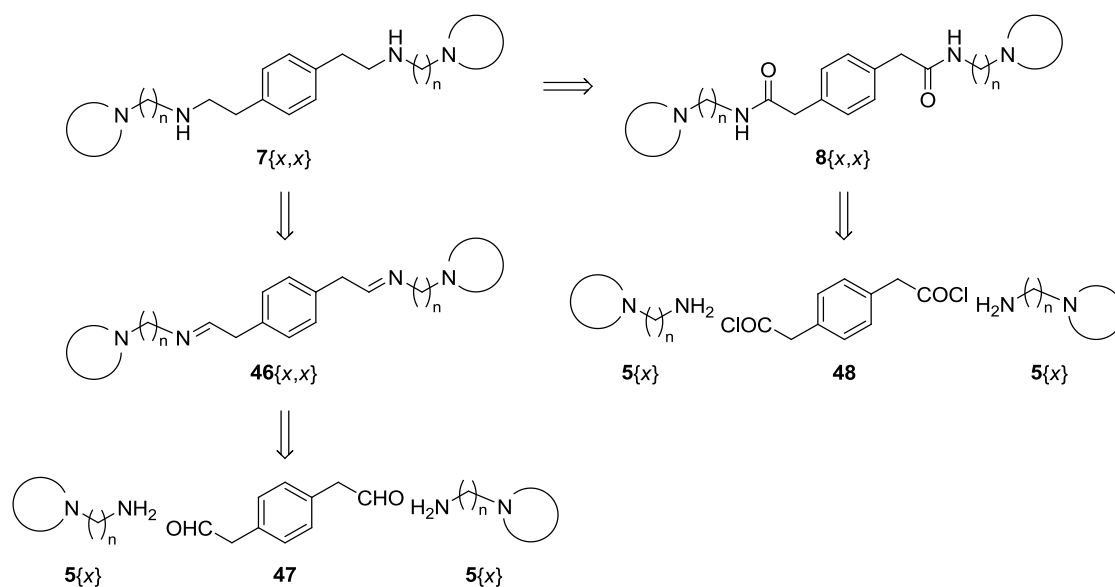


Figura 2.5 Anàlisi retrosintètica de les diamines **7**

Si bé les amides precursors **8** $\{x,x\}$ són en termes generals poc actives, l'activitat antiviral de les amines **7** $\{x,x\}$ millora, en dues terceres parts dels casos analitzats, la de les anàlogues **2** $\{x,x\}$ en fins a dos ordres de magnitud, mentre que la citotoxicitat es manté del mateix ordre¹³⁰ (Taula 2.1).

Taula 2.1 Comparació de les activitats dels diferents anàlegs obtinguts al GEM

amina 5 $\{x\}$	diamina 2 $\{x,x\}$		diamina 7 $\{x,x\}$		diamida 8 $\{x,x\}$	
	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
5 $\{4\}$	10,2	> 25	0,51	70	4,2	> 125
5 $\{5\}$	0,9	32,4	0,068	37	> 64,6	> 64,6
5 $\{6\}$	> 59,5	59,5	> 125	> 125	> 125	> 125
5 $\{7\}$	> 11,7	11,7	0,1	50	2,0	> 125
5 $\{8\}$	0,050	> 25	0,032	52	68	> 125
5 $\{9\}$	9,5	> 125	> 36,03	36	> 125	> 125
5 $\{10\}$	> 85,7	85,7	> 125	> 125	> 125	> 125
5 $\{11\}$	> 125	> 125	20,73	101	> 125	> 125
5 $\{12\}$	0,14	> 25	0,042	47	> 125	> 125

Una segona possibilitat seria introduir el grup metil en la posició benzílica, però deixant també en aquesta posició un àtom de nitrogen, com és el cas per a l'AMD3100 que es pren de referència. Això permetria mantenir l'estratègia sintètica seguida per a la obtenció de les diamines **2**. Amb els compostos **9** $\{x,y\}$, que es podrien obtenir a partir del 4-acetilbenzaldehyd (**11**) i les amines **5**, s'avaluaria l'efecte del grup metil en la posició benzílica sobre un únic costat de l'anell aromàtic. Per als compostos **12**, que permetrien avaluar l'efecte en els dos costats de l'espaiador, l'anàlisi retrosintètica porta a la desconexió de la imina intermèdia **13** en la *p*-acetilacetofenona (**14**) i de nou les amines **5** (Figura 2.6).

Així doncs, es proposa en aquest treball l'ampliació de la quimioteca de compostos amb potencial activitat anti-VIH amb la combinació de d'algunes amines **5** $\{x\}$ seleccionades i els substrats **11** i **14**.

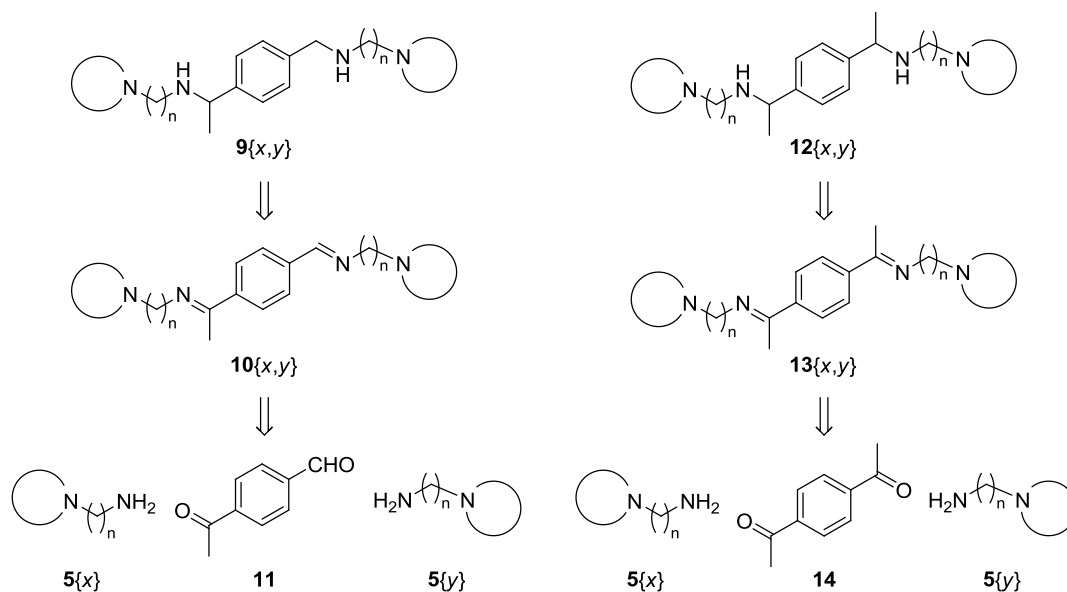


Figura 2.6 Anàlisi retrosintètica de la introducció d'un grup metil en la posició benzílica

Finalment, la tercera proposta consistiria en afegir una baula metilènica més, però entre els dos nitrògens de l'amina **5** precursora en comptes d'afegir-la entre l'anell aromàtic i el nitrogen més pròxim a ell, com en el primer cas estudiat. L'estratègia sintètica tornaria a ser exactament la mateixa que en el cas anterior, però la desconexió duria a amines **5** amb quatre baules metilèniques entre el grup amina primària i l'amina cíclica, les quals no són comercialment disponibles. Tenint en compte que les amines **5{8}** i **5{12}** són les que han rendit productes més actius en els treballs anteriors^{130,145,146}, es proposa en aquest treball sintetitzar les anàlogues amb quatre baules metilèniques **5{13}** i **5{14}** que (combinant-les amb els tres substrats proposats **4**, **11** i **14**) permetran ampliar la quimioteca combinatòria anteriorment descrita al grup¹⁴⁶.

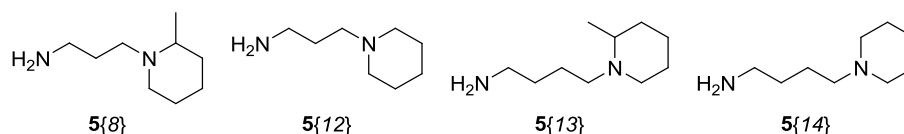
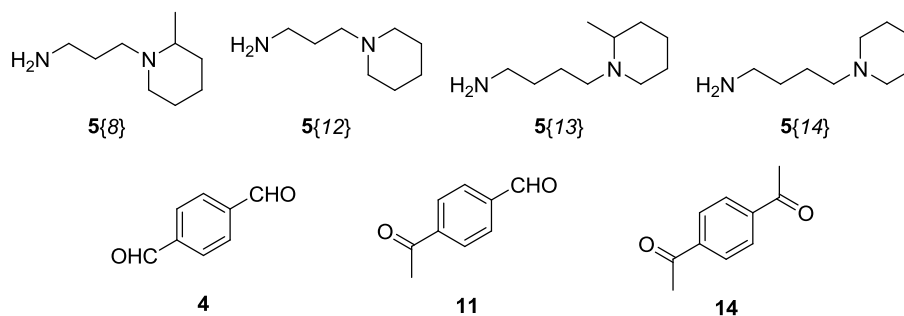


Figura 2.7 Amines **5** emprades en l'ampliació de la quimioteca descrita al GEM

2.2. Ampliació de la quimioteca descrita al GEM

Es planteja doncs com a primer objectiu d'aquest capítol determinar l'efecte que pot tenir sobre l'activitat antiviral la presència d'un substituent metílic en la posició benzílica de l'espaiador *p*-xililènic de la quimioteca de diamines **2** anteriorment descrita al GEM. Simultàniament, es pretén avaluar també l'activitat de compostos amb tres o quatre baules metilèniques entre els dos nitrògens que provenen de l'amina **5**, així com la necessitat del metil en l'anell de piperidina pel que fa als derivats de les amines amb cadenes lineals de quatre àtoms de carboni entre els dos nitrògens. Així doncs, els fragments que s'empraran per a l'ampliació de la quimioteca són els que es mostren a la Figura 2.8: les amines **5{8}** i **5{12}** (que han rendit els productes més actius en treballs anteriors) i les noves amines **5{13}** i **5{14}** (no comercials) es faran reaccionar amb els espaiadors *p*-xililènic **4**, **11** i **14**.


Figura 2.8 Fragments utilitzats en l'ampliació de la quimioteca d'inhibidors de CXCR4 anteriorment descrita al GEM

En primer lloc cal tenir en compte que la combinació de tots els fragments de la Figura 2.8 entre si dóna lloc a una quimioteca virtual de $3 \cdot 4 \cdot 4 = 48$ compostos, que es redueixen a 36 per simetria (les diamines **2** i **12** són simètriques, de manera que el compost **2**{8,12} és equivalent al **2**{12,8} i el **12**{13,14} és equivalent al **12**{14,13}, per exemple). L'elevat nombre de possibles compostos a sintetitzar duu a plantejar-se l'avaluació computacional de les seves activitats abans d'intentar la síntesi al laboratori. Cal recordar que les diamines **2**{8,8} i **2**{12,12} (Taula 2.2) ja han estat sintetitzades prèviament al grup^{145,146}.

Taula 2.2 Combinació de les amines amb tereftaldehid (**4**)

		espaïador 4			
		5{8}	5{12}	5{13}	5{14}
x	5{8}	2{8,8}	--	--	--
	5{12}	2{12,8}	2{12,12}	--	--
	5{13}	2{13,8}	2{13,12}	2{13,13}	--
	5{14}	2{14,8}	2{14,12}	2{14,13}	2{14,14}

Taula 2.3 Combinació de les amines amb *p*-acetilbenzaldehid (**11**)

		espaïador 11			
		5{8}	5{12}	5{13}	5{14}
x	5{8}	9{8,8}	9{8,12}	9{8,13}	9{8,14}
	5{12}	9{12,8}	9{12,12}	9{12,13}	9{12,14}
	5{13}	9{13,8}	9{13,12}	9{13,13}	9{13,14}
	5{14}	9{14,8}	9{14,12}	9{14,13}	9{14,14}

Taula 2.4 Combinació de les amines amb *p*-acetilacetofenona (**14**)

		espaïador 14			
		5{8}	5{12}	5{13}	5{14}
x	5{8}	12{8,8}	--	--	--
	5{12}	12{12,8}	12{12,12}	--	--
	5{13}	12{13,8}	12{13,12}	12{13,13}	--
	5{14}	12{14,8}	12{14,12}	12{14,13}	12{14,14}

2.2.1. Selecció de compostos

Les prediccions computacionals d'activitat es poden realitzar de diferents maneres, en funció de la informació de què es disposi. Si es coneix l'estructura tridimensional del receptor i el mode d'unió d'un lligand concret, es pot quantificar l'energia d'interacció mitjançant mètodes d'engalament. Els

resultats d'aquesta tècnica permeten establir un ordre relatiu entre els diferents lligands, acceptant que la interacció correlaciona amb l'activitat biològica. D'altra banda, en cas de no conèixer l'estructura del receptor, informacions qualitatives es poden extreure també a partir d'aquells lligands que presenten certa activitat. Els anomenats models farmacofòrics o farmacòfors identifiquen aquelles característiques estructurals comunes d'un conjunt de lligands que resulten essencials per a la seva activitat biològica front a un receptor concret¹⁸⁸ (tot i que la idea de farmacòfor fou descrita l'any 1909 per Paul Ehrlich¹⁸⁹, el concepte no fou publicat com a tal fins al 1971^{190,191}). Finalment, si el que interessa és tenir una predicció quantitativa, cal emprar tècniques estadístiques que permetin relacionar el valor de l'activitat biològica coneguda amb característiques fisicoquímiques derivades de l'estructura molecular (descriptors moleculars). Aquests mètodes, anomenats **relacions quantitatives d'estructura-activitat** (*Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR) requereixen d'un conjunt de dades representatiu de tot el marge d'activitats a estudiar per trobar una equació matemàtica que serveixi de model de predicció.

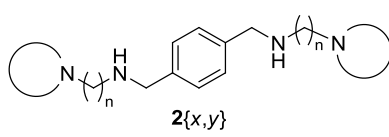
Les diamines **2** prèviament descrites al grup presenten valors d'activitat prou diversos com per ajustar-hi un model QSAR. En treballs previs^{146,187} es calcularen gairebé dos centenars de descriptors moleculars utilitzant el programari MOE 2006.08¹⁹² i se seleccionaren, mitjançant matrius de correlació, aquells vuit que presentaven màxima correlació amb l'activitat i mínima entre ells, essent el que millor correlaciona amb l'activitat antiviral el descriptor Q_VSA_HYD (àrea total hidrofòbica de la superfície de van der Waals). S'obtingueren i validaren una dotzena de models per combinació dels vuit descriptors seleccionats, dels quals s'avaluaren diferents paràmetres estadístics per triar el millor, que resultà ser un model de tres descriptors. L'equació que el representa inclou el Q_VSA_HYD, l'SlogP_VSA8 (suma de l'àrea aproximada de la superfície accessible de van der Waals per als àtoms amb contribució al coeficient de partició octanol/aigua entre 0,3 i 0,4) i el dipoleY (component y del moment dipolar, que és funció de les coordenades externes de la molècula):

$$pEC_{50} = 2,52586 + 0,00940 \cdot Q_VSA_HYD + 0,00507 \cdot SlogP_VSA8 + 0,10611 \cdot dipoleY$$

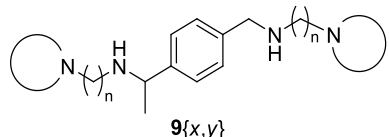
Aquest model presenta un coeficient de correlació (R^2) de 0,81. La validació creuada (*leave one out*, LOO) i amb un conjunt extern presenten $R^2_{LOO} = 0,75$ i $R^2_{ext} = 0,69$, respectivament.

Abans d'aplicar el model QSAR descrit per a la predicció d'activitats de les noves molècules de la quimioteca cal optimitzar-ne l'estructura. Un cop carregada la molècula a pH fisiològic i optimitzada l'estructura amb el programari MOE es calculen les càrregues parcials segons el camp de forces MMFF94, per a la correcta superposició de les estructures i la definició dels descriptors moleculars que intervenen en el model. A continuació, es pren la conformació activa de l'AMD3100 obtinguda per l'engalament amb el coreceptor CXCR4 modelat al grup^{133,193} i s'alineen amb ella les estructures optimitzades de les molècules de la quimioteca, emprant el mòdul FlexAlign del programari MOE. Finalment, es calculen els descriptors necessaris per al model QSAR a partir de la conformació que millor s'alineja amb l'AMD3100 de referència.

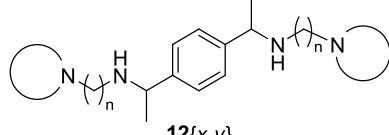
L'aplicació del model QSAR descrit prèviament al GEM ha rendit les prediccions d'activitat que es mostren en les taules següents. Val recordar que, en el cas d'emprar l'espaiador *p*-acetilbenzaldehyd (**11**) l'amina designada com a substituent x és el que s'uneix a l'espaiador pel grup cetònic, mentre que l'amina y és la que es faria reaccionar amb el grup aldehid de l'espaiador.

Taula 2.5 Prediccions d'activitat (μM) de les diamines **2** $\{x,y\}$


espaïador 4		y			
		5{8}	5{12}	5{13}	5{14}
x	5{8}	0,126	--	--	--
	5{12}	0,310	0,411	--	--
	5{13}	0,178	0,245	0,088	--
	5{14}	0,131	0,220	0,164	0,109

Taula 2.6 Prediccions d'activitat (μM) de les diamines **9** $\{x,y\}$


espaïador 11		y			
		5{8}	5{12}	5{13}	5{14}
x	5{8}	0,056	0,140	0,006	0,064
	5{12}	0,124	0,225	0,168	0,123
	5{13}	0,072	0,163	0,044	0,074
	5{14}	0,068	0,132	0,071	0,065

Taula 2.7 Prediccions d'activitat (μM) de les diamines **12** $\{x,y\}$


espaïador 14		y			
		5{8}	5{12}	5{13}	5{14}
x	5{8}	0,039	--	--	--
	5{12}	0,059	0,135	--	--
	5{13}	0,044	0,133	0,020	--
	5{14}	0,043	0,064	0,038	0,037

Dels 36 compostos de la quimioteca se seleccionen per una banda aquells amb bona predicció d'activitat i que, simultàniament, són sintèticament més accessibles, sense perdre de vista que les amines **5** $\{13\}$ i **5** $\{14\}$ s'hauran d'obtenir experimentalment perquè no són comercialment disponibles. D'altra banda, donat que per aconseguir bons models computacionals cal disposar de dades d'activitat de diferents ordres de magnitud, també se seleccionaran alguns compostos amb prediccions d'activitat menors. Tots els compostos simètricament substituïts no obtinguts prèviament se seleccionen per la seva fàcil obtenció (a partir dels espaïadors i dos equivalents de les amines corresponents) i per l'analogia amb el cap de sèrie descrit al GEM **2** $\{8,8\}$. Així doncs, se seleccionen: **2** $\{13,13\}$, **2** $\{14,14\}$, **9** $\{8,8\}$, **9** $\{12,12\}$, **9** $\{13,13\}$, **9** $\{14,14\}$, **12** $\{8,8\}$, **12** $\{12,12\}$, **12** $\{13,13\}$ i **12** $\{14,14\}$ (Taula 2.8, ombrejades de color blau cel).

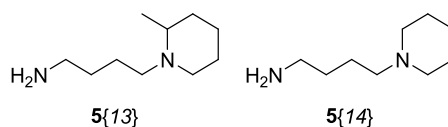
Pel que fa als compostos asimètricament disubstituïts, es descarten les diamines **2** $\{x,y\}$ a causa de les baixes prediccions d'activitat i pel fet que ja es disposa de prou dades per aquesta família obtingudes en treballs anteriors^{145,146}. L'obtenció dels adductes **12** $\{8,y\}$ i **12** $\{13,y\}$ semblaria extremadament interessant, doncs totes les prediccions (tret de **12** $\{13,12\}$) són inferiors a $0,060 \mu\text{M}$. Tanmateix, mentre que l'obtenció de **2** $\{x,y\}$ és sintèticament factible a partir del monoacetal **6**, no es troba comercialment disponible un anàleg monoprotegit de l'espaïador **14**. La monosubstitució sobre dos grups cetònics idèntics, tot i emprar excés de **14** front a l'amina **5** $\{x\}$, rendiria, a priori i per l'experiència prèvia que es té al grup, mesclades difícils de separar. És per això que l'obtenció de les diamines **12** asimètricament substituïdes es deixen, cas de considerar-se necessari, per a posteriors treballs. Pel que fa a la resta, **9** $\{x,y\}$, es podran obtenir, a priori, per la diferent reactivitat del grup aldehídic respecte al grup cetònic del precursor **11**. En l'intent d'aportar noves dades per una possible millora del model computacional, es realitza una selecció en diversitat de tal manera que la distribució dels compostos seleccionats es trobi centrada entorn els $0,1 \mu\text{M}$. A més, la selecció es troba condicionada per la disponibilitat comercial de **5** $\{13\}$ i **5** $\{14\}$, per la qual cosa es minimitza la presència d'aquests fragments. Amb tot, els compostos asimètricament substituïts que s'han seleccionat han estat: **9** $\{12,8\}$, **9** $\{14,8\}$, **9** $\{8,12\}$, **9** $\{14,12\}$, **9** $\{8,13\}$ i **9** $\{12,14\}$ (Taula 2.8, ombrejades de color groc).

Taula 2.8 Prediccions d'activitats (EC₅₀, µM) de les diamines 2{x,y},9{x,y} i 12{x,y}

diamines			y											
2	9	12	5{8}			5{12}			5{13}			5{14}		
x	5{8}		0,126	0,056	0,039	--	0,140	--	--	0,006	--	--	0,064	--
	5{12}		0,310	0,124	0,059	0,411	0,225	0,135	--	0,168	--	--	0,123	--
	5{13}		0,178	0,072	0,044	0,245	0,163	0,133	0,088	0,044	0,020	--	0,074	--
	5{14}		0,131	0,068	0,043	0,220	0,132	0,064	0,164	0,071	0,038	0,109	0,065	0,037

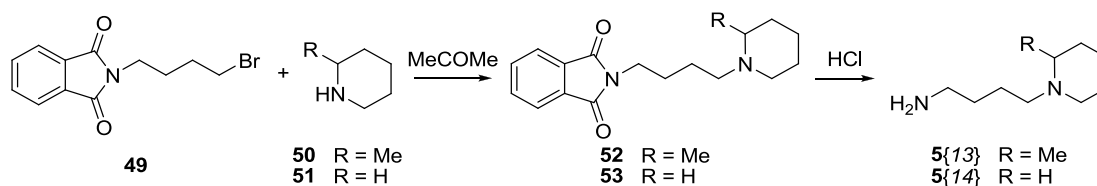
2.2.2. Síntesi de reactius de partida

Tal com ja s'ha comentat, les amines 5{13} i 5{14} (Figura 2.9) emprades en l'ampliació de la quimioteca no són comercialment disponibles, per la qual cosa cal plantejar, en primer lloc, una estratègia sintètica per a la seva obtenció.


Figura 2.9 Amines comercialment no disponibles

Una de les millors síntesis d'amines primàries descrita és la reacció de Gabriel^{194,195}, la qual emprava ftalimida potàssica com a font de nitrogen que, a través d'un mecanisme de tipus SN2, s'uneix a un derivat halogenat. La hidròlisi de la ftalimida *N*-substituïda rendeix l'amina primària desitjada. Generalment, la hidròlisi es fa en medis que permetin recuperar fàcilment la ftalimida, per poder-la emprar en posteriors obtencions d'amines primàries per aquesta via.

En una cerca amb l'*SciFinder® Scholar 2007*¹⁹⁶ s'ha trobat descrita l'obtenció d'amines primàries derivades de la piperidina a través de la reacció de Gabriel¹⁹⁷⁻²⁰⁰. En aquest cas, la *N*-(4-bromobutyl)ftalimida comercial (**49**) es fa reaccionar amb 2-metilpiperidina (també anomenada 2-pipecolina) (**50**) o piperidina no substituïda (**51**). L'atac nucleòfil de l'amina secundària cíclica sobre el derivat halogenat rendeix els intermedis **52** o **53** i allibera bromur d'hidrogen, el qual és capturat per la piperidina **50** o **51**, que sol trobar-se en excés. Finalment, els intermedis s'hidrolitzen en àcid clorhídric aquós (6 M) per obtenir l'amina primària desitjada 5{13} o 5{14} (Figura 2.10).


Figura 2.10 Síntesi de les amines no comercials mitjançant la reacció de Gabriel

L'alquilació de la piperidina es duu a terme modificant lleugerament la metodologia descrita per Apelt i col·laboradors¹⁹⁷: en comptes de tres equivalents de piperidina, els intermedis **52** i **53** s'obtenen amb un excés de piperidina **50** o **51** respecte a la ftalimida **49** de 2:1 a reflux d'acetona durant 12 hores. En aquest temps s'observa la formació de bromur de piperidina com un sòlid blanc, que es filtra al buit abans de prosseguir amb la metodologia. La hidròlisi dels intermedis en àcid clorhídric 6 M permet arribar a les amines 5{13} i 5{14} desitjades. Curiosament, els intents de doblar les quantitats inicials de reactius porta a productes força impurs, de manera que es decideix repetir la síntesi partint d'aproximadament 10 mmol de reactiu **49** tantes vegades com calgui en comptes d'escalar la reacció. Pel que fa als

rendiments globals, la síntesi de **5{13}** a partir de **49** i la piperidina 2-substituïda **50** té un rendiment del 12%, substancialment més baix que el de l'amina **5{14}**, la qual s'obté a partir de la ftalimida *N*-alquilada **49** i la piperidina **51** amb un rendiment que oscil·la entre el 50 i el 65% en les diverses repeticions.

La síntesi de Gabriel emprada en l'obtenció de les amines **5{13}** i **5{14}**, tot i conduir a resultats satisfactoris, presenta un gran inconvenient des del punt de vista de la Química Verda: l'efectivitat atòmica. La Química Verda o Química Sostenible va sorgir a principis dels anys noranta del segle XX com una disciplina de la Química que pretenia dissenyar, desenvolupar i implementar productes i processos químics que reduïssin o eliminessin impactes negatius sobre el medi ambient, minimitzant els compostos tòxics i la bioacumulació i millorant la seguretat i l'eficiència de la producció. Els dotze principis d'aquesta nova disciplina foren publicats l'any 1998 per Paul Anastas i John Warner²⁰¹.

L'efectivitat atòmica, que pot no semblar rellevant a nivell de laboratori, resultaria de gran importància a l'hora de plantejar la síntesi a major escala, doncs els subproductes no reutilitzables que se'n poguessin obtenir tindrien gran impacte sobre el medi ambient. Així doncs, en cas de ser necessari en un futur, es podria plantejar la síntesi de les amines **5{13}** i **5{14}** a partir del derivat **54** o **55**, que podria obtenir-se per alquilació de la piperidina **50** o **51** anteriors amb el bromonitril **56**, evitant així la síntesi de Gabriel (Figura 2.11). De fet, alquilacions com la que es proposen i reduccions de nitrils en sistemes referibles han estat ben descrites a la bibliografia²⁰²⁻²⁰⁶.

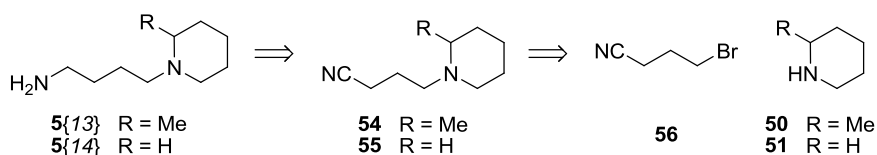


Figura 2.11 Anàlisi retrosintètica per a l'obtenció de les amines **5{13}** i **5{14}** evitant la síntesi de Gabriel

2.2.3. Síntesi dels acoblaments simètrics seleccionats

Una vegada sintetitzades les amines de partida i en disposició de les amines comercials **5{8}** i **5{12}**, el proper objectiu d'aquest capítol és la síntesi dels acoblaments simètrics seleccionats en l'apartat 2.2.1 (pàg. 78).

L'aproximació més directa per a l'obtenció d'amines secundàries o terciàries és l'aminació reductora d'aldehids i cetones, que emprava als inicis típicament cianoborohidrur sòdic (NaBH_3CN) com a agent reductor (reducció de Borch)²⁰⁸. Aquest, força tòxic i relativament car, s'ha anat substituint al llarg del temps per borohidrur sòdic (NaBH_4)²⁰⁷. Altres metodologies possibles per a l'obtenció d'amines secundàries i terciàries, com l'alquilació d'amines menys substituïdes, presenten limitacions importants, particularment i sovint baixos rendiments i formació de la sal d'amoni quaternari corresponent, a més de reaccions d'eliminació en competència.

Així doncs, la reacció dels espaiadors **4**, **11** i **14** (Figura 2.8, pàg. 78) amb dos equivalents de les amines **5{8}**, **5{12}**, **5{13}** o **5{14}** rendirà, per aminació reductora, compostos amb estructura **2**, **9** i **12**, amb els quals es pretén avaluar l'efecte de la presència del substituent metílic en la posició benzílica sobre l'activitat antiviral.

2.2.3.a. Acoblaments amb tereftaldehid (**4**)

Tenint en compte que els acoblaments simètrics **2**{8,8} i **2**{12,12} s'han realitzat anteriorment al grup¹⁴⁶, es pretén seguir la mateixa metodologia sense esperar gaire dificultats afegides en la síntesi dels acoblaments **2**{13,13} i **2**{14,14} (Figura 2.12).

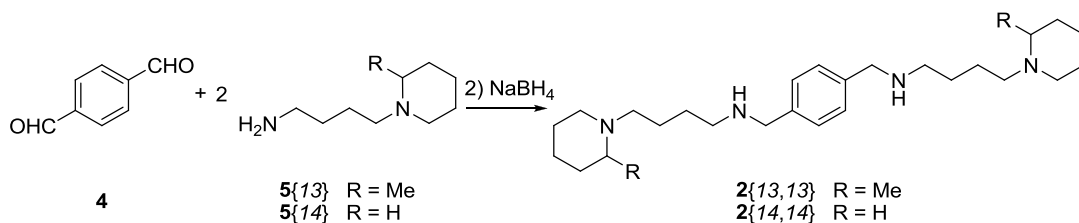


Figura 2.12 Obtenció dels acoblaments simètrics amb tereftaldehid (**4**) seleccionats

L'aminació reductora d'aldehids ha estat àmpliament descrita emprant diversos agents reductors^{209,210}. S'inicia amb l'atac nucleòfil de l'amina sobre el carbonil aldehídic per formar un intermedi hemiamínic que es deshidrata reversiblement i rendeix la imina **3**. L'equilibri aldehid:imina es pot desplaçar cap a la formació de la imina separant l'aigua que es forma en el medi de reacció amb un agent deshidratant com és el sulfat sòdic. L'intermedi imínic **3**, que podria aïllar-se, es pot reduir amb un agent reductor apropiat com ara el borohidruir sòdic (NaBH₄) en el que s'anomena l'aminació reductora indirecta^{211,212}. Havent-se avaluat les activitats antivirals dels intermedis **3** anàlegs en treballs anteriors i no havent resultat actius, es decideix no aïllar-los en els acoblaments amb les noves amines **5** sintetitzades i procedir a la reducció amb borohidruir sòdic en el mateix medi de reacció.

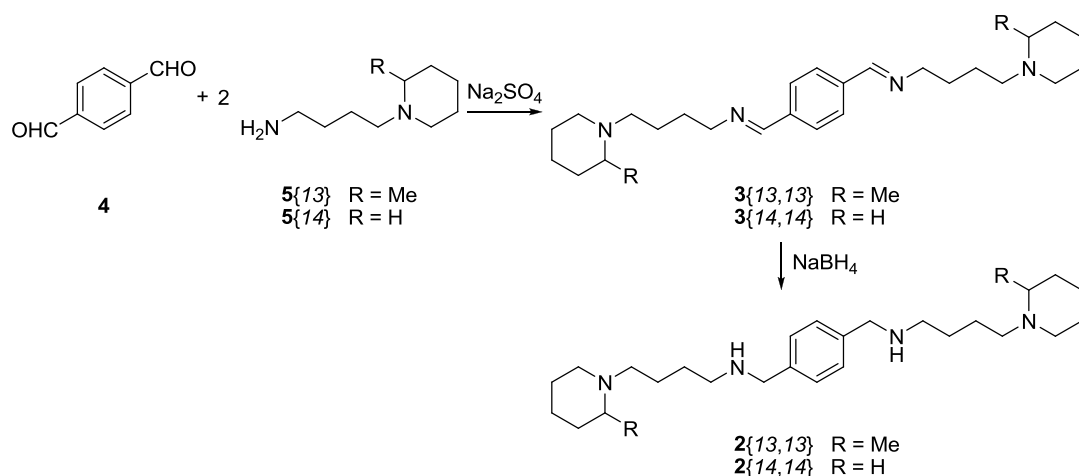


Figura 2.13 Aminació reductora per a l'obtenció de **2**{13,13} i **2**{14,14}

La reacció de mesclades estequiomètriques de **4** i **5**{x} en metanol i amb presència de Na₂SO₄ es duu inicialment a terme escalfant a reflux durant diverses hores. En experiments posteriors, s'ha assajat la síntesi de les diamines **2**{x,x} amb calefacció per microones, la qual ha demostrat ser més eficaç que la calefacció convencional per convecció²¹³ i suposa un gran avantatge pel que fa al temps de reacció (en dues hores s'aconsegueix la conversió completa dels reactius). L'estudi més exhaustiu, però, ha permès determinar que la conversió completa s'aconsegueix també, en el cas de fer reaccionar aldehids, en poc més de quatre hores fins i tot a temperatura ambient.

Cal remarcar en aquest punt la importància de fer reaccionar mesclades molt acurades pel que fa a les quantitats de reactius emprades, doncs un lleuger excés d'alguns dels reactius impurifica el producte final, el qual resulta molt difícil de purificar per cromatografia de columna, doncs les condicions cromatogràfiques no resulten sempre reproduïbles. Així, tenint en compte que la imina **3** intermèdia no

s'aïlla, un excés de tereftaldehid en la mescla inicial duu a productes **2** impurificats amb el dialcohol benzílic **57** (Figura 2.14), producte de la reducció del tereftaldehid amb NaBH_4 . Ja que les amines **5** provenen de síntesis anteriors, caldria poder-ne determinar la puresa (difícilment avaluable per RMN per coincidència de senyals), per tal d'ajustar la quantitat de tereftaldehid. D'altra banda, el possible excés d'amina **5** presenta una polaritat massa semblant al producte final en els intents de separar-la del producte d'acoblament **2** desitjat per cromatografia de columna.

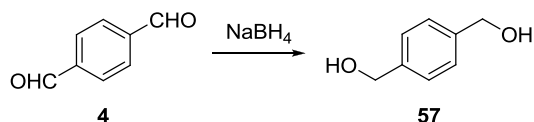


Figura 2.14 Reducció del tereftaldehid amb NaBH_4

El lleuger excés de tereftaldehid (**4**) és fàcilment detectable per la presència dels senyals característics de **57** en els espectres de ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) i ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75,5 MHz) de les diamines **2**{13,13} i **2**{14,14}. El protó benzílic s'enregistra com un singlet a 4,65 ppm i el carboni que el sustenta a 64,7 ppm, mentre que el carboni quaternari de l'anell aromàtic té un desplaçament químic molt similar a l'anàleg per a les diamines **2**, 140,0 ppm.

Sorpren que les diverses extraccions a diferents pH que es realitzen durant el tractament posterior a la reducció de les imines intermèdies **3** no siguin suficients per separar la impuresa **57** dels productes desitjats **2**, per la qual cosa se sintetitza el dialcohol benzílic per reducció de tereftaldehid amb NaBH_4 en metanol a temperatura ambient durant 5 hores. El producte **57** resultant és soluble en aigua, fet que explica que les extraccions no permetin separar-lo del tot de les diamines **2** sintetitzades.

Una alternativa proposada per a la purificació de les diamines **2**, que s'obtenen en forma d'oli groc, és la síntesi dels seus corresponents clorhidrats, que s'obtenen fent reaccionar l'oli amb HCl/EtOEt . El sòlid blanc que precipita, emperò, conté encara petites quantitats del dialcohol **57**.

Les diamines **2**{13,13} i **2**{14,14} s'obtenen finalment en forma lliure amb un rendiment del 40% i del 57% respectivament per calefacció amb microones. Havent-se obtingut quantitats suficients de producte pur per a l'avaluació de la seva activitat antiviral, no s'ha provat fins al moment d'optimitzar la síntesi per augmentar-ne el rendiment. L'avaluació de la seva activitat antiviral front al VIH al Laboratori de Retrovirologia de la Fundació IrsiCaixa de l'Hospital Germans Trias i Pujol es descriu en l'apartat 2.4, pàg. 96.

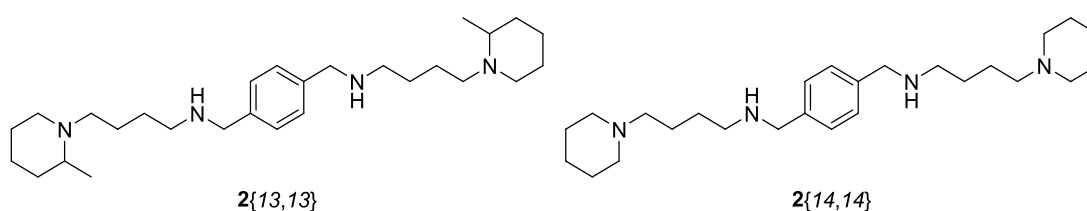


Figura 2.15 Acoblaments simètrics amb tereftaldehid sintetitzats

2.2.3.b. Acoblaments amb *p*-acetilbenzaldehyd (**11**)

Tot i l'ús d'un reactiu asimètric per a l'obtenció de les diamines **9**{x,x}, la reactivitat similar d'aldehids i cetones front a l'aminació reductora ha de permetre a priori obtenir els productes asimètricament disubstituïts en una sola etapa de reacció sense aïllar les imines **10** intermèdies, anàlogament a la síntesi de les diamines **2**{x,x} anterior (Figura 2.16).

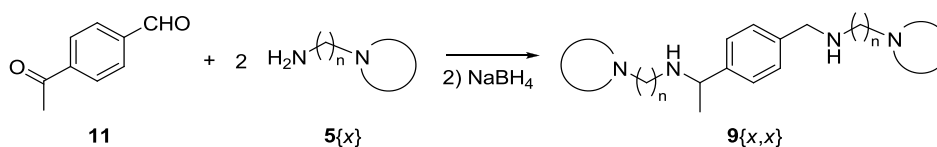


Figura 2.16 Obtenció dels acoblaments asimètricament disubstituïts $9\{x,x\}$ per aminació reductora

En el primer intent d'obtenir la diamina $9\{8,8\}$ no s'obté el producte final amb la puresa necessària per a l'avaluació de la seva activitat antiviral. Un estudi en profunditat de les impureses deixa palès que la conversió del reactiu **11** no és total, car s'identifiquen productes monosubstituïts probablement deguts a la menor reactivitat del carbonil cetònic respecte a l'aldehid.

Una posterior cerca bibliogràfica permet trobar un catalitzador com l'isopropòxid de titani (IV), emprat en aminacions reductores de reactius amb impediments estèrics o amb manca de reactivitat^{212,214,215}. Aquesta sal de metall de transició s'utilitza com a àcid de Lewis suau, compatible amb una varietat de grups funcionals sensibles a àcids com acetals, lactames, èters silícics i derivats de *tert*-butoxicarbonil²¹⁶. Tot i que el mecanisme de la catàlisi no està del tot elucidat, possiblement es produeix l'atac de l'amina **59** sobre la cetona **58** i es forma un complex metilaminoalcoholat de titani (IV) **60** amb el catalitzador (Figura 2.17)^{212,214,215,217}. L'intermedi forma la imina **61** que finalment es redueix mitjançant un reductor addicional a l'amina **62** desitjada.

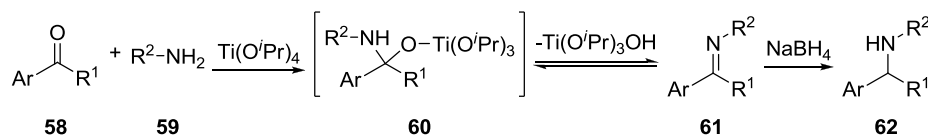


Figura 2.17 Mecanisme de l'aminació reductora amb catàlisi d'isopropòxid de titani

El complex intermedi **60** es forma, segons la metodologia descrita²¹², barrejant el compost carbonílic **58**, l'amina **59** i el catalitzador $(\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4)$ en etanol absolut a temperatura ambient entre 8 i 10 hores. L'agent reductor (NaBH_4) s'afegeix posteriorment i la mescla resultant es deixa agitant de nou unes 8 hores a temperatura ambient. Finalment, la reacció s'atura amb aigua bàsica (generalment unes gotes d' NH_3). El precipitat de TiO_2 així format es filtra i el filtrat s'extreu amb diclorometà. El producte desitjat s'aïlla de la fase orgànica, extraient amb HCl 1 M, basificant la fase aquosa per recuperar l'amina lliure i tornant a extreure amb diclorometà.

El principal inconvenient en l'ús d'aquesta metodologia per a l'obtenció de les diamines $9\{x,x\}$ seleccionades és la difícil manipulació del TiO_2 , un sòlid fi problemàtic a l'hora de filtrar, format en basificar el cru de reacció amb una dissolució aquosa. Una centrifugació prèvia a la filtració resol aquesta dificultat satisfactòriament.

La síntesi de la diamina $9\{8,8\}$ en primer lloc sense catalitzador i posteriorment emprant l'isopropòxid de titani mostra resultats reveladors: mentre que la síntesi sense catalitzador rendeix la diamina desitjada amb un rendiment de producte no aïllat del 55% i amb una puresa (estimada per $^1\text{H-RMN}$) de l'ordre del 80%, l'obtenció de la mateixa diamina $9\{8,8\}$ amb isopropòxid de titani té un rendiment proper al 70% i en l'espectre de $^1\text{H-RMN}$ no s'observa reactiu de partida.

La diamina **9**{12,12} s'ha sintetitzat sense el catalitzador, amb una puresa suficient per a la seva avaluació antiviral. El baix rendiment obtingut en aquest cas (21%) és en part degut a la pèrdua de producte durant la manipulació.

Els acoblaments amb les amines **5**{13} i **5**{14} s'han dut a terme directament amb el catalitzador descrit. Malauradament, l'acoblament amb l'amina **5**{13} no ha permès arribar al producte desitjat. La diamina **9**{14,14}, d'altra banda, s'ha obtingut amb un rendiment del 54%.

Els tres acoblaments amb *p*-acetilbenzaldehid (**11**) sintetitzats (Figura 2.18) es van enviar al Laboratori de Retrovirologia de la Fundació IrsiCaixa per a la seva avaluació antiviral (veure apartat 2.4, pàg. 96).

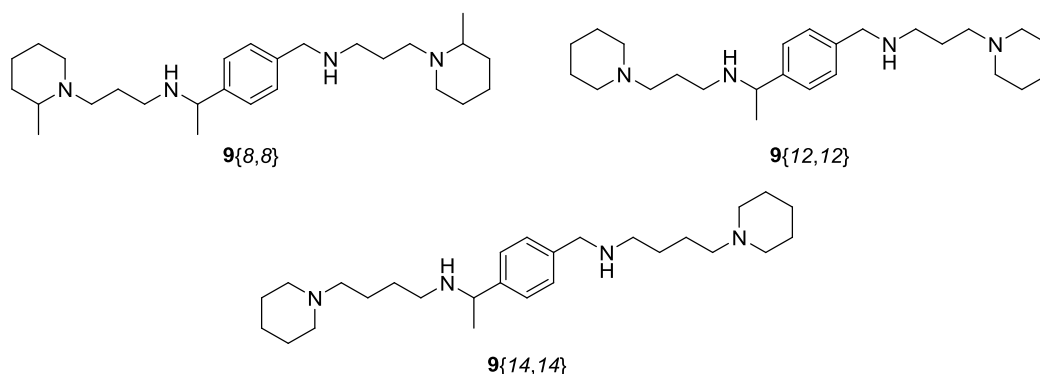


Figura 2.18 Diamines **9** simètricament substituïdes de les quals s'ha avaluat l'activitat anti-VIH

Anàlogament als acoblaments prèviament realitzats amb l'espaiador tereftaldehid (**4**), un greu problema de les síntesis dels productes **9** és la dificultat de purificar-los, de manera que una correcta proporció dels reactius és crítica per obtenir productes el més purs possibles, així com el fet de deixar evolucionar la reacció el temps necessari per afavorir la conversió completa. S'han estudiat diversos eluents i capes primes, arribant-se a la conclusió que la combinació més efectiva per a qualsevol intent de purificació dels productes **9** és la capa prima d'alúmina neutra i una mescla de diclorometà:metanol (80:20) com a eluent. Així, en algun cas s'ha pogut arribar a identificar com dues taques diferents el producte final desitjat i el subproducte de reducció de l'espaiador **11** (el qual es reconeix fàcilment en els espectres de RMN). Tanmateix, les separacions mitjançant columnes cromatogràfiques per gravetat o columnes flash no reproduïxen els resultats de les cromatografies de capa prima.

2.2.3.c. Acoblaments amb *p*-acetilacetofenona (**14**)

Amb el tercer espaiador, la *p*-acetilacetofenona (**14**), i tenint en compte que els dos grups funcionals que es volen fer reaccionar són carbonils cetònics, menys reactius que els aldehids, s'opta per assajar la síntesi de les diamines **12**{*x*,*x*}, amb les dues posicions benzíliques metilades, usant l'isopropòxid de titani (IV) com a catalitzador. Així doncs, la reacció que es pretén dur a terme és la que es mostra a la Figura 2.19.

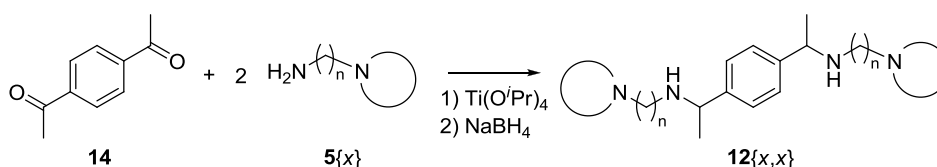


Figura 2.19 Aminació reductora catalitzada per a la síntesi de les diamines simètriques **12**

Els inconvenients que presenta aquesta reacció són anàlegs als descrits anteriorment per a la reacció amb el *p*-acetilbenzalhid (**11**): la manipulació del $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ i, molt especialment, del TiO_2 format amb el tractament bàsic aquós dificulta l'aïllament, i les pesades acurades dels reactius són crítiques i condicionen la puresa dels productes finals obtinguts, que resulten difícils de purificar per cromatografia de columna.

L'obtenció de **63** en les condicions de reacció de l'aminació reductora (agitació dels reactius dissolts en metanol a temperatura ambient durant unes 5 hores) corrobora que el producte de reducció de la *p*-acetilacetofenona (**14**) és soluble en aigua, fet que justifica la difícil purificació de les diamines **12** emprant extraccions líquid-líquid. La caracterització per RMN de **63** permet, addicionalment, identificar fàcilment els senyals característics de la impuresa en els espectres dels productes finals **12**, que n'indiquen la presència en els olis obtinguts.

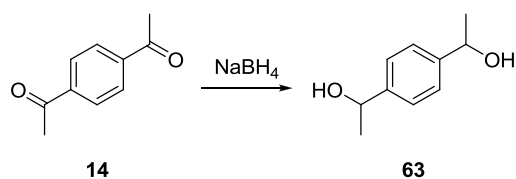


Figura 2.20 Reducció de la *p*-acetilacetofenona en les condicions de reacció de l'aminació reductora

Els rendiments d'obtenció dels compostos **12** simètricament substituïts són força més baixos que els aconseguits amb els anàlegs **9** descrits a l'apartat anterior, tant si les síntesis de **12** es fan amb catalitzador com sense. De fet, l'ús del catalitzador en aquests casos permet augmentar la puresa dels productes **12** obtinguts, però no augmentar-ne el rendiment.

Sense emprar isopropòxid de titani s'obté la diamina **12**{8,8} amb un rendiment de producte no aïllat de l'ordre del 34% (estimat per ^1H -RMN) i una puresa de l'ordre del 40%, mentre que l'ús del catalitzador té efectes negatius sobre el rendiment global (21%, per la dificultat en la filtració del TiO_2) però augmenta la puresa del compost final fins a un 96% (estimada per ^1H -RMN).

Pel que fa a la diamina **12**{12,12}, pèrdues durant la filtració del TiO_2 han dut el rendiment global de la reacció fins al 12%, però el producte desitjat s'obté de qualitat suficient com per avaluar-ne l'activitat anti-VIH (veure apartat 2.4, pàg. 96).

Finalment, els acoblaments amb les amines sintetitzades, **5**{13} i **5**{14}, que presenten quatre baules metilèniques entre els dos àtoms de nitrogen han resultat més problemàtiques. **12**{13,13} s'ha aconseguit amb un rendiment inferior al 5%, però en quantitats suficients com per caracteritzar el producte i enviar a avaluar la seva activitat biològica. En cap dels diversos intents de síntesi de la diamina **12**{14,14}, sorprenentment, no s'ha obtingut el producte desitjat, sinó crus molt complexos que no s'han pogut caracteritzar.

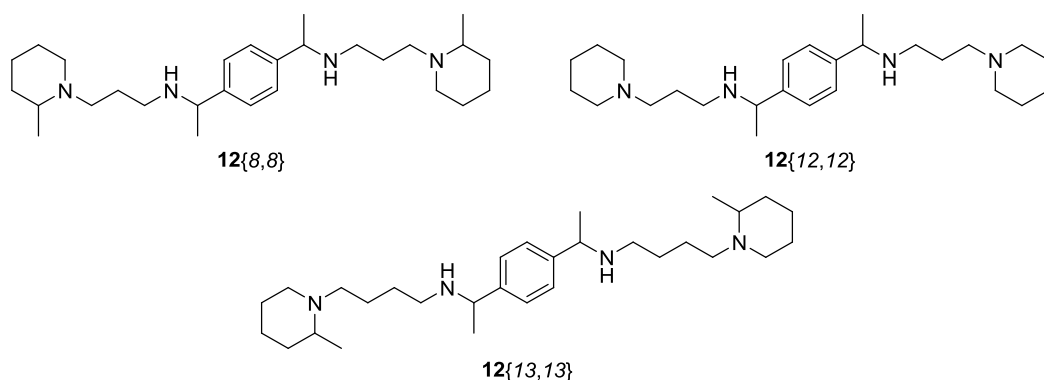


Figura 2.21 Compostos **12** simètricament substituïts dels quals s'ha avaluat l'activitat antiviral

2.2.4. Síntesi dels acoblaments asimètrics seleccionats

L'obtenció de sistemes *p*-xililènics asimètricament disubstituïts requereix de reactius que permetin fer la reacció d'aminació reductora amb una amina **5**{*x*} selectivament per un dels costats de l'anell aromàtic que fa d'espaiador, i posteriorment dur a terme l'acoblament amb una amina **5**{*y*} diferent de la primera sobre el compost monosubstituït format.

2.2.4.a. Acoblaments amb tereftaldehid (**4**)

Els acoblaments amb tereftaldehid rendeixen en qualsevol cas anàlegs de l'AMD3100 sense metils en les posicions benzíliques. Els sistemes **2** asimètricament disubstituïts poden obtenir-se, seguint la metodologia prèviament emprada al grup^{145,146}, per reacció del monoacetal diètilic comercial del tereftaldehid (**6**) amb una amina **5**{*y*}. La posterior desprotecció de l'acetal **64**{*y*} en medi àcid permet que l'aldehid **65**{*y*} que en resulta pugui sotmetre's a l'aminació reductora amb una amina **5**{*x*} diferent de la primera per obtenir el compost **2**{*x,y*} desitjat (Figura 2.22).

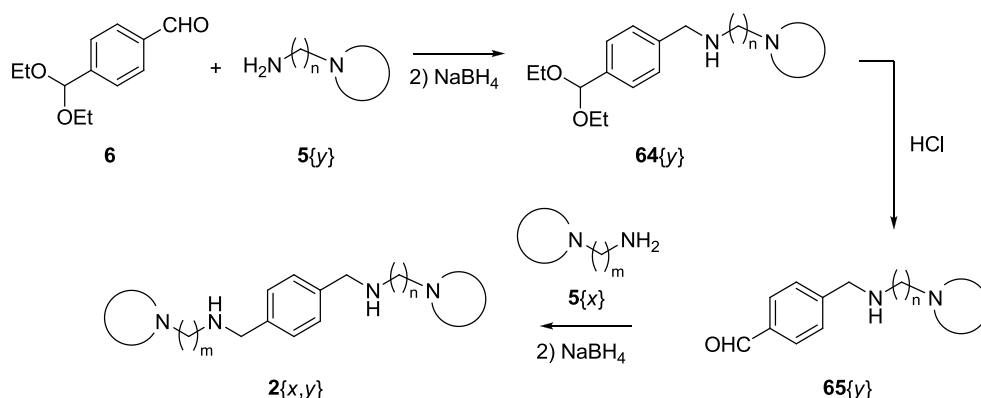


Figura 2.22 Esquema sintètic per a l'obtenció de diamines **2** asimètricament disubstituïdes

L'aplicació del model QSAR sobre les diamines **2**{*x,y*} (Taula 2.5, pàg. 80 i Taula 2.8, pàg. 81) ha donat prediccions d'activitat superiors en pràcticament tots els casos als 0,150 μM, valor que s'ha considerat insuficient per a la selecció de qualsevol d'aquests compostos. En conseqüència, es descarta la seva síntesi.

2.2.4.b. Acoblaments amb *p*-acetilbenzaldehyd (**11**)

La no simetria del reactiu **11** emprat per a l'obtenció de sistemes **9** és justament l'avantatge que permet obtenir sistemes **9**_{x,y} (Figura 2.23). Durant la síntesi dels adductes **9**_{x,x} (apartat 2.2.3.b, pàg. 84), s'ha comprovat experimentalment la major reactivitat de l'aldehyd front a la cetona del *p*-acetilbenzaldehyd (**11**). Aprofitant aquest fet, es tractarà en primer lloc el grup aldehyd de **11** amb una amina **5**_{y}, a temperatura ambient i sense catàlisi, per obtenir la imina **66**_{y} sense reduir. Aquesta es farà reaccionar posteriorment amb una altra amina **5**_{x} en presència del catalitzador d'isopropòxid de titani (IV) per millorar la conversió del carbonil cetònic. Un cop obtinguda la diimina **10**_{x,y} es tractaran els dos grups imínics simultàniament amb borohidrur sòdic per obtenir el producte reduït **9**_{x,y} desitjat. Val la pena remarcar que la reducció de la primera imina formada no es pot dur a terme abans de l'acoblament amb la segona amina (**5**_{x}), doncs el carbonil cetònic es reduiria durant el tractament de **66**_{y} amb NaBH₄.

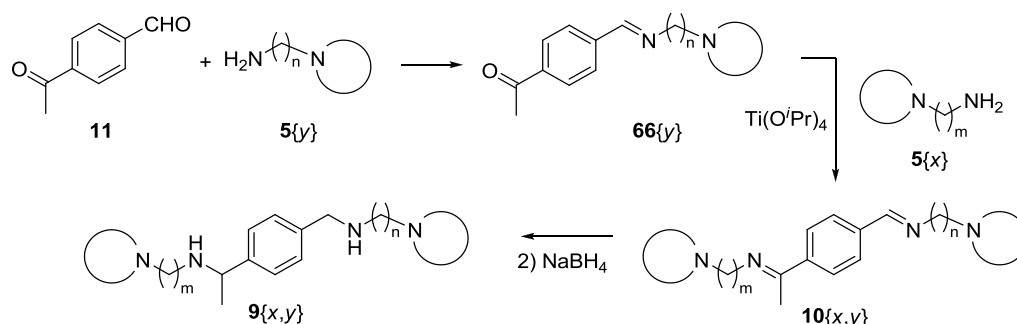


Figura 2.23 Síntesi dels sistemes **9** asimètricament disubstituits

En les obtencions dels productes **9**_{x,y}, tant els intermedis **66**_{y} com els compostos finals desitjats són difícils de purificar per cromatografia de columna de la mateixa manera que ha succeït en els acoblaments anteriors, de manera que cal ser molt acurat en les pesades dels reactius emprats.

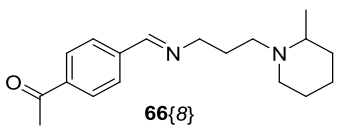
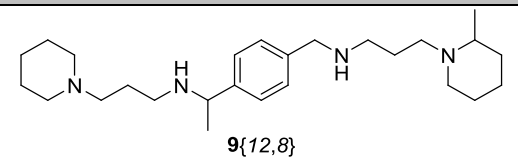
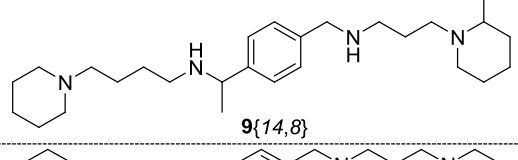
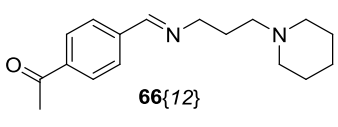
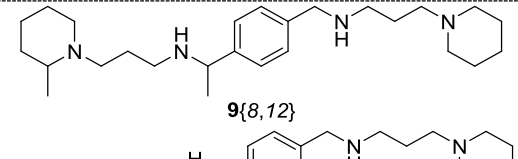
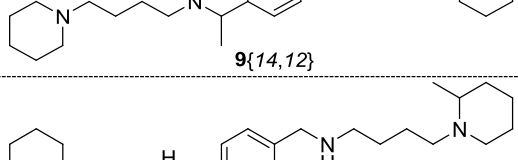
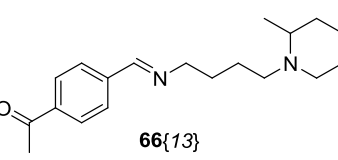
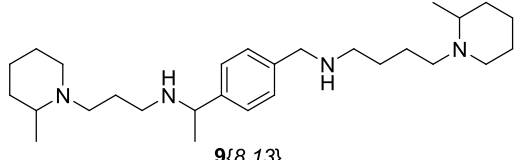
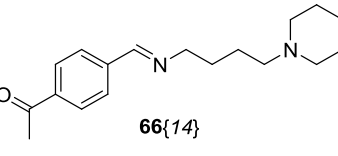
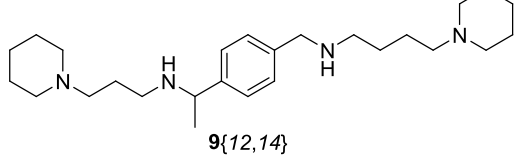
De totes les combinacions de l'espaiador **11** amb les amines en estudi **5**_{8}, **5**_{12}, **5**_{13} i **5**_{14}, s'han tingut en compte per a la selecció tant els valors d'activitat predits amb el model QSAR aplicat com criteris de disponibilitat dels reactius de partida. Ja que les amines **5**_{8} i **5**_{12} són comercialment disponibles, aquestes no limiten la selecció, mentre que la necessitat de sintetitzar prèviament les amines **5**_{13} i **5**_{14} i la voluntat de centrar la selecció entorn d'activitats predites de 0,1 μM fa triar els compostos **9**_{12,8}, **9**_{14,8}, **9**_{8,12}, **9**_{14,12}, **9**_{8,13}, **9**_{12,14} per a la seva síntesi i avaluació antiviral.

En primer lloc es proven de sintetitzar els intermedis **66**_{8}, **66**_{12}, **66**_{13} i **66**_{14} necessaris. El tractament de l'espaiador **11** amb les amines **5**_{8}, **5**_{12} i **5**_{13} en metanol anhidre i atmosfera de nitrogen, a temperatura ambient durant 5 hores rendeix els compostos **66**_{8}, **66**_{12} i **66**_{13} desitjats sense dificultats afegides i amb rendiments superiors al 80%. L'acoblament amb **5**_{14}, sorprenentment, requereix de fins a 48 hores per completar-se. Després de la filtració de l'agent dessecant i les extraccions pertinents, s'obté **66**_{14} amb un rendiment del 70%.

Un cop obtinguts els sistemes monosubstituïts **66**_{y}, s'acoblen amb les amines **5**_{x} necessàries per obtenir les diïmines intermèdies **10**_{x,y}, emprant isopropòxid de titani (IV) com a catalitzador. Les diïmines **10**_{x,y} no s'aïllen i es redueixen seguidament amb borohidrur sòdic a les diamines **9**_{x,y} seleccionades, en el mateix medi de reacció. La Taula 2.9 mostra els rendiments obtinguts tant per als intermedis **66**_{y} com per a les diamines **9**_{x,y} sintetitzades. Tal com ja havia passat en els acoblaments simètrics, l'aminació reductora amb el grup cetona de **11**, tot i que catalitzada per Ti(O*i*Pr)₄, té rendiments força inferiors als obtinguts per a la formació de la imina amb el grup aldehyd. Per a **9**_{12,8} i

9{14,8}, els rendiments s'han calculat com a producte no aïllat del 85% i 80% de puresa, respectivament. L'espectre de ^1H -RMN mostra part del reactiu **66**{8} sense reaccionar, identificat pel senyal a 4,87 ppm del protó benzílic que resulta de la reducció del grup acetil amb NaBH_4 . S'ha caracteritzat **9**{8,12} en part gràcies a l'espectre de masses d'alta resolució, doncs l'espectre de ^1H -RMN mostra més senyals dels esperats i no s'ha pogut purificar per cromatografia de columna. Pèrdues de producte durant la manipulació posterior han contribuït parcialment rendiment inferior al 30% obtingut per a **9**{14,12} (amb una puresa estimada del 83%).

Taula 2.9 Rendiments dels intermedis 66{y} i dels acoblaments asimètrics 9{x,y} sintetitzats

intermedi 66{y}	rendiment	diamina 9{x,y}	rendiment	rendiment global des del precursor 11
 66{8}	81%	 9{12,8}	65%	52%
		 9{14,8}	68%	55%
 66{12}	93%	 9{8,12}	32%	30%
		 9{14,12}	28%	26%
 66{13}	82%	 9{8,13}	79%	65%
 66{14}	70%	 9{12,14}	86%	60%

2.2.4.c. Acoblaments amb *p*-acetilacetofenona (**14**)

Segons els valors d'activitat predits pel model QSAR, resultaria molt interessant l'obtenció de sistemes asimètricament disubstituïts **12**{*g*,*y*}, doncs totes les prediccions d'activitat són inferiors als 0,060 μM. Tanmateix, la manca de reactius comercials amb un dels dos grups acetil de **14** protegits dificulta molt l'obtenció de sistemes asimètricament disubstituïts **12**{*x*,*y*}. Tot i que aquest es considera motiu suficient per no haver fet la selecció de cap compost **12** que contingui dues amines **5** diferents, s'ha assajat la unió selectiva de **5**{*1*} per un sol costat de l'anell aromàtic de **14** fent una addició lenta de l'amina sobre l'espaiador, en defecte d'amina (relació **5**:**14** de 1:2). Tot i que s'ha intentat purificar la mescla resultant mitjançant dues cromatografies de columna consecutives, les fraccions que se n'obtenen resulten mínimes i encara massa impures.

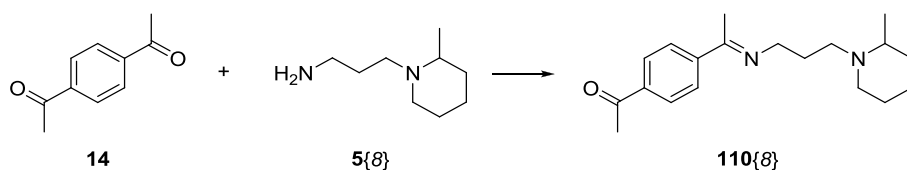


Figura 2.24 Intent de monoacoblament sobre **14** per rendir **110**, precursor de possibles sistemes **12**{*g*,*x*} asimètricament disubstituïts

2.3. Síntesi dels estereoisòmers del cap de sèrie descrit al GEM

Tal com ja s'ha comentat anteriorment, el projecte de la sida al GEM va portar a la identificació del compost **2**{*g*,*g*} com a cap de sèrie amb activitat antiviral submicromolar, del mateix ordre de magnitud que l'AMD3100 pres de referència com a inhibidor del coreceptor d'entrada CXCR4^{145,146}. Aquest compost, patentat en una gran família l'any 2006¹⁴⁷, presenta dos centres quirals i, per tant, no s'ha de perdre de vista que l'activitat antiviral descrita és la que presenta la mescla dels tres estereoisòmers: aquell amb els dos centres quirals *S* (**2**{*gS*,*gS*}), la seva imatge especular (**2**{*gR*,*gR*})) i la forma meso, que conté un centre quiral amb configuració *R* i un centre *S* i presenta pla de simetria (**2**{*gS*,*gR*})) (Figura 2.25).

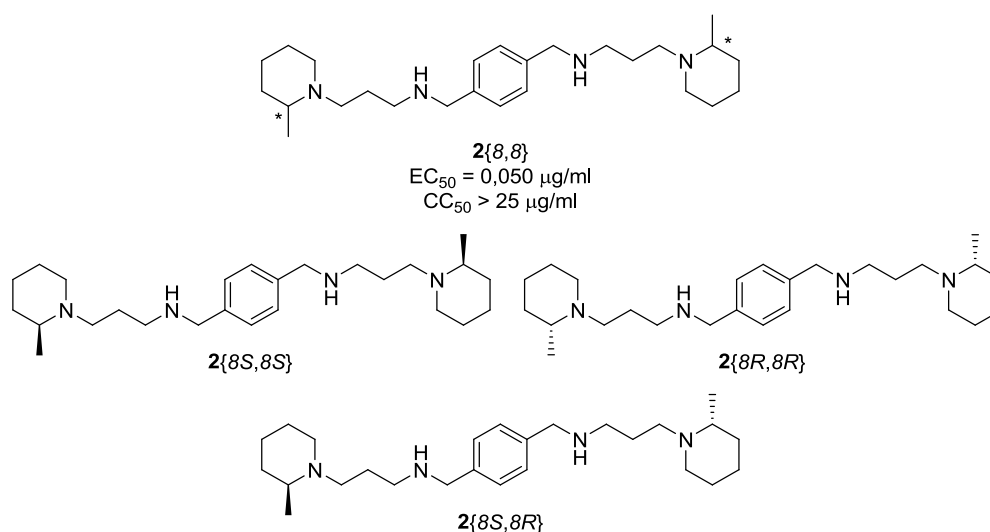


Figura 2.25 Diamina **2** descrita com a més activa i els seus tres estereoisòmers

En el passat, els fàrmacs quirals es desenvolupaven com a racemats (si la molècula presentava un sol centre quiral) o com a mescles diastereomèriques (si en presentava més d'un). L'any 1984, E.J. Ariens va remarcar que, tenint en compte l'entorn quiral que solen presentar els receptors biològics, l'estereoselectivitat implicaria que només un dels compostos de la mescla seria terapèuticament actiu. En qualsevol cas, criticava els racemats com a compostos que contenen un 50% d'impureses, les quals podrien contribuir potencialment als efectes secundaris que presentés el fàrmac. També es podria donar la situació que els dos isòmers tinguessin activitats biològiques oposades, que fos possible la inversió metabòlica estereoselectiva d'un dels enantiòmers o fins i tot que, en aquells fàrmacs amb més d'una activitat biològica, només una d'elles fos determinada per l'estereoselectivitat²¹⁸. La relació eudísmica, calculada com la relació entre la EC_{50} de l'enantiòmer més actiu (eutòmer) respecte la del menys actiu (distòmer) és la mesura usual de l'estereoselectivitat d'un fàrmac front a un receptor específic²¹⁹.

En aquest sentit, en les darreres dècades, les companyies farmacèutiques han estès la vida dels seus fàrmacs quirals, si es van aprovar inicialment com a racemats, amb l'anomenat canvi quiral (*chiral switch*), protegint mitjançant noves patents l'enantiòmer biològicament actiu en comptes de la mescla racèmica (els antiinflamatoris ibuprofè i ketoprofè, l'antiasmàtic albuterol o el protector gàstric omeprazole en són casos coneguts)²²⁰⁻²²². De fet, als anys vuitanta ja hi havia molts fàrmacs aprovats com un únic enantiòmer, fins i tot abans que les noves directives fomentessin el desenvolupament i comercialització de compostos enantiomèricament purs²²²⁻²²⁵. Des de principis dels noranta, la directiva europea 75/318/EEC de l'Agència de Fàrmacs Europea i les següents revisions fixen que cal justificar l'elecció d'un racemat en comptes d'un dels estereoisòmers concrets per a l'aprovació d'un nou fàrmac²²⁶, la qual cosa ha dut a una davallada del nombre de mescles estereoisomèriques aprovades com a nous fàrmacs des de finals del segle XX (Figura 2.26).

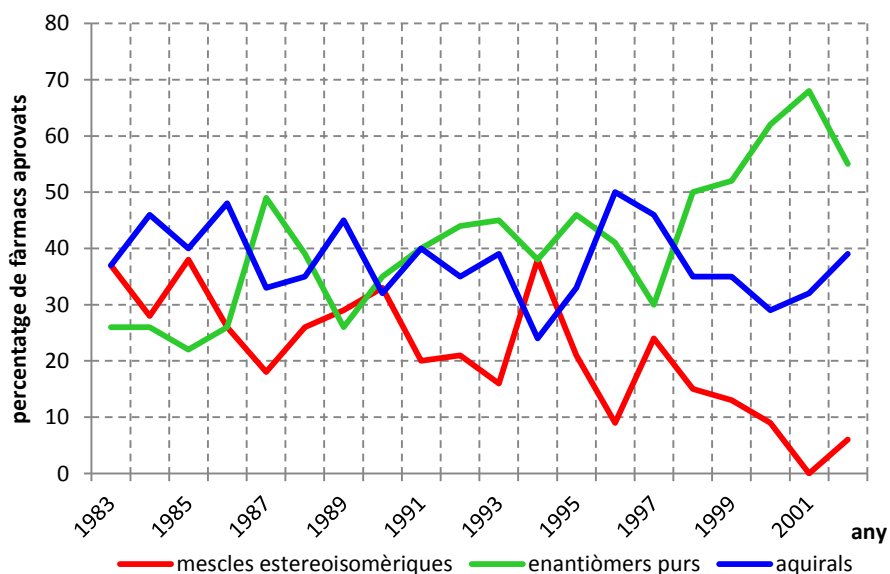


Figura 2.26 Evolució dels fàrmacs quirals aprovats en el període 1983 - 2002

La importància de la caracterització dels centres quirals que formen part d'un fàrmac queda palesa amb casos tan tràgics com el de la talidomida, emprada als anys cinquanta com a sedant i retirada del mercat al 1961 per considerar-se la causant de desenes de milers de malformacions en nounats, les mares dels quals prengueren talidomida durant l'embaràs. El fàrmac, un derivat de l'àcid glutàmic, presenta un centre quiral que, en la seva conformació *S*, resulta teratogènic. Tot i que s'ha afirmat que s'hagués pogut evitar la tragèdia administrant tant sols l'enantiòmer *R* en comptes del

racemat, s'ha demostrat que el centre quiral és inestable i pateix una ràpida inversió de configuració en medis protonats²²² (Figura 2.27).

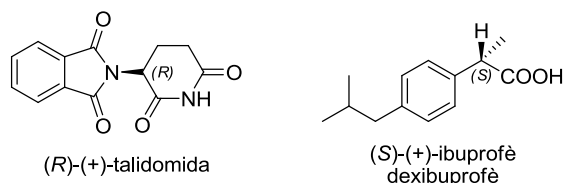


Figura 2.27 Fàrmacs amb una sola forma quiral activa

Un altre cas més proper i favorable és el de l'ibuprofè (Figura 2.27), un antiinflamatori no esteroïdal (AINE) amb un carboni quiral que és actiu en la seva forma *S* (dexibuprofè) i que sol administrar-se com a racemat perquè s'ha demostrat la inversió metabòlica (per la isomerasa α -metil-CoA racemasa) de l'enantiòmer *R* a la forma activa²²⁷.

Casos més curiosos de dissimilitud biològica es mostren a la Figura 2.28, en què els dos enantiòmers del mateix compost (limonè, carvona i asparagina) presenten gustos o olors totalment diferents^{219,225}.

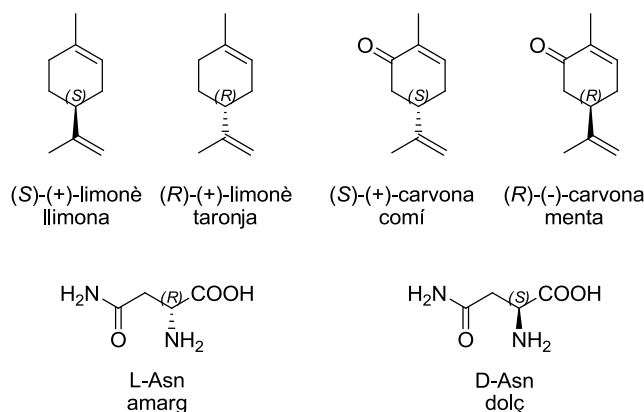


Figura 2.28 Compostos enantiomèrics amb característiques organolèptiques diferencials

Així doncs, de cara a avaluar l'activitat antiviral per separat dels dos enantiòmers i la forma meso del compost **2{8,8}**, identificat com a cap de sèrie, el segon objectiu d'aquest capítol és la síntesi dels tres compostos per separat, a partir dels precursors homoquirals, per tal d'evitar separacions de la mescla o auxiliars quirals.

2.3.1. Síntesi dels dos enantiòmers de l'amina **5{8}**

Tenint en compte que l'amina primària **5{8}** només és comercialment disponible com a mescla racèmica, cal obtenir en primer lloc les amines homoquirals **5{8S}** i **5{8R}**. De la mateixa manera que s'ha fet per a la síntesi de les amines **5{13}** i **5{14}**, la reacció de Gabriel es pren com la millor via sintètica per a l'obtenció de les amines enantiomèriques **5{8S}** i **5{8R}** a partir de la (*S*)-2-metilpiperidina (**50S**) i la (*R*)-2-metilpiperidina (**50R**) (Figura 2.29). Bo i que la resolució de **50** està descrita²²⁸ s'ha optat per adquirir-les, donat que estan disponibles comercialment amb una puresa del 97% sense especificar, però, l'excés enantiomèric (ee). Curiosament, el derivat **50R** només s'ha pogut adquirir en forma de clorhidrat **50R·HCl** (680 €/10 g, equivalents a 93 €/1 g d'amina lliure), mentre que la 2-metilpiperidina **50S** és comercialitzada per Sigma-Aldrich en forma d'amina lliure (128 €/1 g). Si bé en el cas de les amines **5{13}** i **5{14}** s'ha emprat l'excés descrit del derivat piperidínic **50** o **51** en reflux d'acetona durant

12 hores¹⁹⁷, l'obtenció dels dos isòmers de la *N*-(3-aminopropil)-2-pipecolina **5{8S}** i **5{8R}** hauria de ser idealment possible a partir de quantitats estequiomètriques dels reactius, que evitessin el consum innecessari del compost homoquiral, així com la necessitat de purificacions intermèdies.

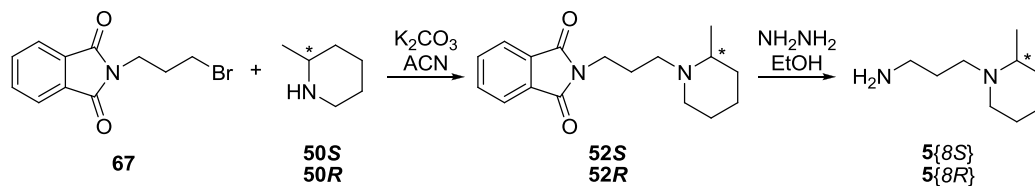


Figura 2.29 Obtenció dels dos estereoisòmers de l'amina **5{8}**

Així doncs, una nova cerca amb l'*SciFinder*[®] *web version*²²⁹ permet trobar descrita una nova metodologia més recent en què s'empra una base inorgànica insoluble en el medi de reacció (K_2CO_3) per capturar el bromur d'hidrogen que es desprèn en la primera etapa sintètica, fet que permet l'ús d'un menor excés de reactius (1,2:1 de la 2-pipecolina **50** respecte a la ftalimida derivatitzada **67**) o fins i tot emprar-ne quantitats estequiomètriques¹⁹⁸ (Figura 2.29). Emprant acetonitril en comptes d'acetona com a dissolvent també es redueix el temps de reacció a la meitat, tot i que s'ha preferit mantenir el reflux durant 8 hores per assegurar la conversió completa dels reactius. Les condicions d'hidròlisi dels intermedis **52** emprades en aquest cas també són més suaus, doncs s'usa hidrazina etanòlica en comptes d'àcid clorhídric 6 M per a l'obtenció de les amines **5{8S}** i **5{8R}** a partir de la ftalimida derivatitzada.

Els derivats **52S** i **52R** s'han obtingut amb la metodologia descrita per Jo i col·laboradors¹⁹⁸ amb rendiments superiors al 85%, sense tenir en compte el rendiment de l'extracció prèvia del clorhidrat **50R·HCl** que es requereix per disposar de **50R**. La solubilitat en aigua de l'amina lliure **50**, comprovada experimentalment i bibliogràfica²²⁸, dificulta l'extracció quantitativa del clorhidrat i fa augmentar el preu per mol de l'amina homoquiral **50R**. Les amines objectiu **5{8S}** i **5{8R}** s'han obtingut a partir dels seus precursors amb rendiments superiors al 70%, els quals suposen un rendiment global per a l'obtenció de les amines homoquirals per sobre del 60%.

La rotació específica ($[\alpha]_D$) de la (*S*)-2-metilpiperidina (**50S**) s'ha descrit amb valors variables entre +3,9 ° i +36,4 °^{228,230}, fet que dificulta la determinació de la puresa enantiomèrica del reactiu comercial emprat, del qual s'ha mesurat $[\alpha]_D = +14,2$ ° (concentració 10 mg/ml en $CHCl_3$). Tant **52S** com **5{8S}** han resultat també dextrogirs, amb rotacions específiques de +39,4 ° (concentració 10 mg/ml en $CHCl_3$) i +69,5 ° (concentració 15 mg/ml en $CHCl_3$) respectivament.

El clorhidrat que s'ha adquirit (**50R·HCl**) ha demostrat no ésser enantiomèricament pur, la rotació específica determinada per al reactiu comercial ha resultat també dextrogir ($[\alpha]_D = +4,3$ °, concentració 17 mg/ml en H_2O). L'alliberament del clorhidrat ha rendit la (*R*)-2-metilpiperidina (**50R**) com un oli incolor levogir, de $[\alpha]_D = -5,9$ ° (concentració 14 mg/ml en $CHCl_3$). Prenent com a referència el valor de $[\alpha]_D = +14,2$ ° obtingut anteriorment per **50S**, l'excés enantiomèric de **50R** és inferior al 40%. Tant **52R** com **5{8R}** han mantingut el signe de la rotació del precursor, conservant l'excés enantiomèric.

2.3.2. Síntesi dels tres estereoisòmers de la diamina **2{8,8}**

L'obtenció dels estereoisòmers **2{8S,8S}** i **2{8R,8R}** s'ha dut a terme seguint la metodologia descrita prèviament al grup per a **2{8,8}**^{145,146}, on es fan reaccionar dos equivalents de l'amina homoquiral **5{8}** amb un equivalent de tereftaldehid (**4**) i la imina intermèdia formada es redueix sense aïllar a l'estructura desitjada **2{8S,8S}** o **2{8R,8R}** (Figura 2.30).

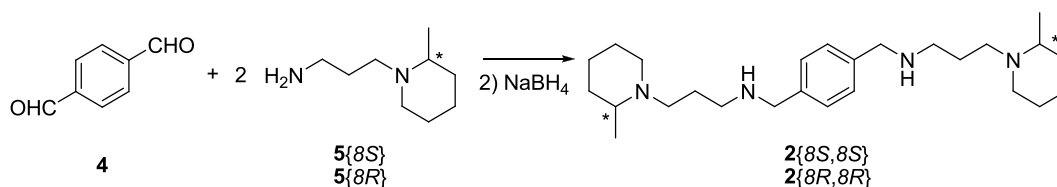


Figura 2.30 Síntesi dels dos enantiòmers de l'amina **2**{8,8}

Pel que fa a la forma meso **2**{8*S*,8*R*}, ja que les amines que hi ha a cada banda de l'espaiador aromàtic són diferents, la seva obtenció passa necessàriament pel tereftaldehid monoprotegit **6** (Figura 2.31).

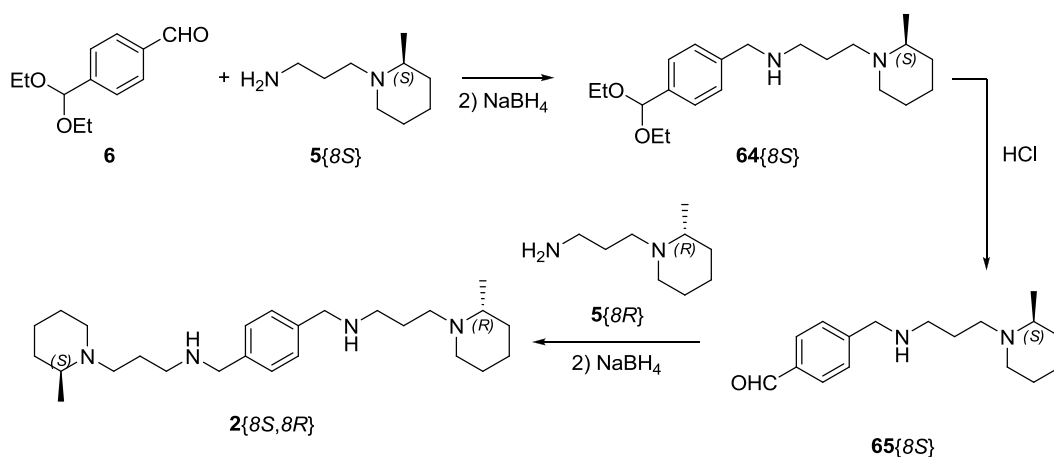


Figura 2.31 Obtenció de la forma meso del cap de sèrie anteriorment descrit al GEM

L'ordre en què es realitzen les aminacions reductores amb les amines enantiomèriques **5**{8*S*} i **5**{8*R*} és, a priori, indistint. Tanmateix, s'ha optat per emprar primer l'amina **5**{8*S*} per diverses raons, entre les quals la seva disponibilitat immediata. A més, l'extracció en medi bàsic que es requereix per a l'obtenció de **5**{8*R*} augmenta el seu preu per mol, equiparant-lo al del seu enantiòmer, per la qual cosa s'ha cregut convenient reservar-lo per a la darrera etapa sintètica.

Igual que els seus precursors, **2**{8*S*,8*S*} ha resultat dextrogir ($[\alpha]_D = +35,4^\circ$, concentració 11 mg/ml en CDCl_3) i **2**{8*R*,8*R*} levogir ($[\alpha]_D = -12,9^\circ$, concentració 11 mg/ml en CDCl_3 , la qual cosa representa un excés enantiomèric inferior al 36%).

Els tres estereoisòmers del cap de sèrie anteriorment descrit al GEM **2**{8,8} s'han provat de purificar obtenint-ne els clorhidrats en metanol (**2**{8*S*,8*S*}-4HCl, **2**{8*R*,8*R*}-4HCl, **2**{8*S*,8*R*}-4HCl). De tota manera, com que les sals són solubles en el medi metanòlic, s'ha hagut d'eliminar el dissolvent a pressió reduïda i els clorhidrats han quedat lleugerament colorats, tot i que la puresa es considera suficient per a la seva caracterització i l'avaluació de l'activitat biològica.

2.4. Avaluació de l'activitat antiviral de l'ampliació de la quimioteca

Un cop obtinguts i caracteritzats els compostos objectiu, al voltant de 10 mg de producte, que ha de tenir una puresa superior al 80%, s'envien al Laboratori de Retrovirologia de la Fundació IrsiCaixa, a

l'Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona, per a la determinació de la seva activitat antiviral front al VIH-1.

L'avaluació de l'activitat anti-VIH es realitza mitjançant l'assaig colorimètric del bromur de 3-(4,4-dimetiltiazole-2-il)-2,5-difeniltetrazole (MTT) ²³¹, tant en cultius infectats en què es vol avaluar l'activitat antiviral (EC₅₀) com en cultius no infectats on es determina la toxicitat dels compostos en el cultiu (CC₅₀). L'MTT és un tetrazole de color groc que es redueix a formazan, de color porpra, en les cèl·lules vives per acció de la succinat deshidrogenasa dels mitocondris. Així, les cèl·lules del cultiu que són viables redueixen el tetrazole i donen coloració porpra, mentre que les cèl·lules que moren en el cultiu (sigui per l'acció citotòxica del compost avaluat o per l'acció del VIH-1) no metabolitzen l'MTT i deixen el cultiu de color groc. L'assaig, estandarditzat per una placa de 96 pous, empra cèl·lules MT-4 (línia cel·lular provinent de les cèl·lules T humanes aïllades d'un pacient amb leucèmia de cèl·lules T) que s'infecten amb la soca salvatge del VIH-1_{NL4-3}, la qual presenta tropisme X4 ²³².

Per a tots els compostos avaluats es determina l'EC₅₀ i la CC₅₀, en base a la viabilitat de les cèl·lules MT-4 infectades o no infectades amb el virus, a diferents concentracions dels compostos a analitzar dissolts en la mínima quantitat de DMSO, que és tòxic per a les cèl·lules a concentracions superiors al 0,8%. El cultiu s'incuba durant 5 dies i es quantifica el nombre de cèl·lules viables mitjançant el mètode colorimètric d'MTT. Per comprovar la validesa dels resultats, es prenen com a referència de l'assaig el biclicam AMD3100 (inhibidor del coreceptor CXCR4), l'AZT (Zidovudina, ITIAN), la NVP (Nevirapina, el primer ITINAN aprovat) i l'EFV (Efavirenz, ITINAN). En alguns casos s'avalua simultàniament l'activitat antiviral del sulfat de dextrà (DS, EC₅₀ = 0,011 µg/ml), un polisacàrid inhibidor de la unió del virus a la cèl·lula per interacció amb la proteïna gp120. La màxima concentració assajada per als nous compostos sol ser de l'ordre dels 25 µg/ml.

La Figura 2.32 mostra els resultats obtinguts en les avaluacions de les activitats dels compostos sintetitzats. Els assajos solen fer-se per duplicat o triplicat, doncs el mateix mètode pot donar valors dispersos en diferents mesures (pel cap de sèrie de referència 2{8,8} s'han determinat valors de 0,008 µg/ml i 0,050 µg/ml en diferents avaluacions).

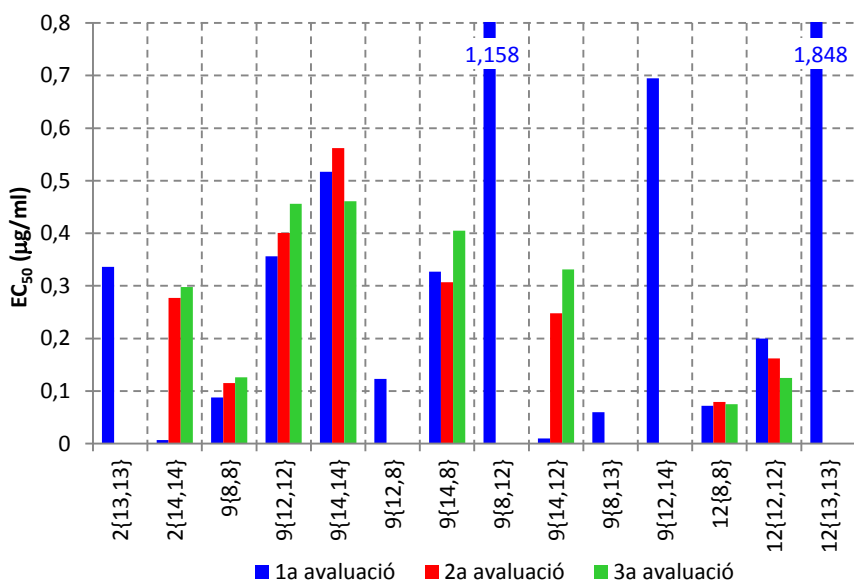


Figura 2.32 Activitats antivirals obtingudes en l'avaluació per triplicat

Els valors de l'activitat per a les molècules 2{14,14} i 9{14,12} presenten desviacions estàndard superiors a 0,15. Una anàlisi dels valors experimentals obtinguts permet identificar la primera avaluació

d'aquests dos compostos com a errònia, tenint en compte que difereix en gairebé dos ordres de magnitud de la segona i tercera avaluació. A més, l'activitat antiviral obtinguda per a l'AMD3100 patró en aquell mateix assaig fou menor a l'esperada (però no per a altres patrons simultanis), cosa que justifica també l'eliminació dels dos punts erronis.

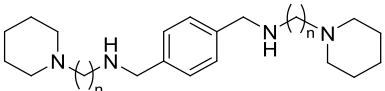
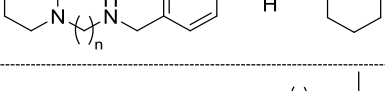
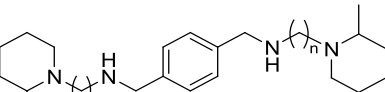
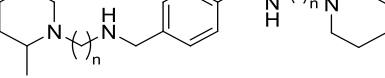
La Taula 2.10 mostra les mitjanes de les activitats i citotoxicitats obtingudes (en µg/ml), havent eliminat prèviament els punts que s'han considerat erronis. Les EC₅₀ predites amb el model QSAR en unitats micromolars (Taula 2.5, pàg. 80 a Taula 2.8, pàg. 81) s'han recalculat a µg/ml per poder-les comparar fàcilment amb els valors experimentals. S'han ombrejat de color blau cel aquells compostos dels quals se n'ha fet una única avaluació i s'ha marcat en negreta el compost més actiu de la selecció sintetitzada.

Taula 2.10 Activitats mitjanes obtingudes per als compostos sintetitzats de la nova quimioteca

compost	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml) predita	CC ₅₀ (µg/ml)
AMD3100	0,003	--	> 1
AZT	0,0012	--	> 1
NVP	0,026	--	> 2
EFV	0,0009	--	> 1
2{8,8}	0,050	0,0522	> 25
2{12,12}	0,140	0,1589	> 25
2{13,13}	0,336	0,0390	> 25
2{14,14}	0,288	0,0452	> 25
9{8,8}	0,110	0,0240	> 25
9{12,12}	0,404	0,0901	> 25
9{14,14}	0,513	0,0279	> 25
9{12,8}	0,123	0,0514	> 25
9{14,8}	0,346	0,0292	> 25
9{8,12}	0,158	0,0581	> 25
9{14,12}	0,290	0,0547	> 25
9{8,13}	0,060	0,0027	> 25
9{12,14}	0,695	0,0510	> 25
12{8,8}	0,075	0,0173	> 25
12{12,12}	0,162	0,0560	> 25
12{13,13}	1,848	0,0094	> 25

D'una banda, queda demostrat que l'augment de la distància entre els dos àtoms de nitrogen que es troben al mateix costat de l'espaiador aromàtic (compostos derivats de les amines **5{13}** i **5{14}**) no millora l'activitat anti-VIH, mentre que no repercuteix en la citotoxicitat. Comparant estructures anàlogues amb tres o quatre baules metilèniques entre els dos nitrògens queda palès que l'ús de les amines **5{13}** i **5{14}** manté l'activitat en el mateix ordre de magnitud (**2{12,12}** respecte **2{14,14}**) o la disminueix fins a dos ordres de magnitud (comparació de **2{8,8}** front a **2{13,13}** o **12{8,8}** front a **12{13,13}**) (Taula 2.11).

Taula 2.11 EC₅₀ (µg/ml) i CC₅₀ (µg/ml) d'anàlegs amb tres o quatre baules metilèniques entre els dos àtoms de nitrogen provinents de l'amina **5**

estructura	n	compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
	3	2{12,12}	0,140	> 25
	4	2{14,14}	0,288	> 25
	3	2{8,8}	0,050	> 25
	4	2{13,13}	0,336	> 25

estructura	n	compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
	3	9{12,12}	0,404	> 25
	4	9{14,14}	0,513	> 25
	3	12{8,8}	0,075	> 25
	4	12{13,13}	1,848	> 25

Analitzant aquells casos en què l'amina precursora 5{x} és la mateixa a les dues bandes de l'espaiador, mantenir la simetria en la substitució benzílica sembla el més favorable: és millor deixar les dues posicions benzíliques lliures o metilades en comptes de substituir-ne només una (2{8,8} i 12{8,8} respecte 9{8,8}, 2{12,12} i 12{12,12} front a 9{12,12}, 2{14,14} front a 9{14,14}) (Taula 2.12).

Taula 2.12 EC₅₀ (µg/ml) i CC₅₀ (µg/ml) d'anàlegs metilats o no en les posicions benzíliques de l'espaiador *p*-xilènic

estructura	R	R'	compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
	H	H	2{8,8}	0,050	> 25
	Me	H	9{8,8}	0,110	> 25
	Me	Me	12{8,8}	0,075	> 25
	H	H	2{12,12}	0,140	> 25
	Me	H	9{12,12}	0,404	> 25
	Me	Me	12{12,12}	0,162	> 25
	H	H	2{14,14}	0,288	> 25
	Me	H	9{14,14}	0,513	> 25

L'anàlisi global dels valors d'activitat obtinguts per a l'ampliació de la quimioteca permet identificar el compost 9{8,13} com el més potent dels sintetitzats (EC₅₀ = 0,060 µg/ml), tal com suggerien les prediccions d'activitat biològica. D'altra banda, en el mateix ordre d'activitat antiviral i el segon més potent dels compostos avaluats, es troba el compost 12{8,8} (EC₅₀ = 0,075 µg/ml). Resulta remarcable que també comparteixi l'amina de partida 5{8} amb el cap de sèrie 2{8,8} i amb la diamina 7{8,8}, descrita igualment com un dels inhibidors més potents de la família (EC₅₀ = 0,032 µg/ml)¹³⁰. Hom pot considerar, doncs, l'amina 5{8} com a idònia per conferir bones interaccions amb el lloc d'unió del coreceptor CXCR4. De fet, el compost més actiu per a cadascuna de les subestructures 2{x,y}, 7{x,x}, 9{x,y} i 12{x,y}, presenta sempre l'amina 5{8} com a precursora.

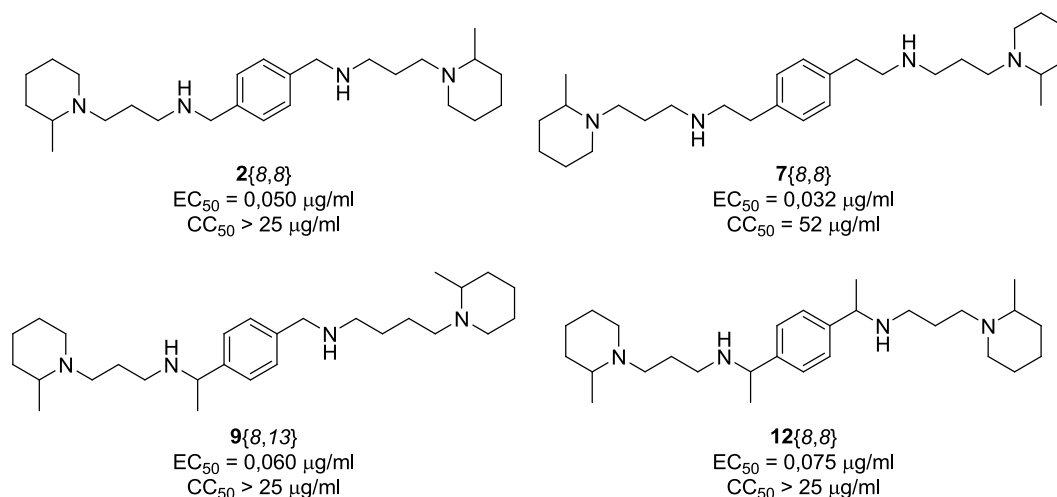


Figura 2.33 Derivats de l'amina 5{8} amb major activitat biològica

Tot i que les activitats biològiques obtingudes són en general prou satisfactòries, la comparació d'aquests resultats amb les prediccions fetes amb el model QSAR descrit duu a plantejar-se la bondat del model. De fet, el model basat en tres descriptors moleculars té un error quadràtic mig descrit de 0,57, el qual compleixen tots els resultats obtinguts tret de les activitats dels compostos 9{8,12}, 9{12,14} i 12{13,13}. Cal remarcar aquests tres compostos presenten metils en les posicions benzíliques, a diferència dels compostos 2{x,y} que s'han emprat per crear i validar el model. Fóra interessant, doncs, provar de millorar el model afegint-hi molècules amb estructura 9 o 12.

Val a dir que, tot i que no s'ha millorat en valor absolut l'activitat descrita per als derivats 2{8,8} i 7{8,8} descrits, tant 9{8,13} com 12{8,8} es mantenen en el mateix ordre de magnitud que els caps de sèrie anteriorment descrits al grup. Aquestes estructures tenen les amines 5{8} i 5{13} com a precursors (ambdues derivades de la 2-pipecolina), la qual cosa suggereix la síntesi de 2{8,13}, 9{13,8} i 12{8,13} en futurs treballs. Bo i així, tal com s'ha comentat, amb les dades d'activitat obtingudes fins al moment, caldria refinar el model QSAR predictiu per identificar el millor dels tres candidats.

Pel que fa als estereoisòmers del cap de sèrie 2{8,8}, s'ha avaluat l'activitat anti-VIH dels tres compostos obtinguts en forma de clorhidrat, per comparar-les amb l'activitat de la mescla estereoisomèrica. El resultat ha estat del mateix ordre per a tots els productes (Taula 2.13) tot i estar enriquits en un dels tres estereoisòmers, fet que demostra que no hi ha un compost remarcablement més actiu que la resta. Val indicar que, tot i que la puresa de tots ells ha estat considerada suficient per a l'avaluació biològica, la coloració de 2{8S,8R}·4HCl és quelcom superior que en la resta de compostos, la qual cosa correlacionaria amb la seva citotoxicitat lleugerament diferencial en la comparació de les activitats mitjanes obtingudes en dues avaluacions.

Taula 2.13 Activitats antivirals mitjanes dels estereoisòmers de 2{8,8}

compost	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
2{8,8}	0,050	> 25	0,121	> 60
2{8,8} · 4HCl	0,073	> 25	0,130	> 44
2{8S,8S} · 4HCl	0,070	> 25	0,125	> 44
2{8R,8R} · 4HCl	0,077	> 25	0,137	> 44
2{8S,8R} · 4HCl	0,078	18	0,139	32

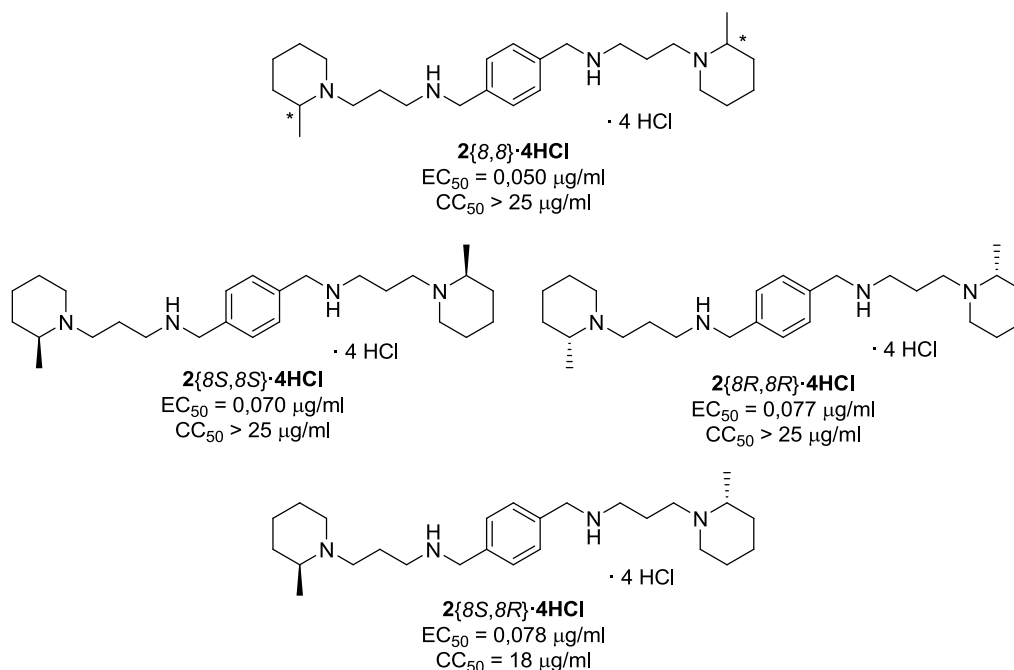


Figura 2.34 Estructures dels clorhidrats dels tres estereoisòmers del cap de sèrie 2{8,8}

2.5. El futur del cap de sèrie 2{8,8}

El cap de sèrie 2{8,8} descrit al GEM presenta una activitat anti-VIH $EC_{50} = 0,050 \mu\text{g/ml}$ ^{145,146} i es patentà l'any 2006 amb aquesta aplicació. Tanmateix, si bé és cert que la inhibició del coreceptor CXCR4 ha estat validada com a diana terapèutica per a la intervenció contra la infecció per l'agent etiològic de la sida, el tractament amb AMD3100, desenvolupat inicialment com a inhibidor del CXCR4, no ha aportat fins al moment dades clíniques convincents en el tractament de la malaltia: els inhibidors de les etapes primerenques que han estat aprovats com a fàrmacs fins l'any 2010 són inhibidors del coreceptor CCR5 (Maraviroc) o interaccionen amb la gp41 del virus (Enfuvirtide).

Ara bé, al desembre de 2008, la FDA dels Estats units aprovà l'AMD3100 (Plerixafor, comercialitzat com a Mozobil®), pres de referència durant gran part del projecte de la sida al GEM, per a la mobilització de les cèl·lules mare hematopoètiques. A finals de maig de 2009, aquest inhibidor del CXCR4 s'aprovà a Europa amb les mateixes indicacions²³³. De fet, s'ha demostrat que un gran nombre de receptors de quimiocines està relacionat amb el desenvolupament de càncers primaris i metàstasis, la causa de mortalitat més important de la majoria de càncers. Cèl·lules tumorals de com a mínim 23 tipus diferents de càncers d'origen epitel·lic, mesenquimàtic i hematopoètic expressen el receptor CXCR4^{234,235}, l'únic lligand natural conegut del qual és la quimiocina CXCL12. A banda d'estar relacionat amb el receptor del factor de creixement epitel·lic (*epithelial growth factor receptor*, EGFR, de la família de receptors de les tirosina cinases)²³⁶ les interaccions del CXCR4 amb la CXCL12 tenen un paper crucial en el moviment de les cèl·lules tumorals a òrgans específics. La inhibició d'aquestes interaccions a través d'antagonistes selectius ha demostrat bloquejar la metàstasi in vivo del càncer de mama i pulmó²³⁷⁻²³⁹.

Així doncs, queda un gran camí encara per recórrer en el possible desenvolupament del cap de sèrie 2{8,8} i els seus estereoisòmers com a fàrmacs, amb diferents possibles aplicacions.

2.6. Resum

S'ha ampliat la quimioteca anteriorment descrita al GEM amb nous substrats *p*-xililènics **11** i **14** i les amines **5{13}** i **5{14}**. El cribratge virtual de les noves molècules amb el model QSAR de tres descriptors ha permès seleccionar aquelles molècules d'estructura **2**, **9** i **12** amb millor activitat predita que permetessin, simultàniament, una possible millora del model computacional. La quimioteca virtual enumerada de 48 compostos s'ha reduït a 36 per simetria. D'aquests, s'han seleccionat un total de 16 compostos per a ésser sintetitzats, deu dels quals simètricament dissubstituïts per la seva facilitat d'obtenció a priori (**2{13,13}**, **2{14,14}**, **9{8,8}**, **9{12,12}**, **9{13,13}**, **9{14,14}**, **12{8,8}**, **12{12,12}**, **12{13,13}** i **12{14,14}**) i sis asimètricament dissubstituïts (**9{12,8}**, **9{14,8}**, **9{8,12}**, **9{14,12}**, **9{8,13}** i **9{12,14}**). Tots els compostos asimètricament substituïts seleccionats tenen estructura **9** per la manca de disponibilitat comercial d'un reactiu derivat de **14** que permeti tenir dos grups acetil amb diferents reactivitats per arribar a estructures **12** asimètricament dissubstituïdes.

S'han obtingut les noves amines **5{13}** i **5{14}** per síntesi de Gabriel amb rendiments moderats. Dels 16 nous compostos seleccionats se n'han obtingut 14 per aminació reductora dels precursors amb amines **5**: vuit dels deu compostos simètricament dissubstituïts (**2{13,13}**, **2{14,14}**, **9{8,8}**, **9{12,12}**, **9{14,14}**, **12{8,8}**, **12{12,12}** i **12{13,13}**) i els sis asimètricament substituïts (**9{12,8}**, **9{14,8}**, **9{8,12}**, **9{14,12}**, **9{8,13}** i **9{12,14}**). La menor reactivitat del grup cetònic respecte l'aldehídic s'ha resolt emprant isopropòxid de titani (IV) com a catalitzador.

S'han avaluat les activitats biològiques dels 14 compostos objectiu sintetitzats, arribant a EC₅₀ de l'ordre del cap de sèrie **2{8,8}** anteriorment descrit al GEM, però sense aconseguir millorar-la en cap cas. L'augment de la distància entre els dos àtoms de nitrogen provinents de l'amina **5** o la substitució de les posicions benzíliques no es tradueix en una millora considerable de l'activitat anti-VIH. El compost sintetitzat que ha presentat millor activitat biològica ha estat **9{8,13}** (EC₅₀ = 0,060 µg/ml), destacant l'amina **5{8}** com un precursor idoni de cara a inhibir el coreceptor CXCR4.

A banda, de cara a un possible desenvolupament com a fàrmac del cap de sèrie **2{8,8}**, se n'han sintetitzat els tres estereoisòmers, **2{8S,8S}**, **2{8R,8R}** i **2{8S,8R}**, a partir de les amines homoquirals precursoras **5{8S}** i **5{8R}** obtingudes per síntesi de Gabriel. L'activitat biològica de les tres mostres de clorhidrats enriquides en els tres estereoisòmers corresponents es manté en el mateix ordre de magnitud que l'activitat de la mescla estereoisomèrica.

3. DISSENY *DE NOVO* DE POTENCIALS INHIBIDORS DEL CORECEPTOR CXCR4

3.1. Generació de noves famílies de compostos

Les noves mesures reguladores, més estrictes, i el fet que sembla haver-se assolit una gran capacitat d'acció terapèutica van fer disminuir fins a principis del segle XXI el nombre de noves entitats químiques (*new chemical entities*, NCE) aprovades com a fàrmacs (l'any 2002 la FDA només aprovà 18 NCE)²²⁰. El descobriment dels caps de sèrie (*leads*) ha passat d'estar basat en els productes naturals²⁴⁰ o en els descobriments casuals (per serendipitat) a la recerca sistemàtica o racional. La Química Combinatòria i el cribratge d'alt rendiment (*high-throughput screening*, HTS) permeteren inicialment l'avaluació de l'activitat biològica de grans quimioteques de compostos i han donat pas amb el temps al cribratge virtual, possible a partir de l'elucidació dels mecanismes biològics responsables dels efectes terapèutics. A partir d'aquí, l'optimització de qualsevol cap de sèrie és sempre un procés evolutiu, en què s'empen els resultats obtinguts fins al moment per millorar l'activitat biològica d'interès.

Actualment, el disseny racional de noves famílies de lligands selectius de proteïnes es pot enfocar de dues maneres diferents en funció de la informació de què es disposi. Si es disposa de l'estructura de la proteïna, el disseny pot estar orientat a la cerca de les potencials zones d'unió i trobar molècules que encaixin en el receptor, en el què s'anomena **disseny de fàrmacs basat en l'estructura** (*Structure Based Drug Design*, SBDD)²⁴¹. Si, a més, es disposa de l'estructura d'un o més complexos proteïna-inhibidor, es pot aprofitar la informació de les principals interaccions proteïna-lligand per fer el disseny més acurat. Els avenços en el camp de la bioquímica permeten identificar experimentalment els aminoàcids que intervenen en aquestes interaccions per mutagènesi dirigida. A principis de l'any 2011, la principal base de dades de lliure accés d'estructures elucidades (*Protein Data Bank*²⁴²), conté més de 70800 estructures de diferents biomolècules determinades experimentalment. L'estudi de proteïnes encara no resoltes implica sovint la utilització de tècniques aproximades, com la modelització per homologia amb proteïnes de la mateixa família, la qual permet obtenir models prou satisfactoris dels receptors en estudi. Aquest és el cas per a molts receptors acoblats a proteïnes transmembrana cel·lulars (GPCR), els models primerencs de les quals es basaven, tot i la poca semblança, en l'estructura de la bacteriorodopsina²⁴³. L'any 2000 es publicà l'estructura resolta de la rodopsina bovina, la primera GPCR d'un mamífer⁵⁷, que permeté modelar per homologia algunes GPCR humanes com els coreceptors CXCR4 i CCR5^{63,64,244}. No fou fins l'any 2007, ja durant el transcurs d'aquesta tesi doctoral, que es publicà l'estructura de la primera GPCR humana, el receptor adrenèrgic β_2 ^{58,59} i molt recentment s'ha elucidat també el coreceptor CXCR4⁶⁰.

D'altra banda, quan no es disposa de l'estructura del receptor, el **disseny de fàrmacs basat en els lligands** (*Ligand Based Drug Design*, LBDD) permet trobar noves famílies de compostos a partir de conjunts de molècules que actuen sobre un mateix lloc d'unió, amb possibilitats d'establir-hi interaccions

anàlogues. Els models farmacofòrics o les tècniques QSAR utilitzats en el capítol anterior s'engloben en aquesta estratègia.

Tal com s'ha comentat al llarg dels capítols anteriors, el principal objectiu del projecte de la sida al GEM és la cerca de potencials inhibidors d'entrada del VIH, antagonistes preferents dels coreceptors CXCR4 o CCR5, car la inhibició del receptor primari CD4 afectaria directament la resposta immunitària cel·lular. La manca de l'estructura elucidada dels coreceptors a l'inici del projecte va fer-ne necessària la modelització per homologia amb la rodopsina bovina, l'única GPCR de mamífer coneguda fins al moment. Els models computacionals d'ambdós coreceptors han estat validats amb tècniques diverses, com ara l'engalament o el reconeixement de forma (*shape matching*), en cribratges virtuals retrospectius^{193,245,246}. A més, en els darrers anys també s'han descrit al GEM diversos models farmacofòrics i models QSAR del receptor CXCR4^{146,187}.

Coneixedors de la capacitat del VIH per desenvolupar resistència als fàrmacs actuals, cal no perdre de vista la necessitat de desenvolupar noves famílies d'inhibidors de les etapes primerenques del cicle víric. Havent explotat des de l'inici del projecte de la sida al GEM les famílies d'anàlegs a l'AMD3100 amb estructura *p*-xililènica, es pretén en aquest capítol aprofitar les eines del disseny molecular i els models dels coreceptors desenvolupats al grup per proposar noves estructures que puguin donar lloc a altres famílies de compostos amb potencial activitat anti-VIH.

Partint del model del coreceptor CXCR4 desenvolupat al grup^{132,133} es poden emprar tècniques de SBDD. En aquest tipus de disseny racional, els nous lligands es poden trobar en bases de dades d'estructures conegudes o a través de la cerca a partir de fragments, mitjançant la simulació de les interaccions proteïna-lligand. El principal avantatge de l'ús de **bases de dades de compostos coneguts** és que les molècules estan descrites o són sintèticament accessibles i que es pot estalviar molt temps de càlcul i espai de disc. Tanmateix, tant la varietat com el nombre de noves famílies que es troben depen fortament de la base de dades emprada.

D'altra banda, la **cerca a partir de fragments** empra bases de dades d'unitats estructurals per identificar aquelles que millor interaccionen amb les diferents zones del lloc d'unió. Posteriorment, els diversos fragments s'uneixen amb un espaciador adient per tenir-los en una mateixa molècula i a la distància necessària. Aquesta tècnica, anomenada **disseny de novo**, permet obtenir un nombre i varietat de molècules molt elevat (s'estima que hi ha entre 10^{60} i 10^{100} compostos amb propietats adients per ser candidats a fàrmacs²⁴⁷), però cal avaluar-ne, sobretot, l'accessibilitat sintètica²⁴⁸.

3.2. Quimioteca virtual de nous possibles inhibidors de CXCR4

Al Laboratori de Disseny Molecular del GEM es disposa del programari Ludi²⁴⁹ (Cerius2, del paquet DiscoveryStudio d'Accelrys), una eina de disseny *de novo* de compostos amb una certa afinitat per un lloc d'unió conegut. Permet emprar tant SBDD com LBDD, modificant lligands coneguts per millorar les interaccions que estableixen amb el receptor, i treballa bàsicament en tres etapes:

1. Identificació de les zones d'interacció del lloc d'unió a partir de la proteïna o de lligands coneguts.
2. Cerca de fragments i col·locació en la zona d'interacció adient.
3. Unió dels fragments mitjançant aquell espaciador que els situa en una molècula a la distància necessària.

Aquest programari distingeix quatre possibles interaccions proteïna-lligand: els ponts d'hidrogen (tant donadors com acceptors de ponts d'hidrogen) -els quals es modelen amb vectors, donada la seva forta direccionalitat- i les interaccions hidrofòbiques (regions lipofíliques-alifàtiques i regions lipofíliques-aromàtiques).

Els fragments s'identifiquen mitjançant criteris de distàncies, de manera que es consideren adients si un mínim de tres (i un màxim de vuit) àtoms del fragment es troben a la distància correcta per interaccionar amb alguna de les regions del receptor. Posteriorment, es considera que encaixen si la col·locació en el lloc d'unió (de tal manera que hi interaccioni) no implica la superposició amb la proteïna en estudi.

En la tercera etapa, les unitats estructurals s'uneixen fent créixer la molècula *de fora cap a dins*. És a dir, *de fora*, a partir dels fragments trobats, *cap a dins*, cercant un espaiador adient que els uneixi en una única entitat química. Existeix també l'estratègia contrària, *de dins cap a fora*, quan l'espaiador central és la part de l'estructura a mantenir en el disseny. La llibreria estàndard del programari que s'utilitza inclou al voltant de mil fragments, els quals s'uneixen entre sí mitjançant algun dels 1100 espaiadors de la llibreria d'espaiadors, que poden tenir un, dos o fins a tres punts d'ancoratge.

Un cop generats els nous lligands potencials, es rebutgen tots aquells que impliquen la superposició amb el receptor o l'espaiador i tots aquells que no compleixin amb els filtres seleccionats. En segon lloc, es prioritzen emprant una funció de puntuació (*scoring function*) empírica. Si un fragment pot interaccionar amb el receptor en diferents orientacions, només se'n conserva aquella que té major puntuació.

En el nostre cas, l'ús del programari Ludi amb l'estructura del coreceptor modelat CXCR4 ha rendit una quimioteca virtual on alguns dels fragments més habituals són heterocicles aromàtics *privilegiats* com l'indole o la dibenzazepina. Aquest terme, que ha emergit amb el disseny racional de noves molècules biològicament actives durant els darrers quinze anys, es refereix a unitats moleculars amb possibilitats d'interacció molt versàtils, de manera que un mateix fragment pot rendir lligands potents i selectius d'un gran conjunt de dianes biològiques diferents, per modificació dels seus grups funcionals. A més, solen presentar propietats que els fan bons candidats a fàrmacs, de manera que les quimiotèques que se'n deriven les mantenen^{250,251}. De fet, el tricicle de dibenzazepina seleccionat com a fragment, 2-cloro i *N*-(*N*-metil)aminopropil substituït, és conegut com a norclomipramina (també desmetilclomipramina). Aquesta és el metabòlit actiu de la clomipramina, la qual inhibeix el transport de nou a la neurona presinàptica de norepinefrina (també anomenada noradrenalina, neurotransmissor psicoactiu com la serotonina o la dopamina), de manera que augmenta el nivell de neurotransmissor a l'espai sinàptic i actua d'antidepressiu.

A banda dels grups *privilegiats*, la quimioteca generada conté alcohols terciaris quirals, units típicament a ponts disulfur o triples enllaços asimètricament substituïts, que els fan de difícil accessibilitat sintètica, i molts dels fragments repetits són comercialment poc disponibles o poc assequibles (Figura 3.1).

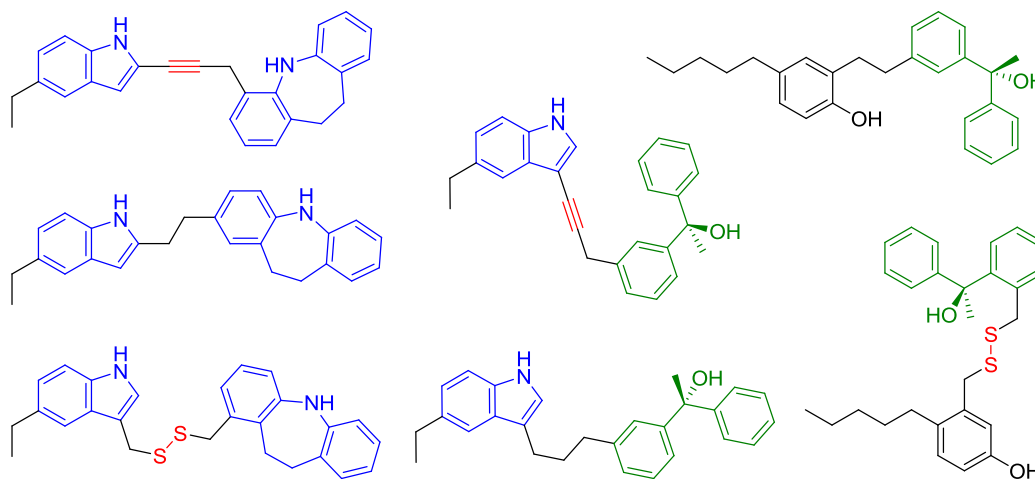


Figura 3.1 Selecció de molècules de difícil accessibilitat sintètica proposades pel Ludi en el disseny *de novo*

El tricicle de dibenzazepina no es comercialitza funcionalitzat en la posició 2, mentre que amb la posició 3 substituïda es pot adquirir tan sols a proveïdors no habituals i en quantitats mínimes. Per contra, sí és disponible funcionalitzat sobre l'àtom de nitrogen o sense cap mena de substitució. A partir d'aquest últim, es troba descrita la reacció de Mannich amb la dibenzazepina (**68**), formaldehid (**69**) i diverses amines secundàries cícliques **70**{x}²⁵², així com l'alquilació de l'àtom de nitrogen²⁵³ (Figura 3.2).

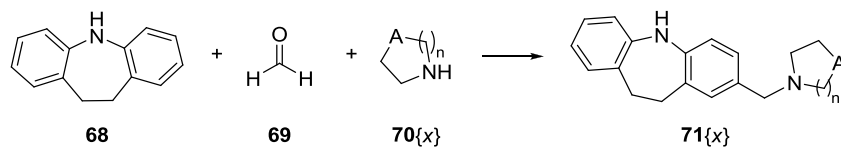


Figura 3.2 Reacció de Mannich descrita amb el tricicle **68**

Pel que fa a l'heterocicle d'indole alquilat amb un grup etil sobre la posició 5, no resulta fàcil d'adquirir. Sí són comercials, emperò, l'indole no substituït i l'indole funcionalitzat sobre les posicions 2 o 3 (fins i tot 5-metilat simultàniament) amb grups reactius com aldehid o èster, que poden permetre acoblar-hi altres sistemes. A més, es troben descrites reaccions varies amb aquest heterocicle²⁵⁴⁻²⁵⁹.

Davant d'aquesta situació, a partir dels reactius comercials i les reaccions descrites, s'opta per proposar una nova quimioteca, més accessible, basada en alguns dels fragments triats en el disseny *de novo* (principalment el tricicle de dibenzazepina **68** i els indoles formilats **72** i **73**). Els ponts disulfur asimètricament substituïts es podrien reemplaçar per grups isostèrics com una cadena etilènica (-CH₂-CH₂-) o bé -O-CH₂- que podrien, al seu torn, provenir de derivats halogenats. Als fragments susceptibles de combinació s'afegeixen les amines **5**{x} que han donat bons resultats en anteriors quimiotèques combinatòries del grup, per poder dur a terme aminacions reductores amb els heterocicles d'indole. Les diferents unitats estructurals que es preveu combinar es mostren a la Figura 3.3.

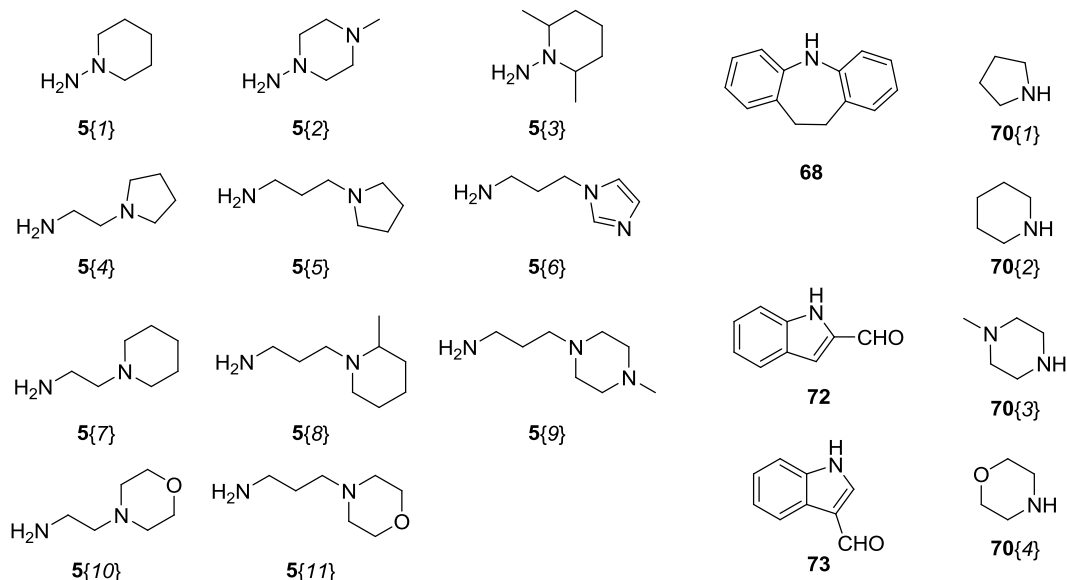


Figura 3.3 Fragments a combinar en la quimioteca combinatòria proposada com a alternativa

En l'intent d'obtenir anàlegs als compostos en què diferents grups aromàtics o nitrogenats es trobin separats per cadenes de dues, tres o fins a quatre baules, es planteja la possibilitat d'alquilar els heterocicles **70** de tal manera que quedin funcionalitzats amb un grup que pugui reaccionar amb algun dels altres fragments, com ara les amines **5**. Amb aquesta idea en ment s'han trobat comercialment

disponibles el bromoacetaldehid (**74**) i el seu acetal dimetilic (**75**), així com el 4-bromobutiraldehid (**76**). Curiosament, no és comercial el derivat de tres carbonis (probablement per la possible eliminació per rendir el compost carbonílic α,β -insaturat). Igualment, només es troben derivats α,ω -dihalogenats (o halohidroxiderivats) comercials de cadenes lineals de dos (**77**) i quatre àtoms de carboni (**78**).

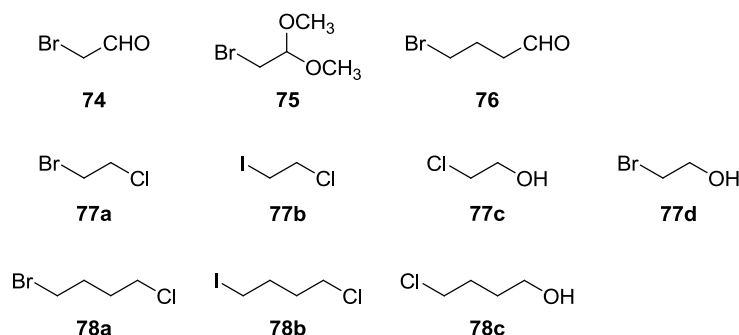
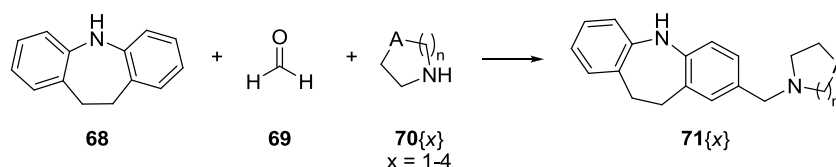


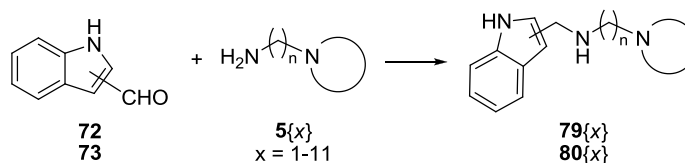
Figura 3.4 Derivats comercials amb dos i quatre àtoms de carboni

Finalment, amb l'aminació reductora com a reacció principal emprada al llarg del projecte de la sida al GEM, es dissenya una quimioteca combinatòria alternativa, sintèticament accessible, mantenint la combinació dels fragments representatius del disseny *de novo* que són, simultàniament, comercialment disponibles. La quimioteca virtual alternativa inclou:

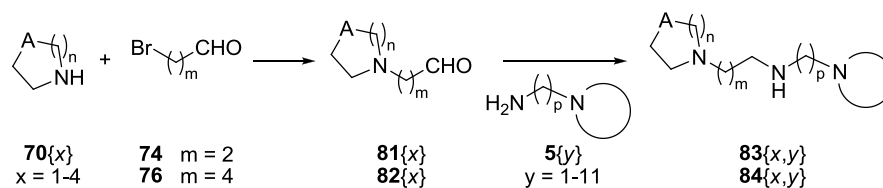
- 4 compostos derivats del tricicle **68** i els quatre heterocicles **70**, que podrien obtenir-se per reacció de Mannich, segons s'ha trobat descrit²⁵².



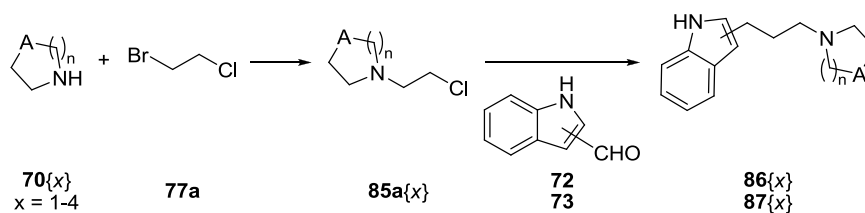
- 22 productes d'aminacions reductores que combinen l'indole 2-formilat (**72**) o l'indole 3-formilat (**73**) amb les onze amines **5{x}**.



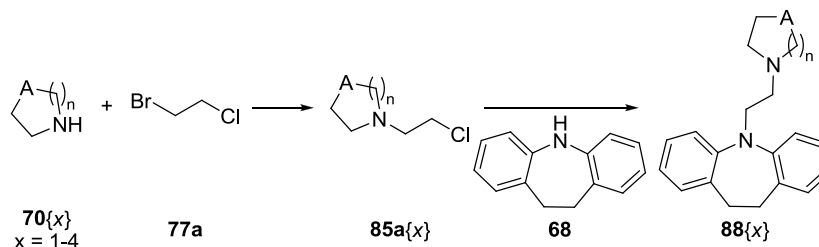
- 88 molècules resultants de l'alquilació d'un heterocicle **70** amb un aldehid halogenat de dos (**74**) o quatre carbonis (**76**) i posterior aminació reductora amb una amina **5**. Tot i que suposaria una etapa sintètica més, l'obtenció de derivats amb dues (**83{x,y}**) o quatre (**84{x,y}**) baules metilèniques també podria obtenir-se per reducció d'una amida.



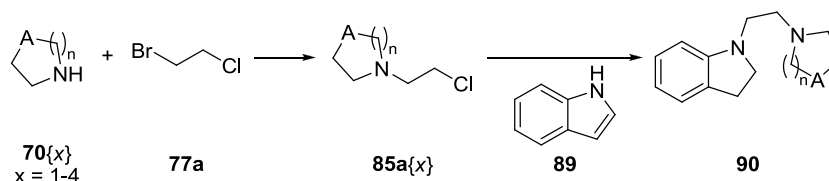
- 8 molècules amb tres baules metilèniques entre els heterocicles, que poden sintetitzar-se per reacció de Wittig i posterior reducció del doble enllaç.



- 4 dibenzazepines *N*-alquilades amb el derivat d'un heterocicle **70**.



- 4 indoles *N*-alquilats amb el derivat d'una amina cíclica **70**.



La quimioteca virtual global, que inclou un total de 130 molècules, s'enumera amb el programari MOE 2006.08¹⁹² i es cribra mitjançant les diverses tècniques conegudes al Laboratori de Disseny Molecular del GEM. L'objectiu d'aquest filtratge, que inclou tant tècniques de SBDD com LBDD, és establir un criteri que permeti decidir quines molècules resulten més susceptibles de ser potencials inhibidors del coreceptor CXCR4. En col·laboració amb el Laboratori de Disseny Molecular s'ha avaluat la interacció de les diverses molècules amb la proteïna, a través d'engalçaments realitzats amb els programaris GOLD²⁶⁰ i HEX²⁶¹. D'altra banda, s'han emprat models farmacofòrics¹⁸⁷ i de coincidència de forma (*shape matching*)¹⁹³ basats en els lligands coneguts del coreceptor. Cadascuna de les tècniques ha emprat una funció de puntuació que ha permès ordenar els compostos de la quimioteca virtual segons la seva interacció amb la proteïna, bé sigui com a activitat biològica predita o com a energia d'interacció calculada. Aquestes llistes ordenades han servit de base per a la selecció d'aquells compostos considerats els més interessants com a possibles candidats a ser sintetitzats. A banda, s'ha avaluat també la semblança de propietats amb els programaris Qikprop/Qiksim de l'empresa Schrödinger^{262,263}, a través del Servei de Disseny de Fàrmacs (SDF) del Centre de Supercomputació de Catalunya (CESCA). Per a la comparació s'han pres tant la distància euclidiana com el coeficient de Tanimoto²⁶⁴ dels compostos de la quimioteca virtual amb els cap de sèrie AMD3100 i **2{8,8}**.

Dels 130 compostos de la quimioteca virtual s'han seleccionat com a candidats per ser sintetitzats aquells que queden situats entre els 40 millors en un mínim de tres de les cinc llistes. Els 130 compostos finals seleccionats són els que es mostren a la Figura 3.5.

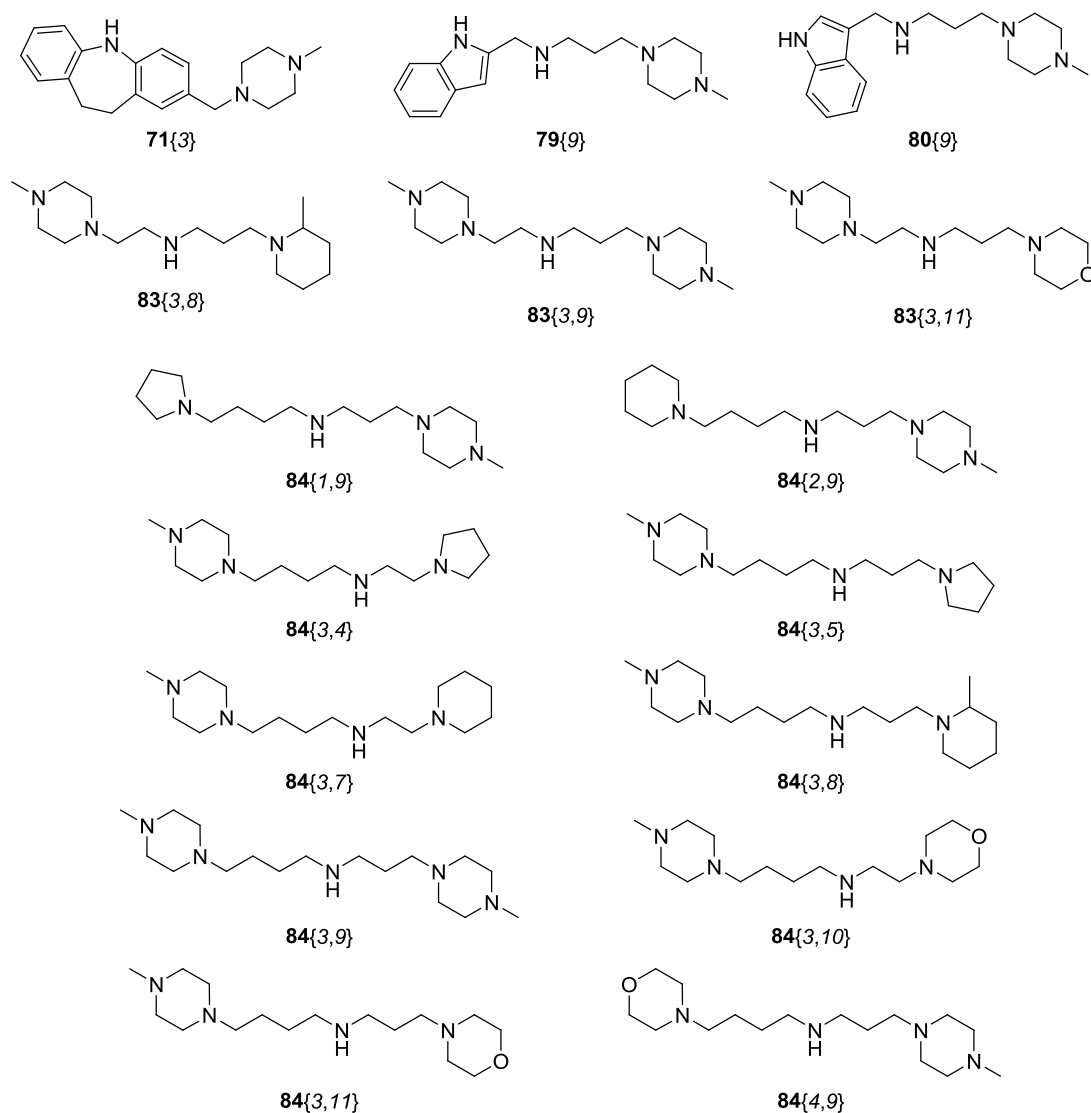


Figura 3.5 Compostos de la quimioteca alternativa seleccionats per ser sintetitzats

Destaca de la selecció el fet que tots els compostos escollits continguin l'heterocicle de *N*-metilpiperazina, bé sigui com a heterocicle nitrogenat **70**{3} o com a part de l'amina **5**{9} usada com a reactiu de partida. Tenint en compte que només una tercera part de les molècules de la quimioteca proposada tenen estructura **84**, també sorprèn que aquests compostos representin més de la meitat de la selecció. Això podria ser degut, tanmateix, a què els anàlegs amb dues baules metilèniques, d'estructura **83**, que representen un altre terç de la quimioteca virtual, siguin massa petits per interaccionar amb el lloc d'unió del coreceptor CXCR4 que es pretén inhibir.

Cal remarcar que, tot i trobar-se entre els millors compostos proposats de cada llista, cap de les estructures seleccionades presenta una afinitat pel receptor comparable a les millors molècules sintetitzades anteriorment al grup. Tot i això, l'objectiu d'aquest capítol és l'obtenció de compostos prototip (*hits*) que puguin donar lloc a noves famílies de compostos a optimitzar en el futur, a través d'un procés de prototip a precandidat (*hit-to-lead*), atès que els anàlegs a l'AMD3100 han estat ja àmpliament estudiats.

3.3. Síntesi de compostos amb heterocicles aromàtics

L'obtenció del derivat de dibenzazepina **71{3}** es troba descrita a partir de reactius comercials ²⁵² per reacció de Mannich ^{252,265,266}. Seguint la metodologia descrita s'ha obtingut una mescla del producte desitjat i el tricicle **68**, de la qual s'ha aïllat el compost potencialment actiu **71{3}** per digestió en hexà, amb un rendiment global del 47%, front al 65% descrit obtingut per destil·lació a pressió reduïda (2,6 mm Hg) (Figura 3.6).

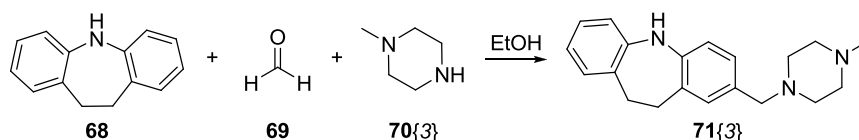


Figura 3.6 Obtenció del derivat de dibenzazepina **71{3}**

La baixa conversió del reactiu pot ser deguda a la pèrdua de part del formaldehid reactiu en escalfar. És per això que s'ha provat de millorar la metodologia experimental tot emprant un excés de formaldehid o escalfant la mescla al microones i en recipient tancat, sense millores destacables. Tanmateix, donat que es tracta d'un producte ja descrit, es considera suficient haver-lo obtingut en prou quantitat per avaluar-ne la seva activitat biològica. Si resultés actiu i calgués optimitzar la reacció, es podria assajar la síntesi al microones o emprar la sal d'Eschenmoser per obtenir en primer lloc l'electròfil i afegir-hi posteriorment **68**.

Pel que fa als altres dos compostos aromàtics seleccionats, **79{9}** i **80{9}**, s'assaja la seva síntesi per aminació reductora a partir dels indoles formilats corresponents, emprant les mateixes condicions de reacció que s'han utilitzat al llarg del capítol anterior ¹⁴⁵. Ambdós productes s'han obtingut en forma d'oli groc amb rendiments superiors al 95%, sense aïllar la imina intermèdia formada (Figura 3.7).

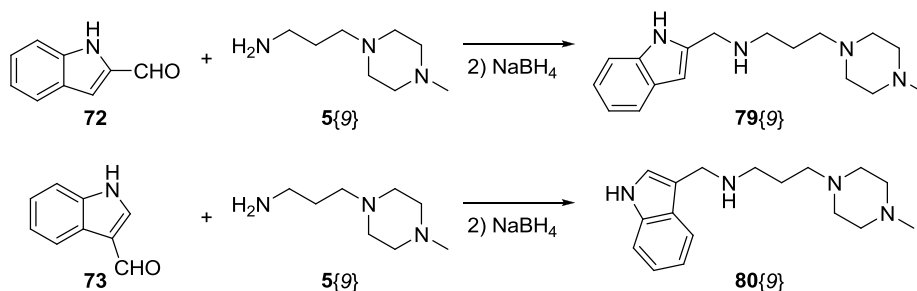


Figura 3.7 Obtenció dels derivats d'indole seleccionats

Tenint en compte la facilitat sintètica dels derivats d'indole anteriors i que **73** és notablement més econòmic que **72**, se sintetitza també el derivat **80{11}** amb la mateixa metodologia, per avaluar-ne l'activitat biològica i comprovar, simultàniament, la bondat de la selecció (Figura 3.8). L'elecció de l'amina **5{11}** respecte la resta d'amines **5{x}** es recolza, d'una banda, en la simetria de l'heterocicle que en simplifica l'espectroscòpia i, de l'altra, perquè l'heterocicle de morfolina ha estat el segon més freqüent (per darrere de la N-metilpiperazina) en la selecció de les famílies **83** i **84** (Figura 3.5). El compost **80{11}** s'obté amb un rendiment quantitatiu.

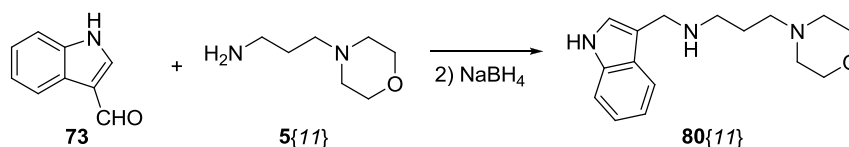


Figura 3.8 Obtenció del derivat **80{11}** no seleccionat com a potencialment actiu

Un cop obtinguts, s'ha avaluat l'activitat biològica dels derivats d'heterocicles nitrogenats al Laboratori de Retrovirologia de la Fundació IrsiCaixa. Tan sols un dels compostos (**80{9}**) ha resultat lleugerament actiu (Taula 3.7, pàg. 130).

3.4. Síntesi de compostos amb dues baules metilèniques

3.4.1. Disseny de síntesi

L'anàlisi retrosintètica dels compostos **83**, que presenten els dos sistemes nitrogenats precursors separats per dues baules metilèniques, porta a diferents estratègies sintètiques possibles, a partir de les obtencions típiques d'amines secundàries²⁶⁷: **a)** aminació reductora, **b)** alquilació directa o **c)** reducció d'amides (Figura 3.9).

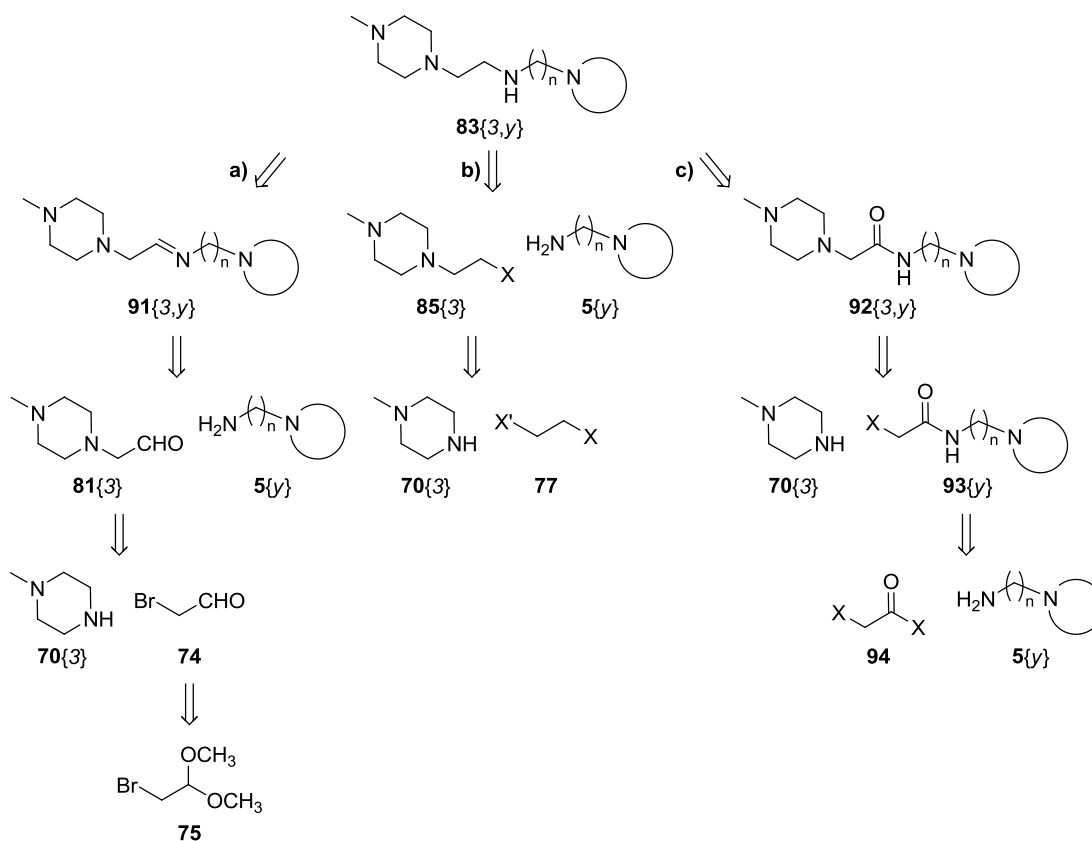


Figura 3.9 Anàlisi retrosintètica dels compostos **83{3,y}** seleccionats

La primera via sintètica (**a**) permet desconnectar la imina precursora **91**{3,y} en l'amina **5**{y} i l'heterocicle convenientment funcionalitzat **81**{3}, el qual provindria, al seu torn, d'una alquilació sobre l'heterocicle **70**{3} amb el bromoacetaldehid **74**. Aquesta ruta, que emprava l'aminació reductora ja coneguda al grup com la reacció principal per a l'obtenció d'amines secundàries, presenta com a principal inconvenient l'ús del bromoacetaldehid, que el comercialitza un proveïdor no habitual. Sí és comercialment disponible el seu acetal dimetilic (**75**), l'ús del qual suposaria un pas addicional de síntesi per desprotegir l'aldehid un cop alquilada la *N*-metilpiperazina (**70**{3}), però reaccions similars es troben descrites²⁶⁸. Evidentment, també podria plantejar-se la síntesi a la inversa, fent primer l'aminació reductora del grup aldehid de **74** amb l'amina primària **5**{y} i posteriorment alquilar l'heterocicle **70**{3}.

La segona alternativa (**b**), que a primera vista presenta menys etapes sintètiques, desconnecta els sistemes nitrogenats per la monoalquilació de l'amina primària **5**{x} amb un derivat de **70**{3} que també provindria de l'alquilació de la *N*-metilpiperazina. Les alquilacions d'heterocicles nitrogenats de baix pes molecular com **70**{x} s'han trobat descrites a partir d'hidrocarburs α -bromo- ω -clorosubstituïts amb rendiments moderats i en diferents condicions de reacció²⁶⁹⁻²⁷⁴. Si bé la monoalquilació d'amines primàries presenta com a greu inconvenient les polialquilacions (degudes a la major reactivitat del producte respecte al propi reactiu front a l'alquilació), s'han trobat descrites diverses condicions de reacció que semblen afavorir la monosubstitució: l'ús d'un excés de reactiu²⁷⁵⁻²⁷⁷, del mètode Fukuyama –via l'intermedi sulfonamida-²⁷⁸, de líquids iònics o aigua com a dissolvent^{279,280}, o l'ús de catalitzadors^{281,282} o medis bàsics (CsOH)^{283,284}.

Finalment, l'anàlisi retrosintètica a través de la via **c**) proposa l'amida **92**{3,y} com a precursora del producte objectiu **83**{3,y}. La desconexió de **92**{3,y} en els precursors **70**{3}, **94** i **5**{y} aprofita la gran diferència de reactivitat de l'halur d'àcid front a l'halogen. La síntesi d'amides a partir d'halurs d'àcid halogenats i amines primàries es troba descrita en diferents condicions, generalment amb amines primàries que no contenen més àtoms de nitrogen que el de la pròpia funcionalitat amino. S'han descrit síntesis d'amides amb diversos dissolvents com ara l'acetat d'etil²⁸⁵, derivats clorats²⁸⁶⁻²⁹³, acetonitril^{292,294,295}, toluè^{296,297}, èter dietílic o tetrahidrofuran²⁹⁸. L'addició d'una base com ara piridina^{290,299}, trietilamina^{285-287,293,294,298,300}, carbonat potàssic²⁸⁸ o fins i tot un excés de l'amina reactiu, permet l'obtenció de l'amida en forma lliure, mentre que si no s'hi addiciona s'obté la sal de l'amida desitjada (l'halur d'hidrogen que es desprèn en la reacció de substitució nucleòfila acílica protona l'amina). Tot sovint, les síntesis d'amides descrites amb halurs d'àcid halogenats prossegueixen amb l'alquilació d'una altra amina, típicament una amina secundària cíclica, fet que reforça aquesta via sintètica com la més idònia per assajar la síntesi dels compostos objectiu **83**{3,y}.

3.4.2. Síntesi de les amides halogenades **93**{y}

Tal com ja s'ha comentat, l'obtenció dels sistemes objectiu **83**{3,y} s'ha assajat a través de la via **c**), per considerar-se aquesta com la més adient. Aquesta estratègia sintètica passa per una primera etapa d'obtenció de l'amida **93**{y} a partir de l'halur d'acetil **94** i l'amina **5**{y}, aprofitant la major reactivitat de l'halur d'àcid front a l'halogen de **94**.

Tot i que la reacció d'un àcid carboxílic amb una amina primària rendeix generalment el carboxilat d'amoni (degut als pK_a d'ambdós reactius), la calefacció en un dissolvent d'alt punt d'ebullició pot generar l'amida corresponent per pèrdua d'aigua. Alternativament, la reacció es pot dur a terme sense dissolvent sempre i quan els reactius presentin prou estabilitat tèrmica, tinguin temperatures de fusió per sota els 200 °C i siguin poc volàtils a aquesta temperatura³⁰¹. Aquestes limitacions es poden superar amb l'ús de derivats de l'àcid carboxílic com els halurs d'àcid^{302,303}, anhídrids o èsters, o bé emprant agents d'acoblament³⁰³⁻³⁰⁵ (com carbodiimides o benzotriazoles), la correcta elecció dels quals

pot ser crítica^{306,307}. D'aquestes alternatives, els halurs d'àcid es presenten com l'estratègia més extesa a la bibliografia (Figura 3.10).

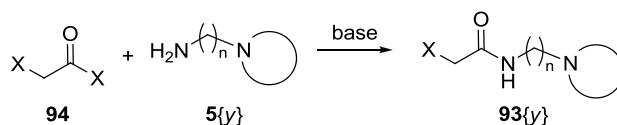


Figura 3.10 Síntesi de les amides **93{y}**

La gran diferència de reactivitat entre l'halur d'àcid i l'halogen de **94** sol ser suficient per assegurar la conversió del derivat carboxílic a l'amida **93**. Tanmateix, tenint en compte la disponibilitat comercial de diversos derivats **94** i que la següent etapa de síntesi consistirà en l'alquilació del metilè halogenat de l'amida **93** amb *N*-metilpiperazina, s'ha assajat l'obtenció de diferents anàlegs de **93**. Els halurs d'acetil comercials es mostren a la Figura 3.11: bromur de bromoacetil (**94a**), clorur de bromoacetil (**94b**) i clorur de cloroacetil (**94c**).

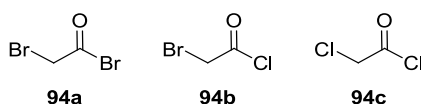


Figura 3.11 Halurs d'àcid halogenats **94** comercials

Habitualment, a la mescla de l'halur d'àcid i l'amina primària s'hi afegeix alguna base (bé sigui excés d'amina reactiu o una altra base orgànica o inorgànica) per capturar l'hidràcid alliberat durant la reacció. Tanmateix, Gunnlaugsson i col·laboradors descrigueren l'obtenció de sistemes **93{10}** sense base, amb la intenció d'obtenir directament el clorhidrat del producte desitjat²⁸⁵. Així, en un primer intent de reproduir aquesta síntesi, a una dissolució en acetat d'etil anhidre de **5{10}**, refredada a 0 °C, s'afegeix lentament i amb agitació l'halur **94a**. Un cop finalitzada l'addició, la mescla es manté en agitació durant 1 hora, es filtra el sòlid blanc precipitat i es renta amb acetat d'etil anhidre. El producte desitjat **93a{10}** s'obté en forma de bromhidrat amb un rendiment del 86% (descriu²⁸⁵, 75%). L'obtenció de l'amida en forma de sal es corrobora mitjançant espectroscòpia d'IR, per l'enregistrament d'una banda d'absorció de carbonil amídic al voltant de 1670 cm⁻¹, però la metodologia experimental no resulta fàcilment reproduïble per a la resta d'amines **5{y}** d'interès.

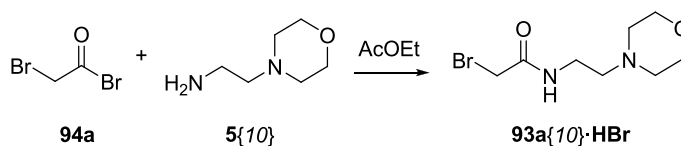


Figura 3.12 Obtenció de **93a{10}·HBr** segons Gunnlaugsson i col·laboradors²⁸⁵

Malgrat que l'obtenció dels compostos **93** en forma de sal podria afavorir el seu emmagatzemament, tenint en compte que la següent etapa sintètica és una alquilació a través d'una substitució nucleòfila de l'halur, s'opta per cercar una metodologia que permeti arribar a les amides **93{y}** en forma lliure. Ja al segle XIX, Schotten³⁰⁸ i Baumann³⁰⁹ descrigueren la síntesi d'amides per addició lenta de l'halur d'àcid sobre una dissolució aquosa bàsica que contenia l'amina, afegint excés del derivat carbonílic per contrarestar la seva descomposició en el medi aquós. Actualment, aquesta reacció es pot dur a terme en dissolució en medi orgànic i en presència d'una base orgànica o inorgànica. L'elecció d'aquesta última pot dependre de la nucleofília de l'amina primària amb què es vol formar l'amida. Com a sal inorgànica s'empra comunament el carbonat sòdic, mentre que l'elecció d'una amina terciària

(trimetilamina o trietilamina són les més emprades) genera la sal d'amoni, insoluble en el medi de reacció. Així, quan l'amina primària reactiu és poc nucleòfila, solen escollir-se les bases orgàniques, doncs presenten efecte catalític^{20,301,306,310-312}.

L'obtenció de les amines **93{y}** en forma lliure s'assaja inicialment seguint la metodologia descrita per Gunnlaugsson i col·laboradors²⁸⁵ però afegint K_2CO_3 al medi de reacció, sense obtenir-se el producte desitjat **93a{y}**. Una nova cerca bibliogràfica amb l'*SciFinder® web version*²²⁹ i l'obtenció al grup de recerca d'altres amides anàlogues¹³⁰ porten a considerar la metodologia descrita per Routaboul i col·laboradors³¹². En ella es mesclen quantitats estequiomètriques de clorur halur d'àcid i d'amina, afegint-hi un lleuger excés de trietilamina (1,1 equivalents) en CH_2Cl_2 a 0 °C. Després de deixar-ho agitant durant 18 hores a temperatura ambient, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda, es dilueix en èter dietílic i es renta amb àcid clorhídric 0,1 M i salmorra. L'amida s'obté a continuació per eliminació del dissolvent a pressió reduïda (Figura 3.13).

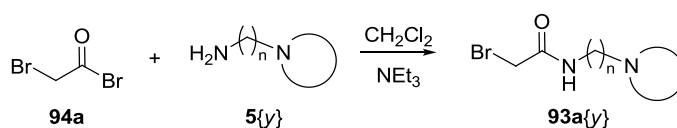


Figura 3.13 Obtenció de les amides **93a{y}** en forma lliure

Tenint en compte la presència d'amines terciàries que podrien protonar-se en el rentat amb àcid clorhídric 0,1 M, el cru de reacció es renta amb K_2CO_3 al 40%. Aquest tractament permet eliminar els possibles clorhidrats d'amina formats durant la síntesi de l'amida i arribar als productes desitjats **93a{10}** i **93a{11}** per eliminació a pressió reduïda tant del dissolvent com de la trietilamina, amb rendiments del 21% i el 10%, respectivament. Aquests baixos rendiments es poden justificar, en part, degut a la solubilitat en aigua dels productes **93a**, que dificulta l'extracció i motiu pel qual s'ha emprat una dissolució de carbonat potàssic tan concentrada (les referències bibliogràfiques^{130,312}, empen solucions de K_2CO_3 al 15% en comptes del 40%).

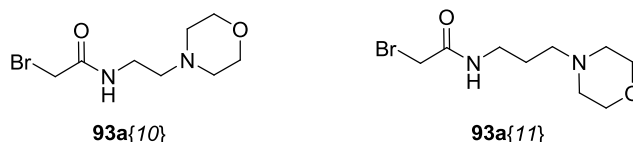


Figura 3.14 Amides **93a** obtingudes amb la metodologia modificada de Routaboul i col·laboradors³¹²

Els baixos rendiments obtinguts duen a cercar una altra metodologia més efectiva per a l'obtenció de les amides halogenades **93{y}** evitant, en la mesura del possible, les extraccions en fase aquosa. Barge i col·laboradors³¹³ obtenen amides anàlogues a les desitjades per addició lenta a 0 °C d'un lleuger excés de l'halur d'àcid sobre una dissolució de l'amina (1,1:1 de **94:5**) en acetonitril anhidre i en presència de K_2CO_3 . Un cop finalitzada l'addició, es manté la mescla en agitació durant 4 hores, es filtra la sal inorgànica i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. Tot i que la metodologia bibliogràfica descriu posteriors extraccions amb diverses fases aquoses a diferents pH, aquestes s'obvien en els assajos realitzats per evitar el contacte amb aigua de les amides **93{y}** que hi serien solubles.

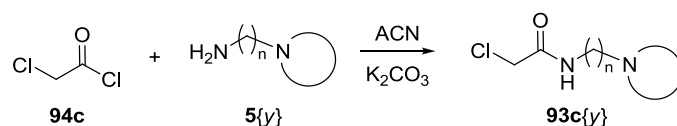
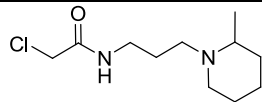
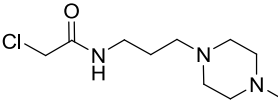
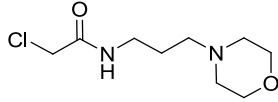


Figura 3.15 Obtenció de les amides **93{y}** segons la metodologia descrita per Barge³¹³

Els primers intents amb l'halur **94b** presenten reactiu sense reaccionar passat el temps de reacció descrit, mentre que aquells assajos en què s'ha utilitzat **94c** han evolucionat favorablement en 4 hores. Així doncs, les amides halogenades **93{y}** desitjades s'obtenen per reacció d'un lleuger excés de **94c** respecte de l'amina **5{y}** corresponent, amb rendiments superiors al 90% (Taula 3.1).

Taula 3.1 Rendiments de l'obtenció de **93c{y}** amb la metodologia de Barge modificada ³¹³

compost	rendiment
 93c{8}	quantitatiu
 93c{9}	quantitatiu
 93c{11}	90%

La comparació d'aquests rendiments amb els obtinguts anteriorment per a les amides **93a** identifiquen com a millor alternativa per a l'obtenció d'amides halogenades **93{y}** l'ús d'acetonitril com a dissolvent i K_2CO_3 com a base, havent-se aconseguit augmentar el rendiment d'obtenció de **93{11}** del 10% al 90%. Val a dir que no s'ha assajat l'obtenció de **93c{10}** per haver obtingut prou producte per a les posteriors etapes sintètiques amb la primera via.

Cal remarcar l'enregistrament d'un pic inesperat en l'espectre de masses d'alta resolució de **93c{9}** i **93c{11}**. La ionització per electrosprai i mesura del temps de vol (ESI-TOF) ha rendit un anió amb una relació massa/càrrega equivalent a la d'ió molecular esperat més un àtom de clor. Aquest fet s'ha trobat descrit en algun cas en què s'ha emprat aquesta tècnica d'ionització per a l'anàlisi de compostos que no formen anions amb facilitat per pèrdua de protons, però que sí poden formar un adducte amb un àtom de clor del dissolvent emprat en l'anàlisi ³¹⁴.

Així doncs, a mode de resum, es disposa de les amides halogenades de la Figura 3.16 per a l'alquilació següent.

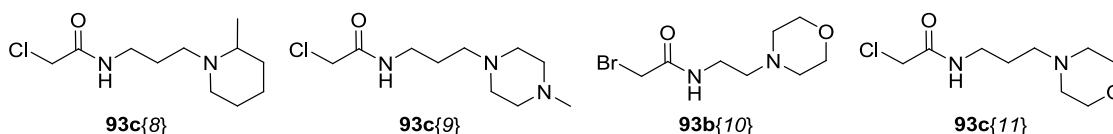


Figura 3.16 Amides halogenades disponibles per a ser alquilades

3.4.3. Alquilació de les amides halogenades **93{y}**

Un cop obtingudes les amides halogenades **93**, la segona etapa sintètica en l'estratègia proposada inicialment per a l'obtenció de les amines objectiu **83{3,y}** (apartat 3.4.1, pàg. 113, Figura 3.9) és l'alquilació de **93{y}** amb *N*-metilpiperazina (**70{3}**) per obtenir les amides alquilades **92{3,y}**.

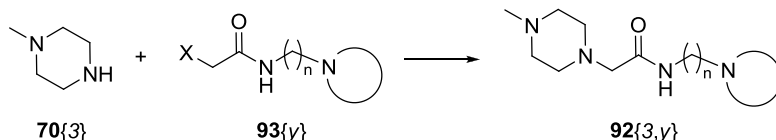


Figura 3.17 Segona etapa sintètica en l'obtenció de les amines **83{3,y}** objectiu

L'alquilació dels metilens halogenats passa per la substitució nucleòfila de l'halogen per part de l'amina secundària cíclica **70{3}**. En la cerca d'alquilacions d'*N*-metilpiperazina (**70{3}**) descrites s'han trobat diverses metodologies, que empen típicament un dissolvent orgànic polar (metilisobutilcetona²⁷⁷, acetonitril^{313,315} o alcohols de baix pes molecular³¹⁶, entre d'altres) i una base inorgànica per capturar l'halur d'hidrogen que es desprèn (K_2CO_3 ¹⁴⁶, Na_2CO_3 ²⁰⁹). La reacció sol tenir lloc en unes 8 hores màxim, temps en què es manté agitant (a temperatura ambient o escalfant lleugerament) una mescla equimolar dels dos reactius, amb un lleuger excés de l'*N*-metilpiperazina i en presència de la base inorgànica, insoluble en el medi de reacció³¹⁵. Tenint en compte que en el capítol anterior s'han descrit alquilacions en acetonitril i emprant K_2CO_3 com a base, s'emprarà la mateixa metodologia en aquest cas. Per provar d'augmentar la velocitat de reacció, emperò, es durà a terme l'alquilació amb calefacció per microones. Aquest tipus de calefacció és més efectiva que la calefacció convencional (per convecció) per l'absorció directa de l'energia de microones per part de les molècules de reactiu^{213,317}, de manera que sovint es redueixen considerablement els temps de reacció i en alguns casos s'han arribat a millorar-ne els rendiments. Prova d'això és que en l'alquilació de les amides halogenades **93{y}** s'ha aconseguit passar de 6 hores de reacció amb calefacció convencional a reflux a un màxim d'una hora per calefacció amb microones a 100 °C.

Les amides **92{3,y}** s'han obtingut a partir de l'*N*-metilpiperazina **70{3}** i l'amida halogenada **93{y}** en acetonitril i amb excés de K_2CO_3 (mínim 1,5:1 de base:amida halogenada). Un cop acabada la reacció, només cal filtrar la sal inorgànica i eliminar el dissolvent a pressió reduïda. Tot i que els productes desitjats **92{3,y}** s'obtenen generalment força purs, s'han purificat per cromatografia de columna emprant alumina bàsica com a fase estacionària i una mescla de $CH_2Cl_2:MeOH:NH_3$ com a fase mòbil, per facilitar l'elució de les amines, que queden massa retengudes si s'usa sílice com a fase estacionària. Els compostos obtinguts i els rendiments per a cadascun d'ells es mostren a la Taula 3.2.

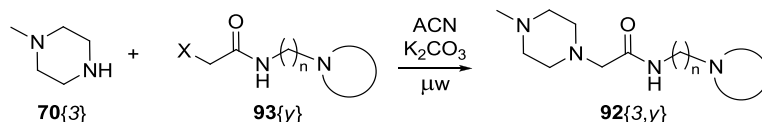


Figura 3.18 Alquilació de les amides **93{y}** amb *N*-metilpiperazina **70{3}**

Taula 3.2 Compostos i rendiments obtinguts per les amides **92{3,y}** per calefacció amb microones

compost	rendiment	compost	rendiment
	18%		60%
92{3,8}		92{3,10}	
	22%		52%
92{3,9}		92{3,11}	

Havent resultat algunes de les amides sintetitzades prèviament al grup lleugerament actives front al VIH¹³⁰, s'ha avaluat l'activitat dels compostos **92**{3,y} obtinguts. Malauradament, cap d'ells ha resultat actiu a la màxima concentració assajada (apartat 3.6, pàg. 129).

3.4.4. Reducció de les amides **92**{3,y}

En l'obtenció dels compostos objectiu **83**{3,y}, resultants del cribratge virtual prospectiu realitzat, a partir de les amides sintetitzades en l'apartat anterior **92**{3,y} queda tan sols la reducció del grup amida. La reducció d'aquesta funcionalitat ha estat àmpliament descrita a la bibliografia amb reactius i condicions de reacció molt diversos^{209,299,318}. Entre els reductors més comuns es troben els hidrurs metàl·lics bé sigui com a tals o complexats (H₄LiAl, AlH₃, LiAlH(OMe)₃, BH₃, NaBH₄). Tanmateix, la substitució de les amides pot dificultar la reducció amb alguns d'aquest compostos. Així, les reaccions d'amides no substituïdes no són completes o extraordinàriament lentes, mentre que en les amides substituïdes són més ràpides però els rendiments de reacció poden ser baixos degut a reaccions secundàries³¹⁹. A banda, la majoria d'aquests reductors no són selectius i poden reduir altres grups funcionals de l'amida de partida.

En el GEM de l'IQS es té força experiència prèvia en la reducció d'amides amb reductors més suaus que els hidrurs metàl·lics, bé sigui emprant el complex de borà en tetrahidrofuran (BTHF)^{173,320} o el complex de borà en dimetilmercaptà (*borane dimethylsulfide complex*, BMS)¹³⁰, més estable que el primer. Malauradament, el BMS té una olor fortament desagradable. És per això que s'han desenvolupat altres fonts de borà complexades o no amb bases de Lewis, que presenten una major compatibilitat de dissolvents (sempre que siguin apròtics) i permeten funcionalitats varies en el reactiu a reduir^{130,207,315,321,322}.

Així doncs, atenent a la semblança estructural de les molècules en estudi amb les anteriorment descrites al grup¹³⁰, s'assaja la reducció de les amides alquilades **92**{3,y} amb BMS per obtenir les amines objectiu **83**{3,y} (Figura 3.19).

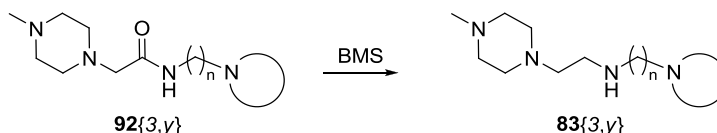


Figura 3.19 Obtenció de les amines **83** objectiu per reducció dels precursors **92**

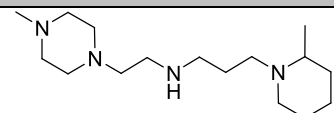
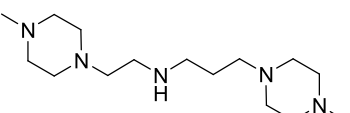
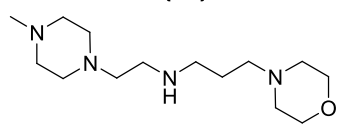
El mecanisme de les reduccions amb BMS requereix de dos mols d'agent reductor per cada mol de l'amida de partida, a més d'una segona etapa d'hidròlisi per tal d'obtenir l'amina desitjada³²³. La hidròlisi del complex format es pot fer amb un excés de propilamina, diazabicyclo[2.2.2]octà (DABCO), catàlisi de Pd/C o amb HCl/MeOH a reflux. La facilitat de manipulació i l'experiència prèvia al grup fa decidir-se per l'ús de HCl/MeOH.

Així doncs, l'amida **92**{3,9} es dissol en THF anhidre a 0 °C i s'afegeix BMS en excés (un mínim de 3 equivalents, per assegurar la reacció completa). A continuació, la mescla s'escalfa a reflux durant tres hores, passades les quals es pot afegir l'àcid clorhídric metanòlic i tornar a refluir. Un cop acabada la hidròlisi, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i el cru es dissol en NaOH aquós fins a pH = 14. La fase aquosa s'extreu amb diclorometà per obtenir l'amida reduïda **83**{3,9}. La reacció no resulta completa, de manera que es prova de repetir l'assaig augmentant el temps de reacció fins a cinc dies, doncs és el que s'ha trobat descrit per Pirali i col·laboradors³²⁴. De fet, posteriorment s'ha comprovat que amb tres dies de reacció n'hi ha prou per obtenir les amines desitjades **83**{3,y}. El compost objectiu **83**{3,9} s'obté de puresa suficient com per avaluar-ne l'activitat antiviral, mentre que les amines **83**{3,8} i **83**{3,11} es

purifiquen per cromatografia de columna emprant alúmina bàsica com a fase estacionària i diclorometà/metanol com a eluent. En canvi, no s'ha aconseguit la reducció de **83**{3,10} en aquestes condicions.

Amb tot, mitjançant aquesta metodologia, s'han sintetitzat les amines representades a la Taula 3.3, amb rendiments de reducció no superiors al 50%. Els rendiments globals des dels precursors **94** i **5**{y} no arriben a superar en cap cas el 10%. Els baixos rendiments obtinguts es deuen principalment a les purificacions per cromatografia de columna, doncs gran part del cru queda retingut a la fase estacionària. Bo i així, les quantitats i puresa han estat suficients per avaluar-ne l'activitat antiviral i detectar el compost **83**{3,8} com un compost prototip de noves famílies (veure apartat 3.6, pàg. 129).

Taula 3.3 Amines objectiu sintetitzades

compost	rendiment de reducció	rendiment global des de 94 i 2 {y}
 83 {3,8}	50%	9%
 83 {3,9}	33%	7%
 83 {3,11}	7%	3%

3.5. Síntesi de compostos amb quatre baules metilèniques

Vistos els resultats obtinguts en la síntesi de les estructures **83**{3,y}, la síntesi dels compostos objectiu amb quatre baules metilèniques **84**{x,y} es planteja des de l'inici com la dels seus anàlegs. L'anàlisi retrosintètica porta, doncs, a l'obtenció de les molècules objectiu per reducció de les amides **95**{x,y}, les quals poden desconnectar-se en l'heterocicle nitrogenat **70**{x} i l'amida halogenada **96**{y}. Finalment, l'amida intermèdia pot obtenir-se per reacció del clorur de 4-bromobutiril amb l'amina **5**{y} corresponent (Figura 3.20).

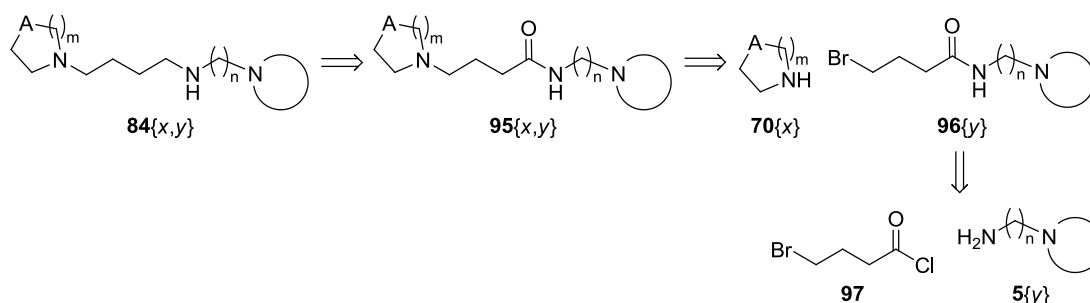


Figura 3.20 Anàlisi retrosintètica per a l'obtenció de la família de compostos **84**{x,y} objectiu

3.5.1. Síntesi de les amides halogenades 96

Ja que les amines 5{y} presenten, a més del grup amino amb el què s'obté l'amida 96{y}, una altra funcionalitat amina terciària, cal no perdre de vista que part del reactiu 5{y} pot capturar el clorur d'hidrogen que es desprèn de la reacció de 97 amb 5{y} i desactivar-se per continuar reaccionant amb l'halur d'àcid. És per això que en els primers assajos per a les obtencions de les amides 96{y} s'afegeix al medi de reacció un lleuger excés de trietilamina, seguint les metodiques descrites^{285-287,294,300}. A més, l'elevada reactivitat del clorur d'àcid requereix d'atmosferes inertes durant la reacció.

L'obtenció de les amides desitjades 96{4}, 96{9} i 96{11} s'ha assajat emprant diclorometà o acetat d'etil com a dissolvent. El clorur de 4-bromobutiril (97) s'ha addicionat lentament sobre una dissolució de l'amina 5{y} corresponent a 0 °C, en atmosfera de nitrogen i en presència de trietilamina. La conversió dels reactius en el producte desitjat s'ha pogut detectar seguint la reacció per ¹H-RMN i en períodes de temps no superiors a una hora. En les posteriors extraccions líquid-líquid, emperò, el producte 96{y} desitjat s'ha perdut parcialment per una lleugera solubilitat en el medi aquós. Les amides 96{4}, 96{9} i 96{11} també s'han pogut obtenir emprant diclorometà com a dissolvent i K₂CO₃ en suspensió com a base per a la captura del clorur d'hidrogen alliberat, però amb rendiments molt baixos i difícilment reproduïbles.

La síntesi de l'amida 96{4} s'ha assajat també sense base, per tal d'obtenir-ne directament el clorhidrat. Aquest, que s'ha obtingut en forma de sòlid blanc altament higroscòpic, s'ha aconseguit emprant acetat d'etil o diclorometà com a dissolvent. L'alliberament de l'amida s'ha realitzat tant per reflux en acetat d'etil com amb una resina d'intercanvi iònic (Amberlite-OH), aquest últim amb un rendiment aproximat del 50%.

Val remarcar que entre els principals subproductes de reacció caracteritzats al llarg d'aquests primers assajos s'han identificat en proporcions considerables, la butirolactona i l'àcid 4-bromobutíric, subproducte d'hidròlisi de 97.

La reacció de Schotten-Baumann també ha estat estudiada com una alternativa per a la síntesi d'amides difícils d'obtenir en altres condicions^{288,325,326}. En ella, els reactius dissolts en un dissolvent orgànic es mantenen en agitació a temperatura ambient amb una segona fase aquosa bàsica (generalment una dissolució concentrada de K₂CO₃ o NaOH), de manera que l'halur d'hidrogen alliberat és capturat per la fase aquosa. Havent assajat aquestes condicions per a l'obtenció de les amides objectiu 96{9} i 96{11}, s'han aïllat les lactames 98{9} i 98{11} (Figura 3.21) en comptes dels productes desitjats. Ambdues estructures 98 provenen de l'obtenció de l'amida desitjada 96 i posterior alquilació del nitrogen amídic pel derivat halogenat. S'ha decidit avaluar-ne també l'activitat biològica perquè recorden lleugerament als compostos del cribratge virtual (sistemes nitrogenats cíclics separats per una cadena hidrocarbonada), però han resultat no ser actives ni tòxiques a la màxima concentració assajada de 125 µg/ml.

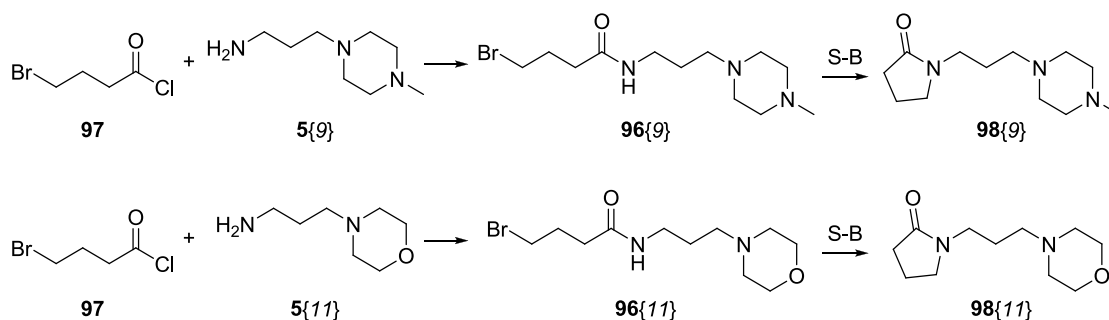


Figura 3.21 Lactames 98 obtingudes en les condicions de reacció de Schotten-Baumann

Vistes les dificultats per obtenir les amides objectiu **96**{*y*} de forma reproduïble a partir del clorur de 4-bromobutiril (**97**), s'ha fet una cerca bibliogràfica amb l'*SciFinder® web version*²²⁹ de les possibles reaccions secundàries descrites que pot patir aquest reactiu. De fet, la major part d'amides halogenades descrites parteixen de derivats de l'àcid acètic (**94**) com els emprats en la síntesi dels compostos **83**{*3,y*} però s'han trobat poques referències que emprin el derivat **97** com a reactiu. En la reacció de **97** amb amines primàries **99**, en èter dietílic i en presència de trietilamina com a base s'ha trobat descrita la formació de ciclopropilamides **100** en quantitats importants³²⁷. Igualment, forçant les condicions de reacció s'ha descrit la ciclació de la 4-bromo-*N*-ciclohexilbutiramida **101**, derivada de **97**, a l'estructura **102**, i altres referibles^{328,329}.

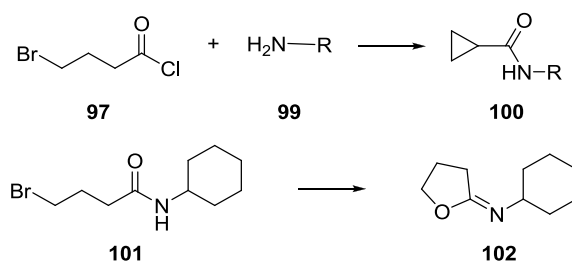


Figura 3.22 Possibles reaccions en competència amb la formació d'amides **96**

Així doncs es considera necessària la cerca d'una altra metodologia per a la síntesi dels intermedis amídics **96**.

Tal com s'ha presentat a l'apartat anterior (Figura 3.9, pàg. 113), una alternativa sintètica plantejada anàlogament amb els derivats de dues baules metilèniques era l'aminació reductora a partir de l'aldehid halogenat **105** (Figura 3.23). L'oxidació selectiva d'alcohols a aldehids es troba àmpliament descrita a la bibliografia: per oxidació amb clorocromat de piridina (PCC)³³⁰⁻³³⁴, a través de l'oxidació de Swern amb dimetilsulfòxid/clorur d'oxalil i derivats^{335,336} o per oxidació de Corey-Kim amb sulfur de dimetil/*N*-clorosuccinimida i derivats^{336,337}, així com amb el periodinà de Dess-Martin^{338,339} o variants mediambientalment més amigables amb catalitzadors reutilitzables³⁴⁰. Tot i que l'aldehid **105** s'ha obtingut a partir del derivat comercial **78c** per oxidació amb PCC seguint la metodica de Meyer i col·laboradors³³⁴ amb un rendiment del 85%, aquesta via sintètica es descarta ràpidament per la fàcil oxidació de **105** a l'aire.

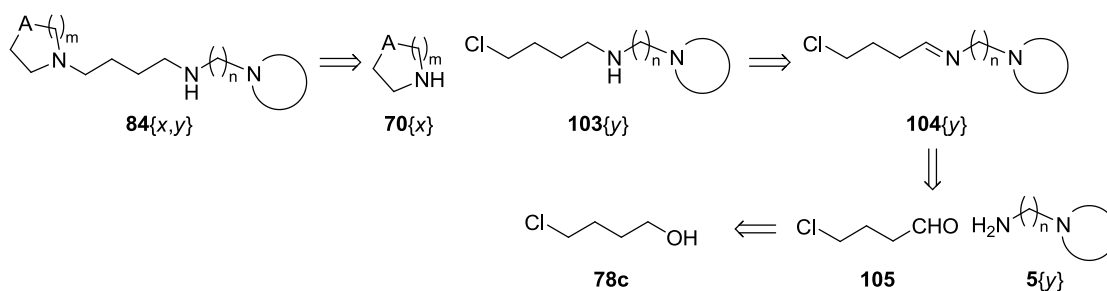


Figura 3.23 Possible alternativa via aminació reductora per la síntesi de **84**

Amb tot, es planteja la possibilitat de cercar una alternativa sintètica per a l'obtenció de **84**{*x,y*} que permeti disminuir la reactivitat de l'halur d'àcid de quatre carbonis **97** utilitzat inicialment, tenint en compte que l'estratègia via amides ha donat bons resultats en la síntesi dels compostos objectiu amb dues baules metilèniques **83**{*3,y*}.

3.5.2. Alquilació del 4-bromobutirat d'etil (107)

Tenint en compte que l'halur d'àcid és el derivat d'àcid carboxílic amb major reactivitat, una possibilitat d'evitar les reaccions no desitjades comentades en l'apartat anterior és emprar un derivat d'àcid carboxílic menys reactiu com l'èster, de manera que l'estratègia sintètica sigui també via l'amida **95**, però amb les darreres etapes invertides: l'èster etílic **107**, comercialment disponible, es pot alquilar primer amb l'heterocicle **70** $\{x\}$ i després obtenir l'amida per aminolisi de l'èster **106** $\{x\}$ (Figura 3.24).

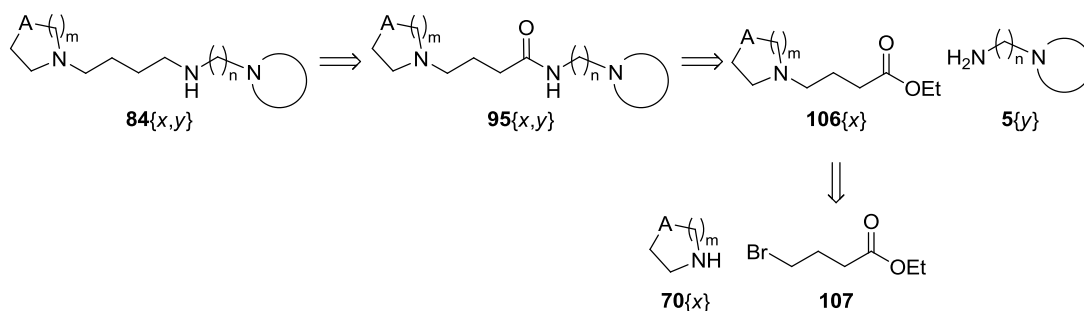


Figura 3.24 Anàlisi retrosintètica dels compostos objectiu **84** via èster

L'alquilació de **107** amb heterocicles **70** es troba descrita a reflux durant un mínim de 6 hores en diversos dissolvents polars (acetonitril³⁴¹, etanol³⁴², acetona³⁴³, isopropilmetilcetona³⁴⁴) i emprant bases inorgàniques insolubles en el medi de reacció (carbonat sòdic³⁴⁴ o potàssic^{341,343}) per capturar el bromur d'hidrogen que s'allibera. En les condicions descrites s'obtenen rendiments moderats (50-85%) després de purificar per cromatografia de columna.

Així, els èsters alquilats **106** $\{x\}$ s'han obtingut escalfant a reflux durant 16 hores l'amina secundària **70** $\{x\}$ amb l'èster comercial **107** en acetonitril i en presència de K_2CO_3 polvoritzat, amb rendiments superiors al 75%, sense necessitat de purificacions posteriors (Taula 3.4). Un cop més, la *N*-metilpiperazina (**70** $\{3\}$) resulta el reactiu de la família d'heterocicles nitrogenats **70** amb menor rendiment d'obtenció de **106** $\{3\}$ respecte a la resta d'estructures **106**.

Taula 3.4 Rendiments obtinguts per als èsters **106**

compost	rendiment	compost	rendiment
106 $\{1\}$	87%	106 $\{3\}$	76%
106 $\{2\}$	86%	106 $\{4\}$	95%

L'obtenció dels èsters alquilats objectiu **106** es determina fàcilment per espectroscòpia de 1H -RMN, doncs el metilè que sustenta l'àtom de brom es registra com un triplet a 3,5 ppm en el reactiu **107** i s'apantalla fins a les 2,3 ppm quan està unit a l'àtom de nitrogen en **106** $\{x\}$ (Figura 3.25, Figura 3.26). Pel que fa a l'espectre de ^{13}C -RMN, el senyal d'aquest mateix carboni passa de 33 ppm en el reactiu precursor **107** a les 55-59 ppm en les estructures alquilades **106** $\{x\}$.

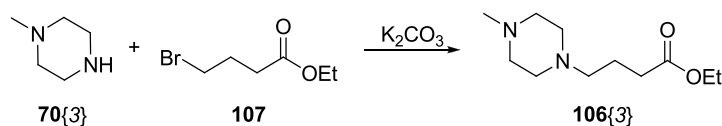


Figura 3.25 Exemple d'alquilació de l'èster halogenat **107**

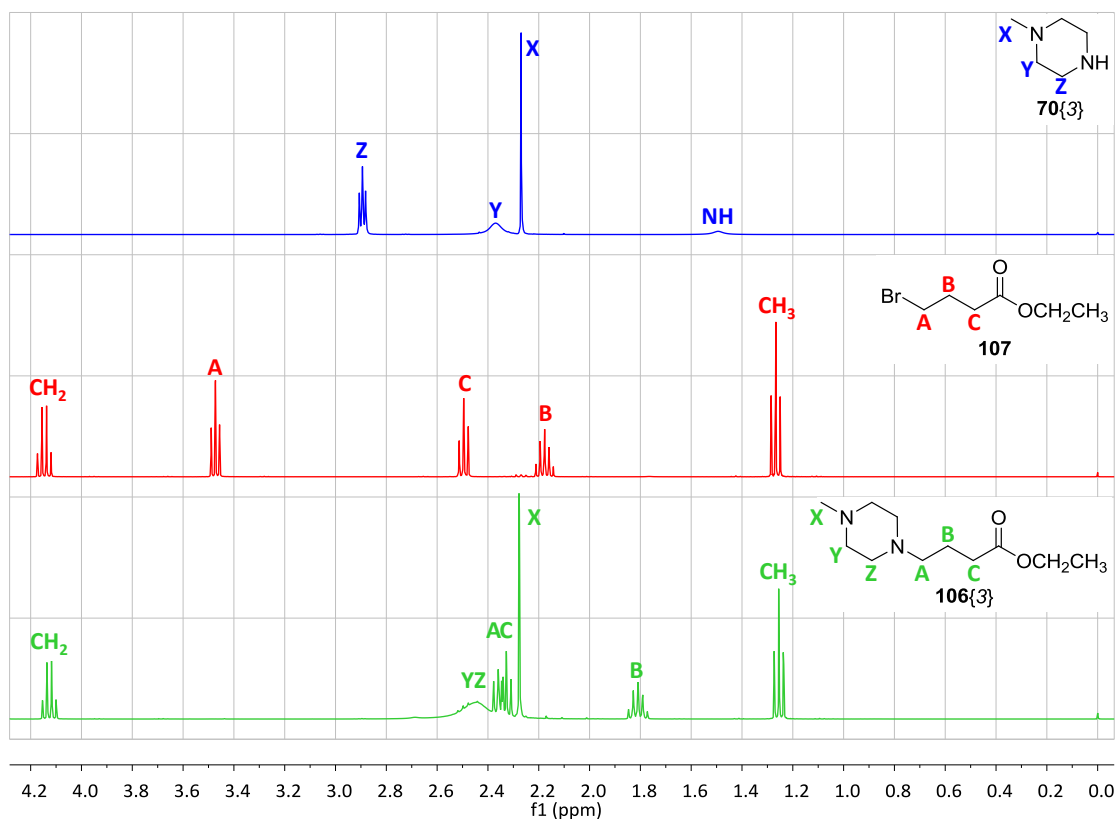


Figura 3.26 Comparació dels espectres de ^1H -RMN dels compostos implicats en l'obtenció de **106{3}**

Els espectres de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN del compost **106{3}** es registren sense incidències, identificant-se clarament els senyals de l'heterocicle i els de la cadena lineal. Tanmateix, resulta remarcable el fet que no es visualitzi el senyal de correlació entre els protons i els carbonis del cicle en l'espectre bidimensional HSQC (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*, correlació heteronuclear d'un sol quanta) (Figura 3.27). Aquest fet és probablement degut a la naturalesa d'aquesta darrera seqüència: els senyals corresponents als metilens de l'anell d'*N*-metilpiperazina de **106{3}** s'enregistren en l'espectre de ^1H -RMN com un senyal ample degut a la ràpida relaxació que els origina. La seqüència de polsos de l'HSQC és massa llarga per a què sobrevisquin aquests senyals, que relaxen massa ràpidament. Cal considerar, a més, la possible coalescència pel joc conformacional del cicle, que porta als diferents protons de la posició axial a l'equatorial.

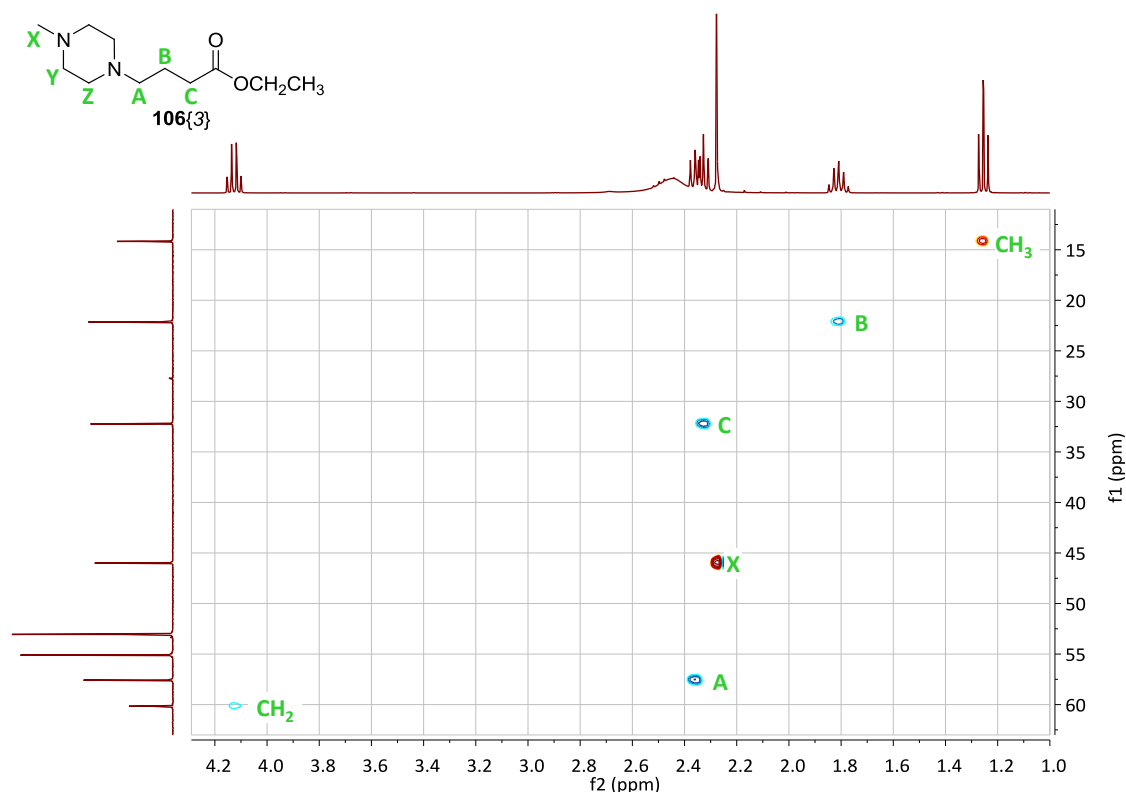


Figura 3.27 Espectre bidimensional HSQC del compost **106{3}**

3.5.3. Síntesi d'amides **95**

Havent-se obtingut els èsters alquilats **106**, la següent etapa de reacció és l'aminolisi de l'èster per obtenir l'amida **95{x,y}** desitjada (Figura 3.28).

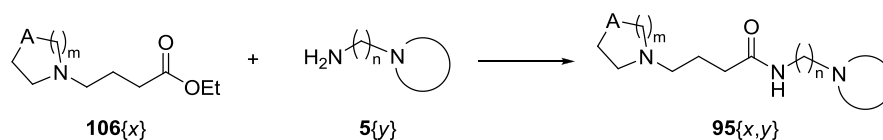


Figura 3.28 Obtenció de les amides **95** a partir dels èsters alquilats **106** prèviament sintetitzats

Les amides no alquilsubstituïdes s'obtenen comunament a partir d'èsters per aminolisi (reacció d'un èster amb amoníac concentrat aquós). La reacció avança fàcilment a temperatura ambient, especialment si s'empren els èsters metàlics d'àcids carboxílics de baix pes molecular, cristal·litzant les amides poc solubles (com la succinamida) en el propi medi de reacció³⁰⁷. D'altra banda, no tan comuna és l'obtenció d'amides *N*-substituïdes per aminolisi de l'èster amb una amina primària.

Ambdues vies passen per una substitució nucleòfila acílica del grup alcòxid. Després de l'atac nucleòfil de l'amina sobre l'èster, el mecanisme requereix generalment de catàlisi bàsica (com el propi amoníac en excés per a l'aminolisi), la qual permet desprotonar l'àtom de nitrogen de l'intermedi tetraèdric. La densitat de càrrega del nitrogen afavoreix en aquest punt el trencament de l'intermedi per expulsió de l'anió alcòxid³⁴⁵.

Experimentalment l'aminolisi s'ha descrit també per reflux d'una mescla equimolar de l'èster i l'amina en xilè com a dissolvent²⁰⁹. Encara que aquestes condicions podrien promoure l'ús d'un

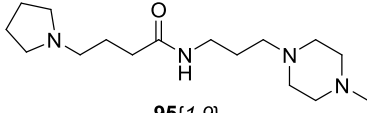
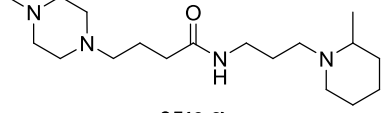
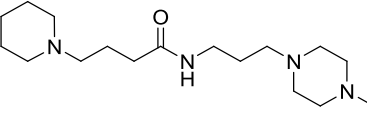
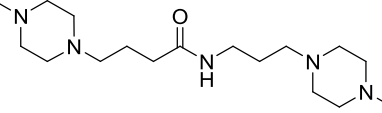
montatge tipus Dean-Stark, es descarta degut a la miscibilitat de l'etanol alliberat i el dissolvent emprat. De fet, l'etanol forma una mescla azeotròpica amb el toluè de punt d'ebullició proper als 77 °C. L'intent d'escalfar a reflux una mescla equimolar de **106**{3} i **5**{11} en toluè porta només a la mescla dels reactius, encara que es dugui a terme per calefacció amb microones, en vial segellat, durant més de 30 minuts.

Una cerca bibliogràfica amb l'*SciFinder*[®] *web version*²²⁹ permet identificar la transformació directa d'èsters a amides com una reacció habitual en síntesi orgànica, tot i que sol ocórrer en condicions dures (llargs temps i altes temperatures, ús de catalitzadors metàl·lics fortament alcalins), incompatibles amb molècules que presenten grups funcionals sensibles^{209,346}. En aquest sentit, diverses metodologies descrites empen trimetilalumini, un catalitzador altament pirofòric i manipulable tan sols a petita escala^{347,348}. D'altra banda, les amides de derivats d'àcids carboxílics lineals d'elevat pes molecular s'han descrit amb metodiques diferents en funció de la temperatura d'ebullició de l'amina precursora i la seva solubilitat en aigua. Per amines amb baix punt d'ebullició, Roe i col·laboradors empen el clorur d'àcid en condicions estàndard o bé l'èster sota pressió i temperatura elevades³⁴⁹. En el cas d'emprar amines amb elevat punt d'ebullició, obtenen les amides desitjades amb rendiments elevats, a partir de l'èster i a altes temperatures.

L'ús de calefacció per microones s'ha estudiat àmpliament en les aminolisis d'èsters. De fet, Varma i col·laboradors descrigueren la síntesi d'amides sense dissolvent i per calefacció al microones d'èsters aromàtics i anilines o amines benzíliques³⁴⁶ i altres estudis han demostrat l'augment important del rendiment front a la calefacció convencional, sobretot si s'utilitzen dissolvents apolars, ja que l'absorció de les microones és específica dels reactius³⁵⁰⁻³⁵⁵. En alguns casos, l'addició d'una base (generalment alcòxids) al medi de reacció permet augmentar parcialment el rendiment àdhuc en els casos en què s'empra la calefacció per convecció^{345,350,351}.

Amb les propostes d'aquests darrers estudis en ment, s'ha assajat la síntesi de les amides objectiu **95**{x,y} al microones i en presència de *tert*-butòxid potàssic. La calefacció al microones d'una dissolució equimolar en toluè dels reactius precursors **106**{x} i **5**{y} amb dos equivalents de *t*BuOK com a base durant 20 minuts rendeix un gel translúcid, degut a la suspensió de la sal de l'amida en el dissolvent. Diversos intents de neutralitzar el gel amb àcids varis (àcid clorhídric aquós, àcid acètic, àcid clorhídric en metanol) han permès identificar la neutralització amb la quantitat estequiomètrica d'àcid clorhídric en metanol com a millor alternativa. Per a una correcta neutralització, es manté primerament la mescla resultant en agitació durant uns minuts, transcorreguts els quals es filtra el clorur potàssic alliberat. L'eliminació dels dissolvents (toluè, *tert*-butanol) a pressió reduïda condueix a les amides **95**{x,y} desitjades en forma de sòlids gelatinosos blancs o lleugerament acolorits amb rendiments pràcticament quantitativs, tal com es mostra a la Taula 3.5.

Taula 3.5 Amides **95**{x,y} sintetitzades a partir dels precursors **106**{x} i **5**{y}

compost	rendiment	compost	rendiment
	90%		90%
95 {1,9}		95 {3,8}	
	98%		97%
95 {2,9}		95 {3,9}	

compost	rendiment	compost	rendiment
	98%		97%
95{3,4}		95{3,10}	
	95%		99%
95{3,5}		95{3,11}	
	96%		92%
95{3,7}		95{4,9}	

La reacció se segueix fàcilment per ^1H -RMN, doncs s'observa la pèrdua dels senyals triplet i quadruplet del grup etil dels èsters precursors **106**{x} a 1,25 ppm i 4,12 ppm, respectivament. La resta de senyals es mantenen pràcticament com en els reactius (Figura 3.29). Tal com ja s'ha comentat per al cas de **106**{3} (Figura 3.27, pàg. 125), en tots els derivats de l'heterocicle **70**{3} sorprèn que no es registri el senyal de correlació dels protons i carbonis de la *N*-metilpiperazina en els espectres de resonància magnètica nuclear bidimensional, probablement degut a la coalescència i la llargada de les seqüències.

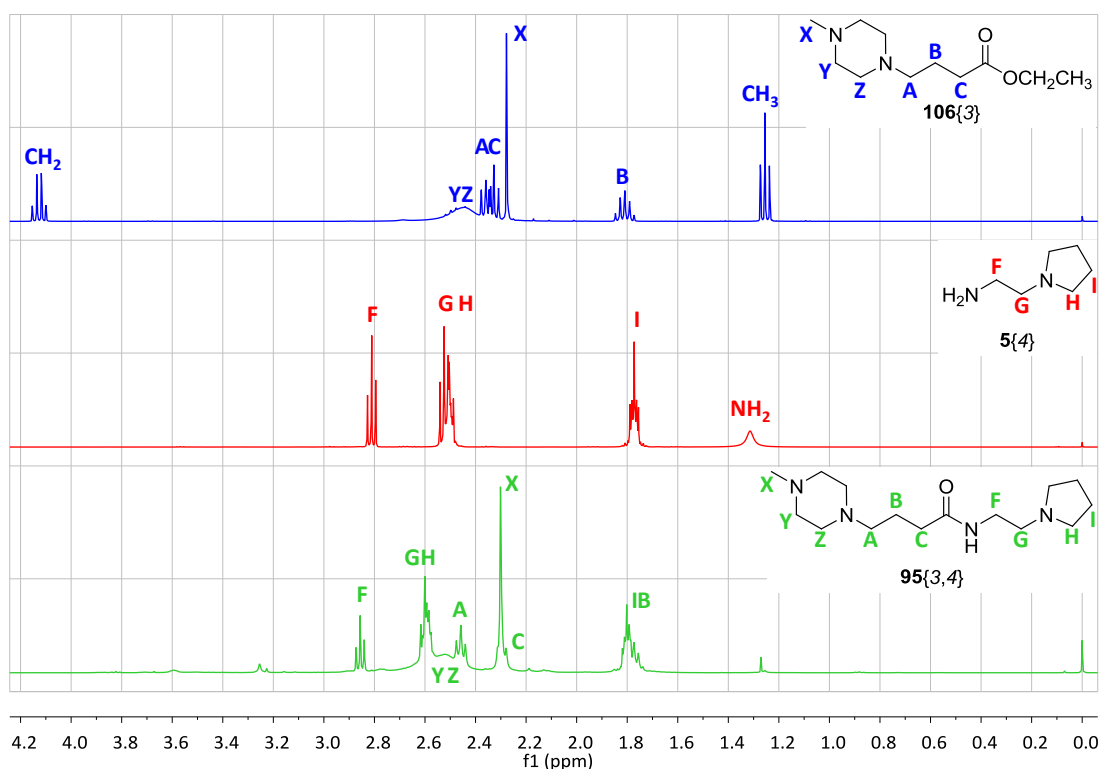


Figura 3.29 Espectres comparatius de ^1H -RMN de l'èster **106**{3}, l'amina **5**{4} i l'amida que se'n deriva, **95**{3,4}

Pel que fa a l'espectroscòpia de ^{13}C -RMN de les amides **95**, els canvis més remarcables respecte als èsters precursors s'observen en la manca dels senyals del grup etil de l'èster (14 ppm i 60 ppm) i en el desplaçament a camps més baixos del senyal del carbonil (173 ppm en els èsters **106** i al voltant de 178 ppm en les amides **95**).

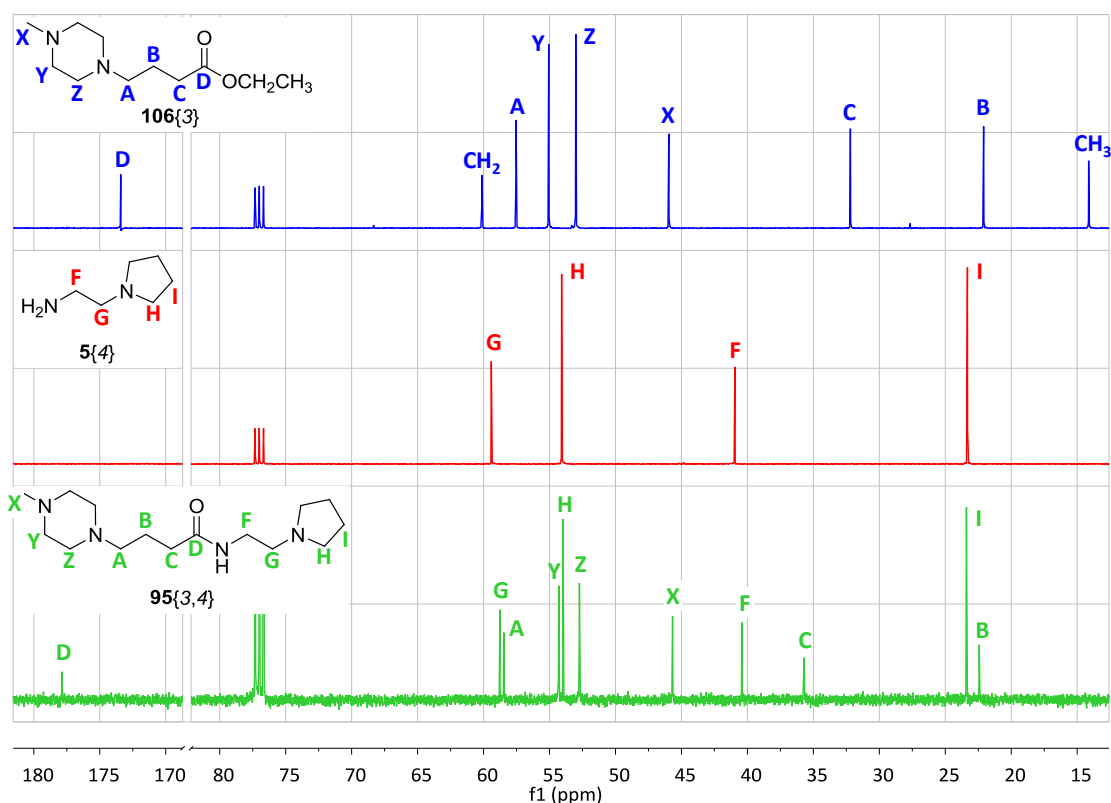


Figura 3.30 Espectres comparatius de ^{13}C -RMN de l'èster **106{3}**, l'amina **5{4}** i l'amida que se'n deriva, **95{3,4}**

De totes les amides **95{x,y}** sintetitzades, tot i no ser els productes finals objectiu, se n'ha avaluat l'activitat antiviral, donada la seva semblança estructural amb els compostos finals **84{x,y}**. A l'apartat 3.6 (pàg. 129) es descriuen els resultats obtinguts.

3.5.4. Reducció de les amides **95{x,y}** a les amines objectiu **84{x,y}**

Finalment s'han reduït les amides **95{x,y}** sintetitzades als compostos objectiu **84{x,y}**. Tenint en compte que la reducció ha estat satisfactòria per a les amides amb dues baules metilèniques **92{3,y}**, s'han mantingut les mateixes condicions de reacció per a la reducció del carbonil amídic de **95{x,y}** amb el complex de borà en dimetilmercaptà (BMS).

Així doncs, l'amida es dissol en THF anhidre a 0 °C i s'hi afegeix un excés de tres equivalents de BMS. Tot seguit, la mescla s'escalfa a reflux durant un mínim de 16 hores, passades les quals s'afegeix àcid clorhídric metanòlic a la dissolució i es torna a refluir. Un cop finalitzada la hidròlisi, el dissolvent s'elimina a pressió reduïda i el cru resultant es dissol en NaOH fins a pH bàsic (pH = 14). Les amines objectiu **84** s'obtenen en general prou pures per extracció amb diclorometà. Tanmateix, es recomana la purificació per cromatografia de columna, emprant alúmina bàsica com a fase estacionària i una mescla diclorometà:metanol com a eluent. Tal com ja s'havia descrit anteriorment al grup ¹³⁰, l'ús de sílice com a fase estacionària és totalment desaconsellable, ja que les amines **84{x,y}** hi queden fortament ancorades i es perd gran part del producte.

S'han reduït així nou de les deu amides **95{x,y}** sintetitzades, amb rendiments molt variables, després de la purificació per cromatografia de columna, segons es mostra a la Taula 3.6. L'amida **95{3,8}** no s'ha aconseguit reduir en les condicions de reacció esmentades.

Finalment, s'ha avaluat l'activitat antiviral de les nou amines objectiu sintetitzades, amb l'objectiu de detectar possibles compostos prototip que puguin donar lloc a noves famílies d'estructures inhibidores del coreceptor CXCR4. Tan sols les amines **84**{3,10} i **84**{3,11} han resultat lleugerament actives ($EC_{50} = 3,00 \mu\text{g/ml}$ i $EC_{50} = 18,25 \mu\text{g/ml}$, respectivament), mentre que la resta de compostos **84** no han resultat ni actius ni tòxics a la màxima concentració assajada de $25 \mu\text{g/ml}$. Els resultats dels assajos biològics es detallen a l'apartat 3.6.

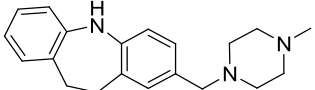
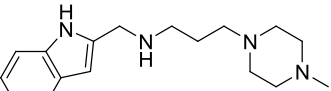
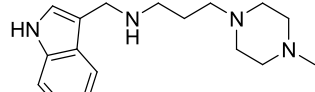
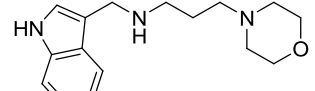
Taula 3.6 Amines **84**{x,y} obtingudes per reducció de les amides **95**{x,y} corresponents amb BMS

compost	rendiment	compost	rendiment
	50%		40%
84 {1,9}		84 {3,9}	
	33%		52%
84 {2,9}		84 {3,10}	
	47%		51%
84 {3,4}		84 {3,11}	
	46%		33%
84 {3,5}		84 {4,9}	
	36%		
84 {3,7}			

3.6. Avaluació de l'activitat antiviral dels compostos derivats del disseny de novo

Un cop obtinguts, s'ha avaluat l'activitat biològica dels quatre derivats d'heterocicles aromàtics (**71**{3}, **79**{9}, **80**{9} i **80**{11}), per a les quals s'han obtingut els valors d' EC_{50} i CC_{50} que es mostren a la Taula 3.7 (pàg. 130). Els assajos, duts a terme amb el mètode d'MTT descrit a l'apartat 2.4, pàg. 96, s'han realitzat al Laboratori de Retrovirologia de l'Institut Universitari Germans Trias i Pujol (Fundació IrsiCaixa), amb qui el GEM col·labora des dels inicis del projecte de la sida. Només un dels compostos seleccionats com a potencial inhibidor (**80**{9}) ha resultat més actiu que tòxic, però a concentracions molt elevades. La resta de compostos, tant els dos seleccionats com a potencialment actius, com el compost no actiu addicional han presentat valors de citotoxicitat massa elevada, de manera que no se n'ha pogut avaluar l'activitat com a concentració efectiva per causar el 50% d'inhibició (EC_{50}).

Taula 3.7 Activitats biològiques obtingudes per als derivats d'heterocicles aromàtics

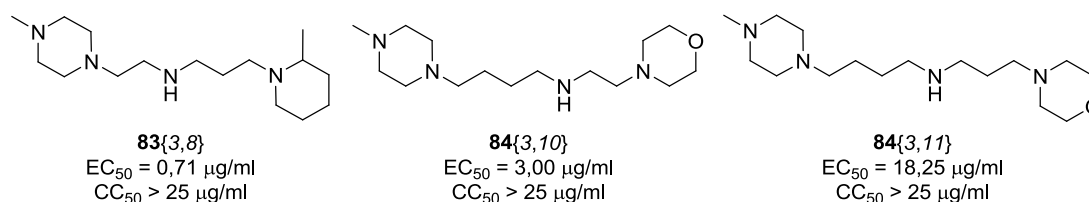
compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
 71{3}	> 9,9	9,9
 79{9}	> 3,8	3,8
 80{9}	15,9	50,8
 80{11}	> 51,4	51,4

Pel que fa a les amides de dues i quatre baules metilèniques (**92**{3,y} i **95**{x,y}, respectivament) i les corresponents amines reduïdes **83**{3,y} i **84**{x,y}, els resultats de les avaluacions antivirals es mostren a la Taula 3.8.

Taula 3.8 Avaluació antiviral dels compostos amb dues i quatre baules metilèniques (es pren de referència l'AMD3100, que presenta EC₅₀ = 0,001 µg/ml i CC₅₀ > 1 µg/ml).

Amides			Amines		
compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	compost	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
92 {3,8}	> 125	70	83 {3,8}	0,71	> 25
92 {3,9}	> 125	95	83 {3,9}	> 25	> 25
92 {3,11}	> 125	91	83 {3,11}	> 125	76
95 {1,9}	> 125	86	84 {1,9}	> 25	> 25
95 {2,9}	> 125	63	84 {2,9}	> 25	> 25
95 {3,4}	> 125	69	84 {3,4}	> 25	> 25
95 {3,5}	> 125	71	84 {3,5}	> 25	> 25
95 {3,7}	> 125	96	84 {3,7}	> 25	> 25
95 {3,8}	9,20	99	84 {3,8}	--	--
95 {3,9}	> 125	90	84 {3,9}	> 25	> 25
95 {3,10}	> 125	90	84 {3,10}	3,00	> 25
95 {3,11}	> 125	94	84 {3,11}	18,25	> 25
95 {4,9}	> 125	90	84 {4,9}	> 25	> 25

L'anàlisi dels resultats obtinguts demostra la importància de la reducció del carbonil amídic, doncs tan sols una de les amides és més activa que tòxica (**95**{3,8}), mentre que s'ha pogut avaluar satisfactòriament l'activitat antiviral de tres productes reduïts (**83**{3,8}, **84**{3,10} i **84**{3,11}), que poden ser considerats compostos prototip de cara a una futura optimització de les famílies **83** i **84** (Figura 3.31). Malauradament, aquest comportament no es pot corroborar per al derivat **84**{3,8}, per no haver-se aconseguit la reducció satisfactòria de l'amida precursora.


Figura 3.31 Compostos més actius resultats del disseny *de novo*

Destaca especialment l'activitat antiviral de l'amina **83**{3,8} i, sobretot, l'augment de l'activitat respecte a l'amida precursora **92**{3,8}. Tal com ja s'ha conclòs en el capítol anterior (apartat 2.4, pàg. 96) i en concordança amb estudis previs del GEM^{130,145,146}, l'amina **5**{8} resulta un fragment idoni en la cerca de nous inhibidors de l'agent etiològic de la sida.

El fet que dues de les tres amines més actives presentin un heterocicle de morfolina en la seva estructura (**84**{3,10} i **84**{3,11}) coincideix també amb les activitats moderades de les estructures **2**{x,y} derivades de les amines **5**{10} i **5**{11}.

3.7. Resum

Mitjançant el programari Ludi (Cerius2, del paquet Discovery Studio d'Accelrys) i el model del coreceptor CXCR4 desenvolupat al GEM, s'ha dissenyat *de novo* una quimioteca virtual de potencials inhibidors del coreceptor d'entrada de l'agent etiològic de la sida. La quimioteca virtual així generada ha resultat de difícil accessibilitat sintètica, principalment degut a fragments quirals o asimètricament disubstituïts. A partir dels fragments identificats, però, s'ha dissenyat una nova quimioteca virtual, sintèticament més accessible, que s'ha cribrat a través dels diferents models computacionals de què es disposa al GEM i emprant tant tècniques SBDD com LBDD. Aquest cribratge ha resultat en una nova selecció de compostos de tres famílies diferents (derivats d'heterocicles aromàtics, derivats amb dues baules metilèniques i compostos amb quatre baules metilèniques), amb activitats predites poc remarcables, però susceptibles de ser sintetitzats i d'avaluar-ne l'activitat biològica, per poder obrir el camí del desenvolupament de noves famílies de compostos inhibidors de l'entrada del VIH a les cèl·lules hostes.

S'han sintetitzat quatre compostos derivats dels heterocicles de dibenzazepina i indole, tres dels quals foren seleccionats com a potencialment actius en el filtrat computacional. D'aquests, tan sols un compost, el **80**{9} ha resultat ser més actiu que tòxic, tot i que amb una activitat poc destacable.

De la família dels compostos amb dues baules metilèniques s'han obtingut tres dels quatre productes objectiu **83**{3,y}, a través de l'obtenció d'amides halogenades **93**{y} que posteriorment s'han alquilat per donar **92**{3,y} i reduït. Malgrat que cap de les amides **92** sintetitzades ha resultat activa, sí que ho ha estat l'amina **83**{3,8}, esdevenint el compost més actiu obtingut del disseny *de novo*, amb una EC₅₀ = 0,71 µg/ml. Si bé aquest compost no millora l'activitat dels anàlegs de l'AMD3100 descrits prèviament al grup, sí es considera un bon candidat prototip de cara a la optimització de noves famílies de potencials inhibidors del coreceptor CXCR4.

Finalment, pel que fa a la família de derivats amb quatre baules metilèniques, ha calgut modificar l'estratègia sintètica i obtenir en primer lloc els èsters **106**. L'aminolisi d'aquests compostos per calefacció amb microones i en presència de tBuOK ha rendit les amides **95**{x,y}, amb rendiments superiors al 90%. Tan sols l'amida **95**{3,8} ha presentat activitat biològica. Tanmateix, la reducció de les amides **95**{x,y} amb BMS ha rendit dues amines objectiu **84** amb activitat moderada (**84**{3,10} i **84**{3,11}). Ambdues estructures contenen un heterocicle de morfolina i es podran considerar també com a compostos prototip per a futurs processos d'optimització a precandidats.

