

# HETEROCYCLIC ARCHITECTURE FOR THE SYNTHESIS OF ANTI-HIV PROTEASE AND ANTI-CANCER COMPOUNDS

## Riassunto

### Introduzione

L'introduzione di strutture eterocicliche in una molecola bioattiva può avere importanti effetti sulle proprietà fisico-chimiche e farmacologiche, a causa della loro stabilità chimica, della loro rigidità strutturale e per il miglioramento della biodisponibilità e della solubilità acquosa.<sup>1</sup> Pertanto la possibilità di formare legami idrogeno con gli atomi della spina dorsale bersaglio può aumentare la loro efficacia. Il successo di questa strategia nell'identificazione di nuove molecole biologicamente attive in aree terapeutiche distinte ha ottenuto una crescita significativa e nelle molecole biologiche vengono introdotti diversi eterocicli<sup>2</sup>. In particolare, le molecole organiche contenenti eterocicli sono state descritte come "strutture privilegiate", poiché sono in grado di legarsi a molti recettori ad alta affinità<sup>3</sup>. Di particolare interesse è il fatto che la maggior parte delle sostanze chimiche conosciute sono basate su strutture eteroareniche<sup>4,5</sup>. Ci sono una serie di sistemi ad anello fusi [5,6] che mostrano attività biologica. In particolare i sistemi ad anello fusi [5,6], utilizzati nei percorsi sintetici discussi in questo lavoro, includono indolo, benzofurano e benzotiofene. Da diversi anni, nel laboratorio dove ho svolto il mio lavoro di dottorato, la ricerca è focalizzata sull'introduzione di strutture eterocicliche in molecole con potenziale attività inibitoria contro il virus dell'HIV. Lo studio ha riguardato la sintesi di composti destinati a bloccare l'azione della proteasi dell'HIV (HIV-Pr), un enzima essenziale per la produzione di particelle di HIV mature<sup>6</sup>. L'obiettivo dello studio è quello di introdurre strutture eterocicliche nel nucleo centrale idrossietilaminico che è la struttura che un inibitore dell'HIV-Pr deve avere per essere mimetico dello stato di transizione. La nostra ricerca si concentra sulla sintesi di analoghi del Darunavir, l'ultimo approvato dalla Food

---

<sup>1</sup> a) G.A. Patani, E.J. La Voie, *Chem Rev.* **1996**, *96*, 3147. b) N.A. Meanwell, *J Med Chem.* **2011**, *54*, 2529.

<sup>2</sup> J. Sangshettia, S.K. Pathan, R.Patil, S.A. Ansari, S. Chhajed, R. Arote, D.B. Shind, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2019**, *27*, 3979.

<sup>3</sup> D.A. Horton, G.T. Bourne, M.L. Smythe, *Chem. Rev.*, *103*, 893, **2003**.

<sup>4</sup> C.A. Rouzer, D. Riendeau, J-P Falguyret, C.K. Lau, M.J. Gresser, *Biochem Pharmacol*, *41*, 1365, **1991**.

<sup>5</sup> T.R. Bosin, E.E. Campaigne, *Drug. Res.*, *11*, 191, **1977**.

<sup>6</sup> A.G. Tomasselli, R.L. Heinrichson, *Biochim. et Biophys. Acta*, *1477*, 189–214, **2000**.

and Drug Administration e l'unico attivo contro il virus mutato<sup>7</sup>. Gosh ha mostrato l'effetto di aumento della potenza del tetraidrofurano ciclico fuso (bis-THF) presente nella struttura del Darunavir che può essere coinvolto in un'interazione con gli atomi dello scheletro dell'enzima.<sup>8</sup> Pertanto, la nostra progettazione di ligandi e modelli è focalizzata sull'introduzione di strutture cicliche/eterocicliche che potrebbero interagire attraverso un forte legame di idrogeno con gli atomi della spina dorsale nel sito attivo della proteasi e che potrebbero migliorare la biodisponibilità dei PI. Inoltre, diversi studi hanno riportato che gli inibitori dell'HIV sono stati dotati di attività antitumorale; dopo il successo nel trattamento di pazienti affetti da HIV infetti da sarcoma di Kaposi con inibitori della proteasi HIV-1, gli studi sono stati orientati con successo verso altri tumori solidi.<sup>9</sup> Infatti, gli inibitori della proteasi dell'HIV sembrano essere una nuova classe di farmaci antitumorali con effetti multipli..<sup>10</sup> Alla luce di quanto detto, l'emergere della resistenza ai farmaci spinge la comunità scientifica a produrre nuove molecole con minori effetti collaterali e maggiore efficacia, soprattutto se è possibile una doppia attività biologica.

### Primo scopo della tesi

Seguendo questa linea di ricerca e basandosi sui risultati del passato, questo lavoro è focalizzato sulla sintesi di nuovi composti PIs, con nucleo idrossietilamminico con diversi eteroareni e sulfonamidi, con potenziale attività ad ampio spettro contro le varianti resistenti ai farmaci e con attività antitumorale. La struttura generale del composto sintetizzato è riportato in figura 1, in cui l'eterociclo è spaziato dal nucleo centrale da diverse funzionalità, ammidica e carbammica, il tipo di gruppo eteroarilico (X = O, NH, S), la frazione sulfonamidica e il nucleo sono stati modificati, con la presenza di H o di un gruppo benzilico come sostitente R'.

---

<sup>7</sup> A.K. Gosh, Z.L. Dawson, H. Mitsuya, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7576.

<sup>8</sup> A.K. Ghosh, B.D. Chapsal, I.T. Weber, H. Mitsuya, *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, No 1, 78.

<sup>9</sup> D. Maksimovic-Ivanic, P. Fagone, J. McCubrey, K. Bendtzen, S. Mijatovic, F. Nicoletti, *Int. J. Cancer*, *140*, 1713, **2017**.

<sup>10</sup> a) MZ Dewan, M. Tomita, H. Katano, *Int J Cancer*, *124*, 622, **2009**. b) S. Gant, J. Carlsson, M. Ikoma, *Antimicrob Agents Chemother*, *55*, 2696, **2011**.

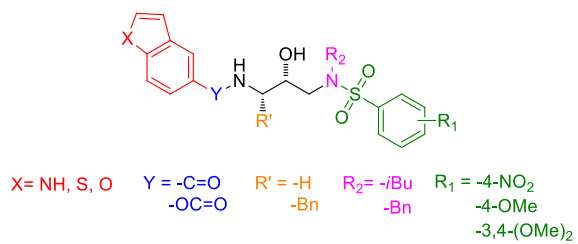
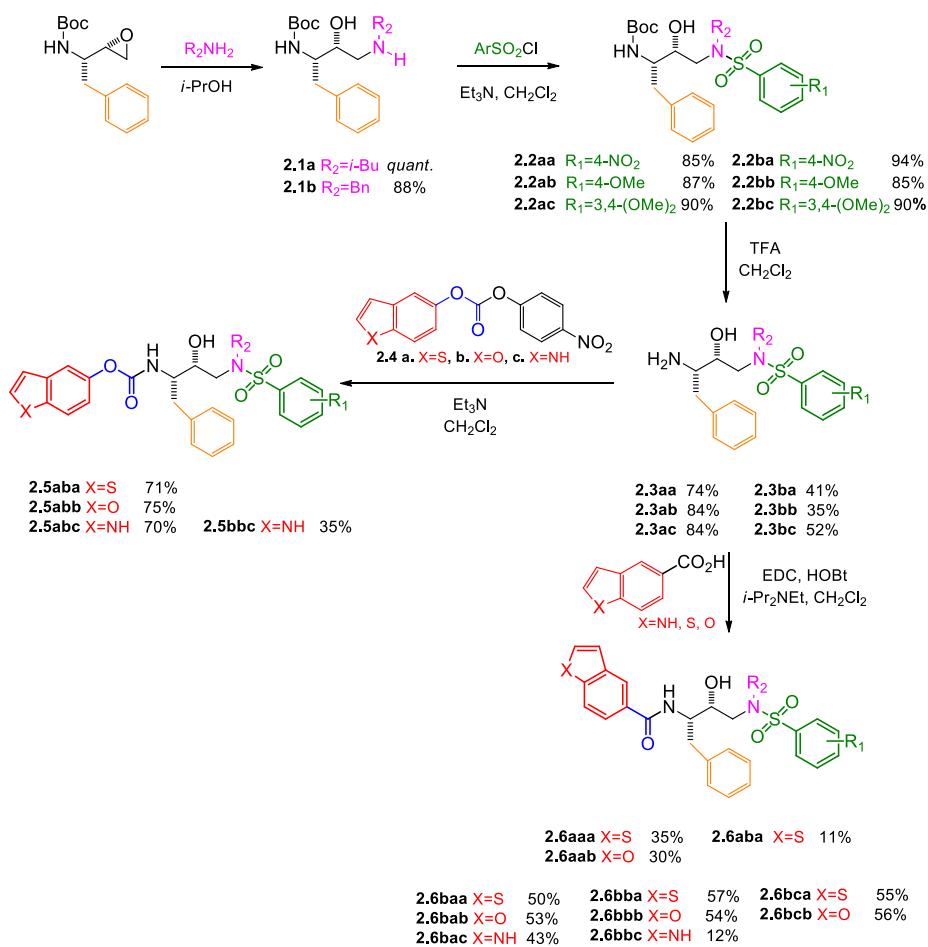


Figure 1

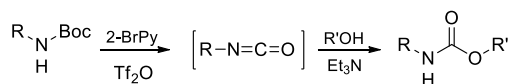
Quando R' è gruppo benzilico, il percorso sintetico parte dall'amminoepossido N-Boc protetto per ottenere una libreria di composti con funzionalità ammidica o carbammica che spaziano l'eteroarene dal nucleo (schema 1).



**Scheme 1**

**a.** R<sub>2</sub>=*i*-Bu; **b.** R<sub>2</sub>=Bn  
**a.** R<sub>1</sub>=4-NO<sub>2</sub>; **b.** R<sub>1</sub>=4-OMe; **c.** R<sub>1</sub>=3,4-(OMe)<sub>2</sub>  
**a.** X=S; **b.** X=O; **c.** X=NH

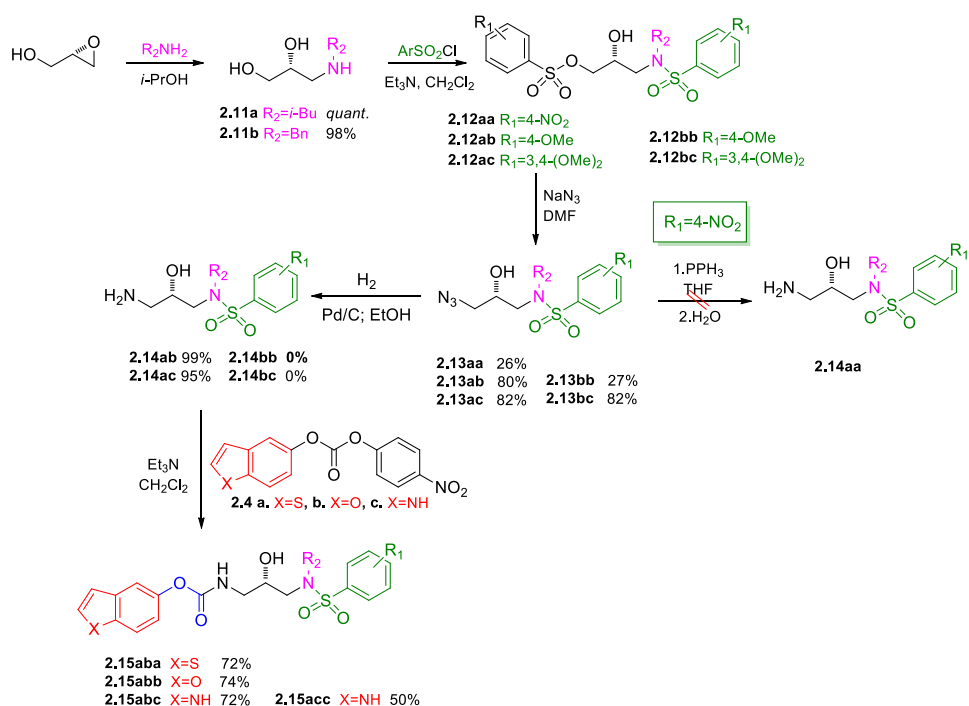
In questo lavoro vengono studiati nuovi percorsi sintetici per ridurre al minimo i passaggi e aumentare la resa complessiva. In particolare è stata provata la sintesi in un solo step per ottenere carbammati da ammine protette da Boc, come riportato nello schema 2, ma con scarsi risultati.



Scheme 2

Inoltre, è stata studiata una sintesi diversamente orientata, invertendo i passaggi sintetici per cambiare le diverse funzionalità a seconda delle esigenze.

Con il nucleo centrale non sostituito, la sintesi parte da S-glicidolo come riportato nello schema 3.



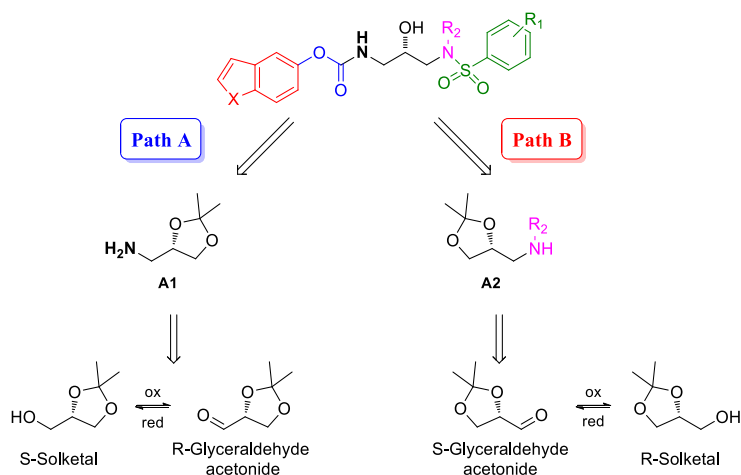
Scheme 3

**a.**  $R_2=i\text{-Bu}$ ; **b.**  $R_2=\text{Bn}$

**a.**  $R_1=4\text{-NO}_2$ ; **b.**  $R_1=4\text{-OMe}$ ; **c.**  $R_1=3,4\text{-(OMe)}_2$

**a.**  $X=\text{S}$ ; **b.**  $X=\text{O}$ ; **c.**  $X=\text{NH}$

Inoltre, a causa delle difficoltà incontrate in questo caso di utilizzo di *S*-Glicidolo come materiale di partenza, al fine di preparare una libreria di composti, sono state studiate nuove strategie con un substrato chirale di partenza diverso, a seconda del lato della molecola su cui lavorare; i percorsi retrosintetici sono riportati nello schema 4.



Scheme 4

I composti sintetizzati sono stati saggiati per valutare la loro attività *in vitro* contro una protease ricombinante, utilizzando la metodologia FRET, e per valutare la loro vitalità cellulare è stato usato il saggio MTT.

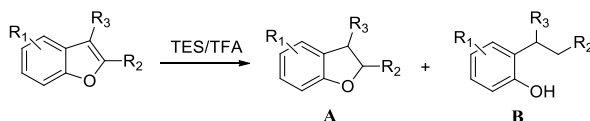
I risultati dell'analisi FRET hanno mostrato che quando  $R_2$  è un *i*-Bu, i composti **2.5abb** e **2.5abc**, in cui il gruppo eteroarilico è distanziato dal nucleo dalla funzionalità carbammica, sono gli inibitori più potenti, con valori  $IC_{50}$  inferiori a 0.6 nM. Quando  $R_2$  è un gruppo benzilico, invece, spaziature più lunghe come la funzionalità carbammica tra l'eteroarene e il nucleo diminuisce l'attività di inibizione, quindi è richiesta la funzionalità ammidica. Per spiegare tali risultati, il Prof. Berti dell'Università di Trieste ha effettuato una serie di saggi docking sugli inibitori testati, per valutare l'interazione con l'enzima.

I risultati dei test MTT sulle linee cellulari dell'epatocarcinoma (HepG2), confrontati con gli epatociti sani (IHH), hanno mostrato che i composti con la frazione eterociclica riducono l'attività citotossica come previsto; questo conferma l'attività probabilmente importante dell'ammina libera sul lato sinistro della molecola.

Tuttavia l'attività citotossica del derivato **2.15abc**, che ha mostrato una bassa attività antivirale, è di particolare interesse.

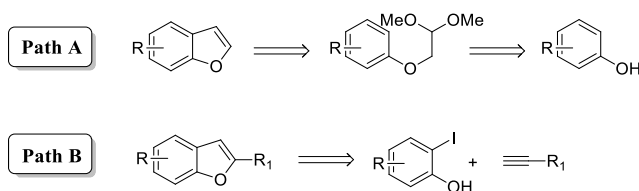
## Secondo scopo della tesi

Un altro eterociclo che costituisce lo scheletro del nucleo di un gran numero di composti biologicamente attivi è il sistema ad anello di 2,3-diidrobenzofurani<sup>11</sup>, derivante dall'idrogenazione dell'anello di furano fuso con un nucleo di benzene. Ci sono diversi approcci alla sintesi del 2,3-diidrobenzofurano<sup>12</sup>, ma manca ancora un metodo generale. Uno di questi dovrebbe essere l'idrogenazione dei derivati del benzofurano ai corrispondenti 2,3-diidrobenzofurani, ma potrebbe essere difficile da ottenere rispetto ad altri nuclei eteroaromatici<sup>13</sup>. Infatti, l'idrogenazione catalitica del benzofurano, in tutte le condizioni, è accompagnata da una parziale scissione dell'anello di furano. Alla luce di ciò, un'altra questione è quella di studiare la reattività del benzofurano sostituito durante le reazioni di riduzione, per capire l'influenza dei sostituenti sull'anello di benzene o sull'anello di furano. Tra i possibili metodi di riduzione, in questo lavoro è stata applicata la riduzione con idrosilani (schema 5)



Scheme 5

L'anello di benzofurani sostituiti è stato ottenuto con due strategie diverse a causa dei diversi sostituiti presenti sull'anello benzenico: il percorso A dove l'anello benzofuranico è stato ottenuto dalla preparazione e dalla ciclizzazione degli acetali di arilossiacetaldeide; il percorso B dove l'anello benzofuranico è stato ottenuto dalla reazione di cross-coupling, Sonogashira e dalla contemporanea ciclizzazione (schema 6):



Scheme 6

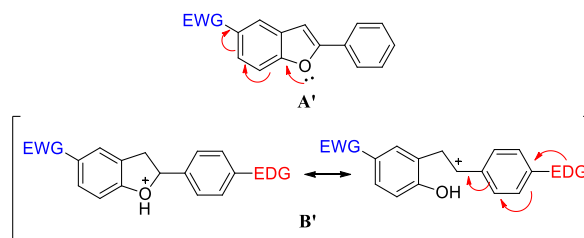
<sup>11</sup> a) M.H. Keylor, B.S. Matsuura, R.J. Stephenson, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8976. b) K. Chen, M. Pitchakuntla, Y. Jia, *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36*, 666.

<sup>12</sup> J.T. Kuethe, A. Wong, M. Journet, I.W. Davies, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3727.

<sup>13</sup> E. Baralt, S.J. Smith, J. Hurwitz, I.T. Horvath, R.H. Fish, *J. Am. Chem. Soc.*, *114*, 5187, **1992**.

I benzofurani sintetizzati sono stati utilizzati nella reazione di riduzione, secondo le condizioni descritte nello schema 4, per studiare come i sostituenti e la loro posizione possono influenzare la reattività in questa reazione. Si è cercato di razionalizzare i risultati della riduzione (notazione riferita allo schema 5):

- se  $R_2$  è un gruppo alchilico si ottiene il 2,3-diidrobenzofurano, **A**, indipendentemente dai sostituenti  $R_3$  e  $R_1$ ; invece se  $R_2$  è un gruppo arilico, e  $R_1$  e  $R_3$  sono H, si ottiene il prodotto di una riduzione eccessiva, **B**, a causa della stabilizzazione della carbocazione dal benzile per effetto mesomerico;
- per i benzofurani 2,(3),5-sostituiti, l'andamento è abbastanza sistematico e razionalizzabile secondo i sostituenti presenti, come descritto nello schema 7:



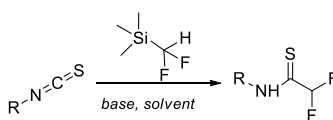
Scheme 7

- per i benzofurani 2,(3),4,6-sostituiti c'è più difficoltà di accesso alla protonazione e la riduzione è più lenta. Così, identificare una tendenza generale diventa complicato e non facilmente correlata ai sostituiti presenti.



### Terzo scopo della tesi

Infine, l'incorporazione del fluoro nelle molecole bioattive è di particolare interesse per le industrie farmaceutiche grazie alla capacità del fluoro di aumentare la stabilità metabolica e la biodisponibilità. Inoltre il fluoro aumenta la lipofilia dei gruppi ossidrilici o tiolici e ha la capacità di interagire con legami idrogeno<sup>14</sup>. Le classi principali di composti organofluorurati con attività biologica includono i gruppi trifluorometil- e difluorometil. In particolare, il gruppo funzionale difluorometilico (CF<sub>2</sub>H) ha grandi proprietà. Pertanto, lo sviluppo di metodologie efficaci e generali per l'incorporazione di questo gruppo attraverso percorsi nucleofili<sup>15</sup>, elettrofili<sup>16</sup> e radicali<sup>17</sup> è diventato uno degli obiettivi nel campo della chimica organica. In questo lavoro, in collaborazione con il Dipartimento di Chimica Farmaceutica dell'Università di Vienna, è stato introdotto un gruppo di CHF<sub>2</sub>- per aggiunta nucleofila ad un carbonio elettrofilo. Il gruppo Pace, infatti, ha mostrato come l'aggiunta nucleofila di reagenti organometallici funzionalizzati agli isocianati e agli isotiocianati costituisca un approccio versatile, diretto, monocomponente e ad alto rendimento per introdurre questo gruppo e rappresenti uno strumento attraente per la preparazione di composti di tipo amidico<sup>18</sup>. Lavorando in questa direzione, il difluorometiltrimetilsilano è stato utilizzato come reagente organometallico e diversi isotiocianati come reagenti elettrofili reattivi per ottenere  $\alpha,\alpha$ -difluorotioamidi, una classe fondamentale di molecole organiche con caratteristiche attraenti (scheme 8).



Scheme 8

Si tratta di un nuovo metodo per introdurre questo gruppo al fine di sostituire il metodo che necessita di elementi costosi e tossici o di agenti fluorizzanti. Sono state ricercate le condizioni ottimali per questo tipo di reazione e sono stati utilizzati diversi isotiocianati per

<sup>14</sup> T. Zhu, Z. Zhang, J. Tao, K. Zhao, T. Loh, *Organic Letter* **2019**, *21*, 6155.

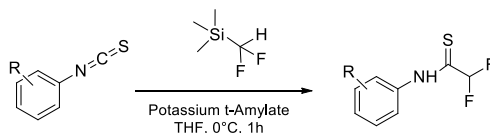
<sup>15</sup> a) Y. Gu, X. B. Leng, Q. Shen, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5405 b) X.L. Jiang, Z. H. Chen, X. H. Xu, F.L. Qing, *Org. Chem. Front.* **2014**, *1*, 774. c) D.L. Chang, Y. Gu, Q. Shen, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 6074.

<sup>16</sup> a) C.S. Thomason, W.R. Dolbier, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8904. b) K. Aikawa, K. Maruyama, K. Honda, K. Mikami, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4882.

<sup>17</sup> a) S. Zhang, L. Li, J. Zhang, M. Xue, K. Xu, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 3181. b) P. Xiong, H.-H. Xu, J. Song, H.-C. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2460. c) P. Dai, X. Yu, P. Teng, W.H. Zhang, C. Deng, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 6901.

<sup>18</sup> V. Pace, S. Monticelli, K. de la Vega-Hernandez, L. Castoldi, *Org. Biomol. Chem* **2016**, *14*, 7848.

ottenere una vasta gamma di tioammidi con alte rese. Così si è ottenuta una libreria di scaffold utili in sintesi medicinale (schema 9)<sup>19</sup>. La natura dell'isotiocianato non influenza l'efficacia della tecnica.



**Scheme 9**

Il successo della procedura ha motivato la valutazione della reattività degli analoghi isocianati. Poi, lo stesso studio è stato esteso alle amidi del Weireb. La reattività delle (tio)ammidi ottenute è stata studiata per poter ottenere prodotti con attività biologica, ma gli studi preliminari non hanno permesso di ottenere i prodotti desiderati.

<sup>19</sup> M. Miele, R. D'Orsi, S. Vellaisamy, W. Holzer, V. Pace, *Chem. Commun.* **2019**, 55, 12960