

21. Química

Influencia sobre la actividad biológica del resto 2-amino-lactámico en antihelmínticos con estructura híbrida lactama-bencimidazol

Luzardo, Martín; mluzardo@fq.edu.uy; Incerti, Marcelo*; mincerti@fq.edu.uy; Manta, Eduardo*; emanta@fq.edu.uy; Teixeira, Ramiro; rteixeira@fq.edu.uy

Universidad de la República - Facultad de Química

*Prof. Orientador

Resumen

Utilizando una metodología de hibridación molecular, la cual es una potente herramienta para la construcción de nuevos compuestos bioactivos, se sintetizaron siete nuevos compuestos con interesante actividad antihelmíntica contra *Haemonchus contortus*. Estos compuestos tienen estructura híbrida del tipo 2-amino- δ -valerolactamas-bencimidazol y 2-amino- ϵ -caprolactama-bencimidazol. Se observa que las mejores actividades las presentan los compuestos derivados de la 2-amino- ϵ -caprolactama, demostrando la influencia sobre la actividad biológica de este fragmento. Al mismo tiempo se demuestra que esta misma serie de compuestos presenta una mayor resistencia a la racemización en las condiciones ensayadas.

Palabras clave: híbridos, ϵ -caprolactama, δ -valerolactama, *H. contortus*, antihelmíntica.

Introducción

Las infecciones parasitarias, principalmente las producidas por nematodos, son una causa importante de pérdidas económicas en la industria agropecuaria en todo el mundo (Neiuwhoff y Bishop, 2005). Particularmente, *Haemonchus contortus* es uno de los nematodos gastrointestinales más prevalentes y patógenos en ovejas (80% de carga parasitaria). El control químico farmacológico ha sido el preferido para el tratamiento de estas parasitosis. Sin embargo, el uso indiscriminado de

antihelmínticos comercializados, ha conducido al desarrollo de resistencia, con un crecimiento dramático, tanto a nivel mundial como en nuestro país. Esta situación, está generando un serio vacío terapéutico, que conduce a una urgente necesidad de desarrollo de nuevos antihelmínticos (Woods, Vaillancourt, Wendt, y Meeus, 2011). Es en esta línea de trabajo, que recientemente nuestro grupo de trabajo del laboratorio de Química Farmacéutica, de Facultad de Química-UdelaR, ha comunicado la preparación de nuevos antihelmínticos. (1,

Figura 1 (Uruguay, Patente N° 14.424, 2014). Dicho método consiste en la unión de dos fragmentos, con comprobada actividad contra nematodos (Gordon, 1998), los cuales son derivados de 2-amino- δ -valerolactamas y de 2-aminobencimidazoles. La hibridación de compuestos bioactivos es una estrategia utilizada para mejorar su actividad, por sinergia entre los farmacóforos involucrados y/o aumento de la biodisponibilidad, entre otras. En general, el concepto de hibridación ofrece la oportunidad de hacer uso de una unidad adicional que sirve como linker de los dos fragmentos. Al mismo tiempo este linker podría ser utilizado como herramienta para mejorar las propiedades fisicoquímicas de los fragmentos individuales (Karagöz, 2018).

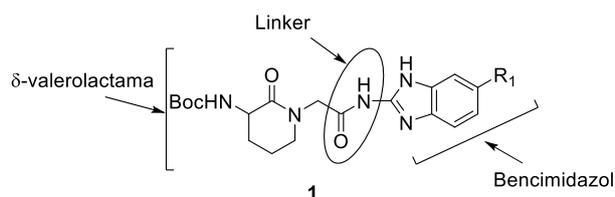


Figura 1

Los resultados presentados en este trabajo utilizan un resto oxazol como linker de ambos farmacóforos. Estos restos oxazólicos suelen aparecer en varios productos naturales activos y resultan estar biogenéticamente relacionados con restos aminoacídicos. Por otro lado, la quiralidad es un atributo fundamental de la

naturaleza que determina por ejemplo la unión selectiva de macromoléculas biológicas quirales a los enantiómeros con configuración específica (Peng y Ding, 2017). Es por esto, que parte de este trabajo, se centra en la determinación de la estereoselectividad lograda en la obtención de intermediarios de los compuestos aquí mostrados. En este trabajo se presentan los resultados recientemente alcanzados, tanto químicos como biológicos, en el desarrollo de nuevos potenciales fármacos antihelmínticos, con estructura general (**2 y 3 Figura 2**). El diseño molecular de los mismos es el resultado de la utilización de una combinación de técnicas, que incluyen, además de la hibridación, el diseño basado en fragmentos y la síntesis orientada a la diversidad (Hajduk, 2011). Los diferentes fragmentos utilizados, fueron seleccionados a partir de productos naturales activos de origen marino con demostrada actividad antihelmíntica (Nakao, et al., 2008). Así como también, de restos bencimidazólicos de antihelmínticos sintéticos conocidos. En la construcción de estas nuevas moléculas, se utilizaron secuencias sintéticas basadas en reacciones de acoplamiento de los diferentes fragmentos seleccionados, aplicando técnicas de amidación, ciclodeshidratación, y oxidación. La actividad antihelmíntica in vitro de los compuestos fue determinada

en diferentes estadios del ciclo de vida de *H. contortus* (cepa Kirby farmacológicamente susceptible, McMaster), utilizando el test de eclosión de huevos (EHA) y el ensayo de motilidad sobre el parásito en estado adulto (Munguía, et al., 2015).

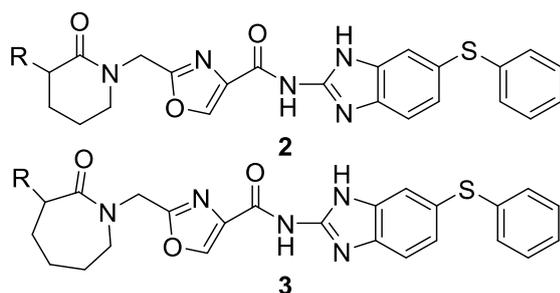


Figura 2

Objetivos

Este trabajo tuvo como objetivos el estudio la influencia en la actividad biológica del resto 2-amino-lactámico en antihelmínticos con estructura híbrida lactama-bencimidazol para lo que se sintetizaron dos series, 2-amino-valerolactama y 2-amino-caprolactama, de estructura general (**2** y **3**) y el estudio de la estereoselectividad lograda en la obtención de los mismos, utilizando diferentes métodos de RMN y HPLC quiral.

Materiales y Métodos

Las estructuras de todos los compuestos sintetizados en este trabajo fueron elucidadas por técnicas de Resonancia

Magnética Nuclear (RMN) espectroscopía de infrarrojo (IR) y espectroscopia de Masas (MS). Los espectros de RMN (^1H y ^{13}C) fueron realizados en un equipo Bruker Avance DPX 400. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) y son relativos al estándar interno TMS. Las constantes de acoplamiento (valores J) se informan en Hertz (Hz). Las siguientes abreviaciones se utilizan para indicar la multiplicidad de las señales del RMN: s, singulete; d, doblete; t, triplete; q, cuarteto; dd, doble doblete; m, multiplete; brs, señal ancha. Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro infrarrojo Shimadzu, IR-Prestige 21, colocando el producto en pastillas de KBr. Las frecuencias en las que aparecen las bandas de absorción se expresan en cm^{-1} . Los espectros de MS de baja resolución se realizaron en un equipo Shimadzu QP 1100-EX por inyección directa y fragmentación por impacto electrónico (EI) a 20 eV. Los compuestos derivados de la 2-amino- δ -valerolactama y 2-amino- ϵ -caprolactama fueron analizados por HPLC en fase reversa y HPLC quiral, para la determinación de la relación enantiomérica, en colaboración con el QF Ramiro Teixeira. Para la determinación de relaciones enantoméricas se utilizó un equipo de HPLC Waters con bomba binaria Waters 1525 y detector de arreglo de fotodiodos Waters 2996. La columna

de fase reversa utilizada fue Zorbax Eclipse XBD, Agilent, 4.6 mm x 150 mm, 5 μ m. La columna quiral utilizada fue Daicel, Chiralcel OD 4.6 mm x 250 mm, 5 μ m.

Los compuestos (**4** y **5** esquema 1 Anexo A) fueron obtenidos a través de una reacción de ciclodeshidratación del aminoácido *L*-ornitina o *L*-lisina respectivamente, el cual fue utilizado previamente por nuestro grupo (Gordon, et al., 1997). Esta metodología desarrollada por Bladé-Font utiliza alúmina básica como agente de ciclodeshidratación en tolueno a reflujo, utilizando una trampa de Dean Stark (Bladé-Font, 1980). Con la misma se obtiene la 2-amino- δ -valerolactama y 2-amino- ϵ -caprolactama las cuales se las hace reaccionar con (Boc)₂O para obtener los compuestos **4a** y **5a**. Posteriormente estos compuestos se alquilan en el nitrógeno 6 o 7 (según el caso), para esto, se utiliza hidruro de sodio como base en tetrahidrofurano, dando lugar al anión correspondiente, alquilado por tratamiento con bromoacetato de etilo, éstos son tratados con KOH en una mezcla EtOH/H₂O (5:1) para obtener los compuestos **6a** y **7a** (esquema 1, Anexo A) Se sigue la síntesis de los distintos derivados como puede verse en los esquemas 2 y 3 (Anexo A) estas en su gran mayoría son reacciones de acoplamiento utilizando la metodología

general de formación de amidas descrita en la tesis doctoral de Marcelo Incerti (Incerti, 2006). Por otra parte la formación del resto oxazólico se lleva a cabo por medio de una ciclodeshidratación de β -hidroxi amidas con Deoxo-Fluor en CH₂Cl₂ a -20 °C con posterior oxidación con BrCCl₃ según lo descrito por Phillips (Phillips, Uto, Wipf, Reno y Williams, 2000). Se detalla a continuación la síntesis y espectroscopia de los compuestos **21**, **22** y **24**, (esquemas 2 y 3, Anexo A) los cuales resultaron ser los más activos.

tert-butyl((S)-1-oxo-1-(((S)-2-oxo-1-((4-((6-phenylthio)-1H-benzo[δ]imidazol-2-yl)carbamoyl)oxazol-2-yl)methyl)azepan-3-yl)amino)-3-phenylpropan-2-yl)carbamate (**21**): A una solución de **20a** (200 mg, 0.4 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (10 mL) a 0 °C, bajo atmósfera de N₂, se agrega DIPEA (100 μ L, 0.60 mmol), DMAP (10 mg, 0.08 mmol) y Amino-Febendazol (96.50 mg, 0.40 mmol). Luego de agitar 30 minutos a 0 °C se adiciona EDCI (115.0 mg, 0.60 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 horas, controlando el avance de la reacción por TLC (AcOEt). Una vez finalizada la reacción se agrega HCl 5% hasta llegar a pH 4 aproximadamente y se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL), se juntan las capas orgánicas y se concentra a presión reducida. Se obtiene un aceite amarillento que es purificado por columna de sílica gel

utilizando AcOEt:MeOH al 5%. Se obtiene **21** (550mg, 76 %) como un sólido amorfo blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1.37 (brs, 11H), 1.79 (m, 2H), 1.92 (m, 1H), 2.03 (d, $J=12.8$ Hz, 1H), 3.08 (m, 2H), 3.25 (m, 1H) 3.56 (m, 1H), 4.49 (m, 1H), 4.71 (m, 3H), 5.18 (m, 1H), 7.20 (m, 11H), 7.33 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J=6.0$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 8.36 (s, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 27.2, 27.7, 28.4, 31.6, 38.6, 45.0, 49.5, 52.6, 55.6, 80.2, 126.3, 126.9, 127.4, 127.9, 128.6, 129.0, 129.1 129.5, 135.3, 136.6, 138.2, 143.8, 147.3, 155.4, 160.2, 160.7, 170.6, 173.2. MS (LRMS-ID-EI) (20 eV), m/z (I_{rel}); calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{41}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}$ (M^+) 723.28, encontrado 723.20 (0.2); calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_4$ 414.23, encontrado 414.15 (2); calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ 350.08, encontrado 350.10 (2); calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ 308.33, encontrado 308.10 (100); calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ 335.06, encontrado 335.10 (4); calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}$ 241.07, encontrado 241.05 (46); calculado para C_7H_9 91.05, encontrado 91.05 (4). IR (ν_{max} , KBr) cm^{-1} : 3356, 2926, 1651, 1560, 1483, 1440, 1167, 1107, 1051, 815, 741, 698, 621.

2-(((S)-3-((S)-2-(3,3-dimethylbutanamido)-3-phenylpropanamido)-2-oxozepan-1-yl)methyl)-N-(6-(phenylthio)-1H-benzo[δ]imidazol-2-yl)oxazole-4-carboxamide (**22**): Se agrega a un balón de una boca 300 mg de **21** y 15 mL de

HCl/Dioxano 2.5 M. Se sigue el avance de la reacción por TLC (AcOEt/MeOH al 5%) y cuando se observa que se ha completado la reacción, 30 minutos aproximadamente, se destila el dioxano a presión reducida. La sal así formada se lava tres veces con 10mL de AcOEt. Se obtiene (290 mg, 97%) de un sólido amarillento. A una solución de este sólido (100 mg, 0.15 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (10 mL) a 0 °C, bajo atmósfera de N_2 , se agrega DIPEA (66.0 μL , 0.38 mmol), DMAP (3.7 mg, 0.03 mmol) y ácido 3,3-dimetilbutírico (20.0 μL , 0.15 mmol). Luego de agitar 30 minutos a 0 °C se adiciona EDCI (43.5 mg, 0.23 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 horas, controlando el avance de la reacción por TLC(AcOEt), una vez finalizada la reacción, se agrega HCl 5% hasta llegar a pH 4 aproximadamente y se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL), se juntan las capas orgánicas se secan con Na_2SO_4 y se concentra a vacío. Se obtiene un aceite amarillento que es purificado por columna de sílica gel utilizando AcOEt como fase móvil. Se obtiene **22** (84mg, 77 %) como un sólido amorfo blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 0.91 (s, 9H), 1.29 (m, 1H), 1.45 (dd, $J=23.2$ Hz, $J=11.2$ Hz, 1H), 1.79 (m, 2H), 1.95 (m, 1H), 2.04 (m, 3H) 3.08 (m, 2H), 3.30 (dd, $J=15.2$ Hz, $J=3.9$ Hz, 1H), 3.59 (m, 1H), 4.61 (m, 2H), 4.75 (d, $J=16.1$ Hz, 1H), 4.83 (dd, $J=14.1$ Hz, $J=7.7$ Hz,

1H) 6.11 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.16 (m, 5H), 7.23 (m, 7H), 7.34 (dd, $J=8.3$ Hz, $J=1.5$ Hz, 2H), 7.47 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 8.40 (s, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 27.3, 27.7, 29.8, 31.0, 31.5, 38.4, 45.1, 49.6, 50.4, 52.7, 54.1, 126.4, 127.0, 127.9, 128.0, 128.7, 129.1, 129.2, 129.3, 135.2, 136.6, 138.0, 143.9, 147.2, 160.2, 160.8, 170.5, 171.8, 173.1. MS (LRMS-ID-EI) (20 eV), m/z (I_{rel}); calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}$ (M) $^+$ 721.87, encontrado 721.20 (4); calculado para [M-33dimetilbutanal] 622.22, encontrado 622.10 (3); calculado para [M-3-3-dimetilbutanamida] 607.21, encontrado 607.10 (1); calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$ 503.15, encontrado 503.10 (3); calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}$ 475.16, encontrado 475.10 (8); calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$ 461.15, encontrado 461.05 (5); calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_3$ 387.25, encontrado 387.20 (30); calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ 349.08, encontrado 349.00 (100), calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ 309.06, encontrado 309.05 (11); calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}$ 241.07, encontrado 241.00 (28); calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}$ 218.15, encontrado 218.05 (9); encontrado para $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ 168.09, encontrado 168.05 (23); calculado para C_7H_9 91.05, encontrado 91.05 (57); calculado para C_4H_9 57.07, encontrado 57.05 (16). IR (ν_{max} , KBr) cm^{-1} : 3356, 2949, 1649, 1560, 1485, 1437, 1107, 1024, 873, 745, 698, 667.

tert-butyl((S)-3-(4-(benzyloxy)phenyl)-1-oxo-1-(((S)-2-oxo-1-((4-((6-(phenylthio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamoyl)oxazol-2-yl)methyl)azepan-3-yl)amino)propan-2-yl)carbamate (24): A una solución de **20b** (240 mg, 0.40 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (10 mL) a 0 °C, bajo atmósfera de N_2 , se agrega DIPEA (110 μL , 0.60 mmol), DMAP (15 mg, 0.12 mmol) y Amino-Febendazol (97 mg, 0.40 mmol). Luego de agitar 30 minutos a 0 °C se adiciona EDCI (115 mg, 0.60 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 horas, controlando el avance de la reacción por TLC (AcOEt:MeOH al 5%), una vez finalizada la reacción se agrega HCl 5% hasta llegar a pH 4 aproximadamente y se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL), se juntan las capas orgánicas se secan con Na_2SO_4 y se concentra a vacío. Se obtiene un aceite amarillento que es purificado por columna de sílica gel utilizando AcOEt:MeOH al 5% como fase móvil. Se obtiene **24** (51mg, 15 %) como un sólido amorfo blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1.28 (m, 1H), 1.38 (brs, 10H), 1.82 (dd, $J=27.3$ Hz, $J=13.3$ Hz, 2H), 1.94 (m, 1H), 2.03 (d, $J=13.3$ Hz, 1H), 3.02 (d, $J=5.7$ Hz, 2H), 3.27 (dd, $J=15.2$ Hz, $J=3.9$ Hz, 1H), 3.58 (m, 1H), 4.41 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 4.47-4.84 (m, 3H), 4.99 (s, 2H), 5.13 (d, $J=6.9$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.08 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.16 (m, 1H), 7.23 (m, 5H), 7.28-7.42 (m, 8H), 7.47 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 8.34 (s,

1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 27.3, 27.7, 28.4, 31.6, 37.8, 45.0, 49.5, 52.6, 55.7, 70.1, 80.2, 115.0, 126.3, 127.6, 128.0, 128.1, 128.7, 128.9, 129.1, 130.5, 135.2, 137.1, 138.1, 143.8, 147.2, 155.5, 157.9, 160.1, 160.8, 170.7, 173.3. MS (LRMS-ID-EI) (20 eV), m/z (I_{rel}); calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ 365.19, encontrado 365.15 (14); calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ 355.18, encontrado 355.10 (3); calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ 309.06, encontrado 309.20 (1); calculado para $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4$ 226.08, encontrado 226.10 (5); calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}$ 241.07, encontrado 241.05 (46); calculado para $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$ 129.08, encontrado 129.10 (23); calculado para calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}$ 197.10, encontrado 197.05 (10); calculado para C_7H_7 91.05, encontrado 91.05 (20); calculado para C_4H_8 56.06, encontrado 56.10 (100). IR (ν_{max} , KBr) cm^{-1} : 3379, 2931, 1654, 1562, 1508, 1490, 1440, 1170, 1111, 1024, 846, 742, 696, 669.

Resultados y Discusión

Para la preparación de los derivados de **2** y **3** se utilizaron similares metodologías sintéticas. En ambos casos se utilizó como material de partida derivados acídicos de la 2-Boc- δ -valerolactama **6** y de la 2-Boc- ϵ -caprolactama **7**.

La síntesis de **4** y **5** se llevó a cabo mediante dos diferentes metodologías sintéticas (llamadas A y B Esquema 1, Anexo A). En el método **A** la *L*-ornitina y la *L*-lisina (según el caso), se disuelven en

tolueno en presencia de trietilamina y alúmina, la suspensión se refluja durante 24 horas (Bladé-Font, 1980). Luego se procede a la protección del grupo amino con Boc_2O para obtener el compuesto **4a** y **5a** (esquema 1, Anexo A) respectivamente, posteriormente se realiza la N-alkilación con bromoacetato de etilo seguido de la hidrólisis del éster para la obtención de los ácidos **6** y **7**. El método **B** solo difiere del método **A** en la primera reacción, donde la *L*-lisina se suspende en xileno, se agrega hexametildisilazano y clorotrimetilsilano dejando la mezcla refluja por 48 horas, luego de esto se enfría y se agrega EtOH, se destila a vacío y el residuo se toma en cloroformo. La mezcla se filtra por celite y el filtrado se concentra a vacío (Pellegata, Pinza y Pifferi, 1978). Para el caso de la *L*-ornitina se suspende en metanol, se agrega el TMSCl y refluja por 3 horas, se adiciona trietilamina y se lo deja refluja por 3 horas más. Cuando se ha completado la reacción, se destila el disolvente a vacío (Mendina, 2009). Bladé-Font reportan que la síntesis de 2- δ -valerolactama y 2- ϵ -caprolactama a través del método **A** conduce a la racemización del aminoácido, la cual es muy dependiente del tiempo de reacción (Bladé-Font, 1980). Esto también fue comprobado por parte del equipo de Química Farmacéutica en la Tesis de Doctoral de Pablo Mendina (Mendina,

2009). Por otra parte Pellegata y colaboradores reportan una mejora en la síntesis γ -, δ -, y ϵ -lactamas, mediante un procedimiento de un paso que ofrece muchas ventajas sobre los métodos de síntesis anteriores. Con éste procedimiento se logra estereoselectividad, a lo que se suma la ventaja de llevarse a cabo en condiciones suaves, con un work-up sencillo y altos rendimientos (Pellegata, et al., 1978). Basándonos en estos antecedentes se decide realizar la síntesis de los compuestos **6** y **7** por ambos métodos, con el fin de comparar los mismos.

Una vez obtenidos los compuestos **6** y **7**, (como se muestra en los esquemas 1 y 2, Anexo A) se comparan y analizan por RMN, HPLC en fase reversa y HPLC con columna quiral. La fase reversa se utilizó con el fin de estimar la pureza de los compuestos obtenidos, para evitar errores por impurezas al momento de estudiar los casos por HPLC quiral (**tabla 1**, Anexo B). Con respecto a los derivados de 2- δ -valerolactama, el compuesto **4a** obtenido por el método **A** muestra dos picos con un porcentaje de área de 44% y 56%, lo cual reafirma lo descrito en literatura, y previamente comprobado por nuestro grupo. Cuando a este producto se lo alquila para obtener el compuesto **8a** se observa dos picos con 49% y 51%, lo cual es razonable ya que partimos de una mezcla racémica. Cuando se observan

ambos compuestos **4b** y **8b** obtenidos por el método **B**, nos encontramos con que para el caso de **4b** se encuentran dos picos con porcentajes de áreas de 10% y 90%. La estereoselectividad lograda concuerda con lo reportado por Pellegata y colaboradores. En el caso del compuesto **8b** se obtiene una relación enantiomérica de 72% y 28%. Evidentemente en la reacción de alquilación se está produciendo una racemización en nuestro centro quiral, ya que el porcentaje de áreas correspondientes a los dos enantiómeros del compuesto **4b** pasa de 90/10 a 72/28 en **8b**.

Con respecto a los derivados de la 2- ϵ -caprolactama, podemos ver en la **tabla 1** que el compuesto **5a** obtenido por el método **A**, tiene una relación de porcentajes de áreas de los dos picos de 80% y 20%, mientras que el mismo compuesto **5b** obtenido por el método **B** presenta una relación de 87% y 13%. Como era de esperar en éste último método se obtiene una mejora en la relación enantiomérica para el compuesto **5**. También se puede observar que en las reacciones siguientes (alquilación, acoplamiento y ciclodeshidratación con posterior oxidación), para la formación de los compuestos **9** y **10** se mantiene la relación enantiomérica, lo cual no sucedía en los derivados de las 2- δ -valerolactama. Por lo tanto en cuanto a la síntesis de los

intermediarios **6** y **7** realizados por los métodos A y B se puede observar que el método **A** produce la racemización al sintetizar 2-Boc- δ -valerolactama (compuesto **4**) pero no así en el caso de la 2-Boc- ϵ -caprolactama (compuesto **5**). Esto nos hace pensar que el anillo de 7 miembros es más estable en las condiciones de reacción que el anillo de 6 miembros, ya que se parte, en ambos casos, de aminoácidos enantioméricamente puros. Esta estabilidad puede deberse a aspectos conformacionales que hace que el protón del carbono quiral esté menos accesible en el anillo de 7 miembros que en el de 6 miembros, haciéndolo más resistente a la racemización. Ésta hipótesis también es reafirmada con los resultados obtenidos de las reacciones posteriores que sufren los compuestos **4** y **5**, ya que los mismos son sometidos a bases fuertes tales como el NaH y KOH. En este caso los compuestos derivados de **5** (compuestos **9** y **10**) no presentan variación en la relación enantiomérica mientras que el derivado de **4** (compuesto **8**) sí la presenta.

Los derivados híbridos 2-amino- δ -valerolactama-febendazol fueron sintetizados como se describe en el **esquema 2** (Anexo A). Se utilizó el compuesto **6** como material de partida. El resto oxazólico fue obtenido utilizando una secuencia de amidación (L-Ser-OMe),

ciclodeshidratación, oxidación y por último hidrólisis del éster correspondiente. El acoplamiento del ácido **12** con el resto aminobencimidazólico **13**, utilizando los agentes acoplantes indicados conduce al compuesto **14** con un rendimiento del 92%. A partir de este último se obtienen los compuestos **15** y **16**, en las condiciones mostradas en el esquema, con rendimientos de 83% y 76%.

Por otro lado los compuestos derivados de la 2- ϵ -caprolactama-febendazol siguieron una ruta de síntesis similar a la anterior, como se describe en el **esquema 3** (Anexo A). Se utilizó el compuesto **7** como material de partida. Para obtener el resto oxazólico se sigue la misma secuencia sintética descrita en el esquema anterior, amidación (L-Ser-OMe), ciclodeshidratación, y posterior oxidación. En este caso no se realiza la hidrólisis ya que el compuesto **18** así obtenido se lo hace reaccionar con HCl/Dioxano, para posteriormente acoplarlo con, Boc-L-Phe-OH o Boc-L-Tyr(Bzl)-OH. De esta forma se obtienen las dos series de derivados (**19a** y **19b** respectivamente). Posteriormente, ambas series son sometidas a las mismas secuencias de reacciones. Una vez obtenida las estructuras **19** se acoplan al compuesto **13** con HBTU como agente acoplante y el resto de los reactivos indicados en el esquema. Luego de esto, se realizan modificaciones sobre R₂, donde se hacen

nuevos acoplamientos con ácido mirístico y ácido 3,3-dimetilbutírico obteniéndose los productos (**20 – 23**). El rendimiento de estos últimos pasos sintéticos (**20, 21, 22**) están en el orden del 77% de rendimiento mientras que en el caso del producto **23** tan solo pudo obtenerse un 15%.

La actividad antihelmíntica *in vitro* de los compuestos fue determinada en diferentes estadios del ciclo de vida de *H. contortus* (cepa Kirby farmacológicamente susceptible, McMaster), utilizando el test de eclosión de huevos (EHA) y el ensayo de motilidad sobre el parásito en estadio adulto (Mungía, et al., 2015). Muchos de los nuevos compuestos sintetizados presentaron una interesante actividad antihelmíntica contra *H. contortus* en estado adulto, en los ensayos biológicos utilizados, (ver **Tabla 2**). El score de índice de motilidad es de 0 a 3, siendo 0 el puntaje máximo de toxicidad, se considera de interés aquellos compuestos que presentan índices menor o igual a 1.5 ± 0.2 . En el caso del ensayo de eclosión de huevos presentan una actividad ovicida interesante aquellos compuestos cuyo porcentaje de eclosión de huevos es menor o igual al 50%.

Se destacan los compuestos **20, 21 y 23** los cuales presentan las mayores actividades frente al estadio adulto, sin embargo no presentan actividades ovicidas de interés. Se puede apreciar en la tabla que los derivados de la 2-amino- ϵ -

caprolactama presentan en general mejores actividades que los derivados de 2-amino- δ -valerolactama. Al mismo tiempo se puede destacar que los compuestos que presentan mayores actividades, contienen el resto aminoacídico de la fenilalanina o la bencil-tirosina, ambas, con su grupo amino protegido ya sea con Boc o acoplado con un grupo voluminoso como el ácido 3,3-dimetilbutírico.

Tabla 2. Actividad antihelmíntica contra *H. contortus*

Compuesto número	EHA (25 $\mu\text{g/ml}$) % de eclosión de huevos (media \pm SD)	Ensayo de motilidad en adulto (10 $\mu\text{g/ml}$) índice de motilidad (media \pm SD)
14	80.4 \pm 8.0	1.7 \pm 0.5
15	90.2 \pm 2.6	1.6 \pm 0.5
16	48.8 \pm 7.4	2.5 \pm 0.5
20	76.6 \pm 5.0	1.0 \pm 0.0
21	84.1 \pm 7.6	1.0 \pm 0.0
22	87.1 \pm 5.5	1.7 \pm 0.5
23	91.2 \pm 3.8	1.0 \pm 0.0

*Control positivo Albendazol: 0% para EHA a 25 $\mu\text{g/ml}$. 0.7 ± 0.5 a 10 $\mu\text{g/ml}$ para motilidad en adultos.

Conclusiones

En el presente trabajo se sintetizaron siete nuevos derivados con estructura general **2** y **3** los cuales se enumeran en la **Tabla 2.**, utilizando las secuencias sintéticas mostradas en los esquemas 1 y 2 con moderados y buenos rendimientos. Los mismos fueron evaluados biológicamente

frente a las diferentes etapas del ciclo de vida del nematodo parásito *H. contortus*, mostrando una interesante actividad antihelmíntica contra el estadio adulto. Se observa que los derivados de la serie de 2-amino- ϵ -caprolactama presentan mayores actividades en los ensayos realizados en comparación a la serie de derivados de 2-amino- δ -valerolactama, fundamentalmente los compuestos **20**, **21** y **23**, no así en el ensayo de eclosión de huevos donde ningún compuesto presenta una actividad interesante. También es importante destacar que los compuestos de mayor actividad son aquellos que presentan el resto aminoacídico protegido con Boc o acoplado al ácido 3,3-dimetilbutírico. Esto nos alienta a continuar trabajando en la farmacomodulación de los mismos en la búsqueda de mayores actividades biológicas de estas series de compuestos. En cuanto a la síntesis de los intermediarios **6** y **7** realizados por los métodos **A** y **B** se puede observar que el método **A** produce la racemización al sintetizar 2-Boc- δ -valerolactama (compuesto **4**) pero no así en el caso de la 2-Boc- ϵ -caprolactama (compuesto **5**) en los tiempos de reacción ensayados. También se puede observar que la caprolactama es más resistente a la racemización que la valerolactama ya que al someterla a bases fuertes como el NaH, no cambia la relación enantiomérica

obtenida en la ciclodeshidratación de la lisina, lo cual no sucede para la valerolactama, donde se aprecia una disminución en la pureza enantiomérica.

Bibliografía

- Bladé-Font A., (1980). Facile synthesis of γ -, δ -, and ϵ -lactams by cyclodehydration of ω -amino acids on alumina or silica gel. *Tetrahedron Letters*, 21, 2443-2446.
- Gordon, S. (1998) *Nuevos antihelmínticos derivados de la 2-aminovalerolactama. Síntesis y evaluación biológica*. (Tesis doctoral) Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
- Gordon, S., Costa, L., Incerti, M., Manta, E., Saldaña, J., Domínguez, L., Mariezcurrena, R., Suescum, L. (1997) Synthesis and in vitro anthelmintic activity against *Nippostrongylus brasiliensis* of new 2-amino-4-hydroxy- δ -valerolactam derivatives. *II Farmaco* 52, 603-608.
- Hajduk, P.J., (2011). A question of library desing. *Nature*, 470, 42-43. Y (Galloway, W.R.J.D., Isidro-Llobet A., y Spring D.R.) Diversity-oriented synthesis as a tool for the discovery of novel biologically active small molecules. *Nature Communications*, 1, 80.

- Incerti, M., (2006) *Síntesis, elucidación estructural y actividad biológica de análogos a dominios parciales de Phorboxazoles*. (Tesis doctoral), Facultad de Química, Udelar, Montevideo, Uruguay.
- Karagöz, A.Ç., Reiter, C., Seo, E., Gruber, L., Hahn, F., Leidenberger, M.,... Tsogoeva, S.B. (2018). Access to new highly potent antileukemia, antiviral and antimalarial agents via hybridization of natural products (homo)egonol, thymoquinone and artemisinin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(12), 3610-3618.
- Mendina, P., (2009). *Optimización de nuevos agentes antihelmínticos para su eventual uso en quimioterapia*. (Tesis doctoral) Facultad de Química, Udelar, Montevideo, Uruguay.
- Munguía, B., Michelena M., Melian E., Saldaña J., Ures X., Manta E., Domínguez, L. (2015). Development of novel valerolactam-benzimidazole hybrids anthelmintic derivatives: Diffusion and biotransformation studies in helminth parasites. *Experimental Parasitology*, 153, 75-80.
- Nakao, y., Kawatsu, S., Okamoto, C., Okamoto, M., Matsumoto, Y., Matsunaga, S., van Soest, R.W.M. and Fusetani, N. (2008) Ciliatamides A-C, Bioactive Lipopeptides from the Deep-Sea Sponge *Aaptos ciliate*. *Journal of Natural Products*, 71, 469-472.
- Neiuwhoff, G., Bishop, S.C. (2005). Costs of the major endemic diseases of sheep in Great Britain and the potential benefits of reduction in disease impact, *Animal Science*, 81, 23-29.
- Mendina, P., Munguía, B., Espinosa, R., Saldaña, J., Domínguez L., y Manta, E. (2014). Patente N° 14.424. Montevideo, Uruguay.
- Pellegata R., Pinza, M., Pifferi, G., (1978). An Improved Synthesis of γ -, δ -, ϵ -lactams. *Synthesis*, 8, 614-616.
- Peng, W., y Ding, F. (2017). Enantioselective recognition of isomeric ligand by biomolecule: Mechanistic insights from static, dynamic enantiomeric behavior and structural flexibility. *Molecular BioSystems*, 13(11), 2226-2234.
- Phillips, A.J., Uto, Y., Wipf, P., Reno M.J., and Williams DR. (2000). Synthesis of Functionalized Oxazolines and Oxazoles with DAST and Deoxo-Fluor. *Organic Letters*, 2(8), 1165-1168.
- Woods, D.J., Vaillancourt, V.A., Wendt, J.A., y Meeus, P.F. (2011). Discovery and development of veterinary antiparasitic drugs: past,

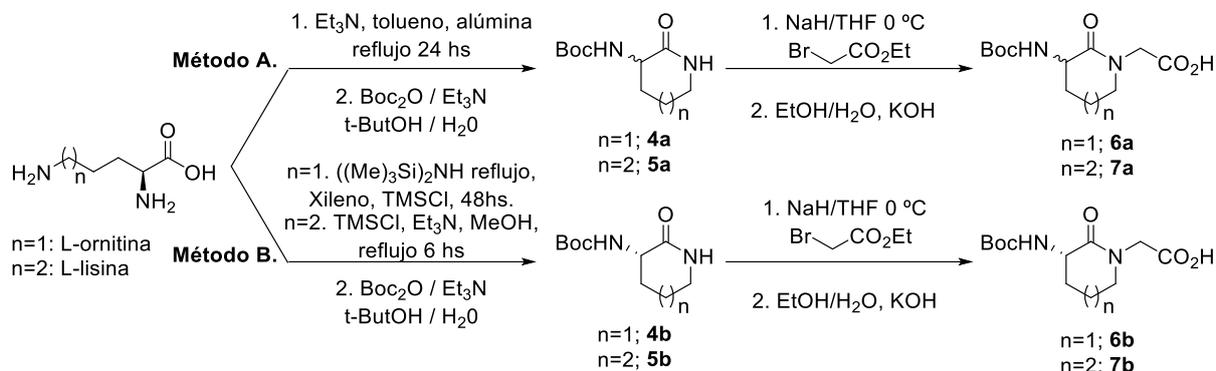
present and future. *Future Med. Chem.*, 3, 887-896.

Agradecimientos

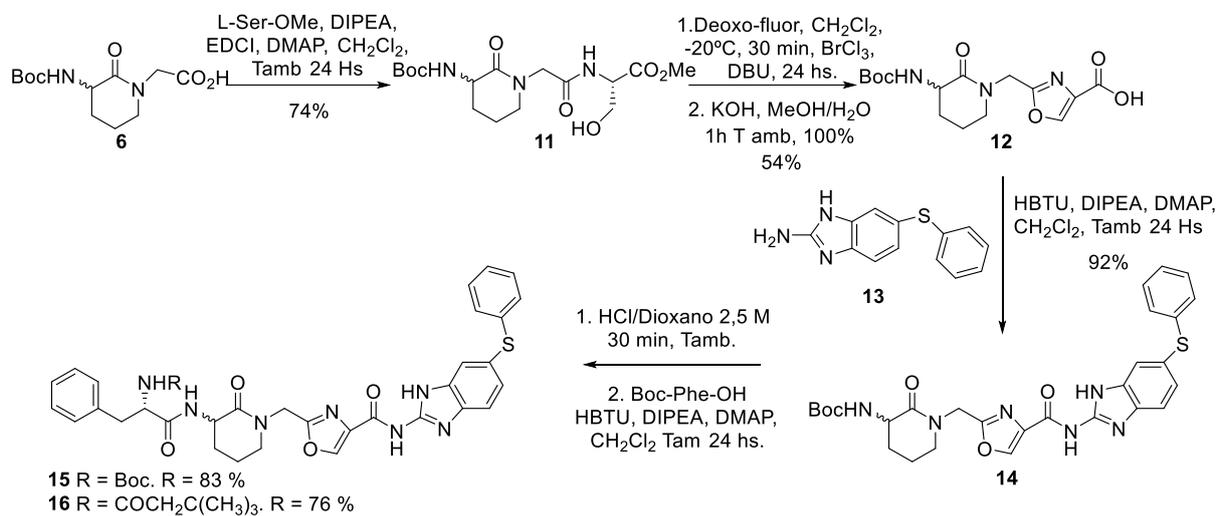
Prof. L. Domínguez y su grupo de Farmacología-LEA FQ por realizar los bioensayos; y a Innovagro-ANII, CSIC.

Anexo A

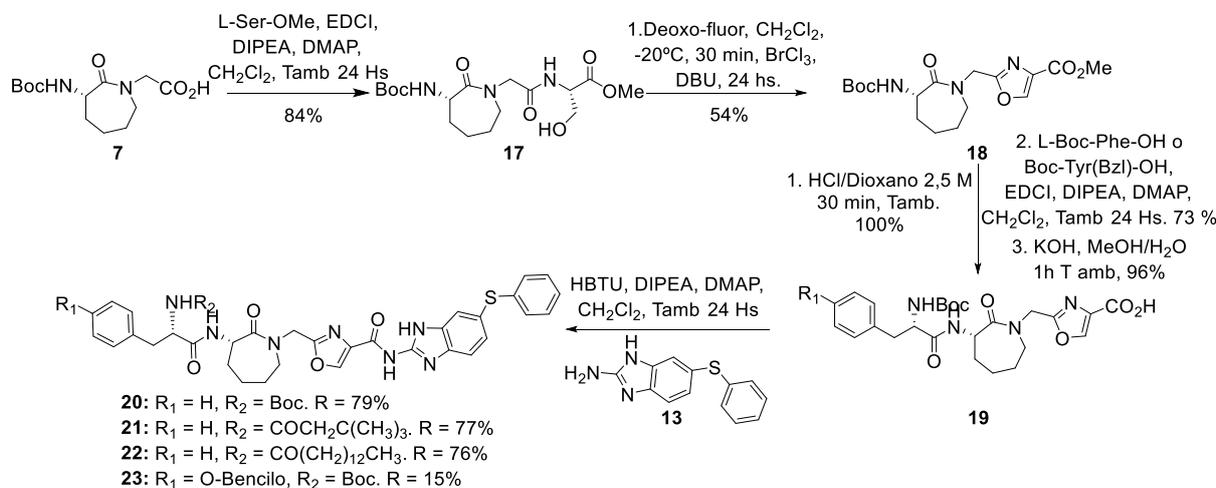
Esquema 1. Obtención de los compuestos 4 y 5 a través de los métodos A y B mencionados en el texto.



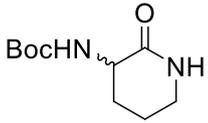
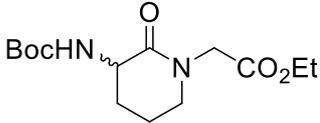
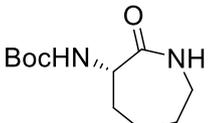
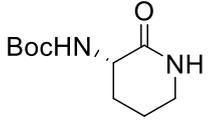
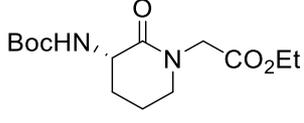
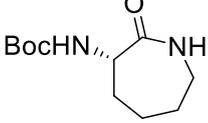
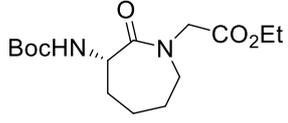
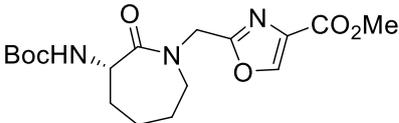
Esquema 2. Obtención de los compuestos 14, 15 y 16



Esquema 3. Obtención de los compuestos 20 a 23



Anexo B
Tabla 1. Se muestran los resultados obtenidos en el análisis por HPLC quiral de algunos de los intermediarios de síntesis de los híbridos lactama-bencimidazol

Método	Producto	t _R	% Área
A	 4a	8,541	44,14
		9,641	55,86
	 8a	7,665	48,92
		10,793	51,08
	 5a	5,688	79,57
		6,066	20,43
B	 4b	8,565	10,32
		9,630	89,68
	 8b	7,671	28,02
		10,764	71,98
	 5b	5,719	86,59
		6,131	13,41
	 9b	6,091	12,01
		6,643	87,99
	 10b	19,551	12,90
		22,123	87,10