

## SÍNTESIS DE UREIDODIPÉPTIDOS A PARTIR DE O-SUCCINIMIDIL CARBAMATOS DERIVADOS DE $\alpha$ -AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS EN SU FUNCIÓN AMINO TERMINAL

### SYNTHESIS OF UREIDODIPEPTIDES FROM O-SUCCIDIMIDYL CARBAMATES OBTAINED FROM N-TERMINUS PROTECTED $\alpha$ -AMINO ACIDS

José Manuel Lozano<sup>\*1</sup>, Gilles Guichard<sup>\*\*</sup>, Jean Paul Briand<sup>\*\*</sup>, José Libardo Torres-Castellanos<sup>\*\*\*</sup>, Fabiola Espejo<sup>†</sup> y Manuel Elkin Patarroyo<sup>†</sup>

Recibido: 18/11/03 – Aceptado: 19/12/03

#### RESUMEN

Una estrategia hacia el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos e inmunoprolácticos contra enfermedades transmisibles consiste en la alteración de la identidad química del enlace peptídico entre dos aminoácidos determinados, así como la modificación de la conformación de los carbonos  $\alpha$  de tales residuos. En este sentido se ha explorado exitosamente la sustitución de un enlace peptídico de la forma normal [CO-NH] por enlaces isómeros del tipo amida reducida  $\Psi$ [CH<sub>2</sub>-NH] para generar pseudopéptidos modulados estructural y funcionalmente como potenciales componentes de nuevas generaciones de vacunas sintéticas. Con el objeto de obtener nuevos isómeros del enlace peptídico, proponemos el diseño y la síntesis de pseudodipéptidos que contienen motivos urea en su esquele-

to peptídico para generar nuevas restricciones conformacionales de la molécula como oligómeros de urea o ureidopéptidos  $\Psi$ [NH-CO-NH].

**Palabras clave:** enlace peptídico, ureidopéptido, pseudopéptido.

#### ABSTRACT

A strategy towards the development of new therapeutic and immunoprophylactic agents against transmissible diseases consists on the alteration of the chemical identity of a peptide bond between two determined amino acids, as well as the modification specific alpha carbons' conformation of such residues. In this sense, the substitution of a peptide bond whose normal form [CO-NH] has been successfully explored by obtaining reduced amide  $\Psi$ [CH<sub>2</sub>-NH] isoster bonds to allow

1 Autor correspondiente. Correo electrónico: jm\_lozano@fidic.org.co y jotalozano@hotmail.com

\* Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (Fidic), Carrera 50 No. 26-00, Bogotá, Colombia.

\*\* Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Laboratoire de Chimie Immunologique, UPR 9021 CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC), 15, rue Descartes, F-67084 Strasbourg Cedex, France.

\*\*\* Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá.

structural and functionally modulated pseudo-peptides as potential component of new synthetic vaccine generations. With the aim of obtaining new peptide bond isomers, we propose the design and synthesis of Pseudo-dipeptides that contain urea motifs in their peptide backbone to generate novel conformational restrained molecules as urea or ureidopeptide-based  $\Psi$ [NH-CO-NH] oligomers.

**Key words:** Peptide bond, ureidopeptide, pseudo-peptide.

## INTRODUCCIÓN

La obtención de nuevos agentes capaces de bloquear las interacciones hospedero-patógeno reside en gran parte en los complejos mecanismos moleculares empleados por los agentes patógenos para unirse a una célula blanco y posteriormente infectarla y desencadenar enfermedad. Normalmente los ligandos empleados

por los microorganismos patógenos al ser humano están constituidos por proteínas y péptidos de mediano tamaño molecular. La mayoría de estos ligandos está constituida por residuos de aminoácidos de conformación  $\underline{L}$  y se cree que la interacción de estos ligandos con receptores celulares es de tipo estereoespecífica mediada por interacciones de tipo quiral entre las moléculas de los dos agentes interactuantes.

En los últimos 25 años se ha dedicado bastante investigación a la transformación química del enlace y esqueleto peptídico. La obtención de análogos no hidrolizables del enlace peptídico conocidos como pseudopéptidos y denotados por la nomenclatura  $\Psi$  [ ] propuesta por Spatola (1) ha sido reconocida como una poderosa herramienta para mejorar tanto las propiedades biológicas de los péptidos como su estabilidad a la proteólisis por prolongación de los tiempos de vida media de estas nuevas moléculas y, en consecuen-

cia, se presentan como elementos importantes para el diseño de nuevas vacunas e inhibidores enzimáticos con rasgos conformacionales determinados (2).

Una nueva aproximación hacia la modificación química del esqueleto peptídico es la introducción de motivos del tipo urea [NH-CO-NH] como sustitutos de un enlace peptídico natural [CO-NH]. En la Figura 1 se observa la relación entre un enlace peptídico normal y algunos de sus principales análogos. Recientemente se han descrito varias familias de biopolímeros con esqueletos peptídicos que incluyen enlaces urea, entre otros las oligoureas unidas  $N,N'$ -

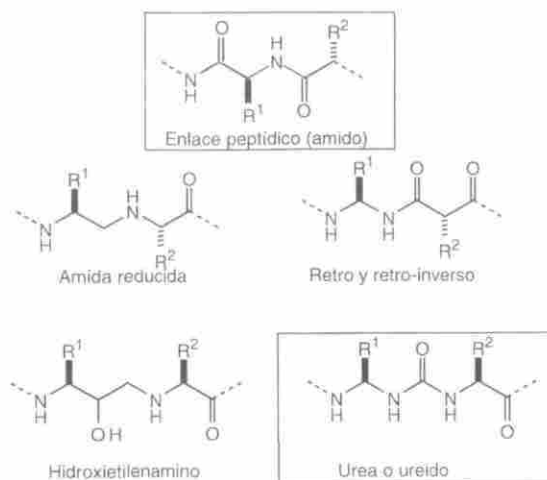


Figura 1. El enlace peptídico y algunas de sus formas isostéricas.

$[N(\text{CONHR})-(\text{CH}_2)_m]_n$  (3),  $[\text{NH}-\text{CHR}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}]_n$  (4), ureidopeptoides  $[\text{NR}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}]_n$ , y ureas cíclicas oligómeras (5).

De esta manera el motivo urea surge como un elemento importante que debe ser considerado para el desarrollo de nuevas vacunas y medicamentos debido a su estabilidad frente al metabolismo y a sus propiedades para formar puentes de hidrógeno (6, 7). En estado sólido las oligoureas *N,N'*-disustituidas se encuentran frecuentemente involucradas en autocomplementaridad intermolecular bidireccional mediante puentes de hidrógeno debido a la geometría *trans* de los dos enlaces amida. Norwick y colaboradores establecieron una metodología para imitar estructuras moleculares del tipo hebra  $\beta$ , vueltas tipo horquilla *hairpin turns* mediante la incorporación de motivos urea en un esqueleto peptídico dado (3 y 8).

En este contexto, el objeto de este trabajo es la obtención de los sintones necesarios para la inclusión del motivo urea  $\Psi[\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}]$  en la obtención de pseudopéptidos modificados entre dos  $\alpha$  aminoácidos vecinos como sustituyente de un enlace peptídico dado  $[\text{CO}-\text{NH}]$ , mediante la investigación de la síntesis de carbamatos del tipo *O*-succinimidil derivados de  $\alpha$ -aminoácidos protegidos en su función amino terminal para obtener ureido-péptidos como nuevos tipos de pseudopéptidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los  $\alpha$ -aminoácidos utilizados en este trabajo se obtuvieron de Neosystem o de Novabiochem. El tetrahidrofurano (THF) se destiló en laboratorio empleando la es-

trategia potasio o sodio/benzofenona bajo atmósfera inerte de Argón (Ar). El tolueno se destiló sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$  y se almacenó sobre tamiz molecular de 4 Å. Los análisis cromatográficos se realizaron por medio de HPLC-FR en una columna analítica  $\text{C}_{18}$  Nucleosil (5  $\mu\text{m}$ , 3,9 150 mm) empleando un gradiente lineal de solvente A (0,1% ácido trifluoroacético-TFA en  $\text{H}_2\text{O}$ ) y B (0,08% TFA en acetonitrilo-MeCN) con un flujo de elusión de 1,2 mL/min con detección UV a 214 nm.

Los análisis RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizaron en un equipo Bruker de 200 MHz, empleando los solventes deuterados producidos por Merck (Darmstadt).

## Obtención de los *O*-Succinimidil carbamatos 4, 12 y 39

Se disolvieron 10 mmol de  $\alpha$ -aminoácidos protegidos en su función amino con los grupos protectores *t*-Boc (*tert*-butiloxycarbonilo) compuesto 12 o Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) compuestos 4 (Figura 2) y 39 (Figura 3) en 30 mL de THF bajo atmósfera inerte de Ar, esta solución se enfrió hasta  $-20^\circ\text{C}$ . Posteriormente se adicionó (1,1 equivalentes) de cloroformiato de etilo (EtOCOCl) y 1,1 equivalentes de *N*-metilmorfolina (NMM), seguidamente la suspensión resultante se llevó a  $-5^\circ\text{C}$  y se trató con una disolución acuosa de  $\text{NaN}_3$  (2,5 equivalentes). Posteriormente la mezcla se agitó durante cinco minutos, se diluyó en acetato de etilo (EtOAc) y se lavó con una solución saturada de cloruro de sodio. Por último este producto de secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentró bajo presión reducida para obtener así la acilazida 2, la cual se empleó para la siguiente etapa de reacciones

sin purificaciones adicionales. Posteriormente el compuesto 2 se calentó a 65 °C con agitación constante para dar lugar a la formación del producto 3 por rearrreglo de Curtius (10). Finalmente se adicionó 1 equivalente de *N*-hidroxisuccinimida y un equivalente de piridina. La mezcla se agitó por cinco minutos a la misma temperatura y luego se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. En la mayoría de los casos el compuesto esperado se cristalizó en la solución de tolueno lo cual facilitó su separación mediante filtración. Luego de recristalización del compuesto a partir de la solución de tolueno se obtuvo el compuesto puro *O*-succinimidil carbamato 4.

Los códigos asignados a cada producto son consecutivos de una lista de 100 compuestos obtenidos en total. En este trabajo hacemos referencia sólo a los productos 11, 12, 34, 36 y 39.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Obtención de *t*-Boc-*g*Ser(Bzl)-COOSu (11):** *t*-Boc-Ser(Bzl)-OH (11,8 g, 40

mmol) se trató de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente. La recristalización en la disolución tolueno produjo el compuesto 11 (12,14 g, 60, 25%) como un sólido blanco (Figura 5). El análisis por HPLC-FR mostró un  $t_R$  de 12,88 minutos (gradiente lineal 20-80% *B*, 20 min). El análisis por RMN-<sup>1</sup>H ([D<sub>6</sub>]DMSO, 200 MHz):  $\delta$  = 1,35 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2,73 (s, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3,46 (d,  $J$  = 6,6 Hz, 2H, CHCH<sub>2</sub>), 4,46 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5,07-5,21 (m, 1H, NHCHNH), 7,19-7,36 (m, 5H, H arom.), 7,38 (amplio d, 1H, NHCO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 8,67 (amplio d,  $J$  = 7,6, 1H, NHCO<sub>2</sub>Su). RMN-<sup>13</sup>C ([D<sub>6</sub>]DMSO, 50 MHz):  $\delta$  = 25,2 (CH<sub>2</sub>), 28,0 (CH<sub>3</sub>), 59,0 (CH), 69,8 (CH<sub>2</sub>), 72,0 (CH<sub>2</sub>), 78,4 (C), 127,5 (CH), 128,1 (CH), 138,0 (C), 150,8 (C), 154,4 (C), 170,7 (C). HRMS *m/e* C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (M + H)<sup>+</sup> calculada 408,18, encontrada 408,25 (*m/z*). Estos datos permitieron determinar la identidad del compuesto obtenido acorde con lo propuesto en el diseño experimental.

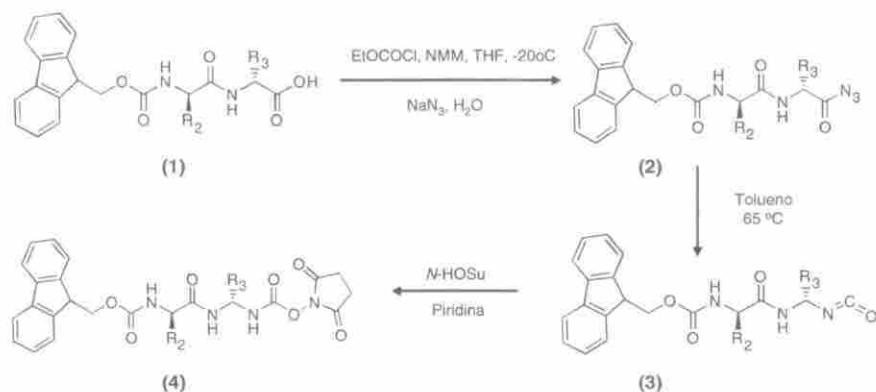
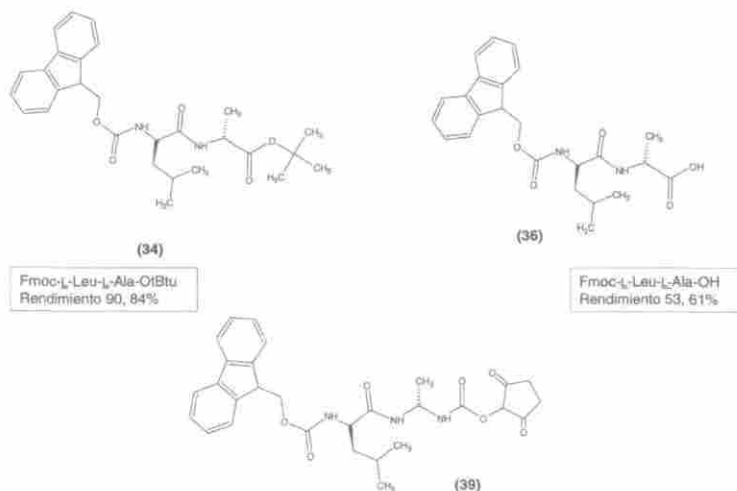


Figura 2. Síntesis de derivados *O*-succinimidil carbamatos a partir de *N*- aminoácidos protegidos.



**Figura 3.** Transformación química de la función C-terminal del dipéptido Fmoc-L-Leu-L-Ala para la obtención del derivado O-succinimidil carbamato.

**Obtención de *t*-Boc-gSer(Bzl)- $\Psi$ [NH-CO-NH]-D-Leu-N-Me (12):** se disolvieron 1,15 g, 2,83 mmol del compuesto 11 en 10 mL de *N,N'*-dimetilformamida (DMF) y se adicionaron 1,1 equivalentes de  $\text{HN}(+)\text{-D-Leu-NH}(\text{Me})$  (1,15 g, 2,83 mmol) y luego se adicionaron 1,5 equivalentes de diisopropietilamida (DIEA). La mezcla se dejó reaccionar durante dos horas con agitación constante a temperatura ambiente. Luego de recristalización en tolueno se obtuvieron 0,9 g del producto de reacción 12 (Figura 5) como un sólido amorfo blanco con un rendimiento del 73,13%. El análisis por HPLC-FR mostró un  $t_R$  de 10,22 min (gradiente lineal de 30-100% B, 20 min). El análisis por RMN- $^1\text{H}$  ( $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , 200 MHz):  $\delta = 1,35$  (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,52 (m, 1H Leu), 2,01 (s, 2H, C, Leu), 2,5 (d, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3,35 (s, 1H, C, gSer), 4,25 (c, 1H, C $\alpha$ , D-Leu), 4,55 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5,22 (m, 1H, C $\alpha$ , gSer),

6,25 (d, 1H, N-H D-Leu), 6,45 (d, 1H, N-H-CO), 7,10 (banda ancha, 1H, NH-C $\alpha$ , gSer), 7,3 (s, 5H H-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7,85 (d, 1H, CO-NH-CH<sub>3</sub>), como se observa en la Figura 6. Como en el caso anterior, estos datos permitieron determinar la identidad del compuesto obtenido de acuerdo con el diseño planteado.

**Obtención de Fmoc-L-Leu-gAla-COOSu, compuesto 39:** se disolvieron 1,27 g (7 mmol) de H-AlaOtBu.HCl en 15 mL de DMF. A esta disolución se adicionaron 1,05 equivalentes de Fmoc-L-Leu en presencia de 1,05 equivalentes de Benzotriazol-1-iloxitris-(dimetilamino)-fosfoniohexafluorofosfato (BOP) y 3 equivalentes de DIEA, tal como se describió anteriormente. Esta mezcla se dejó reaccionar con agitación durante dos horas y posteriormente el producto 34 se trató con una solución de NaHCO<sub>3</sub> para formar 3,4 g de un precipitado blancuzco el cual se lavó con agua y se concentró por rota-evaporación del sol-

vente. El rendimiento de la reacción fue del 90,84%. El análisis por HPLC-FR mostró un  $t_R$  15,2 min (Figura 4). Posteriormente, el compuesto 34 se trató con 20 mL de ácido trifluoroacético (TFA) al 100% durante 30 minutos. El producto obtenido (36) se extrajo seguidamente con éter etílico ( $\text{Et}_2\text{O}$ ) y *n*-hexano. Por último, 36 se concentró por rota-evaporación para la obtención de 1,61 g del compuesto arrojando un rendimiento de reacción del 53,61%. El análisis por HPLC-FR mostró un  $t_R$  14,4 min (Figura 4). Estos datos permitieron determinar la identidad del compuesto obtenido acorde con el diseño experimental planteado.

Finalmente, 1,56 g (3,675 mmol) del compuesto 36 se trataron como se describió anteriormente para la formación del derivado carbamato *O*-succinimida, de esta manera se produjeron 1,659 g (3,18 mmol) del compuesto objetivo 39 como un sólido blanco, con un rendimiento de reacción del 89,12%. El análisis por HPLC-FR mostró un  $t_R$  17,1 min empleando un gradiente lineal del 20-80%

*B*, 20 minutos en todos los casos como se observa en la Figura 4.

Los resultados encontrados en este trabajo concuerdan con los resultados reportados por Goodman y colaboradores en un estudio dirigido a la obtención de residuos alquilo gem-diamino diacilados derivados de Boc-, *Z*- y acetyl fenilalanina. Ellos encontraron que reacciones laterales asociadas con la adición de MeOH o alcohol bencílico al correspondiente isocianato varían con la naturaleza del grupo protector de la función amino del aminoácido, en este sentido la protección de esta función con el grupo acetilo (AcO) ofrece mejores resultados que el grupo *Z* (Cl-Bzl) que a su vez es mejor que el grupo *t*-Boc (11).

## CONCLUSIONES

### Viabilidad de la obtención de derivados *O*-succinimidil carbamatos

A pesar de que se sabe que el rearrreglo de Curtius se lleva a cabo manteniendo

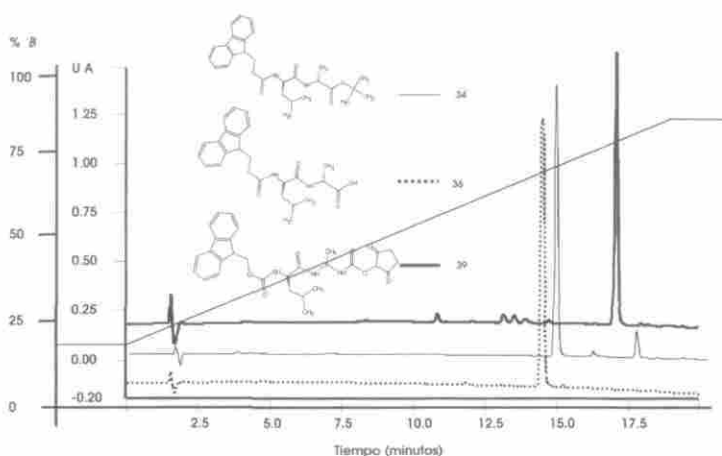


Figura 4. Seguimiento cromatográfico por HPLC-FR de la transformación química de la función C-terminal del dipéptido Fmoc-L-Leu-L-Ala-OtBtu 34 para la obtención del derivado *O*-succinimidil carbamato 39.

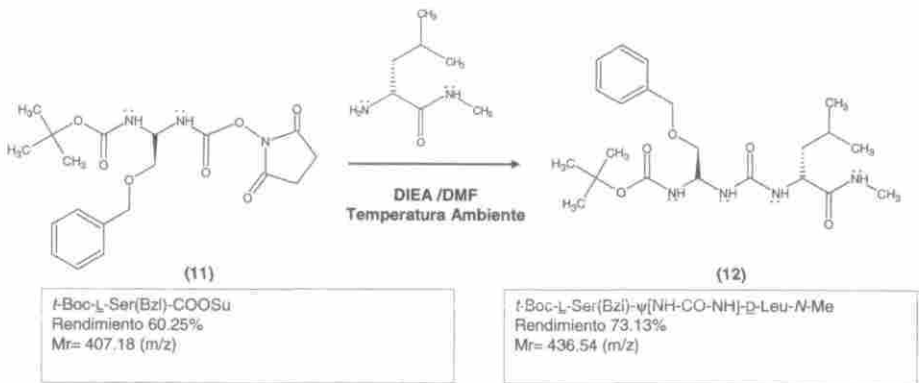


Figura 5. Obtención del pseudodipéptido del tipo ureido *t*-Boc-L-Ser(Bzl)-[NH-CO-NH]-D-Leu-N-Me (12).

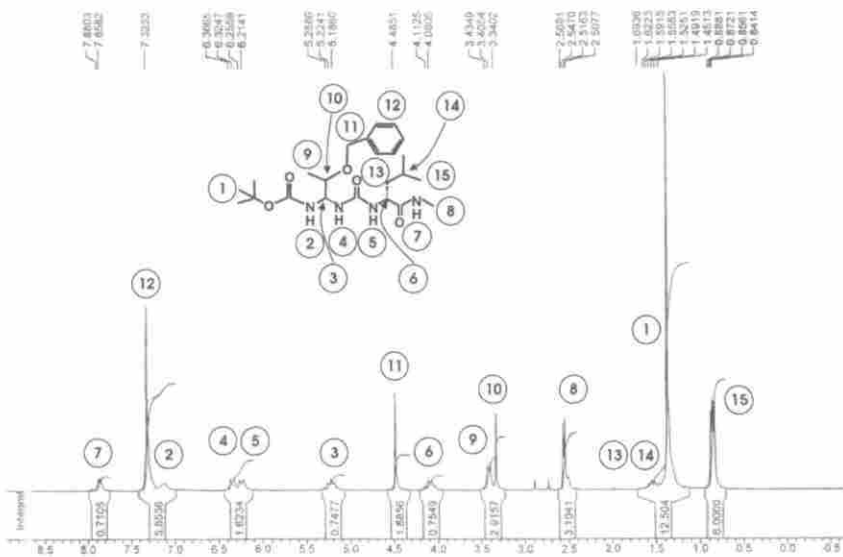


Figura 6. Perfil protónico por RMN-<sup>1</sup>H del pseudo dipéptido del tipo ureido *t*-Boc-L-Ser(Bzl)-[NH-CO-NH]-D-Leu-N-Me (12).

la configuración (10, 12), es posible que ocurra epimerización durante la formación de la acilazida 2, o durante la reacción del grupo isocianato 3 con la *N*-hidroxisuccinimida (13, 14).

### Reactividad de los *O*-succinimidil carbamatos

Como se esperaba, los carbamatos 11 y 39 derivados de  $\alpha$ -aminoácidos, el prime-

ro protegido por el grupo *t*-Boc y el segundo con Fmoc, reaccionan rápida y limpiamente con aminas primarias y secundarias como son los grupos amino libres de diferentes residuos de aminoácidos para dar lugar a la formación de los correspondientes ureido-dipéptidos [NH-CO-NH] con buenos rendimientos de reacción, entre un 70 a 90%. La obtención del pseudodipéptido *t*-Boc-*g*Ser(Bzl)-[NH-CO-NH]-*D*-Leu-*N*-Me 12, fue posible debido a la reactividad del derivado *O*-succinimida *t*-Boc-*g*Ser(Bzl)-COOSu 11 con la amina primaria del residuo  $_3\text{HN}(+)\text{-D-Leu-NH(Me)}$ . Este compuesto es un potencial formador de oligómeros de urea para la obtención posterior de cadenas pseudo-peptídicas con potencial restricción conformacional a hebras tipo  $\beta$ .

La versatilidad del procedimiento para obtención de bloques pequeños o derivados *O*-succinimidil carbamatos a partir de -aminoácidos protegidos en su función amino con el grupo *t*-Boc o el grupo Fmoc, constituye una herramienta para la obtención de oligómeros de urea como isómeros de enlaces peptídicos con aplicación hacia el desarrollo de moléculas moduladas estructuralmente para ser evaluadas como nuevos tipos de inmunógenos en enfermedades transmisibles como la malaria.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Presidencia de la República de Colombia a través del Ministerio de la Protección Social. Agradecemos a la División de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia (DIB) y al convenio de cooperación Colombo-Francesa ECOS-Nord proyecto No. 00PFC29S03.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Spatola, A. F. (1983). Chemistry and Biochemistry of Amino acids, peptides and Proteins, B. Weinstein (ed.), New York: Marcel Dekker Inc., 7, pp 267-357.
2. Sawyer, T. K. (1995). *Peptide-Based Drug Design Controlling Transport and Metabolism*, M. D. Taylor, G. L. Amidorn (eds.), New York: Oxford University Press, pp 332-422.
3. Nowick, J. S. (1999). Chemical models of protein -sheets. *Acc. Chem. Res.* **32**, 287-296.
4. Burgess, K.; Linthicum, D. S., Shin, H. (1995). Solid phase syntheses of un-natural biopolymers containing repeating urea units. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**, 907-908.
5. Kim, J. M.; Wilson, T. E.; Norman, T. C.; Schultz, P. G. (1996). Synthesis of a cyclic urea as a non-natural biopolymer scaffold. *Tetrahedron Lett.* **37**, 5309-5312.
6. Cram, F. (1986). Host-guest complexation-37: Synthesis and binding properties of a transacylase partial mimic with imidazole and benzyl alcohol in place. *Tetrahedron* **42**, 1607-11.
7. Lam, P. Y.; Jadhav, P. K.; Eyerman, C. J. et al., (1994). HIV-protease inhibitors. *Science* **263**, 380-384.
8. Nowick, J. S.; Mahrus, S.; Smith, E. M. et al., (1996). Thiourea derivatives of diethylenetriamine as poten-



- tial templates for the formation of artificial  $\alpha$ -sheets. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 1066-1072.
9. Tritsch, G. L.; Wooley, D. W. (1960). The synthesis of L-Leucyl-L-valyl-L-cysteinyl-glycyl-L-glutamyl, an insulin fragment with Strepogenin activity. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 2787-2793.
  10. Curtius, T. (1894). *Ber.* **23**, 3023. *Idem* (1890). *J. Prakt. Chem.* **50** (2): 275-77.
  11. Chorev, M.; MacDonald, S. A.; Goodman, M. (1984). Retro-inverso isomerization of peptides: side reactions in the synthesis of N,N'-diacyl-1,1-diamino-2-phenylethane derivatives. *J. Org. Chem.*, **49**, 821-827.
  12. Terashima, S.; Lee, K. K.; Yamada, S. (1969). *Chem. Pharm. Bull.* **17**, 2533-2539.
  13. Sieber, P.; Riniker, B.; Brugger et al., (1970). Human calcitonin. VI. Synthesis of calcitonin M. *Helv. Chim. Acta.* **53**, 2135-2150.
  14. Izumiya, N.; Muraoka, M. (1969). Racemization test in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 2391-95.