

Tesi doctoral

PRODUCTES NATURALS COM A FONT DE NOUS FÀRMACS:
SÍNTESI EN FASE SÒLIDA DE DEPSIPÈPTIDS CÍCLICS I AÏLLAMENT
D'AGENTS ANTITUMORALS D'ESPONGES MARINES

Núria Bayó Puxan

Departament de Química Orgànica
Facultat de Química. Universitat de Barcelona

Institut de Recerca Biomèdica
Parc Científic de Barcelona. Universitat de Barcelona

Barcelona, 1 Setembre 2006

Memòria presentada per

Núria Bayó Puxan

Per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi Doctoral dirigida per :

Dr. Ernesto Nicolás Galindo

Dr. Fernando Albericio Palomera



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Programa de Doctorat: Bienni 2002-2004

Departament de Química Orgànica.

Facultat de Química. Universitat de Barcelona

Per a vosaltres, família

Índex General

Abreviacions	
INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	5
RESULTATS I DISCUSSIÓ	
CAPÍTOL 1:	
Síntesi d'un anàleg de la sirengotoxina, un depsipèptid cíclic anti-Leishmania	33
CAPÍTOL 2:	
Síntesi de l'azatiocoralina, un pèptid simètric i bicíclic anàleg de la tiocoralina	79
CAPÍTOL 3:	
La tiocoralina, nova síntesi en fase sòlida	151
CAPÍTOL 4:	
Aïllament i caracterització de compostos antitumorals d'esponges marines	241
CONCLUSIONS	279
PART EXPERIMENTAL	287
Annex 1. Taules d'aminoàcids, reactius i grups protectors emprats	
Annex 2. Nomenclatura abreviada per pèptids cíclics, ramificats, homo- o heterodètics	
Annex 3. Espectres de RMN del didehidropèptid Fmoc-Thr('Bu)-(Z)-Dhb-OH	
Annex 4. Articles publicats i acceptats	

ABREVIACIONS

AA; aa*	Aminoàcid
AAA	Anàlisi d'aminoàcids
Acm	Acetamidometil
Ac₂O	Anhídrid d'acètic
AcOEt	Acetat d'etil
AcOH	Àcid acètic
Alloc	Al·liloxicarbonil
Alloc-Cl	Cloroformiat d'al·lil
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
Boc₂O	Anhídrid de <i>tert</i> -butoxicarbonil
CCF	Cromatografia en cap fina
Cis	Cistina
COSY	Espectrometria de correlació
¹³C-RMN	Ressonància magnètica nuclear de carboni 13
CTC-PS	Resina 2-clorotritil o resina de Barlos
d	Dublet
δ	Desplaçament químic
DAST	Trifluorur de dietilaminosulfur
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCM	Diclorometà
DEAD	Dietilazodicarboxilat
Dhb	Àcid α,β-didehidroaminobutíric
DHB	Àcid 2,5-dihidroxibenzoic
DIEA	<i>N,N'</i> -Diisopropiletilamina
DIPCDI	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida
DKP	2,5-Dicetopiperazina
CMB	Center of Molecular Biodiversity (Brisbane, Australia)
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N'</i> -Dimetilformamida
DSC	Carbonat de <i>N,N'</i> -disuccinimil
DTT	Ditiotreitol
EDC-HCl	Hidroclorur de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>n'</i> -etilcarbodiimida
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
EM	Espectrometria de masses
EM-IQ	Espectroscopia de masses amb ionització química
eq	Equivalent

* Les abreviacions emprades per als aminoàcids i pèptids segueixen les regles de la IUPAC-IUB descrites al *J. Pep. Sci.*, **2003**, 9, 1-8. Tot i que les abreviacions de la IUPAC-IUB per un *N*-metil aminoàcid és MeXX, per evitar confusions amb els *N*-metil aminoàcids, emprarem l'abreviació NMe-XX.

ESI	Ionització per electrospri
Et₃N	Trietilamina
Et₂O	Èter dietílic
EtOH	Etanol
f	Funcionalització del suport polimèric
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonil
Fmoc-Cl	Clorur de 9-fluorenilmetoxicarbonil
GP	Grup protector
HATU	Tetrafluorofosfat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i>]piridin-1-il-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamini
HBTU	Hexafluorofosfat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamini
HFA	Hexafluoroacetona
HOAt	7-Aza-1-hidroxibenzotriazol
HOBt	1-Hidroxibenzotriazaol
HOSu	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
HOPfp	Pentafluorofenol
HPLC	Cromatografia líquida d'alta pressió
HPLC-EM	Cromatografia líquida d'alta pressió amb detecció per espectrometria de masses
HPLC-ELSD	Cromatografia líquida d'alta pressió amb detecció per dispersió de la llum
3HQA	Àcid 3-hidroxiquinàldic
¹H-RMN	Ressonància magnètica nuclear de protó
Hz	Herz
IC₅₀	Concentració de mostra que causa el 50 % de mort cel·lular
IG₅₀	Concentració de mostra que inhibeix el 50 % del creixement cel·lular
IR	Espectroscopia d'infraroig
<i>J</i>	Constant d'acoblament
λ	Longitud d'ona
<i>m</i>	Multiplet
MALDI-TOFF	Espectrometria de masses de desorció iònica provocada per làser, assistida per matriu i anàlisis de temps de vol
MeCN	Acetonitril
MeOH	Metanol
MFS	<i>N</i> -metilació en fase sòlida segons Miller i Scanlan
MS	Espectrometria de masses
Me	Metil
Mmt	Metoxitritil
MSNT	1-(mesitilè-2-sulfonil)-3-nitro-1,2,4-triazol
MST	Àcid mirístic (àcid tetradecanoic)
MTBD	Metil-4-nitrobenzenesulfonat
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -Butanol
NMe	Aminometil
NMeI	<i>N</i> -metilimidazol
NOESY	Espectrometria d'efecte nuclear Overhauser
Npys	3-nitro-2-piridilsulfenil

OMS	Organització Mundial de la Salut
oNBS	o-Nitrobenzenesulfonyl
OSu	Èster de <i>N</i> -hidroxisuccinimida
PDA	Fotodiode array
Pip	piperidina
<i>p</i>NZ	<i>p</i> -Nitrobenziloicarbonil
<i>p</i>NZ-Cl	Cloroformiat de <i>p</i> -nitrobenzil
PPh₃	Trifenilfosfina
ppm	Parts per milió
PS	Poliestirè
PTSA	Àcid <i>p</i> -toluensulfònic
PyOAP	Hexafluorofosfat de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidin)fosfoni
QNA	Àcid quinàldic
QXA	Àcid 2-quinoxalinecarboxilic
R_f	Factor de retenció a la cromatografia de capa fina
s	Singulet
Scm-Cl	Clorur de metoxicarbonilsulfenil
^tBu	<i>tert</i> -Butil
TBAF	Fluorur de <i>n</i> -butilamoni
TBDMS	<i>tert</i> -Butildimetilsilil
TBME	<i>tert</i> -Butilmetilèter
TBTU	Tetrafluoroborat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(1 <i>h</i> -benzotriazol-1-il)-dimetilaminometilen]- <i>N</i> -metilmetanamini
Tce	Èster de 2,2,2-tricloroetanol
TFA	Àcid trifluoroacètic
THF	Tetrahidrofurà
TES	Trietilsilà
TGI	Concentració de mostra que causa la inhibició total del creixement
TIS	Triisopropilsilà
TMS	Trimetilsilil
TMS-Cl	Clorur de trimetilsilil
t_R	Temps de retenció
Troc	2,2,2-tricloroetoxicarbonil
Troc-Cl	Cloroformiat de 2,2,2-tricloroetil
Trt	Tritil
Trt-Cl	Clorur de tritil
Ts	Tosil
UV	Ultraviolat
Z	Benziloxicarbonil
&	Enllaç



INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

1. INTRODUCCIÓ	9
1.1 Productes naturals com a font de nous fàrmacs	9
1.2 Depsipèptids cíclics aïllats de microorganismes	25
2. OBJECTIUS	31

1. INTRODUCCIÓ

1.1 PRODUCTES NATURALS COM A FONT DE NOUS FÀRMACS

Els recursos naturals han estat històricament la font de curació i prevenció per a les dolències i malalties de l'ésser humà. Les plantes, especialment, han estat la base dels sistemes de la medicina tradicional. El seu ús ha estat àmpliament documentat i els primers escrits es daten d'aproximadament el 2600 aC. a la zona Mesopotàmica. A partir d'aquí s'han recollit diversos documents de la medicina egípcia, chinesa, grega, romana i àrab, entre d'altres. Els egipcis van incloure els òrgans d'animals i els minerals com a noves fonts de remeis naturals. Els documents chinesos recullen fórmules d'administració com gàrgares, infusions, pastilles i pomades, i l'ús de llet, mel, cervesa i vi com a vehicles de transport. Els romans van recollir, preservar i usar les plantes medicinals que cercaren i trobaren durant els seus viatges de conquesta. Els monestirs van ser els encarregats de preservar els escrits durant l'Edat Mitjana i els àrabs van recuperar els coneixements greco-romans i van fer valuoses aportacions.

Tots els treballs van ser codificats i recollits en el *London Pharmacopoeia* en el 1618. El concepte de compost pur com a fàrmac va establir-se gràcies a l'aïllament dels principis actius de les plantes i herbes medicinals més comuns: estricnina, morfina, atropina i colquicina, a principis del 1800 (Figura 1.1). Aquests aïllaments van ser seguits pel que es considera el primer producte natural pur comercialitzat, la morfina, per E. Merck al 1826 i pel primer fàrmac semi-sintètic basat en un producte natural, l'aspirina, per Bayer al 1899 (Figura 1.1).

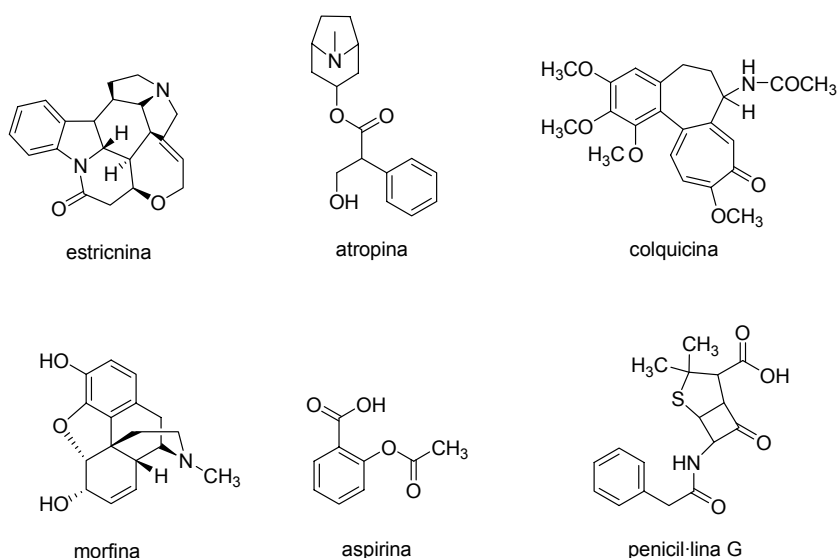


Figura 1.1 Primers compostos aïllats com a fàrmacs

Anys més tard, el 1928, es va descobrir la penicil·lina, pel bacteriòleg Fleming. Després de 10 anys, la penicil·lina va poder ser aïllada i estudiada per Chain i Florey, i a inicis dels anys quaranta es va comercialitzar. Aquest treball va revolucionar la investigació de la recerca de productes naturals provinents de cultius de microorganismes com a nous fàrmacs. Fruit d'aquesta intensa investigació es van desenvolupar un gran nombre de potents antibiòtics: l'estreptomicina, el cloramfenicol, la clortetraciclina, la cefalosporina, l'eritromicina i la vancomicina.

A principi del anys cinquanta la cerca de nous compostos es va estendre fins a l'ecosistema marí. El descobriment dels nucleòsids espongotimidina i espongouridine va demostrar l'existència d'un vast terreny de recerca encara verge, el mar.

Un altre salt important en la descoberta de nous productes naturals bioactius va ser l'aïllament de compostos mitjançant la determinació de l'activitat biològica. El primer compost aïllat seguint aquest novedós procediment va ser l'àcid clavulànic, inhibidor de β -lactamasas, a principis dels anys setanta.

Des de llavors, i fins a meitat dels anys noranta, ha anat augmentant el nombre de patents i de fàrmacs basats en els productes naturals. S'ha determinat que un 50 % dels nous fàrmacs es corresponen a productes naturals, productes naturals semi-sintètics o compostos sintètics basats en productes naturals.¹ A continuació existeix un període de disminució suau de la incidència dels productes naturals en el món farmacèutic, seguit d'un ressorgiment pel seu interès a principis del nou mil·lenni.² Més tard es comentaran els motius d'aquestes fluctuacions.

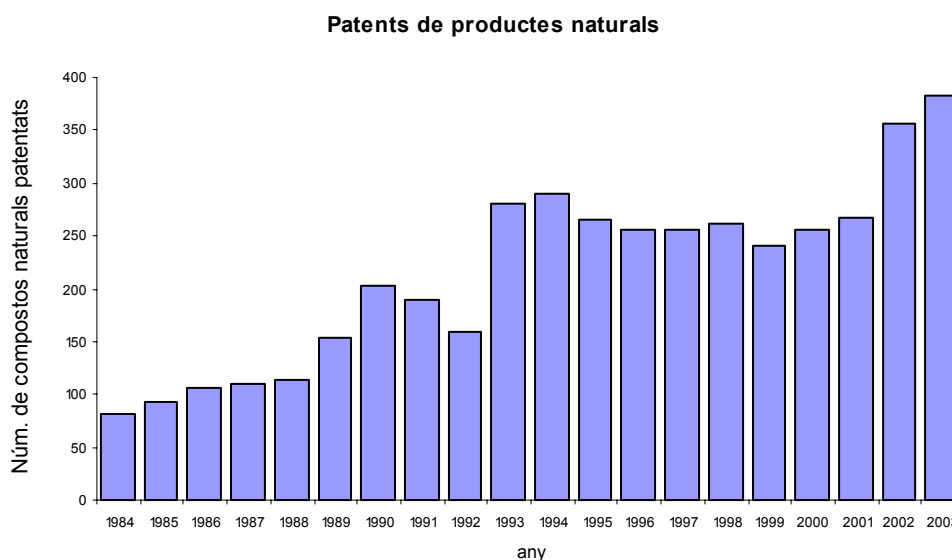


Figura 1.2 Compostos naturals patentats en els anys 1984-2003²

Les medicines tradicionals basades en les plantes i herbes medicinals tenen un paper rellevant encara avui en la salut. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) estima que avui dia, un 80 % de la població mundial depenen de la medicina tradicional per a l'atenció primària de les malalties. El 20 % restant de la població, que resideix principalment en països anomenats desenvolupats, disposen d'una medicina basada en gran mesura en el coneixement i l'ús dels productes naturals.

¹ Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M., Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002, *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66, 1002-1037.

² Koehn, F. E.; Carter, G. T., The evolving role of natural products in drug discovery, *Science, Nature Drug Discov.*, **2005**, 4, 206-220.

1.1.1 PROPIETATS FARMACOLÒGIQUES DELS PRODUCTES NATURALS

Els productes naturals contenen diverses característiques que els converteixen en bons candidats com a fàrmacs: elevada diversitat, estructuració química i especificitat bioquímica. S'han realitzat varis estudis per determinar la idoniïtat dels productes naturals com a fàrmacs en comparació amb els compostos sintetitzats *de novo*. Els estudis han demostrat que els productes naturals tenen un major nombre de centres quirals, i tenen estructures espacials més complexes. En quan a la composició, els compostos de síntesi contenen més àtoms de nitrogen, sofre i halògens, però els compostos naturals són més rics en àtoms d'oxigen.³

El disseny de nous fàrmacs es basa en les possibilitats dels compostos orgànics d'interaccionar amb sistemes biològics altament complexos. Les estructures que tenen la capacitat d'interaccionar amb diversos sistemes biològics s'anomenen *estructures privilegiades*. Virtualment existeix un nombre infinit de petites estructures químiques que poden interaccionar amb el sistema biològic d'interès. El desenvolupament de la *química combinatoria*, a inicis dels anys noranta, ha permès l'obtenció, de forma paral·lela i altament eficient, de grans quantitats de compostos definits i agrupats en les anomenades *lliberies de compostos*. El disseny de les lliberies es troba limitat per les possibilitats sintètiques i el conjunt de compostos queda reduït a una ínfima part de les possibilitats. Els productes naturals es poden considerar com una població d'estructures privilegiades que han estat seleccionades per la pressió evolutiva per interaccionar amb una àmplia varietat de proteïnes, enzims i altres dianes biològiques amb funcions específiques. Els productes naturals es converteixen en bons punts de partida per a la generació de lliberies de compostos més direccionades.

Una peculiaritat dels productes naturals és que sovint es troben formant famílies de compostos estructuralment molt relacionats. Encara es desconeixen els motius pels que un organisme destina tanta energia i recursos a la producció de compostos similars, dels quals, hi ha molts que els manca activitat i/o funció biològica. Una proposta és la "hipòtesis del cribatge" que es basa en el rastreig d'activitat natural i en la proposició que l'activitat biològica és una propietat peculiar per qualsevol molècula, i per un organisme és un avantatge si és capaç de generar una bateria de compostos similars a baix cost.⁴ D'aquesta manera l'organisme genera la pròpia diversitat química dels seus metabolits secundaris, optimitzant així el procés de millorar la relació estructura-activitat. L'estudi de la relació estructura-

³ Feher, M.; Schmidt, J. M., Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **2003**, 43, 218-227.

⁴ Finn, R. D.; Jones, C. D., Natural products- a simple model to explain chemical diversity, *Nat. Prod. Rep.*, **2003**, 20, 382-391.

activitat dels compostos produïts per un mateix organisme ofereix una valuosa informació per al disseny de llibreries de compostos basats en el compost natural bioactiu.

En les darreres dues dècades, l'interès de les companyies farmacèutiques per al desenvolupament de nous fàrmacs a partir de productes naturals ha disminuït dràsticament. Varis factors lligats a la complexitat del procés de desenvolupament en combinació a les millores en altres camps de la química mèdica poden explicar aquesta tendència:

- *La introducció del cribatge massiu contra dianes terapèutiques definides (HTS) i el desenvolupament de la química combinatòria.* La possibilitat d'obtenir sintèticament grans llibreries de compostos químics i ser avaluades biològicament en dies, ha atret l'atenció de les companyies farmacèutiques. Els productes naturals nous apareixen en compta gotes i la seva obtenció a gran escala no és trivial.
- *Un menor interès de les companyies farmacèutiques per les malalties infeccioses.* Les malalties causades per microorganismes ha estat una diana terapèutica clàssica dels productes naturals.
- *La Convenció de Rio de Diversitat Biològica.*⁵ Les restriccions indicades a l'explotació dels ecosistemes ha dificultat la col·lecció de nous materials.

L'incompliment de les expectatives de la química combinatòria que ha desenvolupat un elevat nombre de molècules poc complexes, juntament amb el desenvolupament d'un ampli nombre de tècniques que han optimitzat el procés d'aïllament, l'eficàcia que han mostrat els productes naturals com a agents antitumorals i el sorgiment del mar com a nova font de productes han marcat un canvi de tendència cap a una renovació de l'interès de les companyies farmacèutiques per a la cerca de nous productes naturals. Al mateix temps s'han iniciat línies de recerca per l'ús de la química combinatòria per a l'obtenció de llibreries de compostos químics basades en estructures presents als productes naturals bioactius.⁶

⁵ Kirsop, B. E., The convention on biological diversity: some implications for microbiology and microbial collections, *J. Indust. Microbiol. Biotech.*, **1996**, *17*, 505-511.

⁶ Breinbauer, R.; Vetter, I. R.; Waldmann, H., From protein domains to drug candidates - Natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2878-2890.

1.1.1.1 Aplicacions terapèutiques

Possiblement l'aplicació terapèutica dels productes naturals més antiga i extensa és el tractament del dolor. L'ús dels extractes de les groselles que contenen compostos opiacis contra el dolor es daten del 4000 a.C a l'antiga Mesopotàmia. Els primers compostos aïllats van ser la morfina i la codeïna. Tot i el seu potencial analgèsic, la morfina està associada a importants efectes secundaris que en limita l'ús terapèutic, com són l'addicció, la tolerància i les depressions respiratòries. A partir del descobriment dels receptors opiacis i de pèptids endògens, s'ha realitzat un gran esforç per a l'estudi i desenvolupament de nous compostos derivats que disminueixin els efectes adversos.⁷ Una altra font de compostos naturals amb propietats analgèsiques ha estat el verí de determinats vertebrats. Existeixen més de 500 espècies de cargolines de mar (classe *molusc* i gen *Conus*) que produeixen una bateria de pèptids rics en ponts disulfurs, les conotoxines, que són llençats a l'aigua per immobilitzar la presa abans de ser devorada. La conotoxina SNX-111 (Figura 1.3) és comercialitzada amb el nom de ziconotide per l'empresa Elan. Al 1974 es va aïllar un nou alcaloide de la pell d'una granota equatoriana (*Epipedobates tricolor*), l'epibatidina (Figura 1.3) que presenta activitat en el receptor nicotínic.⁸ El camp dels fàrmacs analgèsics és un dels actuals motors de la indústria farmacèutica.

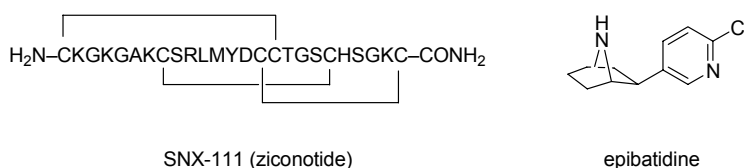


Figura 1.3 Compostos naturals aïllats del verí d'animals vertebrats i amb importants activitats analgèsiques

El descobriment de la penicil·lina va obrir la porta a l'estudi de nous compostos naturals de *microorganismes* per al tractament de malalties ocasionades per altres microorganismes, com són els antibactericides, els antivirals, els antifúngics, i els antimalarials. En els trenta anys posteriors al descobriment de la penicil·lina es va intensificar la cerca de nous compostos i es va obtenir la majoria de compostos antibactericides coneguts actualment, alhora que es va reduir la mortalitat relacionada amb

⁷ Dooley, C. T.; Houghten, R. A., New opioid peptides, peptidomimetics, and heterocyclic compounds from combinatorial libraries, *Biopolymers*, **2000**, *51*, 379-390.

⁸ Spande, T. P.; Garrafo, H. M.; Edwards, M. W.; Yeh, H. J. C.; Pannel, L.; Daly, J. W., Epibatidine: a novel (Chloropyridyl)azabicycloheptane with potent analgesic activity from an Ecuadorian poison frog, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 3475-3478.

les malalties infeccioses causades per microorganismes. En els darrers deu anys, però, només s'han introduït tres nous fàrmacs a la indústria farmacèutica: mupirocin (al 1985), linezolid (al 2000) i el lipopèptid datomycin (al 2003). Les indústries farmacèutiques han reduït dràsticament la investigació en la cerca de nous productes bactericides. La resistència desenvolupada per molts microorganismes i els fluxos de població a nivell mundial demanen de la cerca de nous compostos amb nous mecanismes d'acció. La Leishmania és un exemple de malaltia de gran mortalitat i orfe de tractament efectiu i les infeccions causades per aquest protozou són un dels majors problemes de salut a nivell mundial segons la OMS (2002).⁹

El descobriment del taxol com a nou agent antitumoral, aïllat de l'arbre *taxus brevifolia*, va centrar bona part de la cerca de productes naturals en la búsqueda de nous agents antitumorals.

El càncer s'ha definit com un conjunt de malalties que es caracteritzen per un creixement excessiu i descontrolat de cèl·lules que envaeixen i danyen teixits i òrgans, provocant finalment la mort de l'individu.¹⁰ El càncer es desenvolupa a partir d'una sola cèl·lula que ha experimentat una mutació en el seu DNA. Aquesta cèl·lula, en comptes de créixer i diferenciar-se normalment, no deixa de dividir-se sense madurar. Actualment el càncer és una de les malalties amb major incidència en la població dels països desenvolupats, constituint la segona causa de mort, després de les malalties cardiovasculars. L'Organització Mundial de la Salut estima que en vint anys, el càncer podria augmentar fins a un 50 % degut, principalment, a l'envelliment de la població, estils de vida poc saludables i altres factors mediambientals. Existeixen molt tipus diferents de càncer i cada un té comportaments diferents de creixement, resposta a tractament i supervivència de l'individu. Actualment existeixen diferents tipus de tractament: l'extirpació quirúrgica, la radioteràpia i la quimioteràpia.

La quimioteràpia consisteix en l'administració de fàrmacs o hormones. Molts dels fàrmacs quimioterapèutics actuen induint, en última instància, la mort cel·lular per apoptosi. Actualment existeix una gran quantitat de fàrmacs estructuralment molt diversos que s'empren per combatre el càncer. Els productes naturals han ofert una font de potents agents terapèutics. Actualment un 60 % dels fàrmacs antitumorals estan basats en compostos naturals. Sovint aquest agents terapèutics actuen mitjançant mecanismes d'acció novedosos que han permès ampliar l'estudi de la malaltia (Figura 1.4).

⁹ Organització Mundial de la Salut (OMS), 2002, Programa per la supervivència i el control de la leishmaniasis

¹⁰ Muñoz, A., Càncer y nuevas terapias, Ed. Hélice, Madrid, 1997.

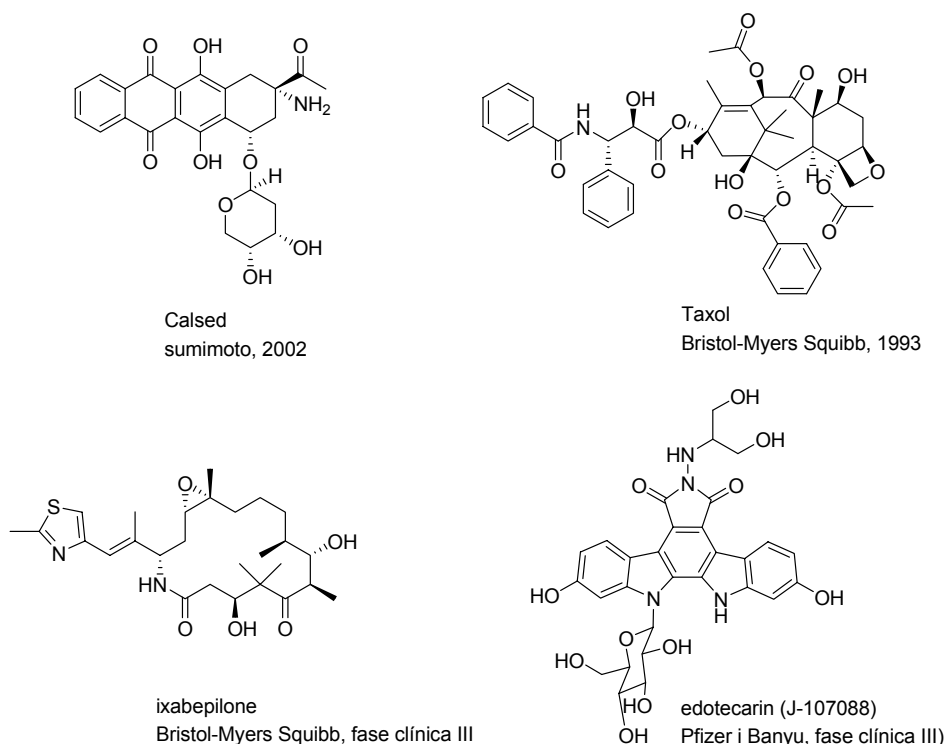


Figura 1.4 Productes naturals o derivats que estan en el mercat farmacèutic o en fase clínica III

El desenvolupament dels assaigs biològics *in vitro* a partir de l'estudi de línies cel·lulars tumorals ha permès un cribatge massiu de nous agents terapèutics perquè recull un ampli rang de dianes terapèutiques i ofereix un sistema molt reproducible de l'activitat *in vivo*. A partir d'aquest descobriment es va intensificar la búsqueda de productes naturals i es va centrar en l'activitat antitumoral com a diana terapèutica. El desenvolupament del Ara-C a partir d'un producte marí va girar les mirades cap a la immensitat de l'ecosistema marí com a font de nous fàrmacs antitumorals.

L'activitat biològica dels compostos naturals depèn, principalment, del sistema d'assaig biològic emprat per a la cerca de compostos naturals actius. Hi ha casos de compostos classificats amb una determinada activitat biològica que després s'ha revisat en un nou assaig biològic.

1.1.2 DIVERSITAT DELS PRODUCTES NATURALS: RIQUESA I COMPLEXITAT

Si hi ha una paraula que acompanya l'estudi dels productes naturals, aquesta és: diversitat. Diversitat d'entitats químiques, d'origen, de dianes terapèutiques, de mecanisme d'acció i d'aplicacions. L'elevada diversitat ofereix un ampli ventall de possibilitats per afrontar el desenvolupament de nous fàrmacs. Aquesta diversitat també condueix a una elevada complexitat en el treball de camp.

Els productes naturals es caracteritzen per una important diversitat estructural. S'han descrit compostos basats en estructures d'alcaloides, d'oligonacàrids, nucleobases, pèptids, policetones, i combinació de les diferents estructures (Figura 1.5). I cal notar que les estructures no estan directament relacionades amb una determinada diana terapèutica.

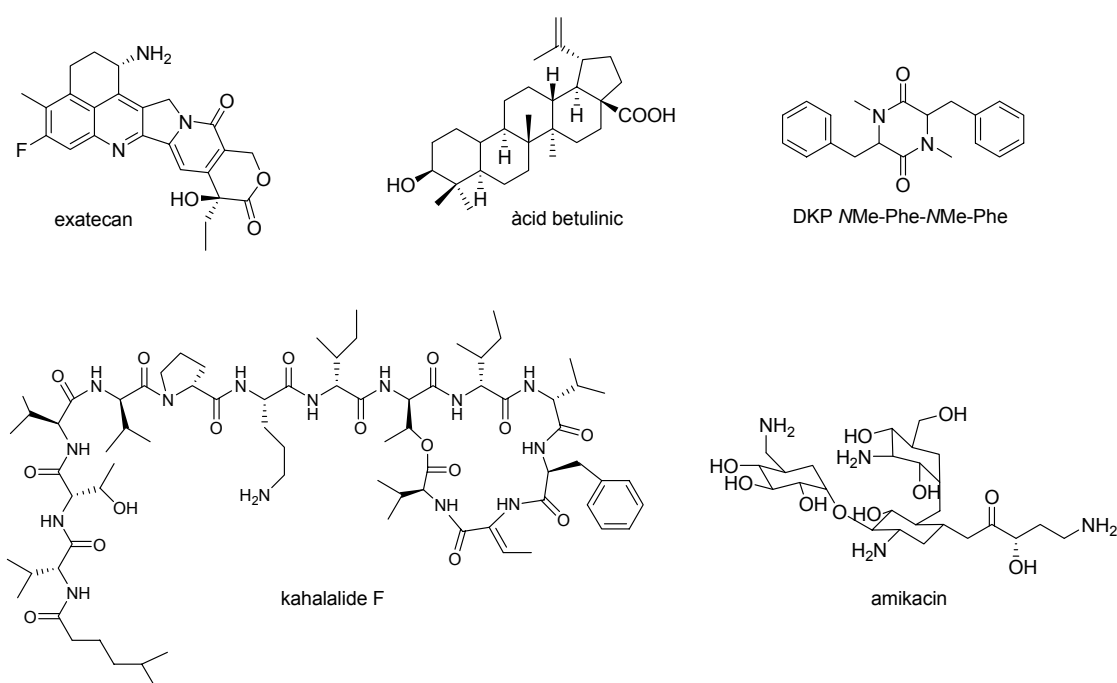


Figura 1.5 Productes naturals i fàrmacs basats en productes naturals amb una elevada diversitat estructural

S'han aïllat i caracteritzat productes naturals bioactius d'un ampli rang d'organismes vius:

- *Plantes terrestres*. És potser la font de productes naturals més antiga i que ha generat més quantitat de compostos biològicament actius.
- *Microorganismes terrestres*. Els microorganismes és una potent font de substàncies bioactives i estructuralment diverses. Han tingut un paper rellevant en el descobriment de compostos bactericides. Actualment s'ha ampliat el seu rang d'acció a agents immunodepressors, agents disminuïdors dels colesterol, agents antihelmíntic, i agents antitumorals.

- *Vertebrats i invertebrats terrestres.* Al llarg de la història de la medicina i l'estudi de la fisiologia humana i les seves patologies, s'han descobert un gran nombre de molècules bioactives amb funcions conegudes. L'excés o el defectes d'algunes d'elles provoquen patologies. És el cas de les hormones neuronals, hormones peptídiques, hormones sexuals, altres hormones i les prostaglandines. S'ha descobert altres compostos a partir de l'estudi d'altres animals vertebrats o invertebrats, és el cas de les substàncies presents en determinats verins que han demostrat importants efectes terapèutics.
- *Organismes marins.* La història dels productes marins naturals és molt curta. El primer compost bioactiu es descobreix al 1950. Els metabolits secundaris d'organismes marins s'han estudiat intensament en els darrers trenta anys. El desenvolupament de nous fàrmacs d'origen marí és un camp d'investigació jove i que ha experimentat una acceleració important degut a la implicació de molts grups interdisciplinaris: bioquímics, biològics, ecològics, químics orgànics i farmacològics. El conjunt de nous compostos aïllats del mar ha mostrat una major diversitat estructural i major eficàcia terapèutica. El resultat s'ha justificat per les particularitats de l'ecosistema marí: vasta extensió a l'ocupar el 70 % de la superfície terrestre, major pressió evolutiva i menor impacte de l'home. Una altra particularitat dels compostos bioactius marins és que procedeixen en major mesura d'organismes relacionats amb el món animal, en comparació amb els compostos actius terrestres que provenen majoritàriament de les plantes. Molts dels organismes marins no disposen d'eines físiques per a la captura de preses i defensa de l'espai i han desenvolupat sofisticades eines químiques a fi de preservar-se dels enemics. Des del punt de vista d'evolució i de biodiversitat, l'ecosistema marí és superior al terrestre. L'ecosistema marí, però, és més inaccessible que el terrestre i per això l'ús del mar ha estat històricament com a via de transport i de col·lecció d'aliment. La medicina china és la primera en recollir compostos dels aiguamolls en la seva farmacopeia. Les innovacions en les tècniques de immersió i de submarinisme han permès l'exploració de les profunditats del mar i la descoberta d'un gran nombre de noves entitats químiques amb activitat biològica en els darrers 25 anys. S'ha determinat una major diversitat estructural que els corresponents terrestres. En quan a propietats antitumorals, segons estudis preclínics realitzats per l'Institut Nacional del Càncer dels EEUU (NCI), prop del 1.8 % dels extractes d'origen marí ha mostrat activitat antitumoral front un 0.4 % dels extractes d'origen terrestre. Les esponges marines són una poderosa font de compostos amb potencial activitat antitumoral. La seva incapacitat de mobilitat li ha portat a desenvolupar defenses químiques antiproliferatives per a evitar el creixement massiu de microorganismes sobre les seves estructures. Els descobriment de la presència de microorganismes en simbiosi amb les esponges com a autèntics productors dels compostos actius ha augmentat l'interès per a la col·lecció i estudi d'aquests organismes.

1.1.3 DE PRODUCTE NATURAL A FÀRMAC

El procés de desenvolupament d'un nou fàrmac a partir d'un producte natural és un procés llarg, complex i que implica la participació d'un gran equip interdisciplinari de professionals. S'estima que els temps transcorregut des de la caracterització d'un nou compost bioactiu fins a la seva entrada en el mercat farmacèutic és d'aproximadament 12-15 anys. La següent figura mostra les etapes i les àrees de coneixement implicades en el procés:

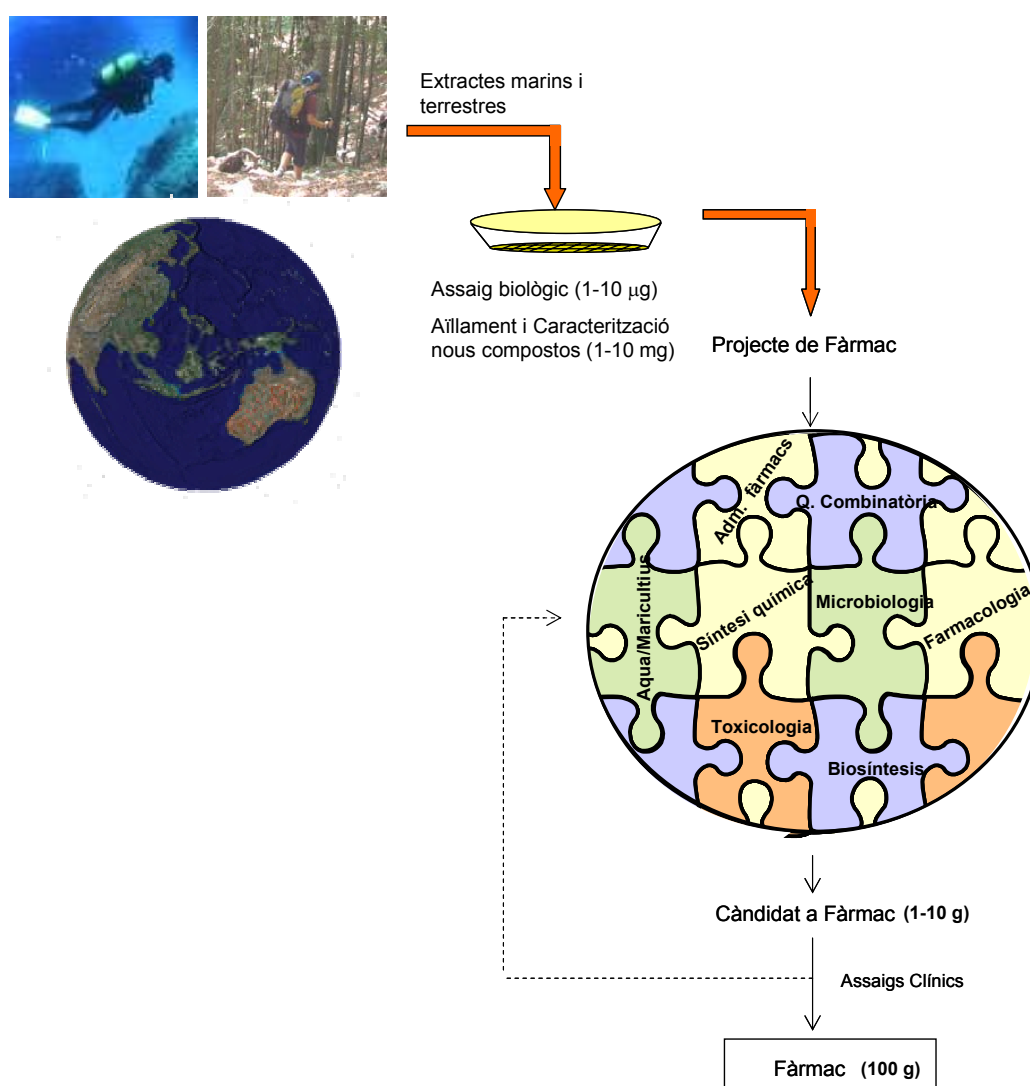


Figura 1.6 Procés de desenvolupament d'un nou fàrmac

L'esquema general de descoberta d'un producte natural bioactiu i desenvolupament cap a nou fàrmac consta de les següents etapes:

- *Obtenció d'un nou candidat:* extracció de la font natural, aïllament, caracterització i determinació de l'activitat biològica (1-10 mg). Síntesi química del compost per a verificar l'estructura
- *Obtenció del compost a gran escala (1-10 g) per realitzar estudis de validació del compost com a candidat a nou fàrmac:* toxicologia, biodisponibilitat, relació activitat-estructura,... mitjançant mètodes de fermentació de microorganismes i, preferentment, per síntesi química.
- *Estudis clínics i obtenció del compost a escala de producció per a poder ser comercialitzat* (100 g).

El coll d'ampolla del procés de desenvolupament d'un nou fàrmac a partir de productes naturals és la seva baixa disponibilitat, problema que s'accentua en la cerca de productes d'invertebrats marins. Les petites quantitats que s'obtenen dificulten la purificació, la caracterització i la determinació de l'activitat biològica. L'existència de famílies de compostos altament relacionats afegeix dificultat al procés. Els productes naturals bioactius caracteritzats contenen, sovint, estructures sofisticades i novedoses. La seva obtenció en quantitats suficients per a confirmar l'estructura i realitzar estudis biològics avançats no és una tasca senzilla. Els mètodes de producció a gran escala han de ser poc costosos per fer viable la seva comercialització. En els darrers anys s'han desenvolupat importants millores en cada una de les etapes de desenvolupament que han permès, conjuntament, agilitzar l'entrada al mercat de nous fàrmacs basats en els productes naturals. A continuació es detallen les millores del procés més rellevants:

1.1.3.1 Innovacions en l'obtenció de nous productes naturals bioactius

Les millores en les tècniques d'immersió i de recollida han ajudat a augmentar el nombre, la diversitat i la quantitat de mostres per analitzar. Paral·lelament, s'han desenvolupat un gran nombre de tècniques cromatogràfiques i analítiques orientades a disminuir la quantitat de producte necessari per a la determinació de l'activitat biològica i la caracterització del nou compost. També s'han optimitzat els processos de purificació per extreure la màxima informació sobre la seva viabilitat com a fàrmac. A continuació s'enumeren algunes d'aquestes millores:

- La identificació ràpida dels compostos coneguts a fi de no repetir esforços. Es consegueix per l'ús de sistemes analítics HPLC acoblats a detectors de UV i de masses en combinació amb bases de dades dels productes naturals coneguts. Una de les darreres innovacions tècniques és l'acoblament d'un aparell de RMN a un sistema analític de HPLC.
- La determinació de l'estructura de nous compostos naturals aïllats mitjançant tècniques d'alta resolució de RMN, tant en el camp dels espectres bidimensionals com en la resolució dels monodimensionals. Actualment, és possible l'anàlisi estructural de compostos amb menys d'un mil·ligram. La determinació de la fórmula molecular s'obté amb espectrometria de masses d'alta resolució. La combinació de les dues tècniques permet la caracterització dels compostos en hores o dies en comptes de les setmanes o mesos necessaris anteriorment.
- La millora en les tècniques cromatogràfiques ha permès, per una banda, l'aïllament dels productes constituents d'un mateix extracte i poder correlacionar-los amb l'activitat biològica i, per l'altra, fer eficient les purificacions a major escala i poder obtenir suficient material per realitzar estudis d'activitat més complets.
- El desenvolupament del mètode de cribatge massiu en la determinació de l'activitat biològica també ha ajudat a analitzar les mescles de compostos obtingudes dels extractes de productes naturals.

1.1.3.2 Innovacions en el procés de producció

Una vegada es disposa d'un nou candidat de fàrmac cal superar altre cop la baixa disponibilitat del producte natural i obtenir el compost en quantitats suficients per poder realitzar estudis de toxicologia, biodisponibilitat i poder-lo comercialitzar mitjançant un mètode rentable. En aquesta etapa s'han produït els avenços científics més importants. Així, s'han obtingut grans resultats en el camp del maricultiu i l'aquacultiu, la fermentació de microorganismes, la biosíntesi combinatòria i la síntesi química.

1.1.3.2.1 El maricultiu i aquacultiu

Tal i com s'ha comentat anteriorment, els productes marins són els que es troben en menor quantitat. Els rendiments d'aïllament dels compostos d'interès terapèutic respecte la biomassa és molt baix, 10^{-4} - 10^{-6} % i fa necessari el cultiu dels organismes per assegurar-ne la disponibilitat i reduir els costos d'obtenció. El cultiu d'invertebrats marins és una tècnica nova i actualment té un cost de producció molt elevat i necessita d'una inversió important de temps i personal. El maricultiu fa referència

al creixement controlat en el medi natural dels organismes i l'aquacultiu fa referència quan el cultiu es dona en instal·lacions artificials. De moment, es reserven aquestes tècniques per aquells casos en els que ni la síntesi química ni el treball amb microorganismes poden produir el compost d'interès. Tot i així, els treballs realitzats fins el moment per a la producció de tres compostos (bryostatin d'una bryozoa, ET-743 d'un tunicat i kalihinane d'una esponja) són molt prometedors i suposen una disminució de temps i de costos per a següents aquacultius.¹¹

1.1.3.2.2 Fermentació de microorganismes

La fermentació de microorganismes ha experimentat avenços importants, especialment a partir de la descoberta de microorganismes en simbiosi amb invertebrats marins com a autèntics productors de productes naturals bioactius.¹² En aquesta direcció, s'han optimitzat processos de fermentació per obtenir millors rendiments, major selectivitat del producte, major diversitat de compostos relacionats i la possibilitat de produir compostos naturals en altres microorganismes hostes.¹³ S'està estudiant la possibilitat d'emprar els microorganismes com a productors de productes naturals d'invertebrats.

En els darrers anys s'ha realitzat un interessant treball en l'estudi de les rutes biosintètiques dels productes naturals bioactius. La identificació i localització del grup de gens responsables de la síntesi d'un determinat producte ha permès la producció del compost en un microorganisme hoste més efectiu i, recentment, s'han obtingut nous productes per combinació de fragments de gens i inserció en un microorganisme hoste.¹⁴

¹¹ Mendola, D., Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: process developments and economics, *Biomolecular Engineering*, **2003**, 20, 441-458.

¹² König, G. M.; Kehraus, S.; Seibert, S. F.; Abdel-Lateff, A.; Müller, D., Natural products from marine organisms and their associated microbes, *ChemBioChem*, **2006**, 7, 229-238.

¹³ a) Proksch, P.; Edrada, R. A.; Ebel, R., Drugs from the sea – current status and microbiological implications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, 59, 125-134. b) Kaeberlein, T.; Lewis, K.; Epstein, S. S., Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment, *Science*, **2002**, 296, 1127-1129. c) Knight, V.; Sanglier, J. J.; Ditullio, D.; Braccili, S.; Bonner, P.; Waters, J.; Hughes, D.; Zhang, L., Diversifying microbial natural products for drug discovery, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, 62, 446-458. d) Sobolevskaya, M. P.; Smetanina, O.F.; Speitling, M.; Shevchenko, L.S.; Dmitrenok, P.S., Controlling production of brominated cyclic depsipeptides by *Pseudoalteromonas maricaloris* KMM 636T, *Let. Appl. Microbiol.*, **2005**, 40, 243-248.

¹⁴ a) Fortman, J. L.; Sherman, D. H., Utilizing the power of microbial genetics to bridge the gap between the promise and the application of marine products, *ChemBioChem*, **2005**, 6, 960-978. b) Handelsman, J.; Rondon, M. R.; Brady, S. F.; Clardy, J.; Goodman, R. M., Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products, *Chem. Biol.*, **1998**, 5, R245-259. c) Wenzel, S. C.; Müller, R., Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathway, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2005**, 16, 594-606.

La *biosíntesis combinatòria* és una nova àrea de recerca que té per objectiu l'obtenció de llibreries de compostos a partir de la manipulació dels gens i dels paràmetres de cultiu de determinats microorganismes.¹⁵

La fermentació de microorganismes suposa una garantia de poder superar la baixa biodisponibilitat dels productes naturals, especialment dels obtinguts a partir de fonts marines.

1.1.3.2.3 Síntesi química de productes naturals

La síntesi de l'aspirina, al 1899, va suposar l'inici de la química mèdica. Un esdeveniment sense volta enrera. Des de llavors, s'ha descrit un gran nombre de síntesis de compostos naturals a mida que aquests anaven essent aïllats. La descoberta d'una nova entitat química és un nou repte per al químic. La síntesi química dels productes naturals ha esdevingut el mètode per a validar-ne l'estructura i, és especialment important, a mida que va augmentant la complexitat estructural dels compostos. En alguns casos, la síntesi química ha permès discriminar entre dues estructures plantejades, com és el cas del depsipèptid cíclic kahalalide F. El treball independent dels grups d'investigació de Rinehart i col.¹⁶ i Scheuer i col.¹⁷ va concloure amb la proposta de dues estructures diferents en el centre quiral d'un aminoàcid. La síntesi química posterior de tots dos anàlegs i comparació amb el producte natural va poder resoldre l'estereoquímica del producte.¹⁸ A més, la síntesi química ofereix altres funcions que la fan rellevant:

- És la via més important d'obtenció a gran escala del compost natural i acostuma a ser a un cost assequible.
- Permet l'obtenció de llibreries de compostos relacionats amb un compost natural, bé a partir de síntesi *de novo*, semi-síntesis o a partir del compost natural d'interès. La finalitat d'aquestes llibreries és la cerca d'un millor candidat a fàrmac.
- La síntesi de compostos relacionats perfectament dissenyats permet estudiar el mecanisme d'interacció i determinar les parts rellevants de la molècula per a la seva activitat.

¹⁵ a) Hopwood, D.A.; Malpartida, F.; Kieser, H.M.; Ikeda, H.; Duncan, J.; Fujii, I.; Rudd, B.A.M.; Floss, H.G.; Omura, S., Production of "hybrid" antibiotics by genetic engineering, *Nature*, **1985**, *314*, 642-644. b) Floss, H. G., Combinatorial biosynthesis—Potential and problems, *J. Biotech.*, **2006**, *124*, 242-257. c) Bode, H. B.; Bethe, B.; Höfs, R.; Zeeck, A., Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity, *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 619-627.

¹⁶ Bonnard, I.; Manzanares, I.; Rinehart, K.L., Stereochemistry of kahalalide F, *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 1466-1470.

¹⁷ Goetz, G.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J., The absolute stereochemistry of kahalalide F, *Tetrahedron*, **1999**, *55* 7739-7746.

¹⁸ López-Macià, A.; Jiménez, J. C.; Royo, M.; Giralt, E.; Albericio, F., Synthesis and structure determination of kahalalide F, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 11398-11401.

En l'evolució de la química hi ha dos esdeveniments que han permès un avenç important en la síntesi química de productes naturals: la química combinatòria i la síntesi en fase sòlida. La química combinatòria ha permès el desenvolupament d'instrumental i un canvi de mentalitat que han propiciat el treball en paral·lel i l'obtenció de llibreries de compostos d'una forma més ràpida i eficient. La química combinatòria també permet el treball a petita escala, ideal per a optimitzar els primers estadis de desenvolupament d'un nou fàrmac i anàlegs. Tot i així, en la síntesi de productes naturals, la química combinatòria té un desenvolupament diferent perquè les rutes sintètiques són més llargues i elaborades que les emprades normalment en l'obtenció de llibreries de productes químics. I, per tant, es realitzen síntesis de llibreries petites d'anàlegs i en lots reduïts.¹⁹ El desenvolupament per Merrifield al 1963, de la fase sòlida en la síntesi de pèptids ha suposat una revolució en la química orgànica. L'ancorament dels productes en un suport polimèric insoluble ha facilitat enormement les síntesis i ha possibilitat l'obtenció de molts productes naturals i llibreries de compostos, reduint els temps de les síntesis respecte de la química en solució.

Cuevas i col. van obtenir el producte natural Ecteinascidin (ET-743) mitjançant una semi-biosíntesis (Figura 1.7). La fermentació del bacteri *Pseudomonas fluorescens* proporciona l'intermedi cyanosafracin B i aquest és el punt de partida per a una ruta sintètica de 20 etapes que condueix fins al producte natural.²⁰ El compost ET-743 és un potent agent antitumoral que es troba actualment en fase clínica III pel tractament de sarcoma en teixits tous i pel càncer d'ovari.²¹

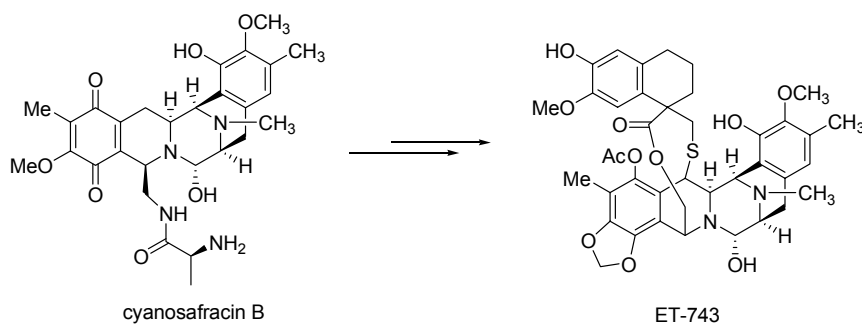


Figura 1.7 cyanosafracin B obtingut del bacteri *pseudomonas fluorescens* i el compost ET-743

¹⁹ Albericio, F.; Fernández, A.; Giralt, E.; Gracia, C.; López, P.; Varón, S.; Cuevas, C.; López-Macià, A.; Francesch, A.; Jiménez, J. C.; Royo, M., Preparation of kahalalide F analogs as antitumor agents, PCT Int. Appl., 2005, WO 2005103072. b) Pla, D.; Marchal, A.; Olsen, C. A.; Francesch, A.; Cuevas, C.; Albericio, F.; Alvarez, M., Synthesis and structure-activity relationship study of potent cytotoxic analogues of the marine alkaloid lamellarin D, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 3257-3268.

²⁰ a) Cuevas, C.; Perez, M.; Martin, M. J.; Chicharro, J. L.; Fernandez-Rivas, C.; Flores, M.; Francesch, A.; Gallego, P.; Zarzuelo, M.; de la Calle, F.; Garcia, J.; Polanco, C.; Rodriguez, I.; Manzanares, I., Synthesis of ecteinascidin ET - 743 and phthalascidin Pt-650 from cyanosafracin B, *Org. Lett.*, **2000**, 2, 2545-2548.

²¹ <http://www.pharmamar.com/es/pipeline/yondelis.cfm> (25 Agost 2006)

La síntesi química ha possibilitat l'obtenció de derivats de productes naturals, els quals mantenen l'activitat biològica alhora que tenen una estructura més senzilla que permet la seva obtenció a escala industrial i possibilita el seu ús com a fàrmac. Aquest és el cas dels compostos E7389 i l'anàleg A de briostatin que deriven dels corresponents productes naturals halicondrin B i briostatin (Figura 1.8). Tots dos derivats es troben en fases clíniques com a agents antitumorals.

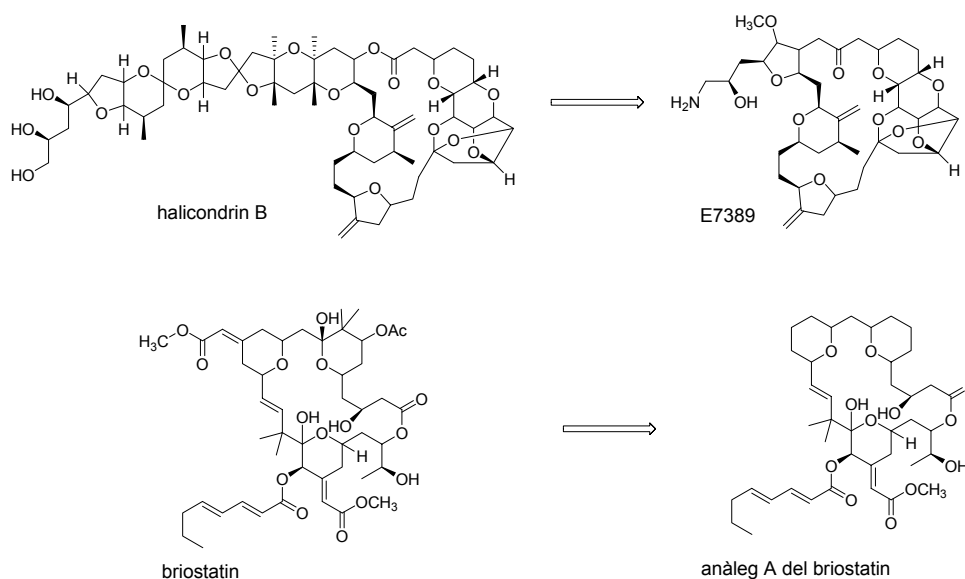


Figura 1.8 Obtenció dels anàlegs E7389 i anàleg de briostatin A a partir dels corresponents productes naturals halichondrin B i bryostatin 1

1.2 DEPSIPÈPTIDS CÍCLICS AÏLLATS DE MICROORGANISMES

Un pèptid es defineix com una cadena curta d'aminoàcids, de tamany inferior a 100 aminoàcids, essent aquest un valor orientatiu.

Els pèptids tenen una funció important en la regulació dels organismes vius; hormonal, controladors de l'activitat enzimàtica, comunicació inter-cel·lular i participació en la defensa de microorganismes invasors. S'han aïllat i caracteritzat d'un ampli espectre de fonts naturals (regne animal i vegetal, vertebrats i microorganismes) un gran nombre de pèptids de diferents estructures i amb activitats biològiques diverses: reguladors de canals iònics, inhibidors de proteases, hormones reguladores del metabolisme, citotòxics, antimicrobians. Molts d'ells han servit per al desenvolupament de nous fàrmacs peptídics o peptidomimètics.

Els punts forts com a agents terapèutics és la seva elevada especificitat i potent activitat, que generalment implica una baixa toxicitat, pocs efectes secundaris i redueix les dosis necessàries. Els pèptids tenen una vida relativament curta i no s'acumulen a l'organisme. Des del descobriment de l'ús dels pèptids com a agents terapèutics s'han aïllat, caracteritzat i sintetitzat un gran nombre de pèptids bioactius, i cada vegada són més els que estan arribant a la indústria farmacèutica. Els pèptids contenen diverses dificultats que ha calgut anar superant.

- *Baixa estabilitat metabòlica.* Els pèptids són degradats per les proteases de l'organisme. Hi ha factors com són l'estructura, el tamany i la composició que influeixen en la seva estabilitat.
- *Forma d'administració.* L'administració oral no és adient per a l'administració de pèptids perquè són degradats fàcilment per les proteases de l'estómac. S'estan desenvolupant tècniques de conjugació de pèptids amb sistemes que evitin la degradació de les proteases. L'administració via pulmonar necessita de dosis més elevades i està lligada a una reducció dels costos sintètics. Per això, l'ús terapèutic dels pèptids està restringit a aquelles indicacions en les que es tolera l'administració via intravenosa.
- *Elevat cost de producció.*

Tal i com s'ha comentat anteriorment, hi ha moltes espècies verinoses (cargolins de mar, aranyes, abelles, escorpins, etc.) contenen pèptids actius en la composició dels verins. Els pèptids aïllats de les plantes tenen activitat contra bacteris i s'han emprat com a insecticides en l'agricultura. Els microorganismes són la font més potent d'interessants pèptids bioactius perquè s'ha demostrat que molts d'ells tenen funcions biològiques de defensa i de preservar l'espai.

Els pèptids sintetitzats pels microorganismes disposen d'un alt contingut de residus no proteinogènics així com una elevada diversitat estructural. Sovint es troben estructures que combinen elements peptídics amb elements alifàtics o policetones que no fan sinó ampliar encara més la diversitat estructural. Els microorganismes disposen d'una maquinària enzimàtica especial que permet realitzar modificacions post-traduccionals a la cadena peptídica, com són la interconversió de centres quirals de L a D, *N*-metilació, deshidratació, introducció d'halògens i, especialment important, la ciclació de la cadena a través d'enllaços èster o tioèster. Aquestes característiques aporten al pèptid una major estabilitat com a fàrmacs, ja que no són reconeguts per les proteases humanes. La diversitat estructural també ofereix mecanismes d'acció novedosos i molt potents que ajuden a conèixer el mecanisme d'acció en determinades malalties.

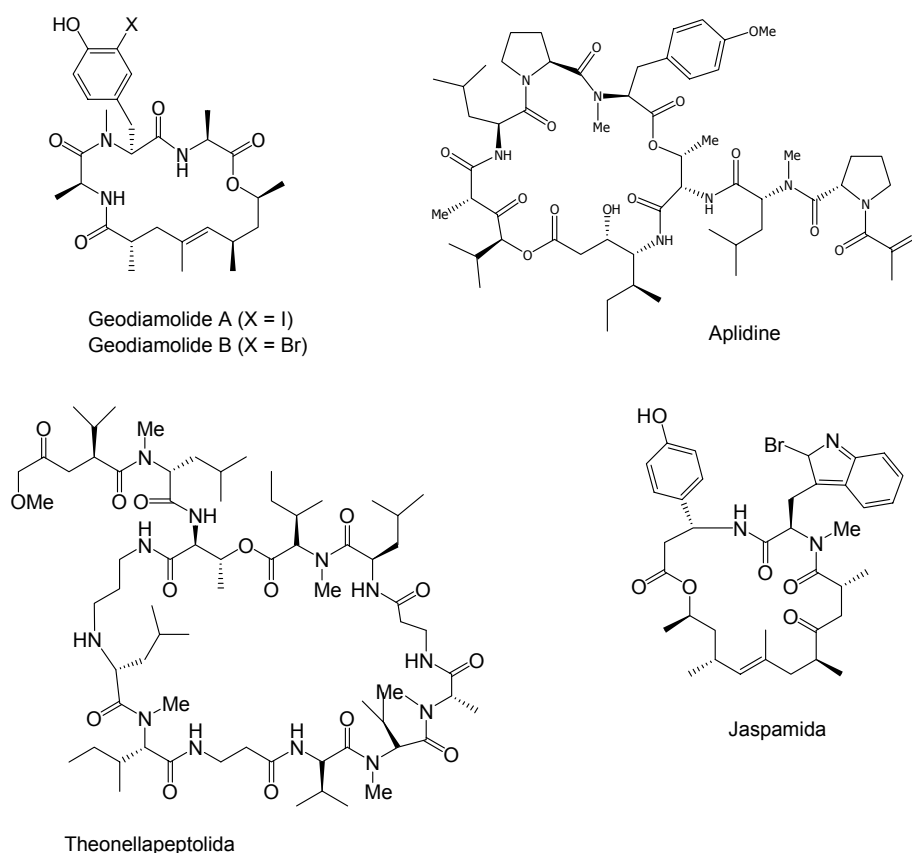


Figura 1.9 Depsipèptids cíclics produïts per microorganismes

Els depsipèptids cíclics produïts per microorganismes és un conjunt molt extens de pèptids (Figura 1.9) que han estat ciclats a través d'un residu de Ser o Thr per formar un enllaç èster. Només s'ha aïllat i caracteritzat un depsitopèptid cíclic que es cicla a través d'una Cys per formar un enllaç tioèster, i el pèptid s'anomena tiocoralina. Els depsi(tio)pèptids cíclics comparteixen els avantatges dels pèptids com a agents terapèutics, i les seves estructures complexes i composició amb elements no proteínogènics els ofereixen una major resistència metabòlica. Tot i que sovint tenen un cost de producció associat més elevat perquè requereixen d'estratègies sintètiques més llargues i de baix rendiment.

La síntesi química té un paper important en la validació dels pèptids com a agents terapèutics. L'optimització de les síntesis i l'obtenció d'anàlegs que potenciïn l'activitat, millorin l'estabilitat i la solubilitat han de permetre un fort impacte dels pèptids en el mercat farmacèutic. La constitució del pèptid en una unió successiva d'aminoàcids el fa ser un candidat idoni per a la generació de llibreries de compostos anàlegs a fi d'explorar-ne la diversitat estructural i estudiar-ne els mecanismes d'acció i determinar el corresponent farmacòfor. La determinació del farmacòfor pot permetre la simplificació del

sistema i amb ell la reducció dels costos sintètics. La resolució de la síntesi dels compostos peptídics que van essent aïllats i caracteritzats permet la consolidació de la tècnica i l'enforteix davant subseqüents nous reptes. Tradicionalment, les síntesis químiques dels depsipèptids cíclics s'han realitzat en solució, però el desenvolupament de la fase sòlida ha permès un mètode alternatiu de síntesi que ofereix temps de desenvolupament i de síntesis més curts i la possibilitat d'automatitzar la síntesi. L'optimització de la síntesi peptídica d'aquests compostos es basa en el desenvolupament dels diferents pilars: grups protectors i suports polimèrics, agents d'acoblament, síntesi de compostos no proteïnogènics i estratègies sintètiques robustes i versàtils

A finals dels anys noranta es va aïllar d'una bacteria patògena dels arbres cítrics, un liponadepsipèptid cíclic amb una potent activitat anti-Leishmania, la sirengotoxina (Figura 1.10). I al 1997 s'aïllà d'una actinomiceta marina de les costes de Moçambic un depsitiopeptid cíclic i simètric que es presentà com un important agent antitumoral, la tiocoralina. Tots dos compostos es caracteritzen per un contingut elevat de residus no proteïnogènics, una estructura complexa i tenir un alt interès farmacològic.

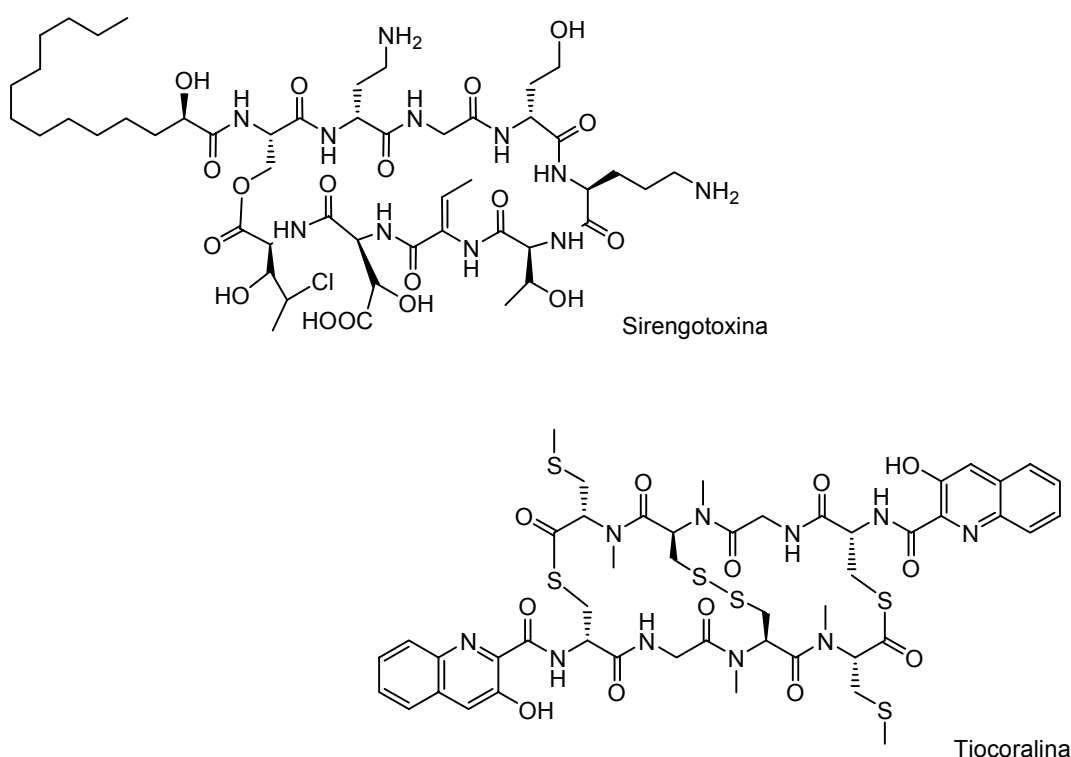


Figura 1.10 Depsipèptids cíclics produïts per microorganismes amb important activitat biològica; la sirengotoxina actua contra el paràsit de la Leishmania i la tiocoralina és un potent agent antitumoral

La sirengotoxina no disposa de cap síntesi descrita a la literatura. En la present Tesi es planteja el desenvolupament de la síntesi de la sirengotoxina en fase sòlida. L'alt contingut de residus no proteïnogènics fa necessari el disseny d'un anàleg que permeti el desenvolupament de l'estratègia de síntesi previ a l'obtenció del producte natural (Capítol 1).

La tiocoralina, en canvi, s'ha descrit una síntesi en solució, però s'ha determinat una vida mitjana en plasma curta i una baixa solubilitat en aigua. En aquest cas, es planteja el desenvolupament de la síntesi en fase sòlida d'un anàleg de la tiocoralina que pugui ser més resistent en plasma i augmenti la seva solubilitat (Capítol 2). També es planteja l'aproximació sintètica del pèptid natural sobre el suport polimèric per reduir el temps de síntesi i possibilitar l'obtenció de llibreries de compostos relacionats amb el producte natural que ajudin a l'estudi de relació estructura-activitat (Capítol 3).

En tots dos casos, és important el desenvolupament d'eines sintètiques que permetin la seva obtenció mitjançant una síntesi eficient, robusta i versàtil perquè pugui respondre als requeriments de producció i d'estudi de les activitats biològiques i d'exploració de nous anàlegs.

En el darrer capítol del treball es descriu l'aïllament de compostos antitumorals extrets d'esponges marines col·lectades a les costes australianes (Capítol 4). El treball forma part del projecte: Cerca de nous fàrmacs antitumorals de la biodiversitat marina australiana, i és un projecte de col·laboració entre l'empresa Pharma Mar, S.A. i el Centre de Biodiversitat Marina de la Universitat de Queensland (Austràlia).

2. OBJECTIUS

L'interès de la sirengotoxina i la tiocoralina com a nous fàrmacs i el desenvolupament de noves síntesis de depsipèptids cíclics en fase sòlida són els punts de partida del treball de la present Tesi. Donades les característiques de cada un dels productes naturals es plantegen els següents objectius:

- *Desenvolupament de la síntesi en fase sòlida d'un anàleg de la sirengotoxina*
 - Disseny d'un anàleg de la sirengotoxina que permeti el desenvolupament de la síntesi en fase sòlida del producte natural. El nou compost ha de mantenir tots els elements estructurals, la configuració de la cadena peptídica i el màxim nombre de residus respecte el pèptid natural. I el disseny d'una estratègia de síntesi que permeti l'obtenció de l'anàleg de sirengotoxina plantejat i sigui coherent amb la possible síntesi del pèptid natural.
 - Preparació de l'aminoàcid no proteïnogènic (Z)-Dhb per a la seva inserció en la cadena peptídica i preparació dels aminoàcids ramificadors d'acord amb les estratègies de síntesi plantejades.
 - Obtenció de l'anàleg de la sirengotoxina i avaluació de la seva activitat biològica front el paràsit de la Leishmania en comparació amb el pèptid natural.

- *Obtenció d'un anàleg de la tiocoralina que sigui més resistent en plasma, més soluble en medi aquós i no disminueixi la seva activitat com a agent antitumoral.*
 - Disseny d'una estratègia de síntesi que permeti la preparació de forma eficient i ràpida de l'anàleg de la tiocoralina, així com de possibles derivats per a poder realitzar estudis de relació estructura-activitat
 - Síntesi dels aminoàcids no proteïnogènics NMe-Cys, aminoàcids rellevants en l'estructura del pèptid natural.
 - Obtenció de l'anàleg de la tiocoralina i avaluació de la seva activitat antitumoral en comparació al pèptid natural i les seves propietats farmacocinètiques.

- *Desenvolupament de la síntesi en fase sòlida de la tiocoralina*
 - Disseny d'una estratègia que permeti l'obtenció de la tiocoralina d'una forma eficient. L'estratègia de síntesi cal que sigui vàlida per a l'obtenció d'anàlegs de la tiocoralina per poder obtenir llibreries de compostos que ajudin en els estudis de relació estructura-activitat.
 - Obtenció del compost i avaluació de l'activitat com a agent antitumoral en comparació al producte natural.

Per tal d'obtenir un coneixement més ampli sobre el procés de desenvolupament d'un nou fàrmac a partir de productes naturals, en aquest treball es recull la participació en el projecte d'aïllament de nous compostos antitumorals de la biodiversitat marina australiana amb l'objectiu d'obtenir un nou projecte de fàrmac antitumoral.



CONCLUSIONS

Les conclusions obtingudes a partir de la realització del present treball i, agrupades en els diferents capítols, es recullen a continuació :

- *Desenvolupament de la síntesi en fase sòlida d'un anàleg de la sirengotoxina*
 - L'obtenció d'un didehidropèptid protegit amb el grup *N*-terminal amb el grup Fmoc és viable i es dona amb bons rendiments si s'empra la carbodiimida soluble i clorur de coure com a agents deshidratants. El nou Fmoc-didehidropèptid és més convenient per a la síntesi de pèptids seguint la química Fmoc/^tBu.
 - La deshidratació emprant la EDC·HCl i el CuCl obté crús de reacció més nets que si s'empra la DSC. Els Fmoc-dipèptids cal aïllar-los mitjançant columnes cromatogràfiques de gel de sílice degut a la baixa solubilitat que presenten en medis aquosos bàsics.
 - La reacció de deshidratació emprant la EDC·HCl i CuCl condueix a la formació d'un producte secundari per eliminació del grup protector de l'extrem C-terminal. La proporció del producte secundari és major quan millor grup sortint sigui el grup protector.
 - L'acoblament complet del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH s'aconsegueix emprant 3 eq d'excés i DIPCDI i HOAt com a agents d'acoblament i mitjançant l'addició de més agents d'acoblament en comptes de realitzar un reacoblament amb Fmoc-dipèptid nou.
 - L'estratègia de síntesi plantejada basada en la resina CTC-PS com a suport polimèric, la química Fmoc/^tBu, la Gly com a primer aminoàcid i el grup Alloc per a solucionar el punt de ramificació permeten l'obtenció de l'anàleg de sirengotoxina plantejat, i pot ser vàlida per a la síntesi del pèptid natural.
 - La DKP formada a l'inici de la cadena peptídica de l'anàleg de la sirengotoxina [D-Dab(Boc)-Gly] s'evita si s'empra la resina CTC-PS, es redueix el temps d'eliminació del grup Fmoc del segon aminoàcid i es realitza un acoblament ràpid del tercer aminoàcid.

- L'ordre d'eliminació dels grups protectors en el punt ramificador és important. Es proposa la introducció de la primera Ser protegida amb el grup Fmoc i la Thr(^tBu) amb el grup Alloc per evitar l'eliminació indesitjada del grup Fmoc en les condicions d'eliminació del grup Alloc.
 - Les substitucions realitzades en la composició del pèptid natural han reduït la seva activitat com a Leishmanicida per bé que conserva, presumiblement, el mateix mecanisme d'acció.
- *Obtenció d'un anàleg de la tiocoralina que sigui més resistent en plasma, més soluble en medi aquós i no disminueixi la seva activitat com a agent antitumoral.*
 - El pèptid azatiocoralina, que substitueix els enllaços tioèsters per enllaços més estables amida, s'obté en una síntesi eficient i versàtil que permet l'obtenció d'anàlegs sintetitzats únicament en fase sòlida i obre la possibilitat d'obtenir pèptids asimètrics amb diferents heterocicles intercaladors. L'èxit de l'estratègia de síntesi recau en l'elecció del D-Dap com a primer aminoàcid, en l'obtenció del monòmer amb una puresa elevada i, especialment, en el concurs d'agents d'acoblament emprats al llarg de la síntesi.
 - El D-Dap com a primer aminoàcid evita la formació de DKPs a nivell de resina perquè l'elongació de la cadena es realitza pel grup amino de la cadena lateral. Si s'introdueix en la forma H-D-Dap(Fmoc)-Oal·lil permet la síntesi de l'azatiocoralina realitzant les dues ciclacions en fase sòlida.
 - Per a l'obtenció del monòmer d'azatiocoralina s'obtenen pureses i rendiments més elevats si s'introdueixen els aminoàcids ja derivatitzats: Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH i Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH. L'elongació seqüencial ofereix rendiments i pureses similars, no implica un temps de reacció molt superior i disminueix els costos de síntesi respecte l'elongació per fragments. La N-metilació segons Miller i Scanlan permet la síntesi de derivats d'azatiocoralina sintetitzats íntegrament sobre la fase sòlida, sense la necessitat de preparar cap precursor en solució.
 - Els agents d'acoblament juguen un paper important en la síntesi de l'azatiocoralina. L'agent d'acoblament HATU amb la DIEA permeten l'acoblament entre N-metil aminoàcids de forma ràpida (35 min) i quantitativa, i l'obtenció de la cadena peptídica amb una elevada puresa. L'agent PyOAP amb la DIEA és l'encarregat del l'acoblament de fragments que és més impedit i demana de més temps de reacció. El grup protector

del tiol de la cisteïna Ac_m permet l'obtenció del pont disulfur intramolecular sobre el suport polimèric per addició de iode. La reacció transcorre en 10 min i s'elimina l'excés de iode per filtració i successius rentats de la peptidil-resina. La carbodiimida soluble EDC·HCl, en combinació amb l'HOAt en DCM (1 mM) són les condicions òptimes per la ciclació en solució de l'azatiocoralina i derivats. Per a la introducció de l'àcid 3-hidroxiquinàldic s'empra la EDC·HCl però ara s'empra el HOSu que és menys reactiu que el HOAt i el HOBt i evita la sobreincorporació de l'heterocicle a través del seu grup hidroxil.

- La combinació de la resina CTC-PS i els grups protectors temporals Boc permet la introducció de l'heterocicle en solució, en la darrera etapa de síntesi, reduint així l'heterocicle necessari i permetent l'obtenció d'anàlegs basats en diferents heterocicles intercaladors.

○ L'obtenció de les *N*-metil cisteïnes necessàries per a l'obtenció de l'azatiocoralina [Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH i Fmoc-NMe-Cys(Ac_m)-OH] s'obtenen en rendiments baixos a partir de la reducció amb Na i NH₃ de la tioprolina i conseqüents proteccions dels grup tiol i amino.

○ L'azatiocoralina no millora significativament la solubilitat de la tiocoralina i té una activitat més reduïda com a agent antitumoral.

- *Desenvolupament de la síntesi en fase sòlida de la tiocoralina*

○ L'exploració de la síntesi en fase sòlida de l'oxatiocoralina, anàleg que conté dos enllaços èster en substitució als enllaços tioèster de la tiocoralina, ha permès la identificació dels problemes associats amb l'inici de la cadena peptídica en cada un dels possibles residus de la cadena, aprofundir amb la química de l'enllaç èster en el si d'una cadena peptídica, i elaborar modificacions en les metodologies de síntesi de pèptids en fase sòlida que s'adaptin a les necessitats del depsipèptid cíclic.

- Si la cadena peptídica s'inicia pel residu NMe-Cys(Ac_m), durant l'etapa d'acoblament de fragments es dona una reacció intramolecular entre l'amida de la Gly i l'èster activat que condueix a una ciclació intramolecular que inhibeix l'acoblament a la peptidil-resina. Aquest problema es podria solucionar mitjançant un grup protector d'amides, com les pseudo-prolines o, més convenientment, el grup Hmb.

- Si la cadena peptídica s'inicia pel residu Gly, durant l'etapa d'acoblament de fragments es forma una DKP a la peptidil-resina a nivell de l'enllaç èster que inhibeix l'acoblament del monòmer èster activat.
 - Si la cadena peptídica s'inicia pel residu D-Ser es pot obtenir el monòmer amb una puresa acceptable però l'etapa d'acoblament de fragments no dona bons resultats. Els problemes s'atribueixen a una baixa estabilitat de la cadena peptídica. En la síntesi del monòmer, l'acoblament del quart aminoàcid realitzat amb HATU i un defecte de base (5:4.8) en comptes de l'habitual doble d'excés, disminueix significativament la formació de DKPs i permet l'obtenció del monòmer tetrapeptídic {[Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&] [Boc-D-Ser(&)-OH]} amb una puresa acceptable.
 - El residu D-Ser permet la síntesi del primer derivat de l'oxatiocoralina [QNA, NMe-Leu³, NMe-Leu⁴] oxatiocoralina. La síntesi lineal revela com el segon enllaç èster, situat en el si de la cadena peptídica, és més làbil que l'enllaç èster format amb la D-Ser ancorada directament sobre la resina CTC-PS quan es treballa amb química Alloc. La ciclació de la cadena de vuit residus és lenta i, segurament, la cadena peptídica lineal és inestable en solució.
 - Quan la D-Ser està directament ancorada al suport polimèric, l'enllaç èster no és estable en les condicions d'eliminació del grup Fmoc. L'estabilitat és més baixa si el grup amino està en la forma *N*-acil que en forma de *N*-carbamat.
 - La Ser amb la cadena lateral protegida amb el grup TBDMS és la forma més convenient d'introduir l'aminoàcid directament sobre la resina CTC-PS.
 - La inactivació dels centres reactius remanents de la resina Wang es pot realitzar amb 20 % de Boc₂O en DCM i DMAP (cat.), i és una bona alternativa a l'ús de d'àcid acètic, especialment, en la síntesi de fragments o de cadenes que posteriorment es ciclaran en solució.
 - La resina CTC-PS es pot emprar com a grup protector protector temporal en l'obtenció de dipèptids i d'aminoàcids amb el grup α -amino protegit que no són assequibles comercialment.
- La síntesi en fase sòlida de la tiocoralina s'ha obtingut mitjançant l'exploració dels grups protectors temporals del grup α -amino compatibles amb l'estabilitat de l'enllaç tioèster i dels grups protectors del grup tiol de les cisteïnes compatibles amb la formació del pont disulfur i dels dos enllaços tioèster.

- L'ús dels grups Alloc i pNZ són compatibles amb l'estabilitat d'un enllaç tioèster en el si d'una cadena peptídica.
 - El grup Npys, grup protector del tiol de la cisteïna es pot eliminar i deixar el grup tiol lliure si s'empra la tributilfosfina (100 eq) en una solució DMF-H₂O (4:1) (2 x 20 min).
 - Tractaments àcids forts provoquen l'escissió de la cadena peptídica de la tiocoralina entre dos *N*-metil cisteïnes (TFA i HF) i la pèrdua d'una *N*-metil cisteïna quan es troba en l'extrem C-terminal (95 % TFA en aigua).
 - L'estratègia de síntesi 4+3+1 permet simplificar el quadre de grups protectors pel grup tiol de les cisteïnes de la cadena. Seguint aquesta estratègia s'obtenen els pèptids [Boc, *N*Me-Leu³, *N*Me-Leu⁴] tiocoralina, [QNA, *N*Me-Leu⁴] tiocoralina i, finalment, la tiocoralina.
 - La *N*-metilació en fase sòlida segons Miller i Scanlan també permet l'obtenció de derivats de tiocoralina sintetitzats íntegrament sobre el suport polimèric (seguint l'estratègia 4+3+1).
 - L'eliminació dels grups Boc en solució emprant una solució 95 % de TFA en aigua dona millors resultats que si s'empra la solució comercial 4M d'àcid clorhídric en 1,4-dioxà.
- L'obtenció dels aminoàcids degudament protegits per a les noves estratègies de síntesi plantejades s'han realitzat en solució amb rendiments acceptables a excepció del treball amb les *N*Me-cisteïnes.
- *Aïllament de compostos antitumorals d'esponges marines*
- L'esquema d'aïllament basat en una primera partició de l'extracte d'etanol entre *n*-butanol i aigua i una segona etapa de trituració de les dues fraccions en solvents de polaritat creixent, en combinació amb l'anàlisi de cada una de les fraccions obtingudes per HPLC-EM, RMN-¹H i, especialment, per l'assaig biològic *in vitro*, permet la ràpida identificació de nous compostos antitumorals d'un elevat nombre d'esponges marines d'estudi. L'assaig biològic antitumoral *in vitro* es prou sensible per detectar activitat d'un mil·ligram de mostra fraccionada en un sistema HPLC.

- Les trunculines és una família extensa de compostos amb una interessant activitat antitumoral que es localitzen exclusivament a les costes australianes. La relació activitat-estructura no està completament definida per bé que es postula que la forma amb l'àcid carboxílic és més activa que amb l'èster metílic. Els compostos parcialment i totalment reduïts que presenten dos grups hidroxils en comptes d'un grup peròxid presenten una interessant activitat com antitumorals.
 - La reducció selectiva del peròxid amb Mg i MeOH permet preservar la integritat de la cadena alifàtica de les trunculines i es presenta com un mètode millor que la reducció amb H₂/Pd (cat.) per a la determinació de la configuració absoluta de les trunculines. La deshidratació amb àcid *p*-toluensulfònic en bezè permet el reciclatge cap a la formació de l'anell tetrahidrofurà a partir dels dos alcohols.