

Departament de Química Orgànica  
Facultat de Química  
Universitat de Barcelona



## Tesi Doctoral

**Síntesi de lligands monovalents i divalents semi-rígidts d'avidina i  
estreptavidina i estudi de la seva interacció**

**Eva Ayet Galcerà**

Barcelona, desembre de 2007



Memòria presentada per a optar al grau de Doctora per la  
Universitat de Barcelona  
Bienni 2002-2004

Presentada per

**Eva Ayet Galcerà**

Dirigida i revisada per

***Dr. Joan Anton Farrera Piñol***

Prof. Titular del Departament de Química Orgànica  
Universitat de Barcelona



*Als meus pares i germà i a l'Irra*

*Si plores perquè has perdut el sol,  
Les llàgrimes no et deixaran veure el sol.*  
R. Tagore



*Bé, i finalment arriba el principi del final, els agraïments a tantes persones que han estat al meu costat al llarg d'aquests pràcticament 5 anys que ha durat aquesta aventura.*

*Tot va començar amb un Erasmus a Nijmegen, juntament amb la meva amiga de l'ànima, l'Eli. Allí totes dues vam descobrir una colla de gent fantàstica i van sorgir una sèrie d'amistats que encara duren avui dia i que espero que mai es trenquin a pesar de la distància que ens separa. Per aquest motiu, vull donar les gràcies a l'Aurèlie per la seva alegria i somriure contagiosos, al Dennis per introduir-me en el meravellós món de la investigació i donar-me suport en els seus inicis, al Gerald per les seves visites al "lab" i sortides culturals i lúdiques per Holanda i ara a Catalunya, a la Pili perquè sempre ajudes a ser el nexa d'unió entre cultures, i a tota la resta de companys que vaig tenir en aquesta etapa tant maca de la meva vida.*

*Aleshores va arribar la tornada a Barcelona, on va començar realment aquesta Tesi Doctoral. Aquí he pogut desenvolupar aquest esperit inquiet que m'ha dut a dedicar-me a aquest món tant apassionant i a la vegada desagraït, que és el món de la investigació. Aquesta Tesi no hagués estat possible sense l'ajuda, el suport i la confiança que ha dipositat en mi el Joan Anton, el qual m'ha ensenyat a ser persistent a pesar de què les coses no surtin a la primera i de vegades no trobis la sortida, tot i les nostres diferències. De la mateixa manera voldria donar les gràcies al Pedrito, per estar al meu costat a llarg d'aquest temps, per ajudar-me i aconsellar-me sempre que ho he necessitat, a més a més, ara al costat de l'Eli us desitjo molta felicitat i que puguem compartir moltes estones fora del laboratori! I com no, gràcies a tu Ivan, per compartir plegats tots aquests anys tant a dins com fora del laboratori, per la teva alegria i optimisme, per escoltar els meus problemes i aconsellar-me, perquè ets una peça clau dins del grup, no canviïs. Tampoc em voldria oblidar de tota la gent que ha contribuït en major o menor grau a què el grup 13 tiri endavant, la Rosa amb qui em compartit moltes coses a part de la nostra procedència, al Sander que ens va aportar coses de la cultura holandesa i a la resta d'alumnes que han passat pel lab, Dani, Eva S., Montse, Sílvia, etc.*

*De la mateixa manera no em puc oblidar dels meus companys de carrera. Alguns ja no esteu tant a prop, però hi sou en la memòria; Pilar, Anna, Llorenç, Mireia, Mercè, Juanra, Nacho, etc. I d'altres a qui tinc el plaer de veure-us sovint i compartir les nostres alegries i penes amb els dinars el bar de la Uni, gràcies Laura, Toni i Óscar per ser-hi i perquè ho puguem repetir molts anys....*

*També m'agradaria donar les gràcies a tota la gent del departament de química orgànica que també han estat imprescindibles per a què aquesta Tesi tiri endavant, gràcies al Vicente, al Salvador i a l'Ignasi, a les "secres" que sempre acabeu trobant una solució a la paperassa quan ja no queda temps..., a la M<sup>a</sup> Pilar per la gran quantitat d'estones i xerrades compartides a la sala d'aparells i com no, a la Irene i la Marta, per la gran ajuda que m'heu donat a l'hora de barallar-me amb els equips de masses i ajudar-me a interpretar els resultats obtinguts. Tampoc em vull oblidar de la gent dels serveis Científico-Tècnics que m'han ajudat amb la GPC i l'ESI-TOF, com la Maria Reixach i l'Isidre Casals; i de la gent del servei de difracció de Raigs X, com el Xavier Solans, el qual malauradament ens ha deixat, i la Mercè Font.*

*També voldria donar les gràcies a la resta de gent que com jo hem format part d'aquest grup de becaris que lluita per descobrir coses noves i amb els quals hem compartit cafès i bones estones, Ester, Toni, Sònia, Carlos, Zoubir, Júlia, Dani,...i moltes persones més que no anomeno sinó no acabaria mai. Que tingueu molta sort en el futur!*

*Així com també voldria donar les gràcies als professors del Departament que m'han ajudat amb els seus savis coneixements quan els he necessitat.*

*Tota aquesta aventura no hagués estat possible sense el suport incondicional dels meus pares, els quals m'han donat la vida i m'han ajudat sempre que els he necessitat, encara que moltes vegades no us he sabut agrair prou bé tot el que heu fet per mi. També dono les gràcies al meu germà "estupendo" per ser-hi sempre que l'he necessitat i com no a l'amiga i cunyada, Gladis, encara que estiguem lluny, sabeu que sempre us porto amb mi, i que sóc aquí pel que necessiteu. També vull donar les gràcies als meus avis, tot i que molts ja no hi sou, em vau donar molts bons i savis consells que mai oblidaré.*

*També voldria donar les gràcies a la resta de la meva família, que tot i que de vegades no se si enteneu massa el que estic fent, fan que cada vegada que ens reunim em senti feliç de tenir aquesta gran família. Sobretot gràcies a tu Judit, perquè ets qui millor m'entén ja que estàs passat per la mateixa experiència, i sobretot gràcies pels teus consells sobre difracció de raigs X, en els moments que més ho he necessitat.*

*I com no donar les gràcies a la gran quantitat d'amics de Móra: Eva, Natàlia i Alfred, Marta i Miquel, Noe i Josep M<sup>a</sup>, Maribel, Glòria i Gil, Merce i Juan, a les meves ex-companyes de pis, per tots els moments viscuts, Anna, Laura, Mar, Eli i Maria, i respectives parelles, a les amigues de Batea: Irene, Maria, Neus, Teresa, Maribel, Lourdes, Montse, etc.*

*Gràcies també als meus nous companys de feina i "jefes" a OED, amb qui he connectat des del principi i sobretot gràcies per recolzar-me en aquesta última i dura etapa, perquè puguem compartir molts moments plegats.*

*Per últim, però no menys important sinó tot al contrari, et vull donar les gràcies a tu Irra, perquè has patit en les pròpies carns el fet de què aquesta Tesi hagi acabat sent el que és, per tenir tanta paciència i estar al meu costat en els moments més difícils, donant-me suport i ànim quan ja no podia més. T'estimo supins! Gràcies també a la teva família, que per mi ja és la meva pròpia família, perquè em fan sentir com una més i m'estimen com si fos sa filla. I com no, gràcies a tota la colla que he fet gràcies a tu: Maria i Marc, David i Vero, David i Arabella, Girbi i Marta, Óscar i Judit, Marc i Marta, Dolors i David, Eloi, Nel, Uri, Torto, etc. Perquè em feu sentir com una més de la colla, pels moments que hem compartit plegats i pels molts que ens queden per compartir.*

*Per tot això i molt més que no es pot dir en paraules, gràcies a tots per ser com sou!*



**ABREVIATURES I ACRÒNIMS**

AcOEt	acetat d'etil
AcOH	àcid acètic
Av	avidina
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
BT	Biotina
<sup>t</sup> BuOK	<i>tert</i> -butòxid de potassi
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
<i>n</i> -BuNH <sub>2</sub>	<i>n</i> -butilamina
Cbz	benziloxicarbonil
C <sub>eff</sub>	concentració efectiva
CCF	cromatografia de capa fina
d	doblet
δ	desplaçament químic
DCC	diciclohexilcarbodiimida
DCU	diciclohexilurea
DIEA	diisopropiletilamina
DMAP	dimetilaminopiridina
DMF	dimetilformamida
DMPDU	dimetilpropandiurea (9,9-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]nonà)
DMSO	dimetilsulfòxid
DPPA	difenilfosforilazida
ε	coeficient d'absortivitat molar
EDC	hidroclorur de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
EM	molaritat efectiva
ES	enantioselectivitat
ESI	ionització per electroesprai
Et <sub>3</sub> N	triètilamina
Et <sub>2</sub> O	èter dietílic
F	intensitat de fluorescència
Gril	glicoluril
GPC	cromatografia d'exclusió molecular
HABA	àcid 2-(4-hidroxifenilazo)benzoic
HPLC	cromatografia líquida d'alta resolució
HOBT	1-hidroxibenzotriazole
I	indicador
IR	infrarroig
K <sub>a</sub>	constant d'associació
K <sub>d</sub>	constant de dissociació
K <sub>dim</sub>	constant de dimerització

L	l·ligand
$\lambda$	longitud d'ona
$\lambda_{\text{ex}}$	longitud d'ona d'excitació
m	multiplet
MS	espectrometria de masses
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
PBS	tampó fosfats
Pd(dba) <sub>2</sub>	dibenzilidenacetona de pal·ladi
Pf	punt de fusió
PDU	Propandiurea (3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]nonà)
PyBOP	Hexafluorofosfat de 1-(benzotriazoliloxi)tripirrolidinofosfoni
RMN	ressonància magnètica nuclear
s	singlet
S	subunitat de proteïna
SAv	estreptavidina
t	triplet
t.a.	temperatura ambient
TBAF	fluorur de tetrabutylamoni
TES	triethylsilyl
TESA	triethylsilylacetyl
TFA	àcid trifluoroacètic
TFF	tetrafluorophenol
TMS	trimethylsilyl
TMSA	trimethylsilylacetyl
U.A.	unitats arbitràries
UV	ultraviolat
vs	envers





---

1	INTRODUCCIÓ GENERAL	1
1.1	Funció biològica de la biotina	3
1.2	Les proteïnes avidina (Av) i estreptavidina (SAv)	3
1.3	Els complexos avidina-biotina (Av-BT) i estreptavidina-biotina (SAv-BT)	5
1.4	Altres lligands d'avidina i estreptavidina	7
1.4.1	HABA i derivats	7
1.4.2	Homobiotina i norbiotina	9
1.4.3	Glicoluril i derivats	11
1.4.4	Derivats de la propandiurea (PDU)	13
1.5	Multivalència	13
1.5.1	Concentració efectiva ( $C_{\text{eff}}$ ) i molaritat efectiva (EM)	14
1.5.2	Efectes cooperatius en sistemes multivalents	16
1.6	Lligands divalents d'avidina i estreptavidina	16
2	OBJECTIUS	19
	RESULTATS I DISCUSSIÓ	23
3	LLIGANDS MONOVALENTS	25
3.1	Síntesi de lligands monovalents: ( $\pm$ )-PDU- <i>N</i> -C <sub><i>n</i></sub> -COOH (8, 9) i ( $\pm$ )-DMPDU- <i>N</i> -C <sub><i>n</i></sub> -COOH (11, 12, 13)	26
3.1.1	Ruta A: N-Alquilació de la DMPDU (10) o la PDU (6) mitjançant $\omega$ -haloèsters.	26
3.1.2	Ruta B: Condensació d'un propandial amb una barreja d'urea i un àcid $\omega$ -ureidocarboxílic (16, 17, 18).	27
3.2	Síntesi de lligands monovalents units a espaiadors conformacionalment flexibles	28
3.2.1	Síntesi del compost 41	28
3.2.2	Síntesi del compost 43	29
3.3	Estructures cristal·lines de compostos de tipus PDU- <i>N</i> -C <sub><i>n</i></sub> -COOH ( <i>n</i> = 4,5)	30
3.3.1	Estructura del compost PDU- <i>N</i> -C <sub>4</sub> -COOH (8)	30
3.3.2	Estructura del compost PDU- <i>N</i> -C <sub>5</sub> -COOH (9)	33
3.4	Estudis de complexació dels lligands monovalents a avidina i estreptavidina	36
3.4.1	Mètodes emprats en la determinació de les constants d'associació dels lligands monovalents a avidina i estreptavidina.	36
3.4.1.1	Valoració espectrofotomètrica competitiva	36
3.4.1.2	Valoració espectrofluorimètrica	40
3.4.2	Complexos de lligands monovalents de tipus dimetilpropandiurea (DMPDU) amb SAv	47
3.4.3	Complexos de lligands monovalents de tipus propandiurea (PDU) amb SAv	51
3.4.4	Complexos de lligands monovalents de tipus dimetilpropandiurea (DMPDU) amb Av	56
3.4.5	Complexos de lligands monovalents de tipus propandiurea (PDU) amb Av	61
3.5	Estudis d'agregació de lligands monovalents mitjançant espectrometria de masses-electrosprai (MS-ESI)	67

---

---

4	LLIGANDS DIVALENTS SEMI-RÍGIDS	71
4.1	Disseny dels lligands divalents semi-rígids	73
4.2	Síntesi de lligands divalents semi-rígids de tipus alquílic i polièter	74
4.2.1	N-protecció i activació de l'àcid 5-aminoisoftàlic	74
4.2.2	Síntesi del lligand divalent 54	75
4.2.3	Síntesi del lligand divalent 59	77
4.2.4	Síntesi del lligand divalent 63	80
4.2.5	Síntesi del lligand divalent 68	82
4.2.6	Síntesi del lligand divalent 78	84
4.3	Estudis de complexació de lligands divalents semi-rígids a avidina i estreptavidina	88
4.3.1	Model d'unió i equacions per una valoració espectrofotomètrica competitiva amb un lligand divalent	88
4.3.2	Complexos de lligands divalents semi-rígids amb estreptavidina	91
4.3.2.1	Lligands divalents semi-rígids amb espaiadors de tipus alquílic	91
4.3.2.2	Lligands divalents semi-rígids amb espaiadors de tipus polièter	93
4.3.3	Complexos de lligands divalents semi-rígids amb avidina	96
4.3.3.1	Lligands divalents semi-rígids amb espaiadors de tipus alquílic	96
4.3.3.2	Lligands divalents semi-rígids amb espaiadors de tipus polièter	98
4.4	Estudi de l'associació lligand-proteïna mitjançant GPC	102
4.5	Estudis de l'associació lligand-proteïna per ESI-TOF	104
4.5.1	Instrumentació i modes de treball	104
4.6	Lligands divalents semi-rígids de tipus acetilènic	109
4.6.1	Introducció. La reacció de Cadiot-Chodkiewicz i mètodes relacionats.	109
4.6.2	Ús de co-catalitzadors	110
4.6.3	Heteroacoblements no-oxidatius	111
4.7	Reacció de Sonogashira	113
4.7.1	Introducció	113
4.7.2	Mecanisme	113
4.7.3	Catalitzadors de Sonogashira	115
4.7.4	Amines	115
4.7.5	Dissolvents i additius	115
4.7.6	Utilització de microones en síntesi orgànica	116
4.7.6.1	Fonaments de la tècnica	117
4.7.6.2	Tècniques experimentals	118
4.8	Aproximació a lligands divalents amb una unitat central rígida derivada de l'àcid 3,5-bis(butadiinil)benzoic	119
4.8.1	Aproximació A: Síntesi dels diins no simètrics; reacció de Cadiot-Chodkiewicz	119
4.8.2	Acoblament del dí al 3,5-dibromobenzoat d'alquí; reacció de Sonogashira	123
4.8.3	Aproximació B: acoblament de Sonogashira i de Cadiot-Chodkiewicz	124

---

---

5	PART EXPERIMENTAL	139
5.1	MÈTODES GENERALS	141
5.1.1	Dissolvents i reactius	141
5.1.2	Instrumentació general	141
5.2	LLIGANDS MONOVALENTS	145
5.2.1	Síntesi de derivats N-alquilats de propandiurea	145
5.2.1.1	Síntesi de l'àcid 6-ureidohexanoic (18) <sup>153</sup>	145
5.2.1.2	Síntesi de l'àcid 5-ureidopentanoic (17) <sup>153</sup>	145
5.2.1.1	Generació del malonaldehid <sup>154</sup>	146
5.2.1.2	Síntesi del 3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]nonà [PDU (6)] <sup>52</sup>	146
5.2.1.3	Síntesi del 5-(3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]non-2-il)-pentanoat d'etil [PDU-N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -COOEt (22)]	147
5.2.1.4	Síntesi de l'àcid 5-(3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]non-2-il)-pentanoic [PDU-N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -COOH, (8)]	148
5.2.1.5	Síntesi del 6-(3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]non-2-il)-hexanoat d'etil [PDU-N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOEt; (28)]	149
5.2.1.6	Obtenció de l'àcid 6-(3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]non-2-il)-hexanoic [PDU-N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH; (9)]	150
5.2.2	Síntesi de derivats N-alquilats de dimetilpropandiurea (DMPDU)	151
5.2.2.1	Síntesi del 9,9-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]nonà (DMPDU) <sup>155</sup> (10) <sup>151</sup>	
5.2.2.2	Síntesi de l'àcid 4-(9,9-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]non-2-il)butanoic [DMPDU-N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -COOH, (11)]	151
5.2.2.3	Síntesi de l'àcid 5-(9,9-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]non-2-il)pentanoic [DMPDU-N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -COOH, (8)]	152
5.2.2.4	Síntesi de l'àcid 6-(9,9-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]non-2-il)hexanoic [DMPDU-N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH, (13)]	153
5.2.2.5	Síntesi del compost 40 <sup>54</sup>	154
5.2.2.6	Síntesi del compost 41	154
5.2.2.7	Síntesi del compost 42	155
5.2.2.8	Síntesi del compost 43	156
5.2.3	Estudis de difracció de raigs X	156
5.2.3.1	Difracció de raigs X del compost PDU-N-C <sub>4</sub> -COOH (8)	156
5.2.3.2	Difracció de raigs X del compost PDU-N-C <sub>5</sub> -COOH (9)	158
5.2.4	Determinació de les constants d'associació dels lligands monovalents amb avidina i estreptavidina.	161
5.2.4.1	Procediment general de les valoracions espectrofotomètriques competitives	161
5.2.4.2	Procediment general de les valoracions espectrofluorimètriques	162
5.3	LLIGANDS DIVALENTS SEMI-RÍGIDS	164
5.3.1	Síntesi del core central dels lligands divalents semi-rígid	164
5.3.1.1	Síntesi de l'àcid N-(benziloxycarbonil)-5-aminobenzen-1,3-dicarboxílic (48) <sup>79</sup>	164

---

5.3.1.2	Síntesi de 3,5-bis(2,3,5,6-tetrafluorofenoxicarbonil)fenilcarbamat de benzil (49) <sup>49</sup>	164
5.3.2	Síntesi del compost 54	165
5.3.2.1	Síntesi del compost 51	165
5.3.2.2	Síntesi del compost 52	166
5.3.2.3	Síntesi del compost 53	167
5.3.2.4	Síntesi del compost 54	168
5.3.3	Síntesi del compost 59	169
5.3.3.1	Síntesi del compost 56	169
5.3.3.2	Síntesi del compost 57	169
5.3.3.3	Síntesi del compost 58	170
5.3.3.4	Síntesi del compost 59	171
5.3.4	Síntesi del compost 63	172
5.3.4.1	Síntesi del 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamat de tert-butil (36) <sup>156,157</sup>	172
5.3.4.2	Síntesi del compost 60	172
5.3.4.3	Síntesi del compost 61	173
5.3.4.4	Síntesi del compost 62	173
5.3.4.5	Síntesi del compost 63	174
5.3.5	Síntesi del compost 68	175
5.3.5.1	Síntesi del compost 64	175
5.3.5.2	Síntesi del compost 66	176
5.3.5.3	Síntesi del compost 67	177
5.3.5.4	Síntesi del compost 68	178
5.3.6	Síntesi del compost 78	179
5.3.6.1	Síntesi del 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamat de benzil <sup>158</sup> (69)	179
5.3.6.2	Síntesi del compost 70	179
5.3.6.3	Síntesi del compost 71	180
5.3.6.4	Síntesi del compost 73	181
5.3.6.5	Síntesi del compost 74	181
5.3.6.6	Síntesi del compost 76	182
5.3.6.7	Síntesi del compost 78	183
5.3.7	Mesures d'interaccions no-covalents lligand-proteïna través de GPC	185
5.3.8	Mesures d'interaccions no-covalents lligand-proteïna través de ESI-TOF	191
5.4	Lligands divalents semi-rígid de tipus acetilènic	195
5.4.1	Síntesi de l'àcid 3-bromopropínic <sup>135</sup>	195
5.4.2	Síntesi del 3-bromo-2-propin-1-ol <sup>136</sup>	195
5.4.3	Síntesi del 3,5-dibromobenzoat d'etil <sup>88</sup>	196
5.4.4	Síntesi del 3,5-bis(trimetilsililetinil)benzoat d'etil (83)	196
5.4.5	Síntesi del 3,5-dietinilbenzoat d'etil (84) <sup>145</sup>	197
5.4.6	Síntesi del 3,5-bis(2-bromoetinil)benzoat d'etil (85) <sup>146</sup>	198
5.4.7	Síntesi del 3,5-dibromobenzoat de metil <sup>141</sup>	198
5.4.8	Síntesi del 3,5-bis(trimetilsililetinil)benzoat de metil (87)	199

---



---

5.4.9	Síntesi del 3,5-dietinilbenzoat de metil (88)	199
5.4.10	Síntesi del 3,5-bis(2-bromoetinil)benzoat de metil (89)	200
5.4.11	Intents de síntesi de l'àcid 5-(trimetilsilil)pentadiinoic (90)	200
5.4.12	Síntesi de l'àcid 5-(trietilsilil)pentadiinoic (91)	201
5.4.13	Síntesi del 5-(trietilsilil)penta-2,4-diin-1-ol (92)	202
5.4.14	Síntesi del 2,4-pentadiin-1-ol <sup>139</sup>	203
5.4.15	Síntesi del 3,5-bis(5-hidroxipenta-1,3-diinil)benzoat d'etil (95)	204
5.4.15.1	Intents de síntesi a partir del 3,5-dibromobenzoat d'etil	204
5.4.15.2	A partir del 3,5-dietinilbenzoat d'etil	205
5.4.16	Síntesi del 3,5-bis(4-carboxibutadiinil)benzoat d'etil (98)	206
5.4.16.1	Intent a partir de 3,5-dietinilbenzoat d'etil	206
5.4.16.2	A partir de 3,5-bis(2-bromoetinil)benzoat d'etil	206
5.4.17	Síntesi del 8-(propiolamido)-3,6-dioxaocilcarbamat de tert-butil (102)	209
5.4.18	Síntesi del 8-aminoocilcarbamat de tert-butil <sup>51</sup>	210
5.4.19	Síntesi del 8-(propiolamido)ocilcarbamat de tert-butil	210
5.4.20	Síntesi del trifluoroacetat de la N-(8-aminoocil)propiolamida (106)	211
5.4.21	Intent de síntesi del producte (107)	211
5.4.22	Intents de síntesi del compost (110)	212
5.4.23	Síntesi del 8-(3-bromopropiolamido)ocilcarbamat de tert-butil (114)	214
5.4.24	Intent de síntesi de 8-(5-(trimetilsilil)penta-2,4-diinamido)ocilcarbamat de tert-butil	214
5.4.25	Intent de síntesi de 8-(5-(trietilsilil)penta-2,4-diinamido)ocilcarbamat de tert-butil	215
5.4.26	Intents de síntesi del compost (118)	216
5.4.27	Intent de síntesi del compost (120)	217
5.4.28	Síntesi del compost (121)	218
5.4.29	Intent de síntesi del compost (123)	218
5.4.30	Intent de síntesi del compost (124)	219
5.4.31	Intent de síntesi del compost (125)	220
5.4.32	Síntesi del 6-aminohexilcarbamat de benzil	220
5.4.33	Síntesi del 8-aminoocilcarbamat de benzil	221
5.4.34	Síntesi del compost (128)	222
5.4.35	Síntesi del compost (129)	222
5.4.36	Síntesi del compost (44)	223
5.4.37	Síntesi del compost (43)	223
5.4.38	Intent de síntesi del compost (132)	224
5.4.39	Proves d'estabilitat del diàcid (98)	224
6	CONCLUSIONS	227
7	ESTRUCTURES	231
8	BIBLIOGRAFIA	245

---



# 1 **INTRODUCCIÓ GENERAL**

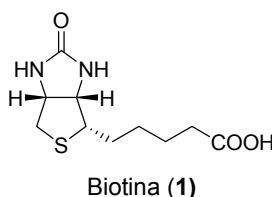


Recentment s'han desenvolupat tècniques d'aplicació en el camp biomèdic que es basen en l'aprofitament de la capacitat de reconeixement molecular i d'autoensamblatge dels compostos d'origen biològic.<sup>1</sup> Un dels sistemes més estudiats en aquest camp ha estat el sistema format per la biotina (o vitamina H) i les proteïnes avidina (Av) i estreptavidina (SAv).<sup>2</sup>

### 1.1 Funció biològica de la biotina

La biotina (**1**) és un compost amb estructura de tipus biciclo[3.3.0], amb un grup urea en un dels cicles i un àtom de sofre en l'altre cicle, així com una cadena lateral de valerat unida al C<sub>α</sub> respecte de l'àtom de sofre.

La funció biològica de la biotina va ser descoberta al 1935 per F. Lynen i col·laboradors, els quals van observar que el mecanisme biològic de la biotina era una reacció de transferència de CO<sub>2</sub> a través de la formació reversible de 1'-N-carboxibiotina. La biotina serveix com a portador de CO<sub>2</sub> unit covalentment, per a reaccions en les quals el CO<sub>2</sub> es fixa a un acceptor a través de carboxilases. Aleshores aquest grup carboxil pot ser transferit, en una reacció independent, des de la biotina a un nou substrat a través de transcarboxilases, o el grup carboxil pot ser eliminat com a CO<sub>2</sub> a través de descarboxilases. Aquestes transformacions bioquímiques succeeixen en un complex multienzimàtic format per almenys tres proteïnes: proteïna portadora de biotina, biotina carboxilasa i biotina transferasa.<sup>3</sup>

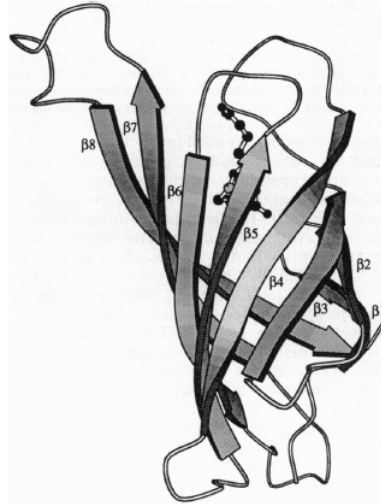


### 1.2 Les proteïnes avidina (Av) i estreptavidina (SAv)

L'avidina i l'estreptavidina són proteïnes tetramèriques formades per quatre subunitats idèntiques amb quatre llocs d'unió (un en cada subunitat). Cada subunitat es troba organitzada en vuit fulls β antiparal·lels, els quals formen un barril β clàssic (Figura 1). La majoria de diferències en l'estructura terciària d'ambdues proteïnes recauen en la llargada i la conformació dels bucles que connecten els fulls β.<sup>4-7</sup>

Els monòmers d'avidina s'uneixen a través d'interaccions per pont d'hidrogen entre els extrems N-terminals del full β8 de cada monòmer. Com a resultat, cada monòmer contribueix amb el Trp110 (Figura 2) al lloc d'unió d'una altra subunitat. Quan s'uneix la biotina, la interacció 1-2 augmenta degut a la interacció Trp110-biotina.

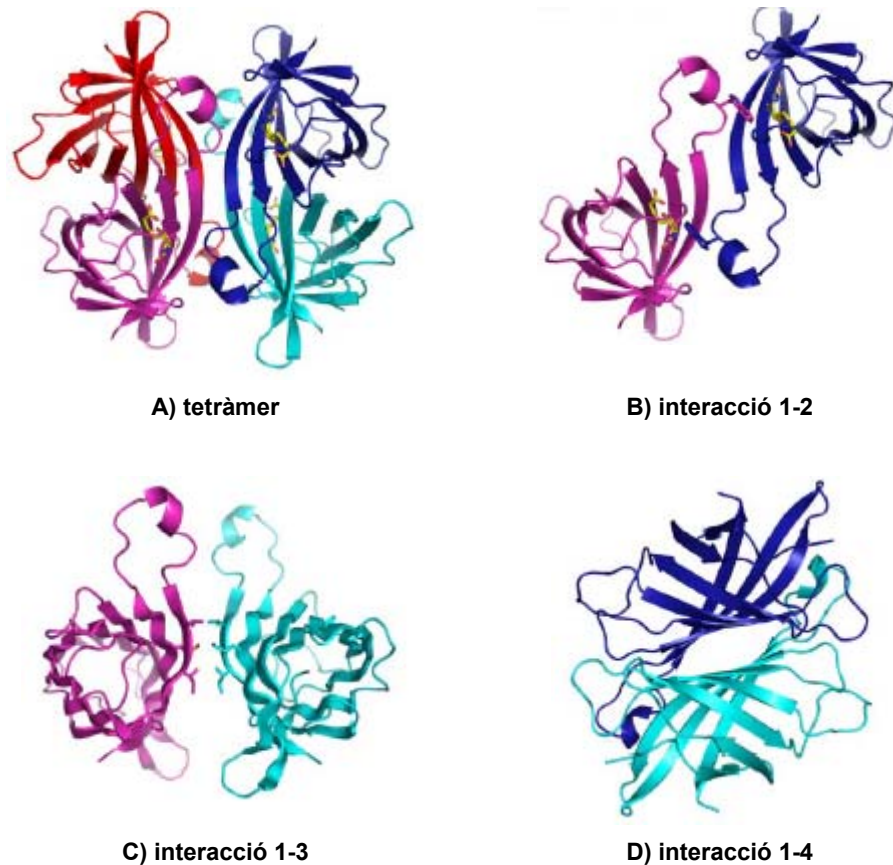
Hi ha tres regions d'interacció monòmer-monòmer en l'avidina (Figura 2). Aquestes interaccions contribueixen a la rigidesa de l'estructura quaternària i també contribueixen a crear un entorn favorable per a la forta unió a la biotina. La comparació entre avidina i estreptavidina ha revelat que les interaccions 1-2 i 1-4 són molt similars.



**Figura 1:** Diagrama del complex monomèric avidina-biotina amb els vuit fulls  $\beta$  disposats en forma de barril. La biotina es representa en model de boles i palets.<sup>5</sup>

En ambdues proteïnes, la interacció 1-4 fa la contribució més gran a l'estructura tetramèrica i pot ser considerada com un adhesiu tetramèric en ambdós casos (Figura 2D). Això es reflecteix en el fet que, per exemple, en el complex avidina-biotina l'àrea de la superfície d'interacció 1-4 oculta és  $1951 \text{ \AA}^2$  per monòmer, mentre que en les interaccions 1-2 i 1-3 són  $729$  i  $120 \text{ \AA}^2$  respectivament.<sup>6</sup> La majoria dels contactes en la interacció 1-4 inclouen forces de van der Waals, però també hi ha interaccions per pont d'hidrogen entre residus polars i molècules d'aigua. Hi ha però algunes diferències entre avidina i estreptavidina respecte a la interacció 1-3 (Figura 2C). En l'avidina, aquesta particular interacció monòmer-monòmer es caracteritza només per forces de van der Waals, mentre que en estreptavidina també hi ha interaccions per pont d'hidrogen.

El tetràmer natural d'estreptavidina es produeix quan interaccionen dos dímers, estabilitzant-se a través d'interaccions de van der Waals entre les superfícies dels dímers, els quals tenen curvatures complementàries.<sup>4,5,7</sup>



**Figura 2:** (A) Estructura quaternària del tetràmer d'avidina. Les 4 molècules de biotina es representen en groc. Els monòmers d'avidina es representen en colors diferents. (B) Interacció entre els monòmers 1 i 2. (C) Interacció entre els monòmers 1 i 3. (D) Interacció entre els monòmers 1 i 4 (rotada 90° respecte a l'eix vertical relatiu a A).<sup>5,7</sup>

### 1.3 Els complexos avidina-biotina (Av-BT) i estreptavidina-biotina (SAv-BT)

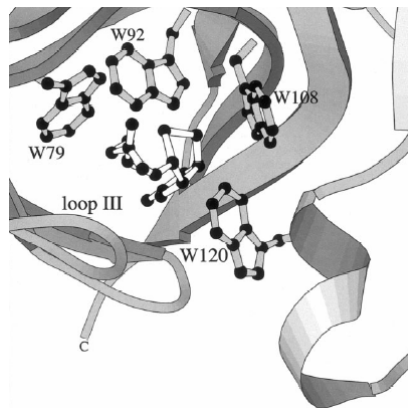
Les associacions de les proteïnes homòlogues avidina i estreptavidina amb el seu lligand natural, la biotina, constitueixen dos dels complexos més estables (excloent els complexos metàl·lics), en què hi participi una molècula de baix pes molecular com és la biotina. Aquests complexos presenten unes constants d'associació de  $2.5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$  en el cas de l'estreptavidina<sup>8</sup> i de  $1.6 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$  en el cas de l'avidina,<sup>8</sup> essent la unió tant forta que es pot considerar pràcticament irreversible. L'alta afinitat de les interaccions no-covalents entre la biotina i l'estreptavidina juntament amb el fet que el grup carboxílic de la biotina es pot derivatitzar sense que impedeixi l'associació forta amb l'avidina o l'estreptavidina, ha permès utilitzar el sistema SAv-biotina en nombroses aplicacions biomèdiques: immunoassajos, cromatografia d'afinitat, kits de diagnòstic, etc.<sup>8</sup>

Les estructures cristal·lines dels complexos avidina:biotina i estreptavidina:biotina donen indicis per explicar la seva alta afinitat. Aquests factors inclouen la formació de múltiples interaccions per pont d'hidrogen i interaccions de van der Waals entre la biotina i la proteïna.

El lloc d'unió de la biotina es troba proper a un dels extrems del barril  $\beta$  (Figura 1), i els residus del lloc d'unió estan disposats de tal manera que formen un espai pràcticament fet a mida per la biotina.

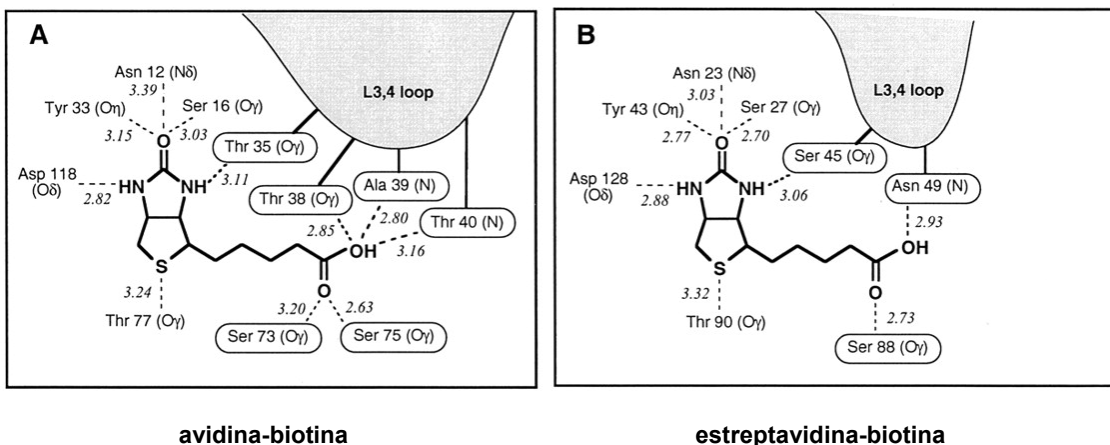
Durant la complexació, la biotina desplaça les molècules de dissolvent, i un dels bucles exposat (L 3,4; el bucle que connecta  $\beta_3$  a  $\beta_4$ , Figura 1) s'ordena i bloqueja la biotina al seu lloc d'unió. En aquest procés, quatre residus d'aminoàcids en el bucle d'avidina i dos en el bucle d'estreptavidina contribueixen a formar interaccions addicionals amb la molècula de biotina (Figura 4).

Els estudis de difracció de raigs X dels complexos biotina-avidina<sup>5</sup> i biotina-streptavidina<sup>4</sup> van demostrar que les interaccions no-covalents lligand-proteïna eren bastant similars en ambdós complexos. Diversos residus aromàtics en el lloc d'unió, quatre en el cas de l'estreptavidina i cinc en el cas de l'avidina, formen una "caixa hidrofòbica" en la qual resideix la molècula de biotina (Figura 3).<sup>9</sup>



**Figura 3:** vista espacial de quatre residus de triptòfan, 79, 92, 108 i 120, envoltant la biotina en el complex que forma amb estreptavidina.<sup>10,11</sup>

A més d'aquestes interaccions hidrofòbiques, el grup ureido de la biotina forma interaccions per pont d'hidrogen crucials amb les cadenes laterals de cinc residus aminoacídics polars.



**Figura 4:** Representació esquemàtica de la xarxa d'interaccions per pont d'hidrogen dels complexos avidina-biotina i estreptavidina-biotina.<sup>12</sup>

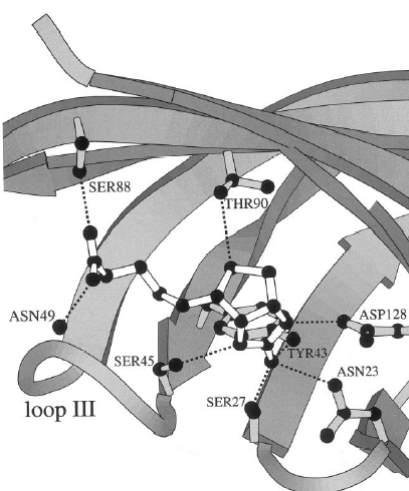


D'altra banda la cadena de valerat de la biotina també presenta interaccions per pont d'hidrogen amb diversos residus aminoacídics, cinc en el cas de l'avidina i dos en el cas de l'estreptavidina (Figura 4).<sup>13</sup>

Aquest major nombre d'interaccions per pont d'hidrogen i hidrofòbiques en el complex avidina-biotina podria explicar la seva major constant d'associació respecte del complex estreptavidina-biotina.

Com a resultat de l'extensiu patró d'interaccions, resultants en part de l'ordenament del bucle L 3,4, la biotina unida es troba essencialment amagada en el complex amb només els oxígens del grup carboxil de valerat parcialment accessibles al dissolvent (Figura 5).

D'altra banda s'han realitzat experiments de valoracions calorimètriques que mostren com la unió de la biotina a estreptavidina està dominada per un terme entàlpic molt favorable ( $\Delta G^\circ = -18.3$  kcal/mol,  $\Delta H^\circ = -32.0$  kcal/mol).



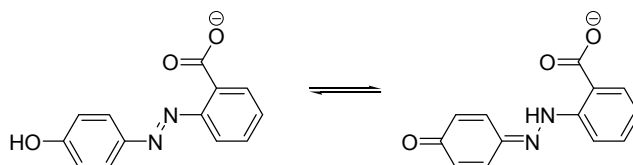
**Figura 5:** Vista espacial de la xarxa d'interaccions per pont d'hidrogen que forma la biotina en el seu lloc d'unió a estreptavidina.<sup>10,11,14</sup>

## 1.4 Altres lligands d'avidina i estreptavidina

### 1.4.1 HABA i derivats

L'àcid 2-(4'-hidroxifenilazo)benzoic (HABA) i alguns dels seus derivats també s'uneixen a avidina i estreptavidina en els mateixos llocs d'unió que la biotina, encara que amb una  $K_a$  inferior ( $K_a = 1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  per avidina i  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  per estreptavidina).<sup>8,15</sup> Aquest compost és molt utilitzat en la tecnologia avidina-biotina ja que permet determinar la quantitat d'avidina i estreptavidina actives capaces d'unir-se a biotina en dissolució.<sup>16,17</sup> Això és possible gràcies a que l'HABA canvia de color (de groc a vermellós) quan s'uneix a Av o SAV, fet que permet utilitzar-lo com a indicador en la determinació de l'activitat d'aquestes proteïnes. Aquest canvi de color és degut al desplaçament de l'equilibri tautomèric des de la forma azo ( $\lambda_{\text{max}} = 345 \text{ nm}$ ) en què es troba la forma lliure, cap a la forma hidrazona ( $\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$ ) en què es troba la forma complexada a Av i SAV (Figura 6). L'addició de biotina a una dissolució del complex Av-HABA o del complex SAV-HABA condueix a la formació

quantitativa dels complexos Av-BT i SAv-BT respectivament, alliberant-se l'HABA (degut a la seva menor  $K_a$ ) dels llocs d'unió. Això porta associat una disminució en l'absorbància a 500 nm que es pot utilitzar per determinar quantitativament l'activitat d'aquestes dues proteïnes.



**Figura 6:** Tautòmers azo i hidrazona de l'HABA a pH = 7.0.

L'HABA s'uneix a avidina i estreptavidina amb una alteració mínima de la geometria dels llocs d'unió. Algunes de les interaccions característiques dels complexos Av-BT i SAv-BT també s'observen en els complexos Av-HABA i SAv-HABA. En aquests complexos s'observa que la posició d'un dels oxígens del carboxilat de l'HABA és molt semblant a la de l'oxigen del grup ureido de la biotina, i forma una xarxa idèntica de tres interaccions per pont d'hidrogen amb els residus Asn12, Ser16 i Tyr33 d'Av, així com amb els residus Asn23, Tyr43 i Ser27 de SAv, formant un oxianió. L'altre oxigen carboxílic de l'HABA forma interaccions per pont d'hidrogen amb Ser16 i Thr35 d'Av i amb Ser27 i Ser45 de SAv, i una interacció per pont d'hidrogen intramolecular amb el nitrogen proper de l'HABA. L'anell d'àcid benzoic també presenta interaccions hidrofòbiques amb els tres residus aromàtics Phe79, Trp9 i Trp110 d'Av.

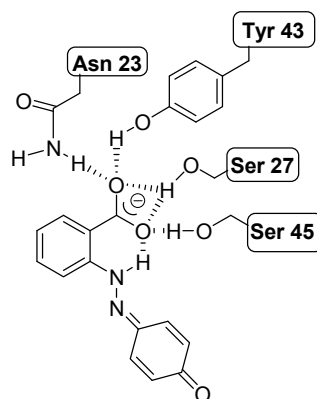
A l'altre extrem de la molècula, l'oxigen hidroxifenílic de l'HABA forma una interacció per pont d'hidrogen amb Ser73 i interaccions hidrofòbiques amb Phe72 d'Av. A més, l'anell hidroxifenílic del lligand es manté proper a l'anell indòlic del Trp70 en Av (Trp79 en SAv) formant un complex de transferència de càrrega, on el triptòfan actua com a donador i l'anell d'hidroxifenil de l'HABA (tautòmer hidrazona) actua com a acceptor.

La unió de l'HABA no immobilitza completament el bucle L 3,4, el qual es troba desordenat en l'estreptavidina lliure, però s'immobilitza en la unió a biotina.<sup>4</sup> Aquest bucle es manté parcialment desordenat en el complex SAv-HABA i permet l'exposició parcial del grup hidroxifenil de l'HABA, encara que les mateixes 5 molècules d'aigua que són desplaçades per la biotina, també ho són per la unió d'HABA.<sup>18</sup>

A diferència de la biotina, on la unió a SAv està dominada pel terme entàlpic, la unió de l'HABA a estreptavidina està dominada pel terme entròpic ( $\Delta G^\circ = -5.27$  kcal/mol,  $T\Delta S^\circ = 6.97$  kcal/mol a 25°C). Això suggereix que, malgrat que les interaccions per pont d'hidrogen tenen una contribució important, les interaccions hidrofòbiques tenen una contribució energètica encara major en la unió de l'HABA.<sup>18</sup>

Quan es comparen les interaccions de l'HABA amb avidina i el seu anàleg bacterià estreptavidina, es poden observar les similituds i diferències en les respectives interaccions i interpretar les variacions observades en les constants de dissociació.<sup>15</sup> Les similituds en les propietats d'unió de l'HABA a les dues proteïnes es manifesten per les interaccions dels oxígens en l'anell de benzoat, les quals són completament anàlogues amb les dues proteïnes. Encara que les interaccions dels residus aromàtics de l'estreptavidina amb HABA no estan descrites amb detall, per analogia amb

avidina, es pot concloure que aquestes interaccions hidrofòbiques són anàlogues a les del complex Av-HABA. Aquestes interaccions involucren els residus Trp92 i Trp108, així com Trp120 del monòmer adjacent, els quals interaccionen amb l'anell benzoat de l'HABA.<sup>15</sup>



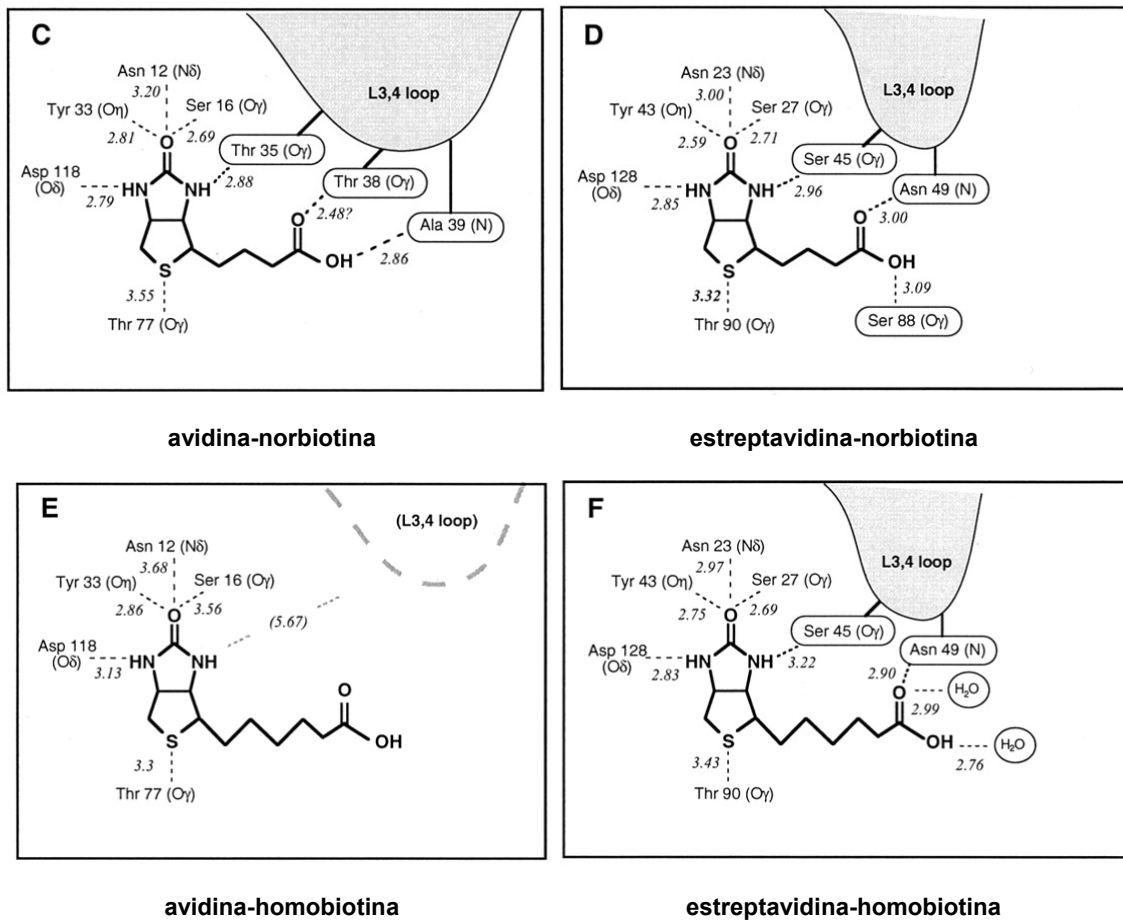
**Figura 7:** Representació esquemàtica de l'HABA unit estreptavidina.<sup>18</sup>

La diferència clau entre les interaccions de l'HABA amb avidina i estreptavidina recau en les dues úniques interaccions entre l'anell hidroxifenílic del colorant i l'avidina; és a dir, les interaccions descrites anteriorment entre els residus veïns Phe72 i Ser73 de l'avidina i l'HABA. Aquestes interaccions no s'observen en el cas de l'estreptavidina. Aquests dos residus estan situats en el bucle entre els fulls  $\beta 5$  i  $\beta 6$  de l'avidina. El bucle corresponent en estreptavidina és quatre residus més llarg que el d'avidina i no té contacte amb l'HABA. La participació d'aquest bucle en la unió de l'HABA a avidina ens recorda el seu paper en la unió de la biotina, el qual es considera que reflecteix les diferències en l'afinitat observada per formar els complexos Av-BT i SAv-BT. És interessant ressaltar que la diferència relativa entre l'afinitat exhibida per les dues proteïnes amb biotina i HABA és molt similar.<sup>15</sup>

#### 1.4.2 Homobiotina i norbiotina

A fi i efecte d'estudiar amb més profunditat la naturalesa dels llocs d'unió de les proteïnes avidina i estreptavidina, s'han estudiat els complexos formats amb anàlegs de la biotina que tinguessin una cadena lateral d'àcid carboxílic de diferent longitud que en la biotina. Concretament s'han estudiat els compostos norbiotina (cadena lateral d'àcid carboxílic de tres metilens) i homobiotina (cadena lateral d'àcid carboxílic de cinc metilens).

La principal diferència estructural entre els monòmers d'Av i SAv recau en la grandària i la conformació dels bucles que connecten els fulls  $\beta$  adjacents. El bucle que connecta les cadenes  $\beta 3$  i  $\beta 4$  (L3,4), és tres residus aminoacídics més llarg en l'avidina que en l'estreptavidina.



**Figura 8:** Representació esquemàtica de la xarxa d'interaccions per pont d'hidrogen en complexos d'avidina i estreptavidina amb diversos lligands derivats de la biotina.<sup>12</sup>

En tots aquests complexos, el sistema bicíclic del lligand presenta interaccions per pont d'hidrogen similars a les que presenta la biotina, essent les diferències més importants les del grup carboxilat del lligand (Figura 8).

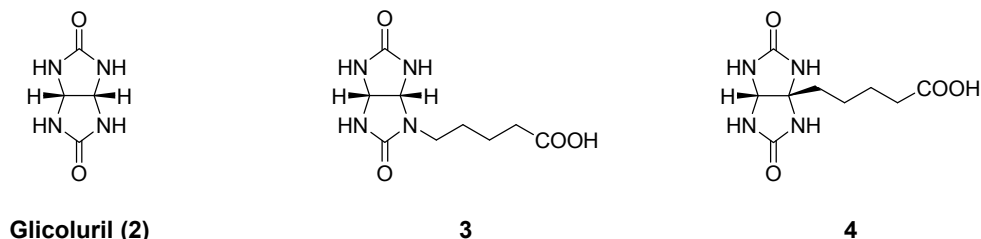
En el cas del complex Av-norbiotina, el grup carboxilat forma només dues interaccions per pont d'hidrogen amb la proteïna (tres menys que la biotina), però malgrat això el bucle L3,4 presenta una conformació tancada similar a la del complex Av-BT (Figura 8C). En canvi en el complex Av-homobiotina, el grup carboxilat no interacciona amb cap residu de la proteïna, i el bucle L3,4 presenta una conformació desordenada (Figura 8E). Aleshores, un dels nitrògens del grup ureido no forma enllaç d'hidrogen amb el bucle L3,4 perquè la distància a Thr35 és massa llarga (5.7 Å).

En canvi en el cas de l'estreptavidina, el fet que el bucle L3,4 sigui més curt, fa que presenti una conformació tancada i ordenada tant en els complexos amb biotina, com amb norbiotina i homobiotina (Figura 8 D i F).

Com a conclusió, podem dir que l'allargament o l'escurçament en un únic metilè de la cadena lateral de la biotina no afecta gaire a les interaccions en el lloc d'unió a l'estreptavidina, però sí que afecta a les interaccions en el lloc d'unió a Av.<sup>12</sup>

### 1.4.3 Glicoluril i derivats

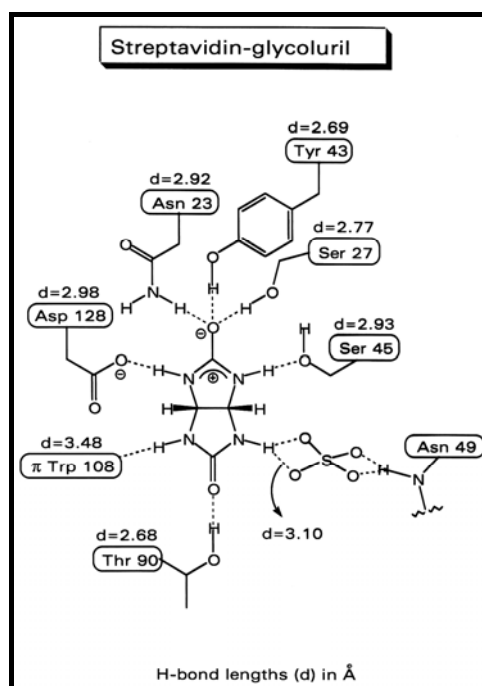
Altres compostos com el glicoluril (**2**), el (+)-Gril-N-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**3**) i el Gril-C-C<sub>4</sub>-COOH (**4**) amb una estructura de tipus biciclo[3.3.0] però que tenen dos grups urea, un en cada cicle, també s'uneixen a Av i SAV tot i que amb constants d'associació inferiors a la biotina (Figura 9).



**Figura 9:** Alguns lligands d'avidina i estreptavidina amb estructura de tipus biciclo[3.3.0]

El glicoluril es pot considerar com un anàleg de la biotina en el qual s'ha substituït el grup CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub> per un segon grup ureido, i a més s'ha suprimit la cadena de valerat. El glicoluril s'uneix a SAV<sup>19</sup> amb una K<sub>a</sub> de 4.7x10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>, i a Av<sup>19</sup> amb una K<sub>a</sub> de 2.2x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>, determinades per valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA. S'ha descrit l'estructura de raigs X del complex SAV-glicoluril, la qual cosa ha permès comparar les interaccions formades en aquest complex respecte a les que es formen en el complex SAV-biotina.<sup>20</sup> Quan es superposa l'estructura cristal·logràfica del complex SAV-glicoluril amb la del complex SAV-biotina, s'observa que les interaccions per pont d'hidrogen del grup ureido de la biotina i del glicoluril amb l'SAV són molt similars (Figura 10).

En el complex SAV-glicoluril, la interacció per pont d'hidrogen entre l'oxigen del grup ureido (O1) i Thr90 reemplaça a la interacció que es formava entre l'àtom de sofre de la biotina i aquest residu. La substitució de l'àtom de sofre de la biotina per un grup carbonil en el glicoluril fa créixer el glicoluril en una direcció; la distància O1-O2' en el glicoluril és de 6.00 Å comparada amb la distància S1-O2' de 5.01 Å en la biotina, i això podria explicar en part la menor afinitat de l'estreptavidina pel glicoluril. Aquesta diferència de longitud es veu compensada per la disminució de la grandària de l'anell de glicoluril degut a què la distància dels enllaços C-N és de 1.33 Å comparada amb la distància dels enllaços C-S de 1.80 Å en la biotina.<sup>20</sup>



**Figura 10:** Esquema de les interaccions per pont d'hidrogen més importants en el complex glicoluril-estreptavidina obtinguda a partir de l'estructura de raigs X del complex.<sup>20</sup>

També s'ha suggerit que la menor afinitat de l'estreptavidina pel glicoluril respecte a la biotina podria ser deguda a l'absència de la cadena lateral de valerat, de manera que es perdrien les interaccions per pont d'hidrogen amb el grup carboxilat i les interaccions de van der Waals amb els metilens de la cadena lateral de la biotina. D'altra banda es va observar que una molècula de sulfat reemplaçava el grup valerat de la biotina en el complex SA<sub>v</sub>-glicoluril, de manera que la interacció per pont d'hidrogen amb el residu Asn49 no es perdria. No obstant això, s'ha observat que la  $K_a$  no varia quan es fa l'experiment en absència de sulfat, la qual cosa ha induït a pensar que l'aigua o algun altre ió fa la seva funció en aquests casos.<sup>20</sup>

Posteriorment s'han descrit derivats del glicoluril que porten incorporada una cadena lateral de valerat unida al N d'un grup ureido (Gril-N-C<sub>4</sub>-COOH, **3**) o bé al C cap de pont (Gril-C-C<sub>4</sub>-COOH, **4**). Al mesurar les  $K_a$  d'aquests compostos s'ha observat que la introducció de la cadena lateral de valerat sobre l'àtom de N (Gril-N-C<sub>4</sub>-COOH, **3**) es tradueix en un petit augment de  $K_a$  (12 vegades superior amb Av i 38 vegades superior amb SA<sub>v</sub>) només quan té l'estereoquímica adequada, és a dir amb el compost (+)-**3**. En canvi el seu enantiòmer ((-)-**3**), amb una estereoquímica no adequada per a unir-se a Av i SA<sub>v</sub>, presenta una disminució de la  $K_a$  (18 cops inferior amb Av i 4 cops inferior amb SA<sub>v</sub>) respecte del propi glicoluril (**2**).<sup>19</sup>

D'altra banda, quan la cadena de valerat està unida al C cap de pont (Gril-C-C<sub>4</sub>-COOH, **4**), la  $K_a$  a Av i SA<sub>v</sub> és encara més inferior a la que presenta el glicoluril (**2**). Això significa que es produeix un augment important en la  $K_a$  (3100 vegades superior amb Av i 23700 vegades superior amb SA<sub>v</sub>) al passar la cadena lateral del C cap de pont (**4**) al N del grup ureido, amb l'estereoquímica apropiada ((+)-**3**).<sup>19</sup>

#### 1.4.4 Derivats de la propandiurea (PDU)

D'altra banda el compost DMPDU-C-C<sub>4</sub>-COOH (**5**), que també té dos grups urea i una cadena de valerats, però en el qual el sistema bicíclic és de tipus biciclo[3.3.1], també s'uneix a Av i SAV en el mateix lloc que la biotina, essent les K<sub>a</sub> de 5.3x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> i 2.8x10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> respectivament, i això malgrat tenir dos substituents metil en el pont més curt, i la cadena de valerats unida al carboni cap de pont.

En el nostre grup s'han sintetitzat altres lligands (Figura 11) amb una estructura de tipus biciclo[3.3.1]<sup>21,22</sup> i una urea a cada cicle (estructura de tipus propandiurea, que anomenarem PDU) en els quals la cadena lateral d'àcid carboxílic es troba unida a un dels àtoms de N, ja que en el cas del glicoluril el derivat *N*-alquilat (+)-**3** té una K<sub>a</sub> a avidina 3100 vegades més gran que el seu anàleg *C*-alquilat (**4**).

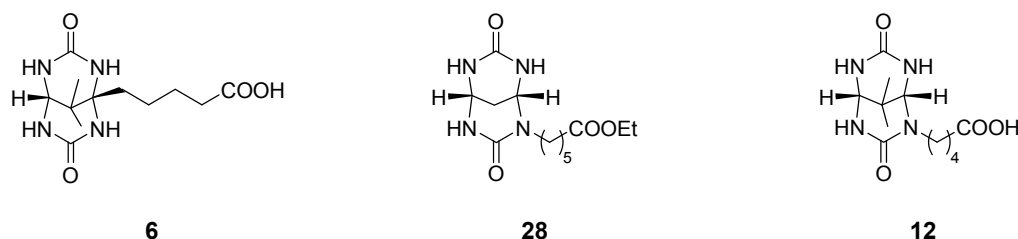


Figura 11: Alguns lligands monovalents amb estructura de tipus biciclo[3.3.1]

### 1.5 Multivalència

En l'última dècada la multivalència ha estat àmpliament estudiada per investigadors de diversos camps. En el camp de la bioquímica degut a què bastantes interaccions biològiques es poden considerar multivalents. Un altre camp és la química supramolecular, on la multivalència ofereix una manera de controlar, dirigir i seleccionar nanoestructures d'auto-ensamblatge funcionals i robustes.<sup>23-29</sup>

La multivalència descriu la unió de dues o més espècies que impliquen la interacció simultània entre múltiples funcionalitats complementàries dins d'aquestes espècies. La valència d'una espècie es defineix com el nombre de connexions separades i del mateix tipus que pot formar, mitjançant interaccions no-covalents, amb una altra espècie amb funcionalitat complementària.<sup>23</sup> La valència d'un complex es defineix com el nombre d'interaccions compartides entre dues espècies que interaccionen. Així es pot parlar de complexos divalents, trivalents, etc. No s'ha de confondre el terme multivalència amb aquells casos en què la interacció entre dues espècies involucra múltiples grups funcionals, ni tampoc amb els casos d'una espècie multivalent que s'uneix a múltiples espècies monovalents (Figura 12).

La unió entre dues entitats multivalents no necessàriament ha de ser multivalent, és a dir intramolecular, sinó que també pot ser intermolecular. Mentre que la interacció multivalent dona lloc a estructures ben definides, la unió intermolecular dona lloc a la formació d'oligòmers i estructures polimèriques (Figura 13).

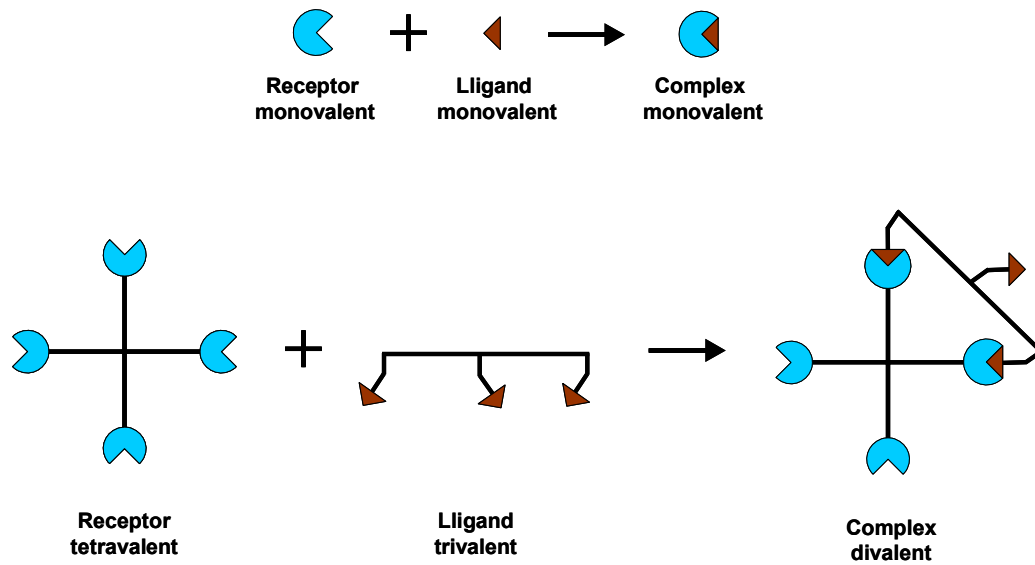


Figura 12: Terminologia de valències.<sup>23</sup>

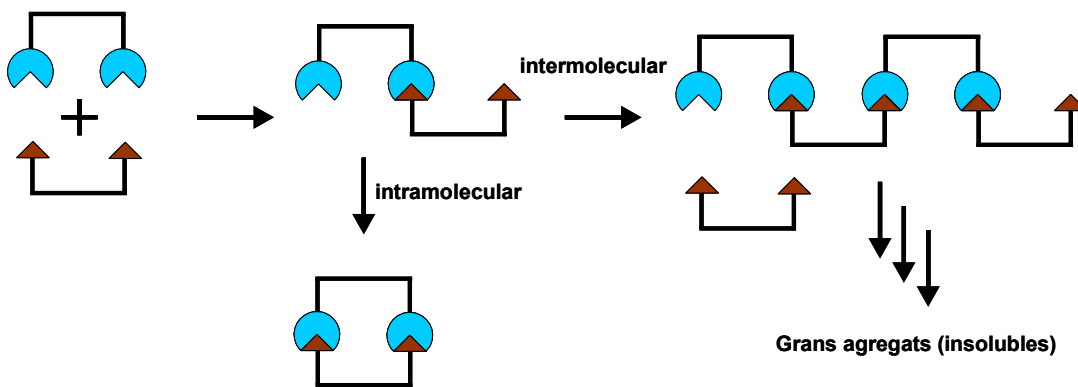


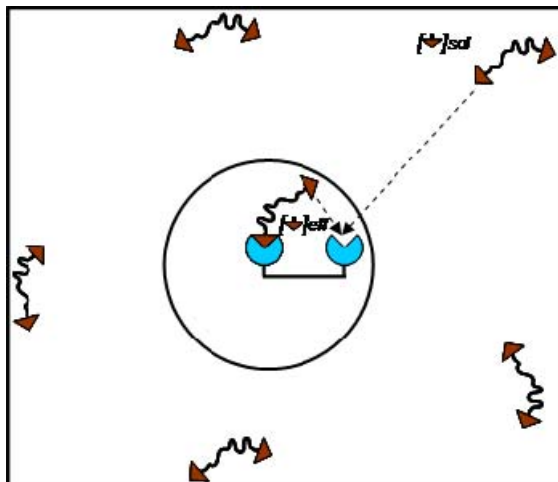
Figura 13: Unió multivalent vs. Intermolecular.<sup>23</sup>

### 1.5.1 Concentració efectiva ( $C_{eff}$ ) i molaritat efectiva (EM)

La multivalència ens porta a introduir el terme de la *concentració efectiva*, el qual ens proporciona una relació entre la longitud i la flexibilitat de l'espaiador i l'energia d'associació. Aquest paràmetre representa la probabilitat d'interacció entre dues entitats complementàries interconnectades i simbolitza una concentració "físicament real" d'una de les entitats, tal com l'experimenta l'entitat complementària corresponent. La primera interacció d'un lligand multivalent amb un receptor multivalent altera la concentració de lligand que experimenta el receptor veí lliure. Si aquesta concentració efectiva ( $C_{eff}$ ) és superior que la concentració real de lligand en solució, la unió intramolecular (multivalent) es trobarà afavorida. En canvi, si la concentració de lligand en solució és superior que la  $C_{eff}$  experimentada pel lloc d'unió del receptor, la unió es produirà probablement de forma intermolecular (Figura 14).<sup>23</sup> Per tant, en el cas d'interaccions multivalents el tipus d'associació



dependrà de la concentració: associació intramolecular afavorida a baixes concentracions i associació intermolecular afavorida a altes concentracions.



**Figura 14:** Representació esquemàtica del concepte de concentració efectiva, posant de manifest l'increment de probabilitat d'interacció per unions intramoleculars. Un lloc d'unió lliure del receptor experimenta una concentració efectiva de lligand  $[L]_{eff}$  en una dissolució amb una concentració de lligand  $[L]_{sol}$ . El cercle puntejat representa l'esfera en la qual el receptor pot trobar-se amb el lligand.<sup>23</sup>

Per a una interacció multivalent formada per diverses interaccions independents, la constant d'associació per la interacció  $n$ -valent,  $K_n$ , és directament proporcional a la constant d'associació intrínseca ( $K_i$ ) i a la concentració efectiva ( $C_{eff}$ ) segons la següent equació:

$$K_n = bK_i^n C_{eff}^{n-1}$$

#### Equació 1

On  $b$  és el factor estadístic que determina el nombre de possibles camins d'associació i dissociació en les etapes següents.

La concentració efectiva és un concepte similar a la molaritat efectiva ( $EM$ ). Tot i que la  $C_{eff}$  quantifica de forma teòrica (a partir de la geometria dels complexos) l'avantatge d'una interacció intramolecular sobre una d'intermolecular, mentre que la  $EM$  ho fa de forma empírica, a partir de la relació entre constants d'associació intramolecular i intermolecular. Aquest avantatge és principalment de tipus entròpic i la  $EM$  podria arribar a ser de l'ordre de  $10^8$  M, concentració que seria físicament inassolible.

Per a una interacció intramolecular  $n$ -valent amb una constant d'associació  $K_n$ , i una constant d'associació intrínseca ( $K_i$ ), la molaritat efectiva ( $EM$ ) ve donada per:

$$EM = \left( \frac{K_n}{bK_i^n} \right)^{1/(n-1)}$$

**Equació 2**

El terme molaritat efectiva s'ha aplicat amb èxit per a indicar la facilitat de ciclació en diverses reaccions,<sup>29,30</sup> la viabilitat de l'auto-ensamblatge en sistemes multi-component,<sup>29,31-33</sup> i com a mesura de l'increment d'afinitat degut a interaccions multivalents.<sup>34-37</sup> En canvi, la concentració efectiva no s'utilitza tant habitualment degut a la dificultat de determinar-la exactament. Malgrat aquestes dificultats, s'ha predit que la concentració efectiva és inversament proporcional a la longitud del espaiador elevada al cub, la qual cosa s'explica per l'increment del volum, on pot trobar-se el lligand confinat i no complexat, amb l'increment de la longitud de l'espaiador.

### 1.5.2 Efectes cooperatius en sistemes multivalents

La deducció de si hi ha efectes cooperatius en la formació d'un complex multivalent no és trivial, i ha conduït a nombroses interpretacions errònies.<sup>35,38,39</sup> Recentment Ercolani<sup>40</sup> ha clarificat el concepte de cooperativitat en interaccions multivalents. Segons Ercolani, per esbrinar si hi ha cooperativitat en una interacció multivalent caldria la deconvolució dels efectes cooperatiu i multivalent. La cooperativitat en sistemes multivalents només es pot avaluar considerant de forma separada i independent els processos intermoleculars i intramoleculars. És a dir, que la cooperativitat només es pot avaluar si les constants d'equilibri que es comparen tenen les mateixes dimensions.

Es poden tenir indicis de la presència d'efectes cooperatius i de la seva extensió comparant les constants d'associació experimentals i estadístiques per a la interacció intramolecular. Si la constant experimental fos superior a l'estadística, tindriem cooperativitat positiva, mentre que en el cas oposat la cooperativitat seria negativa. També es poden tenir indicis de cooperativitat comparant  $EM$  i  $C_{eff}$ . Una  $EM$  bastant inferior a la  $C_{eff}$  seria indicativa d'efectes cooperatius negatius, mentre que una  $EM$  bastant superior a la  $C_{eff}$  seria indicativa d'efectes cooperatius positius. L'avaluació de la cooperativitat en sistemes multivalents requereix comparar quantitativament les constants d'associació multivalent i monovalent, juntament amb les dades de  $\Delta H^\circ$  dels processos multivalent i monovalent.<sup>41-43</sup>

## 1.6 Lligands divalents d'avidina i estreptavidina

En moltes aplicacions del sistema SA<sub>v</sub>-BT,<sup>44,45</sup> per exemple en la preparació de monocapes proteiques basades en polímers amfifílics d'avidina,<sup>46</sup> és desitjable tenir un únic tipus de complex i una arquitectura supramolecular ben definida. Això s'aconsegueix habitualment treballant en condicions de saturació, on els quatre llocs d'unió estan ocupats per molècules de biotina derivatitzades. Malgrat tot, en algunes aplicacions específiques, pot resultar difícil o fins i tot impossible arribar a ocupar els quatre llocs d'unió de SA<sub>v</sub>, donant lloc a la formació de complexos isomèrics així com complexos de diferent estequiometria. En aquest cas l'ús de lligands divalents, és a dir lligands en els quals dues unitats de lligand monovalent es troben unides covalentment a través

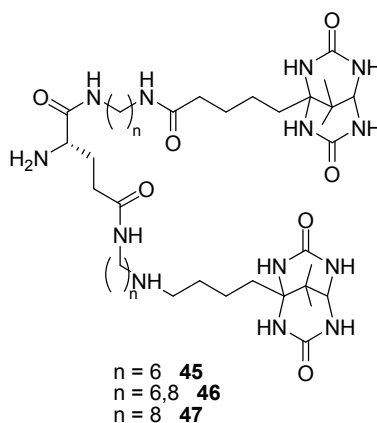
d'un braç espaciador, podria ser avantatjós degut al menor nombre de possibles complexos que es poden formar amb SA<sub>v</sub>. A més, els lligands divalents tindrien una constant d'associació a SA<sub>v</sub> bastant superior a la dels corresponents lligands monovalents.

Alguns treballs previs donen indicis de quina és la llargada òptima que ha de tenir l'espaiador per tal que un lligand s'uneixi divalentment a avidina i a estreptavidina. Així s'han descrit compostos bis-biotinilats que provoquen oligomerització d'Av o SA<sub>v</sub> quan la llargada de l'espaiador no és òptima per a la formació del complex intramolecular,<sup>8,47-49</sup> però generalment són compostos dissenyats per a provocar l'oligomerització d'Av o SA<sub>v</sub>.

Malauradament, les tècniques utilitzades per detectar l'existència d'oligomerització (microscopia electrònica i cromatografia d'exclusió molecular) no donen informació sobre l'estabilitat del complex intramolecular, i només donen indicis de les llargades d'espaiador que minimitzen l'oligomerització.

Una aproximació diferent per tal d'optimitzar la naturalesa de l'espaiador dels lligands divalents d'Av i SA<sub>v</sub> consisteix en substituir les dues unitats de biotina dels extrems del lligand divalent per lligands de menor afinitat.<sup>50</sup> Amb aquests lligands divalents de baixa afinitat es pot mesurar fàcilment la seva constant d'associació a Av i SA<sub>v</sub>. Per tant, en una sèrie de lligands divalents que només difereixin en la naturalesa de l'espaiador, aquell que tingui la constant d'associació a Av o SA<sub>v</sub> més elevada hauria de ser el que portés incorporat l'espaiador òptim de cara a la formació del corresponent complex intramolecular amb aquesta proteïna.

Amb aquest propòsit s'han sintetitzat lligands divalents que incorporessin el lligand monovalent **5** en la seva estructura, degut a la seva moderada constant d'associació a Av i SA<sub>v</sub>, com és el lligand divalent **45** (Figura 15).<sup>19,51</sup>



**Figura 15:** Alguns lligands divalents d'Av i SA<sub>v</sub>.

La comparació de les constants d'associació del lligand **45** ( $K_a = 1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  i  $K_a = 6.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  per SA<sub>v</sub> i Av respectivament)<sup>50</sup> amb les del corresponent lligand monovalent **5** ( $K_a = 2.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  i  $K_a = 5.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  per SA<sub>v</sub> i Av respectivament)<sup>50</sup> semblava indicar que l'espaiador de sis metilens ( $n = 6$ ) del compost **45** ja era bastant adequat per a formar el complex divalent amb SA<sub>v</sub>, però que encara no era l'òptim per a l'Av.



## **2 OBJECTIUS**



Els objectius del present treball es resumeixen a continuació:

1. Síntesi de nous lligands monovalents i estudi de la seva complexació a avidina i estreptavidina. Efecte sobre la constant d'associació de:

- Tipus de sistema bicíclic [3.3.1]: propandiurea (PDU) o dimetilpropandiurea (DMPDU).
- Presència o no de cadena lateral d'àcid carboxílic.
- Posició d'unió de la cadena lateral al sistema bicíclic.
- Llargada de la cadena lateral.
- Derivarització de la cadena lateral en forma d'amida.

2. Síntesi de nous lligands divalents amb una unitat central rígida i espaiadors conformacionalment flexibles de tipus polièter o alquílic. Estudi de la complexació dels lligands divalents sintetitzats a Av i SAV.





## **RESULTATS I DISCUSSIÓ**



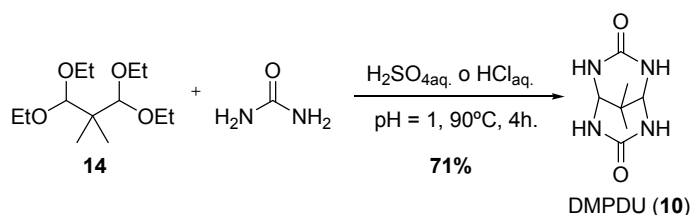
### **3      *LLIGANDS MONOVALENTS***

### 3.1 Síntesi de lligands monovalents: ( $\pm$ )-PDU-*N*-C<sub>n</sub>-COOH (**8**, **9**) i ( $\pm$ )-DMPDU-*N*-C<sub>n</sub>-COOH (**11**, **12**, **13**)

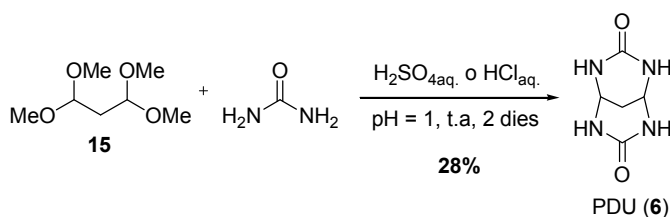
La síntesi d'aquests compostos es va realitzar seguint dues rutes.

#### 3.1.1 Ruta A: *N*-Alquilació de la DMPDU (**10**) o la PDU (**6**) mitjançant $\omega$ -haloèsters.

En primer lloc es van sintetitzar els compostos bicíclics dimetilpropandiurea (**10**) (Esquema 1) i propandiurea (**6**) (Esquema 2) a partir de la condensació dels corresponents dialdehids amb urea en medi àcid.<sup>52</sup>



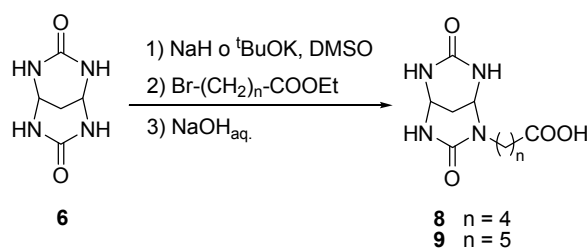
Esquema 1



Esquema 2

A continuació es procedeix a l'alquilació de la propandiurea (**6**) utilitzant com a base NaH o <sup>t</sup>BuOK i un  $\omega$ -haloèster en medi DMSO<sub>anh</sub> (Esquema 3). Cal tenir en compte que la quantitat de base utilitzada és molt important per tal d'evitar polialquilacions, però a la vegada és difícil de controlar ja que es necessita força quantitat de DMSO per dissoldre la propandiurea degut a la seva baixa solubilitat (aprox. 1 mg/mL a 90°C) i és difícil obtenir i mantenir el DMSO totalment anhidre al llarg de la reacció.

Finalment es va dur a terme la saponificació de l'èster obtingut utilitzant hidròxid de sodi per tal d'obtenir l'àcid desitjat (Esquema 3). Aquesta hidròlisi es va dur a terme en condicions suaus, 1.2 equivalents de NaOH i a Temp. ambient, per tal de minimitzar reaccions de trencament del sistema bicíclic.



Esquema 3



Per a la purificació de la barreja mitjançant cromatografia en columna en gel de sílice, es va haver d'utilitzar un eluent molt polar ( $\text{SiO}_2$ ; *n*-BuOH/AcOH/ $\text{H}_2\text{O}$ ; 4/1/1) ja que els compostos sintetitzats eren molt polars i quedaven molt retinguts. Com a conseqüència s'obtenia el producte impurificat amb gel de sílice. Aleshores es va procedir a realitzar una esterificació de Fisher, amb  $\text{MeOH}_{\text{anh}}$  i catàlisi d'àcid *p*-toluensulfònic, ja que l'èster metílic és més fàcil de purificar mitjançant HPLC en fase reversa (Kromasil C18,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ).

Aleshores es va saponificar l'èster metílic amb NaOH 2M obtenint-se l'àcid desitjat (**11**, **12** i **13**) en forma de racèmic. Com que l'àcid desitjat s'obté en forma de racèmic, amb la qual cosa cadascun dels enantiòmers pot tenir una constant d'associació amb Av i SA<sub>v</sub> diferent, es va procedir a la resolució dels racèmics ( $\pm$ )-**8** i ( $\pm$ )-**12** mitjançant HPLC amb una columna amb fase estacionària quiral (Chirobiotic T, ASTEC Inc) per tal d'obtenir una petita quantitat de cadascun dels enantiòmers i poder mesurar la seva constant d'associació a les proteïnes Av i SA<sub>v</sub>.

Aquesta ruta B no dona bons resultats quan s'intenten obtenir els compostos de la sèrie PDU-*N*-C<sub>n</sub>-COOH ja que el propandial, al tenir hidrògens en posició  $\alpha$  als grups aldehyd, dona preferentment pirimidones (**19** i **20**) com a productes de condensació.

## 3.2 Síntesi de lligands monovalents units a espaiadors conformacionalment flexibles

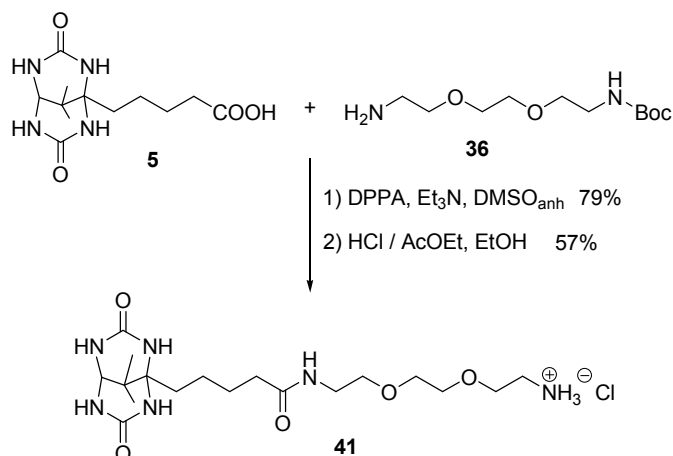
Els lligands monovalents descrits presenten la característica de tenir una cadena d'àcid carboxílic, amb la qual cosa poden formar interaccions per pont d'hidrogen amb els residus aminoacídics de la proteïna. D'altra banda, els lligands descrits a l'apartat 1.6 de la introducció, els quals s'havien sintetitzat en el grup,<sup>50,51</sup> consten de dues unitats de lligand monovalent unides a un espaiador a través del grup àcid carboxílic del lligand monovalent derivatitzat en forma d'amida. Per aquest motiu era interessant veure l'efecte que produïa sobre la constant d'associació d'un lligand monovalent, el fet que el grup àcid carboxílic es trobés derivatitzat en forma d'amida. En aquest sentit es va pensar en l'acoblament del lligand DMPDU-C-C<sub>4</sub>-COOH (**5**) a dos espaiadors de tipus diamina per tal de generar la corresponent amida, tal com s'exposa a continuació.

### 3.2.1 Síntesi del compost **41**

Seguint el procediment desenvolupat en el nostre grup,<sup>54</sup> el lligand monovalent **5** es va acoblar amb l'espaiador 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbammat de *tert*-butil (**36**) utilitzant difenilfosforilazida (DPPA) com agent d'acoblament en medi de DMSO i en presència de  $\text{Et}_3\text{N}$  (Esquema 6).

El producte **40** es va obtenir amb un 79% de rendiment, després de purificar-lo mitjançant columna cromatogràfica ( $\text{SiO}_2$ ) i posteriorment a través de HPLC en fase reversa (Kromasil C18,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ; 1/1).

A continuació, el grup amino protegit en forma de Boc es va desprotegir en medi HCl en AcOEt i EtOH durant 24 hores. Aleshores es va purificar el compost a través de HPLC en fase reversa (Kromasil C18,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ; 9/1) obtenint-se l'hidroclorur **41** amb un 57% de rendiment (Esquema 6).

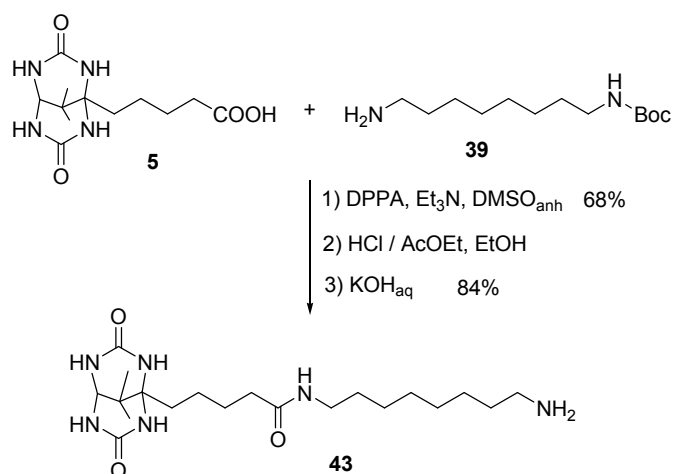


Esquema 6

Per tal d'obtenir el producte **41** en forma neutra, s'ha basificat a pH = 10 amb una dissolució de KOH<sub>aq.</sub> i s'ha purificat cromatogràficament a través de fase estacionària polimèrica (MCI Gel CHP20P) eluint amb H<sub>2</sub>O (per eliminar les sals) i barreges de H<sub>2</sub>O/MeOH per eluir el compost en forma d'amina neutra.

### 3.2.2 Síntesi del compost 43

Anàlogament a com s'havia procedit en l'apartat anterior, es va acoblar el lligand monovalent **5** a l'espaiador 8-aminooctilcarbamat de *tert*-butil (**39**) utilitzant DPPA com agent d'acoblament en medi de DMSO i en presència de Et<sub>3</sub>N. El producte **42** es va obtenir amb un 68% de rendiment després de purificar-lo mitjançant columna cromatogràfica (SiO<sub>2</sub>) i posteriorment a través de HPLC en fase reversa (Kromasil C18, H<sub>2</sub>O/MeOH; 3/7) ja que hi ha restes de DPPA que són difícils de separar si no és a través de HPLC (Esquema 7).



Esquema 7

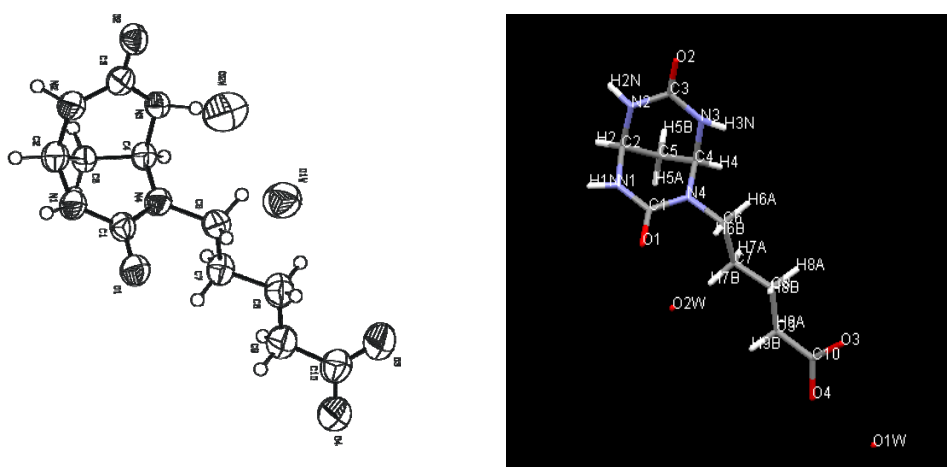
A continuació l'extrem amino protegit en forma de Boc es va desprotegir amb HCl en AcOEt i EtOH. Tot seguit, un tractament amb base va generar l'amina lliure, la qual es va purificar

cromatogràficament a través d'una fase estacionària polimèrica (MCI Gel CHP20P, H<sub>2</sub>O/MeOH; 1/0, 1/1, 3/7). D'aquesta manera s'obtingué el compost **43** amb un 84% de rendiment (Esquema 7).

### 3.3 Estructures cristal·lines de compostos de tipus PDU-*N*-C<sub>*n*</sub>-COOH (*n* = 4,5)

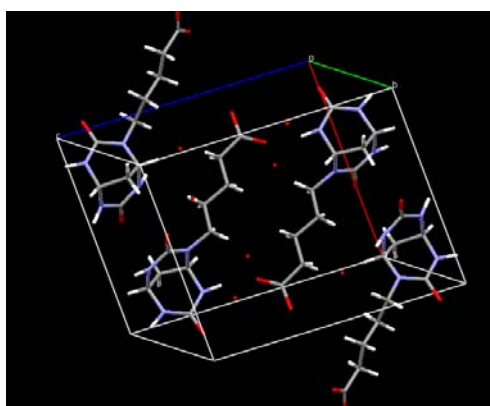
S'han intentat diferents mètodes per tal d'obtenir monocristalls dels compostos PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH (**8**) i PDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (**9**), com ara la difusió d'un co-dissolvent o bé l'evaporació lenta del dissolvent. No obstant això, els millors resultats s'han obtingut per evaporació lenta d'una dissolució aquosa del lligand.

#### 3.3.1 Estructura del compost PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH (**8**)



**Figura 16:** Vistes espaials del lligand PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH (**8**) a través dels programes ORTEP i Mercury respectivament.

El compost PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH (**8**) cristal·litza amb el sistema monoclínic, amb una molècula del compost i una molècula d'aigua per unitat asimètrica (Figura 16). El grup espacial és P2<sub>1</sub>/a, la qual cosa indica que existeix un eix binari perpendicular a un pla de simetria de manera que la cel·la unitària conté quatre posicions equivalents, i per tant quatre molècules del compost (Figura 17).



**Figura 17:** Empaquetament del lligand PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH (**8**) dins la cel·la unitària.



A continuació es descriuen les característiques més importants d'aquest compost.

#### Grup ureido:

Els grups ureido són aproximadament planars. El carbonil del grup ureido disubstituit té una distància d'enllaç de 1.22 Å, mentre que en el del grup ureido trisubstituit és de 1.27 Å. Aquests valors són lleugerament inferior i superior al del grup ureido de la biotina (1.25 Å)<sup>55</sup> i als de la PDU (**6**) (dC-O = 1.24 Å).<sup>52</sup> D'altra banda, les distàncies entre el carboni carbonílic i els nitrògens del grup ureido disubstituit (C3-N2 i C3-N3) són de 1.35 Å, les quals són molt similars a les de la PDU<sup>52</sup> i de la biotina<sup>55</sup> (1.34 Å). Aquesta distància disminueix a 1.33 Å per al N1-C1, mentre que augmenta a 1.37 Å per al N4-C1, és a dir, quan el nitrogen es troba unit a la cadena de valerat.

#### Sistema bicíclic:

Al passar d'un sistema bicíclic de tipus [3.3.0] a un de tipus [3.3.1] disminueix l'angle que formen els carbonils dels dos grups ureidos, i això fa que la distància entre els oxígens dels dos grups ureido també sigui menor. És a dir, que el sistema bicíclic de tipus [3.3.1] queda lleugerament més tancat que el de tipus [3.3.0]. Així doncs, mentre que en el glicoluril (**2**) la distància entre els O carbonílics és de 6.0 Å,<sup>56</sup> en la PDU (**6**) és de 5.4 Å.<sup>21,22,52</sup>

Quan aquests sistemes bicíclics estan monoalquilats, la distància augmenta però la tendència es manté. Així doncs, en la PDU-N-C<sub>4</sub>-COOH (**8**) la distància entre els O carbonílics és de 5.6 Å, mentre que per la PDU és de 5.4 Å. Això posa de manifest que la presència de la cadena lateral, produeix un lleuger estirament del sistema bicíclic i un augment de l'angle que formen els eixos que contenen els grups oxígens carbonílics de cada cicle. Si comparem els angles que formen els grups carbonílics dels dos grups ureido, s'observa que per al lligand PDU-N-C<sub>4</sub>-COOH (**8**) es forma un angle de 112°, mentre que per la PDU és de 99.9°, per al glicoluril és de 124° i per un compost de tipus glicoluril amb cadena lateral de glutarat Gril-N-C<sub>3</sub>-COOH, l'angle que es forma és de 119.1°.<sup>57</sup> En canvi, en la biotina (**1**), (dO-S = 5.01 Å) l'angle és de 104°.<sup>55</sup>

#### Cadena lateral:

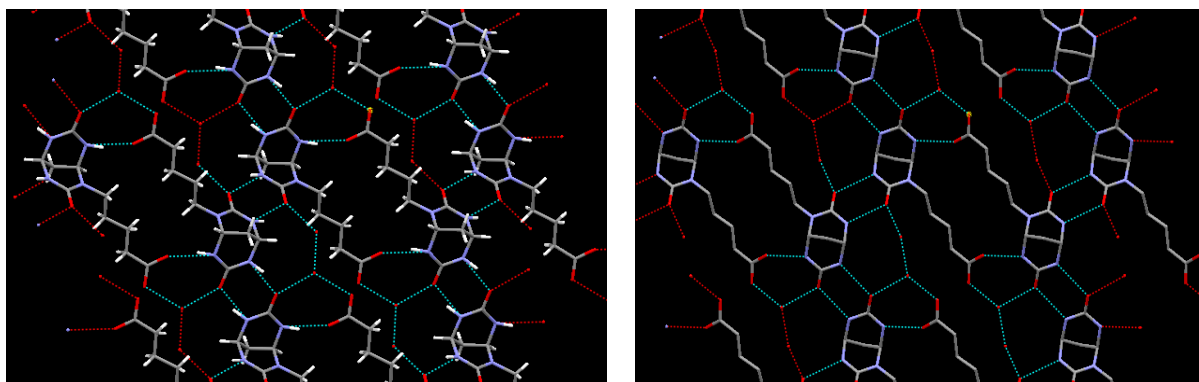
La conformació de la cadena lateral de valerat en el compost PDU-N-C<sub>4</sub>-COOH (**8**) és antiperiplanar, amb angles de torsió N4-C6-C7-C8 de 174.7°, C6-C7-C8-C9 de 167.1° i C7-C8-C9-C10 de 177.7°.

Els dos àtoms d'oxigen del grup àcid carboxílic es troben un d'ells en posició antiperiplanar (angle de torsió C8-C9-C10-O4 de 171.7°) i l'altre sinperiplanar (angle de torsió C8-C9-C10-O3 de -5.2°).

#### Interaccions per pont d'hidrogen intermoleculars:

Les molècules del compost PDU-N-C<sub>4</sub>-COOH (**8**) estan associades mitjançant interaccions per pont d'hidrogen entre els grups ureido formant cadenes, amb distàncies d'enllaç d(D...A) 2.93 Å per a N1-H...O1 i d(D...A) 2.89 Å per a N2-H...O2. Aquestes interaccions per pont d'hidrogen formen una estructura cíclica de 6 baules molt estable, la qual cosa confereix una bona ordenació de l'estructura cristal·lina (Figura 18).

D'altra banda, cada molècula d'una cadena interacciona directament amb una molècula de la cadena veïna mitjançant una doble interacció per pont d'hidrogen entre un oxigen del grup àcid carboxílic i un NH de l'altra molècula ( $d(\text{H}\dots\text{A})$  2.83 Å per a N3-H...O3) (Taula 2). L'altre oxigen del grup àcid carboxílic també interacciona amb dos àtoms d'oxigen ureídics de dues molècules diferents de la cadena veïna, però ho fa de manera indirecta, a través de molècules d'aigua que fan de pont entre les molècules. Això permet que les interaccions entre dues molècules de cadenes veïnes puguin ser especialment intenses (dos ponts d'hidrogen directes i dos més d'indirectes).

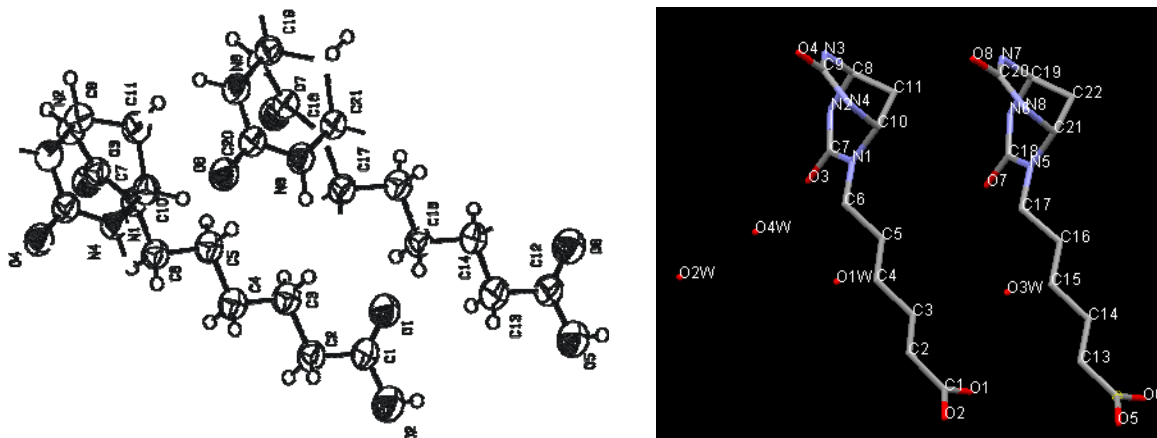


**Figura 18:** Visió espacial de les interaccions per pont d'hidrogen que es produeixen en la xarxa cristal·lina del compost PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH (**8**). Imatges aconseguïdes a través del programa Mercury 1.4.2 (Cambridge, Soft.). En la imatge de la dreta, obtinguda a través de l'eix b, s'ometen els H per a més claredat.

D	--H	..A	$d(\text{H}\dots\text{A})$	$d(\text{D}\dots\text{A})$	$\angle(\text{DHA})$
<b>N(1)</b>	<b>--H(1N)</b>	<b>..O(1)</b>	2.078(16)	2.929(4)	147.4(18)
<b>N(2)</b>	<b>--H(2N)</b>	<b>..O(2)</b>	2.111(17)	2.887(4)	136(2)
<b>N(3)</b>	<b>--H(3N)</b>	<b>..O(3)</b>	1.984(15)	2.830(4)	146.6(15)

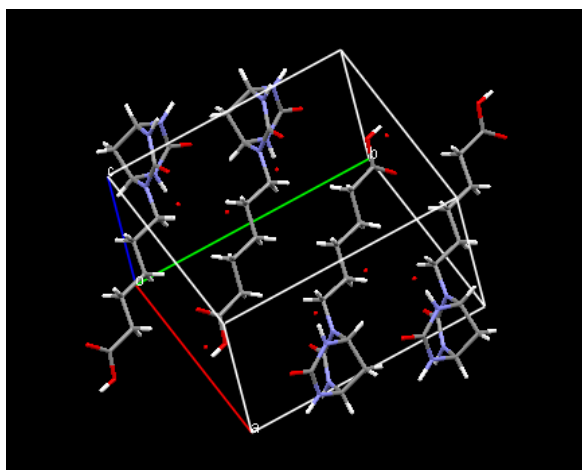
**Taula 2:** Distàncies (Å) i angles (°) de les interaccions per pont d'hidrogen del compost PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH (**8**).

### 3.3.2 Estructura del compost PDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (9)



**Figura 19:** Vistes espaials de dues molècules del lligand PDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (9), les quals conformen la unitat de simetria, a través dels programes ORTEP i Mercury respectivament.

El compost PDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (9) cristal·litza amb el sistema triclínic, amb dues molècules del compost i dues molècules d'aigua per unitat asimètrica (Figura 19). El grup espacial és P-1, la qual cosa indica que tan sols existeix un centre d'inversió, de manera que la cel·la unitat conté dues posicions equivalents i per tant quatre molècules del compost (Figura 20). Aquest fet es podria atribuir a què al augmentar la longitud de la cadena lateral, al compost li consti més d'empaquetar-se, amb la qual cosa hi hagi menys simetria que amb el compost anterior.



**Figura 20:** Empaquetament del lligand PDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (9) dins la cel·la unitària.

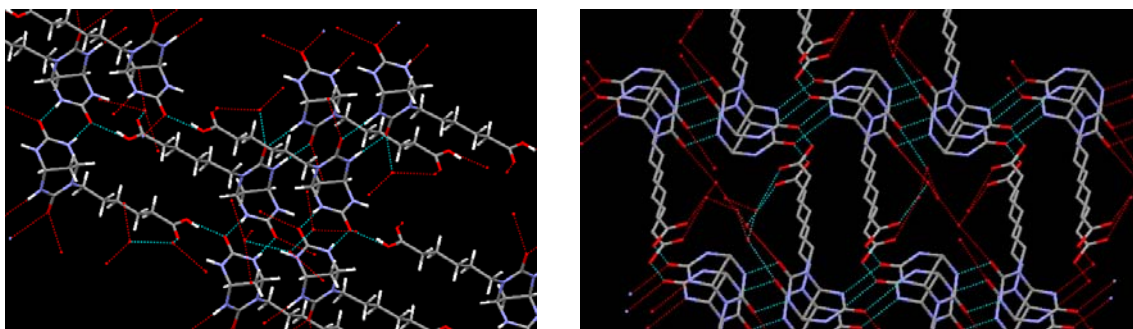
Els paràmetres geomètrics dels grups ureido i sistema bicíclic del compost PDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (9) són bastant similars als descrits anteriorment per al compost PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH (8) (Figura 21, Taula 3).

El compost PDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (9) té un metilè addicional en la cadena de valerat, però també adopta una conformació antiperiplanar anàloga a la del compost PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH (8), amb uns angles de torsió N1-C6-C5-C4 de 176.1°, C6-C5-C4-C3 de 176.2°, C5-C4-C3-C2 de 178.3° i C4-C3-C2-C1 de 178.6°.

Segons s'ha trobat experimentalment, els grups carbonílics del grup ureido del lligand **9** formen interaccions per pont d'hidrogen intermoleculars amb els nitrògens disubstituïts, anàlogament a com ho feia el compost **8**, amb distàncies  $d(D...A)$  2.92 Å per a N2-H...O7,  $d(D...A)$  2.85 Å per a N4-H...O8,  $d(D...A)$  2.93 Å per a N6-H...O3 i  $d(D...A)$  2.84 Å per a N8-H...O4. Aquestes interaccions per pont d'hidrogen també formen una estructura cíclica de sis baules molt estable, la qual cosa confereix una bona ordenació de l'estructura cristal·lina (Figura 21).

De la mateixa manera a com s'havia observat en el compost **8**, el fet d'afegir una cadena lateral al sistema bicíclic, provoca un augment de la distància entre els O carbonílics dels grups ureido, disminuint l'angle que formen aquests grups carbonílics. Així doncs la distància i l'angle entre els grups carbonílics és de 5.6 Å i  $108^\circ$  per al lligand **9**, mentre que per la PDU és de 5.4 Å i  $99.9^\circ$  respectivament.<sup>21,22,52</sup>

La principal diferència respecte al compost **8**, la trobem en la cadena lateral d'àcid carboxílic. El fet d'allargar-la en un metilè provoca que les interaccions del grup àcid carboxílic siguin diferents. Així doncs, s'observa com el O2-H del grup carboxílic interacciona amb el O4 d'un grup ureido de forma intermolecular a una distància de  $d(D...A)$  2.59 Å per a O2-H...O4, mentre que l'altre O1 utilitza una molècula d'aigua per a interaccionar amb un O3 d'un altre grup ureido (Figura 21). En canvi amb el lligand **8**, la interacció del O2 es produïa amb un N d'un grup ureido adjacent.



**Figura 21:** Visió espacial de les interaccions per pont d'hidrogen que es produeixen en la xarxa cristal·lina del lligand PDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (**9**). Imatges aconseguides a través del programa Mercury (Cambridge, Soft.). En la imatge de la dreta, obtinguda a través de l'eix b, s'ometen els H per a més claredat

D	--H	..A	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(2)	--H(2)	..O(4)	1.79	2.592(2)	167
N(2)	--H(2N)	..O(7)	1.964(19)	2.917(3)	173.3(19)
N(3)	--H(3N)	..O(1)	2.27(2)	3.175(3)	162.8(17)
N(4)	--H(4N)	..O(8)	1.936(19)	2.852(2)	171(2)
O(5)	--H(5)	..O(8)	1.80	2.606(2)	170
N(6)	--H(6N)	..O(3)	1.825(18)	2.929(2)	171.1(17)
N(7)	--H(7N)	..O(6)	2.23(2)	3.210(3)	161.3(15)
N(8)	--H(8N)	..O(4)	1.913(19)	2.841(2)	162.1(18)

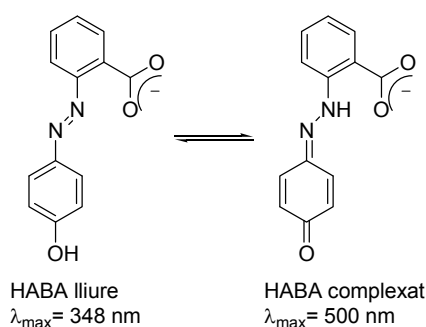
**Taula 3:** Distàncies (Å) i angles (°) de les interaccions per pont d'hidrogen del compost PDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (**9**).

### 3.4 Estudis de complexació dels lligands monovalents a avidina i estreptavidina

#### 3.4.1 Mètodes emprats en la determinació de les constants d'associació dels lligands monovalents a avidina i estreptavidina.

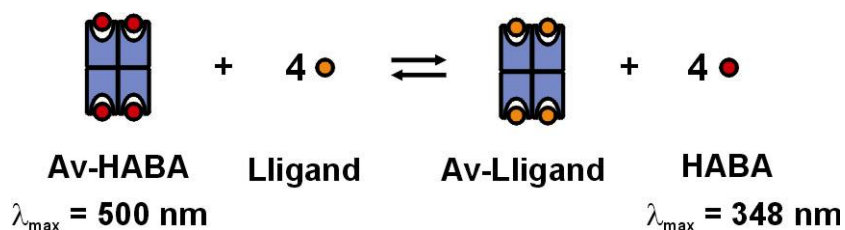
##### 3.4.1.1 Valoració espectrofotomètrica competitiva

Per tal de comprovar que els lligands monovalents sintetitzats s'uneixen a Av i SAV i amb quina afinitat ho fan, es va utilitzar l'àcid 2-(4'-hidroxifenilazo)benzoic (HABA), el qual s'ha demostrat que s'uneix a Av i SAV en els mateixos llocs d'unió que el seu lligand natural, la biotina. Aquest colorant, en la seva forma lliure, presenta un màxim d'absorció a 348 nm, el qual es desplaça a 500 nm quan s'uneix a Av o SAV (Esquema 8).<sup>16</sup>



Esquema 8

L'addició de qualsevol dels lligands sintetitzats a una dissolució d'HABA i qualsevol de les proteïnes, Av o SAV, provoca un decreixement de la banda a 500 nm i un augment de la banda a 348 nm, la qual cosa ens indica que aquests lligands s'uneixen en els mateixos llocs d'unió que l'HABA i consegüentment que la biotina, desplaçant el colorant del seu lloc d'unió (Esquema 9). Com que les constants d'associació de l'HABA amb Av i SAV són conegudes ( $K_a = 1.7 \times 10^5$  i  $7.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , respectivament),<sup>8,18</sup> les constants d'associació dels nous lligands a Av i SAV es podrien mesurar mitjançant experiments de competició amb HABA.



Esquema 9

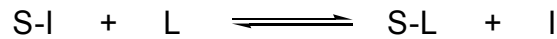
A continuació s'exposen els models utilitzats.

### 3.4.1.1.1 Model d'unió i equacions per una valoració competitiva amb un lligand enantiomèricament pur (lligand únic)

Suposant que els quatre llocs d'unió de cada proteïna (Av o SAV) es comportin de manera independent (sense efectes cooperatius), la competició entre l'indicador (I) i el lligand (L) per la proteïna tetramèrica es pot considerar equivalent a una competició de I i L pel lloc d'unió que hi ha en una subunitat proteica (Esquema 10). Per tant es podran aplicar les equacions del model de complexació 1:1.<sup>50</sup>



Esquema 10



$$[I] = \frac{I_t}{1 + K_{IS}[S]} \quad [IS] = K_{IS}[S][I]$$

$$[L] = \frac{L_t}{1 + K_{LS}[S]} \quad [LS] = K_{LS}[L][S]$$

$$[S] = \frac{S_t}{1 + K_{IS}[I] + K_{LS}[L]}$$

on:

$I_t$ : concentració total de l'indicador (HABA)

$S_t$ : concentració total de subunitats de proteïna

$L_t$ : concentració total de lligand

$[I]$ : concentració d'indicador lliure (HABA)

$[S]$ : concentració de subunitats de proteïna lliures

$[L]$ : concentració de lligand lliure

$[IS]$ : concentració d'indicador complexat

$[LS]$ : concentració de lligand complexat

$K_{IS}$ : constant d'associació de l'indicador

$K_{LS}$ : constant d'associació del lligand

Per a cada lligand, es representa l'absorbància experimental a 500 nm ( $A_{500}$ ) envers la relació [ligand]/[subunitats proteïna]. De l'ajust de l'absorbància calculada ( $A_{calc}$ ) a l'absorbància experimental (Equació 3), s'obté el valor òptim de la constant d'associació entre S i L ( $K_{SL}$ ).<sup>58,59</sup>

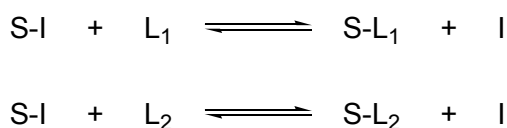
$$A_{calc} = \varepsilon_{I(500)} [I] + \varepsilon_{SI(500)} [SI]$$

## Equació 3

### 3.4.1.1.2 Model d'unió i equacions per una valoració competitiva amb un lligand racèmic (o una barreja de dos lligands)

Es troba descrit que quan la valoració mitjançant  $^1\text{H-RMN}$  d'un receptor racèmic amb un lligand racèmic condueix a desplaçaments químics promitjats, es podran deduir les dues constants d'associació dels dos complexos diastereomèrics, sempre i quan es pugui deduir la relació entre aquestes dues constants a partir d'un altre experiment independent.<sup>60</sup>

En el cas molt habitual en què un lligand en forma de racèmic s'uneix a un receptor quiral enantiomèricament pur (per exemple, una proteïna), cadascun dels enantiòmers ( $L_1$  i  $L_2$ ) del lligand pot unir-se de forma independent a la proteïna (Esquema 11).



## Esquema 11

Inclús en el cas que s'obtingui una única resposta promig per als dos complexos diastereomèrics també és possible obtenir simultàniament les dues constants d'associació ( $K_{L_1S}$  i  $K_{L_2S}$ ) d'ambdós lligands enantiomèrics. Aquestes dues constants d'associació es poden obtenir mitjançant una única valoració del receptor enantiomèricament pur amb el lligand racèmic.<sup>19,61</sup>

El model d'unió descrit a continuació també pressuposa que els quatre llocs d'unió de cada proteïna (Av o SAV) es comportin de manera independent, sense efectes cooperatius, de manera que es puguin aplicar les equacions del model de complexació 1:1. Però ara hi ha dos lligands ( $L_1$  i  $L_2$ ) que competeixen amb l'indicador (I) pel lloc d'unió que hi ha a cada subunitat proteica (S).

$$\begin{array}{ll} [I] = \frac{I_t}{1 + K_{IS}[S]} & [IS] = K_{IS}[S][I] \\ [L_1] = \frac{L_{1t}}{1 + K_{L_1S}[S]} & [L_1S] = K_{L_1S}[L_1][S] \\ [L_2] = \frac{L_{2t}}{1 + K_{L_2S}[S]} & [L_2S] = K_{L_2S}[L_2][S] \end{array}$$



$$[S] = \frac{S_t}{1 + K_{IS}[I] + K_{L1S}[L_1] + K_{L2S}[L_2]}$$

on  $I_t$ ,  $S_t$ ,  $[S]$ ,  $[IS]$  i  $K_{IS}$  són com en l'apartat 3.4.1.1.1 (model d'unió de lligand únic)

$L_{1t}$ : concentració total del lligand 1 (o enantiòmer 1)

$L_{2t}$ : concentració total del lligand 2 (o enantiòmer 2)

$[L_1S]$ : concentració del lligand 1 complexat

$[L_2S]$ : concentració del lligand 2 complexat

$K_{L1S}$ : constant d'associació del lligand 1

$K_{L2S}$ : constant d'associació del lligand 2

L'ajust de la variació de l'absorbància calculada ( $A_{\text{calc}}$ , Equació 3) a la variació de l'absorbància experimental al llarg de la valoració ens proporciona simultàniament les constants d'associació ( $K_{L1S}$  i  $K_{L2S}$ ) dels dos lligands enantiomèrics.

Òbviament aquesta metodologia no ens indica a quin enantiòmer del lligand correspon cada constant d'associació, però presenta el gran avantatge de proporcionar les constants d'associació i l'enantioselectivitat dels dos lligands enantiomèrics en una única valoració del receptor amb el lligand racèmic. Aquesta metodologia permet fer una selecció ràpida dels lligands obtinguts en forma de racèmic, sense haver de separar els dos enantiòmers. Només aquells lligands racèmics que presentin una constant d'associació o activitat apropiada prosseguiran cap a la següent etapa de resolució del racèmic.

Finalment, la valoració amb els lligands òptims enantiomèricament purs hauria de permetre confirmar les constants d'associació abans obtingudes, així com assignar-les al corresponent enantiòmer del lligand.

### 3.4.1.2 Valoració espectrofluorimètrica

#### 3.4.1.2.1 El fenomen de la luminiscència

El fenomen de la luminiscència consisteix en l'emissió de fotons des d'estats electrònics excitats.<sup>62</sup> Pot ser de dos tipus depenent de la naturalesa de l'estat fonamental i els estats excitats (Figura 22). La fluorescència és l'emissió que resulta d'una transició electrònica des d'un estat excitat singlet a l'estat fonamental i és una transició permesa quànticament. El temps de vida de fluorescència és el temps promig que un fluoròfor roman a l'estat excitat. La fosforescència és l'emissió que resulta de la transició entre estats de diferent multiplicitat, normalment des d'un estat excitat triplet a l'estat fonamental singlet. Aquestes transicions no són permeses i, per aquesta raó, els temps de fosforescència són més llargs que els de fluorescència.

A l'estat fonamental, el primer i el segon estats electrònics excitats (representats per  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ) el fluoròfor pot existir a diferents nivells vibracionals (0, 1, 2, etc.). Quan un fluoròfor absorbeix llum, s'excita cap als estats  $S_1$  ó  $S_2$  i, normalment, les molècules relaxen fins al nivell vibracional de més baixa energia de  $S_1$ , en un procés que rep el nom de conversió interna. La transició electrònica des d'aquest estat fins al fonamental ( $S_0$ ) constitueix el fenomen de la fluorescència. Hi ha molècules que quan es troben a  $S_1$ , poden experimentar una conversió cap al primer triplet excitat ( $T_1$ ) i des d'aquest estat té lloc l'emissió. La conversió de  $S_1$  a  $T_1$  s'anomena creuament entre sistemes (la transició en sentit contrari és prohibida) i l'emissió des de  $T_1$  rep el nom de fosforescència i té lloc a  $\lambda$  més elevades respecte a la fluorescència.

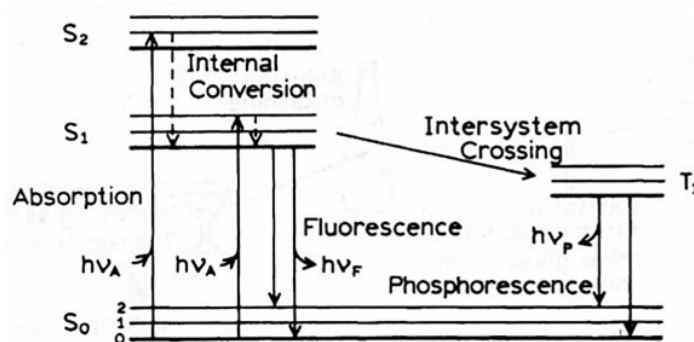


Figura 22: Diagrama de Jablonski on es representen els nivells d'energia d'absorció i d'emissió de la radiació.

#### 3.4.1.2.2 Espectres d'emissió i excitació

L'espectre d'emissió s'obté com a resultat de la mesura de l'emissió en un rang de longituds d'ona com a conseqüència de l'excitació a una determinada longitud d'ona. En canvi, l'espectre d'excitació representa la dependència de la intensitat d'emissió a una longitud d'ona determinada quan es fa un escombrat de longituds d'ona d'excitació. En absència de reaccions o transferència d'energia a l'estat excitat, l'espectre d'excitació hauria de ser pràcticament idèntic a l'espectre d'absorció del fluoròfor. Normalment, en aquests espectres es representa la intensitat de fluorescència en funció de la longitud d'ona (expressada en nm). Per tal d'obtenir uns bons espectres

és recomanable dividir el senyal que prové del detector per un senyal de referència per tal de minimitzar les fluctuacions de la font de radiació i obtenir mesures de fluorescència més acurades.

### 3.4.1.2.3 Temps de vida de fluorescència i rendiment quàntic

El temps de vida de fluorescència i el rendiment quàntic són potser les característiques més importants d'un fluoròfor. El rendiment quàntic és la relació entre el nombre de fotons emesos i el nombre de fotons absorbits. El temps de vida d'un estat excitat es defineix com el temps promig que una molècula es passa a l'estat excitat abans de retornar a l'estat fonamental.

La intensitat de fluorescència pot decreïxer degut a diversos processos. Aquest fenomen es coneix com "quenching". El quenching per col·lisió es dóna quan un fluoròfor a l'estat excitat es desactiva després del contacte amb una altra molècula en dissolució. Les molècules no són químicament alterades per aquest procés. En aquests casos, la disminució de fluorescència ve descrita per l'equació de Stern-Volmer (Equació 4):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

Equació 4

on:

$F_0$  és la fluorescència inicial

$F$  és la fluorescència en un moment determinat

$K$  és la constant de quenching de Stern-Volmer

$k_q$  és la constant de quenching bimolecular

$\tau_0$  és el temps de vida del fluoròfor en absència de "quencher"

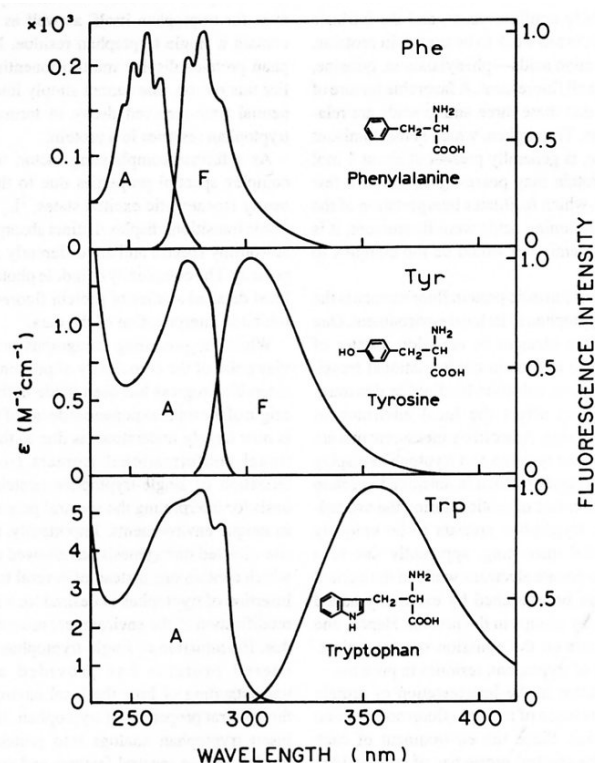
$[Q]$  és la concentració de quencher

El mecanisme de quenching varia segons el parell fluoròfor-quencher.

### 3.4.1.2.4 Fluorescència de proteïnes

Les proteïnes contenen tres aminoàcids<sup>63-65</sup> que poden ser fluorescents: Tyr, Trp i Phe. Un fet favorable per a l'estudi de proteïnes a través de fluorescència és que aquests tres aminoàcids són poc freqüents en proteïnes, en concret, el Trp que és l'aminoàcid fluoròfor que més s'utilitza, només és present en un 1% en proteïnes. D'aquesta manera s'obtenen espectres més senzills. Cal destacar que la fluorescència del Trp és altament depenent de l'entorn en què es trobi, per aquest motiu pot canviar en funció de si la proteïna s'associa amb algun lligand, o bé es desplega l'estructura quaternària, etc. En aquest sentit, el Trp sembla ser únicament sensible a efectes de quenching per col·lisió, aparentment degut a la tendència de l'anell d'indole a donar electrons en el seu estat excitat.<sup>66</sup>

Els espectres d'absorció i d'emissió d'aquests tres aminoàcids es detallen a la Figura 23.



**Figura 23:** Espectres d'absorció (A) i emissió (F) dels aminoàcids aromàtics en dissolució aquosa a pH = 7.<sup>62</sup>

L'emissió de les proteïnes es troba dominada pel Trp, el qual absorbeix a la  $\lambda$  més alta i presenta el coeficient d'extinció més elevat. Per aquest motiu, l'energia d'absorció de la Phe i la Tyr es transfereix normalment als residus de Trp de la mateixa proteïna. El rendiment quàntic de fluorescència de Phe és baix i difícilment s'observa en proteïnes.<sup>66</sup>

L'absorció de les proteïnes a 280 nm és deguda als residus de Tyr i Trp, essent per sobre de 290 nm deguda fonamentalment al Trp. Per tant, a 290 nm es pot excitar majoritàriament el Trp sense afectar a la Tyr.

L'emissió de la Tyr en medi aquós té lloc a 303 nm i és bastant poc sensible a la polaritat del dissolvent. El màxim d'emissió del Trp en medi aquós es troba a 348 nm i és, en canvi, altament depenent de la polaritat de l'entorn. La fluorescència de la majoria de proteïnes està dominada pels residus de Trp, ja que l'anell d'indole és un grup fluoròfor amb un rendiment quàntic de fluorescència molt elevat i molt sensible, a efectes de dissolvent i d'entorn. D'altra banda, tot i presentar una gran absorció a 280 nm i tenir un rendiment quàntic considerable, l'emissió de Tyr en moltes proteïnes sovint no és detectable. Hi ha diverses raons que justifiquen aquest fet, per exemple es pot produir transferència d'energia cap al Trp, o bé la seva emissió pot veure's disminuïda o del tot eliminada (*"quenching"*) a causa de grups de la cadena peptídica propera a l'espai (grups carboxil o amino). El mecanisme de *"quenching"* està probablement relacionat amb una transferència del protó del grup fenòlic de la cadena lateral de Tyr, ja sigui a l'estat fonamental o a l'estat excitat. A més a més, en les proteïnes, el grup hidroxil podria estar formant interaccions per pont d'hidrogen amb grups amida i això faria que la Tyr no fos fluorescent.

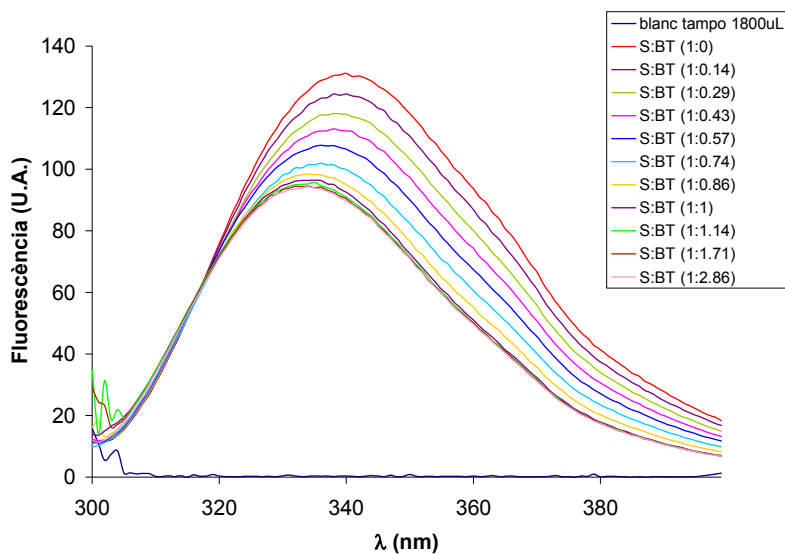
Entre els factors que afecten a l'espectre d'emissió de les proteïnes cal destacar la seva estructura tridimensional. Així per exemple, la desnaturalització de les proteïnes provoca un augment en l'emissió deguda a la Tyr. En canvi, en el cas del Trp, la polaritat del dissolvent s'ha de tenir molt present ja que la interacció de l'anell indòlic amb els grups polars provoca una disminució de l'emissió de fluorescència. D'altra banda, els espectres d'emissió de proteïnes també es poden veure afectats per la unió de substrats i reaccions d'associació, observant-se desplaçaments en els màxims d'emissió i canvis d'intensitat d'emissió.

#### **3.4.1.2.5 Interaccions lligand-proteïna**

Hi ha dues possibles situacions que es poden explorar per a l'estudi de les interaccions lligand-proteïna: la fluorescència de la proteïna pot canviar per unió d'un lligand o pot ser la fluorescència del lligand la que canviï. També es pot donar el cas que totes dues experimentin modificacions, la qual cosa conduiria a complicacions en el tractament de les dades. Aquesta situació es pot evitar escollint longituds d'ona d'excitació i d'emissió en què les contribucions de les dues espècies no es superposin.<sup>67</sup>

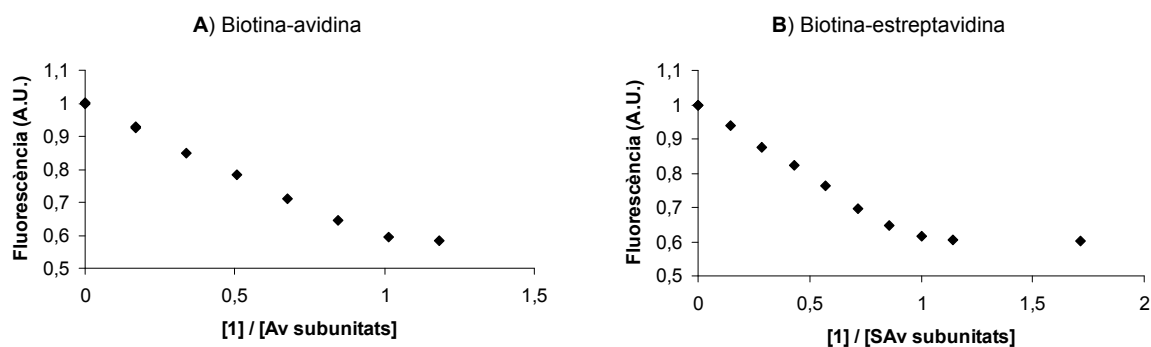
Tant l'avidina com l'estreptavidina contenen grups Trp en el lloc d'unió de la biotina, tal com s'ha descrit a partir de les estructures de raigs X. Com a conseqüència, la unió de la biotina a avidina i estreptavidina va acompanyada d'una disminució de la intensitat de fluorescència de la proteïna, degut a la modificació de l'entorn en què es troben els residus de Tyr i Trp.<sup>68,69</sup> Aquestes observacions, combinades amb la coneguda alta afinitat que hi ha entre aquestes proteïnes i la biotina, han permès desenvolupar un assaig per tal de determinar la quantitat de proteïna activa que hi ha en una dissolució. L'experiment consisteix en addicionar petits volums d'una dissolució de biotina de concentració coneguda sobre una dissolució que conté avidina o estreptavidina, realitzant mesures després de cada addició. La mostra s'excita a 290 nm i la fluorescència emesa es mesura a 350 nm. Les addicions es continuen fins que no s'observa variació de la fluorescència mesurada, la qual cosa ens indica que s'ha arribat al punt d'equivalència en el qual totes les subunitats de proteïna es troben complexades per biotina (Figura 24).<sup>70</sup>

Aquest mètode proporciona la manera més ràpida i sensible de determinar la concentració de proteïna activa que hi ha en mostres que contenen material relativament pur. Per aquest motiu és el mètode que hem utilitzat per valorar les dissolucions de proteïna comercial.



**Figura 24:** Representació de la disminució de fluorescència (“*quenching*”) d’una dissolució de SAv 0.36  $\mu\text{M}$  (subunitats) per addicions successives de biotina 41  $\mu\text{M}$ . Longitud d’ona d’excitació ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) = 290 nm.

Aquest experiment s’ha dut a terme cada dia abans de realitzar la resta de mesures de fluorescència amb els compostos d’interès, ja que d’aquesta manera sabem la concentració efectiva de la dissolució de proteïna que s’utilitzarà per a la resta de mesures (Figura 25).



**Figura 25:** Representació de la disminució de fluorescència normalitzada a  $\lambda = 350$  nm al adicionar biotina (1) per tal de determinar la concentració activa d’avidina (A) i estreptavidina (B). Longitud d’ona d’excitació ( $\lambda$ ) = 290 nm.

### 3.4.1.2.6 Determinació de constants d’associació

Les valoracions espectrofluorimètriques són una metodologia molt útil per a la determinació de constants d’associació ( $K_a$ ) a l’estat fonamental. Els avantatges de la fluorescència sobre les mesures d’absorbància són: la més elevada sensibilitat i selectivitat (es pot evitar el senyal d’altres molècules que presenten absorció). A més a més, en les mesures de fluorescència es necessita molta menys

proporció de fluoròfor per aconseguir la mateixa sensibilitat que en les mesures d'absorbància, de manera que es poden detectar concentracions més baixes d'aquest.<sup>68,69</sup> Això fa que sigui especialment útil en el cas de complexos de  $K_a$  elevada.

L'addició de lligands a Av i SAV pot anar acompanyada d'un decreixement de la intensitat de fluorescència de la proteïna, similar al provocat per l'addició de biotina (Figura 24).<sup>68,69</sup>

En el cas de la biotina, la representació de la intensitat de fluorescència envers la relació molar lligand/proteïna, hem vist que dóna lloc a una recta degut a l'elevada  $K_a$  del complex Av-BT i SAV-BT. No obstant això, en el cas de complexos (S)Av-ligand de menor  $K_a$ , cal esperar que aquesta representació sigui una corba, i que de l'ajust de la corba teòrica (deduïda a partir del model d'associació) a la corba experimental es pugui deduir el valor de la  $K_a$  del complex.

El model utilitzat també suposa que els llocs d'unió de la proteïna es comporten de manera independent (sense efectes cooperatius) de manera que es puguin utilitzar les equacions del model d'unió 1:1.



Esquema 12

$$K_d = \frac{[S][L]}{[SL]}$$

Equació 5

La relació entre la concentració i la propietat espectroscòpica mesurada, en aquest cas la intensitat de fluorescència, ve donada per l'expressió:<sup>58,71</sup>

$$F_i = F_S + F_{SL} = f_S [S] + f_{SL} [SL]$$

Equació 6

que representa la contribució de la intensitat de fluorescència de la proteïna lliure ( $F_S$ ) i la contribució del complex ( $F_{SL}$ ).  $F_i$  és el valor d'intensitat de fluorescència en cada mesura,  $[S]$  la concentració de subunitats de proteïna a l'equilibri,  $[SL]$  la concentració del complex a l'equilibri, i  $f_S$  i  $f_{SL}$  són les constants de proporcionalitat.

Tenint en compte que:

$$[S] = S_t - [SL]$$

Equació 7

$$[L] = L_t - [SL]$$

Equació 8

on  $L_t$  i  $S_t$  són les concentracions totals de L i S respectivament, la reorganització d'aquestes equacions condueix a l'expressió:

$$F_i = f_S(S_t - [SL]) + f_{SL}[SL] = f_S S_t + (f_{SL} - f_S)[SL]$$

**Equació 9**

i a partir del l'expressió de la constant d'equilibri, es pot deduir:

$$[SL] = \frac{[S][L]}{K_d} = \frac{(S_t - [SL])(L_t - [SL])}{K_d} = \frac{S_t L_t - S_t [SL] - L_t [SL] + [SL]^2}{K_d}$$

**Equació 10**

Si escrivim l'Equació 10 en forma d'equació de segon grau, s'obté una expressió del tipus:

$$0 = S_t L_t - (S_t + L_t + K_d)[SL] + [SL]^2$$

**Equació 11**

on  $[SL]$  és la incògnita que es resol com una equació de segon grau. Aillant  $[SL]$  de l'Equació 11 i substituint en l'expressió Equació 9, s'obté la següent expressió:

$$F_i = f_S S_t + \frac{(f_{SL} - f_S)}{2} \left[ (L_t + S_t + K_d) - \sqrt{(L_t + S_t + K_d)^2 - 4L_t S_t} \right]$$

**Equació 12**

Per cada lligand, es representa la fluorescència experimental a 350 nm ( $F_i$ ) envers la relació [ligand]/[subunitats proteïna]. De l'ajust de la fluorescència calculada ( $F_{calc}$ ) a la fluorescència experimental (Equació 12), s'obté el valor òptim de la constant de dissociació ( $K_d$ ) del complex SL.

La constant de proporcionalitat  $f_s$  es calcula a partir de la fluorescència inicial de la dissolució de proteïna, en absència de lligand (Equació 13).

$$f_S = \frac{F_0}{S_t}$$

**Equació 13**

D'altra banda, la constant de proporcionalitat  $f_{SL}$  es calcula a partir de la fluorescència al final de la valoració, suposant que la proteïna es troba totalment complexada i, per tant, que la concentració de complex és igual a la concentració total de proteïna (Equació 14).

$$f_{SL} = \frac{F_{final}}{[SL]} = \frac{F_{final}}{S_t}$$

**Equació 14**



Sempre que ha estat possible, els valors de  $K_a$  s'han determinat pel mètode de competició amb HABA exposat prèviament, el mateix mètode que s'havia utilitzat per a compostos similars descrits anteriorment.<sup>19,50</sup>

En les valoracions amb lligands monovalents, el fet que les corbes de valoració calculades i les experimentals s'ajustin raonablement bé dona suport a la suposició inicial de què els llocs d'unió es comporten de manera independent, sense efectes cooperatius, essent correcta la utilització de les equacions corresponents al model dels complexos 1:1.

### 3.4.2 Complexos de lligands monovalents de tipus dimetilpropandiurea (DMPDU) amb SAV

Lligand	$K_a$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta G$ ( $kJ\ mol^{-1}$ )	ES
DMPDU (10)	$1.6 (\pm 0.3) \times 10^2$	$-12.5 \pm 0.5$ <sup>(a)</sup>	
DMPDU-C-C <sub>4</sub> -COOH (5)	$2.8 (\pm 0.2) \times 10^3$	$-19.6 \pm 0.2$ <sup>(a)50</sup>	
DMPDU-N-C <sub>4</sub> -COOH (+)-12	$4.3 (\pm 0.2) \times 10^5$ $5.3 (\pm 0.3) \times 10^5$	$-32.1 \pm 0.1$ <sup>(a)</sup> $-32.6 \pm 0.2$ <sup>(b)</sup>	570
DMPDU-N-C <sub>4</sub> -COOH (-)-12	$7.5 (\pm 2.5) \times 10^2$ $\leq 1.0 \times 10^3$	$-14.2 \pm 2.8$ <sup>(a)</sup> $\geq -17.1$ <sup>(b)</sup>	
DMPDU-N-C <sub>5</sub> -COOH (±)-13	$5.3 (\pm 0.3) \times 10^5$ i $\leq 1.0 \times 10^3$	$-32.6 \pm 0.2$ i $\geq -17.1$ <sup>(b)</sup>	$\geq 530$
DMPDU-C-C <sub>4</sub> -CONH-O <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> (41)	$2.3 (\pm 0.1) \times 10^3$	$-19.1 \pm 0.1$ <sup>(a)</sup>	
DMPDU-C-C <sub>4</sub> -CONH-C <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub> (44)	$3.8 (\pm 0.1) \times 10^3$	$-20.4 \pm 0.1$ <sup>(a)51</sup>	

**Taula 4:** Constants d'associació de lligands monovalents de tipus DMPDU a estreptavidina a pH = 7.0.

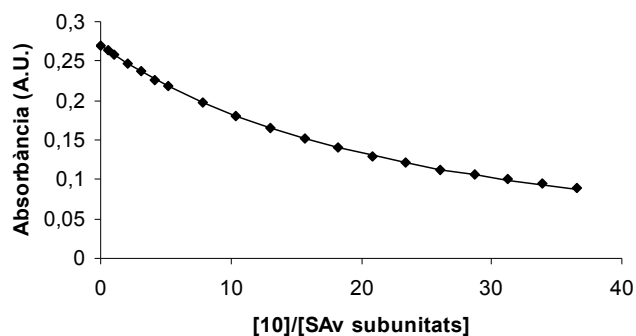
<sup>(a)</sup> Valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA

<sup>(b)</sup> Valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA amb el lligand racèmic.

Tal com ja s'ha indicat a la introducció,<sup>19,50</sup> el compost DMPDU-C-C<sub>4</sub>-COOH (5), que conté un sistema bicíclic de tipus [3.3.1], s'uneix a l'estreptavidina amb una  $K_a$  de  $2.8 \times 10^3\ M^{-1}$ . El fet que la cadena de valerat es trobi unida a la posició del C cap de pont, fa que el compost sigui aquiral i fàcil de sintetitzar.

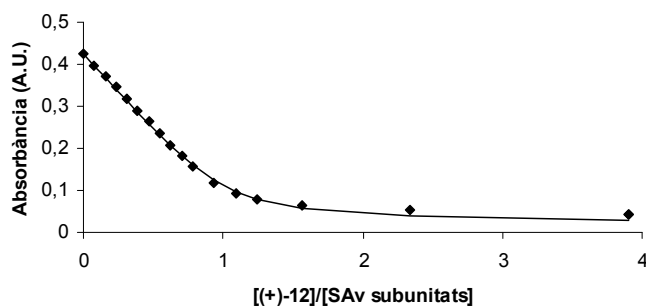
Segons s'ha vist amb lligands de tipus glicoluril, els quals tenen una estructura bicíclica de tipus [3.3.0], passar de tenir la cadena de valerat unida al C cap de pont a tenir-la unida al N del grup ureido es tradueix en un important augment de  $K_a$ , però només si l'estereoquímica és l'adequada.<sup>19</sup> Així doncs, en passar del Gril-C-C<sub>4</sub>-COOH (4) ( $K_a = 76\ M^{-1}$ ) al (+)-Gril-N-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-3) ( $K_a = 1.8 \times 10^6\ M^{-1}$ ) l'augment en la  $K_a$  a SAV és d'unes 23700 vegades. En aquest sentit, vam considerar interessant veure si en els lligands derivats de la dimetilpropandiurea (DMPDU) es produiria també un augment considerable en la  $K_a$  al passar la cadena de valerat del C cap de pont al N del grup ureido.

Tot i que abans es va determinar la  $K_a$  a SAV d'un compost de referència que tingués el mateix sistema bicíclic de tipus [3.3.1], però sense la cadena lateral de valerat. Aquest compost de referència, la DMPDU (**10**), va resultar tenir una  $K_a = 1.6 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$  (Figura 26, Taula 4). D'altra banda, el compost amb el mateix sistema bicíclic però amb una cadena de valerat unida al C cap de pont, la DMPDU-C-C<sub>4</sub>-COOH (**5**), presenta una  $K_a$  a SAV de  $2.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .<sup>50</sup> És a dir que la introducció d'una cadena de valerat en la posició C cap de pont de la DMPDU es tradueix en un augment de 17 vegades en la seva  $K_a$  a SAV.

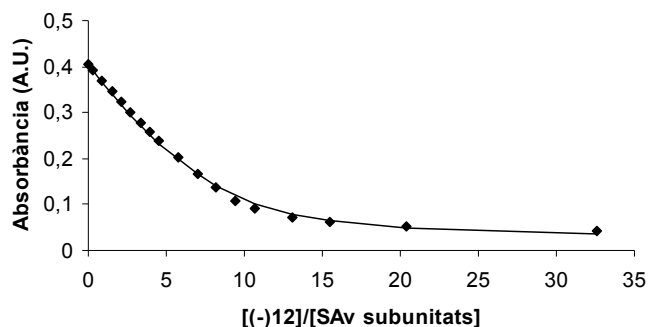


**Figura 26:** Canvis d'absorbància a 500 nm en la valoració de SAV 28.8  $\mu\text{M}$  (tetràmer) i HABA 40.2  $\mu\text{M}$  amb el lligand DMPDU (**10**). La línia contínua representa l'ajust de les dades al model d'unió (1:1).

Al considerar el compost DMPDU-N-C<sub>4</sub>-COOH (**12**) cal tenir en compte que és un compost quiral, i cal suposar que els dos enantiòmers tindran una  $K_a$  diferent. Per aquest motiu es van mesurar les  $K_a$  dels enantiòmers purs separatament i es va observar com l'enantiòmer dextrorotatori ((+)-**12**) era el que presentava l'estereoquímica més favorable per unir-se a SAV, ja que presentava una constant d'associació ( $K_a = 4.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) 570 cops més elevada que l'enantiòmer levorotatori ((-)-**12**,  $K_a = 7.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ ) (Figura 27 i Figura 28). Això representa una enantioselectivitat (*ES*), definida com la relació entre les  $K_a$  dels dos enantiòmers a un mateix receptor, de 570 (Taula 4).



**Figura 27:** Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració de SAV 53.2  $\mu\text{M}$  (tetràmer) i HABA 48.3  $\mu\text{M}$  amb l'enantiòmer dextrorotatori del lligand DMPDU-N-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**12**) en tampó fosfats 0.1 M, pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1.



**Figura 28:** Canvis en l'absorbància a 500 nm en la valoració de SAv 47.6  $\mu$ M (tetràmer) i HABA 53.8  $\mu$ M amb l'enantiòmer levorotatori del lligand DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((-)-**12**) en tampó fosfats 0.1 M, pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades al model d'unió (1:1). Aquest ajust es va obtenir tenint en compte que el lligand levorotatori estava impurificat amb un 10% de lligand dextrorotatori i tenint en compte el corresponent valor de constant d'unió a la proteïna. Aquest fet va ser confirmat per anàlisi d'HPLC-MS amb fase estacionària quiral.

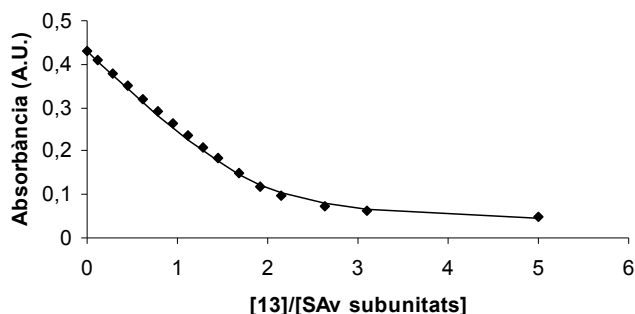
Al comparar el lligand (+)-DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**12**) amb el lligand DMPDU (**10**) s'observa que la introducció de la cadena de valerat sobre el N del grup ureido provoca un augment de 150 vegades en la  $K_a$  a SAv. En canvi en el cas del seu enantiòmer (-)-DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((-)-**12**) l'augment és de només 4 vegades. És a dir, que la introducció de la cadena de valerat sobre la DMPDU (**10**), tant si s'uneix al carboni cap de pont, com si s'uneix al nitrogen del grup ureido, sempre condueix a un augment de la  $K_a$  a SAv. Tot i que aquest augment és petit quan la cadena de valerat s'uneix a un dels nitrògens amb l'estereoquímica desfavorable (enantiòmer (-)), és una mica major quan s'uneix al carboni cap de pont, i bastant més gran quan s'uneix a un dels nitrògens amb l'estereoquímica favorable (enantiòmer (+)).

Per veure si un petit augment de la llargada de la cadena lateral es podia traduir en un augment de  $K_a$ , es va determinar la  $K_a$  dels dos enantiòmers del lligand DMPDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (**13**) fent la valoració amb el racèmic i utilitzant les equacions descrites a l'apartat 3.4.1.1.2. Prèviament s'havia comprovat fent la valoració de SAv amb el lligand ( $\pm$ )-**12** que els dos valors de  $K_a$  obtinguts per aquest mètode concordaven bastant bé amb els obtinguts a partir dels enantiòmers purs, fet que donava validesa a l'aplicació d'aquest mètode per a aquest tipus de compostos.

Els resultats obtinguts amb el racèmic ( $\pm$ )-**13** indiquen que un dels enantiòmers té una constant d'associació ( $K_a = 5.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) aproximadament igual o lleugerament superior a la del lligand (+)-**12**, i de l'altre enantiòmer només es pot concloure un límit superior de  $K_a \leq 1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Per tant, l'efecte sobre la  $K_a$  a SAv d'allargar en un metilè la cadena de valerat és pràcticament negligible (Figura 29).

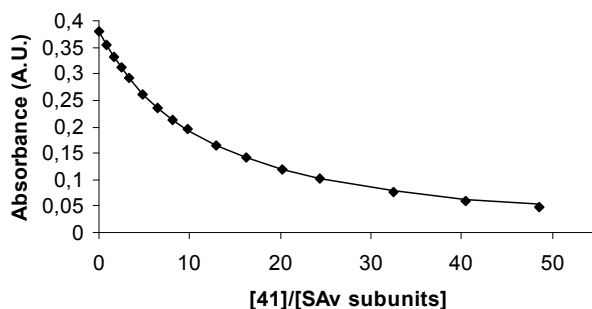
Cal destacar que les valoracions espectrofluorimètriques amb els lligands de tipus dimetilpropandiurea, DMPDU (**10**) i els seus derivats *C*- i *N*- alquilats (**5**, ( $\pm$ )-**12**, ( $\pm$ )-**12**), no van donar bons resultats perquè no es va observar disminució de fluorescència deguda a la interacció amb els grups Trp de la proteïna. Per tant, no es va poder avaluar la  $K_a$  utilitzant el mètode espectrofluorimètric descrit a l'apartat 3.4.1.2.6. En tot cas s'hauria de buscar alguna modificació del mètode o introduir un competidor, però amb aquests tipus de lligands no va ser necessari ja que s'han

pogut determinar totes les  $K_a$  per valoracions espectrofotomètriques competitives utilitzant HABA com a competidor.



**Figura 29:** Canvi d'absorbància a 500 nm en la valoració de SAV 44.8  $\mu\text{M}$  (tetràmer) i HABA 59.0  $\mu\text{M}$  amb el lligand DMPDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (( $\pm$ )-**13**) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. Aquest ajust es va obtenir amb el model que considera els dos enantiòmers del racèmic i calcula les constants d'associació separatament.

D'altra banda es va voler avaluar l'efecte que produiria el fet de derivatitzar el grup àcid carboxílic del compost **5** amb el grup amino d'un espaiador de tipus polièter o alquílic (compostos **41** i **44** respectivament), ja que s'havia descrit a la literatura que al derivatitzar el grup carboxilat de la biotina en forma d'amida, s'observava una disminució d'uns dos ordres de magnitud en la  $K_a$  a SAV.<sup>5</sup> No obstant això, l'estudi de la interacció dels compostos **41** i **44**<sup>51</sup> amb SAV no va mostrar un canvi significatiu en la  $K_a$  (Figura 30 i Taula 4) respecte del compost **5**.



**Figura 30:** Canvi d'absorbància a 500 nm en la valoració de SAV 52.2  $\mu\text{M}$  (tetràmer) i HABA 34.4  $\mu\text{M}$  amb el lligand DMPDU-C-C<sub>4</sub>-CONH-O<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (**41**) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model 1:1.

## 3.4.3 Complexos de lligands monovalents de tipus propandiurea (PDU) amb SAV

Lligand	$K_a$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta G$ ( $kJ\ mol^{-1}$ )	ES
<b>PDU (6)</b>	$6 (\pm 3) \times 10^4$	$-26.8 \pm 1.3$ <sup>(a)</sup>	
<b>PDU-N-C<sub>4</sub>-COOH (+)-8</b>	$3.1 (\pm 0.2) \times 10^8$ $> 2.4 \times 10^7$	$-48.4 \pm 0.2$ <sup>(a)</sup> $< -41.6$ <sup>(b,c)</sup>	22100
<b>PDU-N-C<sub>4</sub>-COOH (-)-8</b>	$1.4 (\pm 0.2) \times 10^4$ $4.5 (\pm 0.1) \times 10^3$ $3.9 (\pm 0.1) \times 10^3$	$-23.6 \pm 0.3$ <sup>(a)</sup> $-20.8 \pm 0.1$ <sup>(b)</sup> $-20.5 \pm 0.1$ <sup>(c)</sup>	
<b>PDU-N-C<sub>5</sub>-COOH (±)-9</b>	$\geq 2 \times 10^7$ i $9.0 (\pm 1) \times 10^3$	$\leq -41.6$ i $-22.5 \pm 0.3$ <sup>(c)</sup>	$> 2700$

Taula 5: Constants d'associació de lligands monovalents de tipus PDU a estreptavidina a pH = 7.0.

<sup>(a)</sup> Valoració espectrofluorimètrica.

<sup>(b)</sup> Valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA.

<sup>(c)</sup> Valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA amb el lligand racèmic.

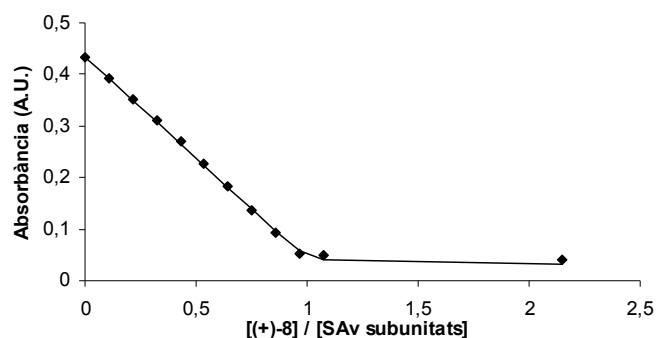
Per tal d'esbrinar si el sistema bicíclic de tipus [3.3.0] era millor o pitjor que el de tipus [3.3.1] en lligands d'Av i SAV, calia comparar lligands que només diferissin en el tipus de sistema bicíclic.

Ja es disposava dels valors de  $K_a$  de lligands derivats de glicoluril ((±)-**3**, (±)-**21**) amb sistema bicíclic [3.3.0], però els lligands derivats de DMPDU (**10**) no eren útils per a fer aquesta comparativa, ja que tenen el sistema bicíclic [3.3.1] disubstituit amb grups metil en el pont més curt. Calia fer la comparació amb lligands derivats de la PDU (**6**), ja que en aquesta sèrie de compostos l'únic substituent del sistema bicíclic [3.3.1] seria la cadena d'àcid carboxílic.

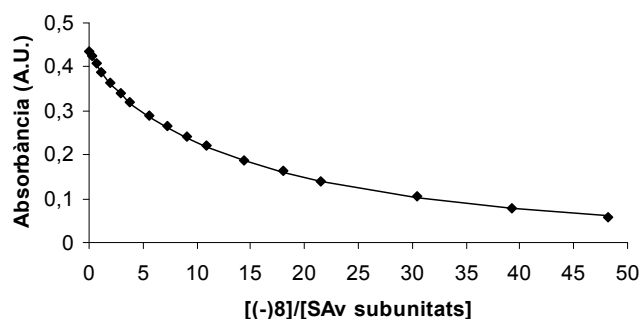
En aquest sentit es va creure necessari disposar del compost de referència PDU (**6**) per tal de fer la comparativa de constants d'associació amb o sense cadena lateral de valerat.

El lligand PDU-N-C<sub>4</sub>-COOH ((±)-**8**) s'havia obtingut en forma de racèmic, amb la qual cosa es van separar els enantiòmers per tal de determinar la  $K_a$  de cadascun d'ells per separat. Aleshores es va comprovar que l'enantiòmer dextrorotatori (+)-**8** s'unia a la proteïna amb una  $K_a$  massa elevada per al mètode que s'estava utilitzant (valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA, Figura 31), i tan sols es podia donar un límit inferior ( $K_a \geq 2 \times 10^7\ M^{-1}$ ). Per aquest motiu es va haver de buscar un altre mètode que ens permetés calcular el valor de  $K_a$ .

En canvi l'enantiòmer levorotatori (-)-**8** presentava una constant d'associació inferior i es va poder determinar mitjançant el mètode de competició ( $K_a = 4.5 \times 10^3\ M^{-1}$ , Figura 32).



**Figura 31:** Canvis d'absorbància a 500 nm en la valoració de SAv 35.0  $\mu\text{M}$  (tetràmer) i HABA 59.0  $\mu\text{M}$  amb l'enantiòmer dextrorrotatori del lligand PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**8**) en tampó fosfat 0.1 M, pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades al model d'unió (1:1).



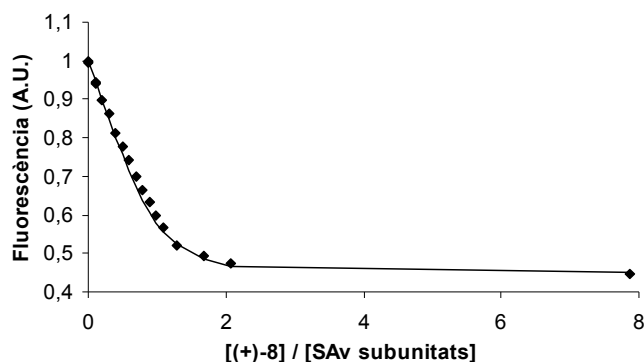
**Figura 32:** Canvi d'absorbància a 500 nm en la valoració de SAv 35.0  $\mu\text{M}$  (tetràmer) i HABA 59.0  $\mu\text{M}$  amb l'enantiòmer levorotatori del lligand PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((-)-**8**) en tampó fosfats 0.1 M, pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades a un model d'unió (1:1). Aquest ajust va ser obtingut quan es va considerar que el lligand levorotatori estava impurificat en un 1% amb el lligand dextrorrotatori i tenint en compte el seu valor de constant d'associació a la proteïna.

El mètode utilitzat va ser la fluorescència que presentava certs avantatges respecte a les valoracions espectrofotomètriques competitives, com són el fet que no era necessari l'ús d'un competidor i que es pot treballar a concentracions més diluïdes de proteïna i de lligand que per UV (uns 10 cops inferior).

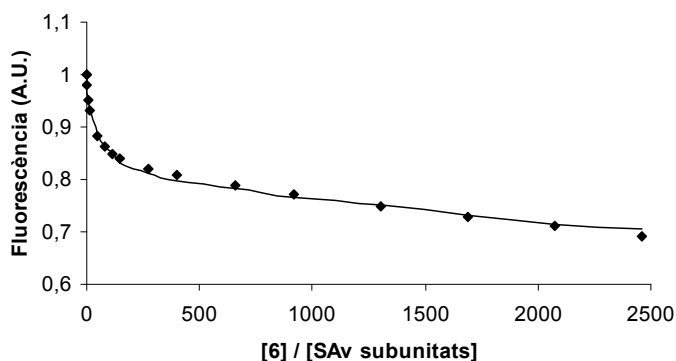
En les mesures de les mostres, el monocromador d'excitació es situa a 290 nm (utilitzant una amplada de banda de 4 nm), i la fluorescència després de cada addició d'agent valorant, es mesura a 350 nm (utilitzant una amplada de banda de 16 nm).<sup>70</sup> La valoració espectrofluorimètrica es va realitzar addicionant alíquotes de l'agent valorant sobre una dissolució de proteïna i mesurant 5 min. després de cada addició. La disminució de la banda d'emissió a 350 nm corresponent als grups Trp de la proteïna sembla força lògica si tenim en compte que hi ha quatre residus de Trp en el lloc d'unió de la proteïna, els quals es poden veure afectats per la unió d'un lligand en aquest punt.

Mitjançant aquesta tècnica es va poder determinar la  $K_a = 3.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  del lligand (+)-PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**8**), el qual va resultar ser el lligand òptim d'entre tots els estudiats (Figura 33). Com podem veure la seva  $K_a$  és molt més elevada, unes 5000 vegades, que la del compost de referència

sense cadena lateral, la PDU (**6**) (Figura 34). En canvi, el lligand PDU ( $K_a = 6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) presenta una constant d'associació a SAv lleugerament superior (4 vegades) a la de (-)-PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((-)-**8**) ( $K_a = 1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) (Figura 35).

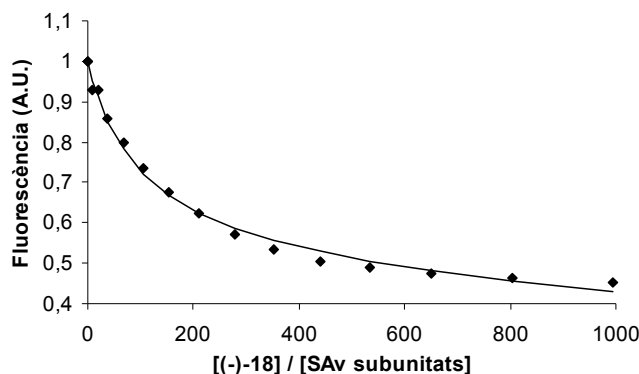


**Figura 33:** Canvi de fluorescència a 350 nm en la valoració de SAv 0.4  $\mu\text{M}$  (monòmer) amb l'enantiòmer dextrorrotatori del lligand (+)-PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**8**) en tampó A a pH=7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades a un model d'unió (1:1).



**Figura 34:** Canvis de fluorescència a 350 nm en la valoració de SAv 0.4  $\mu\text{M}$  (tetràmer) amb el lligand PDU (**6**) en tampó A a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades a un model d'unió (1:1).

Aquest fet posa clarament de manifest que la introducció de la cadena lateral de valerat amb l'estereoquímica adequada (enantiòmer dextrorrotatori, (+)-**8**), es tradueix en un fort augment de la  $K_a$ , però si l'estereoquímica no és l'adequada (enantiòmer levorrotatori, (-)-**8**) la  $K_a$  resulta ser inclús inferior a la de la PDU. Aquest fet comporta una elevada enantioselectivitat ( $ES = 22100$ ) (Taula 5) de l'estreptavidina a favor de l'enantiòmer (+)-PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**8**).



**Figura 35:** Canvi de fluorescència a 350 nm en la valoració de SAv 0.4  $\mu$ M (monòmer) i l'enantiòmer levorotatori del lligand (-)-PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((-)-**8**) en tampó A (vegeu part experimental) a pH=7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades a un model d'unió (1:1). Aquest ajust s'ha obtingut considerant que el lligand levorotatori estava impurificat amb un 1% de lligand dextrorotatori i tenint en compte la seva constant d'associació a la proteïna.

Si es fa la comparativa entre els lligands de tipus PDU i els de tipus glicoluril, s'observa que en el cas dels compostos sense cadena lateral, s'obtenen valors de  $K_a$  molt similars, lleugerament superiors en el cas de la PDU ( $K_a = 4.7 \times 10^4$  i  $K_a = 6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , per glicoluril i PDU respectivament).

D'altra banda, si comparem els lligands de tipus PDU amb els de tipus DMPDU sense cadena lateral, s'observa un clar augment en la  $K_a$  al passar del sistema DMPDU (**10**) al sistema PDU (**6**) ( $K_a = 1.6 \times 10^2$  i  $K_a = 6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , per DMPDU i PDU respectivament).

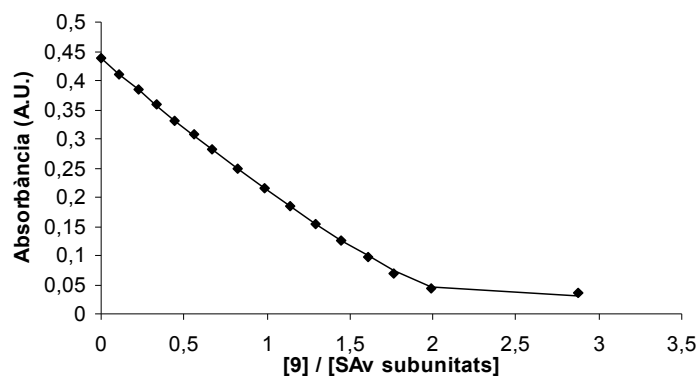
En canvi si comparem els resultats obtinguts per als lligands derivats amb la cadena lateral de valerat, s'observa com el lligand (+)-PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**8**) amb sistema biciclo[3.3.1] ( $K_a = 3.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) s'uneix unes 170 vegades més fort que el seu homòleg Gril-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**3**) amb sistema biciclo[3.3.0] ( $K_a = 1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ).<sup>19</sup>

Anàlogament s'observa que el lligand (+)-PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**8**) s'uneix unes 720 vegades més fort que el seu homòleg (+)-DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**12**) ( $K_a = 4.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ).

Aquesta comparativa no és del tot correcta ja que no tenim les mesures realitzades utilitzant la mateixa tècnica, però ens dóna una idea de la força d'unió en cada cas. En aquest supòsit, podem concloure que el sistema PDU és l'òptim entre els estudiats tant en absència de cadena lateral com amb presència de cadena lateral de valerat unida al N del grup ureido quan l'estereoquímica és l'adequada.

De la mateixa manera que amb els lligands de tipus DMPDU, es va voler estudiar si al augmentar la longitud de la cadena lateral en un metilè, PDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (**9**), els resultats obtinguts eren similars als obtinguts amb la cadena de valerat. Aquest lligand també s'obté en forma de racèmic, amb la qual cosa es va aplicar el mètode espectrofotomètric competitiu descrit a l'apartat 3.4.1.1.2<sup>19</sup> per a realitzar la mesura de la seva  $K_a$  a SAv utilitzant HABA com a indicador. D'aquestes mesures només es va poder extreure un límit inferior ( $K_a \geq 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) per a un dels enantiòmers i  $K_a = 9.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  per a l'altre enantiòmer, Figura 36.





**Figura 36:** Canvis d'absorbància a 500 nm en la valoració de SAv 44.8  $\mu\text{M}$  (tetràmer) i HABA 59.0  $\mu\text{M}$  amb el lligand PDU-N-C<sub>5</sub>-COOH ((±)-9) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. L'ajust es va obtenir amb el model que considera els dos enantiòmers del racèmic i en calcula les constants d'associació per separat.

Aquests resultats ens permeten concloure que en el cas de sistemes bicíclics amb dos grups urea (un en cada cicle), el sistema bíclic de tipus propandiurea (PDU) dóna majors  $K_a$  a SAv que el sistema bíclic de tipus glicoluril. Això podria ser conseqüència de què es formessin millors interaccions de van der Waals amb els residus de la proteïna degut a què el lligand encaixés millor en el lloc d'unió. Aleshores els anàlegs amb sistema bíclic PDU amb una cadena lateral d'àcid carboxílic també presentarien millors valors de  $K_a$ .

## 3.4.4 Complexos de lligands monovalents de tipus dimetilpropandiurea (DMPDU) amb Av

Lligand	$K_a$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta G$ ( $kJ\ mol^{-1}$ )	ES
DMPDU (10)	$1.5 (\pm 0.2) \times 10^3$	$-18.0 \pm 0.3$ <sup>(a)</sup>	
DMPDU-C-C <sub>4</sub> -COOH (5)	$5.3 (\pm 0.2) \times 10^5$	$-32.6 \pm 0.1$ <sup>(a)50</sup>	
DMPDU-N-C <sub>3</sub> -COOH ( $\pm$ )-11	$9.1 (\pm 1.0) \times 10^5$ i $\leq 5.5 \times 10^3$	$-34.0 \pm 0.3$ i $\geq -21.3$ <sup>(b)</sup>	$\geq 165$
DMPDU-N-C <sub>4</sub> -COOH (+)-12	$8.0 (\pm 1.0) \times 10^6$ $9.0 (\pm 1.0) \times 10^6$	$-39.3 \pm 0.3$ <sup>(a)</sup> $-39.6 \pm 0.3$ <sup>(b)</sup>	57100
DMPDU-N-C <sub>4</sub> -COOH (-)-12	$1.4 (\pm 0.3) \times 10^2$ $\leq 1.0 \times 10^3$	$-12.1 \pm 0.5$ <sup>(a)</sup> $\geq -17.1$ <sup>(b)</sup>	
DMPDU-N-C <sub>5</sub> -COOH ( $\pm$ )-13	$8.2 (\pm 1.0) \times 10^6$ i $\leq 5.0 \times 10^3$	$-39.4 \pm 0.3$ i $\geq -21.1$ <sup>(b)</sup>	$\geq 1600$
DMPDU-C-C <sub>4</sub> -CONH-O <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> (41)	$1.7 (\pm 0.2) \times 10^3$	$-18.5 \pm 0.3$ <sup>(a)</sup>	
DMPDU-C-C <sub>4</sub> -CONH-C <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub> (44)	$1.9 (\pm 0.1) \times 10^4$	$-24.4 \pm 0.1$ <sup>(a)51</sup>	

Taula 6: Constants d'associació de lligands monovalents de tipus dimetilpropandiurea a Av a pH = 7.0.

<sup>(a)</sup> Valoració espectrofotomètrica competitiva.

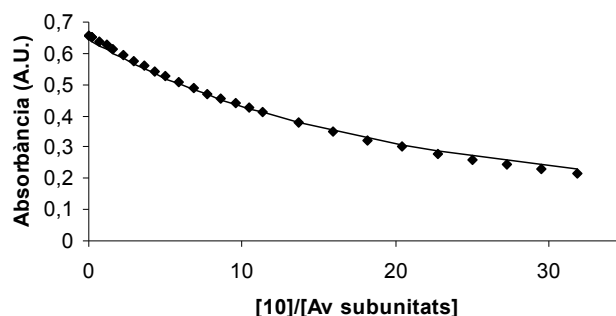
<sup>(b)</sup> Valoració espectrofotomètrica competitiva del lligand racèmic.

En el cas de l'Av els valors de  $K_a$  obtinguts són en general més elevats que en el cas de SAV, tal com també s'observa amb el lligand natural biotina. Aquest fet pot ser degut a les diferències existents entre les dues proteïnes, que generen interaccions diferents.

Segons s'ha vist amb lligands de tipus glicoluril, els quals tenen una estructura bicíclica de tipus [3.3.0], passar de tenir la cadena de valerat unida al C cap de pont a tenir-la unida al N del grup ureido es tradueix en un important augment de  $K_a$ , però només si l'estereoquímica és l'adequada.<sup>19</sup> Així doncs, en passar del Gril-C-C<sub>4</sub>-COOH (4) ( $K_a = 8.5 \times 10^3\ M^{-1}$ )<sup>19</sup> al (+)-Gril-N-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-3) ( $K_a = 2.6 \times 10^7\ M^{-1}$ )<sup>19</sup> l'augment en la  $K_a$  a Av és 3000 vegades superior, un canvi menys pronunciat que el que es produeix amb SAV. Anàlogament a com s'havia fet amb SAV, es va voler avaluar l'efecte de tenir la cadena de valerat unida al C cap de pont o al N del grup ureido en un compost de tipus DMPDU.

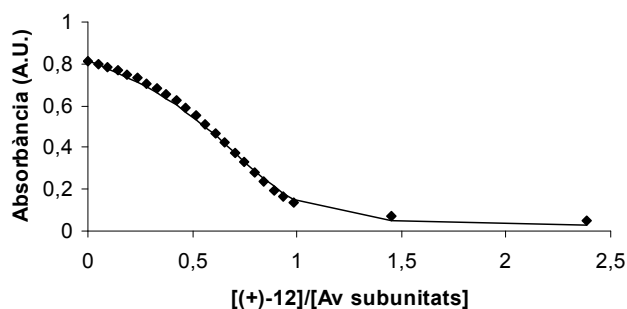
En aquest sentit es va estudiar la  $K_a$  dels lligands amb sistema bicíclic de tipus [3.3.1] derivats de la DMPDU (10) i es van obtenir similituds i diferències. Al comparar el lligand amb la cadena de valerat unida al C cap de pont, DMPDU-C-C<sub>4</sub>-COOH (5) respecte del sistema bicíclic de referència sense cadena lateral, DMPDU (10), s'observa un augment en la constant d'associació ( $K_a = 5.3 \times 10^5\ M^{-1}$  i  $K_a = 1.5 \times 10^3\ M^{-1}$ , per als lligands 5 i 10 respectivament) d'unes 350 vegades (Figura 37). Aquest fet és raonable si tenim en compte que al addicionar la cadena lateral es produeix la introducció

d'interaccions de van der Waals i d'interaccions per pont d'hidrogen del carboxilat terminal amb els residus de la proteïna.



**Figura 37:** Canvis d'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 33.9  $\mu\text{M}$  (tetràmer) i HABA 24.8  $\mu\text{M}$  amb el lligand DMPDU (**10**) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades a un model d'unió (1:1).

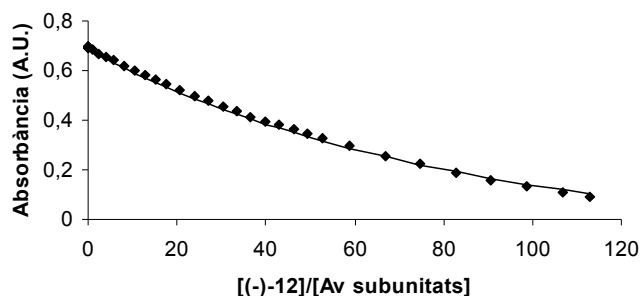
En aquest sentit es van mesurar les constants d'associació dels enantiòmers purs separatament del lligand DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((±)-**12**) i es va observar, igual que havia passat amb la SAV, que l'enantiòmer (+)-DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**12**) era el que presentava l'estereoquímica adequada amb una  $K_a$  a Av de  $8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  (Figura 38), la qual és unes 57100 vegades superior a l'enantiòmer levorotatori (-)-DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((-)-**12**) ( $K_a = 1.4 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ , Figura 39). Això representa una enantioselectivitat (ES) aproximada de 57100 (Taula 6).



**Figura 38:** Canvi d'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 49.5  $\mu\text{M}$  (tetràmer) i HABA 27.9  $\mu\text{M}$  amb l'enantiòmer dextrorotatori del lligand DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**12**) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades al model d'unió (1:1).

Al comparar el lligand (+)-DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**12**) amb el lligand de referència DMPDU (**10**), s'observa que la introducció de la cadena de valerat es tradueix en un augment de 5300 vegades la  $K_a$  a Av. Contràriament al que succeeix al comparar el lligand (-)-DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((-)-**12**), en el qual s'aprecia una disminució en la  $K_a$  (11 vegades inferior) respecte al lligand DMPDU (**10**) sense cadena de valerat. És a dir, la introducció de la cadena de valerat sobre la DMPDU (**10**) produirà un augment (cadena de valerat en el C cap de pont o N amb estereoquímica (+)) o una disminució (cadena de valerat amb estereoquímica (-)) en la  $K_a$  a Av en funció de si tenim

l'estereoquímica adequada o no, a diferència del cas de SA<sub>v</sub>, on sempre es produeix un augment de  $K_a$ .

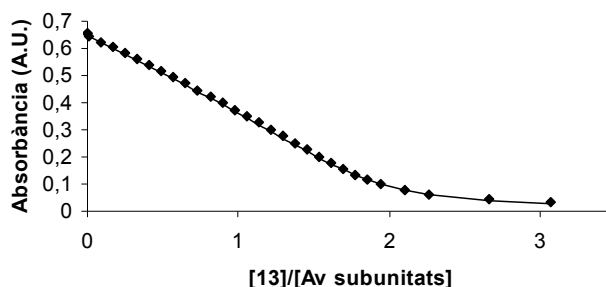


**Figura 39:** Canvi d'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 34.0  $\mu\text{M}$  (tetràmer) i HABA 27.4  $\mu\text{M}$  amb l'enantiòmer levorotatori del lligand DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((-)-**12**) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades al model d'unió (1:1). Aquest ajust va ser obtingut considerant que el lligand levorotatori estava impurificat amb un 0.7% de lligand dextrorotatori i tenint en compte la seva constant d'unió a la proteïna. Aquest fet va ser confirmat per anàlisi en HPLC-MS amb una columna de fase estacionària quiral.

D'altra banda si comparem l'efecte de tenir la cadena de valerat unida al C cap de pont o a un N del grup ureido, s'obté un resultat similar a l'obtingut amb SA<sub>v</sub>. S'han mesurat les  $K_a$  dels enantiòmers del lligand **12** independentment i s'ha comprovat que l'enantiòmer dextrorotatori (+)-**12** és el que es troba disposat amb l'estereoquímica adequada per unir-se a Av, donant una  $K_a = 8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ , la qual és 15 vegades superior que la del compost **5**. Aquests resultats posen de manifest el fet que desplaçar la cadena de valerat del C cap de pont al N del grup ureido pot afavorir la unió lligand-proteïna.

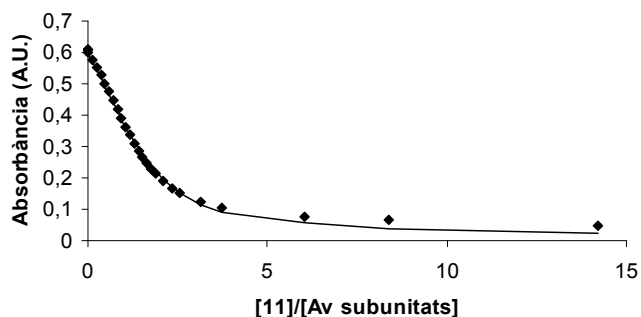
Aquests resultats són certs quan tenim l'estereoquímica adequada, en canvi amb el lligand levorotatori (-)-**12** s'obté una  $K_a = 1.4 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ , la qual és unes 3800 vegades inferior que la del lligand **5**. Una vegada més queda palesa la importància de l'estereoquímica dels lligands quirals per unir-se a la proteïna. Paral·lelament es van realitzar mesures del racèmic ( $\pm$ )-**12** utilitzant el mètode exposat a l'apartat 3.4.1.1.2,<sup>19</sup> tal com havíem fet en el cas de l'SA<sub>v</sub> i es van obtenir resultats comparables als obtinguts amb els enantiòmers purs.

A continuació es va avaluar l'efecte d'allargar la cadena un metilè tal com s'havia fet per SA<sub>v</sub>. El compost estudiat DMPDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH ( $\pm$ )-**13** és un compost quiral, amb la qual cosa es van realitzar mesures del racèmic, obtenint-se uns resultats pràcticament idèntics als del lligand DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ( $\pm$ )-**12**, ( $K_a = 8.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  i  $K_a \leq 5.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , per als lligands (+)-**13** i (-)-**13**, Figura 40).



**Figura 40:** Canvis d'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 37.1  $\mu\text{M}$  (tetràmer) i HABA 24.1  $\mu\text{M}$  amb el lligand DMPDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (**13**) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. Aquest ajust va ser obtingut amb el model que considera constants d'associació diferents per als dos enantiòmers del racèmic.

Com que un allargament de la cadena lateral no es tradueix en un augment de la  $K_a$ , es va provar el cas invers, és a dir, un escurçament de la cadena lateral en un metilè. En aquest cas també es van realitzar les mesures a partir del racèmic, obtenint-se com a constants d'associació  $9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  i un límit superior de  $\leq 5.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  per als dos enantiòmers del lligand DMPDU-*N*-C<sub>3</sub>-COOH **11** (Figura 41). Aquests resultats implicaven una disminució de 9 vegades la  $K_a$  amb Av respecte al lligand DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH (+)-**12** en el millor dels casos, és a dir, si prenem com a referència la  $K_a$  més elevada. Com a conseqüència d'aquests resultats es pot concloure que una disminució de la cadena lateral d'àcid carboxílic es tradueix en una disminució de la  $K_a$  a Av.



**Figura 41:** Canvis d'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 31.7  $\mu\text{M}$  (tetràmer) i HABA 23.8  $\mu\text{M}$  amb el lligand DMPDU-*N*-C<sub>3</sub>-COOH (**11**) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. Aquest ajust va ser obtingut amb el model que considera constants d'associació diferents per als dos enantiòmers del racèmic.

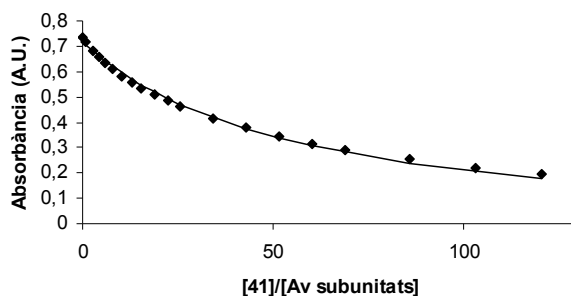
Després dels estudis realitzats podem concloure que la llargada òptima de la cadena lateral d'àcid carboxílic per als lligands de tipus dimetilpropandiurea és la que té quatre ó cinc metilens.

Val a dir que es van realitzar valoracions espectrofluorimètriques d'avidina amb els lligands **5** i **10**, però en cap cas es va observar disminució de fluorescència a 350 nm deguda als grups Trp, motiu pel qual es va descartar aquest mètode per a la determinació de la  $K_a$ .

D'altra banda es va voler estudiar l'efecte que produïa la derivatització l'extrem àcid carboxílic del lligand DMPDU-*C*-C<sub>4</sub>-COOH (**5**) fent-lo reaccionar amb un espaiador amino i generant d'aquesta

manera la corresponent amida. Es va escollir un espaiador de tipus polièter i alquílic generant els compostos DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-CONH-O<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (**41**) i DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-CONH-C<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (**44**) respectivament.

Els resultats obtinguts van ser lleugerament diferents als que s'havien obtingut en el cas de SAV. En aquest cas ambdós lligands van provocar una disminució de la  $K_a$  a Av respecte al lligand **5** ( $K_a = 1.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  i  $K_a = 1.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  per al lligand **41** i **44**<sup>51</sup> a Av respectivament, Figura 42). En canvi amb SAV s'obtenia una lleugera disminució per al lligand **41** i un lleuger augment per al lligand **44** respectivament.



**Figura 42:** Canvis d'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 35.2  $\mu\text{M}$  (tetràmer) i HABA 28.0  $\mu\text{M}$  amb el lligand DMPDU-C-C<sub>4</sub>-CONH-O<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (**41**) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. Aquest ajust va ser obtingut amb el model d'associació 1:1.

La disminució en la constant de la formació del complex a Av va ser més acusada (unes 300 vegades inferior) en el cas del compost **41**, en el qual l'espaiador és de tipus polièter. En canvi amb el lligand **44**, la disminució de la  $K_a$  és més moderada (28 vegades inferior) respecte al lligand **5**. Això podria ser degut al fet que l'espaiador de tipus alquílic, més apolar que l'anterior, presenti interaccions hidrofòbiques més favorables amb entorns apolars de la proteïna. Tot i que també podria ser degut a diferències en altres tipus d'interaccions no covalents de l'espaiador amb la proteïna.

## 3.4.5 Complexos de lligands monovalents de tipus propandiurea (PDU) amb Av

Lligand	$K_a$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta G$ ( $KJ mol^{-1}$ )	ES
PDU (6)	$1.8 (\pm 0.3) \times 10^5$	$-29.8 \pm 0.3$ <sup>(a)</sup>	
PDU-N-C <sub>4</sub> -COOH (+)-8	$1.0 (\pm 0.1) \times 10^8$ $3.1 (\pm 0.1) \times 10^7$	$-45.6 \pm 0.1$ <sup>(a,b)</sup> $-42.7 \pm 0.1$ <sup>(c)</sup>	6250
PDU-N-C <sub>4</sub> -COOH (-)-8	$1.6 (\pm 0.1) \times 10^4$ $1.7 (\pm 0.1) \times 10^4$	$-24.0 \pm 0.1$ <sup>(a)</sup> $-24.1 \pm 0.1$ <sup>(b)</sup>	
PDU-N-C <sub>5</sub> -COOH (±)-9	$5.0 (\pm 0.1) \times 10^7$ i $\leq 1.0 \times 10^4$	$-43.9 \pm 0.1$ i $\geq -22.8$ <sup>(b)</sup>	$\geq 5000$

Taula 7: Constants d'associació de lligands monovalents de tipus propandiurea a avidina a pH = 7.0.

<sup>(a)</sup> Valoració espectrofotomètrica competitiva.

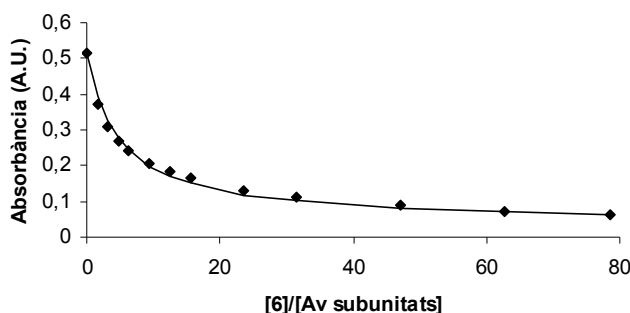
<sup>(b)</sup> Valoració espectrofotomètrica competitiva del lligand racèmic.

<sup>(c)</sup> Valoració espectrofluorimètrica.

Anàlogament a la SAV es volia avaluar l'efecte que produïen els metils del pont del sistema bicíclic. Per aquest motiu es va passar del sistema bicíclic DMPDU al sistema bicíclic PDU.

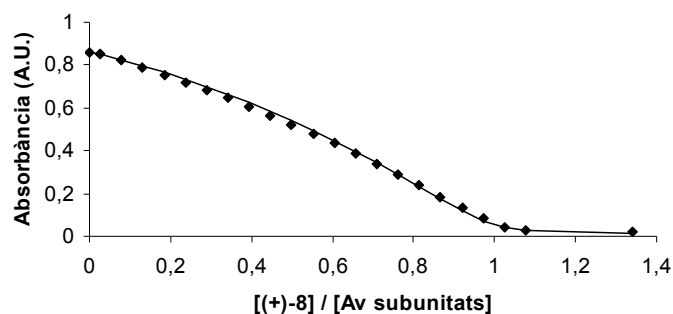
Segons els resultats obtinguts per als complexos d'avidina amb els lligands de la sèrie DMPDU, la llargada òptima de la cadena lateral es trobava entre 4 ó 5 metilens,

De la mateixa manera que s'havia obtingut amb SAV, el compost de referència PDU (6) s'unia a Av amb una  $K_a$  de  $1.8 \times 10^5 M^{-1}$  (Figura 43), és a dir 120 vegades superior que el compost DMPDU (10). Aleshores es va comprovar si l'augment de  $K_a$  també es mantenia amb la sèrie de lligands de la família de la PDU.



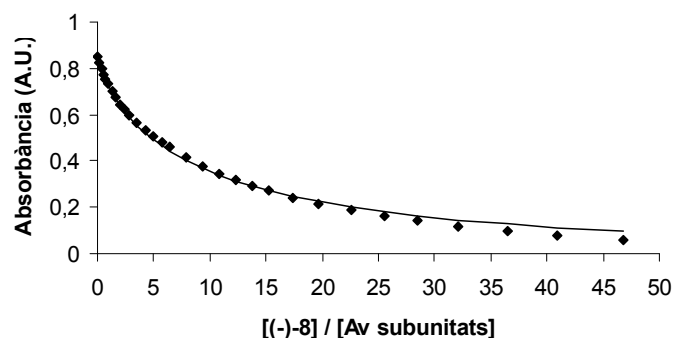
**Figura 43:** Canvi d'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 14.6  $\mu M$  (tetràmer) i HABA 71.8  $\mu M$  amb el lligand PDU (6) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades al model d'uní (1:1).

En aquest sentit, es va començar amb el lligand (+)-PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**8**), comprovant-se com l'enantiòmer dextrorrotatori era el que disposava de l'estereoquímica òptima per unir-se a Av, obtenint-se una  $K_a = 1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  per al compost (+)-**8** (Figura 44), la qual va resultar ser 550 vegades superior que la del lligand de referència PDU (**6**). Aquest valor és molt proper al límit superior de  $K_a$  que es pot calcular mitjançant el mètode espectrofotomètric competitiu utilitzant HABA com a competidor.



**Figura 44:** Canvi d'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 52.5 μM (tetràmer) i HABA 29.2 μM amb l'enantiòmer dextrorrotatori del lligand PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**8**) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades al model d'unió (1:1).

En canvi amb l'enantiòmer levorotatori (-)-PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((-)-**8**) es va obtenir una  $K_a = 1.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  (Figura 45), la qual cosa donava una enantioselectivitat força elevada a favor de l'enantiòmer dextrorrotatori ( $ES = 6250$ ). Aquest resultat posava de manifest el fet que el lligand levorotatori s'uneix a Av amb una disposició poc favorable donant una  $K_a$  inclòs 10 vegades inferior que la del lligand de referència PDU (**6**), fet que ja s'havia observat en la unió d'aquests compostos a SA<sub>v</sub>.



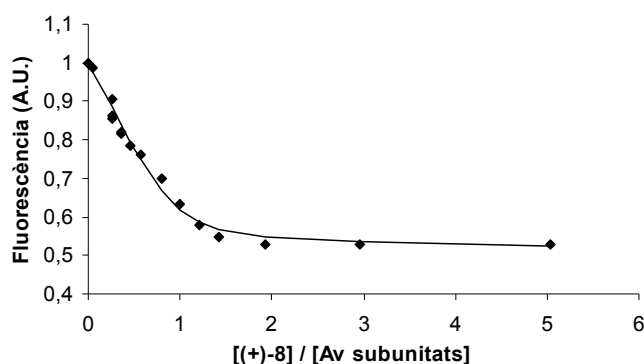
**Figura 45:** Canvi d'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 49.5 μM (tetràmer) i HABA 29.2 μM amb l'enantiòmer levorotatori del lligand PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((-)-**8**) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades al model d'unió (1:1).

Els valors de  $K_a$  dels enantiòmers del lligand (±)-PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((±)-**8**) es van determinar pels dos mètodes descrits als apartats 3.4.1.1.1 i 3.4.1.1.2.; amb els enantiòmers purs (Figura 44 i Figura 45) i amb el racèmic considerant que cada enantiòmer s'uneix a Av amb una  $K_a$  diferent. Els



resultats obtinguts en ambdós mètodes van ser molt similars, fet que dóna validesa al mètode que utilitza el racèmic per a calcular la  $K_a$  de cada enantiòmer.

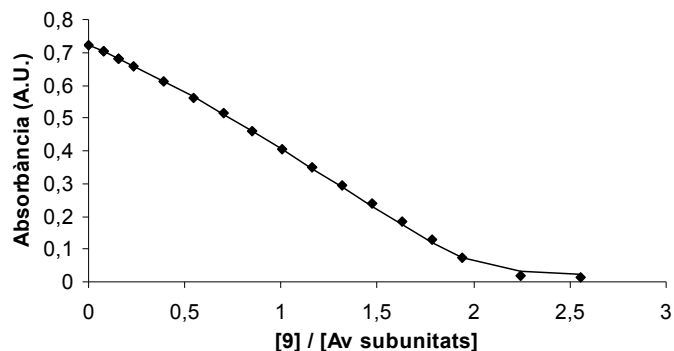
Com a conseqüència de l'alta  $K_a$  del lligand (+)-**8**, difícil de determinar pel mètode de competició amb HABA, es va estudiar la seva associació amb Av mitjançant el mètode espectrofluorimètric. En aquest cas, sí que es va observar disminució de la fluorescència a 350 nm deguda als residus de Trp després d'haver irradiat la mostra a 290 nm, cosa que no succeïa amb els lligands de la sèrie DMPDU. Aquest fet podria indicar que tant amb Av com amb SAv, els lligands de tipus PDU s'uneixen amb una orientació similar a la de la biotina i el Gril-*N*-C<sub>4</sub>-COOH, mentre que els lligands de tipus DMPDU s'uneixen amb una disposició diferent que comportés interaccions diferents amb els residus de Trp del lloc d'unió. Aplicant el mètode descrit a l'apartat 3.4.1.2.6 es va obtenir un valor de  $K_a = 3.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  (Figura 46), el qual és un mica inferior al determinat per competició però continua sent més alt que els valors obtinguts amb el lligand (+)-DMPDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**12**).



**Figura 46:** Canvi de fluorescència a 350 nm en la valoració de Av 7.1  $\mu\text{M}$  (monòmer) i l'enantiòmer dextrorrotatori del lligand (+)-PDU-*N*-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**8**) en tampó A a pH=7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades a un model d'unió (1:1).

A continuació es va avaluar el fet d'allargar la cadena lateral en un metilè, per veure si es traduïa en un augment de la  $K_a$  o no, com s'havia vist amb SAv. Es van mesurar els valors de  $K_a$  de cada enantiòmer a partir del racèmic ( $\pm$ )-PDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (( $\pm$ )-**9**) utilitzant el mètode espectrofotomètric competitiu amb HABA descrit a l'apartat 3.4.1.1.2. S'obtingueren valors similars als anteriors ( $K_a = 5.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  i un límit superior del valor de  $K_a \leq 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  per als dos enantiòmers de ( $\pm$ )-PDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH (( $\pm$ )-**9**), Figura 51).

Una vegada més queda palesa la importància de l'estereoquímica del lligand en la unió a la proteïna, obtenint-se una elevada enantioselectivitat en el lligand ( $\pm$ )-**9** ( $ES \geq 5000$ ).



**Figura 47:** Canvis d'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 34.7  $\mu\text{M}$  (tetràmer) i HABA 28.5  $\mu\text{M}$  amb el lligand ( $\pm$ )-PDU-*N*-C<sub>5</sub>-COOH ( $\pm$ )-(9) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. Aquest ajust va ser obtingut amb el model que considera constants d'associació diferents per als dos enantiòmers del racèmic.

El resum dels resultats obtinguts s'exposa a continuació (Taula 8).

Canvi estructural	Lligands comparats	$\Delta(\Delta G)$ en SAv ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$\Delta(\Delta G)$ en Av ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
Canvi de DMPDU a PDU	10 vs 6	-14	-12
	(+)-12 vs (+)-8	-16	-6
	(-)-12 vs (-)-8	-7	-12
Introducció d'una cadena de valerat en la DMPDU	10 vs (+)-12	-20	-21
	10 vs (-)-12	-2	+6
Introducció d'una cadena de valerat en la PDU	6 vs (+)-8	-22	-16
	6 vs (-)-8	+3	+6
Punt d'unió de la cadena de valerat (de C cap de pont a N)	5 vs (+)-12	-12	-7
Canvi d'enantiòmer de (+) a (-)	(-)-12 vs (+)-12	-18	-27
	(-)-8 vs (+)-8	-25	-22
Derivatització de la cadena lateral d'àcid carboxílic a amida	5 vs 41	+0.6	+14

**Taula 8:** Variació en la  $\Delta G$  de complexació a Av i SAv provocat pels canvis estructurals indicats.

El canvi de sistema bicíclic de DMPDU a PDU es tradueix en una disminució de  $\Delta G$  de 12-14  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  tant a Av com a SAv.

La introducció d'una cadena lateral de valerat sobre l'àtom de N per tal de generar l'enantiòmer (+) porta associada una disminució important de  $\Delta G$  de 16-22  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  quan l'estereoquímica del lligand és l'adequada (enantiòmer dextrorrotatori), tant en el sistema de tipus PDU com DMPDU. En

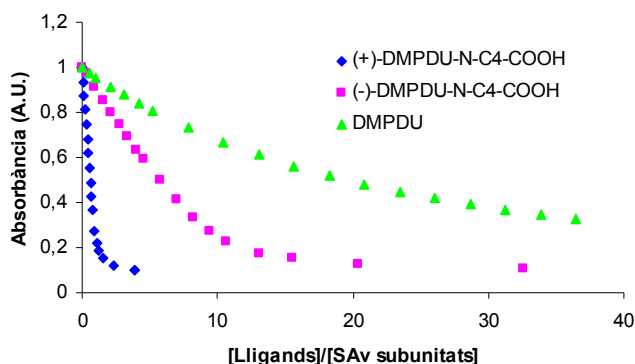
canvi, quan l'estereoquímica no és l'adequada (enantiòmer levorotatori) es produeix el cas contrari, és a dir hi ha un petit augment de  $\Delta G$  de 3-6  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , excepte amb el lligand (-)-**12** on s'observa una petita disminució de  $\Delta G$  de 2  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  respecte al sistema bicíclic de referència DMPDU (**10**).

En els lligands de tipus DMPDU, passar de tenir la cadena de valerat unida del C cap de pont a tenir-la unida al N del grup ureido com a enantiòmer (+), comporta una disminució de  $\Delta G$ , més important en SA<sub>v</sub> (12  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) que en Av (7  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

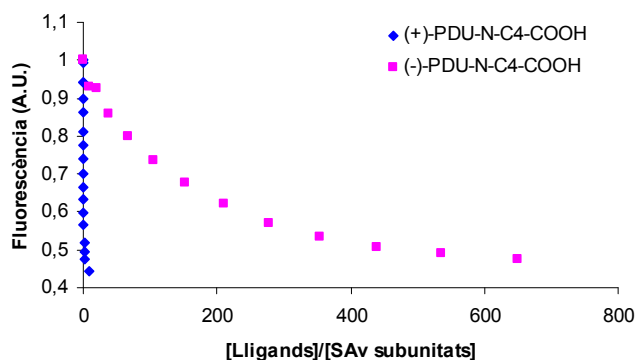
En els lligands amb cadena de valerat unida al N, l'enantiòmer (+) té una major afinitat per Av i SA<sub>v</sub> que l'enantiòmer (-), tant en lligands de tipus PDU com de tipus DMPDU, essent la  $\Delta(\Delta G)$  d'entre -18 i -27  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

En el compost DMPDU-C-C<sub>4</sub>-COOH (**5**), la derivatització de la cadena lateral d'àcid carboxílic en forma d'amida afecta poc a la seva  $\Delta G$  a SA<sub>v</sub> (0.6  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), però fa augmentar bastant la  $\Delta G$  a Av (14  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

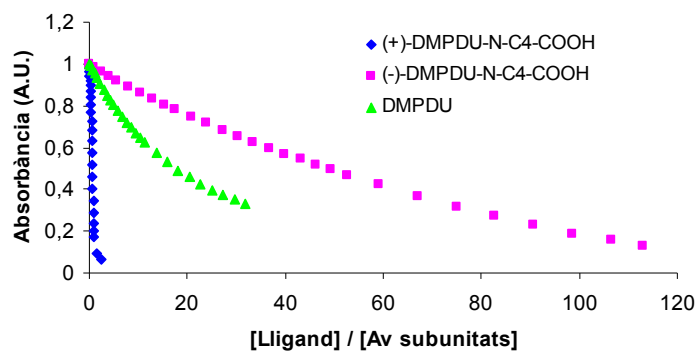
La (+)-PDU-N-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**8**) és el lligand monovalent que presenta major  $K_a$ , tant a Av com a SA<sub>v</sub>, essent inclús superior a la del compost (+)-Gril-N-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**3**).



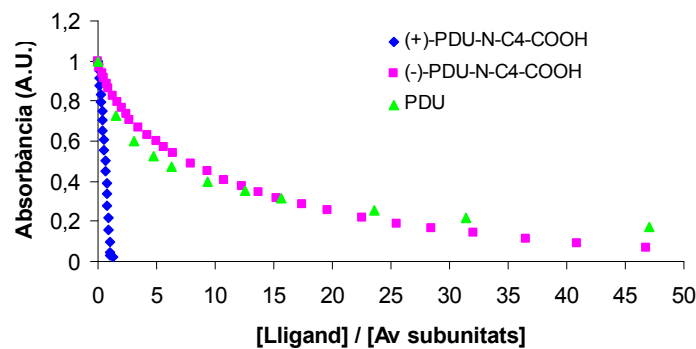
**Figura 48:** Efecte sobre la complexació a SA<sub>v</sub> d'afegir una cadena lateral de valerat al lligand monovalent DMPDU (**10**) obtenint-se els enantiòmers del lligand monovalent DMPDU-N-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**12**) i ((-)-**12**). Mesures realitzades per absorbància.



**Figura 49:** Efecte sobre la complexació a SA<sub>v</sub> de comparar els enantiòmers del lligand monovalent PDU-N-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**8**) i ((-)-**8**). Mesures realitzades per fluorescència.



**Figura 50:** Efecte sobre la complexació a Av d'afegir una cadena lateral de valerat al lligand monovalent DMPDU (10) obtenint-se els enantiòmers del lligand monovalent DMPDU-N-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-12) i ((-)-12). Mesures realitzades per absorbància.



**Figura 51:** Efecte sobre la complexació a Av d'afegir una cadena lateral de valerat al lligand monovalent PDU (6) obtenint-se els enantiòmers del lligand monovalent PDU-N-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-8) i ((-)-8). Mesures realitzades per absorbància.

### 3.5 Estudis d'agregació de lligands monovalents mitjançant espectrometria de masses-electrosprai (MS-ESI)

En la caracterització per MS-ESI dels compostos **5**, **8**, **9**, **12** i **13** en condicions estàndard (en MeOH o MeOH/H<sub>2</sub>O) es van detectar senyals relativament intensos a valors de m/z corresponents a dímers, trímers i tetràmers. Això ens donava indicis de la formació d'agregats d'aquests compostos.

Com que en la mesura de la constant d'associació d'aquests lligands a Av o SA<sub>v</sub> no és el mateix considerar que tot el lligand està en forma de monòmer o que està parcialment agregat, vam voler verificar si en medi aquós (medi en què es formen els complexos amb les proteïnes estudiades) també es detectaven aquests agregats i quines eren les millors condicions per detectar-los. D'altra banda calia fer un estudi a diferents concentracions per tal de verificar que els senyals detectats corresponien efectivament a dímers i trímers de tipus no-covalent, i que la seva proporció relativa respecte del monòmer disminuïa al diluir.

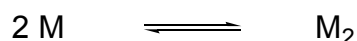
Per tal de realitzar aquests estudis d'agregació es van escollir inicialment els compostos **5** i **12**. Aquests estudis de MS-ESI es van realitzar a pH < 3 (on l'àcid es troba en forma neutra) i a pH = 7.0 (on l'àcid es troba en forma de monoanió).

Els resultats obtinguts en ESI (+) semblen indicar que els compostos **5** i **12** s'agreguen en aigua, tant quan es troben en medi d'àcid fòrmic aquós al 0.1% (pH < 3) com quan es troben en medi de tampó acetat amònic 10 mM (pH = 7.0). En ambdós medis es va detectar la presència de dímers ([M<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>, [M<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup>, [M<sub>2</sub>+K]<sup>+</sup>), trímers ([M<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, [M<sub>3</sub>+Na]<sup>+</sup>, [M<sub>3</sub>+K]<sup>+</sup>) i tetràmers ([M<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup>, [M<sub>4</sub>+Na]<sup>+</sup>, [M<sub>4</sub>+K]<sup>+</sup>) en proporció decreixent. El caràcter no-covalent d'aquestes espècies va quedar confirmat al disminuir la seva proporció relativa respecte del monòmer ([M+H]<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup>, [M+K]<sup>+</sup>) amb la dilució.

Per MS-ESI(-) també es detectaven dímers ([M<sub>2</sub>-H]<sup>-</sup>, [M<sub>2</sub>+AcO]<sup>-</sup>), trímers ([M<sub>3</sub>-H]<sup>-</sup>, [M<sub>3</sub>+AcO]<sup>-</sup>), etc. i la seva proporció relativa respecte del monòmer ([M-H]<sup>-</sup>, [M+AcO]<sup>-</sup>) també disminueix amb la dilució.

La tècnica MS-ESI s'ha utilitzat recentment en la determinació de constants d'associació (o de dimerització) de diversos compostos, per exemple per a calcular la constant d'associació d'èters corona amb els ions Na i K,<sup>72</sup> per a la complexació de β-ciclodextrines amb diversos lligands,<sup>73</sup> a més d'altres exemples.<sup>74-77</sup> La bona concordança dels valors obtinguts per MS-ESI amb els valors obtinguts per mètodes espectroscòpics,<sup>73</sup> avala la utilització d'aquesta tècnica per a la determinació de constants d'associació en determinades situacions.

A partir d'un model senzill que només tingui en compte l'equilibri monòmer-dímer (Esquema 13), es dedueix l'Equació 15:



Esquema 13

$$C_t = 2[M_2] + [M] \quad R = \frac{[M]}{[M_2]} \quad K_{\text{dim}} = \frac{[M_2]}{[M]^2}$$

on:

$C_t$ : concentració total de compost

$[M]$ : concentració de monòmer

$[M_2]$ : concentració de dímer

$K_{dim}$ : constant de dimerització

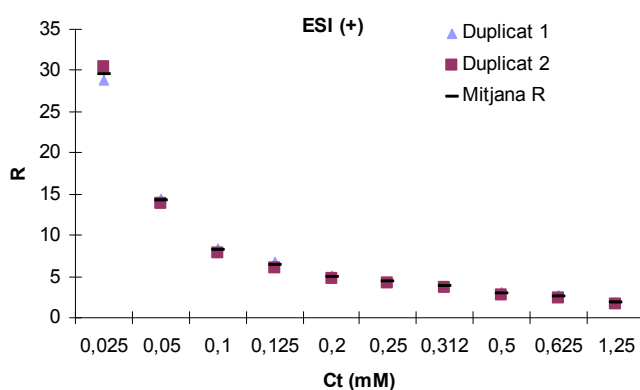
$R$ : relació de concentracions de monòmer respecte a dímer

$$C_t = \frac{2}{K_{dim}} \cdot \frac{1}{R^2} + [M]$$

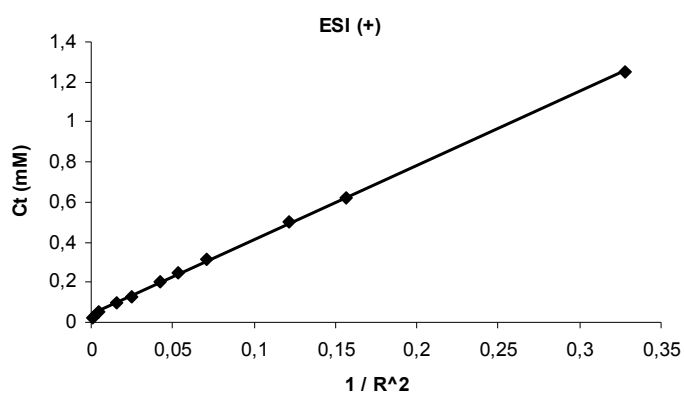
#### Equació 15

Per tant, al representar els valors de  $C_t$  vs  $1/R^2$ , s'hauria d'obtenir una recta el pendent de la qual hauria de correspondre al doble de l'invers de  $K_{dim}$  (Equació 15).

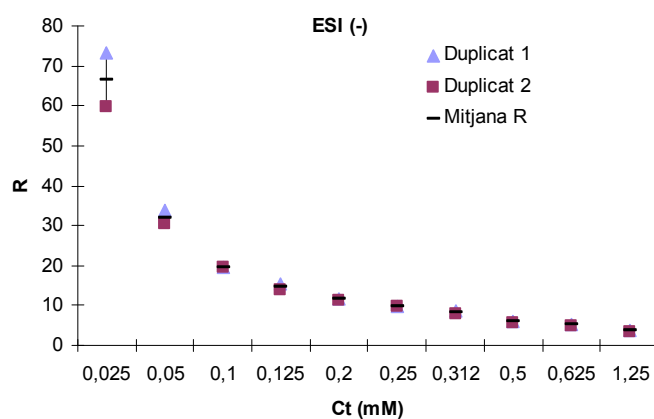
Degut a la major disponibilitat de producte, els següents estudis es van realitzar només amb el compost DMPDU-C-C<sub>4</sub>-COOH (**5**). Per tal que el model fos aplicable es va treballar en un rang de concentracions prou baix com perquè només es detectés senyal de monòmer i de dímer. Es van fer les mesures a pH = 7.0, ja que aquestes són les condicions en què es determina habitualment la constant d'associació a la proteïna. Les mesures de les dissolucions de lligand a diferents concentracions es van realitzar en les mateixes condicions experimentals, durant el mateix dia i per duplicat per tal d'evitar artefactes de la tècnica que donessin lloc a resultats erronis. Els resultats obtinguts a través de MS-ESI (+) es mostren a la Figura 52 i Figura 53, mentre que els obtinguts a través de MS-ESI (-) es mostren a la Figura 54 i Figura 55.



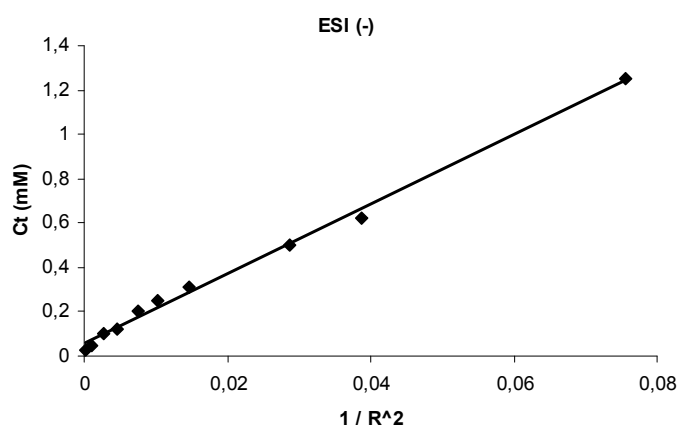
**Figura 52:** Representació de la relació monòmer/dímer ( $R$ ) respecte a la concentració total de compost **5** obtinguda mitjançant mesures de MS-ESI(+).



**Figura 53:** Representació de la concentració total de compost **5** en funció de l'invers de la relació monòmer/dímer al quadrat, deduïda per MS-ESI(+).



**Figura 54:** Representació de la relació monòmer/dímer (R) respecte a la concentració total de compost **5** obtinguda mitjançant mesures de MS-ESI(-).



**Figura 55:** Representació de la concentració total de compost **5** en funció de l'invers de la relació monòmer/dímer al quadrat deduïda per MS-ESI(-).

El fet que l'ajust de la recta teòrica als valors experimentals sigui raonablement bo, tant en ESI(+), com en ESI(-), sembla confirmar que el model de dimerització i la tècnica de MS-ESI siguin apropiats per a aquests estudis.

Els valors de constant de dimerització ( $K_{\text{dim}}$ ) obtinguts en cada cas en aplicar l'Equació 15 es troben indicats a la Taula 9.

Tècnica	$K_{\text{dim}} \text{ (M}^{-1}\text{)}$
MS-ESI (+)	$270 \pm 30$
MS-ESI (-)	$64 \pm 3$

**Taula 9:** Valors de  $K_{\text{dim}}$  obtinguts per al lligand DMPDU-C-C<sub>4</sub>-COOH (**5**).

Segons els resultats obtinguts sembla que els lligands estudiats s'agreguen en medi aquós, tot i que els valors que s'obtenen de  $K_{\text{dim}}$  varien en funció de la tècnica utilitzada per al seu estudi. Val a dir que habitualment la tècnica MS-ESI (+) és més sensible que la tècnica MS-ESI (-) a l'hora de detectar els ions.

És difícil assegurar que la  $K_{\text{dim}}$  obtinguda per ESI(+) es refereixi a l'espècie aniònica de l'àcid carboxílic ja que, encara que les mesures es realitzin a pH = 7.0, el compost es protona en el procés d'ionització i per aquest motiu es detecta en forma d'ió carregat positivament.

El fet que aquests lligands estessin parcialment agregats implicaria un petit cost energètic a l'hora de dissociar-se, abans de poder complexar-se a Av o SAV. Aquest peatge energètic ja estaria inclòs en el valor mesurat de la constant d'associació a la proteïna. Per tant, minimitzant la tendència a l'autoassociació del lligand, els valors mesurats de constant d'associació a Av o SAV serien majors. En aquest sentit es van dur a terme experiments similars a nivell qualitatiu amb biotina i es va observar que únicament es detectaven senyals de monòmer ( $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ) i de dímer ( $[M_2+H]^+$ ,  $[M_2+Na]^+$ ,  $[M_2+K]^+$ ). Aquest fet es podria explicar tenint en compte que la biotina té només un grup ureido. Igual que en el cas anterior, la proporció de monòmer respecte dímer ( $M/M_2$ ) augmentava a mesura que s'anava diluint la mostra. Això contribuiria a explicar, en part, la major constant d'associació de la biotina i de lligands similars amb un únic grup ureido (homobiotina, norbiotina) respecte de compostos anàlegs amb dos grups ureido (Gril-N-C<sub>4</sub>-COOH, **3**).



## **4 LLIGANDS DIVALENTS SEMI-RÍGIDS**



## 4.1 Disseny dels lligands divalents semi-rígidts

### **Entitat monovalent:**

Tal i com s'ha indicat a la introducció, en el nostre grup s'ha sintetitzat tota una sèrie de lligands divalents amb espaiadors no rígids de tipus alquilic enllaçats covalentment amb una unitat central d'àcid glutàmic per tal d'obtenir la longitud òptima.<sup>51</sup> Tots aquests lligands divalents **45**, **46** i **47** (Figura 15) contenen dues unitats de lligand monovalent **5**. L'elecció d'aquest lligand com a entitat monovalent és deguda a:

- La moderada afinitat per l'avidina i l'estreptavidina.
- És fàcilment assequible mitjançant síntesi amb alts rendiments.
- Al ser aquiral, ens estalviem la resolució del racèmic.

Aquests tres factors van fer aconsellable la utilització del lligand **5**, i no d'altres lligands com **7**, **8** o **9**, en aquesta etapa d'optimització de l'espaiador.

### **Espaiador:**

Les dues unitats d'entitat monovalent **5** estaran unides covalentment als extrems d'un espaiador. Per tal d'optimitzar l'espaiador dels lligands divalents s'han considerat tres variables:

- La longitud de l'espaiador. La longitud es considerarà òptima quan li correspongui el valor màxim de constant d'associació ( $K_a$ ).
- La rigidesa de l'espaiador. Un cert augment en la rigidesa podria traduir-se també en un augment de la  $K_a$  i en una major selectivitat de la complexació intramolecular envers la complexació intermolecular.
- La naturalesa química de l'espaiador, la qual afectaria a la polaritat, i per tant a la solubilitat del lligand divalent, però també pot afectar a la  $K_a$  dels lligands divalents.

D'aquesta manera es pretén explorar quin d'aquests espaiadors és l'òptim per tal d'obtenir complexos intramoleculars, minimitzant la formació d'oligòmers.

S'ha establert que la distància mínima que hauria de tenir un espaiador completament estès per tal que el lligand divalent pugui formar un complex intramolecular amb Av, és de 25 Å.<sup>8</sup> En el cas de SA<sub>v</sub> la distància mínima per tal de formar complexos intramoleculars sembla ser de 20 Å.<sup>78</sup>

En el present treball s'han sintetitzat lligands divalents amb una estructura que incorporés les següents unitats estructurals:

- Una unitat central rígida derivada de l'àcid 5-aminoisoftàlic, en la qual dos enllaços tenen una geometria fixada degut a la rigidesa imposada per l'anell aromàtic.
- Dues unitats de lligand monovalent **5**.
- Dos espaiadors: de tipus polièter o alquilic.

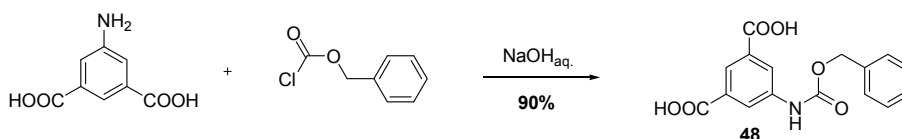
Amb aquestes unitats estructurals es pretén augmentar lleugerament la rigidesa d'aquests lligands divalents respecte als que ja estaven descrits (**45**, **46** i **47**), i verificar si aquest petit augment de rigidesa es tradueix en un augment de la constant d'associació entre lligand i proteïna, afavorint la

formació del complex intramolecular. Si aquesta situació es compleix, posteriorment s'abordaria la síntesi d'altres lligands divalents amb major grau de rigidesa.

## 4.2 Síntesi de lligands divalents semi-rígid de tipus alquílic i polièter

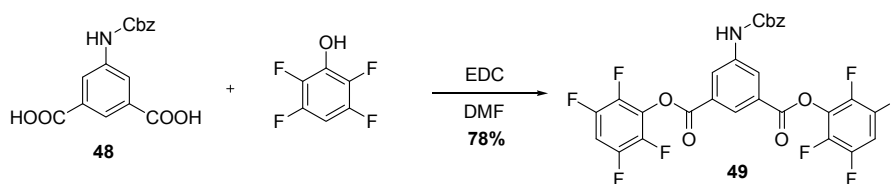
### 4.2.1 N-protecció i activació de l'àcid 5-aminoisoftàlic

En primer lloc es va dur a terme la protecció de l'extrem amino de l'àcid 5-aminobenzen-1,3-dicarboxílic mitjançant el grup protector Cbz (Esquema 14).<sup>79</sup> D'aquesta manera es deixava un punt protegit per a possibles reaccions o derivatitzacions posteriors que poguessin millorar la solubilitat del lligand final.



Esquema 14

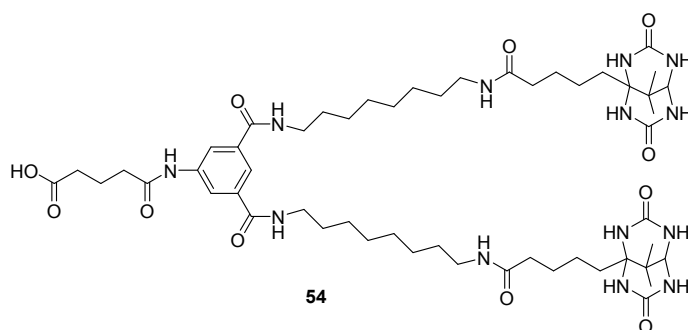
A continuació es va generar el corresponent èster activat per acoblament de **48** amb 2,3,5,6-tetrafluorofenol en DMF,<sup>49</sup> emprant EDC com agent d'acoblament (Esquema 15).



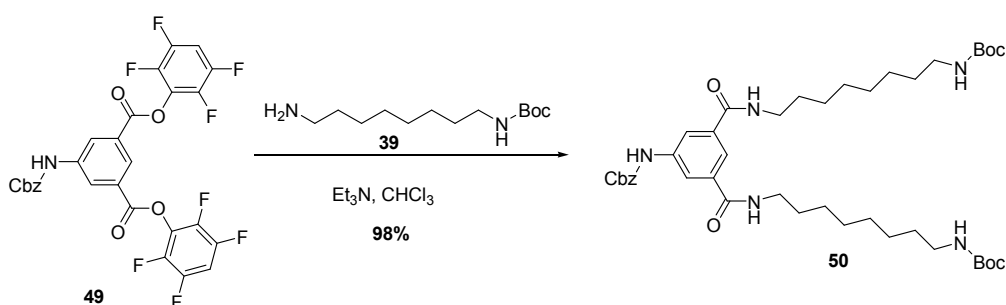
Esquema 15

Aquest èster activat (**49**) va ser l'intermedi a partir del qual es van generar els diversos lligands divalents amb espaiadors de diferent naturalesa i longitud, tal com s'exposa a continuació.

En primer lloc es van sintetitzar lligands divalents amb espaiadors de tipus alquílic, per analogia amb els lligands divalents **45**, **46** i **47** que s'havien sintetitzat al grup<sup>51</sup> i que s'unien a Av i SAV.

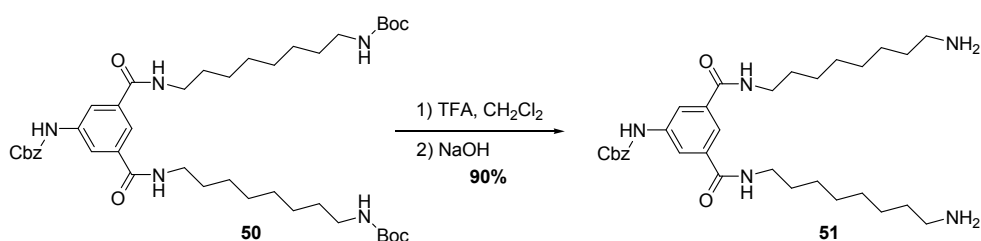
4.2.2 Síntesi del lligand divalent **54**

El lligand **54** també conté dues unitats del lligand monovalent **5** unides a una unitat central derivada de l'àcid aminoisofàlic mitjançant espaiadors de tipus alquílic de vuit metilens. Es va procedir en primer lloc amb l'acoblament del 8-aminooctilcarbamat de *tert*-butil al 3,5-bis(2,3,5,6-tetrafluorofenoxycarbonyl)fenilcarbamat de benzil (**49**) en medi de cloroform i en presència de trietilamina (Esquema 16).



Esquema 16

A continuació es va dur a terme la desprotecció dels grups amino protegits en forma de Boc mitjançant hidròlisi àcida amb TFA en medi de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Posteriorment es neutralitza la sal formada amb  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$ , i s'extreu amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  recuperant-se la diamina **51** amb un 90% de rendiment (Esquema 17).

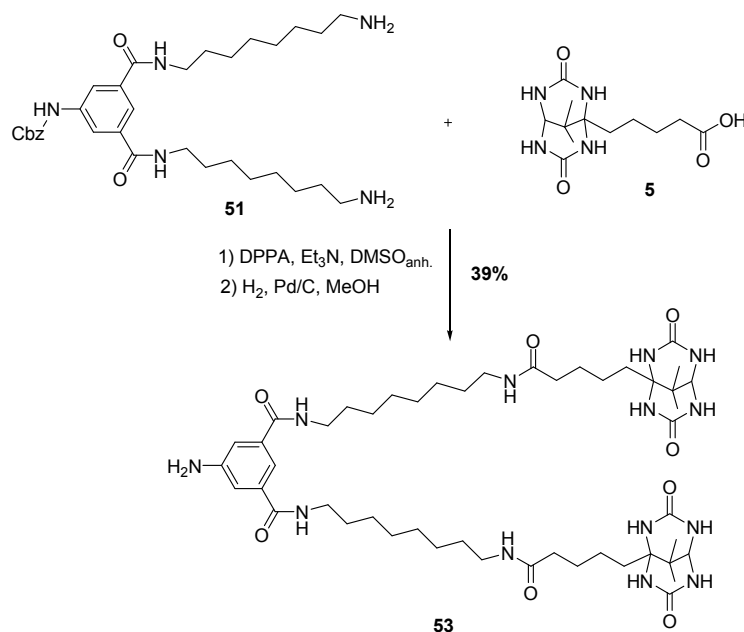


Esquema 17

La formació d'amides derivades del compost **5** és difícil degut a la poca solubilitat del compost en la majoria de dissolvents orgànics, excepte el DMSO. No obstant això, es coneix que el compost **5** s'acobra a l'espaiador amino monoprotegit **36** emprant DPPA en DMSO com a agent d'acoblament.<sup>50</sup>

Per aquest motiu s'han seguit condicions anàlogues en l'acoblament que ens interessa acoblant una molècula de lligand **5** a cadascun dels grups amino del compost **51**, utilitzant DPPA com a agent d'acoblament en medi de DMSO i en presència de trietilamina.

Després d'una purificació cromatogràfica de la barreja de reacció, s'obté el producte **52** en forma suficientment pura per procedir a la desprotecció del grup Cbz. La desprotecció mitjançant hidrogenòlisi amb catalitzador Pd/C en medi metanòlic, va proporcionar el compost **53**, el qual es va purificar mitjançant HPLC en fase reversa (Kromasil C18, H<sub>2</sub>O/MeOH; 4/6) obtenint-se amb un rendiment conjunt (acoblament i desprotecció) del 39% (Esquema 18).



Esquema 18

En els lligands divalents en què la unitat central deriva de l'àcid glutàmic (**45**, **46** i **47**), a pH = 7.0 el grup amino es troba en forma protonada, facilitant la seva solubilització en el medi aquós encara que les cadenes espaciadores siguin de tipus alquílic. En canvi, en els lligands divalents en què el grup amino està unit a un anell aromàtic (per exemple: **53**) cal esperar que aquest grup amino es trobi en forma neutra a pH = 7.0 ja que l'anilina té un pK<sub>a</sub> = 4.6.<sup>80</sup>

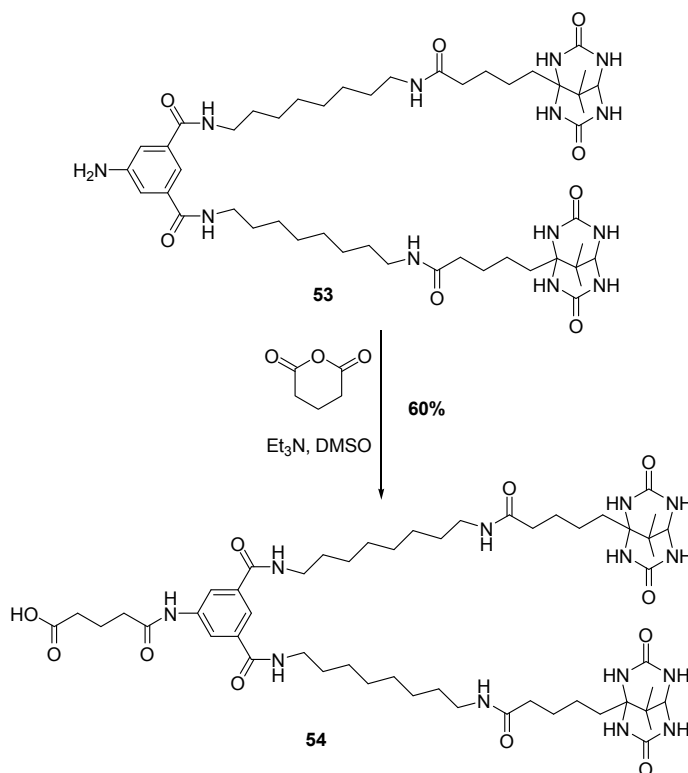
No obstant això, quan els espaciadors són de tipus polièter, el lligand divalent pot ser prou soluble en aigua a pH = 7.0 per permetre la solubilització i la determinació de la seva constant d'associació. Per contra, quan l'espaiador és de tipus alquílic, per exemple en el compost **53**, la solubilitat en medi aquós tamponat a pH = 7.0 ha resultat ser massa baixa per permetre la determinació de la constant d'associació. En aquest sentit s'han explorat diverses possibilitats per solucionar el problema:

- La determinació de la K<sub>a</sub> a pH inferior a 7.0 de manera que el grup amino es trobi protonat, ja que l'Av i SA<sub>v</sub> són estables a pH lleugerament àcids. Aquesta possibilitat presenta un problema, els valors de K<sub>a</sub> d'altres lligands (**45**, glicoluril, HABA,...) s'han determinat a pH = 7.0. Aleshores per comparar valors de constant d'associació de diferents lligands cal que s'hagin determinat al mateix valor de pH.

- La derivatització del grup amino, per exemple per reacció amb anhidrid glutàric, de manera que el nou lligand tingui un grup àcid carboxílic, el qual es trobaria ionitzat a pH = 7.0.

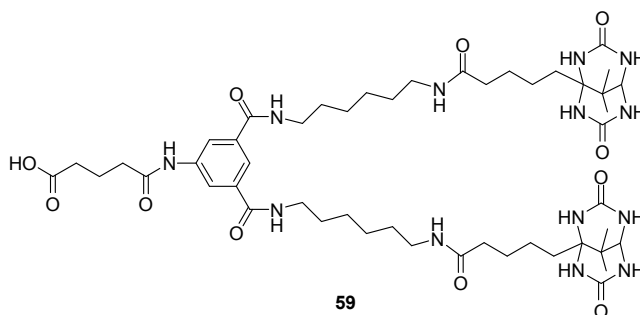
- L'addició d'una petita quantitat d'un co-dissolvent per tal d'augmentar la solubilitat del lligand en el medi aquós tamponat a pH = 7.0.

En un primer moment es va optar per derivatitzar el compost **53** mitjançant la reacció del grup amino lliure amb anhidrid glutàric en medi de DMSO i en presència de Et<sub>3</sub>N, seguida de purificació per HPLC en fase reversa (Kromasil C18, 0.1% HCOOH<sub>aq</sub>/MeOH; 4/6) proporcionant el compost **54** amb un rendiment del 60% (Esquema 19). No obstant això, el compost **54**, tot i ser més soluble que el compost **53**, encara no era suficientment soluble en medi aquós a pH = 7.0, per la qual cosa va ser necessària l'addició d'un co-dissolvent (MeOH, DMSO) per tal de dissoldre el compost completament i fer els estudis d'associació a la proteïna.

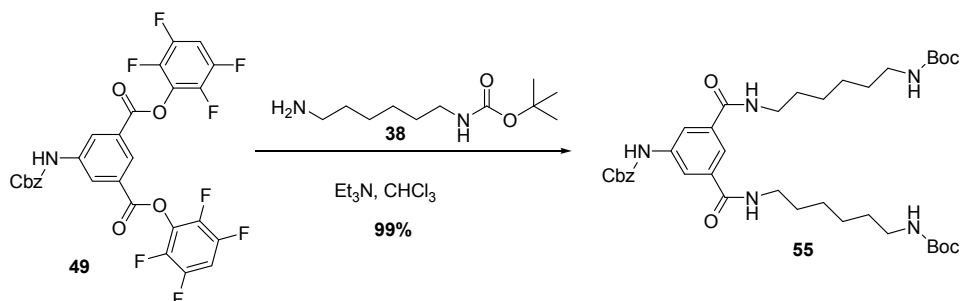


Esquema 19

#### 4.2.3 Síntesi del lligand divalent **59**

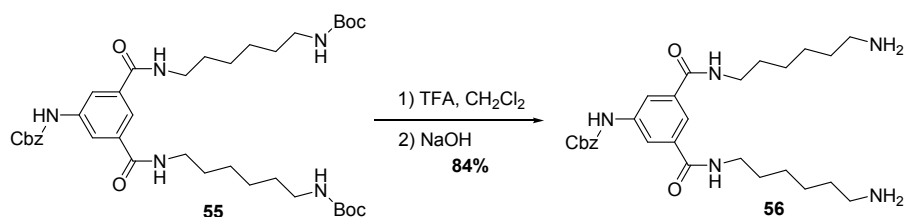


Aquest compost també conté dues unitats del lligand monovalent **5** unides a una unitat central derivada de l'àcid aminoisofàlic mitjançant espaiadors de tipus alquílic, però ara ambdós espaiadors són de sis metilens. Anàlogament a les síntesis prèvies, es va procedir en primer lloc a l'acoblament del 6-aminohexilcarbammat de *tert*-butil (**38**) al 3,5-bis(2,3,5,6-tetrafluorofenoxicarbonil)fenilcarbammat de benzil (**49**) en medi de cloroform i en presència de trietilamina (Esquema 20).



Esquema 20

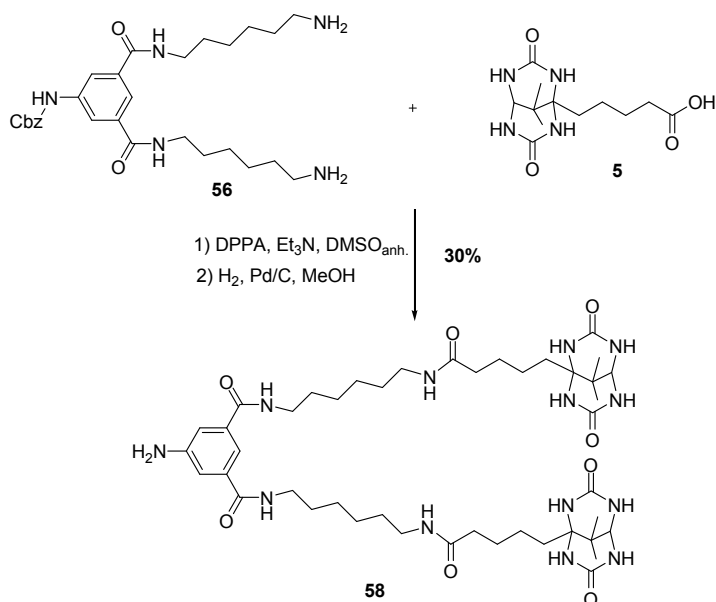
A continuació es va dur a terme la desprotecció dels grups amino protegits en forma de Boc mitjançant hidròlisi àcida amb TFA en medi de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Posteriorment es neutralitza la sal formada amb  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$  i s'extreu amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  recuperant-se la diamina **56** amb un 84% de rendiment (Esquema 21).



Esquema 21

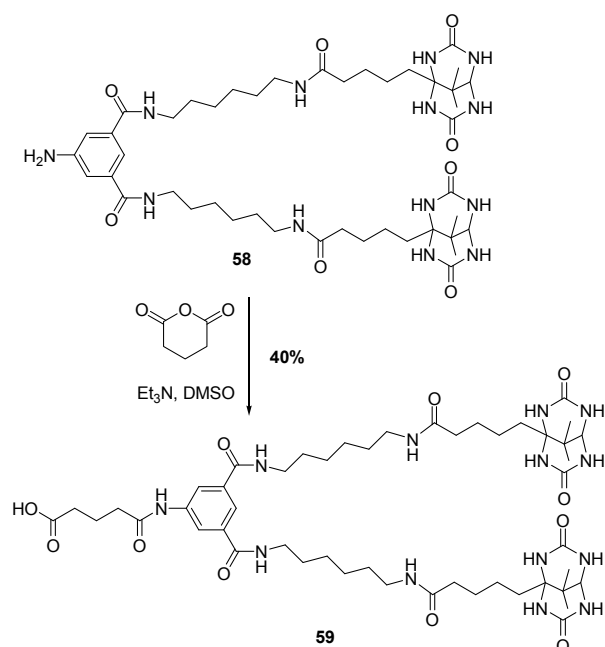
A continuació s'acobra en compost **5** a cadascun dels grups amino del compost **56**, utilitzant DPPA com a agent d'acoblament en medi de DMSO i en presència de trietilamina. Després d'una purificació cromatogràfica de la barreja de reacció, s'obté el producte **57** en forma suficientment pura per procedir a la desprotecció del grup Cbz. La desprotecció mitjançant hidrogenòlisi amb catalitzador Pd/C en medi metanòlic, va proporcionar el compost **58**, el qual es va purificar mitjançant HPLC en fase reversa (Kromasil C18,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ; 1/1) obtenint-se amb un rendiment conjunt (acoblament i desprotecció) del 30% (Esquema 22).





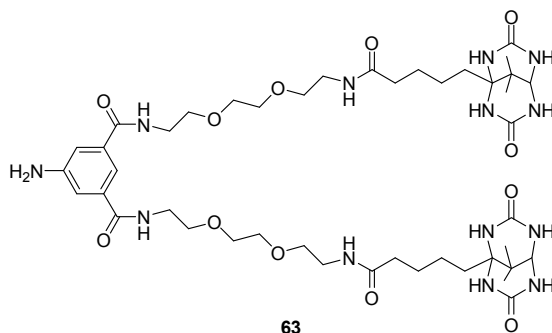
Esquema 22

Es va comprovar la solubilitat del compost **58** en medi aquós tamponat (PBS, pH = 7.0) i es va observar que el compost no era completament soluble en aquest medi, tot i haver disminuït la longitud de les cadenes alquíliques. Per aquest motiu es va pensar en derivatitzar-lo a través del grup amino lliure fent-lo reaccionar amb anhídrid glutàric i generant d'aquesta manera el derivat àcid, el qual hauria d'estar en forma de sal a pH = 7.0, amb la qual cosa milloraria la seva solubilitat (Esquema 23).

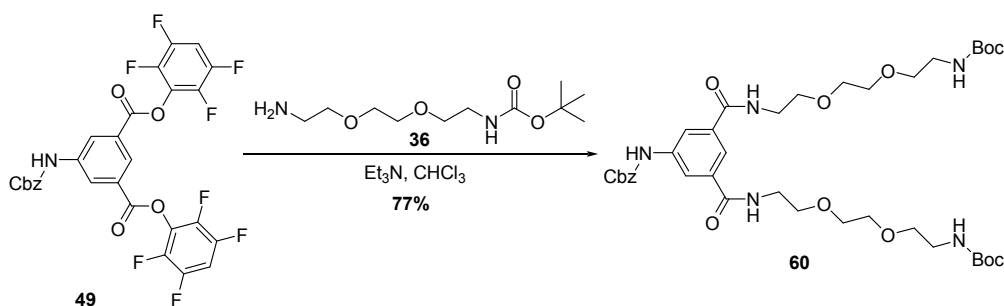


Esquema 23

El compost **59**, tot i tenir quatre metilens menys que el compost **54** tampoc era gaire soluble en aigua a pH = 7.0, de manera que es va procedir a sintetitzar lligands divalents amb espaiadors de tipus polièter que li conferissin millor solubilitat en aquestes condicions.

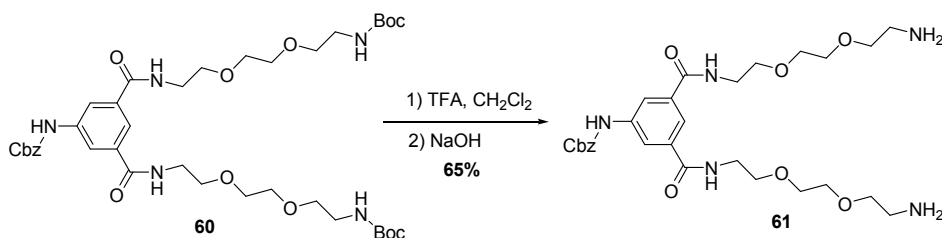
4.2.4 Síntesi del lligand divalent **63**

En primer lloc es va incorporar un espaiador de tipus polièter, la 3,6-dioxaoctan-1,8-diamina monoprotegida en un extrem amino mitjançant el grup Boc (**36**) (Esquema 24). Amb aquest espaiador es pretenia que el lligand divalent obtingut fos més soluble en medi aquós, degut a la presència dels grups èter tot i mantenir una certa flexibilitat per encaixar en els llocs d'unió de la proteïna. La reacció de l'èster activat **49** amb l'amina **36** en cloroform va proporcionar el compost **60** amb un 77% de rendiment.



Esquema 24

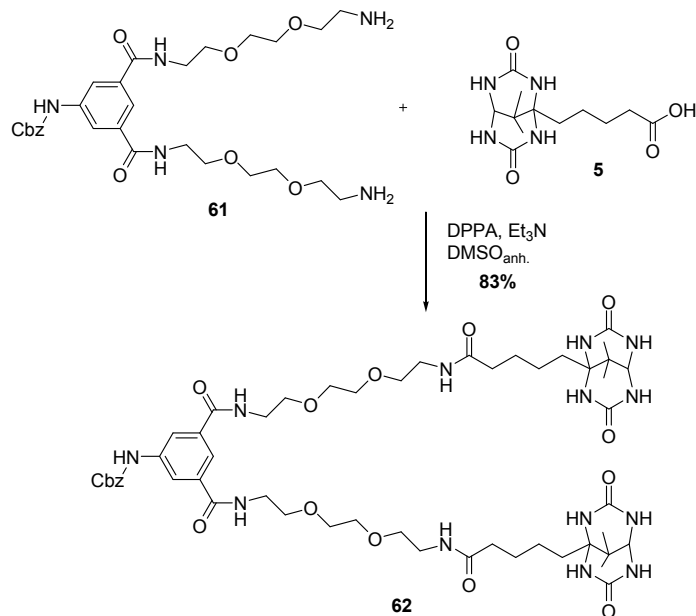
A continuació es va dur a terme la desprotecció dels grups amino protegits en forma de Boc mitjançant hidròlisi àcida amb TFA en medi de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Posteriorment es neutralitza la sal formada amb  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$  i s'extreu amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  recuperant-se la diamina **61** amb un 65% de rendiment (Esquema 25).



Esquema 25

A continuació s'acobla el compost **5** a cadascun dels grups amino del compost **61** utilitzant DPPA com a agent d'acoblament en medi bàsic de  $\text{Et}_3\text{N}$  i DMSO com a dissolvent ja que així podem

tenir tots dos compostos en dissolució (Esquema 26), obtenint-se el compost desitjat **62** amb un 83% de rendiment.

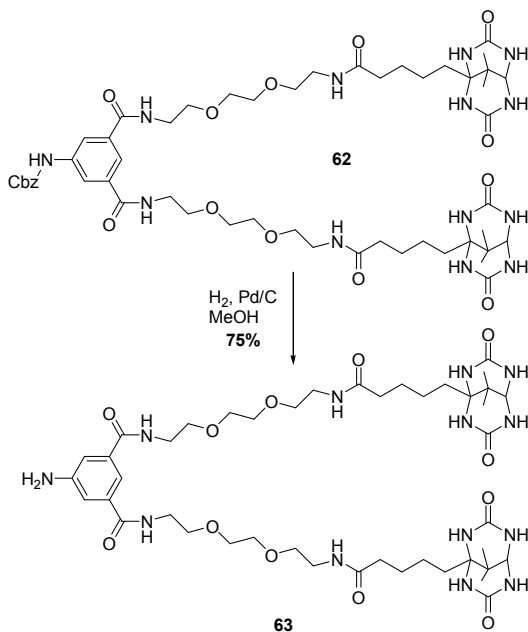


Esquema 26

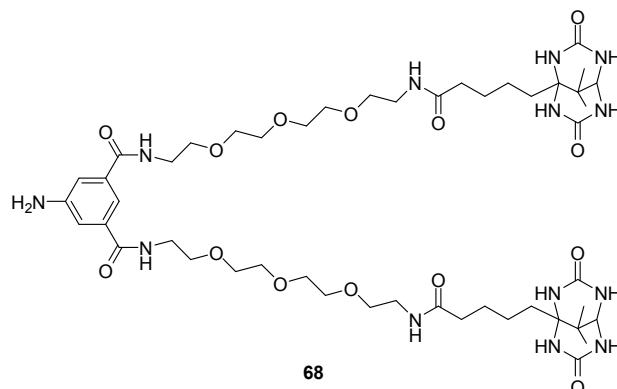
Finalment es procedeix a la desprotecció del grup Cbz mitjançant hidrogenòlisi utilitzant hidrogen i Pd sobre carbó com a catalitzador en MeOH (Esquema 27).

Degut a la seva elevada polaritat, el compost **63** es va haver de purificar per HPLC en fase reversa (Kromasil C18, MeOH/H<sub>2</sub>O; 6/4), obtenint-se el producte desitjat amb un 75% de rendiment.

Com a conseqüència de què el compost **63** ja era suficientment soluble en aigua a pH = 7.0, no va ser necessari derivatitzar-lo per reacció amb anhidrid glutàric.

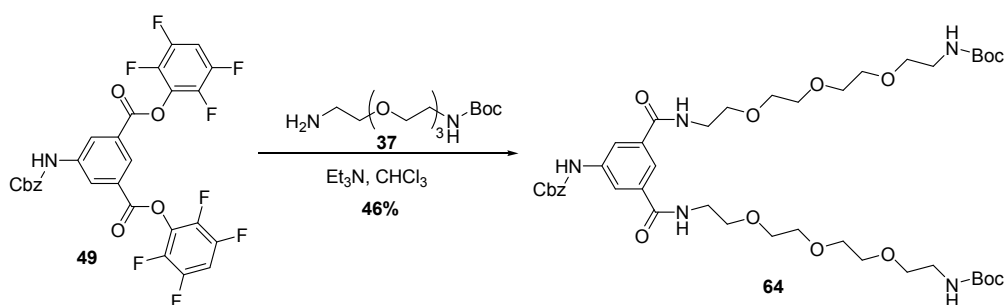


Esquema 27

4.2.5 Síntesi del lligand divalent **68**

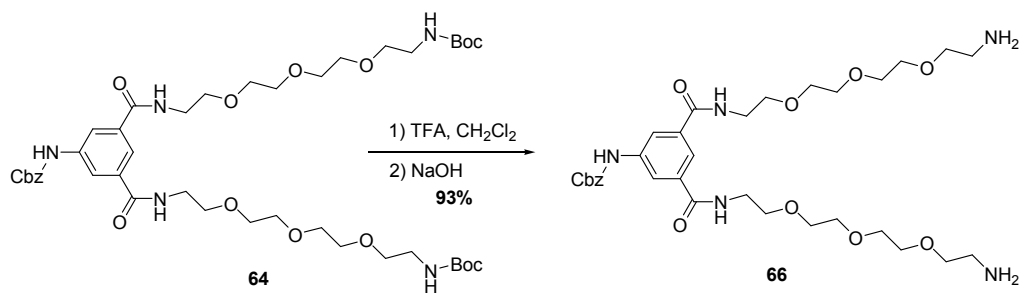
Aquest compost també conté dues unitats del lligand monovalent **5** unides a una unitat central derivada de l'àcid aminoisoftàlic mitjançant espaiadors de tipus polièter. No obstant això, en el compost **68**, l'espaiador té una llargada superior a la del compost **63**.

Anàlogament a la síntesi del compost **63** es va procedir en primer lloc a l'acoblament de l'11-amino-3,6,9-dioxaundecilcarbamit de *tert*-butil (el qual havia estat sintetitzat en el nostre grup)<sup>51</sup> al 3,5-bis(2,3,5,6-tetrafluorofenoxicarbonil)fenilcarbamit de benzil en medi de cloroform i en presència de trietilamina (Esquema 28). En aquest cas s'obté el producte desitjat **64** amb un rendiment del 46% acompanyat d'un 10% del corresponent producte de monosubstitució **65**.



Esquema 28

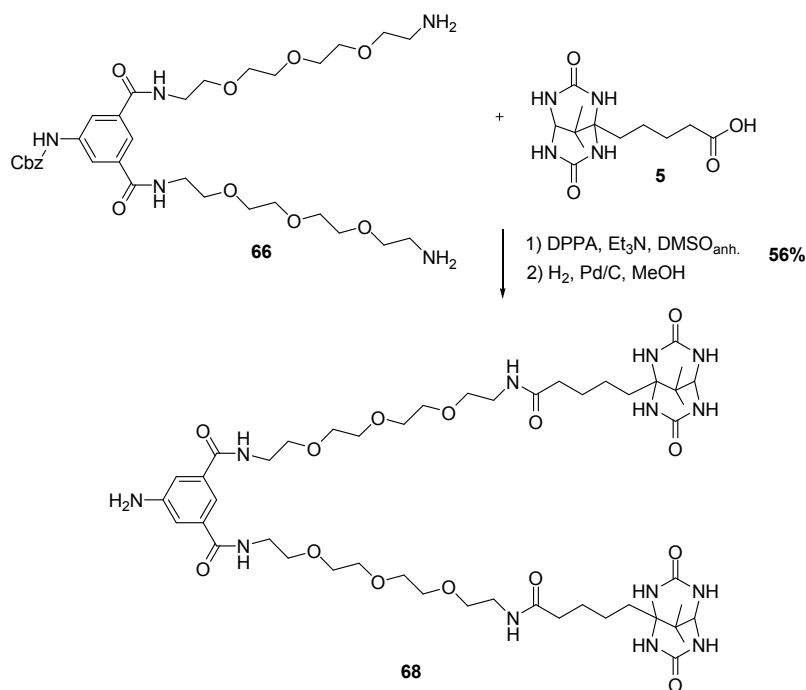
A continuació es va dur a terme la desprotecció dels grups amino protegits en forma de Boc mitjançant hidròlisi àcida amb TFA en medi de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Posteriorment es neutralitza la sal formada amb  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$  i s'extreu amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  recuperant-se la diamina **66** amb un 93% de rendiment (Esquema 29).



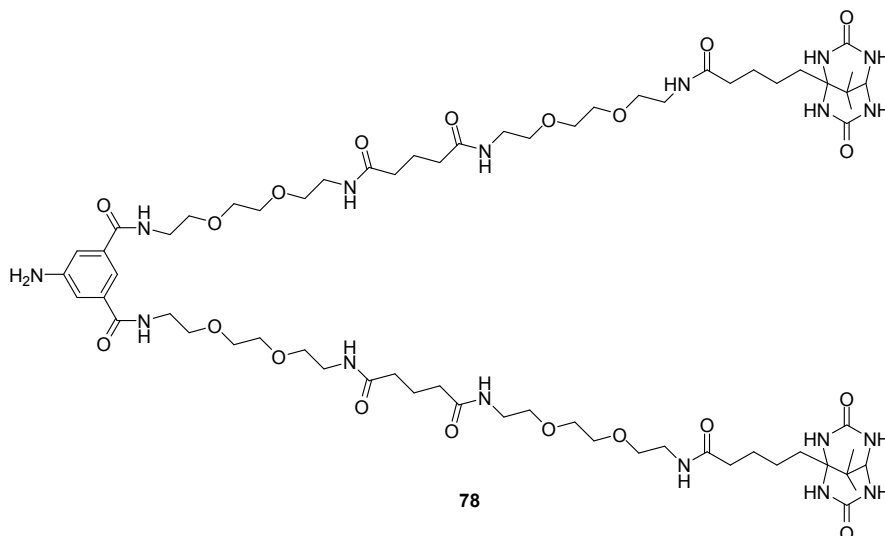
Esquema 29

A continuació s'acobla el compost **5** a cadascun dels grups amino del compost **66**, utilitzant DPPA com a agent d'acoblament en medi de DMSO i en presència de trietilamina. Després d'una purificació cromatogràfica de la barreja de reacció, s'obté el producte **67** en forma suficientment pura per procedir a la desprotecció del grup Cbz.

La desprotecció mitjançant hidrogenòlisi amb catalitzador Pd/C en medi metanòlic, va proporcionar el compost **68**, el qual es va purificar mitjançant HPLC en fase reversa (Kromasil C18, H<sub>2</sub>O/MeOH; 1/1) obtenint-se amb un rendiment conjunt (acoblament i desprotecció) del 56% (Esquema 30).

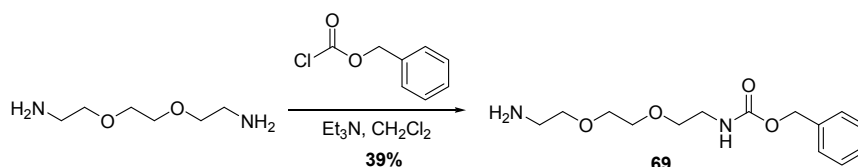


Esquema 30

4.2.6 Síntesi del lligand divalent **78**

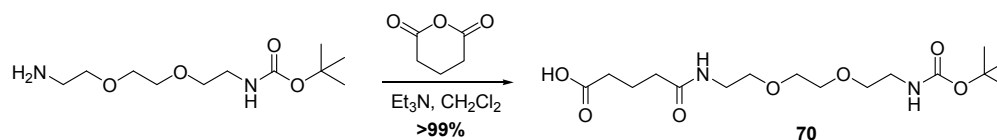
Aquest compost també conté dues unitats del lligand monovalent **5** unides a una unitat central derivada de l'àcid aminoisoftàlic mitjançant espaiadors de tipus polièter, però amb una longitud bastant superior a la dels compostos **63** i **68**.

Per a la síntesi d'aquest lligand, es va partir de la 3,6-dioxaoctan-1,8-diamina, la qual es va protegir en primer lloc per reacció amb cloroformat de benzil en medi de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i en presència de trietilamina, generant d'aquesta forma el 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamit de benzil (**69**) amb un 39% de rendiment (Esquema 31).



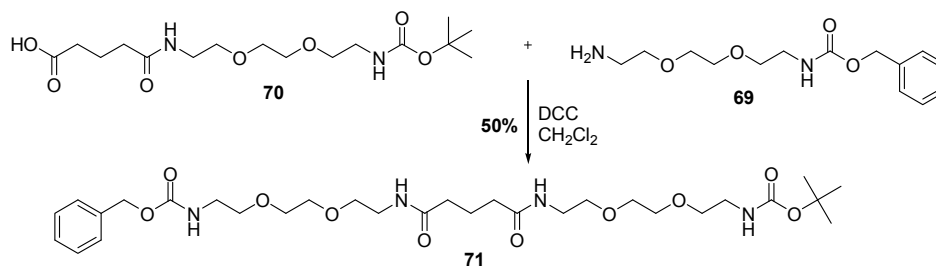
Esquema 31

D'altra banda es va fer reaccionar el 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamit de *tert*-butil amb anhídrid glutàric en medi de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i en presència de trietilamina, obtenint-se l'àcid carboxílic **70** amb un rendiment pràcticament quantitatiu (Esquema 32).



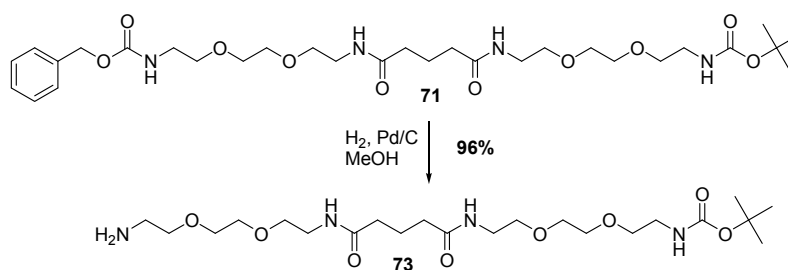
Esquema 32

L'acoblament de l'àcid carboxílic **70** i l'amina **69** emprant DCC com agent d'acoblament en medi de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , va proporcionar el compost **71** amb un 50% de rendiment acompanyat d'una quantitat important (37%) de la corresponent N-acilurea **72** (Esquema 33).



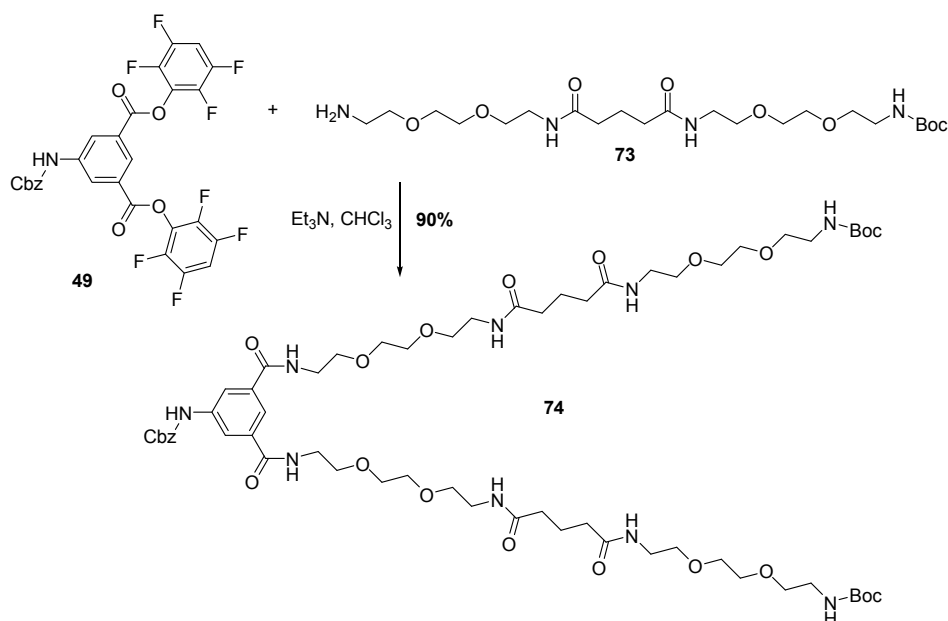
Esquema 33

Tot seguit es va dur a terme la desprotecció de l'extrem amino protegit amb el grup Cbz mitjançant hidrogenòlisi amb Pd sobre carbó com a catalitzador en medi metanòlic, generant d'aquesta manera el compost **73** amb un 96% de rendiment (Esquema 34).



Esquema 34

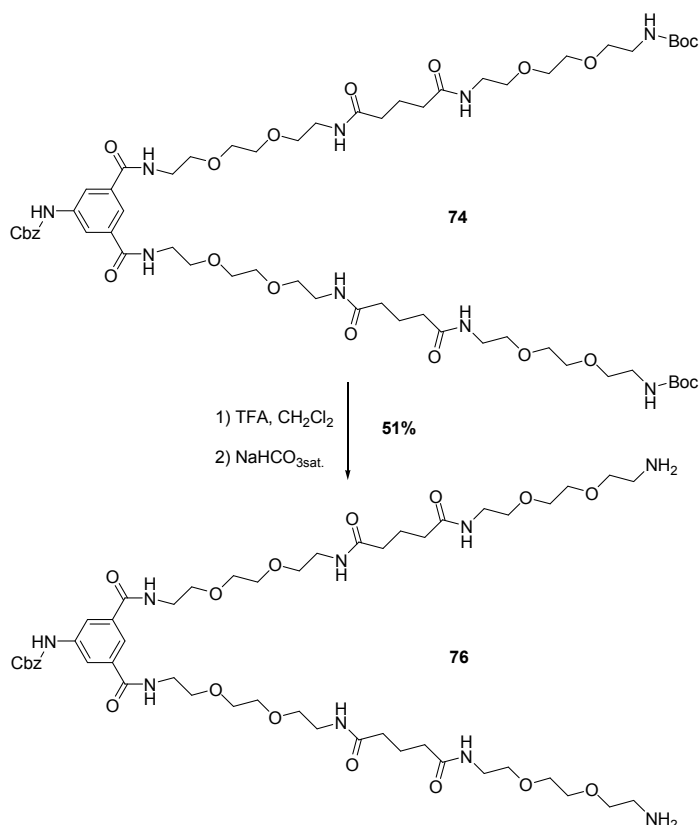
A continuació es va acoblar l'amina **73** al dièster activat 3,5-bis(2,3,5,6-tetrafluorofenoxycarbonyl)fenilcarbammat de benzil (**49**), obtenint-se el compost **74** amb un 90% de rendiment (Esquema 35).



Esquema 35

Aleshores es desprotegeixen els extrems amino protegits amb el grup Boc mitjançant hidròlisi àcida amb TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A continuació es neutralitza la sal formada amb NaHCO<sub>3sat.</sub> i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, recuperant-se la diamina **76** amb un 51% de rendiment (Esquema 36).

El menor rendiment obtingut en aquesta desprotecció respecte de les de compostos anàlegs descrits anteriorment podria ser degut a què és més hidròfil, la qual cosa dificultaria la seva recuperació mitjançant extracció amb un dissolvent orgànic.

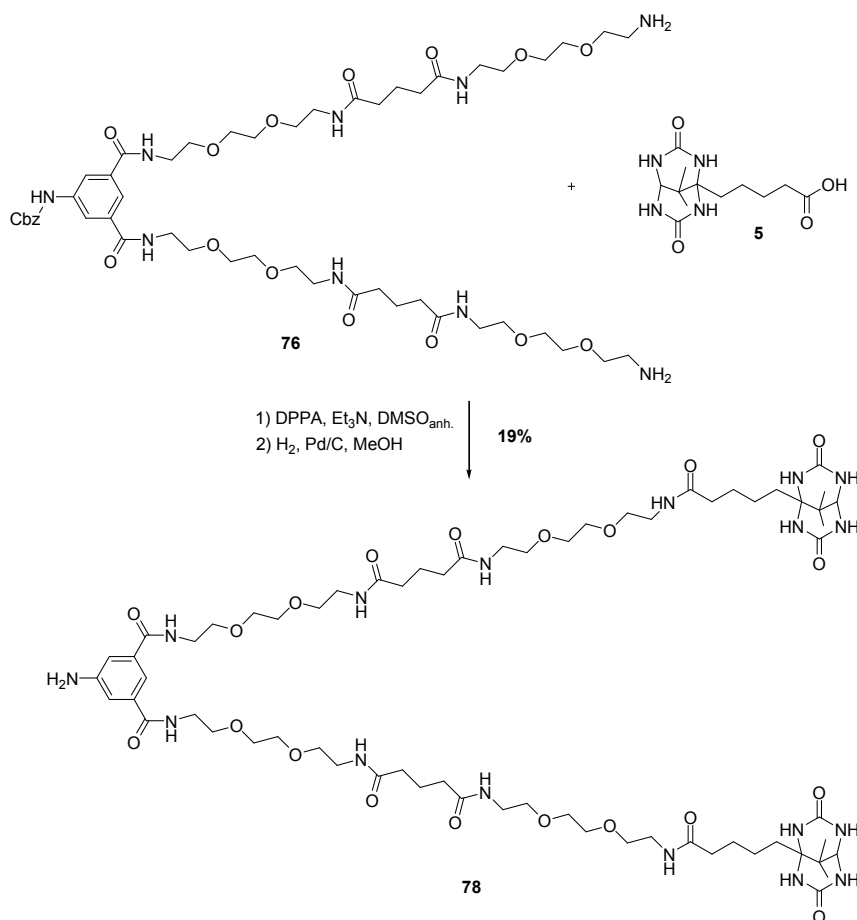


Esquema 36

A continuació es van acoblar dues molècules de compost **5**, una a cadascun dels grups amino del compost **76** utilitzant DPPA com agent d'acoblament en DMSO i en presència de Et<sub>3</sub>N, tal com s'havia fet en casos anteriors.

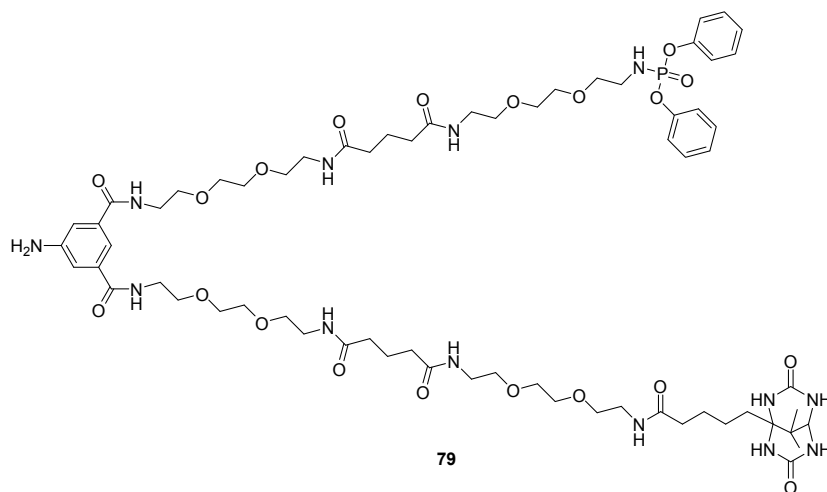
El producte **77** obtingut, una vegada purificat cromatogràficament, es va desprotegir mitjançant hidrogenòlisi del grup Cbz emprant un catalitzador de Pd sobre carbó en medi metanòlic. La purificació final mitjançant HPLC en fase reversa (Kromasil C18, H<sub>2</sub>O/MeOH; 6/4) va proporcionar l'amina **78** amb un 19% de rendiment conjunt de les dues etapes (acoblament i desprotecció) (Esquema 37).





Esquema 37

Es va intentar augmentar el rendiment en l'etapa de desprotecció del grup Boc aïllant el trifluoroacetat de l'amina i generant l'amina lliure "in situ" en la reacció d'acoblament posterior, però el resultat encara va ser pitjor ja que en aquest cas es va obtenir el compost **79** com a producte majoritari (28% de rendiment) sense que es detectés pràcticament gens del producte esperat.<sup>81</sup>



### 4.3 Estudis de complexació de lligands divalents semi-rígid a avidina i estreptavidina

En general, en una complexació lligand-receptor, la rigidificació de les molècules que interaccionen es tradueix en un augment considerable de la constant d'associació, d'entre 4 i 10 vegades per a cada rotació congelada. Això és degut a què el cost entròpic corresponent a la pèrdua de graus de llibertat conformacional ja s'ha pagat per avançat durant la síntesi del lligand o receptor semi-rígid. Aquesta contribució entròpica està habitualment entre  $-3.5$  i  $-5$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  per cada rotació congelada.<sup>59</sup>

Igual que en el cas dels lligands monovalents, les constants d'associació entre els lligands divalents sintetitzats i les proteïnes Av i SAV també es van determinar mitjançant valoracions espectrofotomètriques competitives, per a les quals es va utilitzar el colorant HABA com a competidor. Així doncs, l'addició d'una dissolució de lligand divalent sobre una dissolució de proteïna i HABA, provocava una disminució de l'absorbància a 500 nm (HABA complexat) i un augment de l'absorbància a 348 nm (HABA lliure) degut al desplaçament de l'HABA del lloc d'unió a la proteïna per l'addició del lligand. Tenint en compte que les constants d'associació entre l'HABA i Av o SAV són conegudes ( $K_a = 1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  i  $K_a = 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  respectivament),<sup>8</sup> es pot calcular la constant d'associació entre el lligand i la proteïna.

#### 4.3.1 Model d'unió i equacions per una valoració espectrofotomètrica competitiva amb un lligand divalent

Suposant que aquests lligands interaccionen amb Av i SAV formant el complex divalent, aquest tindrà una estequiometria 1:2 (Figura 56).

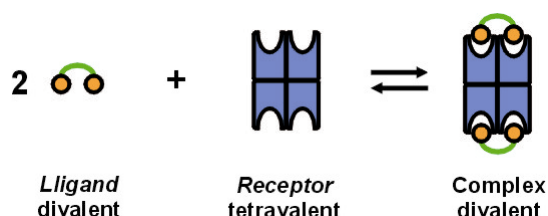


Figura 56

No obstant això, si a més suposem que tampoc hi ha efectes cooperatius, és a dir que les dues subunitats amb els llocs d'unió propers es comporten de manera independent de les altres dues subunitats, la reacció de complexació es podria considerar equivalent a la de formació d'un complex d'estequiometria 1:1 entre el lligand divalent i la bis-subunitat proteica amb els llocs d'unió adjacents (Figura 57).

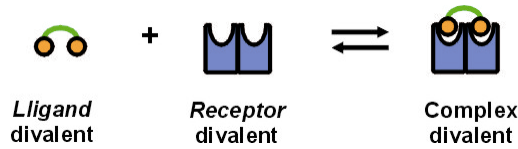


Figura 57

Per tant, fent aquestes dues suposicions, la valoració competitiva es podria representar tal com s'indica a continuació (Figura 58).

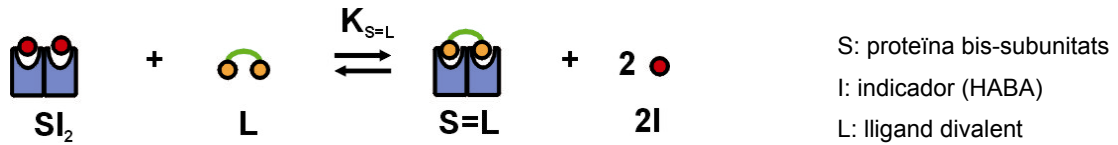


Figura 58

No obstant això, s'ha considerat també la possibilitat que, a més del complex divalent (S=L), es puguin formar també els complexos monovalents (S-L, SL<sub>2</sub> i S<sub>2</sub>L) tal com s'indica a la Figura 59.<sup>50</sup>

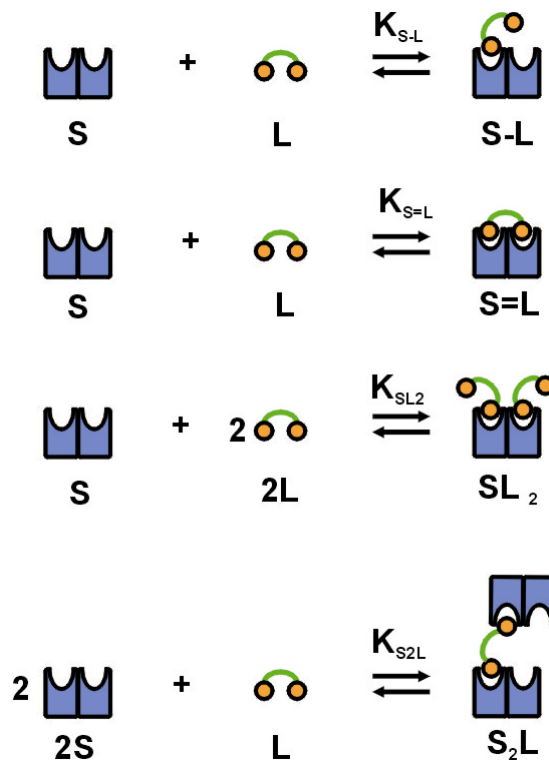


Figura 59

La consideració d'aquests equilibris dóna lloc a les següents expressions matemàtiques, les quals han estat utilitzades en l'ajust de mínims quadrats de l'absorbància calculada ( $A_{\text{calc.}}$ ) a l'absorbància experimental ( $A_{\text{exp.}}$ ) (Equació 16).<sup>50</sup>

$$[S] = \frac{S_t}{1 + K_{SI}[I] + K_{S=L}[L] + K_{SI}K_{SI_2}[I]^2 + K_{S=L}[L](1 + K_{L_2S}[L] + 2K_{S_2L}[S])}$$

$$[I] = \frac{I_t}{1 + K_{SI}[S](1 + 2K_{SI_2}[I])}$$

$$[L] = \frac{L_t}{1 + K_{S=L}[S] + K_{S=L}[S](1 + 2K_{SL_2}[L] + K_{S_2L}[S])}$$

$$[SI] = K_{SI}[S][I]$$

$$[SI_2] = K_{SI_2}[I][SI]$$

$$A_{calc} = \varepsilon_{I(500)}[I] + \varepsilon_{SI(500)}([SI] + 2[SI_2])$$

#### Equació 16

On:

$I_t$ : concentració total d'indicador (HABA)

$S_t$ : concentració total de bis-subunitats de proteïna

$L_t$ : concentració total de lligand

$[I]$ : concentració d'indicador lliure (HABA)

$[S]$ : concentració de bis-subunitats de proteïna lliure

$[L]$ : concentració de lligand lliure

$[SI]$ : concentració de complex SI

$[SI_2]$ : concentració de complex SI<sub>2</sub>

$K_{SI}$ : constant d'associació de l'indicador

$K_{S=L}$ : constant d'associació del lligand

L'obtenció d'un bon ajust entre la corba experimental i la calculada, en aquells casos en què s'ha obtingut, a més de proporcionar-nos el valor òptim de constant d'associació del complex divalent ( $K_{S=L}$ ), també ens indica que la suposició d'absència d'efectes cooperatius és vàlida. La incorporació dels complexos S-L, SL<sub>2</sub> i S<sub>2</sub>L al procés d'ajust no afecta gaire als valors de  $K_{S=L}$  obtinguts.

### 4.3.2 Complexos de lligands divalents semi-rígid amb estreptavidina

Tal com s'ha exposat prèviament, s'han utilitzat les valoracions espectrofotomètriques competitives per tal de determinar la  $K_a$  dels lligands divalents sintetitzats a Av i SAV. Com a compost monovalent de referència s'ha utilitzat el lligand monovalent unit a l'espaiador alquílic (**44**) o polièter (**41**) segons el cas. A continuació s'indiquen els valors de  $K_a$  obtinguts (Taula 10).

Lligand	$d_{\max}$ (Å) <sup>(c)</sup>	$K_a$ (M <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	EM (M)
<b>45</b>	27	$1.1 \pm 0.1 \times 10^6$	$-34.5 \pm 0.1$ <sup>(a)50</sup>	0.038
<b>54</b>	32	$7.8 \pm 0.3 \times 10^7$	$-45.0 \pm 0.1$ <sup>(b)</sup>	2.7
<b>59</b>	27	$3.3 \pm 0.2 \times 10^7$	$-42.9 \pm 0.1$ <sup>(b)</sup>	1.1
<b>63</b>	32	$1.1 \pm 0.2 \times 10^6$	$-34.4 \pm 0.1$ <sup>(a)</sup>	0.11
<b>68</b>	39	$3.4 \pm 0.2 \times 10^6$	$-37.2 \pm 0.1$ <sup>(a)</sup>	0.34
<b>78</b>	69	$1.9 \pm 0.3 \times 10^4$	$-24.4 \pm 0.4$ <sup>(a)</sup>	0.0019

**Taula 10:** Constants d'associació de lligands divalents amb SAV a pH = 7.0.

<sup>(a)</sup> Valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA en tampó fosfats.

<sup>(b)</sup> Valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA en tampó fosfats i 0.5% de DMSO.

<sup>(c)</sup> Les mesures de les distàncies entre els grups carbonil amida de les dues cadenes de valeril dels espaiadors es van dur a terme mitjançant el programa informàtic ChemDraw 3D (Cambridge-Soft Corp., Cambridge, MA) després de minimitzar l'estructura completament estesa i amb conformació planar dels compostos sintetitzats.

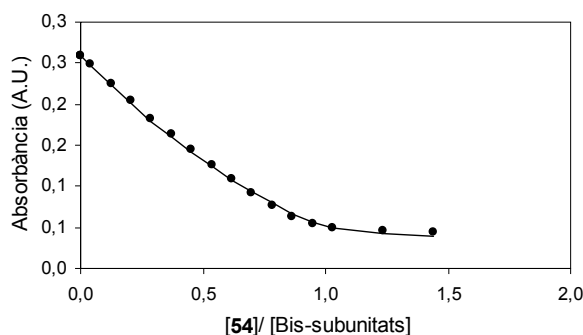
#### 4.3.2.1 Lligands divalents semi-rígid amb espaiadors de tipus alquílic

Per analogia amb els compostos que s'havien sintetitzat prèviament en el grup (**45**, **46** i **47**), els quals actuaven de forma divalent amb SAV,<sup>51,50</sup> es van estudiar compostos anàlegs amb espaiadors de tipus alquílic, però amb una unitat central rígida derivada de l'àcid 5-aminoisoftàlic.

En primer lloc es va estudiar la complexació del compost **54**, en el qual els carbonils de les cadenes de valeril de les unitats monovalents estan separats per 26 enllaços, que en una conformació totalment estesa i plana representaria una distància d'aproximadament 32 Å. Aquest compost no és completament soluble en medi aquós a pH = 7.0, per la qual cosa, la determinació de la constant d'associació es va fer emprant un co-dissolvent que facilités la seva solubilització en el medi aquós tamponat a pH = 7.0 (vegeu apartat valoracions espectrofotomètriques competitives). Prèviament es va comprovar que per dicromisme circular, la presència d'un 2-5% de DMSO no provocava la desnaturalització de la proteïna (Av) ni tampoc afectava significativament al valor de la constant d'associació del lligand **47**.<sup>51</sup> A més a més, ja s'havia vist en altres estudis

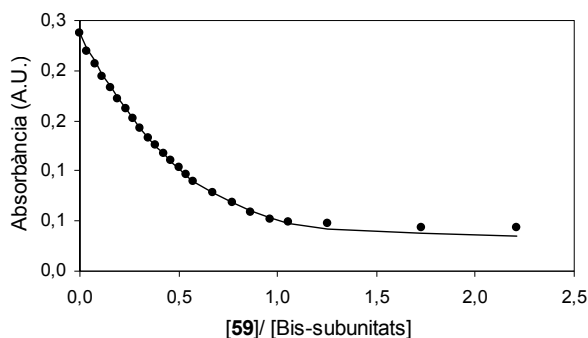
espectrofluorimètrics que l'addició de petites quantitats de co-dissolvent (DMSO) no afectaven a l'activitat de Av i SAv.<sup>82,83</sup>

Aquest compost (**54**) presenta una forta unió a SAv ( $K_a = 7.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ), unes 20000 vegades superior a la del lligand monovalent de referència (**44**). D'altra banda, la molaritat efectiva (EM) en la complexació de **54** amb SAv és 2.7 M. Aquests resultats, posen de manifest que el compost **54** s'uneix a SAv de forma divalent (Figura 60). Tot i que en el lligand divalent **45** l'espaiador és una mica més curt (22 enllaços, aproximadament 27 Å entre carbonils de valeril quan està totalment estès), el lligand **54** s'uneix a SAv amb una  $K_a$  unes 71 vegades superior a la del lligand **45**. Aquest augment de  $K_a$  porta associada una disminució de  $\Delta G$  d'uns  $10 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  que es podria atribuir en gran part a l'augment de rigidesa del lligand, al substituir la unitat central d'àcid glutàmic per una d'àcid 5-aminoisoftàlic.



**Figura 60:** Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració de SAv  $6.7 \mu\text{M}$  (bis-subunitats) i HABA  $87.7 \mu\text{M}$  amb el lligand divalent (**54**) en tampó fosfats  $0.1 \text{ M}$  a  $\text{pH} = 7.0$  i amb un  $0.5 \%$  de DMSO. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 (lligand:bis-subunitat).

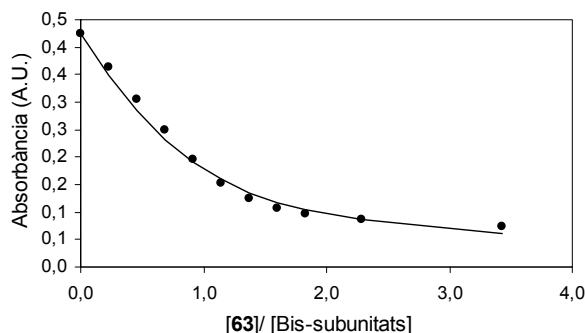
Degut a la baixa solubilitat del lligand **54** en medi aquós a  $\text{pH} = 7.0$ , es va pensar en disminuir la longitud de la cadena alquílica, la qual cosa donaria un compost probablement més soluble en aquest medi i encara suficientment llarg per actuar de manera divalent. Aquest compost va ser el lligand **59**, el qual té una separació de 22 enllaços entre els carbonils de les cadenes de valeril, de manera que coincideix en el nombre d'enllaços amb el lligand **45**. Això correspon a una longitud d'aproximadament 27 Å quan està totalment estès. Aquesta disminució en la longitud de la cadena alquílica es tradueix en una petita millora de la solubilitat del compost, però continua sent necessari l'ús del DMSO com a co-dissolvent per assegurar la dissolució total del compost. D'altra banda l'escurçament de l'espaiador en quatre metilens es tradueix en una petita disminució (2 vegades inferior) en la  $K_a$  a SAv ( $K_a = 3.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) respecte al compost **54** (Figura 61). La molaritat efectiva (EM) per a la complexació de **59** amb SAv també es força elevada ( $1.1 \text{ M}$ ), tot i que una mica inferior a la del compost **54**. Aquests resultats posen de manifest que tots dos compostos actuen de forma divalent en la seva complexació a SAv. El fet que el lligand semi-rígid **59** i el lligand conformacionalment flexible **45** tinguin aproximadament la mateixa longitud permet atribuir l'increment de  $K_a$  de 30 vegades ( $\Delta\Delta G = -8.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) del primer respecte del segon a la major rigidesa del lligand **59**.



**Figura 61:** Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració de SAv 5.9  $\mu\text{M}$  (bis-subunitats) i HABA 87.7  $\mu\text{M}$  amb el lligand divalent (**59**) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0 i amb un 0.5 % de DMSO. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 (l·ligand:bis-subunitat).

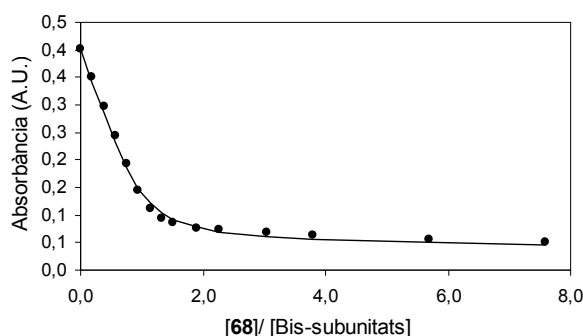
#### 4.3.2.2 Lligands divalents semi-rígidts amb espaiadors de tipus polièter

Degut als problemes de solubilitat amb què ens havíem trobat amb els espaiadors de tipus alquílic, es va optar per canviar la naturalesa de l'espaiador d'alquílic a polièter per tal de millorar la solubilitat dels compostos en el medi aquós. El lligand **63**, amb 26 enllaços de separació entre els grups carbonil de les cadenes de valeril s'uneix de forma divalent a SAv donat que s'observa un augment considerable de la constant d'associació ( $K_a = 1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ , Figura 62), unes 650 vegades superior respecte al lligand monovalent de referència (**41**). Tot i que si el comparem amb el lligand **54**, en el qual hi ha el mateix nombre d'enllaços entre els grups carbonil, però canviant la naturalesa de l'espaiador, s'obté una disminució en la constant d'associació, 100 vegades inferior, quan l'espaiador és de tipus polièter. Aquesta menor afinitat per l'estreptavidina dels lligands amb espaiadors de tipus polièter podria ser deguda en part a interaccions menys favorables o desfavorables de l'espaiador, possiblement deguda al cost energètic que suposa passar l'espaiador a una conformació més adequada per unir-se a SAv.



**Figura 62:** Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració de SAv 12.3  $\mu\text{M}$  (bis-subunitats) i HABA 88.8  $\mu\text{M}$  amb el lligand divalent (**63**) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 (l·ligand:bis-subunitat).

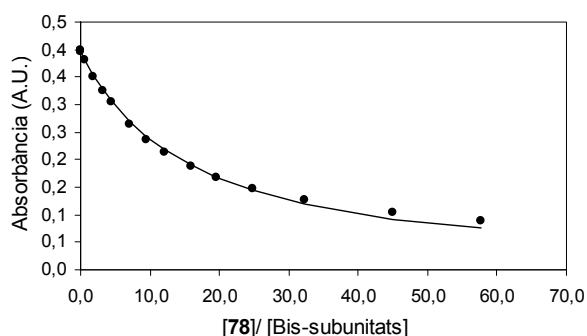
Si s'augmenta la longitud de l'espaiador polièter a 32 enllaços entre els grups carbonil de les cadenes de valeril, com és el cas del lligand **68**, s'obté un lleuger augment en el valor de la  $K_a$  a SAV ( $K_a = 3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) unes 3 vegades superior a la del seu homòleg **63** de cadena més curta, però continua sent un valor inferior a l'obtingut amb els lligands amb espaiadors de tipus alquílic (Figura 63). Les molaritats efectives (EM) d'aquests dos lligands amb espaiadors de tipus polièter (0.11 M per al lligand **63** i 0.34 M per al lligand **68**), tot i no ser tant elevades com les dels lligands amb espaiadors de tipus alquílic (**54** i **59**), són encara prou grans per actuar en la majoria de condicions experimentals.



**Figura 63:** Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració de SAV 11.6  $\mu\text{M}$  (bis-subunitats) i HABA 87.7  $\mu\text{M}$  amb el lligand divalent (**68**) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 (ligand:bis-subunitat).

Finalment es proposa un augment considerablement gran de la longitud dels espaiadors amb la síntesi del compost **78**, el qual disposa de 56 enllaços senzills entre els carbonils de les dues cadenes de valeril. Amb aquest compost el que s'aconsegueix és una disminució del valor de la constant d'associació a SAV ( $K_a = 1.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) de 180 vegades respecte al lligand **68** i de 60 vegades respecte al lligand **63**. Aquest fet pot ser degut a què la longitud dels espaiadors sigui massa gran i conseqüentment, una concentració efectiva ( $C_{\text{eff}}$ ) menor que la dels altres lligands es tradueix en una  $K_a$  també menor (Figura 64).

La menor molaritat efectiva (EM) del lligand **78** (1.9 mM) comporta que es puguin formar oligòmers de SAV quan la concentració de **78** sigui de l'ordre de mM o superior.



**Figura 64:** Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració de SAV 11.5  $\mu\text{M}$  (bis-subunitats) i HABA 87.7  $\mu\text{M}$  amb el lligand divalent (**78**) en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 (ligand:bis-subunitat).



Els ajustos de les corbes teòriques amb els valors experimentals van ser raonablement bons per a la majoria del lligands, tal com es pot veure a les figures anteriors.

### 4.3.3 Complexos de lligands divalents semi-rígid amb avidina

Tal com s'ha indicat anteriorment, els compostos **54** i **59** no són suficientment solubles en tampó fosfats a pH = 7.0 com per poder determinar la seva  $K_a$  a Av i SAV, i cal utilitzar un co-dissolvent. La utilització de MeOH com a co-dissolvent es va haver de descartar ja que calia utilitzar-ne com a mínim un 20%, i en aquestes condicions els valors de  $K_a$  no eren comparables als obtinguts en absència de co-dissolvents. Així, per exemple, la  $K_a$  del complex Av-HABA, que en tampó fosfats és de  $1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , en presència d'un 20% de MeOH en el medi, la  $K_a$  passava a ser de  $2.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . En canvi, quan s'utilitza DMSO com a co-dissolvent, un 0.5% de DMSO ja és suficient per a dissoldre completament aquests lligands. En presència d'un 0.5% de DMSO, la  $K_a$  del complex Av-HABA surt pràcticament idèntica a l'obtinguda en absència de DMSO, de manera que els valors de  $K_a$  en aquests dos medis sí que seran comparables (Taula 11).

Lligand	$d_{\text{max.}} (\text{Å})^{(e)}$	$K_a (\text{M}^{-1})$	$\Delta G (\text{KJ mol}^{-1})$	EM (M)
<b>45</b>	27	$6.0 \pm 0.1 \times 10^7$	$-44.4 \pm 0.1$ <sup>(a)50,51</sup>	0.083
		$1.0 \pm 0.1 \times 10^7$	$-39.9 \pm 0.1$ <sup>(b)50,51</sup>	
<b>54</b>	32	$(9.5 \pm 0.5) \times 10^4$	$-28.4 \pm 0.2$ <sup>(c)</sup>	0.018
		$1.3 \pm 0.2 \times 10^7$	$-40.5 \pm 0.3$ <sup>(d)</sup>	
<b>59</b>	27	$1.6 \pm 0.1 \times 10^5$	$-29.7 \pm 0.1$ <sup>(c)</sup>	0.035
		$2.5 \pm 0.2 \times 10^7$	$-42.2 \pm 0.2$ <sup>(d)</sup>	

**Taula 11:** Valors de  $K_a$  obtinguts entre alguns lligands divalents amb Av a pH = 7.0.

<sup>(a)</sup> Valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA en tampó fosfats.

<sup>(b)</sup> Valoració calorimètrica isotèrmica (ITC).

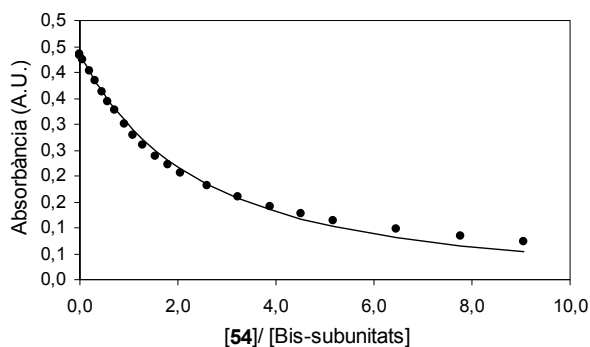
<sup>(c)</sup> Valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA, calculant la  $K_a (\text{s-1}) = 2.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , en medi PBS/MeOH (8/2).

<sup>(d)</sup> Valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA en tampó fosfats i un 0.5% de DMSO.

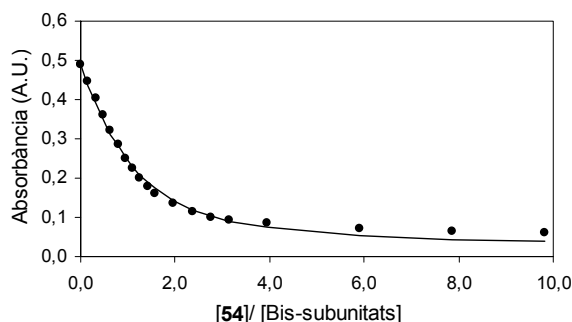
<sup>(e)</sup> Les mesures de les distàncies entre els grups carbonil de les dues cadenes de valeril dels espaiadors es van dur a terme mitjançant el programa informàtic ChemDraw 3D (Cambridge-Soft Corp., Cambridge, MA) després de minimitzar l'estructura completament estesa i amb conformació planar dels compostos sintetitzats.

#### 4.3.3.1 Lligands divalents semi-rígid amb espaiadors de tipus alquílic

Es van realitzar valoracions de l'Av amb els lligands **54** i **59**, obtenint-se els valors de  $K_a$  de  $1.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  i  $2.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  respectivament, tot i que els ajustos no van ser tant bons com en les valoracions amb SAV. En el cas de l'estreptavidina, en augmentar la longitud de l'espaiador en quatre metilens addicionals (pas de **54** a **59**) la  $K_a$  es feia dues vegades més gran. En canvi, en el cas de l'Av, aquest mateix increment de quatre metilens en la longitud de l'espaiador es tradueix en una reducció de la  $K_a$  a la meitat (Figura 65-68).



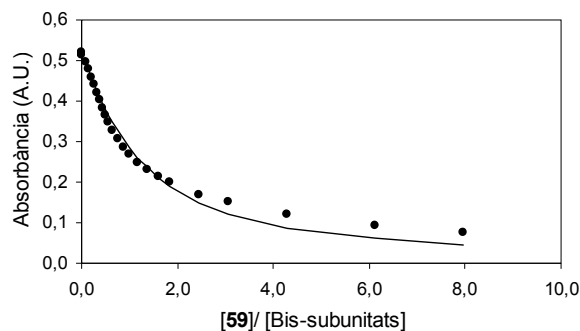
**Figura 65:** Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 11.0  $\mu\text{M}$  (bis-subunitats) i HABA 33.1  $\mu\text{M}$  amb el l·ligand divalent **54** en tampó fosfats 0.1 M i 20% de MeOH a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 (l·ligand:bis-subunitat).



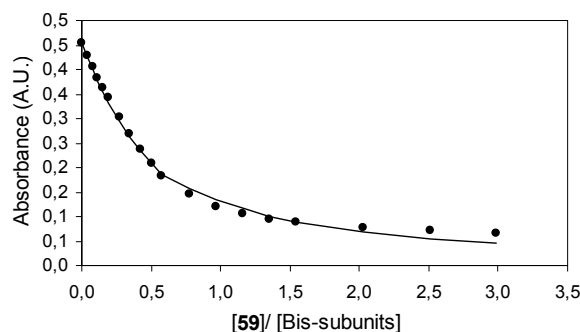
**Figura 66:** Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 15.7  $\mu\text{M}$  (bis-subunitats) i HABA 55.7  $\mu\text{M}$  amb el l·ligand divalent **54** en tampó fosfats 0.1 M + 0.5% de DMSO a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 (l·ligand:bis-subunitat).

Els resultats obtinguts denoten un augment considerable de la  $K_a$  respecte al l·ligand monovalent de referència (**44**) de 680 vegades en el cas del l·ligand **54** i de 1300 vegades en el cas del l·ligand **59**. D'altra banda, els valors de molaritat efectiva (EM), de 18 mM per al l·ligand **54** i de 35 mM per al l·ligand **59**, no són tant elevats com els que presentaven en la seva complexació a SA<sub>v</sub>, però indiquen que amb Av també predominarà el complex divalent en la majoria de condicions experimentals. Només a concentracions superiors a la seva EM, aquests l·ligands conduiran a la formació d'oligòmers d'Av per complexació intermolecular.

En el cas de la complexació a Av, els l·ligands semi-rígidts **54** i **59** tenen valors de  $K_a$  del mateix ordre de magnitud que el l·ligand conformacionalment flexible (**45**) que agafem com a referència. És a dir, que aquest petit augment de rigidesa en el l·ligand divalent, no es tradueix en un augment significatiu en la  $K_a$  a Av (Taula 11).



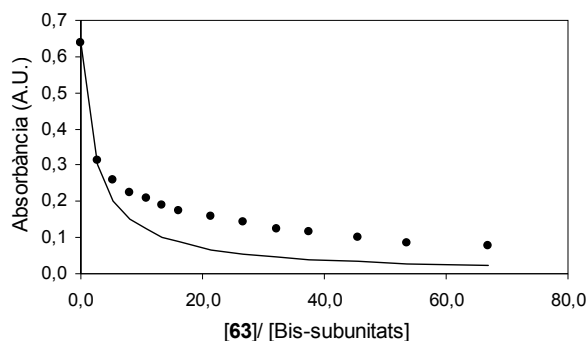
**Figura 67:** Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 25.4  $\mu\text{M}$  (bis-subunitats) i HABA 44.6  $\mu\text{M}$  amb el lligand divalent **59** en tampó fosfats 0.1 M i 20% de MeOH a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 (l·ligand:bis-subunitat).



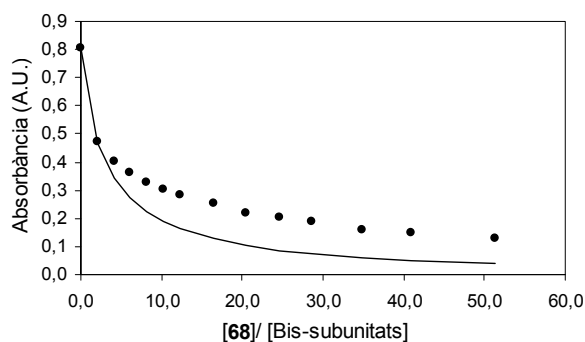
**Figura 68:** Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 14.2  $\mu\text{M}$  (bis-subunitats) i HABA 55.4  $\mu\text{M}$  amb el lligand divalent **59** en tampó fosfats 0.1 M + 0.5% de DMSO (s'utilitza per dissoldre el lligand). La línia contínua representa l'ajust de les dades d'acord amb el model d'unió 1:1 (l·ligand:bis-subunitat).

#### 4.3.3.2 Lligands divalents semi-rígid amb espaiadors de tipus polièter

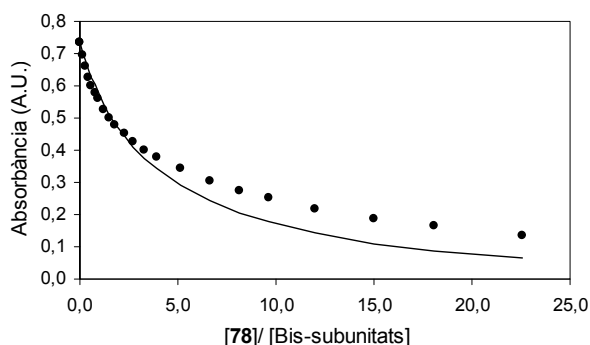
Després dels resultats obtinguts per als lligands amb espaiadors de tipus alquílic es va decidir estudiar el comportament dels lligands amb espaiadors de tipus polièter (**63**, **68** i **78**). No obstant això, es va observar que la corba experimental no acabava d'ajustar amb el model teòric que proposa una unió divalent entre una molècula de lligand i dues subunitats de proteïna. Per aquest motiu només es pot aconseguir, en algun cas, un valor aproximat de constant d'associació ajustant els primers punts de la corba, en els quals es produeix la unió de la primera unitat de lligand a la proteïna (Figura 69-Figura 71).



**Figura 69:** Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 57.0  $\mu\text{M}$  (bis-subunitats) i HABA 25.8  $\mu\text{M}$  amb el lligand divalent **63** en tampó fosfats 0.1 M, pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades als primers punts de la valoració d'acord amb el model d'unió 1:1 (ligand:bis-subunitat).



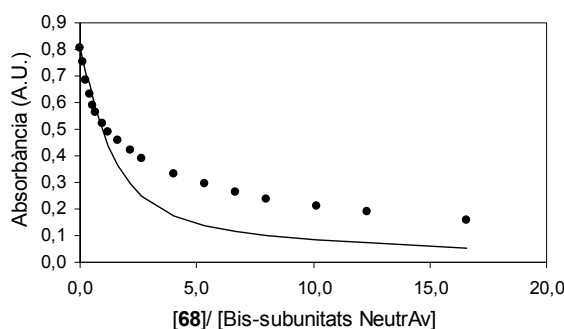
**Figura 70:** Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 57.0  $\mu\text{M}$  (bis-subunitats) i HABA 26.6  $\mu\text{M}$  amb el lligand divalent **68** en tampó fosfats 0.1 M, pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades als primers punts de la valoració d'acord amb el model d'unió 1:1 (ligand:bis-subunitat).



**Figura 71:** Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 21.4  $\mu\text{M}$  (bis-subunitats) i HABA 26.0  $\mu\text{M}$  amb el lligand divalent **78** en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades als primers punts de la valoració d'acord amb el model d'unió 1:1 (ligand:bis-subunitat).

Una diferència important entre Av i SAV és que l'Av és una glicoproteïna, i això fa que en l'Av es produeixi una unió inespecífica de lligands en major extensió que en la SAV. Per tal de descartar que aquesta fos la causa de què no s'ajusti la corba experimental al model teòric, es va realitzar una

valoració espectrofotomètrica competitiva del compost **68** a Neutravidina (Av on s'ha suprimit la cadena d'oligosacàrid). El resultat obtingut però no van diferir apreciablement dels obtinguts amb Av, és a dir, la corba experimental tampoc s'ajusta al model teòric d'unió divalent (Figura 72).



**Figura 72:** Canvi de l'absorbància a 500 nm en la valoració de NeutrAv 37.9  $\mu$ M (bis-subunitats) i HABA 31.3  $\mu$ M amb el lligand divalent **68** en tampó fosfats 0.1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades als primers punts de la valoració d'acord amb el model d'unió 1:1 (ligand:bis-subunitat).

S'ha establert que la longitud que hauria de tenir un espaiador que s'unís als carbonils de les cadenes de valeril de dues biotines en els llocs d'unió adjacents hauria de ser de 25 Å per a l'avidina. Si tenim en compte que en tots els lligands estudiats, els espaiadors tenen una longitud 27-69 Å<sup>1</sup> quan es troben completament estirats, caldria esperar que en tots els casos la llargada del lligand fos suficient per assolir dos punts d'unió de la proteïna adjacents, és a dir, es produís el complex intramolecular i s'obtingués un bon ajust entre el model teòric i les dades experimentals. Com que aquest fet no es produeix, es creu que aquests resultats podrien indicar dues coses:

a) La formació d'oligòmers.

b) L'existència d'efectes cooperatius, és a dir, que la unió de la primera molècula de lligand a una subunitat d'Av modifiqués l'afinitat de la segona bis-subunitat d'Av per la segona molècula de lligand.

S'ha intentat detectar la formació d'oligòmers en la complexació d'Av amb els lligands **63**, **68** i **78** mitjançant cromatografia d'exclusió molecular, però tal com s'exposarà a continuació, no es van trobar indicis de la formació d'oligòmers mitjançant aquesta tècnica.

També es van realitzar estudis d'espectrometria de masses (ESI-TOF) d'alguns dels lligands sintetitzats units a Av, però en aquests estudis tampoc es van obtenir proves de què aquests lligands provoquessin l'oligomerització d'Av.

Tots aquests resultats negatius apunten cap a la possible existència d'efectes cooperatius en la complexació dels lligands **63**, **68** i **78** a Av. En les figures 69-72 s'observa que, ajustant la corba teòrica als primers punts de la valoració, quan deixen d'ajustar-se les dues corbes sempre queda la corba teòrica per sota dels resultats experimentals. Això indicaria que la unió de la primera molècula de lligand dificulta la complexació de la segona molècula de lligand (efecte cooperatiu negatiu).

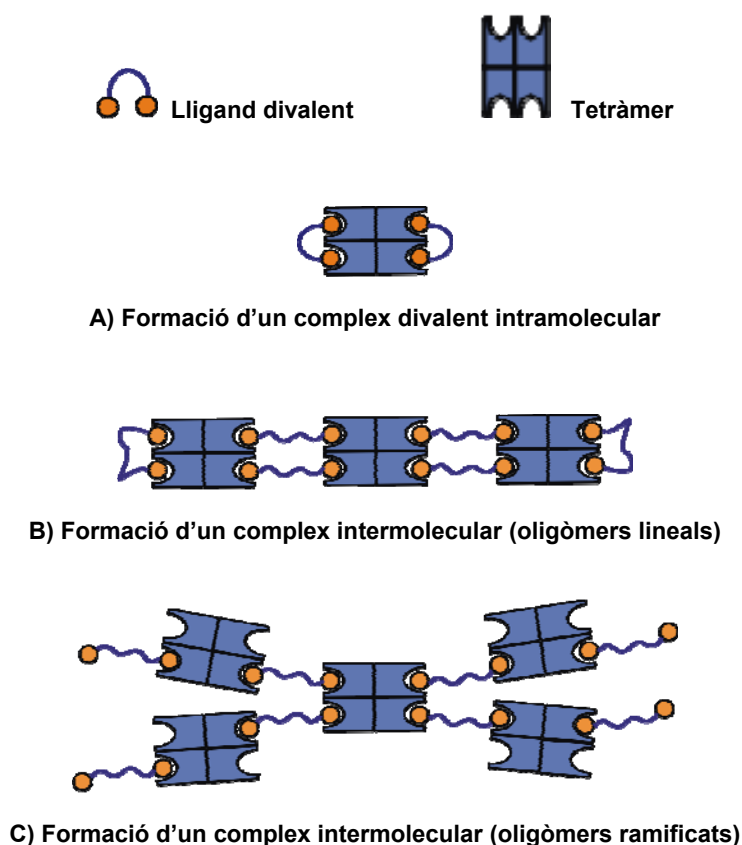
<sup>1</sup> Les mesures de les distàncies entre els grups carbonil de les dues cadenes de valeril es van dur a terme mitjançant el programa informàtic ChemDraw 3D (Cambridge-Soft Corp., Cambridge, MA) després de minimitzar l'estructura completament estesa i amb conformació planar dels compostos sintetitzats.

En resum, de tots els lligands divalents semi-rígids descrits en aquest treball, el compost **54** és el que presenta una major  $K_a$  a SA<sub>v</sub>, essent aquesta quasi dos ordres de magnitud superior a la del lligand divalent no rígid de referència (**45**). En canvi, en la complexació a Av el lligand divalent semi-rígid amb major  $K_a$  és el compost **59**, però aquest valor de  $K_a$  és del mateix ordre de magnitud que el del lligand divalent no rígid de referència (**45**).

#### 4.4 Estudi de l'associació lligand-proteïna mitjançant GPC

La cromatografia d'exclusió molecular s'ha utilitzat en múltiples ocasions per a estudiar l'associació entre lligands i proteïnes. Un dels sistemes estudiats mitjançant aquesta tècnica ha estat el complex Av-BT i SAV-BT, així com alguns derivats biotinilats.<sup>48,84</sup>

La formació de complexos intermoleculars entre lligands divalents i Av conduiria a la formació d'oligòmers que, si fossin prou estables, es podrien detectar per GPC (Figura 73). Així doncs, s'han analitzat els complexos dels lligands **54**, **59**, **63**, **68** i **78** amb Av per GPC a diferents relacions molars (Superosa 12 HR 10/30 pre-compactada, Pharmacia LKB Biotechnology), però en tots els casos s'ha obtingut un cromatograma pràcticament idèntic al de l'Av pura. És a dir, els pics obtinguts corresponen al complex Av-ligand, però en cap cas s'ha observat la presència significativa d'agregats o oligòmers de pes molecular superior (Taula 12).



**Figura 73:** Unió multivalent (A) vs. intermolecular (B, C).<sup>23</sup>



Mostra	[L] ( $\mu\text{M}$ )	[L] / [S]	tr (min)	Àrea (%)
Av	-	-	38.1 (O)	5.7
			41.7 (t)	84.2
54	24.2	0.59	37.7 (O)	7.2
			41.4 (T)	92.6
54	159	5.0	37.7 (O)	2.6
			41.4 (T)	33.9
			82.3 (L)	62.5
59	26.2	0.63	37.1 (O)	6.9
			41.2 (T)	82.5
59	174	5.05	37.5 (O)	2.7
			41.4 (T)	28.4
			68.1 (L)	68.9
63	21.3	0.53	37.7 (O)	5.9
			41.5 (T)	87.1
			63.3 (L)	3.6
63	134	5.07	37.7 (O)	3.6
			41.5 (T)	32.7
			63.3 (L)	62.0
68	23.2	0.57	38.1 (O)	4.7
			41.7 (T)	81.5
			61.7 (L)	13.3
68	160	5.09	38.1 (O)	1.9
			41.7 (T)	27.9
			61.7 (L)	66.5
78	26.3	0.63	37.5 (O)	8.0
			41.4 (T)	73.2
			79.2 (L)	18.3
78	185	5.02	37.5 (O)	3.2
			41.4 (T)	30.7
			79.9 (L)	64.7

**Taula 12:** Dades obtingudes a partir dels cromatogrames mesurats per GPC entre Av ([bis-subunitats] = 26  $\mu\text{M}$ ) i els lligands divalents. [L] representa la concentració del lligand divalent, [S] representa la concentració de bis-subunitats d'Av, tr representa el temps de retenció. (O) representa l'octàmer d'Av i (T) representa el tetràmer d'Av.

## 4.5 Estudis de l'associació lligand-proteïna per ESI-TOF

L'espectrometria de masses ha resultat ser una tècnica molt útil en els últims anys per a estudiar interaccions no-covalents de diversos tipus. En concret, la tècnica d'electrosprai proporciona unes condicions d'ionització de la mostra molt suaus que permeten conservar l'estructura dels complexos formats, la qual cosa permet que en principi puguin ser analitzats i detectats, i d'aquesta manera es puguin estudiar les possibles associacions que es produeixen entre lligands i proteïnes.<sup>85-88</sup> Mitjançant aquesta tècnica s'han detectat complexos proteïcs no-covalents, i les seves interaccions amb DNA, RNA, lligands i cofactors.<sup>89-93</sup> Una altra tècnica que va ser àmpliament utilitzada en els inicis per estudis d'aquest tipus ha estat el MALDI.<sup>94,95</sup>

En els últims anys l'espectrometria ha esdevingut una tècnica cada cop més acceptada dins el camp de la proteòmica, ja que ens permet obtenir informació de la massa molecular de les proteïnes i de la seva estructura primària. A més a més s'està utilitzant com a eina per estudiar la formació de complexos amb proteïnes.<sup>86,87</sup> L'observació d'estructures no-covalents després de la ionització per MS-ESI suporta la teoria que aquests complexos resisteixen el procés d'ionització.

### 4.5.1 Instrumentació i modes de treball

Un espectròmetre de masses consisteix en una font que genera ions en fase gas, un analitzador de masses que mesura la relació  $m/z$  dels analits ionitzats, i un detector que registra el nombre d'ions a cada valor de  $m/z$ .

La font d'ions pot ser de diferents tipus, en aquests casos bàsicament es parla de ESI, ionització per electroesprai a pressió atmosfèrica. Sol ser la més utilitzada per a estudiar interaccions no-covalents ja que s'aconsegueix una ionització suau respectant la composició de la mostra a analitzar. Aquesta ionització es produeix a través del camp elèctric aplicat a l'extrem del capil·lar (1-4 kV), fet que carrega positivament o negativament (segons el mode de treball) la dissolució a analitzar. L'evaporació del dissolvent fa que les gotes formades es trenquin i siguin cada cop més petites, creant una major repulsió coulòmbica entre les càrregues que conté la gota. Aquestes càrregues són la base dels ions carregats en fase gas. Aquesta ionització a pressió atmosfèrica no sol produir la fragmentació del compost a analitzar.

L'analitzador varia en funció de l'aparell utilitzat. Els més coneguts són:

a) "*Single quadrupol*", és un analitzador que consisteix en un sol quadrupol a través del qual avancen els ions carregats. El quadrupol el formen 4 cilindres carregats positivament i negativament dos a dos i que canvien la seva polaritat constantment per tal de generar un camp elèctric a través del qual avancen els ions carregats. Aquest pot anar acompanyat d'un hexapol que té la mateixa funció però consisteix en 6 cilindres carregats enlloc de 4.

b) "*Triple quadrupol*", és un analitzador format per dos quadrupols col·locats en sèrie i enmig dels quals es disposa una cambra de col·lisió on s'aplica un potencial i un gas, normalment argó, que provoquen la fragmentació del ió precursor generant d'aquesta manera ions fills que corresponen a fragments de la molècula. Aquesta tècnica proporciona una informació més completa del compost que es vol estudiar.

c) “*Ion-Trap*”, és un analitzador format per un quadrupol, a la sortida del qual s’acobla una trampa iònica on entra l’ió d’interès. En la trampa iònica s’aplica un potencial i un gas transportador, heli, que provoca la fragmentació del precursor en ions fills, els quals a la vegada es poden tornar a fragmentar i d’aquesta manera obtenir-se una informació més completa del precursor inicial.

d) “*ESI-TOF*”, és un analitzador format per un quadrupol, hexapol o ambdós a la sortida del qual s’acobla un tub analitzador TOF (“*time of flight*”), en el qual viatgen els ions en funció de la seva relació  $m/z$ . Aquesta tècnica ha esdevingut revolucionària en el camp d’anàlisi i detecció de complexos biomacromoleculars, ja que acobla l’anàlisi en continu del quadrupol que fa de filtre amb la detecció per polsos de l’analitzador ortogonal TOF. Aquests analitzadors permeten treballar amb un rang de  $m/z$  i sensibilitat molt més elevats (aprox. 10000), mentre que la resta no solen passar de 3000-4000 unitats  $m/z$ . Solen ser els equips utilitzats per a compostos amb pesos moleculars elevats, com són algunes proteïnes. Aquest tipus d’aparell va ser emprat per a realitzar les nostres mesures de formació del complex lligand-Av (veure part experimental).

El detector sol ser un fotodíode que transforma la senyal rebuda en fotons excitats, els quals es desexciten generant electrons que es transformen per donar una mesura d’intensitat.

En l’electrosprai (ESI), els líquids en forma d’esprai es sotmeten a camps elèctrics elevats formant gotes petites i molt carregades. La tècnica ESI requereix que la mostra no contingui sals no volàtils ni detergents per tal d’obtenir el màxim de sensibilitat possible i no embrutar l’aparell. També requereix una optimització exhaustiva dels paràmetres experimentals de l’aparell, del compost o sistema que es vol estudiar ja que els resultats i les condicions òptimes canviaran en funció del compost. La miniaturització de la tècnica d’electrosprai (nano-electrosprai) utilitzant capil·lars més estrets, ha permès la formació de gotetes més petites degut a la reducció del flux i com a conseqüència un augment de la sensibilitat de la tècnica.

En el cas de proteïnes se solen utilitzar tampons volàtils tipus acetat d’amoni, format d’amoni, etc. per tal d’afavorir la formació d’espècies carregades. S’ha comprovat que la formació d’espècies carregades positives es troba més afavorida que la formació d’espècies carregades negatives. La càrrega calculada es pot preveure pel límit d’estabilitat de fissió Coulòmbic de les gotes d’aigua (Rayleigh, 1882), amb una grandària equivalent a la proteïna o al complex amb la proteïna. La càrrega prevista ve donada per (Equació 17):

$$Z_R = \frac{8\pi}{e\sqrt{\gamma\epsilon_0}R^3}$$

**Equació 17**

On:

$\gamma$  és la tensió superficial de la gota d’aigua

$\epsilon_0$  és la permitivitat elèctrica del buit

$e$  és la càrrega elemental

$R$  és el radi de la gota

Assumint que el radi de la proteïna és directament proporcional al pes molecular i que la densitat d'una proteïna és similar a la de l'aigua, es pot derivar una equació més simple que ens dona una idea de la càrrega del pic més intens (Equació 18):

$$Z_R = 0.078\sqrt{M}$$

Equació 18

On:

$M$  és la massa del complex en Dalton

En el nostre cas es va utilitzar l'espectrometria de masses per veure si es detectava la formació dels complexos intramoleculars o bé intermoleculars a través de la tècnica ESI-TOF. Aquesta tècnica ens va permetre fer un anàlisi qualitatiu de la formació de complexos, però en cap cas es va poder fer l'anàlisi quantitatiu ja que els resultats obtinguts mostraven un desplaçament lleuger de les bandes de la proteïna degudes a l'augment de pes molecular per la formació del complex, però no es podia fer la deconvolució d'aquestes bandes per saber la proporció de complex i proteïna lliure.

Es van realitzar mesures a diferents relacions lligand/proteïna, tal com es resumeix a la Taula 13:.

Mostra	R = [L] / [S]	Espècies detectades	
		Tetràmer (T)	Octàmer (O)
<b>Av</b>	-	T	O
<b>1:Av</b>	0.78	T + 2L; T + 3L	O + 6L
<b>5:Av</b>	0.9	T + 3L	O + 6L
<b>41:Av</b>	1	T	
	3.26	T	
<b>63:Av</b>	0.84	T + L; T + 2L	O + 2L; O + 4L
	1.68	T + 2L	O + 4L
	3.23	No s'ionitza	
<b>68:Av</b>	0.46	T + L	O + 2L
	1	T + 2L	O + 4L
	1.65	T + 2L	O + 4L
	3.26		No s'ionitza
	10.7		No s'ionitza

**Taula 13:** Mesures realitzades per ESI-TOF per estudiar les interaccions no-covalents lligand/proteïna. Avidina 54  $\mu$ M (en subunitats) en tampó acetat amònic 10 mM a pH = 7.0. [L] = lligand, [S] = 54  $\mu$ M (subunitats d'avidina), D = dímer, T = tetràmer, O = octàmer

De les mesures realitzades es poden extreure vàries conclusions, d'una banda, s'observa que la proteïna avidina s'obté majoritàriament en forma de tetràmer, però també s'observa formació d'octàmer (dímer de tetràmer). S'han realitzat estudis a diferents pH i s'ha vist que la proporció de monòmer (M), dímer (D), tetràmer (T) i octàmer (O) pot variar molt en funció del pH.<sup>96</sup> Per aquest motiu es van realitzar les mesures a pH = 7.0 ja que eren les condicions en què s'havien realitzat les valoracions espectromètriques, tot i que es va canviar el tampó fosfats per acetat d'amoni ja que es requereix un tampó volàtil per treballar en MS-ESI.

Altres factors importants pel que fa a l'observació de l'estructura quaternària de les proteïnes mitjançant interaccions no-covalents són la temperatura de la sonda i el voltatge aplicat.<sup>97</sup> Per això fem vàries mesures amb la proteïna sola fins a trobar les condicions de treball òptimes. L'augment del voltatge acostuma a afavorir el trencament de l'estructura quaternària de la proteïna degut al trencament d'interaccions no-covalents. En el cas del sistema Av-BT, es pot observar trencament de l'estructura quaternària, però sense dissociació de la molècula de BT del seu lloc d'unió. Aquest fet és una evidència més de la gran constant d'associació amb la qual interacciona aquest sistema.

El valor de la constant de dissociació ( $K_D$ ) entre el lligand i la proteïna és important per a preveure els resultats obtinguts. Si el valor de  $K_D$  és més petit que la concentració de proteïna, aleshores pot haver-hi unió a una concentració de lligand del mateix ordre que la de proteïna. En canvi, si el valor de  $K_D$  és superior a la concentració de proteïna, aleshores es necessitaran concentracions de lligand considerablement superiors a la de proteïna per a completar la unió de tots els llocs. Per tant, els resultats dels estudis d'unió lligand-proteïna estan clarament relacionats amb la  $K_D$ .<sup>98</sup> El problema el podem trobar en aquelles parelles lligand-proteïna que tinguin una  $K_D$  bastant elevada, ja que això ens obligarà a treballar a concentracions de lligand força elevades, la qual cosa pot causar supressió de la ionització de la proteïna i dels seus complexos, fent que aquests tipus de sistemes no es puguin estudiar a través d'aquesta tècnica.

Quan s'analitzen dissolucions de biotina-Av, es detecta el complex T+3L que caldria esperar a partir de la relació R de la mostra, degut a què la força d'unió és tant elevada que la formació del complex és pràcticament irreversible. Amb el lligand monovalent **5** encara s'obté un resultat similar al de la biotina, tot i que la seva  $K_a$  a Av és bastant inferior ( $K_a = 5.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ). En canvi amb el lligand monovalent **41**, el qual fem servir com a referència respecte als lligands divalents ja que també té un espaïador de tipus polièter, no es detecta el complex amb Av. Això pot ser degut a què la seva  $K_a$  a Av no és tant elevada ( $K_a = 1.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ). Al ser la  $K_D$  d'aquest sistema més elevada que la concentració de proteïna, es requeriria una concentració de lligand **41** superior, però això va en contra de la bona ionització del complex format ja que si hi ha una elevada concentració de lligand, es produeix supressió de la ionització.

En el cas dels lligands divalents **63** i **68**, aquests s'uneixen a Av amb una constant d'associació prou elevada com per poder observar-ne els complexos per ESI-TOF. El fet de detectar el complex T+2L i no detectar el T+3L o T+4L semblaria indicar que la unió entre els lligands **63** i **68** i l'avidina en aquest rang de concentracions, és principalment intramolecular, és a dir, en forma de complex divalent. Cal tenir en compte que les mesures s'han de realitzar amb dissolucions de concentracions similars tant de lligand com de proteïna, ja que sinó s'observa supressió de la ionització, és a dir, si hi ha un excés de lligand, aquest és l'únic que s'ionitza i no permet la correcta ionització de la proteïna.

Els resultats obtinguts mitjançant aquesta tècnica ratifiquen que els lligands **63** i **68** es comporten com a lligands divalents i que interaccionen amb l'Av de forma intramolecular i augmentant d'aquesta manera la constant d'unió entre ells respecte al lligand monovalent de referència **41**.

## 4.6 Lligands divalents semi-rígid de tipus acetilènic

Per tal d'optimitzar la longitud i la rigidesa dels lligands divalents es va pensar en l'augment de la rigidesa dels espaiadors que els formen per tal de disminuir encara més la llibertat conformacional i augmentar la  $K_a$  a  $Av$  i  $SAv$ .

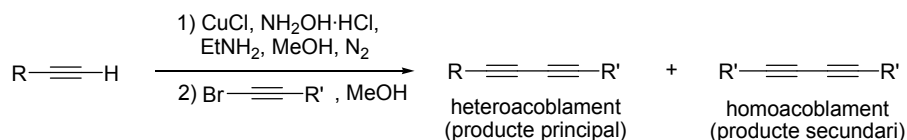
El sistema rígid escollit consistia en un anell aromàtic central amb espaiadors mono- o diacetilènics units a un altre espaiador més flexible enllaçat al lligand monovalent **5**.

Es van seguir diverses aproximacions per a la construcció del sistema rígid.

La utilització d'acetilens com a grup funcional per aportar rigidesa a l'estructura del lligand ens porta a explorar la química del acetilens.

### 4.6.1 Introducció. La reacció de Cadiot-Chodkiewicz i mètodes relacionats.

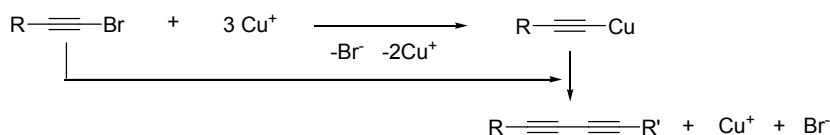
La reacció de Glaser i mètodes relacionats, donen normalment resultats poc satisfactoris per a acoblaments no-simètrics ja que es produeix simultàniament la formació de productes simètrics. La solució per a aquest problema, la van plantejar Chodkiewicz i Cadiot<sup>99</sup> i consisteix en la condensació entre un alquí terminal amb un 1-bromoacetilè en la presència d'una sal de coure (I) i una amina adequada. La influència de diversos factors com ara la naturalesa de la base i l'acetilè, el dissolvent, el temps i la temperatura de la reacció han estat investigats amb gran detall. Aquest mètode ha estat aplicat a la síntesi de nombrosos 1,3-butadiïns alifàtics i aromàtics i tolera una gran quantitat de grups funcionals, incloent-hi alcohols i poliols, epòxids, amines, acetals, carboxilats, èsters carboxílics i amides, disulfurs, grups protectors silil-acetilènic, i fins i tot radicals nitroxil.



**Esquema 38:** Condicions d'acoblament de Cadiot-Chodkiewicz

Els 1,3-butadiïns aromàtics s'obtenen generalment amb rendiments més elevats que els alifàtics.<sup>100,101</sup> Els alquins terminals de l'heteroacoblament són particularment útils si contenen funcions hidrofíliques com el grup hidroxil, amino o carboxilat. Els alquins conjugats com el 1,3-butadiï també experimenten reaccions de Cadiot-Chodkiewicz amb haloalquins, la qual cosa és de gran utilitat en la síntesi de compostos poliacetilènics. Apart dels bromoalquins, els iodo derivats també han estat utilitzats en menor freqüència, mentre que els cloroacetilens tenen poca importància degut a la seva poca reactivitat. Les formes dels 1-iodoalquins són fortament oxidants enfront als ions de coure (I) i normalment afavoreixen l'homoacoblament. Aquest homoacoblament també s'observa freqüentment amb bromoalquins i es considera que es produeix a través d'un intercanvi metall-halogen, i pot ser aplicat a la síntesi de poliacetilens simètrics.<sup>101</sup>

Així, en absència d'un alquí terminal, els 1-bromoalquins experimenten la reacció d'homoacoblament catalitzada per coure (I) per donar el corresponent diacetilè simètric.

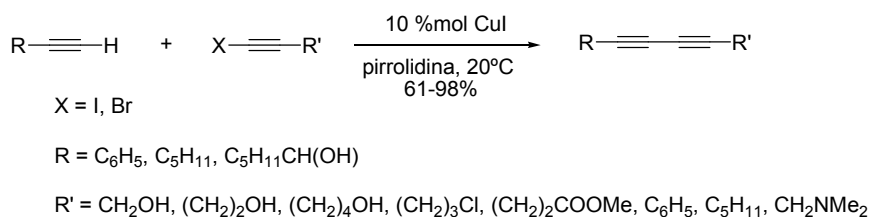


Esquema 39

En les reaccions de Cadiot-Chodkiewicz, la reacció secundària d'homoacoblament es pot minimitzar emprant una amina apropiada i amb l'ús de concentracions baixes de coure (I) i de 1-bromoalquí (addició lenta del bromoalquí a la barreja de reacció).

Posteriorment han aparegut un gran nombre de variacions complementàries. Al 1996, Alami i Ferri van publicar l'eficiència de la reacció d'heteroacoblament entre 1-haloalquins i alquins terminals amb catàlisi de iodur de coure (I) i pirrolidina.<sup>102</sup>

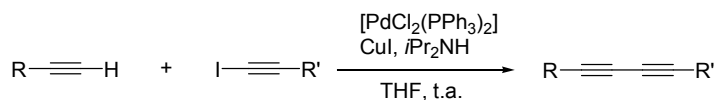
Anàlogament al protocol de Cadiot-Chodkiewicz, ells van observar la baixa reactivitat dels cloro derivats, mentre que els corresponents iodurs donaven bons rendiments. La reactivitat dels bromoalquins pot ser augmentada per l'addició de  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  com a co-catalitzador. L'ús de pirrolidina com a amina i dissolvent, dóna millors rendiments i temps de reacció.



Esquema 40

#### 4.6.2 Ús de co-catalitzadors

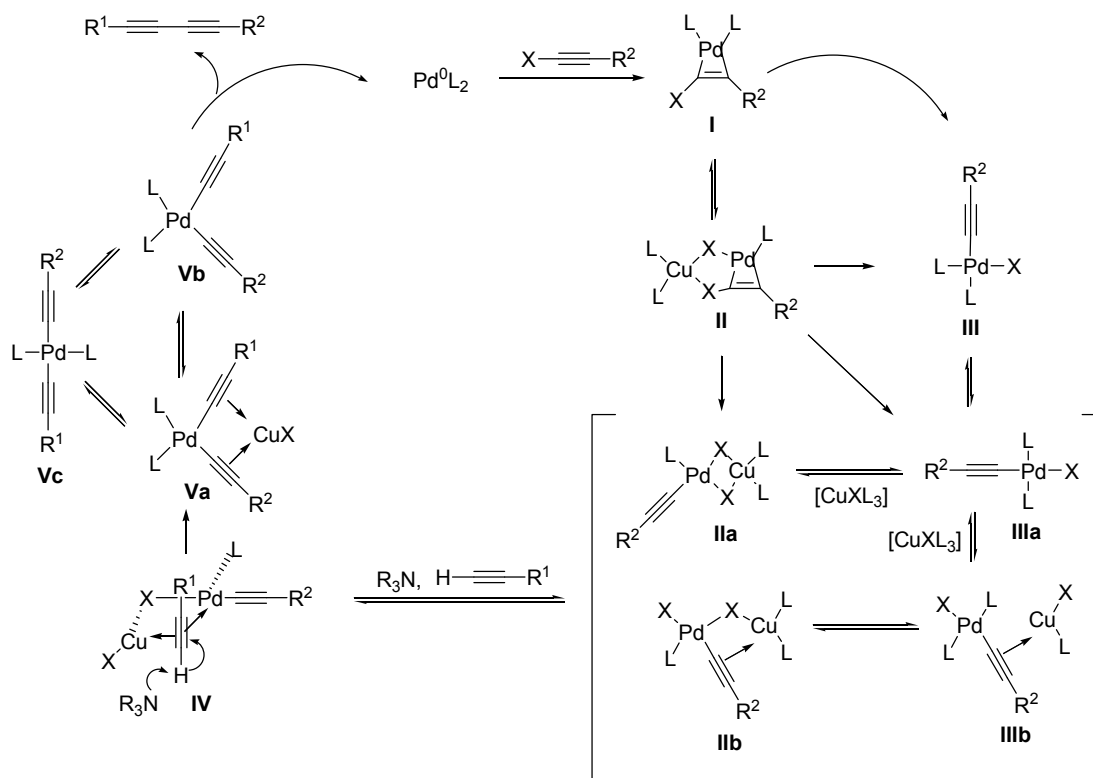
Són coneguts els heteroacoblaments acetilènics utilitzant catàlisi de pal·ladi. L'ús de 1-haloalquins en reaccions catalitzades per pal·ladi el van establir Suzuki i col·laboradors. Al 1991, Wityak i Chan van realitzar un acoblament en condicions suaus i eficients entre un 1-iodoalquí i un alquí terminal utilitzant pal·ladi i coure com a catalitzadors. Els rendiments van ser entre bons i excel·lents, sense que es detectés quantitats apreciables de productes d'homoacoblament, inclòs quan l'oxigen no era rigorosament exclòs.



Esquema 41

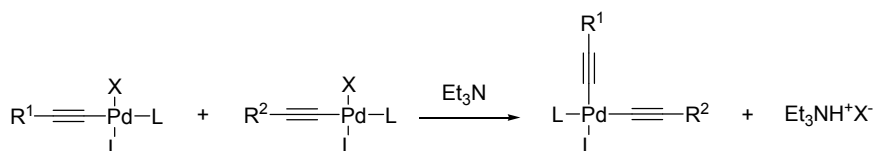






**Esquema 44:** Mecanisme proposat per Cai i Vasella per al heteroacoblament d'alquins amb 1-haloalquins catalitzat per pal·ladi.<sup>106</sup>

Amatore i col·laboradors van proposar un mecanisme alternatiu, el qual involucrava la transmetal·lació de dues espècies d'alquínipal·ladi, per donar lloc a la formació del complex de dialquínipal·ladi **V** en el cicle catalític (Esquema 45).<sup>108</sup>



**Esquema 45:** Mecanisme de transmetal·lació proposat per Amatore i col·laboradors per a la formació de complexos dialquínipal·ladi a través de l'heteroacoblament d'alquins i 1-haloalquins catalitzat per pal·ladi.<sup>108</sup>

Després de tot, és obvi que encara queda molt per acabar d'entendre completament el mecanisme dels processos d'acoblament d'alquins.

## 4.7 Reacció de Sonogashira

La síntesi de lligands amb espaiadors de tipus acetilènic ens porta a introduir l'acoblament de Sonogashira com a reacció clau en la formació de compostos acetilènics aromàtics.

### 4.7.1 Introducció

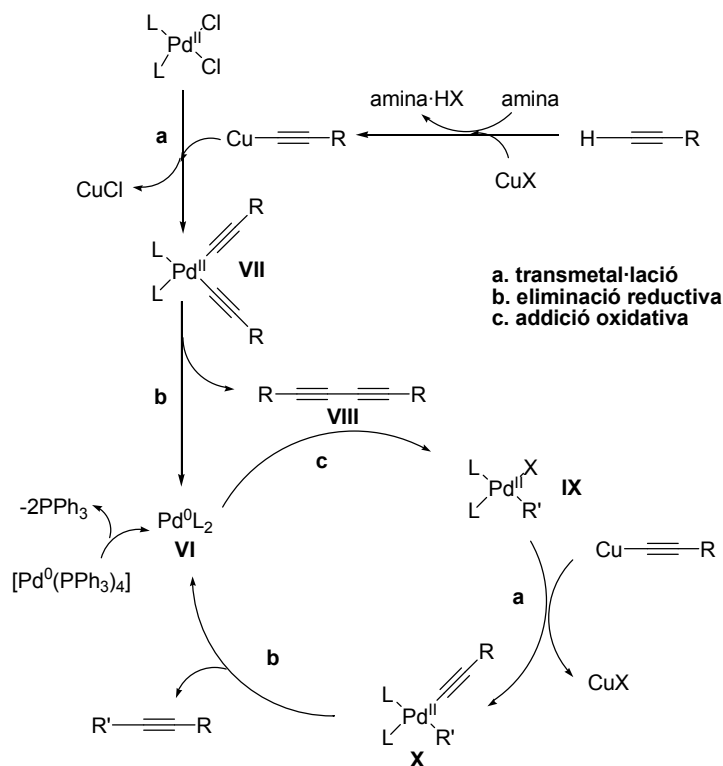
Els grups de Cassar<sup>109</sup> i Heck<sup>109,110</sup> van demostrar independentment que els halurs d'aril i de vinil s'acoblaven a acetilens terminals utilitzant un complex de pal·ladi. Més tard, Sonogashira i Hagihara van trobar que la reacció funcionava sota condicions més suaus utilitzant CuI com a co-catalitzador amb una amina com a solvent/reactiu (Esquema 46).<sup>111-113</sup> Aquest procediment s'utilitza habitualment com a mètode d'acoblament d'alquins degut a la simplicitat de la preparació dels materials de partida, les condicions suaus, i la facilitat de tolerar gran varietat de grups funcionals.

### 4.7.2 Mecanisme

El mecanisme tradicionalment acceptat per a la reacció de Sonogashira és similar al que van proposar inicialment Sonogashira i Hagihara<sup>111-113</sup> (Esquema 46).

Els catalitzadors clàssics més utilitzats són  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$  i  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ . La forma activa del complex és subjecte de debat, però es creu que està coordinadament insaturat amb 14 electrons  $[\text{PdL}_2]$  (**VI**).<sup>111-113</sup> En el cicle catalític, el  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2]$  s'ha proposat que es formi per dissociació de dos lligands  $\text{PPh}_3$  del compost  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ . Altrament, la generació de **VI** de Pd (II) es podria produir via transmetal·lació de l'alquínur de coure, el qual es genera per reacció d'una base amb CuI, seguit d'eliminació reductiva de l'espècie dialquínul-Pd (II) **VII** per a donar **VI** i el diacetilè **VIII**. Aquest compost **VIII**, el qual es forma per reducció del complex de Pd (II), és un producte secundari habitual en la reacció de Sonogashira, i de vegades pot arribar a ser el producte majoritari. Tot i que la dimerització es detecta fins i tot quan s'utilitza Pd (0), aquesta pot ser minimitzada purgant l'oxigen dels dissolvents i fent la reacció sota atmosfera inert.

Després de la formació de catalitzador actiu de Pd (0) **VI**, es produeix l'addició oxidativa de l'halur d'aril o vinil donant el complex de Pd (II) **IX**. Aquest pas és crític per al procés catalític i s'han dissenyat molts catalitzadors nous per tal de millorar-lo. Seguidament es produeix la transmetal·lació amb l'acetilur de Cu donant **X**, i finalment l'eliminació reductiva dóna el producte d'acoblament així com el catalitzador actiu regenerat.

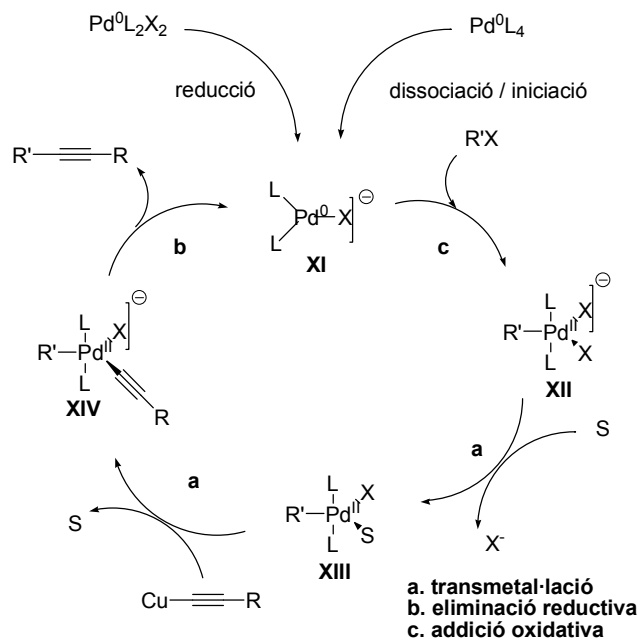


Esquema 46

Hi ha estudis recents que suggereixen un mecanisme més complex que involucra espècies aniòniques de Pd pentacoordinades (Esquema 47).<sup>114-117</sup>

Amatore i Jutand han establert recentment que els halurs de ArX i els precursors de Pd (0) poden jugar un paper crucial en el cicle catalític i que el principal complex intermedi de Pd (0) podria ser l'espècie aniònica  $[(PdL_2X)]^-$  (XI).<sup>114-117</sup> Aquesta espècie activa de Pd es formaria per reducció de  $PdL_2Cl_2$  amb la transmetal·lació/eliminació reductiva seguida de l'associació amb un ió clorur. Si partim de  $PdL_4$ , el compost XI es formaria per dissociació de dos lligands de fosfina, seguida de l'associació de X de R'X generat després d'un cicle catalític complert (Esquema 47) o del CuI present en solució. L'addició oxidativa d'un halur de vinil o d'aril dona l'espècie pentacoordinada de Pd (II) XII, la qual es coordina ràpidament amb el dissolvent neutre (S) formant l'espècie  $R'PdXS L_2$  XIII. L'addició de l'acetilur de coure a aquesta espècie, completa el procés de transmetal·lació i dona el complex aniònic XIV en el qual hi ha R' i l'acetilur en bona posició per l'eliminació reductiva generant el producte d'acoblament i regenerant el complex actiu de Pd XI.

Hi ha moltes variables que afecten a l'eficiència del cicle catalític, com ara els lligands, la base, la sal de coure, el dissolvent, els additius i les característiques electròniques i estèriques de l'electròfil orgànic i l'alquí. Els organohalurs electro-deficients donen millors resultats d'heteroacoblament, mentre que amb l'alquí succeeix el contrari.<sup>118,119</sup> La reactivitat general de les espècies  $sp^2$  és iodur de vinil  $\geq$  triflat de vinil  $>$  bromur de vinil  $>$  clorur de vinil  $>$  iodur d'aril  $>$  triflat d'aril  $\geq$  bromur d'aril  $>>$  clorur d'aril. Els iodurs d'aril són els més utilitzats i solen reaccionar a temperatura ambient. Últimament s'utilitzen bromurs d'aril per a l'heteroacoblament a temperatures superiors a 80°C.



Esquema 47

#### 4.7.3 Catalitzadors de Sonogashira

La majoria d'heteroacoblaments es duen a terme amb els catalitzadors estàndard  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$  o  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ . El catalitzador  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$  dona millors resultats en alguns casos, però presenta l'inconvenient que descomposa molt fàcilment al exposar-se a l'aire i a temperatures superiors a  $0^\circ\text{C}$ . Un altre avantatge és que s'evita l'etapa d'eliminació reductiva del  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$  per formar el compost **VI**, per tant es forma molt poc o gens de dímer **VIII** (Esquema 46). En canvi, el  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$  té l'avantatge de ser estable a l'aire i a la temperatura i és més econòmic que el  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ , encara que es produirà almenys un equivalent de **VIII**.

#### 4.7.4 Amines

La presència d'una base de tipus amina és un altre element crucial en la reacció de Sonogashira. La  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{Et}_2\text{NH}$  i  $i\text{Pr}_2\text{NH}$  són les amines més utilitzades. Bases més fortes com ara piperidina i pirrolidina també s'han utilitzat i freqüentment donen bons resultats. Linstrumelle ha publicat que les bases més fortes incrementen el rendiment i el grau de reacció quan no s'utilitza  $\text{CuI}$  com a co-catalitzador.<sup>120</sup> Altres estudis descriuen un decreixement del grau de reacció amb  $\text{BuNH}_2 > \text{Et}_3\text{N} > i\text{Pr}_2\text{NH} > \text{Et}_2\text{NH} > \text{K}_2\text{CO}_3$  per a l'heteroacoblament del trimetilsililacetilè amb iodopiridona.<sup>121</sup>

#### 4.7.5 Dissolvents i additius

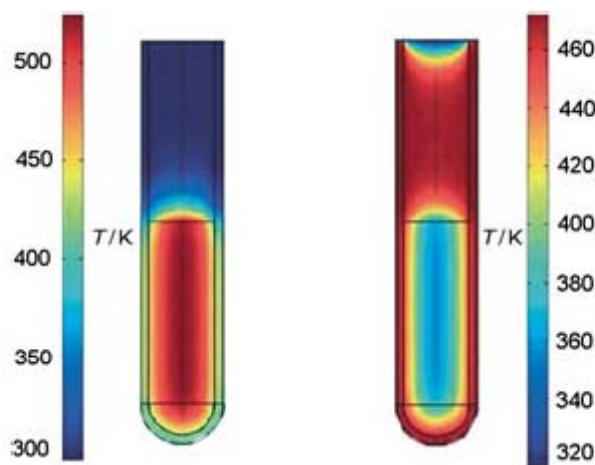
En el protocol original de Sonogashira, l'amina funciona com a base i com a dissolvent. Estudis posteriors van descriure millors rendiments utilitzant una barreja d'amina i un altre dissolvent, normalment THF. Alguns autors han trobat que, emprant THF com a co-dissolvent, no és necessari

desgasar el dissolvent si l'addició de l'alquí es fa lentament, ja que el producte **VIII** es forma amb un rendiment molt baix. Altres dissolvents comuns són: DMF, NMP, benzè i toluè. No hi ha una evidència clara de perquè milloren els rendiments d'aquestes reaccions, potser senzillament un increment en la solubilitat dels catalitzadors, reactius i productes.

S'ha descrit que alguns additius com ara sals d'amoni i de plata, TBAF o TBAOH, milloren el rendiment i la velocitat de la reacció.<sup>122</sup>

#### 4.7.6 Utilització de microones en síntesi orgànica

Les reaccions de catàlisi homogènia de metalls de transició són unes de les reaccions més estudiades per MAOS (microwave assisted organic synthesis).<sup>123</sup> La formació de l'enllaç C-C i C-X catalitzat per metalls de transició normalment requereix d'hores i dies sota escalfament a reflux i freqüentment sota atmosfera inert. L'ús de catàlisi amb metalls juntament amb les microones poden tenir avantatges significatius respecte els mètodes d'escalfament convencionals, ja que la inversió del gradient de temperatura sota les condicions de microones, pot fer incrementar el temps de vida del catalitzador per l'eliminació dels efectes de paret.<sup>124</sup>



**Figura 74:** Gradients de temperatura invertits en un microones i en un esclafament en bany d'oli. Després d'un minut d'irradiació amb microones (esquerra) i tractament en un bany d'oli (dreta). En la irradiació per microones es produeix l'escalfament de tot el volum simultàniament, mentre que en el bany d'oli, la mescla de reacció en contacte amb les parets s'escalfa primer.

En els últims anys l'escalfament i les reaccions conduïdes per microones han adquirit un gran interès en la comunitat científica.<sup>125</sup> Aquest interès és degut a què l'escalfament per microones és capaç no solament de reduir el temps de reacció d'hores a minuts, sinó també de reduir les reaccions secundàries incrementant el rendiment i millorant la reproduïbilitat.

La irradiació amb microones produeix un escalfament de tot el medi de reacció més eficient, ràpid i simultani que el mètode tradicional d'escalfament amb una font de calor. En l'escalfament amb una font de calor, la temperatura del recipient és superior a la del medi de reacció, mentre que en l'escalfament induït per microones es produeix una inversió del gradient de temperatura.

Els reactors han d'estar fets de materials transparents a les microones, com ara vidre borosilicat, quars o tefló.

#### 4.7.6.1 Fonaments de la tècnica

La radiació de microones és una radiació electromagnètica amb un rang de freqüència de 0.3 a 300 GHz. No obstant això, tots els aparells de microones domèstics i els reactors per a síntesi tenen una freqüència de 2.45 GHz per tal d'evitar les interferències amb els aparells de telefonia mòbil. L'energia d'un fotó de microones en aquest rang de freqüències és massa baixa (0.0016 eV) per a trencar enllaços químics i també és més baixa que l'energia del moviment Brownià. Per tant, està clar que les microones no poden induir reaccions químiques.<sup>126-128</sup>

La utilització de microones en síntesi es basa en l'eficiència d'escalfar els materials mitjançant efectes d'escalfament dielèctric per microones. Aquest fenomen depèn de l'habilitat d'un material específic (dissolvent o reactiu) d'absorbir l'energia del microones i convertir-la en calor. La component elèctrica<sup>129-131</sup> del camp electromagnètic és la que provoca l'escalfament, principalment a través de dos mecanismes: polarització dipolar i conducció iònica.

La irradiació d'una mostra a la freqüència de microones fa que els dipols o ions s'alineïn amb el camp elèctric. A mesura que el camp aplicat oscil·la, els dipols o ions intenten realinear-se amb el camp elèctric i, en el procés, s'allibera energia en forma de calor a través de la fricció molecular i la pèrdua dielèctrica. La quantitat de calor generada en aquest procés està directament relacionada amb l'habilitat de les molècules de la matriu per alinear-se elles mateixes amb la freqüència de camp aplicat. Si el dipol no té suficient temps per realinear-se, o bé es reorienta massa ràpid amb el camp elèctric aplicat, no es desprèn calor. La freqüència de 2.45 GHz atribuïda als aparells comercials, recau precisament entre aquests dos extrems i dona temps als dipols moleculars a alinear-se seguint les oscil·lacions del camp elèctric.

La capacitat d'una substància específica per a convertir energia electromagnètica en calor a una freqüència i temperatura donades depèn de les seves propietats dielèctriques, i es determina a través del factor de pèrdua  $\tan\delta$ . Aquest factor s'expressa com el quocient  $\tan\delta = \epsilon'' / \epsilon'$ , on  $\epsilon''$  és la pèrdua dielèctrica, la qual és indicativa de l'eficiència amb la qual la radiació electromagnètica es converteix en calor, i  $\epsilon'$  és la constant dielèctrica que descriu la facilitat de les molècules per a ser polaritzades per un camp elèctric. Es requereix un medi amb un valor elevat de  $\tan\delta$  per tenir una absorció eficient i, com a conseqüència, un escalfament ràpid.

Altres dissolvents sense moment dipolar permanent, com ara tetraclorur de carboni, benzè i dioxà també es poden utilitzar en reaccions en microones, sempre que algun altre component (reactiu, catalitzador, additiu) tingui dipols permanents.

A la següent taula s'indiquen els factors de pèrdua ( $\tan\delta$ ) d'alguns dissolvents (Taula 15).

Dissolvent	$\tan\delta$
etilenglicol	1.350
EtOH	0.941
DMSO	0.825
2-propanol	0.799
Àcid fòrmic	0.722
MeOH	0.659
NMP	0.275
Àcid acètic	0.174
DMF	0.161
aigua	0.123
CHCl <sub>3</sub>	0.091
ACN	0.062
AcOEt	0.059
Acetona	0.054
THF	0.047

**Taula 15:** Dades obtingudes a 2.45 GHz, 20°C.<sup>132</sup>

#### 4.7.6.2 Tècniques experimentals

La síntesi assistida per microones es pot dur a terme en dissolvents orgànics estàndard sota condicions de recipients oberts o segellats. Si els dissolvents s'escalfen a través d'irradiació per microones en un recipient obert, el punt d'ebullició del dissolvent limita la temperatura que pot assolir la reacció. Per aquests casos s'utilitzen dissolvents que poden assolir elevats punts d'ebullició. Els reactors moderns de microones són capaços de controlar la temperatura i la pressió, amb la qual cosa permeten utilitzar recipients segellats.<sup>133</sup>

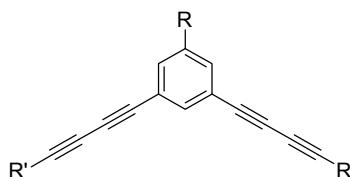
Les condicions típiques d'acoblament de iodurs, bromurs, clorurs i triflats d'aril utilitzen la DMF com a dissolvent, dietilamina com a base i [PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (2-5% mol) com a catalitzador amb CuI (5% mol) com a additiu.<sup>134</sup>



#### 4.8 Aproximació a lligands divalents amb una unitat central rígida derivada de l'àcid 3,5-bis(butadiinil)benzoic

A la literatura es troben descrites substàncies amb un elevat grau de rigidesa, la qual és conseqüència de la presència de determinats elements estructurals, com ara sistemes aromàtics (benzè, porfirina) i triples enllaços C≡C.

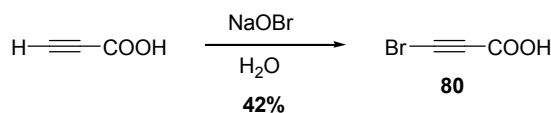
Per tal d'augmentar una mica més la rigidesa dels lligands divalents es va creure convenient incorporar a l'anell d'àcid benzoic dues cadenes diacetilèniques en posició relativa *meta*-. Aquestes cadenes diacetilèniques haurien d'estar convenientment funcionalitzades en els extrems per tal de poder-hi unir el lligand a través d'un espaiador no rígida.



Per a la síntesi d'aquests compostos s'ha seguit diverses estratègies tal com es detalla a continuació.

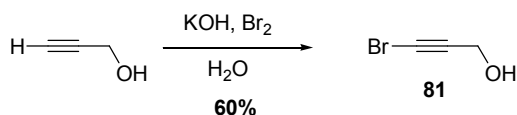
##### 4.8.1 Aproximació A: Síntesi dels diins no simètrics; reacció de Cadiot-Chodkiewicz

En primer lloc es va bromar l'àcid propinoic amb hipobromit de sodi en medi aquós a 0°C, seguint un procediment descrit a la bibliografia<sup>135</sup> (Esquema 48). En quant a la seva purificació, es va veure que per cristal·lització (que era el procediment descrit a la literatura) s'obtenia un rendiment baix i era difícil de recuperar el producte pur. Aleshores es va utilitzar com a tècnica de purificació la sublimació obtenint-se d'aquesta manera el producte desitjat amb un 42% de rendiment en forma de cristalls blanquinosos que eren molt més fàcils de separar de la resta d'impureses. Cal anar amb compte de no escalfar per sobre de 100°C ja que sinó es formen productes secundaris no desitjats.



Esquema 48

D'altra banda es va bromar l'alcohol propargílic seguint el mètode Strauss<sup>136</sup> utilitzant brom en medi bàsic a 0°C (Esquema 49). S'obté el producte bromat, d'olor desagradable, en forma d'oli marró amb un 60% de rendiment.



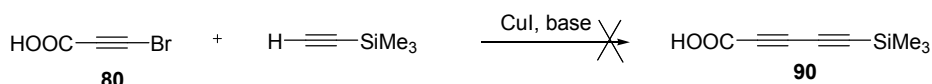
Esquema 49

Aleshores es van fer les primeres proves d'acoblament de Cadiot-Chodkiewicz entre l'àcid 3-bromopropiòic i el trimetilsililacetilè.

Els grups trialquilsilil són els grups protectors més freqüentment utilitzats, com ara trimetilsililacetilè (TMSA), trietilsililacetilè (TESA) i triisopropilsililacetilè (TIPSA). El TMSA es pot acoblar fàcilment amb haloarens utilitzant la reacció de Sonogashira i desprotegir-se per tractament amb KOH o  $\text{K}_2\text{CO}_3$  aquós o metanòlic, o amb un reactiu de fluorur tipus KF o TBAF, per donar l'acetilè terminal.

En els últims anys hi ha hagut estudis per tal d'incrementar els rendiments globals de desprotecció/heteroacoblament desprotegint el grup TMS *in situ* i sota condicions estàndard d'heteroacoblament.<sup>137</sup> Els grups més voluminosos com TIPS necessiten ions fluorur per a la seva desprotecció ja que són inerts a les condicions bàsiques de desprotecció. Això permet realitzar desproteccions selectives.

Inicialment es va utilitzar CuI com a catalitzador i es van provar varies bases com la N-metilpirrolidina (NMP), la piperidina i la pirrolidina. També es va addicionar  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  com a co-catalitzador i hidrocloaur d'hidroxilamina, però en cap cas s'obtingué un resultat satisfactori. Les condicions provades es resumeixen a la Taula 16.



Esquema 50

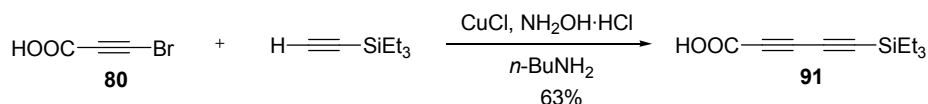
80 (mmol)	TMSA (mmol)	CuI (mmol)	Base/Dissolvent (mL)	$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (mmol)	$\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (mmol)	Rend. (%)
0.68	1.61	0.10	NMP/THF 1.5/1.5	-	-	-
0.77	1.87	0.18	Piperidina, 1.5	-	-	-
0.67	1.73	0.11	Pirrolidina, 1.5	-	0.09	-
0.67	2.65	0.18	Pirrolidina, 1.5	0.03	0.56	-

Taula 16: Condicions provades per a la formació de l'àcid 5-(trimetilsilil)pentadiòic

Segons una referència bibliogràfica<sup>136</sup> trobada a posteriori, el fet que la reacció no progressi pot ser degut a què el grup protector trimetilsilil no aguanti les condicions de reacció descomposant-se i evitant d'aquesta manera que la reacció progressi satisfactòriament.

A continuació es va intentar el mateix tipus d'acoblament però utilitzant el trietilsililacetilè com a alquí terminal, ja que la velocitat de descomposició d'aquest grup protector és 277 cops més lenta que el trimetilsilil en medi bàsic aquós-metanòlic.<sup>138</sup> Es va adaptar un procediment descrit<sup>136</sup> per a

compostos similars i es van optimitzar condicions de reacció (Taula 17). El millor resultat es va obtenir quan s'utilitzava H<sub>2</sub>O com a dissolvent, CuCl com a catalitzador, hidroclorur d'hidroxilamina com agent reductor i *n*-butilamina com a base. D'aquesta manera s'obtingué el dí **91** amb un 63% de rendiment (Esquema 51).

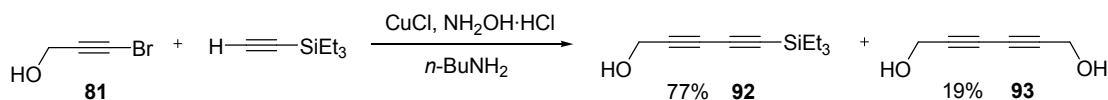


Esquema 51

<b>80</b> (mmol)	<b>TESA</b> (mmol)	<b>catalitzador</b> (mmol)	<b>Dissolvent/Base</b> (mL)	<b>Condicions</b>	<b>Rend.</b> (%)
1.0	1.07	CuCl, 0.1	Dioxà/BuNH <sub>2</sub> aq. 30% 5/10	1) 1h, 0°C 2) 3h, t.a.	-
0.95	1.64	CuCl, 0.1	DMF/BuNH <sub>2</sub> 7/3	1) 1h, 0°C 2) 3h, t.a.	-
1.1	1.53	CuCl, 0.1	BuNH <sub>2</sub> aq. 30% 20	1) 5min, 0°C 2) 20min, t.a.	(36)
0.5	0.75	CuCl, 0.05 PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 0.05	BuNH <sub>2</sub> aq. 30% 20	1) 5min, 0°C 2) 20min, t.a.	-
0.5	0.88	CuI, 0.06	Pirrolidina 4	1) 15min, 0°C	-
3	3.9	CuCl, 0.6	BuNH <sub>2</sub> aq. 30% 20	1) 5min, 0°C 2) 20min, t.a.	(63)

Taula 17: Condicions provades per a la formació de l'àcid 5-(trietilsilil)pentadiinoic (**91**).

Aleshores es va procedir a l'acoblament del 3-bromo-2-propin-1-ol amb el trietilsililacetilè seguint les condicions descrites a la literatura,<sup>136</sup> a partir de les quals es descriu un elevat rendiment (95%) que no va ser possible reproduir. No obstant això, s'han trobat altres autors que parlen de rendiments més moderats (65%) per aquest acoblament.<sup>139</sup> En aquesta reacció a més del producte d'heteroacoblament 5-(trietilsilil)penta-2,4-diin-1-ol (**92**), també es forma el corresponent producte d'homoacoblament hexa-2,4-diin-1,6-diol (**93**). Per tal de minimitzar la formació del producte d'homoacoblament, es va utilitzar un co-solvent i es va fer l'addició del bromoalquí lentament i a baixa temperatura sobre la mescla de reacció. En aquestes condicions s'obté el producte d'heteroacoblament **92** amb un 77% de rendiment (Esquema 52).



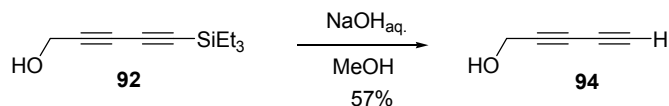
Esquema 52

81 (mmol)	TESA (mmol)	CuCl (mmol)	Base/Dissolvent (mL)	Condicions	Rend. (%)
3.1	3.9	0.09	BuNH <sub>2</sub> aq. 30%/Et <sub>2</sub> O 10 / 1	1) 1 min, 0°C	<b>93</b> (49)
				2) 20 min, t.a.	<b>92</b> (38)
6.4	8.4	0.7	BuNH <sub>2</sub> aq. 30% 10	1) 5 min, 0°C <sup>(1)</sup>	<b>93</b> (64)
				2) 10 min, t.a.	<b>92</b> (18)
7.4	8.05	0.7	BuNH <sub>2</sub> aq. 30%/MeOH 10 / 12	1) 10 min, 0°C <sup>(2)</sup>	<b>93</b> (19)
				2) 15 min, t.a.	<b>92</b> (77)

**Taula 18:** Condicions provades per a la formació del 5-(triethylsilyl)penta-2,4-diin-1-ol (**92**)

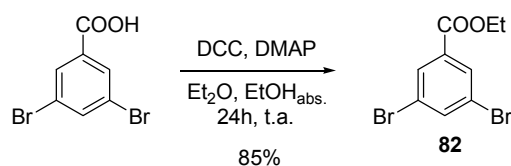
- (<sup>1</sup>) S'han dissolt tots els reactius junts en el medi de reacció.  
 (<sup>2</sup>) Addició lenta del bromoalquí dissolt en MeOH a la barreja de TESA, CuCl i BuNH<sub>2</sub> dissolts en MeOH.

A continuació es va procedir a la desprotecció del grup triethylsilyl del producte d'heteroacoblament (**92**) mitjançant tractament en medi bàsic en MeOH a -5°C<sup>139</sup> (Esquema 53). Segons la bibliografia n'hi ha prou amb extraccions per purificar el compost, però segons la nostra experiència, no n'hi ha prou per eliminar les possibles restes de silanol o altres productes secundaris (detectats per RMN). Per aquest motiu es decideix purificar-lo mitjançant cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/hexà, 1/9). Cal anar amb compte a l'evaporar el dissolvent de les fraccions que contenen el producte, ja que el penta-2,4-diin-1-ol és bastant volàtil (P.eb. = 33°C (0.1 Torr).)<sup>140</sup> D'aquesta manera s'obté l'alcohol **94** en forma d'oli amb un 57% de rendiment.



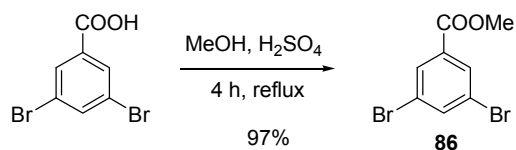
**Esquema 53**

El producte comercial de partida utilitzat per a l'obtenció d'aquests lligands divalents semi-rígidus era l'àcid 3,5-dibromobenzoic. En primer lloc calia protegir el grup àcid carboxílic per tal que en reaccions posteriors no interferís donant lloc a productes secundaris no desitjats. Per aquest motiu es va esterificar l'àcid 3,5-dibromobenzoic amb EtOH utilitzant diclohexilcarbodiimida (DCC) com agent d'acoblament i dimetilaminopiridina (DMAP) en quantitat catalítica<sup>88</sup> ja que era un mètode descrit que donava bons rendiments. D'aquesta manera s'obtingué l'èster **82** amb un 85% de rendiment (Esquema 54).



**Esquema 54**

També es va esterificar l'àcid 3,5-dibromobenzoic amb MeOH a reflux i amb catalisi àcida obtenint-se l'èster **86** amb un 97% de rendiment.<sup>141</sup>



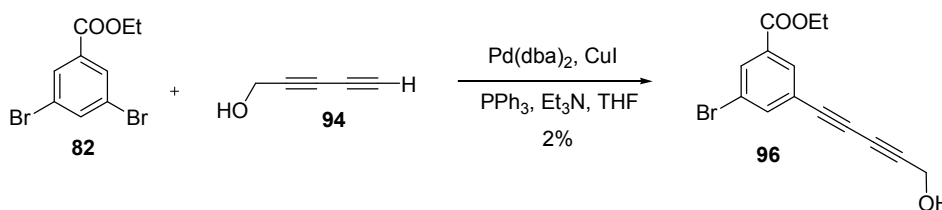
Esquema 55

#### 4.8.2 Acoblament del dií al 3,5-dibromobenzoat d'alquil; reacció de Sonogashira

Una vegada obtinguts el 3,5-dibromobenzoat d'etil i el 2,4-pentadiïn-1-ol, es va intentar el seu acoblament a través de les condicions de Sonogashira, però en aquest cas es va utilitzar el catalitzador Pd(dba)<sub>2</sub> ja que, segons es trobava descrit a la literatura,<sup>142</sup> aquest catalitzador afavoria la disubstitució en un acoblament similar. Es troba descrit que l'ús de les condicions originals d'acoblament de Sonogashira<sup>111</sup> entre el 3,5-dibromobenzoat d'etil i l'alcohol propargílic donen lloc al producte monosubstituit com a resultat de la desactivació de l'anell aromàtic per la presència de l'èster etílic. Aquest efecte també va ser observat per Thorand i Krause<sup>143</sup> en l'acoblament del trimetilsililacetilè al bromobenzoat de metil, en el qual van ser necessàries grans quantitats de catalitzador per tal d'augmentar l'eficiència de l'heteroacoblament. Encara que quan aquestes condicions van ser aplicades a l'acoblament entre el 3,5-dibromobenzoat d'etil i l'alcohol propargílic, van resultar ineficaces. Per aquest motiu, Hayes i col·laboradors van provar un ampli rang de catalitzadors de pal·ladi i combinacions de lligands per tal d'augmentar la formació del producte disubstituit. Com a resultat es va trobar que una modificació del procediment d'heteroacoblament de Sonogashira utilitzant el sistema catalític: trietilamina, bis(dibenzilidenacetona)pal·ladi, trifenilfosfina, clorur de coure (I), THF, donava rendiments acceptables de producte disubstituit.<sup>142</sup>

En el nostre cas, però no s'obtingué el producte disubstituit (**95**), sinó que només s'obtingué el monosubstituit (**96**) amb un baix rendiment (2%). Aleshores es va pensar que potser la reacció progressaria millor si s'utilitzava la radiació de microones ja que en altres productes ens havia funcionat amb rendiments molt bons, però aquesta estratègia tampoc va obtenir resultats satisfactoris (Esquema 56).

Les condicions provades es resumeixen a la Taula 19.



Esquema 56

82 (mmol)	94 (mmol)	Catalitzador (mmol)	Dissolvent	Condicions	Rend. (%)
1	3	Pd(dba) <sub>2</sub> 0.04	THF <sub>anh.</sub>	1 h, t.a. 24 h, reflux	96 (2)
0.52	1.56	PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 0.02	DMF	MW 25 min, 120°C	-

**Taula 19:** Condicions provades per a l'acoblament del 3,5-dibromobenzoat d'etil i el 2,4-pentadiin-1-ol

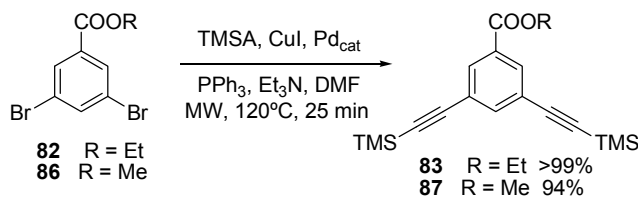
A la vista dels resultats es podia optar per utilitzar un haloaril més reactiu, ja que els iodoarils estan descrits com a més reactius que els bromoarils, però degut a seu al cost i inestabilitat es va passar a explorar la segona aproximació.

#### 4.8.3 Aproximació B: acoblament de Sonogashira i de Cadiot-Chodkiewicz

En aquesta aproximació es tracta d'obtenir en primer lloc el derivat bisacetilènic, mitjançant doble reacció de Sonogashira, per tal de generar posteriorment el derivat bis-diacetilènic, mitjançant un doble acoblament de Cadiot-Chodkiewicz.

A la bibliografia es trobava descrita la formació del 3,5-bis((trimetilsilil)etinitil)benzoat de metil (**87**) a partir del iodobenzoat de metil (que és més car) amb acoblament seqüencial del trimetilsililacetilè.<sup>144</sup>

Per tant, es va començar amb l'acoblament entre el 3,5-dibromobenzoat d'etil i el trimetilsililacetilè en condicions de Sonogashira estàndards. Es van provar dos catalitzadors, el PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> i el Pd(dba)<sub>2</sub> obtenint-se en tots dos casos rendiments de disubstitució superiors al 95% (Esquema 57).



**Esquema 57**

A continuació es va provar aquest acoblament en un reactor de microones, ja que està descrit que els temps de reacció disminueixen considerablement (passàvem de 24 h a 25 min) i l'atmosfera inert ja no és necessària.<sup>134</sup> En el nostre cas, utilitzant PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> com a catalitzador, i els èsters **82** i **86** juntament amb el TMSA com a reactius de partida, s'han obtingut els productes **83** i **87** disubstituïts amb rendiments del 87% i del 94% respectivament, mentre que els temps de reacció es van escurçar de 24 h a 25 min.

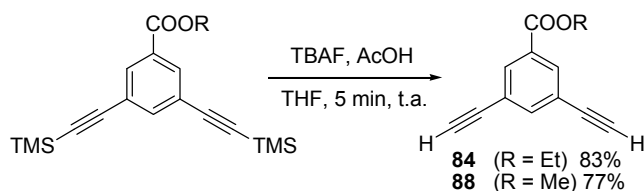
Cal destacar però que el THF és un bon dissolvent per a reaccions a pressió atmosfèrica i amb escalfament tèrmic, però no ho és per a reaccions amb microones ja que el seu factor de pèrdua

(tanδ) és massa petit i la reacció no progressa satisfactòriament. En canvi la DMF ha resultat ser un bon dissolvent en aquest tipus de reaccions amb microones.

haloarè (mmol)	TMSA (mmol)	Catalitzador (mmol)	Condicions	Producte (% rend.)
<b>82</b> 0.5	3	Pd(dba) <sub>2</sub> 0.02	P atm., THF Reflux, 24h	<b>83</b> (96)
<b>82</b> 0.5	3	PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 0.02	P atm., THF Reflux, 24h	<b>83</b> (>99)
<b>82</b> 0.5	3	Pd(dba) <sub>2</sub> 0.02	MW, THF 120°C, 25min	-
<b>82</b> 0.5	3	PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 0.02	MW, DMF 120°C, 25min	<b>83</b> (87)
<b>86</b> 1	6	PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 0.04	MW, DMF 120°C, 25min	<b>87</b> (94)

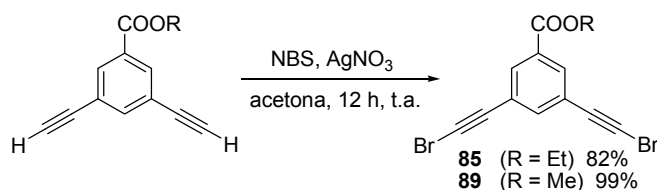
**Taula 20:** Condicions provades per a l'obtenció del 3,5-bis((trimetilsilil)etnil)benzoat d'etil (**83**) i el 3,5-bis((trimetilsilil)etnil)benzoat de metil (**87**)

Seguidament es procedeix a la desprotecció del grup trimetilsilil mitjançant fluorur de tetrabutilamoni (TBAF) i àcid acètic en THF durant 5 min. a temperatura ambient.<sup>145</sup> Després de purificar-lo per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>; hexà/AcOEt, 95/5), s'obté el corresponent producte desprotegit amb un rendiment del 83% en el cas de **84** i del 77% en el cas de **88** (Esquema 58).



**Esquema 58**

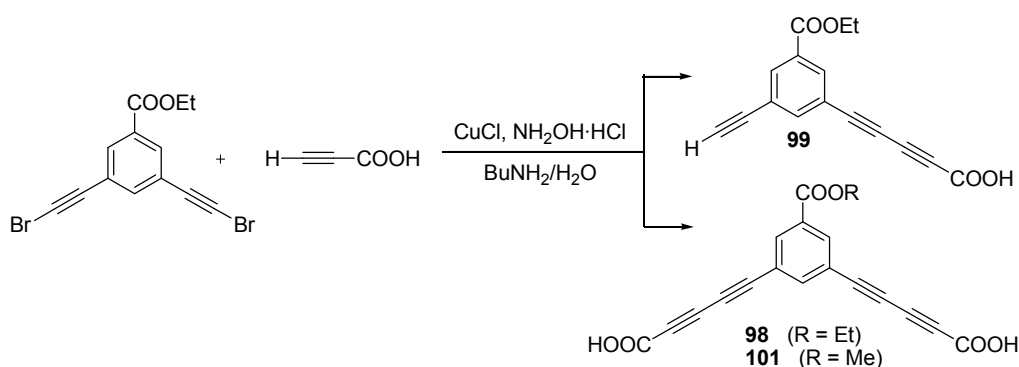
Tot seguit es procedeix a la bromació del 3,5-dietnilbenzoat d'etil (**84**) i el 3,5-dietnilbenzoat de metil (**88**) mitjançant N-bromosuccinimida (NBS) i nitrat de plata en quantitat catalítica en medi d'acetona.<sup>146</sup> Els productes es purifiquen per cromatografia en columna obtenint-se amb un 82% de rendiment en el cas de **85** i amb un 99% de rendiment en el cas de **89**.



**Esquema 59**

En aquest punt es va pensar en realitzar un acoblament de Cadiot-Chodkiewicz entre el 3,5-bis(2-bromoetil)benzoat d'etil i l'àcid propiòic i d'aquesta manera obtenir un diàcid que ens permetés l'acoblament a un espaiador amino. Per a aquest acoblament es va seguir una variant de les condicions de Cadiot-Chodkiewicz que consisteix en utilitzar *n*-butilamina en medi aquós com a base, éter dietílic com a dissolvent, clorur de coure com a catalitzador i hidroclore d'hidroxilamina com a agent reductor.<sup>146</sup> En el nostre cas es va substituir l'éter dietílic per EtOH o MeOH segons el cas, ja que l'éter en medi aquós formava dues fases i la reacció no progressava satisfactòriament.

La substitució de l'éter dietílic per EtOH va permetre obtenir l'àcid dicarboxílic **98** amb un rendiment superior al 95% i amb una puresa suficient per a ser utilitzat en les següents reaccions (Esquema 60). Això es va aconseguir quan la purificació únicament consistia en fer extraccions amb AcOEt de la mescla de reacció acidificada a pH = 2.0. En canvi, quan es purificava per cromatografia en columna en fase normal (sílica) o bé per HPLC en fase reversa (Kromasil C18) el rendiment era molt baix. Això podria ser degut a què el producte quedés parcialment retingut en la fase estacionària, o bé a què descomposés (per exemple per descarboxilació) en evaporar les barreges H<sub>2</sub>O/MeOH (eluent d'HPLC). Veure resum a la Taula 21.



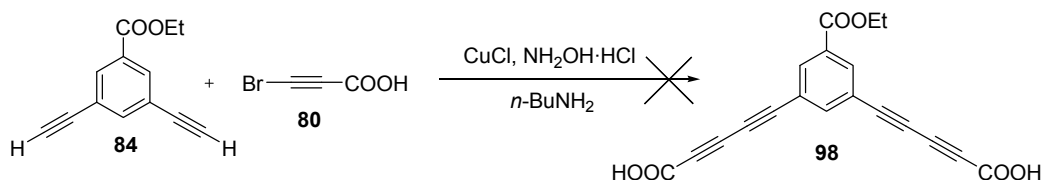
<b>85</b> (mmol)	<b>Àc. propiòic</b> (mmol)	<b>Dissolvent</b> (mL)	<b>Condicions</b>	<b>Producte</b> (% Rend.)
0.4	0.95	Et <sub>2</sub> O 5	2h, t.a.	<b>100</b> (< 50)
0.25	0.76	EtOH 25	1h, t.a.	<b>98</b> (10) <sup>(1)</sup>
0.25	0.76	EtOH 25	1h, t.a.	<b>98</b> (> 95) <sup>(2)</sup>
0.5	1.74	EtOH 30	1h, t.a.	Barreja <sup>(2,3)</sup> 1:1 <b>98 : 99</b>

**Taula 21:** Condicions provades per a l'acoblament del 3,5-dibromobenzoat d'etil i l'àcid propiòic.

- (1) Purificat per HPLC (Kromasil C18)  
 (2) Resultat de les extraccions amb AcOEt de la mescla de reacció, sense purificació cromatogràfica  
 (3) Anàlisi per <sup>1</sup>H-RMN

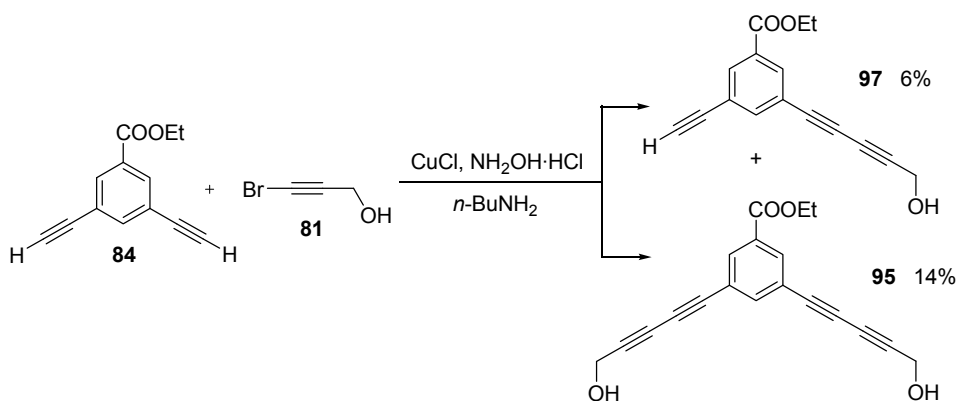


Es va proposar una ruta alternativa a fi i efecte d'obtenir-se el mateix compost. Aquesta ruta consistia en fer l'acoblament entre el 3,5-dietinilbenzoat d'etil i l'àcid 3-bromopropionic (Esquema 61). El resultat obtingut no va ser satisfactori, possiblement degut a què l'acidesa dels protons alquínic del 3,5-dietinilbenzoat d'etil era inferior que en el compost àcid propionic de la reacció anterior, per la qual cosa es va preferir la ruta anterior.



Esquema 61

Paral·lelament es va dur a terme l'acoblament del 3,5-dietinilbenzoat d'etil amb el 3-bromo-2-propin-1-ol en les mateixes condicions obtenint-se una barreja de compostos mono- i disubstituïts (Esquema 62), però els resultats no van millorar,



Esquema 62

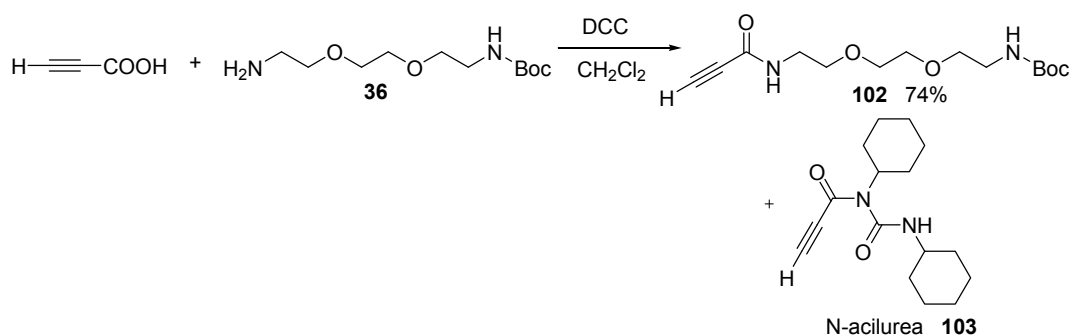
<b>84</b> (mmol)	<b>Bromoalquí</b> (mmol)	<b>Dissolvent</b> (mL)	<b>Amina</b> (mL)	<b>Condicions</b>	<b>Producte</b> (% Rend.)
0.25	<b>80</b>	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 30	$\text{BuNH}_2$ 0.75	1h, t.a.	-
	0.55 + 0.38				
0.25	<b>81</b>	THF/MeOH 25/5	$\text{BuNH}_2$ 0.75	3h, t.a.	<b>84</b> (20)
	0.6 + 0.72				<b>97</b> (6)
	+ 1.70				<b>95</b> (14)
0.3	<b>81</b>	THF/MeOH 25/5	Piridina 0.75	5h, t.a.	-
	0.75 + 1.35				

Taula 22: Condicions provades per a l'acoblament del 3,5-dietinilbenzoat d'etil (**84**) i el bromoalquí (**80**) i (**81**).

Com a espaiadors no rígids es van utilitzar d'entrada els mateixos (**36** i **39**) que ja s'havien utilitzat en la síntesi d'altres lligands divalents, sense preocupar-nos massa de si la seva longitud era l'òptima, degut a què ja disposàvem d'ells monoprotegits amb el grup Boc.

Així, una vegada sintetitzat ja el primer lligand divalent derivat de l'àcid 3,5-bis(butadiinil)benzoic, deixaríem per a més endavant l'optimització de la longitud d'aquest espaiador no rígid.

En primer lloc es va acoblar l'àcid propinoic a l'espaiador 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamat de *tert*-butil (**36**) (Esquema 63) i s'obtingué un resultat diferent en funció de les condicions utilitzades, tal com es resumeix a continuació (Taula 23). Cal destacar que la DCC no és un bon agent d'acoblament en dissolvents polars com la DMF, on es preferible utilitzar EDC. En canvi cal tenir la precaució de no afegir base quan es treballa amb EDC, ja que sinó l'acoblament entre l'àcid i l'amina no progressa. En tots els casos és aconsellable utilitzar l'amina en forma neutra abans d'addicionar base al medi de reacció, ja que l'addició de base afavoreix la formació de l'espècie *N*-acilurea. D'aquesta manera s'aconsegueixen resultats força satisfactoris en l'acoblament amb DCC en medi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



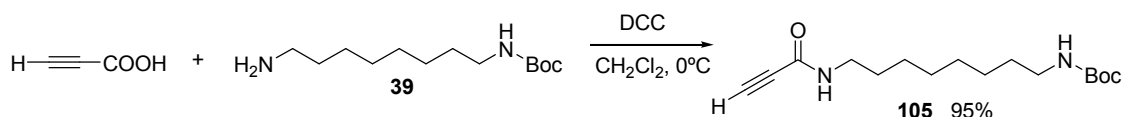
Esquema 63

Àc. propinoic (mmol)	36 (mmol)	Carbodiimida (mmol)	Dissolvent (mL)	Condicions	Producte (% Rend.)
0.31	0.25	DCC 0.27	DMF 10	1) 1h., 0°C 2) 2h., t.a.	<b>103</b> (94)
0.31	0.26	EDC 0.29	DMF 10	1) 30 min., 0°C 2) 2h., t.a.	<b>102</b> (57)
0.25	0.25	EDC, 0.3 DIEA, 0.3	DMF 10	1) 30 min., 0°C 2) 5h., t.a.	-
2.24	1.5	DCC 1.85	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 15	1) 30 min., 0°C 2) 3h., t.a.	<b>102</b> (74)

Taula 23: Condicions provades per a la síntesi del compost (**102**)

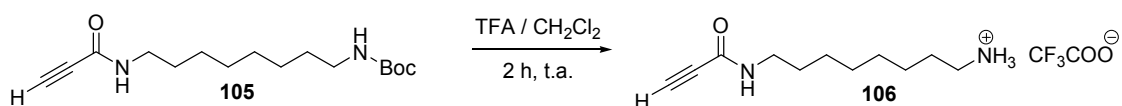
Degut a què les millors condicions trobades per a l'acoblament de l'àcid propinoic i el 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamat de *tert*-butil (**36**), han estat utilitzant diciclohexilcarbodiimida (DCC) com agent d'acoblament i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> com a dissolvent, es decideix seguir el mateix procediment per a l'acoblament d'aquest mateix àcid al 8-aminooctilcarbamat de *tert*-butil (**39**). El producte es purifica per

cromatografia en columna ( $\text{SiO}_2$ ; hexà/AcOEt, 1/1) obtenint-se l'amida **105** amb un 95% de rendiment. Cal destacar la importància de què l'extrem amino de l'espaiador es trobi en forma neutra ja que d'aquesta manera no és necessària l'addició de trietilamina que sovint fa baixar els rendiments dels acoblaments. També és important dissoldre l'àcid carboxílic i l'amina conjuntament, refredar a  $0^\circ\text{C}$  i tot seguit addicionar-hi la DCC dissolta, ja que la formació de l'espècie reactiva (O-acilisourea) té lloc molt ràpidament i d'aquesta manera reacciona immediatament amb l'amina lliure present en la dissolució.



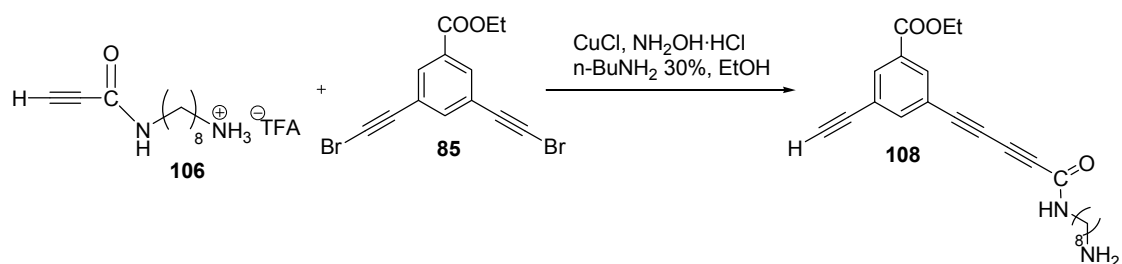
Esquema 64

La desprotecció de l'amina **105** amb àcid trifluoroacètic (TFA) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a temperatura ambient va proporcionar el trifluoroacetat de l'amina, el qual es va fer reaccionar directament ja que l'obtenció de la forma neutra de l'amina és complicada.



Esquema 65

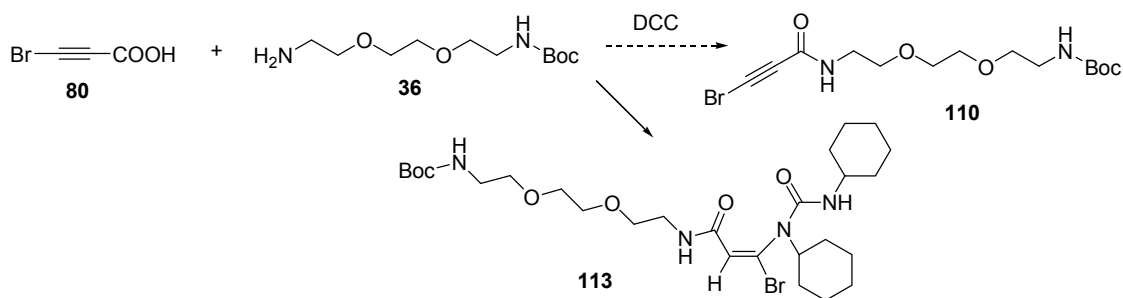
El compost sintetitzat anteriorment **106** es va voler acoblar al 3,5-bis(2-bromoetil)benzoat d'etil sota condicions de Cadiot-Chodkiewicz, utilitzant *n*-butilamina en medi aquós, clorur de coure (I), hidrocloïr d'hidroxiilamina i EtOH com a dissolvent de l'èster (per tal d'evitar la transesterificació). En aquest cas es va formar un precipitat que després de separar i analitzar per IR i MS va resultar que corresponia a una barreja del producte de monosubstitució desbromat (**108**) i l'amina de partida en forma neutra (**109**). Una possible explicació seria que el producte de monosubstitució precipités en el medi de reacció evitant d'aquesta manera la formació del producte disubstituit, o bé que la reacció de desbromació competís amb l'acoblament de Cadiot-Chodkiewicz, evitant d'aquesta manera que es formessin quantitats apreciables de producte disubstituit (**107**).



Esquema 66

Aleshores es va intentar l'acoblament entre l'àcid 3-bromopropinoic i l'amina **36**. Per aquest acoblament es van utilitzar diversos agents d'acoblament, i condicions, però ni la DCC ni el PyBOP van donar l'amida **110** (Esquema 67).

En el cas de la reacció amb DCC com agent d'acoblament, el producte principal va resultar ser el compost **113**, del qual no en sabem l'estereoquímica, amb la qual cosa es representa una de les possibles estructures que pot adoptar.



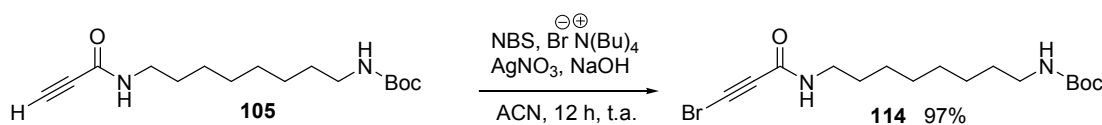
Esquema 67

<b>80</b> (mmol)	<b>36</b> (mmol)	Agent acoblament (mmol)	Additiu (mmol)	Dissolvent	Condicions	Producte (% Rend.)
1.01	1.16	PyBOP 1.20	DIEA, 2.50 HOBt, 0.1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	24 h., t.a.	-
1.60	1.32	DCC 2.23	-	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1) 1h., 0°C 2) 12h., t.a.	<b>113</b> (43) <sup>(1)</sup>

Taula 24: Condicions provades per a l'obtenció de l'amida **110**

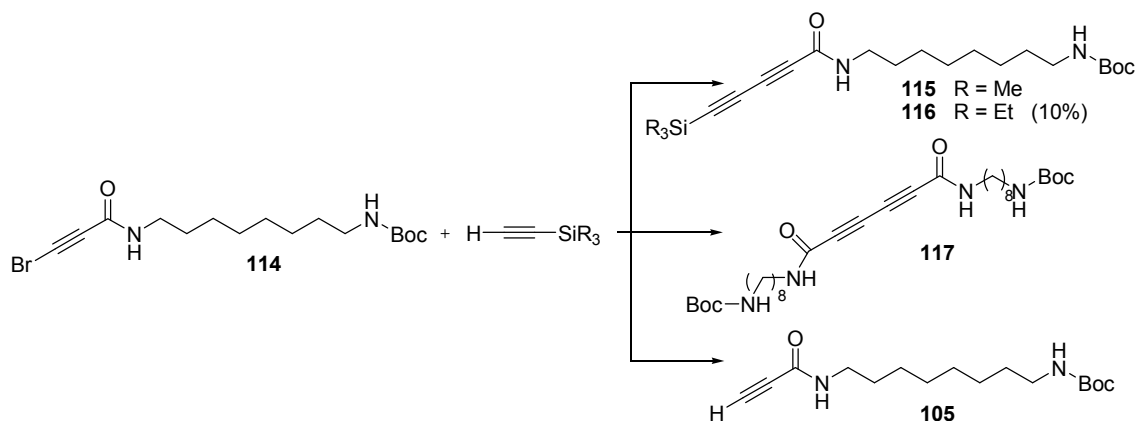
<sup>(1)</sup> Purificat per HPLC (Kromasil C18, columna analítica, f = 0.8 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH (2/8), tr = 14.4 min)

Aleshores es va procedir a la bromació del producte 8-(propiolamido)octilcarbamat de *tert*-butil (**105**), sintetitzat anteriorment, amb *N*-bromosuccinimida (NBS), nitrat de plata com a catalitzador, bromur de tetrabutilamoni, medi bàsic i ACN com a dissolvent<sup>147</sup> (Esquema 68), obtenint-se el bromoalquí **114** amb un rendiment del 97%.



Esquema 68

L'acoblament de Cadiot-Chodkiewicz entre el bromoalquí **114** i l'acetilè monoprotegit (trimetilsililacetilè o trietilsililacetilè) no va donar bon resultat. Es van fer varies proves canviant les condicions, però els resultats obtinguts no van ser gaire satisfactoris; o no reaccionava, o bé es formava majoritàriament el producte d'homoacoblament (**117**) o bé el producte de desbromació. Només en un cas es va obtenir el diacetilè **116** amb un 10% de rendiment (Esquema 69).



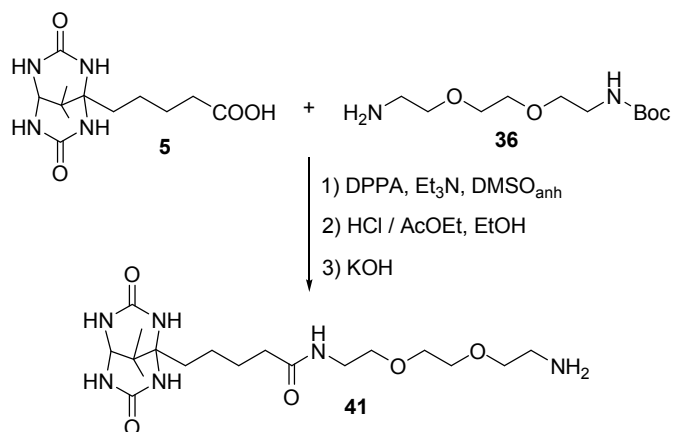
Esquema 69

A continuació es detallen les proves realitzades.

114 (mmol)	Acetilè monoprotegit (mmol)	Catalitzador (mmol)	Dissolvent (mL)	Condicions	Producte (% Rend.)
0.41	TMSA 1.53	CuI, 0.06 PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 0.03	Piperidina / MeOH (3/8)	0°C 1h, t.a.	-
0.16	TMSA 0.32	CuCl, 0.016	EtNH <sub>2</sub> aq. (70%) (10)	NH <sub>2</sub> OH·HCl 0°C 5h, t.a.	-
0.66	TESA 0.99	CuCl, 0.06	BuNH <sub>2</sub> aq. (30%) / Et <sub>2</sub> O (5/2)	NH <sub>2</sub> OH·HCl 0°C 2h. t.a.	<b>116</b> (10) <b>117</b> (89)
1.0	TESA 2.7	CuCl, 0.15	BuNH <sub>2</sub> aq. (30%) / dioxà / AcOEt (25/25/25)	NH <sub>2</sub> OH·HCl 0°C, 30 min, t.a.	<b>105</b> (18) <b>117</b> (80)

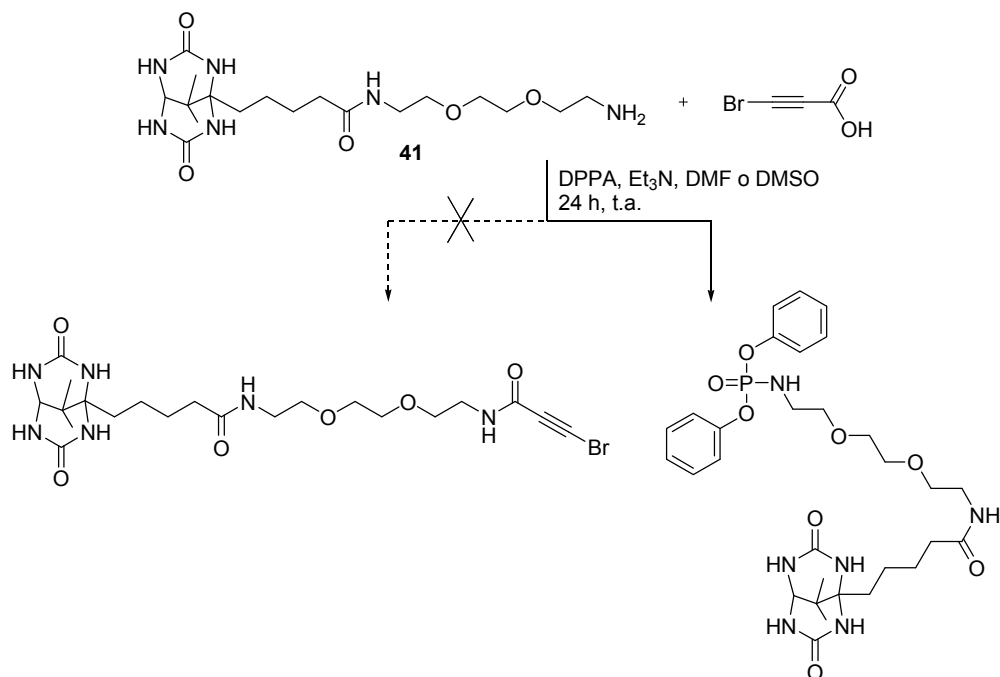
Taula 25: Condicions provades per a la formació dels productes **115** i **116**

Es va pensar en una altra possibilitat que consistia en acoblar en primer lloc el lligand monovalent **5** a l'espaiador monoprotegit utilitzant difenilfosforilazida (DPPA) com agent d'acoblament en DMSO.<sup>54</sup> Aquest producte es va obtenir en forma de sòlid blanc després de purificar-lo mitjançant columna cromatogràfica (SiO<sub>2</sub>) i posteriorment amb HPLC en fase reversa (Kromasil C18) ja que hi ha restes de DPPA que són molt difícils de separar si no és a través de l'HPLC. Finalment s'obtingué l'amida **40** amb un 79% de rendiment. A continuació es va desprotegir l'amina amb HCl en AcOEt durant 24 h., tot seguit es va purificar de les sals que contenia a través d'HPLC en fase reversa (Kromasil C18) obtenint-se el producte desprotegit en forma d'hidroclorur amb un 57% de rendiment. Si es vol obtenir el producte en forma neutra (**41**), es basifica a pH = 10 amb KOH i es purifica a través d'una columna amb fase estacionària polimèrica (MCI Gel CHP20P) eluint amb H<sub>2</sub>O i barreges H<sub>2</sub>O/MeOH (Esquema 70).



Esquema 70

Aleshores es va intentar l'acoblament de l'amina **41** amb l'àcid 3-bromopropínic utilitzant DPPA com agent d'acoblament i trietilamina en DMF com a dissolvent, però la reacció no va progressar. Com que el reactiu de partida amino no és molt soluble en DMF, es va decidir repetir l'acoblament en les mateixes condicions però utilitzant DMSO com a dissolvent. No obstant això, tampoc es va obtenir el producte **118**, sinó que es va aïllar el producte resultant de l'addició-eliminació de l'amina **41** a la DPPA analitzat per RMN, ESI-MS i IR (Esquema 71).



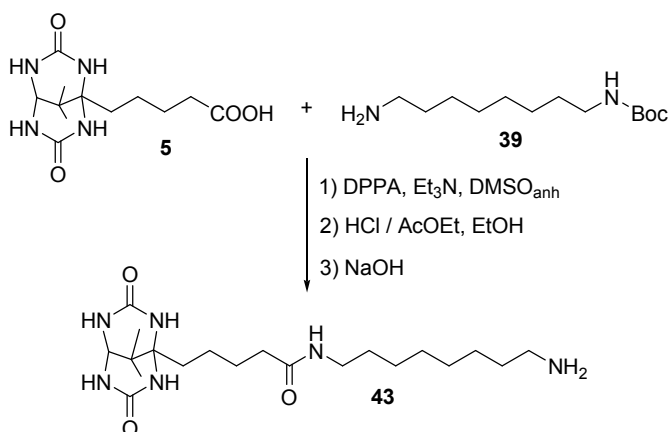
Esquema 71

Una possible explicació per a la formació d'aquest producte secundari seria que la DPPA s'hidrolitzi i a continuació amb la presència de l'hidroclorur, es formi el clorur de l'àcid difenilfosfòric, el qual es troba descrit que reacciona amb una amina primària generant el producte N-fosforamidat.<sup>148</sup>

Com a conseqüència de que els acoblaments amb l'àcid 3-bromopropínic no s'havien obtingut amb èxit, es va decidir provar una altra ruta que consistia en acoblar en primer lloc l'amina

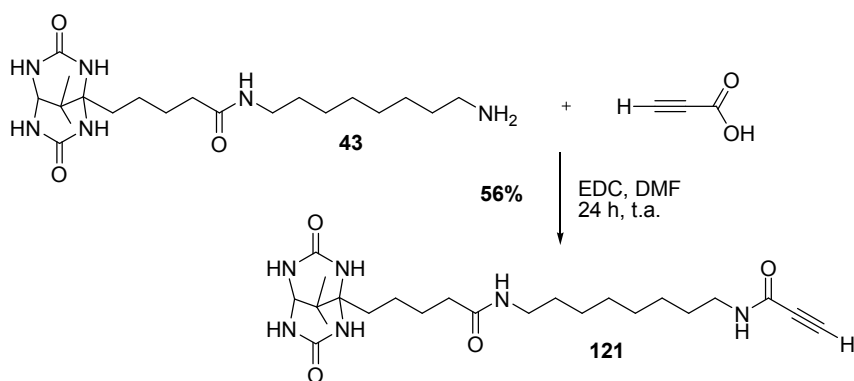
sintetitzada **41** a l'àcid propinoic per tal de procedir amb la bromació un cop el compost s'hagués format.

En aquest cas es va acoblar el lligand monovalent **5** i el 8-aminooctilcarbamat de *tert*-butil **39** utilitzant DPPA i DMSO.<sup>51</sup> Posteriorment es va desprotegir l'amina utilitzant HCl en AcOEt i, tot seguit, un tractament amb base va generar l'amina lliure (Esquema 72).



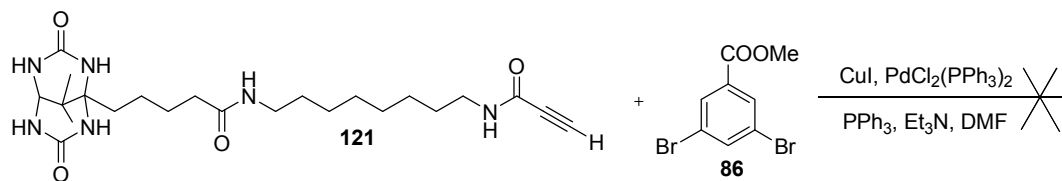
Esquema 72

Aquesta amina **43** es va acoblar a l'àcid propinoic utilitzant hidroclorur de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) com agent d'acoblament i DMF com a dissolvent, ja que el compost **43** no es dissol en dissolvents més apolars. El producte **121** es purifica a través d'HPLC semi-preparatiu en fase reversa (Kromasil C18) obtenint-se el producte desitjat amb un 56% de rendiment (Esquema 73).



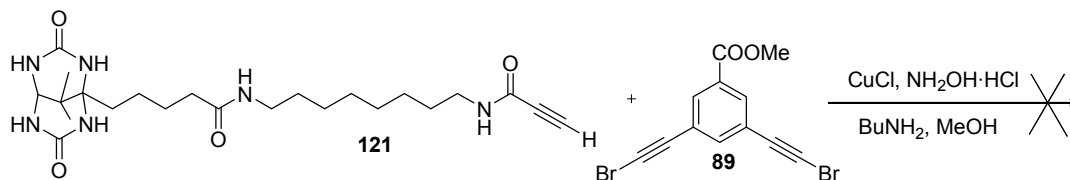
Esquema 73

El compost sintetitzat **121** es va intentar acoblar al 3,5-dibromobenzoat de metil mitjançant una reacció de Sonogashira, utilitzant el catalitzador de pal·ladi  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ , CuI, trifenílfosfina, trietilamina i DMF com a dissolvent. La mescla es va irradiar al microones a 120°C durant 25 min, ja que aquestes eren les condicions amb les qual s'havien obtingut millors resultats anteriorment (Esquema 74). En aquest cas la reacció no va progressar satisfactòriament, i es va haver d'optar per una altra ruta.



Esquema 74

Una alternativa era l'acoblament de Cadiot-Chodkiewicz entre l'alquí **121** i el 3,5-bis(2-bromoetil)benzoat de metil (**89**) utilitzant les condicions d'acoblament que millor ens han funcionat, és a dir, CuCl, hidroclozur d'hidroxilamina, *n*-butilamina i MeOH. En aquest cas no es va utilitzar aigua perquè empitjorava la solubilitat de l'èster. Tot i això es va observar l'aparició de terbolesa i per això s'addicionaren altres dissolvents (AcOEt, DMF, H<sub>2</sub>O) intentant dissoldre tots els reactius. Amb això es va millorar una mica la solubilitat global, però la reacció no va funcionar (Esquema 75).



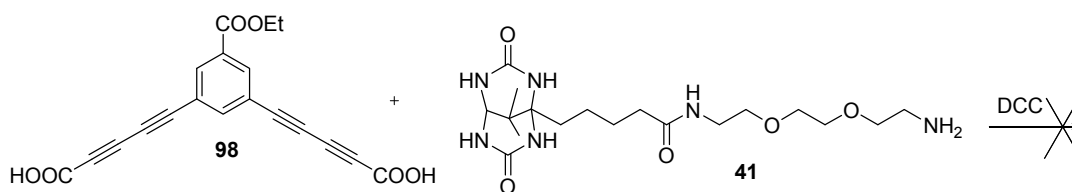
Esquema 75

Finalment es va intentar l'acoblament entre el diàcid **98** i les amines **41** i **43**. Es van provar diferents agents d'acoblament en cada cas. Amb el compost **41** es va utilitzar la DCC en DMF i barreges CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF i la EDC en DMF, sense obtenir resultats satisfactoris, tal com es resumeix a continuació (Esquema 76, Taula 26).

Diàcid 98 (mmol)	Amino 41 (mmol)	Agent d'acoblament (mmol)	Dissolvent (mL)	Condicions	Rend.
0.024	0.028	DCC	DMF	1h, 0°C	-
		0.036	10	2h, t.a.	
0.074	0.08	DCC	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /DMF	1h, 0°C	-
		0.185	15/35	24h, t.a.	
0.22	0.26	EDC	DMF	1h, 0°C	-
		0.27	100	12h, t.a. 2d, 55°C	

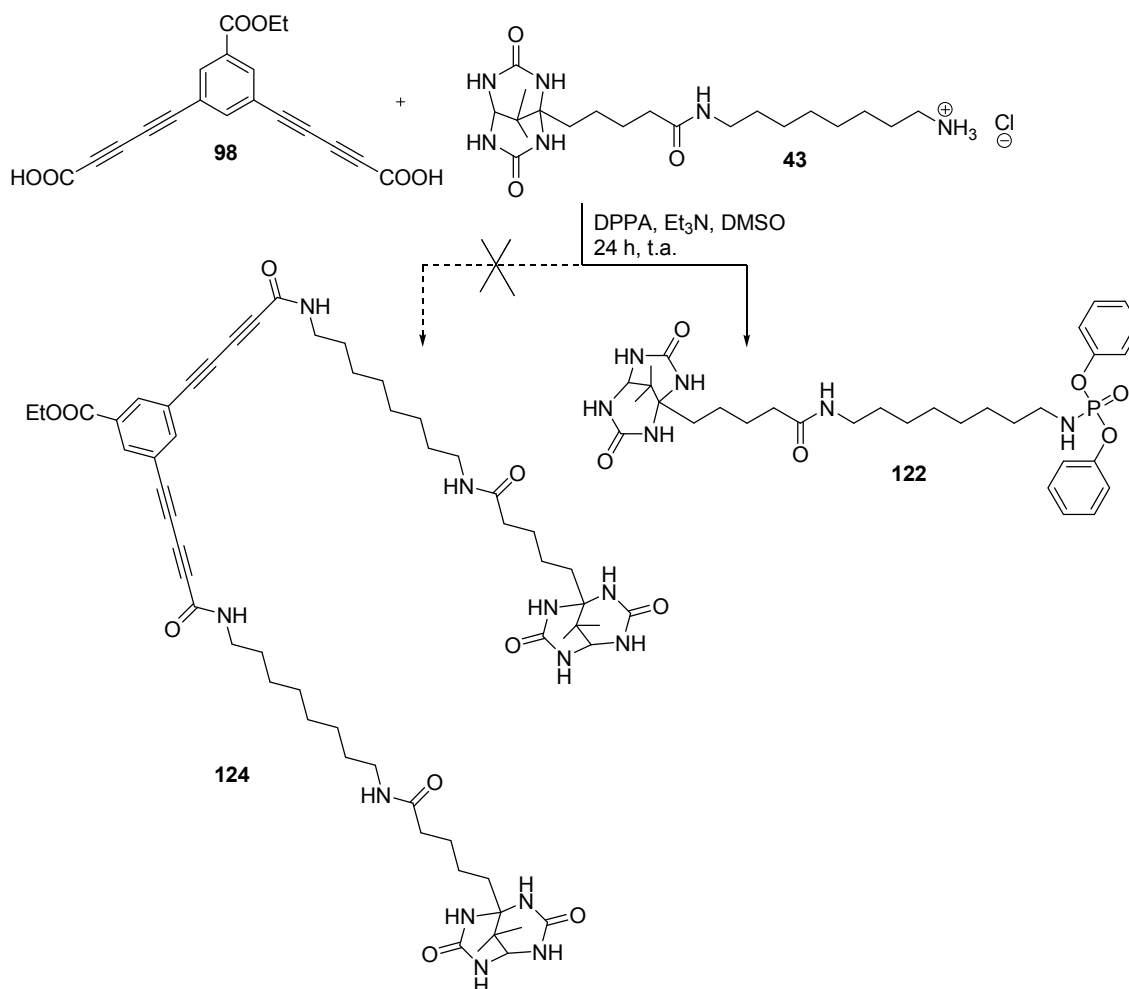
Taula 26: Condicions provades per a l'obtenció del compost **120**





Esquema 76

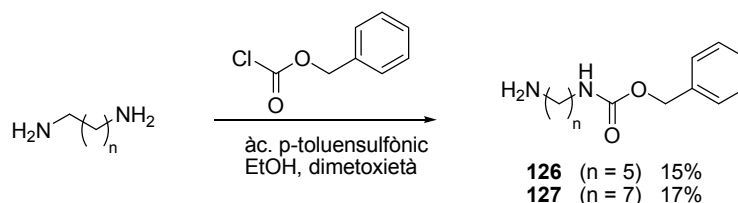
En vista dels resultats i com a conseqüència de que la solubilitat del producte **43** amb cadena etilènica és més dolenta en dissolvents apolars, es va realitzar l'acoblament en DMSO i utilitzant DPPA com agent d'acoblament amb trietilamina. Després de purificar la barreja de reacció per cromatografia en columna s'obtingué un producte majoritari que va resultar ser el producte **122** resultat d'addició-eliminació de l'amina **43** a la DPPA, tal com ja havia passat en un acoblament anterior (Esquema 77). En aquest cas, també partíem de l'hidroclorur i això podria explicar, com en el cas anterior, la formació d'aquest producte secundari.



Esquema 77

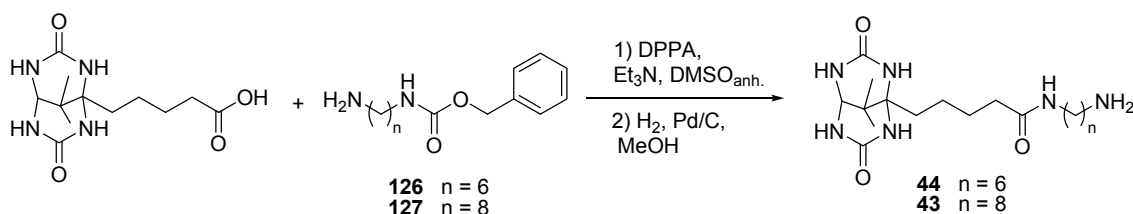
Per tal d'evitar que l'extrem amino del compost **43** es trobés en forma d'hidroclorur o bé protonat, es va optar per realitzar la síntesi d'aquest compost mitjançant una ruta diferent en la qual

s'utilitzés un altre grup protector, la desprotecció del qual no generés l'hidroclorur. Aleshores es va començar protegint els espaiadors 1,6-hexandiamina i 1,8-octandiamina amb el cloroformat de benzil seguint una variació del procediment descrit a la literatura. D'aquesta manera s'obtingueren els compostos 6-aminohexilcarbammat de benzil (**126**)  $n = 6$  i 8-aminooctilcarbammat de benzil (**127**)  $n = 8$  amb un 15% i un 17% de rendiment respectivament (Esquema 78).



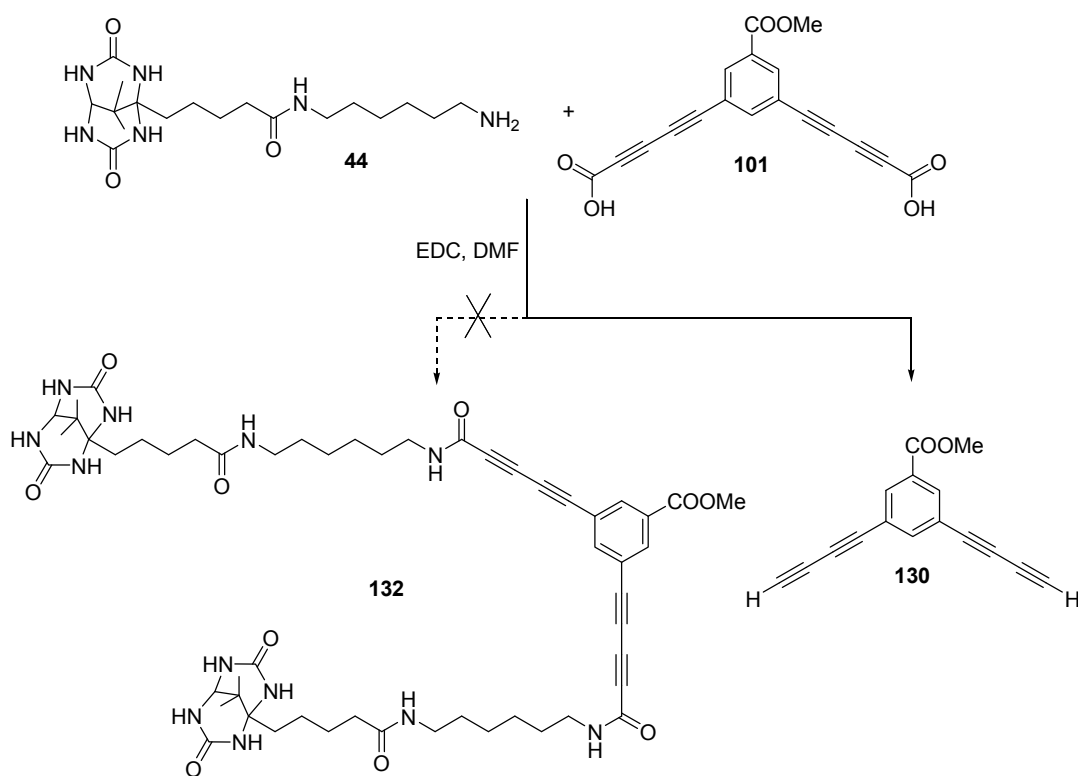
Esquema 78

Aleshores es van acoblar els espaiadors monoprotegits amb el grup Z al lligand monovalent **5** seguint el mateix procediment que havíem utilitzat per als espaiadors monoprotegits amb el grup Boc, és a dir utilitzant DPPA com agent d'acoblament en medi de  $\text{Et}_3\text{N}$  i DMSO. D'aquesta manera s'obtingueren els compostos **128** amb un 66% de rendiment després de purificació per HPLC i **129** amb un rendiment pràcticament quantitatiu, tot i que en aquest cas no es va purificar per HPLC ja que el compost era prou pur per a realitzar la reacció següent i posteriorment purificar-lo. Posteriorment es va procedir a la desprotecció de l'extrem amino mitjançant hidrogenació catalítica utilitzant Pd/C com a catalitzador i s'obtingueren d'aquesta manera els compostos desitjats amb l'extrem amino en forma neutra **43** i **44** (Esquema 79).



Esquema 79

Aleshores es va provar l'acoblament entre el compost **44** i el diàcid **101** utilitzant EDC com agent d'acoblament, en absència de base i utilitzant DMF com a dissolvent. Es va analitzar l'evolució de la reacció i es va observar com el diàcid de partida desapareixia, però després d'analitzar la barreja de reacció, es va comprovar que el diàcid havia descarboxilat generant d'aquesta manera el compost **130** i que es recuperava el reactiu de partida **44** (Esquema 80). Això ens va fer pensar que hi havia algun problema amb el dissolvent, per això es van fer proves d'estabilitat del diàcid **101** en DMF amb addició d'àcid i sense addició d'àcid. El resultat ens va mostrar com el diàcid descarboxilava simplement al estar dissolt en DMF durant 1h. a T. amb., en canvi si el medi és àcid, la descarboxilació no es produeix. Aquesta descarboxilació pot ser deguda a les amines que pugui contenir la DMF utilitzada, per tant no és un bon dissolvent per a realitzar aquest acoblament, la qual cosa en complica la síntesi del producte desitjat, ja que en dissolvents més apolars, el reactiu **44** no es dissol.



Esquema 80

A pesar del resultats pocs exitosos que s'han obtingut amb les rutes explorades, es podria abordar la síntesi d'aquest tipus de lligands semi-rígid a partir de la formació d'un èster activat del diàcid **101** i posterior reacció amb l'amina **44** o algun altre lligand monovalent similar.



**5      *PART EXPERIMENTAL***



## 5.1 MÈTODES GENERALS

### 5.1.1 Dissolvents i reactius

- Els reactius comercials s'han utilitzat directament, sense prèvia purificació i comprovant que les dades espectroscòpiques experimentals corresponien amb les teòriques.

- Els dissolvents utilitzats en les reaccions van ser purificats i assecats quan va ser necessari segons els procediments descrits a la literatura.<sup>149</sup>

Per tal d'obtenir el DMSO anhidre s'ha fet una congelació parcial del DMSO comercial i a continuació s'ha destil·lat el DMSO a pressió reduïda sobre CaH<sub>2</sub>, descartant els caps i recollint el DMSO anhidre sota atmosfera de N<sub>2</sub>.

- L'aigua utilitzada per a realitzar els experiments d'unió del lligand a la proteïna, es filtra i purifica en un sistema Millipore (Milli-Q).

- El <sup>t</sup>BuOK s'ha purificat per sublimació a pressió reduïda.

### 5.1.2 Instrumentació general

**Punt de fusió (Pf):** mesurats amb un aparell Kofler Reichert Thermovar amb llum polaritzada i no estan corregits.

**Rotació òptica ([ $\alpha$ ]<sub>D</sub>):** mesurats a temperatura ambient (25°C) en un polarímetre Perkin Elmer 241 MC. Les concentracions es donen en g/100 mL i les mesures van ser preses a 589 nm (línia D del sodi) en una cel·la de 1 dm de longitud i 1 mL de capacitat.

**Espectres d'infraroig (IR):** es van realitzar utilitzant un aparell de transformada de Fourier Nicolet 510 FT-IR o Perkin-Elmer 681, utilitzant per a les mostres sòlides barreges sòlides de KBr i per a les mostres líquides un film sobre una pastilla de NaCl.

**Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN):** els espectres es van enregistrar en dissolucions de CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, d<sub>6</sub>-DMSO, D<sub>2</sub>O o d<sub>6</sub>-acetona segons el cas. Els aparells utilitzats són:

- Varian-Gemini 200 per <sup>1</sup>H-RMN (200 MHz) i <sup>13</sup>C-RMN (50 MHz)

- Bruker-Unity 300 per <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz) i <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz)

- Mercury 400 per <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz) i <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz)

Els desplaçaments químics es donen en ppm i referenciats respecte al TMS (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C,  $\delta$ : 0.0), al CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H,  $\delta$ : 7.26, <sup>13</sup>C,  $\delta$ : 77.0), al CD<sub>3</sub>OD (<sup>1</sup>H,  $\delta$ : 3.34, <sup>13</sup>C,  $\delta$ : 49.86), al d<sub>6</sub>-DMSO (<sup>1</sup>H,  $\delta$ : 2.54, <sup>13</sup>C,  $\delta$ : 40.45), a la D<sub>2</sub>O (sal sòdica de TMS, <sup>1</sup>H,  $\delta$ : 0.0, <sup>13</sup>C,  $\delta$ : 0.0) i a la d<sub>6</sub>-acetona (<sup>1</sup>H,  $\delta$ : 2.09, <sup>13</sup>C,  $\delta$ : 30.6). Les constants d'acoblament (J) es donen en Hz i la seva multiplicitat s'indica de la següent manera: s (singlet), d (doblet), dd (doblet de doblets), dt (doblet de triplets), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet) i així successivament. La multiplicitat del carboni (CH<sub>3</sub>: carboni primari), (CH<sub>2</sub>: carboni secundari),

(CH: carboni terciari) i (C: carboni quaternari) s'estableix a partir d'experiments DEPT i correlació per HSQC.

**Espectrometria de masses (MS):** Els espectres de masses es van realitzar per ESI (espectròmetre de masses ZQ, Micromass, UK), FAB (espectròmetre de masses VG-QUATTRO, Micromass, UK), ionització química i MALDI al Departament de Química Orgànica de la UB i Mariner ESI-TOF (Applied Biosystems) al Servei de Masses dels Serveis Científic-Tècnics del PCB.

**UV-Visible:** Els espectres UV-Visible es van realitzar amb un espectrofotòmetre CARY 500 Scan / UV-Vis-NIR.

**Fluorescència:** Els espectres de fluorescència es van realitzar en un aparell Aminco Bowman Series 2 connectat a un termòstat Haake DC 10 a una temperatura de 25°C. Les esclatxes d'excitació es van mantenir a 4 nm i les d'emissió es van mantenir a 16 nm. El voltatge aplicat per a fotomultiplicar el senyal al detector es va anar variant en funció de cada conjunt de mesures per tal de no saturar el detector. Es va emprar una cubeta de quars d'1 cm de pas de llum.

**GPC:** Les mesures de GPC s'ha realitzat al Servei de Cromatografia de Líquids dels Serveis Científic-Tècnics del PCB utilitzant una columna d'exclusió molecular (Superosa 12 10/30).

**pH-metre:** Les mesures de pH es van dur a terme mitjançant un pH-metre Cyberscan 510.

#### **Cromatografia:**

**Columnes de cromatografia flash:** S'utilitza gel de sílice (SDS, 35-70 µm) i pressió d'aire per a compactar-les i eluir els productes.

**Cromatografia en capa fina (CCF):** Es realitza sobre plaques cromatogràfiques de gel de sílice de Merck (DC-Alufolien KIESELGEL 60 F254; SiO<sub>2</sub> de 0.2 mm) i els components es visualitzen sota una làmpada de llum ultraviolada a 254 nm o 365 nm, o per tractament amb els següents reveladors:

- Les plaques van ser exposades a vapors de Cl<sub>2</sub> gas i a continuació a un agent revelador de 4,4'-metilenbis(N,N-dimetilanilina) (TDM). Amb aquest procediment eren actius els grups amida, fenols, àcids carboxílics, urea i amina entre d'altres.

- Anisaldehyd: 9.2 mL de 4-metoxibenzaldehyd, 3.8 mL d'àcid acètic glacial, 338 mL d'EtOH (95%) i 12.5 mL d'àcid sulfúric (98%). Aquest revelador es va utilitzar per visualitzar aldehids.

- Permanganat de potassi: 3 g KMnO<sub>4</sub>, 20 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 300 mL d'aigua i 5 mL de NaOH<sub>aq.</sub> (5%). Aquest revelador es va utilitzar per visualitzar principalment triples enllaços, tot i que es revelaven pràcticament tots els grups funcionals.

- Iode: vapors de iode. Aquest revelador es va utilitzar per visualitzar triples enllaços.

**Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC):** Les mesures d'HPLC es van fer utilitzant els aparells següents: Shimadzu (amb bombes LC9A i LC10A) i detector UV o detector de díode-Array, Waters 510 amb detector d'índex de refracció i Waters acoblat a detector de díode-Array i



espectròmetre de masses (Micromass ZQ). Es van utilitzar segons el cas, les següents columnes: Kromasil C18 (30 x 0.46 cm Ø), Kromasil C18 (15 x 4.5 cm Ø), Chirobiotic T (30 x 0.21 cm Ø).

**Microones:**

Avui en dia els reactors per a síntesi en microones disposen d'agitadors magnètics (que assegurin l'homogeneïtat), controlen la temperatura de reacció a través de sondes de fibra òptica o sensors d'IR, i disposen de software que permet el control de la temperatura/pressió a través de la regulació de la potència de les microones.<sup>150-152</sup> Hi ha dos tipus de reactors; els que tenen diverses cavitats multimode que permeten síntesi en paral·lel i els monomode que només tenen una cavitat i on només es pot irradiar una mostra cada vegada. Els reactors monomode processen volums petits i disposen d'una corrent d'aire refrigerant que permet refredar la mostra després d'haver estat irradiada. Els instruments disponibles actualment poden operar amb rangs de 0.2 a 50 mL en recipients segellats (250°C, 20 bar).

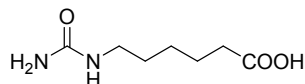
En el nostre cas s'ha treballat amb l'aparell monomode MW Biotage amb capacitat per a un reactor amb volum de 0.5-10 mL, el qual pot treballar a un màxim de 20 bars i a 250°C.



## 5.2 LLIGANDS MONOVALENTS

### 5.2.1 Síntesi de derivats *N*-alquilats de propandiurea

#### 5.2.1.1 Síntesi de l'àcid 6-ureidohexanoic (**18**)<sup>153</sup>



Es dissol l'àcid 6-aminohexanoic (7.0 g, 53 mmol) en 120 mL d'aigua. A continuació es dissol el KCNO (5.2 g, 63 mmol) en la mínima quantitat d'aigua i s'addiciona a la dissolució anterior. La mescla de reacció s'escalfa a reflux 30 min. i es controla l'evolució de la reacció per CCF (SiO<sub>2</sub>; *n*-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O, 4/0.5/0.5). Tot seguit es refreda a T.amb. i s'afegeix HCl 2M fins a pH= 3. Es refreda la mescla de reacció a 4°C i s'obté un sòlid blanc que es filtra i es renta amb aigua refredada a 0°C i acetona. El producte es recristal·litza en aigua i s'obtenen 8.7 g (49.9 mmol) d'àcid 6-ureidohexanoic (**18**) que representen un 94% de rendiment.

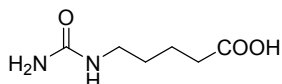
**CCF** (SiO<sub>2</sub>; *n*-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O, 4/0.5/0.5; Rf = 0.75)

**<sup>1</sup>H-RMN** (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 6.86 (1H, s, NH), 5.32 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 2.89 (2H, q, J = 6.2 Hz, NH-CH<sub>2</sub>), 2.16 (2H, t, J = 7.2 Hz, -CH<sub>2</sub>-COOH), 1.30 (6H, m, NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH)

**IR** υ (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3407, 3214, 2950, 1709 (C=O), 1661 (C=O), 1559

**ESI-MS:** m/z = 174.8 [M+H]<sup>+</sup>, 196.8 [M+Na]<sup>+</sup>, 212.8 [M+K]<sup>+</sup>

#### 5.2.1.2 Síntesi de l'àcid 5-ureidopentanoic (**17**)<sup>153</sup>



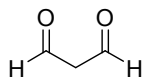
Es dissol l'hidroclorur de l'àcid 5-aminopentanoic (4.0 g, 26 mmol) en 120 mL d'aigua (el pes real és inferior perquè el producte està humit). A continuació es dissol el KCNO (2.1 g, 26 mmol) en la mínima quantitat d'aigua i s'addiciona a la dissolució anterior. La mescla de reacció s'escalfa a reflux 30 min. i es controla l'evolució de la reacció per CCF (SiO<sub>2</sub>; *n*-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O, 4/0.5/0.5). Tot seguit es refreda a T.amb. i s'afegeix HCl 2M fins a pH= 3. Es refreda la mescla de reacció a 4°C i s'obté un sòlid blanc que es filtra i es renta amb aigua refredada a 0°C i acetona. El producte es recristal·litza en aigua i s'obtenen 338 mg (2.1 mmol) d'àcid 5-ureidopentanoic (**17**) que representen un 8% de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; *n*-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O, 4/0.5/0.5; Rf = 0.69)

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ(ppm): 11.99 (1H, s, -COOH), 5.89 (1H, m, H<sub>2</sub>N-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-COOH), 5.34 (2H, s, H<sub>2</sub>N-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-COOH), 2.92 (2H, q, J = 6.2 Hz, H<sub>2</sub>N-CO-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-COOH), 2.18 (2H, t, J = 7.2 Hz, H<sub>2</sub>N-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 1.48-1.30 (4H, m, H<sub>2</sub>N-CO-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH)

IR  $\nu$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3442, 3222, 1695 (C=O), 1674 (C=O), 1599

### 5.2.1.1 Generació del malonaldehid <sup>154</sup>



Es dissol el 1,1,3,3-tetrametoxipropà (**15**) (8.214 g, 50 mmol) en una dissolució de HCl 2 M (25 mL) i s'agita a temperatura ambient sota atmosfera de nitrogen. Es controla el transcurs de la reacció per CCF ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) i RMN. La desprotecció ha finalitzat quan ja no s'observa reactiu inicial, passades unes 2 hores.

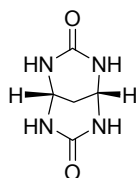
Per analitzar per RMN, s'ha d'extreure una fracció de la mescla de reacció amb  $\text{CDCl}_3$  i posteriorment s'ha d'assecar la fase orgànica passant-la a través d'una pipeta que contingui  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidre.

**CCF** ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Rf = 0.5) (visible sota la làmpada d'UV)

<sup>1</sup>H-RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 9.75 (2H, t, J = 1.0 Hz, H-CO-CH<sub>2</sub>-CO-H), 9.40 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-CO-CH=CHOH), 7.41 (1H, d, J = 10.6 Hz, H-CO-CH=CHOH), 5.63 (1H, dd, J<sub>1</sub> = 10.6 Hz, J<sub>2</sub> = 8.2 Hz, H-CO-CH=CHOH), 2.76 (2H, dd, J = 5.7 Hz, J = 1.0 Hz, H-CO-CH<sub>2</sub>-CO-H)

La proporció ceto-enòlica aprox. segons la integració és: 1:2 (forma cetònica i enòlica respectivament)

### 5.2.1.2 Síntesi del 3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]nonà [PDU (6)]<sup>52</sup>



Es pesa el 1,1,3,3-tetrametoxipropà (**15**) (9.85 g, 60 mmol) i la urea (7.2 g, 120 mmol) en un matràs de 50 mL (relació molar 1:2). S'afegeixen 30 mL de dissolució HCl 2M o bé  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M. Es comprova amb paper indicador que el pH de la mescla és àcid (pH=1). Es tapa el matràs de reacció amb un sèptum i s'agita amb agitació magnètica i sota atmosfera de nitrogen durant 2 dies a temperatura ambient, o fins que s'observa que algun dels reactius s'ha esgotat. Quan ja no s'observa malonaldehid es para la reacció refredant-la a 4°C i filtrant el sòlid obtingut.

El sòlid es recristal·litza en aigua i s'asseca al dessecador, obtenint-se el producte desitjat amb un 28% de rendiment.

**Pf** (°C) > 300°C

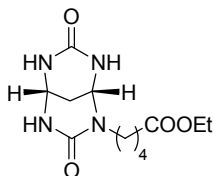
**CCF** ( $\text{SiO}_2$ ; *n*-BuOH/AcOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , 4/1/1; Rf = 0.34)

<sup>1</sup>H-RMN (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 7.06 (4H, m, H-N), 4.47 (2H, m, CH), 1.92 (2H, m, CH<sub>2</sub>)

IR  $\nu$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3257, 3077, 1657 (C=O), 1636

ESI-MS: ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ )  $m/z$  = 178.7  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 194.7  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , 313.0  $[\text{2M}+\text{H}]^+$ , 335.0  $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ , 469.1  $[\text{3M}+\text{H}]^+$ , 491.1  $[\text{3M}+\text{Na}]^+$  i més agregats.

### 5.2.1.3 Síntesi del 5-(3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicclo[3.3.1]non-2-il)-pentanoat d'etil [PDU-N-( $\text{CH}_2$ )<sub>4</sub>-COOEt (22)]



#### **Procediment A: Utilitzant NaH com a base**

Es pesa 187 mg (1.2 mmol) de PDU (**6**) en un matràs i es guarda sota atmosfera de nitrogen fins que s'hi transfereix el DMSO anhidre (200 mL) a través de cànula i sota atmosfera inert. Aquesta dissolució s'escalfa ( $\sim 90^\circ\text{C}$ ) amb agitació per tal de dissoldre la PDU completament i seguidament es deixa refredar fins aproximadament  $40^\circ\text{C}$ . En un altre matràs es pesa el NaH 60% en oli mineral (100 mg, 2.5 mmol) i es renta amb hexà anhidre ( $3 \times 10$  mL) sota atmosfera de nitrogen. Tot seguit es transfereix la dissolució de PDU sobre el matràs que conté el NaH net i sec, a través d'una cànula i sota atmosfera de  $\text{N}_2$ . Es deixa agitant uns 15 min a temperatura ambient. Finalment s'afegeix el 5-bromopentanoat d'etil (**26**) (251 mg, 1.2 mmol) amb xeringa i gota a gota sobre la mescla de reacció.

La mescla de reacció es deixa agitant sota atmosfera de nitrogen i a temperatura ambient durant 24 h. Després d'analitzar-se per CCF ( $\text{SiO}_2$ ;  $n\text{-BuOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 4/0.5/0.5) encara s'observa gran quantitat de PDU, per la qual cosa s'addiciona 1.25 mmol de 5-bromopentanoat d'etil i es continua agitant sota les mateixes condicions durant 2 dies. Aleshores es torna a analitzar per CCF i encara s'observa PDU, per la qual cosa s'addiciona 1.18 mmol de 5-bromopentanoat d'etil i s'esclafa la mescla a  $50^\circ\text{C}$  durant 24 hores més. Finalment s'evapora el dissolvent ja que no s'observen canvis apreciables en l'evolució de la reacció.

L'anàlisi de la barreja de reacció per CCF ( $\text{SiO}_2$ ;  $n\text{-BuOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 4/0.5/0.5) dóna 3 taques a  $R_f$  = 0.59, 0.42 i 0.34 (PDU) en proporció aproximada 1:10:8. Aleshores es purifica la mescla de reacció per cromatografia en columna ( $35 \times 3$  cm  $\varnothing$ ;  $\text{SiO}_2$ ;  $n\text{-BuOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 4/0.5/0.5), obtenint-se 288 mg del compost desitjat (**22**) impurificats amb gel de sílice, però prou purs per a procedir amb la reacció següent.

#### **Procediment B: Utilitzant <sup>t</sup>BuOK com a base**

Una barreja de PDU (**6**) (40 mg, 0.25 mmol) i  $\text{DMSO}_{\text{anh}}$ . (50 mL) s'escalfa a  $90^\circ\text{C}$  amb agitació fins a dissolució total i es deixa refredar la barreja a temperatura ambient. A continuació s'addiciona gota a gota una dissolució de <sup>t</sup>BuOK (31.6 mg, 0.28 mmol) en  $\text{DMSO}_{\text{anh}}$ . (5 mL) sobre la barreja anterior i es deixa agitant a T.amb. sota atmosfera de nitrogen durant 30 min. Aleshores s'addiciona una dissolució de 5-bromopentanoat d'etil (58.87 mg, 0.28 mmol) en 2 mL de  $\text{DMSO}_{\text{anh}}$ . i la barreja s'agita a T.amb. sota atmosfera de nitrogen durant 24 h. L'evolució de la reacció es controla per

anàlisi de CCF (SiO<sub>2</sub>; n-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O, 4/0.5/0.5) i per HPLC (Kromasil C18, columna analítica, f = 1 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 6/4, tr (**6**) = 2.8 min, tr (**22**) = 5.7 min) de diverses fraccions a diferents temps de reacció. La barreja de reacció s'evapora a pressió reduïda, es redissol en H<sub>2</sub>O/MeOH (1/1) i es purifica mitjançant HPLC semi-preparatiu (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 4 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 6/4, tr = 9.5-10.5 min) obtenint-se el producte desitjat (**22**) (18 mg, 0.06 mmol) amb un 25% de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; N-N-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O, 4/0.5/0.5; R<sub>f</sub> = 0.42)

**<sup>1</sup>H-RMN** (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 7.37 (1H, ampla, *H-N*), 7.12 (2H, ampla, *H-N*), 4.52 (1H, ampla, *N-CH-N*), 4.42 (1H, ampla, *N-CH-N*), 4.0 (2H, q, J = 7.0 Hz, *COO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>*), 3.40 (1H, m, *-N-CHH-*), 2.95 (1H, m, *-N-CHH-*), 2.27 (2H, t, J = 6.4 Hz, *-CH<sub>2</sub>-COOEt*), 1.96 (2H, m, *HC-CH<sub>2</sub>-CH*), 1.52-1.41 (4H, m, *-N-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2-</sub>*), 1.13 (3H, t, J = 7.0 Hz, *-COO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>*)

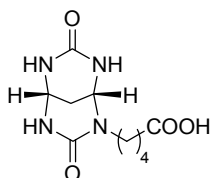
**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 4.79 (1H, ampla, *N-CH-N*), 4.74 (1H, ampla, *N-CH-N*), 4.02 (2H, q, J = 7.6 Hz, *-COO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>*), 3.30 (1H, m, *-N-CHH-*), 3.15 (1H, m, *-N-CHH-*), 2.28 (2H, t, J = 6.4 Hz, *-CH<sub>2</sub>-COOEt*), 2.15 (2H, m, *HC-CH<sub>2</sub>-CH*), 1.46 (4H, m, *N-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2-</sub>*), 1.12 (3H, t, J = 7.6 Hz, *-COO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>*)

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 177.5, 157.6, 157.1, 62.3, 61.1, 55.9, 46.3, 34.3, 27.8, 26.8, 22.2, 14.0

**IR**  $\nu$  (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3246, 3074, 2939, 1735 (C=O), 1670 (C=O), 1640

**ESI-MS:** (H<sub>2</sub>O/MeOH) m/z = 285.5 [M+H]<sup>+</sup>, 307.5 [M+Na]<sup>+</sup>, 569.8 [2M+H]<sup>+</sup>, 591.8 [2M+Na]<sup>+</sup>, 854.1 [3M+H]<sup>+</sup>

#### 5.2.1.4 Síntesi de l'àcid 5-(3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]non-2-il)-pentanoic [PDU-N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-COOH, (**8**)]



A una dissolució de 6-(3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]non-2-il)-pentanoat d'etil (**22**) (20.3 mg, 0.07 mmol) en aigua (10 mL), se li addiciona 1.6 mL de NaOH 0.047 M (0.075 mmol, 1.1 eq). La barreja s'agita a T.amb. sota atmosfera de nitrogen durant 24 h., fins que desapareix completament la taca de l'èster per CCF (AcOEt/MeOH, 1/1, R<sub>f</sub> = 0.4). Aleshores la mescla s'acidifica a pH = 5 per addició de HCl<sub>dt</sub> i s'evapora el dissolvent. El cru de reacció es redissol en H<sub>2</sub>O i es purifica a través d'HPLC (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 4 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 9/1, tr = 3.9 min) obtenint-se el producte desitjat (17.5 mg, 0.07 mmol) amb un 98% de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 1/1; R<sub>f</sub> = 0.1)

**Pf (°C)** 225-227

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 4.79 (1H, ampla, *N-CH-N*), 4.74 (1H, ampla, *N-CH-N*), 3.30 (1H, m, *-N-CHH-*), 3.15 (1H, m, *-N-CHH-*), 2.29 (2H, t, J = 6.4 Hz, *-CH<sub>2</sub>-COOH*), 2.0 (2H, m, *HC-CH<sub>2</sub>-CH*), 1.52-1.41 (4H, m, *N-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2-</sub>*)

$^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm): 179.4, 157.6, 157.1, 61.1, 55.9, 46.3, 34.1, 27.8, 26.8, 22.2

$\text{IR}$   $\nu$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3275, 2933, 1714 (C=O), 1666 (C=O), 1633

**ESI-MS:** ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ )  $m/z$  = 256.9  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 278.9  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 294.9  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , 513.1  $[\text{2M}+\text{H}]^+$ , 535.1  $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ , 551.1  $[\text{2M}+\text{K}]^+$ , 769.3  $[\text{3M}+\text{H}]^+$ , 791.2  $[\text{3M}+\text{Na}]^+$ , 807.2  $[\text{3M}+\text{K}]^+$

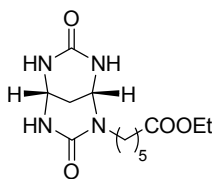
**Anàlisi elemental**  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$  (calculat): C 45.28, H 6.46, N 21.12 (experimental): C 45.17, H 6.37, N 20.63

La resolució racèmica de l'àcid 5-(3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabíclio[3.3.1]non-2-il)-pentanoic a escala de mg, ha estat possible a través d'HPLC utilitzant una columna amb fase estacionària quiral Chirobiotic<sup>®</sup> T (ASTEC Inc, USA), ( $f$  = 0.25 mL/min, MeOH 100%,  $T$  = 25°C,  $\text{tr}$  (+)-**8** = 9-15 min,  $\text{tr}$  (-)-**8** = 45-60 min). Altres condicions, treballant amb un forn per a columnes analítiques:  $f$  = 0.3 mL/min,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ; 6/4,  $T$  = 37°C,  $\text{tr}$  (+)-**8** = 4-6 min,  $\text{tr}$  (-)-**8** = 11-15 min.

(+)-**8**:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +56.9$  ( $c$  = 0.0017 g/mL, MeOH)

(-)-**8**:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -54.3$  ( $c$  = 0.0026 g/mL, MeOH)

#### 5.2.1.5 Síntesi del 6-(3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabíclio[3.3.1]non-2-il)-hexanoat d'etil [PDU-N-( $\text{CH}_2$ )<sub>5</sub>-COOEt; (**28**)]



Es pesa 187 mg (1.2 mmol) de PDU (**6**) en un matràs i es guarda sota atmosfera de nitrogen fins que s'hi transfereix el DMSO anhidre (200 mL) a través de cànula i sota atmosfera inert. Aquesta dissolució s'escalfa (~90°C) amb agitació per tal de dissoldre la PDU completament i seguidament es deixa refredar fins aproximadament 40°C. En un altre matràs es pesa el NaH 60% en oli mineral (100 mg, 2.5 mmol) i es renta amb hexà anhidre (3x10 mL) sota atmosfera de nitrogen. Tot seguit es transfereix la dissolució de PDU sobre el matràs que conté el NaH net i sec, a través d'una cànula i sota atmosfera de  $\text{N}_2$ . Es deixa agitant uns 15 min a temperatura ambient. Finalment s'afegeix el 6-bromohexanoat d'etil (**25**) (267 mg, 1.2 mmol) amb xeringa i gota a gota sobre la mescla de reacció.

La mescla de reacció es deixa agitant sota atmosfera de nitrogen i a temperatura ambient durant 24 h. Després d'analitzar-se per CCF ( $\text{SiO}_2$ ;  $n\text{-BuOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 4/0.5/0.5) s'observen 4 taques als següents  $R_f$  = 0.29 (PDU), 0.36, 0.43, 0.67.

Es purifiquen 485 mg de mescla de reacció fent rentats del sòlid amb la barreja  $n\text{-BuOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ : 4/0.5/0.5, seguits de centrifugació fins que es comprovi que el sòlid només conté la PDU que no ha reaccionat i el sobrenedant, que conté la barreja del productes d'alquilació, es purifica per cromatografia en columna ( $\text{SiO}_2$ ; 35 x 3 cm Ø;  $n\text{-BuOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 4/0.5/0.5), obtenint-se 258 mg de producte desitjat (**28**) impurificat gel de sílice. A continuació es purifica a través d'HPLC (Kromasil

C18, columna semi-preparativa,  $f = 5$  mL/min,  $H_2O/MeOH$ ; 6/4,  $tr = 11.7$  min) i s'obtenen 29 mg (0.1 mmol) de producte desitjat (**28**) amb un 8% de rendiment.

**CCF** ( $SiO_2$ ;  $n-BuOH/AcOH/H_2O$ , 4/0.5/0.5;  $R_f = 0.36$ )

**Pf** ( $^{\circ}C$ ) 272-275

**$^1H$ -RMN** (200 MHz,  $DMSO-d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 7.36 (1H, ampla,  $H-N$ ), 7.17 (2H, ampla,  $H-N$ ), 4.58 (1H, ampla,  $N-CH-N$ ), 4.42 (1H, ampla,  $N-CH-N$ ), 4.01 (2H, q,  $J = 7.0$  Hz,  $-COO-CH_2-CH_3$ ), 3.33 (1H, m,  $-N-CHH-$ ), 2.95 (1H, m,  $-N-CHH-$ ), 2.24 (2H, t,  $J = 7.3$  Hz,  $-CH_2-COOEt$ ), 1.96 (2H, ampla,  $HC-CH_2-CH$ ), 1.59-1.37 (6H, m,  $-N-CH_2-(CH_2)_3-$ ), 1.14 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz,  $-COO-CH_2-CH_3$ )

**IR**  $\nu$  (KBr,  $cm^{-1}$ ) 3249, 1734 (C=O), 1669 (C=O), 1640

**ESI-MS**: ( $H_2O/CH_3CN$ )  $m/z = 321.7$   $[M+Na]^+$ , 619.9  $[2M+Na]^+$

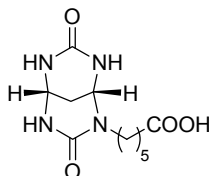
S'han dut a terme experiments d'espectroscopia de masses per assignar els productes obtinguts en les alquilacions. Els resultats han estat els següents:

-Taca 1 ( $R_f = 0.87$ ) : ESI-MS (MeOH):  $m/z = 724.87$   $[M+H]^+$  (correspon al pes molecular de la PDU tetraalquilada, **32**)

-Taca 2 ( $R_f = 0.67$ ) : ESI-MS (MeOH):  $m/z = 582.85$   $[M+H]^+$  (correspon al pes molecular de la PDU trialquilada, **31**)

-Taca 3 ( $R_f = 0.43$ ) : ESI-MS (MeOH):  $m/z = 440.76$   $[M+H]^+$ , 462.72  $[M+Na]^+$  (correspon al pes molecular de la PDU dialquilada, **29** o **30**)

#### 5.2.1.6 Obtenció de l'àcid 6-(3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]non-2-il)-hexanoic [PDU-N( $CH_2$ )<sub>5</sub>-COOH; (**9**)]



A una dissolució de 6-(3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]non-2-il)-hexanoat d'etil (**28**) (16.1 mg, 0.054 mmol) en aigua (10 mL), se li addiciona 1.2 mL de NaOH 0.047 M (0.06 mmol, 1.1 eq). La barreja s'agita a T.amb. sota atmosfera de nitrogen durant 24 h., fins que desapareix completament la taca de l'èster per CCF ( $AcOEt/MeOH$ , 1/1;  $R_f = 0.5$ ). Aleshores la mescla s'acidifica a  $pH = 5$  per addició de  $HCl_{dt}$  i s'evapora el dissolvent. El cru de reacció es redissol en  $H_2O$  i es purifica a través d'HPLC (Kromasil C18, columna semi-preparativa,  $f = 5$  mL/min, 100%  $H_2O$ ,  $tr = 3.9$  min) obtenint-se el producte desitjat ( $\pm$ )-**9** (14.6 mg, 0.05 mmol) amb un 92% de rendiment.

**CCF** ( $SiO_2$ ;  $AcOEt/MeOH$ , 1/1;  $R_f = 0.25$ )

**Pf** ( $^{\circ}C$ ) 221-223

**$^1H$ -RMN** (200 MHz,  $DMSO-d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 7.39 (1H, ampla,  $H-N$ ), 7.12 (2H, ampla,  $H-N$ ), 4.53 (1H, ampla,  $N-CH-N$ ), 4.42 (1H, ampla,  $N-CH-N$ ), 3.37 (1H, m,  $-N-CHH-$ ), 2.94 (1H, m,  $-N-CHH-$ ), 2.10 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz,  $-CH_2-COOH$ ), 1.96 (2H, ampla,  $HC-CH_2-CH$ ), 1.48-1.14 (6H, m,  $-N-CH_2-(CH_2)_3-$ )

**$^{13}C$ -NMR** (100 MHz,  $D_2O$ ),  $\delta$  (ppm): 182.7, 157.7, 157.1, 61.1, 56.0, 46.7, 36.7, 28.1, 26.8, 26.4, 25.7



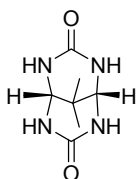
IR  $\nu$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3855-2902 (ampla), 1707 (C=O), 1670 (C=O), 1640

ESI-MS: ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ )  $m/z$  = 270.9  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 292.9  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 308.9  $[\text{M}+\text{K}]^+$ . S'observen dímers: 541.1  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , 563.1  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ , 579.1  $[2\text{M}+\text{K}]^+$ ; i trímers: 811.3  $[3\text{M}+\text{H}]^+$ , 833.3  $[3\text{M}+\text{Na}]^+$ , 849.3  $[3\text{M}+\text{K}]^+$

Anàlisi elemental  $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{MeOH}$  (calculat): C 48.24, H 7.04, N 19.57 (experimental): C 48.09, H 7.13, N 20.02

## 5.2.2 Síntesi de derivats *N*-alquilats de dimetilpropandiurea (DMPDU)

### 5.2.2.1 Síntesi del 9,9-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabíclio[3.3.1]nonà (DMPDU)<sup>155</sup> (10)



Es dissol una barreja de 1,1,3,3-tetraetoxi-2,2-dimetilpropà<sup>2</sup> (**14**) (1.5 g, 6.04 mmol) i urea (0.9 g, 12.6 mmol) en 3 mL d'aigua i s'addiciona àcid sulfúric concentrat (3 gotes) fins a obtenir pH = 1-2. La barreja s'escalfa a 90°C durant 4 h. obtenint-se un sòlid blanc que es filtra a través d'una placa filtrant (del núm. 3) i es renta amb aigua freda i acetona. S'obtenen 784.8 mg (4.26 mmol) amb un 71% de rendiment.

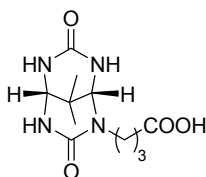
CCF ( $\text{SiO}_2$ ;  $n\text{-BuOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 4/1/1;  $R_f$  = 0.45;  $n\text{-BuOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 4/0.5/0.5;  $R_f$  = 0.35)

Pf. (°C) > 300 (descomposa)

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$  (ppm): 6.52 (4H, s, NH), 3.83 (2H, s, CH) 1.09 (6H, s,  $\text{CH}_3$ )

IR  $\nu$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3250, 3050, 1700 (C=O), 1630, 1540.

### 5.2.2.2 Síntesi de l'àcid 4-(9,9-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabíclio[3.3.1]non-2-il)butanoic [DMPDU-N-( $\text{CH}_2$ )<sub>3</sub>-COOH, (11)]



Una barreja equimolar d'urea (240 mg, 4 mmol) i àcid 4-ureidobutanoic<sup>3</sup> (**16**) (586 mg, 4 mmol) es dissolen en 20 mL d'aigua escalfant a 90°C per tal de dissoldre-ho completament. Tot seguit s'addiciona el 1,1,3,3-tetraetoxi-2,2-dimetilpropà (**14**) (1146 mg, 4.6 mmol) i  $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{conc}}$ . (6 gotes) fins a pH = 1. S'escalfa la barreja a 90°C durant 6 h., aleshores es refreda a 4°C i es filtra el sòlid obtingut. Es purifiquen 100 mg de sòlid mitjançant HPLC semi-preparatiu (Kromasil C18, columna semi-

<sup>2</sup> Sintetitzat per Joaquim Martín. Màster Experimental en Química Orgànica, Universitat de Barcelona, 2003.

<sup>3</sup> Sintetitzat al nostre grup de la mateixa manera que l'àcid 6-ureidohexanoic (**18**).

preparativa,  $f = 4$  mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH, 87/13) i s'obtenen 2 pics majoritaris:  $t_r = 6.9-10$  min. (corresponent a DMPDU (**10**)) i  $t_r = 16.8-21.4$  min. (42 mg, 0.17 mmol) corresponents al producte desitjat (**11**) amb un 42% de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; *n*-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O, 4/1/1; R<sub>f</sub> = 0.47)

**Pf** (°C) 245-250

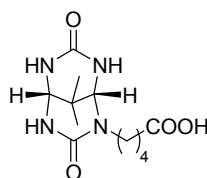
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 4.39 (1H, s, -CH), 4.32 (1H, s, -CH), 3.51 (1H, dt,  $J_d = 14.8$  Hz,  $J_t = 7.6$  Hz, -N-CHH-), 3.21 (1H, dt,  $J_d = 14.8$  Hz,  $J_t = 7.6$ , -N-CHH-), 2.39 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, -CH<sub>2</sub>-COOH), 1.86 (2H, m, -CH<sub>2</sub>-), 1.23 (6H, s, -CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 179.2, 157.8, 157.3, 70.0, 64.6, 49.9, 46.1, 32.1, 30.8, 24.1, 21.9.

**IR**  $\nu$  (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3278, 1730 (C=O), 1669 (C=O), 1634

**ESI-MS** (H<sub>2</sub>O/MeOH)  $m/z$ : 270.8 [M+H]<sup>+</sup>, 292.8 [M+Na]<sup>+</sup>, 308.8 [M+K]<sup>+</sup>

### 5.2.2.3 Síntesi de l'àcid 5-(9,9-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]non-2-il)pentanoic [DMPDU-N-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-COOH, (**8**)]



Una barreja equimolar d'urea (240 mg, 4 mmol) i àcid 5-ureidopentanoic (**17**) (640 mg, 4 mmol) es dissolen en 20 mL d'aigua escalfant a 90°C per tal de dissoldre-ho completament. Tot seguit s'addiciona el 1,1,3,3-tetraetoxi-2,2-dimetilpropà (**14**) (1111 mg, 4.47 mmol) i H<sub>2</sub>SO<sub>4conc.</sub> (6 gotes) fins a pH = 1. S'escalfa la barreja a 90°C durant 6 h., aleshores es refreda a 4°C i es filtra el sòlid obtingut. En la purificació del sòlid obtingut s'utilitza en primer lloc la cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>; *n*-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O, 4/0.5/0.5) obtenint-se el producte desitjat impurificat amb gel de sílice. Per tal de facilitar la seva purificació cromatogràfica es va transformar una part del producte (103 mg, 0.36 mmol) en el corresponent èster metílic dissolent-lo en 50 mL de MeOH anhidre amb catàlisis d'àcid p-toluensulfònic (5 mg) en un bany a 45-50°C durant 24 h. Després de la purificació mitjançant HPLC (Kromasil C18, columna semi-preparativa,  $f = 5$  mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 6/4,  $t_r = 7.3$  min), s'obtenen 49.7 mg (0.17 mmol) d'èster metílic **34** amb un 44% de rendiment. Aquest èster metílic (**34**) es saponifica amb NaOH<sub>aq.</sub> 2M (24 h, T. amb.) obtenint-se el producte desitjat (10 mg, 0.036 mmol) en forma d'àcid (**12**) amb un 10% de rendiment global.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; *n*-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O, 4/1/1; R<sub>f</sub> = 0.51)

**Pf** (°C) 232-237

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm): 7.59 (1H, s, -NH), 7.28 (1H, s, -NH), 7.15 (1H, s, -NH-CO-N-), 4.39 (1H, s, CH-N-CH<sub>2</sub>-), 4.30 (1H, s, CH), 3.50 (1H, m, -N-CHH-), 3.15 (1H, m, -N-CHH-), 2.37 (2H, m, -CH<sub>2</sub>-COOH), 1.58 (2H, t,  $J = 3.5$  Hz, -CH<sub>2</sub>-COOH), 1.23 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.21 (3H, s, -CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 174.7, 153.9, 153.8, 68.6, 64.3, 43.8, 33.6, 30.5, 27.6, 22.5, 22.3, 22.0

**IR**  $\nu$  (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3276, 1717 (C=O), 1670 (C=O), 1636

**ESI-MS** (H<sub>2</sub>O/MeOH) m/z: 307.1 [M+Na]<sup>+</sup>

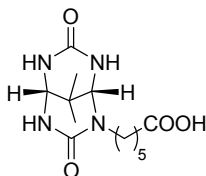
La resolució del racèmic de l'àcid 5-(9,9-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabíciclo[3.3.1]non-2-il)pentanoic ((±)-**12**) a escala de mg. es va dur a terme mitjançant HPLC utilitzant una columna amb fase estacionària quirals (Chirobiotic<sup>®</sup> T, ASTEC Inc, U.S.A., f = 0.3 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 6/4, Temp = 35°C) obtenint-se els dos enantiòmers a tr = 3.3-5 min. ((+)-**12**) i tr = 8-11 min. ((-)-**12**).

Altres condicions: f = 0.25 mL/min, 100% MeOH, tr = 6.5-12 min. ((+)-**12**) i tr = 28-45 min. ((-)-**12**)

(+)-**12**:  $[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = +38.4$  (c = 0.0017 g/mL, MeOH)

(-)-**12**:  $[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = -22.2$  (c = 0.0011 g/mL, MeOH) (el qual s'obté amb un 82% de puresa enantiomèrica).

#### 5.2.2.4 Síntesi de l'àcid 6-(9,9-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabíciclo[3.3.1]non-2-il)hexanoic [DMPDU-N-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-COOH, (**13**)]



Una barreja equimolar d'urea (240 mg, 4 mmol) i àcid 6-ureidohexanoic (**18**) (697 mg, 4 mmol) es dissolen en 20 mL d'aigua escalfant a 90°C per tal de dissoldre-ho completament. Tot seguit s'addiciona el 1,1,3,3-tetraetoxi-2,2-dimetilpropà (**14**) (1166 mg, 4.7 mmol) i H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>conc. (6 gotes) fins a pH = 1. S'escalfa la barreja a 90°C durant 6 h., aleshores es refreda a 4°C i es filtra el sòlid obtingut. En la purificació del sòlid obtingut s'utilitza en primer lloc la cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>; n-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O, 4/0.5/0.5) obtenint-se el producte desitjat impurificat amb gel de sílice. Per tal de facilitar la purificació del compost, es van esterificar 100 mg de producte mitjançant una esterificació de Fisher utilitzant MeOH anhidre (50 mL) amb catàlisi d'àcid p-toluensulfònic (5 mg) durant 24 h. a 45-50°C. Després de la purificació mitjançant HPLC (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 5 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 6/4, tr = 9.6 min), s'obtenen 77.7 mg (0.24 mmol) d'èster metílic **35** amb un 71% de rendiment. Aquest èster metílic es saponifica amb NaOH<sub>aq.</sub> 2M (24 h., T.amb.) i es purifica mitjançant HPLC (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 5 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 99/1, tr = 8.3 min) obtenint-se el producte desitjat (±)-**13** (29 mg, 0.1 mmol) amb un 93% de rendiment de saponificació.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; n-BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O, 4/0.5/0.5; R<sub>f</sub> = 0.53)

**Pf (°C)** 242-244

**<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ (ppm): 7.36 (1H, s, -NH), 7.02 (2H, s, -NH), 3.96 (1H, s, N-CH-N), 3.85 (1H, s, N-CH-N), 3.40 (1H, m, -N-CHH-), 2.85 (1H, m, -N-CHH-), 2.02 (2H, m, -CH<sub>2</sub>-COOH), 1.41 (4H, m, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-), 1.16 (2H, m, -CH<sub>2</sub>-), 1.09 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.07 (3H, s, -CH<sub>3</sub>)

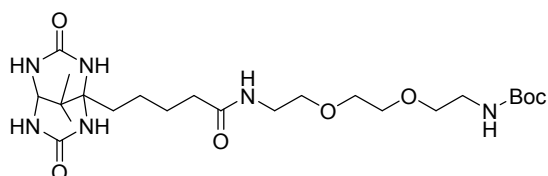
**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ (ppm): 174.7, 154.0, 153.7, 68.7, 64.3, 44.3, 33.8, 30.5, 27.9, 26.1, 24.5, 22.5, 22.3

IR  $\nu$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3276, 1715 (C=O), 1670 (C=O), 1634

ESI-MS ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ )  $m/z$ : 320.9  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**Anàlisi elemental**  $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (calculat): C 49.36, H 7.65, N 17.71 (experimental): C 50.15, H 7.67, N 17.89

#### 5.2.2.5 Síntesi del compost 40<sup>54</sup>



Es dissol el compost **5** (305 mg, 1.01 mmol) en 50 mL de  $\text{DMSO}_{\text{anh}}$  i s'addiciona la difenilfosforilazida (DPPA, 825 mg, 1.5 mmol) i la trietilamina (0.42 mL, 1.5 mmol). A continuació s'addiciona a través de cànula el 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamat de *tert*-butil (372 mg, 1.5 mmol) dissolt en 10 mL de  $\text{DMSO}_{\text{anh}}$ . La mescla es deixa agitant a T. amb sota atmosfera de nitrogen durant 24 h. Aleshores s'addiciona uns 2 mL d'aigua i s'evapora amb la bomba d'oli per tal d'eliminar el DMSO. La mescla resultant es purifica per cromatografia en columna ( $\text{SiO}_2$ ; 10 x 3.5 cm Ø;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9/1, 75/25). S'obté el producte impurificat lleugerament amb  $\text{Et}_3\text{N}$  i sílica, per la qual cosa es purifica a través de HPLC semi-preparatiu (Kromasil C18, columna semi-preparativa,  $f = 4$  mL/min,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ; 1/1,  $t_r = 16$  min). S'obté el producte desitjat el forma de sòlid blanc (404 mg, 0.79 mmol) amb un 79% de rendiment.

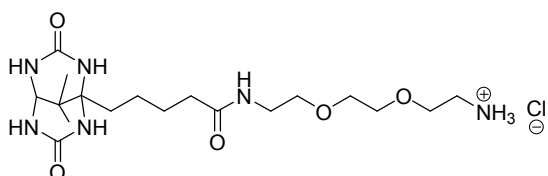
**HPLC** (Kromasil C18, columna analítica,  $f = 0.8$  mL/min,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ; 1/1,  $t_r = 15.3$  min)

**Pf** (°C) 225-229

**<sup>1</sup>H-RMN** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 200 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.26 (6 H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.48 (9 H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.57 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.62 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.78 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 2.31 (2H, t,  $J = 7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 3.27 (2H, t,  $J = 6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ) 3.42 (2H, t,  $J = 5.4$  Hz,  $\text{CH}_2$ ) 3.56 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3.66 (6H, m,  $\text{CH}_2$ ), 4.11 (1H, s, CH)

**ESI-MS**:  $m/z = 515.3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 537.3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

#### 5.2.2.6 Síntesi del compost 41



A una dissolució del compost **40** (500 mg, 0.97 mmol) en 30 mL d'EtOH, se li addiciona 30 mL d' $\text{HCl}/\text{AcOEt}$  (~2M) i es deixa reaccionar 12 h. a T. amb. A continuació s'evapora el dissolvent amb la trompa d'aigua i es purifica per HPLC semi-preparatiu en fase reversa (Kromasil C18, columna semi-

preparativa,  $f = 4$  mL/min,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ; 9/1,  $t_r = 12.8$  min). S'obté el producte desitjat en forma d'hidroclorur (183 mg, 0.41 mmol) amb un 86% de rendiment.

**HPLC** (Kromasil C18, columna analítica,  $f = 0.8$  mL / min,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ; 9/1,  $t_r = 12.8$  min)

**Anàlisi elemental** [ $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{ClN}_6\text{O}_5 + \text{H}_2\text{O}$ ] teòric (%) C: 46.1, H: 7.9, N: 17.9; experimental (%) C: 46.7, H: 7.9, N: 18.0

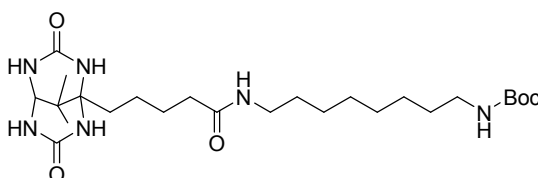
A continuació es redissol el producte en 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$  i es basifica amb  $\text{KOH}_{\text{aq}}$  2M a  $\text{pH}=10$ . Es purifica a través d'una columna amb fase estacionària polimèrica (MCI Gel CHP20P, 15 x 1 cm Ø) per tal de treure les sals. S'elueix en primer lloc amb  $\text{H}_2\text{O}$  (per eluir les sals) i tot seguit amb barreges  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (75/25) (s'obté el producte desitjat) fins acabar amb  $\text{MeOH}$  100% (per regenerar la columna).

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.06 (6H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.38 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.52 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.65 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 2.19 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 3.08 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ ), 3.28 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 3.52 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.58 (4H, s,  $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 3.63 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 4.14 (1H, s,  $\text{CH}$ )

**IR**,  $\nu$  ( $\text{KBr}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1126, 1530, 1645 ( $\text{C=O}$ ), 1685 ( $\text{C=O}$ ), 2930, 3069 ( $\text{N-H}$ ), 3238 ( $\text{N-H}$ )

**ESI-MS**:  $m/z = 415.1$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , 414.5 (calc)

### 5.2.2.7 Síntesi del compost 42

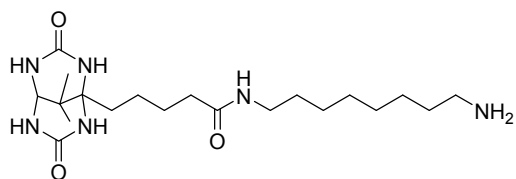


Es dissol el compost **5** (454 mg, 1.5 mmol) en 50 mL de  $\text{DMSO}_{\text{anh}}$  i s'addiciona la difenilfosforilazida (DPPA, 619 mg, 2.25 mmol) i la trietilamina (0.31 mL, 2.25 mmol). A continuació s'addiciona a través de cànula el 8-aminooctilcarbamat de *tert*-butil (**39**) (521.0 mg, 2.1 mmol) dissolt en 10 mL de  $\text{DMSO}_{\text{anh}}$ . La mescla es deixa agitant a T. amb sota atmosfera de nitrogen durant 24 h. Aleshores s'addicionen 2 mL d'aigua i s'evapora amb la bomba d'oli per tal d'eliminar el  $\text{DMSO}$ . La mescla resultant es purifica per cromatografia en columna ( $\text{SiO}_2$ , 10 x 4.5 cm Ø,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ; 98/2, 95/5, 9/1, 8/2). S'obté el producte impurificat lleugerament amb  $\text{Et}_3\text{N}$  i DPPA, per la qual cosa es purifica per HPLC semi-preparatiu (Kromasil C18, columna semi-preparativa,  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ; 30/70,  $f = 4$  mL/min,  $t_r = 12$  min). S'obté el producte esperat (520 mg, 1.02 mmol) en forma de sòlid blanc amb un 68% de rendiment.

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.24 (6H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.36 (8H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.46 (9H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.53 (6H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.67 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.76 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 2.27 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 3.04 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{-NH-Boc}$ ), 3.18 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 4.10 (1H, s,  $\text{CH}$ )

**ESI-MS**:  $m/z = 511.7$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , 533.7 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$

### 5.2.2.8 Síntesi del compost 43



El compost **42** (505 mg, 0.99 mmol) es dissol en 30 mL d'EtOH i se li addiciona 30 mL d'HCl/AcOEt (~ 2M), deixant-ho reaccionar 12 h. a T.amb. A continuació s'evapora el dissolvent amb la trompa d'aigua, es redissol amb H<sub>2</sub>O, es basifica amb NaOH<sub>aq.</sub> fins a pH = 12 i es purifica a través d'una columna polimèrica (18 x 1 cm Ø, MCI Gel CHP20P) utilitzant H<sub>2</sub>O i H<sub>2</sub>O/MeOH (1/1), H<sub>2</sub>O/MeOH (3/7) com a eluent. S'obté el producte esperat (**43**) (226 mg, 0.55 mmol) en forma de sòlid blanc amb un 84% de rendiment.

**Pf. (°C)** 245-247

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ (ppm) 1.25 (6H, s, CH<sub>3</sub>), 1.37 (8H, m, CH<sub>2</sub>), 1.53 (6H, m, CH<sub>2</sub>), 1.67 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.76 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.27 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 2.68 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 3.20 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-NH), 4.10 (1H, s, CH)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) δ (ppm) 21.4, 22.9, 27.4, 28.0, 30.4, 30.4, 30.5, 33.6, 34.8, 34.9, 36.6, 40.4, 42.5, 67.3, 71.4, 158.0, 175.8

**IR**,  $\nu$  (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1134, 1540, 1654 (C=O), 1699 (C=O), 2852, 2924, 3251 (N-H)

**ESI-MS**: m/z = 411.5 [M+H]<sup>+</sup>, 433.5 [M+Na]<sup>+</sup>

### 5.2.3 Estudis de difracció de raigs X

#### 5.2.3.1 Difracció de raigs X del compost PDU-N-C<sub>4</sub>-COOH (**8**)

Un cristall prismàtic (0.1 x 0.1 x 0.2 mm) vas ser seleccionat i es va muntar sobre d'un difractòmetre MAR345 amb un detector amb placa d'imatge. Els paràmetres de la cel·la unitària van ser determinats a través de 14 reflexions ( $3 < \theta < 31^\circ$ ) i refinats pel mètode de mínims quadrats. Les intensitats van ser recollides en grafit després de radiació monocromada de Mo K $\alpha$ . Es van mesurar 4185 reflexions en el rang de  $2.69 \leq \theta \leq 29.99$ , 3761 de les quals no van ser equivalents per simetria. Es va assumir 1753 reflexions aplicant la condició  $I > 2\sigma(I)$ . Es va aplicar la polarització de Lorentz, però no les correccions d'absorció.

L'estructura es va resoldre per mètodes directes, utilitzant un programa informàtic SHELXS (Sheldrick, G.M., (1997), un programa per la solució automàtica de l'estructura del cristall, Univer Goettingen, Germany) i refinament a través del mètode de mínims quadrats de la matriu completa amb el programa informàtic SHELX97 (Sheldrick, G.M., (1997), un programa per al refinament de l'estructura del cristall, Univer Goettingen, Germany), utilitzant 4185 reflexions (moltes intensitats negatives no són considerades). La funció minimitzada fou:

$$\sum w \left| |Fo|^2 - |Fc|^2 \right|^2$$

$$\text{on } w = \left[ \sigma^2(I) + (0.0950P)^2 \right]^{-1},$$

$$\text{i } P = \frac{\left( |Fo|^2 + 2|Fc|^2 \right)}{3}$$

on  $f$ ,  $f'$  i  $f''$  són presos de les taules internacionals de Cristal·lografia per Raigs-X, (International Tables of X-Ray Crystallography, (1974), Ed. Kynoch press, Vol. IV, pp 99-100 i 149). 15 àtoms de H van ser comptats i refinats, utilitzant un model de transport, amb un factor de temperatura isotròpic igual a 1.2 vegades el factor de temperatura equivalent de l'àtom al qual es troba unit. El factor final R (en F) va ser 0.069,  $wR$  (en  $|F|^2$ ) = 0.171 i el bon ajust = 0.920 per a totes les reflexions observades. El nombre de paràmetres refinats va ser 190. Els pics max. i min. en la diferència final de síntesi van ser 0.345 i -0.413 eÅ<sup>-3</sup>, respectivament.

Dades experimentals obtingudes:

#### PDU-N-C<sub>4</sub>-COOH

##### Crystal data

C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> D <sub>4</sub>	D <sub>x</sub> = 1.373 Mg m <sup>-3</sup>
M <sub>r</sub> = 292.30	Melting point: 298 K
Monoclinic, P2 <sub>1</sub> /a	Mo Kα radiation      λ = 0.71073 Å
Hall symbol:	Cell parameters from 14 reflections
a = 11.104 (11) Å	θ = 3–31°
b = 8.951 (6) Å	μ = 0.11 mm <sup>-1</sup>
c = 14.494 (10) Å	T = 293 (2) K
β = 100.95 (4)°	Cell measurement pressure: ? kPa
V = 1414 (2) Å <sup>3</sup>	Prism,
Z = 4	0.2 × 0.1 × 0.1 mm
F <sub>000</sub> = 624	

##### Data collection

diffractometer	1753 reflections with I > 2σ(I)
Radiation source: fine-focus sealed tube	R <sub>int</sub> = 0.057
Monochromator: graphite	θ <sub>max</sub> = 30.0°

T = 293(2) K	$\theta_{\min} = 2.7^\circ$
P = ? kPa	h = -14→13
Absorption correction: none	k = 0→12
4185 measured reflections	l = 0→20
3761 independent reflections	Standard reflections:

*Refinement*

Refinement on $F^2$	Primary atom site location: structure-invariant direct methods
Least-squares matrix: full	Secondary atom site location: difference Fourier map
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.069$	Hydrogen site location: inferred from neighbouring sites
$wR(F^2) = 0.202$	H-atom parameters constrained
S = 0.92	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.095P)^2]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
3761 reflections	$(\Delta/\sigma)_{\max} < 0.001$
190 parameters	$\Delta\rho_{\max} = 0.35 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$
16 restraints	$\Delta\rho_{\min} = -0.41 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$
? constraints	Extinction correction: none

Refinement of  $F^2$  against ALL reflections. The weighted R-factor  $wR$  and goodness of fit  $S$  are based on  $F^2$ , conventional R-factors  $R$  are based on  $F$ , with  $F$  set to zero for negative  $F^2$ . The threshold expression of  $F^2 > 2\sigma(F^2)$  is used only for calculating R-factors(gt) etc. and is not relevant to the choice of reflections for refinement. R-factors based on  $F^2$  are statistically about twice as large as those based on  $F$ , and R-factors based on ALL data will be even larger.

All e.s.d.'s (except the e.s.d. in the dihedral angle between two l.s. planes) are estimated using the full covariance matrix. The cell e.s.d.'s are taken into account individually in the estimation of e.s.d.'s in distances, angles and torsion angles; correlations between e.s.d.'s in cell parameters are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic) treatment of cell e.s.d.'s is used for estimating e.s.d.'s involving l.s. planes.

**Computing details**

Data collection; cell refinement; data reduction; program(s) used to solve structure; program(s) used to refine structure: SHELXL97 (Sheldrick, 1997); molecular graphics; software used to prepare material for publication.

**5.2.3.2 Difracció de raigs X del compost PDU-N-C<sub>5</sub>-COOH (9)**

Un cristall prismàtic (0.1 x 0.1 x 0.2 mm) vas ser seleccionat i es va muntar sobre d'un difractòmetre MAR345 amb un detector amb placa d'imatge. Els paràmetres de la cel·la unitària van ser determinats a través de 110 reflexions ( $3 < \theta < 31^\circ$ ) i refinats per mètode de mínims quadrats. Les



intensitats van ser recollides en grafit després de radiació monocromada de Mo K $\alpha$ . Es van mesurar 16403 reflexions en el rang de  $2.82 \leq \theta \leq 29.99$ , 8052 de les quals no van ser equivalents per simetria. Es va assumir 7839 reflexions aplicant la condició  $I > 2\sigma(I)$ . Es va aplicar la polarització de Lorentz, però no les correccions d'absorció.

L'estructura es va resoldre per mètodes directes, utilitzant un programa informàtic SHELXS (Sheldrick, G.M., (1997), un programa per la solució automàtica de l'estructura del cristall, Univer Goettingen, Germany) i refinament a través del mètode de mínims quadrats de la matriu completa amb el programa informàtic SHELX97 (Sheldrick, G.M., (1997), un programa per al refinament de l'estructura del cristall, Univer Goettingen, Germany), utilitzant 16403 reflexions (moltes intensitats negatives no són considerades). La funció minimitzada fou:

$$\sum w \left| |Fo|^2 - |Fc|^2 \right|^2$$

$$\text{on } w = \left[ \sigma^2(I) + (0.0350P)^2 + 0.3575P \right]^{-1},$$

$$\text{i } P = \frac{(|Fo|^2 + 2|Fc|^2)}{3}$$

on  $f$ ,  $f'$  i  $f''$  són presos de les taules internacionals de Cristal·lografia per Raigs-X, (International Tables of X-Ray Crystallography, (1974), Ed. Kynoch press, Vol. IV, pp 99-100 i 149). 6 àtoms de H van ser localitzats i refinats, utilitzant un model de transport, amb un factor de temperatura isotròpic igual a 1.2 vegades el factor de temperatura equivalent de l'àtom al qual es troba unit. El factor final R (en F) va ser 0.058,  $wR$  (en  $|F|^2$ ) = 0.133 i el bon ajust = 1.282 per a totes les reflexions observades. El nombre de paràmetres refinats va ser 397. Els pics max. i min. en la diferència final de síntesi van ser 0.162 i -0.306 eÅ<sup>-3</sup>, respectivament.

Dades experimentals obtingudes:

### **PDU-N-C<sub>5</sub>-COOH**

#### *Crystal data*

C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ·2(H <sub>2</sub> O)	$F_{000} = 656$
$M_r = 306.33$	$D_x = 1.330 \text{ Mg m}^{-3}$
Triclinic, $P\bar{1}$	Melting point: 298 K
Hall symbol:	Mo K $\alpha$ radiation $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$
$a = 11.674 (7) \text{ \AA}$	Cell parameters from 110 reflections
$b = 12.047 (5) \text{ \AA}$	$\theta = 3\text{--}31^\circ$
$c = 12.701 (6) \text{ \AA}$	$\mu = 0.11 \text{ mm}^{-1}$

$\alpha = 71.83 (4)^\circ$	$T = 248 (2) \text{ K}$
$\beta = 66.58 (3)^\circ$	Cell measurement pressure: kPa
$\gamma = 73.22 (3)^\circ$	Prism,
$V = 1529.3 (13) \text{ \AA}^3$	$0.2 \times 0.1 \times 0.1 \text{ mm}$
$Z = 4$	

*Data collection*

diffractometer	7839 reflections with $I > 2\sigma(I)$
Radiation source: fine-focus sealed tube	$R_{\text{int}} = 0.034$
Monochromator: graphite	$\theta_{\text{max}} = 30.0^\circ$
$T = 293(2) \text{ K}$	$\theta_{\text{min}} = 2.8^\circ$
$P = ? \text{ kPa}$	$h = -14 \rightarrow 16$
Absorption correction: none	$k = -15 \rightarrow 16$
16403 measured reflections	$l = 0 \rightarrow 16$
8052 independent reflections	Standard reflections:

*Refinement*

Refinement on $F^2$	Primary atom site location: structure-invariant direct methods
Least-squares matrix: full	Secondary atom site location: difference Fourier map
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.058$	Hydrogen site location: inferred from neighbouring sites
$wR(F^2) = 0.133$	H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement
$S = 1.28$	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.035P)^2 + 0.3575P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
8052 reflections	$(\Delta/\sigma)_{\text{max}} < 0.001$
397 parameters	$\Delta\rho_{\text{max}} = 0.16 \text{ e \AA}^{-3}$
15 restraints	$\Delta\rho_{\text{min}} = -0.31 \text{ e \AA}^{-3}$
? constraints	Extinction correction: none

Refinement of  $F^2$  against ALL reflections. The weighted  $R$ -factor  $wR$  and goodness of fit  $S$  are based on  $F^2$ , conventional  $R$ -factors  $R$  are based on  $F$ , with  $F$  set to zero for negative  $F^2$ . The threshold expression of  $F^2 > 2\sigma(F^2)$  is used only for calculating  $R$ -factors(gt) etc. and is not relevant to the choice of reflections for refinement.  $R$ -factors based on  $F^2$  are statistically about twice as large as those based on  $F$ , and  $R$ -factors based on ALL data will be even larger.

All e.s.d.'s (except the e.s.d. in the dihedral angle between two l.s. planes) are estimated using the

full covariance matrix. The cell e.s.d.'s are taken into account individually in the estimation of e.s.d.'s in distances, angles and torsion angles; correlations between e.s.d.'s in cell parameters are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic) treatment of cell e.s.d.'s is used for estimating e.s.d.'s involving l.s. planes.

#### 5.2.4 Determinació de les constants d'associació dels lligands monovalents amb avidina i estreptavidina.

##### 5.2.4.1 Procediment general de les valoracions espectrofotomètriques competitives

Les valoracions espectrofotomètriques competitives es van dur a terme en una cel·la de 1.5 mL amb 1 cm de pas de llum. Es van addicionar alíquotes d'una dissolució de lligand de concentració 0.1-2.0 mM en tampó fosfats (0.1 M, a pH = 7.0) a una dissolució de proteïna 3-30  $\mu$ M i d'HABA 70-100  $\mu$ M en el mateix tampó fosfats. 5 minuts després de cada addició es va enregistrar el corresponent espectre d'absorció entre 200-700 nm. Els canvis d'absorbància produïts a 500 nm o a 348 nm (deguts al desplaçament del HABA unit a la proteïna produït pel lligand) són ajustats al model d'unió 1:1 assumint que hi ha comportament independent entre els quatre llocs d'unió de la proteïna. Fent aquesta suposició del comportament independent, l'experiment de competició es pot representar de la següent manera (Esquema 81).



Esquema 81

Les expressions [S], [I], [L], [SI] i [SL] derivades del model d'unió 1:1, són utilitzades en l'ajust de mínims quadrats de l'absorbància a 500 nm calculada ( $A_{calc}$ ) (Equació 19)<sup>50</sup> a l'absorbància experimental ( $A_{exp}$ ). (Veure equacions a resultats i discussió, apartat 3.4.1.1.1)

$$A_{calc} = \epsilon_{I(500)} \cdot [I] + \epsilon_{SI(500)} \cdot [SI]$$

Equació 19

Aquest procediment d'ajust dona un valor òptim de constant d'associació entre S i L. El bon ajust obtingut entre les corbes teòriques i les corbes experimentals suporten la suposició del comportament independent entre els llocs d'unió d'aquestes proteïnes.

Per tal de mesurar les constants d'associació dels dos enantiòmers directament per valoració d'una dissolució de proteïna:HABA amb un racèmic, es va seguir un procediment experimental idèntic a l'utilitzat pels enantiòmers purs. Aleshores es va assumir que els dos enantiòmers es comportaven independentment (no hi havia interacció entre ells) i es va suposar que cadascun dels enantiòmers

s'unia a la proteïna amb una constant d'associació diferent.<sup>19</sup> (Veure equacions a resultats i discussió, apartat 3.4.1.1.2).

L'ajust de mínims quadrats de l'absorbància calculada a l'absorbància experimental proporciona simultàniament les constants d'associació dels dos enantiòmers, tot i que no ens diu a quin enantiòmer correspon cada valor de constant.

#### 5.2.4.2 Procediment general de les valoracions espectrofluorimètriques

Les valoracions espectrofluorimètriques es van dur a terme en una cel·la de quars de 4 mL amb 1x1 cm de pas de llum. Es van addicionar alíquotes de dissolució de lligand 0.01-2.0 mM en tampó A (100 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA a pH = 7.0) a una dissolució de proteïna de concentració 0.2-0.4 µM. Es van enregistrar els espectres d'emissió de fluorescència després de 5 minuts de cada addició entre 300 i 400 nm (slit = 16 nm), després d'haver excitat a λ = 290 nm (slit = 4 nm). Els canvis de fluorescència a 350 nm s'ajusten al corresponent model d'unió 1:1 assumint comportament independent entre els llocs d'unió (Equació 20). (Veure equacions a resultats i discussió, apartat 3.4.1.2.6).

$$F_{calc} = f_{S(350)} \cdot [S] + f_{SL(350)} \cdot [SL]$$

Equació 20

Totes les mesures d'un lligand es van realitzar en un mateix dia per tal d'evitar fluctuacions de la làmpada. En primer lloc es realitzava un experiment addicional que consistia en realitzar una valoració de la dissolució de proteïna que s'havia d'utilitzar (de concentració aprox. 0.2 µM), addicionant alíquotes de 2 µL d'una dissolució de biotina de concentració coneguda (0.041 mM). Es van enregistrar els espectres d'emissió a 350 nm passats 5 min. de cada addició, fins que ja no s'observava variació. Tenint en compte que cada subunitat de proteïna és capaç d'unir una molècula de biotina i que la proteïna està formada per quatre subunitats, el punt en el qual ja no s'observa variació de la fluorescència, ens indica que és el punt d'equivalència en el qual totes les subunitats de proteïna es troben complexades amb biotina. Tenint en compte que la concentració de la dissolució de biotina és coneguda, podem saber els mols de biotina necessaris per complexar totalment la proteïna i d'aquesta manera podem deduir les concentració de subunitats de proteïna actives que es troba en dissolució. Aquesta concentració serà la que s'utilitzarà per a la resta de valoracions amb els lligands monovalents.

És aconsellable repetir aquest procediment cada dia abans de realitzar les valoracions amb els lligands, ja que la concentració de proteïna activa pot variar molt d'un dia a l'altre, la qual cosa donaria lloc a resultats erronis.

Les dissolucions de proteïna es poden guardar al congelador a -18°C durant 1 mes i ser utilitzades sense haver patit processos de congelació-descongelació sense que hagi perdut pràcticament gens d'activitat.

La determinació dels factors  $f_{S(350)}$  i  $f_{SL(350)}$  es va dur a terme a partir dels resultats experimentals de fluorescència a 350 nm. D'aquesta manera al principi de la valoració, on només hi ha proteïna (S) podem deduir el valor  $f_{S(350)}$  de la següent expressió (Equació 21), on  $F_{0exp}$  és la fluorescència experimental inicial:

$$f_S = \frac{F_{0exp}}{[S]}$$

**Equació 21**

Al final de la valoració, és a dir quan ja no hi ha variació de fluorescència, fem la suposició que tota la proteïna es troba complexada amb el lligand, per tant tota la fluorescència és deguda al complex (SL). Seguint el mateix raonament que hem utilitzat anteriorment, es pot deduir el valor de  $f_{SL(350)}$  de la següent expressió (Equació 22), on  $F_{fexp}$  és la fluorescència al final de la valoració. D'aquesta manera s'han calculat els valors del factor  $f$  en cada cas.

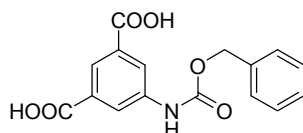
$$f_{SL} = \frac{F_{fexp}}{[SL]}$$

**Equació 22**

### 5.3 LLIGANDS DIVALENTS SEMI-RÍGIDS

#### 5.3.1 Síntesi del core central dels lligands divalents semi-rígids

##### 5.3.1.1 Síntesi de l'àcid N-(benziloxicarbonil)-5-aminobenzen-1,3-dicarboxílic (48)<sup>79</sup>



Es dissol l'àcid 5-aminobenzen-1,3-dicarboxílic (996 mg, 5.5 mmol) en 6 mL de NaOH<sub>aq.</sub> 2M i es refreda la mescla a 0°C. En un altre matràs es dissol el cloroformat de benzil (0.94 mL, 6.62 mmol) en 3.3 mL de NaOH 2M i s'addiciona sobre la mescla anterior a través d'un embut d'addició gota a gota durant 30 min. A continuació es deixa escalfar a T.amb. i s'agita sota atmosfera de nitrogen durant 15h. Seguidament s'extreu amb Et<sub>2</sub>O (4x25 mL) per eliminar l'excés de cloroformat de benzil. La fase aquosa s'acidifica amb HCl 2M observant-se la formació d'un precipitat que es filtra a través d'una placa filtrant amb porus del núm. 4 i s'asseca al dessecador de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, obtenint-se el producte desitjat en forma de sòlid blanquinós (1.55 g, 4.9 mmol) amb un 90% de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/AcOH, 99/1; R<sub>f</sub> = 0.5)

**Pf** (°C) 297-298 (teòric)<sup>79</sup>, >325 (experimental, descomposa)

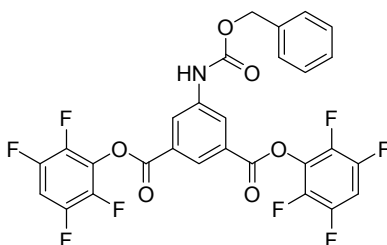
**<sup>1</sup>H-RMN** (acetona-d<sub>6</sub>, 300 MHz) δ (ppm) 5.27 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 7.44 (5H, m, Ar-H), 8.40 (1H, t, J = 1.8 Hz, Ar-H), 8.57 (2H, d, J = 1.8 Hz, Ar-H), 9.20 (1H, s, NH)

**<sup>13</sup>C-RMN** (acetona-d<sub>6</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 57.4, 113.8, 113.9, 115.2, 119.4, 119.5, 119.8, 123.1, 127.7, 131.2, 144.7, 157.8

**IR**,  $\nu$  (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1262, 1541, 1693 (C=O), 2860, 2968, 3299

**UV-vis** (MeOH)  $\lambda_{\max}$ . = 218 nm ( $\epsilon$  = 38614), 309 nm ( $\epsilon$  = 2154)

##### 5.3.1.2 Síntesi de 3,5-bis(2,3,5,6-tetrafluorofenoxicarbonil)fenilcarbamat de benzil (49)<sup>49</sup>



Es dissol l'àcid N-(benziloxicarbonil)-5-aminobenzen-1,3-dicarboxílic (520 mg, 1.6 mmol) en 2.5 mL de DMF. En un altre matràs es dissol el 2,3,4,5-tetrafluorofenol (681 mg, 3.8 mmol) en 4 mL de DMF i s'addiciona sobre la mescla anterior. Tot seguit es dissol la EDC (731 mg, 3.8 mmol) en 10 mL de DMF (forma una suspensió blanquinosa) i s'addiciona sobre la barreja anterior. La barreja s'agita a

T.amb. sota atmosfera de nitrogen durant 24 h. A continuació s'evapora el dissolvent a sequedat amb la bomba d'oli, es redissol en H<sub>2</sub>O (per hidrolitzar possibles restes d'EDC) i s'evapora. El cru de reacció es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 10 x 4.5 cm Ø, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) obtenint-se el producte desitjat (785 mg, 1.22 mmol) amb un 78% de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; R<sub>f</sub> = 0.64)

**Pf** (°C) 159-161 (teòric)<sup>49</sup>, 155-157 (experimental)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 5.26 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 7.06 (2H, m, TFF-H), 7.40 (5H, m, Ar-H), 8.57 (2H, d, J = 1.6 Hz, Ar-H), 8.70 (1H, t, J = 1.6 Hz, Ar-H)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 67.7, 103.7, 125.5, 127.2, 128.4, 128.6, 128.7, 129.1, 135.4, 139.5, 142.0, 144.9, 147.3, 152.9, 161.2

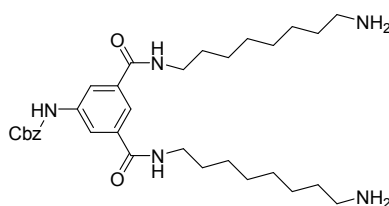
**IR**, ν (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1102, 1192, 1490, 1526, 1766 (C=O), 3087 (N-H)

**ESI-MS**: m/z = 629.3 [M-NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 1245.4 [2M+Na]<sup>+</sup>

**UV-vis** (MeOH) λ<sub>max.</sub> = 229 nm (ε = 56694), 324 (ε = 3222)

### 5.3.2 Síntesi del compost 54

#### 5.3.2.1 Síntesi del compost 51

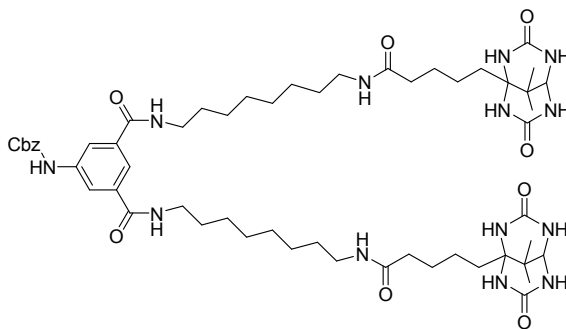


Es dissol el 8-aminoocilcarbamat de *tert*-butil<sup>51</sup> (**39**) (483 mg, 1.98 mmol) i la trietilamina (0.5 mL, 3.56 mmol) en 5 mL de CHCl<sub>3</sub>. En un altre matràs es dissol el 3,5-bis(2,3,5,6-tetrafluorofenoxicarbonil)fenilcarbamat de benzil (**49**) (315 mg, 0.49 mmol) en 40 mL de CHCl<sub>3</sub> i s'addiciona gota a gota amb un embut d'addició sobre la solució anterior (2 h.). La barreja resultant s'agita 12 h. a T.amb sota atmosfera de nitrogen. Aleshores es comprova per CCF (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 95/5; R<sub>f</sub> = 0.85) que la reacció s'ha completat. Tot seguit s'evapora la barreja, es redissol en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'extreu amb NaHSO<sub>4sat.</sub> (3x25 mL), NaCl<sub>sat.</sub> (1x25 mL), NaHCO<sub>3sat.</sub> (3x25 mL) i NaCl (1x25 mL). La fase orgànica s'asseca amb Na<sub>2</sub>SO<sub>4anh.</sub> i s'obté 383 mg (0.48 mmol) de producte desitjat (**50**) en forma de sòlid blanc amb un 98% de rendiment. A continuació es dissol el producte **50** en 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i se li addiciona 3 mL de TFA. S'agita a T.amb. durant 2 h. i es comprova per CCF (SiO<sub>2</sub>; MeOH/NH<sub>3</sub>, 8/2; R<sub>f</sub> = 0.8) que la reacció ha finalitzat. Aleshores s'evapora el dissolvent, es redissol el residu en 25 mL de NaOH<sub>aq.</sub> 1M i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. S'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub>, s'evapora i s'obtenen 269 mg (0.43 mmol) de producte desitjat (**51**) en forma d'oli amb un 90 % de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; MeOH/NH<sub>3</sub>, 8/2; R<sub>f</sub> = 0.8)

**<sup>1</sup>H-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1.26-1.32 (20H, m, CH<sub>2</sub>), 1.50 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 2.5 (4H, t, J = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.22 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 5.18 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 7.40 (5H, m, Ar-H), 7.85 (1H, t, J = 1.2 Hz, Ar-H), 8.01 (2H, d, J = 1.2 Hz, Ar-H), 8.46 (2H, t, J = 5.6 Hz, NH)  
**IR**, υ (film, cm<sup>-1</sup>) 1654 (C=O), 1734 (C=O), 2125, 2252, 2931, 3447

### 5.3.2.2 Síntesi del compost 52



A una dissolució del compost **5** (302 mg, 0.99 mmol), difenilfosforilazida (0.86 mL, 3.96 mmol) i trietilamina (0.56 mL, 4 mmol) en 30 mL de DMSO<sub>anh.</sub> i se li addiciona el compost **51** (247 mg, 0.40 mmol) dissolt en 10 mL de DMSO<sub>anh.</sub> i s'agita a T. amb sota atmosfera de nitrogen durant 24 h. Aleshores s'addicionen 10 mL d'H<sub>2</sub>O i s'evapora la barreja a sequedat amb la bomba d'oli. El cru de reacció es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 20 x 4.5 cm Ø) aplicant la barreja en forma sòlida barrejada amb sílica i eluint amb AcOEt/MeOH (1/1) fins a MeOH 100%. La separació es complexa degut a la diferent solubilitat dels compostos i s'han de fer dues cromatografies en columna successives. S'obtenen 301 mg de producte desitjat (**52**) impurificats amb gel de sílice, però suficientment purs per a procedir a la desprotecció del grup Z que es descriu en l'apartat següent.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 1/1; R<sub>f</sub> = 0.2)

**Pf** (°C) 198-203 (exp.)

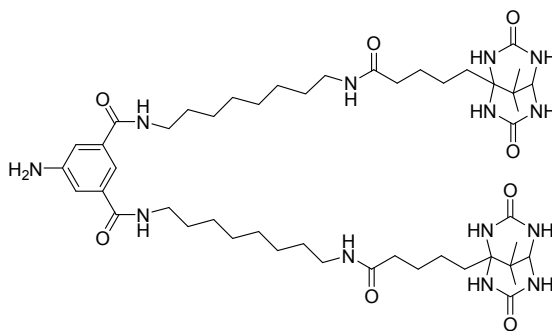
**<sup>1</sup>H-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1.05 (12H, s, CH<sub>3</sub>), 1.26-1.51 (36H, m, CH<sub>2</sub>), 2.04 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 3.00 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.22 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.78 (2H, t, J = 4.4 Hz, CH), 5.18 (2H, s, Ar-CH<sub>2</sub>), 6.52 (4H, d, J = 2 Hz, NH), 7.00 (4H, d, J = 2 Hz, NH), 7.39 (5H, m, Ar-CH), 7.72 (2H, t, J = 5.6 Hz, NH), 7.83 (1H, t, J = 1.2 Hz, Ar-H), 7.99 (2H, d, J = 1.2 Hz, Ar-H), 8.44 (2H, t, J = 5.6 Hz, NH), 10.01 (1H, ampla, NH)

**IR**, υ (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1521, 1540, 1652 (C=O), 1684 (C=O), 1717 (C=O), 1734 (C=O), 2929, 3260

**ESI-MS**: m/z = 1100.9 [M+H]<sup>+</sup>, 1122.9 [M+Na]<sup>+</sup>, 573.4 [M+2Na]<sup>+/2</sup>



## 5.3.2.3 Síntesi del compost 53



Es dissol el compost anterior **52** (160 mg, 0.14 mmol) en 50 mL de MeOH escalfant lleugerament per dissoldre'l completament. A continuació s'addicionen 10 mg de pal·ladi sobre carbó (10% p/p) i s'hi bombolleja hidrogen a T.amb. L'anàlisi de la barreja de reacció per CCF (SiO<sub>2</sub>; MeOH 100%) indica que, al cap de 24 h., la taca de reactiu inicial ha desaparegut, observant-se una nova taca a R<sub>f</sub> = 0.25 que presenta absorció a  $\lambda = 365$  nm, característica que no presenta el reactiu inicial. Aleshores es filtra el catalitzador sobre Celite, s'evapora el dissolvent i s'obtenen 138 mg de barreja de reacció. A continuació es purifica per HPLC (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 4 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 4/6, tr = 17-19 min) i s'obtenen 83 mg (0.086 mmol) de producte desitjat (**53**) en forma de sòlid blanc amb un 39% de rendiment conjunt després de l'acoblament i la desprotecció.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; MeOH 100%; R<sub>f</sub> = 0.25)

**Pf** (°C) 230-231 (exp.)

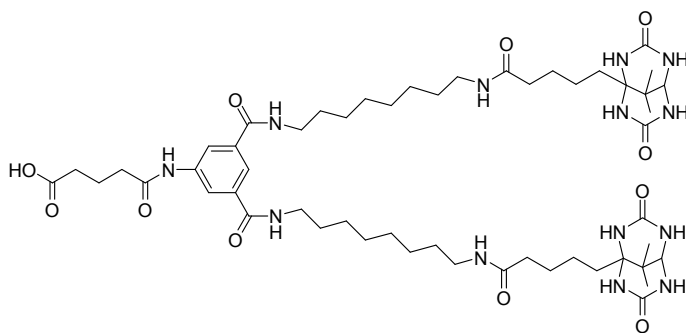
**<sup>1</sup>H-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.05 (12H, s, CH<sub>3</sub>), 1.27 (16H, m, CH<sub>2</sub>), 1.35-1.49 (20H, m, CH<sub>2</sub>), 2.04 (4H, t, J = 6.4 Hz, COCH<sub>2</sub>), 3.00 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 3.20 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 3.79 (2H, t, J = 4.4 Hz, CH), 5.36 (2H, ampla, NH<sub>2</sub>), 6.53 (4H, d, J = 2 Hz, CNH), 7.01 (4H, dd, J = 2 Hz, CHNH), 7.08 (2H, d, J = 1.2 Hz, Ar-H), 7.33 (1H, t, J = 1.2 Hz, Ar-H), 7.72 (2H, t, J = 5.6 Hz, CONH), 8.25 (2H, t, J = 5.6 Hz, CONH)

**<sup>13</sup>C-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 21.9, 22.1, 26.8, 27.0, 29.6, 29.8, 30.0, 34.0, 34.5, 36.0, 39.1, 40.0, 40.5, 66.3, 70.5, 114.0, 115.8, 136.8, 149.5, 155.5, 167.2, 172.8

**IR**,  $\nu$  (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1521, 1540, 1652 (C=O), 1683 (C=O), 1696 (C=O), 2856, 2929, 3294

**ESI-MS**: m/z = 506.1 [M+2Na]<sup>+</sup>/2, 988.6 [M+Na]<sup>+</sup>

## 5.3.2.4 Síntesi del compost 54



Es dissol el compost **53** (17 mg, 0.017 mmol) i l'anhidrid glutàric (5.5 mg, 0.048 mmol) en 10 mL de DMSO<sub>anh.</sub> i s'addiciona trietilamina (0.1 mL, 0.7 mmol). La mescla s'agita a T. amb durant 48 h. Aleshores s'afegeixen 2 mL d'H<sub>2</sub>O i s'evapora la barreja amb la bomba d'oli. Es redissol el cru de reacció en 5 mL H<sub>2</sub>O/MeOH (1/1), s'acidifica a pH = 3.0 amb àcid fòrmic, s'analitza per HPLC (Kromasil C18, columna analítica, f = 0.8 mL/min, H<sub>2</sub>O + 0.1% àcid fòrmic/MeOH; 4/6) i s'obtenen 2 pics corresponents al reactiu de partida (tr = 9.5 min, (**53**)) i al producte esperat (tr = 13.6 min, (**54**)) analitzats per MS-ESI(-). Després de separar el producte esperat per HPLC, s'obtenen 11 mg (0.011 mmol) de producte desitjat (**54**) en forma de sòlid blanc que suposen un 60 % de rendiment.

NOTA: Cal anar amb compte a l'hora d'evaporar les fraccions de l'HPLC i no escalfar massa el bany ja que en algun cas s'ha esterificat l'àcid formant l'èster metílic degut a la presència d'àcid fòrmic i MeOH.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH, 70/30/4; R<sub>f</sub> = 0.75)

**Pf** (°C) 207-208 (exp.)

**<sup>1</sup>H-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1.05 (12H, s, CH<sub>3</sub>), 1.26-1.51 (36H, m, CH<sub>2</sub>), 1.82 (2H, quin, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.04 (4H, t, J = 7.2 Hz, COCH<sub>2</sub>), 2.28 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.37 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.01 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 3.22 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 3.79 (2H, t, J = 4.4 Hz, CH), 6.53 (4H, d, J = 2 Hz, CNH), 7.00 (4H, dd, J = 2 Hz, CHNH), 7.73 (2H, t, J = 5.6 Hz, NH), 7.87 (1H, t, J = 1.2 Hz, Ar-H), 8.11 (2H, d, J = 1.2 Hz, Ar-H), 8.45 (2H, t, J = 5.6 Hz, CONH), 10.15 (1H, s, NH)

**<sup>13</sup>C-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 20.3, 21.1, 21.5, 25.9, 26.3, 26.4, 28.6, 29.0, 29.1, 30.6, 32.8, 33.2, 33.7, 35.1, 35.2, 38.3, 65.7, 69.5, 120.1, 120.4, 135.6, 139.1, 154.4, 165.8, 170.9, 171.7, 174.1

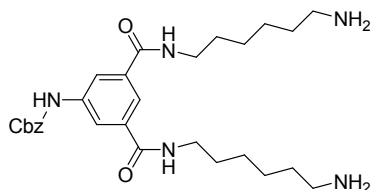
**IR**, ν (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1637 (C=O), 1654 (C=O), 1686 (C=O), 1735 (C=O), 2874, 2935, 3273

**ESI-MS**: m/z = 1078.7 [M-H]<sup>-</sup>, 1102.6 [M+Na]<sup>+</sup>, 562.8 [M+2Na]<sup>+</sup>/2

**Anàlisi elemental**, C<sub>53</sub>H<sub>85</sub>N<sub>13</sub>O<sub>11</sub>·H<sub>2</sub>O·HCOOH + 4% matèria inert, (%) calculat: C: 53.56, H: 7.57, N: 15.06; experimental: C: 53.68, H: 7.59, N: 14.98

### 5.3.3 Síntesi del compost 59

#### 5.3.3.1 Síntesi del compost 56



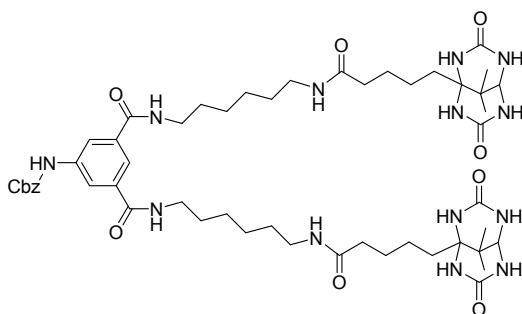
Es dissol el 6-aminohexilcarbamat de *tert*-butil<sup>51</sup> (**38**) (408 mg, 1.89 mmol) i la trietilamina (0.5 mL, 3.56 mmol) en 5 mL de CHCl<sub>3</sub>. En un altre matràs es dissol el 3,5-bis(2,3,5,6-tetrafluorofenoxicarbonil)fenilcarbamat de benzil (**49**) (471 mg, 0.73 mmol) en 40 mL de CHCl<sub>3</sub> i s'addiciona gota a gota amb un embut d'addició sobre la solució anterior (2 h.). La barreja resultant s'agita 12 h. a T. amb sota atmosfera de nitrogen. Es comprova per CCF (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 95/5; R<sub>f</sub> = 0.75) que la reacció s'ha completat. Aleshores s'evapora el dissolvent, es redissol el cru de reacció en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'extreu amb NaHSO<sub>4sat.</sub> (3x25 mL), NaCl<sub>sat.</sub> (1x25 mL), NaHCO<sub>3sat.</sub> (3x25 mL) i NaCl (1x25 mL). La fase orgànica resultant s'asseca amb Na<sub>2</sub>SO<sub>4anh.</sub> i s'obtenen 544 mg (0.73 mmol) de producte desitjat (**55**) amb un rendiment quantitatiu. A continuació es dissol el producte **55** en 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i se li addiciona 3 mL de TFA. La barreja resultant s'agita a T. amb. durant 2 h. i es comprova per CCF (SiO<sub>2</sub>; MeOH/NH<sub>3</sub>, 8/2; R<sub>f</sub> = 0.8) que la reacció ha finalitzat. Aleshores s'evapora el dissolvent, es redissol el residu en 25 mL de NaOH<sub>aq.</sub> 1M i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. S'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4anh.</sub>, s'evapora i s'obtenen 350 mg (0.62 mmol) de producte desitjat en forma d'oli amb un 84 % de rendiment.

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1.29-1.33 (12H, m, CH<sub>2</sub>), 1.50 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 2.50 (4H, m, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.22 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 5.17 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 7.39 (5H, m, Ar-H), 7.8 (1H, t, J = 1.2 Hz, Ar-H), 8.00 (2H, d, J = 1.2 Hz, Ar-H), 8.45 (2H, t, J = 5.6 Hz, NH)

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 26.8, 27.0, 29.5, 34.0, 40.5, 42.3, 66.5, 120.4, 120.5, 128.7, 128.8, 129.0, 136.7, 137.3, 140.0, 154.2, 166.7

IR, ν (film, cm<sup>-1</sup>) 1654 (C=O), 1718 (C=O), 2126, 2252, 3442

#### 5.3.3.2 Síntesi del compost 57



Es dissolen el compost **5** (430 mg, 1.42 mmol), la difenilfosforilazida (1.2 mL, 5.69 mmol) i la trietilamina (0.7 mL, 5 mmol) en 70 mL de DMSO<sub>anh.</sub> i s'addiciona la diamina (**56**) (323 mg, 0.57 mmol) dissolta en 10 mL de DMSO<sub>anh.</sub>, deixant-se la barreja 24 h. amb agitació a T. amb i sota atmosfera de nitrogen. Aleshores s'addicionen 10 mL d'H<sub>2</sub>O i s'evapora a sequedat amb la bomba d'oli. El cru de reacció es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 20 x 4.5 cm Ø) aplicant la barreja en forma sòlida barrejada amb sílica i eluint amb AcOEt/MeOH (1/1) fins a MeOH 100%. La separació es complexa degut a la diferent solubilitat dels compostos i s'han de fer dues columnes. Al final s'obtenen 391 mg del producte esperat impurificat amb gel de sílice, però suficientment pur per procedir a la desprotecció del grup Z que es descriu en l'apartat següent.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>, MeOH 100%, R<sub>f</sub> = 0.5)

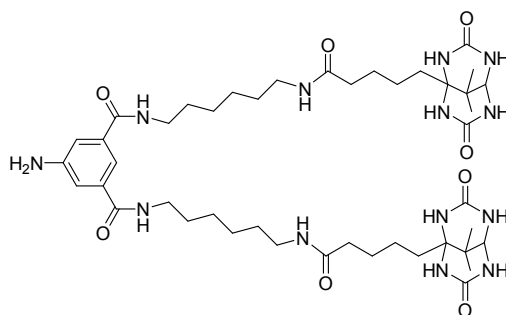
**Pf** (°C) 192-198 (exp.)

**<sup>1</sup>H-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1.04 (12H, s, CH<sub>3</sub>), 1.27-1.49 (28H, m, CH<sub>2</sub>), 2.02 (4H, t, J = 6.4, CH<sub>2</sub>CO), 3.00 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6, CH<sub>2</sub>NH), 3.22 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6, CH<sub>2</sub>NH), 3.77 (2H, t, J = 4.4, CH), 5.16 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 6.52 (4H, m, NH), 7.00 (4H, m, NH), 7.39 (5H, m, Ar-H), 7.72 (2H, t, J = 5.6, NH), 7.83 (1H, t, J = 1.2, Ar-H), 7.98 (2H, d, J = 1.2, Ar-CH), 8.43 (2H, t, J = 5.6, NH), 10.0 (1H, ampla, NH)

**IR**, ν (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1521, 1652 (C=O), 1682 (C=O), 1700 (C=O), 1733 (C=O), 2934, 3078, 3260

**ESI-MS**: m/z = 1066.9 [M+Na]<sup>+</sup>, 1044.6 [M+H]<sup>+</sup>, 534.3 [(M+H+Na)/2]<sup>+</sup>

### 5.3.3.3 Síntesi del compost 58



Es dissol el compost anterior **57** (148 mg, 0.14 mmol) en 50 mL de MeOH escalfant lleugerament per dissoldre'l completament. A continuació s'addicionen 10 mg de pal·ladi sobre carbó (10% p/p) i s'hi bombolleja hidrogen a T. amb. L'anàlisi de la barreja de reacció per CCF (SiO<sub>2</sub>; MeOH 100%) indica que, al cap de 24 h., la taca de reactiu inicial ha desaparegut, observant-se una nova taca a R<sub>f</sub> = 0.3 que presenta absorció a λ = 365 nm, característica que no presenta el reactiu inicial. Aleshores es filtra el catalitzador sobre Celite, s'evapora i s'obtenen 112 mg de producte impur. A continuació es purifica per HPLC (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 4 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 1/1, t<sub>r</sub> = 10-12 min) i s'obtenen 61 mg (0.067 mmol) de producte desitjat (**58**) en forma de sòlid blanc amb un 30% de rendiment conjunt d'acoblament i desprotecció.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; MeOH 100%, R<sub>f</sub> = 0.3)

**Pf** (°C) 189-190 (exp.)

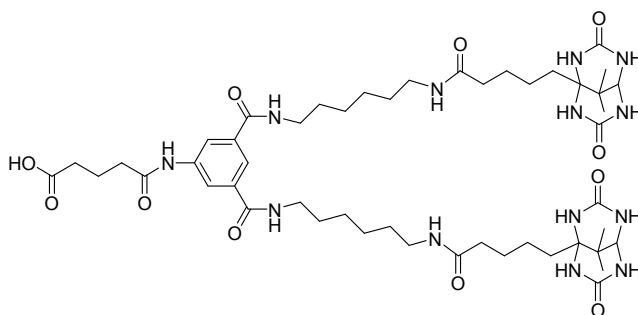
**<sup>1</sup>H-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1.04 (12H, s, CH<sub>3</sub>), 1.27 (8H, m, CH<sub>2</sub>), 1.35-1.49 (20H, m, CH<sub>2</sub>), 2.03 (4H, t, J = 6.4 Hz, COCH<sub>2</sub>), 3.00 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 3.19 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 3.77 (2H, t, J = 4.4 Hz, CH), 5.36 (2H, ampla, NH<sub>2</sub>), 6.53 (4H, d, J = 2 Hz, CNH), 7.00 (4H, dd, J = 2 Hz, CHNH), 7.07 (2H, d, J = 1.2 Hz, Ar-H), 7.33 (1H, t, J = 1.2 Hz, Ar-H), 7.73 (2H, t, J = 5.6 Hz, CONH), 8.25 (2H, t, J = 5.6 Hz, CONH)

**<sup>13</sup>C-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 21.9, 22.1, 26.8, 27.0, 29.9, 34.0, 34.5, 36.0, 39.0, 40.0, 40.5, 66.3, 70.5, 114.0, 115.8, 136.5, 149.5, 155.5, 167.2, 172.8

**IR**, ν (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1522, 1540, 1654 (C=O), 1684 (C=O), 1701 (C=O), 2859, 2931, 3260

**ESI-MS**: m/z = 910.6 [M+H]<sup>+</sup>, 932.6 [M+Na]<sup>+</sup>

### 5.3.3.4 Síntesi del compost 59



Es dissol el compost **58** (40.5 mg, 0.04mmol) i l'anhidrid glutàric (25.4 mg, 0.15 mmol) en 10 mL de DMSO<sub>anh.</sub> i s'addiciona trietilamina (0.1 mL, 0.7 mmol). La mescla s'agita a T. amb durant 48 h. Aleshores s'afegeixen 2 mL d'H<sub>2</sub>O i s'evapora la barreja a sequedat amb la bomba d'oli. Es redissol el cru de reacció en 10 mL de H<sub>2</sub>O/MeOH (1/1) i s'analitza per HPLC (Kromasil C18, columna analítica, f = 0.8 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 1/1). S'obtenen 2 pics corresponents al reactiu de partida (tr = 7.2 min, (**58**)) i al producte esperat (tr = 11.7 min, (**59**)) analitzats per MS-ESI(-). Després de separar el producte esperat per HPLC semi-preparatiu (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 4 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 1/1, tr = 14-20 min) s'obtenen 18 mg (0.017 mmol) de producte desitjat en forma de sòlid blanc que suposen un 40 % de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; MeOH 100%, R<sub>f</sub> = 0.62)

**Pf** (°C) 185-189 (exp.)

**<sup>1</sup>H-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1.05 (12H, s, CH<sub>3</sub>), 1.29-1.54 (28H, m, CH<sub>2</sub>), 1.82 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.06 (4H, t, J = 6.4 Hz, COCH<sub>2</sub>), 2.27 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.37 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.02 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 3.22 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 3.79 (2H, t, J = 4.4 Hz, CH), 6.55 (4H, d, J = 2 Hz, CNH), 7.03 (4H, dd, J = 2 Hz, CHNH), 7.74 (2H, t, J = 5.6 Hz, NH), 7.89 (1H, t, J = 1.2 Hz, Ar-H), 8.12 (2H, d, J = 1.2 Hz, Ar-H), 8.47 (2H, t, J = 5.6 Hz, CONH), 10.18 (1H, s, NH)

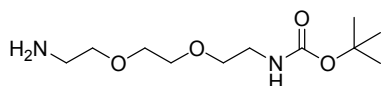
**<sup>13</sup>C-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 20.4, 21.1, 21.5, 25.9, 26.1, 29.0, 29.1, 30.6, 33.0, 33.2, 33.7, 35.1, 35.3, 38.2, 65.7, 69.6, 120.1, 120.5, 135.6, 139.1, 154.5, 154.6, 165.8, 171.0, 171.8

**ESI-MS**: m/z = 1024.6 [M+H]<sup>+</sup>, 1046.5 [M+Na]<sup>+</sup>, 534.9 [M+2Na]<sup>+</sup>/2

**Anàlisi elemental**,  $C_{49}H_{77}N_{13}O_{11} \cdot MeOH \cdot 2HCOOH$  + 4% matèria inert, (%) calculat: C: 51.41, H: 7.22, N: 14.98; experimental: C: 51.24, H: 7.33, N: 14.76

### 5.3.4 Síntesi del compost 63

#### 5.3.4.1 Síntesi del 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamat de *tert*-butil (**36**)<sup>156,157</sup>

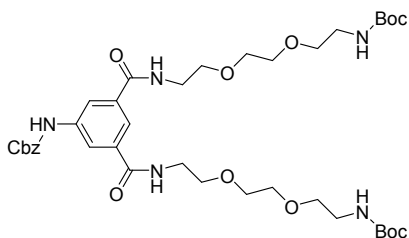


Es dissol la 3,6-dioxaoctan-1,8-diamina (25.59 g, 172.6 mmol) en 200 mL de dioxà i es refreda en un bany de gel. En un altre matràs es dissol el dicarbonat de di-*tert*-butil (anhídrid de Boc) (9.98 g, 45.7 mmol) en 150 mL de dioxà i s'addiciona gota a gota a través d'un embut d'addició sobre la mescla anterior (1.5 h.). Aleshores es deixa la mescla de reacció agitant a T.amb, sota atmosfera de nitrogen, durant 24 h. A continuació s'evapora el dissolvent, es redissol el residu en  $H_2O$ , s'acidifica amb HCl a pH = 2-3 i s'extreu amb  $CH_2Cl_2$  (3x50 mL). S'asseca la fase orgànica amb  $MgSO_{4anh}$ . i s'evapora obtenint-se 1.38 g (4.0 mmol) del producte de diprotecció (10% rendiment). La fase aquosa es basifica a pH = 11 amb NaOH 1M, s'extreu amb  $CH_2Cl_2$  (50x50 mL) fins que pràcticament no s'observa producte a la fase aquosa. La fase orgànica resultant s'asseca amb  $MgSO_{4anh}$ . i s'evapora a sequedat obtenint-se 5.14 g (20.7 mmol) de producte de monoprotecció desitjat en forma de cera (50 % rendiment).

**CCF** ( $SiO_2$ ; MeOH/ $NH_3$ , 9/1;  $R_f$  = 0.6)

**$^1H$ -RMN** ( $CDCl_3$ , 200 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.44 (9H, s,  $CH_3$ ), 2.88 (2H, t,  $J$  = 5.2 Hz,  $CH_2NH_2$ ), 3.33 (2H, m,  $CH_2NHBoc$ ), 3.5-3.7 (8H, m,  $CH_2O$ ), 5.19 (1H, s,  $NH$ )

#### 5.3.4.2 Síntesi del compost 60



Es dissol el 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamat de *tert*-butil (**36**) (840 mg, 3.38 mmol) en 15 mL de  $CHCl_3$  acabat de destil·lar i s'hi addiciona trietilamina (340  $\mu$ L, 2.4 mmol) acabada de destil·lar. En un altre matràs es dissol el 3,5-bis(2,3,5,6-tetrafluorofenoxicarbonil)fenilcarbamat de benzil (**49**) (212 mg, 0.33 mmol) en 70 mL de  $CHCl_3$  i s'addiciona gota a gota durant 1 h. sobre la barreja anterior. La mescla de reacció es deixa agitant a T.amb, sota atmosfera de nitrogen, durant 12 h. A continuació s'evapora el dissolvent, es redissol la barreja en  $CH_2Cl_2$  i s'extreu amb  $NaHSO_{4sat}$ . (4x30 mL) per tal

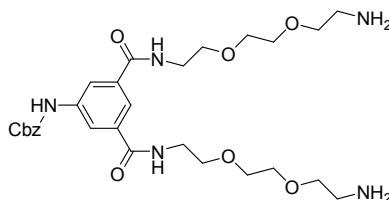
d'eliminar l'excés d'espaiador amino i la trietilamina. A continuació s'extreu amb  $\text{NaHCO}_{3\text{sat}}$ . (4x30 mL) per tal d'eliminar el 2,3,5,6-tetrafluorofenol. S'asseca la fase orgànica amb  $\text{Na}_2\text{SO}_{4\text{anh}}$ , s'evapora a sequedat i s'obté el producte desitjat en forma de sòlid blanc (278 mg, 0.36 mmol) amb un 77% de rendiment.

**CCF** ( $\text{SiO}_2$ ;  $\text{AcOEt/MeOH}$ , 95/5;  $R_f = 0.4$ )

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 200 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.33 (18H, s,  $\text{CH}_3$ ), 3.02 (4H, dt,  $J_d = J_t = 5.8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH Boc}$ ), 3.32-3.5 (20H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$  i  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 5.16 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 6.75 (2H, t,  $J_t = 5.8$  Hz,  $\text{NH}$ ), 7.37 (5H, m,  $\text{Ar-H}$ ), 7.85 (1H, m,  $\text{Ar-H}$ ), 8.01 (2H, m,  $\text{Ar-H}$ ), 8.45 (2H, t,  $J_t = 5.8$  Hz,  $\text{NH}$ ), 9.90 (1H, s,  $\text{NH}$ )

**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 28.9, 39.9, 40.3, 66.6, 69.6, 69.9, 70.2, 70.2, 78.2, 120.4, 120.6, 128.7, 129.1, 136.1, 137.2, 139.9, 154.1, 156.2, 166.7

### 5.3.4.3 Síntesi del compost 61

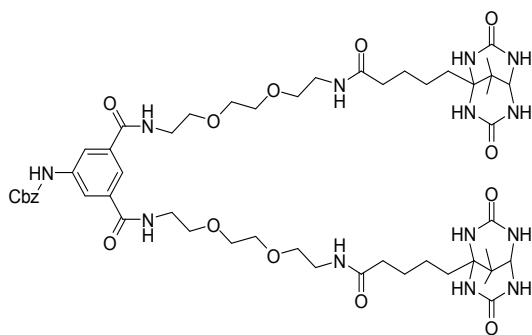


Es dissol el compost **60** (278 mg, 0.36 mmol) en 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i s'addicionen 3 mL de TFA. La mescla s'agita a T. amb sota atmosfera de nitrogen durant 1 h. i es comprova per CCF que la desprotecció ha finalitzat ( $\text{SiO}_2$ ;  $\text{MeOH/NH}_3$ , 8/2;  $R_f = 0.6$ ). A continuació s'evapora el dissolvent, es redissol en 25 mL de  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$ . 1M i s'extreu amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , s'asseca la fase orgànica amb  $\text{Na}_2\text{SO}_{4\text{anh}}$ . i s'evapora a sequedat obtenint-se el producte desitjat (174 mg, 0.30 mmol) amb un 85% de rendiment.

**CCF** ( $\text{SiO}_2$ ;  $\text{MeOH/NH}_3$ , 8/2;  $R_f = 0.6$ )

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.50 (br,  $\text{NH}_2$ ), 2.85 (4H, t,  $J_t = 5.8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3.45-3.8 (20H, m,  $\text{CH}_2$ ), 5.21 (2H, s,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 7.38 (5H, m,  $\text{Ar-H}$ ), 7.91 (1H, m,  $\text{Ar-H}$ ), 8.15 (2H, m,  $\text{Ar-CH}$ ), 8.30 (2H, m,  $\text{NH}$ )

### 5.3.4.4 Síntesi del compost 62



Es dissol el compost **5** (105 mg, 0.35 mmol) en 50 mL de DMSO<sub>anh.</sub> i s'addiciona la difenilfosforilazida (0.37 mL, 1.73 mmol) i la trietilamina (0.24 mL, 1.73 mmol) sota atmosfera de nitrogen. A continuació es dissol el compost **61** (80 mg, 0.14 mmol) en un altre matràs amb 10 mL de DMSO<sub>anh.</sub> i s'addiciona sobre la mescla anterior a través de cànula. La mescla de reacció s'agita a T.amb., sota atmosfera de nitrogen, durant 24 h. Aleshores s'addiciona uns 10 mL d'H<sub>2</sub>O i s'evapora a sequedat. El cru de reacció es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 10 x 4.5 cm Ø), aplicant la barreja en forma de sòlid barrejat amb sílica i s'elueix amb AcOEt augmentant la polaritat fins arribar a MeOH 100%. El producte s'elueix amb AcOEt/MeOH, 4/6. S'obtenen 152 mg. del producte desitjat impurificat amb sílica. Per purificar-los s'intenta la recristal·lització amb H<sub>2</sub>O, però sense obtenir bons resultats. Aleshores s'intenta la purificació a través de l'HPLC en fase reversa. Per aquesta purificació s'utilitza la columna semi-preparativa (Kromasil C18, f = 4 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 4/6, tr = 9.6 min) i s'obtenen 128 mg de producte desitjat (0.11 mmol) amb un 83% de rendiment.

**HPLC** (Kromasil C18, columna analítica, f = 0.8 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 1/1, tr = 17 min)

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; MeOH/H<sub>2</sub>O, 9/1; R<sub>f</sub> = 0.67)

**Pf** (°C) 196-197 (exp.)

**<sup>1</sup>H-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1.05 (12H, s, CH<sub>3</sub>), 1.42-1.53 (12H, m, CH<sub>2</sub>), 2.06 (4H, t, J = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>CO), 3.17 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.31 (4H, s, CH<sub>2</sub>O o CH<sub>2</sub>N), 3.38 (8H, m, CH<sub>2</sub>O o CH<sub>2</sub>N), 3.53 (8H, m, CH<sub>2</sub>O o CH<sub>2</sub>N), 3.79 (2H, t, J = 4.4 Hz, NH-CH-NH), 5.18 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 6.55 (4H, m, NH), 7.03 (4H, m, NH), 7.42 (5H, m, Ar-H), 7.82 (2H, t, J = 5.6 Hz, NH), 7.89 (1H, s, Ar-H), 8.03 (2H, s, Ar-H), 8.51 (2H, t, J = 5.6 Hz, NH), 10.04 (1H, s, NH)

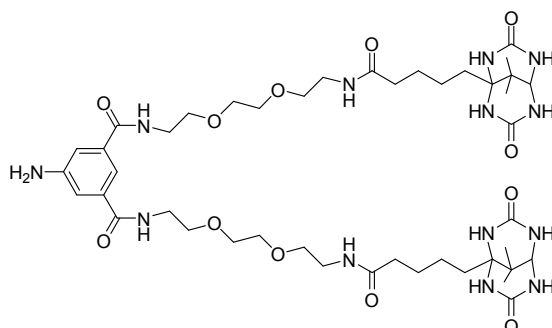
**<sup>13</sup>C-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 21.8, 22.1, 26.5, 33.9, 34.4, 35.7, 39.0, 40.3, 66.4, 66.5, 69.5, 69.8, 70.1, 70.2, 120.3, 120.5, 128.7, 129.1, 136.0, 137.1, 139.9, 154.0, 155.2, 166.7, 172.8

**IR**, ν (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1522, 1651 (C=O), 2938 (CH<sub>2</sub>), 3290 (NH)

**ESI-MS**: m/z = 1130.8 [M+Na]<sup>+</sup>, 1108.8 [M+H]<sup>+</sup>, 566.3 [(M+H+Na)/2]<sup>+</sup>

**UV-vis** (MeOH) λ<sub>max.</sub> = 218 nm (ε = 41846), 304 nm (ε = 1812)

#### 5.3.4.5 Síntesi del compost **63**



Es dissol el compost **62** (128 mg, 0.12 mmol) en 50 mL de MeOH escalfant lleugerament per dissoldre'l completament. A continuació s'addicionen 10 mg de pal·ladi sobre carbó (10% p/p) i s'hi bombolleja hidrogen a T.amb. L'anàlisi de la barreja de reacció per CCF (SiO<sub>2</sub>, MeOH) indica que, al cap de 5 h de reacció, la taca de reactiu inicial (R<sub>f</sub> = 0.4) pràcticament ha desaparegut, observant-se



una nova taca a  $R_f = 0.35$  que presenta absorció a  $\lambda = 365$  nm, característica que no presenta el reactiu inicial. Per acabar de completar la reacció, es deixa durant 12 h, sota atmosfera d'hidrogen. A continuació es filtra el catalitzador sobre Celite i s'evapora el dissolvent obtenint-se 106 mg d'una barreja. L'anàlisi d'aquesta barreja per HPLC (Kromasil C18, columna analítica,  $f = 0.8$  mL/min,  $H_2O/MeOH$ ; 6/4) indica que conté un pic del producte majoritari ( $t_r = 7.5$  min) corresponent al producte pur (**63**) i un segon pic com a impuresa ( $t_r = 11.6$  min), per tant es decideix purificar el producte a través de HPLC (Kromasil C18, columna semi-preparativa,  $f = 4$  mL/min,  $H_2O/MeOH$ ; 1/1). S'obtenen 85 mg de producte desitjat (0.09 mmol) amb un 75% de rendiment.

**CCF** ( $SiO_2$ ; MeOH;  $R_f = 0.35$ )

**Pf** ( $^{\circ}C$ ) 198-200 (exp.)

**$^1H$ -RMN** (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.05 (12H, s,  $CH_3$ ), 1.42-1.53 (12H, m,  $CH_2$ ), 2.06 (4H, t,  $J = 6.8$  Hz,  $CH_2CO$ ), 3.17 (4H, dt,  $J_d = J_t = 5.6$  Hz,  $CH_2NH$ ), 3.31 (4H, s,  $CH_2O$ ), 3.38 (8H, t,  $J = 5.6$  Hz,  $CH_2NH$  i  $CH_2O$ ), 3.53 (8H, m,  $CH_2O$ ), 3.79 (2H, t,  $J = 4.4$  Hz,  $NH-CH-NH$ ), 5.42 (2H, s,  $NH_2$ ), 6.55 (4H, m, C-NH), 7.03 (4H, m, CH-NH), 7.12 (2H, s, Ar-H), 7.39 (1H, s, Ar-H), 7.82 (2H, t,  $J = 5.6$  Hz,  $NHCO$ ), 8.31 (2H, t,  $J = 5.6$  Hz, Ar-CONH)

**$^{13}C$ -RMN** (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 21.8, 22.2, 26.6, 34.0, 34.5, 35.8, 39.1, 40.2, 66.4, 69.6, 69.9, 70.2, 70.3, 113.8, 115.7, 136.1, 149.4, 155.3, 167.4, 172.9

**IR**,  $\nu$  (KBr,  $cm^{-1}$ ) 1522, 1600 (C=O), 1650 (C=O), 1695 (C=O), 2871, 2934, 3334 (NH)

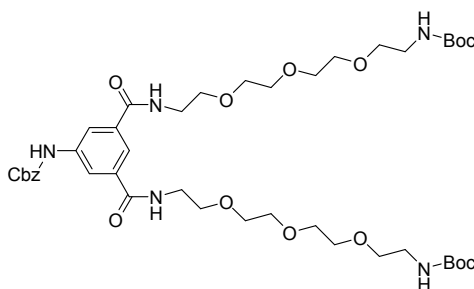
**UV-vis** (MeOH)  $\lambda_{max}$  = 220 nm ( $\epsilon = 26277$ ), 330 nm ( $\epsilon = 2298$ )

**ESI-MS**:  $m/z = 974.6 [M+H]^+$ ,  $996.6 [M+Na]^+$ ,  $510.0 [M+2Na]^+/2$

**Anàlisi elemental**,  $C_{44}H_{71}N_{13}O_{12} \cdot H_2O \cdot MeOH + 4\%$  matèria inert, (%) calculat: C: 50.66, H: 7.28, N: 17.07; experimental: C: 50.05, H: 7.35, N: 17.15

### 5.3.5 Síntesi del compost 68

#### 5.3.5.1 Síntesi del compost 64



Es dissol el 11-amino-3,6,9-dioxaundecilcarbamtat de *tert*-butil<sup>51</sup> (**37**) (432 mg, 1.47 mmol) i la trietilamina (0.25 mL, 1.77 mmol) en 5 mL de  $CHCl_3$ . En un altre matràs es dissol el 3,5-bis(2,3,5,6-tetrafluorofenoxicarbonil)fenilcarbamtat de benzil (**49**) (785 mg, 1.28 mmol) en 40 mL de  $CHCl_3$  i s'addiciona gota a gota amb un embut d'addició sobre la solució anterior (2 h.). La barreja es deixa agitant a T. amb sota atmosfera de nitrogen durant 12 h. A continuació s'analitza la barreja per CCF ( $SiO_2$ ; AcOEt/MeOH, 95/5) i encara s'observa èster activat ( $R_f = 0.9$ ). Aleshores s'addiciona més 11-

amino-3,6,9-dioxaundecilcarbammat de *tert*-butil (**37**) (480 mg, 1.64 mmol) i s'agita 1 h. més, a partir de la qual ja no s'observa l'èster activat de TFF per CCF. Tot seguit s'evapora el dissolvent, es redissol en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i s'extreu amb  $\text{NaHSO}_{4\text{sat}}$ . (3x40 mL) per tal d'eliminar l'excés d'amina (**37**) i de trietilamina. A continuació s'extreu amb  $\text{NaHCO}_{3\text{sat}}$ . (4x40 mL) per tal d'eliminar el fenol. La fase orgànica resultant s'asseca amb  $\text{Na}_2\text{SO}_{4\text{anh.}}$ , s'evapora a sequedat i es purifica el cru de reacció per cromatografia en columna ( $\text{SiO}_2$ , 10 x 4.5 cm Ø, AcOEt/MeOH; 9/1). S'obtenen majoritàriament 2 productes que corresponen al producte de disubstitució (**64**) (506 mg, 46% rendiment) i al producte de monosubstitució (**65**) (90 mg, 10% rendiment).

#### Producte **64**:

**CCF** ( $\text{SiO}_2$ ; AcOEt/MeOH, 9/1;  $R_f = 0.35$ )

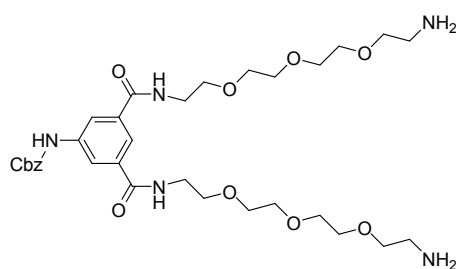
**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.39 (18H, s,  $\text{CH}_3$ ), 3.24 (4H, dt,  $J_d = J_t = 4.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.49 (4H, t,  $J = 4.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.56-3.64 (24H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.15 (2H, ampla,  $\text{NH}$ ), 5.21 (2H, s,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 7.18 (2H, ampla,  $\text{NH}$ ), 7.37 (5H, m,  $\text{Ar-H}$ ), 7.93 (1H, t,  $J = 1.6$  Hz,  $\text{Ar-H}$ ), 8.18 (2H, m,  $\text{Ar-H}$ ), 8.36 (1H, ampla,  $\text{NH}$ )

#### Producte **65**:

**CCF** ( $\text{SiO}_2$ ; AcOEt/MeOH, 9/1;  $R_f = 0.8$ )

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.39 (9H, s,  $\text{CH}_3$ ), 3.23 (2H, dt,  $J_d = J_t = 4.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.47 (2H, t,  $J = 4.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.51-3.64 (12H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.04 (1H, ampla,  $\text{NH}$ ), 5.23 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 7.05 (1H, m, TFF-H), 7.25 (1H, ampla,  $\text{NH}$ ), 7.37 (5H, m,  $\text{Ar-CH}$ ), 8.24 (1H, m,  $\text{NH}$ ), 8.29 (1H, m,  $\text{Ar-H}$ ), 8.72 (1H, m,  $\text{Ar-H}$ ), 8.86 (1H, m,  $\text{Ar-H}$ )

### 5.3.5.2 Síntesi del compost **66**

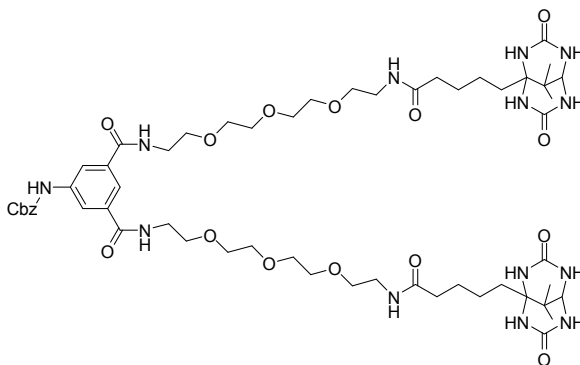


Es dissol el compost **64** (506 mg, 0.58 mmol) en 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i se li addiciona 6 mL de TFA. La mescla resultant s'agita a T. amb sota atmosfera de nitrogen durant 3 h. i es comprova per CCF que la desprotecció a finalitzat ( $\text{SiO}_2$ ; MeOH/ $\text{NH}_3$ , 8/2;  $R_f = 0.4$ ). A continuació s'evapora el dissolvent, es redissol la barreja en 25 mL de  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$ , 1M i s'extreu amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , s'asseca la fase orgànica amb  $\text{Na}_2\text{SO}_{4\text{anh.}}$  i s'evapora obtenint-se 357 mg (0.54 mmol) de producte desitjat amb un 93% de rendiment.

**CCF** ( $\text{SiO}_2$ ; MeOH/ $\text{NH}_3$ , 8/2;  $R_f = 0.3$ )

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  (ppm) 2.05 (br,  $\text{NH}_2$ ), 2.77 (4H, t,  $J = 4.8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3.43 (4H, t,  $J = 4.8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.56-3.63 (24H, m,  $\text{OCH}_2$ ), 5.20 (2H, s,  $\text{CH}_2\text{-Ar}$ ), 7.38 (5H, m,  $\text{Ar-H}$ ), 7.91 (2H, ampla,  $\text{NH}$ ), 8.03 (1H, m,  $\text{Ar-H}$ ), 8.20 (2H, m,  $\text{Ar-H}$ ), 8.98 (1H, ampla,  $\text{NH}$ )

### 5.3.5.3 Síntesi del compost 67



Es dissol el compost **5** (354 mg, 1.17 mmol) en 50 mL de  $\text{DMSO}_{\text{anh}}$  i se li addiciona la meitat de la difenilfosforilazida (0.5 mL, 2.5 mmol) i la trietilamina (0.73 mL, 5.2 mmol) sota atmosfera de nitrogen. A continuació es dissol la diamina **66** (346 mg, 0.52 mmol) en un altre matràs amb 10 mL de  $\text{DMSO}_{\text{anh}}$  i s'addiciona sobre la mescla anterior a través de cànula. Passades 2 h. s'addiciona l'altra meitat de DPPA (0.5 mL, 2.5 mmol). La mescla de reacció s'agita a T. amb. sota atmosfera de nitrogen durant 24 h. S'analitza per CCF ( $\text{SiO}_2$ ;  $\text{MeOH}/\text{NH}_3$ , 8/2;  $R_f = 0.3$ ) i ja no s'observa presència de la diamina **66**. Aleshores s'addiciona uns 10 mL d' $\text{H}_2\text{O}$  i s'evapora la barreja amb la bomba d'oli. El cru de reacció es purifica per cromatografia en columna ( $\text{SiO}_2$ , 20 x 4.5 cm  $\varnothing$ ). La barreja s'aplica en forma sòlida barrejada amb sílica i s'elueix amb  $\text{AcOEt}$  augmentant la polaritat fins arribar a  $\text{MeOH}$  100%. S'obtenen 491 mg (0.41 mmol) de producte desitjat **67** impurificat amb sílica, però prou pur per procedir a la desprotecció del grup Z que es descriu en el següent apartat.

**CCF** ( $\text{SiO}_2$ ;  $\text{MeOH}/\text{AcOEt}$ , 1/1;  $R_f = 0.2$ )

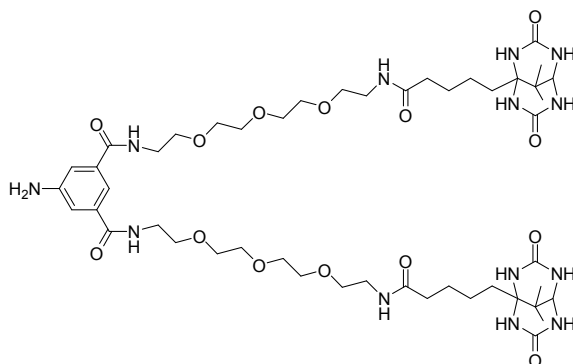
**Pf** ( $^\circ\text{C}$ ) 187-188 (exp.)

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.05 (12H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.42-1.53 (12H, m,  $\text{CH}_2$ ), 2.06 (4H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.17 (4H, dt,  $J_d = J_t = 5.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.30-3.34 (4H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3.37 (4H, t,  $J = 5.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}$  o  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.42 (4H, t,  $J = 5.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}$  o  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.47-3.53 (16H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.79 (2H, t,  $J = 4.4$  Hz,  $\text{CH}$ ), 5.18 (2H, s,  $\text{CH}_2\text{-Ar}$ ), 6.52 (4H, ampla,  $\text{NH}$ ), 7.01 (4H, m,  $\text{NH}$ ), 7.42 (5H, m,  $\text{Ar-H}$ ), 7.82 (1H, t,  $J = 5.6$  Hz,  $\text{NH}$ ), 7.89 (1H, s,  $\text{Ar-H}$ ), 8.03 (2H, s,  $\text{Ar-H}$ ), 8.51 (2H, t,  $J = 5.6$  Hz,  $\text{NH}$ ), 10.04 (1H, s,  $\text{NH}$ )

**IR**,  $\nu$  ( $\text{KBr}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1522, 1652 ( $\text{C=O}$ ), 1660 ( $\text{C=O}$ ), 1734 ( $\text{C=O}$ ), 2935, 3259

**ESI-MS**:  $m/z = 1218.8$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ , 1196.8 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , 610.3 [ $(\text{M}+\text{H}+\text{Na})/2$ ] $^+$

## 5.3.5.4 Síntesi del compost 68



Es dissol el compost anterior **67** (486 mg, 0.41 mmol) en 50 mL de MeOH escalfant lleugerament per dissoldre'l completament. A continuació s'addicionen 10 mg de pal·ladi sobre carbó (10% p/p) i s'hi bombolleja hidrogen a T.amb. L'anàlisi de la barreja de reacció per CCF (SiO<sub>2</sub>; MeOH 100%) indica que, al cap de 16 h., la taca de reactiu inicial ha desaparegut, observant-se una nova taca a R<sub>f</sub> = 0.2 que presenta absorció a  $\lambda = 365$  nm, característica que no presenta el reactiu inicial. Aleshores es filtra el catalitzador sobre Celite i s'evapora el dissolvent obtenint-se 415 mg (0.39 mmol) de producte desitjat **68** impurificat amb sílica. La purificació per HPLC (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 4 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 1/1) proporciona 311 mg (0.29 mmol) de producte desitjat **68** amb un 56% de rendiment després de les dues últimes reaccions, acoblament i desprotecció.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; MeOH 100%, R<sub>f</sub> = 0.2)

**Pf** (°C) 191-193 (exp.)

**<sup>1</sup>H-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.05 (12H, s, CH<sub>3</sub>), 1.42-1.53 (12H, m, CH<sub>2</sub>), 2.06 (4H, t, J = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>CO), 3.17 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.38 (8H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH o CH<sub>2</sub>O), 3.50 (20H, m, CH<sub>2</sub>O), 3.79 (2H, t, J = 4.4 Hz, CH), 5.42 (2H, ampla, NH<sub>2</sub>), 6.54 (4H, d, J = 2 Hz, C-NH), 7.03 (4H, dd, J = 2 Hz, CH-NH), 7.12 (2H, d, J = 1.2 Hz, Ar-H), 7.38 (1H, t, J = 1.2 Hz, Ar-H), 7.82 (2H, t, J = 5.6 Hz, NHCO), 8.30 (2H, t, J = 5.6 Hz, CONH)

**<sup>13</sup>C-RMN** (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 21.8, 22.2, 26.6, 34.0, 34.5, 35.8, 39.1, 40.2, 66.4, 69.6, 69.9, 70.2, 70.3, 70.3, 70.4, 113.7, 115.7, 136.1, 149.4, 155.2, 167.4, 172.9

**IR**,  $\nu$  (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1125, 1522, 1647 (C=O), 2871, 2935, 3323 (NH)

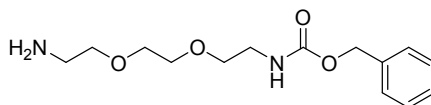
**UV-vis** (PBS 0.1M, pH=7.0)  $\lambda_{\text{max}}$  = 220 nm ( $\epsilon = 29635$ ), 320 nm ( $\epsilon = 2401$ )

**ESI-MS**: m/z = 1062.7 [M+H]<sup>+</sup>, 1084.7 [M+Na]<sup>+</sup>, 554.2 [M+2Na]<sup>+</sup>/2

**Anàlisi elemental**, C<sub>48</sub>H<sub>79</sub>N<sub>13</sub>O<sub>14</sub>·H<sub>2</sub>O·MeOH + 3% matèria inert, (%) calculat: C: 51.32, H: 7.47, N: 15.88; experimental: C: 50.55, H: 7.49, N: 15.99

### 5.3.6 Síntesi del compost 78

#### 5.3.6.1 Síntesi del 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamat de benzil<sup>158</sup> (69)



Es dissol 3,6-dioxaoctan-1,8-diamina (4.031g, 27.2 mmol) i trietilamina (0.6 mL, 8.4 mmol) en 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i es refreda a -45°C en un bany de nitrogen líquid i AcOEt. En un altre matràs es dissol el cloroformat de benzil (1.335 g, 7.8 mmol) en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'addiciona gota a gota a través d'un embut d'addició sobre la dissolució anterior durant 30 min. La mescla resultant s'agita a T.amb durant 12 h. A continuació s'extreu la fase orgànica amb H<sub>2</sub>O (3x25 mL), s'asseca la fase orgànica amb Na<sub>2</sub>SO<sub>4anh.</sub> i s'evapora. El cru de reacció es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 15 x 4.5 cm Ø) utilitzant com a eluent 500 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N (85/15/1) i 1 L de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N (80/20/1). S'obté el producte impurificat amb hidrocloreur de trietilamoni, per la qual cosa es purifica fent extraccions amb NaHCO<sub>3sat.</sub> (3x25 mL) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i NaCl<sub>sat.</sub> (2x25 mL), s'asseca la fase orgànica amb Na<sub>2</sub>SO<sub>4anh.</sub> s'evapora i s'obtenen 839 mg (2.97mmol) de producte esperat (**69**) en forma d'oli amb un 39% de rendiment.

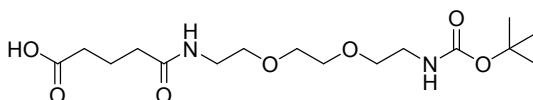
**CCF** (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 8/2; R<sub>f</sub> = 0.2)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.43 (2H, ampla, NH<sub>2</sub>), 2.84 (2H, t, J = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.39 (2H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.47-3.63 (8H, m, CH<sub>2</sub>O), 5.10 (2H, s, Ar-CH<sub>2</sub>), 5.52 (1H, ampla, NH), 7.34 (5H, m, Ar-H)

**IR**, ν (film, cm<sup>-1</sup>) 1538, 1716 (C=O), 2870, 2921, 3327

**ESI-MS**: m/z = 283.4 [M+H]<sup>+</sup>

#### 5.3.6.2 Síntesi del compost 70



Es dissolen l'anhídrid glutàric (507.5 mg, 4.45 mmol) i el 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamat de *tert*-butil (1024.8 mg, 4.13 mmol) en 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'addiciona la trietilamina (1.1 mL, 8.05 mmol). La mescla resultant s'agita a T.amb. sota atmosfera de nitrogen durant 24 h. Aleshores es para la reacció fent extraccions amb NaHSO<sub>4sat.</sub> (3x25 mL). S'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4anh.</sub> i s'obté 1.496 g (4.13 mmol) de producte desitjat (**70**) en forma d'oli amb un rendiment quantitatiu.

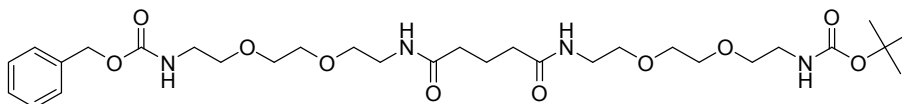
**CCF** (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 8/2; R<sub>f</sub> = 0.63)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.46 (9H, s, CH<sub>3</sub>), 1.98 (2H, quint, J = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.33 (4H, t, J = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.34 (2H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.5-3.63 (10H, m, CH<sub>2</sub>), 5.22 (1H, ampla, NH), 6.3 (1H, ampla, NH)

IR,  $\nu$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1539, 1653 (C=O), 1711 (C=O), 2870, 2924, 3328

ESI-MS:  $m/z = 363.5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $385.5$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$

### 5.3.6.3 Síntesi del compost 71



Es dissol l'àcid **70** (696 mg, 1.92 mmol) i l'amina **69** (471 mg, 1.67 mmol) en 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (filtrat a través d'alúmina bàsica) i es refreda en un bany de gel a  $0^\circ\text{C}$ . A continuació s'hi addiciona la DCC (564 mg, 2.73 mmol) dissolta en 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i s'agita a  $0^\circ\text{C}$  durant 1 h. i a T. amb durant 12 h. Aleshores s'extreu la mescla de reacció amb  $\text{NaHSO}_{4\text{sat.}}$  (3x25 mL) i amb  $\text{NaHCO}_{3\text{sat.}}$  (3x25 mL). S'asseca la fase orgànica amb  $\text{MgSO}_{4\text{anh.}}$ , s'evapora a sequedat i es purifica per cromatografia en columna ( $\text{SiO}_2$ , 12 x 3.5 cm  $\varnothing$ ) utilitzant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i augmentant la polaritat fins a  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (9/1). S'obté com a subproducte la *N*-acilisourea **72** (351 mg, 0.62 mmol, 37% rendiment) a més del producte desitjat (**71**) en forma d'oli (528 mg, 0.84 mmol, 50% rendiment).

#### Producte (**71**):

CCF ( $\text{SiO}_2$ ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9/1;  $R_f = 0.2$ )

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.44 (9H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.95 (2H, quint,  $J = 6.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.21 (4H, t,  $J = 6.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.34 (2H, dt,  $J_d = J_t = 5.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.47 (6H, dt,  $J_d = J_t = 5.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.50-3.60 (16H, m,  $\text{CH}_2$ ), 5.1 (2H, s, Ar- $\text{CH}_2$ ), 5.45 (2H, ampla, NH), 6.5 (2H, ampla, NH), 7.35 (5H, m, Ar-H)

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  (ppm) 21.9, 28.4, 35.1, 39.1, 40.2, 40.3, 40.8, 66.7, 69.7, 69.9, 70.0, 70.1, 128.0, 128.4, 156.4, 172.6

IR,  $\nu$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1252, 1540, 1654 (C=O), 1711 (C=O), 2871, 2933, 3325 (NH)

ESI-MS:  $m/z = 627.4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $649.4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$

#### Producte (**72**):

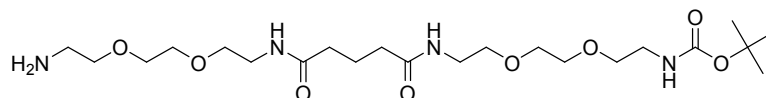
CCF ( $\text{SiO}_2$ ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9/1;  $R_f = 0.45$ )

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.15-1.8 (20H, m, Chx), 1.46 (9H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.99 (2H, quin,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.29 (2H, t,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.48 (2H, t,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.34 (2H, dt,  $J_d = J_t = 5.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.47 (2H, dt,  $J_d = J_t = 5.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.54-3.63 (8H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.95 (1H, ampla, NH), 5.10 (1H, ampla, NH), 6.22 (1H, ampla, NH)

IR,  $\nu$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1530, 1654 (C=O), 1700 (C=O), 2858, 2933, 3317 (NH)

ESI-MS:  $m/z = 591.4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$

## 5.3.6.4 Síntesi del compost 73



Es dissol el producte **71** (268 mg, 0.43 mmol) en 70 mL de MeOH, se li addiciona 10 mg de pal·ladi sobre carbó (10% p/p) i es bombolleja hidrogen durant unes 4 h. Es deixa 12 h. més sota atmosfera d'hidrogen i a continuació es comprova per CCF que la desprotecció ha finalitzat (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95/5; R<sub>f</sub> = 0.1). Tot seguit es filtra la mescla sobre Celite, s'evapora i s'obtenen 202 mg (0.41 mmol) de producte desitjat (**73**) que representen un 96% de rendiment.

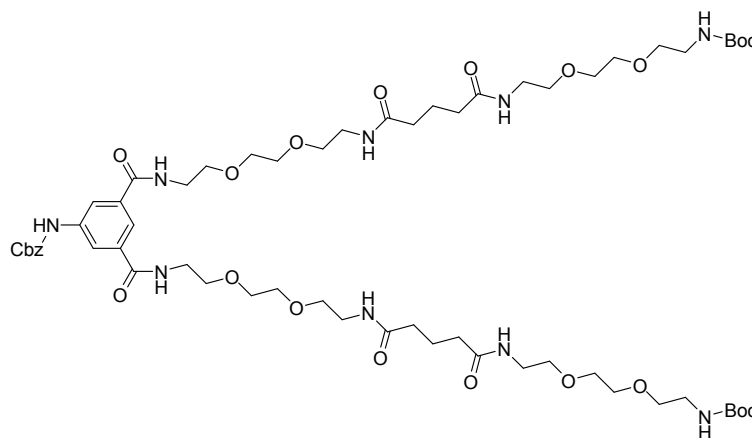
**CCF** (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 8/2; R<sub>f</sub> = 0.2)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.44 (9H, s, CH<sub>3</sub>), 1.95 (2H, quint, J = 6.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.15 (2H, ampla, NH<sub>2</sub>), 2.24 (4H, t, J = 6.2 Hz, CH<sub>2</sub>CO), 2.87 (2H, t, J = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>CO), 3.32 (2H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.52 (6H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.54-3.63 (16H, m, CH<sub>2</sub>O), 5.2 (1H, ampla, NH), 6.7 (1H, ampla, NH), 6.83 (1H, ampla, NH)

**IR**, υ (film, cm<sup>-1</sup>) 1539, 1652 (C=O), 1705 (C=O), 2869, 2926, 3067, 3305

**ESI-MS**: m/z = 493.6 [M+H]<sup>+</sup>

## 5.3.6.5 Síntesi del compost 74



Es dissol el compost **73** (417 mg, 0.85 mmol) en 40 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'addiciona 0.5 mL (3.5 mmol) de trietilamina acabada de destil·lar. En un altre matràs es dissol el 3,5-bis(2,3,5,6-tetrafluorofenoxycarbonyl)fenilcarbamat de benzil (**49**) (192 mg, 0.31 mmol) en 25 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'addiciona gota a gota sobre la dissolució anterior. La mescla s'agita sota atmosfera de nitrogen durant 12 h. a T.amb. Aleshores es comprova per CCF (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1/1) que la reacció s'ha completat. S'evapora la barreja, es redissol el cru de reacció en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'extreu amb NaHSO<sub>4sat.</sub> (3x50 mL), NaCl<sub>sat.</sub> (1x50 mL) i NaHCO<sub>3sat.</sub> (3x50 mL). S'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4anh.</sub>, s'evapora i es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 11 x 3.5 cm Ø) eluint amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9/1) i augmentant la polaritat fins a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (8/2). S'obté el producte desitjat (**74**) en forma d'oli

(356 mg, 0.28 mmol, 90% de rendiment), però en algun cas s'ha obtingut com a subproducte el producte de monosubstitució (**75**).

**Producte (74):**

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9/1; R<sub>f</sub> = 0.25)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1.43 (18H, s, CH<sub>3</sub>), 1.89 (4H, quint, J = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.17 (8H, t, J = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>CO), 3.28 (4H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.38 (8H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.50-3.61 (36H, m, CH<sub>2</sub>), 5.18 (2H, ampla, NH), 5.19 (2H, s, Ar-CH<sub>2</sub>), 6.66 (1H, ampla, NH), 6.85 (1H, t, J = 5.2 Hz, NH), 7.37 (5H, m, Ar-H), 7.92 (1H, t, J = 1.2 Hz, Ar-CH), 8.19 (2H, d, J = 1.2 Hz, Ar-H), 9.08 (2H, ampla, NH)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 22.1, 28.64, 35.4, 39.4, 40.2, 40.49, 67.2, 69.9, 69.9, 70.4, 70.5, 120.4, 120.5, 128.4, 128.6, 128.8, 135.9, 136.4, 139.7, 154.09, 167.1, 173.3

**IR**,  $\nu$  (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1542, 1654 (C=O), 1702 (C=O), 2871, 2921, 3303 (NH)

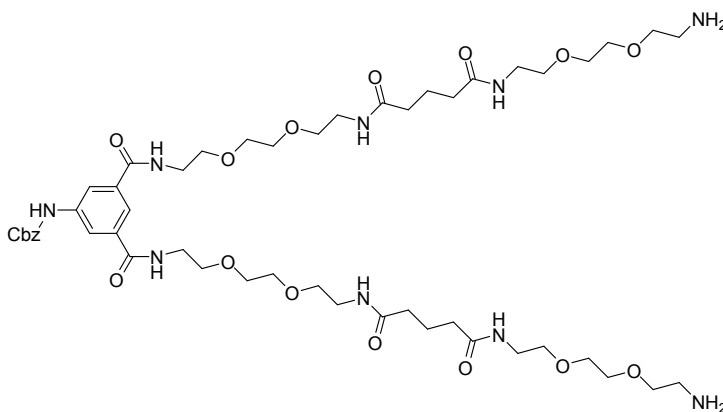
**ESI-MS**: m/z = 1265 [M+H]<sup>+</sup>, 633 [M+2H]<sup>+</sup>/2

**Producte (75):**

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9/1; R<sub>f</sub> = 0.75)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.43 (9H, s, CH<sub>3</sub>), 1.95 (2H, quint, J = 6.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.20 (4H, t, J = 6.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.32 (2H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH, CH<sub>2</sub>), 3.43-3.64 (22H, m, CH<sub>2</sub>), 5.05 (1H, br, NH), 5.23 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 6.5 (1H, ampla, NH), 6.65 (1H, ampla, NH), 7.05 (1H, m, TFF-H), 7.37 (5H, m, Ar-H), 8.05 (1H, s, Ar-H), 8.32 (1H, s, Ar-H), 8.75 (1H, ampla, NH), 8.80 (1H, s, Ar-H)

### 5.3.6.6 Síntesi del compost 76



A una dissolució del producte **75** (153 mg, 0.12 mmol) en 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se li addicionen 2 mL de TFA i es deixa amb agitació a T. amb, sota atmosfera de nitrogen, durant 8 h. Aleshores es comprova per CCF (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9/1) que la reacció s'ha completat. S'evapora el dissolvent, es redissol la barreja en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i NaHCO<sub>3sat.</sub>, i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x50 mL), s'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4anh.</sub> i s'evapora obtenint-se 66 mg (0.062 mmol) de producte desitjat (**76**) amb un 51% de rendiment.

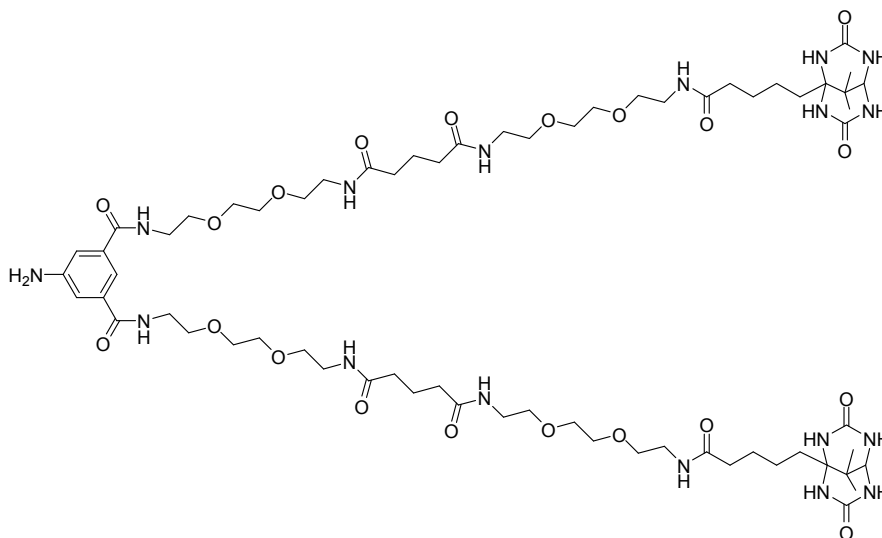


NOTA: Com que el rendiment és bastant baix, en properes ocasions, es deixarà el producte en forma de sal de TFA.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 8/2; R<sub>f</sub> = 0.15)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 1.85 (4H, quint, J = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.18 (8H, t, J = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.11 (4H, t, J = 5.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.37 (8H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.55 (8H, t, J = 5.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.60-3.70 (28H, m, CH<sub>2</sub>), 4.16 (11H, ampla, NH), 5.21 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 7.37 (5H, m, Ar-H), 7.93 (1H, t, J = 1.2 Hz, Ar-H), 8.03 (2H, d, J = 1.2 Hz, Ar-H)

### 5.3.6.7 Síntesi del compost 78



**Prova A:** A una dissolució del compost **5** (53 mg, 0.17 mmol), difenilfosforilazida (248 mg, 0.9 mmol) i trietilamina (0.1 mL, 0.7 mmol) en 20 mL de DMSO<sub>anh</sub> i se li addiciona la diamina **76** (65.6 mg, 0.062 mmol) dissolta en 10 mL de DMSO<sub>anh</sub> i s'agita a T. amb sota atmosfera de nitrogen durant 24 h. Aleshores s'addicionen 5 mL d'H<sub>2</sub>O i s'evapora la barreja a sequedat amb la bomba d'oli. El cru de reacció es renta amb Et<sub>2</sub>O per eliminar l'excés de DPPA. A continuació es purifica la barreja per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 17 x 3.5 cm Ø) eluint amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (8/2) i augmentant la polaritat fins a 100% MeOH. S'obtenen 50 mg del producte **77** impurificat amb gel de sílice, però prou pur per a la desprotecció següent. Aquest producte es desprotegeix dissolent-lo en 30 mL de MeOH, addicionant 10 mg de pal·ladi sobre carbó (10% p/p) i bombollejant hidrogen durant 24 h. Aleshores es filtra el catalitzador sobre Celite, s'evapora el dissolvent i s'obtenen 33 mg (0.02 mmol) de producte **78** que purificarem per HPLC ja que pot estar impurificat amb gel de sílice. Condicions de purificació en fase reversa: Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 4 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 6/4, tr = 11-18 min. S'obtenen 17 mg (0.01 mmol) de producte **78** que suposen un 19% de rendiment total de les dues reaccions, acoblament i desprotecció.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; MeOH 100%; R<sub>f</sub> = 0.1; fluorescent a λ = 365 nm)

**Pf** (°C) 115-120 (exp.)

**HPLC** (Kromasil C18, columna analítica, f = 0.8 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 6/4, tr = 11.4 min)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ (ppm) 1.20 (12H, s, CH<sub>3</sub>), 1.52 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 1.63 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 1.72 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 1.87 (4H, quint, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.20 (8H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>CO), 2.25 (4H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>CO), 3.35 (12H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.50-3.67 (36H, m, CH<sub>2</sub>), 4.06 (2H, s, CH), 7.23 (2H, d, J = 1.6 Hz, Ar-H), 7.48 (1H, t, J = 1.6 Hz, Ar-H)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) δ (ppm) 21.5, 22.8, 23.0, 27.3, 34.8, 34.9, 36.2, 36.6, 40.3, 41.0, 67.3, 70.6, 71.3, 71.4, 71.4, 71.4, 115.6, 117.3, 137.1, 150.1, 158.0, 170.2, 175.5, 175.6, 176.0

**IR**,  $\nu$  (film, cm<sup>-1</sup>) 1540, 1651 (C=O), 2872, 2929, 3077, 3282

**ESI-MS**: m/z = 756.0 [M+2Na]<sup>+</sup>/2, 743.4 [M+H+Na]<sup>+</sup>/2, 732 [M+2H]<sup>+</sup>/2

**Prova B**: S'ha realitzat la mateixa reacció i en les mateixes condicions però partint del trifluoroacetat de l'amina **76**. Després de purificar per HPLC semi-preparatiu (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 4 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 6/4, tr = 14-20 min) el resultat que s'ha obtingut ha estat la formació majoritària d'un subproducte **79** (47.5 mg, 0.33 mmol).

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; MeOH 100%; R<sub>f</sub> = 0.4; fluorescent a  $\lambda$  = 365 nm)

**Pf** (°C) 115-117 (exp.)

**HPLC** (Kromasil C18, columna analítica, f = 0.8 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 4/6, tr = 11.5 min)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ (ppm) 1.20 (6H, s, CH<sub>3</sub>), 1.52 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.63 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.72 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.87 (4H, quint, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.20 (8H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>CO), 2.25 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>CO), 3.18 (2H, dt, J<sub>d</sub> = 11.6 Hz, J<sub>t</sub> = 6 Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.33-3.37 (8H, m, CH<sub>2</sub>), 3.44 (2H, t, J = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.50-3.67 (36H, m, CH<sub>2</sub>), 4.06 (1H, s, CH), 7.23 (8H, m, Ar-H), 7.37 (4H, m, Ar-H), 7.48 (1H, s, Ar-H)

**IR**,  $\nu$  (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1540, 1558, 1653 (C=O), 1683 (C=O), 2872, 2935, 3303

**ESI-MS**: m/z = 1451.6 [M+Na]<sup>+</sup>, 737.5 [M+2Na]<sup>+</sup>/2

**Anàlisi elemental**, C<sub>66</sub>H<sub>102</sub>N<sub>13</sub>O<sub>20</sub>P·2H<sub>2</sub>O·MeOH, (%) calculat: C: 53.77, H: 7.41, N: 12.17;

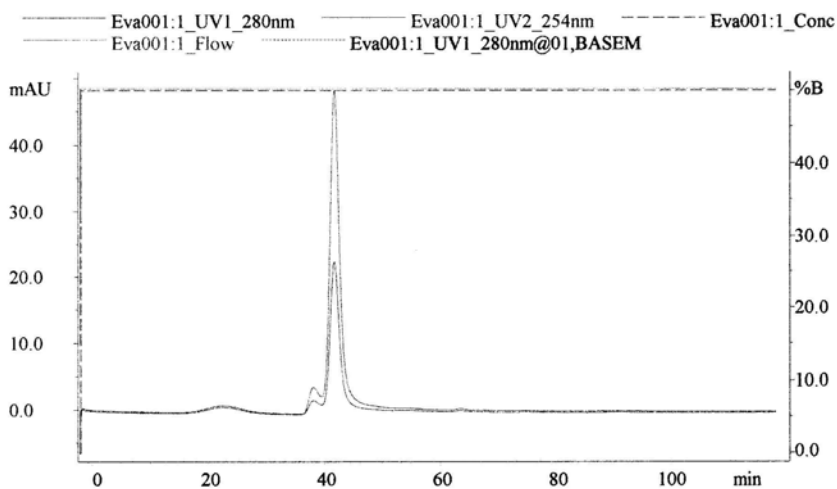
experimental: C: 53.30, H: 7.34, N: 11.92

### 5.3.7 Mesures d'interaccions no-covalents lligand-proteïna través de GPC

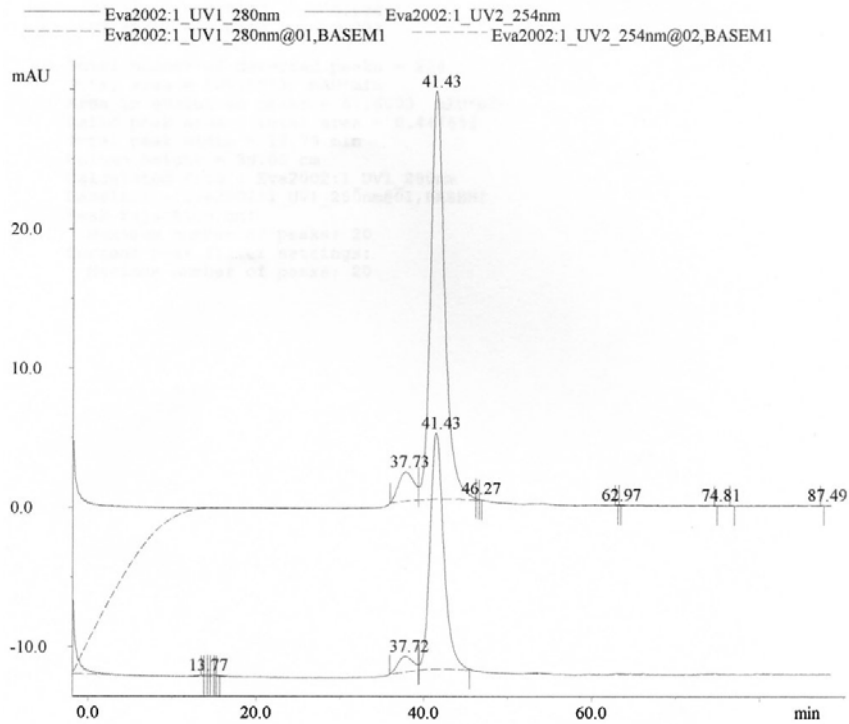
Per a les mesures de cromatografia per exclusió de tamany es va utilitzar una columna Superosa 12 HR 10/30 pre-compactada (Pharmacia LKB Biotechnology). Aquesta columna està formada per un medi basat en agarosa en forma de cross-linking, el qual permet la filtració per gel de biomolècules a alta resolució. Amb aquestes condicions es pot treballar amb rangs de masses de 1000-300000 UMA. El tampó utilitzat consisteix en una dissolució de NaCl 0.15 M, PBS 0.05 M i s'ajusta la dissolució a pH = 7.0. El flux de treball és de 0.4 mL/min i el detector permet enregistrar els cromatogrames a dues longituds d'ona  $\lambda = 280$  nm i  $\lambda = 254$  nm, a una velocitat d'escombrat de 0.5 cm/min.

Es preparen les mostres dissolent els lligands i la proteïna en el tampó. Aleshores es valora la quantitat de Av activa en dissolució a través d'una valoració espectrofotomètrica amb HABA<sup>16</sup> i a partir de la concentració coneguda d'Av ([Sub-unitats] = 52  $\mu$ M), es preparen les barreges d'Av-lligand amb la relació molar que ens interessa i es realitzaran les mesures de la seva afinitat a través de la columna Superosa 12. Els cromatogrames s'enregistren durant 1 h., ja que és el temps màxim que triguen en eluir cadascun dels lligands estudiats.

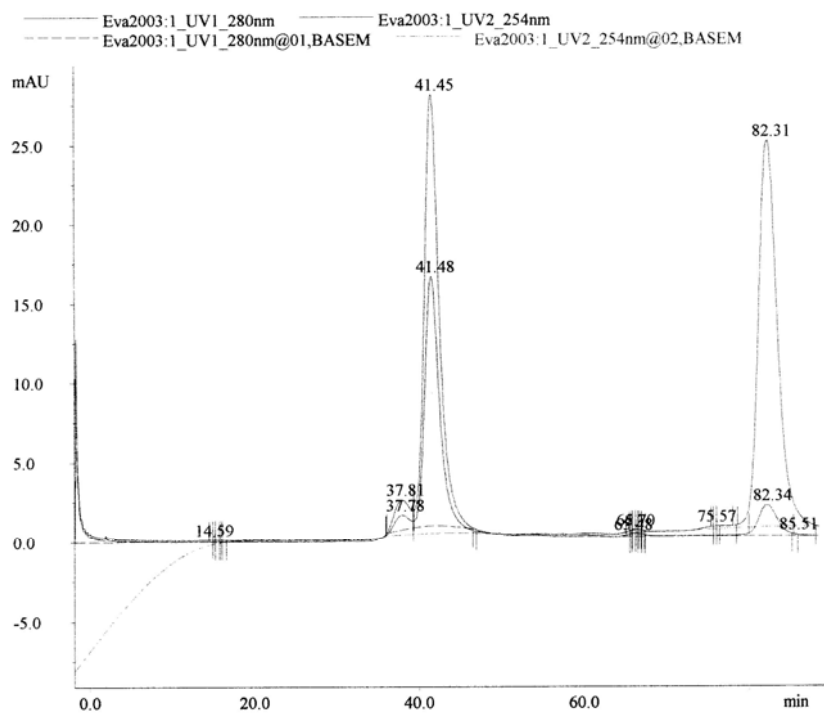
Cromatogrames obtinguts de les barreges entre Av i els lligands divalents estudiats utilitzant la columna de GPC Superosa 12, tal com es descriu a la part experimental.



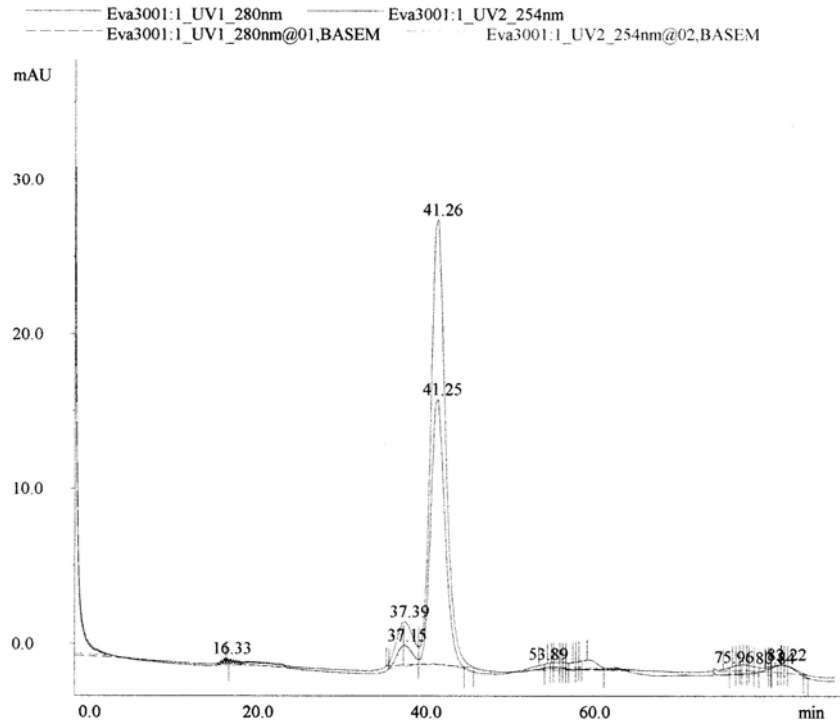
**Cromatograma 1:** Cromatograma de GPC de l'Av enregistrat a  $\lambda = 280$  nm i 254 nm.



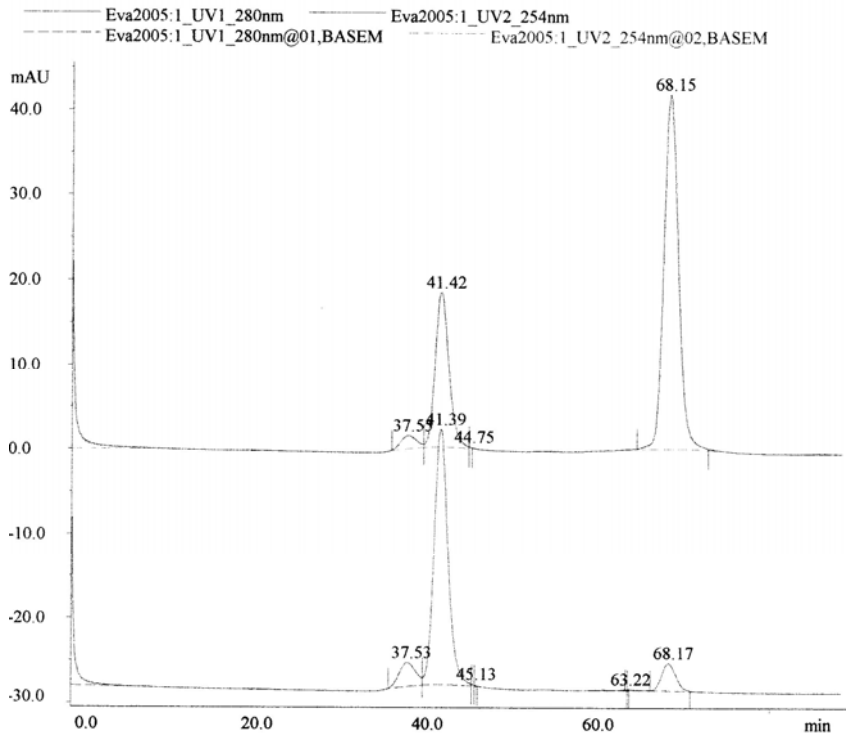
**Cromatograma 2:** Cromatograma de GPC de la barreja 54/Av ([L]/[S] = 0.59 enregistrat a  $\lambda = 280$  nm i 254 nm.



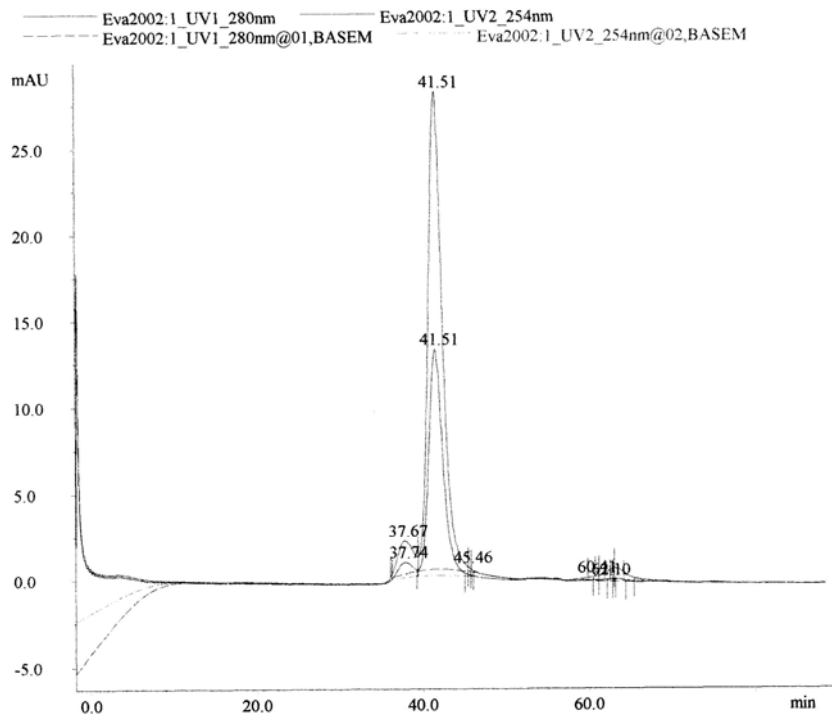
**Cromatograma 3:** Cromatograma de GPC de la barreja 54/Av ([L]/[S] = 5.0 enregistrat a  $\lambda = 280$  nm i 254 nm.



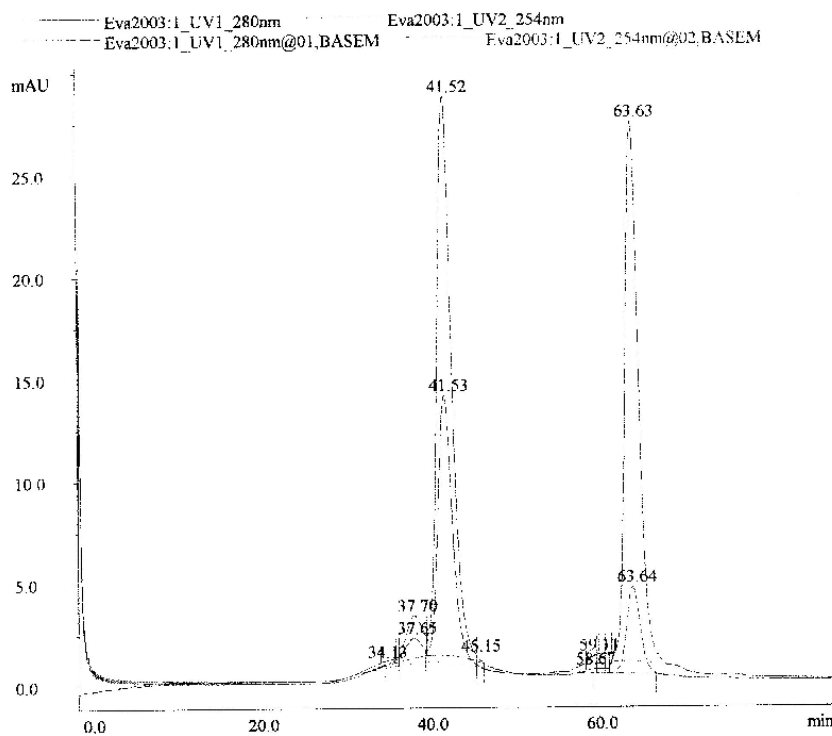
**Cromatograma 4:** Cromatograma de GPC de la barreja **59/Av** ( $[L]/[S] = 0.63$  enregistrat a  $\lambda = 280$  nm i 254 nm.



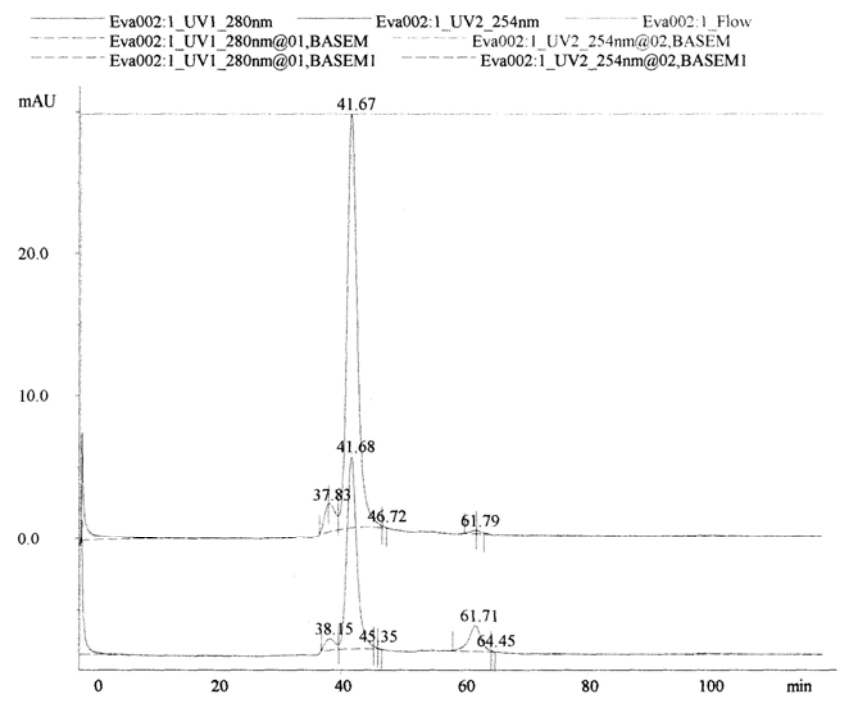
**Cromatograma 5:** Cromatograma de GPC de la barreja **59/Av** ( $[L]/[S] = 5.05$  enregistrat a  $\lambda = 280$  nm i 254 nm.



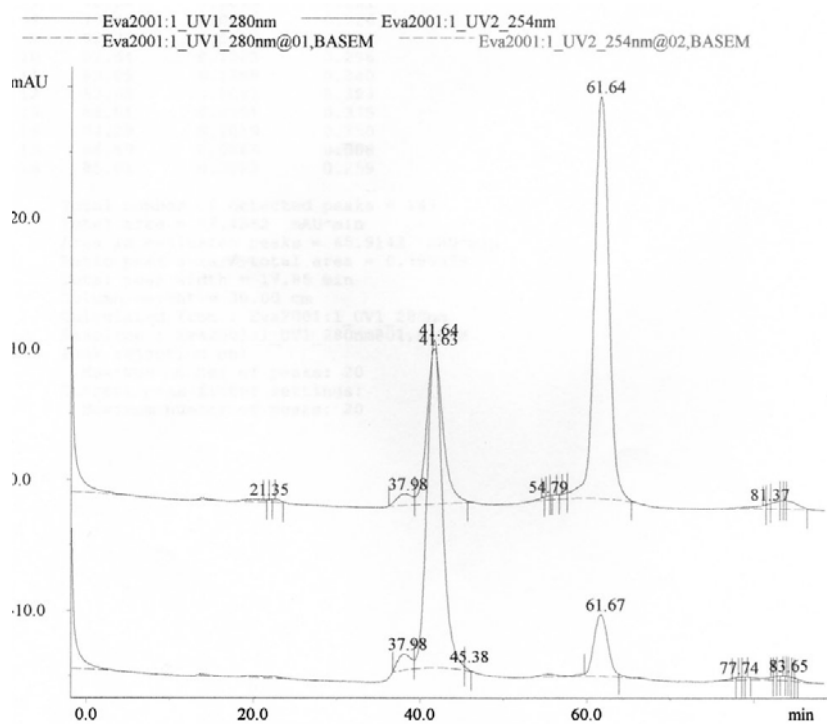
**Cromatograma 6:** Cromatograma de GPC de la barreja 63/Av ([L]/[S] = 0.53 enregistrat a  $\lambda = 280$  nm i 254 nm.



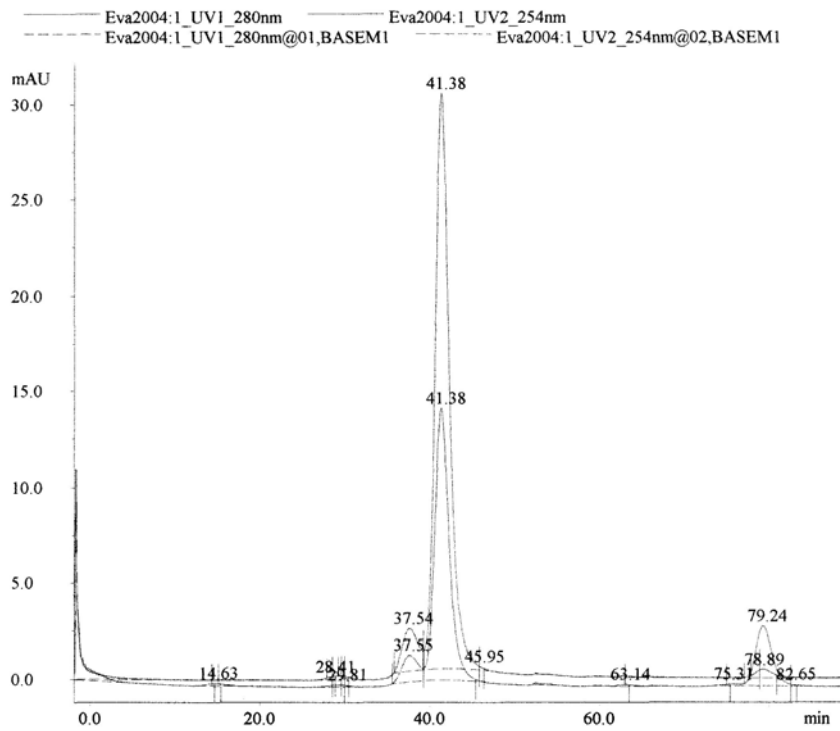
**Cromatograma 7:** Cromatograma de GPC de la barreja 63/Av ([L]/[S] = 5.07 enregistrat a  $\lambda = 280$  nm i 254 nm.



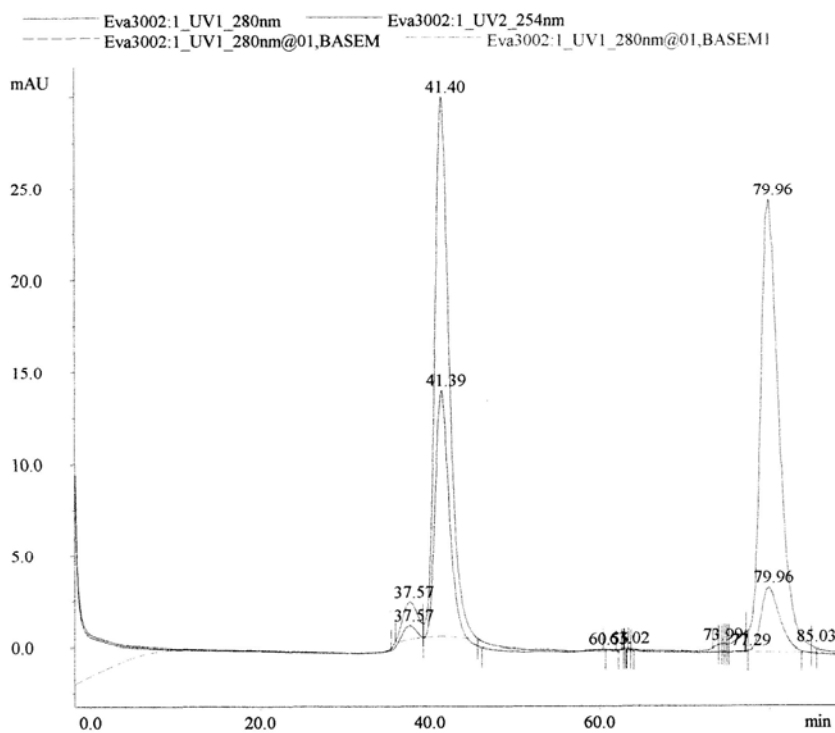
**Cromatograma 8:** Cromatograma de GPC de la barreja 68/Av ( $[L]/[S] = 0.57$  enregistrat a  $\lambda = 280$  nm i 254 nm.



**Cromatograma 9:** Cromatograma de GPC de la barreja 68/Av ( $[L]/[S] = 5.09$  enregistrat a  $\lambda = 280$  nm i 254 nm.



**Cromatograma 10:** Cromatograma de GPC de la barreja 78/Av ( $[L]/[S] = 0.63$  enregistrat a  $\lambda = 280$  nm i 254 nm.

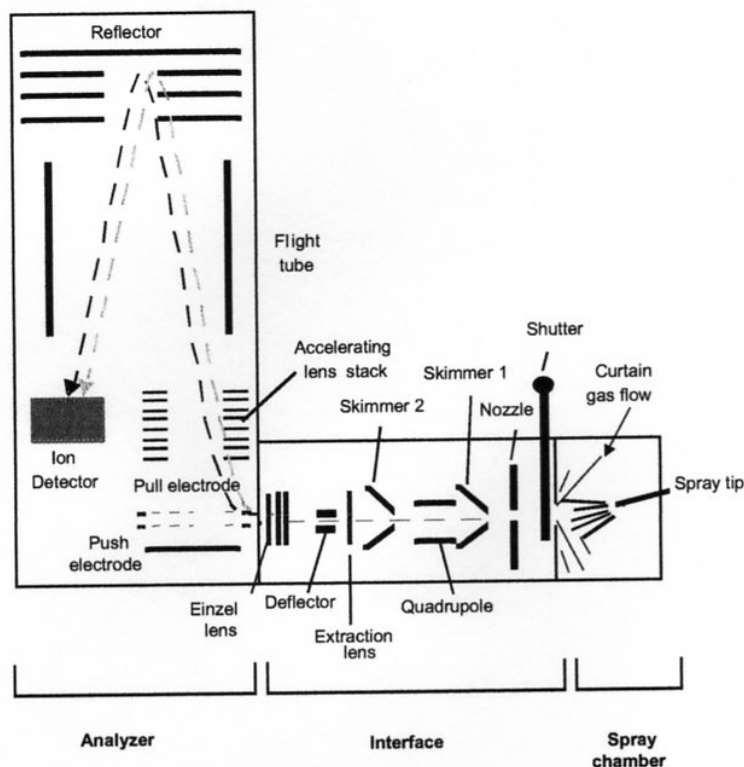


**Cromatograma 11:** Cromatograma de GPC de la barreja 78/Av ( $[L]/[S] = 0.63$  enregistrat a  $\lambda = 280$  nm i 254 nm.



### 5.3.8 Mesures d'interaccions no-covalents lligand-proteïna través de ESI-TOF

Es van realitzar estudis d'associació a través d'interaccions no-covalents entre els lligands divalents sintetitzats i l'avidina mitjançant un aparell "Mariner Applied Biosystems", en el qual es produeix la ionització de la mostra suau per electro spray (ESI) i la detecció es du a terme amb un detector TOF.



**Esquema 82:** Parts del espectròmetre de masses ESI-TOF Mariner (Applied Biosystems)

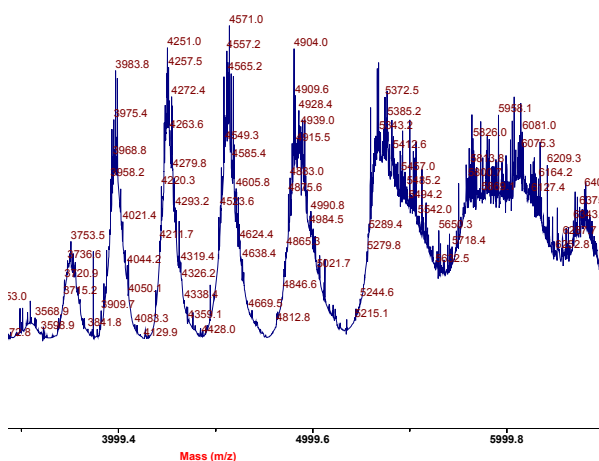
Com a patró de calibratge de l'aparell pel seu ús amb proteïnes es va utilitzar Mioglobina (Myo) dissolta en tampó  $\text{NH}_4\text{Ac}$  10 mM a  $\text{pH} = 7$ . Com a fase mòbil es va utilitzar el mateix tampó i es va treballar a un  $f = 5 \mu\text{L}/\text{min}$ . Els paràmetres òptims de l'aparell trobats per a realitzar aquestes mesures eren: Nozzle Potential = 80 V, Quadrupole RF Voltage = 1600 V, Nozzle Temperature =  $160^\circ\text{C}$ .

Les mostres es preparen dissolent l'Av ( $[\text{S}] = 42 \mu\text{M}$ ) en tampó  $\text{NH}_4\text{Ac}$  10 mM a  $\text{pH} = 7$ , calculant la concentració de proteïna activa mitjançant una valoració espectrofotomètrica amb HABA i a partir d'aquesta concentració es calcula el volum de dissolució de cada lligand en el mateix tampó que cal afegir per obtenir la relació molar desitjada.

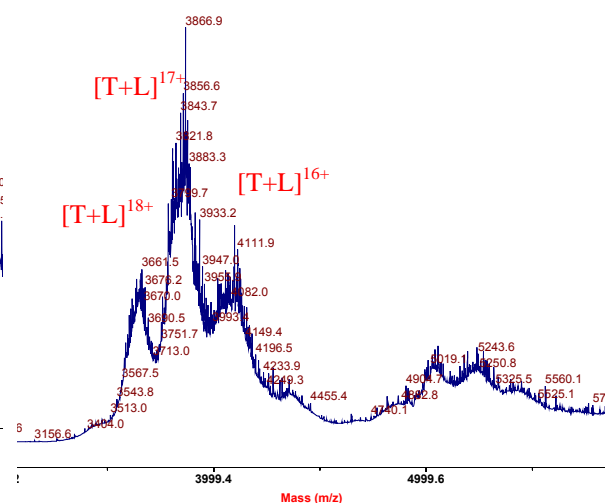
Espectres obtinguts de les mesures per ESI-TOF de dissolucions d'Av amb els respectius lligands.



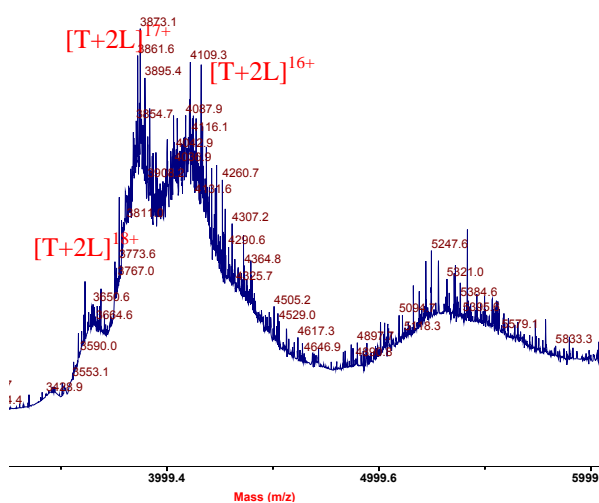
g) 41 / Av (R = 9.2)



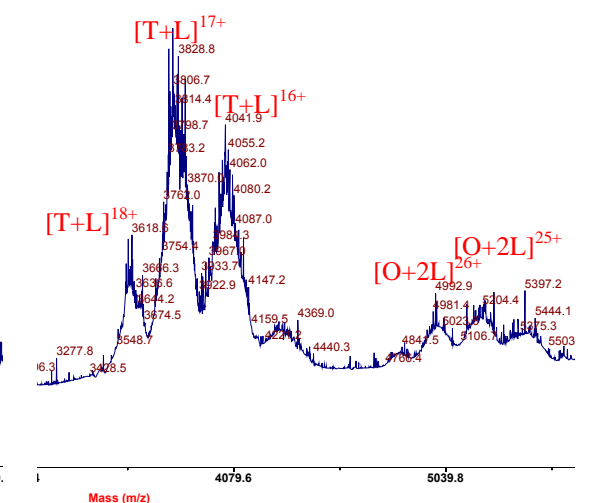
h) 63 / Av (R = 0.84)



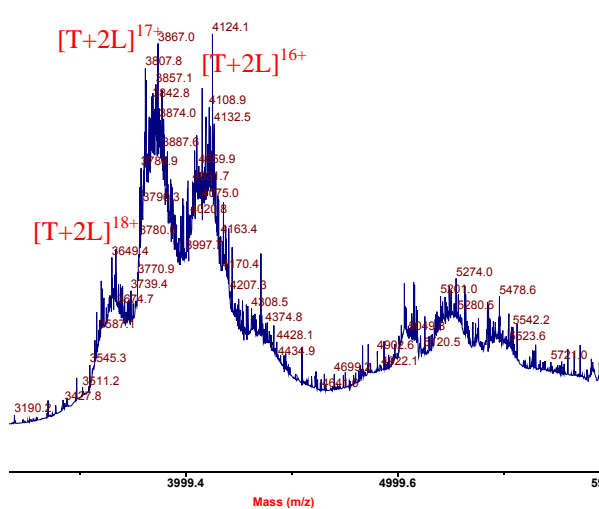
i) 63 / Av (R = 1.68)



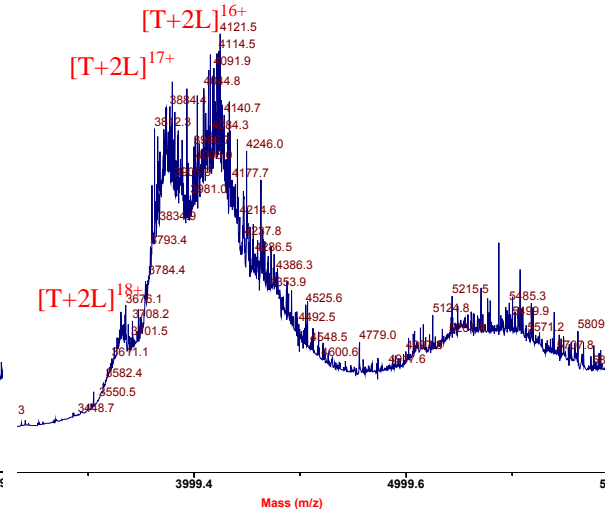
j) 68 / Av (R = 0.46)



k) 68 / Av (R = 1)



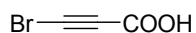
l) 68 / Av (R = 1.65)





## 5.4 Lligands divalents semi-rígid de tipus acetilènic

### 5.4.1 Síntesi de l'àcid 3-bromopropinoic<sup>135</sup>



Es prepara una dissolució d'hipobromit de sodi (solució A) afegint Br<sub>2</sub> (2 mL) a 20 mL d'una dissolució aquosa de NaOH (3.4 g) amb refrigeració. Mentrestant es prepara la solució B afegint carbonat de sodi (1.54 g) a 15 mL d'una solució aquosa que conté l'àcid propinoic (2.084 g, 29.77 mmol). Aleshores la solució A s'afegeix sobre la solució B i la mescla es deixa reaccionar durant 30 min a T.amb. Tot seguit la mescla es refreda en un bany de gel i s'ajusta a pH = 3 per addició d'HCl<sub>conc.</sub> A continuació la barreja s'extreu amb AcOEt i la fase orgànica es renta amb H<sub>2</sub>O, s'asseca i s'evapora obtenint-se un oli que es purifica per sublimació (P = 6 mmHg, T ≤ 100°C ja que sinó es produeixen reaccions secundàries). Finalment s'obté l'àcid 3-bromopropinoic (1.85 g, 12.4 mmol) en forma d'agulles blanquinoses amb un 42% de rendiment.

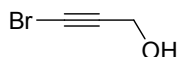
**CCF** (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 7/3; R<sub>f</sub> = 0.39)

**Pf.** (°C) 80-84 (84 lit.)<sup>159</sup>

**IR**,  $\nu$  (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1247, 1642 (C=O), 2199 (C≡C), 3420 (COOH)

**ESI-MS**: m/z = 160.9 [M-H]<sup>-</sup>, 162.9 [M-H]<sup>-</sup>

### 5.4.2 Síntesi del 3-bromo-2-propin-1-ol<sup>136</sup>



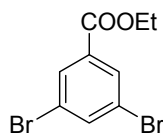
Es prepara una solució d'hidròxid de potassi (50.2 g, 896 mmol) en 200 mL d'H<sub>2</sub>O i es refreda en un bany de gel i sal (-5 a 0°C). S'afegeix el brom (20.5 g, 128 mmol) lentament i s'agita durant 15 min a 0°C. A continuació s'addiciona el 2-propin-1-ol (9.6 g, 171.8 mmol) gota a gota amb un embut d'addició. La barreja s'agita 30 min. a 0°C i es deixa escalfar a T.amb. A continuació s'extreu amb Et<sub>2</sub>O (4x100 mL), s'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora obtenint-se el producte desitjat en forma de líquid marró (13.8 g, 102.26 mmol) amb un 60% de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; hexà/AcOEt 8/2; R<sub>f</sub> = 0.15)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.77 (1H, s, OH), 4.30 (2H, s, CH<sub>2</sub>)

**IR**,  $\nu$  (film, cm<sup>-1</sup>) 1050 (CH<sub>2</sub>-OH), 1678, 2216 (C≡C), 3327 (O-H)

### 5.4.3 Síntesi del 3,5-dibromobenzoat d'etil<sup>88</sup>



A una solució d'àcid 3,5-dibromobenzoic (1.0 g, 3.57 mmol) en Et<sub>2</sub>O (20 mL) s'addiciona EtOH<sub>abs.</sub> (4 mL). A continuació s'addiciona la DCC (903 mg, 4.38 mmol) i DMAP en quantitat catalítica (48 mg, 0.39 mmol) dissoltes en Et<sub>2</sub>O. Es deixa agitant a temperatura ambient sota atmosfera de nitrogen durant tota la nit.

Passades 24 hores, es filtra la DCU formada amb una placa filtrant del núm. 4. La fase etèria s'extreu amb H<sub>2</sub>O (3x50 mL), AcOH 10% (3x50mL), H<sub>2</sub>O (1x50 mL) i NaCl<sub>sat.</sub> (1x50 mL). La fase orgànica s'asseca amb MgSO<sub>4</sub>, es filtra i s'evapora. Tot seguit es purifica per cromatografia en columna per tal d'eliminar les restes de DCU (SiO<sub>2</sub>, 4 x 4.5 cm Ø, hexà/AcOEt ; 5/1). S'obté el producte desitjat (933 mg, 3.03 mmol) amb un 85% de rendiment.

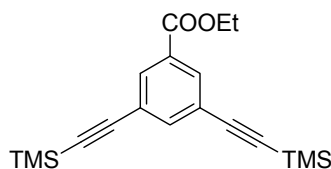
**Pf. (°C)** 58-59 (58 lit.)<sup>160</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.40 (3H, t, J = 7.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 4.39 (2H, q, J = 7.4 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.75 (1H, m, Ar-H), 8.10 (2H, m, Ar-H)

**IR**,  $\nu$  (film, cm<sup>-1</sup>) 1262, 1415, 1558, 1725 (C=O), 2981

**CI-MS:** (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) m/z = 306.1, 308.1, 310.1

### 5.4.4 Síntesi del 3,5-bis(trimetilsililetinil)benzoat d'etil (83)



#### A pressió atmosfèrica:

**Prova A:** Una barreja de 3,5-dibromobenzoat d'etil (154 mg, 0.5 mmol), Pd(dba)<sub>2</sub> (11.5 mg, 0.02 mmol), iodur de coure (I) (3.81 mg, 0.02 mmol), trifenilfosfina (24.9 mg, 0.095 mmol), trimetilsililacetilè (294.6 mg, 3 mmol) i trietilamina (0.46 mL, 3.25 mmol) s'agiten en 50 mL de THF<sub>anh.</sub> sota atmosfera de nitrogen a reflux durant 24 hores. Aleshores la barreja de reacció es tracta amb Et<sub>2</sub>O, es filtra sobre Celite, s'aboca sobre una solució de HCl 1M i s'extreu amb Et<sub>2</sub>O (3x50 mL). La fase orgànica s'extreu amb NaHCO<sub>3sat</sub> (3x50 mL) i H<sub>2</sub>O (1x50 mL). Tot seguit s'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora. A continuació es redissol en hexà i es filtra sobre Celite. El filtrat es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 10 x 4.5 cm Ø, hexà/AcOEt; 98/2). S'obté el producte desitjat (165 mg, 0.48 mmol) en forma d'oli groguenc amb un 96% de rendiment.

**Prova B:** Una barreja de 3,5-dibromobenzoat d'etil (154 mg, 0.5 mmol), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (14.0 mg, 0.02 mmol), iodur de coure (I) (3.81 mg, 0.02 mmol), trifenilfosfina (24.9 mg, 0.095 mmol),

trimetilsililacetilè (294.6 mg, 3 mmol) i trietilamina (0.46 mL, 3.25 mmol) s'agiten en 50 mL de THF<sub>anh</sub> sota atmosfera de nitrogen a reflux durant 24 hores. Es segueix el mateix procediment de purificació que en el cas anterior. S'obté el producte desitjat (172 mg, 0.5 mmol) amb un rendiment quantitatiu.

**Amb microones:**<sup>134</sup>

**Prova C:** Una barreja de 3,5-dibromobenzoat d'etil (154 mg, 0.5 mmol), Pd(dba)<sub>2</sub> (11.5 mg, 0.02 mmol), iodur de coure (I) (3.81 mg, 0.02 mmol), trifenilfosfina (24.9 mg, 0.095 mmol), trimetilsililacetilè (294.6 mg, 3 mmol) i trietilamina (0.46 mL, 3.25 mmol) s'agiten en 7 mL de THF<sub>anh</sub> sota atmosfera de nitrogen en un vial segellat tipus Smith a 120°C durant 25 min. en una cavitat de microones. La barreja de reacció es purifica seguint el mateix procediment que en les reaccions a pressió atmosfèrica. En aquest cas no s'obté el producte desitjat, obtenint-se en el seu lloc els reactius de partida.

**Prova D:** Una barreja de 3,5-dibromobenzoat d'etil (154 mg, 0.5 mmol), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (14.0 mg, 0.02 mmol), iodur de coure (I) (3.81 mg, 0.02 mmol), trifenilfosfina (24.9 mg, 0.095 mmol), trimetilsililacetilè (294.6 mg, 3 mmol) i trietilamina (0.46 mL, 3.25 mmol) s'agiten en 7 mL de DMF sota atmosfera de nitrogen en un vial segellat tipus Smith a 120°C durant 25 min. en una cavitat de microones. La barreja de reacció es purifica seguint el mateix procediment que en el cas anterior. S'obté el producte desitjat (149 mg, 0.44 mmol) amb un rendiment del 87%.

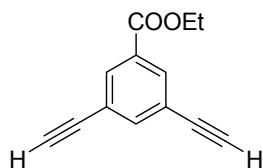
**CCF** (SiO<sub>2</sub>; hexà/AcOEt, 98/2; R<sub>f</sub> = 0.45)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 0.26 (18H, s, CH<sub>3</sub>Si) 1.38 (3H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 4.38 (2H, q, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.72 (1H, m, Ar-H), 8.04 (2H, m, Ar-H)

**IR**, ν (film, cm<sup>-1</sup>) 1224, 1249, 1729 (C=O), 2157 (C≡C), 2897, 2958

**ESI-MS:** m/z = 343.4 [M+H]<sup>+</sup>, 360.4 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>

**5.4.5 Síntesi del 3,5-dietinilbenzoat d'etil (84)**<sup>145</sup>



En una dissolució del 3,5-bis-(trimetilsililetinil)benzoat d'etil (352 mg, 1.03 mmol) en THF (15 mL) s'addiciona l'àcid acètic (0.13 mL, 2.11 mmol) i el fluorur de tetrabutilamoni (TBAF) 1.0 M en THF (2.12 mL, 2.11 mmol). La mescla s'agita a temperatura ambient durant 5 min. i s'evapora. Tot seguit es redissol en aigua i s'extreu amb Et<sub>2</sub>O (3 x 50 mL), s'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora. A continuació es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 13 x 4.5 cm Ø, hexà/AcOEt; 95/5). S'obté el producte desitjat en forma de sòlid (169 mg, 0.85 mmol) amb un 83% de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; hexà/AcOEt, 95/5; R<sub>f</sub>=0.3)

**Pf. (°C)** 90-94 (92-94 lit.)<sup>145</sup>

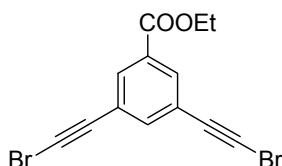
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.40 (3 H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 3.15 (2H, s, C≡CH), 4.38 (2H, q, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.76 (1H, t, J = 1.8 Hz, Ar-H), 8.12 (2H, d, J = 1.8 Hz, Ar-H)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 14.3, 61.5, 78.9, 81.7, 123.0, 131.2, 133.2, 139.2, 165.0

**IR**, ν (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1226, 1307, 1589, 1712 (C=O), 2114 (C≡C), 2982, 3266.

**ESI-MS**: m/z = 199 [M+H]<sup>+</sup>, 221 [M+Na]<sup>+</sup>

#### 5.4.6 Síntesi del 3,5-bis(2-bromoetil)benzoat d'etil (85)<sup>146</sup>



En una dissolució de 3,5-dietinilbenzoat d'etil (246 mg, 1.24 mmol) en 50 mL d'acetona, s'afegeix la *N*-bromosuccinimida (NBS, 486.5 mg, 2.73 mmol) i el nitrat de plata (AgNO<sub>3</sub>, 42 mg, 0.25 mmol). La mescla s'agita 12 h. a temperatura ambient sota atmosfera de nitrogen. Seguidament es filtra la mescla sobre Celite, s'evapora i es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>; 9 x 4.5 cm Ø; hexà/AcOEt, 98/2). S'obté el producte desitjat en forma de sòlid groguenc (364 mg, 1.02 mmol) amb un 82% de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; hexà/AcOEt, 8/2; Rf = 0.7)

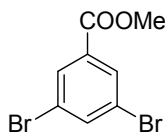
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.40 (3 H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 4.38 (2H, q, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.67 (1H, t, J = 1.8 Hz, Ar-H), 8.07 (2H, d, J = 1.8 Hz, Ar-H)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 14.6, 52.5, 61.9, 78.6, 123.9, 131.6, 133.3, 139.2, 165.2

**IR**, ν (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1227, 1323, 1592, 1723 (C=O), 2197 (C≡C), 2980.

**CI-MS**: (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) m/z = 354.1, 356.1, 358.1 [M], 372.1, 374.1, 376.1 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>

#### 5.4.7 Síntesi del 3,5-dibromobenzoat de metil<sup>141</sup>



A una solució d'àcid 3,5-dibromobenzoic (1.0 g, 3.57 mmol) en 10 mL de MeOH, s'addiciona H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>conc. (1.2 mL, 21.4 mmol) gota a gota. La barreja s'escalfa a reflux durant 4 hores. A continuació es neutralitza amb NaHCO<sub>3</sub>sat. i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x50 mL). La fase orgànica s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora. S'obté el producte desitjat en forma de sòlid marró (1.02 g, 3.47 mmol) amb un 97 % de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 9/1; Rf = 0.9)

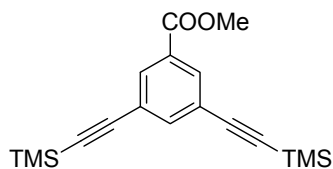
**Pf. (°C)** 60-62 (62-63 lit.)<sup>161</sup>



$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 3.93 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 7.84 (1H, t,  $J = 1.6$  Hz, Ar- $H$ ), 8.10 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, Ar- $H$ )

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 52.7, 123.0, 131.3, 133.2, 138.2, 164.5

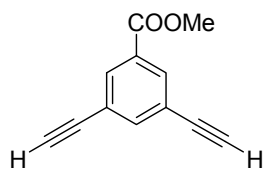
#### 5.4.8 Síntesi del 3,5-bis(trimetilsililetinil)benzoat de metil (**87**)



Una barreja de 3,5-dibromobenzoat de metil (294 mg, 1 mmol), clorur de coure (I) (7.6 mg, 0.035 mmol),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (28.07 mg, 0.04 mmol), trifenilfosfina (49.84 mg, 0.19 mmol), trietilamina (656.5 mg, 6.5 mmol) i trimetilsililacetilè (589.3 mg, 6 mmol) en 5 mL de DMF s'agita sota atmosfera de nitrogen en un vial de tipus Smith al microones durant 25 min. a  $120^\circ\text{C}$ . La barreja de reacció es purifica seguint el mateix procediment descrit per al corresponent èster etílic (apartat 5.4A) obtenint-se el producte desitjat en forma d'oli (310 mg, 0.94 mmol) amb un 94 % de rendiment.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 0.25 (18H, s,  $\text{SiCH}_3$ ) 3.92 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 7.72 (1H, t,  $J = 1.6$  Hz, Ar- $H$ ), 8.04 (2H, d,  $J = 1.6$  Hz, Ar- $H$ )

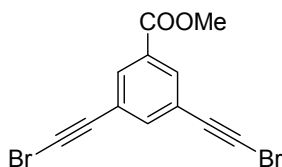
#### 5.4.9 Síntesi del 3,5-dietinilbenzoat de metil (**88**)



A una dissolució de 3,5-bis(trimetilsililetinil)benzoat de metil (310 mg, 0.94 mmol) en 15 mL de THF, s'addiciona el TBAF (1.89 mL, 1.89 mmol) i AcOH (0.11 mL, 1.89 mmol) com amb el corresponent èster etílic (**83**). La barreja de reacció es purifica seguint el mateix procediment que amb el corresponent èster etílic (**83**). S'obté el producte desitjat (134 mg, 0.73 mol) amb un 77 % de rendiment.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm) 3.14 (2H, s,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 3.92 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 7.76 (1H, t,  $J = 1.6$  Hz, Ar- $H$ ), 8.12 (2H, d,  $J = 1.6$  Hz, Ar- $H$ )

#### 5.4.10 Síntesi del 3,5-bis(2-bromoetil)benzoat de metil (89)

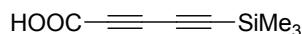


A una dissolució de 3,5-dietinilbenzoat de metil (87 mg, 0.47 mmol), s'addiciona NBS (184.03 mg, 1.03 mmol) i  $\text{AgNO}_3$  (16.0 mg, 0.09 mmol) com amb el corresponent èster etílic (**84**). La barreja de reacció es purifica seguint el mateix procediment que amb el corresponent èster etílic (**84**), obtenint-se el producte desitjat (165 mg, 0.47 mmol) en forma de sòlid blanquinós amb un rendiment quantitatiu.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 3.91 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 7.66 (1H, t,  $J = 1.6$  Hz, Ar-H), 8.06 (2H, d,  $J = 1.6$  Hz, Ar-H)

IR,  $\nu$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1733 (C=O), 2195 (C $\equiv$ C), 2924, 2955

#### 5.4.11 Intents de síntesi de l'àcid 5-(trimetilsilil)pentadiinoic (90)



##### Procediment general:

Es dissol l'àcid 3-bromopropinoic i el trimetilsililacetilè en l'amina i s'addiciona el catalitzador. La barreja resultant es deixa reaccionar a T.amb sota atmosfera de nitrogen entre 30 min i 2 h segons la prova. A continuació s'evapora el dissolvent i el cru de reacció es redissol en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i s'extreu amb  $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat.}}$  i  $\text{NaHSO}_4_{\text{sat.}}$ , s'asseca la fase orgànica amb  $\text{MgSO}_4$  i s'evapora a sequedat. A continuació s'analitza per IR i CCF ( $\text{SiO}_2$ ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ , 70/30/4).

Prova A: Es parteix de l'àcid 3-bromopropinoic (102.0 mg, 0.68 mmol), TMSA (158 mg, 1.61 mmol) i CuI (19.9 mg, 0.1 mmol) dissolts en 1.5 mL de N-metilpirrolidina i 1.5 mL de THF. S'agita 30 min. a T.amb, tot i que s'observa que l'àcid no es dissol completament en aquest medi. Seguint el procediment general, s'analitza la barreja de reacció per IR, però no es detecta el producte desitjat ni tampoc els reactius inicials.

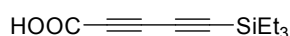
Prova B: Es parteix de l'àcid 3-bromopropinoic (115.2 mg, 0.77 mmol), TMSA (184 mg, 1.87 mmol) i CuI (34.7 mg, 0.18 mmol) dissolts en 1.5 mL de piperidina. En aquest cas els reactius es dissolen completament. La barreja de reacció s'agita a T.amb. durant 2 h. Seguint el procediment general, s'analitza la barreja de reacció per IR, però no es detecta el producte desitjat ni tampoc els reactius inicials.

Prova C: Es parteix de l'àcid 3-bromopropinoic (100.9 mg, 0.67 mmol) i es dissol en 1.5 mL de pirrolidina. En un altre matràs es pesa el TMSA (170 mg, 1.73 mmol), CuI (20.7 mg, 0.11 mmol) i l'hidroclorur d'hidroxilamina (6.3 mg, 0.09 mmol). S'addiciona la dissolució d'àcid lentament sobre la barreja que conté el TMSA. La barreja s'agita a T.amb durant 2 h. A continuació s'acidifica

addicionant 8 mL de HCl 3M i s'extreu amb AcOEt. S'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub>, s'evapora a sequedat i s'analitza per IR sense obtenir-se el producte desitjat ni els reactius inicials.

**Prova D:** Es parteix de TMSA (260 mg, 2.65 mmol), CuI (33.6 mg, 0.18 mmol), hidrocloreur d'hidroxilamina (38.9 mg, 0.56 mmol) i PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (24.4 mg, 0.03 mmol) dissolts en 0.5 mL de pirrolidina. En un altre matràs es dissol l'àcid 3-bromopropinoic (100.3 mg, 0.67 mmol) en 1.5 mL de pirrolidina i s'addicionen lentament sobre la mescla anterior. S'agita a T. amb durant 3 h. Seguint el procediment general, s'analitza la barreja de reacció per IR, però no es detecta el producte desitjat ni tampoc els reactius inicials.

#### 5.4.12 Síntesi de l'àcid 5-(trietilsilil)pentadiinoic (91)



##### **Procediment general:**

Es dissol el clorur de coure (I) i l'hidrocloreur d'hidroxilamina en una barreja d'amina i dissolvent. S'addiciona el trietilsililacetilè i es refreda la barreja en un bany de gel a 0°C. A continuació s'addiciona l'àcid 3-bromopropinoic dissolt en el dissolvent corresponent en cada cas gota a gota sobre la mescla anterior. Tot seguit s'agita a T. amb sota atmosfera de nitrogen. El temps de reacció varia en funció de cada prova. Si la mescla adquireix coloració blavosa-verdosa, s'addicionen uns cristallets d'hidrocloreur d'hidroxilamina fins que desapareix el color blau.

Tot seguit s'acidifica la mescla de reacció amb HCl 2M i s'extreu amb AcOEt, s'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub>, s'evapora i s'analitza per CCF i IR. Finalment el cru de reacció es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 10 x 3.5 cm Ø, AcOEt 100%, AcOEt/MeOH; 95/5, 9/1, 8/2).

**Prova A:** Es parteix de CuCl (10 mg, 0.1 mmol), NH<sub>2</sub>OH·HCl (cristallets), TESA (150 g, 1.07 mmol) i àcid 3-bromopropinoic (149 mg, 1 mmol) dissolts en 5 mL de dioxà i 10 mL de BuNH<sub>2aq</sub>, 30%. Passades 4 h. s'acidifica la mescla de reacció a pH = 1 amb HCl 2M i s'extreu amb Et<sub>2</sub>O, s'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub>, s'evapora a sequedat i es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 11 x 3.5 cm Ø, AcOEt 100%, AcOEt/MeOH; 96/4, 9/1, 8/2) recuperant-se l'àcid 3-bromopropinoic de partida.

**Prova B:** Es parteix de CuCl (11 mg, 0.1 mmol), NH<sub>2</sub>OH·HCl (cristallets), TESA (230 g, 1.64 mmol) i àcid 3-bromopropinoic (141 mg, 0.95 mmol) dissolts en 3 mL de DMF i 7 mL de BuNH<sub>2</sub>. Passades 4 h. s'acidifica la mescla de reacció a pH = 1 amb HCl 2M i es purifica com en el cas anterior (prova A) recuperant-se també l'àcid 3-bromopropinoic de partida.

**Prova C:** Es parteix de CuCl (11 mg, 0.1 mmol), NH<sub>2</sub>OH·HCl (cristallets), TESA (214 g, 1.53 mmol) i àcid 3-bromopropinoic (164 mg, 1.1 mmol) dissolts en 20 mL de BuNH<sub>2aq</sub>, 30% a 0°C. Després de 20 min. de reacció a T. amb, s'acidifica la mescla de reacció fins a pH = 1 amb HCl 2M i s'extreu amb AcOEt (3 x 40 mL), s'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. A continuació es purifica la barreja per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 11 x 3.5 cm Ø, AcOEt 100%, AcOEt/MeOH; 96/4, 9/1, 8/2). S'obté el producte desitjat (74 mg, 0.36 mmol) amb un 36% de rendiment.

**Prova D:** Es parteix de CuCl (4.95 mg, 0.06 mmol), NH<sub>2</sub>OH·HCl (cristallets), TESA (105 g, 0.75 mmol), àcid 3-bromopropinoic (74.5 mg, 0.5 mmol) i PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> dissolts en 20 mL de BuNH<sub>2aq</sub>, 30% a 0°C. Després de 20 min. de reacció a T.amb, s'acidifica la mescla de reacció fins a pH = 1 amb HCl 2M i s'extreu amb AcOEt (3x40 mL), s'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. S'analitza per IR i no s'observen les bandes característiques dels alquins conjugats, la qual cosa ens indica que no s'ha obtingut el producte desitjat.

**Prova E:** Es parteix de CuI (11 mg, 0.06 mmol), NH<sub>2</sub>OH·HCl (cristallets), TESA (124 g, 0.88 mmol) i àcid 3-bromopropinoic (74.5 mg, 0.5 mmol) dissolts en 4 mL de pirrolidina a 0°C. Després de 15 min. de reacció a 0°C, s'acidifica la mescla de reacció fins a pH = 1 amb HCl 2M i s'extreu amb AcOEt (3x40 mL), s'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. S'analitza per IR i no s'observen les bandes característiques dels alquins conjugats, la qual cosa ens indica que no s'ha obtingut el producte desitjat.

**Prova F:** Es parteix de CuCl (13.9 mg, 0.6 mmol), NH<sub>2</sub>OH·HCl (cristallets), TESA (550 g, 3.9 mmol) i àcid 3-bromopropinoic (446 mg, 3 mmol) dissolts en 20 mL de BuNH<sub>2aq</sub>, 30% a 0°C. Després de 20 min. de reacció a T.amb, s'acidifica la mescla de reacció amb HCl 2M i s'extreu amb AcOEt (3x40 mL), s'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. A continuació es purifica la barreja per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 8 x 3.5 cm Ø, AcOEt 100%). S'obté el producte desitjat (396 mg, 1.9 mmol) amb un 63% de rendiment.

**Caracterització de l'àcid 5-(trietilsilil)pentadiinoic (91):**

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 8/2; R<sub>f</sub> = 0.5)

**HPLC** (Kromasil C18 columna analítica; f = 0.8 mL/min; H<sub>2</sub>O/MeOH, 2/8; tr = 8.7 min).

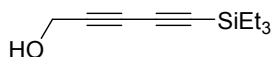
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 0.68 (6H, q, J = 8 Hz, CH<sub>2</sub>Si), 0.98 (9H, t, J = 8 Hz, CH<sub>3</sub>)

**IR**, ν (film, cm<sup>-1</sup>) 1688 (C=O), 2106 (C≡C), 2204 (C≡C), 2877, 2958, 3286 (br, COOH)

**UV-Vis** (λ<sub>max</sub>. nm, MeOH) 255, 269, 285

**ESI-MS:** m/z = 207.1 [M-H]<sup>-</sup>, 163.1 [M-COO]<sup>-</sup>, 415.4 [2M-H]<sup>-</sup>

#### 5.4.13 Síntesi del 5-(trietilsilil)penta-2,4-diin-1-ol (92)



**Prova A:** Es dissol el CuCl (9 mg, 0.09 mmol) en 10 mL de *n*-BuNH<sub>2aq</sub>, 30% i s'afegeixen uns cristallets de NH<sub>2</sub>OH·HCl fins que desapareix el color blau (per la reducció de Cu(II) a Cu(I)). A continuació s'addiciona el trietilsililacetilè (550 mg, 3.9 mmol) i es refreda la barreja en un bany de gel a 0°C detectant-se la formació d'una suspensió groguenca deguda a la formació del derivat cuprat. Tot seguit s'addiciona el 3-bromo-2-propin-1-ol (418 mg, 3.1 mmol) dissolt en 1 mL de Et<sub>2</sub>O gota a gota sobre la mescla anterior a 0°C. Seguidament s'agita a T.amb sota atmosfera de nitrogen durant 20 min (passats 10 min. s'observa l'aparició de coloració vermellosa). (Si la mescla adquireix coloració blavosa-verdosa, s'addicionen uns cristallets d'hydroclorur d'hydroxilamina fins que desapareix el color blau.) La barreja de reacció s'extreu amb Et<sub>2</sub>O i NH<sub>4</sub>Cl<sub>sat</sub>. ja que complexa el coure, s'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub>, s'evapora a sequedat i el cru de reacció es purifica per

cromatografia en columna ( $\text{SiO}_2$ , 10 x 3.5 cm Ø, hexà/AcOEt 9/1, hexà/AcOEt 8/2, AcOEt 100%), obtenint-se dos productes; el producte resultat de l'homoacoblament (**93**) (84 mg, 0.76 mmol) amb un 49% de rendiment i el producte desitjat resultat de l'heteroacoblament (**92**) (231 mg, 1.18 mmol) amb un 38% de rendiment.

Hexa-2,4-diin-1,6-diol (**93**):

**CCF** ( $\text{SiO}_2$ ; hexà/AcOEt, 8/2; Rf = 0.1)

**Pf.** (°C) 110-112 (112 lit.)<sup>162</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.58 (2H, s, OH), 4.35 (4H, s,  $\text{CH}_2$ )

**IR**,  $\nu$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1030 ( $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 2874, 2956, 3309 (O-H)

**UV-Vis** ( $\lambda_{\text{max}}$ . (nm), MeOH) 257, 243, 231, 212

5-(trietilsilil)-penta-2,4-diin-1-ol (**92**):

**CCF** ( $\text{SiO}_2$ ; hexà/AcOEt, 8/2; Rf = 0.54)

**<sup>1</sup>H-RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  (ppm) 0.62 (6H, q, J = 8 Hz,  $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 0.98 (9H, t, J = 8 Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ), 1.65 (1H, s, OH), 4.34 (2H, s,  $\text{CH}_2\text{OH}$ )

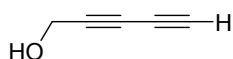
**IR**,  $\nu$  (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1012 ( $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 2104 ( $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 2218 ( $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 2874, 2952, 3206 (O-H)

**UV-Vis** ( $\lambda_{\text{max}}$ . (nm), MeOH) 329, 268, 254

Prova B: Es dissol el CuCl (71 mg, 0.7 mmol), el  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  (125 mg, 1.8 mmol), el TESA (1180 mg, 8.4 mmol) i el 3-bromo-2-propin-1-ol (860 mg, 6.4 mmol) en 10 mL de  $\text{BuNH}_{2\text{aq}}$ . 30% (on s'ha bombollejat nitrogen) a 0°C. La barreja es deixa reaccionar amb agitació 5 min. a 0°C i 10 min. a T.amb. A continuació es purifica seguint el mateix procediment descrit en la prova A. S'obtenen dos productes; el producte resultat de l'homoacoblament (**93**) (212 mg, 1.93 mmol) amb un 64% de rendiment i el producte desitjat resultat de l'heteroacoblament (**92**) (204 mg, 1.05 mmol) amb un 18% de rendiment.

Prova C:<sup>136</sup> Es procedeix com en la prova A partint de CuCl (71.3 mg, 0.7 mmol),  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  (100 mg, 1.4 mmol), TESA (1130 mg, 8.05 mmol) i 3-bromo-2-propin-1-ol (1008 mg, 7.4 mmol). Aquesta prova es diferencia en què el bromoalquí es dissol en 12 mL de MeOH i s'addiciona lentament sobre la barreja de reacció durant 10 min. A continuació s'agita 15 min. a T.amb. i es purifica seguint el mateix procediment descrit a la prova A. S'obtenen dos productes; el producte resultat de l'homoacoblament (**93**) (74 mg, 0.67 mmol) amb un 19% de rendiment i el producte desitjat resultat de l'heteroacoblament (**92**) (1049 mg, 5.4 mmol) amb un 77% de rendiment.

**5.4.14 Síntesi del 2,4-pentadiin-1-ol**<sup>139</sup>



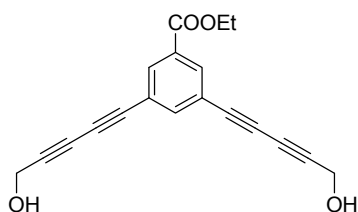
Es dissol el 5-(trietilsilil)penta-2,4-diin-1-ol (528 mg, 2.7 mmol) en 20 mL de MeOH i s'addiciona 3.8 mL de NaOH<sub>aq.</sub> 2.5M. S'agita la mescla en un bany de gel i sal (-5°C) sota atmosfera de nitrogen. Passades 4 h. s'addicionen 3.5 mL d'àcid fòrmic 2M i s'extreu amb Et<sub>2</sub>O (3x50 mL). La fase orgànica es renta amb NaCl<sub>sat.</sub> (1x30 mL), s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. Cal anar amb compte de no escalfar al evaporar ja que sinó el producte descomposa. L'oli resultant es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 7 x 4.5 cm Ø, hexà/AcOEt 9/1). D'aquesta manera s'obté el producte desitjat (**94**) en forma d'oli (125 mg, 1.56 mmol) amb un 57% de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; hexà/AcOEt, 9/1; Rf = 0.25)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.62 (2H, s, OH), 2.21 (1H, s, CH), 4.33 (2H, s, CH<sub>2</sub>OH)

**IR**,  $\nu$  (film, cm<sup>-1</sup>) 1016 (CH<sub>2</sub>-OH), 2061 (C≡C), 2218 (C≡C), 3291 (O-H)

#### 5.4.15 Síntesi del 3,5-bis(5-hidroxipenta-1,3-diinil)benzoat d'etil (**95**)



##### 5.4.15.1 Intents de síntesi a partir del 3,5-dibromobenzoat d'etil

**Prova A:** Es dissol el 3,5-dibromobenzoat d'etil (308 mg, 1 mmol) en 10 mL de THF<sub>anh.</sub> i s'addiciona la trietilamina (0.9 mL, 6.5 mmol). En un altre matràs es dissol la trifenilfosfina (49.8 mg, 0.19 mmol), el iodur de coure (7.6 mg, 0.04 mmol) i la dibenzilidenacetona de pal·ladi (23 mg, 0.04 mmol) en 10 mL de THF i s'addicionen a través de cànula sobre la mescla anterior. La barreja s'agita 30 min. a T.amb. i sota atmosfera de nitrogen. A continuació es dissol el 2,4-pentadiin-1-ol (240 mg, 3 mmol) en 20 mL de THF i s'addicionen lentament a través de l'embut d'addició sobre la mescla anterior (1h.). Tot seguit s'escalfa la barreja a reflux.

Passades 48h. s'analitza per CCF i sembla que ja no quedi 2,4-pentadiin-1-ol, amb la qual cosa es filtra el catalitzador sobre Celite, s'evapora, es redissol en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'extreu amb HCl 2M (1 x 50 mL) i NaCl<sub>sat.</sub> (2 x 50 mL). S'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub>, s'evapora i es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 18 x 3.5 cm Ø, hexà/AcOEt 8/2, hexà/AcOEt 1/1, AcOEt 100%). S'obtenen majoritàriament dues fraccions; una conté el 3,5-dibromobenzoat d'etil de partida juntament amb dibenzilidenacetona i trietilsilanol i l'altra el 3-bromo-5-(5-hidroxipenta-1,3-diinil)benzoat d'etil (**96**) (6 mg, 0.019 mmol) amb un 2% de rendiment.

**Prova B:** Es dissol el 3,5-dibromobenzoat d'etil (160 mg, 0.5 mmol), la trietilamina (0.45 mL, 3.2 mmol), la trifenilfosfina (31 mg, 0.09 mmol), el iodur de coure (I) (4 mg, 0.02 mmol), el PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (20 mg, 0.03 mmol) i el 2,4-pentadiin-1-ol (125 mg, 1.56 mmol) amb 7 mL de DMF en un tub segellat tipus Smith. Tot seguit s'escalfa al microones 25 min. a 120°C. A continuació es purifica seguint el mateix procediment que en la prova A, obtenint-se resultats similars.

**3-bromo-5-(5-hidroxipenta-1,3-diinil)benzoat d'etil (96)**

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.40 (3H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 4.38 (2H, q, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.44 (2H, s, CH<sub>2</sub>OH), 7.78 (1H, m, Ar-H), 8.07 (1H, m, Ar-H), 8.15 (1H, m, Ar-H)

**IR**, υ (film, cm<sup>-1</sup>) 1253, 1724 (C=O), 2150 (C≡C), 2247 (C≡C), 3292 (O-H)

**5.4.15.2 A partir del 3,5-dietinilbenzoat d'etil**

**Prova A:** Es dissol el 3,5-dietinilbenzoat d'etil (50 mg, 0.25 mmol) en 10 mL de THF. Tot seguit es dissolen el clorur de coure (I) (3 mg, 0.03 mmol) i l'hidroclorur d'hidroxilamina (9 mg, 0.13 mmol) en 10 mL de THF/MeOH (1:1). A continuació s'addicionen 0.75 mL de *n*-butilamina i la barreja es refreda en un bany de gel. En un altre matràs es dissol el 3-bromo-2-propinol (82 mg, 0.6 mmol) en 10 mL de THF i s'addiciona gota a gota sobre la barreja anterior. Tot seguit s'agita la barreja a T.amb. i es controla l'evolució de la reacció per CCF (SiO<sub>2</sub>; hexà/AcOEt, 8/2). Quan ja no es detecta bromoalquí però encara es detecta èster de partida, s'addiciona més bromoalquí ja que la reacció d'homoacoblament del bromoalquí competeix enfront de l'heteroacoblament. Així doncs, s'han addicionat 0.72 mmol de 3-bromo-2-propinol als 15 min. de reacció i 1.7 mmol més als 75 min. de reacció.

Quan ja no s'observa progrés de la reacció, s'addiciona CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'extreu amb NH<sub>4</sub>Cl<sub>sat.</sub>. S'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub>, s'evapora a sequedat i es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>; 16 x 3.5 cm Ø; hexà/AcOEt, 100/1, 98/2, 95/5, 9/1, 8/2). S'obtenen tres compostos: es recupera un 20% del 3,5-dietinilbenzoat d'etil de partida (10 mg, 0.05 mmol) (**84**), el 3-etinil-5-(5-hidroxipenta-1,3-diinil)benzoat d'etil (**97**) (4 mg, 0.016 mmol) amb un 6% de rendiment i el 3,5-bis(5-hidroxipenta-1,3-diinil)benzoat d'etil (**95**) desitjat (11mg, 0.036 mmol) amb un 14% de rendiment.

**3-etinil-5-(5-hidroxipenta-1,3-diinil)benzoat d'etil (97):**

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; hexà/AcOEt, 8/2; R<sub>f</sub> = 0.25)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.40 (3 H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 3.16 (1H, s, C≡CH), 4.38 (2H, q, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.44 (2H, s, CH<sub>2</sub>OH), 7.74 (1H, t, J = 1.6 Hz, Ar-H), 8.11 (2H, d, J = 1.6 Hz, Ar-H)

**IR**, υ (film, cm<sup>-1</sup>) 1256, 1589, 1723 (C=O), 2113 (C≡C), 2150 (C≡C), 2245 (C≡C), 3292 (O-H)

**ESI-MS** m/z: 253 [M+H]<sup>+</sup>, 270 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 275 [M+Na]<sup>+</sup>

**3,5-bis(5-hidroxipenta-1,3-diinil)benzoat d'etil (95):**

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; hexà/AcOEt, 1/1; R<sub>f</sub> = 0.5)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.41 (3 H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 4.27 (4H, s, CH<sub>2</sub>OH), 4.41 (2H, q, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.73 (1H, t, J = 1.6 Hz, Ar-H), 8.09 (2H, d, J = 1.6 Hz, Ar-H)

**IR**, υ (film, cm<sup>-1</sup>) 1252, 1587, 1721 (C=O), 2150 (C≡C), 2244 (C≡C), 3334 (O-H)

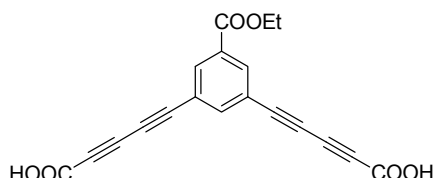
**ESI-MS** m/z: 329 [M+Na]<sup>+</sup>, 635 [2M+Na]<sup>+</sup>, 941 [3M+Na]<sup>+</sup>

**Prova B:** Es procedeix de la mateixa manera que en la prova A, però en aquest cas s'utilitza piridina com a base. Es parteix de 3,5-dietinilbenzoat d'etil (60 mg, 0.3 mmol), clorur de coure (I) (3.6

mg, 0.036 mmol) i l'hidroclorur d'hidroxilamina (11 mg, 0.16 mmol) i 0.75 mL de piridina. S'addiciona el 3-bromo-2-propinol en dues vegades; 0.75 mmol al principi i 1.35 mmol passades 2h.

La mescla de reacció es purifica de la mateixa manera que en la prova A, sense obtenir-se el producte esperat.

#### 5.4.16 Síntesi del 3,5-bis(4-carboxibutadiinil)benzoat d'etil (98)



##### 5.4.16.1 Intent a partir de 3,5-dietinilbenzoat d'etil

Es dissol el 3,5-dietinilbenzoat d'etil (50 mg, 0.25 mmol) en 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Tot seguit es dissolen el clorur de coure (I) (3 mg, 0.03 mmol) i l'hidroclorur d'hidroxilamina (9 mg, 0.13 mmol) en 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . A continuació s'addicionen 0.75 mL de *N*-butilamina i la barreja es refreda en un bany de gel. En un altre matràs es dissol l'àcid 3-bromopropinoic (82 mg, 0.55 mmol) en 30 mL de THF i s'addiciona gota a gota sobre la barreja anterior. Tot seguit s'agita la barreja a T.amb. L'evolució de la reacció es controla per CCF ( $\text{SiO}_2$ ; hexà/AcOEt, 8/2). Passats 30 min. ja no s'observa l'àcid 3-bromopropinoic ( $R_f = 0.2$ , AcOEt/MeOH; 8/2) però encara s'observa èster de partida ( $R_f = 0.9$ , AcOEt/MeOH; 8/2). Aleshores s'addiciona més àcid 3-bromopropinoic (57 mg, 0.38 mmol) ja que la reacció d'homoacoblament de l'àcid 3-bromopropinoic competeix amb la d'heteroacoblament.

Quan ja no s'observa progrés de la reacció, s'extreu la barreja de reacció amb AcOH 10%, i es renta la fase orgànica amb  $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$  i  $\text{NaCl}_{\text{sat}}$ . S'asseca la fase orgànica amb  $\text{MgSO}_4$ , s'evapora a sequedat i s'analitza per  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) observant-se que es recupera el 3,5-dietinilbenzoat d'etil de partida (**84**) sense detectar-se la formació del producte desitjat.

##### 5.4.16.2 A partir de 3,5-bis(2-bromoetinil)benzoat d'etil

Prova A: Es dissol el clorur de coure (I) (4 mg, 0.04 mmol) en 5 mL de *n*- $\text{BuNH}_2$  al 30% en medi aquós, obtenint-se una dissolució de color blau. S'afegeixen uns cristallets d'hidroclorur d'hidroxilamina per tal de reduir el Cu (II) a Cu (I) amb la conseqüent desaparició del color blavós. A continuació s'addiciona l'àcid propinoic (67 mg, 0.95 mmol) i es refreda la barreja en un bany de gel. Seguidament es dissol el 3,5-bis(2-bromoetinil)benzoat d'etil (145 mg, 0.41 mmol) en 5 mL  $\text{Et}_2\text{O}$  i s'addiciona gota a gota sobre la barreja anterior durant 10 min. Es treu la mescla del bany de gel i s'observa el canvi de color cap a groc-marronós. Si apareix coloració blavosa o verdosa, s'addicionen uns cristallets d'hidroclorur d'hidroxilamina.

L'evolució de la reacció es controla per CCF ( $\text{SiO}_2$ ; AcOEt/MeOH, 2/1). Passades 2h. ja no s'observa bromoalquí de partida ( $R_f = 0.95$ ). Aleshores s'acidifica la barreja de reacció amb HCl 2M



fins a pH=2 i s'extreu amb AcOEt (5x50 mL). S'asseca la fase orgànica amb Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evapora. El cru de reacció es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>; 10 x 3.5 cm Ø; AcOEt/MeOH, 1/0, 95/5, 9/1, 8/2, 6/4). S'obté majoritàriament l'àcid 5-(3-etoxicarbonil-5-(2-bromoetnil)fenil)penta-2,4-diinoic (**100**) (70 mg, 0.2 mmol) impurificat amb sílica.

àcid 5-(3-etoxicarbonil-5-(2-bromoetnil)fenil)penta-2,4-diinoic (**100**):

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 2/1; Rf = 0.15)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz) δ (ppm) 1.43 (3H, t, J = 7 Hz, CH<sub>3</sub>), 4.41 (2H, q, J = 7 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.87 (1H, t, J = 1.6 Hz, Ar-H), 8.12 (2H, d, J = 1.6 Hz, Ar-H)

**IR**,  $\nu$  (film, cm<sup>-1</sup>) 1252, 1361, 1602, 1719 (C=O), 2139 (C≡C), 2226 (C≡C), 3200 (ampla, COOH)

**ESI-MS**: m/z = 171.2, 172.2, 173.2 [(M-2H)/2]<sup>-</sup>

Prova B: Es dissol el clorur de coure (I) (6 mg, 0.06 mmol) en 5 mL de *n*-BuNH<sub>2</sub> al 30% en medi aquós, obtenint-se una dissolució de color blau. S'afegeixen uns cristallets d'hidroclorur d'hidroxilamina per tal de reduir el Cu (II) a Cu (I) amb la conseqüent desaparició del color blavós. A continuació s'addiciona l'àcid propinoic (196 mg, 2.8 mmol) i es refreda la barreja en un bany de gel. Seguidament es dissol el 3,5-bis(2-bromoetnil)benzoat d'etil (139 mg, 0.39 mmol) en 5 mL de MeOH i s'addiciona gota a gota sobre la barreja anterior durant 10 min. Es treu la mescla del bany de gel i s'observa el canvi de color cap a groc-marronós. Si apareix coloració blavosa o verdosa, s'addicionen uns cristallets d'hidroclorur d'hidroxilamina. La barreja de reacció es purifica de la mateixa manera que en la prova A, obtenint-se 80 mg d'una barreja en proporció 1:1 de 3,5-bis(4-carboxibutadiinil)benzoat d'etil (**98**) i 3,5-bis(4-carboxibutadiinil)benzoat de metil (**101**) impurificats amb sílica.

3,5-bis(4-carboxibutadiinil)benzoat d'etil (**98**):

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 6/4; Rf = 0.2)

**HPLC** (columna analítica, Kromasil C18, f=0.8 mL, H<sub>2</sub>O + 0.1% fòrmic/MeOH (4/6); tr = 9.9 min.)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ (ppm) 1.43 (3 H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 4.42 (2H, q, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 8.06 (1H, t, J = 1.8 Hz, Ar-H), 8.27 (2H, d, J = 1.8 Hz, Ar-H)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) δ (ppm) 14.5, 63.1, 67.3, 69.4, 74.4, 81.0, 122.9, 133.4, 136.0, 141.6, 154.7, 165.4

**IR**,  $\nu$  (film, cm<sup>-1</sup>) 1252, 1361, 1696 (C=O), 1719 (C=O), 2154 (C≡C), 2230 (C≡C), 3200 (ampla, COOH)

**ESI-MS**: m/z = 245.3 [M-2COOH]<sup>-</sup>, 289.3 [M-COOH]<sup>-</sup>, 333.3 [M-H]<sup>-</sup>

**UV-Vis** ( $\lambda_{\text{max}}$ , (nm), MeOH) 332, 310, 287, 269, 256, 231

3,5-bis(4-carboxibutadiinil)benzoat de metil (**100**):

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 6/4; Rf = 0.2)

**HPLC** (columna analítica, Kromasil C18, f=0.8 mL, H<sub>2</sub>O + 0.1% fòrmic/MeOH (4/6); tr = 6.5 min.)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ (ppm) 3.96 (3H, s, CH<sub>3</sub>O), 8.06 (1H, t, J = 1.8 Hz, Ar-H), 8.27 (2H, d, J = 1.8 Hz, Ar-H)

**ESI-MS:**  $m/z = 231.3$  [M-2COOH],  $275.3$  [M-COOH],  $319.3$  [M-H]<sup>+</sup>

Prova C: Es dissol el clorur de coure (I) (2.5 mg, 0.025 mmol) en 5 mL de *n*-BuNH<sub>2</sub> al 30% en medi aquós, obtenint-se una dissolució de color blau. S'afegeixen uns cristallets d'hidroclorur d'hidroxilamina per tal de reduir el Cu (II) a Cu (I) amb la consegüent desaparició del color blavós. A continuació s'addiciona l'àcid propinoic (53 mg, 0.76 mmol) i es refreda la barreja en un bany de gel. Seguidament es dissol el 3,5-bis(2-bromoetini)benzoat d'etil (90 mg, 0.25 mmol) en 25 mL d'EtOH i s'addiciona gota a gota sobre la barreja anterior durant 10 min. Es treu la mescla del bany de gel i s'observa el canvi de color cap a groc-marronós. Si apareix coloració blavosa o verdosa, s'addicionen uns cristallets d'hidroclorur d'hidroxilamina. La barreja de reacció es purifica de la mateixa manera que en la prova A, obtenint-se el producte desitjat impurificat amb sílice. Per tal de purificar-lo utilitzarem HPLC semi-preparatiu (Kromasil C18, columna semi-preparativa,  $f = 4$  mL/min, H<sub>2</sub>O + 0.1 % àcid fòrmic/MeOH, 2/8,  $t_r = 12-15$  min). Aquesta tècnica no és prou adequada per aquest compost ja que el producte queda força retingut a la columna i dóna pic amb cua. A més al evaporar les fraccions al rotavapor pot descomposar possiblement degut a la Temp. del bany que pot fer que l'àcid descarboxili. Finalment s'obté el producte desitjat (**98**) (8 mg, 0.025 mmol) amb un 10% de rendiment.

Prova D: Es dissol el clorur de coure (I) (2.5 mg, 0.025 mmol) en 5 mL de *n*-BuNH<sub>2</sub> al 30% en medi aquós, obtenint-se una dissolució de color blau. S'afegeixen uns cristallets d'hidroclorur d'hidroxilamina per tal de reduir el Cu (II) a Cu (I) amb la consegüent desaparició del color blavós. A continuació s'addiciona l'àcid propinoic (86 mg, 1.23 mmol) i es refreda la barreja en un bany de gel. Seguidament es dissol el 3,5-bis(2-bromoetini)benzoat d'etil (90 mg, 0.25 mmol) en 25 mL d'EtOH i s'addiciona gota a gota sobre la barreja anterior durant 10 min. Es treu la mescla del bany de gel i s'observa el canvi de color cap a groc-marronós. Si apareix coloració blavosa o verdosa, s'addicionen uns cristallets d'hidroclorur d'hidroxilamina. La barreja es deixa reaccionar durant 30 min. i es comprova que el bromoalquí de partida no es detecta per CCF (Hexà/AcOEt, 8/2;  $R_f = 0.8$ ). Aleshores s'acidifica la barreja amb HCl 2M fins a pH = 2 i s'extreu amb AcOEt (1x50 mL). A continuació s'extreu la fase orgànica amb HCl 2M (3x50 mL), s'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora obtenint-se el producte desitjat (**98**) (117 mg) cap més purificació.

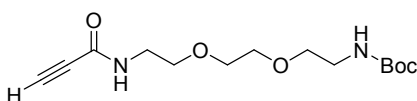
Prova E: Es dissol el clorur de coure (I) (5 mg, 0.05 mmol) en 30 mL de *n*-BuNH<sub>2</sub> al 30% en medi aquós, obtenint-se una dissolució de color blau. S'afegeixen uns cristallets d'hidroclorur d'hidroxilamina per tal de reduir el Cu (II) a Cu (I) amb la consegüent desaparició del color blavós. A continuació s'addiciona l'àcid propinoic (122 mg, 1.74 mmol) i es refreda la barreja en un bany de gel. Seguidament es dissol el 3,5-bis(2-bromoetini)benzoat d'etil (177 mg, 0.5 mmol) en 30 mL d'EtOH i s'addiciona gota a gota sobre la barreja anterior durant 10 min. Es treu la mescla del bany de gel i s'observa el canvi de color cap a groc-marronós. Si apareix coloració blavosa o verdosa, s'addicionen uns cristallets d'hidroclorur d'hidroxilamina. La barreja es purifica com en la prova D obtenint-se 162 mg de sòlid que corresponen a una barreja en proporció 1:1 del producte desitjat 3,5-bis(4-carboxibutadiini)benzoat d'etil (**98**) i àcid 5-(3-etoxicarbonil-5-etinilfenil)penta-2,4-diinoic (**99**) que no es purificaran fins la reacció posterior ja que la purificació en aquest estadi és complicada.

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ (ppm) 1.43 (6 H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 3.68 (1H, s, C≡CH), 4.42 (4H, q, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.91 (1H, t, J = 1.6 Hz, Ar-H), 8.06 (1H, t, J = 1.6 Hz, Ar-H), 8.16 (1H, t, J = 1.6 Hz, Ar-H), 8.18 (1H, t, J = 1.6 Hz, Ar-H), 8.27 (2H, d, J = 1.6 Hz, Ar-H)

**IR**, υ (film, cm<sup>-1</sup>) 1264, 1371, 1719 (C=O), 2119 (C≡C-H), 2154 (C≡C), 2230 (C≡C), 3200 (COOH)

**ESI-MS**: m/z = 221.3 [(99)-COOH]<sup>-</sup>, 265.3 [(99)-H]<sup>-</sup>; 245.3 [(98)-2COOH]<sup>-</sup>, 289.3 [(98)-COOH]<sup>-</sup>, 333.3 [(98)-H]<sup>-</sup>

#### 5.4.17 Síntesi del 8-(propiolamido)-3,6-dioxaoctilcarbamat de *tert*-butil (**102**)



**Prova A:** Es dissolen l'àcid propinoic (22 mg, 0.31 mmol) i el 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamate de *tert*-butil (62 mg, 0.25 mmol) en 5 mL de DMF i es refreda la barreja a 0°C. A continuació s'addiciona la DCC (56 mg, 0.27 mmol) dissolta en 5 mL de DMF a través de cànula. La mescla s'agita a 0°C durant 1h. i a T.amb sota atmosfera de nitrogen durant 2h. Aleshores s'extreu la fase orgànica amb NaHCO<sub>3(sat)</sub> (1x30 mL), NaHSO<sub>4(sat)</sub> (1x30 mL) i NaCl<sub>(sat)</sub> (1x30 mL). S'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. S'analitza per <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) i CCF (SiO<sub>2</sub>, AcOEt 100%) i s'observa que s'obté únicament la 1,3-diciclohexil-1-propinoilurea (**103**) (81 mg, 0.29 mmol) amb un 94% de rendiment, CCF (SiO<sub>2</sub>; AcOEt 100%; R<sub>f</sub> = 0.95).

**Prova B:** Es dissolen l'àcid propinoic (22 mg, 0.31 mmol) i el 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamate de *tert*-butil (65 mg, 0.25 mmol) en 5 mL de DMF i es refreda la barreja a 0°C. A continuació s'addiciona la EDC (56 mg, 0.27 mmol) dissolta en 5 mL de DMF a través de cànula. La mescla s'agita a 0°C durant 1h. i a T.amb sota atmosfera de nitrogen durant 12h. Aleshores s'evapora la barreja a sequedat, es redissol en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i es segueix el mateix procediment de purificació de la prova A obtenint-se d'aquesta manera el producte desitjat (**102**) (43 mg, 0.14 mmol) amb un 57% de rendiment.

#### 8-(propiolamido)-3,6-dioxaoctilcarbamate de *tert*-butil (**102**):

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt, 1/1; R<sub>f</sub> = 0.15)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.45 (9H, s, CH<sub>3</sub>), 2.79 (1H, s, C≡CH), 3.34 (2H, m, CH<sub>2</sub>-NH-Boc), 3.48-3.63 (10H, m, CH<sub>2</sub>), 5.05 (1H, br, NH), 6.70 (1H, br, NH)

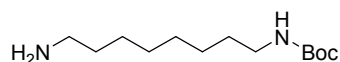
**IR**, υ (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1528, 1653 (C=O), 1699 (C=O), 2106 (C≡C), 3304 (NH)

**Prova C:** Es dissolen l'àcid propinoic (17.5 mg, 0.25 mmol) i el 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamate de *tert*-butil (62 mg, 0.25 mmol) en 5 mL de DMF i es refreda la barreja a 0°C. A continuació s'addicionen la EDC (57 mg, 0.3 mmol) i la DIEA (39 mg, 0.3 mmol) dissoltes en 5 mL de DMF a través de cànula. La mescla s'agita a 0°C durant 1h. i a T.amb sota atmosfera de nitrogen durant 5h.

Aleshores s'analitza la barreja per CCF (SiO<sub>2</sub>, MeOH/NH<sub>3</sub>, 9/1) observant-se els reactius de partida i sense detectar-se formació del producte esperat.

**Prova D:** Es dissolen l'àcid propínic (157 mg, 2.24 mmol) i el 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbammat de *tert*-butil (372 mg, 1.5 mmol) en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> filtrat sobre alúmina bàsica i es refreda la barreja a 0°C. A continuació s'addiciona la DCC (383 mg, 1.86 mmol) dissolta en 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a través de cànula. La mescla s'agita a 0°C durant 1h. i a T. amb sota atmosfera de nitrogen durant 3h. Aleshores es refreda la barreja en un bany de gel per afavorir la precipitació de la DCU i es filtra amb placa filtrant de 4 µm. El filtrat s'evapora a sequedat, es redissol en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i es segueix el mateix procediment de purificació de la prova A. En aquest cas cal una purificació posterior per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>; 10 x 4.5 cm Ø; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt, 1/1) obtenint-se el producte desitjat (**102**) (334 mg, 1.11 mmol) amb un 74% de rendiment.

#### 5.4.18 Síntesi del 8-aminooctilcarbammat de *tert*-butil<sup>51</sup>

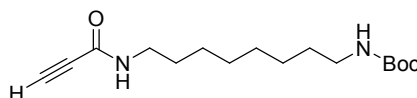


Es dissol el 1,8-diaminoctà (4.9 g, 34.5 mmol) en 100 mL d'una barreja dioxà/H<sub>2</sub>O (8/2). S'addiciona trietilamina (5.8 mL, 42.1 mmol) i es refreda la barreja en un bany de gel a 0°C. A continuació s'addiciona el Boc<sub>2</sub>O (2.3 g, 10.7 mmol) dissolt en 50 mL de dioxà lentament a través d'un embut d'addició. La barreja es deixa reaccionar durant 1h. en el bany de gel i 4h. a T. amb. Aleshores la mescla s'evapora a sequedat, es redissol en H<sub>2</sub>O i s'acidifica a pH = 2-3 amb HCl 2M. S'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i aquesta fase orgànica s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora obtenint-se el producte diprotegit amb el grup Boc (**104**) (354 mg, 0.79 mmol) amb un 7% de rendiment (CCF, MeOH/NH<sub>3</sub>, 9/1; R<sub>f</sub> = 0.9). La fase aquosa es basifica a pH = 11 amb NaOH<sub>aq.</sub> 2M i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fins que ja no s'extreu més producte. Tot seguit s'asseca la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora obtenint-se el producte monoprotegit (**39**) (1.02 g, 3.4 mmol) amb un 32% de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; MeOH/NH<sub>3</sub>, 9/1; R<sub>f</sub> = 0.5)

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.30 (9H, s, CH<sub>3</sub>), 1.44 (12H, m, CH<sub>2</sub>), 2.68 (2H, t, J = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.10 (2H, m, CH<sub>2</sub>-NH-Boc), 4.53 (1H, s, NH)

#### 5.4.19 Síntesi del 8-(propiolamido)octilcarbammat de *tert*-butil



Una dissolució de DCC (377 mg, 1.8 mmol) en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (filtrat a través d'alúmina bàsica) es refreda en un bany de gel a 0°C i es transfereix a través de cànula a un matràs que conté

una barreja d'àcid propínoic (192 mg, 2.7 mmol) i 8-aminooctilcarbamat de *tert*-butil (298 mg, 1.2 mmol). La barreja s'agita durant 30 min. en el bany de gel i 24 h. a T.amb. A continuació es torna a refredar a 0°C per tal que precipiti la DCU formada i es filtra en una placa porosa del núm. 4. El filtrat s'evapora i es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 10 x 4.5 cm Ø, hexà/AcOEt; 7/3, hexà/AcOEt; 1/1) obtenint-se el producte desitjat (**105**) (345 mg, 1.16 mmol) amb un 95% de rendiment.

**HPLC** (Kromasil C18, columna analítica, f = 0.8 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH; 2/8, tr = 5.8 min)

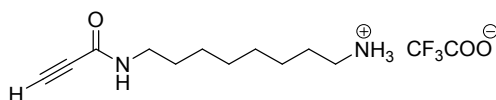
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.30 (9H, s, CH<sub>3</sub>), 1.44 (8H, m, CH<sub>2</sub>), 1.53 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 2.79 (1H, s, C≡CH), 3.09 (2H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>-NH-Boc), 3.28 (2H, dt, J<sub>d</sub> = J<sub>t</sub> = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>-NH), 4.5 (1H, s, ampla, NH), 6.0 (1H, s, ampla, NH)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 26.8, 26.9, 28.6, 29.2, 29.3, 29.3, 30.2, 40.1, 40.7, 73.1, 77.7, 79.6, 152.4, 156.0

**IR**, ν (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1533, 1645 (C=O), 1692 (C=O), 2104 (C≡C), 3302 (N-H)

**ESI-MS**: m/z = 297.3 [M+H]<sup>+</sup>, 319.4 [M+Na]<sup>+</sup>, 615.6 [2M+Na]<sup>+</sup>

#### 5.4.20 Síntesi del trifluoroacetat de la N-(8-aminooctil)propiolamida (**106**)

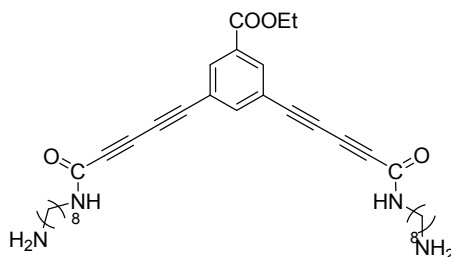


Es dissol el 8-(propiolamido)octilcarbamat de *tert*-butil (**105**) (305 mg, 1.03 mmol) en 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'addiciona 3 mL d'àcid trifluoroacètic (40.38 mmol). Passades 2 h. s'analitza per CCF (MeOH/NH<sub>3</sub>; 9/1) i ja no s'observa producte protegit amb Boc-. S'evapora el dissolvent a la trompa d'aigua i s'asseca al dessecador. Es convenient no generar l'amina lliure ja que és difícil d'aïllar i podem perdre el producte tal com ha passat amb productes similars amb espaiadors de tipus polièter. D'aquesta manera s'obté el producte **106** en forma de sal.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; MeOH/NH<sub>3</sub>, 9/1; R<sub>f</sub> = 0.4)

**IR**, ν (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1634 (C=O), 1682 (C=O), 2104 (C≡C), 2859, 2929

#### 5.4.21 Intent de síntesi del producte (**107**)

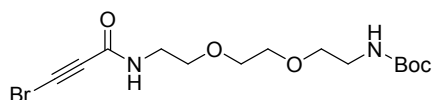


Es dissol el trifluoroacetat de la *N*-(8-aminooctil)propiolamida (**106**) (214 mg, 0.69 mmol) en una solució de CuCl (5 mg, 0.05 mmol) i una punta d'espàtula d'hidroclorur d'hidroxiilamina en 25 mL de *n*-BuNH<sub>2</sub> 30% en medi aquós. A continuació es refreda a 0°C i s'observa coloració groguenca deguda possiblement a la formació del derivat cuprat de l'alquí terminal. Tot seguit es dissol el 3,5-bis(2-bromoetil)benzoat d'etil (75 mg, 0.21 mmol) en 10 mL d'EtOH i s'addiciona gota a gota sobre la mescla anterior amb un embut d'addició i sota atmosfera de nitrogen. La mescla s'agita a T.amb i al cap de 15 min. de reacció s'observa l'aparició d'un precipitat groguenc en el medi de reacció. Es filtra el sòlid format i es renta amb H<sub>2</sub>O i acetona. L'anàlisi per IR i MS de la barreja de reacció indica que conté una barreja dels compostos (**108**) i *N*-(8-aminooctil)propiolamida de partida (**109**).

**IR**,  $\nu$  (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1648 (C=O), 1720 (C=O), 2041 (C≡C), 2175 (C≡C), 2228 (C≡C), 2858, 2928, 3380 (N-H)

**ESI-MS**:  $m/z$  = 393.4 [M+H]<sup>+</sup> (**108**), 197.2 [M+H]<sup>+</sup> (**109**)

#### 5.4.22 Intents de síntesi del compost (110)



**Prova A:** Es dissol l'àcid 3-bromopropiòic (251 mg, 1.68 mmol) i el 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamidat de *tert*-butil (280 mg, 1.12 mmol) en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (filtrat a través d'alúmina bàsica) i es refreda 0°C. A continuació s'addiciona l'agent d'acoblament DCC (440 mg, 2.13 mmol) dissolt en el mateix dissolvent (10 mL) a través de cànula i s'agita a 0°C i a T.amb sota atmosfera de nitrogen durant 12 h. Aleshores s'evapora a sequedat i es purifica el cru de reacció a través de columna cromatogràfica (SiO<sub>2</sub>, 12 x 3.5 cm Ø, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 1/0, 98/2, 95/5, 9/1) obtenint-se el subproducte (**113**) (412 mg, 0.68 mmol) amb un 60% de rendiment.

**Prova B:** Es dissol l'àcid propiòic (151 mg, 1.01 mmol) i la DIEA (0.43 mL, 2.5 mmol) en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'addiciona el PyBOP (625 mg, 1.2 mmol) i l'HOBt (13 mg, 0.09 mmol) dissolts en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Es deixa reaccionar 10 min. a T.amb. i s'addiciona el 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamidat de *tert*-butil (289 mg, 1.16 mmol) dissolt en 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. S'agita a T.amb. sota atmosfera de nitrogen durant 24 hores. Aleshores s'evapora la barreja a sequedat, es redissol en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, s'extreu amb NaHCO<sub>3sat.</sub> (6x30 mL), es renta la fase orgànica amb H<sub>2</sub>O, s'extreu amb NaHSO<sub>4sat.</sub>, s'asseca la fase orgànica amb Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'analitza per IR sense observar-se la presència de la banda típica d'alquins entre 2100-2200 cm<sup>-1</sup>, la qual cosa indica que no s'obté el producte esperat ni l'àcid 3-bromopropiòic de partida.

**Prova C:** Es procedeix com en la prova A. El producte es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 15 x 3.5 cm Ø; AcOEt/hexà 1/2, 1/1, 1/0). S'obté un producte amb R<sub>f</sub> = 0.54 (AcOEt 100%), però que semblen 2 productes amb R<sub>f</sub> molt similars; R<sub>f1</sub> = 0.9 i R<sub>f2</sub> = 0.87 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9/1). Per aquest motiu s'analitza per HPLC (Kromasil C18, f = 0.8 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeOH 2/8). S'obté un pic a  $t_{r1}$  = 4.6 min corresponent a la DCU (analitzat per MS) i un pic a  $t_{r2}$  = 14.5 min corresponent a un subproducte (**113**) resultat de l'acoblament de l'àcid, l'amino i la DCU (analitzat per MS, <sup>1</sup>H-RMN i IR).

**Prova D:** Es dissol l'àcid 3-bromopropinoic (149 mg, 1 mmol) en 5mL de clorur de tionil, s'escalfa a reflux durant 30 min. amb un tub de clorur de calci i s'evapora el clorur de tionil amb la trompa d'aigua (s'intercala un tub de clorur de calci perquè no entri humitat). S'obté un oli marró que es dissol en 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i a continuació s'addiciona el 8-amino-3,6-dioxaoctilcarbamat de *tert*-butil (492 mg, 1.98 mmol) dissolt en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Es deixa reaccionar durant 1h. a T.amb, s'evapora el dissolvent, es redissol en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'extreu amb NaHCO<sub>3sat.</sub> (3x25 mL) i HCl 2M (3x25 mL). S'asseca la fase orgànica amb Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'analitza per CCF i IR sense obtenir-se cap producte nou.

**Prova E:** Es procedeix com en la prova D, però en el work-up, es fan extraccions amb NaHSO<sub>4</sub> (3x25 mL) per tal d'eliminar les restes de trietilamina. S'observen 2 productes que es purifiquen per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 22 x 2 cm Ø, AcOEt/hexà 1/1, 6/4, 7/3). S'obtenen 2 productes amb R<sub>f1</sub> = 0.8 (15 mg, **111**) i R<sub>f2</sub> = 0.5 (10 mg, **112**) en SiO<sub>2</sub>, AcOEt 100%, analitzats per <sup>1</sup>H-RMN, IR, MS. Com a conseqüència d'aquest resultat, s'analitza l'àcid 3-bromopropinoic de partida per MS i s'observa que ja estava impur, era barreja d'àcid 3-bromopropinoic, àcid dibromopropinoic i àcid tribromopropinoic. Això pot explicar el resultat d'aquesta reacció.

**Prova F:** Es procedeix com en la prova E, però en aquest cas s'utilitza àcid 3-bromopropinoic pur i acabat de sintetitzar. Segons l'anàlisi de IR i CCF, s'obté el mateix resultat que en el cas anterior.

**Producte (110):**

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.45 (9H, s, CH<sub>3</sub>), 1.0-2.1 (20H, m, Chx), 3.32 (2H, m, CH<sub>2</sub>-NH-Boc), 3.50-3.63 (10H, m, CH<sub>2</sub>), 5.05 (1H, br, NH), 6.70 (1H, br, NH)

**IR**, υ (film, cm<sup>-1</sup>) 1524, 1647 (C=O), 1697 (C=O), 2194 (C≡C), 2930 (CH<sub>2</sub>), 3373 (NH)

**ESI-MS:** m/z = 379.2, 381.2 [(**110**)+H]<sup>+</sup>, 401.2, 403.2 [(**110**)+Na]<sup>+</sup>

**Producte (113):**

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.45 (9H, s, CH<sub>3</sub>), 1.0-2.1 (20H, m, Chx), 3.32 (2H, m, CH<sub>2</sub>-NH-Boc), 3.50-3.63 (10H, m, CH<sub>2</sub>), 4.10 (1H, br, NH), 5.05 (1H, br, NH), 6.70 (1H, br, NH), 7.82 (1H, br, C=CH)

**IR**, υ (film, cm<sup>-1</sup>) 1524, 1650 (C=O), 1710 (C=O), 2855 (CH<sub>2</sub>), 2930 (CH<sub>2</sub>), 3337 (NH)

**ESI-MS:** m/z = 603.4, 605.4 [**21.2**+H]<sup>+</sup>, 625.3, 627.3 [**21.2**+Na]<sup>+</sup>

**Producte (111):**

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.46 (9H, s, CH<sub>3</sub>), 3.32 (2H, m, CH<sub>2</sub>-NH-Boc), 3.50-3.63 (10H, m, CH<sub>2</sub>), 4.95 (1H, br, NH), 6.60 (1H, br, NH)

**IR**, υ (film, cm<sup>-1</sup>) 1521, 1669 (C=O), 1671(C=O), 2870 (CH<sub>2</sub>), 2930 (CH<sub>2</sub>), 3295 (NH)

**ESI-MS:** m/z = 537.1, 539.1, 541.1, 543.1 [**22.1**+H]<sup>+</sup>, 559.1, 561.1, 463.1, 465.1 [**22.1**+Na]<sup>+</sup>

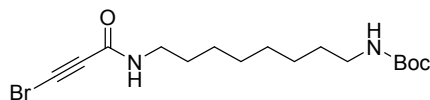
**Producte (112):**

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.46 (9H, s, CH<sub>3</sub>), 3.32 (2H, m, CH<sub>2</sub>-NH-Boc), 3.50-3.63 (10H, m, CH<sub>2</sub>), 4.95 (1H, br, NH), 6.50 (1H, br, NH), 6.62 (1H, br, C=CH)

**IR**, υ (film, cm<sup>-1</sup>) 1525, 1663 (C=O), 1690 (C=O), 2869 (CH<sub>2</sub>), 2975 (CH<sub>2</sub>), 3322 (NH)

**ESI-MS:**  $m/z = 459.3, 461.3, 463.3 [22.2+H]^+, 481.3, 483.3, 485.3 [22.2+Na]^+$

#### 5.4.23 Síntesi del 8-(3-bromopropiolamido)octilcarbammat de *tert*-butil (**114**)



Es dissolen 8-(propiolamido)octilcarbammat de *tert*-butil (50 mg, 0.17 mmol), N-bromosuccinimida (NBS, 60.1 mg, 0.34 mmol), bromur de tetrabutilamoni (1.3 mg, 0.004 mmol), nitrat de plata (0.7 mg, 0.004 mmol) i hidròxid de sodi (13.5 mg, 0.34 mmol) en 20 mL de ACN i s'agita a T. amb i sota atmosfera de nitrogen durant tota la nit. A l'endemà es fan extraccions amb AcOEt i  $NaCl_{sat}$ . S'asseca la fase orgànica i s'evapora a sequedat. A continuació es purifica per cromatografia en columna ( $SiO_2$ ; 10 x 3.5 cm Ø; hexà/AcOEt, 7/3) obtenint-se el producte desitjat (**114**) (61 mg, 0.16 mmol) amb un 97% de rendiment.

**CCF** ( $SiO_2$ ; hexà/AcOEt, 7/3;  $R_f = 0.3$ )

**HPLC** (Kromasil C18, columna analítica,  $f = 0.8$  mL/min,  $H_2O/MeOH$ ; 2/8,  $t_r = 6.8$  min)

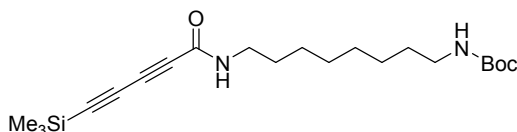
**$^1H$ -RMN** ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.30 (9H, s,  $CH_3$ ), 1.44 (8H, m,  $CH_2$ ), 1.51 (4H, m,  $CH_2$ ), 3.10 (2H, m,  $CH_2-NH-Boc$ ), 3.28 (2H, m,  $CH_2-NH$ ), 4.52 (1H, s,  $NH$ ), 5.98 (1H, s,  $NH$ )

**$^{13}C$ -RMN** ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 26.8, 26.9, 28.6, 29.2, 29.3, 29.34, 34.1, 40.2, 40.7, 75.5, 75.5, 79.1, 152.2, 156.2

**IR**,  $\nu$  ( $KBr$ ,  $cm^{-1}$ ) 1539, 1649 (C=O), 1697 (C=O), 2193 (C≡C), 3286 (N-H)

**ESI-MS:**  $m/z = 375.4, 377.4 [M+H]^+, 397.4, 399.4 [M+Na]^+$

#### 5.4.24 Intent de síntesi de 8-(5-(trimetilsilil)penta-2,4-diinamido)octilcarbammat de *tert*-butil



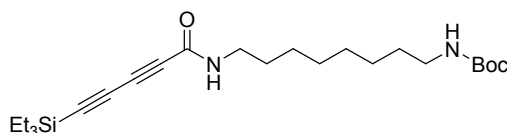
**Prova A:** Es dissol el  $CuI$  (11.8 mg, 0.06 mmol), el  $PdCl_2(PPh_3)_2$  (21.1 mg, 0.03 mmol) i el TMSA (150 mg, 1.53 mmol) en 1 mL de piperidina. A continuació s'addiciona el 8-(3-bromopropiolamido)octilcarbammat de *tert*-butil (153 mg, 0.41 mmol) dissolt en 2 mL de piperidina i 5 mL de MeOH gota a gota sobre la barreja anterior i s'agita la mescla a T. amb sota atmosfera de nitrogen durant 1 h. Tot seguit la mescla de reacció s'extreu amb  $NH_4Cl_{sat}$  i AcOEt. La fase orgànica s'asseca amb  $MgSO_4$  i s'evapora a sequedat. S'analitza per IR,  $^1H$ -RMN i ESI-MS obtenint-se un subproducte que no podem identificar i que no correspon al producte desitjat.

**Prova B:** Es dissol el  $CuCl$  (17.7 mg, 0.18 mmol), el  $NH_2OH \cdot HCl$  (29.6 mg, 0.42 mmol) i el TMSA (149 mg, 1.52 mmol) en 5 mL de  $EtNH_{2aq}$ , 70%. S'observa la formació de fums blancs i la barreja adquireix coloració vermella. A continuació s'addiciona el 8-(3-



bromopropiolamido)octilcarbammat de *tert*-butil (60 mg, 0.16 mmol) dissolt en 5 mL de EtNH<sub>2aq</sub>. 70% gota a gota sobre la barreja anterior i s'agita la mescla a T.amb sota atmosfera de nitrogen durant 5 h. La mescla adquireix coloració marronosa. A continuació es purifica seguint el mateix procediment que en la prova A. S'analitza com en la prova A i tampoc s'obté el producte desitjat.

#### 5.4.25 Intent de síntesi de 8-(5-(trietilsilil)penta-2,4-diinamido)octilcarbammat de *tert*-butil



Prova A: Es dissol el CuCl (6 mg, 0.06 mmol), uns cristallets de NH<sub>2</sub>OH·HCl i el TESA (138.7 mg, 0.99 mmol) en 5 mL de BuNH<sub>2aq</sub>. 30% i es refreda en un bany de gel. A continuació s'addiciona el 8-(3-bromopropiolamido)octilcarbammat de *tert*-butil (248 mg, 0.66 mmol) dissolt en 2 mL de Et<sub>2</sub>O gota a gota sobre la barreja anterior i s'agita la mescla a T.amb sota atmosfera de nitrogen durant 2 h. Tot seguit la mescla de reacció s'extreu amb NH<sub>4</sub>Cl<sub>sat</sub>. i AcOEt. La fase orgànica s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. El cru de reacció es purifica a través de cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>; 10 x 4.5 cm Ø; hexà/AcOEt, 2/1, 1/1, 1/2, 0/1) obtenint-se el producte desitjat (**116**) (28 mg, 0.064 mmol) amb un 10% de rendiment i com a subproducte majoritari el producte resultat de l'homoacoblament del bromoalquí (**117**) (174.3 mg, 0.29 mmol) amb un 89% de rendiment.

#### 8-(5-(trietilsilil)penta-2,4-diinamido)octilcarbammat de *tert*-butil (**116**):

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 0.60 (6H, q, J = 7.8 Hz, CH<sub>2</sub>Si), 0.96 (9H, t, J = 7.8 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.29 (9H, s, CH<sub>3</sub>), 1.44 (8H, m, CH<sub>2</sub>), 1.51 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 3.10 (2H, m, CH<sub>2</sub>-NH-Boc), 3.28 (2H, m, CH<sub>2</sub>-NH), 4.52 (1H, s, NH), 5.98 (1H, s, NH)

IR, ν (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1592, 1658 (C=O), 1701 (C=O), 2109 (C≡C), 2171 (C≡C), 3363 (N-H)

ESI-MS: m/z = 452.4 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 508.4 [M+BuNH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>

#### Producte d'homoacoblament (**117**):

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ (ppm) 1.29 (18H, s, CH<sub>3</sub>), 1.44-1.59 (24H, m, CH<sub>2</sub>), 3.10 (4H, m, CH<sub>2</sub>-NH-Boc), 3.28 (2H, m, CH<sub>2</sub>-NH), 3.45 (2H, m, CH<sub>2</sub>-NH), 4.60 (4H, s, NH)

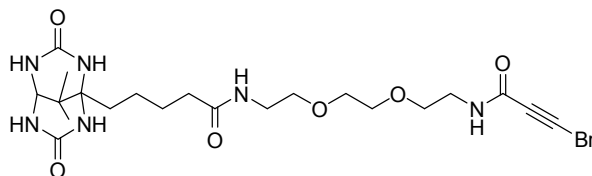
IR, ν (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1527, 1624 (C=O), 1697 (C=O), 2858, 2927, 3332 (N-H)

ESI-MS: m/z = 592.3 [M+H]<sup>+</sup>, 664.6 [M+BuNH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>

Prova B: Es dissolen CuCl (15 mg, 0.15 mmol), NH<sub>2</sub>OH·HCl (30 mg, 0.43 mmol), TESA (380 mg, 2.7 mmol) i 8-(3-bromopropiolamido)octilcarbammat de *tert*-butil (375 mg, 1 mmol) en 25 mL de BuNH<sub>2aq</sub>. 30% refredada en un bany de gel, però com que la dissolució no és total, s'addicionen 25 mL de dioxà i 25 mL de AcOEt. Aleshores s'agita a T.amb sota atmosfera de nitrogen durant 30 min. (ja que no s'observa bromoalquí per CCF (SiO<sub>2</sub>, hexà/AcOEt, 1/1; R<sub>f</sub> = 0.55). La barreja es purifica seguint el mateix procediment que en la prova A, obtenint-se el producte 8-

(propiolamido)octilcarbammat de *tert*-butil (**105**) (54 mg, 0.18 mmol) amb un 18% de rendiment (vegeu caracterització a l'apartat 5.19) i el producte resultat de l'homoacoblament del bromoalquí (**117**) (240 mg, 0.40 mmol) amb un 80% de rendiment.

#### 5.4.26 Intents de síntesi del compost (**118**)



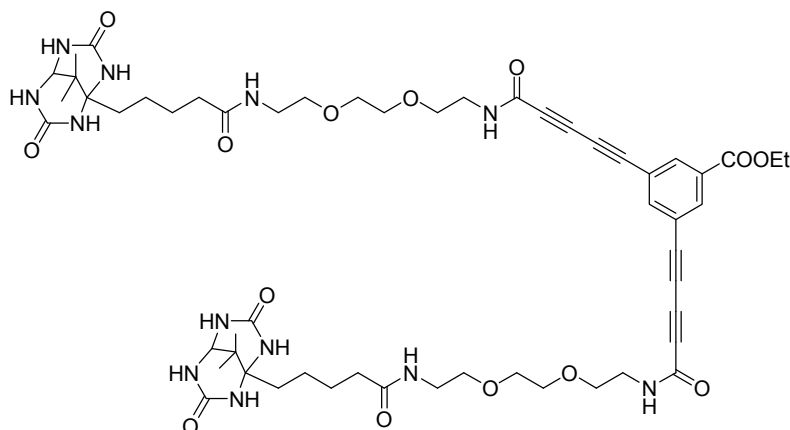
##### Utilitzant DMF:

Es dissol l'àcid 3-bromopropiòlic (75 mg, 0.28 mmol) en 20 mL de DMF i s'addiciona la difenilfosforilazida (387 mg, 1.4 mmol) i la trietilamina (0.2 mL, 1.4 mmol). Al adicionar la trietilamina, s'observa l'aparició de color marró intens. En un altre matràs es dissol l'hidroclorur de **41** (128 mg, 0.28 mmol) en 10 mL de DMF i s'addiciona trietilamina (0.2 mL, 1.4 mmol) per tal de regenerar l'amina lliure. En aquest punt s'observa l'aparició de precipitat blanquinós que pot ser degut a la formació de clorur de trietilamoni i que sigui insoluble en DMF. Aquesta barreja s'addiciona sobre la mescla anterior a través de cànula i es deixa reaccionar a T. amb sota atmosfera de nitrogen. S'analitza l'evolució de la reacció a través de CCF (MeOH/NH<sub>3</sub>; 9/1) passades 4h., 6h. i encara s'observa reactius de partida. En aquest punt s'addiciona més DPPA (355 mg, 1.29 mmol), però tampoc s'observa evolució de la reacció.

##### Utilitzant DMSO:

Es dissol l'àcid 3-bromopropiòlic (13 mg, 0.087 mmol) i l'hidroclorur de **41** (20 mg, 0.048 mmol) en 25 mL de DMSO<sub>anh.</sub> i s'addiciona la DPPA (77 mg, 0.28 mmol) i la Et<sub>3</sub>N (20 mg, 0.2 mmol). Es deixa reaccionant a T. amb sota atmosfera de nitrogen durant 12 h. A continuació s'evapora i s'analitza per <sup>1</sup>H-RMN, MS-ESI i IR la barreja de reacció sense que es detecti el producte desitjat.

## 5.4.27 Intent de síntesi del compost (120)

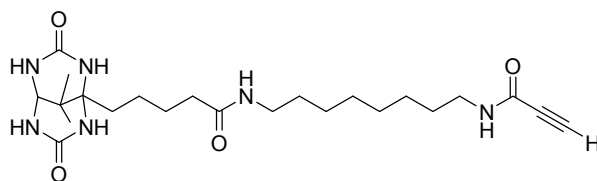


**Prova A:** Es dissol la DCC (7.4 mg, 0.036 mmol) en 10 mL de DMF a 0°C i s'addiciona sobre un matràs que conté el diàcid **98** (8 mg, 0.24 mmol) i l'amina **41** (11.9 mg, 0.028 mmol). La barreja resultant s'agita a 0°C durant 1 h. i tot seguit a T.amb. durant 2 h. A continuació s'analitza la barreja de reacció per CCF (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 1/1 i MeOH/NH<sub>3</sub>, 9/1) sense observar-se la formació de cap producte nou. A més a més sembla que el diàcid s'ha descompost.

**Prova B:** Es dissol el diàcid **98** (25 mg, 0.074 mmol) en 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (filtrat per alúmina bàsica) i 5 mL de DMF (ja que sinó no es dissol completament). En un altre matràs es dissol l'amina **41** (36 mg, 0.08 mmol) en 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i 30 mL de DMF (cal escalfar lleugerament per dissoldre). A continuació s'addiciona la dissolució que conté el diàcid sobre la dissolució que conté l'amina a través de cànula i es refreda la barreja en un bany de gel a 0°C. Seguidament s'addiciona la DCC (38.2 mg, 0.18 mmol) dissolta en 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. S'observa l'aparició d'una barreja tèrbola blanquinosa, potser deguda a què algun reactiu precipiti. La barreja s'agita a 0°C sota atmosfera de nitrogen durant 1h. i a T.amb 24 h. Aleshores purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>; 9 x 3.5 cm Ø; AcOEt/MeOH, 9/1, 8/2, 75/25, 1/1, 0/1; MeOH/NH<sub>3</sub>, 9/1) obtenint-se 2 subproductes difícils de caracteritzar i l'amina **41** (28 mg) de partida.

**Prova C:** Es dissol el diàcid **98** (73 mg, 0.22 mmol) i l'amina **41** (108 mg, 0.26 mmol) en 100 mL de DMF i es refreda la barreja en un bany de gel a 0°C. A continuació s'addiciona la EDC (51.8 mg, 0.27 mmol) dissolta en 2 mL de DMF i s'agita sota atmosfera de nitrogen a 0°C durant 1 h. i a T.amb 12 h. Aleshores s'analitza per CCF (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 1/1 i MeOH/NH<sub>3</sub>, 9/1) sense observar-se progrés de la reacció. Es decideix escalfar a 55°C però al cap de 2 dies, no es detecta el producte esperat.

## 5.4.28 Síntesi del compost (121)



Es dissol el compost **43** (124 mg, 0.31 mmol) en 100 mL de DMF, escalfant i sonicant la barreja ja que sinó no es dissolen completament. Es deixa refredar a T.amb i s'addiciona l'àcid propinoic (67 mg, 0.96 mmol) mitjançant xeringa. A continuació s'addiciona la EDC (133 mg, 0.69 mmol) dissolta en 10 mL de DMF a través de cànula i s'agita a T.amb sota atmosfera de nitrogen. Passades 24 hores s'evapora la mescla de reacció amb la bomba d'oli, es redissol en H<sub>2</sub>O/MeOH i es purifica mitjançant HPLC semi-preparatiu (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 4 mL/min, H<sub>2</sub>O 0.1% fòrmic/MeOH; 55/45, tr = 15 min). S'obté el producte desitjat (79 mg, 0.17 mmol) en forma de sòlid blanc amb un 56% de rendiment.

**Pf. (°C)** 235-240

**HPLC** (Kromasil C18, columna analítica, f = 0.8 mL/min, H<sub>2</sub>O 0.1% fòrmic/MeOH; 55/45, tr = 15.2 min)

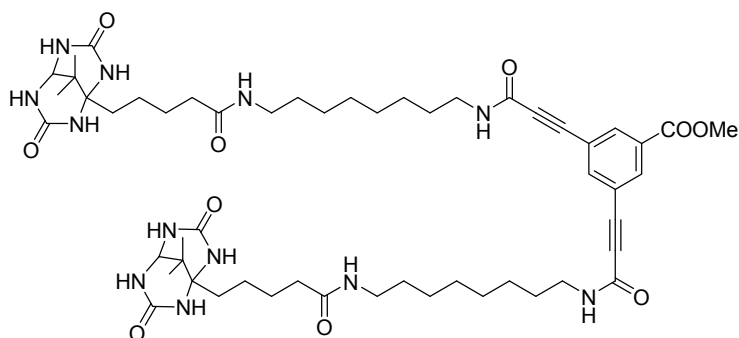
**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ (ppm) 1.25 (6H, s, CH<sub>3</sub>), 1.37 (8H, m, CH<sub>2</sub>), 1.54 (6H, m, CH<sub>2</sub>), 1.67 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.76 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.27 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 3.20 (2H, t, J = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.23 (2H, t, J = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.38 (1H, s, C≡CH), 4.10 (1H, s, CH)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) δ (ppm) 22.3, 23.8, 28.2, 28.7, 28.8, 30.9, 31.1, 31.1, 31.3, 35.7, 35.7, 37.5, 41.2, 41.5, 68.1, 72.3, 76.4, 79.2, 158.8, 176.7

**IR**, ν (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1528, 1616 (C=O), 1652 (C=O), 2104 (C≡C), 3073 (N-H), 3241 (N-H)

**ESI-MS**: m/z = 463.5 [M+H]<sup>+</sup>, 925.7 [2M+H]<sup>+</sup>

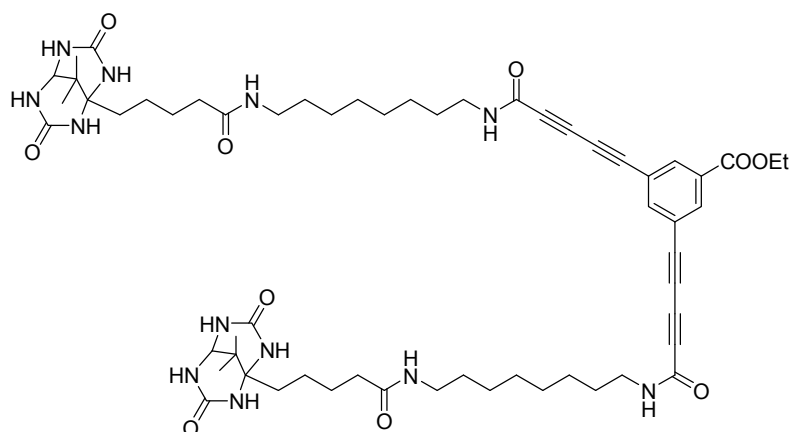
## 5.4.29 Intent de síntesi del compost (123)



En un vial tipus Smith es dissolen 3,5-dibromobenzoat de metil (7.7 mg, 0.026 mmol), l'alquí terminal **121** (20 mg, 0.043 mmol), iodur de coure (I) (0.9 mg, 0.004 mmol), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (4.5 mg, 0.006 mmol), trifetilfosfina (3.8 mg, 0.014 mmol) i trietilamina (0.04 mL, 0.28 mmol) en 4 mL de DMF. Es segella el vial i es fa reaccionar al microones 25 min. a 120°C. A continuació es filtra el catalitzador

a través de llana de vidre i s'analitza per HPLC-MS ja que la barreja és força complexa (Kromasil C18, columna analítica,  $f = 0.8$  mL/min,  $H_2O + 0.1\%$  fòrmic/MeOH; 4/6) i no es detecta el producte esperat. S'evapora una alíquota de la mescla de reacció i s'analitza per  $^1H$ -RMN ( $CD_3OD$ ), però tampoc es detecta el producte esperat.

#### 5.4.30 Intent de síntesi del compost (124)



Es dissol el diàcid **98** (28 mg, 0.08 mmol) en 10 mL de  $DMSO_{anh}$ , i s'addiciona difenilfosforilazida (0.05 mL, 0.24 mmol) i trietilamina (0.03 mL, 0.24 mmol). S'agita la barreja durant 5 min a T.amb. A continuació s'addiciona el compost **43** (76 mg, 0.18 mmol) dissolt en 20 mL de  $DMSO_{anh}$ , i s'agita a T.amb sota atmosfera de nitrogen durant 12 h. Aleshores s'evapora el  $DMSO$  amb la bomba de buit i es purifica el cru de reacció per cromatografia en columna ( $SiO_2$ ,  $9 \times 3.5$  cm Ø; AcOEt 100%, AcOEt/MeOH 9/1, AcOEt/MeOH 75/25, MeOH 100%, MeOH/ $NH_3$  9/1). S'obtenen varies fraccions de subproductes difícils de caracteritzar i un subproducte (**122**) resultat de l'acoblament entre el compost (**121**) i la DPPA.

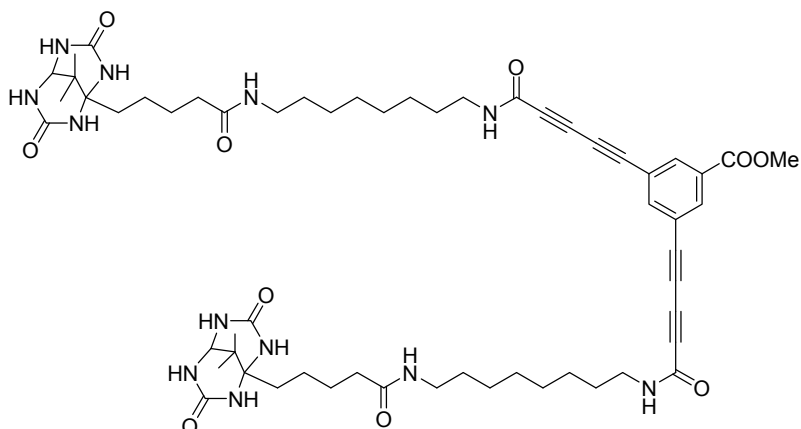
#### Producte (**122**):

$^1H$ -RMN ( $CD_3OD$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.24 (6H, s,  $CH_3$ ), 1.28 (8H, m,  $CH_2$ ), 1.51 (6H, m,  $CH_2$ ), 1.65 (2H, m,  $CH_2$ ), 1.74 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.26 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $CH_2CO$ ), 3.02 (2H, m,  $CH_2NH$ ), 3.18 (2H, m,  $CH_2NHCO$ ), 4.09 (1H, s, CH), 7.25 (6H, m, Ar-CH), 7.41 (4H, m, Ar-CH)

IR,  $\nu$  (KBr,  $cm^{-1}$ ) 1652 (C=O), 2931 ( $CH_2$ ), 3241 (N-H)

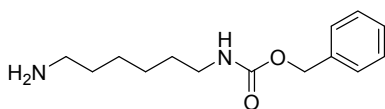
ESI-MS:  $m/z = 643.5$   $[M+H]^+$ ,  $665.5$   $[M+Na]^+$

## 5.4.31 Intent de síntesi del compost (125)



Es dissol l'alquí terminal **121** (55 mg, 0.12 mmol) en 15 mL de MeOH i s'addiciona 7 mL de BuNH<sub>2</sub>, CuCl (0.23 mg, 0.002 mmol) i uns cristallets de NH<sub>2</sub>OH·HCl. Aquesta barreja es refreda en un bany de gel i s'observa aparició d'una barreja tèrbola, possiblement deguda a què el derivat cuprat és més insoluble en el medi de reacció. Aleshores s'afegeixen 5 mL de AcOEt, 5 mL de DMF i 5 mL de H<sub>2</sub>O per veure si la solubilitat millora, però no s'observen canvis apreciables. De totes formes s'addiciona el 3,5-bis(2-bromoetil)benzoat de metil (**89**) (26 mg, 0.076 mmol) dissolt en 10 mL de MeOH i 2 mL de AcOEt (ja que sinó no es dissol completament) gota a gota durant 5 min. S'agita la mescla a T. amb i poc a poc s'observa que la terbolesa va desapareixent quedant una dissolució groguenca. Passada 1h. s'evapora el dissolvent i es redissol en H<sub>2</sub>O i AcOEt, s'acidifica amb àcid fòrmic per tal de protonar la N-butilamina i s'extreu amb AcOEt. La fase orgànica es renta amb H<sub>2</sub>O àcida, s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora. La mescla de reacció s'analitza per HPLC-MS (Kromasil C18, columna analítica, f = 0.8 mL, H<sub>2</sub>O + 0.1% fòrmic/MeOH; 4/6) detectant-se un pic a tr = 9.3 min. amb una relació m/z que podria correspondre al producte esperat (**125**); **ESI-MS**: m/z = 552.6, 1104.9 (concorda amb el producte desitjat (**125**)). Aleshores es separa per HPLC semi-preparatiu (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 4 mL, H<sub>2</sub>O + 0.1% fòrmic/MeOH; 4/6) i s'analitza el possible producte per <sup>1</sup>H-RMN i IR comprovant-se que no correspon al producte desitjat, sinó que és el reactiu de partida (**121**) tot i que per <sup>1</sup>H-RMN no s'observa el H alquínic (veure caracterització a l'apartat 5.2.28).

## 5.4.32 Síntesi del 6-aminohexilcarbamat de benzil



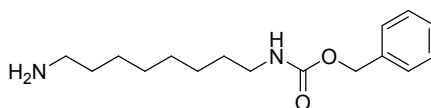
Es dissolen 5.88 g (50.6 mmol) de 1,6-hexandiamina en 15 mL d'aigua i s'addicionen 19.02 g (100 mmol) d'àcid p-toluensulfònic dissolts en 10 mL d'aigua obtenint-se pH = 3. Aleshores s'addiciona 50 mL d'EtOH i s'agita a 20°C. A continuació s'addiciona el cloroformat de benzil (6.3 mL,

44.5 mmol) dissolt en 15 mL de dimetoxietà a través d'un embut d'addició i durant 15 min. Seguidament s'agita a 20°C i es controla que el pH de la reacció estigui entre 3.5-4.5 mitjançant mesures constants amb pH-metre i addicionant dissolució d'acetat de sodi 25% (p/v). Passada 1.5 h ja no s'observa canvi de pH, amb la qual cosa es deixa agitant a 20°C durant 1 h. i s'evapora el dissolvent. El cru de reacció es redissol en aigua i es filtra el sòlid obtingut corresponent al producte diprotegit (519 mg, 1.35 mmol) que representen un 6% de rendiment. El filtrat es basifica amb NaOH<sub>aq.</sub> (40%) a pH = 13 i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5x75 mL). La fase orgànica es renta amb NaCl<sub>sat.</sub> (2x50 mL), s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> i s'evapora obtenint-se el compost desitjat (**126**) en forma de cera (1.62 g, 6.49 mmol) amb un 15% de rendiment.

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm) 1.31-1.51 (8H, m, CH<sub>2</sub>), 2.65 (2H, t, J = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 3.17 (2H, dt, J<sub>d</sub> = 6.6 Hz, J<sub>t</sub> = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>-NH-Cbz), 4.65 (1H, s, ampla, NH), 5.08 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ar), 7.33 (5H, m, Ar-H)

**ESI-MS:** (MeOH) m/z = 251.4 [M+H]<sup>+</sup>

#### 5.4.33 Síntesi del 8-aminooctilcarbammat de benzil



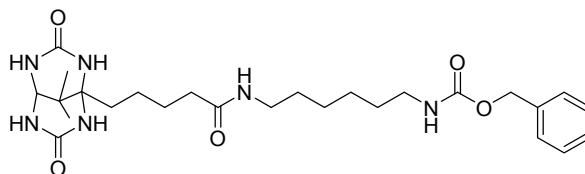
Es dissolen 7.22 g (50 mmol) de 1,8-octandiamina en 15 mL d'aigua i s'addicionen 19.02 g (100 mmol) d'àcid p-toluensulfònic dissolts en 10 mL d'aigua obtenint-se pH = 3. Aleshores s'addiciona 50 mL d'EtOH i s'agita a 20°C. A continuació s'addiciona el cloroformat de benzil (6.3 mL, 44.5 mmol) dissolt en 15 mL de dimetoxietà a través d'un embut d'addició i durant 15 min. Seguidament s'agita a 20°C i es controla que el pH de la reacció estigui entre 3.5-4.5 mitjançant mesures constants amb pH-metre i addicionant dissolució d'acetat de sodi 25% (p/v). Passada 1.5 h ja no s'observa canvi de pH, amb la qual cosa es deixa agitant a 20°C durant 1 h. i s'evapora el dissolvent. En aquest cas s'observa que la solubilitat dels compostos és inferior. Per aquest motiu es realitzar un procés de purificació diferent. Tant el producte diprotegit com el monoprotegit precipiten en el medi de reacció, per la qual cosa es decideix purificar a través de cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>, 13 x 4.5 cm Ø, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 9/1). D'aquesta manera s'obté el producte desitjat (**127**) en forma de cera (2.15 g, 7.64 mmol) amb un 17% de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; MeOH/NH<sub>3</sub>, 9/1; R<sub>f</sub> = 0.37)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm) 1.29 (6H, m, CH<sub>2</sub>), 1.43-1.48 (6H, m, CH<sub>2</sub>), 2.67 (2H, t, J = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 3.16 (2H, dt, J<sub>d</sub> = 6.6 Hz, J<sub>t</sub> = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>-NH-Cbz), 4.85 (1H, s, ampla, NH), 5.09 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ar), 7.33 (5H, m, Ar-H)

**ESI-MS:** (MeOH) m/z = 279.5 [M+H]<sup>+</sup>

## 5.4.34 Síntesi del compost (128)



Es dissol el compost **5** (302.3 mg, 1 mmol) en 50 mL de DMSO<sub>anh.</sub> i s'addiciona DPPA (421.8 mg, 1.5 mmol) i trietilamina (0.2 mL, 1.5 mmol). En un altre matràs es dissol el 6-aminohexilcarbamat de benzil (402 mg, 1.6 mmol) en 10 mL de DMSO<sub>anh.</sub> i s'addiciona sobre la mescla anterior a través de cànula. La barreja s'agita a T. amb sota atmosfera de nitrogen durant 2 dies. Aleshores s'evapora el DMSO a pressió reduïda. El cru de reacció es redissol en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'extreu amb HCl 2M (2x50 mL) i NaOH<sub>aq.</sub> 40% (2x50 mL) per tal d'eliminar sals de trietilamoni i de DPPA. La fase orgànica es purifica per cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>; 14 x 4.5 cm Ø; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 1/0, 95/5, 9/1, 8/2, 3/2). S'obté el producte desitjat impurificat amb DPPA ja que tots dos productes tenen una polaritat molt similar. Per aquest motiu s'utilitza HPLC semi-preparatiu per acabar de purificar el compost desitjat. HPLC (Kromasil C18, columna semi-preparativa; f = 4 mL/min; H<sub>2</sub>O/MeOH, 35/65, tr = 11 min). D'aquesta manera s'obté el producte desitjat (**128**) en forma de sòlid blanc (344 mg, 0.66 mmol) amb un 66% de rendiment.

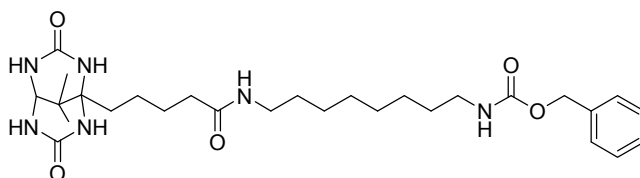
**CCF** (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9/1; R<sub>f</sub> = 0.15)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ (ppm) 1.24 (6H, s, CH<sub>3</sub>), 1.37 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 1.53 (6H, m, CH<sub>2</sub>), 1.67 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.77 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.65 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 3.14 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-NH-Cbz), 3.19 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-NH), 4.09 (1H, s, CH), 5.09 (2H, s, CH<sub>2</sub>-Ar), 7.36 (5H, m, Ar-H)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) δ (ppm) 21.4, 22.9, 27.3, 27.4, 27.6, 30.3, 30.8, 34.8, 34.9, 36.6, 40.3, 41.7, 67.3, 71.4, 128.7, 128.9, 129.6, 138.6, 158.0, 158.9, 175.8

**ESI-MS:** (MeOH) m/z = 517.6 [M+H]<sup>+</sup>, 539.6 [M+Na]<sup>+</sup>, 555.6 [M+K]<sup>+</sup>

## 5.4.35 Síntesi del compost (129)



Es dissol el compost **5** (302.3 mg, 1 mmol) en 50 mL de DMSO<sub>anh.</sub> i s'addiciona DPPA (421.8 mg, 1.5 mmol) i trietilamina (0.2 mL, 1.5 mmol). En un altre matràs es dissol el 8-aminooctilcarbamat de benzil (443 mg, 1.6 mmol) en 10 mL de DMSO<sub>anh.</sub> i s'addiciona sobre la mescla anterior a través de cànula. La barreja s'agita a T. amb sota atmosfera de nitrogen durant 2 dies. Aleshores s'evapora el DMSO a pressió reduïda. El cru de reacció es redissol en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'extreu amb HCl 2M (2x50 mL) i NaOH<sub>aq.</sub> 40% (2x50 mL) per tal d'eliminar sals de trietilamoni i de DPPA. La fase orgànica es purifica

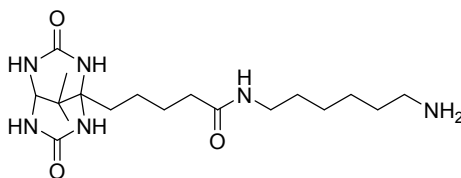


per cromatografia en columna ( $\text{SiO}_2$ ; 14 x 4.5 cm Ø;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 1/0, 95/5, 9/1, 8/2, 3/2), però en aquest cas no cal la purificació a través d'HPLC ja que el producte obtingut per purificació cromatogràfica ja és prou pur, en tot cas s'ha arrossegat sílica que eliminarem en la purificació de la reacció següent. D'aquesta manera s'obtenen 607 mg del compost desitjat (**129**) (impurs amb sílica) que representen un rendiment quantitatiu.

**CCF** ( $\text{SiO}_2$ ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9/1;  $R_f = 0.12$ )

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  (8/2), 300 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.21 (6H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.31 (8H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.50 (6H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.67 (4H, m,  $\text{CH}_2$ ), 2.23 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 3.15 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 3.18 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 4.04 (1H, s,  $\text{CH}$ ), 5.08 (2H, s,  $\text{CH}_2\text{-Ar}$ ), 7.34 (5H, m,  $\text{Ar-H}$ )

#### 5.4.36 Síntesi del compost (44)



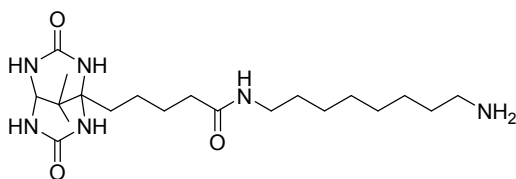
Es dissol el compost **128** (224 mg, 0.43 mmol) en 50 mL de MeOH, s'afegeix una punta d'espàtula de Pd/C (10 mg) i es bombolleja hidrogen durant 1 h. A continuació s'agita sota atmosfera d'hidrogen durant 14 h. a T.amb i es comprova per CCF ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ; 9/1,  $R_f = 0.1$ ) que la reacció s'ha completat. Aleshores es filtra el catalitzador sobre Celite i s'evapora el dissolvent obtenint-se el producte desitjat (**44**) en forma de film transparent (167 mg, 0.43 mmol) amb un rendiment quantitatiu.

**CCF** ( $\text{SiO}_2$ ;  $\text{MeOH}/\text{NH}_3$ , 9/1;  $R_f = 0.1$ )

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.24 (6H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.37 (4H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.53 (6H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.67 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.77 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 2.27 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 2.71 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ ), 3.21 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 4.10 (1H, s,  $\text{CH}$ )

**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 21.4, 22.8, 27.3, 27.5, 27.7, 30.4, 32.7, 34.8, 34.9, 36.6, 40.2, 42.1, 67.3, 71.4, 158.0, 175.8

#### 5.4.37 Síntesi del compost (43)



Es dissol el compost **129** (520 mg, 0.95 mmol) en 50 mL de MeOH, s'afegeix una punta d'espàtula de Pd/C (10 mg) i es bombolleja hidrogen durant 1 h. A continuació s'agita sota atmosfera

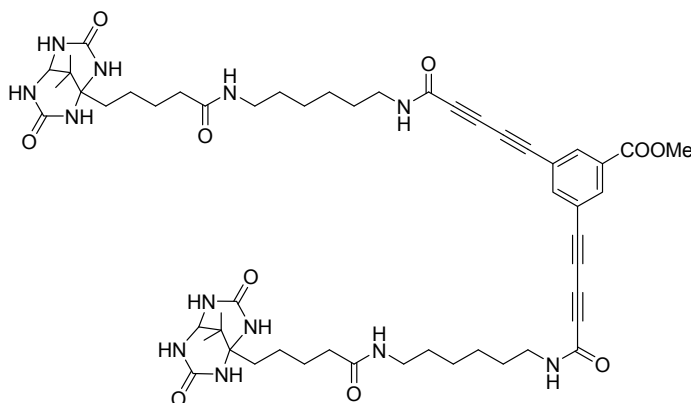
d'hidrogen durant 14 h. a T.amb i es comprova per CCF (SiO<sub>2</sub>, MeOH/NH<sub>3</sub>; 9/1, R<sub>f</sub> = 0.15) que la reacció s'ha completat. Aleshores es filtra el catalizador sobre Celite i s'evapora el dissolvent obtenint-se el producte desitjat (**43**) en forma de film transparent (382 mg, 0.93 mmol) amb un 98% de rendiment.

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; MeOH/NH<sub>3</sub>, 9/1; R<sub>f</sub> = 0.15)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ (ppm) 1.24 (6H, s, CH<sub>3</sub>), 1.37 (8H, m, CH<sub>2</sub>), 1.53 (6H, m, CH<sub>2</sub>), 1.67 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.77 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.27 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 2.71 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 3.20 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>-NH), 4.10 (1H, s, CH)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) δ (ppm) 21.4, 22.8, 27.3, 27.8, 27.9, 30.3, 30.4, 30.5, 32.2, 34.8, 34.9, 36.6, 40.4, 42.0, 67.3, 71.4, 158.0, 175.8

#### 5.4.38 Intent de síntesi del compost (132)



Es dissol en diàcid **101** (78 mg, 0.17 mmol) en 10 mL de DMF. En un altre matràs es dissol el compost **44** (151 mg, 0.29 mmol) en 60 mL de DMF escalfant a 80°C per tal de dissoldre el compost completament i deixant refredar a T.amb. Aquesta dissolució s'afegeix a la del diàcid a través de cànula. A la vegada s'afegeix una dissolució de EDC (57 mg, 0.3 mmol) en 5 mL de DMF sobre la mescla de reacció. La mescla té coloració ocre. S'agita a T.amb. sota atmosfera de nitrogen durant 15 h. Aleshores s'analitza per CCF (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 2/1) sense detectar-se presència del diàcid de partida. Com a conseqüència s'evapora la mescla de reacció i es purifica la meitat del cru de reacció mitjançant cromatografia en columna (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 9/1, 2/1, 1/1, 0/1; MeOH/NH<sub>3</sub>, 9/1) i s'obté el producte de descarboxilació (**130**) impurificat amb EDC i el producte de partida (**44**) impurificat amb sílice.

#### 5.4.39 Proves d'estabilitat del diàcid (98)

Es va dissoldre 2 mg del diàcid (**98**) en 2 mL de DMF i es va agitar la barreja durant 1 h. a T.amb. Aleshores es va analitzar per CCF (SiO<sub>2</sub>, AcOEt/MeOH, 2/1) sense detectar-se el diàcid a R<sub>f</sub> = 0.2. Aleshores es va evaporar a sequedat i es va analitzar per RMN comprovant que el diàcid havia descarboxilat obtenint-se d'aquesta manera el 3,5-di(buta-1,3-diinil)benzoat d'etil (**131**).

**CCF** (SiO<sub>2</sub>; AcOEt/MeOH, 2/1; R<sub>f</sub> = 0.9)

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) δ (ppm) 1.40 (3H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 4.40 (2H, q, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.78 (1H, t, J = 1.5 Hz, Ar-H), 8.15 (2H, d, J = 1.5 Hz, Ar-H)

**IR**, ν (KBr, cm<sup>-1</sup>) 1240, 1721 (C=O), 2146 (C≡C), 2228 (C≡C)

**ESI-MS:** (MeOH) m/z = 245.3 [M-H]<sup>-</sup>



## **6 CONCLUSIONS**



1. S'han sintetitzat lligands monovalents d'Av i SAV amb sistema bicíclic de tipus [3.3.1], tant de tipus PDU, com DMPDU i s'ha demostrat que s'uneixen a Av i SAV. En aquests lligands monovalents s'ha observat que:

- El canvi de sistema bicíclic de DMPDU a PDU es tradueix en un augment de la constant d'associació tant a Av com a SAV.
- La introducció d'una cadena lateral de valerat sobre l'àtom de N per tal de generar l'enantiòmer (+) porta associat un augment important de la  $K_a$  de complexació a SAV i Av, tant en el sistema de tipus PDU com en el de tipus DMPDU. En canvi, quan s'introdueix la cadena de valerat sobre el N per tal de generar l'enantiòmer (-), els canvis en la  $K_a$  són molt menors i de signe contrari, és a dir, hi ha un petit augment en el cas de la DMPDU, però una petita disminució en el cas de la PDU quan s'associen a SAV. En canvi en l'Av es produeix sempre la disminució de  $K_a$ .
- En els lligands de tipus DMPDU, passar de tenir la cadena de valerat unida al C cap de pont a tenir-la unida al N del grup ureido com a enantiòmer (+), comporta un augment de la  $K_a$ , més important en Av que en SAV.
- En els lligands amb cadena de valerat unida al N, l'enantiòmer (+) té una major afinitat per Av i SAV que l'enantiòmer (-), tant en els lligands de tipus PDU com en els de tipus DMPDU.
- En el compost DMPDU-C-C<sub>4</sub>-COOH (**5**), la derivatització de la cadena lateral d'àcid carboxílic en forma d'amida afecta poc a la seva  $K_a$  a SAV, però fa disminuir bastant la  $K_a$  a Av.
- La (+)-PDU-N-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**8**) és el lligand monovalent que presenta major  $K_a$ , tant a Av com a SAV, essent inclús superior a la del compost (+)-Gril-N-C<sub>4</sub>-COOH ((+)-**3**).

2. S'ha sintetitzat lligands divalents semi-rígid amb espaiadors de diferent longitud i naturalesa química. En aquells casos en què la estat possible, s'ha determinat la seva  $K_a$  a Av i SAV.

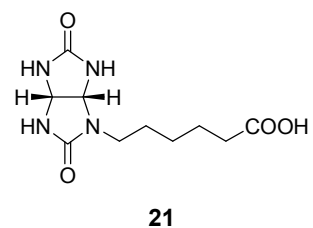
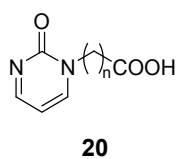
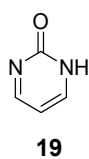
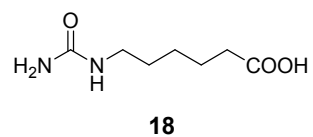
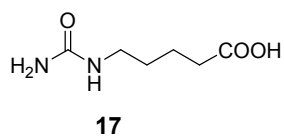
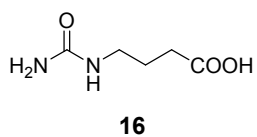
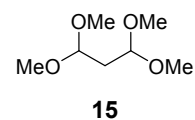
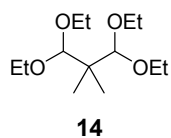
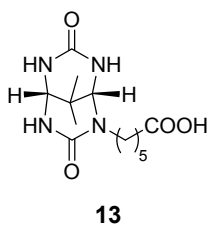
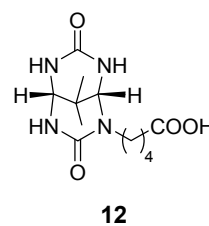
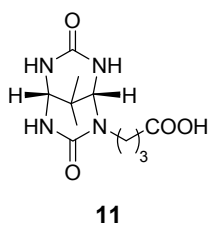
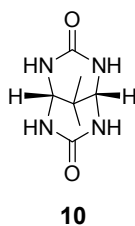
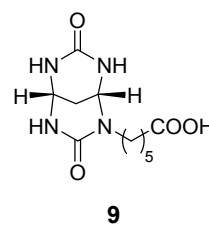
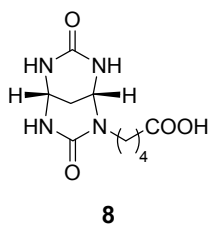
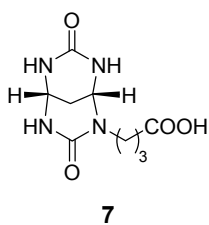
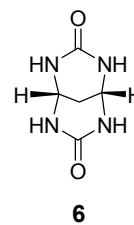
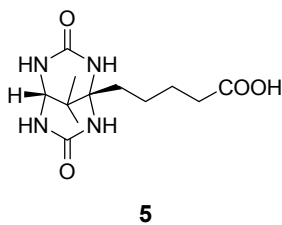
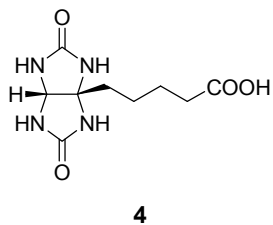
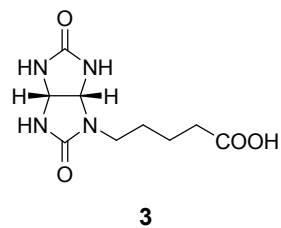
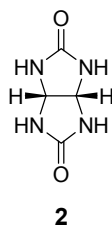
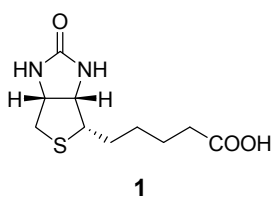
- D'entre els lligands amb espaiadors de tipus alquílic, el que presenta una major  $K_a$  a SAV és el compost **54** ( $K_a = 7.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ).
- En els lligands divalents amb espaiadors de tipus alquílic, un augment en la rigidesa de l'espaiador es tradueix en un augment en la  $K_a$  a SAV.

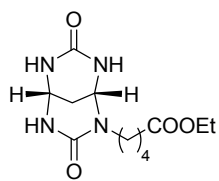
3. S'han explorat rutes de síntesi de nous lligands divalents amb una part rígida més extensa que en els lligands anteriors.



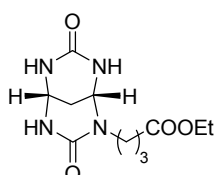


## **7    *ESTRUCTURES***

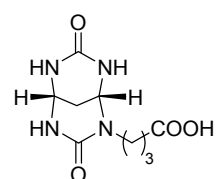




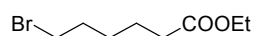
22



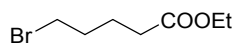
23



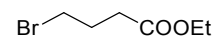
24



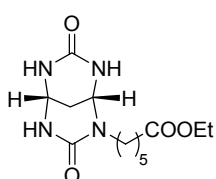
25



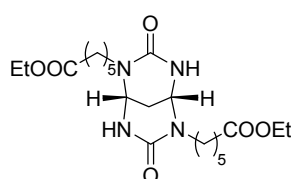
26



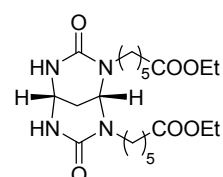
27



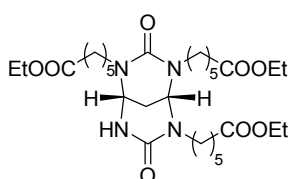
28



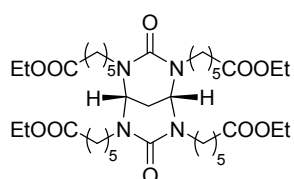
29



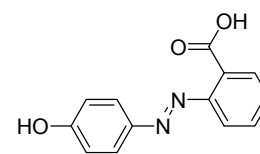
30



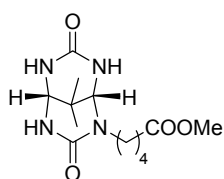
31



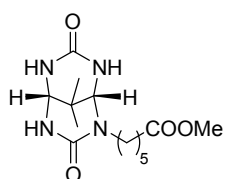
32



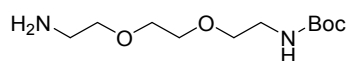
33



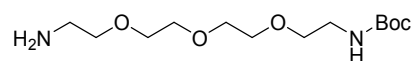
34



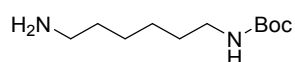
35



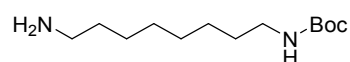
36



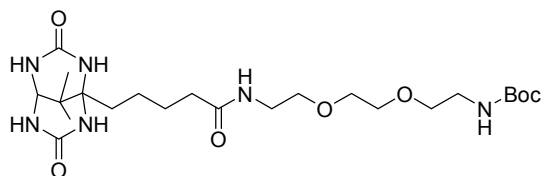
37



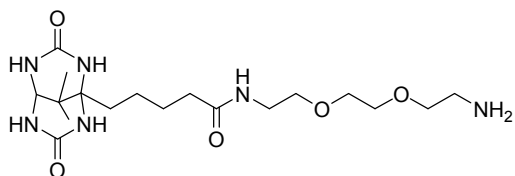
38



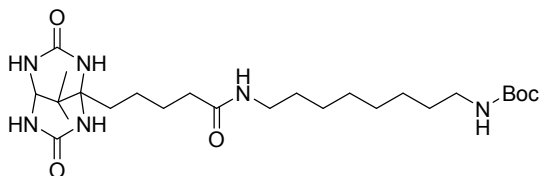
39



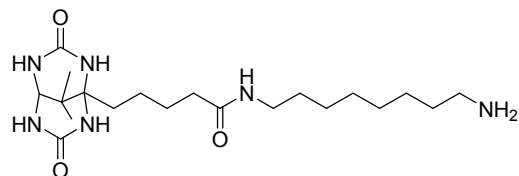
40



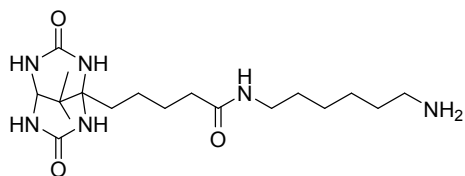
41



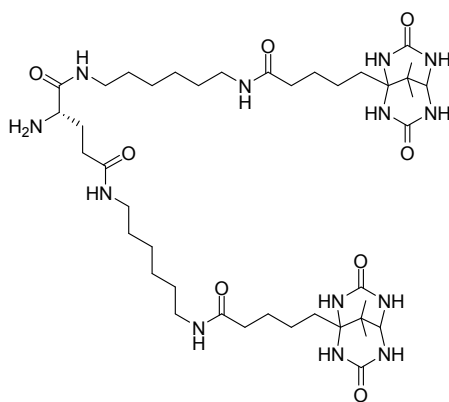
42



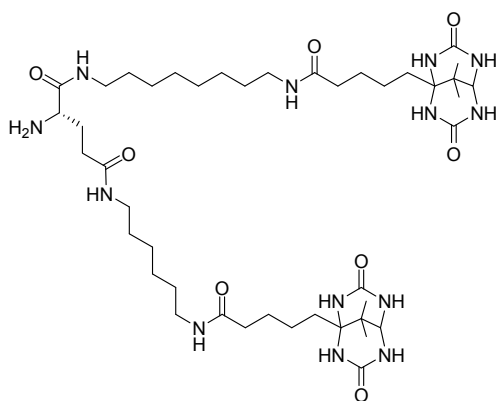
43



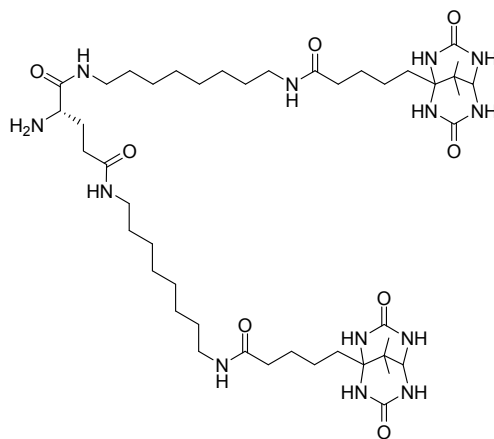
44



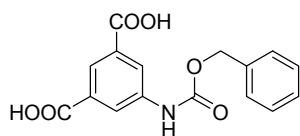
45



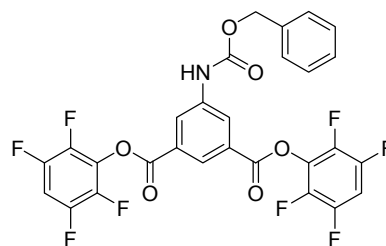
46



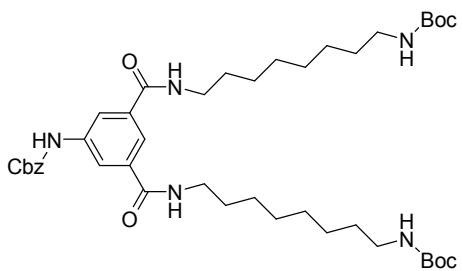
47



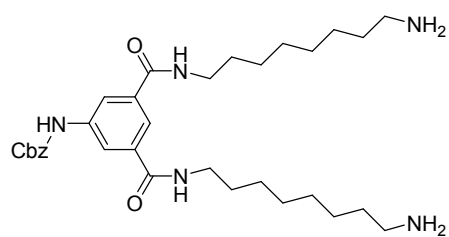
48



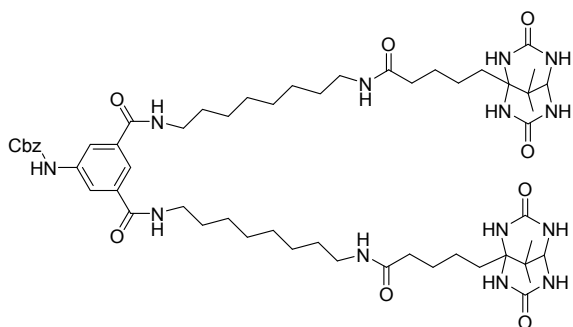
49



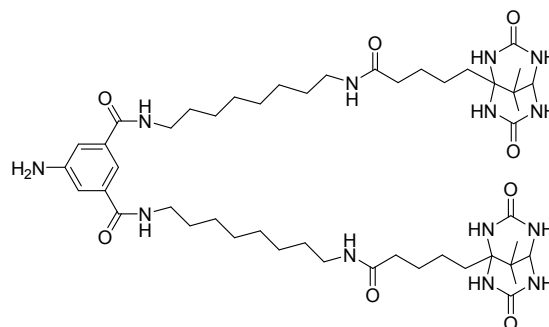
50



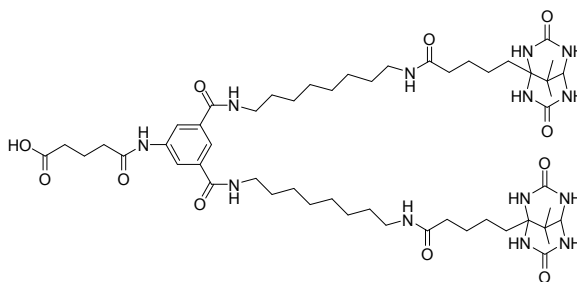
51



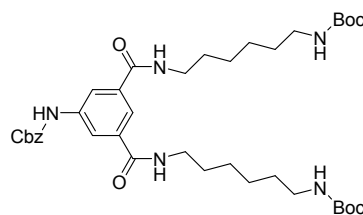
52



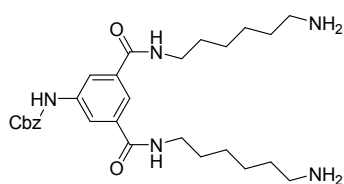
53



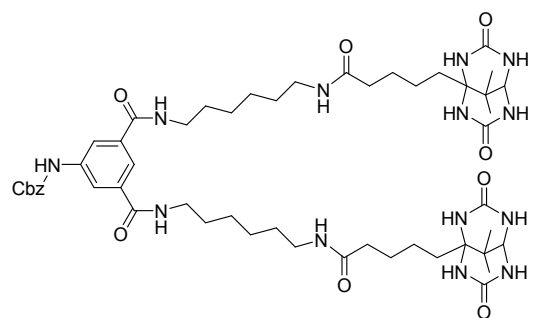
54



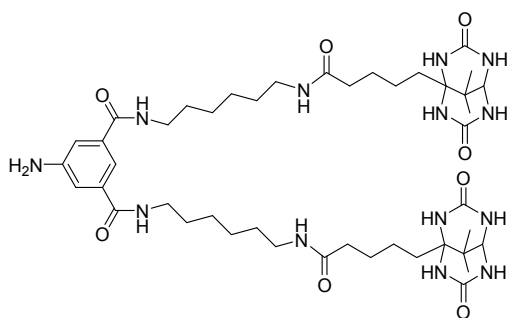
55



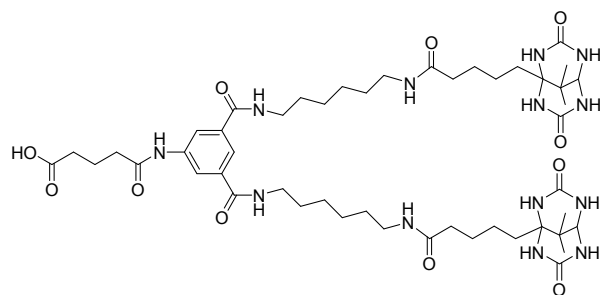
56



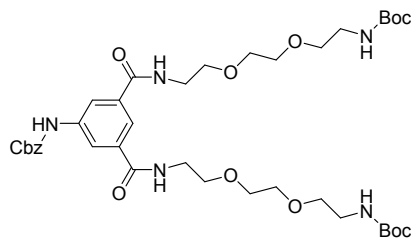
57



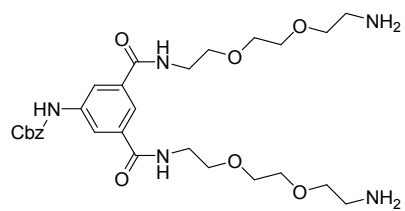
58



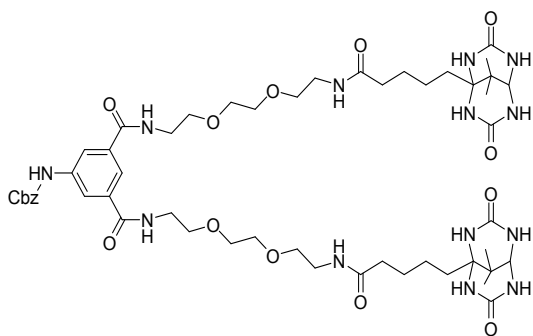
59



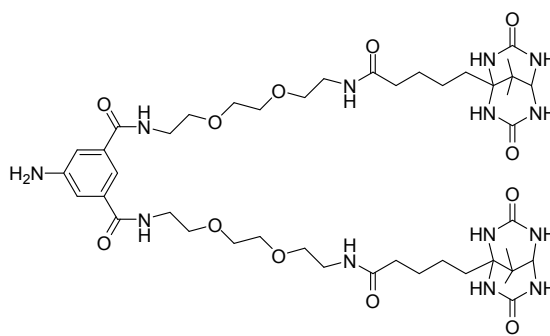
60



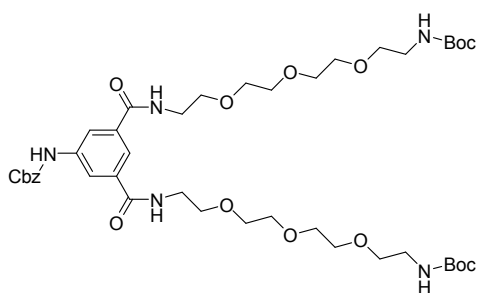
61



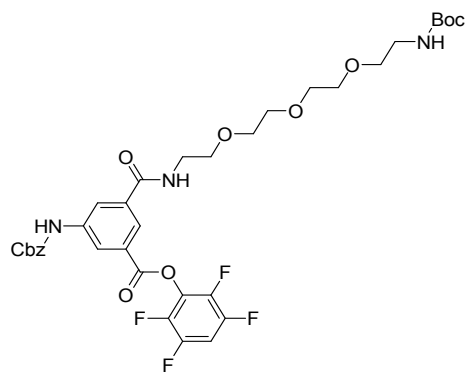
62



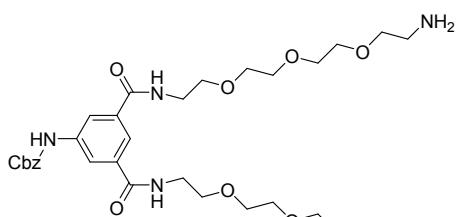
63



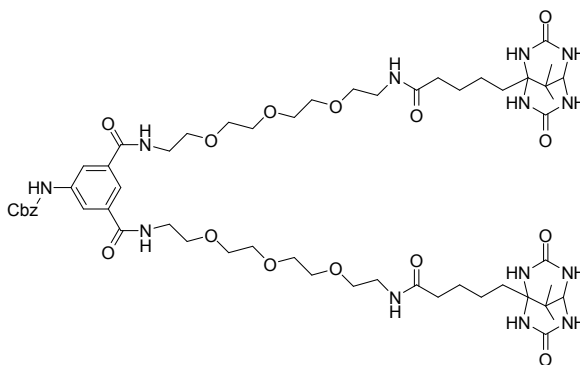
64



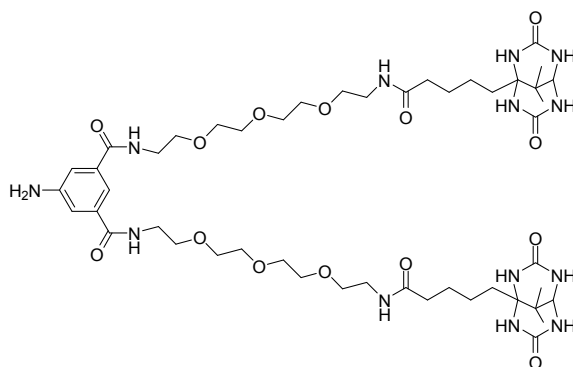
65



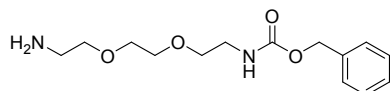
66



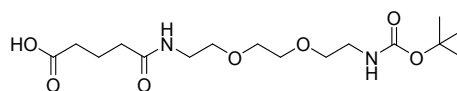
67



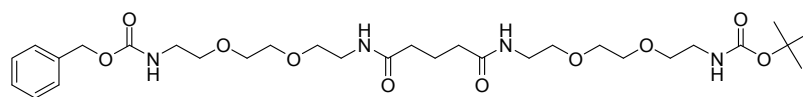
68



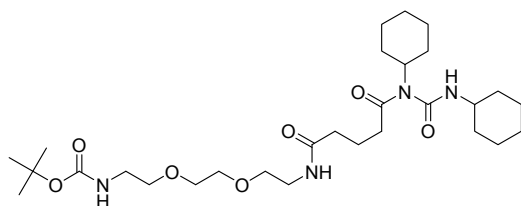
69



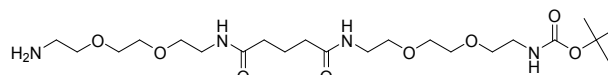
70



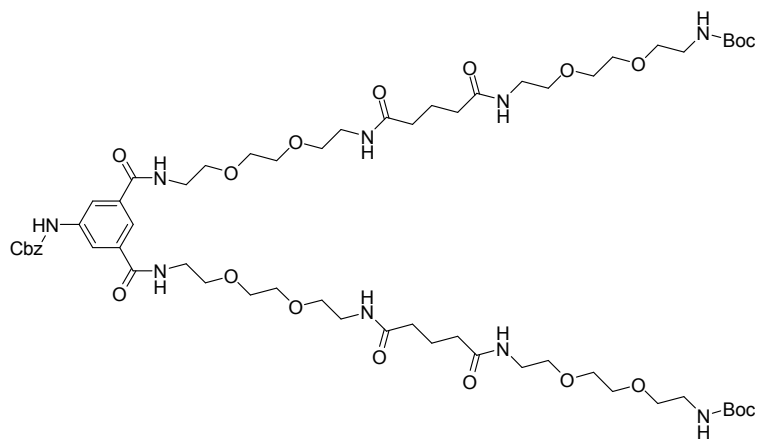
71



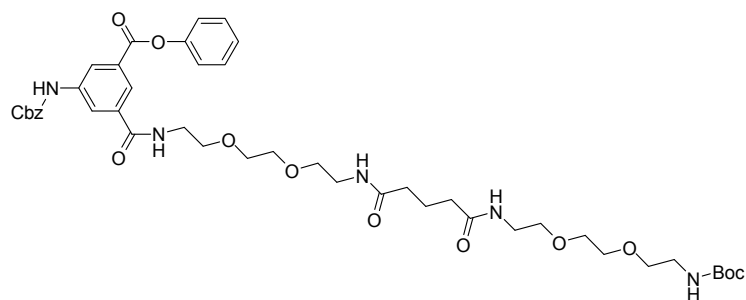
72



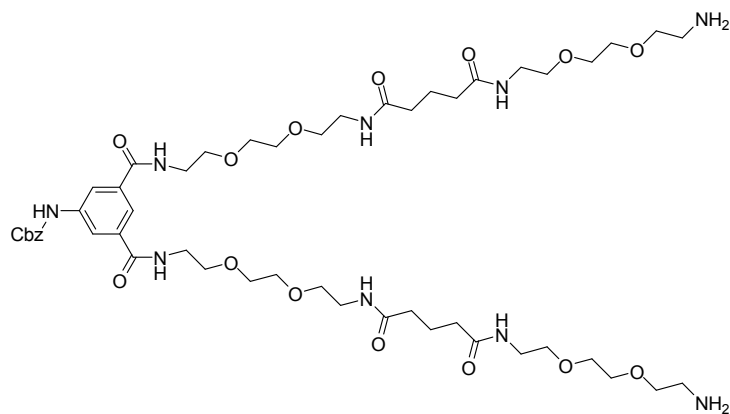
73



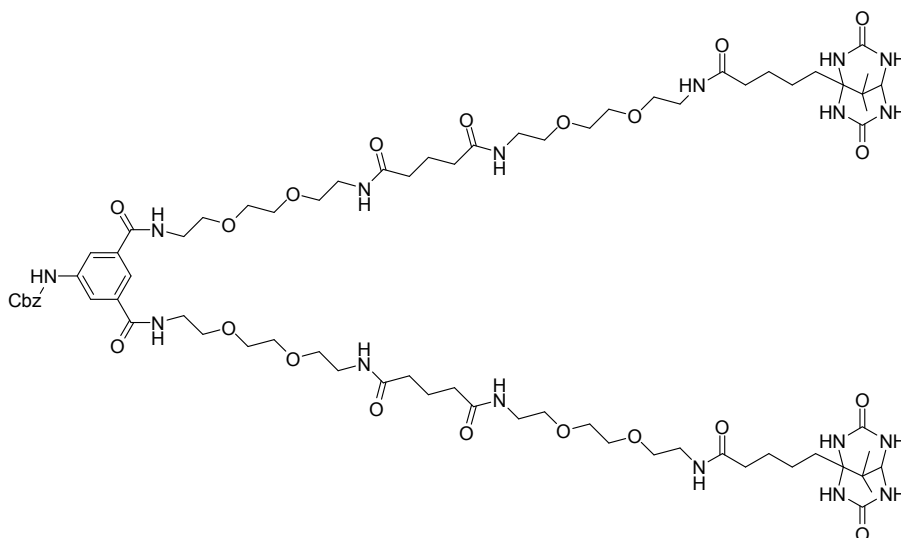
74



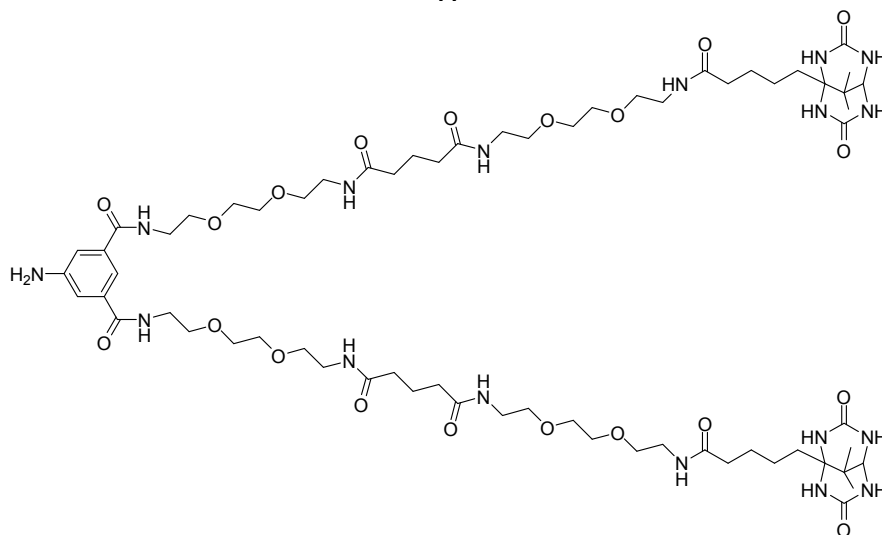
75



76



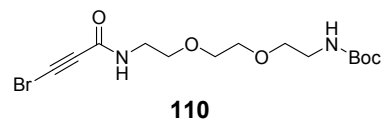
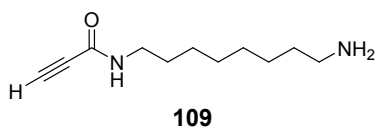
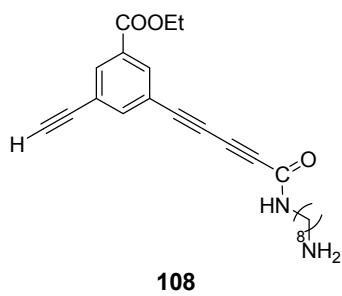
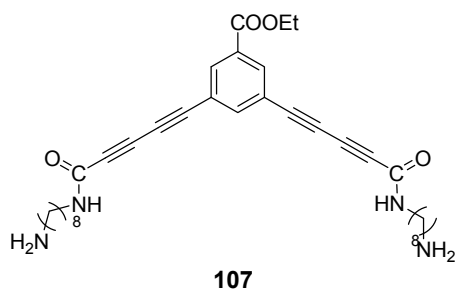
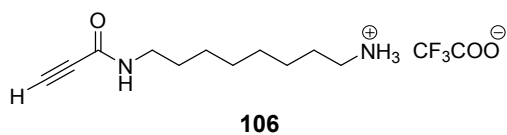
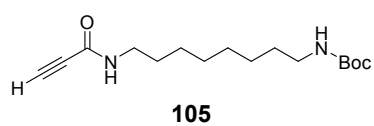
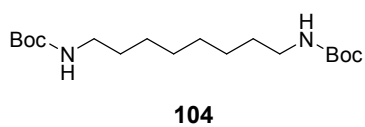
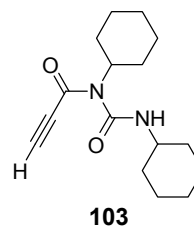
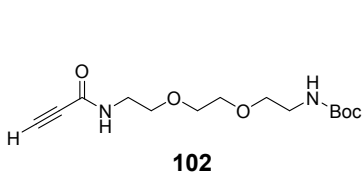
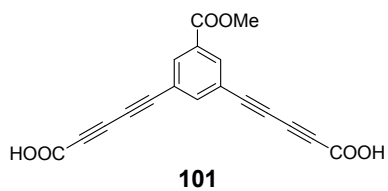
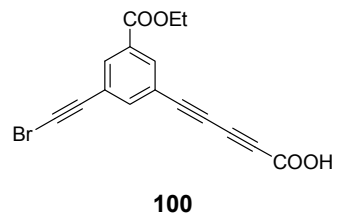
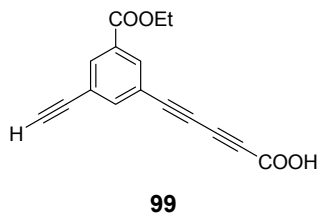
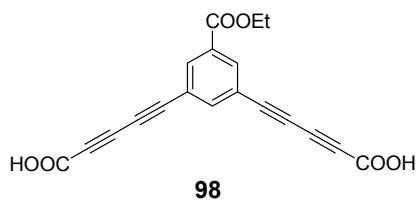
77

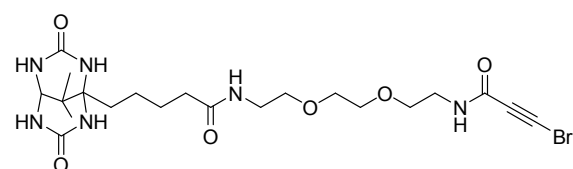
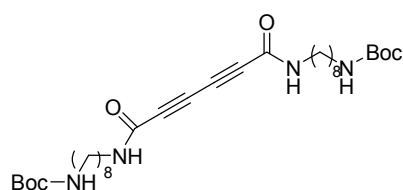
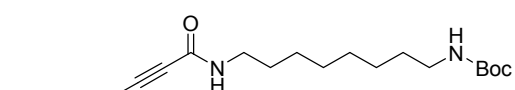
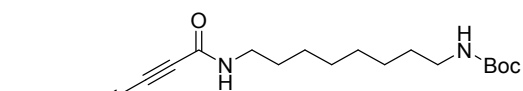
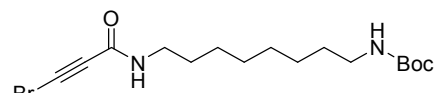
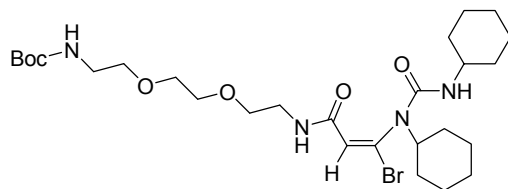
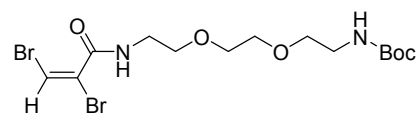
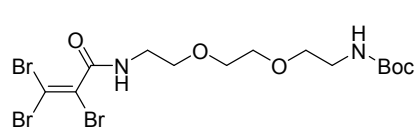


78



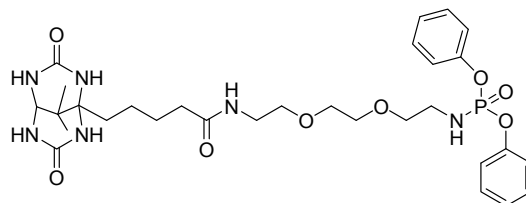




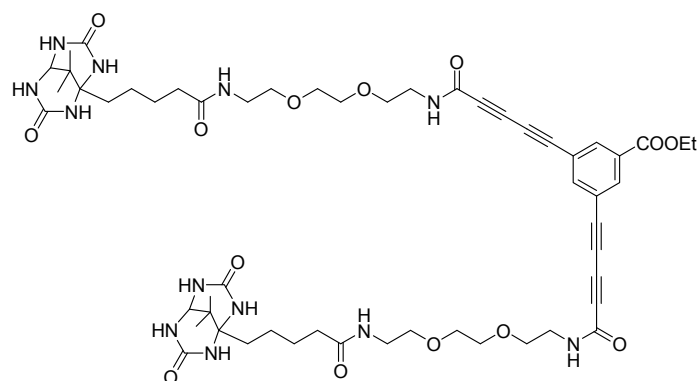


117

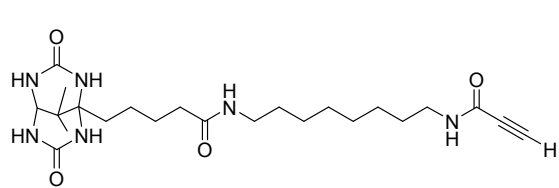
118



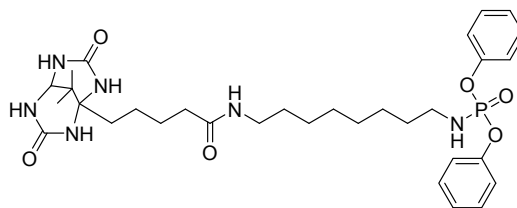
119



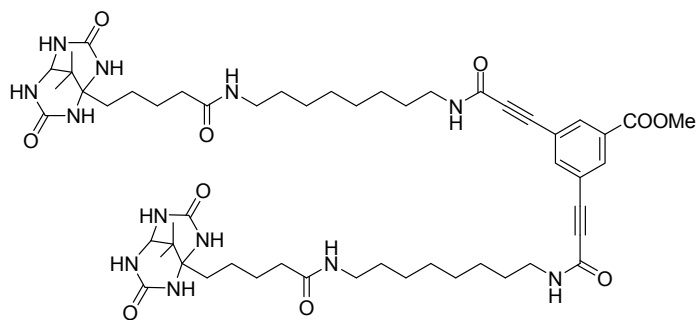
120



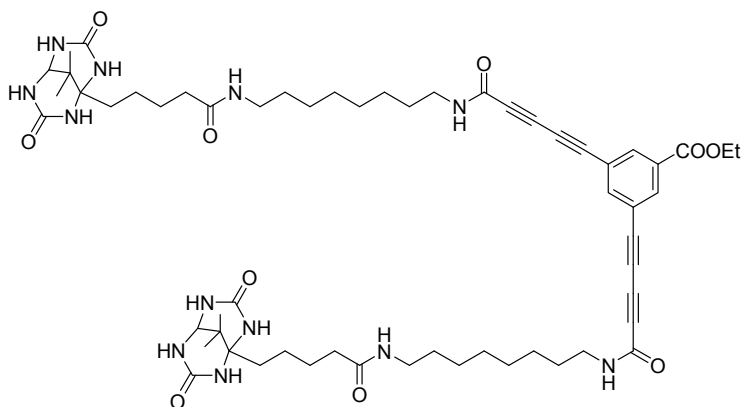
121



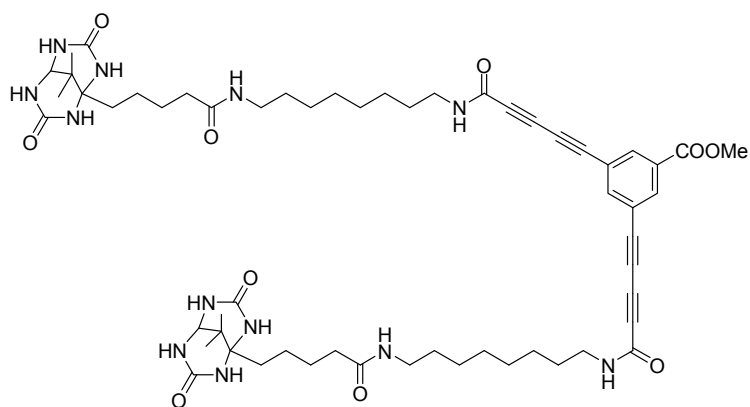
122



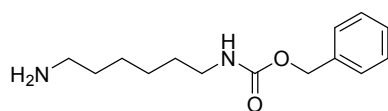
123



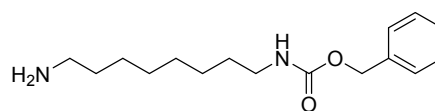
124



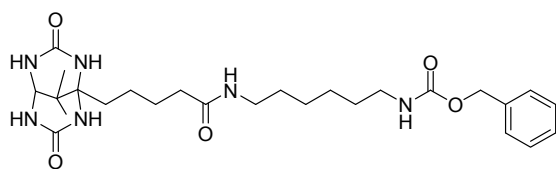
125



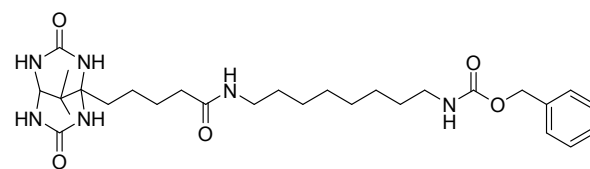
126



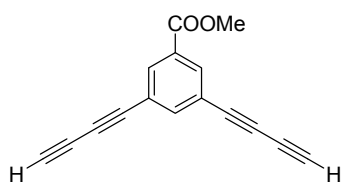
127



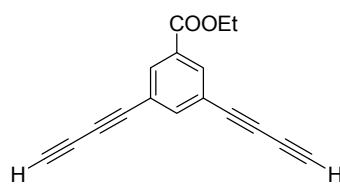
128



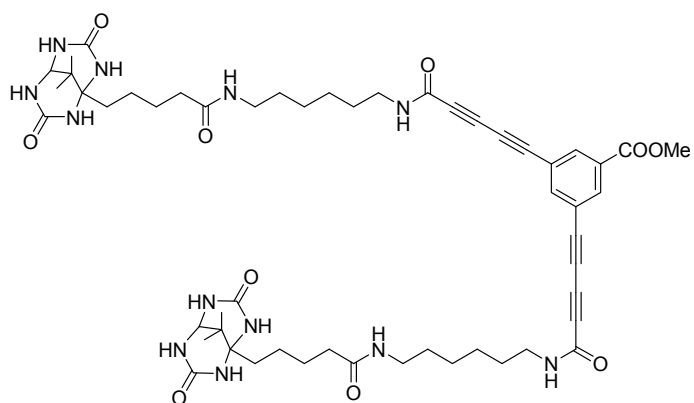
129



130



131



132



**8 BIBLIOGRAFIA**





- (1) Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M. *Advances in Supramolecular Chemistry* **2000**, 6, 41-156.
- (2) Green, N. M. *Advances in Protein Chemistry* **1975**, 29, 85-133.
- (3) Dugas, H. *Biorganic Chemistry*; 3rd. Edition ed.; Springer, 1996.
- (4) Weber, P. C.; Ohlendorf, D. H.; Wendoloski, J. J.; Salemme, F. R. *Science (Washington, DC, United States)* **1989**, 243, 85-8.
- (5) Livnah, O.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Sussman, J. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, 90, 5076-80.
- (6) Brüchner, A. T.; University, Y., Ed. New Haven, CT, 1992.
- (7) Wilchek, M.; Bayer, E. A.; Livnah, O. *Immunology Letters* **2006**, 103, 27-32.
- (8) Green, N. M. *Methods in Enzymology* **1990**, 184, 51-67.
- (9) Rosano, C.; Arosio, P.; Bolognesi, M. *Biomolecular Engineering* **1999**, 16, 5-12.
- (10) Freitag, S.; Le Trong, I.; Klumb, L.; Stayton, P. S.; Stenkamp, R. E. *Protein Science* **1997**, 6, 1157-1166.
- (11) Freitag, S.; Le Trong, I.; Klumb, L. A.; Chu, V.; Chilkoti, A.; Stayton, P. S.; Stenkamp, R. E. *Biomolecular Engineering* **1999**, 16, 13-19.
- (12) Pazy, Y.; Kulik, T.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Livnah, O. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 30892-30900.
- (13) Kuhn, B.; Kollman, P. A. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 3786-3791.
- (14) Freitag, S.; Le Trong, I.; Chilkoti, A.; Klumb, L. A.; Stayton, P. S.; Stenkamp, R. E. *Journal of Molecular Biology* **1998**, 279, 211-221.
- (15) Livnah, O.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Sussman, J. L. *FEBS Letters* **1993**, 328, 165-8.
- (16) Green, N. M. *Biochemical Journal* **1965**, 94, 23c-24c.
- (17) Wilchek, M.; Bayer, E. A. *Methods in Enzymology* **1990**, 184, 5-13.
- (18) Weber, P. C.; Wendoloski, J. J.; Pantoliano, M. W.; Salemme, F. R. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114, 3197-200.
- (19) Hidalgo-Fernandez, P.; Ayet, E.; Canal, I.; Farrera, J.-A. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, 4, 3147-54.
- (20) Katz, B. A.; Liu, B.; Cass, R. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 7914-7920.
- (21) Jansen, R. J.; de Gelder, R.; Rowan, A. E.; Scheeren, H. W.; Nolte, R. J. M. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 2643-2653.
- (22) Jansen, R. J.; Rowan, A. E.; de Gelder, R.; Scheeren, H. W.; Nolte, R. J. M. *Chemical Communications (Cambridge)* **1998**, 121-122.
- (23) Mulder, A.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, 2, 3409-3424.
- (24) Kramer, R. H.; Karpen, J. W. *Nature (London)* **1998**, 395, 710-713.
- (25) Kitov, P. I.; Shimizu, H.; Homans, S. W.; Bundle, D. R. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 3284-3294.
- (26) Huskens, J. *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, 10, 537-543.
- (27) Huskens, J.; Deij, M. A.; Reinhoudt, D. N. *Angewandte Chemie, International Edition* **2002**, 41, 4467-4471.

- (28) Huskens, J.; Mulder, A.; Auletta, T.; Nijhuis, C. A.; Ludden, M. J. W.; Reinhoudt, D. N. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 6784-6797.
- (29) Ballester, P.; Oliva, A. I.; Costa, A.; Deya, P. M.; Frontera, A.; Gomila, R. M.; Hunter, C. A. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 5560-5569.
- (30) Galli, C.; Mandolini, L. *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, 3117-3125.
- (31) Ercolani, G. *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 5699-5703.
- (32) Ercolani, G. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 5052-5057.
- (33) Ercolani, G.; Ioele, M.; Monti, D. *New Journal of Chemistry* **2001**, *25*, 783-789.
- (34) Anderson, H. L.; Anderson, S.; Sanders, J. K. M. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* **1995**, 2231-45.
- (35) Rao, J.; Lahiri, J.; Weis, R. M.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 2698-2710.
- (36) Felluga, F.; Tecilla, P.; Hillier, L.; Hunter, C. A.; Licini, G.; Scrimin, P. *Chemical Communications (Cambridge)* **2000**, 1087-1088.
- (37) Krishnamurthy, V. M.; Semetey, V.; Bracher, P. J.; Shen, N.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 1312-1320.
- (38) Badjic, J. D.; Nelson, A.; Cantrill, S. J.; Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F. *Accounts of Chemical Research* **2005**, *38*, 723-732.
- (39) Ballester, P.; Costa, A.; Deya, P. M.; Frontera, A.; Gomila, R. M.; Oliva, A. I.; Sanders, J. K. M.; Hunter, C. A. *Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 6616-6622.
- (40) Ercolani, G. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 16097-16103.
- (41) Dam, T. K.; Roy, R.; Page, D.; Brewer, C. F. *Biochemistry* **2002**, *41*, 1351-1358.
- (42) Dam, T. K.; Roy, R.; Page, D.; Brewer, C. F. *Biochemistry* **2002**, *41*, 1359-1363.
- (43) Dam, T. K.; Roy, R.; Das, S. K.; Oscarson, S.; Brewer, C. F. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 14223-14230.
- (44) Muller, W.; Ringsdorf, H.; Rump, E.; Wildburg, G.; Zhang, X.; Angermaier, L.; Knoll, W.; Liley, M.; Spinke, J. *Science (New York, N.Y.)* **1993**, *262*, 1706-8.
- (45) Ebato, H.; Herron, J. N.; Mueller, W.; Okahata, Y.; Ringsdorf, H.; Suci, P. *Angewandte Chemie* **1992**, *104*, 1064-6 (See also *Angew Chem, Int Ed Engl*, 1992, 31(8), 1087-90).
- (46) Hannink, J. M.; Cornelissen, J. J. L. M.; Farrera, J. A.; Foubert, P.; De Schryver, F. C.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Nolte, R. J. M. *Angewandte Chemie, International Edition* **2001**, *40*, 4732-4734.
- (47) Taylor, D. M.; Fukushima, H.; Morgan, H. *Supramolecular Science* **1995**, *2*, 75-87.
- (48) Wilbur, D. S.; Pathare, P. M.; Hamlin, D. K.; Weerawarna, S. A. *Bioconjugate Chemistry* **1997**, *8*, 819-832.
- (49) Hamblett, K. J.; Kegley, B. B.; Hamlin, D. K.; Chyan, M.-K.; Hyre, D. E.; Press, O. W.; Wilbur, D. S.; Stayton, P. S. *Bioconjugate Chemistry* **2002**, *13*, 588-598.
- (50) Farrera, J.-A.; Hidalgo-Fernandez, P.; Hannink, J. M.; Huskens, J.; Rowan, A. E.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Nolte, R. J. M. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3*, 2393-2395.
- (51) Hidalgo-Fernández, P.; Farrera, J. A., resultats pendents de publicar.

- 
- (52) Piacenza, G.; Beguet, C.; Wimmer, E.; Gallo, R.; Giorgi, M. *Acta Crystallographica, Section C: Crystal Structure Communications* **1997**, C53, 1459-1462.
- (53) Martín, J. "Master experimental en química orgànica", Universitat de Barcelona, 2003.
- (54) Farrera, J. A.; Nolte, R. J., resultats pendents de publicar.
- (55) DeTitta, G. T.; Edmonds, J. W.; Stallings, W.; Donohue, J. *Journal of the American Chemical Society* **1976**, 98, 1920-6.
- (56) Xu, S.; Gantzel, P. K.; Clark, L. B. *Acta Crystallographica, Section C: Crystal Structure Communications* **1994**, C50, 1988-9.
- (57) Kravchenko, A. N.; Chegaev, K. Y.; Chikunov, I. y. E.; Belyakov, P. A.; Maksareva, E. Y.; Lyssenko, K. A.; Lebedev, O. V.; Makhova, N. N. *Mendeleev Communications* **2003**, 269-271.
- (58) Connors, K. A. *Binding Constants: The Measurements of Molecular Complex Stability*, **1987**.
- (59) Schneider, H.-J.; Yatsimirsky, A. K. *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, **2000**.
- (60) Dalla Cort, A.; Murua, J. I. M.; Pasquini, C.; Pons, M.; Schiaffino, L. *Chemistry--A European Journal* **2004**, 10, 3301-3307.
- (61) Buergisser, E.; Lefkowitz, R. J.; DeLean, A. *Molecular Pharmacology* **1981**, 19, 509-12.
- (62) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescent Spectroscopy*, **1986**.
- (63) Demchenko, A. P. *Ultraviolet Spectrophotometry and Structure of Proteins*, **1981**.
- (64) Konev, S. V. *Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids*, **1967**.
- (65) Weinryb, I.; Steiner, R. F. *Excited States Proteins Nucleic Acids* **1971**, 277-318.
- (66) Lakowicz, J. R.; Editor *Protein Fluorescence. [In: Top. Fluoresc. Spectrosc., 2000; 6]*, **2000**.
- (67) Taboada, L., Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona, 2004.
- (68) Green, N. M. *Biochemical Journal* **1964**, 90, 564-8.
- (69) Chignell, C. F.; Starkweather, D. K.; Sinha, B. K. *Journal of Biological Chemistry* **1975**, 250, 5622-30.
- (70) Lin, H. J.; Kirsch, J. F. *Methods in enzymology* **1979**, 62, 287-9.
- (71) Lehn, J. M. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Pergamon, 1996; Vol. 8.
- (72) Kempen, E. C.; Brodbelt, J. S. *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 5411-5416.
- (73) Dotsikas, Y.; Loukas, Y. L. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, 14, 1123-1129.
- (74) Ayed, A.; Krutchinsky, A. N.; Ens, W.; Standing, K. G.; Duckworth, H. W. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, 12, 339-344.
- (75) Rogniaux, H.; Sanglier, S.; Strupat, K.; Azza, S.; Roitel, O.; Ball, V.; Tritsch, D.; Branlant, G.; Van Dorsselaer, A. *Analytical Biochemistry* **2001**, 291, 48-61.
- (76) Oshovsky, G. V.; Verboom, W.; Fokkens, R. H.; Reinhoudt, D. N. *Chemistry--A European Journal* **2004**, 10, 2739-2748.
- (77) Jorgensen, T. J. D.; Roepstorff, P.; Heck, A. J. R. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 4427-4432.
-

- (78) Hendrickson, W. A.; Paehler, A.; Smith, J. L.; Satow, Y.; Merritt, E. A.; Phizackerley, R. P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86*, 2190-4.
- (79) Hayashi, T.; Hitomi, Y.; Ogoshi, H. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 4910-4915.
- (80) Bryson, A. *Journal of the American Chemical Society* **1960**, *82*, 4858-62.
- (81) Francisco, C. G.; Herrera, A. J.; Suarez, E. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 7439-7445.
- (82) Kada, G.; Kaiser, K.; Falk, H.; Gruber, H. J. *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects* **1999**, *1427*, 44-48.
- (83) Kada, G.; Falk, H.; Gruber, H. J. *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects* **1999**, *1427*, 33-43.
- (84) Stayton, P. S.; Hoffman, A. S.; Murthy, N.; Lackey, C.; Cheung, C.; Tan, P.; Klumb, L. A.; Chilkoti, A.; Wilbur, F. S.; Press, O. W. *Journal of Controlled Release* **2000**, *65*, 203-220.
- (85) Loo, J. A. *Mass Spectrometry Reviews* **1997**, *16*, 1-23.
- (86) Veros, C. T.; Oldham, N. J. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21*, 3505-3510.
- (87) Tang, L.; Hopper, E. D.; Tong, Y.; Sadowsky, J. D.; Peterson, K. J.; Gellman, S. H.; Fitzgerald, M. C. *Analytical Chemistry (Washington, DC, United States)* **2007**, *79*, 5869-5877.
- (88) Frego, L.; Gautschi, E.; Martin, L.; Davidson, W. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, *20*, 2478-2482.
- (89) Meng, C. K.; Fenn, J. B. *American Biotechnology Laboratory* **1990**, *8*, 54-60.
- (90) Light-Wahl, K. J.; Loo, J. A.; Edmonds, C. G.; Smith, R. D.; Witkowska, H. E.; Shackleton, C. H. L.; Wu, C. S. *Biological Mass Spectrometry* **1993**, *22*, 112-20.
- (91) Mann, M.; Wilm, M. *Trends in Biochemical Sciences* **1995**, *20*, 219-24.
- (92) Sarmentero, M. A.; Ballester, P. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2007**, *5*, 3046-3054.
- (93) Rosu, F.; Gabelica, V.; Houssier, C.; De Pauw, E. *Advances in Mass Spectrometry* **2001**, *15*, 795-796.
- (94) Hillenkamp, F.; Karas, M. *Methods in Enzymology* **1990**, *193*, 280-95.
- (95) Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Analytical Chemistry* **1991**, *63*, 1193A-1203A.
- (96) Bacher, G.; Szymanski, W. W.; Kaufman, S. L.; Zollner, P.; Blaas, D.; Allmaier, G. *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *36*, 1038-1052.
- (97) Schwartz, B. L.; Light-Wahl, K. J.; Smith, R. D. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1994**, *5*, 201-4.
- (98) Eckart, K.; Spiess, J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1995**, *6*, 912-19.
- (99) Chodkiewicz, W. *Ann. chim. (Paris) [13]* **1957**, *2*, 819-69.
- (100) Godt, A. *Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 7471-7474.
- (101) Cadiot, P.; Chodkiewicz, W. *Chem. Acetylenes* **1969**, 597-647.
- (102) Alami, M.; Ferri, F. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 2763-6.
- (103) Zal'kind, Y. S.; Aizikovich, M. A. *Zhurnal Obshchei Khimii* **1937**, *7*, 227-33.

- (104) Zal'kind, Y. S.; Fundyler, B. M. *Zhurnal Obshchei Khimii* **1939**, *9*, 1725-8.
- (105) Viehe, H. G.; Franchimont, E.; Valange, P. *Chemische Berichte* **1959**, *92*, 3064-75.
- (106) Cai, C.; Vasella, A. *Helvetica Chimica Acta* **1995**, *78*, 2053-64.
- (107) Cai, C.; Vasella, A. *Helvetica Chimica Acta* **1995**, *78*, 732-57.
- (108) Amatore, C.; Blart, E.; Genet, J. P.; Jutand, A.; Lemaire-Audoire, S.; Savignac, M. *Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60*, 6829-39.
- (109) Cassar, L. *Journal of Organometallic Chemistry* **1975**, *93*, 253-7.
- (110) Weber, E.; Hecker, M.; Koepp, E.; Orlia, W.; Czugler, M.; Csoregh, I. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry (1972-1999)* **1988**, 1251-7.
- (111) Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Letters* **1975**, 4467-70.
- (112) Sonogashira, K. *Journal of Organometallic Chemistry* **2002**, *653*, 46-49.
- (113) Sonogashira, K. *Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis* **2002**, *1*, 493-529.
- (114) Amatore, C.; Jutand, A. *Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis* **2002**, *1*, 943-972.
- (115) Amatore, C.; Jutand, A. *Accounts of Chemical Research* **2000**, *33*, 314-321.
- (116) Amatore, C.; Jutand, A.; Khalil, F.; M'Barki, M. A.; Mottier, L. *Organometallics* **1993**, *12*, 3168-78.
- (117) Grosshenny, V.; Romero, F. M.; Ziessel, R. *Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 1491-1500.
- (118) Austin, W. B.; Bilow, N.; Kelleghan, W. J.; Lau, K. S. Y. *Journal of Organic Chemistry* **1981**, *46*, 2280-6.
- (119) Singh, R.; Just, G. *Journal of Organic Chemistry* **1989**, *54*, 4453-7.
- (120) Alami, M.; Ferri, F.; Linstrumelle, G. *Tetrahedron Letters* **1993**, *34*, 6403-6.
- (121) Houpis, I. N.; Choi, W. B.; Reider, P. J.; Molina, A.; Churchill, H.; Lynch, J.; Volante, R. P. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 9355-8.
- (122) Yahiro, K.; Morinaga, N.; Satoh, M.; Matsuura, G.; Tomonaga, T.; Nomura, F.; Moss, J.; Noda, M. *Molecular Microbiology* **2006**, *62*, 480-490.
- (123) Kappe, C. O. *Angewandte Chemie, International Edition* **2004**, *43*, 6250-6284.
- (124) Whittaker, A. G.; Mingos, D. M. P. *Dalton* **2000**, 1521-1526.
- (125) Adam, W.; Bialas, J.; Hadjiarapoglou, L. *Chemische Berichte* **1991**, *124*, 2377.
- (126) Baghurst, D. R.; Mingos, D. M. P. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1992**, 674-7.
- (127) Gabriel, C.; Gabriel, S.; Grant, E. H.; Grant, E. H.; Halstead, B. S. J.; Mingos, D. M. P. *Chemical Society Reviews* **1998**, *27*, 213-224.
- (128) Stuerger, D.; Delmotte, M. *Microwaves in Organic Synthesis* **2002**, 1-33.
- (129) Goncalves, P. F. B.; Stassen, H. *Pure and Applied Chemistry* **2004**, *76*, 231-240.
- (130) Timmel, C. R.; Hore, P. J. *Chemical Physics Letters* **1996**, *257*, 401-408.
- (131) Woodward, J. R.; Jackson, R. J.; Timmel, C. R.; Hore, P. J.; McLauchlan, K. A. *Chemical Physics Letters* **1997**, *272*, 376-382.
- (132) Hayes, B. L. *Microwave synthesis: Chemistry at the speed of light* Matthews NC, **2002**.

- (133) Li, J.; Mau, A. W. H.; Strauss, C. R. *Chemical Communications (Cambridge)* **1997**, 1275-1276.
- (134) Erdelyi, M.; Gogoll, A. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 4165-4169.
- (135) Morisawa, Y.; Konishi, K.; Kataoka, M.; (Sankyo Co., Ltd., Japan). Application: EP EP, 1982, p 37 pp.
- (136) Marino, J. P.; Nguyen, H. N. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 6841-6844.
- (137) Shultz, D. A.; Gwaltney, K. P.; Lee, H. *Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, 4034-4038.
- (138) Eaborn, C.; Walton, D. R. M. *Journal of Organometallic Chemistry* **1965**, 4, 217-28.
- (139) Ouyang, X.; Fowler, F. W.; Lauher, J. W. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 12400-12401.
- (140) Armitage, J. B.; Whiting, M. C. *Journal of the Chemical Society* **1952**, 2005-10.
- (141) Cary, J. M.; Moore, J. S. *Organic Letters* **2002**, 4, 4663-4666.
- (142) Blencowe, A.; Davidson, L.; Hayes, W. *European Polymer Journal* **2003**, 39, 1955-1963.
- (143) Thorand, S.; Krause, N. *Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, 8551-8553.
- (144) Forster, B.; Bertran, J.; Teixidor, F.; Vinas, C. *Journal of Organometallic Chemistry* **1999**, 587, 67-73.
- (145) Matsuda, K.; Stone, M. T.; Moore, J. S. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, 11836-11837.
- (146) Howarth, M.; Chinnapen, D. J. F.; Gerrow, K.; Dorrestein, P. C.; Grandy, M. R.; Kelleher, N. L.; El-Husseini, A.; Ting, A. Y. *Nature Methods* **2006**, 3, 267-273.
- (147) Sugihara, Y.; Yamashita, T.; Shibata, S.; Matsumura, K.; Kuwazuru, Y.; (Takeda Chemical Industries, Ltd., Japan). EP, **1995**, p 44 pp.
- (148) Francisco, C. G.; Herrera, A. J.; Suarez, E. *Journal of Organic Chemistry* **2003**, 68, 1012-1017.
- (149) Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Rogers, V.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis. 4th Ed*, 1978.
- (150) Favretto, L. *Molecular Diversity* **2003**, 7, 287-290.
- (151) Gribble, G. W.; Ferguson, D. C. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1975**, 535-6.
- (152) Schanche, J.-S. *Molecular Diversity* **2003**, 7, 293-300.
- (153) Chegaev, K. Y.; Kravchenko, A. N.; Lebedev, O. V.; Strelenko, Y. A. *Mendeleev Communications* **2001**, 32-33.
- (154) Bertz, S. H.; Dabbagh, G. *Journal of Organic Chemistry* **1990**, 55, 5161-5.
- (155) Bugnet, E. A.; Nixon, T. D.; Kilner, C. A.; Greatrex, R.; Kee, T. P. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, 5491-5494.
- (156) Han, S.-Y.; Choi, S. H.; Kim, M. H.; Lee, W. G.; Kim, S. H.; Min, Y. K.; Kim, B. T. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 2915-2919.
- (157) Pastorin, G.; Wu, W.; Wieckowski, S.; Briand, J.-P.; Kostarelos, K.; Prato, M.; Bianco, A. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)* **2006**, 1182-1184.
- (158) Roy, B. C.; Mallik, S. *Journal of Organic Chemistry* **1999**, 64, 2969-2974.

(159) Laurence, C.; Guilleme, J.; Kirschleger, B. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry (1972-1999)* **1981**, 1341-3.

(160) Motrenko, T. I.; Sevbo, D. P.; Nekhoroshev, A. A.; Ginzberg, O. F. *Zhurnal Organicheskoi Khimii* **1978**, 14, 1669-76.

(161) Bachman, G. B.; Finholt, R. W. *Journal of the American Chemical Society* **1948**, 70, 622-4.

(162) Wegner, G. *Zeitschrift fuer Naturforschung, Teil B: Anorganische Chemie, Organische Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie* **1969**, 24, 824-32.