

Departament de Química Orgànica
FACULTAT DE QUÍMICA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Programa de Doctorat de Química Orgànica
Bienni 2001-2003

Estudis sobre la síntesi d'oligòmers d'*N*-alquilglicines.
Noves aportacions a la química combinatòria.

Memòria presentada per optar
al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona
Joaquim Messeguer i Escriche

Director:
Àngel Messeguer i Peypoch
Professor d'Investigació
Dept. de Química Orgànica Biològica
IIQAB-CSIC

Tutor:
Ernesto Nicolás i Galindo
Prof. Titular
Dept. de Química Orgànica
Facultat de Química, UB

“Després d’escalar una muntanya molt alta, vam descobrir
que hi ha moltes altres muntanyes per escalar.”

Nelson Mandela

Al meu pare

AGRAÏMENTS

Sovint aquesta part d'una tesi és la més llegida, sobretot per tots aquells que més enllà d'aquestes pàgines comencen a tenir dificultats per seguir el que s'hi explica o simplement s'espanten al pensar que es parla de química. Per tant, intentaré dedicar-li el mateix esforç que a tota la resta de la tesi per agrair-vos a tots la companyia al llarg del camí que m'ha permès arribar fins aquí.

Durant els darrers set anys que he passat al CID, el nombre de persones que hi he conegut ha estat enorme. A tots ells, els he d'agrair alguna cosa concreta, algun cop de mà i, sobretot, el tracte rebut al llarg de tot aquest temps. Per una raó estrictament d'espai, tothom no pot ser anomenat individualment, però el meu agraïment és igualment sincer per a tots ells.

En primer lloc, al meu director de tesi, el Prof. Àngel Messeguer. Tot i ser qui sóc, vull agrair-te, des d'un punt de vista professional, el suport i la confiança dipositada en mi des del primer dia. La situació no era fàcil, però crec que sempre m'has tractat com un més sense fer cap mena de distinció ni mostrar cap preferència, la qual cosa és d'agrair de cara a mantenir una bona relació per no dir excel·lent amb tots els meus companys. Gràcies per donar-me aquesta oportunitat i per intentar transmetre'm la teva il·lusió i entusiasme per la química, una ciència apassionant alhora que ingrata i desesperant en molts moments. Finalment, agrair la teva comprensió i els ànims rebuts en els moments difícils, sense els quals hauria estat complicat tirar endavant.

Al Dr. Ernesto Nicolás, Professor Titular del Departament de Química Orgànica de la Universitat de Barcelona, per haver acceptat ser el tutor d'aquesta tesi.

Al Dr. Jordi Bujons per ajudar-me sempre que ho he necessitat, especialment en aspectes propis de la bioquímica i la informàtica.

Agrair a tots els membres del CID que m'han facilitat sempre la feina. Al Dr. Francisco Sánchez per estar sempre disposat a donar un cop de mà, especialment en temes relacionats amb l'RMN. A la Roser i la Dori per l'ajuda rebuda per resoldre els mals de cap patits amb els aparells de masses. A la Dra. Pilar Doménech per dur a terme les anàlisis elementals. I a les "secres", la Josefina i l'Àngels, per l'afecte rebut i tota l'ajuda en qüestions burocràtiques.

A tots els grups col·laboradors que han intervingut en la realització dels assaigs biològics: el grup del Dr. Eduardo Soriano de la Unitat de Neurobiologia del Desenvolupament i de la Regeneració Cel·lular del Parc Científic de Barcelona (IRBB-PCB), el grup de la Dra. Guillermina Asins del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona i el grup del Dr. Antonio Ferrer-Montiel de la Universitat Miguel Hernández d'Elx. Gràcies especialment a la Marisol, al David, a la Nuria i a l'Àsia.

Als grups col·laboradors dels projectes de la Marató de TV3, als quals aprofito l'ocasió per agrair-los tot l'entusiasme dipositat i l'ajut rebut sempre que l'he necessitat, ja que la feina realitzada en aquest projecte no s'ha inclòs en aquesta memòria i era just fer aquest reconeixement. Al grup de la Dra. Mercè Pérez de l'Institut de Recerca Oncològica i al grup del Dr. Enrique Pérez-Payá del Laboratori de Pèptids i Proteïnes del Centro de Investigación Príncipe Felipe de València. Gràcies especialment a la Mari, la Laura i l'Ana. I gràcies també a la Leti, el Rodri, l'Eliana, la Puig i l'Ali per tractar-me tan bé durant les diferents estades que vaig fer a València.

I què dir de la gran família del 309! Primerament, voldria agrair molt sincerament a tots els que la formen o n'han format part pel tracte rebut des del primer dia, donada la situació particular que els ha tocat viure amb mi. Gràcies a tots per fer-me sentir sempre com un més i no permetre mai que hi hagués cap tipus de distinció entre nosaltres, us ho agraeixo a tots i totes amb el cor a la mà.

A la Isabel, per acceptar la responsabilitat de ser la meva codirectora fins que vas marxar a treballar a l'empresa. Gràcies per la confiança dipositada en mi, per ajudar-me des del primer dia a treballar en el món de la investigació i, sobretot, per formar-me tant a nivell professional com a nivell personal. A tu et dec bona part del que sé.

A la Maia, la Su i l'Anna per rebre'm amb els braços oberts, estar sempre disposades a ajudar-me a resoldre tot els dubtes que tenia i transmetre'm el sentiment de grup, sense oblidar els bons moments viscuts fora del laboratori. Menció especial per l'Anna, la meva companya de taula, per fer-me sentir molt a gust treballant al teu costat, per animar-me en els moments difícils amb un somriure i transmetre'm sempre una visió optimista a l'hora d'afrontar els problemes.

Al Marc, per la seva simpatia i l'ajuda a introduir-me en el món de la combinatòria. Al Jordi G. (*no me'n sortiré!*), pels bons moments compartits al laboratori i el suport rebut en els moments difícils. A l'Ade (*ja puiu!*) pels pastissos que preparava i l'ajuda a purificar peptoides per HPLC. I a tants altres... l'Eyleen, el Raulito, l'Òscar.

Al Rafa (*alies Rapel*), per donar-me una lliçó de coratge davant de les situacions adverses. A la Noemí, per ensenyar-me a lluitar contra les dificultats i ajudar-me amb els temes més bioquímics. A la Cristina, per ser la meva darrera companya de taula i una guia excel·lent per la Corunya. A l'Aida, pels sopars que ens ha preparat i per lluitar pels drets dels becaris. A la Glòria, el Miquel i la Carina per la seva simpatia tot i el poc temps que he pogut compartir amb ells.

A la Glòria, per l'alegria, la simpatia i l'optimisme que encomanes allà on vas. Sense oblidar la teva predisposició a escoltar i la teva capacitat infinita de plantejar alternatives per solucionar els problemes. *Gràcies glorieta!*

A la Sandra, per les teves ganes de treballar fins a les tantes i fer-me companyia, per oferir-me la teva ajuda en tot moment, pel suport rebut en temes de resso, per les xerrades a la pissarra i per la generositat i hospitalitat demostrada quan vam anar de visita per Galícia. *Gracias chavalita!*

A l'Annita, per la teva simpatia, pel *carinyo* que sempre m'has demostrat, per ensenyar-me a defensar les pròpies idees fins al final tot i quedar-te sol, per la paciència que has tingut per aguantar la infinitat de bromes que t'he fet i pel suport rebut en els moments difícils. *Gràcies fricki!*

I al Jordi, company d'aventures des de la facultat, un dels meus millors amics i una gran persona. Sempre has estat al meu costat i mai no et podré agrair tot el que has fet per mi, sobretot en els mals moments quan més et vaig necessitar. Resumir tot el que hem passat junts és difícil, però les festes (de Sant Albert, de la Pobla...), els viatges (Tunísia, País Basc, Galícia...) i les milers d'hores al laboratori formen part d'un conjunt de records inoblidables. I a la Carmete, la teva mitja taronja, amb la qual he tingut la sort de compartir molts bons moments i a la qual vull agrair el carinyo amb que m'ha tractat sempre.

Als *eliseros*, companys de laboratori quan jo vaig arribar i amb els quals sempre hi ha hagut una relació especial: al Roger, la Berta, la Mika, la Núria S., la Carme, l'Hèctor, el Xavi, el Javi, la Raquel, el Dani, l'Eva María, la Begoña... i especialment al Pablo (*alias Peibol*), company de cursos de doctorat, per la seva simpatia i predisposició a ajudar-me sempre que ho he necessitat.

Als meus companys del "Ripo" que m'han permès seguir practicant l'esport de la meua vida. Per ajudar-me a alliberar tensions seguint una pilota en un ambient distès i ple de bon humor. A l'Oscar P., a l'Oscar C., a l'Enric, al Teto, al Cristian, al Gabi, a l'Uri, al Jordi, al Xavi...i més especialment al Marc i al Tin, els quals s'han mantingut més interessats en la meua feina tots aquest anys, i al Ferran, al qual m'uneix a més una amistat que espero no es perdi mai.

Gràcies a tot el grupet d'amics de Sant Cugat per la paciència que vau demostrar al llarg de tot aquell primer any i per tants i tants moments que hem viscut plegats. A la Marta, al Raimon, a la Cristina, al Jaume, a la Vega, al Pepe, a la Laia, a la Ceci i especialment a la Mònica, al Julio, al Jordi i al Jaume R., amb els quals he compartit viatges de vacances i estones molt entranyables, i a l'Anna, per ser tant bona persona i estar sempre disposada a fer costat als seus amics.

També vull fer un agraïment molt especial al Delmir, la Feli, el Jordi i la Maria José per acceptar que "el noi de la rosa" entrés a formar part de la seva família i pel carinyo que sempre m'han demostrat.

Per acabar, als meus pares, als quals dedico tota la il·lusió i l'esforç d'aquest treball. Per creure en mi, per haver estat sempre al meu costat, per tot el *carinyo* rebut des d'aquell llunyà 5 de Maig del 77, per gaudir amb mi dels moments d'alegria i animar-me en els de tristesa, per no haver-me fallat mai i fer-me sentir tan estimat. Sense la vostra ajuda no hauria arribat fins aquí. També vull agrair tot el recolzament que m'han donat la meua germana i el Sergi, per la vostra comprensió, pel vostre *carinyo* i pels deliciosos sopars dels diumenges. I a la resta de família pel suport rebut tots aquests anys.

I a tu, Núria, la persona que possiblement més ha patit aquesta tesi i que mereix un agraïment especial. Per estar sempre al meu costat i donar-me tot el suport, els ànims i la comprensió que necessito. Per tenir paciència amb mi, per demostrar-me dia a dia el que sents, per aguantar-me quan rondino, per compartir amb mi els bons i mals moments, per voler seguir caminant al meu costat, per creure en mi i, en definitiva, per estimar-me d'una forma incondicional. Espero algun dia estar a la teua alçada, mentrestant lluito per aconseguir que el teu somriure no s'apagui mai ja que estar al teu costat és un regal. Gràcies per ser com ets, una persona excepcional. T'estimo.

Gràcies a tots.

SUMARI GENERAL

Abreviatures	xiii
1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	1
 PART I. SÍNTESI DE MONÒMERS D'<i>N</i>-ALQUILGLICINES. ESTUDI DEL PEPTOIDE N22-6-16C	
2. INTRODUCCIÓ	29
3. SÍNTESI DE PEPTOIDES EN FASE SÒLIDA	35
4. SÍNTESI DE MONÒMERS D' <i>N</i> -ALQUILGLICINES	47
5. ACTIVITAT BIOLÒGICA DEL PEPTOIDE N22-6-16C	79
6. SUBPRODUCTE DE PM-14	93
7. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS	109
 PART II. QUÍMICA COMBINATÒRIA ASSISTIDA PER MICROONES	
8. INTRODUCCIÓ	175
9. SÍNTESI DE PEPTOIDES ASSISTIDA PER MICROONES	185
10. PEPTOIDES COM A AGONISTES DELS RECEPTORS TRKA I P75 ^{NTR}	199
11. UTILITZACIÓ DEL MICROONES COMERCIAL CEM	211
12. SÍNTESI D'UNA QUIMIOTECA DE PEPTOIDES	227
13. ACTIVITAT BIOLÒGICA DELS PENTÀMERS DE LA QUIMIOTECA	243
14. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS	261
 CONCLUSIONS	 295
 ANNEX	 299
 BIBLIOGRAFIA	 307

ABREVIATURES

ac	absorció complexa
ACN	acetonitril
Alloc	al·liloxicarbonil
AP	<i>Alkaline Phosphatasa</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
CA	<i>Cornus Amonnis</i> (Hipocamp propi)
CCP	cromatografia en capa prima
CE	còrtex entorrinal
CL-EM	cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses
CG-EM	cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses
d	doblet
DBU	1,8-diazabiclo[5.4.0]undec-7-è
DCM	diclorometà
dd	doble doblet
ddd	doble doble doblet
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIEA	diisopropiletilamina
DiI	perclorat d'1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina
DIV	dies <i>in vitro</i>
DKP	2,5-piperazinadiona
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DRG	<i>Dorsal Root Ganglia</i>
dt	doble triplet
dtd	doble triple doblet
DVB	divinilbenzè
EGL	<i>External Granule Cell Layer</i>
EM	espectrometria de masses
EMAR	espectrometria de masses d'alta resolució
eq.	equivalent
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
Et ₃ N	triètilamina
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i>
Fmoc	<i>N^l</i> -fluorenilmetoxicarbonil

GD	gir dentat o <i>fascia dentata</i>
gDQCOSY	<i>gradient Double-Quantum Filtered Correlated Spectroscopy</i>
gHSQC	<i>gradient Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
GSK3	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
HATU	hexafluorofosfat de 2-(7-aza-1H-benzotriazole-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazole
HOBt	1-hidroxibenzotriazole
hp	heptuplet
iPrOH	alcohol isopropílic
J	constant d'acoblament
m	multiplet
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
Np-1,Np-2	neuropilina-1,neuropilina-2
Ns	2-nitrobenzensulfonil
Plex-A1	plexina-A1
PM	pes molecular
PyBOP	hexafluorofosfat de benzotriazole-1-il-oxi-tris-pirrolidini-fosfoni
q	quadruplet
rdt.	rendiment
rpm	revolucions per minut
SEAP	<i>Secreted Alkaline Phosphatase</i>
Sema	semaforina
SICHI	<i>Semaphorin Induced Chemorepulsion Inhibitor</i>
SNC	sistema nerviós central
SNP	sistema nerviós perifèric
t	triplet
t.a.	temperatura ambient
tBuOH	alcohol <i>tert</i> -butílic
TFA	àcid trifluoroacètic
THF	tetrahidrofuran
TNBS	àcid 2,4,6-trinitrobenzensulfònic
t _r	temps de retenció

INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

Un dels principals objectius de la recerca biomèdica és la identificació de nous composts actius d'interès terapèutic que a més presentin una elevada selectivitat. Tradicionalment, la font de composts amb activitat biològica s'ha basat en la síntesi seqüencial de molècules, així com en l'aïllament de productes naturals tant d'origen vegetal com animal. No obstant, malgrat comptar amb èxits remarcables, aquestes estratègies són lentes i sovint impliquen la realització d'assaigs biològics llargs i complexos.

En els últims anys, el procés d'identificació de nous fàrmacs ha experimentat una important transformació degut als avenços aconseguits en les àrees de la bioquímica, la biologia i la bioinformàtica. Per una banda, una de les conseqüències més immediates de la seqüenciació del genoma humà ha estat la identificació d'un gran nombre de dianes d'interès terapèutic que abans eren desconegudes, circumstància que ha obert un camp il·limitat de recerca de fàrmacs que actuïn sobre aquestes dianes. Per l'altra, la robotització, automatització i miniaturització d'una àmplia gamma d'assaigs *in vitro* ha conduït al desenvolupament d'assaigs biològics d'alt rendiment (HTS, *High Throughput Screening*). Aquest desenvolupament ha invertit la situació clàssica dels laboratoris d'investigació biomèdica. Si fins llavors l'assaig farmacològic era el coll d'ampolla del procés de descobriment de fàrmacs (la quantitat de molècules que els equips de síntesi eren capaços de subministrar saturava sovint la capacitat dels equips que els avaluaven), a partir d'aquella època ho va passar a ser la producció de molècules per assajar, creant la necessitat de sintetitzar, en poc temps i de manera eficient, milers de composts. A més, per

facilitar el disseny racional de nous fàrmacs cada vegada es fa més palesa la necessitat d'aplicar estudis estructurals i computacionals per obtenir resultats de relació estructura-activitat (SAR, *Structure-Activity Relationships*), així com analitzar el mode d'interacció molècula-diana (*Docking*). Finalment, els costos de llançament al mercat d'un nou fàrmac, han forçat la indústria farmacèutica a escurçar totes les etapes implicades en el desenvolupament de fàrmacs, sobretot pel que fa referència a la fase preclínica, contribuint d'una manera notable a l'optimització de temps i recursos.

Així doncs, aquests avenços han posat de manifest la necessitat de disposar d'una elevada quantitat de molècules per ser avaluades en front de les dianes terapèutiques d'interès. Per respondre a aquesta demanda, durant els anys 90 va néixer la Química Combinatòria com una alternativa molt potent per crear grans col·leccions de composts.

La **Química Combinatòria** és una metodologia dirigida al disseny i síntesi de col·leccions de composts estructuralment relacionats, anomenades quimioteques, d'una forma sistemàtica, ràpida, eficient i simultània, per provar-los davant d'una determinada propietat. Les quimioteques estan estructurades a partir d'un esquelet central, al qual s'hi va introduint la diversitat química a través de les diferents fonts de diversitat utilitzades.

La síntesi orgànica convencional es realitza seguint una estratègia lineal i sovint convergent, per obtenir un compost final d'estructura determinada. A la Figura 1.1 (A) quedaria representada la química on el reactiu A reaccionaria amb el reactiu B per obtenir el producte AB. En canvi, la síntesi combinatòria permet obtenir molts més productes per cada reacció, tot combinant un nombre limitat de reactius. A la Figura 1.1 (B) s'exemplifica la química combinatòria on els reactius de tipus A ($A_1, A_2, \dots, A_n$) reaccionarien amb els reactius de tipus B ($B_1, B_2, \dots, B_n$) per obtenir els productes $A_{1-n}B_{1-n}$ provinents de la combinació de tots els reactius emprats. Si apliquem aquest principi combinatori a diferents etapes de reacció, la quantitat de composts obtinguda s'incrementa exponencialment, la qual cosa evidencia la capacitat de la química combinatòria per generar diversitat estructural.

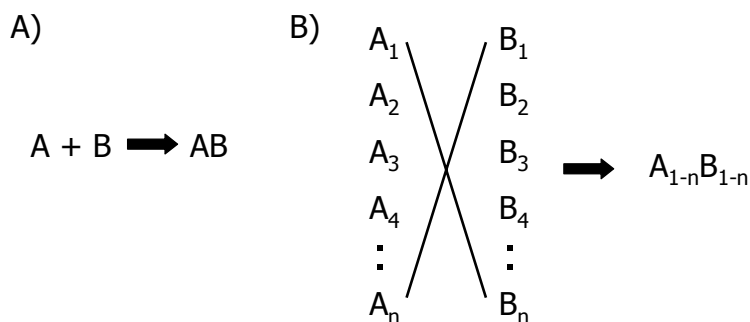


Figura 1.1. Esquema representatiu de la síntesi orgànica tradicional (A) i de la síntesi orgànica combinatòria (B), on A i B representen els reactius i AB el producte obtingut.

En la Figura 1.2 es mostra l'esquema del procés de recerca d'un fàrmac, destacant les etapes on el paper de la química combinatòria pot ser fonamental, tant en la identificació de nous compostos com en l'optimització dels candidats que passen a ser avaluats en els estudis avançats de la fase preclínica. Els avenços aconseguits en els últims anys han canviat el coll d'ampolla en el procés de descobriment d'un fàrmac, passant de la generació d'estructures a candidat preclínic (*lead*) cap a la seva transformació a fàrmacs actius administrables oralment amb les propietats fisiològiques desitjades. Tot i això, les etapes d'optimització del compost, els assaigs preclínic i, sobretot, els clínics fan que el procés global d'identificació de nous fàrmacs encara sigui car i lent (de 6 a 12 anys).

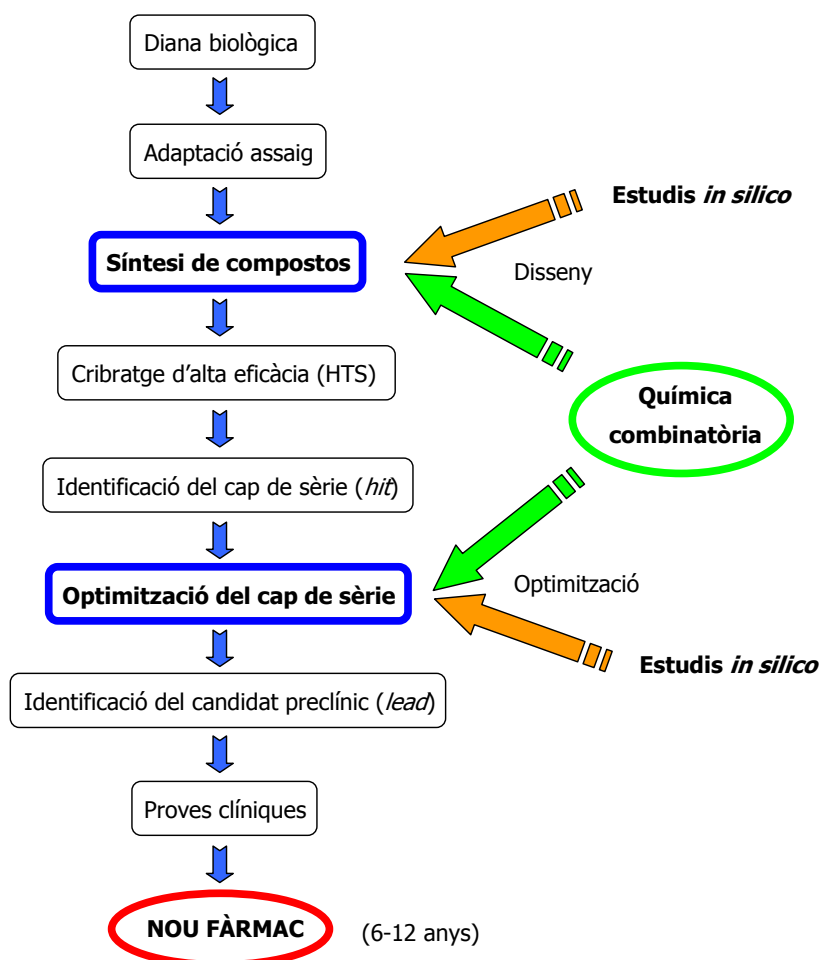


Figura 1.2. Esquema representatiu de les diferents etapes que inclouen el procés de descobriment d'un fàrmac i el paper que juga la química combinatòria.

La primera etapa del procés consisteix en la identificació de la diana terapèutica d'interès i el disseny d'un assaig biològic que permeti avaluar de forma ràpida i eficient els compostos disponibles. En aquest punt del procés té lloc el disseny de la quimioteca, el qual dependrà del coneixement que es tingui sobre la diana en qüestió. Si es tenen dades estructurals

d'interaccions proteïna-ligand al centre actiu o relacions quantitatives estructura-activitat (QSAR, *Quantitative Structure-Activity Relationships*), es dissenyarà una quimioteca focalitzada per aquesta diana; en cas contrari, el disseny anirà encaminat cap a una quimioteca general amb molta més diversitat química. Les molècules identificades del cribratge de la quimioteca durant els assaigs biològics amb activitat, afinitat i selectivitat per a la diana terapèutica es coneixen com a *hits*, i entren en la següent fase del procés, la qual consisteix en el desenvolupament d'altres molècules optimitzades que en millorin la seva activitat, afinitat, selectivitat i falta de toxicitat. És en aquesta etapa on la química combinatòria també juga un paper important per dissenyar i sintetitzar quimiotèques més reduïdes que presentin les modificacions necessàries de l'estructura química, així com potenciar les seves propietats ADMET (Administració, Distribució, Metabolisme, Excreció i Toxicitat). El cribratge d'aquesta nova quimioteca permetrà la identificació d'una estructura optimitzada o *lead* amb les característiques i propietats idònies per esdevenir, en cas de superar les proves clíniques, un nou fàrmac potencial.

En els últims anys, la informàtica ha esdevingut una eina complementària al llarg de tot el procés, desenvolupant mètodes computacionals (*in silico*) aplicats tant al disseny de l'estructura dels composts de les quimiotèques, per a la identificació de *hits*, com a l'optimització d'aquests, per a la identificació de *leads*.

Així doncs, la química combinatòria ha demostrat la seva utilitat en l'àrea biomèdica en simplificar i accelerar el procés de preparació i optimització de composts d'interès terapèutic. A més, la seva utilitat no ha passat inadvertida en altres camps tant diversos, com la ciència de materials,¹⁻⁴ el reconeixement molecular,⁵⁻⁷ la química de polímers,^{8,9} l'agroquímica¹⁰ o la recerca de nous catalitzadors,¹¹⁻¹⁴ on la seva aplicació ha permès l'obtenció de resultats molt satisfactoris.

1.1. ANTECEDENTS HISTÒRICS DE LA QUÍMICA COMBINATÒRIA

La química combinatòria té els seus orígens en la síntesi de pèptids en fase sòlida. L'any 1963 Merrifield va introduir aquesta metodologia per sintetitzar un tetrapèptid sobre un suport sòlid de clorometilestirè copolimeritzat amb divinilbenzè.¹⁵ A partir d'aquell moment, la tecnologia de la fase sòlida va anar evolucionant fins aconseguir sintetitzar un gran nombre de pèptids amb un bon rendiment i una puresa elevada.

La primera quimioteca de pèptids descrita en la bibliografia va ser la sintetitzada per Geysen *et al.* en *multipins* de poliestirè funcionalitzat l'any 1984,¹⁶ i un any més tard Houghten va introduir la metodologia de les bossetes de te (*tea bags*) amb una resina de poliestirè per a la síntesi múltiple de pèptids.¹⁷ Posteriorment, es va desenvolupar la metodologia de síntesi de divisió i mescla (*split & mix*), introduïda per Furka *et al.* l'any 1988 per sintetitzar una quimioteca de 180 pentapèptids¹⁸. Paral·lelament, partint del concepte introduït per Furka però

intentant evitar el procés iteratiu de resíntesi que aquest implica, Houghten *et al.* van desenvolupar una nova metodologia anomenada rastreig posicional (*positional scanning*) per a la síntesi d'una quimioteca d'hexapèptids.¹⁹

En els seus inicis, la química combinatòria s'aplicava únicament a la síntesi de pèptids i oligonucleòtids, fins que Bunin i Ellman van publicar l'any 1992 la primera quimioteca discreta d'1,4-benzodiazepines en fase sòlida.²⁰ A partir d'aquesta publicació, l'aplicació de la química combinatòria i la fase sòlida a la síntesi de quimiotèques de molècules orgàniques de baix pes molecular ha estat en contínua expansió.^{21,22}

Tot i que també s'han sintetitzat quimiotèques en dissolució,²³⁻²⁶ la síntesi en fase sòlida és la metodologia més emprada en química combinatòria. A continuació s'explicaran les característiques més remarcables de la fase sòlida i de la fase homogènia, així com altres aspectes importants de l'estratègia combinatòria que cal tenir en compte.

1.2. ASPECTES GENERALS DE LA QUÍMICA COMBINATÒRIA

Abans d'iniciar la síntesi d'una quimioteca, cal realitzar un treball previ de disseny on s'haurà d'analitzar l'objectiu d'aquesta síntesi ja que aquest factor serà el que determinarà l'estratègia a seguir, tant des del punt de vista de la dimensió i composició de la quimioteca, com de la metodologia a utilitzar per a la seva construcció. A més, s'hauran de tenir en consideració els aspectes que s'explicaran a continuació.

1.2.1. ESQUELET

L'esquelet (*scaffold*) és el fragment molecular comú a tots els components de la quimioteca combinatòria sobre el qual s'insereix la diversitat. L'elecció d'aquest fragment es fa en funció del coneixement de la seva activitat o bé com a resultat d'estudis preliminars en bases de dades adients, tenint en compte la mida necessària, el número de fonts de diversitat que s'hi vulguin inserir, la rigidesa desitjada, etc. Pel que fa referència a la seva estructura, aquesta es pot obtenir per tres vies diferents: la primera consisteix en la seva construcció a mesura que es van realitzant les successives etapes d'introducció de les fonts de diversitat; la segona és mitjançant una reacció posterior a l'alliberament del compost sintetitzat del suport polimèric (en el cas de treballar en fase sòlida); finalment, la tercera via consisteix en la introducció inicial d'una entitat estructural definida amb els corresponents grups funcionals, els quals permeten la incorporació de les diferents fonts de diversitat.

1.2.2. BLOCS DE CONSTRUCCIÓ. FONTS DE DIVERSITAT

Els blocs de construcció (*building blocks*) o fonts de diversitat són els representants de l'espai de diversitat que ens interessa explorar, els quals condicionen el procés sintètic de la quimioteca.

En termes generals, tal i com s'ha comentat anteriorment, la síntesi d'una quimioteca es pot enfocar des de dos punts de vista. Si interessa identificar un nou cap de sèrie amb activitat davant una diana biològica, s'ha d'explorar un ampli espai de diversitat química (grups acceptors i donadors d'electrons, grups carregats o ionitzables, acceptors i donadors de pont d'hidrogen, substituents hidrofòbics i hidrofílics, etc.) i sintetitzar un gran nombre de composts (quimioteca generalista). En canvi, si es vol optimitzar un cap de sèrie ja identificat o actuar sobre una diana d'estructura coneguda, ens interessa sintetitzar quimiotèques més petites i focalitzades per millorar l'activitat i selectivitat del compost, modificant d'una forma sistemàtica els grups que són importants en la interacció del lligand amb la diana i, per tant, aplicarem una diversitat química més limitada i específica, preparant un nombre més reduït de composts (quimioteca focalitzada).

En qualsevol dels casos, la diversitat dels blocs de construcció o elements de diversitat hauria de presentar estabilitat en les condicions de reacció (i d'escissió en el cas de treballar en fase sòlida), exclouent aquells substituents capaços de formar enllaços covalents no específics amb el receptor o que poguessin donar falsos positius en el cribratge.

Per evitar pèrdues econòmiques i de temps per a les empreses farmacèutiques, s'estan desenvolupant estudis amb la finalitat de poder predir si un compost té possibilitats d'arribar al mercat. En aquest sentit, l'any 1997, Lipinski *et al.* van establir una sèrie de regles que havia de complir un compost identificat amb activitat per esdevenir un bon candidat a fàrmac.²⁷ Per altra banda, s'han desenvolupat tècniques d'algorismes genètics amb la intenció de minimitzar el nombre de substàncies a ser sintetitzades,²⁸ així com d'altres programes informàtics que han desenvolupat mètodes *in silico* per a la identificació de *hits* i *leads*.²⁹⁻³¹ Més recentment, amb els avenços aconseguits en l'àrea de la genòmica i la proteòmica, ha sorgit una altra especialitat, la farmacogenòmica, la qual permetria dissenyar en un futur fàrmacs individualitzats per a cada pacient segons les seves característiques genètiques.³²⁻³⁴

1.2.3. SÍNTESI EN FASE SÒLIDA. SÍNTESI EN DISSOLUCIÓ

La síntesi d'una quimioteca combinatòria es pot realitzar seguint dues metodologies: la síntesi heterogènia (fase sòlida) o bé la síntesi homogènia (dissolució i fase líquida).

Quan es parla de fase sòlida, en general es fa referència a l'ús d'una resina polimeritzada, ja sigui de poliestirè, Tentagel, poliacrilamida, etc., encara que també hi ha altres mètodes

basats en varetes o *pins* polimèrics,^{16,35} làmines de vidre³⁶ o membranes de cel·lulosa,^{37,38} els quals permeten identificar de forma inequívoca els productes sintetitzats individualment.

Els inicis de la química combinatòria van anar estretament lligats a la fase sòlida, ja que es va començar amb l'adaptació de la síntesi clàssica de pèptids sobre suport sòlid. Per aquest motiu, la major part dels treballs publicats de síntesi de quimiotèques s'han realitzat emprant aquesta metodologia. No obstant això, en els últims anys, la síntesi en dissolució ha anat guanyant terreny, apareixent publicats diversos articles amb resultats satisfactoris.³⁹⁻⁴¹ Ambdós mètodes presenten diferents avantatges i inconvenients que es resumeixen a la Taula 1.1.

Taula 1.1. Comparació de la química combinatòria en fase sòlida i en dissolució.

	Fase sòlida	Síntesi en dissolució
Avantatges	• Fàcil eliminació de l'excés de reactius. • Purificació del producte mitjançant el rentat del suport sòlid. • Senzilla automatització de les etapes sintètiques de reacció. • Aplicació a la síntesi múltiple en paral·lel o de mescles. • Pseudo-dilució.	• Ampli ventall de reaccions orgàniques. • No es necessària l'adaptació de les reaccions ja conegudes. • No es requereixen reaccions addicionals per a l'ancoratge i escissió de la fase sòlida. • Es poden sintetitzar quantitats il·limitades de producte. • Control de reacció per mètodes convencionals.
Inconvenients	• Necessitat d'adaptar els processos a la fase sòlida. • Impossibilitat de purificar els productes secundaris ancorats. • Escala limitada. • No són possibles les síntesis convergents. • Dificultat de control d'intermedis ancorats a la fase sòlida. • Dificultat d'ús de reactius heterogenis (catalitzadors...). • Restricció de la varietat de dissolvents. S'han d'acoblar al tipus de suport depenent del grau d'inflament.	• Dificultat en la utilització d'excossos de reactius. • Dificultat en les etapes d'aïllament i purificació. • L'ús de resines segrestadores o <i>scavengers</i> i de reactius sobre suport sòlid resulta car.^{42,43}

Es podria concloure que no hi ha un mètode millor que l'altre sinó que tots dos són vàlids en funció del tipus de reacció que s'hagi de fer i/o del tipus de quimioteca que es vulgui sintetitzar. En aquest sentit, la combinació de la síntesi en fase sòlida i en dissolució en una mateixa seqüència sintètica es perfila com a possible alternativa als inconvenients que plantegen ambdues estratègies per separat.

En aquest punt cal referir-se a l'altre aspecte de la síntesi en fase homogènia, l'anomenada síntesi en fase líquida. Aquesta consisteix en sintetitzar la molècula unida a un suport polimèric de polietilenglicol monometil èter (MeO-PEG), el qual és soluble en molts dissolvents orgànics, de manera que el substrat es manté en dissolució durant la reacció. Ara bé, en contacte amb èter dietílic el polímer és insoluble i cristal·litza afavorint els processos de purificació.^{25,44} Aquest mètode permet, a la vegada, l'ús d'excessos de reactius treballant en dissolució i, finalment, induir la precipitació de la resina i per tant l'eliminació dels reactius per filtració, com en una síntesi en fase sòlida.

1.2.4. TIPUS DE FORMATS

Un altre factor important a tenir en compte a l'hora de dissenyar una quimioteca i que determina tant la metodologia de síntesi com el nombre d'assaigs biològics a realitzar durant el procés de cribratge és la seva estructura, la qual pot ser de composts individuals o de mescles controlades.

1.2.4.1. Quimiotèques de composts individuals. Síntesi en paral·lel

La síntesi en paral·lel de composts individuals, tant en dissolució com en fase sòlida, és aquella en la qual a cada reactor es sintetitza un únic producte. En aquestes condicions, la identificació del compost responsable d'una activitat determinada durant el procés de cribratge de la quimioteca és immediata i directa. No obstant, això requereix un nombre d'assaigs biològics a realitzar igual al nombre de composts que tingui la quimioteca, motiu pel qual es requereix que el procés estigui automatitzat i robotitzat.

Cal esmentar que aquesta metodologia és la preferida per les empreses farmacèutiques ja que s'eviten els processos de deconvolució i resíntesi necessaris en la síntesi de mescles, així com la possibilitat de tenir falsos positius.

1.2.4.2. Quimiotèques de mescles controlades

En les quimiotèques de mescles controlades és on s'aplica pròpiament el concepte combinatori ja que cada reactor conté una barreja de productes, els quals s'avaluen de forma conjunta emprant un nombre reduït d'assaigs biològics. Posteriorment, es fa necessari realitzar un procés de deconvolució recurrent a la lògica de la construcció de les mescles i/o resíntesi dels composts individuals més actius per validar i comprovar els resultats obtinguts.

Les dues metodologies més emprades per a la síntesi de mescles controlades són: la de divisió i mescla (*split & mix*) en la qual hi ha una mescla de resines i el rastreig posicional (*positional scanning*), en el qual es mesclen els reactius.

1.2.4.2.1. Divisió i mescla (*split & mix*)

Aquesta metodologia va ser desenvolupada inicialment per Á. Furka.^{18,45} Consisteix en la repetició de tres operacions: dividir el suport sòlid en tantes porcions com diversitat s'ha d'introduir, acoblament de cada porció per separat amb una font de diversitat i, finalment, mesclar les diferents porcions de resina per tornar a separar-les. El procés es repeteix n vegades (vegeu Figura 1.3).

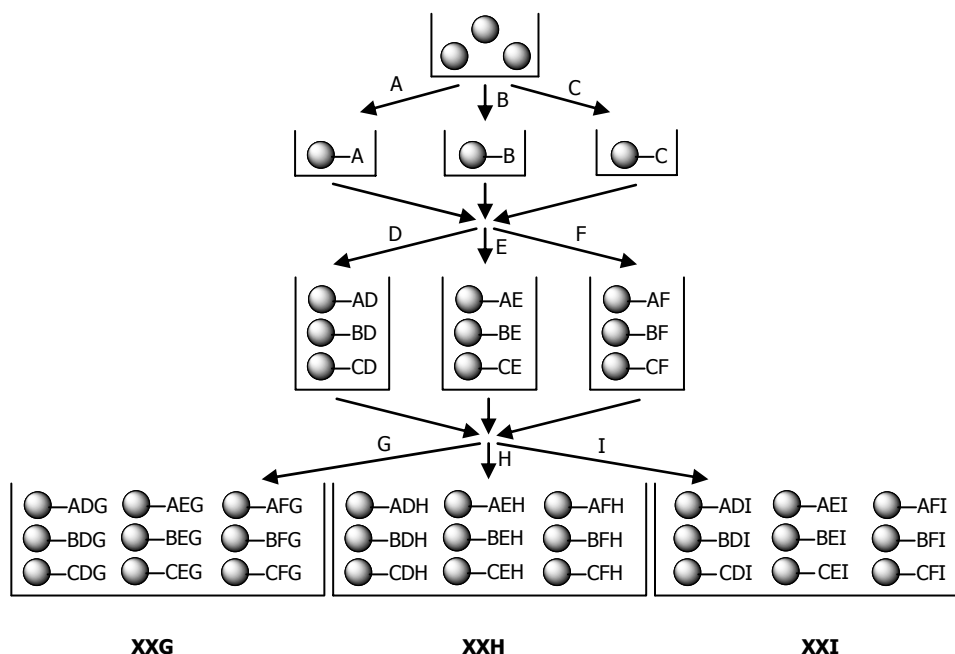


Figura 1.3. Esquema representatiu de la metodologia de divisió i mescla amb tres fonts de diversitat i tres elements de diversitat a cadascuna. S'obtenen 27 composts distribuïts en 3 mescles de 9 composts.

Com es veu, es treballa amb mescla de suports i només hi ha un reactiu per reactor, de tal manera que s'eviten els problemes de diferència de reactivitat entre reactius de naturalesa diversa. Donat el format de la síntesi, cada granet de resina conté un únic compost (one *bead-one compound*), concepte introduït per primera vegada per Lam *et al.*,^{46,47} del qual només se'n coneix l'última posició.

La determinació dels composts de la mescla responsables de l'activitat s'ha de realitzar mitjançant una deconvolució de tipus iterativa, tècniques de microanàlisi (microseqüenciació^{46,48} i espectrometria de masses^{49,50}) o bé mitjançant l'etiquetatge del suport sòlid per codificació isotòpica,⁵¹ radiofreqüència⁵² o etiquetes haloaromàtiques,⁵³ entre d'altres.

1.2.4.2.1.1. Deconvolució iterativa i deconvolució recursiva per al format de divisió i mescla

El cribratge o avaluació de les mescles d'una quimioteca sintetitzada en format de divisió i mescla, les quals tenen l'última posició coneguda, davant d'una determinada diana biològica selecciona els elements de diversitat que mostren més activitat per aquesta posició (H en la Figura 1.4). A continuació es resintetitza la quimioteca definint l'última posició amb els elements de diversitat més actius seleccionats en el primer cribratge, de tal manera que el nou cribratge seleccionarà els elements de diversitat amb més activitat per a la posició anterior (D en la Figura 1.4). Aquest procés té lloc de forma iterativa fins que es seleccionen els elements de diversitat amb més activitat per a cada posició de la quimioteca, identificant-se en últim terme el/els composts amb més activitat⁵⁴ (en el cas de la quimioteca de la Figura 1.4, la resíntesi tindria lloc dues vegades fins identificar CDH).

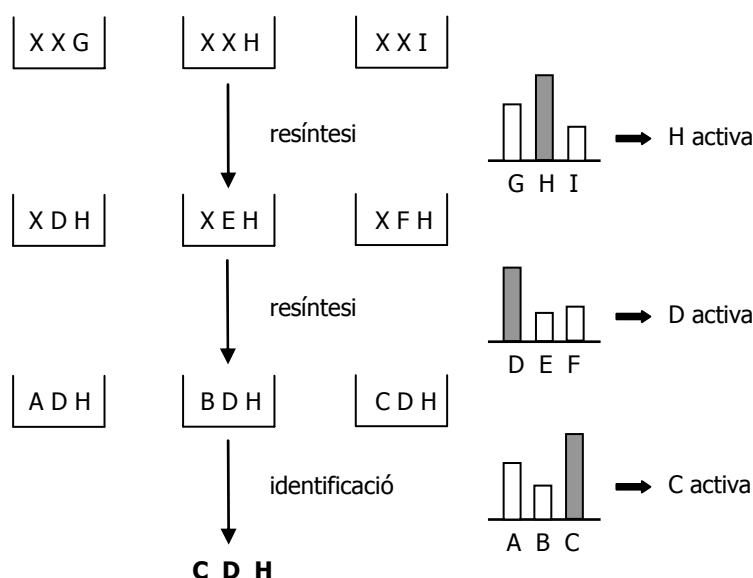


Figura 1.4. Deconvolució iterativa i de resíntesi en el format de divisió i mescla, fins a la identificació de compost més actiu CDH. X representa una posició no definida.

L'inconvenient d'aquest procés és que s'ha de resintetitzar la quimioteca tantes vegades com etapes d'introducció de fonts de diversitat s'hagin fet i, a més, és possible que es seleccionin més d'un element de diversitat per a cada posició, fet que incrementaria el nombre de resíntesis que s'haurien de realitzar.

Una alternativa a aquest procés iteratiu és la deconvolució recursiva on es separa una porció de resina a cada etapa d'introducció de diversitat, per estalviar temps a l'hora de resintetitzar la quimioteca en el procés deconvolutiu. Aquesta estratègia la va seguir el grup de Janda per sintetitzar una quimioteca de pentapèptids.⁴⁴

1.2.4.2.2. Rastreig posicional (*positional scanning*)

Aquesta metodologia es basa en una mescla de reactius a l'hora d'introduir la diversitat química, els quals es fan reaccionar simultàniament per obtenir una barreja final de composts. El procediment consisteix en sintetitzar les diferents mescles formant subquimiotèques, tantes com posicions de diversitat s'hagin d'introduir. Aquestes subquimiotèques contindran la totalitat dels productes de la quimioteca, però organitzats de forma diferent en cada mescla. De fet, cada subquimioteca conté una posició definida i coneguda (O), mentre que les altres esdevenen posicions aleatòries (X), on hi ha una mescla de totes les fonts de diversitat possibles (vegeu Figura 1.5). Cada subquimioteca té Z^n composts diferents, repetits en totes elles, on Z representa el nombre d'elements introduïts en cada font de diversitat i n és el nombre de fonts de diversitat.⁵⁵

En treballar amb mescles de reactius, és molt important conèixer la reactivitat relativa de les diferents fonts de diversitat, a fi que la mescla contingui els productes en quantitats aproximadament equimoleculars.⁵⁶ Una distribució descompensada dels components de la mescla pot conduir a resultats enganyosos a l'hora de l'avaluació de la quimioteca.

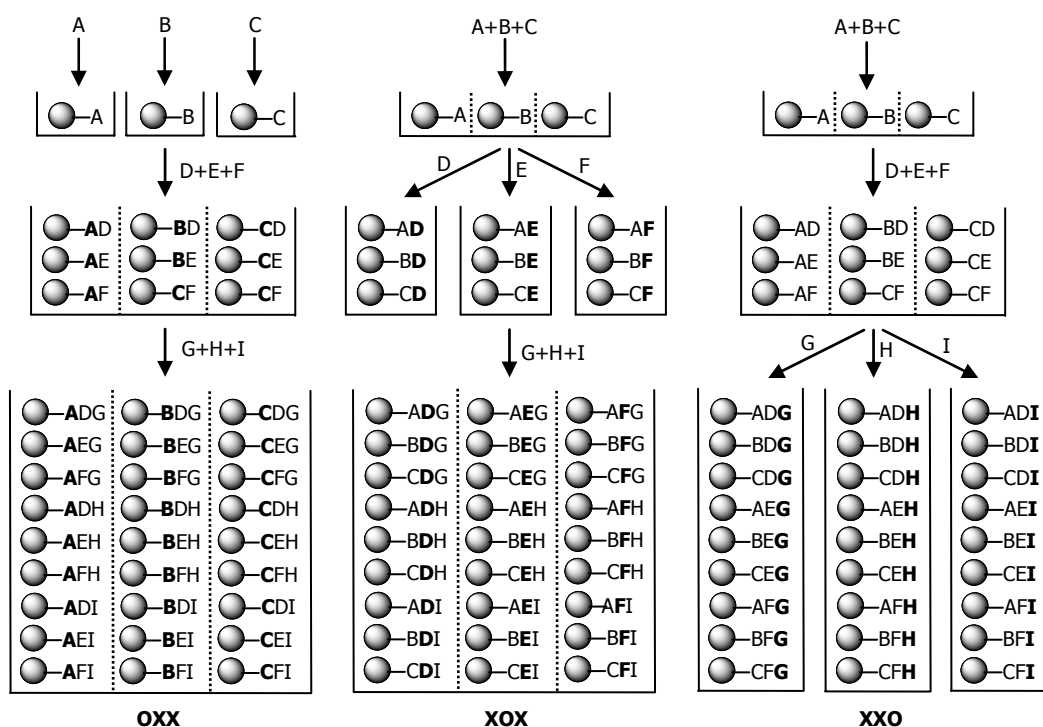


Figura 1.5. Esquema representatiu de la metodologia de rastreig posicional amb 3 fonts de diversitat i 3 elements de diversitat a cadascuna. S'obtenen 3 subquimiotèques amb 27 composts repetits a cadascuna. Cada subquimioteca conté una posició definida (O) mentre que les altres dues són aleatòries (X).

La determinació dels composts de la mescla responsables de l'activitat s'ha de realitzar mitjançant un procés de deconvolució, tal i com s'explica a continuació.

1.2.4.2.2.1. Deconvolució per al format de rastreig posicional

Aquesta estratègia de deconvolució va ser desenvolupada per R. Houghten *et al.*^{55,57} i permet identificar els composts més actius d'una quimioteca de mescles sintetitzada en format de rastreig posicional realitzant un únic assaig per mescla. El cribratge realitzat sobre cada subquimioteca dóna informació de quines fonts de diversitat són més actives per la posició que defineixen, tal i com es mostra esquemàticament en la Figura 1.6. La combinació dels elements amb més activitat per a cada font de diversitat condueix a la identificació del/s compost/os individual/s més actius de la quimioteca.

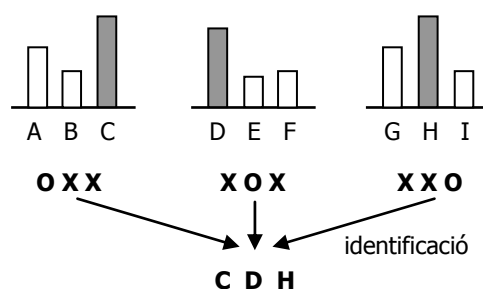


Figura 1.6. Deconvolució per rastreig posicional fins a la identificació del compost més actiu CDH. O representa una posició definida i X una posició aleatòria.

Aquesta metodologia requereix un procés addicional de validació, ja que en treballar amb mescles de productes, es poden produir falsos positius en seleccionar una mescla activa com a resultat de la suma de petites activitats de diversos composts que hi són presents. La validació d'aquest procés consisteix en resintetitzar els composts identificats amb més activitat de forma individual i tornar a realitzar els assaigs biològics per confirmar els resultats de la quimioteca de mescles.

1.2.5. ALTRES ESTRATÈGIES COMBINATÒRIES

1.2.5.1. Quimiotèques virtuals

De forma complementària a la síntesi i cribratge de les quimiotèques, els treballs en química combinatòria s'estan orientant a la utilització de tècniques computacionals per al disseny de noves quimiotèques i l'optimització de composts dels quals ja se'n coneix l'activitat biològica. D'aquesta manera es pot explorar virtualment un espai conformacional molt més ampli d'una forma ràpida i, a través de diferents filtres, reduir el nombre de composts a

sintetitzar i avaluar posteriorment, contribuint a una reducció important dels costos en la fase preclínica.

Les *quimiotèques virtuals*⁵⁸ són quimiotèques dissenyades amb eines computacionals segons l'ús de bases de dades electròniques, tenint en compte una sèrie de descriptors químics. Aquests descriptors defineixen característiques com lipofília, moment dipolar, grups funcionals, així com determinades característiques estructurals en funció del receptor amb què hauran d'interaccionar. Així mateix, es poden trobar grans bases de dades de composts i programes que amb els seus algorismes permeten reduir el risc de generar composts amb característiques inadequades o que siguin difícils de sintetitzar.⁵⁹ Seguidament, el cribratge virtual d'aquestes quimiotèques aplicant determinats models que permetin avaluar l'activitat biològica dels composts permet identificar aquells que presentin més activitat, els quals hauran de ser sintetitzats de forma real i tornar a ser avaluats per confirmar els resultats.

1.2.5.2. Quimiotèques dinàmiques

A finals dels anys 90 es va originar un altre concepte dins de la química combinatòria provinent del camp del reconeixement molecular i desenvolupat fonamentalment per J. M. Lehn, el de les *quimiotèques dinàmiques*.⁶⁰⁻⁶² Aquesta metodologia treballa amb el concepte de reacció reversible i es basa en la síntesi d'una col·lecció de composts que es troben en equilibri dinàmic. Serà la interacció preferent amb una diana determinada la que produirà el desplaçament dels equilibris conduint a un increment de la concentració del compost amb més activitat, el qual es pot aïllar i identificar (vegeu Figura 1.7).

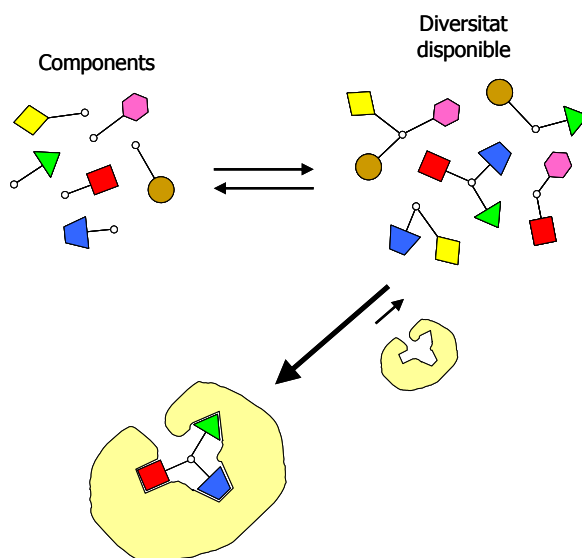


Figura 1.7. Generació d'una quimioteca dinàmica i desplaçament dels equilibris per interacció amb una diana seleccionada.

1.2.5.3. Quimiotèques de quimiotèques

Aquest concepte va ser introduït per Houghten *et al.*^{63,64} i consisteix en aplicar diverses transformacions químiques (alquilació, oxidació, reducció, acilació, etc.) sobre les quimiotèques sintetitzades quan aquestes encara estan ancorades sobre el suport sòlid, per obtenir-ne de noves que presentin diferents propietats físiques, químiques i biològiques. D'aquesta manera es poden generar i desenvolupar sèries de quimiotèques diferenciades estructuralment, ampliant ràpidament l'espai químic explorat.

1.2.5.4. Genètica química

El concepte de *genètica química*,⁶⁵⁻⁶⁷ introduït per S. L. Schreiber, ha consituït un avenç destacable en la utilització de la química combinatòria. Una manera d'entendre la funció cel·lular d'una proteïna és alterar-ne la funció. Per aconseguir-ho, l'aproximació genètica utilitza la generació de mutacions inactivadores en els gens que codifiquen la proteïna fins aconseguir l'efecte desitjat. Schreiber, va proposar una aproximació complementària, com és la utilització de molècules orgàniques per alterar la funció proteica mitjançant la unió com a lligand. En aquest sentit actuarien com una mena de *knock out* (vegeu Figura 1.8).

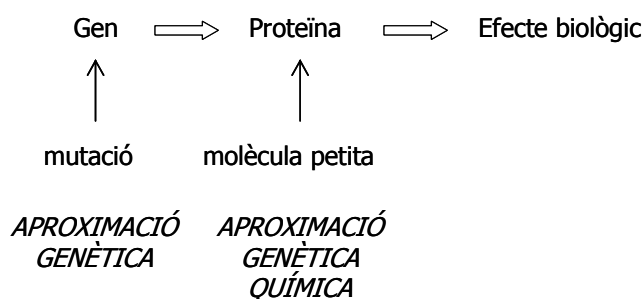


Figura 1.8. Aproximació genètica i genètica química.

L'objectiu d'aquesta estratègia seria la identificació d'una molècula petita que interaccionés amb una proteïna determinada amb l'avantatge de poder alterar-ne la funció i, a més a més poder-la modular i controlar. La química combinatòria jugaria un paper important dins d'aquesta aproximació, tant des del punt de vista de la generació d'aquestes molècules com en la posterior modificació per controlar-ne l'efecte. Experimentalment, es procediria escollint aquella molècula, entre totes les d'una quimioteca combinatòria, que produís l'efecte biològic desitjat i, posteriorment, s'identificaria sobre quina proteïna interacciona. Finalment, la modificació d'aquesta molècula proporcionaria el control sobre el seu efecte biològic.

1.2.5.5. Evolució biològica-Evolució química

Aquesta estratègia introdueix el concepte *d'evolució d'un fàrmac*, convertint l'evolució biològica en evolució química. Aquest procés d'optimització es pot dur a terme mitjançant diverses aproximacions, entre les quals destaquen la dels algorismes genètics introduïda per J. H. Holland⁶⁸ i la d'hibridació introduïda per Lazar *et al.*⁶⁹.

Els *algorismes genètics*⁷⁰ es basen en els principis evolutius i de selecció natural de Darwin, permetent una evolució dinàmica del conjunt de molècules (anomenat població) per anar millorant gradualment les seves propietats per competició. Durant aquest procés d'evolució (vegeu Figura 1.9), diferents individus (molècules) són seleccionats, creuats i mutats per generar nous individus, els quals són avaluats segons una funció o model respecte la seva capacitat d'adaptació al medi (qualitat de la solució que ofereix al problema plantejat). Només els millors candidats seran seleccionats per formar part de la següent generació, aconseguint així anar millorant les seves propietats pas a pas.

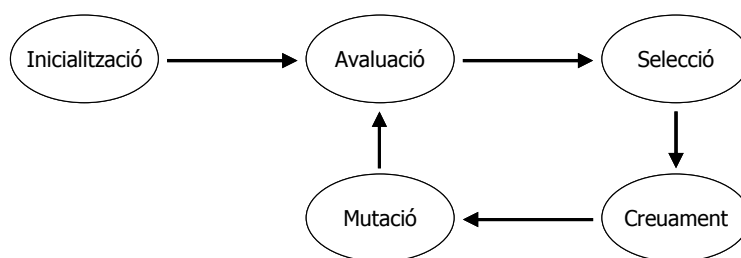


Figura 1.9. Etapes del procediment general utilitzat per l'estratègia dels algorismes genètics.

La *hibridació* és un mètode evolutiu anàleg al descrit per J. H. Holland, però d'aproximació més general, que treballa sense una diana específica. Consisteix en l'evolució de fàrmacs ja existents, mimetitzant el procés de fecundació combinant dos fàrmacs pares, per desenvolupar-ne de nous que es puguin aplicar a un ventall ampli de dianes terapèutiques i dissenyar quimioteques generalistes d'evolució de fàrmacs. L'únic requisit que han de complir els fàrmacs pares és tenir el mateix esquelet, ja que la combinació dels blocs de construcció es farà sempre per a cada posició de diversitat determinada d'aquest esquelet, de la mateixa manera que la recombinació genètica es produeix amb els cromosomes corresponents (vegeu Figura 1.10).

La molècula 1 està substituïda amb els blocs de construcció R1 i R2 a la primera i segona posicions de diversitat, respectivament, mentre que la molècula 2 ho està amb els blocs de construcció R1' i R4' a la primera i quarta posicions de diversitat, respectivament. Els blocs de construcció R1 i R1' ocupen la mateixa posició de diversitat en les molècules pare, així que les molècules de segona generació (fills) tindran R1 o R1' en la primera posició de diversitat. En

canvi, la molècula pare 2 no té cap bloc de construcció en la segona posició de diversitat i la molècula pare 1 no en té a la quarta. Per aquest motiu, les molècules de segona generació tindran R2 o no tindran bloc de construcció en la segona posició de diversitat i tindran R4 o no tindran bloc de construcció en la quarta. D'aquesta manera, el resultat final seran sis molècules de segona generació fruit de la combinació dels blocs de construcció de les dues molècules pare 1 i 2.

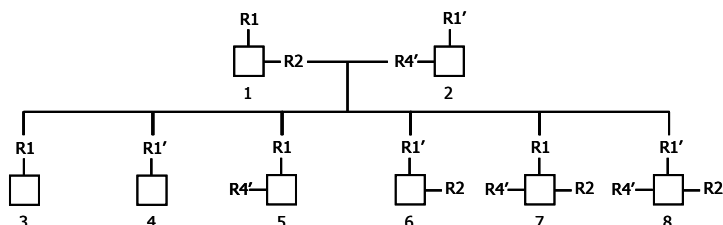


Figura 1.10. Esquema proposat per a la mescla de blocs de construcció seguint el mètode d'hibridació.⁶⁹

1.2.5.6. Síntesi de quimiotèques utilitzant la irradiació per microones

En els últims anys, la síntesi orgànica en fase sòlida i en solució assistida per microones ha generat un gran interès.⁷¹ En la bibliografia es recullen reaccions de diferents tipus, les quals es veuen accelerades i transcorren amb bons rendiments i pureses elevades, reduint en alguns casos el temps de reacció d'hores a pocs minuts.⁷² Aquest èxit es deu principalment al procés d'escalfament, el qual és ràpid i eficient degut al contacte directe de l'energia sobre les molècules polars i depèn de la capacitat del material per absorbir energia i convertir-la en calor.

Aquestes característiques són les apropiades per a la química combinatòria ja que permeten la generació de composts d'una forma ràpida i amb un bon rendiment. Per aquest motiu, aquesta tecnologia va passar ben aviat a ser una eina molt utilitzada i en contínua expansió dins de la química combinatòria.⁷³ El primer exemple va ser el descrit per Cotterill *et al.*⁷⁴ l'any 1998 per a la síntesi en paral·lel d'una quimioteca de piridines substituïdes. Més tard se'n van descriure en síntesi en paral·lel en fase sòlida,⁷⁵ en síntesi automàtica seqüencial en dissolució⁷⁶ i en síntesi en fase sòlida en format de divisió i mescla.⁷⁷ Finalment, cal esmentar que la segona part d'aquesta memòria està dedicada precisament a la síntesi assistida per microones, explicant a fons els seus fonaments i la seva aplicació a la síntesi de la primera quimioteca en fase sòlida en format de rastreig posicional.

1.2.5.7. Preparació de quimiotèques utilitzant la síntesi fluorada

Aquesta estratègia sorgeix com alternativa a la síntesi en fase sòlida i consisteix en el marcatge del substrat de reacció amb una etiqueta fluorada o perfluorada, permetent així

aprofitar els avantatges que ofereix la síntesi en fase sòlida (fàcil purificació dels composts i separació per extracció en fase fluorada, possibilitat d'utilitzar excessos de reactius, etc.) juntament amb els que ofereix la síntesi en fase líquida (compostos solubles en dissolvents orgànics, seguiment de reaccions per mètodes convencionals, purificació d'intermedis de reacció, etc.).⁷⁸

No obstant, presenta alguns inconvenients: a l'augmentar el contingut de fluor el compost esdevé menys orgànic i podem trobar problemes de solubilitat, els efectes estèrics o electrònics de l'etiqueta fluorada poden modificar la reactivitat del substrat i, finalment, la mida de l'etiqueta ha de ser proporcional al pes del compost perquè mantingui aquesta afinitat per la fase fluorada.

1.3. ELS PEPTIDOMIMÈTICS

Una gran quantitat de funcions biològiques i fisiològiques estan controlades per pèptids o proteïnes de pes molecular baix. Ara bé, tot i el seu potencial farmacològic, els fàrmacs peptídics sovint presenten una baixa disponibilitat oral degut a una baixa absorció intestinal, una elevada inestabilitat metabòlica, accions múltiples i àmplies fluctuacions en el seu comportament farmacocinètic. D'aquí la necessitat de desenvolupar pèptids modificats o peptidomimètics que presentin unes propietats farmacològiques més favorables.

Els *peptidomimètics* són composts estructuralment semblants als pèptids per tal de mantenir la seva activitat biològica, però que no presenten els desavantatges mencionats. En aquest sentit, s'han descrit un gran nombre de modificacions estructurals partint de l'estructura del pèptid natural⁷⁹ (vegeu Figura 1.11).

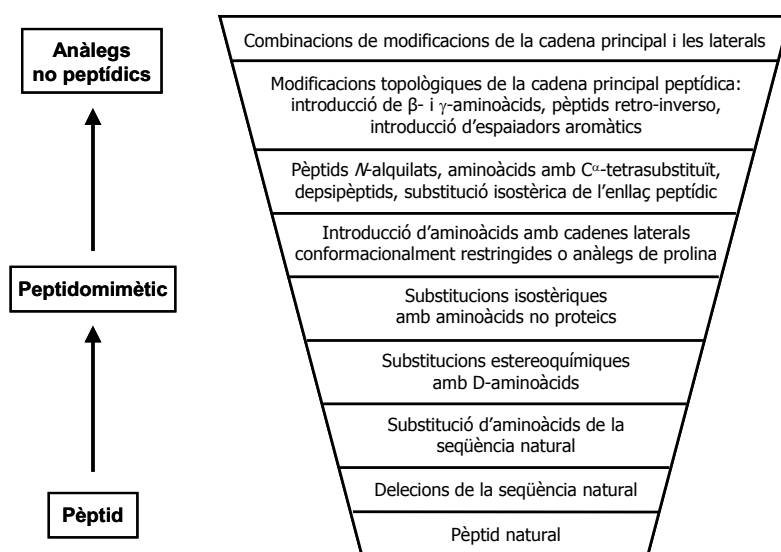


Figura 1.11. Esquema representatiu de les diferents modificacions estructurals introduïdes mirant d'optimitzar les propietats farmacològiques dels pèptids.⁸⁰

1.3.1. ELS PEPTOIDES

Entre les diferents estructures peptidomimètiques, fa uns anys que el nostre grup d'investigació es va interessar en els peptoides. Formalment, aquests composts són oligòmers de glicines *N*-substituïdes que difereixen estructuralment dels pèptids en el trasllat de les seves cadenes laterals, passant del carboni en alfa al grup carbonil a l'àtom de nitrogen de l'enllaç amida (vegeu Figura 1.12).

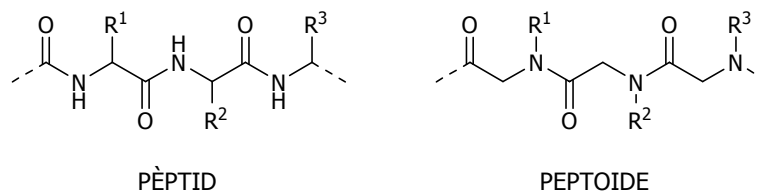


Figura 1.12. Estructura d'un pèptid i d'un peptoid. R^1 , R^2 i R^3 representen la diversitat introduïda per les cadenes laterals.

Aquesta diferència estructural confereix als peptoides una major estabilitat metabòlica i una menor polaritat, característiques que es tradueixen en una elevada resistència a la hidròlisi per part de les proteases de l'organisme, una millor absorció intestinal i, a més, una llibertat conformational més gran degut a la incapacitat de formar els ponts d'hidrogen que tenen els pèptids.^{81,82} La comparació més detallada de les característiques principals dels pèptids i els peptoides queda resumida en la Taula 1.2.

Taula 1.2. Comparació de les principals característiques dels pèptids i els peptoides.⁸³

	Pèptids	Peptoides
Identitat	Polímers d'aminoàcids	Polímers d' <i>N</i> -alquilglicines
Síntesi	En fase sòlida. Polimerització d'aminoàcids <i>N</i> -protegits (Fmoc o Boc)	En fase sòlida mitjançant l'estratègia del monòmer o del submonòmer
Nombre de cadenes laterals	20	Derivats dels centenars d'amines primàries, tant comercials com sintètiques
Estructures secundàries	Hèlix α i full β	Hèlix
Estabilització estructural	Enllaç per pont d'hidrogen intramolecular	Repulsions estèriques i electròniques
Estabilitat tèrmica de les estructures	Fins ~40 °C	> 75 °C
Estabilitat estructural en dissolució	Es desnaturalitzen amb una concentració salina elevada, en dissolvents orgànics o a pH extrem	Generalment estables a concentracions salines elevades, pH i dissolvents orgànics.
Estabilitat <i>in vivo</i>	Degradació ràpida (proteòlisi)	Més estables a la proteòlisi.

Finalment, cal destacar que la diversitat química en els peptoides es pot introduir a través d'amines primàries, com es detallarà més extensament en la part I d'aquesta memòria, posant de manifest el potencial combinatori que presenten aquest tipus d'estructures de cara a la identificació de composts bioactius.

1.4. OBJECTIUS

Donat el gran impacte de la química combinatòria en la recerca de molècules farmacològicament actives i d'acord amb l'interès i experiència del nostre grup d'investigació en l'aplicació d'aquesta estratègia dins del camp de la recerca biomèdica, es va plantejar com a objectiu global d'aquesta tesi el desenvolupament de noves estratègies sintètiques per a la preparació d'oligòmers d'*N*-alquilglicina amb potencial activitat davant de diferents dianes biològiques.

Així doncs, els objectius plantejats a l'inici d'aquest treball i els que se'n van derivar posteriorment van ser els següents:

1. Estudis sobre la síntesi de peptoides derivats de la deconvolució de quimiotèques combinatòries que presenten amines amb una amina terciària en la cadena lateral en la seva estructura.
2. Síntesi i caracterització del peptoide N22-6-16C (SICHI), identificat com a inhibidor potencial de la senyalització d'inhibidors endògens del creixement axonal (Semaforines). Aquest bloqueig pot constituir una nova via per estimular la regeneració neuronal.
3. Utilització de la tecnologia d'escalfament per microones per a la síntesi de peptoides. Optimització de les diferents etapes sintètiques i aplicació per a la síntesi d'una quimioteca de pentàmers d'*N*-alquilglicines en format de rastreig posicional.

**PART I. SÍNTESI DE MONÒMERS D'N-ALQUILGLICINES. ESTUDIS
SOBRE EL PEPTOIDE N22-6-16C**

SUMARI PART I

2. INTRODUCCIÓ	29
2.1. Antecedents	31
3. SÍNTESI DE PEPTOIDES EN FASE SÒLIDA	35
3.1. Síntesi en fase sòlida	35
3.2. Elecció del suport sòlid	36
3.2.1. Manipulació de la resina	37
3.3. Criteri de nomenclatura dels peptoides	38
3.4. Síntesi de peptoides definits	39
3.4.1. Productes secundaris de ciclació	39
3.4.2. Síntesi del peptoide N22-6-16C (1)	41
3.4.2.1. Estratègia del submonòmer	42
3.4.2.2. Estratègia del monòmer	43
3.4.2.3. Estratègia mixta	43
4. SÍNTESI DE MONÒMERS D'N-ALQUILGLICINES	47
4.1. Introducció	47
4.2. Estratègia 1: protecció amb el grup Fmoc	50
4.2.1. Obtenció dels N-alquilaminoacetats de <i>tert</i> -butil	50
4.2.2. Obtenció de les N-alquilglicines	51
4.2.3. Obtenció de les N-alquilglicines protegides amb Fmoc	52
4.2.4. Aplicació dels monòmers d'N-alquilglicines protegits amb el grup Fmoc a la síntesi de peptoides	53
4.2.4.1. Síntesi del peptoide model N22-22-15C (22)	53
4.2.4.2. Síntesi del peptoide N22-6-16C (1)	55
4.3. Estratègia 2: protecció amb el grup Alloc	56
4.3.1. Obtenció dels N-alquilaminoacetats d'etil	56
4.3.2. Obtenció dels carbamats d'al·lil	58
4.3.3. Obtenció de les N-alquilglicines protegides amb Alloc	59
4.3.4. Aplicació dels monòmers d'N-alquilglicines protegits amb el grup Alloc a la síntesi de peptoides	60
4.3.4.1. Síntesi del peptoide N22-6-16C (1)	60
4.4. Estratègia 3: protecció amb el grup Ns	61
4.4.1. Obtenció de les N-alquil-2-nitrobenzensulfonamides	61
4.4.2. Obtenció de les N-alquil-N- <i>tert</i> -butoxicarbonilmetil-2-nitro-benzensulfonamides	63
4.4.3. Obtenció de les N-alquilglicines protegides amb Ns	66
4.4.4. Aplicació dels monòmers d'N-alquilglicines protegits amb el grup Ns a la síntesi de peptoides	67
4.4.4.1. Síntesi del peptoide model N10-37-15C (59)	67
4.4.4.2. Síntesi del peptoide N22-6-16C (1)	70
4.4.4.3. Estudi de les condicions d'acoblament de monòmers d'N-alquilglicines d'amines amb un nitrogen terciari en la cadena lateral	71
4.4.4.4. Síntesi dels peptoides model N22-22-15C (22) i N16-22-15C (60)	73

4.4.4.5. Síntesi del peptòide N22-6-16C (1)	74
4.5. Resum i conclusions	75
5. ACTIVITAT BIOLÒGICA DEL PEPTOIDE N22-6-16C	79
5.1. Introducció	79
5.2. Cribatge de la quimioteca de peptòides-I	80
5.3. Activitat biològica del SICH1 (1)	83
5.3.1. Determinació de l'interval de concentració actiu	83
5.3.2. Activitat biològica de SICH1 en el creixement axonal	84
5.3.3. Activitat biològica de SICH1 en regeneració axonal	87
5.3.4. Mode d'actuació de SICH1	88
5.3.5. Efecte de SICH1 en la cascada de senyalització intracel·lular activada per Sema 3A	89
5.3.6. Activitat de SICH1 en regeneració neuronal	90
5.4. Conclusions	91
6. SUBPRODUCTE DE PM-14	93
6.1. Introducció	93
6.2. Determinació estructural del compost de PM-14	95
6.2.1. Experiments basats en la síntesi de diferents sèries de peptòides	96
6.2.1.1. Efecte de l'amina situada a l'extrem <i>N</i> -terminal	96
6.2.1.2. Efecte produït al canviar l'amina A22 de posició	97
6.2.1.3. Influència del canvi de les amines A6 i/o A16 per una amina aromàtica sense nitrogen terciari en la cadena lateral	98
6.2.1.4. Efecte de la longitud de la cadena lateral de l'amina A22	99
6.2.2. Experiments basats en el marcatge isotòpic	100
6.2.2.1. Marcatge de l'amina A22 . Síntesi de l'N22*-6-16C	100
6.2.2.1.1. Obtenció de l'amina deuterada 76	100
6.2.2.1.2. Obtenció de l'amina deuterada 79	101
6.2.2.1.3. Síntesi del peptòide N22 ⁺ -6-16C i N22 ⁺ -6-16C	102
6.2.2.2. Marcatge de l'amina A16 . Síntesi de l'N22-6-16*C	103
6.2.2.2.1. Preparació de l'amina deuterada 89	103
6.2.2.2.2. Síntesi del peptòide N22-6-16*C	106
6.3. Conclusions	107
7. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS	109
7.1. Consideracions generals	109
7.1.1. Instrumentació de la síntesi en fase sòlida	111
7.1.2. Controls qualitius en fase sòlida	112
7.1.2.1. Test del cloranil	112
7.1.2.2. Test del TNBS	112
7.2. Procediment general de la síntesi de peptòides a temperatura ambient per la via del submonòmer	112
7.2.1. En absència d'amines amb un nitrogen terciari addicional en R ³ i R ²	112
7.2.2. En presència d'amines amb un nitrogen terciari addicional en R ³ i R ²	113
7.2.3. Síntesi del peptòide N22-6-16C (1)	114
7.3. Síntesi de peptòides en fase sòlida per la via mixta	116

7.3.1. Estratègia 1: Síntesi de monòmers protegits amb Fmoc	116
7.3.1.1. Procediment general per a l'obtenció dels <i>N</i> -alquilaminoacetats de <i>tert</i> -butil	116
7.3.1.2. Procediment general per a l'obtenció de les <i>N</i> -alquilglicines	120
7.3.1.3. Procediment general per a l'obtenció de les <i>N</i> -alquilglicines protegides amb Fmoc	122
7.3.1.4. Aplicació dels monòmers d' <i>N</i> -alquilglicines protegits amb el grup Fmoc a la síntesi de peptoides	126
7.3.1.4.1. Síntesi del peptoid model N22-22-15C (22)	126
7.3.1.4.2. Síntesi del peptoid N22-6-16C (1)	127
7.3.2. Estratègia 2: Síntesi de monòmers protegits amb Alloc	128
7.3.2.1. Procediment general per a l'obtenció dels <i>N</i> -alquilaminoacetats d'etil	128
7.3.2.2. Procediment general per a l'obtenció dels carbamats d'al·lil	131
7.3.2.3. Procediment general per a l'obtenció de les <i>N</i> -alquilglicines protegides amb Alloc	134
7.3.2.4. Aplicació dels monòmers d' <i>N</i> -alquilglicines protegits amb el grup Alloc a la síntesi de peptoides	137
7.3.2.4.1. Síntesi del peptoid N22-6-16C (1)	137
7.3.3. Estratègia 3: Síntesi de monòmers protegits amb Ns	138
7.3.3.1. Procediment general per a l'obtenció de les <i>N</i> -alquil-2-nitrobenzen-sulfonamides	138
7.3.3.2. Procediment general per a l'obtenció d' <i>N</i> -alquil- <i>N</i> - <i>tert</i> -butoxicarbonilmetil-2-nitrobenzensulfonamides	143
7.3.3.3. Procediment general per a l'obtenció de les <i>N</i> -alquilglicines protegides amb el grup Ns	147
7.3.3.4. Aplicació dels monòmers d' <i>N</i> -alquilglicines protegits amb el grup Ns a la síntesi de peptoides	150
7.3.3.4.1. Síntesi del peptoid model N10-37-15C (59)	150
7.3.3.4.2. Síntesi del peptoid N22-6-16C (1)	151
7.3.3.4.3. Estudi de les condicions d'acoblament de monòmers d' <i>N</i> -alquilglicines d'amines amb un nitrogen terciari en la cadena lateral	152
7.3.3.4.4. Síntesi dels peptoides model N22-22-15C (22) i N16-22-15C (60)	152
7.3.3.4.5. Síntesi del peptoid N22-6-16C (1)	154
7.4. Determinació estructural del compost de PM-14	155
7.4.1. Experiments basats en la síntesi de peptoides. Sèries 1, 2, 3 i 4	155
7.4.1.1. Sèrie 1	155
7.4.1.2. Sèrie 2	155
7.4.1.3. Sèrie 3	156
7.4.1.4. Sèrie 4	156
7.4.2. Experiments basats en el marcatge isotòpic	157
7.4.2.1. Marcatge de l'amina A22	157
7.4.2.1.1. Síntesi de l'amina deuterada 76	157
7.4.2.1.1.1. Obtenció de l'acetamida 75	157
7.4.2.1.1.2. Obtenció de l'amina 76	157
7.4.2.1.2. Síntesi de l'amina deuterada 79	158
7.4.2.1.2.1. Obtenció del carbamat 77	158
7.4.2.1.2.2. Obtenció del carbamat 78	159
7.4.2.1.2.3. Obtenció de l'amina 79	159
7.4.2.1.3. Síntesi dels peptoides N22 ⁺ -6-16C i N22 ⁺ -6-16C	160

7.4.2.2. Marcatge de l'amina A16	160
7.4.2.2.1. Síntesi de l'amina deuterada 89	160
7.4.2.2.1.1. Obtenció del prolinol 80	160
7.4.2.2.1.2. Obtenció del Boc-prolinol 81	161
7.4.2.2.1.3. Obtenció del tosilat 82	162
7.4.2.2.1.4. Obtenció del nitril 83	163
7.4.2.2.1.5. Obtenció de l'homoprolina 84	163
7.4.2.2.1.6. Obtenció de l'homoprolinol 85	164
7.4.2.2.1.7. Obtenció del Boc-homoprolinol 86	165
7.4.2.2.1.8. Obtenció de l'N-metilhomoprolinol 87	165
7.4.2.2.1.9. Obtenció de la ftalimida 88	166
7.4.2.2.1.10. Obtenció de l'amina 89	167
7.4.2.2.2. Síntesi dels peptoides N22-6-16C i N22-6-16*C	167

2. INTRODUCCIÓ

La síntesi de quimiotèques de pèptids en fase sòlida ha permès la identificació de seqüències amb una elevada activitat biològica *in vitro* davant de determinades dianes.⁸⁴ No obstant, tal i com s'ha comentat anteriorment, els pèptids presenten limitacions en la seva aplicació farmacèutica degut als problemes en la seva activitat *in vivo*. Aquests problemes fan necessària la seva modificació per aconseguir millorar aquests desavantatges i desenvolupar composts amb activitats *in vivo* més acceptables.

En aquest sentit, s'ha realitzat un gran esforç per desenvolupar peptidomimètics, composts estructuralment semblants als pèptids per tal de mantenir la seva activitat biològica, però que no presentin els desavantatges mencionats. Entre els peptidomimètics més interessants es troben les glicines *N*-substituïdes o peptoides, els quals seran l'objecte d'estudi d'aquesta memòria.

Formalment, en l'esquelet dels peptoides, les cadenes laterals del carboni α de l'esquelet peptídic es traslladen cap el nitrogen de l'enllaç amida, donant lloc a amides disubstituïdes. Aquesta diferència estructural confereix als peptoides una estabilitat més elevada a la hidròlisi i una menor polaritat. Aquestes característiques es tradueixen en una elevada resistència a les proteases de l'organisme i millor absorció intestinal.⁸² A més, hi ha una llibertat conformacional més gran degut a l'absència de l'estructura secundària característica dels pèptids, en no formar-

se ponts d'hidrogen intramoleculars entre l'hidrogen d'amida i els carbonils. Així mateix, l'absència de quiralitat i l'àmplia varietat de blocs de construcció (*building blocks*) fan dels peptoides uns bons candidats per interaccionar amb diferents dianes terapèutiques.⁸¹

La primera síntesi de peptoides en fase sòlida aplicada a la química combinatòria va ser realitzada per Simon *et al.*⁸¹ emprant l'estratègia estàndard dels pèptids, amb *N*-alquilglicines protegides amb Fmoc, com a components monomèrics sintetitzats prèviament, i amb PyBop o PyBrop com a agents d'acoblament (vegeu Figura 2.1, part superior).

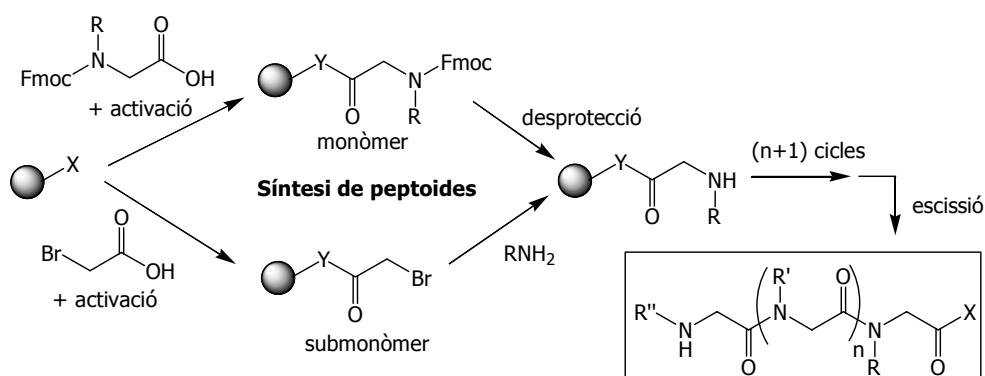


Figura 2.1. Síntesi en fase sòlida de peptoides. Dalt: acoblament d'*N*-alquilglicines protegides amb Fmoc.⁸¹ Baix: acoblament de submonòmers, haloàcids i amines primàries.⁸⁵ X=NH₂, OH; Y=NH, O.

Per altra banda, Zuckermann *et al.*^{85,86} van plantejar una síntesi més senzilla mitjançant l'aproximació del submonòmer, on cada cicle implica dues etapes: la formació de l'enllaç amida amb àcid bromoacètic emprant DIC (*N,N*-diisopropilcarbodiimida) com a agent activant i el desplaçament de l'àtom de brom per una amina primària, obtenint el monòmer corresponent d'*N*-alquilglicina. La successió d'aquests cicles conduiria al compost desitjat (vegeu Figura 2.1, part inferior).

Liskamp i Kruijtz van descriure la síntesi de peptoides en dissolució basada en l'acoblament d'unitats d'*N*-alquilglicina protegides amb Fmoc.⁸⁷ En aquest cas, treballar en dissolució pot ser adequat per obtenir peptoides concrets a gran escala, tot i que cal utilitzar menys equivalents de reactius per facilitar la seva eliminació i la purificació del compost final.

L'estratègia del submonòmer presentava certs avantatges respecte l'estratègia d'*N*-alquilglicines: la possibilitat d'emprar un gran nombre d'amines primàries comercials en l'etapa d'acoblament per obtenir quimiotèques amb una àmplia diversitat i l'eliminació de les etapes de síntesi prèvia dels monòmers. Amb aquesta metodologia, Zuckermann *et al.* van sintetitzar una quimioteca mitjançant el format de divisió i mescla, de la qual es van identificar, entre d'altres, antagonistes del receptor α_1 -adrenèrgic amb una activitat de l'ordre nanomolar.²³

2.1. ANTECEDENTS

En el context de la seva Tesi Doctoral,⁸⁸ Marc Humet va desenvolupar la síntesi d'una quimioteca de peptoides (trímers d'*N*-alquilglicines) en fase sòlida i en el format de rastreig posicional, formada teòricament per 10648 composts presents en tres subquimiotèques (OXX, XOX, XXO, on O representa una posició definida i X una mescla preequilibrada de les 22 amines), formades per 22 mescles amb 484 peptoides diferents cadascuna (quimioteca de peptoides-I).^{89,90} La síntesi es va dur a terme en fase sòlida utilitzant una resina Rink amida, seguint la tècnica de les "bossetes de te" (*tea bags*)¹⁷ i aplicant la metodologia sintètica mostrada en la Figura 2.2.

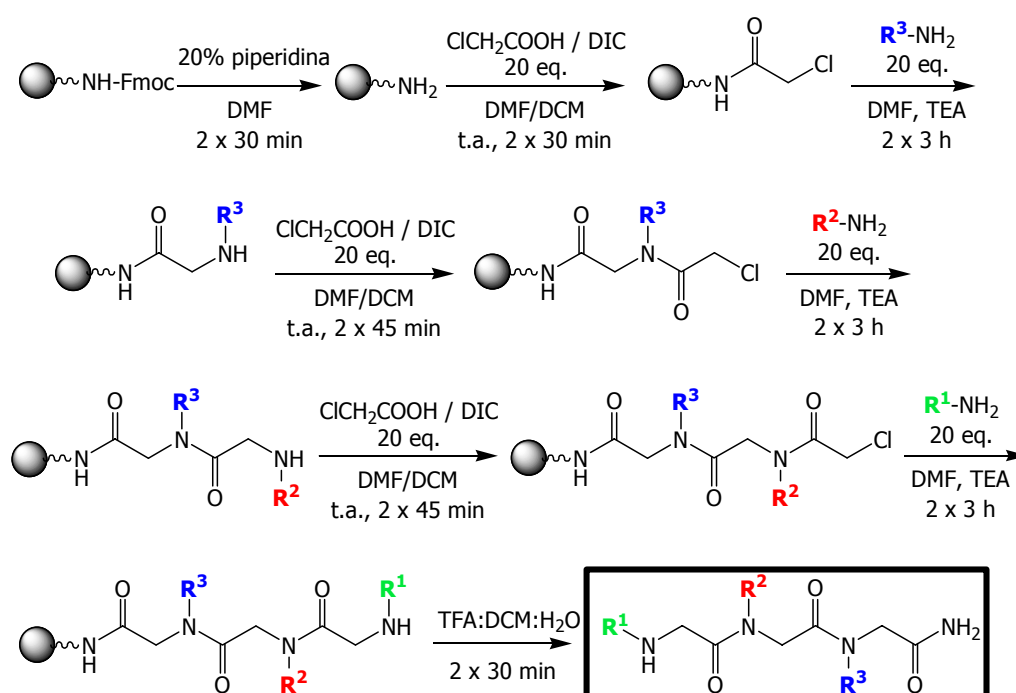


Figura 2.2. Esquema seguit per a la síntesi de la quimioteca de peptoides per M. Humet.⁸⁸

Com a fonts de diversitat es van fer servir amines primàries del tipus R-CH₂-CH₂-NH₂, escollides entre les disponibles en diferents catàlegs comercials seguint un criteri de diversitat química, però evitant la presència d'altres grups funcionals que poguessin donar reaccions secundàries, tals com alcohols, tiols, àcids carboxílics, etc., o que fos necessari una protecció addicional durant la síntesi de la quimioteca (vegeu Figura 2.3).

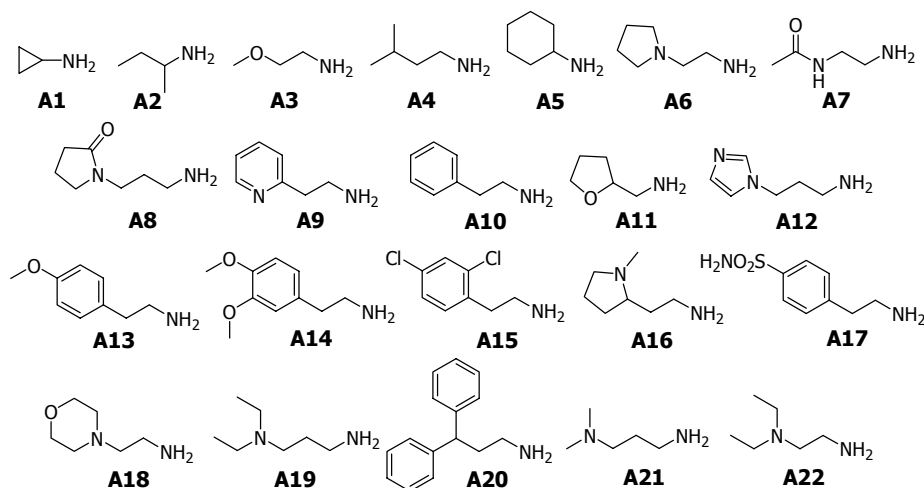


Figura 2.3. Les 22 amines primàries utilitzades com a font de diversitat en la síntesi de la quimioteca de peptoides-I.

El cribratge d'aquesta quimioteca es va realitzar sobre diverses dianes terapèutiques: bloquejadors de receptors d'NMDA,^{91,92} inhibidors de l'acetilcolinesterasa, antimicrobians,⁹⁰ bloquejadors de l'activitat del canal TRPV1⁸⁹ i inhibidors de semaforines. Es van identificar diferents composts amb una elevada activitat, els quals estan actualment en procés d'optimització.

No obstant, en el decurs dels diferents processos de deconvolució, a l'hora de resintetitzar de forma individual determinats peptoides, es va comprovar la formació de subproductes ciclats (en ocasions fins i tot s'obtenien com a productes majoritaris), a causa de l'atac nucleòfil d'una amina terciària d'una de les cadenes laterals de l'oligòmer sobre el cloroderivat corresponent, després de les etapes d'acilació.^{88,93} Aquest fet s'havia produït quan en la primera i/o segona fonts de diversitat hi havia una amina amb un nitrogen terciari addicional, conduint a la impossibilitat de finalitzar la síntesi. Per aquest motiu, en les diferents mesclades de la quimioteca no hi havia tots els peptoides que caldria o bé aquests s'havien format en quantitats inferiors a les esperades i, a més, s'hi trobaven alguns productes de ciclació no esperats com els que es mostren a la Figura 2.4.

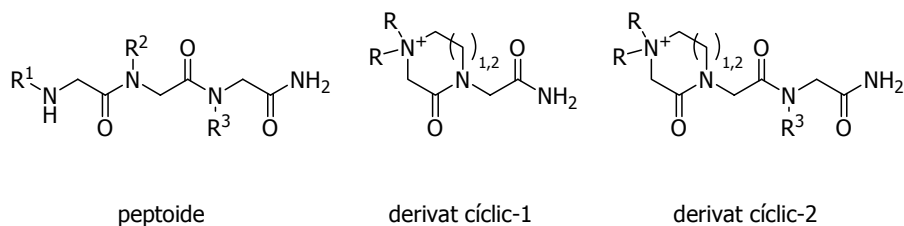
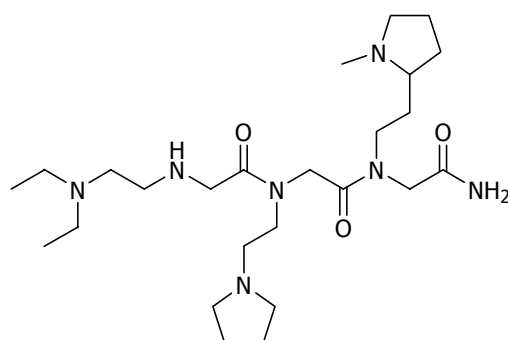


Figura 2.4. Composts obtinguts en la quimioteca de peptoides-I. Els derivats cíclics (cíclic-1 i cíclic-2, respectivament) es van obtenir quan en la primera i/o segona font de diversitat hi havia una amina amb un àtom de nitrogen terciari addicional (**A6**, **A16**, **A19**, **A21** i **A22** de la Figura 2.3).

En el transcurs de la seva Tesi Doctoral,⁹³ Isabel Masip va aprofitar aquest problema per sintetitzar una quimioteca de composts cíclics de tetraalquilamoni.⁹⁴ No obstant, era necessari desenvolupar noves estratègies sintètiques per a l'obtenció de peptoides amb amines que presentessin un àtom de nitrogen terciari en la seva cadena lateral, tant des del punt de vista de la preparació d'una quimioteca com de la síntesi individual composts. En aquest sentit, cal destacar el cas del peptoid N22-6-16C (SICHI, vegeu Figura 2.5), identificat com a inhibidor de semaforines, el qual conté aquest tipus d'amina en les tres fonts de diversitat i que es comentarà extensament al llarg dels següents capítols d'aquesta memòria.



N22-6-16C

1

Figura 2.5. Estructura del peptoid N22-6-16C (**1**) (SICHI, *Semaphorin Induced Chemorepulsion Inhibitor*) identificat com a inhibidor de semaforines (M. Montolio *et.al.*, manuscrit en preparació)

3. SÍNTESI DE PEPTOIDES EN FASE SÒLIDA

3.1. SÍNTESI EN FASE SÒLIDA

Un dels principals avantatges que presenta la síntesi en fase sòlida és la facilitat amb la qual els composts poden ser aïllats en cada etapa sintètica, a través de l'eliminació de les impureses i altres productes de reacció no units a la resina per filtració i rentat del suport sòlid. Això proporciona la possibilitat de realitzar síntesis d'una forma ràpida i paral·lela que generin quimiotèques combinatòries. Amb tot, s'han de tenir en compte una sèrie de consideracions.

És necessari que la seqüència sintètica sigui fàcilment adaptable a la fase sòlida, tenint en compte els aspectes mecànics de la resina escollida, la qual haurà de suportar les condicions requerides per a la síntesi.

Les etapes d'introducció de diversitat haurien de ser ràpides i transcórrer de forma anàloga per a tots els reactius emprats ja que, especialment en les síntesis de mescles, una diferència de reactivitat pot implicar que no es formin tots dels composts esperats, obtenint-se més quantitat d'aquells en què els reactius presenten unes condicions de reactivitat més favorables. Quan es treballa en síntesi en paral·lel de composts individuals, aquest aspecte no resulta tan important, ja que una reactivitat menor es pot arribar a compensar amb excessos de reactius que assegurin la màxima conversió. Això és cert sempre que aquesta diferència de reactivitat

no provoqui alentiments importants en la conversió de la reacció, amb la qual cosa el concepte de síntesi en paral·lel perdria sentit.

Com s'ha esmentat, en una síntesi en fase sòlida es solen utilitzar grans excessos de reactius per assegurar conversions elevades. Això es degut a que el control de l'evolució dels processos pot resultar complex. Així doncs, quan la reacció ho permet, la seva evolució es controla per anàlisi de l'aparició o desaparició de determinats grups funcionals sobre la pròpia resina, mitjançant tests qualitius colorimètrics (test de la ninhidrina, del cloranil, del TNBS, etc). En altres casos s'ha de procedir a l'escissió dels composts de la fase sòlida i dur a terme les anàlisis amb les tècniques convencionals de la síntesi en dissolució, com ara HPLC, RMN, CG-EM, CL-EM o MALDI. No obstant, també es troben a la bibliografia procediments per analitzar l'evolució de les reaccions sense haver d'escindir el producte de la resina, com l'anomenat angle màgic en RMN,⁹⁵⁻⁹⁸ tot treballant amb resines de tipus TentaGel, o per espectroscòpia d'IR.^{98,99}

Una vegada optimitzada la síntesi, els excessos de reactius permeten accelerar les reaccions i assegurar que tinguin conversions elevades en temps més curts i, inclús, en moltes ocasions cada etapa sintètica es fa per duplicat.

3.2. ELECCIÓ DEL SUPORT SÒLID

A l'hora de treballar sobre un suport sòlid o resina, s'ha de tenir en compte la seva compatibilitat tant amb els dissolvents orgànics utilitzats com amb el tipus de reaccions que s'hi duren a terme. En aquest sentit, la resina emprada per a la síntesi de peptoides va ser del tipus Rink amida, seguint les condicions descrites per Simon *et. al.*⁸¹ La utilització d'una resina de tipus amida, enlloc d'una resina Wang o d'altres amb una funcionalització de tipus ester, va ser deguda, principalment, a que en presentar un impediment estèric i una densitat electrònica més grans, es minimitzen els problemes potencials d'aminòlisi que ocorren amb suports sòlids de tipus ester,¹⁰⁰ especialment en les etapes d'acoblament d'amina (on s'utilitza un elevat excés de reactiu) i en presència de grups bàsics nucleòfils (vegeu Figura 3.1).

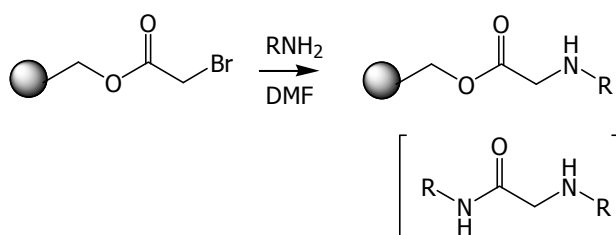


Figura 3.1. Esquema de l'etapa d'acoblament d'una amina primària en una resina de tipus ester. Formació del producte desitjat d'acoblament i del subproducte d'aminòlisi.

La resina Rink amida consisteix en un esquelet de poliestirè amb un 1% de divinilbenzè (DVB). El grau de DVB emprat permet arribar a una solució de compromís entre l'estabilitat mecànica i el grau d'inflat de la resina. La resina Rink aconsegueix un grau d'inflament òptim amb els dissolvents DCM i DMF. La molècula d'unió o *linker* entre el polímer i la molècula a sintetitzar constitueix l'anomenada molècula Rink amida AM (vegeu Figura 3.2).

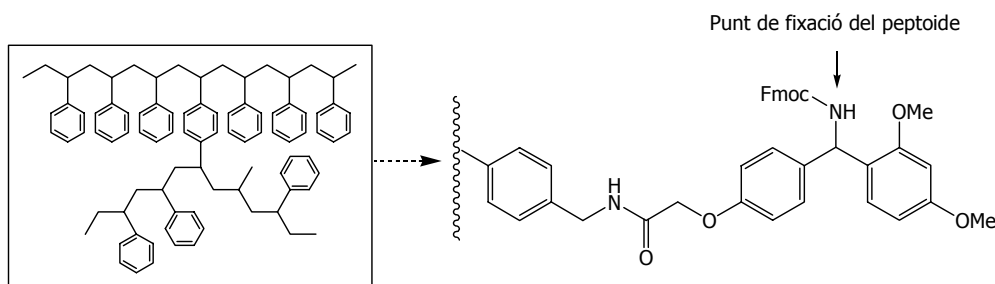


Figura 3.2. Resina Rink amida: esquelet de poliestirè amb un 1% de DVB (esquerra). Molècula d'unió o linker (dreta).

Una vegada el grup protector Fmoc és eliminat, el grup amino unit a la resina es pot acilar fàcilment emprant mètodes estàndard per a la formació de l'enllaç amida. L'amida resultant és estable a una gran varietat de condicions de reacció, però s'escindeix en medi àcid fort (TFA). La resina és tant més làbil al medi àcid com més estable sigui el catió format en l'escissió. En aquest cas, la presència dels grups alcoxi augmenten la labilitat en estabilitzar el carbocatió intermedi. Després de l'escissió del suport sòlid, la resina no pot ser reutilitzada, ja que el grup amino resta unit a la molècula sintetitzada.

3.2.1. MANIPULACIÓ DE LA RESINA

Entre les diferents metodologies per dur a terme les reaccions en fase sòlida per a la síntesi de peptoides de forma individual, es va escollir la que utilitza una xeringa de polipropilè com a "contenedor" de la resina o reactor (vegeu Figura 3.3).

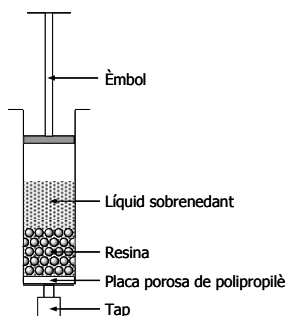


Figura 3.3. Xeringa de polipropilè com a reactor per a la síntesi en fase sòlida.

Els reactors es van obtenir a partir de xeringues normals de polipropilè de mides variables segons la quantitat de resina a treballar (2 ml, 5 ml o 10 ml), proveïdes d'una placa porosa i un tap de tefló. Amb aquests reactors és possible treballar a baixes temperatures, banyant parcialment les xeringues en un bany de gel o de neu carbònica, o bé treballar amb temperatures més elevades emprant blocs escalfadors o banys de sorra. El punt dèbil d'aquesta metodologia és la possibilitat de l'obertura espontània del reactor (que salti el tap o l'èmbol), degut a sobrepressions per canvis sobtats de temperatura amb dissolvents volàtils. En aquest sentit, tant la quantitat de dissolvent com les condicions de reacció utilitzades el nostre cas no feien preveure que es produís aquesta situació.

3.3. CRITERI DE NOMENCLATURA DELS PEPTOIDES

La forma d'anomenar els peptoides en aquest treball s'ha fet seguint el criteri emprat en els pèptids, és a dir, començant per l'extrem *N*-terminal i acabant pel C-terminal. Aquest ordre és l'invers del procés de síntesi. Per aquest motiu i per tal d'evitar confusions, la introducció de les fonts de diversitat durant la síntesi es denota en sentit contrari, començant per exemple en el cas dels trímers per R^3 (primera font de diversitat) i acabant per R^1 (tercera font de diversitat).

Per altra banda, al llarg d'aquesta memòria s'anomenaran els peptoides (trímers, pentàmers, etc.) definits d'una forma abreujada per tal de facilitar la seva identificació (vegeu Figura 3.4). Així doncs, començant per l'extrem *N*-terminal i acabant pel C-terminal s'anomenaran les amines que defineixen cada posició del peptoide, tenint en compte la numeració de les amines especificada en la Figura 2.3 del capítol 2.

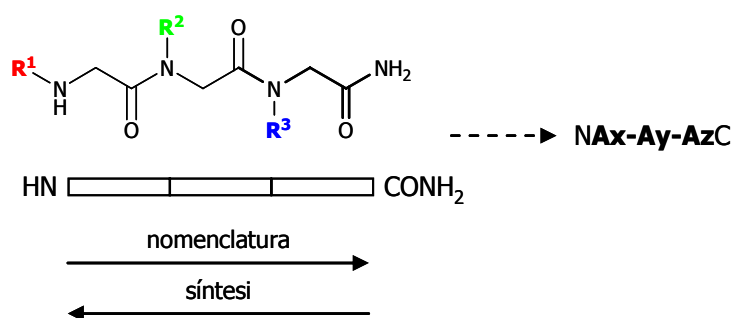


Figura 3.4. Sentit escollit per a la nomenclatura dels peptoides i criteri utilitzat per anomenar-los, on Ax indica l'amina de la tercera posició de diversitat (R^1), Ay l'amina de la segona posició (R^2) i Az l'amina de la primera posició (R^3).

3.4. SÍNTESI DE PEPTOIDES DEFINITS

La identificació d'un compost actiu després del cribratge d'una quimioteca sintetitzada segons el format del rastreig posicional, requereix un procés de deconvolució fent ús de la lògica de construcció de les mescles, seguit d'una resíntesi dels composts seleccionats per tornar-los a assajar i validar els resultats obtinguts.

La seqüència seguida per a la síntesi de peptoides de forma individual seria anàloga a la descrita per a la síntesi de la quimioteca de peptoides (vegeu Figura 2.2 del capítol 2). No obstant, en aquest cas cada posició del trímer estaria definida per una amina determinada i la síntesi es realitzaria en les xeringues de polipropilè comentades anteriorment, en comptes de les bossetes de te que es van fer servir per a la síntesi de la quimioteca. A més, al tractar-se de composts individuals, es rebaixaria la quantitat d'excés de reactius, passant de 20 eq. a 5 eq i es podrien analitzar els crús de reacció per HPLC i identificar els corresponents peptoides pel seu espectre de masses i les seves dades espectroscòpiques.

3.4.1. PRODUCTES SECUNDARIS DE CICLACIÓ

Durant el procés de resíntesi de diferents peptoides identificats com actius en el procés de cribratge i deconvolució de la quimioteca de peptoides davant diferents dianes biològiques, Marc Humet⁸⁸ i Isabel Masip⁹³ van detectar la formació de subproductes de ciclació que impediè la finalització de les corresponents síntesis a causa de l'atac nucleòfil d'una amina terciària d'una de les cadenes laterals de l'oligòmer sobre el cloroderivat format després de l'etapa d'acilació (vegeu Figura 3.5).

La nomenclatura dels composts ciclats segueix el codi utilitzat per als peptoides (vegeu l'apartat 3.3), basat en les amines que conformen la diversitat. En el cas de formar-se després de l'entrada de la primera amina, es descriu amb la notació $N\text{AxC}^+$. Si l'amina que produeix la ciclació és la segona que s'introdueix s'anomena: NAy-AxC^+ . A la Figura 3.5 es mostren, de forma general, dos exemples.

Davant d'aquesta situació i tenint en compte que hi havia amines que afavorien més la ciclació que d'altres, Marc Humet i Isabel Masip van realitzar un conjunt d'experiments amb l'objectiu de determinar els factors que podien influir sobre la reacció de formació dels composts ciclats. Les conclusions d'aquest estudi van ser les següents: que les ciclacions que produïen un anell de sis baules estaven més afavorides que les que el formaven de set, que la presència de substituents voluminosos dificultava la ciclació i que la temperatura afavoria la ciclació fins al punt que un augment conduïa a la formació del compost ciclats de forma majoritària.

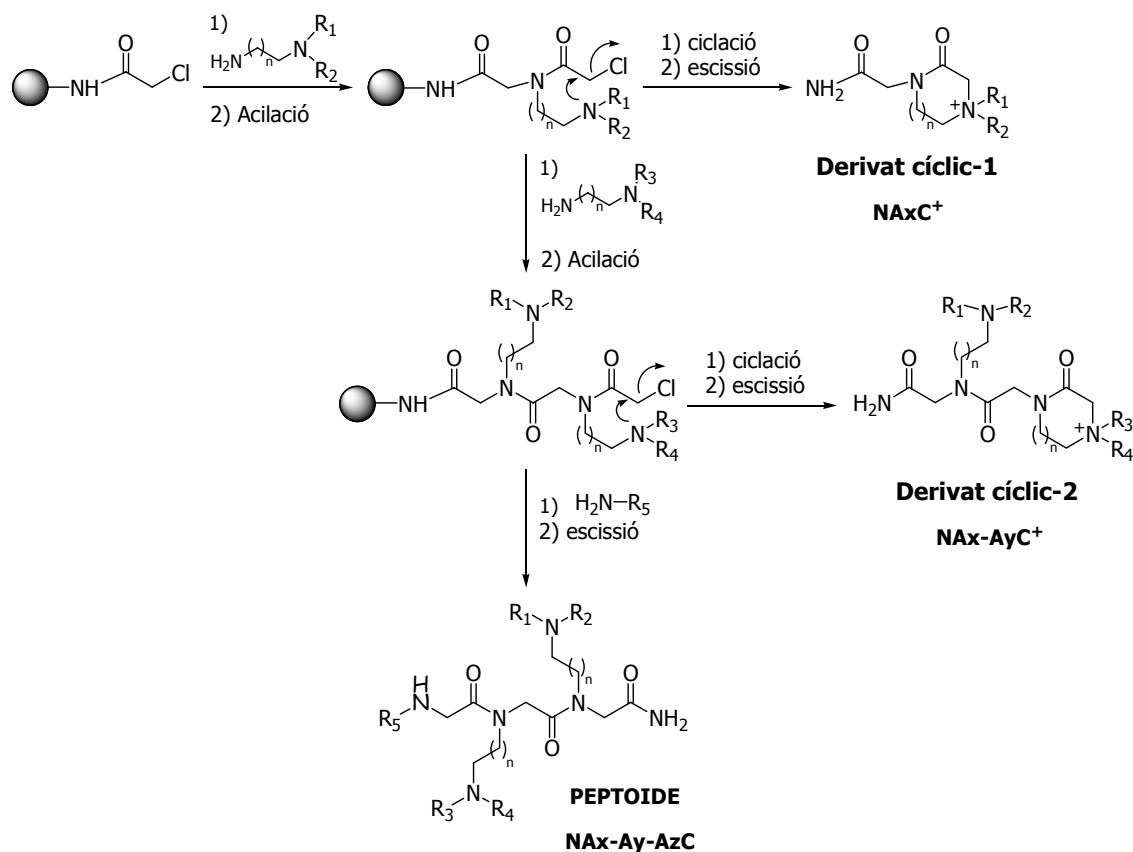


Figura 3.5. Via de formació dels subproductes de ciclació durant la síntesi de peptoides en presència d'amines amb un àtom de nitrogen terciari addicional en la primera i/o segona posicions de diversitat. Segons les amines escollides en cada cas, $n=1$ o 2 .

Una vegada identificat el problema sintètic i analitzats els factors que l'afavorien, calia pensar en un procés alternatiu de síntesi que permetés l'obtenció dels peptoides amb aquest tipus d'amines "problemàtiques". En aquest sentit, en el transcurs de la seva Tesi Doctoral, Marc Humet va afrontar aquest repte des de dos punts de vista: en primer lloc, optimitzant la reacció d'acilació posterior a l'entrada de l'amina terciària responsable de la ciclació i, en segon lloc, protegint aquesta amina mitjançant la formació del seu *N*-òxid derivat (vegeu Figura 3.6).

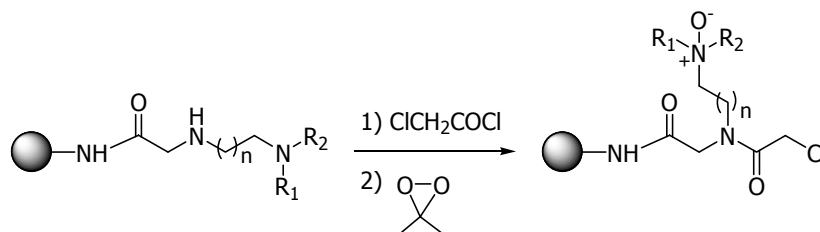


Figura 3.6. Esquema sintètic seguit per dur a terme la protecció del nitrogen terciari causant de la reacció de formació dels productes ciclats. Segons l'amina escollida, $n=1$ o 2 .

Pel que fa referència a l'optimització de la reacció d'acilació, les condicions que van donar els millors resultats van ser canviant l'agent d'acilació, passant de l'àcid cloroacètic activat amb DIC, al clorur de cloroacetil, i fent la reacció una sola vegada a baixa temperatura (-20 °C) durant 5 min. En aquestes condicions, tot i no ser òptimes, ja que el problema no quedava solucionat, sí que es podien obtenir els peptoides desitjats amb un rendiment global després de la seva purificació entorn al 10%, impensable d'assolir seguint el protocol estàndard de síntesi de peptoides utilitzant l'estratègia del submonòmer.

La segona estratègia plantejada, la de protecció-desprotecció amb el corresponent *N*-òxid, pretenia aprofitar l'experiència del grup en aquest tipus de reacció d'oxidació per mirar d'eliminar la reactivitat de l'amina terciària. No obstant, tot i els diferents intents realitzats, no es va detectar la formació dels peptoides desitjats i, a més, no es va trobar una metodologia eficient per fer el seguiment de la reacció de protecció. Amb aquests resultats, es va decidir desestimar l'aplicació d'aquesta estratègia.

En resum, es pot dir que els antecedents a aquest treball pel que fa referència a la síntesi de peptoides que presentaven un amina terciària en la cadena lateral en primera i/o segona posicions de diversitat, consistien en la modificació de les condicions de reacció de l'etapa d'acilació convencional aconseguint, en el millor dels casos, un rendiment global de síntesi del 10%.

3.4.2. SÍNTESI DEL PEPTOIDE N22-6-16C (1)

Un dels objectius més importants de la recerca biomèdica és la identificació de noves molècules cap de sèrie amb interès terapèutic. Amb aquesta finalitat es va realitzar el cribratge de la quimioteca de peptoides-I davant de diferents dianes biològiques disponibles en diversos grups de recerca, de l'àmbit públic i privat, amb qui el nostre grup es va posar en contacte.

Una d'aquestes col·laboracions es va establir amb el grup del Prof. Eduardo Soriano de la Unitat de Neurobiologia del Desenvolupament i de la Regeneració Cel·lular del Parc Científic de Barcelona (IRBB-PCB) amb l'objectiu d'identificar inhibidors potencials de la senyalització de les semaforines. Les semaforines (SEMA) són inhibidors endògens del creixement axonal i estudis recents indiquen que el seu bloqueig pot constituir una nova via per estimular la regeneració neuronal.

El procés de cribratge de la quimioteca de peptoides-I per trobar inhibidors de semaforines va ser realitzat per Marisol Montolio (vegeu Capítol 5). Amb els resultats obtinguts d'aquest cribratge, es va realitzar el procés de deconvolució i es va identificar com a compost actiu el peptoid N22-6-16C (1) (vegeu Figura 2.5), el qual presentava amines amb un nitrogen terciari en la seva cadena lateral en les tres posicions de diversitat. Una vegada identificat, calia resintetitzar-lo de forma individual per realitzar altres assaigs addicionals i confirmar els resultats obtinguts amb les mesclures originals.

Amb aquests antecedents, l'objectiu principal d'aquesta primera part de la memòria va ser el desenvolupament d'una nova estratègia sintètica que millorés els resultats obtinguts per a la síntesi de peptoides amb aquesta característica estructural tan particular. A continuació s'explicaran les diferents estratègies proposades per a l'obtenció d'aquest tipus de peptoides.

3.4.2.1. Estratègia del submonòmer

Abans d'iniciar el desenvolupament d'una nova metodologia sintètica, es va realitzar la síntesi del peptoid N22-6-16C de forma individual seguint l'esquema mostrat en la Figura 2.2. La presència d'amines problemàtiques en la seqüència, tant en la primera com en la segona posicions de diversitat, va requerir l'aplicació de les modificacions sintètiques introduïdes per Marc Humet⁸⁸ comentades anteriorment, és a dir, realitzant les etapes d'acilació posteriors a l'entrada de les amines problemàtiques amb clorur de cloroacetil com agent d'acilació i a baixa temperatura (-20 °C) durant 5 min i sense fer duplicats. A més, en aquests casos, l'etapa d'introducció d'amina es va realitzar immediatament amb un gran excés del reactiu (20 eq.) per afavorir la seva incorporació i minimitzar la formació dels subproductes ciclats.

Malgrat els esforços realitzats, el resultat obtingut va ser l'obtenció dels productes ciclats com a composts majoritaris. L'anàlisi del cru de reacció per HPLC va presentar el perfil mostrat en la Figura 3.7 amb el seu corresponent espectre de masses obtingut en mode *FIA* (*Flow Injection Analysis*). El rendiment final de síntesi del peptoid **1** va ser del 8%. Cal destacar que el primer producte ciclats (N16C⁺) es va formar ràpidament tot i formar un anell de set baules, menys afavorit que la formació d'anells de sis.

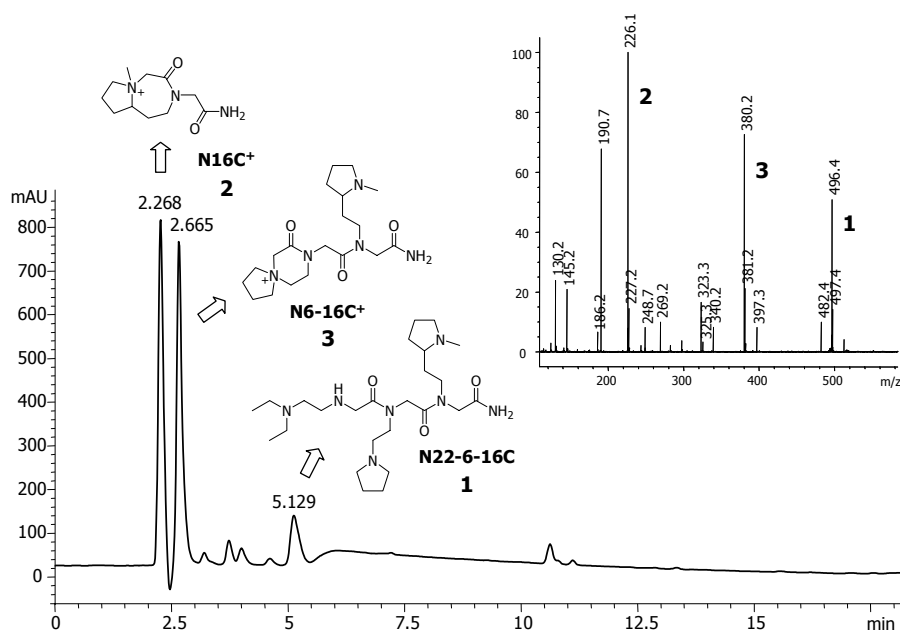


Figura 3.7. Perfil cromatogràfic d'HPLC del cru de reacció del peptoid N22-6-16C sintetitzat seguint l'estratègia del submonòmer. A sobre de cada pic cromatogràfic s'indica el seu temps de retenció per HPLC, en min. A dalt a la dreta es mostra l'espectre de masses del cru de reacció obtingut en mode *FIA*.

Aquesta síntesi va confirmar definitivament que aquesta estratègia era ineficaç com a via d'obtenció d'aquest tipus de peptoides, donada la facilitat amb què es formaven els composts ciclats. A més, aquest problema era additiu, obtenint-se un resultat pitjor a mesura que augmentava el nombre de fonts de diversitat ocupades per amines que presentaven un àtom de nitrogen terciari en la cadena lateral (en la primera i segona posicions de diversitat en el cas particular dels trímers). En el cas d'anar més enllà dels trímers, aquesta situació és probable que s'agreugés fins al punt que impediria l'obtenció de peptoides que presentessin més de dues posicions de diversitat amb aquest tipus d'amina.

3.4.2.2. Estratègia del monòmer

Els resultats obtinguts van obligar el canvi d'estratègia. Per aquest motiu es va recuperar la del monòmer comentada durant la introducció d'aquesta part de la memòria, la qual havia estat descrita per primera vegada per Simon *et al.*⁸¹ (vegeu Figura 2.1, a dalt). No obstant, aquesta estratègia presentava un inconvenient important, ja que implicava la síntesi prèvia dels diferents monòmers d'*N*-alquilglicina, tants com amines diferents s'utilitzessin en les diferents fonts de diversitat. En aquest sentit, tot i el desavantatge, la síntesi del peptòide N22-6-16C es podria afrontar sense massa problemes, però resultaria poc pràctica per sintetitzar una quimioteca o inclús diversos peptoides degut a la necessitat de sintetitzar prèviament tots els monòmers implicats.

Així doncs, tenint en compte aquest fet i mirant d'optimitzar el procés global, es va decidir adoptar una estratègia mixta entre les dues, la del monòmer i la del submonòmer, alternant segons el cas la utilització d'una o altra per aprofitar els avantatges que oferia cadascuna d'elles.

3.4.2.3. Estratègia mixta

Aquesta metodologia pretenia adoptar com a eix principal l'estratègia del submonòmer i anar introduint la del monòmer en les etapes que fos imprescindible, és a dir, després de la incorporació d'una amina amb un nitrogen terciari en la seva cadena lateral (vegeu Figura 3.8). Precisament per aquest motiu, la primera font de diversitat no presenta cap problema i per tant es pot utilitzar sempre l'estratègia del submonòmer (A). A partir d'aquest moment, depenent del tipus d'amina introduïda prèviament, s'utilitzaria una estratègia o l'altra. Si l'amina incorporada és problemàtica (conté un nitrogen terciari en la seva cadena lateral), s'hauria de canviar d'estratègia i passar a utilitzar la del monòmer (B); en cas contrari es continuaria utilitzant la del submonòmer.

Des del punt de vista sintètic, les dues estratègies impliquen una seqüència de dues reaccions. Així doncs, mentre que la del submonòmer realitza una primera etapa d'acilació i una segona d'incorporació d'amina, la del monòmer implica la incorporació de l'*N*-alquilglicina

protegida i la corresponent desprotecció posterior. La diferència fonamental és que la primera estratègia utilitza directament reactius que són comercials mentre que la segona requereix una feina prèvia de síntesi dels diferents monòmers.

Una vegada introduïda la segona font de diversitat, es tornaria a plantejar la mateixa pregunta: l'amina que s'acaba d'incorporar és problemàtica? Si la resposta fos afirmativa, novament s'hauria d'utilitzar l'estratègia del monòmer (D) mentre que si fos negativa, s'utilitzaria la del submonòmer (C). Seguint aquest esquema s'aniria allargant la cadena fins arribar a l'oligòmer desitjat, evitant la formació dels composts ciclats.

Un cop definida l'estratègia mixta, calia desenvolupar una metodologia sintètica per obtenir els monòmers requerits en els casos on s'apliqués l'estratègia del monòmer. En aquest sentit, els requeriments necessaris a l'hora de desenvolupar-la van ser els següents: la seqüència sintètica dels monòmers havia de tenir el nombre mínim d'etapes possibles, les quals havien de ser ràpides i amb un bon rendiment, sense la necessitat d'etapes de purificació intermitges i sense presentar problemes d'escalat. Per altra banda, la metodologia havia de ser aplicable de forma general a qualsevulla amina i, en particular, a les amines que presentessin un nitrogen terciari en la seva cadena lateral.

L'aplicació d'aquesta estratègia modificava substancialment la manera de treballar en comparació amb la utilització de l'estratègia del submonòmer, ja que el requeriment de la síntesi prèvia dels monòmers obligava a un plantejament i una anàlisi individual dels oligòmers a preparar per saber quins monòmers feia falta sintetitzar.

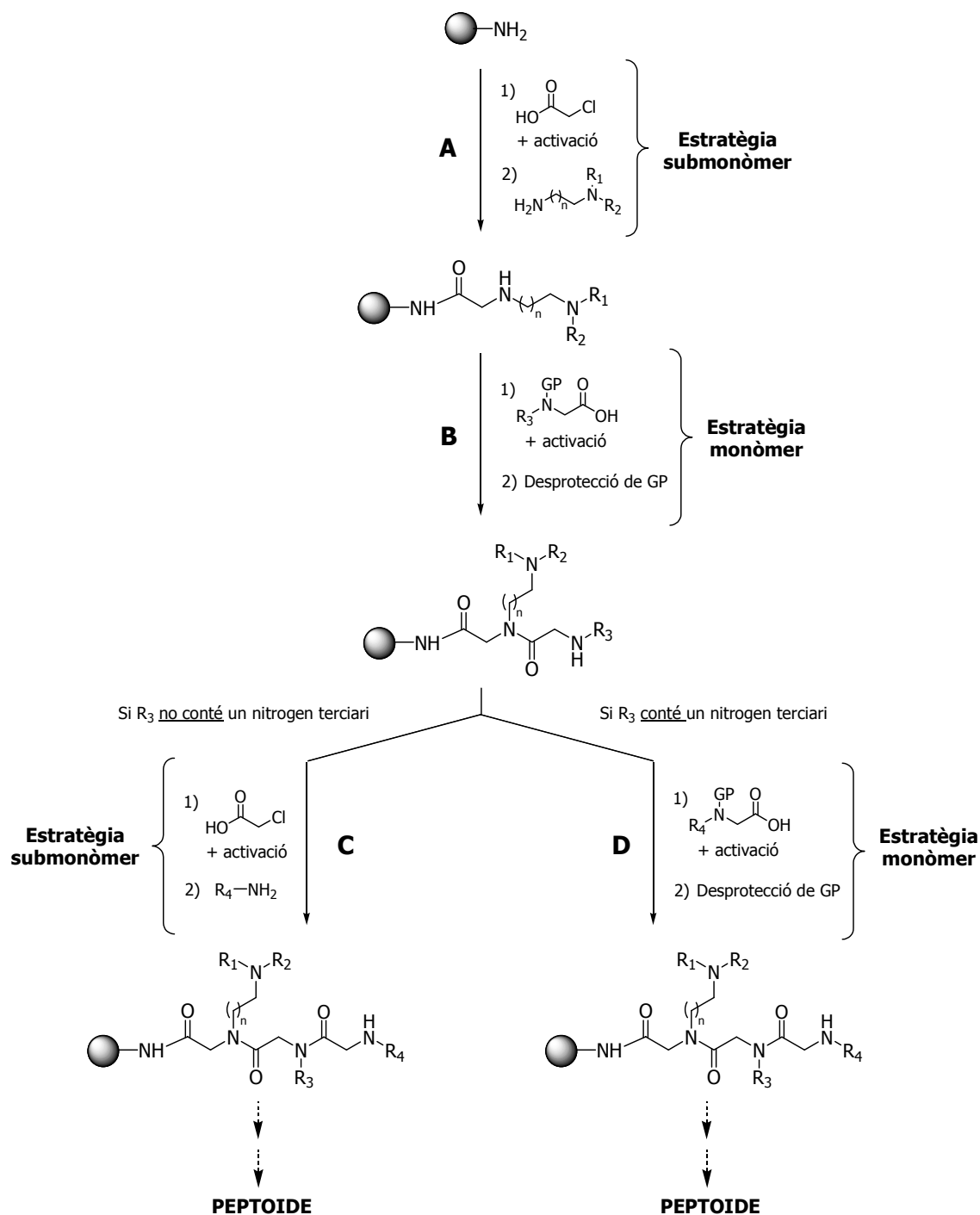


Figura 3.8. Esquema sintètic de l'estratègia mixta, on s'aplica en primera opció l'estratègia del submonòmer (A i C), introduint la del monòmer en les etapes de possible formació dels composts ciclats, és a dir, després de la incorporació d'una amina amb un nitrogen terciari (B i D). GP= grup protector i $n=1$ o 2 depenent de l'amina escollida.

En el capítol següent s'explicaran les diferents estratègies seguides per a la síntesi dels monòmers d'*N*-alquilglicina, les quals divergeixen en la utilització de diferents grups protectors ortogonals entre ells i compatibles amb la síntesi de peptoides en fase sòlida, afavorint així la seva possible aplicació en altres línies d'investigació d'interés en el nostre grup de recerca.

4. SÍNTESI DE MONÒMERS D'*N*-ALQUILGLICINES

4.1. INTRODUCCIÓ

Els antecedents de síntesi de monòmers d'*N*-alquilglicines es remunten als primers treballs de síntesi de peptoides, tant en fase sòlida⁸¹ com en dissolució,⁸⁷ on es descriuen les metodologies generals mostrades a la Figura 4.1.

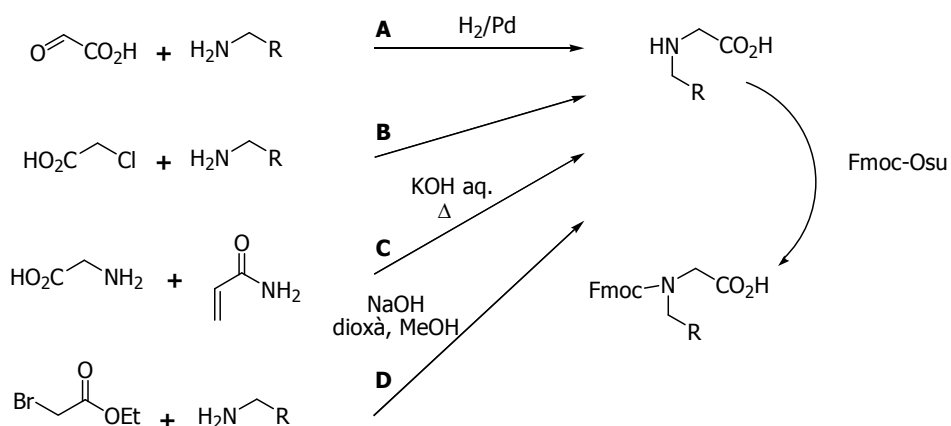


Figura 4.1. Metodologies generals per a la síntesi de monòmers d'*N*-alquilglicines.

No obstant, en cap d'elles es descrivia la utilització d'amines amb un nitrogen terciari en la seva cadena lateral, les quals significarien la principal novetat del nostre estudi. A més, en tots els casos es descrivia la utilització del mateix grup protector del grup amino del monòmer, el grup Fmoc, la qual cosa restringia el seu camp d'aplicació als casos on la química utilitzada fos compatible amb aquest grup protector.

Amb aquests antecedents, es van plantejar com a objectius dels nostre estudi el desenvolupament d'un mètode de síntesi de monòmers d'*N*-alquilglicina eficient tant per a les amines amb un nitrogen terciari en la seva cadena lateral com per a la resta d'amines, així com la introducció de diferents grups protectors que permetessin una major versatilitat d'aquests monòmers, ampliant el seu camp d'aplicació als diferents tipus de química utilitzats en la síntesi en fase sòlida.

La introducció de diferents grups protectors responia als interessos del nostre laboratori en les noves línies d'investigació encaminades a sintetitzar nous composts estructuralment anàlegs als peptoides que requereixen sovint estratègies sintètiques amb grups protectors ortogonals com els que es descriuran a continuació. Entre aquestes línies, cal destacar la feina realitzada per Glòria Sanclimens i Alejandra Moure en la síntesi d'anàlegs de peptoides conformacionalment més restringits, així com la síntesi de peptoides amb diferents tipus d'espaiadors per poder-los enllaçar a altres matrius polimèriques (resines, *microarrays*, etc.) realitzada per Núria Cortés, i la introducció d'aminoàcids per ajudar a solubilitzar els composts sintetitzats més lipòfils.

Així doncs, al llarg d'aquest capítol es mostraran les tres vies diferents estudiades amb la utilització d'un grup protector diferent en cadascuna d'elles (vegeu Figura 4.2). En aquest punt, cal recordar que un dels principals objectius d'aquest estudi era l'obtenció dels monòmers necessaris per a l'obtenció del peptoide N22-6-16C (vegeu Figura 2.5), amb la qual cosa al llarg de les diferents estratègies de síntesi de monòmers d'*N*-alquilglicina es farà èmfasi a les corresponents amines A6 i A22 (vegeu Figura 2.3).

La primera estratègia (Via 1 de la Figura 4.2) es va plantejar seguint l'esquema sintètic descrit per Kruijtzter *et al.*⁸⁷ (Via D de la Figura 4.1). Partint de l'amina primària es va realitzar una reacció d'alquilació amb el bromoacetat de *tert*-butil seguida de la desprotecció de l'àcid. Cal destacar que es va introduir una modificació respecte l'esquema proposat per Kruijtzter *et al.* com era el canvi d'èster, utilitzant el bromoacetat de *tert*-butil enlloc del bromoacetat d'etil. Aquesta modificació pretenia evitar la hidròlisi en medi aquós amb NaOH (4 N), donada la dificultat d'extracció del corresponents productes en el cas de presentar una amina amb un nitrogen terciari en la cadena lateral. Finalment, es va protegir l'amina secundària amb el grup Fmoc (*N*⁹-fluoroenilmetoxycarbonil), el qual havia estat àmpliament utilitzat en la pròpia síntesi de monòmers d'*N*-alquilglicines.

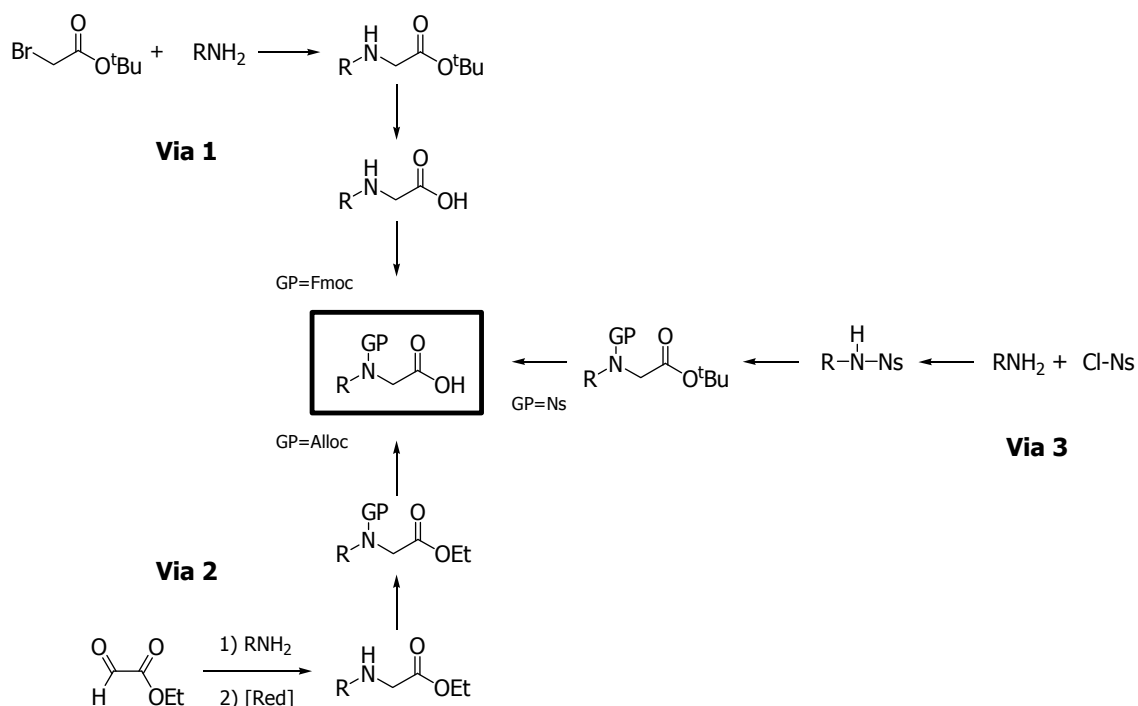


Figura 4.2. Les tres estratègies estudiades per a la síntesi de monòmers d'*N*-alquilglicina. En la primera d'elles es va utilitzar l'Fmoc com a grup protector (Via 1), mentre que en la segona es va optar per l'Alloc (Via 2) i, finalment, en la tercera es va escollir el grup Ns (Via 3).

La segona estratègia (Via 2 de la Figura 4.2) es va plantejar per mirar d'evitar l'inconvenient principal de la primera estratègia, és a dir, la possible dialquilació de l'amina primària. Per aconseguir-ho, es va decidir fer una aminació reductiva, la qual es va dur a terme mitjançant la reducció de l'imina formada entre el glicoxilat d'etil i la corresponent amina primària. Seguidament es va procedir a la introducció del grup protector Alloc (al·liloxycarbonil) i a la hidròlisi de l'ester per obtenir els monòmers desitjats. Tot i solucionar els problemes de dialquilació presents en la primera estratègia, aquesta segona no va ser tan eficient com s'esperava, sobretot al treballar amb amines amb un nitrogen terciari en la seva cadena lateral. El rendiment global del procés va ser baix degut als problemes sorgits durant l'aïllament dels composts obtinguts després de la reacció d'aminació reductiva, així com dels monòmers finals. No obstant això, la introducció del grup protector Alloc representava un avantatge interessant, ja que oferia la oportunitat d'obtenir els monòmers protegits amb estabilitat a condicions de reacció àcides i bàsiques.

Finalment, es va estudiar una tercera estratègia (Via 3 de la Figura 4.2) on es va utilitzar com a grup protector el Ns (2-nitrobenzensulfonil). A diferència de les dues estratègies anteriors, aquest grup es va introduir en la primera etapa sintètica mitjançant una reacció neta, ràpida i amb una conversió quantitativa. Seguidament es va procedir a l'alquilació de la sulfonamida, tot aprofitant l'acidesa del corresponent protó i es va alliberar l'àcid desitjat, el qual es trobava protegit en forma d'ester *tert*-butílic. El rendiment global del procés va ser

elevat, tot i la identificació d'un subproducte de dialquilació format durant l'alquilació prèvia a l'alliberament de l'àcid. Aquest subproducte, la proporció del qual depenia de l'amina utilitzada, només apareixia en treballar amb amines amb un nitrogen terciari en la cadena lateral i corresponia a l'alquilació addicional sobre aquest nitrogen terciari. Tot i aquest inconvenient, el procés global era satisfactori i, a més, oferia, com en l'estratègia anterior, l'oportunitat d'obtenir els monòmers protegits amb estabilitat a condicions àcides i bàsiques.

En resum, es pot dir que s'han provat diferents estratègies per sintetitzar monòmers d'*N*-alquilglicina i que tot i que no s'han estudiat totes les combinacions possibles, l'estudi realitzat ens ha donat suficient experiència i informació per avaluar la millor estratègia i el millor grup protector a utilitzar en cada cas.

4.2. ESTRATÈGIA 1: PROTECCIÓ AMB EL GRUP FMOC

Tal i com s'ha comentat anteriorment, aquesta estratègia sintètica es va plantejar seguint el procediment descrit per Kruijtzter *et al.*⁸⁷ L'esquema retrosintètic proposat va ser el mostrat a Figura 4.3. Els monòmers s'obtidrien per reacció del carbonat de 9-fluorenilmetilsuccinimidil (FmocOsu) amb l'amina secundària de les corresponents *N*-alquilglicines, les quals s'obtidrien de la desprotecció del grup àcid dels *N*-alquilaminoacetats de *tert*-butil per tractament amb TFA/DCM. Finalment, aquests provindrien d'una reacció de substitució nucleòfila entre el bromoacetat de *tert*-butil i la corresponent alquilamina primària.

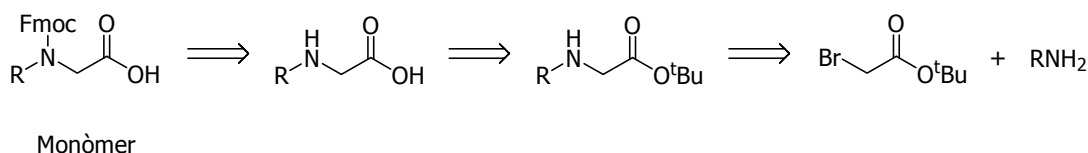


Figura 4.3. Esquema retrosintètic proposat per a l'obtenció dels monòmers d'*N*-alquilglicines protegits amb el grup Fmoc (Via 1 de la Figura 4.2).

4.2.1. OBTENCIÓ DELS *N*-ALQUILAMINOACETATS DE *tert*-BUTIL

Aquesta reacció es va dur a terme seguint l'esquema mostrat en la Figura 4.4 mitjançant una reacció d'alquilació de l'amina primària corresponent amb bromoacetat de *tert*-butil en presència de trietilamina en THF.

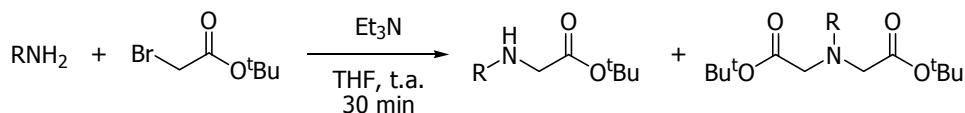


Figura 4.4. Obtenció dels *N*-alquilaminoacetats de *tert*-butil.

La mescla de reacció es va mantenir en agitació a temperatura ambient durant 30 min. L'anàlisi dels crus de reacció corresponents va posar de manifest la presència d'un subproducte, la proporció del qual oscil·lava entre el 10-15%. Les dades espectroscòpiques i d'espectrometria de masses van confirmar que es tractava del producte de doble alquilació, tot i que en la bibliografia es descrivia aquest procés sense descriure'n la seva formació.⁸⁷ Per aquest motiu, es va haver de realitzar una destil·lació al buit per poder separar i aïllar els productes desitjats, els quals es van obtenir en forma d'oli incolor amb un rendiment mitjà al voltant del 50% (vegeu Figura 4.5, composts **4-9**).

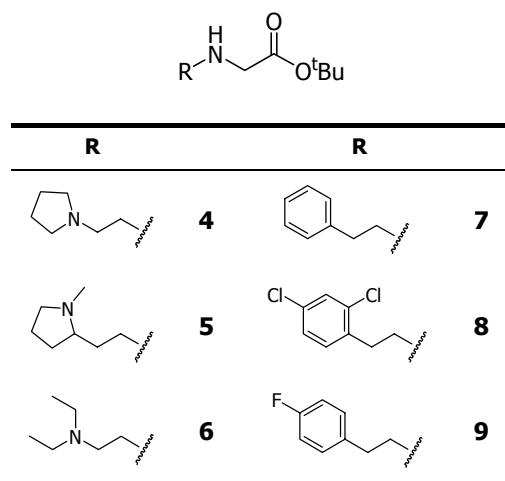


Figura 4.5. Conjunt d'*N*-alquilaminoacetats de *tert*-butil preparats.

4.2.2. OBTENCIÓ DE LES *N*-ALQUILGLICINES

Seguint l'esquema mostrat en la Figura 4.6, es va procedir a la desprotecció de l'ester *tert*-butílic corresponent per tractament amb una mescla DCM/TFA (1:1).

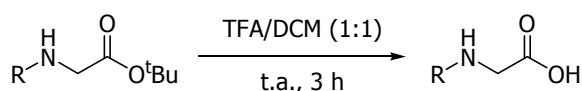


Figura 4.6. Obtenció de les *N*-alquilglicines.

La mescla de reacció es va mantenir en agitació a temperatura ambient durant 3 h. Passat aquest temps, el control de reacció efectuat per ^1H -RMN mostrava la desaparició completa del senyal corresponent al grup *tert*-butil. Tot seguit, el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda i es van realitzar rentats amb ACN per tal d'eliminar completament les traces d'àcid. Aquests cruts de reacció es van utilitzar directament per a la següent etapa sintètica sense cap altre tractament. En tots els casos, la conversió del procés va ser quantitativa (vegeu Figura 4.7, composts **10-15**).

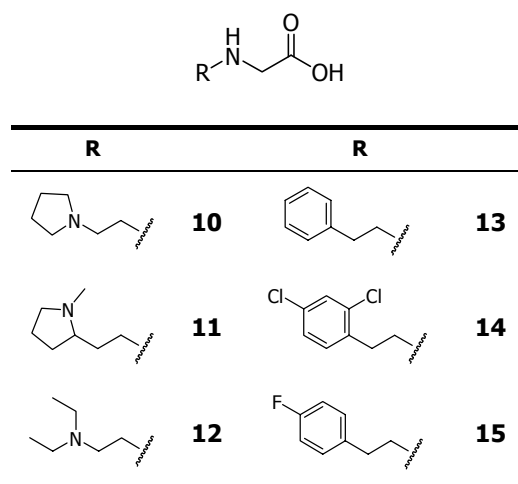


Figura 4.7. Conjunt d'*N*-alquilglicines preparades.

4.2.3. OBTENCIÓ DE LES *N*-ALQUILGLICINES PROTEGIDES AMB FMOC

La reacció de protecció de l'amina secundària de les *N*-alquilglicines sintetitzades anteriorment es va fer seguint l'esquema mostrat en la Figura 4.8. Aquest procediment, descrit per Kruijtzter *et al.*⁸⁷ consistia en l'addició d'una dissolució d'FmocOsu en ACN a la corresponent *N*-alquilglicina dissolta en H₂O a pH=9-9.5 (ajustat amb trietilamina). La mescla de reacció es va deixar en agitació a temperatura ambient durant 4 h per obtenir les *N*-alquilglicines protegides amb un rendiment superior al 85% en tots els casos. Tot i els diferents intents realitzats, no es va aconseguir cristal·litzar-les, obtenint així les corresponents *N*-alquilglicines protegides en forma de residu oliós.

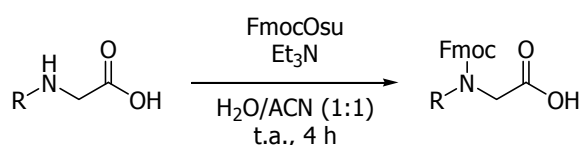


Figura 4.8. Obtenció de les *N*-alquilglicines protegides amb el grup protector Fmoc.

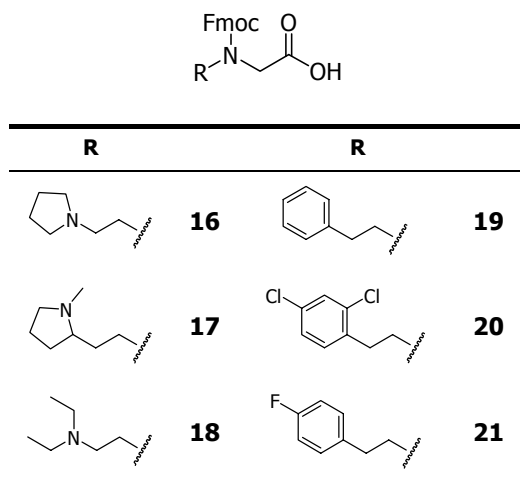


Figura 4.9. Conjunt d'*N*-alquilglicines preparades protegides amb Fmoc.

El rendiment global de tot el procés de síntesi de les *N*-alquilglicines seguint aquesta estratègia sintètica (Via 1 de la Figura 4.2) va ser al voltant del 40% en tots els casos.

4.2.4. APLICACIÓ DELS MONÒMERS D'*N*-ALQUILGLICINES PROTEGITS AMB EL GRUP FMOC A LA SÍNTESI DE PEPTOIDES

4.2.4.1. Síntesi del peptòide model N22-22-15C (22)

Una vegada establerta l'estratègia per a la síntesi de monòmers d'*N*-alquilglicina protegits amb el grup protector Fmoc, es va procedir a la seva aplicació a la síntesi de peptòides. El peptòide model escollit per mirar d'establir el protocol d'acoblament dels monòmers va ser l'N22-22-15C (vegeu Figura 4.10), el qual contenia en la primera posició una amina amb un grup cromòfor que permetia, des d'un bon principi, el seguiment de les diferents etapes sintètiques de reacció per HPLC (vegeu Figura 4.11). Aquest aspecte era especialment important a l'hora controlar l'evolució de les reaccions, ja que sovint els test colorimètrics del TNBS i del cloranil donaven resultats ambigus en presència d'amines amb un nitrogen terciari addicional en la cadena lateral.

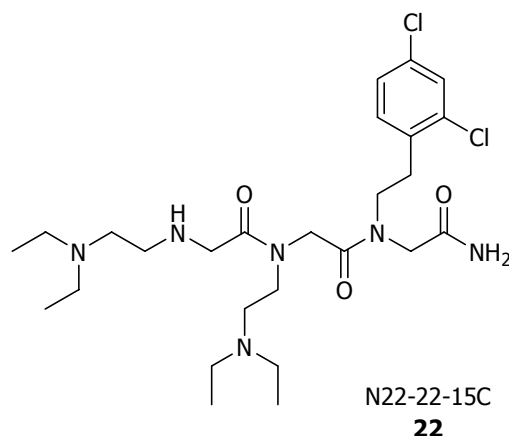


Figura 4.10. Peptide model N22-22-15C sintetitzat via monòmers d'*N*-alquilglicines protegits amb el grup Fmoc.

La síntesi es va dur a terme seguint l'estratègia mixta, realitzant el primer acoblament via submonòmer (acilació i aminació) i els dos següents via monòmer (acoblament i desprotecció). Així doncs, es va preparar una xeringa de 3 ml que contenia 116 mg (0.79 mmol/g, 0.09 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Després de realitzar l'inflat inicial de la resina, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc per tractament amb una dissolució de piperidina al 20% (v/v) en DMF. A continuació, es va realitzar la reacció d'acilació amb àcid bromoacètic i DIC en DCM/DMF (2:1), seguida d'una reacció d'aminació amb la 2,4-diclorofenetilamina (**A15**) en DMF. Arribat aquest punt, es va dividir la resina en dues parts i es van provar dues condicions d'acoblament diferents per al monòmer de l'*N,N*-dietiletilendiamina (Figura 4.9, compost **18**): una primera utilitzant com a agents d'acoblament DIC i *N*-hidroxibenzotriazole (HOBt) en DMF, i una segona utilitzant l'hexafluorofosfat de 2-(7-aza-1H-benzotriazole-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni (HATU) com a agent d'acoblament amb diisopropiletilamina (DIEA) com a base en DMF. La primera d'elles va donar resultats negatius mentre que la segona va mostrar l'aparició d'un nou pic per HPLC acompanyat de la desaparició del corresponent producte de partida (vegeu Figura 4.11, segon cromatograma). Seguidament, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc del monòmer acoblat per tractament amb piperidina, i el procés es va repetir pel següent monòmer. Aquest acoblament es va dur a terme en les condicions mencionades anteriorment (HATU/DIEA en DMF). Tot seguit, es va desprotegir el grup Fmoc del monòmer acoblat i es va procedir a l'escissió del peptide de la resina per tractament amb un còctel format per TFA/DCM/H₂O (60:40:2). El filtrat obtingut es va concentrar a pressió reduïda. Finalment, l'oli groguenc residual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 20 mg de residu corresponent al peptide **22** (rdt. 80%), amb una puresa del 90% per HPLC. La identificació del peptide es va confirmar per CL-EM.

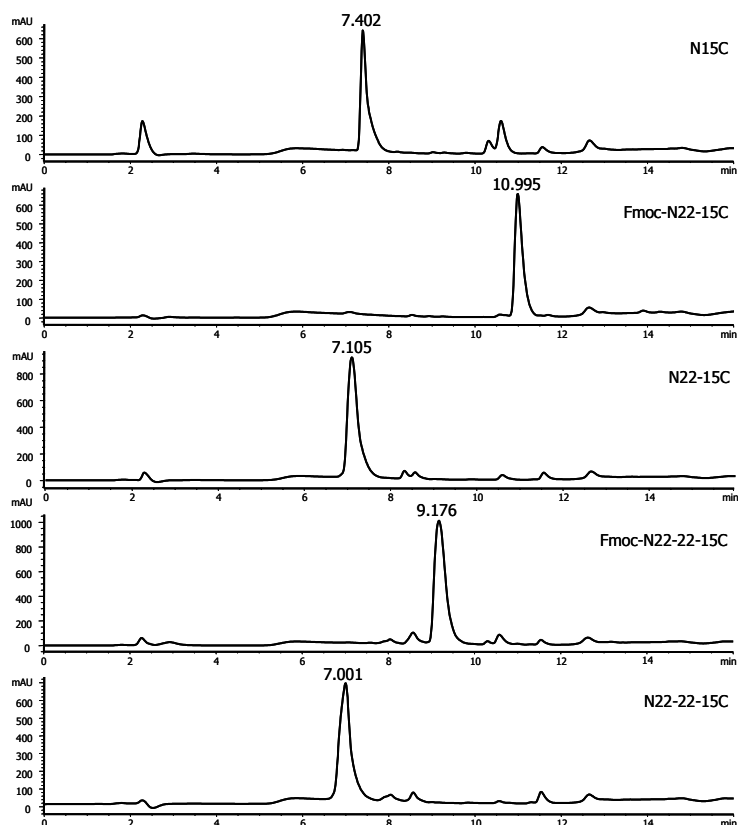


Figura 4.11. Perfils cromatogràfics d'HPLC a 220 nm dels controls realitzats al finalitzar cadascuna de les etapes sintètiques del peptòide N22-22-15C. A cada pic s'indica el seu temps d'elució, en min.

4.2.4.2. Síntesi del peptòide N22-6-16C (1)

Després de comprovar l'eficàcia de l'estratègia mixta i, sobretot, de l'acoblament de monòmers d'*N*-alquilglicina protegits amb el grup Fmoc, es va procedir a sintetitzar el peptòide **1** (vegeu Figura 2.5).

Es va preparar una xeringa de 10 ml que contenia 400 mg (0.79 mmol/g, 0.32 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Després de l'inflat inicial de la resina, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc de forma anàloga a l'anteriorment descrita en l'apartat anterior així com la reacció d'acilació i d'acoblament d'amina, la qual es va realitzar amb l'amina 2-(2-aminoetil)-1-metilpirrolidina (**A16**). Seguidament, es va procedir a l'acoblament del monòmer de l'**A6** (Figura 4.9, compost **16**) protegit amb el grup Fmoc utilitzant com a agent d'acoblament l'HATU en presència de DIEA com a base en DMF. Després de l'acoblament, es va realitzar la desprotecció del grup Fmoc del monòmer i es va procedir de forma anàloga a realitzar l'últim acoblament, el corresponent al monòmer de l'amina **A22** (Figura 4.9, compost **18**). A continuació es va desprotegir el grup Fmoc i es va procedir a realitzar l'escissió del peptòide de la resina. Finalment, el filtrat resultant es va tractar tal i com s'ha explicat en l'apartat anterior per obtenir 110 mg de residu, amb una puresa del 85% per HPLC. La

identificació del peptòide es va confirmar per CL-EM. La purificació d'aquest residu es va realitzar per HPLC a escala semipreparativa, obtenint finalment 70 mg del peptòide **1** desitjat (rdt. 45%), amb una puresa superior al 98% per HPLC.

4.3. ESTRATÈGIA 2: PROTECCIÓ AMB EL GRUP ALLOC

Aquesta estratègia es va plantejar per mirar de solucionar els problemes de doble alquilació de l'amina primària observats al llarg del desenvolupament de la primera estratègia, a l'hora que es va aprofitar per estudiar l'ús d'un nou grup protector, l'Alloc (al·liloxicarbonil). L'esquema retrosintètic proposat va ser el mostrat a la Figura 4.12.

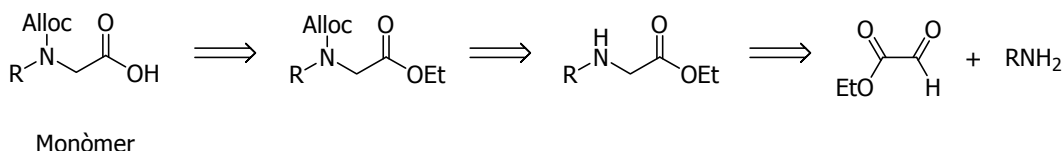


Figura 4.12. Esquema retrosintètic proposat per a l'obtenció dels monòmers d'*N*-alquilglicina protegits amb el grup Alloc.

Els monòmers protegits amb el grup Alloc s'obtidrien per hidròlisi de l'èster etílic dels propis monòmers protegits amb el grup Alloc, els quals s'obtidrien per atac nucleòfil de l'amina secundària dels corresponents *N*-alquilaminoacetats d'etil sobre el clorur d'Alloc. Finalment, aquests provindrien de la reacció d'aminació reductiva entre el glicoxilal d'etil i la corresponent alquilamina primària.

4.3.1. OBTENCIÓ DELS *N*-ALQUILAMINOACETATS D'ETIL

Aquesta reacció es va dur a terme seguint l'esquema mostrat en la Figura 4.13 mitjançant una reacció d'aminació reductiva entre la corresponent amina primària i el glicoxilal d'etil. La primera etapa de la reacció va conduir a la formació de l'imina, la qual es va reduir en una segona etapa per tractament amb NaBH₃CN en presència d'àcid acètic en EtOH.

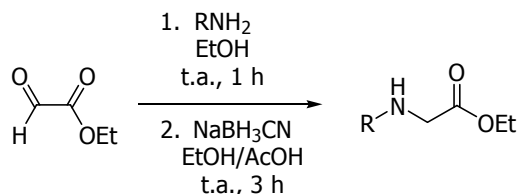


Figura 4.13. Obtenció dels *N*-alquilaminoacetats d'etil.

Sobre l'amina primària dissolta en EtOH s'hi va addicionar el glioxilat d'etil i la mescla de reacció es va mantenir en agitació a temperatura ambient durant 1 h. A continuació s'hi va afegir una dissolució de NaBH₃CN en EtOH amb un 1% d'àcid acètic. L'addició de l'àcid acètic va facilitar el procés de reducció de l'imina, ja que l'ió imini format feia augmentar la seva electrofília. Passades 2 h de reacció, aquesta es va donar per acabada i es va procedir al seu tractament.

Pel que fa al rendiment de les reaccions, cal destacar que en el cas de les amines amb un nitrogen terciari en la seva cadena lateral (**A6** i **A22**), aquest va ser entre el 50-60% (vegeu Figura 4.14, productes **23** i **24** respectivament), mentre que per a la resta d'amines (**A10**, **A15** i **A37**) va oscil·lar entre el 75-85% (vegeu Figura 4.14, productes **25-27** respectivament). Aquests resultats van posar de manifest que hi havia una diferència entre els dos grups, la qual no es podia explicar per motius de reactivitat entre les diferents amines, ja que en tots els casos el control de reacció realitzat per CG mostrava el mateix perfil cromatogràfic amb la presència d'una baix percentatge (2-5%) d'amina primària sense reaccionar, a més del producte desitjat. Així doncs, la diferència fonamental entre els dos grups la trobem en el procés d'extracció, on els composts que presentaven una amina amb un nitrogen terciari en la cadena lateral quedaven repartits entre la fase aquosa i l'orgànica. En aquest sentit, cal destacar que es van provar altres dissolvents per dur a terme el procés d'extracció (DCM, CHCl₃) sense aconseguir millorar els resultats obtinguts. La puresa dels crús de reacció (>90% en tots els casos) va permetre la utilització dels corresponents productes de forma directa sense haver de realitzar cap etapa de purificació addicional.

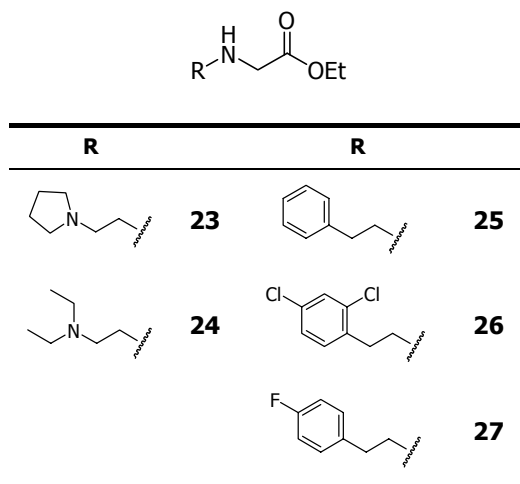


Figura 4.14. Conjunt d'*N*-alquilaminoacetats d'etil preparats.

4.3.2. OBTENCIÓ DELS CARBAMATS D'AL·LIL

L'obtenció dels carbamats d'al·lil es va dur a terme per atac nucleòfil de l'amina secundària del corresponent *N*-alquilaminoacetat d'etil sobre el cloroformat d'al·lil seguint el procediment descrit per Fernández-Forner *et al.*¹⁰¹ mostrat en la Figura 4.15, canviant l'H₂O pel DCM com a dissolvent de reacció. Aquest canvi es va plantejar per mirar d'evitar el procés d'extracció necessari, en cas de treballar en medi aquós, per tal d'aïllar els composts desitjats del cru de reacció donats els problemes apareguts anteriorment en el cas dels productes que presentaven un nitrogen terciari en cadena lateral.

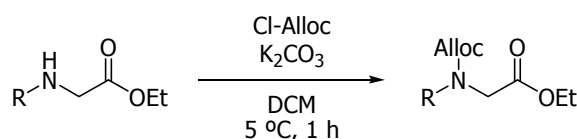


Figura 4.15. Obtenció dels *N*-alquilaminoacetats d'etil protegits amb Alloc.

La reacció es va dur a terme per addició lenta del cloroformat d'al·lil sobre una dissolució del corresponent *N*-alquilaminoacetat d'etil en DCM en presència de K₂CO₃. L'anàlisi del cru de reacció per CG al cap d'1 h va confirmar la conversió quantitativa de l'*N*-alquilaminoacetat d'etil de partida. A més, va posar de manifest crús de reacció d'una puresa elevada en tots els casos (superior al 95% per CG), motiu pel qual es van utilitzar directament per a la següent etapa de síntesi sense haver de realitzar cap etapa de purificació addicional (vegeu Figura 4.16, composts **28-32**).

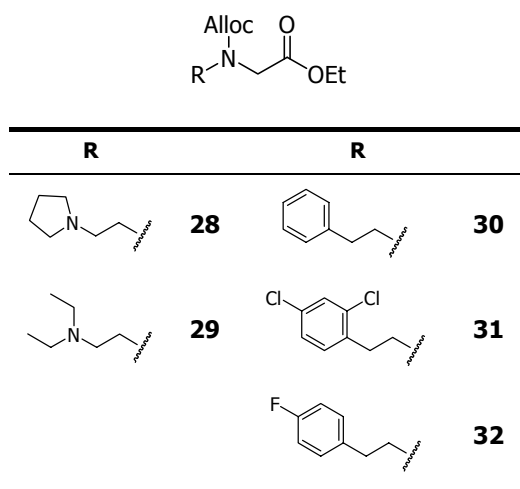
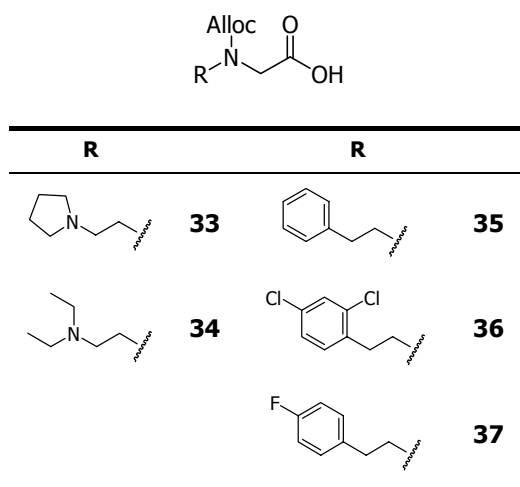


Figura 4.16. Conjunt d'*N*-alquilaminoacetats d'etil preparats protegits amb Alloc.

$$\text{R}-\text{N}(\text{Alloc})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et} \xrightarrow[\text{Dioxane, } 80^\circ\text{C, 3 h}]{\text{NaOH (4 N)}} \text{R}-\text{N}(\text{Alloc})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$$

Es va dissoldre el carbatat d'al·lil corresponent en dioxà i s'hi va afegir una dissolució d'NaOH (4 N). La mescla de reacció es va escalfar a 80 °C i es va mantenir en agitació constant durant 3 h. Passat aquest temps, es va acidificar el medi mitjançant l'addició d'HCl fins a tenir un pH<3, es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda i es va procedir a l'aïllament de les *N*-alquilglícines protegides amb Alloc. Aquest procés es va realitzar de dues formes diferents segons l'amina utilitzada per a la seva obtenció. Per als composts amb amines que presentaven un nitrogen terciari en la cadena lateral (vegeu Figura 4.18, productes **33** i **34**), el cru de reacció acidificat es va congelar i es va liofilitzar. A continuació, es va afegir CHCl₃ sobre el residu liofilitzat, es va agitar, sonicar i filtrar per obtenir, després d'eliminar el dissolvent a pressió reduïda, el sòlid corresponent al clorhidrat de les *N*-alquilglícines protegides amb Alloc amb un rendiment entre el 70-75%. Per a la resta de composts (vegeu Figura 4.18, productes **35-37**) en canvi, una vegada acidificat el medi, es va realitzar un procés d'extracció amb ^tBuOMe, el qual va permetre l'obtenció de les *N*-alquilglícines protegides amb Alloc corresponents en forma d'oli amb un rendiment entre el 78-86%.



59

El rendiment global de tot el procés de síntesi de les *N*-alquilglicines seguint aquesta estratègia sintètica (Via 2 de la Figura 4.2) va ser al voltant del 40% per a les *N*-alquilglicines que presentaven un amina amb un nitrogen terciari en la cadena lateral i al voltant del 65% per a la resta. En aquesta ocasió, sí que hi va haver una diferència significativa entre els dos grups d'amines, degut principalment a la dificultat d'extracció i aïllament dels composts que presentaven una amina amb un nitrogen terciari en la cadena lateral.

4.3.4. APLICACIÓ DELS MONÒMERS D'*N*-ALQUILGLICINES PROTEGITS AMB EL GRUP ALLOC A LA SÍNTESI DE PEPTOIDES

4.3.4.1. Síntesi del peptòide N22-6-16C (1)

Una vegada establerta l'estratègia sintètica per a la síntesi de monòmers d'*N*-alquilglicina protegits amb el grup protector Alloc, es va procedir a la seva aplicació a la síntesi de peptòides. El peptòide escollit per mirar d'establir el protocol d'acoblament dels monòmers va ser el propi N22-6-16C (vegeu Figura 2.5).

La síntesi es va dur a terme seguint l'estratègia mixta, realitzant el primer acoblament via submonòmer (acilació i aminació) i els dos següents via monòmer (acoblament i desprotecció). Així doncs, es va preparar una xeringa de 10 ml que contenia 600 mg (0.70 mmol/g, 0.42 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Després de l'inflat inicial de la resina i la desprotecció del grup Fmoc, es va dur a terme la reacció d'acilació i d'aminació amb l'amina **A16** seguint el procediment estàndard descrit anteriorment. A continuació, es va procedir a l'acoblament del monòmer corresponent a l'amina **A6** (Figura 4.18, compost **33**) utilitzant DIC com a agent d'acoblament en una mescla DCM/DMF (2:1), fent aquest tractament per duplicat. Seguidament, es va realitzar la desprotecció del grup Alloc per tractament amb una dissolució de Pd(PPh₃)₄ (0.1 eq.) i PhSiH₃ (10 eq.) en DCM anhidre, seguint el procediment descrit per Montserrat del Fresno en la seva Tesi Doctoral.¹⁰² Després de realitzar aquest tractament per duplicat, es va repetir el procés per tal d'acoblar el següent monòmer, el corresponent a l'amina **A22** (Figura 4.18, compost **34**). Tot seguit, es va desprotegir el grup Alloc del monòmer acoblat i es va procedir a l'escissió del peptòide de la resina per tractament amb un còctel format per TFA/DCM/H₂O (60:40:2). El filtrat obtingut es va concentrar a pressió reduïda. Finalment, l'oli groguenc residual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 158 mg de residu (rdt. 76%), amb una puresa del 84% per HPLC. La identificació del peptòide es va confirmar per CL-EM.

La purificació d'aquest residu es va realitzar per HPLC a escala semipreparativa, obtenint finalment 88 mg del peptòide **1** desitjat (rdt. 43%), amb una puresa superior al 98% per HPLC.

4.4. ESTRATÈGIA 3: PROTECCIÓ AMB EL GRUP NS

Aquesta estratègia es va plantejar per mirar de solucionar els problemes, d'origen divers, sorgits en les dues estratègies anteriors per a l'obtenció dels *N*-alquilaminoacetats d'etil o de *tert*-butil, tot aprofitant la introducció d'un nou grup protector, l'Ns (2-nitrobenzensulfonyl). L'esquema retrosintètic proposat va ser el mostrat a la Figura 4.19.

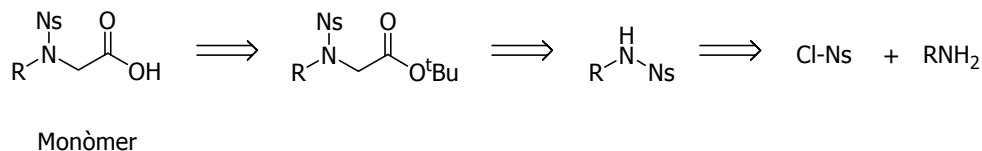


Figura 4.19. Esquema retrosintètic proposat per a l'obtenció dels monòmers d'*N*-alquilglicina protegits amb el grup Ns.

Els monòmers protegits amb el grup Ns s'obtidrien per tractament amb TFA/DCM de l'èster *tert*-butílic dels propis monòmers protegits amb el grup Ns, els quals s'obtidrien per atac nucleòfil de l'àtom de nitrogen de la sulfonamida sobre el bromoacetat de *tert*-butil. Finalment aquestes sulfonamides s'obtidrien per reacció de la corresponent amina primària amb el clorur de 2-nitrobenzensulfonyl.

La utilització del grup protector Ns introduïa un canvi important des del punt de vista sintètic respecte a les dues estratègies comentades anteriorment, ja que la seva incorporació es feia en la primera etapa de síntesi enlloc de en l'última. Aquest fet oferia la possibilitat de fer la reacció d'alquilació aprofitant l'acidesa del protó del nitrogen de la sulfonamida i a més augmentava considerablement el caràcter hidrofòbic dels productes resultants, cosa que afavoriria el seu aïllament dels corresponents crurs de reacció. Aquest darrer aspecte podia resultar especialment important en el cas de les amines amb un àtom de nitrogen terciari en la cadena lateral, tenint en compte els resultats obtinguts en la segona de les estratègies comentades.

4.4.1. OBTENCIÓ DE LES *N*-ALQUIL-2-NITROBENZENSULFONAMIDES

Aquesta reacció es va dur a terme seguint el procediment descrit per Kan *et al.*¹⁰³ mostrat en la Figura 4.20. La protecció de l'amina primària es va fer per tractament amb clorur de 2-nitrobenzensulfonyl en presència de trietilamina en DCM.

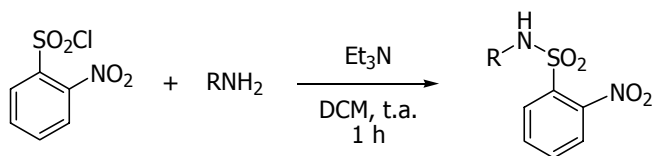


Figura 4.20. Obtenció de les *N*-alquil-2-nitrobenzensulfonamides.

Sobre una dissolució de la corresponent amina primària (**A6**, **A10**, **A13**, **A15**, **A16**, **A22**, i **A37**) i trietilamina en DCM disposada en un bany de gel, s'hi va addicionar el clorur de 2-nitrobenzensulfonil lentament. Acabada l'addició, es va retirar el bany de gel i es va deixar la mescla de reacció en agitació a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps, es va procedir a realitzar el tractament de les reaccions. Les *N*-alquil-2-nitrobenzensulfonamides que presentaven un nitrogen terciari en la cadena lateral (vegeu Figura 4.21, composts **38-40**) es van obtenir en forma d'un oli dens de coloració groguenca/marronosa, amb un rendiment superior al 90% (HPLC, RMN) mentre que la resta de composts (vegeu Figura 4.21, composts **41-44**) es van obtenir com a sòlids fruit d'una recristal·lització de DCM/hexà, amb un rendiment al voltant del 75%.

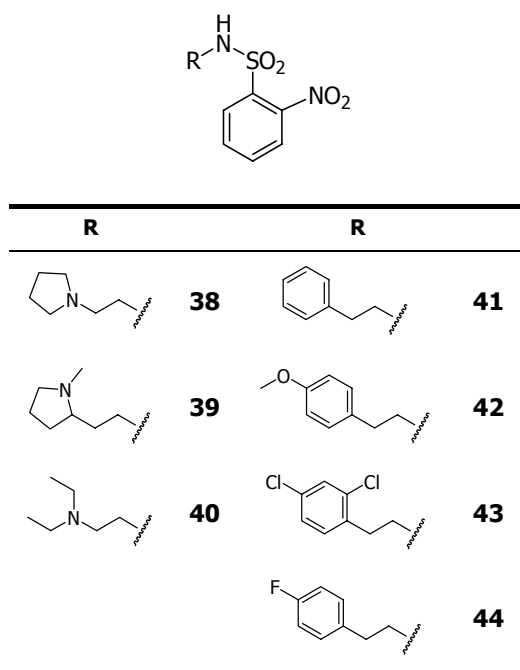


Figura 4.21. Conjunt d'*N*-alquil-2-nitrobenzensulfonamides preparades.

4.4.2. OBTENCIÓ DE LES *N*-ALQUIL-*N*-*tert*-BUTOXICARBONILMETIL-2-NITRO-BENZENSULFONAMIDES

L'alquilació de les sulfonamides es va dur a terme seguint el procediment descrit per Kan *et al.*¹⁰³ mostrat en la Figura 4.22.

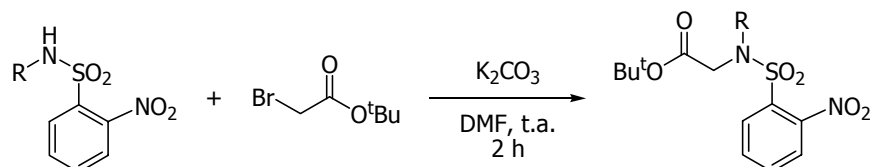


Figura 4.22. Obtenció de les *N*-alquil-*N*-*tert*-butoxicarbonilmetil-2-nitrobenzensulfonamides.

L'alquilació es va realitzar per addició del bromoacetat de *tert*-butil sobre una dissolució de la sulfonamida en DMF en presència de K_2CO_3 . Aquesta reacció va posar de manifest la gran versatilitat del grup protector Ns, ja que més enllà de la seva funció com a tal podia actuar com a agent activant donada l'acidesa del protó de la sulfonamida, permetent la seva alquilació en condicions suaus.

Un cop acabada la reacció, els composts que presentaven una amina amb un nitrogen terciari en la cadena lateral (vegeu Figura 4.23, composts **45-47**) es van redissoldre en DCM/NaOH 1 N i es va realitzar una extracció amb DCM. Per a la resta de composts (vegeu Figura 4.23, composts **48-51**), el cru de reacció es va redissoldre en una mescla $tBuOMe/H_2O$ i es va realitzar una extracció amb $tBuOMe$. En ambdós casos, es van obtenir les sulfonamides desitjades amb un rendiment superior al 90% excepte per al cas de la corresponent a l'**A16 (47)** que va ser del 82%.

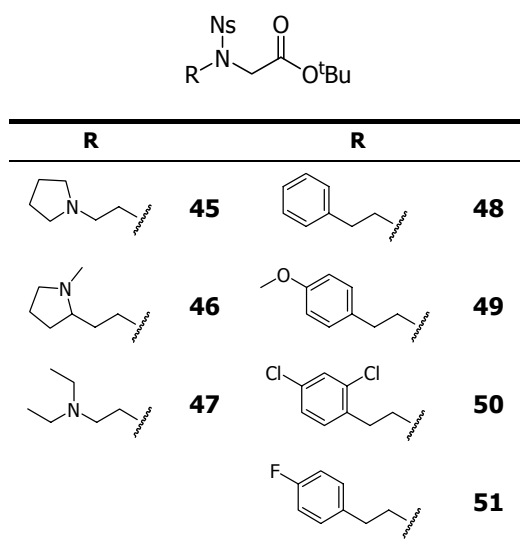


Figura 4.23. Conjunt d'*N*-alquil-*N*-*tert*-butoxicarbonilmetil-2-nitrobenzensulfonamides preparades.

Precisament aquest darrer cas va posar de manifest la formació d'un subproducte que només es formava en treballar amb les amines que tenien un atom de nitrogen terciari en la cadena lateral. Aquest subproducte va ser identificat com el resultant d'una alquilació d'aquest nitrogen terciari conduint a la formació d'una sal de tetraalquilamoni com la mostrada en la Figura 4.24.

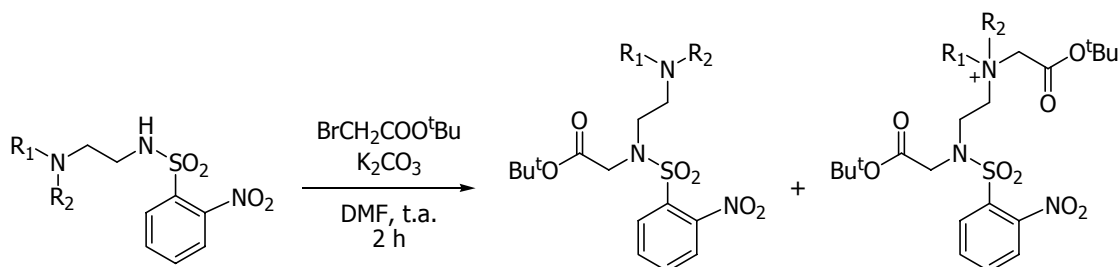


Figura 4.24. Formació d'una sal de tetraalquilamoni durant l'obtenció de les *N*-alquil-*N*-*tert*-butoxicarbonilmetil-2-nitrobenzensulfonamides en treballar amb amines amb un nitrogen terciari en la cadena lateral.

La formació d'aquest subproducte es podia justificar amb els precedents comentats en l'apartat 3.4.1 on es mostrava l'atac nucleòfil d'una amina terciària d'una de les cadenes laterals d'un oligòmer enllaçat a una fase sòlida sobre el cloroderivat format després de l'etapa d'acilació del propi oligòmer. A més, aquesta reacció es produïa exclusivament quan s'utilitzaven *N*-alquil-2-nitrobenzensulfonamides que presentaven amines amb un nitrogen terciari en la cadena lateral, si bé dels tres casos estudiats (**A6**, **A16** i **A22**), només en el de l'amina **A16** la formació del subproducte era destacable. Així doncs, es va plantejar la possibilitat d'ampliar aquest estudi per a aquesta reacció en concret per a la sèrie d'amines mostrades en la Figura 4.25.

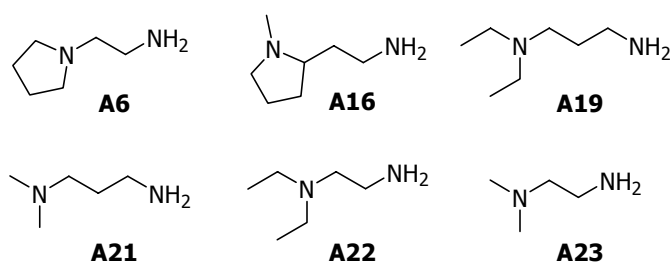


Figura 4.25. Conjunt d'amines que presenten un nitrogen terciari en la cadena lateral utilitzades per a la formació d'*N*-alquil-*N*-*tert*-butoxicarbonilmetil-2-nitrobenzensulfonamides.

Seguint els procediments descrits anteriorment es van preparar les sulfonamides corresponents a les amines **A19**, **A21** i **A23** i es van analitzar per HPLC tots els crús de

reacció, incloent les preparades anteriorment corresponents a les amines **A6**, **A16** i **A22**. Els cromatogrames obtinguts van ser els mostrats en la Figura 4.26.

Un aspecte destacable va ser, lògicament, que la formació del subproducte implicava que part del reactiu de partida restava sense reaccionar, ja que el bromoacetat de *tert*-butil s'afegia en quantitats estequiomètriques. No obstant això, en els casos menys favorables corresponents a les amines **A23** i **A21** es va provar d'afegir-ne un excés (0.5 eq.) per mirar de completar la reacció. El resultat, però, no va ser satisfactori, ja que va seguir quedant reactiu de partida sense reaccionar i en canvi va augmentar la proporció de subproducte, arribant fins i tot a ser el producte majoritari, com en el cas de l'amina **A21**.

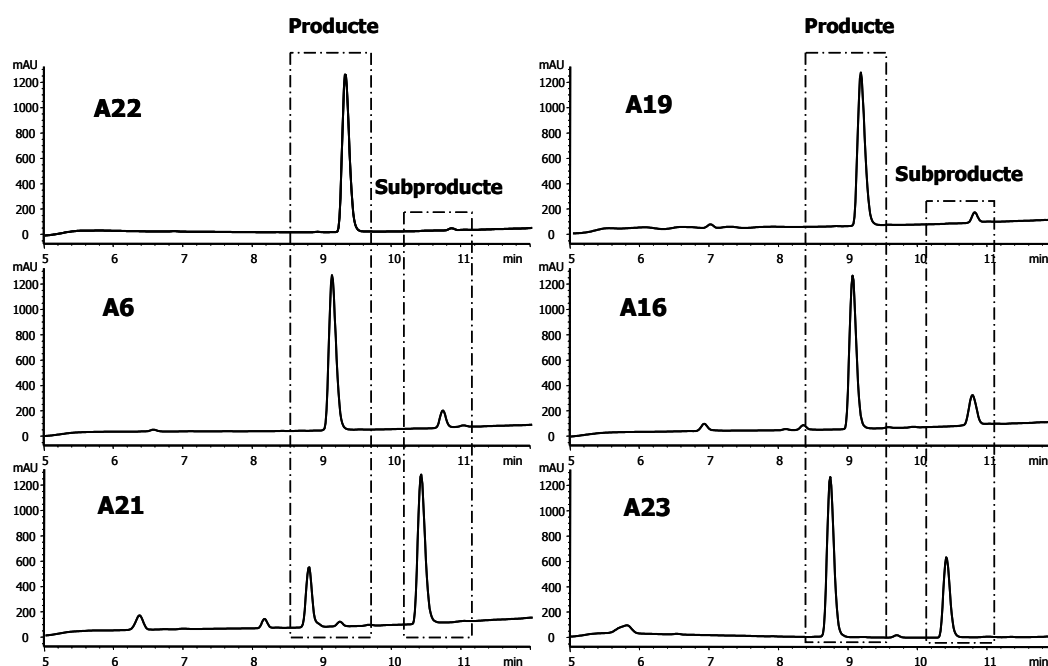


Figura 4.26. Perfils d'HPLC a 220 nm dels crús de reacció finals d'obtenció de les *N*-alquil-*N*-*tert*-butoxicarbonilmetil-2-nitrobenzensulfonamides corresponents a les amines **A6**, **A16**, **A19**, **A21**, **A22** i **A23**.

En termes generals i després d'analitzar els cromatogrames obtinguts, es van classificar les diferents amines en tres grups: un primer format per les amines **A6**, **A19** i **A22** amb una conversió superior al 95% i una proporció de subproducte inferior al 8%; un segon amb l'amina **A16** amb una conversió similar a l'anterior (96%) però amb una proporció major de subproducte (16%) i, finalment, un tercer amb les amines **A21** i **A23** on va restar un 10% de reactiu de partida sense reaccionar i la proporció de subproducte es va enfil·lar més enllà del 30% en el cas de l'amina **A23** i fins al 60% en el cas de l'amina **A21**.

Amb aquests resultats, es va decidir analitzar l'estructura de cadascuna de les amines que formaven part de cada grup per mirar de trobar els trets que expliquessin la diferència de

reactivitat que presentaven. En aquest sentit, es va poder observar que les amines que tenien el nitrogen terciari substituït amb grups metil afavorien la formació del subproducte, essent les que en presentaven dos (**A21** i **A23**) les que el formaven en major proporció. En canvi, quan presentaven grups etil (**A19** i **A22**) la seva formació era pràcticament nul·la. Pel que fa a les altres dues amines (**A6** i **A16**), tot i presentar una estructura similar amb un anell de pirrolidina, donaven resultats diferents. Mentre l'**A6** tenia un comportament semblant a les amines **A19** i **A22**, l'amina **A16** quedava en un punt intermig entre els dos grups i per aquest motiu es va classificar en un grup a part. L'explicació a aquesta diferència la podríem trobar en la situació de l'àtom de nitrogen terciari, el qual resta més impedit en el cas de l'amina **A6** que en l'amina **A16**, on un dels substituents és un metil.

En resum, es pot afirmar que a mesura que s'augmenta el volum dels substituents i per conseqüència l'impediment estèric del nitrogen terciari, aquest reacciona amb més dificultats per donar lloc al subproducte d'alquilació, afavorint la formació dels productes desitjats.

Finalment, cal dir que acabat aquest estudi, es va seguir desenvolupant aquesta estratègia per a les amines que havien estat objecte d'estudi des d'un principi, desestimant per tant les amines **A19**, **A21** i **A23**. En cas d'haver seguit endavant amb aquestes dues últimes amines, hauria estat necessari realitzar una purificació per HPLC, ja que l'elevada proporció del subproducte d'alquilació format sobre el nitrogen terciari podria interferir durant l'acoblament entre monòmers en la síntesi de peptoides.

4.4.3. OBTENCIÓ DE LES *N*-ALQUILGLICINES PROTEGIDES AMB NS

Seguint l'esquema mostrat en la Figura 4.27, es va procedir a la desprotecció de l'èster *tert*-butílic de les corresponents sulfonamides per tractament amb una mescla DCM/TFA (1:1). La mescla de reacció es va mantenir en agitació a temperatura ambient durant 3 h. Passat aquest temps, el control de reacció efectuat per HPLC va mostrar una conversió quantitativa.

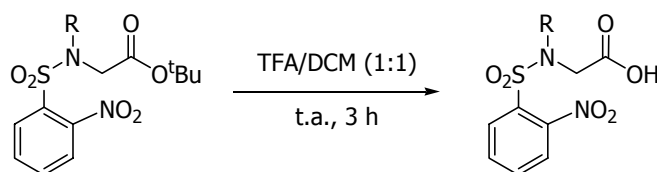


Figura 4.27. Obtenció de les *N*-alquilglicines protegides amb Ns.

En el cas de les *N*-alquilglicines protegides amb Ns que presentaven amines amb un nitrogen terciari en la cadena lateral (vegeu Figura 4.28, composts **52-54**), es va utilitzar el cru de reacció sense cap tractament addicional per a la síntesi de peptoides, mentre que per a la

resta (vegeu Figura 4.28, composts **55-58**) es va optar per recristal·litzar-les d'una mescla DCM/hexà. En tots els casos es va obtenir un sòlid corresponent a la *N*-alquilglicina protegida amb Ns amb un rendiment entre el 75-85%.

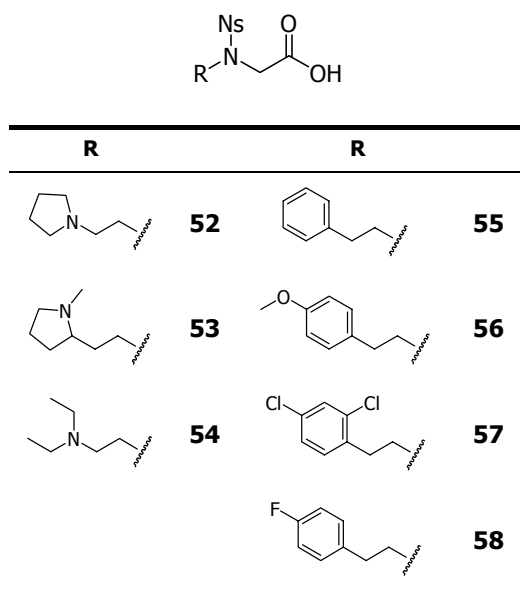


Figura 4.28. Conjunt d'*N*-alquilglicines preparades protegides amb Ns.

El rendiment global de tot el procés de síntesi de les *N*-alquilglicines protegides amb Ns seguint aquesta estratègia sintètica (Via 3 de la Figura 4.2) va ser al voltant del 55% per a les que presentaven les amines **A10**, **A13**, **A15** i **A37** i al voltant del 70% per a les que presentaven les amines **A6**, **A16** i **A22**. Aquesta diferència entre els dos grups va ser causada per les dues etapes de recristal·lització realitzades a les del primer grup al llarg del procés sintètic, ja que la conversió en cadascuna de les etapes del procés va ser idèntic per a totes elles.

4.4.4. APLICACIÓ DELS MONÒMERS D'*N*-ALQUILGLICINES PROTEGITS AMB EL GRUP NS A LA SÍNTESI DE PEPTOIDES

4.4.4.1. Síntesi del peptòide model N10-37-15C (**59**)

Un cop preparades les *N*-alquilglicines protegides amb el grup Ns, es va decidir sintetitzar un peptòide model per establir les condicions adients per dur a terme els acoblaments dels diferents monòmers, així com la desprotecció del grup Ns posterior a cada acoblament. Per fer-ho, es va plantejar la síntesi del peptòide **59** (vegeu Figura 4.29).

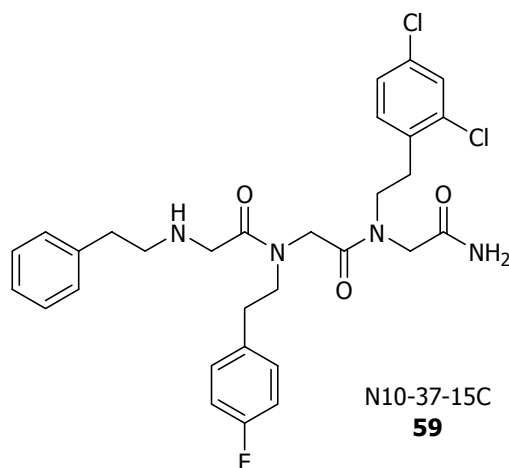


Figura 4.29. Peptòide model N10-37-15C sintetitzat via monòmers d'*N*-alquilglicina protegits amb el grup Ns.

En aquest cas, la síntesi es va realitzar seguint l'estratègia del monòmer. Així doncs, es va preparar una xeringa de 5 ml que contenia 210 mg (0.79 mmol/g, 0.17 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Després de l'inflat inicial de la resina i la desprotecció del grup Fmoc, es va realitzar la reacció d'acoblament del primer monòmer per tractament amb una dissolució del monòmer **57** (3 eq.) i DIC en DCM/DMF (2:1). La mescla de reacció es va mantenir en agitació a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps, es va eliminar l'excés de reactius i es va repetir el procés. L'anàlisi realitzat sobre una fracció de resina mitjançant els test colorimètric del TNBS va posar de manifest que l'acoblament havia tingut lloc de forma satisfactòria. Seguidament, es va procedir a la desprotecció del grup Ns del monòmer acoblat per tractament amb una dissolució de tiofenol i DBU en DMF en agitació a temperatura ambient durant 30 min. Passat aquest temps, es va eliminar l'excés de reactius i es va repetir el procés. L'anàlisi realitzat per HPLC va posar de manifest la desprotecció quantitativa del grup Ns (vegeu Figura 4.30). A continuació, es van repetir aquestes dues etapes per tal d'acoblar els monòmers **58** i **55**. En aquesta ocasió, però, les etapes de desprotecció es van haver d'allargar fins a 1 h per aconseguir una conversió quantitativa. Els controls realitzats per HPLC després de cada etapa són els mostrats a la Figura 4.30.

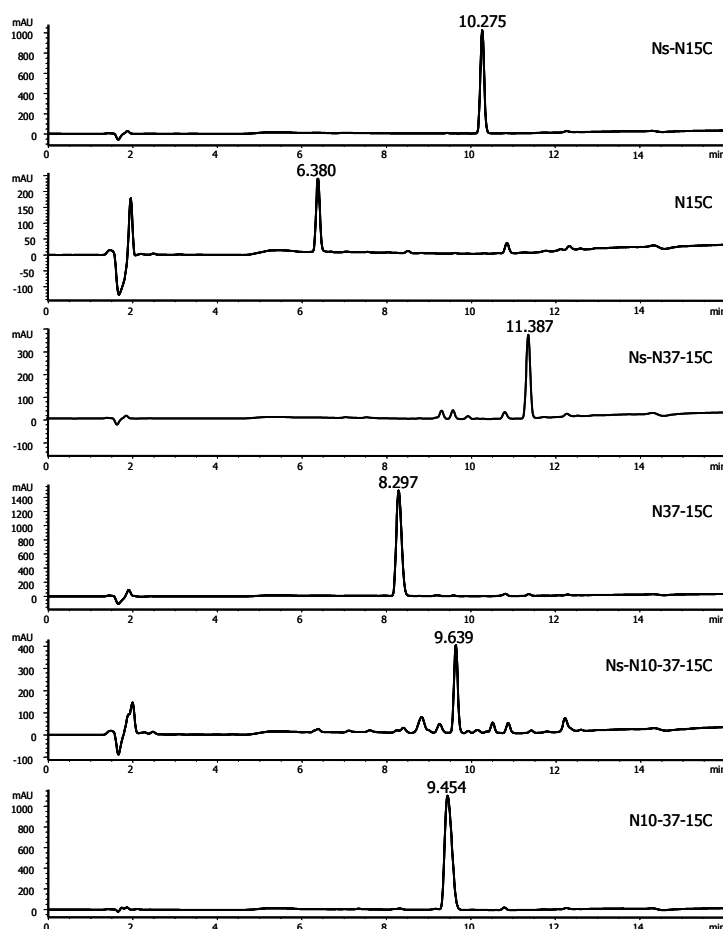


Figura 4.30. Perfils cromatogràfics d'HPLC a 220 nm dels controls realitzats al finalitzar cadascuna de les etapes sintètiques del peptòide N10-37-15C. A cada pic s'indica el seu temps d'elució, en min.

Paral·lelament al control de les diferents etapes de reacció per HPLC, es va decidir explorar la possibilitat de realitzar aquest control mitjançant l'espectroscòpia d'infraroig sobre la fase sòlida. La introducció i l'alliberament del grup 2-nitrobenzensulfonamida implicat en cadascuna de les etapes podia permetre el seu seguiment degut a la presència o no de les bandes de tensió SO_2 a ~ 1350 i $\sim 1150 \text{ cm}^{-1}$. A continuació es mostren, a nivell d'exemple, els espectres obtinguts després dels dos primers acoblaments de monòmer (vegeu Figura 4.31, B i D) i de les corresponents reaccions de desprotecció del grup Ns (vegeu Figura 4.31, C i E).

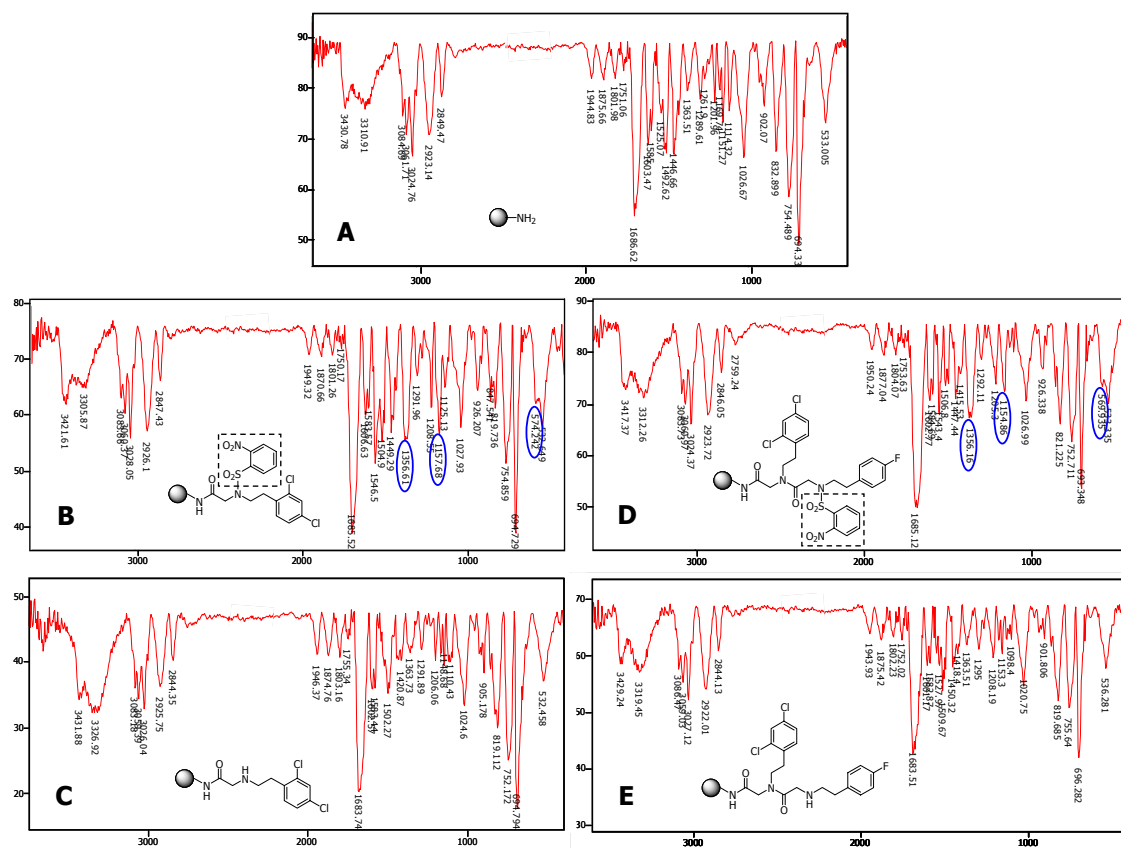


Figura 4.31. Controls de reacció realitzats per espectroscòpia d'infraroig dels dos primers acoblaments de monòmer (B i D) i les corresponents desproteccions del grup Ns (C i E).

Efectivament, es va poder observar l'aparició i desaparició de les bandes de tensió corresponents, si bé la zona on aquestes apareixien no era una zona aïllada que permetés determinar amb claredat els casos on la conversió no fos quantitativa. Per aquest motiu, tot i quedar demostrat el seu potencial d'aplicació i la possibilitat d'efectuar els controls de reacció gairebé a temps reals, es va decidir seguir controlant l'evolució de les reaccions per HPLC, els quals permetien una anàlisi quantitativa més acurada.

Finalment, es va procedir a realitzar l'escissió del peptide i el tractament del cru tal i com s'ha explicat anteriorment, per obtenir 75 mg de residu (rdt. 78%), amb una puresa del 93% per HPLC. La identificació del peptide **59** es va confirmar per CL-EM.

4.4.4.2. Síntesi del peptide N22-6-16C (1)

Una vegada establert el protocol de síntesi de peptides mitjançant l'acoblament de monòmers d'*N*-alquilglicina protegits amb el grup Ns, es va procedir a la seva aplicació a la síntesi del peptide **1** (vegeu Figura 2.5).

En aquesta ocasió, la síntesi es va dur a terme mitjançant l'estratègia mixta, realitzant l'acoblament de la primera unitat d'*N*-alquilglicina seguint la via del submonòmer i les altres dues seguint la via del monòmer. Es va preparar una xeringa de 3 ml que contenia 100 mg (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Després de l'inflat inicial de la resina i la desprotecció del grup Fmoc, es va dur a terme una reacció d'acilació per tractament amb una dissolució d'àcid bromoacètic i DIC en DCM/DMF (2:1) seguida d'una reacció d'aminació amb l'amina **A16** en DMF. A continuació, es va realitzar l'acoblament del monòmer **52** per tractament amb una dissolució d'aquest i DIC en DCM/DMF (2:1). Després d'eliminar l'excés de reactius i repetir el procés, es va agafar una fracció de resina i es va analitzar mitjançant el test del cloramil. El resultat va ser positiu, és a dir, va mostrar un coloració verdosa, posant de manifest la presència d'una amina secundària i, per tant, que l'acoblament no s'havia produït. La confirmació d'aquest fet, però, es va produir mitjançant un anàlisi per CL-EM, on es va poder observar la presència del pic corresponent al producte d'acoblament com a producte minoritari i el corresponent a la 2-(2'-(*N*'-metilpirrolidin-2''-il)etilamino)acetamida de partida com a pic majoritari.

La primera alternativa plantejada per superar aquest problema va ser fer servir un altre sistema d'acoblament utilitzat en la química de pèptids per accelerar les reaccions de formació d'amides, el qual fa servir PyBOP com a agent d'acoblament i DIEA com a base. No obstant, els resultats obtinguts no van millorar els descrits anteriorment i, per tant, es va decidir aturar aquí l'intent de síntesi d'aquest peptòide per passar a estudiar més detingudament altres sistemes d'acoblament.

4.4.4.3. Estudi de les condicions d'acoblament de monòmers d'*N*-alquilglicines d'amines amb un nitrogen terciari en la cadena lateral

Davant de les dificultats trobades per incorporar els monòmers d'*N*-alquilglicina protegits amb el grup Ns que presentaven un nitrogen terciari en la cadena lateral, es va plantejar l'estudi de la reacció mostrada en l'esquema de la Figura 4.32 utilitzant diversos sistemes d'acoblament. L'elecció de la 2-(2,4-diclorofenetilamino)acetamida ancorada a la fase sòlida com a substrat sobre el qual incorporar-hi el monòmer **54**, va permetre el seguiment de cadascuna de les reaccions per HPLC.

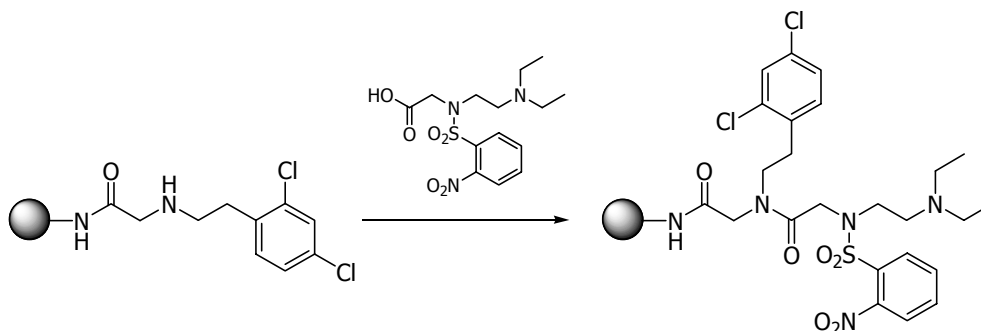


Figura 4.32. Esquema sintètic seguit per a l'estudi de les condicions d'acoblament de monòmers d'*N*-alquilglicina protegits amb el grup Ns que presenten un nitrogen terciari en la cadena lateral.

Inicialment, es va preparar una xeringa de 10 ml que contenia 320 mg (0.79 mmol/g, 0.25 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Després de l'inflat inicial de la resina i la desprotecció del grup Fmoc, es va dur a terme la reacció d'acilació seguida d'una reacció d'aminació amb l'amina **A15**. Després dels corresponents rentats de la resina, aquesta es va repartir entre 8 xeringues de 3 ml (40 mg de resina/xeringa). Tot seguit, es va tractar cadascuna d'elles amb una dissolució del monòmer **54** i un dels sistemes d'acoblament mostrats en la Taula 4.1 i es van mantenir en agitació constant a temperatura ambient durant 1 h o tota la nit (12 h). En aquest cas, no es van realitzar duplicats de reacció. En acabar, es va agafar una mostra de resina de cadascuna de les xeringues, es va escindir el producte ancorat a la resina i es va analitzar el cru de reacció resultant per HPLC. Els valors de % d'àrea del producte d'acoblament respecte a la 2-(2,4-diclorofenetil-amino)acetamida de partida obtinguts van ser els recollits en la Taula 4.1.

Taula 4.1. Condicions d'acoblament del monòmer **54** utilitzades en els 8 experiments. A dalt, s'indiquen els diferents sistemes d'acoblaments emprats, mentre que a l'esquerra s'indica el temps de reacció. En cada casella es mostra el % d'àrea per HPLC del producte d'acoblament respecte a la 2-(2,4-diclorofenetilamino)acetamida de partida, tot fent les lectures a 220 nm.

	HOAt/DIC	HOBt/PyBOP DIEA	HATU/DIEA	HOBt/DIC
1 h	77%	32%	92%	10%
12 h	70%	29%	99%	12%

En primer lloc, es van confirmar els resultats obtinguts anteriorment durant l'intent de síntesi del peptòide N22-6-16C, ja que els sistemes HOBt/PyBOP/DIEA i HOBt/DIC, tot i l'addició de l'HOBt, van seguir mostrant la seva ineficàcia en aquest cas, donant valors de producte d'acoblament baixos.

En segon lloc, es va poder observar com els resultats en cadascun dels sistemes d'acoblament utilitzats no variaven significativament amb el temps de reacció, demostrant que 1 h de reacció era suficient.

Per últim, van permetre determinar que el millor sistema d'acoblament per aquest cas concret era el format per HATU/DIEA, arribant a valors de conversió superiors al 90%.

4.4.4.4. Síntesi dels peptoides model N22-22-15C (22) i N16-22-15C (60)

Una vegada determinat el millor sistema d'acoblament per aquest tipus de monòmer, es va decidir continuar la síntesi anterior i realitzar un nou acoblament en les mateixes condicions per obtenir els peptoides N22-22-15C (vegeu Figura 4.10) i N16-22-15C (vegeu Figura 4.33).

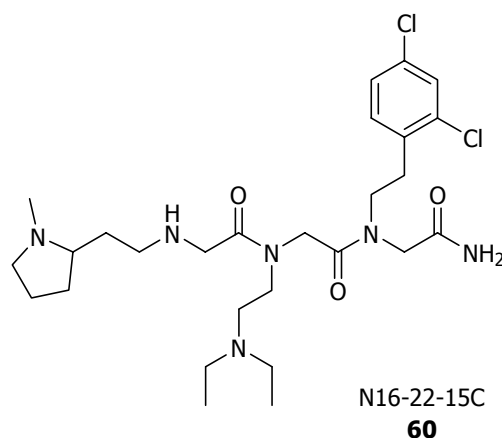


Figura 4.33. Peptoid model N16-22-15C sintetitzat via monòmers d'*N*-alquilglicina protegits amb el grup Ns.

Així doncs, es va agafar la resina de les vuit xeringues que s'havien fet reaccionar amb el sistema d'acoblament HATU/DIEA, es van ajuntar amb una de sola de 10 ml i es va repetir l'acoblament realitzat anteriorment per obtenir una conversió quantitativa i una resina homogènia en tots els punts. A continuació, es va dur a terme la desprotecció del grup Ns per tractament amb una dissolució de tiofenol i DBU en DMF. Arribat aquest punt, la resina es va separar en dues xeringues de 5 ml i es va realitzar l'acoblament del corresponent monòmer en les condicions descrites anteriorment. La reacció es va fer per duplicat i deixant en agitació a temperatura ambient durant 1.5 h. Finalment, es va dur a terme la desprotecció del grup Ns i l'escissió de la resina per obtenir, després del tractament i la liofilització del cru de reacció, 49 i 55 mg de residu (79% i 75% de puresa per HPLC) corresponents als peptoides **22** i **60** respectivament.

La purificació d'aquests residus es va realitzar per HPLC a escala semipreparativa, obtenint finalment 19.8 mg del peptòide **22** (rdt. 30%) i 21.6 mg del peptòide **60** (rdt. 32%), ambdós amb una puresa superior al 98% per HPLC. La identificació dels peptòides es va confirmar per CL-EM.

4.4.4.5. Síntesi del peptòide N22-6-16C (**1**)

Un cop determinat el sistema d'acoblament de monòmers d'*N*-alquilglicina protegits amb el grup Ns en el cas de presentar un nitrogen terciari en la cadena lateral, es va plantejar novament la síntesi del peptòide **1** seguint l'estratègia mixta descrita anteriorment. Així doncs, es va preparar una xeringa de 3 ml que contenia 100 mg (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) de resina de poliestirè AM RAM i es va procedir forma anàloga a la descrita a l'apartat 4.4.4.2 fins a la introducció de la primera amina (**A16**). A continuació, es va realitzar l'acoblament del monòmer **52** per tractament amb una dissolució d'aquest, HATU i DIEA en DMF. La reacció es va fer per duplicat, agitant a temperatura ambient durant 1.5 h. En acabar, es va agafar una mostra de resina i es va analitzar mitjançant el test del cloranil, el qual va donar lleugerament positiu. Per aquest motiu, es va fer un tercer acoblament, deixant la mescla de reacció en agitació durant tota la nit. L'endemà al matí, es va eliminar l'excés de reactius i es va analitzar novament una fracció de resina mitjançant el test del cloranil. En aquesta ocasió, però, el resultat va ser negatiu, posant de manifest que l'acoblament s'havia produït satisfactòriament. A continuació, es va procedir a realitzar la desprotecció del grup Ns tal i com s'ha descrit anteriorment (control per HPLC) seguida de l'acoblament del monòmer **54**. Aquesta reacció d'acoblament es va dur a terme per duplicat, deixant la mescla de reacció en agitació a temperatura ambient durant 1.5 h. Finalment, es va dur a terme la desprotecció del grup Ns i l'escissió de la resina per obtenir, després del tractament i la liofilització del cru de reacció, 34 mg de residu corresponents al peptòide **1**.

La purificació d'aquest residu es va realitzar per HPLC a escala semipreparativa, obtenint finalment 11.3 mg del peptòide **1** (rdt. 29%) amb una puresa superior al 98% per HPLC. La identificació del peptòide es va confirmar per CL-EM.

l'acoblament del monòmer seguit de la desprotecció pertinent (sistema A, B o C de la Figura 4.34).

Seguint aquest esquema es podria anar allargant la cadena fins al punt desitjat. Arribat aquest moment, ens trobaríem en el requadre discontinu central i seguiríem la via 3 de la Figura 4.34 per tal de realitzar l'escissió final del producte de la fase sòlida.

Després de resumir breument les diferents estratègies plantejades al llarg d'aquest capítol, les conclusions extretes de tot aquest estudi són les següents:

1) L'aplicació de les diferents estratègies de síntesi de monòmers d'*N*-alquilglicina amb els corresponents sistemes d'acoblament permet sintetitzar peptoides que presentin amines amb un nitrogen terciari en la seva cadena lateral en qualsevol de les fonts de diversitat amb rendiments i pureses satisfactòries.

2) L'elecció de l'estratègia a seguir ve determinada per la compatibilitat del grup protector de les *N*-alquilglicines amb les condicions de reacció de les diferents etapes del procés sintètic plantejat.

3) En cas de no haver-hi problemes d'incompatibilitat, l'elecció s'hauria de prendre després d'analitzar els avantatges i inconvenients que presenten cadascuna de les estratègies i avaluar quins aspectes són més importants segons els cas. En aquest sentit, cal destacar que la majoria d'inconvenients es produeixen pel fet de treballar amb amines amb un nitrogen terciari en la cadena lateral, i degut a les propietats que presenten els corresponents compostos.

4) La primera estratègia (protecció amb Fmoc) presenta com a principal inconvenient la reacció de dialquilació que es produeix en la primera etapa de síntesi dels monòmers, la qual afecta totes les amines primàries i obliga a fer una purificació per destil·lació al buit per tal d'aïllar els compostos desitjats. Per contra, presenta com a avantatges que les tres etapes de reacció són ràpides i que les condicions de desprotecció del grup Fmoc són suaus i no requereixen la manipulació de reactius especialment sensibles o perillosos que obliguin a prendre precaucions addicionals més enllà de les habituals.

5) La segona estratègia (protecció amb Alloc) és la menys favorable, ja que presenta dificultats d'aïllament dels productes finals en la primera i tercera etapes de síntesi dels monòmers, fent baixar força el rendiment sintètic global, i utilitza el catalitzador de Pd per a les etapes de desprotecció del grup Alloc, requerint una manipulació especial del sistema per mantenir una atmosfera inert. Ara bé, presenta també alguns avantatges, com són: l'assequibilitat dels agents d'acoblament utilitzats, l'absència de problemes de dialquilació durant la síntesi dels monòmers i l'estabilitat del grup protector en condicions àcides i bàsiques.

6) Finalment, la tercera estratègia (protecció amb Ns) és segurament la més eficient des d'un punt de vista sintètic, ja que ofereix el rendiment global d'obtenció dels monòmers més elevat. Per aquest motiu, aquesta estratègia estaria especialment indicada en els casos on la disponibilitat d'amina primària de partida fos limitada. A més, les tres etapes de reacció són

ràpides, utilitza un grup protector estable en medis àcids i bàsics, i la desprotecció es fa en condicions suaus utilitzant reactius assequibles. No obstant, presenta també certs inconvenients, com és la formació de subproductes de dialquilació de difícil separació en amines que presentin un nitrogen terciari en la cadena lateral amb substituents poc voluminosos i el fet d'utilitzar un tiol en l'etapa de desprotecció del grup protector Ns, la qual cosa requereix una manipulació especial del sistema degut a la olor que desprenen aquest tipus de composts.

5. ACTIVITAT BIOLÒGICA DEL PEPTOIDE N22-6-16C

5.1. INTRODUCCIÓ

L'absència de regeneració neuronal en el Sistema Nerviós Central adult és un greu problema biomèdic, sanitari i social, associat a nombroses lesions traumàtiques com les de la medul·la espinal. La capacitat regenerativa del Sistema Nerviós Perifèric (SNP) es coneix des de fa temps, en contrast amb el Sistema Nerviós Central (SNC), on el potencial de regeneració està limitat per influències inhibidores derivades de factors cel·lulars (glia reactiva, fibroblasts, cèl·lules endotelials) i per molècules de la matriu extracel·lular. En els últims anys s'ha identificat un gran nombre de molècules amb capacitat quimiorrepulsiva, involucrades en el desenvolupament del SNC i que estan expressades en el SNC adult, tot impeding la seva capacitat de regeneració. Estudis recents indiquen que el bloqueig d'aquests inhibidors endògens del creixement axonal pot constituir una nova via per estimular la regeneració neuronal.¹⁰⁴ En aquest sentit, el descobriment de la família de les semaforines (i els seus receptors: les neuropilines), els inhibidors més potents del creixement axonal, ofereix un ampli ventall de noves possibilitats experimentals i terapèutiques en regeneració neuronal. Les semaforines^{105,106} (Sema) són una gran família de proteïnes secretades o associades a la membrana que actuen com a quimiorrepel·lents o inhibidors dels axons, tot afectant la seva direcció de creixement, la seva fasciculació i ramificació, així com la formació de la sinapsi.

En aquest context, tal i com s'ha comentat anteriorment (vegeu l'apartat 3.4.2), es va iniciar un estudi en col·laboració amb el grup del Prof. Eduardo Soriano de la Unitat de Neurobiologia del Desenvolupament i de la Regeneració Cel·lular del Parc Científic de Barcelona (IRBB-PCB), per intentar identificar inhibidors potencials de semaforines a partir del cribratge de la quimioteca de peptoides-I.

5.2. CRIBRATGE DE LA QUIMIOTECA DE PEPTOIDES-I

Els assaigs d'activitat biològica per avaluar l'activitat inhibidora dels components de la quimioteca sobre els receptors de semaforines van ser realitzats per Marisol Montolio.

El cribratge de la quimioteca es va fer adaptant un assaig de quimiorepulsió, avaluant el bloqueig de repulsió axonal produït per les mescles de la quimioteca en explants d'hipocamp embrionari de ratolí (E15-E16) enfrontats a cèl·lules COS1 transfectades per tal d'expressar semaforines en una matriu de col·lagen.^{107,108}

Seguint aquesta metodologia, es va fer el cribratge de les 66 mescles de peptoides que conformaven la quimioteca i es va avaluar la seva activitat sobre un mínim de 20 explants.¹⁰⁹ A la Figura 5.1 A es mostra un resultat negatiu on en confrontar l'hipocamp amb les cèl·lules transfectades per tal d'expressar Sema 3A, els axons queden repel·lits i creixen en direcció contrària a aquestes. En canvi, a la Figura 5.1 B es mostra un resultat positiu on l'inhibició d'aquest efecte produeix un creixement dels axons de forma radial.

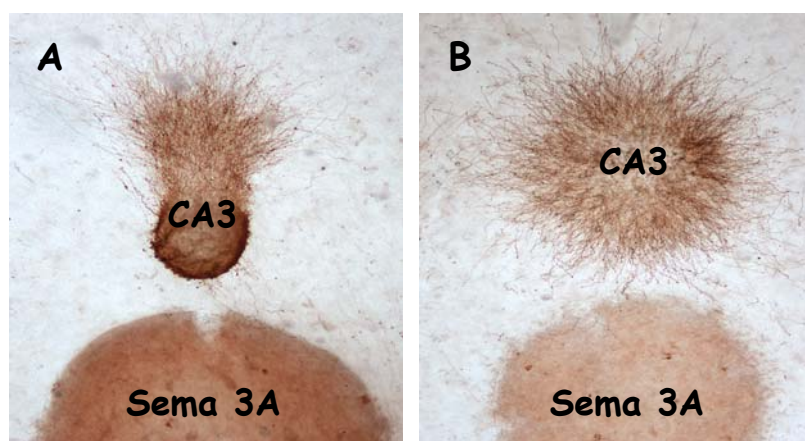


Figura 5.1. Fotografies obtingudes durant els assaigs de cribratge de la quimioteca de peptoides. En el cas A es pot veure que les cèl·lules de l'hipocamp (CA3) creixen repel·lides per les semaforines, mentre que en el cas B aquestes queden inhibides i el creixement és normal (M. Montolio¹⁰⁹).

Cal dir que a l'hora de fer la deconvolució es van agafar com a positius aquells que ho eren clarament, deixant fora els casos dubtosos o poc clars. Davant els resultats obtinguts es van

escollir les mescles **16**, **18**, **22**, **28** i **66**, les quals va portar a la identificació de les amines més actives per a cadascuna de les tres posicions de diversitat, les quals van ser: **A16** en R^3 , **A6** en R^2 i **A16**, **A18** i **A22** en R^1 . Aquesta selecció va conduir a la síntesi de tres peptoides definits, resultat de totes les combinacions possibles: N16-6-16C, N18-6-16C i N22-6-16C (vegeu Figura 5.2).

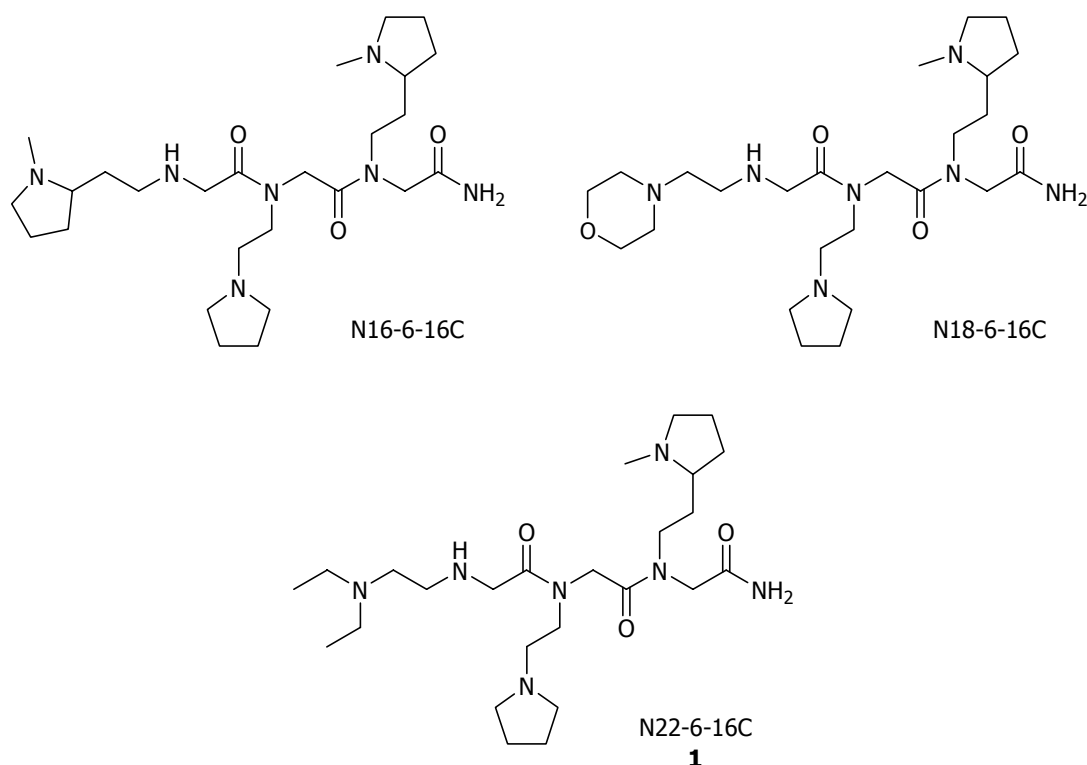


Figura 5.2. Els tres peptoides definits resultants de la deconvolució de la quimioteca de peptoides en el cribratge per identificar inhibidors de semaforines.

A la vista de l'estructura dels tres peptoides, es pot observar que presenten una característica comuna: totes les amines que conformen cadascun dels casos presenten un nitrogen terciari en la cadena lateral. Aquesta característica els confereix unes propietats particulars des del punt de vista de polaritat i reactivitat respecte a la majoria de peptoides de la quimioteca.

Així doncs, es procedí a la síntesi d'aquests tres peptoides definits per tal de validar el cribratge i la deconvolució que s'havia fet. La síntesi es va fer seguint l'estratègia del submonòmer i el procediment descrit a l'apartat 3.4.2.1. Cal posar de manifest que aquesta part de l'estudi es va realitzar amb anterioritat a tot el desenvolupament sintètic explicat en el capítol anterior, motiu pel qual aquesta síntesi es va dur a terme seguint aquesta estratègia tot i els inconvenients que presentava. Precisament per aquesta raó, es van sintetitzar també els subproductes de ciclació **2** i **3** (vegeu la Figura 3.7 de l'apartat 3.4.2.1), els quals es trobaven

en quantitats elevades en els crus de reacció dels tres peptoides definits i podien ser els causants de l'activitat observada.

No obstant, realitzats els assaigs, no es van obtenir resultats positius per aquests subproductes de ciclació, és a dir, no eren capaços d'anular l'efecte quimiorepulsiu produït per Sema 3A i, per tant, es va descartar la seva participació com a agents causants de l'efecte observat amb les mostres corresponents a les mescles de la quimioteca. En canvi, els tres peptoides definits van mostrar resultats positius respecte a la seva capacitat per revertir la quimiorepulsió. Aquests resultats, però, van ser diferents entre ells ja que en el cas dels peptoides N16-6-16C i N18-6-16C, un 56% dels explants analitzats creixien totalment radials, mentre que el peptoid N22-6-16C va lograr bloquejar completament l'efecte de Sema 3A en un 73% dels casos (vegeu Taula 5.1). Precisament, aquest últim va ser el peptoid seleccionat com a més actiu i se'l va anomenar SICH1 (*Semaphorin Induced Chemorepulsion Inhibitor*).

Taula 5.1. Percentatge d'explants amb creixement radial i nombre d'explants comptats en cadascun dels casos.

Mostra	% d'explants que presentaven creixement radial	Nº Explants
Mescla 16	48%	23
Mescla 18	57%	23
Mescla 22	54%	28
Mescla 28	82%	28
Mescla 66	60%	20
N16-6-16C	55%	22
N18-6-16C	56%	22
N22-6-16C (SICH1)	73%	22

5.3. ACTIVITAT BIOLÒGICA DEL SICH I (1)

Després d'identificar el SICH I com a peptòide més actiu, es va procedir a la realització dels assaigs biològics per determinar l'interval de concentració en el qual el peptòide mostrava activitat sense arribar a nivells tòxics. Tots els assaigs que s'explicaran a continuació van ser realitzats per Marisol Montolio i els resultats obtinguts es troben recollits en un article pendent de publicació (M. Montolio *et. al.*).

5.3.1. DETERMINACIÓ DE L'INTERVAL DE CONCENTRACIÓ ACTIU

L'assaig realitzat per determinar l'interval de concentració en el qual el peptòide SICH I era actiu, va ser anàleg al descrit a l'apartat anterior. No obstant, en aquesta ocasió, els explants es van dividir en quatre quadrants (proximal, distal i dos laterals), per tal de quantificar l'efecte produït pel SICH I a cada concentració mitjançant el comptatge d'axons en cadascun dels quadrants (vegeu Figura 5.3).

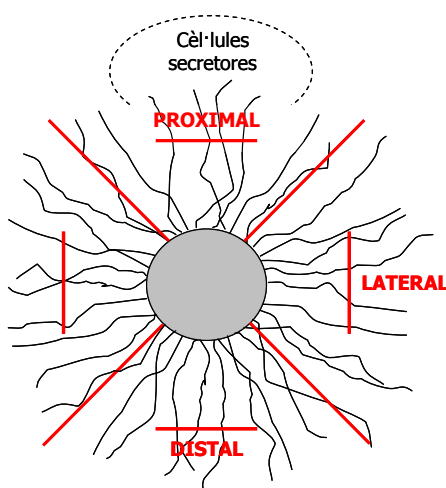


Figura 5.3. Esquema del comptatge axonal realitzat per a la quantificació de l'efecte produït per SICH I en funció de la seva concentració.

Mitjançant aquest procés, es va calcular el quocient proximal/distal (P/D) com a índex de creixement de l'explant. Valors alts d'aquest quocient implicaven una elevada inhibició de la quimiorepulsió produïda per Sema 3A. A una concentració de 0.2 μM , l'índex P/D tenia un valor de 0.1, el qual va anar pujant a mesura que s'incrementava la concentració de peptòide fins a un valor màxim de 0.5 a una concentració de 4 μM (vegeu Figura 5.4). A partir d'aquí, un augment de concentració implicava una disminució del creixement radial.

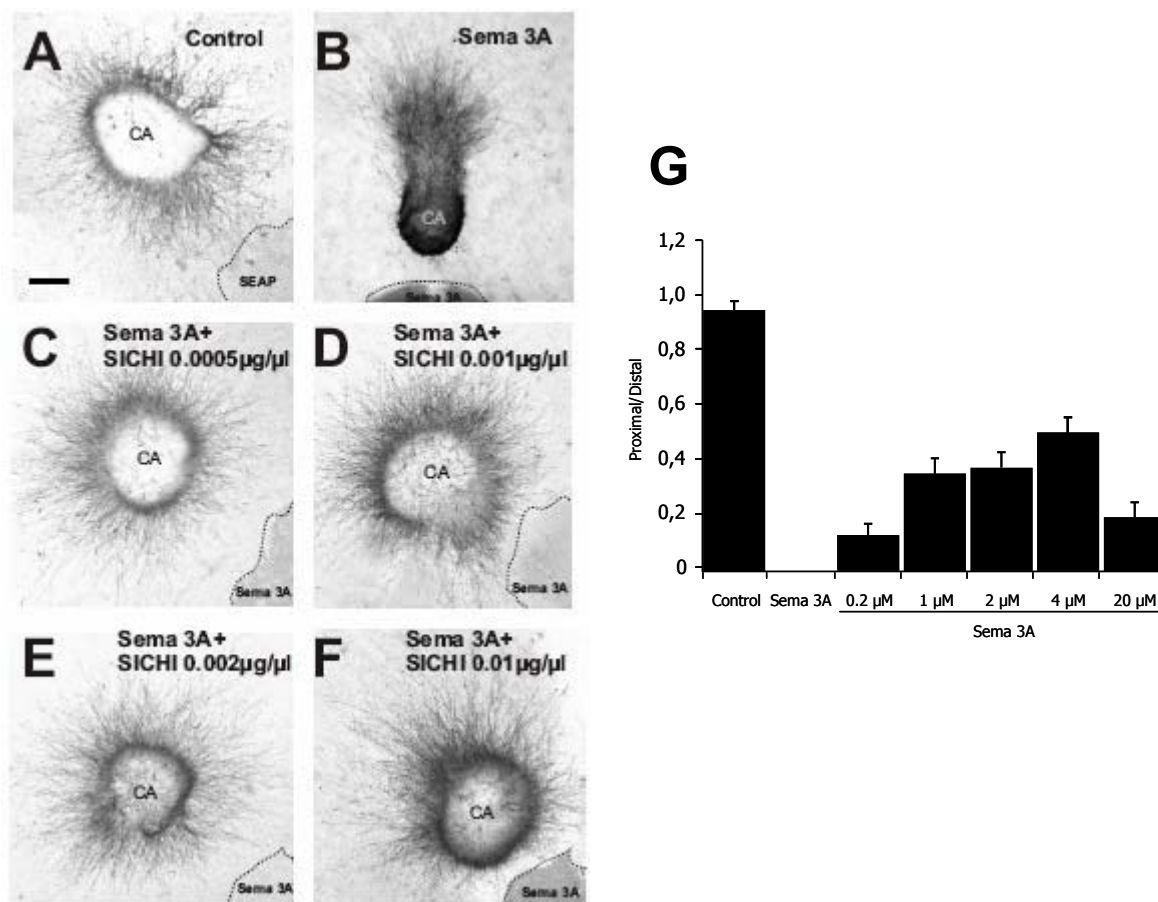


Figura 5.4. Assaig de creixement axonal en explants de CA3 d'hipocamp en condicions control (SEAP) (A), confrontats a una font de Sema 3A (B) i amb tractaments de SICH1 1 µM (C), 2 µM (D), 4 µM (E) i 20 µM (F). L'histograma reflexa el nombre d'axons capaços de créixer en la zona proximal de l'explant respecte als de la zona distal (G).

5.3.2. ACTIVITAT BIOLÒGICA DE SICH1 EN EL CREIXEMENT AXONAL

Un cop determinat l'interval de concentració en el qual SICH1 mostrava activitat, es va procedir a determinar el seu efecte sobre el col·lapse axonal produït per Sema 3A. Per fer-ho, es va realitzar un assaig de col·lapse a partir d'explants embrionaris d'hipocamp (E16) cultivats sobre portaobjectes i exposats a SICH1-Sema 3A durant 30-45 min. Els axons tractats amb medi control (SEAP) presentaven cons de creixement rics en lamelipodis i filopodis (vegeu Figura 5.5 A), mentre que els tractats amb Sema 3A ho feien contrets en forma característica de llapis, típica del col·lapse del con axonal (vegeu Figura 5.5 B). En canvi, el tractament amb SICH1-Sema 3A provocava la mateixa morfologia que els tractats amb SEAP, obtenint per tant una reversió del col·lapse, tant a concentracions de peptòide 2 µM com a 4 µM (vegeu Figura 5.5 C i D, respectivament). A l'histograma de la Figura 5.5 E es representa la quantificació de l'efectivitat de les diferents concentracions de SICH1.

Aquests resultats van demostrar que la inhibició de la repulsió produïda per Sema 3A era deguda a una reversió del col·lapse del con de creixement per part del peptòide SICH1.

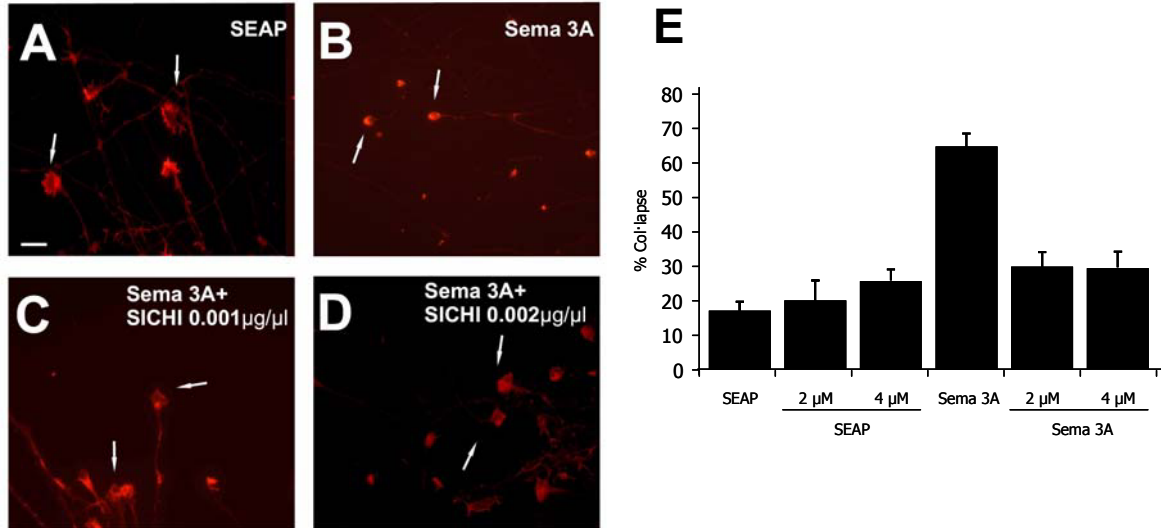


Figura 5.5. Tinció amb faloidina-rodamina en cultius d'hipocamp en embrions E16. Explants cultivats amb medi SEAP (A). Després d'una incubació en medi condicionat de Sema 3A s'observa com els explants de CA tenen els seus cons de creixement (fletxes) amb una morfologia típica del col·lapse axonal (B). En afegir medi amb SICH1 es van observar uns cons de creixement (fletxes) normals amb lamel·lipodis i filopodis, tant a concentracions de 2 µM (C) com a 4 µM (D). L'histograma mostra els percentatges de cons de creixement col·lapsats després de la incubació de CA en medi condicionat Sema 3A o medi condicionat SEAP, en presència i absència de SICH1 (E).

Tenint en compte que l'expressió de semaforines en el còrtex entorrinal (CE) juga un paper crucial impedit l'entrada d'axons hipocàmpals Np-1 positius al seu interior, es va analitzar la capacitat del SICH1 per bloquejar aquesta inhibició endògena. Per fer-ho, es van confrontar explants embrionaris de còrtex entorrinal amb explants d'hipocamp (CA) i s'hi va afegir SICH1 (0.2 µM-4 µM). Passats quatre dies, els cultius control van mostrar repulsió d'axons d'hipocamp provocada per la secreció de Sema 3A en el còrtex entorrinal (vegeu Figura 5.6 A). En canvi, en presència del SICH1, els axons que emergien de la CA mostraven un creixement radial en totes direccions (vegeu Figura 5.6 B). Per tant, es va poder concloure que l'activitat bloquejadora de SICH1 inhibia la resposta dels axons d'hipocamp a Sema 3A endògena.

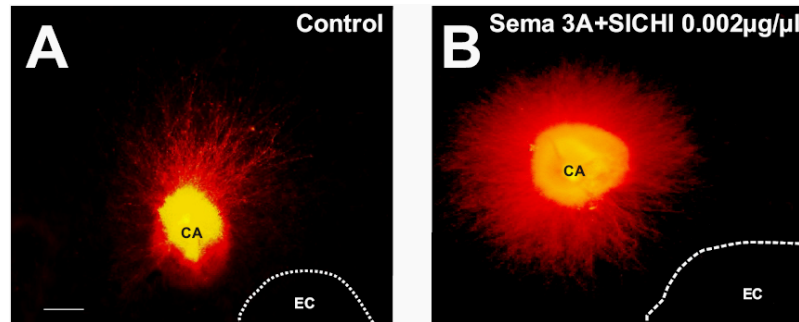


Figura 5.6. Fotografia on es veu com SICHI ($4\ \mu\text{M}$) inhibeix l'efecte de repulsió de Sema 3A endògena en CE (línies discontinues) en explants de CA visualitzats amb DiI (B) provocat en condicions control (A).

Per altra banda, es va voler determinar si l'efecte produït per SICHI era exclusiu de la quimiorrepulsió induïda per Sema 3A o si també afectava a altres processos de quimiorrepulsió. Es coneix que Sema 3A induïx una resposta al col·lapse per unió amb el receptor Np-1 mentre que Sema 3F induïx una resposta similar per unió amb Np-2. En edats embrionàries (E15-16), les regions CA1 i CA3 expressen Np-2 i, per tant, responen a Sema 3F.¹¹⁰ Així doncs, es va dur a terme una anàlisi d'especificitat de SICHI, mitjançant un assaig de repulsió en matriu de col·lagen confrontant explants de CA amb cèl·lules secretores de Sema 3F, el qual va permetre determinar que SICHI no bloquejava la repulsió exercida per Sema 3F (vegeu Figura 5.7 B).

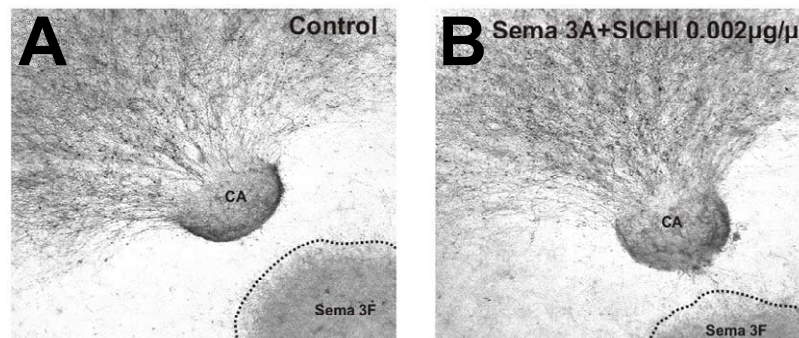


Figura 5.7. Fotografia on es pot comprovar que SICHI no inhibeix la repulsió de Sema 3F en explants de CA confrontats a cèl·lules secretores de Sema 3F.

Paral·lelament, es va voler determinar la capacitat de SICHI per inhibir la repulsió induïda en explants d'EGL (*external granule cell layer*) de cerebel postnatal (P4-P5) per agregats de cèl·lules EBNA-293 secretores de Netrina-1 mitjançant un assaig anàleg al descrit anteriorment en matriu de col·lagen. En la Figura 5.8 B es mostra el resultat negatiu d'aquest assaig, el qual va permetre determinar que SICHI tampoc era capaç d'inhibir la quimiorrepulsió produïda per Netrina-1.

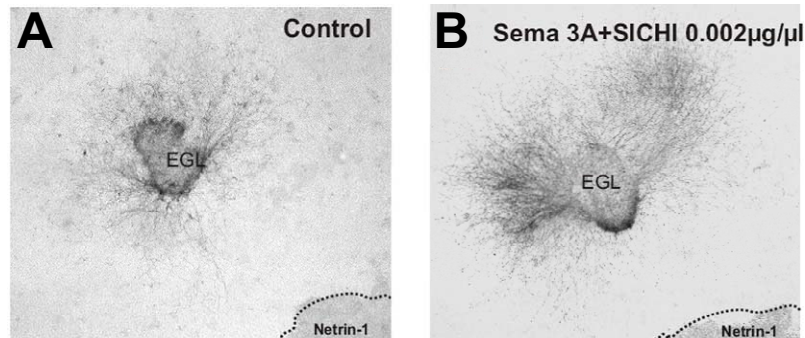


Figura 5.8. Fotografia on es pot comprovar que SICHI no inhibeix la respulsió de Netrina-1 en explants d'EGL confrontats a agregats de cèl·lules secretores de Netrina-1.

5.3.3. ACTIVITAT BIOLÒGICA DE SICHI EN REGENERACIÓ AXONAL

S'ha descrit que la sobreexpressió de Sema 3A en SNC adult està relacionada amb la prevenció de la regeneració axonal.¹⁰⁴ Per aquest motiu, es va estudiar el potencial de SICHI en la regeneració de la via perforant *in vitro* després d'una axotomia. Per fer-ho, es va utilitzar el model de cultius organotípics de la formació hipocàmpica, en el qual s'hi va realitzar una axotomia en la via perforant passats 15 dies *in vitro*. En condicions control, després de l'axotomia mencionada no es va observar una regeneració axonal dels aferents entorrinals (vegeu Figura 5.9 A). En canvi, en un altre grup de cultius organotípics axotomitats, als quals se'ls va administrar SICHI cada vegada que es canviava el medi de cultiu (2-3 dies) a les concentracions de 2, 4 o 20 μ M, es va observar un increment notable del nombre d'axons que emergien de l'escorça entorrinal cap a l'hipocamp (vegeu Figura 5.9 B i C). Aquests axons creixien després de la lesió, ja que es va observar que en moltes ocasions els axons acabaven en cons de creixement.

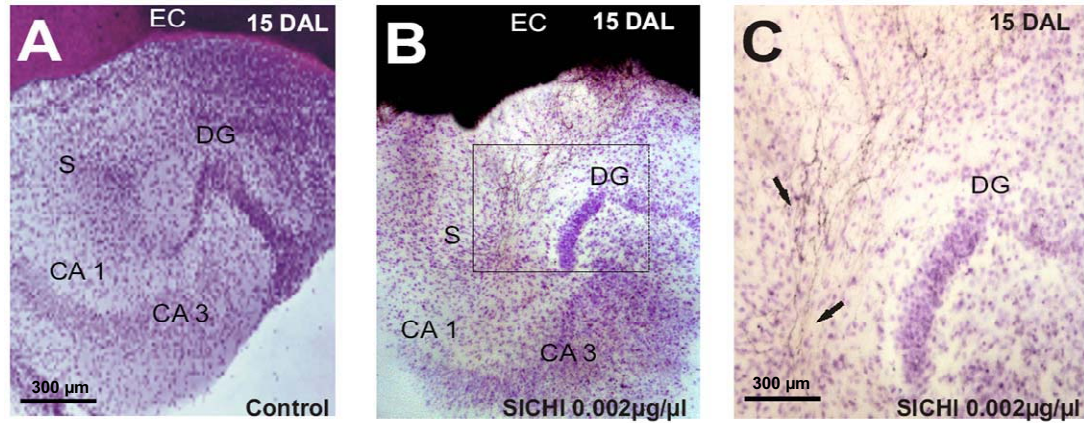


Figura 5.9. El tractament amb SICHI dels cultius organotípics axotomitzats va produir una regeneració de les fibres que emergien del còrtex entorrinal. Passats 15 dies *in vitro* de l'axotomia, cocultius entorrino-hipocampals es van incubar en absència (A) o presència de SICHI (B). En aquest darrer cas, el nombre d'axons emergents va augmentar, tal i com es pot observar en l'ampliació del requadre (C), on s'indiquen els marcats amb biocitina (fletxes).

5.3.4. MODE D'ACTUACIÓ DE SICHI

És conegut el paper del complex receptor Np-1/Plex-A1 com a mitjancer de la quimiorepulsió induïda per la Sema 3A.¹¹¹ Per determinar si SICHI actuava extracel·lularment i quina influència tenia en la unió de Sema 3A a Np-1/Plex-A1, es va procedir a examinar la unió de Sema 3A als seus coreceptors en presència o absència de SICHI. Per fer-ho, es van utilitzar cèl·lules COS1 cotransfectades amb Np-1+vector sense insert, Np1-1+Plex-A1, Plex-A1+vector i vector sense insert. La unió de Sema 3A-AP o SEAP a les cèl·lules transfectades es va analitzar utilitzant l'assaig de fosfatasa alcalina (AP) com a prova d'afinitat al receptor. El complex Np-1/Plex-A1 tenia molta més afinitat per Sema 3A que per Np-1, ja que es va observar molt més marcatge quan les cèl·lules havien estat cotransfectades amb els dos coreceptors que quan s'havia fet únicament amb Np-1. Pel que fa referència al cas de la transfecció amb Plex-A1+vector, no es va detectar unió de Sema 3A amb aquest receptor.

En cèl·lules transfectades amb Np-1/Plex-A1, es va poder observar que en presència de SICHI, la unió de Sema 3A és menor (vegeu Figura 5.10 D i E) que en els tractats únicament en medi condicionat Sema 3A (vegeu Figura 5.10 A i B). En el control amb SEAP, no es va obtenir marcatge que indiqués unió als receptors (vegeu Figura 5.10 G).

També es van analitzar els resultats de les cèl·lules transfectades únicament amb Plex-A1 i es va poder observar que no hi havia cap tipus d'unió entre Sema 3A i aquest receptor, i que no es produïa cap canvi al afegir-hi el SICHI (dades no mostrades).

En el cas de la transfecció únicament amb plàsmid Np-1 sense el seu coreceptor Plex-A1, es va poder observar que Sema 3A tenia menor afinitat que en cèl·lules contranfectades amb

els dos coreceptors. La incubació amb SICH1 i Sema 3A va disminuir la unió de Sema 3A a Np-1 (vegeu Figura 5.10 C i F).

En resum, SICH1 impedeix la unió de Sema 3A amb el seu complex receptor, interaccionant amb el receptor transmembrana Np-1 i, essencialment, amb el complex Np-1/Plex-A1.

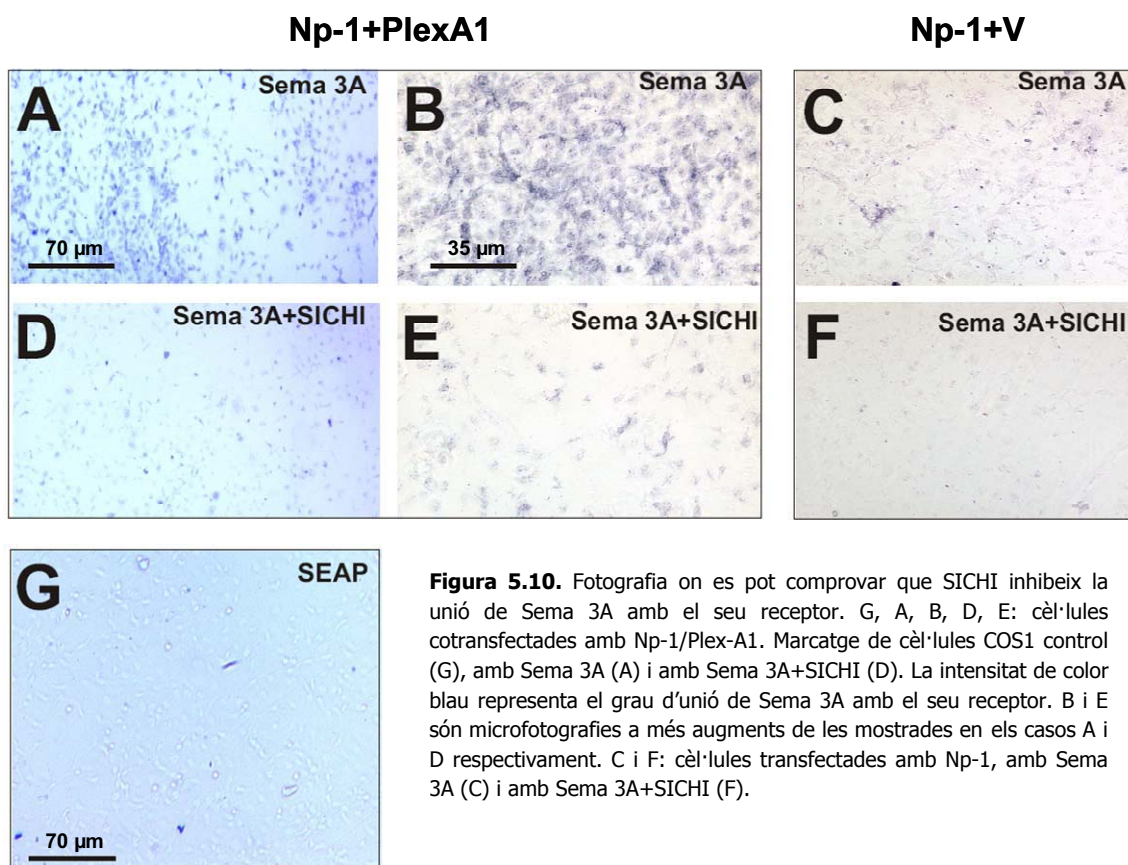


Figura 5.10. Fotografia on es pot comprovar que SICH1 inhibeix la unió de Sema 3A amb el seu receptor. G, A, B, D, E: cèl·lules cotransfectades amb Np-1/Plex-A1. Marcatge de cèl·lules COS1 control (G), amb Sema 3A (A) i amb Sema 3A+SICH1 (D). La intensitat de color blau representa el grau d'unió de Sema 3A amb el seu receptor. B i E són microfotografies a més augments de les mostrades en els casos A i D respectivament. C i F: cèl·lules transfectades amb Np-1, amb Sema 3A (C) i amb Sema 3A+SICH1 (F).

5.3.5. EFECTE DE SICH1 EN LA CASCADA DE SENYALITZACIÓ INTRACEL·LULAR ACTIVADA PER SEMA 3A

Per analitzar l'efecte de SICH1 en la cascada de senyalització intracel·lular activada per Sema 3A, es van realitzar cultius primaris d'hipocamp (E15) i es van determinar els nivells de proteïnes que estaven implicats a través d'un assaig de *Western-blotting*. Una d'aquestes proteïnes és GSK3, la qual disminueix el seu nivell de fosforilació en serines (P-SerGSK3) en presència de Sema 3A. No obstant, no es van observar diferències significatives entre la incubació amb Sema A3 i la incubació amb Sema A3 i SICH1. Una altra de les proteïnes analitzades va ser Akt, la qual inhibeix GSK3 quan es troba fosforilada (P-Akt). En aquest cas,

tampoc es van observar diferències significatives entre els nivells de fosforilació amb els diferents tractaments.

Per determinar si SICH1 estava activant altres vies intracel·lulars, es van analitzar els nivells d'Erk fosforilada (P-Erk), una proteïna quinasa implicada en el procés de mitogènesi o proliferació cel·lular i relacionada amb la supervivència neuronal. Es va poder observar que quan s'addicionava SICH1 a Sema 3A, la quantitat d'Erk fosforilada augmentava. Aquest increment es va poder observar també quan es va aplicar únicament SICH1. Aquest resultat va fer pensar que SICH1 podia tenir un possible paper en processos de supervivència neuronal.

5.3.6. ACTIVITAT DE SICH1 EN REGENERACIÓ NEURONAL

Degut a la connexió existent entre l'activació de GSK3 i la subsegüent activació d'algunes vies apoptòtiques,¹¹² i la demostració que inhibidors de GSK3 prevenen la mort neuronal,¹¹³ es va voler estudiar si aquestes vies podien arribar a estar influenciades per la unió de Sema 3A a Np-1. Per fer-ho, es van realitzar assaigs de supervivència neuronal utilitzant diferents concentracions de SICH1 en diversos cultius neuronals. Així doncs, es van realitzar assaigs amb cultius primaris tan de neurones depenents com no depenents de neurotrofines per a la seva supervivència. Per a l'estudi de supervivència no dependent de neurotrofines, es van utilitzar neurones d'hipocamp a E15 i de cerebel a P6.

En hipocamp, la supervivència neuronal passats 7 dies d'incubació era menor en els assaigs control que en els tractats amb SICH1. En analitzar l'evolució d'aquest cultius amb el temps, es va observar que no hi havia diferències entre els diferents tractaments a les 48 hores, mentre que el nombre de neurones descendia un 38% en la situació control i un 20% en els tractaments amb SICH1 passats 4-7 dies d'incubació.

En cerebel, també es va observar un descens de la supervivència neuronal en els assaigs control al comparar-los amb els cultius tractats amb SICH1. No obstant, aquest descens va ser superior a l'observat en els assaig d'hipocamp. Pel que fa a l'anàlisi dels cultius amb el temps, es va observar que a les 24 h tots ells mostraven el mateix nombre de neurones vives, mentre que a les 48 h, 72 h i 5 dies es produïa un descens majoritari en la situació control i en el tractament amb SICH1 a 2 μ M que en el tractament amb SICH1 a 4 μ M on la supervivència augmentava un 20%.

En ambdós casos (tractament amb SICH1 a 2 μ M i 4 μ M), es va poder observar un augment de la supervivència neuronal d'un 20% en neurones tractades amb SICH1 respecte al control negatiu en el mateix període de temps. Aquestes dades suggereixen que SICH1 pot modificar la supervivència de neurones no depenents de neurotrofina.

Pel que fa referència a les neurones depenents de neurotrofines, es va utilitzar com a model neurones depenents d'NGF i neurones depenents de BDNF. Com a model dependent d'NGF, es van analitzar neurones de ganglis simpàtics i de DRG. En ambdós casos, no es va

observar cap diferència entre els tractaments control i els realitzats amb SICH1. Per tant, SICH1 no era capaç de substituir l'efecte de la neurotrofina i no estaria implicat en la supervivència en sistemes dependents d'NGF.

Com a sistemes dependents de la neurotrofina BDNF, es va avaluar l'efecte de SICH1 en el gangli nodós en E15. Es van realitzar assaigs *in vitro* en els quals es va analitzar el nombre de neurones, tant en cultius privats de BDNF passades 24 h d'incubació com en no privats d'aquesta neurotrofina. El resultat obtingut va mostrar que els cultius no privats de BDNF i els privats de BDNF però que havien estat tractats amb SICH1, presentaven un nombre similar de neurones després de 5 dies *in vitro* (DIV) sense canviar el medi. En canvi, no va aparèixer cap neurona en el cultiu privat de BDNF al qual no se li havia subministrat SICH1. Per tant, SICH1 seria capaç, d'alguna manera, de suplantar l'efecte de BDNF en aquestes neurones. Després de quantificar el nombre de neurones a diferents temps, es va observar que les neurones privades de BDNF morien progressivament, de tal manera que després de 5 DIV desapareixien totes. Quan les neurones es van tractar amb SICH1 a una concentració de 4 μ M, la supervivència es mantenia en un 30% durant tots els dies que va durar l'experiment, mentre que quan es van tractar amb SICH1 a una concentració de 2 μ M, es va observar un 85% de supervivència a les 48 h, un 50% a les 72 h i una estabilització a un 30% en els últims dies de l'experiment. Per altra banda, les neurones tractades amb BDNF van presentar una supervivència del 80% fins als 5 dies d'assaig. Finalment, les tractades amb BDNF i SICH1 a una concentració de 2 μ M o 4 μ M van seguir un patró de supervivència similar al descrit per neurones tractades únicament amb BDNF.

Aquests resultats permeten afirmar que SICH1 és capaç d'augmentar la supervivència de les neurones en el gangli nodós privat de BDNF.

5.4. CONCLUSIONS

El cribratge de quimiotèques combinatòries i, més concretament, de quimiotèques de mesclades controlades, és un bon sistema per identificar composts actius vers una diana biològica d'interès. En aquest cas, ha permès identificar el peptòide N22-6-16C (SICH1) com a potencial inhibidor de la semaforina 3A.

El conjunt d'assaigs realitzats una vegada identificat, purificat i caracteritzat ha permès treure les següents conclusions de la seva activitat biològica:

- 1) SICH1 inhibeix la resposta quimiorepulsiva induïda per Sema 3A d'una manera dependent de la dosi i aquesta inhibició és deguda a una reversió del col·lapse del con de creixement.
- 2) SICH1 no és capaç d'interferir en la quimiorepulsió produïda per Sema 3F ni en la Netrina-1. Per tant, es pot afirmar que els seus efectes biològics estan associats únicament a Sema 3A.

3) SICH1 potencia la regeneració d'axons entorrino-hipocampals axotomitzats en cultius organotípics.

4) SICH1 actua a nivell extracel·lular impedit la unió de Sema 3A amb el seu complex receptor.

5) SICH1 reverteix la baixada dels nivells de P-SerGSK3 en el con de creixement produïda per Sema 3A en hipocamp de ratolí en edats entre E15 i E16.

6) SICH1 augmenta la supervivència d'alguns grups neuronals.

6. SUBPRODUCTE DE PM-14

6.1. INTRODUCCIÓ

Tot i els resultats presentats en el capítol anterior, la identificació del peptòide N22-6-16C (anomenat SICH1) com a inhibidor de la semaforina 3A, va resultar més complexa del previst degut a problemes de reproductibilitat durant la realització dels primers assaigs biològics. Una vegada preparat el peptòide identificat durant el procés de deconvolució del cribratge de la quimioteca de peptòides-I, es van repetir els assaigs amb el cru de reacció per confirmar els resultats obtinguts. La sorpresa va ser que tot i confirmar l'activitat observada anteriorment, aquesta no va mostrar la mateixa intensitat. Per aquest motiu, es va decidir, per una banda, purificar el cru de reacció i, per l'altra, analitzar impureses del cru de reacció que poguessin interferir la realització dels assaigs biològics. Cal recordar que, tal i com s'ha comentat anteriorment (vegeu l'apartat 3.4.2), la puresa d'aquest cru era al voltant del 10% (per HPLC).

Pel que fa referència a la identificació d'impureses, cal destacar que es van identificar els productes ciclats **2** i **3**, els qual es van aïllar i provar sense obtenir resultats positius (vegeu l'apartat 5.2) com a inhibidors de semaforina 3A.

Per altra banda, la purificació del cru de reacció va permetre identificar un subproducte de pes molecular 481 (**X**) que diferia del peptòide N22-6-16C únicament en 14 unitats de massa

($PM_{N22-6-16C}=495$). A més, aquest subproducte tenia un t_r per HPLC molt proper al del peptòide (vegeu Figura 6.1 pics **X** i **1**) així com un espectre d'ultraviolat similar. Tots aquests factors apuntaven en una mateixa direcció: el subproducte identificat havia de tenir una estructura molt semblant a la del peptòide **1**.

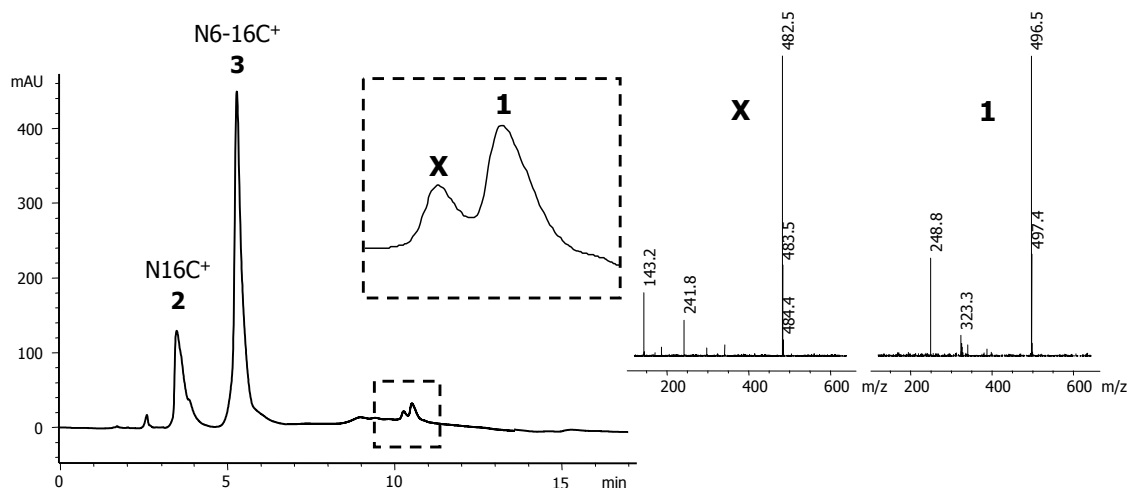


Figura 6.1. Cromatograma d'HPLC a 220 nm del cru de síntesi del peptòide N22-6-16C preparat seguint l'estratègia del submonòmer i espectres de masses dels pics marcats amb un requadre. Els pics majoritaris que surten al front, corresponen als productes de ciclació **2** i **3**, respectivament. El pic **1** correspon al peptòide **1**, mentre que el pic **X** correspon a un subproducte amb 14 unitats de massa menys. L'elució es va realitzar en condicions isocràtiques al 3% d'ACN. Els pics observats per EM corresponent als pics M+1 dels composts **X** i **1**.

Diferents síntesis del peptòide N22-6-16C fetes seguint l'estratègia del submonòmer van confirmar la presència d'aquest subproducte, la proporció del qual variava força segons el cas, arribant fins i tot a ser majoritari respecte al peptòide desitjat (vegeu Figura 6.2). En aquest sentit, cal destacar que en cap dels casos descrits en el capítol 4 on s'havia fet la síntesi d'aquest peptòide mitjançant l'estratègia mixta i utilitzant els corresponents monòmers d'*N*-alquilglicines diferentment protegits, es va observar la formació d'aquest subproducte.

La purificació dels crús de reacció obtinguts seguint l'estratègia del submonòmer va permetre aïllar el subproducte **X**. Ara bé, la determinació estructural d'aquest compost per RMN no va ser possible degut a la complexitat dels espectres obtinguts per l'existència de diferents conformacions. No obstant, sí que es van poder realitzar els corresponents assaigs biològics, el resultat dels quals va ser negatiu, descartant d'aquesta manera la seva influència en l'activitat observada amb el cru de reacció.

Més tard, tal i com s'ha comentat en el capítol anterior, es va confirmar que el peptòide N22-6-16C era realment el responsable de l'activitat i que els problemes sorgits inicialment de reproductibilitat estaven relacionats amb la concentració administrada i no amb el compost assajat. Cal recordar que el peptòide mostrava activitat en l'interval de concentracions comprés

entre 0.2 i 4 μM i que la concentració del peptòide en el cru de reacció (rendiment al voltant del 10% únicament) era molt menor que la present un cop purificat. Aquest fet explicaria la falta de reproductibilitat durant els primers assaigs d'activitat, en passar dels assaigs amb les mescles de la quimioteca i el cru de reacció del peptòide definit als fets amb el peptòide purificat.

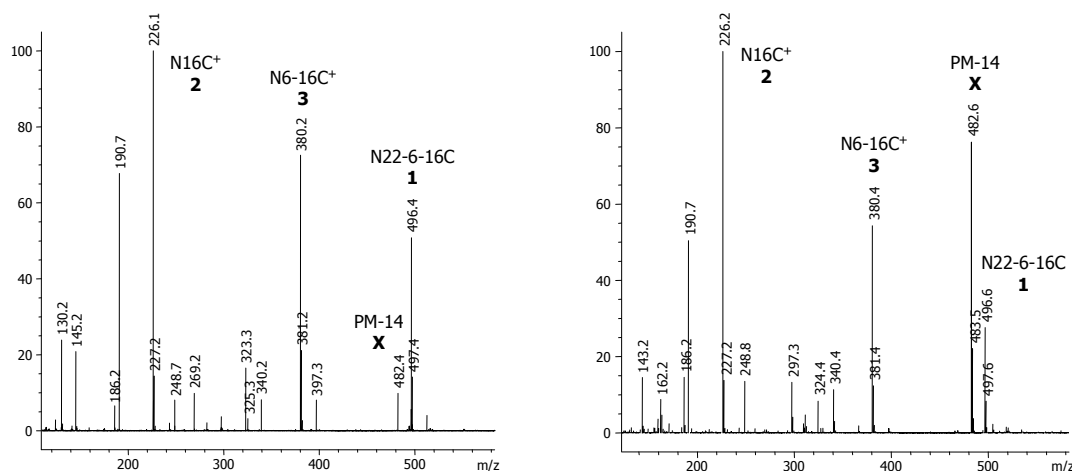


Figura 6.2. Espectres de masses obtinguts en mode FIA del cru de reacció de dues síntesis d'N22-6-16C, on es mostra, a nivell d'exemple, la diferència de relació entre el pic corresponent al peptòide (496, M+1) i el subproducte de PM-14 (482, M+1).

No obstant, abans d'obtenir els resultats d'activitat d'aquest subproducte **X** i la confirmació que el peptòide **1** era el responsable de l'activitat observada, es van plantejar una sèrie d'experiments encaminats a determinar l'estructura d'aquest subproducte i llavors esbrinar com s'havia format.

6.2. DETERMINACIÓ ESTRUCTURAL DEL COMPOST DE PM-14

L'elucidació estructural del subproducte de PM-14 es va realitzar en dues etapes: una primera de caràcter general encaminada a determinar si aquest tipus de compost es produïa en altres casos més enllà del peptòide N22-6-16C i quins factors hi estaven implicats, i una segona més concreta amb l'objectiu d'identificar i caracteritzar el subproducte. En tots dos casos es va utilitzar l'estratègia del submonòmer anteriorment descrita perquè la formació d'aquest subproducte només s'observava en utilitzar aquesta metodologia.

Pel que fa referència a la primera etapa, aquesta es va dur a terme mitjançant la síntesi de diferents sèries de peptòides dissenyades amb l'objectiu d'anar definint els factors determinants de la formació d'aquest tipus de subproducte (amb massa molecular M-14 respecte al peptòide esperat). És a dir, si depenia d'alguna amina primària concreta, de la posició que ocupava en el trímer, etc.

Per a la segona etapa, en canvi, es va plantejar la síntesi del peptòide N22-6-16C utilitzant el marcatge isotòpic de les corresponents amines primàries per confirmar que el subproducte de PM-14 provenia de la síntesi del peptòide i poder determinar la seva estructura mitjançant el seguiment dels diferents fragments marcats.

6.2.1. EXPERIMENTS BASATS EN LA SÍNTESI DE DIFERENTS SÈRIES DE PEPTOIDES

La realització d'aquest estudi es va dur a terme mitjançant l'estratègia del submonòmer, utilitzant en tots els casos la metodologia convencional de síntesi de peptòides explicada en l'apartat 3.4.2.1. En acabar, el cru de reacció corresponent es va analitzar (sense purificar) per CL-EM en mode *FIA* (*Flow Injection Analysis*).

6.2.1.1. Efecte de l'amina situada a l'extrem *N*-terminal

La primera sèrie de peptòides (S1, vegeu Figura 6.3) pretenia avaluar la influència de l'amina situada a l'extrem *N*-terminal, mantenint l'amina **A6** al mig i l'amina **A16** a l'extrem C-terminal. Les amines escollides per a l'extrem *N*-terminal presentaven diferents substituents en el nitrogen terciari de la seva cadena lateral: dos etils en el cas de l'amina **A22**, dos metils en el cas de l'amina **A23** i un anell pirrolidínic en el cas de l'amina **A6**.

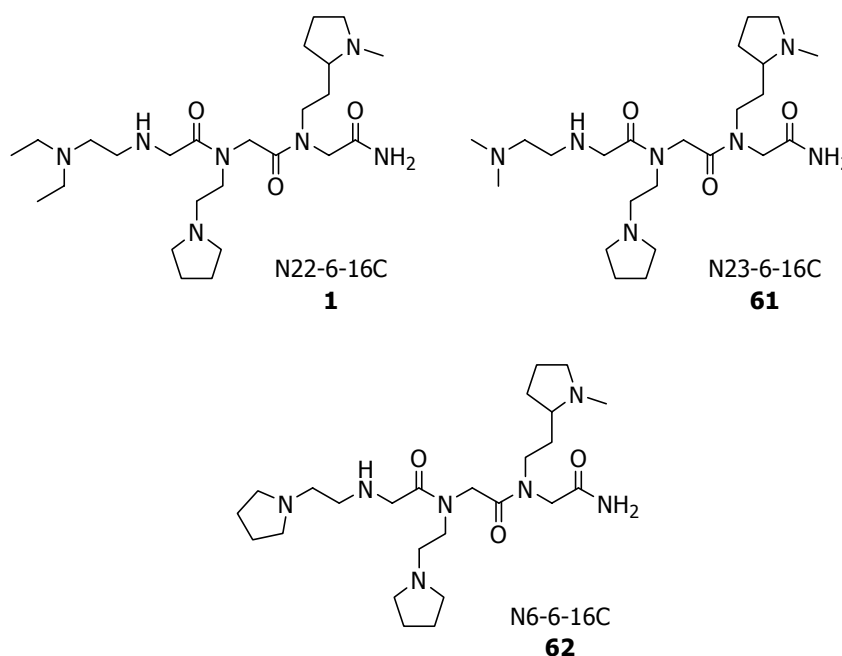


Figura 6.3. Peptòides sintetitzats en la primera sèrie (S1).

L'anàlisi dels crus de reacció va posar de manifest que únicament el peptòide N22-6-16C presentava el pic corresponent a PM-14, el qual, a més, era de la mateixa intensitat que el del peptòide. La resta, en canvi, mostraven només el pic corresponent al peptòide. Així doncs, es va poder concloure que l'extrem *N*-terminal era determinant per formar el subproducte de PM-14, essent necessària la presència de l'amina **A22** en aquesta posició.

6.2.1.2. Efecte produït al canviar l'amina **A22** de posició

La segona sèrie escollida (S2, vegeu Figura 6.4) pretenia avaluar la importància i l'efecte de l'amina **A22** en totes les posicions del trímer format per la pròpia amina **A22**, l'amina **A6** i l'amina **A16**. A més, s'hi va afegir el peptòide N19-6-16C per analitzar si la longitud de la cadena lateral de l'amina podia tenir algun efecte, passant de dos àtoms de carboni en l'amina **A22** a tres àtoms de carboni en l'amina **A19**.

En aquest cas, l'anàlisi de tots els crus de reacció va posar de manifest la presència del pic corresponent a PM-14, si bé la seva intensitat era molt menor que la del pic del corresponent peptòide i que l'obtinguda en el cas del peptòide N22-6-16C de la S1.

Amb aquest segon estudi es va poder concloure que la posició ocupada per l'amina **A22** en el peptòide podia influir en la formació del subproducte de PM-14, essent l'extrem *N*-terminal la posició més favorable per a la seva formació. No obstant, aquest no era un factor determinant ja que en la resta de posicions també es formava. Pel que fa referència a la longitud de la cadena, va resultar més favorable per a la formació del subproducte de PM-14 la cadena de dos àtoms de carboni (**A22**) que la de tres (**A19**).

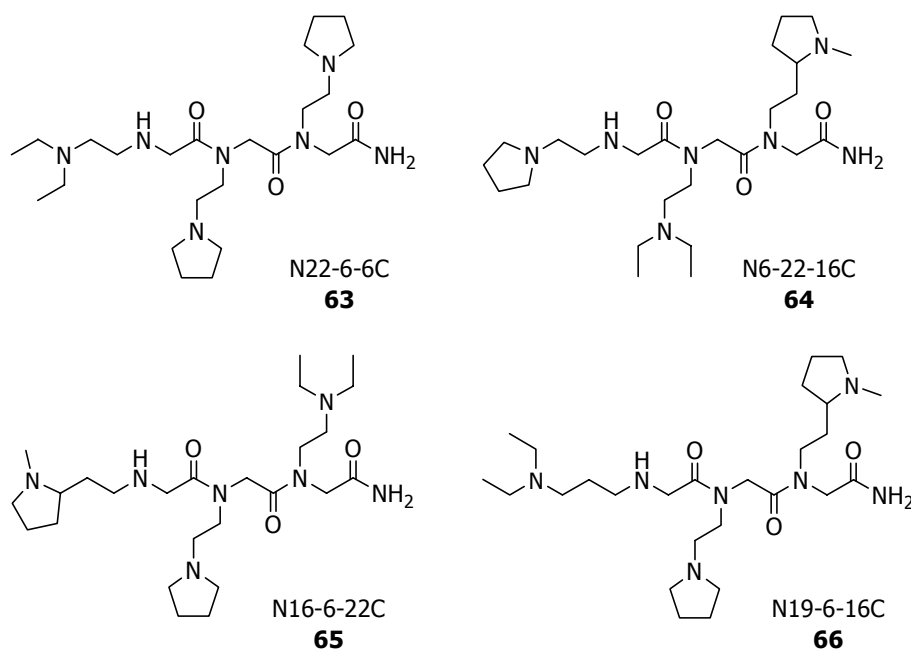


Figura 6.4. Peptòides sintetitzats en la segona sèrie (S2).

6.2.1.3. Influència del canvi de les amines **A6** i/o **A16** per una amina aromàtica sense nitrogen terciari en la cadena lateral

La tercera sèrie (S3, vegeu Figura 6.5) es va dissenyar per avaluar l'efecte produït al canviar les amines **A6** i/o **A16** per una amina aromàtica sense nitrogen terciari en la seva cadena lateral, com l'amina **A10**, tot mantenint l'amina **A22** fixa a l'extrem *N*-terminal.

L'anàlisi dels crús de reacció va posar de manifest que en cap dels casos s'havia format el subproducte de PM-14. Aquest resultat semblava indicar que la presència d'amines amb un nitrogen terciari en la seva cadena lateral era un factor determinant per a la formació de productes tipus PM-14. Ara bé, aquesta condició era necessària, però no suficient, després d'analitzar els resultats obtinguts en la S1, on tots els peptoides sintetitzats tenien aquest tipus d'amina i únicament l'N22-6-16C presentava el pic. Així doncs, la conclusió que es podia treure amb el conjunt d'experiments realitzats fins aquest punt era que hi havia dos factors determinants per a la formació del subproducte de PM-14: la presència de l'amina **A22** o l'amina **A19** (preferentment en l'extrem *N*-terminal) i que la resta de posicions del trímer estiguessin ocupades per amines amb un nitrogen terciari en la cadena lateral.

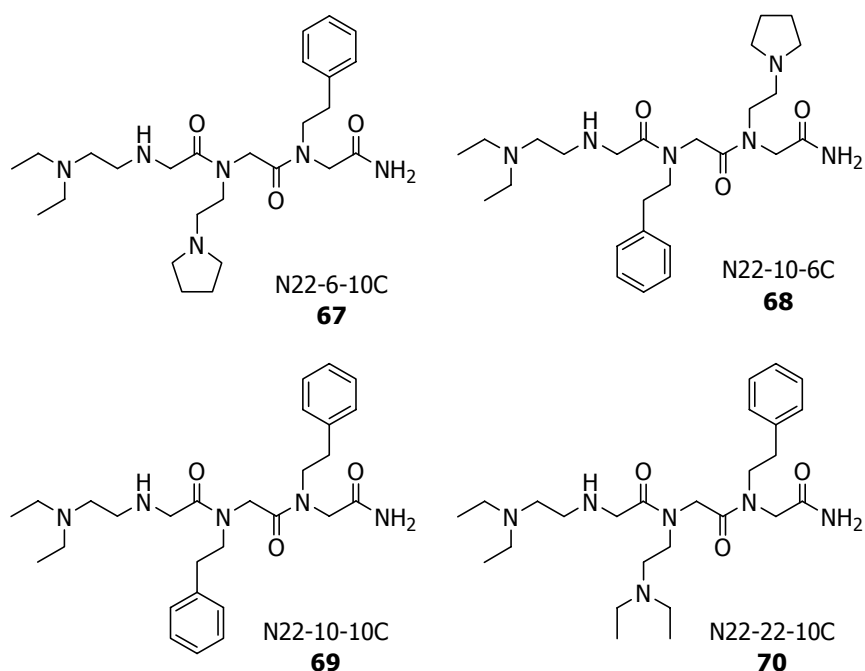


Figura 6.5. Peptoides sintetitzats en la tercera sèrie (S3).

6.2.1.4. Efecte de la longitud de la cadena lateral de l'amina A22

La quarta sèrie de peptoides dissenyada (S4, vegeu Figura 6.6) pretenia avaluar si la longitud de la cadena lateral de l'amina **A22** podia ser un factor determinant per a la formació del subproducte de PM-14 com semblava que els resultats de la S2 havien mostrat, així com la presència de més d'una unitat d'aquesta amina.

Els anàlisis dels crús de reacció no van mostrar en cap cas la formació del subproducte de PM-14. Aquest resultat va impedir l'avaluació del primer dels factors plantejats en aquesta sèrie, però va permetre acabar de determinar les condicions necessàries perquè es formés el subproducte de PM-14.

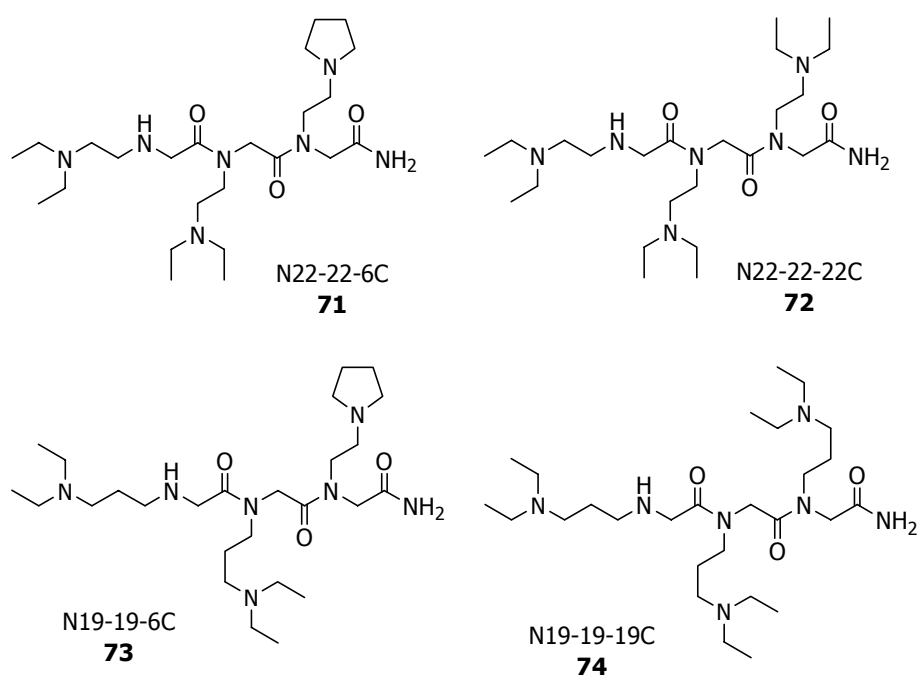


Figura 6.6. Peptoides sintetitzats en la quarta sèrie (S4).

Així doncs, la conclusió final de l'estudi basat en la síntesi de sèries de peptoides, va ser que les condicions necessàries per formar el subproducte de PM-14 eren dues: la presència de l'amina **A22** o l'amina **A19** en alguna posició del trímer (preferentment a l'extrem *N*-terminal) i que les altres dues posicions havien d'estar ocupades per amines amb un nitrogen terciari en la cadena lateral, el qual havia de formar part d'un cicle. Ara bé, aquest estudi no va permetre determinar si la formació del subproducte de PM-14 es produïa per modificació de l'estructura d'alguna de les amines i en cas que fos així, de quina amina es tractava i mitjançant quin mecanisme es produïa. Per aquest motiu, la nova estratègia plantejada es va centrar en l'estudi del peptoide N22-6-16C a través del marcatge isotòpic de les corresponents amines primàries.

6.2.2. EXPERIMENTS BASATS EN EL MARCATGE ISOTÒPIC

6.2.2.1. Marcatge de l'amina **A22**. Síntesi de l'**N22*-6-16C**

El primer marcatge estudiat va ser el de l'amina **A22**, el qual es va realitzar en dos punts diferents com es mostra a la Figura 6.7.

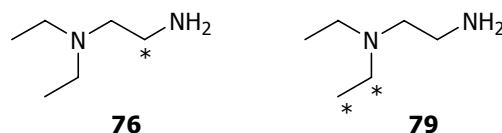


Figura 6.7. Amines anàlogues a l'amina **A22** on els asteriscs indiquen els punts de marcatge amb deuteri.

6.2.2.1.1. Obtenció de l'amina deuterada **76**

La preparació de l'amina **76** es va realitzar en dues etapes (vegeu Figura 6.8). Primerament es va fer reaccionar l'*N,N*-dietilamina amb cloroacetamida en presència de K_2CO_3 a reflux de THF durant 4 h, per obtenir la 2-(*N,N'*-dietilamino)acetamida **75** amb un rendiment del 90%. A continuació, aquesta amida es va sotmetre a un procés de reducció per tractament amb $LiAlD_4$ en THF a reflux durant 7 h, per obtenir l'amina **76** amb un 95% de puresa per RMN, sense necessitat de realitzar cap etapa de purificació addicional.

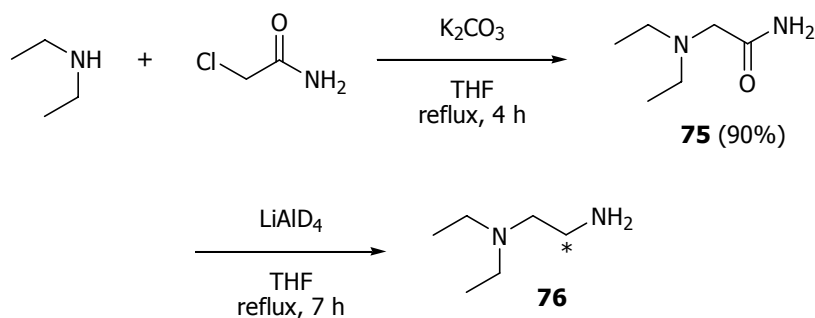


Figura 6.8. Esquema seguit per a la síntesi de l'amina deuterada **76**. El punt de marcatge amb deuteri s'indica amb un asterisc.

Ambdós productes van ser caracteritzats espectroscòpicament. Les dades més significatives van ser el desplaçament del singlet corresponent als protons en α al carbonil de la cloroacetamida cap a camps més alts, passant de 4.04 a 3.02 ppm per a l'acetamida **75** i el desplaçament a camps encara més alts d'aquests mateixos protons en la formació de l'amina **76**, passant a 2.58 ppm. En aquesta darrera reacció, també cal destacar la desaparició del senyal del grup carbonil a l'espectre de ^{13}C -RMN i l'aparició d'un quintuplet a 38.5 ppm degut a l'acoblament carboni-deuteri corresponent al metilè marcat reduït.

6.2.2.1.2. Obtenció de l'amina deuterada **79**

L'obtenció de l'amina **79** es va dur a terme en tres etapes (vegeu Figura 6.9). Seguint la metodologia descrita per Pittelkow *et al.*¹¹⁴ es va procedir a la protecció selectiva de l'amina primària de l'*N*-etil-1,2-etandiamina amb carbonat de *tert*-butilfenil, per obtenir un sòlid corresponent al carbamat **77** amb un 75% de rendiment. Posteriorment, es va realitzar l'alquilació de l'amina secundària per tractament amb iodur d'etil deuterat, en DMF en presència de K_2CO_3 , per obtenir el carbamat **78** amb un rendiment del 90%. Finalment, es va procedir a l'alliberament de l'amina **79** en forma de clorhidrat per hidròlisi amb una mescla d'HCl 4 N/dioxà (2:5), amb un 87% de rendiment sense necessitat de purificar el sòlid obtingut.

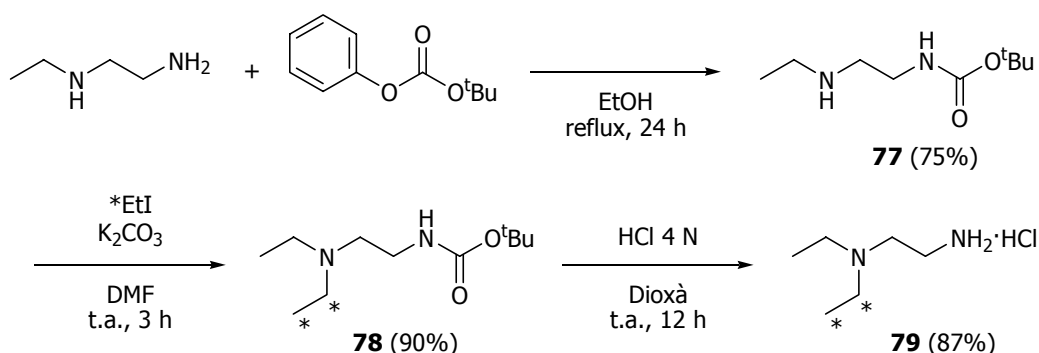


Figura 6.9. Esquema seguit per a la síntesi de l'amina **79**. Els punts de marcatge amb deuteri s'indiquen amb un asterisc.

Pel que fa referència a la caracterització espectroscòpica de l'intermedi **77**, cal destacar l'aparició del singlet corresponent al grup *tert*-butil a l'espectre de ^1H -RMN i el desplaçament dels H veïns de l'amina primària cap a camps més baixos, passant de 2.81 a 3.22 ppm.

Respecte el carbamat marcat amb deuteri **78**, el triplet i quadruplet corresponents als dos grups de H veïns de l'amina secundària es van desplaçar cap a camps més alts, passant de 2.73 a 2.54 ppm i de 2.65 a 2.45 ppm, respectivament. En l'espectre de ^{13}C -RMN, cal destacar l'aparició de dos nous senyals corresponents als carbonis marcats amb deuteri a 45.5 i

10.0 ppm, els quals sortien a desplaçaments químics molt propers als corresponents a l'etil no marcat i presentaven la multiplicitat causada per l'acoblament carboni-deuteri.

Finalment, els espectres de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN del clorhidrat de l'amina **79** van mostrar la desaparició dels senyals corresponents al grup *tert*-butil.

6.2.2.1.3. Síntesi del peptòide $\text{N22}^+-6-16\text{C}$ i $\text{N22}^+-6-16\text{C}$

Una vegada sintetitzades les amines **76** i **79** es va dur a terme la síntesi dels peptòides marcats $\text{N22}^+-6-16\text{C}$ i $\text{N22}^+-6-16\text{C}$. Aquesta síntesi es va realitzar novament seguint la metodologia convencional de síntesi de peptòides descrita en l'apartat 3.4.2.1. En tots dos casos es va partir de 150 mg (0.7 mmol/g, 0.10 mmol) de resina de poliestirè AM RAM i l'etapa d'introducció de les amines **76** per al cas de l' $\text{N22}^+-6-16\text{C}$ i **79** per al cas de l' $\text{N22}^+-6-16\text{C}$ es va fer utilitzant-ne 10 eq. En el cas de l'amina **76**, aquesta es va utilitzar directament mentre que en el de l'amina **79** es va realitzar un tractament previ amb trietilamina per alliberar-la del clorhidrat. En acabar la síntesi dels dos peptòides els crús de reacció (sense purificar) es van analitzar per CL-EM en mode *FIA*.

Els espectres de masses obtinguts es mostren a la Figura 6.10. En tots dos casos es van identificar els pics 226 i 380 corresponents als productes ciclats **2** i **3**, respectivament (vegeu l'apartat 3.4.2.1). També es van observar els pics 498 i 484 en el cas del peptòide sintetitzat amb l'amina **76** (**A**) i 501 i 487 en el cas del peptòide sintetitzat amb l'amina **79** (**B**) corresponents al pes molecular del peptòide marcat i al subproducte de PM-14.

Així doncs, aquests resultats van permetre confirmar, en primer lloc, la formació del suproducte de PM-14 i, en segon lloc, que aquests subproductes responien al marcatge introduït en cadascun dels casos. En aquest sentit, quedava demostrat de forma inequívoca que la formació d'aquests subproductes provenia del peptòide sintetitzat i que el fragment corresponent a l'amina **A22** quedava inalterat durant la seva formació al romandre inalterat el seu patró de marcatge amb deuteri respecte al peptòide sintetitzat. Ara bé, la incògnita sobre la seva estructura i el mecanisme de formació seguia sense resoldre's. Per aquest motiu es va plantejar un nou estudi de marcatge amb deuteri sobre una de les altres dues amines implicades en la síntesi del peptòide $\text{N22}-6-16\text{C}$, com era l'amina **A16**.

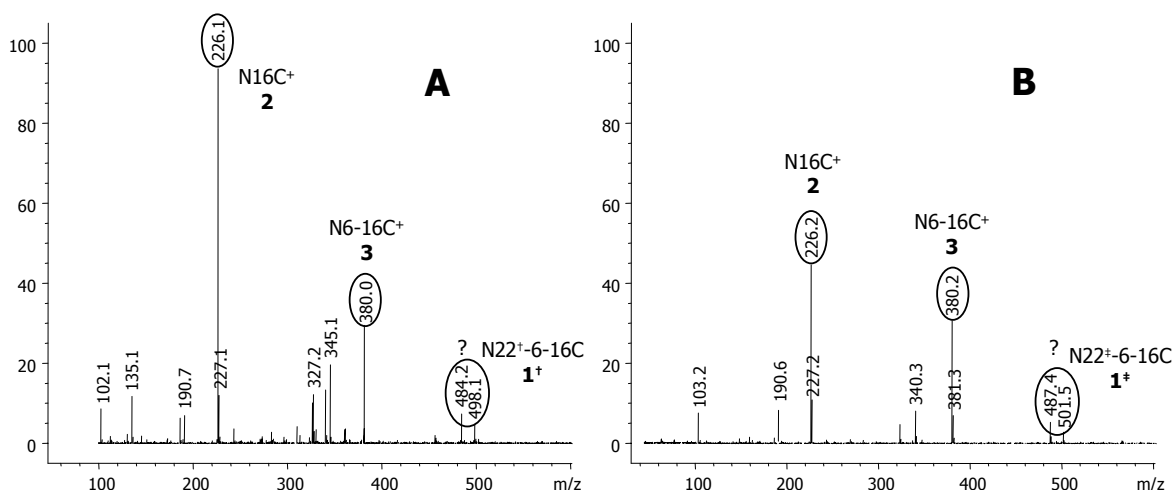


Figura 6.10. Espectres de masses obtinguts en mode *FIA* dels crús de síntesi dels peptoides N22⁺-6-16C (A) i N22⁺-6-16C (B) preparats utilitzant les amines **76** i **79**, respectivament.

6.2.2.2. Marcatge de l'amina A16. Síntesi de l'N22-6-16*C

El marcatge de l'amina **A16** es va realitzar sobre el metil de l'anell pirrolidínic, tal com es mostra en la Figura 6.11. L'elecció d'aquest punt es va fer plantejant com a hipòtesi la possibilitat que fos precisament aquest metil el que es perdés al llarg del procés de síntesi del peptoid N22-6-16C, donant lloc a la formació del subproducte de PM-14.

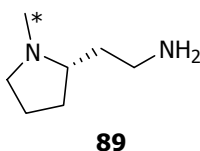


Figura 6.11. Amina anàloga a l'amina **A16** on l'asterisc indica el punt de marcatge amb deuteri.

6.2.2.2.1. Preparació de l'amina deuterada **89**

L'obtenció de l'amina **89** es va dur a terme seguint l'esquema mostrat a la Figura 6.12, emprant com a producte de partida la L-prolina. La primera etapa va consistir en una reducció del grup àcid amb LiAlH₄ a reflux de THF, per obtenir el prolinol **80**, en forma d'oli incolor amb un 85% de rendiment. A continuació, es va protegir el grup amino per tractament amb Boc₂O en tBuOH en presència d'NaOH 1 N, per obtenir el sòlid corresponent a l'*N*-(Boc)-prolinol **81** amb un 94% de rendiment. A continuació, seguint el procediment descrit per Cardillo *et al.*,¹¹⁵ es va activar el grup hidroxil per tractament de **81** amb TsCl en DCM en presència de

triethylamina i DMAP, per obtenir el tosilat **82** amb un rendiment del 83%, després de la purificació per cromatografia en columna. La substitució nucleòfila del tosilat amb NaCN en DMF per donar el nitril **83** amb un 75% de rendiment i la posterior hidròlisi d'aquest nitril per tractament amb una mescla HCl/AcOH a reflux va permetre l'obtenció de l'homoprolina **84** amb un 93% de rendiment.¹¹⁵ Seguidament, es va dur a terme la reacció de reducció amb LiAlH₄ i la posterior protecció del grup amino amb Boc repetint el procediment descrit inicialment per a la prolina de partida, per obtenir l'homoprolinol **85** amb un 77% de rendiment i el Boc-homoprolinol **86** amb un 81% de rendiment. A continuació, es va introduir el marcatge amb deuteri a través de la reducció del grup Boc per tractament amb LiAlD₄ en THF a reflux, per obtenir l'*N*-metil-homoprolinol **87**, marcat isotòpicament, amb un 72% de rendiment. L'obtenció de l'amina final **89** es va dur a terme mitjançant una reacció de Mitsunobu en què es va fer reaccionar **87** en presència d'una mescla equimolar d'azodicarboxilat de dietil (DEAD) i trifenilfosfina, obtenint una sal d'alcoxifosfoni.¹¹⁶ Aquest compost és un bon grup donador d'alquil, facilitant així la transferència del grup alquil a la ftalimida per donar l'ftalimida **88** amb un 62% de rendiment. Finalment, es va procedir a l'obtenció de l'amina **89** en forma de clorhidrat per hidrazinòlisi amb hidrat d'hidrazina a reflux d'etanol i en medi àcid, amb un 70% de rendiment.

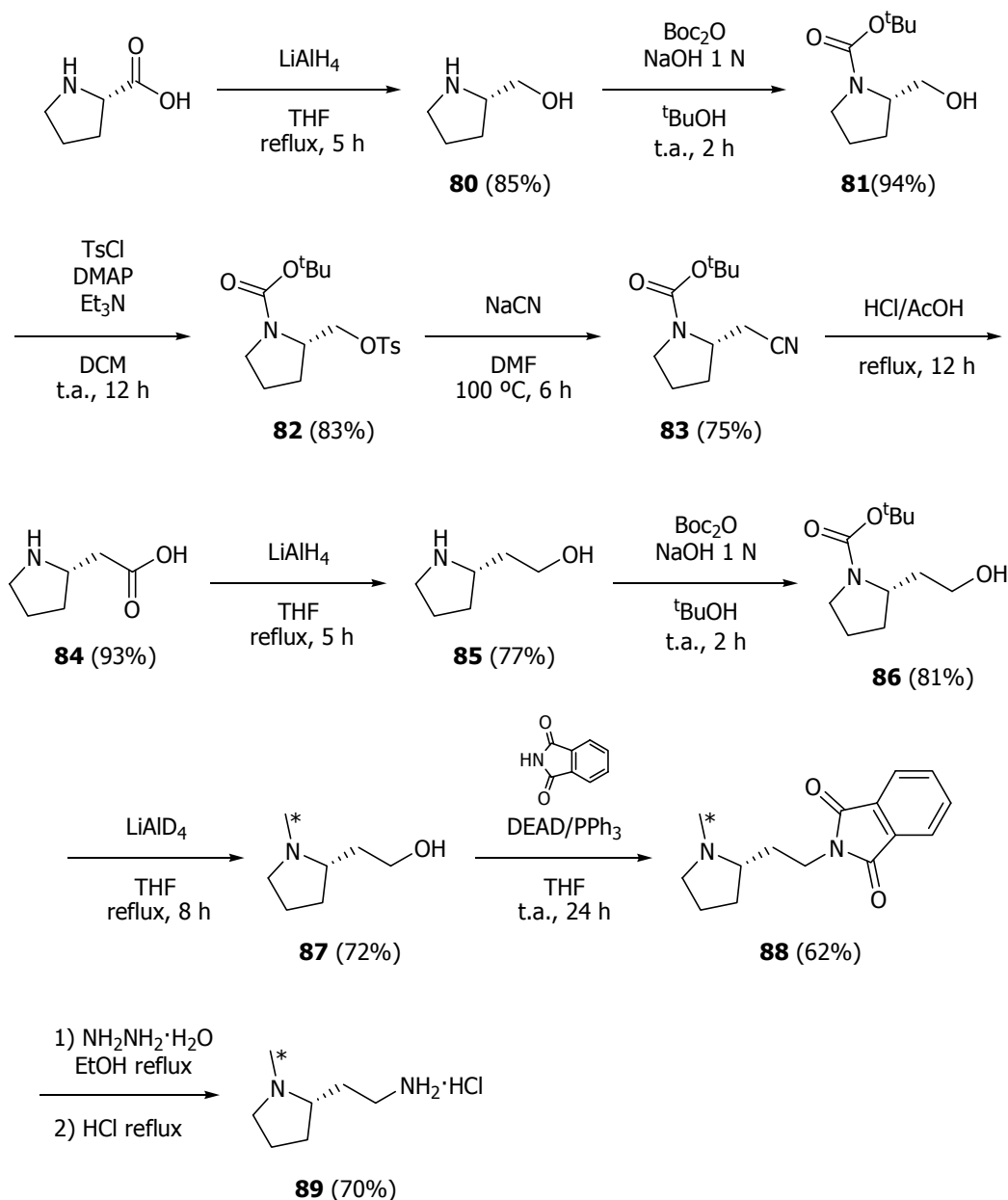


Figura 6.12. Esquema seguit per a la síntesi de l'amina **89**. El punt de marcatge amb deuteri s'indica amb un asterisc.

Tots els composts van ser caracteritzats espectroscòpicament. Les dades més significatives en els espectres de ^1H -RMN van ser l'aparició de dos senyals diferenciats dels H diastereotòpics veïns al grup hidroxil en el prolinol **80**, mostrant dos dobles dobles a 3.35 i 3.55 ppm respectivament; la desaparició del senyal de l'H del grup amino pirrolidínic i l'aparició del corresponent al grup *tert*-butil en el Boc-prolinol **81**; l'aparició de dos dobles a 7.76 i 7.33 ppm i un singlet a 2.44 ppm corresponents al grup tosil, així com el desplaçament dels H veïns a l'àtom d'oxigen a camps més baixos, passant de 3.60 a 3.89 ppm a l'intermedi **82**; la desaparició de tots els senyals corresponents al grup tosil i el desplaçament dels H veïns al grup nitril a camps més alts, passant de 3.89 a 2.60-2.82 ppm i l'aparició del senyal a 118.0 ppm

corresponent al carboni introduït amb el grup nitril a l'espectre de ^{13}C -RMN en el compost **83**; la desaparició dels senyals corresponents al grup *tert*-butil tant a l'espectre de ^1H -RMN com a l'espectre de ^{13}C -RMN i l'aparició en aquest darrer del senyal corresponent al carbonil del grup àcid a 174.2 ppm en l'homoprolina **84**; l'aparició d'un senyal complex a 3.81 ppm corresponent als H veïns del grup hidroxil a l'espectre de ^1H -RMN i el desplaçament del senyal del carboni veí al grup hidroxil a l'espectre de ^{13}C -RMN, passant de 174.2 a 62.3 ppm fruit de la reducció del grup carbonil de l'àcid a metilè en l'homo-prolinol **85**; l'aparició del senyal corresponent al grup *tert*-butil en el Boc-homoprolinol **86**; la desaparició del senyal del grup *tert*-butil a l'espectre de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN i l'aparició en aquest últim del multiplet a 39.8 ppm corresponent al metil marcat amb deuteri fruit de la reducció del grup *tert*-butil en el *N*-metil-homoprolinol **87**; l'aparició dels senyals aromàtics de la ftalimida a l'espectre de ^1H -RMN i el desplaçament dels H veïns al nitrogen de la ftalimida a camps més baixos, passant de 3.05 a 3.26 ppm en la ftalimida **88**; finalment, el desplaçament d'aquests mateixos protons, gairebé 1 ppm a camps més alts, en alliberar-se la ftalimida i obtenir l'amina **89** en forma clorhidrat.

6.2.2.2.2. Síntesi del peptòide N22-6-16**C*

Un cop preparada l'amina **89** es va procedir a la síntesi del peptòide N22-6-16**C* seguint novament l'estratègia del submonòmer explicada anteriorment en l'apartat 3.4.2.1. La síntesi es va dur a terme amb 150 mg (0.7 mmol/g, 0.10 mmol) de resina de poliestirè AM RAM, utilitzant una mescla d'amina **89** prèviament tractada amb trietilamina per tal d'alliberar el clorhidrat format durant el seu procés de síntesi i d'amina **A16** comercial amb una relació (1:2). La utilització d'aquesta mescla es va plantejar per motius de disponibilitat d'amina **89**. En acabar la síntesi del peptòide es va analitzar el cru de reacció (sense purificar) per CL-EM en mode *FIA*.

L'espectre de masses obtingut es mostra a la Figura 6.13, on es van poder identificar els pics 226, 380 i 496 corresponents als subproductes ciclats **2** i **3** i al peptòide **1**, respectivament. A més també es van poder identificar els pics 229, 383 i 499 corresponents als subproductes ciclats **2*** i **3*** i al peptòide **1*** marcats, els quals mantenien la relació 1:2 establerta al preparar la mescla d'amines **89/A16** utilitzada en la primera etapa d'aminació de la síntesi del peptòide. En canvi, no es va poder detectar el subproducte de PM-14. Així doncs, els resultats obtinguts en aquest cas no van permetre treure cap conclusió respecte a la hipòtesi plantejada.

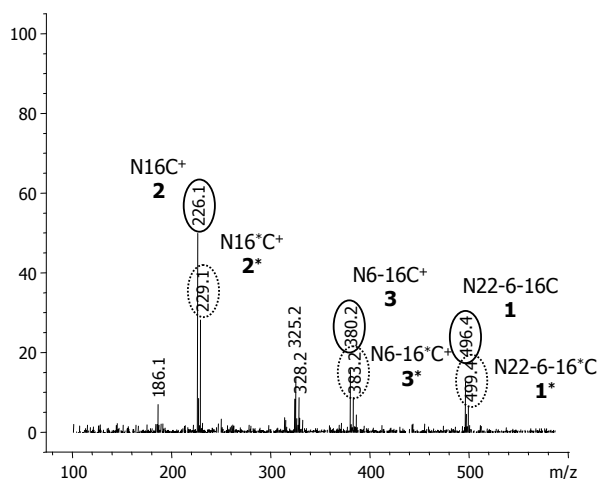


Figura 6.13. Espectre de masses obtingut en mode *FIA* del cru de síntesi dels peptoides N22-6-16⁺C i N22-6-16C preparat utilitzant la mescla d'amines **89/A16**.

6.3. CONCLUSIONS

Abans de presentar les conclusions d'aquest capítol cal destacar que no s'ha aconseguit l'objectiu principal que s'havia plantejat a l'hora d'iniciar aquest estudi, ja que malgrat els esforços realitzats, no s'ha pogut determinar l'estructura del subproducte de PM-14. Ara bé, no s'ha de perdre de vista un fet important com és que tot aquest estudi es va iniciar pensant que aquest subproducte podia ser el responsable de l'activitat inhibidora de la semaforina 3A (vegeu capítol anterior) i que finalment es va demostrar que no ho era, motiu pel qual es va decidir aturar aquest estudi en aquest punt. La seva continuació hauria implicat esmerçar temps i recursos per un compost que havia perdut interès en no presentar activitat inhibidora de semaforines.

No obstant, sí que s'ha pogut treure una sèrie de conclusions respecte a la formació del subproducte de PM-14, que són les següents:

- 1) La seva formació està condicionada a la metodologia utilitzada per a la síntesi dels peptoides, essent necessària la síntesi seguint l'estratègia del submonòmer.
- 2) És necessària la presència de l'amina **A22** o l'amina **A19** en el trímer, preferentment a l'extrem *N*-terminal i que la resta de posicions estiguin ocupades per amines amb un nitrogen terciari en la cadena lateral, el qual a més ha d'estar formant part d'un cicle.
- 3) En el cas del peptoid N22-6-16C, el subproducte de PM-14 manté intacta l'estructura de l'amina **A22** i presenta un t_r per HPLC i un espectre d'ultraviolat molt similar al del peptoid.

4) No s'ha pogut comprovar la hipòtesi que fos la pèrdua del metil del fragment d'amina **A16** el que estés implicat en la formació del subproducte de PM-14.

7. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

7.1. CONSIDERACIONS GENERALS

Tots els reactius comercials es van emprar sense purificació prèvia. Els dissolvents utilitzats van ser de qualitat per a síntesi, excepte en la manipulació de productes finals, on es van emprar dissolvents de qualitat per a anàlisi. Els dissolvents anhidres es van preparar seguint els procediments descrits a la bibliografia.¹¹⁷

L'evolució de les reaccions en dissolució es va seguir per cromatografia de gasos, cromatografia en capa prima (CCP) o cromatografia de líquids (HPLC). Les anàlisis per CCP es van realitzar sobre cromatofolis de sílica de 0.2 mm de gruix sobre suport d'alumini Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ i sobre cromatofolis d'alúmina de 0.2 mm de gruix sobre suport d'alumini Merck Aluminiumoxid 60 F₂₅₄. El revelat de les plaques es va fer amb llum ultraviolada de $\lambda = 254$ nm.

Les anàlisis per CG es van realitzar en un aparell Hewlett Packard 5890 Series II amb detector d'ionització de flama (FID), amb un integrador HP3396 Series II i columnes capil·lars SPB-5 (diàmetre intern 0.25 mm, diàmetre de partícula 0.25 μ m) de 12 a 15 m de longitud, emprant heli com a gas portador.

Les anàlisis per HPLC es van realitzar emprant un aparell Hewlett Packard 1100 Series equipat amb una columna de fase inversa Kromasil 100 C₁₈ de 5 µm (4.6 x 250 mm) de Scharlau o bé una de tipus Kromasil 100 C₈ de 5 µm (4.6 x 150 mm) de Teknokroma. Com a eluents es van utilitzar H₂O amb 0.1% de TFA, i ACN amb 0.07% de TFA. El programa d'elució seguit va variar segons el cas i s'especificarà a cadascun dels apartats, tot mantenint un flux constant d'1 ml/min i detecció a 220 i 254 nm.

Les purificacions d'alguns composts es van realitzar sobre cromatofolis de sílica de 2 mm gruix sobre suport d'alumini Merck Kieselgel 60 F₂₅₄. Per altres composts (peptoides majoritàriament) es va realitzar una purificació per HPLC a escala semipreparativa mitjançant tres aparells diferents. El primer va ser un sistema de dues bombes Waters 510, un detector-controlador de gradients d'Applied Biosystems (783 Programable Absorbance Detector) i fent servir una columna de tipus Kromasil 100 C₈ de 5 µm (20 x 250 mm) de Scharlau treballant a un flux de 5 ml/min. El segon, va ser un aparell Waters (Milford, MA, U.S.A.) equipat amb una columna de fase inversa X-Terra[®] C₁₈ de 5 µm (19 x 250 mm) de Waters treballant a un flux de 10 ml/min. El tercer, va ser l'aparell Hewlett Packard 1100 Series esmentat anteriorment equipat amb una columna de fase inversa X-Terra[®] C₁₈ de 5 µm (10 x 150 mm) de Waters treballant a un flux de 4.7 ml/min. Tots tres sistemes van utilitzar com a eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.1% de TFA. El gradient va variar segons el cas i s'especificarà en cadascun d'ells. La detecció es va fer a 220 nm.

Els espectres de ressonància magnètica nuclear de protó (¹H-RMN) i de carboni (¹³C-RMN) es van realitzar en un aparell Varian Unity 500 (¹H-500 MHz, ¹³C-125 MHz), un Varian Unity 400 (¹H-400 MHz, ¹³C-100 MHz) o en un Varian Unity 300 (¹H-300 MHz, ¹³C-75 MHz). El desplaçament químic dels senyals s'expressa en l'escala δ en parts per milió. Per a cada senyal de protó figura, entre parèntesis, la multiplicitat, la integració i el valor de les constants d'acoblament (J) en Hz, així com la seva assignació. Per indicar les multiplicitats observades s'han emprat les abreviacions següents: s (singlet), d (doblet), dd (doble doblet), ddd (doble doblet de doblets), t (triplet), td (triple doblet), q (quadruplet), m (multiplet), ac (absorció complexa) i una "a" darrera de les anteriors abreviacions per indicar que el senyal és ample.

Els espectres de masses (EM) d'alguns composts es van obtenir en un espectrofotòmetre Fisons MD800 acoblat a un cromatògraf de gasos model 8000 Series i proveït d'una columna capil·lar Hewlett Packard HP-5 de 25 m i un detector d'ions positius de tipus quadrupolar. Els espectres es van enregistrar emprant ionització per impacte electrònic (IE) a 70 eV, i els fragments obtinguts s'indiquen amb la seva relació massa/càrrega (m/z) i entre parèntesis la seva proporció relativa (%).

Els espectres de masses enregistrats amb la tècnica de *electrospray-ionization* (ESI) es van fer en un sistema Hewlett Packard Series 1100 LC/MSD constituït per un cromatògraf de líquids acoblat a un detector de diodes i un espectròmetre de masses.

Els espectres de IR es van enregistrar en una aparell Bomen Michelson Series MB120 i les absorcions s'indiquen en cm^{-1} .

Els punts de fusió es van determinar en un aparell Reichert-Jung model 286238 amb una sonda Crison T-637 per mesurar la temperatura i s'han indicat sense corregir.

Les anàlisis elementals van ser realitzades al Servei de Microanàlisi Elemental de l'IIQAB, emprant un analitzador Carlo Erba 1108.

Les mesures de masses a alta resolució (EMAR) es van realitzar a la Unidad de Espectrometría de Masas de la Universidad de Santiago de Compostela.

7.1.1. INSTRUMENTACIÓ DE LA SÍNTESI EN FASE SÒLIDA

La resina emprada per a la síntesi de composts en fase sòlida va ser un polímer de poliestirè reticulat amb un 1% de divinilbenzè i funcionalitzat amb Fmoc-aminoetil-RAM (Rink amida) com a braç d'unió entre el polímer i el compost sintetitzat. La resina va ser subministrada per Rapp Polymere, amb una dimensió de partícula de 200-400 mesh i un grau de funcionalització entre 0.70 i 0.79 meq/g de resina protegida, depenent del lot.

Per fer la síntesi en fase sòlida es van utilitzar xeringues de polipropilè de 3, 5 o 10 ml, de la marca Injekt, equipades amb una placa porosa de polietilè que actuava com a filtre.

Per afegir el dissolvent (DMF, DCM i iPrOH) en les etapes de rentat de la resina es van fer servir flascons rentadors de 500 ml subministrats per la casa Afora.

L'agitació de les xeringues es va fer en un agitador de vaivé, model HS501 Digital de IKA Labortechnik, a una velocitat d'agitació entre 180 i 250 rpm, en funció de les condicions de treball (vegeu Figura 7.1, esquerra).

El rentat de la resina en les xeringues es va realitzar en un aparell distribuïdor de buit Visiprep SPE, amb vàlvules de control de flux de 24 posicions, de la marca Supelco (vegeu Figura 7.1, dreta).



Figura 7.1 Esquerra: agitador de vaivé emprat en la síntesi en fase sòlida. Dreta: aparell per filtrar i rentar la resina, de la casa Supelco.

Es va utilitzar una liofilitzadora del model FreeZone®6 Liter Freeze Dry system de LabConco i un evaporador centrífuga del model Univap d'Uniscience.

7.1.2. CONTROLS QUALITATIUS EN FASE SÒLIDA

Per visualitzar bé el color adquirit pels grans de resina es va fer servir una lupa (model SDZ-TR-P de Kyowa Optical).

7.1.2.1. Test del cloranil¹¹⁸

En un portaobjectes es van disposar 1-3 mg de resina i s'hi van afegir una gota d'una dissolució d'acetaldehid al 2% en DMF i una gota d'una dissolució de cloranil al 2% en DMF. Després de 3 min a t.a., el color blau/verd de la resina indica la presència d'amines secundàries. En presència d'amines primàries la resina adquireix una tonalitat blau cel. En els altres casos la resina queda incolora.

7.1.2.2. Test del TNBS¹¹⁹

En un portaobjectes es van disposar 1-3 mg de resina i s'hi van afegir una gota d'una dissolució d'*N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) al 10% i una gota d'una dissolució d'àcid 2,4,6-trinitrobenzensulfònic (TNBS) a l'1% en DMF. Després d'1 min a t.a., una coloració vermella indica la presència d'amines primàries; en qualsevol altre cas la resina queda incolora.

7.2. PROCEDIMENT GENERAL DE LA SÍNTESI DE PEPTOIDES A TEMPERATURA AMBIENT PER LA VIA DEL SUBMONÒMER

7.2.1. EN ABSÈNCIA D'AMINES AMB UN NITROGEN TERCIARI ADDICIONAL EN R³ I R²

En una xeringa de 10 ml que contenia 650 mg (0.70 mmol/g, 0.5 mmol) de resina de poliestirè AM RAM s'hi van afegir 5 ml de DMF per inflar-la. Seguidament el dissolvent es va filtrar i es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc.

Desprotecció: es va afegir una dissolució de 5 ml de piperidina al 20% (v/v) en DMF a la resina i la mescla es va deixar reaccionant durant 30 min. Després d'eliminar el dissolvent per filtració es va repetir l'operació. A continuació, es van realitzar els rentats de la resina amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml). La desprotecció de la resina es va comprovar mitjançant de test del TNBS, el qual va donar positiu (color vermell).

Acilació: sobre la resina desprotegida i inflada amb DCM, es va afegir una dissolució de 320 mg (2.3 mmol, 5 eq.) d'àcid bromoacètic en 5 ml d'una mescla DCM/DMF (2:1). Seguidament, es van afegir 355 μ l (2.3 mmol, 5 eq.) de DIC i la mescla es va agitar mecànicament durant 30 min, a t.a. i a 200 rpm. Després d'eliminar l'excés de reactius, es va repetir el procés. Finalment, la resina es va rentar amb DCM (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DMF (3 x 5 ml). La desaparició de l'amina primària es va comprovar amb el test del TNBS, el qual va donar positiu per aquesta reacció (incolor).

Acoblament d'amina: a una suspensió de la resina acilada en 5 ml de DMF es van afegir 2.3 mmol (5 eq.) d'amina primària i 310 μ l (2.3 mmol, 5 eq.) de Et₃N. La mescla de reacció es va agitar durant 3 h a t.a. i a 200 rpm. Transcorregut aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir l'operació. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml). La presència d'una amina secundària es va confirmar mitjançant el test del cloranil (color blau).

La *segona acilació* es va dur a terme de la mateixa manera que la primera, exceptuant que el temps de reacció va ser d'1 h.

La *segona aminació*, *tercera acilació* i *tercera aminació* es van dur a terme de forma anàloga a les descrites anteriorment.

Escissió de la resina: després d'assecar la resina, es va transferir a un tub de vidre de 10 ml roscat amb un sèptum de tefló resistent a l'àcid. Seguidament, s'hi van afegir 5 ml d'un còctel d'escissió format per TFA/DCM/H₂O (60:40:2, v/v), tornant-se la resina de color granatós. La mescla es va deixar agitant durant 30 min a t.a. A continuació es va filtrar la mescla en la mateixa xeringa en què s'havia fet la síntesi i el filtrat es va recollir en un matràs de 25 ml. La resina es va tornar a posar al tub i es va repetir l'operació. Els filtrats de les dues fraccions es van aplegar i els dissolvents es van eliminar a pressió reduïda. Les traces d'aigua i d'àcid es van eliminar realitzant rentats amb ACN (3 x 5 ml), els quals es van eliminar igualment a pressió reduïda. Finalment, l'oli groguenc residual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir uns 250-350 mg de residu (rdts. entre el 80-90%), amb pureses generalment superiors al 90% per HPLC. Els peptoides es van identificar per CL-EM.

7.2.2. EN PRESENCIA D'AMINES AMB UN NITROGEN TERCIARI ADDICIONAL EN R³ I R²

El procediment va ser anàleg al descrit en l'apartat 7.2.1, excepte en l'etapa d'acilació i d'acoblament d'amina posterior a l'acoblament de l'amina amb un nitrogen terciari addicional.

Acilació: acabada l'etapa d'acoblament d'amina amb un nitrogen terciari, es va refredar la xeringa amb neu carbònica i s'hi van afegir 5 ml de DCM fred i clorur de cloroacetil (180 μ l, 2.3 mmol). Es va mantenir en agitació sobre la neu carbònica durant 5 min. Després d'eliminar l'excés de reactius, la resina es va rentar amb DCM (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DMF (3 x

5 ml). La desaparició de l'amina secundària es va comprovar amb el test del cloranil, el qual va donar positiu per aquesta reacció (incolor).

Acoblament d'amina: a una suspensió de la resina acilada en 5 ml de DMF es van afegir 9 mmol (20 eq.) d'amina primària i 310 μ l (2.3 mmol, 5 eq.) de Et₃N. La mescla es va agitar durant 3 h a t.a. i a 200 rpm. Transcorregut aquest temps l'excés de reactius es va eliminar i es va repetir l'operació. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml). La presència d'una amina secundària es va confirmar mitjançant el test del cloranil (color blau).

7.2.3. SÍNTESI DEL PEPTOIDE N22-6-16C (1)

En una xeringa de 5 ml que contenia 300 mg (0.70 mmol/g, 0.21 mmol) de resina de poliestirè AM RAM s'hi van afegir 3 ml de DMF per inflar-la. Seguidament, el dissolvent es va filtrar i es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc seguint el procediment general descrit a l'apartat 7.2.1. Seguint aquest mateix procediment es va dur a terme la primera reacció d'acilació i la primera reacció d'aminació (**A16**). Acabada l'etapa d'acoblament d'amina, es va refredar la xeringa amb neu carbònica i es van fer els dos cicles d'acilació i aminació restants (**A6** i **A22**) seguint el procediment descrit a l'apartat 7.2.2.

En acabar, després d'assecar la resina, es va transferir a un tub de vidre de 10 ml roscat amb un sèptum de tefló resistent a l'àcid. Seguidament, s'hi van afegir 3 ml d'un còctel d'escissió format per TFA/DCM/H₂O (60:40:2, v/v), tornant-se la resina de color granatós. La mescla es va deixar agitant durant 30 min a t.a. A continuació es va filtrar la mescla en la mateixa xeringa en què s'havia fet la síntesi i el filtrat es va recollir en un matràs de 25 ml. La resina es va tornar a posar al tub i es va repetir l'operació. Els filtrats de les dues fraccions es van aplegar i els dissolvents es van eliminar a pressió reduïda. Les traces d'aigua i d'àcid es van eliminar fent rentats amb ACN (3 x 5 ml), els quals es van eliminar igualment a pressió reduïda. Finalment, l'oli groguenc residual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 85 mg de residu, amb una puresa al voltant del 10% (HPLC). La identificació del peptòide es va confirmar per CL-EM.

La purificació d'aquest cru es va realitzar per HPLC a escala semipreparativa (vegeu condicions de purificació descrites a l'apartat 7.1 utilitzant la columna Kromasil 100 C8 de 5 μ m (250 x 20 cm) de Scharlau amb el programa: 15 min a 5% d'ACN, de 5% a 20% en 30 min, de 20% a 100% en 25 min i 10 min a 100% d'ACN) per obtenir 7.9 mg del peptòide N22-6-16C (**1**) (rdt. 8%) amb una puresa superior al 98% per HPLC. Aquesta mateixa purificació va permetre aïllar i caracteritzar els dos subproductes ciclats formats anomenats respectivament N16C⁺ (**2**) (17 mg, rdt. 36%) i N6-16C⁺ (**3**) (25 mg, rdt. 31%).

Les assignacions dels senyals dels espectres de ¹H-RMN i ¹³C-RMN d'aquests composts es van confirmar pels experiments gDQCOSY i gHSQC. La presència de diferents conformacions va

conduir a uns espectres molt complexos, motiu pel qual només s'han assignat els senyals del conòrmer majoritari en cada cas.

[*N*-(2-Dietilaminoetil)glicil]-[*N*-(2-(1'-pirrolidinil)etil)glicil]-*N*-[2-(1'-metil-2'-pirrolidinil)etil]glicinamida

N22-6-16C (1)

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 4.38 (s, 2H, COCH₂N), 4.25 (s, 2H, COCH₂N), 3.87 (ac, 2H, NCH₂CH₂NCO), 3.86 (s, 2H, COCH₂N), 3.78 (ac, 2H, 2 x NCH₂CH₂), 3.68 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 3.66 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH), 3.54 (ac, 2H, NCH₂CH₂NH), 3.42 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH), 3.40 (ac, 2H, NCH₂CH₂NCO), 3.36 (ac, 2H, NCH₂CH₂NH), 3.33 (ac, 4H, 2 x NCH₂CH₃), 3.27 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 3.15 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 3.15 (ac, 2H, 2 x NCH₂CH₂), 2.93 (s, 3H, NCH₃), 2.46 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 2.20 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH), 2.15 (ac, 4H, 2 x NCH₂CH₂), 2.13 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH₂CH), 1.85 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 1.80 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH), 1.37 (t, J=7 Hz, 6H, 2 x NCH₂CH₃).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 172.4 (CO), 171.7 (CO), 170.9 (CO), 68.3 (NCH₂CH₂CH₂CH), 57.2 (NCH₂CH₂CH₂CH), 55.7 (2 x NCH₂CH₂), 53.8 (NCH₂CH₂NCO), 50.6 (COCH₂N), 50.3 (COCH₂N), 49.5 (COCH₂N), 48.8 (2 x NCH₂CH₃), 47.1 (NCH₂CH₂NH), 46.6 (NCH₂CH₂CH), 45.1 (NCH₂CH₂NCO), 43.4 (NCH₂CH₂NH), 39.9 (NCH₃), 30.5 (NCH₂CH₂CH₂CH), 29.7 (NCH₂CH₂CH), 24.1 (2 x NCH₂CH₂), 22.5 (NCH₂CH₂CH₂CH), 9.0 (2 x NCH₂CH₃).

EMAR per C₂₅H₅₀N₇O₃

Calculada: 496.3975 (M+H)⁺

Determinada: 496.3966

Trifluoroacetat d'1-(metil)azonia-3-oxo-4-(aminocarbonilmetil)aza[5.3.0]deca

N16C⁺ (2)

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 4.81 (s, 1H, COCH₂N⁺), 4.45 (s, 1H, COCH₂N), 4.11 (ac, 1H, CH₂CH₂N), 4.03-3.92 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 3.96 (s, 1H, COCH₂N), 3.84-3.78 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 3.80 (s, 1H, COCH₂N⁺), 3.71-3.64 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 3.46-3.40 (ac, 1H, CH₂CH₂N), 3.34 (s, 3H, NCH₃), 2.74-2.66 (ac, 1H, CH₂CH₂N), 2.38-2.33 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH₂CH), 2.30-2.16 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH₂CH), 2.12 (ac, 1H, CH₂CH₂N).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 171.9 (CO), 165.8 (CO), 75.4 (NCH₂CH₂CH₂CH), 70.2 (NCH₂CH₂CH₂CH), 61.1 (COCH₂N⁺), 51.9 (COCH₂N), 48.9 (NCH₃), 45.0 (CH₂CH₂N), 26.7 (CH₂CH₂N), 26.0 (NCH₂CH₂CH₂CH), 19.5

(NCH₂CH₂CH₂CH).**EMAR per C₁₁H₂₀N₃O₂⁺**Calculada: 226.1550 (M)⁺

Determinada: 226.1556

Trifluoroacetat de 5-azonia-7-oxo-8-[[*N*-(aminocarbonilmetil)-*N*-(2-(1'-metil-2'-pirrolidinil)etil)]aminocarbonilmetil}azaespiro[4.5]deca**N6-16C⁺ (3)**

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 4.34 (s, 2H, COCH₂N), 4.31 (s, 2H, COCH₂N), 4.23 (s, 2H, COCH₂N⁺), 3.89 (ac, 2H, NCH₂CH₂N⁺), 3.80-3.73 (ac, 4H, 2 x CH₂CH₂N⁺), 3.76-3.74 (ac, 2H, NCH₂CH₂N⁺), 3.72-3.69 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH), 3.69-3.62 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 3.46-3.38 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH), 3.33 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 3.17-3.09 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 2.90 (s, 3H, NCH₃), 2.45 (ac, 1H, CH₂CH₂CH₂CH), 2.38-2.34 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH), 2.30 (ac, 4H, 2 x CH₂CH₂N⁺), 2.24-2.12 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 1.94-1.87 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH), 1.86-1.78 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 1.77-1.70 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 172.6 (CO), 170.0 (CO), 162.9 (CO), 68.3 (NCH₂CH₂CH₂CH), 64.7 (2 x CH₂CH₂N⁺), 61.3 (COCH₂N⁺), 57.2 (NCH₂CH₂CH₂CH), 56.1 (NCH₂CH₂N⁺), 50.0 (COCH₂N), 48.7 (COCH₂N), 46.3 (NCH₂CH₂CH), 44.5 (NCH₂CH₂N⁺), 40.1 (NCH₃), 30.7 (NCH₂CH₂CH), 30.5 (NCH₂CH₂CH₂CH), 29.9 (NCH₂CH₂CH₂CH), 22.4 (2 x CH₂CH₂N⁺).

EMAR per C₁₉H₃₄N₅O₃⁺Calculada: 380.2656 (M)⁺

Determinada: 380.2665

7.3. SÍNTESI DE PEPTOIDES EN FASE SÒLIDA PER LA VIA MIXTA

7.3.1. ESTRATÈGIA 1: SÍNTESI DE MONÒMERS PROTEGITS AMB FMOC

7.3.1.1. Procediment general per a l'obtenció dels *N*-alquilaminoacetats de *tert*-butil

En un matràs de 100 ml es van afegir 25.8 mmol de l'amina primària corresponent (**A6**, **A10**, **A15**, **A16**, **A22** i **A37**) i 7.2 ml (51.6 mmol, 2 eq.) de Et₃N dissolts en 25 ml de THF. Tot seguit, es va col·locar el matràs en un bany de gel a 0 °C i s'hi van afegir 3.8 ml (25.8 mmol, 1 eq.) de bromoacetat de *tert*-butil. Acabada l'addició, es va retirar el bany de gel i la mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 30 min, controlant la desaparició del reactiu de partida per CG. Passat aquest temps, es va donar la reacció per acabada i el dissolvent es va

eliminar a pressió reduïda. A continuació s'hi van afegir 30 ml d'H₂O i es va transvasar a un embut d'extracció on es van realitzar extraccions amb DCM (3 x 20 ml). Les fraccions orgàniques es van ajuntar, es van assecar amb MgSO₄ anhidre i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda. El cru de reacció resultant es va destil·lar al buit per obtenir el producte desitjat en forma d'oli incolor. El punt d'ebullició en cadascun dels casos es mostra en la Taula 7.1. En tots els casos es van obtenir rendiments al voltant del 50%.

Taula 7.1. Punt d'ebullició dels *N*-alquilaminoacetats de *tert*-butil corresponents a cadascuna de les amines utilitzades.

Amina	Punt d'ebullició (°C)	Pressió (Torr)
A6	81-84	0.3
A16	90-93	0.3
A22	78-80	0.3
A10	107-110	0.5
A15	145-147	0.8
A37	116-118	0.5

2-[2'-(*N*-Pirrolidinil)etilamino]acetat de *tert*-butil (4)

TLC:	AcOEt-MeOH-Et ₃ N (1:1:0.01)	R _f =0.43
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	3.27 (s, 2H, COCH ₂ NH), 2.68 (t, J=5.7 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.55 (t, J=5.7 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.47 (ac, 4H, 2 x CH ₂ CH ₂ N), 2.19 (sa, 1H, NH), 1.73 (ac, 4H, CH ₂ CH ₂ N), 1.43 (s, 9H, 3 x CH ₃).	
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):	171.7 (CO), 80.9 (C(CH ₃) ₃), 56.0 (CH ₂ CH ₂ NH), 54.1 (COCH ₂ NH), 51.7 (2 x CH ₂ CH ₂ N), 48.0 (CH ₂ CH ₂ NH), 28.0 (3 x CH ₃), 23.4 (2 x CH ₂ CH ₂ N).	
IR (film), ν (cm⁻¹):	3336 (NH), 2970-2792, 1738 (CO), 1459, 1396-1355 (C(CH ₃) ₃), 1236, 1159.	
EM (m/z)	228 (M, 40), 171 (M-C ₄ H ₉ , 10), 127 (M-C ₅ H ₉ O ₂ , 57), 84 (M-C ₇ H ₁₄ NO ₂ , pic base).	
EMAR per C₁₂H₂₅N₂O₂	Calculada: 229.1916 (M+H) ⁺ Determinada: 229.1920	

2-(2'-(*N'*-Metilpirrolidinil)etilamino)acetat de *tert*-butil (5)

TLC:	AcOEt-MeOH-Et ₃ N (1:1:0.01)	R _f =0.28
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	3.21 (s, 2H, COCH ₂ NH), 2.97 (m, 1H, CH), 2.55 (ac, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.23 (s, 3H, CH ₃ N), 2.09-1.93 (ac, 3H, NH-CH ₂ CH ₂ N), 1.92-1.73 (ac, 2H, CH ₂ CHN), 1.39 (sa, 11H, CH ₂ CH ₂ NH i 3 x CH ₃).	
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):	171.6 (CO), 80.9 (C(CH ₃) ₃), 64.2 (CH), 57.0 (COCH ₂ NH), 51.7 (CH ₂ CH ₂ N), 46.8 (CH ₂ CH ₂ NH), 40.3 (NCH ₃), 33.8 (CH ₂ CH ₂ NH), 30.5 (CH ₂ CHN), 28.0 (3 x CH ₃), 21.7 (CH ₂ CH ₂ N).	
IR (film), ν (cm⁻¹):	3337 (NH), 2970-2779, 1735 (CO), 1457, 1389-1348 (C(CH ₃) ₃), 1225, 1152.	
EM (m/z)	242 (M, 16), 185 (M-C ₄ H ₉ , 54), 141 (M-C ₅ H ₉ O ₂ , 64), 98 (M-C ₇ H ₁₄ NO ₂ , 66), 84 (M-C ₈ H ₁₆ NO ₂ , pic base).	
EMAR per C₁₃H₂₇N₂O₂	Calculada: 243.2073 (M+H) ⁺ Determinada: 243.2066	

2-(*N,N'*-Dietiletilendiamino)acetat de *tert*-butil (6)

TLC:	AcOEt-MeOH-Et ₃ N (1:1:0.01)	R _f =0.42
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	3.27 (s, 2H, COCH ₂ NH), 2.61 (t, J=6 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.50 (t, J=6 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.48 (q, J=7.2 Hz, 4H, 2 x CH ₃ CH ₂ N), 2.06 (sa, 1H, NH), 1.42 (s, 9H, 3 x CH ₃), 0.97 (t, J=7.2 Hz, 6H, CH ₃ CH ₂ N).	
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):	171.6 (CO), 80.8 (C(CH ₃) ₃), 52.6 (CH ₂ CH ₂ NH), 51.0 (COCH ₂ NH), 47.2 (CH ₂ CH ₂ NH), 46.9 (2 x CH ₃ CH ₂ N), 28.0 (3 x CH ₃), 11.6 (2 x CH ₃ CH ₂ N).	
IR (film), ν (cm⁻¹):	3335 (NH), 2974-2809, 1736 (CO), 1453, 1390-1365 (C(CH ₃) ₃), 1229, 1155.	
EM (m/z)	230 (M, 38), 173 (M-C ₄ H ₉ , 6), 129 (M-C ₅ H ₉ O ₂ , 56), 86 (M-C ₇ H ₁₄ NO ₂ , pic base).	
EMAR per C₁₂H₂₇N₂O₂	Calculada: 231.2073 (M+H) ⁺ Determinada: 231.2065	

2-(Feniletilamino)acetat de *tert*-butil (7)

TLC:	Hexà-AcOEt-Et ₃ N (3:1:0.01)	Rf=0.27
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	7.29 (ac, 2H, H _{ar}), 7.21 (ac, 3H, H _{ar}), 3.31 (s, 2H, COCH ₂ NH), 2.85 (ac, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.82 (ac, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 1.70 (sa, 1H, NH), 1.44 (s, 9H, 3 x CH ₃).	
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):	171.5 (CO), 139.7 (C _{ar}), 128.6 (2 x CH _{ar}), 128.4 (2 x CH _{ar}), 126.1 (CH _{ar}), 81.1 (C(CH ₃) ₃), 51.6 (COCH ₂ NH), 50.7 (CH ₂ CH ₂ NH), 36.5 (CH ₂ CH ₂ NH), 28.0 (3 x CH ₃).	
IR (film), ν (cm⁻¹):	3330 (NH), 3092-2814, 1735 (CO), 1459, 1393-1350 (C(CH ₃) ₃), 1228, 1155.	
EM (m/z)	235 (M, 5), 178 (M-C ₄ H ₉ , 7), 144 (M-C ₇ H ₇ , 78), 134 (M-C ₅ H ₉ O ₂ , pic base),.	
EMAR per C₁₄H₂₂NO₂	Calculada: 236.1651 (M+H) ⁺ Determinada: 236.1643	

2-(2',4'-Diclorofeniletilamino)acetat de *tert*-butil (8)

TLC:	Hexà-AcOEt-Et ₃ N (3:1:0.01)	Rf=0.26
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	7.33 (s, 1H, H _{ar}), 7.16 (ac, 2H, H _{ar}), 3.30 (s, 2H, COCH ₂ NH), 2.86 (ac, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.84 (ac, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 1.68 (sa, 1H, NH), 1.43 (s, 9H, 3 x CH ₃).	
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):	171.5 (CO), 136.0 (C _{ar}), 134.6 (C _{ar}), 132.5 (C _{ar}), 131.5 (CH _{ar}), 129.2 (CH _{ar}), 127.0 (CH _{ar}), 81.2 (C(CH ₃) ₃), 51.5 (COCH ₂ NH), 48.6 (CH ₂ CH ₂ NH), 33.6 (CH ₂ CH ₂ NH), 28.0 (3 x CH ₃).	
IR (film), ν (cm⁻¹):	3328 (NH), 3091-2817, 1731 (CO), 1473, 1388-1346 (C(CH ₃) ₃), 1224, 1152.	
EM (m/z)	303 (M, 3), 178 (M-C ₄ H ₉ , 5), 202 (M-C ₅ H ₉ O ₂ , pic base), 172 (M-C ₅ H ₁₂ NO ₂ , 92), 144 (M-C ₇ H ₅ Cl ₂ , 88).	
EMAR per C₁₄H₂₀Cl₂NO₂	Calculada: 304.0871 (M+H) ⁺ Determinada: 304.0866	

2-(4'-Fluorofeniletilamino)acetat de *tert*-butil (9)

TLC:	Hexà-AcOEt-Et ₃ N (3:1:0.01)	R _f =0.28
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	7.15 (ac, 2H, H _{ar}), 6.96 (ac, 2H, H _{ar}), 3.29 (s, 2H, COCH ₂ NH), 2.82 (ac, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.77 (ac, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 1.65 (sa, 1H, NH), 1.44 (s, 9H, 3 x CH ₃).	
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):	171.5 (CO), 161.4 (d, J=242 Hz, FC _{ar}), 135.3 (d, J=3.4 Hz, C _{ar}), 130.0 (d, J=7.6 Hz, 2 x CH _{ar}), 115.1 (d, J=20.8 Hz, 2 x CH _{ar}), 81.1 (C(CH ₃) ₃), 51.6 (COCH ₂ NH), 50.6 (CH ₂ CH ₂ NH), 35.7 (CH ₂ CH ₂ NH), 28.0 (3 x CH ₃).	
IR (film), ν (cm⁻¹):	3330 (NH), 3042-2821, 1733 (CO), 1599, 1507, 1391-1341 (C(CH ₃) ₃), 1224, 1145.	
EM (m/z)	253 (M, 3), 196 (M-C ₄ H ₉ , 6), 152 (M-C ₅ H ₉ O ₂ , 95), 144 (M-C ₇ H ₆ F, pic base).	
EMAR per C₁₄H₂₁FNO₂	Calculada: 254.1556 (M+H) ⁺ Determinada: 254.1550	

7.3.1.2. Procediment general per a l'obtenció de les *N*-alquilglicines

En un matràs de 100 ml que contenia el corresponent *N*-alquilaminoacetat de *tert*-butil (9 mmol) dissolt en 20 ml de DCM, s'hi van afegir 20 ml de TFA. La mescla es va mantenir en agitació a t.a. durant 3 h. Passat aquest temps, es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda i es van realitzar rentats amb ACN (3 x 10 ml). Els crús de reacció corresponents es van analitzar per ¹H-RMN, mostrant la desaparició completa del senyal del grup *tert*-butil. En tots els casos la conversió va ser quantitativa i el rendiment final va ser superior al 99%.

***N*-(2'-(1''-Pirrolidinil)etil)glicina (10)**

¹H-RMN (500 MHz, acetona-d₆):	4.20 (s, 2H, COCH ₂ NH), 4.01-3.99 (ac, 2H, NCH ₂ CH ₂ NH), 3.92-3.90 (ac, 2H, NCH ₂ CH ₂ NH), 2.16 (sa, 1H, NH), 2.08-2.05 (ac, 8H, 2 x CH ₂ CH ₂ N).
¹³C-RMN (125 MHz, acetona-d₆):	167.5 (CO), 54.5 (2 x CH ₂ CH ₂ N), 51.2 (NCH ₂ CH ₂ NH), 47.8 (COCH ₂ NH), 43.9 (NCH ₂ CH ₂ NH), 23.0 (2 x CH ₂ CH ₂ N).

***N*-(2'-(2'',4''-Diclorofenil)etil)glicina (14)**

¹H-RMN (500 MHz, acetona-d₆): 7.51 (s, 1H, H_{ar}), 7.50 (d, J=8.4 Hz, 1H, H_{ar}), 7.37 (d, J=8.4 Hz, 1H, H_{ar}), 4.22 (s, 2H, COCH₂NH), 3.56 (t, J=8 Hz, 2H, CH₂CH₂NH), 3.36 (t, J=8 Hz, 2H, CH₂CH₂NH).

¹³C-RMN (125 MHz, acetona-d₆): 168.4 (CO), 135.5 (C_{ar}), 134.5 (C_{ar}), 134.2 (C_{ar}), 133.4 (CH_{ar}), 130.0 (CH_{ar}), 128.6 (CH_{ar}), 48.3 (COCH₂NH), 47.6 (CH₂CH₂NH), 30.0 (CH₂CH₂NH).

EMAR per C₁₀H₁₂Cl₂NO₂

Calculada: 248.0245 (M+H)⁺

Determinada: 248.0237

***N*-(2'-(4''-Fluorofenil)etil)glicina (15)**

¹H-RMN (500 MHz, acetona-d₆): 7.37 (t, J=7.2 Hz, 2H, H_{ar}), 7.10 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH_{ar}), 4.18 (s, 2H, COCH₂NH), 3.54 (t, J=8 Hz, 2H, CH₂CH₂NH), 3.21 (t, J=8 Hz, 2H, CH₂CH₂NH).

¹³C-RMN (125 MHz, acetona-d₆): 168.5 (CO), 162.7 (d, J=236 Hz, FC_{ar}), 133.8 (C_{ar}), 131.6 (d, J=8.1 Hz, 2 x CH_{ar}), 116.2 (d, J=21.2 Hz, 2 x CH_{ar}), 49.7 (COCH₂NH), 48.2 (CH₂CH₂NH), 31.8 (CH₂CH₂NH).

EMAR per C₁₀H₁₃FNO₂

Calculada: 198.0930 (M+H)⁺

Determinada: 198.0925

7.3.1.3. Procediment general per a l'obtenció de les *N*-alquilglicines protegides amb Fmoc

En un matràs de 100 ml que contenia l'*N*-alquilglicina corresponent (9 mmol) dissolta en 25 ml d'H₂O a pH=9-9.5 (ajustat amb trietilamina), s'hi van afegir 3.03 g d'FmocOsu dissolts en 25 ml d'ACN. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 4 h fins que el control per HPLC va mostrar la desaparició completa de l'FmocOsu de partida. Tot seguit el medi es va acidificar amb HCl i la mescla es va concentrar a pressió reduïda. Finalment, es va realitzar una extracció amb AcOEt (3 x 20 ml) i els extractes orgànics es van assecar sobre MgSO₄. Després de l'eliminació del dissolvent a pressió reduïda, els crús de reacció obtinguts mostraven la corresponent *N*-alquilglicina amb una puresa al voltant del 90% per ¹H-RMN amb un rendiment superior al 85%. Per aquest motiu, es van utilitzar directament sense purificació prèvia per a la síntesi de peptoides tal i com es mostrarà més endavant.

(COCH₂N), 47.0 (CHCH₂O), 46.2 (CHCH₂CH₂N), 40.0 (CH₃), 29.6 (NCH₂CH₂CH₂CH), 29.4 (CHCH₂CH₂N), 21.6 (NCH₂CH₂CH₂CH).

EMAR per C₂₄H₂₉N₂O₄

Calculada: 409.2127 (M+H)⁺

Determinada: 409.2126

***N*-(9'-Fluorenilmetoxycarbonil)-*N*-(2'-dietilaminoetil)glicina (18)**

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):

7.75 (d, J=7.5 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 7.53 (d, J=7.5 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 7.44-7.30 (ac, 4H, 4 x H_{ar}), 4.39 (d, J=7 Hz, 2H, CHCH₂O), 4.20 (t, J=7 Hz, 1H, CHCH₂O), 4.11 (s, 2H, COCH₂N), 3.38 (sa, 2H, NCH₂CH₂NCO), 3.23-3.14 (ac, 4H, 2 x CH₃CH₂N), 2.73 (sa, 2H, NCH₂CH₂NCO), 1.30 (t, J=7.5 Hz, 6H, 2 x CH₃CH₂N).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):

173.5 (CO), 156.3 (CO), 143.4 (2 x C_{ar}), 141.2 (2 x C_{ar}), 127.8 (2 x CH_{ar}), 127.2 (2 x CH_{ar}), 124.9 (2 x CH_{ar}), 120.0 (2 x CH_{ar}), 68.6 (CHCH₂O), 50.4 (CHCH₂O), 50.1 (COCH₂N), 47.3 (NCH₂CH₂NCO), 47.1 (2 x CH₃CH₂N), 44.4 (NCH₂CH₂NCO), 8.4 (2 x CH₃CH₂N).

EMAR per C₂₃H₂₉N₂O₄

Calculada: 397.2127 (M+H)⁺

Determinada: 397.2137

***N*-(9'-Fluorenilmetoxycarbonil)-*N*-(2'-feniletíl)glicina (19)**

TLC:

Hexà-AcOEt-Àcid acètic (6:4:0.01) R_f=0.24

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):

7.73 (d, J=7.6 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 7.58 (d, J=7.2 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 7.40-7.14 (ac, 8H, 8 x H_{ar}), 6.95 (d, J=7.2 Hz, 1H, H_{ar}), 4.57 (d, J=5.6 Hz, CHCH₂O), 4.20 (ac, 1H, CHCH₂O), 3.84 (s, 2H, COCH₂N), 3.33 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 2.56 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂N).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):

174.6 (CO), 156.5 (CO), 143.7 (2 x C_{ar}), 141.4 (2 x C_{ar}), 138.5 (C_{ar}), 128.7 (2 x CH_{ar}), 128.5 (2 x CH_{ar}), 127.7 (2 x CH_{ar}), 127.1 (2 x CH_{ar}), 126.4 (CH_{ar}), 124.7 (2 x CH_{ar}), 120.0 (2 x CH_{ar}), 67.2 (CHCH₂O), 50.2 (COCH₂N), 49.4 (CH₂CH₂N), 47.2 (CHCH₂O), 34.7 (CH₂CH₂N).

Anàlisi elemental per a C₂₅H₂₃NO₄

Calculada: C, 74.79; H, 5.77; N, 3.49

Determinada: C, 74.75; H, 5.85; N, 3.43

***N*-(9'-Fluorenilmetoxycarbonil)-*N*-(2'-(2'',4''-diclorofenil)etil)glicina (20)**

TLC: Hexà-AcOEt-Àcid acètic (6:4:0.01) R_f=0.27

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.73 (d, J=7.6 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 7.58 (d, J=7.6 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 7.40-7.25 (ac, 5H, 5 x H_{ar}), 7.12 (ac, 1H H_{ar}), 6.68 (d, J=7.6 Hz, 1H, H_{ar}), 4.61 (d, J=5.2 Hz, 2H, CHCH₂O), 4.21 (ac, 1H, CHCH₂O), 3.86 (s, 2H, COCH₂N), 3.26 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 2.60 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂N).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 174.7 (CO), 156.3 (CO), 143.7 (2 x C_{ar}), 141.3 (2 x C_{ar}), 134.7 (C_{ar}), 134.4 (C_{ar}), 133.0 (C_{ar}), 131.8 (CH_{ar}), 129.3 (CH_{ar}), 127.7 (2 x CH_{ar}), 127.1 (2 x CH_{ar}), 127.0 (CH_{ar}), 124.6 (2 x CH_{ar}), 120.0 (2 x CH_{ar}), 67.0 (CHCH₂O), 49.5 (COCH₂N), 48.0 (CH₂CH₂N), 47.2 (CHCH₂O), 31.8 (CH₂CH₂N).

Anàlisi elemental per a C₂₅H₂₁Cl₂NO₄ Calculada: C, 63.84; H, 4.50; Cl, 15.08; N, 2.98

Determinada: C, 63.80; H, 4.51; Cl, 15.02; N, 2.93

***N*-(9'-Fluorenilmetoxycarbonil)-*N*-(2'-(4''-fluorofenil)etil)glicina (21)**

TLC: Hexà-AcOEt-Àcid acètic (6:4:0.01) R_f=0.22

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.74 (d, J=7.6 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 7.58 (d, J=7.2 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 7.41-7.25 (ac, 4H, 4 x H_{ar}), 6.92 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 6.85 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 4.64 (d, J=5.2 Hz, 2H, CHCH₂O), 4.23 (ac, 1H, CHCH₂O), 3.84 (s, 2H, COCH₂N), 3.25 (t, J=7.6 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 2.48 (t, J=7.6 Hz, 2H, CH₂CH₂N).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 174.9 (CO), 161.5 (d, J=243 Hz, FC_{ar}), 156.4 (CO), 143.7 (2 x C_{ar}), 141.4 (2 x C_{ar}), 134.0 (C_{ar}), 130.1 (d, J=7.7 Hz, 2 x CH_{ar}), 127.7 (2 x CH_{ar}), 127.1 (2 x CH_{ar}), 124.6 (2 x CH_{ar}), 120.0 (2 x CH_{ar}), 115.2 (d, J=20.8 Hz, 2 x CH_{ar}), 67.0 (CHCH₂O), 50.3 (COCH₂N), 49.5 (CH₂CH₂N), 47.3 (CHCH₂O), 33.8 (CH₂CH₂N).

Anàlisi elemental per a C₂₅H₂₂FNO₄ Calculada: C, 71.59; H, 5.29; F, 4.53; N, 3.34

Determinada: C, 71.51; H, 5.27; F, 4.55; N, 3.30

7.3.1.4. Aplicació dels monòmers d'*N*-alquilglicines protegits amb el grup Fmoc a la síntesi de peptoides

7.3.1.4.1. Síntesi del peptoide model N22-22-15C (**22**)

En una xeringa de 3 ml que contenia 116 mg (0.79 mmol/g, 0.09 mmol) de resina de poliestirè AM RAM, s'hi van afegir 2 ml de DMF per realitzar l'inflat inicial de la resina. Una vegada eliminat el dissolvent, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc per tractament amb 2 ml d'una dissolució de piperidina al 20% (v/v) en DMF. La xeringa es va mantenir el agitació a t.a. durant 30 min. Passat aquest temps, es va eliminar el dissolvent i l'operació es va repetir. A continuació, es van realitzar els rentats de la resina amb DMF (3 x 3 ml), iPrOH (3 x 3 ml), DCM (3 x 3 ml).

Primera acilació: sobre la resina desprotegida i inflada amb DCM, es va afegir una dissolució de 64 mg (0.45 mmol, 5 eq.) d'àcid bromoacètic en 2 ml d'una mescla DCM/DMF (2:1). Seguidament s'hi van afegir 72 µl (0.45 mmol, 5 eq.) de DIC i la xeringa es va mantenir en agitació a t.a. durant 30 min. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i el procés es va repetir. En acabar, la resina es va rentar amb DCM (3 x 3 ml), iPrOH (3 x 3 ml) i DCM (3 x 3 ml). La desaparició de l'amina primària va ser comprovada mitjançant el test del TNBS, el qual va donar negatiu (incolor).

Primer acoblament d'amina: sobre la resina acilada, s'hi va afegir una dissolució de 70 µl (0.45 mmol, 5 eq.) d'amina **A15** en 2 ml de DMF. La xeringa es va mantenir en agitació a t.a. durant 3 h. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir el procés. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 3 ml), iPrOH (3 x 3 ml) i DCM (3 x 3 ml). La presència d'una amina secundària es va comprovar mitjançant el test del cloranil, el qual va donar positiu (color verd).

Primer acoblament de monòmer: arribat aquest punt, es va dividir la resina entre dues xeringues de 3 ml i s'hi van afegir respectivament una des les dues dissolucions següents:

A) 36 mg del monòmer de l'amina **A22** (0.09 mmol, 2 eq.), 15 µl de DIC (0.09 mmol, 2 eq.) i 12 mg d'HOBt (0.09 mmol, 2 eq.) en 2 ml de DMF.

B) 36 mg del monòmer de l'amina **A22** (0.09 mmol, 2 eq.), 30 µl de DIEA (0.18 mmol, 4 eq.) i 34 mg d'HATU (0.09 mmol, 2 eq.) en 2 ml de DMF.

Les xeringues es van mantenir en agitació a t.a. durant 1 h. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir el procés. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 3 ml), iPrOH (3 x 3 ml) i DCM (3 x 3 ml). A continuació, es va agafar una mostra de resina de cadascuna de les dues xeringues i es van analitzar mitjançant el test del cloranil i per HPLC. El resultat del test no va ser concloent ja que mostrava certa coloració quan havia de ser incolor, mentre que els cromatogrames van mostrar clarament que el tractament amb la dissolució B conduïa cap al producte esperat, mentre que en el cas de la dissolució A no

presentava cap canvi respecte al producte de partida. Així doncs, es va decidir seguir únicament amb la xeringa que s'havia acoblat correctament.

Desprotecció del grup Fmoc: es va procedir de forma anàloga a la desprotecció inicial de la resina. En acabar, es va agafar una mostra de resina i es va analitzar per HPLC, per comprovar la desprotecció completa del monòmer acoblat.

Segon acoblament de monòmer: es va realitzar tal i com es va realitzar el primer acoblament, addicionant la dissolució B sobre la resina inflada amb DMF. En acabar, es va agafar una mostra de resina i es va analitzar per HPLC. Aquesta anàlisi va mostrar l'aparició d'un nou pic acompanyat de la desaparició del corresponent producte de partida.

Desprotecció del grup Fmoc: es va procedir de forma anàloga a les anteriors. En acabar, es va agafar una mostra de resina i es va analitzar per HPLC per comprovar la desprotecció completa del monòmer acoblat.

Escissió de la resina: després d'assecar la resina, es va transferir a un tub de vidre Pyrex de 10 ml roscat amb un sèptum de tefló resistent a l'àcid. Seguidament s'hi van afegir 3 ml de còctel d'escissió (TFA/DCM/H₂O, 60:40:2), tornant-se la resina de color granatós. La mescla de reacció es va mantenir en agitació mecànica durant 30 min a t.a. A continuació, es va filtrar en la mateixa xeringa en què s'havia fet la síntesi, recollint el filtrat en un matràs de 10 ml. El dissolvent es va eliminar a pressió reduïda. Les traces d'aigua i d'àcid es van eliminar realitzant rentats amb ACN (3 x 3 ml), els quals es van eliminar igualment a pressió reduïda. Finalment, l'oli groguenc residual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 20 mg de residu (rdt. 80%) corresponent al peptòide **22**, amb una puresa del 90% per HPLC. La identificació del peptòide es va confirmar per CL-EM.

**[*N*-(2-Dietilaminoetil)glicil]-[*N*-(2-dietilaminoetil)glicil]-*N*-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida
N22-22-15C (22)**

CL-EM 559.3, 561.3, 563.3 (M+H, Cl₂)⁺

7.3.1.4.2. Síntesi del peptòide N22-6-16C (1)

Es va preparar una xeringa de 10 ml que contenia 400 mg (0.79 mmol/g, 0.32 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. La síntesi es va realitzar de forma anàloga a la descrita en l'apartat 7.3.1.4.1, variant el volum de les diferents dissolucions addicionades que va passar de 2 ml a 5 ml, i l'amina i els monòmers acoblats en cadascuna de les etapes.

La desprotecció inicial dels grups Fmoc de la resina es va realitzar per tractament amb 5 ml d'una dissolució de piperidina al 20% (v/v) en DMF. Després dels corresponents rentats de la resina, es va procedir amb la primera reacció d'acilació per tractament amb una dissolució de 220 mg àcid bromoacètic (1.6 mmol, 5 eq.) i 250 µl de DIC (1.6 mmol, 5 eq.) en 5 ml de DMF. Tot seguit, es va realitzar el primer acoblament d'amina per tractament amb una dissolució de 230 µl d'amina **A16** (1.6 mmol, 5 eq.) en 5 ml de DMF. Finalitzada la reacció, es va procedir amb l'acoblament del monòmer corresponent a l'amina **A6**, el qual es va realitzar mitjançant l'addició sobre la resina d'una dissolució de 252 mg del monòmer de l'amina **A6** (0.64 mmol, 2 eq.), 220 µl de DIEA (1.28 mmol, 4 eq.) i 240 mg d'HATU (0.64 mmol, 2 eq.) en 5 ml de DMF. A continuació es va procedir a desprotegir els grups Fmoc tal i com s'ha descrit anteriorment i es va realitzar l'acoblament del monòmer corresponent a l'amina **A22** per tractament amb una dissolució de 253 mg del monòmer de l'amina **A22** (0.64 mmol, 2 eq.), 220 µl de DIEA (1.28 mmol, 4 eq.) i 240 mg d'HATU (0.64 mmol, 2 eq.) en 5 ml de DMF. Finalment, es va realitzar l'última desprotecció dels grups Fmoc i l'escissió del peptòide de la resina per tractament amb 5 ml de còctel d'escissió. El tractament posterior va permetre l'obtenció d'un oli groguenc residual, el qual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 110 mg de residu amb una puresa del 85% per HPLC. El peptòide es va identificar per CL-EM.

La purificació d'aquest cru de reacció es va realitzar per HPLC a escala semipreparativa (vegeu condicions de purificació descrites a l'apartat 7.1 utilitzant la columna X-Terra® C₁₈ de 5 µm (19 x 250 mm) de Waters amb el programa: 5 min a 5% d'ACN, de 5% a 100% en 35 min i 10 min a 100% d'ACN), per obtenir 70 mg del peptòide **1** (rdt. 45%) amb una puresa superior al 98% per HPLC.

7.3.2. ESTRATÈGIA 2: SÍNTESI DE MONÒMERS PROTEGITS AMB ALLOC

7.3.2.1. Procediment general per a l'obtenció dels *N*-alquilaminoacetats d'etil

En un matràs de 250 ml que contenia la corresponent amina primària (**A6**, **A10**, **A15**, **A22** i **A37**) (50 mmol) dissolta en 100 ml d'EtOH, s'hi van addicionar 10.4 ml de glioxilat d'etil (52,5 mmol, 1.05 eq.) (50% en toluè). La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 1 h. A continuació, s'hi va afegir una dissolució de NaBH₃CN (3.96 g, 60 mmol, 1.2 eq.) i 100 µl d'àcid acètic en 15 ml d'EtOH i es va continuar agitant a t.a durant 2 h més. Passat aquest temps, la reacció es va donar per acabada (control per CG) i es va procedir al seu tractament. Després d'eliminar el dissolvent a pressió reduïda, s'hi va addicionar una dissolució d'NaOH al 10%, es va saturar amb NaCl i es va dur a terme una extracció amb ^tBuOMe (en el cas de les amines **A10**, **A15** i **A37**) o bé amb AcOEt (en el cas de les amines **A6** i **A22**). Els extractes orgànics units es van assecar amb MgSO₄ i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda per obtenir l'*N*-alquilaminoacetat d'etil corresponent en forma d'oli amb un rendiment

entre el 50-60% (en el cas de les amines **A6** i **A22**), o bé entre el 75-85% (en el cas de les amines **A10**, **A15** i **A37**). En tots els casos la puresa dels crús de reacció va ser superior al 90% (per CG).

2-[2'-(*N*-Pirrolidinil)etilamino]acetat d'etil (**23**)

TLC:	AcOEt-MeOH-Et ₃ N (1:1:0.01)	R _f =0.49
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃):	4.19 (q, J=7.2 Hz, 2H, CH ₃ CH ₂ O), 3.43 (s, 2H, COCH ₂ NH), 2.74 (t, J=6.3 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.60 (t, J=6.3 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.51 (ac, 4H, 2 x CH ₂ CH ₂ N), 2.14 (sa, 1H, NH), 1.77 (ac, 4H, 2 x CH ₂ CH ₂ N), 1.28 (t, J=7.2 Hz, 3H, CH ₃ CH ₂ O).	
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃):	172.5 (CO), 60.5 (CH ₃ CH ₂ O), 55.9 (2 x CH ₂ CH ₂ N), 54.1 (CH ₂ CH ₂ NH), 50.9 (COCH ₂ NH), 48.0 (CH ₂ CH ₂ NH), 23.4 (2 x CH ₂ CH ₂ N), 14.1 (CH ₃ CH ₂ O).	
EM (m/z)	200 (M, 40), 127 (M-C ₃ H ₅ O ₂ , 52), 116 (M-C ₅ H ₁₀ N, 10), 98 (M-C ₄ H ₈ NO ₂ , 10), 84 (M-C ₅ H ₁₀ NO ₂ , pic base), 70 (M-C ₆ H ₁₂ NO ₂ , 38).	
EMAR per C₁₀H₂₁N₂O₂	Calculada: 201.1603 (M+H) ⁺ Determinada: 201.1598	

2-(*N,N'*-Dietiletilendiamino)acetat d'etil (**24**)

TLC:	AcOEt-MeOH-Et ₃ N (1:1:0.01)	R _f =0.46
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	4.17 (q, J=7.2 Hz, 2H, CH ₃ CH ₂ O), 3.40 (s, 2H, COCH ₂ NH), 2.66 (t, J=6.3 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.55 (t, J=6.3 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.52 (q, J=7 Hz, 4H, 2 x CH ₃ CH ₂ N), 2.15 (sa, 1H, NH), 1.28 (t, J=7.2 Hz, 3H, CH ₃ CH ₂ O), 1.02 (t, J=7 Hz, 6H, 2 x CH ₃ CH ₂ N).	
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):	172.5 (CO), 60.6 (CH ₃ CH ₂ O), 52.5 (CH ₂ CH ₂ NH), 51.0 (COCH ₂ NH), 47.0 (CH ₂ CH ₂ NH), 46.8 (2 x CH ₃ CH ₂ N), 14.8 (CH ₃ CH ₂ O), 11.6 (2 x CH ₃ CH ₂ N).	
EM (m/z)	202 (M, 30), 129 (M-C ₃ H ₅ O ₂ , 50), 116 (M-C ₅ H ₁₂ N, 10), 100 (M-C ₄ H ₈ NO ₂ , 14), 86 (M-C ₅ H ₁₀ NO ₂ , pic base), 72 (M-C ₆ H ₁₂ NO ₂ , 48).	
EMAR per C₁₀H₂₃N₂O₂	Calculada: 203.1760 (M+H) ⁺ Determinada: 203.1755	

2-(Feniletilamino)acetat d'etil (25)

TLC:	Hexà-AcOEt-Et ₃ N (5:1:0.01)	Rf=0.24
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃):	7.32-7.17 (ac, 5H, H _{ar}), 4.17 (q, J=7.2 Hz, 2H, CH ₃ CH ₂ O), 3.41 (s, 2H, COCH ₂ NH), 2.87 (t, J=6.3 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.81 (t, J=6.3 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 1.65 (sa, 1H, NH), 1.26 (t, J=7.2 Hz, 3H, CH ₃ CH ₂ O).	
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃):	172.3 (CO), 139.6 (C _{ar}), 128.6 (2 x CH _{ar}), 128.4 (2 x CH _{ar}), 126.2 (C _{ar}), 60.6 (CH ₃ CH ₂ O), 50.8 (COCH ₂ NH), 50.7 (CH ₂ CH ₂ NH), 36.4 (CH ₂ CH ₂ NH), 14.1 (CH ₃ CH ₂ O).	
EM (m/z)	207 (M, 10), 134 (M-C ₃ H ₅ O ₂ , 65), 116 (M-C ₇ H ₇ , pic base), 105 (M-C ₄ H ₈ NO ₂ , 70), 91 (M-C ₅ H ₁₀ NO ₂ , 20), 77 (M-C ₆ H ₁₂ NO ₂ , 25).	
EMAR per C₁₂H₁₈NO₂	Calculada: 208.1338 (M+H) ⁺ Determinada: 208.1335	

2-(2',4'-Diclorofeniletilamino)acetat d'etil (26)

TLC:	Hexà-AcOEt-Et ₃ N (5:1:0.01)	Rf=0.25
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	7.35 (ac, 1H, H _{ar}), 7.20-7.13 (ac, 2H, 2 x H _{ar}), 4.17 (q, J=7.2 Hz, 2H, CH ₃ CH ₂ O), 3.42 (s, 2H, COCH ₂ NH), 2.87 (ac, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.83 (ac, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 2.43 (sa, 1H, NH), 1.25 (t, J=7.2 Hz, 3H, CH ₃ CH ₂ O).	
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):	172.2 (CO), 135.8 (C _{ar}), 134.7 (C _{ar}), 132.6 (C _{ar}), 131.7 (CH _{ar}), 129.4 (CH _{ar}), 127.2 (CH _{ar}), 60.8 (CH ₃ CH ₂ O), 50.7 (COCH ₂ NH), 48.7 (CH ₂ CH ₂ NH), 33.4 (CH ₂ CH ₂ NH), 14.2 (CH ₃ CH ₂ O).	
EM (m/z)	275 (M, 5), 202 (M-C ₃ H ₅ O ₂ , 40), 173 (M-C ₄ H ₈ NO ₂ , 30), 159 (M-C ₅ H ₁₀ NO ₂ , 15), 116 (M-C ₇ H ₅ Cl ₂ , pic base).	
EMAR per C₁₂H₁₆Cl₂NO₂	Calculada: 276.0558 (M+H) ⁺ Determinada: 276.0554	

2-(4'-Fluorofeniletilamino)acetat d'etil (27)

TLC:	Hexà-AcOEt-Et ₃ N (5:1:0.01)	Rf=0.20
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	7.19-7.12 (ac, 2H, 2 x H _{ar}), 7.03-6.95 (ac, 2H, 2 x H _{ar}), 4.17 (q, J=7.2 Hz, 2H, CH ₃ CH ₂ O), 3.41 (s, 2H, COCH ₂ NH), 2.87 (t, J=6 Hz, 2H,	

CH₂CH₂NH), 2.83 (t, J=6 Hz, 2H, CH₂CH₂NH), 1.85 (sa, 1H, NH), 1.26 (t, J=7.2 Hz, 3H, CH₃CH₂O).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 172.3 (CO), 161.4 (d, J=242 Hz, FC_{ar}), 135.2 (C_{ar}), 129.9 (d, J=7.9 Hz, CH_{ar}), 115.3 (d, J=21 Hz, CH_{ar}), 60.7 (CH₃CH₂O), 50.8 (COCH₂NH), 50.7 (CH₂CH₂NH), 35.6 (CH₂CH₂NH), 14.2 (CH₃CH₂O).

EM (m/z) 225 (M, 5), 152 (M-C₃H₅O₂, 84), 123 (M-C₄H₈NO₂, 80), 116 (M-C₇H₆F, pic base), 109 (M-C₅H₁₀NO₂, 54), 102 (M-C₈H₈F, 70).

EMAR per C₁₂H₁₇FNO₂ Calculada: 226.1243 (M+H)⁺
Determinada: 226.1237

7.3.2.2. Procediment general per a l'obtenció dels carbamats d'al·lil

En un matràs de 100 ml col·locat en un bany del gel/H₂O a 5 °C que contenia una dissolució del corresponent *N*-alquilaminoacetat d'etil (10 mmol) i K₂CO₃ (2.07 g, 15 mmol, 1.5 eq.) en 30 ml de DCM, s'hi va afegir cloroformat d'al·lil (1.27 ml, 12 mmol, 1.2 eq.) lentament. Acabada l'addició, la mescla de reacció es va mantenir en agitació en el mateix bany durant 1 h fins que es va observar la desaparició del producte inicial (control per CG). Seguidament es van filtrar les sals a través d'una placa porosa i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda per obtenir els composts desitjats amb un rendiment superior al 95% en tots els casos.

Etoxicarbonilmetil-2-(*N*-pirrolidinil)etilcarbamats d'al·lil (28)

TLC: Hexà-AcOEt-Et₃N (3:1:0.01) R_f=0.18

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 5.91 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.34-5.15 (ac, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.62 (d, J=5.4 Hz, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.18 (q, J=7.2 Hz, 2H, CH₃CH₂O), 4.06 (s, 2H, COCH₂N), 3.49 (t, J=6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NCO), 2.66 (t, J=6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NCO), 2.52 (ac, 4H, 2 x CH₂CH₂N), 1.76 (ac, 4H, 2 x CH₂CH₂N), 1.27 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃CH₂O).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 169.8 (CO), 155.7 (CO), 132.7 (OCH₂CH=CH₂), 117.3 (OCH₂CH=CH₂), 66.3 (OCH₂CH=CH₂), 61.0 (CH₃CH₂O), 54.5 (CH₂CH₂NCO), 54.1 (2 x CH₂CH₂N), 49.5 (COCH₂N), 47.5 (CH₂CH₂NCO), 23.4 (2 x CH₂CH₂N), 14.1 (CH₃CH₂O).

IR (film), ν (cm⁻¹): 2968-2793, 1746 (CO), 1702 (CO), 1466, 1410, 1365, 1214, 1150.

EM (m/z) 284 (M, 15), 239 (M-C₂H₅O, 10), 227 (M-C₃H₅O, 10), 211 (M-C₃H₅O₂, 15), 84 (M-C₉H₁₄NO₄, pic base).

Anàlisi elemental per a C₁₄H₂₄N₂O₄ Calculada: C, 59.13; H, 8.51; N, 9.85

Determinada: C, 59.21; H, 8.53; N, 9.69

Etoxicarbonilmetil-2-(dietilamino)etilcarbammat d'al·lil (29)

TLC: Hexà-AcOEt-Et₃N (3:1:0.01) R_f=0.28

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 5.88 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.32-5.14 (ac, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.59 (d, J=5 Hz, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.17 (q, J=7.2 Hz, 2H, CH₃CH₂O), 4.07 (s, 2H, COCH₂N), 3.40 (t, J=7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NCO), 2.59 (t, J=7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NCO), 2.50 (q, J=7.5 Hz, 4H, 2 x CH₃CH₂N), 1.25 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃CH₂O), 1.01 (t, J=7.5 Hz, 6H, 2 x CH₃CH₂N).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 169.9 (CO), 155.8 (CO), 132.0 (OCH₂CH=CH₂), 117.7 (OCH₂CH=CH₂), 66.6 (OCH₂CH=CH₂), 61.5 (CH₃CH₂O), 51.5 (CH₂CH₂NCO), 49.8 (COCH₂N), 47.3 (2 x CH₃CH₂N), 47.0 (CH₂CH₂NCO), 14.1 (CH₃CH₂O), 11.8 (2 x CH₃CH₂N).

IR (film), ν (cm⁻¹): 2973-2803, 1751 (CO), 1706 (CO), 1466, 1410, 1375, 1295, 1240, 1200, 1170, 1125.

EM (m/z) 286 (M, 15), 241 (M-C₂H₅O, 10), 229 (M-C₃H₅O, 5), 213 (M-C₃H₅O₂, 15), 100 (M-C₈H₁₂NO₄, 30), 86 (M-C₉H₁₄NO₄, pic base).

Anàlisi elemental per a C₁₄H₂₆N₂O₄ Calculada: C, 58.72; H, 9.15; N, 9.78

Determinada: C, 58.67; H, 9.14; N, 9.67

Etoxicarbonilmetil-2-(fenil)etilcarbammat d'al·lil (30)

TLC: Hexà-AcOEt (5:1) R_f=0.35

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.31-7.15 (ac, 5H, 5 x H_{ar}), 5.90 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.34-5.17 (ac, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.59 (d, J=5.2 Hz, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.17 (q, J=7.2, 2H, CH₃CH₂O), 3.89 (s, 2H, COCH₂N), 3.55 (t, J=7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 2.86 (t, J=7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 1.25 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃CH₂O).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 169.7 (CO), 156.2 (CO), 138.8 (C_{ar}), 132.7 (OCH₂CH=CH₂), 128.7 (2 x CH_{ar}), 128.5 (2 x CH_{ar}), 126.5 (CH_{ar}), 117.4 (OCH₂CH=CH₂), 66.3

(OCH₂CH=CH₂), 61.2 (CH₃CH₂O), 50.0 (COCH₂N), 49.5 (CH₂CH₂N), 35.0 (CH₂CH₂N), 14.1 (CH₃CH₂O).

IR (film), ν (cm⁻¹): 3090-2877, 1748 (CO), 1703 (CO), 1526, 1472, 1410, 1370, 1237, 1192, 1174, 1126, 1028, 988, 952, 930, 770, 748, 699.

EM (m/z) 291 (M, 5), 246 (M-C₂H₅O, 5), 218 (M-C₃H₅O₂, 15), 206 (M-C₄H₅O₂, 7), 200 (M-C₇H₇, pic base), 156 (M-C₇H₇-C₂H₅O, 80), 128 (M-C₇H₇-C₃H₅O₂, 30), 91 (M-C₉H₁₄NO₄, 50).

Anàlisi elemental per a C₁₆H₂₁NO₄ Calculada: C, 65.96; H, 7.27; N, 4.81

Determinada: C, 65.85; H, 7.24; N, 4.90

Etoxicarbonilmetil-2-(2',4'-diclorofenil)etilcarbammat d'al·lil (31)

TLC: Hexà-AcOEt (5:1) R_f=0.34

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.36 (s, 1H, H_{ar}), 7.19-7.14 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 5.87 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.32-5.17 (ac, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.56 (ac, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.19 (q, J=7.2, 2H, CH₃CH₂O), 3.94 (s, 2H, COCH₂N), 3.54 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 3.00 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 1.26 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃CH₂O).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 169.6 (CO), 156.1 (CO), 135.0 (C_{ar}), 134.7 (C_{ar}), 133.0 (C_{ar}), 132.6 (OCH₂CH=CH₂), 131.8 (CH_{ar}), 129.3 (CH_{ar}), 127.2 (CH_{ar}), 117.7 (OCH₂CH=CH₂), 66.5 (OCH₂CH=CH₂), 61.2 (CH₃CH₂O), 49.5 (COCH₂N), 48.0 (CH₂CH₂N), 31.3 (CH₂CH₂N), 14.1 (CH₃CH₂O).

IR (film), ν (cm⁻¹): 3090-2877, 1748 (CO), 1708 (CO), 1521, 1472, 1410, 1379, 1237, 1197, 1179, 1099, 1050, 1028, 988, 956, 930, 863, 823, 770.

EM (m/z) 359 (M, 4), 314 (M-C₂H₅O, 6), 286 (M-C₃H₅O₂, 10), 274 (M-C₄H₅O₂, 8), 200 (M-C₇H₅Cl₂, pic base), 173 (M-C₈H₁₂NO₄, 20), 159 (M-C₉H₁₄NO₄, 25), 156 (M-C₇H₅Cl₂-C₂H₅O, 90), 128 (M-C₇H₅Cl₂-C₃H₅O₂, 35).

Anàlisi elemental per a C₁₆H₁₉Cl₂NO₄ Calculada: C, 53.35; H, 5.32; Cl, 19.68; N, 3.89

Determinada: C, 53.44; H, 5.40; Cl, 19.86; N, 3.92

Etotoxicarbonilmetil-2-(4'-fluorofenil)etilcarbammat d'al·lil (32)

TLC:	Hexà-AcOEt (5:1)	Rf=0.31
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃):	7.14 (ac, 2H, 2 x H _{ar}), 6.97 (ac, 2H, 2 x H _{ar}), 5.90 (m, 1H, OCH ₂ CH=CH ₂), 5.33-5.17 (ac, 2H, OCH ₂ CH=CH ₂), 4.59 (d, J=5.4 Hz, 2H, OCH ₂ CH=CH ₂), 4.18 (q, J=7.5, 2H, CH ₃ CH ₂ O), 3.89 (s, 2H, COCH ₂ N), 3.53 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ N), 2.84 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ N), 1.26 (t, J= 7.5 Hz, 3H, CH ₃ CH ₂ O).	
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃):	169.6 (CO), 161.5 (d, J=243 Hz, FC _{ar}), 156.1 (CO), 134.4 (C _{ar}), 132.6 (OCH ₂ CH=CH ₂), 130.1 (d, J=7.7 Hz, 2 x CH _{ar}), 117.5 (OCH ₂ CH=CH ₂), 115.4 (d, J=20.2 Hz, 2 x CH _{ar}), 66.3 (OCH ₂ CH=CH ₂), 61.2 (CH ₃ CH ₂ O), 50.8 (COCH ₂ N), 49.5 (CH ₂ CH ₂ N), 34.1 (CH ₂ CH ₂ N), 14.1 (CH ₃ CH ₂ O).	
IR (film), ν (cm⁻¹):	3077-2877, 1748 (CO), 1703 (CO), 1508, 1468, 1406, 1374, 1223, 1201, 1174, 1126, 1028, 988, 952, 925, 828, 770.	
EM (m/z)	309 (M, 3), 264 (M-C ₂ H ₅ O, 5), 236 (M-C ₃ H ₅ O ₂ , 18), 224 (M-C ₄ H ₅ O ₂ , 8), 200 (M-C ₇ H ₆ F, pic base), 156 (M-C ₇ H ₆ F-C ₂ H ₅ O, 90), 128 (M-C ₇ H ₆ F-C ₃ H ₅ O ₂ , 38), 123 (M-C ₈ H ₁₂ NO ₄ , 54), 109 (M-C ₉ H ₁₄ NO ₄ , 66).	
Anàlisi elemental per a C₁₆H₂₀FNO₄	Calculada: C, 62.12; H, 6.52; F, 6.14; N, 4.53 Determinada: C, 62.12; H, 6.64; F, 6.27; N, 4.52	

7.3.2.3. Procediment general per a l'obtenció de les *N*-alquilglicines protegides amb Alloc

En un matràs de 100 ml que contenia el corresponent carbamat d'al·lil (6 mmol) dissolt en 30 ml de dioxà, s'hi van afegir 5 ml d'una dissolució de NaOH 4 N. La mescla de reacció es va escalfar a 80 °C i es va mantenir en agitació durant 3 h. Passat aquest temps, el control de reacció realitzat per CG va mostrar la desaparició del producte de partida i es va procedir a fer el tractament de la reacció. Primerament, es va acidificar el medi mitjançant l'addició HCl (fins a tenir un pH<3) i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. A continuació, depenent del cas, es va realitzar un dels tractaments següents:

1) *En el cas de presentar una amina amb un nitrogen terciari en la cadena lateral (A6 i A22):* es va redissoldre el cru de reacció en 15 ml d'H₂O, es va congelar i es va liofilitzar. Seguidament, s'hi van afegir 10 ml de CHCl₃ sobre el residu liofilitzat, es va agitar, sonicar i filtrar. Aquest procés es va repetir fins a tres vegades. Les fraccions orgàniques es van ajuntar i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda per obtenir el sòlid corresponent al clorhidrat de les *N*-alquilglicines protegides amb Alloc amb un rendiment entre el 70-75%.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 173.2 (CO), 156.3 (CO), 139.0 (C_{ar}), 132.7 (OCH₂CH=CH₂), 128. 6 (2 x CH_{ar}), 128. 3 (2 x CH_{ar}), 126.6 (CH_{ar}), 117.6 (OCH₂CH=CH₂), 66.9 (OCH₂CH=CH₂), 51.1 (COCH₂N), 49.6 (CH₂CH₂NCO), 35.3 (CH₂CH₂NCO).

Anàlisi elemental per a $C_{14}H_{17}NO_4$ Calculada: C, 63.87; H, 6.51; N, 5.32

Determinada: C, 63.96; H, 6.54; N, 5.26

***N*-Aliloxicarbonil-*N*-(2'-(2'',4''-diclorofenil)etil)glicina (36)**

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 9.95 (sa, 1H, OH), 7.35 (s, 1H, H_{ar}), 7.17-7.10 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 5.85 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.30-5.16 (ac, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.52 (d, J=6 Hz, 2H, OCH₂CH=CH₂), 3.95 (s, 2H, COCH₂N), 3.53 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NCO), 2.95 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NCO).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 172.9 (CO), 156.7 (CO), 135.6 (C_{ar}), 135.0 (C_{ar}), 133.6 (C_{ar}), 132.8 (OCH₂CH=CH₂), 132.2 (CH_{ar}), 130.0 (CH_{ar}), 127.9 (CH_{ar}), 117.5 (OCH₂CH=CH₂), 67.3 (OCH₂CH=CH₂), 50.0 (COCH₂N), 49.6 (CH₂CH₂NCO), 32.9 (CH₂CH₂NCO).

Anàlisi elemental per a $C_{14}H_{15}Cl_2NO_4$ Calculada: C, 50.62; H, 4.55; Cl, 21.35; N, 4.22

Determinada: C, 50.74; H, 4.60; Cl, 21.28; N, 4.13

***N*-Alililoxicarbonil-*N*-(2'-(4''-fluorofenil)etil)glicina (37)**

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 9.91 (sa, 1H, OH), 7.13 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 6.97 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 5.88 (m, 1H, OCH₂CH=CH₂), 5.32-5.16 (ac, 2H, OCH₂CH=CH₂), 4.59 (d, J=4.5 Hz, 2H, OCH₂CH=CH₂) 3.93 (s, 2H, COCH₂N), 3.52 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 2.83 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂N).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 174.5 (CO), 161.6 (d, J= 241 Hz, FC_{ar}), 156.3 (CO), 134.1 (C_{ar}), 132.3 (OCH₂CH=CH₂), 130.1 (d, J=7.8 Hz, 2 x CH_{ar}), 117.7 (OCH₂CH=CH₂), 115.3 (d, J=21 Hz, 2 x CH_{ar}), 66.9 (OCH₂CH=CH₂), 50.1 (COCH₂N), 49.2 (CH₂CH₂NCO), 34.0 (CH₂CH₂NCO).

Anàlisi elemental per a $C_{14}H_{16}FNO_4$ Calculada: C, 59.78; H, 5.73; F, 6.75; N, 4.98

Determinada: C, 59.73; H, 5.71; F, 6.79; N, 4.98

7.3.2.4. Aplicació dels monòmers d'*N*-alquilglicines protegits amb el grup Alloc a la síntesi de peptoides

7.3.2.4.1. Síntesi del peptoide N22-6-16C (1)

En una xeringa de 10 ml que contenia 600 mg (0.70 mmol/g, 0.42 mmol) de resina de poliestirè AM RAM, s'hi van afegir 5 ml de DMF per realitzar l'inflat inicial de la resina. Una vegada eliminat el dissolvent, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc per tractament amb 4 ml d'una dissolució de piperidina al 20% (v/v) en DMF. La xeringa es va mantenir el agitació a t.a. durant 30 min. Passat aquest temps, es va eliminar el dissolvent i es va repetir l'operació. A continuació, es van realitzar els rentats de la resina amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml), DCM (3 x 5 ml).

Primera acilació: sobre la resina desprotegida i inflada amb DCM, s'hi va afegir una dissolució de 290 mg (2.1 mmol, 5 eq.) d'àcid bromoacètic en 4 ml d'una mescla DCM/DMF (2:1). Seguidament s'hi van afegir 320 µl (0.45 mmol, 5 eq.) de DIC i la xeringa es va mantenir en agitació a t.a. durant 30 min. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir el procés. En acabar, la resina es va rentar amb DCM (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DMF (3 x 5 ml). La desaparició de l'amina primària va ser comprovada mitjançant el test del TNBS, el qual va donar negatiu (incolor).

Primer acoblament d'amina: sobre la resina acilada, s'hi va afegir una dissolució de 305 µl (2.1 mmol, 5 eq.) d'amina **A16** en 4 ml de DMF. La xeringa es va mantenir en agitació a t.a. durant 3 h. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir el procés. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml). La presència d'una amina secundària es va comprovar mitjançant el test del cloranil, el qual va donar positiu (color verd).

Primer acoblament de monòmer: sobre la resina inflada amb DCM, s'hi va afegir una dissolució del monòmer corresponent a l'amina **A6** (268 mg, 1.05 mmol, 2.5 eq.) i DIC (320 µl, 0.45 mmol, 5 eq.) en una mescla DCM/DMF (2:1). La xeringa es va mantenir en agitació a t.a. durant 3 h. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir el procés. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml). El test del cloranil (incolor) va posar de manifest que l'acoblament s'havia produït correctament.

Desprotecció del grup Alloc: la xeringa es va tancar amb dos sèptums i s'hi va afegir una dissolució de Pd(PPh₃)₄ (48 mg, 0.04 mmol, 0.1 eq.) i PhSiH₃ (518 µl, 4.2 mmol, 10 eq.) en 4 ml de DCM anh. en contracorrent d'argó. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 30 min sota atmòsfera d'argó. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar i es va repetir el procés. En acabar, la resina es va rentar amb DCM (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DMF (3 x 5 ml). El test del cloranil (color verd) va posar de manifest la presència d'una amina secundària i, per tant, que la desprotecció havia tingut lloc satisfactòriament.

Segon acoblament de monòmer: es va realitzar de forma anàloga a l'explicat anteriorment però utilitzant el monòmer corresponent a l'amina **A22**.

Desprotecció del grup Alloc: es va procedir de forma anàloga a l'explicada anteriorment.

Finalment es va realitzar l'escissió del peptòide de la resina per tractament amb 7 ml de còctel d'escissió seguint el procediment estàndard. El tractament posterior va permetre l'obtenció d'un oli groguenc residual, el qual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 158 mg de residu amb una puresa del 84% per HPLC. El peptòide es va identificar per CL-EM.

La purificació d'aquest cru es va realitzar per HPLC a escala semipreparativa (vegeu condicions de purificació descrites a l'apartat 7.1 utilitzant la columna de tipus Kromasil 100 C₈ de 5 µm (20 x 250 mm) de Scharlau amb el programa: 10 min a 5% d'ACN, de 5% a 20% en 20 min, de 20% a 100% en 20 min i 10 min a 100% d'ACN) per obtenir 88 mg del peptòide **1** (rdt. 43%) amb una puresa superior al 98% per HPLC.

7.3.3. ESTRATÈGIA 3: SÍNTESI DE MONÒMERS PROTEGITS AMB NS

7.3.3.1. Procediment general per a l'obtenció de les *N*-alquil-2-nitrobenzen-sulfonamides

En un matràs de 100 ml que contenia la corresponent amina primària (**A6**, **A10**, **A13**, **A15**, **A16**, **A22** i **A37**) (20 mmol) dissolta en 50 ml de DCM, s'hi van afegir 2.7 ml (20 mmol, 1eq.) de trietilamina. El matràs es va refredar a 0 °C i s'hi va afegir 4.4 g (20 mmol, 1 eq.) de clorur de 2-nitrobenzensulfonil. Acabada l'addició, es va retirar el bany de gel i la mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 1 h. El control de reacció efectuat per HPLC va mostrar la desaparició del producte inicial i l'aparició d'un sol pic corresponent a l'*N*-alquil-2-nitrobenzensulfonamida desitjada. A continuació, depenent del cas, es va realitzar un dels tractaments següents:

1) *En el cas de presentar una amina amb un nitrogen terciari en la cadena lateral* (**A6**, **A16** i **A22**): el cru de reacció es va transvasar a un embut d'extracció i es van realitzar dos rentats, un primer amb 30 ml d'HCl 0.5 N i un segon amb 30 ml d'H₂O. Finalment, la fase orgànica es va assecar sobre MgSO₄ i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda per obtenir l'*N*-alquil-2-nitrobenzensulfonamida desitjada en forma d'oli marronós amb un rendiment superior al 90%.

2) *En el cas de no presentar una amina amb un nitrogen terciari en la cadena lateral* (**A10**, **A13**, **A15** i **A37**): el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda i es va obtenir un sòlid corresponent a l'*N*-alquil-2-nitrobenzensulfonamida amb un rendiment al voltant del 75% després de recristal·litzar-la de DCM/hexà.

***N*-[2'-(*N*'-Pirrolidinil)etil]-2-nitrobenzensulfonamida (38)**

TLC:	AcOEt-MeOH-Et ₃ N (5:1:0.01)	R _f =0.25
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	8.15 (ac, 1H, H _{ar}), 7.86 (ac, 1H, H _{ar}), 7.74 (ac, 2H, 2 x H _{ar}), 5.00 (sa, 1H, NH), 3.20 (t, J=6 Hz, 2H, NCH ₂ <u>CH</u> ₂ NH), 2.68 (t, J=6 Hz, 2H, NCH ₂ CH ₂ NH), 2.48 (t, J=7 Hz, 4H, 2 x CH ₂ <u>CH</u> ₂ N), 1.74 (ac, 4H, 2 x CH ₂ CH ₂ N).	
¹³C-RMN 125 MHz, CDCl₃):	147.2 (C _{ar}), 133.5 (CH _{ar}), 133.3 (C _{ar}), 132.6 (CH _{ar}), 131.2 (CH _{ar}), 125.2 (CH _{ar}), 53.7 (NCH ₂ CH ₂ NH), 53.4 (2 x CH ₂ <u>CH</u> ₂ N), 41.7 (NCH ₂ <u>CH</u> ₂ NH), 23.4 (2 x CH ₂ CH ₂ N).	
EM (m/z)	299 (M, 2), 186 (M-C ₆ H ₁₃ N ₂ , 5), 84 (M-C ₇ H ₇ N ₂ O ₄ S, pic base).	
IR (film), ν (cm⁻¹):	3326 (tensió NH), 3096 (tensió arC-H), 2965-2802 (tensió C-H), 1676 (flexió NH), 1541 (tensió NO ₂), 1346 (tensió SO ₂), 1169 (tensió SO ₂).	
EMAR per C₁₂H₁₈N₃O₄S	Calculada: 300.1018 (M+H) ⁺ Determinada: 300.1011	

***N*-[2'-(2''-*N*'-Metilpirrolidinil)etil]-2-nitrobenzensulfonamida (39)**

TLC:	AcOEt-MeOH-Et ₃ N (5:1:0.01)	R _f =0.05
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	8.11 (ac, 1H, H _{ar}), 7.83 (ac, 1H, H _{ar}), 7.73 (ac, 2H, 2 x H _{ar}), 3.23 (ac, 1H, CH ₂ <u>CH</u> ₂ NH), 3.16 (ac, 1H, CH ₂ <u>CH</u> ₂ NH), 3.10 (ac, 1H, NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 2.43 (ac, 1H, NCH ₂ CH ₂ CH ₂ <u>CH</u>), 2.32 (s, 3H, NCH ₃), 2.14 (ac, 1H, NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 1.84 (ac, 2H, CH ₂ CH ₂ NH), 1.65 (ac, 2H, NCH ₂ <u>CH</u> ₂ CH ₂ CH), 1.65-1.40 (ac, 2H, NCH ₂ CH ₂ <u>CH</u> ₂ CH).	
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):	148.0 (C _{ar}), 133.7 (C _{ar}), 133.2 (CH _{ar}), 132.4 (CH _{ar}), 130.8 (CH _{ar}), 125.0 (CH _{ar}), 64.2 (NCH ₂ CH ₂ CH ₂ <u>CH</u>), 56.8 (NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 40.5 (NCH ₃), 40.3 (CH ₂ <u>CH</u> ₂ NH), 28.8 (CH ₂ CH ₂ NH), 28.2 (NCH ₂ CH ₂ <u>CH</u> ₂ CH), 22.6 (NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH).	
EM (m/z)	313 (M, 2), 186 (M-C ₇ H ₁₅ N ₂ , 4), 127 (M-C ₆ H ₄ NO ₄ S, 4), 98 (M-C ₇ H ₇ N ₂ O ₄ S, 5), 84 (M-C ₈ H ₉ N ₂ O ₄ S, pic base).	
IR (film), ν (cm⁻¹):	3346 (tensió NH), 3097-3024 (tensió arC-H), 2970-2800 (tensió C-H), 1671 (flexió NH), 1538 (tensió NO ₂), 1338 (tensió SO ₂), 1162 (tensió SO ₂).	

EMAR per C₁₃H₂₀N₃O₄SCalculada: 314.1175 (M+H)⁺

Determinada: 314.1172

N*-(3'-Dietilaminoetil)-2-nitrobenzensulfonamida (40)*TLC:** AcOEt-MeOH-Et₃N (5:1:0.01) R_f=0.39**¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):** 8.14 (ac, 1H, H_{ar}), 7.87 (ac, 1H, H_{ar}), 7.75 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 5.02 (sa, 1H, NH), 3.09 (t, J=6 Hz, NCH₂CH₂NH), 2.55 (t, J=6 Hz, NCH₂CH₂NH), 2.39 (q, J=7.2 Hz, 4H, 2 x CH₃CH₂N), 0.90 (t, J=7.2 Hz, 6H, 2 x CH₃CH₂N).**¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):** 148.0 (C_{ar}), 133.5 (CH_{ar}), 133.3 (C_{ar}), 132.5 (CH_{ar}), 131.1 (CH_{ar}), 125.2 (CH_{ar}), 51.0 (CH₂CH₂NH), 46.2 (2 x CH₃CH₂N), 41.1 (CH₂CH₂NH), 11.5 (2 x CH₃CH₂N).**EM (m/z)** 301 (M, 2), 286 (M-CH₃, 4), 272 (M-C₂H₅, 4), 186 (M-C₆H₁₅N₂, 8), 86 (M-C₇H₇N₂O₄S, pic base).**IR (film), ν (cm⁻¹):** 3330 (tensió NH), 3096 (tensió arC-H), 2972-2817 (tensió C-H), 1593 (flexió NH), 1541 (tensió NO₂), 1350 (tensió SO₂), 1169 (tensió SO₂).**EMAR per C₁₂H₂₀N₃O₄S**Calculada: 302.1175 (M+H)⁺

Determinada: 302.1170

N*-(2'-Feniletil)-2-nitrobenzensulfonamida (41)*TLC:** Hexà-AcOEt (3:1) R_f=0.32**Pf:** 90-91 °C**¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):** 8.09 (ac, 1H, H_{ar}), 7.82 (ac, 1H, H_{ar}), 7.72 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 7.24 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 7.19 (ac, 1H, H_{ar}), 7.08 (d, J=7.5 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 5.34 (sa, 1H, NH), 3.39 (sa, 2H, CH₂CH₂NH), 2.84 (t, J=7 Hz, 2H, CH₂CH₂NH).**¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):** 147.8 (C_{ar}), 133.7 (C_{ar}), 133.5 (CH_{ar}), 132.8 (CH_{ar}), 130.9 (CH_{ar}), 128.7 (2 x CH_{ar}), 128.6 (2 x CH_{ar}), 126.9 (CH_{ar}), 125.4 (CH_{ar}), 45.0 (CH₂CH₂NH), 35.9 (CH₂CH₂NH).**EM (m/z)** 306 (M, 3), 215 (M-C₇H₇, 40), 186 (M-C₈H₁₀N, pic base), 91 (M-C₇H₇N₂O₄S, 68).

EMAR per C₁₄H₁₅N₂O₄S Calculada: 307.0753 (M+H)⁺
Determinada: 307.0744

TLC: Hexà-AcOEt (3:1) R_f=0.39

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 8.07 (ac, 1H, H_{ar}), 7.82 (ac, 1H, H_{ar}), 7.71 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 6.99 (d, J=8.5 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 6.75 (d, J=8.5 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 5.31 (t, J=6 Hz, 1H, NH), 3.76 (s, 3H, CH₃O), 3.34 (ac, 2H, CH₂CH₂NH), 2.77 (t, J=6.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NH).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 158.4 (C_{ar}), 147.8 (C_{ar}), 133.8 (C_{ar}), 133.4 (CH_{ar}), 132.8 (CH_{ar}), 130.9 (C_{ar}), 129.6 (2 x CH_{ar}), 129.2 (CH_{ar}), 125.4 (CH_{ar}), 114.1 (2 x CH_{ar}), 55.2 (CH₃O), 45.2 (CH₂CH₂NH), 35.0 (CH₂CH₂NH).

EM (m/z) 336 (M, 2), 186 (M-C₉H₁₂NO, 10), 121 (M-C₇H₇N₂O₄S, pic base), 91 (M-C₇H₇N₂O₄S-CH₃O, 10).

IR (KBr), ν (cm⁻¹): 3371 (tensió NH), 3096-3021 (tensió arC-H), 2979-2850 (tensió C-H), 1605 (flexió NH), 1540 (tensió NO₂), 1329 (tensió SO₂), 1239 (tensió arC-O-C), 1157 (tensió SO₂).

EMAR per C₁₅H₁₇N₂O₅S Calculada: 337.0858 (M+H)⁺
Determinada: 337.0850

TLC: Hexà-AcOEt (3:1) R_f=0.23

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 8.05 (dd, J₁=7 Hz, J₂= 2H, 1H, H_{ar}), 7.83 (dd, J₁=7 Hz, J₂= 2H, 1H, H_{ar}), 7.71 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 7.26 (s, 1H, H_{ar}), 7.11 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 5.40 (t, J=5.5 Hz, 1H, NH), 3.43 (ac, 2H, CH₂CH₂NH), 2.95 (t, J=7 Hz,

2H, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}}$).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3): 147.7 (C_{ar}), 136.5 (C_{ar}), 135.9 (C_{ar}), 134.6 (C_{ar}), 133.7 (C_{ar}), 133.5 (CH_{ar}), 132.9 (CH_{ar}), 132.0 (CH_{ar}), 130.7 (CH_{ar}), 129.4 (CH_{ar}), 127.2 (CH_{ar}), 125.4 (CH_{ar}), 43.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 33.5 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}}$).

EM (m/z) 375 (M, 1), 339 (M-Cl, 2), 215 (M-C₇H₅Cl₂, 75), 186 (C₈H₈Cl₂N, pic base), 159 (M-C₇H₇N₂O₄S, 30).

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3343 (tensió NH), 3089 (tensió arC-H), 2942-2886 (tensió C-H), 1591 (flexió NH), 1538 (tensió NO₂), 1335 (tensió SO₂), 1160 (tensió SO₂).

EMAR per C₁₄H₁₃Cl₂N₂O₄S Calculada: 374.9973 (M+H)⁺
Determinada: 374.9979

***N*-[2'-(4''-Fluorofenil)etil]-2-nitrobenzensulfonamida (44)**

TLC: Hexà-AcOEt (3:1) R_f=0.27

Pf: 94-95 °C

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): 8.07 (ac, 1H, H_{ar}), 7.83 (ac, 1H, H_{ar}), 7.72 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 7.05 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 6.90 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 5.34 (sa, 1H, NH), 3.37 (t, J=7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NH), 2.81 (t, J=7.5 Hz, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}}$).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3): 161.7 (d, J=243 Hz, FC_{ar}), 147.8 (C_{ar}), 133.7 (C_{ar}), 133.1 (C_{ar}), 133.5 (CH_{ar}), 132.8 (CH_{ar}), 130.8 (CH_{ar}), 130.1 (d, J=8 Hz, 2 x CH_{ar}), 125.4 (CH_{ar}), 115.5 (d, J=21 Hz, 2 x CH_{ar}), 45.0 (CH₂CH₂NH), 35.2 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}}$).

EM (m/z) 215 (M-C₇H₆F, 25), 186 (C₈H₉FN, pic base), 109 (M-C₇H₇N₂O₄S, 60).

IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3353 (tensió NH), 3094-3027 (tensió arC-H), 2942-2885 (tensió C-H), 1592 (flexió NH), 1543 (tensió NO₂), 1360 (tensió SO₂), 1169 (tensió SO₂).

EMAR per C₁₄H₁₄FN₂O₄S Calculada: 325.0658 (M+H)⁺
Determinada: 325.0649

7.3.3.2. Procediment general per a l'obtenció d'*N*-alquil-*N*-*tert*-butoxicarbonilmetil-2-nitrobenzensulfonamides

A una dissolució de la corresponent *N*-alquil-2-nitrobenzensulfonamida (10 mmol) en 50 ml de DMF se li van afegir 2.7 g (20 mmol, 2 eq.) de K₂CO₃. Seguidament, es van afegir a la mescla 1.1 ml (10 mmol, 1 eq.) de bromoacetat de *tert*-butil i la mescla es va deixar en agitació a t.a. durant 2 h. Finalitzada la reacció (control per HPLC), es van filtrar les sals i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. A continuació, depenent del cas, es va realitzar un dels tractaments següents:

1) *En el cas de presentar una amina amb un nitrogen terciari en la cadena lateral (A6, A16 i A22):* el cru de reacció es va redissoldre en 100 ml d'una mescla DCM/NaOH 1 N (1:1) i es va transvasar a un embut d'extracció, on es va realitzar dues extraccions amb DCM (2 x 50 ml). Finalment, la fase orgànica es va assecar amb MgSO₄ i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda per obtenir l'*N*-alquil-*N*-*tert*-butoxicarbonilmetil-2-nitrobenzensulfonamida desitjada en forma d'oli marronós amb un rendiment superior al 90%, excepte per al cas de l'amina **A16** on aquest va ser menor (86%).

2) *En el cas de no presentar una amina amb un nitrogen terciari en la cadena lateral (A10, A13, A15 i A37):* el cru de reacció es va redissoldre en 100 ml d'una mescla ^tBuOMe/H₂O (1:1) i es va transvasar a un embut d'extracció on es van realitzar dues extraccions amb ^tBuOMe (2 x 50 ml). Finalment, la fase orgànica es va assecar sobre MgSO₄ i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, per obtenir l'*N*-alquil-*N*-*tert*-butoxicarbonilmetil-2-nitrobenzensulfonamida desitjada en forma d'oli groc amb un rendiment superior al 90%.

N-*tert*-Butoxicarbonilmetil-*N*-[2'-(*N*'-pirrolidinil)etil]-2-nitrobenzensulfonamida (45)

TLC:	AcOEt-MeOH-Et ₃ N (10:1:0.01) R _f =0.40
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	8.10 (ac, 1H, H _{ar}), 7.68 (ac, 2H, 2 x H _{ar}), 7.61 (ac, 1H, H _{ar}), 4.23 (s, 2H, COCH ₂ N), 3.53 (t, J=7 Hz, 2H, NCH ₂ CH ₂ NSO ₂), 2.68 (t, J=7 Hz, 2H, NCH ₂ CH ₂ NSO ₂), 2.47 (ac, 4H, 2 x CH ₂ CH ₂ N), 1.73 (ac, 4H, 2 x CH ₂ CH ₂ N), 1.37 (s, 9H, 3 x CH ₃).
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):	167.9 (CO), 147.9 (C _{ar}), 133.6 (C _{ar}), 133.3 (CH _{ar}), 131.6 (CH _{ar}), 130.8 (CH _{ar}), 124.0 (CH _{ar}), 82.1 (C(CH ₃) ₃), 54.7 (COCH ₂ N), 54.0 (2 x CH ₂ CH ₂ N), 49.3 (NCH ₂ CH ₂ NSO ₂), 46.8 (NCH ₂ CH ₂ NSO ₂), 27.8 (3 x CH ₃), 23.4 (2 x CH ₂ CH ₂ N).
IR (film), ν (cm⁻¹):	3107-3087 (tensió arC-H), 2975-2796 (tensió C-H), 1740 (tensió CO), 1543 (tensió NO ₂), 1371 (tensió NO ₂), 1352 (tensió SO ₂), 1158 (tensió SO ₂).

EMAR per C₁₈H₂₈N₃O₆SCalculada: 414.1699 (M+H)⁺

Determinada: 414.1691

N*-tert-Butoxicarbonilmetil-*N*-(2'-(2''-*N*'-metilpirrolidinil)etil)-2-nitrobenzen-sulfonamida (46)*TLC:**AcOEt-MeOH-Et₃N (10:1:0.01) R_f=0.16**¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):**

8.09 (ac, 1H, H_{ar}), 7.69 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 7.61 (ac, 1H, H_{ar}), 4.18 (s, 2H, COCH₂N), 3.44 (t, J=7.3 Hz, 2H, CH₂CH₂NSO₂), 3.05 (t, J=7 Hz, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 2.26 (s, 3H, NCH₃), 2.14 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH₂CH), 1.94 (ac, 2H, CH₂CH₂NSO₂), 1.70 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH₂CH), 1.50-1.40 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH₂CH), 1.38 (s, 9H, 3 x CH₃).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):

167.6 (CO), 147.9 (C_{ar}), 133.5 (C_{ar}), 133.4 (CH_{ar}), 131.6 (CH_{ar}), 130.8 (CH_{ar}), 124.0 (CH_{ar}), 82.3 (C(CH₃)₃), 63.4 (NCH₂CH₂CH₂CH), 57.0 (NCH₂CH₂CH₂CH), 48.3 (COCH₂N), 45.6 (CH₂CH₂NSO₂), 40.3 (NCH₃), 31.5 (NCH₂CH₂CH₂CH), 30.3 (CH₂CH₂NSO₂), 27.9 (3 x CH₃), 21.9 (NCH₂CH₂CH₂CH).

IR (film), ν (cm⁻¹):

3097-3073 (tensió arC-H), 2972-2780 (tensió C-H), 1744 (tensió CO), 1544 (tensió NO₂), 1371 (tensió NO₂), 1351 (tensió SO₂), 1160 (tensió SO₂).

EMAR per C₁₉H₃₀N₃O₆SCalculada: 428.1855 (M+H)⁺

Determinada: 428.1842

N*-tert-Butoxicarbonilmetil-*N*-(2'-dietilaminoetil)-2-nitrobenzensulfonamida (47)*TLC:**AcOEt-MeOH-Et₃N (10:1:0.01) R_f=0.53**¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):**

8.09 (ac, 1H, H_{ar}), 7.68 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 7.60 (ac, 1H, H_{ar}), 4.23 (s, 2H, COCH₂N), 3.47 (t, J=6.8 Hz, 2H, NCH₂CH₂NSO₂), 2.63 (t, J=6.8 Hz, 2H, NCH₂CH₂NSO₂), 2.48 (q, J=7.2 Hz, 4H, 2 x CH₃CH₂N), 1.37 (s, 9H, 3 x CH₃), 0.98 (t, J=7.2 Hz, 6H, 2 x CH₃CH₂N).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):

168.0 (CO), 147.9 (C_{ar}), 133.6 (C_{ar}), 133.3 (CH_{ar}), 131.6 (CH_{ar}), 130.7 (CH_{ar}), 124.0 (CH_{ar}), 82.0 (C(CH₃)₃), 52.2 (COCH₂N), 49.5 (NCH₂CH₂NSO₂), 47.2 (2 x CH₃CH₂N), 46.2 (NCH₂CH₂NSO₂), 27.8 (3 x CH₃), 11.8 (2 x CH₃CH₂N).

EMAR per C₁₈H₃₀N₃O₆S Calculada: 416.1855 (M+H)⁺
Determinada: 416.1850

EMAR per $C_{20}H_{25}N_2O_6S$ Calculada: 421.1433 (M+H)⁺
Determinada: 421.1441

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 167.7 (CO), 158.3 (C_{ar}), 147.9 (C_{ar}), 133.6 (C_{ar}), 133.3 (CH_{ar}), 131.6 (CH_{ar}), 130.8 (CH_{ar}), 129.8 (C_{ar}), 129.7 (2 x CH_{ar}), 124.0 (CH_{ar}), 114.0 (2 x CH_{ar}), 82.3 (C(CH₃)₃), 55.2 (CH₃O), 50.1 (COCH₂N), 49.0

(CH₂CH₂NSO₂), 33.8 (CH₂CH₂NSO₂), 27.9 (3 x CH₃).

IR (film), ν (cm^{-1}): 3093-3005 (tensió arC-H), 2980-2834 (tensió C-H), 1741 (tensió CO), 1540 (tensió NO₂), 1369 (tensió NO₂), 1348 (tensió SO₂), 1248 (tensió C-O-C), 1168 (tensió SO₂).

EMAR per $C_{21}H_{27}N_2O_7S$

Calculada:	451.1539 (M+H) ⁺
Determinada:	421.1543

***N*-tert-Butoxicarbonilmetil-*N*-[2'-(2'',4''-diclorofenil)etil]-2-nitrobenzen-sulfonamida (50)**

TLC: Hexà-AcOEt (3:1) R_f=0.36

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 8.03 (d, J=7.4 Hz, 1H, H_{ar}), 7.65 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 7.58 (d, J=7.4 Hz, 1H, H_{ar}), 7.26 (s, 1H, H_{ar}), 7.15 (d, J=8 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 7.09 (d, J=8 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 4.11 (s, 2H, COCH₂N), 3.61 (t, J=7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂NSO₂), 2.98 (t, J=7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂NSO₂), 1.40 (s, 9H, 3 x CH₃).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 167.6 (CO), 147.7 (C_{ar}), 139.2 (C_{ar}), 134.5 (C_{ar}), 133.9 (C_{ar}), 133.4 (CH_{ar}), 133.3 (C_{ar}), 132.1 (CH_{ar}), 131.7 (CH_{ar}), 130.9 (CH_{ar}), 129.3 (CH_{ar}), 127.3 (CH_{ar}), 124.1 (CH_{ar}), 82.5 (C(CH₃)₃), 48.8 (COCH₂N), 47.7 (CH₂CH₂NSO₂), 31.9 (CH₂CH₂NSO₂), 27.9 (3 x CH₃).

IR (film), ν (cm⁻¹): 3094-3008 (tensió arC-H), 2984-2870 (tensió C-H), 1743 (tensió CO), 1541 (tensió NO₂), 1368 (tensió NO₂), 1351 (tensió SO₂), 1167 (tensió SO₂).

EMAR per C₂₀H₂₃Cl₂N₂O₆S Calculada: 489.0654 (M+H)⁺
Determinada: 489.0643

***N*-tert-Butoxicarbonilmetil-*N*-[2'-(4''-fluorofenil)etil]-2-nitrobenzensulfonamida (51)**

TLC: Hexà-AcOEt (3:1) $R_f=0.27$

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 8.01 (d, J=7.2 Hz, 1H, H_{ar}), 7.65 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 7.58 (d, J=7.2 Hz, 1H, H_{ar}), 7.11 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 6.92 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 4.04 (s, 2H, COCH₂N), 3.61 (t, J=7.6 Hz, 2H, CH₂CH₂NSO₂), 2.86 (t, J=7.6 Hz, 2H, CH₂CH₂NSO₂), 1.38 (s, 9H, 3 x CH₃).

7.3.3.3. Procediment general per a l'obtenció de les *N*-alquilglicines protegides amb el grup Ns

***N*-(2'-Nitrobenzensulfonil)-*N*-(2''-(*N*''-pirrolidinil)etil)glicina (52)**

147

***N*-(2'-Nitrobenzensulfonil)-*N*-(2'-(2''-*N*'-metilpirrolidinil)etil)glicina (53)**

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 8.07 (dd, $J_1=7.5$ Hz, $J_2=2$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.82 (ac, 2H, H_{ar}), 7.77 (dd, $J_1=7.5$ Hz, $J_2=2$ Hz, 1H, H_{ar}), 4.22 (s, 2H, COCH₂N), 3.67 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 3.57 (ac, 2H, CH₂CH₂NSO₂), 3.45 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 3.16 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 2.94 (s, 3H, NCH₃), 2.49 (ac, 1H, CH₂CH₂NSO₂), 2.32 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 2.16-2.02 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH₂CH), 1.79 (ac, 2H, 1H de CH₂CH₂NSO₂ i 1H de NCH₂CH₂CH₂CH).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 172.4 (CO), 149.6 (C_{ar}), 135.6 (CH_{ar}), 133.3 (CH_{ar}), 133.2 (C_{ar}), 131.6 (CH_{ar}), 125.5 (CH_{ar}), 68.0 (NCH₂CH₂CH₂CH), 57.3 (NCH₂CH₂CH₂CH), 50.0 (COCH₂N), 47.9 (CH₂CH₂NSO₂), 40.1 (NCH₃), 30.7 (NCH₂CH₂CH₂CH), 30.3 (CH₂CH₂NSO₂), 22.5 (NCH₂CH₂CH₂CH).

EMAR per C₁₅H₂₂N₃O₆S Calculada: 372.1229 (M+H)⁺

Determinada: 372.1237

***N*-(2'-Nitrobenzensulfonil)-*N*-(2''-dietilaminoetil)glicina(54)**

¹H-RMN (500 MHz, D₂O): 7.96 (d, $J=7.5$ Hz, H_{ar}), 7.82-7.76 (ac, 3H, 3 x H_{ar}), 4.24 (s, 2H, COCH₂N), 3.77 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, NCH₂CH₂NSO₂), 3.38 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, NCH₂CH₂NSO₂), 3.24 (ac, 4H, 2 x CH₃CH₂N), 1.24 (t, $J=7$ Hz, 6H, 2 x CH₃CH₂N).

¹³C-RMN (125 MHz, D₂O): 172.9 (CO), 147.5 (C_{ar}), 135.6 (CH_{ar}), 133.2 (CH_{ar}), 130.2 (C_{ar}), 130.1 (CH_{ar}), 125.2 (CH_{ar}), 52.2 (COCH₂N), 50.1 (NCH₂CH₂NSO₂), 46.5 (2 x CH₃CH₂N), 45.7 (NCH₂CH₂NSO₂), 8.0 (2 x CH₃CH₂N).

EMAR per C₁₄H₂₂N₃O₆S Calculada: 360.1229 (M+H)⁺

Determinada: 360.1222

***N*-(2'-Nitrobenzensulfonil)-*N*-(2''-feniletil)glicina (55)**

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 8.00 (dd, $J_1=7.5$ Hz, $J_2=2$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.65 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 7.59 (dd, $J_1=7.5$ Hz, $J_2=1.5$ Hz, 1H, H_{ar}), 7.23 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 7.17 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 7.13 (d, $J=7$ Hz, 1H, H_{ar}), 4.15 (s, 2H, COCH₂N), 3.61 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH₂CH₂NSO₂), 2.86 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH₂CH₂NSO₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 173.6 (CO), 147.7 (C_{ar}), 137.6 (C_{ar}), 133.7 (CH_{ar}), 133.0 (C_{ar}), 131.8 (CH_{ar}), 130.8 (CH_{ar}), 128.7 (2 x CH_{ar}), 128.6 (2 x CH_{ar}), 126.8 (CH_{ar}), 124.3 (CH_{ar}), 50.1 (COCH₂N), 48.1 (CH₂CH₂NSO₂), 34.7 (CH₂CH₂NSO₂).

EMAR per C₁₆H₁₇N₂O₆SCalculada: 365.0807 (M+H)⁺

Determinada: 365.0799

***N*-(2'-Nitrobenzensulfonil)-*N*-(2''-(4'''-metoxifenil)etil)glicina (56)**

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.99 (dd, J₁=7.5 Hz, J₂=1.5 Hz, 1H, H_{ar}), 7.65 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 7.59 (dd, J₁=7.5 Hz, J₂=1.5 Hz, 1H, H_{ar}), 7.04 (d, J=8.5 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 6.75 (d, J=8.5 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 4.15 (s, 2H, COCH₂N), 3.76 (s, 3H, CH₃O), 3.58 (t, J=7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NSO₂), 2.80 (t, J=7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NSO₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 173.5 (CO), 158.3 (C_{ar}), 147.6 (C_{ar}), 133.5 (C_{ar}), 133.1 (C_{ar}), 131.8 (CH_{ar}), 130.8 (CH_{ar}), 129.7 (2 x CH_{ar}), 129.5 (CH_{ar}), 124.2 (CH_{ar}), 114.0 (2 x CH_{ar}), 50.2 (COCH₂N), 48.0 (CH₂CH₂NSO₂), 33.7 (CH₂CH₂NSO₂).

EMAR per C₁₇H₁₉N₂O₇SCalculada: 395.0913 (M+H)⁺

Determinada: 395.0910

***N*-(2'-Nitrobenzensulfonil)-*N*-(2''-(2''',4'''-diclorofenil)etil)glicina (57)**

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 8.00 (dd, J₁=8 Hz, J₂=1 Hz, 1H, H_{ar}), 7.72-7.60 (ac, 3H, 3 x H_{ar}), 7.23 (s, 1H, H_{ar}), 7.13 (d, J=8 Hz, 1H, H_{ar}), 7.07 (d, J=8 Hz, 1H, H_{ar}), 4.25 (s, 2H, COCH₂N), 3.62 (t, J=7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NSO₂), 2.97 (t, J=7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NSO₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 174.1 (CO), 147.5 (C_{ar}), 134.4 (C_{ar}), 133.8 (CH_{ar}), 133.7 (C_{ar}), 133.4 (C_{ar}), 132.9 (C_{ar}), 132.1 (CH_{ar}), 131.9 (CH_{ar}), 130.9 (CH_{ar}), 129.3 (CH_{ar}), 127.3 (CH_{ar}), 124.4 (CH_{ar}), 48.0 (COCH₂N), 47.8 (CH₂CH₂NSO₂), 31.8 (CH₂CH₂NSO₂).

EMAR per C₁₆H₁₅Cl₂N₂O₆SCalculada: 433.0028 (M+H)⁺

Determinada: 433.0019

***N*-(2'-Nitrobenzensulfonil)-*N*-(2''-(4'''-fluorofenil)etil)glicina (58)**

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.97 (dd, J₁=8 Hz, J₂=1.5 Hz, 1H, H_{ar}), 7.70-7.59 (ac, 3H, 3 x H_{ar}), 7.08 (t, J=7.6 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 6.89 (t, J=7.6 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 4.16

(s, 2H, COCH_2N), 3.59 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NSO}_2$), 2.84 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NSO}_2$).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3): 173.5 (CO), 161.6 (d, $J=243$ Hz, FC_{ar}), 147.6 (C_{ar}), 133.7 (CH_{ar}), 133.2 (C_{ar}), 133.0 (C_{ar}), 131.8 (CH_{ar}), 130.8 (CH_{ar}), 130.2 (d, $J=7.75$ Hz, 2 x CH_{ar}), 124.3 (CH_{ar}), 115.4 (d, $J=21.1$ Hz, 2 x CH_{ar}), 50.1 (COCH_2N), 48.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NSO}_2$), 33.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NSO}_2$).

EMAR per $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{FN}_2\text{O}_6\text{S}$

Calculada: 383.0713 (M+H)⁺

Determinada: 383.0707

7.3.3.4. Aplicació dels monòmers d'*N*-alquilglicines protegits amb el grup Ns a la síntesi de peptoides

7.3.3.4.1. Síntesi del peptoide model N10-37-15C (**59**)

Es va preparar una xeringa de 5 ml que contenia 210 mg (0.79 mmol/g, 0.17 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Després de l'inflat inicial de la resina, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc seguint el procediment estàndard descrit a l'apartat 7.2.3.

Primera acoblament de monòmer: sobre la resina desprotegida i inflada amb DCM, s'hi va afegir una dissolució de 220 mg (0.51 mmol, 3 eq.) del monòmer corresponent a l'amina **A15** en 3 ml d'una mescla DCM/DMF (2:1). Seguidament s'hi van afegir 130 μl (0.85 mmol, 5 eq.) de DIC i la xeringa es va mantenir en agitació a t.a. durant 1 h. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir el procés. En acabar, la resina es va rentar amb DCM (3 x 3 ml), iPrOH (3 x 3 ml) i DMF (3 x 3 ml). La desaparició de l'amina primària va ser comprovada mitjançant el test del TNBS (incolor) i per espectroscòpia d'IR.

Desprotecció del grup Ns: sobre la resina inflada amb DMF, s'hi va afegir una dissolució de 87 μl (0.85 mmol, 5 eq.) tiofenol i 127 μl (0.85 mmol, 5 eq.) de DBU en 3 ml de DMF. La xeringa es va mantenir en agitació a t.a. durant 30 min. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir el procés. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 3 ml), iPrOH (3 x 3 ml) i DCM (3 x 3 ml). La presència d'una amina secundària es va comprovar mitjançant el test del cloranil (color verd), el control de reacció realitzat per HPLC i el control per espectroscòpia d'IR.

Segon acoblament de monòmer: es va procedir de forma anàloga al primer acoblament, utilitzant en aquest cas el monòmer corresponent a l'amina **A37** i fent el control de reacció mitjançant el test del cloranil (incolor), per HPLC i per espectroscòpia d'IR.

Desprotecció del grup Ns: es va procedir de forma anàloga a l'explicada anteriorment.

Tercer acoblament de monòmer: es va realitzar de forma anàloga a les anteriors, utilitzant en aquest cas el monòmer corresponent a l'amina **A10**.

Desprotecció del grup Ns: es va procedir de forma anàloga a les dues anteriors.

Escissió de la resina: es va dur a terme seguint el procediment estàndard descrit a l'apartat 7.2.3. Finalment, l'oli groguenc residual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 75 mg de residu (rdt. 78%) corresponent al peptòide **59** amb una puresa del 93% per HPLC. La identificació del peptòide es va confirmar per CL-EM.

**[*N*-(2-Feniletil)glicil]-[*N*-(2-(4'-fluorofenil)etil)glicil]-*N*-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida
N10-37-15C (**59**)**

CL-EM 587.2, 589.2, 591.2 (M+H, Cl₂)⁺

7.3.3.4.2. Síntesi del peptòide N22-6-16C (1**)**

Es va preparar una xeringa de 3 ml que contenia 100 mg (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Després de l'inflat inicial de la resina, es va procedir a realitzar la desprotecció del grup Fmoc, la primera acilació i la primera aminació (**A16**) seguint el procediment estàndard descrit a l'apartat 7.2.3 (canviant l'àcid cloroacètic per l'àcid bromoacètic en l'etapa d'acilació).

Primera acoblament de monòmer: sobre la resina inflada amb DCM, s'hi va afegir una dissolució de 86 mg (0.24 mmol, 3 eq.) del monòmer corresponent a l'amina **A6** en 2 ml d'una mescla DCM/DMF (2:1). Seguidament s'hi van afegir 60 µl (0.4 mmol, 5 eq.) de DIC i la xeringa es va mantenir en agitació a t.a. durant 1 h. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i el procés es va repetir. En acabar, la resina es va rentar amb DCM (3 x 3 ml), iPrOH (3 x 3 ml) i DMF (3 x 3 ml). No obstant, el test del cloranil realitzat va donar positiu (color verd), posant de manifest la presència d'una amina secundària i, per tant, que l'acoblament no s'havia produït. La confirmació d'aquest extrem es va obtenir per CL-EM on es va poder observar com a pic majoritari el corresponent a la 2-(2'-(*N*'-metilpirrolidin-2"-il)etilamino)acetamida de partida. Com a alternativa, es va procedir a afegir una dissolució de 86 mg (0.24 mmol, 3 eq.) del monòmer corresponent a l'amina **A6**, 166 mg (0.32 mmol, 4 eq.) de PyBOP i 82 µl (0.48 mmol, 6 eq.) de DIEA en 2 ml d'una mescla DCM/DMF (2:1). La mescla es va deixar en agitació a t.a. durant 2 h. Després d'eliminar l'excés de reactius i fer els corresponents rentats de la resina, es va fer el test del cloranil. El resultat va ser novament positiu (color verd), posant de manifest que l'acoblament no s'havia produït.

7.3.3.4.3. Estudi de les condicions d'acoblament de monòmers d'*N*-alquilglicines d'amines amb un nitrogen terciari en la cadena lateral

Es va preparar una xeringa de 10 ml que contenia 320 mg (0.79 mmol/g, 0.25 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Després de l'inflat inicial de la resina, es va procedir a realitzar la desprotecció del grup Fmoc, la primera acilació i la primera aminació (**A15**) seguint el procediment estàndard descrit a l'apartat 7.2.3 (canviant l'àcid cloroacètic per l'àcid bromoacètic en l'etapa d'acilació). Després dels rentats de la resina, aquesta es va deixar assecar i es va repartir entre 8 xeringues de 3 ml (40 mg de resina/xeringa). A continuació, es van agafar les xeringues per parelles i s'hi va afegir una de les quatre dissolucions següents:

- 1) 34 mg (0.09 mmol, 3 eq.) de monòmer corresponent a l'amina **A22**, 316 µl (0.16 mmol, 5 eq.) d'HOAt i 25 µl (0.16 mmol, 5 eq.) de DIC en 800 µl de DMF.
- 2) 34 mg (0.09 mmol, 3 eq.) de monòmer corresponent a l'amina **A22**, 21.3 mg (0.16 mmol, 5 eq.) d'HOBt, 82.2 mg (0.16 mmol, 5 eq.) de PyBOP i 27 µl (0.16 mmol, 5 eq.) de DIEA en 800 µl de DMF.
- 3) 34 mg (0.09 mmol, 3 eq.) de monòmer corresponent a l'amina **A22**, 60 mg (0.16 mmol, 5 eq.) d'HATU i 27 µl (0.16 mmol, 5 eq.) de DIEA en 800 µl de DMF.
- 4) 34 mg (0.09 mmol, 3 eq.) de monòmer corresponent a l'amina **A22**, 21.3 mg (0.16 mmol, 5 eq.) d'HOBt i 25 µl (0.16 mmol, 5 eq.) de DIC en 800 µl de DMF.

Les xeringues es van mantenir en agitació a t.a. durant 1 h (una xeringa de cadascuna de les parelles) o durant 12 h (la resta de xeringues) sense realitzar duplicats. En acabar, es van realitzar els rentats amb DMF (3 x 2 ml), iPrOH (3 x 2 ml) i DCM (3 x 2 ml). Finalment, es va agafar una mostra de resina de cadascuna de les xeringues, es va realitzar l'escissió de la resina i es va analitzar els residu obtingut per HPLC. Els resultats d'aquest anàlisi s'han mostrat en la Taula 4.1 de l'apartat 4.4.4.3.

7.3.3.4.4. Síntesi dels peptoides model N22-22-15C (**22**) i N16-22-15C (**60**)

Es va ajuntar la resina de les vuit xeringues utilitzades en l'estudi anterior en una única xeringa de 10 ml i es va realitzar el duplicat de l'acoblament del monòmer corresponent a l'amina **A22**.

Primer acoblament de monòmer: sobre la resina inflada amb DMF, s'hi va afegir una dissolució de 273 mg (0.76 mmol, 3 eq.) de monòmer corresponent a l'amina **A22**, 479 mg (1.26 mmol, 5 eq.) d'HATU i 215 µl (1.26 mmol, 5 eq.) de DIEA en 4 ml de DMF. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 1.5 h. Passat aquest temps, es va eliminar l'excés de reactius i es va procedir a realitzar els rentats de la resina amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml). El test del cloranil va donar negatiu (incolor), posant de manifest que l'acoblament s'havia produït satisfactòriament.

Desprotecció del grup Ns: sobre la resina inflada amb DMF, s'hi va afegir una dissolució de 130 µl (1.26 mmol, 5 eq.) tiofenol i 188 µl (1.26 mmol, 5 eq.) de DBU en 4 ml de DMF. La xeringa es va mantenir en agitació a t.a. durant 30 min. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir el procés. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml). La presència d'una amina secundària es va comprovar mitjançant el test del cloranil (color verd) i el control de reacció realitzat per HPLC.

Seguidament, la resina es va separar en dues xeringues de 5 ml (~ 160 mg de resina/xeringa) i es va continuar la síntesi en paral·lel dels dos peptoides.

Segon acoblament de monòmer: es va procedir de forma anàloga a l'anterior tot escalant les quantitats de reactius i dissolvent a la meitat i utilitzant respectivament el monòmer corresponent a l'amina **A22** per a la síntesi del peptoid N22-22-15C i el monòmer corresponent a l'amina **A16** per a la síntesi del peptoid N16-22-15C. La reacció d'acoblament es va fer duplicat en cadascun dels casos. En acabar, es va realitzar el test del cloranil i el resultat va ser negatiu (incolor), posant de manifest que l'acoblament s'havia produït satisfactòriament. Aquest resultat es va comprovar també per HPLC.

Desprotecció del grup Ns: es va procedir de forma anàloga a l'anterior tot escalant novament les quantitat de reactius i dissolvent a la meitat.

Escissió de la resina: es va dur a terme seguint el procediment estàndard descrit a l'apartat 7.2.3. Finalment, els olis groguencs residuals es van redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es van liofilitzar, per obtenir 49 i 55 mg de residu (79% i 75% de puresa per HPLC) corresponents als peptoides **22** i **61** respectivament.

La purificació d'aquests crus de reacció es va realitzar per HPLC a escala semipreparativa (vegeu condicions de purificació descrites a l'apartat 7.1 utilitzant la columna X-Terra[®] C₁₈ de 5 µm (10 x 150 mm) de Waters amb el programa: 2 min a 10% d'ACN, de 10% a 100% en 20 min i 5 min a 100% d'ACN) per obtenir 19.8 mg del peptoid **22** (rdt. 30%) i 21.6 mg del peptoid **61** (rdt. 30%), ambdós amb una puresa superior al 98% per HPLC. La identificació dels peptoides es va confirmar per CL-EM.

[N-(2-(1'-Metil-2'-pirrolidinil)etil)glicil]-[N-(2-dietilaminoetil)glicil]-N-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida

N16-22-15C (60)

CL-EM

571.3, 573.3, 575.3 (M+H, Cl₂)⁺

7.3.3.4.5. Síntesi del peptòide N22-6-16C (**1**)

Es va preparar una xeringa de 3 ml que contenia 100 mg (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Després de l'inflat inicial de la resina, es va procedir a realitzar la desprotecció del grup Fmoc, la primera acilació i la primera aminació (**A16**) seguint el procediment estàndard descrit a l'apartat 7.2.3 (canviant l'àcid cloroacètic per l'àcid bromoacètic en l'etapa d'acilació).

Primer acoblament de monòmer: sobre la resina inflada amb DMF, s'hi va afegir una dissolució de 84 mg (0.24 mmol, 3 eq.) del monòmer corresponent a l'amina **A6**, 150 mg (0.39 mmol, 5 eq.) d'HATU i 68 µl (0.39 mmol, 5 eq.) de DIEA en 1.5 ml de DMF. La mescla es va mantenir en agitació a t.a. durant 1.5 h. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir el procés. En acabar, es van realitzar els rentats de la resina amb DMF (3 x 2 ml), iPrOH (3 x 2 ml) i DCM (3 x 2 ml). El test del cloranil va donar lleugerament positiu (color verd) i, per tant, es va fer un tercer acoblament en les mateixes condicions deixant la xeringa en agitació durant tota la nit (12 h). Aleshores es van realitzar els rentats de la resina de forma anàloga a l'explicada anteriorment i es va fer el test del cloranil. El resultat, en aquesta ocasió, va ser negatiu (incolor) posant de manifest que l'acoblament s'havia produït satisfactòriament.

Desprotecció del grup Ns: sobre la resina inflada amb DMF, s'hi va afegir una dissolució de 40 µl (0.39 mmol, 5 eq.) de tiofenol i 60 µl (0.39 mmol, 5 eq.) de DBU en 1.5 ml de DMF. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 30 min. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir el procés. En acabar, es van realitzar els rentats de la resina amb DMF (3 x 2 ml), iPrOH (3 x 2 ml) i DCM (3 x 2 ml). El test del cloranil va donar positiu (color verd) posant de manifest la presència d'una amina secundària. La confirmació que la desprotecció havia estat quantitativa es va obtenir mitjançant el control de reacció realitzat per HPLC.

Segon acoblament de monòmer: es va procedir de forma anàloga al primer acoblament, utilitzant en aquest cas el monòmer corresponent a l'amina **A22**. Després de realitzar el duplicat, es van fer els corresponents rentats i el test del cloranil, el qual va donar un resultat negatiu (incolor).

Desprotecció del grup Ns: es va realitzar de forma anàloga a l'explicada anteriorment.

Escissió de la resina: es va dur a terme seguint el procediment estàndard descrit a l'apartat 7.2.3. Finalment, l'oli groguenc residual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 34 mg de residu corresponents al peptòide **1**.

La purificació d'aquest cru de reacció es va realitzar per HPLC a escala semipreparativa (vegeu condicions de purificació descrites a l'apartat 7.1 utilitzant la columna X-Terra[®] C₁₈ de 5 µm (10 x 150 mm) de Waters amb el programa: 2 min a 5% d'ACN, de 5% a 100% en

20 min i 5 min a 100% d'ACN) per obtenir 11.3 mg del peptòide **1** (rdt. 29%) amb una puresa superior al 98% per HPLC. La identificació del peptòide es va confirmar per CL-EM.

7.4. DETERMINACIÓ ESTRUCTURAL DEL COMPOST DE PM-14

7.4.1. EXPERIMENTS BASATS EN LA SÍNTESI DE PEPTOIDES. SÈRIES 1, 2, 3 I 4

La síntesi dels peptòides de les quatre sèries es va dur a terme seguint el procediment descrit a l'apartat 7.2.3, utilitzant xeringues de 3 ml que contenien 150 mg (0.75 mmol/g, 0.11 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Un cop acabada la síntesi i escindit el peptòide de la resina, es va dur a terme l'anàlisi de cadascun dels crús de reacció, sense purificar, per CL-EM. Aquesta anàlisi va ser suficient per identificar els peptòides sintetitzats, no essent necessària la seva caracterització per RMN.

7.4.1.1. Sèrie 1

[*N*-(2-Dimetilaminoetil)glicil]-[*N*-(2-(1'-pirrolidinil)etil)glicil]-*N*-[2-(1'-metil-2'-pirrolidinil)etil]glicinamida

N23-6-16C (61)

CL-EM: 468.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(2-(1'-pirrolidinil)etil)glicil]-*N*-[2-(1'-metil-2'-pirrolidinil)etil]glicinamida

N6-6-16C (62)

CL-EM: 494.4 (M+H)⁺

7.4.1.2. Sèrie 2

[*N*-(2-Dietilaminoetil)glicil]-[*N*-(2-(1'-pirrolidinil)etil)glicil]-*N*-[2-(1'-pirrolidinil)etil]glicinamida

N22-6-6C (63)

CL-EM: 482.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-Pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(2-dietilaminoetil)glicil]-*N*-[2-(1'-metil-2'-pirrolidinil)etil]glicinamida

N6-22-16C (64)

CL-EM: 496.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-Metil-2'-pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(2-(1'-pirrolidinil)etil)glicil]-*N*-[2-dietilaminoetil]glicinamida

N16-6-22C (65)

CL-EM: 496.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-Dietilaminopropil)glicil]-[*N*-(2-(1'-pirrolidinil)etil)glicil]-*N*-[2-(1'-metil-2'-pirrolidinil)etil]glicinamida

N19-6-16C (66)

CL-EM: 510.4 (M+H)⁺

7.4.1.3. Sèrie 3

[*N*-(2-Dietilaminoetil)glicil]-[*N*-(2-(1'-pirrolidinil)etil)glicil]-*N*-(2-feniletil)glicinamida

N22-6-10C (67)

CL-EM: 489.2 (M+H)⁺

[*N*-(2-Dietilaminoetil)glicil]-[*N*-(2-feniletil)glicil]-*N*-[2-(1'-pirrolidinil)etil]glicinamida

N22-10-6C (68)

CL-EM: 489.2 (M+H)⁺

[*N*-(2-Dietilaminoetil)glicil]-[*N*-(2-feniletil)glicil]-*N*-(2-feniletil)glicinamida

N22-10-10C (69)

CL-EM: 496.3 (M+H)⁺

[*N*-(2-Dietilaminoetil)glicil]-[*N*-(2-dietilaminoetil)glicil]-*N*-(2-feniletil)glicinamida

N22-22-10C (70)

CL-EM: 491.4 (M+H)⁺

7.4.1.4. Sèrie 4

[*N*-(2-Dietilaminoetil)glicil]-[*N*-(2-dietilaminoetil)glicil]-*N*-[2-(1'-pirrolidinil)etil]glicinamida

N22-22-6C (71)

CL-EM: 484.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-Dietilaminoetil)glicil]-[*N*-(2-dietilaminoetil)glicil]-*N*-[2-dietilaminoetil]glicinamida

N22-22-22C (72)

CL-EM: 486.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-Dietilaminopropil)glicil]-[*N*-(2-dietilaminopropil)glicil]-*N*-[2-(1'-pirrolidinil)etil]glicinamida

N19-19-6C (73)

CL-EM: 512.3 (M+H)⁺

[*N*-(2-Dietilaminopropil)glicil]-[*N*-(2-dietilaminopropil)glicil]-*N*-(2-dietilaminopropil)glicinamida

N19-19-19C (74)

CL-EM: 528.5 (M+H)⁺

7.4.2. EXPERIMENTS BASATS EN EL MARCATGE ISOTÒPIC

7.4.2.1. Marcatge de l'amina A22

7.4.2.1.1. Síntesi de l'amina deuterada **76**

7.4.2.1.1.1. Obtenció de l'acetamida **75**

A una dissolució de cloroacetamida (6.23 g, 65 mmol) en 80 ml de THF anh.^{*}, s'hi van afegir 10.7 g (78 mmol) de K₂CO₃ i 4.7 g (65 mmol) de d'*N,N*-dietilamina. La mescla es va escalfar a reflux durant 1 h. A continuació s'hi van afegir 0.5 eq. més de dietilamina (2.4 g). Després de 3 h, es va observar per CG que la reacció havia estat completa. El cru de reacció es va filtrar i el dissolvent i l'excés d'amina es van eliminar a pressió reduïda, per obtenir 7.6 g de sòlid blanc corresponent a l'acetamida **75** (rdt. 90%).

2-(Dietilamino)acetamida (**75**)¹²⁰

Pf: 76-77 °C (lit.¹²⁰ 76-77 °C)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 3.01 (s, COCH₂N), 2.57 (q, J=7.2 Hz, 4H, 2 x CH₃CH₂N), 1.04 (t, J=7.2 Hz, 6H, 2 x CH₃CH₂N).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 175.5 (CO), 57.3 (COCH₂N), 48.6 (2 x CH₃CH₂N), 12.3 (2 x CH₃CH₂N).

EM (m/z) 130 (M, 5), 86 (M-CH₂NO, pic base), 72 (M-C₂H₄NO, 7), 58 (M-C₄H₁₀N, 55).

7.4.2.1.1.2. Obtenció de l'amina **76**

En un matràs sec i flamejat sota atmosfera d'argó col·locat en un bany de gel a 0 °C que contenia 230 mg de LiAlD₄ (5.5 mmol), s'hi va afegir una dissolució d'acetamida **75** (480 mg, 3.7 mmol) en 20 ml de THF anh. A continuació, es va retirar el bany de gel i la suspensió es va

* El THF es va destil·lar sobre filaments de Na.

escalfar a reflux durant 7 h, controlant la reacció per CG. Passat aquest temps, la reacció es va tractar afegint H₂O lentament per destruir l'excés d'agent reductor. El cru de reacció es va filtrar i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, per obtenir 360 mg d'un oli groguenc corresponent a la mescla d'amina **76** i d'acetamida **75** de partida amb una relació 95:5, determinada per RMN. Aquest cru de reacció es va utilitzar directament per a la síntesi del corresponent peptòide marcat sense realitzar cap etapa de purificació.

***N,N*-Dietil-1,2-etandiamina (**76**)**

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃):	2.49 (q, J=7.2 Hz, 4H, 2 x CH ₃ CH ₂ N), 2.43 (sa, 2H, NCH ₂ CD ₂ NH ₂), 1.84 (sa, 2H, NH ₂), 0.99 (t, J=7.2 Hz, 6H, 2 x CH ₃ CH ₂ N).
¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃):	55.3 (NCH ₂ CD ₂ NH ₂), 46.6 (2 x CH ₃ CH ₂ N), 38.5 (q, J=20.4 Hz, NCH ₂ CD ₂ NH ₂), 11.4 (2 x CH ₃ CH ₂ N).
EM (m/z)	118 (M, 30), 86 (M-CH ₂ D ₂ N, pic base), 72 (M-C ₂ H ₄ D ₂ N, 30), 46 (M-C ₄ H ₁₀ N, 35).
EMAR per C₆H₁₅D₂N₂	Calculada: 119.1517 (M+H) ⁺ Determinada: 119.1513

7.4.2.1.2. Síntesi de l'amina deuterada **79**

7.4.2.1.2.1. Obtenció del carbamat **77**

En un matràs que contenia 2 g (22.2 mmol) d'*N*-etil-1,2-etandiamina en 50 ml d'EtOH, s'hi van afegir 4.6 ml (22.2 mmol) de carbonat de *tert*-butilfenil. La mescla de reacció es va escalfar a reflux en agitació durant 24 h. Desaparegut el producte de partida (control per CG), el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, s'hi van afegir 30 ml d'H₂O i HCl 2 N per tal d'acidificar el medi i es va realitzar una extracció amb DCM (3 x 25 ml). La fase aquosa es va basificar afegint NaOH 4 N i es va realitzar una nova extracció amb DCM (3 x 30 ml). Els extractes orgànics es van assecar sobre MgSO₄ i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, per obtenir un sòlid corresponent al carbamat **77** (3.14 g, 75% rdt.).

2-(Etilamino)etilcarbamat de *tert*-butil (77**)¹²¹**

Pf: (lit.¹²¹ 54.5-55 °C)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 5.02 (sa, 1H, NHCO), 3.22 (q, J=6.6 Hz, 2H, NHCH₂CH₂NHCO), 2.73

(t, J=6.6 Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 2.65 (q, J=7.2 Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$), 1.45 (s, 9H, 3 x CH_3), 1.30 (sa, 1H, NH), 1.10 (t, J=7.2 Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): 156.1 (CO), 79.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 48.9 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 43.7 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$), 40.3 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 28.4 (3 x CH_3), 15.3 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$).

EM (m/z) 188 (M, 2), 115 (M- $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}$, 28), 72 (M- $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_2$, 55), 58 (M- $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_2$, pic base).

7.4.2.1.2.2. Obtenció del carbamat **78**

En un matràs que contenia 1 g (5.3 mmol) del carbamat **77** i 830 mg (6.4 mmol) de K_2CO_3 en 30 ml de DMF, s'hi van afegir lentament 446 μl (5.6 mmol) de iodur d'etil deuterat. La mescla es va mantenir en agitació a t.a. durant 3 h. Acabada la reacció (control per CG), el cru de reacció es va filtrar i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. A continuació, es va redissoldre en DCM i es va tornar a filtrar. Finalment, el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, per obtenir 1.05 g del carbamat **78** en forma d'oli (rdt. 90%).

2-(Dietilamino)etilcarbammat de *tert*-butil (**78**)

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): 3.16 (q, J=5.7 Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 2.54 (ac, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ i $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$), 1.45 (s, 9H, 3 x CH_3), 1.00 (t, J=7.2 Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$).

^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3): 155.7 (CO), 79.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 51.3 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 46.2 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$), 45.5 (q, J=20.2 Hz, $\text{CH}_3\text{CD}_2\text{N}$), 36.0 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 27.8 (3 x CH_3), 11.1 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$), 10.0 (hep, J=19.6 Hz, $\text{CD}_3\text{CH}_2\text{N}$).

EM (m/z) 221 (M, 4), 164 (M- C_4H_9 , 2), 148 (M- $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}$, 42), 120 (M- $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2$, 8), 105 (M- $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_2$, 9), 91 (M- $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_2$, pic base), 77 (M- $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NO}_2$, 12), 57 (M- $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{D}_5\text{N}_2\text{O}_2$, 36).

EMAR per $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{D}_5\text{N}_2\text{O}_2$ Calculada: 222.2230 (M+H)⁺
Determinada: 222.2230

7.4.2.1.2.3. Obtenció de l'amina **79**

Sobre el matràs que contenia 1.05 g (4.8 mmol) del carbamat **78** s'hi van afegir 16 ml de dioxà i 6 ml d'HCl 4 N. La mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant tota la nit. Passades 12 h (control per CG), la reacció es va donar per acabada i es va eliminar el dissolvent

a pressió reduïda, per obtenir 662 mg d'amina **79** en forma de clorhidrat (rdt. 87%). Aquest sòlid es va utilitzar directament sense cap tipus de purificació addicional per a la síntesi del peptòide N22*-6-16C.

***N,N*-Dietyl-1,2-etandiamina (79)**

¹H-RMN (400 MHz, D₂O): 3.52-3.38 (ac, 4H, NCH₂CH₂NH₂), 3.23 (q, J=7.2 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1.24 (t, J=7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃).

¹³C-RMN (100 MHz, D₂O): 53.5 (NCH₂CH₂NH₂), 47.8 (CH₂CH₃), 47.0 (q, J=21.3 Hz, CD₂CD₃), 33.8 (NCH₂CH₂NH₂), 8.2 (CH₂CH₃), 7.3 (hep, J=19.5 Hz, CD₂CD₃).

EMAR per $C_6H_{12}D_5N_2$ Calculada: 122.1706 (M+H)⁺
Determinada: 122.1704

7.4.2.1.3. Síntesi dels peptoides $N22^+$ -6-16C i $N22^+$ -6-16C

La síntesi dels dos peptoides es va dur a terme seguint el procediment descrit a l'apartat 7.2.3, utilitzant xeringues de 3 ml que contenien 150 mg (0.70 mmol/g, 0.10 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. L'última etapa d'aminació es va fer per duplicat tot afegint una dissolució de 124 mg (1 mmol) d'amina **76** pel cas de l' N^{22+} -6-16C o 164 mg (1 mmol) d'amina **79** pel cas de l' N^{22+} -6-16C en 1.5 ml de DMF. En el cas de l'amina **79**, aquesta es va dissoldre en DMF, s'hi van afegir 145 μ l (1 mmol) de trietilamina i es va filtrar abans d'afegir-la sobre la resina. Un cop acabada la síntesi i escindit el peptoide de la resina, es va dur a terme l'anàlisi de cadascun dels crus de reacció sense purificar per CL-EM.

7.4.2.2. Marcatge de l'amina A16

7.4.2.2.1. Síntesi de l'amina deuterada 89

7.4.2.2.1.1. Obtenció del prolinol **80**

Seguint el procediment descrit per Correa *et al.*,¹²² en un matràs sec i flamejat sota atmosfera d'argó que contenia 3.94 g (104.2 mmol) de LiAlH₄ en 250 ml de THF anh. col·locat en un bany de gel a 0 °C, s'hi van afegir 10 g (86.8 mmol) d'L-prolina. Seguidament, es va retirar el bany de gel i la reacció es va escalfar a reflux durant 5 h. Un cop acabada la reacció, es va procedir al seu tractament afegint lentament THF amb un 5% d'H₂O per destruir l'excés d'agent reductor. A continuació, el cru de reacció es va filtrar i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, per obtenir 8.5 g d'un oli de color groc pàl·lid. Aquest oli es va purificar per

destil·lació al buit (20 Torr), recollint la fracció pura als 105 °C en forma d'oli incolor corresponent a l'(*S*)-prolinol **80** (7.4 g, rdt. 85%).

(*S*)-Prolinol (80)¹²³

Peb:	104-107 °C a 20 Torr (lit. ¹²³ 79-82 °C a 3 Torr)
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	3.56 (dd, J ₁ =11 Hz, J ₂ =4 Hz, 1H, <u>CH</u> ₂ OH), 3.40 (sa, 2H, NH i OH), 3.35 (dd, J ₁ =11 Hz, J ₂ =8 Hz, 1H, <u>CH</u> ₂ OH), 3.26 (ac, 1H, NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ <u>CH</u>), 2.91 (t, J ₁ =6.5 Hz, 2H, NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 1.80 (ac, 1H, NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 1.71 (ac, 2H, NHCH ₂ <u>CH</u> ₂ CH ₂ CH), 1.40 (ac, 1H, NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH).
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):	64.6 (<u>CH</u> ₂ OH), 59.7 (NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ <u>CH</u>), 46.2 (NH <u>CH</u> ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 27.4 (NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 25.8 (NHCH ₂ <u>CH</u> ₂ CH ₂ CH).
IR (film), ν (cm⁻¹):	3650-3050 (OH, NH), 2959, 2871 (CH), 1540, 1416, 1043.
EM (m/z)	101 (M, 3), 70 (M-CH ₃ O, pic base).

7.4.2.2.1.2. Obtenció del Boc-prolinol **81**

Seguint el procediment descrit per Keller *et al.*,¹²⁴ es van pesar 5.9 g (58.4 mmol) d'(*S*)-prolinol **80** i es van dissoldre en 50 ml de tBuOH i 65 ml de NaOH 1 N. Tot seguit, s'hi van afegir 13 g (58.4 mmol) de Boc₂O i la mescla de reacció es va mantenir en agitació a t.a. durant 2 h. Desaparegut el producte de partida (control per CG), s'hi van afegir 50 ml d'H₂O i es va extreure amb DCM (3 x 50 ml). Les fraccions orgàniques es van ajuntar i es van assecar sobre MgSO₄. El dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, per obtenir 11.1 g del Boc-(*S*)-prolinol **81** en forma d'oli incolor, el qual va cristal·litzar en refredar-se (rdt. 94%).

(*S*)-*N*-tert-Butoxicarbonilprolinol (81**)¹²⁵**

Pf:	56-57 °C (lit. ¹²⁵ 57-58 °C)
TLC	Hexà-AcOEt (1:1) R _f =0.42
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	4.82 (sa, 1H, OH), 3.97 (ac, 1H, NCH ₂ CH ₂ CH ₂ <u>CH</u>), 3.63-3.58 (ac, 2H, <u>CH</u> ₂ OH), 3.45-3.43 (ac, 1H, N <u>CH</u> ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 3.32-3.29 (ac, 1H, NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 2.02-1.98 (ac, 1H, NCH ₂ CH ₂ <u>CH</u> ₂ CH), 1.85-1.78 (ac,

2H, NCH₂CH₂CH₂CH), 1.56-1.54 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 1.47 (s, 9H, 3 x CH₃).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 157.1 (CO), 80.1 (C(CH₃)₃), 67.5 (CH₂OH), 60.1 (NCH₂CH₂CH₂CH), 47.5 (NCH₂CH₂CH₂CH), 28.6 (NCH₂CH₂CH₂CH), 28.4 (3 x CH₃), 23.9 (NCH₂CH₂CH₂CH).

IR (KBr), ν (cm⁻¹): 3550-3200 (OH), 2976, 2876 (CH), 1698 (CO), 1407, 1253, 1170, 1050, 773.

EM (m/z) 201 (M, 1), 170 (M-CH₃O, 70), 128 (M-C₄H₉O, 65), 114 (M-C₅H₁₂O, 95), 70 (M-C₆H₁₂O₃, pic base).

7.4.2.2.1.3. Obtenció del tosilat **82**

Seguint el procediment descrit per Cardillo *et al.*,¹¹⁵ en un matràs que contenia 5.5 g (27.3 mmol) de Boc-(*S*)-prolinol **81**, 7.5 ml (54.6 mmol) de trietilamina i 1.1 g (9 mmol) de DMAP en 200 ml de DCM col·locat en un bany de gel a 0 °C, s'hi van afegir 7.8 g (40.9 mmol) de clorur de tosil. Tot seguit, es va retirar el bany de gel i es va mantenir la reacció en agitació constant a t.a. durant tota la nit. Desaparegut el producte de partida (control per CG), el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, s'hi van afegir 150 ml d'H₂O gelada i es va extreure amb tBuOMe (3 x 70 ml). Finalment, la fase orgànica es va rentar amb 50 ml de KHCO₃ sat. i es va assecar sobre MgSO₄. El dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, per obtenir 11.3 g de cru de reacció en forma d'oli marronós. Aquest es va purificar per cromatografia en columna tipus *flash* eluint amb hexà:AcOEt (5:1), per obtenir un oli incolor corresponent al tosilat **82** (8.05 g, rdt. 83%).

(*S*)-*N*-tert-Butoxicarbonil-*O*-tosilprolinol (**82**)¹²⁶

TLC Hexà-AcOEt (3:1) R_f=0.36

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.75 (d, J=8 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 7.34 (d, J=8 Hz, 2H, 2 x H_{ar}), 4.10-3.95 (ac, 2H, CH₂O), 3.82-3.77 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 3.34-3.26 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH₂CH), 2.44 (s, 3H, C_{ar}CH₃), 1.96-1.79 (ac, 4H, NCH₂CH₂CH₂CH), 1.36 (s, 9H, 3 x CH₃).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 154.3 (CO), 144.8 (C_{ar}), 132.7 (C_{ar}), 129.5 (CH_{ar}), 127.8 (CH_{ar}), 79.8 (C(CH₃)₃), 69.8 (CH₂O), 55.4 (NCH₂CH₂CH₂CH), 46.4 (NCH₂CH₂CH₂CH), 28.2 (3 x CH₃), 27.5 (NCH₂CH₂CH₂CH), 23.7 (NCH₂CH₂CH₂CH), 21.5 (C_{ar}CH₃).

IR (film), ν (cm⁻¹):	3084, 3029 (C _{ar} -H), 2976, 2878 (CH), 1693 (CO), 1395, 1189, 1176, 1097, 968.
EM (m/z)	355 (M, 2), 282 (M-C ₄ H ₉ O, 5), 207 (M-C ₁₁ H ₁₆ , 5), 170 (M-C ₈ H ₉ O ₃ S, 25), 114 (M-C ₁₂ H ₁₇ O ₃ S, 80), 70 (M-C ₁₃ H ₁₇ O ₅ S, pic base).

7.4.2.2.1.4. Obtenció del nitril **83**

En un matràs que contenia 5.7 g (16 mmol) de tosilat **82** en 130 ml de DMF anh., s'hi van afegir 1.57 g (32 mmol) de NaCN. La mescla de reacció es va escalfar a 100 °C i es va mantenir en agitació constant durant 6 h. Desaparegut el producte de partida (control per TLC i CG), el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, s'hi van afegir 100 ml d'H₂O i es extreure amb tBuOMe (3 x 70 ml). Els extractes orgànics es van assecar sobre MgSO₄ i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, per obtenir 3.35 g de cru de reacció en forma d'oli. Aquest es va purificar per cromatografia en columna tipus *flash* eluint amb hexà:AcOEt (2:1), per obtenir el nitril **83** en forma d'oli groguenc (2.51 g, rdt. 75%).

(*S*)-*N*-tert-Butoxicarbonil-2-(cianometil)pirrolidina (**83**)

TLC	Hexà-AcOEt (4:1) R _f =0.26
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	4.00 (ac, 1H, NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 3.47-3.38 (ac, 2H, NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 2.86-2.55 (ac, 2H, CH ₂ CN), 2.20-1.83 (ac, 4H, NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 1.47 (s, 9H, 3 x CH ₃).
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):	154.5 (CO), 118.0 (CN), 79.9 (C(CH ₃) ₃), 47.0 (NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 46.7 (NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 30.3 (NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 28.4 (3 x CH ₃), 23.6 (NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 22.2 (CH ₂ CN).
IR (film), ν (cm⁻¹):	2976, 2876 (CH), 2250 (CN), 1692 (CO), 1395, 1164, 773.
EM (m/z)	210 (M, 2), 195 (M-CH ₃ , 3), 170 (M-C ₂ H ₂ N, 55), 137 (M-C ₄ H ₉ O, 80), 114 (M-C ₆ H ₁₀ N, 80), 109 (M-C ₅ H ₉ O ₂ , 54), 70 (M-C ₇ H ₁₀ NO ₂ , pic base).

7.4.2.2.1.5. Obtenció de l'homoprolina **84**

Seguint el procediment descrit per Cardillo *et al.*,¹¹⁵ en un matràs que contenia 2.5 g (11.9 mmol) del nitril **83** s'hi van afegir 130 ml d'HCl 12 N i 26 ml d'àcid acètic glacial. La mescla de reacció es va escalfar a reflux durant 3 h. Passat aquest temps, es va retirar la

manta calefactora i es va deixar en agitació a t.a durant 12 h. A continuació, es van fer rentats amb Et₂O (2 x 80 ml) i l'H₂O es va eliminar a pressió reduïda. Finalment, el cru de reacció es va congelar i liofilitzar per obtenir 1.82 g d'un sòlid blanc corresponent al clorhidrat de l'homoprolina **84** (93% rdt.). Aquest sòlid es va utilitzar directament sense realitzar cap etapa de purificació addicional.

Àcid 2-((*S*)-pirrolidin-2-il)acètic (**84**)

¹H-RMN (500 MHz, D₂O): 3.76 (ac, 1H, NHCH₂CH₂CH₂CH), 3.19 (t, J=9 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH), 2.84-2.67 (CH₂CO), 2.14-1.55 (NHCH₂CH₂CH₂CH).

¹³C-RMN (125 MHz, D₂O): 174.2 (CO), 57.4 (NHCH₂CH₂CH₂CH), 45.7 (NHCH₂CH₂CH₂CH), 36.0 (CH₂CO), 29.8 (NHCH₂CH₂CH₂CH), 23.2 (NHCH₂CH₂CH₂CH).

CL-EM: 130.1 (M+H)⁺

7.4.2.2.1.6. Obtenció de l'homoprolinol **85**

El procediment seguit va ser anàleg al descrit a l'apartat 7.4.2.2.1.1 per a l'obtenció del prolinol **80**. En un matràs sec i flamejat que contenia 1.03 g (27.3 mmol) de LiAlH₄ i 50 ml de THF anh. s'hi van afegir 1.8 g (10.9 mmol) del clorhidrat de l'àcid 2-((*S*)-pirrolidin-2-il)acètic. La mescla es va escalfar a reflux durant 5 h. Acabada la reacció, es va fer el tractament descrit anteriorment per obtenir 965 mg d'un oli groguenc corresponent a l'homoprolinol **85** (rdt. 77%). Aquest es va utilitzar directament sense realitzar cap etapa de purificació addicional.

2-((*S*)-Pirrolidin-2-il)etanol (**85**)

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 3.82-3.78 (ac, 2H, CH₂CH₂OH), 3.41-3.37 (ac, 1H, NHCH₂CH₂CH₂CH), 2.92 (t, J=6.8 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH), 1.93-1.43 (ac, 6H, CH₂CH₂OH i NHCH₂CH₂CH₂CH).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): 62.3 (CH₂CH₂OH), 59.1 (NHCH₂CH₂CH₂CH), 45.9 (NHCH₂CH₂CH₂CH), 35.5 (CH₂CH₂OH), 31.6 (NHCH₂CH₂CH₂CH), 25.6 (NHCH₂CH₂CH₂CH).

EM (m/z) 115 (M, 3), 98 (M-OH, 10), 84 (M-CH₃O, 7), 70 (M-C₂H₅O, pic base).

7.4.2.2.1.7. Obtenció del Boc-homoprolinol **86**

El procediment seguit va ser anàleg al descrit a l'apartat 7.4.2.2.1.2. per a l'obtenció de l'(*S*)-BOC-prolinol **81**. En un matràs que contenia 950 mg (8.3 mmol) de l'(*S*)-homoprolinol **85** dissolt en 12 ml de tBuOH i 16 ml de NaOH 1 N, s'hi van afegir 1.90 g (8.7 mmol) de Boc₂O i la mescla es va mantenir en agitació a t.a. durant 2 h. Acabada la reacció (control per CG), es va fer el tractament descrit anteriorment i el residu es va purificar per cromatografia en columna tipus *flash* eluint amb hexà:AcOEt (2:1), per obtenir l'(*S*)-BOC-homoprolinol **86** en forma d'oli incolor (1.44 g, rdt. 81%).

2-((*S*)-*N*-*tert*-Butoxicarbonilpirrolidin-2-il)etanol (**86**)

TLC	Hexà-AcOEt (2:1) R _f =0.22
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):	4.14 (ac, 1H, NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 3.60-3.52 (ac, 2H, CH ₂ CH ₂ OH), 3.32 (t, J=6 Hz, 2H, NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 2.03-1.60 (ac, 6H, CH ₂ CH ₂ OH i NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 1.47 (s, 9H, 3 x CH ₃).
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃):	156.4 (CO), 79.8 (C(CH ₃) ₃), 59.0 (NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 53.4 (CH ₂ CH ₂ OH), 46.4 (NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 38.3 (CH ₂ CH ₂ OH), 31.1 (NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 28.4 (3 x CH ₃), 23.5 (NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH).
EM (m/z)	215 (M, 2), 170 (M-C ₂ H ₅ O, 60), 158 (M-C ₄ H ₉ , 35), 142 (C ₄ H ₉ O, 60), 114 (M-C ₅ H ₉ O ₂ , pic base), 70 (M-C ₅ H ₉ O ₂ -C ₂ H ₅ O, 90).

7.4.2.2.1.8. Obtenció de l'*N*-metilhomoprolinol **87**

Seguint el procediment descrit per Leyendecker *et al.*,¹²⁷ en un matràs sec i flamejat sota atmosfera d'argó que contenia 585 mg de LiAlD₄ (13.9 mmol) en 20 ml de THF anh. en un bany de gel a 0 °C, s'hi van afegir 1 g (4.65 mmol) de l'alcohol **86**. Seguidament es va retirar el bany de gel i la reacció es va escalfar a reflux durant 8 h. Un cop acabada la reacció, es va procedir al seu tractament afegint lentament THF amb un 5% d'H₂O per destruir l'excés d'agent reductor. A continuació, el cru de reacció es va filtrar i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, per obtenir 442 mg d'un oli de color groc pàl·lid corresponent al 2-((*S*)-*N*-metilpirrolidin-2-il)etanol **87** (rdt. 72%). Aquest oli es va utilitzar directament sense realitzar cap etapa de purificació addicional.

2-((S)-N-Metilpirrolidin-2-il)etanol (87)

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 3.95 (ddd, J=11 Hz, J=10 Hz, J=3.6 Hz, 1H, CH₂CH₂OH), 3.66 (dtd, J=11 Hz, J=4.7 Hz, J=0.6 Hz, 1H, CH₂CH₂OH), 3.05 (ac, 1H, NHCH₂CH₂CH₂CH), 2.16 (ac, 1H, NHCH₂CH₂CH₂CH), 2.54 (ac, 1H, NHCH₂CH₂CH₂CH), 1.95-1.52 (ac, 6H, CH₂CH₂OH i NHCH₂CH₂CH₂CH).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 64.8 (NCH₂CH₂CH₂CH), 60.0 (CH₂CH₂OH), 56.7 (NCH₂CH₂CH₂CH), 39.8 (hp, J=20 Hz, NCD₃), 31.7 (CH₂CH₂OH), 28.3 (NCH₂CH₂CH₂CH), 22.9 (NCH₂CH₂CH₂CH).

EM (m/z) 132 (M, 6), 114 (M-CD₃, 5), 87 (M-C₂H₅O, pic base).

EMAR per C₇H₁₃D₃NO Calculada: 133.1420 (M+H)⁺

Determinada: 133.1415

7.4.2.2.1.9. Obtenció de la ftalimida 88

Seguint el procediment descrit per Mitsunobu *et al.*,¹¹⁶ a una dissolució de 400 mg (3 mmol) d'alcohol **87**, 865 mg (3.3 mmol) trifenilfosfina i 485 mg (3.3 mmol) de ftalimida en 40 ml de THF anh. refredada a 0 °C, s'hi van afegir gota a gota 520 µl (3.3 mmol) de diazodicarboxilat de dietil (DEAD). La dissolució resultant es va agitar a t.a. durant 24 h. L'evolució de la reacció es va controlar per CG. Acabada la reacció, el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda i el residu es va redissoldre amb una mescla Et₂O:hexà (1:1). El sòlid precipitat es va eliminar per filtració i el filtrat es va concentrar a pressió reduïda, obtenint 1.08 g d'un oli groguenc que es va purificar per cromatografia en columna tipus flash eluint amb hexà:AcOEt (1:1), per obtenir un sòlid corresponent a la ftalimida **88** (485 mg, rdt. 62%).

N-(2-((S)-N'-Metilpirrolidin-2-il)etil)ftalimida (88)

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.87-7.84 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 7.75-7.72 (ac, 2H, 2 x H_{ar}), 3.76-3.67 (ac, 2H, CH₂CH₂NCO), 3.07 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 2.18-2.06 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH₂CH), 1.96-1.42 (ac, 6H, CH₂CH₂NCO i NHCH₂CH₂CH₂CH).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 168.5 (2 x CO), 133.8 (2 x C_{ar}), 129.1 (2 x CH_{ar}), 127.3 (2 x CH_{ar}), 64.1 (NCH₂CH₂CH₂CH), 56.1 (NCH₂CH₂CH₂CH), 38.4 (hp, J=19.8 Hz, NCD₃), 37.9 (CH₂CH₂NCO), 32.0 (NCH₂CH₂CH₂CH), 30.2 (CH₂CH₂NCO), 21.3 (NHCH₂CH₂CH₂CH).

EM (m/z) 261 (M, 2), 160 (M-C₆H₉D₃N, 4), 87 (M-C₁₀H₈NO₂, pic base).

EMAR per $C_{15}H_{16}D_3N_2O_2$ Calculada: 262.1635 (M+H)⁺

Determinada: 262.1634

7.4.2.2.1.10. Obtenció de l'amina 89

A una dissolució de 400 mg (1.53 mmol) de ftalimida **88** en 12 ml d'EtOH absolut s'hi van afegir 370 µl (7.65 mmol, 5 eq.) d'hidrat d'hidrazina. La mescla de reacció es va escalfar a reflux durant 1.5 h, obtenint-se un precipitat blanc. A continuació, la mescla es va refredar i s'hi van afegir 6 ml més d'EtOH i l'HCl necessari per tenir un pH àcid (1.1 ml). La mescla resultant es va tornar a escalfar a reflux durant 5 h. Finalitzada la reacció (control per CG), el sòlid es va eliminar per filtració i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, per obtenir un oli incolor corresponent al clorhidrat de l'amina **89** (178 mg, rdt. 70%).

2-((S)-N'-Metilpirrolidin-2-il)etanamina (89)

¹H-RMN (400 MHz, D₂O): 3.40-3.35 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 3.13-3.05 (ac, 1H, NCH₂CH₂CH₂CH), 2.88-2.77 (ac, 3H, NCH₂CH₂CH₂CH i CH₂CH₂NH₂), 2.11-1.99 (ac, 2H, CH₂CH₂NH₂), 1.83-1.43 (ac, 4H, NCH₂CH₂CH₂CH).

¹³C-RMN (100 MHz, D₂O): 66.1 (NCH₂CH₂CH₂CH), 56.1 (NCH₂CH₂CH₂CH), 38.6 (hep, J=22.0 Hz, NCD₃), 36.5 (CH₂CH₂NH₂), 28.9 (NCH₂CH₂CH₂CH), 28.0 (CH₂CH₂NH₂), 21.1 (NCH₂CH₂CH₂CH).

EMAR per $C_7H_{14}D_3N_2$ Calculada: 132.1580 (M+H)⁺

Determinada: 132.1576

*7.4.2.2.2. Síntesi dels peptoides N22-6-16C i N22-6-16*C*

La síntesi d'aquests peptoides es va dur a terme seguint el procediment descrit a l'apartat 7.2.3, utilitzant una xeringa de 3 ml que contenia 150 mg (0.70 mmol/g, 0.10 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. En aquest punt només s'explica en detall la primera etapa d'aminació, la qual es va dur a terme per duplicat tot afegint una mescla d'amina **89** i amina **A16** preparada de la següent manera: a una dissolució de 54 mg (0.33 mmol) d'amina **89** en 1.5 ml de DMF s'hi van afegir 46 µl (0.33 mmol) de trietilamina, es va filtrar i s'hi van afegir 96 µl (0.66 mmol) d'amina **A16**. Un cop acabada la síntesi i escindits els peptoides de la resina, es va dur a terme l'anàlisi del cru de reacció sense purificar per CL-EM.

PART II. QUÍMICA COMBINATÒRIA ASSISTIDA PER MICROONES

SUMARI PART II

8. INTRODUCCIÓ	175
8.1. Antecedents històrics	175
8.2. Fonament teòric	176
8.2.1. Què són les microones	176
8.2.2. L'escalfament amb microones	177
8.2.3. Efecte de microones	179
8.2.3.1. El sobreescalfament	180
8.2.3.2. Escalfament selectiu	180
8.2.3.3. Els punts calents	180
8.2.3.4. Efectes no tèrmics	181
8.2.3.4.1. Factor preexponencial (A)	181
8.2.3.4.2. L'energia d'activació ($\Delta G^\ddagger$)	181
8.3. Microones en química orgànica	181
8.4. Microones en fase sòlida i química combinatòria	182
9. SÍNTESI DE PEPTOIDES ASSISTIDA PER MICROONES	185
9.1. Optimització de les etapes sintètiques utilitzant un microones domèstic	186
9.1.1. Desprotecció de la resina	186
9.1.2. Acilació	187
9.1.2.1. Proves amb àcid cloroacètic i àcid bromoacètic	188
9.1.2.2. Estudi de les condicions d'acilació amb àcid bromoacètic	189
9.1.3. Acoblament d'amina	191
9.2. Procediment general per a la síntesi de peptoides. Preparació del peptòide N20-13-20C (91)	193
9.3. Preparació dels peptoides híbrids N13-15-37-G-G-37-15-13C (92) i N37-15-13-G-G-37-15-13C (93)	195
10. PEPTOIDES COM A AGONISTES DELS RECEPTORS TRKA I P75^{NTR}	199
10.1. Introducció	199
10.1.1. Els factors neurotròfics	200
10.1.1.1. Família de les neurotrofines. Lligands i receptors	200
10.2. Activitat biològica dels peptoides	203
10.2.1. Cribratge de la quimioteca	203
10.2.1.1. Assaig de supervivència pel receptor p75 ^{NTR} (línia cel·lular RN22)	203
10.2.1.2. Assaig de diferenciació pel receptor TrkA (línia PC12)	203
10.2.1.3. Resultats del cribratge	203
10.2.2. Cribratge de peptoides definits	204
10.2.2.1. Preparació de 18 peptoides definits	204
10.2.2.2. Assaigs de supervivència i assaig de diferenciació	204
10.2.2.3. Assaig de fosforilació	205
10.2.2.4. La mescla número 15 de la quimioteca	206
10.2.2.4.1. Síntesi dels peptoides N35-4-10C, N35-4-13C, N35-4-15C, N35-4-35C i N35-4-37C	206
10.2.2.5. Síntesi dels peptoides N35-4-8C (94), N35-4-17C (95) i N6-4-17C (96) a l'escala del gram	207

11. UTILITZACIÓ DEL MICROONES COMERCIAL CEM	211
11.1. Introducció	211
11.1.1. Reaccions en sistema obert o tancat	212
11.1.2. Reactors	212
11.2. Optimització de les etapes sintètiques utilitzant el microones comercial CEM	214
11.2.1. Sistema tancat	214
11.2.1.1. Desprotecció de la resina	215
11.2.1.2. Acilació	216
11.2.1.3. Acoblament d'amina	218
11.2.1.4. Síntesi del peptòide model N20-13-20C (91)	219
11.2.2. Escissió de la resina dins de la bosseta	220
11.2.3. Sistema obert	220
11.2.3.1. Síntesi del pentàmer model N6-20-34-13-7C (102)	221
11.2.3.2. Síntesi del pentàmer model N6-20-34-13-7C amb 5 bossetes alhora	223
11.3. Comparació entre les diferents metodologies utilitzades per sintetitzar peptòides.	223
12. SÍNTESI D'UNA QUIMIOTECA DE PEPTÒIDES	227
12.1. Manipulació de la resina	227
12.2. Format de la quimioteca	228
12.3. Diversitat de la quimioteca	229
12.3.1. Elecció de les fonts de diversitat	229
12.3.2. Proves de reactivitat	230
12.3.2.1. Antecedents	230
12.3.2.2. Estudi de la reactivitat de les amines del Grup A i del Grup B en fase sòlida utilitzant mescles equimolars en l'etapa d'acoblament	234
12.3.2.3. Estudi de la reactivitat de les amines del Grup A i del Grup B en fase sòlida utilitzant mescles equireactives en l'etapa d'acoblament	236
12.3.3. Conclusions de la reactivitat de les amines de la quimioteca	237
12.4. Procediment per a la síntesi de la quimioteca	237
12.4.1. Plantejament de la síntesi	237
12.4.2. Procediment general per a la síntesi d'una quimioteca de mescles	238
12.5. Conclusions	241
13. ACTIVITAT BIOLÒGICA DELS PENTÀMERS DE LA QUIMIOTECA	243
13.1. Diabetis	243
13.1.1. Cribratge de la quimioteca	245
13.2. Neuroprotecció. receptor d'nmda	250
13.2.1. Cribratge de la quimioteca	251
13.3. Analgèsia.	253
13.3.1. Cribratge de la quimioteca	255
13.4. Conclusions	258
14. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS	261
14.1. Consideracions generals	261
14.1.1. Instrumentació de la síntesi en fase sòlida	262
14.2. Síntesi de peptòides assistida per microones mitjançant un aparell de microones domèstic	263

14.2.1. Desprotecció de la resina	263
14.2.2. Proves d'acilació	264
14.2.2.1. Acilació amb àcid bromoacètic i amb àcid cloroacètic	264
14.2.2.2. Estudi de les condicions d'acilació amb àcid bromoacètic	265
14.2.3. Proves d'acoblament d'amina	266
14.2.4. Preparació de l'N15C (90) en agitació a temperatura ambient.	268
14.2.5. Procediment general de la síntesi de peptoides. Preparació del peptòide N20-13-20C (91)	268
14.2.6. Preparació dels peptoides híbrids N13-15-37-G-G-37-15-13C (92) i N37-15-13-G-G-37-15-13C (93)	270
14.2.7. Preparació de 18 peptoides definits com a agonistes dels receptors TrkA i p75 ^{NTR}	272
14.2.8. Preparació dels peptoides N35-4-10C, N35-4-13C, N35-4-15C, N35-4-35C i N35-4-37C	275
14.2.9. Preparació dels peptoides N35-4-8C (94), N35-4-17C (95) i N6-4-17C (96) a l'escala del gram	276
14.3. Síntesi de peptoides assistida per microones mitjançant l'aparell de microones comercial CEM	280
14.3.1. Sistema tancat	280
14.3.1.1. Desprotecció de la resina	280
14.3.1.2. Proves d'acilació	281
14.3.1.3. Proves d'acoblament d'amina	282
14.3.1.4. Procediment general de la síntesi de peptoides. Preparació del peptòide N20-13-20C (91)	283
14.3.1.5. Escissió de la resina dins de la bosseta	285
14.3.2. Sistema obert	285
14.3.2.1. Procediment general de la síntesi de peptoides. Síntesi del pentàmer model N6-20-34-13-7C (102)	285
14.3.2.2. Síntesi del pentàmer model N6-20-34-13-7C (102) amb 5 bossetes alhora	287
14.4. ESTudi de la reactivitat de les amines de la quimioteca	288
14.4.1. Estudi per HPLC	288
14.4.1.1. Estudi de la reactivitat de les deu amines en fase sòlida utilitzant mescles equimolars	288
14.4.1.2. Estudi de la reactivitat de les 10 amines en fase sòlida utilitzant mescles equireactives	290
14.5. Síntesi de la quimioteca de pentàmers	290

8. INTRODUCCIÓ

8.1. ANTECEDENTS HISTÒRICS

La presència del microones a la cuina de la nostra llar és una realitat, però no sempre ha estat així. No cal tornar gaire enrera en el temps quan es cuinaven els aliments únicament damunt dels fogons o al forn. El microones ha revolucionat el concepte de cuinar fent possible l'obtenció d'un menjar acceptable en aproximadament mitja hora, espai de temps comprès entre el procés de descongelació i d'escalfament del menjar envasat al buit.

Tot va començar fa més de 50 anys, en el transcurs de la segona guerra mundial, quan P. Spencer va observar que una pastilla de xocolata se li havia fos a la butxaca mentre estudiava la utilització del magnetró com a generador de microones de freqüència fixa en els aparells de radar.^{128,129} Investigacions posteriors van demostrar que les microones podien incrementar la temperatura interna dels aliments molt més ràpid que un forn convencional.

La primera patent en aquest camp va ser presentada per P. Spencer l'any 1946 i un any després va aparèixer el primer forn microones al mercat. No obstant això, es va haver d'esperar fins el 1954 per a la introducció del primer forn microones domèstic. Vint anys més tard, el 60% de les famílies dels Estats Units ja en tenien un.

Ben aviat, enginyers i investigadors van adonar-se que aquesta tecnologia podia tenir aplicacions interessants en camps tant diversos com: la manipulació dels aliments, la indústria dessecadora, la indústria del carbó per eliminar el sofre i altres contaminants, la vulcanització del cautxú, el tractament de residus, la tecnologia de polímers, la ceràmica, la ciència dels materials, la química analítica (procés de digestió de mostres biològiques i geològiques), etc.

A mesura que es van anar introduint millores i simplificacions en el disseny del magnetró, els preus dels microones domèstics van baixar considerablement, tot esdevenint un producte utilitzat arreu. Tant va ser així, que bona part de la investigació química realitzada a finals de la segona meitat del segle XX es va dur a terme en microones domèstics modificats.

8.2. FONAMENT TEÒRIC

Les microones són una font d'energia potent i adaptable a diverses aplicacions. Entendre la teoria bàsica que hi ha darrera proporciona al químic orgànic una bona eina per ser capaç d'aplicar de forma efectiva aquesta forma d'energia a qualsevulla ruta sintètica.

8.2.1. QUÈ SÓN LES MICROONES

Les microones són una forma d'energia electromagnètica situada en la zona baixa de freqüències de l'espectre electromagnètic, comprès en l'interval que va des de 0.3 a 300 GHz (vegeu Figura 1.1).

Tots els forns microones domèstics i tots els reactors de microones dissenyats específicament per realitzar síntesi química treballen a una freqüència de 2.45 GHz, la qual correspon a una longitud d'ona de 12.24 cm. Aquesta freqüència es va definir així per evitar interferències amb telecomunicacions i amb freqüències telefòniques, alhora que suposava una profunditat de penetració adequada per interaccionar amb les mostres a escala de laboratori.

L'energia del fotó de microones en aquesta regió de freqüència (0.0016 eV) és molt baixa en comparació a la que seria necessària per trencar un enllaç químic; per tant les microones no afecten l'estructura de les molècules orgàniques sinó que únicament afecten la seva rotació.^{130,131}

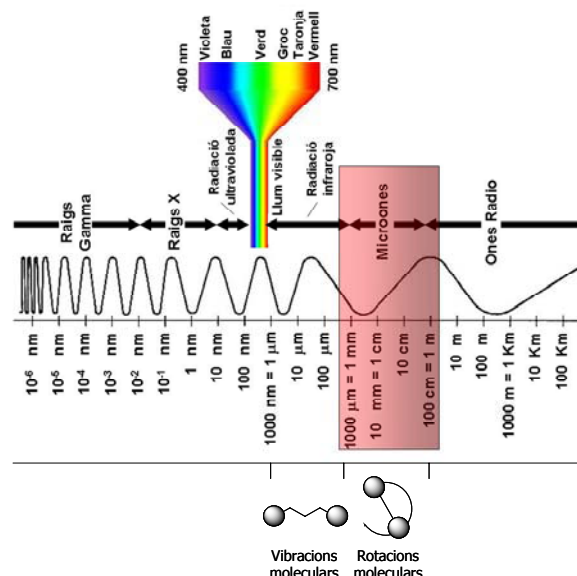


Figura 8.1. Espectre electromagnètic. El requadre assenyalat la zona corresponent a les microones, les quals afecten a la rotació molecular.

8.2.2. L'ESCALFAMENT AMB MICROONES

La component elèctrica¹³²⁻¹³⁴ del camp electromagnètic és la que produeix calor, i ho fa mitjançant dos mecanismes principals: la polarització dipolar i la conducció iònica. La irradiació de la mostra a freqüències de microones provoca l'alineament dels dipols i dels ions dins del camp elèctric aplicat. A mesura que aquest va oscil·lant, els dipols i ions intenten realinear-se dins el camp elèctric altern. Durant aquest procés es produeix una pèrdua d'energia en forma de calor per fricció molecular i pèrdua dielèctrica. La quantitat de calor generada durant aquest procés està relacionada directament amb la capacitat de la matriu per alinear-se amb la freqüència del camp aplicat. Si el dipol no té prou temps per alinear-se o es reorienta massa ràpid, no hi ha escalfament. La freqüència fixada a 2.45 GHz en tots els sistemes comercials es troba entre aquests dos extrems i, per tant, dona prou temps perquè els dipols s'alineïn dins el camp, però no per seguir l'alternança amb precisió.¹³¹

L'escalfament d'un material (per exemple, un dissolvent) sota la irradiació per microones depèn de les seves propietats dielèctriques. La capacitat d'una substància específica per convertir energia electromagnètica en calor, a una freqüència i temperatura determinades, està determinada per l'anomenat factor de pèrdua $\tan \delta$. Aquest factor de pèrdua s'expressa com el quocient $\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$, on ϵ'' és la pèrdua dielèctrica, la qual és indicativa de l'eficiència de conversió d'energia electromagnètica en calor, i ϵ' és la constant dielèctrica, i descriu la capacitat de les molècules de ser polaritzades per l'efecte d'un camp elèctric. Per tenir una absorció eficient i, en conseqüència, un escalfament ràpid, cal un medi de reacció amb un valor

de $\tan \delta$ elevat. El factor de pèrdua d'alguns dels dissolvents més utilitzats es mostra a la Taula 8.1. En general, els dissolvents es poden classificar segons la seva capacitat d'absorbir l'energia de les microones en alta ($\tan \delta > 0.5$), mitjana ($\tan \delta 0.1-0.5$) i baixa ($\tan \delta < 0.1$).

Taula 8.1. Factors de pèrdua ($\tan \delta$) de diferents dissolvents.¹³⁵

Dissolvent	$\tan \delta$	Dissolvent	$\tan \delta$
Etilenglicol	1.350	DMF	0.161
Etanol	0.941	1,2-Dicloroetà	0.127
DMSO	0.825	Aigua	0.123
2-Propanol	0.799	Clorobenzè	0.101
Àcid fòrmic	0.722	Cloroform	0.091
Metanol	0.659	Acetonitril	0.062
Nitrobenzè	0.589	Acetat d'etil	0.059
1-Butanol	0.571	Acetona	0.054
2-Butanol	0.447	Tetrahidrofuran	0.047
1,2-Diclorobenzè	0.280	Diclorometà	0.042
<i>N</i> -Metilpirrolidona	0.275	Toluè	0.040
Àcid acètic	0.174	Hexà	0.020

Altres dissolvents d'ús comú sense un moment dipolar permanent, com el tetraclorur de carboni, el benzè o el dioxà, són més o menys transparents a les microones. El fet que un dissolvent tingui un valor de $\tan \delta$ baix, no l'exclou de poder ser emprat per a dur a terme una reacció activada per aquesta radiació. Mentre el substrat o alguns dels reactius/catalitzadors siguin polars, les propietats dielèctriques globals del medi de reacció seran suficients per poder ser escalfats per irradiació amb microones. A més, es poden afegir additius polars, com per exemple els líquids iònics, per augmentar el nivell d'absorbància del medi.

Tradicionalment, la síntesi orgànica s'ha realitzat per escalfament per conducció mitjançant una font de calor externa (per exemple, un bany d'oli). Aquesta calor és conduïda cap a les substàncies, passant primer a través de les parets del reactor fins arribar al dissolvent i als reactius. És un sistema lent i poc efectiu pel que fa a la transferència d'energia, ja que depèn de la conductivitat tèrmica dels diferents materials que s'han de travessar. El resultat és que la temperatura del reactor és sempre més elevada que la de la pròpia mescla de reacció, implicant la pèrdua del temps necessari perquè aquest dos arribin a l'equilibri tèrmic. Aquest procés pot ser llarg, dificultant el control de la reacció.

L'escalfament per microones, en canvi, és un procés diferent. La radiació produeix un escalfament intern eficient per la interacció directa de l'energia de les microones amb les molècules (dissolvent, reactius o catalitzadors) presents en la mescla de reacció, conduint cap a un augment ràpid de la temperatura. El procés és independent de la conductivitat tèrmica dels materials amb els quals s'ha fabricat el reactor i, si aquests són transparents a les microones

(per exemple, borosilcats, quars o tefló), s'aconsegueix una inversió en el gradient de temperatura comparat amb l'escalfament tèrmic convencional (vegeu Figura 8.2).

Així doncs, l'èxit de la química assistida per microones es basa en l'escalfament eficient dels materials mitjançant l'efecte de l'escalfament dielèctric. Aquest fenomen depèn de la capacitat d'un material específic (dissolvent o reactiu) per absorbir l'energia de les microones i convertir-la en calor.

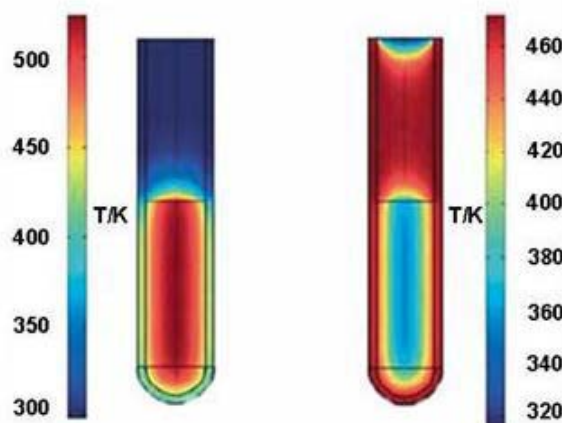


Figura 8.2. Gradients de temperatura inversos entre l'escalfament per microones (esquerre) i amb bany d'oli (dreta). La radiació per microones escalfa tot el volum de reacció simultàniament, mentre que en el cas de l'escalfament amb bany d'oli, són les parets del reactor les que ho fan primer.^{136,137}

8.2.3. EFECTE DE MICROONES

Des dels inicis de la síntesi orgànica assistida per microones, l'observació de l'acceleració de les velocitats de reacció i, de vegades, de l'alteració de la distribució dels productes obtinguts en comparació amb els experiments realitzats per escalfament convencional, van conduir cap a l'especulació de l'existència dels anomenats "efectes microona", també anomenats "específics" o "no tèrmics". Avui en dia, però, la majoria dels científics estan d'acord en afirmar que, en la majoria dels casos, la raó que explica l'acceleració de les reaccions és purament per efectes tèrmics i/o cinètics, com a conseqüència de les elevades temperatures de reacció assolides ràpidament per irradiació de materials polars en un camp de microones.

A més dels efectes tèrmics i cinètics, hi ha efectes causats únicament pel mecanisme d'escalfament dielèctric amb microones. Són els anomenats "efectes específics de microona" i s'haurien de definir com a acceleracions que no es poden assolir o reproduir mitjançant l'escalfament convencional, tot i que no deixen de ser en essència efectes tèrmics. En aquesta categoria hi trobem: l'efecte de sobreescalfament de dissolvents a pressió atmosfèrica,¹³⁸⁻¹⁴⁰ l'escalfament selectiu d'un reactiu o catalitzador heterogeni en un medi de reacció poc polar,¹⁴¹⁻

¹⁴⁴ la formació de “*hot spots*”¹⁴⁵ i l’eliminació de l’efecte paret causat per la inversió del gradient de temperatura (vegeu Figura 8.2).

8.2.3.1. El sobreescalfament

El sobreescalfament de líquids polars és un efecte que es pot aprofitar de forma pràctica per millorar l’eficiència de determinats processos i que difícilment es pot reproduir mitjançant l’escalfament convencional. Baghurst *et al.*¹³⁸ van detectar aquest efecte en líquids polars emprant l’escalfament per microones, on va aconseguir un sobreescalfament entre 13-26 °C per sobre del seu punt d’ebullició a pressió atmosfèrica. Aquest efecte es pot explicar mitjançant la “inversió de transferència de calor” des del medi irradiat cap a l’exterior fins que els nuclis d’ebullició no estan formats en la superfície del líquid. En cas de no ser desitjat, aquest efecte es pot eliminar o minimitzar treballant amb mescles ben agitada^{140,146} i potències de microones baixes.

8.2.3.2. Escalfament selectiu

És clar que la irradiació per microones és un mètode selectiu d’escalfament. Les microones generen una ràpida intensitat d’escalfament de les substàncies polars mentre que les substàncies apolars no absorbeixen la irradiació i no s’escalfen. Aquesta característica s’ha explotat per escalfar de forma selectiva el dissolvent,¹⁴⁷ els catalitzadors¹⁴¹ o els reactius.¹⁴⁸ Si cap dels components anteriors no és susceptible d’absorbir l’energia de les microones, es pot utilitzar un compost auxiliar inert que ho faci de forma eficient i que sigui capaç de transferir aquesta energia a la resta de components del medi de reacció. Aquest és el cas del grafit, en reaccions en condicions heterogènies o sense dissolvent,¹⁴⁹ i dels líquids iònics, en reaccions en dissolució i en condicions homogènies.¹⁵⁰

8.2.3.3. Els punts calents

Diversos autors han detectat o postulat la presència de punts calents o “*hot spots*” en mostres irradiades amb microones. Aquest és un efecte tèrmic produït principalment per la diferència en les propietats dielèctriques dels materials o per la distribució irregular de la força del camp electromagnètic aplicat, i que té com a conseqüència que la temperatura en determinades zones de la mostra sigui molt més elevada que la de tot el conjunt (temperatura macroscòpica).^{144,151}

8.2.3.4. Efectes no tèrmics

Alguns autors han suggerit la possibilitat que hi hagi efectes de microona que no siguin tèrmics. Aquests s'han classificat com a acceleracions que no han pogut ser explicades per efectes purament cinètics/tèrmics. Són essencialment el resultat de la interacció directa del camp elèctric amb molècules específiques del medi de reacció. S'argumenta que la presència d'un camp elèctric condueix cap a l'efecte d'orientació de les molècules dipolars i d'aquí que canvia el factor preexponencial A o energia d'activació (terme d'entropia) de l'equació d'Arrhenius [$k = A \exp(-\Delta G^\ddagger/RT)$].¹⁵²⁻¹⁵⁴ Un efecte similar s'hauria d'observar en mecanismes de reacció polars, on la polaritat aniria creixent des de l'estat inicial fins a l'estat de transició, augmentant la reactivitat en disminuir l'energia d'activació.

8.2.3.4.1. Factor preexponencial (A)

La component elèctrica del camp electromagnètic afecta el moviment de les molècules polars involucrades en la reacció, les quals intenten realinear-se constantment. Aquest moviment augmenta en bona mesura la probabilitat que dues molècules es trobin i col·lisionin de forma efectiva per produir la reacció entre elles. Precisament és el factor preexponencial (A) el que representa aquesta probabilitat i depèn principalment de la freqüència de vibració dels àtoms en la interfase de reacció. Per aquest motiu, aquest és un dels paràmetres determinants que explicaria, en alguns casos, l'increment de la velocitat observat de les reaccions irradiades per microones.¹⁵⁵

8.2.3.4.2. L'energia d'activació ($\Delta G^\ddagger$)

El terme corresponent a l'energia d'activació es pot desenvolupar en termes d'entropia i entalpia ($\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$). Precisament aquest segon terme ($-T\Delta S^\ddagger$) és el que incrementa el seu valor en reaccions assistides per microones, degut a la polarització dipolar que comporta una organització més gran en comparació amb l'escalfament convencional.¹⁵⁶ Aquest augment implica una disminució global de l'energia d'activació i, en conseqüència, un augment de la velocitat de reacció.

8.3. MICROONES EN QUÍMICA ORGÀNICA

En química inorgànica, la tecnologia de microones s'ha anat utilitzant des de finals dels anys 70. No obstant, l'exploració dels efectes de la irradiació per microones en síntesi orgànica no es va iniciar fins a meitat dels anys 80, quan van aparèixer els dos primers articles per part dels grups de Gedye i Giguere (1986).^{157,158}

A partir d'aquell moment, el nombre de publicacions relacionades amb la química orgànica assistida per microones va experimentar un creixement exponencial, arribant a superar les 2000

en l'actualitat, entre articles, revisions^{71,72} i llibres.^{159,160} Aquest increment es va accentuar a finals dels anys 90 amb l'irrupció al mercat de nova instrumentació de microones dissenyada especialment per a ser emprada en laboratoris.¹⁶¹ Aquesta instrumentació ofereix un control elevat de les condicions de reacció (monitorització de la pressió i la temperatura), mesures automàtiques de seguretat i una major reproductibilitat dels experiments. Tot això ha fet que, actualment, diversos sectors com l'acadèmic i les indústries, hagin implementat aquesta tecnologia en els seus laboratoris.

En la bibliografia podem trobar moltes aplicacions sobre la síntesi orgànica assistida per microones (SOAM): reaccions sense dissolvent,¹⁶²⁻¹⁶⁴ reaccions de cicloadició,¹⁶⁵ la síntesi de radioisòtops,^{166,167} la química del ful·lerè,^{168,169} polímers,¹⁷⁰ la química heterocíclica,^{171,172} la química de sucres,^{173,174} la catàlisi homogènia¹⁷⁵ i heterogènia,¹⁴³ la química mèdica,¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ la química combinatòria^{73,179-181} i la química verda.¹⁸²⁻¹⁸⁵ I és que aquesta tecnologia permet optimitzar molts processos per tal d'obtenir rendiments més elevats, condicions de reacció més suaus i en un temps de reacció molt menor, arribant a reduir en molts casos el que abans eren processos de setmanes o dies a hores o minuts.

8.4. MICROONES EN FASE SÒLIDA I QUÍMICA COMBINATÒRIA

Aquesta revolució no ha passat desapercebuda en el camp de la síntesi en fase sòlida, on molts investigadors estan treballant per mirar d'accelerar-ne les reaccions. Tant és així, que l'aplicació d'aquesta tecnologia ha significat un nou impuls en el camp de la química combinatòria en fase sòlida, el qual havia quedat una mica aturat després de la seva irrupció durant la dècada dels anys 90.

L'aparició de noves dianes terapèutiques sorgides de la genòmica i la proteòmica requereix el desenvolupament urgent de nous mètodes eficients de síntesi de noves molècules que siguin capaces d'interaccionar-hi i modular-ne la seva activitat. La química combinatòria en fase sòlida assistida per microones, doncs, es presenta com una bona eina per als químics per mirar d'assolir aquest objectiu.

Les reaccions en fase sòlida són heterogènies i sovint requereixen molt més temps per assolir una conversió completa que les seves anàlogues en fase homogènia. Problemes de solvatació i de difusió dels reactius dins de la matriu polimèrica alenteixen el procés, especialment quan es treballa amb una dimensió de partícula de resina gran o aquesta està molt funcionalitzada. La conseqüència és que les reaccions en fase sòlida requereixen forçar més les condicions de reacció, ja sigui escalfant-les, amb temps de reacció més llargs o augmentant el nombre d'equivalents de reactius, podent conduir a la generació de subproductes no desitjats, crus de reacció més complexos i degradació del suport polimèric.

Així doncs, l'escalfament per microones ofereix una possible solució a aquests inconvenients i d'aquí l'interés creixent de la química mèdica en aquesta tecnologia, on la

velocitat de reacció i el temps són aspectes fonamentals. Moltes de les companyies de la indústria farmacèutica, agroquímica i biotecnològica han apostat decididament per la síntesi assistida per microones com a metodologia capdavantera per a la síntesi de quimiotèques i optimització de candidats preclínic, accelerant per tant el propi procés de descobriment de nous fàrmacs.

Els primers exemples de síntesi en fase sòlida assistida per microones implicaven la utilització de la tecnologia en un únic pas de reacció i principalment per ancorar o escindir composts de la resina.¹⁸⁶ Ben aviat, però, una de les pedres angulars de la síntesi en fase sòlida, la de pèptids, va iniciar la utilització d'aquesta metodologia amb resultats molt satisfactoris.¹⁸⁷

Més recentment, Erdélyi i Gogoll han aplicat la radiació per microones per a la síntesi d'un tripèptid que conté tres dels aminoàcids naturals que presenten un major impediment estèric (Thr, Val i Ile), sense observar la degradació del suport sòlid ni la racemització de l'enllaç peptídic durant el tractament a temperatura elevada.¹⁸⁸ De fet, la implantació d'aquesta tecnologia ha estat tan important en aquest camp que actualment es poden trobar equips especialitzats dedicats específicament a la síntesi de pèptids en fase sòlida assistida per microones.^{189,190}

Més enllà de la síntesi de pèptids, la tecnologia es va anar aplicant a altres tipus de reaccions en fase sòlida: reaccions catalitzades per metalls de transició (acoblements de Suzuki,¹⁹¹ Stille,¹⁹¹ Sonogashira,¹⁹² reaccions de Negishi,¹⁹³ alquilacions al·líliques catalitzades per Mo,¹⁴⁸ aminocarbonilacions,¹⁹⁴ reaccions de cianació,¹⁹⁵ trifluorometansulfonacions,¹⁹⁶ aminacions de Buchwald-Hartwig),¹⁹⁷ condensacions de Claisen i Knoevenagel, i substitucions nucleòfiles, entre d'altres. A mesura que l'ús d'aquesta tecnologia es vagi implementant als laboratoris, aquesta llista anirà creixent i moltes reaccions que havien estat catalogades com a massa lentes per dur-les a terme en fase sòlida, s'hauran de revisar.

Finalment, cal mencionar que a més de la síntesi orgànica en fase sòlida tradicional, la utilització de reactius, catalitzadors o segrestadors sostinguts sobre un suport sòlid ha crescut considerablement dins de l'àmbit de la química combinatòria. No és estrany, doncs, que la combinació de la utilització d'aquests reactius i la síntesi orgànica assistida per microones sigui un camp d'aplicació que creix també ràpidament.¹⁹⁸

9. SÍNTESI DE PEPTOIDES ASSISTIDA PER MICROONES

En la primera part de la tesi s'ha comentat l'interès dels peptoides en el camp dels peptidomimètics, així com les seves característiques i propietats. De la mateixa manera s'ha destacat el paper d'aquest tipus de composts en la química desenvolupada en el nostre laboratori els últims vuit anys, donant com a resultat la presentació de tres tesis doctorals.^{88,93,199}

No obstant, la metodologia descrita per a l'obtenció de peptoides consistia en etapes successives d'acilació i d'acoblament d'amina (aproximació del submonòmer)⁸⁵ sobre un suport sòlid, prèviament desprotegit, en condicions d'agitació constant a temperatura ambient, tot convertint el procés global en llarg i lent.

L'impacte de la química assistida per microones va obrir la possibilitat de millorar aquest darrer aspecte. Olivos *et al.*²⁰⁰ van aconseguir optimitzar les condicions sintètiques per a l'obtenció de peptoides per escalfament amb un forn microones domèstic, reduint considerablement el temps de síntesi: passant de dies a hores.

Posteriorment, la introducció de millores tecnològiques en els aparells de microones pel que fa referència al control de paràmetres de reacció (pressió, temperatura, etc) i, sobretot, a mesures de seguretat va comportar l'adaptació de la metodologia sintètica descrita fins

aleshores a aquests nous aparells. Aquest és el cas de Gorske *et al.*,²⁰¹ els quals van descriure la síntesi de peptoides utilitzant un aparell de microones comercial.

En aquest capítol de la tesi, s'explicaran les proves realitzades amb aquesta metodologia per a la síntesi de peptoides. Part de la feina explicada a continuació és prèvia a l'adquisició del microones comercial CEM Discover per part del nostre grup d'investigació, motiu pel qual es va utilitzar el microones domèstic.

9.1. OPTIMITZACIÓ DE LES ETAPES SINTÈTIQUES UTILITZANT UN MICROONES DOMÈSTIC

La síntesi de peptoides assistida per microones es va plantejar seguint l'estratègia del submonòmer anteriorment descrita. Així doncs, calia optimitzar cadascuna de les etapes de què consta la seqüència: la desprotecció del grup Fmoc de la resina, l'acilació i l'acoblament d'amina (vegeu Figura 9.1).

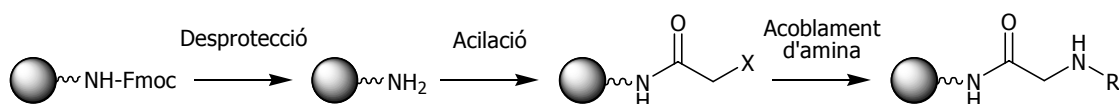


Figura 9.1. Esquema general de l'estratègia del submonòmer, on X=Cl o Br.

9.1.1. DESPROTECCIÓ DE LA RESINA

La primera etapa en una síntesi en fase sòlida és la desprotecció de la resina, sempre que sigui necessari. Aquest és el cas de la resina Rink amida AM, la qual té protegit el seu grup amino amb el grup Fmoc. La desprotecció es porta a terme per tractament amb una dissolució de piperidina al 20% en DMF en agitació a temperatura ambient durant 30 min, tot i que sovint es fa un doble tractament per tal d'assegurar una desprotecció completa.

Sorprenentment, en els estudis anteriors de síntesi de peptoides utilitzant la radiació per microones realitzats per Olivos²⁰⁰ i Gorske,²⁰¹ es va fer la desprotecció del grup Fmoc a temperatura ambient, sense aplicar la metodologia d'escalfament per microones que tants avantatges oferia. Per aquest motiu, es va considerar oportú estudiar aquesta etapa de desprotecció en aquestes condicions.

Es van realitzar dues reaccions de desprotecció de la resina en paral·lel: una en condicions d'agitació a temperatura ambient durant 30 min (forma convencional) i l'altra per escalfament per microones (3 x 20 s a 100 W). Una mostra alíquota de cadascun dels crús de reacció filtrats

es va analitzar per HPLC i es va observar l'aparició de dos pics: un primer ($t_r=11.7$ min) corresponent a l'adducte entre la piperidina, en excés en el medi, i el dibenzofulvè format com a producte de la desprotecció de la resina (**B**), i un segon ($t_r=20.6$ min) corresponent al propi dibenzofulvè (**A**) lliure (vegeu Figura 9.2). En ambdós casos, el perfil cromatogràfic va ser idèntic, tant en la quantitat de pics com en la seva intensitat.

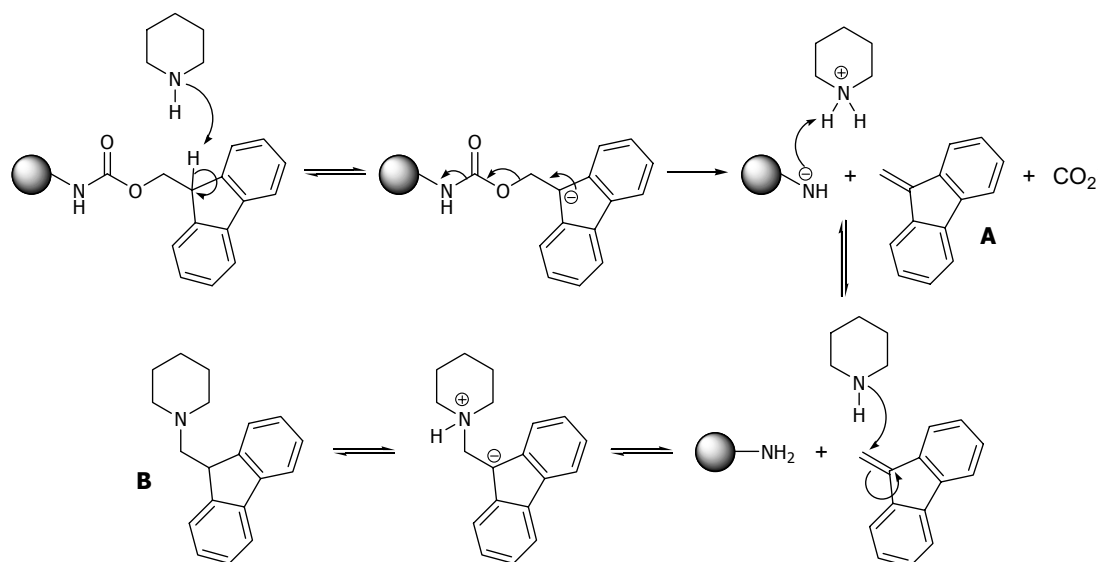


Figura 9.2. Mecanisme de desprotecció del grup Fmoc utilitzant piperidina com a base. En primera instància s'allibera el dibenzofulvè (**A**) el qual evoluciona, degut a l'excés de piperidina en el medi de reacció, formant el corresponent adducte (**B**).

Tot i ser una prova qualitativa, ja va indicar que la desprotecció utilitzant l'escalfament per microones era una bona manera de dur a terme aquesta reacció amb un considerable estalvi de temps.

9.1.2. ACILACIÓ

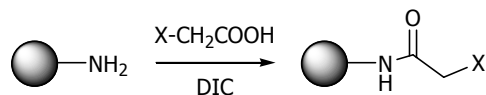


Figura 9.3. Esquema general per a les etapes d'acilació, on X=Cl o Br.

Seguint l'aproximació del submonòmer i una vegada eliminat el grup Fmoc, calia estudiar la reacció d'acilació del grup amino unit a la resina. Aquesta es podia dur a terme fàcilment emprant mètodes estàndard per a la formació de l'enllaç amida, com per exemple: utilitzant el

clorur de cloroacetil, l'èster activat de l'agent acilant, l'àcid activat, etc. Donada l'experiència adquirida en el nostre grup en aquest tipus de reacció i a les dades de la bibliografia,^{85,202,203} es va escollir el mètode que implicava la utilització d'un àcid haloacètic activat *in situ* mitjançant una carbodiimida (DIC).

9.1.2.1. Proves amb àcid cloroacètic i àcid bromoacètic

Una vegada escollit el mètode, es van plantejar dues possibilitats: la utilització de l'àcid cloroacètic o la de l'àcid bromoacètic com a agent acilant. L'experiència en el nostre laboratori amb aquest tipus de reacció, basada en la síntesi de dues quimioteques de peptoides en agitació a temperatura ambient,^{88,93,199} una de 2,5-piperazinadiones⁹³ i una de sals cícliques de tetraalquilamoni,⁹³ assenyalava cap a l'opció de l'àcid cloroacètic, el qual havia estat emprat en tots els casos. En canvi, Olivos *et al.*²⁰⁰ i Gorske *et al.*²⁰¹ van utilitzar l'àcid bromoacètic per establir el seu protocol de síntesi de peptoides utilitzant el microones.

Paral·lelament, Burkoth *et al.*²⁰² van realitzar un estudi comparatiu entre la utilització de l'àcid cloroacètic i l'àcid bromoacètic en reaccions d'acilació, demostrant que l'ús de l'àcid cloroacètic (amb un grup sortint pitjor que l'àcid bromoacètic) era necessari en presència de cadenes laterals amb àtoms de nitrogen nucleòfils. En aquests casos, una reacció secundària no observable normalment com és l'alquilació (és aproximadament 1000 vegades més lenta que l'acilació) podia afectar al rendiment de la reacció, així com en la puresa dels crurs resultants. En la resta de casos, la reactivitat era similar i s'obtenien perfils de reacció molt semblants.

Amb aquests precedents, l'elecció no era fàcil i per tant es va decidir realitzar un estudi de reactivitat entre els dos àcids en les nostres condicions de reacció, seguint l'esquema de la Figura 9.4.

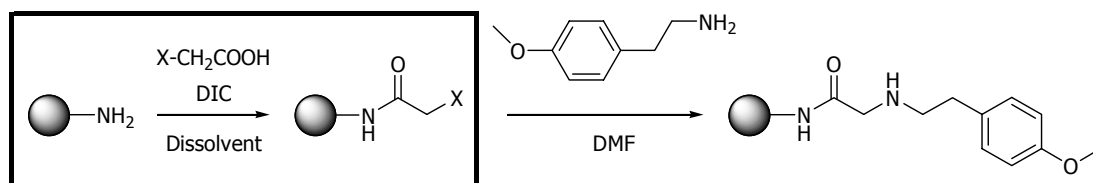


Figura 9.4. Esquema general de síntesi per a les proves de la reacció d'acilació, on X=Cl o Br. El requadre indica la pròpia reacció d'acilació en estudi. Seguidament, però, es va realitzar un acoblament d'amina per poder tenir un grup cromòfor detectable per HPLC.

Es van realitzar quatre reaccions d'acilació en paral·lel i escalfant al microones domèstic durant 1 min (3 x 20 s) a una potència de 100 W, on en dues reaccions es va utilitzar l'àcid cloroacètic i en les altres dues l'àcid bromoacètic. De les dues reaccions realitzades amb cadascun dels àcids, una es va dur a terme en DMF com a dissolvent, mentre que en l'altra es va utilitzar una mescla DMF/DCM (1:1). D'aquesta manera es podria determinar també l'efecte del dissolvent en aquesta reacció.

Acabada l'acilació, es va realitzar un acoblament amb la 4-metoxifenetilamina (**A13**) en DMF i es va procedir a l'escissió de la resina. Una alíquota de cadascun dels quatre crus de reacció es va analitzar per HPLC i en tots es va observar la presència d'un pic ($t_r=4.6$ min) corresponent a la 2-(4-metoxifenetilamino)acetamida (**N13C**) desitjada, però amb intensitats diferents. Els crus de reacció resultants del tractament amb àcid bromoacètic presentaven intensitats superiors als resultants del tractament amb àcid cloroacètic (aproximadament 15 vegades més), mentre que la diferència en canviar de dissolvent era molt menor, essent favorable a la mescla DMF/DCM (1:1).

Aquests resultats es podrien explicar degut a la reacció d'acoblament d'amina i no per la pròpia reacció d'acilació, donada la diferència de velocitat de reacció entre els dos grups sortints, la qual és 40 vegades major en el cas del bromur.²⁰⁴ A més, els assaigs colorimètrics realitzats just després de la reacció d'acilació van mostrar el mateix resultat en els dos casos. Per altra banda, la petita diferència observada en canviar de dissolvent s'explicaria en termes d'un major inflat de la resina, essent el DCM un dissolvent més favorable en aquest sentit, ja que facilita l'accés a més punts funcionalitzats del suport polimèric.

Aquest primer estudi, tot i no ser quantitatiu, va servir per escollir l'àcid bromoacètic com l'haloàcid utilitzat a partir d'aquest moment en totes les reaccions d'acilació, exceptuant en aquelles amb presència de cadenes laterals amb àtoms nucleòfils, on s'utilitzaria l'àcid cloroacètic.

9.1.2.2. Estudi de les condicions d'acilació amb àcid bromoacètic

Un cop escollit l'àcid bromoacètic com a agent d'acilació, es va procedir a estudiar més detingudament les condicions de la reacció. Per fer-ho, es va dissenyar una matriu d'experiments per mirar de definir els paràmetres que podien influir en el rendiment de la reacció. Se'n van estudiar cinc: els equivalents de reactiu (3 o 5), la seva concentració (0.12 M o 0.24 M en el cas de 3 eq. i 0.20 M o 0.40 M en el cas de 5 eq.), el dissolvent (DMF o una mescla DMF/DCM 1:1), el temps de reacció (2 x 20 s o 3 x 20 s) i la realització o no de duplicats.

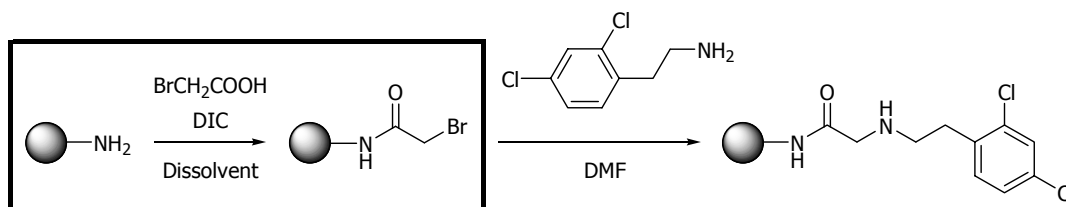


Figura 9.5. Esquema general de síntesi per a les proves de la reacció d'acilació amb àcid bromoacètic. El requadre indica la pròpia reacció d'acilació en estudi. Seguidament, però, es va realitzar un acoblament d'amina per poder tenir un grup cromòfor detectable per HPLC.

En total es van realitzar 32 experiments, els quals es van dur a terme en xeringues de polipropilè de 3 ml. Aquests experiments van consistir en una primera etapa de desprotecció del grup Fmoc de la resina, la qual es va dur a terme conjuntament per a tots els casos en agitació a temperatura ambient, la pròpia reacció d'acilació realitzada individualment i, finalment, un acoblament amb l'amina **A15**, el qual es va dur a terme novament de forma conjunta i en agitació a temperatura ambient. En acabar, es va procedir a fer els rentats corresponents de la resina i la reacció d'escissió.

Es va agafar una mostra alíquota de cada cru de reacció resultant, s'hi va afegir una dissolució d'*N*-3,3-difenilpropilacetamida com a patró de referència externa i les mostres es van analitzar per HPLC. En tots els casos es va poder observar l'aparició de dos pics: un corresponent a la 2-(2,4-diclorofenetilamino)acetamida (**90**) ($t_r=7.2$ min) i l'altre corresponent al patró de referència ($t_r= 10.1$ min). El quocient entre les àrees dels dos pics va permetre relacionar els experiments entre si i determinar les condicions òptimes d'acilació (vegeu Taula 9.1).

Taula 9.1. Condicions d'acilació utilitzades en les 32 xeringues de la matriu d'experiments (vegeu esquema de la Figura 9.5). A l'esquerre s'indica el temps de reacció, la realització o no de duplicats i el dissolvent utilitzat en cada reacció, mentre que a dalt s'indiquen els equivalents i la concentració utilitzada en cadascuna d'elles. En cada casella es mostra el valor del quocient d'àrees per HPLC entre la 2-(2,4-diclorofenetilamino)acetamida i l'*N*-3,3-difenilpropilacetamida (patró extern).

	3 eq. [0.12 M]	5 eq. [0.20 M]	3 eq. [0.24 M]	5 eq. [0.39 M]
1 x (2 x 20 s) DMF	-	1.88	2.61	2.20
1 x (3 x 20 s) DMF	-	2.21	2.59	3.30
2 x (2 x 20 s) DMF	2.14	2.93	3.80	3.21
2 x (3 x 20 s) DMF	1.82	2.37	4.08	3.41
1 x (2 x 20 s) DMF/DCM	1.81	3.04	4.02	3.46
1 x (3 x 20 s) DMF/DCM	3.18	3.09	3.94	3.42
2 x (2 x 20 s) DMF/DCM	3.47	2.97	4.01	3.18
2 x (3 x 20 s) DMF/DCM	3.54	3.28	4.35	3.51

En termes generals, es pot observar que els millors resultats van ser els de la tercera columna, és a dir, els corresponents a treballar amb 3 eq. de reactius a una concentració de 0.24 M. Entre aquests, es poden destacar els dos marcats amb un requadre negre, els quals

difereixen entre si únicament en el dissolvent utilitzat. En tots dos, la reacció es va dur a terme per duplicat i realitzant tres cicles d'escalfament de 20 s.

L'efecte dels equivalents de reactius i, sobretot, de la seva concentració, va resultar un dels paràmetres més importants, ja que els experiments corresponents a la quarta columna, els quals es van realitzar amb més equivalents i a una concentració més elevada, van donar pitjors resultats. Aquest resultat s'explicaria per la hidròlisi parcial de la bromoacetamida formada degut a la concentració d'àcid present en el medi en condicions d'escalfament per radiació per microones (vegeu més endavant l'apartat 11.2.1.2).

Pel que fa al temps de reacció, en tots els casos, es van obtenir millors resultats fent tres cicles d'escalfament de 20 s enlloc de dos. També cal destacar la realització de duplicats, els quals van ser necessaris en els experiments realitzats amb DMF com a dissolvent o a baixes concentracions de reactius.

Tot i la lleugera diferència a favor de la mescla DMF/DCM, es van escollir com a condicions òptimes de reacció el treballar amb DMF com a dissolvent de reacció, degut als problemes de sobrepressió que produïa el DCM en escalfar les xeringues al microones domèstic.

Un altre resultat que calia considerar va ser l'obtingut en un experiment paral·lel als descrits, on es va preparar la 2-(2,4-diclorofenetilamino)acetamida (**90**) mitjançant la metodologia establerta per a la síntesi de peptoides a temperatura ambient descrita en l'apartat 7.2.1. Cal recordar que aquesta metodologia havia estat optimitzada prèviament al nostre grup d'investigació i per tant el resultat obtingut seria considerat com a valor de referència d'una síntesi amb una conversió completa. L'anàlisi d'aquest cru de reacció per HPLC en les condicions descrites anteriorment, va donar un valor de relació d'àrees de 3.92, molt pròxim a l'obtingut en les millors condicions estudiades en la matriu d'experiments.

En resum, les condicions òptimes escollides per a dur a terme la reacció d'acilació van ser: 3 eq. de reactius en DMF a una concentració de 0.24 M, realitzant tres cicles d'escalfament de 20 s cadascun, i fent la reacció per duplicat.

9.1.3. ACOBLAMENT D'AMINA

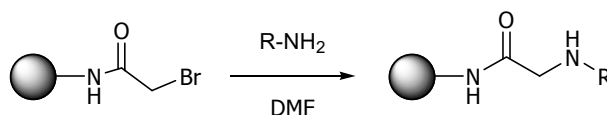


Figura 9.6. Esquema general per a les etapes d'acoblament d'amina.

Finalment, després d'establir les condicions per dur a terme la reacció d'acilació, es va procedir a estudiar la reacció d'acoblament d'amina. Aquest estudi es va realitzar de forma

anàloga a l'anterior, exceptuant el paràmetre del canvi de dissolvent, ja que en aquest cas es va dur a terme únicament amb DMF. Es van estudiar els següents paràmetres: els equivalents de reactiu (3 o 5), la seva concentració (0.12 M o 0.24 M en el cas de 3 eq. i 0.20 M o 0.40 M en el cas de 5 eq.), el temps de reacció (2 x 20 s o 3 x 20 s) i la realització o no de duplicats.

En total es van realitzar 16 experiments, els quals es van dur a terme en xeringues de polipropilè de 3 ml. Aquests experiments van consistir en una primera etapa de desprotecció del grup Fmoc i la posterior reacció d'acilació, les quals es van dur a terme conjuntament per a tots els casos en agitació a temperatura ambient. Seguidament, es va procedir amb l'acoblament d'amina, el qual es va realitzar amb l'amina **A15** de forma individual i seguint les condicions particulars de cada experiment. En acabar, es va procedir a fer els rentats corresponents de la resina i la reacció d'escissió.

Els crus de reacció resultants es van analitzar per HPLC tal i com s'ha explicat en l'apartat anterior i es van obtenir els valors mostrats en la Taula 9.2.

Taula 9.2. Condicions d'acoblament d'amina utilitzades en les 16 xeringues. A l'esquerra s'indica el temps de reacció i la realització o no de duplicats en cada reacció, mentre que a dalt s'indiquen els equivalents i la concentració utilitzada en cadascuna d'elles. En cada casella es mostra el valor del quocient d'àrees per HPLC entre la 2-(2,4-diclorofenetilamino)acetamida i l'*N*-3,3-difenilpropilacetamida (patró).

	3 eq. [0.12 M]	5 eq. [0.20 M]	3 eq. [0.24 M]	5 eq. [0.39 M]
1 x (2 x 20 s) DMF	0.96	1.42	1.55	2.50
1 x (3 x 20 s) DMF	1.38	2.02	1.85	3.11
2 x (2 x 20 s) DMF	1.57	2.36	2.54	3.22
2 x (3 x 20 s) DMF	2.75	2.82	3.13	3.53

A diferència de la reacció d'acilació, en aquest cas els resultats van ser millors a mesura que les condicions eren més enèrgiques, és a dir, en augmentar qualsevol dels paràmetres estudiats. Es pot observar clarament com els resultats van millorar a mesura que anàvem tirant a la dreta i baixant dins de la matriu d'experiments. Tant és així, que les millors condicions estudiades van ser les corresponents a la reacció d'acoblament per duplicat, amb 5 eq. d'amina dissolts en DMF a una concentració de 0.39 M i escalfant durant 1 min en tres cicles de 20 s.

És evident que aquestes van ser les millors condicions de reacció estudiades, la qual cosa no significa que fossin les òptimes. Per poder fer aquesta afirmació, s'haurien de realitzar nous experiments amb un interval de valors més ampli de tots els paràmetres de reacció que determinen el seu rendiment.

No obstant això, hi ha dos aspectes que indicarien que aquestes condicions estudiades eren pròximes a les òptimes: en primer lloc, Olivos *et al.*²⁰⁰ havien descrit un protocol de síntesi de peptoides amb l'aproximació del submonòmer utilitzant un microones domèstic on les reaccions d'acoblament d'amina les realitzaven una sola vegada, escalfant durant 30 s en dos cicles de 15 s i en segon lloc, tal i com s'ha comentat anteriorment, el valor de relació d'àrees obtingut en la preparació de la 2-(2,4-diclorofenetilamino)acetamida mitjançant la metodologia descrita per a la síntesi de peptoides a temperatura ambient va ser molt pròxim a l'obtingut en les millors condicions estudiades en la matriu d'experiments.

Així doncs, després de realitzar aquests experiments es va poder concloure que realitzant les reaccions per duplicat irradiant durant 1 min en 3 cicles de 20 s es podien rebaixar tant la concentració com els equivalents d'amina necessaris per dur a terme la corresponent reacció d'acoblament d'amina, cosa que significaria una despesa molt menor en reactius respecte al procediment descrit per Olivos *et al.*²⁰⁰

9.2. PROCEDIMENT GENERAL PER A LA SÍNTESI DE PEPTOIDES. PREPARACIÓ DEL PEPTOIDE N20-13-20C (91)

Una vegada optimitzada la seqüència sintètica segons l'esquema general descrit en la Figura 9.7, es va procedir a la síntesi del peptoid N20-13-20C (Figura 9.8).

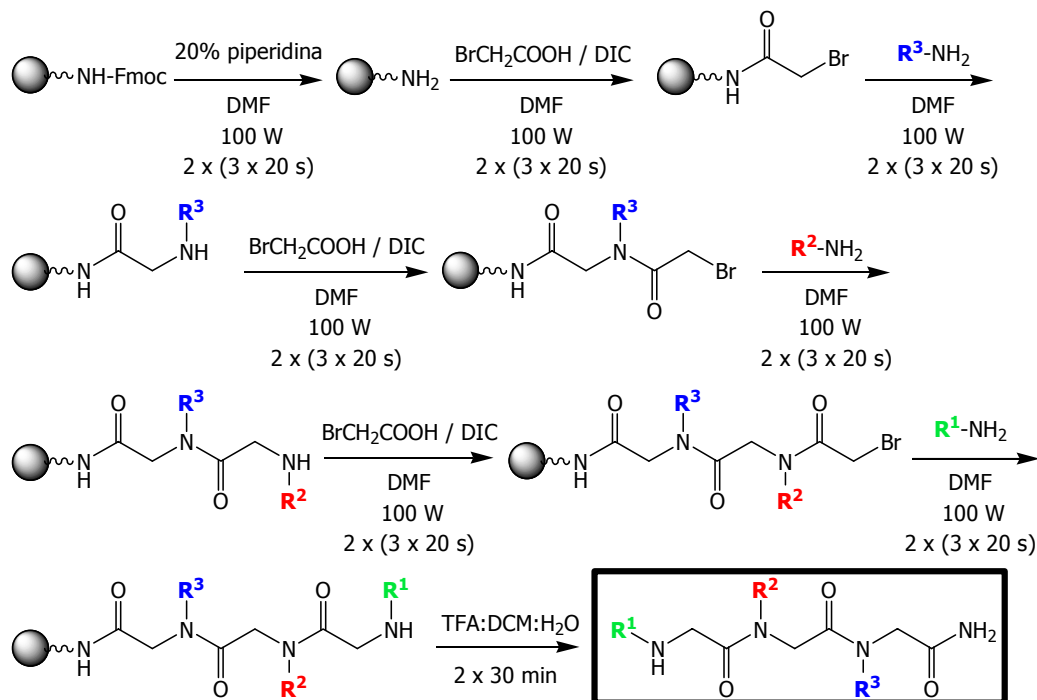


Figura 9.7. Esquema general de síntesi de peptoides utilitzant el microones domèstic.

Aquest peptòide havia estat identificat durant el cribratge de la quimioteca de peptòides II, sintetitzada per Isabel Masip i Núria Cortés en el transcurs de la seva tesi doctoral,^{93,199} com a neutralitzador de l'activitat d'LPS.²⁰⁵

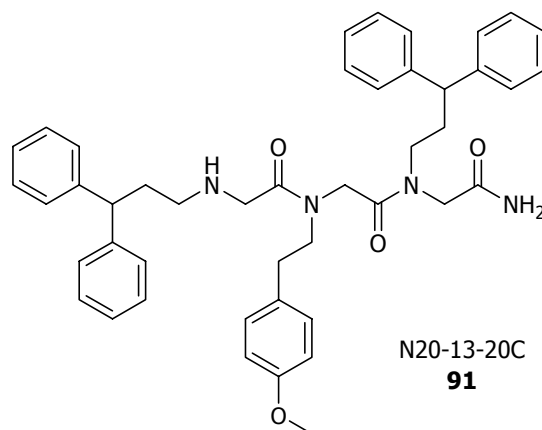


Figura 9.8. Peptòide N20-13-20C (**91**) sintetitzat seguint el protocol de síntesi de peptòides al microones domèstic.

La síntesi es va dur a terme en una xeringa de polipropilè de 10 ml que contenia 500 mg (0.75 mmol/g, 0.38 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. El peptòide **91** es va identificar pel seu espectre de masses (CL-EM), observant el pic molecular a 711.4 (M+H)⁺.

El perfil cromatogràfic d'HPLC del cru de reacció després de l'escissió del peptòide de la resina va mostrar una puresa superior al 90%, millorant lleugerament l'obtinguda en la síntesi d'aquest mateix peptòide en agitació a temperatura ambient, la qual va ser del 83% (vegeu Figura 9.9), mentre que el rendiment de la reacció va ser igual (rdt. 63%).

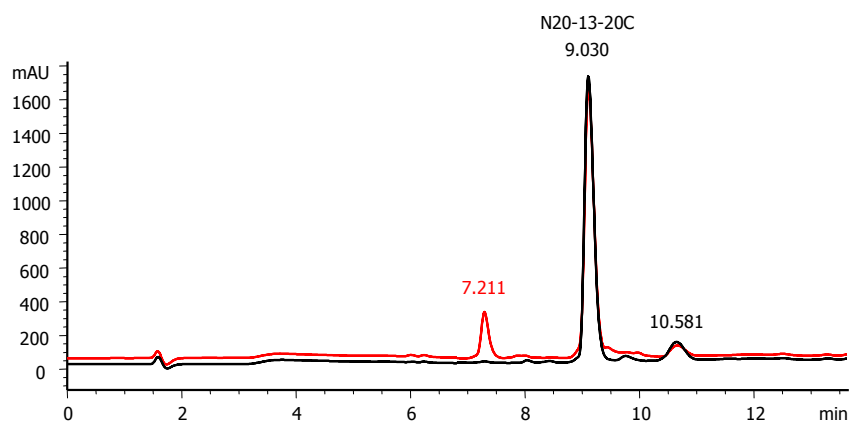


Figura 9.9. Perfil cromatogràfic d'HPLC a 220 nm del peptòide N20-13-20C sintetitzat al microones domèstic (color negre) i sintetitzat en agitació a temperatura ambient (color vermell). La identificació del pic majoritari es va realitzar per CL-EM.

D'aquesta manera quedaven validats els processos d'optimització de les diferents etapes sintètiques descrites anteriorment, així com el protocol general de síntesi de peptoides utilitzant el microones domèstic.

Aquest protocol permetia l'obtenció dels peptoides amb un rendiment de reacció i una puresa semblants als obtinguts mitjançant la metodologia d'agitació a temperatura ambient però reduint el temps de reacció més de trenta vegades, passant de 24.5 h a 44 min (vegeu Taula 9.3).

Taula 9.3. Comparació dels temps de reacció de la síntesi del peptòide N20-13-20C mitjançant la metodologia d'agitació a temperatura ambient i la d'escalfament per microones.

	Nº Etapes*	Temps per etapa (min)		Temps total (min)	
		Agitació t.a.	Microones	Agitació t.a.	Microones
Desprotecció del grup Fmoc	1 x 2	30	1	60	2
Acilació	1 x 2	30	1	300	6
	2 x 2	60	1		
Acoblament d'amina	3 x 2	180	1	1080	6
Escissió	1	30	30	30	30


**1470 min
(24.5 h)**


44 min

* La realització de duplicats s'indica per x 2.

En tots dos casos, però, s'ha d'afegir el temps necessari per dur a terme els rentats de la resina, el qual és el mateix. Així doncs, el temps total aproximat de preparació d'un peptòide mitjançant la metodologia d'agitació a temperatura ambient és d'un mínim de tres dies, mentre que escalfant per microones no arriba a les 3 hores.

9.3. PREPARACIÓ DELS PEPTOIDES HÍBRIDS N13-15-37-G-G-37-15-13C (92) I N37-15-13-G-G-37-15-13C (93)

Després de comprovar l'eficàcia del protocol establert per a la preparació de peptoides al microones i, més concretament, de trímers d'*N*-alquilglicina, es va plantejar la possibilitat d'anar més enllà i preparar construccions més llargues i complexes utilitzant aquesta metodologia. D'aquesta manera, es podria obrir el ventall d'estudi cap a la recerca de noves molècules

moduladores d'interaccions proteïna-proteïna, on la dimensió dels lligands pot ser un factor crucial per a la interacció amb la diana.

En aquest sentit, es va pensar en la possibilitat d'introduir un aminoàcid en la seqüència, augmentant la diversitat estructural i conduint a estructures mixtes peptoides-pèptid. En concret, es va plantejar la síntesi de dos octàmers, formats cadascun d'ells per dos peptoides (trímers) units per un pont de dues glicines (vegeu Figura 9.10), per incrementar d'aquesta manera la seva solubilitat.

Les amines escollides van ser totes aromàtiques perquè s'ha demostrat que aquestes ajuden al reconeixement molecular així com a l'estabilització d'interaccions entre proteïnes mitjançant interacció π - π , catió- π , etc.²⁰⁶ A més, des del punt de vista sintètic, presentaven l'avantatge de ser un bon cromòfor i per tant afavorien la seva detecció per HPLC alhora d'identificar la seva incorporació.

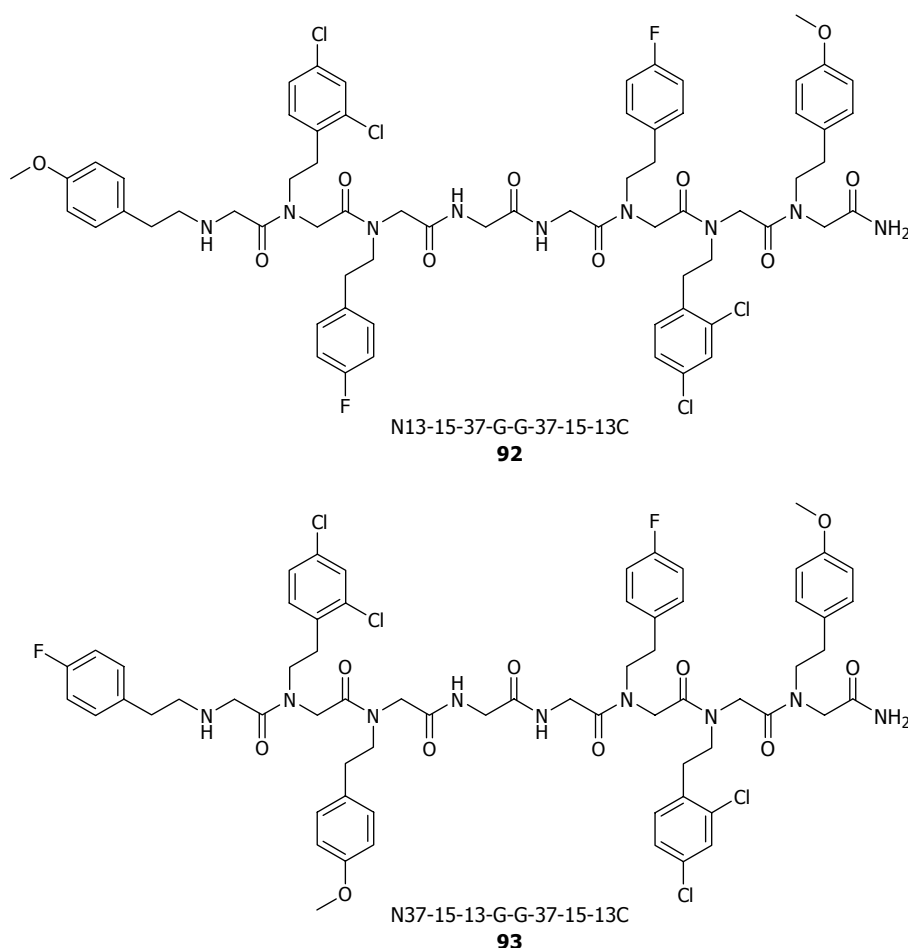


Figura 9.10. Peptoides híbrids N13-15-37-G-G-37-15-13C (**92**) (dalt) i N37-15-13-G-G-37-15-13C (**93**) (baix) sintetitzats seguint el protocol de síntesi de peptoides al microones domèstic.

La síntesi es va dur a terme en una xeringa de 10 ml que contenia 500 mg (0.70 mmol/g, 0.35 mmol) de resina de poliestirè AM RAM i seguint el procediment descrit a l'apartat 9.2.

Passades les tres primeres reaccions d'acilació i d'acoblament d'amina, es va realitzar la introducció de la primera unitat de glicina protegida amb el grup Fmoc en el seu extrem *N*-terminal. Aquesta reacció es va dur a terme de forma anàloga a les reaccions d'acilació anteriors, però amb l'addició d'HOBt per ajudar a la formació de l'enllaç amida mitjançant la formació del corresponent ester actiu a partir de la *O*-acilisourea prèviament formada a partir de l'aminoàcid i la DIC. Tot seguit, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc de la glicina, la qual es va realitzar tal i com s'ha explicat anteriorment per a la desprotecció inicial de la resina. Aquest procediment es va repetir per introduir la segona unitat de glicina.

Després d'efectuar els rentats corresponents de la resina, aquesta es va dividir en dues parts iguals (0.18 mmol/xeringa), les quals es van afegir a dues xeringues de 5 ml i es va continuar amb la síntesi de cadascun dels dos peptoides híbrids seguint el procediment estàndard descrit anteriorment. Finalment, els residus resultants de l'etapa d'escissió es van congelar i liofilitzar, per obtenir 195 mg de cru del peptoide híbrid **92** i 203 mg de cru del peptoide híbrid **93** amb pureses superiors al 85% per HPLC. Els dos peptoides híbrids es van identificar per CL-EM. A més, es va agafar una mostra alíquota dels dos crus de reacció i es van purificar per HPLC a escala semipreparativa.

A continuació es mostren, a mode d'exemple, els perfils cromatogràfics de les mostres analitzades després de cadascuna de les etapes sintètiques del cru corresponent al peptoide híbrid **93** (vegeu Figura 9.11). Cal dir que els primers perfils cromatogràfics mostraven la presència d'un pic al front ($t_r=2.2$ min), el qual corresponia a la de DMF en la mostra analitzada i que en cap cas es tractava d'una impuresa del cru de reacció. Donada l'eficàcia del protocol de síntesi demostrada anteriorment en la preparació del peptoide N20-13-20C (**91**) (vegeu l'apartat 9.2), es va decidir iniciar el control de l'evolució de les reaccions a partir del trímer N37-15-13C, motiu pel qual aquest és el primer dels perfils mostrats. Efectivament, va quedar novament comprovada l'eficàcia del protocol ja que aquest perfil mostrava únicament la presència d'un pic ($t_r=15.1$ min), corresponent a l'intermedi desitjat. A continuació, es van anar analitzant els crus de reacció després de cada etapa i es va observar en tots els casos la desaparició del producte de partida i l'aparició d'un nou pic majoritari corresponent a cadascun dels intermedis de reacció esperats. A més, en la majoria dels casos, aquest pic era únic.

No obstant, en la penúltima acilació (vuitè perfil cromatogràfic), es va poder observar la presència de petites impureses no identificades que es van anar arrossegant fins al final de la síntesi. Tot i això, el cru de síntesi final va donar una puresa superior al 85%. En el cas del peptoide híbrid **92**, aquest va presentar un cru de síntesi final més net, arribant a una puresa superior al 90% per HPLC.

Així doncs, aquest estudi feia extensiva la validació del protocol de síntesi de trímers d'*N*-alquilglicina per a la preparació d'oligòmers més llargs i d'estructures híbrides d'una forma ràpida i amb rendiments i pureses elevades.

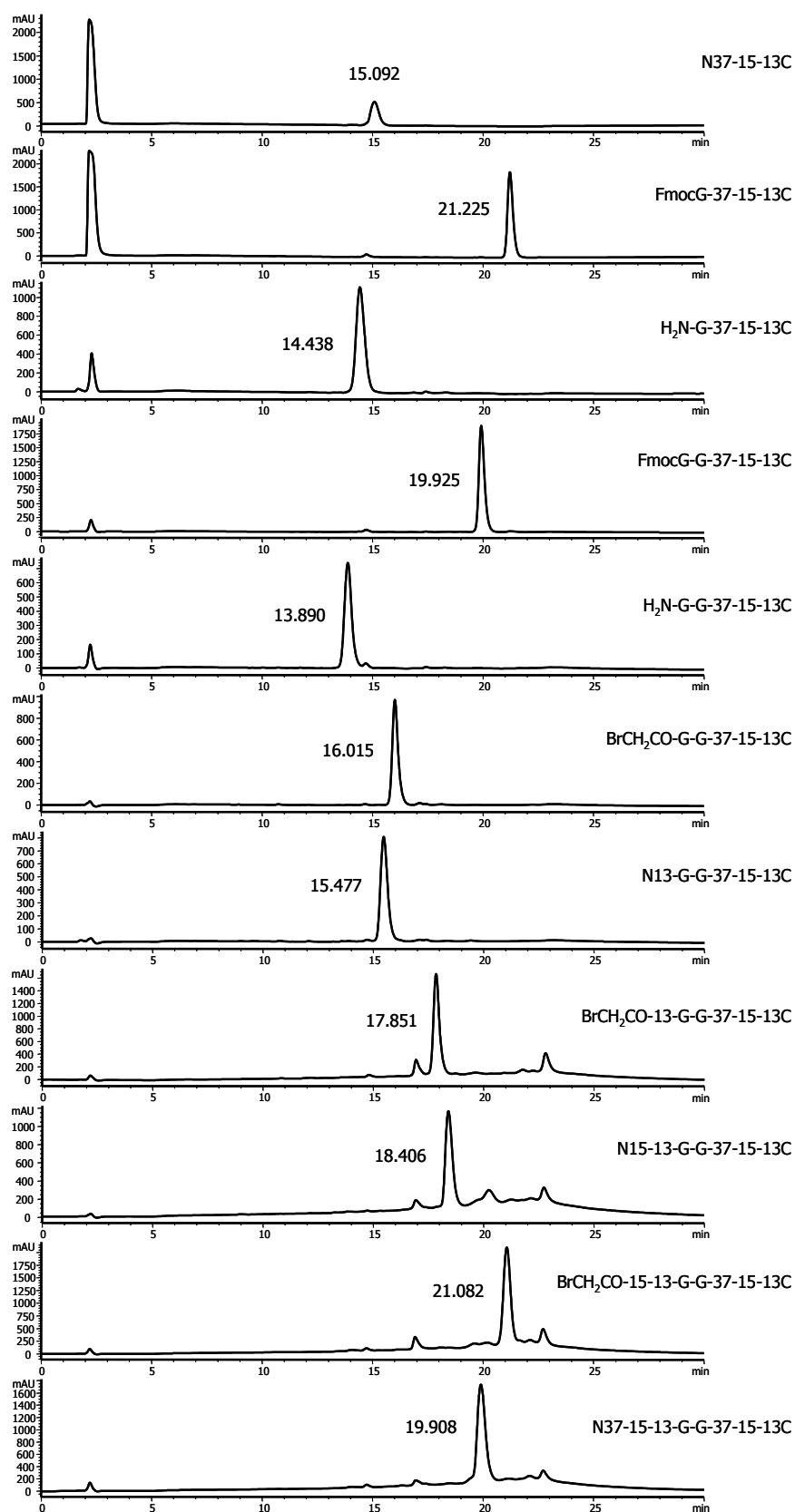


Figura 9.11. Perfils cromatogràfics d'HPLC a 220 nm del cru de reacció després de cadascuna de les etapes successives de síntesi del peptòide híbrid **93** una vegada introduïdes les tres primeres fonts de diversitat. Al costat de cada pic cromatogràfic s'indica el seu temps de retenció per HPLC, en min.

10. PEPTOIDES COM A AGONISTES DELS RECEPTORS TRKA I P75^{NTR}

El cribratge de la quimioteca de peptoides II davant de diferents dianes biològiques disponibles en diversos grups de recerca, de l'àmbit públic i privat, amb qui el nostre grup es va posar en contacte, va permetre identificar noves molècules cap de sèrie amb interès terapèutic.^{205,207}

Un d'aquests grups, va ser el del Dr. Pablo Villoslada del Centro de Investigación Médica Aplicada de la Universidad de Navarra, el qual treballa en el desenvolupament d'agonistes dels receptors del factor de creixement nerviós (*NGF*, *Nerve Growth Factor*) TrkA i p75^{NTR} per mirar de millorar el tractament de malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer i el Parkinson.

10.1. INTRODUCCIÓ

Durant el desenvolupament del sistema nerviós, la mort cel·lular programada o apoptosi és un procés que afecta a totes les poblacions neuronals.²⁰⁸ Aquest mecanisme és essencial per a la correcta formació dels circuits neuronals que defineixen les nostres funcions sensorials, motores o cognitives. La mort cel·lular programada està regulada mitjançant diversos mecanismes, entre els quals destaquen els factors neurotròfics, ja que aquestes proteïnes són

sintetitzades en quantitats limitants, de manera que les neurones que no les capten moren per apoptosi.²⁰⁹ A més de produir-se durant el desenvolupament, la mort apoptòtica es produeix en neurones madures, a causa d'una lesió o per estrès. Els factors neurotròfics han estat implicats en aquests processos degeneratius ja que els seu patró d'expressió o el dels seus receptors està alterat.²¹⁰⁻²¹⁴

10.1.1. ELS FACTORS NEUOTRÒFICS

Els factors neurotròfics són proteïnes endògenes que promouen la supervivència i la diferenciació de certes poblacions neuronals, regulen el procés de formació i establiment de les connexions sinàptiques i, a més, regulen l'expressió gènica a través de la seva interacció amb determinats receptors cel·lulars específics.²¹⁵

Tot i tenir un paper protagonista durant el desenvolupament, els factors tròfics també participen en l'etapa adulta en fenòmens com la regeneració, la neuroprotecció i la plasticitat.²¹⁶⁻²¹⁸ Per altra banda, és conegut que la interacció dels factors tròfics amb els seus respectius receptors pot tenir una implicació en els mecanismes que regulen la diferent vulnerabilitat d'algunes poblacions neuronals afectades en malalties neurodegeneratives.²¹⁹ A més, les alteracions en els nivells de factors tròfics tenen efecte en una àmplia varietat de fenòmens com són la mielinització, el dolor, l'agressivitat, la depressió i l'abús de fàrmacs.²²⁰

S'han descrit una gran varietat de famílies de factors tròfics amb diferents funcions i receptors específics, com la de promoure la supervivència, la diferenciació, la proliferació o la maduració de les cèl·lules durant estadis particulars del desenvolupament, així com en l'edat adulta: la família de les neurotrofines (NGF, BDNF, etc), la família de les citoquines (CNTF, LIF, etc) i la superfamília del TGF- β (inclou la família del TGF- β , la del GDNF, la del BMP i la de les activines).

D'entre aquest conjut de famílies, la col·laboració es centrava en la de les neurotrofines degut a l'objectiu de desenvolupar agonistes dels receptors del factor de creixement nerviós (NGF) TrkA i p75^{NTR}.

10.1.1.1. Família de les neurotrofines. Lligands i receptors

Les neurotrofines són la família de factors tròfics més estudiada. Està formada pel NGF (*Nerve Growth Factor*), el BDNF (*Brain-derived Neurotrophic Factor*), la NT-3 i la NT-4/5 (*Neurotrophin-3* i *Neurotrophin-4/5*, respectivament).

Les neurotrofines són proteïnes sintetitzades en forma de precursors (pro-neurotrofines), les quals evolucionen intracel·lularment per esdevenir les proteïnes madures.²²⁰ Tenen una dimensió d'aproximadament 12 kDa i es troben en forma dimèrica. Presenten una gran homologia de seqüència entre elles, del voltant del 50%, però els residus dels extrems N- i C-

terminals així com els residus de les regions de gir β són molt variables i juguen un paper clau en la interacció i activació dels seus receptors, les tirosina quinases (Trk).

L'NGF va ser el primer membre de la família de les neurotrofines descobert l'any 1951 pels seus efectes sobre la supervivència de les neurones simpàtiques i sensorials en cultiu.^{221,222} L'NGF està format per tres subunitats, α , β i γ , les quals interaccionen per formar un complex de 27 kDa. Tot i que el monòmer (pro-NGF) presenta activitat promotora del creixement, és la forma dimèrica (NGF madur) la principal causant de la seva activitat fisiològica.

Les neurotrofines s'uneixen als seus receptors, els quals estan presents en la membrana citoplasmàtica: el receptor de baixa afinitat p75^{NTR} (*p75 neurotrophin receptor*) i, a més, el seu receptor específic d'elevada afinitat, el Trk (*Tropomyosin-related kinase tyrosine kinase*). L'NGF s'uneix específicament al TrkA, el BDNF i l'NT-4/5 s'uneixen al receptor TrkB, tot i que l'NT-4/5 es pot unir amb menor afinitat al TrkA, i, per últim, l'NT-3 s'uneix al TrkC, si bé pot interaccionar amb menor afinitat amb el TrkA i el TrkB (vegeu Figura 10.1). Quan les neurotrofines s'uneixen únicament al seu receptor Trk, aquest és capaç de donar lloc a una resposta neurotròfica, tot i que actualment també està demostrat que la quantitat relativa de p75^{NTR} respecte a la de Trk és crucial per a l'especificitat entre la neurotrofina i el seu receptor.

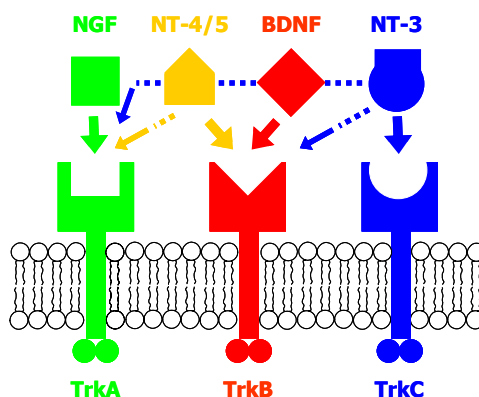


Figura 10.1. Família de les neurotrofines i els seus receptors Trk.

Els receptors transmembranaris Trk presenten també una elevada homologia en la seva seqüència. El seu domini extracel·lular es pot subdividir en cinc dominis i el seu domini intracel·lular conté el centre actiu, amb residus de tirosina que en ser fosforilats provoquen una cascada de senyals que, en últim terme, modulen el creixement i la diferenciació neuronal.

El receptor de baixa afinitat p75^{NTR} va ser el primer receptor aïllat per neurotrofines així com el primer membre descobert de la família dels receptors del TNF (*Tumor Necrosis Factor*). La seva funció està encara en discussió perquè pot interaccionar directament amb els Trk i perquè la seva capacitat d'activar cascades de senyalització es veu modificada per l'activació dels receptors Trk. S'han postulat dues funcions contradictòries, per una banda actuaria com a

mitjancer de la inducció de la supervivència neuronal realitzada pels receptors Trk i, per una altra, actuaria promovent la mort neuronal d'una forma Trk-independent (vegeu Figura 10.2).²²³ No obstant, hi ha diversos autors que han atribuït altres funcions al p75^{NTR} com la de prevenir la regeneració després d'un dany neuronal.²²⁰

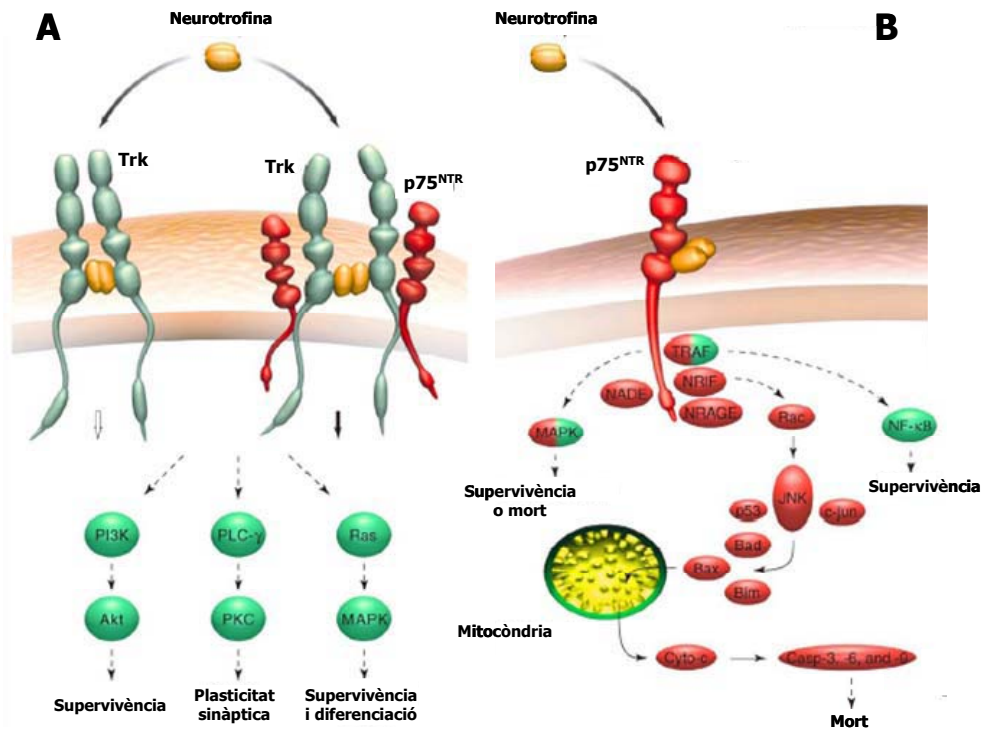


Figura 10.2. La unió de les neurotrofines al receptor Trk indueix la seva dimerització i la fosforilació del seu domini intracitoplasmàtic amb l'activació de la cascada de senyalització intracel·lular inhibint la inducció d'apoptosi i permetent la supervivència (efecte tròfic) i la diferenciació neuronal (A esquerra). La coexpressió del p75^{NTR} amb el Trk refina l'especificitat i l'afinitat pel lligand així com l'associació a proteïnes citosòliques que actuen com a adaptador (A dreta). Com a conseqüència, el complex dímer p75^{NTR}-Trk activa cascades de senyalització diferents de les activades pel dímer del Trk. El receptor p75^{NTR} activa cascades de senyalització regulant la mort neuronal (vermell) i la supervivència (verd) (B).²²³

La capacitat dels receptors Trk i p75^{NTR} de presentar diferents llocs d'unió i afinitat per les neurotrofines determina la seva resposta i especificitat. L'absència d'aquesta especificitat i de selectivitat degut a la interacció de les neurotrofines amb múltiples receptors pot provocar efectes secundaris no desitjats, amb implicacions en el dolor i la neuropatia, el càncer i en malalties neurodegeneratives com ara l'Alzheimer.

Una possible solució per modular aquests efectes secundaris és trobar agonistes o antagonistes dels receptors de Trk i/o de p75 que hi interaccionin selectivament. Així doncs, aquest objectiu esdevé de gran interès en biomedicina.

10.2. ACTIVITAT BIOLÒGICA DELS PEPTOIDES

10.2.1. CRIBRATGE DE LA QUIMIOTECA

El cribratge de la quimioteca de peptoides II²⁰⁷ amb l'objectiu d'identificar composts agonistes de TrkA i p75^{NTR} el va realitzar Beatriz Moreno, del grup del Dr. Pablo Villoslada, mitjançant dos tests *in vitro*: els assaigs de supervivència en línies de *schwanoma* (línia RN22) i els assaigs de diferenciació en cèl·lules PC12.

10.2.1.1. Assaig de supervivència pel receptor p75^{NTR} (línia cel·lular RN22)

L'assaig de supervivència es va avaluar en la línia cel·lular RN22 de *schwanoma* que expressa el receptor p75^{NTR} seguint dos mètodes: el d'estrès oxidatiu amb MTT (0.5 mg/ml de bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazole) i amb apoptosi SP600125 (inhibidor de la Jinkinasa). Mitjançant un assaig colorimètric es va avaluar la capacitat de supervivència de les cèl·lules davant l'estrès oxidatiu després d'exposar-les a medi (control negatiu), NGF i proNGF (control positiu) i les mostres alíquotes de la quimioteca. L'assaig amb MTT és molt sensible, però poc específic mentre que l'assaig amb SP600125 és més selectiu, amb la qual cosa es va escollir aquest darrer mètode per seleccionar els composts amb activitat agonista de p75^{NTR}.

10.2.1.2. Assaig de diferenciació pel receptor TrkA (línia PC12)

L'assaig de diferenciació neuronal en la línia cel·lular PC12 de feocromocitoma de rata va avaluar, mitjançant el comptatge per microscopia, la capacitat de diferenciació de les cèl·lules després d'exposar-les a medi (control negatiu), NGF i proNGF (control positiu) i les mostres alíquotes de la quimioteca.

10.2.1.3. Resultats del cribratge

Es van identificar 8 mescleres actives de les 52 que formaven la quimioteca. D'aquestes, 3 corresponien a les que definien la primera posició (15, 17 i 18), 2 a les que definien la segona posició (23 i 26) i 3 que definien la tercera posició (41, 45 i 49). Amb aquests resultats es va fer la corresponent deconvolució per definir els 18 peptoides descrits en la Taula 10.1.

Taula 10.1. Peptoides obtinguts després del procés de deconvolució del cribratge de la quimioteca de peptoides-II davant l'assaig de supervivència pel receptor p75^{NTR} i l'assaig de diferenciació pel receptor TrkA.

Peptoides		
N35-4-8C	N6-4-8C	N16-4-8C
N35-4-12C	N6-4-12C	N16-4-12C
N35-4-17C	N6-4-17C	N16-4-17C
N35-9-8C	N6-9-8C	N16-9-8C
N35-9-12C	N6-9-12C	N16-9-12C
N35-9-17C	N6-9-17C	N16-9-17C

10.2.2. CRIBRATGE DE PEPTOIDES DEFINITS

10.2.2.1. Preparació de 18 peptoides definits

La síntesi individual d'aquests 18 peptoides es va dur a terme en fase sòlida seguint el procediment estàndard en agitació a temperatura ambient (vegeu l'apartat 7.2.1) amb resina de poliestirè AM RAM. En aquest cas, els crús de reacció no es van purificar per HPLC a escala semipreparativa, degut a que mostraven una puresa prou elevada per poder realitzar els següents assaigs.

10.2.2.2. Assaigs de supervivència i assaig de diferenciació

Es van realitzar els mateixos assaigs comentats anteriorment. Dels 18 peptoides analitzats, se'n van seleccionar tres: l'N35-4-8C (**94**), l'N35-4-17C (**95**) i l'N6-4-17C (**96**) (vegeu Figura 10.3), els quals van donar resultats positius en tots els assaigs realitzats, mostrant la seva capacitat per produir el desenvolupament de dendrites en les cèl·lules PC12 i per afavorir la supervivència davant de determinats agents inductors de mort cel·lular.

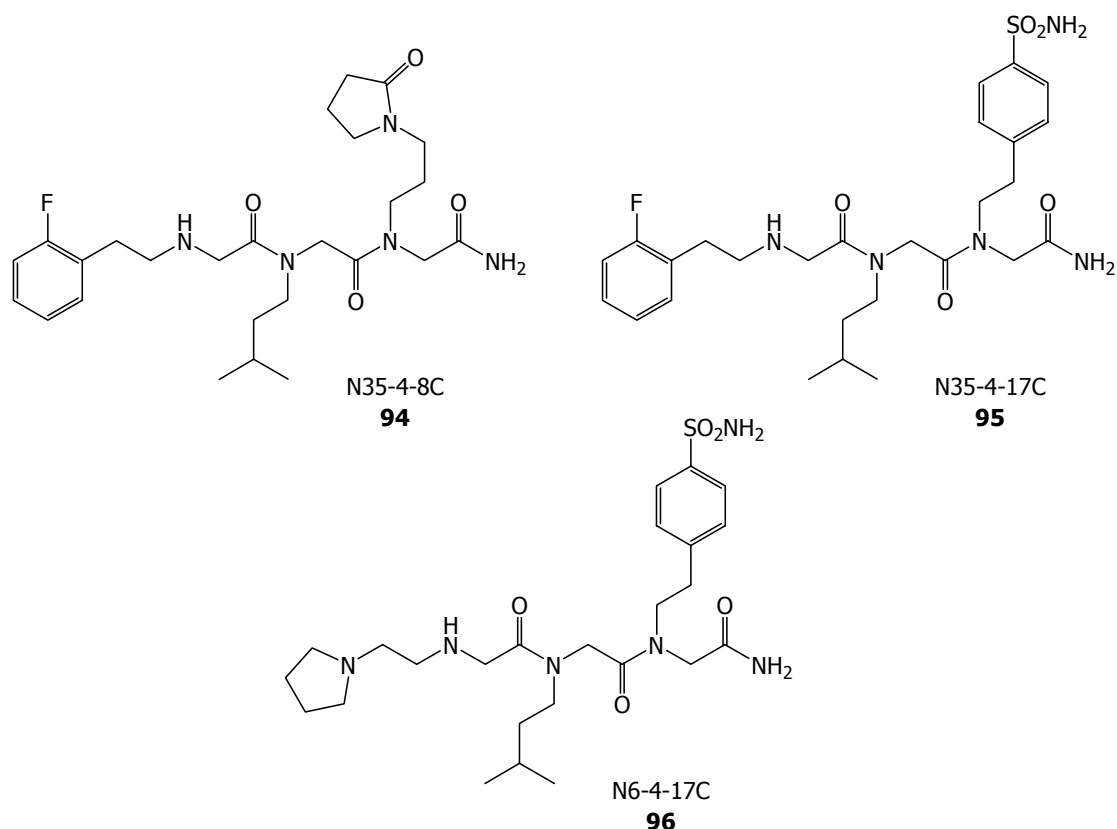


Figura 10.3. Peptoides actius obtinguts del cribatge de la quimioteca de peptoides-II en front de la seva capacitat d'actuar com a agonistes dels receptors TrkA i p75^{NTR}.

Una vegada validats els resultats inicials de les mescles de la quimioteca, es van realitzar els assaigs de fosforilació per identificar el punt d'actuació en la via de senyalització. Per realitzar aquest assaigs, es va seleccionar també la mescla número 15 (corresponent a la posició *N*-terminal fixada amb l'amina **A35**) de la quimioteca cribada degut a una confusió inicial per part del grup del Dr. Villoslada, encarregat de realitzar els assaigs biològics mencionats, el qual va escollir aquesta mescla com si es tractés d'un compost individual, quan en realitat n'hi havia 256.

10.2.2.3. Assaig de fosforilació

Una vegada identificats els candidats amb activitat agonista de TrkA i/o p75^{NTR} en els assaigs funcionals, es va procedir a realitzar els assaigs de fosforilació del receptor TrkA i de la senyalització intracel·lular de p75^{NTR} mitjançant *Western Blotting* amb anticossos per p-TrkA, p-IkB α i p-SAP/JNK (aquest dos últims com a marcadors de la senyalització mitjançant el receptor p75^{NTR}).

En les PC12, tant els 3 peptoides com la mescla número 15 van donar resultats negatius (no augmentava la fosforilació respecte el nivell basal) per l'anticòs p-SAP/JNK, amb la qual

cosa es va poder concloure que els 3 peptoides actuaven exclusivament activant el receptor TrkA, ja que eren positius per p-TrkA i p-IkB α . Aquests resultats van quedar confirmats després d'utilitzar la línia cel·lular RN22 que únicament expressa p75^{NTR}, on els *Western Blott* per p-IkB α i p-SAP/JNK van ser negatius en tots els casos.

10.2.2.4. La mescla número 15 de la quimioteca

Tal i com s'ha explicat, una confusió inicial sobre les mescles de la quimioteca va fer que s'escollís la mescla número 15 com si es tractés d'un compost individual. No obstant, això no tenia sentit perquè s'estava realitzant un assaig pensant com si es tingués un únic compost quan en realitat n'hi havia 256 i, per tant, no es podia assignar l'activitat a cap compost en concret. Aquest fet va fer pensar en la necessitat de preparar un conjunt de peptoides individuals fixant la posició *N*-terminal amb l'amina A35 (l'amina que definia la mescla número 15).

10.2.2.4.1. Síntesi dels peptoides N35-4-10C, N35-4-13C, N35-4-15C, N35-4-35C i N35-4-37C

Es va decidir preparar un conjunt de 5 peptoides definits amb una estructura general com la mostrada en la Figura 10.4 on l'extrem *N*-terminal estava fixat amb l'amina **A35** i la segona posició amb l'amina **A4**. Pel que fa a l'extrem C-terminal, aquest variava en funció de l'amina escollida d'un conjunt de 5 amines: **A10**, **A13**, **A15**, **A35** i **A37**.

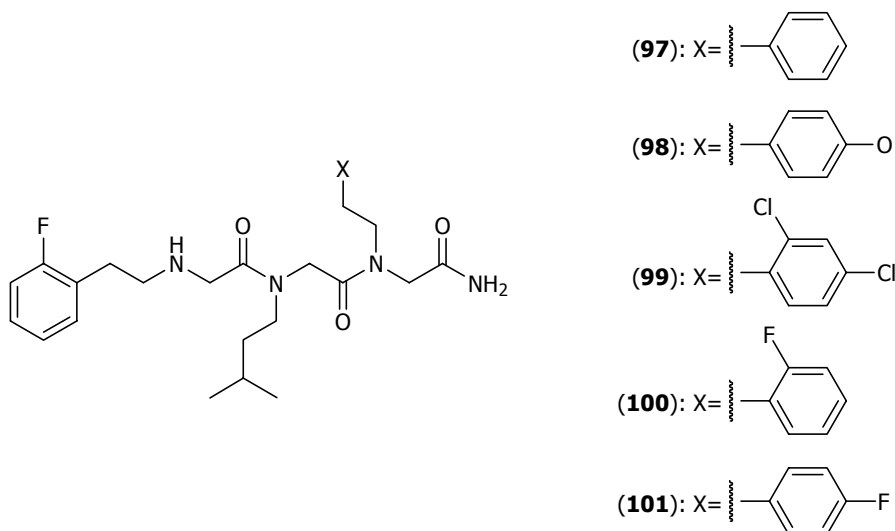


Figura 10.4. Estructura dels cinc peptoides preparats amb l'extrem *N*-terminal fixat amb l'amina **A35**, la segona posició amb l'amina **A4**, i l'extrem C-terminal en funció de l'amina escollida del conjunt format per les amines **A10**, **A13**, **A15**, **A35** i **A37**.

La decisió de fixar la segona posició amb l'amina **A4** es va fer després de comprovar que els 3 peptoides definits **94**, **95** i **96** identificats com a agonistes del receptor TrkA tenien aquesta amina en aquesta posició (vegeu Figura 10.3). En canvi, a l'extrem C-terminal es va introduir part de la diversitat de la quimioteca i per aquest motiu es van escollir les amines mencionades anteriorment.

La síntesi d'aquests 5 peptoides es va dur a terme en fase sòlida seguint el procediment estàndard de preparació de peptoides al microones domèstic (vegeu l'apartat 9.2), fent servir resina de poliestirè AM RAM. En aquest cas, els crús de reacció es van purificar per HPLC a escala semipreparativa, per obtenir uns rendiments finals de l'entorn del 45-65% i amb pureses superiors al 98% per HPLC, en tots els casos. Els peptoides es van identificar per CL-EM.

Actualment, s'estan realitzant els assaigs biològics amb aquests peptoides per tal d'avaluar la seva activitat com a agonistes dels receptors TrkA i p75^{NTR}.

10.2.2.5. Síntesi dels peptoides N35-4-8C (94), N35-4-17C (95) i N6-4-17C (96) a l'escala del gram

Una vegada identificats els 3 peptoides actius (N35-4-8C, N35-4-17C i N6-4-17C, vegeu Figura 10.3) com a agonistes del receptor TrkA i p75^{NTR} en els assaigs *in vitro*, es va procedir a realitzar els assaigs *in vivo* en el model animal d'esclerosi múltiple, l'encefalitis autoimmune experimental (EAE) i en el model d'Alzheimer utilitzant el ratolí transgènic APPTg2576, per avaluar la seva eficàcia en promoure la supervivència neuronal i modular la inflamació.

La realització d'aquests assaigs requeria quantitats de producte més elevades. Per aquest motiu es va pensar en aplicar la tecnologia de microones utilitzant un microones comercial i aprofitar així la seva capacitat per dur a terme reaccions d'una forma ràpida i controlant paràmetres de reacció com la temperatura i la potència de la radiació.

La síntesi es va dur a terme en el microones comercial de la marca CEM model Discover (vegeu Figura 14.2, dreta), seguint la seqüència de síntesi de peptoides al microones descrita anteriorment (vegeu Figura 9.7) i treballant en sistema obert (vegeu capítol 11). La síntesi es va realitzar de forma individual utilitzant un matràs de 100 ml proveït d'un agitador magnètic com a reactor.

L'etapa de desprotecció del grup Fmoc de la resina i les acilacions es van escalfar a 60 °C durant 5 min a una potència de 150 W, mentre que les etapes d'acoblament d'amina es van escalfar a 80 °C durant 7 min a 150 W de potència. En totes elles es van utilitzar 5 eq. de reactius i es van realitzar duplicats.

Els perfils cromatogràfics dels crús de reacció després de l'escissió dels peptoides de la resina van mostrar pureses superiors al 90% (vegeu Figura 10.5). En el cas del peptòide N6-4-17C, es pot observar un pic cromatogràfic corresponent al peptòide amb un temps de

retenció baix i una forma ampla degut a la presència d'una amina amb un àtom de nitrogen terciari a la seva estructura.

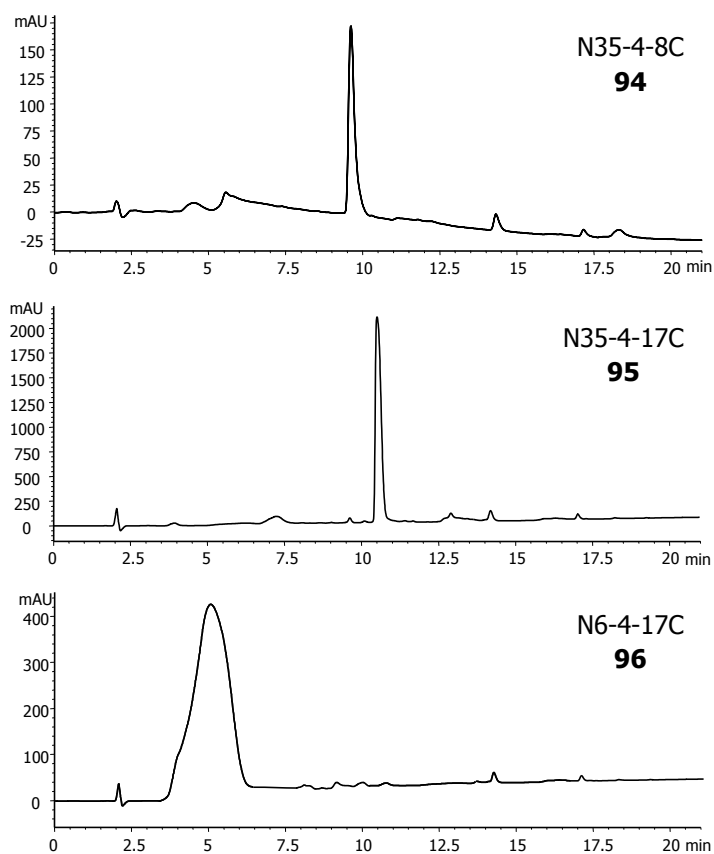


Figura 10.5. Perfils cromatogràfics dels crus de reacció dels tres peptoides després de l'escissió de la resina a 220 nm.

Els peptoides es van purificar per HPLC a escala semipreparativa, per obtenir, en cada cas, les quantitats mostrades en la Taula 10.2 amb una puresa superior al 98% per HPLC. La identificació dels peptoides es va dur a terme per espectrometria de masses i per les seves dades espectroscòpiques. No obstant, la presència de diferents conformacions dels peptoides va conduir a uns espectres de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN molt complexos, fent necessària la realització d'experiments bidimensionals (gDQCOSY i gHSQC) per confirmar l'assignació dels senyals del conòrmer majoritari en cada cas.

Taula 10.2. Quantitat obtinguda de cadascun dels tres peptoides i rendiment global del procés en cada cas.

Peptoide	Quantitat	Rdt.
N35-4-8C	830 mg	56%
N35-4-17C	698 mg	40%
N6-4-17C	863 mg	51%

Finalment, d'acord amb els resultats obtinguts, va quedar reflectida la validesa de l'aplicació de la metodologia utilitzada, permetent obtenir d'una forma ràpida quantitats de producte properes a l'escala del gram.

11. UTILITZACIÓ DEL MICROONES COMERCIAL CEM

11.1. INTRODUCCIÓ

Els avantatges que oferia la utilització de la tecnologia de microones havien quedat palesos amb els experiments descrits als capítols precedents. No obstant, la manca de control sobre paràmetres tan importants com la temperatura i la pressió a l'interior del reactor, així com des del punt de vista de les mesures de seguretat d'aquests reactors, va aconsellar l'adquisició d'un aparell de microones comercial (de la marca CEM i model Discover, vegeu Figura 14.2, dreta). Aquest aparell monomode mantenia les característiques del microones domèstic utilitzat fins aleshores, oferia la possibilitat de controlar diversos paràmetres de reacció i, a més, augmentava considerablement la seguretat de l'usuari, ja que presentava diversos dispositius preventius en cas que es produís algun incident (escalfament excessiu, augment de la pressió per sobre del llindar de seguretat, explosió, etc.).

El canvi d'aparell, però, va comportar estudiar novament les condicions de reacció per a les diferents etapes del procediment descrit anteriorment per a la preparació de peptoides: la desprotecció del grup Fmoc de la resina, l'acilació i l'acoblament d'amina. No obstant, abans d'iniciar aquest estudi, caldria explicar les diferents modalitats que presenta aquest tipus d'aparell pel que fa referència a la manera de treballar des d'un punt de vista experimental.

11.1.1. REACCIONS EN SISTEMA OBERT O TANCAT

En funció de la reacció que es vol dur a terme, s'ha de decidir si fer-la en sistema obert o tancat. La major part de les vegades, però, l'elecció és condicionada per la quantitat de mostra que es tingui.

Les reaccions en sistema tancat es fan utilitzant un tub de 10 ml de volum com a reactor, limitant la quantitat de reactius a aquest volum. No obstant, aquest sistema ofereix diversos avantatges respecte al tancat, com és la possibilitat d'escalfar el dissolvent per sobre del seu punt d'ebullició o el manteniment d'atmosferes inerts. En canvi, el sistema obert ofereix com a principal avantatge el fet d'utilitzar matrassos estàndard com a reactor, la qual cosa permet la utilització de refrigerants, embuts d'addició, etc. Ara bé, l'augment de la velocitat de reacció observat en aquest cas (10x) respecte a les condicions convencionals de reacció, no serà tan evident com en sistema tancat, on l'increment pot arribar a 1000x.

11.1.2. REACTORS

La feina realitzada en el transcurs d'aquesta tesi es desenvolupa principalment en el camp de la síntesi en fase sòlida, i per tant, en la manipulació de resina com a suport polimèric en el qual es duen a terme les reaccions químiques. Per aquest motiu, es comentaran breument els diferents sistemes o reactors que es poden utilitzar treballant en aquest camp amb aquest tipus d'aparell de microones.

En la Figura 11.1 es mostren les tres formes principals de treballar amb resina utilitzant el microones comercial CEM. Tot i que en la figura només es mostren les corresponents a treballar en sistema tancat, aquestes es poden aplicar també si es treballa en sistema obert. La única variació entre elles, és la quantitat de resina que es pot utilitzar en cada cas. La primera forma consisteix en treballar directament amb la resina en suspensió en el dissolvent de reacció (A). De totes, és la que permet treballar amb una quantitat de resina més elevada. No obstant, presenta un inconvenient important i és que, després de cada etapa sintètica, la resina s'ha de transvasar cap algun tipus d'instrumentació complementària que permeti el rentat, disminuint el rendiment final de la reacció degut a les pèrdues de resina durant la manipulació i provocant la pèrdua de temps que comporta aquesta operació. Per evitar aquest inconvenient, es van desenvolupar les altres dues metodologies, on la resina es troba retinguda a l'interior d'una xeringa proveïda d'una placa filtrant (B)⁷⁷ o bé a l'interior d'una bosseta de malla de polipropilè aprofitant la tecnologia desenvolupada per Houghten (C).¹⁷ Des del punt de vista experimental, la xeringa és més pràctica que la bosseta, ja que acabada la reacció el dissolvent es filtra i la resina es renta, mentre que en el cas de bosseta, aquesta s'ha de treure del tub i col·locar-la dins d'un flascó rentador. Ara bé, la metodologia de la bosseta presenta un gran avantatge respecte a la xeringa, com és la possibilitat de col·locar més d'una bosseta en el mateix tub o

matràs (necessari per preparar una quimioteca en format de rastreig posicional), mentre que les reaccions en xeringa s'han de realitzar d'una en una.

En resum, segons el tipus de reacció a estudiar, les condicions que aquesta requereixi (temperatura, concentració de reactius, etc.) i la quantitat de producte requerit, serà millor una metodologia o una altra i s'haurà d'escollir en funció de les condicions particulars de cada cas.

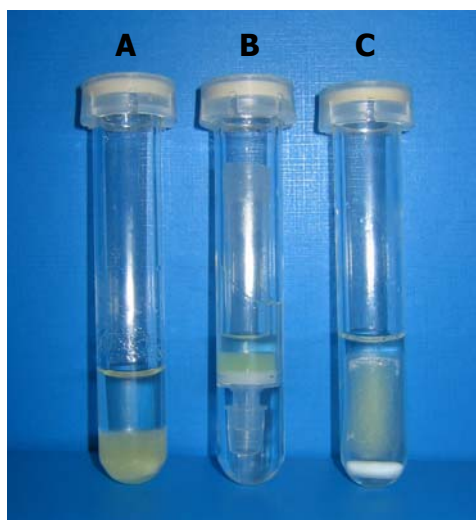


Figura 11.1. Diferents maneres de treballar amb resina en reaccions en el microones comercial CEM: la resina en suspensió en el dissolvent de reacció (A), la resina continguda a l'interior d'una xeringa de polipropilè proveïda d'una placa porosa (B) i amb la resina continguda a l'interior d'una bosseta de malla de polipropilè (C).

Finalment, caldria destacar que l'aparell de microones CEM model Discover disposa d'un sensor de temperatura per IR situat just a sota de la cavitat dissenyada per al reactor (tub, matràs, etc.). Si en el medi de reacció hi ha alguna cosa que impedeix la correcta mesura de la temperatura (com per exemple un excés de resina, un nucli magnètic massa gran, etc.), es pot produir un sobreescalfament de la mostra i perdre el control d'aquest paràmetre. Per aquest motiu, abans d'iniciar qualsevol estudi sobre una reacció determinada, és aconsellable fer una prova del dispositiu a utilitzar amb l'absència dels reactius i mesurar la temperatura final de reacció amb un termòmetre convencional. Una alternativa a aquest sistema seria l'adquisició d'un mesurador de temperatura de fibra òptica, dissenyat recentment per la companyia CEM, el qual es col·loca a l'interior del reactor i mesura de forma directa la temperatura de la dissolució, evitant que es produeixi un sobreescalfament i que aquest passi desapercebut.

11.2. OPTIMITZACIÓ DE LES ETAPES SINTÈTIQUES UTILITZANT EL MICROONES COMERCIAL CEM

L'adquisició de l'aparell de microones CEM va exigir un procés d'adaptació de les condicions de reacció de les diferents etapes sintètiques per a la preparació de peptoides. En aquest cas, d'entre les diferents formes de treballar comentades anteriorment, es va escollir el de la bosseta de malla de polipropilè, ja que seria l'utilitzat posteriorment per a la síntesi d'una quimioteca de pentàmers en format de rastreig posicional (vegeu el capítol 12).

11.2.1. SISTEMA TANCAT

Abans d'iniciar l'estudi de les condicions de reacció de cada etapa sintètica, es va realitzar un estudi d'estabilitat de les bossetes de malla de polipropilè per comprovar la seva resistència sota la irradiació per microones. Per aquest motiu es van segellar tres bossetes i es van col·locar a l'interior del tub de reacció amb aproximadament 5 ml de DMF. Seguidament, es van anar col·locant d'una en una a l'interior del microones i es van escalfar a 100 °C, 120 °C i 140 °C, respectivament, durant 5 min i a una potència de 150 W. La Figura 11.2 mostra l'estat de les bossetes passat el temps d'escalfament en cada cas.

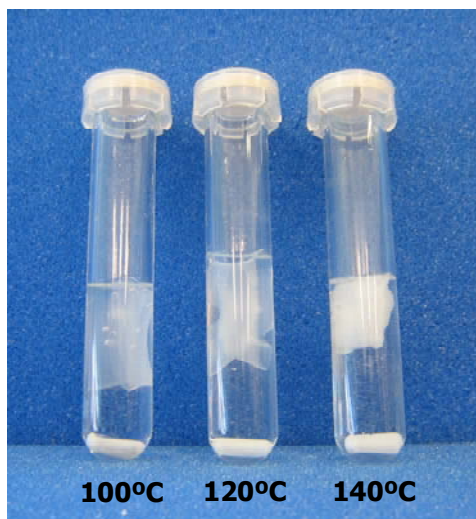


Figura 11.2. Estat en que van quedar les bossetes després d'irradiar-les durant 5 min a 100 °C, 120 °C i 140 °C, respectivament.

Es pot veure clarament que a 100 °C la bosseta queda intacta, mentre que a 120 °C ja mostra certa deformació, la qual va ser total a 140 °C. D'aquesta manera va quedar fixada la temperatura de 100 °C com la màxima de treball en el cas de les bossetes de malla de polipropilè. A partir d'aquesta temperatura, la bosseta podia patir deformacions que

modifiquessin la seva porositat així com el moviment lliure de la resina a l'interior de la bosseta, arribant fins i tot al trencament.

11.2.1.1. Desprotecció de la resina

La realització d'aquest estudi es va dur a terme en bossetes individuals que contenien 100 mg de resina Rink amida AM. En total es van preparar i segellar 9 bossetes. Un cop segellades, es van anar col·locant d'una en una en el tub de reacció de 10 ml i s'hi va afegir una dissolució de piperidina al 20% en DMF. Les condicions de les diferents reaccions estan descrites en la Taula 11.1.

Una vegada realitzades totes les reaccions, es va preparar una mostra alíquota de cadascuna de les dissolucions corresponents i es van analitzar mitjançant un espectrofotòmetre, fent les lectures a una longitud d'ona de 290 nm. Els valors obtinguts en cada cas van ser els mostrats en la Taula 11.1. Paral·lelament, es va realitzar una reacció de desprotecció del grup Fmoc de la resina en agitació a temperatura ambient, utilitzant una xeringa de polipropilè de 5 ml que contenia 100 mg de resina Rink amida AM. Es va preparar una mostra alíquota de la dissolució resultant i es va analitzar de forma anàloga a com s'havia fet per a les 9 bossetes anteriors. El valor d'absorbància obtingut (0.90) es va prendre com a referència, ja que estava demostrat que amb aquestes condicions de reacció la desprotecció era completa.

Taula 11.1. Condicions de reacció utilitzades en les 9 bossetes per a l'etapa de desprotecció del grup Fmoc de la resina. A l'esquerra s'indica el temps de reacció, mentre que a dalt s'indica la temperatura a la qual es va dur a terme. En cada casella es mostra el valor d'absorbància obtingut corresponent a l'adducte format entre el dibenzofulvè i la piperidina (vegeu Figura 9.2) de les mostres alíquotes preparades després de cada reacció en cadascun dels casos. La última casella indica el valor d'absorbància de referència (obtingut de la reacció de desprotecció realitzada en agitació a temperatura ambient).

	40 °C	60 °C	80 °C	Referència
1 min	0.20	0.60	0.72	0.90
2 min	0.76	0.84	0.86	
5 min	0.62	0.85	0.88	

D'acord amb aquests resultats, es va establir que les condicions més favorables per dur a terme la reacció de desprotecció amb aquesta metodologia de sistema tancat eren irradiar la mostra a una temperatura de 60 °C durant 2 min a una potència de 150 W, ja que tant si s'allargava el temps de irradiació com si s'augmentava la temperatura, els resultats no milloraven significativament i, a més, podien afavorir el desgast o estrès del suport polimèric.

Per mirar d'assegurar la desprotecció completa, es va decidir fer un duplicat de la reacció. El corresponent valor d'absorbància obtingut sumant les dues lectures va ser de 0.91, quedant demostrada una desprotecció completa de la resina. En aquest mateix sentit, cal destacar les condicions descrites per Murray *et al.*⁷⁷ publicades amb posterioritat a aquest estudi, els quals desprotegien el grup Fmoc de la resina utilitzant el mateix aparell però fent tres cicles d'escalfament a 60 °C durant 2 min, sense canviar la dissolució de piperidina entre cicle i cicle d'escalfament.

11.2.1.2. Acilació

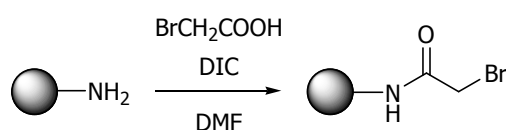


Figura 11.3. Esquema general per a les etapes d'acilació.

Just abans d'iniciar l'estudi de les condicions de reacció d'acilació, Gorske *et al.*²⁰¹ va descriure precisament la síntesi de peptoides utilitzant un aparell de microones comercial incloent un estudi d'optimització de les condicions de reacció d'acilació així com de les d'acoblament d'amina. Per aquest motiu, tot i no ser exactament el mateix aparell (en aquell cas es va treballar amb un reactor multimode), ni la mateixa metodologia (ells van treballar amb la resina dispersa dins del tub de reacció), es va decidir prendre com a punt de partida les condicions de reacció descrites en aquest article.

Es va preparar una bosseta amb 100 mg de resina Rink amida AM, es va col·locar a l'interior d'un tub de reacció de 10 ml i es va procedir a la desprotecció tal i com s'ha comentat en l'apartat anterior. Seguidament, es va dur a terme la reacció d'acilació en sistema tancat en les condicions descrites per Gorske *et al.*,²⁰¹ és a dir, afegint una dissolució d'àcid bromoacètic (30 eq.) i DIC (30 eq.) en 3 ml de DMF i irradiant la mostra a una temperatura de 35 °C durant 30 s amb una potència de 150 W. Després del rentat de la resina, es va fer els test del TNBS, el qual va posar de manifest que l'acilació no havia estat completa, en romandre part de la resina de color vermell.

Després d'analitzar aquest resultat, es va decidir realitzar un nou experiment allargant el temps d'irradiació, passant de 30 s a 1 min i augmentant la temperatura de 35 °C a 60 °C per afavorir la difusió de reactius a través de la malla de polipropilè. Aquest podia ser un factor determinant al treballar en bossetes i inexistent en el treball realitzat per Gorske *et al.* El test del TNBS va mostrar certa coloració vermella, però molt menys intensa que en el cas anterior, amb la qual cosa es posava de manifest la millora aconseguida amb les modificacions introduïdes. Tot i això, la reacció no era completa i, per tant, es va decidir realitzar un duplicat.

En aquesta ocasió, el test del TNBS va sortir incolor, mostrant que la reacció d'acilació havia estat completa.

Tot i el bon resultat obtingut, es va decidir intentar minimitzar la quantitat d'equivalents utilitzada ja que 30 eq. suposava una despesa de reactius molt elevada. Per aquest motiu, es van realitzar quatre experiments irradiant a una temperatura de 60 °C durant 1 min amb una potència de 150 W modificant la quantitat d'equivalents de reactius utilitzats en cadascun d'ells (5, 10, 20 i 30 eq.) i fent les reaccions per duplicat. Acabats els experiments, es va dur a terme el test del TNBS a una mostra de resina de cadascun d'ells, observant coloració vermella en tots els casos, excepte al corresponent a 30 eq. que va sortir incolor. Entre els que van donar coloració, es va poder observar clarament que la intensitat d'aquesta disminuïa a mesura que s'analitzava la mostra corresponent a un major nombre d'equivalents, indicant que a major concentració de reactius, millor rendiment de reacció s'obtenia en aquestes condicions de reacció.

Finalment, es va realitzar una altra sèrie d'experiments avaluant el temps de radiació per intentar evitar la realització de duplicats, els quals significaven una despesa de reactius considerable. Es van preparar quatre bossetes que contenien 100 mg de resina Rink amida AM i es van realitzar experiments mantenint una concentració de reactius de 30 eq., irradiant a una temperatura de 60 °C amb una potència de 150 W, i variant en cadascun d'ells el temps d'irradiació (30 s, 1 min, 5 min i 10 min). De forma anàloga als casos anteriors, acabats els experiments, la resina es va rentar i es va procedir a fer el test del TNBS (vegeu Figura 11.4).

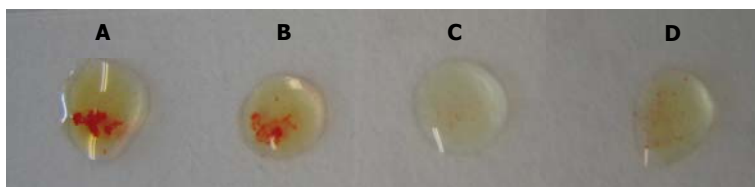


Figura 11.4. Resultats del test del TNBS corresponents als quatre experiments realitzats per estudiar la reacció d'acilació irradiant durant: 10 min (A), 5 min (B), 1 min (C) i 30 s (D), respectivament. El color vermell de la resina indica la presència d'amines primàries lliures i, per tant, que la reacció d'acilació no ha estat completa.

Inicialment el resultat obtingut va ser desconcertant, ja que a més temps de reacció pitjor era el resultat, essent la mostra corresponent a 1 min de reacció la que mostrava un grau d'acilació major. Una possible explicació d'aquests resultats podria ser, per una part, que amb un temps de reacció massa curt (30 s), no hi havia una correcta difusió dels reactius a través de la bosseta i a l'interior d'aquesta la homogeneïtat no era perfecta, quedant punts de la resina inaccessibles per als reactius. Per l'altra, amb temps de reacció massa llargs, l'elevada concentració d'àcid sota aquestes condicions de reacció podria hidrolitzar l'amida formada alliberant novament l'amina primària inicial ancorada a la resina, cosa que explicaria el color

vermell del test del TNBS realitzat en els experiments A i B. Per comprovar aquesta hipòtesi, es va realitzar un últim experiment que va consistir en agafar la bosseta amb la resina resultant del cas A i fer-la reaccionar amb una dissolució d'àcid bromoacètic (5 eq.) i DIC (5 eq.) en DMF en agitació a temperatura ambient durant 30 min (condicions estàndard d'acilació convencional). Passat aquest temps, la resina es va rentar i es va fer el test del TNBS, el qual va donar negatiu (incolor) posant de manifest una acilació completa de la resina i demostrant la hipòtesi proposada inicialment.

Després de fer tots aquests experiments, es va concloure que les condicions òptimes per dur a terme la reacció d'acilació en sistema tancat utilitzant una bosseta de malla de polipropilè per contenir la resina eren les següents: escalfar a una temperatura de 60 °C durant 1 min amb una potència de 150 W treballant amb una concentració de reactius de 0.4 M i realitzar un duplicat de la reacció.

La comparació amb les condicions descrites per Gorske *et al.* eren inevitables, tot i que a la vista dels resultats obtinguts, es va poder comprovar que les diferències existents entre les dues metodologies eren prou significatives com per no permetre aquesta comparació, si més no d'una forma directa. El canvi d'aparell, passant d'un multimode a un monomode, així com la utilització de les bossetes de malla de polipropilè enlloc de les xeringues de polipropilè, van determinar les condicions utilitzades. Per aquest motiu, no es pot dir quin mètode és millor sinó que depenent del que es necessiti i es tingui s'haurà d'utilitzar un o un altre.

11.2.1.3. Acoblament d'amina

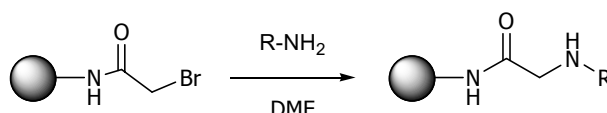


Figura 11.5. Esquema general per a les etapes d'acoblament d'amina.

L'aparició de l'article de Gorske *et al.*²⁰¹ va modificar el plantejament inicial de les proves d'optimització d'aquesta reacció, tal i com s'ha comentat anteriorment per al cas de la reacció d'acilació. Per aquest motiu, es va decidir realitzar un estudi incloent les condicions de reacció descrites en aquest article, així com introduir algunes modificacions per mirar de comprovar el resultat obtingut en canviar d'aparell i passar de treballar d'un aparell de microones multimode a un de monomode. Es van estudiar dos paràmetres de reacció: el temps (1 min o 2 min) i la temperatura (70 °C, 80 °C o 90 °C), treballant en tots els casos a una potència de 150 W.

En total es van realitzar 6 experiments, els quals es van dur a terme en bossetes de malla de polipropilè que contenen 100 mg de resina Rink amida AM. Prèviament a l'inici de l'estudi de la reacció d'acoblament d'amina, però, es van realitzar les corresponents reaccions de

desprotecció del grup Fmoc de la resina i d'acilació. Per no introduir cap factor que alterés el resultat final obtingut, aquestes reaccions es van realitzar conjuntament per a les sis bossetes en agitació a temperatura ambient. Seguidament, es va procedir amb l'acoblament de l'amina a estudiar, el qual es va realitzar amb l'amina **A15** de forma individual, col·locant cadascuna de les bossetes en un tub de reacció de 10 ml, i seguint les condicions particulars de cada experiment. En acabar, es va procedir a fer els rentats corresponents de la resina i la reacció d'escissió.

Els crus de reacció es van analitzar per HPLC i es van obtenir els valors de relació d'àrea entre la 2-(2,4-diclorofenetilamino)acetamida (**90**) esperada i l'*N*-3,3-difenil-propilacetamida (patró extern) mostrats en la Taula 11.2.

Taula 11.2. Condicions d'acoblament d'amina utilitzades en els 6 experiments. A l'esquerre s'indica el temps de reacció, mentre que a dalt s'indica la temperatura a la qual es va dur a terme cada reacció. En cada casella es mostra el valor del quocient d'àrees per HPLC entre la 2-(2,4-diclorofenetilamino)acetamida (**90**) i l'*N*-3,3-difenil-propilacetamida (patró) fent les lectures a 220 nm.

	70 °C	80 °C	90 °C
1 min	2.07	2.74	2.69
2 min	2.34	3.18	2.98

Els resultats obtinguts en tots els casos van ser del mateix ordre tot i que van mostrar una tendència favorable cap als experiments on l'escalfament es va dur a terme durant 2 min. D'entre aquests, el millor resultat va ser el corresponent a la reacció d'acoblament d'amina a 80 °C. Així doncs, aquestes van ser les condicions escollides per dur a terme la reacció d'acoblament d'amina amb bosseta de malla de polipropilè en tub de reacció de 10 ml en sistema tancat.

11.2.1.4. Síntesi del peptòide model N20-13-20C (**91**)

Una vegada optimitzades les etapes sintètiques de desprotecció del grup Fmoc de la resina, d'acilació i d'acoblament d'amina en sistema tancat, es va procedir amb la síntesi del peptòide model N20-13-20C (**91**) per mirar de validar el protocol de síntesi de peptòides en fase sòlida al microones comercial CEM en sistema tancat i utilitzant les bossetes de malla de polipropilè.

La síntesi es va dur a terme en una bosseta de polipropilè que contenia 100 mg (0.79 mmol/g, 0.079 mmol) de resina de poliestirè AM RAM, la qual es va col·locar a l'interior d'un tub de 10 ml tapat amb un sèptum. A continuació es va procedir amb la desprotecció dels grups Fmoc de la resina i amb les successives etapes d'acilació i d'acoblament d'amina. Totes

les etapes es van realitzar per duplicat. Finalment, es va dur a terme l'escissió de la resina i es va obtenir el peptòide **91** esperat, el qual es va identificar pel seu espectre de masses (CL-EM, pic molecular 711.4 (M+H)⁺).

El perfil cromatogràfic d'HPLC del cru de reacció després de l'escissió del peptòide de la resina va ser idèntic a l'obtingut utilitzant la xeringa en agitació a temperatura ambient (vegeu Figura 9.9) i va mostrar una puresa superior al 85%, mentre que el rendiment de la reacció va ser inferior (rdt. 52%).

11.2.2. ESCISSIÓ DE LA RESINA DINS DE LA BOSSETA

Una vegada optimitzat el protocol de síntesi de peptòides utilitzant la bosseta de polipropilè, es va pensar en estudiar la possibilitat de realitzar l'escissió de la resina sense haver de treure-la de la bosseta i transvasar-la cap a un tub de vidre, evitant així la seva manipulació.

Per dur a terme aquest experiment es va escollir novament el peptòide model **91**, el qual es va sintetitzar en una xeringa de polipropilè de 10 ml que contenia 300 mg de resina (0.79 mmol/g, 0.24 mmol) de poliestirè AM RAM utilitzant la metodologia descrita anteriorment amb el microones domèstic (vegeu l'apartat 9.2).

Acabada la síntesi, la resina es va rentar i assecar. Un cop seca, es va dividir en dues parts iguals: una meitat es va transvasar cap a un tub de vidre proveït d'un tap roscat i l'altra es va introduir a l'interior d'una bosseta de malla de polipropilè, la qual es va col·locar a l'interior d'un tub falcon de 15 ml proveït d'un tap roscat. A continuació, es va realitzar la reacció d'escissió.

El perfil cromatogràfic d'HPLC del cru de reacció després de l'escissió del peptòide de la resina va ser igual en ambdós casos, mostrant una puresa superior al 90%, mentre que la quantitat de residu obtingut va ser similar (105 mg i 100 mg, respectivament). El peptòide **91** es va identificar pel seu espectre de masses (CL-EM).

Així doncs, s'ha demostrat que la reacció d'escissió es pot fer sense haver de treure la resina de la bosseta. Aquest resultat va ser important de cara a la síntesi de la quimioteca de pentàmers que s'explicarà més endavant, ja que suposava una simplificació des del punt de vista experimental a l'hora de tractar amb un gran nombre de bossetes.

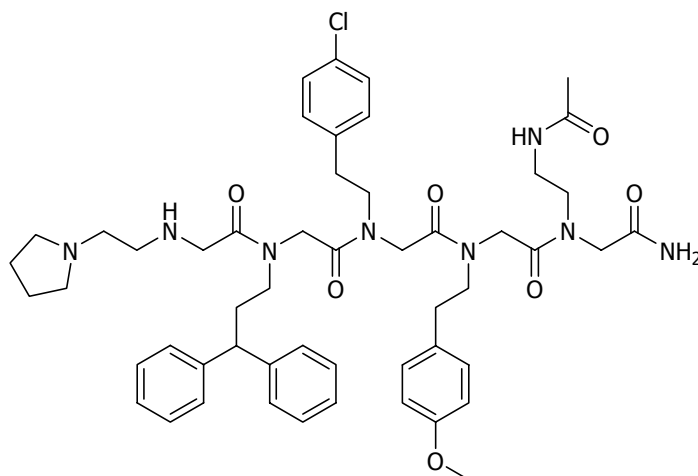
11.2.3. SISTEMA OBERT

Una vegada demostrada l'eficàcia d'aquesta metodologia en sistema tancat, es va seguir amb les proves en sistema obert. Cal recordar que un dels objectius d'aquesta tesi era sintetitzar una quimioteca de pentàmers d'*N*-alquilglicines en format de rastreig posicional i que, degut precisament al format escollit, requeria la realització d'etapes comunes de síntesi per a diferents bossetes de resina contingudes en un mateix reactor. Aquesta necessitat feia inviable

la utilització dels tubs de 10 ml, ja que era impossible col·locar-hi més d'una bosseta de la mida requerida per contenir 100 mg de resina. Així doncs, es va optar per l'opció del matràs enlloc del tub com a reactor. Amb aquest canvi, no únicament es va canviar el propi reactor de reacció, sinó que va implicar el canvi de forma de treballar, passant del sistema tancat cap al sistema obert. Tot i aquest canvi, no s'esperaven gaires modificacions respecte a les condicions de reacció descrites anteriorment, ja que igualment s'utilitzarien les bossetes i les temperatures de treball no s'acostaven al punt d'ebullició del dissolvent (DMF), amb la qual cosa no quedaven modificades dràsticament les condicions de pressió a l'interior del reactor. Per aquest motiu i mirant d'enfocar ja l'estudi de cara a la síntesi de la quimioteca, es van iniciar les proves directament amb l'intent de síntesi del pentàmer N6-20-34-13-7C (**102**) (vegeu Figura 11.6), el qual seria un dels composts de les mescles de la quimioteca.

11.2.3.1. Síntesi del pentàmer model N6-20-34-13-7C (**102**)

L'elecció del pentàmer N6-20-34-13-7C (**102**) com a model va ser arbitrària, buscant un dels composts de les mescles de la quimioteca per tal d'optimitzar el protocol de síntesi.



N6-20-34-13-7C
102

Figura 11.6. Pentàmer model N6-20-34-13-7C (**102**) sintetitzat seguint el protocol de síntesi de peptoides al microones comercial CEM utilitzant les bossetes de malla de polipropilè en sistema obert.

La síntesi es va dur a terme en una bosseta de polipropilè que contenia 100 mg (0.79 mmol/g, 0.079 mmol) de resina de poliestirè AM RAM, la qual es va col·locar a l'interior d'un matràs de 50 ml de volum proveït d'un nucli d'agitació magnètica.

Inicialment es va realitzar la desprotecció dels grups Fmoc de la resina, i a continuació, es va procedir amb les successives etapes d'acilació i d'acoblament d'amina. Les reaccions d'acilació es va dur a terme amb una concentració de reactius 0.3 M i irradiant durant 1 min a una temperatura de 60 °C amb una potència de 150 W, mentre que les d'acoblament d'amina es van realitzar amb la mateixa concentració de reactius però irradiant durant 2 min a 80 °C amb la mateixa potència. En tots els casos, les reaccions es van realitzar per duplicat. Finalment es va realitzar la reacció d'escissió col·locant la bosseta a l'interior d'un tub falcon de 15 ml. El el cru de reacció es va concentrar, es va redissoldre en una mescla ACN/H₂O i es va liofilitzar.

Es van obtenir 48 mg de cru de reacció (els esperats eren ~ 100 mg) amb una puresa superior al 85% per HPLC. Aquest resultat significava tenir un rendiment final baix ja que durant el procés de purificació s'acostuma a recuperar al voltant del 50% del cru de reacció injectat. Per aquest motiu es va decidir repetir la síntesi però variant alguns paràmetres de reacció. Cal recordar que s'havien optimitzat les condicions en sistema tancat i no en sistema obert.

Així doncs, es va agafar una bosseta de polipropilè que contenia 100 mg (0.79 mmol/g, 0.079 mmol) de resina de poliestirè AM RAM i es va col·locar a l'interior d'un matràs de 50 ml. Després de realitzar la desprotecció dels grups Fmoc de la resina es va procedir amb les corresponents reaccions d'acilació i acoblament d'amina. En aquest cas, les acilacions es van dur a terme irradiant durant 30 s a una temperatura de 35 °C, mentre que les d'acoblament d'amina es van realitzar irradiant durant 1.5 min a una temperatura de 95 °C. En tots els casos, es va mantenir la concentració de reactius (0.3 M) i es va irradiar amb una potència de 150 W, realitzant les reaccions una sola vegada. Acabada la síntesi, es va realitzar la reacció d'escissió col·locant la bosseta a l'interior d'un tub falcon de 15 ml. El el cru de reacció es va concentrar, es va redissoldre en una mescla ACN/H₂O i es va liofilitzar.

El perfil cromatogràfic d'HPLC del cru de reacció va mostrar la mateixa puresa obtinguda en la síntesi anterior (superior al 85%), però la quantitat de cru de reacció obtinguda es va duplicar (95 mg). La seva purificació per HPLC a escala semipreparativa va conduir cap a l'obtenció de 49.5 mg de pentàmer (rdt. 66%) amb una puresa per HPLC superior al 98%.

Aquest resultat es va considerar satisfactori ja que representava l'assoliment de les perspectives plantejades, és a dir, determinar les condicions de reacció per sintetitzar peptoides en sistema obert amb una puresa elevada i un rendiment acceptable de cara a la síntesi d'una quimioteca de pentàmers, la qual s'explicarà en el capítol següent.

L'explicació al canvi de condicions respecte a la síntesi en sistema tancat la podem trobar en el fet de treballar amb les bossetes, les quals, en el cas del sistema tancat, queden encaixonades dins del tub, provocant que la resina quedi força retinguda i amb poca mobilitat en el seu interior. A més, la pròpia dissolució no s'agita fàcilment, amb la qual cosa es pot produir una falta d'homogeneïtat en el si de la mescla de reacció, dificultant l'accés de reactius cap a la resina. Per aquest motiu, en aquest cas, n'hi ha prou amb unes condicions més suaus,

en quant a temps i temperatura, i no són necessaris els duplicats en cadascuna de les reaccions. En aquest sentit, cal destacar que aquestes condicions són les descrites per Gorske *et al.*²⁰¹ per a la síntesi de peptoides mencionades anteriorment, la qual cosa indica que al treballar amb la bosseta en un matràs en sistema obert, la resina es troba en condicions similars a les descrites per aquests autors.

11.2.3.2. Síntesi del pentàmer model N6-20-34-13-7C amb 5 bossetes alhora

Una vegada determinades les condicions de síntesi, calia confirmar la seva adequació al cas de tenir més d'una bosseta en el mateix matràs de reacció i, més concretament, al cas de tenir-ne cinc. Aquest requeriment venia determinat pel disseny que s'havia plantejat per a la síntesi d'una quimioteca de pentàmers en format de rastreig posicional, la qual tal s'explicarà amb detall al capítol següent.

Així doncs, es va plantejar la síntesi del pentàmer model **102** en 5 bossetes que contenen 100 mg (0.79 mmol/g, 0.079 mmol) de resina de poliestirè AM RAM cadascuna, les quals s'havien etiquetat convenientment per tal d'identificar-les.

Les bossetes es van col·locar a l'interior d'un matràs de 50 ml i la síntesi es va iniciar amb la desprotecció dels grups Fmoc de la resina. Seguidament, es van anar realitzant les corresponents reaccions d'acilació i d'acoblament d'amina seguint les condicions descrites en l'apartat anterior, però amb un volum de dissolucions superior per tal de tenir sempre totes les bossetes ben sumergides en el si de la dissolució. Acabada la síntesi, es va realitzar la reacció d'escissió col·locant cadascuna de les bossetes a l'interior d'un tub falcon de 15 ml. Els crus de reacció es van concentrar, es van redissoldre en una mescla ACN/H₂O i es van liofilitzar.

El perfil cromatogràfic d'HPLC dels 5 crus de reacció va ser igual en tots els casos, mostrant una puresa entre el 80-85%, mentre que la quantitat de cru de reacció obtingut va ser entre 85-95 mg (en l'estudi anterior d'optimització s'havien obtingut 95 mg de cru de reacció). Aquest resultat va servir per validar el protocol utilitzat, assegurant la correcta formació del compost desitjat i, el que era més important en aquest cas, que en totes les bossetes s'hi trobava per igual.

11.3. COMPARACIÓ ENTRE LES DIFERENTS METODOLOGIES UTILITZADES PER SINTETITZAR PEPTOIDES.

Al llarg d'aquests capítols s'han anat mostrant diferents metodologies de síntesi de peptoides, les quals es poden classificar en tres grups: mitjançant agitació a temperatura ambient, utilitzant un aparell de microones domèstic i finalment utilitzant un aparell de microones comercial.

En un principi, es va utilitzar la metodologia d'agitació a temperatura ambient que s'havia desenvolupat a finals dels anys 80 i principis dels 90, la qual havia sigut àmpliament utilitzada amb resultats molt satisfactoris. No obstant, presentava un inconvenient important, ja que els protocols sintètics descrits implicaven etapes d'acoblament llargues, conduint a processos sintètics que podien durar dies o setmanes, depenent de la longitud del peptòide desitjat.

L'aparició i desenvolupament de la tecnologia de microones va representar un pas endavant, i va proporcionar una solució a aquest inconvenient mitjançant l'acceleració de les reaccions químiques. En aquest sentit, cal destacar el primer article descrit sobre la síntesi de peptòides utilitzant un aparell de microones domèstic per part d'Olivos *et al.*,²⁰⁰ el qual va impulsar la nostra entrada en el camp de la síntesi assistida per microones i va servir de guia per optimitzar les condicions de reacció en el nostre cas.

Els bons resultats obtinguts amb l'aparell de microones domèstic van motivar l'adquisició d'un aparell de microones comercial, el qual oferia millores considerables en aspectes tan importants com el de la seguretat i el control dels paràmetres de reacció. Amb aquest aparell, es van desenvolupar nous protocols de síntesi de peptòides en diverses condicions: sistema obert o tancat, resina dispersa dins del reactor o en bosseta, etc. Durant aquest desenvolupament va sortir publicat el protocol de Gorske *et al.*,²⁰¹ el qual ens va servir per comparar els resultats obtinguts.

Ahora d'intentar comparar les diferents metodologies i destacar els avantatges i els inconvenients de cadascuna d'elles, cal tenir en compte un aspecte fonamental, com és la complementarietat entre elles, és a dir, que no hi ha cap metodologia que superi les altres, sinó que segons l'objectiu plantejat n'hi haurà una que anirà millor que la resta. No obstant això, sempre que sigui possible seria aconsellable evitar la d'agitació a temperatura ambient, ja que implica una pèrdua de temps considerable respecte a les altres.

El primer factor que pot determinar l'elecció és la quantitat de producte desitjada. Si aquesta és prou elevada, qualsevol de les metodologies que utilitzi un reactor petit no seria una bona opció, ja que obligaria a repetir-la diverses vegades amb la qual cosa es perdria l'estalvi de temps que suposa el treballar amb activació per microones. En aquest cas la millor opció seria treballar amb el microones comercial en sistema obert, on el volum del reactor seria el propi matràs de reacció, arribant fins a un màxim de 100 ml de volum (entre 3 o 4 g de resina).

Un segon aspecte a tenir en compte són les pròpies condicions de reacció, ja que en funció de si estan optimitzades i han d'estar controlades o no, podem escollir una metodologia o una altra. En aquest sentit, si cal fer un estudi d'optimització de condicions, l'elecció serà clara a favor del microones comercial ja que aquest ofereix un control millor sobre diferents paràmetres de reacció, ahora que assegura una major reproductibilitat. Per contra, si el procés ja està optimitzat i petites variacions en els paràmetres de reacció no afecten el rendiment de la reacció, es podria escollir treballar amb xeringues de polipropilè en el microones domèstic donada la seva capacitat de treballar amb vàries xeringues ahora. Ara bé, en aquest cas,

caldrà conèixer bé la reacció i anar amb compte ja que les mesures de seguretat que ofereix aquest aparell són mínimes. Des d'aquest punt de vista, en cas de dubte o desconeixement de la reacció, la recomanació seria l'elecció del microones comercial ja que ofereix a la persona encarregada de manipular l'aparell unes mesures de seguretat elevades.

En el cas de les quimioteques, tant si aquestes són de productes individuals com si són de mescles, s'aconsellaria utilitzar el microones comercial ja que ofereix més garanties de mantenir sempre les mateixes condicions de reacció al llarg de tota la síntesi. En el cas de treballar amb productes individuals (síntesi múltiple en paral·lel) o bé mescles controlades en format de partició i mescla (*split and mix*), es recomanaria utilitzar un aparell de microones multimode, el qual permetria realitzar un gran nombre de reaccions alhora. En canvi, en el cas de treballar amb mescles controlades en format de rastreig posicional (com es comentarà en el següent capítol), seria més apropiat treballar amb un aparell de microones monomode en sistema obert utilitzant la tècnica de la bossetes de te de Houghten,¹⁷ degut als avantatges que ofereix des del punt de vista experimental la possibilitat de realitzar les etapes de reacció comunes per a diferents bossetes alhora en una única reacció.

Per finalitzar, cal destacar que s'ha realitzat la síntesi de diferents composts utilitzant les següents metodologies: agitació a temperatura ambient, xeringa en microones domèstic, resina dispersa dins d'un matràs en microones comercial en sistema obert, resina en bosseta en microones comercial en sistema obert i resina en bosseta en microones comercial en sistema tancat. En tots els casos s'ha obtingut una puresa superior al 85% mentre que el rendiment de reacció ha oscil·lat més segons el cas. La mitjana estaria al voltant del 60%, exceptuant els casos de la resina en bosseta en microones comercial en sistema tancat on el rendiment va ser menor (rdt. 50%) degut principalment a problemes d'homogeneïtat de la dissolució i dificultats en la difusió dels reactius, i el de la resina dispersa dins d'un matràs en microones comercial en sistema obert, on les condicions de reacció no estaven del tot optimitzades i el rendiment va disminuir fins a un 40%.

12. SÍNTESI D'UNA QUIMIOTECA DE PEPTOIDES

12.1. MANIPULACIÓ DE LA RESINA

Per facilitar la manipulació de la resina i degut al format del rastreig posicional emprat per a la síntesi de la quimioteca, es va escollir la tècnica de les bosses de te desenvolupada per R. Houghten.¹⁷ Les bossetes estaven formades per una malla de polipropilè de dimensions 2.5 x 3.5 cm que contenia 100 mg de resina Rink amida (vegeu Figura 12.1). D'aquesta manera, les bosses són permeables a reactius i dissolvents però no deixen passar els grànuls de la resina. Cadascuna de les bosses estaven segellades tèrmicament i etiquetades de forma permanent per poder identificar-les al llarg de tota la síntesi.



Figura 12.1. Bossa de te amb 100 mg de resina Rink-amida emprada per a la síntesi de la quimioteca de pentàmers.

12.2. FORMAT DE LA QUIMIOTECA

La quimioteca es va dissenyar seguint el format de rastreig posicional i es va limitar a la introducció de quatre fonts de diversitat, deixant la primera posició dels pentàmers definida. L'elecció de la llargada dels peptoides es va fer tenint en compte una sèrie de consideracions. En primer lloc, la intenció d'anar una mica més enllà dels trímers, els quals havien estat àmpliament estudiats en el nostre laboratori amb resultats molt satisfactoris.^{89-92,205,207,224} En segon lloc, es tractava del primer intent, en el nostre grup, de preparar una quimioteca aplicant la metodologia d'activació per microones amb la utilització de les *bosses de te* i es va considerar que aquesta llargada era suficient per establir el protocol de síntesi en aquestes condicions. I finalment, cal destacar també que aquesta quimioteca es va dissenyar pensant en conferir a les molècules finals les característiques necessàries per poder interaccionar amb els receptors biològics amb què s'assajarien posteriorment

La primera posició de diversitat R^5 (vegeu Figura 12.2) es va fixar per tal de simplificar la preparació de la quimioteca. A més, l'experiència adquirida en el nostre grup avalava aquesta decisió, ja que es coneixia que precisament la posició més propera a l'extrem C-terminal era poc determinant en l'activitat dels peptoides. L'amina escollida per ocupar aquesta posició va ser l'*N*-(2-aminoetil)acetamida (**A7**). Aquesta amina mostrava una bona reactivitat i conferiria una solubilitat més elevada als pentàmers sintetitzats. Tant en la segona com en la tercera i quarta posicions de diversitat (R^4 , R^3 i R^2 , respectivament), es va emprar un conjunt de 5 amines primàries (vegeu Figura 12.3, grup A). Per a la cinquena posició (R^1), se'n va emprar un altre també de 5 (vegeu Figura 12.3, grup B).

Cadascuna de les quatre subquimiotèques donaria informació sobre la posició del pentàmer que es definia en aquella subquimioteca. Les mescles o bosses numerades de l'1 a la 5 tindrien definida la segona posició de diversitat (R^4), les mescles de la 6 a la 10 la tercera (R^3), les mescles de l'11 a la 15 la quarta posició de diversitat (R^2) i les mescles de la 16 a la 20 la cinquena (R^1) (vegeu Figura 12.2). D'aquesta manera, una de les posicions estava definida (O) en cada mescla per a una determinada amina i les altres tres posicions eren aleatòries (X), és a dir, una mescla de les 5 amines del grup A o de les 5 amines del grup B emprades, depenent de la posició.

D'aquesta manera s'obtindrien quatre subquimiotèques amb 5 bossetes o mescles cadascuna i 125 composts per mescla. En total, 625 peptoides diferents en el conjunt de la quimioteca, on cada compost es trobaria per quadruplicat, com a conseqüència del format de rastreig posicional.

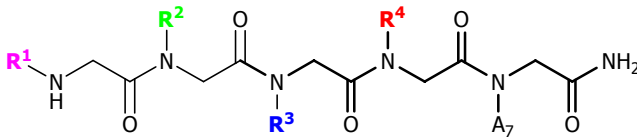
	Número de mescla	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
	1-5	X	X	X	O
	6-10	X	X	O	X
	11-15	X	O	X	X
	16-20	O	X	X	X
O Cadena lateral definida X Cadena lateral aleatòria					

Figura 12.2. Esquelet bàsic comú a la quimioteca de peptoides i organització de les mescles en funció de la posició del pentàmer que defineixen. Les fonts de diversitat es denoten com R¹, R², R³ i R⁴. La font de diversitat R⁵ està fixada amb l'amina A7.

La forma d'anomenar els pentàmers s'ha definit seguint el mateix sistema que per anomenar els trímers (vegeu l'apartat 3.3).

12.3. DIVERSITAT DE LA QUIMIOTECA

12.3.1. ELECCIÓ DE LES FONTS DE DIVERSITAT

A l'hora d'escollir les amines que haurien de servir per introduir la diversitat en els pentàmers finals, es va pensar en amines primàries assequibles comercialment. En general, es van emprar les amines que havien donat millors resultats en les quimiotèques de peptoides sintetitzades anteriorment al laboratori, evitant totes aquelles que no havien donat resultats positius en les dianes assajades. Per altra banda, amb l'objectiu d'evitar la formació de composts ciclats no desitjats (vegeu l'apartat 3.4.1) es van eliminar de la primera, segona i tercera posicions (R⁴, R³ i R², respectivament) aquelles amines que tenien un nitrogen terciari addicional (vegeu Figura 12.3, grup A), però sí que es van introduir en la quarta posició (R¹), perquè en els resultats del cribratge de les quimiotèques de peptoides es van identificar composts actius que contenien aquest tipus d'amina (vegeu Figura 12.3, grup B, amines A6 i A19).

En general, les amines escollides van ser del tipus R-CH₂-CH₂-NH₂, per intentar que tinguessin reactivitats similars. No obstant això, n'hi ha dues del tipus R-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂ (A12 i A19) i una del tipus R-CH₂-NH₂ (A11).

Aquest conjunt d'amines tenia una funcionalització variada per conferir a la quimioteca una elevada diversitat, però evitant la presència d'altres grups funcionals a la seva estructura que poguessin donar reaccions secundàries, tals com alcohols, tiols, àcids carboxílics, etc., o que fos necessari una protecció addicional durant la síntesi de la quimioteca.

Així doncs, les amines escollides presentaven diferències d'hidrofobicitat, d'aromaticitat, de càrrega, de dimensió, de flexibilitat, de capacitat de formar ponts d'hidrogen i amb grups donadors o atraients d'electrons. Analitzant més concretament les amines del grup A (**A7**, **A12**, **A13**, **A20** i **A34**), es pot comprovar que hi predominava el caràcter aromàtic. Això es va decidir així perquè es poden trobar molts exemples en la bibliografia que descriuen la importància de les interaccions aromàtiques en el reconeixement molecular (proteïna-ligand, proteïna-proteïna, etc.)^{206,225} així com en la estabilització de l'estructura de les proteïnes²²⁶ i de complexos proteics amb molècules petites.²⁰⁶ Per altra banda, les amines del grup B (**A6**, **A9**, **A11**, **A19** i **A35**), es van escollir amb molta més diversitat, ja que la experiència adquirida en el nostre grup d'investigació indicava que l'amina de l'extrem *N*-terminal podia ser determinant en l'activitat del peptòide sintetitzat.

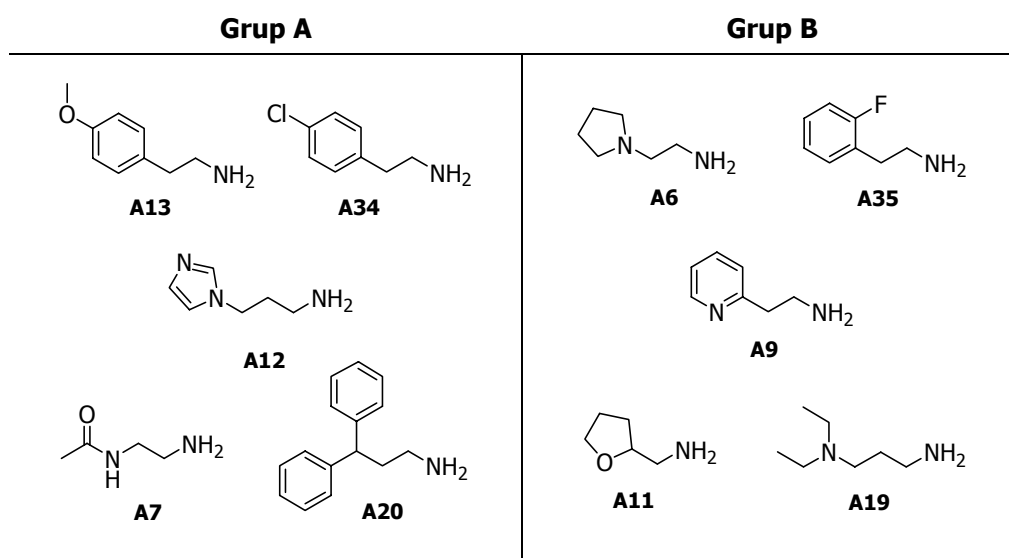


Figura 12.3. Conjunt d'amines primàries emprades per a la síntesi de la quimioteca de pentàmers: grup A per les fonts de diversitat R^2 , R^3 i R^4 i grup B per la font de diversitat R^1 .

12.3.2. PROVES DE REACTIVITAT

12.3.2.1. Antecedents

Tal i com s'ha comentat anteriorment, en sintetitzar una quimioteca de mesclures és important realitzar un estudi previ per avaluar les possibles diferències de reactivitat que poden haver entre els reactius emprats en les diferents fonts de diversitat. Aquest estudi resulta molt important en el format de rastreig posicional, on es treballa amb mesclures de reactius en les etapes d'introducció de diversitat. L'existència de diferències de reactivitat pot implicar que no es formin tots els productes esperats o que es trobin en les mesclures finals en concentracions

inferiors o superiors a les esperades. Aquests fets poden produir falsos negatius o falsos positius durant el cribratge de les mescles davant una diana biològica.

En el nostre laboratori s'han realitzat diferents estudis de reactivitat d'amines. El primer va ser realitzat per Marc Humet en el transcurs de la seva tesi doctoral per a la síntesi de la quimioteca de peptoides-I.⁸⁸ Aquest estudi estava basat en la reacció d'acoblament entre la cloroacetamida i una mescla de dues amines ($R-NH_2$ i R^*-NH_2 , Figura 12.4) i l'anàlisi posterior i quantificació de les integrals dels hidrògens del carboni alfa respecte el grup carbonil per 1H -RMN. Aquesta reacció es va estudiar amb un conjunt de quatre amines representatives de tot el conjunt amb què es treballava i es va concloure que no hi havia diferències significatives de reactivitat entre elles.

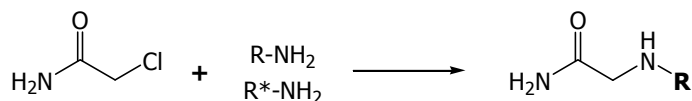


Figura 12.4. Primer assaig per avaluar les reactivitats relatives de les amines respecte el patró R^*-NH_2 , on R pot ser R o R^* .⁸⁸

Posteriorment, en la seva tesi doctoral,¹⁹⁹ Núria Cortés va realitzar uns estudis de reactivitat molt més exhaustius després d'observar diferències de reactivitat entre les diferents amines utilitzades per a la síntesi d'una segona quimioteca de peptoides. Primerament, va fer un estudi en dissolució fent reaccionar el clorur de cloroacetil amb mescles equimolars d'amines, analitzant les glicinamides obtingudes per CG (vegeu Figura 12.5).

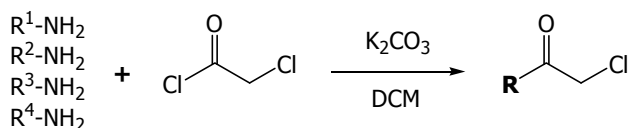


Figura 12.5. Esquema general d'acilació amb el clorur de cloroacetil emprant mescles equimolars d'amines, on R pot ser R^1 , R^2 , R^3 o R^4 .¹⁹⁹

Aquests estudis van mostrar diferències de reactivitat importants, però el model escollit no era representatiu de les reaccions que s'havien de fer durant la síntesi de la quimioteca i per tant se'n va buscar un de més adient.

El segon model utilitzat introduïa un factor tan important com era la fase sòlida. Aquest assaig va consistir en la síntesi de glicinamides *N*-substituïdes seguint l'esquema general descrit en la Figura 12.6, fent competir les amines en l'etapa d'acoblament.

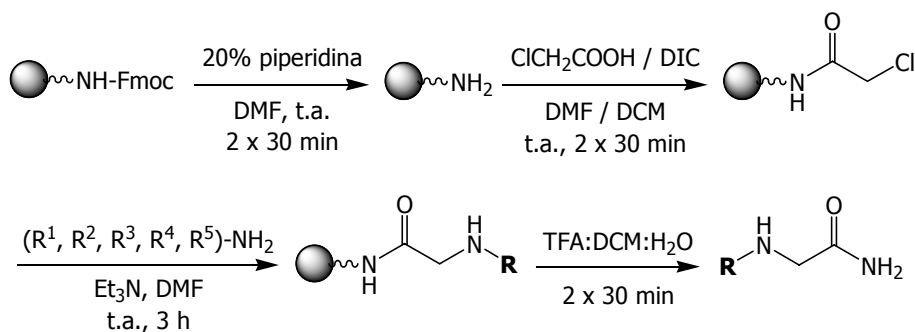


Figura 12.6. Esquema general per a la síntesi de glicinamides *N*-substituïdes en fase sòlida emprant mescles equimolars d'amines, on **R** pot ser R^1 , R^2 , R^3 , R^4 o R^5 .

Després de l'escissió final, es va procedir a l'anàlisi i quantificació de les mescles obtingudes. Tot i confirmar per CL-EM la presència de totes les glicinamides esperades, la quantificació va resultar difícil per CG perquè els cromatogrames obtinguts eren molt complexos i mostraven una gran quantitat de pics.

A continuació es va fer un assaig anàleg a aquest últim, però prenent la formació de 2,5-piperazinadiones (DKPs)⁹³ com a model per fer competir les amines en les etapes d'acoblament i fer un anàlisi per ^1H -RMN. Malgrat les expectatives inicials, el resultat no va ser del tot satisfactori, ja que es van tornar a observar diferències de reactivitat, però no es van poder quantificar correctament.

Per aquest motiu es va pensar en una altra tècnica analítica que evités la manipulació i purificació de les mostres. En aquest sentit, l'HPLC va ser la tècnica escollida. Abans, però, es va haver d'introduir una modificació sintètica per assegurar la detecció per UV de tots els composts analitzats. Aquesta modificació va consistir en el canvi de l'àcid cloroacètic per l'àcid 4-clorometilbenzoic en l'etapa d'acilació, tal i com es mostra en l'esquema de la Figura 12.7, per donar lloc a benzamides *N*-substituïdes. D'aquesta manera es farien competir les amines en l'etapa d'acoblament i es quantificarien cadascuna de les mescles finals respecte a un patró extern de referència. En funció de les diferències de reactivitat observades, es podrien aplicar factors de correcció en els equivalents de les amines a afegir per assegurar una concentració equiparable dels corresponents productes en les mescles finals.

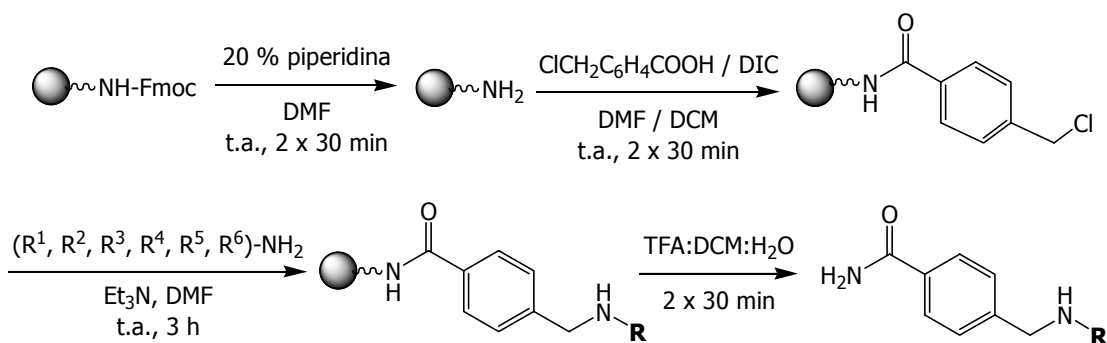


Figura 12.7. Esquema general de síntesi de benzamides en fase sòlida emprant mesclres equimolars d'amines en l'etapa d'acoblament, on **R** pot ser $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5$ o R^6 .

Per quantificar les benzamides formades per HPLC, es van haver de trobar unes condicions d'elució òptimes que en permetessin la separació i va ser necessari l'obtenció de les rectes de calibració per a cadascuna d'elles respecte una referència externa. Per aquest motiu va ser necessari sintetitzar prèviament cadascuna de les benzamides d'estudi seguint una seqüència sintètica de dues etapes amb la 4-metilbenzamida com a producte de partida (vegeu Figura 12.8).

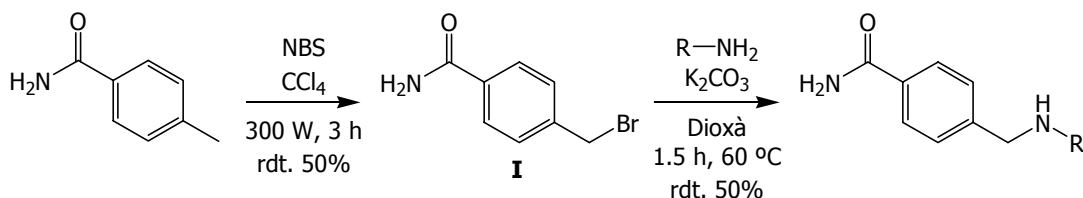


Figura 12.8. Esquema general per a la síntesi de benzamides en dissolució: primerament té lloc la bromació de la 4-metilbenzamida per obtenir el compost bromat **I**, seguida de la substitució nucleòfila del brom per una amina primària (dades de Núria Cortés).¹⁹⁹

Primerament, es va dur a terme la bromació amb NBS sota irradiació amb llum blanca, seguida de la substitució nucleòfila del brom per una amina primària. El patró de referència extern escollit per determinar les rectes de calibració va ser l'*N*-3,3-difenilpropilacetamida, obtinguda per acetilació de l'amina **A20** amb anhídrid acètic i piridina, donada la seva estabilitat química i el seu temps de retenció per HPLC, prou diferent al de les benzamides. A la Taula 12.1 queden recollides les rectes de calibració de les 10 benzamides sintetitzades corresponents a les 10 amines estudiades per a la síntesi de la quimioteca de pentàmers. Finalment, després d'analitzar tots els valors obtinguts, es van poder determinar els factors d'equiactivitat per a les amines estudiades.

Taula 12.1. Equacions de les rectes de calibració determinades per a les deu benzamides estudiades.¹⁹⁹ Esquerre, les corresponents a les amines del grup A; dreta, les del grup B. Al costat de cada benzamida s'indica la corresponent amina emprada per a la seva síntesi. $Y = \text{Abs}(\text{benzamida})/\text{Abs}(\text{patró})$ i $X = [\text{benzamida}]/[\text{patró}]$.

Benzamida	Amina	Equació	Benzamida	Amina	Equació
I	A7	$y = 0.648x + 0.006$	VI	A6	$y = 0.397x + 0.046$
II	A12	$y = 0.587x - 0.006$	VII	A9	$y = 0.872x + 0.019$
III	A13	$y = 1.102x + 0.019$	VIII	A11	$y = 0.588x - 0.028$
IV	A20	$y = 1.501x - 0.027$	IX	A19	$y = 0.425x + 0.008$
V	A34	$y = 1.337x + 0.004$	X	A35	$y = 0.973x - 0.020$

D'aquesta manera, quedava establert un mètode de determinació de factors d'equiactivitat aplicable de forma general per qualsevol tipus d'amina primària per a aquest tipus de reaccions en fase sòlida.

12.3.2.2. Estudi de la reactivitat de les amines del Grup A i del Grup B en fase sòlida utilitzant mescles equimolars en l'etapa d'acoblament

Aquest estudi es va realitzar seguint el procediment descrit anteriorment, modificant l'etapa d'acoblament de les amines, la qual es va fer per activació amb microones en les mateixes condicions de reacció que posteriorment s'utilitzarien per preparar la quimioteca de pentàmers. Seguint l'esquema de la Figura 12.9, es van fer dues reaccions en fase sòlida, una per a les amines del grup A i una per a les del grup B.

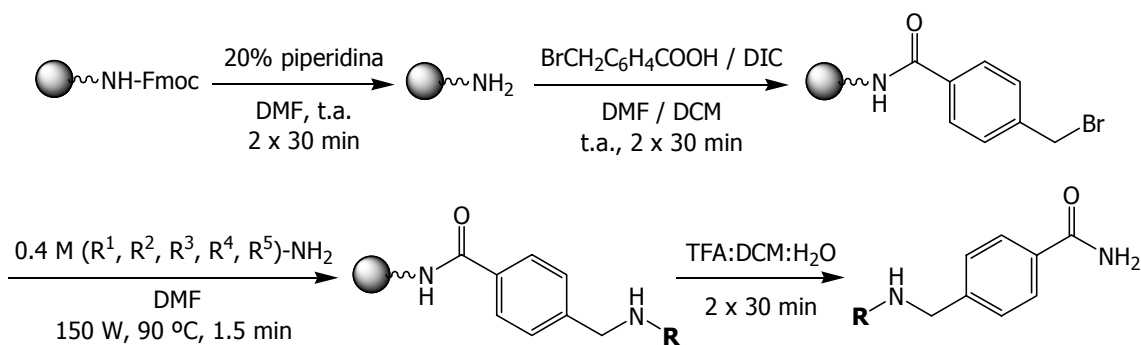


Figura 12.9. Esquema general de síntesi de benzamides en fase sòlida emprant mescles equimolars d'amines i irradiació per microones en l'etapa d'acoblament, on **R** pot ser R^1 , R^2 , R^3 , R^4 o R^5 .

La introducció de diversitat va tenir lloc per l'atac nucleòfil d'una mescla equimolar de 5 amines, emprant la mateixa concentració que la utilitzada per a la síntesi de la quimioteca de pentàmers, sobre el bromoderivat unit a la resina. Es va escollir l'amina **A12** com a referència

interna de les amines del grup A, mentre que per a les del grup B es va escollir l'amina **A6**. Cadascun d'aquests estudis es va realitzar per duplicat. Després de l'etapa d'escissió, els residus de les mescles de les benzamides es van liofilitzar i, sense cap tipus de tractament addicional, es van analitzar per HPLC, afegint com a patró de referència l'*N*-3,3-difenilpropilacetamida. A la Figura 12.10 es mostra, a tall d'exemple, el perfil cromatogràfic obtingut d'un dels residus.

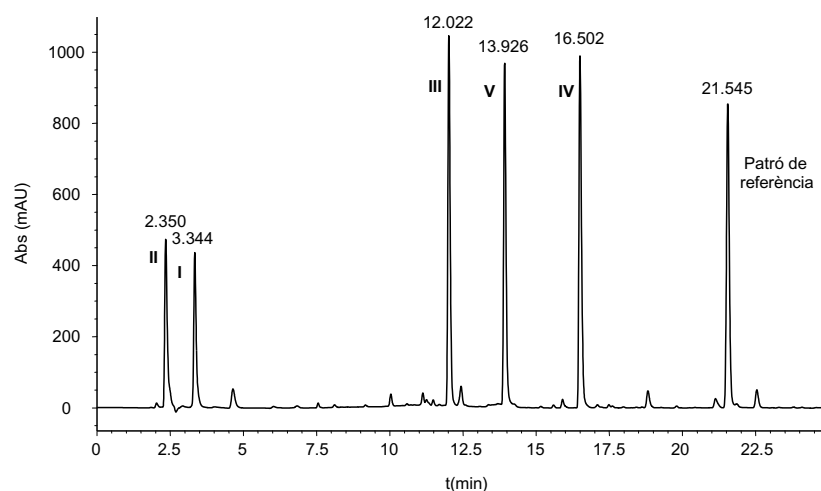


Figura 12.10. Perfil cromatogràfic d'HPLC del residu obtingut d'una de les mescles de benzamides amb el patró de referència. Als pics corresponents a cada compost de la mescla s'indica el seu temps d'elució, en min.

A partir de l'anàlisi de les mostres per HPLC i tenint en compte les corresponents rectes de calibració de cada benzamida (vegeu Taula 12.1 de l'apartat 12.3.2.1.), es van determinar els valors de reactivitat relativa i els factors d'equireactivitat[‡] en fase sòlida de les 10 amines corresponents a les benzamides sintetitzades en relació a l'amina **A12**, per a les amines del grup A, i en relació a l'amina **A6** per a les del grup B. La mitjana dels resultats obtinguts dels dos duplicats de cada reacció es mostren a la Taula 12.2.

Taula 12.2 Valors de reactivitat i factors d'equireactivitat en fase sòlida determinats per a les 10 amines estudiades en relació a l'amina **A12** per a les amines del grup A (esquerre) i en relació a l'amina **A6** per a les del grup B (dreta).

	A7	A12	A13	A20	A34	A6	A9	A11	A19	A35
Reactivitat relativa	0.73	1.00	0.95	0.78	0.76	1.00	0.46	0.47	0.90	0.31
Factor d'equireactivitat	1.37	1.00	1.05	1.28	1.32	1.00	2.18	2.15	1.11	3.24

[‡] El factor d'equireactivitat s'ha calculat a partir de la inversa del valor de reactivitat relativa a **A12** per a les amines del grup A i a **A6** per a les del grup B, és a dir a 1.

Aquests resultats van mostrar una certa homogeneïtat de valors de reactivitat entre les amines del grup A i una dispersió més gran entre les del grup B. Precisament en aquest grup, cal destacar les amines **A6** i **A19**, amb un nitrogen terciari en la cadena lateral, les quals van mostrar una reactivitat molt superior a la resta d'amines. En canvi, l'amina que va mostrar menys reactivitat va ser, sorprenentment, l'amina **A35**, que és l'amina aromàtica fluorada en posició *orto* i una de les més utilitzades darrerament en el laboratori donats els seus bons resultats d'activitat davant de diferents dianes biològiques.^{207,224} Pel que fa referència a les amines del grup A, totes elles van mostrar valors de reactivitat similars. Evidentment, en no tenir cap amina comú entre els dos grups, no es van poder treure conclusions entre amines de diferent grup. No obstant això, aquest fet no suposava cap inconvenient ja que durant el transcurs de la síntesi de la quimioteca, mai dues amines de grups diferents estarien mesclades competint pel mateix substrat.

En aquest punt, calia confirmar els resultats anteriors i comprovar si variant les concentracions de cada amina en l'etapa d'acoblament, tot aplicant els factors de correcció d'acord amb els corresponents factors d'equireactivitat, s'aconseguia compensar la diferència de reactivitat entre les amines i, en conseqüència, obtenir concentracions similars de cada benzamida en les mescles finals.

12.3.2.3. Estudi de la reactivitat de les amines del Grup A i del Grup B en fase sòlida utilitzant mescles equireactives en l'etapa d'acoblament

De forma anàloga a l'apartat anterior, es van realitzar dues reaccions en fase sòlida, una per a les amines del grup A i una per a les del grup B, afegint una mescla de 5 amines amb les concentracions ajustades d'acord amb els factors de reactivitat determinats. Igualment, cada reacció es va realitzar per duplicat. En aquest cas, l'anàlisi per HPLC dels residus de les mescles de les benzamides resultants van mostrar els valors de reactivitat de les 10 amines corresponents a les benzamides sintetitzades que s'indiquen a la Taula 12.3.

Taula 12.3. Valors de reactivitat en dissolució determinats per a les 10 amines estudiades en relació a l'**A12** per a les amines del grup A (esquerre) i en relació a l'**A6** per a les del grup B (dreta), després d'haver aplicat durant la síntesi de les benzamides els factors d'equireactivitat corresponents a cada amina.

	A7	A12	A13	A20	A34	A6	A9	A11	A19	A35
Reactivitat relativa	0.98	1.00	1.01	0.98	1.00	1.00	0.89	0.95	0.97	0.87

Els nous valors de reactivitat obtinguts van mostrar com, efectivament, després de tenir en compte els factors de correcció de cada amina, la seva reactivitat era molt similar en gairebé

tots els casos. Novament es va poder comprovar l'homogeneïtat entre totes les amines del grup A, mentre que les del grup B van presentar una lleugera dispersió, sobretot en els casos de l'amina **A9** i de l'amina **A35**, els quals van donar uns valors de reactivitat relativa d'un 10% inferiors als del valor de referència.

12.3.3. CONCLUSIONS DE LA REACTIVITAT DE LES AMINES DE LA QUIMIOTECA

En aquest estudi per HPLC es van obtenir els valors de reactivitat dels dos conjunt d'amines que s'utilitzarien per sintetitzar la quimioteca de pentàmers. En termes generals, s'ha pogut observar una dispersió en la reactivitat de les amines en fase sòlida, tant entre les amines aromàtiques com entre les no aromàtiques, posant de manifest les diferències existents entre elles a nivell d'estructura, de volum, de volatilitat, de caràcter polaritzable o d'hidrofobicitat. Aquestes diferències s'han fet més evidents sobretot, entre les amines del grup B, on els valors de reactivitat relativa han estat més dispersos.

No obstant, tot i l'existència de diferències en la reactivitat de les amines en fase sòlida, s'ha pogut comprovar la correcció i amortiment d'aquesta diferència amb l'ajust de les quantitats d'amina, en funció dels seus factors d'equireactivitat, durant la síntesi de les benzamides corresponents.

Així doncs, els resultats d'aquest estudi de reactivitat han mostrat la importància i la necessitat de la realització d'aquest tipus d'estudi quan es porten a terme síntesis de quimiotèques de mesclades on les etapes d'introducció de diversitat impliquen l'addició de mesclades de reactius. Aquesta necessitat, per tant, és inqüestionable en el cas d'una síntesi seguint el format de rastreig posicional amb reactius que difereixen prou entre ells, escollits per tal que la diversitat de la quimioteca sigui gran, com és el cas de la quimioteca de pentàmers.

12.4. PROCEDIMENT PER A LA SÍNTESI DE LA QUIMIOTECA

12.4.1. PLANTEJAMENT DE LA SÍNTESI

La seqüència plantejada per a la síntesi de la quimioteca de pentàmers es mostra a la Figura 12.11.

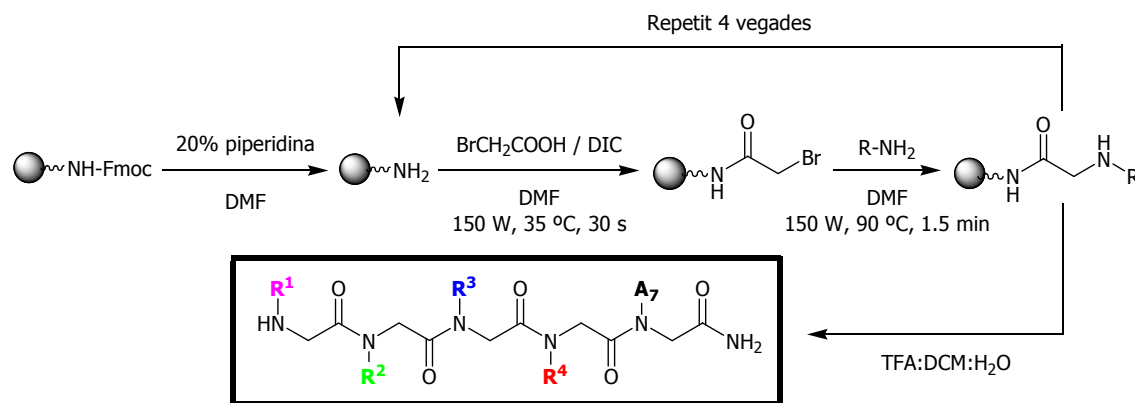


Figura 12.11. Esquema plantejat per a la síntesi de la quimioteca de pentàmers: etapes de desprotecció, d'acilació i d'aminació successives, i d'escissió final.

La síntesi va comportar un total de 12 etapes, de les quals la desprotecció del grup Fmoc dels grups amino units a la resina es va realitzar conjuntament per a totes les mescles. La resta es va realitzar en tandes de 5 en 5 degut a la limitació del volum del reactor emprat en l'aparell de microones, excepte en el cas de les etapes d'aminació on quedava definida una de les posicions de diversitat, casos on les mescles es van fer reaccionar de forma individual. Els rentats entre les diferents etapes es va realitzar en ampolles de polipropilè de 5 en 5 o de forma individual, segons de la reacció d'on procedien els crús.

Les condicions emprades per a la síntesi van ser les optimitzades durant el desenvolupament de la metodologia de reacció en fase sòlida, amb l'activació per microones, exceptuant la desprotecció inicial, la qual es va dur a terme en agitació a temperatura ambient.

A diferència de la metodologia convencional utilitzada en el nostre laboratori per a la síntesi de peptoides, es va decidir substituir en les etapes d'acilació l'àcid cloroacètic per l'àcid bromoacètic, per mirar d'afavorir les reaccions d'acoblament d'amina i així assegurar una màxima conversió. Per altra banda, la utilització de la tècnica de les *bossetes de te* va implicar la utilització d'un excés de reactius de 30-50 equivalents per mantenir-ne la concentració òptima, donat el gran volum de dissolvent requerit per aquesta metodologia.

12.4.2. PROCEDIMENT GENERAL PER A LA SÍNTESI D'UNA QUIMIOTECA DE MESCLÉS

Per sintetitzar una quimioteca amb format de rastreig posicional, s'ha de seguir una metodologia concreta en les etapes d'introducció de diversitat, tal i com s'ha esquematitzat en la Figura 12.12. Inicialment es van posar totes les bossetes juntes en una ampolla de polipropilè de 500 ml per realitzar l'etapa de desprotecció del grup Fmoc en agitació a temperatura ambient. Acabada la reacció, es va buidar el dissolvent i es va procedir als rentats

corresponents de la resina dins de la mateixa ampolla. A partir d'aquí es van separar les bossetes de cada subquimioteca i es va procedir a continuar la síntesi amb etapes successives d'acilació i d'acoblament d'amina. Totes les reaccions es van fer conjuntament per a les 5 bossetes de cadascuna d'aquests quatre grups, excepte les etapes d'acoblament d'amina amb la posició definida, les quals es van tractar de forma individual amb la corresponent amina (50 eq.) en DMF. En canvi, en les etapes d'acoblament d'amina amb les posicions no definides (posicions aleatòries) es van fer reaccionar totes les bossetes amb una mescla equireactiva d'amines aplicant els factors d'equireactivitat explicats en l'apartat 12.3.2.3 partint d'un nombre mínim de 30 eq.

Per altra banda, no es van fer controls de reacció degut a la dificultat d'introduir una bosseta més per a la síntesi en paral·lel d'un pentàmer control, en les mateixes condicions de reacció que la resta de pentàmers, dins l'esquema sintètic de la quimioteca. No obstant això, la gran quantitat de proves d'optimització de les condicions de reacció efectuades abans de la síntesi de la quimioteca donava prou garanties d'èxit com per dur a terme tota la síntesi sense la necessitat de controlar-la al final de cada etapa.

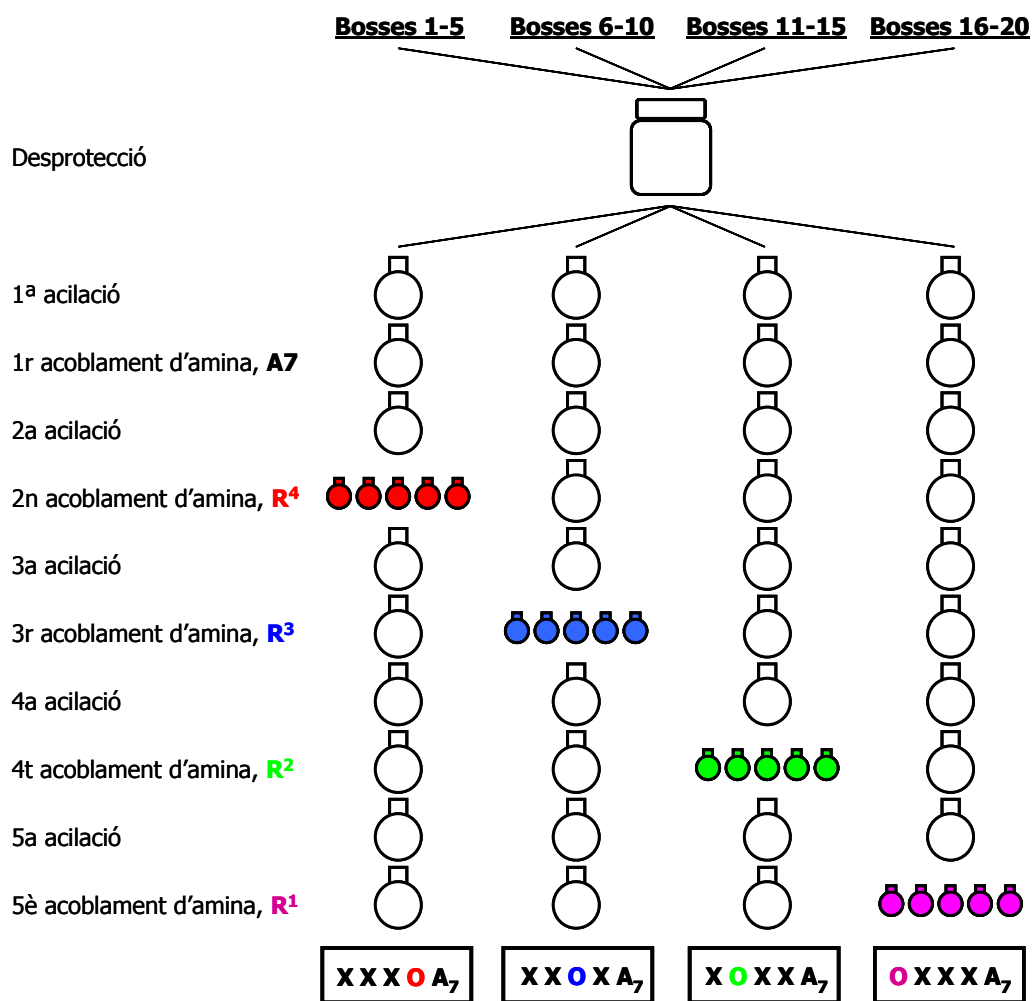


Figura 12.12. Esquema de la manipulació i organització de les diferents bossetes en la síntesi de la quimoteca de pentàmers en format de rastreig posicional. **O**: posició definida; **X**: posició aleatòria.

Després de l'escissió final de la resina, no es va poder determinar la puresa dels pentàmers degut a la presència del nombre tan elevat de composts (125 pentàmers) en cada mescla. No obstant, es van analitzar totes les mescles per EM (mode FIA) i es van poder observar clarament les dues distribucions gaussianes corresponents al pic molecular $(M+H)^+$ entre 726 i 1092 i al $(M+2H)^{2+}/2$ entre 363 i 546. Evidentment, hi havia massa composts per intentar identificar-los individualment, però sí que mostrava clarament la presència dels pentàmers. A tall d'exemple, la Figura 12.13 mostra l'espectre de masses obtingut per a la bossa n^o 11.

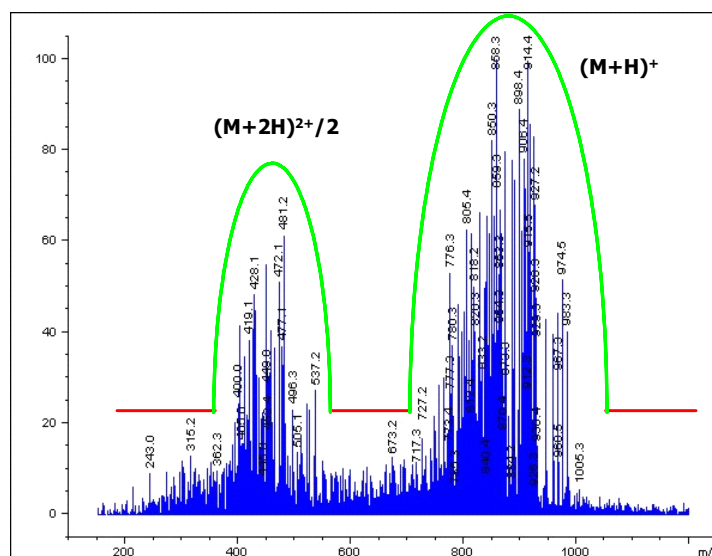


Figura 12.13. Espectre de masses obtingut en mode FIA per a la mescla de pentàmers de la bossa n^o 11. Esquerra: conjunt de masses corresponents a $(M+2H)^{2+}/2$; Dreta: conjunt de masses corresponents a $(M+H)^+$.

Els pentàmers es trobaven en forma de trifluoroacetats, en provenir de l'evaporació dels dissolvents del còctel de tall de la fase sòlida. Sense cap purificació addicional, les mescles de la quimoteca es van dividir en mostres alíquotes a una concentració de 5 mg/ml, el que suposava una concentració aproximada de 40 μ M per peptòide en cada mescla i es van liofilitzar. Finalment, es van distribuir aquestes mostres alíquotes entre diferents grups d'investigació, els quals han dut a terme els assaigs d'activitat biològica contra diferents dianes d'interès terapèutic.

12.5. CONCLUSIONS

Al llarg d'aquest capítol s'ha presentat una metodologia alternativa per a la preparació de quimiotèques combinatòries i, més concretament, de quimiotèques en format de rastreig posicional. En aquest sentit, caldria destacar que es tracta de la primera quimioteca de mescles controlades sintetitzada en aquest format utilitzant la metodologia de les bossetes de te i activació per microones.

En aquest sentit, ha quedat demostrada la necessitat de realitzar l'estudi d'equireactivitat entre les amines primàries escollides com a font de diversitat, ja que tot i tenir una estructura general comuna, mostren diferències de reactivitat importants entre algunes d'elles, la qual cosa podria conduir a diferències importants en la distribució dels productes finals en les mescles de la quimioteca.

Així doncs, la principal novetat presentada és l'activació per microones, la qual permet accelerar molt el procés sense perdre eficàcia sintètica. Tant és així que, un cop optimitzades les etapes de síntesi i després de realitzar els estudis d'equireactivitat, la quimioteca es va poder sintetitzar en un únic dia de feina.

13. ACTIVITAT BIOLÒGICA DELS PENTÀMERS DE LA QUIMIOTECA

Un dels objectius més importants de la recerca biomèdica és la identificació de noves molècules cap de sèrie amb interès terapèutic. Amb aquesta finalitat es va realitzar el cribratge de la quimioteca de pentàmers davant de diferents dianes biològiques disponibles en diversos grups de recerca amb qui el nostre grup es va posar en contacte.

Al llarg d'aquest capítol es mostraran els resultats més rellevants obtinguts fins ara en el cribratge de la quimioteca.

13.1. DIABETIS

La diabetis (*Diabetis mellitus*) és una malaltia crònica del metabolisme dels carbohidrats, els greixos i les proteïnes caracteritzada per un augment anormal dels nivells de glucosa en la sang (hiperglucèmia), com a conseqüència de falta d'insulina o d'un mal funcionament de la seva producció o regulació. Aquests desordres metabòlics condueixen als símptomes típics de la diabetis: poliúria, polifàgia i polidípsia. La diabetis s'associa també amb neuropaties, nefrologies, retinopaties, problemes cardiovasculars, embòlies i mort prematura. El resultat és una disminució substancial de la qualitat i de l'esperança de vida.

Hi ha dos tipus de diabetis: la tipus 1 o diabetis insulíndependent, i la tipus 2 o no insulíndependent. La primera afecta entre un 5-10% de la població, es manifesta en la infantesa i en l'adolescència, i està provocada per una destrucció autoimmune de les cèl·lules β pancreàtiques. En canvi, la diabetis tipus 2 afecta al 90-95% de població i es caracteritza per dos factors: el desenvolupament per part de l'organisme d'una resistència cap als efectes de la insulina i una relativa deficiència en la seva producció per part de les cèl·lules β pancreàtiques.

Tot i que tradicionalment l'estudi d'aquesta patologia s'havia centrat en el metabolisme de carbohidrats, en els últims anys s'ha produït un canvi cap a l'estudi del metabolisme dels àcids grassos com a promotor principal d'aquesta malaltia. En aquest sentit, s'ha demostrat una correlació entre l'acumulació de lípids en teixits perifèrics (fetge i múscul principalment), la menor captació de glucosa en el múscul i l'aparició de resistència a la insulina.

El transport d'àcids grassos dins de la mitocondria el realitza el sistema carnitina-palmitoiltransferasa i està esquematitzat a la Figura 13.1. Aquest sistema està compost per tres proteïnes: la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I), la carnitina-acilcarnitina translocasa (CACT) i la carnitina palmitoiltransferasa II (CPT II), cadascuna d'elles amb una localització subcel·lular diferent. En un primer pas, els acils-CoA formats en la membrana mitocondrial externa per l'acció de l'ACS (acil-CoA sintetasa) a partir d'àcids grassos, són convertits en acil-carnitina. Aquest pas està regulat per la CPT I, localitzada en la membrana mitocondrial externa. El complex acil-carnitina és transportat a la matriu mitocondrial en una reacció d'intercanvi facilitada per la CACT, una proteïna integral de membrana mitocondrial interna. En la matriu mitocondrial, l'acil-carnitina és reconvertida a acil-CoA per acció de la CPT II, localitzada a la cara interna de la membrana mitocondrial interna. La carnitina alliberada difon cap al citoplasma i pot tornar a ser utilitzada per la CPT I.

La CPT I està fortament regulada pel seu inhibidor fisiològic, el malonil-CoA, i per tant és el pas més important en el control de l'oxidació d'àcids grassos. Això converteix a CPT I en una potencial diana farmacològica per al tractament de l'acumulació d'acils-CoA de cadena llarga, contribuint al tractament de desordres metabòlics com les malalties coronàries, la resistència a la insulina i la diabetis.

Els mamífers expressen dues isoformes de CPT I: la isoforma hepàtica (LCPT I) i la isoforma de múscul cardíac i esquelètic (MCPT I). Aquestes isoformes són producte de dos gens diferents. La identitat de seqüència d'aminoàcids és del 62%, però la seva regulació per malonil-CoA és diferent. La isoforma muscular és molt més sensible al malonil-CoA (la IC_{50} és dos ordres de magnitud menor per a la MCPT I). Aquesta propietat està involucrada en la complexa regulació de l'oxidació d'àcids grassos en el múscul esquelètic.

El nostre objectiu, doncs, va ser la identificació de compostos capaços d'activar farmacològicament l'activitat de CPT I en les seves dues isoformes.

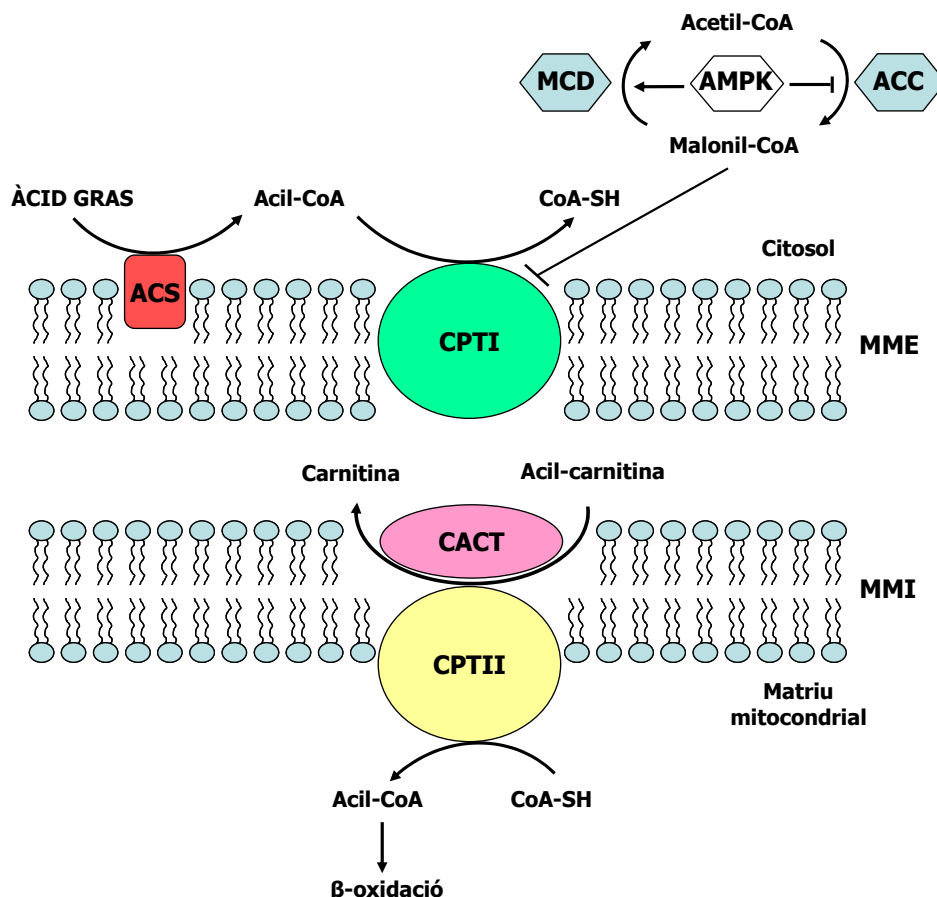


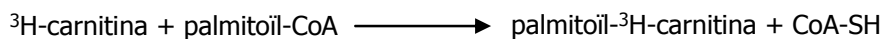
Figura 13.1. El transport d'àcids grassos dins la mitocondria mitjançant el sistema CPT. Els àcids grassos de cadena llarga s'activen a acil-CoA per acció de la acil-CoA sintetasa (ACS). El transport de l'acil-CoA cap a l'interior de la mitocondria el realitza la CPT I, la qual converteix l'acil-CoA en acil-carnitina; la carnitina:acilcarnitina translocasa (CACT), que transporta l'acil-carnitina a través de la membrana mitocondrial interna; i la CPT II que reconverteix l'acil-carnitina en acil-CoA. Els nivells de malonil-CoA, inhibidor de la CPT I, estan regulats per l'activitat de l'acetil-CoA carboxilasa (ACC) i la malonil-CoA descarboxilasa (MCD), les quals alhora estan regulades per l'AMPK. MME: membrana mitocondrial externa; MMI: membrana mitocondrial interna.

13.1.1. CRIBRATGE DE LA QUIMIOTECA

El procés de cribatge de la quimioteca de pentàmers per trobar activadors farmacològics de la CPT I va ser realitzat pel Dr. David Sebastian, del grup del Dr. Fausto García-Hegardt i de la Dra. Guillermina Asins, del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

L'activitat de la CPT I es va determinar mitjançant un mètode radiomètric assajat en fraccions enriquides en mitocondries,²²⁷ on aquestes romanien intactes. L'assaig es va realitzar sempre amb aquestes fraccions sense congelar per evitar la ruptura de les mitocondries i l'aparició de l'activitat de la CPT II.

Els substrats per l'assaig d'activitat van ser l'hidroclorur de l'L-[metil-³H]carnitina i el palmitoil-CoA. La reacció es va produir en la següent direcció:



El procés es basa en la formació de palmitoilcarnitina marcada radioactivament, la qual és soluble en un medi orgànic de butanol, mentre que l'excés de carnitina radioactiva que no ha reaccionat és soluble en aigua. D'aquesta manera, mitjançant una extracció amb butanol saturat d'aigua es pot separar la palmitoilcarnitina. La determinació de la radioactivitat d'aquesta fracció orgànica permet quantificar l'activitat específica de l'enzim.

El cribratge de la quimioteca per les dues isoformes va donar els resultats que es mostren en la Figura 13.2. D'acord amb el format de rastreig posicional de la quimioteca, el procés de cribratge amb només 20 assaigs (un per mescla) va permetre extreure informació d'un total de 625 compostos, identificant aquells que van presentar una major activitat. Ara bé, l'activitat trobada va ser contrària a la plantejada en l'objectiu inicial, ja que els components de les mescles actuaven com a inhibidors de la CPT I enlloc d'actuar com a activadors i ho feien selectivament per a la isoforma de múscul (MCPT I). Aquest resultat era interessant, però per altres motius que no tenien relació amb l'augment de l'oxidació d'àcids grassos en múscul.

Fins ara, tots els inhibidors coneguts de CPT I no distingeixen entre LCPT I i MCPT I, amb la qual cosa trobar-ne un que inhibeixi específicament la isoforma muscular i no l'hepàtica seria interessant tant des del punt de vista fisiològic com molecular. Molecularment, podria ajudar a veure les diferències estructurals entre les dues isoformes, mentre que fisiològicament podria aplicar-se al tractament de la diabetis/hiperglucèmies i al tractament dels infarts cardíacs. Pel que fa referència al tractament d'hiperglucèmies, si s'aconseguís la inhibició de l'oxidació d'àcids grassos en múscul, aquest hauria d'obtenir l'energia obligatòriament de l'oxidació de la glucosa, amb la qual cosa en captaria més i contribuiria a baixar-ne els seus nivells plasmàtics. De fet, ja s'han utilitzat inhibidors de la CPT I (Etomoxir)^{228,229} amb aquesta finalitat, però com aquest fàrmac també inhibeix la CPT I hepàtica (LCPT I), produïa efectes secundaris importants i per aquest motiu va ser rebutjat per la FDA. Respecte el tractament dels infarts cardíacs, la inhibició de l'oxidació d'àcids grassos podria ajudar a la recuperació dels pacients després de patir-ne un. Durant un infart, el que succeeix és que no arriba oxigen al cor, amb la qual cosa aquest múscul passa d'un metabolisme oxidatiu (glucòlisi + cicle de Krebs) a un no oxidatiu (glucòlisi + fermentació), produint una acumulació de lactat. Aquesta acumulació produeix un canvi metabòlic que provoca que deixi de bategar. A més, l'infart provoca l'alliberació d'àcids grassos del teixit adipós en una resposta hormonal. Després de l'infart, ja sigui perquè no ha estat suficientment fort per produir la mort o bé perquè s'ha corregit farmacològicament, hi ha més àcids grassos i el cor els utilitza per al seu metabolisme oxidatiu (ja hi torna a haver

oxigen), i la glucosa segueix pel metabolisme no oxidatiu, de manera que es segueix acumulant lactat, la qual cosa no és bona per a la recuperació del pacient que acaba de patir l'infart.

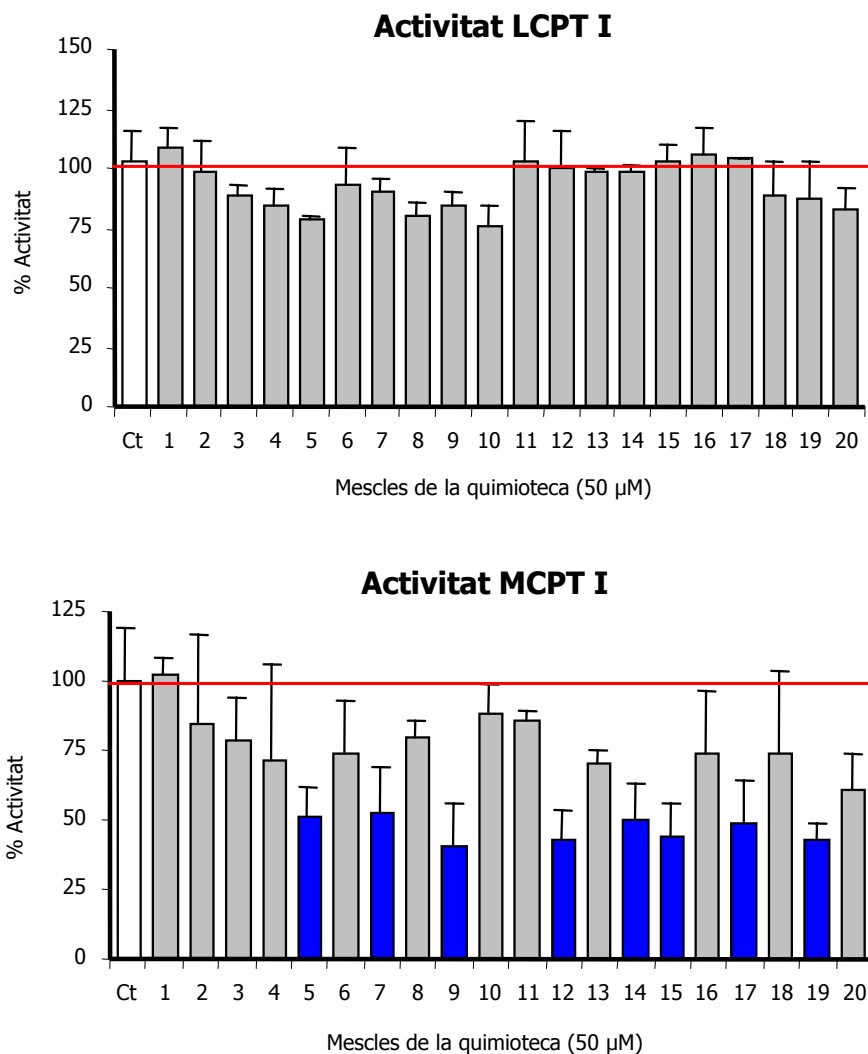


Figura 13.2. Resultats del cribratge de la quimioteca en l'assaig per a la identificació d'activadors de CPT I, tant en la seva isoforma hepàtica (LCPT I) com en la seva isoforma de múscul (MCPT I). En blanc es mostra el control corresponent a un 100% d'activitat de cada isoforma i en blau es mostren les mescles més actives seleccionades a una concentració de 50 µM.

Del cribratge de la quimioteca es van seleccionar les mescles **5, 7, 9, 12, 14, 15, 17 i 19** com les més actives per a la MCPT I, les quals van permetre identificar tres amines per a la posició R^1 (*N*-terminal), dues amines per a R^2 , dues amines per a R^3 i una amina per a R^4 . Les 12 combinacions d'aquestes amines van conduir a la identificació de 12 peptoides, els quals es van resintetitzar individualment i es van tornar a assajar sense purificar (puresa > 95% per

HPLC). Els resultats obtinguts a una concentració de peptòide de 50 μM es mostren a la Figura 13.3.

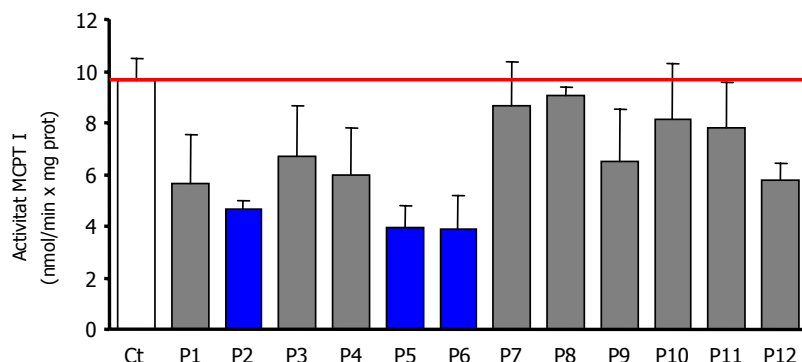


Figura 13.3. Resultats del cribratge dels 12 peptòides definits en l'assaig per a la identificació d'inhibidors de la MCPT I. En blau es mostren els tres peptòides més actius seleccionats a 50 μM . En blanc es mostra el control que correspon al 100% d'activitat de la MCPT I.

Del cribratge dels 12 peptòides definits com a inhibidors de la MCPT I es van identificar els peptòides **P2**, **P5** i **P6** com a compostos amb activitats més elevades. Concretament, la inhibició de l'activitat de la MCPT I va ser al voltant del 60% a 50 μM .

Una vegada identificats, es va repetir l'assaig amb aquests tres peptòides definits purificats per HPLC (puresa > 98%). Aquest assaig es va realitzar també sobre l'altra isoforma per tal d'assegurar-ne la seva especificitat. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 13.4.

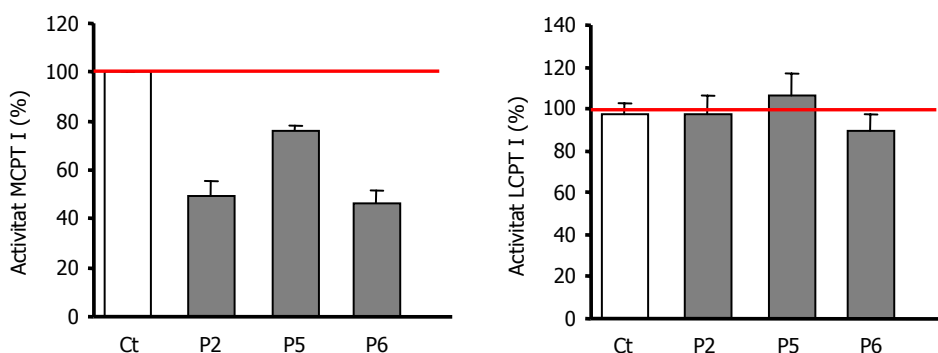


Figura 13.4. Resultats dels assaigs d'inhibició per a les isoformes MCPT I i LCPT I amb els tres peptòides definits purificats a una concentració de 50 μM . En blanc es mostra el control que correspon a un 100% d'activitat de cadascuna de les isoformes.

Els millors resultats obtinguts van ser els corresponents als peptòides **P2** i **P6**, els quals van confirmar a més la seva especificitat per a la isoforma de múscul.

Amb aquest dos peptoides, en ser els que més inhibien, es va decidir fer un assaig dosi-resposta. Tal i com es pot observar a la Figura 13.5, el peptoid **P6** és el més eficient a concentracions baixes. Sobretot en els punts corresponents a 5 μM i 10 μM , on el peptoid **P2** no inhibeix i el peptoid **P6** inhibeix fins a un 50% (a 10 μM).

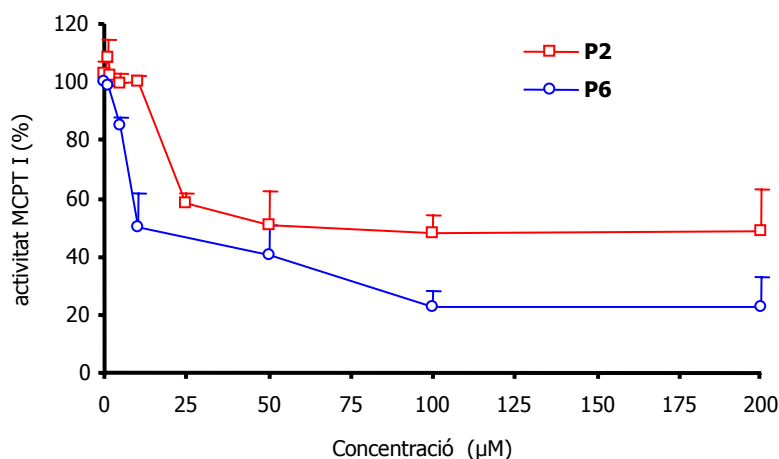


Figura 13.5. Estudi dosi-resposta d'inhibició realitzat per als peptoides **P2** (en vermell) i **P6** (en blau).

En base a aquest resultat, el següent pas serà l'estudi del peptoid **P6** *ex vivo* en cèl·lules (activitat CPT I i oxidació d'àcids grassos) que expressin tant la MCPT I (cèl·lules musculars de múscul humà) com cèl·lules que expressin LCPT I (hepatòcits primaris de rata). A més s'estudiarà l'efecte *in vivo* d'aquest peptoid injectant en rates i determinant el percentatge d'inhibició de l'activitat CPT I en mitocòndries de fetge, múscul esquelètic i cor.

Així doncs, aquest peptoid esdevé un nou esquelet farmacofòric per al desenvolupament de nous fàrmacs inhibidors específics de MCPT I per una millora en el tractament de les hiperglucèmies (diabetes) i els infarts cardíacs. Ara bé, en un futur caldrà efectuar un estudi d'optimització de la seva estructura per tal de millorar-ne la seva activitat. En aquest sentit, antecedents en el nostre grup de recerca suggereixen que aquest procés es pot dur a terme augmentant la rigidesa de l'estructura i reduint la seva llibertat conformational, comptant, a més amb el guiatge d'estudis de modelatge molecular amb l'enzim model CPT1B.

13.2. NEUROPROTECCIÓ. RECEPTOR D'NMDA

Malalties neurològiques com els vessaments cerebrals i l'epilèpsia, o neurodegeneratives com la malaltia de Huntington, malaltia de Parkinson, malaltia d'Alzheimer o l'esclerosi amiotròfica lateral, estan relacionades amb la sobreestimulació de receptors de glutamat com els receptors d'NMDA, AMPA o KA.^{‡,230}

El glutamat (Glu) és un neurotransmissor excitatori en mamífers que activa diferents tipus de receptors, els quals es poden classificar en ionotòpics, associats a l'obertura de canals iònics, i metabotròpics, associats a proteïnes G, els quals modulen l'activitat de diversos enzims. La mort neuronal està relacionada amb l'activació excessiva dels receptors ionotòpics, especialment del tipus NMDA. A la Figura 13.6 s'ha esquematitzat el procés d'ativació dels receptors de tipus AMPA i NMDA.

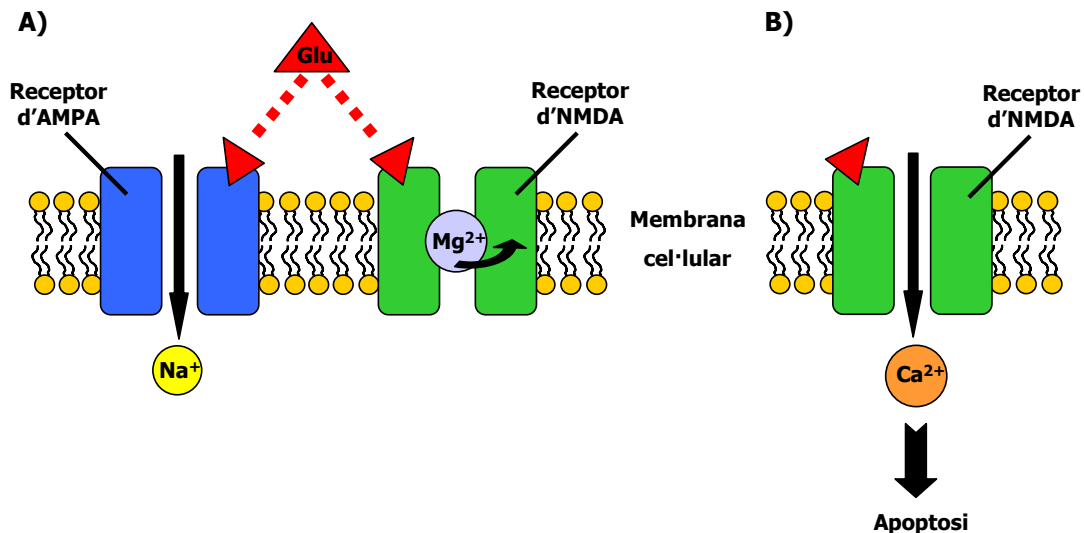


Figura 13.6. A) Activació dels receptors de tipus AMPA i d'NMDA pel glutamat (Glu), entrada a l'interior de la cèl·lula d'ions Na^+ i desbloqueig dels ions Mg^{2+} . B) Entrada a l'interior cel·lular d'ions Ca^{2+} , fet que pot conduir a l'apoptosi o mort cel·lular.

Es coneix que una activació perllongada del receptor de tipus AMPA per part del glutamat provoca l'entrada d'ions Na^+ a l'interior cel·lular i una consegüent disminució del potencial de membrana. Aquest canvi condueix al desbloqueig dels ions Mg^{2+} del receptor d'NMDA, el qual també es troba activat pel glutamat, i provoca el pas d'ions Ca^{2+} cap a l'interior de la cèl·lula. Aquest augment de la concentració intracel·lular de Ca^{2+} provoca una cascada de reaccions posteriors que acaben generant òxid nítric i cGMP. Aquestes alteracions condueixen, en últim terme, al procés d'apoptosi o de necrosi cel·lular (vegeu Figura 13.6).²³¹

[‡] NMDA: àcid N-metil-D-aspartic; AMPA: àcid (RS)-2-amino-3-(3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolil)propioníc; KA: àcid kaínic.

La mort neuronal induïda per glutamat pot ser amortida pel bloqueig dels receptors d'NMDA amb un antagonista selectiu o mitjançant la interferència en alguna de les etapes de la cascada posterior dels esdeveniments intracel·lulars.

Per aquests motius, els receptors de tipus NMDA es consideren unes dianes terapèutiques importants en el camp de la neuroprotecció i es persegueix el desenvolupament d'antagonistes selectius del glutamat de moderada afinitat pels receptors. A més, cal que aquestes estratègies terapèutiques modulin l'activitat dels receptors sobreactivats, però que no disminueixin la transmissió sinàptica degut a la inhibició del neurotransmissor del glutamat, raó per la qual caldria que tinguessin una capacitat bloquejadora reversible i ràpida.

13.2.1. CRIBRATGE DE LA QUIMIOTECA

Els assaigs biològics referents al cribratge de la quimioteca respecte la seva capacitat bloquejadora dels receptors de tipus NMDA van ser realitzats per Asia Fernández, del grup del Dr. Antonio Ferrer-Montiel de la Universitat Miguel Hernández d'Elx.

El model emprat per als assaigs *in vitro* van ser ovòcits de granota del tipus *Xenopus laevis* expressats amb les unitats NR1 i NR2A del receptor d'NMDA.²³² L'assaig consisteix en posar en contacte els ovòcits que expressen els receptors amb l'agonista, el glutamat, i amb el coagonista, la glicina, i mesurar el corrent de la cèl·lula quan tots els canals es troben oberts al pas de Ca^{2+} , mitjançant el pinçament del voltatge de membrana amb dos microelèctrodes (vegeu Figura 13.7, A), obtenint-se un valor màxim d'intensitat de corrent ($I_{\text{màx}}$). Posteriorment, es tracten els ovòcits amb una dissolució de glutamat i glicina en presència dels compostos a avaluar, en aquest cas les mesclures de peptoides, i, si aquests són capaços de bloquejar els canals, el corrent iònic disminueix. Un cop s'ha establitzat aquest corrent, la seva mesura (I_{mescla}) condueix a la resposta bloquejadora dels peptoides i, per tant, a la seva capacitat com a agonista d'NMDA, segons la relació $[1 - (I_{\text{mescla}}/I_{\text{màx}})] \times 100 = \%$ de resposta bloquejadora del canal o, el que és el mateix, $(I_{\text{bloq}}/I_{\text{màx}}) \times 100 = \%$ (vegeu Figura 13.7, B).

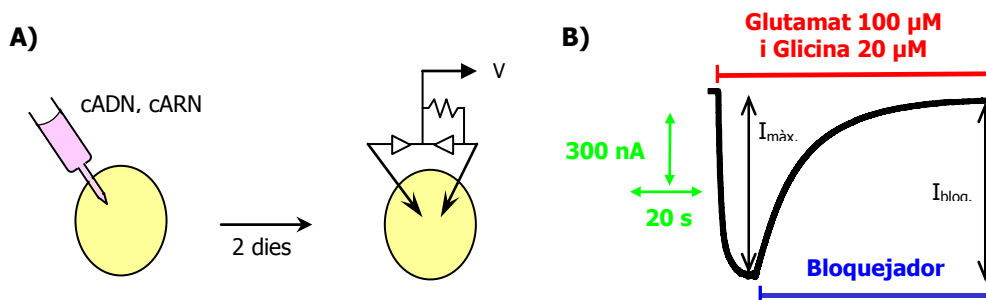


Figura 13.7. Model *in vitro* per a la mesura de la capacitat d'un antagonista bloquejador de l'activitat del receptor d'NMDA: A) esquema de l'assaig electrofisiològic; B) resposta obtinguda per un bloquejador de l'activitat del receptor d'NMDA activat per glutamat 100 µM i glicina 20 µM.

Els resultats obtinguts del cribratge de la quimioteca respecte la seva activitat bloquejadora del receptor d'NMDA es mostren en la Figura 13.8.

Del cribratge de la quimioteca es van seleccionar les que van mostrar una eficàcia neuroprotectora amb una activitat bloquejadora superior al 40%, és a dir, les mescles **4, 5, 10, 12, 13, 15, 18 i 19**. Així doncs, es van identificar dues amians per a la posició R¹ (*N*-terminal), una amina per a R², tres amines per a R³ i dues amines per a R⁴. La combinació d'aquestes amines va conduir a la identificació de 12 peptoides, els quals es van resintetitzar individualment per tal de tornar-los a assajar (sense purificar, puresa >95% per HPLC). Actualment s'estan realitzant aquests assaigs i s'està a l'espera dels resultats corresponents.

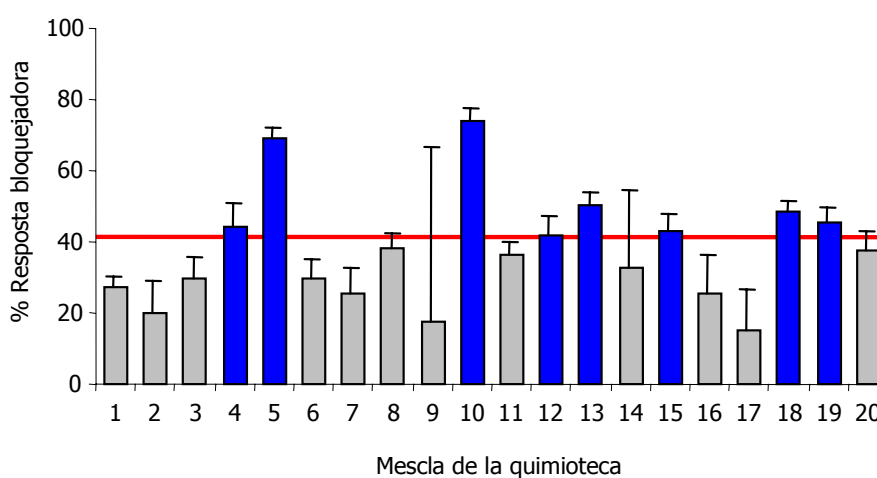


Figura 13.8. Resultats del cribratge de la quimioteca en l'assaig per a la identificació de bloquejadors de l'activitat del receptor d'NMDA. En blau es mostren les mescles més actives seleccionades a una concentració de 50 µg/ml.

13.3. ANALGÈSIA.

El dolor, ja sigui transitori o crònic, representa un greu problema social i econòmic ja que és patit per un gran nombre de persones arreu del món. La sensació de dolor s'inicia quan les terminacions nervioses de les neurones sensorials (nociceptors) s'activen davant d'estímuls nocius externs de diferent naturalesa i transmeten la informació als centres processadors de la sensació del dolor.

Es calcula que aproximadament un 50% del tractament del dolor és ineficaç, degut a la manca d'especificitat i als efectes secundaris que provoca, així com dependència. Així doncs, la identificació de nous compostos que millorin el tractament i la prevenció del dolor esdevé un objectiu molt important.

Gràcies a la caracterització i clonació del canal de la subunitat 1 vanilloide (TRPV1), s'han començat a aclarir els mecanismes de transmissió del dolor.²³³ Aquest receptor de membrana consisteix en un canal iònic no selectiu amb una elevada permeabilitat a l'ió Ca^{2+} quan està activat per capsaïcina.²³⁴ A més, aquest canal també s'obre quan es troba exposat a una temperatura nociva ($>42^\circ\text{C}$) o a un pH baix, i la seva activitat està fortament modulada per l'acció de reguladors inflamatoris. Aquests fets condueixen a pensar que el canal TRPV1 està involucrat en les vies de dolor i que exerceix una funció determinant en la transducció dels estímuls nocius tèrmics i químics en les terminals nervioses dels teixits perifèrics.^{235,236}

Els analgèsics tradicionals es divideixen en dues classes, opiàcids i antipirètics, els quals no mostren una elevada selectivitat i presenten efectes secundaris, com ara dependència i tolerància.²³⁷ En aquest context, la recerca de nous moduladors o antagonistes específics de l'activitat de TRPV1 a través del control dels canals iònics constitueix una estratègia d'elevat interès per al tractament del dolor.

Els últims anys el nostre laboratori en col·laboració amb el grup del Dr. Antonio Ferrer-Montiel de la Universitat Miguel Hernández d'Elx ha abordat la recerca de nous bloquejadors del canal TRPV1 mitjançant el cribratge de quimiotèques de peptoides amb resultats satisfactoris, identificant els peptoides N16-15-15C i N19-15-15C amb una activitat bloquejadora del canal de l'ordre micromolar.^{89,199} Malgrat els resultats obtinguts inicialment, la falta de biodisponibilitat mostrada per aquests peptoides va obligar finalment a abandonar la seva possible aplicació.

Cal destacar que malgrat els esforços destinats al desenvolupament d'antagonistes del canal de TRPV1, a dia d'avui, encara no s'ha aconseguit llençar al mercat cap fàrmac capaç de bloquejar el canal selectivament.²³⁸ Aquest fet posa de manifest la dificultat d'afrontar el problema seguint l'estratègia d'actuació directe sobre el propi canal. Per aquest motiu, la recerca de noves estratègies encaminades a interaccionar de forma indirecta sobre el canal sembla una bona alternativa de futur.

Una d'aquestes estratègies consisteix en la inhibició de l'activitat proteolítica de la tripsina, la qual actua com a agonista del receptor PAR 2 (*Proteinase-Activated Receptor 2*) quan és alliberada en un teixit durant el procés d'inflamació. L'activació d'aquest receptor sensibilitza i potencia l'activitat del receptor de TRPV1, desencadenant la sensació de dolor i intervenint directament en la seva transmissió.^{239,240}

Durant dècades, s'ha considerat a les proteases com a mers enzims degradatius implicats en la funció digestiva. El descobriment dels receptors activats per proteases (PARs), particularment en sistema nerviós, ha aportat nous elements sobre la potencial activitat fisiològica d'aquests enzims. Els PARs són receptors formats per set unitats transmembrana acoblats a proteïna G i la seva activació es produeix per hidròlisi, en un punt específic, de l'extrem extracel·lular *N*-terminal del receptor. Aquest tall deixa exposat un nou extrem *N*-terminal que actua com a lligand d'unió, el qual s'uneix intramolecularment per iniciar la senyalització cel·lular (vegeu Figura 13.9). Entre els diferents PARs que existeixen, l'objecte del nostre estudi es centra en el PAR2, el qual és activat per la tripsina i que està relacionat amb l'activació del receptor TRPV1.

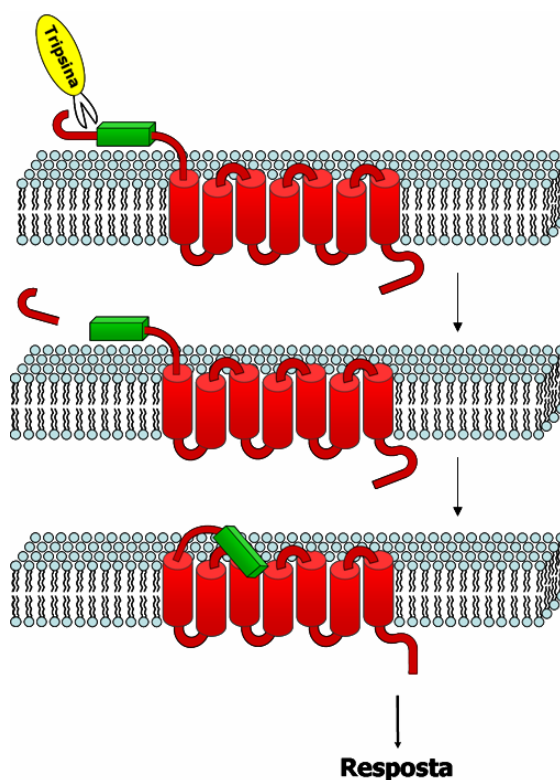


Figura 13.9. Mecanisme d'activació dels receptors activats per proteases (PARs), més concretament l'activació del PAR2 per tripsina. La tripsina (representada per unes estirores) tallen el domini *N*-terminal en la superfície de la cèl·lula exposant un nou extrem *N*-terminal, el qual uneix i activa el receptor induint un senyal intracel·lular.²⁴¹

13.3.1. CRIBRATGE DE LA QUIMIOTECA

Els assaigs biològics referents al cribratge de la quimioteca respecte la seva capacitat inhibidora de l'activitat proteolítica de la tripsina van ser realitzats per Nuria García, del grup del Dr. Antonio Ferrer-Montiel de la Universitat Miguel Hernández d'Elx.

L'assaig del cribratge de la quimioteca es va basar en la determinació per fluorescència dels fragments digerits per la tripsina d'un substrat no fluorescent en presència de les diferents mescles de la quimioteca. Aquest assaig de fluorescència va consistir en la preincubació de les mescles de la quimioteca resuspeses en DMSO al 5% (0.2 mg/ml) amb la tripsina (Trypsin TPCK de pàncreas boví, T1426, Sigma) en microplaques negres de 96 pouets durant 1 h en agitació a temperatura ambient. Passat aquest temps, s'hi va afegir el substrat (BODIPY-FL casein, EnzChek® Protease Assay Kit, Molecular Probes) a una concentració final de 5 µg/ml i es van incubar les reaccions durant 1 h en agitació a temperatura ambient i protegides de la llum. El substrat no fluorescent era digerit per la tripsina alliberant fragments fluorescents que es monitoritzaven en un lector de fluorescència utilitzant el filtre d'excitació a 485 nm i el d'emissió a 530 nm.

Els resultats obtinguts del cribratge de la quimioteca respecte la seva activitat inhibidora de l'activitat proteolítica de la tripsina es mostren en la Figura 13.10.

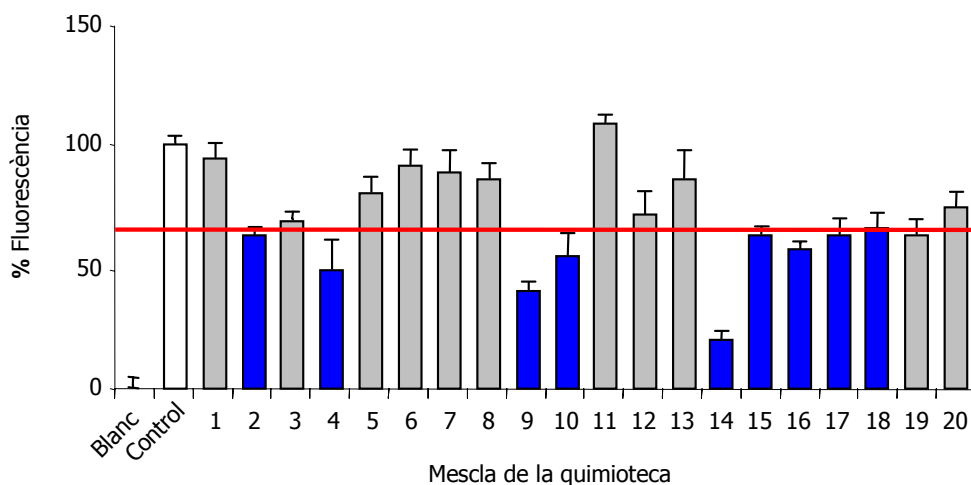


Figura 13.10. Resultats del cribratge de la quimioteca en l'assaig per a la identificació d'inhibidors de l'activitat proteolítica de la tripsina. En blau es mostren les mescles més actives seleccionades a una concentració de 0.2 mg/ml. En blanc es mostra el control realitzat amb tripsina i substrat en absència d'inhibidor, mostrant un 100% de fluorescència.

Del cribratge de la quimioteca es van seleccionar les mescles **2, 4, 9, 10, 14, 15, 16, 17 i 18**. Cal destacar, però, que l'elecció de les mescles més actives corresponents a la posició R¹ (N-terminal, mescles **15-18**) es va fer després de repetir l'assaig per a aquestes mescles a una

concentració superior, és a dir, a 0.3 mg/ml al no observar-se cap resultat positiu en el primer assaig. Així doncs, es van identificar quatre amines per a la posició R¹ (N-terminal), dues per la posició R², dues per a la posició R³ i una per la posició R⁴. La combinació d'aquestes amines va conduir a la identificació de 24 peptoides, els quals es van resintetitzar individualment per tal de tornar-los a assajar (sense purificar, puresa > 95% per HPLC). Es van realitzar dos assaigs, un a una concentració de peptoides de 0.1 mg/ml i un altre a 0.3 mg/ml. Els resultats obtinguts en el primer dels assaigs es mostren a la Figura 13.11, on es destaquen en color blau els peptoides que van donar una activitat inhibidora més elevada. Cal destacar que el peptoides P6 no va ser seleccionat tot i l'activitat inhibidora mostrada en primera instància, degut als resultats obtinguts per aquest peptoides en el segon assaig, on la seva activitat va quedar reduïda considerablement.

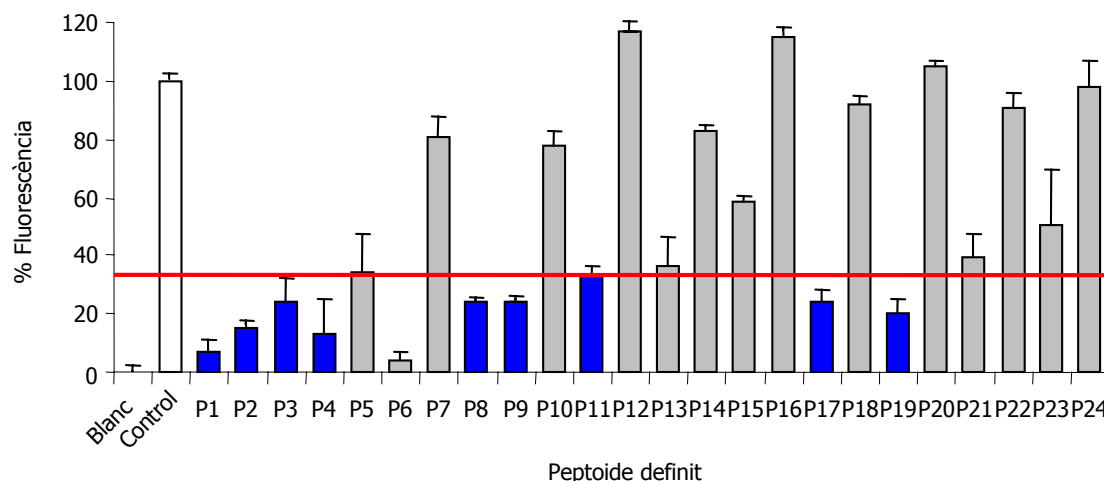


Figura 13.11. Resultats del cribratge dels 24 peptoides definits en l'assaig per a la identificació d'inhibidors de l'activitat proteolítica de la tripsina. En blau es mostren els nou peptoides més actius seleccionats a 0.1 mg/ml. En blanc es mostra el control realitzat amb tripsina i substrat en absència d'inhibidor, mostrant un 100% de fluorescència.

Amb els nou peptoides que van mostrar una capacitat d'inhibició major es va realitzar un assaig dosi-resposta a les següents concentracions: 0.01, 0.05, 0.1 i 0.5 mg/ml, i es van obtenir els valors d'IC₅₀ mostrats en la Taula 13.1.

Taula 13.1. Activitat biològica dels 9 peptoides definits de la quimioteca de pentàmers com a inhibidors de l'activitat proteolítica de la tripsina.

Peptóide	Activitat inhibidora de tripsina (IC ₅₀ µM)
P1	64
P2	23
P3	104
P4	38
P8	50
P9	67
P11	90
P17	61
P19	57

Finalment, per conèixer la selectivitat d'aquests nou peptoides vers la tripsina i comprovar que no es tractava d'una reacció inespecífica es va realitzar un assaig d'inhibició amb una altra proteasa, l'elastasa. L'assaig es va basar en la determinació per fluorescència dels fragments digerits per l'elastasa d'un substrat no fluorescent en presència dels diferents peptoides definits. Aquest assaig de fluorescència va consistir en la preincubació dels diferents peptoides definits a una concentració d'1.3 mg/ml en microplaques negres de 96 pouets amb 1.05 unitats/ml d'elastasa (EnzChek® Elastase Assay Kit, Molecular Probes) durant 1 h en agitació a temperatura ambient. Passat aquest temps, s'hi va addicionar el substrat (DQTM elastina dissolta en aigua miliQ autoclavada) a una concentració final de 25 µg/ml i es van incubar les reaccions durant 2 h en agitació a temperatura ambient i protegides de la llum. El substrat no fluorescent era digerit per la tripsina alliberant fragments fluorescents que es monitoritzaven en un lector de fluorescència utilitzant el filtre d'excitació a 485 nm i el d'emissió a 530 nm. Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 13.12.

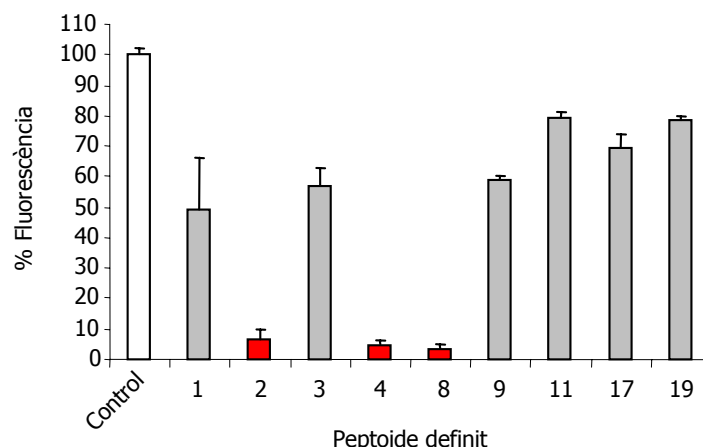


Figura 13.12. Resultats del cribratge dels 9 peptoides definits en l'assaig per a la identificació d'inhibidors de l'activitat proteolítica d'elastasa. En vermell es mostren els peptoides més actius seleccionats a 1.3 mg/ml, els quals per tant no mostraven selectivitat en la seva acció. En blanc es mostra el control realitzat amb elastasa i substrat en absència d'inhibidor, mostrant un 100% de fluorescència.

Els peptoides P2, P4 i P8 van mostrar una activitat inhibidora d'elastasa important i per tant van ser descartats al no presentar la selectivitat desitjada. Actualment, s'està a l'espera dels resultats dels assaigs *ex vivo* realitzats amb la resta de peptoides per confirmar els resultats obtinguts *in vitro*.

13.4. CONCLUSIONS

El fet que les cadenes laterals dels peptoides recaiguin en l'àtom de nitrogen de l'enllaç amida en comptes del carboni en α al carbonil, com és el cas dels pèptids, evita la formació de ponts d'hidrogen intramoleculars, augmentant d'aquesta manera el seu grau de llibertat conformacional. Aquesta flexibilitat els permet adoptar diverses conformacions, com s'observa en la gran complexitat dels espectres de ^1H -RMN i de ^{13}C -RMN, i els facilita la seva interacció amb múltiples dianes d'interès terapèutic.

Del conjunt d'amines seleccionades a partir dels resultats obtinguts del cribratge de la quimioteca davant de les tres dianes terapèutiques estudiades amb més activitat, s'observa com en les posicions de diversitat R^2 , R^3 i R^4 únicament es van seleccionar les amines aromàtiques, mentre que a la posició de diversitat R^1 es van seleccionar amines que presentaven un segon heteroàtom en la cadena lateral. Tot i presentar aquesta característica comú, les amines seleccionades per aquesta posició (R^1) mostraven una variabilitat estructural elevada, la qual cosa semblaria indicar que la posició *N*-terminal del pentàmer juga un paper determinant en la interacció amb les dianes estudiades i, per tant, podria ser la posició de diversitat més important a tenir en compte a l'hora d'optimitzar la seva estructura. En canvi, en les posicions de diversitat R^2 , R^3 i R^4 , la presència d'amines aromàtiques estructuralment més semblants

semblaria indicar que únicament la seva capacitat d'establir interaccions més inespecífiques de tipus π - π de caràcter hidrofòbic seria el seu efecte més important a l'hora d'interaccionar amb les dianes.

Un dels principals inconvenients que poden presentar les quimiotèques de mescles sintetitzades en format de rastreig posicional en comparació a aquelles sintetitzades en format de divisió i mescla, o de les quimiotèques de definits, és el fals negatiu. És a dir, quan es realitza el primer cribratge d'una quimioteca davant una diana determinada, el procés de deconvolució selecciona les mescles més actives i s'identifiquen els reactius més actius per a cada font de diversitat, donant lloc a la identificació dels corresponents compostos amb més activitat. No obstant, l'existència de diferències importants de concentració en els compostos de les mescles pot produir que compostos poc actius mostrin una activitat elevada degut a que es troben en una alta concentració, mentre que compostos moderadament actius, o fins i tot amb activitats elevades, no es detectin perquè es troben en concentracions més baixes a les esperades. En aquest sentit, tot i l'estudi d'equiactivitat realitzat entre les diferents amines per minimitzar aquest efecte, cal validar els resultats d'aquest primer cribratge, resintetitzant els compostos de forma individual i tornant-los a assajar en un segon torn d'assaigs. Aquest procés de validació permet confirmar o no l'activitat dels compostos inicialment identificats, però no permet detectar aquells actius que no van ser seleccionats durant el cribratge inicial.

Al llarg d'aquest capítol s'ha comentat com els processos de cribratge, deconvolució i validació de la quimioteca de pentàmers han conduït a la identificació, fins ara, d'un inhibidor selectiu de CPT I de múscul (**P6**) amb potencial activitat pel tractament d'hipoglucèmies (diabetes) i els infarts cardíacs. A més, s'està realitzant la validació dels resultats obtinguts del cribratge de la quimioteca respecte la seva capacitat bloquejadora dels receptors de tipus NMDA mitjançant l'assaig de 12 pentàmers definits i respecte a la capacitat inhibidora de la tripsina amb uns altres 6 pentàmers definits. Aquests resultats són ja proves fefaents de la validesa de la quimioteca de pentàmers sintetitzada.

14. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

14.1. CONSIDERACIONS GENERALS

Les reaccions químiques, instrumentació i reactius referides a la Part II es van realitzar tenint en compte les consideracions generals descrites en l'apartat 7.1.

Les anàlisis per HPLC en l'estudi de reactivitat d'amines es van realitzar emprant un aparell Hewlett Packard 1100 Series equipat amb una columna de fase inversa Kromasil 100 C₁₈ de 5 µm (4.6 x 250 mm) de Scharlau. Com a eluents es van utilitzar: a) H₂O amb HCOOH-Et₃N 20 mM a pH=5.0 i ACN, i b) H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA. El programa d'elució següent va ser el següent: 2 min a 5% d'ACN, de 5% a 80% d'ACN en 23 min i 2 min a 80% d'ACN, tot mantenint un flux constant d'1 ml/min i detecció a 220 nm.

Les anàlisis per HPLC per determinar la puresa dels peptoides així com l'evolució de les reaccions es van realitzar en el mateix aparell amb una columna de fase inversa de tipus Kromasil 100 C₈ de 5 µm (4.6 x 150 mm) de Teknokroma. Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; programa: 2 min 20% d'ACN, de 20% a 80% d'ACN en 17 min, 1 min a 80% d'ACN, de 80% a 100% d'ACN en 3 min i 2 min a 100% d'ACN, tot mantenint un flux constant d'1 ml/min i detecció a 220 nm.

Les purificacions dels peptoides es van realitzar per HPLC a escala semipreparativa en dos aparells diferents. El primer va ser el mateix aparell anterior equipat amb una columna de fase inversa de tipus X-Terra® C₁₈ de 5 µm (10 x 150 mm) de Waters. Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.1% de TFA; programes: de 20% a 100% d'ACN en un temps variable segons el cas, tot mantenint un flux constant de 4 ml/min i detecció a 220 nm. El segon, va ser un aparell Waters (Milford, MA, U.S.A.) equipat amb una columna de fase inversa X-Terra® C₁₈ de 5 µm (19 x 250 mm) de Waters o bé amb una columna de fase inversa PrePack® C₁₈ de 15-20 µm (47 x 300 mm) també de Waters. Eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.1% de TFA; programa: variable segons el cas i la columna utilitzada, així com el flux. En tots els casos la detecció es va fer a 220 nm.

14.1.1. INSTRUMENTACIÓ DE LA SÍNTESI EN FASE SÒLIDA

Part de la instrumentació utilitzada en la síntesi en fase sòlida s'ha comentat anteriorment en les consideracions generals descrites en l'apartat 7.1.

Per a la síntesi en fase sòlida de la quimioteca es van fer servir bossetes formades d'una malla de polipropilè de dimensions 2.5 x 3.5 cm.

Les bossetes es van preparar a partir d'una malla de polipropilè subministrada pel Dr. Enrique Pérez-Payá del Laboratori de Pèptids i Proteïnes del Centro de Investigación Príncipe Felipe de València. El segellat dels seus extrems es va realitzar amb una segelladora de la casa Rovebloc model P.R.I.B.-350 com la que es mostra en la Figura 14.1.



Figura 14.1. Segelladora de bossetes per impulsos d'accionament manual mitjançant un pedal, de la casa Rovebloc.

En el cas de la quimioteca, les dues primeres etapes de reacció es van dur a terme en una ampolla de polipropilè de rosca ampla de 500 ml, mentre que els rentats de les etapes posteriors es van fer en una altra de 20 ml.

Es van utilitzar dos aparells de microones diferents: un multimode d'ús domèstic de la marca LG model MS-197H (vegeu Figura 14.2, esquerra) i posteriorment un monomode d'ús comercial de la marca CEM model Discover (vegeu Figura 14.2, dreta).



Figura 14.2 Esquerra: microones d'ús domèstic emprat per la síntesi de peptoides. Dreta: microones d'ús comercial emprat per la síntesi de la quimioteca.

14.2. SÍNTESI DE PEPTOIDES ASSISTIDA PER MICROONES MITJANÇANT UN APARELL DE MICROONES DOMÈSTIC

14.2.1. DESPROTECCIÓ DE LA RESINA

En 2 xeringues de polipropilè de 3 ml equipades amb una placa porosa de polietilè que contenen 100 mg (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) de resina de poliestirè AM RAM, es van afegir 2 ml de DMF per tal d'inflar-la. Les xeringues es van mantenir en agitació mecànica durant 3 min i, seguidament, el dissolvent es va eliminar per filtració.

Sobre la resina inflada amb DMF, es van afegir 2 ml de piperidina al 20% (v/v) en DMF. Una de les xeringues es va col·locar en un agitador de vaivé a t. a. durant 30 min mentre que l'altra es va col·locar dins del microones domèstic i es va escalfar durant 1 min a una potència de 100 W en cicles de 20 s (3 x 20 s), agitant-la manualment entre cicle i cicle d'escalfament.

Acabades les dues reaccions, les dissolucions es van filtrar i es van recollir en vials de 3 ml. Seguidament es van preparar mostres al·lòtiques de cadascuna de les dues dissolucions i es van analitzar per HPLC (condicions d'anàlisi: columna Kromasil 100 C₈ de 5 µm (15 x 0.46 cm) de Teknokroma; eluents: H₂O amb 0.1% de TFA i ACN amb 0.07% de TFA; programa: 2 min 20%

d'ACN, de 20% a 80% d'ACN en 17 min i 2 min a 80% d'ACN, tot mantenint un flux constant d'1 ml/min i detecció a 220 nm).

14.2.2. PROVES D'ACILACIÓ

14.2.2.1. Acilació amb àcid bromoacètic i amb àcid cloroacètic

En 4 xeringues de polipropilè de 3 ml proveïdes d'una placa porosa de polietilè que contenen 50 mg (0.79 mmol/g, 0.04 mmol) de resina de poliestirè AM RAM, es van afegir 2 ml de DMF per tal d'inflar-la. Les xeringues es van mantenir en agitació mecànica durant 3 min. Seguidament, el dissolvent es va eliminar per filtració i es va procedir al pas de desprotecció.

Desprotecció: sobre la resina inflada amb DMF, es van afegir 1.5 ml d'una dissolució de piperidina al 20% (v/v) en DMF. Les xeringues es van col·locar dins del microones domèstic i es van escalfar durant 1 min a una potència de 100 W en cicles de 20 s (3 x 20 s), agitant-les manualment entre cicle i cicle d'escalfament. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i el procés de desprotecció es va repetir. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 2 ml), iPrOH (3 x 2 ml) i DCM (3 x 2 ml). La desprotecció de la resina es va comprovar mitjançant el test del TNBS, el qual va donar positiu (color vermell) en tots els casos.

Acilació: sobre la resina desprotegida i inflada amb DCM, es va afegir 1 ml d'una de les 4 dissolucions preparades que contenen 0.2 mmol (5 eq.) d'àcid i 31 µl (0.2 mmol, 5 eq.) de DIC (vegeu Taula 14.1). Seguidament, les xeringues es van col·locar dins del microones i es van escalfar durant 1 min a una potència de 100 W en cicles de 20 s (3 x 20 s), agitant-les manualment entre cicle i cicle d'escalfament.

Taula 14.1. Condicions d'acilació utilitzades en les 4 xeringues.

Xeringa	Àcid	Dissolvent
1	BrCH ₂ COOH	DMF/DCM (1:1)
2	BrCH ₂ COOH	DMF
3	ClCH ₂ COOH	DMF/DCM (1:1)
4	ClCH ₂ COOH	DMF

Després d'eliminar l'excés de reactius per filtració, la resina es va rentar amb DCM (3 x 2 ml), iPrOH (3 x 2 ml) i DMF (3 x 2 ml). La desaparició de l'amina primària es va confirmar amb el test del TNBS, el qual va donar negatiu (incolor) en els casos 1 i 3, mentre que va mostrar certa coloració vermella en el 2 i 4.

Acoblament d'amina: a una suspensió de la resina acilada en 1 ml de DMF es van afegir 29 µl (0.2 mmol, 5 eq.) de 4-metoxifenetilamina (**A13**). Seguidament, les xeringues es van col·locar a l'interior del microones i es van escalfar durant 1 min a una potència de 100 W en cicles de 20 s (3 x 20 s), agitant-les manualment entre cicle i cicle d'escalfament. Després d'eliminar l'excés de reactius per filtració, la resina es va rentar amb DMF (3 x 2 ml), iPrOH (3 x 2 ml) i DCM (3 x 2 ml). La presència d'una amina secundària es va confirmar mitjançant el test del cloranil, el qual va donar positiu (color verd) en tots els casos, essent d'una intensitat superior en els casos 1 i 2.

Escissió de la resina: després d'assecar la resina, es va transferir a un tub de vidre Pyrex de 10 ml roscat amb un sèptum de tefló resistent a l'àcid. Seguidament s'hi van afegir 2 ml de còctel d'escissió (TFA/DCM/H₂O, 60:40:2), tornant-se la resina de color granatós. La mescla de reacció es va mantenir en agitació mecànica durant 30 min a t.a. A continuació, la mescla de cada tub es va filtrar en la mateixa xeringa en què s'havia fet la síntesi i el filtrat es va recollir en un vial de 3 ml. Una mostra alíquota de cada prova es va analitzar per HPLC (vegeu condicions d'anàlisi de peptoides de l'apartat 14.1 amb el programa: 2 min a 20% d'ACN, de 20% d'ACN a 100% d'ACN en 10 min i 2 min a 100% d'ACN, tot mantenint un flux constant d'1 ml/min i detecció a 220 nm).

14.2.2.2. Estudi de les condicions d'acilació amb àcid bromoacètic

En 32 xeringues de polipropilè de 3 ml proveïdes d'una placa porosa de polietilè que contenen 50 mg (0.79 mmol/g, 0.04 mmol) de resina de poliestirè AM RAM, es van afegir 2 ml de DMF per tal d'inflar-la. Les xeringues es van mantenir en agitació mecànica durant 3 min i seguidament, el dissolvent es va eliminar per filtració i es va procedir a la seva desprotecció.

Desprotecció: sobre la resina inflada amb DMF, es van afegir 1.5 ml d'una dissolució de piperidina al 20% (v/v) en DMF. Les xeringues es van mantenir en agitació mecànica durant 30 min, a t.a. i a 200 rpm. Transcorregut aquest temps, el dissolvent es va eliminar per filtració i es va repetir el procés de desprotecció. A continuació es van realitzar els rentats de la resina amb DMF (3 x 2 ml), iPrOH (3 x 2 ml) i DCM (3 x 2 ml). Es van escollir 4 xeringues a l'atzar i es va comprovar la desprotecció de la resina mitjançant el test del TNBS, el qual va donar positiu (color vermell) en tots els casos.

Acilació: sobre la resina desprotegida i inflada amb DCM, es va afegir una de les dissolucions que es mostren en la Taula 14.2 i la corresponent quantitat de DIC (3 eq. o 5 eq.) depenent dels equivalents d'àcid bromoacètic afegits. Seguidament, es van anar fent les reaccions corresponents, d'una en una, utilitzant el microones domèstic a una potència de 100 W, tot agitant manualment les xeringues entre cicle i cicle d'escalfament.

Taula 14.2. Condicions d'acilació utilitzades en les 32 xeringues. A l'esquerre s'indica el temps de reacció, la realització o no de duplicats i el dissolvent utilitzat en cada reacció, mentre que a dalt s'indiquen els equivalents i la concentració utilitzada en cadascuna d'elles.

	3 eq. [0.12 M]	5 eq. [0.20 M]	3 eq. [0.24 M]	5 eq. [0.39 M]
1 x (2 x 20 s) DMF	1	9	17	25
1 x (3 x 20 s) DMF	2	10	18	26
2 x (2 x 20 s) DMF	3	11	19	27
2 x (3 x 20 s) DMF	4	12	20	28
1 x (2 x 20 s) DMF/DCM	5	13	21	29
1 x (3 x 20 s) DMF/DCM	6	14	22	30
2 x (2 x 20 s) DMF/DCM	7	15	23	31
2 x (3 x 20 s) DMF/DCM	8	16	24	32

Després d'eliminar l'excés de reactius per filtració, la resina es va rentar amb DCM (3 x 2 ml), iPrOH (3 x 2 ml) i DMF (3 x 2 ml).

Acoblament d'amina: a una suspensió de la resina acilada en 1 ml de DMF es van afegir 60 µl (0.4 mmol, 10 eq.) d'amina **A15**. Seguidament, les xeringues es van mantenir en agitació mecànica durant 3 h, a t.a. i a 200 rpm. Transcorregut aquest temps, el dissolvent es va eliminar per filtració i es va repetir l'operació. A continuació es van realitzar els rentats de la resina amb DMF (3 x 2 ml), iPrOH (3 x 2 ml) i DCM (3 x 2 ml).

Escissió de la resina: es va realitzar seguint el procediment descrit en l'apartat 14.2.2.1. L'oli groguenc obtingut es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 2.3-5.0 mg de residu.

Finalment, els crus de reacció resultants es van redissoldre en 1 ml d'H₂O/ACN (20:80), i es van preparar noves dissolucions a partir de 75 µl de les dissolucions anteriors, 25 µl d'*N*-3,3-difenilpropilacetamida d'una concentració 1.2 mg/ml, la qual va actuar com a referència externa, i 100 µl d'H₂O/ACN (20:80). Aquestes mostres es van analitzar per HPLC (en les mateixes condicions d'anàlisi que en l'apartat anterior) per obtenir els percentatges de producte mostrats a la Taula 9.1 de l'apartat 9.1.2.2.

14.2.3. PROVES D'ACOBLAMENT D'AMINA

Es van preparar 16 xeringues de polipropilè de 3 ml proveïdes d'una placa porosa de polietilè amb 50 mg (0.79 mmol/g, 0.04 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Seguint el

procediment descrit a l'apartat 14.2.2.2, es va procedir al seu inflat inicial i a la desprotecció del grup Fmoc. En aquest cas, però, es van escollir a l'atzar 4 xeringues per comprovar la desprotecció de la resina mitjançant el test del TNBS, el qual va donar positiu (color vermell) en tots els casos.

Acilació: sobre la resina desprotegida i inflada amb DCM, s'hi va afegir una dissolució d'àcid bromoacètic (27 mg, 0.2 mmol, 5eq.) en 1 ml d'una mescla DCM/DMF (2:1). Seguidament, s'hi van afegir 30 µl (0.2 mmol, 5 eq.) de DIC i la mescla es va agitar mecànicament durant 30 min, a t.a. i a 200 rpm. Transcorregut aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir l'operació. Finalment, la resina es va rentar amb DCM (3 x 2 ml), iPrOH (3 x 2 ml) i DMF (3 x 2 ml). Es van escollir 4 xeringues a l'atzar i es va comprovar la desaparició de l'amina primària mitjançant el test del TNBS, el qual va donar negatiu (incolor) en tots els casos.

Acoblament d'amina: la realització d'aquest acoblament es va fer individualment seguint les condicions descrites en la Taula 14.3. L'amina escollida va ser novament l'amina **A15** i totes les reaccions es van dur a terme dins del microones domèstic a una potència de 100 W, agitant manualment les xeringues entre cicle i cicle d'escalfament. En acabar, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es van fer els rentats de la resina amb DMF (3 x 2 ml), iPrOH (3 x 2 ml) i DCM (3 x 2 ml). En aquest cas, es va decidir no efectuar el test del cloranil perquè tot seguit tots els crús de reacció es van analitzar per HPLC.

Taula 14.3. Condicions d'acoblament d'amina utilitzades en les 16 xeringues. A l'esquerre s'indica el temps de reacció i la realització o no de duplicats en cada reacció mentre que a dalt s'indiquen els equivalents i la concentració utilitzada en cadascuna d'elles.

	3 eq. [0.12 M]	5 eq. [0.20 M]	3 eq. [0.24 M]	5 eq. [0.39 M]
1 x (2 x 20 s) DMF	1	5	9	13
1 x (3 x 20 s) DMF	2	6	10	14
2 x (2 x 20 s) DMF	3	7	11	15
2 x (3 x 20 s) DMF	4	8	12	16

L'etapa d'escissió de la resina es va realitzar seguint el procediment descrit en l'apartat 14.2.2.1. L'oli groguenc obtingut es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 1.2-3.8 mg de residu.

Finalment, els crús de reacció resultants es van analitzar per HPLC (la preparació de les mostres es va dur a terme tal i com s'ha explicat a l'apartat anterior, mentre que les condicions d'anàlisi utilitzades van ser les descrites a l'apartat 14.2.2.1), per obtenir els percentatges de producte mostrats a la Taula 9.2 de l'apartat 9.1.3.

14.2.4. PREPARACIÓ DE L'N15C (90) EN AGITACIÓ A TEMPERATURA AMBIENT.

Es van preparar 2 xeringues de polipropilè de 3 ml proveïdes d'una placa porosa de polietilè que contenen 50 mg (0.79 mmol/g, 0.04 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Seguint el procediment descrit a l'apartat 7.2.1, després de l'inflat inicial de la resina, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc, l'acilació i l'acoblament d'amina (0.2 mmol, 5 eq.) i, finalment, l'escissió necessària per obtenir la 2-(2,4-diclorofenetilamino)acetamida (N15C), producte resultant dels estudis d'acilació i d'acoblament dels apartats 14.2.2.2 i 14.2.3.

Després de l'etapa d'escissió, es va obtenir un oli groguenc que es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 2.3 i 2.8 mg de residu.

2-(2,4-Diclorofenetilamino)acetamida (90)

N15C

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 7.51 (d, J=1.6 Hz, 1H, H_{ar}), 7.38 (d, J=8.4 Hz, 1H, H_{ar}), 7.34 (dd, J₁=8.4 Hz, J₂=1.6 Hz, 1H, H_{ar}), 3.87 (s, 2H, COCH₂N), 3.27 (ac, 2H, NCH₂CH₂), 3.16 (ac, 2H, NCH₂CH₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 168.4 (CO), 135.9 (C_{Ar}), 135.2 (C_{Ar}), 134.2 (C_{Ar}), 133.2 (CH_{Ar}), 130.5 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 48.9 (COCH₂N), 47.7 (NCH₂CH₂), 30.6 (NCH₂CH₂).

CL-EM 246.9 (M+H)⁺

14.2.5. PROCEDIMENT GENERAL DE LA SÍNTESI DE PEPTOIDES. PREPARACIÓ DEL PEPTOIDE N20-13-20C (91)

Procediment general

En una xeringa de polipropilè de 10 ml proveïda d'una placa porosa de polietilè que contenia 500 mg (0.75 mmol/g, 0.38 mmol) de resina de poliestirè AM RAM, es van afegir 5 ml de DMF per tal d'inflar-la i es va mantenir en agitació mecànica durant 5 min. Seguidament, el dissolvent es va eliminar per filtració i es va procedir a la seva desprotecció.

Desprotecció: sobre la resina inflada amb DMF, es van afegir 4 ml d'una dissolució de piperidina al 20% en DMF i la xeringa es va col·locar dins del microones domèstic. Aleshores, es va escalfar durant 1 min a una potència de 100 W en cicles de 20 s (3 x 20 s), agitant-la manualment entre cicle i cicle d'escalfament. Passat aquest temps, el dissolvent es va eliminar per filtració i es va repetir el procés. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 7 ml),

iPrOH (3 x 7 ml) i DCM (3 x 7 ml). La desprotecció de la resina va ser comprovada mitjançant el test del TNBS, el qual va donar positiu (color vermell).

Primera acilació: sobre la resina desprotegida i inflada amb DMF, es va afegir una dissolució de 260 mg (1.9 mmol, 5 eq.) d'àcid bromoacètic en 4 ml de DMF. Seguidament s'hi van afegir 293 µl (1.9 mmol, 5 eq.) de DIC i la xeringa es va col·locar dins del microones domèstic. La mescla de reacció es va escalfar durant 1 min a una potència de 100 W en cicles de 20 s (3 x 20 s), agitant-la manualment entre cicle i cicle d'escalfament. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir el procés. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 7 ml), iPrOH (3 x 7 ml) i DCM (3 x 7 ml). La desaparició de l'amina primària va ser comprovada mitjançant el test del TNBS, el qual va donar negatiu (incolor).

Primer acoblament d'amina: sobre la resina acilada, s'hi va afegir una dissolució de 395 mg (1.9 mmol, 5 eq.) de 3,3-difenilpropilamina (**A20**) en 4 ml de DMF. La xeringa es va col·locar dins del microones i es va escalfar durant 1 min a una potència de 100 W en cicles de 20 s (3 x 20 s), agitant-la manualment entre cicle i cicle d'escalfament. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir el procés. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 7 ml), iPrOH (3 x 7 ml) i DCM (3 x 7 ml). La presència d'una amina secundària es va comprovar mitjançant el test del cloranil, el qual va donar positiu (color verd).

Segona acilació: es va dur a terme de forma anàloga a la primera acilació. El test del cloranil va donar negatiu (incolor) posant de manifest l'absència d'amines secundàries.

Segon acoblament d'amina: es va dur a terme de forma anàloga al primer acoblament d'amina. En aquest cas, però, es van afegir 274 µl (1.9 mmol, 5 eq.) de 2-(4-metoxifenil)etilamina (**A13**). En acabar, es va procedir a fer el test del cloranil, el qual va donar positiu (color verd).

Tercera acilació: es va dur a terme de forma anàloga a les anteriors. El test del cloranil va donar negatiu (incolor).

Tercer acoblament d'amina: es va dur a terme de forma idèntica al primer acoblament, novament utilitzant l'amina **A20**. El test del cloranil va donar positiu (color verd).

Escissió de la resina: després d'assecar la resina, es va transferir a un tub de vidre Pyrex de 10 ml roscat amb un sèptum de tefló resistent a l'àcid. Seguidament s'hi van afegir 5 ml de còctel d'escissió (TFA/DCM/H₂O, 60:40:2), tornant-se la resina de color granatós. La mescla de reacció es va deixar agitant durant 30 min a t.a. A continuació, es va filtrar en la mateixa xeringa en què s'havia fet la síntesi i el filtrat es va recollir en un matràs de 25 ml. La resina es va torna a posar al tub de vidre Pyrex i es va repetir l'operació. Els filtrats de les dues fraccions es van ajuntar i els dissolvents es van eliminar a pressió reduïda. Les traces d'aigua i d'àcid es van eliminar realitzant rentats amb ACN (3 x 5 ml), els quals es van eliminar igualment a pressió reduïda. Finalment, l'oli groguenc residual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 260 mg de residu, amb una pureses superiors al 90% per HPLC.

La purificació es va realitzar per HPLC a escala semipreparativa (vegeu condicions de purificació descrites a l'apartat 14.1 utilitzant la columna X-Terra® C₁₈ de 5 µm (19 x 250 mm) de Waters amb el programa: 10 min a 10% d'ACN, de 10% a 75% en 65 min, de 75% a 100% en 10 min i 10 min a 100% d'ACN; mantenint un flux constant de 5 ml/min) per obtenir 168 mg del peptòide (**91**) (rdt. 63%) amb una puresa superior al 98% per HPLC.

Les assignacions dels senyals dels espectres de ¹H-RMN i ¹³C-RMN d'aquests composts es van confirmar pels experiments gDQCOSY i gHSQC. La presència de diferents conformacions va conduir a uns espectres molt complexos, motiu pel qual només s'han assignat els senyals del conformer majoritari en cada cas.

**[*N*-(3,3-Difenilpropil)glicil]-[*N*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-*N*-(3,3-difenilpropil)glicinamida
N20-13-20C (**91**)²⁰⁵**

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 7.33-7.04 (22H, H_{Ar}), 6.83-6.81 (ac, 2H, H_{Ar}), 4.20-3.77 (ac, 8H, 6H (3 x COCH₂) + 2H (2 x CHPh₂)), 3.71 (s, 3H, CH₃O), 3.52 (ac 2H, NCH₂CH₂), 3.29 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH), 2.91 (ac, 2H, HNCH₂CH₂CH), 2.72 (ac, 2H, NCH₂CH₂), 2.47-2.27 (ac, 4H, 2 x CH₂CHPh₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 173.5 (CO), 170.4 (CO), 169.7 (CO), 159.8 (C_{Ar}), 145.8 (2 x C_{Ar}), 144.7 (2 x C_{Ar}), 131.3 (CH_{Ar}), 130.8 (2 x CH_{Ar}), 129.8 (8 x CH_{Ar}), 128.7 (8 x CH_{Ar}), 127.8 (4 x CH_{Ar}), 115.3 (2 x CH_{Ar}), 55.7 (CH₃O), 51.1 (COCH₂N), 50.6 (COCH₂N), 50.4 (CHPh₂), 50.1 (COCH₂N), 49.8 (CHPh₂), 48.9 (NCH₂CH₂CH), 48.3 (NCH₂CH₂), 47.9 (NCH₂CH₂CH), 34.8 (CH₂CHPh₂), 33.9 (NCH₂CH₂), 32.5 (CH₂CHPh₂).

14.2.6. PREPARACIÓ DELS PEPTOIDES HÍBRIDS N13-15-37-G-G-37-15-13C (92**) I
N37-15-13-G-G-37-15-13C (**93**)**

Es va preparar una xeringa de polipropilè de 10 ml proveïda d'una placa porosa de polietilè amb 500 mg (0.70 mmol/g, 0.35 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Seguint el procediment descrit en l'apartat 14.2.5, després de l'inflat inicial de la resina, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc i a les successives etapes d'acilació i aminació. Es van afegir 256 µl (1.75 mmol, 5 eq.) d'amina **A13** en el primer acoblament d'amina, 263 µl (1.75 mmol, 5 eq.) d'amina **A15** en el segon i 230 µl de 2-(4-fluorofenil)etilamina (**A37**) en el tercer.

Acoblament de glicina: sobre la resina inflada amb DMF, s'hi va afegir una dissolució de 260 mg (0.88 mmol, 2.5 eq.) d'Fmoc-glicina en 3 ml de DMF. Seguidament, s'hi van afegir 140 µl (0.88 mmol, 2.5 eq.) de DIC i 120 mg (0.88 mmol, 2.5 eq.) d'HOBt. La xeringa es va col·locar dins del microones i es va escalfar durant 1 min a una potència de 100 W en cicles de 20 s (3 x 20 s), agitant-la manualment entre cicle i cicle d'escalfament. Passat aquest temps,

l'excés de reactius es va eliminar per filtració i es va repetir el procés. En acabar, la resina es va rentar amb DMF (3 x 7 ml), iPrOH (3 x 7 ml) i DCM (3 x 7 ml). El test del cloranil va donar negatiu (incolor), posant de manifest l'absència d'amines secundàries.

A continuació, seguint el procediment descrit a l'apartat 14.2.5 per a la desprotecció de la resina inicial, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc de la glicina. La presència d'una amina primària es va confirmar mitjançant el test del TNBS (color vermell).

La síntesi va continuar amb un altre acoblament d'Fmoc-glicina i la posterior desprotecció del grup Fmoc. Després d'aquesta desprotecció i un cop rentada i seca la resina, es va dividir en dues parts iguals (0.18 mmol/xeringa), les quals es van afegir a dues xeringues de 5 ml proveïda d'una placa porosa de polietilè.

En tots dos casos, es va procedir amb successives etapes d'acilació i d'acoblament d'amina seguint el procediment descrit en l'apartat 14.2.5.

A una de les xeringues es van afegir 115 µl d'amina **A37** (0.88 mmol, 5 eq.) en el quart acoblament d'amina, 132 µl (0.88 mmol, 5 eq.) d'amina **A15** en el cinquè i 128 µl (0.88 mmol, 5 eq.) d'amina **A13** en el sisè. A l'altra, es van afegir 128 µl (0.88 mmol, 5 eq.) d'amina **A13** en el quart acoblament d'amina, 132 µl (0.88 mmol, 5 eq.) d'amina **A15** en el cinquè i 115 µl d'amina **A37** (0.88 mmol, 5 eq.) en el sisè.

Finalment, es va procedir a l'escissió de la resina tal i com s'ha descrit anteriorment. L'oli groguenc residual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 195 mg de cru del peptòide híbrid **92** i 203 mg de cru del peptòide híbrid **93** amb pureses superiors al 90% per HPLC. Els dos peptòides híbrids es van identificar per CL-EM.

A la Figura 9.11 de l'apartat 9.3 s'han mostrat els perfils cromatogràfics dels controls de reacció realitzats després de cada etapa sintètica a partir del primer acoblament de glicina-Fmoc del peptòide híbrid **93**.

Una mostra alíquota de cada cru de reacció es va purificar per HPLC a escala semipreparativa per poder caracteritzar els dos peptòides híbrids per EMAR (vegeu condicions de purificació descrites a l'apartat 14.1 utilitzant la columna X-Terra[®] C₁₈ de 5 µm (10 x 150 mm) de Waters de Waters amb el programa: 2 min a 20% d'ACN, de 20% a 100% en 18 min i 3 min a 100% d'ACN; mantenint un flux constant de 4.7 ml/min).

[*N*-(2-(4'-Metoxifenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]-
 [*N*-(2-(4'-fluorofenil)etil)glicil]-glicil-glicil-[*N*-(2-(4'-fluorofenil)etil)glicil]-
 [*N*-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]-*N*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicinamida

N13-15-37-G-G-37-15-13C (92)

EMAR per $C_{66}H_{74}Cl_4F_2N_9O_{10}$ Calculada: 1330.4281 (M+H)⁺

Determinada: 1330.4317

[*N*-(2-(4'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]-
 [*N*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicil]-glicil-glicil-[*N*-(2-(4'-fluorofenil)etil)glicil]-
 [*N*-(2-(2',4'-diclorofenil)etil)glicil]-*N*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicinamida

N37-15-13-G-G-37-15-13C (93)

EMAR per $C_{66}H_{74}Cl_4F_2N_9O_{10}$ Calculada: 1330.4281 (M+H)⁺

Determinada: 1330.4291

14.2.7. PREPARACIÓ DE 18 PEPTOIDES DEFINITS COM A AGONISTES DELS RECEPTORS TRKA I P75^{NTR}

Es van preparar 18 xeringues de polipropilè de 5 ml proveïdes d'una placa porosa de polietilè que contenen 300 mg (0.79 mmol/g, 0.24 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Seguint el procediment descrit a l'apartat 7.2.1, després de l'inflat inicial de la resina, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc i les successives etapes d'acilació amb àcid cloroacètic (1.2 mmol, 5 eq.) i DIC (1.2 mmol, 5 eq.), i d'acoblament amb la corresponent amina (1.2 mmol, 5 eq.) (vegeu Taula 14.4).

Taula 14.4. Quantitats d'amina necessàries per l'etapa d'acoblament (quantitats arrodonides en la pràctica a 0 o 5).

Amina	Quantitat
A8	166 µl
A12	142 µl
A17	237 mg
A4	137 µl
A9	142 µl
A35	155 µl
A6	150 µl
A16	172 µl

Finalment, es va procedir a l'etapa d'escissió i posterior tractament de les mostres per obtenir un oli groguenc residual, el qual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir uns 90-115 mg de residu (rdt. entre el 80-90%), i amb pureses generalment superiors al 85% per HPLC. Els peptoides es van identificar per CL-EM.

[*N*-(2-(2'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-[3-(2'-oxopirrolidinilpropil)]glicinamida (94)

N35-4-8C

CL-EM: 506.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(2'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-(3-(1'-imidazolil)propil)glicinamida

N35-4-12C

CL-EM: 489.3 (M+H)⁺

[*N*-(2-(2'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-[2-(4'-sulfamoïlfenil)etil]glicinamida (95)

N35-4-17C

CL-EM: 564.3 (M+H)⁺

[*N*-(2-(2'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2'-piridinil)etil)glicil]-*N*-[3-(2'-oxopirrolidinilpropil)]glicinamida

N35-9-8C

CL-EM: 541.3 (M+H)⁺

[*N*-(2-(2'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2'-piridinil)etil)glicil]-*N*-(3-(1'-imidazolil)propil)glicinamida

N35-9-12C

CL-EM: 524.3 (M+H)⁺

[*N*-(2-(2'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2'-piridinil)etil)glicil]-*N*-[2-(4'-sulfamoïlfenil)etil]glicinamida

N35-9-17C

CL-EM: 599.3 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-Pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-[3-(2'-oxopirrolidinilpropil)]glicinamida

N6-4-8C

CL-EM: 481.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-Pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-(3-(1'-imidazolil)propil)glicinamida

N6-4-12C

CL-EM: 464.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-Pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-[2-(4'-sulfamoïlfenil)etil]glicinamida (96)

N6-4-17C

CL-EM: 539.3 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-Pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2'-piridinil)etil)glicil]-*N*-[3-(2'-oxopirrolidinilpropil)]glicinamida

N6-9-8C

CL-EM: 516.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-Pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2'-piridinil)etil)glicil]-*N*-(3-(1'-imidazolil)propil)glicinamida

N6-9-12C

CL-EM: 499.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-Pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2'-piridinil)etil)glicil]-*N*-[2-(4'-sulfamoïlfenil)etil]glicinamida

N6-9-17C

CL-EM: 574.3 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-Metil-2'-pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-[3-(2'-oxopirrolidinilpropil)]glicinamida

N16-4-8C

CL-EM: 495.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-Metil-2'-pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-(3-(1'-imidazolil)propil)glicinamida

N16-4-12C

CL-EM: 478.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-Metil-2'-pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-[2-(4'-sulfamoïlfenil)etil]glicinamida

N16-4-17C

CL-EM: 553.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-Metil-2'-pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2'-piridinil)etil)glicil]-*N*-[3-(2'-oxopirrolidinilpropil)]glicinamida

N16-9-8C

CL-EM: 530.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-Metil-2'-pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2'-piridinil)etil)glicil]-*N*-(3-(1'-imidazolil)propil)glicinamida

N16-9-12C

CL-EM: 513.3 (M+H)⁺

[*N*-(2-(1'-Metil-2'-pirrolidinil)etil)glicil]-[*N*-(2-(2'-piridinil)etil)glicil]-*N*-[2-(4'-sulfamoïlfenil)etil]glicinamida

N16-9-17C

CL-EM: 588.3 (M+H)⁺

14.2.8. PREPARACIÓ DELS PEPTOIDES N35-4-10C, N35-4-13C, N35-4-15C, N35-4-35C I N35-4-37C

Es van preparar 5 xeringues de polipropilè de 5 ml proveïdes d'una placa porosa de polietilè amb 200 mg (0.79 mmol/g, 0.16 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Seguint el procediment descrit en l'apartat 14.2.5, després de l'inflat inicial de la resina, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc i a les successives etapes d'acilació i aminació. Es van afegir 0.79 mmol (5 eq.) d'amina primària (vegeu Taula 14.5) en el primer acoblament d'amina, 92 µl (0.79 mmol, 5 eq.) de 3-metil-1-butilamina (**A4**) en el segon i 103 µl (0.79 mmol, 5 eq.) de 2-(2-fluorofenil)etilamina (**A35**) en el tercer.

Taula 14.5. Quantitats d'amina necessàries per al primer acoblament d'amina.

Peptòide	Amina	Quantitat
N35-4- 10C	A10	110 µl
N35-4- 13C	A13	116 µl
N35-4- 15C	A15	120 µl
N35-4- 35C	A35	103 µl
N35-4- 37C	A37	104 µl

Després de l'etapa d'escissió de la resina, es va obtenir un oli groguenc que es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 90-130 mg de residu, amb pureses superiors al 80% per HPLC.

La purificació dels cinc peptòides es va dur a terme per HPLC a escala semipreparativa utilitzant la columna Xterra[®] C₁₈ de 5 µm (10 x 150 mm) de Waters amb el programa: 2 min a 20% d'ACN, de 20% a 80% en 17 min, de 80% a 100% en 3 min i 1 min a 100% d'ACN, mantenint un flux constant de 4 ml/min, per obtenir en cada cas, les quantitats recollides en la Taula 14.6 amb una puresa superior al 98% per HPLC. Els peptòides es van identificar per CL-EM.

Taula 14.6. Quantitat obtinguda de cadascun dels cinc peptoides i rendiment global del procés en cada cas.

Peptoide	Quantitat	Rdt.
N35-4-10C	43.8 mg	57%
N35-4-13C	54.5 mg	67%
N35-4-15C	56.2 mg	64%
N35-4-35C	36.8 mg	46%
N35-4-37C	40.6 mg	51%

[*N*-(2-(2'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-(2-feniletil)glicinamida

N35-4-10C (97)

CL-EM: 485.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(2'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-(2-(4'-metoxifenil)etil)glicinamida

N35-4-13C (98)

CL-EM: 515.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(2'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-[2-(2',4'-diclorofenil)etil]glicinamida

N35-4-15C (99)

CL-EM: 553.3, 555.3, 557.3 (M+H, Cl₂)⁺

[*N*-(2-(2'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-(2-(2'-fluorofenil)etil)glicinamida

N35-4-35C (100)

CL-EM: 503.4 (M+H)⁺

[*N*-(2-(2'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-(2-(4'-fluorofenil)etil)glicinamida

N35-4-37C (101)

CL-EM: 503.4 (M+H)⁺

14.2.9. PREPARACIÓ DELS PEPTOIDES N35-4-8C (94), N35-4-17C (95) I N6-4-17C (96) A L'ESCALA DEL GRAM

Procediment general

En un matràs de 100 ml de boca ampla proveït d'un agitador magnètic, es van disposar 4 g (0.79 mmol/g, 3.1 mmol) de resina de poliestirè AM RAM i s'hi van afegir 50 ml de DMF per tal d'inflar-la. La suspensió es va mantenir en agitació a t.a. durant 5 min, el dissolvent es va eliminar per filtració en una xeringa de polipropilè de 60 ml proveïda d'una placa porosa de

polietilè. A continuació, la resina es va transferir novament cap al matràs de reacció per tal de procedir a la desprotecció del grup Fmoc.

Desprotecció: sobre la resina inflada amb DMF, es van afegir 60 ml d'una dissolució de piperidina al 20% en DMF i el matràs es va col·locar al microones CEM equipat amb un refrigerant (reacció en sistema obert). La mescla de reacció es va escalfar a 60 °C durant 5 min a una potència de 150 W. Passat aquest temps, la resina es va filtrar en la xeringa de 60 ml utilitzada anteriorment i es va rentar amb 40 ml de DMF. Tot seguit, la resina es va transferir al matràs de reacció i es va repetir el procés. Acabada la reacció, la resina es va filtrar i es va rentar amb DMF (3 x 40 ml), iPrOH (3 x 40 ml) i DCM (3 x 40 ml). Finalment, la resina es va deixar assecar durant 2 min i es va transferir al matràs proveït amb l'agitador magnètic. La desprotecció de la resina es va comprovar mitjançant el test del TNBS, el qual va donar positiu (color vermell).

Primera acilació: sobre la resina desprotegida, es va afegir una dissolució de 2.2 g (15.8 mmol, 5 eq.) d'àcid bromoacètic en 50 ml de DMF. Seguidament s'hi van afegir 2.5 ml (15.8 mmol, 5 eq.) de DIC i es va col·locar el matràs en el microones CEM equipat novament amb un refrigerant. La mescla de reacció es va escalfar a 60 °C durant 5 min a una potència de 150 W. Passat aquest temps, la resina es va filtrar en la xeringa, es va rentar amb 40 ml de DMF i es va deixar assecar. Seguidament la resina es va transferir al matràs de reacció i es va repetir el procés. Acabada la reacció, la resina es va filtrar i es va rentar amb DMF (3 x 40 ml), iPrOH (3 x 40 ml) i DCM (3 x 40 ml). A continuació, la resina es va deixar assecar durant 2 min i es va procedir a fer el test del TNBS, el qual va donar color vermell, posant de manifest que l'acilació no havia estat completa. Així doncs, es va fer una tercera reacció d'acilació procedint de la mateixa manera que s'ha descrit anteriorment. Acabada la reacció, la resina es va filtrar i es va rentar amb DMF (3 x 40 ml), iPrOH (3 x 40 ml) i DCM (3 x 40 ml). Finalment, la resina es va deixar assecar durant 2 min i es va transferir al matràs proveït amb l'agitador magnètic. La desaparició de l'amina primària es va comprovar mitjançant el test del TNBS, el qual va donar, ara sí, positiu per aquesta reacció (incolor).

Primer acoblament d'amina: a una suspensió de la resina acilada en 50 ml de DMF es van afegir 2.2 ml (15.8 mmol, 5 eq.) d'1-(3-aminopropil)-2-pirrolidinona (**A8**) o 3.2 g (15.8 mmol, 5 eq.) de 4-(2-aminoetil)benzensulfonamida (**A17**), segons el cas. El matràs amb la mescla de reacció es va col·locar en el microones CEM equipat amb un refrigerant i es va escalfar a 80 °C durant 7 min a una potència de 150 W. Passat aquest temps, la resina es va filtrar en la xeringa, es va rentar amb 40 ml de DMF i es va deixar assecar. Seguidament la resina es va transferir al matràs de reacció i es va repetir el procés. Acabada la reacció, la resina es va filtrar i es va rentar amb DMF (3 x 40 ml), iPrOH (3 x 40 ml) i DCM (3 x 40 ml). Finalment, la resina es va deixar assecar durant 2 min i es va transferir al matràs proveït amb l'agitador magnètic. L'aparició d'una amina secundària es va confirmar mitjançant el test del cloranill (color verd).

Segona acilació: es va dur a terme de forma anàloga a la primera acilació. En aquest cas, però, una doble acilació va ser suficient.

El *segon acoblament d'amina*, la *tercera acilació* i el *tercer acoblament d'amina* es van dur a terme de forma anàloga a les descrites anteriorment. Es van afegir 1.8 ml (15.8 mmol, 5 eq.) d'**A4** en el segon acoblament d'amina i 2.0 ml (15.8 mmol, 5 eq.) d'**A35** o 2.0 ml (15.8 mmol, 5 eq.) de 2-(1-pirrolidinil)etanamina (**A6**), segons el cas, en el tercer acoblament d'amina.

Escissió de la resina: després d'assecar la resina, es va repartir entre quatre tubs de vidre Pyrex de 30 ml roscats amb un sèptum de tefló resistent a l'àcid. Seguidament s'hi van afegir 20 ml de còctel d'escissió (TFA/DCM/H₂O, 60:40:2), tornant-se la resina de color granatós. La mescla de reacció es va deixar agitant durant 30 min a t.a. A continuació, la mescla de cada tub es va filtrar a través d'una xeringa de polipropilè de 10 ml proveïda d'una placa porosa de polietilè. Els filtrats es van recollir en un matràs de 250 ml i el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda, mentre que la resina es va transferir novament als tubs de vidre Pyrex per repetir l'etapa d'escissió. Les traces d'aigua i d'àcid es van eliminar realitzant rentats amb ACN (3 x 10 ml), els quals es van eliminar igualment a pressió reduïda. Finalment, l'oli groguenc residual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 1.25-1.80 g de residu, amb pureses superiors al 85% per HPLC.

La purificació dels tres peptoides es va dur a terme per HPLC a escala semipreparativa utilitzant la columna PrePack[®]-C₁₈ de 15-20 µm (47 x 300 mm) de Waters i els programes mantenint un flux constant de 60 ml/min: a) per al cas del N35-4-8C, 10 min a 20% d'ACN, de 20% a 80% en 60 min, de 80% a 100% en 10 min i 10 min a 100% d'ACN; b) per al cas del N35-4-17C i del N6-4-17C, 10 min a 10% d'ACN, de 10% a 50% en 50 min, de 50% a 80% en 20 min, de 80% a 100% en 10 min i 10 min a 100% d'ACN; per obtenir, en cada cas, les quantitats recollides en la Taula 10.2 de l'apartat 10.2.2.5 amb una puresa superior al 98% per HPLC.

Les assignacions dels senyals dels espectres de ¹H-RMN i ¹³C-RMN d'aquests composts es van confirmar pels experiments gDQCOSY i gHSQC. La presència de diferents conformacions va conduir a uns espectres molt complexos, motiu pel qual només s'han assignat els senyals del conòrmer majoritari en cada cas.

[*N*-(2-(2'-Fluorofenil)etil)glicil]-[*N*-(3-metilbutil)glicil]-*N*-[3-(2'-oxopirrolidinil)propil]glicinamida

N35-4-8C (94)

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): 7.34 (ac, 1H, H_{Ar}), 7.32 (ac, 1H, H_{Ar}), 7.17 (ac, 1H, H_{Ar}), 7.12 (ac, 1H, H_{Ar}), 4.4-3.9 (ac, 6H, 3 x COCH₂N), 3.5-3.2 (ac, 10H, 4 x NCH₂CH₂ i 1 x HNCH₂CH₂), 3.10 (ac, 2H, HNCH₂CH₂), 2.36 (ac, 2H, COCH₂CH₂), 2.03 (ac, 2H, COCH₂CH₂), 1.9-1.7 (ac, 2H, NCH₂CH₂CH₂N), 1.60 (ac, 1H, (CH₃)₂CHCH₂CH₂N), 1.6-1.4 (ac, 2H, (CH₃)₂CHCH₂CH₂N), 0.94 (ac, 6H, (CH₃)₂CHCH₂CH₂N).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): 170.1 (CO), 167.3 (CO), 166.6 (CO), 144.6 (C_{ar}), 143.1 (C_{ar}), 130.5 (2 x CH_{Ar}), 127.6 (2 x CH_{Ar}), 55.7 (2 x N_{cicle}CH₂CH₂), 51.3 (COCH₂N), 51.0 (COCH₂N), 50.9 (HNCH₂CH₂), 50.6 (COCH₂N), 50.3 (NCH₂CH₂C_{ar}), 47.5 (NCH₂CH₂), 44.3 (HNCH₂CH₂), 37.1 ((CH₃)₂CHCH₂CH₂N), 34.3 (NCH₂CH₂C_{ar}), 27.1 ((CH₃)₂CHCH₂CH₂N), 24.0 (N_{cicle}CH₂CH₂CH₂CH₂), 22.8 (2 x (CH₃)₂CHCH₂CH₂N).

EMAR per C₂₅H₄₃N₆O₅S

Calculada: 539.3016 (M+H)⁺

Determinada: 539.3022

14.3. SÍNTESI DE PEPTOIDES ASSISTIDA PER MICROONES MITJANÇANT L'APARELL DE MICROONES COMERCIAL CEM

14.3.1. SISTEMA TANCAT

14.3.1.1. Desprotecció de la resina

Es van preparar 9 bossetes de malla de polipropilè que contenen 100 mg (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) de resina de poliestirè AM RAM cadascuna. A continuació es van col·locar d'una en una a l'interior d'un tub de reacció de 10 ml proveït amb un nucli d'agitació magnètica. Seguidament s'hi va afegir 3 ml d'una dissolució de piperidina al 20% (v/v) en DMF, es va tapar el tub, es va col·locar a l'interior de l'aparell de microones CEM i es van anar realitzant les corresponents reaccions segons les condicions recollides en la Taula 14.7.

Taula 14.7. Condicions de reacció utilitzades en les 9 bossetes per a l'etapa de desprotecció del grup Fmoc de la resina. A l'esquerra s'indica el temps de reacció, mentre que a dalt s'indica la temperatura a la qual es va dur a terme.

	40 °C	60 °C	80 °C
1 min	1	4	7
2 min	2	5	8
5 min	3	6	9

Acabades les reaccions, les dissolucions es van recollir en vials de 3 ml. Seguidament es van preparar mostres alíquotes de cadascuna de les 9 dissolucions i es van analitzar mitjançant un espectrofotòmetre, fent les lectures a una longitud d'ona de 290 nm. Els valors obtinguts en cada cas van ser els mostrats en la Taula 11.1. D'acord amb aquests resultats, es va establir

que les condicions més favorables per dur a terme la reacció de desprotecció amb aquesta metodologia de sistema tancat eren irradiar la mostra a una temperatura de 60 °C durant 2 min a una potència de 150 W.

14.3.1.2. Proves d'acilació

Es va preparar una bosseta de malla de polipropilè que contenia 100 mg (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Seguint el procediment descrit a l'apartat anterior, es va procedir al seu inflat inicial i a la desprotecció del grup Fmoc.

Acilació: la bosseta amb la resina desprotegida i inflada amb DCM, es va col·locar novament a l'interior d'un tub de reacció de 10 ml proveït d'un nucli d'agitació magnètica i s'hi van afegir 3 ml d'una dissolució d'àcid bromoacètic (333 mg, 2.4 mmol, 30 eq.) i DIC (375 µl, 2.4 mmol, 30 eq.) en DMF. A continuació es va tancar el tub, es va col·locar a l'interior de l'aparell de microones CEM i es va escalfar durant 30 s a una temperatura de 35 °C amb una potència de 150 W. En acabar, es va buidar la dissolució i la bosseta es va transferir cap a una ampolla de polipropilè de 20 ml, on es van realitzar els corresponents rentats amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml). Finalment es va agafar una mostra de resina i es va realitzar el test del TNBS, el qual va posar de manifest que l'acilació no havia estat completa, en romandre part de la resina de color vermell.

Es van preparar un total de 9 bossetes més i es va procedir de la mateixa manera, variant només les condicions de la reacció d'acilació. Les condicions utilitzades en cada cas van ser les descrites en la Taula 14.8. Al finalitzar cadascun d'aquests experiments, es va realitzar el test del TNBS per analitzar els resultats obtinguts.

Taula 14.8. Condicions d'acilació utilitzades en els 9 experiments. A l'esquerra s'indica el número d'experiment, mentre que a dalt s'indiquen els 4 paràmetres de reacció que definien les condicions de reacció en cada cas.

	Temperatura (°C)	Temps (min)	Eq. de reactius	Duplicat
1	60	1	30	Si
2	60	1	5	Si
3	60	1	10	Si
4	60	1	20	Si
5	60	1	30	Si
6	60	0.5	30	No
7	60	1	30	No
8	60	5	30	No
9	60	10	30	No

D'acord amb aquests resultats, es va establir que les condicions més favorables per dur a terme la reacció d'acilació amb aquesta metodologia en sistema tancat eren escalfar la mostra a una temperatura de 60 °C durant 1 min amb una potència de 150 W treballant amb una concentració de reactius de 0.4 M i realitzar un duplicat de la reacció.

14.3.1.3. Proves d'acoblament d'amina

Es van preparar 6 bossetes de malla de polipropilè que contenen 100 mg (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) de resina de poliestirè AM RAM cadascuna. Tot seguit, les bossetes es van col·locar a l'interior d'una única ampolla de rosca ampla de 20 ml i que contenia 10 ml de DMF, per procedir a l'inflat inicial.[§] L'ampolla es va mantenir en agitació durant 5 min i seguidament es va buidar el dissolvent.

Desprotecció: es van col·locar totes les bossetes en una ampolla que contenia 10 ml d'una dissolució de piperidina al 20% (v/v) en DMF i es van mantenir en agitació mecànica durant 30 min, a t.a. i a 200 rpm. Llavors, el dissolvent es va buidar i es va tornar a repetir l'operació. Les bossetes es van rentar amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml). En cada rentat les ampolles es van mantenir en agitació durant 1 min.

Acilació: sobre les 6 bossetes col·locades a l'interior de l'ampolla de polipropilè de 20 ml, s'hi van afegir 10 ml d'una dissolució d'àcid bromoacètic (660 mg, 0.4 mmol/bossa, 5 eq.) en 20 ml de DCM/DMF (1:1) i DIC (370 µl, 0.4 mmol/bossa, 5 eq.) i es va mantenir en agitació mecànica durant 30 min, a t.a. i a 200 rpm. Llavors, el dissolvent es va buidar i es va tornar a repetir l'operació. Les bossetes es van rentar amb DCM (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DMF (3 x 5 ml). En cada rentat les ampolles es van mantenir en agitació durant 1 min.

Acoblament d'amina: la realització d'aquest acoblament es va fer individualment per a cada bosseta, la qual es va col·locar a l'interior d'un tub de 10 ml proveït d'un nucli d'agitació magnètica. Seguidament, s'hi van afegir 4 ml de DMF, l'amina **A15** (360 µl, 2.4 mmol, 30 eq.), es va tancar i es va col·locar a l'interior de l'aparell de microones CEM. Cadascun dels experiments es va dur a terme seguint les condicions descrites en la

Taula 14.9 amb una potència de 150 W. En acabar, l'excés de reactius es va eliminar i es van fer els rentats de la resina de la bosseta amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml).

[§] El dissolvent ha de cobrir completament les bosses quan aquestes es mantenen en agitació.

Taula 14.9. Condicions d'acoblament d'amina utilitzades en els 6 experiments. A l'esquerra s'indica el temps de reacció, mentre que a dalt s'indica la temperatura a la qual es va dur a terme cada reacció.

	70 °C	80 °C	90 °C
1 min	1	3	5
2 min	2	4	6

Escissió de la resina: es van agafar les 6 bossetes i es van col·locar cadascuna d'elles en un tub falcon roscat de 15 ml amb 5 ml de còctel d'escissió format per TFA/DCM/H₂O (60:40:2, v/v). Els tubs es van mantenir en agitació mecànica a t.a. durant 30 min. Llavors, es van recollir les corresponents dissolucions en matrassos de 10 ml i es van eliminar els dissolvents a pressió reduïda. Les traces d'aigua i d'àcid es van eliminar per rentats amb ACN (3 x 5 ml), els quals es van eliminar igualment a pressió reduïda. Els olis groguencs residuals es van redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es van liofilitzar.

Finalment, els crús de reacció resultants es van analitzar per HPLC (la preparació de les mostres es va dur a terme tal i com s'ha explicat a l'apartat 14.2.2.2, mentre que les condicions d'anàlisi utilitzades van ser les descrites a l'apartat 14.2.2.1), per obtenir els valors del quocient d'àrees entre la 2-(2,4-diclorofenetilamino)acetamida (**90**) i l'*N*-3,3-difenil-propilacetamida utilitzada com a patró extern mostrats a la Taula 11.2 de l'apartat 11.2.1.3.

14.3.1.4. Procediment general de la síntesi de peptoides. Preparació del peptòide N20-13-20C (91)

Procediment general

Es va preparar una bosseta de malla de polipropilè que contenia 100 mg (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) de resina de poliestirè AM RAM i es va col·locar a l'interior d'un tub de 10 ml proveït amb un nucli d'agitació magnètica. A continuació s'hi van afegir 4 ml de DMF i es va mantenir en agitació a t.a. durant 5 min per procedir a l'inflat inicial de la resina. Seguidament, el dissolvent es va eliminar i es va procedir a la seva desprotecció.

Desprotecció: sobre la resina inflada amb DMF, es van afegir 4 ml d'una dissolució de piperidina al 20% (v/v) en DMF, es va tancar el tub i es va col·locar a l'interior de l'aparell de microones CEM. Aleshores, es va escalfar durant 2 min a una temperatura de 60 °C amb una potència de 150 W. Passat aquest temps, el dissolvent es va eliminar i es va repetir el procés. En acabar, la bosseta es va treure del tub i es va transferir cap a una ampolla de rosca ampla de polipropilè de 20 ml on es va rentar amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml).

Primera acilació: es va col·locar la bosseta a l'interior d'un tub de reacció de 10 ml proveït amb un nucli d'agitació magnètica i s'hi va afegir una dissolució de 330 mg (2.4 mmol, 30 eq.) d'àcid bromoacètic en 5 ml de DMF i 370 μ l (2.4 mmol, 30 eq.) de DIC. Aleshores es va tancar el tub, es va col·locar a l'interior de l'aparell de microones CEM i es va escalfar durant 1 min a una temperatura de 60 °C amb una potència de 150 W. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar i es va repetir el procés. En acabar, la bosseta es va treure del tub i es va transferir cap a una ampolla de rosca ampla de polipropilè de 20 ml on es va rentar amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml).

Primer acoblament d'amina: es va col·locar novament la bosseta a l'interior d'un tub de reacció de 10 ml proveït amb un nucli d'agitació magnètica i s'hi va afegir una dissolució de 500 mg (2.4 mmol, 30 eq.) d'amina **A20** en 5 ml de DMF. Aleshores es va tancar el tub, es va col·locar a l'interior de l'aparell de microones CEM i es va escalfar durant 2 min a una temperatura de 80 °C amb una potència de 150 W. Passat aquest temps, l'excés de reactius es va eliminar i es va repetir el procés. En acabar, la bosseta es va treure del tub i es va transferir cap a una ampolla de rosca ampla de polipropilè de 20 ml on es va rentar amb DMF (3 x 5 ml), iPrOH (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml).

Segona acilació: es va dur a terme de forma anàloga a la primera acilació.

Segon acoblament d'amina: es va dur a terme de forma anàloga al primer acoblament d'amina. En aquest cas, però, es van afegir 345 μ l (2.4 mmol, 30 eq.) d'amina **A13**.

Tercera acilació: es va dur a terme de forma anàloga a les anteriors.

Tercer acoblament d'amina: es va dur a terme de forma idèntica al primer acoblament, novament utilitzant l'amina **A20**.

Escissió de la resina: després d'assecar la resina, es va obrir la bosseta i es va transferir la resina cap a un tub de vidre pyrex roscat amb un tap proveït d'un sèptum de tefló resistent a l'àcid. Tot seguit, s'hi van afegir 5 ml de còctel d'escissió (TFA/DCM/H₂O, 60:40:2), tornant-se la resina de color granatós. La mescla de reacció es va deixar en agitació mecànica a t.a durant 30 min i a continuació es va filtrar a través d'una xeringa de polipropilè de 5 ml proveïda d'una placa filtrant. El filtrat es va recollir en un matràs de 25 ml i els dissolvents es van eliminar a pressió reduïda. Les traces d'aigua i d'àcid es van eliminar per rentats amb ACN (3 x 5 ml), els quals es van eliminar igualment a pressió reduïda. Finalment, l'oli groguenc residual es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 48 mg de residu, amb una puresa superior al 85% per HPLC.

La purificació es va realitzar per HPLC a escala semipreparativa (vegeu condicions de purificació descrites a l'apartat 14.1 utilitzant la columna X-Terra® C₁₈ de 5 μ m (19 x 250 mm) de Waters amb el programa: 10 min a 10% d'ACN, de 10% a 75% en 65 min, de 75% a 100% en 10 min i 10 min a 100% d'ACN; mantenint un flux constant de 5 ml/min) per obtenir 29.2 mg del peptòide (**91**) (rdt. 52%) amb una puresa superior al 98% per HPLC.

14.3.1.5. Escissió de la resina dins de la bosseta

Es va preparar una xeringa de polipropilè de 10 ml proveïda d'una placa porosa de polietilè amb 300 mg (0.79 mmol/g, 0.24 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Seguint el procediment descrit en l'apartat 14.2.5, després de l'inflat inicial de la resina, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc i a les successives etapes d'acilació i aminació. Es van afegir 250 mg (1.19 mmol, 5 eq.) d'amina **A20** en el primer acoblament d'amina, 175 µl (1.19 mmol, 5 eq.) d'amina **A13** en el segon i novament 250 mg (1.19 mmol, 5 eq.) d'amina **A20** en el tercer. En acabar, es van realitzar els rentats de la resina i es va deixar assecar en la pròpia xeringa disposada en el rentador sota l'aspiració de la campana extractora fins que no es notà humida.

Un cop seca, la resina es va separar en dues meitats. La primera d'elles es va transferir cap a un tub de vidre pyrex mentre que l'altra es va transferir cap a una bosseta de malla de polipropilè, la qual es va col·locar a l'interior d'un tub falcon roscat de 15 ml. Tot seguit, es van afegir 5 ml del còctel d'escissió descrit anteriorment i es van deixar les dues mescles en agitació mecànica a t.a. durant 30 min. Passat aquest temps, la mescla del tub de vidre pyrex es va filtrar a través d'una xeringa de polipropilè de 5 ml proveïda d'una placa filtrant tot recollint el filtrat en un matràs de 10 ml, mentre que la dissolució de la mescla de la bosseta es va recollir en un altre matràs de 10 ml. Els dissolvents es van eliminar a pressió reduïda mentre que les traces d'aigua i d'àcid es van eliminar realitzant rentats amb ACN (3 x 5 ml), els quals es van eliminar igualment a pressió reduïda. Finalment, els olis groguencs residuals es van redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es van liofilitzar, per obtenir 105 mg i 100 mg de residu, respectivament.

El perfil cromatogràfic d'HPLC del cru de reacció va ser igual en els dos casos, mostrant una puresa superior al 90%.

14.3.2. SISTEMA OBERT

14.3.2.1. Procediment general de la síntesi de peptoides. Síntesi del pentàmer model N6-20-34-13-7C (102)

Procediment general

Es va preparar una bosseta de malla de polipropilè que contenia 100 mg (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) de resina de poliestirè AM RAM i es va procedir de forma anàloga al procediment descrit en l'apartat 14.3.1.4. En aquest cas, però, el reactor utilitzat va ser un matràs de 50 ml proveït d'un nucli d'agitació magnètica enlloc d'un tub de reacció de 10 ml i el sistema no estava tancat sinó equipat amb un refrigerant en sistema obert.

Després de l'inflat inicial de la resina per agitació a t.a. amb 10 ml de DMF, es va procedir amb la desprotecció dels grups Fmoc de la resina per tractament amb 10 ml d'una dissolució de

piperidina al 20% (v/v) en DMF escalfant durant 2 min a una temperatura de 60 °C amb una potència de 150 W. Passat aquest temps, el dissolvent es va eliminar i es va repetir el procés.

Les reaccions d'acilació es van realitzar mitjançant l'addició de 10 ml d'una dissolució d'àcid bromoacètic (416 mg, 3 mmol, 38 eq.) en DMF i DIC (470 µl, 3 mmol, 38 eq.) i posterior escalfament durant 1 min a una temperatura de 60 °C amb una potència de 150 W.

Pel que fa a les reaccions d'acoblament d'amina, aquestes es van dur a terme mitjançant l'addició de 10 ml d'una dissolució de la corresponent amina (3 mmol, 38 eq., vegeu Taula 14.10) en DMF i posterior escalfament durant 2 min a una temperatura de 80 °C amb una potència de 150 W.

Taula 14.10. Quantitats d'amina necessàries en cadascuna de les reaccions d'acoblament.

Acoblament	Amina	Quantitat
1	A7	287 µl
2	A13	439 µl
3	A34	420 µl
4	A20	633 mg
5	A6	380 µl

Les quantitats de cada amina afegides es van arrodonir a 0 o 5.

L'escissió de la resina es va dur a terme sense treure-la de la bosseta mitjançant el procediment descrit en l'apartat anterior, per obtenir 48 mg de cru de reacció liofilitzat amb una puresa superior al 85% per HPLC. Tot i que la puresa del cru era acceptable, la quantitat de cru de reacció obtinguda era baixa. Per aquest motiu, es va decidir repetir la síntesi variant diferents paràmetres de reacció.

Es va preparar una bosseta de malla de polipropilè que contenia 100 mg (0.79 mmol/g, 0.08 mmol) de resina de poliestirè AM RAM i es va procedir de forma anàloga a la descrita anteriorment. En aquest cas, però, les reaccions d'acilació es van dur a terme escalfant durant 30 s a una temperatura de 35 °C amb una potència de 150 W mentre que les reaccions d'acoblament d'amina es van realitzar escalfant durant 1.5 min a una temperatura de 95 °C amb la mateixa potència. A més, no es van realitzar duplicats de reacció, excepte en el cas de la desprotecció inicial dels grups Fmoc de la resina.

Finalment es va dur a terme la reacció d'escissió de la resina tal i com s'ha comentat anteriorment, per obtenir 95 mg de cru de reacció liofilitzat amb una puresa novament superior al 85%.

reactius en les etapes d'acilació i d'acoblament d'amina, la qual es va fixar a 0.4 M (30 eq./bosseta). Les condicions utilitzades van ser les següents:

Acilació: àcid bromoacètic (1.66 g, 12 mmol, 30 eq./bosseta) i DIC (1.88 ml, 12 mmol, 30 eq./bosseta) en 30 ml de DMF.

Acoblament d'amina: amina segons Taula 14.11 (12 mmol, 30 eq./bosseta) en 30 ml de DMF.

Taula 14.11. Quantitats d'amina necessàries en cadascuna de les reaccions d'acoblament.

Acoblament	Amina	Quantitat
1	A7	1.22 g
2	A13	1.81 g
3	A34	1.87 g
4	A20	2.54 g
5	A6	1.37 g

Finalment, es va dur a terme la reacció d'escissió de la resina tal i com s'ha comentat anteriorment a cadascuna de les bossetes per separat, per obtenir entre 80-88 mg de cru de reacció liofilitzat amb una puresa entre el 80-85%.

14.4. ESTUDI DE LA REACTIVITAT DE LES AMINES DE LA QUIMIOTECA

14.4.1. ESTUDI PER HPLC

14.4.1.1. Estudi de la reactivitat de les deu amines en fase sòlida utilitzant mescles equimolars

Es va preparar una xeringa de 10 ml que contenia 400 mg (0.79 mmol/g, 0.3 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Seguint el procediment descrit a l'apartat 7.2.1, es va procedir a la desprotecció del grup Fmoc i a l'acilació amb l'àcid 4-bromometilbenzoic. Els tests van donar positius en cada cas.

Un cop la resina estava ben seca, es van preparar quatre bossetes de malla de polipropilè (dues per a la reacció amb les amines del grup A i dues per a la reacció amb les amines del grup B), s'hi van pesar 100 mg d'aquesta resina i es van segellar. Seguidament es va procedir a realitzar l'etapa d'aminació de forma individual per a cadascuna de les bossetes.

L'aminació es va dur a terme afegint 10 ml de DMF que contenien una mescla equimolar (4 mmol/amina, 50 eq.) de 5 amines (vegeu Taula 14.12) a un matràs de 50 ml proveït amb un nucli magnètic que contenia la bosseta amb la resina. El matràs es va col·locar a l'interior del microones CEM i es va escalfar a una temperatura de 90 °C durant 1.5 min, a una potència de 150 W. Transcorregut aquest temps, el dissolvent es va buidar i la bosseta es va transferir a una ampolla de polipropilè de 20 ml de rosca ampla per tal de procedir al rentat amb DMF (3 x 10 ml), iPrOH (3 x 10 ml) i DCM (3 x 10 ml). En cada rentat l'ampolla es va mantenir en agitació manual durant 20 s.

Taula 14.12. Quantitats d'amina necessàries en cada matràs per a l'etapa d'acoblament. En negreta es mostren les amines escollides com a referència en cada grup.

Grup A	Quantitat	Grup B	Quantitat
A7	454 mg	A6	461 mg
A12	511 mg	A9	514 mg
A13	617 mg	A11	417 mg
A20	871 mg	A19	526 mg
A34	635 mg	A35	562 mg

Les quantitats de cada amina afegides es van arrodonir a 0 o 5.

Després de l'etapa d'escissió, es va obtenir un oli groguenc que es va redissoldre en una mescla d'H₂O/ACN i es va liofilitzar, per obtenir 42/42 mg dels residus del grup A i 44/42 mg dels del grup B.

Seguidament, es van preparar dissolucions dels residus obtinguts d'una concentració aproximada de 8 mg en 200 µl d'ACN. Tal i com es van preparar les dissolucions de les rectes de calibració,¹⁹⁹ a 5 µl de les dissolucions anteriors dels residus s'hi van afegir 10 µl del patró (*N*-3,3-difenilpropilacetamida) d'una concentració 0.41 µM i 185 µl d'una dissolució aquosa de HCOOH-Et₃N 20 mM, pH=5.0. En el cas dels residus del grup B es va preparar també una dissolució anàloga a l'anterior, però afegint-hi 185 µl d'H₂O amb 0.1% de TFA.

A partir de l'anàlisi de les mostres per HPLC (vegeu condicions d'anàlisi de l'apartat 14.1) i tenint en compte les rectes de calibració corresponents a cada benzamida (vegeu Taula 12.1), es van determinar els valors de reactivitat relativa i els factors d'equireactivitat^{**} en fase sòlida entre les amines presents en un mateix grup, els quals s'han mostrat a la Taula 12.2 de l'apartat 12.3.2.2.

^{**} El factor d'equireactivitat s'ha calculat a partir de la inversa del valor de reactivitat relativa a **A12** en el grup A i **A6** en el grup B, és a dir a 1.

14.4.1.2. Estudi de la reactivitat de les 10 amines en fase sòlida utilitzant mescles equireactives

Es va preparar una xeringa de 10 ml que contenia 400 mg (0.79 mmol/g, 0.3 mmol) de resina de poliestirè AM RAM i es va procedir de forma anàloga a la descrita anteriorment en l'apartat 14.4.1.1 fins a l'etapa d'acoblament d'amina. En aquest cas, aquesta etapa es va realitzar variant la quantitat de cada amina afegida en funció dels factors d'equireactivitat respectius obtinguts (vegeu Taula 14.13).

Taula 14.13. Quantitats d'amina necessàries en cada matràs per l'etapa d'acoblament en fase sòlida, després d'aplicar els factors d'equireactivitat respectius. En negreta es mostren les amines escollides com a referència.

Grup A	mmol	Quantitat	Grup B	mmol	Quantitat
A7	5.48	622 mg	A6	4.00	461 mg
A12	4.00	511 mg	A9	8.72	1117 mg
A13	4.20	648 mg	A11	8.60	888 mg
A20	5.12	1106 mg	A19	4.44	584 mg
A34	5.28	838 mg	A35	12.96	1817 mg

Les quantitats de cada amina afegides es van arrodonir a 0 o 5.

Després de l'escissió de la resina i de la liofilització final, es van obtenir 43/45 mg dels residus del grup A i 48/50 mg dels del grup B.

De l'anàlisi dels dos residus de cada grup per HPLC (vegeu condicions d'anàlisi de l'apartat 14.1), es van obtenir els nous valors de reactivitat en fase sòlida entre les amines presents en un mateix grup, els quals s'han mostrat a la Taula 12.3 de l'apartat 12.3.2.3.

14.5. SÍNTESI DE LA QUIMIOTECA DE PENTÀMERS

Es van omplir 20 bossetes convenientment etiquetades amb 100 mg (0.79 mmol/g, 0.079 mmol) de resina de poliestirè AM RAM. Inicialment, les bossetes es van disposar en una única ampolla de polipropilè de rosca ampla de 500 ml i que contenia 250 ml de DMF, per procedir a l'inflat inicial.^{††} L'ampolla es va mantenir en agitació durant 5 min i seguidament es va buidar el dissolvent.

Desprotecció: totes les bossetes es van col·locar a l'ampolla descrita anteriorment amb 250 ml d'una dissolució de piperidina al 20% (v/v) en DMF i es van mantenir en agitació mecànica durant 30 min, a t.a. i a 200 rpm. Llavors, el dissolvent es va buidar i es va tornar a

^{††} El dissolvent ha de cobrir completament les bosses quan aquestes es mantenen en agitació.

repetir l'operació. Les bossetes es van rentar amb DMF (3 x 150 ml), iPrOH (3 x 150 ml) i DCM (3 x 150 ml). En cada rentat les ampolles es van mantenir en agitació durant 2 min.

Acilació: les primeres 5 bossetes (1-5) es van col·locar dins d'un matràs de 50 ml equipat amb un nucli magnètic. Seguidament, s'hi van afegir 30 ml d'una dissolució d'àcid bromoacètic (33.5 g, 2.4 mmol/bossa, 30 eq.) en 600 ml de DMF i DIC (1.9 ml, 2.4 mmol/bossa, 30 eq.). El matràs es va col·locar en el microones CEM i es va escalfar a una temperatura de 35 °C durant 30 s a una potència de 150 W. Transcorregut aquest temps, el dissolvent es va buidar i les bossetes es van transferir des del matràs cap a una ampolla de polipropilè de 20 ml de rosca ampla per tal de procedir al seu rentat amb DMF (3 x 10 ml), iPrOH (3 x 10 ml) i DCM (3 x 10 ml). En cada rentat l'ampolla es va mantenir en agitació manual durant 20 s. Aquesta operació es va repetir per a la resta de bossetes: 6-10, 11-15 i 16-20.

Acoblament d'amina, R⁵: seguint l'esquema dissenyat per a la síntesi de la quimioteca, el primer acoblament d'amina és comú per a totes les bossetes (**A7**). Les bossetes de l'1-5 es van col·locar a un matràs de 50 ml proveït d'un nucli magnètic. Seguidament s'hi van afegir 30 ml de DMF i l'*N*-(2-aminoetil)acetamida (1.36 g, 2.4 mmol/bossa, 30 eq.). El matràs es va col·locar en el microones i es va escalfar a una temperatura de 90 °C durant 1.5 min, a una potència de 150 W. Transcorregut aquest temps, el dissolvent es va buidar i les bossetes es van transferir des del matràs a una ampolla de polipropilè de 20 ml de rosca ampla per tal de procedir al rentat amb DMF (3 x 10 ml), iPrOH (3 x 10 ml) i DCM (3 x 10 ml). En cada rentat l'ampolla es va mantenir en agitació manual durant 20 s. Aquesta operació es va repetir per a la resta de bossetes: 6-10, 11-15 i 16-20.

2a acilació: es va procedir de la mateixa forma que en la primera acilació.

2n acoblament d'amina, R⁴: les bossetes numerades de l'1 al 5 es van fer reaccionar individualment. Es va col·locar cada bosseta en un matràs de 50 ml proveït amb un nucli magnètic. Seguidament s'hi van afegir 10 ml de DMF i la quantitat d'amina corresponent (4 mmol, 50 eq.) (vegeu Taula 14.14) per definir la quarta posició.

Taula 14.14. Quantitats d'amina necessàries (50 eq.) per a la primera posició de diversitat (R⁴) de la quimioteca de pentàmers.

Bossa	Amina	Quantitat
1	A7	454 mg
2	A12	487 µl
3	A13	597 µl
4	A20	550 µl
5	A34	571 µl

Les quantitats de cada amina afegides es van arrodonir a 0 o 5.

La resta de bosses, amb la quarta posició aleatòria, es van fer reaccionar com ja s'ha explicat anteriorment, aplegades de 5 en 5 (6-10, 11-15, 16-20). Cada grup de 5 bossetes es va col·locar dins d'un matràs de 50 ml proveït amb un nucli magnètic. Seguidament s'hi van afegir 30 ml d'una dissolució que contenia una mescla equireactiva de cinc amines en DMF (vegeu Taula 14.15), tenint en compte els seus corresponents factors d'equireactivitat.

Taula 14.15. Quantitats d'amina necessàries per tenir la mescla equireactiva per a la primera posició de diversitat (R^4) de la quimioteca de pentàmers.

Amina	Quantitat	Equivalents
A7	1.87 g	41.5
A12	1.46 ml	30.3
A13	1.88 ml	31.8
A20	2.11 ml	38.8
A34	2.26 ml	40.0

Les quantitats de cada amina afegides es van arrodonir a 0 o 5.

En ambdós casos es va col·locar el matràs de reacció dins de l'aparell de microones i es va escalfar a una temperatura de 90 °C durant 1.5 min a una potència de 150 W. Transcorregut aquest temps, el dissolvent es va buidar i les bossetes es van transferir des del matràs cap a una ampolla de polipropilè de 20 ml de rosca ampla per tal de procedir al rentat amb DMF (3 x 10 ml), iPrOH (3 x 10 ml) i DCM (3 x 10 ml). En cada rentat l'ampolla es va mantenir en agitació manual durant 20 s.

3a acilació: es va procedir de la mateixa forma que en les anteriors etapes d'acilació.

3r acoblament d'amina, R^3 : es va procedir com s'ha explicat anteriorment, però en aquest cas es van fer reaccionar individualment les bossetes numerades de l'6 al 10. Les quantitats emprades de cada amina, tant en les bossetes amb la tercera posició definida, individuals, com en les de posició aleatòria, van ser les mateixes que en l'acoblament d'amina anterior (vegeu Taula 14.14 i Taula 14.15).

4a acilació: es va procedir de la mateixa forma que en les anteriors etapes d'acilació.

4t acoblament d'amina, R^2 : es va procedir com s'ha explicat anteriorment, però en aquest cas es van fer reaccionar individualment les bossetes numerades de l'11 al 15. Les quantitats emprades de cada amina, tant en les bossetes amb la segona posició definida, individuals, com en les de posició aleatòria, van ser les mateixes que en els dos acoblament d'amina anteriors (vegeu Taula 14.14 i Taula 14.15).

5a acilació: es va procedir de la mateixa forma que en les anteriors etapes d'acilació.

5è acoblament d'amina, R^1 : es va procedir com s'ha explicat anteriorment, però en aquest cas es van fer reaccionar individualment les bossetes numerades del 16 al 20. Les amines emprades en aquest acoblament, tant en les bossetes amb la primera posició definida, individuals, com en les de posició aleatòria, van ser diferents i són les mostrades en la Taula 14.16.

Taula 14.16. Quantitats d'amina necessàries per a la cinquena posició de diversitat (R^1) de la quimioteca de pentàmers. Esquerra: reaccions individuals per posicions definides, bossetes 16-20. Dreta: mescles equireactives per posicions aleatòries, bossetes 1-5, 6-10 i 11-15.

Bossa	Amina	Quantitat	Amina	Quantitat	Equivalents
16	A6	512 μ l	A6	1.54 ml	30.3
17	A9	504 μ l	A9	3.29 ml	66.1
18	A11	426 μ l	A11	2.75 ml	65.1
19	A19	637 μ l	A19	2.12 ml	33.6
20	A35	527 μ l	A35	5.13 ml	98.2

Les quantitats de cada amina afegides es van arrodonir a 0 o 5.

Escissió de la resina: després dels rentats, les bossetes es van assecar bé sota corrent d'aire fins que la resina no es va notar humida. A continuació, cada bosseta es va col·locar a l'interior d'un tub Falcon amb tap de rosca de 15 ml resistent a l'àcid. Seguidament s'hi van afegir 5 ml d'un còctel d'escissió format per TFA/DCM/ H_2O (60:40:2) (v/v/v), tornant-se la resina de color granatós. Els tubs es van mantenir en agitació a t.a. durant 30 min. A continuació es va recollir el cru de reacció de cada tub en un matràs de 10 ml. Així mateix, es va fer un rentat de cada tub amb cada bosseta fent servir 1 ml més de còctel. Una vegada aplegades les dues fraccions, el dissolvent es va eliminar a pressió reduïda. Per acabar d'eliminar les traces d'aigua i d'àcid, es van fer rentats amb ACN (2 x 4 ml), els quals es van eliminar igualment a pressió reduïda. Finalment, les 20 mescles es van liofilitzar per acabar obtenint en tots els casos un oli groguenc/marronós com a residu.

Cadascuna de les mescles es va dividir en mostres alíquotes a una concentració de 5 mg/ml, el que suposava una concentració mitjana de 5 mM (aproximadament 40 μ M per pentàmer en cada mescla).

Es van analitzar totes les mescles per FIA (vegeu la Figura 12.13 de l'apartat 12.4.2), per observar les dues distribucions gaussianes corresponents al $(M+H)^+$ entre 726 i 1092 i el $(M+2H)^{2+}/2$ entre 363 i 546.

CONCLUSIONS

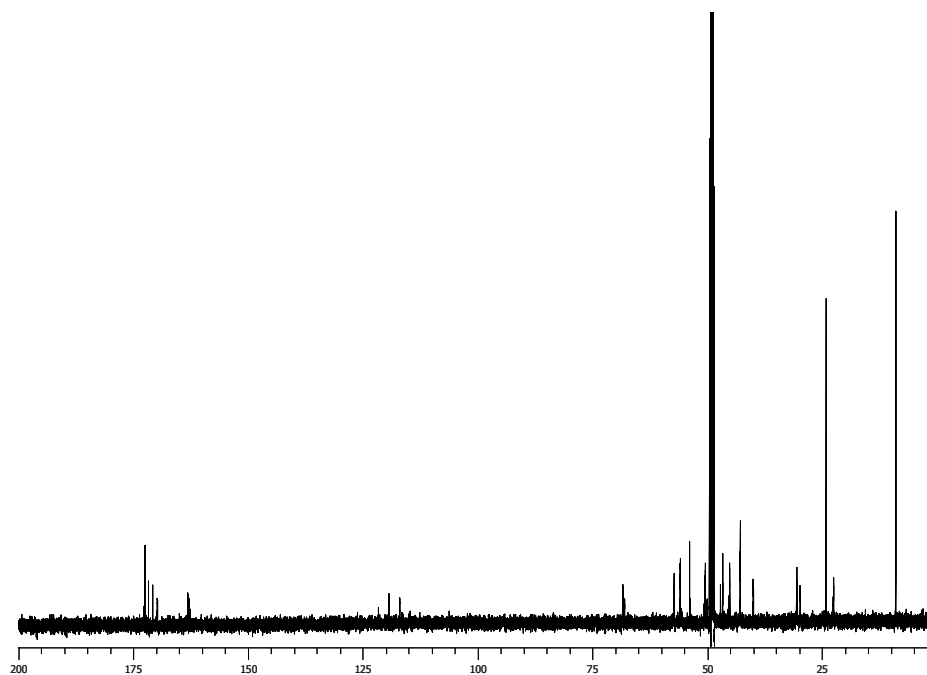
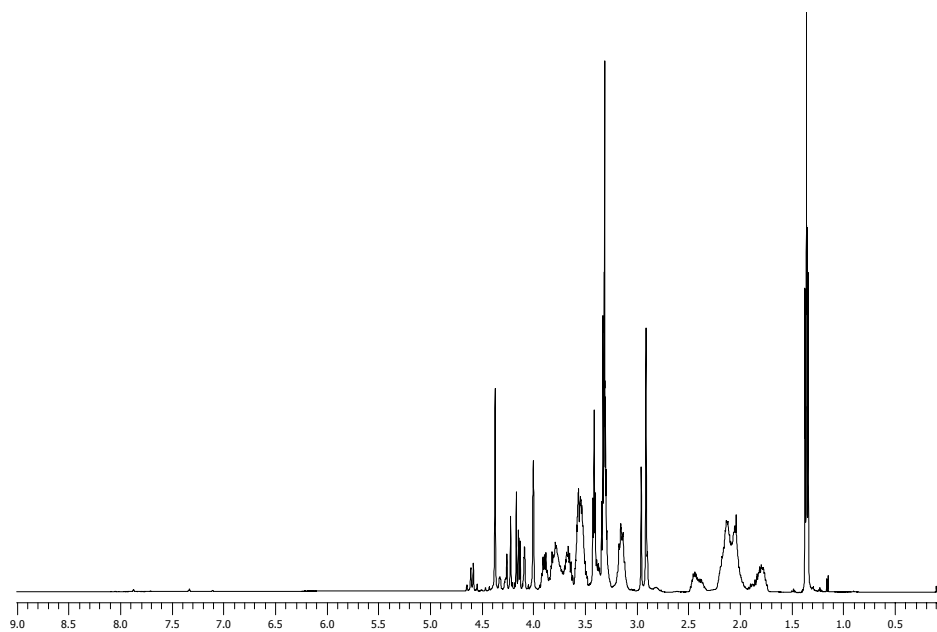
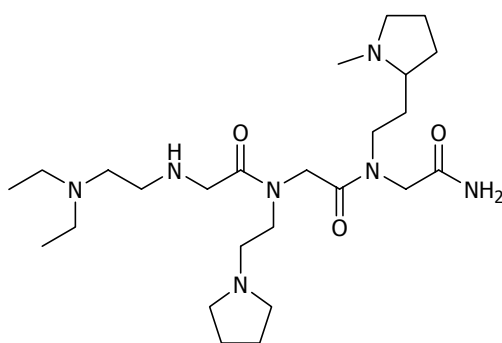
1. S'han establert tres estratègies de síntesi de monòmers d'*N*-alquilglicines aplicables de forma general a qualsevol amina primària que no presenti altres grups funcionals reactius addicionals en les condicions descrites. A més, la introducció de diferents grups protectors en cadascuna de les estratègies, ortogonals entre si, permet ampliar el ventall d'aplicació d'aquests monòmers més enllà de la síntesi de peptoides, degut a la seva estabilitat en diferents condicions de reacció.
2. S'ha demostrat que el mètode de l'acoblament d'unitats de glicines *N*-substituídes és adient per sintetitzar, amb rendiments i pureses satisfactòries, peptoides que continguin substituents amb grups amino terciaris. Aquest mètode està particularment indicat per als casos on les fonts de diversitat que continguin aquests substituents amino es trobin en la posició central o C-terminal del peptoide.
3. L'aplicació d'aquestes estratègies ha permès la síntesi, purificació i caracterització del peptoide N22-6-16C (SICHI), el qual havia estat identificat del cribratge de la quimioteca de peptoides-I com a un potencial inhibidor de la semaforina 3A. El conjunt d'assaigs realitzats amb aquest peptoide ha permès determinar que SICHI inhibeix la resposta quimiorepulsiva induïda per Sema 3A d'una manera depenent de la dosi degut a la reversió del col·lapse del con de creixement. A més, s'ha pogut establir que SICHI potencia la regeneració d'axons entorrino-hipocampals axotomitzats i augmenta la supervivència d'alguns grups neuronals actuant a nivell extracel·lular, tot impedit la unió de Sema 3A amb el seu complex receptor.
4. Els estudis realitzats per a la determinació estructural del subproducte de PM-14, identificat en el transcurs de la síntesi del peptoide N22-6-16C (SICHI) i que inicialment es relacionava amb l'activitat d'inhibició de la Sema 3A, no han permès resoldre la seva estructura, ni explicar la seva formació. No obstant, sí que han permès determinar que la seva formació està condicionada a la utilització de l'estratègia del submonòmer i que és necessària la presència de l'amina **A22** o l'amina **A19** en el trímer, preferentment a l'extrem *N*-terminal, així com l'ocupació de la resta de posicions del trímer per part d'amines amb un nitrogen terciari en la cadena lateral, el qual a més ha d'estar formant part d'un cicle.
5. S'ha desenvolupat la metodologia de síntesi de peptoides en fase sòlida assistida per microones utilitzant en primer lloc un aparell domèstic i posteriorment un aparell comercial de la casa CEM. Aprofitant aquesta metodologia s'han sintetitzat els peptoides N35-4-8C, N35-4-17C i N6-4-17C a l'escala del gram i s'ha establert un protocol de síntesi de peptoides en fase sòlida utilitzant la tècnica de les bossetes de te de Houghten.
6. S'ha sintetitzat una quimioteca de mesclures de 625 peptoides (pentàmers d'*N*-alquilglicines) en fase sòlida assistida per microones i en format de rastreig posicional.
7. S'ha realitzat un estudi de reactivitat de les amines introduïdes en les fonts de diversitat de la quimioteca, havent determinat les seves reactivitats relatives i els seus factors d'equiactivitat.

S'ha comprovat la correcció i amortiment de la diferència existent en la reactivitat amb l'ajust de les quantitats d'amina afegida en l'etapa d'introducció de diversitat, en funció dels seus factors d'equireactivitat.

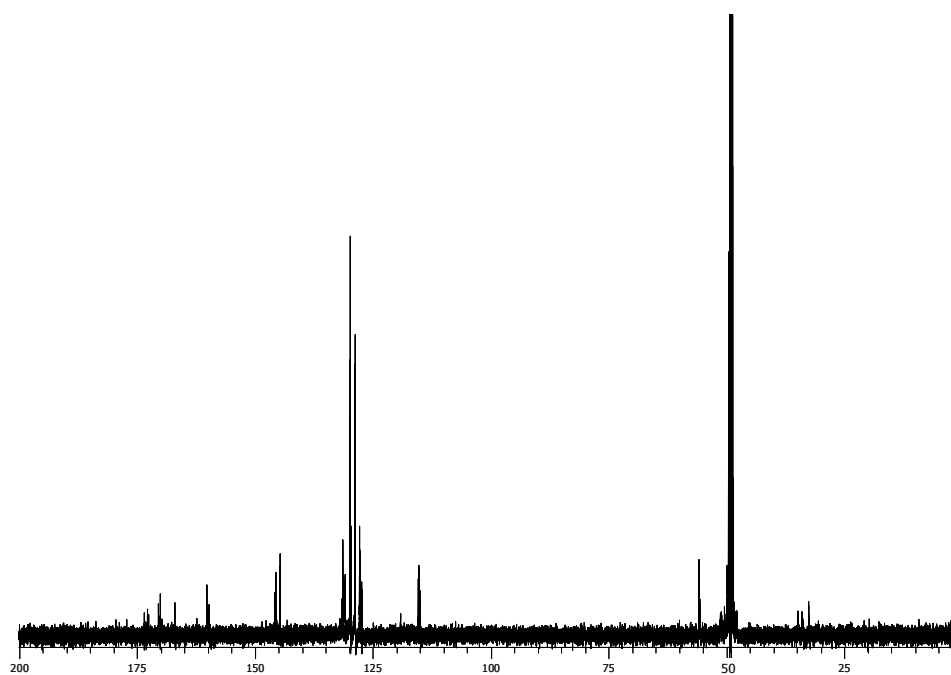
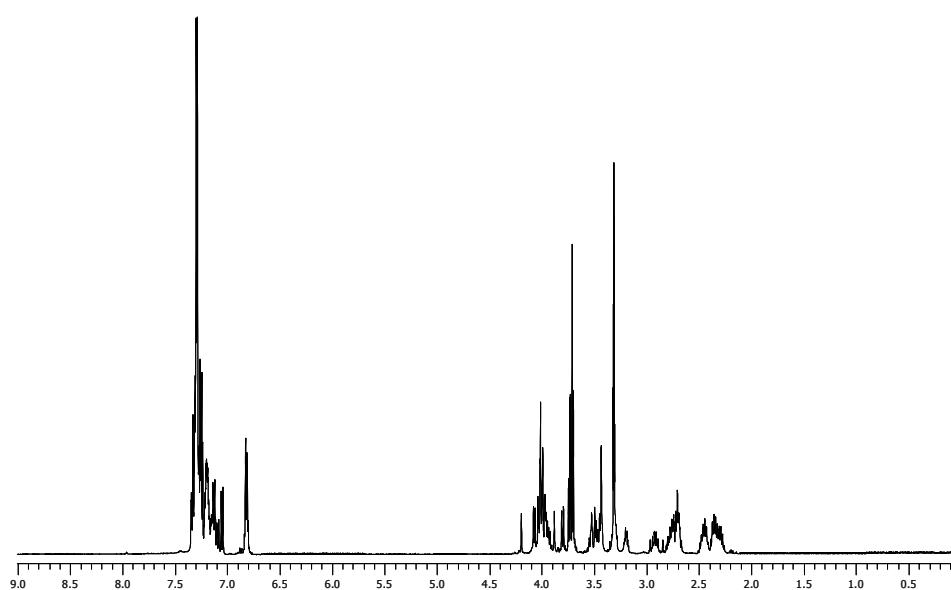
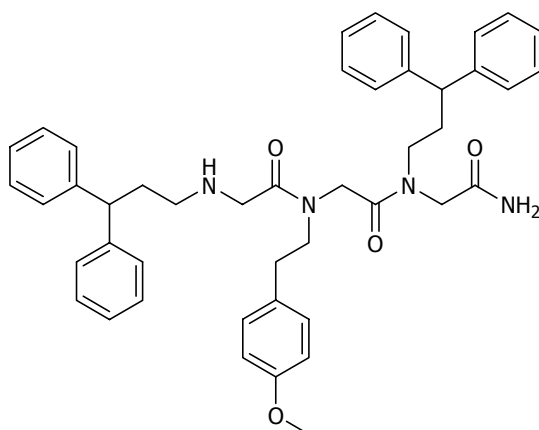
8. En col·laboració amb altres grups d'investigació, s'ha realitzat el cribratge, deconvolució i validació de la quimioteca davant de tres dianes terapèutiques. Aquest estudi ha permès identificar diversos candidats a caps de sèrie. Cal destacar un inhibidor selectiu del CPT I de múscul (P6) amb potencial activitat per al tractament d'hiperglucèmies (diabetes) i els infarts cardíacs.

Globalment, aquest treball introdueix una nova metodologia de síntesi de peptoides especialment indicada per al cas d'introducció d'amines amb un nitrogen terciari en la seva cadena lateral i reflecteix la utilització i aplicació de la química combinatòria, en concret de quimiotèques de mescles controlades, per a la recerca de nous compostos actius d'interès terapèutic. A més, introdueix l'aplicació de les microones en el camp de la química combinatòria per accelerar el procés de síntesi de compostos, posant de manifest el potencial d'una tecnologia que ha experimentat un gran impuls en els darrers anys.

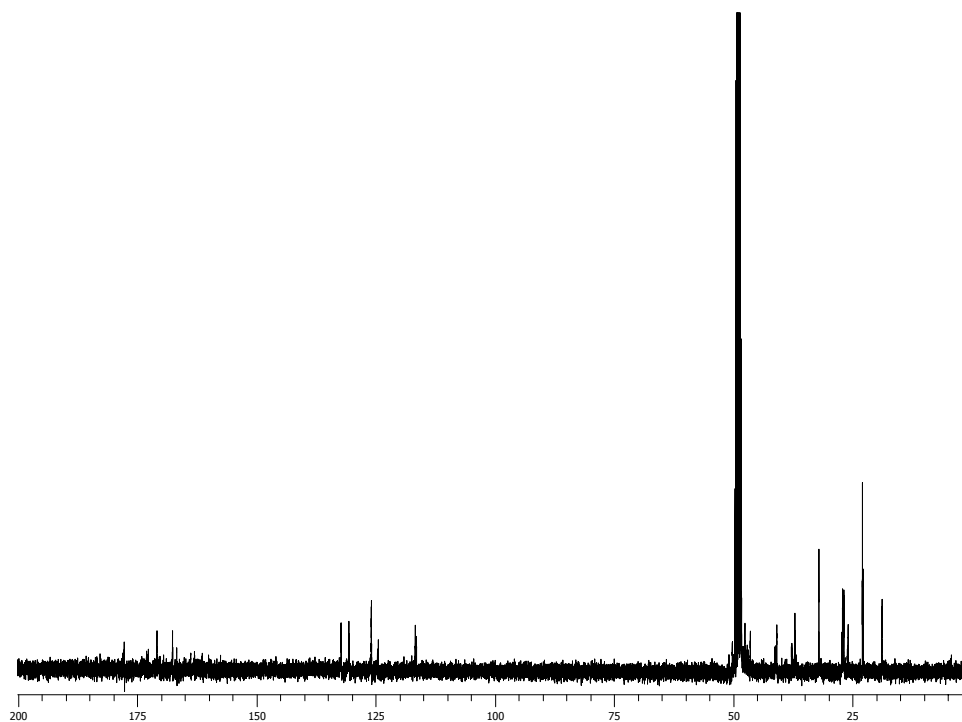
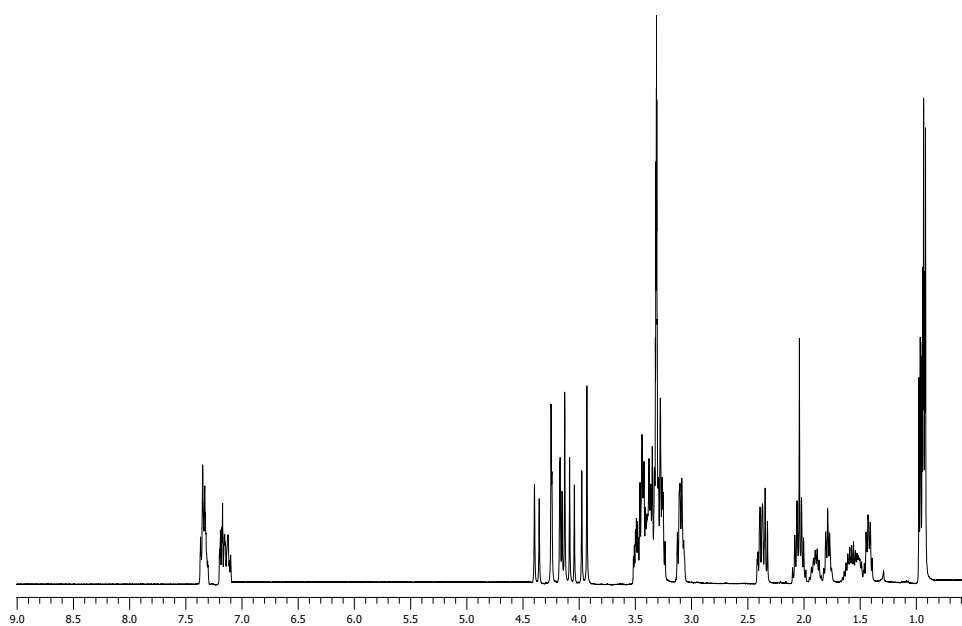
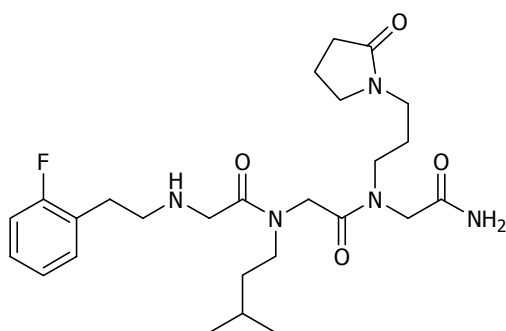
ANNEX

Compost 1

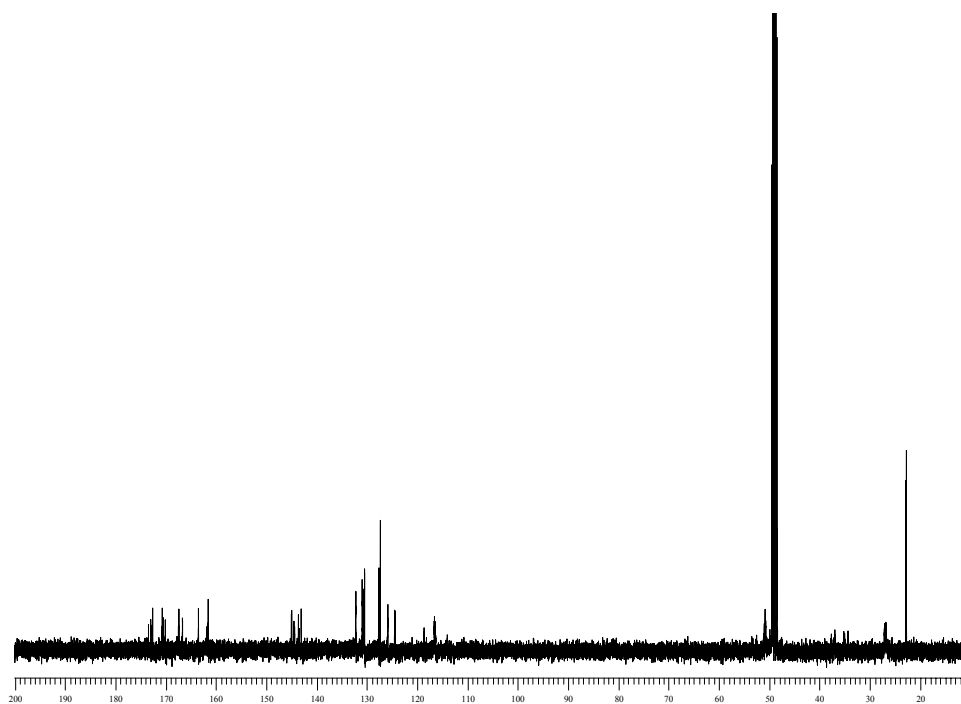
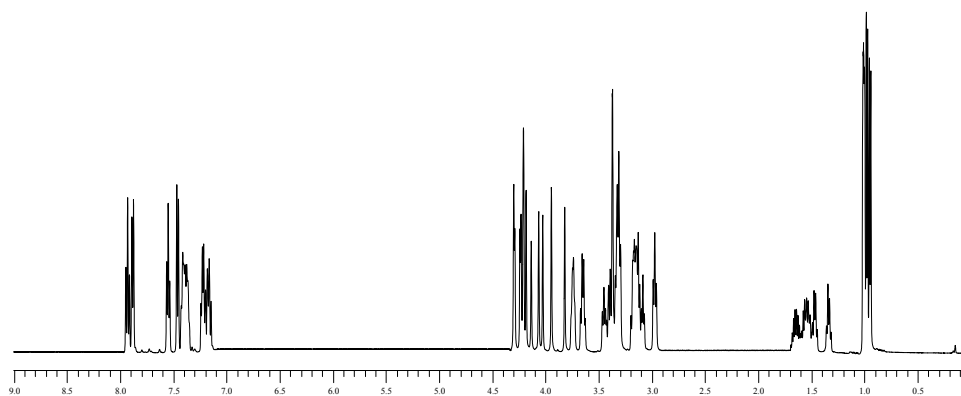
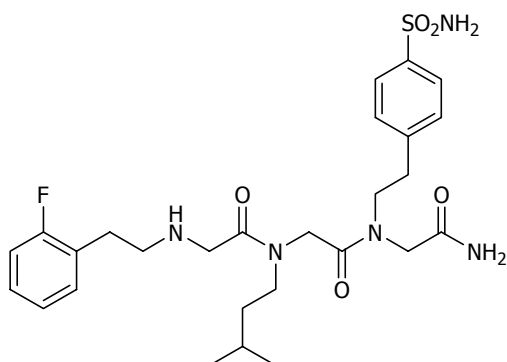
Compost 91



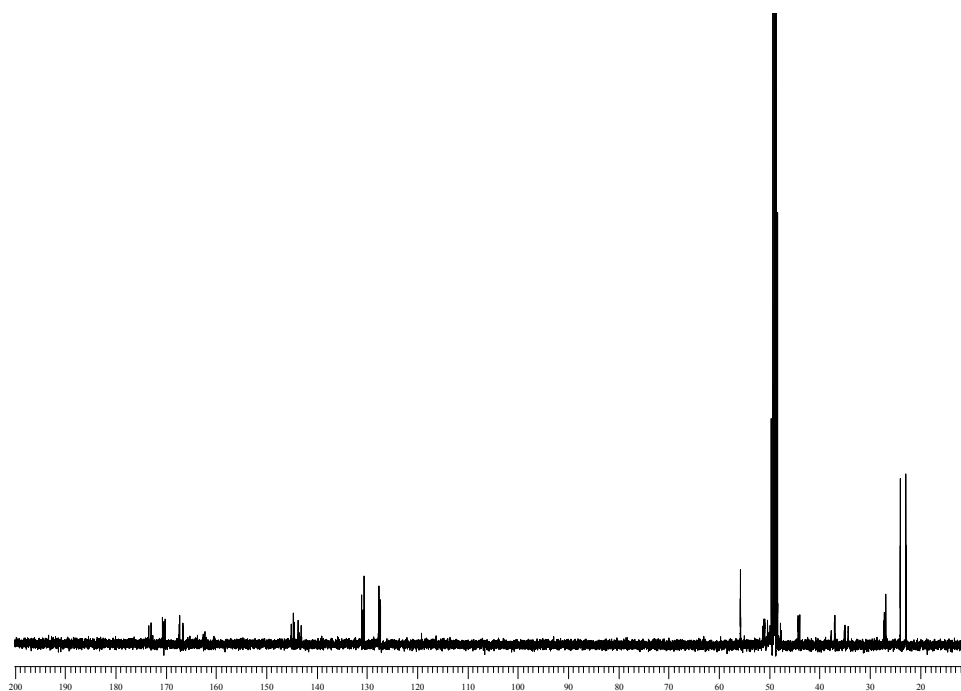
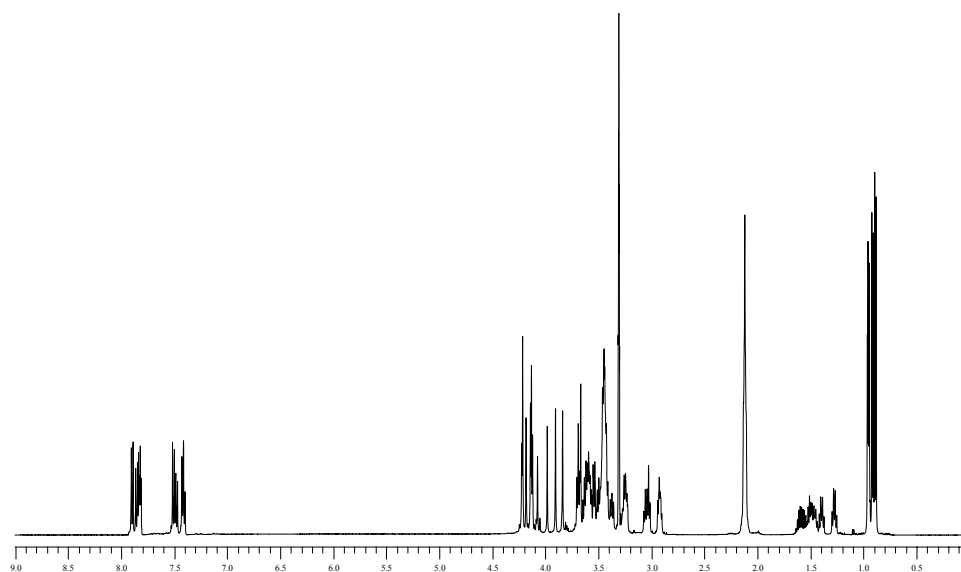
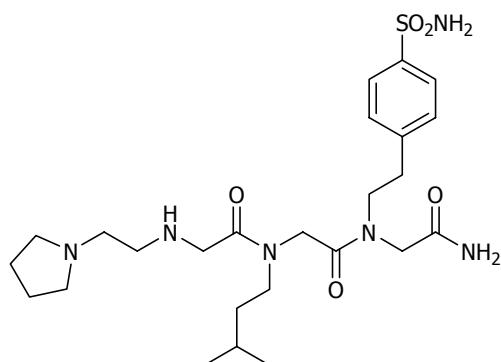
Compost 94

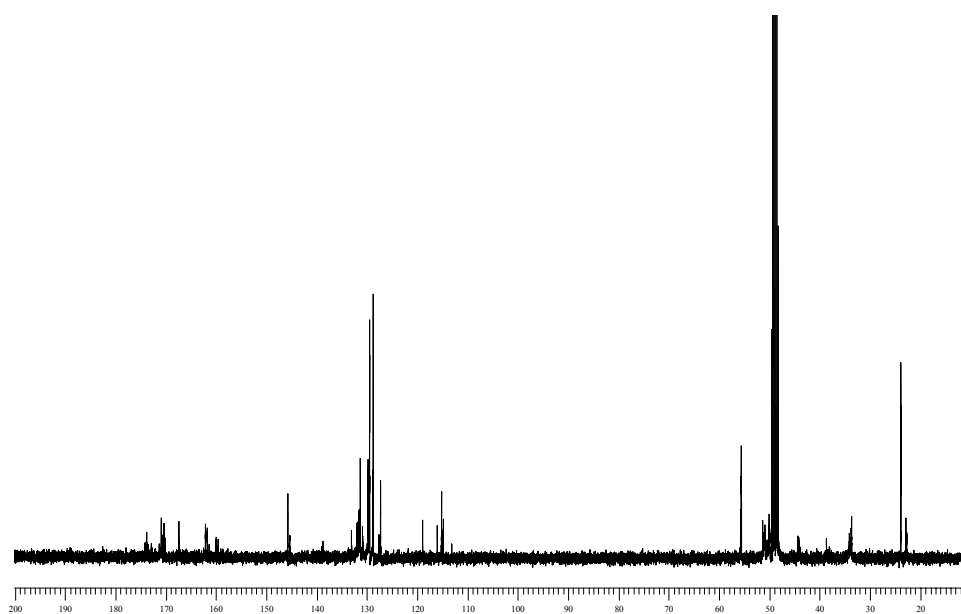
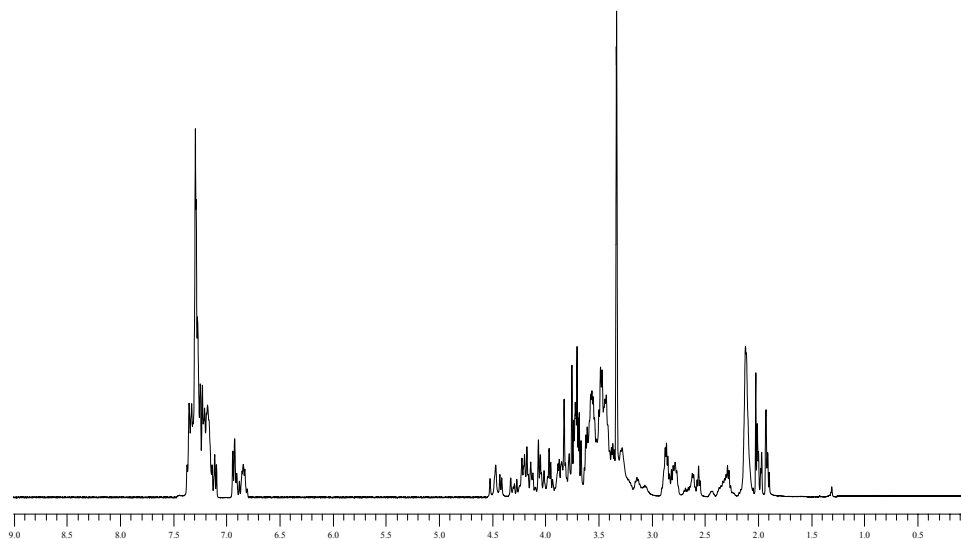
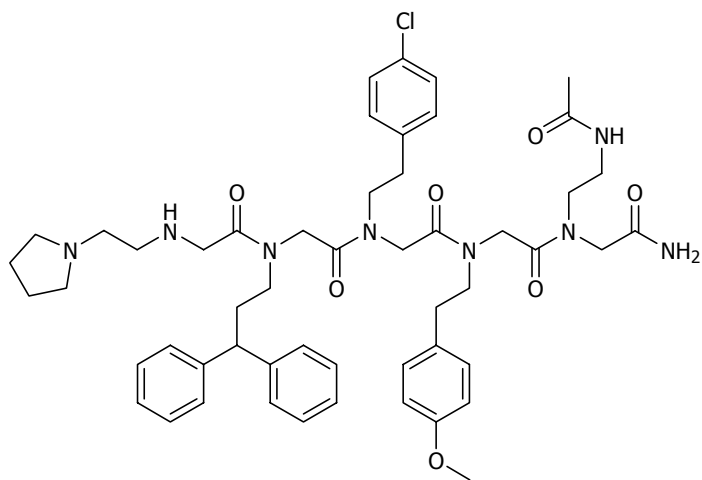


Compost 95



Compost 96





BIBLIOGRAFIA

1. Xiang, X.-D.; Sun, X.; Briceño, G.; Lou, Y.; Wang, K.-S.; Chang, H.; Wallace-Freedman, W. G.; Chen, S.-W.; Schultz, P. G. A combinatorial approach to materials discovery. *Science* **1995**, *268*, 1738-1740.
2. Briceño, G.; Chang, H.; Sun, X.; Schultz, P. G.; Xiang, X.-D. A class of cobalt oxide magnetoresistance materials discovered with combinatorial synthesis. *Science* **1995**, *270*, 273-275.
3. McFarland, E. W.; Weinberg, W. H. Combinatorial approaches to materials discovery. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 107-115.
4. Koinuma, H.; Takeuchi, I. Combinatorial solid-state chemistry of inorganic materials. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 429-438.
5. Boyce, R.; Li, G.; Nestler, H. P.; Suenaga, T.; Still, W. C. Peptidosteroidal receptors for opioid peptides. Sequence-selective binding using a synthetic receptor library. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7955-7956.
6. Rothman, J. H.; Still, W. C. Peptide-binding antibiotics: a solid-phase assay for screening libraries of vancomycin mimics for selective d-Ala-d-Ala binding. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 3159-3164.
7. Ying, L.; Liu, R.; Zhang, J.; Lam, K.; Lebrilla, C. B.; Gervay-Hague, J. A topologically segregated one-bead-one-compound combinatorial glycopeptide library for identification of lectin ligands. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 372-384.
8. Brocchini, S. T.; Kohn, J. Combinatorial approach for polymer design. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4553-4554.
9. Amis, E. J. Combinatorial materials science: reaching beyond discovery. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 83-85.
10. Teixidó, J.; Michelotti, E. L.; Tice, C. M. Ruminations regarding the design of small mixtures for biological testing. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 658-674.
11. Shimizu, K. D.; Snapper, M. L.; Hoveyda, A. H. High-throughput strategies for the discovery of catalysts. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1885-1889.
12. Maier, W. F. Combinatorial chemistry-challenge and chance for the development of new catalysts and materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1216-1218.
13. Bein, T. Efficient assays for combinatorial methods for the discovery of catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 323-325.
14. Ramnarayanan, R.; Chan, B. C.; Salvitti, M. A.; Mallouk, T. E.; Falihi, F. M.; Davis, J.; Galloway, D. B.; Bare, S. R.; Willis, R. R. Directed-sorting method for synthesis of bead-based combinatorial libraries of heterogeneous catalysts. *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 199-212.
15. Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
16. Geysen, H. M.; Meloan, R. H.; Barteliling, S. J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3998-4002.

17. Houghten, R. A. General methods for the rapid solid-phase synthesis of large number of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 5131-5135.
18. Furka, Á.; Sebestyén, F.; Asgedom, M.; Dibó, G. Cornucopia of peptides by synthesis. *Abstr. 14th Int. Congr. Biochem. Prague, Czechoslovakia* **1988**, *5*, 47.
19. Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E.; Appel, J. R.; Dooley, C. T.; Cuervo, J. H. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature* **1991**, *354*, 84-86.
20. Bunin, B. A.; Ellman, J. A. A general and expedient method for the solid-phase synthesis of 1,4-benzodiazepine derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10997-10998.
21. Thompson, L. A.; Ellman, J. A. Synthesis and applications of small molecule libraries. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555-600.
22. Balkenhohl, F.; von dem Bussche-Hünnefeld, C.; Lansky, A.; Zechel, C. Combinatorial synthesis of small organic molecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2288-2337.
23. Zuckermann, R. N.; Martin, E. J.; Spellmeyer, D. C.; Stauber, G. B.; Shoemaker, K. R.; Kerr, J. M.; Figliozzi, G. M.; Goff, D. A.; Siani, M. A.; Simon, R. J.; Banville, S. C.; Brown, E. G.; Wang, L.; Richter, L. S.; Moos, W. H. Discovery of nanomolar ligands for 7-transmembrane G-protein-coupled receptors from a diverse *N*-(substituted)glycine peptoid library. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2678-2685.
24. Bailey, N.; Dean, A. W.; Judd, D. B.; Middlemiss, D.; Storer, R.; Watson, S. P. A convenient procedure for the solution phase preparation of 2-aminothiazole combinatorial libraries. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1409-1414.
25. Han, H.; Janda, K. D. Azatides: solution and liquid phase syntheses of a new peptidomimetic. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2539-2544.
26. Martin, S. W.; Romine, J. L.; Chen, L.; Mattson, G.; Antal-Zimanyi, I. A.; Poindexter, G. S. Application of solution-phase parallel synthesis to preparation of trisubstituted 1,2,4-triazoles. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 35-37.
27. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
28. Weber, L.; Wallbaum, S.; Broger, C.; Gubernator, K. Optimization of the biological activity of combinatorial compounds libraries by genetic algorithm. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2280-2282.
29. Augen, J. The evolving role of information technology in the drug discovery process. *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 315-323.
30. Bajorath, J. Rational drug discovery revisited: interfacing experimental programs with bio- and chemo-informatics. *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 989-995.
31. Hansch, C.; Kurup, A.; Garg, R.; Gao, H. Chem-Bioinformatics and QSAR: a review of QSAR lacking positive hydrophobic terms. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 619-672.

32. Abbott, A. With your genes? Take one of these, three times a day. *Nature* **2003**, *425*, 760-762.
33. Evans, W. E.; McLeod, H. L. Pharmacogenomics-Drug disposition, drug targets, and side effects. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 538-549.
34. Phillips, K. A.; Veenstra, D. L.; Oren, E.; Lee, J. K.; Sadee, W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* **2001**, *286*, 2270-2279.
35. Valerio, R. M.; Bray, A. M.; Campbell, R. A.; DiPasquale, A.; Margellis, C.; Rodda, S. J. Multipin peptide synthesis at the micromole scale using 2-hidroxyethyl methacrylate grafted polyethylene supports. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1993**, *42*, 1-9.
36. Fodor, S. P. A.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T.; Solas, D. Light-directed spatially adressable parallel chemical synthesis. *Science* **1991**, *251*, 767-773.
37. Frank, R.; Döring, R. Simultaneous multiple peptide synthesis under continuous flow conditions on cellulose paper discs as segmental solid supports. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6031-6040.
38. Heine, N.; Ast, T.; Schneider-Mergener, J.; Reineke, U.; Germeroth, L.; Wenschuh, H. Synthesis and screening of peptoid arrays on cellulose membranes. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9919-9930.
39. Smith, P. W.; Lai, J. Y. Q.; Whittington, A. R.; Cox, B.; Houston, J. G. Synthesis and biological evaluation of a library containing potentially 1600 amides/esters. A strategy for rapid compound generation and screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2821-2824.
40. Pirrung, M. C.; Chen, J. Preparation and screening against acetylcholinesterase of a non-peptide "indexed" combinatorial library. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1240-1245.
41. Coe, D. M.; Storer, R. Solution-phase combinatorial chemistry. *Mol. Diversity* **1999**, *4*, 31-38.
42. Kaldor, S. W.; Siegel, M. G.; Fritz, J. E.; Dressman, B. A.; Hahn, P. J. Use of solid supported nucleophiles and electrophiles for the purification of non-peptide small molecule libraries. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7193-7196.
43. Kaldor, S. W.; Fritz, J. E.; Tang, J.; McKinney, E. R. Discovery of antirhinoviral leads by screening a combinatorial library of ureas prepared using covalent scavengers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 3041-3044.
44. Han, H.; Wolfe, M. M.; Brenner, S.; Janda, K. D. Liquid-phase combinatorial synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 6419-6423.
45. Furka, Á.; Sebestyén, F.; Asgedom, M.; Dibó, G. General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 487-493.
46. Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature* **1991**, *354*, 82-84.
47. Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchnák, V. The "one bead-one compound" combinatorial library method. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411-448.

48. Liu, R.; Lam, K. S. Automatic Edman microsequencing of peptides containing multiple unnatural amino acids. *Anal. Biochem.* **2001**, *295*, 9-16.
49. Burlingame, A. L. Mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 599R-651R.
50. Youngquist, R. S.; Fuentes, G. R.; Lacey, M. P.; Keough, T. Generation and screening of combinatorial peptide libraries designed for rapid sequencing by mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3900-3906.
51. Geysen, H. M.; Wagner, C. D.; Bodnar, W. M.; Markworth, C. J.; Parke, G. J.; Schoenen, F. J.; Wagner, D. S.; Kinder, D. S. Isotope or mass encoding of combinatorial libraries. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 679-688.
52. Nicolaou, K. C.; Xiao, X.-Y.; Parandoosh, Z.; Senyei, A.; Nova, M. P. Radiofrequency encoded combinatorial chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2289-2291.
53. Borchardt, A.; Still, W. C. Synthetic receptor binding elucidated with an encoded combinatorial library. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 373-374.
54. Dooley, C. T.; Chung, N. N.; Wilkes, B. C.; Schiller, P. W.; Bidlack, J. M.; Pasternak, G. W.; Houghten, R. A. An all D-amino acid opioid peptide with central analgesic activity from a combinatorial library. *Science* **1994**, *266*, 2019-2022.
55. Dooley, C. T.; Houghten, R. A. The use of positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries for the rapid determination of opioid receptor ligands. *Life Sci.* **1993**, *52*, 1509-1517.
56. Ostresh, J. M.; Winkle, J. H.; Hamashin, V. T.; Houghten, R. A. Peptide libraries: determination of relative reaction rates of protected amino acids in competitive couplings. *Biopolymers* **1994**, *34*, 1681-1689.
57. Pinilla, C.; Appel, J. R.; Blondelle, S. E.; Dooley, C. T.; Eichler, J.; Ostresh, J. M.; Houghten, R. A. Versatility of positional scanning synthetic combinatorial libraries for the identification of individual compounds. *Drug Dev. Res.* **1994**, *33*, 133-145.
58. Walters, W. P.; Stahl, M. T.; Murcko, M. A. Virtual screening-an overview. *Drug Discov. Today* **1998**, *3*, 160-178.
59. Schneider, G.; Clément-Chomienne, O.; Hilfiger, L.; Schneider, P.; Kirsch, S.; Böhm, H.-J.; Neidhart, W. Virtual screening for bioactive molecules by evolutionary *de novo* design. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4130-4133.
60. Ganesan, A. Strategies for the dynamic integration of combinatorial synthesis and screening. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2828-2831.
61. Lehn, J.-M. Dynamic combinatorial chemistry and virtual combinatorial libraries. *J. Eur. Chem.* **1999**, *5*, 2455-2463.
62. Cousins, G. R. L.; Poulsen, S.-A.; Sanders, J. K. M. Dynamic combinatorial libraries of pseudo-peptide hydrazone macrocycles. *Chem. Commun.* **1999**, 1575-1576.
63. Ostresh, J. M.; Husar, G. M.; Blondelle, S. E.; Dörner, B.; Weber, P. A.; Houghten, R. A. "Libraries from libraries": chemical transformation of combinatorial libraries to extend the range and repertoire of chemical diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11138-11142.

64. Nefzi, A.; Ostresh, J. M.; Yu, J.; Houghten, R. A. Combinatorial chemistry: libraries from libraries, the art of the diversity-oriented transformation of resin-bound peptides and chiral polyamides to low molecular weight acyclic and heterocyclic compounds. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3603-3609.
65. Schreiber, S. L. Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1127-1152.
66. Tan, D. S.; Foley, M. A.; Stockwell, B. R.; Shair, M. D.; Schreiber, S. L. Synthesis and preliminary evaluation of a library of polycyclic small molecules for use in chemical genetic assays. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9073-9087.
67. Mayer, T. U.; Kapoor, T. M.; Haggarty, S. J.; King, R. W.; Schreiber, S. L.; Mitchison, T. J. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* **1999**, *286*, 971-974.
68. Holland, J. H. *Adaptation in natural and artificial systems.*, University of Michigan Press: Ann Arbor, Michigan, **1975**.
69. Lazar, C.; Kluczyk, A.; Kiyota, T.; Konishi, Y. Drug evolution concepts in drug design: 1. Hybridization method. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6973-6982.
70. Venkatasubramanian, V.; Chan, K.; Caruthers, J. M. Evolutionary design of molecules with desired properties using the genetic algorithm. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1995**, *35*, 188-195.
71. Kappe, C. O. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6250-6284.
72. Lidström, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. Microwave assisted organic synthesis - a review. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9225-9283.
73. Lew, A.; Krutzik, P. O.; Hart, M. E.; Chamberlin, A. R. Increasing rates of reaction: microwave-assisted organic synthesis for combinatorial chemistry. *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 95-105.
74. Cotterill, I. C.; Usyatinsky, A. Y.; Arnold, J. M.; Clark, D. S.; Dordick, J. S.; Michels, P. C.; Khmelnitsky, Y. L. Microwave assisted combinatorial chemistry. Synthesis of substituted pyridines. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1117-1120.
75. Hoel, A. M. L.; Nielsen, J. Microwave-assisted solid-phase Ugi four-component condensations. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3941-3944.
76. Stadler, A.; Kappe, C. O. Automated library generation using sequential microwave-assisted chemistry. Application toward the Biginelli multicomponent condensation. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 624-630.
77. Murray, J. K.; Farooqi, B.; Sadowsky, J. D.; Scalf, M.; Freund, W. A.; Smith, L. M.; Chen, J.; Gellman, S. H. Efficient synthesis of a β -peptide combinatorial library with microwave irradiation. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13271-13280.
78. Studer, A.; Curran, D. P. A strategic alternative to solid phase synthesis: preparation of a small isoxazoline library by "fluorous synthesis". *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6681-6696.
79. Gentilucci, L.; Tolomelli, A.; Squassabia, F. Peptides and peptidomimetics in medicine, surgery and biotechnology. *Curr. Med. Chem* **2006**, *13*, 2449-2466.

80. *Chem files: Unnatural amino acids. Tools for drug discovery.*, Sigma-Aldrich publications, **2004**, Vol. 4 No. 6, 3-4.
81. Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Bartlett, P. A. Peptoids: a modular approach to drug discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9367-9371.
82. Miller, S. M.; Simon, R. J.; Ng, S.; Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Moos, W. H. Proteolytic studies of homologous peptide and *N*-substituted glycine peptoid oligomers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2657-2662.
83. Patch, J. A.; Kirshenbaum, K.; Seurnyck, S. L.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. . *Pseudo-peptides in drug discovery. Versatile oligo(N-substituted)glycines: the many roles of peptoids in drug discovery.* Nielsen, P. E., Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2004**, Chapter 1, 1-31.
84. Houghten, R. A.; Dooley, C. T. The use of synthetic peptide combinatorial libraries for the determination of peptide ligands in radio-receptor assays: opioid peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 405-412.
85. Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W. H. Efficient method for the preparation of peptoids [oligo(*N*-substituted glycines)] by submonomer solid-phase synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10646-10647.
86. Figliozzi, G. M.; Goldsmith, R.; Ng, S. C.; Banville, S. C.; Zuckermann, R. N. Synthesis of *N*-substituted glycine peptoid libraries. *Method Enzymol.* **1996**, *267*, 437-447.
87. Kruijtz, J. A. W.; Liskamp, R. M. J. Synthesis in solution of peptoids using Fmoc-protected *N*-substituted glycines. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6969-6972.
88. Humet, M. *Disseny, síntesi i validació d'una quimioteca de peptoides en el format de rastreig posicional.* Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona. **2002**.
89. García-Martínez, C.; Humet, M.; Planells-Cases, R.; Gomis, A.; Caprini, M.; Viana, F.; De la Peña, E.; Sánchez-Baeza, F.; Carbonell, T.; De Felipe, C.; Pérez-Payá, E.; Belmonte, C.; Messeguer, A.; Ferrer-Montiel, A. Attenuation of thermal nociception and inflammatory hyperalgesia by novel VR1 blockers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 2374-2379.
90. Humet, M.; Carbonell, T.; Masip, I.; Sánchez-Baeza, F.; Mora, P.; Cantón, E.; Gobernado, M.; Abad, C.; Pérez-Payá, E.; Messeguer, A. A positional scanning combinatorial library of peptoids as a source of biological active molecules: identification of antimicrobials. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 597-605.
91. Planells-Casas, R.; Montoliu, C.; Humet, M.; Fernández, A. M.; García-Martínez, C.; Valera, E.; Merino, J. M.; Pérez-Payá, E.; Messeguer, A.; Felipo, V.; Ferrer-Montiel, A. A novel *N*-methyl-D-aspartate receptor open channel blocker with in vivo neuroprotectant activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *302*, 163-173.
92. Montoliu, C.; Humet, M.; Canales, J.-J.; Burda, J.; Planells-Cases, R.; Sánchez-Baeza, F.; Carbonell, T.; Pérez-Payá, E.; Messeguer, A.; Ferrer-Montiel, A.; Felipo, V. Prevention of in vivo excitotoxicity by a family of trialkylglycines, a novel class of neuroprotectants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 29-36.

93. Masip, I. *Utilització d'estratègies de química combinatòria per a la identificació de molècules amb potencial interès en biomedicina*. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona. **2002**.
94. Masip, I.; Ferrándiz-Huertas, C.; García-Martínez, C.; Ferragut, J. A.; Ferrer-Montiel, A.; Messeguer, A. Synthesis of a library of 3-oxopiperazinium and perhydro-3-oxo-1,4-diazepinium derivatives and identification of bioactive compounds. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 135-141.
95. Luo, Y.; Ouyang, X.; Armstrong, R. W.; Murphy, M. M. A case study of employing spectroscopic tools for monitoring reactions in the developmental stage of a combinatorial chemistry library. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8719-8722.
96. Ruhland, T.; Andersen, K.; Pedersen, H. Selenium-linking strategy for traceless solid-phase synthesis: direct loading, aliphatic C-H bond formation upon cleavage and reaction monitoring by gradient MAS NMR spectroscopy. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9204-9211.
97. Warrass, R.; Lippens, G. Quantitative monitoring of solid phase organic reactions by high-resolution Magic Angle Spinning NMR spectroscopy. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2946-2950.
98. Cironi, P.; Álvarez, M.; Albericio, F. A combination of different spectroscopic techniques to monitor the "in situ" solid-phase synthesis of organic molecules. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 61-68.
99. Yan, B.; Kumaravel, G.; Anjaria, H.; Wu, A.; Petter, R. C.; Jewell, C. F.; Wareing, J. R. Infrared spectrum of a single resin bead for real-time monitoring of solid-phase reactions. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5736-5738.
100. Scott, B. O.; Siegmund, A. C.; Marlowe, C. K.; Pei, Y.; Spear, K. L. Solid phase organic synthesis (SPOS): a novel route to diketopiperazines and diketomorpholines. *Mol. Diversity* **1995**, *1*, 125-134.
101. Fernández-Fórner, D.; Casals, G.; Navarro, E.; Ryder, H.; Albericio, F. Solid-phase synthesis of 4-aminopiperidine analogues using the Alloc protecting group: an investigation of Alloc removal from secondary amines. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4471-4474.
102. Del Fresno, M. *Aproximacions Combinatorials per a la síntesi de quimioteques amb esquelet aminoacídic. Introducció de derivats del grup guanidini com a motiu de diversitat*. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona. **2001**. 229.
103. Kan, T.; Fukuyama, T. New strategies: a highly versatile synthetic method for amines. *Chem. Commun.* **2004**, 353-359.
104. Pasterkamp, R. J.; Verhaagen, J. Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res. Rev.* **2001**, *35*, 36-54.
105. Semaphorin Nomenclature Committee. Unified nomenclature for the Semaphorins/Collapsins. *Cell*, **1999**, *97*, 551-552.
106. Kolodkin, A. L. Semaphorins: mediators of repulsive growth cone guidance. *Trends Cell Biol.* **1996**, *6*, 15-22.
107. Pozas, E.; Pascual, M.; Nguyen Ba-Charvet, K. T.; Guijarro, P.; Sotelo, C.; Chédotal, A.; Del Río, J. A.; Soriano, E. Age-dependent effects of secreted semaphorins 3A, 3F and

- 3E on developing hippocampal axons: in vitro effects and phenotype of semaphorin 3A (2/2) mice. *Mol. Cell. Neurosci.* **2001**, *18*, 26-43.
108. Chédotal, a.; Del Río, J. A.; Ruiz, M.; He, Z.; Borrell, V.; De Castro, F.; Ezan, F.; Goodman, C. S.; Tessier-Lavigne, M.; Sotelo, C.; Soriano, E. Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development* **1998**, *125*, 4313-4323.
109. Montolio, M. *Desarrollo y aplicación de moléculas con actividad bloqueante de semaforinas*. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona. **2005**.
110. Atwal, J. K.; Singh, K. K; Tessier-Lavigne, M.; Miller, F. D.; Kaplan, D. R. . Semaphorin 3F antagonizes neurotrophin-induced phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase kinase signaling: a mechanism for growth cone collapse. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 7602-7609.
111. Rohm, B.; Ottemeyer, A.; Lohrum, M.; Püschel, A. W. Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech. Dev.* **2000**, *93*, 95-104.
112. Kaytor, M. D.; Orr, H. T. The GSK3 β signaling cascade and neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2002**, *12*, 275-278.
113. Cross, D. A. E.; Culbert, A. A.; Chalmers, K. A.; Facci, L.; Skaper, S. D.; Reith, A. D. Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 94-102.
114. Pittelkow, M.; Lewinsky, R.; Christensen, J. B. Selective synthesis of carbamate protected polyamines using alkyl phenyl carbonates. *Synthesis* **2002**, *15*, 2195-2202.
115. Cardillo, G.; Gentilucci, L.; Qasem, A. R.; Sgarzi, F.; Spampinato, S. Endomorphin-1 analogues containing β -proline are μ -opioid receptor agonists and display enhanced enzymatic hydrolysis resistance. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2571-2578.
116. Mitsunobu, O.; Wada, M.; Sano, T. Stereospecific and stereoselective reactions. I. Preparation of amines from alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 679-680.
117. Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. L. *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press: Oxford, **1980**.
118. Vojtkovsky, T. Detection of secondary amines on solid phase. *Pept. Res.* **1995**, *8*, 236-237.
119. Hancock, W. S.; Battersby, J. E. A new micro-test for the detection of incomplete coupling reactions in solid-phase peptide synthesis using 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid. *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 260-264.
120. Werber, M. M.; Shalitin, Y. The reaction of tertiary amino alcohols with active esters. *Bioorg. Chem.* **1973**, *2*, 202-220.
121. Almeida, M. L. S.; Grehn, L.; Ragnarsson, U. Selective protection of polyamines: synthesis of model compounds and spermidine derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1988**, 1905-1911.
122. Correa, A.; Denis, J. N.; Greene, A. E. A safe, simple, one-pot preparation of *N*-derivatized β -amino alcohols and oxazolidinones from amino acids. *Synth. Commun.* **1991**, *21*, 1-9.

123. Enders, D.; Eichenauer, H. Asymmetrische synthesen via metallierte chirale hydrazone. Enantioselektive alkylierung von cyclischen ketonen und aldehyden. *Chem. Ber.* **1979**, *112*, 2933-2960.
124. Keller, O.; Keller, W. E.; Van Look, G.; Wersin, G. *tert*-Butoxycarbonylation of amino acids and their derivatives: *N-tert*-butoxycarbonyl-L-phenylalanine. *Organic Syntheses*. Freeman, J. P. New York/Chichester/Brisbane/Toronto/Singapore, John Wiley & Sons, Inc. **1990** *Coll. Vol. VII*: 70-75.
125. Drew, M. G. B.; Gorsuch, S.; Mann, J.; Yoshida, S. Novel peptide isosteres that were designed to inhibit the binding of the HIV surface glycoprotein (gp120) to the T cell surface glycoprotein CD4. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1998**, 1627-1636.
126. Das, J.; Floyd, D. M.; Kimball, S. D.; Duff, K. J.; Lago, M. W.; Krapcho, J.; White, R. E.; Ridgewell, R. E.; Obermeier, M. T.; Moreland, S.; McMullen, D.; Normandin, D.; Hedberg, S. A.; Schaeffer, T. R. Benzazepinone calcium channel blockers. 5. Effects on antihypertensive activity associated with N1 and aromatic substituents. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2610-2617.
127. Leyendecker, F.; Jesser, F.; Laucher, D. Ligand effects in enantioface differentiation of 1,4 addition to 1,3 diphenyl-2-propen-1-one. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 3513-3516.
128. Neas, E. D.; Collins, M. J. *Introduction to microwave sample preparation theory and practice*. Kingston, H. M. and Jassie, L. B. Eds., American Chemical Society, **1988**, Ch. 2, 7-32.
129. Mingos, D. M. P.; Baghurst, D. R. *Microwave-enhanced chemistry fundamentals, sample preparation, and applications*. Kingston, H. M. and Haswell, S. J. Eds., American Chemical Society, **1997**, Ch. 1, 3-53.
130. Baghurst, D. R.; Mingos, D. M. P. Applications of microwave dielectric heating effects to synthetic problems in chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **1991**, *20*, 1-47.
131. Gabriel, C.; Gabriel, S.; Grant, E. H.; Halstead, B. S.; Mingos, D. M. P. Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 213-223.
132. Stass, D. V.; Woodward, J. R.; Timmel, C. R.; Hore, P. J.; McLauchlan, K. A. Radiofrequency magnetic field effects on chemical reaction yields. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *329*, 15-22.
133. Timmel, C. R.; Hore, P. J. Oscillating magnetic field effects on the yields of radical pair reactions. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *257*, 401-408.
134. Woodward, J. R.; Jackson, R. J.; Timmel, C. R.; Hore, P. J.; McLauchlan, K. A. Resonant radiofrequency magnetic field effects on a chemical reaction. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *272*, 376-382.
135. Hayes, B. L. *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*. CEM Publishing, Matthews NC, **2002**, Ch. 2, 35.
136. Schanche, J.-S. Microwave synthesis solutions from personal chemistry. *Mol. Diversity* **2003**, *7*, 291-298.
137. Biotage AB (formally Personal Chemistry AB), www.personalchemistry.com, www.biotage.com.

138. Baghurst, D. R.; Mingos, D. M. P. Superheating effects associated with microwave dielectric heating. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 674-677.
139. Saillard, R.; Poux, M.; Berlan, J.; Audhuy-Peaudecerf, M. Microwave heating of organic solvents: thermal effects and field modelling. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 4033-4042.
140. Chemat, F.; Esveld, E. Microwave super-heated boiling of organic liquids: origin, effect and application. *Chem. Eng. Technol.* **2001**, *24*, 735-744.
141. Bogdal, D.; Lukasiewicz, M.; Pielichowski, J.; Miciak, A.; Bednarz, Sz. Microwave-assisted oxidation of alcohols using MagtrieveTM. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 649-653.
142. Lukasiewicz, M.; Bogdal, D.; Pielichowski, J. Microwave-assisted oxidation of side chain arenes by MegatrieveTM. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 1269-1272.
143. Will, H.; Scholz, P.; Ondruschka, B. Heterogene gasphasenkatalyse im mikrowellenfeld. *Chem. Ing. Tech.* **2002**, *74*, 1057-1067.
144. Zhang, X.; Lee, C. S.-M.; Mingos, D. M. P.; Hayward, D. O. Effects of microwave dielectric heating on heterogeneous catalysis. *Catal. Lett.* **2003**, *88*, 33-38.
145. Hajek, M. *Microwave in Organic Synthesis*. (Ed.: A. Loupy), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, 345-378.
146. Stadler, A.; Kappe, C. O. High-speed couplings and cleavages in microwave-heated, solid-phase reactions at high temperatures. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *5*, 919-925.
147. Raner, K. D.; Strauss, C. R.; Trainor, R. W. A new microwave reactor for batchwise organic synthesis. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2456-2460.
148. Kaiser, N. F. K.; Bremberg, U.; Larhed, M.; Moberg, C.; Hallberg, A. Fast, convenient, and efficient molybdenum-catalyzed asymmetric allylic alkylation under noninert conditions: an example of microwave-promoted fast chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3595-3598.
149. Ley, S. V.; Leach, A. G.; Storer, R. I. A polymer-supported thiolating agent. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2001**, 358-361.
150. Garrigues, B.; Laurent, R.; Laporte, C.; Laporterie, A.; Dubac, J. Microwave-assisted carbonyl diels-alder and carbonyl-ene reactions supported on graphite. *Liebigs Ann. Chem.* **1996**, *5*, 743-744.
151. Zhang, X.; Hayward, D. O.; Mingos, D. M. P. Apparent equilibrium shifts and hot-spots formation for catalytic reactions induced by microwave dielectric heating. *Chem. Commun.* **1999**, 975-976.
152. Westaway, K. C.; Gedye, R. The question of specific activation of organic reactions by microwaves. *J. Microwave Power Electromagn. Energy* **1995**, *30*, 219-230.
153. Langa, F.; de la Cruz, P.; de la Hoz, A.; Díaz-Ortiz, A.; Díez-Barra, E. Microwave irradiation: more than just a method for accelerating reactions. *Contemp. Org. Synth.* **1997**, *4*, 373-386.
154. Perreux, L.; Loupy, A. A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9199-9223.

155. Binner, J. G. P.; Hassine, N. A.; Cross, T. E. The possible role of the pre-exponential factor in explaining the increased reaction rates observed during the microwave synthesis of titanium carbide. *J. Mater. Sci.* **1995**, *30*, 5389-5393.
156. Lewis, D. A.; Summers, J. D.; Ward, T. C.; McGrath, J. E. Accelerated imidization reactions using microwave radiation. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1992**, *30*, 1647-1653.
157. Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 279-282.
158. Giguere, R. J.; Bray, T. L.; Duncan, S. M.; Majetich, G. Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4945-4948.
159. *Microwave in Organic Synthesis*. Ed.: A. Loupy, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
160. *Microwave-Assisted Organic Synthesis*. Lidstöm, P. and Tierney, J. P. Eds., Blackwell Scientific, Oxford, **2004**.
161. Roberts, B. A.; Strauss, C. R. Toward rapid, "green", predictable microwave-assisted synthesis. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 653-661.
162. Loupy, A.; Bram, G.; Sansoulet, J. Anion activation in solvent-free heterogeneous solution-use of microwave-ovens. *New J. Chem.* **1992**, *16*, 233-242.
163. Loupy, A.; Petit, A.; Hamelin, J.; Texier-Boullet, F.; Jacquault, P.; Mathé, D. New solvent-free organic synthesis using focused microwaves. *Synthesis* **1998**, 1213.
164. Varma, R. S. Clay and clay-supported reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 1235-1255.
165. De la Hoz, A.; Díaz-Ortiz, A.; Moreno, A.; Langa, F. Cycloadditions under microwave irradiation conditions: methods and applications. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3659-3673.
166. Elander, N.; Jones, J. R.; Lu, S. Y.; Stone-Elander, S. Microwave-enhanced radiochemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 239-249.
167. Stone-Elander, S.; Elander, N. Microwave applications in radiolabelling with short-lived positron-emitting radionuclides. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2002**, *45*, 715-746.
168. Langa, F.; de la Cruz, P.; Espildora, E.; García, J. J.; Pérez, M. C.; de la Hoz, A. Fullerene chemistry under microwave irradiation. *Carbon* **2000**, *38*, 1641-1646.
169. Langa, F.; de la Cruz, P.; Espildora, E.; de la Hoz, A. *Fullerenes 2000. Vol 9: functionalized fullerenes*. Inc., The Electrochemical Society, New York, **2000**, *9*, 168-178.
170. Zong, L.; Zhou, S.; Sgriccia, N.; Hawley, M. C.; Kempel, L. C. A review of microwave-assisted polymer chemistry (MAPC). *J. Microwave Power Electromagn. Energy* **2003**, *38*, 49-74.
171. Xu, T.; Guo, Q-X. Syntheses of heterocyclic compounds under microwave irradiation. *Heterocycles* **2004**, *63*, 903-974.

172. Romanova, N. N.; Kudan, P. V.; Gravis, A. G.; Bundel, Y. G. Application of microwave activation in the chemistry of heterocyclic compounds. *Khim. Geterotsikl. Soedini.* **2000**, 1308-1320.
173. Das, S. K. Application of microwave irradiation in the synthesis of carbohydrates. *Synlett* **2004**, 915-932.
174. Corsaro, A.; Chiacchio, U.; Pistara, V.; Romeo, G. Microwave-assisted chemistry of carbohydrates. *Curr. Org. Chem.* **2004**, 8, 511-538.
175. Larhed, M.; Moberg, C.; Hallberg, A. Microwave-accelerated homogeneous catalysis in organic chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 717-727.
176. Krstenansky, J. L.; Cotterill, I. Recent advances in microwave-assisted organic syntheses. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2000**, 3, 454-461.
177. Larhed, M.; Hallberg, A. Microwave-assisted high-speed chemistry: a new technique in drug discovery. *Drug Discov. Today* **2001**, 6, 406-416.
178. Wathey, B.; Tierney, J.; Lidström, P.; Westman, J. The impact of microwave-assisted organic chemistry on drug discovery. *Drug Discov. Today* **2002**, 7, 373-380.
179. Kappe, C. O. High-speed combinatorial synthesis utilizing microwave irradiation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 314-320.
180. Lidström, P.; Westman, J.; Lewis, A. Enhancement of combinatorial chemistry by microwave-assisted organic synthesis. *Comb. Chem. High Throughput Screening.* **2002**, 5, 441-458.
181. Blackwell, H. E. Out of the oil bath and into the oven-microwave-assisted combinatorial chemistry heats up. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 1251-1255.
182. Varma, R. S. Solvent-free organic transformations using supported reagents and microwave irradiation. *Clean Products and Processes* **1999**, 1, 132-147.
183. Varma, R. S. *Advances in green chemistry: chemical syntheses using microwave irradiation*. Foundation, Astra Zeneca Research, Kavitha Printers, Bangalore, India, **2002**.
184. Bose, A. K.; Manhas, M. S.; Ganguly, S. N.; Sharma, A. H.; Banik, B. K. More chemistry for less pollution: applications for process development. *Synthesis* **2002**, 1578-1591.
185. Nüchter, M.; Ondruschka, B.; Bonrath, W.; Gum, A. Microwave assisted synthesis—a critical technology overview. *Green Chem.* **2004**, 6, 128-141.
186. Yu, H.-M.; Chen, S.-T.; Chiou, S.-H.; Wang, K.-T. Determination of amino acids on Merrifield resin by microwave hydrolysis. *J. Chromatogr.* **1988**, 456, 357-362.
187. Yu, H.-M.; Chen, S.-T.; Wang, K.-T. Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4781-4784.
188. Erdélyi, M.; Gogoll, A. Rapid microwave-assisted solid phase peptide synthesis. *Synthesis* **2002**, 11, 1592-1596.
189. Ferguson, J. D. Focused™ microwave instrumentation from CEM corporation. *Mol. Diversity* **2003**, 7, 281-286.

190. www.cemsynthesis.com.
191. Lahred, M.; Lindeberg, G.; Hallberg, A. Rapid microwave-assisted Suzuki coupling on solid-phase. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8219-8222.
192. Erdélyi, M.; Gogoll, A. Rapid microwave promoted sonogashira coupling reactions on solid phase. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6431-6434.
193. Walla, P.; Kappe, C. O. Microwave-assisted Negishi and Kumada cross-coupling reactions of aryl chlorides. *Chem. Commun.* **2004**, *5*, 564-565.
194. Wannberg, J.; Larhed, M. Increasing rates and scope of reactions: sluggish amines in microwave-heated aminocarbonylation reactions under air. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5750-5753.
195. Alterman, M.; Hallberg, A. Fast microwave-assisted preparation of aryl and vinyl nitriles and the corresponding tetrazoles from organo-halides. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7984-7989.
196. Bengtson, A.; Hallberg, A.; Larhed, M. Fast synthesis of aryl triflates with controlled microwave heating. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1231-1233.
197. Weigand, K.; Pelka, S. Microwave-assisted Pd(0)-catalyzed amination of aryl halides on solid support. *Mol. Diversity* **2003**, *7*, 181-184.
198. Baxendale, I. R.; Lee, A.-L.; Ley, S. V. *Microwave-Assisted Organic Synthesis*. Ed.: P. Lidstöm, J. P. Tierney, Blackwell, Oxford, **2004**, Chap. 6.
199. Cortés, N. *Contribucions al disseny, síntesi i aplicacions de quimiotèques combinatòries de peptoides*. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona. **2005**.
200. Olivos, H. J.; Alluri, P. G.; Reddy, M. M.; Salony, D.; Kodadek, T. Microwave-assisted solid-phase synthesis of peptoids. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4057-4059.
201. Gorske, B. C.; Jewell, S. A.; Guerard, E. J.; Blackwell, H. E. Expedient synthesis and design strategies for new peptoid construction. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1521-1524.
202. Burkoth, T. S.; Fafarman, A. T.; Charych, D. H.; Connolly, M. D.; Zuckermann, R. N. Incorporation of unprotected heterocyclic side chains into peptoid oligomers via solid-phase submonomer synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8841-8845.
203. Kirshenbaum, K.; Barron, A. E.; Goldsmith, R. A.; Armand, P.; Bradley, E. K.; Truong, K. T. V.; Dill, K. A.; Cohen, F. E.; Zuckermann, R. N. Sequence-specific polypeptoids: a diverse family of heteropolymers with stable secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4303-4308.
204. Bateman, L. C.; Church, M. G.; Hughes, E. D.; Ingold, C. K.; Taher, N. A. Mechanism of substitution at a saturated carbon atom. Part XXIII. A kinetic demonstration of the unimolecular solvolysis of alkyl halides. (Section E) A general discussion. *J. Chem. Soc.* **1940**, 979-1011.
205. Mora, P.; Masip, I.; Cortés, N.; Marquina, R.; Merino, R.; Merino, J.; Carbonell, T.; Mingarro, I.; Messeguer, A.; Pérez-Payá, E. Identification from a positional scanning peptoid library of in vivo active compounds that neutralize bacterial endotoxins. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1965-1968.

206. Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F. Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1210-1250.
207. Masip, I.; Cortés, N.; Abad, M.-J.; Guardiola, M.; Pérez-Payá, E.; Ferragut, J.; Ferrer-Montiel, A.; Messegue, A. Design and synthesis of an optimized positional scanning library of peptoids: identification of novel multidrug resistance reversal agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1923-1929.
208. Lockshin, R. A.; Williams, C. M. Programmed cell death-I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *J. Insect. Physiol.* **1965**, *11*, 123-133.
209. Oppenheim, R. W. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **1991**, *14*, 453-501.
210. Ferrer, I.; Goutan, E.; Marín, C.; Rey, M. J.; Ribalta, T. Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Res.* **2000**, *866*, 257-261.
211. Hock, C. H.; Heese, K.; Olivieri, G.; Hulette, C. H.; Rosenberg, C.; Nitsch, R. M.; Otten, U. Alterations in neurotrophins and neurotrophin receptors in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* **2000**, *59*, 171-174.
212. Holsinger, R. M.; Schnarr, J.; Henry, P.; Castelo, V. T.; Fahnstock, M. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2000**, *76*, 347-354.
213. Hurko, O.; Walsh, F. S. Novel drug development for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **2000**, *180*, 21-28.
214. Nagatsu, T.; Mogi, M.; Ichinose, H.; Togari, A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* **2000**, *60*, 277-290.
215. Huang, E. J.; Reichardt, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, *24*, 677-736.
216. Kaplan, D. R.; Miller, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2000**, *10*, 381-391.
217. Thoenen, H. Neurotrophins and activity-dependent plasticity. *Prog. Brain Res.* **2000**, *128*, 183-191.
218. Schinder, A. F.; Poo, M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **2000**, *12*, 639-645.
219. Connor, B.; Dragunow, M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **1998**, *1*, 1-39.
220. Chao, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 299-309.
221. Levi-Montalcini, R.; Angeletti, P. U. Nerve growth factor. *Physiol. Rev.* **1968**, *48*, 534-569.
222. Levi-Montalcini, R. The nerve growth factor: thirty-five years later. *EMBO J.* **1987**, *6*, 1145-1154.

223. Nykjaer, A.; Willnow, T. E. P75^{NTR}-live or let die. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2005**, *15*, 49-57.
224. Abad-Merin, M. J.; Cortés, N.; Masip, I.; Pérez-Payá, E.; Ferragut, J. A.; Messeguer, A.; Ferrer-Montiel, A. Trimers of *N*-alkylglycines are potent modulators of the multidrug resistance phenotype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313*, 112-120.
225. Waters, M. L. Aromatic interactions in model systems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 736-741.
226. Burley, S. K.; Petsko, G. A. Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science* **1985**, *229*, 23-28.
227. Morillas, M.; Clotet, J.; Rubí, B.; Serra, D.; Asins, G.; Ariño, J.; Hegardt, F. G. Identification of the two histidine residues responsible for the inhibition by malonyl-CoA in peroxisomal carnitine octanoyltransferase from rat liver. *FEBS Letters* **2000**, *466*, 183-186.
228. Yotsumoto, T.; Naitoh, T.; Kitahara, M.; Tsuruzoe, N. Effects of carnitine palitoyltransferase I inhibitors on hepatic hypertrophy. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *398*, 297-302.
229. Merrill, C. L.; Ni, H.; Yoon, L. W.; Tirmenstein, M. A.; Narayanan, P.; Benavides, G. R.; Easton, M. J.; Creech, D. R.; Hu, C. X.; McFarland, D. C.; Hahn, L. M.; Thomas, H. C.; Morgan, K. T. Etomoxir-induced oxidative stress in HepG2 cells detected by differential gene expression is confirmed biochemically. *Toxicol. Sci.* **2002**, *68*, 93-101.
230. Bräuner-Osborne, H.; Egebjerg, J.; Nielsen, E. Ø; Madsen, U.; Krogsgaard-Larsen, P. Ligands for glutamate receptors: design and therapeutic prospects. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2609-2645.
231. Yu, S. P.; Yeh, C.-H.; Strasser, U.; Tian, M.; Choi, D. W. NMDA receptor-mediated K⁺ efflux and neuronal apoptosis. *Science* **1999**, *284*, 336-339.
232. Ferrer-Montiel, A. V.; Montal, M. Structure-function relations in ligand-gated ion channels: reconstitution in lipid bilayers and heterologous expression in *Xenopus* oocytes. *Methods* **1994**, *6*, 60-69.
233. Caterina, M. J.; Schumacher, M. A.; Tominaga, M.; Rosen, T. A.; Levine, J. D.; Julius, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **1997**, *389*, 816-824.
234. Liu, L.; Simon, S. A. A rapid capsaicin-activated current in rat trigeminal ganglion neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 738-741.
235. Tominaga, M.; Caterina, M. J.; Malmberg, A. B.; Rosen, T. A.; Gilvert, H.; Skinner, K.; Raumann, B. E.; Basbaum, A. I.; Julius, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **1998**, *21*, 531-543.
236. Caterina, M. J.; Julius, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, *24*, 487-517.
237. Williams, M.; Kowaluk, E. A.; Arneric, S. P. Emerging molecular approaches to pain therapy. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1481-1500.

- 238. Szallasi, A.; Cortright, D. N.; Blum, C. A.; Eid, S. R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 357-372.
- 239. Dai, Y.; Moriyama, T.; Higashi, T.; Togashi, K.; Kobayashi, K.; Yamanaka, H.; Tominaga, M.; Noguchi, K. Proteinase-Activated Receptor 2-Mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 4293-4299.
- 240. Amadesi, S.; Nie, J.; Vergnolle, N.; Cotterell, G. S.; Grady, E. F.; Trevisani, M.; Manni, C.; Geppetti, P.; McRoberts, J. A.; Ennes, H.; Davis, J. B.; Mayer, E. A.; Bunnett, N. W. Proteinase-Activated Receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 4300-4312.
- 241. Vergnolle, N.; Ferazzini, M.; D'Andrea, M. R.; Buddenkotte, J.; Steinhoff, M. Proteinase-activated receptors: novel signals for peripheral nerves. *Trends Neurosci.* **2003**, *26*, 496-500.