

Tesi doctoral

PRODUCTES NATURALS COM A FONT DE NOUS FÀRMACS:
SÍNTESI EN FASE SÒLIDA DE DEPSIPÈPTIDS CÍCLICS I AÏLLAMENT
D'AGENTS ANTITUMORALS D'ESPONGES MARINES

Núria Bayó Puxan

Departament de Química Orgànica
Facultat de Química. Universitat de Barcelona

Institut de Recerca Biomèdica
Parc Científic de Barcelona. Universitat de Barcelona

Barcelona, 1 Setembre 2006

Memòria presentada per

Núria Bayó Puxan

Per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi Doctoral dirigida per :

Dr. Ernesto Nicolás Galindo

Dr. Fernando Albericio Palomera



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Programa de Doctorat: Bienni 2002-2004

Departament de Química Orgànica.

Facultat de Química. Universitat de Barcelona

Per a vosaltres, família

Índex General

Abreviacions	
INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	5
RESULTATS I DISCUSSIÓ	
CAPÍTOL 1:	
Síntesi d'un anàleg de la sirengotoxina, un depsipèptid cíclic anti-Leishmania	33
CAPÍTOL 2:	
Síntesi de l'azatiocoralina, un pèptid simètric i bicíclic anàleg de la tiocoralina	79
CAPÍTOL 3:	
La tiocoralina, nova síntesi en fase sòlida	151
CAPÍTOL 4:	
Aïllament i caracterització de compostos antitumorals d'esponges marines	241
CONCLUSIONS	279
PART EXPERIMENTAL	287
Annex 1. Taules d'aminoàcids, reactius i grups protectors emprats	
Annex 2. Nomenclatura abreviada per pèptids cíclics, ramificats, homo- o heterodètics	
Annex 3. Espectres de RMN del didehidropèptid Fmoc-Thr('Bu)-(Z)-Dhb-OH	
Annex 4. Articles publicats i acceptats	

ABREVIACIONS

AA; aa*	Aminoàcid
AAA	Anàlisi d'aminoàcids
Acm	Acetamidometil
Ac₂O	Anhídrid d'acètic
AcOEt	Acetat d'etil
AcOH	Àcid acètic
Alloc	Al·liloxycarbonil
Alloc-Cl	Cloroformiat d'al·lil
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
Boc₂O	Anhídrid de <i>tert</i> -butoxicarbonil
CCF	Cromatografia en cap fina
Cis	Cistina
COSY	Espectrometria de correlació
¹³C-RMN	Ressonància magnètica nuclear de carboni 13
CTC-PS	Resina 2-clorotritil o resina de Barlos
d	Dublet
δ	Desplaçament químic
DAST	Trifluorur de dietilaminosulfur
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]unde-7-ene
DCM	Diclorometà
DEAD	Dietilazodicarboxilat
Dhb	Àcid α,β-didehidroaminobutíric
DHB	Àcid 2,5-dihidroxibenzoic
DIEA	<i>N,N'</i> -Diisopropiletilamina
DIPCDI	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida
DKP	2,5-Dicetopiperazina
CMB	Center of Molecular Biodiversity (Brisbane, Australia)
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N'</i> -Dimetilformamida
DSC	Carbonat de <i>N,N'</i> -disuccinimil
DTT	Ditiotreitol
EDC-HCl	Hidroclorur de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>n'</i> -etilcarbodiimida
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
EM	Espectrometria de masses
EM-IQ	Espectroscopia de masses amb ionització química
eq	Equivalent

* Les abreviacions emprades per als aminoàcids i pèptids segueixen les regles de la IUPAC-IUB descrites al *J. Pep. Sci.*, **2003**, 9, 1-8. Tot i que les abreviacions de la IUPAC-IUB per un *N*-metil aminoàcid és MeXX, per evitar confusions amb els *N*-metil aminoàcids, emprarem l'abreviació NMe-XX.

ESI	Ionització per electrospri
Et₃N	Trietilamina
Et₂O	Èter dietílic
EtOH	Etanol
f	Funcionalització del suport polimèric
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonil
Fmoc-Cl	Clorur de 9-fluorenilmetoxicarbonil
GP	Grup protector
HATU	Tetrafluorofosfat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i>]piridin-1-il-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamini
HBTU	Hexafluorofosfat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamini
HFA	Hexafluoroacetona
HOAt	7-Aza-1-hidroxibenzotriazol
HOBt	1-Hidroxibenzotriazaol
HOSu	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
HOPfp	Pentafluorofenol
HPLC	Cromatografia líquida d'alta pressió
HPLC-EM	Cromatografia líquida d'alta pressió amb detecció per espectrometria de masses
HPLC-ELSD	Cromatografia líquida d'alta pressió amb detecció per dispersió de la llum
3HQA	Àcid 3-hidroxiquinàldic
¹H-RMN	Ressonància magnètica nuclear de protó
Hz	Herz
IC₅₀	Concentració de mostra que causa el 50 % de mort cel·lular
IG₅₀	Concentració de mostra que inhibeix el 50 % del creixement cel·lular
IR	Espectroscopia d'infraroig
<i>J</i>	Constant d'acoblament
λ	Longitud d'ona
<i>m</i>	Multiplet
MALDI-TOFF	Espectrometria de masses de desorció iònica provocada per làser, assistida per matriu i anàlisi de temps de vol
MeCN	Acetonitril
MeOH	Metanol
MFS	<i>N</i> -metilació en fase sòlida segons Miller i Scanlan
MS	Espectrometria de masses
Me	Metil
Mmt	Metoxitritil
MSNT	1-(mesitilè-2-sulfonil)-3-nitro-1,2,4-triazol
MST	Àcid mirístic (àcid tetradecanoic)
MTBD	Metil-4-nitrobenzenesulfonat
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -Butanol
NMe	Aminometil
NMeI	<i>N</i> -metilimidazol
NOESY	Espectrometria d'efecte nuclear Overhauser
Npys	3-nitro-2-piridilsulfenil

OMS	Organització Mundial de la Salut
oNBS	o-Nitrobenzenesulfonyl
OSu	Èster de <i>N</i> -hidroxisuccinimida
PDA	Fotodiode array
Pip	piperidina
<i>p</i>NZ	<i>p</i> -Nitrobenziloxycarbonil
<i>p</i>NZ-Cl	Cloroforniat de <i>p</i> -nitrobenzil
PPh₃	Trifenilfosfina
ppm	Parts per milió
PS	Poliestirè
PTSA	Àcid <i>p</i> -toluensulfònic
PyOAP	Hexafluorofosfat de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidin)fosfoni
QNA	Àcid quinàldic
QXA	Àcid 2-quinoxalinecarboxilic
R_f	Factor de retenció a la cromatografia de capa fina
s	Singulet
Scm-Cl	Clorur de metoxicarbonilsulfenil
^tBu	<i>tert</i> -Butil
TBAF	Fluorur de <i>n</i> -butilamoni
TBDMS	<i>tert</i> -Butildimetilsilil
TBME	<i>tert</i> -Butilmetilèter
TBTU	Tetrafluoroborat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(1 <i>h</i> -benzotriazol-1-il)-dimetilaminometilen]- <i>N</i> -metilmetanamini
Tce	Èster de 2,2,2-tricloroetanol
TFA	Àcid trifluoroacètic
THF	Tetrahidrofurà
TES	Trietilsilà
TGI	Concentració de mostra que causa la inhibició total del creixement
TIS	Triisopropilsilà
TMS	Trimetilsilil
TMS-Cl	Clorur de trimetilsilil
t_R	Temps de retenció
Troc	2,2,2-tricloroetoxycarbonil
Troc-Cl	Cloroforniat de 2,2,2-tricloroetil
Trt	Tritil
Trt-Cl	Clorur de tritil
Ts	Tosil
UV	Ultraviolat
Z	Benziloxycarbonil
&	Enllaç

PART EXPERIMENTAL



1.	MATERIALS I MÈTODES	293
1.1	DISSOLVENTS I REACTIUS	293
1.1.1	Dissolvents	293
1.1.2	Reactius	294
1.2	INSTRUMENTACIÓ BÀSICA GENERAL	294
1.3	CROMATOGRAFIA	295
1.3.1	Cromatografia en capa fina	295
1.3.2	Cromatografia en columna	295
1.3.3	Cromatografia líquida d'alta resolució a escala analítica (HPLC)	295
1.3.4	Cromatografia líquida d'alta resolució a escala semipreparativa i preparativa	297
1.4	MÈTODES DE DETERMINACIÓ ESTRUCTURAL	297
1.4.1	Espectrometria de masses	297
1.4.2	Espectrometria de Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)	298
1.4.3	Espectrometria d'infraroig	298
1.4.4	Espectrometria d'UV-vis	298
1.5	PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS DE LA SÍNTESI DE PÈPTIDS EN FASE SÒLIDA	299
1.5.1	Consideracions generals de la síntesi	299
1.5.2	Tests d'identificació	299
1.5.3	Hidròlisi i anàlisi d'aminoàcids	301
1.5.4	Síntesi en fase sòlida emprant l'estratègia de protecció Fmoc/ ^t Bu	302
2.	SÍNTESI D'UN ANÀLEG DE LA SIRENGOTOXINA, DEPSIPÈPTID CÍCLIC ANTI-LEISHMANIA	308
2.1	SÍNTESI DEL DIDEHIDROPÈPTID Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OSu	308
2.1.1	Síntesi de Fmoc-Thr(^t Bu)-OSu	308
2.1.2	Síntesi del dipèptid Fmoc-Thr(^t Bu)-Thr-OH	309
2.1.3	Intent de deshidratació del dipèptid Fmoc-Thr(^t Bu)-Thr-OH amb DSC	309
2.2	SÍNTESI DEL DIDEHIDROPÈPTID Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH	310
2.2.1	Síntesi de H-Thr-Oal ·Hl	310
2.2.2	Síntesi del dipèptid Fmoc-Thr(^t Bu)-Thr-Oal ·Hl	311
2.2.3	Obtenció del didehidropèptid Fmoc-Thr(^t Bu)-(Z)-Dhb-Oal ·Hl	312
2.2.4	Síntesi de Fmoc-Thr(^t Bu)-(Z)-Dhb-OH	313

2.3	SÍNTESI DELS DIDEHIDROPÈPTIDS	
	Fmoc-THR(^tBu)-(Z)-DHB-OME I Fmoc-THR(^tBu)-(Z)-DHB-OCH₂COPH	314
2.3.1	Síntesi del dipèptid Fmoc-Thr(^t Bu)-Thr-OME	314
2.3.2	Síntesi del HCl H-Thr-CH ₂ COPh	315
2.3.3	Síntesi del dipèptid Fmoc-Thr(^t Bu)-Thr-OCH ₂ COPh	316
2.3.4	Intent de deshidratació dels dipèptids Fmoc-Thr(^t Bu)-Thr-OME i Fmoc-Thr(^t Bu)-Thr-OCH ₂ COPh	316
2.4	SÍNTESI DE [MST, D-SER⁴, THR⁶, ASP⁹] SIRENGOTOXINA	317
2.4.1	Síntesi de Alloc-Ser-OH	317
2.4.2	Síntesi de la tetrapeptidil-resina [Alloc-Ser(&)-D-Dab(Boc)-Gly-resina CTC-PS] [Fmoc-Thr&]	318
2.4.3	Obtenció del depsipèptid lineal protegit [H-D-Ser-Orn(Boc)-Thr(^t Bu)-(Z)-Dhb-Asp(O ^t Bu)-Thr(^t Bu)&] [MST-Ser-&)-D- Dab(Boc)-Gly-OH]	319
2.4.4	Ciclació del depsipèptid lineal protegit	320
2.4.5	Eliminació dels grups protectors de les cadenes laterals	321
2.4.6	Obtenció del [MST, D-Ser ⁴ , Thr ⁶ , Asp ⁹] sirengotoxina	321
3.	SÍNTESI DE LA TIOCORALINA I ANÀLEGS	322
3.1	SÍNTESI DELS DERIVATS D'AZATIOCORALINA	322
3.1.1	[QXC, NMe-Ala ⁴] azatiocoralina i [QNA, NMe-Ala ⁴] azatiocoralina	322
3.1.2	Síntesi de [NMe-Leu ⁴] azatiocoralina. Dues ciclacions en fase sòlida	326
3.2	SÍNTESI DE L'AZATIOCORALINA	328
3.2.1	Síntesi de la cadena lineal {[Boc-D-Dap(& ¹)-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)& ²] [H-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)& ¹] [Boc-D-Dap(& ²)-CTC-PS]}	328
3.2.2	Les dues ciclacions: {[Boc-D-Dap(& ¹)-Gly-NMe-Cys(& ²)-NMe-Ala& ³] [Boc-D-Dap(& ³)-Gly-NMe-Cys(& ²)-NMe-Ala& ¹]}	330
3.2.3	[2QXA] azatiocoralina	331
3.2.4	Azatiocoralina	331
3.3	CAP A LA SÍNTESI DE L'OXATIOCORALINA	332
3.3.1	Síntesi dels monòmers d'oxatiocoralina	332
3.3.2	[QNA, NMe-Leu ³ , NMe-Leu ⁴] oxatiocoralina	334
3.4	SÍNTESI DELS DERIVATS DE TIOCORALINA	337
3.4.1	Cap a la síntesi de [QNA, NMe-Leu ³ , NMe-Leu ⁴] tiocoralina	337
3.4.2	[QNA, NMe-Leu ⁴] tiocoralina	339

3.5	TIOCORALINA	341
3.5.1	Síntesi del monòmer Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH	341
3.5.2	Acoblaments 4+3+1: {[Boc-D-Cys(Trt)-Gly-NMe-Cys(&1)-NMe-Cys(Me)&2] [Boc-D-Cys(&2)-Gly-NMe-Cys(&1)-NMe-Cys(Me)-OH]}.	342
3.5.3	Tiocoralina	343
4.	SÍNTESI DELS AMINOÀCIDS DE LA TIOCORALINA I ANÀLEGS	344
4.1	SÍNTESI DE LES CISTEÏNES N-METILADES	344
4.1.1	HCl HMe-Cys-OH	344
4.1.2	HCl HMe-Cys(Me)-OH	344
4.1.3	HCl HMe-Cys(Acm)-OH	345
4.1.4	Protecció amb el grup Fmoc: Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH i Fmoc-NMe-Cys(Acm)	345
4.1.5	Protecció amb el grup Alloc: Alloc-NMe-Cys(Me)-OH i Alloc-NMe-Cys(Acm)-OH	347
4.1.6	Protecció amb el grup pNZ: pNZ-NMe-Cys(Acm)-OH	348
4.1.7	Protecció amb el grup Boc: Boc-NMe-Cys(Me)-OH i Boc-NMe-Cys(Acm)-OH	349
4.2	OBTENCIÓ DE D-CISTEÏNES PROTEGIDES	350
4.2.1	Obtenció de Troc-D-Cys(Trt)-OH en solució	350
4.2.2	Obtenció de Troc-D-Cys(Trt)-OH en fase sòlida	351
4.2.3	Obtenció de Boc-D-Cys(S ^t Bu)-OH	352
4.3	OBTENCIÓ D'AMINOÀCIDS NO DERIVATS DE LA CISTEÏNA	353
4.3.1	Obtenció de H-D-Dap(Fmoc)-Oal iil	353
4.3.2	Obtenció d'Alloc-Gly-OH i pNZ-Gly-OH. Mètode de l'azida	354
4.3.3	Obtenció d'Alloc-NMe-Leu-OH	355
4.3.4	Obtenció de Boc-NMe-Ala	356
4.3.5	Obtenció de Boc-D-Ser(TBDMS)-OH	356
4.3.6	Obtenció de Fmoc-Gly-F	357
4.4	OBTENCIÓ DE DIPÈPTIDS EN FASE SÒLIDA	357
4.4.1	Obtenció de Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH	357
4.4.2	Obtenció de Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH	358
5.	ANTITUMOR COMPOUNDS FROM AUSTRALIAN MARINE SPONGES	359
5.1	COLLECTION, EXTRACTION, AND ISOLATION	359
5.1.1	CMB-02633-A.	359
5.1.2	CMB-02633-B	360
5.1.3	Trunculin C	360

5.1.4	Trunculin E	360
5.2	NEW CHEMISTRY AFFORDABLE TRUNCULINS A & B	361
5.2.1	Trunculin A methyl ester	361
5.2.2	Hydrogenation of trunculin A	361
5.2.3	Ester Methyl of (5) & (6))	362
5.2.4	Peroxide reduction of trunculin A	362
5.2.5	Ester methyl of (13)	363
5.2.6	Dehydration of (14)	363
5.2.7	Saponification of (15)	364
5.2.8	Trunculin B methyl ester	364
5.2.9	Hydrogenation of trunculin B	364
5.2.10	Peroxide reduction of trunculin B	365
5.2.11	Ester methyl of (13)	365

1. Materials i mètodes

1.1 DISSOLVENTS I REACTIUS

1.1.1 Dissolvents

El nom, qualitat i casa comercial dels dissolvents més emprats en aquesta tesi es troben detallats en la següent taula (Taula 1.1):

Nom	Qualitat	Casa comercial
AcOEt	Síntesis	SDS
AcOH	Síntesis	SDS
TBME	Síntesis	SDS
Et ₂ O	Síntesis	SDS
Hexà	Síntesis	SDS
1,4-dioxà	Síntesis	SDS
MeCN	Anàlisi HPLC	SDS
MeOH	Anàlisi HPLC	SDS
DMF	Síntesis de pèptids	SDS
DCM	Anàlisi	SDS
THF ²⁰⁴	Anàlisi	SDS
TFA	Anàlisi	Fluorochem
TFA	Anàlisi HPLC	Fluorochem
DMSO	Síntesis	Panreac
H ₂ O ²⁰⁵	Mili Q	

Taula 1.1 Nom, qualitat i casa comercial dels dissolvents emprats en la tesi.

²⁰⁴ S'obté directament per destil·lació sobre sodi metall en presència de benzofenona i sota atmosfera de nitrogen. Prèviament s'eliminen els peròxids fent-lo passar per una columna amb alumina bàsica.

²⁰⁵ L'aigua es desionitza i es filtra amb un sistema Mili-Q plus (Millipore) amb una resistivitat superior a 18 MΩcm⁻¹.

1.1.2 Reactius

Els aminoàcids emprats en aquesta tesi són de les cases comercials NovaBiochem i Neosystem, a excepció dels aminoàcids detallats en la següent taula (Taula 1.2):

Nom	Casa comercial	Nom	Casa comercial
Fmoc-D-Dab(Boc)-OH	Bachem	DIEA	Merck
Boc-D-Dap(Fmoc)-OH	Bachem	DSC	Aldrich
Boc-Cys(Me)-OH	Bachem	DMAP	Fluka
Boc-Cys(Acm)-OH	Bachem	EDC HCl	Aldrich
Boc-D-Cys(NPys)-OH	Bachem	DIPCDI	Fluka
MST	Aldrich	HOBt	SDS
Bromoacetofenona	Aldrich	HOAt	Medalchery
Bromur d'al·lil	Aldrich	HOSu	Fluka
Al·lil cloroformiat	Aldrich	TBTU	Albatros
PhSiH ₃	Fluka	HATU	IRIS Biotech
TMS-Cl	Scharlau	PyOAP	Neosystem
Piperidina	Aldrich	CTC-PS-PS	Patras;Romhand Hass
HCl 1,4-dioxà	Aldrich	Wang	Novabiochem
[Pd(PPh ₃) ₄]	Aldrich	Boc ₂ O	Aldrich
Iode	Aldrich	Fmoc-Cl	Novabiochem
NaH	Aldrich	pNZ-Cl	Aldrich
Mel	Aldrich		

Taula 1.2 Nom i casa comercial dels reactius emprats en la tesi.

1.2 INSTRUMENTACIÓ BÀSICA GENERAL

Balances

Mettler Toledo
 PB 3002-S. 2 xifres significatives
 AB 204-S. 4 xifres significatives
 AT 261 Detlarange. 5 xifres significatives

Centrifuga

Allegra 21R, Beckman Coulter

Liofilitzador

Freezemobile 12 EL, Virtis

pHmetre

pH Meter GLP21, Crison

Rotavapors

Laborota 4003, Heidolph

Agitador Orbital·lic

Unimax 1010, Heidolph

1.3 CROMATOGRAFIA

1.3.1 Cromatografia en capa fina

La cromatografia en capa fina analítica (CCF) es realitza en cromatofolis de gel de sílice amb indicador de fluorescència a 254 nm sobre suport d'alumini (60F₂₅₄, 0.2 mm, Merck), amb unes mescles d'elució que s'indiquen en cada cas particular. El revelat de les capes primes s'ha realitzat de forma diferent segons la naturalesa dels compostos a analitzar:

- *revelat per UV*: detecció de grups aromàtics/cromòfors. El revelat es fa directament sota una làmpada ultraviolada.
- *revelat amb ninhidrina*: detecció de grups amino lliures. El reactiu emprat consisteix en una dissolució de ninhidrina al 0.5 % en acetona. La placa es polvoritza amb aquesta solució i s'escalfa a 110 °C durant 2-3 minuts. La presència de grups amino lliures es manifesta per l'aparició d'una coloració violada. En el cas que el grup amino es trobi protegit per un grup protector làbil als àcids com el grup Boc, aquest s'elimina prèviament tractant la capa prima amb vapors àcids o bé escalfant-la breument amb un secador d'alta potència.
- *reactiu universal de revelat*: en el cas de productes que no poden ser revelats amb cap de les tècniques anteriors, s'utilitza el reactiu universal: 7 g d'àcid fosfomolibdic en 100 mL d'etanol absolut. El revelat s'obté submergeint la capa prima en el reactiu i, posteriorment, escalfant amb un secador d'alta potència fins a l'aparició d'unes taques de color verdós.

1.3.2 Cromatografia en columna

La cromatografia en columna s'ha realitzat sobre gel de sílice (Chromatogel 60 Å CC, 35-71 microns, SDS). S'empren 60 g de sílice per cada gram de cru a purificar. En el cas de l'addició de mostres en forma de càrrega sòlida, aquesta es prepara per eliminació del dissolvent d'una mescla que conté 5 g de sílice per gram de producte. Els eluents utilitzats s'especifiquen en cada cas.

1.3.3 Cromatografia líquida d'alta resolució a escala analítica (HPLC)

Els instruments emprats per a l'anàlisi, separació i caracterització dels compostos d'aquesta tesis es troben especificats en la següent taula (Taula 1.3):

Capítol 1	<ul style="list-style-type: none"> HPLC <i>Shimadzu</i> constituït per dues bombes model <i>LC-6A</i>, autoinjector <i>SIL 6B/9B</i>, detector d'UV-vis de doble longitud d'ona model <i>SPD-6A</i>, controlador del sistema model <i>SCL-6B</i> i registrador-integrador <i>Chromatopac</i> model <i>C-R6A</i>.
	<ul style="list-style-type: none"> HPLC <i>Waters</i> constituït per un controlador amb bomba de doble pistó model <i>600E</i>, autoinjector model <i>712</i>, detector d'UV-vis de doble longitud d'ona model <i>490E</i> i registrador-integrador model <i>Shimadzu</i> model <i>C-R5A</i>.
Capítol 2 i 3	<ul style="list-style-type: none"> HPLC <i>Waters</i> model <i>Alliance 2695</i> constituït per una bomba quaternària, detector diode array model <i>996</i> i programa de control <i>Millenium</i> versió 3.5. HPLC <i>Waters</i> constituït per una bomba binària model <i>1525</i>, autoinjector model <i>717 plus</i>, detector d'UV de doble longitud d'ona model <i>2487</i> i programa de control <i>Breeze</i> versió 3.2.
Capítol 4	<ul style="list-style-type: none"> HPLC <i>Agilent</i> model <i>1100</i> constituït per una bomba quaternària, detector diode array, detector ELSD model <i>PL-ELS1000 (Polymer Laboratories)</i> i programa de control <i>ChemStation rev.9.03A</i>.

Taula 1.3 Descripció dels instruments de HPLC emprats en els diferents capítols de la tesi.

Les columnes analítiques emprades estan recollides en la següent taula:

Capítol 1	<ul style="list-style-type: none"> Nucleosil C₁₈, 250 x 4.0 mm x 10 µm, 120 Å (Sharlau Science)
Capítol 2 i 3	<ul style="list-style-type: none"> Symmetry C₁₈, 150 x 4.6 mm x 5 µm, 100 Å (Waters) Symmetry-300 C₁₈, 150 x 3.9 mm x 5 µm, 300 Å (Waters)
Capítol 4	<ul style="list-style-type: none"> Zorbax-SB C₁₈, 150 x 4.6 mm x 5 µm (Zorbax) Zorbax-SB C₈, 150 x 4.6 mm x 5 µm (Zorbax) Zorbax-SB C₃, 150 x 4.6 mm x 5 µm (Zorbax)

Taula 1.4 Descripció de les columnes emprades en els diferents capítols de la tesi.

Les condicions cromatogràfiques que s'han utilitzat són: flux d'1 mL/min emprant diferents gradients lineals dels solvents A i B (A: H₂O amb un 0.045 % de TFA i B: MeCN amb un 0.036 % de TFA). L'acetonitril emprat és de qualitat HPLC i l'aigua de qualitat Milli-Q.

1.3.4 Cromatografia líquida d'alta resolució a escala semipreparativa i preparativa

L'aparell emprat per a la purificació dels compostos derivats de la sirengotoxina és el cromatògraf *Waters* indicat a l'apartat anterior referent al capítol 1. L'elució es realitza amb un flux de 3 mL/min utilitzant diferents gradients lineals dels solvents A i B (A: H₂O amb un 0.1 % de TFA i B: MeCN amb un 0.1 % de TFA).

Les purificacions dels compostos derivats de la tiocoralina a escala semipreparativa es realitzen en un sistema *Waters* constituït per una bomba quaternària, un autoinjector model *Simple Manager 2700*, un detector d'UV-vis de doble longitud d'ona model *2487*, un col·lector de fraccions automàtic model *Fraction Collector II* i el programa de control *Masslynx* versió 3.5. La columna emprada és una *Symmetry C₈* (100 x 30 mm x 5 µm), 100 Å (*Waters*). Les mostres s'elueixen a un flux de 10 mL/min emprant gradients lineals dels solvents A i B (A: H₂O amb un 0.1 % de TFA i B: MeCN amb un 0.1 % de TFA). Per a les purificacions dels compostos a escala preparativa s'empra un sistema *Waters* constituït per una bomba quaternària, detector d'UV de doble longitud d'ona model *2487*, injector manual model *Delta 4000*, col·lector automàtic model *Fraction Collector II* i programa de control *Millenium* versió 3.2. La columna preparativa és *Waters C₁₈* (300 x 30 mm x 15 µm), 300 Å.

Les purificacions de les trunculines del capítol 4 es realitzen en un sistema LC-semipreparatiu *Agilent* sèrie 1100 Separation Module, amb un detector d'UV-vis de dues longituds d'ona model 1100, un col·lector de fraccions model 1100 i un programa de control *ChemStation Rev. 9.03A* versió Purify A.1.2.

1.4 MÈTODES DE DETERMINACIÓ ESTRUCTURAL

1.4.1 Espectrometria de masses

1.4.1.1 Cromatografia líquida d'alta pressió a escala analítica amb detector d'espectrometria de masses

Els anàlisis realitzats al llarg dels capítols 3 i 4 s'han fet en un sistema HPLC *Waters* model *Alliance 2796*, constituït per una bomba quaternària, amb detector d'UV-vis de doble longitud d'ona model *2487*, sistema d'ESI-MS model *Micromass ZQ* i programa de control *Masslynx* versió 4.0. La columna emprada ha estat una *Symmetry 300 C₁₈* (150 x 3.9 mm x 5 µm), 300 Å. Les mostres s'han eluït a un flux constant d'1 mL/min emprant gradients lineals dels solvents A i B (A: H₂O amb un 0.1 % d'àcid fòrmic; B: MeCN amb un 0.07 % d'àcid fòrmic). Les condicions per a la detecció amb ESI-MS (voltatge de con i rang de masses) han estat optimitzades per cada mostra.

1.4.1.2 Espectrometria de masses MALDI-TOF

La massa molecular dels pèptids sintetitzats s'ha determinat per espectrometria de masses MALDI-TOF emprant un instrument MALDI *Voyager-DETMRP time-of-flight* (TOF) (PE Biosystems, Foster City, CA, USA). Es mescla 1 µL de solució de pèptid (1-2 mg/mL) amb 1 µL de matriu. La mescla resultant s'aplica sobre la placa de MALDI i es deixa assecar a temperatura ambient. Les matrius emprades han estat les següents: àcid dihidroxibenzoic (DHB) i àcid α-ciano-4-hidroxi-cinàmic (ACH), preparades a una concentració de 10 mg/mL en una mescla H₂O/MeCN (1:1) amb un 0.1 % de TFA. Les solucions de les matrius es poden mantenir a 4 °C durant un període màxim de 2-3 setmanes.

1.4.2 **Espectrometria de Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)**

Els espectres de protó (¹H RMN) i de carboni (¹³C RMN) s'han enregistrat en espectròmetres diferents de la casa Varian: Gemini-200 (¹H RMN de 200 MHz i ¹³C RMN de 50 MHz), Unity-plus (¹H RMN de 300 MHz i ¹³C RMN de 75 MHz), Mercury 400 (¹H RMN de 400 MHz i ¹³C RMN de 100 MHz), i de la casa Bruker: Bruker 500 (¹H RMN de 500 MHz) i Bruker 600 (¹H RMN de 600 MHz i ¹³C RMN de 150 MHz).

Els dissolvents emprats han estat: CDCl₃ (TMS com a referència interna), CDOD, D₂O. Tots els dissolvents deuterats emprats són de la casa comercial SDS.

1.4.3 **Espectrometria d'infraroig**

Els espectres d'infraroig s'han efectuat en un espectrofotòmetre de transformada de Fourier Nicolet model 510-FT. Les mostres sòlides s'analitzen en forma de discs de KBr i els olis en forma de pel·lícules sobre plaques de NaCl.

1.4.4 **Espectrometria d'UV-vis**

Les mesures d'UV-vis s'han realitzat en un espectrofotòmetre *Shimadzu* model *UV mini 1240*.

1.5 PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS DE LA SÍNTESI DE PÈPTIDS EN FASE SÒLIDA

1.5.1 Consideracions generals de la síntesi

La síntesi de pèptids en fase sòlida es fa manualment en xeringues de polipropilè, provistes d'un filtre de polietilè porós. Els volums de les xeringues són de 2, 5 i 10 mL, depenent de la quantitat de resina de partida i de la longitud de la cadena peptídica a sintetitzar. Els reactius o dissolvents s'afegeixen a la xeringa de manera que permetin que la resina quedi ben inflada. La mescla s'agita amb una vareta de tefló si el tractament és curt (agitació mecànica), i si el tractament és prou llarg s'utilitza l'agitació automàtica de mode orbital. Al final de cada tractament s'elimina el dissolvent, els excessos de reactius i els subproductes de la reacció, per filtració, a través d'un sistema connectat al buit.

1.5.2 Tests d'identificació

1.5.2.1 Test qualitatiu de Kaiser o de ninhidrina²⁰⁶

El test de ninhidrina permet determinar de manera qualitativa la presència de grups amino primaris en una resina. Servirà de control de les etapes d'acoblament i de desprotecció en la síntesi de pèptids en fase sòlida.

Per realitzar l'assaig, es prenen 0.5-2 mg de peptidil-resina mullada en DCM en un tub, i s'addiciona 6 gotes de *reactiu A* i 2 gotes de *reactiu B*. La mescla es posa a 110 °C durant 3 min. A continuació el tub es refreda ràpidament amb ajut d'aigua freda. Una coloració blava o blau-verdosa de la resina o del sobrenedant indica la presència d'amines primàries (ninhidrina positiva). Una coloració groga indica l'absència d'amines primàries (ninhidrina negativa), i assegura que la incorporació de l'aminoàcid ha estat superior al 99.5 % per una funcionalització de 0.5 mmol/g resina. Paral·lelament, es realitza un assaig en absència de resina com a blanc del test.

- *reactiu A*: Es prepara una dissolució en calent de fenol (40 g) en EtOH (10mL). Per altra banda, es prenen 2 mL d'una solució de KCN (65 mg) en H₂O (100 mL) i s'afegeixen sobre 100 mL de piridina, acabada de destil·lar sobre ninhidrina. A totes dues solucions s'afegeixen 4 g de resina *Amberlite MB-3*, i s'agiten durant 45 min. Seguidament es filtren i es mesclen totes dues.

- *reactiu B*: Es prepara una solució de ninhidrina (2.5 g) en EtOH (50 mL). Es necessari protegir la solució de la llum i conservar-la preferentment sota atmosfera d'argó.

²⁰⁶ Kaiser, E.; Collescott, R. L.; Bossinger, C.D.; Cook, P. I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Biochem.*, **1970**, 34, 595-598

1.5.2.2 Test qualitatiu de cloranil²⁰⁷

El test de cloranil s'utilitza per avaluar els acoblaments sobre amines secundàries com els *N*-metil aminoàcids. Es fa servir una dissolució saturada de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloranil) en toluè (0.75 g en 25 mL). Per realitzar aquest assaig, es diposita una mostra de peptidil-resina (0.5-2 mg) mullada en DCM en un tub de vidre, i s'afegeixen 20 gotes d'acetona i 5 gotes de cloranil en toluè i s'agita durant 5 minuts a temperatura ambient. Una coloració blau-verdosa de la resina indica la presència d'amines secundàries a la resina i, per tant, un acoblament incomplet. Aquest mètode no és tan sensible com el test de De Clercq.

1.5.2.3 Test qualitatiu de De Clercq o del *p*-nitrofenilèster del vermell dispers I (Red Dye I)²⁰⁸

L'assaig qualitatiu del *p*-nitrofenilèster del vermell dispers I permet detectar la presència d'amines secundàries i primàries sobre una resina amb una major sensibilitat que el test de cloranil (apartat 1.5.2.2). Per realitzar aquest test es prenen 0.5-2 mg de peptidil-resina mullada en DCM sobre els que s'afegeixen 5 gotes del *reactiu de De Clercq*. La mescla es manté a 70 °C durant 10 minuts i, un cop refredada, es separa el sobrenedant i es renta la resina amb DMF fins que els rentats no estiguin colorejats. Una coloració vermellosa o rosada dels grans de resina (test positiu) indica la presència d'amines secundàries o primàries lliures en la resina. L'absència de color (test negatiu) indica l'absència d'amines lliures.

- *reactiu de De Clercq*: El colorant comercial vermell dispers I es fa reaccionar amb diazoacetat d'etil, es saponifica i es condensa amb *p*-nitrofenol emprant POCl₃. El producte obtingut es purifica per recristal·lització. El *p*-nitrofenil èster del vermell dispers I s'utilitza per a la determinació d'amines secundàries lliures a una concentració de 0.02 M en MeCN.

²⁰⁷ Christensen, T., Qualitative test for monitoring coupling completeness in solid-phase peptide-synthesis using chloranil., *Acta Chemica Scandinavica Series B-Organic Chemistry and Biochemistry*, **1979**, 33, 763-766.

²⁰⁸ Madder, A., Farcy, N., Hosten, N. G. C.; De Muyneck, H., De Clercq, P. J.; Barry, J.; Davis, A. P., A novel sensitive colorimetric assay for visual detection of solid-phase bound amines, *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 1999, 2787-2791.

1.5.2.4 Test qualitatiu de Kuisle²⁰⁹

El test qualitatiu de Kuisle permet detectar la presència d'alcohols lliures sobre suport polimèric. L'assaig es realitza sobre una placa de sílica, on es diposita 0.5-2 mg de la peptidil-resina en suspensió amb DCM, amb ajut d'una pipeta Pasteur. A continuació s'addiciona dues gotes d'una solució de *p*-toluensulfonil en toluè (0.03 M) i dues gotes d'una solució de *p*-nitrobencilpiridina en toluè (0.075 M). La placa de sílica es calenta amb una pistola d'aire calent fins que s'observa la desaparició de la coloració taronja inicial, i llavors s'addiciona sobre la peptidil-resina dues gotes d'una solució 20 % de piperidina en DMF. Si la peptidil-resina presenta una coloració violada, el test és positiu. Cal realitzar un control positiu i un de negatiu.

1.5.2.5 Test qualitatiu d'Ellman²¹⁰

El test d'Ellman permet determinar la presència de grups tiols lliures en una solució o sobre la resina. L'assaig es realitza sobre una alíquota de la mostra. S'addicionen dues gotes del *reactiu d'Ellman* i també TRIS-HCl (0.1 M, pH 8) fins aconseguir pH 8. Si es desitja realitzar el test d'Ellman sobre suport polimèric no compatible en medi aquós es pot preparar una solució d'àcid 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic en DMF i addicionar 5 gotes sobre l'alíquota de peptidil-resina i a continuació 3 gotes de DIEA. Paral·lelament, es realitza un blanc. L'aparició de coloració groga és indicativa de presència de tiol.

- *reactiu d'Ellman*: es prepara una solució d'àcid 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic (DNTB) en un tampó fosfat 100 mM a pH 7 (39.6 mg DNTB/10 mL tampó fosfat). La solució es conserva sobre argó en un vial segellat.

1.5.3 Hidròlisi i anàlisi d'aminoàcids

El contingut i la proporció d'aminoàcids presents en una mostra peptídica es determinen per anàlisi cromatogràfic d'intercanvi iònic, prèvia hidròlisi àcida de la mostra. El protocol d'hidròlisi és lleugerament diferent segons es tracti d'una peptidil-resina o d'un pèptid en solució.

Per hidrolitzar la peptidil-resina es col·loca 2-10 mg de la peptidil-resina completament seca en un tub d'hidròlisi, s'afegeixen 0.25 mL de HCl:àcid propiònic (1:1) i es tanca el tub a la flama. Es deixa la mescla reaccionar a 155 °C durant 90 minuts i posteriorment s'evapora l'àcid a pressió reduïda fins a

²⁰⁹ Kuisle, O.; Lolo, M.; Quiñoa, E.; Riguera, R., Monitoring the solid-phase synthesis of depsides and depsipeptides. A color test for hydroxyl groups linked to a resin. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 14807-14812

²¹⁰ Allman, G. L., A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1958**, 74, 443-450.

sequeuat. El residu es redissol en un volum conegut de tampó citrat 0.06 M pH 2 i es filtra amb un filtre de nylon de 0.45 μm abans d'injectar-se a l'analitzador.

La hidròlisi de pèptid lliure es realitza amb una solució HCl 6 M (afegint un 1 % de fenol per minimitzar l'oxidació de mostres que contenen tirosina). Es tanca el tub a la flama i es deixa la mescla reaccionant a 155 °C durant 60 min, tot i que també es pot fer reaccionar a 110 °C durant 24 h. Posteriorment la mostra es tracta com en el cas de la peptidil-resina.

Aquesta tècnica no permet quantificar la cisteïna, el triptòfan ni *N*-metil aminoàcids.

1.5.4 Síntesi en fase sòlida emprant l'estratègia de protecció Fmoc/^tBu

Els suports polimèrics emprats en aquesta tesi per a l'obtenció de pèptids amb extrem C àcid han estat la resina 2-clorotritil (CTC-PS) i la resina Wang.

La resina CTC-PS és molt làbil al medi àcid i a l'aigua, i per això cal tenir en compte les següents precaucions: es guarda a baixa temperatura i abans de utilitzar-la es col·loca en un dessecador de KOH per atemperar-la. El DCM emprat per a realitzar els acoblaments i els rentats es fa passar prèviament per una columna d'alúmina bàsica per tal d'eliminar traces d'àcid clorhídric. Abans d'iniciar la síntesi en la resina CTC-PS es renta amb DCM (5 x 1 min) per tal de solvatar-la, amb DMF (5 x 1 min) per eliminar traces d'àcid clorhídric i altre cop amb DCM (5 x 1 min) que serà el dissolvent emprat en la incorporació del primer aminoàcid.

1.5.4.1 Incorporació del primer aminoàcid.

- **Resina CTC-PS.** La incorporació del primer aminoàcid en la resina CTC-PS (1.5 mmol/g resina) es realitza mitjançant una reacció de substitució nucleòfila i es duu a terme en defecte d'equivalents per disminuir la funcionalització per evitar el risc d'agregació de la cadena peptídica durant la síntesi. S'addiciona 0.7 eq de Fmoc-AA-OH per obtenir una funcionalització d'aproximadament 0.5 mmol-g resina. El Fmoc-AA-OH es dissol en DCM i s'hi addiciona 1.7 eq de DIEA. La mescla s'addiciona sobre la resina i s'agita durant 5 minuts. A continuació s'addicionen 3.3 eq més de DIEA i es deixa reaccionant durant 1 h. Posteriorment, s'afegeix MeOH (0.8 mL/g de resina), i es deixa reaccionant durant 15 min, per tal de bloquejar tots aquells punts reactius de la resina en els que no s'ha incorporat el primer aminoàcid. Finalment es renta la resina amb DCM (5 x 1 min) i DMF (5 x 1 min).

- **Resina Wang.** La resina Wang té una funcionalització òptima per a la síntesi de pèptids (func = 0.8 mmol/g resina). S'addiciona el primer aminoàcid (4 eq) dissolt en DCM i DMAP (0.1 eq). Seguidament s'afegeix la DIPCDI (4 eq) i es deixa reaccionar durant 1 h a temperatura ambient en agitació orbitalica. A continuació es realitza el test qualitatiu d'alcohols.

1.5.4.2 Eliminació del grup Fmoc

El grup Fmoc s'elimina realitzant 3 tractaments de 5 min i 1 de 10 min amb piperidina-DMF (1:4). En el cas de l'eliminació del grup Fmoc d'un *N*-metil aminoàcid i de l'amino d'una cadena lateral es realitzen dos tractaments extres de cinc minuts amb piperidina-DBU-toluè-DMF (5:5:20:70).

1.5.4.3 Càlcul de la funcionalització de la resina

La substitució de la resina es calcula per l'anàlisi d'aminoàcids d'una alíquota de resina hidrolitzada o per quantificació del grup Fmoc eliminat, tal i com indica el següent apartat.

1.5.4.4 Quantificació del grup Fmoc

La quantificació del grup Fmoc es realitza per saber la substitució de la resina després de la incorporació del primer aminoàcid i per determinar el rendiment d'un acoblament. Per quantificar el grup Fmoc cal realitzar l'eliminació del grup Fmoc seguint el protocol descrit a l'apartat 1.5.4.2 i recollir els rentats de tots els tractaments en un matrau aforat. Es dilueix amb DMF de manera que la seva absorbància estigui en la zona lineal de la llei de *Lambert-Beer*. Es mesura l'absorbància a 290 nm i es calcula la funcionalització de la resina aplicant la fórmula següent::

On:

$$Z = \frac{A \cdot X}{\varepsilon \cdot Y \cdot l}$$

Z: Funcionalització de la resina (mmol/g resina)

A: Absorbància

X: Volum de solvent (mL)

ε : Coeficient d'absorció molar = 5800 (L·mol⁻¹·cm⁻¹)

Y: Pes de la resina (g)

l: Longitud de la cubeta (cm)

1.5.4.5 Ensamblatge de la cadena peptídica

El creixement de la cadena peptídica es realitza de forma general seguint el cicle d'etapes descrit a la següent taula:

Etapa	Reactiu	Operació	Núm. Tractaments	Temps (min)
1	DMF	Rentat	5	1
2	Piperidina/DMF (1:4)	Desprotecció	1	1
			3	5
			1	10
3	DMF	Rentat	5	1
4	DCM	Rentat	5	1
5	DMF	Rentat	5	1
6	Fmoc-AA-OH/Agent d'acoblament	Acoblament	1	60
7	DMF	Rentat	5	1
8	DCM	Rentat	5	1

Taula 1.5 Cicle d'etapes en l'elongació del pèptid en la síntesi en fase sòlida.

Finalitzat el temps d'acoblament, la resina es filtra i es renta amb DMF (5 x 1 min) i DCM (5 x 1 min). Es realitza el test qualitatiu de ninhidrina (apartat 1.5.2.1). Si l'assaig és positiu es repeteix l'acoblament desde l'etapa 3 (Taula 1.5). Si l'assaig és negatiu es procedeix a realitzar l'eliminació del grup Fmoc (apartat 1.5.4.2).

Els agents i additius d'acoblament, així com els equivalents que s'han emprat en cada una de les síntesis s'especifiquen en cada cas en els apartats corresponents. L'agent d'acoblament més emprat en el capítol 1 ha estat la carbodiimida DICPDI amb HOBt mentre que s'ha emprat l'agent d'acoblament HATU amb DIEA en les síntesi de derivats de tiocoralina. Els protocols seguits en els acoblaments es troben descrits a continuació:

1.5.4.5.1 Acoblament amb DIPCDI/HOBt

La parella d'agents d'acoblament DIPCDI/HOBt s'empra de forma general entre aminoàcids naturals. Es dissol l'aminoàcid (5 eq) i l'HOBt (5 eq) en DMF i s'addiciona a la resina. A continuació s'afegeix la carbodiimida DIPCDI (5 eq) i es deixa reaccionant 1 h a temperatura ambient en agitació orbitalica.

1.5.4.5.2 Acoblament amb HATU/DIEA

La sal d'amini s'empra en acoblaments entre aminoàcids ramificats o amb la peptidil-resina amb l'extrem *N*-alquilat. Es dissol l'aminoàcid (3 eq) i l'HATU (2.9 eq) en DMF i a continuació s'addiciona la DIEA. Amb ajut d'una pipeta Pasteur s'agita la mescla de reacció durant 5 min i llavors s'addiciona sobre la peptidil resina. La reacció es deixa 35 min a temperatura ambient i en agitació orbitalica.

1.5.4.6 Eliminació del grup protector Alloc/èster al·lílic

La peptidil-resina protegida amb el grup Alloc/èster al·lílic es renta amb DCM (5 x 1 min) fins quedar ben solvatada i s'addiciona [Pd(PPh₃)₄] (0.1 eq) en presència d'un captador de cations al·lílics, PhSiH₃ (10 eq). La mescla de reacció es manté durant 15 min a temperatura ambient amb agitació mecànica. El procediment es repeteix tres vegades més. Un cop eliminat el grup protector Alloc/èster al·lílic, cal rentar la resina amb DCM (5 x 1 min), DMF (5 x 1 min) i DCM (5 x 1 min). És recomanable realitzar rentats addicionals amb una solució de dietilditiocarbamat sòdic 0.02 M en DMF (2 x 20 min) per eliminar traces de Pd.

1.5.4.7 Eliminació del grup protector pNZ

La peptidil-resina protegida amb el grup pNZ es renta amb DMF (5 x 1 min) i s'addiciona una solució 6 M de SnCl₂ en DMF que conté HCl (1.6 mM). Es deixa la reacció 30 min a temperatura ambient amb agitació mecànica. Es repeteix el mateix procediment una altra vegada i finalment es renta la resina amb DMF (5 x 1 min), DCM (5 x 1 min) i DMF (5 x 1 min).

1.5.4.8 Eliminació del grup Npys

La peptidil resina protegida amb el grup Npys es renta amb DMF (5 x 1 min) i DMF/H₂O (4:1) (2 x 1 min). S'addiciona DMF/H₂O (4:1) (4 mL/g resina) a la peptidil-resina i a continuació s'addiciona Bu₃P (100 eq). La reacció es manté 10 min a temperatura ambient i amb agitació mecànica. Es repeteix el mateix procediment una altra vegada, observant-se l'absència de color en la solució. Després del segon tractament es renta la resina amb DMF/H₂O (4:1) (5 x 1 min) i DMF (5 x 1 min).

1.5.4.9 Eliminació del grup protector Mmt de la Cys i Trt de la Ser

La peptidil-resina protegida amb el grup Mmt en la cadena lateral de la cisteïna o amb el grup Trt en la cadena lateral de la Ser, es renta amb DCM (5 x 1 min). S'addiciona una solució 1 % de TFA en DCM que conté un 5 % de TIS. Es deixa la reacció durant 30 min a temperatura ambient i es repeteix el mateix tractament dues vegades més. S'observa l'absència de color en el darrer tractament.

1.5.4.10 Acilació del grup amino

La peptidil-resina amb el grup amino lliure es renta amb DMF (5 x 1 min) i es tracta amb Ac₂O (15 eq) i s'hi addiciona DIEA (30 eq), es deixa reaccionar 1 h a temperatura ambient amb agitació orbitalica. A continuació es filtra, es renta amb DMF (5 x 1 min), DCM (5 x 1 min) i es realitza el test de ninhidrina o De Clercq. Si el test és positiu es repeteix el procés.

1.5.4.11 Formació del pont disulfur entre Cys(Acm) en la resina CTC-PS

La peptidil-resina es renta amb DMF (5 x 1 min) i s'addiciona iode (2.5 eq per grup Acm) dissolt en DMF (4 mL/g resina). Es deixa la reacció 10 min a temperatura ambient amb agitació mecànica. Seguidament, es filtra la solució de iode i es renta la resina amb DMF (1 x 5 min), DCM (5 x 1 min), CHCl₃ (5 x 1 min) i DCM (4 x 1 min), es pren una alíquota per ésser analitzada en el HPLC-EM.

1.5.4.12 Divisió de la resina

S'addiciona un volum conegut de DMF a la peptidil-resina i amb ajuda d'una pipeta Pasteur de plàstic o una micropipeta i s'aconsegueix una suspensió homogènia. Es pren un mateix volum i es reparteix en les diferents xeringues, prèviament preparades amb el corresponent filtre de polietilè porós. Es repeteix l'operació tantes vegades com sigui necessari fins que la quantitat de peptidil-resina en la xeringa inicial sigui desprezable. Una altra possibilitat és secar bé la peptidil-resina i fer les alíquotes per pesada. Però el primer mètode és més recomanable perquè la peptidil-resina es troba en tot moment solvatada i la repartició de la peptidil-resina és més acurada. En canvi, no es pot quantificar la quantitat de resina transferida i es determina en referència a la quantitat de resina inicial.

1.5.4.13 Escissió del pèptid de la resina

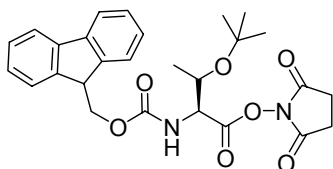
- **Resina CTC-PS.** La resina CTC-PS ofereix la possibilitat d'escindir el pèptid en diferents concentracions d'àcid de manera que, emprant una elevada concentració d'àcid obtenim el pèptid totalment desprotegit i, amb una solució diluïda d'àcid obtenim el pèptid protegit amb els grups Boc^t/Bu. En la present tesi ens interessa obtenir els pèptids lineals o fragments totalment protegits per tal de ser ciclats en solució o per poder-los acoblar a una peptidil-resina. Per això sempre realitzarem l'escissió del pèptid de la resina en condicions d'acidòlisi suaus. Es renta la peptidil-resina amb DCM (5 x 1 min). Es prepara un sistema de filtració de manera que els filtrats es recullen en un baló que conté aigua (15 mL H₂O/250 mg resina). S'addiciona a la peptidil-resina una solució 1 % de TFA en DCM de manera que cobreixi la peptidil-resina i es deixa reaccionant durant 30 s i es filtra. Es repeteix la mateixa operació 4 vegades més. El baló que conté els filtrats recollits es duu ràpidament a evaporació a pressió reduïda per tal d'eliminar l'àcid.
- **Resina Wang.** Es renta la peptidil-resina amb DCM (5 x 1 min). Es prepara un sistema de filtració de manera que els filtrats es recullen en un baló. S'addiciona a la peptidil-resina una solució de TFA/H₂O/TIS (95:2.5:2.5), TFA/H₂O (4:1) o un altra tipus de mescla acidolítica, depenent de la peptidil-resina que es vulgui escindir. De manera aproximada, s'addicionen 10 mL de mescla acidolítica per g de resina durant 1 h a temperatura ambient amb agitació orbital. El baló que conté els filtrats recollits es duu ràpidament a evaporació a pressió reduïda per tal d'eliminar l'àcid. A continuació s'addiciona TBME per fer precipitar el pèptid i poder decantar les restes dels grups protectors i els additius de la mescla d'escissió. Si el pèptid no disposa de cadenes laterals polars i té el grup amino protegit és possible que no precipiti.

2. Síntesi d'un anàleg de la sirengotoxina, depsipèptid cíclic anti-Leishmania

2.1 SÍNTESI DEL DIDEHIDROPÈPTID FMOC-THR(^tBu)-(Z)-DHB-OSU

2.1.1 Síntesi de Fmoc-Thr(^tBu)-OSu

En un baló de 250 mL es dissol el Fmoc-Thr(^tBu)-OH (3 g, 7.5 mmols) en 20 mL de 1,4-dioxà. En un vial es dissol l'HOSu (1.56 g, 13.6 mmols) en 5 mL de 1,4-dioxà i 500 μ L d'H₂O, s'agita fins a dissolució i s'addiciona al baló. Posteriorment s'hi addiciona la DIPCDI (1.52 mL, 9.8 mmols), i es deixa la mescla en agitació a temperatura ambient durant 16 h. A continuació, s'evapora el dissolvent a pressió reduïda i es redissol el residu en 30 mL d'AcOEt, rentant-se la solució orgànica amb H₂O (3 x 25 mL) i amb una solució d'aigua acidificada amb HCl fins pH 3 (3 x 25 mL). La fracció orgànica s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda, obtenint-se 3.55 g d'un sòlid blanc.



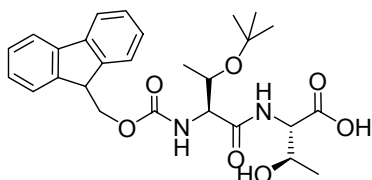
Rendiment: 95%. **HPLC** (gradient de 7:3 a 0:10 en 30 min, C₁₈): t_R = 20.2 min. **CCF** (SiO₂, CHCl₃-MeOH (9:1), revelat a l'UV): R_f = 0.58.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1.13 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃ Thr(^tBu)); 1.22 (s, 9H, 3CH₃ ^tBu); 2.80 (s, 4H, 2CH₂ OSu); 4.26 (m, 1H, CH Fmoc); 4.37 (m, 1H, CH ^{β} Thr(^tBu)); 4.43 (m, 2H, CH₂ Fmoc); 4.62 (dd,

J = 9.2, 2.0 Hz, 1H, CH ^{α} Thr(^tBu)); 5.70 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, NH Thr(^tBu)); 7.31 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.39 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.62 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.76 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃): δ 21.5 (CH₃ Thr(^tBu)); 26.3 (2CH₂ OSu); 29.3 (3CH₃ Boc); 47.9 (CH Fmoc); 59.4 (CH ^{α} Thr(^tBu)); 68.0 (CH ^{β} Thr(^tBu)); 68.2 (CH₂ Fmoc); 75.5 (C Boc); 120.7 (2CH_{arom} Fmoc), 125.9 (2CH_{arom} Fmoc), 127.8 (2CH_{arom} Fmoc), 128.5 (2CH_{arom} Fmoc); 142.1 (2C_{arom} Fmoc), 144.4 (2C_{arom} Fmoc); 157.0 (CO Fmoc); 167.6 (CO Thr(^tBu)); 169.2 (2CO OSu). **EM** [MALDI-TOF (DHB)], *m/z*: calculat per C₂₇H₃₀N₂O₇ 494.6; trobat 517.9 [M + Na]⁺, 533.9 [M + K]⁺.

2.1.2 Síntesi del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-OH

En un baló de 100 mL es dissol el Fmoc-Thr(^tBu)-OSu (1.29 g, 2.61 mmols) en 10 mL de 1,4-dioxà. En un vial es dissol l'aminoàcid H-Thr-OH (0.31 g, 2.60 mmols) en 5 mL de 1,4-dioxà, s'hi addiciona la DIEA (0.45 mL, 2.60 mmols), s'agita fins a total dissolució i s'addiciona a la primera solució. La mescla reaccionant es manté en agitació a temperatura ambient durant 15 h; s'evapora el dissolvent a pressió reduïda i es redissol en 30 mL d'AcOEt. Es fan successius rentats de la solució orgànica amb una solució d'aigua acidificada amb HCl fins pH 3 (3 x 25 mL). La fracció orgànica s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda, obtenint-se 3.40 g d'un sòlid blanc escumós.



Rendiment: 85%. **HPLC** (gradient de 7:3 a 0:10 en 30 min, C₁₈): t_R = 21.2 min. **CCF** (SiO₂, DCM–Acetona (9:1), revelat a l'UV): R_f = 0.54. **EM** [MALDI-TOF (DHB)], m/z: calculat per C₂₇H₃₄N₂O₇ 498.2, trobat 521.8 [M+Na]⁺; 537.8 [M+K]⁺.

2.1.3 Intent de deshidratació del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-OH amb DSC

En un baló de 50 mL es dissol el dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-OH (0.53 g, 1.06 mmols) en 10 mL d'MeCN; paral·lelament, en un vial es dissol la DSC (0.54 g, 2.12 mmols) amb 5 mL d'MeCN i 1 mL de DMF i s'addiciona a la primera solució. Seguidament s'addiciona la DIEA (2.23 mL, 12.82 mmols) i es manté la solució en agitació a temperatura ambient durant 3 dies. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i el residu es redissol amb 50 mL d'AcOEt, rentant-se la solució orgànica amb una solució aquosa acidificada amb HCl fins a pH 3 (3 x 40 mL) i amb una solució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica amb MgSO₄ anhidre, es filtra i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda, obtenint-se 2.02 g d'un producte blanc escumós. El producte s'hidrolitza en la purificació per cromatografia en columna de sílice fent servir com a fase mòbil Hexà–Cloroform (9:1).

Rendiment: 10%. **HPLC** (gradient de 7:3 a 0:10 en 30 min, C₁₈): t_R = 20.7 min. **CCF** (SiO₂, Hexà–Cloroform (9:1), revelat a l'UV): R_f = 0.53. **EM** [MALDI-TOF (DHB)], m/z: calculat per C₃₁H₃₅N₃O₈ 577.2, trobat 600.4 [M+Na]⁺; 616.4 [M+K]⁺.

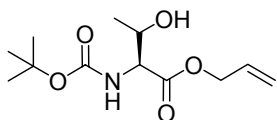
2.2 SÍNTESI DEL DIDEHIDROPÈPTID FMOC-THR(TBU)-(Z)-DHB-OH

2.2.1 Síntesi de H-Thr-Oal·lil

2.2.1.1 Síntesi de Boc-Thr-Oal·lil

Es treballa en tot moment a la vitrina degut a la toxicitat del bromur d'al·lil. Tots els residus generats i el material fet servir cal rentar-los prèviament amb una solució de NaOH en MeOH abans de ser dipositats en els contenidors de residus comuns.

En un baló de 250 mL s'addiciona el Boc-Thr-OH (2 g, 9.8 mmols), seguidament s'hi adiciona la DIEA (1.71 mL, 9.8 mmols) i finalment, el bromur d'al·lil (19 mL, 220 mmols). Es col·loca un refrigerant tapat amb un sèptum i proveït d'un globus i es manté la solució a reflux (75 °C) durant 4 h, fins que s'observa per CCF la desaparició de l'aminoàcid de partida; la solució passa d'un color groguenc a ataronjat intens i s'observa, a més a més, la formació d'un precipitat blanc. A continuació es refreda el baló a temperatura ambient, es filtra la mescla i el filtrat es dissol en 30 mL d'AcOEt. Es realitzen rentats de la solució orgànica amb una solució aquosa de NaHCO₃ al 5 % (5 x 20 mL) per tal d'extreure possibles restes de l'aminoàcid de partida i la major part del bromur d'al·lil, obtenint-se 2.31 g d'un oli marró. Finalment es purifica el producte per cromatografia en columna fent servir com a fase estacionària SiO₂ i com a eluents una mescla d'Hexà/Acetat d'etil (7:3). S'obtenen 2.23 g d'un oli groguenc.

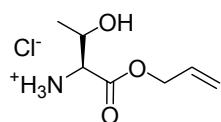


Rendiment: 93% . **HPLC** (gradient de 10:0 a 0:10 en 30 min., C₁₈): t_R = 18.2 min. **CCF** (SiO₂, Hexà-AcOEt (3:2), revelat amb ninhidrina): R_f = 0.44. **IR** (film, ν, cm⁻¹): 3691 (O-H, st), 3089 (Csp²-H, st), 2981 (Csp³-H, st), 1719 (C=O, st), 1653 (HC=CH₂, st), 1368-1393 (C-CH₃, def. Boc), 1069 (C-O, st).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1.26 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CH₃ Thr); 1.46 (s, 9H, 3CH₃ Boc); 2.13 (s, 1H, OH Thr); 4.26-4.32 (m, 2H, CH^α Thr, CH^β Thr); 4.66 (m, 2H, OCH₂ al·lil); 5.27 (dm, J = 10.5 Hz, 1H, =CHH' al·lil); 5.35 (dm, J = 17.4 Hz, 1H, =CHH' al·lil); 5.36 (s, 1H, NH Thr); 5.92 (m, 1H, CH al·lil). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃): δ 19.9 (CH₃ Thr); 28.3 (3CH₃ Boc); 58.9 (CH^α Thr); 66.0 (OCH₂ al·lil); 67.9 (CH^β Thr); 80.0 (C Boc); 118.6 (=CH₂ al·lil); 131.4 (CH al·lil); 156.1 (CO Boc); 171.1 (CO Thr). **EM** [ES(+), H₂O-MeCN (1:1)], m/z: calculat per C₁₂H₂₁NO₅ 259.1, trobat 204.1 [M - al·lil + H]⁺; 260.1 [M + H]⁺; 282.1 [M + Na]⁺.

2.2.1.2 Síntesi de HCl·H-Thr-Oal·lil

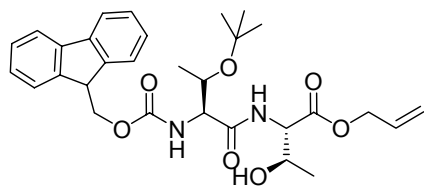
S'addiciona Boc-Thr-Oal·lil (1.82 g, 7.46 mmols) en un baló de 250 mL i es tapa amb un sèptum. Mitjançant una cànula s'addiciona la solució comercial de HCl·1,4-dioxà (4 M) fins a quedar l'aminoàcid totalment cobert, es col·loca un sèptum i una agulla, i es manté en agitació a temperatura ambient durant 1.5 h. A continuació s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es fan diverses coevaporacions amb Et₂O, obtenint-se 1.44 g d'un oli groguenc.



Rendiment: 98%. **CCF** (SiO₂, Hexà-AcOEt (3:2), revelat amb ninhidrina): R_f = 0.05. **IR** (film, ν, cm⁻¹): 3691 (O-H, st), 2932 (Csp³-H, st), 1746 (C=O, st), 1652 (HC=CH₂, st), 1457 (CH₃, def), 1221 (C-O-C, st), 1117 (C-O(H), st). **RMN ¹H** (200 MHz, CD₃OD): δ 1.33 (d, J = 6.2 Hz, 3H, CH₃ Thr); 4.00 (d, J = 4.0 Hz, 1H, CH^α Thr); 4.30 (qd, J = 6.4, 4.2 Hz, 1H, CH^β Thr); 4.80 (m, 2H, OCH₂ al·lil); 5.30 (dm, J = 10.4 Hz, 1H, =CHH' al·lil); 5.40 (dm, J = 17.2 Hz, 1H, =CHH' al·lil); 6.00 (m, 1H, CH al·lil). **RMN ¹³C** (75 MHz, CD₃OD): δ 18.6 (CH₃ Thr); 57.8 (CH^α Thr); 64.3 (CH^β Thr); 65.9 (OCH₂ al·lil); 117.6 (=CH₂ al·lil); 130.5 (CH al·lil); 166.8 (CO Thr). **EM** [ES (+), H₂O-MeCN (1:1), 1 % àcid fòrmic], m/z: calculat per C₇H₁₄NO₃Cl 195.1, trobat 160.2 [M + H]⁺.

2.2.2 Síntesi del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-Oal·lil

En un baló de 250 mL es dissol el HCl·H-Thr-Oal·lil (1.44 g, 7.3 mmols) en 25 mL de 1,4-dioxà i s'addiciona la DIEA (2.55 mL, 14.6 mmols). En un altre baló es prepara la dissolució de la Fmoc-Thr(^tBu)-OSu en 20 mL de 1,4-dioxà, s'addiciona a la primera solució i es manté en agitació a temperatura ambient durant 15 h. S'observa la formació d'un precipitat blanc i per HPLC no es determina la presència de producte de partida. Tot seguit s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es redissol el residu amb 40 mL d'acetat d'etil. La solució orgànica es renta amb una solució aquosa saturada de NaCl (2 x 25 mL) i posteriorment amb una solució aquosa de HCl de pH 3-4 (3 x 25 mL). La fracció orgànica s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i s'asseca a pressió reduïda, obtenint-se 2.43 g d'un sòlid escumós blanc.

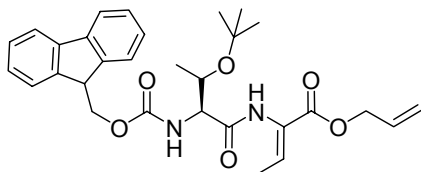


Rendiment: 85%. **HPLC** (gradient de 7:3 a 0:10 en 30 min, C₁₈): t_R = 21.2 min. **CCF** (SiO₂, DCM-Acetona (9:1), revelat a l'UV): R_f = 0.54. **RMN ¹H** (600 MHz, CDCl₃): δ 1.10 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃ Thr(^tBu)); 1.23 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃ Thr); 1.29 (s, 9H, 3CH₃ ^tBu); 2.04 (d, J = 3.6 Hz, 1H, OH Thr); 4.18 (m,

1H, CH^β Thr(^tBu)); 4.22 (m, 1H, CH Fmoc); 4.28 (m, 1H, CH^α Thr(^tBu)); 4.40 (m, 3H, CH₂ Fmoc, CH^β Thr); 4.55 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H, CH^α Thr); 4.66 (m, 2H, OCH₂ al·lil); 5.25 (dm, *J* = 10.2 Hz, 1H, =CHH' al·lil); 5.34 (dm, *J* = 17.4 Hz, 1H, =CHH' al·lil); 5.90 (m, 1H, CH al·lil); 6.00 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH Thr(^tBu)); 7.29 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.38 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.59 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.74 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 8.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH Thr). **RMN ¹³C** (150 MHz, CDCl₃): δ 16.6 (CH₃ Thr(^tBu)); 20.3 (CH₃ Thr); 28.4 (3CH₃ ^tBu); 47.7 (CH Fmoc); 57.9 (CH^α Thr); 58.9 (CH^α Thr(^tBu)); 66.3 (OCH₂ al·lil); 67.2 (CH^β Thr(^tBu)); 67.4 (CH^β Thr, CH₂ Fmoc); 75.9 (C ^tBu); 119.3 (=CH₂ al·lil); 120.4 (2CH_{arom} Fmoc), 125.5 (2CH_{arom} Fmoc), 127.4 (2CH_{arom} Fmoc), 128.0 (2CH_{arom} Fmoc); 131.8 (CH al·lil); 141.6 (2C_{arom} Fmoc), 144.2 (2C_{arom} Fmoc); 156.9 (CO Fmoc); 170 (CO Thr(^tBu), CO Thr). **EM** [MALDI-TOF(DHB)], *m/z*: calculat per C₃₀H₃₈N₂O₇ 538.3; trobat 562.0 [M + Na]⁺; 577.9 [M + K]⁺.

2.2.3 Obtenció del didehidropèptid Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-Oal·lil

En un baló de 250 mL s'addiciona el dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-Oal·lil (2.43 g, 4.5 mmols) i 40 mL d'una mescla de DCM–DMF (98:2), agitant-se fins a total dissolució. Paral·lelament, en un vial es dissol la carbodiimida EDC·HCl (1.73 g, 9.0 mmols) en 5 mL de la mescla de DCM–DMF (98:2) i s'addiciona la solució al baló. Seguidament es tapa amb un sèptum i es purga amb nitrogen. Posteriorment s'addiciona el CuCl (0.537 g, 5.42 mmols), tornant a purgar amb nitrogen. Es deixa la mescla reaccionant a temperatura ambient, amb agitació i sota atmosfera de nitrogen (globus), realitzant controls regulars per HPLC fins a les 20 h de reacció, temps en què s'esgota tot el dipèptid de partida. A continuació s'evapora el dissolvent a pressió reduïda i es purifica el residu per cromatografia en columna, fent servir SiO₂ com a fase estacionària i una mescla de DCM–Acetona de polaritat creixent com a fase mòbil; s'inicia amb DCM i es finalitza amb la mescla DCM/Acetona (9:1). S'obtenen 1.6 g de dipèptid deshidratat. El tractament posterior del cru de reacció mitjançant rentats amb EDTA i extraccions àcides i bàsiques és tediós i poc eficient.



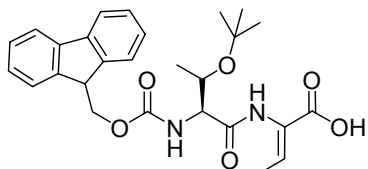
Rendiment: 70%. **HPLC** (gradient de 7:3 a 0:10 en 30 min, C₁₈): *t_R* = 23.6 min. **CCF** (SiO₂, DCM–Acetona (98:2), revelat a l'UV): *R_f* = 0.47. **RMN ¹H** (600 MHz, CDCl₃): δ 1.12 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃ Thr(^tBu)); 1.30 (s, 9H, 3CH₃ ^tBu); 1.78 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃ Dhb); 4.22 (m, 2H, CH Fmoc, CH^β Thr(^tBu)); 4.32 (dd, *J* = 4.8, 4.8 Hz, 1H, CH^α Thr(^tBu)); 4.40 (m, 2H, CH₂ Fmoc); 4.68 (m, 2H, OCH₂ al·lil); 5.25 (dm, *J* = 10.2 Hz, 1H, =CHH' al·lil); 5.34 (dm, *J* = 17.4 Hz, 1H, =CHH' al·lil); 5.93 (m, 1H, CH al·lil); 6.00 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, NH Thr(^tBu)); 6.76 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH Dhb); 7.31 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.39 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.62 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.76 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 8.58 (s, 1H, NH Dhb). **RMN ¹³C** (150 MHz, CDCl₃): δ 15.7 (CH₃ Dhb); 17.2 (CH₃ Thr(^tBu)); 28.3 (3CH₃ ^tBu); 47.5 (CH Fmoc); 59.4

(CH^α Thr(^tBu)); 66.1 (OCH₂ al·lil); 66.9 (CH^β Thr (^tBu)); 67.3 (CH₂ Fmoc); 76.3 (C ^tBu); 118.8 (=CH₂ al·lil); 120.5 (2CH_{arom} Fmoc), 125.6 (2CH_{arom} Fmoc), 127.4 (2CH_{arom} Fmoc), 128.0 (2CH_{arom} Fmoc); 126.9 (C Dhb); 127.6 (CH al·lil); 133.2 (CH Dhb); 141.8 (2C_{arom} Fmoc), 144.1 (2C_{arom} Fmoc); 156.5 (CO Fmoc); 164.2 (CO Dhb); 168.2 (CO Thr(^tBu)). **EM** [MALDI-TOF (DHB)], calculat per C₃₀H₃₆N₂O₆ 520.3, trobat 543.8 [M + Na]⁺; 559.8 [M + K]⁺.

2.2.4 Síntesi de Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH

Cal treballar amb material ben sec, dissolvents anhidres i sota atmosfera d'argó.

En un baló de 100 mL s'addiciona el Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-Oal·lil (1.6 g, 3.1 mmols) i el PhSiH (1.14 mL, 9.2 mmols), es dissolen en 20 mL de DCM i es purga el sistema amb argó. Posteriorment, s'addiciona el catalitzador [Pd(PPh₃)₄] (107 mg, 0.1 mmols) i es torna a purgar amb argó. Es manté la mescla en agitació, a temperatura ambient i sota atmosfera d'argó, i a les 2 h de reacció s'observa per HPLC que ja s'ha desprotegit tot el dipèptid de partida. Tot seguit s'addiciona H₂O (277 μL, 15.38 mmols) al cru de reacció, es filtra la solució i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. Finalment es purifica el residu per cromatografia en columna, fent servir com a fase estacionària el SiO₂ i una mescla de DCM–Acetona–MeOH (90:8:2) com a fase mòbil. El producte es troba en tres fraccions: pura (614 mg), impura amb l'isòmer E (130 mg, 75 % puresa) i impura amb dibenzofulbè (750 mg, 83 % puresa).

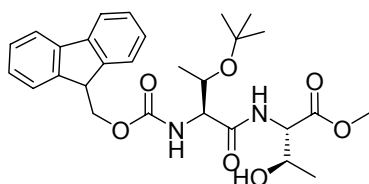


Rendiment: 42 % de producte pur. **HPLC** (gradient de 7:3 a 0:10 en 30 min, C₁₈): t_R = 19.7 min. **CCF** (SiO₂, DCM–Acetona–MeOH (90:8:2), revelat a l'UV): R_f = 0.24. **RMN** ¹H (600 MHz, CDCl₃): δ 1.12 (d, J = 6.0 Hz, 3H, CH₃ Thr(^tBu)); 1.30 (s, 9H, 3CH₃ ^tBu); 1.81 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃ Dhb); 4.22 (m, 1H, CH Fmoc); 4.24 (m, 1H, CH^β Thr(^tBu)); 4.33 (m, 1H, CH^α Thr(^tBu)); 4.40 (m, 2H, CH₂ Fmoc); 6.00 (d, J = 5.4 Hz, 1H, NH Thr(^tBu)); 6.87 (q, J = 7.2 Hz, 1H, CH Dhb); 7.31 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.39 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.62 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.76 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 8.58 (s, 1H, NH Dhb). **RMN** ¹³C (150 MHz, CDCl₃): δ 15.2 (CH₃ Dhb); 23.7 (CH₃ Thr(^tBu)); 28.3 (CH₃ ^tBu); 47.8 (CH Fmoc); 59.3 (CH^α Thr(^tBu)); 67.1 (CH^β Thr(^tBu)); 67.2 (CH₂ Fmoc); 120.6 (2CH_{arom} Fmoc), 125.8 (2CH_{arom} Fmoc), 127.8 (2CH_{arom} Fmoc), 128.4 (2CH_{arom} Fmoc); 135.1 (C Dhb); 141.3 (2C_{arom} Fmoc), 143.7 (2C_{arom} Fmoc); 156.3 (CO Fmoc); 167.6, 168.2 (CO Thr(^tBu), CO Dhb). **EM** [MALDI-TOF (DHB)], m/z: calculat per C₂₇H₃₂N₂O₆ 480.2, trobat 503.8 [M + Na]⁺; 519.7 [M + K]⁺.

2.3 SÍNTESI DELS DIDEHIDROPÈPTIDS Fmoc-THR(^tBu)-(Z)-DHB-OME I Fmoc-THR(^tBu)-(Z)-DHB-OCH₂COPH

2.3.1 Síntesi del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-OMe

En un baló de 100 mL s'addiciona el Fmoc-Thr(^tBu)-OSu (1.0 g, 2.02 mmols) i 20 mL de 1,4-dioxà, agitant fins a dissolució. En un baló de 50 mL s'addiciona HCl·H-Thr-OH (0.64 g, 5.26 mmols), la DIEA (1.84 mL, 10.52 mmols) i 10 mL de 1,4-dioxà, s'agita fins a dissolució i, seguidament, la solució s'addiciona al primer baló. La mescla reaccionant es manté en agitació a temperatura ambient durant 15 h. Per HPLC encara s'observa producte de partida. A continuació, s'evapora el dissolvent a pressió reduïda, el residu es redissol en 50 mL d'AcOEt i la solució orgànica es renta amb una solució aquosa acidificada amb HCl fins pH 3 (3 x 40 mL) i una solució aquosa saturada de NaCl. La fase orgànica s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda, obtenint 0.971 g d'un sòlid blanquinós.

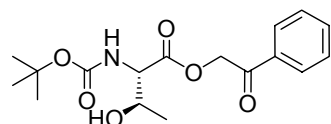


Rendiment: 90%. **HPLC** (gradient de 7:3 a 0:10 en 30 min, C₁₈): t_R = 19.4 min. **CCF** (SiO₂, DCM-Acetona (9:1), revelat a l'UV): R_f = 0.56. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃; δ, ppm): 1.1 (d, J_{H_γ-H_β} = 6.3 Hz, 3H, CH₃^γ Thr); 1.22 (s, 3H, CH₃^γ Thr); 1.29 (s, 15H, 3 CH₃^tBu, CH₃ OMe); 4.17, 4.24 (m, 3H, CH_β Thr, CH_β Thr(^tBu), CH Fmoc); 4.28 (m, 1H, CH_α Thr); 4.37 (m, 2H, CH₂ Fmoc); 4.50 (m, 1H, CH_α Thr(^tBu)); 5.98 (s, 1H, NH Thr(^tBu)); 7.29 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.38 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.58 (d, J = 9 Hz, 2H, 2CH_{arom} Fmoc); 7.73 (d, J = 10 Hz, 2CH_{arom} Fmoc); 7.88 (d, J = 12 Hz, 1H, NH Thr). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃; δ, ppm): 18.0, 19.9 (CH₃ Thr, CH₃ Thr(^tBu)); 28.1 (CH₃^tBu); 47.1, 57.4, 58.0, 67.5, 66.9 (CH_α Thr, CH_α Thr(^tBu), CH_β Thr, CH_β Thr(^tBu), CH Fmoc); 119.9, 125.1, 127.0, 127.6 (CH_{arom} Fmoc); 142.0, 144.0 (C Fmoc). **EM** [MALDI-TOF (DHB)], *m/z*: calculat per C₂₈H₃₆N₂O₇ 521.3, trobat 457.6 [M-tBu+H]⁺, 535.7 [M+Na]⁺, 551.7 [M+K]⁺.

2.3.2 Síntesi del HCl H-Thr-CH₂COPh

2.3.2.1 Síntesi de Boc-Thr-CH₂COPh

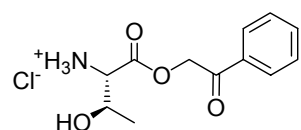
En un baló de 100 mL s'addiciona el Boc-Thr-OH (2.10 g, 9.58 mmols), 30 mL d'AcOEt i la DIEA (1.79 mL, 9.58 mmols), i s'agita fins a total dissolució. A continuació s'addiciona el bromur de benzofenona (1.50 g, 7.54 mmols) i es manté la reacció a reflux (78 °C) durant 16 h. Es deixa refredar la solució fins a temperatura ambient i es filtra la solució orgànica per tal d'eliminar la sal de bromur de DIEA. Seguidament es renta la solució orgànica amb aigua (3 x 25 mL) i amb una solució aquosa del 5 % de NaHCO₃ (3 x 25 mL). La fracció orgànica s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda, obtenint-se un oli marronós. Es purifica per recristal·lització en èter dietílic a -78 °C i s'obtenen 2.38 g d'un sòlid blanc.



Rendiment: 92%. **HPLC** (gradient de 7:3 a 0:10 en 30 min, C₁₈): t_R = 13.6 min. **CCF** (SiO₂, DCM-Acetona (9:1), revelat amb ninhidrina): R_f = 0.30. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃; δ, ppm): 1.32 (d, J_{H_γ-H_β} = 6.6 Hz, CH_γ); 1.46 (s, 9H, 3CH₃ Boc); 3.78 (m, 1H, CH^β Thr); 4.44 (m, 1H, CH^α Thr); 4.60 (s, 1H, OH); 5.34 (d, J_{H-H'} = 16.5 Hz, 1H, HH' CH₂COPh); 4.41 (d, J_{NH-H^α} = 12.9 Hz, 1H, NH); 5.68 (d, J_{H-H'} = 16.5 Hz, 1H, HH' CH₂COPh); 7.50-7.90 (m, 5H, 5CH_{arom} CH₂COPh). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃; δ, ppm): 18.7 (CH₃^γ); 28.2 (CH₃ Boc); 59.3 (CH^β); 66.5 (CH₂ CH₂COPh); 68.2 (CH^α); 79.9 (C Boc); 127.9, 135.5 (CH_{arom} CH₂COPh); 133.3, 156.2, 171.1 (C CH₂COPh, CO CH₂COPh, CO Thr, CO Boc). **EM** [MALDI-TOF (DHB)], m/z: calculat per C₁₇H₂₃NO₆ 337.2, trobat 360.8 [M+Na]⁺; 376.8 [M+K]⁺.

2.3.2.2 Síntesi de HCl H-Thr-OCH₂COPh

En un baló de 100 mL s'addiciona el HCl-Thr-OCH₂COPh (1.20 g, 3.72 mmols) i 15 mL de HCl-1,4-dioxà (4 M), es tapa el baló amb un sèptum, s'hi col·loca una agulla i es manté en agitació a temperatura ambient durant 1.5 h. A continuació s'evapora el dissolvent a pressió reduïda i es realitzen coevaporacions amb Et₂O per tal d'eliminar tot el 1,4-dioxà. S'obtenen 0.99 g d'un sòlid blanc.

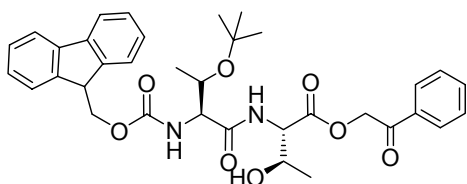


Rendiment: 98%. **HPLC** (gradient de 9:1 a 0:10 en 30 min, C₁₈): t_R = 9.5 min. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃; δ, ppm): 1.43 (d, J_{H_γ-H_β} = 7.8 Hz, 3H, CH₃^γ); 4.09 (m, 1H, CH^β); 4.40 (m, 1H, CH^α); 5.66 (s, 2H, CH₂ CH₂COPh); 7.50-8.00 (m, 5H, 5CH_{arom} CH₂COPh). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃; δ, ppm): 20.5 (CH₃ Thr); 59.9 (CH^β);

66.7 (CH^α); 68.9 CH₂ CH₂COPh); 129.0, 130.1, 134.5 (CH_{arom} CH₂COPh); 168.9 (CO CH₂COPh); 193.4 (CO Thr). **EM** [MALDI-TOF (DHB)], *m/z*: calculat per C₁₂H₁₆NO₄Cl 273.1, trobat 238.7 [M+Na]⁺; 260.7 [M+K]⁺.

2.3.3 Síntesi del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-OCH₂COPh

S'addiciona el Fmoc-Thr(^tBu)-OSu (1.38 g, 2.79 mmols) i 20 mL de 1,4-dioxà en un baló de 100 mL i s'agita fins a total dissolució. A continuació s'adiciona el HCl-H-Thr-OCH₂COPh (0.987 g, 3.62 mmols) i la DIEA (1.26 mL, 3.62 mmols), mantenint l'agitació a temperatura ambient durant 20 h. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es purifica el cru per cromatografia en columna de sílice fent servir com a fase mòbil Hexà-AcOEt (95:5), obtenint 1.61 g d'un sòlid blanc lleugerament escumós.



Rendiment: 94%. **HPLC** (gradient de 7:3 a 0:10 en 30 min, C₁₈): t_R = 21.4 min. **CCF** (SiO₂, DCM/Acetona (9:1), revelat a l'UV): R_f = 0.47. **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃; δ, ppm): 1.14 (d, J_{H_γ-H_β} = 6.2 Hz, 3H, CH₃^γ Thr); 1.32 (m, 12H, 3CH₃^tBu, CH₃^γ Thr); 4.7 (m, 2H, CH^α Thr, CH Fmoc); 4.2-4.7 (m, 7H, 2CH^α, 2CH^β, CH₂ Fmoc, CH Fmoc); 5.5 (m, 2H, CH₂ CH₂COPh); 6.03 (d, J_{NH-CH^α} = 4.8 Hz, 1H, NH Thr(^tBu)); 7.3-7.9 (m, 13H, 8CH_{arom} Fmoc, 5CH_{arom} CH₂COPh). **EM** [MALDI-TOF (DHB)], *m/z*: calculat per C₃₅H₄₀N₂O₈ 616.3, trobat 640.0 [M+Na]⁺; 656.0 [M+K]⁺.

2.3.4 Intent de deshidratació dels dipèptids Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-OMe i Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-OCH₂COPh.

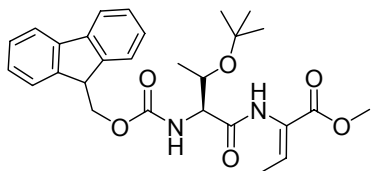
Se segueix el mateix procediment experimental que el realitzat per a la deshidratació del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-Oal·Hil.

La taula següent conté la relació de quantitats dels reactius emprats:

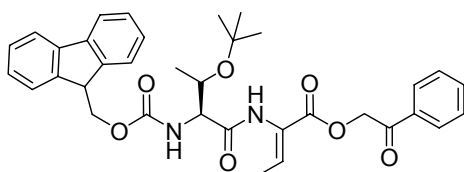
Dipèptid (g, mmols)	EDC-HCl / g	CuCl / g	Relació molar	Dissolvent / mL	Temps / dies
Fmoc-Thr(^t Bu)-Thr-OMe (0.34, 66)	0.50	0.156	1:2.4:4	10	14
Fmoc-Thr(^t Bu)-Thr-OCH ₂ COPh (0.20, 32)	0.24	0.072	1:2.4:4	4.11	10

El cru de reacció d'anàliza per HPLC, HLPC-EM i per MALDI-TOF

Fmoc-Thr(^tBu)-Dhb-OMe:



HPLC-EM [ES(+)]: t_R 19.6 min, m/z calculat per $C_{28}H_{34}N_2O_6$ 494.2, trobat 496.0 [M+H]⁺, 439 [M-^tBu]⁺.



Fmoc-Thr(^tBu)-Thr-OCH₂COPh:

HPLC: t_R 20.7. EM [MALDI-TOF (DHB)], m/z : calculat per $C_{35}H_{38}N_2O_7$ 598.3, trobat 622.0 [M+Na]⁺, 638 [M+K]⁺.

2.4 SÍNTESI DE [MST, D-SER⁴, THR⁶, ASP⁹] SIRENGOTOXINA

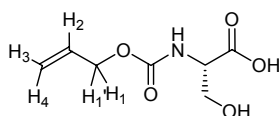
Les síntesis peptídiques es realitzen sobre suport polimèric CTC-PS seguint la metodologia Fmoc/^tBu. Se segueix el procediment estàndard descrit a l'apartat 1.5. De forma general els acoblaments es realitzen emprant DIPCDI i HOBt com a agents d'acoblament, mantenint la reacció d'acoblament en agitació mecànica durant 1h i realitzant un assaig de ninhidrina en finalitzar cada acoblament, per tal de determinar si aquest ha estat complert (assaig ninhidrina negatiu) o si necessita d'un posterior reacoblament (assaig ninhidrina positiu).

2.4.1 Síntesi de Alloc-Ser-OH

Cal treballar amb el material ben sec i amb dissolvents anhidres.

En un baló de 50 mL s'addiciona la serina (H-Ser-OH, 1.2 g, 9.5 mmols) i 10 mL de DCM. Es purga el sistema amb argó, s'addiciona el clorur de tetrametilsilil (TMS-Cl, 3.1 g, 28.5 mmols) i es torna a fer una purga amb argó. La reacció es manté a reflux (64 °C) i sota atmosfera d'argó durant 2 hores. A continuació es refreda la solució a temperatura ambient i després es manté en un bany de gel durant 30 min, obtenint un sòlid blanc. Posteriorment s'addiciona la DIEA (4.70 mL, 27.0 mmols) (solubilització del sòlid) i seguidament s'addiciona el cloroformat d'al·lil (0.84 mL, 7.9 mmols). Cal fer aquesta addició lentament, ja que la reacció és molt exotèrmica. La solució pren una coloració groguenca. Es manté la reacció en agitació i en un bany

de gel durant 20 minuts i després 2 hores més a temperatura ambient. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es redissol el residu en 30 mL d'una solució aquosa del 10 % de NaHCO₃, rentant la fase aquosa amb AcOEt (3 x 40mL); les fases aquoses s'ajunten i s'acidifica amb una solució aquosa de HCl 1 N fins assolir pH 2, i tot seguit es fan extraccions amb AcOEt (3 x 50 mL). La fase orgànica s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda, obtenint 1.05 g d'un sòlid groc.



Rendiment: 70%. **HPLC** (gradient de 10:0 a 0:10 en 30 min, C₁₈): t_R = 10.1

min. **IR** (film, v, cm⁻¹): 3670 (O-H, st); 3087 (Csp²-H, st); 2950 (Csp³-H);

1703 (C=O, st). **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃; δ, ppm): 3.98 (m, 2H, CH₂^β);

4.410 (m, 1H, CH^α); 4.59 (m, 2H, CH₂ al lil); 5.22 (d, J = 10 Hz, 1H, H³ al lil);

5.31 (d, J = 18 Hz, 1H, H⁴ al lil); 5.91 (m, 1H, H² al lil); 6.10 (m, 1H, NH). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃; δ,

ppm): 55.8 (CH Ser); 62.7 (CH₂ Ser); 66.2 (CH₂-O al lil); 117.9 (CH al lil); 132.3 (CH₂= al lil); 156.6 (CO

Alloc); 173.5 (CO Ser). **EM** [MALDI-TOF (DHB)], m/z: calculat per C₇H₁₅NO₅ 193.1, trobat 212.4

[M+Na]⁺; 228.4 [M+K]⁺.

2.4.2 Síntesi de la tetrapeptidil-resina [Alloc-Ser(&)-D-Dab(Boc)-Gly-resina CTC-PS] [Fmoc-Thr&]

La resina CTC-PS (150 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. S'introdueix el primer aminoàcid Fmoc-Gly-OH (32 mg, 0.7 mmol) i DIEA (117 μL, 6.67 eq) en DCM. Després de 5 min, s'addiciona més DIEA (59 μL, 3.33 eq) i la mescla de reacció es deixa en agitació durant 55 min a 25 °C. La reacció finalitza amb l'addició de MeOH (120 μL) i la mescla es manté en agitació durant 10 min més. La peptidil-resina Fmoc-Gly-CTC-PS se sotmet als següents rentats/tractaments: filtració, DCM (5 x 30 s), DMF (5 x 30 s), piperidina/DMF (1:4) (1 x 1 min, 3 x 5 min, 1 x 10 min), piperidina/DBU/toluè/DMF (5:5:20:70) (2 x 5 min). La funcionalització es calcula per AAA i resulta 0.59 mmol/g resina.

Es realitza l'acoblament del Fmoc-D-Dab(Boc)-OH (99.1 mg, 3 eq) fent servir com a agents d'acoblament DIPCDI (34.8 μL, 3 eq) i HOBT (34.5 mg, 3 eq). Es manté l'acoblament en agitació mecànica durant 1 h. Cal realitzar un reacoblament amb 3 eq de Fmoc-D-Dab(Boc)-OH, DIPCDI i HOBT. A continuació s'elimina el gup Fmoc amb DMF–piperidina–DBU–toluè (70:5:5:20) i es duu a terme la incorporació de l'Alloc-Ser-OH (42.5 mg, 3 eq) amb TBTU (72.2 mg, 3 eq), HOBT (34.4 mg, 3 eq) i DIEA (78.4 μL, 6 eq) com a agents d'acoblament. Per fer això, es prepara en un vial una solució de l'aminoàcid, l'HOBT i la DIEA en la mínima quantitat de DMF. Una vegada addicionada a la resina,

s'afegeix el TBTU dissolt també en la mínima quantitat de DMF i es manté en agitació mecànica durant 30 min. Cal realitzar un reacoblament en condicions similars de 3 eq de reactius. Es pren una alíquota, es tracta amb un 1 % de TFA en DCM (5 x 30 s) i el cru resultant s'analitza per EM.

EM [MALDI-TOF (DHB)] *m/z*: calculat per $C_{18}H_{30}N_4O_9$ 446.2, trobat 347.7 [M-Boc+H]⁺; 369.7 [M-Boc+K]⁺; 469.8 [M+Na]⁺; 485.8 [M+K]⁺.

La incorporació de Fmoc-Thr(^tBu)-OH i consegüent formació de l'enllaç èster es realitza en les mateixes condicions que les descrites anteriorment per a la incorporació de la treonina desprotegida, emprant Fmoc-Thr(^tBu)-OH (149.1 mg, 5 eq), DIPCDI (58.1 µL, 5 eq), DMAP (4.77 mg, 0.5 eq) i DIEA (13.1 µL, 1 eq). En aquest cas, després de cada tractament es realitza el test d'alcohols en resina (*Experimental*, 1.5.2.4). Com que no s'obté un resultat clar, es decideix fer un tercer tractament en condicions similars a les emprades en els dos acoblaments anteriors. Es pren una alíquota de la peptidil-resina i es tracta amb un 1 % de TFA en DCM (5 x 30 s) i el cru resultant s'analitza per EM. Finalment es renta la resina amb DCM (5 x 30 s).

EM [MALDI-TOF (DHB)] *m/z*: calculat per $C_{41}H_{55}N_5O_{13}$ 826.3, trobat 849.2 [M+Na]⁺; 865.13 [M+K]⁺.

2.4.3 Obtenció del depsipèptid lineal protegit [H-D-Ser-Orn(Boc)-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-Asp(O^tBu)-Thr(^tBu)&][MST-Ser-(^tBu)-Dab(Boc)-Gly-OH]

L'eliminació del grup Alloc es realitza mitjançant tres tractaments de 15 min amb una solució de PhSiH (92.4 µL, 10 eq) i [Pd(PPh₃)₄] (8.7 mg, 0.1 eq) en DCM. En tot moment es manté en agitació mecànica.

Per l'acoblament de l'àcid mistíric (85.6 mg, 5 eq) es fa servir HOBt (57.4 mg, 5 eq) i DIPCDI (58 µL, 5 eq) com a agents d'acoblament. Es realitza un segon acoblament fent servir 5 eq d'àcid mirístic i com a agents d'acoblament HOBt (57.4 mg, 5 eq), TBTU (120.4 mg, 5 eq) i DIEA (130.6 µL, 10 eq). Es realitza l'eliminació del grup Fmoc de la Thr(^tBu) (20% de piperidina en DMF, 20 min), es pren una alíquota de la peptidil-resina, es tracta amb un 1% de TFA en DCM (5 x 30 s) i s'analitza el cru resultant per EM.

EM [MALDI-TOF (DHB)] *m/z*: calculat per $C_{36}H_{67}N_5O_{10}$ 729.5, trobat 631.16 [M-Boc+H]⁺; 653.17 [M-Boc+Na]⁺; 669.16 [M-Boc+K]⁺; 753.25 [M+Na]⁺; 769.23 [M+K]⁺; 675.11 [M-^tBu+H]⁺.

La incorporació del Fmoc-Asp(^tBu)-OH es fa seguint el protocol general, utilitzant 5 eq d'aminoàcid (154 mg) i com a agents d'acoblament HOBt (57 mg, 5 eq) i DIPCDI (58 µL, 5 eq). Cal fer un segon tractament amb 5 eq d'aminoàcid i d'agents d'acoblament.

2.4.3.1 Acoblament del dipèptid Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH

Per l'acoblament del dipèptid s'empren 3 eq de Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH (108 mg) amb HOAt (35 mg, 3 eq) i DIPCDI (35 μ L, 3 eq) com a agents d'acoblament, mantenint la reacció en agitació mecànica durant 3 h. Es realitza un test de ninhidrina sense filtrar i es comprova que l'acoblament no ha estat complet, per la qual cosa s'addiciona a la peptidil-resina més HOAt (17 mg, 1.5 eq) i DIPCDI (18 μ L, 1.5 eq). Es deixa reaccionant tota la nit i es fa l'assaig de ninhidrina, comprovant que l'acoblament ha estat complet.

Per a la incorporació dels darrers dos aminoàcids [Fmoc-Orn(Boc)-OH i Fmoc-D-Ser-OH] se segueix el protocol general descrit. Cal realitzar un segon acoblament amb 5 eq dels dos aminoàcids i un tercer tractament amb 3 eq d'aminoàcid en el cas de la Fmoc-D-Ser-OH i 30 min de durada. Es realitza l'eliminació del grup Fmoc (20% de piperidina en DMF, 20 min). Es tracta la peptidil-resinaa anterior amb una solució de l'1 % de TFA en DCM (5 x 30 s). Es recullen els filtrats de la resina en un baló que conté 10 mL d'H₂O (15 mL H₂O/250 mg resina), s'elimina el dissolvent i el TFA a pressió reduïda, el residu es redissol en H₂O i finalment es liofilitza. La quantitat de pèptid que s'obté és de 57 mg, determinada per AAA. La funcionalització final de la peptidil-resinaa determinada per AAA és de 0.32 mmol/g.

HPLC (gradient de 8:2 a 0:10 en 30 min, C₁₈): t_R = 27.8 min (pic majoritari, 61% de puresa).

EM [MALDI-TOF (DHB)] *m/z*: calculat per C₆₉H₁₂₃N₁₁O₂₁ 1441.9, trobat 1465.0 [M+Na]⁺; 1481.0 [M+K]⁺.

2.4.4 **Ciclació del depsipèptid lineal protegit**

En un baló de 100 ml s'addiciona HOBt (8.5 mg, 4 eq) i la mínima quantitat de DMF, just per solvatar-lo. Es prenen 20 mg del pèptid lineal protegit i es dissolen en 14 mL de DCM (concentració d'1 mM) i s'addiciona al baló. A continuació s'hi addiciona la DIEA (7.2 μ L, 3 eq) per neutralitzar possibles restes d'àcid i, per últim, s'hi addiciona la DIPCDI (8.6 μ L, 4 eq). La reacció es manté en agitació mecànica i a temperatura ambient durant 1.5 h. S'analitza el cru per HPLC i es comprova que no hi ha restes de producte de partida. Tot seguit s'elimina el dissolvent a pressió reduïda.

HPLC (gradient de 65:35 a 0:100 en 30 min, C₄): t_R = 23.3 min (pic majoritari, 44% de puresa).

EM [MALDI-TOF (DHB)] *m/z*: calculat per C₆₉H₁₂₁N₁₁O₂₀ 1423.9, trobat 1448.5 [M+Na]⁺; [M+K]⁺.

2.4.5 Eliminació del grups protectors de les cadenes laterals

En el baló que conté el depsipèptid ciclat protegit s'addiciona una solució del 5 % de TFA en H₂O i es manté en agitació i a temperatura ambient durant 1.5 h. Seguidament s'elimina el TFA a pressió reduïda i es liofilitza.

HPLC (gradient de 7:3 a 0:10 en 30 min, C₄): t_R = 12.8 min (pic majoritari, 44% de puresa).

EM [MALDI-TOF (DHB)], *m/z*: calculat per C₄₇H₈₁N₁₁O₁₆ 1055.6, trobat 1057.4 [M+H]⁺; 1079.4 [M+Na]⁺, 1095.37 [M+K]⁺.

2.4.5.1 Proves de solubilitat

El pèptid obtingut presenta poca solubilitat en solució aquosa. Es realitza un conjunt de proves per determinar la solubilitat del producte en una mescla de dissolvents compatibles amb el sistema de purificació HPLC-semipreparatiu. Es pren una alíquota de la mostra en un tub d'assaig, es dissol en TFA i s'elimina l'àcid per evaporació amb nitrogen. Seguidament es tracta amb la mescla de dissolvents corresponents i s'observa si hi ha formació de precipitat.

2.4.6 Obtenció del [MST, D-Ser⁴, Thr⁶, Asp⁹] sirengotoxina

El cru liofilitzat de la síntesi (depsipèptid ciclat i protegit) es dissol en una solució d'MeCN/H₂O (3:7), es filtra i s'injecta a un sistema HPLC preparatiu amb un gradient de 6:4 a 3:7 en 120 min.

S'analitzen els productes aïllats per HPLC (gradient de 65:35 a 0:100 en 30 min, C₄) i MALDI-TOF. La fracció que conté el producte desitjat es col·lecta i es liofilitza.

Es pren la fracció que conté el producte pur i se sotmet al mateix tractament d'eliminació del grups protectors de les cadenes laterals que s'ha seguit en l'apartat 2.2.4. S'evapora el TFA a pressió reduïda i es redissol el pèptid en una solució aquosa del 10 % d'AcOH, observant una solució tèrbola. Es fan rentats de la fase aquosa amb Et₂O i tot seguit es liofilitza. La mostra es dissol parcialment amb una solució aquosa del 10 % d'AcOH i s'analitza la fracció soluble per HPLC i EM, obtenint com a mínim 2 mg de "l'Anàleg de la Sirengotoxina" amb una puresa del 90 %.

HPLC (gradient de 7:3 a 0:10 en 30 min, C₄): t_R = 12.8 min (pic majoritari, 90% de puresa).

EM [MALDI-TOF (DHB)], *m/z*: 1057.7 [M+H]⁺; 1079.7 [M+Na]⁺; M teòrica 1055.6

3. Síntesi de la tiocoralina i anàlegs

3.1 SÍNTESI DELS DERIVATS D'AZATIOCORALINA

3.1.1 [QXC, NMe-Ala⁴] Azatiocoralina i [QNA, NMe-Ala⁴] Azatiocoralina

3.1.1.1 Síntesi de la cadena lineal {[Boc-D-Dap(&¹)-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Ala&²][H-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Ala&¹][Boc-D-Dap(&²)-CTC-PS]}: Aproximació lineal

La resina CTC-PS (500 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. S'introdueix el primer aminoàcid Boc-D-Dap(Fmoc)-OH (149 mg, 0.7 mmol) i DIEA (408 µL, 6.67 eq) en DCM. Després de 5 min, s'addiciona més DIEA (204 µL, 3.33 eq) i la mescla de reacció es deixa en agitació durant 55 min a 25 °C. La reacció finalitza amb l'addició de MeOH (400 µL) i la mescla es manté en agitació durant 10 min més. La peptidil-resina Boc-D-Dap(Fmoc)-CTC-PS se sotmet als següents rentats/tractaments: filtració, DCM (5 x 30 s), DMF (5 x 30 s), piperidina–DMF (1:4) (1 x 1 min, 3 x 5 min, 1 x 10 min), piperidina–DBU–toluè–DMF (5:5:20:70) (2 x 5 min). La funcionalització es calcula per mesura de l'absorbància a 290 nm i resulta 0.44 mmol/g resina. Per a l'elongació de la cadena s'empra l'agent d'acoblament HATU i DIEA. Se segueixen els cicles de síntesi descrits en l'apartat ensamblatge de la cadena peptídica (*Part Experimental*, 1.5.4.5) La taula següent resumeix l'evolució de la síntesi:

Aminoàcid	Quantitat (mg, mmol, eq)	Agents acoblament (eq)	Condicions acoblament	Test acoblament
Fmoc-NMe-Ala-OH	407, 1.25, 5	HATU (5) / DIEA (10)	DCM, 35 min	Ninh (+)
Fmoc-NMe-Ala-OH	244, 0.75, 3	HATU (3) / DIEA (6)	DCM, 35 min	Ninh (-)
Fmoc-Cys(Acm)-OH	518, 1.25, 5	HATU (5) / DIEA (10)	DCM, 35 min	De Clercq (+)
Fmoc-Cys(Acm)-OH	518, 1.25, 5	HATU (5) / DIEA (10)	DCM, 35 min	De Clercq (-)
N-metilació en fase sòlida				
Fmoc-Gly-OH	372, 1.25, 5	HATU (5) / DIEA (10)	DCM, 35 min	De Clercq (-)
Boc-D-Dap(Fmoc)-OH	320, 0.75, 3	HATU (3) / DIEA (6)	DCM, 35 min	De Clercq (+)
Boc-D-Dap(Fmoc)-OH	320, 0.75, 3	HATU (3) / DIEA (6)	DCM, 35 min	De Clercq (-)
Fmoc-NMe-Ala-OH	407, 1.25, 5	HATU (5) / DIEA (10)	DCM, 35 min	Ninh (+)
Fmoc-NMe-Ala-OH	407, 1.25, 5	HATU (5) / DIEA (10)	DCM, 15 min	Ninh (-)
Fmoc-Cys(Acm)-OH	518, 1.25, 5	HATU (5) / DIEA (10)	DCM, 35 min	De Clercq (+)
Fmoc-Cys(Acm)-OH	518, 1.25, 5	HATU (5) / DIEA (10)	DCM, 35 min	De Clercq (-)
N-metilació en fase sòlida				
Fmoc-Gly-OH	372, 1.25, 5	HATU (5) / DIEA (10)	DCM, 35 min	De Clercq (-)

La N-metilació en fase sòlida es realitza mitjançant quatre etapes de síntesi que es resumeixen a la següent taula:

N-metilació en fase sòlida			
Etapa	Reactius	Condicions	Control reacció
Protecció	Clorur de 2-nitrobenzenesulfonil (166 mg, 3 eq) DIEA (824 μ L, 20 eq)	DCM, 25 °C 2 x 1 h	Test de ninhidrina
N-metilació	metil-4-nitrobenzenesulfonat (217 mg, 4 eq) MTBD (108 μ L, 3 eq)	DMF, 25 °C 2 x 30 min	HPLC-EM
Desprotecció	β -mercaptoetanol (175 μ L, 10 eq) DBU (187 μ L, 5 eq)	DMF, 25 °C, Ar 1 x 10 min, 2 x 40 min,	Test de De Clercq

El rendiment de la síntesi de la cadena lineal es determina per la mesura de l'absorbància en l'eliminació del darrer grup Fmoc, que resulta ser del 30 %. Es pren una alíquota, es tracta amb una solució 1 % de TFA en DCM i després d'eliminar el solvent i redissoldre la mostra en MeCN, s'analitza en el HPLC.

HPLC (gradient de 1:0 a 0:1 en 15 min, C_{18}): t_R = 7.0 min, 70 % puresa.

EM [ES(+)], m/z : calculat per $C_{42}H_{74}N_{12}O_{15}S_2$ 1050.5, trobat 1051.6 [M+H]⁺, 1073.5 [M+Na]⁺, 1089.5 [M+K]⁺, 951.5 [M-Boc+H]⁺.

3.1.1.2 *[[Boc-D-Dap^{&1}-Gly-NMe-Cys(&²)-NMe-Ala^{&3}][H-Gly-NMe-Cys(&²)-NMe-Ala^{&1}][Boc-D-Dap(&³)-OH]]: Pont disulfur en fase sòlida*

S'addiciona a la resina iode (317 mg, 2.5 eq per Acm) en DMF i la mescla es deixa reaccionant en agitació mecànica durant 10 min. És necessari un segon tractament de 10 min per completar la reacció que se segueix per HPLC-EM.

El pèptid s'escindeix de la resina amb una solució de TFA-H₂O (1:99) (5 x 30 s). Es recullen els filtrats de la resina en un baló que conté H₂O (30 mL), s'elimina el dissolvent i el TFA a pressió reduïda, el residu es redisol en H₂O i MeCN i finalment es liofilitza. S'obtenen 67 mg de cru del pèptid cíclic.

HPLC (gradient de 1:0 a 0:1 en 15 min, C₁₈): t_R= 7.6 min, 70 % puresa.

EM [ES(+)], m/z: calculat per C₃₆H₆₂N₁₀O₁₃S₂ 906.4, trobat 907.6 [M+H]⁺, 807.5 [M-Boc+H]⁺.

3.1.1.3 *[[Boc-D-Dap(&¹)-Gly-NMe-Cys(&²)-NMe-Ala^{&3}][Boc-D-Dap(&³)-Gly-NMe-Cys(&²)-NMe-Ala^{&1}]]*

- **Proves d'agents d'acoblements per a la ciclació en solució**

Una primera alíquota de pèptid escindit (6.2 mg, 6.2 μmol) es dissol en DCM (3,2 mL) i s'addiciona HOBt (3.8 mL, 24.8 μmol), DIEA (3.2 μL, 18.3 μmol), i DIPCDI (3.8 μL, 24.8 μmol). La reacció es manté en agitació mecànica durant 3 dies a 25 °C. La segona alíquota de pèptid (5 mg, 5 μmol), es dissol en DCM (3 mL) i s'addiciona HOAt (3.4 mg, 20 μmol), DIEA (3 μL, 15 μmol) i DIPCDI (3.4 μL, 20 μmol). La reacció es manté en agitació mecànica durant 3 dies a 25 °C. La tercera alíquota de pèptid cíclic (5.7 mg, 5.7 μmol) es dissol en DCM (3 mL) i s'addiciona PyOAP (13 mg, 22.8 μmol) i DIEA (9 μL, 46 μmol). La reacció es manté en agitació mecànica durant 3 dies a 25 °C.

- **Ciclació emprant DICPCDI i HOAt**

L'HOAt es dissol en la mínima quantitat de DMF i DCM (50 mL) i s'addiciona el pèptid escindit (50 mg, 50 μmol), DIEA (30 μL, 0.15 mmol) i la DIPCDI (34 μL, 0.2 mmol). La reacció es deixa en agitació mecànica durant 1.5 h a 25 °C. El solvent s'elimina a pressió reduïda i el producte es purifica en el sistema d'HPLC-semipreparatiu de fase reversa (gradient de 7:3 a 5:5 en 25 min, 10 mL/min, C₁₈). S'obtenen 26 mg de producte ciclat pur. Rendiment (pont disulfur, escissió, ciclació i purificació) 44 %

HPLC (gradient de 7:3 a 5:5 en 15 min, C₁₈): t_R= 8.4 min, 72 % puresa.

EM [MALDI-TOF (DHB)], m/z: calculat per C₃₆H₆₀N₁₀O₁₂S₂ 888.4, trobat 911.3 [M+Na]⁺, 927.3[M+K]⁺; ES(+): 889.5[M+H]⁺.

El pèptid protegit es tracta amb una solució de TFA-H₂O (95:5) i la reacció es manté en agitació mecànica durant 1.5 h a 25 °C. El solvent s'elimina a pressió reduïda, es redissol amb H₂O i MeCN i es liofilitza. S'obtenen 22 mg de pèptid desprotegit. El producte es divideix en dues fraccions i es fa reaccionar amb dos grups cromòfors diferents.

3.1.1.4 [2QXA, NMeAla⁴] Azatiocoralina

L'àcid 2-quinoxalinecarboxílic (2QXA) (12.7 mg, 73 µmol) es preactiva amb DIPCDI (11.3 µL, 73 µmol), HOAt (11.2 mg, 73 µmol) i DIEA (7.6 µL, 73 µmol) en DCM durant 30 min. A continuació s'addiciona el pèptid lliure (10 mg, 14.5 µmol) i es manté la reacció amb agitació mecànica durant 3 dies. S'elimina el solvent a pressió reduïda i el cru es purifica en el sistema HPLC de fase reversa (C₄) i s'aconsegueix 1 mg de producte final amb una puresa de 98 %. Rendiment de síntesi: 1.2 %

HPLC (gradient de 8:2 a 2:8 en 15 min, C₁₈): t_R= 7.4 min, 98 % puresa.

EM [MALDI-TOF MS (DHB)], m/z: calculat per C₄₄H₅₂N₁₄O₁₀S₂ 1000.3, trobat 1001.8[M+H]⁺, 1022.6 [M+Na]⁺, 1039.6[M+K]⁺.

3.1.1.5 [QNA, NMeAla⁴] Azatiocoralina

L'àcid quinàldic (QNA) (12.6 mg, 73 µmol) es preactiva amb DIPCDI (11.3 µL, 73 µmol), HOAt (11.2 mg, 73 µmol) i DIEA (7.6 µL, 73 µmol) en DCM durant 30 min. A continuació s'addiciona el pèptid (10 mg, 14.5 µmol) i es manté la reacció en agitació mecànica durant 3 dies a 25 °C. El producte es purifica en el sistema HPLC-seminpreparatiu de fase reversa (C₈) i s'obté 0.8 mg de producte final amb una puresa de 97 %. Rendiment de síntesi: 1.0 %

HPLC (gradient de 8:2 a 3:7 en 15 min, C₁₈): t_R= 10.3 min, 98 % puresa.

EM [MALDI-TOF (DHB)], m/z: calculat per C₄₆H₅₄N₁₂O₁₀S₂ 998.3, trobat 999.4 [M+H]⁺, 1021.4 [M+Na]⁺, 1037.4 [M+K]⁺.

3.1.2 Síntesi de [NMe-Leu⁴] Azatiocoralina. Dues ciclacions en fase sòlida

3.1.2.1 *[[Boc-D-Dap(&¹)-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Leu&²]]H-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Leu&¹]* *[N(CTC-PS)-D-Dap(&²)-Oal-iii]*

La resina CTC-PS (50 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. La introducció del primer aminoàcid, la inactivació de les posicions reactives remanents i la determinació de la funcionalització inicial de la resina segueixen els procediments anteriorment detallats. A continuació es resumeix l'evolució de la síntesi mitjançant la següent taula:

Primer aminoàcid: H-D-Dap(Fmoc)-Oal-iii					
Resina CTC-PS	50 mg				
H-D-Dap(Fmoc)-Oal-iii	12.8 mg, 35 µmol				
DIEA	40 µL (2/3), 20 µL (1/3)				
MeOH	40 µL				
Funcionalització	0.43 mmol/g resina				
Elongació de la cadena					
Aminoàcid	Quant./mg, mmol, eq	Agents acobl. (eq)	Condicions	Test	% Rendt.
Fmoc-NMe-Leu-OH	24, 0.067, 3	HATU (3)/ DIEA (6)	DMF, 35 min	Ninhydrina (-)	97
Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH	27, 0.063, 3	HATU (3)/ DIEA (9)	DMF, 35 min	De Clercq (-)	95
Fmoc-Gly-OH	37, 0.12, 5	HATU (5)/ DIEA(10)	DMF, 35 min	De Clercq (-)	99
Boc-D-Dap(Fmoc)-OH	26, 0.061, 3	HATU (3)/ DIEA (6)	DMF, 35 min	Ninhydrina (-)	95
Fmoc-NMe-Leu-OH	24, 0.067, 3	HATU (3)/ DIEA (6)	DMF, 35 min	Ninhydrina (-)	98
Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH	27, 0.063, 3	HATU (3)/ DIEA (9)	DMF, 35 min	De Clercq (+)	99
	27, 0.063, 3	HATU (3)/ DIEA (9)	DMF, 35 min	De Clercq (+)	
		PyOAP (1)/DIEA (3)	DMF, 10 min	De Clercq (-)	
Fmoc-Gly-OH	37, 0.12, 5	HATU (5)/ DIEA(10)	DMF, 35 min	De Clercq (-)	97

El rendiment de la síntesi de la cadena lineal és del 81 %. Es pren una alíquota de la peptidil-resina i s'analitza en el HPLC-EM.

HPLC (gradient de 1:0 a 0:1 en 15 min, C₁₈): t_R = 7.3 min, 79 % puresa.

EM [MALDI-TOF (DHB)], m/z: calculat per C₄₆H₈₂N₁₂O₁₃S₂ 1074.6, trobat 1075.7 [M+H]⁺, 1097.7 [M+Na]⁺, 1113.7 [M+K]⁺.

3.1.2.2 *[[Boc-D-Dap(&¹)-Gly-NMe-Cys(&²)-NMe-Leu&³]*
[N(CTC-PS)-D-Dap(&³)-Gly-NMe-Cys(&²)-NMe-Leu&¹]]

El grup al·lil èster s'elimina amb 3 tractaments de 15 min de [Pd(PPh₃)₄] (6 mg, 0.1 eq) i PhSiH₃ (62 µL, 10 eq) dissolts en DCM sota atmosfera d'Argó. Les traces de Pd s'eliminen amb 3 rentats de 15 min amb una solució de dietilditiocarbamat de sodi en DMF (0.02 M).

Una solució de iode (81mg, 2.5 eq per Acm) en DMF s'addiciona a la peptidil-resina i s'agita mecànicament durant 10 min. Després de filtrar, la peptidil-resina es renta reptides vegades amb DMF (5 x 30 s), DCM (10 x 30 s) i CHCl₃ (5 x 30 s). Una anàlisi per HPLC-EM d'una al·lquota de la peptidil-resina indica la total formació del pont disulfur.

En un primer intent, la ciclació es realitza amb la carbodiimida DIPCDI (2 eq) i HOBT (2 eq) com agents d'acoblament en DMF i durant 40 min. Després de filtrar, s'obté un test de ninhidrina positiu. Es realitza un segon acoblament més reactiu amb DIPCDI (2 eq)/HOAt (2 eq) en DMF durant 40 min. El test de ninhidrina és lleugerament positiu. Es repeteix l'acoblament i després s'addiciona HATU (2 eq) i DIEA (2 eq). Després de filtrar s'obté el test de ninhidrina negatiu.

HPLC (gradient de 1:0 a 0:1 en 15 min, C₁₈): t_R= 8.3 min, 31 % puresa.

EM [MALDI-TOF (DHB)], m/z: calculat per C₃₇H₆₄N₁₀O₁₀S₂ 872.4, trobat 873.7 [M+H]⁺, 895.6 [M+Na]⁺, 911.5 [M+K]⁺.

3.1.2.3 *[NMe-Leu⁴] Azatiocoralina*

El pèptid s'escindeix de la resina com es descriu anteriorment. Després d'eliminar el dissolvent, s'addiciona una solució de TFA-H₂O (95:5) i es manté l'agitació durant 1.5 h a 25 °C. El solvent s'elimina a pressió reduïda, es redissol H₂O i MeCN i es liofilitza. L'àcid 3-hidroxiquinolina-2-carboxílic (3HQA) s'acobla tal i com s'ha descrit per la síntesi de l'azatiocoralina. El producte es purifica en el sistema HPLC analític fase reversa (C₁₈).

HPLC (gradient de 9:1 a 5:5 en 15 min, C₁₈): t_R= 8.8 min, 98 % puresa

EM [HRMS ES (+)], m/z: calculat per C₅₂H₆₆N₁₂O₁₂S₂ 1114.43665, trobat 1115.4437 [M+H]⁺.

3.2 SÍNTESI DE L'AZATIOCORALINA

3.2.1 Síntesi de la cadena lineal {[Boc-D-Dap(¹)-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)²]} [H-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)¹] [Boc-D-Dap(²)-CTC-PS]}

3.2.1.1 Aproximació 4+4

La resina CTC-PS (150 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. La introducció del primer aminoàcid, la inactivació de les posicions reactives remanents i la determinació de la funcionalització inicial de la resina segueixen els procediments anteriorment detallats. A continuació es resumeix l'evolució de la síntesi mitjançant la següent taula:

Primer aminoàcid: Boc-D-Dap(Fmoc)-OH					
Resina CTC-PS	150 mg				
Boc-D-Dap(Fmoc)-OH	45 mg, 0.21 mmol				
DIEA	123 µL (2/3), 60 µL (1/3)				
MeOH	120 µL				
Funcionalització	0.61 mmol/g resina				
Elongació de la cadena					
Aminoàcid	Quant./mg, mmol, eq	Agents acobl. (eq)	Condicions	Test	% Rendt.
Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH	102, 0.28, 3	HATU (3)/ DIEA (9)	DMF, 35 min	Ninhidrina (-)	90
Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH	118, 0.28, 3	HATU (3)/ DIEA (9)	DMF, 35 min	De Clercq (-)	96
Fmoc-Gly-OH	136, 0.46, 5	HATU (5)/ DIEA (10)	DMF, 35 min	De Clercq (-)	

La peptidil-resina es divideix en 1/3 i 2/3 parts. S'elimina el grup Fmoc de la fracció petita seguint el procediment general descrit i la resta de la peptidil-resina es tracta amb una solució de TFA-H₂O (1:99) (5 x 30 s) i els filtrats es recullen en un baló que conté H₂O (3 mL). Els filtrats combinats s'evaporen a pressió reduïda per obtenir 34.4 mg (43 µmol) del tetrapèptid protegit. Rendiment 78 %.

HPLC (gradient de 10:0 a 3:7 en 15 min, C₁₈): t_R= 8.7 min, 88 % puresa.

EM [MALDI-TOF (DHB)], m/z: calculat per C₃₇H₅₀N₆O₁₀S₂ 802.3, trobat 825.5 [M+Na]⁺, 841.5 [M+K]⁺.

El producte liofilitzat, sense ser purificat, s'addiciona a la peptidil-resina lliure amb PyOAP (22.4 mg, 43 μmol) i DIEA (22 μL , 129 μmol) en DMF. La reacció es deixa en agitació orbitalica tota la nit a 25 °C. Després d'un test de De Clercq positiu sense filtració, s'addiciona més PyOAP (22 mg, 43 μmol), i DIEA (22 μL , 129 μmol), i després de 4 hores s'addiciona més PyOAP (11mg, 22 μmol) i DIEA (11 μL , 65 μmol). Després de 2 h el test de De Clercq és negatiu. S'elimina el grup Fmoc seguint el procediment general i es mesura el rendiment de la reacció d'acoblament de fragments del 81 %. Una alíquota de la peptidil-resina es tracta amb una solució de TFA-DCM (1:99) i s'analitza per HPLC-EM.

HPLC (gradient de 7:3 a 1:9 en 15 min, C_{18}): t_R = 8.3 min, 91 % puresa.

EM [MALDI-TOF (DHB)], m/z : calculat per $C_{44}H_{78}N_{12}O_{15}S_4$ 1142.5, trobat 1143.4 $[M+H]^+$, 1165.4 $[M+Na]^+$.

3.2.1.2 Aproximació seqüencial

La resina CTC-PS (300 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. La introducció del primer aminoàcid, la inactivació de les posicions reactives remanents i la determinació de la funcionalització inicial de la resina segueixen els procediments anteriorment detallats. A continuació es resumeix l'evolució de la síntesi mitjançant la següent taula:

Primer aminoàcid: Boc-D-Dap(Fmoc)-OH					
Resina CTC-PS	150 mg				
Boc-D-Dap(Fmoc)-OH	45 mg, 0.21 mmol				
DIEA	123 μL (2/3), 60 μL (1/3)				
MeOH	120 μL				
Funcionalització	0.61 mmol/g resina				
Elongació de la cadena					
Aminoàcid	Quant./mg, mmol, eq	Agents acobl. (eq)	Condicions	Test	Rendt. (%)
Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH	214, 0.58, 3	HATU (3)/ DIEA (9)	DMF, 35 min	Ninhidrina (-)	95
Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH	247, 0.58, 3	HATU (3)/ DIEA (9)	DMF, 35 min	De Clercq (-)	97
Fmoc-Gly-OH	285, 0.96, 5	HATU (5)/ DIEA (10)	DMF, 35 min	De Clercq (+)	97
	285, 0.96, 5	HATU (5)/ DIEA (10)	DMF, 35 min	De Clercq (-)	
Boc-D-Dap(Fmoc)-OH	246, 0.58, 3	HATU (3)/ DIEA (6)	DMF, 35 min	Ninhidrina (-)	97
Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH	214, 0.58, 3	HATU (3)/ DIEA (9)	DMF, 35 min	Ninhidrina (-)	98
Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH	247, 0.58, 3	HATU (3)/ DIEA (9)	DMF, 35 min	De Clercq (-)	97
Fmoc-Gly-OH	285, 0.96, 5	HATU (5)/ DIEA (10)	DMF, 35 min	De Clercq (-)	94

El rendiment global de la síntesi lineal és de 78 %. Una alíquota de la peptidil-resina es tracta amb una solució de TFA–DCM (1:99) i s'analitza per HPLC-EM.

HPLC (gradient de 7:3 a 1:9 en 15 min, C_{18}): t_R = 8.3, 8.4 min, 83 % puresa.

EM [ES(+)], m/z : calculat per $C_{44}H_{78}N_{12}O_{15}S_4$ 1142.5, trobat 1143.9 [M+H]⁺.

3.2.2 Les dues ciclacions: {[Boc-D-Dap(&¹)-Gly-NMe-Cys(&²)-NMe-Ala&³] [Boc-D-Dap(&³)-Gly-NMe-Cys(&²)-NMe-Ala&¹]}

3.2.2.1 Formació del pont disulfur en fase sòlida

Una solució de iode (122 mg, 2.5 eq per Acm) en DMF s'addiciona a la peptidil-resina i la mescla s'agita mecànicament durant 10 min a 25 °C. Després de filtrar, la resina es renta repetides vegades amb DMF (5 x 30 s), DCM (10 x 30 s) i $CHCl_3$ (5 x 30 s). L'anàlisi per HPLC-EM d'una alíquota de la peptidil-resina tractada amb TFA–DCM (1:99) indica que la formació del pont disulfur és completa.

A continuació, la peptidil-resina es tracta amb una solució de TFA–H₂O (1:99) (5 x 30 s), i els filtrats es col·lecten en un baló que conté H₂O (18 mL). Els filtrats combinats s'evaporen a pressió reduïda per obtenir 86 mg de pèptid cíclic.

HPLC (gradient de 7:3 a 1:9 en 15 min, C_{18}): t_R = 9.4 min, 82 % puresa.

EM [MALDI-TOF (DHB)], m/z : calculat per $C_{38}H_{66}N_{10}O_{13}S_4$ 998.4, trobat 999.3 [M+H]⁺, 1021.3 [M+Na]⁺, 1037.3 [M+K]⁺.

3.2.2.2 Segona ciclació en solució

El pèptid escindit (85 mg, 85 μmol) es dissol en DCM (85 mL, 1 mM) i s'addiciona a una solució de HOAt (53 mg, 340 μmol) dissolt en la mínima quantitat de DMF. Després s'addiciona la DIEA (30 μL, 170 μmol) i després la carbodiimida EDC·HCl (65 mg, 340 μmol). La reacció es manté en agitació durant 35 min a 25 °C. El solvent s'elimina a pressió reduïda. A continuació es redissol amb una solució de DCM–Et₂O (1:1) (6 mL). Les fases orgàniques es renten amb una solució aquosa 5 % NaHCO₃ (2 x 4 mL), HCl (1 N) (2 x 4 mL), i NaCl (sat) (2 x 4 mL). El solvent s'elimina a pressió reduïda.

HPLC (gradient de 7:3 a 1:9 en 15 min, C_{18}): t_R = 9.4 min, 88 % puresa).

EM [ES(+)], m/z : calculat per $C_{38}H_{64}N_{10}O_{12}S_4$ 980.4, trobat 982 [M+H]⁺.

3.2.3 [2QXA] Azatiocoralina

10 mg del pèptid bicíclic protegit es tracta amb una solució 95 % TFA en H₂O durant 1 h. Seguidament s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es realitzen tres successives coevaporacions amb 1,4-dioxà. El producte es redissol en MeCN/ H₂O i es liofilitza. L'heterocicle 2QXA (5.23 mg, 3 eq) es pre-activa amb HOAt (4 mg, 3 eq) i EDC-HCl (5.76 mg, 3 eq) en DCM (5 mL) durant 20 min en un bany d'aigua gel. El pèptid bicíclic desprotegit es dissol en DCM (2 mL), s'addiciona DIEA (5.2 µL, 2 eq) i seguidament s'addiciona a la solució de l'heterocicle. Després de 16 h de reacció el cru de reacció es renta amb solucions aquoses de NH₄Cl (sat.) (3 x 3 mL) i NaCl (sat.) (3 x 3 mL). La fase orgànica s'asseca amb MgSO₄, es filtra i s'elimina el solvent a pressió reduïda. El producte es purifica en el HPLC-analític (gradient 7:3 a 3:7 en 30 min, 2 mL/min).

HPLC (gradient de 7:3 a 3:7 en 15 min, C₁₈): *t_R* = 7.8 min, 95 % puresa).

EM [ES(+)], *m/z*: calculat per C₄₆H₅₄N₁₂O₁₀S₆ 1126.2, trobat 1127.6 [M+H]⁺, 1149.6 [M+Na]⁺, 1165.6 [M+K]⁺.

3.2.4 Azatiocoralina

El pèptid bicíclic es dissol en una solució de TFA-H₂O (19:1) (3 mL) i s'agita mecànicament durant 1.5 h a 25 °C. El TFA s'elimina sota pressió reduïda i les traces d'àcid fent coevaporacions amb Et₂O. S'addiciona H₂O i MeCN i el producte es liofilitza. S'obté un sòlid blanc (16.7 mg). El pèptid bicíclic desprotegit (16.7 mg, 21.4 µmol) es dissol en DCM (250 µL) i llavors s'hi addiciona DIEA (11 µL). L'àcid 3-hidroxiquinolina-2-carboxílic (12.3 mg, 64.2 µmol) es preactiva amb la carbodiimida EDC-HCl (12.4 mg, 64.2 µmol) i HOSu (7.4 mg, 11 µmol) en DCM (1 mL), i després de 15 min s'addiciona sobre la solució de pèptid. La reacció es manté en agitació durant 16 h a 25 °C. S'addiciona més agent d'acoblament: EDC-HCl (12.4 mg, 64.2 µmol) i HOSu (7.4 mg, 11 µmol) i es deixa la reacció durant 2 dies més. El cru es purifica per cromatografia de capa fina preparativa [SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH (95:5)] per obtenir 2.5 mg de producte final de 80 % puresa. Rendiment: 3.5 %

HPLC (gradient de 9:1 a 5:5 en 15 min, C₁₈): *t_R* = 7.1 min, 80 % puresa.

EM [HRMS ES(+)], *m/z*: calculat per C₄₈H₅₈N₁₂O₁₂S₄ 1122.3180, trobat 1123.3253 [M+H]⁺.

3.3 CAP A LA SÍNTESI DE L'OXATIOCORALINA

3.3.1 Síntesi dels monòmers d'Oxatiocoralina

3.3.1.1 *[[Boc-D-Ser(&)-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH][Alloc-NMe-Cys(Me)&]]*

La resina CTC-PS (150 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. La introducció del primer aminoàcid, la inactivació de les posicions reactives remanents i la determinació de la funcionalització inicial de la resina segueixen els procediments anteriorment detallats. A continuació es resumeix l'evolució de la síntesi mitjançant la següent taula:

Primer aminoàcid: Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH				
Resina CTC-PS			150 mg	
Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH			32 mg, 0.075 mmol	
DIEA			87 µL (2/3), 44 µL (1/3)	
MeOH			120 µL	
Funcionalització			0.63 mmol/g resina	
Elongació de la cadena				
Aminoàcid	Quant./mg, mmol, eq	Agents Acoblament (eq)	Condicions	Test
Alloc-Gly-OH	60, 0.38, 5	HATU (5), DIEA (10)	DMF, 35 min	De Clercq (+)
	60, 0.38, 5	HATU (5), DIEA (10)	DMF, 35 min	De Clercq (-)
Boc-D-Ser-OH	77, 0.38, 5	HATU (5), DIEA (10)	DMF, 35 min	Ninhidrina (-)
Alloc-NMe-Cys(Me)-OH ENLLAÇ ESTER	52, 0.22, 3	DIPCDI (3), DIEA (1), DMAP (0.3)	DMF, 45 min	Anàlisi per HPLC-EM
	52, 0.22, 3	DIPCDI (3), DIEA (1), DMAP (0.3)	DMF, 45 min	

HPLC (gradient de 9:1 a 2:8 en 15 min, C18): $t_R = 1.03$ min, 69 % puresa

EM [ES(+)], m/z: calculat per $C_{26}H_{43}N_5O_{11}S_2$ 666.2, trobat 667.3 [M+H]⁺, 688.3 [M+Na]⁺, 566.1 [M-Boc+H]⁺.

3.3.1.2 *[[Boc-D-Ser(&)-Gly-OH]]Fmoc-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&]]*

La resina CTC-PS (150 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. La introducció del primer aminoàcid, la inactivació de les posicions reactives remanents i la determinació de la funcionalització inicial de la resina segueixen els procediments anteriorment detallats. A continuació es resumeix l'evolució de la síntesi mitjançant la següent taula:

Primer aminoàcid: Fmoc-Gly-OH				
Resina CTC-PS	150 mg			
Fmoc-Gly-OH	31 mg, 0.10 mmol			
DIEA	87 µL (2/3), 44 µL (1/3)			
MeOH	120 µL			
Funcionalització	0.65 mmol / g resina			
Elongació de la cadena				
Aminoàcid	Quant./mg, mmol, eq	Agents Acoblament	Condicions	Test
Boc-D-Ser-OH	77, 0.38, 5	HATU (5), DIEA (10)	DMF, 35 min	Ninhidrina (-)
Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH	84, 0.22, 3	DIPCDI (3), DIEA (1), DMAP (0.3)	DMF, 45 min	Anàlisi per HPLC-EM
ENLLAÇ ESTER	84, 0.22, 3	DIPCDI (3), DIEA (1), DMAP (0.3)	DMF, 45 min	
Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH	96, 3, 0.22	HATU (3), DIEA (6)	DMF, 45 min	De Clercq (-)

El rendiment de la síntesi de la cadena lineal és del 76 % (mesura absorbància en l'eliminació Fmoc)

HPLC (gradient de 9:1 a 2:8 en 15 min, C₁₈): t_R= 13.1 min, 79 % puresa)

EM [ES(+)], m/z: calculat per C₃₇H₄₉N₅O₁₁S₂ 803.8, trobat 804.8 [M+H]⁺, 826.8 [M+Na]⁺, 704.8 [M-Boc+H]⁺.

3.3.1.3 *[[Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)&]]Boc-D-Ser(&)-OH]]*

La resina CTC-PS (200 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. La introducció del primer aminoàcid, la inactivació de les posicions reactives remanents i la determinació de la funcionalització inicial de la resina segueixen els procediments anteriorment detallats. A continuació es resumeix l'evolució de la síntesi mitjançant la següent taula:

Primer aminoàcid: Boc-D-Ser-OH				
Resina CTC-PS		200 mg		
Boc-D-Ser(TBDMS)-OH		44 mg, 0.14 mmol		
DIEA		162 μ L (2/3), 81 μ L (1/3)		
MeOH*		160 μ L		
Funcionalització		0.5 mmol/g resina (teòrica)		
Elongació de la cadena				
Aminoàcid	Quant./mg, mmol, eq	Agents Acoblament (eq)	Condicions	Test
Alloc-NMe-Cys(Me)-OH ENLLAÇ ESTER	70, 0.30, 3	DIPCDI (3), DMAP (0.3)	DMF, 45 min	Anàlisi per HPLC-EM
	70, 0.30, 3	DIPCDI (3), DMAP (0.3)	DMF, 45 min	
	70, 0.30, 3	DIPCDI (3), DMAP (0.3)	DMF, 45 min	
Alloc-NMe-Cys(Acm)-OH*	87, 0.30, 3	HATU (3), DIEA (6)	DMF, 1 h	De Clercq (-)
Alloc-Gly-OH**	24, 0.50, 5	HATU (5), DIEA (4.8)	DMF, 20 min	De Clercq (-)
	24, 0.50, 5	HATU (5), DIEA (4.8)	DMF, 20 min	

* Després del tractament amb MeOH es realitza l'eliminació del grup TBDMS mitjançant una solució de 1 M de TBAF en THF (20 eq), 30 min. ** L'eliminació del grup Alloc es realitza mitjançant dos tractaments de 10 min amb [Pd(PPh₃)₄] (0.1 eq), PhSiH₃ (10 eq).

HPLC (gradient de 8:2 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R = 7.6 min, puresa 53 % (es detecta un 25 % de producte oxidat durant l'escissió)

EM [ES(+)], m/z: calculat per C₂₆H₄₃N₅O₁₁S₂ 665.8, trobat 666.8 [M+H]⁺, 668.8 [M+Na]⁺, 565.8 [M-Boc+H]⁺.

3.3.2 [QNA, NMe-Leu³, NMe-Leu⁴] Oxatiocoralina

3.3.2.1 Síntesi del monòmer: {[Alloc-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&][Boc-D-Ser(&)-OH]}

La resina CTC-PS (100 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. La introducció del primer aminoàcid, la inactivació de les posicions reactives remanents i la determinació de la funcionalització inicial de la resina segueixen els procediments anteriorment detallats. A continuació es resumeix l'evolució de la síntesi mitjançant la següent taula:

Primer aminoàcid: Boc-D-Ser(TBDMS)-OH				
Resina CTC-PS	100 mg			
Boc-D-Ser(TBDMS)-OH*	22 mg, 0.07 mmol			
DIEA	81 µL (2/3), 41 µL (1/3)			
MeOH	80 µL			
Funcionalització	0.5 mmol/g resina (teòrica)			
Elongació de la cadena				
Aminoàcid	Quant./mg, mmol, eq	Agents Acoblament	Condicions	Test
Alloc-NMe-Leu-OH ENLLAÇ ESTER	57, 0.25, 3	DIPCDI (3), DMAP (0.3)	DMF, 45 min	Anàlisi per HPLC-EM
	57, 0.25, 3	DIPCDI (3), DMAP (0.3)	DMF, 45 min	
Alloc-NMe-Leu-OH	34, 0.15, 3	HATU (3), DIEA (6)	DMF, 35 min	De Clercq (+)
	34, 0.15, 3	HATU (3), DIEA (6)	DMF, 35 min	De Clercq (-)
Alloc-Gly-OH	40, 0.25, 5	HATU (5), DIEA (6)	DMF, 30 min	De Clercq (-)
	40, 0.25, 5	HATU (5), DIEA (6)	DMF, 30 min	

* Després del tractament amb MeOH es realitza l'eliminació del grup TBDMS mitjançant una solució de 1 M de TBAF en THF (20 eq), 30 min.

HPLC (gradient de 8:2 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R= 13.0 min, pureza 99 %

EM [ES(+)], m/z: calculat per C₂₈H₄₈N₄O₁₀ 600.7, trobat 601.8 [M+H]⁺, 623.8 [M+Na]⁺, 501.8 [M-Boc+H]⁺.

3.3.2.2 Síntesi de la cadena lineal: $\{[Boc-D-Ser(\&^1)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu\&^2][Alloc-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu\&^1][Boc-D-Ser(\&^2)-OH]\}$

Es continua l'elongació de la cadena de forma seqüencial. En la taula següent es detalla l'evolució de la síntesi de la cadena lineal:

Aminoàcid	Quant./mg, mmol, eq	Agents Acoblament	Condicions	Test
Boc-D-Ser-OH	52, 0.25, 5	DIPCDI (5), HOBt (5)	DMF, 1.5 h	Ninhidrina (-)
Alloc-NMe-Leu-OH	57, 0.25, 3	DIPCDI (3), DMAP (0.3)	DMF, 45 min	Anàlisi per HPLC-EM
	57, 0.25, 3	DIPCDI (3), DMAP (0.3)	DMF, 45 min	
	57, 0.25, 3	DIPCDI (3), DMAP (0.3)	DMF, 45 min	
Alloc-NMe-Leu-OH	34, 0.15, 3	HATU (3), DIEA (6)	DMF, 35 min	De Clercq (+)
	34, 0.15, 3	HATU (3), DIEA (6)	DMF, 35 min	De Clercq (+)
	57, 0.25, 5	HATU (5), DIEA (10)	DMF, 35 min	De Clercq (-)
Alloc-Gly-OH	40, 0.25, 5	HATU (5), DIEA (10)	DMF, 20 min	De Clercq (+)
	40, 0.25, 5	HATU (5), DIEA (10)	DMF, 35 min	
	40, 0.25, 5	HATU (5), DIEA (10)	DMF, 45 min	De Clercq (-)

El producte s'escindeix de la resina com es descriu anteriorment. I s'obtenen 45 mg de producte lineal amb els següents resultats:

- *Cadena de vuit residus:* {[Boc-D-Ser(&¹)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&²][H-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&¹][Boc-D-Ser(&²)-OH]}

Rendiment: 50% (sense purificar)

HPLC (gradient de 7:3 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R= 13.0 min, puresa 54 %

EM [ES(+), ES(-)], m/z: C₄₈H₈₆N₈O₁₅ 1014.6, trobat 1016.4 [M+H]⁺, 1013.2 [M-H]⁻.

- *Cadena de sis residus:* {[Boc-D-Ser(&¹)-Gly-NMe-Leu-NMe&²][H-Gly&¹][Boc-D-Ser(&²)-OH]}

Rendiment: 50 % (sense purificar)

HPLC (gradient de 7:3 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R= 10.3 min, puresa 41 %

EM [ES(+), ES(-)], m/z: C₃₄H₆₀N₆O₁₃ 760.9, trobat 762.1 [M+H]⁺, 758.4 [M-H]⁻.

3.3.2.3 Obtenció de [QNA, NMe-Leu³,NMe-Leu⁴]Oxatiocoralina i {[QNA-D-Ser(&¹)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&²][QNA-D-Ser(&²)-Gly&¹]}

Es prenen 35 mg del producte escindit de la resina, constituït per una mescla 1:1 de cadena de vuit residus (0.025 mmol) i de cadena de sis (0.025 mmol). El producte es dissol en 42 mL de DCM i s'afegeix DIEA (22 µL, 0.15 mmol) i HOAt (23 mg, 0.20 mmol) dissolta en la mínima quantitat de DMF i, finalment, la carbodiimida EDC·HCl (32 mg, 0.20 mmol). Es deixa la reacció durant 1 h en agitació i a temperatura ambient. Un control per HPLC-EM indica la conversió total del producte lineal. El cru de reacció es renta amb una solució aquosa saturada de NH₄Cl. Seguidament, s'addiciona una solució 95 % de TFA en H₂O per eliminar els grups Boc. La reacció es deixa en agitació a temperatura ambient durant 1 h. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es fan coevaporacions amb 1,4-dioxà. El producte es dissol en H₂O i MeCN i es liofililitza. La incorporació de l'heterocicle es realitza preactivant l'àcid quinàldic (16 mg, 0.092 mmol) amb DIPCDI (15 µL, 0.092 mmol) i HOAt (13 mg, 0.092 mmol) en 10 mL d'una solució DCM–DMF (98:2). Després de 10 min de reacció, s'addiciona el producte peptídic dissolt en 5 mL de solució DCM–DMF (98:2). Es pren una alíquota (3 mg) i es purifiquen els dos productes en el HPLC analític (gradient de 5:5 a 0:10 en 15 min, C₁₈)

- [QNA, NMe-Leu³, NMe-Leu⁴]Oxatiocoralina

HPLC (gradient de 5:5 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R= 12.3 min, puresa 99 %

EM [ES(+)], m/z: C₅₈H₇₈N₁₀O₁₂ 1106.6, trobat 1108.2 [M+H]⁺, 554.9 [M+2H]⁺.

- {[QNA-D-Ser(&¹)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&²][QNA-D-Ser(&²)-Gly&¹]}

HPLC (gradient de 5:5 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R= 8.6 min, puresa 99 %

EM [ES(+)], m/z: C₄₄H₅₂N₈O₁₀ 852.9, trobat 853.9 [M+H]⁺, 427.7 [M+2H]⁺.

3.4 SÍNTESI DELS DERIVATS DE TIOCORALINA

3.4.1 Cap a la síntesi de [QNA, NMe-Leu³, NMe-Leu⁴] Tiocoralina

3.4.1.1 Síntesi de la cadena lineal: {[Boc-D-Cys(Trt)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&][Boc-D-Cys(&)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu-OH]}

La resina CTC-PS (300 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. La introducció del primer aminoàcid, la inactivació de les posicions reactives remanents i la determinació de la funcionalització inicial de la resina segueixen els procediments anteriorment detallats. A continuació es resumeix l'evolució de la síntesi mitjançant la següent taula:

Primer aminoàcid: Fmoc-NMe-Leu-OH				
	Resina CTC-PS		300 mg	
	Fmoc-NMe-Leu-OH		77 mg, 0.21 mmol	
	DIEA		271 µL	
	MeOH		240 µL	
	Funcionalització		0.68 mmol / g resina	
Elongació de la cadena				
Aminoàcid	Quantitat/mg (mmol)	Agents Acoblament	Condicions	Test
Fmoc-NMe-Leu-OH	165 (0.45)	HATU (3), DIEA (6)	DMF, 45 min	De Clercq (+)
	165 (0.45)	HATU (3), DIEA (6)	DMF, 45 min	De Clercq (-)
Alloc-Gly-OH	167 (1.05)	HATU (5), DIEA (10)	DMF, 20 min	De Clercq (-)
	167 (1.05)	HATU (5), DIEA (10)	DMF, 40 min	

La peptidil-resina es divideix en 1/3 i 2/3 parts. S'escindeix el pèptid de la resina amb una solució 1 % de TFA en DCM (5 x 30 s) i s'obté el tripèptid Alloc-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu-OH amb una puresa del 83 % ($t_R = 11.1$ min, gradient 8:2 a 0:10 en 15 min, C_{18}). S'elimina el grup Alloc de la fracció petita i s'incorpora l'aminoàcid Boc-D-Cys(Npys)-OH (79 mg, 0.21 mmol) amb DIPCDI (33 μ L, 0.21 mmol) i HOAt (29 mg, 0.21 mmol) com a agents d'acoblament. La reacció es deixa en agitació mecànica durant 2 h. S'obté un test de ninhidrina negatiu. A continuació s'elimina el grup Npys mitjançant dos tractaments de 20 min amb Bu_3P (100 mmol) en una solució DMF-H₂O (4:1). Per l'acoblament 4+3 es dissol el tripèptid Alloc-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu-OH en DCM i s'addiciona DIEA (12 μ L, 0.07 mmol), HOAt (19 mg, 0.14 mmol) i, finalment, la DIPCDI (22 μ L, 0.14 mmol). L'acoblament es deixa durant 2 h i després s'addiciona les mateixes quantitats d'agents d'acoblament. Després de 1.5 h més de reacció, es pren una alíquota de la peptidil-resina i es comprova per HPLC que s'ha acoblat tot el tripèptid. S'elimina el grup Alloc i s'hi incorpora l'aminoàcid Boc-D-Cys(Trt)-OH (97 mg, 0.21 mmol) i DIPCDI (33 μ L, 0.21 mmol) i HOAt (29 mg, 0.21 mmol) com a agents d'acoblament. A les 2 h de reacció el test de ninhidrina és negatiu. S'escindeix el pèptid de la resina i es recullen els filtrats en 16 mL d'H₂O per evitar l'eliminació del grup Trt. S'obtenen 84 mg de pèptid lineal. Rendiment: 93 %

HPLC (gradient de 5:5 a 0:10 en 15 min, C_{18}): $t_R = 15.3$ min, puresa 99 %

EM [ES(+), ES(-)], m/z : calculat per $C_{67}H_{100}N_8O_{13}S_2$ 1289.69, trobat 1289.4 [M-H].

3.4.1.2 Ciclació:[Boc-D-Cys(&¹)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&²]/[Boc-D-Cys(&²)-Gly-NMe-Leu-NMe-Leu&¹]

Es prenen 5 mg del pèptid lineal protegit i es tracten amb una solució 2 % de TFA, 2 % TES en DCM (2 mL) durant 30 min. A continuació s'addiciona 1,4-dioxà (1 mL) i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda i es realitzen tres successives coevaporacions amb 1,4-dioxà. El producte es redissol amb MeCN/H₂O i es liofilitza. Per a la ciclació, el producte es dissol en DCM (5 mL) i s'addiciona HOAt (3.8 mg, 4 eq), DIEA (2.5 μ L, 3 eq) i, finalment, la carbodiimida EDC-HCl (3.8 mg, 4 eq). A les dues hores de reacció s'observa la total conversió del producte. El producte es renta amb rentats amb solucions aquoses NH₄Cl (sat) (3 x 3 mL) i NaCl (sat.) (3 x 3 mL).

HPLC* (gradient de 5:5 a 0:10 en 15 min, C_{18}): $t_R = 15.9$ min.

EM [ES(+)], m/z : calculat per $C_{48}H_{84}N_8O_{12}S_2$ 1028.6, trobat 1028.3 [M+H]⁺, 1050.3 [M+Na]⁺, 928.3 [M-Boc+H]⁺.

* Solvents; A: H₂O amb 0.1 % àcid fòrmic i B: MeCN amb 0.1 % àcid fòrmic.

3.4.2 [QNA, NMe-Leu⁴] Tiocoralina

3.4.2.1 Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Leu-OH

La resina CTC-PS (600 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. S'introdueix el primer aminoàcid Fmoc-NMe-Leu-OH (154 mg, 0.21 μ mol) i DIEA (713 μ L, 7 eq) en DCM. Es deixa la reacció en agitació orbitalica durant 1 h a 25 °C. La reacció finalitza amb l'addició de MeOH (480 μ L) i la reacció es manté en agitació mecànica durant 10 min més. La peptidil-resina Fmoc-NMe-Leu-CTC-PS es sotmet als següents rentats/tractaments: filtració, DCM (5 x 30 s), DMF (5 x 30 s), piperidina-DMF (1:4, v/v) (1 x 1 min, 3 x 5 min, 1 x 10 min). El següent aminoàcid Fmoc-Cys(Acm)-OH (870 mg, 2.10 mmol) s'addiciona amb HATU (5 eq) i DIEA (10 eq) com a agents d'acoblament. Cal la realització d'un segon reacoblament per aconseguir el test De Clercq negatiu. El grup Fmoc s'elimina tal i com s'ha descrit per a l'eliminació del primer aminoàcid. Es determina una funcionalització de la resina incial de 0.66 mmol/ g resina. Seguidament, es procedeix a la *N*-metilació en fase sòlida segons Miller i Scanlan.

Per a la protecció amb el grup 2-nitrobenzenesulfonyl s'addiciona sobre la peptidil resina clorur de 2-nitrobenzenesulfonyl (280 mg, 1.26 mmol) i 1,3,5-colidina (278 μ L, 2.10 mmol) en DCM i es deixa la reacció en agitació orbitalica durant 1 h. Es repeteix el mateix tractament una vegada més. S'observa test de ninhidrina negatiu. A continuació s'hi addiciona l'agent alquilant metil-4-nitrobenzenesulfonat (364 mg, 1.68 mmol) i la base MTBD (180 μ L, 1.26 mmol) en DMF i es deixa la reacció en agitació orbitalica durant 30 min. Es repeteix el mateix tractament una vegada més. Per a eliminar el grup protector es tracta la peptidil resina amb β -mercaptoetanol (314 μ L, 4.2 mmol) i DBU (294 μ L, 2.1 mmol) en DMF durant 10 min i es realitza un segon tractament de 20 min.

L'Alloc-Gly-OH (334 mg, 2.10 mmol) s'incorpora amb HATU (5 eq) i DIEA (10 eq) com a agents d'acoblament en DMF i la reacció es deixa en agitació orbitalica durant 35 min. Sense realització del test de De Clercq es fa un segon tractament i un tercer després d'obtenir test de De Clercq lleugerament positiu. Dues tercers part de la resina es tracta amb una solució 1 % de TFA en DCM (5 x 30 s) i els filtrats es recullen en 1,4-dioxà. S'obtenen 83 mg de pèptid amb una puresa del 93 %. Rendiment: 90 %

HPLC (gradient de 8:2 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R = 6.4 min, puresa del 93 %.

EM [ES(-)], *m/z*: calculat per C₂₀H₃₄N₄O₇S 474.21, trobat 475.66 [M-H].

3.4.2.2 Acoblament 1+3: $\{[Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Leu\&][Boc-D-Cys(\&)-OH]\}$

Per a l'acoblament 1+3 es realitza la síntesi anteriorment descrita sobre 1.2 g de resina CTC-PS. El tripèptid Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Leu-OH s'escindeix de la resina i s'asseca al buit durant 16 h. S'obtenen 420 mg de tripeptid amb una puresa del 93 %. Paral·lelament s'introdueix la resina CTC-PS (600 mg, 1.6 mmol/g resina) en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. S'introdueix l'aminoàcid Boc-D-Cys(Npys)-OH (158 mg, 0.42 mmol). S'elimina el grup Npys amb dos tractaments de 20 min d'una solució de Bu₃P (2 mL) en una solució DMF-H₂O (4:1) (1 mL). S'addiciona el tripèptid escindit dissolt en DMF, el HOAt (82 mg, 0.2 mmol), la DIEA (104 µL, 0.2 mmol) i, finalment, DIPCDI (93 µL, 0.2 mmol). La reacció es manté en agitació mecànica durant 3 h. Un anàlisi per HPLC-EM mostra un acoblament complet. Dues terceres parts de la peptidil resina es separen i es tracten amb una solució 1 % de TFA en DCM (5 x 30 s) i els filtrats es recullen en H₂O. El solvent s'elimina a pressió reduïda, es fan coevaporacions amb dioxà i el producte es redissol en MeCN/H₂O i es liofilitza.

HPLC (gradient de 7:3 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R = 7.4 min, puresa del 86 %.

EM [ES(-)], m/z: calculat per C₂₈H₄₇N₅O₁₀S₂ 677.28, trobat 675.36 [M-H].

3.4.2.3 Acoblaments 4+3+1: $\{[Boc-D-Cys(Trt)-Gly-NMe-Cys(\&^1)-NMe-Leu\&^2] [Boc-D-Cys(\&^2)-Gly-NMe-Cys(\&^1)-NMe-Leu-OH]\}$

Per a la síntesi de la cadena lineal del segon anàleg de la Tiocoralina s'empra el monòmer sintetitzat en l'apartat 3.4.2.1. S'elimina el grup Alloc de la peptidil resina restant anterior (2/3) i s'incorpora l'aminoàcid Boc-D-Cys(Npys)-OH (79 mg, 0.21 mmol) amb DIPCDI (3 eq) i HOAt (3 eq) en DMF i es deixa la reacció en agitació orbital·lica durant dues hores. Es comprova que l'acoblament ha estat complet per el test de ninhidrina. S'elimina el grup Npys amb tractaments (2 x 20 min) de Bu₃P (1 mL, 21 mmol) en una solució DMF-H₂O (4:1). A continuació es realitza l'acoblament 4+3. En el baló que conté el tripèptid Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Leu-OH s'addiciona el HOAt (27 mg, 0.14 mmol), la DIEA (17 µL, 0.07 mmol) i la DMF, i s'addiciona sobre la peptidil resina. A continuació s'addiciona DIPCDI (31 µL, 0.14 mmol). La reacció es deixa en agitació orbital·lica durant 3 h. L'anàlisi per HPLC d'una alíquota de la peptidil-resina mostra l'acoblament complet (t_R 7.6 min, gradient de 7:3 a 0:10). A continuació s'elimina el grup Alloc i es tracta la peptidil-resina amb una solució de iode (89 mg, 0.35 mmol) en DMF durant 10 min. El darrer aminoàcid Boc-D-Cys(Trt)-OH (70 mg, 0.21 mmol) s'incorpora amb DIPCDI (3 eq) i HOAt (3 eq) en DMF durant 2 h. Un test de ninhidrina negatiu indica un acoblament complet. El pèptid s'escindeix de la resina amb una solució 1 % de TFA en DCM (5 x 30 s) i els filtrats es recullen en H₂O.

HPLC (gradient de 7:3 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R = 15.1 min, pureza del 31 %.

EM [ES(-)], m/z : calculat per C₆₁H₈₆N₈O₁₃S₄ 1266.52, trobat 1263.61 [M-H].

3.4.2.4 [QNA, NMe-Leu⁴] Tiocoralina

El grup Trt s'elimina amb una solució 2 % de TFA i 2 % de TIS en DCM durant 1 h. El dissolvent s'elimina a pressió reduïda i es fan coevaporacions amb TBME. El producte es redissol en MeCN i H₂O i es liofilitza. Per a la ciclació, es prenen 5.3 mg del producte liofilitzat i es dissolen en 5 mL de DCM i s'addciona la DIEA (2 eq). En un baló es pesa el HOAt (2 eq) i es dissol en la mínima quantitat de DMF. A continuació s'hi addiciona la solució del pèptid i seguidament la carbodiimida EDC·HCl (2 eq). La reacció es deixa en agitació mecànica a temperatura ambient. Un anàlisi en el HPLC-EM mostra la conversió total del producte de partida cíclic al producte final bicíclic. L'eliminació del grups Boc es realitza amb una solució 95 % de TFA en H₂O durant 1 h. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es fan coevaporacions amb TBME. El producte es redissol en MeCN i H₂O i es liofilitza. Es realitza una liofilització addicional amb H₂O i una solució 1 N d'HCl en H₂O. La incorporació de l'àcid quinàldic (4.6 mg, 2.5 eq) es fa preactivant l'àcid amb HOAt (3.6 mg, 2.5 eq), DIPCDI (4.1 μL, 2.5 eq) en DCM. Després de 10 min de reacció s'addiciona el pèptid i DIEA (1 μL, 1 eq). Després de dos dies de reacció en agitació mecànica a temperatura ambient s'observa la desaparició del producte de partida i obtenció del pèptid [QNA, NMe-Leu⁴] Tiocoralina. El producte es purifica en el HPLC analític i no s'obté suficient quantitat per poder avaluar-ne l'activitat biològica.

HPLC (gradient de 5:5 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R = 8.8 min, pureza del 99 %.

EM [ES(+)], m/z : calculat per C₅₈H₆₄N₁₀O₁₀S₄ 1116.37, trobat 1117.54 [M+H]⁺.

3.5 TIOCORALINA

3.5.1 Síntesi del monomer Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH

La resina CTC-PS (150 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. S'introdueix el primer aminoàcid Alloc-NMe-Leu-OH (31 mg, 0.11 μmol) i DIEA (183 μL, 7 eq) en DCM (1 mL). Es deixa la reacció en agitació orbitalica durant 1 h a 25 °C. La reacció finalitza amb l'addició de MeOH (120 μL) i la reacció es manté en agitació mecànica durant 10 min més. La peptidil-resina Alloc-NMe-Cys(Me)-CTC-PS es sotmet a tres tractaments de 15 min amb PhSiH₃ (10 eq), [Pd(PPh₃)₄] (3 x 15 min) en DMF i tres tractaments de 5 min amb una solució 0.02 M ditiocarbonat de sodi en DMF. El següent aminoàcid Alloc-

NMeCys(Acm)-OH (65 mg, 0.23 mmol) s'addiciona amb HATU (3 eq) i DIEA (6 eq) com a agents d'acoblament. S'obté test de De Clercq negatiu. En aquest punt es divideix la resina en dues fraccions per provar la incorporació del tercer aminoàcid en unes condicions noves: HATU en defecte de base. Primer s'elimina el grup Alloc de la peptidil resina amb tres tractaments de 15 min amb PhSiH₃ (10 eq), [Pd(PPh₃)₄] (3 x 15 min) en DMF i tres tractaments de 5 min amb una solució 0.02 M ditiocarbonat de sodi en DMF. Paral·lelament als rentats amb la solució de ditiocarbonat de sodi, es preactiva l'aminoàcid Alloc-Gly-OH (30 mg, 0.38 mmol) amb HATU (5 eq) i DIEA (4.8 eq) en DMF. Després de 5 min s'addiciona sobre la peptidil-resina i es manté en agitació manual durant 20 min. Seguidament es filtra i es repeteix l'acoblament durant 45 min més. S'obté test de De Clercq negatiu. La resina se sotmet als següents rentats: DMF (5 x 30 s), DCM (5 x 30 s), MeOH (5 x 30 s), (5 x 30 s), MeOH (5 x 30 s), DMF (5 x 30 s) per tal d'eliminar les restes de salts d'uroní. Es divideix la resina en dues fraccions (2/3 i 1/3). La fracció major es tracta amb una solució 1 % de TFA en DCM (5 x 30 s) i els filtrats es recullen en H₂O. Un anàlisi per HPLC-EM mostra la presència del tripèptid esperat i un elevat contingut de restes d'agent d'acoblament per el que no es pot calcular el rendiment ni la puresa del producte final.

HPLC (gradient de 8:2 a 0:10 en 15 min, C₁₈): *t_R* = 5.1 min, puresa del 99 %.

EM [ES(-)], *m/z*: calculat per C₁₉H₃₂N₄O₆S₂ 476.18, trobat 475.62 [M-H].

3.5.2 Acoblaments 4+3+1: {[Boc-D-Cys(Trt)-Gly-NMe-Cys(¹)-NMe-Cys(Me)²][Boc-D-Cys(²)-Gly-NMe-Cys(¹)-NMe-Cys(Me)-OH]}.

Per a l'elongació de la cadena peptídica es pren la peptidil-resina protegida Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-CTC-PS (25 mg resina inicial) i es realitzen tres tractaments de 15 min amb PhSiH₃ (10 eq), [Pd(PPh₃)₄] (0.1 eq) en DMF i seguidament tres tractaments de 15 min amb una solució 0.02 M de ditiocarbonat de sodi en DMF. Per a la incorporació del quart aminoàcid Boc-D-Cys(Npys)OH (23 mg, 0.061 mmol) s'empra DIPCDI (5 eq) i HOAt (5 eq) en DMF com a agents d'acoblament. La reacció es deixa en agitació mecànica durant 2 h. S'obté un test de ninhidrina negatiu. Es tracta la peptidil-resina dues vegades amb una solució de Bu₃P (250 mL) i una solució DMF-H₂O (4:1) (125 mL) durant 20 min per eliminar el grup Npys. El tripèptid anteriorment escindit de la resina Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-NMe-Cys(Me)-OH es dissol en DMF i s'addiciona HOAt (3.4 mg, 0.025 mmol), DIPCDI (3.9 µL, 0.025 mmol) i DIEA (4.3 µL, 0.025 mmol). La mescla s'addiciona sobre la peptidil-resina amb el grup tiol lliure. Es deixa la reacció en agitació mecànica durant 1.5 h. Seguidament s'addiciona més agents d'acoblament HOAt (3.4 mg, 0.025 mmol), DIPCDI (3.9 µL, 0.025 mmol) i DIEA (4.3 µL, 0.025 mmol) i es deixa 1.5 h més. Un anàlisi per HPLC-EM mostra l'acoblament complet. Es procedeix a l'eliminació del grup Alloc tal i com s'ha comentat anteriorment. Es tracta la peptidil resina amb una solució de iode

(15 mg, 0.059 mmol) en DMF durant 10 min. Es filtra i es comprova per HPLC-EM que la formació del pont disulfur ha estat complerta. La resina se sotmet als següents rentats: DMF (5 x 30 s), DCM, (5 x 30 s), CHCl_3 (5 x 30 s), DCM (5 x 30 s), DMF-H₂O (4:1) (5 x 30 s), DMF-H₂O (0.5 M Na₂S₂O₃) (4:1), DMF-H₂O (4:1) (5 x 30 s), DMF (5 x 30 s). El darrer aminoàcid Boc-D-Cys(Trt)-OH (29 mg, 0.062 mmol) s'incorpora amb DIPCDI (9.7 mL, 0.062 mmol) i HOAt (8.5 mg, 0.062 mmol) en DMF com a agents d'acoblament. Es deixa la reacció en agitació mecànica durant 2 h. S'obté un test de ninhidrina negatiu. El pèptid s'escindeix de la resina amb una solució 1 % de TFA en DCM (5 x 30 s) i els filtrats es recullen en un baló que conté H₂O (5 mL). S'evapora el dissolvent a pressió reduïda, es fan coevaporacions i el producte es redissol en MeCN/H₂O i es liofilitza.

3.5.3 Tiocoralina

L'eliminació del grup Trt es fa per tractament del pèptid amb 3 mL d'una solució 2 % TFA, 2 % TES en DCM durant 1 h. S'addiciona 2 mL de 1,4-dioxà i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda, es fan coevaporacions amb 1,4-dioxà i el producte es redissol en MeCN/H₂O i es liofilitza. Per a la ciclació es dissol el pèptid en 5 mL de DCM i s'addiciona HOAt (1.5 mg, 0.011 mmol), DIEA (1.8 μL , 0.011 mmol) i, finalment, EDC-HCl (2 mg, 0.011 mmol). Es realitza un control per HPLC-EM després d'una hora de reacció i s'observa producte de partida i a les dues hores de reacció ja s'ha esgotat el producte inicial. S'evapora el dissolvent i es tracta amb una solució 95 % de TFA en H₂O durant 1 h. S'elimina el dissolvent, es fan coevaporacions amb 1,4-dioxà, es redissol en MeCN/H₂O, es liofilitza, es redissol en una solució aquosa 1 N HCl i es torna a liofilitzar. Per a la incorporació de l'àcid 3-hidroxiquinàldic (4.5 mg, 0.026 mmol), es dissol en DCM i s'addiciona HOSu (3 mg, 0.026 mmol), EDC-HCl (5 mg, 0.026 mmol) i DIEA (1 μL , 0.005 mmol). La reacció es deixa en agitació mecànica a temperatura ambient durant dos dies. Un control per HPLC-EM mostra la presència del producte final únicament en el detector de ES(+).

HPLC (gradient de 8:2 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R = 5.1 min, puresa del 99 %.

EM [ES(-)], m/z : calculat per C₄₈H₅₆N₁₀O₁₂S₆ 1156.2, trobat 1157.2 [M+H]⁺, 579.1 [M+2H]²⁺.

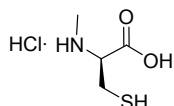
4. Síntesi dels aminoàcids de la tiocoralina i anàlegs

4.1 SÍNTESI DE LES CISTEÏNES *N*-METILADES

4.1.1 HCl HMe-Cys-OH

Cal treballar en condicions d'elevada seguretat degut a la perillositat del sodi metàl·lic.

S'addiciona l'àcid (R)(-)-tiazolidina-4-carboxílic (8 g, 60.2 mmol) i sodi seqüencialment i en petites proporcions sobre amoníac líquid (200 mL). En tot moment es manté un excés de sodi indicat per una coloració de la solució blavosa. Per finalitzar la reacció s'addiciona clorur d'amoni fins a esgotar l'excés de sodi. L'amoníac líquid s'elimina sota pressió reduïda. El producte es dissol en la mínima quantitat d'aigua i s'acidifica amb una solució aquosa d'àcid clorhídric fins a obtenir un pH = 3-4. Després s'elimina l'aigua sota pressió reduïda i el producte s'extreu amb MeOH. S'obtenen 6.9 g d'un sòlid blanc.

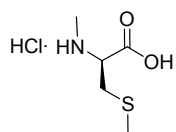


Rendiment 66 %. **CCF** (SiO₂, AcOEt–2-propanol–H₂O–AcOH (2:1:1:1): R_f = 0.36.

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ = 3.93 (m, 1H; CH^α), 3.03 (m, 2H; CH₂^β), 2.65 (s, 3H; NMe). **RMN ¹³C** (D₂O, 100 MHz): δ = 169.9 (CO Cys), 60.7 (CH^α), 32.0 (CH₂^β), 22.9 (CH₃, NMe). **EM** [ES(+)], *m/z*: calculat per C₄H₉NO₂S 135.0, trobat 136.0 [M+H]⁺.

4.1.2 HCl HMe-Cys(Me)-OH

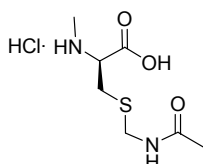
HCl HMe-Cys-OH (4.1 g, 23.8 mmol) es dissol en una solució de H₂O–THF (1:1) (170 mL) i la mescla es refreda en un bany aigua-gel. Per altra banda, es preparen dues solucions: CH₃I (2.1 mL, 33.3 mmol) en THF (68 mL), i NaHCO₃ (5.3 g, 71.4 mmol) en H₂O (68 mL). Ambdues solucions s'addicionen seqüencialment gota a gota sobre la solució de l'aminoàcid. Finalitzada l'addició, la mescla de reacció es manté en agitació durant 4 h a 25 °C. La reacció es finalitza per acidificació de la mescla de reacció amb d'una solució aquosa d'HCl fins aconseguir pH = 5. El solvent s'elimina a pressió reduïda.



CCF (SiO₂, AcOEt–2-propanol–H₂O–AcOH (2:1:1:1): R_f = 0.79. **RMN ¹H** (D₂O, 400 MHz): δ = 3.86 (t, 1H, J = 5.2 Hz; CH^α), 3.02 (d, 2H, J = 5.2 Hz; CH₂^β), 2.65 (s, 3H; NMe), 2.04 (s, 3H; SMe).

4.1.3 HCl-HNMe-Cys(Acm)-OH

HCl-HNMe-Cys-OH (4.1 g, 23.8 mmol) es dissol en H₂O (12.3 mL), es purga amb argó i es refreda en un bany aigua-gel. A continuació s'addiciona *N*-(hidroxiametil)acetamida (3.54 g, 39.7 mmol) i una solució de TFA i àcid trifluorometansulfònic (95:5) (41 mL). La mescla de reacció es manté en agitació durant 16 h a 25 °C. El solvent s'elimina a pressió reduïda.

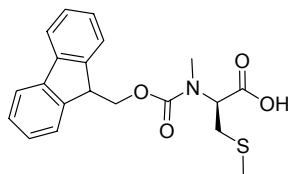


CCF (SiO₂, AcOEt–2-propanol–H₂O–AcOH (2:1:1:1): R_f = 0.53. **RMN ¹H** (D₂O, 400 MHz): δ = 4.44 (m, 2H, CH₂ Acm), 4.08 (m, 1H; CH^α), 3.21 (m, 2H; CH₂^β), 2.66 (s, 3H; NMe), 2.04 (s, 3H; CH₃ Acm).

4.1.4 Protecció amb el grup Fmoc: Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH i Fmoc-NMe-Cys(Acm)

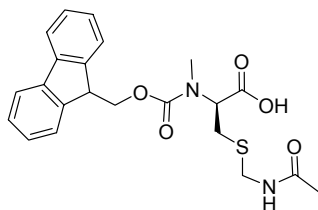
L'aminoàcid sense purificar HNMe-Cys(Me)-OH i HNMe-Cys(Acm)-OH es dissol en H₂O (2 % Na₂CO₃)–1,4-dioxà (1:1) (80 mL per 24 mmol d'aminoàcid), i la solució es refreda en un bany aigua-gel. Per una altra banda es prepara una solució de Fmoc-Cl (1.6 eq) en la mínima quantitat de 1,4-dioxà i s'addiciona sobre la solució d'aminoàcid. La mescla de reacció es manté en agitació durant 2 h en el bany d'aigua-gel, i tres dies a temperatura ambient. El pH es manté en tot moment a pH = 9-10 per addició d'una solució aquosa 10 % Na₂CO₃. Per CCF es controla la desaparició de l'aminoàcid de partida. El 1,4-dioxà s'elimina a pressió reduïda i la fase aquosa es renta amb TBME (3 x 50 mL). A continuació, s'acidifica la fase aquosa amb una solució aquosa d'àcid clorhídric fins pH = 3-4 i el producte s'extreu amb AcOEt (3 x 50 mL). La fase orgànica s'asseca amb Na₂SO₄, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda.

4.1.4.1 Fmoc-NMe-Cys(Me)-OH



S'inicia la síntesi amb 4.1 g de HMe-Cys-OH i s'obté 1.23 g de producte pur. Rendiment 7 %. El producte es purifica en un sistema HPLC-preparatiu (gradient 7:3 a 3:7 en 30 min, C₄, 20 mL/min). **HPLC** (gradient de 7:3 a 3:7 en 15 min, C₁₈): t_R = 12.8 min, puresa 99 %. **RMN ¹H** (CDCl₃, 400 MHz): δ = 9.1 (brs, 1H; COOH), 7.75 (m, 2H; 2CH_{arom} Fmoc), 7.60 (m, 2H; 2CH_{arom} Fmoc), 7.55 (m, 2H; 2CH_{arom} Fmoc), 7.34 (m, 2H; 2CH_{arom} Fmoc), 4.87 & 4.67 (1:2) (m, 1H; CH ^{α}), 4.46 (m, 2H; CH₂ Fmoc), 4.29 & 4.22 (m, 1H; CH Fmoc), 3.11 & 2.82 (m, 2H; CH₂ ^{β}), 2.96 & 2.89 (s, 3H; NMe), 2.12 & 1.88 (s, 3H; SMe). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 100 MHz): δ = 175.0 (CO Cys), 157.5 (CO Fmoc), 143.9 (2C_{arom} Fmoc), 141.6 (CO_{arom} Fmoc), 128.0 (2CH_{arom} Fmoc), 127.4 (2CH_{arom} Fmoc), 125.3 (2CH_{arom} Fmoc), 120.3 (2CH_{arom} Fmoc), 68.0 (CH₂ Fmoc), 58.6 (CH ^{α}), 47.3 (CH Fmoc), 33.4 (CH₂ ^{β}), 32.1 (CH₃, NMe), 15.7 (CH₃, SMe). **EM** [MALDI-TOF(DHB)], m/z : calculat per C₂₀H₂₁NO₄S 371.1, trobat 372.0 [M+H]⁺, 393.9 [M+Na]⁺, 409.9 [M+K]⁺.

4.1.4.2 Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH

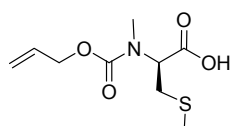


S'inicia la síntesi amb 4.1 g de HMe-Cys-OH i s'obtenen 3.0 g de producte. Rendiment 33 %. El producte es purifica en un sistema HPLC-preparatiu (isocràtic del 40 % de MeCN en H₂O, 20 mL/min). Rendiment 33 %. **HPLC** (gradient de 7:3 a 3:7 en 15 min, C₁₈): t_R = 8.8 min, puresa 99 %. **RMN ¹H** (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.76 (m, 2H; 2CH_{arom} Fmoc), 7.58 (m, 2H; 2CH_{arom} Fmoc), 7.39 (m, 2H; 2CH_{arom} Fmoc), 7.29 (m, 2H; 2CH_{arom} Fmoc), 7.01 & 6.55 (1:3.7) (m, 1H; NH Acm), 4.95 & 4.73 (m, 1H; CH ^{α}), 4.55, 4.25 (m, 4H; CH₂ Fmoc, CH₂ Acm), 4.21 (m, 1H; CH Fmoc), 3.25 & 2.9 (m, 2H; CH₂ ^{β}), 2.91 & 2.90 (s, 3H; NMe), 2.02 & 1.99 (s, 3H, Acm). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 100 MHz): δ = 172.6 (CO Cys), 157.9 (CO Fmoc), 156.0 (CO Acm), 144.0 (2C_{arom} Fmoc), 141.6 (CO_{arom} Fmoc), 128.0 (2CH_{arom} Fmoc), 127.4 (2CH_{arom} Fmoc), 125.3 (2CH_{arom} Fmoc), 120.2 (2CH_{arom} Fmoc), 68.5 (CH₂ Fmoc), 58.8 (CH ^{α}), 47.4 (CH Fmoc), 42.1 (CH₂ Acm), 32.0 (CH₂ ^{β}), 31.3 (CH₃, NMe), 23.1 (CH₃, Acm). **EM** [MALDI-TOF (DHB)], m/z : calculat per C₂₂H₂₄N₂O₅S 428.1, trobat 429.2 [M+H]⁺, 451.2 [M+Na]⁺, 467.2 [M+K]⁺.

4.1.5 Protecció amb el grup Alloc: Alloc-NMe-Cys(Me)-OH i Alloc-NMe-Cys(Acm)-OH

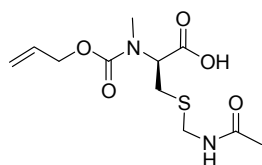
El producte es dissol en una solució H₂O (2% Na₂CO₃)-1,4-dioxà (1:1) (230 mL per 34 mmol d'aminoàcid), i la solució es refreda en un bany d'aigua-gel. Per una altra banda es prepara una solució de cloroformat d'al·lil (Alloc-Cl) (1 eq) en la mínima quantitat de 1,4-dioxà i s'addiciona sobre la solució d'aminoàcid. La mescla de reacció es manté en agitació durant 2 h en el bany d'aigua-gel i tres dies a temperatura ambient. El pH es manté a tot moment a pH = 9-10 per addició d'una solució aquosa 10 % Na₂CO₃. Per CCF es controla la desaparició de l'aminoàcid de partida. El 1,4-dioxà s'elimina a pressió reduïda i la fase aquosa es renta amb TBME (3 x 50 mL). A continuació la fase aquosa s'adificica amb una solució aquosa de HCl fins pH = 3-4 i el producte s'extreu amb AcOEt (3 x 50 mL). La fase orgànica s'asseca amb Na₂SO₄, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda.

4.1.5.1 Alloc-NMe-Cys(Me)-OH



S'inicia la síntesi amb 6.30 g d'aminoàcid no purificat HCl·HNMe-Cys-OH (34 mmols). El producte es purifica per cromatografia en columna fent servir com a fase estacionària SiO₂ i com eluents un gradient de MeOH en DCM de 0:100 a 5:100. S'obtenen 700 mg del producte amb una puresa del 98 %. Rendiment 8.8 %. **HPLC** (gradient de 9:1 a 0:10 en 15 min, C₁₈): *t_R* = 7.2 min, puresa 98 %. **CCF** (SiO₂, DCM-MeOH (9:1)): *R_f* = 0.21. **¹H RMN** (CDCl₃, 400 MHz): δ = 5.93 (m, 1H; CH Alloc), 5.33 (dm, 1H, J = 17.2 Hz; CHH' Alloc), 5.23 (dm, 1H, J = 10 Hz; CHH' Alloc), 4.86 & 4.76 (m, 1H; CH^α), 4.64 & 4.58 (dm, 2H, J = 5.6 Hz; CH₂ Alloc), 2.95 (s, 3H; SCH₃), 3.11 & 2.90 (m, 2H; CH₂^β), 2.15 (s, 3H; NMe). **¹³C RMN** (CDCl₃, 100 MHz): δ = 174.28 (CO Cys), 156.57 (CO Alloc), 132.62 (CH Alloc), 118.27 (CHH' Alloc), 67.28 (CH₂O Alloc), 66.25 (CH₂^β), 66.37 (CH^α), 43.29 (NCH₃). **EM** [ES(+)], *m/z*: calculat per C₉H₁₅NO₄S 233.3, trobat 234.3 [M+H]⁺, 256.3 [M+Na]⁺, 272.3 [M+K]⁺.

4.1.5.2 Alloc-NMe-Cys(Acm)-OH

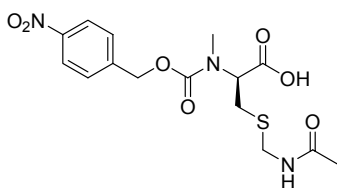


S'inicia la síntesi amb l'aminoàcid no purificat HCl·HNMe-Cys-OH (2.41 g, 14.2 mmols). S'obtenen 3.21 g de producte amb una puresa del 80 %. Rendiment 78 % sense purificar. **HPLC** (gradient de 9:1 a 0:10 en 15 min, C₁₈): *t_R* = 6.0 min, puresa 80 %. **RMN ¹H** (CDCl₃, 400 MHz): δ = 10.25 (brs, 1H; COOH), 7.34 (brs, 1H; NH Acm), 5.92 (m, 1H, CH Alloc), 5.34 (dm, 1H, J = 17.2 Hz; CHH' Alloc), 5.25 (dm, 1H, J = 10.4 Hz; CHH' Alloc), 4.94 & 4.84 (m, 1H; CH^α), 4.65 (m, 2H; CH₂ Alloc), 4.58 (dd, 1H, J₁ = 14.4 Hz, J₂ = 6.8 Hz; CHH' Acm), 4.24 (dd, 1H, J₁ = 14.4 Hz, J₂ = 5.2 Hz; CHH' Acm), 3.25 (dd, 1H,

$J_1 = 16$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz; CHH^{β}), 2.92 (m, 4H; NMe, CHH^{β}), 2.11 (s, 3H, CH_3 AcM). **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 100 MHz): $\delta = 174.0$ (CO Cys), 159.8 (CO Alloc), 158.2 (CO AcM), 132.1 (CH Alloc), 118.2 (CHH Alloc), 67.5 (CH_2O Alloc), 59.1 (CH^{α} Cys), 42.1 (CH_2 AcM), 31.7 (CH_2^{β} Cys), 30.9 (CH_3 NMe), 22.4 (CH_3 AcM). **EM** [ES(+)], m/z : calculat per $C_{11}H_{18}N_2O_5S$ 290.1, trobat 291.2 [M+H]⁺, 313.2 [M+Na]⁺.

4.1.6 Protecció amb el grup pNZ: pNZ-NMe-Cys(AcM)-OH

L'aminoàcid sense purificar Boc-NMe-Cys(AcM)-OH (4 g, 10.4 mmol) es tracta amb una solució 50 % TFA en DCM durant 1.5 h. A continuació, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es realitzen diverses coevaporacions amb TBME. Seguidament, es dissol el producte en una mescla H_2O (2 % Na_2CO_3)–1,4-dioxà (1:1) (28 mL), i la solució es refreda en un bany d'aigua-gel. Per una altra banda es prepara una solució de cloroformat de *p*-nitrobenzil (pNZ-Cl) (2.23 g, 10.4 mmol) en la mínima quantitat de 1,4-dioxà i s'addiciona sobre la solució d'aminoàcid. La mescla de reacció es manté en agitació durant 2 h en el bany d'aigua-gel, i tres dies a temperatura ambient. Al segon dia s'addiciona més pNZ-Cl (0.25 eq). El pH es manté en tot moment a pH = 9-10 per addició d'una solució aquosa 10 % Na_2CO_3 . Per CCF es controla la desaparició de l'aminoàcid de partida. El 1,4-dioxà s'elimina a pressió reduïda i la fase aquosa es renta amb TBME (3 x 50 mL). A continuació, la fase aquosa s'adificica amb una solució aquosa d'àcid clorhídric fins pH = 3-4 i el producte s'extreu amb AcOEt (3 x 50 mL). La fase orgànica s'asseca amb Na_2SO_4 , es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 3.85 g d'un sòlid blanc amb una puresa del 93 %.

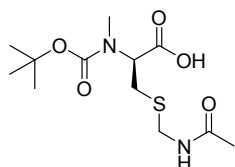


Rendiment 77%. **HPLC** (gradient 10:0 a 0:10 en 15 min, C_{18}): $t_R = 9.1$ min, puresa 93 %. **1H RMN** ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 8.22$ (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, CH_{arom} pNZ), 7.52 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, CH_{arom} pNZ), 6.70 & 6.42 (br s, 1H, NH Cys), 5.28 (s, 2H, CH_2 pNZ), 4.98 & 4.94 (m, 1H, CH^{α} Cys), 4.68 & 4.58 (1: 2.5) (m, 1H, CHH AcM), 4.22 & 3.99 (m, 1H, CHH AcM), 3.25 & 2.96 (m, 2H, CH_2^{β} Cys), 2.96 & 2.94 (s, 3H, NMe Cys), 2.07 & 2.05 (s, 3H, AcM). **^{13}C RMN** ($CDCl_3$, 100 MHz): $\delta = 172.6$ (CO Cys), 157.3 (CO pNZ), 156.0 (CO AcM), 147.8 (C_{arom} pNZ), 144.1 (C_{arom} pNZ), 128.0 (CH_{arom} pNZ), 124.0 (CH_{arom} pNZ), 66.5 (CH_2 pNZ), 58.8 (CH^{α} Cys), 41.6 (CH_2 AcM), 31.6 (CH_3 NMe), 30.0 (CH_2^{β} Cys), 23.2 (CH_3 AcM). **EM** [ES(+)], m/z : calculat per $C_{15}H_{19}N_3O_7S$ 385.1, trobat 386.1 [M+H]⁺, 408.1 [M+Na]⁺.

4.1.7 Protecció amb el grup Boc: Boc-NMe-Cys(Me)-OH i Boc-NMe-Cys(Acm)-OH

4.1.7.1 Boc-NMe-Cys(Acm)-OH

L'aminoàcid HCl·H-NMe-Cys(Acm)-OH (3.3 g, 19.2 mmol) obtingut prèviament i sense ser purificat, es dissol en 20 mL d'H₂O i 40 mL de THF. El pH de la solució es basifica fins a pH 9-10 per addició d'una solució aquosa NaOH (50 %). Seguidament s'addiciona Boc₂O (5 g, 23 mmol). La reacció es manté en agitació i a temperatura ambient i se segueix per CCF (2-propanol-AcOH-H₂O, 4:1:1). A les 48 h s'addiciona més Boc₂O (1.2 eq) i als cinc dies s'observa la total conversió del producte de partida. El dissolvent orgànic s'elimina a pressió reduïda i la fase aquosa es renta amb TBME (3 x 50 mL). A continuació s'acidifica la fase aquosa amb una solució aquosa d'àcid clorhídric fins pH = 3-4 i el producte s'extreu amb AcOEt (3 x 50 mL). La fase orgànica s'asseca amb Na₂SO₄, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. Obtenim 4.3 g d'un producte espumós blanc amb una puresa del 77 % determinada per UV. Rendiment 74 %.

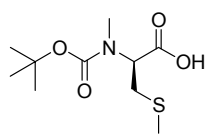


HPLC (gradient de 10:0 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R = 8.0 min, puresa 78 %. **CCF** (SiO₂, DCM-MeOH (8:2), revelat amb ninhidrina): R_f = 0.37. **RMN ¹H** (CDCl₃, 400 MHz): δ = 6.72 (brs, 1H; NH Acm), 4.92 (m, 1H; CHH' Acm), 4.56 (m, 1H; CH^α), 4.21 (m, 1H, CHH' Acm), 3.21 (m, 1H; CHH'^β), 2.89 & 2.82 (m, 4H, CH₃ NMe, CHH'^β), 2.05 (m, 3H, CH₃ Acm), 1.50 (s, 9H, Boc). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 100 MHz): δ = 172.6 (CO Cys), 159.1 (CO Boc), 153.5 (CO Acm), 80.9 (C Boc), 59.3 (CH^α), 40.6 (CH₂ Acm), 32.3 (CH₂^β), 31.4 (CH₃ NMe), 28.3 (CH₃ Boc), 22.9 (CH₃ Acm). **EM** [ES(+)], m/z: calculat per C₁₂H₂₂N₂O₅S 306.1, trobat 307.2 [M+H]⁺, 329.3 [M+Na]⁺.

4.1.7.2 Boc-NMe-Cys(Me)-OH

Cal treballar amb el material ben sec, dissolvents anhidres i sota atmosfera d'argó.

En un baló es dissol l'aminoàcid Boc-Cys(Me)-OH (1 g, 4.24 mmol) amb 10 mL de THF anhidre. La solució es purga amb argó i es transfereix via cànula a un baló refredat en un bany aigua-gel que conté hidrur de sodi en oli mineral (509 mg, 12.7 mmol). La reacció es deixa en agitació i en el bany de gel durant 30 min. Seguidament s'addiciona via cànula una solució de iodur de metil (528 μL, 8.48 mmol) en 2 mL de THF anhidre. La reacció es manté en agitació a l'interior d'una cambra freda a 4 °C. Després de 16 h de reacció s'observa per HPLC la conversió total del producte de partida i la presència d'un 44 % del producte esperat. Part del producte es purifica en un sistema de HPLC-preparatiu (gradient de 15 a 50 en 30 min, 40 mL.min). S'obtenen 450 mg de producte blanc amb una puresa del 99 %. Rendiment del 44 %.



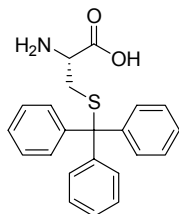
HPLC (gradient de 10:0 a 0:10 en 15 min, C_{18}): $t_R = 10.3$ min, pureza 99 %. **RMN 1H** ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 7.18$ (br s, 1H, NH), 4.74 (m, 1H, CH^α), 3.05 (m, 1H, CHH^β), 2.88 (m, 1H, CHH^β), 2.84 (s, 3H, SMe), 2.13 (s, 3H, AcM), 1.46 (s, 9H, Boc). **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 100 MHz): $\delta = 175.2$ (CO Cys), 156.5 (CO Boc), 80.7 (C Boc), 58.0 (CH^α), 33.2 (CH_2^β), 32.1 (CH_3 NMe), 28.6 (CH_3 Boc), 15.6 (CH_3 SMe). **EM** [ES(+)]: m/z : calculat per $C_{10}H_{19}NO_4S$ 249.1, trobat 250.3 [M+H]⁺, 272.3 [M+Na]⁺.

4.2 OBTENCIÓ DE D-CISTEÏNES PROTEGIDES

4.2.1 Obtenció de Troc-D-Cys(Trt)-OH en solució

4.2.1.1 Síntesi de H-D-Cys(Trt)-OH

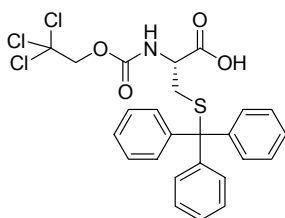
En un baló s'addiciona l'aminoàcid, H-D-Cys-OH HCl H_2O (3 g, 17 mmol), el Trt-Cl (7.1 g, 25.6 mmol) i 11 mL de DMF. S'obté una suspensió. La reacció es deixa en agitació durant dos dies i s'observa la dissolució dels productes. A continuació, s'addicionen 100 mL d'una solució aquosa de AcONa (10 %) i s'observa la formació d'un precipitat blanc. La suspensió es refreda en un bany d'aigua-gel i seguidament es filtra. El sòlid obtingut s'addiciona en un baló que conté 50 mL d'acetona i s'escalfa en un bany de 50 °C durant 30 min. La suspensió es refreda en un bany d'aigua-gel, es filtra i es renta amb acetona i TBME. S'obtenen 5.5 g d'un sòlid blanc amb una pureza del 99 % determinada per UV. Rendiment del 81 %.



HPLC (gradient de 1:0 a 0:1 en 15 min, C_{18}): $t_R = 9.2$ min, pureza 99 %. **RMN 1H** ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 7.44$ (m, 6H; CH_{arom} Trt), 7.31 (m, 6H; CH_{arom} Trt), 7.24 (m, 6H; CH_{arom} Trt), 3.05 (dd, 1H, $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz; CH^α), 2.82-3.05 (dd, 1H, $J_1 = 13.6$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz; CHH^β), 2.69 (dd, 1H, $J_1 = 13.2$ Hz, $J_2 = 9.2$ Hz; CHH^β). **EM** [ES(+)], m/z : calculat per $C_{22}H_{21}NO_2S$ 363.1, trobat 364.3 [M + H]⁺, 386.3 [M + H]⁺.

4.2.1.2 Síntesi Troc-D-Cys(Trt)-OH

En un baló es prepara 24 mL d'una solució de H₂O (2 % Na₂CO₃)-1,4-dioxà (1:1) i s'addiciona l'aminoàcid H-D-Cys(Trt)-OH (1 g, 2.75 mmol). Seguidament s'addiciona el clorur de 2,2,2-tricloroetoxicarbonil (Troc-Cl) (1.5 mL, 3 mmol) i es deixa la reacció en agitació a temperatura ambient. La reacció se segueix per CCF i s'observa, a les dues hores, la total conversió de l'aminoàcid de partida. S'addiciona Et₂O (20 mL) i es fan rentats de la fase aquosa (4 x 20 mL), s'acidifica amb una solució aquosa d'àcid clorhídric (4 N) i el producte s'extreu amb DCM (4 x 20 mL). La fase orgànica se seca amb Na₂SO₄, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 1.46 g d'un sòlid blanc amb una puresa del 99 % determinada per UV. Rendiment del 99 %.



HPLC (gradient de 7:3 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R = 12.9 min, puresa 99 %. **¹H RMN** (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.44 (m, 6H; CH_{arom} Trt), 7.31 (m, 6H; CH_{arom} Trt), 7.23 (m, 6H; CH_{arom} Trt), 3.31 (m, 2H, CH₂ Troc), 3.04 (dd, 1H, J₁ = 9.2 Hz, J₂ = 4.0 Hz; CH ^{α}), 2.82 (dd, 1H, J₁ = 13.4 Hz, J₂ = 4.0 Hz; CHH ^{β}), 2.68 (dd, 1H, J₁ = 13.4 Hz, J₂ = 4.0 Hz; CHH ^{β}). **¹³C RMN** (CDCl₃, 100 MHz): δ = 174.3 (CO Cys), 154.2 (CO Troc), 144.3 (C, Trt), 129.7 (CH_{arom} Trt), 128.3 (CH_{arom} Trt), 127.3 (CH_{arom} Trt), 95.4 (C, Troc), 75.0 (CH₂ Troc), 67.6 (CH ^{α}), 54.2, 53.1 (CH ^{β}). **EM** [ES(-)]: m/z : calculat per C₂₅H₂₂NO₄Cl₃S 538.9, trobat 537.4 [M - H].

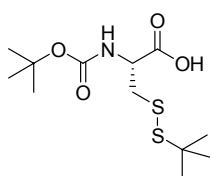
4.2.2 **Obtenció de Troc-D-Cys(Trt)-OH en fase sòlida**

La resina CTC-PS (200 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. S'introdueix el primer aminoàcid Fmoc-D-Cys(Trt)-OH (82 mg, 0.14 mmol) i DIEA (156 μ L, 6.67 eq) en DCM. Després de 5 min, s'addiciona més DIEA (78 μ L, 3.33 eq) i la mescla de reacció es deixa en agitació durant 55 min a 25 °C. La reacció finalitza amb l'addició de MeOH (160 μ L) i la mescla es manté en agitació durant 10 min més. La peptidil-resina Fmoc-D-Cys(Trt)-CTC-PS se sotmet als següents rentats/tractaments: filtració, DCM (5 x 30 s), DMF (5 x 30 s), piperidina/DMF (1:4) (1 x 1 min, 3 x 5 min, 1 x 10 min). La funcionalització es calcula per mesura de l'absorbància a 290 nm i resulta 0.50 mmol/g resina. A continuació s'addiciona el Troc-Cl (56 μ L, 0.6 mmol) i DIEA (502 μ L, 3 mmol) dissolts en DCM. La reacció es manté en agitació durant 30 min, es filtra i es comprova per test de ninhidrina que la protecció ha estat quantitativa. La peptidil-resina es tracta amb una solució 1 % de TFA en DCM (5 x 30s). Els filtrats es recullen en un baló que conté aigua (8 mL) i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El producte es redissol en H₂O/MeCN i es liofilitza. S'obtenen 58 mg de producte sòlid blanc, amb una puresa del 98 %, determinada per HPLC. Rendiment de la síntesi del 92 %.

4.2.3 Obtenció de Boc-D-Cys(S^tBu)-OH

En un baló es prepara una solució de Scm-Cl (1.1 mL, 12.3 mmol) en 9 mL de MeOH. La solució es manté en agitació i en un bany d'aigua-gel. A continuació, es dissol l'aminoàcid H-D-Cys-OH·HCl·H₂O (1 g, 6.4 mmol) en 8.5 mL de MeOH i s'addiciona 500 µL de la dissolució comercial 1,4-dioxà-HCl (4 M). La solució de l'aminoàcid s'addiciona lentament sobre la primera solució. Seguidament, la reacció es manté en agitació i en el bany d'aigua-gel durant 1 h. La reacció se segueix per CCF (1-butanol-AcOH-H₂O, 4:1:1). El dissolvent s'evapora a pressió reduïda i es realitzen diverses coevaporacions amb TBME fins a obtenir un sòlid sense olor i pràcticament incolor.

A continuació es prepara una solució de 2-tiol-2-metilpropà (1.5 mL, 12.7 mmol, 2 eq) amb 6 mL de MeOH i s'addiciona Et₃N (900 µL, 5.7 mmol). L'aminoàcid prèviament activat es dissol en 4.5 mL de MeOH i s'addiciona gota a gota sobre la primera solució. S'observa la formació d'un gel. Finalitzada l'addició, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 718 mg d'un sòlid blanc (rendiment del 60 %). L'aminoàcid protegit H-D-Cys(S^tBu)-OH (718 mg, 3.4 mmol) es dissol en 15 mL d'una solució aquosa Na₂CO₃ (2 %). El Boc₂O (958 mg, 4.39 mmol) es dissol en 15 mL de 1,4-dioxà i s'addiciona sobre la solució aquosa. La reacció es manté en agitació i a temperatura ambient, i se segueix per CCF (2-propanol-AcOH-H₂O, 4:1:1). A les 24 h encara s'observa producte de partida i s'addiciona més Boc₂O (1.3 eq). Després de 2 dies s'observa la conversió total del producte de partida. Seguidament s'addiciona Et₂O (20 mL) i es fan rentats de la fase aquosa (4 x 20 mL), s'acidifica amb una solució aquosa de HCl (4 N) i el producte s'extreu amb DCM (4 x 20 mL). La fase orgànica se seca amb Na₂SO₄, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 636 mg d'un sòlid blanc amb una puresa del 90 % determinada per UV. Rendiment del 60 % i rendiment global del 36 %.



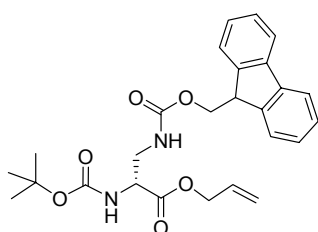
HPLC (gradient de 9:1 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R = 11.4 min, puresa 90 %. **CCF** (SiO₂, 2-propanol-AcOH-H₂O (4:1:1), revelat amb ninhidrina): R_f = 0.30. **RMN ¹H** (CDCl₃, 400 MHz): δ = 5.37 (1H, d, J = 6.4 Hz; NH), 4.60 (1H, m; CH ^{α}), 3.18 (m, 2H; CH ^{β}), 1.47 (9H, s; Boc), 1.38 (9H, s; S^tBu). **¹³C RMN** (CDCl₃, 100 MHz): δ = 175.4 (CO Cys), 156.2 (CO Boc), 80.9 (C Boc), 53.5 (CH ^{α}), 48.5 (C ^tBu), 42.2 (CH ^{β}), 30.0 (CH₃ Boc), 28.5 (CH₃ ^tBu). **EM** [ES(+)], m/z: calculat per C₁₂H₂₃NO₄S₂ 309.1, trobat 310.2 [M+H]⁺, 322.2 [M+Na]⁺.

4.3 OBTENCIÓ D'AMINOÀCIDS NO DERIVATS DE LA CISTEÏNA

4.3.1 Obtenció de H-D-Dap(Fmoc)-Oal·lil

4.3.1.1 Boc-D-Dap(Fmoc)-Oal·lil

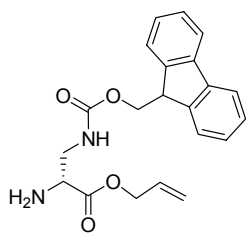
La DIEA (164 mL, 0.94 mmol) s'addiciona a una suspensió d'aminoàcid comercial Boc-D-Dap(Fmoc)-OH (200 mg, 0.47 mmol) en AcOEt (5 mL). La mescla es manté en agitació fins que s'obté la total dissolució a 25 °C. A continuació s'addiciona bromur d'al·lil (1 mL, 11.6 mmol) i la mescla de reacció s'escalfa a reflux durant 1 h, es refreda, es filtra i es dilueix amb AcOEt (5 mL). La fase orgànica es renta amb una solució aquosa de 5 % NaHCO₃ (3 x 5 mL), HCl (1 N) (3 x 5 mL), i NaCl (sat) (3 x 5 mL). Després, la fase orgànica s'elimina a pressió reduïda per obtenir un oli. El producte es cristal·litza amb Et₂O–dioxà per aconseguir Boc-D-Dap(Fmoc)-Oal·lil (128 mg, 0.27 mmol, 58 % rendiment) com un sòlid blanc.



HPLC (gradient de 7:3 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R = 12.5 min, pureza 89 %). **RMN ¹H** (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.77 (m, 2H; CH_{arom} Fmoc), 7.58 (m, 2H; CH_{arom} Fmoc), 7.40 (m, 2H; CH_{arom} Fmoc), 7.32 (m, 2H; CH_{arom} Fmoc), 5.91 (m, 1H, CH al·lil), 5.42 (brs, 1H, NH), 5.34 (dm, 1H, J = 17 Hz; =CHH' al·lil), 5.25 (dm, 1H, J = 10.4 Hz; =CHH' al·lil), 5.16 (brs, 1H, NH), 4.65 (m, 2H, CH₂ Fmoc), 4.40-4.38 (m, 3H, CH ^{α} , CH₂ al·lil), 4.21 (m, 1H, CH Fmoc), 3.62 (m, 2H, CH₂ ^{β}), 1.45 (s, 9H, Boc). **EM** [ES(+)], m/z : calculat per C₂₆H₃₀N₂O₆ 466.2, trobat 467.4 [M+H]⁺, 489.4 [M+Na]⁺, 367.3 [M-Boc+H]⁺.

4.3.1.2 H-D-Dap(Fmoc)-Oal·lil

Es tracta l'aminoàcid Boc-D-Dap(Fmoc)-Oal·lil (128 mg, 0.27 mmol) amb una solució de TFA–H₂O (95:5). La mescla de reacció es manté en agitació durant 1.5 h a 25 °C. El solvent s'elimina a pressió reduïda i amb coevaporacions amb Et₂O per obtenir l'aminoàcid H-D-Dap(Fmoc)-Oal·lil (97 mg, 0.26 mmol, 98 %) com un sòlid blanc.



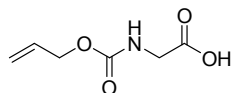
HPLC (gradient de 7:3 a 0:10 en 15 min, C_{18}): t_R = 9.6 min, pureza 93 %. **RMN** 1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7.70 (m, 2H; $2CH_{arom}$ Fmoc), 7.55 (m, 2H; $2CH_{arom}$ Fmoc), 7.30 (m, 2H; $2CH_{arom}$ Fmoc), 7.21 (m, 2H; $2CH_{arom}$ Fmoc), 5.88 (m, 1H; CH al lil), 5.28 (dm, 1H, J = 17.2 Hz; = CHH' al lil), 5.18 (dm, 1H, J = 10.6 Hz; = CHH' al lil), 4.68 (m, 1H; CH^α), 4.59 (m, 1H; CH Fmoc), 4.32, 4.10 (m, 2H; CH_2 al lil o CH_2 Fmoc), 3.56 (m, 2H; CH_2^β). **RMN** ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): δ = 167.6 (CO Dap), 157.6 (CO Fmoc), 143.9 ($2C_{arom}$ Fmoc), 141.4 (CO_{arom} Fmoc), 130.0 (CH al lil), 128.1 ($2CH_{arom}$ Fmoc), 127.4 ($2CH_{arom}$ Fmoc), 125.2 ($2CH_{arom}$ Fmoc), 120.1 ($2CH_{arom}$ Fmoc), 67.6 (OCH_2 al lil), 67.4 (CH_2 Fmoc), 53.2 (CH Fmoc), 47.0 (CH^α), 41.0 (CH_2^β al lil). **EM** [ES(+)], m/z : calculat per $C_{21}H_{22}N_2O_4$ 366.2, trobat 367.1 [M+H] $^+$, 389.1 [M+Na] $^+$.

4.3.2 Obtenció d'Alloc-Gly-OH i pNZ-Gly-OH. Mètode de l'azida

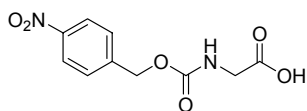
Per a la protecció amb el grup Alloc i el grup pNZ es preparen en un baló dissolucins de 1,4-dioxà i el corresponent cloroformat (1 eq). Les solucions es refreden en un bany aigua-gel i s'addiciona l'azida sòdica (1.5 eq) dissolta en aigua (H_2O –1,4-dioxà, 1:1). Les reaccions es deixen en agitació durant 3 h a temperatura ambient.

Posteriorment s'addiciona l'aminoàcid H-Gly-OH dissolt en una solució H_2O (2 % Na_2CO_3)–1,4-dioxà (1:1) (0.65 M). La reacció es manté en agitació durant 2 dies. La reacció se segueix per CCF i test de ninhidrina. El pH de la reacció es va rectificant per mantenir un valor de pH = 10-11. Finalitzada la reacció, s'addiciona Et_2O (20 mL) i es fan rentats de la fase aquosa (4 x 20 mL), s'acidifica amb una solució aquosa d'àcid clorhídric (4 N) i el producte s'extreu amb DCM (4 x 20 mL). La fase orgànica se seca amb Na_2SO_4 , es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda.

4.3.2.1 Alloc-Gly-OH



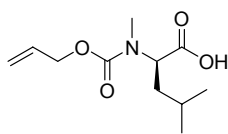
S'obtenen 1.98 g de producte amb una pureza del 99 % determinada per UV. Rendiment 98 %. **HPLC** (gradient de 10:0 a 3:7 en 15 min, C_{18}): t_R = 6.0 min, pureza 99 %. **RMN** 1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 5.92 (m, 1H; CH Alloc), 5.32 (dm, 1H, J = 17.2 Hz; CHH' Alloc), 5.30 (m, 1H; NH Gly), 5.23 (dm, 1H, J = 10 Hz; CHH' Alloc), 4.60 (d, 2H, J = 5.6 Hz; CH_2 Alloc), 4.03 (d, 2H, J = 5.6 Hz; CH_2^β). **RMN** ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): δ = 174.28 (CO Cys), 156.57 (CO Alloc), 132.62 (CH Alloc), 118.27 (CHH' Alloc), 67.28 (CH_2O Alloc), 66.25 (CH_2^β), 66.37 (CH^α), 43.29 (NMe). **EM** [ES(+)], m/z : calculat per $C_6H_9NO_4$ 159.1, trobat 160.3 [M+H] $^+$, 182.2 [M+Na] $^+$.

4.3.2.1.1 pNZ-Gly-OH

S'obtenen 1.57 g de producte amb una puresa del 99 % determinada per UV. Rendiment 63 %. **HPLC** (gradient de 7:3 a 0:10 en 15 min, C₁₈): t_R = 4.4 min, puresa 99 %). **RMN ¹H** (CDCl₃, 400 MHz): δ = 8.20 (2H, d, J = 8.7 Hz; CH_{arom} pNZ), 7.68 (t, 1H, J = 6.0 Hz; NH), 7.60 (d, 2H, J = 8.7 Hz; CH_{arom} pNZ), 5.18 (2H, s; CH₂ pNZ), 3.67 (d, 2H; CH₂ ^{α}), **RMN ¹³C** (CDCl₃, 100 MHz), δ = 172.1 (CO Gly), , 156.9 (CO pNZ), 147.6 (C_{arom} pNZ), 145.7 (C_{arom} pNZ), 128.8 (CH_{arom} pNZ), 124.2 (CH_{arom} pNZ), 65.0 (CH₂ pNZ), 42.8 (CH₂ Gly). **EM** [ES(+)], m/z : calculat per C₁₀H₁₁N₂O₆S 255.1, trobat 256.2 [M+H]⁺.

4.3.3 **Obtenció d'Alloc-MMe-Leu-OH**

Es dissol l'aminoàcid HCl·HMe-Leu-OH (2 g, 11 mmol) en 40 mL d'una solució aquosa de Na₂CO₃ (2 %) i es manté en un bany d'aigua-gel. Paral·lelament es dissol el cloroformat d'al·lil (1.4 mL, 13.3 mmol) en 40 mL de 1,4-dioxà i s'addiciona lentament sobre la solució d'aminoàcid. La reacció es manté en agitació i a temperatura ambient i se segueix per CCF (2-propanol–AcOH–H₂O, 4:1:1). Passades 24 hores s'addiciona més Alloc-Cl (1.2 eq) i a les 48 h s'observa la total conversió del producte de partida. S'addiciona Et₂O (20 mL) i es fan rentats de la fase aquosa (4 x 20 mL), s'acidifica amb una solució aquosa de HCl (4 N) i el producte s'extreu amb DCM (4 x 20 mL). La fase orgànica se seca amb Na₂SO₄, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 2.41 g d'un producte oliós amb una puresa del 98 % determinada per UV. Rendiment 95 %.

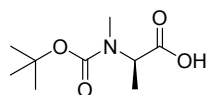


HPLC (gradient de 10:0 a 3:7 en 15 min, C₁₈): t_R = 15.5 min, puresa 98 %). **CCF** (SiO₂, 2-propanol–AcOH–H₂O (4:1:1)): R_f = 0.78. **¹H NMR** (CDCl₃, 400 MHz): δ = 5.93 (m, 1H; CH alloc), 5.19 (m, 2H; =CH₂ alloc), 4.78 (m, 2H; CH₂ Alloc), 3.44 (m, 1H, CH ^{α}), 2.81 (s, 3H, NMe), 1.73 (m, 2H; CH₂ ^{β}), 1.57 (m, 1H; CH ^{γ}), 0.89 (d, 6H, 2CH₃ ^{δ}). **¹³C RMN** (CDCl₃, 100 MHz): δ = 177.5 (C, COOH), 157.3 (C, CO), 133.0 (CH, CH alloc), 117.6 (CH₂, =CH₂ alloc), 66.7 (CH₃, NMe), 56.9 (CH, CH ^{α}), 37.4 (CH₂, CH₂ alloc), 30.6 (CH₂, CH₂ ^{β}), 25.1 (CH, CH ^{γ}), 23.4, 21.5 (CH₃, 2CH₃ ^{δ}). **EM** [ES(+)], m/z : calculat per C₁₁H₁₉NO₄ 229.1, trobat 230.6 [M+H]⁺.

4.3.4 Obtenció de Boc-MMe-Ala

Cal treballar amb material ben sec, dissolvents anhidres i sota atmosfera d'argó.

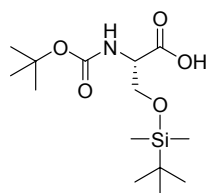
En un baló es dissol l'aminoàcid Boc-Ala-OH (250 mg, 1.32 mmol) amb 5 mL de THF anhidre. La solució es purga amb argó i es transfereix via cànula a un baló que conté hidrur de sodi (60 % en oli mineral) (160 mg, 4.24 mmol). La reacció es deixa en agitació i en un bany d'aigua-gel durant 30 min. Seguidament s'addiciona el iodur de metil (660 μ L, 5.60 mmol). La reacció es manté en agitació a temperatura ambient. Després de 16 h de reacció s'observa per HPLC la conversió total del producte de partida. S'addiciona lentament MeOH per eliminar les traces de NaH. S'acidifica el medi amb una solució d'àcid clorhídric (4 N) fins a obtenir un pH 3-4. Es realitzen varis rentats amb DCM per extreure el producte. S'obtenen 189 mg de producte amb una puresa del 92 % determinada per UV. Rendiment del 65 %.



RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 5.93 (m, 1H; CH Alloc), 5.33 (dm, 1H, J = 17.2 Hz; CHH' Alloc), 5.23 (dm, 1H, J = 10 Hz; CHH' Alloc), 4.86 & 4.76 (m, 1H; CH $^\alpha$), 4.64 & 4.58 (dm, 2H, J = 5.6 Hz; CH $_2$ Alloc), 2.95 (s, 3H; SMe), 3.11 & 2.90 (m, 2H; CH $_2^\beta$), 2.15 (s, 3H; NMe), 1.48 (s, 9H, Boc). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 174.28 (CO Cys), 156.57 (CO Alloc), 132.62 (CH Alloc), 118.27 (CHH' Alloc), 67.28 (CH $_2\text{O}$ Alloc), 66.25 (CH $_2^\beta$), 66.37 (CH $^\alpha$), 43.29 (NMe). **EM** [ES(+)], *m/z*: calculat per $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$ 233.3, trobat 234.3 [M+H] $^+$, 256.3 [M+Na] $^+$, 272.3 [M+K] $^+$.

4.3.5 Obtenció de Boc-D-Ser(TBDMS)-OH

En un baló es pesa l'aminoàcid Boc-D-Ser-OH (0.5 g, 2.43 mmol) i es dissol DMF (10 mL) i es refreda en un bany d'aigua-gel. Seguidament s'addiciona el clorur de *tert*-butildimetilsilil (474 mg, 3.16 mmol), i l'imidazole (496 mg, 7.29 mmol). La solució es deixa 1 h en agitació en el bany d'aigua-gel i després es deixa 16 h en agitació a temperatura ambient. Per cromatografia en capa prima preparativa es comprova la finalització de la reacció. S'addiciona Et $_2$ O (2 x 25 mL) i es renta amb una solució aquosa 1 N de HCl. Les fases orgàniques s'assequen amb MgSO $_4$ i el producte es purifica per cromatografia en columna, fent servir com a fase estacionària el SiO $_2$ i una mescla de DCM–AcOEt (2:1) com a fase mòbil. S'obtenen 496 mg del producte com un sòlid blanc. Rendiment del 64 %.



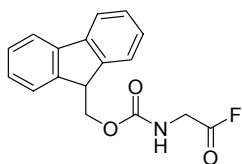
CCF (SiO $_2$, DCM–MeOH (9:1), revelat amb ninhidrina): R_f = 0.62. **RMN ^1H** (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 5.45 (br s, 1H, NH), 4.37 (m, 1H, CH $^\alpha$), 4.11 (m, 1H, CHH $^\beta$), 3.85 (m, 1H, CHH $^\beta$), 1.46 (s, 9H, t Bu, Boc), 0.92 (s, 6H, 2CH $_3$, TBDMS), 0.88 (s, 9H, t Bu,

TBDMS). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 175.2 (CO Ser), 156.4 (CO Boc), 80.5 (C, Boc), 63.6 (CH_2^β), 55.4 (CH^α), 28.5 (CH_3 Boc), 25.9 (CH_3 , tBu-Si), 18.4 (C TBDMS), -3.4 (CH_3 -Si), -5.6 (CH_3 -Si). **EM** [ES(-)], *m/z*: calculat per $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NO}_5\text{Si}$ 319.2, trobat 317.8 [M-H].

4.3.6 Obtenció de Fmoc-Gly-F

Cal treballar amb el material ben sec i sota atmosfera d'argó.

En un baló es pesa l'aminoàcid Fmoc-Gly-OH (600 mg, 2.02 mmol) i es dissol en DCM anhidre (20 mL). Seguidament s'addiciona el DAST (428 μL , 3.03 mmol). La reacció es deixa en agitació durant una hora. Després es realitzen rentats amb aigua-gel i el solvent s'elimina a pressió reduïda. El producte es precipita amb DCM/hexà i seguidament es filtra el sòlid blanc. S'obtenen 507 mg de producte, rendiment del 84 %. Per quantificar la puresa del producte es pren una alíquota del sòlid blanc i s'addiciona una solució 5 % de piridina en MeOH, després de 10 min s'analitza la solució en el HPLC i es determina la proporció de Fmoc-Gly-OMe respecte l'aminoàcid de partida. S'obté una puresa del producte del 95 %.



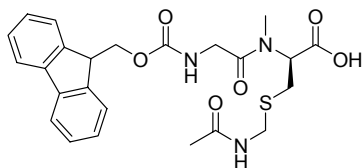
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 7.76 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc), 7.59 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc), 7.40 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc), 7.31 (m, 2H, 2CH_{arom} Fmoc), 5.27 (brs, 1H, NH), 4.43 (d, 2H, J = 7.2 Hz, CH_2 Fmoc), 4.24 (t, 1H, J = 6.8 Hz), CH Fmoc), 4.06 (d, 2H, J = 5.6 Hz, CH_2^α). **IR** (film, ν , cm^{-1}): 1843 (C=O st), 1177 (C-F st), 985 (C-CO st).

4.4 OBTENCIÓ DE DIPÈPTIDS EN FASE SÒLIDA:

4.4.1 Obtenció de Fmoc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH

La resina CTC-PS (600 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. S'introdueix el primer aminoàcid Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH (220 mg, 0.51 mmol) i DIEA (573 μL , 6.67 eq) en DCM. Després de 5 min, s'addiciona més DIEA (286 μL , 3.33 eq) i la mescla de reacció es deixa en agitació durant 55 min a 25 °C. La reacció finalitza amb l'addició de MeOH (480 μL) i la mescla es manté en agitació durant 10 min més. La peptidil-resina Fmoc-NMe-Cys(Acm)-CTC-PS se sotmet als següents rentats/tractaments: filtració, DCM (5 x 30 s), DMF (5 x 30 s), piperidina/DMF (1:4) (1 x 1 min, 3 x 5 min, 1 x 10 min). La funcionalització es calcula per mesura de l'absorbància a 290 nm i resulta 0.55 mmol/g resina. Seguidament s'addiciona l'aminoàcid Fmoc-Gly-OH (294 mg, 1 mmol) i els agents d'acoblament

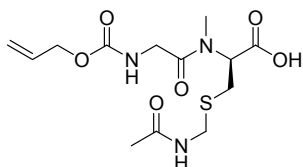
HATU (376 mg, 1 mmol) i DIEA (331 μ L, 1.98 mmol) dissolts en DMF. L'acoblament es deixa 35 min en agitació i es comprova pel test de ninhidrina que l'acoblament ha estat quantitatiu. La peptidil-resina es tracta amb una solució 1 % de TFA en DCM (5 x 310 s). Els filtrats es recullen i s'elimina el solvent a pressió reduïda. S'obtenen 218 mg de producte sòlid blanc amb una puresa de 97 %, determinada per HPLC. El rendiment de la síntesi és del 87 %.



HPLC (gradient de 7:3 a 0:10 en 15 min, C_{18}): t_R = 6.6 min, puresa 97 %. **EM** [ES(+)], m/z : calculat per $C_{24}H_{27}N_3O_6S$ 485.2, trobat 486.4 [M+H]⁺, 508.3 [M+Na]⁺.

4.4.2 Obtenció de Alloc-Gly-NMe-Cys(Acm)-OH

La resina CTC-PS (250 mg, 1.6 mmol/g resina) s'introdueix en una xeringa de polipropilè equipada amb un filtre de polietilè i es renta segons els procediments generals descrits. S'introdueix el primer aminoàcid Fmoc-NMe-Cys(Acm)-OH (75 mg, 0.18 mmol) i DIEA (195 μ L, 6.67 eq) en DCM. Després de 5 min, s'addiciona més DIEA (97 μ L, 3.33 eq) i la mescla de reacció es deixa en agitació durant 55 min a 25 °C. La reacció finalitza amb l'addició de MeOH (200 μ L) i la mescla es manté en agitació durant 10 min més. La peptidil-resina Fmoc-NMe-Cys(Acm)-CTC-PS se sotmet als següents rentats/tractaments: filtració, DCM (5 x 30 s), DMF (5 x 30 s), piperidina/DMF (1:4) (1 x 1 min, 3 x 5 min, 1 x 10 min). La funcionalització es calcula per mesura de l'absorbància a 290 nm i resulta 0.58 mmol/g resina. Seguidament s'addiciona l'aminoàcid Alloc-Gly-OH (69 mg, 0.44 mmol) i els agents d'acoblament HATU (69 mg, 0.44 mmol) i DIEA (145 μ L, 0.87 mmol) dissolts en DMF. L'acoblament es deixa 35 min en agitació i es comprova pel test de ninhidrina que l'acoblament ha estat quantitatiu. La peptidil-resina es tracta amb una solució 1 % de TFA en DCM (5 x 310 s). Els filtrats es recullen i s'elimina el solvent a pressió reduïda. S'obtenen 46 mg de producte oliós amb una puresa de 90 %, determinada per HPLC. El rendiment de la síntesi és del 75 %.



HPLC (gradient de 1:0 a 0:1 en 15 min, C_{18}): t_R = 6.5 min, puresa 90 %. **EM** [ES(+)], m/z : calculat per $C_{13}H_{21}N_3O_6S$ 347.1, trobat 348.3 [M+H]⁺, 370.3 [M+Na]⁺.

5. Antitumor compounds from marine sponges

5.1 COLLECTION, EXTRACTION, AND ISOLATION

The sponge CMB-02633 was collected by scuba (15-20 m) off Port Campbell (Victoria) and the diced specimen immersed in EtOH and stored at -20 °C. A portion (50 %) of the EtOH extract was decanted and concentrated under reduced pressure to obtain 1 g of dried extract. This extract was partitioned between into *n*-BuOH and H₂O. The *n*-BuOH solubles were concentrated under reduced pressure (353 mg) and then triturated in petrol (178 mg, 50 %), DCM (12 mg, 3 %), MeOH (34 mg, 10 %) and water (2.3 mg, 1 %). An aliquot of petrol solubles (24 mg) was subjected to purification by semi-preparative HPLC (Zorbax C₁₈ semiprep column, 250 x 9.4 mm, 5 μm, eluting with 4.0 mL/min 35% H₂O/MeCN to MeCN with a 0.1% TFA modifier, and detecting at 210 and 254 nm (DAD) and ELSD for 40 min) to yield CMB-02633-A (7.7 mg, 0.77 % yield) and CMB-02633-B (1.3 mg, 0.13 % yield).

The sponge CMB-02709 was collected by scuba (8-10 m) off Deal Island (Tasmania) and the diced specimen immersed in EtOH and stored at -20 °C. A portion (40 %) of the EtOH extract was decanted and concentrated under reduced pressure to obtain 3.2 g of the dried extract. This extract was partitioned between *n*-BuOH and H₂O. The *n*-BuOH fraction was concentrated under reduced pressure (1164 mg) and triturated in petrol (365 mg, 31 %), DCM (250 mg, 21 %), MeOH (246 mg, 21%) and water (8.0 mg, 1 %). An aliquot (40 mg) of the petrol solubles fraction was subjected to purification by semi-preparative HPLC (Zorbax C₈ semiprep column, 250 x 9.4 mm, 5 μm, eluting with 4.0 mL/min 50% H₂O/MeCN to MeCN with a 0.1% TFA modifier, and detecting at 210 and 254 nm (DAD) and ELSD for 40 min) to yield trunculin C (0.3 mg, 0.01 % yield) and trunculin E (2.9 mg, 0.9 % yield).

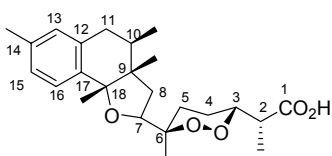
5.1.1 CMB-02633-A.

1.3 mg stable oil (0.13 % yield). Purity (by UV spectrum at 254 nm): 98 %. **ESI(+)**MS *m/z* calculated for C₂₅H₃₆O₅ 416.3 found 417.2 [M+H]⁺, 439.2 [M+Na]⁺, 455.2 [M+K]⁺. **HPLC**: *t_R* 14.4 min (C₁₈, gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H₂O, B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA). **¹H NMR** (CDCl₃, 600 MHz; δ, ppm; *J*, Hz): 1.82 (dd, *J* = 12.9, 11.0, 1H), 1.96 (m, 1H), 2.10 (dd, *J* = 12.8, 6.3, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.55 (br s, 1H), 2.56 (br d, *J* = 3.4, 1H), 3.65 (s, 3H), 4.25 (td, *J* = 8.6, 4.3, 1H), 4.27 (dd, *J* = 10.8, 6.0, 1H), 6.88 (br s, 1H), 7.04 (br d, *J* = 7.9, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.4, 1H).

5.1.2 CMB-02633-B

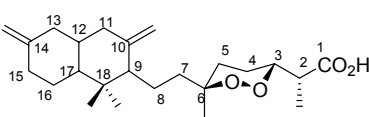
7.7 mg unstable oil (0.77 % yield). Purity (by UV spectrum at 254 nm): 98 % **ESI(+)**MS m/z calculated for $C_{24}H_{38}O_4$ 390.3 found 391.2 $[M+H]^+$, 413.2 $[M+Na]^+$, 429.2 $[M+K]^+$. **HPLC**: t_R 15 min (C_{18} , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA). **1H NMR** ($CDCl_3$, 600 MHz; δ , ppm; J , Hz): 0.84 (d, $J = 6.3$, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.23 (d, $J = 7.1$, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.90 (m, 1H), 2.29 (m, 2H), 2.40 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 4.17 (m, 1H), 4.68 (br d, $J = 2.3$, 1H), 4.92 (s, 1H), 5.17 (br s, 1H)

5.1.3 Trunculin C



0.3 mg unstable oil (0.01 % yield). Purity (by UV spectrum at 254 nm): 99 % **ESI(+)**MS m/z calculated for $C_{24}H_{34}O_5$ 402.2 found 403.6 $[M+H]^+$, 425.6 $[M+Na]^+$. **HPLC**: t_R 10.5 min (C_{18} , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA). **1H NMR** ($CDCl_3$, 600 MHz; δ , ppm; J , Hz): 0.98 (s, 3H, 10- CH_3), 1.05 (d, 3H, $J = 5.6$, 9- CH_3), 1.21 (d, 3H, $J = 8.0$, 2- CH_3), 1.35 (br s, 3H, 6- CH_3), 1.42 (s, 3H, 18- CH_3), 1.83 (dd, 1H, $J = 12.9, 10.7$, H8'), 1.93 (m, 1H, H10), 2.02 (dd, 1H, $J = 12.8, 6.1$, H8'), 2.29 (s, 3H, 14- CH_3), 2.56 (m, 2H, H11, H11'), 2.65 (m, 1H, H2), 3.79 (dd, 1H, $J = 10.9, 5.4$ Hz, H7), 4.27 (td, 1H, $J = 9.0, 3.2$, H3), 6.86 (br s, 1H, H13), 7.02 (br d, 1H, $J = 8.0$, H15), 7.42 (d, 1H, $J = 8.3$, H16)

5.1.4 Trunculin E

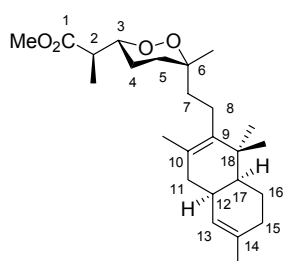


2.9 mg unstable oil (0.9 % yield). Purity (by UV spectrum at 254 nm): 99 % **ESI(+)** MS m/z calculated for $C_{24}H_{38}O_4$ 390.3 found 413.6 $[M+Na]^+$, 429.2 $[M+K]^+$. **HPLC**: t_R 14.8 min (C_{18} , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA). **1H NMR** ($CDCl_3$, 600 MHz; δ , ppm; J , Hz): 0.97 (s, 3H, 18- CH_3), 0.99 (s, 3H, 18- CH_3), 1.19 (d, $J = 7.1$, 3H, 2- CH_3), 1.27 (s, 3H, 6- CH_3), 2.60 (m, 1H, H2), 4.21 (td, $J = 8.7, 4.4$, 1H, H3), 4.52 (br d, $J = 2.2$, 1H, H14), 4.58 (br s, 1H, H14'), 4.66 (br d, $J = 1.7$, 1H, H10), 4.74 (br d, $J = 2$, 1H, H10')

5.2 NEW CHEMISTRY AFFORDABLE TRUNCULINS A & B

5.2.1 Trunculin A methyl ester

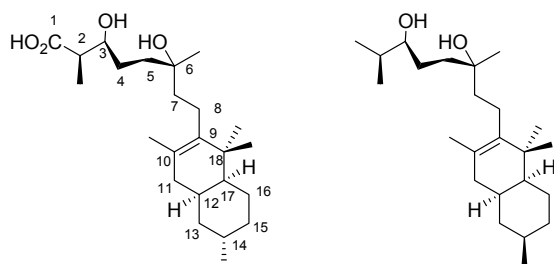
40 mg of natural trunculin A were subjected to form the methyl ester with diazomethane ethereal solution. 40 mg of desired compound were obtained as a white solid product.



Yield: 99 %. Purity (by UV spectrum at 254 nm): 98 %. **ESI(+)** MS m/z calculated for $C_{25}H_{40}O_4$ 404.3 found 405.3 $[M+H]^+$, 427.3 $[M+Na]^+$; **HPLC**: t_R 12.2 min (C_3 , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA). **1H NMR** ($CDCl_3$, 600 MHz; δ , ppm): 0.84 (s, 3H, 18- CH_3), 1.02 (s, 3H, 18- CH_3), 1.13 (d, $J = 8.4$ Hz, 3H, 2- CH_3), 1.15 (s, 3H, 6- CH_3), 1.64 (s, 3H, 10- CH_3 ó 14- CH_3), 1.66 (s, 3H, 10- CH_3 ó 14- CH_3), 2.56 (m, 1H, H2), 3.69 (s, 3H, CO_2CH_3).

5.2.2 Hydrogenation of trunculin A

40 mg of trunculin A (1) were reacted with catalytic amount of 10% Pd/C under H_2 pressure (30 psi) overnight in MeOH. After filtering catalyst, the solvent was removed. 39 mg of C_{14} epimers mixture were obtained. Crude reaction was subjected to purification by HPLC semi preparative system. Conditions: Zorbax C_{18} semiprep column (250 x 9.4 mm, 5 mm), eluting with 4.0 mL/min, isocratic mode of 35 % H_2O , 55 % MeCN, 10 % MeCN (0.1 % TFA) in 25 min. Both epimers (5 & 6) were obtained with high purity (99%).



compound (5): 4.4 mg

ESI(+) MS m/z calculated for $C_{24}H_{42}O_4$ 394.3 found 417.3 $[M+Na]^+$, 377.3 $[M-16]^+$, 393.3 $[M-H]^-$. **HPLC**: t_R 11.0 min (C_{18} , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA). **1H NMR** ($CDCl_3$, 600 MHz; δ , ppm): 0.85 (s, 3H, 18- CH_3), 0.96 (s, 3H, 18- CH_3), 0.99 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, 14- CH_3), 1.29 (br s, 6H, 6- CH_3 , 2- CH_3), 1.58 (s, 3H, 10- CH_3), 2.58 (m, 1H, H2), 3.77 (m, 1H, H3).

compound (6): 6.1 mg

ESI(+)MS m/z calculated for $C_{24}H_{42}O_4$ 394.3 found 417.3 $[M+Na]^+$, 377.3 $[M-16]^+$, 393.3 $[M-H]^-$. **HPLC**: t_R 11.4 min (C_{18} , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA). **1H NMR** ($CDCl_3$, 600 MHz; δ , ppm): 0.81 (s, 3H, 18- CH_3), 0.87 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, 14- CH_3), 0.99 (s, 3H, 18- CH_3), 1.26 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H, 6- CH_3), 1.27 (s, 3H, 2- CH_3), 1.59 (s, 3H, 10- CH_3), 2.56 (m, 1H, H2), 3.74 (m, 1H, H3).

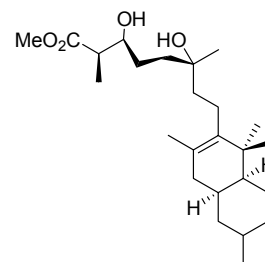
5.2.3 Ester Methyl of (5) & (6)

2.4 mg from compound (5) were subjected to form the methyl ester with diazomethane.

Compound (8) was obtained as a white solid pure compound and quantitative yield. 4.8 mg from compound (6) were subjected to an ester methyl protection with diazomethane ethereal solution. Compound (9) was obtained as a white solid pure compound and quantitative yield.

Compound (8):

ESI(+)MS m/z calculated for $C_{25}H_{44}O_4$ 408.3 found 431.3 $[M+Na]^+$, 391.3 $[M-16]^+$. **HPLC**: t_R 8.5 min (C_{18} , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA).

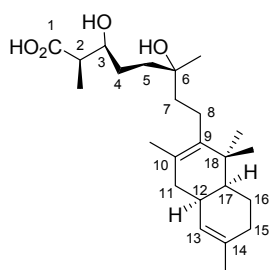


Compound (9):

ESI(+)MS m/z calculated for $C_{25}H_{44}O_4$ 408.3 found 431.3 $[M+Na]^+$, 391.3 $[M-16]^+$. **HPLC**: t_R 8.8 min (C_{18} , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA).

5.2.4 Peroxide reduction of trunculin A

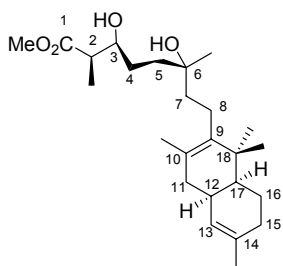
Trunculin A (1) (10 mg) was dissolved in dried MeOH (1 mL) and Mg turnings (20 mg) were added along with a crystal of iodine. After 5 hours the reaction was quenched by the addition of diethyl ether (1 mL) and 10% NH_4Cl_{aq} (1 mL). The ether phase was decanted and the aqueous extracted with two aliquots of Et_2O (1 mL). The ether phase was concentrated in vacuo to yield a crude product (11.2 mg) with a purity of 89%.



Yield: 99 % (without purification). Purity: 89 %. **ESI(+)**MS m/z calculated for $C_{24}H_{40}O_4$ 392.3 found 415.3 $[M+Na]^+$, 375.3 $[M-16]^+$, 391.3 $[M-H]^-$. **HPLC**: t_R 9.4 min (C_3 , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA). **1H NMR** ($CDCl_3$, 600 MHz; δ , ppm): 0.86 (s, 3H, 18- CH_3), 1.10 (s, 3H, 18- CH_3), 1.15 (d, $J = 7.1$, 2- CH_3), 1.19 (s, 3H, 6- CH_3), 1.64 (br s, 6H, 10- CH_3 , 14- CH_3), 2.38 (m, 1H, H2), 3.63 (m, 1H, H3), 5.19 (s, 1H, H13).

5.2.5 Ester methyl of (13)

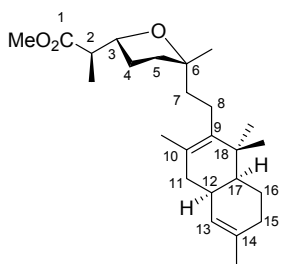
5.6 mg from compound (13) are subjected to form the methyl ester with diazomethane ethereal solution. Compound (14) was obtained as a white solid pure compound, quantitative yield.



ESI(+)MS m/z calculated for $C_{25}H_{42}O_4$ 406.3 found 429.3 $[M+Na]^+$, 389.3 $[M-16]^+$. **HPLC**: t_R 7.9 min (C_3 , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA). **1H NMR** ($CDCl_3$, 600 MHz; δ , ppm): 0.85 (s, 3H, 18- CH_3), 1.05 (s, 3H, 18- CH_3), 1.13 (d, $J = 8.7$, 2- CH_3), 1.18 (s, 3H, 6- CH_3), 1.63 (br s, 6H, 10- CH_3 , 14- CH_3), 2.56 (m, 1H, H2), 3.68 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.72 (m, 1H, H3), 5.17 (s, 1H, H13).

5.2.6 Dehydration of (14)

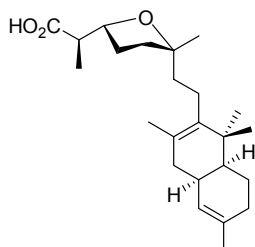
20 mg of compound (14) were reacted with catalytic amount of PSTA in dried benzene (13 mL). The reflux was overnight. Crude reaction analysis by LC/MS revealed presence of desired compound. Solvent was dried and 4 mL of Hexane/AcOEt (1:1) and 4 mL brine were added. Organic phase was washed twice, dried with $MgSO_4$, filter and evaporated. The compound was subjected to a silica gel chromatographic column from hexane to hexane/AcOEt (4:1). 4 mg of desired compound were obtained. 1H NMR analysis revealed presence of isomers mixture. It was probably due to the close ring is not stereochemistry selective reaction.



ESI(+)MS m/z calculated for $C_{25}H_{42}O_3$ 388.3 found 389.3 $[M+H]^+$, 411.3 $[M+Na]^+$, 427.3 $[M+K]^+$. **HPLC**: t_R 13.1 min (C_8 , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA). **1H NMR** ($CDCl_3$, 600 MHz; δ , ppm): 0.83 (s, 3H, 18- CH_3), 1.02 (s, 3H, 18- CH_3), 1.13 (d, $J = 8.8$, 2- CH_3), 1.22 (s, 3H, 6- CH_3), 1.61 (s, 3H, 10- CH_3 o 14- CH_3), 1.64 (s, 3H, 10- CH_3 o 14- CH_3), 2.58 (m, 1H, H2), 3.69 (s, 3H, CO_2CH_3), 4.11 (m, 1H, H3), 5.19 (s, 1H, H13).

5.2.7 Saponification of (15)

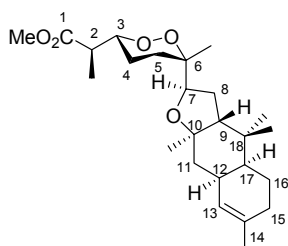
2.3 mg of compound (16) was dissolved in 240 μL of MeOH and 52 μL of aqueous solution 0.1 M NaOH. After 30 min 52 μL of aqueous solution 0.5 M NaOH is added. The reaction is stirring overnight. Then 52 μL of aqueous solution 0.5 M LiOH is added. HPLC analysis revealed a 75 % formation of desired compound. Ph reaction was acidified and products were extracted with AcOEt. The solvent was removed. Product was dissolved in aqueous solution 5 % NaHCO_3 and washed with hexane. Aqueous layer was acidified with aqueous solution 1 N HCl and the product was extract with AcOEt. Final mixture was analysed by MS and final compound was detected as well as starting material.



ESI(+)MS m/z calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_3$ 374.3 found 375.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 411.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 427.3 $[\text{M}+\text{K}]^+$. **HPLC**: t_R 11.1 min (C_8 , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA)

5.2.8 Trunculin B methyl ester

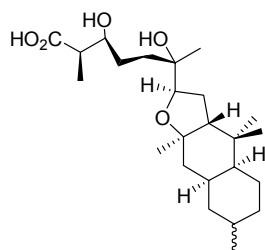
40 mg of natural trunculin B are subjected to form the methyl ester with diazomethane ethereal solution. 40 mg of desired compound were obtained as a white solid product (95 % yield, 96 % purity).



ESI(+)MS m/z calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{O}_5$ 420.3 found 421.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 443.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **HPLC**: t_R 10.2 min (C_3 , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA). **^1H NMR** (CDCl_3 , 600 MHz; δ , ppm): 0.90 (s, 6H, 10- CH_3 , 18- CH_3), 0.99 (s, 3H, 18- CH_3), 1.14 (d, $J = 7$ Hz, 3H, 2- CH_3), 1.19 (s, 3H, 6- CH_3), 1.63 (s, 3H, 14- CH_3), 1.95 (m, 2H, 15- H_2), 2.51 (m, 1H, H2), 2.36 (br d, $J = 10.4$ Hz, 1H, H12), 3.69 (s, 3H, CO_2CH_3), 4.25 (ddd, $J = 5.0, 5.0, 3.0$, 1H, H3), 4.53 (dd, $J = 6.0, 6.0$, 1H, H7), 5.33 (d, $J = 5.3$, 1H, H13).

5.2.9 Hydrogenation of trunculin B

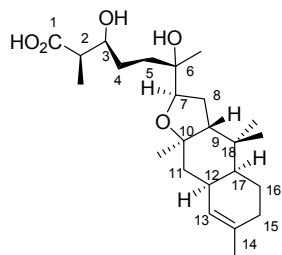
57 mg of trunculin B (2) were reacted with catalytic amount of 10% Pd/C under H_2 pressure (30 psi) overnight in MeOH. After filtering catalyst, solvent was removed. It was obtained 47 mg of desired compound in 70 % purity (82% yield)



ESI(+)MS m/z calculated for $C_{24}H_{42}O_5$ 410.3 found $[M+Na]^+$ 433.3, $[M-16]^+$ 393.3, $[M-H]^-$ 409.3. **HPLC**: t_R 7.9 min (C_{18} , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA).

5.2.10 Peroxide reduction of trunculin B

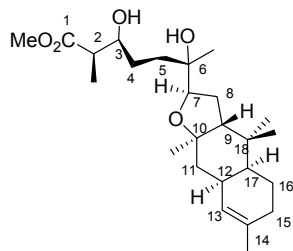
8.2 mg of trunculin B (1) were dissolved in 1 mL of dried MeOH and freshly scratched 16 mg Mg turnings and a tiny crystal of iodine were added. After 5 hours the presence of desired compound and completely lost of starting material were observed in HPLC. Then 1 mL of diethyl ether was added to crude reaction and also 1 mL of 10% NH_4Cl aqueous solution until clear solution. The ethereal phase was taken off and the same procedure was repeated twice. The solvent was dried and 3.7 mg of crude reaction were obtained with a purity of desired compound of 85%. The aqueous phase was acidified and extracted with ether and 3 mg of pure was obtained.



Yield: 75 %. Purity: 85 %. **ESI(+)**MS m/z calculated for $C_{24}H_{40}O_5$ 408.3 found 431.3 $[M+Na]^+$, 391.3 $[M-16]^+$, 407.3 $[M-H]^-$. **HPLC**: t_R 6.9 min (C_{18} , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA). **1H NMR** ($CDCl_3$, 600 MHz; δ , ppm): 0.94 (br s, 6 H, 18- CH_3 , 18- CH_3), 1.09 (s, 3H, 10- CH_3), 1.14 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, 2- CH_3), 1.19 (s, 3H, 6- CH_3), 1.63 (s, 3H, 14- CH_3), 1.98 (m, 2H, H15), 2.40 (m, 1H, H12), 2.50 (m, 1H, H2), 3.69 (m, 1H, H7), 3.87 (m, 1H, H3), 5.35 (d, $J = 5.0$, 1H, H13).

5.2.11 Ester methyl of (13)

1.4 mg of compound (11) was subjected to form the methyl ester with diazomethane ethereal solution.



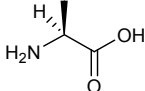
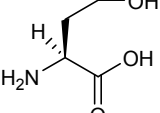
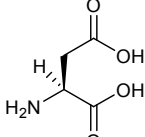
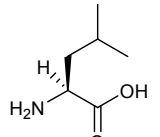
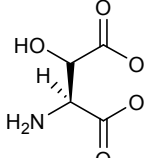
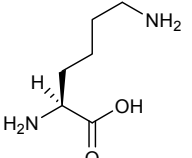
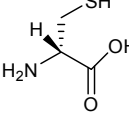
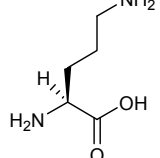
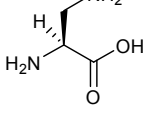
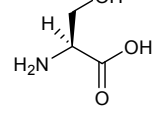
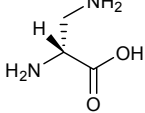
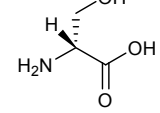
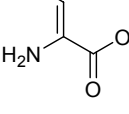
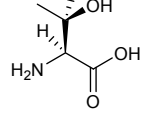
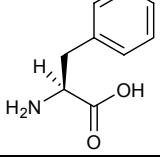
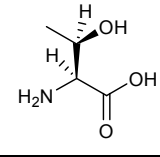
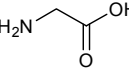
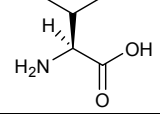
ESI(+)MS m/z calculated for $C_{25}H_{42}O_5$ 422.3 found 445.3 $[M+Na]^+$, 406.3 $[M-16]^+$. **HPLC**: t_R 6.1 min (C_3 , gradient from 5:4:1 to 0:9:1 in 15 min; A: H_2O , B: MeCN, C: MeCN with 0.1% TFA). **1H NMR** ($CDCl_3$, 600 MHz; δ , ppm): 0.94 (br s, 6 H, 18- CH_3 , 18- CH_3), 1.09 (s, 3H, 10- CH_3), 1.12 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H, 2- CH_3), 1.19 (s, 3H, 6- CH_3), 1.63 (s, 3H, 14- CH_3), 1.98 (m, 2H, H15), 2.40 (m, 1H, H12), 2.55 (m, 1H, H2), 3.69 (br envelope, 1H, H7), 3.67 (br s, 3H, CO_2CH_3), 3.87 (m, 1H, H3), 5.35 (d, $J = 5.0$, 1H, H13).

ANNEX 1

**Taules d'aminoàcids,
reactius i grups protectors emprats**

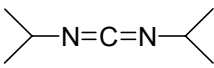
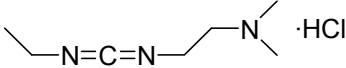
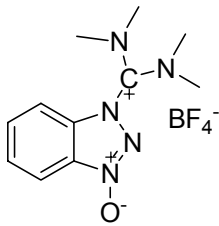
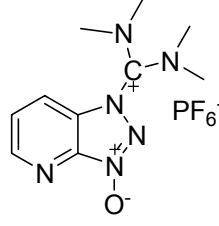
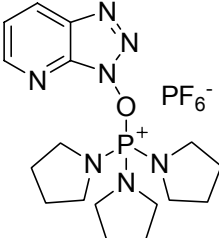
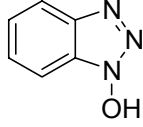
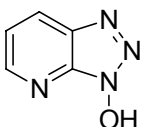
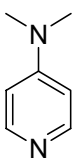
ANNEX 1.1:

Aminoàcids, codi de tres lletres i estructura

Nom	codi	Estructura	Nom	Codi	Estructura
Alanina	Ala		Homoserina	Hse	
Aspàtic	Asp		Leucina	Leu	
(OH)-Aspàtic	(OH)Asp		Lisina	Lis	
D-Cisteïna	D-Cys		Ornitina	Orn	
Àc. α,β -diamiobutíric	Dab		Serina	Ser	
Àc. (α,β)-D-diamiobutíric	D-Dab		D-Serina	D-Ser	
Àc. (Z)-didehidroaminobutíric	(Z)-Dhb		(Cl)-treonina	(Cl)Thr	
Fenilalanina	Phe		Treonina	Thr	
Glicina	Gly		Valina	Val	

ANNEX 1.2:

Agents d'acoblament en la síntesi de pèptids

Nom comú	Nom sistemàtic	Estructura
DIPCDI	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida	
EDC·HCl	Hidroclorur de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	
TBTU	Tetrafluoroborat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamini	
HATU	Tetrafluorofosfat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i>]piridin-1-il-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamini	
PyOAP	Hexafluorofosfat de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidin)fosfoni	
HOBt	1-Hidroxi-benzotriazol	
HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol	
DMAP	<i>N,N'</i> -dimetilaminopiridina	

ANNEX 1.3:

Suports polimèrics i grups protectors

Grup funcional	Nom comú	Estructura	Estabilitat
Amino	Fmoc		Estable: àcids Làbil: bases
Amino	Boc		Estable: bases Làbils: àcids
Amino	Alloc		Estable: àcids, bases Làbil: Pd(0) + nucleòfil
Amino	pNZ		Estable: àcids, bases Làbil: SnCl2 + àcid cat.
Àcid	Al·fil		Estable: àcids, bases Làbil: Pd(0) + nucleòfil
Àcid	-CH2COPh		Estable: àcids, bases Làbil: Zn/AcOH
Alcohol	TBDMS		Estable: bases Làbil: àcids i fluorurs
Alcohol	^t Bu		Estable: bases Làbil: àcids (TFA 40 %)
Tiol	Trt		Estable: bases Làbil: TFA, I2, Hg(II), Ag(I), Ti(III), RSCl
Tiol	Acm		Estable: àcids i bases Làbil: I2, Hg(II), Ag(I), Ti(III), RSCl
Tiol	Npys		Estable: àcids Làbil: RSH, Bu3P
Àcid /Amino	CTC-PS		Estable: Bases Làbil: 1 % TFA
Àcid	Wang		Estable: Bases Làbil: 50 % TFA

ANNEX 2

Nomenclatura abreviada per pèptids cíclics, ramificats, homo- o heterodètics*

** Spengler, J.; Jimenez, J.-C.; Burger, K.; Giralt, E.; Albericio, F., Abbreviated nomenclature for cyclic and branched homo- and hetero-detic peptides, *J. Pep. Res.*, **2005**, *65*, 550-555.

Els pèptids lineals o pèptids cíclics cap-cua poden escriure's de forma lineal mitjançant el codi de tres lletres de cada aminoàcid encadenats per el símbol '-'. No passa el mateix amb els pèptids cíclics cadena-cua, cadena-cap, cadena-cadena, els pèptids ramificats, etc. Les recomanacions de la IUPAC-IUBMB per a la nomenclatura dels pèptids no lineals es basen en l'ús d'editors d'estructures químiques. Les estructures generades per a descriure un pèptid tenen desavantatges respecte les nomenclatures lineals i integrades al text. Per aquest motiu, Spengler i col. han dissenyat una nova nomenclatura per als pèptids ramificats que pot escriure's de forma lineal i integrada en el text. És un codi senzill, visual i precís. La nova nomenclatura es basa en l'ús del símbol '&' per designar nous enllaços químics en la cadena peptídica. Si el compost conté més d'un enllaç químic pot afegir-se índex numèrics (&¹, &², &³,...). El símbol d'enllaç es col·loca en els dos aminoàcids que formen la unió i en funció del grup funcional que participi en la unió el lector pot visualitzar la identitat de la unió (cadena-cua, enllaç ester, pont disulfur, etc).

La nomenclatura proposada resol els dos pèptids objectius de la present tesi i permet descriure el desenvolupament de la seva síntesi d'una forma clara i neta. La Sirengotoxina és un depsipèptid cíclic amb una unió cadena-cua que forma un enllaç ester. L'estructura del pèptid i la representació gràfica proposada per la IUPAC-IUBMB es mostren a la figura següent:

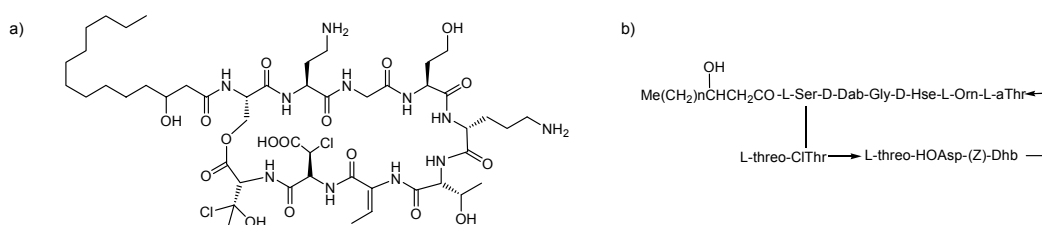
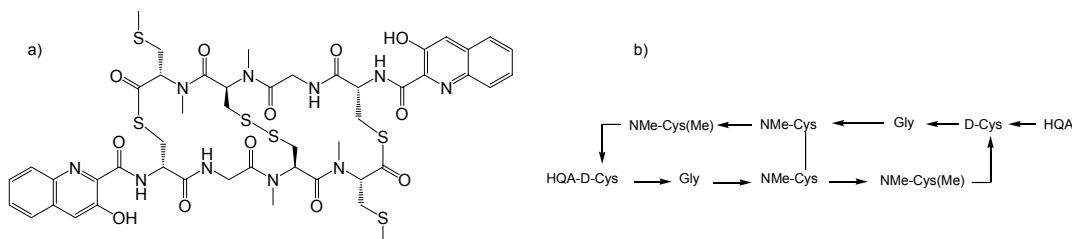


Figura 1.1 a) estructura de la sirengotoxina i b) representació gràfica de la sirengotoxina segons les recomanacions de la IUPAC-IUBMB.

I el nom sistemàtic de la Sirengotoxina d'acord amb la nomenclatura descrita és:

MST-Ser(&)-D-Dab-Gly-D-Hse-Orn-aThr-(Z)-Dhb-treo(OH)Asp-treo(Cl)Thr&

La tiocoralina és un pèptid més ramificat, està format per dues cadenes simètriques disposades de forma antiparal·leles, unides per dos enllaços esters. Un pont disulfur divideix el cicle per la meitat i dos heterocicles s'uneixen als caps de les cadenes peptídiques. L'estructura del pèptid i la representació gràfica que segueix les recomanacions de la IUPAC-IUBMB es mostren a la següent figura:



I el nom sistemàtic de la tiocoralina d'acord amb la nomenclatura descrita és:

[HQA-D-Cys(&¹)-Gly-NMe-Cys(&²)-NMe-Cys(Me)&³] [HQA-D-Cys(&³)-Gly-NMe-Cys(&²)-NMe-Cys(Me)&¹]

Els [] indiquen les cadenes N → C que formen el pèptid. En aquest cas, les dues cadenes peptídiques estan lligades per tres unions: &¹ i &³ simbolitzen enllaços tioesters i &² un pont disulfur.

Les normes de nomenclatura

El sistema de nomenclatura que seguirem al llarg de la present tesis segueix les normes següents:

- 1-. La nomenclatura és compatible amb l'actual nomenclatura de en la química de pèptids
- 2-. '&' representa l'inici o el final d'un enllaç químic i el conjunt de dos '&' representa un enllaç químic.
- 3-. Si hi ha més d'un enllaç químic, s'empren superíndex numèric per identificar les diferents parelles de punts d'unió. Així, &¹ s'uneix a &¹, &² s'uneix a &², etc.

4-. La posició del '&' indica el punt d'unió:

- (i) -&Xaa- la unió s'inicia/finalitza en un extrem N-terminal
- (ii) -Xaa&- la unió s'inicia/finalitza en un extrem C-terminal
- (iii) -Xaa(&)- la unió s'inicia/finalitza en la cadena lateral
- (iv) -(&)Xaa- la unió s'inicia/finalitza en un extrem N-terminal com a segon substituent
- (v) -(&Xaa)- la unió s'inicia/finalitza en el carboni- α de l'aminoàcid Xaa

5-. Si la molècula està formada per dues o més branques (o ponts), aquestes s'escriuen separades dins de claudàtors i les diferents cadenes es recullen en parèntesis, com per exemple {[branca₁][branca₂][pont]}. La branca més llarga s'escriu primer i si tenen la mateixa longitud s'ordena per ordre alfabètic.

6-. La transcripció de pèptids cíclics cap-cua s'inicia amb l'aminoàcid amb major prioritat alfabètica.

ANNEX 3

Espectes de RMN del didehidropèptid

Fmoc-Thr(^tBu)-(Z)-Dhb-OH

Figura 1 . Fmoc-(^tBu)-(Z)-Dhb-OH

Espectre RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz)

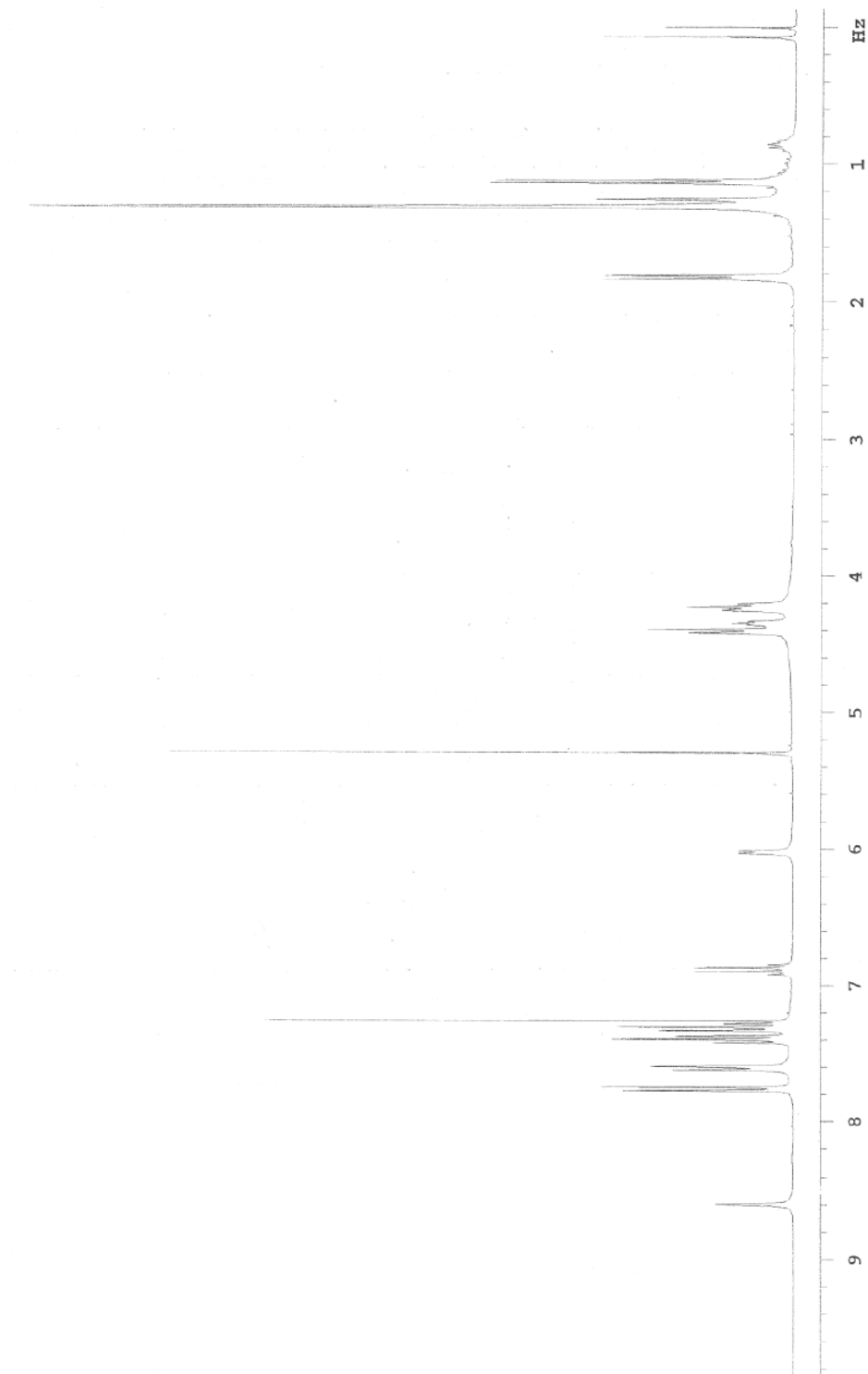


Figura 2 . Mescla d'isòmers Z / E de Fmoc-(^tBu)-Dhb-OH

Espectre RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz)

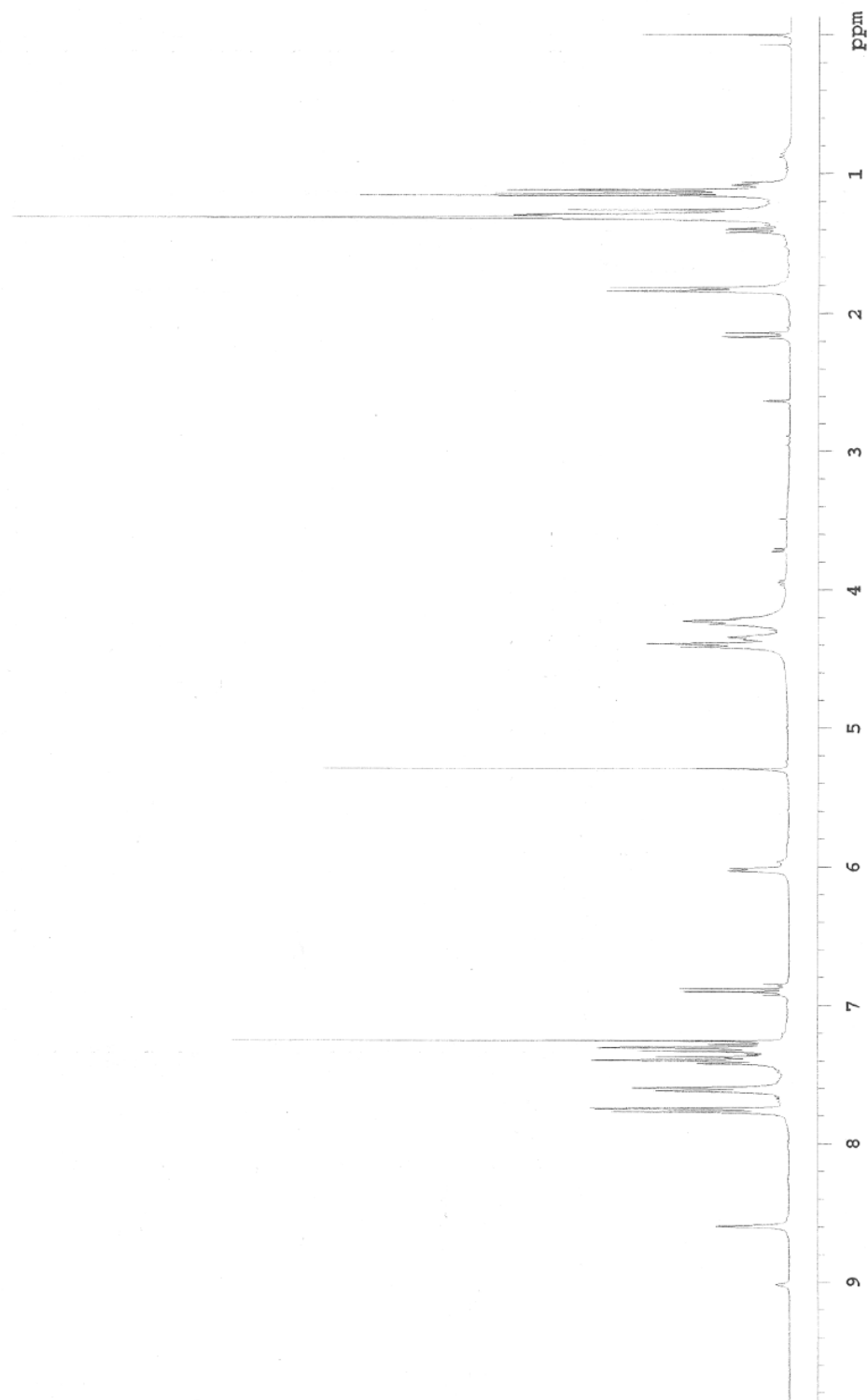


Figura 3. Mescla d'isòmers Z / E de Fmoc-(^tBu)-(Z)-Dhb-OH

Espectre COSY (CDCl₃, 300 MHz)

