



Universitat de Girona

SÍNTESI DE NUCLEOPÈPTIDS EN FASE SÒLIDA, I DE DERIVATS DE PANTOCINA B

Francesc Xavier MEJIAS RUIZ

ISBN: 978-84-693-6126-9

Dipòsit legal: GI-I033-2010

<http://www.tesisenxarxa.net/TDX-081110-092539/>

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UdG

Departament de Química

Universitat de Girona

FACULTAT DE CIÈNCIES

**SÍNTESI DE NUCLEOPÈPTIDS EN FASE SÒLIDA,
I DE DERIVATS DE PANTOCINA B**

Francesc Xavier Mejias Ruiz

TESI DOCTORAL

**SÍNTESI DE NUCLEOPÈPTIDS EN FASE
SÒLIDA I DE DERIVATS DE PANTOCINA B**

Memòria presentada per a aspirar al grau de
Doctor en Ciències (Secció Química) dins el
Programa de 3r. Cicle de Ciències: Química
i Física dels Àtoms, les Biomolècules i els
Materials del Departament de Química de la
Facultat de Ciències de la Universitat de Girona
presentat per Francesc Xavier Mejias Ruiz

Vist-i-plau del director,

Dr. Eduard Bardají i Rodríguez

Prof. Titular de Química Orgànica

Universitat de Girona

Girona, 2007.

ÍNDEX

SÍNTESI DE NUCLEOPÈPTIDS EN FASE SÒLIDA I DE DERIVATS DE PANTOCINA B	ii
I. ABREVIATURES	vii
II. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	1
III. CAPÍTOL 1. Síntesi de Fmoc-TEtβAla-OH (3) i l'aplicació a la síntesi d'oligòmers en fase sòlida	5
III.1. Introducció	7
III.1.1. PNAs: anàlegs d'oligonucleòtids	7
III.1.1.1. Estudis d'estructura-activitat dels PNAs	8
III.2. Síntesi d'àcids pèptid nucleics (PNAs) en fase sòlida.	22
III.3. Resultats i discussió	24
III.3.1.1. Síntesi de <i>N</i> -BOC-2-bromoetilamina (6).....	29
III.3.1.2. Síntesi de tosilat de <i>N</i> -BOC-2-aminoetil (7).	30
III.3.2. Síntesi de <i>N</i> ¹ -2-aminoetiltimina (5) per alquilació directe de la timina.	33
III.3.2.1. Alquilació amb 2-bromoetilamina.....	34
III.3.2.2. Alquilació amb <i>N</i> -BOC-2-bromoetilamina (6).....	36
III.3.2.3. Alquilació amb tosilat de <i>N</i> -BOC-2-aminoetil (7).	38
III.3.3. Síntesi de <i>N</i> ³ -benzoil- <i>N</i> ¹ -(<i>N</i> -BOC-2-aminoetil)-timina (14).....	40
III.3.3.1. Síntesi de <i>N</i> ³ -benzoiltimina (13)	40
III.3.3.2. Alquilació de <i>N</i> ³ -benzoiltimina (13) amb <i>N</i> -BOC-2-bromoetilamina (6).	42
III.3.4. Síntesi de nucleoaminoàcids de timina	44
III.3.4.1. Síntesi de Fmoc-TEtGly-OH (4) a partir de (14)	45
III.3.4.2. Síntesi de Fmoc-TEtGly-OH (4) a partir de (17).	46
III.3.4.3. Síntesi de Fmoc-TEtGly-OH (4) a partir de (5).	51
III.3.4.4. Síntesi de Fmoc-TEt β Ala-OH (3) a partir de (5)	57
III.3.5. Síntesi de nucleopèptids.....	60
III.3.5.1. Síntesi de H-TEt β Ala-TEt β Ala-Gly-NH ₂ (23).....	61
III.3.5.2. Síntesi de H-TEt β Ala-Gly-TEt β Ala-Gly-TEt β Ala-Gly-NH ₂ (25).....	61
III.3.5.3. Síntesi de H-TEt β Ala-TEt β Ala-TEt β Ala-TEt β Ala-TEt β Ala-TEt β Ala-NH ₂ (27).	63
IV. CAPÍTOL 2. Aplicació del grup tetracloroftaloïl a la síntesi d'àcids pèptid nucleics.....	65
IV.1. Introducció	67
IV.1.1. Estratègia de síntesi BOC/Z.....	67
IV.1.2. Estratègia de síntesi Fmoc/Bhoc.....	68
IV.1.3. Estratègia de síntesi TCP/Z	70
IV.2. Resultats i discussió.	72

IV.2.1. Protecció de monòmers de PNA amb el grup TCP utilitzant radiació microones.....	72
IV.2.2. Protecció de monòmers de PNA amb el grup TCP a reflux i a temperatura ambient.....	76
IV.2.3. Elucidació estructural dels monòmers de PNA TCP protegits	82
IV.2.4. Síntesi en fase sòlida de TCP-A(Z)-Gly-NH ₂ (33), de TCP-C(Z)-Gly-NH ₂ (34) i de TCP-C(Z)-T-Gly-NH ₂ (35)	93
V. CAPÍTOL 3. Síntesi de derivats de Pantocina B	99
V.1. La problemàtica del foc bacterià i el seu control a Espanya	101
V.2. Els pèptids antimicrobians com a possibles agents de control d'<i>E. amylovora</i>.....	103
V.2.1. Estudis de relació entre l'estructura química i l'activitat biològica de Pantocina B (36).....	104
V.3. Resultats i discussió.....	107
V.3.1. Síntesi de Pantocina B (36).....	108
V.3.2. Síntesi de nous anàlegs de Pantocina B (36).....	112
V.3.2.1. Protecció de l'àcid màlic amb el grup parametoxibenzil	114
V.3.2.2. Protecció amb el grup al·lil.....	117
V.3.2.3. Substitució del grup hidroxil de (<i>S</i>)-3-(al·liloxi)carbonil-2-hidroxipropanoat de <i>p</i> -metoxibenzil (62)	123
V.3.2.4. Monooxidació del (<i>R</i>)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de <i>p</i> -metoxibenzil (65)	131
V.3.2.5. Dioxidació del (<i>R</i>)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de <i>p</i> -metoxibenzil (65) i del (<i>R</i>)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de <i>p</i> -metoxibenzil (67).....	134
V.3.2.6. Eliminació del grup <i>p</i> -metoxibenzilic.....	137
VI. Conclusions	145
VII. Materials i mètodes.....	149
VII.1. Utilatge de laboratori.....	151
VII.2. Dissolvents i reactius.	151
VII.3. Mètodes analítics.	151
VII.3.1. Cromatografia en capa fina.	151
VII.3.2. Anàlisi qualitatiu de resines i peptidil-resines.....	151
VII.3.3. Anàlisi per HPLC en fase reversa.	153
VII.3.4. Anàlisi per ESI-MS.	153
VII.3.5. Anàlisi elemental.	154
VII.3.6. Espectroscòpia d'infraroig.	154

VII.3.7. Ressonància magnètica nuclear.....	154
VIII. PART EXPERIMENTAL	155
VIII.1. Capítol 1. Síntesi de nucleoaminoàcids de timina i aplicació en la síntesi d'oligòmers en fase sòlida.....	157
VIII.1.1. Síntesi dels reactius de partida per a la síntesi de l'intermedi N^l -2-aminoetiltimina (5)	157
VIII.1.1.1. Síntesi de N -BOC-2-bromoetilamina (6).....	157
VIII.1.1.2. Síntesi de tosilat de N -BOC-2-aminoetil (7)	158
VIII.1.2. Síntesi de N^l -(N -BOC-2-aminoetil)-timina (10) per alquilació de timina amb N -BOC-2-bromoetilamina (6).....	159
VIII.1.3. Síntesi de N^3 -benzoil- N^l -(N -BOC-2-aminoetil)-timina (14) per alquilació de la N^3 -benzoiltimina (13) amb N -BOC-2-bromoetilamina (6).	160
VIII.1.3.1. Obtenció de N^3 -benzoil-timina (13)	160
VIII.1.3.2. Obtenció de N^3 -benzoil- N^l -(N -BOC-2-aminoetil)-timina (14)	161
VIII.1.4. Síntesi de Fmoc-TETGly-OH (4) per alquilació de N^l -(2-aminoetil)- N^3 -benzoiltimina (17).....	162
VIII.1.4.1. Síntesi de N^l -2-aminoetil- N^3 -benzoiltimina (17) per desprotecció del grup BOC de N^3 -benzoil- N^l -(N -BOC-2-aminoetil)-timina (14).....	162
VIII.1.4.2. Alquilació de N^l -2-aminoetil- N^3 -benzoiltimina (17) amb cloroacetat d'etil	162
VIII.1.5. Síntesi de Fmoc-TETGly-OH (4) a partir de N^l -2-aminoetiltimina (5)	164
VIII.1.5.1. Síntesi de N^l -2-aminoetil-timina (5) per desprotecció conjunta del grup benzoil i del grup BOC de N^3 -benzoil- N^l -(N -BOC-2-aminoetil)-timina (14)	164
VIII.1.5.2. Alquilació amb àcid bromoacètic	164
VIII.1.5.3. Aminació reductiva amb àcid glicòlic.....	165
VIII.1.6. Síntesi de Fmoc-TET β Ala-OH (3) a partir de l'addició conjugada de N^l -2-aminoetiltimina (5) amb àcid acrílic	166
VIII.1.7. Procediment general de síntesi de nucleopèptids	167
VIII.1.7.1. Condicionament de la resina	167
VIII.1.7.2. Cicles d'acoblament	168
VIII.1.7.3. Cicles de desprotecció	168
VIII.1.7.4. Desancorament del pèptid	169
VIII.1.8. Síntesi de H-TET β Ala-TET β Ala-Gly-NH ₂ (23)	169
VIII.1.9. Síntesi de H-TET β Ala-Gly-TET β Ala-Gly-TET β Ala-Gly-NH ₂ (25)	170
VIII.1.10. Síntesi de H-TET β Ala-TET β Ala-TET β Ala-TET β Ala-TET β Ala-TET β Ala-NH ₂ (27).....	170
VIII.2. Capítol 2. Preparació de monòmers de PNA TCP protegits i aplicació a la síntesi d'oligòmers	171
VIII.2.1. Protecció fallida del monòmer de PNA d'adenina amb irradiació microones a 285 W	171
VIII.2.2. Protecció fallida del monòmer de PNA de citosina amb irradiació microones a 80 W	171
VIII.2.3. Protecció fallida del monòmer de PNA d'adenina a reflux	172

VIII.2.4. Procediment general de la protecció dels monòmers de PNA amb el grup TCP	172
VIII.2.5. Procediment per a la síntesi de PNAs en fase sòlida amb el grup TCP	174
VIII.3. Capítol 3. Prospecció de nous agents antimicrobians en el control del foc bacterià causat per <i>Erwinia amylovora</i>	177
VIII.3.1. Protecció de l'àcid màlic amb el grup <i>p</i> -metoxibenzil	177
VIII.3.2. Protecció de l'àcid (<i>S</i>)-3-(<i>p</i> -metoxibenziloxi)carbonil-3-hidroxipropanoic (59), de l'àcid (<i>Z</i>)-3-((<i>p</i> -metoxibenziloxi)carbonil)acrílic (60) i de l'àcid (<i>E</i>)-3-((<i>p</i> -metoxibenziloxi)carbonil)acrílic (61) amb el grup al·lil	178
VIII.3.3. Obtenció del (<i>S</i>)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de <i>p</i> -metoxibenzil (65)	180
VIII.3.4. Síntesi de (<i>R</i>)-3-al·liloxicarbonil-2-isobutilsulfanil-propanoat de <i>p</i> -metoxibenzil (66)	181
VIII.3.5. Síntesi de (<i>R</i>)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanil-propanoat de <i>p</i> -metoxibenzil (67)	182
VIII.3.6. Monooxidació del (<i>R</i>)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de <i>p</i> -metoxibenzil (65)	183
VIII.3.7. Dioxidació del (<i>R</i>)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de <i>p</i> -metoxibenzil (65) i del (<i>R</i>)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de <i>p</i> -metoxibenzil (67)	184
VIII.3.8. Procediment general d'eliminació del grup <i>p</i> -metoxibenzil	186
VIII.3.8.1. Síntesi de l'àcid (<i>Z</i>)-3-(al·liloxi)carbonilacrílic (58) a partir del (<i>Z</i>)-3-(al·liloxicarbonil)acrilat de <i>p</i> -metoxibenzil (63)	186
VIII.3.8.2. Síntesi de l'àcid (<i>R</i>)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoic (48) a partir del (<i>R</i>)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de <i>p</i> -metoxibenzil (65)	187
VIII.3.8.3. Síntesi de l'àcid (\pm)-3-(al·liloxi)carbonil-2-metilsulfonilpropanoic (50) a partir del (\pm)-3-(al·liloxi)carbonil-2-metilsulfonilpropanoat de <i>p</i> -metoxibenzil (70)	187
VIII.3.8.4. Síntesi de l'àcid (<i>R</i>)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoic (51) a partir del (<i>R</i>)-3-(al·liloxi)carbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de <i>p</i> -metoxibenzil (67)	188
IX. Índex de fórmules	189
X. Bibliografia	195

I. ABREVIATURES

I. Abreviatures

I. Abreviatures

ADN:	àcid desoxiribonucleic
AcOEt:	acetat d'etil
ARN:	àcid ribonucleic
B:	nucleobase (timina, adenina, citosina, guanina)
BOC:	<i>t</i> -butoxicarbonil
COSY:	<i>Correlated Spectroscopy</i>
DBU:	1.8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-è
diBOC	di- <i>terc</i> -butildicarbonat
DIEA:	diisopropiletilamina
Dissol:	dissolvent
DMF:	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMSO:	dimetilsulfòxid
ESI-MS:	espectrometria de masses amb ionització per electroesprai
FAB-MS:	espectrometria de masses per bombardeig amb àtoms ràpids
Fmoc:	9-fluorenilmetoxicarbonil
FmocOSu:	<i>N</i> -(9-fluorenilmetoxicarboniloxi)succinimida
GC:	cromatografia de gasos
HBTU:	hexafluorofosfat d'O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni
HPLC:	cromatografia líquida d'alta resolució
IRAA:	aminoàcid de referència interna
LC-MS:	cromatografia líquida amb detecció per espectrometria de masses
PAC:	àcid 4-hidroximetilfenoxiacètic
PAL:	àcid 5-(4-aminometil-3,5-dimetoxifenoxi)valèric
PEG-PS:	resina de poliestiré amb divinilbenzè modificada amb diamino-poliètilenglicol
p.f.:	punt de fusió
PIP:	piperidina
PNA:	<i>Peptide Nucleic Acid</i>
R.f.:	factor de retenció
¹ H-RMN:	ressonància magnètica nuclear de protó
¹³ C-RMN:	ressonància magnètica nuclear de carboni
Rdt:	rendiment

I. Abreviatures

t.a.:	temperatura ambient
TBAI:	iodur de tetrabutilamoni
TCP:	tetracloroftaloil
TEA:	trietilamina
Temp:	temperatura
TFA:	àcid trifluoroacètic
TLC:	cromatografia en capa prima
t_R :	temps de retenció
UV:	radiació electromagnètica de la regió ultraviolada

Per tal de poder descriure amb major simplicitat i comoditat els nucleopèptids sintetitzats s'ha utilitzat l'abreviació H-Tet β Ala-OH per designar la molècula *N*-[2-(timin-1-il)etil]- β -alanina i H-TetGly-OH per a la molècula *N*-[2-(timin-1-il)etil]-glicina.

II. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

II. Introducció i objectius

Els treballs realitzats en aquesta tesi doctoral estan organitzats en tres capítols i s'emmarquen en tres línies de recerca del grup LIPPSO. La primera està orientada a la síntesi de nous monòmers per a la preparació de nucleopèptids potencialment anàlegs de PNA. En la segona s'estudia l'aplicació del grup protector TCP com a grup protector temporal en la síntesi d'oligòmers de PNA. La tercera línia, vigent en el moment actual, està dirigida a l'estudi de nous antimicrobians d'aplicació contra patògens de plantes d'interès econòmic.

En concret el primer capítol està dedicat a l'estudi de la síntesi i protecció funcional amb els grups Fmoc o BOC d'un nou tipus de monòmer (Figura II.1) basat en l'estructura de β -alanina i que conté timina enllaçada a través d'una unió etil, així com a la seva aplicació a l'obtenció de nucleopèptids que continguin timina a les cadenes laterals, mitjançant la metodologia de síntesi de pèptids en fase sòlida. Per tal de poder descriure amb major simplicitat i comoditat aquest nou nucleoaminoàcid i els seus derivats s'ha utilitzat l'abreviació TET β Ala.

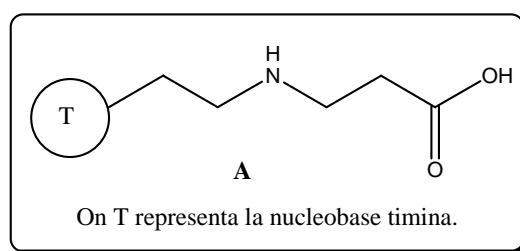


Figura II.1 - Monòmer H-TET β Ala-OH.

El segon capítol d'aquesta tesi doctoral està dedicat a l'estudi de l'aplicació del grup TCP com a grup protector temporal en la síntesi en fase sòlida de PNAs, amb l'objectiu d'avaluar la utilització d'aquesta estratègia sintètica com alternativa a les ja establertes basades en esquemes de protecció funcional Fmoc/Bhoc o BOC/Z.

El tercer capítol d'aquest treball està dedicat a la síntesi del pseudopèptid Pantocina B (**36**) (Figura II.2). L'objectiu central d'aquesta part ha estat la comprovació de l'activitat inhibidora del creixement de l'*E. amylovora*, i el desenvolupament d'estudis sintètics per a la síntesi i avaluació biològica de nous derivats de Pantocina B (**36**). Aquesta última etapa de treballs coincideix amb la concessió d'un nou projecte de recerca en l'àmbit agroalimentari, dedicat a la síntesi de nous agents pel control del foc bacterià.

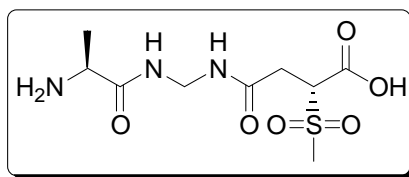


Figura II.2 - Estructura de la Pantocina B (**36**).

III. CAPÍTOL 1. Síntesi de Fmoc-TEt β Ala-OH (3) i l'aplicació a la síntesi d'oligòmers en fase sòlida

III.1. Introducció

III.1.1. PNAs: anàlegs d'oligonucleòtids

Les nucleobases presents en els oligonucleòtids són el component principal dels processos de reconeixement molecular sobre els que es desenvolupa tota la seva química supramolecular, fonament de la funcionalitat biològica d'aquestes biomolècules. A part de les seves aplicacions biològiques, existeix també la possibilitat d'explotar la capacitat de reconeixement i de coordinació de les nucleobases amb altres finalitats com ara la catàlisi,¹ la formació de nanoestructures² o el disseny d'estructures capaces de produir complexos estables amb metalls.³

En el terreny de la química mèdica, els intents de millorar les propietats dels oligonucleòtids ha conduït a la síntesi i l'anàlisi d'una gran varietat de nous anàlegs amb modificacions en el grup fosfat, la ribosa o la nucleobase. El canvi més radical en l'estructura dels anàlegs d'oligonucleòtids va ser introduït pel grup danès format per Buchardt, Nielsen, Egholm, Berg i col·laboradors l'any 1991⁴, que van reemplaçar completament l'esquelet sucre-fosfat per una estructura poliamídica basada en unitats de *N*-2-aminoetilglicina. Els nous compostos anomenats àcids pèptid nucleics (PNAs) tenen alta afinitat davant d'àcids nucleics complementaris i van obrir una important porta a possibles aplicacions terapèutiques i de diagnòstic⁵. Els PNA es poden considerar un tipus de nucleopèptid, és a dir, oligòmers amb esquelet peptídic formats per aminoàcids funcionalitzats en les seves cadenes laterals o en el N^α amb nucleobases. Els bons resultats obtinguts amb els PNAs va fer ressorgir l'interès en l'estudi dels "nucleoaminoàcids" i els seus oligòmers, que ja es va iniciar als anys 70 quan De Koning i Pandit van preparar nucleopèptids derivats de la lisina⁶, i Buttrey i col. sintetitzaren polímers de timinil-β-alanina⁷. Posteriorment, altres autors han emprat el terme PNA per a referir-se tant a anàlegs del mateix, com al que formalment entenem com nucleopèptids. Malgrat de les seves excel·lents propietats, els PNAs tenen algunes limitacions com la seva baixa solubilitat i s'han realitzat molts esforços per tal d'optimitzar les seves característiques sintetitzant-se un gran nombre de noves estructures.

A continuació s'exposa un resum dels tipus de nucleoaminoàcids descrits a la literatura i aquells que han estat utilitzats per a la formació de nucleopèptids com anàlegs d'oligonucleòtids es comenten les seves propietats de reconeixement molecular.

III.1.1.1. Estudis d'estructura-activitat dels PNAs

Els estudis d'estructura-activitat desenvolupats sintetitzant anàlegs amb modificacions de l'esquelet i/o la cadena lateral dels PNAs han donat informació sobre els trets estructurals que afecten la seva unió amb l'ADN o l'ARN. A continuació es descriuen les diferents variacions trobades a la literatura comentant el tipus de monòmers i les propietats dels corresponents oligòmers que ja s'hagin provat. Algunes d'elles han conduït a la síntesi de PNAs amb millor afinitat respecte de l'ADN o l'ARN que els propis ADN i ARN complementaris.

Els monòmers de PNA estan formats per unitats de *N*-2-aminoetilglicina que tenen unida la nucleobase a través d'un pont metilè carbonil (Figura III.1). L'estructura de PNA està basada en la repetició d'aquestes unitats i els oligòmers que se'n deriven posseeixen excel·lents propietats d'hibridització davant d'oligonucleòtids complementaris d'ADN, d'ARN o de PNA⁸.

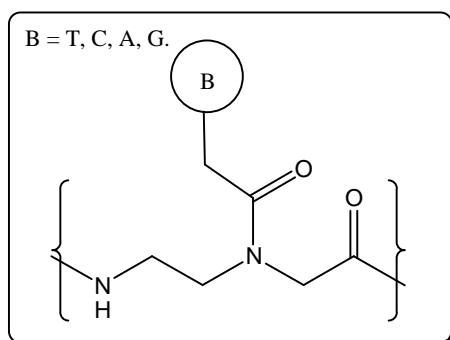


Figura III.1 - Monòmer de PNA.

La introducció d'un grup metilè tant en la part 2-aminoetil, en la glicina o en el pont d'unió amb la nucleobase⁹ (Figura III.2), ha confirmat que la distància entre nucleobases és

de vital importància alhora de reconèixer la cadena d'ADN, essent la distància òptima la de l'esquelet basat en *N*-(2-aminoetil)glicina (Figura III.1).

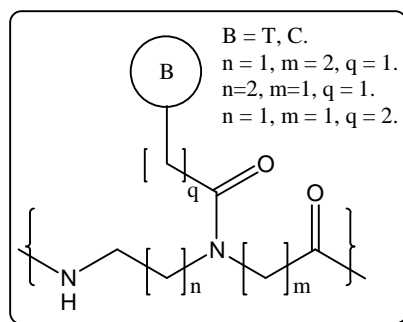


Figura III.2 - Modificacions estructurals a l'esquelet de *N*-2-aminoetilglicina.

S'han preparat PNAs derivats de *N*-[2-(*N*-metilamino)etil]glicina (Figura III.3). Els resultats mostren que el grup metil no afecta seriosament la capacitat de formació de ponts d'hidrogen de l'esquelet al mateix temps que canvia les propietats d'hidrofilia i d'hidratació. Els oligòmers sintetitzats mostren que una metilació del 30 % de la cadena de PNA no modifica el patró d'hibridització amb cadenes d'ADN, RNA o PNA complementaries.¹⁰

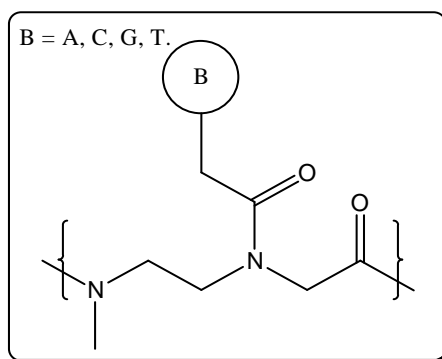


Figura III.3 - Fragment de PNA *N*-metilat.

Modificació dels monòmers de PNA

Amb la finalitat d'estudiar fins a quin extrem pot ser modificat l'esquelet de PNA sense alterar les propietats d'unió PNA/ADN, s'ha preparat un heterodímer timina-timina, format per un PNA decàmer d'homopirimidina, on un dels enllaços carbonil s'ha desplaçat una posició (Figura III.4). S'ha observat que una sola modificació de la seqüència de PNA no altera l'estabilitat tèrmica del triplet (PNA)₂/ADN, però si s'augmenta el número de modificacions de la seqüència del PNA si que es produeix una disminució significativa de l'estabilitat.

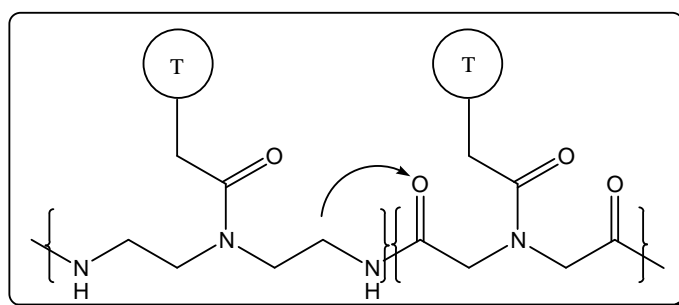


Figura III.4 - Fragment heterodímer timina-timina.

La substitució del grup carbonil per un grup fosfat es va realitzar amb l'objectiu de millorar la solubilitat, reduir la seva tendència a autoagregar-se i permetre un augment de la permeabilitat cel·lular dels PNAs. S'han descrit monòmers contenint les quatre nucleobases (B = A, T, C, o G). Aquests monòmers s'han utilitzat per a la síntesi de fosfono-PNAs (pPNA) purs, així com de quimeres formades per residus fosfono-PNA i PNA, amb unions O (Figura III.5) o N (Figura III.6) entre monòmers¹¹. Els oligòmers de fosfono-PNAs mostren en general una disminució de la capacitat d'hibridització amb cadenes d'ADN complementàries.

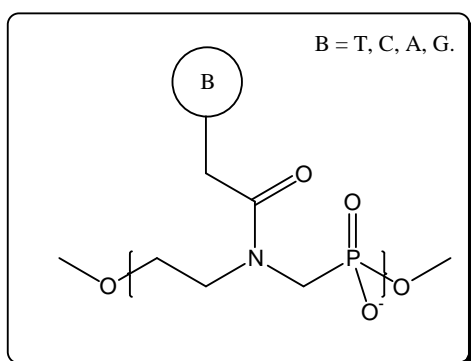


Figura III.5 - Fragment de pPNA-O.

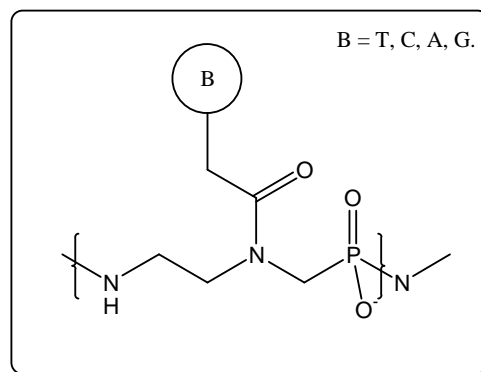


Figura III.6 - Fragment de pPNA-N.

Suposant que la reducció de la capacitat d'hibridització amb cadenes d'ADN complementàries observada pels fosfono-PNAs podia ser deguda a una repulsió entre polímers aniònics, s'han sintetitzat els sulfono-PNAs (SNA) on es substitueix el centre trigonal fosfonat, per un sulfonat tetragonal¹²(Figura III.7). Resten encara pendents els estudis d'estabilitat.

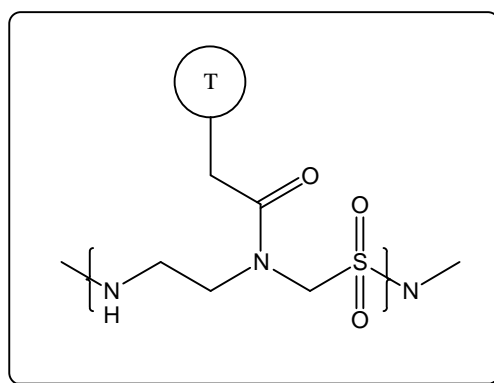


Figura III.7 - Fragment de SNA.

Estudis de cristal·lografia de raigs X i espectroscòpia de RMN de complexos PNA-ADN, PNA-ARN i PNA-PNA han evidenciat que els enllaços amida que connecten les nucleobases amb l'esquelet estan uniformement orientats com a rotàmers Z. S'ha intentat investigar l'efecte de la preorganització estructural de les unitats monomèriques de PNA en la forma *E* o *Z* emprant monòmers Z-OPA (Figura III.8) i E-OPA (Figura III.9). Els oligòmers de PNA preparats a partir d'aquests monòmers mostren una forta disminució de la capacitat d'hibridització amb cadenes d'ADN complementaries.¹³

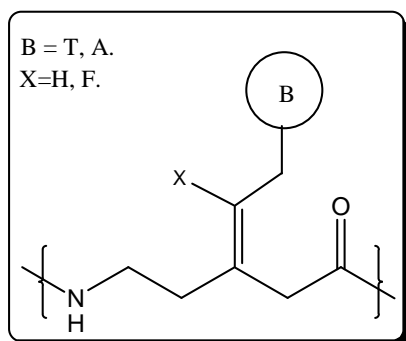


Figura III.8 - Fragment Z-OPA.

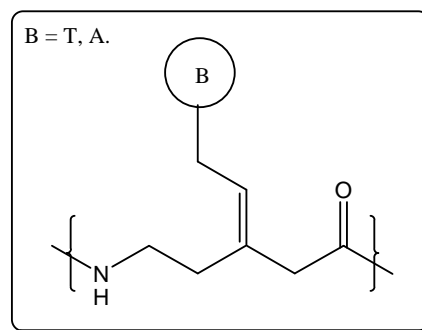


Figura III.9 - Fragment E-OPA.

L'eliminació del grup carbonil de la cadena lateral ha conduït a la síntesi de monòmers on una amina terciària ocupa la posició central de la unitat estructural (Figura III.10). Aquesta modificació feta amb la intenció d'eliminar la restricció conformacional de l'amida i d'introduir una càrrega positiva a pH fisiològic en l'esquelet de PNA, podria permetre una millor atracció electrostàtica entre l'esquelet de PNA i l'esquelet d'ADN ric en fosfats aniónics. Els resultats obtinguts mostren que l'elevada flexibilitat obtinguda amb aquest canvi produeix una forta disminució en l'estabilitat del complex PNA-DNA.¹⁴

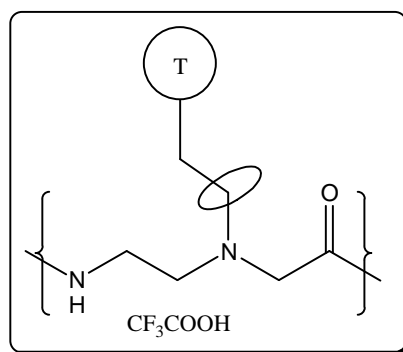


Figura III.10 - Fragment de PNA on s'ha modificat la unió amida amb la nucleobase per una amina terciària.

S'ha estudiat un decàmer de timines amb la modificació del monòmer anterior afegint un grup carbonil dins l'esquelet (Figura III.11) i s'ha observat que no mostra hibridització amb la cadena d'ADN complementària.¹⁵

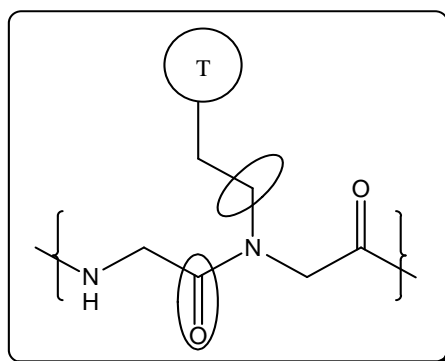


Figura III.11 - Fragment de PNA on s'ha modificat la unió amida amb la nucleobase per una amina terciària i s'ha afegit un grup carbonil en la posició aminoetil.

Retro-inverso" PNAs

Els retro-invers PNAs s'han preparat a partir d'unitats de *N*-(aminometil)- β -alanina *N*-substituides, (Figura III.12), han estat dissenyats per avaluar l'efecte de l'intercanvi dels enllaços donadors i acceptors de punts d'hidrogen dels grups amida de l'esquelet, tot mantenint la posició de les nucleobases constant. Aquesta modificació porta a l'obtenció d'oligòmers de PNA que mostren una forta disminució de la hibridització amb cadenes d'ADN complementaries.¹⁶

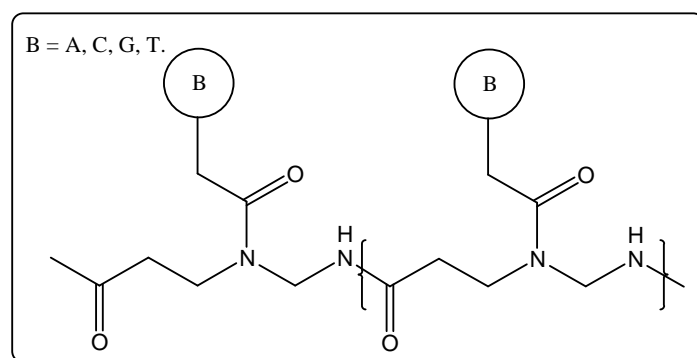


Figura III.12 - Fragment d'un dímer "retro-inverso" PNA.

Modificacions dels monòmers per a la síntesi de PNAs quirals

S'han descrit esquelets de PNA que incorporen centres estereogènics amb la intenció d'avaluar l'efecte de la quiralitat en les propietats dels mateixos. Els monòmers preparats es basen en la incorporació de diferents radicals alquílics a la unitat d'etilendiamina¹⁷ (Figura III.13), la substitució del fragment d'aminoetilglicina per ornitina¹⁸ (Figura III.14) o per 2-aminopropan-1,3-diol¹⁹ (Figura III.15). Resten encara pendents els estudis d'estabilitat.

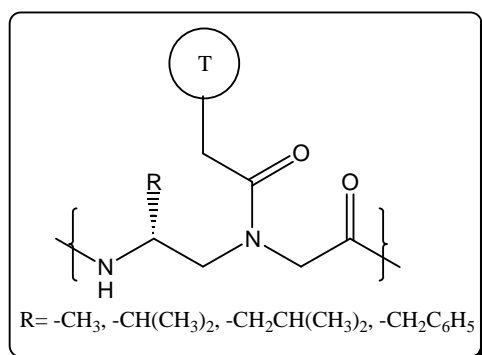


Figura III.13 - Esquelet alquilat sobre el radical etil.

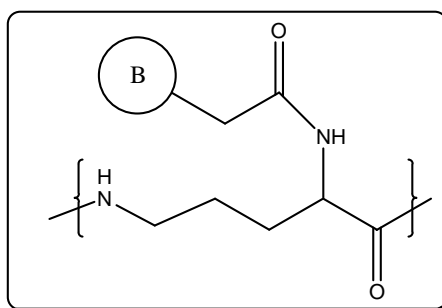


Figura III.14 - Substitució per ornitina.

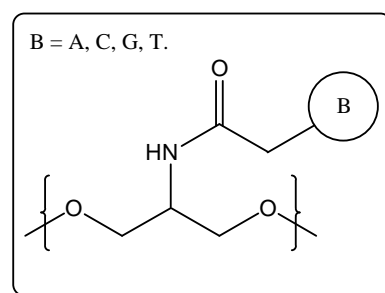


Figura III.15 - Substitució per 2-aminopropan-1,3-diol.

També s'han descrit unitats estructurals basades en l'aminoàcid alanina. L'oligòmer d'alanil-PNA consisteix en un esquelet peptídic regular format per residus d'alanina modificats²⁰ (Figura III.16), amb les nucleobases unides covalentment en la posició β. Els alanil-PNA permeten estudiar la formació de ponts d'hidrogen, interaccions de Van der Waals, "stacking" i efectes del dissolvent entre les cadenes laterals d'aminoàcids i les nucleobases.²¹ Canvis en els monòmers com la introducció d'un grup metilè en la unió a la nucleobase o en l'esquelet, condueixen als anomenats α-homoalanil nucleoaminoàcids²² (Figura III.17) i als β-homoalanil nucleoaminoàcids²³ (Figura III.18). Els seus corresponents oligòmers presenten pèrdua de l'especificitat de l'aparellament respecte dels corresponents PNAs, disminuint molt l'estabilitat del dúplex format amb l'ADN complementari.

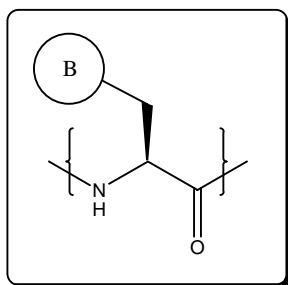


Figura III.16 - Fragment alanil PNA.

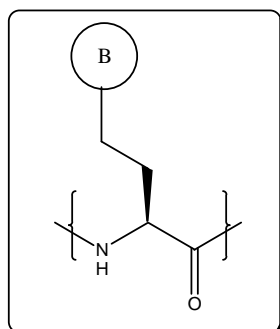


Figura III.17- Fragment α -homoalanil.

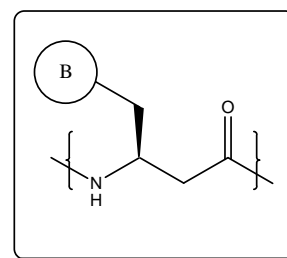


Figura III.18- Fragment β -homoalanil.

Així, s'han descrit anàlegs del dinucleòtid adenililadenosina basats amb un tetrapèptid constituït per dos aminoàcids alternats amb dos unitats d' α -homoalanil PNA (Figura III.19). Els estudis d'estabilitat han demostrat una millora en la hibridització amb seqüències complementàries d'ADN i de PNAs respecte dels PNAs originals²⁴.

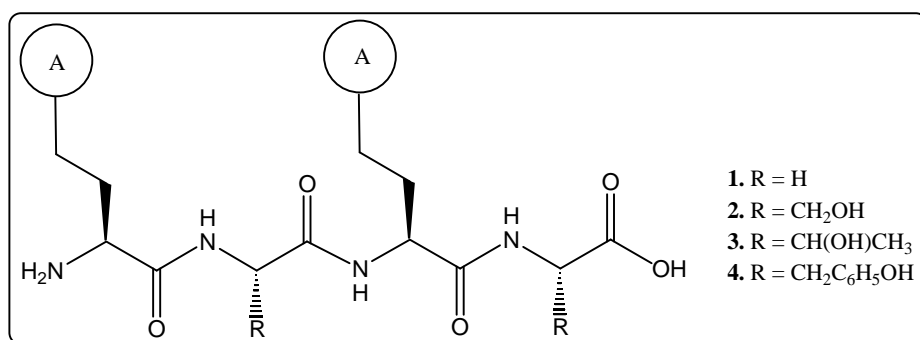


Figura III.19 - Dímer anàleg del dinucleòtid adenililadenosina .

Amb la intenció d'avaluar l'efecte de la presència de grups aromàtics dins l'esquelet de PNA, han estat sintetitzats monòmers com els de la Figura III.20, la presència dels grups aromàtics ha generat la nomenclatura d'APNA "aromatic peptide nucleic acid" per aquests anàlegs de PNA. S'han investigat les possibles interaccions de " π -stacking" degudes a la presència dels grups benzènics, i no s'ha detectat cap efecte estabilitzant en la formació de doblats o triplets amb oligonucleòtids complementaris.²⁵

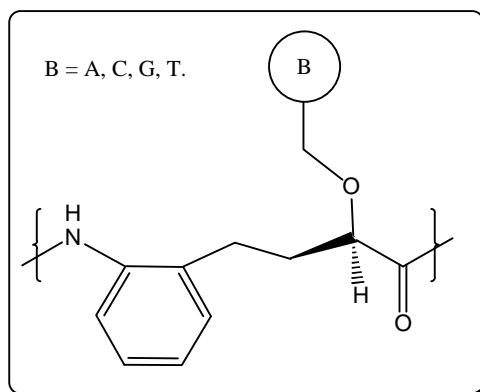


Figura III.20 - Fragments d'APNA.

L'OPNA (Figura III.21) és una modificació de l'esquelet basada en estructures quirals que presenten una unió èter a la cadena principal que li confereix millor solubilitat en medi aquós. Els OPNAs oligòmers han mostrat millor o similar capacitat d'hibridització que els corresponents oligòmers complementaris d'ADN, i encara més interessant, han mostrat major sensibilitat que els PNAs en la hibridització i detecció de seqüències complementàries que tenen un error únic en la cadena de l'ADN.²⁶

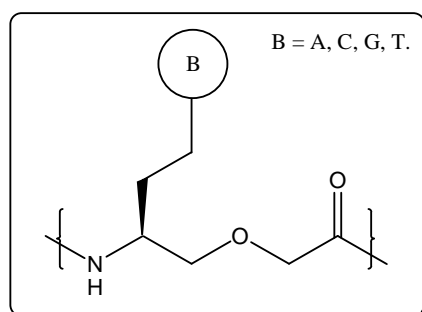


Figura III.21 - Fragment sintètic OPNA (oxi-PNA).

L'efecte de la introducció de funcionalitat i quiralitat en l'esquelet de PNA ha estat estudiat substituint la glicina per diversos aminoàcids com alanina, arginina, leucina, glutamina, tirosina, histidina, treonina, triptòfan, fenilalanina, valina, lisina, serina, àcid glutàmic, àcid aspàrtic o isoleucina (Figura III.22). Aquests monòmers permeten tenir específicament disposats centres estereogènics en un oligòmer de PNA i permeten investigar si una eventual preorganització estereoquímica del PNA pot afavorir el procés de reconeixement amb l'ADN. Tanmateix, els grups funcionals de les cadenes poden ser punts

d'ancoratge de diferents lligands biològicament actius. Els resultats obtinguts en la formació dels dúplex dels nous PNAs amb l'ARN, l'ADN o el PNA complementaris mostren una disminució de l'estabilitat respecte als dúplex formats amb el PNA original.²⁷

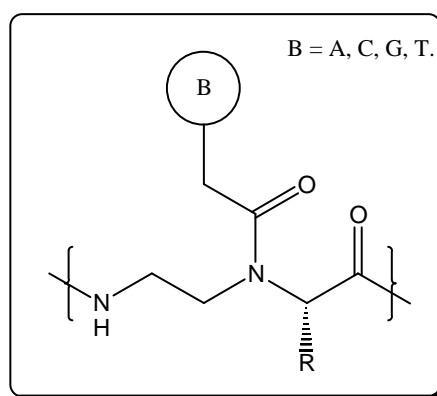


Figura III.22 - Fragment sintètic amb reemplaçament de glicina per altres aminoàcids.

Monòmers de PNA amb restriccions conformacionals

L'estudi de la contribució de la rigidesa de l'esquelet de PNA en la seva unió amb l'ADN o l'ARN s'ha dut a terme introduint cicles que confereixen restricció conformacional de l'esquelet.

S'han sintetitzat monòmers en els que el grup etil del fragment aminoetil estava integrat en un ciclopentà (cpPNA) o en un ciclohexà (chPNA) (Figura III.23). Els resultats obtinguts en la formació de dúplex dels cpPNA amb l'ADN o l'ARN s'observa un menor grau d'afinitat dels dos, però en canvi es produeix una millora en la selectivitat amb les seves bases complementàries. Respecte a la comparació entre els dos cpPNA s'observa un major grau d'afinitat del cpPNA que el chPNA i també que l'estereoquímica té una gran influència, sent el cis-cpPNA el més estable a l'hibridar-se amb l'ADN.²⁸

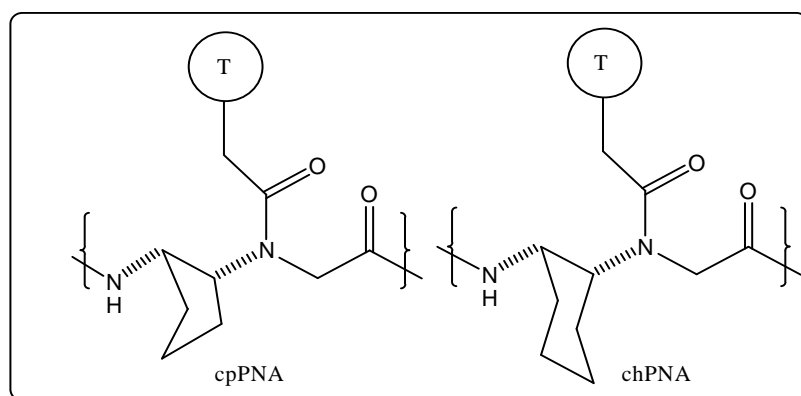


Figura III.23 - Fragments de PNA amb substitució del grup etil per un ciclopentil i un ciclohexil.

Han sigut sintetitzats 4-(*R/S*)-amino- N^{α} -(A/C/G/T)-ilacetil-2-(*R/S*)-prolines (apgPNA)²⁹ i 4-(*S*)-amino- N^{α} -(T)-ilacetil-2-(*S*)-piperidines³⁰ (pipPNA) (Figura III.24), que son anàlegs de PNA conformacionalment restringits per la formació d'un pont metilè (apgPNA) o etilè (pipPNA) en el C- α de la glicina i el C- β d'etilendiamina. Els resultats obtinguts indiquen un augment de l'estabilitat tèrmica del dúplex apgPNA/ADN respecte el aegPNA/ADN, en canvi augmenta la desestabilització del dúplex en el cas del pipPNA/ADN.

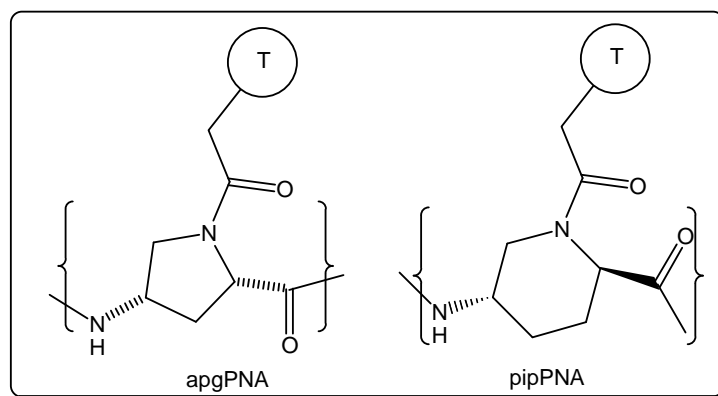


Figura III.24 - Fragments de apgPNA i pipPNA.

Les modificacions dels anteriors monòmers amb anells de tiazolidina i de tiazina condueixen als anomenats tiazolidina PNA i tiazina PNA (Figura III.25). Els nous oligòmers mostren una significativa desestabilització en la formació de triplets de PNA₂/ADN respecte de la formació de l'híbrid PNA/ADN.³¹

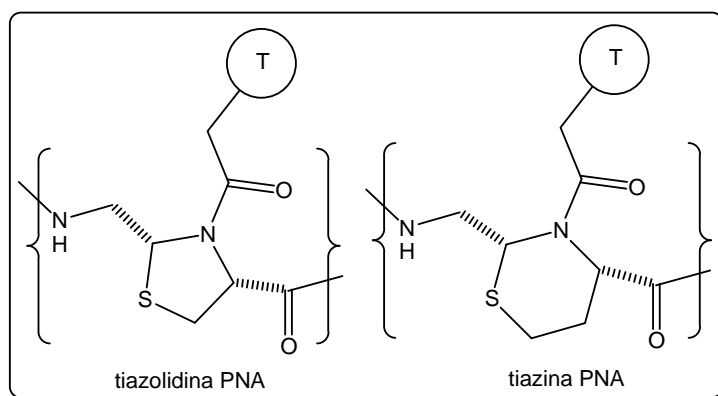


Figura III.25 - Fragments de tiazolidina PNA i de tiazina PNA.

Diversos autors, basant-se en estudis de models moleculars³², han suggerit que l'anell de D-prolina amb nucleobases incorporades en una relació cis amb el grup carboxílic representaria bé les restriccions conformacionals i les relacions estereoquímiques entre els substituents d'un anell de 2'-deoxirribosa d'ADN (Figura III.26). A més els pèptids derivats de D-prolina no és d'esperar que pateixin proteòlisis. Els resultats obtinguts en l'estudi dels respectius oligòmers mostren major estabilitat tèrmica en la formació del dúplex amb l'ADN i l'ARN complementaris que la que presenta el PNA original, i també una major selectivitat per l'ADN que per l'ARN.³³

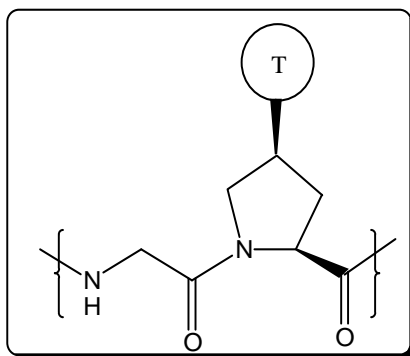


Figura III.26 - Fragments que inclouen anells de D-prolina.

Les Figura III.27 mostra altres modificacions de les estructures que contenen D-prolina³⁴, aquestes noves estructures han mostrat una millor capacitat de combinació amb el seu complementari PNA o ADN respecte del PNA de D-prolina anterior.

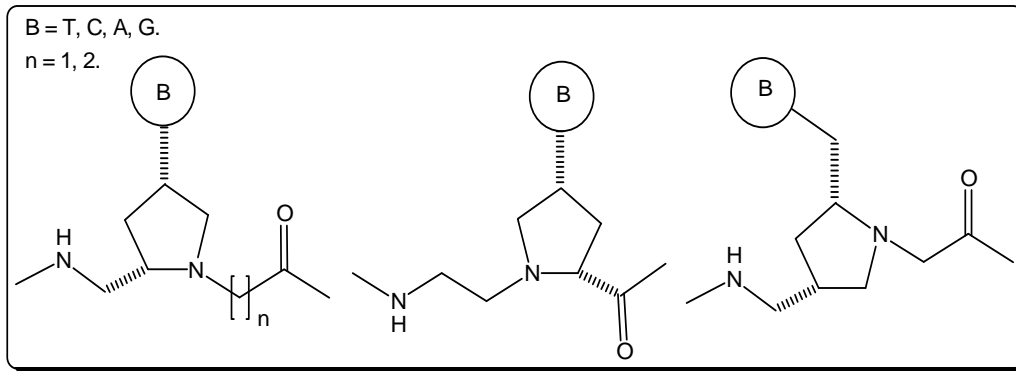


Figura III.27 - Fragments que inclouen modificacions del PNA de prolina.

Finalment, per tal de veure l'efecte d'una variació en l'anell de prolina s'han sintetitzat els pirrolidinona PNAs (pipPNA) i els piperidinona PNAs (pirPNA).³⁵ Tot i que els pipPNAs presenten major afinitat amb l'ARN que amb el ADN, en general disminueix l'afinitat amb tots dos; en el cas del pirPNA l'afinitat amb l'ADN i l'ARN disminueix dràsticament.

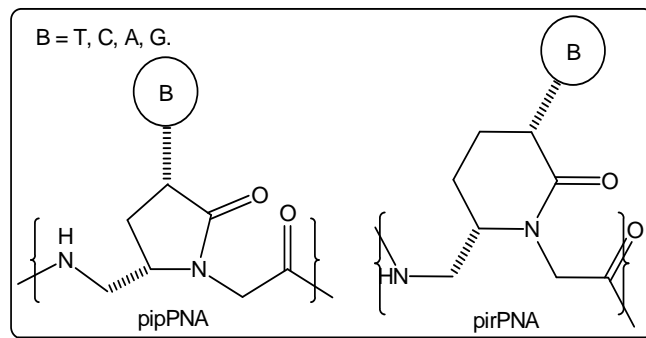


Figura III.28 - Fragments de piperidina PNAs i de pirrolidina PNAs.

Resum dels diferents monòmers de PNA

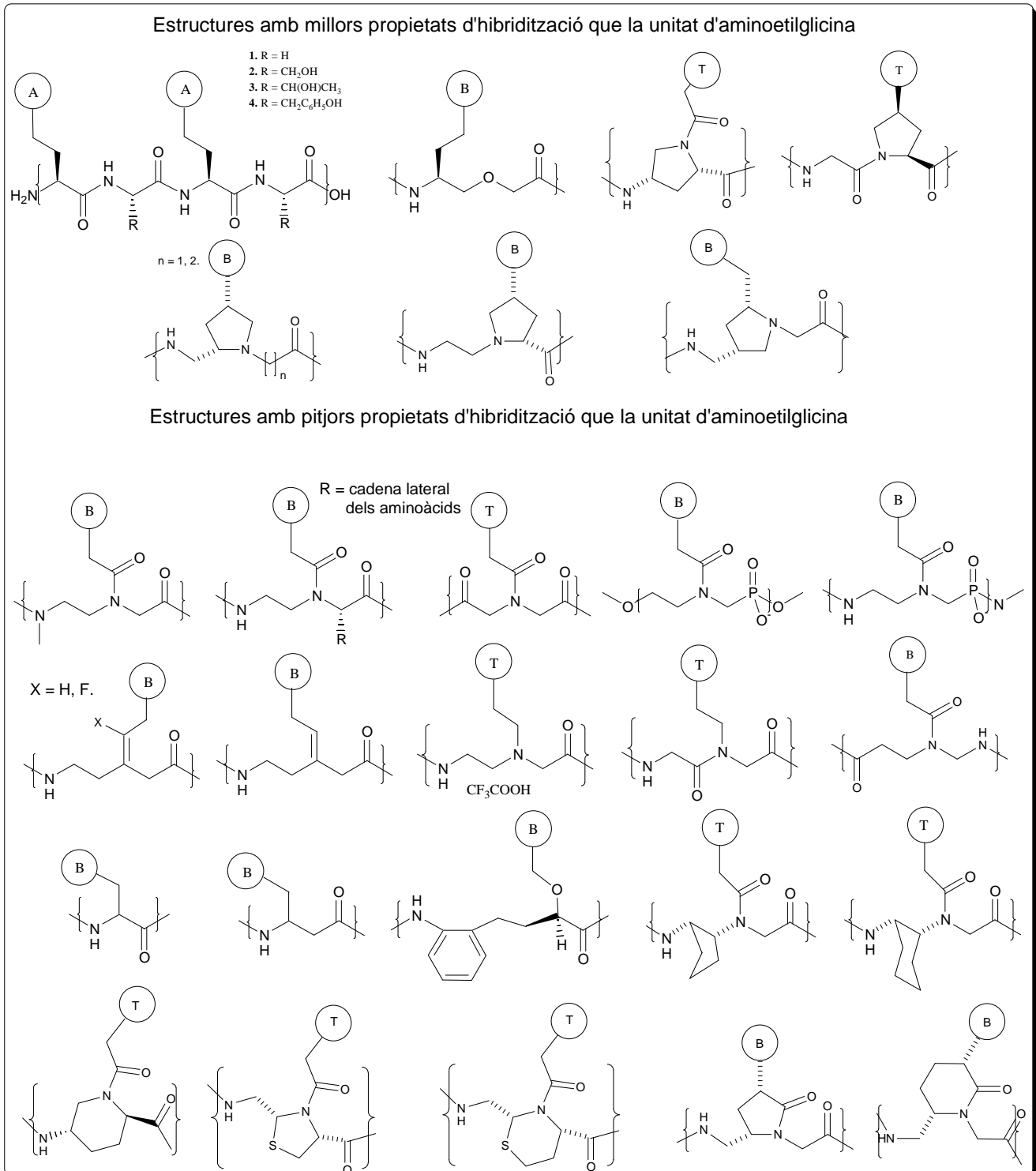


Figura III.29. - Resum de les diferents modificacions dels monòmers de PNA en funció de l'estabilitat de l'híbrid format amb l'ADN complementari.

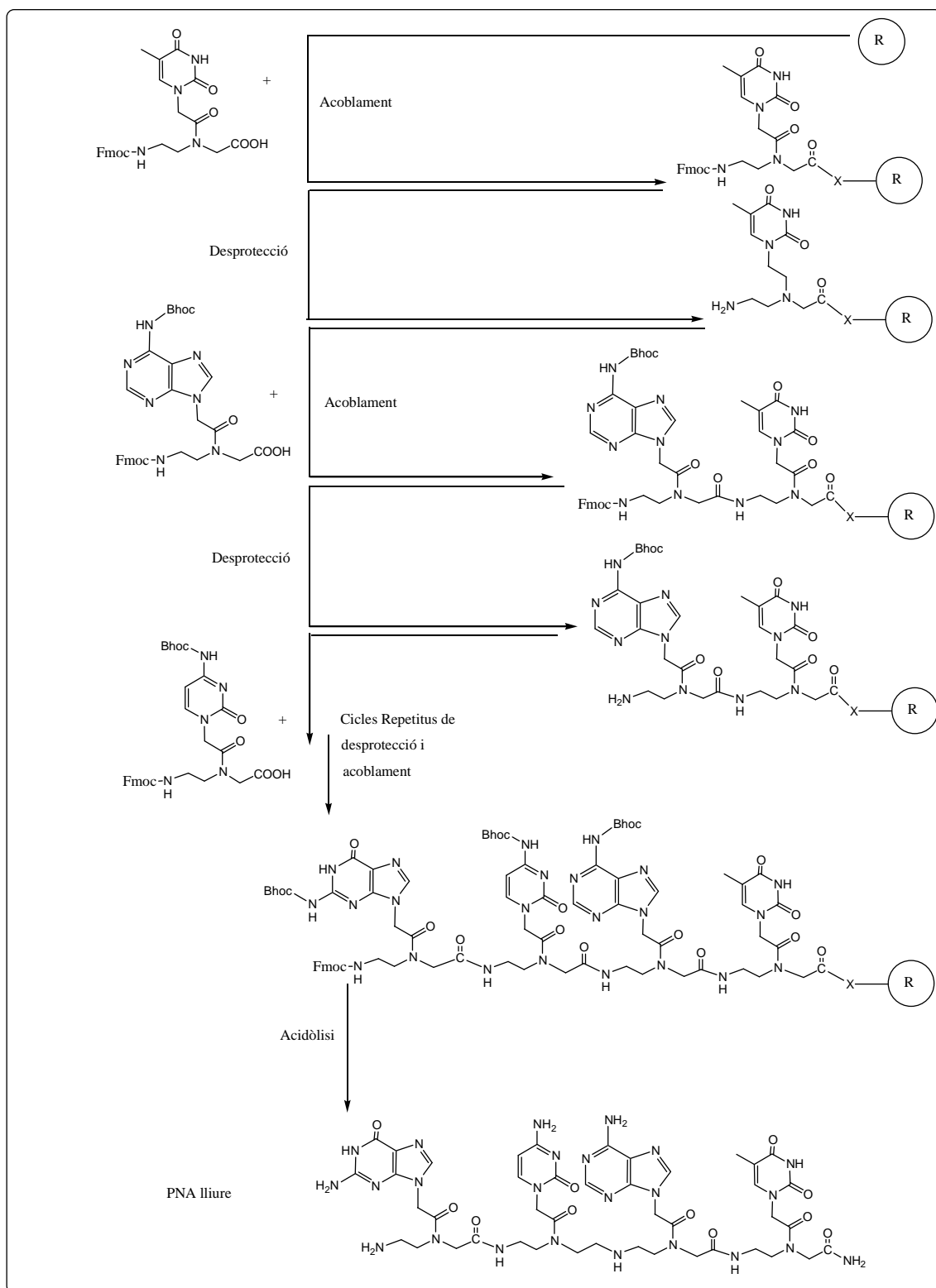
III.2. Síntesi d'àcids pèptid nucleics (PNAs) en fase sòlida.

Degut a que els PNAs i els seus anàlegs estan formats a partir de monòmers de tipus aminoàcid, la síntesi dels corresponents oligòmers es basa en la mateixa metodologia que la síntesi de pèptids en fase sòlida. El primer monòmer s'uneix a una resina on primerament s'ha ancorat un espaiador bifuncional. La resta de monòmers s'incorpora de forma seqüencial mitjançant cicles repetitius de desprotecció de la funció *N*-amino terminal i acoblament del següent monòmer. Una vegada acabada la síntesi, s'allibera l'oligòmer de la resina, es purifica, s'analitza i es caracteritza (Esquema III.1).

Els avantatges principals d'aquesta metodologia, respecte la síntesi en solució, són la seva simplicitat i rapidesa, ja que els excessos de reactius s'eliminen per simples rentats de la resina que conté ancorat el producte durant les diverses etapes sintètiques. A part, la construcció d'una cadena sobre un suport polimèric elimina el problema de la baixa solubilitat dels intermedis de síntesi en solució.

Amb tot, existeixen alguns problemes inherents a la pròpia metodologia. Els rendiments no quantitius en les etapes d'acoblament de cada monòmer i de desprotecció de la funció *N*-amino generen productes de truncament de la cadena que s'acumularan fins al final de la síntesi, aquestes impureses poden ser molt similars al producte final, amb la qual cosa la purificació del cru obtingut després d'alliberar el material peptídic de la resina pot resultar extremadament difícil, així com la determinació de l'homogeneïtat del pèptid resultant. Per això, per a la síntesi de nous tipus d'oligòmers cal fer sempre un estudi previ de les condicions més òptimes per les etapes d'acoblament i de desprotecció dels corresponents monòmers. En el capítol 2 s'analitzarà aquest apartat amb més detall.

III. Capítol 1: Introducció



Esquema III.1 - Síntesi lineal de PNAs en fase sòlida basada en l'estratègia Fmoc/Bhoc.

III.3. Resultats i discussió

Tal com s'ha apuntat anteriorment, la primera part d'aquest treball ha estat dedicada a la síntesi del monòmer H-Tet β Ala-OH basat en l'estructura de β -alanina i que conté timina enllaçada a través d'un grup etilè al grup α -amino, la seva protecció funcional amb els grups Fmoc o BOC, i a la seva aplicació a l'obtenció d'oligòmers que continguin timina a les cadenes laterals aplicant els mètodes de síntesi de pèptids en fase sòlida. En particular, els oligòmers construïts a partir d'aquest monòmer amb una seqüència de residus alternant Gly i Tet β Ala podrien ser anàlegs dels PNAs (Figura III.30). Recentment s'han descrit estructures de β -pèptids modificats amb nucleobases que mostren un bon grau de reconeixement amb l'ADN³⁶ i també s'ha observat la formació d'estructures terciàries estabilitzades per l'associació intramolecular de 4 nucleobases³⁷. Això, unit a la possibilitat de que els productes derivats de β pèptids siguin resistents a les proteasses, ha estat la raó del disseny del monòmer Tet β Ala. De fet el pont etilè que uneix la nucleobase amb l'esquelet es troba en totes les estructures que mostren millors propietats d'hibridització que la unitat d'aminoetilglicina original (Figura III.29), i en les quals l'unitat de repetició de l'esquelet està formada per 5, 6 o 7 àtoms.

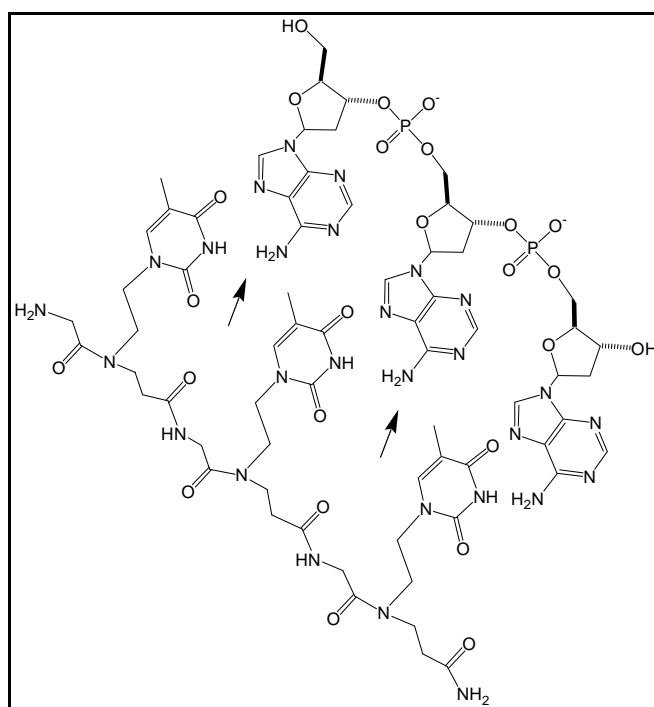


Figura III.30 - Oligòmer de -Gly-Tet β Ala- confrontat a l'estructura complementària de l'ADN.

Per tal de poder descriure amb major simplicitat els nucleoaminoàcids i nucleopèptids sintetitzats s'ha utilitzat la abreviació TET β Ala per designar el residu de nucleopèptid que conté el monòmer A (1) i TETGly per a designar el que conté monòmer B (2). D'aquesta manera per anomenar el nucleoaminoàcid A (1) protegit o *N*-Fmoc-*N*-[2-(timin-1-il)etil]- β -alanina (3) s'utilitza l'abreviatura Fmoc-TET β Ala-OH (3) i per anomenar el monòmer B (2) protegit o *N*-Fmoc-*N*-[2-(timin-1-il)etil]-glicina (4) s'utilitza Fmoc-TETGly-OH (4) (Figura III.31).

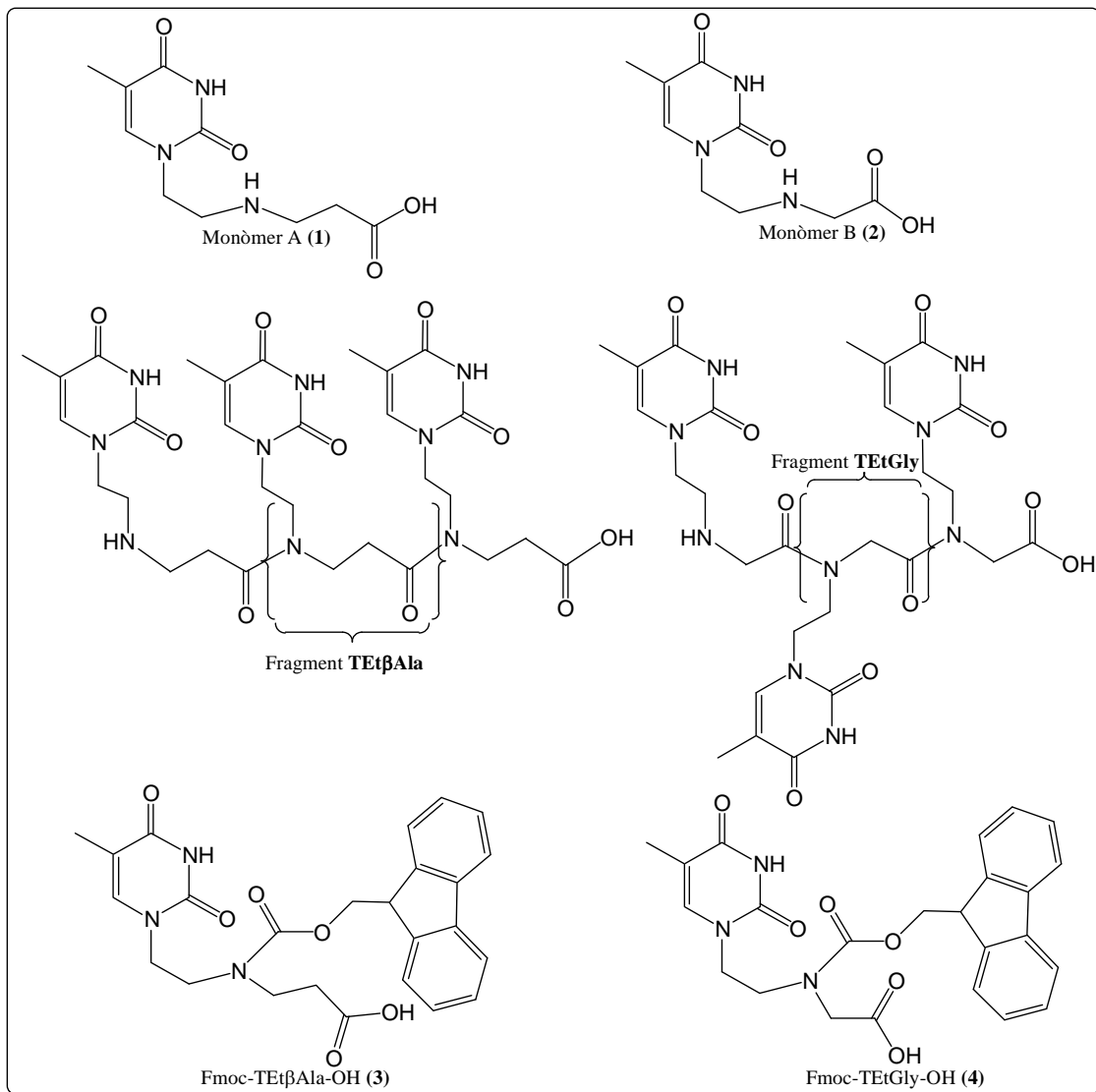
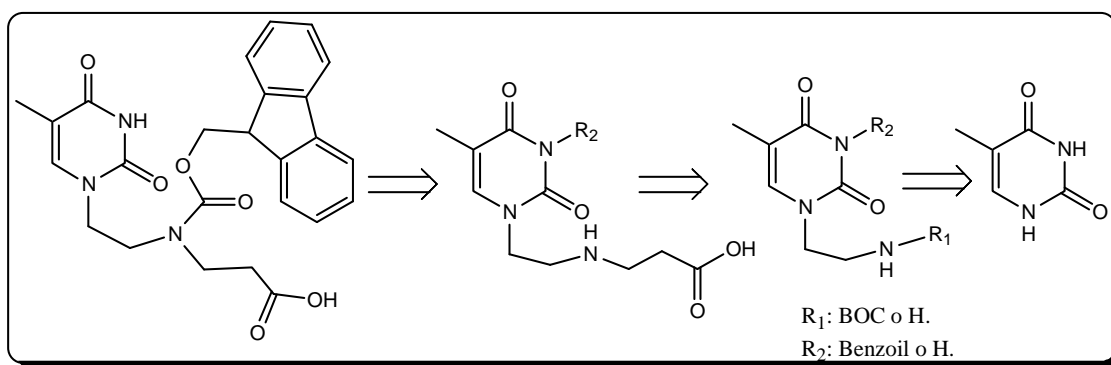


Figura III.31 - Representació de la nomenclatura utilitzada per anomenar els productes objectiu.

L'estratègia per a sintetitzar el monòmer Fmoc-TET β Ala-OH s'ha orientat d'acord amb el següent esquema retrosintètic (Esquema III.2). La síntesi implica partir de la timina i procedir a l'alquilació amb un fragment d'aminoetil, la posterior *N*-alquilació d'aquest intermediari i la protecció funcional final.



Esquema III.2 - Retrosíntesi del monòmer Fmoc-TET β Ala-OH.

Donada la seva similitud estructural, també s'ha intentat aprofitar l'aproximació sintètica per a la preparació del monòmer B (Figura III.32) tot i que es tracta d'un producte descrit a la literatura.^{11c}

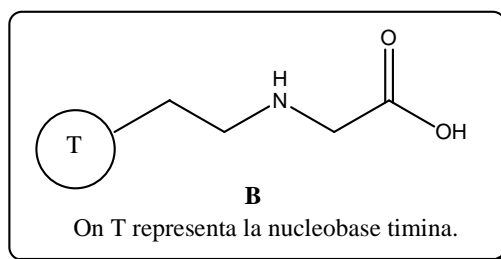
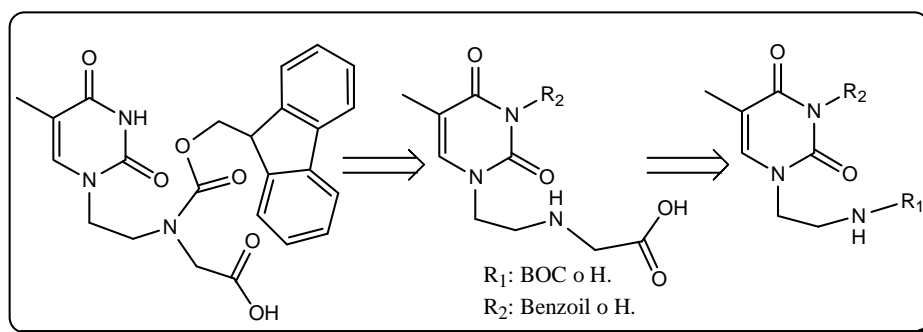


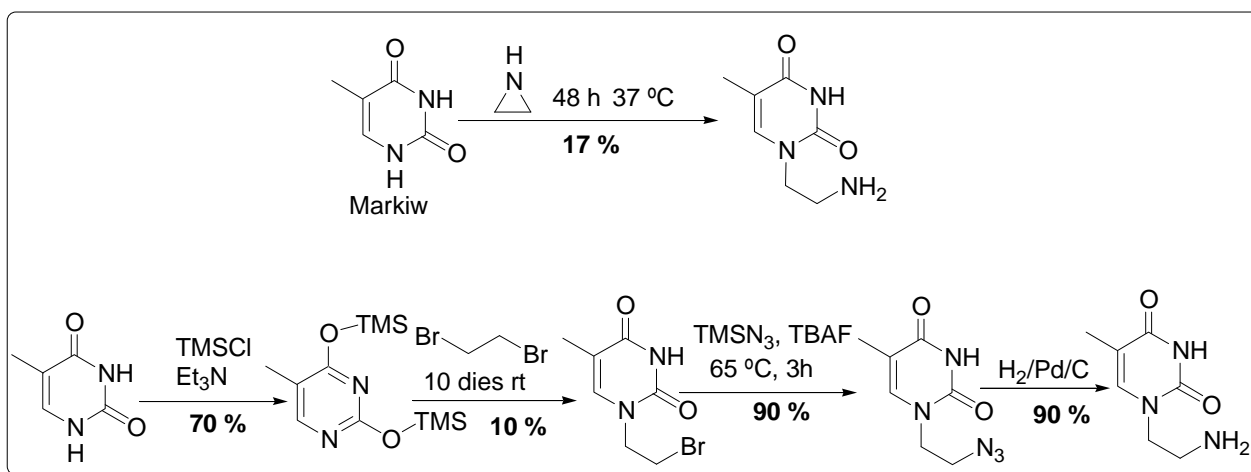
Figura III.32 - Monòmer objectiu B.

La síntesi del monòmer Fmoc-TETGly-OH s'ha planificat d'acord al següent esquema retrosintètic (Esquema III.3), que comparteix un intermediari comú amb la ruta de preparació de Fmoc-TET β Ala-OH, el qual cal alquilar amb un derivat de l'àcid acètic i protegir amb el grup Fmoc.



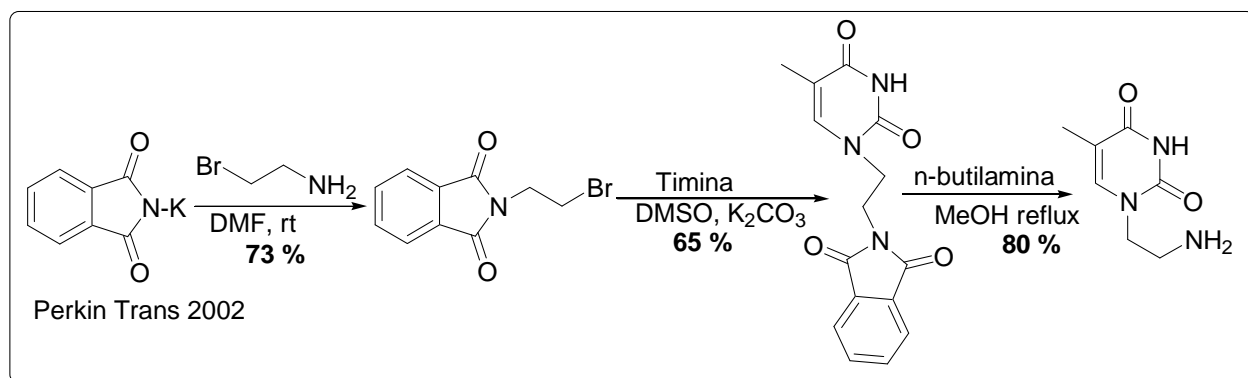
Esquema III.3 - Retrosíntesi del monòmer Fmoc-TETgly-OH.

El primer compost a preparar era doncs l'intermedi comú *N*¹-(2-aminoetil)timina (**5**). La seva síntesi ha estat descrita amb anterioritat per Markiw³⁸ o Nawrot i col.³⁹ emprant els mètodes resumits a l'Esquema III.4, obtenint-se en tots dos casos el compost desitjat amb rendiments finals molt baixos (17 i 6 % respectivament) i requerint la purificació d'un o més intermedis fent servir columnes de bescanvi iònic o Flash.



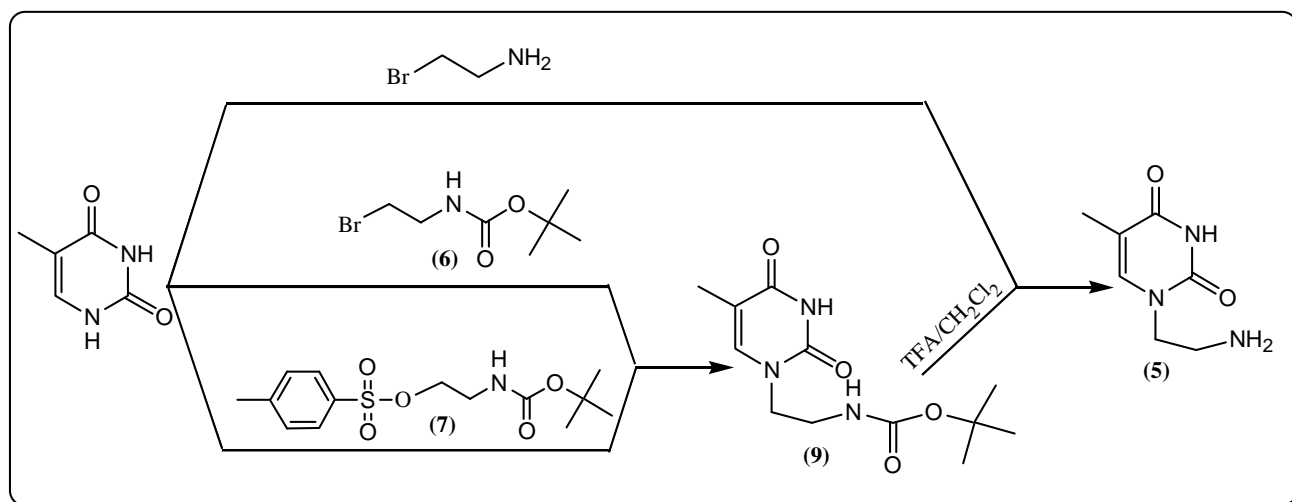
Esquema III.4 - Síntesi de *N*¹-2-aminoetiltimina (**5**) segons Markiw i Nawrot.

Amb posterioritat a la realització d'aquests treballs al laboratori es va publicar un altre síntesi de *N*¹-2-aminoetiltimina (**5**) descrita per Das i col.⁴⁰, on s'obté el producte amb un rendiment global del 38 % segons l'Esquema III.5.



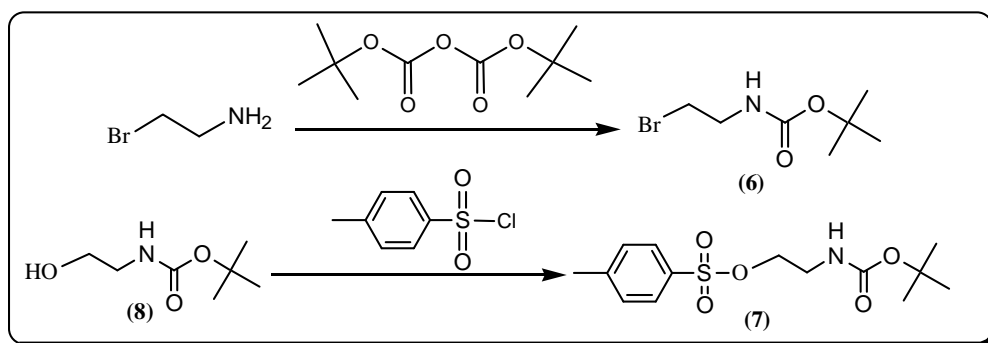
Esquema III.5 - Síntesi de *N*¹-2-aminoetiltimina (**5**) segons Markiw i Stec.

Amb l'intenció d'obtenir el compost desitjat amb millors rendiments en aquest treball s'ha abordat la síntesi de l'intermedi (**5**) partint de la timina d'acord a les alternatives detallades a l'Esquema III.6.



Esquema III.6 - Síntesi de *N*¹-2-aminoetiltimina (**5**).

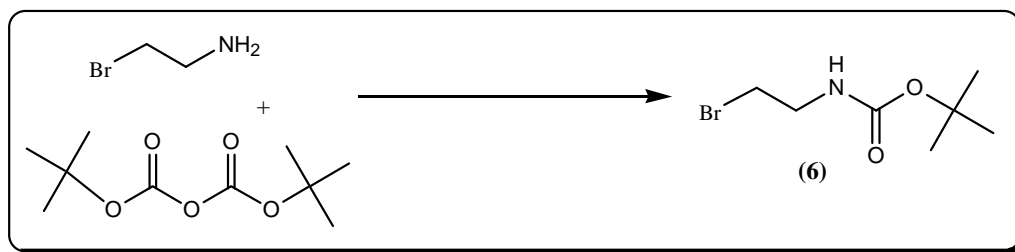
Els reactius *N*-BOC-2-bromoetilamina (**6**) i tosilat de *N*-BOC-2-aminoetil (**7**) requerits per a aquest fi no eren comercials i es varen preparar segons l'Esquema III.7.



Esquema III.7 - Síntesi de (6) i (7).

III.3.1.1. Síntesi de *N*-BOC-2-bromoetilamina (6).

L'obtenció de *N*-BOC-2-bromoetilamina s'ha dut a terme d'acord amb el procediment descrit per Haaima i col.⁴¹ per a la protecció d'amines amb el grup BOC emprant diBOC (Esquema III.8) però utilitzant Na₂CO₃ com a base en comptes d'NaOH. El seguiment de la reacció s'ha realitzat per TLC (Hexà:AcOEt, 4:1), emprant com reveladors permanganat potàssic o bé ninhidrina aplicada a continuació d'un tractament amb HCl 1N de la placa.



Esquema III.8 - Síntesi de (6).

Les diferents condicions de reacció assajades es troben detallades a la Taula III.1. Per poder obtenir el producte amb bons rendiments, es va haver de fer reaccionar 1 equivalent de 2-bromoetilamina amb 1 equivalent de diBOC, fent l'addició de trietilamina durant 2 hores, i transcorregudes 3 hores més de reacció es varen afegir 0.2 equivalents de diBOC junt amb 0.2 equivalents de trietilamina, deixant-los reaccionar 3 hores més. El cru de reacció es va concentrar per evaporació a pressió reduïda i el residu obtingut es va

extreure amb AcOEt, rentant amb HCl 0.05 N per a eliminar la trietilamina i la 2-bromoetilamina no reaccionades.

Taula III.1 - Condicions assajades per a la protecció de 2-brometilamina.

Entrada	Equivalents de diBOC	Equivalents de base	Temp. °C	Temps	Dissolvent	% Rdt.
1	1,5	1,5 Na ₂ CO ₃	t.a.	18 h	H ₂ O	Barreja diBOC + (6)
2	1,5	1,5 Et ₃ N	t.a.	36 h	CH ₂ Cl ₂	Barreja diBOC + (6)
3	1 + 0,2	1 + 0,2 Et ₃ N	t.a.	8 h	CH ₂ Cl ₂	91 %

El producte obtingut és un oli transparent, pur per TLC (Hexà:AcOEt:AcOH, 3:2:0.5, r.f = 0.52), i que s'ha caracteritzat per ¹H-RMN i ¹³C-RMN (Figura III.33).

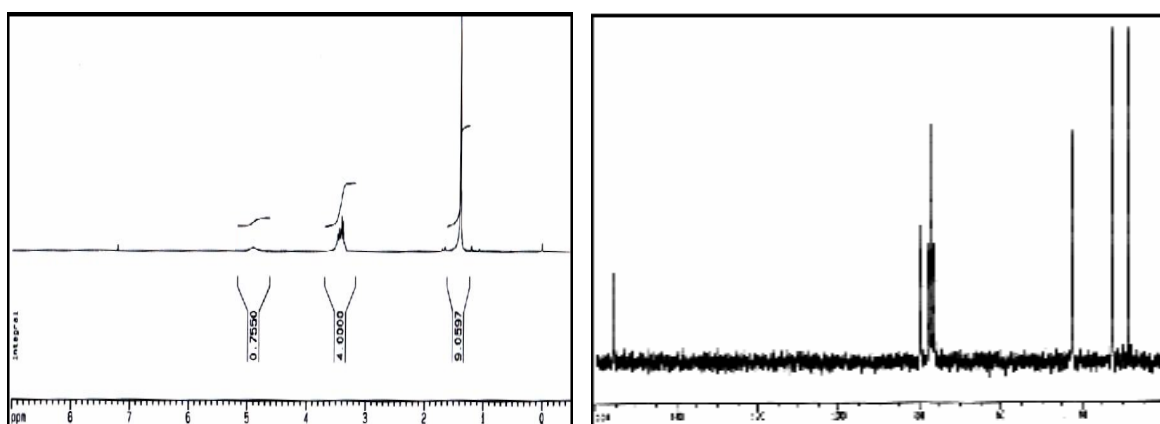


Figura III.33 - Espectre de ¹H-RMN i ¹³C de RMN de (6).

III.3.1.2. Síntesi de tosilat de *N*-BOC-2-aminoetil (7).

L'obtenció del tosilat de *N*-BOC-2-aminoetil (7) a partir de *N*-BOC-2-aminoetanol comercial (8) s'ha dut a terme adaptant el procediment de tosilació d'alcohols descrit per Kabalka⁴² i col.. El seguiment de la reacció s'ha realitzat per TLC (Hexà:AcOEt:AcOH, 3:2:0.5) i HPLC a la longitud d'ona de 265 nm.

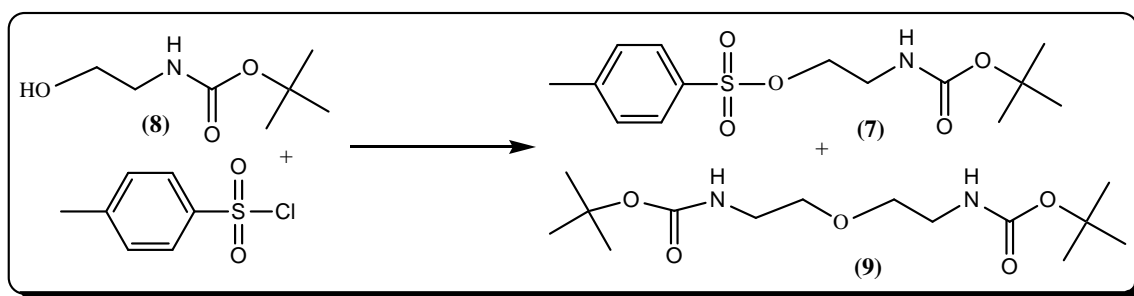


Figura III.34 - Síntesi de tosilat de *N*-BOC-2-aminoetil (7).

Taula III.2 - Condicions assajades per a la síntesi de tosilat de *N*-BOC-2-aminoetil (7).

Entrada	Equivalents de clorur de tosil	Equivalents de Piridina	Temp. °C	Temps	Dissolvent	% Rdt
1	1.5	3	4	6 h	CHCl ₃	Barreja
2	1.5	excés	4	6 h	Piridina	16 %
3	1.5	excés	4	17 h	Piridina	22 %

En el primer assaig, a les 6 hores de reacció ja no es veia senyal de clorur de tosil, donant-se per acabada la reacció. Després de realitzar rentats amb HCl 0.05 M es va advertir que el producte obtingut era una barreja del producte desitjat (7), d'àcid *p*-toluensulfònic i di-*N*-(BOC-2-aminoetil)èter (9) (Figura III.34). La repetició de la reacció emprant piridina com a dissolvent va conduir a l'obtenció de crús de reacció que purificats per columna "flash" amb SiO₂, eluent amb Hexà:AcOEt (5:1), varen proporcionar en el millor cas 0.33g de (7), amb un rendiment del 22 %, i 0,39 g de di-*N*-BOC-2-aminoetil èter (9) amb un rendiment del 72% calculat a partir del *N*-BOC-2-aminoetanol. El producte (7) es va obtenir en quantitat suficient per a la seva utilització posterior, era pur per TLC i per HPLC (Figura III.35) i es va caracteritzar per ¹H-RMN i ¹³C-RMN (Figura III.36). El producte (9) ha estat caracteritzat per ¹H-RMN (Figura III.37).

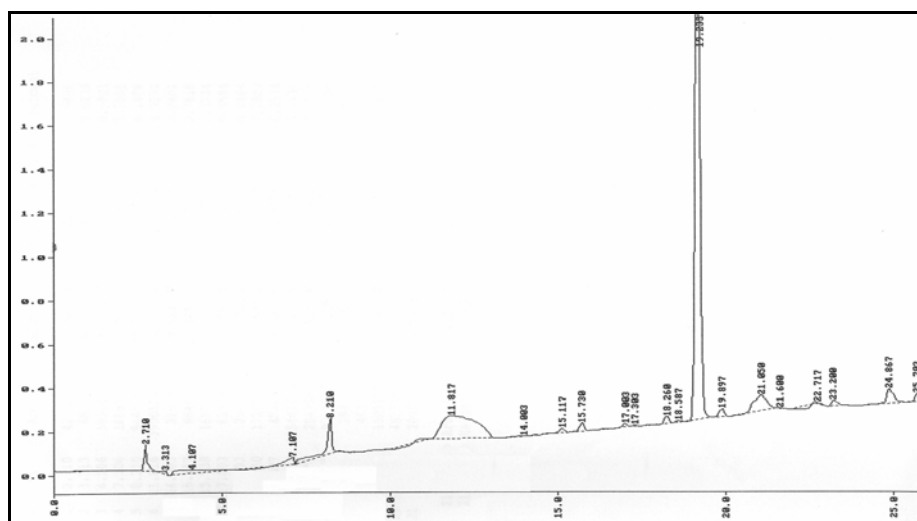


Figura III.35 - Cromatograma d'HPLC a 220 nm de (7).

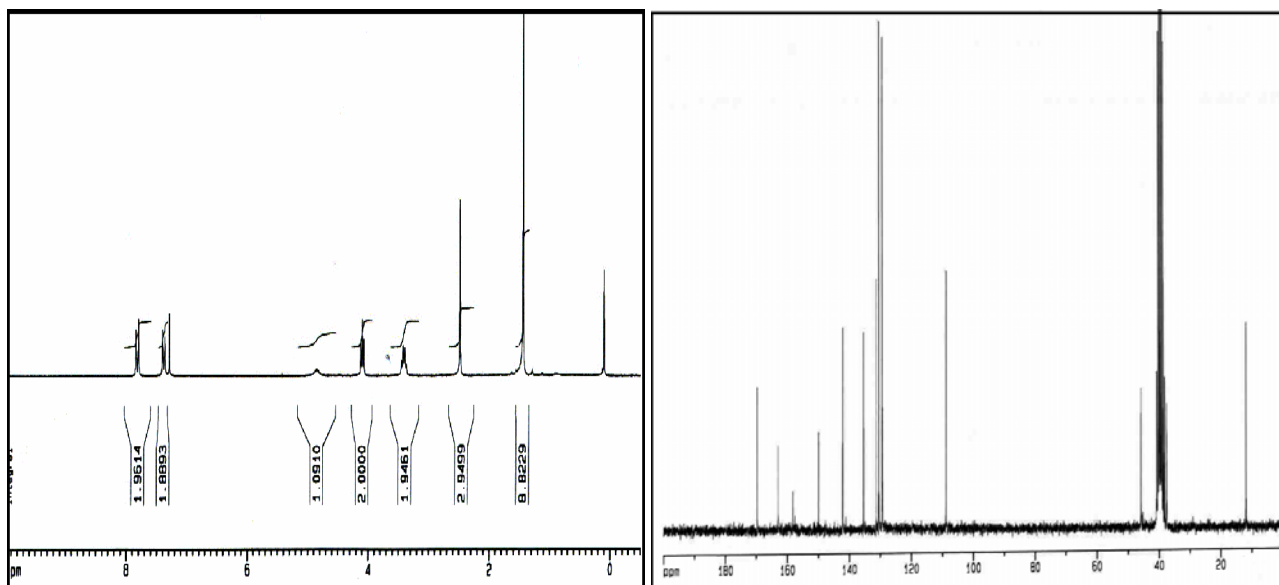


Figura III.36 - Espectres de ^1H -RMN de ^{13}C -RMN de (7).

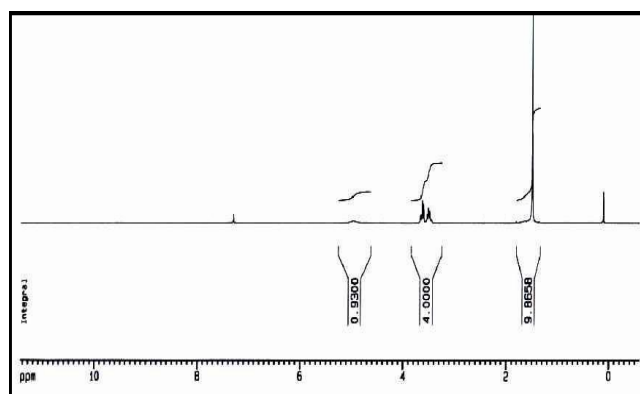
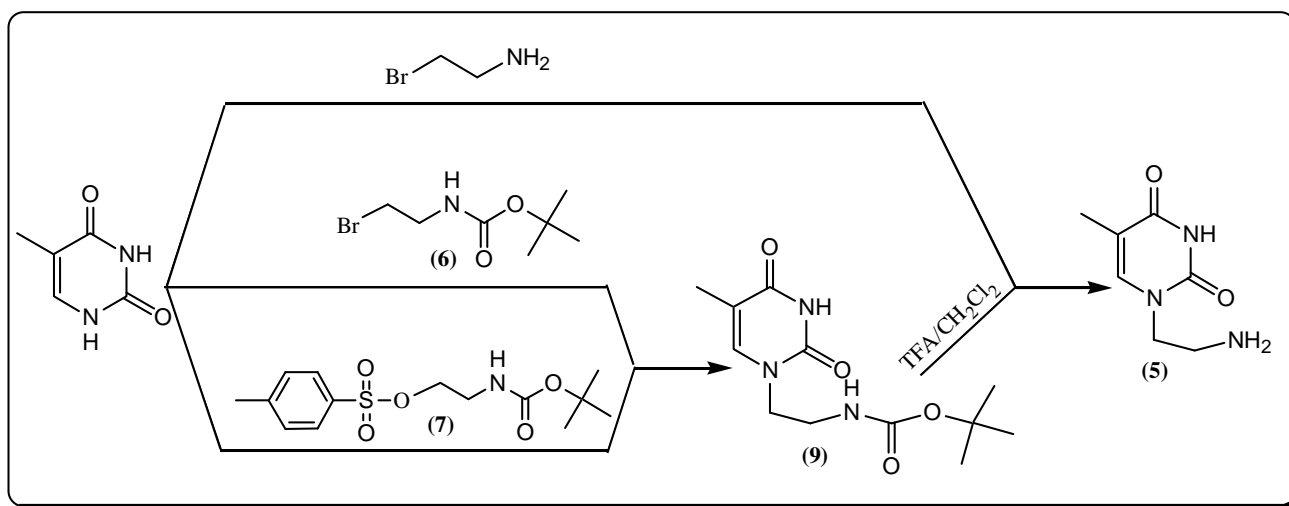


Figura III.37 - Espectre de ^1H -RMN de (9).

III.3.2. Síntesi de N^1 -2-aminoetilimidina (5) per alquilació directe de la timina.

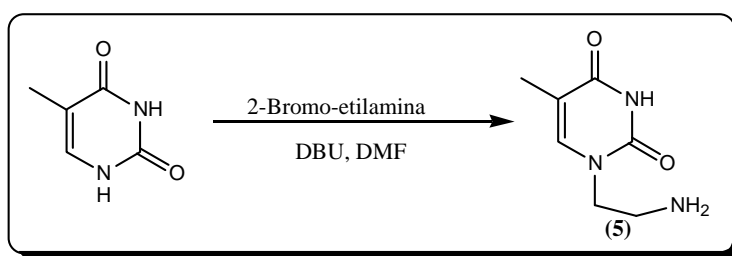
L'alquilació directe de timina per tal d'obtenir N^1 -2-aminoetilimidina (5) sense cap protecció a l'anell heterocíclic, s'ha assajat amb tres reactius diferents, 2-bromoetilamina, N -BOC-2-bromoetilamina (6) i tosilat de N -BOC-2-aminoetil (7) tal com s'indica a l'Esquema III.9.



Esquema III.9 - Alquilació directe de timina.

III.3.2.1. Alquilació amb 2-bromoetilamina.

La *N*-alquilació de timina amb 2-bromoetilamina (Esquema III.10) no estava descrita a la literatura. Aquesta reacció es va assajar agafant com a referència la reacció d'alquilació de timina amb *N*-BOC-serina- β -lactona en presència de DBU descrita per Diederichsen⁴³ obtenint un 58 % de rendiment de producte alquilat.



Esquema III.10 - Alquilació directe de timina amb 2-bromoetilamina.

Partint de 0'1 gr. de timina s'han assajat diferents condicions per aquesta reacció, modificant l'estequiometria, el temps, la temperatura i el dissolvent (les quals es resumeixen a la Taula III.3). En cap cas es va detectar la formació de quantitats significatives de producte alquilat desitjat. El seguiment de la reacció s'ha realitzat per TLC (MeOH:AcOEt:AcOH, 3:2:0.3) i HPLC, detectant a la longitud d'ona de 265 nm, màxim d'absorció de la timina, i a la qual no absorbeix la DMF, evitant així que el senyal del dissolvent emmascari la resta de senyals dels reactius i productes.

Taula III.3 - Condicions assajades per a l'alquilació directe de la timina amb 2-bromoetilamina. A les entrades 3 i 5 s'indica la potència d'escalfament amb MWI.

Entrada	Equivalents de 2-Bromoetilamina	Equivalents DBU	Temp.	Temps	Dissolvent
1	1	2	100 °C	12 h	DMF
2	2	3	100 °C	48 h	DMF
3	1	-	250 W 80 W	2 min. 4 min.	DMF
4	2	3	100 °C	48 h	DMF anhidre
5	1	2	80W	4 min.	DMF
6	1	2	100 °C	48 h	DMF anhidre
7	1	2	25 °C	48 h	DMF

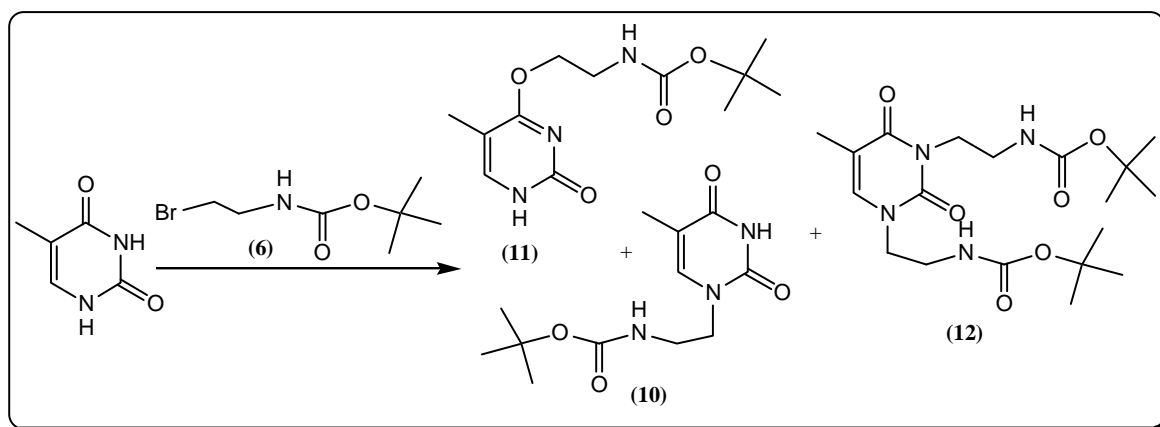
Sota les condicions de reacció indicades a les entrades 1, 2, 3 i 5 (Taula III.3) no es varen observar canvis en l'evolució de les reaccions.

Quan es condueix la reacció amb DMF anhidre (entrada 4, Taula III.3) es pot observar, per TLC i HPLC l'aparició d'un nou producte (R.f. 0.45, t_R 8.3 min.) en proporció molt minoritària (<10%) que absorbeix a l'UV i revela amb ninhidrina. Després de 19 h de reacció la proporció de producte sintetitzat és del 13 % i amb temps més llargs de reacció s'observa l'aparició d'impureses (nous senyals a l'HPLC a 9, 9.3 i 10 min. amb relacions d'àrea del 12, 4 i 9 % respectivament). Al repetir la reacció sense excés de reactiu (entrada 6, Taula III.3) els resultats obtinguts són molt similars, amb la diferència de que tan sols s'observa l'aparició de dos senyals a 8.3 i 9 min. amb relacions d'àrea del 15 i del 4 % respectivament. Si la reacció es du a terme a menys temperatura (entrada 7, Taula III.3) s'observen a la TLC tres nous senyals que donen positiu amb la ninhidrina, d'aquests un presenta absorció a l'UV (R.f. 0.67, t_R 8.3 min.) i els altres dos no (R.f. 0.64 i 0.33), els senyals observats són poc intensos respecte als reactius de partida. En el seguiment per HPLC, a les 19 h de la reacció s'observa la formació del producte amb t_R 8.3 min. amb una proporció del 13 %. Tot considerant la possibilitat de que el producte amb t_R 8.3 min pot

ser el desitjat, i tenint en compte la seva baixa formació, es va resoldre passar a estudiar un altre mètode de preparació.

III.3.2.2. Alquilació amb *N*-BOC-2-bromoetilamina (**6**).

L'alquilació de timina amb *N*-BOC-1-(2-bromoetil)-3-(2-clorobenziloxicarbonil-amino)-propilamina en DMF en presència de K_2CO_3 ha estat descrita per Dallaire i Arya⁴⁴. El mateix tipus de procés s'ha intentat aplicar en aquest treball per a l'alquilació de timina amb *N*-BOC-2-bromoetilamina (**6**) per donar el producte esperat *N*¹-(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (**10**). D'acord amb la literatura citada, la reacció pot conduir a diverses barreges dels productes indicats a l'Esquema III.11, en el seu cas les millors condicions varen conduir a l'obtenció del producte esperat amb rendiments del 60%.



Esquema III.11 – Possibles productes derivats de l'alquilació de timina amb *N*-BOC-2-bromoetilamina (**6**).

Les diferents condicions de reacció estudiades es mostren a la Taula III.4. El seguiment de la reacció s'ha realitzat per HPLC i s'ha pogut observar la formació dels tres productes, amb temps de retenció de 12.8 min., 13.5 min. i 18.0 min, que s'han identificat respectivament com les estructures *N*¹-(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (**10**), *O*⁴-(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (**11**) i *N*¹,*N*³-di-(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (**12**).

Taula III.4 - Diferents condicions de reacció per a l'alquilació directe de timina amb *N*-BOC-2-bromoetilamina (**6**). L'estimació del % de formació s'ha fet per HPLC.

Entrada	Equivalents de reactiu (6)	Equivalents de base	Temp. o potència de MWI	Temps	Dissolvent	% (10)	% (11)	% (12)
1	1	1 de Na ₂ CO ₃	25 °C	24 h	DMF	6	8	5
2	1	1 de K ₂ CO ₃	40 °C	12 h	DMF	10	15	10
3	1	1 de Na ₂ CO ₃	25 °C 220 W	24 h 4 min	DMF	8	8	11
4	1	1 de K ₂ CO ₃	4 °C	48 h	DMF	7	4	8
5	0'3	1 de K ₂ CO ₃	80 °C	48 h	DMSO anhidre	10	4	11

En el procés de purificació dels crus de reacció per rentats amb HCl 0.05 M, NaHCO₃ al 5 % o amb dissolució de NaCl saturat s'observa que els productes amb temps de retenció de 12.8 i 13.5 min. s'extreuen a la fase aquosa, en canvi el producte amb temps de retenció de 18.0 min. es queda junt amb la resta del reactiu (**6**) que no ha reaccionat a la fase orgànica. L'evaporació de la fase aquosa i la separació per columna flash ha permès obtenir i caracteritzar per ¹H-RMN els compostos (**10**) i (**11**). L'espectre de ¹H-RMN del producte amb temps de retenció de 13.5 min era coherent amb l'estructura del producte (**11**), presentant el senyal corresponent al protó en posició 6 de l'anell de timina desdoblada, indicant el seu acoblament amb el protó N-H veí, (Figura III.38). Tanmateix, es va identificar per ¹H-RMN que el producte amb temps de retenció de 12.8 min. concordava amb l'estructura de (**10**) (Figura III.39).

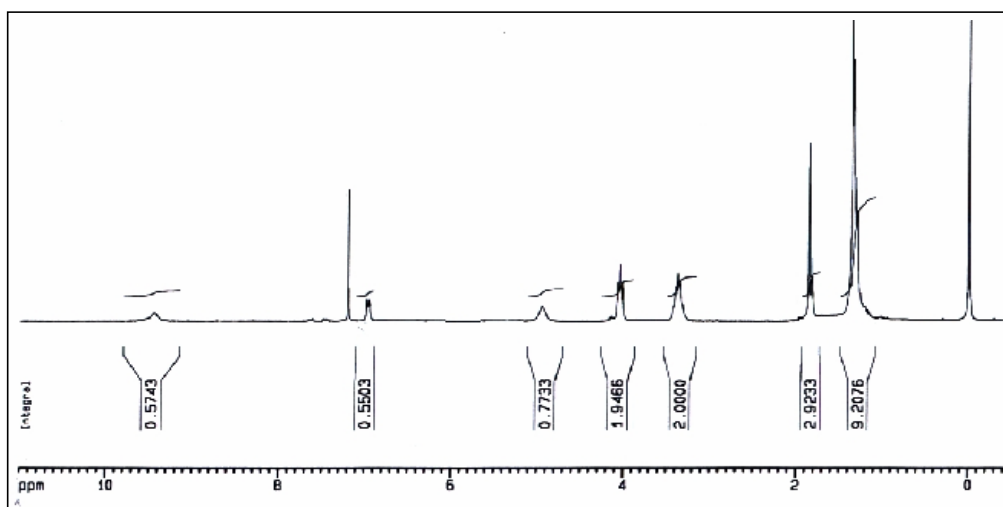


Figura III.38 - Espectre de ^1H -RMN de (11).

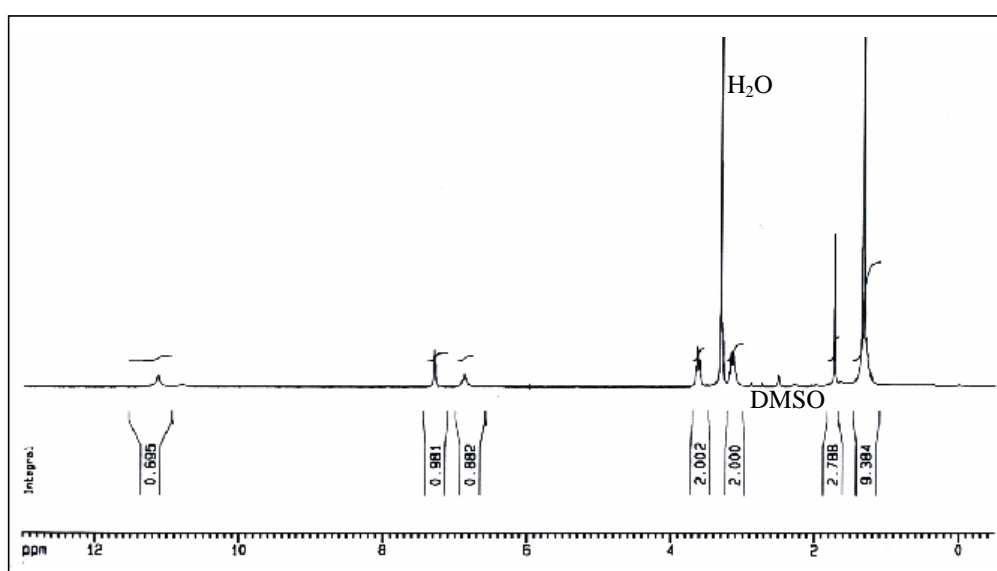
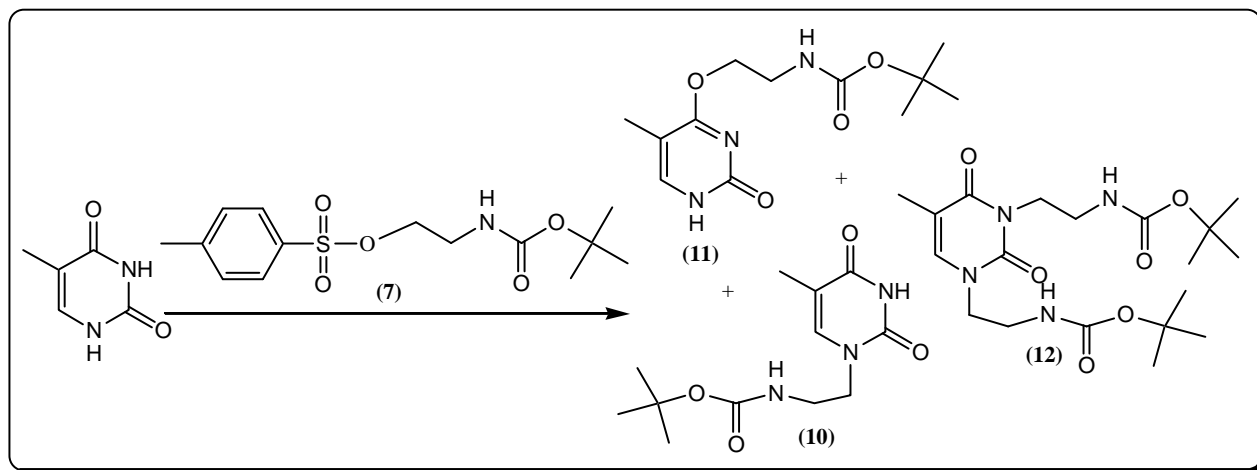


Figura III.39 - Espectre de ^1H -RMN de (10).

III.3.2.3. Alquilació amb tosilat de *N*-BOC-2-aminoetil (7).

L'alquilació directe de timina amb el tosilat de *N*-BOC-2-aminoetil (7) (Esquema III.12) també s'ha assajat sense resultats remarcables, tot i que ha proporcionat millors resultats en l'obtenció del producte (10), arribant fins un rendiment del 35%, que sempre

anava acompanyat d'impureses similars a les descrites en l'apartat anterior. Els resultats es resumeixen a la Taula III.5.



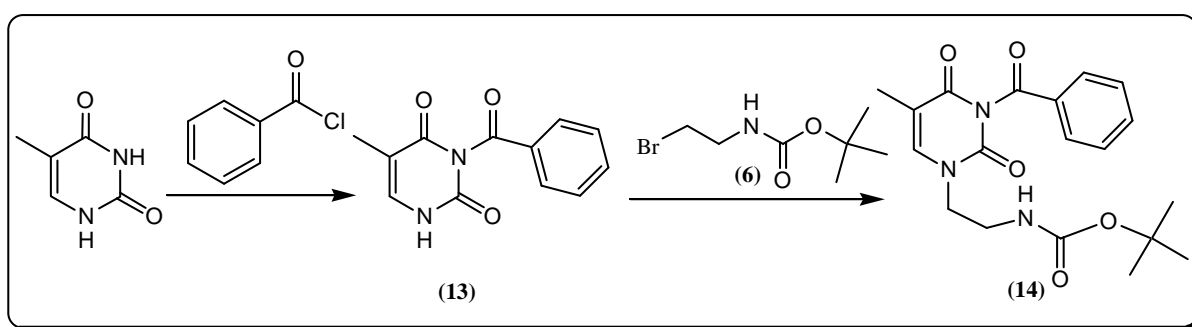
Esquema III.12 - Alquilació directe de timina amb tosilat de *N*-BOC-2-aminoetil (7).

Taula III.5 - Diferents condicions de reacció per a l'alquilació directe de timina amb tosilat de *N*-BOC-2-aminoetil (7).

Entrada	Equivalents de reactiu (7)	Equivalents de base	Temp. °C	Temps	Dissolvent	% (10)	% (11)	% (12)
1	1	3 de DBU	25	24 h	DMF	19	14	17
2	2	2 de DBU	25	48 h	DMF	35	23	4
3	1	1 de Na ₂ CO ₃	50	48 h	DMF	12	9	4
4	1	1 de K ₂ CO ₃	50	48 h	DMF	22	10	19

III.3.3. Síntesi de *N*³-benzoil-*N*¹-(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (14)

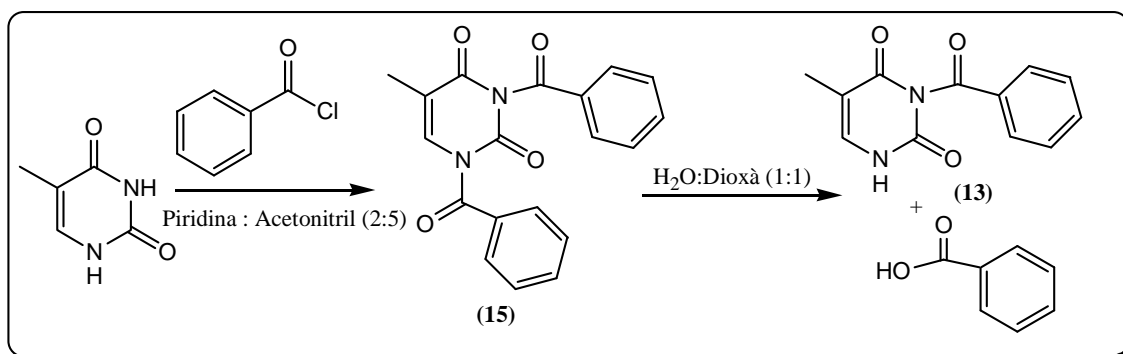
Donat els mals resultats obtinguts per a la síntesi de l'intermedi *N*¹-2-aminoetiltimina (5) mitjançant l'alquilació directa de timina, s'ha modificat la síntesi vers la utilització del seu anàleg protegit *N*³-benzoil-*N*¹-(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (14). La formació d'aquest compost implica l'obtenció del intermedi *N*³-benzoiltimina (13), per tal d'evitar *N*- ò O-alquilacions no desitjades com s'ha observat als apartats anteriors (Esquema III.13).



Esquema III.13 - Síntesi de *N*³-benzoil-*N*¹-(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (14).

III.3.3.1. Síntesi de *N*³-benzoiltimina (13)

La protecció de timina amb clorur de benzoil ha estat descrita amb rendiments del 85% (Cruickshank i col.⁴⁵), en un procés basat en una benzoilació exhaustiva de l'anell de timina seguit d'una hidròlisi selectiva del grup *N*¹-benzoil (Esquema III.14).



Esquema III.14 - Protecció de la timina amb clorur de benzoil.

El procés s'ha dut a terme en aquestes condicions mitjançant dues etapes consecutives de benzoilació i d'hidròlisi. Un cop acabada la segona reacció s'acidifica fins a pH 3-4 amb àcid clorhídric 2 M i es deixa agitant 2 hores fins a precipitació completa del producte (**13**) i de l'àcid benzoic, llavors es renta amb àcid clorhídric 0.05 M. L'intent de purificació per recristal·lització tal com es trobava descrit a la literatura no es va poder repetir i es va modificar aplicant un rentat selectiu del sòlid obtingut. L'anàlisi del producte obtingut s'ha realitzat per TLC (AcOEt:Hexà, 1:1) i HPLC (detectant a la longitud d'ona de 265 nm). Els resultats obtinguts sota diferents condicions de reacció es poden veure a la Taula III.6, quan el producte final es va purificar rentant amb èter etílic es va obtenir (**13**) amb un rendiment del 85 % i una puresa del 94 % per HPLC (Figura III.40) a 220 nm, i es va identificar per ^1H -RMN (Figura III.41) i ^{13}C -RMN (Figura III.42).

Taula III.6 - Condicions assajades per a la protecció de la timina amb clorur de benzoil.

Reacció de benzoilació			Reacció d'hidròlisi selectiva			
Entrada	Equivalents de clorur de benzoil	Temps	Equivalents de K_2CO_3	Temps	Purificació	% Rdt
1	2	16 h.	2.2	12h	Recristal·lització EtOH	20
2	2	48 h	2.2	12 h	Filtrat + rentat EtOH fred	47
3	4	48 h	2.2	24 h	Filtrat + rentat EtOH/Hexà	62
4	4	48 h	2.2	24 h	Filtrat + rentat Èter	88

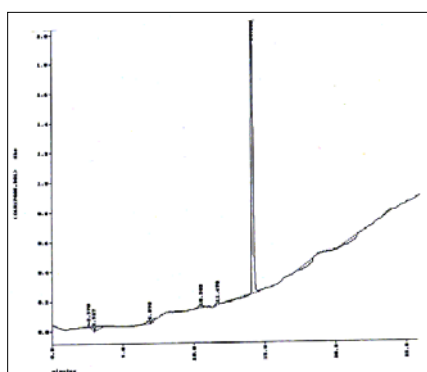


Figura III.40 - Cromatograma d'HPLC a 220 nm de (**13**).

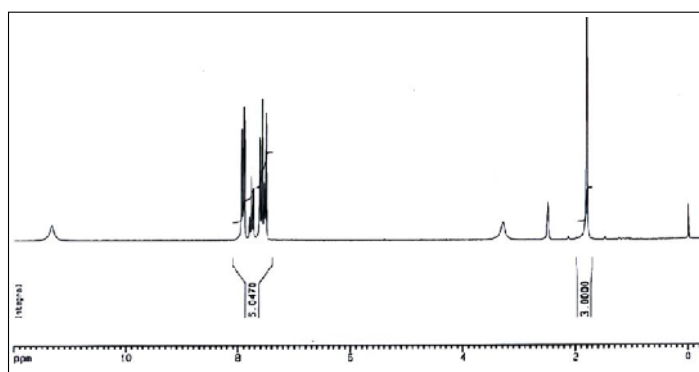


Figura III.41 - Espectre de ^1H -RMN de (**13**).

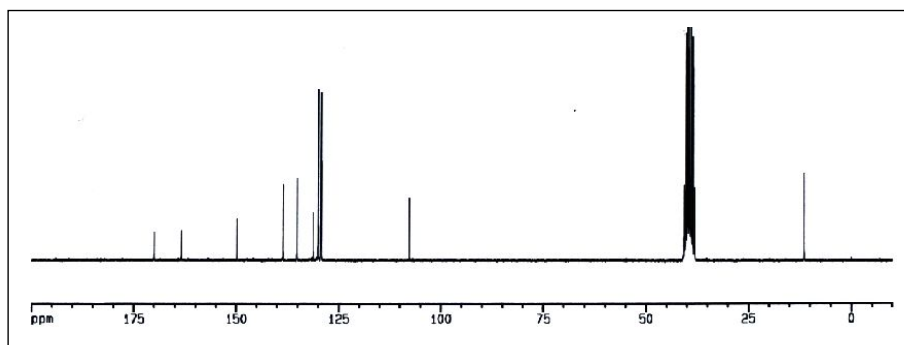
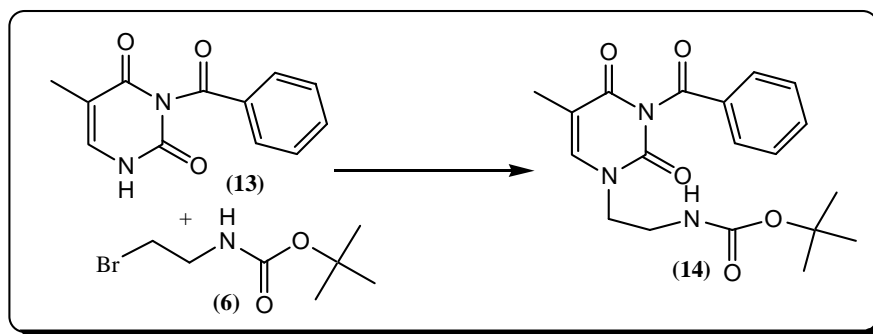


Figura III.42 - Espectre de ^{13}C -RMN de (13).

III.3.3.2. Alquilació de N^3 -benzoiltimina (13) amb N -BOC-2-bromoetilamina (6).

L'alquilació de N^3 -benzoiltimina (13) amb (*S*)-4-bromo-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-butirat de benzil en presència de K_2CO_3 i 0.1 equivalents de TBAI com a reactiu de transferència de fase en acetonitril, ha estat descrita amb rendiments del 65% (Ciapetti i col.⁴⁶). El mateix tipus de procés s'ha intentat aplicar en aquest treball per a l'alquilació de N^3 -benzoiltimina (13) amb el reactiu N -BOC-2-bromoetilamina (6) per a donar el producte esperat (14) (Esquema III.15).



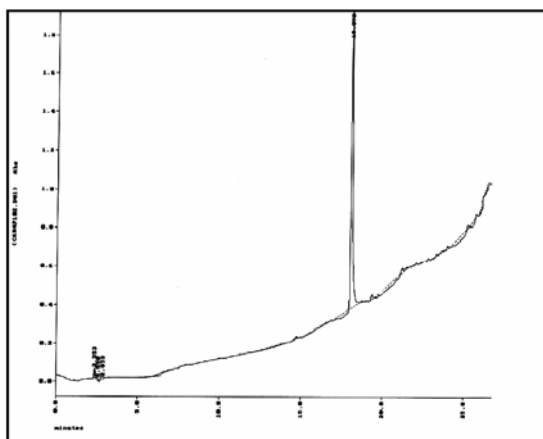
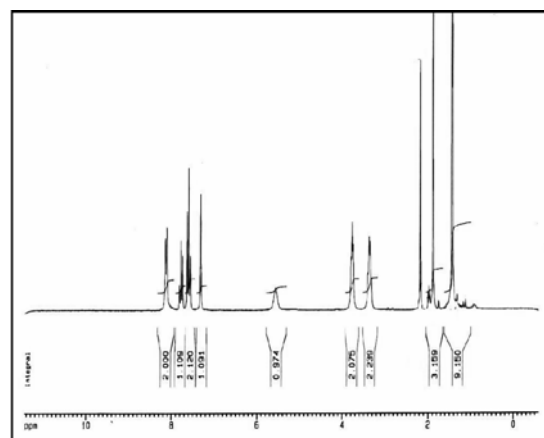
Esquema III.15 - Alquilació de la N^3 -benzoiltimina (13) amb N -BOC-2-bromoetilamina (6).

El seguiment de la reacció s'ha realitzat per TLC (AcOEt) i HPLC, detectant a la longitud d'ona de 265 nm. Els resultats obtinguts a diferents condicions de reacció es poden veure a la Taula III.7.

Taula III.7 - Condicions assajades per a l'alquilació de N³-benzoilimina (**13**) amb N-BOC-2-bromoetilamina (**6**).

Entrada	Equivalents de reactiu (6)	Equivalents de base	T.(°C)	t (h)	Dissolvent	% Rdt
1	1	1 de DBU	40	24 h	CH ₃ CN	0
2	0.45	1 de K ₂ CO ₃	50	1 h	DMF anhidre	46
3	0.45	1 de K ₂ CO ₃	70	3 h	DMF anhidre	60
4	0.45	1 de K ₂ CO ₃	70	5 h	DMF anhidre	71
5	0.83	1 de K ₂ CO ₃	70	5 h	DMF anhidre	70

La utilització d'acetonitril no va conduir a l'obtenció del producte esperat i es va substituir per DMF. La modificació de l'estequiometria, la temperatura i el temps de reacció va conduir a l'obtenció del producte (**14**) amb un rendiment del 70 % i una puresa superior al 95 % per HPLC (Figura III.43) a 220 nm, identificat per ¹H-RMN (Figura III.44) i ¹³C-RMN (Figura III.45). El procés de purificació es realitza afegint al cru de reacció el doble de volum d'aigua, s'agita durant una hora fins a precipitació completa i es filtra rentant amb una dissolució de NaHCO₃ al 5 %.

**Figura III.43** - Cromatograma d'HPLC a 220 nm de (**14**).**Figura III.44** - Espectre de ¹H-RMN de (**14**).

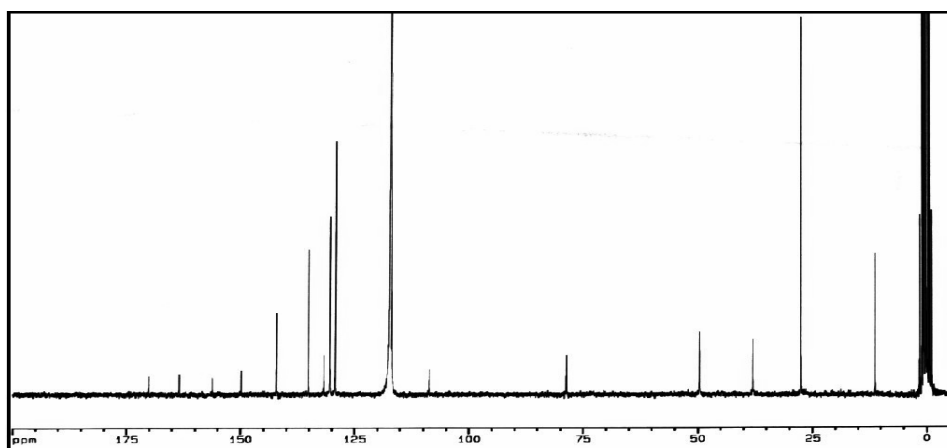
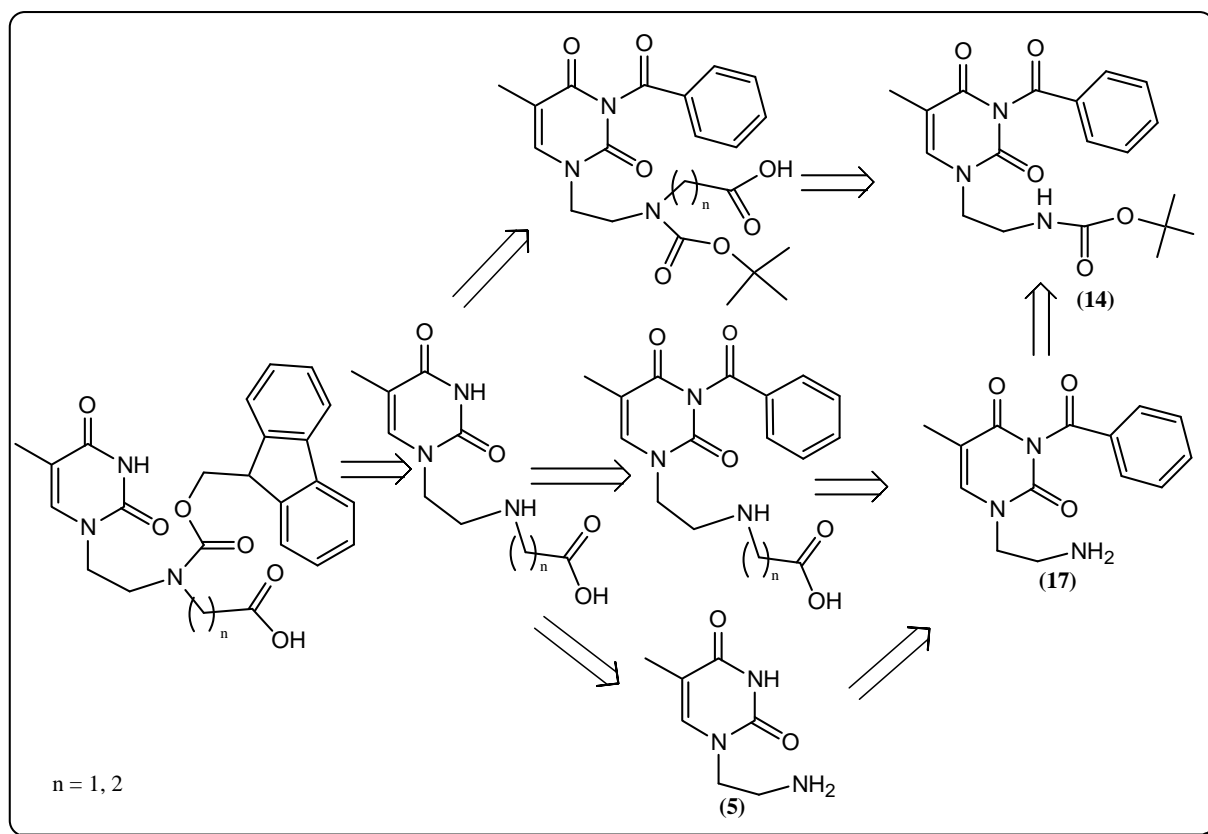


Figura III.45 - Espectre de ^{13}C -RMN de (14).

En aquest procés es pot recuperar part del reactiu de partida (13) sense reaccionar acidificant les aigües de filtració amb HCl 1 M fins a pH 3 i deixant agitar 1 h fins a precipitació completa.

III.3.4. Síntesi de nucleoaminoàcids de timina

Un cop obtingut el producte (14), la síntesi de Fmoc-Tet β Ala-OH (3) i Fmoc-TetGly-OH (4) es va enfocar a partir d'aquest intermedi, tot considerant diverses possibilitats tal com s'indica a l'Esquema III.16.



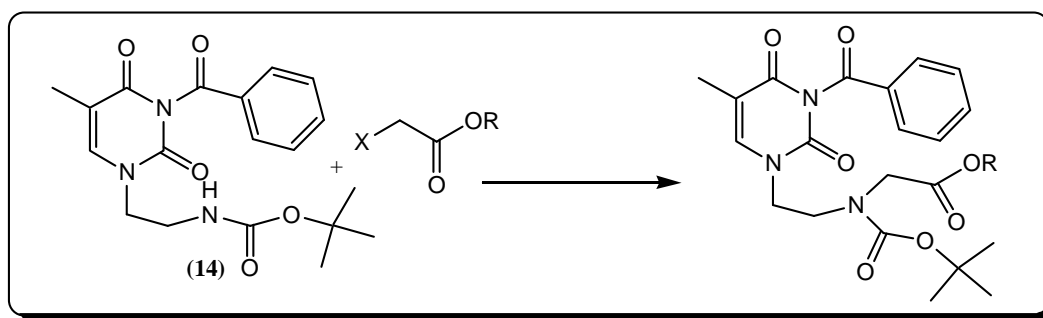
Esquema III.16 - Retrosíntesi de Fmoc-TetGly-OH (**4**) i Fmoc-TetβAla-OH (**3**)

a partir de (**14**) i les seves alternatives.

En primer lloc es va intentar l'alquilació directa de (**14**) sense èxit. Posteriorment es va provar l'alquilació a partir de (**17**) prèvia desprotecció del grup BOC i finalment es va haver de modificar la síntesi alquilant (**5**) després de la desprotecció del grup BOC i el grup benzoil.

III.3.4.1. Síntesi de Fmoc-TetGly-OH (**4**) a partir de (**14**)

Utilitzant els estudis de Salvatore i col.⁴⁷ com a referència on es descriu l'alquilació d'una ampla gamma de carbamats amb hal·lurs fent servir Cs_2CO_3 , DMF i TBAI com a reactiu de transferència de fase, a temperatura ambient i en tan sols 6 hores, es va intentar l'alquilació de (**14**) en condicions similars (Esquema III.17). El seguiment de les reaccions s'ha realitzat per HPLC, detectant a la longitud d'ona de 220 i 265 nm. Els resultats obtinguts a diferents condicions de reacció es poden veure a la Taula III.8.



Esquema III.17 - Alquilació del carbamat (14).

Taula III.8 - Condicions assajades per a la alquilació del carbamat (14).

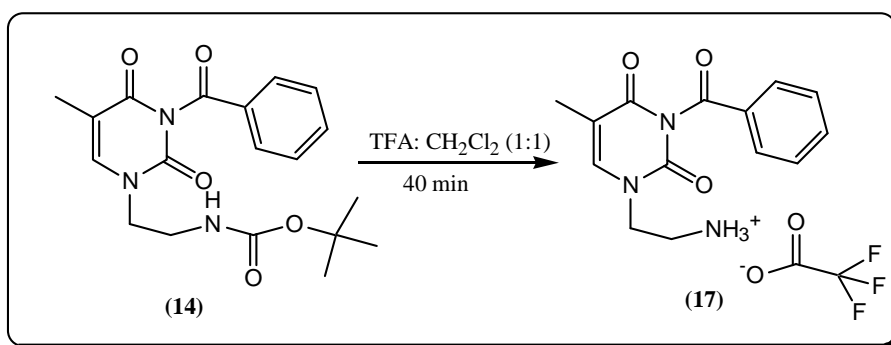
Entrada	Equivalents d'agent alquilant	Equivalents de base	Temp. °C	Temps	Dissolvent	% Rdt.
1	3 (Ac. bromoacètic)	3 (Cs ₂ CO ₃)	23	24 h	DMF	0
2	3 (Ac. bromoacètic)	3 (Cs ₂ CO ₃)	100	24 h	DMF	0
3	1.2 (Cloroacetat d'etil)	1.2 (LDA)	-77 a t.a.	12 h	CH ₂ Cl ₂	0
4	2 (Cloroacetat d'etil)	2 (LDA)	-77 a t.a.	12 h	CH ₂ Cl ₂	0

Ni en els intents d'alquilació amb d'àcid bromoacètic i Cs₂CO₃, ni en els realitzats amb cloroacetat d'etil i LDA, es va apreciar cap modificació del producte de partida i tampoc es va veure que aparegués cap producte nou. Les condicions de reacció estan indicades a la Taula III.8. En aquest punt es va considerar adequat provar l'alquilació a partir de (17).

III.3.4.2. Síntesi de Fmoc-TetGly-OH (4) a partir de (17).

L'eliminació desprotecció del grup BOC de (14) va proporcionar quasi quantitativament el corresponent intermedi *N*¹-2-aminoetil-*N*³-benzoiltimina (17) (Esquema III.18). La reacció amb TFA:CH₂Cl₂ (1:1) es va ajustar en temps per tal de controlar l'eliminació del grup benzoil de l'anell de timina que també té lloc allargant el temps de reacció i sobretot augmentant la proporció de TFA. El seguiment de la reacció s'ha realitzat per TLC i HPLC. Amb temps de reacció d'1 hora ja s'observa l'eliminació completa del

grup BOC, a temps superiors es detecta la hidròlisi parcial del grup benzoil. L'eliminació de l'excés de TFA es va aconseguir utilitzant èter per arrossegar-lo al rotavapor i després amb la bomba de buit.



Esquema III.18 - Desprotecció del grup BOC del producte (14).

El trifluoroacetat de *N*¹-2-aminoetil-*N*³-benzoiltimina (17) s'ha obtingut de forma quantitativa i amb una puresa del 93 % per HPLC (Figura III.46) a 220 nm, i s'ha identificat per ¹H-RMN (Figura III.47) i ¹³C-RMN (Figura III.48).

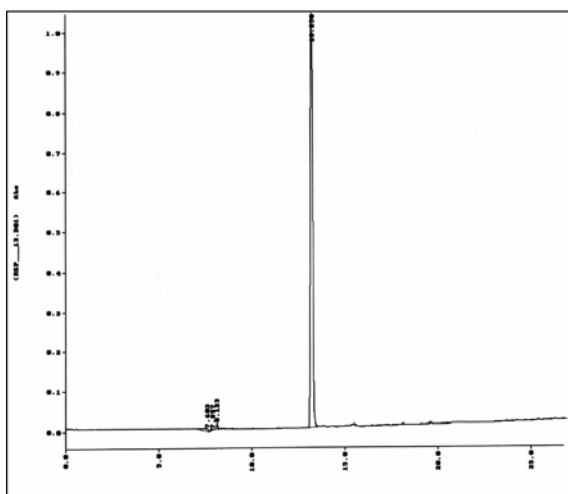


Figura III.46 - Cromatograma d'HPLC a 220 nm de (17).

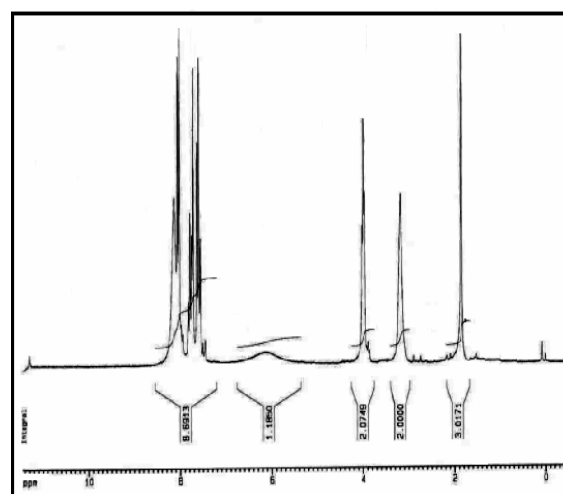


Figura III.47 - Espectre de ¹H-RMN de (17).

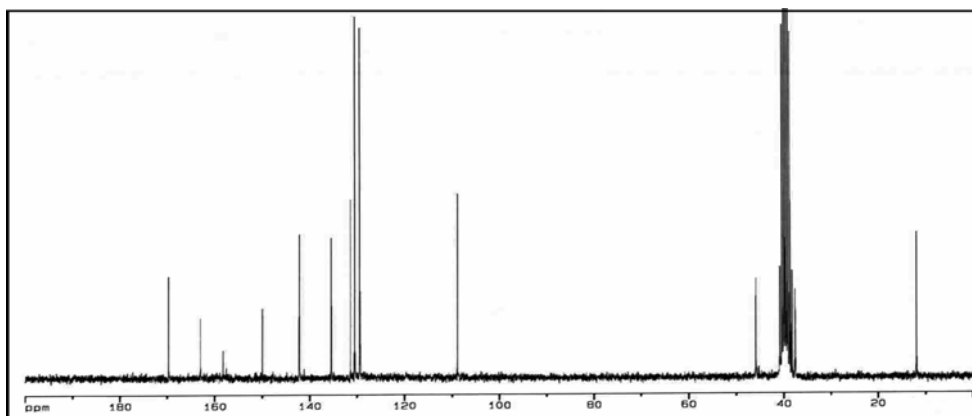
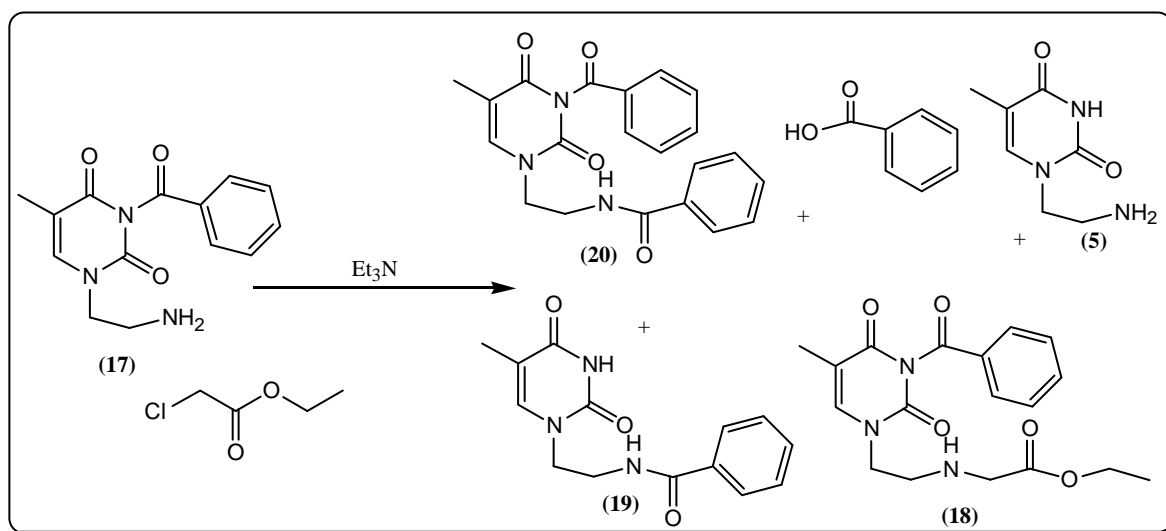


Figura III.48 - Espectre de ^{13}C -RMN de (17).

L'alquilació de N^1 -(2-amino-etil)- N^3 -benzoilimidina (17) es va intentar amb cloroacetat d'etil aplicant condicions similars a les emprades per a l'alquilació de 2-aminoetanol amb àcid cloroacètic en medi aquós, que ha estat descrita amb rendiments del 43 % per Lowe i Vilaivan⁴⁸. Les condicions de reacció estan resumides a la Taula III.9. El seguiment de la reacció s'ha realitzat per HPLC, amb detecció a 265 nm. (Figura III.49), i ja des dels inicis de la reacció es pot observar la formació d'una barreja complexa de reacció en la qual cap dels compostos principals formats correspon al compost desitjat (18). S'observa la formació de productes provinents de la migració del grup benzoil de la posició 3 de l'anell al grup amino primari, tal com s'indica a l'Esquema III.19.



Esquema III.19 - Alquilació de (17) amb cloroacetat d'etil i trietilamina.

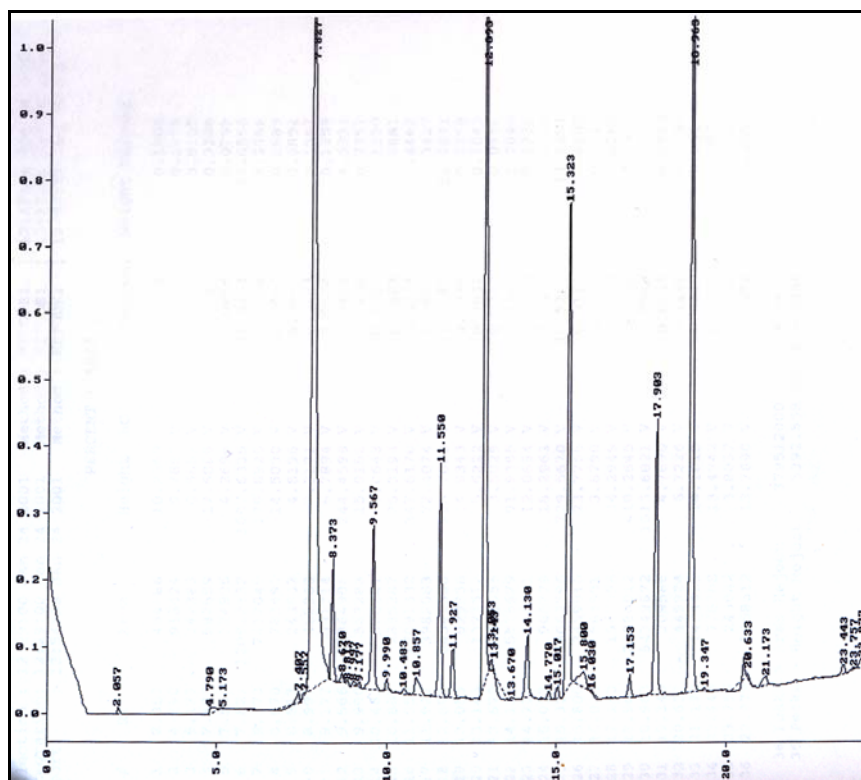


Figura III.49 - Cromatograma d'HPLC a 265 nm. del cru de reacció.

Els resultats obtinguts a diferents condicions de reacció es poden veure a la Taula III.9. Els productes N^1 -(2-aminoetil)imina (**5**), àcid benzoic, N^1 -(N -benzoil-2-aminoetil)-timina (**19**) i N^3 -benzoil- N^1 -(N -benzoil-2-aminoetil)-timina (**20**), es varen aïllar per separació per columna “flash” amb SiO_2 i hexà/ AcOEt i s’han caracteritzat per ^1H -RMN i ^{13}C -RMN (Figura III.54 a Figura III.55) i pel cas del producte (**20**) també per espectrometria d'ESI-MS (Figura III.56).

Taula III.9 - Condicions assajades per a la alquilació de (**17**) amb cloroacetat d’etil en medi bàsic.

Entrada	Equivalents de cloroacetat d’etil	Equivalents de Et_3N	Temps	Dissolvent	% (17)	% (18)	% (19)	% (5)	% (20)	% d’àcid benzoïc
1	0.33	3	24 h	CH_3CN	0	0	50	12	24	8
2	3	3	24 h	DMF	0	0	36	18	13	16

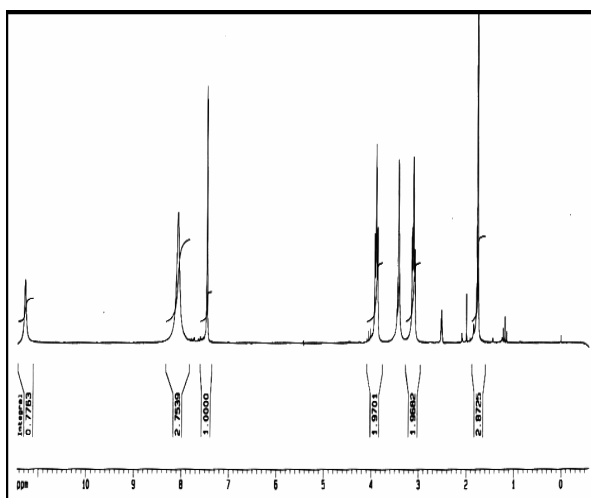


Figura III.50 - Espectre de $^1\text{H-RMN}$ de (5).

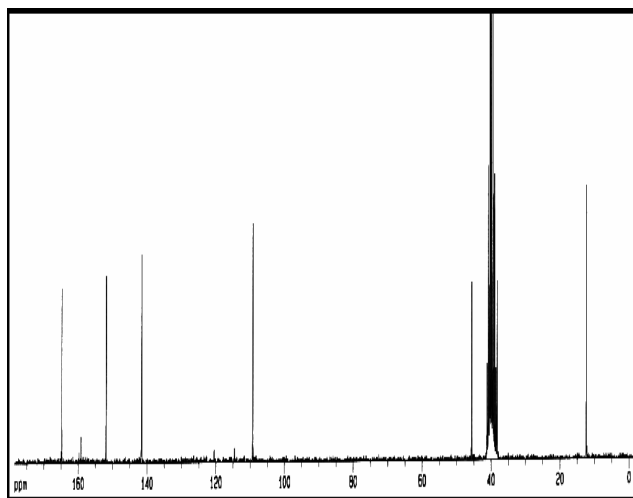


Figura III.51 - Espectre de $^{13}\text{C-RMN}$ de (5).

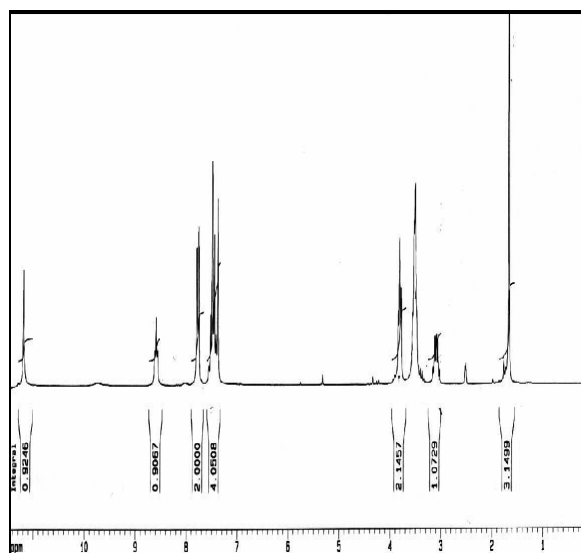


Figura III.52 - Espectre de $^1\text{H-RMN}$ de (19).

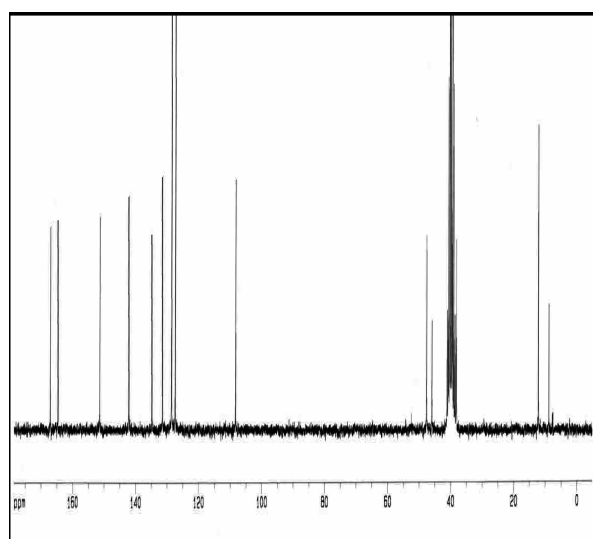


Figura III.53 - Espectre de $^{13}\text{C-RMN}$ de (19).

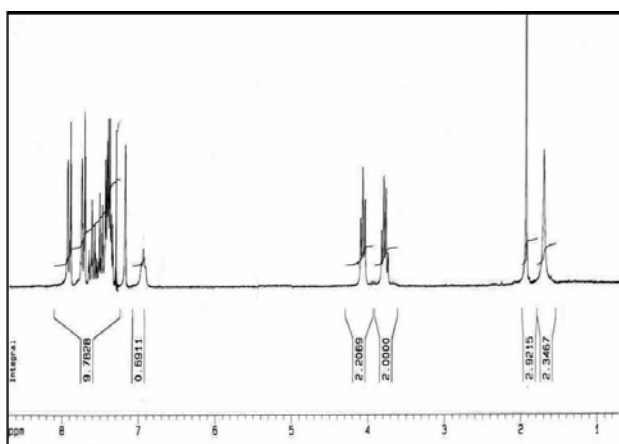


Figura III.54 - Espectre de ¹H-RMN de (20).

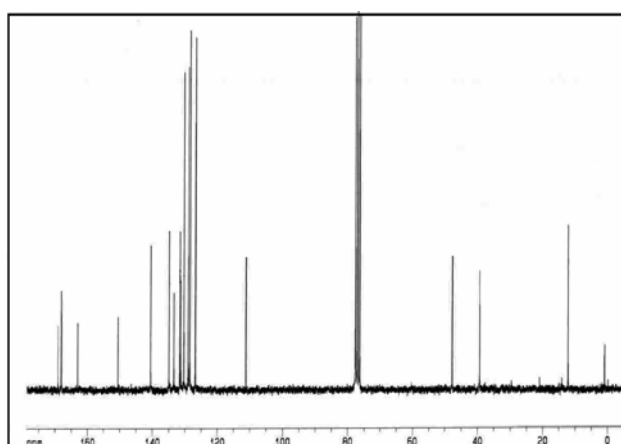


Figura III.55 - Espectre de ¹³C-RMN de (20).

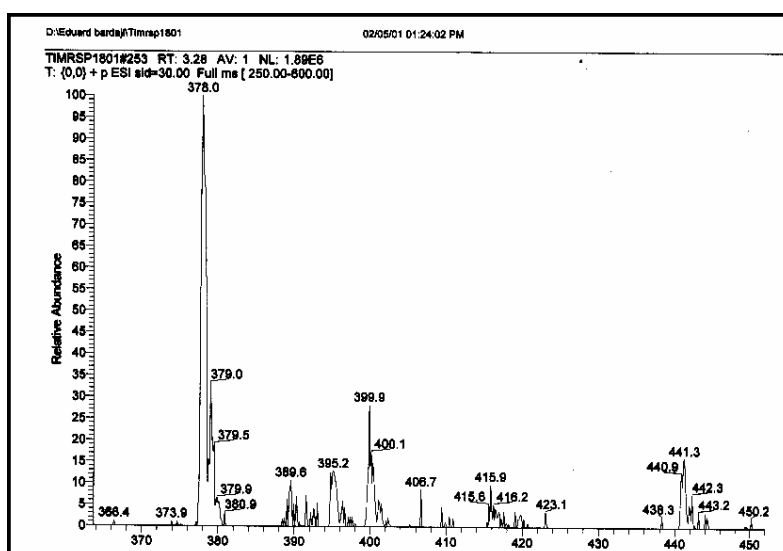
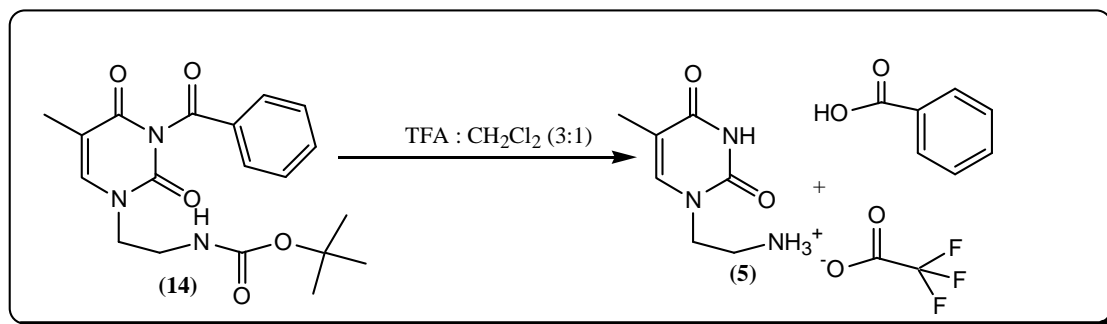


Figura III.56 - Espectre de ESI-MS (20).

III.3.4.3. Síntesi de Fmoc-TetGly-OH (4) a partir de (5).

Degut als resultats obtinguts, la síntesi de Fmoc-TetGly-OH (4) s'ha realitzat a partir del producte (5). Tal com s'ha comentat anteriorment, el tractament de (14) amb excés de TFA conduïa també a la desbenzoilació i es formava (5). La modificació de les condicions de reacció i el seguiment per HPLC va permetre comprovar que si es tractava (14) amb TFA:CH₂Cl₂, (3:1) durant 12 hores la eliminació dels grups BOC i benzoil era completa (Esquema III.20). La precipitació del producte final amb èter permetia mantenir

dissolt l'àcid benzòic i proporcionava la sal trifluoroacètica de **(5)** amb una puresa del 94 % per HPLC (Figura III.57 i Figura III.58). Els espectres del producte **(5)** de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN coincideixen amb els descrits a l'apartat anterior.



Esquema III.20 - Eliminació del grup BOC i del grup benzoil de **(14)**.

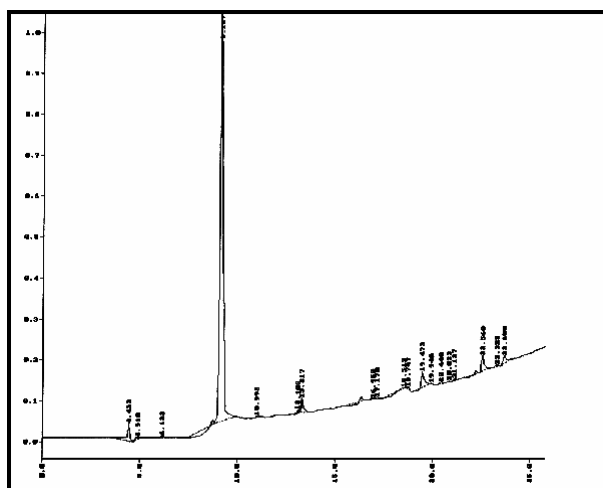


Figura III.57 - Cromatograma d'HPLC a 220 nm de **(5)**.

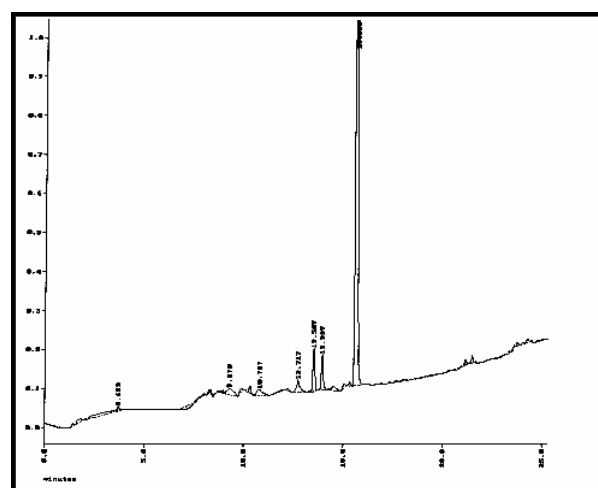
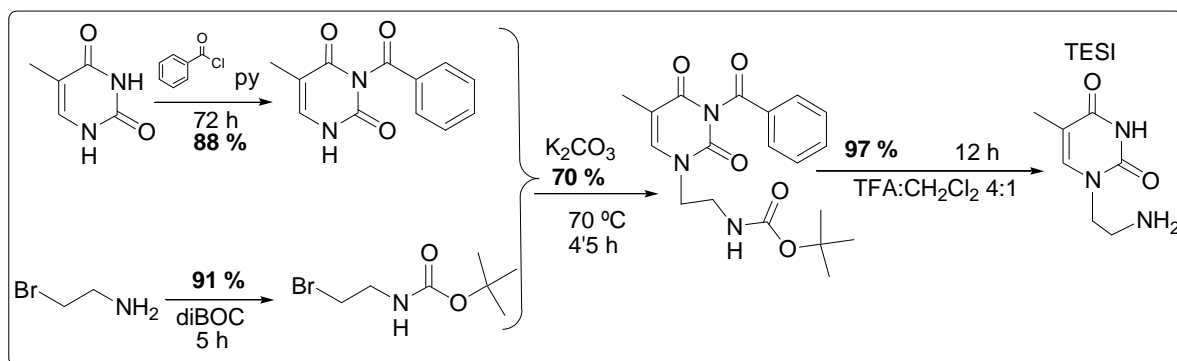


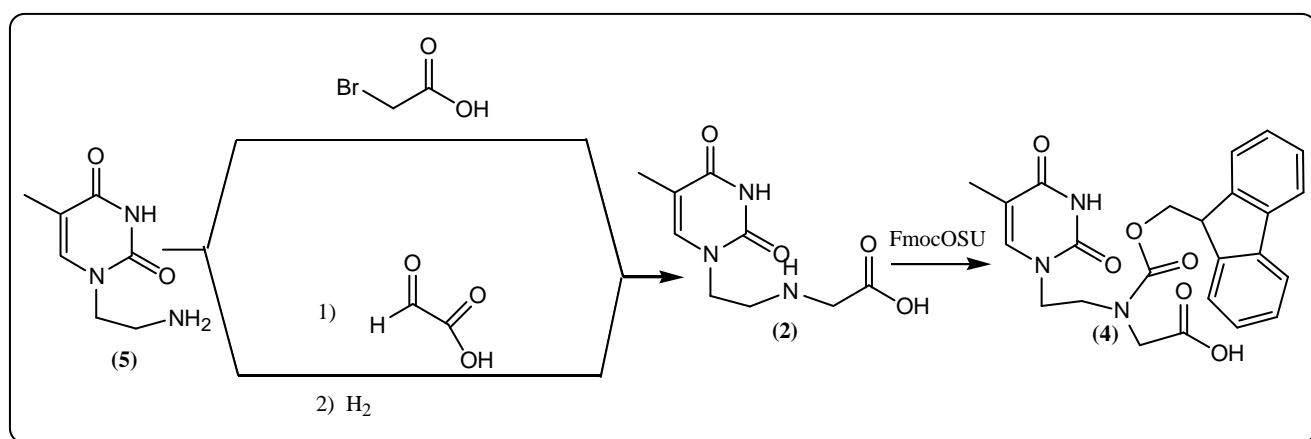
Figura III.58 - Cromatograma d'HPLC a 220 nm de la dissolució d'èter on el pic majoritari és l'àcid benzòic.

La síntesi de l'intermedi N^1 -2-aminoetilimina **(5)** s'ha aconseguit mitjançant el procés seguit a l'Esquema III.21 amb un rendiment global del 60 % que millora els descrits anteriorment a la realització d'aquests treballs i sense haver de purificar per columna en cap etapa.



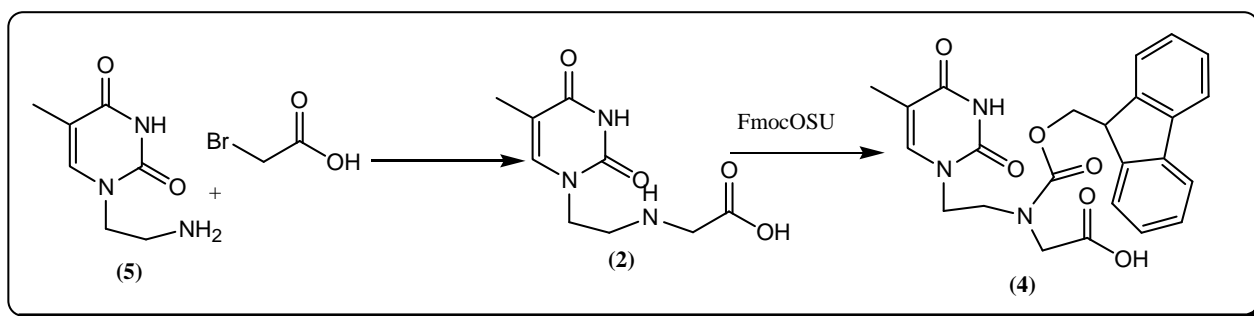
Esquema III.21 - Síntesi de N^1 -2-aminoethyltimina (**5**).

A partir de l'intermedi (**5**) s'han provat dues alternatives: l'alquilació amb àcid bromoacètic i l'aminació reductiva amb àcid glioixílic (Esquema III.22).



Esquema III.22 - Síntesi general de (**4**) a partir de (**5**).

En les proves prèvies de solubilitat s'havia observat que (**5**) a pH bàsic es extremadament insoluble en tota mena de dissolvents orgànics, inclosa la DMF, el millor dissolvent provat va resultar ser l'aigua, on a partir de 75 °C s'observava una solubilització completa. En l'intent d'alquilació de (**5**) amb àcid bromoacètic (Esquema III.23), s'han provat diferents condicions (Taula III.10). L'alquilació i la protecció amb el grup Fmoc s'han realitzat de forma consecutiva, el seguiment de la primera s'ha fet per TLC (MeOH:Et₃N, 10:1) i el de la segona per HPLC.



Esquema III.23 - Síntesi de (4) a partir de l'alquilació (5).

Taula III.10 - Condicions assajades per a la alquilació de (5) i la protecció del producte (2).

Entrada	Reacció 1 Alquilació					Reacció 2 Protecció amb Fmoc			
	Equivalents d'àcid bromoacètic	Equivalents de base	Temp. °C	Temps	Dissol.	Equivalents de Na ₂ CO ₃	Temps	Dissolvent	% Rdt
1	1	2 de Et ₃ N	25	12 h.	DMF	1	24 h	H ₂ O:CH ₃ CN	0
2	2	3 de Et ₃ N	25	24 h	DMF	1	24 h	H ₂ O:CH ₃ CN	0
3	1	3'5 de TEA	50	24 h	DMF	1	24 h	H ₂ O:CH ₃ CN	0
4	1	1 de Na ₂ CO ₃	70	24 h	H ₂ O	1	24 h	H ₂ O:CH ₃ CN	8

Un cop finalitzada la primera reacció es refreda a 0 °C i “in situ” s’afegeix carbonat de sodi i 1 equivalent de FmocOSu. Quan s’ha acabat la segona reacció s’afegeix bicarbonat de sodi al 5 % i es deixa agitant 1 hora, es filtra i les aigües del filtrat s’acidifiquen a pH 2, s’agita 1 hora més fins a precipitació del producte (4) i es torna a filtrar obtenint-se el producte pur, amb un rendiment del 8 % i una puresa del 93 % (Figura III.59). S’ha caracteritzat per ressonància de ¹H-RMN (Figura III.61), ¹³C-RMN (Figura III.62) i espectrometria de ESI-MS (Figura III.60).

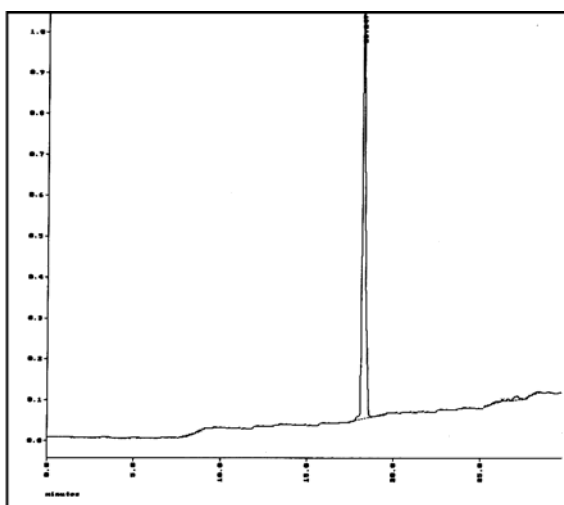


Figura III.59 - Cromatograma d'HPLC a 220 nm del cru precipitat on el pic majoritari és (4).

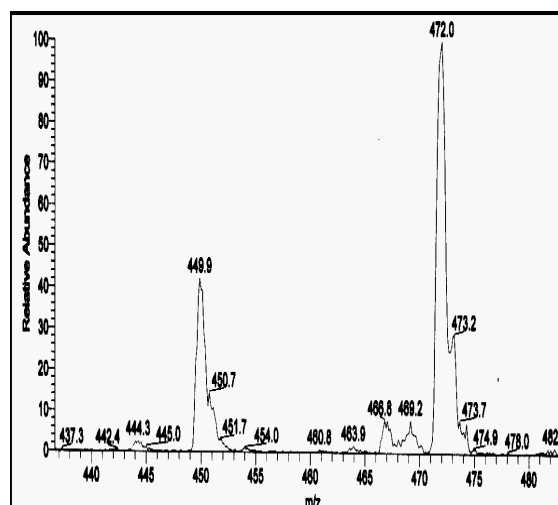


Figura III.60 - Espectre de ESI-MS de (4).

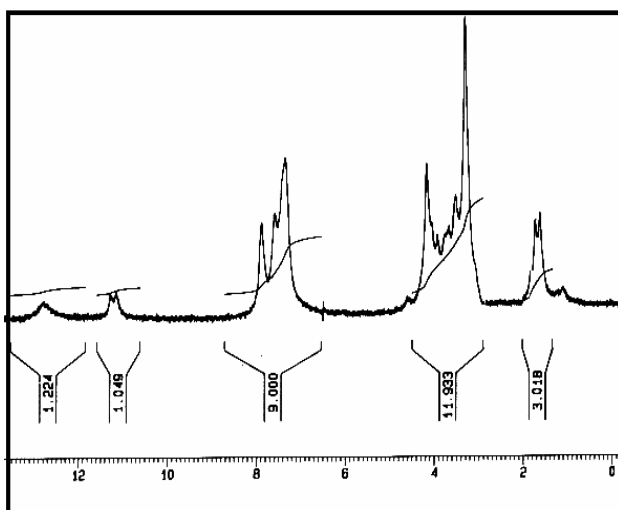


Figura III.61 - Espectre de ¹H-RMN (4).

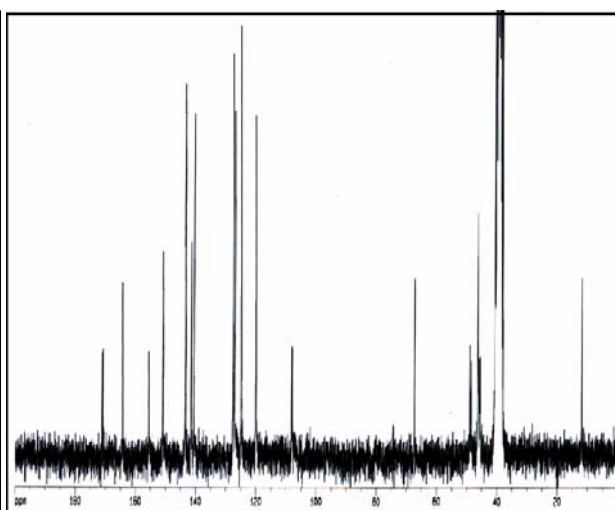
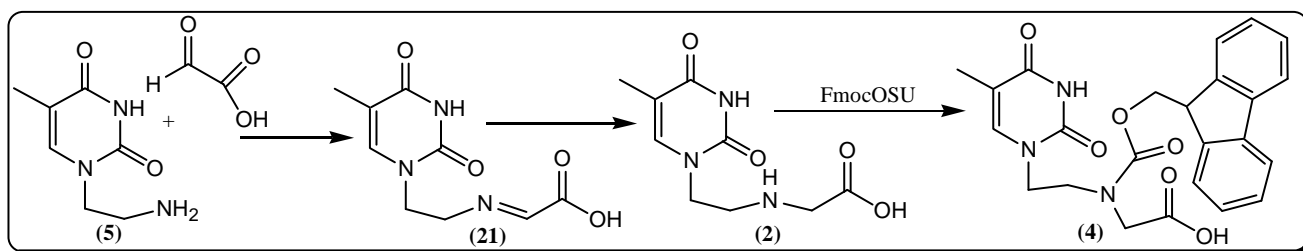


Figura III.62- Espectre de ¹³C-RMN de (4).

La segona via de preparació de (4) assajada ha estat l'aminació reductiva (Esquema III.24). Tot i que s'ha obtingut el producte desitjat els rendiments obtinguts són baixos. El seguiment de la primera reacció s'ha fet per TLC (MeOH:Et₃N, 10:1) i el de la segona reacció per TLC (AcOEt:AcOH, 10:1) i HPLC.



Esquema III.24 - Síntesi de (4) a partir de l'aminació reductiva de (5).

Taula III.11 - Condicions assajades per a la aminació reductiva de (5) i la protecció de (2).

Reacció 1					Reacció 2			Reacció 3			
Ent.	Equivalents d'àcid glioxílic	Temp °C	Temps	Dissol.	Reductor	Dissol.	Temps	Equivalents de Na ₂ CO ₃	Temps	Dissol.	% Rdt.
1	1	25	4 h	MeOH	NaBH ₄	EtOH	4 h	1	24 h	H ₂ O: CH ₃ CN	0
2	2	25	4 h	MeOH	H ₂ Pd/C	MeOH	4 h	1	24 h	H ₂ O: CH ₃ CN	10
3	1	25	12 h	MeOH	H ₂ Pd/C	MeOH	2 h	1	24 h	H ₂ O: CH ₃ CN	9
4	1	25	12 h	MeOH	H ₂ Pd/C	MeOH	3 h	1	24 h	H ₂ O: CH ₃ CN	16
5	1	65	30 min	MeOH	H ₂ Pd/C	MeOH	3 h	1	24 h	H ₂ O: CH ₃ CN	16
6	1	25	12 h	MeOH	1,4-ciclohexadié	MeOH	6 h	1	24 h	H ₂ O: CH ₃ CN	0

A les entrades 1, 2, 3, 4 i 6 (Taula III.11) es va fer servir Na₂SO₄ anhidre per assecat i quan es va acabar la primera reacció es va filtrar, per a comprovar si el sulfat de sodi emmetzinava la reacció es va realitzar una prova paral·lela a la 3 sense filtrar-lo i no es va produir la reacció de reducció, indicant que el sulfat emmetzinava aquesta reacció i per tant s'havia de filtrar abans de començar-la.

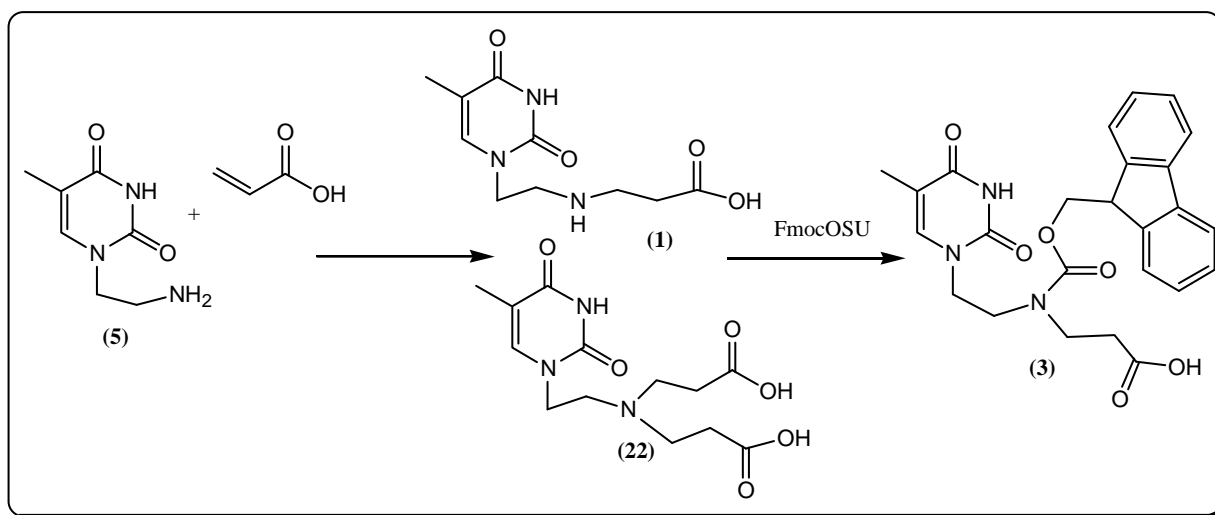
A la entrada 1 (Taula III.11) tot i que s'observava una evolució favorable de la reacció de reducció a la TLC es va veure a la tercera reacció que no es formava el producte desitjat molt possiblement perquè el NaBH₄ feia mal bé l'FmocOSu. No es va aconseguir separar per extraccions el producte (2) degut a que presentava un gran tendència a quedar-se a la fase aquosa.

A la entrada 5 no es va fer servir sulfat de sodi anhidre per assecat, en el seu lloc es va utilitzar un “Dean-Stark”, no es va deixar més temps per a la formació de la imina degut a que a partir de la mitja hora la reacció canviava de color fins a tornar-se completament negre i a la capa fina donava un cua contínua.

Un cop finalitzada la segona reacció es refreda a 0 °C i s’afegeix el carbonat de sodi i l’ FmocOSu. Quan s’ha acabat la segona reacció s’afegeix bicarbonat de sodi al 5 % i es deixa agitant 1 hora, llavors es filtra i el filtrat s’acidifica a pH 2, s’agita 1 hora fins a precipitació del producte (4) i es filtra obtenint-se el producte sòlid pur amb un 16 % de rendiment. Els espectres del producte (5) de ¹H-RMN i ¹³C-RMN coincideixen amb els de l’apartat anterior.

III.3.4.4. Síntesi de Fmoc-TetβAla-OH (3) a partir de (5)

Degut als resultats anteriors s’ha proposat la síntesi de Fmoc-TetβAla-OH (3) partint de l’intermedi (5) a través de la seva addició conjugada sobre l'àcid acrílic (Esquema III.25)⁴⁹.



Esquema III.25 - Síntesi de (3) a partir de (5).

Les condicions assajades es troben resumides a la Taula III.12. A temperatures baixes la reacció d'addició no avançava i a l'augmentar la temperatura la formació de

l'intermedi desitjat (**1**) anava acompanyada de la formació de (**22**), l'anàlisi per HPLC a permès estimar les proporcions dels productes (**1**) i (**22**) formats, i també la quantitat de FmocOSu necessari per protegir (**1**) present en aquesta barreja de forma quantitativa. La presència de (**22**) al cru de reacció es va confirmar fent un espectre de ESI-MS en aquest punt.

Taula III.12 - Condicions assajades per a l'addició conjugada de (**5**) i la protecció de (**1**).

Addició conjugada						Protecció amb Fmoc			
Entrada	Equivalents d'àcid acrílic	Equivalents de base	Temp. °C	Temps	Dissol.	Equivalents de Na ₂ CO ₃	Temps	Dissolvent	% Rdt.
1	1	7 de Et ₃ N	25	12 h.	H ₂ O	1	24 h	H ₂ O:CH ₃ CN	0
2	1	1 de Na ₂ CO ₃	50	24 h	H ₂ O	1	24 h	H ₂ O:CH ₃ CN	21
3	1	1 de Cs ₂ CO ₃	50	24 h	H ₂ O	1	24 h	H ₂ O:CH ₃ CN	0
4	1	1 de Na ₂ CO ₃	70	24 h	H ₂ O	1	24 h	H ₂ O:CH ₃ CN	30
5	1.2	1 de Na ₂ CO ₃	100	24 h	H ₂ O	1	24 h	H ₂ O:CH ₃ CN	50
6	1.3	1 de Na ₂ CO ₃	100	24 h	H ₂ O	1	24 h	H ₂ O:CH ₃ CN	56

El producte (**22**) absorbeix a l'UV, i s'ha caracteritzat per espectrometria de ESI-MS (Figura III.63).

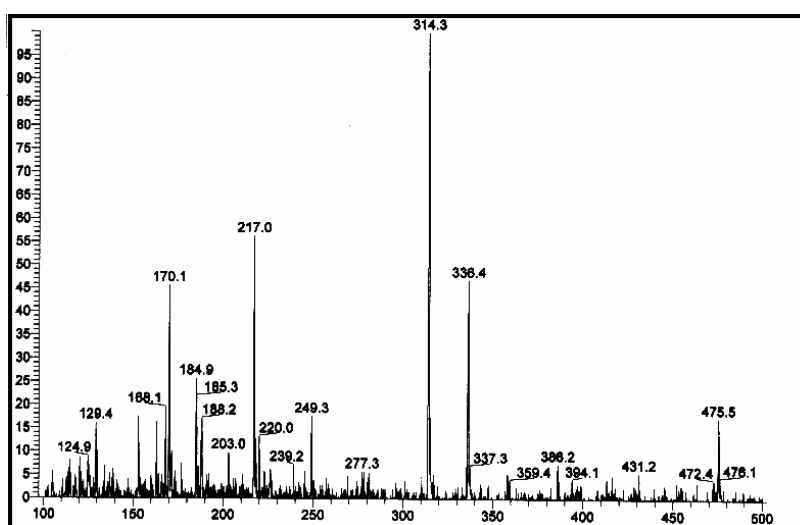


Figura III.63 - Espectre de ESI-MS del cru contenint el producte (**22**), el seu senyal és el de 314,4.

Així un cop finalitzada la reacció d'addició, es refreda a 0 °C i s'afegeix en proporció al reactiu **(5)** inicial un equivalent de carbonat de sodi, i un altre equivalent d'FmocOSu en proporció al producte **(1)** format. La reacció es segueix per HPLC i quan es detecta que tot el producte **(1)** s'ha consumit s'afegeix bicarbonat de sodi al 5 % i es deixa agitant 1 hora, es filtra, el filtrat s'acidifica a pH 2 amb HCl 1N, s'agita 1 hora fins a precipitació del producte **(3)** i es filtra al buit. El producte **(3)** s'ha obtingut amb un rendiment del 56 % i una puresa del 95 % per HPLC (Figura III.64), s'ha caracteritzat per ¹H-RMN (Figura III.65), ¹³C-RMN (Figura III.66), COSY (Figura III.67), espectrometria d'ESI-MS (Figura III.68) i FTIR.

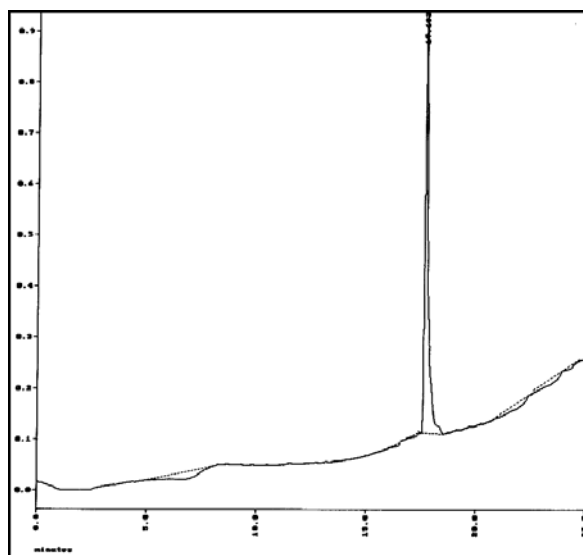


Figura III.64 - Espectre d'HPLC a 220 nm del cru precipitat on el pic majoritari és **(3)**.

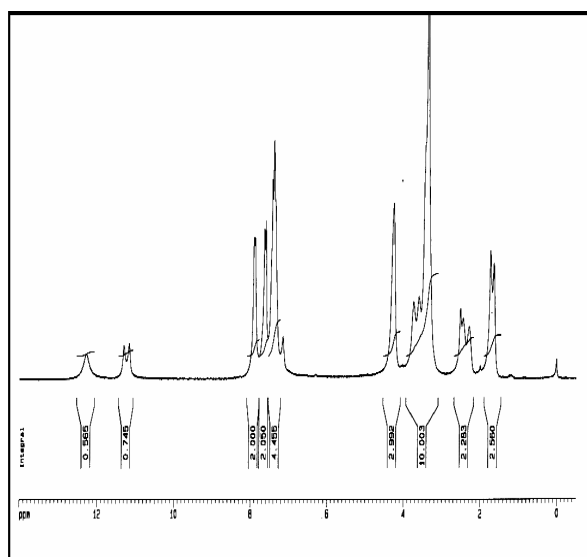


Figura III.65 - Espectre de ^1H -RMN de (3).

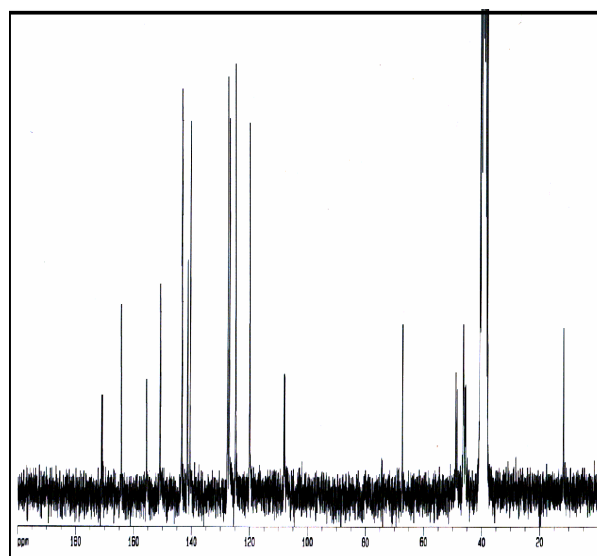


Figura III.66 - Espectre de ^{13}C -RMN de (3).

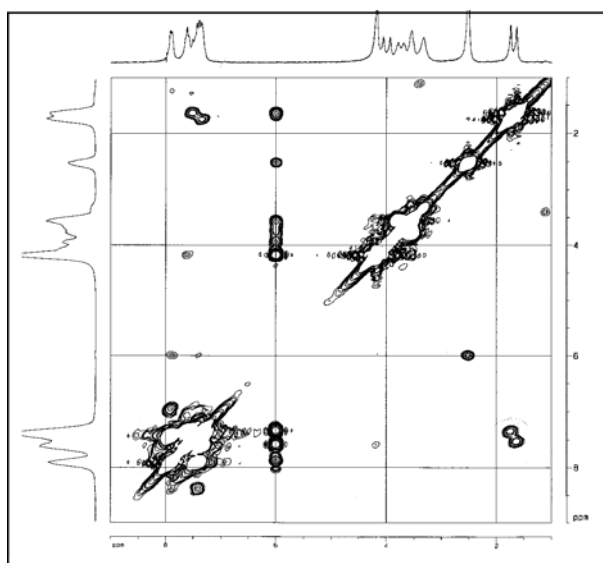


Figura III.67 - Espectre COSY de (3).

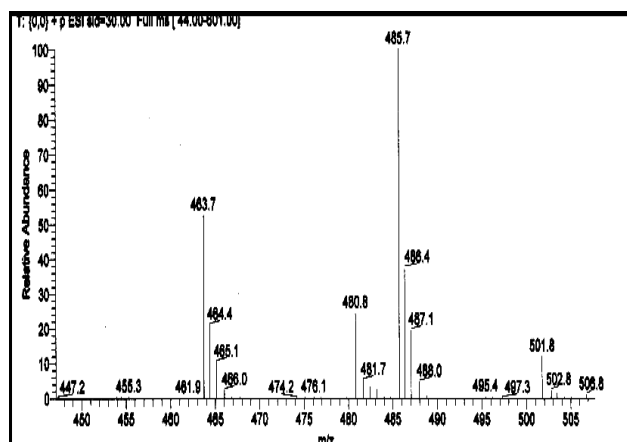


Figura III.68 - Espectre de ESI-MS de (3).

III.3.5. Síntesi de nucleopèptids.

Un cop obtingut el nucleoaminoàcid Fmoc-TEt β Ala-OH (3), s'han assajat la síntesi oligòmers a partir d'aquest monòmer i també d'estructures híbrides alternant-lo amb unitats de glicina. Els mètodes aplicats han estat els propis de la estratègia Fmoc/tBu de síntesi de pèptids en fase sòlida.

III.3.5.1. Síntesi de H-Tet β Ala-Tet β Ala-Gly-NH₂ (**23**).

El nucleopèptid H-Tet β Ala-Tet β Ala-Gly-NH₂ (**23**), s'ha sintetitzat partint de resina Fmoc-PAL-PEG-PS, sobre la qual s'han acoblat els Fmoc-Gly-OH (**24**) i Fmoc-T β EtAla-OH (**3**) utilitzant HBTU i DIPEA en DMF. L'eliminació del grup Fmoc s'ha realitzat amb piperidina/DMF 30% a temperatura ambient durant 2+8 min. Al final de la síntesi es desancora el nucleopèptid amb TFA i s'analitza el cru obtingut per HPLC ($\lambda=220$ nm), indicant la presència de H-Tet β Ala-Tet β Ala-Gly-NH₂ (**23**) amb una puresa per HPLC del 91 % (t_R 10.3 min, Figura III.69) i que s'ha caracteritzat per ESI-MS (Figura III.70).

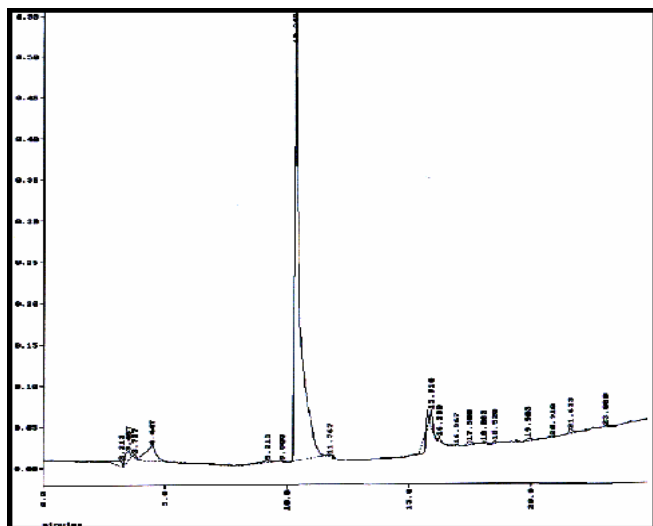


Figura III.69 - Cromatograma d'HPLC del cru de síntesi de H-Tet β Ala-Tet β Ala-Gly-NH₂ (**23**) a 220 nm.

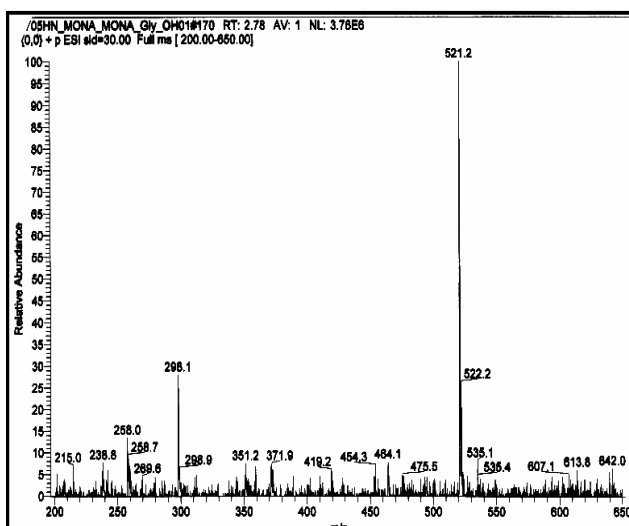


Figura III.70 - Espectre de ESI-MS de H-Tet β Ala-Tet β Ala-Gly-NH₂ (**23**).

III.3.5.2. Síntesi de H-Tet β Ala-Gly-Tet β Ala-Gly-Tet β Ala-Gly-NH₂ (**25**).

El nucleopèptid H-Tet β Ala-Gly-Tet β Ala-Gly-Tet β Ala-Gly-NH₂ (**25**), s'ha sintetitzat seguint la mateixa metodologia que el compost anterior. L'anàlisi per HPLC ($\lambda=220$ nm) del cru obtingut després del desancorament d'una alíquota de resina sense desprotecció prèvia de l'últim grup Fmoc indicava la presència del nucleopèptid protegit Fmoc-Tet β Ala-Gly-Tet β Ala-Gly-Tet β Ala-Gly-NH₂ (**26**) com a pic majoritari amb una

III.3.5.3. Síntesi de H-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-NH₂ (27).

El nucleopèptid H-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-NH₂ (27), s'ha sintetitzat amb la mateixa metodologia que els dos compostos anteriors. L'anàlisi per HPLC ($\lambda=220$ nm) del cru obtingut després del desancorament d'una al·lotiquota de resina, indica la presència del nucleopèptid H-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-NH₂ (27) com a pic majoritari amb una puresa per HPLC del 90 % (t_R 16.0 min, Figura III.74) i que s'ha analitzat per MALDI-MS (Figura III.75).

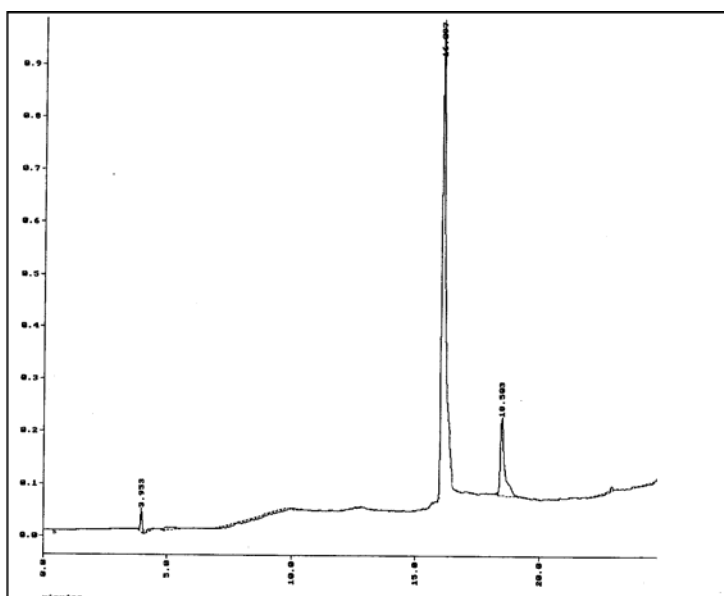


Figura III.74 - Cromatograma d'HPLC del cru de síntesi de Fmoc-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-NH₂ (28) a 220 nm.

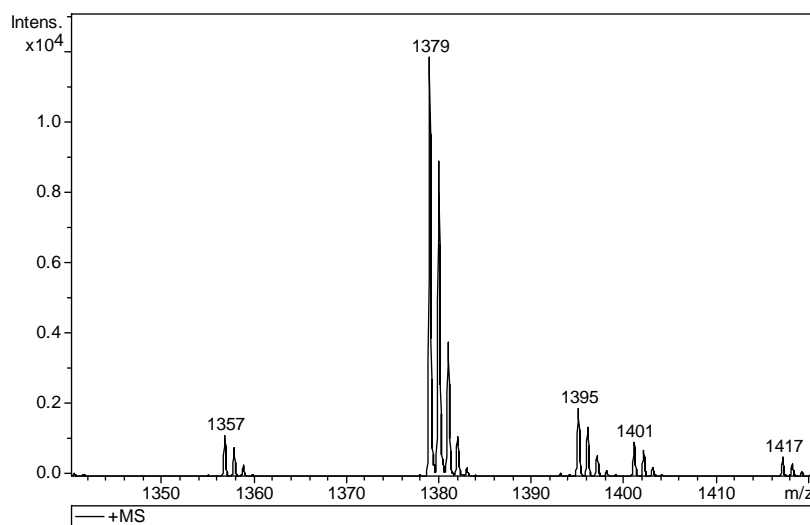


Figura III.75 - Espectre de MALDI-MS de

H-TEtβAla-TEtβAla-TEtβAla-TEtβAla-TEtβAla-TEtβAla-NH₂ (**28**).

**IV. CAPÍTOL 2. Aplicació del grup
tetracloroftaloïl a la síntesi d'àcids pèptid nucleics.**

IV.1. Introducció

Tal com s'ha comentat al capítol 1, els PNAs (àcids pèptid nucleics) són estructures amb esquelet peptídic formats per unitats de *N*-(2-aminoetil)glicina, els productes resultants posseeixen millor afinitat i capacitat d'hibridització que els seus homòlegs naturals davant d'àcids nucleics complementaris d'ADN. El descobriment d'aquests nous compostos va obrir una important porta a possibles aplicacions terapèutiques i de diagnòstic⁵⁰. Degut a què els PNAs estan formalment formats per monòmers de tipus aminoàcid, la síntesi dels corresponents oligòmers de PNA es basa en la mateixa metodologia que la síntesi de pèptids en fase sòlida, essent els mètodes de síntesi més aplicats els basats en les estratègies Fmoc/Bhoc i la BOC/Z, adaptacions respectives de les estratègies Fmoc/*t*-Bu i Boc/Bn àmpliament establertes en síntesi de pèptids.

IV.1.1. Estratègia de síntesi BOC/Z

Aquesta metodologia utilitza el grup BOC com a grup protector temporal i el grup benziloxicarbonil (Z) com a protector permanent de cadascun dels monòmers⁵¹ (Figura IV.1).

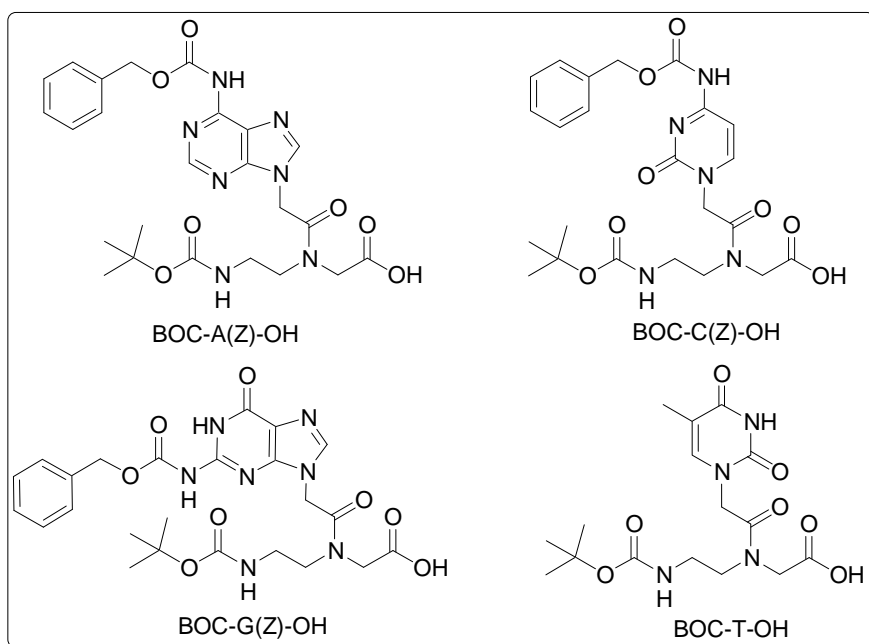
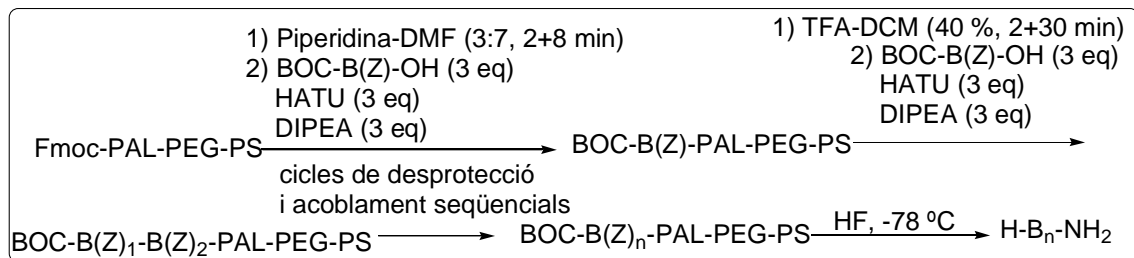


Figura IV.1 - Monòmers de PNA protegits amb el grup BOC i Z.

Els oligòmers de PNA es sintetitzen sobre resines de poliestirè entrecruat amb divinilbenzè o modificat amb cadenes de polietilenglicol (resines Tentagel), sobre les que s'ancora un espaiador bifuncional adequat per a la síntesi. Aquesta estratègia de síntesi es basa en la labilitat selectiva en medi àcid dels dos grups protectors. El grup BOC s'elimina amb àcid trifluoroacètic (TFA), i el grup Z requereix àcid fluorhídric (HF) o àcid trifluorometansulfònic (TMSA), condicions utilitzades per a realitzar el desancorament del producte final. Durant l'eliminació dels grups temporals BOC no s'observa eliminació dels grups protectors permanents Z. Aquesta metodologia és utilitzada per a mètodes de síntesi manuals o automàtics (Esquema IV.1).

La síntesi manual dóna bons rendiments, però requereix una feina intensa i químics molt experimentats, pot ser fàcilment monotritzada i cada monòmer permet una gran flexibilitat d'escala. La síntesi en sintetitzadors automàtics tant sols es permet en alguns sintetitzadors comercials i no és gaire aplicable degut a què necessita reactius químics més agressius que d'altres mètodes.



Esquema IV.1- Síntesi de PNAs mitjançant l'estratègia BOC/Z.

IV.1.2. Estratègia de síntesi Fmoc/Bhoc

Aquesta metodologia utilitza el grup 9-fluorenilmetilcarbonil (Fmoc) com a grup protector temporal i el grup benzhidriloxicarbonil (Bhoc) com a protector permanent per cadascun dels monòmers⁵¹ (Figura IV.2). Els productes es sintetitzen sobre resines de poliestirè entrecruat amb divinilbenzè o modificat amb cadenes de polietilenglicol (resines tentagel), sobre les que s'ancora un espaiador bifuncional adequat per a la síntesi com el PAL, Rink, etc.

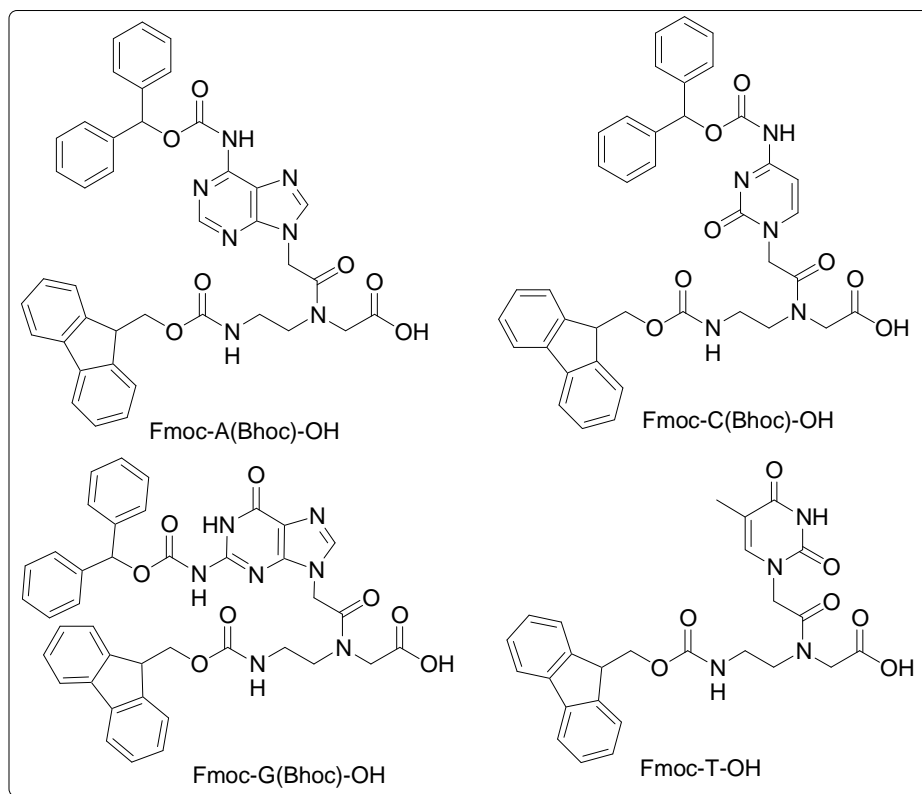
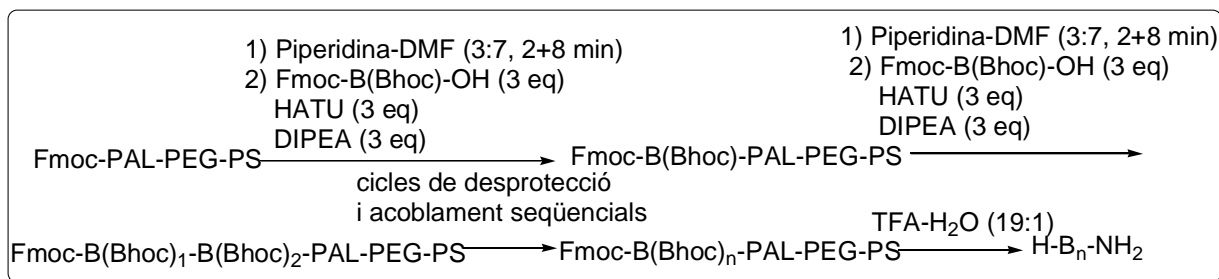


Figura IV.2 - Monòmers de PNA protegits amb el grup Fmoc i Bhoc.

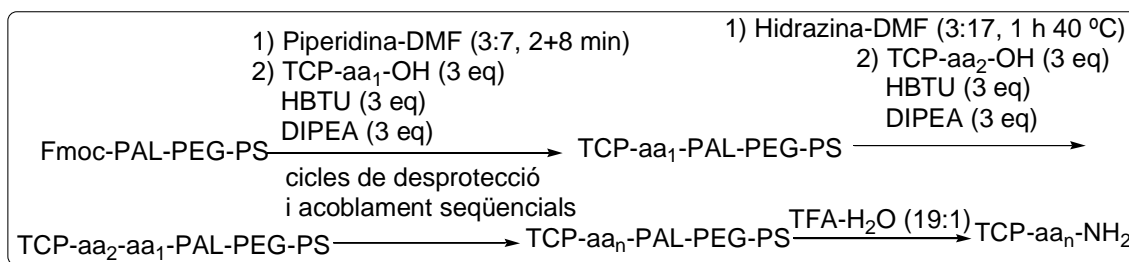
L'estratègia de síntesi Fmoc/Bhoc presenta avantatges respecte l'estratègia BOC/Z, com la utilització de reactius menys agressius, l'ortogonalitat dels grups protectors, la facilitat d'utilització en sintetitzadors automàtics (degut sobretot a la més alta solubilitat del grup Bhoc respecte al grup Z) i el fet de que els cicles de protecció i desprotecció siguin més curts (Esquema IV.2). El grup Bhoc s'elimina al final de l'oligomerització de forma molt neta amb TFA, en menys d'un minut.



Esquema IV.2 - Síntesi de PNAs mitjançant l'estratègia Fmoc/Bhoc.

IV.1.3. Estratègia de síntesi TCP/Z

En el nostre grup de recerca s'ha estudiat l'aplicació de l'estratègia TCP/t-Bu a la síntesi de pèptids i pseudopèptids (Esquema IV.3).⁵²



Esquema IV.3 - Estratègia per a la síntesi de pèptids amb el grup TCP.

Els primers intents d'adaptar l'estratègia TCP/t-Bu a la síntesi de PNAs van permetre comprovar la viabilitat de preparar el monòmer de timina protegit amb el grup TCP (TCP-T-OH) mitjançant irradiació microones, mètode que havia estat aplicat per la preparació d'aminoàcids TCP protegits⁵³. A partir d'aquest monòmer es va sintetitzar l'oligòmer TCP-T₄-Gly-NH₂ amb bons resultats⁵⁴, en canvi els intents de síntesi dels altres monòmers TCP protegits varen resultar negatius.

Dins l'àmbit dels treballs d'aquesta tesi doctoral es va fixar com objectiu posar a punt un mètode viable per a la preparació dels 4 monòmers de PNA protegits amb el grup TCP (TCP-T-OH (**29**), TCP-A(Z)-OH (**30**), TCP-G(Z)-OH (**31**) i TCP-C(Z)-OH (**32**)) així com la seva posterior aplicació a la síntesi d'oligòmers de PNAs.

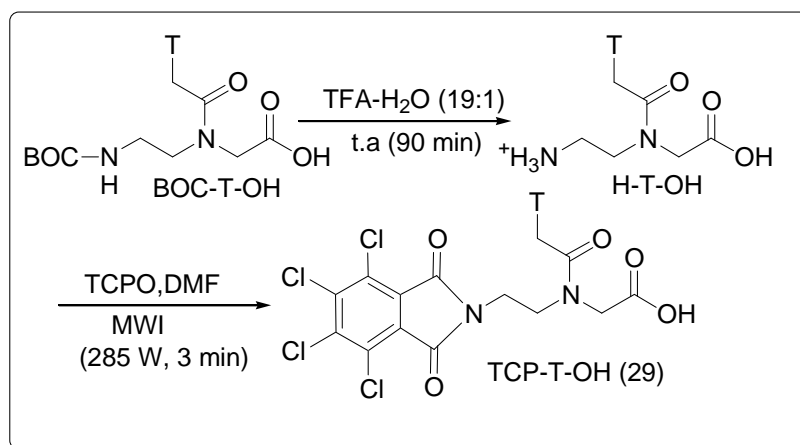
Els arguments a favor de l'ús del grup TCP són el baix cost de l'anhidrid de partida i el fet que els derivats tetracloroftaloil solen ser sòlids cristal·lins que faciliten les manipulacions sintètiques⁵⁵. Els productes protegits amb el grup tetracloroftaloil poden ser fàcilment detectats a la longitud d'ona de 335 nm. Tanmateix, el grup TCP mostra estabilitat davant d'àcids forts i no queda afectat per tractament amb piperidina, d'aquesta manera és compatible amb condicions d'eliminació dels grups Fmoc i BOC. Per aquesta última raó, el grup TCP pot ser una alternativa a les opcions de protecció temporal més emprades. Tot i que a quedat fora de l'àmbit d'estudi d'aquest treball, també és possible que

la seva aplicació trobi un camp més important com a protector de les cadenes laterals amb funció amino primària aplicant esquemes Fmoc/TCP i BOC/TCP. Dins el grup de recerca s'ha estudiat també l'aplicació del grup TCP per a la síntesi de nous híbrids cíclics pèptid-arè⁵⁶.

IV.2. Resultats i discussió.

IV.2.1. Protecció de monòmers de PNA amb el grup TCP utilitzant radiació microones

Com s'ha indicat anteriorment dins la Tesi doctoral d'Esther Cros, s'havia realitzat la protecció del monòmer de timina mitjançant irradiació microones o a reflux partint del monòmer BOC-protegit comercial. La desprotecció de BOC-T-OH amb TFA-H₂O (19:1) conduïa a un cru de reacció que després d'assecar es tractava amb anhídrid tetracloroftàlic i DMF sota irradiació microones a 285 W durant 3 min. (Esquema IV.4). El rendiment obtingut era del 77% i la puresa de TCP-T-OH (**29**) en el cru de reacció del 82%. L'aplicació del mateix mètode pels altres monòmers de PNA comercials BOC/Z protegits portava a la seva degradació⁵⁴.



Esquema IV.4 - Síntesi de TCP-T-OH (**29**) amb irradiació MW.

Aquest fet es va confirmar amb la repetició d'aquest mètode per a l'obtenció del TCP-A(Z)-OH (**30**), obtenint-se a un producte que analitzat per HPLC presentava el cromatograma de la Figura IV.3. Com es pot observar, s'obté una barreja de productes que a 220 nm donen senyals a 15'1, 17 i 18'5 min; d'aquests només absorbeix a 265 nm (longitud d'ona característica per les nucleobases (Figura IV.4)) i a 335 nm (absorció característica del grup TCP (Figura IV.5)) el producte amb temps de retenció 17 min.. Posteriorment es va confirmar que aquest no era el producte desitjat. Els intents d'ajustar la

potència de la irradiació microones no va millorar el resultat obtingut i sempre s'obtenien resultats similars.

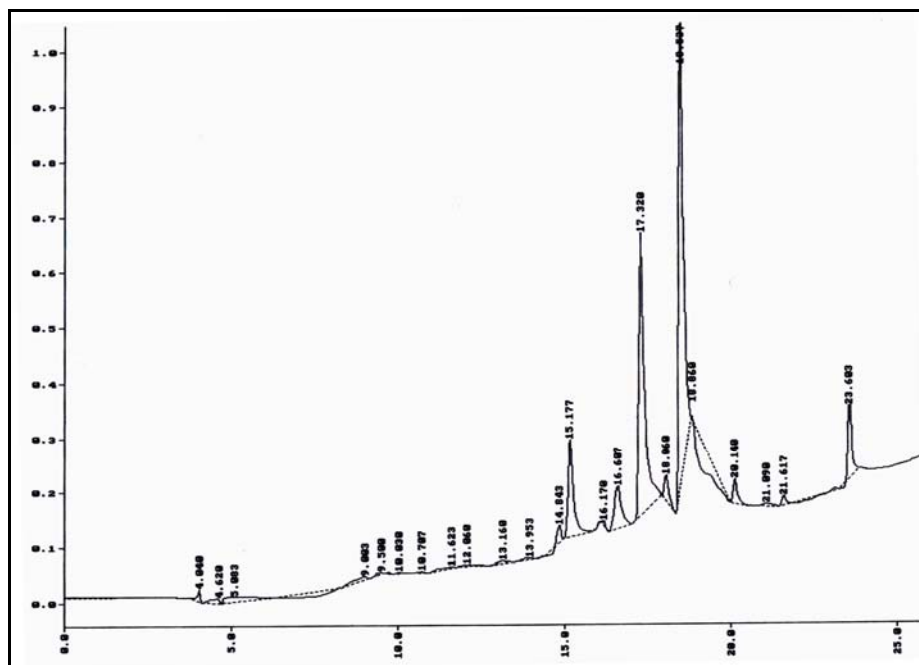


Figura IV.3 - Síntesi de TCP-A(Z)-OH (30) amb irradiació MW a 285 W ($\lambda=220$ nm).

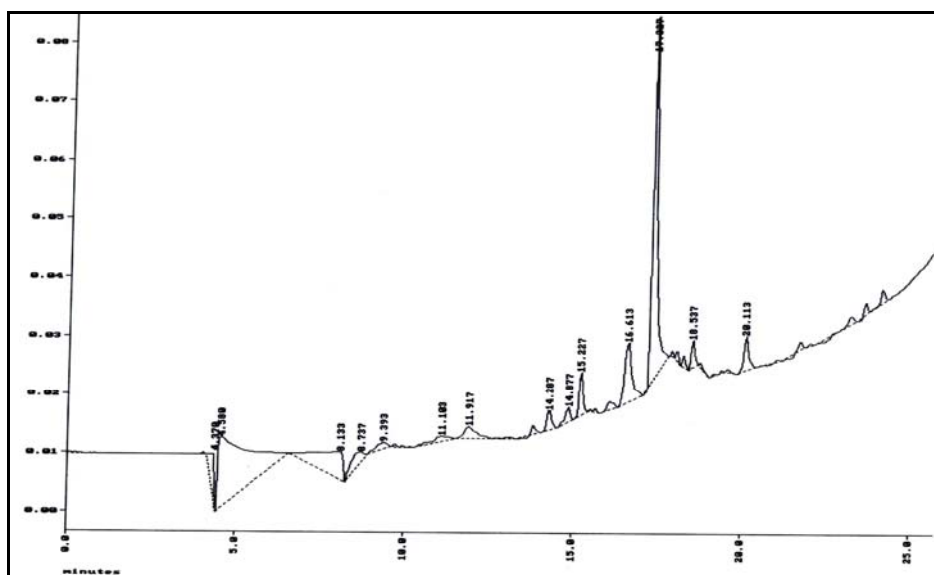


Figura IV.4 - Síntesi de TCP-A(Z)-OH (30) amb irradiació MW a 285 W ($\lambda=265$ nm).

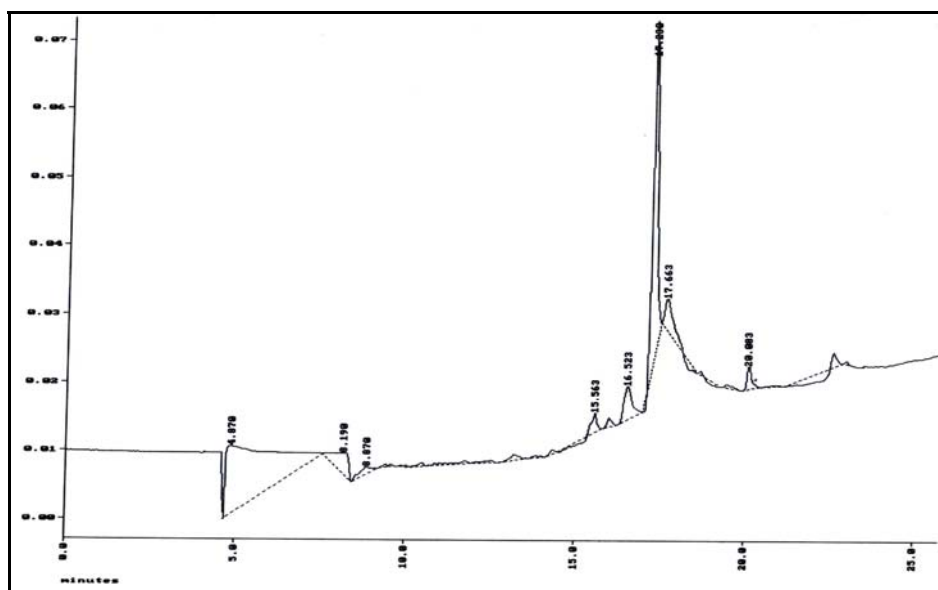


Figura IV.5 - Síntesi de TCP-A(Z)-OH (**30**) amb irradiació MW a 285 W ($\lambda=335$ nm).

Igualment, l'intent de síntesi de TCP-C(Z)-OH (**32**) amb irradiació microones a 80 W va conduir a l'obtenció de crús complexes on apareixien dos productes que absorben a 265 i 335 nm (Figura IV.6 a Figura IV.8). En aquest punt es va considerar oportú considerar altres alternatives a part de l'aplicació de les microones.

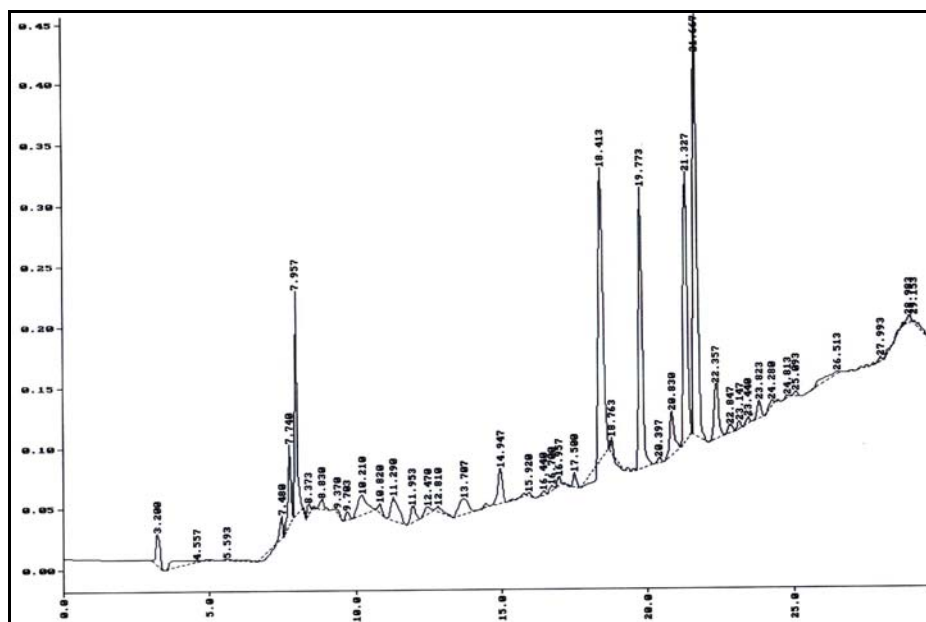


Figura IV.6 - Síntesi de TCP-C(Z)-OH (**32**) a 80 W ($\lambda=220$ nm).

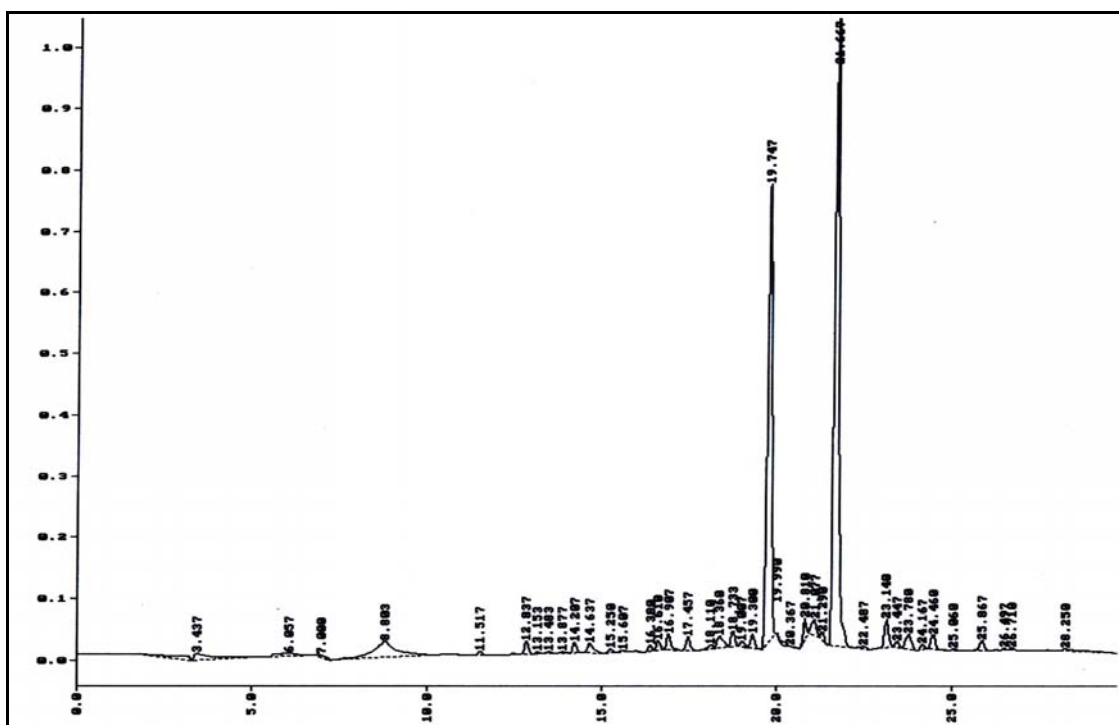


Figura IV.7 - Síntesi de TCP-C(Z)-OH (32) a 80 W ($\lambda=265$ nm).

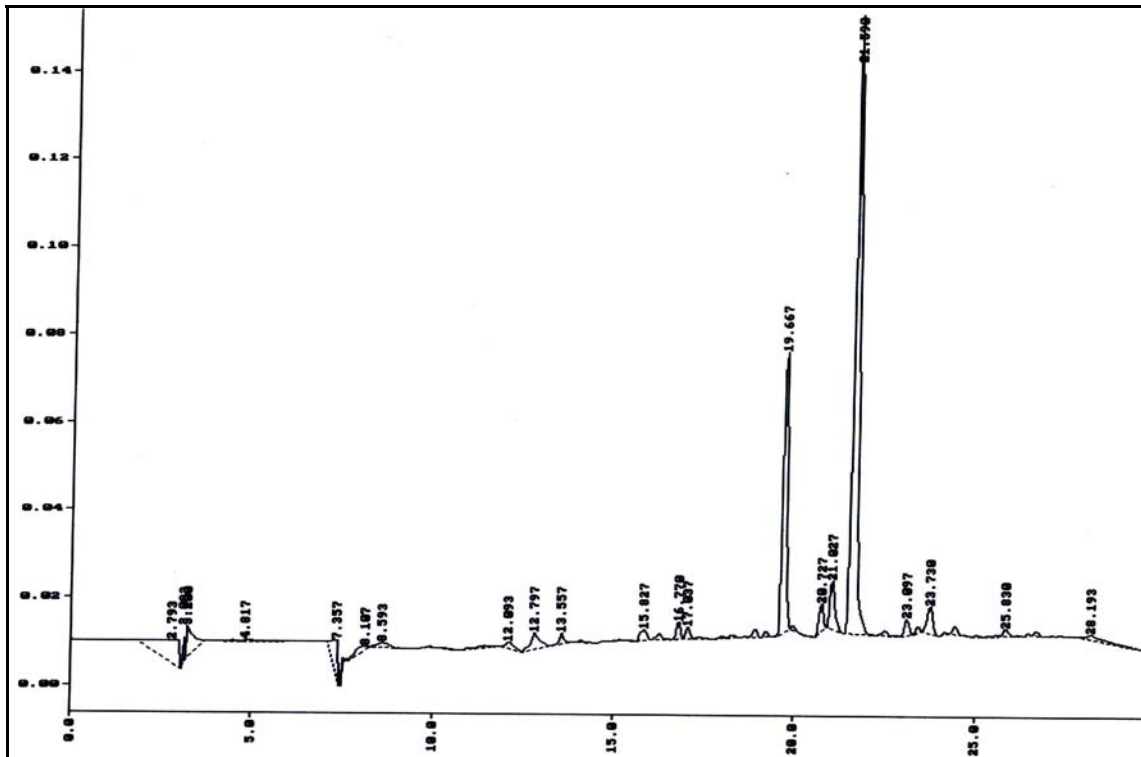
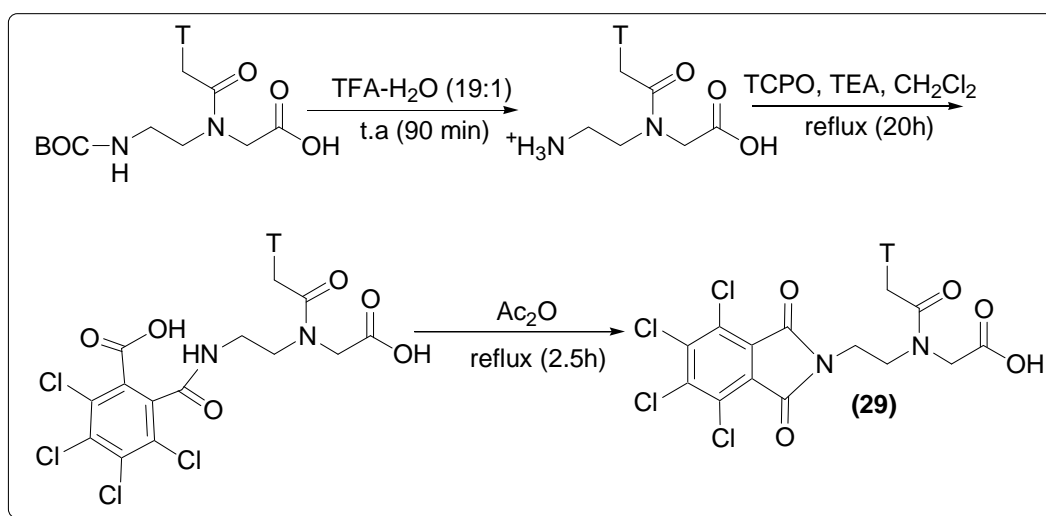


Figura IV.8 Síntesi de TCP-C(Z)-OH (32) a 80 W ($\lambda=335$ nm).

IV.2.2. Protecció de monòmers de PNA amb el grup TCP a reflux i a temperatura ambient

La metodologia clàssica d'introducció del grup TCP en α -aminoàcids consisteix en el tractament a reflux amb anhídrid tetracloroftàlic seguit d'una etapa de ciclació de la ftalamida formada amb anhídrid acètic, en presència d'una base com TEA.



Esquema IV.5 - Síntesi de TCP-T-OH (29) a reflux.

La protecció de H-T-OH s'ha realitzat a partir del cru obtingut després de la desprotecció de BOC-T-OH amb TFA-H₂O 19:1 es va obtenir de TCP-T-OH (29) amb un rendiment del 82% i una puresa del 97% després de purificar per extracció. Les condicions de reacció parteixen del tractament el cru de H-T-OH es dissol en CH₂Cl₂ i s'afegeix TEA, l'anhídrid tetracloroftàlic (TCPO, 1.1 equivalents), es deixa agitant a reflux durant 20 hores i a continuació s'afegeix anhídrid acètic en excés i es continua a reflux durant 2.5 hores més (Esquema IV.5).

L'intent d'aplicar aquest mètode a la resta dels monòmers va conduir a una degradació important dels mateixos. A la Figura IV.9 es pot observar el cromatograma resultant de la reacció a reflux per a la protecció del monòmer d'adenina H-A(Z)-OH, on es pot observar que el pic a 19.6 min. que correspondria al producte desitjat, com es corrobora

posteriorment, és minoritari, i s'han format diversos compostos els quals després de diferents intents de separació i identificació no varen conduir a resultats conclouents.

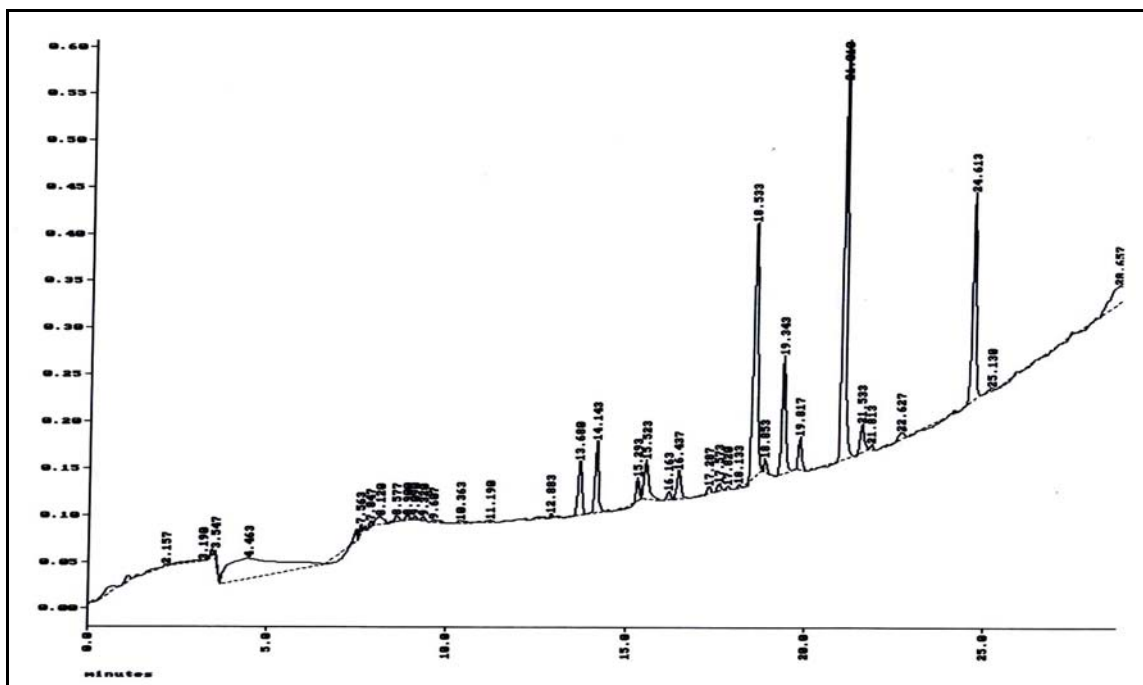
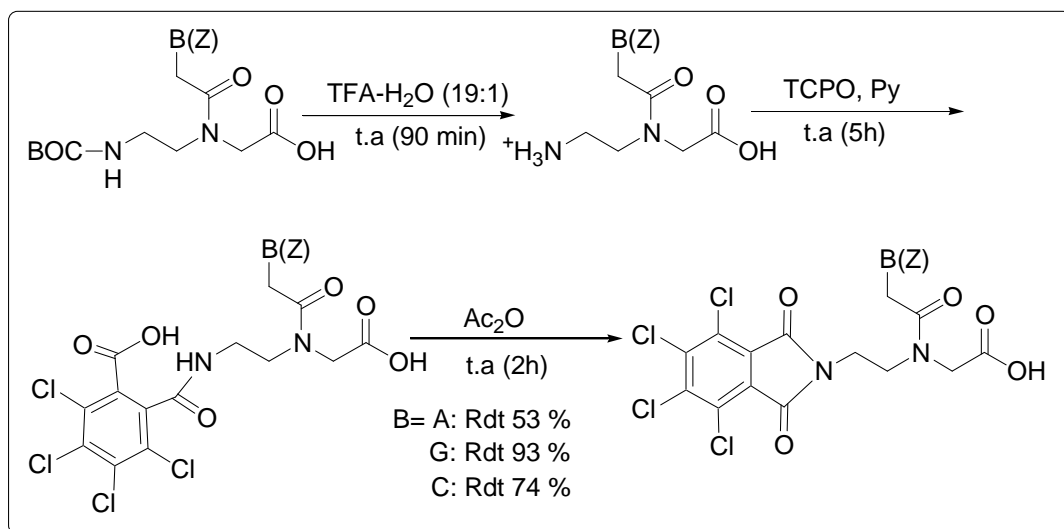


Figura IV.9 - Síntesi de TCP-A(Z)-OH (30) a reflux ($\lambda=220$ nm).

Com alternativa als mètodes anteriors es va provar la protecció a temperatura ambient i utilitzant piridina com a base i com a dissolvent alhora, per diverses raons. En primer lloc s'havia observat que la piridina era un dels pocs dissolvents que permetia la dissolució completa dels monòmers de PNA desprotegits, apart de solvents com DMF i DMSO. D'altra banda es va considerar adequat realitzar les reaccions a temperatura ambient, dons d'acord amb el descrit en els estudis de Krausz i col.⁵⁷ la timina reacciona incontroladament a temperatures elevades quan utilitzant bases fortes com l'hidrur de sodi.



Esquema IV.6 - Síntesi de TCP-B(Z)-OH.

El tractament dels monòmers *N*-BOC protegits comercials BOC-B(Z)-OH (on B representa la nucleobase adenina, guanina o citosina) amb TFA-H₂O 1:1 seguit de la protecció amb TCPO en piridina donava lloc després de 5 hores de reacció a temperatura ambient a la total desaparició del intermedi desprotegit, i a la formació de la ftalamida corresponent. En aquest punt s'afegeix sobre el cru de reacció l'anhídrid acètic i es tracta a temperatura ambient durant 2 hores. Els productes finals s'obtenen per precipitació en medi àcid afegint HCl 1N gota a gota fins a pH 2, separant-se un sòlid que es purifica per filtració i rentant amb aigua freda. Aquestes condicions varen permetre l'obtenció dels desitjats monòmers de PNA de guanina, citosina i adenina, protegits amb el grup TCP (Esquema IV.6).

El producte TCP-A(Z)-OH (**30**) s'ha obtingut amb un 53 % de rendiment i una puresa del 95% avaluada per HPLC. El pic corresponent al producte apareix a 19.66 min. (Figura IV.10).

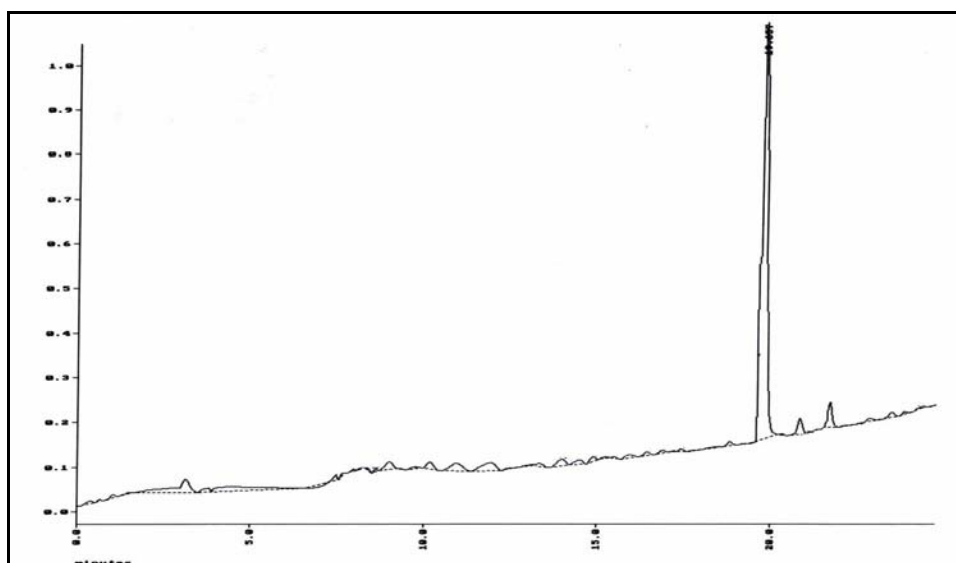


Figura IV.10 - Cromatograma obtingut de la síntesi de TCP-A(Z)-OH (**30**) a λ 220 nm.

A la Figura IV.11 es pot comprovar que el producte obtingut dona senyal a la longitud característica de 335 nm com és característic del grup TCP.

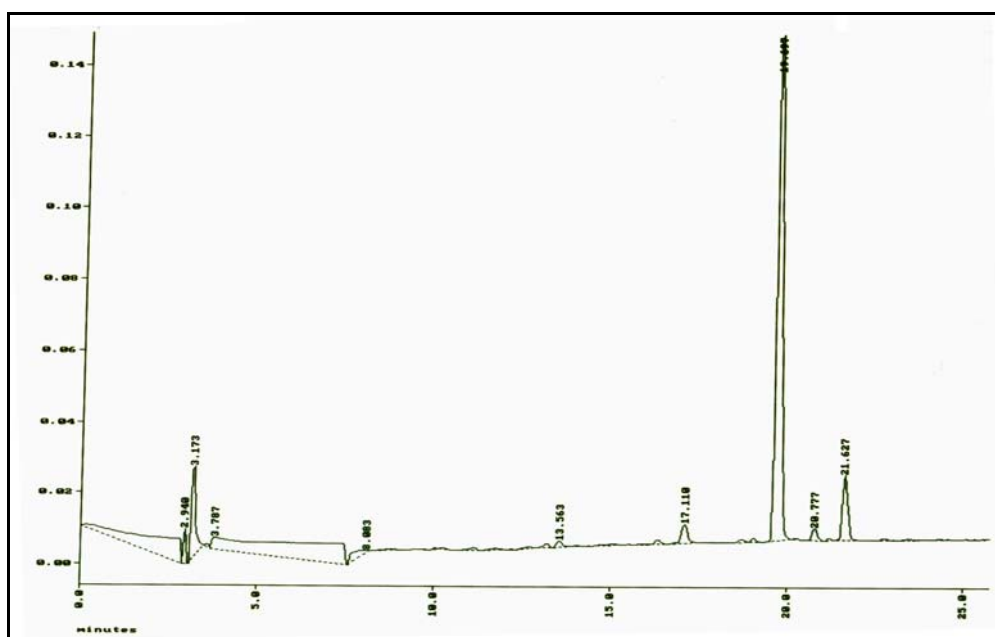


Figura IV.11 - Cromatograma obtingut de la síntesi de TCP-A(Z)-OH (**30**) a λ 335 nm.

El producte TCP-G(Z)-OH (**31**) s'ha obtingut amb un 93 % de rendiment i una puresa del 97 % avaluada per HPLC. El pic corresponent al producte apareix a 19.91 min (Figura IV.12).

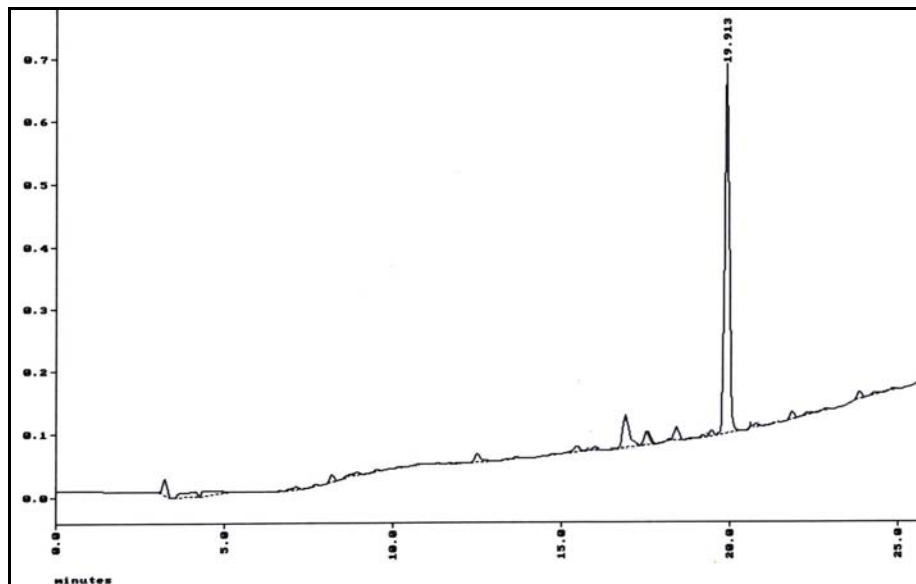


Figura IV.12 - Cromatograma obtingut de la síntesi de TCP-G(Z)-OH (**31**) a λ 220 nm.

A la Figura IV.13 es pot comprovar que el producte obtingut dóna senyal a la longitud característica de 335 nm com és característic del grup TCP.

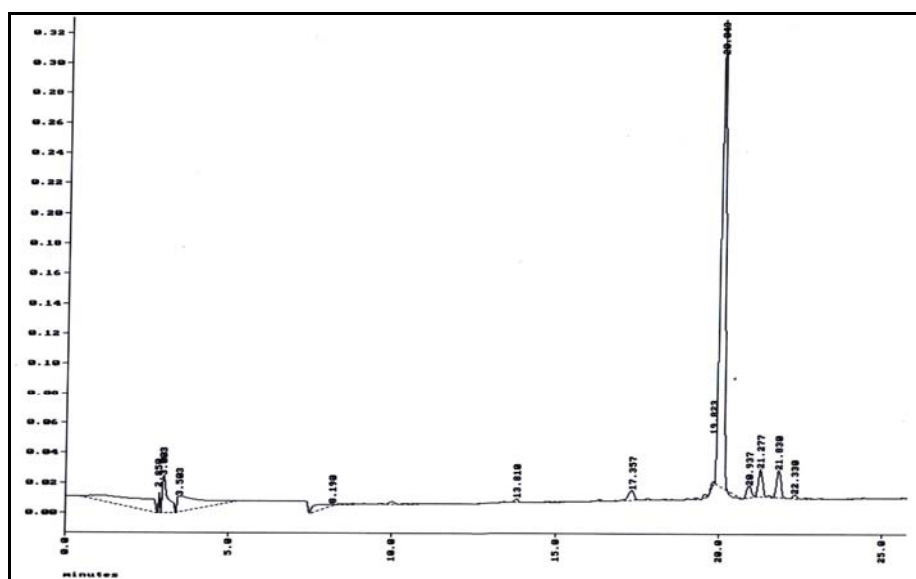


Figura IV.13 - Cromatograma obtingut de la síntesi de TCP-G(Z)-OH (**31**) a λ 335 nm.

El producte TCP-C(Z)-OH (**32**) s'ha obtingut amb un 74 % de rendiment i una puresa del 96% avaluada per HPLC. El pic corresponent al producte apareix a 21.12 min. (Figura IV.14).

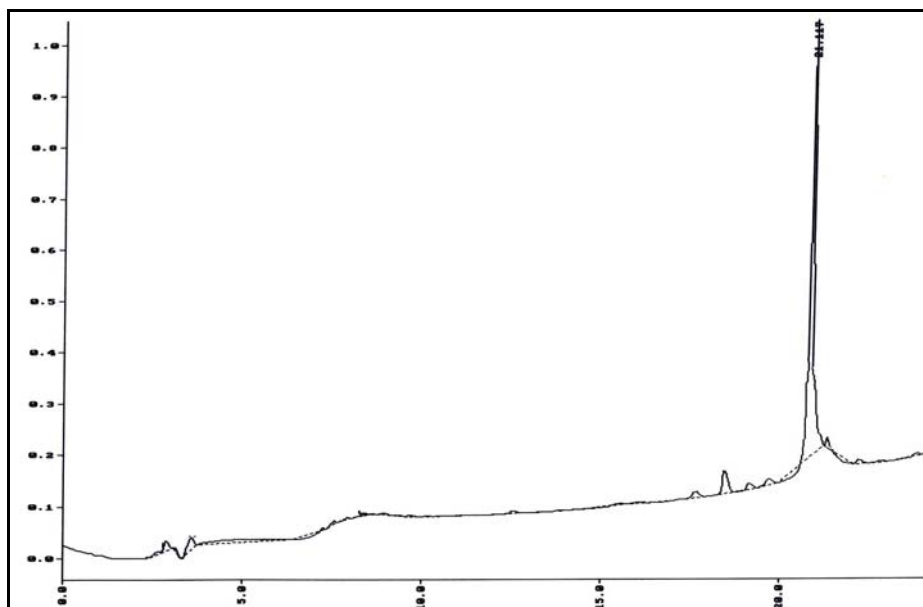


Figura IV.14 Cromatograma obtingut de la síntesi de TCP-C(Z)-OH (**32**) a λ 220 nm.

A la Figura IV.15 es pot comprovar que el producte obtingut dóna senyal a la longitud característica de 335 nm com és característic del grup TCP.

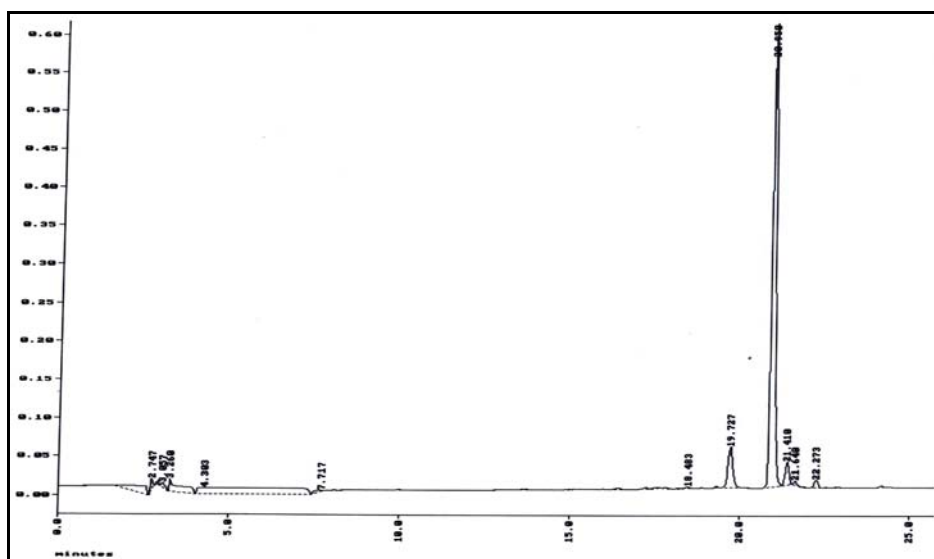


Figura IV.15 - Cromatograma obtingut de la síntesi de TCP-C(Z)-OH (**32**) a λ 335 nm.

Així doncs la protecció dels monòmers amb TCP d'adenina, guanina i citosina utilitzant piridina com dissolvent a temperatura ambient varen indicar la viabilitat d'aquestes condicions de reacció, tot i que si la reacció es realitza amb calefacció també s'observava la formació de subproductes amb proporció important.

A la següent Taula IV.1 es poden comparar els resultats obtinguts per a la protecció amb el grup TCPO dels 3 monòmers H-A(Z)-OH, H-G(Z)-OH, i H-C(Z)-OH.

Taula IV.1 - Resum de la protecció dels 3 monòmers de PNA.

Monòmers de PNA	Rendiment	Puresa	Temps de retenció
TCP-A(Z)-OH (30)	53 %	95 %	19.66 min.
TCP-G(Z)-OH (31)	93 %	97 %	19.91 min.
TCP-C(Z)-OH (32)	74 %	96 %	21.12 min.

IV.2.3. Elucidació estructural dels monòmers de PNA TCP protegits

Els productes TCP-A(Z)-OH (30), TCP-G(Z)-OH (31) i TCP-C(Z)-OH (32) s'han caracteritzat per ^1H -RMN, ^{13}C -RMN i per espectrometria de ESI-MS. A continuació es mostren els espectres de ESI-MS dels tres compostos.

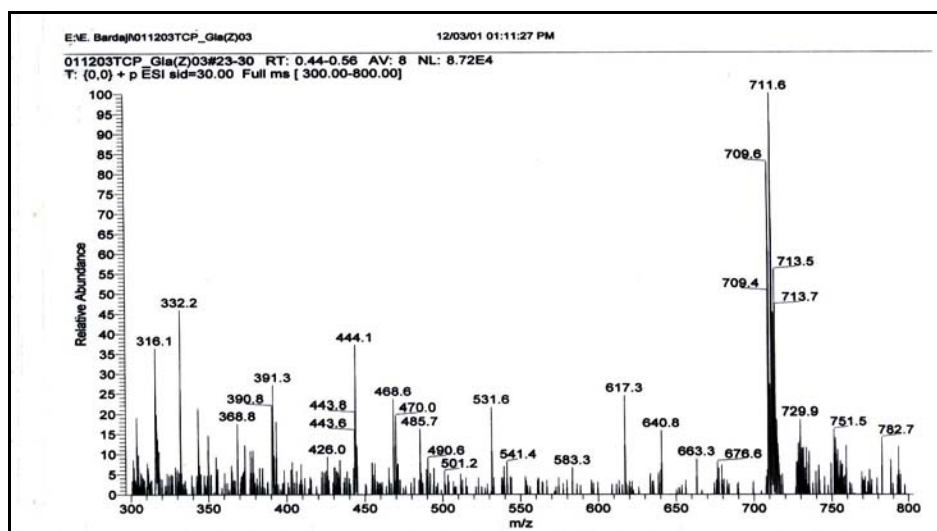


Figura IV.16 - Espectre de ESI-MS de TCP-G(Z)-OH (31).

El pes molecular del TCP-G(Z)-OH (**31**) és 711.29 g/mol i s'observa en l'espectre d'ESI-MS que aquest pic presenta la distribució isotòpica dels quatre clors del grup TCP (Figura IV.16).

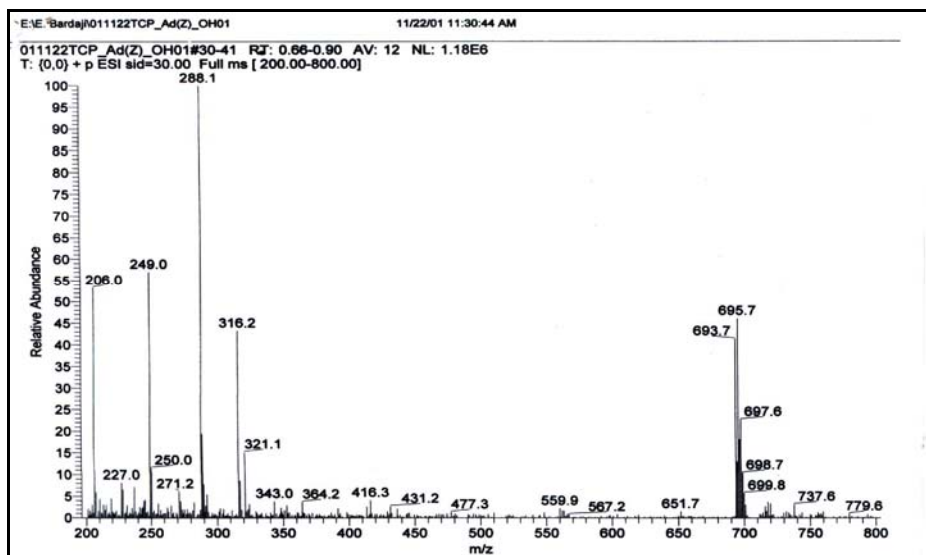


Figura IV.17 - Espectre de ESI-MS de TCP-A(Z)-OH (**30**).

El pes molecular del TCP-A(Z)-OH (**30**) és 695.29g/mol i en l'espectre de masses s'observa que aquest pic presenta la distribució isotòpica característica de la presència dels 4 àtoms de clor (Figura IV.17).

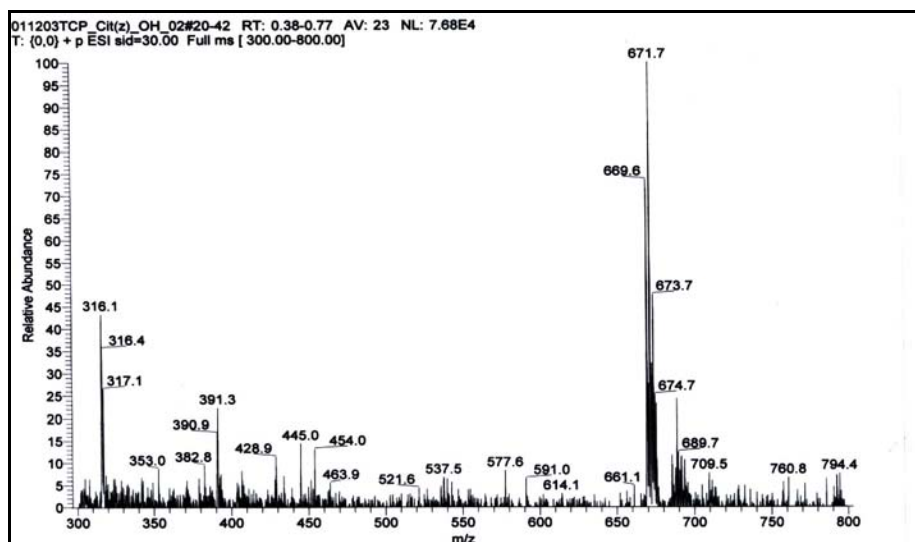


Figura IV.18 - Espectre de ESI-MS de TCP-C(Z)-OH (**32**).

El pes molecular del TCP-C(Z)-OH (**32**) és 671.27 g/mol i en l'espectre de masses s'observa que aquest pic presenta la distribució isotòpica característica de la presència dels 4 àtoms de clor (Figura IV.18).

Altres pics dels espectres que també presenten la distribució isotòpica dels clors, com el de 316.1, que apareix en els tres espectres, i el de 391.3 que apareix en dos d'ells, podrien correspondre respectivament a fragments que conserven part del grup TCP Figura IV.19 proposats a la Figura IV.19. Els pics que corresponen a la distribució isotòpica dels dos clors per al senyal de 316.1 són 316.4 i 317.1 i els que corresponen a la distribució isotòpica dels tres clors per al senyal de 391.3 són 392 i 393.1. Aquests fragments també es poden apreciar en l'espectre ESI-MS de TCP-T-OH (**29**) (Figura IV.20).

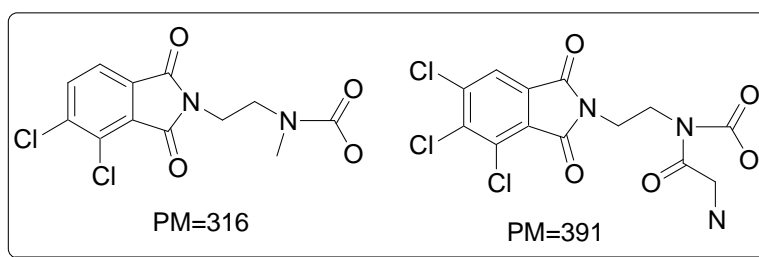


Figura IV.19 - Fragments comuns en els espectres ESI-MS.

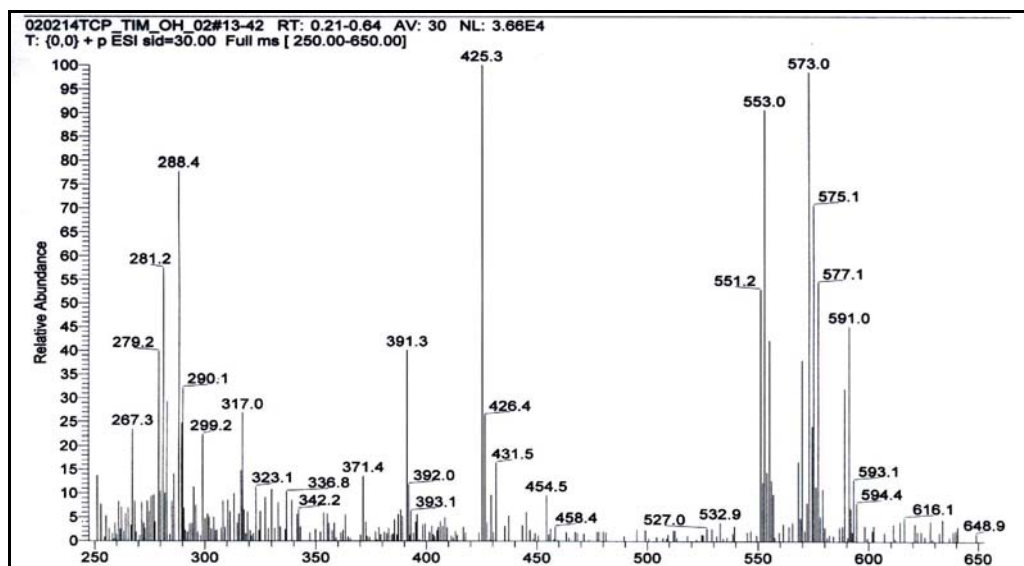


Figura IV.20 - Espectre de ESI-MS de TCP-T-OH (**29**).

En l'estudi del monòmer de timina TCP-T-OH (**29**) a 25 °C descrit a la tesi doctoral d'Esther Cros, realitzada al nostre grup de recerca, es va observar la presència de senyals corresponents a dos rotàmers degut a l'equilibri *cis-trans* de l'enllaç amida (χ_1) (Figura IV.21),

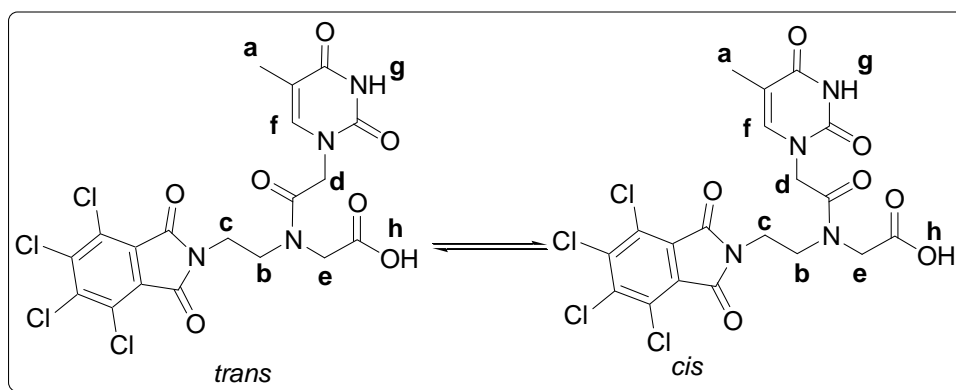


Figura IV.21 - Rotàmers de TCP-T-OH (**29**).

El desdoblament de senyals es pot veure en l'espectre realitzat a 25 °C (Figura IV.22) i aquests coalesceixen quan es realitza l'experiment de RMN a 70° (Figura IV.23). Han estat publicades observacions similars per a altres monòmers de PNA⁵⁸, i han estat justificades per un bescanvi químic lent a l'escala de temps de RMN a temperatura ambient.

Els resultats obtinguts en els espectres dels monòmers protegits de citosina, adenina i guanina concorden amb els de Timina, observant-se tots els espectres de RMN ¹H a 200 MHz com a senyals complexos.

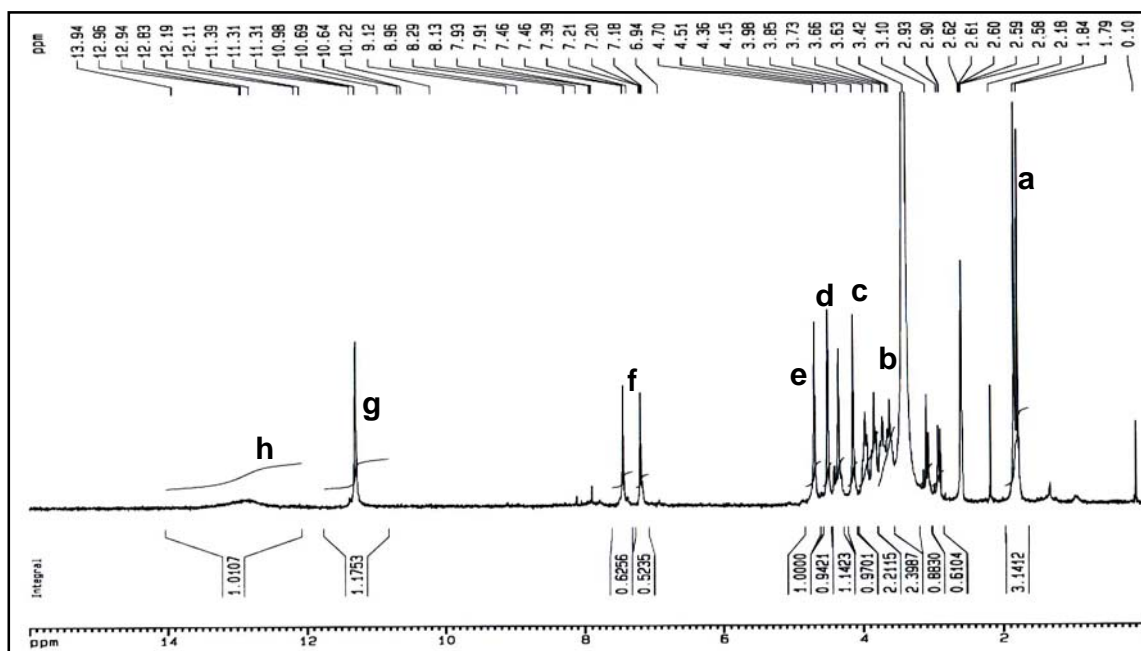


Figura IV.22 - Espectre de RMN de ^1H dels rotàmers de TCP-T-OH (**29**) a 25 °C.

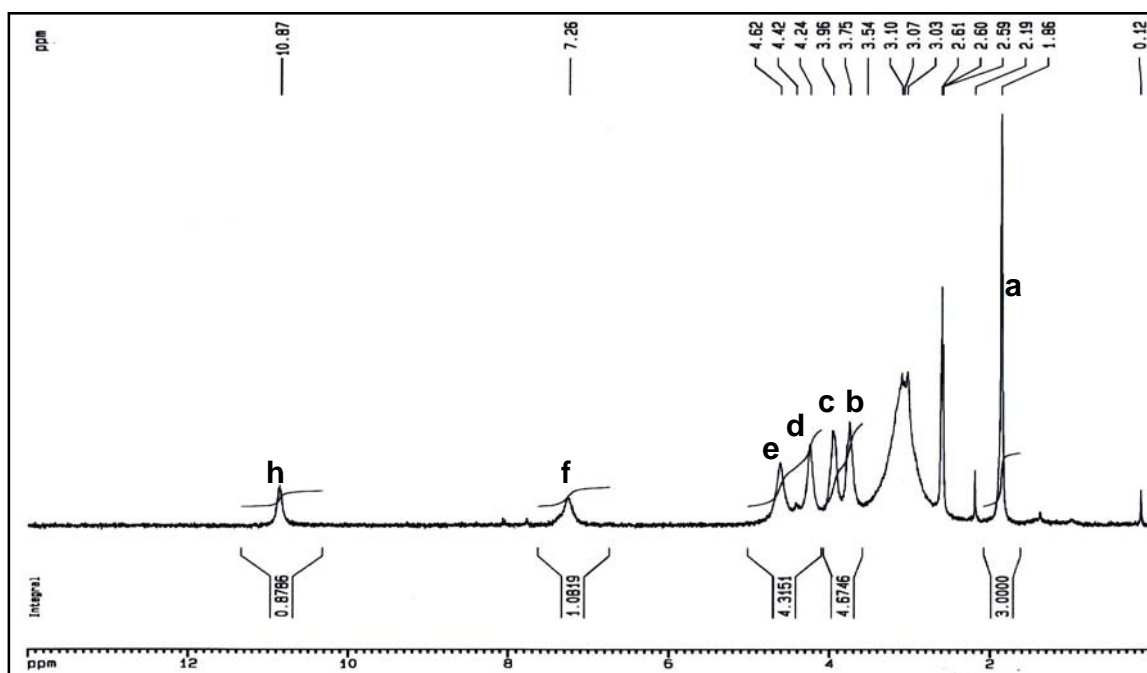


Figura IV.23 - Espectre de RMN de ^1H dels rotàmers de TCP-T-OH (**29**) a 70 °C.

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25°C, de TCP-G(Z)-OH (Figura IV.25), mostra senyals que no queden ben definits degut a l'equilibri *cis-trans* de l'enllaç amida (χ_1)

(Figura IV.24), en el cas dels protons metilènics **a** **b** i **d** el desdoblament es veu amb certa claredat.

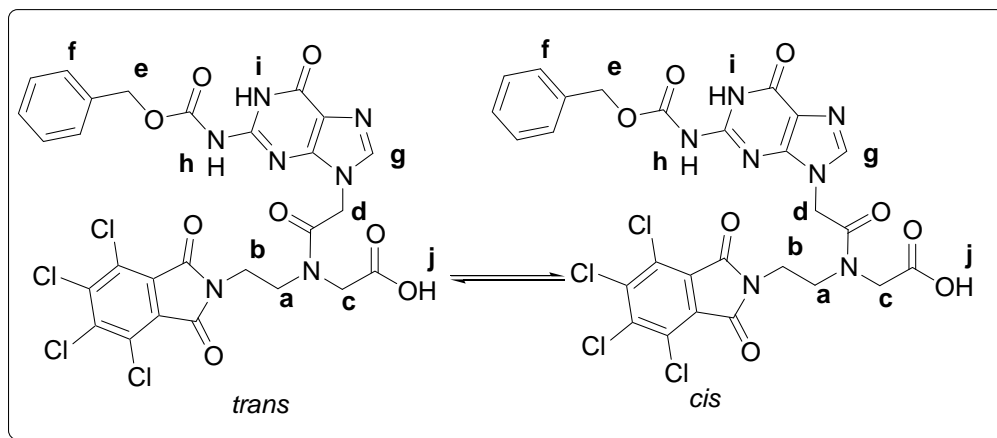


Figura IV.24 - Rotàmers de TCP-G(Z)-OH (31).

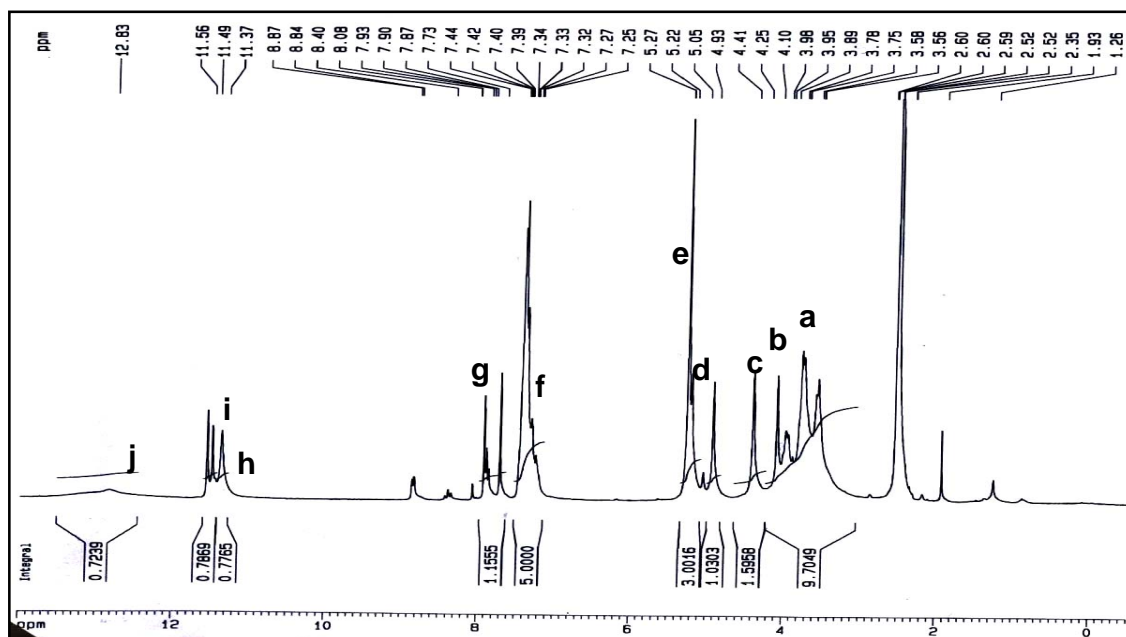


Figura IV.25- Espectre de RMN de ^1H dels rotàmers de TCP-G(Z)-OH (31).

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25°C, de TCP-A(Z)-OH (Figura IV.27) és complex degut a la duplicitat de senyals poc resoltes (Figura IV.26) que apareixen com a bandes mal definides.

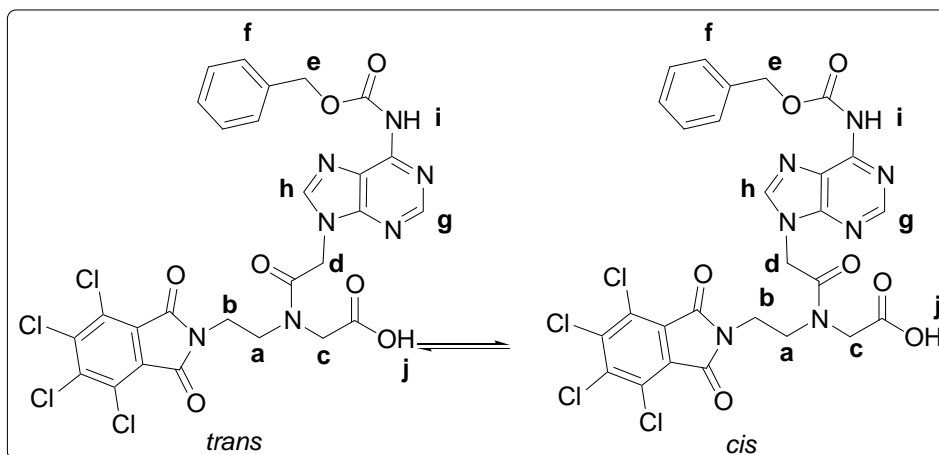


Figura IV.26 - Rotàmers de TCP-A(Z)-OH (30).

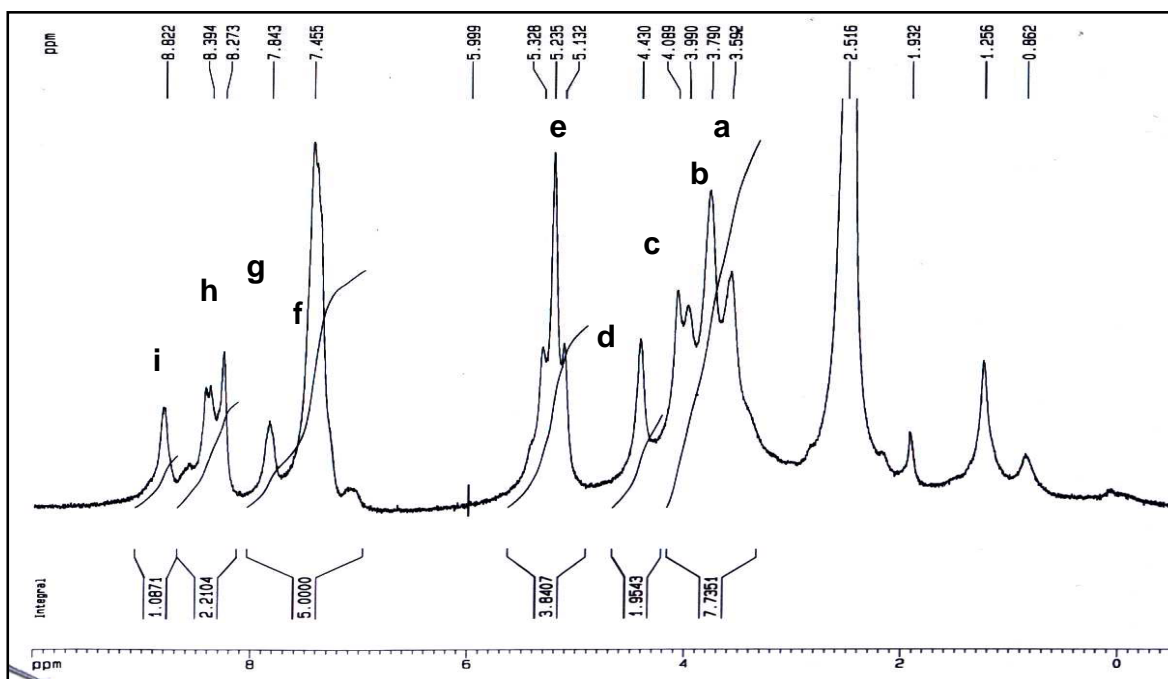


Figura IV.27 - Espectre de RMN de ^1H dels rotàmers de TCP-A(Z)-OH (30).

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25°C (Figura IV.29) del monòmer de citosina mostra senyals clarament desdoblades degut a l'equilibri *cis-trans* (Figura IV.28) sobretot pels àtoms **b** i **i**.

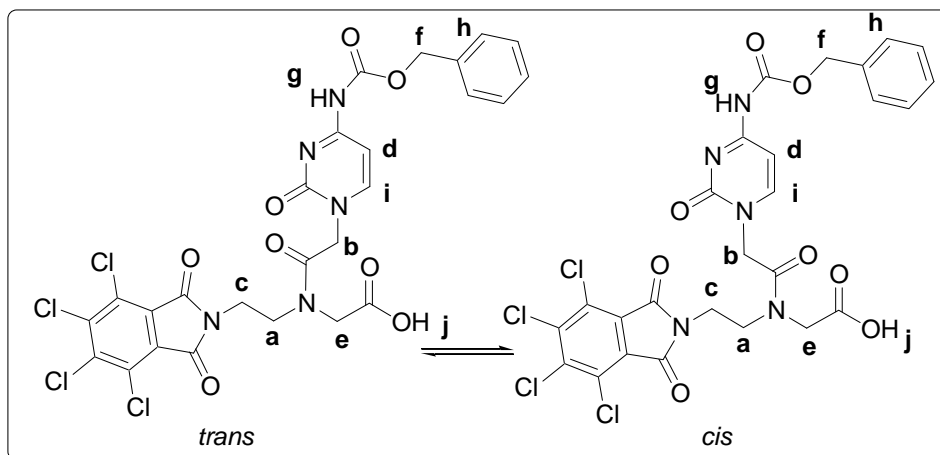
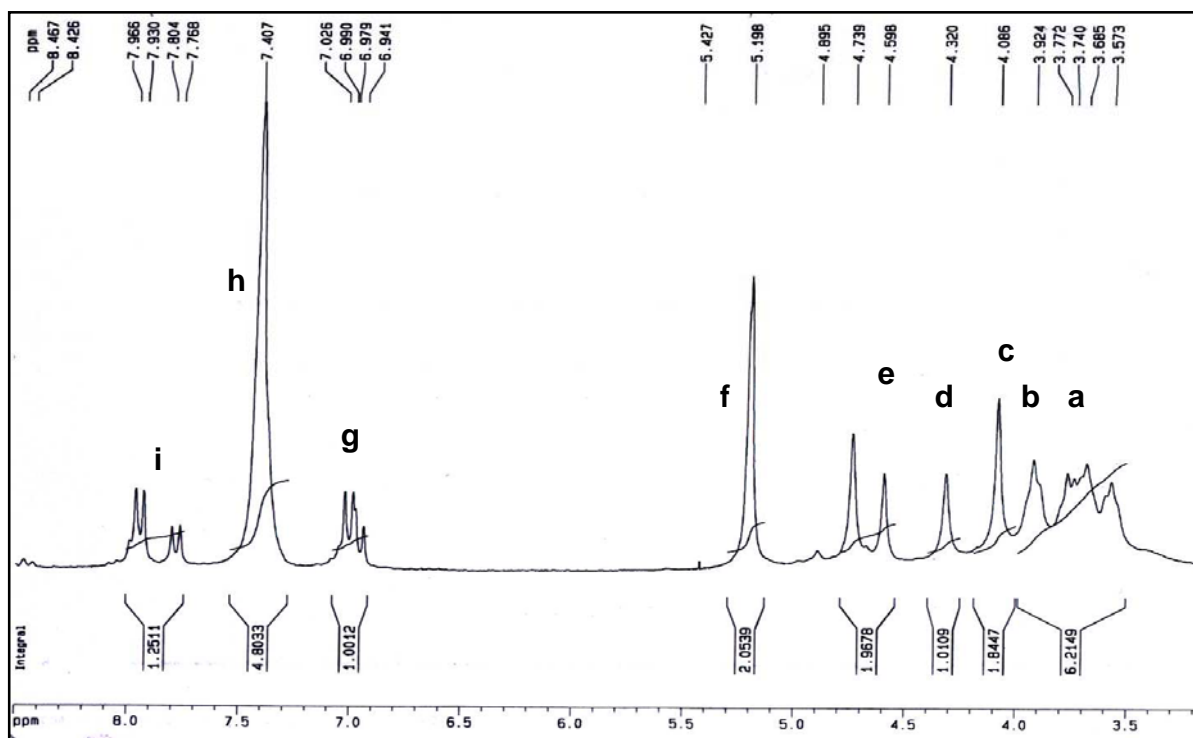


Figura IV.28 - Rotàmers de TCP-C(Z)-OH (32).

Figura IV.29 - Espectre de RMN de ^1H dels rotàmers de TCP-C(Z)-OH (32).

L'espectre de RMN ^{13}C a 50 MHz i 25°C, del monòmer de guanina (Figura IV.30), ens permet veure que molts senyals de l'espectre queden desdoblats degut a l'equilibri *cis-trans* del compost (Figura IV.30), en particular es poden apreciar clarament el desdoblament dels àtoms de carboni més propers a l'enllaç amida, els àtoms **a**, **c** i **d**.

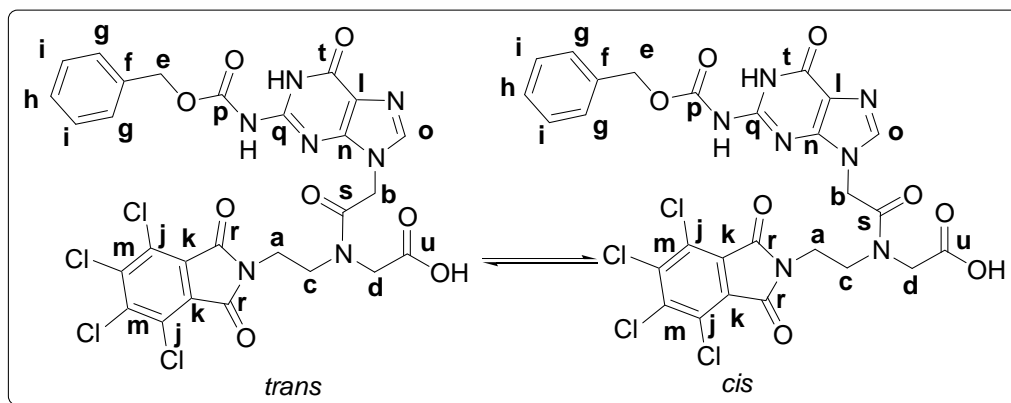


Figura IV.30 - Rotàmers de TCP-G(Z)-OH (31).

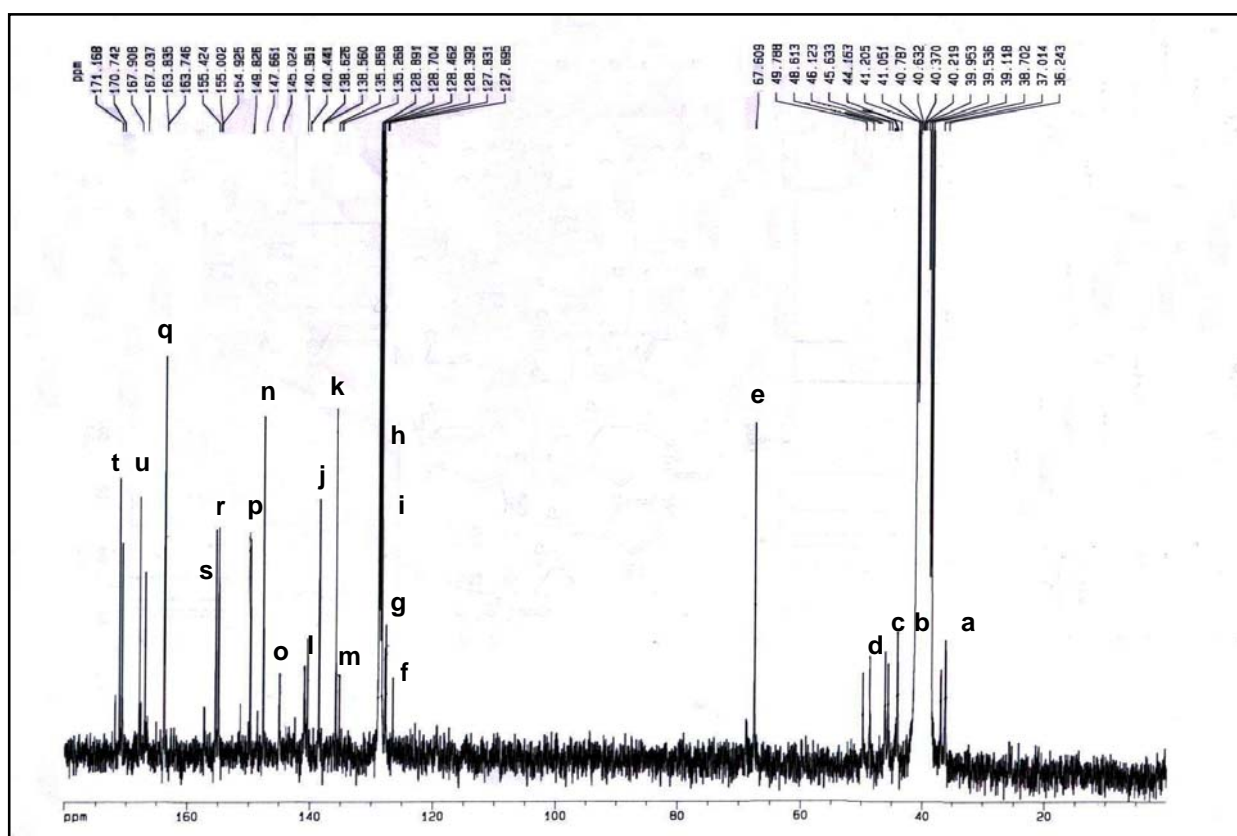


Figura IV.31 - Espectre de Carboni ^{13}C dels rotàmers de TCP-G(Z)-OH (31).

L'espectre de RMN ^{13}C a 50 MHz i 25°C del monòmer d'adenina (Figura IV.33) és també de difícil interpretació. Tot i així ens permet veure certs senyals ben desdoblats degut a l'equilibri *cis-trans* del compost (Figura IV.32), com són els carbonis **t**, **u** i **p** però a

diferència que el cas anterior els àtoms de carboni més propers a l'enllaç amida no queden ben resolts degut a l'intensitat del senyal del DMSO, dissolvent utilitzat per a fer la resonància.

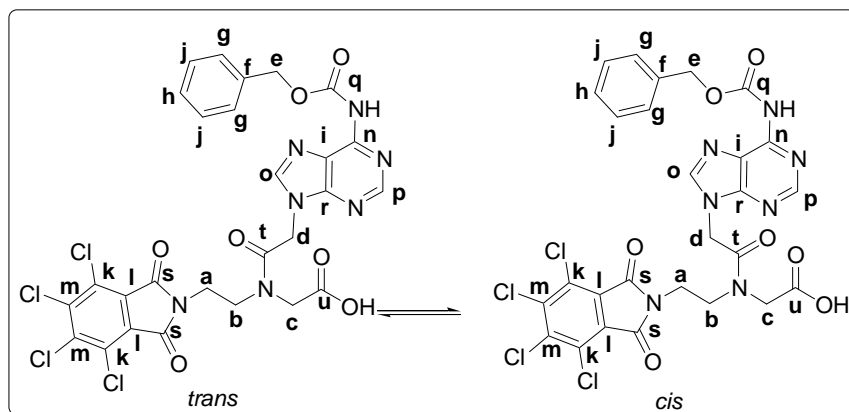


Figura IV.32 - Rotàmers de TCP-A(Z)-OH (30).

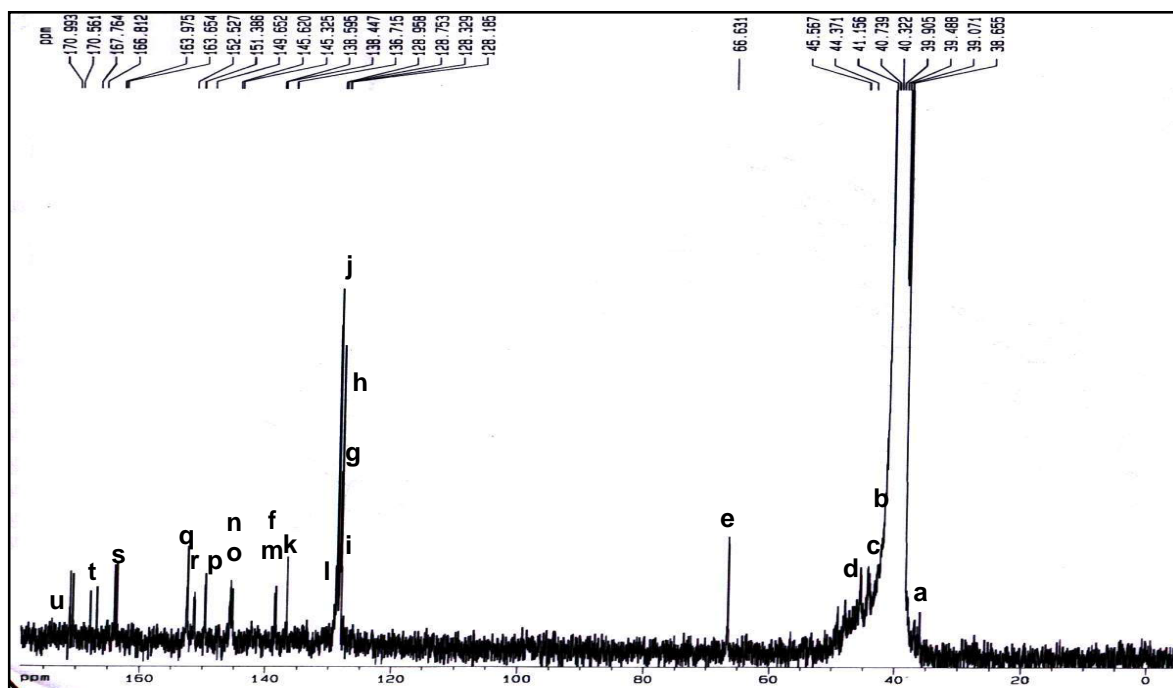


Figura IV.33 - Espectre de Carboni ^{13}C dels rotàmers de TCP-A(Z)-OH (30).

L'espectre de RMN ^{13}C a 50 MHz i 25°C del monòmer de citosina (Figura IV.35) es força ben definit en comparació amb els dos anteriors i els senyals desdoblats degut a l'equilibri *cis-trans* del compost (Figura IV.34) apareixen molt disminuïts tan sols s'aprecien mínimament en els àtoms de carboni molt propers a l'enllaç amida.

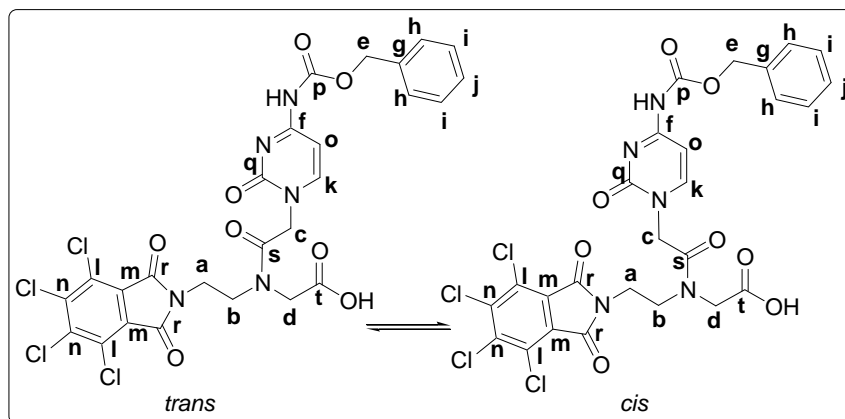


Figura IV.34 - Rotàmers de TCP-C(Z)-OH (32).

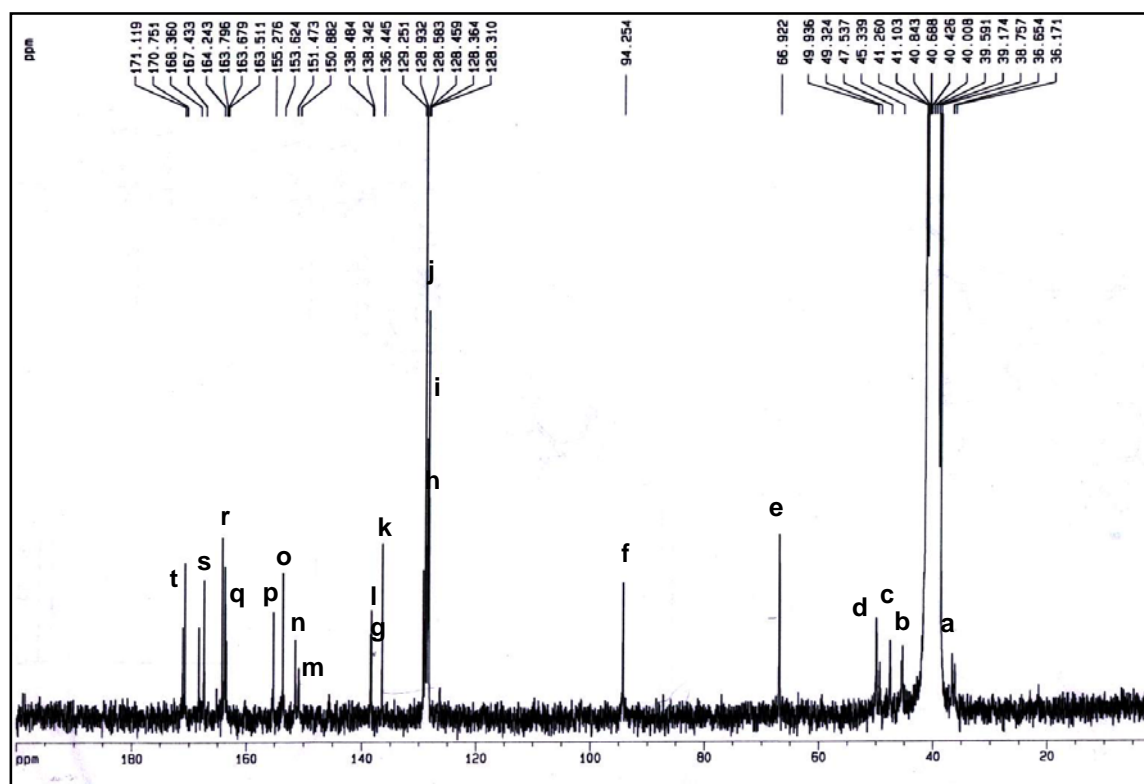


Figura IV.35 - Espectre de Carboni ^{13}C dels rotàmers de TCP-C(Z)-OH (32).

IV.2.4. Síntesi en fase sòlida de TCP-A(Z)-Gly-NH₂ (33), de TCP-C(Z)-Gly-NH₂ (34) i de TCP-C(Z)-T-Gly-NH₂ (35)

Els estudis inicials sobre l'aplicació del grup TCP a la síntesi de PNAs s'han centrat en l'acoblament d'alguns monòmers TCP protegits sobre H-Gly-Rink-MBHA-resines per obtenir TCP-A(Z)-Gly-NH₂ (33), TCP-C(Z)-Gly-NH₂ (34) i TCP-C(Z)-T-Gly-NH₂ (35) (Figura IV.36).

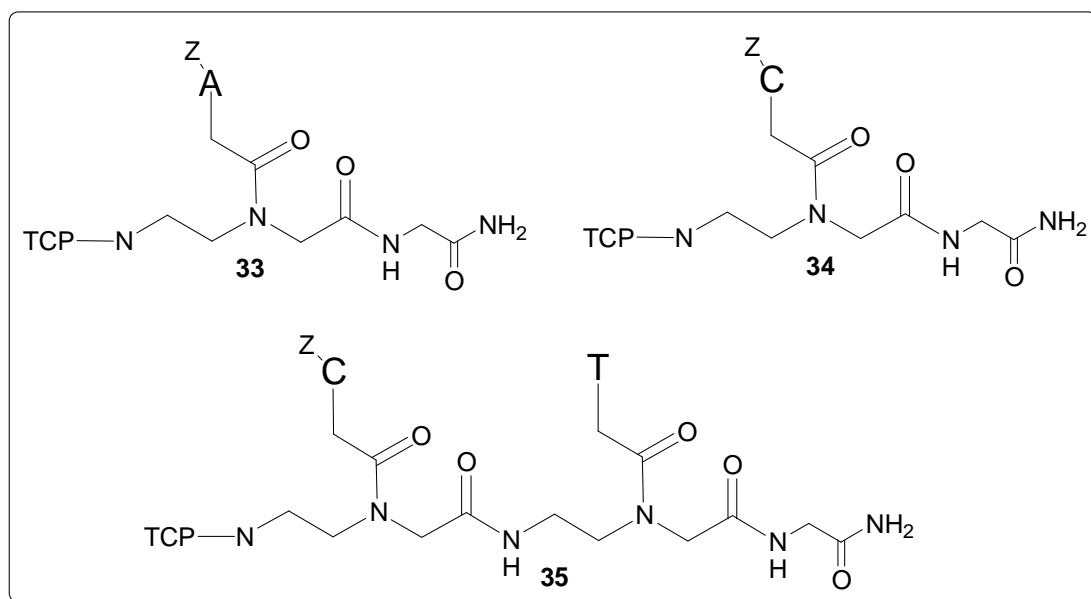
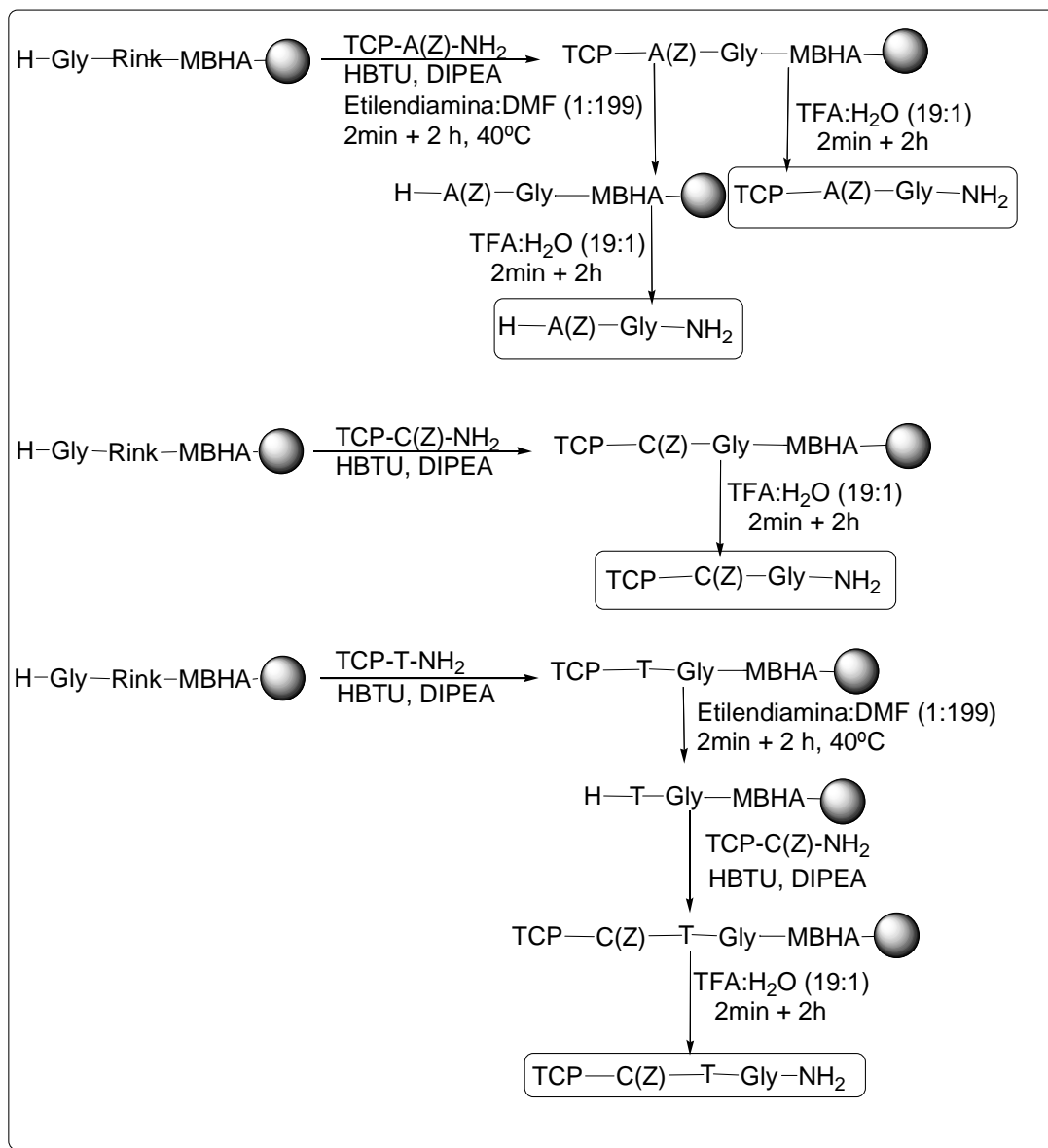


Figura IV.36 - Estructures de les molècules sintetitzades.

La síntesi s'ha dut a terme d'acord amb l'Esquema IV.7. A partir de resines H-Gly-Rink-MBHA-PS (0,3 mmol/g) s'han acoblat els corresponents monòmers mitjançant HBTU i DIPEA utilitzant 3 equivalents de cada reactiu en NMP i durant 3 hores. El mètode de síntesi emprat és el típic de l'estratègia Fmoc/*t*Bu. Pel cas de (35) la síntesi ha inclòs l'etapa de desprotecció de l'intermedi TCP-T-Gly-Rink-MBHA-PS, que s'ha dut a terme mitjançant etilendiamina:DMF (1:199) a 40 °C durant 2 hores, condicions posades a punt en un treball de desprotecció de la cadena lateral de Lys(TCP) protegida⁵⁹. El tractament final de desancorament s'ha fet tractant cada resina amb TFA-H₂O (19:1) i cada cru de reacció s'analitza per HPLC detectant a 3 longituds d'ona (220, 265 i 335 nm). També s'ha provat

l'obtenció de H-A(Z)-Gly-NH₂ incloent una etapa d'eliminació del grup TCP abans del desancorament Esquema IV.7.



Esquema IV.7 - Síntesi d'oligòmers de PNA TCP protegits.

El producte TCP-A(Z)-Gly-NH₂ (**33**) Figura IV.37 es va obtenir amb una puresa del 91 % per HPLC, el pic principal correspon al producte esperat i absorbeix a totes les longituds d'ona provades. En menor proporció també apareixen altres pics d'impureses que individualment no superen el 5 per cent d'integració. En tots els casos tots els pics absorbeixen a 335 nm, fet que suggereix que s'arrosseguen impureses de l'etapa anterior i que el tractament d'acoblament no afecta a la integritat del grup TCP.

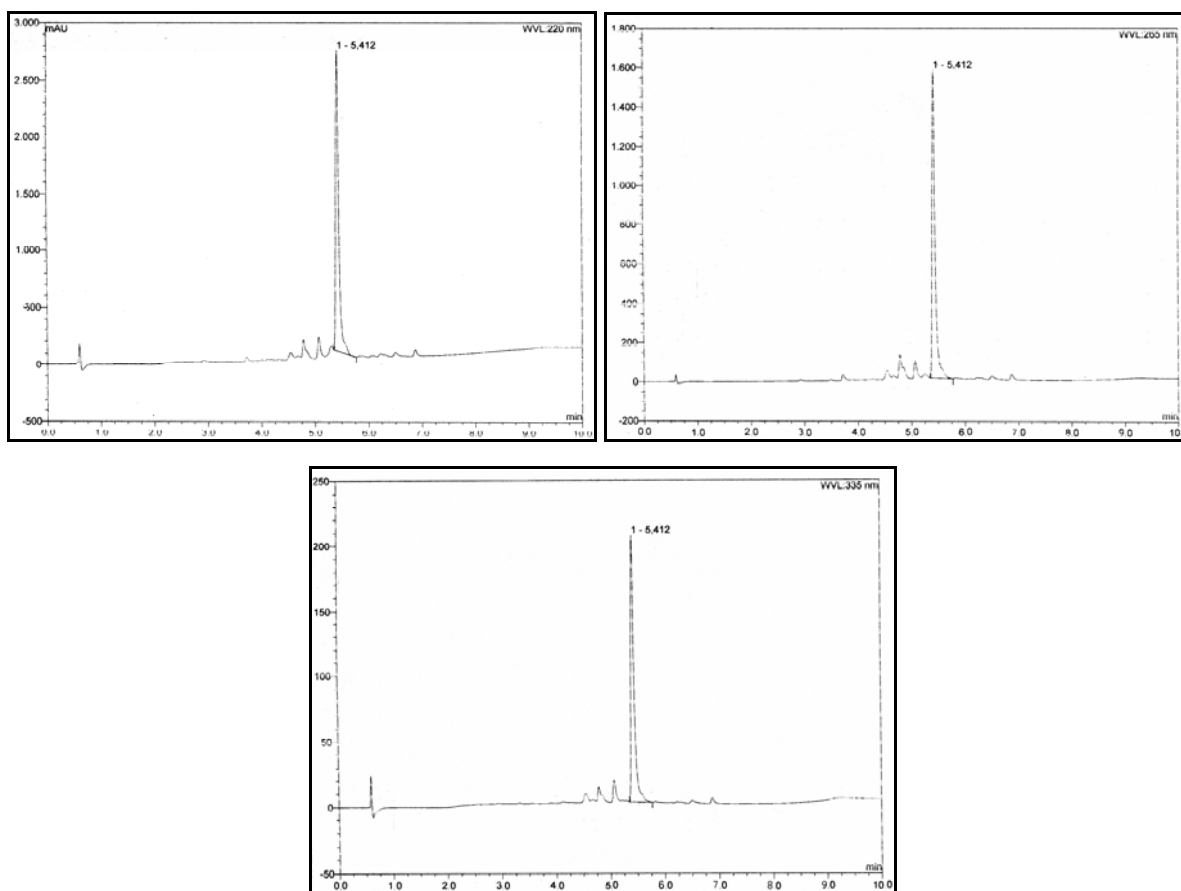


Figura IV.37 - Cromatogrames d'HPLC de TCP-A(Z)-Gly-NH₂ (**33**) a 220, 265 i 335 nm.

El producte H-A(Z)-Gly-NH₂ Figura IV.38 es va obtenir amb una puresa del 79% per HPLC i a temps de retenció majors apareixen impureses que individualment no superen un 6 per cent d'integració. Com es pot observar en la Figura IV.38 l'eliminació del grup TCP posa de manifest la presència d'un major grau d'impureses respecte del pas previ d'acoblament.

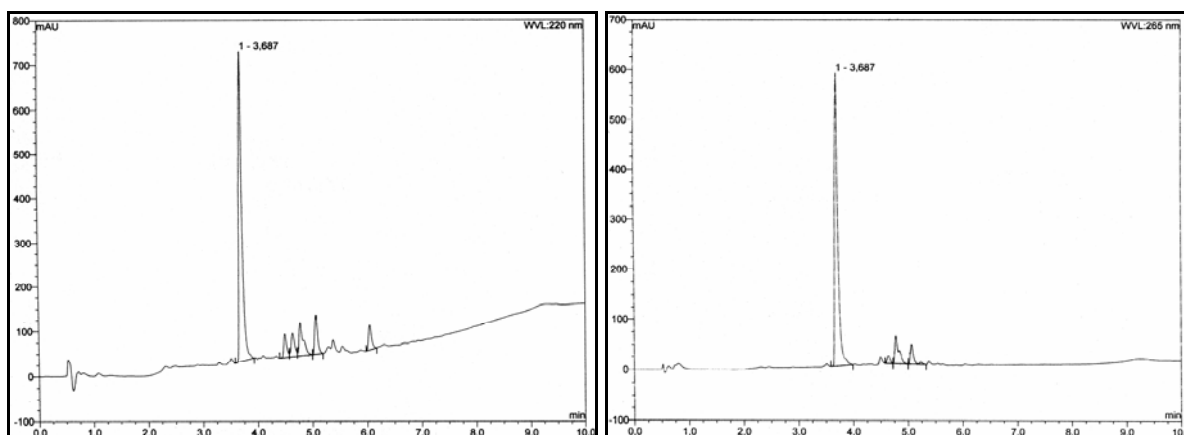


Figura IV.38 - Cromatogrames d'HPLC de $\text{NH}_2\text{-A(Z)-Gly-NH}_2$ a 220 i 265 nm.

El producte TCP-C(Z)-Gly-NH_2 (**34**) Figura IV.39 es va obtenir amb una puresa del 82 % per HPLC a temps de retenció majors apareixen impureses que individualment no superen un 7 per cent d'integració.

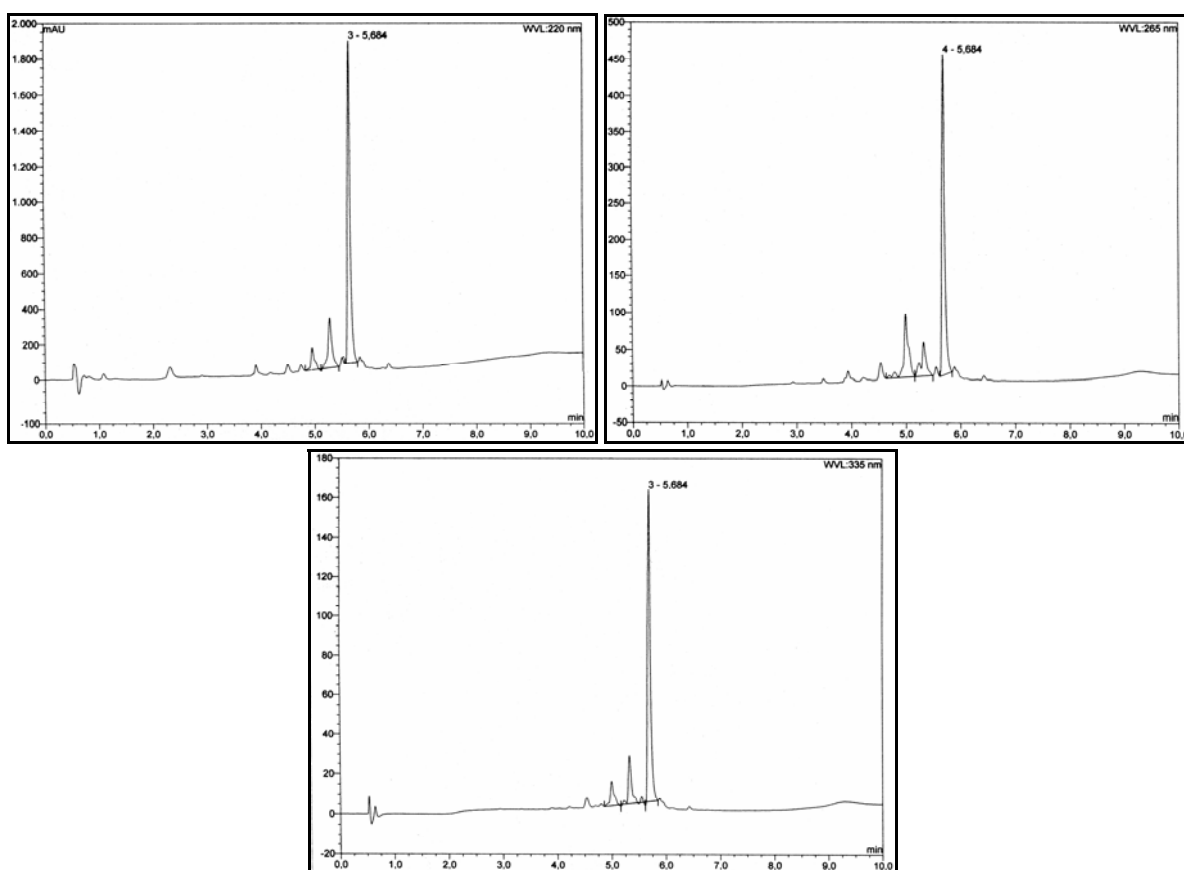


Figura IV.39 - Cromatogrames d'HPLC de TCP-C(Z)-Gly-NH_2 (**34**) a 220, 265 i 335 nm.

El producte TCP-C(Z)-T-Gly-NH₂ (**35**) (Figura IV.40) es va obtenir amb una puresa del 79 % per HPLC acompanyada d'impureses que individualment no superen un 5 per cent d'integració.

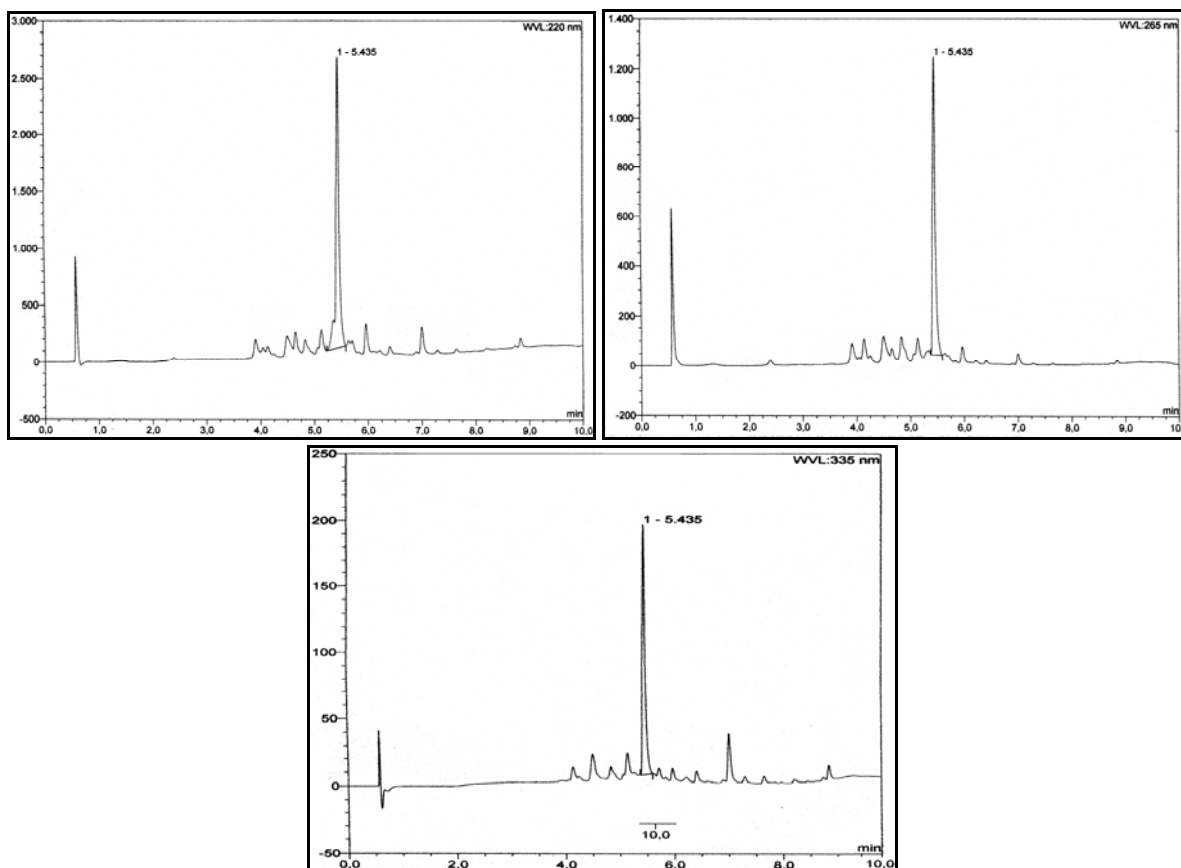


Figura IV.40 - Cromatogrames d'HPLC de TCP-C(Z)-T-Gly-NH₂ (**35**) a 220, 265 i 335 nm.

Només amb les dades obtingudes es pot concloure que, tot i haver-se completat amb èxit la síntesi dels 4 monòmers de PNA TCP protegits, l'aplicabilitat a la síntesi en fase sòlida no funciona correctament sota les condicions assajades. Queda per esbrinar si es pot millorar el resultat emprant monòmers purificats o ajustant millor les condicions d'acoblament. Per tant s'ha deixat pendent per a un possible treball posterior la recerca de condicions més favorables per a l'ús de monòmers TCP protegits de PNA per a la síntesi dels corresponents oligòmers. La potencial aplicació d'aquest grup protector pot reorientar-se a l'obtenció de fragments protegits o l'ús de grup TCP en la protecció dels heterocicles de les cadenes laterals dels monòmers.

V. CAPÍTOL 3. Síntesi de derivats de Pantocina B

V.1. La problemàtica del foc bacterià i el seu control a Espanya

El foc bacterià és una malaltia de quarantena produïda pel bacteri *Erwinia amylovora* i que afecta diferents espècies de plantes, principalment de la família de les rosàcies. La malaltia és de difícil control una vegada introduïda en una zona, i ocasiona la mort d'arbres de varietats sensibles, principalment de perer i pomer, afectant a la producció, modificant l'estructura de varietat del sector de la fruita i incrementant els costos⁶⁰. Els arbres afectats i els que es troben en un perímetre de protecció s'han de cremar.

El foc bacterià es deu a infeccions produïdes per *Erwinia amylovora*, un bacteri que pertany a la família de les enterobacteriàcies i que un cop infecta a la planta es mou ràpidament per entre els espais intercel·lulars causant lesions en el sistema vascular i causar la mort de l'arbre. Entre les que es troben diferents espècies de *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Malus*, *Pyrus*, *Photinia*, *Pyracantha*, *Chaenomeles*, *Stransvaesia* o *Sorbus*, i que són importants comercialment com a fruiters o plantes ornamentals.

El foc bacterià va ser detectat per primera vegada el 1780 en l'estat de Nova York (Estats Units), i es va estendre posteriorment a totes les zones circumdants a Ontàrio (Canadà) i a altres zones de la costa atlàntica, així com a la costa del Pacífic. Aquesta bacteriosi arriba a Europa el 1957 al sud d'Anglaterra. Des de llavors i fins l'actualitat s'ha estès per Europa com una pinça des del nord i des del sud fins la franja de països que inclou Espanya, Itàlia, Àustria, Suïssa i Hongria. A pesar d'aquests fets, no ha sigut descrita en zones fruíteres de l'hemisferi sud com a Sudàfrica, Argentina, Xile o Brasil que son actualment importants exportadors de fruita de pinyol. A Espanya, es va detectar per primera vegada al País Basc a la província de Guipúscoa el 1995⁶¹ i posteriorment es va estendre cap el Nord-est per tota la província prop de Saragossa. El foc bacterià està considerat una malaltia de quarentena a la Unió Europea i per tant, hi ha mesures preventives enfront la introducció i dispersió del seu agent causal. Donat que Espanya està considerada com una zona protegida contra el foc bacterià, existeix una legislació per controlar qualsevol senyal de la presència del patògen.

El símptoma més característic de la malaltia és l'aspecte cremat de les fulles i brots de les plantes afectades, que dóna origen al seu nom. Els primers símptomes apareixen generalment a la primavera, quan la planta brota i floreix, ja que en quasi totes les espècies sensibles, les flors i brots són els òrgans més afectats. Els atacs en brots herbacis amb creixements actius es caracteritzen per un canvi de color a les fulles terminals (ennegrit o vermellós) així com per una pèrdua de turgència de l'extrem del brot que es corba en forma de gaiata de pastor i es marceix. Quant la infecció afecta a la base d'una branca, aquesta es marceix completament. A partir de les fulles, la infecció progressa cap al peciol i el tall del brot, i en pocs dies, si les condicions són favorables, pot avançar fins a 15-30 cm. El fullatge adquireix tons foscos, vermellosos o ennegrits però no es produeix desfoliació i poden observar-se fulles ennegrides durant tot el període vegetatiu. Durant l'avanç de les infeccions poden formar-se ferides en el tronc i branques amb xancre i estries de color vermellores⁶².

La detecció d'*E. amylovora* mitjançant mètodes sensibles i fiables està suposant un avenç important en l'establiment de les vies de transmissió, aspecte que avui en dia és poc conegut i es manté sotmès a bastant especulació. En la difusió de la malaltia s'han implicat tant factors climàtics (pluja sola o en combinació amb el vent o aerosols), labors a les plantacions (poda, recol·lecció, etc.), insectes polinitzadors i fins a ocells. El paper de les abelles i altres insectes com a vectors ha estat estudiat per diversos autors i s'ha constatat que la supervivència d'*E. amylovora* és escassa en els propis insectes, però pot ser d'una a diverses setmanes en el pol·len, nèctar i mel. No obstant, el major risc de difusió de la malaltia a zones protegides resideix en la introducció de material vegetal portador d'*E. amylovora*, i per això s'exigeix el passaport fitosanitari.

Els mètodes de control del foc bacterià han estat ineficaços per a evitar la seva extensió i eradicar la malaltia en els països en què aquesta és epidèmica. Una vegada introduïda i generalitzada la presència d'aquesta bacteriosi en una zona, sols és possible utilitzar mesures de convivència per a evitar els seus efectes, el que ha obligat a les zones afectades a una profunda transformació del sector productiu de poma, pera i nesprer.

La majoria de mètodes de lluita biològica estan basats en bacteries com *Erwinia herbicola* (ceps Eh252, M232A, C9-1, NL18, 112Y, LE-15) o *Pseudomonas fluorescens* (A506)⁶³, i ofereixen poques expectatives a curt termini a nivell comercial, degut a la inconsistència dels resultats obtinguts. En molts casos, aquesta inconsistència ha estat deguda a la baixa supervivència de l'agent de control biològic i limitacions amb la compatibilitat amb altres mètodes químics⁶⁴.

A nivell de lluita biotècnica, s'han assajat metabolits produïts per microorganismes antagonistes d'*E. amylovora* o extractes de plantes. S'han de citar diversos productes com enzims derivats de bacteriòfags, que afecten específicament a l'exopolisacàrid amilovorina que és un factor de virulència, olis essencials o terpens, i compostos complexos d'extractes d'heura (Mosch et al. 1990, Scortichin & Rossi 1993). Fins al moment de l'inici del present treball no s'havien realitzat estudis amb pèptids antimicrobians, excepte en el cas d'algunes bacteriocines que s'estan avaluant obtingudes a partir de *Serratia* sp. (Jabrane et al. 1996)

V.2. Els pèptids antimicrobians com a possibles agents de control d'*E. amylovora*

L'aplicació de productes de síntesi per a la lluita en contra de malalties de plantes i fruites, ja sigui a nivell de producció o en el seu posterior emmagatzematge, és una pràctica que ha trobat obstacles importants a nivell de salut pública i mediambiental, a aquest fet s'ha afegit l'aparició de fenòmens de resistència de poblacions d'alguns agents patògens i, en alguns casos, la pèrdua d'efectivitat dels productes bactericides.

Les més recents aproximacions es dirigeixen cap a l'obtenció d'antimicrobians més segurs per a la salut humana i el medi ambient, el que implica per un costat la investigació de compostos naturals actius i, entre diverses famílies de compostos, la utilització de pèptids antimicrobians pot representar un enfocament útil en la lluita contra agents patògens dels cultius de plantes d'interès econòmic⁶⁵.

La recerca de nous agents d'origen peptídic es un objectiu amb possible implantació industrial, ja que la síntesi i comercialització d'estructures peptídiques de baix pes

molecular seria viable. Recentment s'han descrit pèptids de cadena curta amb activitat antifúngica en cítrics i tomàquets, també s'han descrit interessants estudis d'efectes additius en la seva acció antibacteriana de combinacions de pèptids de cadena relativament curta⁶⁶.

V.2.1. Estudis de relació entre l'estructura química i l'activitat biològica de Pantocina B (36)

Donat que no existeixen tractaments curatius de la malaltia, el present capítol de la tesi es centra en la recerca de nous productes que permetin pal·liar aquesta mancança en la lluita davant el foc bacterià. L'enfoc escollit va ser l'estudi de la síntesi de Pantocina B (36) (Figura V.1) per poder accedir posteriorment a la síntesi dels seus anàlegs.

L'existència de pèptids i pseudopèptids, aïllats de plantes o animals, que posseeixen activitat antimicrobiana es ben coneguda⁶⁷. El bacteri *E. herbicola* colonitza la mateixa superfície de planta que *E. amylovora* però no és un bacteri patogen per a la mateixa. S'ha detectat que produeix la formació de productes naturals que inhibeixen el creixement de *E. amylovora*⁶⁸, i s'ha identificat la Pantocina B (36) com a responsable d'aquesta acció que es deu a l'inhibició de l'enzim *N*-acetilornitina aminotransferasa. Per tant es tracta d'un producte que actua després de la seva internalització en el bacteri. D'acord amb Braddy i col.⁶⁹ la Pantocina B mostra una concentració mínima inhibidòria de 0,75 nM en condicions de medi de cultiu mínim, i la seva activitat es suprimeix per la presència de l'aminoàcid L-arginina.

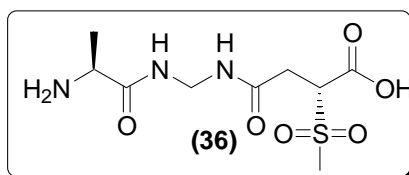


Figura V.1 - Estructura de la Pantocina B (36).

La síntesi de Pantocina B (36) ha estat descrita⁷⁰ i també s'han realitzat estudis de la relació entre l'estructura de Pantocina B (36) i la seva activitat biològica sintetitzant diversos anàlegs⁷¹ indicats a la Figura V.2 i Figura V.3. La utilització d'aquestes dades es

un punt de partida per a explorar la síntesi de noves estructures que puguin tenir major activitat.

Tots els anàlegs descrits han estat assajats amb *E. amylovora* utilitzant l'assaig de difusió de disc, mesurant els halos d'inhibició en cultius en placa de petri produïts per l'aplicació de dosis de 125 ng, 63 ng o 31 ng de Pantocina B (**36**).⁷¹

L'efecte de les modificacions estructurals de Pantocina B (**36**) sobre la seva activitat biològica es pot analitzar atenent a tres seccions de la molècula (Figura V.2).

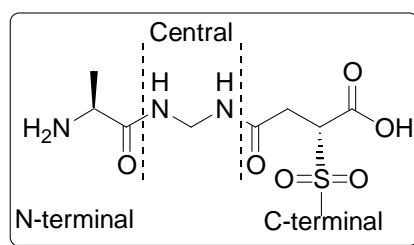


Figura V.2 - Pantocina B (**36**) dividida en seccions per a l'estudi de la seva activitat.

Les variacions realitzades en la secció *N*-terminal (Figura V.3) mostren que la substitució de L-alanina per glicina, L-valina i L-leucina manté l'activitat antibacteriana i que disminueix significativament pel cas de la modificació amb L-fenilalanina i L-prolina. La modificació amb D-alanina o D-leucina porta a la pèrdua total d'activitat antibacteriana. Aquests requeriments estructurals suggereixen que l'accés a la cèl·lula via transport peptídic és essencial per a l'activitat antibacteriana, degut a que els transportadors peptídics mostren una alta estereoselectivitat, però una baixa especificitat de substrat⁷².

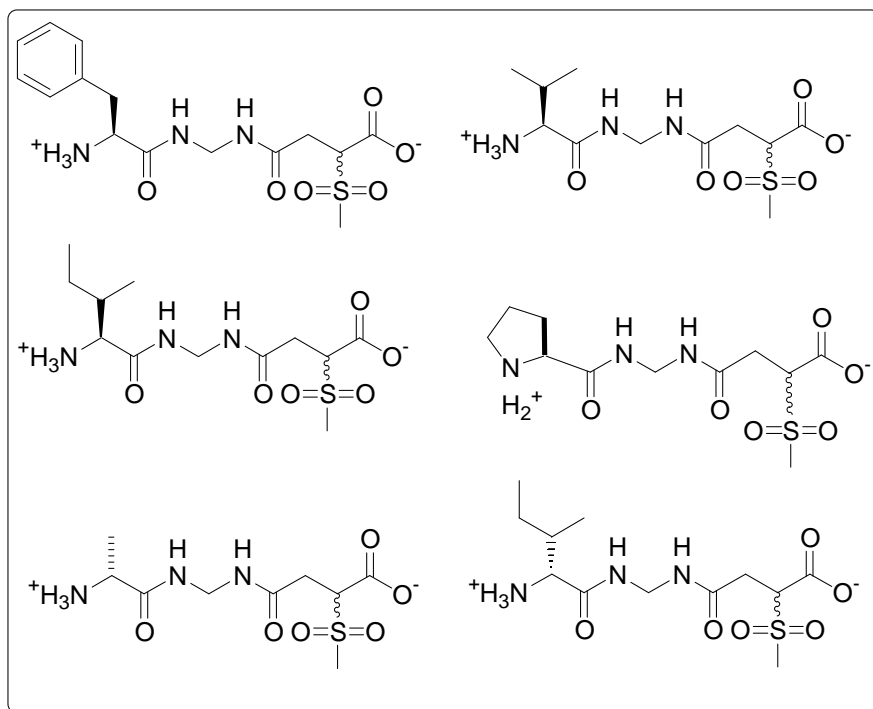


Figura V.3 - Modificacions *N*- terminal de la Pantocina B (**36**).

Les variacions realitzades en la secció central introduint un grup metilè més o substituïnt un hidrogen per un grup metil condueixen a compostos inactius (Figura V.4), fet que ens indica que l'agrupament de metilendiamina central sembla essencial per a l'activitat de la Pantocina B (**36**).

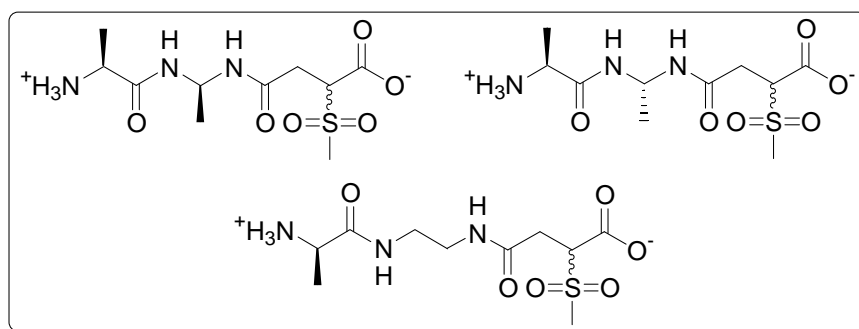


Figura V.4 - Modificacions de la secció central de la Pantocina B (**36**).

De les quatre modificacions introduïdes a la secció C-terminal (Figura V.5) s'ha observat que tan sols el derivat sulfòxid manté l'activitat antibacteriana tot i que en molt

menor grau que Pantocina B (**36**), el que indica la importància de mantenir el grup metilsulfona en l'estructura.

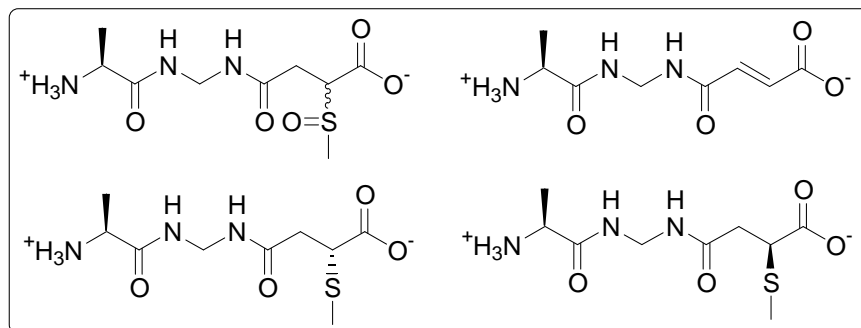


Figura V.5 - Modificacions de la secció C-terminal de la Pantocina B (**36**).

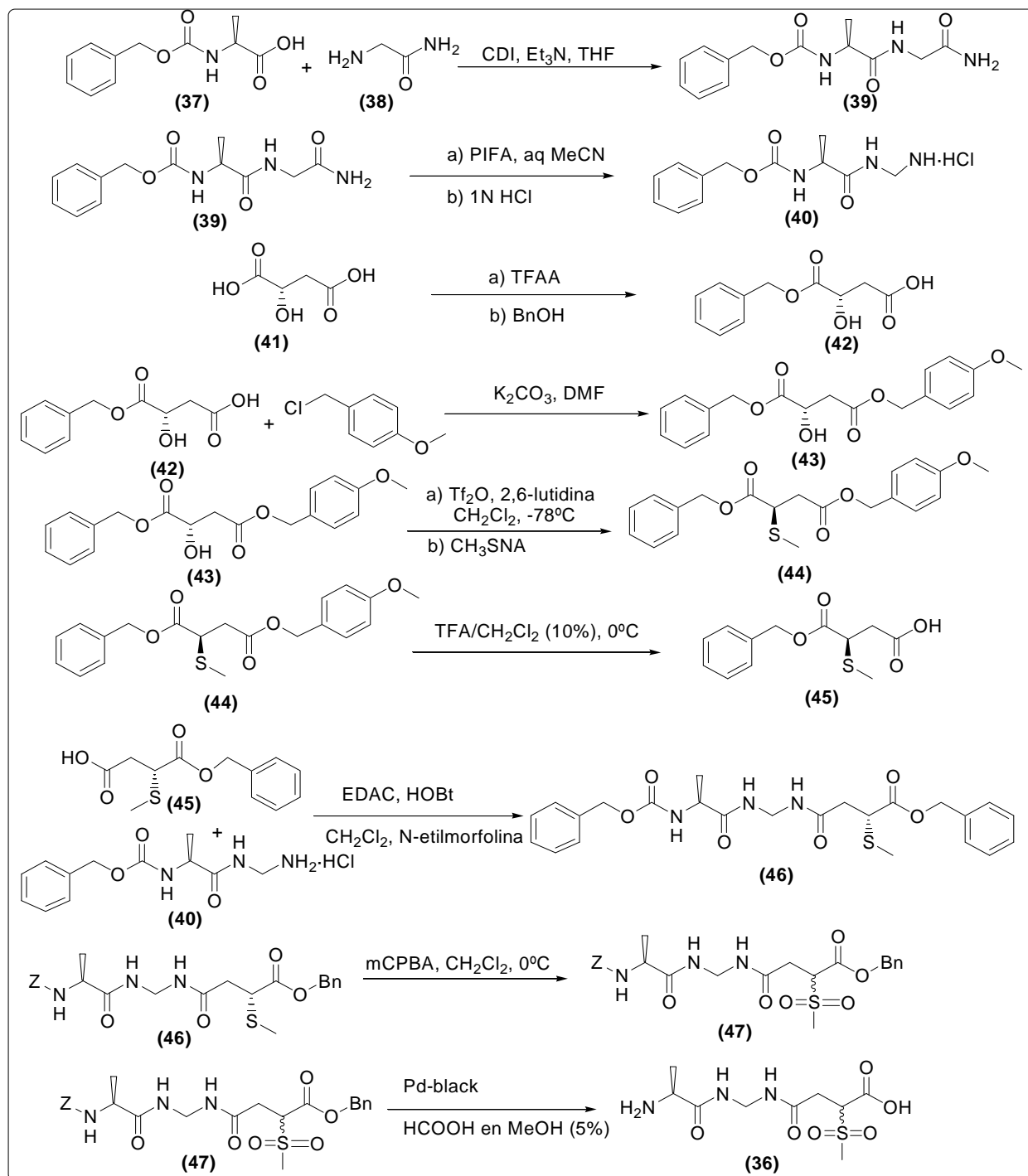
V.3. Resultats i discussió.

Aquest apartat descriu els estudis sintètics preliminars realitzats per a la síntesi de Pantocina B (**36**) i una col·lecció d'anàlegs seus. Els estudis s'han fet en solució per tal de que en el futur es puguin traspasar a fase sòlida i preparar quimioteques d'anàlegs mitjançant química combinatòria. L'objectiu final serà el desenvolupament d'una futura línia de nous pseudopèptids d'origen sintètic potencialment aplicables com agents efectius contra les bacteriosis produïdes per *E. amylovora*.

El pla de treball previst ha estat realitzar la síntesi de Pantocina B (**36**) i d'una primera tanda d'anàlegs pel posterior estudi de la seva activitat *in vitro* davant *E. amylovora*.

V.3.1. Síntesi de Pantocina B (36)

Per tal de poder comparar l'activitat de Pantocina B (36) s'ha sintetitzat segons la ruta descrita per Sutton & Clardy⁷⁰ reproduint els seus resultats de forma satisfactòria (Esquema V.1).



Esquema V.1 - Ruta de síntesi de la Pantocina B (36).

El producte Pantocina B (**36**) s'ha obtingut amb un 95 % de puresa avaluada per HPLC a 215 nm de longitud d'ona, la senyal corresponent al producte apareix a 20.76 min (Figura V.6), i s'ha caracteritzat per $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$ i per espectrometria de ESI-MS.

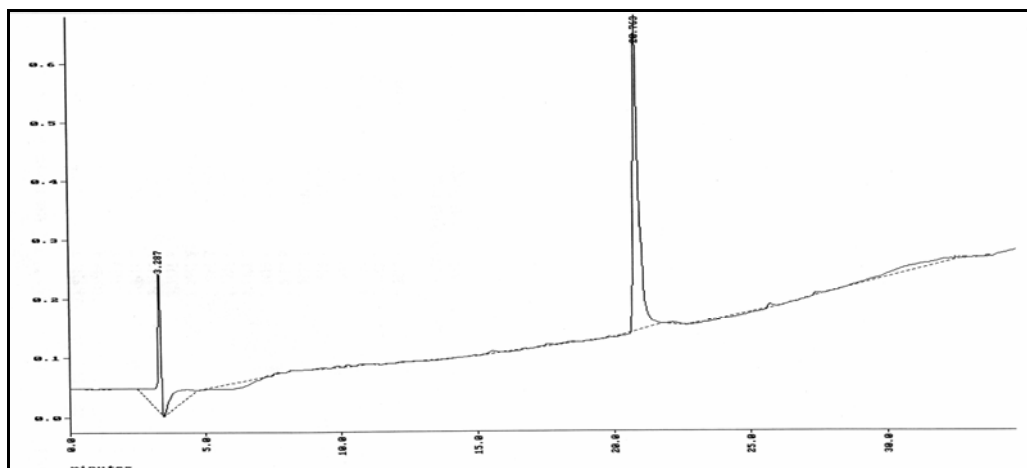


Figura V.6 - Cromatograma d'HPLC de la Pantocina B (**36**) a 215 nm de longitud d'ona.

El pes molecular de la Pantocina B (**36**) és 295.08 g/mol. El fragment de ESI-MS que correspon a aquesta massa molecular a l'espectre (Figura V.7) és el de $m/z[M^+H]$: 295.8, la senyal a 277.9 correspon a la massa de la Pantocina B (**36**) menys una molècula d'aigua, la senyal de 318.9 correspon a la massa de la Pantocina B (**36**) més un àtom de sodi.

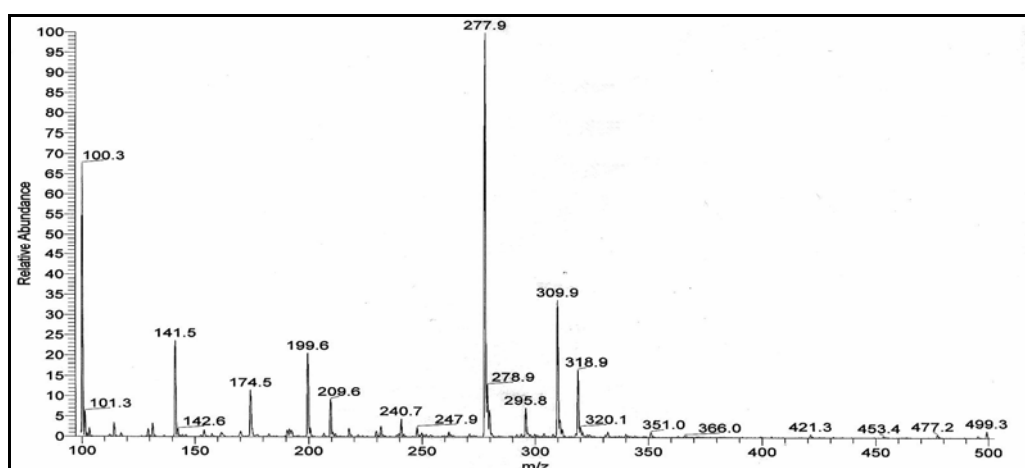


Figura V.7 - Espectre de ESI-MS de Pantocina B (**36**).

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25°C de la Pantocina B (**36**) es mostra a la Figura V.8, es mostra l'equivalència de cadascuna de les senyals de l'espectre ^1H amb el seu corresponent protó de la molècula de Pantocina B (**36**).

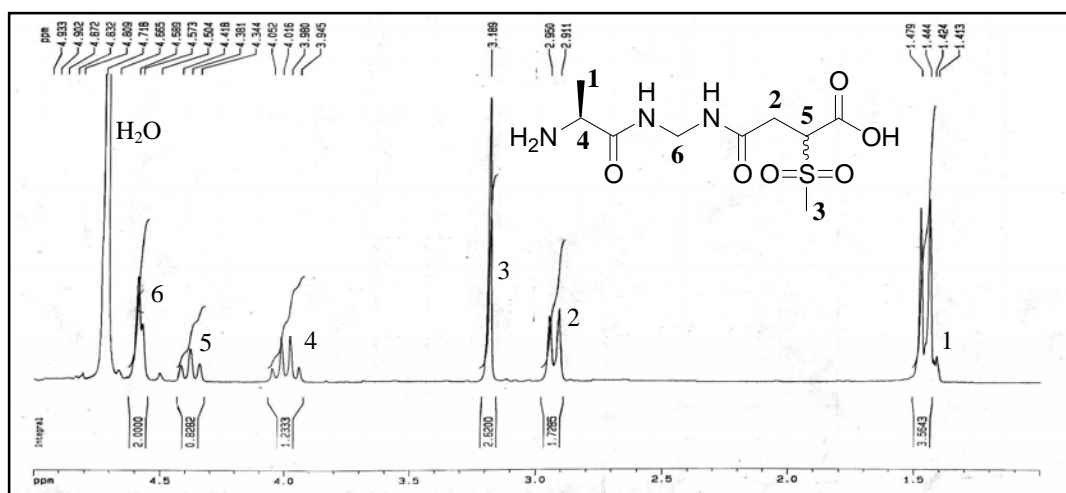


Figura V.8 - Espectre de RMN de ^1H de la Pantocina B (**36**).

L'espectre de RMN ^{13}C a 50 MHz i 25°C de la Pantocina B (**36**) es mostra a la Figura V.9, a la es mostra l'equivalència de cadascuna de les senyals de l'espectre amb el seu corresponent carboni a la molècula de Pantocina B (**36**).

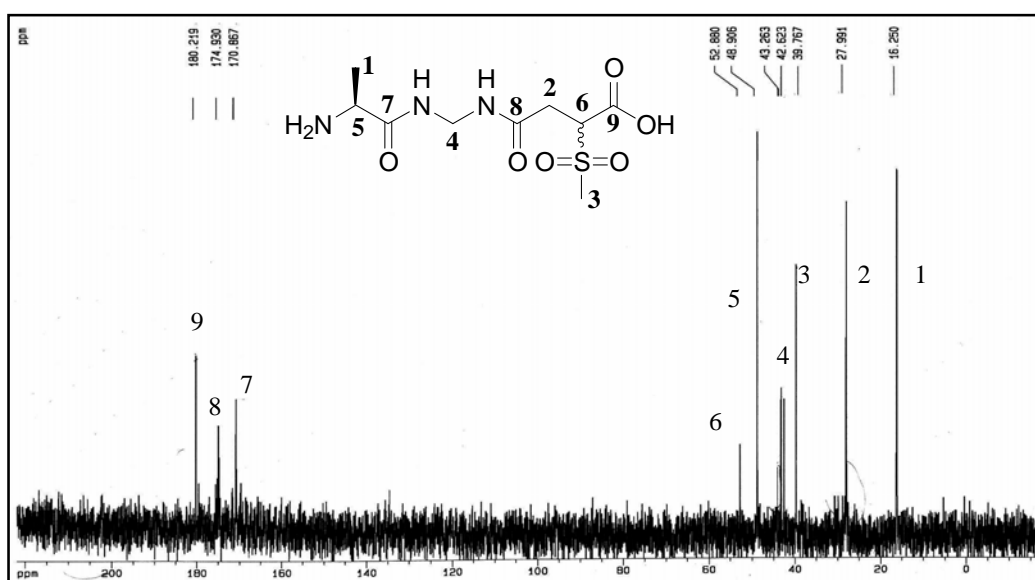


Figura V.9 - Espectre de RMN de ^{13}C de la Pantocina B (**36**).

L'activitat de la Pantocina B sintetitzada ha estat comprovada davant de les soques Ea273 i Ea6076 seguint un protocol equivalent al descrit a la literatura. En un primer assaig s'han aplicat discs de paper de filtre de 7 mm de diàmetre impregnats amb solucions de diferents concentracions en plaques de GA (medi agar contenint D-glucosa, L-asparagina, àcid nicotínic i sals), els resultats es troben resumits a la Taula V.1, on els valors indiquen el diàmetre de l'halus d'inhibició.

Taula V.1 - Resultats del primer assaig amb discs de paper de filtre.

Pantocina B (mM)	Ea 273	Ea 6076
10 mM	19	17
1 mM	12	8
0.1 mM	0	0

Un segon assaig s'ha realitzat en el mateix medi però aplicant la mostra líquida (100 µl) a l'interior d'un cilindre inoxidable de 7 mm de diàmetre i deixant que es difongui cap a l'agar (medi GA). Els resultats es troben resumits a la Taula V.2, on els valors indiquen el diàmetre de l'halus d'inhibició.

Taula V.2 - Resultats del segon assaig aplicant la mostra líquida a l'interior d'un cilindre inoxidable.

Pantocina B (mM)	µmols aplicats	Ea 273	Ea 6076
10 mM	1	> 30	> 30
1 mM	0.1	> 30	> 30
0.1 mM	0.01	> 30	> 30

Ambdós assaigs mostren activitat de la Pantocina B sintetitzada. Es clar que el fet d'utilitzar discs de paper impregnats dona resultats inferiors a quan s'aplica la mostra en dissolució, molt possiblement degut a factors d'absorció del producte sobre les fibres de paper. Amb tot, s'ha pogut comprovar l'activitat de Pantocina B, tot i que no es pot fer una comparació quantitativa amb les dades de la literatura, i queda pendent per més endavant posar a punt un mètode d'assaig que utilitzi el Bioscreen (lector de microplaques).

V.3.2. Síntesi de nous anàlegs de Pantocina B (36)

Per tal d'iniciar un estudi de la relació estructura-activitat de la Pantocina B (36) s'ha proposat la síntesi de noves estructures d'acord a les modificacions indicades a la **Figura V.10**.

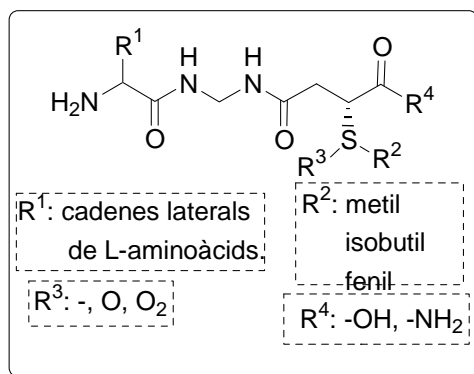


Figura V.10 - Modificacions proposades per la Pantocina B (36).

Les modificacions proposades en la secció C-terminal mantenen el grup metilsulfona o el substitueixen pels grups fenil o isobutil (R₂), i alhora es vol aconseguir accedir a les variants sulfòxid i sulfur corresponents a diferents estats d'oxidació de l'àtom de sofre (R₃). Quan la síntesi es faci en fase sòlida, utilitzant el linker de la resina adequat, s'obtindran totes les seqüències com a àcid terminal o com a amida terminal (R₄), i també es podrà accedir a modificar el grup R₁, o sigui a acoblar els L-aminoàcids que convingui. A part també hi ha dues modificacions on el grup sulfòxid ha estat eliminat i en el seu lloc hi ha una doble enllaç en les dues possibles configuracions (Figura V.11).

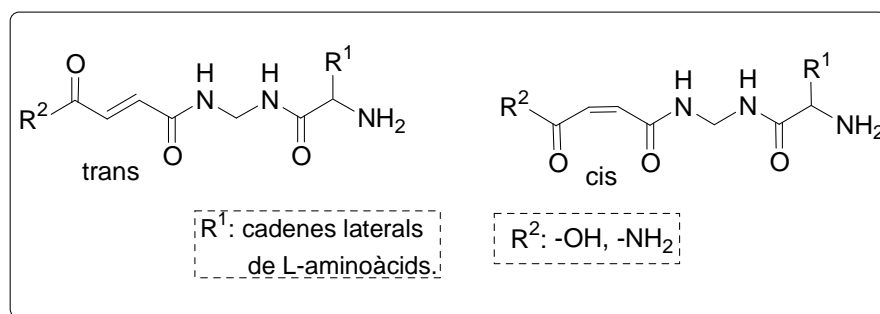


Figura V.11 - Altres variants de la Pantocina B (36) a sintetitzar.

L'objectiu concret d'aquest treball és accedir a la síntesi de 11 monòmers en fase líquida per al seu posterior ancorament al suport sòlid. Els 11 monòmers proposats són els que es troben a la Figura V.12.

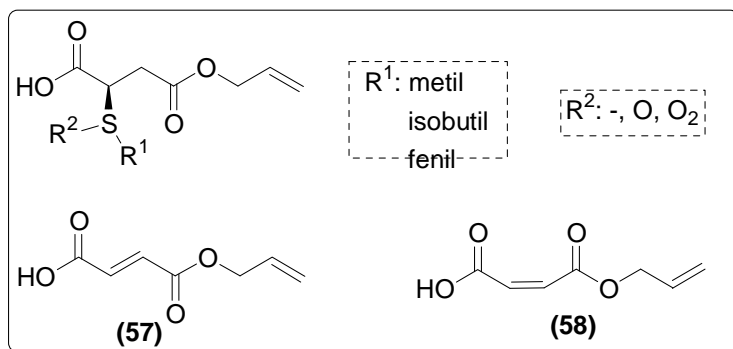
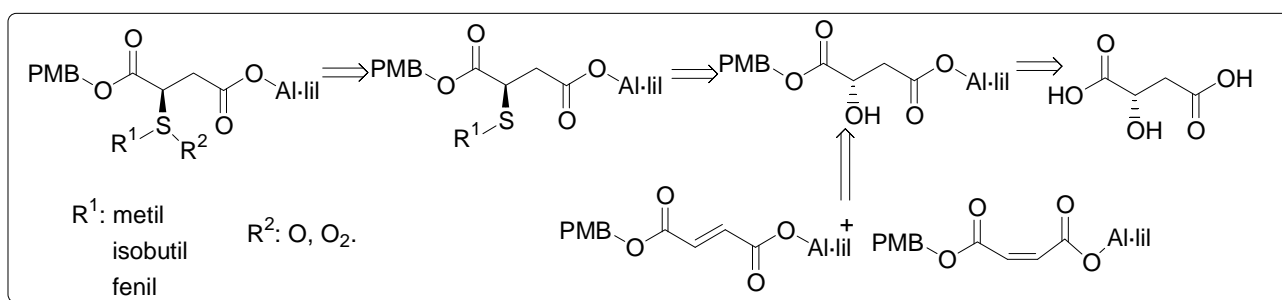


Figura V.12 - Monòmers a sintetitzar en fase líquida.

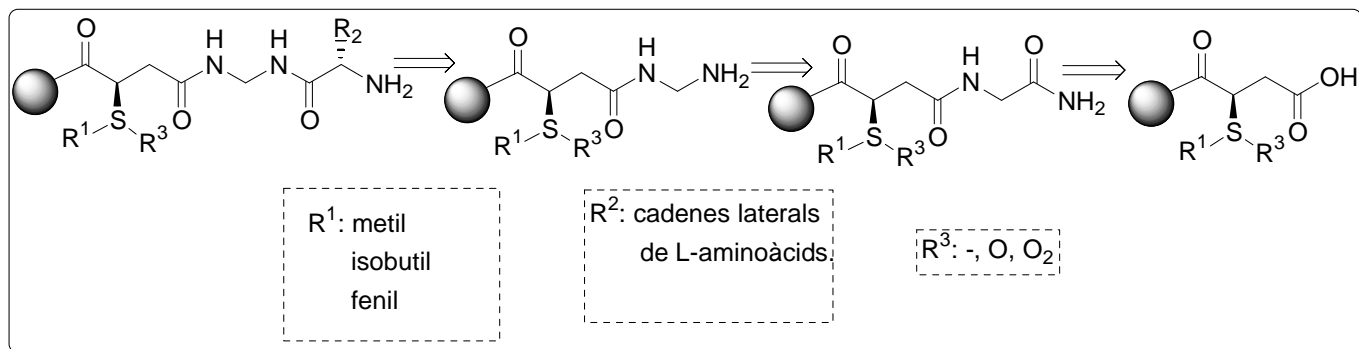
A la retrosíntesi proposada pels 11 monòmers (Esquema V.2) es parteix de l'àcid màlic que es protegeix selectivament amb el grup parametoxibenzil i el grup al·lil, per a continuació substituir l'alcohol lliure per un grup sulfur. Posteriorment s'oxida el sulfur selectivament. A continuació l'eliminació del grup parametoxibenzil deixarà l'àcid en forma lliure per a poder ancorar-lo a la fase sòlida. A partir de l'àcid màlic protegit es pot també accedir a les variants que contenen un doble enllaç.



Esquema V.2 - Retrosíntesi dels 11 monòmers en fase líquida.

La ruta proposada per a la síntesi en fase sòlida de les variants de la Pantocina B (36) seria la representada a l'Esquema V.3. Es partiria dels monòmers sintetitzats que s'ancorarien al suport, es desprotegirien el grup al·lil, i s'acobllaria la glicinamida que tot seguit es sotmet a una transposició de Hoffman sobre suport sòlid en la que el grup amida es converteix en grup amina. Aquesta amina lliure permetria l'addició dels aminoàcids

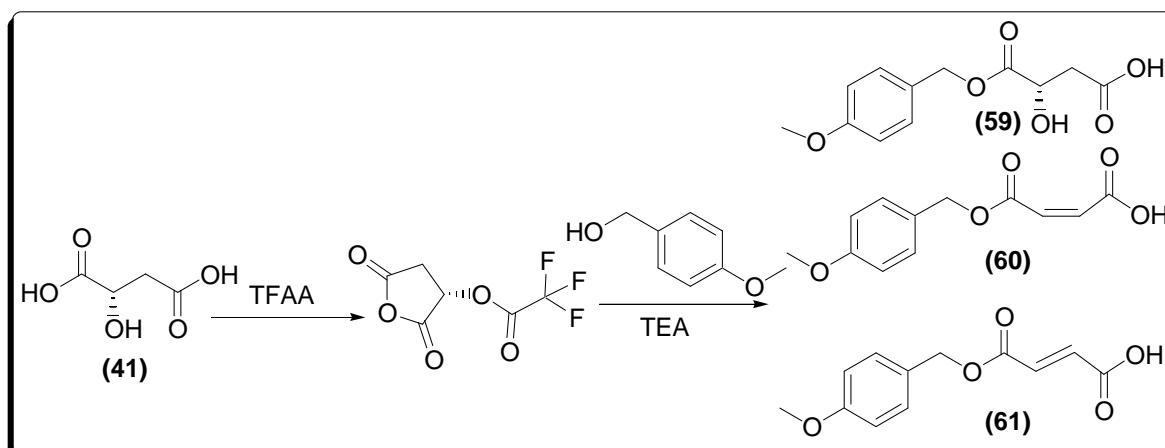
Fmoc protegits escollits, amb posterior eliminació del grup Fmoc i desancorament de la reïna, i es podria obtenir una llarga llista de modificacions de la Pantocina B (**36**).



Esquema V.3 - Retrosíntesi en fase sòlida dels anàlegs de Pantocina B (**36**).

V.3.2.1. Protecció de l'àcid màlic amb el grup parametoxibenzil

La monoprotecció de l'àcid màlic mitjançant el clorur de parametoxibenzil s'ha realitzat modificant el mètode utilitzat per Sutton & Clardy⁷⁰ de protecció amb el grup benzil (Esquema V.4). La reacció es realitza afegint a 2.4 equivalents d'anhidrid trifluoroacètic, un equivalent d'àcid màlic a 0 °C, mentre es manté agitació continua i es deixa agitant fins a dissolució completa, un cop dissolt s'evapora l'anhidrid trifluoroacètic en excés i s'afegeixen 2.4 equivalents de TEA i 3.3 equivalents d'alcohol parametoxibenzílic i es deixa agitant a temperatura ambient tota la nit. El cru de reacció es dissolt amb AcOEt i després de fer diversos rentats es columna obtenint-se conjuntament l'àcid (*S*)-3-((*p*-metoxibenziloxi)carbonil)-3-hidroxiopropanoic (**59**), l'àcid (*Z*)-3-((*p*-metoxibenziloxi)carbonil)acrílic (**60**) i l'àcid (*E*)-3-((*p*-metoxibenziloxi)carbonil)acrílic (**61**).



Esquema V.4 - Protecció de l'àcid màlic amb el grup *p*-metoxibenzil.

El producte **(59)** ha estat caracteritzat per ressonància de ^1H . L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C es mostra a la Figura V.13.

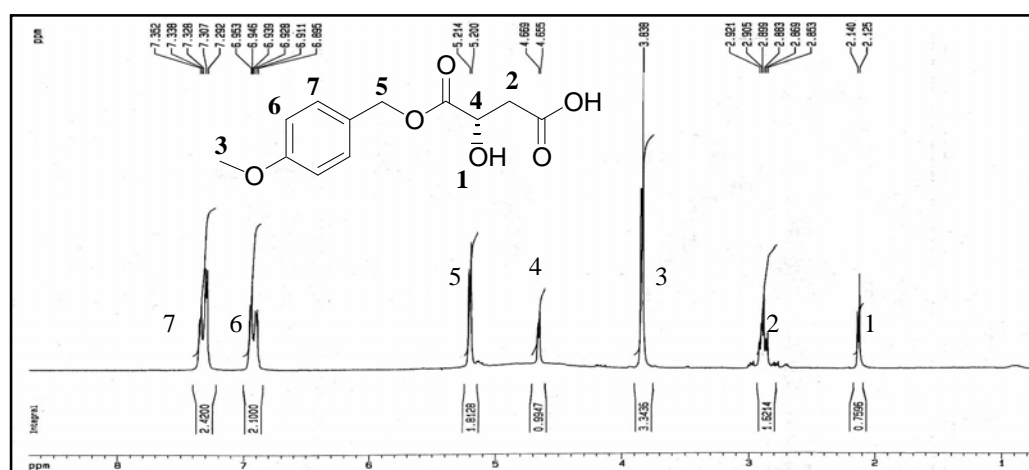


Figura V.13 - Espectre de ^1H de **(59)**.

L'àcid (*Z*)-3-((*p*-metoxibenziloxi)carbonil)acrílic **(60)** obtingut ha estat caracteritzat per ressonància de ^1H i ESI-MS.

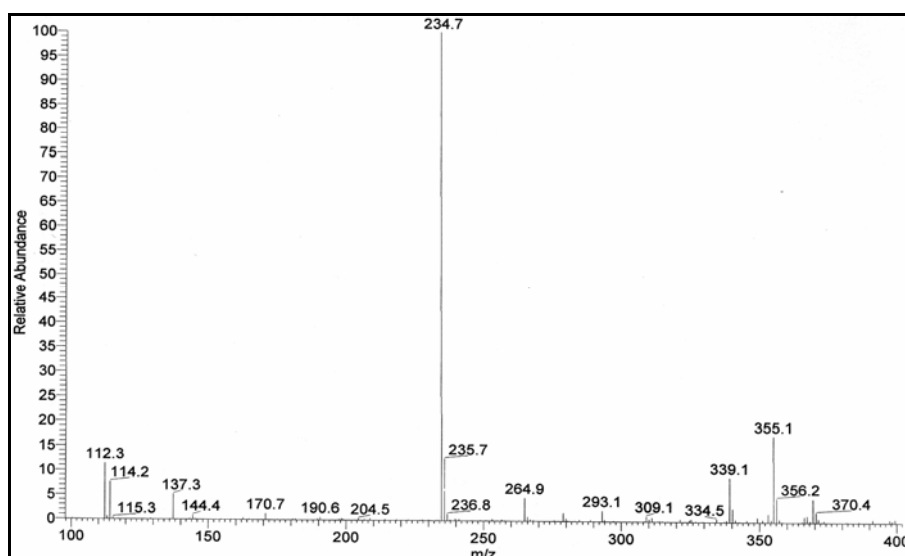


Figura V.14 - Espectre de ESI-MS de **(60)**.

El pes molecular de **(60)** és 236.08 g/mol. El fragment de ESI-MS que correspon a aquesta massa molecular a l'espectre (Figura V.14) és el de $m/z[M+H]^+$: 236.8 la senyal a 234.7 correspon a la massa de **(60)** menys dos hidrògens. L'espectre de RMN 1H a 200 MHz i 25 °C de **(60)** es mostra a la Figura V.15.

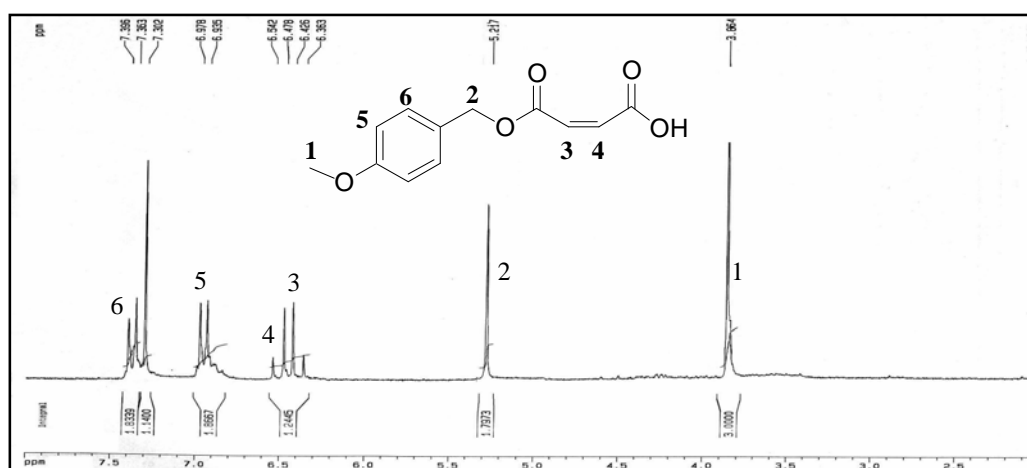


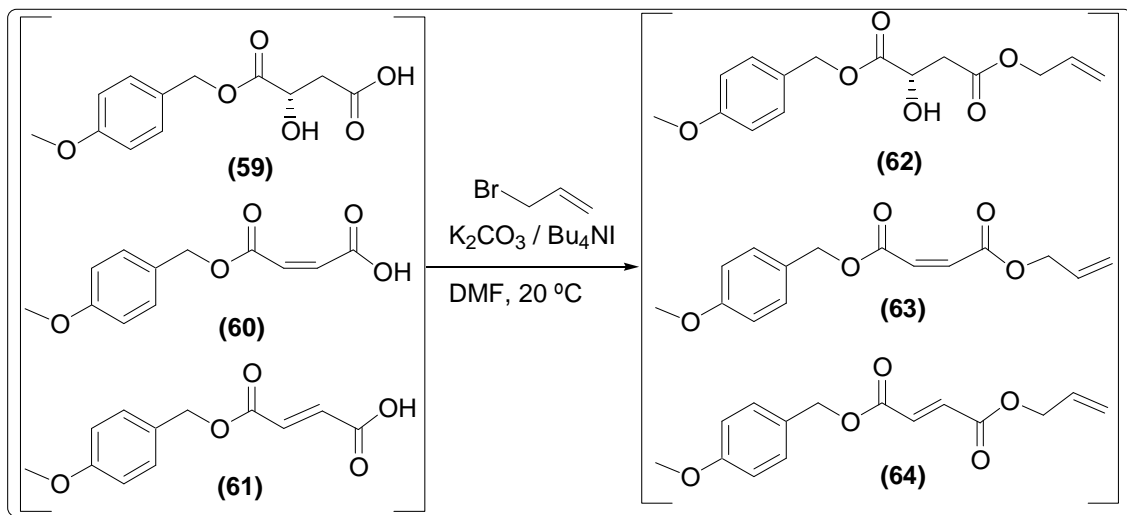
Figura V.15 - Espectre de RMN de 1H de **(60)**.

L'àcid (*E*)-3-((*p*-metoxibenziloxi)carbonil)acrílic (**61**) no s'ha pogut identificar en aquesta etapa degut a la dificultat que presenta separar-los en la columna, s'ha optat per

processar la barreja de reacció en la següent etapa i intentar una millor separació dels compostos diprotegits.

V.3.2.2. Protecció amb el grup al·lil

El cru obtingut a l'etapa anterior es va fer reaccionar directament amb bromur d'al·lil d'acord amb el mètode utilitzat per Joullié⁷³ (Esquema V.5). La reacció es realitza dissolent un equivalent de la barreja obtinguda de la reacció anterior, amb 1.1 equivalents de K_2CO_3 i 0.1 equivalents de Bu_4NI en DMF i seguidament afegint 1.1 equivalents de bromur d'al·lil, es deixa agitant a temperatura ambient tota la nit. El cru de reacció es dilueix amb AcOEt i es renta amb una dissolució saturada de clorur sòdic. La fase orgànica s'asseca sobre sulfat magnèsic anhidre, es filtra i es concentra fins a un volum adequat per a la seva purificació per columna obtenint-se els productes (*S*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-hidroxiopropanoat de *p*-metoxibenzil (**62**) amb un rendiment del 50-55 %, (*Z*)-3-((al·liloxi)carbonil)acrilat de *p*-metoxibenzil (**63**) amb un rendiment del 20-25 % i (*E*)-3-((al·liloxi)carbonil)acrilat de *p*-metoxibenzil (**64**) amb un rendiment del 10-15 %, calculats a partir de l'àcid màlic, reactiu de partida de la primera reacció.



Esquema V.5 - Protecció de (**59**), (**60**) i (**61**) amb el grup al·lil.

Els producte (**62**) ha estat caracteritzat per ESI-MS, 1H -RMN, DEPT135 i ^{13}C -RMN i els productes (**63**) i (**64**) han estat caracteritzats per ressonància de 1H -RMN, DEPT135 i

^{13}C -RMN, els temps de retenció a l'HPLC són de 20.1, 23.9, i 25.4 min respectivament (Figura V.16).

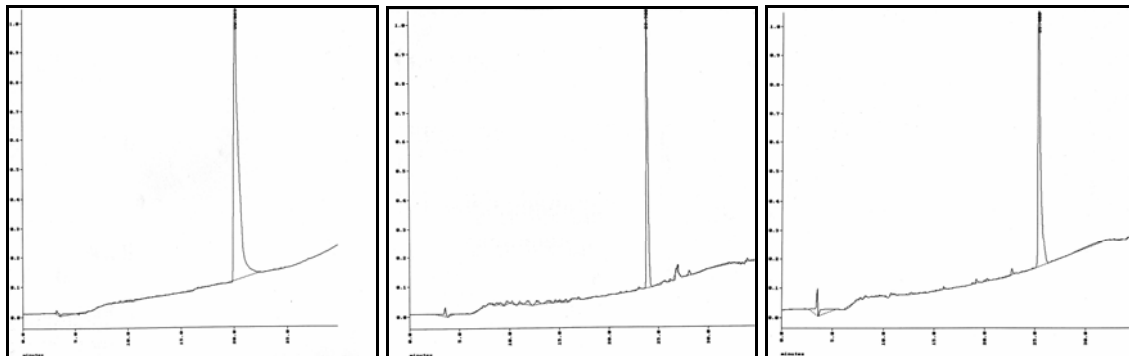


Figura V.16 - HPLC de (62), (63) i (64) a 220 nm.

El pes molecular de (62) és de 294.30 g/mol. El fragment de ESI-MS que correspon a aquesta massa molecular a l'espectre (Figura V.17) és el de $m/z[\text{M}+\text{H}]^+$: 294.9. En l'espectre apareixen també els senyals a 312.2, a 317.2 i a 333.2 que corresponen respectivament a $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ i $[\text{M}+\text{K}]^+$.

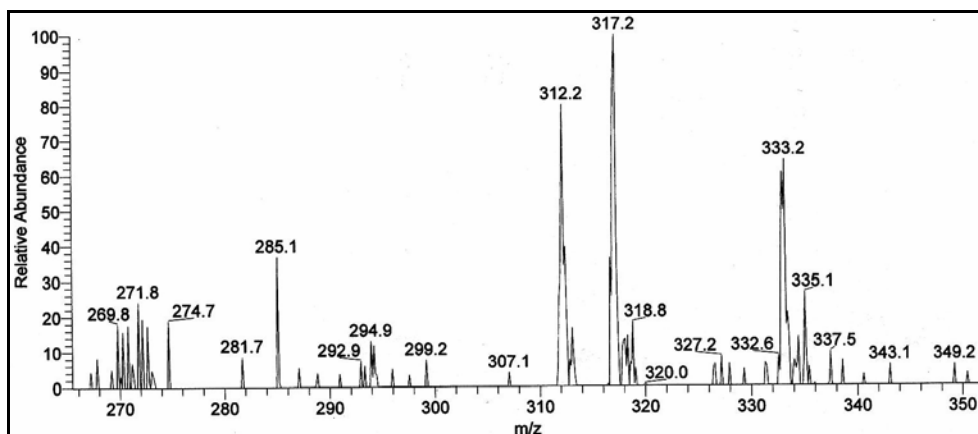


Figura V.17 - Espectre de ESI-MS de (62).

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C de (62) es mostra a la Figura V.18.

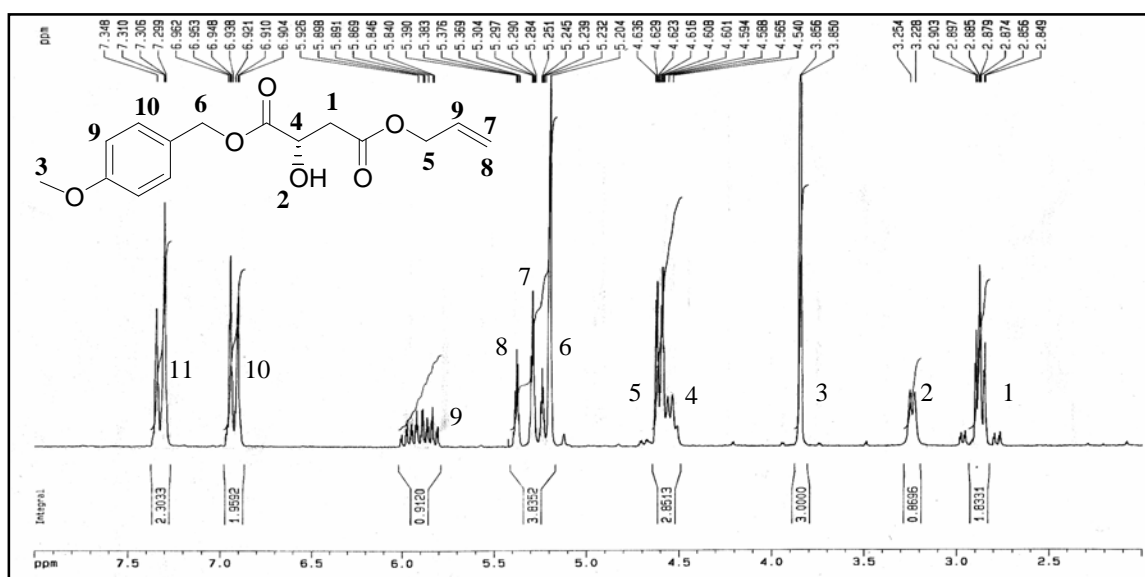


Figura V.18 - Espectre de ^1H de (62).

L'espectre de RMN DEPT135 i ^{13}C a 50 MHz i 25°C de (62) es mostra a la Figura V.19.

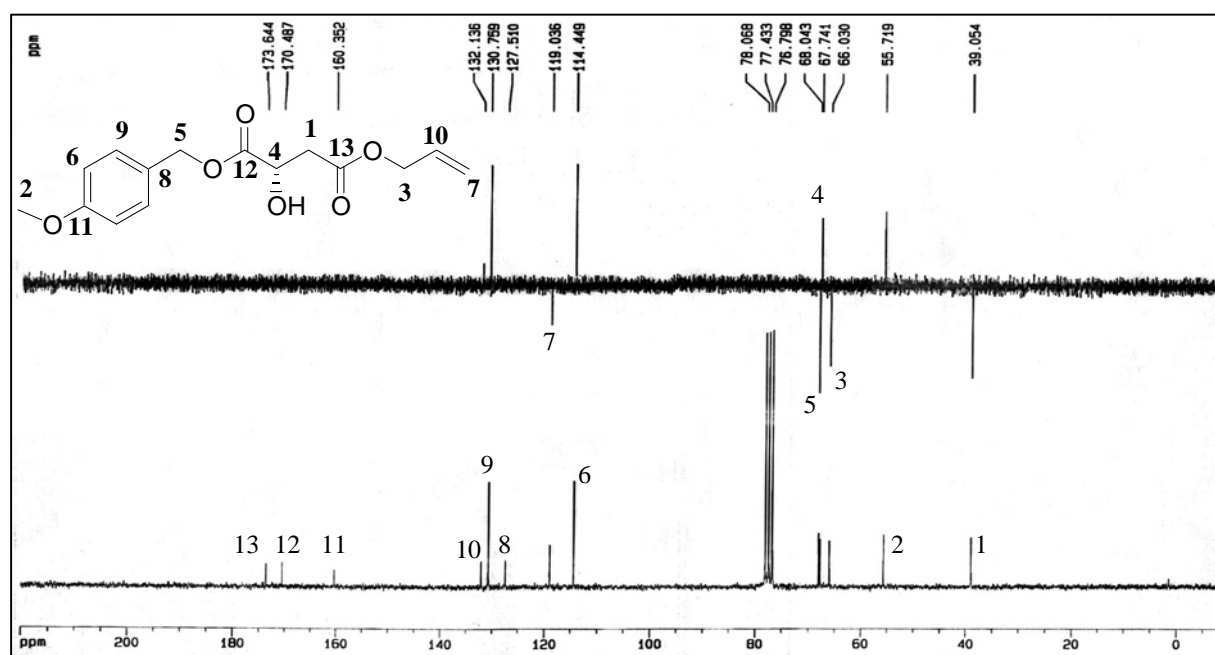


Figura V.19 - Espectre de DEPT135 i ^{13}C de (62).

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C del (Z) 3-al·liloxicarbonilacrilat de *p*-metoxibenzil (63) es mostra a la Figura V.20.

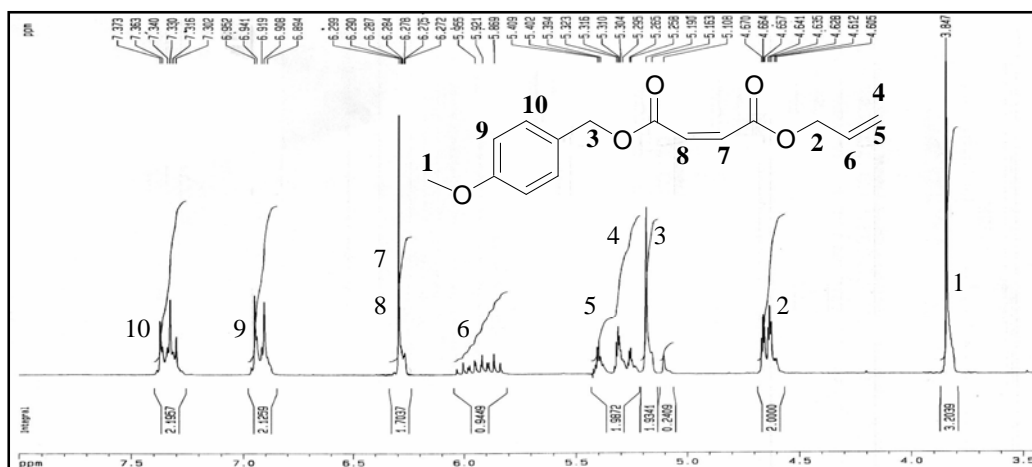


Figura V.20 - Espectre de ^1H -RMN de (63).

L'espectre de RMN DEPT135 i ^{13}C a 50 MHz i 25°C de (63) es mostra a la Figura V.21.

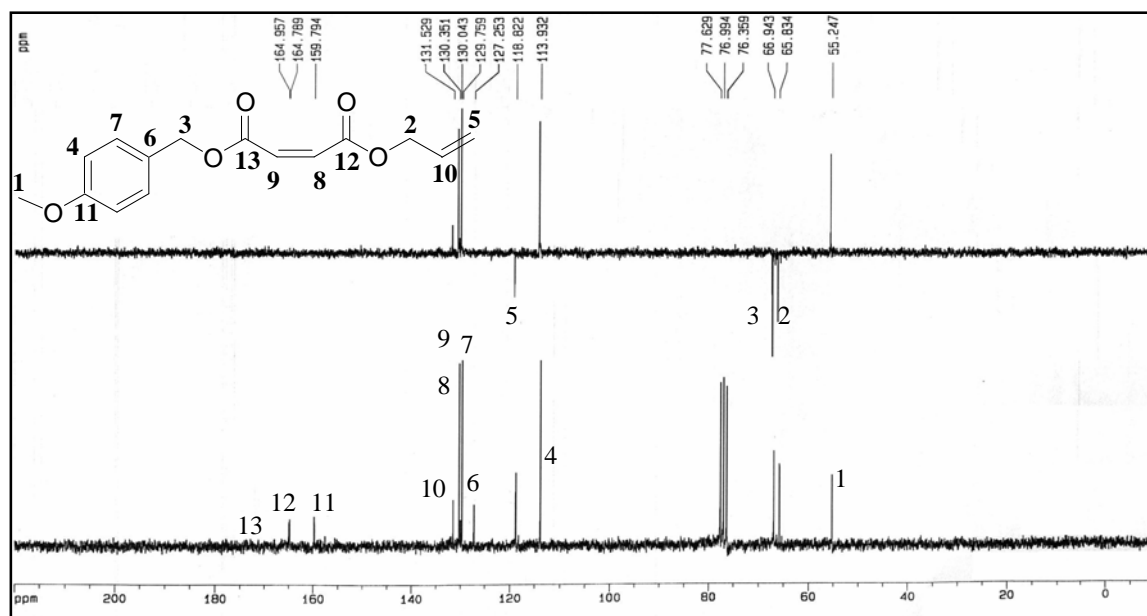


Figura V.21 - Espectre de ^{13}C -RMN de (63).

A la Figura V.22 es troba representat l'espectre de FTIR de (62) i a la (Figura V.23), l'espectre de FTIR de (63) es pot comprovar que son molt similars, amb la diferència principal que en l'espectre de (63) no s'observa la banda característica de l'alcohol a la zona de 3500.

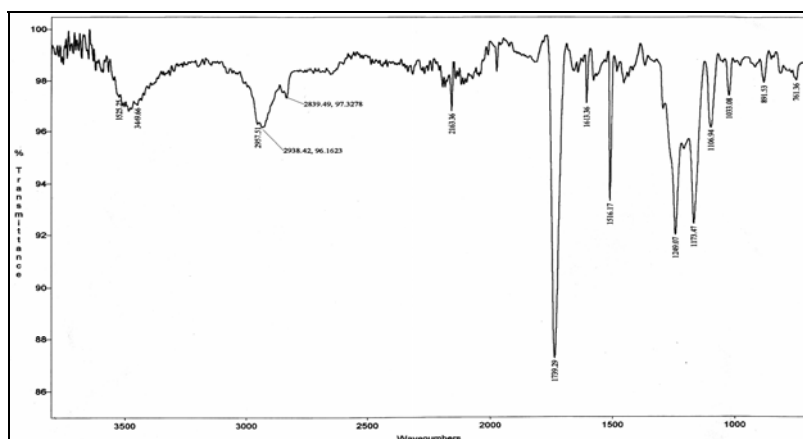


Figura V.22 - Espectre de FTIR de (62).

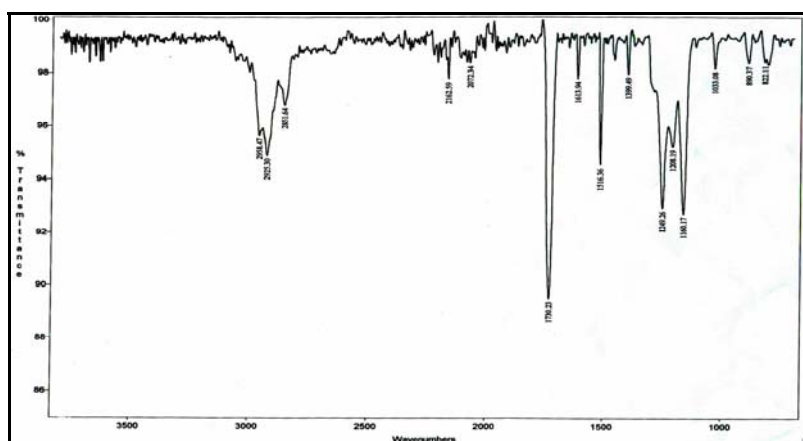


Figura V.23 - Espectre de FTIR de (63).

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C de (*E*) 3-al·liloxicarbonilacrilat de *p*-metoxibenzil (64) es mostra a la Figura V.24.

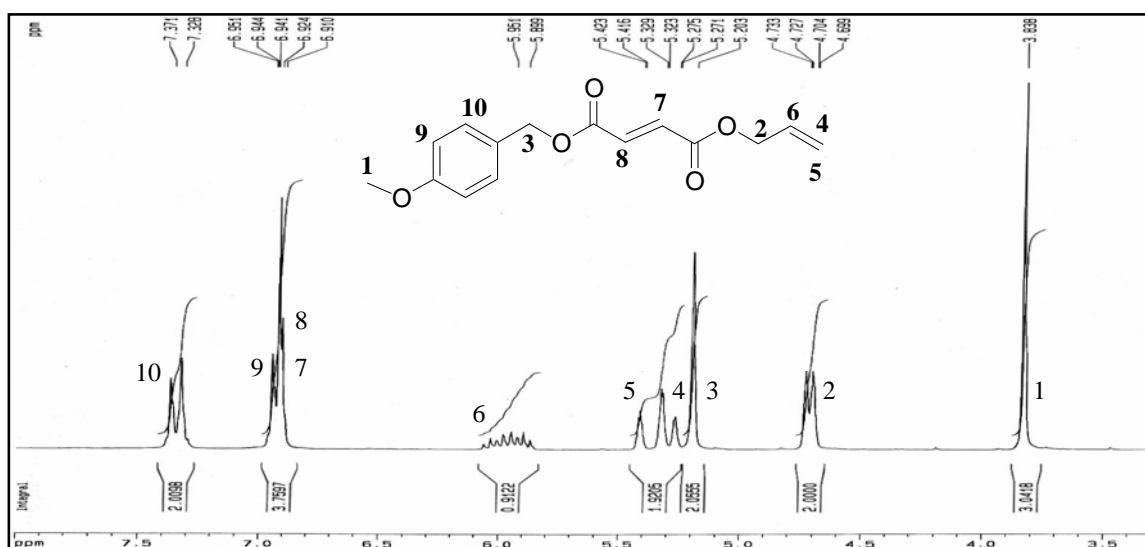


Figura V.24 - Espectre de ¹H de (64).

L'espectre de RMN DEPT135 i ¹³C a 50 MHz i 25°C de (64) es mostra a la Figura V.25.

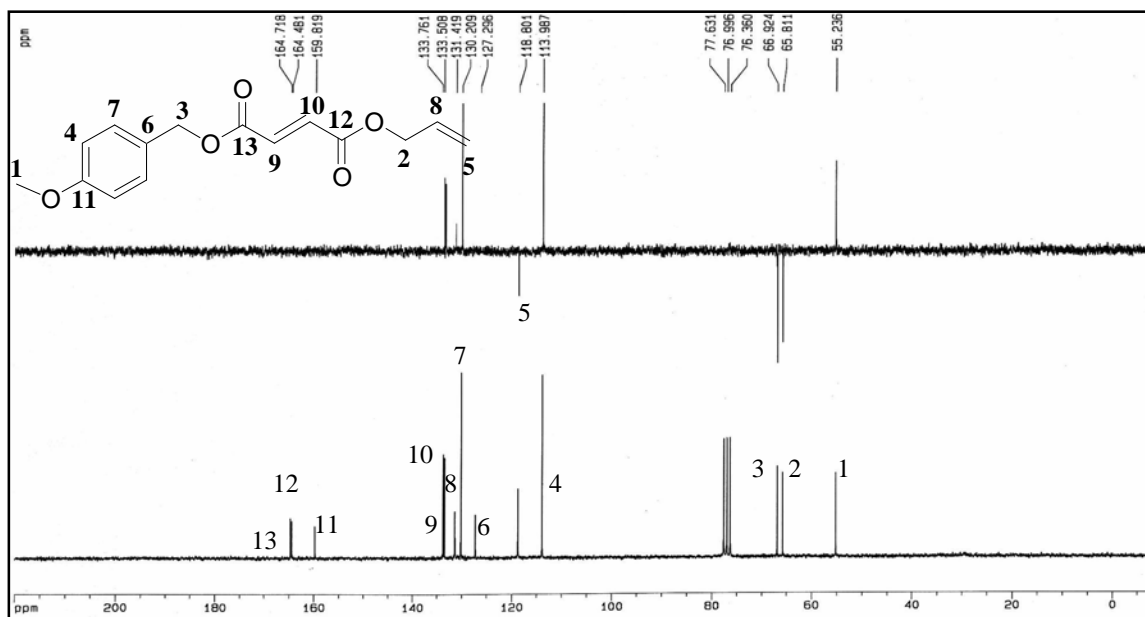
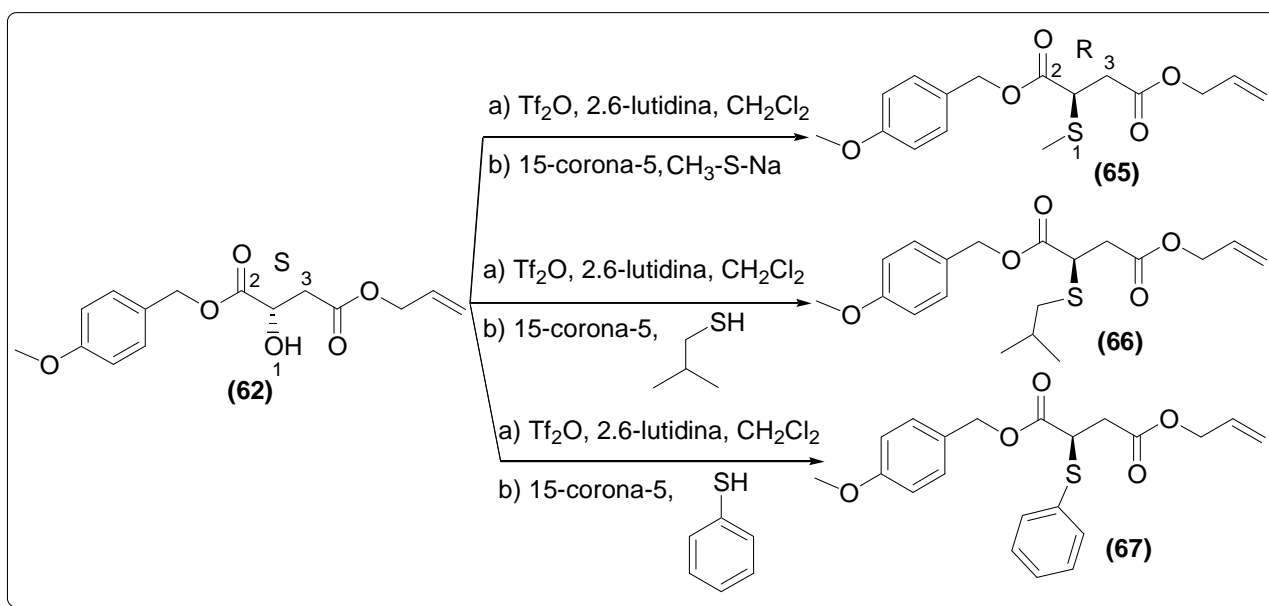


Figura V.25 - Espectre de ¹³C de (64).

V.3.2.3. Substitució del grup hidroxil de (*S*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-hidroxioproanoat de *p*-metoxibenzil (**62**)

Per a la substitució de l'alcohol de (*S*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-hidroxioproanoat de *p*-metoxibenzil (**62**) per un grup metansulfanil, isobutansulfanil o un tiofenil s'ha seguit el mètode utilitzat per Sutton & Clardy⁷⁰. La reacció es realitza dissolent un equivalent de (**62**) en diclorometà, i afegint 1.3 equivalents de 2,6-lutidina i 1.2 equivalents d'anhídrid tífic a -78 °C, es deixa agitant durant 2 hores i seguidament s'afegeix una barreja de quatre equivalents de tiometòxid sòdic i quatre equivalents d'èter 15-corona-5 dissolt en DMF (Esquema V.6); o, en el seu cas, afegint quatre equivalents de isobutantiol o de tiofenol junt amb els quatre equivalents de 2,6-lutidina. Es deixa agitant fins que arribi a temperatura ambient, es fan diversos rentats i cada cru de reacció es purifica per columna flash.



Esquema V.6 - Substitució de l'hidroxil del (*S*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-hidroxioproanoat de *p*-metoxibenzil (**62**).

A part de cadascun dels tres productes desitjats, també s'obté, en cada reacció, un altre subproducte originat per la substitució de l'alcohol per un clor, amb un percentatge formació del subproducte diferent.

El 3-al·liloxicarbonil-2-cloropropanoat de p-metoxibenzil (**68**) s'ha caracteritzat per ^1H , DEPT135 i ^{13}C i presenta un temps de retenció a l'HPLC de 20.2 min (Figura V.26).

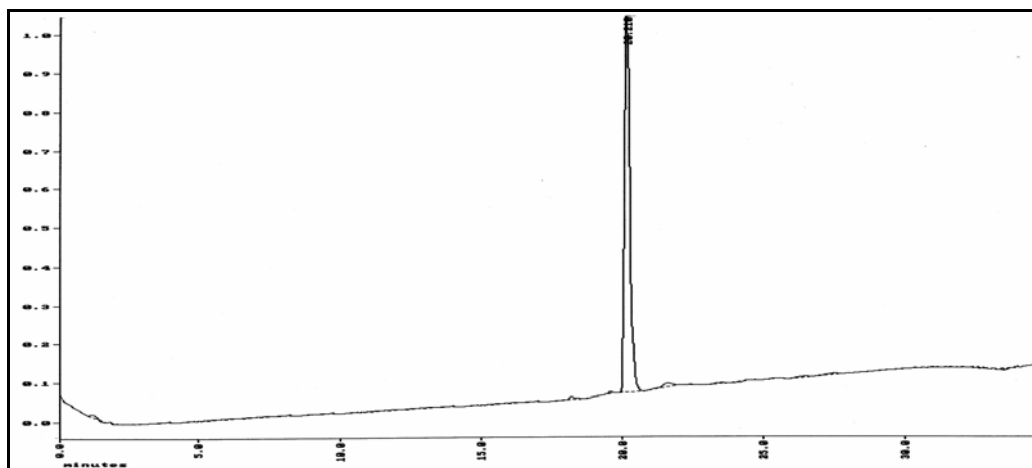


Figura V.26 - Cromatograma d'HPLC de (**68**) a 220 nm.

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C de (**68**) es mostra a la Figura V.27.

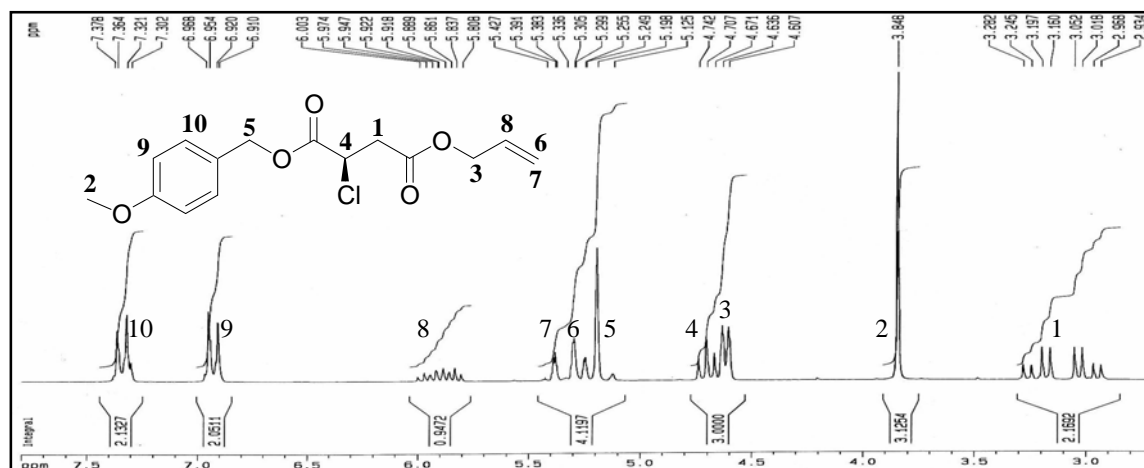


Figura V.27 - Espectre de ^1H -RMN de (**68**).

L'espectre de RMN DEPT135 i ^{13}C a 50 MHz i 25°C de (**68**) es mostra a la Figura V.28.

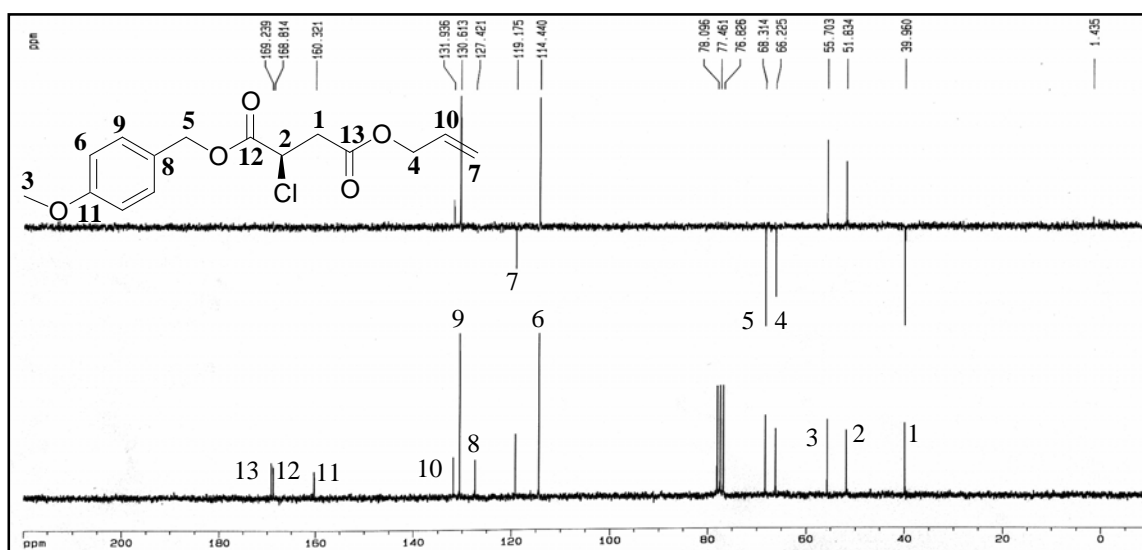


Figura V.28 - Espectre de ^{13}C -RMN i DEPT135 de (68).

El producte (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (65) s'ha obtingut amb un rendiment del 65-70 % i el subproducte (68) amb un 10-15 %. El producte (65) s'ha caracteritzat per ESI-MS, ^1H -RMN, DEPT135, ^{13}C -RMN i FTIR i presenta un temps de retenció a l'HPLC de 25.8 min (Figura V.29).

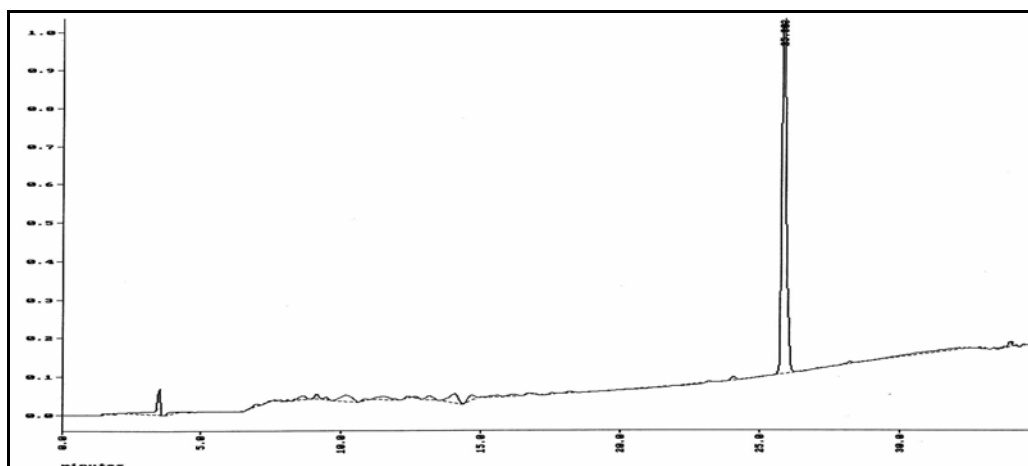


Figura V.29 - Cromatograma d'HPLC de (65) a 220 nm.

El pes molecular de (65) és de 324.39 g/mol, que en l'espectre (Figura V.30) correspon a la senyal de 324.9. En l'espectre de ESI-MS apareixen també els senyals a 346.9 i el de 362.9 que corresponen respectivament a $[\text{M}+\text{Na}]^+$ i $[\text{M}+\text{K}]^+$.

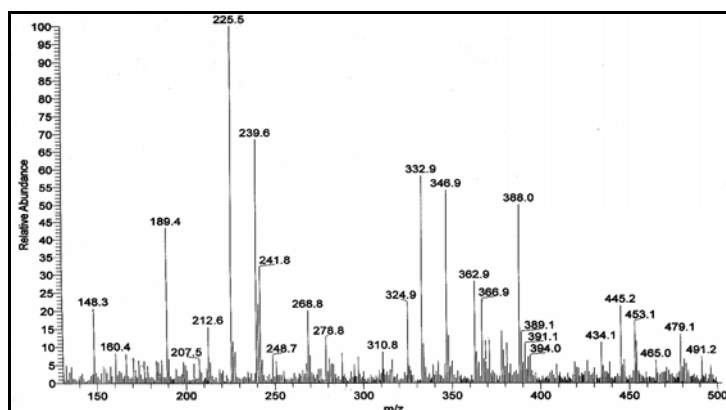


Figura V.30 - Espectre de ESI-MS de (65).

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C de (65) es mostra a la Figura V.31.

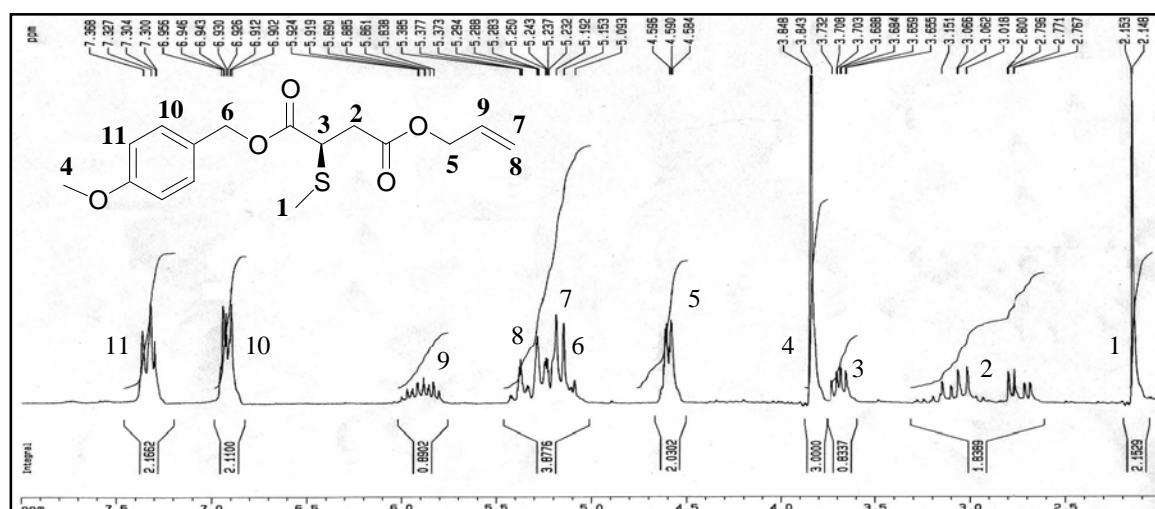


Figura V.31 - Espectre de ^1H -RMN de (65).

L'espectre de RMN DEPT135 i ^{13}C a 50 MHz i 25°C de (65) es mostra a la Figura V.32.

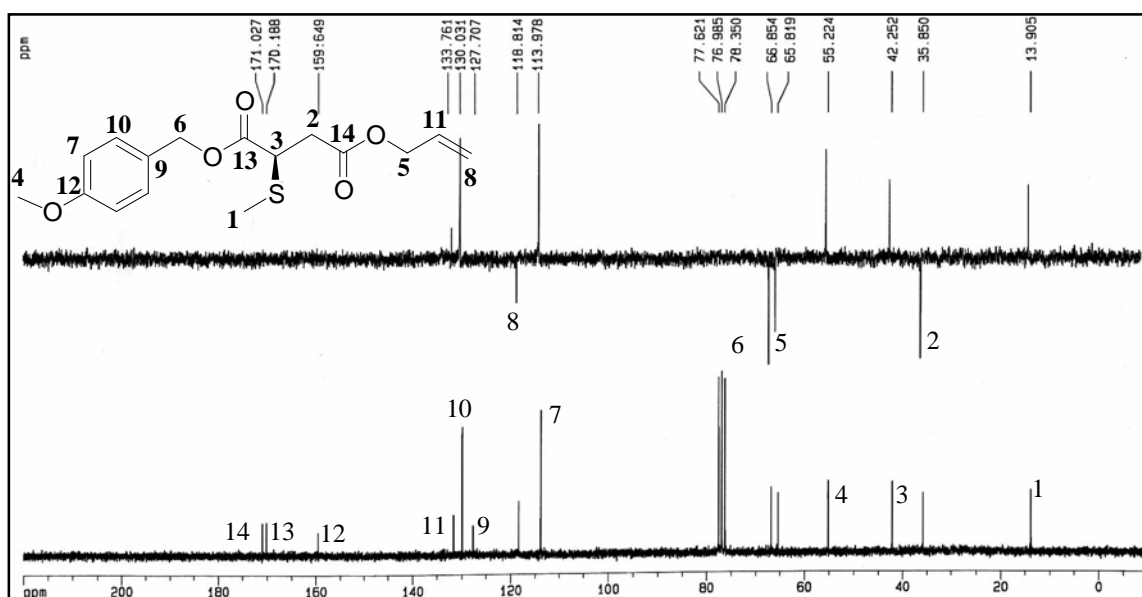


Figura V.32 - Espectre de ^{13}C -RMN i DEPT135 de (65).

El producte (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-isobutilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (66) s'ha obtingut amb un rendiment del 15-20 % i el subproducte (68) amb un 50-55 %. El producte (66) s'ha caracteritzat per ^1H , DEPT135 i ^{13}C i presenta un temps de retenció a l'HPLC de 29.16 min (Figura V.33).

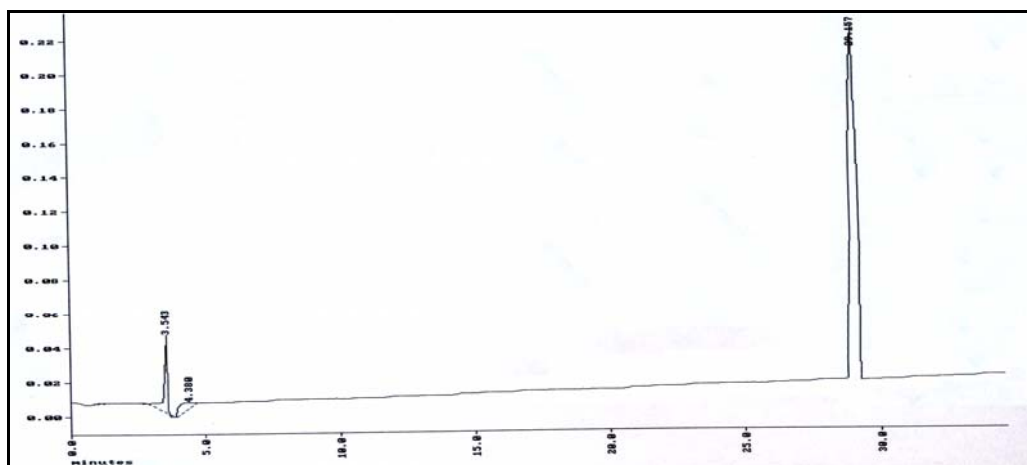


Figura V.33 - Cromatograma de (66) a 220 nm.

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C de (66) es mostra a la Figura V.34.

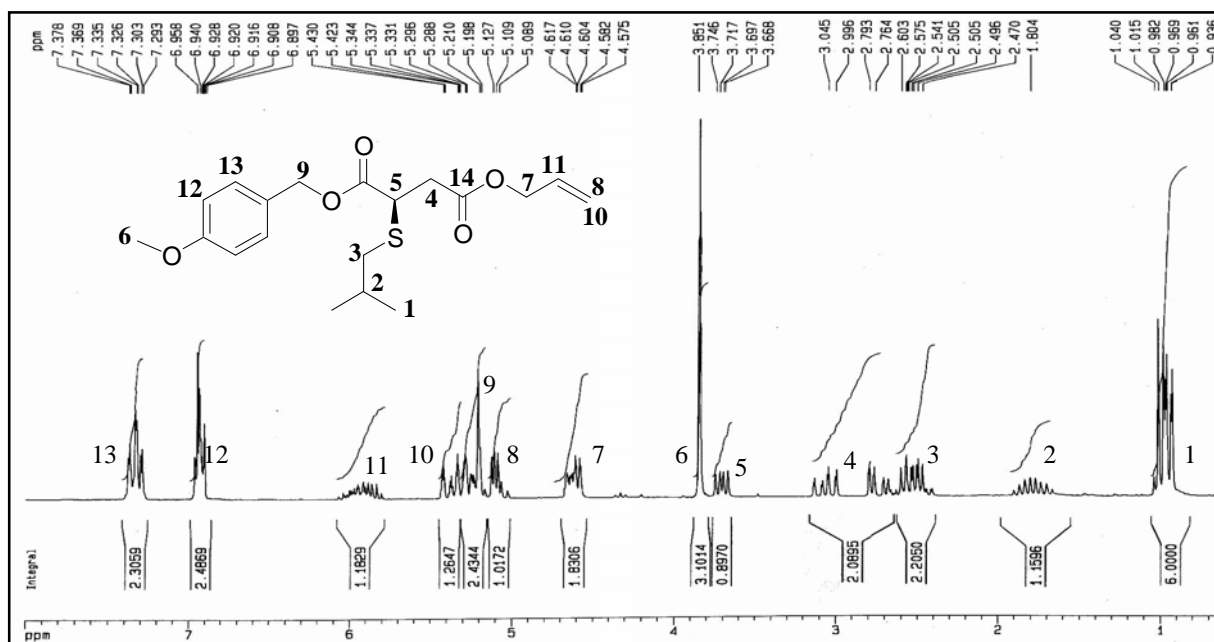


Figura V.34 - Espectre de ¹H-RMN de (66).

L'espectre de RMN DEPT135 i ¹³C a 50 MHz i 25°C de (66) es mostra a la Figura V.35.

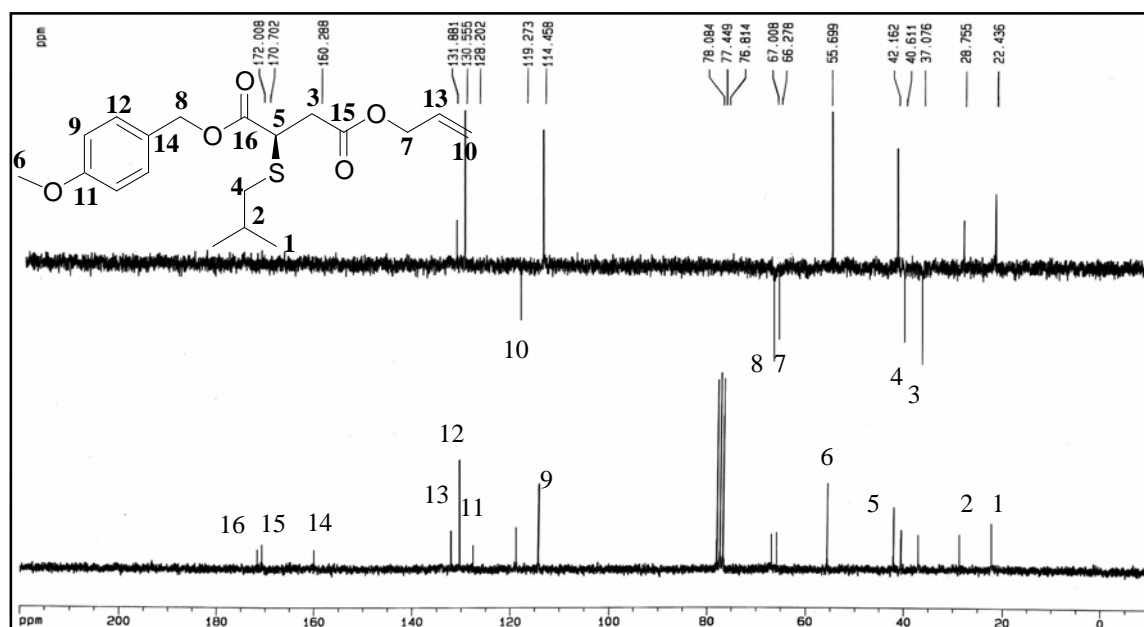


Figura V.35 - Espectre de ¹³C-RMN de (66).

El producte (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**67**) s'ha obtingut amb un rendiment del 85-90 % i el subproducte (**68**) amb un rendiment del 5-10 %. El producte (**67**) s'ha caracteritzat per ESI-MS, ^1H , DEPT135 i ^{13}C i presenta un temps de retenció a l'HPLC de 29.31 min (Figura V.36).

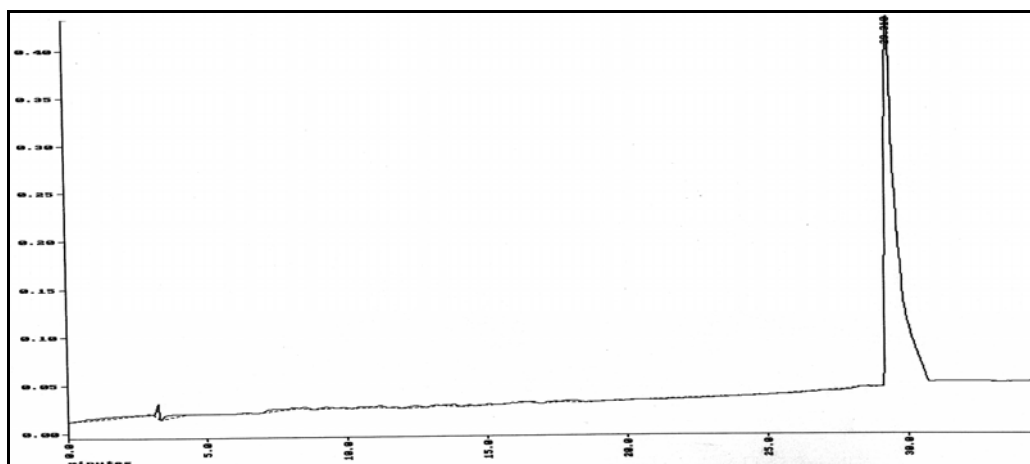


Figura V.36 - Cromatograma de (**67**) a 220 nm.

El pes molecular de (**67**) és de 386.46 g/mol, que en l'espectre (Figura V.37) correspon a la senyal de 387.2. En l'espectre de ESI-MS apareixen també els senyals a 404.3, 409.1 i el de 425.2 que corresponen respectivament a $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$.

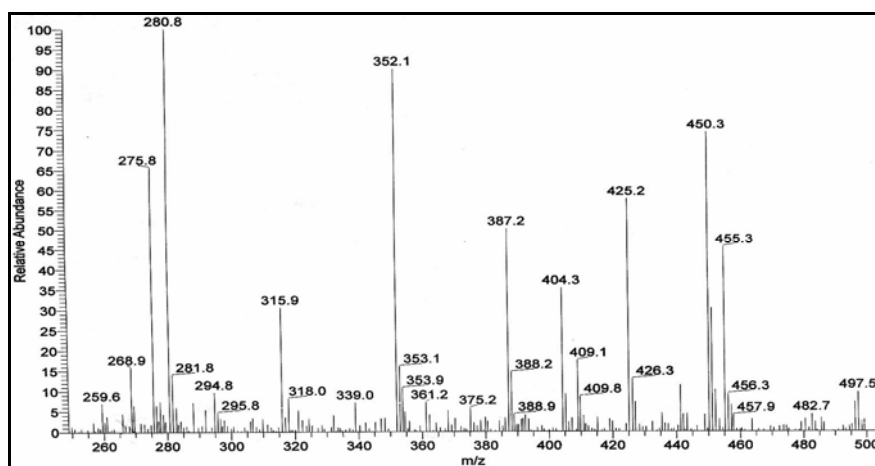


Figura V.37 - Espectre de ESI-MS de (**67**).

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C de (**67**) es mostra a la Figura V.38.

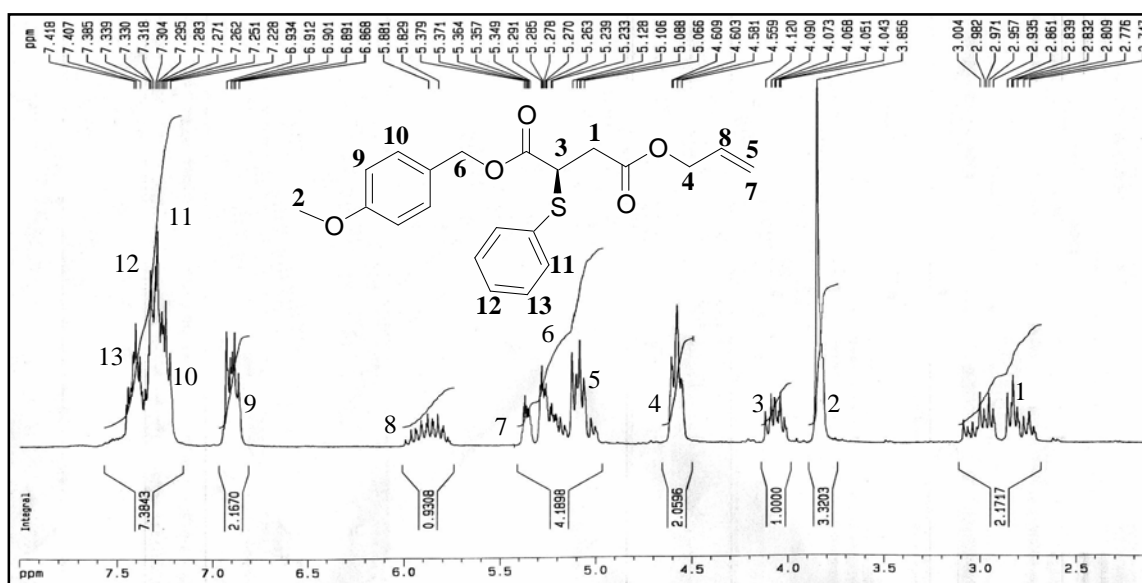


Figura V.38 - Espectre de ¹H-RMN de (67).

L'espectre de RMN DEPT135 i ¹³C a 50 MHz i 25°C de (67) es mostra a la Figura V.39.

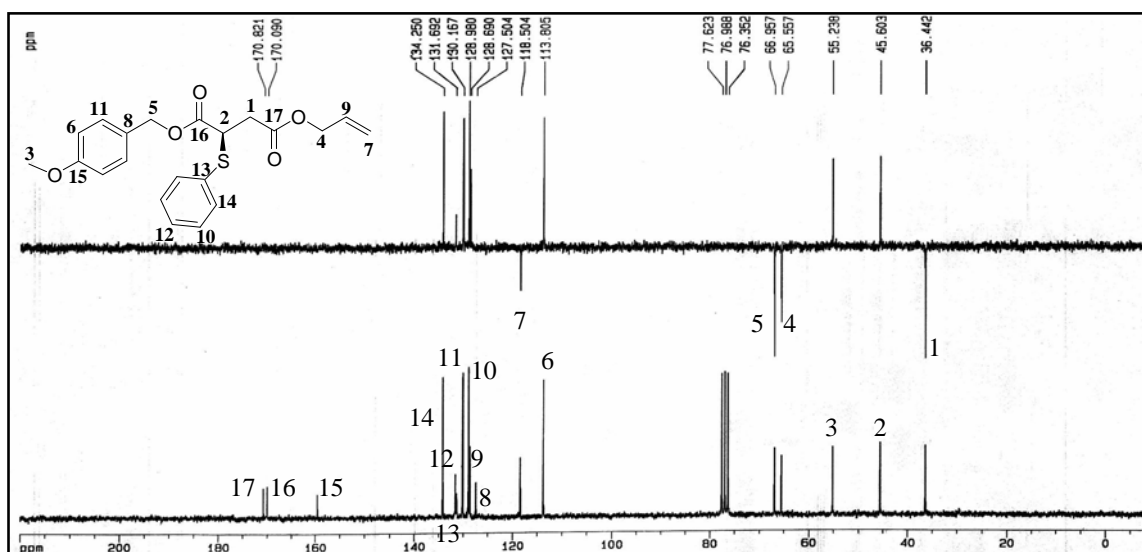


Figura V.39 - Espectre de ¹³C-RMN de (67).

A la Figura V.40 es troba representat l'espectre de FTIR del (*S*)-3-al·liloxicarbonil-2-hidroxipropanoat de *p*-metoxibenzil (65) i a la Figura V.41 l'espectre de FTIR del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (67), es pot comprovar que son

molt similars, amb la diferència principal que en l'espectre de **(65)** no s'observa la banda característica de l'alcohol a la zona de 3500, però si apareixen bandes noves de gran intensitat a la zona de 2900 en el cas de **(65)** i bandes més dèbils en el cas de **(67)**.

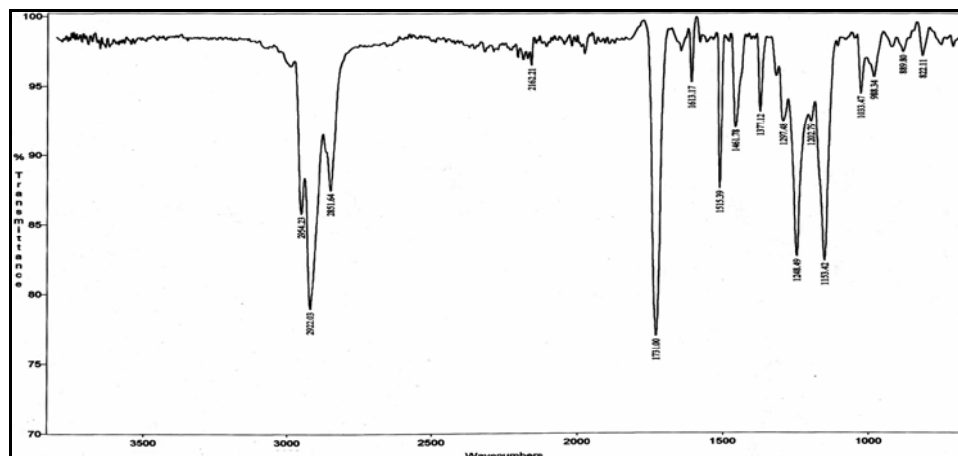


Figura V.40 - Espectre de FTIR de **(65)**.

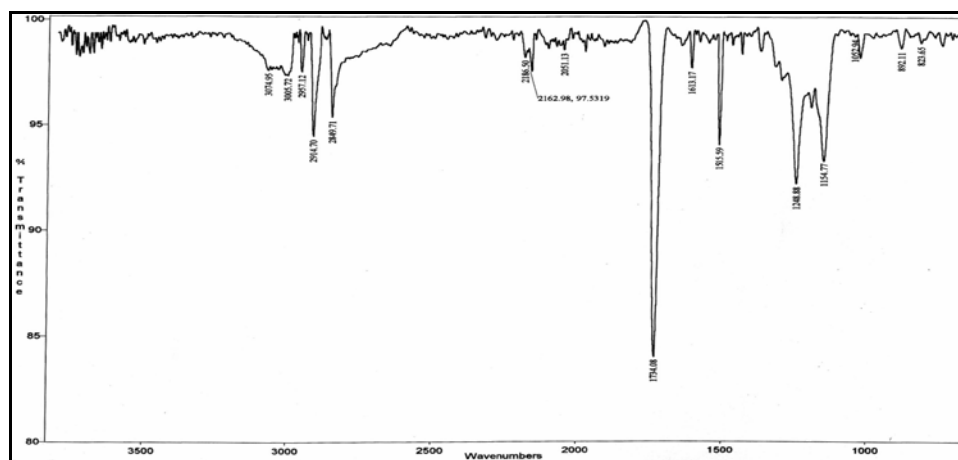
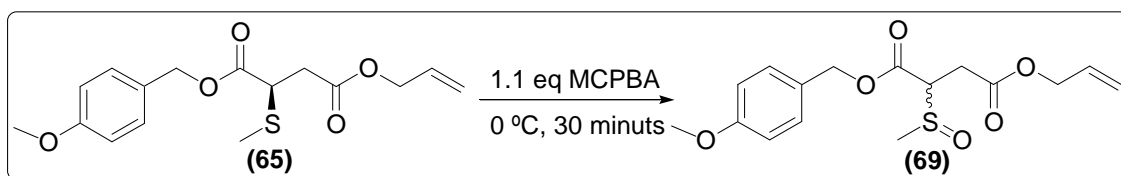


Figura V.41 - Espectre de FTIR de **(67)**.

V.3.2.4. Monooxidació del *(R)*-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil **(65)**

Per a la monooxidació de **(65)** s'ha seguit el mètode utilitzat per Sutton & Clardy⁷⁰ (Esquema V.7). La reacció es realitza dissolent un equivalent de **(65)** en diclorometà i afegint, a 0 °C, 1.1 equivalents de l'àcid metacloroperbenzoic (mCPBA), es deixa agitant 30

min. i s'afegeix una solució de tiosulfat sòdic per tal d'aturar la reacció. Es realitzen diversos rentats i el cru de reacció es purifica per columna flash, obtenint-se el producte (\pm)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfinilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**69**) amb un rendiment del 80-85 %.



Esquema V.7 - Monooxidació de (**65**).

El producte (\pm)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfinilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**69**) s'ha caracteritzat per ^1H , DEPT135 i ^{13}C i presenta un temps de retenció a l'HPLC de 20.3 min (Figura V.42).

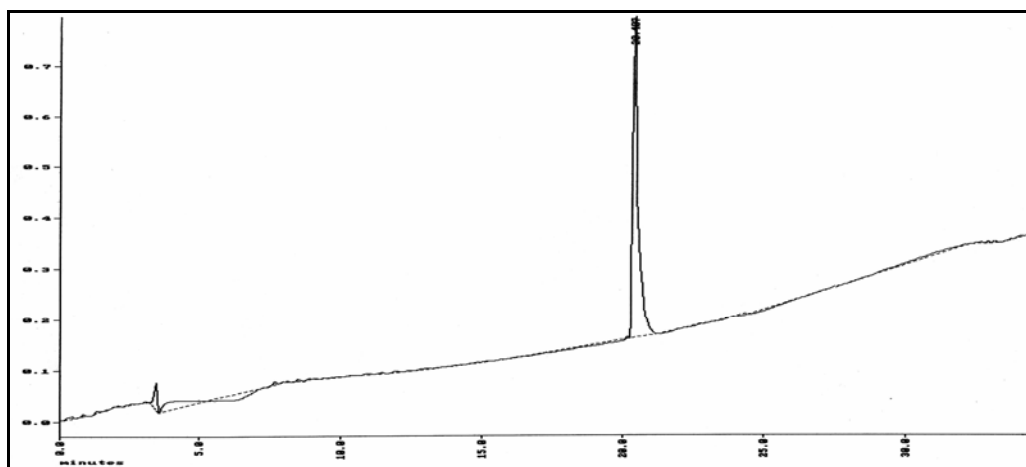


Figura V.42 - Cromatograma d'HPLC de (**69**) a 220 nm.

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C de (**69**) es mostra a la Figura V.43, es pot observar que els protons de les posicions 1 i 4 apareixen desdoblats degut a la oxidació del sofre, és degut a que s'obtenen diastereoisòmers, s'està introduint un nou estereocentre, també s'observa un canvi important en els protons de 2 respecte al de la molècula sense oxidar.

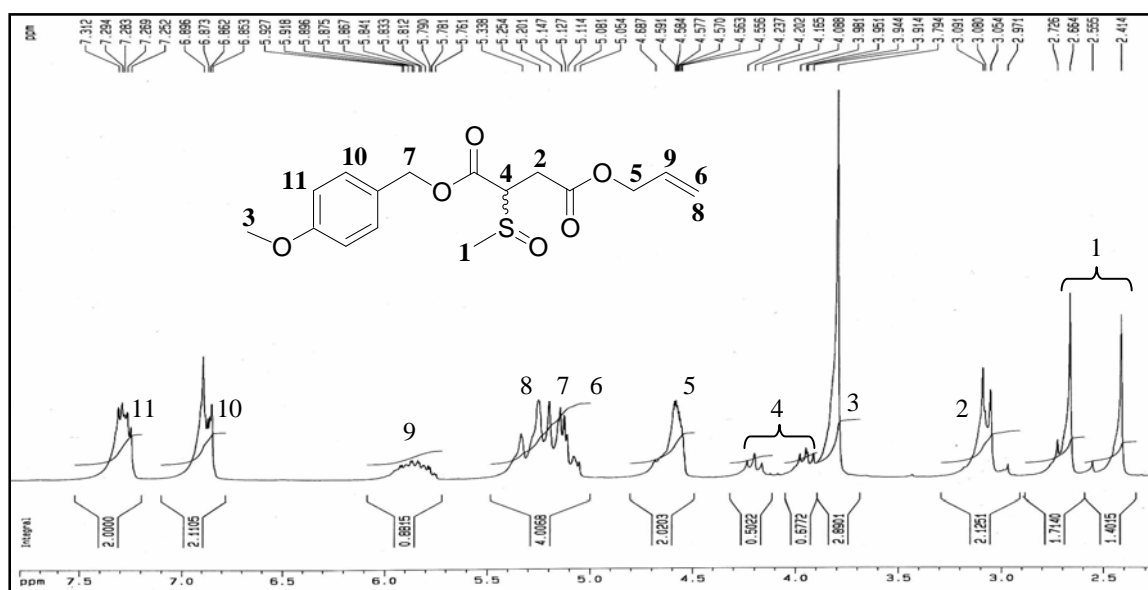


Figura V.43 - Espectre de ^1H de (69).

L'espectre de RMN DEPT135 i ^{13}C a 50 MHz i 25°C de (69) es mostra a la Figura V.44, es pot observar que les senyals dels carbonis (1, 2, 4, 13 i 14) més propers a l'àtom de sofre també es mostren desdoblats.

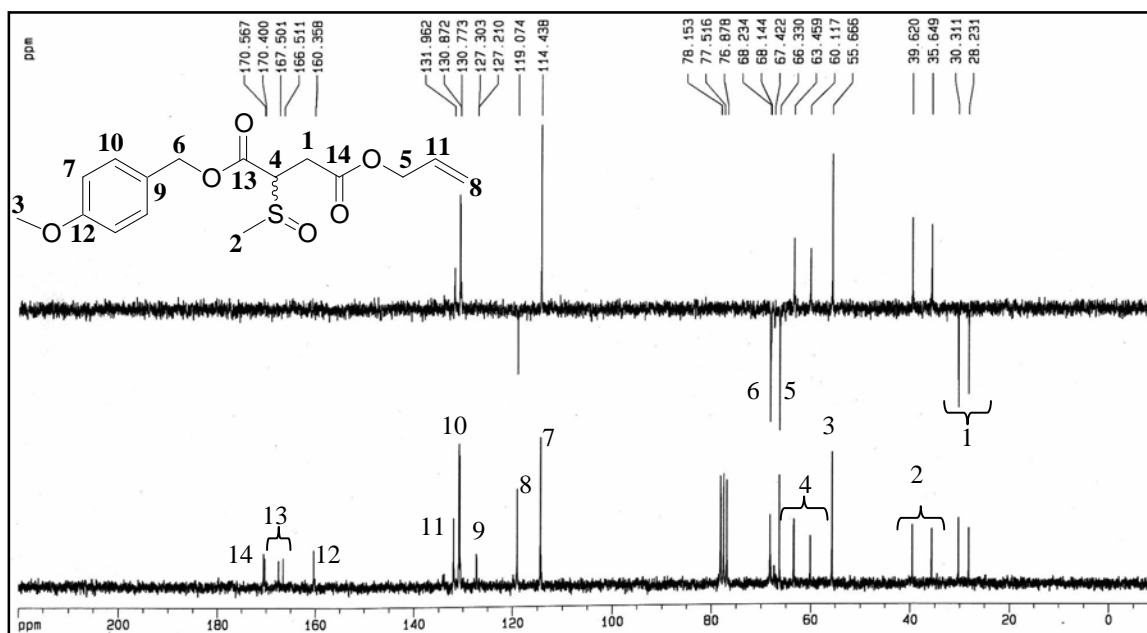
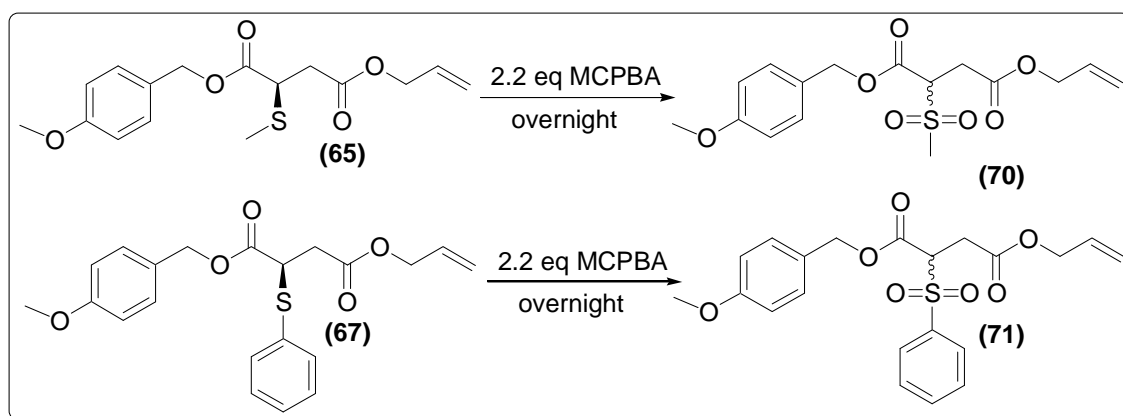


Figura V.44 - Espectre de ^{13}C de (69).

V.3.2.5. Dioxidació del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**65**) i del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**67**)

Per a la dioxidació del (*S*)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**65**) i del (*S*)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**67**) s'ha seguit el mètode utilitzat per Sutton & Clardy⁷⁰ (Esquema V.8). Les reaccions es realitzen dissolent un equivalent de (**65**) o de (**67**) en diclorometà, i afegint 2.2 equivalents d'àcid metacloroperbenzoic (mCPBA), i es deixen agitant tota la nit; a continuació s'afegeix una solució de Na₂S₂O₃ per tal d'aturar la reacció. Es realitzen diversos rentats i es purifica el cru per columna flash, obtenint-se els productes (±)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfonilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**70**) o el (±)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfonilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**71**) amb uns rendiments del 65-70 % cadascun.



Esquema V.8 - Dioxidació de (**65**) i (**67**).

El producte (±) 3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfonilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**70**) s'ha caracteritzat per ¹H, DEPT135 i ¹³C i presenta un temps de retenció a l'HPLC de 22.7 min (Figura V.45).

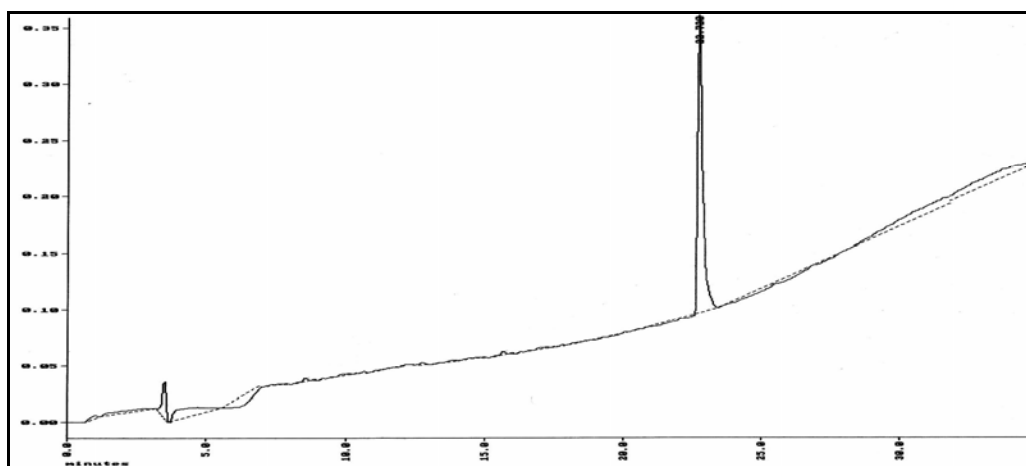


Figura V.45 - Cromatograma d'HPLC de (70) a 220 nm.

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C de (70) es mostra a la Figura V.46.

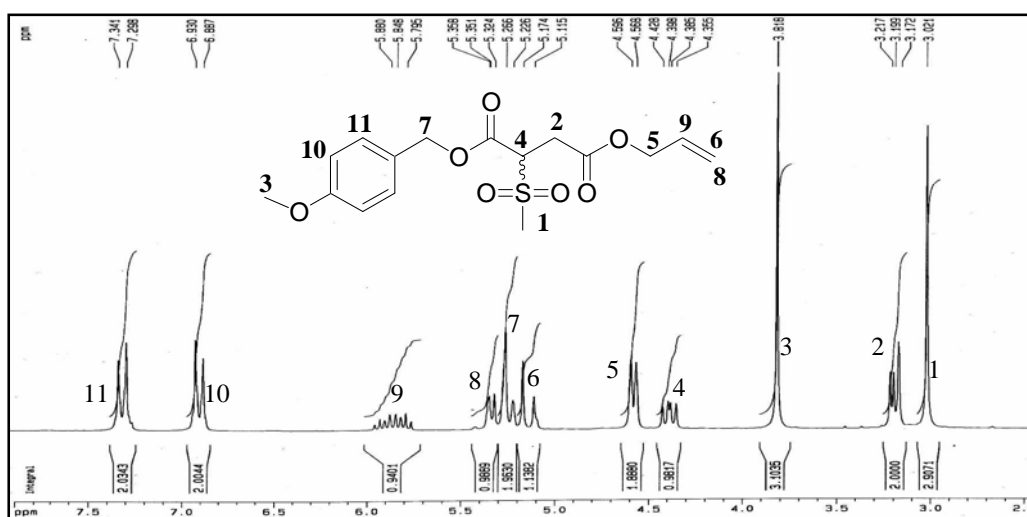


Figura V.46 - Espectre de ^1H -RMN de (70).

L'espectre de RMN DEPT135 i ^{13}C a 50 MHz i 25°C de (70) es mostra a la Figura V.47.

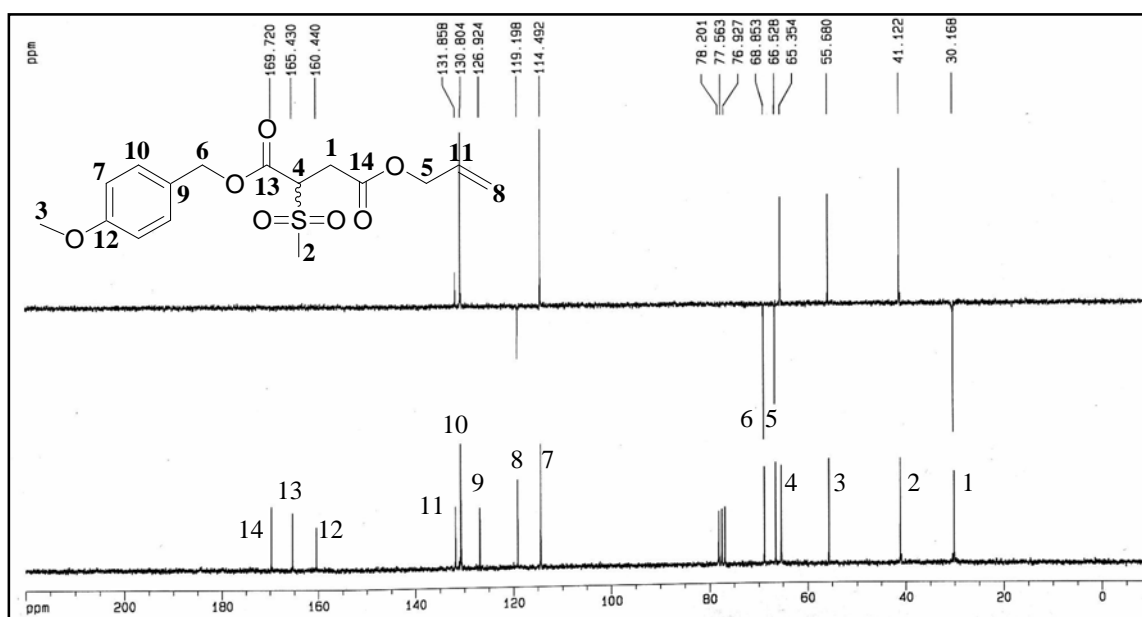


Figura V.47 - Espectre de ^{13}C -RMN de (70).

El producte (\pm) 3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfonilpropanoat de *p*-metoxibenzil (71) s'ha caracteritzat per ^1H . L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C de (71) es mostra a la Figura V.48.

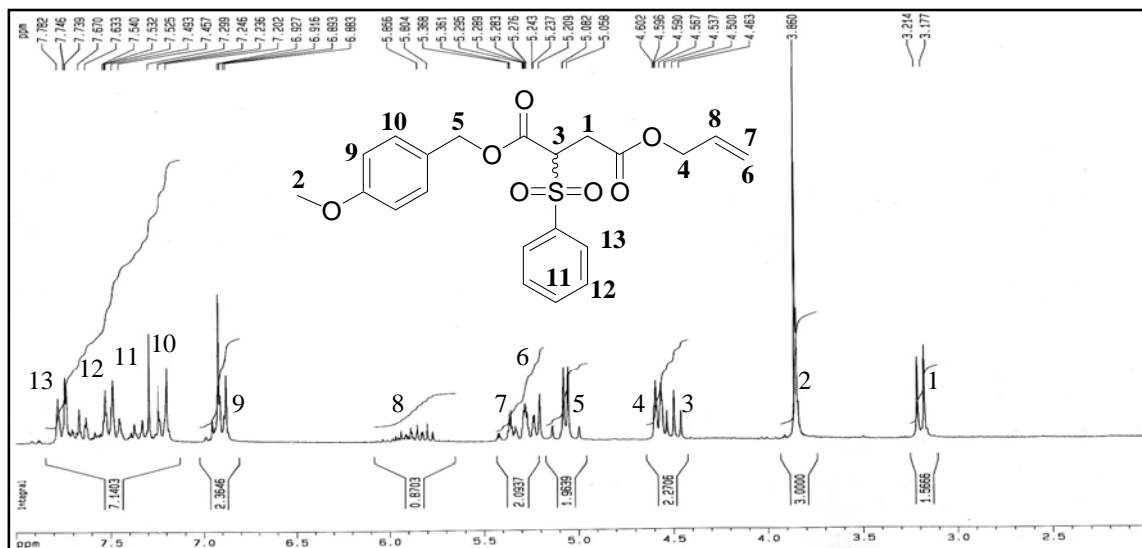
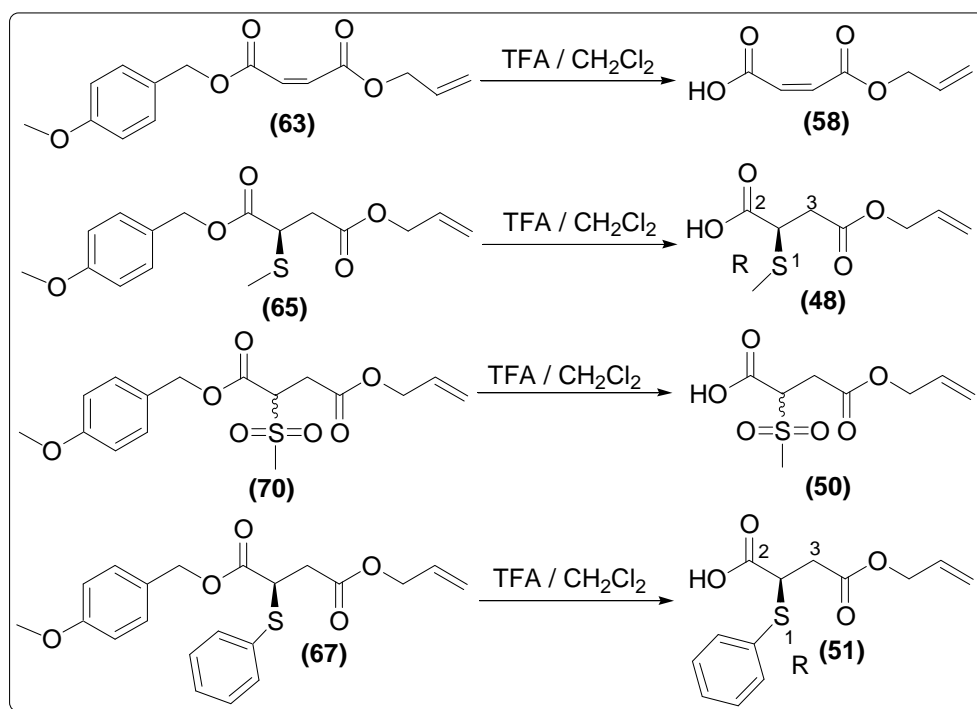


Figura V.48 - Espectre de ^1H -RMN de (71).

V.3.2.6. Eliminació del grup *p*-metoxibenzilic

L'eliminació desprotecció del grup *p*-metoxibenzil dels compostos (*Z*)-3-al·liloxicarbonilacrilat de *p*-metoxibenzil (**63**), del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**65**), del (\pm)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfonilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**70**) i del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**67**) (Esquema V.9). S'ha realitzat dissolent un equivalent de cada producte en una dissolució de 10 % de TFA en diclorometà durant 3-4 hores. Es realitzen diversos rentats amb una solució saturada de bicarbonat sòdic, s'asseca la fase orgànica i s'evapora el dissolvent obtenint-se els productes àcid (*Z*)-3-(al·liloxi)carbonilacrílic (**58**), àcid (*R*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-metilsulfanilpropanoic (**48**), l'àcid (\pm)-(3-al·liloxi)carbonil-2-metilsulfonilpropanoic (**50**) o àcid (*R*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-fenilsulfanilpropanoic (**51**) amb uns rendiments del 90-95 % respectivament.



Esquema V.9 - Eliminació de *p*-metoxibenzil de (**63**), (**65**), (**70**) i (**67**).

L'àcid (*Z*)-3-(al·liloxi)carbonilacrílic (**58**) s'ha obtingut amb una puresa d'HPLC del 95 %. El producte (**58**) s'ha caracteritzat per ¹H-RMN, DEPT135-RMN, ¹³C-RMN i FTIR i presenta un temps de retenció a l'HPLC de 14.0 (Figura V.49).

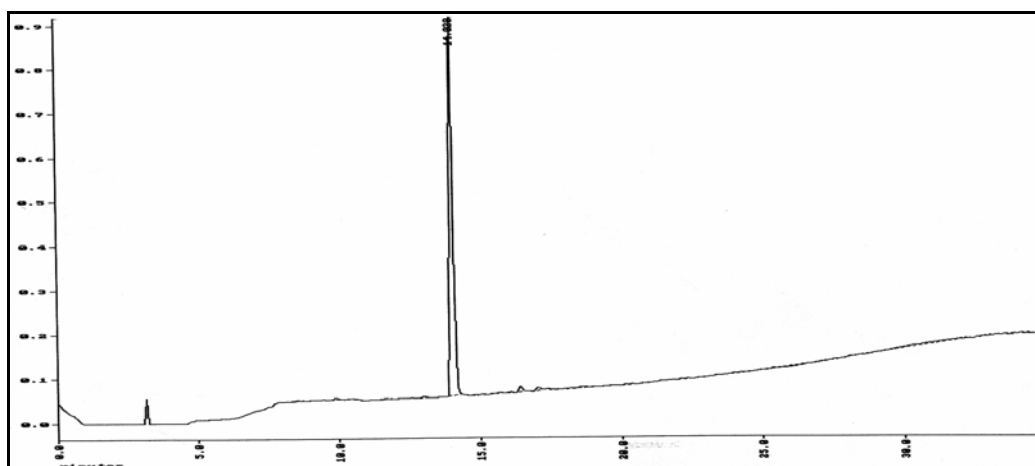


Figura V.49 - Cromatograma d'HPLC de **(58)** a 220 nm.

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C de **(58)** es mostra a la Figura V.50.

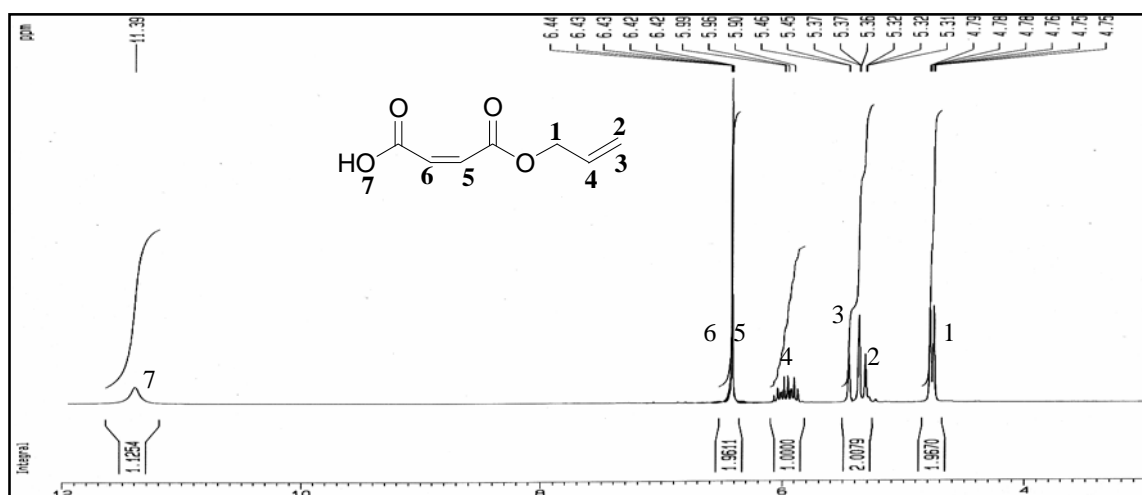


Figura V.50 - Espectre de ^1H -RMN de **(58)**.

L'espectre de RMN DEPT135 i ^{13}C a 50 MHz i 25°C de **(58)** es mostra a la Figura V.51.

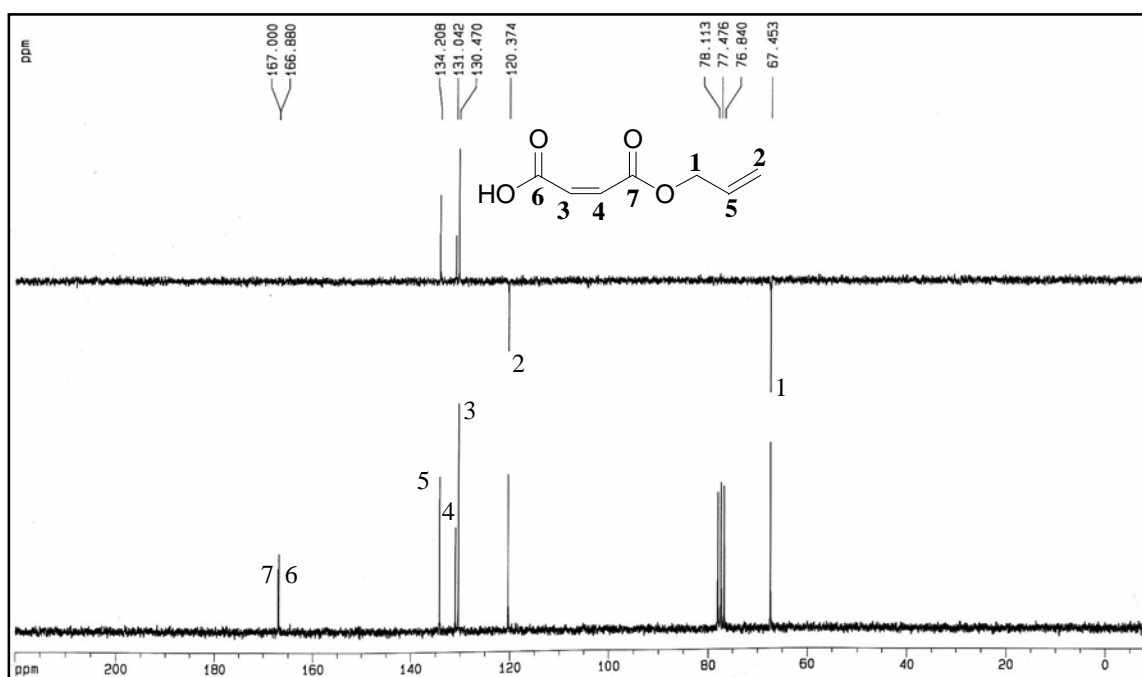


Figura V.51 - Espectre de ^{13}C -RMN de (58).

A la Figura V.52 es troba representat l'espectre de FTIR de l'àcid (Z)-3-(al·liloxi)carbonilacrílic (58), si es compara respecte a la Figura V.23 l'espectre de FTIR de el (Z)-3-(al·liloxi)carbonilacrilat de *p*-metoxibenzil (63) es pot comprovar que son molt similars, amb la diferència principal que en l'espectre de (58) s'observen bandes amples a la zona de 3000 i una senyal d'intensitat mitja a la zona de 1640 característiques de l'àcid carboxílic.

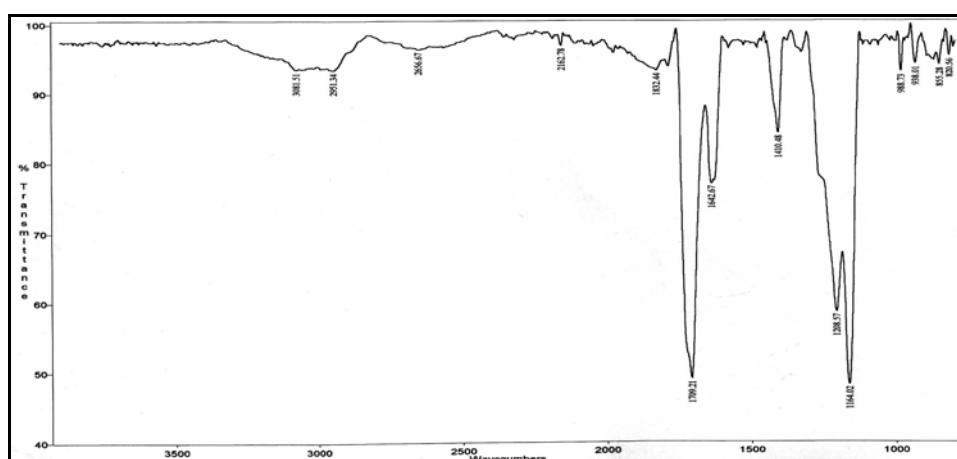


Figura V.52 - Espectre de FTIR de (58).

L'àcid (*R*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-metilsulfanilpropanoic (**48**) s'ha obtingut amb una puresa d'HPLC del 94 %. El producte (**48**) s'ha caracteritzat per RMN ^1H , DEPT135 i ^{13}C i presenta un temps de retenció a l'HPLC de 16.0 min (Figura V.53).

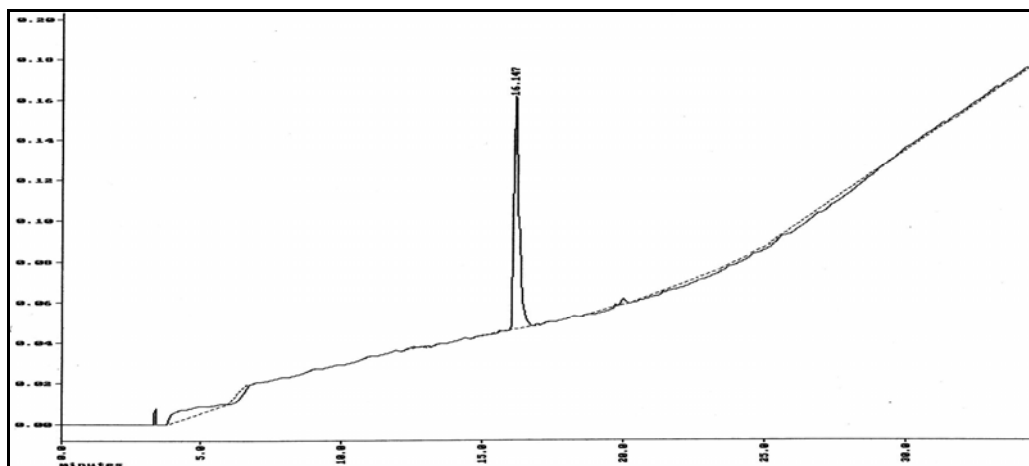


Figura V.53 - Cromatograma d'HPLC de (**48**) a 220 nm.

L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C de (**48**) es mostra a la Figura V.54.

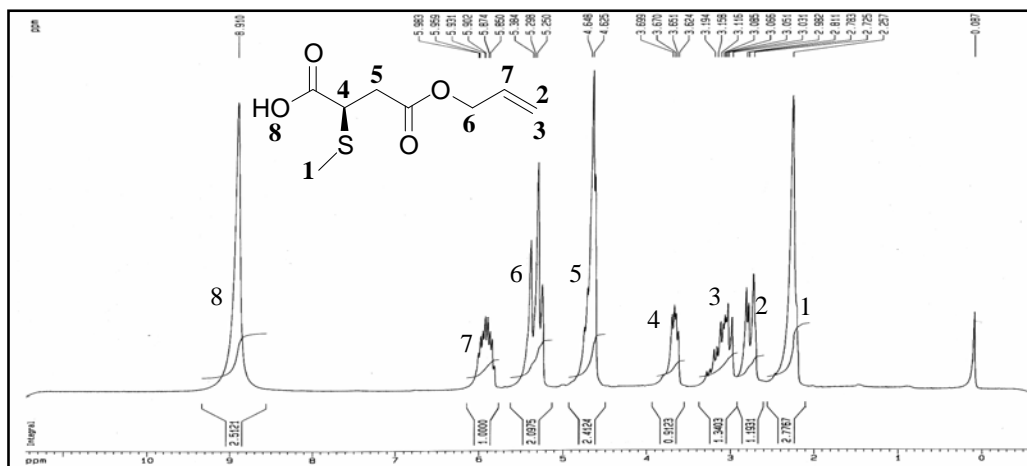


Figura V.54 - Espectre de ^1H -RMN de (**48**).

L'espectre de RMN DEPT135 i ^{13}C a 50 MHz i 25°C de (**48**) es mostra a la Figura V.55.

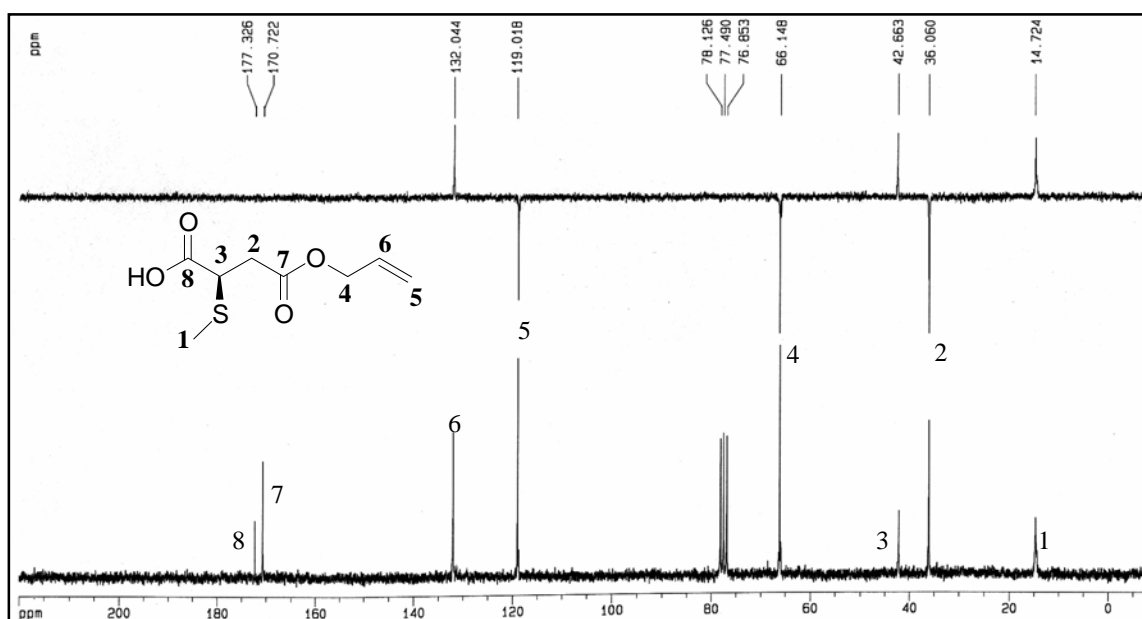


Figura V.55 - Espectre de ^{13}C -RMN de (48).

L'àcid (\pm)-3-(al·liloxi)carbonil-2-metilsulfonilpropanoic (50) s'ha caracteritzat per ^1H -RMN, DEPT135-RMN i ^{13}C -RMN. L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C de (50) es mostra a la Figura V.56.

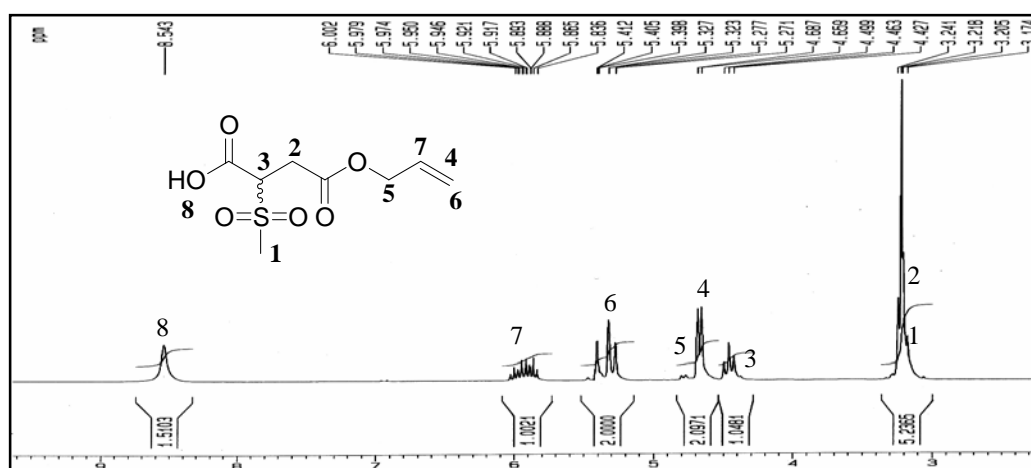


Figura V.56 - Espectre de ^1H de (50).

L'espectre de RMN DEPT135 i ^{13}C a 50 MHz i 25°C de (50) es mostra a la Figura V.57.

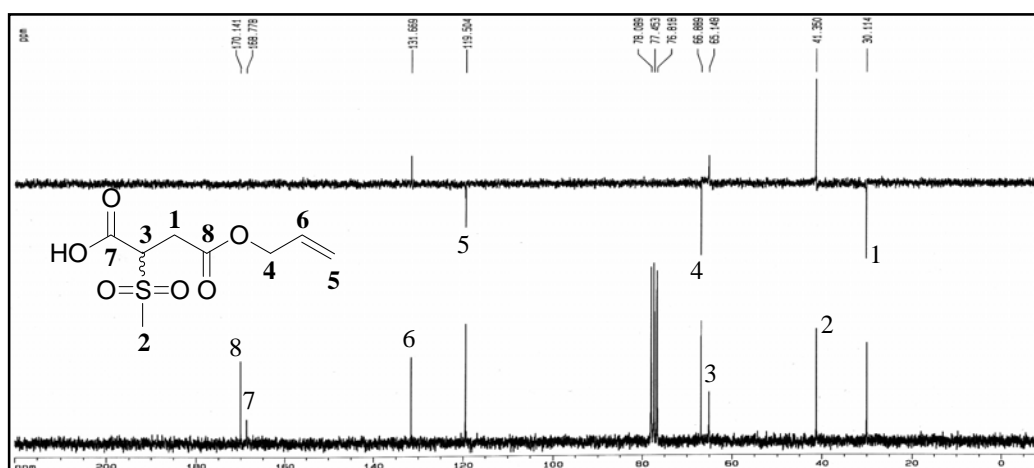


Figura V.57 - Espectre de ^{13}C de (50).

L'àcid (*R*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-fenilsulfanilpropanoic (51) s'ha caracteritzat per ^1H , DEPT135, ^{13}C i FTIR. L'espectre de RMN ^1H a 200 MHz i 25 °C de (51) es mostra a la Figura V.58.

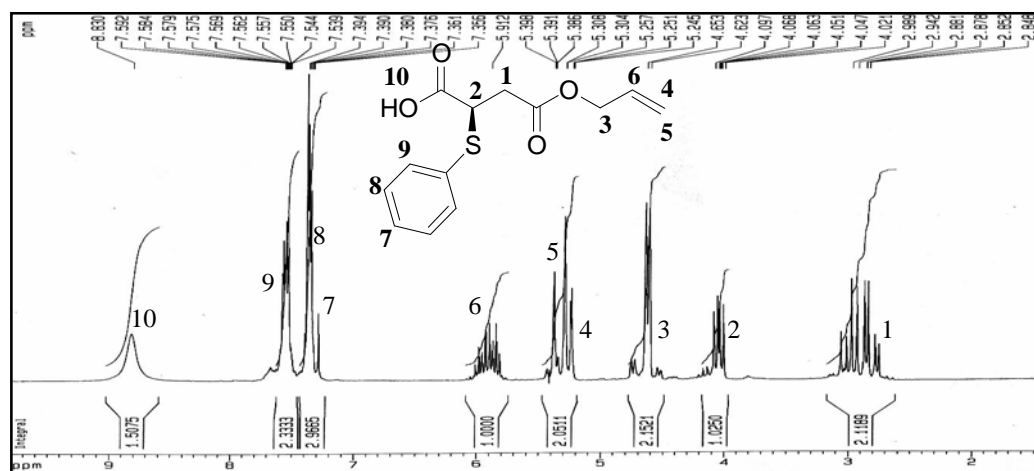


Figura V.58 - Espectre de ^1H de (51).

L'espectre de RMN DEPT135 i ^{13}C a 50 MHz i 25°C de (51) es mostra a la Figura V.59.

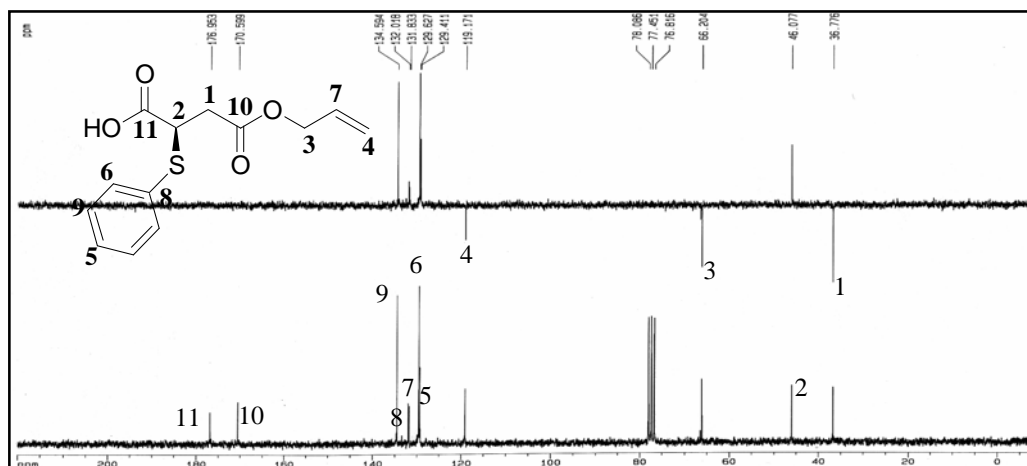


Figura V.59 - Espectre de ^{13}C de (51).

A la Figura V.60 es troba representat l'espectre de FTIR de l'àcid (*R*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-fenilsulfanilpropanoic (51), si es compara respecte a la Figura V.41 l'espectre de FTIR del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (67) es pot comprovar que son molt similars, amb la diferència principal que en l'espectre de (51) s'observen bandes amples a la zona de 3000 i una senyal d'intensitat mitja a la zona de 1640 característiques de l'àcid carboxílic.

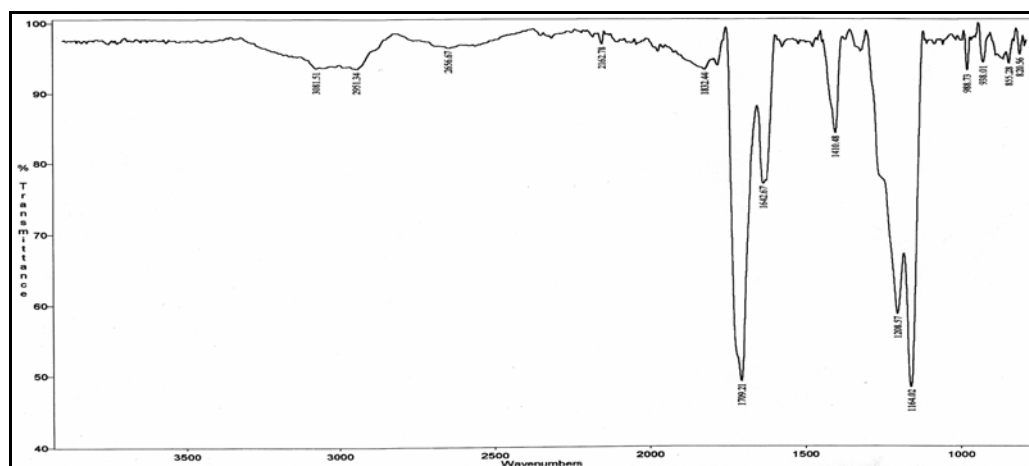


Figura V.60 - Espectre de FTIR de (51).

Fins aquest punt, els estudis realitzats han permès arribar a la síntesi de nou compostos intermedis dels onze proposats per a la síntesi d'anàlegs de Pantocina B en

forma de èsters *p*-metoxibenzílics i quatre sense el grup *p*-metoxibenzil. Les estructures dels compostos i quantitats obtingudes estan resumides a la Figura V.61

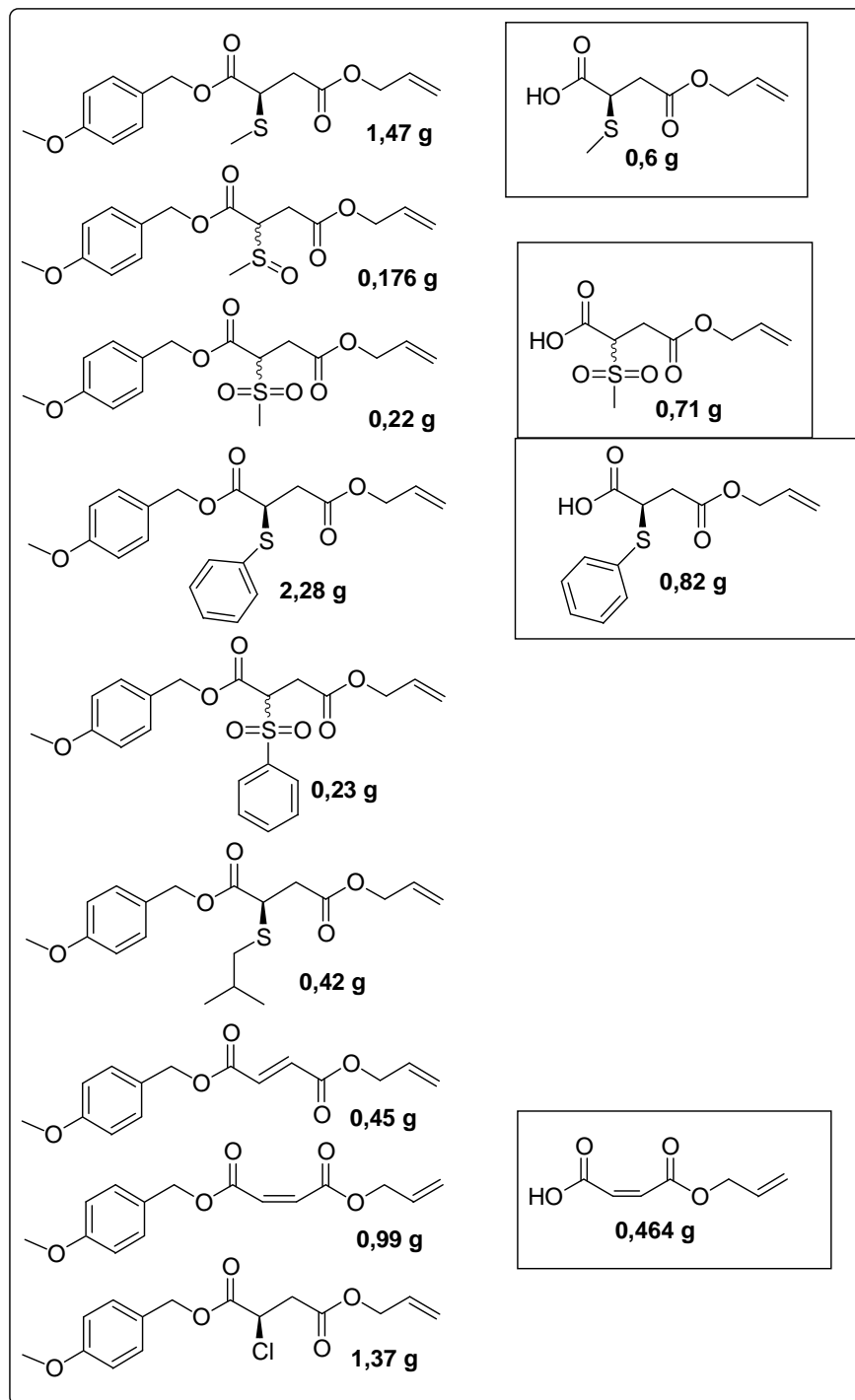


Figura V.61 - Resum de les estructures dels compostos obtinguts.

VI. CONCLUSIONS

VI. Conclusions

1. S'ha sintetitzat per primera vegada el nucleoaminoàcid *N*-Fmoc-*N*-[2-(timin-1-il)etil]- β -alanina (Fmoc-TEt β Ala-OH) (**3**) i per una nova via el nucleoaminoàcid *N*-Fmoc-*N*-[2-(timin-1-il)etil]glicina (**4**).

2. S'ha aplicat el nou nucleoaminoàcid *N*-Fmoc-*N*-(timin-1-ilet)- β -alanina (**3**) a la síntesi en fase sòlida de les seqüències des nucleopèptids H-TEt β Ala-TEt β Ala-Gly-NH₂ (**23**), H-TEt β Ala-Gly-TEt β Ala-Gly-TEt β Ala-Gly-NH₂ (**25**), i H-TEt β Ala-TEt β Ala-TEt β Ala-TEt β Ala-TEt β Ala-TEt β Ala-NH₂ (**27**).

Altres conclusions destacables d'aquests treballs són:

a. S'han sintetitzat satisfactòriament els intermedis *N*-BOC-2-bromoetilamina (**6**), tosilat de *N*-BOC-2-aminoetil (**7**), *N*¹-2-aminoetiltimina (**5**) i *N*³-benzoil-*N*¹-(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (**14**) necessaris per a la síntesi dels nucleoaminoàcids *N*-Fmoc-*N*-[2-(timin-1-il)etil]- β -alanina (**3**) i *N*-Fmoc-*N*-[2-(timin-1-il)etil]glicina (**4**).

b. No s'ha aconseguit la monoalquilació directa i selectiva al nitrogen en posició 1 de la timina sense protegir el nitrogen de la posició 3.

c. No s'ha aconseguit l'alquilació de la molècula *N*³-benzoil-*N*¹-(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (**14**) sense la desprotecció prèvia del grup benzoil.

d. No s'ha aconseguit l'alquilació directa de la molècula *N*¹-(2-amino-etil)-*N*³-benzoiltimina (**17**) en medi bàsic degut a la transposició del grup acetil.

3. S'han sintetitzat els tres monòmers de PNA TCP protegits: TCP-A(Z)-OH (**30**), TCP-G(Z)-OH (**31**) i TCP-C(Z)-OH (**32**).

4. S'ha estudiat l'aplicació dels nous monòmers TCP protegits a la síntesi en fase sòlida d'oligomers de PNA. Tot i que s'ha aconseguit la síntesi dels models TCP-A(Z)-Gly-NH₂ (**33**), TCP-C(Z)-Gly-NH₂ (**34**) i TCP-C(Z)-T-Gly-NH₂ (**35**), els resultats no han estat satisfactoris i es considera que podrien ser millorats emprant monòmers purificats i ajustant les condicions d'acoblament.

5. S'ha sintetitzat el pseudopèptid natural Pantocina B (**36**) i s'ha comprovat *in vitro* la seva capacitat inhibidora d'*E. amylovora*.

6. S'han sintetitzat vuit nous intermedis protegits dels onze proposats per a la síntesi en fase sòlida de les variants de Pantocina B (**36**). D'aquests s'han obtingut desprotegits els compostos: àcid (*Z*)-3-(al·liloxi)carbonilacrílic (**58**), àcid (*R*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-metilsulfanilpropanoic (**48**), àcid (\pm)-3-(al·liloxi)carbonil-2-metilsulfonilpropanoic (**50**) i del àcid (*R*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-fenilsulfanilpropanoic (**51**).

Altres conclusions destacables d'aquests treballs són:

a. S'ha sintetitzat el (*E*)-3-(al·liloxi)carbonilacrilat de *p*-metoxibenzil (**64**) necessari per a la síntesi de l'àcid (*E*)-3-al·liloxicarbonil-acrílic (**57**).

b. S'ha sintetitzat el (\pm)-3-(al·liloxi)carbonil-2-fenilsulfonilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**71**) necessari per a la síntesi de l'àcid (\pm)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfonilpropanoic (**53**).

c. S'ha sintetitzat el (\pm)-3-(al·liloxi)carbonil-2-metilsulfonilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**69**) necessari per a la síntesi de l'àcid (\pm)-3-(al·liloxi)carbonil-2-metilsulfonilpropanoic (**49**).

d. S'ha sintetitzat el (*R*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**67**) necessari per a la síntesi de l'àcid (\pm)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfonilpropanoic (**52**).

e. S'ha sintetitzat el (*R*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-isobutilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**66**) necessari per a la síntesi de l'àcid (*R*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-isobutilsulfanilpropanoic (**54**), de l'àcid (\pm)-3-(al·liloxi)carbonil-2-isobutilsulfonilpropanoic (**55**) i de l'àcid (\pm)-3-(al·liloxi)carbonil-2-isobutilsulfonilpropanoic (**56**).

f. S'ha aïllat i caracteritzat el 3-al·liloxicarbonil-2-cloropropanoat de *p*-metoxibenzil (**68**) que s'obté com a subproducte en les reaccions de substitució amb tiols.

VII. MATERIALS I MÈTODES

VII.1. Utilatge de laboratori.

Els punts de fusió han estat determinats en un aparell de punt de fusió Mel-Temp.

Els dissolvents s'han evaporat a pressió reduïda en un rotavapor Heidolph.

L'aigua ha estat purificada mitjançant un destil·lador Comecta S.A. model Destillation 31.

VII.2. Dissolvents i reactius.

Els reactius de partida han estat subministrats per Sigma-Aldrich. Els aminoàcids protegits han estat subministrats per Novabiochem. La resina PEG-PS amino metilada, el *handle* PAL són de Millipore. L'HBTU és de Advanced ChemTech.

Els dissolvents utilitzats són de qualitat per a síntesi, purificats mitjançant destil·lació i subministrats per Panreac PA. L'acetonitril utilitzat com a eluent d'HPLC és de qualitat gradient de Panreac.

VII.3. Mètodes analítics.

VII.3.1. Cromatografia en capa fina.

La cromatografia en capa fina s'han realitzat en plaques de gel sílice Scharlau o Machery-Nagel (0.25 mm d'espessor, en suport d'alumini) amb indicador fluorescent UV₂₅₄. El procés de visualització s'efectua mitjançant una làmpada de llum UV, o ruixant la placa amb un reactiu adequat.

VII.3.2. Anàlisi qualitatiu de resines i peptidil-resines.

Test de ninhidrina

Per avaluar qualitativament l'eficàcia dels acoblaments sobre amines primàries en SPPS s'utilitza l'assaig de ninhidrina o test de Kaiser⁷⁴(Kaiser i col., 1970), que es basa en

la reacció de transaminació-descarboxilació que té lloc entre el grup amino primari (N^{α}) de l'aminoàcid i la ninhidrina per donar el porpra de Ruhemann.

S'utilitzen tres reactius:

Reactiu A: Dissolució de 500 mg de ninhidrina en 10 ml d'etanol absolut.

Reactiu B: Dissolució de 100 mg de fenol de 25 ml d'etanol absolut.

Reactiu C: 1 ml de dissolució de 1 mM de NaCN en 49 ml de piridina destil·lada sobre ninhidrina.

Una mostra de resina es tracta amb 3 parts iguals de cada reactiu i s'escalfa a 100 °C durant 3 min. Aquest test permet fer un consum de resina mínim per a cada assaig, el test es pot realitzar en capil·lars de punt de fusió (Vilaseca & Bardají, 1995). L'assaig és positiu (aproximadament més de 1 μ mol de grups amino/ g resina) quan apareix una coloració blava en la resina o en el líquid sobrenedant. Aquest resultat indica la presència d'amines primàries a la mostra. L'assaig és negatiu (absència de grups amino lliures) quan s'observa una coloració groga o groc-verdosa.

Test del cloranil

Per avaluar qualitativament l'eficàcia dels acoblaments en síntesi en fase sòlida en presència d'amines secundàries s'utilitza el test del cloranil⁷⁵, que es basa en la reacció d'addició entre el cloranil i l'enamina formada en la reacció de l'acetaldehid amb l'amina secundària donant color blau.

S'utilitzen dos reactius:

Reactiu A: Dissolució al 2 % d'acetaldehid en DMF.

Reactiu B: Dissolució al 2 % de cloranil en DMF.

El procediment seguit en l'assaig del test del cloranil es basa en afegir a una mostra de 1-5 mg de resina una gota de dissolució al 2 % d'acetaldehid en DMF i una gota de dissolució de cloranil en DMF, i la barreja es deixa a 23 °C durant 5 min. L'assaig és positiu quan apareix una coloració blava en la resina o en el líquid sobrenedant. Aquest

resultat indica la presència d'amines secundàries a la mostra. L'assaig és negatiu (absència de grups amino lliures) quan s'observa una coloració groga o groc-verdosa.

VII.3.3. Anàlisi per HPLC en fase reversa.

La cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) s'ha realitzat en un equip format per una bomba binària P2000 de Thermo Separation Products, un detector espectrofotomètric UV/Vis Perkin Elmer LC 290 de λ variable i un integrador Perkin Elmer Nelson 1020 i una impressora HP Deskjet 400.

Per l'anàlisi de mostres s'ha utilitzat una columna en fase reversa C₁₈ Spherisorb ODS-2 5 μ m (25 x 0'46 cm) (Tecnokroma) i el sistema d'eluent (prèviament desgasats al buit durant 20 min), següents: A 0.1 % de TFA en aigua i B 0.1 % de TFA en acetonitril. S'ha treballat tant en condicions isocràtiques com en gradient, amb un flux de 1.0 ml/minut. El gradient general utilitzat en la major part de les anàlisis ha estat de A:B (de 1:0 durant 2 min, fins a 0:1 en 23 min i fins a 1:0 en 10 min). El gradient utilitzat per la detecció dels oligòmers TCP-A(Z)-Gly-NH₂ (**33**), TCP-C(Z)-Gly-NH₂ (**34**), TCP-A(Z)-Gly-NH₂ (**35**) i NH₂-A(Z)-Gly-NH₂ (**36**) ha estat de A:B (de 1:0 durant 2 min, fins a 0:1 amb 8 min i fins a 1:0 en 5 min). En general la detecció s'ha fet a 220 nm., pels productes amb timina, guanina, citosina i adenina s'ha detectat també a $\lambda = 265$ nm., i pels productes amb el grup protector TCP a mes a mes s'ha detectat a $\lambda = 335$ nm.

VII.3.4. Anàlisi per ESI-MS.

S'ha utilitzat un espectròmetre de masses de baixa resolució amb analitzador quadrupolar Navigator (Finnigan, MassLabGroup) amb sistema Aqua i font d'ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) i electroesprai (ESI-MS) mitjançant un aparell amb modus d'ionització positiu i negatiu. L'interval de masses de l'analitzador és de m/z 2-1600. Les mostres han estat introduïdes via bomba cromatogràfica líquida a un flux de 0.3 ml/min usant com a fase mòbil H₂O-ACN 3:7 o per infusió directa.

VII.3.5. Anàlisi elemental.

Les anàlisis elementals han estat realitzades en un aparell Thermo Instruments model EA 1110 CHNS/O (Servei Tècnic de Recerca de la Universitat de Girona) i en un analitzador elemental Carlo Erba Instruments EA 1108 CHNS/O, amb mostrejador per a 50 mostres, microbalança Sartorius XM 10000P i software EAGER 200 de Carlo Erba Instruments. Les condicions analítiques emprades són: T oxidació 1020 °C, T GC 60 °C, columna Porapak PQS 2 m, flux heli portador 100 ml/min, flux oxigen 20 ml / min i detector de conductivitat tèrmica.

VII.3.6. Espectroscòpia d'infraroig.

Els espectres de FTIR s'han enregistrat en un aparell Nicolet 205FT-IR. Les bandes d'absorció estan donades en cm^{-1} , f = forta, m = mitja, d= dèbil i b.a.= banda ampla.

VII.3.7. Ressonància magnètica nuclear.

Els espectres de ressonància magnètica nuclear de ^1H -RMN han estat enregistrats a 200 MHz i els de ^{13}C -RMN a 50.33 MHz en un aparell Bruker model OPX200 Advance (4.7 T) (Servei Tècnic de Recerca de la Universitat de Girona).

Els desplaçaments químics es donen en δ (ppm) utilitzant com a referència interna tetrametilsilà (TMS). Abreviatures: s (singlet), d (doplet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet).

S'han dut a terme experiments de DEPT per tal d'assignar els espectres de ^{13}C -RMN i en els casos que ha estat necessari s'han enregistrat espectres COSY.

VIII. PART EXPERIMENTAL

VIII.1. Capítol 1. Síntesi de nucleoaminoàcids de timina i aplicació en la síntesi d'oligòmers en fase sòlida

VIII.1.1. Síntesi dels reactius de partida per a la síntesi de l'intermedi *N*¹-2-aminoetiltimina (5)

VIII.1.1.1. Síntesi de *N*-BOC-2-bromoetilamina (6)

Dins un baló de 250 mL de capacitat es dissolen 6.57 g (32 mmols) de monobromohidrur de 2-bromoetilamoni i 7 g (32 mmols) de diBOC en 150 mL de diclorometà. A la solució anterior s'afegeix gota a gota durant 2 hores 4.48 mL (32 mmols) de trietilamina, amb agitació magnètica i a t.a. La barreja de reacció s'agita durant 3 hores i s'addiciona 1.314 g (6.4 mmols) de diBOC i 0.90 mL (6.4 mmols) de trietilamina. Es deixa reaccionar durant tres hores i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El residu obtingut es dissol en 100 mL d'AcOEt i es renta cinc vegades amb 25 mL d'àcid clorhídric 0.05 M i una amb 25 mL de solució saturada de clorur sòdic. La solució obtinguda s'asseca sobre sulfat sòdic anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda obtenint 6.6 g (91 %) del producte *N*-BOC-2-bromoetilamina (6) en forma d'oli incolor.

N-BOC-2-bromoetilamina (6)

TLC: R.f. = 0.52 hexà / AcOEt / AcOH, (3:2:0.5). Revelador: HCl i ninhidrina.

FTIR (KBr): 3346m, 2974m, 1751d, 1694f, 1516f, 1516f, 1366m, 1392d, 1366m, 1302d, 1273m, 1252m, 1169f, 952d, 864d, 555d, 401d.

¹H-RMN (CDCl₃): 4.90 (t, 1H, NH), 3.47-3.41 (t, 2H, BrCH₂), 3.42-3.34 (q, 2H, CH₂N), 1.38 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-RMN (CDCl₃): 152.23 (COO), 79.79 (C(CH₃)₃), 42.34 (BrCH₂), 32.69 (CH₂N), 28.28 (C(CH₃)).

VIII.1.1.2. Síntesi de tosilat de *N*-BOC-2-aminoetil (7)

Dins un baló de 100 mL de capacitat es dissolen 0.59 g (4.68 mmols) de *N*-BOC-2-aminoetanol (**8**) en 50 mL de piridina, es refreda amb un bany de gel (4 °C) i sota agitació magnètica s'addiciona 1.34 g (7.02 mmols) de clorur de tosil en petites porcions. S'agita durant 17 hores deixant que arribi a temperatura ambient. La mescla de reacció es dilueix en 25 mL de diclorometà i es renta tres vegades amb 10 mL d'àcid clorhídric 0.05 M i un cop amb 10 mL de solució saturada de clorur sòdic. S'asseca sobre sulfat sòdic anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El residu es purifica per columna "flash" amb SiO₂ eluint amb una barreja d'hexà/AcOEt (80:20). S'obtenen 0.33 g (22 %) del producte de tosilat de *N*-BOC-2-aminoetil (**7**) en forma de sòlid blanc i 0.39 g (72 %) de di-*N,N'*-diBOC-bis-2-aminoetil èter (**9**) en forma d'oli transparent.

Tosilat de *N*-BOC-2-aminoetil (7)

P.f.: 132-134 °C.

TLC: R.f. = 0.8 hexà / AcOEt / AcOH, (3:2:0.5). Revelador: HCl 1N, assecat i ninhidrina.

HPLC: t_R = 19 min.

FTIR (KBr): 3214d, 3092d, 1751f, 1703f, 1640f, 1488d, 1420f, 1322d, 1250m, 1220m, 966d, 893d, 786d, 763d, 706d, 688d, 588d, 546d, 477d.

¹H-RMN (CDCl₃): 7.85-7.80 (d, 2H, *H* arom.), 7.41-7.37 (d, 2H, *H* arom.), 4.86 (d, 1H, NH), 4.13-4.08 (t, 2H, OCH₂), 3.45-3.37 (q, 2H, CH₂N), 2.49 (s, 3H, CCH₃), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-RMN (CDCl₃): 155.53 (COO), 142.29 (CH₃C arom.), 132.49 (CS arom.), 129.87 (C arom.), 127.97 (C arom.), 69.34 (OC(CH₃)₃), 64.88 (OCH₂), 40.525 (CH₂N), 28.17 (C(CH₃)₃), 21.54 (CH₃C).

di-BOC-2-aminoetil èter (9)

TLC: R.f. = 0.74 hexà / AcOEt / AcOH, (3:2:0.5). Revelador: HCl 1N, assecat i ninhidrina.

FTIR(film): 3346m, 2978m, 2978m, 2933d, 1752d, 1694f, 1516f, 1366m, 1272f, 1252f, 1170f, 1170f, , 952d, , 864d, 575d.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 4.98 (s, 2H, NH), 3.67-3.63 (t, 4H, OCH_2), 3.61-3.51 (q, 4H, CH_2N), 1.51 (s, 18H, CCH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3): 154.62 (COO), 78.83 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 59.382 (OCH_2), 43.304 (CH_2N), 27.34 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

VIII.1.2. Síntesi de N^1 -(N -BOC-2-aminoetil)-timina (**10**) per alquilació de timina amb N -BOC-2-bromoetilamina (**6**).

Dins un baló de 25 mL s'afegeixen 56.3 mg (0.25 mmols) de timina, 61.7 mg (0.45 mmols) de carbonat potàssic i 4 mL de DMF, s'escalfa la barreja a 40 °C i es deixa amb agitació magnètica durant 30 min. A la solució s'afegeix gota a gota durant 2 hores, 100 mg (0.45 mmols) de N -BOC-2-bromoetilamina (**6**) i s'agita durant 12 hores a 40 °C. Es deixa refredar a t.a. i s'afegeix 25 mL d'AcOEt, la dissolució obtinguda es renta 5 vegades amb 10 mL d'àcid clorhídric 0.05 M, tres vegades amb 10 mL de dissolució al 10 % de bicarbonat sòdic i un cop amb 10 mL de dissolució saturada de clorur sòdic, s'asseca sobre sulfat sòdic anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El residu obtingut es purifica per columna "flash" amb SiO_2 eluent amb barreges d'hexà/AcOEt (80:20). S'obtenen 11 mg d'un sòlid blanc (10 %) identificat com N^1 -(N -BOC-2-aminoetil)-timina (**10**) i 18 mg (15 %) d'un altre sòlid blanc identificat com O^4 -(N -BOC-2-aminoetil)-timina (**11**).

N^1 -(N -BOC-2-aminoetil)-timina (**10**)

HPLC: $t_R = 12.5$ min.

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO): 11.13 (s, 1H, NH timin), 7.26 (s, 1H, CH timin.), 6.88-6.64 (t, 1H, CH_2NH), 3.66-3.30 (t, 2H, NCH_2), 3.19-3.10 (q, 2H, CH_2NH), 1.73 (s, 3H, CH_3C), 1.33 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

O^4 -(N -BOC-2-aminoetil)-timina (**11**)

HPLC: $t_R = 13.8$ min.

¹H-RMN (CDCl₃): 9.44 (d, 1H, NH timina), 6.98-6.95 (d, 1H, CH timina), 4.94 (t, 1H, CH₂NH), 4.07-4.01 (t, 2H, OCH₂), 3.37-3.35 (q, 2H, CH₂NH), 1.86 (s, 3H, CH₃ timina), 1.33 (s, 9H, C(CH₃)₃).

VIII.1.3. Síntesi de *N*³-benzoil-*N*¹-(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (**14**) per alquilació de la *N*³-benzoiltimina (**13**) amb *N*-BOC-2-bromoetilamina (**6**).

VIII.1.3.1. Obtenció de *N*³-benzoil-timina (**13**)

Dins un baló de 250 mL de capacitat es dissolen 4 g (31.72 mmols) de timina en 20.8 mL de piridina i 51.8 mL d'acetonitril. A la solució anterior s'afegeix gota a gota durant 2 hores, amb agitació magnètica i a t.a., 14.74 mL (126.86 mmols) de clorur de benzoil. S'agita 46 hores i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. En el residu obtingut s'hi afegeixen 96 mL de dioxà, 96 mL d'aigua i 6.634 g de carbonat potàssic. S'agita 24 hores i a continuació s'acidifica la dissolució fins a un pH de 3-4 amb àcid clorhídric 2 M, es deixa agitant 2 hores i el sòlid format es filtra i es renta amb èter per tal d'eliminar l'àcid benzoic present. S'obté 6.39 g (88 %) de *N*³-benzoiltimina (**13**) en forma de sòlid blanc pur per HPLC.

*N*³-benzoiltimina (**13**)

P.f.: 159-160°C.

TLC: R.f. = 0.4 hexà / AcOEt, (1:1).

HPLC: *t*_R = 13.9 min.

FTIR: 3212d, 3092d, 1750f, 1704f, 1638f, 1596m, 1490d, 1423m, 1251m, 1222m, 1251d, 840d, 814d, 787d, 766d, 690d, 480d.

¹H-RMN (DMSO): 11.37 (d, 1H, NH timina), 7.95-7.90 (d, 2H, CH *o*-benzoil), 7.81-7.77 (t, 1H, CH *p*-benzoil), 7.63-7.59 (t, 2H, CH *m*-benzoil), 7.55-7.52 (d, 1H, CH timina), 1.89 (s, 3H, CH₃ timin).

¹³C-RMN (DMSO): 170.01 (CO benzoil), 163.43 (CO 4-timina), 149.82 (CO 2-timina), 138.64 (CH timina), 135.21 (C 1-benzoil), 131.31 (CH *m*-benzoil), 130.09 (CH *o*-benzoil), 129.36 (CH *p*-benzoil). 107.78 (C 5-timina), 11.72 (CH₃ timina).

VIII.1.3.2. Obtenció de N^3 -benzoil- N^1 -(N -BOC-2-aminoetil)-timina (14**)**

Dins un baló de 100 mL, sota atmosfera de nitrogen, s'afegeixen 7 g (31.23 mmols) de N -BOC-2-bromoetilamina (**6**), 5.18 g (37.44 mmols) de carbonat potàssic, 1.383 g (3.74 mmols) de TBAI, 30 mL de DMF anhidre i s'escalfa la barreja a 70 °C durant 30 min., amb constant agitació magnètica. A la barreja anterior s'afegeix 8.62 g (37.44 mmols) de N^3 -benzoiltimina (**13**). S'agita durant 4 hores a 70 °C, s'afegeix 70 mL d'aigua i es deixa agitant 2 hores fins a precipitació completa del producte (**14**). Es filtra el producte i es renta amb una dissolució de bicarbonat sòdic al 10 %, s'obtenen 3.14 g (70 %) de N^3 -benzoil- N^1 -(N -BOC-2-aminoetil)-timina (**14**) en forma de sòlid blanc.

 N^3 -benzoil- N^1 -(N -BOC-2-aminoetil)-timina (14**)**

P.f.: 162-164 °C.

TLC: R.f. = 0.73 AcOEt.

HPLC: t_R = 19.7 min.

FTIR (KBr): 3228m, 3217m, 3215m, 3092d, 1752f, 1703f, 1640f, 1488m, 1420f, 1322.55d, 1250m, 1220m, 967d, 786m, 764m, 706d, 688m, 588d, 478m.

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3CN): 8.15-8.11 (d, 2H, CH *o*-benzoil), 7.82-7.74 (t, 2H, CH *m*-benzoil), 7.64-7.56 (t, 1H, CH *p*-benzoil), 7.32 (s, 1H, CH timina), 5.56 (t, 1H, CH_2NH), 3.80-3.37 (t, 2H, NCH_2), 3.37-3.35 (q, 2H, CH_2NH), 1.89 (s, 3H, CH_3 timina), 1.44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3CN): 170.15 (CO benzoil), 163.53 (CO 4-timina), 156.29 (CO BOC), 149.94 (CO 2-timina), 142.24 (CH timina), 135.21 (C 1-benzoil), 131.84 (CH *p*-benzoil), 130.46 (CH *m*-benzoil), 129.26 (CH *o*-benzoil), 108.75 (C 5-timina), 78.75 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 49.67 (NCH_2), 38.01 (CH_2NH), 27.61 ($\text{C}(\text{CH}_3)$), 11.32 (CH_3 timina).

Anàlisi elemental: calculat per $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5$: C, 61.11; H, 6.21; N, 11.25. Trobat: Anàlisi elemental correcte C, 60.69; H, 6.22; N, 10.89.

VIII.1.4. Síntesi de Fmoc-TETGly-OH (4) per alquilació de N^1 -(2-aminoetil)- N^3 -benzoiltimina (17)

VIII.1.4.1. Síntesi de N^1 -2-aminoetil- N^3 -benzoiltimina (17) per desprotecció del grup BOC de N^3 -benzoil- N^1 -(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (14)

Dins un baló de 25 mL de capacitat, amb constant agitació magnètica, es dissolen 2 g (5.36 mmols) de N^3 -benzoil- N^1 -(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (14) en 3 mL de TFA i 3 mL de diclorometà. Es manté l'agitació magnètica a t.a. durant 30 min i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda arrossegant amb èter, s'obtenen 2.04 g (98 %) de N^3 -benzoil- N^1 -(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (14) en forma de sòlid blanc.

N^1 -2-aminoetil- N^3 -benzoiltimina (17)

P.f.: 173-174 °C.

HPLC: t_R = 13.3 min.

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO): 8.143 (t, 3H, NH_3^+), 8.07-8.02 (d, 2H, CH *o*-benzoil), 7.83-7.75 (t, 2H, CH, *m*-benzoil), 7.73 (t, 1H, CH timina), 7.64-7.56 (t, 1H, CH *p*-benzoil), 4.02-3.97 (t, 2H, NCH_2), 3.55-3.53 (m, 2H, CH_2NH_3^+) 1.85 (s, 3H, CH_3 timina).

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO): 169.9 (CO benzoil), 163.1 (CO 4-timina), 150.0 (CO 2-timina), 142.2 (CH timina), 135.5 (C 1-benzoil), 131.4 (CH *p*-benzoil), 130.5 (CH *m*-benzoil), 129.4 (CH *o*-benzoil), 108.9 (C 5-timina), 45.9 (NCH_2), 39.1 (CH_2NH_3^+), 12.1 (CH_3 timina).

VIII.1.4.2. Alquilació de N^1 -2-aminoetil- N^3 -benzoiltimina (17) amb cloroacetat d'etil

Dins un baló de 25 mL de capacitat es dissolen, amb agitació magnètica i a t.a., 0.20 g (0.52 mmols) de N^1 -2-aminoetil- N^3 -benzoiltimina (17) i 72 μL (0.52 mmols) de Et_3N en 3 mL de DMF. A la solució anterior s'afegeix gota a gota durant una hora, amb agitació magnètica i a t.a., 15 μL (0.17 mmols) de cloroacetat d'etil i s'agita 23 hores. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i el residu es purifica per columna "flash" amb SiO_2 i

hexà/AcOEt (80:20) com a eluents, obtenint-se 23 mg (50 %) del producte *N*¹-(*N*-benzoil-2-aminoetil)-timina (**19**) en forma de sòlid blanc, 3 mg (12 %) de *N*¹-2-aminoetiltimina (**5**) en forma de sòlid blanc, 16 mg (24 %) de *N*³-benzoil-*N*¹-(*N*-benzoil-2-aminoetil)-timina (**20**) també en forma de sòlid blanc i 16.8 mg (8 %) d'àcid benzòic en forma de sòlid blanc-grogenc.

***N*¹-(*N*-benzoil-2-aminoetil)-timina (**19**)**

HPLC: $t_R = 13.3$ min.

¹H-RMN (DMSO): 11.20 (s, 1H, NH timina), 8.62-8.57 (t, 1H, CH₂NH), 7.80-7.77 (d, 2H, CH *o*-benzoil), 7.49-7.46 (t, 1H, CH *p*-benzoil), 7.47 (d, 1H, CH timina), 7.48-7.45 (t, 2H, CH *m*-benzoil), 3.83-3.81 (t, 2H, NCH₂), 3.54-3.52 (q, 2H, CH₂NH), 1.67 (s, 3H, CH₃ timina).

¹³C-RMN (DMSO): 167.16 (CO benzoil), 164.86 (CO 4-timina), 151.48 (CO 2-timina), 142.23 (CH timina), 134.94 (C 1-benzoil), 130.4 (CH *p*-benzoil), 128.65 (CH *m*-benzoil), 127.49 (CH *o*-benzoil), 108.40 (C 5-timina), 47.68 (NCH₂), 38.27 (CH₂NH), 12.21 (CH₃ timina).

***N*³-benzoil-*N*¹-(*N*-benzoil-2-aminoetil)-timina (**20**)**

HPLC: $t_R = 18.0$ min.

¹H-RMN (CDCl₃): 7.95-7.88 (d, 2H, CH *o*-benzoil), 7.75-7.71 (d, 2H, CH *o*-benzoil), 7.65-7.57 (t, 1H, CH *p*-benzoil), 7.53-7.47 (t, 1H, CH *p*-benzoil), 7.44-7.41 (t, 2H, CH *m*-benzoil), 7.43-7.40 (t, 2H, CH *m*-benzoil), 7.30 (s, 1H, CH timina), 6.97-6.94 (t, 1H, NH), 4.14-4.04 (t, 2H, NCH₂), 3.83-3.74 (q, 2H, CH₂NH), 1.92 (s, 3H, CH₃ timina).

¹³C-RMN (CDCl₃): 168.13 (CO benzoil), 167.27 (CO benzoil), 162.42 (CO 4-timina), 151.34 (CO 2-timina), 140.60 (CH timina), 135.00 (C 1-benzoil), 133.52 (C 1-benzoil), 131.69 (CH *p*-benzoil), 131.33 (CH *p*-benzoil), 131.33 (CH *m*-benzoil), 130.38 (CH *m*-benzoil), 129.09 (CH *o*-benzoil), 128.55 (CH *o*-benzoil), 110.97 (C 5-timina), 47.86 (NCH₂), 39.38 (CH₂NH), 12.15 (CH₃).

MS: m/z : [M⁺H] 378.0.

***N*¹-2-aminoetiltimina (5)**

P.f.: 184-185 °C.

HPLC: *t*_R = 8.18 min.

FTIR (KBr): 3454m, 3052m, 3021m, 1693f, 1664f, 1628f, 1492d, 1464d, 1425m, 1344m, 1279m, 1192f, 1144f, 1117d, 840m, 799d, 760d, 723d, 690d, 553d, 428d.

¹H-RMN (DMSO): 11.29 (s, 1H, NH timina), 8.07 (t, 3H, NH₃⁺), 7.48 (s, 1H, CH timina), 3.91-3.89 (t, 2H, NCH₂), 3.53-3.42 (m, 2H, CH₂NH₃⁺) 1.76 (s, 3H, CH₃ timina).

¹³C-RMN (DMSO): 164.5 (CO 4-timina), 157.0 (CO 2-timina), 142.7 (CH timina), 108.9 (C 5-timina), 45.7 (NCH₂), 38.3 (CH₂NH), 12.4 (CH₃ timina).

VIII.1.5. Síntesi de Fmoc-TETgly-OH (4) a partir de *N*¹-2-aminoetiltimina (5)**VIII.1.5.1. Síntesi de *N*¹-2-aminoetil-timina (5) per desprotecció conjunta del grup benzoil i del grup BOC de *N*³-benzoil-*N*¹-(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (14)**

Dins un baló de 25 mL de capacitat, amb constant agitació magnètica, es dissolen 0.6 g (1.6 mmols) de *N*³-benzoil-*N*¹-(*N*-BOC-2-aminoetil)-timina (**14**) en 4.5 mL de TFA i 1.5 mL de diclormetà. Es manté l'agitació magnètica, a t.a., durant 12 hores, s'afegeixen 20 mL d'èter i es deixa agitant 2 hores fins a precipitació completa, es filtra el producte i es renta amb èter. S'obté 0.33 g (97 %) de *N*¹-2-aminoetiltimina (**5**) en forma de sòlid blanc.

VIII.1.5.2. Alquilació amb àcid bromoacètic

Dins un baló de 25 mL de capacitat, amb constant agitació magnètica, es dissolen 0.182 g (0.8 mmols) de *N*¹-2-aminoetiltimina (**5**) i 0.085 g (0.8 mmols) de carbonat sòdic en 3 mL d'aigua i s'escalfa la barreja a 70 °C. Després de 40 min. s'afegeix, durant 20 min. i mantenint la temperatura a 70 °C, 0.11 g (0.8 mmols) d'àcid bromoacètic i s'agita durant 23 hores a 70 °C. Es refreda la solució a 0 °C i s'afegeix 0.085 g (0.8 mmols) de carbonat sòdic i 0.2726 g (0.8 mmols) de FmocOSu, gota a gota i durant 30 min., dissolts en 3 mL

d'acetonitril. Després de 23 hores de reacció s'afegeix 5 ml de bicarbonat sòdic al 5 % i es deixa agitant una hora, es filtren les impureses i les aigües del filtrat s'acidifiquen a pH 2, aquesta solució s'agita durant una altra hora fins a precipitació completa de **(4)**. Es filtra el sòlid precipitat i es renta amb àcid clorhídric 0.05 M obtenint-se 0.03 g (8 %) del producte Fmoc-TETGly-OH (**4**) en forma de sòlid blanc.

Fmoc-TETGly-OH (4)

P.f.: 188-189 °C.

TLC: R.f. = 0.42 AcOEt / AcOH, (5:0.5).

HPLC: t_R = 17.5 min.

FTIR (KBr): 3184d, 3182d, 3149m, 3956d, 2956d, 2925d, 2785d, 2610d, 1723f, 1703f, 1686f, 1662f, 1478m, 1453d, 1425m, 1408d, 1371d, 1241m, 1210m, 1138d, 1122d, 758d, 738d.

¹H-RMN (DMSO): 12.01 (s, 1H, COOH), 11.29-11.16 (d, 1, NH timina), 8.01-8.00 (d, 2H, CH Fmoc), 7.92-7.89 (d, 2H, CH Fmoc), 7.63-7.60 (t, 2H, CH Fmoc), 7.62-7.59 (t, 2H, CH Fmoc), 7.57 (s, 1H, CH timina), 4.31-4.20 (d, 2H, OCH₂ Fmoc), 3.69-3.54 (t, 1H, OCH₂CH Fmoc), 3.60 (s, 2H, CH₂COOH), 3.56-3.48 (t, 2H, CH₂ etil), 3.45-3.34 (t, 2H, CH₂ etil), 1.74-1.63 (2s, 3H, CH₃ timina).

¹³C-RMN (DMSO): 171.21 (COOH), 164.36 (CO 4-timina), 155.45 (NCOO), 151.02 (CO 2-timina), 143.62 (C Fmoc), 141.55 (CH timina), 140.64 (C Fmoc), 127.74 (CH Fmoc), 125.05 (CH Fmoc), 120.16 (CH Fmoc), 108.23 (C 5-timina), 67.37 (OCH₂), 49.03 (CH₂COOH), 46.45 (CH₂ etil), 45.85 (CH₂ etil), 11.87 (CH₃ timina).

Anàlisi elemental: calculat per C₂₄H₂₃N₃O₆: C, 64.13; H, 5.39; N, 9.06. Trobat: Anàlisi elemental correcte C, 63.93; H, 5.50; N, 8.66.

MS: m/z : [M⁺H] 449.9.

VIII.1.5.3. Aminació reductiva amb àcid glioxílic

Dins un baló de 25 mL de capacitat, sota atmosfera de nitrogen, s'afegeixen 0.2465 g (2.68 mmols) d'àcid glioxílic monohidratat, 3 g (21.12 mmols) de sulfat sòdic anhidre i 3 mL de metanol anhidre. La barreja anterior es refreda a 0 °C i s'hi afegeix, gota a gota,

durant una hora i sota atmosfera de nitrogen, 1 g (2.68 mmols) de *N*¹-2-aminoetiltimina (**5**) dissolt en 3 ml de MeOH anhidre. La reacció es manté a t.a. durant 12 hores, es filtra el sulfat sòdic anhidre i s'hi afegeix, a 0 °C i sota atmosfera de nitrogen, un 10 % en pes de Pd/C, es fa circular el corrent d'hidrogen, es purga 4-5 vegades i es deixa reaccionar 3 hores a t. a. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda, es dissolt el residu en 3 mL d'aigua, i s'afegeix 0.284 g (2.68 mmols) de carbonat sòdic, es refreda la solució a 0 °C, i s'afegeix 0.9 g (2.68 mmols) de FmocOSu, gota a gota i durant 30 min., dissolts en 3 mL d'acetonitril. Després de 23 hores de reacció s'afegeix 5 ml de bicarbonat sòdic al 5 % i es deixa agitant una hora, es filtren les impureses i les aigües del filtrat s'acidifiquen a pH 2, aquesta solució s'agita durant una altra hora fins a precipitació completa de (**4**). Es filtra el sòlid precipitat i es renta amb àcid clorhídric 0.05 M obtenint-se 0.192 g (16 %) del producte Fmoc-TEtGly-OH (**4**) en forma de sòlid blanc.

VIII.1.6. Síntesi de Fmoc-TEtβAla-OH (**3**) a partir de l'addició conjugada de *N*¹-2-aminoetiltimina (**5**) amb àcid acrílic

Dins un baló de 25 mL de capacitat, amb constant agitació magnètica, es dissolen 0.3634 g (1.61 mmols) de *N*¹-2-aminoetiltimina (**5**) i 0.17 g (1.61 mmols) de carbonat sòdic en 6 mL d'aigua i s'escalfa la barreja a 70 °C. Després de 40 min. s'afegeix, durant 20 min. i mantenint la temperatura a 70 °C, 143 μL (2.09 mmols) d'àcid acrílic i s'agita durant 23 hores a 100 °C. Es refreda la solució a 0 °C i s'afegeix 0.1 g (0.97 mmols) de carbonat sòdic i 0.329 g (0.97 mmols) de FmocOSu, gota a gota i durant 30 min., dissolts en 6 mL d'acetonitril. Després de 23 hores de reacció s'afegeix 10 mL de bicarbonat sòdic al 5 % i es deixa agitant una hora, es filtren les impureses i les aigües del filtrat s'acidifiquen a pH 2, aquesta solució s'agita durant una altra hora fins a precipitació completa de (**3**). Es filtra el sòlid precipitat i es renta amb àcid clorhídric 0.05 M obtenint-se 0.253 g (56 %) del producte Fmoc-TEtβAla-OH (**3**) en forma de sòlid blanc.

Fmoc-TEtβAla-OH (**3**)

P.f.: 181-182 °C.

TLC: R.f. = 0.44 AcOEt / AcOH, (5:0.5).

HPLC: t_R = 17.7 min.

FTIR (KBr): 3085d, 3064d, 3017d, 2955d, 2651d, 1720f, 1708f, 1650f, 1484m, 1442m, 1375d, 1349d, 1292d, 1241m, 1198m, 1113d, 762d, 738d.

¹H-RMN (DMSO): 12.27 (s, 1H, COOH), 11.30-11.16 (d, 1, NH timina), 7.91-7.88 (d, 2H, CH Fmoc), 7.64-7.60 (d, 2H, CH Fmoc), 7.53-7.46 (t, 2H, CH Fmoc), 7.50-7.47 (t, 2H, CH Fmoc), 7.43 (s, 1H, CH Fmoc), 4.25 (d, 2H, OCH₂ Fmoc), 3.74-3.59 (t, 1H, OCH₂CH Fmoc), 3.62-3.49 (t, 2H, CH₂CH₂COOH), 3.30-3.28 (t, 2H, NCH₂CH₂N), 2.44-2.31 (t, 2H, NCH₂CH₂N), 2.36-2.29 (t, 2H, CH₂COOH), 1.73-1.64 (2s, 1H, CH₃ timina).

¹³C-RMN (DMSO): 171.18 (CH₂COOH), 164.70 (CO 4-timina), 153.54 (NCOO), 151.34 (CO 2-timina), 144.20 (C Fmoc), 141.73 (CH Fmoc), 141.14 (C Fmoc), 128.08 (CH Fmoc), 125.37 (CH Fmoc), 120.53 (CH Fmoc), 108.56 (C 5-timina), 67.18 (OCH₂), 47.02 (CH₂CH₂COOH), 46.55 (NCH₂CH₂N), 45.96 (NCH₂CH₂N), 39.92 (CH₂COOH), 12.27 (CH₃ timina).

MS: m/z : [M⁺H] 463.7.

VIII.1.7. Procediment general de síntesi de nucleopèptids

Totes les operacions realitzades amb resines o peptidil-resines durant la síntesi de pèptids en fase sòlida s'han dut a terme manualment en xeringues de polipropilè de 1 mL o 5 mL, depenent de la quantitat de resina utilitzada. A les xeringues s'adapten plaques filtrants de polietilè porós. A la resina s'afegeixen els reactius i dissolvents idonis per a cada pas de la síntesi, de manera que la resina quedi totalment impregnada i l'inflament tingui lloc fàcilment. S'agita regularment la mescla amb una vareta de tefló i, acabat el tractament, es renta per simple filtració.

VIII.1.7.1. Condicionament de la resina

S'han emprat de 100 a 300 mg de resina Fmoc-PAL-PEG-PS de funcionalització 0.16 mmol/g i que conté Nle com a aminoàcid de referència interna (IRAA). L'aminoàcid de referència interna ha de ser un aminoàcid que no formi part de la cadena peptídica a

sintetitzar. La funció d'aquest aminoàcid és permetre el càlcul dels rendiments dels acoblaments dels aminoàcids durant la síntesi peptídica, mitjançant hidròlisi i anàlisi d'aminoàcids de la peptidil-resina.

Per aconseguir un bon inflament de la resina es tracta amb CH_2Cl_2 (5 x 2 min) i amb DMF (5 x 2 min).

Partint de la resina Fmoc-PAL-PEG-PS en primer lloc es desprotegeix el grup Fmoc amb piperidina-DMF 3:7 (2 + 10 min), i a continuació es renta amb DMF (6 x 1 min), la resina ja està preparada per l'etapa d'acoblament.

VIII.1.7.2. Cicles d'acoblament

El protocol seguit per l'acoblament de Fmoc-Gly-OH (**24**) o Fmoc-Tet β Ala-OH (**3**) s'ha realitzat dissolent 3 equivalents del reactiu corresponent i de 3 equivalents d'HBTU en la mínima quantitat possible de DMF. Tot seguit s'addiciona DIPEA (3 equivalents) i la barreja s'afegeix sobre la resina. Un cop transcorregudes entre 3 i 5 h es realitza l'assaig de ninhidrina (en cas de fer l'acoblament sobre una amina primària) o el test del cloranil (en cas de fer l'acoblament sobre una amina secundària). En el cas que l'assaig continuï donant positiu s'aceta amb una dissolució d'anhidrid acètic i piridina (1:1) o mitjançant Ac_2O / DIPEA / DMF / CH_2Cl_2 (1:1:8:8) (1 x 2 min + 2 x 10 min) per tal de dur a terme el bloqueig de les amines lliures no reaccionades.

VIII.1.7.3. Cicles de desprotecció

El tractament utilitzat en l'etapa d'eliminació del grup protector temporal Fmoc s'ha realitzat utilitzant Piperidina / DMF (3:7) (2 + 8 min), i a continuació es renta amb DMF (6 x 1 min).

Etapa	Reactiu, solvent	Temps (min)
1	Fmoc-Gly-OH (24) o Fmoc-T β EtAla-OH (3) / DIEA / HBTU (1:1:1)	1 x (120-300)
Acoblament	en DMF	
2	DMF	6 x 1
Rentat		
3	Piperidina - DMF (3:7) t.a.	1 x 2
Desprotecció		1 x 8
4	DMF	6 x 1
Rentat		

Cicles d'acoblament / desprotecció.

VIII.1.7.4. Desancorament del pèptid

Per tal d'obtenir els nucleopèptids lliures s'ha procedit al seu desancorament de l'espaiador mitjançant tractaments successius amb TFA-H₂O (19:1) a temperatura ambient (1 x 10 min + 1 x 2 h) i agitant periòdicament la suspensió. Es recull el filtrat i s'evapora sota un corrent de nitrogen, el residu obtingut es dissol amb àcid acètic al 10 %, es congela i liofilitza per donar el nucleopèptid. El producte obtingut s'analitza la seva homogeneïtat per HPLC i s'identifica per MS.

VIII.1.8. Síntesi de H-Tet β Ala-Tet β Ala-Gly-NH₂ (**23**)

Partint de resina Fmoc-PAL-PEG-PS (100 mg, 0.016 mmols), s'han incorporat mitjançant el procediment general descrit anteriorment 14.26 mg de Fmoc-Gly-OH o 22.2 mg Fmoc-Tet β Ala-OH (**3**), emprant en cada cas 18 mg HBTU i 8.36 μ l de DIEA. L'anàlisi del cru de desancorament confirma l'obtenció del producte (**23**) amb una puresa del 91 %.

Anàlisi del cru de desancorament final:**HPLC:** $t_R = 10.3$ min. **MS:** m/z : $[M+H]^+$ 521.2.**VIII.1.9. Síntesi de H-Tet β Ala-Gly-Tet β Ala-Gly-Tet β Ala-Gly-NH₂ (25)**

Partint de resina Fmoc-PAL-PEG-PS (300 mg, 0.048 mmols), s'han incorporat mitjançant el procediment general descrit anteriorment 42.77 mg de Fmoc-Gly-OH o 66.7 mg Fmoc-Tet β Ala-OH (**3**), emprant en cada cas 54.6 mg HBTU i 24.65 μ l de DIEA. L'anàlisi del cru de desancorament confirma l'obtenció del producte (**25**) amb una puresa del 85 %

Anàlisi del cru de desancorament final:**Fmoc protegit:** **HPLC:** $t_R = 16.07$ min. **MS:** m/z : $[M+H]^+$ 1079.6.**Desprotegit:** **MS:** m/z : $[M+Na]^+$ 881.0. **MS:** m/z : $[M+K]^+$ 897.0.**VIII.1.10. Síntesi de H-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-Tet β Ala-NH₂ (27)**

Partint de resina Fmoc-PAL-PEG-PS (300 mg, 0.048 mmols), s'han incorporat mitjançant el procediment general descrit anteriorment 66.7 mg de Fmoc-Tet β Ala-OH (**3**), emprant en cada cas 54.6 mg HBTU i 24.65 μ l de DIEA. L'anàlisi del cru de desancorament confirma l'obtenció del producte (**27**) amb una puresa del 90 %

Anàlisi del cru de desancorament final:**HPLC:** $t_R = 16.3$ min. **MS:** m/z : $[M+Na]^+$ 1379.0. **MS:** m/z : $[M+K]^+$ 1395.0.

VIII.2. Capítol 2. Preparació de monòmers de PNA TCP protegits i aplicació a la síntesi d'oligòmers

VIII.2.1. Protecció fallida del monòmer de PNA d'adenina amb irradiació microones a 285 W

Dins un baló de 25 mL es tracta 0.1 g de BOC-A(Z)-OH amb 5 mL de TFA-H₂O (19:1). La mescla de reacció s'agita a temperatura ambient durant 1 hora i 30 min., s'evapora sota pressió reduïda i el residu obtingut es tracta amb 2 x 10 ml de AcOEt destil·lat i 2 x 10 ml de Et₂O destil·lat, eliminant en cada cas el dissolvent sota pressió reduïda per tal d'arrossegar les restes de TFA. El producte s'asseca a la línia de buit. El residu sòlid obtingut es tracta amb 0.0596 g d'anhídrid tetracloroftàlic (1.1 equivalents) i 1.7 mL de DMF, el baló es tapa amb un embut i es col·loca dins del forn microones. S'irradia durant 3 min. a 285 W, amb fraccions de 20 segons. Després de cada minut la mescla de reacció s'analitza per cromatografia en capa prima per tal de detectar la total consumició dels reactius. El baló es treu del forn microones i la mescla es deixa refredar fins a temperatura ambient. Seguidament s'afegeixen 30 mL d'aigua destil·lada freda. El precipitat format es deixa 2 hores a 4 °C, es filtra amb placa filtrant i es renta tres cops amb aigua freda. El producte s'asseca a la línia de buit. S'obté 0.094 g d'un sòlid que correspon a una barreja de subproductes.

VIII.2.2. Protecció fallida del monòmer de PNA de citosina amb irradiació microones a 80 W

Dins un baló de 25 mL es tracta 0.1 g de BOC-C(Z)-OH amb 5 mL de TFA-H₂O (19:1). La mescla de reacció s'agita a temperatura ambient durant 1 hora i 30 min., s'evapora sota pressió reduïda i el residu obtingut es tracta amb 2 x 10 ml de AcOEt destil·lat i 2 x 10 ml de Et₂O destil·lat, eliminant en cada cas el dissolvent sota pressió reduïda per tal d'arrossegar les restes de TFA. El producte s'asseca a la línia de buit. El residu sòlid es tracta amb 0.062 g d'anhídrid tetracloroftàlic (1.1 equivalents) i 1.7 mL de DMF, el baló es tapa amb un embut i es col·loca dins del forn microones. S'irradia durant 3 min. a 80 W, amb fraccions de 20 segons. Després de cada minut la mescla de reacció

s'analitza per cromatografia en capa prima per tal de detectar la total consumició dels reactius. El baló es treu del forn microones i la mescla es deixa refredar fins a temperatura ambient. Seguidament s'afegeixen 30 mL d'aigua destil·lada freda. El precipitat format es deixa 2 hores a 4 °C, es filtra amb placa filtrant i es renta tres cops amb aigua freda. El producte s'asseca a la línia de buit. S'obté 0.086 g d'un sòlid que correspon a una barreja de subproductes.

VIII.2.3. Protecció fallida del monòmer de PNA d'adenina a reflux

Dins un baló de 25 mL es tracta 0.1 g de BOC-A(Z)-OH amb 5 mL de TFA- H₂O (19:1). La mescla de reacció s'agita a temperatura ambient durant 1 hora i 30 min., s'evapora sota pressió reduïda i el residu obtingut es tracta amb 2 x 10 ml de AcOEt destil·lat i 2 x 10 ml de Et₂O destil·lat, eliminant en cada cas el dissolvent sota pressió reduïda per tal d'arrossegar les restes de TFA. El producte s'asseca a la línia de buit. Al residu s'afegeixen 21 µl (1 equivalent) de TEA i 0.0596 g (1.1 equivalent) de TCPO i s'agita fins a dissolució completa, llavors s'afegeixen 5 ml de CH₂Cl₂ i es porta la reacció a reflux durant 20 hores. S'afegeixen 5 mL d'anhídrid d'àcid acètic mantenint la reacció a reflux durant 2.5 hores més. S'elimina el dissolvent per evaporació i s'afegeixen 15 mL d'HCl 0.1 M, es refreda al bany de gel i es filtra al buit alhora que es renta amb HCl 0.05 M i amb aigua freda. S'obté 0.073 g d'un sòlid que correspon a una barreja de subproductes.

VIII.2.4. Procediment general de la protecció dels monòmers de PNA amb el grup TCP

Dins un baló de 25 mL es tracta 0.1 g de monòmer BOC protegit (BOC-A(Z)-OH, BOC-G(Z)-OH o BOC-C(Z)-OH) amb 5 mL de TFA-H₂O (19:1). La mescla de reacció s'agita a temperatura ambient durant 1 hora i 30 min., s'evapora sota pressió reduïda i el residu obtingut es tracta amb 2 x 10 ml de AcOEt destil·lat i 2 x 10 ml de Et₂O destil·lat, eliminant en cada cas el dissolvent sota pressió reduïda per tal d'arrossegar les restes de TFA. El producte s'asseca a la línia de buit. El residu es dissol amb 5 mL de piridina i es tracta amb 1.1 equivalents de TCPO durant 5 hores a temperatura ambient. A continuació,

s'addicionen 5 mL d'anhídrid d'àcid acètic i la reacció es continua durant 2 hores. Finalment la barreja es passa a un erlenmeyer de 100 mL i es tracta amb una dissolució d'HCl 1N fins que el pH conjunt de la barreja arriba a pH 2.

Totes les reaccions s'han controlat per TLC (MeOH:AcOEt:AcOH, 6:4:1) i els grups amino s'han detectat amb ninhidrina.

TCP-G (Z)-OH (31): S'ha obtingut un sòlid groguenc amb un 93 % de rendiment, un 97 % de puresa.

TLC: R.f. = 0.71.

HPLC: t_R = 19.91 min.

ESI-MS: calculat per a $C_{27}H_{19}Cl_4N_7O_8$, 711.29; trobat: m/z 711.6 $[M+H]^+$.

1H -RMN (200 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.765 (d, J=3 Hz, 2H, CH_2), 3.95 (t, J=3 Hz, 2H, CH_2), 4.1 (s, 1H, CH_2), 4.41 (s, 1H, CH_2), 4.93 (s, 1H, CH_2), 5.22 (s, 1H, CH_2), 5.27 (s, 2H, CH_2), 7.274 (d, J=4 Hz, 2H, CH), 7.327 (t, J=3 Hz, 2H, CH), 7.405 (t, J=3.4 Hz, 1H, CH), 7.726 (s, 0.5H, CH), 7.934 (s, 0.5H, CH), 12.83 (s, 1H, OH).

^{13}C -RMN (50 MHz, DMSO- d_6) δ : 36.243, 37.014 (CH_2), 44.163 (CH_2), 45.633, 46.123, (CH_2), 48.613, 49.788 (CH_2), 67.609 (CH_2), 127.695, 127.831, 128.392, 128.462, 128.704, 128.891 (Carom), 135.268, 135.858 (Carom), 138.560, 138.626 (Carom-Cl), 140.441(Carom), 140.953 (Carom-Cl), 145.024 (CO-Carom-N), 147.661 (C-Carom-N), 149.826 (N-C-N), 154.925, 155.002, 155.424 (O-CO-NH), 163.746, 163.835 (NH-C-NH), 167.037 (C-CO-N), 167.908 (N-CO-CH), 170.742 (COOH), 171.168 (NHCOC).

TCP-A(Z)-OH (30): S'ha obtingut un sòlid groguenc amb un 53 % de rendiment, un 95 % de puresa.

TLC: R.f. = 0.91.

HPLC: t_R = 19.657 min.

ESI-MS: calculat per a $C_{27}H_{19}Cl_4N_7O_7$, 695.29; trobat: m/z 695.7 $[M+H]^+$.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆) δ: 3.592 (s, 2H, CH₂), 3.990 (s, 1H, CH₂), 4.089 (s, 1H, CH₂), 4.430 (s, CH₂), 5.132 (s, 1H, CH₂), 5.23 (s, 2H, CH₂), 5.328 (s, 1H, CH₂), 7.455 (m, 5H, CH), 8.273 (s, 1H, CH), 8.394 (m, 1H, NH), 8.822 (s, 1H, CH).

¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆) δ: 35.828, 35.930 (CH₂), 43.877, 44.155 (CH₂), 45.217, 45.269 (CH₂), 48.813, 48.872 (CH₂), 66.369 (CH₂), 128.184, 128.329, 128.753 (Carom), 128.958 (C-Cl), 136.715 (Carom), 138.447 (Carom), 138.595 (C-Cl), 145.325 (N-C-Cl), 145.620 (N-C-N), 149.652 (N-CH-N), 151.386 (O-CO-NH), 152.527 (N-C-N), 163.654, 163.975 (CO), 165.098, 167.763 (CH-CO-N), 170.561, 170.993 (COOH).

TCP-C(Z)-OH (32): S'ha obtingut un sòlid groguenc amb un 74 % de rendiment, un 96 % de puresa.

TLC: R.f. = 0.62.

HPLC: t_R = 21.12 min.

ESI-MS: calculat per a C₂₆H₁₉Cl₄N₅O₈, 671.27; trobat: m/z 671.7 [M+H]⁺.

¹H-RMN (200 MHz, DMSO-d₆) δ: 3.74 (t, J=6.4 Hz, 2H, CH₂), 3.924 (s, 2H, CH₂), 4.086 (s, 2H, CH₂), 4.32 (s, 1H, CH₂), 4.598 (s, 1H, CH₂), 4.739 (s, 1H, CH), 5.198 (s, 2H, CH₂), 6.979 (m, 1H, NH), 7.407 (m, 5H, CH), 7.930 (dd, 1H, CH).

¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆) δ: 36.171, 36.654 (CH₂), 45.339 (CH₂), 47.537 (CH₂), 49.324, 49.936 (CH₂), 66.922 (CH₂), 94.254 (NH-C-N), 128.310, 128.364, 128.459, 128.583, 128.932, 129.251 (CH, Carom), 136.445 (CH, Carom), 138.342 (Carom), 138.484 (Carom), 150.882, 151.473 (Carom), 153.624 (CH), 155.276 (CO), 163.511, 163.679, 163.796 (C-Cl), 164.243 (CO), 167.433, 168.36 (CO), 170.751 (CO), 171.119 (CO).

VIII.2.5. Procediment per a la síntesi de PNAs en fase sòlida amb el grup TCP

Totes les operacions realitzades amb resines durant la síntesi de PNAs en fase sòlida s'han dut a terme manualment en xeringues de polipropilè de 1 mL, d'acord amb la metodologia general detallada per la SPPS a l'apartat VIII.1.7.

En cada cas s'ha partit de 44 mg d'una resina MBHA amb una funcionalització de 0.3 mmols de NH_2 per 100 g de resina (NH_2 -MBHA-PS).

Per aconseguir un bon inflament de la resina es tracta amb CH_2Cl_2 (3 x 1 min) i amb DMF (3 x 1 min). S'acobra l'espaiador bifuncional Fmoc-RINK-OH (4 equivalents), en presència de quantitats equivalents d'HBTU i DIEA, dissolts en la mínima quantitat de NMP. Es deixa reaccionant la mescla fins obtenir assaig de ninhidrina negatiu. Finalment es renta la resina amb NMP (3 x 1 min) i CH_2Cl_2 .

Després de la desprotecció del grup Fmoc s'acoblen TCP-Gly-OH o TCP-X-OH (3 equivalents) amb quantitats equivalents d'HBTU i DIEA dissolts en la mínima quantitat possible de NMP. Un cop transcorregudes 4 h, es realitza l'assaig de ninhidrina. En el cas que l'assaig continuï donant positiu es continua la reacció fins que aquest doni negatiu. El tractament utilitzat durant l'etapa de desprotecció del grup protector temporal TCP es realitza amb un tractament d'etilendiamina-NMP (1:199) a 40 °C i durant 2 hores.

El protocol seguit per l'acoblament de cada aminoàcid o PNA protegit s'ha realitzat mitjançant el mètode que es detalla a continuació:

Etapa	Reactiu, solvent	Temps (min)
1	TCP-X-OH o TCP-Gly-OH / DIEA / HBTU (1:1:1)	1 x (240)
Acoblament	en NMP	
2	NMP	3 x 1
Rentat	CH_2Cl_2	3 x 1
	NMP	3 x 1
3	Etilendiamina - NMP (1:199), 40 °C	1 x 2
Desprotecció		1 x 90
4	NMP	3 x 1
Rentat	CH_2Cl_2	3 x 1
	NMP	3 x 1

Per tal d'obtenir els nucleopèptids lliures s'ha procedit al desancorament de l'espaiador mitjançant tractaments successius amb TFA-H₂O (19:1) a temperatura ambient (1 x 2 min + 1 x 2 h) i agitant periòdicament la suspensió. El reactiu s'evapora sota corrent de nitrogen i es redissolt amb una barreja de metanol-acetonitril i s'analitza per HPLC.

Anàlisi de TCP-A(Z)-Gly-NH₂ (33)

HPLC: t_R min 5.412 (λ 220 nm una puresa del 91 %; λ 265 nm una puresa del 86 %; λ 335 nm una puresa del 88%).

Anàlisi de NH₂-A(Z)-Gly-NH₂ (36)

HPLC: t_R min 3.687 (λ 220 nm una puresa del 79 %; λ 265 nm una puresa del 89%).

Anàlisi de TCP-C(Z)-Gly-NH₂ (34)

HPLC: t_R min 5.684 (λ 220 nm una puresa del 82 %; λ 265 nm una puresa del 77 %; λ 335 nm una puresa del 85 %).

Anàlisi de TCP-C(Z)-T-Gly-NH₂ (35)

HPLC: t_R min 5.435 (λ 220 nm una puresa del 79 %; λ 265 nm una puresa del 80 %; λ 335 nm una puresa del 70 %).

VIII.3. Capítol 3. Prospecció de nous agents antimicrobians en el control del foc bacterià causat per *Erwinia amylovora*

VIII.3.1. Protecció de l'àcid màlic amb el grup *p*-metoxibenzil

Dins un baló de dos boques de 25 mL de capacitat, sota atmosfera de nitrogen i en un bany de gel, s'afegeixen 5.056 mL (35.80 mmols) d'anhídrid trifluoroacètic. Es refreda el baló a 0 °C i amb constant agitació magnètica s'afegeixen 2 g (14.92 mmols) d'àcid màlic. Es manté la reacció a 0 °C amb forta agitació fins a dissolució completa de l'àcid màlic i es concentra la dissolució a pressió reduïda per evaporació del dissolvent, sense sobrepassar els 30 °C. S'afegeixen 4.996 mL (35.80 mmols) de trietilamina i 6.138 mL (49.22 mmols) d'alcohol *p*-metoxibenzílic i es deixa agitant a temperatura ambient tota la nit. Es dilueix la reacció amb 70 mL d'AcOEt i es renta cinc vegades amb 25 mL de solució saturada de bicarbonat sòdic. S'ajunten les fases aquoses i s'acidifica amb HCl 1N fins a pH = 2, s'extreu cinc vegades amb 40 mL d'AcOEt i s'asseca aquest amb sulfat de magnesi anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El residu es purifica per columna "flash" amb SiO₂ i hexà/AcOEt com a eluents, obtenint-se 3.53 g d'un oli verdós compost d'una barreja de productes àcid (*S*)-3-(*p*-metoxibenziloxi)carbonil-3-hidroxiopropanoic (**59**), àcid (*Z*)-3-((*p*-metoxibenziloxi)carbonil)acrílic (**60**) i l'àcid (*E*)-3-((*p*-metoxibenziloxi)carbonil)acrílic (**61**).

àcid (*S*)-3-((*p*-metoxibenziloxi)carbonil-3-hidroxiopropanoic (**59**)

TLC: R.f. = 0.44 hexà / AcOEt / AcOH (1:1:0.1).

¹H-RMN (CDCl₃): 2.1 (d, 1H, OH), 2.83-2.91 (m, 2H, CH₂COOH), 3.343 (s, 3H, CH₃O), 4.339-4.655 (d, 1H, CHOH), 5.200-5.214 (d, 2H, CH₂OCO), 6.895-6.953 (m, 2H, CH arom.), 7.292-7.352 (m, 2H, CH arom.).

àcid (*Z*)-3-(((*p*-metoxibenzil)oxi)carbonil)acrílic (**60**)

TLC: R.f. = 0.48 hexà / AcOEt / AcOH (1:1:0.1)

¹H-RMN (CDCl₃): 3.864 (s, 3H, CH₃O), 5.271 (s, 2H, CH₂OH), 6.39 (d, 1H, J=12.7 Hz), 6.363-6.542 (d, 1H, COCH), 6.935-6.978 (d, 2H, CH arom.), 7.302-7.396 (d, 2H, CH arom.).

MS: m/z: [M+H]⁺ 236.8

VIII.3.2. Protecció de l'àcid (S)-3-(*p*-metoxibenziloxi)carbonil-3-hidroxiopropanoic (59), de l'àcid (Z)-3-((*p*-metoxibenziloxi)carbonil)acrílic (60) i de l'àcid (E)-3-((*p*-metoxibenziloxi)carbonil)acrílic (61) amb el grup al·lil

Dins un baló de dos boques de 25 mL de capacitat, sota atmosfera de nitrogen, s'afegeixen els 3.53 g de l'oli obtingut a la reacció anterior i 20 mL de DMF anhidre. A la solució anterior, amb agitació magnètica i a t.a., s'afegeixen 2.27 g (16.42 mmols) de carbonat de potassi, 0.55 g (1.5 mmols) de iodur de tetrabutilamoni i 1.42 mL (16.42 mmols) de 3-bromopropè. Es deixa agitant tota la nit, s'afegeixen 100 mL d'AcOEt i es renta quatre vegades amb solució saturada de clorur sòdic. S'asseca amb sulfat de magnesi anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El residu es purifica per columna "flash" amb SiO₂ i hexà/AcOEt com a eluents, obtenint-se 2.28 g (52 %) del (S)-3-al·liloxicarbonil-2-hidroxiopropanoat de *p*-metoxibenzil (**62**), 0.99 g (24 %) del (Z) 3-al·liloxicarbonilacrilat de *p*-metoxibenzil (**63**) i 0.45 g (11 %) del (E) 3-al·liloxicarbonilacrilat de *p*-metoxibenzil (**64**), tots tres en forma d'oli de color verdós.

(S)-3-(al·liloxi)carbonil-2-hidroxiopropanoat de *p*-metoxibenzil (**62**)

TLC: R.f. = 0.64 hexà / AcOEt / AcOH (1:1:0.1).

HPLC: *t*_R = 20.1.

FTIR: 3700-3200d, 2957.51d, 2839.49d, 2163.36d, 1739.29f, 1613.36d, 1516.17m, 1249.07m, 1173.46m, 1106.94d, 1033.08d, 891.53d, 761.36d.

¹H-RMN (CDCl₃): 2.849-2.903 (m, 2H, CHCH₂COO), 3.228-3.254 (d, 1H, OH), 3.228-3.856 (d, 3H, CH₃O), 4.540-4.608 (m, 1H, COCHOH), 4.616-4.636 (m, 2H, OCH₂CH), 5.204-5.232 (d, 2H, CCH₂O), 5.239-5.369 (m, 1H, CHCH₂), 5.376-5.390 (m, 1H,

CH₂CHCH₂), 5.846-5.926 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 6.904-6.962 (m, 2H, CH arom.), 7.299-7.348 (m, 2H, CH arom.).

¹³C-RMN (CDCl₃): 39.054 (CHCH₂COO), 55.719 (CH₃O), 66.030 (OCH₂CH), 67.741 (CHOH), 68.043 (CCH₂O), 114.449 (CH arom), 119.036 (CHCH₂), 127.51 (CCH₂), 130.759 (CH arom.), 132.136 (CH₂CHCH₂), 160.352 (C arom.), 170.487 (CO), 173.644 (CO).

MS: m/z: [M+H]⁺ 294.3.

(Z)-3-al-liloxicarbonilacrilat de p-metoxibenzil (63)

TLC: R.f. = 0.67 hexà / AcOEt / AcOH (1:1:0.1).

HPLC: t_R = 23.9.

FTIR: 2958.47m, 2925.3m, 2851.64d, 2162.59d, 2072.34d, 1730.23f, 1613.94d, 1516.36m, 1399.49d, 1249.26m, 1208.19m, 1160.17m, 1033.08d, 890.37d, 822.11d.

¹H-RMN (CDCl₃): 3.847 (s, 3H, CH₃O), 4.605-4.670 (m, 2H, OCH₂CH), 5.108-5.19 (m, 2H, CCH₂O), 5.265-5.409 (m, 2H, CH₂), 5.869-5.955 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 6.272-6.299 (s, 2H, COCHCHCO), 6.894-6.952 (d, 2H, CH arom.), 7.302-7.373 (d, 2H, CH arom.).

¹³C-RMN (CDCl₃): 55.247 (CH₃O), 66.834 (OCH₂CH), 66.943 (CCH₂O), 113.932 (CH arom.), 118.822 (CHCH₂), 127.253 (C arom.), 129.759 (CH arom.), 130.043 (CH₂CHCH), 130.351 (CH₂CHCH), 131.529 (CH₂CHCH₂), 159.794 (C arom.), 164.789 (COO), 164.957 (COO).

(E) 3-al-liloxicarbonilacrilat de p-metoxibenzil (64)

TLC: R.f. = 0.62 hexà / AcOEt / AcOH (1:1:0.1).

HPLC: t_R = 25.4.

¹H-RMN (CDCl₃): 3.838 (s, 3H, CH₃O), 4.699-4.733 (dd, 2H, OCH₂CH), 5.023 (s, 2H, CCH₂O), 5.271-5.423 (dt, 2H, CHCH₂), 5.899-5.951 (m, 1H, CHCH₂), 6.924-6.944 (s, 2H, CHCH), 6.91-6.951 (s, 2H, CH arom.), 7.328-7.371 (s, CH arom.).

¹³C-RMN (CDCl₃): 55.2367 (CH₃O), 65.811 (OCH₂CH), 66.924 (CCH₂O), 113.987 (CH arom.), 118.801 (CHCH₂), 127.296 (C arom.), 130.209 (CH arom.), 131.419 (CH₂CH), (CHCH), 133.508 (CHCH), 159.819 (C arom.), 164.481 (CO), 164.718 (CO).

VIII.3.3. Obtenció del (S)-3-al-liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (65)

Dins un baló de 25 mL, sota atmosfera de nitrogen i amb agitació magnètica, es dissolen 2 g (6.8 mmols) del (S)-3-al-liloxicarbonil-2-hidroxiopropanoat de *p*-metoxibenzil (62) en 15 mL de diclorometà anhidre. Es refreda la solució anterior a -78 °C en un bany d'acetona/CO₂, i s'hi afegeixen 1.029 mL (8.83 mmols) de 2.6-lutidina, seguidament i durant 2 hores s'afegeixen 1.372 mL (8.16 mmols) d'anhídrid triflic. Dins un altre baló apart de 2 boques, 10 mL de capacitat i sota atmosfera de nitrogen, es dissolen 5.4 mL (27.18 mmols) de 15-corona-5 en 20 mL de DMF anhidre, tot seguit i mantenint una forta agitació magnètica, s'afegeixen 1.9 g (27.18 mmols) de tiometòxid sòdic. Aquesta última dissolució s'afegeix a la primera en petites proporcions i mitjançant una xeringa, sempre mantenint l'atmosfera inert. Es deixa agitant tota la nit, s'afegeixen 200 mL d'èter i es renta quatre vegades amb 25 mL d'una solució d'àcid clorhídric 1N. S'asseca amb sulfat de magnesi anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El residu es purifica per columna "flash" amb SiO₂ i hexà/AcOEt com a eluents, obtenint-se 1.47 g (67 %) del (R)-3-(al-liloxi)carbonil-2-metilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (65) i 0.26 g (12 %) 3-al-liloxicarbonil-2-cloropropanoat de *p*-metoxibenzil (68), tots dos s'obtenen com a un oli verdós.

(R)-3-(al-liloxi)carbonil-2-metilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (65)

TLC: R.f. = 0.56 hexà / AcOEt (2:1).

HPLC: *t*_R = 23.9.

FTIR: 2954.23m, 2922.03f, 2851.64m, 2162.21d, 1731.00f, 1613.17d, 1515.39m, 1461.78d, 1377.12d, 1297.48d, 1248.49f, 1202.79d, 1153.42f, 1033.47d, 988.34d, 889.8d, 822.11d.

¹H-RMN (CDCl₃): 2.153-2.148 (s, 3H, CH₃S), 2.767-3.151 (2dd, 2H, CHCH₂COO), 3.655-3.732 (dd, 1H, CHS), 3.843-3.848 (s, 3H, CH₃O), 4.584-4.596 (d, 2H, OCH₂CH), 5.192 (s, 2H, CCH₂O), 5.093-5.385 (m, 2H, CHCH₂), 5.838-5.924 (m, 1H, CHCH₂), 6.902-6.956 (d, 2H, CH arom.), 7.300-7.368 (d, CH arom.).

¹³C-RMN (CDCl₃): 13.905 (CH₃S), 35.85 (CHCH₂COO), 42.252 (CHS), 55.224 (CH₃O), 65.819 (OCH₂CH), 66.854 (CCH₂), 113.978 (CH arom.), 118.814 (CHCH₂), 127.707 (C arom.), 130.031 (CH arom.), 133.761 (CHCH₂), 159.649 (C arom.), 170.188 (CO), 171.027 (CO).

MS: m/z: [M⁺H] 324.9.

3-al·liloxicarbonil-2-cloroproanoat de *p*-metoxibenzil (68)

TLC: R.f. = 0.33 hexà / AcOEt (2:1).

HPLC: *t*_R = 20.2.

¹H-RMN (CDCl₃): 3.282 (d, 2H, CHCH₂COO), 3.848 (s, 3H, CH₃O), 4.636-4.607 (d, 2H, OCH₂CH), 4.742-4.671 (t, 1H, CHCl), 5.198 (s, 2H, CCH₂CO), 5.427-5.249 (m, 2H, CH₂CHCH₂), 6.003-5.808 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 6.968-6.910 (d, 2H, CH arom.), 7.378-7.302 (d, 2H, CH arom.).

¹³C-RMN (CDCl₃): 39.960 (CHClCH₂), 51.834 (CHClCH₂), 55.703 (CH₃O), 66.225 (OCH₂CH), 68.314 (CCH₂O), 114.40 (CH arom.), 119.175 (CHCH₂), 127.421 (C arom.), 130.613 (CH arom.), 131.936 (CHCH₂), 160.321 (C arom.), 168.814 (CO), 169.239 (CO).

VIII.3.4. Síntesi de (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-isobutilsulfanil-proanoat de *p*-metoxibenzil (66)

Dins un baló de 25 mL, sota atmosfera de nitrogen i amb agitació magnètica, es dissolen 2 g (6.8 mmols) del (*S*)-3-al·liloxicarbonil-2-hidroxioproanoat de *p*-metoxibenzil (**62**) en 15 mL de diclorometà anhidre. Es refreda la solució anterior a -78 °C en un bany d'acetona/CO₂, i s'hi afegeixen 1.029 mL (8.83 mmols) de 2.6-lutidina, seguidament i durant 2 hores s'afegeixen 1.4 mL (8.16 mmols) d'anhídrid triflic. Un cop afegit aquest últim reactiu, s'afegeixen també 3.2 mL (27.18 mmols) de 2,6-lutidina i 2.95 mL (27.18

mmols) de tioisobutà. Es deixa agitant tota la nit, s'afegeixen 200 mL d'èter i es renta quatre vegades amb 25 mL d'una solució d'àcid clorhídric 1N. S'asseca amb sulfat de magnesi anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El residu es purifica per columna "flash" amb SiO₂ i hexà/AcOEt com a eluents, obtenint-se 0.42 g (17 %) del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-isobutilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**66**) i 1.11 g (52 %) de 3-al·liloxicarbonil-2-cloropropanoat de *p*-metoxibenzil (**68**) tots els productes s'obtenen com a un oli verdós.

(*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-isobutilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (66**)**

TLC: R.f. = 0.74 hexà / AcOEt (2:1).

HPLC: t_R = 29.16.

¹H-RMN (CDCl₃): 0.936-1.040 (dd, 6H, (CH₃)₂CH), 1.804 (sept, 1H, (CH₃)₂CH), 2.470-2.575 (m, 2H, CH₂S), 2.764-3.045 (2dd, 2H, CHCH₂COO), 3.688-3.746 (dd, 1H, SCHCH₂), 3.851 (s, 3H, CH₃O), 4.575-4.617 (m, 2H, OCH₂CH), 5.089-5.127 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 5.198-5.288 (m, 2H, CCH₂O), 5.298-5.430 (m, 1H, 1H, CH₂CHCH₂), 5.89 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 6.897-6.958 (d, 2H, CH arom.), 7.293-7.378 (d, 2H, CH arom.) .

¹³C-RMN (CDCl₃): 22.436 (CH₃CH), 28.755 (CH₃CH), 37.076 (CHCH₂CO), 40.611 (CHCH₂), 42.162 (COCHCH₂), 55.699 (CH₃O), 66.278 (OCH₂CH), 67.008 (CCH₂O), 114.458 (CH arom.), 119.273 (CHCH₂) 128.202 (C arom.), 130.555 (CH arom.), 131.881 (CH₂CHCH₂), 160.288 (C arom.), 170.702 (CO), 172.008 (CO).

VIII.3.5. Síntesi de (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanil-propanoat de *p*-metoxibenzil (67**)**

Dins un baló de 25 mL, sota atmosfera de nitrogen i amb agitació magnètica, es dissolen 2 g (6.8 mmols) del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-hidroxipropanoat de *p*-metoxibenzil (**62**) en 15 mL de diclorometà anhidre. Es refreda la solució anterior a -78 °C en un bany d'acetona/CO₂, i s'hi afegeixen 1.029 mL (8.83 mmols) de 2.6-lutidina, seguidament i durant 2h s'afegeixen 1.4 mL (8.16 mmols) d'anhídrid triflic. Un cop afegit aquest últim reactiu, s'afegeixen també 3.2 mL (27.18 mmols) de 2,6-lutidina i 2.79 mL (27.18 mmols) de tiofenol. Es deixa agitant tota la nit, s'afegeixen 200 mL d'èter i es renta quatre vegades

amb 25 mL d'una solució d'àcid clorhídric 1N. S'asseca amb sulfat de magnesi anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El residu es purifica per columna "flash" amb SiO₂ i hexà/AcOEt com a eluents, obtenint-se 2.28 g (87 %) del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**67**) i 0.15 g (7 %) de 3-al·liloxicarbonil-2-cloropropanoat de *p*-metoxibenzil (**68**) tots els productes s'obtenen com a un oli verdós.

(*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (67**)**

TLC: R.f. = 0.69 hexà / AcOEt / AcOH (6:4:0.5).

HPLC: $t_R = 29.31$.

FTIR: 3073.95d, 3005.72d, 2957.12d, 2914.7d, 2849.71d, 2186.5d, 2162.98d, 2051.13d, 1734.08f, 1613.17d, 1515.59m, 1248.88m, 1154.77m, 1052.94d, 892.11d, 823.65d.

¹H-RMN (CDCl₃): 3.004-2.747 (m, 2H, CHCH₂COO), 3.8856 (s, 3H, CH₃O), (m, 1H, SCH), 4.609-4.559 (m, 2H, CH₂CHCH₂), 5.379-5.066 (m, 2H, CH₂CHCH₂), 5.128 (s, 2H, CCH₂O), 5.881-5.829 (CH₂CHCH₂), 6.934-6.868 (m, 2H, CH arom.), 7.418-7.228 (m, 7H, CH arom.).

¹³C-RMN (CDCl₃): 36.442 (CHCH₂CO), 45.603 (SCH), 55.238 (CH₃O), 65.557 (OCH₂CH), 66.957 (CCH₂O), 113.805 (CH arom.), 118.504 (CH₂CHCH₂), 127.504 (C arom.), 128.69 (CHCHCH₂), 128.98 (CH arom.), 130.167 (CH arom.), 131.425 (CH arom.), 131.692 (C arom.), 134.25 (CH arom.), 159.644 (C arom.), 170.090 (CO), 170.821 (CO).

MS: m/z: [M+H]⁺ 387.2.

VIII.3.6. Monooxidació del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (65**)**

Dins un baló de dues boques de 50 mL de capacitat es dissolen 0.2 g (0.62 mmols) del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**65**) en 20 mL de diclorometà anhidre. A la solució anterior s'afegeix, amb agitació magnètica i a 0 °C, 0.152 g

(0.68 mmols) de mCPBA del 77 % de puresa. S'agita 30 min. més, mantenint la reacció a 0 °C, i s'afegeixen 5 mL de solució saturada de tiosulfat sòdic i es deixa agitant 30 min., passat aquest temps, s'afegeixen 80 mL de cloroform i es renta una vegada amb 20 mL d'aigua i cinc vegades més amb 15 mL d'una solució saturada de bicarbonat sòdic. S'asseca amb sulfat de magnesi anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El residu es purifica per columna "flash" amb SiO₂ i hexà/AcOEt com a eluents, obtenint-se 0.176 g (84 %) del (±)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfinilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**69**) en forma d'oli de color verdós.

(±)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfinilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**69**)

TLC: R.f. = 0.06 hexà / AcOEt / AcOH (2:14).

HPLC: $t_R = 20.3$.

¹H-RMN (CDCl₃): 2.414-2.726 (d, 3H, CH₃S), 2.125 (d, 2H, CHCH₂CO), 3.794 (s, 3H, CH₃O), 3.914-4.237 (dt, 1H, CHS), 4.556-4.687 (m, 2H, OCH₂CH), 5.114-5.127 (d, 2H, CCH₂O), 5.054-5.338 (m, 2H, CH₂CHCH₂), 5.761-5.927 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 6.853-6.896 (d, 2H, CH arom.), 7.252-7.312 (d, 2H, CH arom.).

¹³C-RMN (CDCl₃): 30.311-28.231 (CHCH₂CO), 39.620-35.649 (CH₃S), 55.666 (CH₃O), 63.459-60.117 (CHS), 67.422-66.330 (OCH₂CH), 68.234-68.144 (CCH₂O), 114.438 (CH arom.), 119.074 (CHCH₂), 127.303-127.210 (C arom.), 130.872-130.773 (CH arom.), 131.962 (CH₂CHCH₂), 160.358 (C arom.), 167.501-166.511 (CO), 170.567-170.400 (CO).

VIII.3.7. Dioxidació del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**65**) i del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**67**)

Dins un baló de dues boques de 50 mL de capacitat es dissolen 0.3 g (0.92 mmols) del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**65**) o 0.36 g (0.92 mmols) del (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**67**) en 20 mL de diclorometà anhidre. A la solució anterior s'afegeix, amb agitació magnètica i a 0 °C, 0.456 g (2.024 mmols) de mCPBA del 77 % de puresa. S'agita 4 hores més, mantenint la

reacció a 0 °C, i s'afegeixen 5 mL de solució saturada de tiosulfat sòdic i es deixa agitant 30 min., passat aquest temps, s'afegeixen 180 mL de cloroform i es renta una vegada amb 10 mL d'aigua i cinc vegades més amb 25 mL d'una solució saturada de bicarbonat sòdic. S'asseca amb sulfat de magnesi anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El residu es purifica per columna "flash" amb SiO₂ i hexà/AcOEt com a eluents, obtenint-se 0.22 g (66 %) del (±)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfonilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**70**) o 0.23 g (70 %) del (±)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfonilpropanoat de *p*-metoxibenzil (**71**), tots dos s'obtenen en forma d'oli de color verdós.

(±)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfonilpropanoat de *p*-metoxibenzil (70)

TLC: R.f. = 0.23 AcOEt / AcOH (5:0.1).

HPLC: $t_R = 22.7$.

¹H-RMN (CDCl₃): 3.021 (s, 3H, CH₃SO₂), 3.021-3.217 (d, 2H, CHCH₂CO), 3.818 (s, 3H, CH₃O), 4.355-4.428 (dd, 1H, CHS), 4.568-4.596 (OCH₂CH), 5.115-5.226 (t, 1H, CH₂CHCH₂), 5.266 (s, 2H, CH₂CHCH₂), 5.324-5.358 (dd, 1H, CH₂CHCH₂), 5.795-5.880 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 6.887-6.930 (d, 2H, CH arom.), 7.298-7.341 (d, 2H, CH arom.).

¹³C-RMN (CDCl₃): 30.168 (CHCH₂CO), 41.122 (CH₂SO₂), 55.68 (CH₃O), 65.354 (CHSO₂), 66.528 (OCHCH₂), 68.853 (CCH₂O), 114.492 (CH. arom.), 119.198 (CH₂CHCH₂), 126.924 (C arom.), 130.804 (C arom.), 131.858 (CH₂CHCH₂), 160.440 (C arom.), 165.43 (CO), 169.72 (CO).

(±)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfonilpropanoat de *p*-metoxibenzil (71)

TLC: R.f. = 0.72 Hexà / AcOEt / AcOH (1:1:0.1).

¹H-RMN (CDCl₃): 3.177-3.214 (d, 2H, CHCH₂CO), 3.86 (s, 3H, CH₃O), 4.463-4.567 (t, 1H, CHSO₂), 4.590-4.602 (d, 1H, OCH₂CH), 5.058-5.082 (dd, 2H, CCH₂O), 5.209-5.368 (m, 2H, CHCH₂), 5.804-5.856 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 6.883-6.927 (d, 2H, CH arom.), 6.927-7.782 (m, 7H, arom.).

VIII.3.8. Procediment general d'eliminació del grup *p*-metoxibenzil

Dins un baló de 25 mL de capacitat, amb constant agitació magnètica, es dissolen 3.26 mmols de reactiu a desprotegir en 4 mL de dissolució de 10 % de TFA en diclorometà. Es manté l'agitació magnètica, a t.a., durant una hora, es dilueix la reacció amb 100 mL d'èter i es renta cinc vegades amb 25 mL de solució saturada de bicarbonat sòdic. S'ajunten les fases aquoses i s'acidifica amb HCl 1N fins a pH = 1, s'extreu cinc vegades amb 40 mL d'AcOEt i s'asseca aquest amb sulfat de magnesi anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda.

VIII.3.8.1. Síntesi de l'àcid (Z)-3-(al·liloxi)carbonilacrílic (58) a partir del (Z)-3-(al·liloxicarbonil)acrilat de *p*-metoxibenzil (63)

S'obtenen 0.464 g (91 % de rendiment) de l'àcid (Z)-3-(al·liloxi)carbonilacrílic (58) en forma d'oli verdós.

TLC: R.f. = 0.26 Hexà / AcOEt / AcOH (1:1:0.1).

HPLC: $t_R = 14$.

FTIR: 3081.51d, 2951.34d, 2656.67d, 2162.78d, 1832.44d, 1709.21f, 1642.67m, 1410.48m, 1208.57f, 1164.02f, 988.73d, 938.01d, 855.28d, 820.56d.

¹H-RMN (CDCl₃): 4.75-4.79 (d, 2H, CH₂CHCH₂), 5.31-5.46 (m, 2H, CH₂CHCH₂), 5.90-5.99 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 6.42-6.44 (d, 2H, CHCH), 11.39 (s, 1H, OH).

¹³C-RMN (CDCl₃): 67.453 (OCH₂CH), 120.374 (CH₂CHCH₂), 130.470 (CHCH), 131.042 (CHCH), 134.208 (CH₂CHCH₂), 167.000 (CO), 167.000 (CO).

VIII.3.8.2. Síntesi de l'àcid (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoic (48) a partir del (*R*) 3-al·liloxicarbonil-2-metilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (65)

S'obtenen 0.6 g (90 % de rendiment) de l'àcid (*R*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-metilsulfanilpropanoic (48) en forma d'oli verdós.

TLC: R.f. = 0.51 Hexà / AcOEt (2:1).

HPLC: t_R = 16.15.

¹H-RMN (CDCl₃): 2.257 (s, 3H, CH₃S), 2.725-3.194 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 3.524-3.699 (m, 1H, CHS), 4.625-4.648 (s, 2H, CHCH₂CO), 5.25-5.384 (t, 2H, OCHCH₂), 5.850-5.983 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 8.91 (s, 2H, OH).

¹³C-RMN (CDCl₃): 14.724 (CH₃S), 36.06 (CH₂CH₂CO), 42.663 (SCH), 66.148 (OCH₂CH), 119.018 (CH₂CHCH₂), 132.044 (CH₂CHCH₂), 170.722 (CO), 177.326 (CO).

VIII.3.8.3. Síntesi de l'àcid (±)-3-(al·liloxi)carbonil-2-metilsulfonilpropanoic (50) a partir del (±)-3-(al·liloxi)carbonil-2-metilsulfonilpropanoat de *p*-metoxibenzil (70)

S'obtenen 0.71 g, (92% de rendiment) de l'àcid (±)-3-(al·liloxi)carbonil-2-metilsulfonilpropanoic (50) en forma d'oli verdós.

TLC: R.f. = 0.09 AcOEt / AcOH (2:0.1).

¹H-RMN (CDCl₃): 3.174-3.241 (d, 2H, CHCH₂CO), 3.218 (s, 3H, CH₃SO₂), 4.427-4.499 (t, 1H, SCH), 4.659-4.687 (d, 2H, CH₂CHCH₂), 5.271-5.412 (dt, 2H, CH₂CHCH₂), 5.836-6.02 (m, 1H, OCH₂CH), 8.543 (s, 1H, OH)

¹³C-RMN (CDCl₃): 30.114 (CHCH₂CO), 41.35 (CH₃SO₂), 65.148 (CHSO₂), 66.889 (OCH₂CH), 119.504 (CHCH₂), 131.669 (CHCH₂), 168.778 (CO), 170.141 (CO).

VIII.3.8.4. Síntesi de l'àcid (*R*)-3-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoic (51) a partir del (*R*)-3-(al·liloxi)carbonil-2-fenilsulfanilpropanoat de *p*-metoxibenzil (67)

S'obtenen 0.82 g, (94% de rendiment) de àcid (*S*)-4-al·liloxicarbonil-2-fenilsulfanilpropanoic (**51**) en forma d'oli verdós.

TLC: R.f. = 0.63 Hexà / AcOEt / AcOH (1:1:0.1).

FTIR: 3081.51d, 2951.34d, 2656.67d, 2162.78d, 1832.44d, 1709.21f, 1642.67m, 1410.48m, 1410.48m, 1208.57f, 1164.02f, 988.73d, 938.01d, 855.28d, 855.28d, 820.56d.

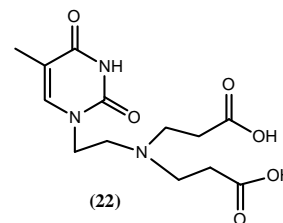
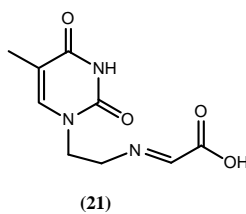
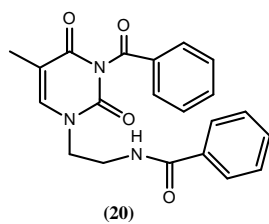
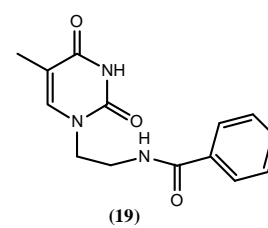
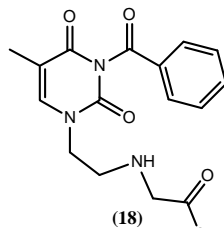
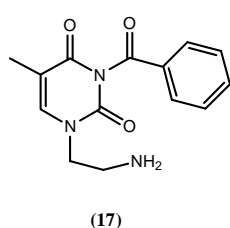
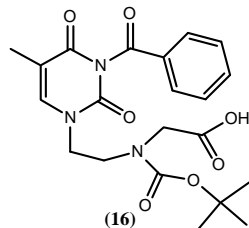
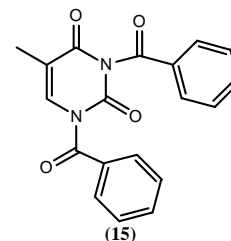
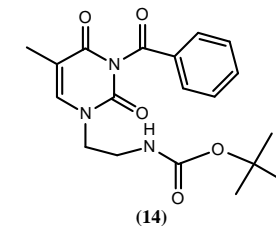
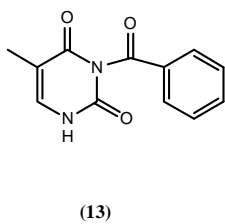
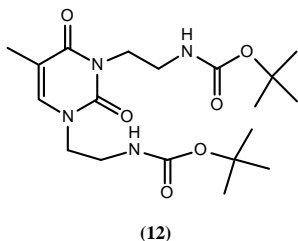
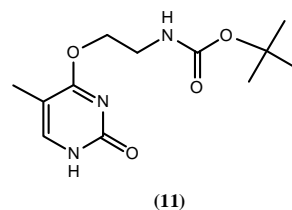
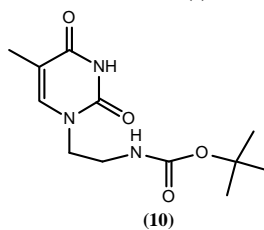
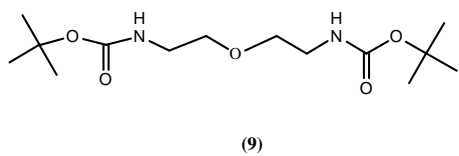
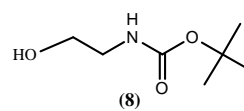
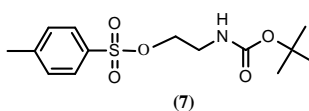
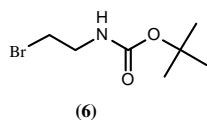
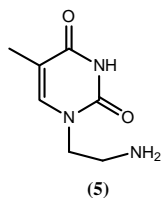
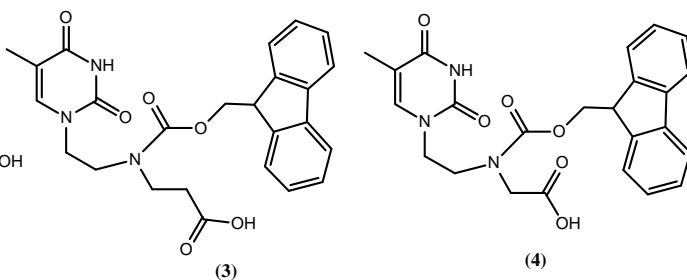
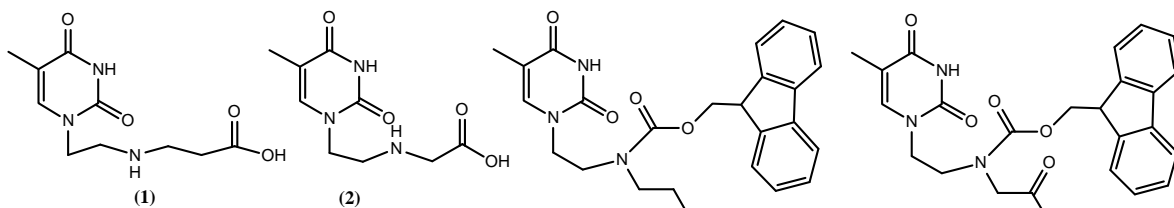
¹H-RMN (CDCl₃): 2.848-2.989 (2dd, 2H, CHCH₂CO), 4.021-4.097 (dd, 1H, CHS), 4.623-4.653 (d, 2H, OCH₂CH), 5.245-5.398 (dt, 2H, CH₂CHCH₂), 5.912 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 7.356-7.592 (m, 5H, CH arom.), 8.830 (s, 1H, OH).

¹³C-RMN (CDCl₃): 36.776 (CHCH₂CO), 46.077 (CHS), 66.204 (OCH₂CH), 119.171 (CH₂CHCH₂), 129.411 (CH arom.), 129.627 (CH arom.), 131.833 (CH₂CHCH₂), 132.018 (C arom.), 134.594 (CH arom.), 170.599 (CO), 176.953 (CO).

IX. ÍNDEX DE FÓRMULES

IX. Índice de fórmulas

IX. Índice de fórmulas



H-TEtβAla-TEtβAla-Gly-NH₂
(23)

Fmoc-Gly-OH
(24)

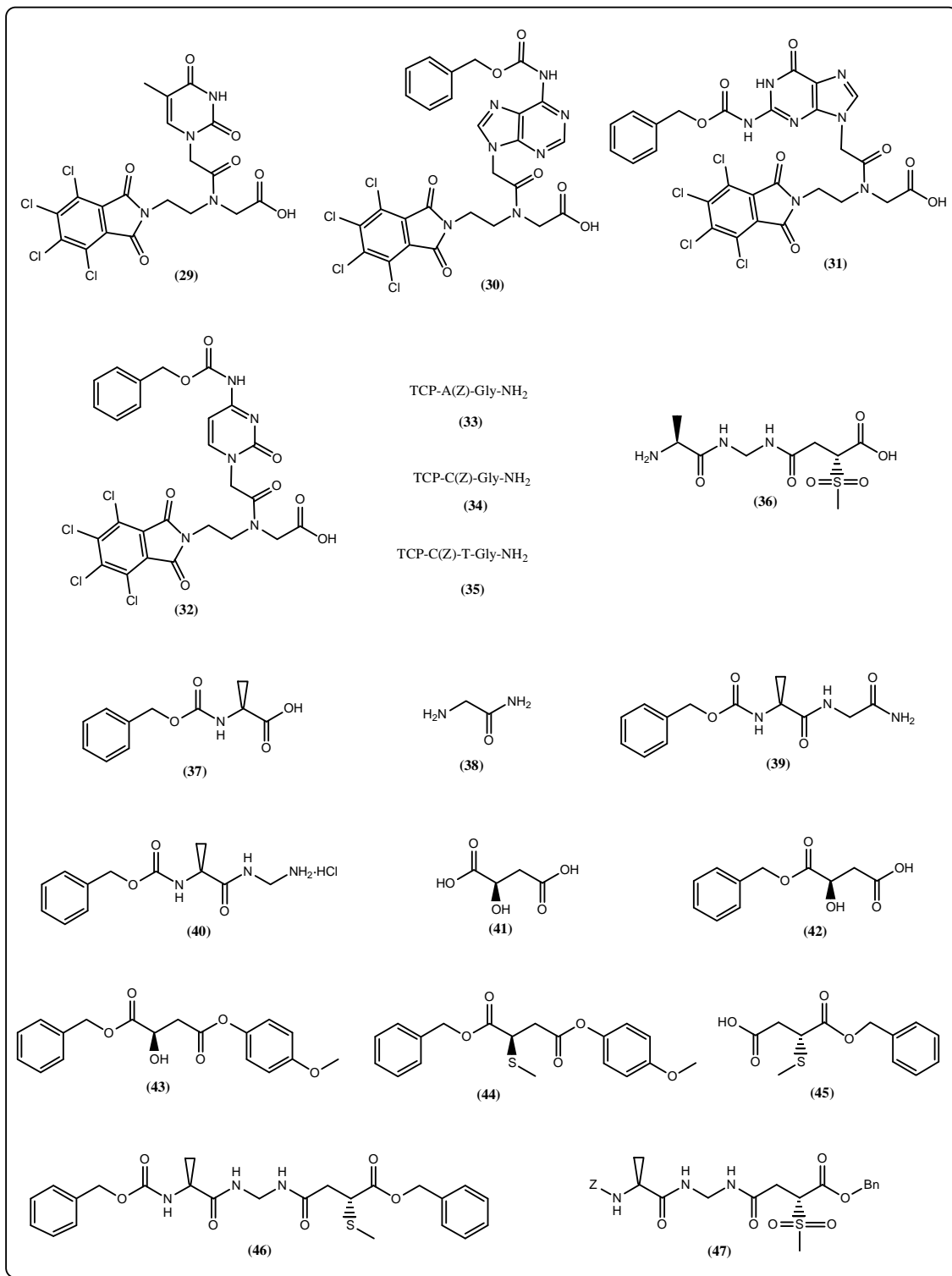
H-TEtβAla-Gly-TEtβAla-Gly-TEtβAla-Gly-NH₂
(25)

Fmoc-TEtβAla-Gly-TEtβAla-Gly-TEtβAla-Gly-NH₂
(26)

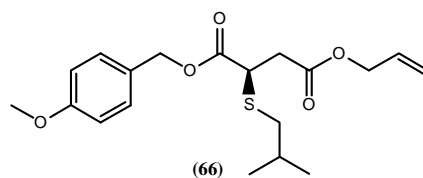
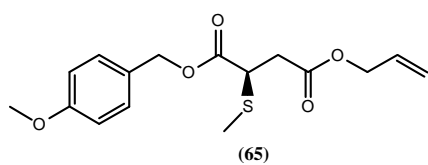
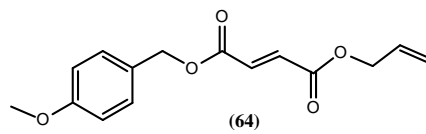
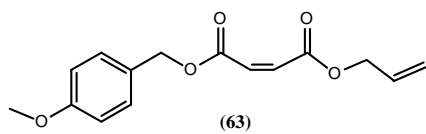
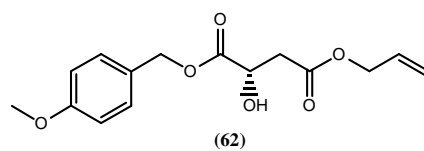
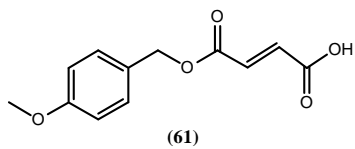
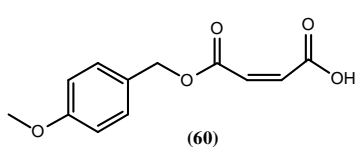
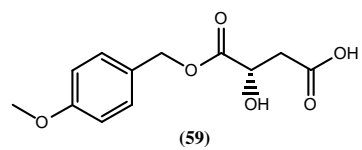
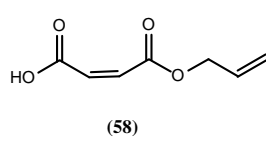
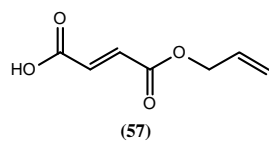
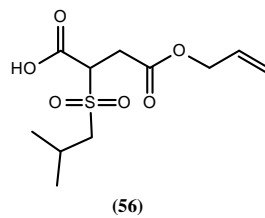
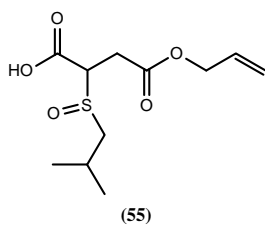
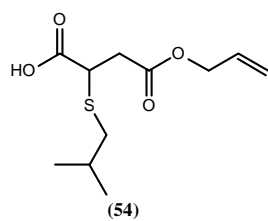
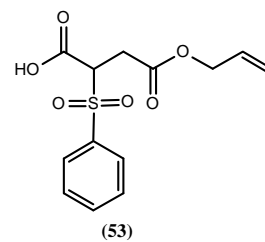
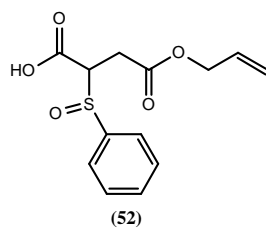
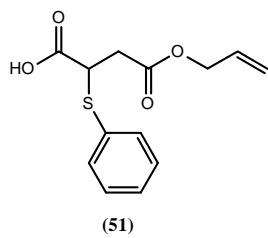
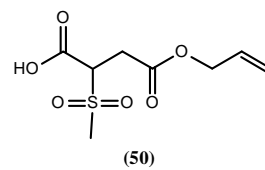
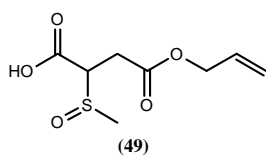
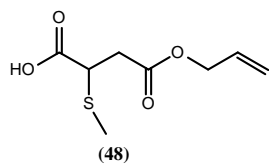
H-TEtβAla-TEtβAla-TEtβAla-TEtβAla-TEtβAla-TEtβAla-NH₂
(27)

Fmoc-TEtβAla-TEtβAla-TEtβAla-TEtβAla-TEtβAla-TEtβAla-NH₂
(28)

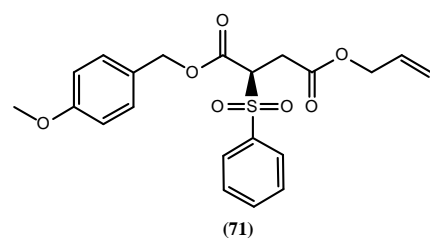
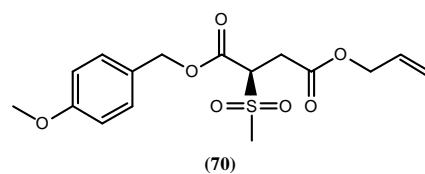
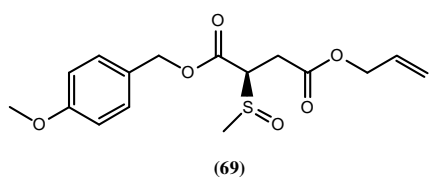
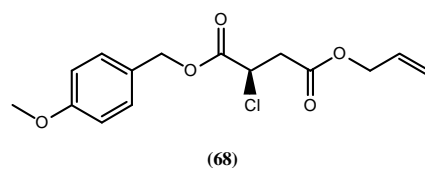
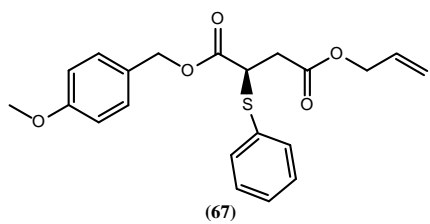
IX. Índice de fórmulas



IX. Índice de fórmulas



IX. Índice de fórmulas



X. BIBLIOGRAFIA

X. Bibliografia

1. a) Braun, K.; Ehemann, V.; Waldeck, W.; Pipkorn, R.; Corban-Wilhelm, H.; Jenne, J.; Gissmann, L.; Debus, J. *Cancer Letters (Amsterdam, Netherlands)* **2004**, 209, 37-49.
 - b) Kaihatsu, K.; Huffman, K. E.; Corey, D. R. *Biochemistry* **2004**, 43, 14340-14347.
 - c) Ma, Z.; Taylor, J. *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 679-683.
 - d) Esposito, V; Randazzo, A.; Messere, A.; Galeone, A.; Petraccone, L.; Giancola, C.; Piccialli, G.; Mayol, L. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3364-3371.
 - e) Efimov, V.; Choob, M.; Buryakova, A.; Phelan, D.; Chakhmakhcheva, O. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.* **2001**, 20, 419-428.
 - f) Doyle, D. F.; Braasch, D. A.; Simmons, C. G.; Janowski, B. A.; Corey, D. R. *Biochemistry.* **2001**, 30, 53-64.
 - g) Hahn, S.; Patron, A.; Fagnani, R. *PCT Int. Appl.* **2000**, WO2000002899A1.
 - h) Barawker, A. D.; Kwok, Y.; Bruice, T. W.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5244-5250.
 - i) Seitz, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3249-3251.
 - j) Seitz, O.; Bergmann, F.; Heindl, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2203-2206.
 - k) Corey, D. R. *TIBTECH* **1997**, 15, 224-229.
 - l) Egholm, M.; Behrens, C.; Christensen, L.; Berg, R. H.; Nielsen, P. E.; Buchardt, O. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 800-801.
2. Gourishankar, A.; Shukla, S.; Ganesh, K. N.; Sastry, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13186-13187.
3. a) Baldoli, C.; Falciola, L.; Licandro, E.; Maiorana, S.; Mussini, P.; Ramani, P.; Rigamonti, C.; Zinzalla, G. **2004**, 689, 4791-4802.
 - b) Verheijen, J., C.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; Metzler-Nolte, N. *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 741-743.
 - c) Hess, A.; Metzler-Nolte, N. *Chem. Commun.* **1999**, 885-886.
4. Nielsen, P.E.; Egholm, R.H.; Berg, O.; Buchardt, O. *Science* **1991**, 254, 1497-1500.
5. a) Kaihatsu, K.; Huffman, K. E.; Corey, D. R. *Biochemistry.* **2004**, 43, 14340-14347.

X. Bibliografia

-
- b) Braun, K.; Ehemann, V.; Waldeck, W.; Pipkorn, R.; Corban-Wilhelm, H.; Jenne, J.; Gissmann, L.; Debus, J. *Cancer Letters (Amsterdam, Netherlands)* **2004**, 209, 37-49.
- c) Rasmussen, J. H.; Rasmussen, P. *PCT Int. Appl.* **2003**. WO2003092735A2.
- d) Ma, Z.; Taylor, J. *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 679-683.
- e) Olek, A.; Piepenbrock, C.; Kurt, B. Diagnoses o diseases associated with signal transduction. *PCT. Int. Appl.* (2002), 24 pp. WO 200200926 A2.
- f) Doyle, D. F.; Braasch, D. A.; Simmons, C. G.; Janowski, B. A.; Corey, D. R. *Biochemistry* **2001**, 30, 53-64.
- g) Olek, A.; Piepenbrock, C.; Kurt, B. *PCT. Int. Appl.* **2001**, WO200181622A2.
- h) Wickstrom, E. Basu, S. *U.S.* 2001, US6180767B1.
- i) Nielsen, P. E. *Acc. Chem. Res* **1999**, 32, 624-630.
- j) Nielsen, P. E. *Current Opinion in Biotechnology* **1999**, 10, 71-75.
- k) Uhlmann, E.; Peyman, A.; Breipohl, G.; Will, D. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2797-2823.
- l) Uhlmann, E. *Biol. Chem.* **1998**, 379, 1045-1052.
- m) Kurakin, A.; Larsen, H.J.; Nielsen, P.E. *Chem. Biol.* **1998**, 5, 81-89.
- n) Nielsen, P.E. *Pure Appl. Chem.* **1998**, 70, 105-110.
- o) Duelhom, K.L.; Nielsen, P.E. *New J. Chem.* **1997**, 21, 19-31.
- p) Knudsen, H. *Anti-Cancer Drugs* **1997**, 8, 113-118.
- q) Corey, D.R. *TIBTECH* **1997**, 15, 224-229.
- r) Erikson, M.; Nielsen, P.E. *Q. Rev. Byophys.* **1996**, 29, 369-394.
- s) Hyrup, B.; Nielsen, P.E. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 5-23.
6. De Koning, H.; Pandit, U.K. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1971**, 90,1069-1080.
7. Buttrey, J. D.; Jones, A.S.; Walker, R. T. *Tetrahedron* **1975**, 31, 73-75.
8. a) Kim, S. K.; Lee, H.; Lim, J. C.; Lee, S. H. *PCT Int. Appl.* **2005**, WO2005009998A1.
- b) Cook, P. D.; Kiely, J.; Sprankle, K. *U.S.* **2004**, US6756199B1.
- c) Viirre, R. D.; Hudson, Robert H. E. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 1630-1632.
- d) Kim, S. K.; Lee, H.; Lim, J. Ch.; Choi, H.; Jeon, J. H.; Ahn, S. Y.; Lee, S. H. *PCT Int. Appl.* **2003**, WO2003062212A1.

X. Bibliografia

-
- e) Kim, S. K.; Lee, H.; Lim, J. Ch.; Choi, H.; Jeon, J. H.; Ahn, S. Y.; Lee, S. H.; Yoon, W. J. *PCT Int. Appl.* **2003**, WO2003091231A1.
- f) Patron, A. P.; Pervin, A. *U.S.* **2002**, US6433134B1.
- g) Timár, Z.; Kovács, L.; Schmél, Z. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 19-26.
- h) Haaiima, G.; Hansen, H. F.; Christensen, L.; Dahl, O.; Nielsen, P. E. *Nucleic Acids Research* **1997**, 25, 4639-4643.
- i) Finn, P. J.; Gibson, N. J.; Fallon, R.; Hamilton, A.; Brown, T. *Nucleic Acids Research* **1996**, 24, 3357-3363.
- j) Dueholm, K. L.; Egholm, M.; Behrens, C.; Christensen, L.; Hansen, J. F.; Vulpius, T.; Petersen, K. H.; Berg, R. H.; Nielsen, P. E.; Buchardt, O. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 5767-5773.
- k) Egholm, M.; Nielsen, P. E.; Buchardt, O.; Berg, R. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 9677-9678.
9. a) Hyrup, B.; Egholm, M.; Nielsen, P.E.; Wittung, P.; Buchardt, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7964-7970.
- b) Hyrup, B.; Egholm, M.; Rolland, M.; Nielsen, P.E.; Berg, R. H.; Buchardt O. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 518-519.
10. Haaiima, G.; Rasmussen, H.; Schmidt, G.; Jensen, D. K.; Kastrup, J. S.; Stafshede, P. W.; Nordén, B.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E. *New. J. Chem.*, **1999**, 23, 833-840.
11. a) Kehler, J.; Heriksen, U.; Vejbjerg, H.; Dahl, O. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 315-322.
- b) Efimov, V. A.; Choob, M. V.; Buryadova, A. A.; Chakhamakcheva, O. G. *Nucleosides & Nucleotides* **1998**, 17, 1671-1679.
- c) Peyman, A.; Uhlmann, K.W.; Augustin, S.; Weiser, C.; Will, D.W.; Breipohl, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2809-2812.
- d) Uhlmann, E.; Will, D. W.; Breipohl, G.; Peyman, A.; Langner, D.; Knolle, J.; O'Malley, G. *Nucleosides & Nucleotides* **1997**, 16, 603-608.
12. Liu, Y.; Hudson, R. H. E. *Synlett* **2001**, 10, 1626-1628.
13. a) Hollenstein, M.; Leumann, C. J. *Organic Letters* **2003**, 5, 1987-1990.
- b) Roberts, C. D.; Schürtz, R.; Leumann, C. J. *Synlett* **1999**, 6, 819-821.

X. Bibliografia

-
- c) Cantin, M.; Schürtz, R.; Leumann, C. J. *Tetrahedron Letter.* **1997**, 38, 4211-4214.
- 14.** Hyrup, B.; Egholm, M.; Rolland, M.; Buchardt O., Nielsen, P. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1083-1088.
- 15.** Almarsson, Ö.; Bruice, T. C.; Kerr, J.; Zuckermann, R. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 7518-7522.
- 16. a)** Krotz, A. H.; Larsen, S.; Buchardt, O.; Eriksson, M.; Nielsen, P. E. *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, 6, 1983-1992.
- b) Krotz, A. H.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6937-6940.
- c) Krotz, A. H.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6941-6944.
- 17. a)** Falkiewicz, B.; Kolodziejczyk, A. S.; Liberek, B.; Wisniewski, K. *Tetrahedron* **2001**, 57, 7909-7917.
- b) Falkiewicz, B.; Kowalska, K.; Kolodziejczyk, A. S.; Wisniewski, K.; Lankiewicz, L. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, 18, 353-361.
- c) Kosynkina, L.; Wang, W.; Liang, T. C. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5173-5176.
- 19.** Peterson, K. H.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 793-79.
- 19.** Ramasamy, K. S.; Seigfert, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1799-1804.
- 20. a)** Diederichen, U. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1886-1889.
- b) Diederichen, U. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 445-448.
- 21. a)** Diederichen, U.; Weicherding, D. *Synlett* **1999**, 917-920.
- b) Diederichen, U.; Schmitt, H. W. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 475-478.
- 22. a)** Howath, N. M.; Wakelin, L.P.G. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 5441-5450.
- b) Ciapetti, P.; Mann, A.; Schoenfelder, A.; Taddei, M.; Trifilieff, E.; Canet., I.; Canet, J. L. *Letters in Peptide Science*, **1997**, 4, 341-349.
- c) Lenzi, A.; Reginato, G.; Taddei, M. *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 1713-1716.
- 23. a)** Bruckner, A. M.; Schmitt, H. W.; Diederichsen, Ulf. *Helvetica Chimica Acta* **2002**, 85, 3855-3866.
- b) Diederichen, U.; Schmitt, H. W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 302-305.

X. Bibliografia

- c) Diederichsen, U.; Schmitt, H. W. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 827-835.
24. Yamazaki, T.; Komatsu, K.; Umemiya, H.; Hashimoto, Y.; Shudo, K.; Kagechika, H. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8363-8366.
25. Tsantrizos, Y. S.; Lunetta, J. F.; Boyd, M.; Falder, L. D.; Wilson, M. C. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 5451-5457.
26. a) Kuwahara, M.; Arimitsu, M.; Sisido, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 256-257.
b) Kuwahara, M.; Arimitsu, M.; Sisido, M. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 10067-10078.
27. a) Baldoli, C.; Gianni, C.; Licandro, E.; Maiorana, S. Zinzalla, G. *Synlett* **2004**, 6, 1044-1048.
b) Hamzavi, R.; Dolle, F.; Tavitian, B.; Dahl, O.; Nielsen, P. E. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, 14, 941-954.
c) Ping, X.; Zhang, T.; Wang, W.; Zou, X.; Zhang, X. F., Y. *Synthesis*. **2003**, 8, 1171-1176.
d) Baldoli, C.; Maiorana, S.; Licandro, E.; Zinzalla, G.; Perdicchia, D. *Organic Letters* **2002**, 4, 4341-4344.
e) Falkiewicz B; Wisniowski W; Kolodziejczyk A S; Wisniewski K. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **2001**, 20, 1393-7.
f) Sforza, S.; Corradini, R.; Ghirardi, S.; Dossena, A.; Marchelli, R. **2000**, 16, 2905-2913.
g) Bock, H.; Lindhorst, T. *PCT Int. Appl.* **2000**, WO2000052038A1.
h) Sforza, E.; Haaima, G.; Marchelli, R.; Nielsen, P. E. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 197-204.
i) Püschl, A.; Sforza, S.; Haaima, G.; Dahl, O.; Nielsen, P. E. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 4707-4710.
j) Maaima, G.; Lohse, A.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1939-1942.
k) Duelhom, K. L.; Petersen, K. H.; Jensen, D. K.; Egholm, M.; Nielsen, P. E.; Buchardt, O. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 1077-1080.
28. a) Govindaraju, T.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N. *J. Org. Chem.* **2004**, 17, 5725-5734.

X. Bibliografia

-
- b) Govindaraju, T.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 1858-1865.
- c) Govindaraju, T.; Gonnade, R. G.; Bhadbhade, M.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N. *Organic Letters* **2003**, 5, 3013-3016.
- d) Kozlov, I. A.; Orgel, L. E.; Nielsen, P. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 23, 4292-4295.
- e) Nielsen, P.; Buchardt, O.; Lagriffoul, P. *U.S.* **1999**, US5977296A.
- f) Wittung, P.; Nielsen, P.; Nordén, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3189-3190.
29. a) Gangamani, B. P.; Kumar, V.A.; Ganesh, K.N. *Tetrahedron* **1999**, 55, 177-192.
- b) Jordan, S.; Schewler, C.; Kosch, W.; Krestchmer, A.; Stropp, U.; Schewemner, E.; Mielke, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 687-690.
- c) Gangamani, B. P.; Kumar, V.A.; Ganesh, K.N. *Tetrahedron* **1996**, 52, 15017-15030.
30. Lonkar P. S.; Kumar V. A.; Ganesh K. N. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **2001**, 20, 1197-1200.
31. a) Bregant, S.; Burlina, F.; Vaissermann, J.; Chassaing, G. *European Journal of Organic Chemistry* **2001**, 17, 3285-3294.
- b) Bregant, S.; Burlina, F.; Chassaing, G. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, 12, 1047-1050.
32. a) Garner P.; Yoo, J. U. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1275.
- b) Lewis, I. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 5697.
- c) Weller, D. D.; Daly, D. T.; Olson, W. K. Summerton, J. E. *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 6000.
33. a) Vilaivan, T.; Lowe, G. J. *Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9326-9327.
- b) Nielsen, P. E.; Pueschl, A. *PCT Int. Appl.* **2002**, WO2002042316A2.
- b) Diederichsen, U.; Schmitt, H. W. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 827-835.
- c) Lowe, G.; Vilaivan, T. *J. Chem. Soc, Perkin Trans. 1* **1997**, 539-546.
- d) Lowe, G.; Vilaivan, T. *J. Chem. Soc, Perkin Trans. 1* **1997**, 547-554.
- e) Lowe, G.; Vilaivan, T. *J. Chem. Soc, Perkin Trans. 1* **1997**, 555-560.
34. a) Govindaraju, T.; Kumar, V. A. *Chemical Communications* **2005**, 4, 495-497.

X. Bibliografia

- b) Lonkar, P. S.; Ganesh, K. N.; Kumar, V. A. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, 18, 2604-2611.
- c) Bai, J.; Li, Y.; Liu, K. *Chinese Journal of Chemistry* **2001**, 19, 276-281.
- d) D'Costa, M.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N. *Organic Letters* **2001**, 3, 1281-1284.
- e) Li, Y.; Jin, T.; Liu, K. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2001**, 20, 1705-1721.
- f) Pueschl, A. Tedeschi, T.; Nielsen, P. E. *Organic Letters* **2000**, 2, 4161-4163.
35. a) Püschl, A.; Boesen, T.; Tedeschi, T.; Dahl, O.; Nielsen, P. E. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 707-712.
- b) Püschl, A.; Boesen, T.; Zuccarello G.; Dahl, O.; Pitsch, S.; Nielsen, P. E. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2001**, 21, 2757-2763.
36. a) Wu, Y.; Xu, J.-C.; Liu, J.; Jin, Y.-X. *Tetrahedron* **2001**, 57, 3373-3381.
- b) Wu, Y.; Xu, J.-C. *Chin. Chem. Lett.* **2000**, 11, 771-774.
37. a) Chakraborty, P.; Brückner, A. M.; Diederichsen, U. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2410-2416.
- b) Chakraborty, P.; Diederichsen, U. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 3207-3216.
- c) Brückner, A. M.; Garcia, M.; Marsh, A.; Gellman, S. H.; Diederichsen, U. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3555-3561.
38. Markiw, R. *J. Org. Chem.*, **1972**, 37, 2165-2168.
39. Nawrot, B.; Michalak, O.; Olejniczak, S.; Wieczorek, M.; Lis, T.; Stec, W. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 3979-3985.
40. Das, K.; Shibata, N; Takeuchi, Y. *Journal of Chemical Society, Perkin Trans 1*, **2002**, 197-206.
41. Haaima, G.; Rasmussen, H.; Schmidt, G.; Jensen, D.; Kastrop, J.; Wittung, P.; Nordén, B.; Bruchardt, O.; Nielsen, P. *New Journal of Chemistry*, **1999**, 23, 833-840.
42. Kabalka, G. W.; Varma, M.; Varma, R. S.; *Journal of Organic Chemistry*, **1986**, 51, 2386-2388.
43. Diederichsen, U. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 445-448.
44. Dallaire, C.; Arya, P.; *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39, 5129-5132.
45. Cruickshank, K.; Jiricny, J.; Reese, C. *Tetrahedron Letters*, **1984**, 25, 681-684.

X. Bibliografia

-
46. Ciapetti, P.; Mann, A.; Schoenfeld, A.; Taddei, M.; Trifilieff, E.; Canet, I.; Canet J. L. *Letters in Peptide Science*, **1997**, 4, 341-349.
47. Salvatore, R.; Shin, S.; Flanders, V.; Jung, K. *Tetrahedrons Letters*, **2001**, 42, 1799-1801.
48. Lowe, G.; Vilaivan, T. *Journal of Chemical Society, Perkin Trans 1*, **1997**, 539-546.
49. Zilkha, A.; Rachman, E. S.; Rivlin, J. *Journal of Organic Chemistry*, **1960**, 26, 376-380.
50. Howarth, N. M.; Wakelin, L. P. G. *Journal of Organic Chemistry*, **1997**, 62, 5441-5450.
51. Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. A. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*; CRC Press, Inc., Boca Raton, **1997**.
52. a) Cros, E.; Planas, M.; Mejias, X.; Bardají, E. *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 6105-6107.
- b) Cros, E.; Planas, M.; Barany, G.; Bardají, E. *Eur.J. Org. Chem.* **2004**, 3633-3642.
53. Cros E., Planas M., Bardají E. *Synthesis*, **2001**, 9, 1313-1320.
54. Tesi Doctoral, Esther Cros, Universitat de Girona, **2000**.
55. Debenham, J. S.; Fraser-Reid, B. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 432-433.
56. Planas, M.; Cros, E.; Rodríguez, R.; Ferre, R. *Tetrahedron Letters*, **2002**, 4431-4434.
57. Grandjean, P.; Benhaddou, R.; Granet, R.; Krausz, P. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38, 6185-6188.
58. a) Nielsen, P.E.; Egholm, R.H.; Berg, O; Buchardt, O. *Science* **1991**, 254, 1497-1500.
- b) Chen, S-M.; Mohan, V.; Kiely, J.S.; Griffith, M. C.; Griffey, R. H. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5105-5108.
- c) Thomson, S. A.; Josey, J. A.; Cadilla, R.; Gaul, M. D.; Hassman, C. F.; Luzzio, M. J.; Pipe, A. J.; Reed, K. L.; Ricca, D. J. *Tetrahedron* **1995**, 51, 6179-6194.
- d) Planas, M.; Bardají, E.; Jensen, K. J.; Barany, G. *Journal of Organic Chemistry* **1999**, 64, 7281-7289.
59. Monroc, S.; Feliu L.; Serra, J.; Planas, M.; Bardají, E. *Synlett*, **2006**, 17, 2743-2746.

X. Bibliografía

- 60. a)** López, M.; Noval, C.; Palazón, E.; Sampayo, M. **1987**. El fuego bacteriano. *Erwinia amylovora*. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.
- b)** Jones, A. L.; Aldwincke, H.S. (Eds.), **1990**. Compendium of apple and pear diseases. *American Phytopathological Society Press*, 100 pp.
- c)** López, M.; Montesinos, E.; Scortichini, M. **1999**. Problemática de las infecciones latentes de *Agrobacterium* spp., *Erwinia amylovora* y *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* en viveros de frutales. *Phyt. Esp.* 114, 142-145.
- d)** López, M.; Montesinos, E.; Lecompte, P.; Paulin, J-P. **1996**. El fuego bacteriano del peral, una amenaza permanente: Situación actual, epidemiología y control de la enfermedad. *Fruticultura Profesional*. 78, 79-87.
- e)** van der Zwet, T.; Beer, S.V. **1995**. Fire Blight. Its nature, prevention and control: A Practical guide to integrated disease management. *U.S. Department of Agriculture. Bulletin* no. 631, 83 pp.
- f)** Sobiczewski, P.; Deckers, T.; Pulawska, J. **1997**. Fire blight (*Erwinia amylovora*). Some aspects of epidemiology and control. Phare-European Community.
- 61.** Butrón, L. **1995**. El fuego bacteriano. Una grave enfermedad para manzanos y perales. *Fruitel* 10-11.
- 62.** Llop, P.; Bonaterra, A.; Peñalver, J.; López, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 234-240.
- 63. a)** Epton, H.; Wilson, M.; Nicholson, S. L.; Sigeo, D. C.; **1994**. Biological control of *Erwinia amylovora* with *Erwinia herbicola*. pp. 335-352. En: Blakeman J.P., Williamson B. (eds.). *Ecology of plant pathogens*. CAB International Biddles, Guilford.
- b)** Beer, S. V., Rundle, J. R.; Norelli, J. L. **1987**. Orchard evaluation of five strains of *Erwinia herbicola* for control of blossom infection. *Acta Hortic.* 217.
- c)** Vanneste, J. L.; Yu, J.; Beer, S. V.; **1992**. Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh252 in biological control of *Erwinia amylovora*. *Journal of Bacteriology* 174: 2785-2796.
- d)** Wilson, M., Epton H.; Sigeo, D. C. **1992**. Interactions between *Erwinia herbicola* and *E. amylovora* on the stigma of hawthorn blossoms. *Phytopathology* 82: 914-918.

X. Bibliografía

- e) Wilson, M.; Epton, H., Sigeo D.C. **1992**. Biological control of fire blight of hawthorn (*Crataegus monogyna*) with fluorescent *Pseudomonas* spp. under protected conditions. *J. Phytopathology* 136: 16-26.
- 64. a)** Andrews, J. H. Biological control in the phyllosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1992**, 30, 603-635.
- b) Stockwell, V. O; Johnson, K. B.; Loper, J. E. *Phytopathology* **1996**, 86, 834-840.
- 65. a)** Jack, R.W.; Jung, G. *Chimia* **1998**, 52, 48-55.
- b) Hancock, R.; Lehrer, R. *TIBTECH* **1998**, 16, 82-88.
- 66. a)** López-García, B.; González-Candelas, L.; Perez-Payá, E.; Marcos, J.F. *Molecular Plant-Microbe interactions* **2000**, 13, 837-846.
- b) Ali, G.S.; Reddy, A. *Molecular Plant-Microbe interactions.* **2000**, 13, 847-859.
- 67. a)** Andreu, D.; Rivas, L.; *Biopolymers* **1998**, 47, 415-433.
- b) Tossi, A.; Sandri, L.; Giangaspero, A. *Biopolymers* **2000**, 55, 4-30.
- 68.** Wodzinski, R. S.; Umholtz, T. E.; Rundle, J. R.; Beer, S. V. *J. Appl. Bacteriol.* **1994**, 76, 22-29.
- 69.** Brady, S. F.; Wright, S. A.; Lee, J. C.; Sutton, A. E.; Zumoff, C. H.; Wodzinski, R. S.; Beer, S. V.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11912-11913.
- 70.** Sutton, A. E.; Clardy, J. *Org. Lett.* **2000**, 2, 319-321.
- 71.** Sutton, A. E.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9935-9946.
- 72.** Steiner, H. Y.; Naider, F.; Becker, J. M. *Mol. Microbiol.* **1995**, 16, 825-834.
- 73.** Liang, B.; Richard, D.; Portonovo, P. S.; Joullié, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4469-4474.
- 74.** Kaiser, E.; Colescott, C. D.; Bossinger, P. C. *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595-598.
- 75.** Vojkosky, T. *Peptide Research*, **1995**, 8, 4, 236-237.