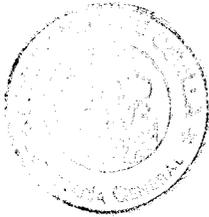


UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA Y FARMACEUTICA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 193 tomo 69 del libro  
correspondiente. NO HAY  
Sevilla: 1990

Modelo del Registro de Tesis

*Alena Laffitte*

INMUNOCOADYUVANTES. SINTESIS DE ANALOGOS RIGIDOS  
DE N-ACETILMURAMIL-L-ALANIL-D-ISOGLUTAMINA (MDP)

Memoria presentada por el Licenciado  
Francisco José Ruiz Rodríguez para  
optar al grado de Doctor en Farmacia

Sevilla, 1.990

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA Y FARMACEUTICA

Vº Bº

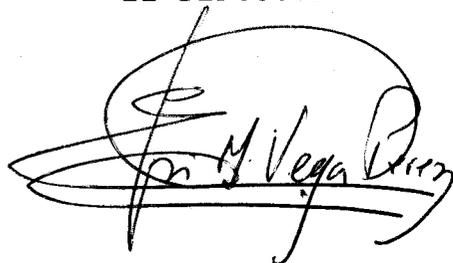
El Catedrático Tutor



Fdo: Felipe Alcudia González  
Catedrático de Química Or-  
gánica de la Universidad de  
Sevilla.

Vº Bº

El Director



Fdo: José Manuel Vega Pérez  
Profesor Titular de Química  
Orgánica de la Universidad  
de Sevilla.

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla bajo la Dirección del Profesor Dr. D. José Manuel Vega Pérez.

Es deseo del autor hacer constar su más sincero agradecimiento:

A D. Juan Antonio Galbis Pérez, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, por las facilidades dadas para la realización de esta Tesis Doctoral.

A D. Felipe Alcudia González, Catedrático de Universidad y Tutor de esta Tesis, por su continuo estímulo a lo largo de la realización de la misma.

A D. José Manuel Vega Pérez, Profesor Titular de Universidad, por su dirección y constante ayuda.

A D. José Luis Espartero Sánchez, Licenciado en Farmacia, por su continua colaboración y su especial contribución a la discusión de los espectros de masas.

A los componentes del Servicio de RMN de la Universidad de Sevilla por la realización de espectros de  $^1\text{H}$ -RMN a 80 MHz,  $^1\text{H}$ -RMN a 200 MHz,  $^{13}\text{C}$ -RMN a 50,3 MHz, así como por la realización de espectros a temperatura variable.

A los componentes del Servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Sevilla por la realización de espectros a alta y baja resolución.

A los compañeros del Departamento que me ofrecieron ayuda y me alentaron en todo momento.

*Para M<sup>a</sup> del Carmen y*

*nuestra pequeña Carmen María*

*"En este momento se están descubriendo inmuno potenciadores que actúan selectivamente sobre ciertos componentes del sistema inmunológico. Posiblemente, a medida que aprendamos a medir y a entender los defectos inmunológicos específicos que se asocian al cáncer o a otras enfermedades, estos inmunopotenciadores más específicos se convertirán en valiosos agentes terapéuticos!"*

*Lloyd J. Old, 1.977*

## I. INTRODUCCION

Desde hace millones de años células procariotas y eucariotas comparten el mismo ecosistema. Tal hecho ha originado una relación intensa y extensa entre las bacterias por una parte y los vertebrados por otra.

Los resultados que se observan de esta relación son, que en muchos casos no es positiva sino que la enfermedad y/o la muerte de los vertebrados da fin a una relación parasitaria u oportunista por parte de las bacterias.

En otros casos, sin embargo, se puede observar otros modos de relación que van desde la mera coexistencia entre bacterias y vertebrados, hasta una verdadera relación simbiótica entre ambos.

Esta situación que podemos llamar de "equilibrio" entre microorganismos y vertebrados se debe a que a través de la evolución, el organismo animal ha ido adaptándose y desarrollando mecanismos de defensa cada vez más potentes, de entre los que destaca el sistema inmune.

Si consideramos, por otra parte, que la mayoría de las procariotas poseen estructuras celulares externas rígidas y prácticamente idénticas en su composición de una a otra especie, y que el sistema inmune de los vertebrados consiste básicamente en un conjunto de células especializadas en distinguir lo propio de lo extraño, no es de extrañar que la estructura molecular externa, común a la mayoría de las procariotas, se erigiera desde tiempos remotos como un motivo de alerta para el sistema inmunológico de los vertebrados.

Desde un punto de vista evolutivo cabe destacar que siendo el sistema inmune de los vertebrados un mecanismo de defensa específico, capaz de estimularse y responder frente a una cantidad prácticamente indefinida de antígenos, ya sean de origen natural como de síntesis artificial, pueda ser estimulado de forma inespecífica por un pequeño grupo de sustancias químicas de origen natural que, desde tiempos ancestrales, han sido espectadores activos en el proceso evolutivo de los seres pluricelulares.

Este singular hecho, de forma exclusivamente empírica y con fines clínicos, fué puesto de manifiesto en 1.925 por G. Ramón, quien demostró que era posible aumentar las respuestas de antitoxina para la difteria y tétanos cuando

se administraban las vacunas junto con bacterias piógenas.

Desde entonces clínicos e inmunólogos han intentado potenciar la respuesta inmune con diferentes agentes, conocidos como inmunopotenciadores, inmunoestimulantes, inmunoadyuvantes o simplemente adyuvantes.

La biotecnología actual, los conocimientos en ingeniería genética y síntesis bioorgánica están permitiendo preparar vacunas sintéticas de muy alta pureza, con epitopos antigénicos hasta hoy imposible de obtener. Desafortunadamente no suelen tener un alto carácter antigénico y su tecnología es cara. Debido a ello, actualmente uno de los objetivos de la investigación inmunológica es conseguir adyuvantes potentes y atóxicos para su incorporación tanto a las vacunas clásicas como a la "nueva generación de vacunas", lo que permitiría facilitar, potenciar y prolongar la respuesta inmune, o bien podrían ser necesarios en casos donde el antígeno sea escaso o su producción costosa.

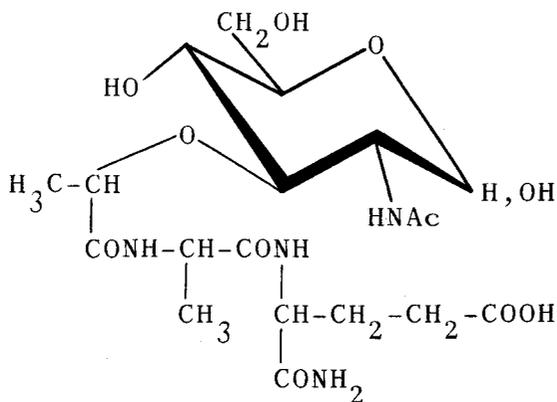
En la pasada década se consiguieron importantes avances en la purificación química de tres adyuvantes de origen bacteriano: Bordetella pertussis, lipopolisacáridos (LPS), y "adyuvante completo de Freund" (FCA). B. pertussis es interesante porque es capaz de modular la inmunidad mediada por células actuando sobre la población de linfo-

citos T. Los LPS y FCA son interesantes por modular la inmunidad celular y la humoral. La capacidad adyuvante de los LPS fué descrita por primera vez en 1.956 por Johnson; son compuestos muy tóxicos y su actividad reside básicamente en una pequeña fracción conocida como Lípido A.

El FCA, uno de los más potentes adyuvantes inmunológicos conocidos, fué preparado en 1.947 por Freund. Debe su actividad a las paredes celulares de las micobacterias muertas que lo compone.

Hace poco más de diez años se consiguió uno de los avances más importantes en el campo de los inmunoadyuvantes al identificarse el muramildipéptido (MDP, 1) como la fracción mínima requerida, derivada de la pared bacteriana, capaz de sustituir a las micobacterias muertas en el FCA. Desde entonces el estudio de los adyuvantes de origen bacteriano se ha sistematizado, y la síntesis química juega un papel principal en cuanto a la búsqueda de los requerimientos mínimos e indispensables para la disociación de las múltiples actividades biológicas que presentan dichos productos.

El interés suscitado por el descubrimiento de la actividad biológica y síntesis del MDP y sus posibles aplicaciones en inmunoterapia, atrajo la atención de muchos



1

investigadores, que basándose fundamentalmente en la diferente funcionalización y cambio de las distintas unidades que forman la molécula de MDP (azúcar y aminoácidos) han conseguido sintetizar muchos nuevos derivados con actividad biológica ( Sección II.2.2. ). Nosotros nos propusimos como tema de investigación la síntesis de unos nuevos análogos del MDP con un perfil de diseño diferente hasta los ahora estudiados. Tratamos de conseguir estructuras parcialmente rígidas, donde la libertad conformacional entre la unidad azucarada y la peptídica quede en parte restringida.

La presente Memoria, en la que se describe la síntesis de nuevos análogos del MDP, se divide en una parte Teórica (II) y una parte Experimental (III). Posteriormente se enumeran las conclusiones (IV) y se recogen las referencias bibliográficas (V).

## II. PARTE TEORICA

## II.1. CONCEPTOS BASICOS DE INMUNOLOGIA

Los vertebrados tienen un mecanismo de vigilancia, llamado sistema inmune, que lo protege de los microorganismos causantes de las enfermedades (patógenos), tales como bacterias y virus, y de las células cancerosas. El sistema inmune reconoce específicamente los invasores extraños y los elimina de un modo selectivo.

El cuerpo humano (como todo vertebrado) presenta en efecto todas las condiciones requeridas, como son: pH, temperatura y nutrientes, para convertirse en una masa pululante de gérmenes y parásitos. Los mecanismos de defensa inmunitario previenen todo esto. En caso de infección, la supervivencia del organismo reposa enteramente sobre su sistema de defensa. Los fármacos, particularmente antibióticos y quimioterápicos, inclinan frecuentemente la balanza a nuestro favor, pero son, primaria y principalmente, los mecanismos de defensa los que se oponen a la infección.

En los vertebrados, la protección inmune está asegurada por un sistema doble que consta de dos mecanismos de defensa básicos contra los invasores extraños. Ambos

mecanismos, el humoral y el celular, responden específicamente a la mayor parte de las sustancias extrañas, aunque generalmente una de las respuestas se halla favorecida. La respuesta inmune celular es particularmente efectiva contra hongos, parásitos, infecciones virales intracelulares, células cancerosas y tejidos extraños. La respuesta inmune humoral se dirige principalmente contra las fases extracelulares de las infecciones bacterianas y virales.

La respuesta inmune depende de una población celular que es capaz colectivamente del procesamiento del antígeno (sustancia o partícula extraña al organismo vertebrado). Dicha población celular pertenece a la serie blanca hemática (leucocitos). Principalmente son dos tipos de células las que se ven involucradas en la respuesta:

- Macrófagos
- Linfocitos

Ambos tipos de células, además de encontrarse en el torrente sanguíneo, maduran, se diferencian e interaccionan en distintos órganos bien definidos: Ganglios linfáticos, Bazo, Timo, Médula ósea, Amígdalas y Sistema reticulo-endotelial, si bien este último no constituye una entidad anatómica como los demás.

Los macrófagos son células grandes, mononucleares

y fagocíticas. Juegan un papel principal en la generación de la respuesta inmune ante un antígeno. Sin la cooperación de los macrófagos sería imposible tanto la respuesta celular como la humoral. Los macrófagos fagocitan los antígenos, y procesandolos de forma adecuada expresan sus determinantes antigénicos (zonas de reconocimiento para lo anticuerpos) en sus propias membranas celulares. Todo ello sin ningún tipo de especificidad.

Por otra parte, la dualidad del sistema inmune se debe al resultado de la existencia de dos poblaciones distintas de linfocitos morfológicamente indistinguibles. A diferencia de los macrófagos, cada linfocito dentro de estas dos poblaciones está preparado para reconocer y responder específicamente a una o varias sustancias extrañas estrechamente relacionadas.

Una población de linfocitos madura en el timo (linfocitos T) y son los responsables de la inmunidad celular. La otra población madura en la médula ósea y son los responsables de la inmunidad humoral (linfocitos B). En cambio, la proliferación y diferenciación de los linfocitos, desencadenada por un antígeno dado, tiene lugar en los órganos linfoides. Minutos después de una infección el antígeno entra en los ganglios linfáticos y es captado y procesado por los macrófagos, expresando éstos en sus membranas

celulares el material altamente inmunogénico para su presentación a los linfocitos específicos. Sólo algunos linfocitos T y B de ambas poblaciones son capaces de interactuar específicamente con los macrófagos portadores de los antígenos procesados. Este fenómeno provoca cambios en la morfología del ganglio linfático y los linfocitos activados forman clones por multiplicación celular.

Los linfocitos B activados producirán anticuerpos específicos para el antígeno. Los anticuerpos son proteínas del tipo de las globulinas, por lo que también se conocen como inmunoglobulinas.

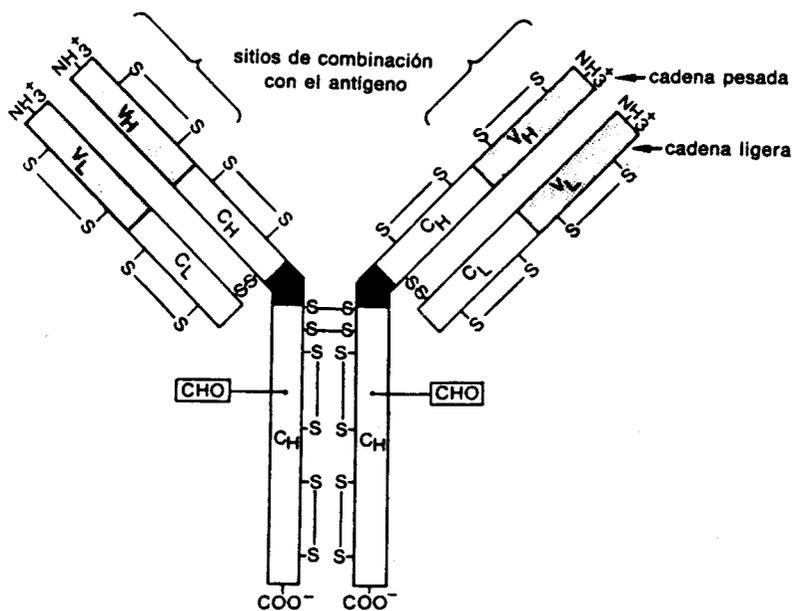


Fig.1. Dibujo esquemático de la molécula de IgG humana, mostrando sus principales características estructurales.

Las inmunoglobulinas tienen la estructura general señalada en la Figura 1, aunque algunas son polímeros de esta unidad básica. La molécula está compuesta por dos pares de cadenas peptídicas, un par de cadenas pesadas y un par de cadenas ligeras. Estas cadenas se encuentran unidas entre sí por puentes disulfuro. Un total de doce puentes disulfuro intracatenarios hace que la estructura sea globular como se muestra en la Figura 2.

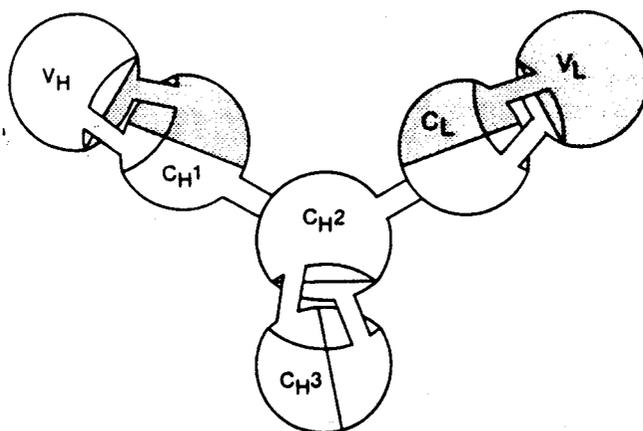


Fig.2. Dibujo esquemático de la estructura globular de la molécula de IgG humana.

En estas figuras se señalan las zonas  $V_H$  y  $V_L$  como las zonas variables (en composición y secuencia de aminoácidos) de la cadena pesada y ligera que son los sitios de

combinación con el antígeno. Las zonas  $C_H$  son las constantes para las cadenas pesadas. Dependiendo de esta zona  $C_H$  se definen cinco tipos de inmunoglobulinas diferentes (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE) con cinco funciones efectoras diferentes. Considerando un grupo como el IgG, pequeñas variaciones en las zonas  $C_H$  hace que se subdivida en otros cuatro grupos (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>). La fracción  $C_L$  es la zona constante de la cadena ligera; ésta además puede ser de dos tipos. Los distintos tipos de inmunoglobulinas poseen diferentes funciones efectoras.

Las IgG son las inmunoglobulinas más abundantes. Es el anticuerpo más importante para la resistencia a la infección. El organismo humano posee 1g de IgG por Kg de peso corporal. Es la única inmunoglobulina que atraviesa la placenta. La IgG materna es, por tanto, el principal agente de la defensa inmunológica del recién nacido. Al 50% se encuentra repartida entre el torrente circulatorio y los líquidos intersticiales.

La IgA se encuentra en el plasma y en las secreciones. En las secreciones se encuentra en forma de dímero, siendo la principal inmunoglobulina contenida en las mismas (saliva por ejemplo).

La IgM es la más voluminosa de las inmunoglobu-

linas. En solución se encuentra en forma pentamérica. Es la primera que se sintetiza durante la respuesta inmunológica. Se puede encontrar en las membranas celulares de los linfocitos B actuando como receptores específicos para antígenos.

La IgD es la menos abundante de las inmunoglobulinas. Su función no es conocida aún. Junto con la IgM puede encontrarse en la membrana celular de los linfocitos B.

La IgE es la única de los cinco isotipos que resulta decididamente citofílica (unida a células). La mayoría se fija a mastocitos, otro tipo de leucocito, los cuales por contacto con un antígeno específico son capaces de liberar histamina y leucotrienos. Representa un importante medio de defensa submucosal porque regula la permeabilidad de los vasos y secreción de las glándulas mucosas. Juega un importante papel en determinados tipos de alergia e infestaciones parasitarias.

De la misma forma que los linfocitos B activados son los responsables de la inmunidad humoral mediante la producción de anticuerpos, los linfocitos T activados son los responsables de la inmunidad celular.

La población de linfocitos T puede dividirse en

dos grupos: Células T auxiliares y Células T efectoras.

Las células T auxiliares específicamente están involucradas tanto en la diferenciación de las células B (productoras de anticuerpos), como en la estimulación de ciertas células T efectoras. Las primeras se conocen como células  $T_H$  (H de Helper) y las segundas como  $T_A$ .

Las funciones efectoras de los linfocitos T son la lisis directa de células antigénicas extrañas, mediada por las células  $T_C$  (C de citotóxicas), y el desarrollo de las respuestas inflamatorias locales crónicas, mediadas por células  $T_D$  (D de Delayed-type hypersensitivity, hipersensibilidad de tipo diferido).

Las células de ayuda  $T_A$  desempeñan una función amplificadora en la maduración de las células  $T_C$  específicas para un antígeno. Aparentemente, las células  $T_A$  reconocen antígenos de la superficie celular o antígenos procesados por los macrófagos, y entonces, de algún modo, estimulan a los precursores de las células  $T_C$  que reconocen otros antígenos (no tienen porqué ser los mismos) en la misma célula blanco, para proliferar y diferenciarse en células efectoras  $T_C$ .

Las células  $T_D$  son las responsables de la infla-

mación crónica local, tal como la hipersensibilidad de tipo diferido. Estas liberan una serie de polipéptidos llamados linfocinas. Estas linfocinas atraen macrófagos y otras células inmunocompetentes al sitio de interacción de las células T con el antígeno.

Por último existe una categoría de linfocitos T, células  $T_S$ , capaces de suprimir la respuesta inmune tanto a nivel celular como humoral.

Bibliografía consultada: 21, 78, 79, 80, 81.

## II.2. ANTECEDENTES

En 1.937, Freund demostró que la incorporación de un antígeno en una emulsión de agua en aceite mineral conducía a un período de producción de anticuerpos prolongado,<sup>4</sup> superior al que se consigue si se administra el antígeno solo. Esta emulsión, en la que el antígeno se encuentra en la fase acuosa, se conoce con el nombre de "Adyuvante Incompleto de Freund" (FIA).

Diez años después, el propio Freund, basándose en las observaciones de Lewis, Loomis, Dienes, Coulaud, Saenz y Canetti,<sup>6</sup> mejoró esta preparación incluyendo en su composición Mycobacterium tuberculosis muertas.<sup>3</sup> Este "Adyuvante Completo de Freund" (FCA) es uno de los adyuvantes más potentes conocidos para la estimulación de la inmunidad tanto humoral como celular. Sin embargo es demasiado tóxico para ser aplicado a nivel clínico, principalmente porque contiene aceite mineral no metabolizable y además porque las micobacterias producen una reacción granulomatosa severa.

Ya en 1.937 escribía Freund que: "Podría ser de

gran interés el identificar la fracción o fracciones que ejerce(n) el efecto adyuvante de las micobacterias y conocer si el efecto puede producirse sin sensibilización a la "tuberculina", reacción inherente al uso de micobacterias.

En un intento de identificar las sustancias químicas responsables de la actividad de las micobacterias muertas, se encontró en 1.958<sup>5</sup> que fracciones liposolubles de bacterias (Wax D) podían reemplazar a las mismas en el adyuvante completo de Freund, produciendo incremento de los niveles de anticuerpos frente a un antígeno e hipersensibilidad de tipo diferido (inmunidad celular).

Durante mucho tiempo se pensó que solamente los derivados liposolubles eran adyuvantes<sup>6</sup>. Pero en 1.972 se aislaron por primera vez adyuvantes solubles en agua (WSA) procedentes de micobacterias. Adan y col.<sup>7</sup> obtuvieron un compuesto bien definido por hidrólisis con lisozima de las paredes celulares de Mycobacterium smegmatis. Compuestos similares se obtuvieron por diferentes investigadores a partir de otras bacterias (M. tuberculosis, BCG)<sup>8,9</sup>. Todos estos adyuvantes solubles estaban compuestos en gran parte de peptidoglicano que es el constituyente clave de la pared celular bacteriana, lo que confirmaba trabajos previos de Freund en el sentido de atribuir a la pared celular de las micobacterias el efecto inmunoadyuvante de las mismas.

Dado el papel clave, como señal de alerta para el sistema inmune de los vertebrados, que juega el peptidoglicano presente en todas las paredes celulares de las bacterias, se expone a continuación su estructura genérica (Figura 3).

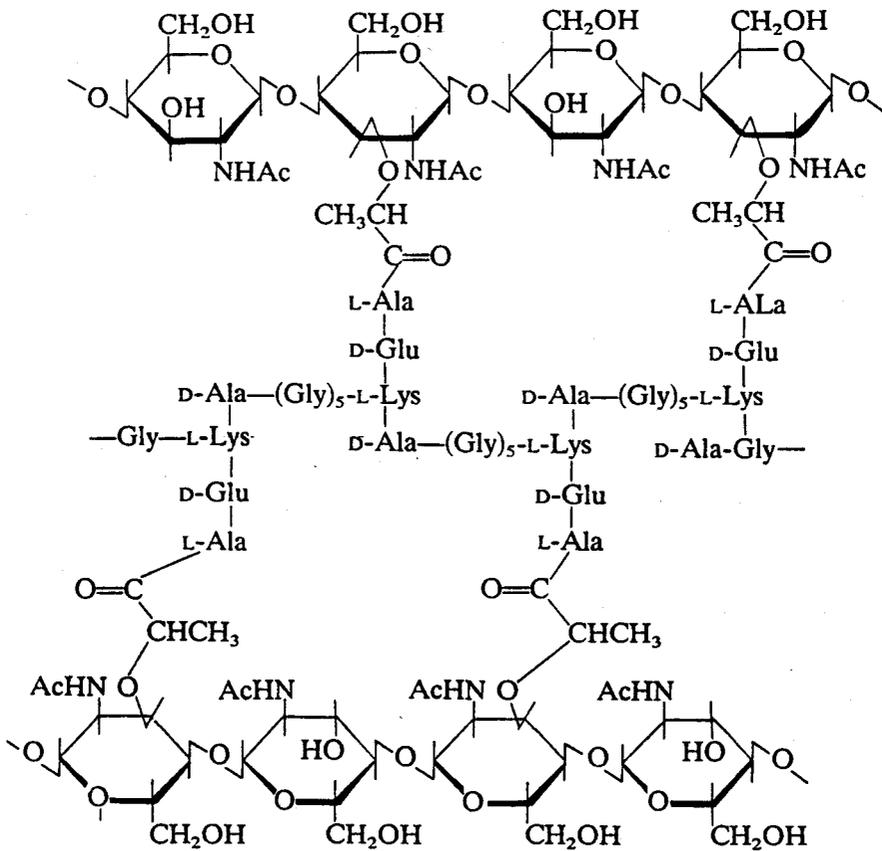


Fig.3. Estructura idealizada del peptidoglicano de la pared celular de Staphylococcus aureus.

El peptidoglicano es un heteropolímero compuesto por cadenas polisacáridicas entrecruzadas a través de pequeños péptidos. La unidad polisacáridica del peptidoglicano es bastante uniforme. Normalmente consta de residuos alternantes de N-acetilglucosamina y ácido murámico (un 3-O-D-lactil-éter de la D-glucosamina) ligados por uniones  $\beta(1-4)$ . La unidad peptídica se enlaza a través de su grupo N-terminal al grupo carboxilo del ácido murámico, y contiene aminoácidos L y D alternativamente. Estas cadenas se unen entre sí directamente o a través de puentes de cortas cadenas peptídicas que pueden variar en su composición. La presencia de aminoácidos con la configuración D es un rasgo característico del peptidoglicano.

En la Figura 4 se muestra la estructura del monómero del peptidoglicano de micobacteria. El grupo N-glicolilo del ácido murámico para estas bacterias y para Nocardia supone criterio taxonómico, puesto que el ácido murámico en otras bacterias es N-acetilado. Esta unidad monomérica puede sustituir completamente a las micobacterias muertas en el "Adyuvante completo de Freund".<sup>11</sup>

La degradación química y enzimática del peptidoglicano de muchas bacterias conduce a la conclusión de que la capacidad inmunoadyuvante es un rasgo común a las paredes celulares de la mayoría<sup>11,12</sup> de las bacterias.

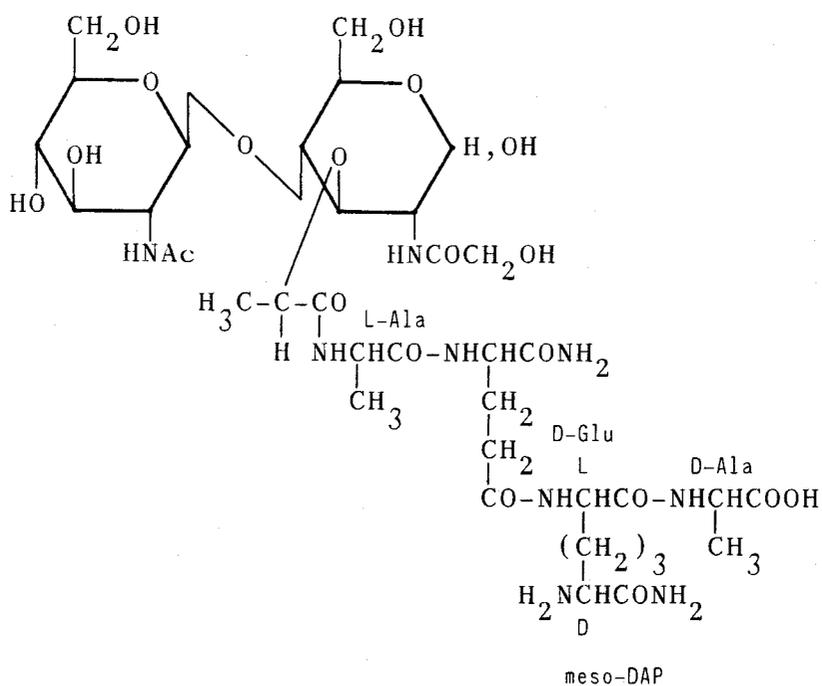
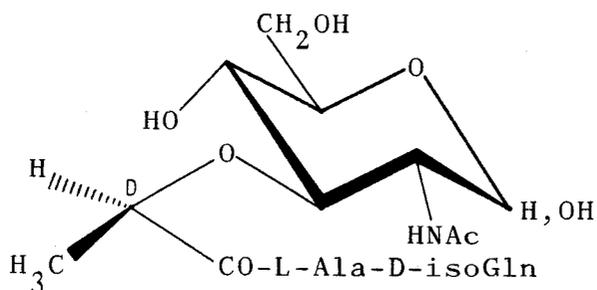


Fig.4. Estructura monómera del peptidoglicano de micobacteria.

De esta forma se consiguió aislar la fracción estructural mínima requerida para la actividad adyuvante: N-acetilmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamina (muramildipeptido, MDP)<sup>13,14</sup> 1. La síntesis posterior confirmó esta observación.<sup>15</sup>



La posibilidad de sustituir las micobacterias muertas en el FCA por compuestos tan relativamente simples como el MDP atrajo la atención de muchos investigadores. En los últimos trece años se han sintetizado cientos de derivados de esta estructura con la finalidad de conseguir moléculas más potentes, menos tóxicas o con un perfil biológico más simple que el propio MDP.

### II.2.1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Antes de introducir la sección II.2.2. RELACION ESTRUCTURA ACTIVIDAD, donde repetidas veces se hablará de aumento, disminución o pérdida de actividad, definiremos las bases biológicas sobre las que se asienta la actividad adyuvante manifestada por las paredes bacterianas (peptidoglicanos), MDP y sus derivados sintéticos estudiados en la siguiente sección (II.2.2.).

Para facilitar la comprensión de los distintos niveles de actuación biológica de estos adyuvantes la sección se divide en cuatro apartados: "Inducción de inmunidad humoral", "Inducción de inmunidad celular", "Mecanismo de acción" y "Otras actividades biológicas".

El MDP es una estructura relativamente simple si se compara con la complejidad molecular de la pared bacteriana. Antes de que se conocieran las actividades biológicas del MDP, se podía responsabilizar a la propia complejidad de la pared bacteriana, de las múltiples actividades biológicas que éstas manifiestan en el FCA.

Actualmente se siguen descubriendo nuevas actividades que comparten tanto las paredes celulares como el MDP. Diferentes autores las han resumido.<sup>6, 16, 17</sup> Las Tablas I y II<sup>16</sup> resumen las actividades biológicas de paredes celulares, MDP y sus derivados sintéticos. En la primera se hace relación de las actividades detectadas "in vivo" y en la segunda las "in vitro".

#### II.2.1.1. INDUCCION DE INMUNIDAD HUMORAL

Determinadas sustancias extrañas a un organismo y conocidas con el nombre genérico de antígenos son capaces de inducir específicamente la producción de inmunoglobulinas (anticuerpos). Otras sustancias en cambio, aunque extrañas al organismo, son incapaces de producir una respuesta humoral normal, permaneciendo los niveles de inmunoglobulinas inalterados. Estas sustancias con poco carácter antigénico son a menudo utilizadas para estudiar el carácter adyuvante de los productos en estudio.

El MDP y sus derivados sintéticos son capaces de inducir una respuesta humoral normal en presencia de antígenos con débil carácter antigénico. Este carácter inmunopotenciador sólo se manifiesta en presencia de un antígeno; así cuando los muramildipéptidos se administran solos no

TABLA I

Actividades biológicas de paredes celulares y muramildipéptidos (in vivo).

- 1.- Modulación de inmunorrespuestas.
  - (a) Potenciación de la respuesta inmune mediada por anticuerpos.
    - Incremento en suero de los niveles de IgG<sub>2</sub> en cobayas, de IgG<sub>1</sub> e IgE en ratones.
    - Activación de células T de ayuda.
  - (b) Potenciación de la respuesta inmune mediada por células.
    - Inducción del efector citotóxico de células T.
  - (c) Inhibición de las inmunorrespuestas mediadas por anticuerpos.
    - Supresión de la respuesta de IgE en ratones.
- 2.- Estimulación del sistema reticuloendotelial.
- 3.- Inducción de monocitosis.
- 4.- Incremento de la producción de interferón.
- 5.- Incremento de resistencia natural a las infecciones microbianas y desarrollo de tumores. Inducción de macrófagos activados y de células NK (Natural Killer).
- 6.- Inducción de enfermedades autoinmunes experimentales: alergia experimental, encefalomiелitis, poliartritis.
- 7.- Pirogenicidad.
- 8.- Inducción de reacción inflamatoria aguda y lesiones granulomatosas crónicas.
- 9.- Producción de reacción necrótica en el lugar de la inoculación junto con bacilo tuberculínico.
- 10.- Incremento de la permeabilidad vascular.
- 11.- Inmunogenicidad.

TABLA II

Actividades biológicas de paredes bacterianas y muramildipéptidos (in vitro).

1.- Modulación de las células involucradas en la inmunidad natural y adquirida.

(a) Monocitos y Macrófagos: actividad quimiotáctica; aumento de la adherencia sobre superficies; inhibición de la migración; estimulación de la diferenciación; inhibición de la síntesis de ADN; incremento de la incorporación de glucosamina; estimulación de la liberación de las enzimas lisosomales; incremento de los niveles de superóxido y glucosa oxidasa; estimulación o inhibición de la fagocitosis; inducción de citotoxicidad o citostasis sobre células tumorales; producción de colagenasa; estimulación de la producción de monokinas.

(b) Linfocitos B: mitogénesis; activación policlonal e inhibición de la activación policlonal inducida por mitógeno; aumento o inhibición de la formación de anticuerpos a antígenos específicos (reemplazando la función de los linfocitos T de ayuda,  $T_H$ ).

(c) Linfocitos T: mitogénesis; aumento de las funciones de ayuda; estimulación de la diferenciación; inducción de las células citotóxicas efectoras; estimulación de reacción linfocítica mixta.

(d) Leucocitos neutrófilos: estimulación o inhibición de fagocitosis.

(e) Leucocitos basófilos: incremento en la captación de histamina.

(f) Mastocitos: estimulación de la liberación de histamina.

(g) Trombocitos: liberación de serotonina.

(h) Aumento de la viabilidad celular.

2.- Activación del complemento por la vía alternativa y clásica.

3.- Estimulación de la resorción ósea.

4.- Gelatinización del lisado de amebocito (ensayo de pirogenicidad).

5.- Contracción de las fibras del íleon.

6.- Estabilización de membranas celulares artificiales.

se observan alteraciones en los niveles de inmunoglobulinas. Este hecho los diferencia claramente de las paredes bacterianas, las cuales sí inducen la formación de inmunoglobulinas incluso en ausencia de antígenos.<sup>18</sup> Por otra parte, el MDP y sus derivados sintéticos solubles son capaces de inducir inmunidad humoral cuando se administran con un antígeno en solución salina;<sup>19</sup> son activos por vía oral e incluso cuando se administran por distinta ruta al antígeno.<sup>20</sup>

Los estudios realizados indican que el tipo de inmunoglobulina inducida por un antígeno en presencia de MDP depende fundamentalmente del método de administración. Así se ha conseguido estimular la  $IgG_1$ ,<sup>18,19,22</sup>  $IgG_2$ ,<sup>18</sup>  $IgE$ ,<sup>23</sup>  $IgG$ <sup>24</sup> e  $IgA$ ;<sup>25,26</sup> efectuando la administración por vía oral en disolución acuosa;<sup>18,19,22</sup> por inyección con vehículo aceite mineral;<sup>18</sup> por vía parenteral conjugados antígeno y MDP;<sup>24</sup> por vía intragástrica;<sup>25</sup> y en forma de aerosol<sup>26</sup> aunque en este caso el antígeno se administra parenteralmente.

Por otra parte, los muramildipéptidos han demostrado estimular la inmunidad humoral para una gran variedad de antígenos naturales (bacterias, virus y protozoos) y sintéticos. Algunas veces sustancias con muy débil carácter antigénico son unidas al MDP con buenos resultados, de esta forma describe J. M. Bernard y col.<sup>27</sup> una vacuna antiluteinizante totalmente sintética. Algunos ejemplos recopilados

por F. Audibert y col.<sup>28</sup> son: toxina diftérica, proteína estreptocócica tipo M-24, enfermedad vírica de pies y boca, proteína del circunsporozoito de Plasmodium knowlesi y antígeno de superficie de la hepatitis B.

En ciertas condiciones experimentales el MDP puede producir un efecto antagónico al descrito. Cuando se administran fuertes dosis antes de la administración del antígeno, se produce inmunodepresión a nivel humoral y celular.<sup>32,33</sup> Ello se debe a la generación de células T supresoras.<sup>33,34</sup>

#### II.2.1.2. INDUCCION DE INMUNIDAD CELULAR

Los muramildipéptidos son capaces de estimular la inmunidad mediada por células (CMI), aunque cuando se administran en soluciones salinas no se detecta este efecto, al menos en los estudios de hipersensibilidad de tipo diferido.<sup>29</sup> Cuando se incrementa la lipofilia del MDP, en cambio, sí se manifiesta el fenómeno de la CMI. El incremento del carácter lipofílico del MDP puede conseguirse por funcionalización química o por incorporación de los mismos en sistemas hidrófobos. Así la incorporación del MDP en emulsiones de aceite mineral (FCA) estimula la respuesta de la CMI<sup>29</sup>; lo mismo ocurre cuando se vehiculizan en liposomas.<sup>30</sup> Los

derivados lipofílicos del MDP son capaces de estimular la CMI sin necesidad de ser incorporados en sistemas físicos hidrófobos, aunque muchos de ellos han sido diseñados para incorporarse a liposomas consiguiendo de esta forma los inductores de inmunidad celular más potentes.<sup>31</sup>

#### II.2.1.3. MECANISMO DE ACCION

A pesar del alto número de publicaciones sobre las propiedades biológicas del MDP, no queda aún completamente claro la cuestión fundamental de cuál es el mecanismo de acción en la respuesta inmune. El estudio de la influencia del MDP sobre distintas células inmunocompetentes, sugiere que no existe un camino único que explique la diversidad de comportamiento biológico que presenta dicha molécula.

Dado el papel clave que juega el macrófago en la regulación de la respuesta inmune, durante mucho tiempo se ha pensado en la posibilidad de que el MDP interaccionara con un receptor localizado en la superficie de estas células. Hasta ahora no existen evidencias sobre la existencia de tales receptores. No obstante, los estudios efectuados muestran que el MDP modifica profundamente muchas funciones biológicas del macrófago (Tabla II). De la misma forma,

también parece actuar sobre células B y T directamente. Es de suponer que de la interrelación compleja con cada una de estas células blanco se produce el efecto de amplificación de la respuesta inmunológica específica humoral y celular.

#### II.2.1.4. OTRAS CARACTERISTICAS BIOLOGICAS

Una nueva actividad ha venido a sumarse a estas otras hace poco años. Los MDP son capaces de inducir sueño de onda lenta en los animales de experimentación. Pappenheimer y col.<sup>35</sup> aislaron del fluido cerebroespinal de animales mantenidos artificialmente en vigilia el llamado "factor S" que es capaz de inducir sueño de onda lenta en otros animales de experimentación. Dicha(s) sustancia(s), de un peso molecular de aproximadamente 920 daltons, ha sido hidrolizada rindiendo ácido murámico, alanina, ácido glutámico y ácido diaminopimélico, constituyentes todos de la pared celular bacteriana. Krueger y col.<sup>36</sup> aislaron el mismo factor en la orina de animales sometidos también a vigilia y ensayaron el MDP como inductor de sueño con éxito.<sup>37</sup>

Este hecho unido a que los animales de experimentación desprovistos de flora intestinal son más susceptibles a las infecciones y no poseen sueño de onda lenta, hace que

los profesores A. Adan y E. Lederer<sup>6</sup> consideren a estas sustancias como una nueva categoría de vitaminas: "Trazas de estos compuestos derivados de la comida (o de la flora intestinal) son indispensables para la salud normal (status inmune y sueño) de nuestro organismo".

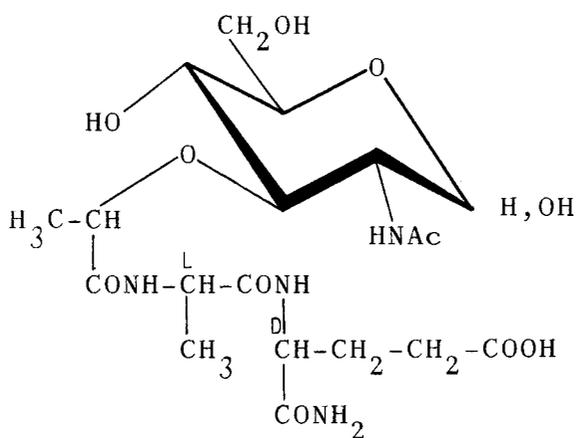
## II.2.2. RELACION ESTRUCTURA ACTIVIDAD

Dada la importancia y variedad de acciones biológicas del MDP no es de extrañar que su estructura haya servido como modelo o prototipo para la preparación de una amplia familia de análogos y derivados. El objetivo buscado es, por un lado, definir la relación estructura-actividad, esto es, conocer los rasgos estructurales presentes en la molécula del MDP que son imprescindibles para su actuación biológica. Por otro lado, y en parte coincidente con lo anterior, se trata de la obtención de sustancias más activas, con actividades biológicas disociadas, eliminación de efectos secundarios, etc. Es decir, llegar a conseguir sustancias que puedan ser usadas clínicamente.

En este sentido, cabe destacar que actualmente se encuentran en fase clínica de estudio algunos derivados que no presentan pirogenicidad ni somnogenicidad para su utilización en vacunas como adyuvantes potentes y seguros.

A continuación se exponen las principales modificaciones introducidas en la molécula del MDP, así como los resultados obtenidos con éstas.

Para el estudio detallado de las modificaciones consideraremos la molécula del MDP (1) como compuesta de dos partes: la cadena lateral de naturaleza peptídica y la fracción de N-acetilglucosamina.



1

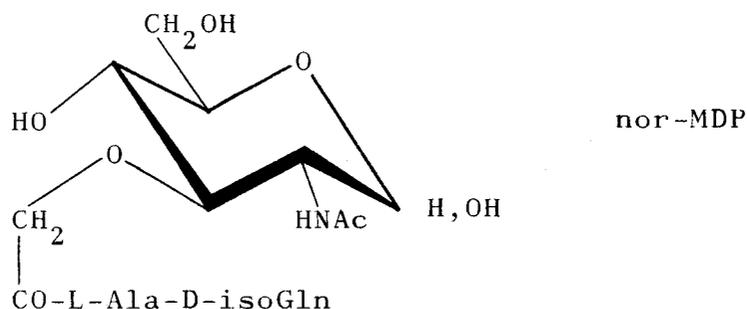
Las modificaciones introducidas en cada una de las partes las estudiaremos por separada. Por otro lado, una línea de investigación que ha resultado muy fructífera es la que ha conducido a la preparación de derivados lipofílicos del MDP. Debido a su importancia la consideraremos aparte, independientemente de cual sea la posición o función modificada.

#### II.2.2.1. MODIFICACIONES EN LA CADENA LATERAL

En primer lugar, el punto de unión de la cadena de naturaleza peptídica al azúcar es crítico. Necesariamente el enlace éter del resto de ácido láctico debe ser con el oxígeno de la posición 3 del azúcar. Los isómeros posicionales donde la unión se realiza en C-4 o C-6 son inactivos.<sup>55</sup>

En segundo lugar, la configuración de los centros quirales de la cadena también es crítica. El resto de ácido láctico debe ser de configuración D, el primer aminoácido debe ser necesariamente L, y el segundo necesariamente D. Así, el derivado N-acetilmuramil-D-alanil-D-isoglutamina (MDP-D-D) no solo es inactivo, sino que bajo ciertas condiciones experimentales es un antagonista del MDP<sup>38</sup> e inmunosupresor.<sup>20</sup> También es inactivo el compuesto N-acetilmuramil-L-alanil-L-isoglutamina (MDP-L-L).<sup>38,40</sup>

En tercer lugar, los residuos ácidos que forman la cadena lateral pueden en algunos casos cambiarse, respetando lo dicho anteriormente para las configuraciones. El resto de ácido láctico puede ser cambiado por ácido acético; el compuesto se llama nor-MDP (2) y es menos activo<sup>38</sup> pero menos tóxico<sup>39</sup> que el MDP. Este hecho es frecuentemente mencionado en literatura de patentes.



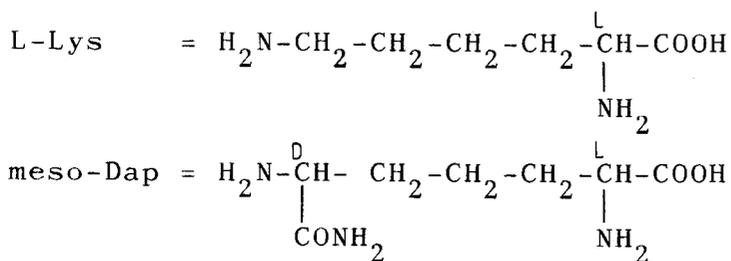
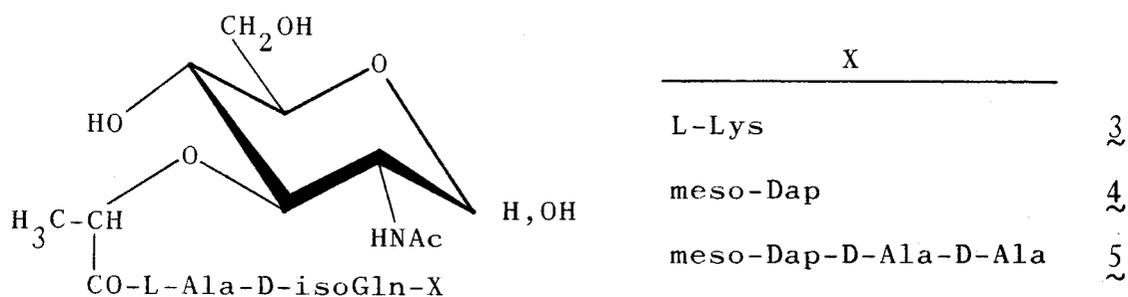
2

La L-alanina se puede reemplazar por diversos L-aminoácidos (o glicina); los análogos con L-serina, L-valina y ácido L- $\alpha$ -aminobutírico parecen ser más activos que el propio MDP.<sup>39</sup>

El residuo de ácido D-glutámico es, en cambio, esencial; el análogo con ácido D-aspártico<sup>38,40</sup> es inactivo. La funcionalización del D-Glu es importante. Por ejemplo, el grupo  $\alpha$ -amido presente en el MDP no es esencial para la actividad.<sup>19</sup> La N-metilamida es activa,<sup>20</sup> mientras que la N,N-dimetilamida es inactiva.<sup>6</sup> Por otra parte, los ésteres  $\gamma$ -metílico y  $\alpha,\gamma$ -dimetílico son fuertemente activos.<sup>20</sup>

Los compuestos con cadenas largas de péptidos, tales como el MDP-L-Lys (3) y el MDP-meso-Dap (4) y el muramilpentapéptido MDP-meso-Dap-D-Ala-D-Ala (5) son adyuvantes

activos.<sup>11</sup> Las largas cadenas mimetizan a los derivados naturales obtenidos por tratamiento hidrolítico de las paredes bacterianas.



#### II.2.2.2. MODIFICACIONES EN LA FRACCION DE AZUCAR

Con el fin de sistematizar las modificaciones más importantes, las podemos plantear en tres niveles:

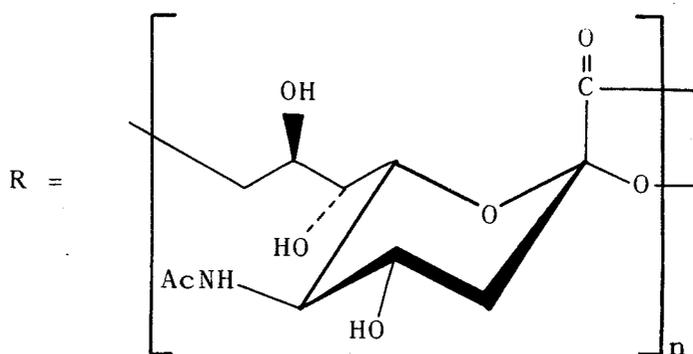
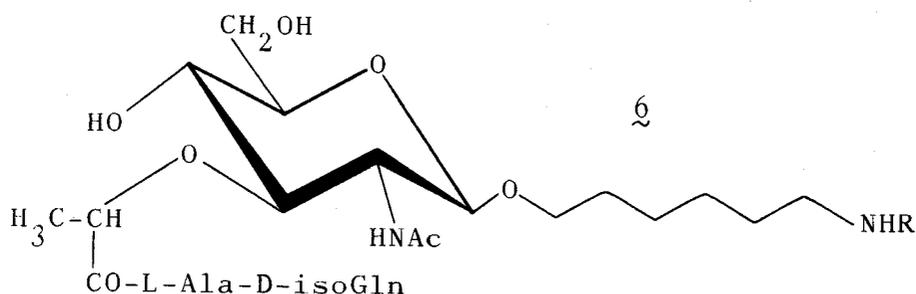
- a) Bloqueo de los distintos hidroxilos del azúcar.
- b) Cambio de los heteroátomos del aminoazúcar por otras funciones. Es decir, cambio de alguno

de los oxígenos o del grupo acetamido por otros grupos.

c) Cambios configuracionales.

a) En cuanto al primer apartado hay que decir que el aprovechamiento de la reactividad de los diferentes hidroxilos ha dado lugar a la síntesis de numerosos compuestos.

Así, la acilación del oxígeno anomérico con diferentes ácidos grasos ha conducido a sustancias activas.<sup>53</sup> Por otra parte, se han obtenido numerosos glicósidos, tanto  $\alpha$  como  $\beta$  utilizándose diferentes aglicones, la naturaleza y el estado anomérico del aglicón puede influir profundamente en la actividad biológica de la sustancia. Así el metil  $\beta$ -glicósido de la N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina es un adyuvante más potente que el correspondiente  $\alpha$ -glicósido.<sup>51</sup> Con una orientación diferente se han preparado los  $\omega$ -aminoalquil  $\beta$ -glicósidos del MDP<sup>52</sup> ( $\zeta$ ); el grupo terminal se condensó con un antígeno polisacarídico de meningococo para realzar su caracter inmunogénico; es decir, el aglicón se ha utilizado como nexo de unión entre el inmunoadyuvante y el antígeno.



En otro sentido, el hidroxilo de C-6 también ha sido acilado o alquilado. Mientras que la acilación ha originado numerosos compuestos activos, como por ejemplo el 6-O-mesil-MDP;<sup>56</sup> la alquilación conduce, generalmente, a compuestos inactivos.<sup>56</sup>

b) El cambio de un hidroxilo o el grupo acetamido por otros radicales ha conducido, asimismo, a la síntesis de numerosos compuestos. Los casos estructuralmente más simples son los de la obtención de desoxiazúcares. Así, el cambio de OH anomérico por H da lugar al 1-desoxi-MDP de actividad adyuvante comparable al propio MDP.<sup>57</sup> Cuando la

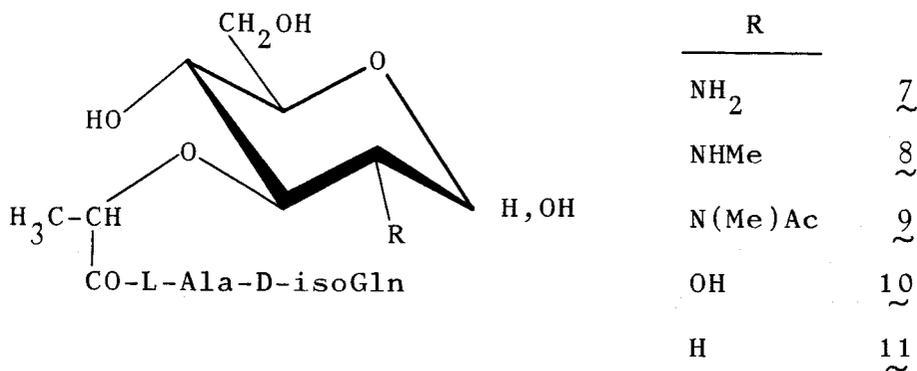
modificación se efectúa en C-4 y C-6<sup>57,58</sup> se obtienen productos inactivos. Asimismo, el cambio del grupo acetamido por H, cambio que origina el 2-desoxi-MDP,<sup>54</sup> conduce a un compuesto inactivo.

Otra línea muy fructífera ha sido la de cambiar algún grupo hidroxilo por un -SH o por un -NH<sub>2</sub> (cambios isostéricos). Así se ha sustituido por azufre el oxígeno anomérico y el oxígeno de las posiciones 3, 5 y 6 del azúcar. En este sentido hay que destacar que el 1-tiomuramil-L-alanil-D-isoglutamina<sup>41-43</sup> es de una actividad comparable al MDP, siendo capaz de estimular la inmunidad humoral y celular. La sustitución del oxígeno en C-3 por azufre (3-tio-MDP)<sup>44</sup> conduce a un producto con escasa actividad, si se compara con el MDP, por lo que dicho oxígeno debe jugar un papel importante en la actividad de la molécula. Este oxígeno en C-3 es particularmente interesante, pues por él se une la fracción peptídica a la azucarada. La sustitución del oxígeno en C-5 por azufre conduce a compuestos inactivos.<sup>45</sup>

Los cambios de oxígeno por nitrógeno se han efectuado en C-3<sup>46,47</sup> y en C-6,<sup>48-50</sup> originando en este último caso compuestos activos. En cambio, la sustitución del oxígeno anomérico por nitrógeno<sup>57</sup> (derivados de la  $\beta$ -piranosilamina) conduce a sustancias inactivas. Por otra parte, el cambio

del hidroxilo en C-6 por bromo conduce a pérdida de actividad.<sup>50</sup>

Finalmente es interesante considerar el cambio del grupo acetamido de C-2 por otros grupos. Así, la sustitución de dicho grupo por un grupo amino (desacetil-MDP), metilamina, amida sustituida (metilacetamida) o hidroxilo conduce a derivados activos (7-10).<sup>54,55</sup> Sin embargo, no puede ser sustituido, como se ha dicho antes, por un protón (11). Estos y otros resultados obtenidos sugieren que la presencia de grupos capaces de participar en enlaces por puentes de hidrógeno es esencial para la actividad.



c) El último nivel de modificación de la fracción azucarada del MDP consiste en cambios configuracionales realizados en las posiciones quirales. A. Hasegawa y col.<sup>55,59,60</sup> han sintetizado los derivados D-alo, D-gulo, D-ga-

lacto, D-mano y L-ido. Sólo los derivados D-mano y D-galacto, epímeros en C-2 y C-4 del derivado natural, muestran actividad. Estos resultados sugieren que la configuración de los centros C-3 y C-5 son críticas para la manifestación de la actividad biológica, mientras que la de C-2 y C-4 son poco importantes. Por otra parte, el enantiómero del compuesto natural, derivado de la L-glucosa es inactivo.<sup>55</sup> Asimismo, es importante señalar que es fundamental la presencia del carbono C-6 funcionalizado con las posibilidades antes comentadas, ya que el derivado de la D-xilosa es inactivo.<sup>49,50</sup>

#### II.2.2.3. DERIVADOS LIPOFILICOS

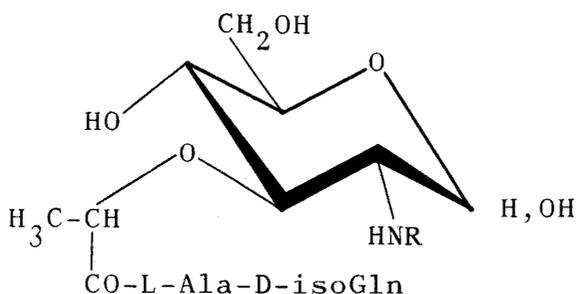
Como ya se ha mencionado, el MDP aumenta la respuesta humoral incluso cuando se administra en solución salina, aunque la estimulación de la respuesta inmune mediada por células (CMI) requiere la presencia de aceite mineral. No obstante, esta estimulación puede conseguirse, evitando los inconvenientes del aceite mineral, mediante la utilización de derivados lipofílicos del MDP, los cuales además presentan, en general, una marcada actividad antitumoral. Por esta razón, la síntesis y el estudio de este tipo de derivados es de gran interés.

La introducción de una cadena lipofílica en C-6

del resto de N-acetilglucosamina del MDP conduce a compuestos tales como 6-O-micolil-MDP, 6-O-nocardomicolil-MDP y 6-O-corinomicolil-MDP, investigados por diferentes autores japoneses<sup>62-65</sup> que exhiben fuerte actividad antitumoral y son solo débilmente pirogénicos

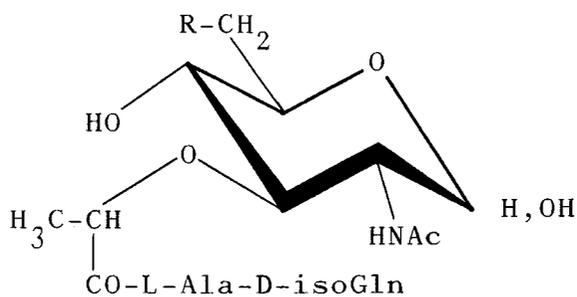
Compuestos más simples como el 6-O-estearoil-MDP se muestran muy activos.<sup>66</sup> La introducción de la cadena lipofílica en C-6 a través de una función amida (6-acilamido-MDP)<sup>48-50</sup> conduce también a compuestos antitumorales basados en la fuerte estimulación de la inmunidad celular. Por otra parte, los 2-acilamido análogos (12-14) en los que el resto acilo son de ácidos grasos, en lugar del resto de acetilo natural, son compuestos con capacidad antitumoral o, al menos, supresores del crecimiento tumoral.<sup>50,67,68</sup> El nitrógeno en C-2 se ha acilado también con restos ácidos presentes en el lípido A,<sup>68</sup> componente de los lipopolisacáridos (LPS) de las paredes bacterianas que de por sí presentan capacidad inmunoadyuvante. Los compuestos así obtenidos (15-18) son fuertemente activos.

La cadena lipofílica puede ser introducida en C-1, bien como éster<sup>53</sup> o como tioéster<sup>41-43</sup> presentando en ambos casos actividad inmunoadyuvante y antitumoral. Asimismo, la alquilación del azufre anomérico del 1-tioMDP, ya mencionado, con cadenas grasas conduce a productos activos.<sup>42</sup>



R	m	
	12	12 ~
$-\text{CO}-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_3$	14	13 ~
	16	14 ~
	10	15 ~
$-\text{CO}-\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_3$	12	16 ~
	14	17 ~
$-\text{CO}-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_3$ $\quad \quad \quad  $ $\quad \quad \quad (\text{CH}_2)_{13}-\text{CH}_3$		18 ~

Entre los derivados grasos de cadenas complejas cabe destacar el B30-MDP (6-O-(2-tetradecilhexadecanoil)-MDP), 19, el cual se ha propuesto como un candidato seguro y potente adyuvante para mejorar la eficacia de las vacunas.<sup>16</sup> El derivado 6-O-(2-docosiltetracosanoil)-MDP, 20, muestra potente actividad en los test supresor de tumores.<sup>66</sup>

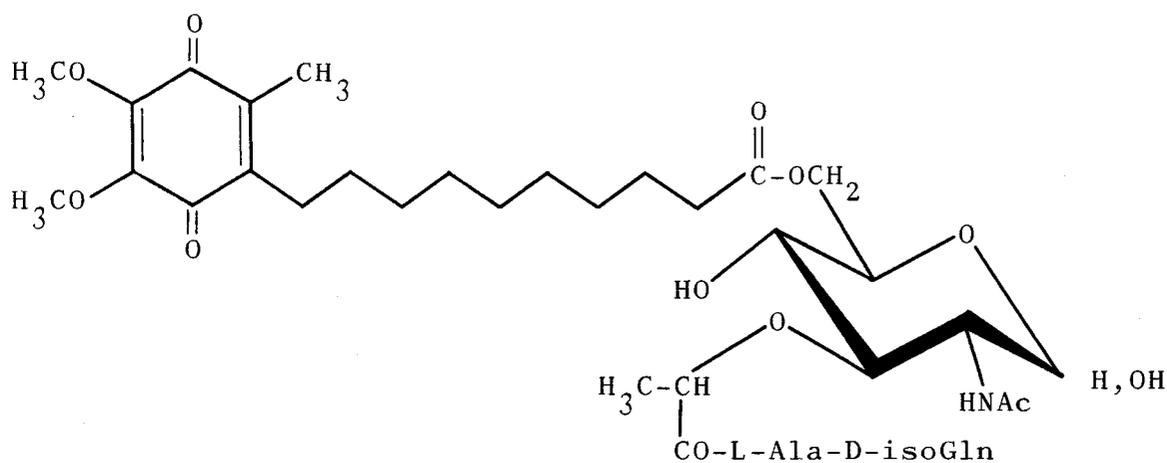


R			
$H_3C-(CH_2)_m$	\	CH-COO-	m = 13      19
$H_3C-(CH_2)_m$	/		m = 21      20
$H_3C-(CH_2)_{21}$	\	CH-O-P-O-	21
$H_3C-(CH_2)_{21}$	/	$\begin{array}{c} O \\    \\ OH \end{array}$	

En un afán de mimetizar las estructuras externas bacterianas, aunque simplificando su complejidad, M. Imoto y col.<sup>70</sup> sintetizaron el 6-(2-docosiltetracosil hidrogenofosfato)-MDP, 21, compuesto que guarda gran similitud con 20. Ambos productos responden de forma similar al test supresor de tumores, pero 21 se muestra muy activo en el test de la regresión tumoral para el cual es inactivo 20. La evaluación de la capacidad antitumoral por el test de la regresión tu-

moral es más cercano a las condiciones actuales de la inmunoterapia clínica. A la luz de estos resultados se podría especular que el parecido estructural entre el compuesto 21 y los fosfolípidos podría ser responsable de su alta actividad biológica; basándose en la facilitación de la interacción del compuesto con las membranas de las células animales.<sup>70</sup>

Se han preparado varios ésteres del MDP derivados de diferentes ácidos de las ubiquinonas y algunos de ellos, en particular el producto 22, presentan fuerte actividad antitumoral.<sup>69</sup>



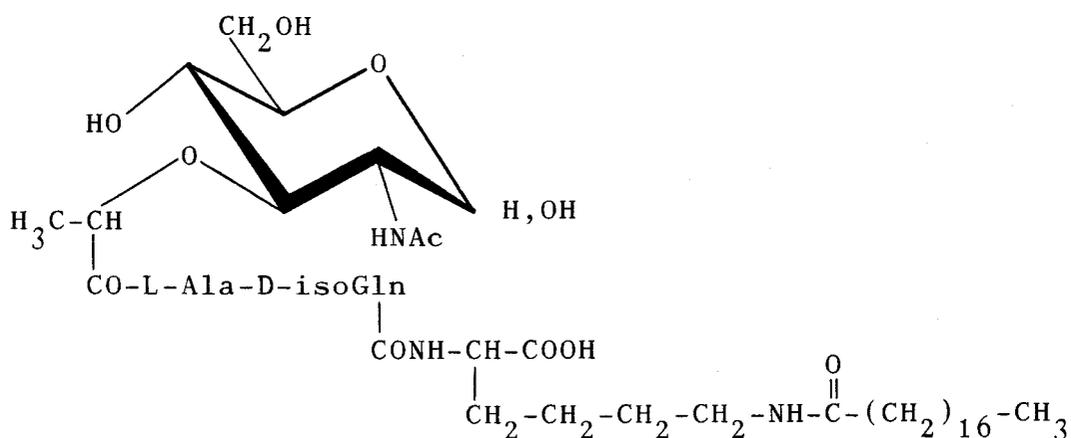
22  
~

Un tipo diferente de derivados lipofílicos complejos del MDP es el que porta la unidad lipídica al final de

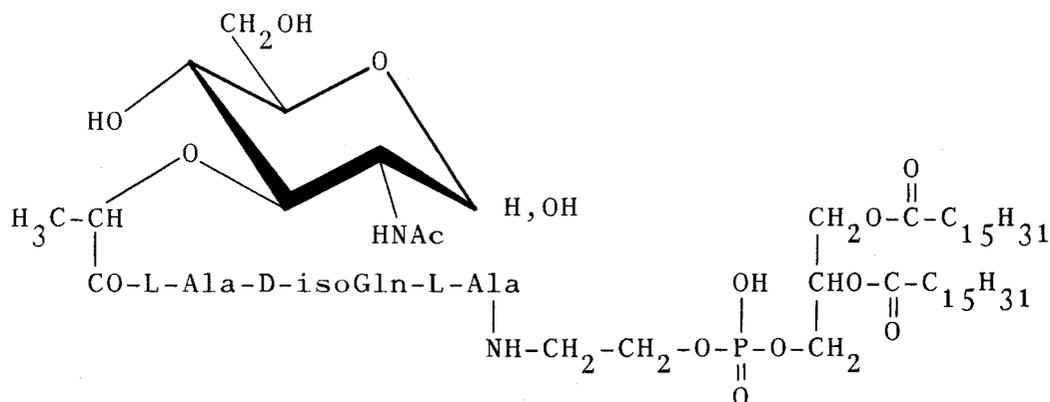
la cadena peptídica. El derivado MDP-L-Ala-glicerol-micolato (MurNAc-L-Ala-D-isoGln-L-Ala-OCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>O-Myc) produce una fuerte estimulación de la resistencia inespecífica contra infecciones bacterianas<sup>71,72</sup> y conduce a una marcada respuesta de hipersensibilidad incluso cuando se administra en solución salina.<sup>73</sup>

Se han sintetizado muchos análogos tales como MurNAc-L-Ala-D-isoGln-L-Lys(Myc), MurNAc-L-Ala-D-isoGln-NHCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O-Myc y algunos dimicolil derivados del MDP, aunque la introducción del segundo grupo micolilo no ha conducido a ninguna ventaja farmacológica.<sup>74</sup>

La estearoilamida, 23, MurNAc-L-Ala-D-isoGln-L-Lys-ε-NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CH<sub>3</sub>, es fuertemente activa en infecciones producidas por Escherichia coli y estafilocócicas.<sup>75</sup>

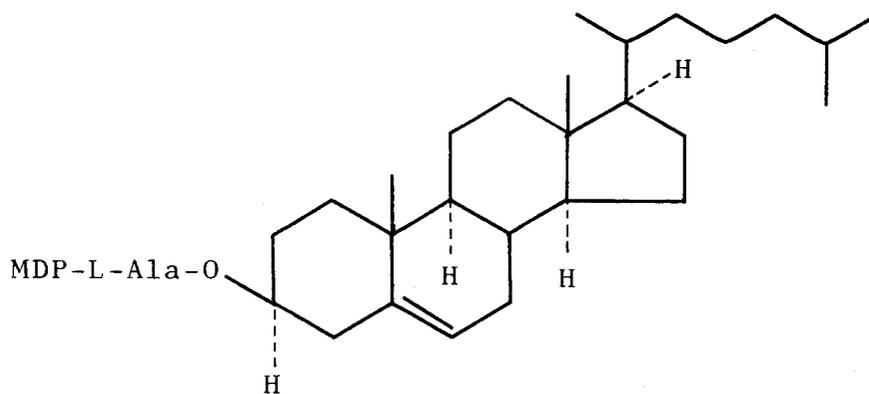


Muchos derivados lipofílicos del MDP se han incorporado en liposomas con excelentes resultados. Este es el caso de MDP-L-Ala-fosfatidiletanolamina (MTP-PE), 24.<sup>76</sup>



24  
~

Gran parte de la información sobre derivados lipofílicos del MDP se encuentra protegida bajo patentes. Recientemente ha sido patentado un éster del colesterol<sup>77</sup> derivado del MDP-L-Ala (MTP-Chol), 25, el cual se emulsiona fácilmente en liposomas y activa fuertemente a los macrófagos murinos para la actividad citotóxica contra el mastocitoma singénico P815 y a los macrófagos de rata para la citotoxicidad contra el melanoma B16-BL6.<sup>6</sup>



II.3. OBJETIVOS: SINTESIS Y CARACTERIZACION DE ANALOGOS  
RIGIDOS DEL MDP

II.3.1. OBJETIVOS

La actividad de la mayoría de los fármacos se debe a mecanismos de acción químicos. En tales casos los fármacos son de acción muy potente, es decir, que actúan a dosis muy pequeñas, estando relacionada la acción farmacológica con la presencia de ciertos grupos funcionales que interaccionan con estructuras macromoleculares conocidas como receptores.<sup>82</sup>

Los receptores son macromoléculas, generalmente de naturaleza proteica, situados normalmente en la superficie pero también en el interior de la célula efectora (biofase) con las cuales interacciona la sustancia biológicamente activa para producir una respuesta determinada.

La interacción neta fármaco-receptor es el resultado de la suma de numerosas interacciones débiles de diversa naturaleza entre los grupos funcionales del fármaco, adecuadamente insertos en una estructura hidrocarbonada,

y los del receptor. Para que sea eficaz debe establecerse un número suficiente de interacciones, por lo que ambos, fármaco y receptor, deben ser complementarios.

Como por otra parte, y según se ha dicho, los receptores son de naturaleza proteica, con un alto grado, por tanto, de información quirál, se comprende la repercusión que las características estereoquímicas de una sustancia tienen sobre su actividad biológica.

Tal repercusión ha quedado de manifiesto, en lo que respecta al MDP, en la parte de Antecedentes (II.2.2.) en la que se comenta cómo cambios configuracionales en determinados centros quirales del MDP conducen a pérdida de actividad.

El grado de asimetría del receptor suele ser tan grande y la necesidad de su complementariedad con el fármaco tan estricta, que éste no solo debe ser de configuración definida sino que interacciona con el receptor a través de una o muy pocas de sus conformaciones posibles. En fármacos que son conformacionalmente flexibles esto puede significar una pérdida de eficacia, ya que la conformación complementaria al receptor (conformación farmacófora) puede no ser la más estable de las posibles que el fármaco pueda adoptar y por tanto no será la más abundante en el equilibrio.

Efectivamente el MDP es un fármaco que responde a esta situación, al menos en cuanto a flexibilidad conformacional se refiere. Es evidente que si se consiguiera "congelar" el equilibrio, fijando de alguna manera la conformación (o una de las conformaciones) reactiva(s), se obtendría un compuesto que exhibiría una gran actividad, al mismo tiempo que suministraría información acerca del receptor (o receptores) con el (los) que interacciona el producto prototipo (en nuestro caso el MDP) para ejercer la acción (en nuestro caso acciones) que presenta.

En síntesis, la cuestión estriba en obtener sustancias análogas al prototipo (MDP) menos flexibles conformacionalmente, rigidez conformacional que se puede alcanzar mediante la formación de ciclos.

Esta ha sido la idea que ha guiado la realización de la presente Memoria, en la que se describe la síntesis del 3-acetil-(2,3-didesoxi-D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (26).

La sustancia 26 es un análogo rígido del MDP. Formalmente puede considerarse derivado de él mediante la formación de un enlace entre el carbono 2 del resto de ácido láctico de la cadena lateral y el nitrógeno de la posición 2 del aminoazúcar, tal como se presenta en la

Figura 5 . Esto supone la formación de un anillo de oxazolidina condensado con el aminoazúcar. Por lo demás posee los rasgos constitucionales y configuracionales propios del MDP, con la excepción de no ser derivado del ácido láctico (R= Me) sino del ácido 2-hidroxiacético (R= H) por ser éstos menos tóxicos.<sup>38,39</sup>

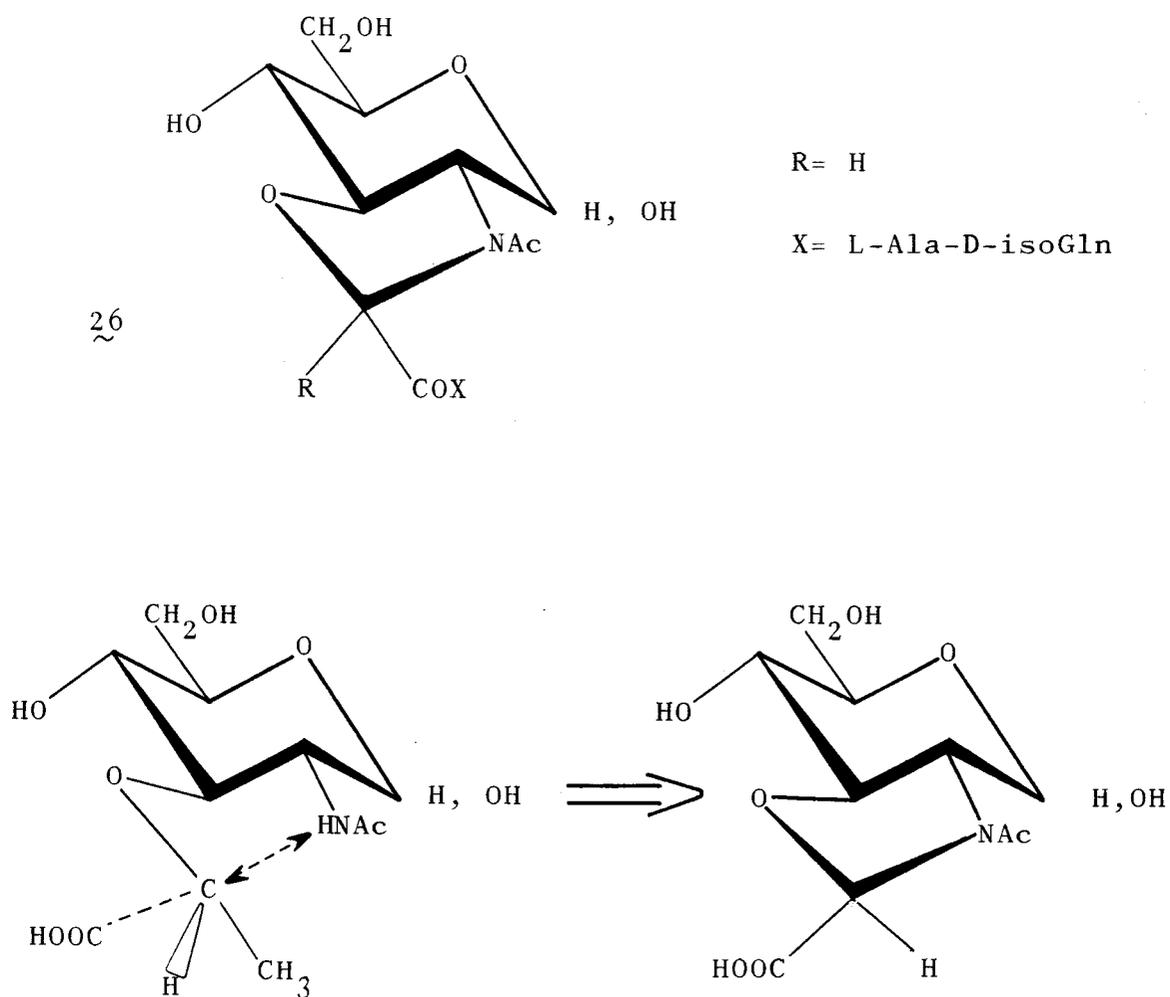


Figura 5

En la Figura 6 se muestra la proyección de Newman alrededor del enlace O3-C3 del azúcar, tanto del compuesto natural (MDP) como de la sustancia cuya síntesis es el objetivo principal de esta Tesis. Se observa cómo el lactoildipéptido, representado por X, que antes podía ocupar, en principio, todas las posiciones punteadas (Figura 6A), queda obligado a ocupar una única posición en el espacio por la creación de un nuevo enlace C-N que supone la formación del anillo de oxazolidina (Figura 6B).

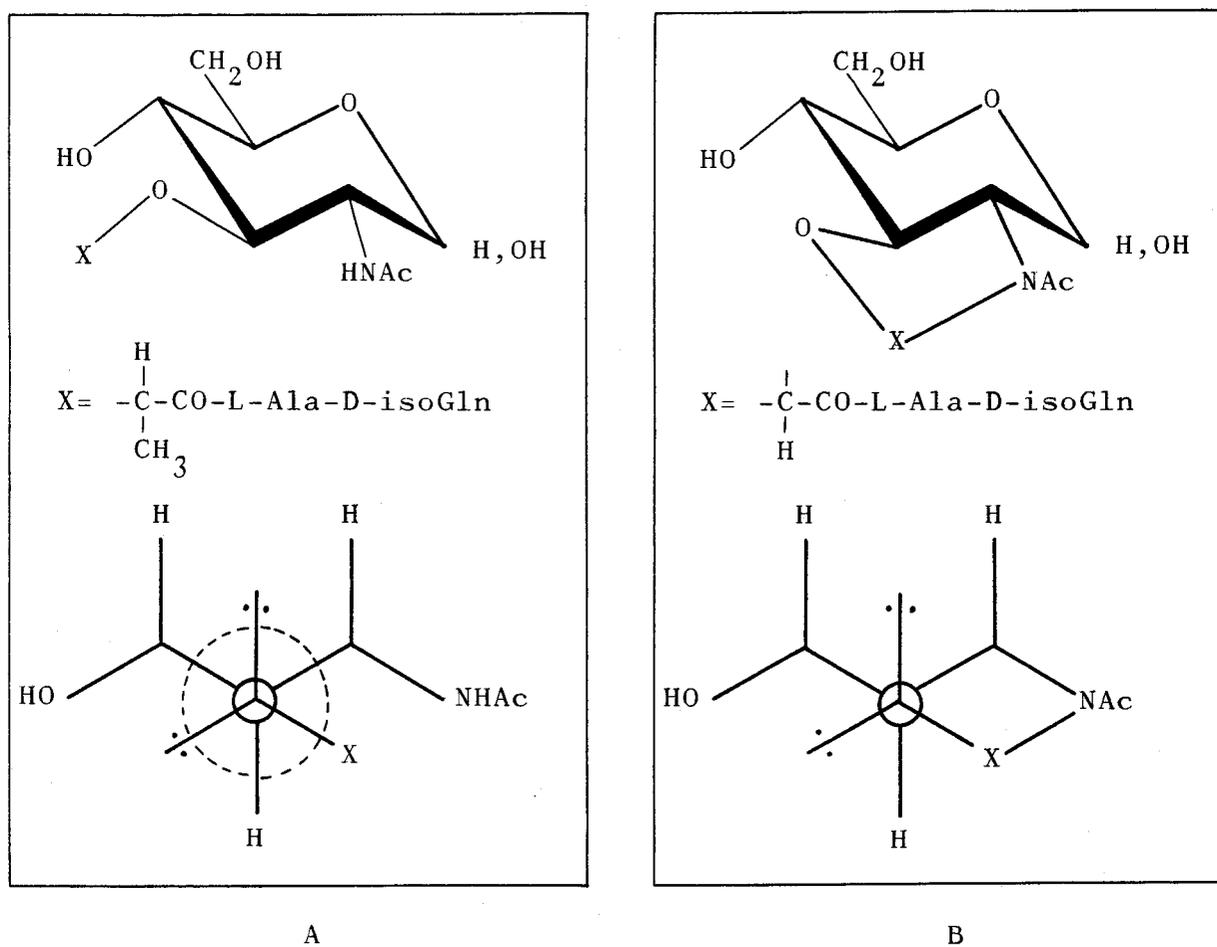
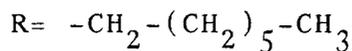
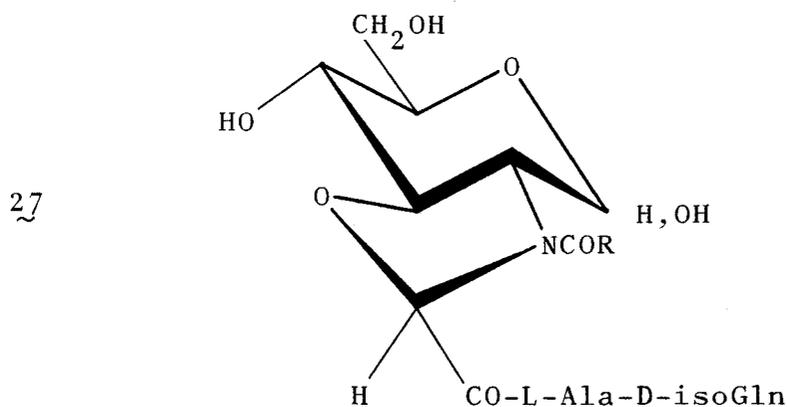


Figura 6

Como ha quedado de manifiesto en la parte de Antecedentes (II.2.2.), muchos derivados lipofílicos del MDP exhiben a menudo una mayor actividad que el propio prototipo. Particularmente interesante es el caso en el que la cadena grasa se introduce en la posición 2 o 6 del aminoazúcar. Teniendo en cuenta este hecho nos hemos propuesto como un segundo objetivo de la tesis la síntesis del 3-n-octanoil-(2,3-didesoxi-D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (27).



La sustancia 27, además del rasgo que le comunica rigidez conformacional, posee una cadena grasa en forma de amida en la posición 2 del aminoazúcar.

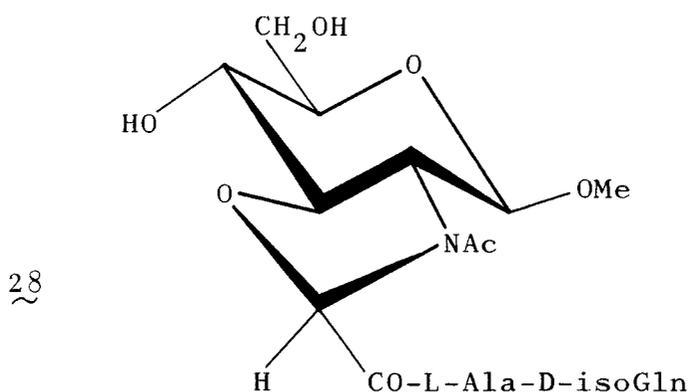
Por otra parte, se ha comentado en los Antecedentes

tes que los derivados del MDP en los que el hidroxilo anomérico está bloqueado en forma de glicósido son sustancias activas. Teniendo esto en cuenta se ha planteado también como objetivo de esta Tesis la síntesis de glicósidos de los análogos rígidos del MDP citados anteriormente.

La razón por la que se aborda la síntesis de estos compuestos es la siguiente : Dada la existencia de un anillo de oxazolidina condensado con el aminoazúcar, es lógico pensar que en estos análogos rígidos del MDP como 26 el equilibrio: forma hemiacetálica  $\rightleftharpoons$  forma aldehídica libre esté más desplazado hacia la derecha que en el compuesto natural (MDP).

Esta predicción, como se expone más adelante, ha sido confirmada por medidas de RMN. El que esto ocurra introduce un factor de incertidumbre a la hora de analizar unos resultados biológicos hipotéticamente negativos de los análogos rígidos del MDP sintetizados en esta Memoria, ya que se podrían atribuir a la presencia del anillo de oxazolidina, cuando es posible que se debiera a la mayor proporción de forma aldehídica en el equilibrio. Dicho de otra manera, la restricción del equilibrio conformacional aumenta la posibilidad de desplazar el equilibrio constitucional. Por todo ello nos hemos propuesto también como objetivo la

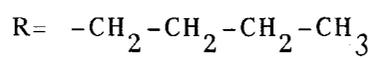
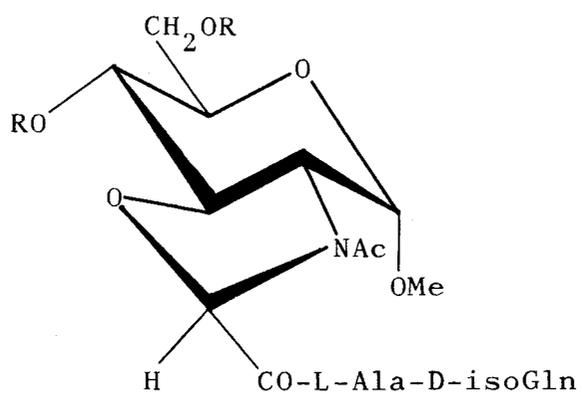
síntesis del 3-acetil-(2,3-didesoxi-1-O-metil-  $\beta$ -D-glucopirán )-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (28).



Como se puede apreciar se trata, una vez introducida la modificación que le da rigidez conformacional, mantener en lo posible la "forma" del compuesto natural, "atrapando" la forma hemiacetálica en forma de glicósido.

Finalmente nos hemos propuesto la síntesis de una sustancia que aúna los tres rasgos que hemos estado considerando: rigidez conformacional como modificación básica, presencia de glicósido para mantener la "forma" y la presencia de grupos que aumenten la lipofilia de la molécula. Se trata de la síntesis del 3-acetil-(4,6-di-O-n-butyl-2,3-dideoxy-1-O-metil-  $\alpha$ -D-glucopirán )-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (29).

29



### II.3.2. SINTESIS DE LOS DERIVADOS RIGIDOS DEL MDP

La síntesis de los derivados rígidos del MDP, compuestos 26, 27, 28 y 29, se ha realizado en cuatro fases a partir del hidrocloreuro de 2-amino-2-desoxi-D-glucosa (30).

En una primera fase se protegen de manera adecuada aquellos grupos funcionales del aminoazúcar que no interesan que tomen parte en las reacciones posteriores.

En una segunda fase se estudia la formación del anillo de oxazolidina, condensado con la glucosamina, a partir del aminoazúcar convenientemente protegido y ácido dicloroacético.

La tercera fase de la síntesis trata de la condensación del ácido obtenido anteriormente con el dipéptido convenientemente protegido.

Finalmente, en una cuarta fase, se procede al desbloqueo de los grupos funcionales que se protegieron en la primera fase.

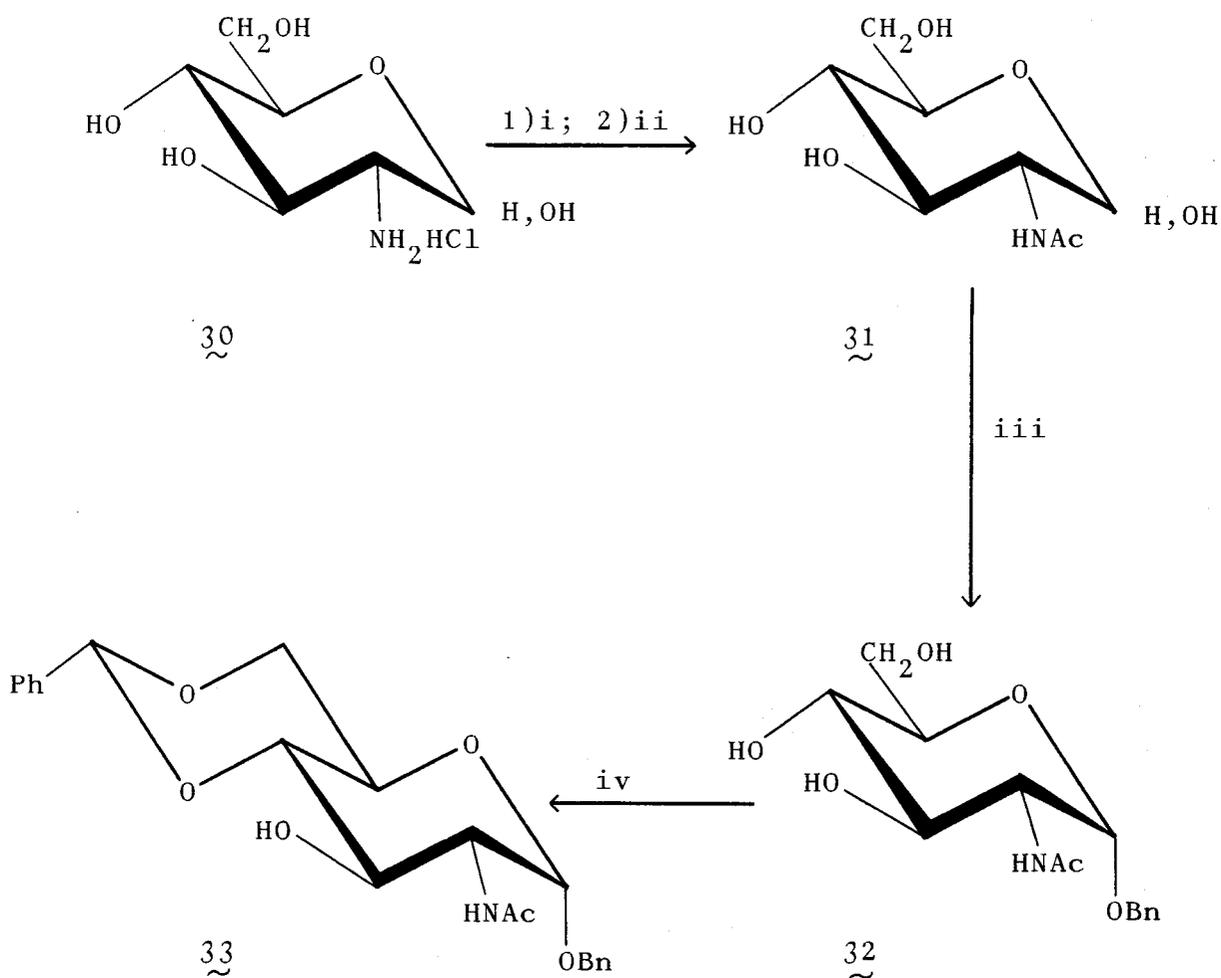
Consideraremos en primer lugar la síntesis de las sustancias 26 y 27 en la que el hidroxilo anomérico se encuentra libre. Estudiaremos en segundo lugar la preparación de las sustancias 28 y 29 en las que el hidroxilo anomérico queda bloqueado en forma de metil glicósido.

II.3.2.1. Síntesis de 3-acetil(n-octanoil)-(2,3-didesoxi-D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (26 y 27).

En el primer paso de síntesis se obtiene la 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa (31) por tratamiento de una disolución saturada de la base libre del aminoazúcar en metanol con anhídrido acético.<sup>83</sup> El segundo paso consiste en la reacción de este compuesto con una disolución al 2% de cloruro de hidrógeno en alcohol bencílico, lo que nos permite obtener el bencil 2-acetamido-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (32).<sup>84</sup> Por reacción del bencil glicósido 32 con benzaldehído, en presencia de cloruro de cinc, se prepara el bencil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (33).<sup>85</sup> (Esquema 1).

De esta manera quedan bloqueados en la D-glucosamina el hidroxilo hemiacetalico en forma de glicósido y los hidroxilos 4 y 6 en forma de acetal mediante un grupo benci-

lidén. El grupo amino queda funcionalizado como amida del ácido acético. Grupos estables en las condiciones básicas necesarias para la formación del anillo de oxazolidina.



$i = \text{Na}/\text{MeOH}$ ;  $ii = \text{Ac}_2\text{O}$ ;  $iii = \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}/\text{HCl}$  seco;  $iv = \text{C}_6\text{H}_5\text{CHO}/\text{ZnCl}_2$

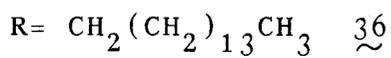
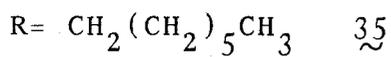
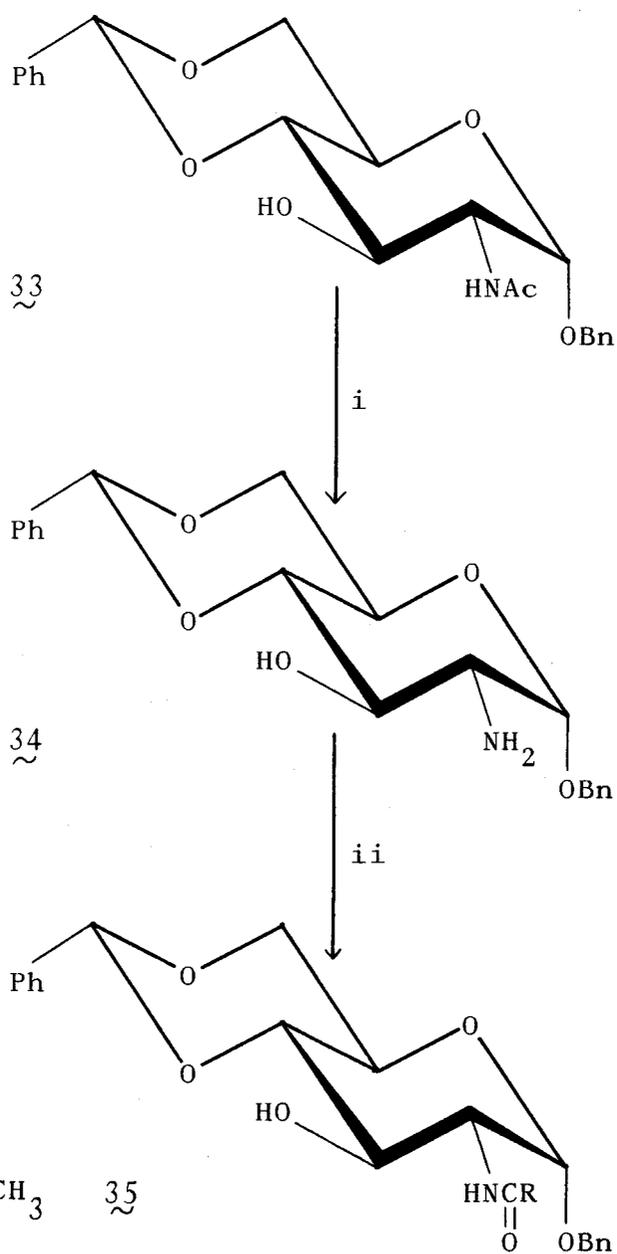
$\text{Ac} = \text{COCH}_3$ ;  $\text{Bn} = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ;  $\text{Ph} = \text{C}_6\text{H}_5$

ESQUEMA 1

La sustancia  $\underline{33}$  es además precursora en solo dos pasos del compuesto  $\underline{35}$  (Esquema 2). La hidrólisis alcalina enérgica de  $\underline{33}$  conduce al bencil 2-amino-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido ( $\underline{34}$ )<sup>85</sup>. Finalmente, la acilación selectiva de  $\underline{34}$  con cloruro de n-octanoilo en piridina nos permite obtener el bencil 4,6-O-bencilidén-2-desoxi-2-n-octanamido- $\alpha$ -D-glucopiranosido ( $\underline{35}$ )<sup>86</sup>; la acilación selectiva de  $\underline{34}$  con cloruro de palmitoilo en piridina nos permite obtener el bencil 4,6-O-bencilidén-2-desoxi-2-palmitamido- $\alpha$ -D-glucopiranosido ( $\underline{36}$ )<sup>86</sup>.

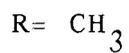
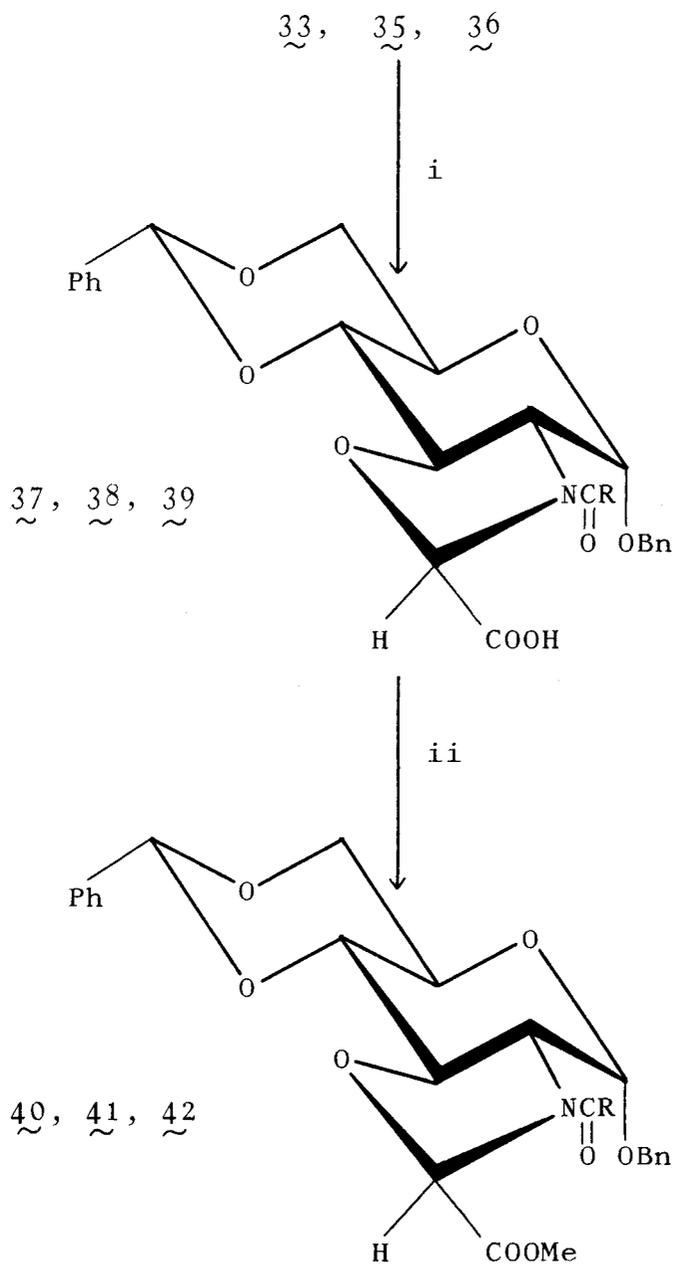
Los compuestos  $\underline{33}$ ,  $\underline{35}$  y  $\underline{36}$  responden a las mismas características estructurales, a salvedad del grupo amino que en el producto  $\underline{33}$  queda funcionalizado como amida del ácido acético, en el  $\underline{35}$  del ácido n-octanoico y en el  $\underline{36}$  del ácido palmítico (n-hexadecanoico).

En la segunda fase de síntesis se hacen reaccionar los productos  $\underline{33}$ ,  $\underline{35}$  y  $\underline{36}$  con la sal sódica del ácido dicloroacético, en presencia de hidruro sódico, obteniéndose respectivamente la 3-acetil-2-carboxi-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina ( $\underline{37}$ ), la 2-carboxi-3-n-octanoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina ( $\underline{38}$ ) y la 2-carboxi-3-palmitoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina ( $\underline{39}$ ) (Esquema 3).

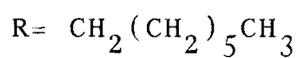


i= KOH, EtOH; ii= ClCOR, Py.

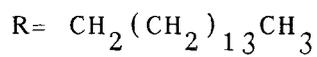
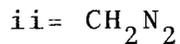
ESQUEMA 2



37, 40



38, 41



39, 42

ESQUEMA 3

En la tercera fase se ha estudiado la síntesis de derivados simples de los ácidos 37, 38 y 39 (ésteres metílicos, y diferentes amidas derivadas del amoníaco y diversos L-aminoácidos), así como la condensación con la cadena peptídica.

Los derivados más simples de los ácidos 37, 38 y 39 han sido preparados con fines de confirmación estructural. Así se obtienen los ésteres metílicos de los tres ácidos por tratamiento con diazometano, productos 40, 41 y 42 (Esquema 3).

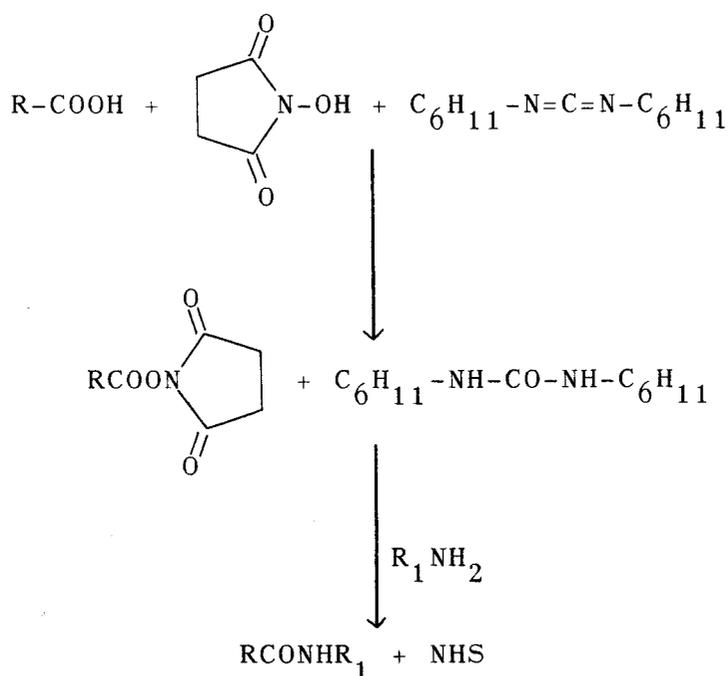
A partir de 37 se obtiene, asimismo, la amida 43 (Esquema 5) mediante activación del grupo carboxilo con N-hidroxisuccinimida (NHS) en presencia de N,N'-diciclohexil carbodiimida (DCC), método ampliamente utilizado en síntesis de péptidos. Efectivamente, la DCC se utiliza desde hace más de 30 años en la síntesis de péptidos<sup>87</sup> y ésteres.<sup>88</sup> Los ésteres de la NHS se obtienen en presencia de la DCC<sup>89</sup> (Esquema 4) y directamente, sin necesidad de aislarlos, se tratan con las diferentes aminas (o amoníaco) para producir las amidas correspondientes.

El objetivo principal de esta tercera fase de síntesis es la introducción de la cadena peptídica a través de la función carboxílica presente en 37 y 38. Esto puede

realizarse por dos caminos diferentes:

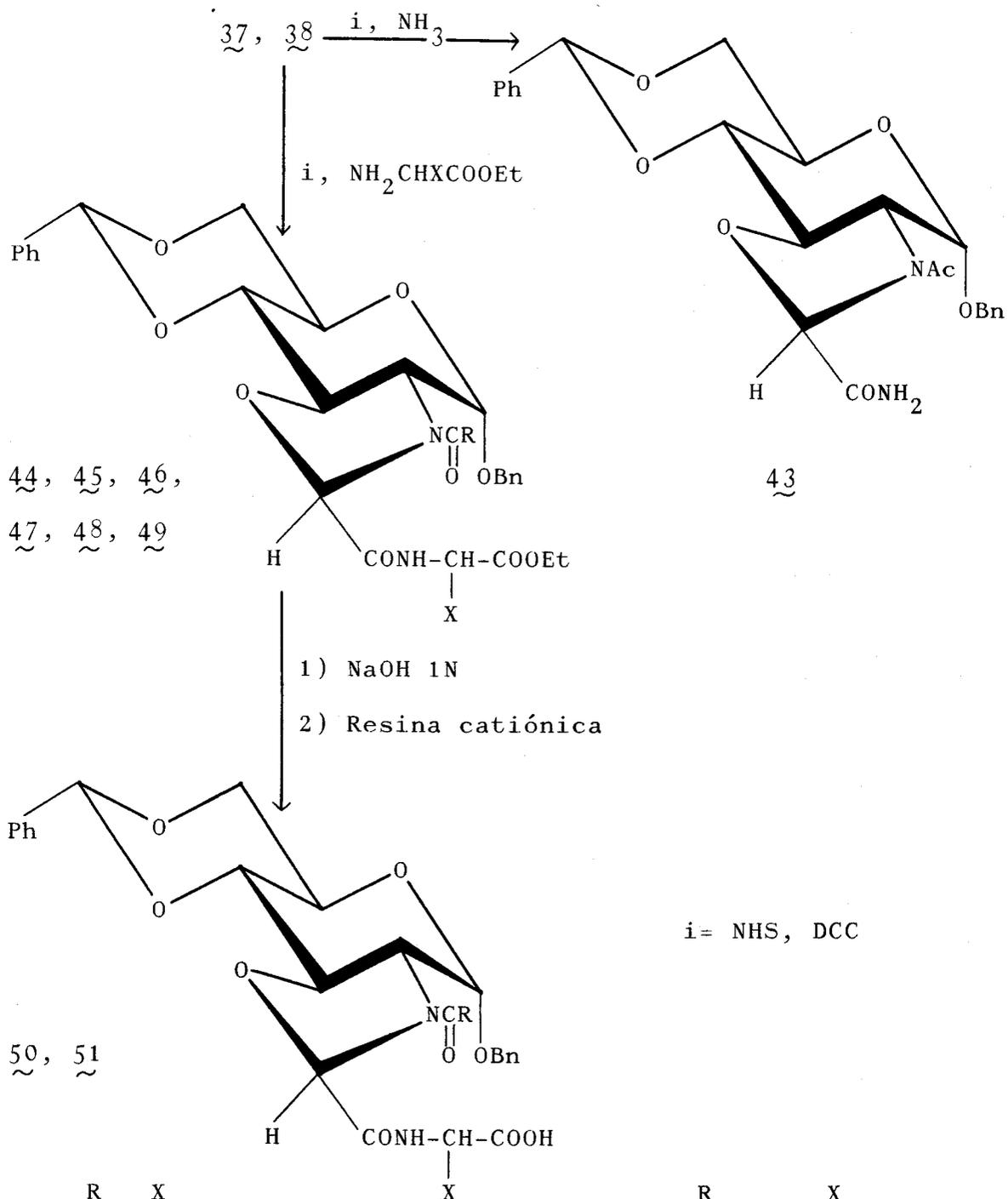
a) Introducción de los aminoácidos, convenientemente protegidos, de forma sucesiva; primero la L-alanina y segundo la D-isoglutamina.

b) Introducción directa del dipéptido adecuadamente protegido.



ESQUEMA 4

En la primera estrategia de síntesis se condensan los diferentes aminoácidos con los ésteres activados de los ácidos 37 y 38. Así, la condensación de 37 con el éster



	R	X		R	X	
44	CH <sub>3</sub>	H	(Gly)	48	CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	H (Gly)
45	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	(L-Ala)	49	CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> (L-Ala)
46	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	(L-Val)	50	CH <sub>3</sub>	H (Gly)
47	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	(L-Phe)	51	CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> (L-Ala)

ESQUEMA 5

etílico del clorhidrato de la glicina (Gly), L-alanina (L-Ala), L-valina (L-Val) y L-fenilalanina (L-Phe) en presencia de trietilamina para liberar la base, conduce a las sustancias 44, 45, 46 y 47 (Esquema 5). La condensación del éster activado derivado de 38 con el éster etílico del clorhidrato de glicina y de L-alanina en presencia de trietilamina, conduce a las sustancias 48 y 49 (Esquema 5).

Por saponificación de los comp. 44 y 49 (NaOH 1N) a temperatura ambiente seguido de neutralización, se consigue liberar la función carboxílica de los correspondientes aminoácidos (sustancias 50 y 51) (Esquema 5). La activación posterior de estos ácidos y su condensación con el clorhidrato del éster bencílico de la D-isoglutamina debe conducir a las sustancias deseadas (Esquema 6). Sin embargo, la insolubilidad del ácido 50 en los disolventes en que normalmente se efectúa la condensación del grupo carboxilo ( $\text{Cl}_3\text{CH}$ ,  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ , THF, 1,4-dioxano, DMF,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) hace que el rendimiento en este caso sea muy bajo. No así en el caso del ácido 51, en el que la presencia de la cadena alifática de la amida en posición 2 del aminoazúcar, le comunica una mayor solubilidad en 1,4-dioxano, permitiendo la obtención del dipéptido 54 (Esquema 6) con un buen rendimiento.

Para superar este problema se sigue la segunda vía de síntesis. Se condensan los ácidos 37 y 38 directamente con el dipéptido convenientemente bloqueado en la forma de paratoluensulfonato del éster bencílico de la L-alanil-D-isoglutamina (Figura 7), preparado mediante una serie de reacciones descritas en la bibliografía y recogidas en la parte Experimental de esta Tesis.

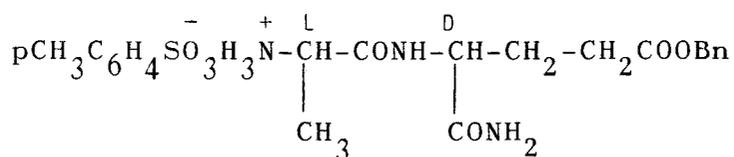


Figura 7

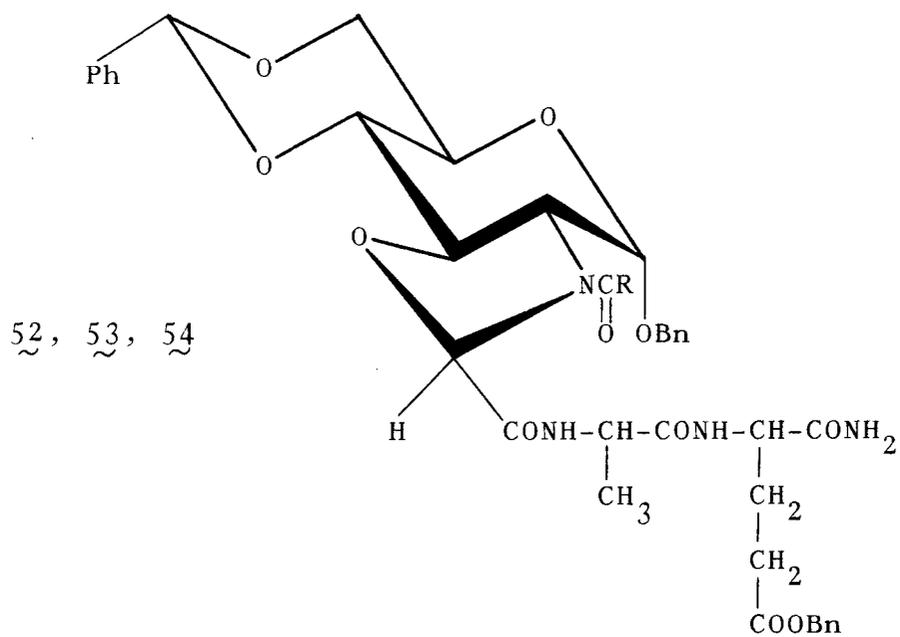
Los primeros ensayos se realizaron con el isómero L-alanil-L-isoglutamina por ser éste más asequible económicamente que el isómero natural. Así, a partir del ácido 37 por condensación con el paratoluensulfonato del éster bencílico de la L-alanil-L-isoglutamina y L-alanil-D-isoglutamina se obtienen la sustancia 52 y el buscado 53. Y por condensación del ácido 38 con el dipéptido natural se obtiene el ya conocido 54 (Esquema 6).

37, 38

51

i, a ó b

i, c



52, 53, 54

i= NHS, DCC

a= L-Ala-L-isoGlnCOOBn

b= L-Ala-D-isoGlnCOOBn

c= D-isoGlnCOOBn

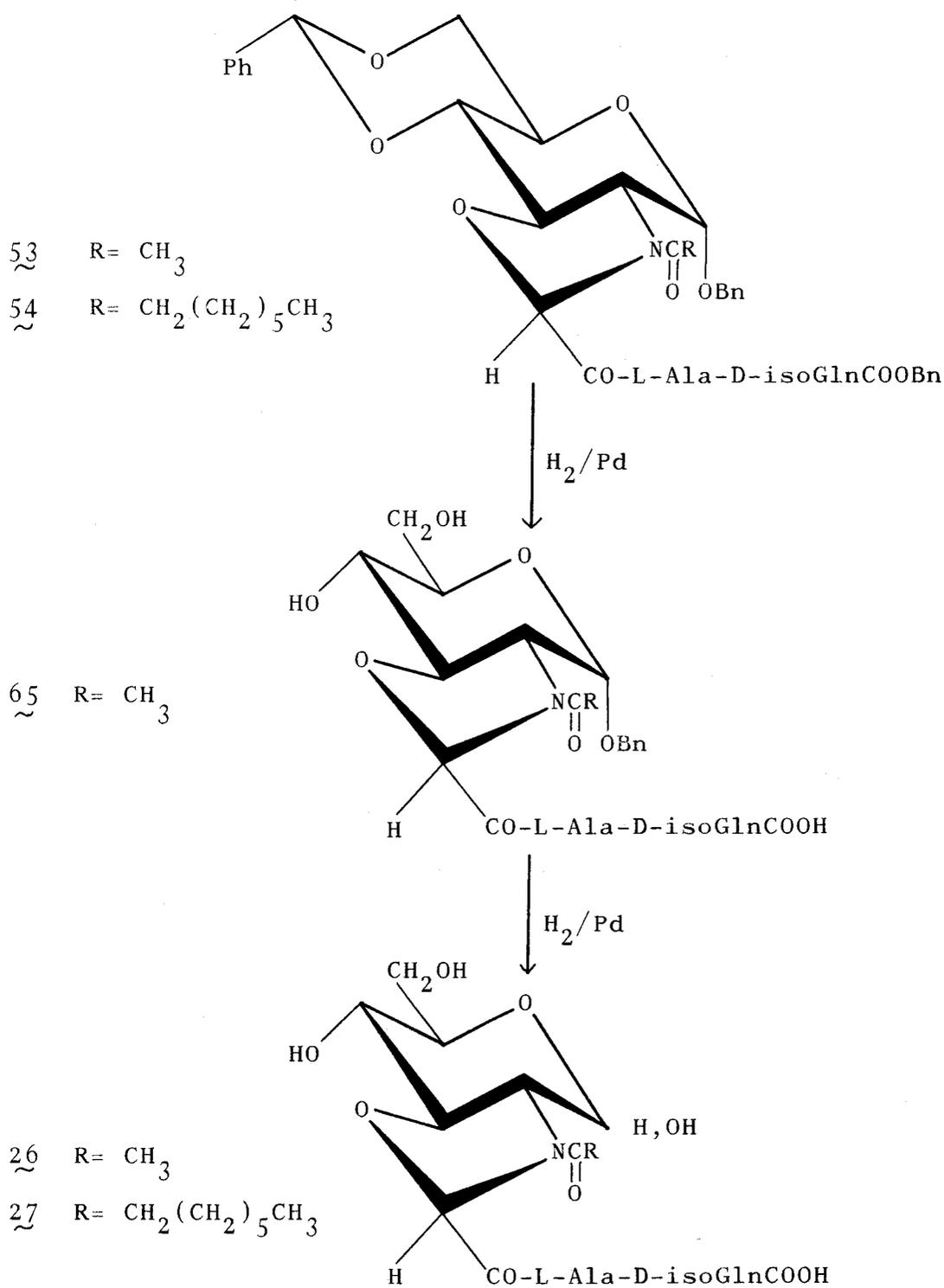
	R	dipéptido
52	CH <sub>3</sub>	a
53	CH <sub>3</sub>	b
54	CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	b

ESQUEMA 6

La última fase de la síntesis consiste en eliminar los grupos protectores presentes en 53 y 54. Ambas moléculas poseen tres grupos protectores, un grupo bencilideno que bloquea los hidroxilos 4 y 6, un bencilo que bloquea el hidroxilo anomérico y un éster bencílico en el aminoácido terminal. Los tres grupos son sensibles a la hidrogenación catalítica; si bien, nos encontramos de nuevo con el problema de la escasa solubilidad de los productos 53 y 54 en los disolventes habituales.

La hidrogenolisis de 54 no fue posible en ninguna de las condiciones ensayadas. La sustancia 53 fue posible hidrogenolizarla suspendida en 1,4-dioxano y usando paladio sobre carbón al 10% como catalizador. La reacción prospera lentamente pudiéndose aislar la sustancia buscada, 26, además de una sustancia intermedia (65)(Esquema 7).

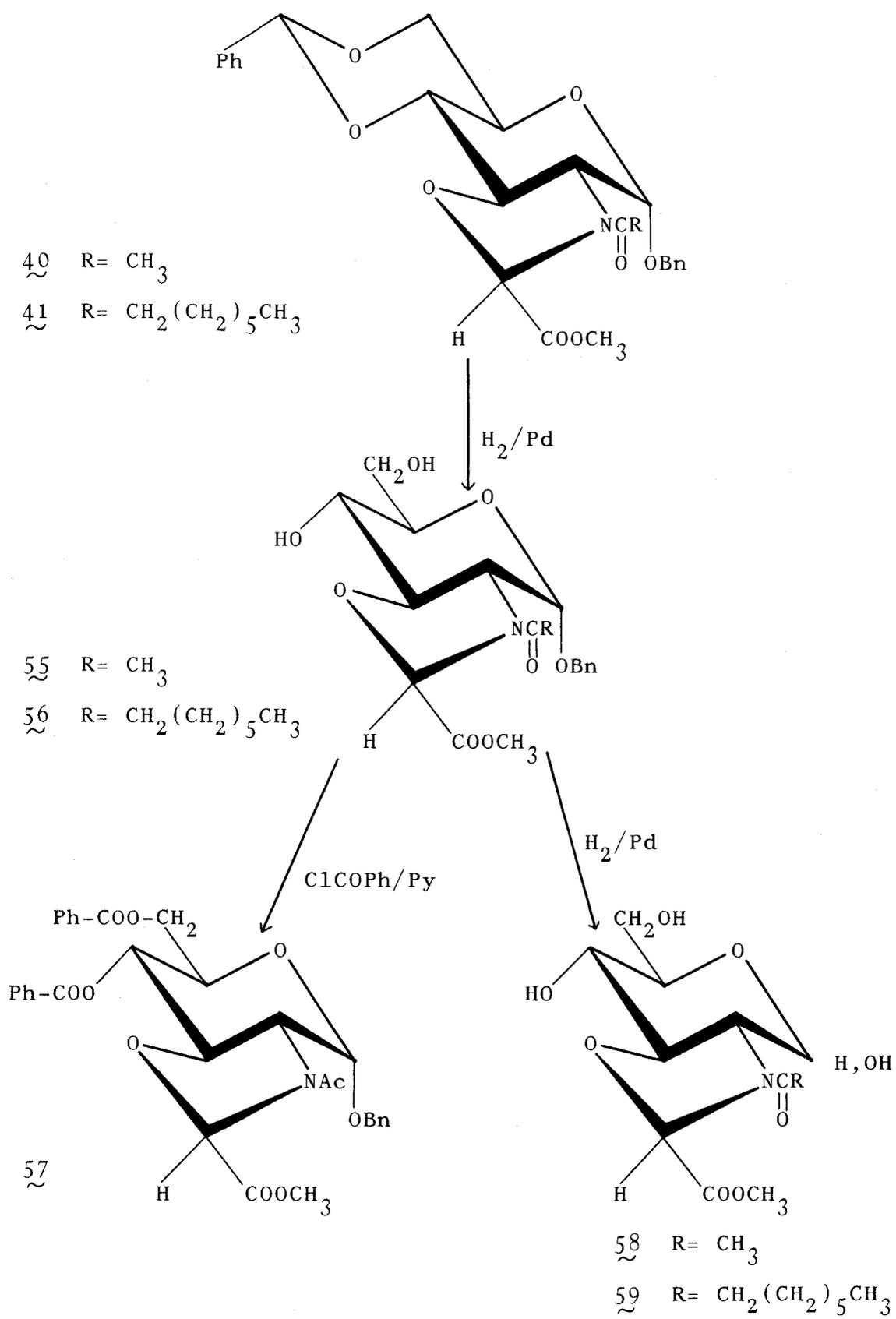
La sustancia 65 procede de 53 por hidrogenolisis del grupo protector de los hidroxilos 4 y 6 del aminoazúcar y del éster bencílico del carboxilo en posición  $\gamma$  de la D-isoglutamina. La hidrogenolisis posterior del bencilo, grupo protector del hidroxilo anomérico, conduce al 3-acetil-(2,3-didesoxi-D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (26), uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral.



ESQUEMA 7

A la vista de estos resultados, con objeto de mejorar los resultados obtenidos en la síntesis de 26 y, por otra parte, obtener 27, producto final de la serie del N-octanamido que no se ha podido obtener, se pensó en una estrategia diferente.

La nueva estrategia consiste en efectuar, previamente a la condensación del ácido activado con el dipéptido, una eliminación parcial de los grupos protectores. Efectivamente, la hidrogenación controlada de los ésteres metílicos 40 y 41 conduce a la eliminación exclusiva del grupo bencilideno, rindiendo respectivamente la 3-acetil-2-metoxicarbonil-(1-0-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (55) y la 2-metoxicarbonil-3-n-octanoil — (1-0-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (56) (Esquema 8). Con fines de caracterización, a partir del compuesto 55, se obtiene su derivado dibenzoilado (57) (Esquema 8). Asimismo, como era interesante disponer para su estudio de modelos sencillos, totalmente desbloqueados, se procedió a la total hidrogenación de 55 y 56 para obtener los compuestos 58 y 59 (Esquema 8).



ESQUEMA 8

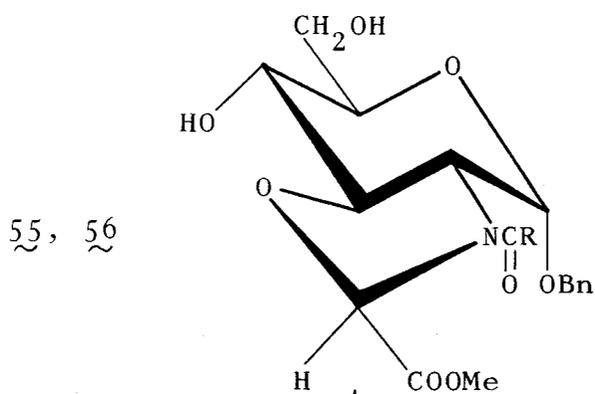
Los ésteres metílicos parcialmente desbloqueados 55 y 56 se convierten en ácidos por saponificación (NaOH 1N) y posterior neutralización (resina catiónica), y se activan por el método usual (NHS, DCC). De nuevo, la reacción de condensación se estudia inicialmente para productos simples y para el isómero L-alanil-L-isoglutamina. Así, a partir de 55 por saponificación, neutralización, activación y posterior condensación con el éster etílico del clorhidrato de la L-alanina origina el derivado 60. La condensación de los ácidos activados obtenidos a partir de 55 y 56 con el éster bencílico del paratoluensulfonato de L-alanil-L-isoglutamina (isómero no natural), origina los productos 62 y 63. Finalmente la condensación con el dipéptido natural origina los compuestos esperados 61 y 64 (Esquema 9).

Efectivamente, y como se esperaba, los productos 61 y 64, análogos a 53 y 54 donde el grupo bencilideno ha sido eliminado, son mucho más solubles en los disolventes habituales, pudiéndose ahora efectuar la hidrogenolisis sin problemas de solubilidad.

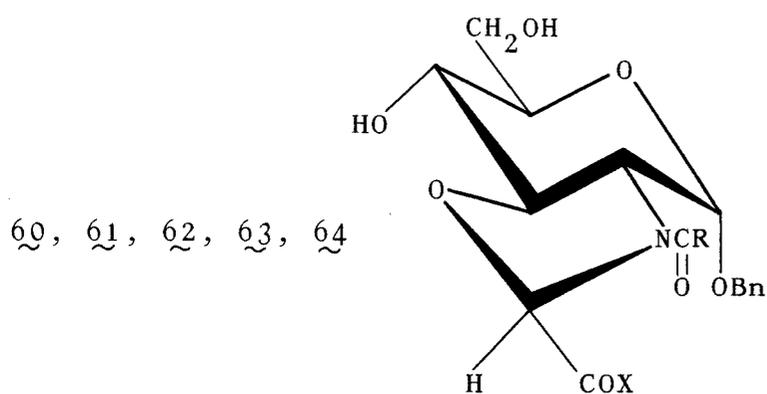
La hidrogenolisis de 61 disuelto en metanol con Pd-C (10%) como catalizador conduce con aceptable rendimiento al buscado compuesto 26 (Esquema 10). Asimismo, se ha aislado como producto intermedio el 3-acetil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-ala

nil-D-isoglutamina (65).

Tampoco en esta ruta ha sido posible la obtención de 27, estando la hidrogenolisis del bencil glicósido probablemente afectada a causa del impedimento estérico que supone no solamente el anillo de oxazolidina formado en la posición 2 y 3 del aminoazúcar, sino la presencia de la cadena grasa de 8 átomos de carbono y la cadena peptídica.

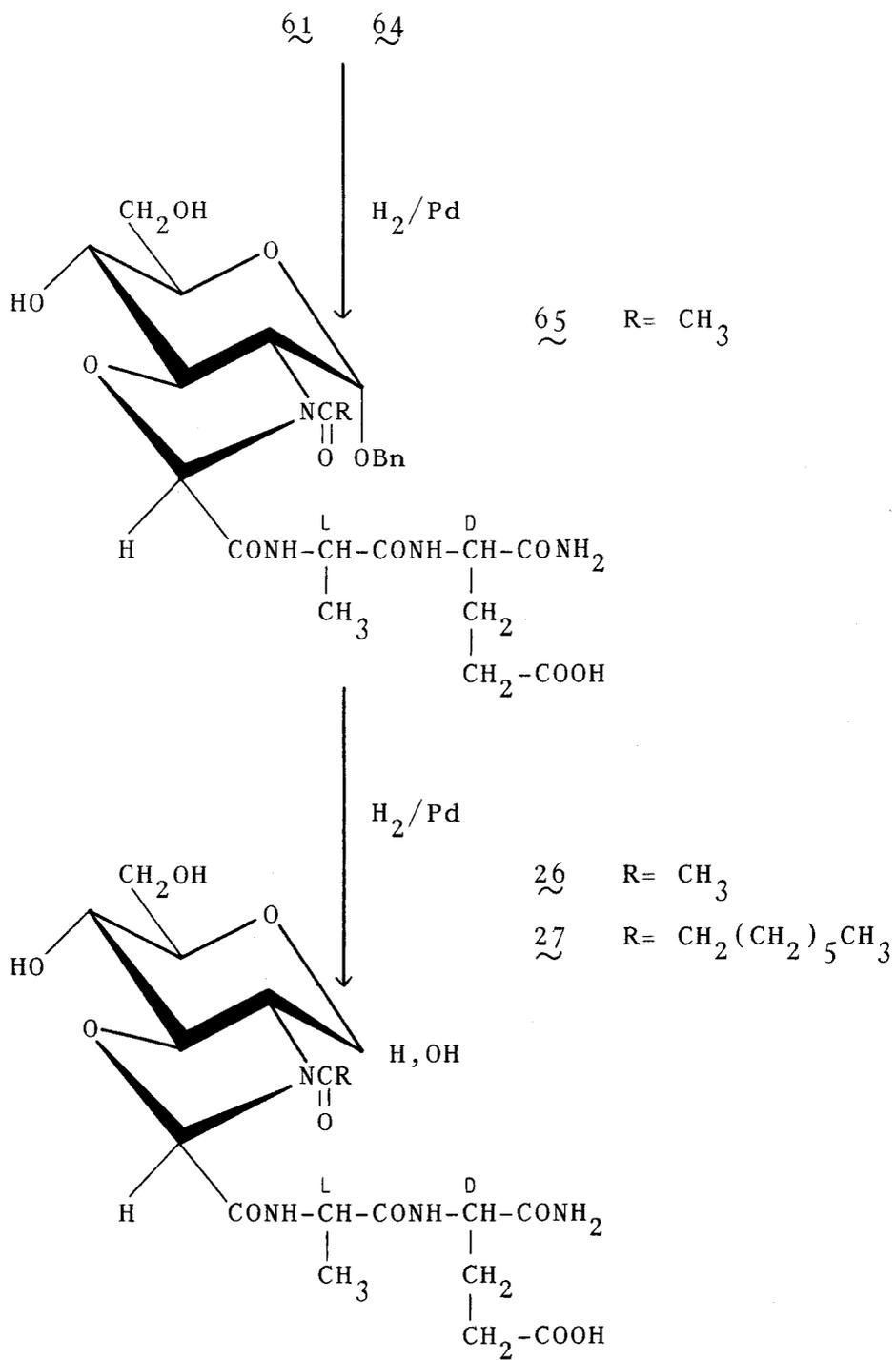


1) NaOH 1N; Resina Catiónica  
2) NHS, DCC, X



	R	X
55	CH <sub>3</sub>	
56	CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	
60	CH <sub>3</sub>	L-AlaCOOEt
61	CH <sub>3</sub>	L-Ala-D-isoGlnCOOBn
62	CH <sub>3</sub>	L-Ala-L-isoGlnCOOBn
63	CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	L-Ala-L-isoGlnCOOBn
64	CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	L-Ala-D-isoGlnCOOBn

ESQUEMA 9



ESQUEMA 10

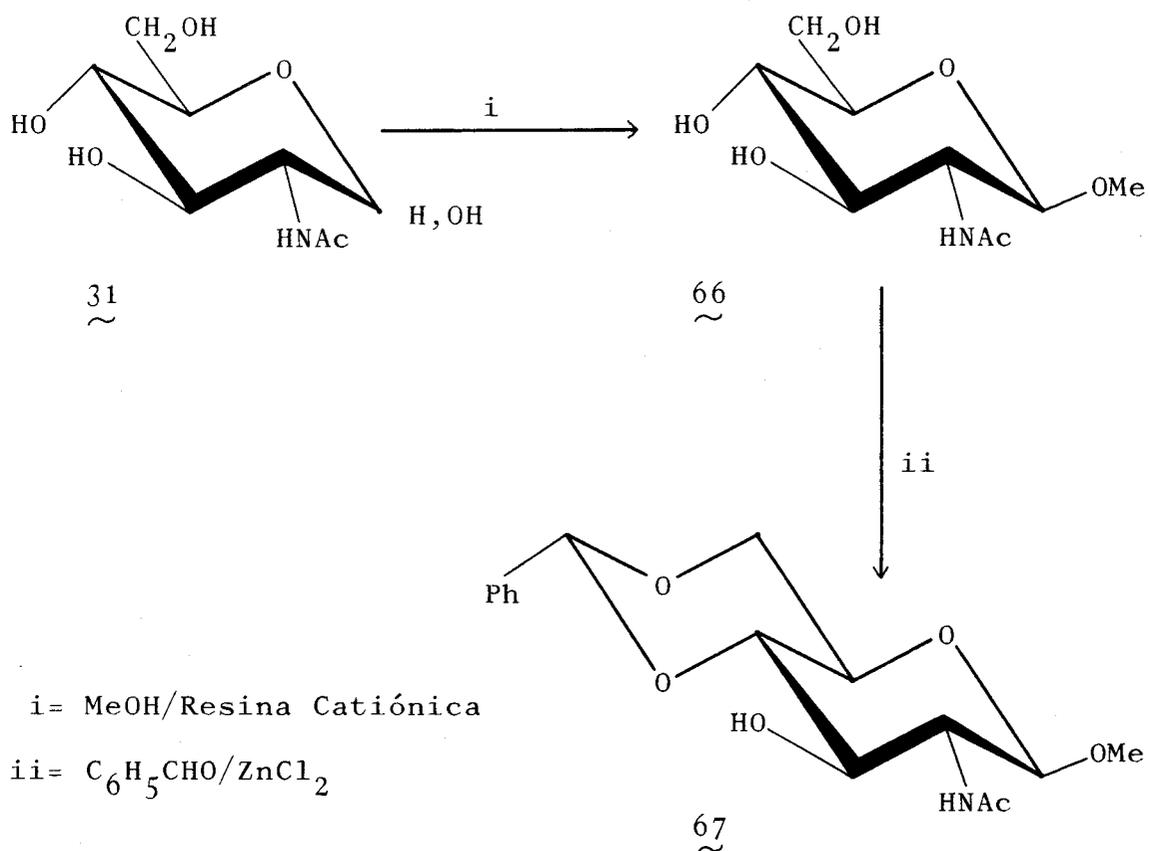
II.3.2.2. Síntesis de 3-acetil-(2,3-didesoxi-1-O-metil- $\beta$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina y de 3-acetil-(4,6-di-O-n-butyl-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina.

Como se expuso en la parte de Objetivos (II.3.1.), la síntesis de metil glicósidos de los análogos rígidos del MDP se diseñó con la finalidad de fijar la estructura de piranosa para que estos compuestos mantuviesen, en lo referente al anillo de azúcar, la forma del compuesto natural, MDP (1).

II.3.2.2.1. Síntesis de 3-acetil-(2,3-didesoxi-1-O-metil- $\beta$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina.

En la primera fase de la síntesis se introducen los grupos que van a bloquear los diferentes hidroxilos, bien de una forma permanente o temporal. Así, mediante tratamiento de una suspensión de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa (31) en metanol seco, en presencia de resina catiónica (forma ácida), se obtiene el metil 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido (66)<sup>90</sup>, el cual, tratado con benzaldehído en pre-

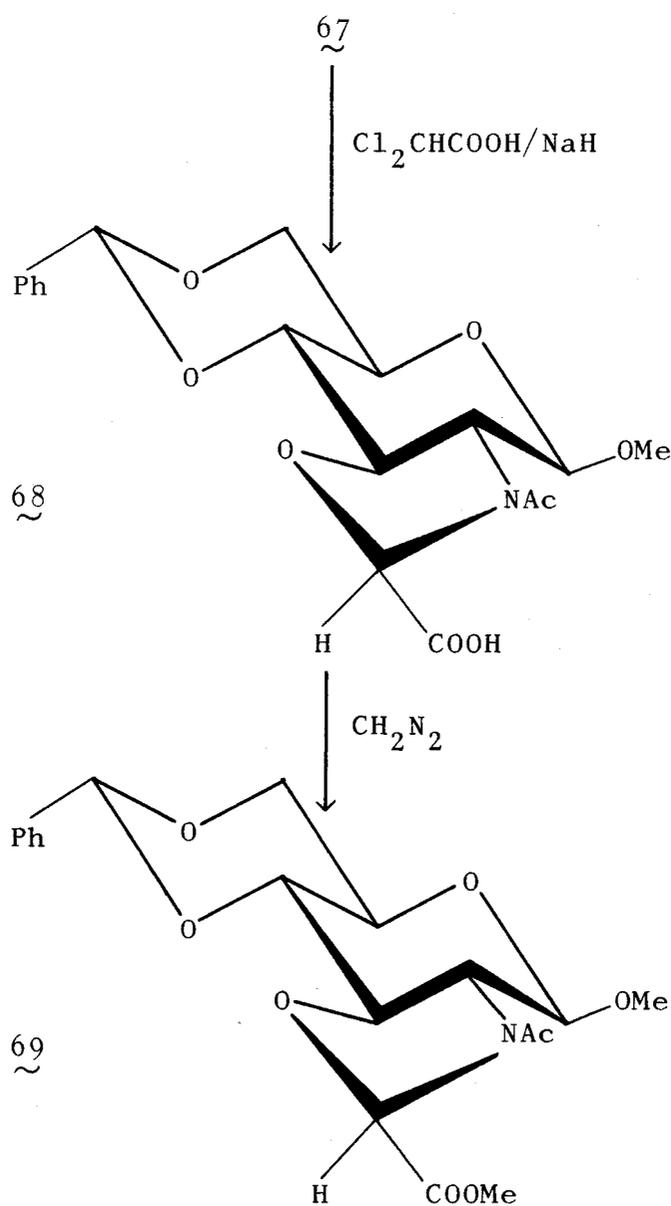
sencia de cloruro de cinc, conduce al metil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido (67)<sup>91</sup> (Esquema 11)



ESQUEMA 11

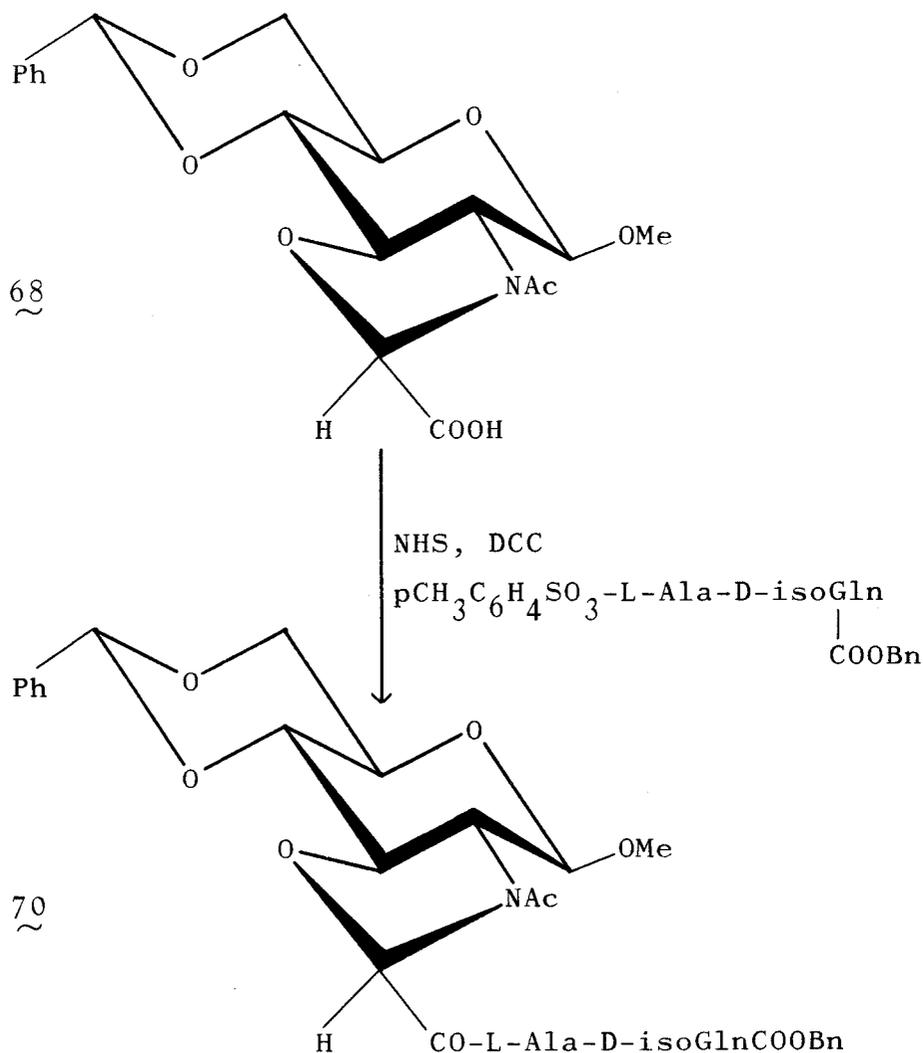
En la segunda fase de síntesis, en la que se trata de formar el anillo de oxazolidina, se hace reaccionar la sustancia 67 con la sal sódica del ácido dicloroacético, en

presencia de hidruro sódico, obteniéndose la 3-acetil-2-carboxi-(4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi-1-O-metil-β-D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (68) con buen rendimiento. Con el fin de caracterizar el ácido, se obtiene su éster metílico (69) por reacción con diazometano (Esquema 12).



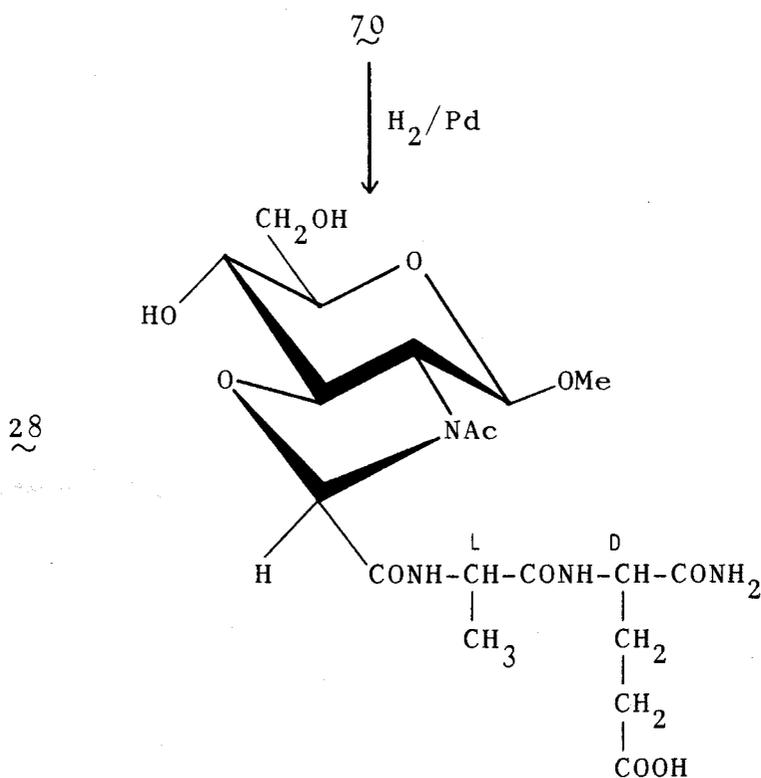
ESQUEMA 12

En la tercera fase de síntesis se estudia la condensación de 68 con el dipéptido natural por la ruta habitual de activación (NHS y DCC) y condensación con el paratoluensulfonato del éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina, obteniéndose el éster bencílico de 3-acetil-(4,6-O-benzilidén-2,3-didesoxi-1-O-metil-β-D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (70) (Esquema 13)



ESQUEMA 13

En la última fase de síntesis se estudia la eliminación de los grupos protectores presentes en 70; un grupo bencilideno que bloquea los hidroxilos 4 y 6, y un éster bencílico que bloquea el aminoácido terminal. Ambos grupos sensibles a la hidrogenólisis catalizada por Pd-C (10%). Efectivamente, la hidrogenólisis de 70 conduce en estas condiciones al esperado 3-acetil-(2,3-didesoxi-1-O-metil-β-D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (28) (Esquema 14), otro de los objetivos de esta Tesis.



ESQUEMA 14

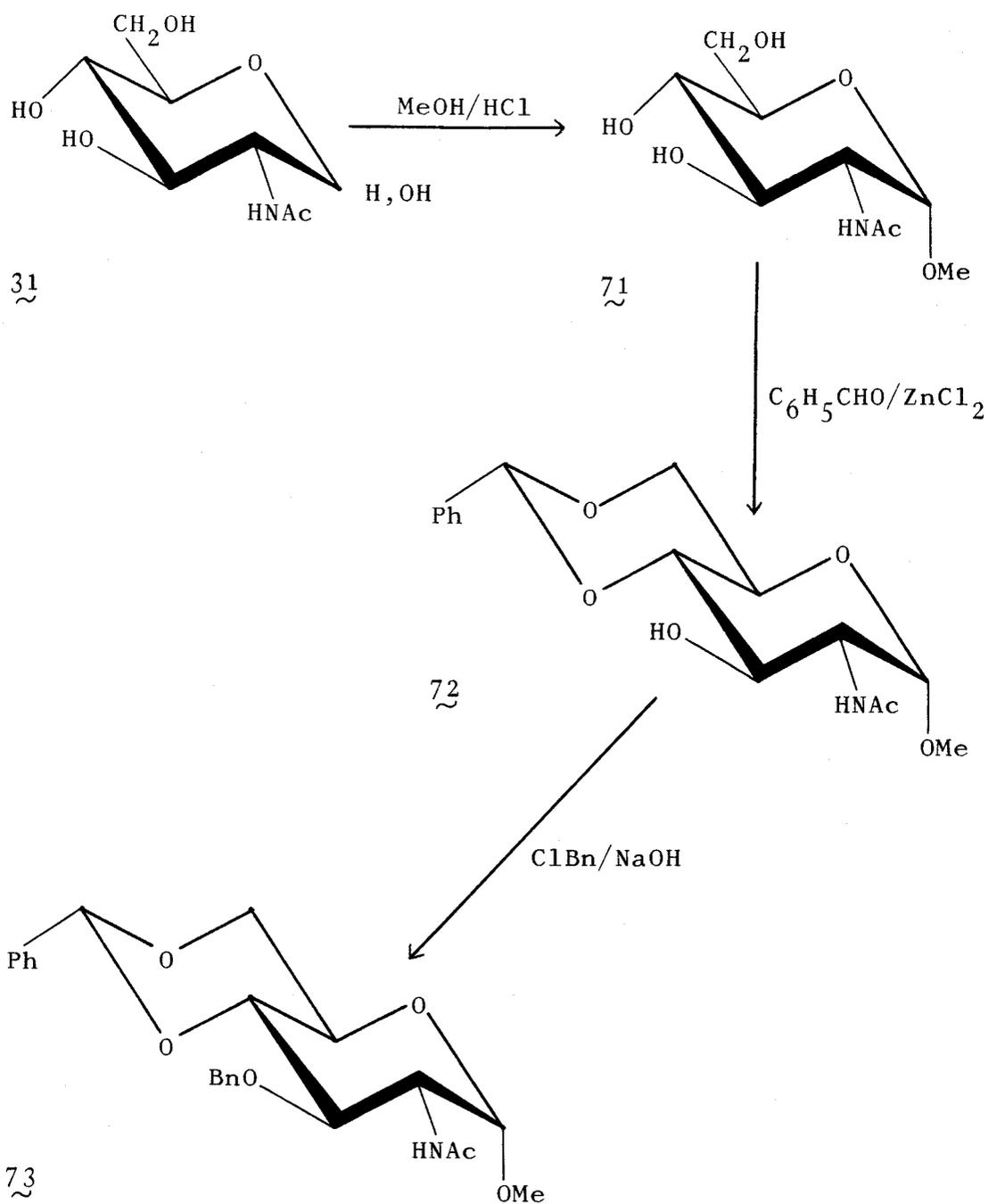
II.3.2.2.2. Síntesis de 3-acetil-(4,6-di-O-n-butil-2,3-dideoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina.

En este compuesto (29) se aúna la presencia del anillo de oxazolidina con el mantenimiento de la forma de piranosa por bloqueo del hidroxilo anomérico en forma de metil glicósido. La introducción de cadenas alifáticas en forma de éter en la posiciones 4 y 6 le comunica una mayor lipofilia.

La primera fase de obtención de 29 consiste en la preparación del metil 2-acetamido-4,6-di-O-n-butil-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (76), sustancia clave en esta síntesis.

Por tratamiento de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa (31) con cloruro de hidrógeno metanólico a reflujo se obtiene el metil 2-acetamido-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (71)<sup>92</sup>, el cual por reacción con benzaldehído en presencia de cloruro de cinc conduce al metil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (72)<sup>92</sup>. La reacción de esta última sustancia con cloruro de bencilo en condiciones de transferencia de fase, utilizando bromuro de tetrabutilamonio como catalizador, produce el metil 2-acetamido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (73)<sup>108</sup>, sus

tancia en la que todos los hidroxilos están bloqueados (Esquema 15).



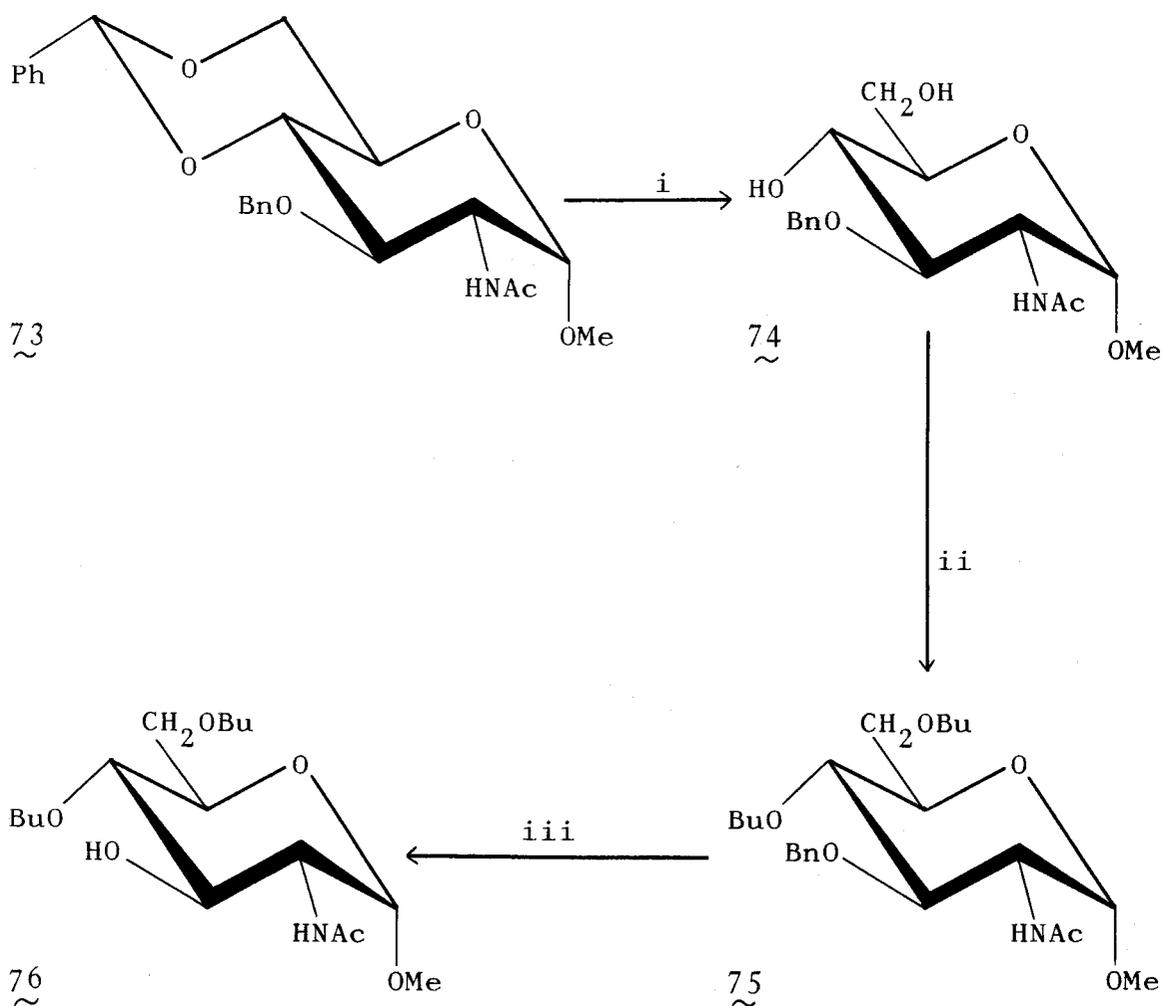
ESQUEMA 15

La hidrólisis del grupo benzal de la sustancia 73 con ácido clorhídrico en acetona, seguida de la reacción del compuesto parcialmente desbloqueado (74)<sup>108</sup> con un exceso de bromuro de n-butilo en 1,4-dioxano y en presencia de NaH, conduce al metil 2-acetamido-3-O-bencil-2-desoxi-4,6-di-O-n-butil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (75), la hidrogenolisis del cual (H<sub>2</sub> en presencia de carbón paladiado) rinde finalmente la sustancia buscada (76) (Esquema 16).

La segunda fase de la síntesis consiste en la formación del anillo de oxazolidina, lo cual se realiza por reacción de 76 con la sal sódica del ácido dicloroacético en 1,4-dioxano y en presencia de hidruro sódico. Se obtiene de esta manera la 3-acetil-2-carboxi-(4,6-di-O-n-butil-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (77). Como siempre, y con objeto de estudiar mejor esta molécula, el ácido 77 se convierte en éster metílico (78) por tratamiento con diazometano (Esquema 17).

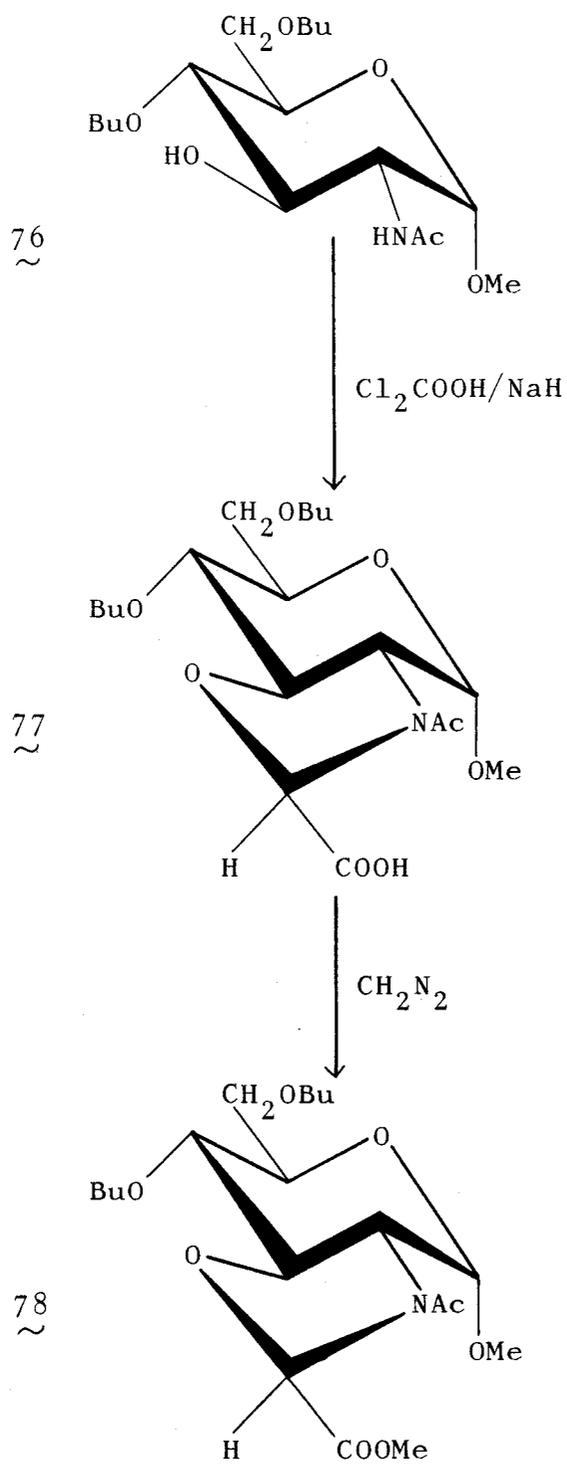
En la tercera fase de síntesis se estudia la condensación con el dipéptido natural por la ruta habitual de activación (NHS y DCC) y posterior condensación con el para-toluensulfonato del éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina en presencia de trietilamina para liberar la base, obteniéndose el éster bencílico de 3-acetil-(4,6-di-O-n-butil-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2

-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (Esquema 18) (79).

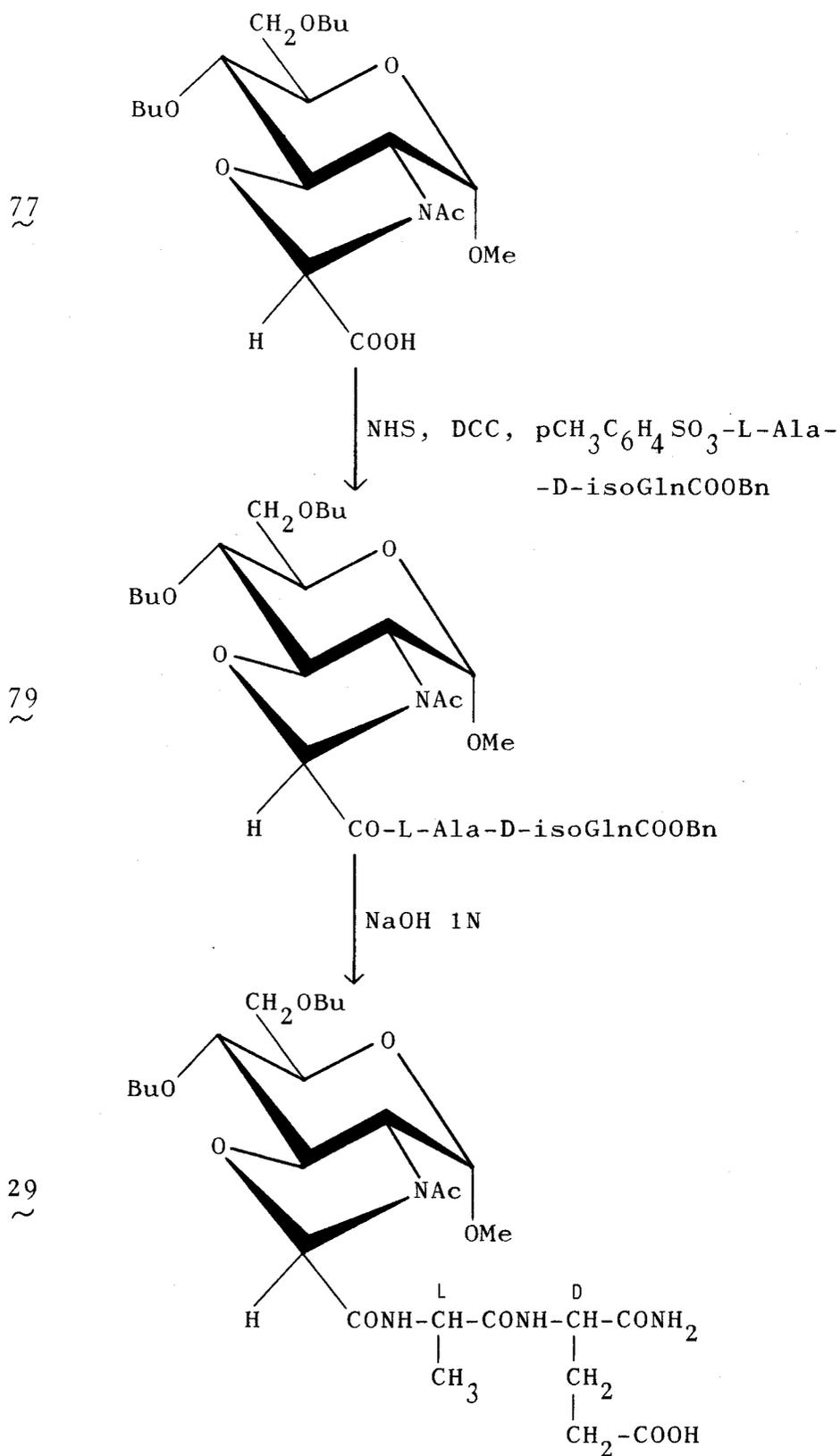


Bu = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>    *i* = HCl/acetona    *ii* = BrBu/NaH    *iii* = H<sub>2</sub>/Pd

ESQUEMA 16



ESQUEMA 17

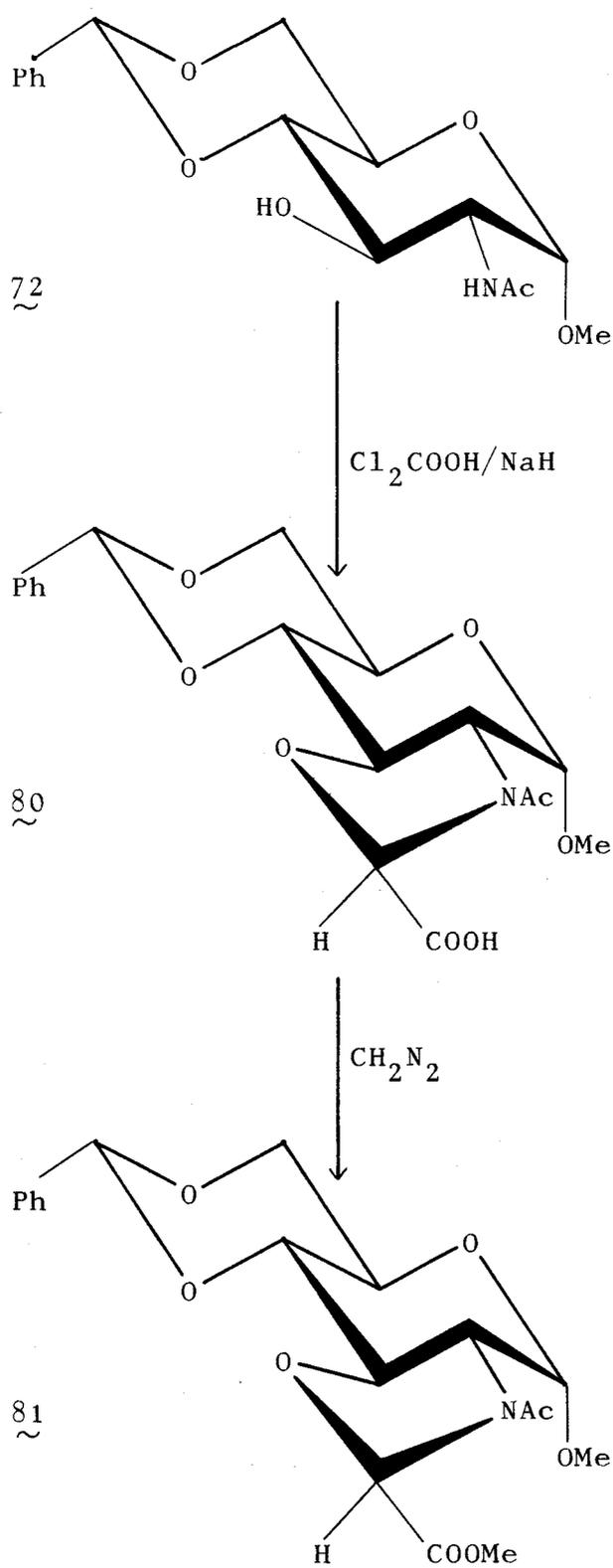


ESQUEMA 18

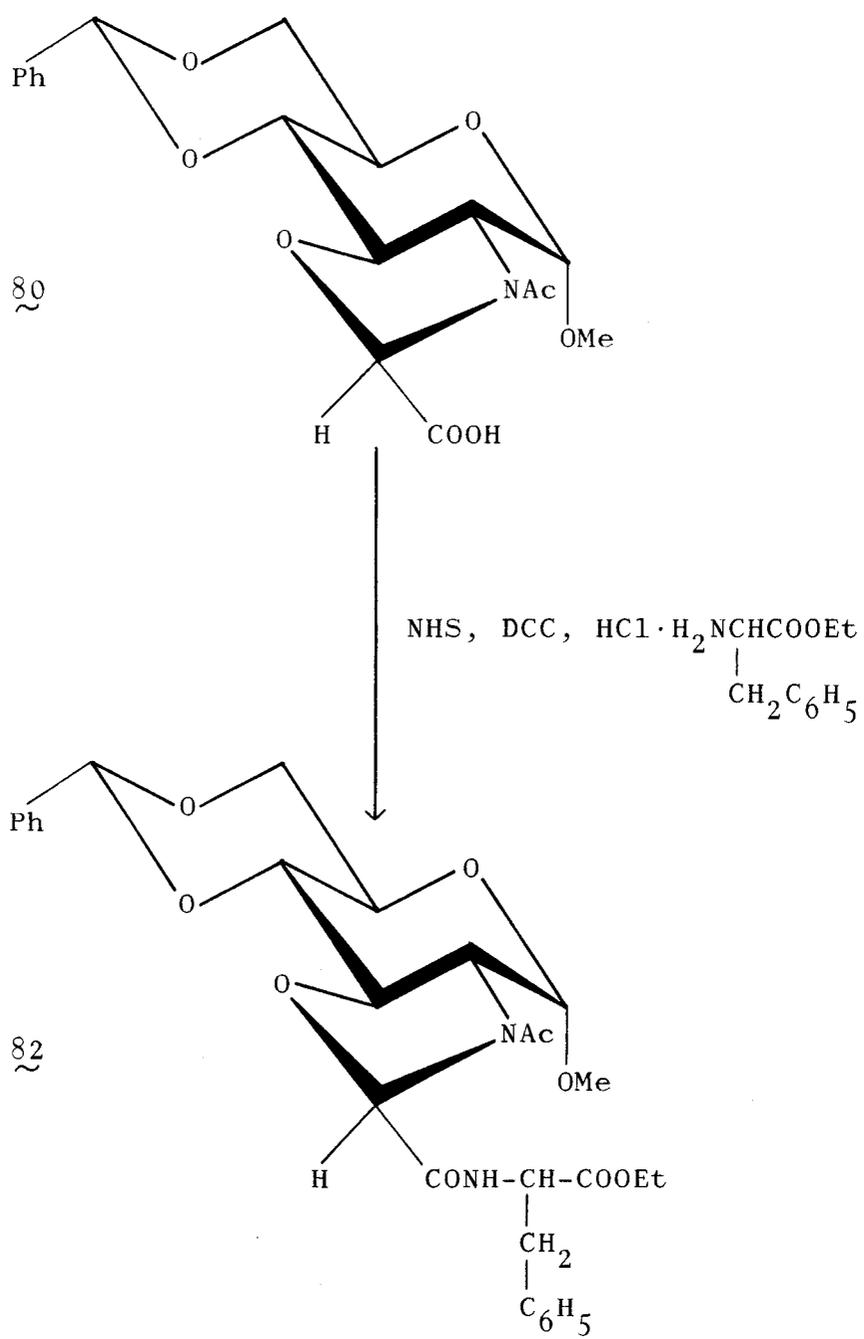
En la última fase de síntesis se estudia la eliminación del único grupo protector presente en  $\underline{79}$  (éster bencílico del aminoácido terminal). Por saponificación a temperatura ambiente y posterior neutralización con resina catiónica, se obtiene la 3-acetil-(4,6-di-O-n-butil-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L--alanil-D-isoglutamina ( $\underline{29}$ ), último de los objetivos de esta Tesis Doctoral (Esquema 18).

Por último y dado a que ya se disponía del éster metílico del  $\beta$ -metil glicósido ( $\underline{69}$ )(Esquema 12), se preparó, con objeto de comparación de sus espectros de RMN y de masas, el análogo  $\alpha$ -metil glicósido ( $\underline{81}$ ). Por reacción de la sustancia  $\underline{72}$  con la sal sódica del ácido dicloroacético en presencia de hidruro sódico, se obtiene el ácido  $\underline{80}$ , el cual se convierte en  $\underline{81}$  por el método habitual ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ ) (Esquema 19).

Por otra parte, la activación de  $\underline{80}$  (NHS, DCC) y posterior condensación con el clorhidrato del éster etílico de la L-fenilalanina, conduce finalmente a la sustancia  $\underline{82}$  (Esquema 20).



ESQUEMA 19



ESQUEMA 20

### II.3.3. CARACTERIZACION POR ESPECTROSCOPIA DE RMN

Para el estudio estructural por espectroscopía de RMN de los compuestos descritos en esta Tesis los dividiremos en tres apartados.

En primer lugar se estudia la estructura de los compuestos obtenidos por reacción de N-acilglucosaminas con ácido dicloroacético en medio básico, con la posición anomérica bloqueada en forma de glicósido ( $\alpha$ -bencilo,  $\alpha$ -metilo o  $\beta$ -metilo) y las posiciones 4 y 6 bien en forma de bencilidén acetal o de di-n-butiléter. Es decir, se trata de estudiar la reacción clave de formación del anillo de oxazolidina en aquellos compuestos bien obtenidos directamente de esta reacción, o bien sus ésteres metílicos por tratamiento de los ácidos con diazometano (Figura 8, Tabla 3) y posterior desbloqueo.

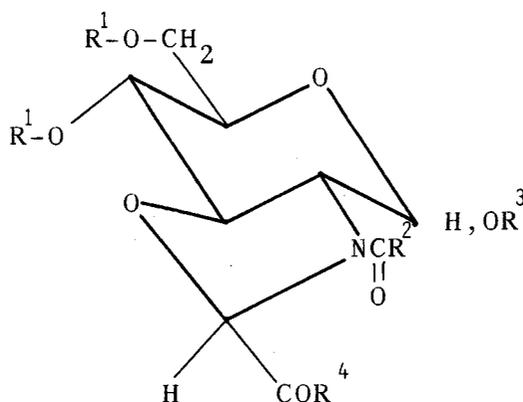


Figura 8

TABLA 3

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
37	PhCH	CH <sub>3</sub>	α-Bn	OH
40	PhCH	CH <sub>3</sub>	α-Bn	OCH <sub>3</sub>
41	PhCH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	α-Bn	OCH <sub>3</sub>
42	PhCH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CH <sub>3</sub>	α-Bn	OCH <sub>3</sub>
55	H	CH <sub>3</sub>	α-Bn	OCH <sub>3</sub>
56	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	α-Bn	OCH <sub>3</sub>
57	Bz	CH <sub>3</sub>	α-Bn	OCH <sub>3</sub>
58	H	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
59	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
69	PhCH	CH <sub>3</sub>	β-Me	OCH <sub>3</sub>
78	Bu	CH <sub>3</sub>	α-Me	OCH <sub>3</sub>
81	PhCH	CH <sub>3</sub>	α-Me	OCH <sub>3</sub>

En segundo lugar se consideran los compuestos obtenidos por condensación con amoníaco o aminoácidos (Figura 8, Tabla 4).

TABLA 4

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
43 ~	PhCH	CH <sub>3</sub>	α-Bn	NH <sub>2</sub>
44 ~	PhCH	CH <sub>3</sub>	α-Bn	GlyCOOEt
45 ~	PhCH	CH <sub>3</sub>	α-Bn	L-AlaCOOEt
46 ~	PhCH	CH <sub>3</sub>	α-Bn	L-ValCOOEt
47 ~	PhCH	CH <sub>3</sub>	α-Bn	L-PheCOOEt
48 ~	PhCH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	α-Bn	GlyCOOEt
49 ~	PhCH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	α-Bn	L-AlaCOOEt
50 ~	PhCH	CH <sub>3</sub>	α-Bn	Gly
51 ~	PhCH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	α-Bn	L-Ala
82 ~	PhCH	CH <sub>3</sub>	α-Me	L-PheCOOEt

En tercer y último lugar se estudian todas aquellas sustancias obtenidas por condensación con el dipéptido L-alanil-D-isoglutamina (Figura 8, Tabla 5).

TABLA 5

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
53	PhCH	CH <sub>3</sub>	α-Bn	L-Ala-D-isoGlnCOOBn
61	H	CH <sub>3</sub>	α-Bn	L-Ala-D-isoGlnCOOBn
64	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	α-Bn	L-Ala-D-isoGlnCOOBn
65	H	CH <sub>3</sub>	α-Bn	L-Ala-D-isoGln
26	H	CH <sub>3</sub>	H	L-Ala-D-isoGln
70	PhCH	CH <sub>3</sub>	β-Me	L-Ala-D-isoGlnCOOBn
28	H	CH <sub>3</sub>	β-Me	L-Ala-D-isoGln
79	Bu	CH <sub>3</sub>	α-Me	L-Ala-D-isoGlnCOOBn
29	Bu	CH <sub>3</sub>	α-Me	L-Ala-D-isoGln

Para mayor comodidad, los espectros registrados y sus diferentes ampliaciones se recogen en un Apéndice aparte numerados como Figura n-A, donde n es un número Natural desde el uno en adelante.

Los estudios de  $^1\text{H}$ -RMN a 200 MHz efectuados sobre el ácido 3-acetil-2-carboxi-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (37) y su éster metílico (40), ofrecen espectros complejos donde prácticamente todas las señales se desdoblan. Las señales que más acusan el desdoblamiento son el protón anomérico, el metínico de la oxazolidina, el metilo del grupo acetamido, el metileno del bencil glicósido y el metilo del éster metílico cuando se trata de la sustancia 40.

En la Tabla 6 se recogen los desplazamientos químicos, asignaciones y multiplicidad de diferentes señales detectadas en los espectros de las sustancias 37 y 40.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del ácido 3-acetil-2-carboxi-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (37) (Figura 1-A) muestra a campo alto dos señales asignadas al metilo de la amida en posición C2 del azúcar; ambos singuletes a 1,86 y 1,95 ppm se encuentran en una proporción de 2:1 aproximadamente. Este hecho singular que puede apreciarse en otras señales del espectro, puede deberse a la existencia de una mezcla de isómeros configuracionales en la proporción 2:1, o bien al efecto rotacional de la amida.

TABLA 6

Datos de H-RMN de los compuestos 37 y 40 (DMSO-d<sub>6</sub>, TMS, 200 MHz)

Compuesto	Ar	PhCH	PhCH <sub>2</sub>	H1	H2	H4	OCHN	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO
<u>37</u>	7,39m	5,73s	4,73 sistAB	5,89s		3,89t	5,76s		1,95s
			4,65 sistAB	5,65sa		3,87t	5,29s		1,86s
<u>40</u>	7,38m	5,74s	4,73 sistAB	5,89d		3,88t	5,83s	3,78s	1,95s
			4,65 sistAB	5,72d		3,86t	5,42s	3,67s	1,87s

A 3,88 ppm encontramos un triplete de doblete que interpretamos como dos tripletes a 3,87 y 3,89 ppm respectivamente, asignables al protón H4 del azúcar, con una constante de acoplamiento de 9,9 Hz. Este hecho se estudia más detenidamente en los próximos espectros comentados.

Con un desplazamiento químico de 4,69 ppm aparece un conjunto de ocho señales asignadas a dos sistemas AB correspondientes a los protones del metileno del bencilglicósido. Los diferentes sistemas se encuentran centrados uno a 4,65 ppm y otro a 4,73 ppm con una constante de acoplamiento geminal de 11,7 Hz.

Entre 5 y 6 unidades de desplazamiento químico aparece un conjunto de cinco señales con una integral conjunta para tres protones. La asignación de estas señales se dan en base a experimentos efectuados y comentados posteriormente. Se asigna un singulete a 5,73 ppm para el protón metínico del grupo protector bencilideno, en posición 4 y 6 del azúcar. Se asignan dos singuletes para el protón metínico de la oxazolidina en posición alfa a los dos heteroátomos, con unos desplazamientos de 5,29 y 5,76 ppm respectivamente. Se asignan dos señales al protón anomérico a 5,65 y 5,89 ppm; ninguna de las dos señales muestran acoplamientos apreciables, aunque en posteriores registros de productos derivados de éste se observan acoplamientos compatibles con la

estructura  $\alpha$ -glicosídica de la sustancia, como a continuación veremos.

A campo bajo, a 7,39 ppm aparece un multiplete debido a los diez protones aromáticos de los grupos protectores.

---

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 2-metoxicarbonil-3-acetil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-dioxazolidina (40) (Figura 2-A) muestra a campo alto las dos señales asignables al metilo de la amida a 1,95 y 1,87 ppm; ambos singuletes aparecen con una proporción relativa aproximada de 2:1. Conservando esta misma proporción aparecen dos singuletes a 3,78 y 3,67 ppm asignados al metilo del éster metílico.

A 3,61 ppm se detecta un doble doblete asignado a H2; muestra dos constantes de acoplamiento conforme a lo esperado para este protón ( $J_{1,2} = 2,5\text{Hz}$  y  $J_{2,3} = 9,7\text{Hz}$ ). A 3,88 y 3,86 ppm aparecen dos tripletes que como en el espectro anterior lo asignamos a H4 ( $J = 9,7\text{Hz}$ ).

A 4,69 ppm aparece un conjunto de siete señales debidas a dos sistemas AB que como en el espectro anterior se asignan a los protones de metileno del bencil-glicósido.

Una señal centrada a 4,73 ppm y la otra a 4,65 ppm, con una constante de acoplamiento geminal de 11,7 Hz.

A campo bajo aparecen cinco señales entre 5 y 6 unidades de desplazamiento químico con una integral conjunta para tres protones. El singulete a 5,74 ppm se asigna al protón metínico del grupo bencilideno. Los singuletes a 5,83 y 5,42 ppm al protón metínico de la oxazolidina. Las dos señales restantes son dos dobletes a 5,90 y 5,72 ppm con una constante de acoplamiento ( $J_{1,2}$ ) de 2,5 Hz. El valor de esta constante es el esperable para un anómero alfa. En la Figura 3-A se muestra una ampliación de estas cinco señales.

A campo bajo, como era de esperar, se encuentra un multiplete a 7,38 ppm debido a los diez protones aromáticos de ambos grupos protectores.

---

Como ya se ha comentado, la duplicidad de muchas de las señales puede deberse bien a la existencia de dos diastereoisómeros, o bien a la rotación parcialmente impedida de la amida. Para conocer cual de las dos situaciones es la real, se procedió a efectuar un estudio de  $^1\text{H}$ -RMN a diferentes temperaturas. El estudio se realizó sobre una muestra

de 3-acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2, 3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (40) en DMSO- $d_6$  a 200 MHz a las temperaturas de 20°, 50°, 80°, 110°, 145° y 150°C. En este tipo de experimentos caben dos posibilidades: una, que no se modifiquen los registros con el aumento de la temperatura, y otra, que colapsen las señales simplificándose considerablemente el espectro. En el primer caso estaríamos ante dos compuestos diferentes, ofreciendo cada uno un conjunto de señales en las proporciones relativas en que estos se encuentren en la mezcla; ambos productos serían diastereoisómeros. En el segundo caso estaríamos ante un solo producto con dos posibilidades conformacionales extremas, de tal forma que con ayuda de calor la barrera energética para el libre giro pueda ser sobrepasada, y donde en un principio aparecen dos señales debidas a dos conformeros, colapsan a una única señal.

Los registros a 20, 50 y 80°C se muestran en la Figura 4-A. Se aprecia claramente cómo los dos singuletes a campo alto asignados al metilo de la amida a 20°C, colapsan gradualmente hasta un singulete aun ancho a 80°C. Lo mismo ocurre con los singuletes asignados al metilo del éster metílico a 20°C (3,67 y 3,78 ppm). El doble sistema AB del metileno del grupo bencilo (4,65 y 4,73 ppm)(Figura 2-A) colapsa a 80°C a un único sistema AB (Figura 5-A). Los dos tripletes asignados a H4 a 3,58 y 3,86 ppm respectivamente (ver Figura

2-A) colapsan a un único triplete; este hecho es el que nos diferencia esta señal a 20°C de un triplete de doblete, que sería su multiplicidad evidente (Figura 5-A).

El sistema de cinco picos que se definen entre 5 y 6 ppm para tres protones a 20°C, comienza a desdibujarse con la temperatura para solo aparecer dos señales a 80°C; sólo el singulete del protón metínico del grupo protector bencilideno permanece sin alterarse con el incremento de la temperatura (Figura 5-A).

Los registros a 110, 145 y 150°C vienen recogidos en las Figuras 6-A, 7-A y 8-A. El detalle más interesante modificado en el espectro a 110°C se encuentra a campo bajo; entre 5 y 6 ppm aparecen ahora tres señales perfectamente asignables. La señal más desapantallada es un doblete asignada al protón anomérico; el singulete más desapantallado es debido al protón metínico del grupo protector bencilideno; la tercera señal, no visible a 80°C, es debida al protón metínico de la oxazolidina. Los registros a 145 y 150°C muestran un conjunto de señales bien definidas y resueltas, pudiéndose ahora resolver todos los protones de la sustancia 40. En la Tabla 7 se recogen los desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de la sustancia 40 a 19 y 145°C.

TABLA 7

Datos de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto  $\underline{40}$  a  $20^\circ\text{C}$  y  $145^\circ\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , TMS, 200 MHz)

Compuesto	Ar	PhCH	PhCH <sub>2</sub>	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H6'	OCHN	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO
$\underline{40}$ $20^\circ\text{C}$	7,38m	5,74s	Sist. AB 4,73 $J_{11,7\text{Hz}}^2$	5,90d $J_{1,2}^{2,5\text{Hz}}$	3,61d		3,88t $J_{4,5}^{9,7\text{Hz}}$				5,83s	3,78s	1,95s
			Sist. AB 4,65 $J_{11,7\text{Hz}}^2$	5,72d $J_{1,2}^{2,5\text{Hz}}$			3,86t $J_{4,5}^{9,7\text{Hz}}$				5,42s	3,67s	1,87s
$\underline{40}$ $145^\circ\text{C}$	7,36m	5,71s	Sist. AB 4,73 $J_{11,8\text{Hz}}^2$	5,83d $J_{1,2}^{2,9\text{Hz}}$	3,53dd $J_{2,3}^{9,9\text{Hz}}$	4,26t $J_{3,4}^{9,9\text{Hz}}$	3,90t $J_{4,5}^{9,9\text{Hz}}$	3,66ddd $J_{5,6}^{4,3\text{Hz}}$	4,13dd $J_{6,6}^{9,8\text{Hz}}$	4,06dd	5,58s	3,77s	1,92s
							$J_{5,6}^{9,1\text{Hz}}$						

A partir de los registros a 145 y 150°C, comparándolos con el registro a 20°C y apoyándonos en una experiencia de doble resonancia, hemos podido diferenciar los protones H3 y H4, así como el sistema ABX formado por H6, H6' y H5. En la Figura 9-A se muestra el experimento de doble resonancia donde se irradia el protón H2 a 145°C. Se observa cómo el doblete a 5,53 ppm correspondiente a H1 colapsa a singulete, y no así el triplete a 3,90 ppm; tal hecho de muestra que la señal a 4,26 corresponde a H3 y la señal a 3,90 ppm a H4; esta última señal a 20°C aparece como un triplete de doblete aunque, como ya hemos comentado, son dos triplete.

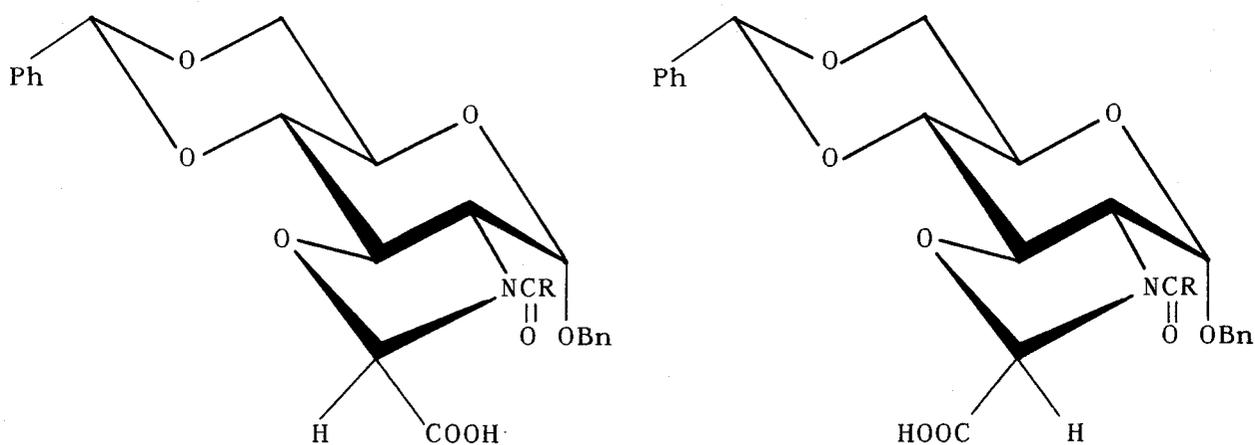
El sistema ABX formado por H6, H6' y H5 queda completamente resuelto. H6 a 4,14 ppm aparece como doblete de doblete con una constante de acoplamiento geminal de 9,8 Hz ( $J_{6,6}$ ) y otra *gauche* de 4,6 Hz con H5; esta señal queda bien resuelta en el experimento de doble resonancia (Figura 9-A). H6' a 4,05 ppm aparece como doblete de doblete (Figura 9-A) con una  $J_{5,6} = 8,7$  Hz. H5 a 3,66 ppm aparece como doblete de doblete, presentando dos constantes de acoplamiento grandes, por su situación *anti* frente a H6' y H4 ( $J_{5,6} = 8,7$ ;  $J_{4,5} = 9,9$  Hz) y otra pequeña por su situación *gauche* respecto a H6 ( $J_{5,6} = 4,6$  Hz) (Figura 7-A).

Cuando sometemos el sistema ABX a un análisis de segundo orden<sup>93</sup> obtenemos para H6' un desplazamiento químico de 4,06 ppm y para H6 de 4,13 ppm. Las constantes de acoplamiento adoptan los valores de 4,3 Hz para  $J_{5,6}$  y de 9,1 Hz para  $J_{5,6}$ . Como era de esperar, la constante de acoplamiento mayor crece sobre el valor medido directamente ( $J_{5,6}$  8,7 → 9,1 Hz) y la menor se reduce ( $J_{5,6}$  4,6 → 4,3 Hz). También los desplazamientos químicos se ven afectados respecto a las medidas tomadas directamente sobre el espectro: H6' pasa de 4,14 a 4,13 ppm ( $\Delta\nu = 1,4$  Hz) y H6 pasa de 4,05 a 4,06 ppm ( $\Delta\nu = 1,5$  Hz), haciéndose menor la diferencia en el desplazamiento químico de las dos señales, de acuerdo con lo esperado.

---

Todo este conjunto de datos espectroscópicos confirma la existencia de un solo diastereoisómero de los dos posibles enunciados en la Figura 9. Ante tal evidencia solo cabe cuestionarse cual de los dos posibles diastereoisómeros se origina en la formación de la oxazolidina. Planteamos este tema en función de las diferentes posibilidades de estabilización de los precursores de la oxazolidina en las condiciones en las que transcurre la formación de la misma.

La condensación de ácido dicloroacético con cualquiera de los aminoazúcares convenientemente bloqueados (bencil 2-acetamido(octanamido, palmitamido)-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido) conduce a la obtención de diferentes ácidos "N-acil-oxazolidín derivados". En principio es de esperar en cada reacción la formación de los dos diastereoisómeros posibles (Figura 9).



R= (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> CH <sub>3</sub>	n= 0	37
	n= 6	38
	n= 14	39

Figura 9

La condensación de la N-acetil-D-glucosamina convenientemente protegida (bencil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido, 33) con el ácido dicloroacético, se realiza en 1,4-dioxano seco y un exceso de hidruro sódico a temperatura de reflujo. En estas condiciones se produce el ataque nucleofílico del alcóxido formado sobre el dicloroacetato sódico, originándose un intermedio con un nuevo centro quiral. En principio no es de esperar ninguna estereoselectividad en la creación de este nuevo centro (Figura 10).

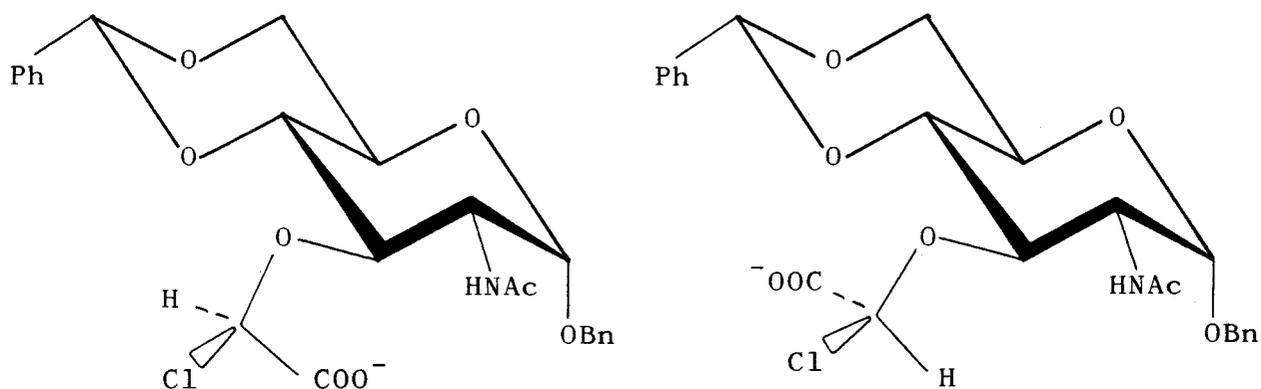


Figura 10

Un nuevo ataque nucleofílico por parte del nitrógeno amídico, en posición C2 del azúcar, sobre el nuevo centro quiral próximo, origina la formación de dos oxazolidinas

diastereoisoméricas (Figura 11).

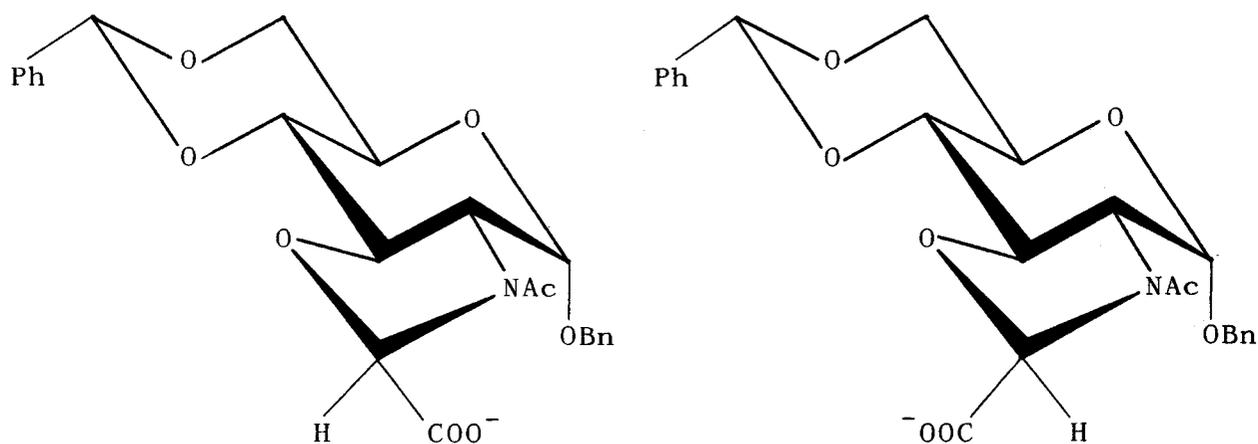


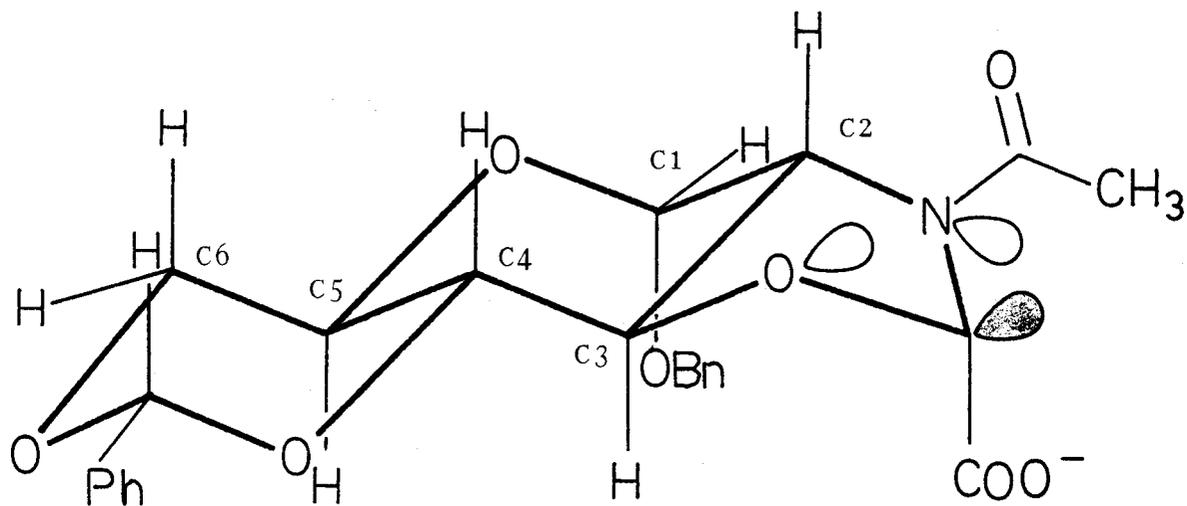
Figura 11

El protón oxazolidínico del nuevo centro quiral generado se encuentra en posición alfa respecto a un grupo carboxílico y a ambos heteroátomos de la oxazolidina. Ello, unido al ambiente fuertemente básico proporcionado por el hidruro sódico excedente y a la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción, facilita la formación de un carbanión. La especie iónica originada adoptará aquella estructura que mejor pueda estabilizarse, siendo ésta la precursora del producto resultante.

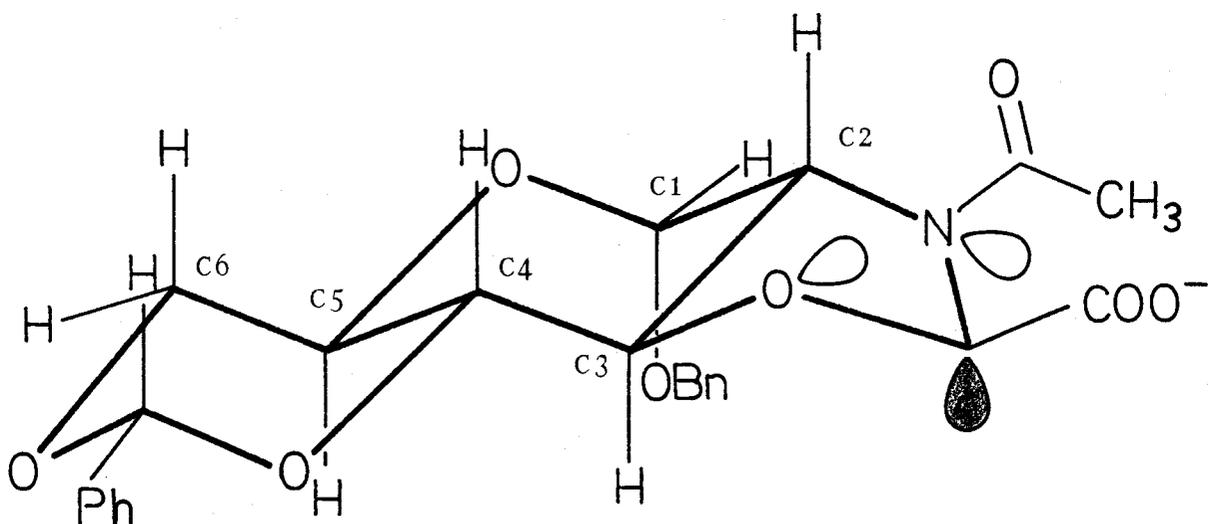
La estructura propuesta para dicha especie ofrece además del efecto electrónico estabilizador propio de los carbaniones  $\alpha$  respecto a un grupo carboxilo, un efecto electrónico estabilizador secundario. Para que se produzca el efecto estabilizador estereoelectrónico es necesario que los orbitales moleculares involucrados en el efecto estén adecuadamente orientados en el espacio. Tal efecto debe ser compatible con una sola de las especies.

En la Figura 12 se presentan las dos posibles especies. La "especie A" con el par de electrones carbaniónicos dispuesto en un orbital ecuatorial, y la "especie B" con el par de electrones en un orbital axial al plano que define la molécula. La "especie A", precursora del nuevo centro quiral de notación S, puede estabilizar el par de electrones no compartidos con el orbital molecular sigma antienlazante ( $\sigma^*$ ) del enlace C3-O. En cambio, la "especie B" no puede ofrecer efectos estabilizantes de esta naturaleza debido a la orientación espacial de los orbitales  $\sigma^*$  en torno al par de electrones no compartidos.

En base a los efectos estabilizadores comentados, la estructura que proponemos para el único diastereoisómero que se aísla de la reacción, es aquella en la que el nuevo centro quiral es de notación S; sustancia que procede directamente por protonación de la "especie A".



ESTRUCTURA A (S)



ESTRUCTURA B (R)

Figura 12

Cabe pues ahora plantearse si la sustancia aislada es compatible con la quiralidad de la molécula natural (ácido N-acetilmurámico). El ácido N-acetilmurámico natural es un éter en posición C3 de la N-acetil-D-glucosamina con el ácido D-láctico (de notación R). Si comparamos la proyección de Fischer del derivado D-láctico natural con la del diastereoisómero sintetizado propuesto (Figura 13), comprobaremos que ambas estructuras, aunque de notaciones diferentes (natural R y propuesto S), son ambas estructuras D. Puede observarse en la Figura 14 la compatibilidad de ambas estructuras desarrolladas.

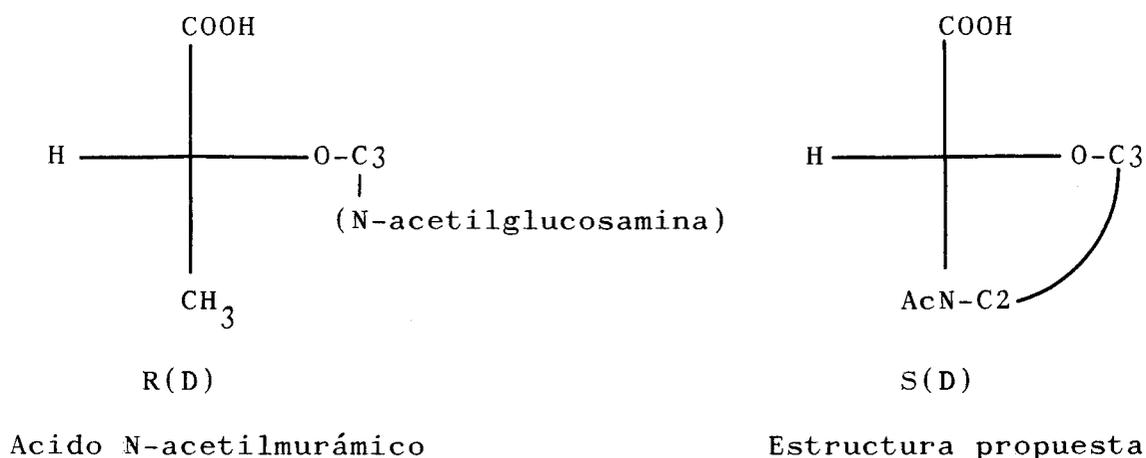
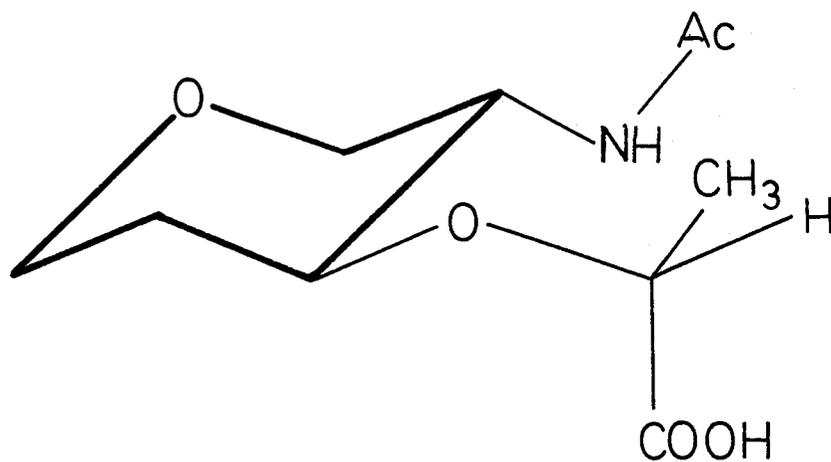
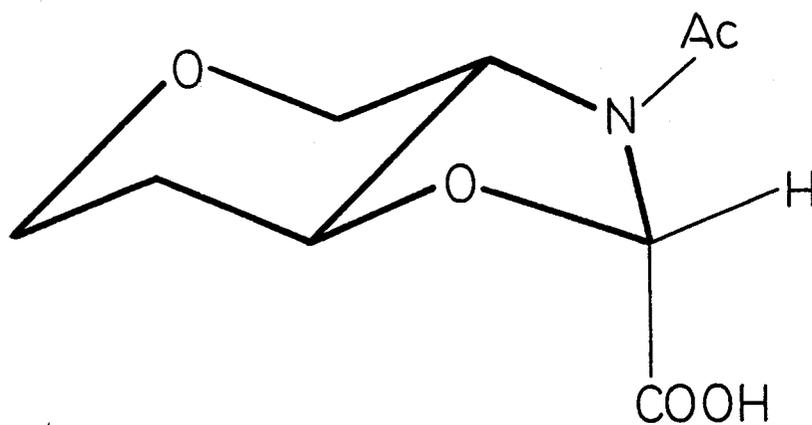


Figura 13



Acido N-acetilmurámico



Estructura propuesta

Figura 14

La misma reacción de condensación para la obtención de la oxazolidina, cuando se efectúa con N-acil derivados grasos de la D-glucosamina conduce a sustancias que presentan comportamientos espectroscópicos similares a los comentados.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 2-metoxicarbonil-3-n-octanoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (41) (Figura 10-A) (Tabla 8), realizado en  $\text{DMSO-d}_6$  a 200 MHz, muestra a campo alto las señales características de la cadena grasa. A 0,85 ppm un pseudotriplete que corresponde al metilo terminal de la cadena alquílica; a 1,21 ppm un singulete ancho asignado a los protones de los cuatro metilenos terminales de la cadena; a 1,39 ppm una señal ancha debida al metileno en  $\beta$  al carbonilo; a 2,26 y 1,9 ppm se detectan los protones diasterotópicos del metileno en  $\alpha$  al carbonilo.

A 3,66 y 3,78 ppm aparecen dos singuletes que se asignan al metilo del éster metílico. A 3,88 ppm un triplete que, como en la sustancia 40 se asigna a H4 ( $J_{4,5}$  10,2 Hz). A 4,67 ppm se detecta el metileno del bencilo como un multiplete de 7 picos, por lo que claramente debe estar afectado de desdoblamiento.

Entre 5 y 6 ppm se observa un conjunto de 5 señales que, por analogía con la sustancia 40 ya estudiada, se interpretan como sigue: el protón anomérico se desdobra en dos señales a 5,93 y 5,71 ppm, quedando su multiplicidad sin resolver; el protón metínico del bencilideno aparece como singulete a 5,74 ppm y, finalmente, el protón metínico de la oxazolidina se desdobra en dos singuletes a 5,84 y 5,42 ppm.

A campo bajo (7,38 ppm) aparecen los diez protones aromáticos de ambos grupos protectores.

Se ha estudiado el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la sustancia 41 a 90°C en DMSO- $d_6$  (Figura 17-A). Como era de esperar, las señales se simplifican, quedando ahora la zona entre 5 y 6 ppm con tan solo tres señales que corresponden una al protón anomérico (a campo más bajo), otra al protón metínico del bencilideno y la última al protón metínico de la oxazolidina (a campo más alto). Este conjunto de señales (entre 5 y 6 ppm) puede compararse con los espectros a 80 y 110°C de la sustancia 40 (Figuras 5-A y 6-A) observándose que la situación del espectro de la sustancia 41 a 90°C es intermedia a la situación de los espectros de la sustancia 40 a 80 y 110°C. En la Figura 17-A puede observarse perfectamente resuelto el sistema AB del metileno del bencilo y un único singulete para el metilo del éster.

---

EL espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 2-metoxicarbonil-3-palmitoil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (42)(Figura 11-A)(Tabla 8) a 200 MHz en  $\text{Cl}_3\text{CD}$ , muestra a campo alto las señales esperadas para la cadena grasa. A 2,03 ppm aparece la señal correspondiente al metileno en  $\alpha$  al carbonilo, y a 1,65 ppm la del metileno en  $\beta$ . A 1,27 ppm aparece un singulete ancho correspondiente a los 12 metilenos (24 protones) restantes de la cadena grasa; el metilo de la cadena aparece a 0,90 ppm como un pseudo triplete.

A 3,54 y 3,64 ppm aparecen dos dobles dobletes asignables a H2 con una constante de acoplamiento de acuerdo con su disposición *gauche* ( $J_{1,2} = 2,8$  Hz) respecto al protón anomérico, y otra *anti* ( $J_{2,3} = 9,8$  Hz) respecto al protón H3.

El metilo del éster metílico aparece como dos singuletes a 3,76 y 3,90 ppm. El sistema AB del metileno del bencilo aparece como un conjunto de siete picos a 4,67 ppm por lo que debe estar afectada de desdoblamiento.

A 6,07 ppm se encuentra el doblete esperado para el protón anomérico ( $J_{1,2} = 2,8$  Hz). A 5,59 ppm un singulete debido al protón metínico del grupo protector bencilideno. A 5,51 y 5,49 ppm aparecen dos singuletes debidos al protón metínico de la oxazolidina. A 7,36 ppm los 10 H aromáticos.

TABLA 8

Datos de  $^1\text{H-RMN}$  de los compuestos 40, 41 y 42 (DMSO- $d_6$ , TMS, 200 MHz)

Compuesto	Ar	PhCH	PhCH <sub>2</sub>	H1	H2	H4	OCHN	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO	CH <sub>2</sub> (α)	CH <sub>2</sub> (β)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	CH <sub>3</sub>
40 ~	7,38m	5,74s	Sist. AB 4,73 J <sub>11</sub> 11,7Hz	5,90d J <sub>1,2</sub> 2,5Hz		3,88t J <sub>4,5</sub> 9,7Hz	5,83s	3,78s	1,95s				
					3,61dd J <sub>2,3</sub> 9,7Hz								
41 ~	7,38	5,74s	Sist. AB 4,67*	5,93		3,88t J <sub>4,5</sub> 10,2Hz	5,84s	3,78s		2,26 y 1,90	1,39	1,21s	0,85t
				5,71		5,42s	3,66s						
42 ~ Cl <sub>3</sub> CD	7,36	5,59s	Sist. AB 4,67*	6,07d J <sub>1,2</sub> 2,8Hz		3,54dd J <sub>2,3</sub> 9,8Hz	5,51s	3,90s		2,03	1,65	1,27s	0,90t
					3,54dd J <sub>2,3</sub> 9,8Hz	5,49s	3,76s						

\* Señal afectada de desdoblamiento

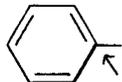
El estudio espectroscópico de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los productos 40, 41 y 42 confirma los resultados obtenidos por espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN.

Así, el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de 3-acetil-2-metoxi-carbonil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (40) en  $\text{DMSO-d}_6$  a 50 MHz a  $20^\circ\text{C}$ , muestra duplicidad para prácticamente todas las señales de los carbonos del producto en mayor o menor grado (Figura 12-A). Cada señal desdoblada aproximadamente guarda una relación de 2:1 como era de esperar, de tal manera que es posible asignar separadamente las señales de los carbonos de los distintos confórmeros (Tabla 9).

Cuando se compara el espectro del producto 40 con el espectro del aminoazúcar precursor de éste (bencil 2-acetamido-4,6-0-bencilidén-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido, 33)<sup>104,105</sup> (Figura 13-A), se observa la presencia de tres nuevas señales. Una desdoblada a 78,00 y 76,25 ppm asignada al metilo del éster; otra desdoblada a 86,71 y 85,62 ppm debida al carbono metínico de la oxazolidina, en posición  $\alpha$  con los heteroátomos del anillo oxazolidínico; y otra nueva señal desdoblada a 167,29 y 167,02 ppm asignada al carbonilo del éster metílico.

TABLA 9

Datos de  $^{13}\text{C}$ -RMN del producto 40 a 20°C y 145°C (DMSO- $d_6$ , TMS, 50 MHz)

Compuesto	C1	C2	C3	C4	C5	C6	OCHN	CON	COO	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO		Ar	PhCh	PhCH <sub>2</sub>
40* ~ 20°C	96,73	52,72	64,49	79,13	60,13	69,71	86,71	168,20	167,29	78,00	22,35	137,58	129,45	100,42	69,97
												a	a		
												136,81	126,09		
40** ~ 20°C	98,03	53,59	64,88	79,74	60,57	70,59	85,62	167,73	167,02	76,25	22,22	137,58	129,45	100,42	67,97
												a	a		
												136,81	126,09		
40 ~ 145°C	97,68	51,71	64,53	79,36	60,33	70,27	85,77	---166,79---		76,53	21,24	127,14	128,12	100,10	67,62
													a		
													125,45		

\* Señales del conformero en mayor proporción  
 \*\* " " " " menor proporción

El registro de un experimento APT muestra la inversión de seis señales (Figura 14-A), las correspondientes a los carbonos carbonílicos (de éster y de amida), las dos correspondientes a los carbonos cuaternarios aromáticos, y las dos correspondientes a los carbonos secundarios (C6 y CH<sub>2</sub> de bencilo).

Cuando se efectúa un registro a 145°C, como era de esperar, todas las señales desdobladas colapsan a una sola (Figura 15-A). Los desplazamientos químicos de las señales se recogen en la Tabla 9.

---

El espectro de <sup>13</sup>C-RMN de 2-metoxicarbonil-3-n-octanoil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi-α-D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (41), efectuado en DMSO-d<sub>6</sub> a 50 MHz y a 20°C, presenta las mismas características que el espectro de la sustancia 40 en las mismas condiciones de registro. Observándose los tres nuevos carbonos de la molécula: el carbono metínico de la oxazolidina a 86,82 y 85,18 ppm, el carbono del metilo del éster a 78,00 y 76,19 ppm y, finalmente, el carbonilo del éster a 167,99 y 167,40 ppm (Figura-16-A).

Los desplazamientos químicos de las señales y sus asignaciones propuestas se recogen en la Tabla 10, diferenciando las señales del conformero mayoritario del que se encuentra en menor proporción en las condiciones de registro.

---

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de 2-metoxicarbonil-3-palmitoil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (42), efectuado en  $\text{DMSO-d}_6$  a 50MHz y 20°C, muestra la misma situación de desdoblamientos que presentan las sustancias 40 y 41 ya estudiadas (Figura 18-A), observándose los tres nuevos carbonos de la molécula: el carbono metínico de la oxazolidina a 86,80 y 85,17 ppm, el carbono del metilo del éster a 77,91 y 76,07 ppm y, finalmente, el carbonilo del éster a 167,97 y 167,39 ppm.

Los desplazamientos químicos de las señales y sus asignaciones propuestas se recogen en la Tabla 10, diferenciando las señales del conformero mayoritario de aquel que se encuentra en menor proporción en las condiciones de registro.

---

TABLA 10

Datos de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los compuestos 41 y 42 (DMSO- $d_6$ , TMS, 50 MHz)

Comp.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	OCHN	CON	COO	OCH <sub>3</sub>	$\alpha\text{CH}_2$	$(\text{CH}_2)_n$	CH <sub>3</sub>		Ar	PhCH	PhCH <sub>2</sub>
41*	96,46	52,43	64,24	79,02	59,74	69,25	86,82	170,90	167,40	78,00	33,17	31,29 a 22,17	14,07	137,52 a 136,60	129,10 a 126,29	100,45	68,79
41**	98,05	53,24	64,54	79,64	60,35	70,32	85,18	169,86	167,99	76,19	33,89	31,29 a 22,17	14,07	137,52 a 136,60	129,10 a 126,29	100,45	67,75
42*	96,47	52,43	64,24	79,00	59,74	69,27	86,80	170,88	167,39	77,91	33,15	31,43 a 22,23	14,08	137,25 a 136,62	129,10 a 126,28	100,43	67,59
42**	98,05	53,24	64,52	79,61	60,35	70,31	85,17	169,83	167,97	76,07	33,89	31,43 a 22,23	14,08	137,25 a 136,62	129,10 a 126,28	100,43	67,69

\* Señales del confórmero en mayor proporción

\*\* " " " " menor proporción

Los valores tabulados para los desplazamientos químicos de las sustancias 40, 41 y 42, ofrecen una situación muy similar, dando la sensación de que el aumento en longitud de la cadena alquílica no influye notablemente en la proporción de las diferentes poblaciones de conformeros.

La distribución del equilibrio de los isómeros geométricos *syn* y *anti* (respecto al oxígeno del carbonilo) en amidas asimétricas N,N-disustituidas en disolución, parece depender tanto de factores estéricos como electrónicos.<sup>94</sup> Cuando se trata de alquilamidas, los efectos electrónicos son poco importantes comparados con los estéricos, de tal forma que cuando el sustituyente R-CO es grande (o mayor que el hidrógeno), el grupo más voluminoso de la amida se dispone en *syn* respecto al oxígeno carbonílico. Este hecho fue puesto de manifiesto por LaPanche<sup>95</sup> en base al orden de tamaño de R: alquilo > CH<sub>3</sub> > O > H.

Basándonos en los desplazamientos químicos e intensidades de las diferentes señales desdobladas y según los antecedentes bibliográficos consultados, puede determinarse qué conformero corresponde a cada una de las poblaciones detectadas por espectroscopía de <sup>13</sup>C-RMN.

Según G. C. Levy y G. L. Nelson,<sup>96,97</sup> los carbonos unidos directamente al nitrógeno de las amidas, están sometidos

dos a diferentes efectos estéricos y anisotrópicos debido a la rotación del carbonilo, de tal manera que, para cada par de picos (en  $^{13}\text{C}$ -RMN), la resonancia a campos más altos corresponde al carbono en *syn* respecto al oxígeno del carbonilo.<sup>98-101</sup>

Si atendemos al desplazamiento químico de los carbonos unidos directamente al nitrógeno de la amida en las sustancias 40, 41 y 42 (Figura 15), obtendremos los siguientes resultados:

a) Desplazamientos químicos de C2:

Sustancia	:	<u>40</u>	<u>41</u>	<u>42</u>
Confórmero mayoritario:		52,72	52,43	52,43
Confórmero minoritario:		53,59	53,24	53,24

Por lo que C2 y el carbonilo deben estar en disposición *syn* en el confórmero mayoritario (Figura 16).

b) Desplazamientos químicos de OCHN:

Sustancia	:	<u>40</u>	<u>41</u>	<u>42</u>
Confórmero mayoritario:		86,71	86,82	86,80
Confórmero minoritario:		85,72	85,18	85,17

Por lo que el carbono metínico de la oxazolidina (OCHN) y el carbonilo deben estar en disposición *anti* en el confórmero mayoritario (Figura 16).

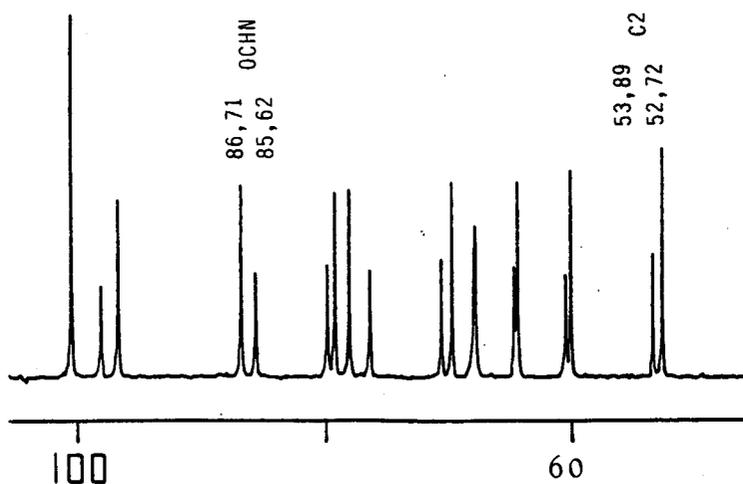


Figura 15

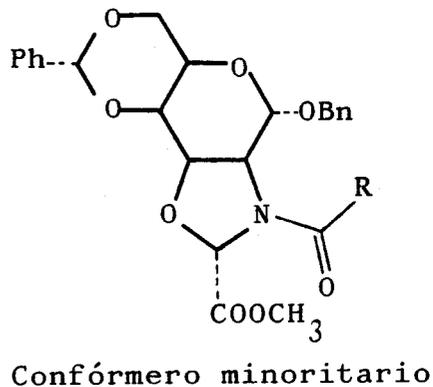
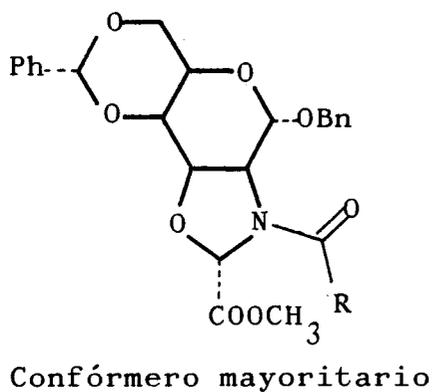


Figura 16

Si consideramos la estructura espacial de estas moléculas, es comprensible esperar que las voluminosas cadenas grasas se alojen en la zona de menor compresión estérica de la molécula, hecho que se deduce de las apreciaciones realizadas sobre los desplazamientos químicos de C2 y OCHN.

En la Figura 17 se muestra una representación espacial de las estructuras de los dos conforméromos. Puede observarse que el conforméromo A, minoritario, puede presentar además interacciones electrónicas que impidan la estabilización del conforméromo. Más adelante se presentarán sustancias que estabilizan mejor el conforméromo A, por la posibilidad de formar un puente de hidrógeno intramolecular.

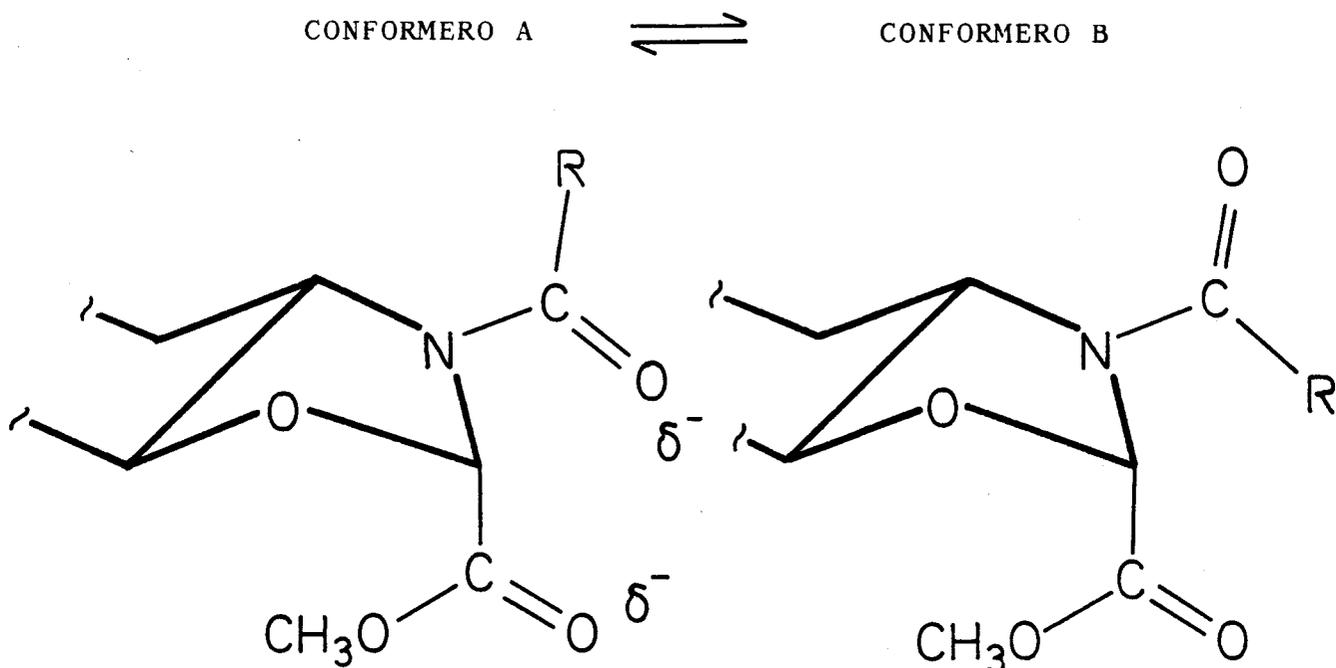


Figura 17

---

Cuando la reacción de condensación para la obtención de la oxazolidina se lleva a cabo con los  $\alpha$  y  $\beta$  metilglicósidos de la N-acetil-D-glucosamina, se obtienen productos cuyos ésteres metílicos muestran comportamientos espectroscópicos muy diferentes a 20°C. Así, mientras el 3-acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-metil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (81) y el 3-acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-metil-4,6-di-O-n-butyl-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (78) muestran el mismo tipo de desdoblamientos presentados por los  $\alpha$ -bencilglicósidos comentados hasta ahora. En cambio, el 3-acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-metil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\beta$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (69) no presenta señales dobles a 20°C (Tabla 11).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 3-acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-metil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\beta$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (69) (Figura 19-A) (Tabla 11) efectuado a 200 MHz en DMSO- $d_6$  a 20°C, muestra a campo alto un único singulete para el metilo de la amida (2,11 ppm). A 3,50 y 3,72 ppm aparecen dos singuletes que se asignan respectiva-

TABLA 11

Datos de  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos  $\underline{69}$ ,  $\underline{81}$  y  $\underline{78}$  (TMS)

Compuesto	Ar	PhCH	H1	H2	H5	H6	H6'	OCHN	COOMe	OMe	CH <sub>3</sub> CO	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\underline{69}$ DMSO-d <sub>6</sub> 200 MHz 20°C	7,38m	5,72s	5,13d J <sub>1,2</sub> <sup>8,7</sup> Hz	3,30t J <sub>2,3</sub> <sup>8,7</sup> Hz	3,45	4,28dd J <sub>5,6</sub> <sup>5,0</sup> Hz J <sub>6,6</sub> <sup>10,0</sup> Hz	3,87t J <sub>5,6</sub> <sup>10,0</sup> Hz	5,58s	3,72s	3,50s	2,11s	—	—
$\underline{81}$ Cl <sub>3</sub> CD 80 MHz 20°C	7,38m	5,60s	5,72d J <sub>1,2</sub> <sup>2,5</sup> Hz	5,34d J <sub>1,2</sub> <sup>2,5</sup> Hz				5,47s	3,79s	3,47s	2,06s	—	—
$\underline{78}$ Cl <sub>3</sub> CD 80 MHz 20°C	—	—	5,70d J <sub>1,2</sub> <sup>2,7</sup> Hz	5,30d J <sub>1,2</sub> <sup>2,7</sup> Hz				5,45s	3,81s	3,42s	2,05s	1,49m	0,92t
									3,77s	3,40s	1,93s		

mente al metilo glicosídico y al metilo del éster. A 3,89 ppm un triplete asignable a H6' con una constante de acoplamiento de 10 Hz; esta señal y el doble doblete a 4,28 ppm asignado a H6 se resuelven en base a experimentos de doble resonancia que comentaremos más adelante; el doble doblete muestra una constante de acoplamiento compatible con la disposición *gauche* de H6 respecto a H5 ( $J_{5,6} = 5$  Hz) y otra de 10 Hz compatible con  $J_{6,6}^2$ .

Entre 5 y 6 ppm aparecen tres señales para tres protones. Un singulete a 5,72 ppm asignado al protón metínico del bencilideno; otro singulete ancho a 5,58 ppm asignado al protón metínico de la oxazolidina. A 5,13 ppm un doblete con una constante de acoplamiento de 8,7 Hz asignado al protón anomérico y compatible con la estructura anomérica  $\beta$ .

A campo bajo aparecen los cinco protones aromáticos correspondiente al grupo protector bencilideno (7,38ppm)

Cuando se registra el espectro de  $\sim 69$  a  $90^\circ\text{C}$  (Figura 20-A) se observa que algunas señales se resuelven mejor que a  $20^\circ\text{C}$ , como ocurre con el singulete del protón metínico de la oxazolidina, pero en ningún caso se observan simplificaciones de señales.

Un experimento de doble resonancia efectuado a

90°C sobre el doblete del protón anomérico (5,13 ppm) hace que el triplete a 3,30 ppm colapse a doblete (Figura 21-A) lo que demuestra que se trata de H2. Una irradiación posterior del doblete asignado a H6 (4,28 ppm) hace que se modifique profundamente el triplete a 3,89 ppm (Figura 22-A) lo que demuestra que se trata de H6'; también queda modificada en este experimento una señal a 3,45 ppm lo que la hace compatible con H5, aunque su multiplicidad no es evidente debido a la deformación a la que se ve sometida por el solapamiento con la señal del metilo anomérico a 3,50 ppm.

---

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 3-acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-metil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (81) (Figura 23-A) (Tabla 11) efectuado a 80 MHz en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  a 20°C, muestra a campo alto dos señales asignadas al metilo de la amida (2,06 y 1,93ppm, singuletes) con una proporción aproximada de 3:2. A 3,47 y 3,79 ppm aparecen dos singuletes asignados respectivamente al metilo glicosídico y al metilo del éster.

Entre 5 y 6 ppm encontramos cuatro señales para una integral conjunta de tres protones. A 5,60 ppm encontramos un singulete asignable al protón metínico del grupo pro-

tector bencilideno; a 5,47 ppm otro singulete (ancho) asignado al protón metínico de la oxazolidina. A 5,72 y 5,34 ppm aparecen dos dobletes asignados al protón anomérico, con una constante de acoplamiento ( $J_{1,2} = 2,5$  Hz) acorde con la estructura anomérica  $\alpha$ .

A campo bajo, a 7,38 ppm, aparecen los cinco protones aromáticos del grupo protector bencilideno.

---

Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 3-acetil-2-metoxicarbonil-(4,6-di-O-n-butyl-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-2,3-dioxazolidina (78) efectuado en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  a 80 MHz (Figura 24-A) (Tabla 11), muestra a campo alto las señales características de las cadenas de n-butilo; a 1,49 ppm el multiplete ancho debido a los seis metilenos de ambas cadenas; a 0,92 ppm un triplete muy deformado asignado a los metilos terminales de las dos cadenas.

A 2,05 y 1,93 ppm aparecen dos singuletes debido al desdoblamiento del metilo de la amida. Asimismo, el metilo glicosídico y el del éster metílico se desdoblan en dos singuletes; el primero a 3,42 y 3,40 ppm y, el segundo, a 3,81 y 3,77 ppm.

El protón anomérico se escinde en un par de dobletes, uno a 5,70 ppm y el otro a 5,30 ppm, mostrando una constante de acoplamiento de 2,7 Hz ( $J_{1,2}$ ). El protón metínico de la oxazolidina aparece como un singulete a 5,45 ppm.

---

Estudiamos a continuación, dentro de este mismo apartado, diferentes sustancias obtenidas a partir de las anteriores (ésteres metílicos) con diferente grado de protección.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 3-acetil-2-metoxicarbonil-(1-0-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (55) (Figura 25-A) obtenido en DMSO- $d_6$  a 80 MHz (Tabla 12), muestra a campo alto las señales características del metilo de la amida desdoblado en dos singuletes a 1,88 y 1,82 ppm. A 3,76 y 3,65 ppm aparecen dos singuletes asignados al metilo del éster. A 4,65 ppm aparece el sistema AB del metileno del bencilo, aunque su integral es compatible para tres protones. Al deuterar (Figura 26-A), la señal de dicho sistema se simplifica considerablemente.

Entre 5 y 6 ppm aparece un conjunto de varias señales integradas para tres protones que al deuterar (Figura 26-A) se hace compatible para dos protones, definiéndose dos

TABLA 12

Datos de  $^1\text{H}$ -RMN de los productos 55 y 57 (DMSO- $d_6$ , TMS)

Compuesto	Ar	CH <sub>2</sub> Ph	H1	H2	H4	OCHN	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO	OH4 y OH6
<u>55</u> 80 MHz 20°C	7,35	Sis. AB 4,65	5,74d $J_{1,2} = 2,7\text{Hz}$			5,70s	3,76s	1,88s	5,6 y 4,65
			5,55d $J_{1,2} = 2,7\text{Hz}$			5,30s	3,65s	1,82s	
<u>57</u> 200 MHz 20°C	7 a 8	Sis. AB 4,77 $J^2 = 11,5\text{Hz}$	5,92d $J_{1,2} = 2,7\text{Hz}$		5,57t $J = 9,6\text{Hz}$	5,84s	3,79s	1,96s	—
			5,77d $J_{1,2} = 2,7\text{Hz}$		5,54t $J = 9,6\text{Hz}$	5,41s	3,68s	1,87s	
<u>57</u> 200 MHz 145°C	7 a 8	Sis. AB 4,78 $J^2 = 11,5\text{Hz}$	5,86d $J_{1,2} = 2,9\text{Hz}$	3,69d $J_{2,3} = 9,7\text{Hz}$	5,58t $J_{3,4} = 9,7\text{Hz}$	5,58s	3,77s	1,94s	—

singuletes a 5,70 y 5,30 ppm asignados al protón metínico de la oxazolidina, y dos dobletes a 5,74 y 5,55 ppm asignados al protón anomérico con una constante de acoplamiento de 2,7 Hz ( $J_{1,2}$ ).

A campo bajo (7,35 ppm) se detecta la señal de los cinco protones aromáticos del bencilo.

---

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 3-acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-bencil-4,6-di-O-benzoil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (57) (Figura 27-A) (Tabla 12) efectuado en DMSO- $d_6$  a 200 MHz, muestra a campo alto las señales características del metilo del grupo acetamido, dos singuletes a 1,96 y 1,87 ppm. A 3,79 y 3,68 ppm dos singuletes asignados al metilo del éster. A 4,77 ppm el sistema AB formado por los protones metilénicos del bencilo, presentando una constante geminal de acoplamiento de 11,5 Hz.

Entre 5 y 6 ppm aparece un conjunto de seis señales para tres protones (Figura 28-A). A 5,92 y 5,77 ppm se detectan dos dobletes con una constante de acoplamiento de 2,9 Hz ( $J_{1,2}$ ) asignados al protón anomérico; a 5,84 y 5,41 ppm dos singuletes debidos al protón metínico de la oxazolidina; finalmente un multiplete centrado a 5,55 ppm que se

resuelve en dos tripletes a 5,57 y 5,54 ppm respectivamente, presenta una constante de acoplamiento de 9,6 Hz y se asigna al protón H4.

Cuando se registra el espectro a 145°C todas las señales desdobladas a 20°C colapsan a una sola (Figura 29-A) (Tabla 12). A 1,94 ppm aparece el singulete para el metilo del grupo acetamido. Se detecta el protón H2 como un doble doblete a 3,69 ppm con una constante de acoplamiento de 2,9 Hz ( $J_{1,2}$ ) y otra de 9,7 Hz ( $J_{2,3}$ ). Un singulete a 3,77 ppm debido al metilo del éster.

Entre 4 y 5 ppm aparece el sistema AB del metileno del bencilo (4,78 ppm) con una constante de acoplamiento geminal de 11,5 Hz; y dos multipletes a 4,51 y 4,17 Hz debidos al sistema ABX formado por los protones H6, H6' y H5, y al protón H3.

Entre 5 y 6 ppm aparece un doblete a 5,86 ppm debido al protón anomérico ( $J_{1,2} = 2,9$  Hz); un singulete a 5,58 ppm asignado al protón metínico de la oxazolidina y un triplete a 5,51 asignado a H4 con una constante de acoplamiento de 9,7 Hz.

A campo bajo aparecen las señales de los protones aromáticos (7 a 8 ppm).

---

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 3-acetil-2-metoxicarbonil-(2,3-didesoxi-D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (58) efectuado en  $\text{DMSO-d}_6$  a 200 MHz (Figura 30-A), muestra un conjunto de señales muy complejas debidas, por una parte, a la posibilidad de establecerse el equilibrio entre los anómeros  $\alpha$  y  $\beta$  originándose dos señales para cada protón considerado y, por otra, al desdoblamiento originado en cada señal por la existencia del equilibrio rotacional de la amida, con una velocidad de interconversión baja a la temperatura de registro (20°C).

Este conjunto de consideraciones hace que para cada protón se puedan predecir hasta cuatro señales con sus multiplicidades y constantes de acoplamiento correspondientes.

Efectivamente, las señales más evidentes del espectro, asignables a los metilos del grupo acetamido y del éster metílico, aparecen como varios singuletes. Entre 1,9 y 2,1 ppm aparecen hasta cuatro singuletes para el metilo del grupo acetamido; el singulete ancho a 2,09 ppm es el principal. Entre 3,6 y 3,7 ppm se detectan hasta tres singuletes para el metilo del éster.

Entre 4 y 6 ppm aparece un conjunto de muchas señales pequeñas de difícil asignación. Entre 6 y 7 ppm un conjunto de tres señales (6,32; 6,50 y 6,70 ppm) que desaparecen al deuterar (Figura 31-A). En el espectro deuterado aparecen entre 5 y 6 ppm varios singuletes compatibles con el protón metínico de la oxazolidina (5,02; 5,31; 5,33 y 5,52 ppm) y dobletes compatibles con el protón H1 del anómero  $\alpha$  ( $\delta = 5,96$  ppm;  $J_{1,2} = 3,6$  Hz) y  $\beta$  ( $\delta = 5,24$  ppm;  $J_{1,2} = 8,1$ Hz)

Cuando se efectúan registros a 37°C del producto deuterado (Temperatura Corporal Media = 36,8°C)<sup>81</sup> (Figura 32-A) el aspecto general del espectro difiere con respecto a los tomados a 20°C; apareciendo señales nuevas o modificándose las proporciones relativas de las señales a 20°. Un hecho especialmente interesante se observa a campo bajo, a 9,32 ppm aparece un singulete asignable a un protón de aldehído. Circunstancia que no es de extrañar si se considera que el anillo de oxazolidina tensiona la estructura hemiacetálica del anillo de piranosa, favoreciendo el aumento de temperatura el equilibrio del hemiacetal hacia su forma abierta. Este hecho, como hemos comentado con anterioridad en los Objetivos (II.3.1.) y en la sección II.3.2.2, nos indujo a proponer la síntesis de los metil-glicosidos 28 y 29.

---

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 2-metoxicarbonil-3-n-octanoil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (56) efectuado en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  a 80 MHz (Figura 33-A) (Tabla 13), muestra a campo alto las señales características de la cadena grasa. A 1,95 ppm un triplete debido al  $\text{CH}_2$  en posición  $\alpha$  al carbonilo de la amida; a 1,58 ppm una señal poco resuelta asignada al  $\text{CH}_2$  en posición  $\beta$  al carbonilo; a 1,24 ppm la señal debida a los 5 metilenos restantes de la cadena grasa. El metilo terminal se detecta a 0,87 ppm como un triplete deformado.

A 3,71 ppm aparece el singulete del metilo del éster. A 4,64 ppm las señales debidas al metileno del bencilo, con una integral compatible para tres protones y, como ocurre con su análogo 55 (Tabla 12), esta señal incluye un protón hidroxílico.

Entre 5 y 6 ppm se detectan dos señales; un doblete a 5,98 ppm con una constante de acoplamiento de 2,8 Hz asignada al protón anomérico; un singulete a 5,50 ppm asignado al protón metínico de la oxazolidina, poseyendo una integral compatible con dos protones y como ocurre en la sustancia 55, esta señal incluye un protón hidroxílico.

A 7,32 ppm aparece la señal debida a los cinco protones aromáticos.

TABLA 13

Datos de  $^1\text{H}$ -RMN de los productos  $\underline{56}$  y  $\underline{59}$  (80 MHz, TMS)

Compuesto	Ar	CH <sub>2</sub> Ph	H1	OCHN	OH6	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> α	CH <sub>2</sub> β	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>
$\underline{56}$ Cl <sub>3</sub> CD	7,31m	4,64	5,98d J <sub>1,2</sub> 2,8Hz	5,50s		3,71s	1,95t	1,58	1,24s	0,87t
$\underline{59}$ DMSO-d <sub>6</sub>	—	—	5,62	5,20s	5,06t	3,64s	2,30t	1,47	1,20s	0,82t

---

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 2-metoxicarbonil-3-n-octanoil-(2,3-didesoxi-D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (59) efectuado en  $\text{DMSO-d}_6$  a 80 MHz (Figura 34-A) (Tabla 13), muestra a campo alto las señales características de la cadena grasa. A 2,30 ppm el triplete del  $\text{CH}_2$  en posición  $\alpha$  al carbonilo de la amida; a 1,47 ppm la señal del  $\text{CH}_2$  en posición  $\beta$  al carbonilo; los cuatro metilenos restantes de la cadena grasa se incluyen en un singulete ancho a 1,20 ppm; el metilo terminal se detecta como un triplete a 0,82 ppm.

A 3,64 ppm aparece un singulete debido al metilo del éster. A 5,20 ppm otro singulete asignado al protón metínico de la oxazolidina. El protón anomérico es compatible con una señal ancha detectada a 5,62 ppm, quedando su multiplicidad sin resolver. A 5,06 ppm aparece un triplete que desaparece al deuterar (Figura 35-A) compatible con el hidroxilo en posición 6 del azúcar.

---

En segundo lugar, se estudia a continuación las sustancias obtenidas por condensación con amoníaco o aminoácidos derivadas de diferentes ácidos. Tales sustancias son las sumarizadas en la Tabla 4, dispuestas por orden creciente de su número localizador.

Derivados del ácido 3-acetil-2-carboxi-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (37).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 3-acetil-2-carboxamido-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (43) (Figura 36-A) (Tabla 14) efectuado en DMSO- $d_6$  a 20°C, muestra a campo alto dos singuletes debidos al metilo de la amida en posición C2 del aminoazúcar (1,90 y 1,84 ppm). Entre 5 y 6 ppm aparecen cuatro señales integradas para tres protones; un doblete a 5,88 ppm con una constante de acoplamiento de 2,8 Hz asignado a H1; un singulete a 5,72 ppm debido al protón metínico del grupo protector bencilideno y, dos singuletes con una proporción relativa de 3:1 asignado al protón metínico de la oxazolidina (5,44 y 5,24 ppm).

A campo bajo se detecta el multiplete de los diez protones aromáticos (7,40 ppm) y dos señales para los protones E y Z de la amida a 7,92 y 7,62 ppm.

TABLA 14

Datos de  $^1\text{H}$ -RMN de los productos 43, 44 y 50 (DMSO- $d_6$ , 80 MHz, TMS)

Compuesto	Ar	PhCH	PhCH <sub>2</sub>	H1	OCHN	CH <sub>3</sub> CO	Aminoácido*	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<u>43</u>	7,40m	5,72s	sist. AB 4,65	5,88d $J_{1,2}^{2,8\text{Hz}}$	5,44s 5,24s	1,90s 1,84s	<u>NH<sub>2</sub></u> HE 7,92s HZ 7,62s	—	—
<u>44</u>	7,35m	5,72s	sist. AB 4,66 $J^2_{11,8\text{Hz}}$	5,89d $J_{1,2}^{2,7\text{Hz}}$	5,59s	1,90s	<u>NH glicina</u> 8,93t $J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}^{8,0\text{Hz}}$	4,10c $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3}^{7,1\text{Hz}}$	1,20t
<u>50</u>	7,35m	5,72s	Sist. AB 4,66 $J^2_{11,7\text{Hz}}$	5,89d $J_{1,2}^{2,5\text{Hz}}$	5,58s	1,90s	<u>NH glicina</u> 8,85t $J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}^{8,2\text{Hz}}$	—	—

\* En el caso de 43: Amoníaco

---

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del éster etílico de 3-acetil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonilglicina (44) (Figura 37-A) (Tabla 14) realizado en  $\text{DMSO-d}_6$  a 80 MHz, muestra a 1,20 ppm un triplete debido al metilo del éster etílico de la glicina (grupo protector) con una constante de acoplamiento de 7,1 Hz con el metileno del mismo grupo protector. A 1,90 ppm aparece el metilo de la amida como un singulete. El metileno del éster a 4,10 ppm se observa como cuadruplete con una constante de acoplamiento de 7,1 Hz. El sistema AB del metileno del bencil-glicósido se detecta a 4,66 ppm con una constante de acoplamiento geminal de 11,8 Hz. A 5,89 ppm el doblete del protón anomérico con una constante de acoplamiento de 2,7 Hz ( $J_{1,2}$ ). A 5,72 y 5,59 ppm aparecen respectivamente los singuletes de los protones metínicos del grupo bencilideno y de la oxazolidina.

A campo bajo se detecta el multiplete de los diez protones aromáticos (7,35 ppm) y el triplete a 8,93 ppm del protón de la amida de la glicina con un acoplamiento de 8,0 Hz ( $J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}$ ).

---

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 3-acetil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonilglicina (50) (Figura 38-A) (Tabla 14) realizado en  $\text{DMSO-d}_6$  a 80 MHz, muestra a campo alto y como era de esperar, el singulete del acetilo de la amida a 1,90 ppm. A 4,66 ppm el sistema AB del metileno del bencilo con una constante geminal de 11,7 Hz.

Entre 5 y 6 ppm aparece un doblete correspondiente a H1 con una  $J_{1,2}$  de 2,5 Hz; dos singuletes a 5,72 y 5,58 ppm debidos a los protones metínicos del bencilideno y la oxazolidina respectivamente.

A campo bajo se detecta el multiplete de los diez protones aromáticos (7,35 ppm) y un triplete a 8,85 ppm debido al protón de la amida de la glicina con una constante de acoplamiento de 8,2 Hz ( $J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}$ ).

---

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del éster etílico de 3-acetil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanina (45) (Figura 39-A) (Tabla 15) efectuado en  $\text{Cl}_3\text{CD}$ , muestra a campo alto un triplete (1,28 ppm) correspondiente al metilo del éster con una  $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3}$  de 7,2 Hz. A 2,10 ppm un singulete ancho debido

TABLA 15

Datos de  $^1\text{H}$ -RMN de los productos  $\underline{45}$ ,  $\underline{46}$  y  $\underline{47}$  ( $\text{Cl}_3\text{CD}$ , 80 MHz, TMS)

Compuesto	Ar	PhCH	PhCH <sub>2</sub>	Hl	OHN	CH <sub>3</sub> CO	Aminoácido		OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	
$\underline{45}$	7,35m	5,60s	Sist. AB 4,69 $J^2_{11,7\text{Hz}}$	6,02sa	5,44s	2,10sa	L-Alanina		4,21c	1,28t	
							NH	CH <sub>3</sub>			
							6,82d	1,44d			
							$J_{\text{H}\alpha, \text{NH}} 7,4\text{Hz}$	$J_{\text{H}\alpha, \text{CH}_3} 7,2\text{Hz}$	$J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} 7,1\text{Hz}$		
$\underline{46}$	7,35m	5,61s	Sist. AB 4,68	6,05sa	5,48s	2,12sa	L-Valina			4,22c	1,28t
							NH	Me <sub>2</sub> CH	Me <sub>2</sub> CH		
							6,77d	2,12	0,94d; 0,92d		
							$J_{\text{H}\alpha, \text{NH}} 8,5\text{Hz}$	$J_{\text{CH}, \text{CH}_3} 6,8\text{Hz}$	$J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} 7,1\text{Hz}$		
$\underline{47}$	7,34m	5,56s	Sist. AB 4,88	5,99sa	5,42s	2,11sa	L-fenilalanina		4,23c	1,26t	
							NH	CH <sub>2</sub>			
							6,78d	4,72			
							$J_{\text{H}\alpha, \text{NH}} 7,9\text{Hz}$		$J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} 7,5\text{Hz}$		

al metilo de la amida.

A 4,21 ppm aparece un cuádruplete asignado al metileno del éster con una constante de acoplamiento de 7,1 Hz. El sistema AB formado por el metileno del bencilo se detecta a 4,69 ppm ( $J^2$  11,7 Hz).

Entre 5 y 6 ppm aparece un singulete ancho asignado a H1 y, otros dos singuletes a 5,60 y 5,44 ppm asignados respectivamente a los protones metínicos del grupo bencilideno y de la oxazolidina.

A campo bajo aparece el multiplete de los diez protones aromáticos (7,35 ppm) y un doblete a 6,82 ppm correspondiente al protón de la amida de la L-Ala ( $J_{H\alpha, NH}$  7,4 Hz), señal que como se observa en la Figura 40-A desaparece al deuterar.

---

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del éster etílico de 3-acetil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-fenilalanina (47) (Figura 41-A) (Tabla 15) efectuado en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  a 80 MHz, muestra a campo alto (1,26 ppm) un triplete con una constante de acoplamiento de 7,5 Hz asignado al metilo del éster de la L-

fenilalanina. A 2,11 ppm un singulete ancho asignado al metilo del grupo acetamido. El metileno del éster aparece a 4,23 ppm como un cuadruplete con una  $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3}$  de 7,5 Hz. El metileno de la L-fenilalanina se detecta a 4,72 como un singulete ancho ligeramente desdoblado. El metileno del bencilo aparece a 4,88 ppm observandose solo parte del sistema AB.

Entre 5 y 6 ppm aparecen las señales características para el protón anomérico (5,99 ppm), ancho y sin resolver su multiplicidad; el protón metínico del bencilideno, singulete a 5,56 ppm; el protón metínico de la oxazolidina, singulete a 5,42 ppm.

A campo bajo se detecta el doblete del protón de la amida de la L-fenilalanina (6,78 ppm,  $J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}$  7,9 Hz) y los quince protones aromáticos como un multiplete centrado a 7,34 ppm.

---

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del éster etílico de 3-acetil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-valina (46) (Figura 42-A) (Tabla 15) efectuado en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  a 80 MHz, muestra a campo alto dos dobletes (0,92 y 0,94 ppm) integrados para seis protones, asignados a los dos metilos isopropílicos de la

L-valina, con una constante de acoplamiento de 6,8 Hz. A 2,12 ppm aparece un singlete ancho, algo deformado, integrado para cuatro protones, esta señal se asigna al metilo de la amida y al protón metínico del grupo isopropilo de la valina. A 1,28 ppm el triplete del  $\text{CH}_3$  del éster ( $J = 6,8\text{Hz}$ ).

El metileno del éster aparece como un cuartete a 4,22 ppm ( $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} 7,1\text{ Hz}$ ) y el sistema AB del metileno del bencilo a 4,68 ppm.

Entre 5 y 6 ppm se detectan tres singletes; uno ancho a 6,05 ppm correspondiente al protón anomérico; otro a 5,61 ppm asignado al protón metínico del grupo bencilideno y un tercero, a 5,45 ppm, debido al protón metínico de la oxazolidina.

A campo bajo aparece el multiplete de los diez protones aromáticos (7,35 ppm) y un doblete asignado al protón de la amida de la L-valina (6,77 ppm) con un acoplamiento de 8,5 Hz ( $J_{\text{H}_\alpha, \text{NH}}$ ).

---

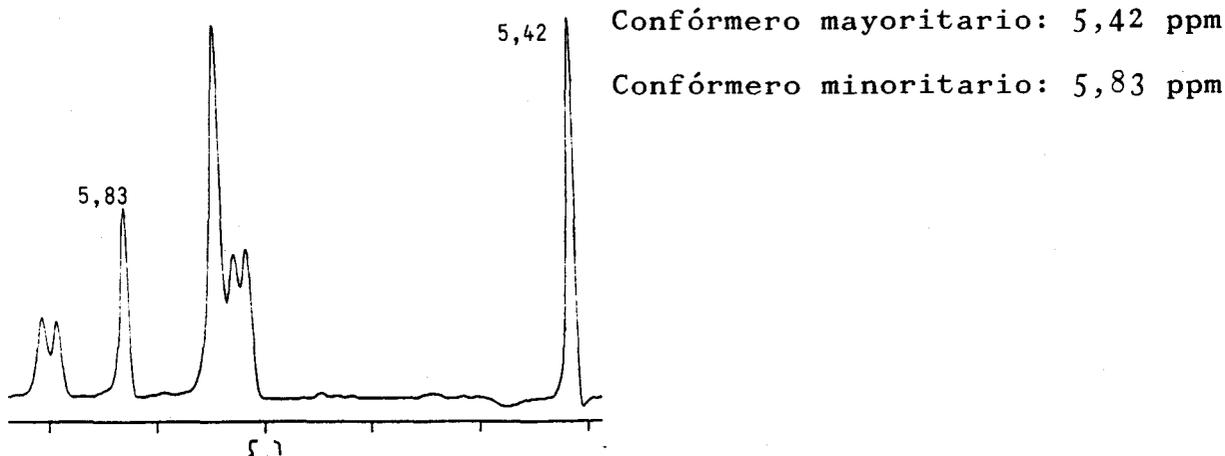
De los diferentes productos (N-acetil derivados) expuestos en las Tablas 14 y 15, solo la sustancia 43 presenta desdoblamientos en algunas de las señales como ocurre con

su análogo 40 (Tabla 7). Los demás productos obtenidos por condensación con los aminoácidos glicina (44), L-alanina (45), L-valina (46) y L-fenilalanina (47) presentan una única señal para cada tipo de protón.

El estudio de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN para el producto 40 predice una mayor abundancia en disolución (DMSO) del Confórmero B (Figura 17), justificado por el hecho de presentar menores interacciones electrónicas entre el carbonilo de la amida, en posición 3 de la oxazolidina, y el sustituyente (metoxicarbonil) en posición 2. Y por razones estéricas.

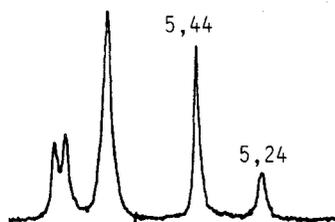
Según W. E. Stewart<sup>94</sup> es posible predecir a partir de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN el confórmero de que se trata. Para las N-isopropilamidas los protones metínicos resuenan a campo más alto cuando están en disposición *anti* al oxígeno carbonílico.

Para la sustancia 40 el desplazamiento químico del protón de la oxazolidina sufre un acusado desdoblamiento:



Ello conduce a pensar que el confórmero mayoritario posee el protón metínico de la oxazolidina en *anti* con el oxígeno carbonílico de la amida, hecho que ya se confirmó por espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -RMN.

Si analizamos con el mismo criterio los desplazamientos químicos del protón metínico de la oxazolidina en la sustancia 43, se llega a la siguiente conclusión:



Confórmero mayoritario: 5,44 ppm

Confórmero minoritario: 5,24 ppm

Ello conduce a pensar, en este caso, que el confórmero en mayor proporción en el equilibrio posee el protón metínico de la oxazolidina en disposición *syn* respecto al oxígeno del carbonilo de la amida.

Dicho fenómeno se explica por el hecho de que puede establecerse un puente de hidrógeno entre los protones del grupo 2-carboxamido y el carbonilo del grupo 3-acetamido como se observa en la Figura 18.

Este nuevo confórmero, estabilizado por puente de hidrógeno, posee un exceso de población superior al exceso conformacional mostrado por la sustancia 40 a la misma

temperatura y en el mismo disolvente. Para la sustancia 40 el exceso conformacional es de 2:1 a favor del Confórmero B (Figura 17); para la sustancia 43 el exceso es de 3:1 a favor del confórmero A (Figuras 17 y 18).

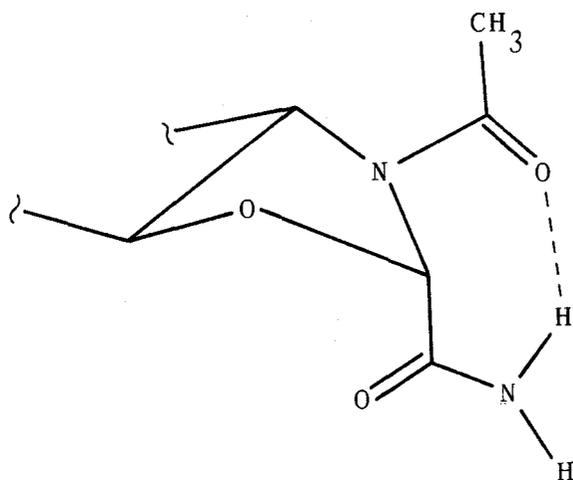


Figura 18

Tal preferencia conformacional estabilizada por puente de hidrógeno en amidas, formando ciclos de siete átomos, ha sido descrita por B. F. Sagar.<sup>102</sup> Ello puede explicar el hecho de que no se detecten doubles señales para los protones de los productos de condensación con aminoácidos (44, 45, 46 y 47) (Tablas 14 y 15), ya que el NH del enlace peptídico, establecido con cada aminoácido, estabiliza el Confórmero A por formación de puente de hidrógeno con el carbonilo de la amida en posición 3 de la oxazolidina. El establecimiento del puente de hidrógeno aludido es análogo a la

situación del compuesto natural (MDP)<sup>103,122</sup>, estableciéndose un puente de hidrógeno (tanto en agua como en DMSO) entre el NH de la L-alanina y el carbonilo del grupo N-acetilo en posición C2 del azúcar.

---

Derivados del ácido 2-carboxi-3-n-octanoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (38).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del éster etílico de 3-n-octanoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonilglicina (48) (Figura 43-A) (Tabla 16) realizado en  $\text{Cl}_3\text{CD}$  a 80 MHz, muestra a campo alto las señales características de la cadena grasa y el metilo del éster metílico. A 2,35 ppm aparece un triplete (Figura 44-A) correspondiente al grupo metileno en  $\alpha$  al carbonilo de la cadena grasa; a 1,58 ppm una señal ancha (Figura 44-A) debida al metileno en  $\beta$  al carbonilo; a 1,24 ppm un singulete ancho asignado a los ocho protones de los cuatro metilenos restantes de la cadena grasa; a 0,87 ppm un psudotriplete que corresponde al metilo terminal de la cadena. A 1,29 ppm se detecta un triplete con una constante de

TABLA 16

Datos de  $^1\text{H}$ -RMN de los productos 48 y 51 (80 MHz, TMS)

Compuesto	Ar	PhCH	PhCH <sub>2</sub>	Hl	OCHN	CH <sub>2</sub> ( $\alpha$ )	CH <sub>2</sub> ( $\beta$ )	(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	CH <sub>3</sub>	Aminoácido	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<u>48</u> $\text{Cl}_3\text{CD}$	7,35m	5,60s	Sist. AB 4,69	6,02sa	5,54s	2,35t	1,57	1,24sa	0,87t	<u>Glicina</u>		
										NH	CH <sub>2</sub>	6,83
										$J_{\text{NH},\text{CH}_2}$ 5,8Hz	$J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3}$ 6,8Hz	
<u>51</u> $\text{DMSO-d}_6$	7,35m	5,73s	Sist. AB 4,64	5,90d	5,53s	2,08t		1,19sa	0,85t	<u>L-Alanina</u>		
										NH	CH <sub>3</sub>	8,91d
			$J^2$ 11,6Hz	$J_{1,2}$ 2,6Hz						$J_{\text{H}\alpha,\text{NH}}$ 7,6Hz	$J_{\text{H}\alpha,\text{CH}_3}$ 7,5Hz	

acoplamiento de 7,1 Hz que corresponde al metilo del éster etílico.

Entre 4 y 5 ppm se observa el metileno del éster etílico (4,23 ppm) como un cuartete con un acoplamiento de 6,8 Hz ( $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3}$ ); el metileno de la glicina a 4,02 ppm como un doblete por su acoplamiento con el protón de la amida ( $J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}$  5,8 Hz); el metileno del bencilo formando un sistema AB a 4,68 ppm.

Entre 5 y 6 ppm aparecen tres singuletes asignados uno al protón anomérico (6,02 ppm, señal ancha y mal resuelta), otro al protón metínico del bencilideno (5,60 ppm) y, el último al protón metínico de la oxazolidina (5,54 ppm).

A campo bajo aparece un multiplete (7,35 ppm) debido a los diez protones aromáticos y una señal poco resuelta que corresponde al protón de la amida (6,83 ppm).

Cuando se deutera la muestra (Figura 44-A) desaparece la señal asignada al protón de la amida (6,83 ppm) y se desacopla el metileno de la glicina (4,02 ppm) originando un singulete a 4,04 ppm.

---

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 3-n-octanoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanina (51) (Figura 45-A) (Tabla 16) realizado en  $\text{DMSO-d}_6$  a 80 MHz, muestra a campo alto las señales características de la cadena grasa y del metilo de la L-alanina. A 2,08 ppm aparece un triplete correspondiente al grupo metileno en  $\alpha$  al carbonilo de la cadena grasa; a 1,19 ppm un singulete ancho debido a los cuatro metilenos terminales de la cadena grasa; a 0,85 ppm el triplete deformado del metilo de dicha cadena. A 1,30 ppm aparece el doblete del metilo de la L-alanina con una constante de acoplamiento de 7,5 Hz ( $J_{\text{H}\alpha, \text{CH}_3}$ ).

Entre 4 y 6 ppm se detecta el doblete del protón anomérico (5,90 ppm) con un acoplamiento de 2,6 Hz ( $J_{1,2}$ ); un singulete a 5,73 ppm del protón metínico del bencilideno; otro singulete a 5,53 ppm del protón metínico de la oxazolidina y, finalmente, el sistema AB formado por los protones de metileno del bencilo (4,64 ppm,  $J^2$  11,6Hz).

A campo bajo aparece un multiplete (7,35 ppm) debido a los diez protones aromáticos y un doblete a 8,91 ppm asignado al protón de la amida de la L-alanina ( $J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}$  7,6Hz)

---

Por último abordaremos el estudio espectroscópico de las sustancias obtenidas por condensación con los dipéptidos L-alanil-D-isoglutamina con diferente grado de protección, así como los productos completamente desbloqueados, objetivo de esta Tesis. En conjunto, todas estas sustancias se sumarizan en la Tabla 5 al comienzo de esta sección.

Derivados del ácido 3-acetil-2-carboxi-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (37).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del éster bencílico de 3-acetil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (53) (Figura 46-A) (Tabla 17) realizado en  $\text{DMSO-d}_6$  a 200 MHz muestra a campo alto diferentes señales características del resto de azúcar y péptido.<sup>103,106</sup> Así, a 1,35 ppm se detecta el doblete del metilo de la L-alanina, con una constante de acoplamiento de 7,2 Hz ( $J_{\text{H}\alpha, \text{CH}_3}$ ); a 2,49 ppm el multiplete debido a los protones  $\gamma$  de la D-isoglutamina. A 1,95 ppm se detecta el singulete (ancho) del metilo del grupo acetamido.

A 4,79 ppm se encuentra el sistema AB de los protones metilénicos del bencilo en posición anomérica, señal que por estar afectada de desdoblamiento se observa como un multiplete.

TABLA 17

Datos de  $^1\text{H}$ -RMN de la sustancia 53 (DMSO- $d_6$ , 200 MHz, TMS)

Azúcar						
Ar	CHPh	CH <sub>2</sub> Ph	H1	OCHN	CH <sub>3</sub> CO	
7,48m	5,67s	Sist.AB 4,79*	5,98s	5,84s	1,95sa	
			5,78s	5,48s		
L-Alanina			D-isoGlutamina			
NH	CH <sub>3</sub>		NH	NH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> ( $\gamma$ )	CH <sub>2</sub> Ph
8,32d				7,38s		
	1,35d		9,04d	7,29s	2,49m	5,18s
7,62d				7,21s		
$J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}$ 8,2Hz	$J_{\text{H}, \text{CH}_3}$ 7,2Hz		$J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}$ 7,5Hz			

\* Señal afectada de desdoblamiento

Entre 5 y 6 ppm aparece el protón anomérico desdoblado a 5,98 y 5,78 ppm (señal poco resuelta, aparece como singulete); el protón metínico de la oxazolidina, singulete desdoblado a 5,84 y 5,48 ppm; el protón metínico del bencilideno, singulete a 5,67 ppm; y, finalmente, el metileno del éster bencílico, singulete a 5,18 ppm.

A campo bajo se detecta la señal de los quince protones aromáticos (7,48 ppm), así como diferentes señales para los protones de amida del resto peptídico:<sup>103</sup> tres singuletes asignados al NH<sub>2</sub> de la D-isoglutamina a 7,38, 7,29 y 7,21 ppm; un doblete asignado al NH de la D-isoglutamina (9,04 ppm) con un acoplamiento de 7,5 Hz ( $J_{H\alpha, NH}$ ); y dos dobletes asignados al NH de la L-alanina (8,32 y 7,62 ppm) con una constante de acoplamiento de 8,2 ppm ( $J_{H\alpha, NH}$ ).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del éster bencílico de 3-acetil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (61) (Figura 47-A) (Tablas 18 y 19) realizado a 200 MHz en  $\text{DMSO-d}_6$ , muestra a campo alto señales características del azúcar (Tabla 18) y del péptido (Tabla 19). A 1,25 ppm se detecta el metilo de la L-alanina como dos dobletes a 1,24 y 1,26 ppm. Dos singuletes a 1,79 y 1,85 ppm asignados al metilo del grupo acetamido. Dos multipletes a 1,98 y 2,40 ppm asignados respectivamente a los protones de metileno  $\beta$  y  $\gamma$  de la D-isoglutamina.

A 3,19 ppm se detecta el protón H2 (o parte de él) como doble doblete ( $J_{1,2}$  2,7 Hz;  $J_{2,3}$  9,8 Hz). A 4,67 un multiplete asignado al metileno del bencilo en posición anomérica.

Entre 5 y 6 ppm aparece un complejo sistema de señales (Tabla 18) que se resuelve de la siguiente manera: a 5,46 y 5,35 ppm dos singuletes asignados al protón metínico de la oxazolidina; a 5,94 ppm parte del protón anomérico ( $J_{1,2}$  2,7 Hz); a 5,56 ppm un doblete asignado a parte del proton OH-4 ( $J_{\text{H4,OH}}$  5,9 Hz); las señales desdobladas de H1 y OH-4 aparecen solapadas (OH-4 a 5,58 ppm y H1 a 5,55 ppm). Finalmente un singulete para dos protones debidos a los protones del metileno del éster bencílico a 5,07 ppm.

TABLA 18

Datos de  $^1\text{H}$ -RMN del resto de azúcar de la sustancia 61 (DMSO- $d_6$ , 200 MHz, TMS)

Temperatura	Ar	CH <sub>2</sub> Ph	H1	H2	OCHN	CH <sub>3</sub> CO	OH-4
20°C	7,35m	4,67	5,94d	3,19dd	5,46s	1,85s	5,66d
			5,55		5,35s	1,79	5,58
			J <sub>1,2</sub> 2,7Hz	J <sub>2,3</sub> 9,8Hz			J <sub>H4,OH</sub> 5,9Hz
145°C	7,32m	Sist.AB	5,70d	3,37dd	5,45s	1,86s	5,00d
		4,65					
		J <sup>2</sup> 11,5Hz	J <sub>1,2</sub> 2,7Hz	J <sub>2,3</sub> 9,9Hz			J <sub>H4,OH</sub> 5,9Hz

TABLA 19

Datos de  $^1\text{H}$ -RMN del resto peptídico de la sustancia  $\underline{\text{61}}$  (DMSO- $\text{d}_6$ , 200 MHz, TMS)

Temperatura	L-Alanina		D-isoGlutamina					
	NH	$\text{CH}_3$	NH	$\text{NH}_2$	$\text{CH}_2(\gamma)$	H( $\beta$ )	H'( $\beta$ )	$\text{CH}_2\text{Ph}$
20°C	8,10d	1,26d	9,10d	7,03s				
					2,40m	---	1,98m ---	5,07s
	7,50d	1,24d	8,84d	6,76s				
	$J_{\text{H}\alpha, \text{NH}} 8,0\text{Hz}$	$J_{\text{H}\alpha, \text{CH}_3} 7,3\text{Hz}$	$J_{\text{H}\alpha, \text{NH}} 7,5\text{Hz}$					
145°C	7,40d	1,27d	8,22d	6,57s	2,43t	2,10m	1,95m	5,09s
		$J_{\text{H}, \text{CH}_3} 7,4\text{Hz}$			$J_{\text{H}\gamma, \text{H}\beta} 7,4\text{Hz}$			

A campo bajo se detectan las señales de los protones aromáticos (multiplete a 7,35 ppm) y de los protones de las amidas del péptido. Así, a 6,76 y 7,03 ppm se detectan dos singuletes debidos al NH del resto de D-isoglutamina. A 8,10 y 7,50 ppm dos dobletes asignados al NH del resto de L-alanina ( $J_{H\alpha, NH}$  8,0 Hz). A 9,10 y 8,84 ppm se detecta el NH de la D-isoglutamina como dos dobletes ( $J_{H\alpha, NH}$  7,5Hz).

Cuando se registra un espectro a 90°C de la sustancia 61 (Figura 48-A) se observa que muchas de las señales se simplifican. Son de destacar, a campo alto, el metilo de la L-alanina que colapsa a un doblete (1,27 ppm); el metilo del grupo acetamido colapsa a un singulete a 1,86 ppm; el CH<sub>2</sub>-γ de la D-isoglutamina que se resuelve como un triplete a 2,43 ppm.

Entre 5 y 6 ppm destaca el protón anomérico a 5,66 ppm como un "singulete" muy ancho; a 5,44 ppm un singulete, aun ancho, para el protón metínico de la oxazolidina; finalmente el OH-4 como un doblete poco resuelto ( $J_{H4, OH}$  5,9 Hz) a 5,29 ppm.

A campo bajo es de destacar el NH<sub>2</sub> de la D-isoglutamina a 6,77 ppm como una única señal ancha. Y el NH de la L-alanina y D-isoglutamina como dos señales muy anchas y poco perceptibles respectivamente a 7,56 y 8,54 ppm.

Cuando se registra un espectro a 145°C se consigue resolver aun más muchas señales del espectro (Figura 49-A) (Tablas 18 y 19). A campo alto puede ahora diferenciarse los multipletes debidos a los protones H $\beta$  y H' $\beta$  del residuo de D-isoglutamina,<sup>103</sup> respectivamente a 2,10 y 1,95 ppm. El protón H<sub>2</sub> queda resuelto como doble doblete a 3,37 ppm con los acoplamientos de J<sub>1,2</sub> 2,7 Hz y J<sub>2,3</sub> 9,9 Hz. El sistema AB del bencilo en posición anomérica queda bien resuelto con un acoplamiento geminal de 11,5 Hz, centrado a 4,65 ppm.

Principalmente es de destacar que a campo bajo se detectan señales únicas para el NH<sub>2</sub> del resto de D-isoglutamina (singulete a 6,57 ppm) y para el NH del resto de L-alanina y D-isoglutamina (dobletes a 7,40 y 8,82 ppm respectivamente).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 3-acetil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L--alanil-D-isoglutamina (65) (Figura 50-A) (Tabla 20) efectuado a 80 MHz en  $\text{DMSO-d}_6$ , muestra a campo alto algunas señales características del azúcar y del péptido. A 1,25 ppm el doblete del metilo de la L-alanina ( $J_{\text{H}\alpha, \text{CH}_3}$  6,9 Hz); a 2,03 ppm el multiplete debido al  $\text{CH}_2$ - $\gamma$  de la D-isoglutamina. A 1,81 ppm se detecta el metilo del grupo acetamido.

El metileno del bencilo, grupo protector del hidroxilo anomérico, se detecta a 4,63 ppm como un multiplete. Entre 5 y 6 ppm se detectan tres señales: un doblete mal resuelto a 5,73 ppm asignado a H1 y dos singuletes (5,53 y 5,30 ppm) asignados al protón metínico de la oxazolidina. Cuando se registra el espectro de la sustancia tratada con  $\text{D}_2\text{O}$  (Figura 51-A), la zona comprendida entre 5 y 6 ppm se resuelve mejor, apareciendo dos dobletes (5,70 y 5,52 ppm) para H1 ( $J_{1,2}$  2,9 Hz) y dos singuletes para el protón metínico de la oxazolidina (5,45 y 5,27 ppm).

A campo bajo se detectan los protones de amida del péptido (Figura 50-A). A 7,20 y 6,95 ppm aparecen dos singuletes asignados respectivamente a los protones del  $\text{NH}_2$  de la D-isoglutamina (protones E y Z);<sup>103</sup> a 7,67 ppm el NH de la L-alanina como un doblete; a 8,86 y 8,65 ppm dos dobletes mal resueltos asignados al NH de la D-isoglutamina. Todas

TABLA 20

Datos de  $^1\text{H}$ -RMN de la sustancia  $\underline{65}$  y  $\underline{26}$  (DMSO- $d_6$ , 80 MHz, TMS)

Compuesto						L-Alanina		D-isoGlutamina		
	Ar	CH <sub>2</sub> Ph	HI	OCHN	CH <sub>3</sub> CO	NH	CH <sub>3</sub>	NH	NH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> ( $\gamma$ )
$\underline{65}$			5,70d*	5,45s*				8,86d	(E)7,20s	
	7,33m	4,63m			1,81sa	7,67d	1,25d			2,03m
			5,52d*	5,27s*				8,65d	(Z)6,95s	
			$J_{1,2}$ 2,9Hz				$J_{\text{H}\alpha, \text{CH}_3}$ 6,9Hz			
$\underline{26}$						8,23d		9,50d	(E)7,33s	
			5,44d*	5,29s*	1,90		1,25d*			
						8,05d		9,22d	(Z)6,89s	
			$J_{1,2}$ 2,9Hz				$J_{\text{H}\alpha, \text{CH}_3}$ 7,1Hz			

\* Datos obtenidos por intercambio con D<sub>2</sub>O

estas señales desaparecen al deuterar (Figura 51-A). Los protones aromáticos del grupo bencilo se observan a 7,33 ppm

---

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 3-acetil-(2,3-didesoxi-D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (26) (Figura 52-A) (Tabla 20) efectuado a 80 MHz en  $\text{DMSO-d}_6$ , muestra a campo alto dos multipletes a 1,25 y 1,90 ppm; el multiplete a 1,25 ppm en el espectro deuterado (Figura 53-A) se resuelve como un doblete con una constante de acoplamiento de 7,1 Hz, asignado al metilo de la L-alanina ( $J_{\text{H}\alpha, \text{CH}_3}$ ); el multiplete a 1,90 ppm queda sin resolver, asignándose conjuntamente al metilo del grupo acetamido y a los metilenos  $\beta$  y  $\gamma$  de la D-isoglutamina.

Entre 5 y 6 ppm aparece un sistema complejo de señales; en el espectro deuterado (Figura 53-A) se resuelve el protón anomérico como un doblete a 5,44 ppm ( $J_{1,2}$  2,9 Hz) y el protón metínico de la oxazolidina a 5,29 ppm.

A campo bajo se detectan varias señales de amidas. Los protones E y Z de la D-isoglutamina ( $\text{NH}_2$ ) a 7,33 y 6,89 ppm respectivamente. El NH de la L-alanina poco resuelto como dos dobletes a 8,23 y 8,05 ppm. Por último el NH de la D-isoglutamina como dos dobletes a 9,50 y 9,22 ppm.

Derivados del ácido 2-carboxi-3-n-octanoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (38).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del éster bencílico de 3-n-octanoil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (64) (Figura 54-A) (Tabla 21) efectuado en  $\text{DMSO-d}_6$  a 80 MHz, muestra a campo alto las señales características de la cadena grasa las cuales integran la mayor parte de las señales del péptido. A 0,83 ppm un triplete deforme debido al metilo terminal de la cadena grasa; a 1,15 ppm un multiplete debido a los cinco metilenos terminales de la cadena, así como al metilo de la L-alanina; a 1,99 ppm un triplete deforme debido al metileno en  $\alpha$  al carbonilo de la cadena grasa. A 2,35 ppm aparece una señal compatible con el metileno  $\gamma$  de la D-isoglutamina.

A 4,60 ppm se detecta el metileno del bencilo en posición anomérica. En el espectro de la sustancia deuterada (Figura 55-A) se aprecia el sistema AB que forman dichos protones.

Entre 5 y 6 ppm aparece el metileno del éster bencílico como un singulete a 5,08 ppm; a 5,50 y 5,35 ppm dos singuletes asignados al protón metínico de la oxazolidina;

a 5,75 ppm un doblete asignado a H1 ( $J_{1,2}$  2,9 Hz). En el espectro de la sustancia deuterada (Figura 55-A) la zona entre 5 y 6 ppm se muestra más resuelta, pudiendose detectar otra parte del protón anomérico a 5,52 ppm incluida en una de las señales del protón metínico de la oxazolidina.

A campo bajo se detectan las señales de las amidas del péptido. Las correspondientes al  $\text{NH}_2$  de la D-isoglutamina aparecen como dos singuletes, uno para el protón E (7,03 ppm) y otra para el Z (6,60 ppm). El NH de la L-alanina aparece desdoblado a 8,00 y 7,60 ppm ( $J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}$  7,8 Hz). El NH de la D-isoglutamina aparece también desdoblado a 9,09 y 8,77 ppm ( $J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}$  7,4 Hz). Todas estas señales desaparecen al deuterar (Figura 55-A).

Finalmente se detectan los diez protones aromáticos a 7,32 ppm.

TABLA 21

Datos de  $^1\text{H}$ -RMN de la sustancia 64 (DMSO- $d_6$ , 80 MHz, TMS)

Azúcar							L-Alanina		D-isoGlutamina			
Ar	CH <sub>2</sub> Ph	H1	OCHN	CH <sub>2</sub> (α)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	CH <sub>3</sub>	NH	CH <sub>3</sub>	NH	NH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> (γ)	CH <sub>2</sub> Ph
		5,75d	5,50s				8,00d		9,09d	(E)7,03s		
7,32m	Sist, AB 4,60			1,99t	1,15m	0,83t					2,35m	5,08s
		5,52d*	5,35s				7,60d		9,77d	(Z)6,60s		
		J <sub>1,2</sub> 2,9Hz					J <sub>Hα, NH</sub> 7,8Hz		J <sub>Hα, NH</sub> 7,4Hz			

\*Dato obtenido por intercambio con D<sub>2</sub>O

Derivados del ácido 3-acetil-2-carboxi-(4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\beta$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (68).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del éster bencílico de 3-acetil-(4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\beta$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (70) efectuado a 200 MHz en DMSO- $d_6$  (Figura 56-A)(Tabla 22), muestra a campo alto un doblete a 1,26 ppm asignado al metilo de la L-alanina ( $J_{\text{H}\alpha, \text{CH}_3}$  7,1 Hz); un singulete a 2,03 ppm correspondiente al metilo del acetilo; un multiplete a 1,85 ppm asignado al  $\text{CH}_2$ - $\beta$  de la D-isoglutamina y un triplete a 2,33 ppm debido al  $\text{CH}_2$ - $\gamma$  del mismo aminoácido, con una constante de acoplamiento de 7,3 Hz ( $J_{\text{H}\beta, \text{H}\gamma}$ ).

A 3,46 ppm aparece un singulete debido al metilo glicosídico. Entre 5 y 6 ppm aparecen tres singuletes; a 5,72 ppm el protón metínico del grupo bencilideno; a 5,53 ppm el protón metínico de la oxazolidina; a 5,06 ppm un singulete integrado para tres protones, dos debidos al metileno del éster bencílico y otro al protón anomérico.

A campo bajo pueden observarse las señales correspondientes a los protones aromáticos (10 H a 7,37 ppm) y a los protones de las amidas del péptido. A 7,73 ppm aparece una señal ancha no resuelta asignada al protón del NH de

TABLA 22

Datos de  $^1\text{H}$ -RMN de la sustancia 70 (DMSO- $d_6$ , 200 MHz, TMS)

Azúcar						L-Alanina		D-isoGlutamina				
Ar	CHPh	OCH <sub>3</sub>	H1	OCHN	CH <sub>3</sub> CO	NH	CH <sub>3</sub>	NH	NH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> ( $\gamma$ )	CH <sub>2</sub> ( $\beta$ )	CH <sub>2</sub> Ph
7,37m	5,72s	3,46s	5,06	5,53s	2,03s	7,73sa	1,26d	8,80sa	(E)7,28s	2,33t	1,85m	5,06s
									(Z)7,12s			
						$J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}^*$ 8,4Hz	$J_{\text{H}\alpha, \text{CH}_3}$ 7,1Hz	$J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}^*$ 7,5Hz		$J_{\text{H}\gamma, \text{H}\beta}$ 7,3Hz		

\* Medidas efectuadas en un registro a 80°C

la L-alanina; a 8,80 ppm otra señal poco resuelta y ancha asignada al protón del NH de la D-isoglutamina. Las señales de los protones del NH<sub>2</sub> de la D-isoglutamina aparecen como dos singuletes a 7,28 ppm para el protón E y a 7,12 ppm para el Z.

Cuando se efectua un registro a 80°C se resuelven las señales debidas a los NH, apareciendo ahora un doblete para la L-alanina ( $J_{H\alpha, NH}$  8,4 Hz) y otro para la D-isoglutamina ( $J_{H\alpha, NH}$  7,5 Hz). En cambio, las señales de los protones del NH<sub>2</sub> de la D-isoglutamina colapsan a un solo singulete. En la Figura 57-A se muestra la porción del espectro correspondiente a las amidas a 20 y 80°C.

---

El espectro de <sup>1</sup>H-RMN de 3-acetil-(2,3-didesoxi-1-O-metil-β-D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (28) (Tabla 23), muestra a campo alto (Figura 58-A) algunas señales del péptido y del azúcar. A 1,24 ppm se observa un multiplete para el metilo de la L-alanina. A 2,04 ppm un singulete ancho para el metilo del grupo acetamido; señal que destaca entre dos multipletes centrados a 2,12 y 1,83 ppm asignados respectivamente a los metilenos γ y β de la D-isoglutamina. A 3,20 ppm aparece



el singulete del metilo en posición anomérica.

En la Figura 59-A se recoge la porción del espectro comprendida entre 4 y 9,5 ppm. Destaca a 4,46 ppm un doblete compatible con H1 por su acoplamiento de 8,3 Hz ( $J_{1,2}$ ). A 5,32, 5,35 y 5,45 ppm aparecen singuletes compatibles con el protón metínico de la oxazolidina. A 5,92 ppm se detecta un protón hidroxílico, señal poco resuelta que desaparece al deuterar.

Entre 6,5 y 9,5 ppm aparecen varias señales asignadas a protones de amidas; todas ellas desaparecen al deuterar la muestra. Para el  $\text{NH}_2$  del residuo de D-isoglutamina se detectan tres singuletes a 7,00, 7,19 y 7,31 ppm. Para el NH de este mismo aminoácido se detectan dos dobletes a 8,88 y 9,35 ppm ( $J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}$  7,2 Hz). Finalmente, el NH del residuo de L-alanina se detecta como dos señales poco resueltas a 7,82 y 8,12 ppm, una de ellas muestra un acoplamiento de 7,8 Hz ( $J_{\text{H}\alpha, \text{NH}}$ ).

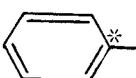
Se han estudiado también los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la serie de los  $\beta$ -metil-glicósidos. Considerando desde el derivado más simple (éster metílico del ácido totalmente bloqueado, 69) hasta el producto condensado con el dipéptido y completamente desbloqueado (sustancia 28).

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de 3-acetil-2-metoxicarbonil-(4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\beta$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (69) (Figura 60-A) (Tabla 24) efectuado a 50 MHz en  $\text{DMSO-d}_6$ , muestra, como era de esperar para esta sustancia, señales simples para cada uno de los carbonos considerados. Los diferentes carbonos son asignados conforme a la literatura consultada.<sup>101,104,105</sup> En la Tabla 24 se recogen sus desplazamientos químicos. Las señales más características de esta sustancia son los carbonilos (amida y éster) a 169,39 y 167,64 ppm; el carbono metínico de la oxazolidina en  $\alpha$  a los heteroátomos (OCHN) a 86,46 ppm; el metilo en posición anomérica (67,19 ppm) y el metilo del éster (78,26 ppm). Para diferenciar entre C6 y el metilo anomérico, respectivamente a 67,66 y 67,19 ppm, se realizó un DEPT sobre la muestra obteniéndose la inversión de la señal a 67,66 ppm (Figura 61-A) lo que demuestra ser un carbono secundario (C6).

---

TABLA 24

Datos de  $^{13}\text{C}$ -RMN de las sustancias 69, 70 y 28 (DMSO- $d_6$ , 50 MHz, TMS)

ASIGNACIÓN	SUSTANCIA		
	<u>69</u>	<u>70</u>	<u>28</u>
<u>Residuo de azúcar</u>			
C-1	100,28	100,27	(101,73; 100,43)
C-2	52,62	51,70	(56,26; 55,88)
C-3	62,15	62,42	(79,86; 79,04)
C-4	79,52	78,39	(71,49)
C-5	56,28	56,32	(73,25; 72,78)
C-6	67,66	67,74	(60,88; 60,55)
OCHN	86,46	87,53	(87,83; 86,95)
OCH <sub>3</sub>	67,19	67,18	(67,76; 68,01)
COOCH <sub>3</sub>	78,26	---	---
CH <sub>3</sub> CO	23,25	23,35	(23,24; 22,30)
<u>Residuo de L-Alanina</u>			
C(α)	---	48,71	(48,80; 48,73)
C(β)	---	17,75	(17,76; 17,44)
<u>Residuo de D-isoglutamina</u>			
C(α)	---	?	(52,98)
C(β)	---	27,04	(27,91; 27,88)
C(γ)	---	30,19	(33,24)
<u>Carbonilos</u>			
Azúcar : CH <sub>3</sub> CO	169,39	173,02	(177,42)
COOCH <sub>3</sub> ó CONH	167,64	172,33	(173,98)
Péptido: CONH	---	171,59	(171,58; 171,19)
CONH <sub>2</sub>	---	169,40	(170,66; 170,07)
COOBn ó COOH	---	166,79	(166,97; 166,78)
<u>Grupos Protectores</u>			
Ar	(129,09 a 126,24)	(129,09 a 126,24)	(-----)
PhCH	101,87	102,10	(-----)
PhCH <sub>2</sub>	---	65,60	(-----)
	137,27	(137,35 y 126,24)	(-----)

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del éster bencílico de 3-acetil-(4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\beta$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (70) (Figura 62-A) (Tabla 24) efectuado en  $\text{DMSO-d}_6$  a 50 MHz, muestra, como era de esperar, señales únicas para cada uno de los carbonos considerados. Las señales más características del espectro de esta sustancia con respecto a la sustancia 69 son las debidas al dipéptido.<sup>107</sup> Aparecen cinco carbonos carbonílicos entre 173,02 y 166,79 ppm, cuatro de amida y uno del éster  $\gamma$ -bencílico de la D-isoglutamina. Del aminoácido L-alanina se detecta su carbono  $\alpha$  a 48,71 ppm y el metilo a 17,75 ppm. Del aminoácido D-isoglutamina los carbonos  $\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente a 27,04 y 30,19 ppm; así como el metileno del éster bencílico a 65,60 ppm.

---

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de 3-acetil-(2,3-didesoxi-1-O-metil- $\beta$ -D-Glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L--alanil-D-isoglutamina (28) (Figura 63-A) (Tabla 24) efectuado en  $\text{DMSO-d}_6$  a 50 MHz, muestra desdoblamiento para prácticamente todas las señales del espectro; ello está de acuerdo con el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para esta misma sustancia. Los desdoblamientos se observan tanto en las señales debidas a la porción azucarada de la molécula, como a la parte peptí

dica. Como era de esperar, se observan cinco carbonilos, tres de ellos desdoblados (Tabla 24). Del residuo de L-alanina se aprecian los carbonos  $C^{\alpha}$  y  $C^{\beta}$  desdoblados respectivamente a 48,80-48,73 ppm y a 17,76-17,44 ppm. Del residuo de D-isoglutamina se aprecian los carbonos  $C^{\alpha}$  (52,98 PPM),  $C^{\beta}$  (27,91-27,88 ppm) y  $C^{\gamma}$  (33,24 ppm). Del residuo de azúcar se aprecian desdoblamientos en muchos de los carbonos como se muestra en la tabla 24.

Derivados del ácido 3-acetil-2-carboxi-(4,6-di-O-n-butil-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (77).

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del éster bencílico de 3-acetil-(4,6-di-O-n-butil-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (79) (Figura 64-A) (Tabla 25) realizado en  $\text{DMSO-d}_6$  a 200 MHz, muestra a campo alto las señales características del azúcar y del péptido. A 1,47 y 1,28 ppm aparecen dos multipletes asignados respectivamente a los metilenos en  $\alpha$  de las cadenas de n-butilo y a los metilenos  $\beta$  y  $\gamma$  de estas mismas cadenas; a 0,87 ppm aparece otro multiplete que se asigna conjuntamente al metilo de la L-alanina y a los metilos terminales de las cadenas de n-butilo. A 1,88 y 1,81 ppm se detectan dos singuletes asignados al metilo del grupo acetamido. Los metilenos  $\beta$  y  $\gamma$  del residuo de D-isoglutamina aparecen como dos multipletes a 1,98 y 2,34 ppm respectivamente.

A 3,17 ppm se detecta un doble doblete, poco resuelto, asignado al protón H2. A 3,38 y 3,29 ppm dos singuletes asignados al metilo en posición anomérica.

Entre 5 y 6 ppm aparecen cuatro señales. Un singulete a 5,07 ppm debido al metileno del éster bencílico; dos singuletes a 5,47 y 5,33 ppm asignados al protón metínico de

TABLA 25

Datos de  $^1\text{H}$ -RMN de la sustancia 79 (DMSO- $\text{d}_6$ , 200 MHz, TMS)

Azúcar							
H1	H2	OCHN	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO	CH <sub>2</sub> ( $\alpha$ )	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
		5,47s	3,38s	1,88s			
5,45d	3,17dd				1,47m	1,28m	0,87m
		5,33s	3,29s	1,81s			
$J_{1,2}$ 3,0Hz							
L-Alanina		D-isoGlutamina					
NH	CH <sub>3</sub>	NH	NH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> ( $\beta$ )	CH <sub>2</sub> ( $\gamma$ )	CH <sub>2</sub> Ph	Ar
8,20d		8,98d	7,29s				
	0,87m		7,19s	1,98m	2,34m	5,07s	7,34s
7,50d		8,93d	7,16s				
$J_{\text{H}\alpha,\text{NH}}$ 8,4Hz		$J_{\text{H}\alpha,\text{NH}}$ 7,5Hz					

la oxazolidina; finalmente un doblete a 5,45 ppm con una constante de acoplamiento de 3 Hz asignada a parte del protón anomérico.

A campo bajo se observan los cinco protones aromáticos del éster bencílico como un singulete a 7,34 ppm, y varias señales de amidas desdobladas. Así, a 8,98 y 8,93 ppm aparecen dos dobletes debidos al NH de la D-isoglutamina que por su cercanía asemejan un falso triplete ( $J_{H\alpha, NH}$  8,4 Hz); a 8,20 y 7,50 ppm aparecen dos dobletes debidos al NH de la L-alanina ( $J_{H\alpha, NH}$  7,5 Hz). El  $NH_2$  de la D-isoglutamina aparece, como en otros casos, formando un conjunto de tres singuletes a 7,16, 7,19 y 7,29 ppm.

---

El espectro de  $^1H$ -RMN de 3-acetil-(4,6-di-O-n-butyl-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (29) (Figura 65-A) (Tabla 26) realizado en  $DMSO-d_6$  a 200 MHz, muestra a campo alto señales características del azúcar y del resto peptídico. A 1,47 y 1,28 ppm aparecen dos multipletes asignados respectivamente a los metilenos  $\alpha$  de las cadenas de n-butilo y a los metilenos  $\beta$  y  $\gamma$  de estas mismas cadenas. A 0,89 ppm un pseudotriplete debido tanto a los metilos terminales de las cadenas

TABLA 26

Datos de <sup>1</sup>H-RMN de la sustancia 29 (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz, TMS)

Azúcar						L-alanina		D-isoGlutamina			
H2	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO	CH <sub>2</sub> (α)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	NH	CH <sub>3</sub>	NH	NH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> (β)	CH <sub>2</sub> (γ)
		2,00s						9,06d	7,35s		
3,18dd	3,30s		1,47m	1,22m	0,89m	7,60	0,89m			1,83m	2,00m
		1,83s						8,97d	6,64s		

alifáticas como al metilo del residuo de L-alanina. A 2,00 y 1,83 ppm se detectan los singuletes del metilo del grupo acetamido, ambas señales inmersas dentro de los dos multipletes debidos a los metilenos  $\gamma$  y  $\beta$  (respectivamente) de la D-isoglutamina.

A 3,18 ppm aparece un doble doblete, mal resuelto, asignado al protón H2. A 3,30 ppm se detecta parte del metilo en posición anomérica. Entre 5 y 6 ppm aparece un conjunto de cinco señales de difícil asignación; se atribuyen al protón anomérico y al metínico de la oxazolidina.

A campo bajo se detectan varias señales de amidas. El NH de la D-isoglutamina a 9,06 y 8,97 ppm como dos dobletes poco resueltos. A 7,60 ppm aparece un falso triplete debido al NH de la L-alanina. El NH<sub>2</sub> de la D-isoglutamina aparece como dos singuletes a 6,64 y 7,35 ppm.

#### II.3.4. CARACTERIZACION POR ESPECTROMETRIA DE MASAS

Se han estudiado los espectros de masas de las sustancias descritas, obtenidos mediante ionización por impacto electrónico con electrones de una energía nominal de 70 eV. Asimismo, en algunos casos se han estudiado los espectros de masas obtenidos mediante la técnica de ionización química, usando isobutano como gas ionizante.

Por otro lado, y con objeto de establecer los mecanismos de fragmentación, se han realizado técnicas especiales, tales como la técnica de los barridos ligados y la espectrometría de masas de alta resolución.

Para facilitar el estudio y comprensión de sus espectros de masas, los productos se han dividido en 4 grupos en función del número de grupos protectores que posean o bien del número de aminoácidos que entren a formar parte de la molécula.

Así, en el primer apartado se estudian los espectros de masas de los compuestos totalmente protegidos, sin aminoácidos o con un sólo aminoácido. En el segundo apartado

se estudian los espectros de masas de las sustancias desbenzaladas, sin aminoácidos o con uno sólo. En el tercer grupo se estudian los espectros de masas de las sustancias desbenzaladas y desbenciladas sin aminoácidos. Por último, en el cuarto apartado se estudian los espectros de masas de las sustancias que presentan en su molécula el resto de D-isoglutamina, sin tener en cuenta el grado de protección que posean.

Antes de iniciar el estudio, hay que decir que el uso de una fórmula estructural determinada no implica que el ión en cuestión haya sido investigado y haya mostrado esa estructura particular; su uso se hace sólo con carácter orientativo y con el objeto de intentar facilitar la comprensión de las rutas de fragmentación que se proponen.

#### II.3.4.1. SUSTANCIAS TOTALMENTE PROTEGIDAS

La estructura general de este grupo viene representada por la estructura de la Figura 19, y las sustancias que se estudian están recogidas en la Tabla 27.

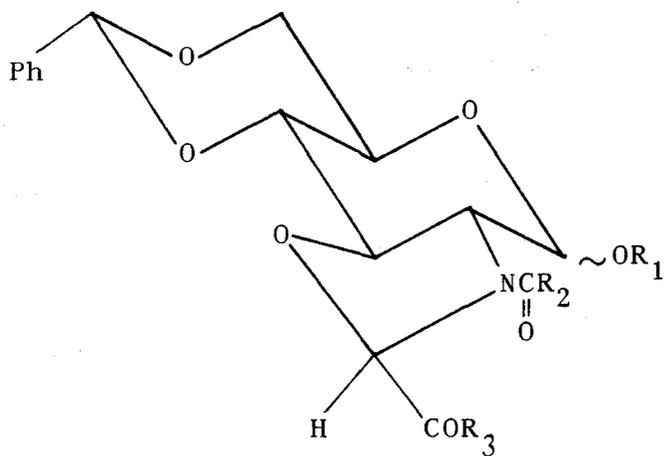


Figura 19

TABLA 27

Sustancia	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
40 ~	αBn	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
81 ~	αMe	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
69 ~	βMe	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
41 ~	αBn	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
42 ~	αBn	(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
43 ~	αBn	CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>
44 ~	αBn	CH <sub>3</sub>	NH-CH <sub>2</sub> -COOEt
45 ~	αBn	CH <sub>3</sub>	NH-CH-COOEt   CH <sub>3</sub>
46 ~	αBn	CH <sub>3</sub>	NH-CH-COOEt   CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

.../...

TABLA 27 (continuación)

Sustancia	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
47 ~	αBn	CH <sub>3</sub>	NH-CH-COOEt   CH <sub>2</sub> Ph
82 ~	αMe	CH <sub>3</sub>	NH-CH-COOEt   CH <sub>2</sub> Ph
48 ~	αBn	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	NH-CH <sub>2</sub> -COOEt
49 ~	αBn	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	NH-CH-COOEt   CH <sub>3</sub>

Los espectros de masas de las sustancias estudiadas en este apartado (Tabla 27), obtenidos por ionización por impacto electrónico, están recogidos en el Apéndice (Figuras 66A-78A). En la Tabla 28 se recoge una selección de las relaciones masa-carga ( $m/z$ ) de los iones producidos en cada caso, así como su intensidad relativa (%) respecto al pico base del espectro.

En todos los espectros la señal más alta que se registra coincide con el peso molecular calculado para cada compuesto, por lo que estas señales han sido asignadas al ión molecular,  $(M)^+$ , correspondiente en cada caso\*. La inten

---

\* En algunos espectros se aprecia una señal una unidad mayor en masa que la correspondiente al ión molecular. Esta señal se ha asignado al producto de la reacción ión-molécula  $(M+H)^+$

TABLA 28

Principales señales registradas y su abundancia relativa (%) para las sustancias 40-49, 69, 81 y 82

40	81	69	41	42	43	44	45	46	47	82	48	49
470 (0,4)	393 (0,9)	393 (1,2)	554 (1,0)	666 (1,0)	454 (0,8)	540 (0,6)	554 (1,6)	583 (0,8)	631 (1,7)	554(19,4)	625 (0,6)	638 (1,4)
469 (0,9)	392 (2,2)	392 (1,7)	553 (1,5)	665 (2,6)	453 (0,4)	195 (1,1)	553 (1,3)	582 (2,3)	630 (4,2)	523 (0,3)	624 (1,3)	637 (1,0)
468 (0,8)	362 (1,3)	362 (0,5)	552 (1,0)	664 (1,2)	411 (1,4)	410(13,1)	509 (2,6)	581 (0,7)	629 (0,2)	509 (1,8)	579 (4,5)	593 (3,4)
426 (2,4)	350 (5,7)	350 (6,5)	510 (1,8)	622 (1,8)	410 (4,9)	391 (2,2)	481 (0,5)	537 (1,4)	585 (0,4)	481 (3,1)	551 (0,1)	565 (0,1)
410 (9,7)	334(54,5)	334(57,3)	494(13,3)	606(13,5)	386 (0,6)	368 (0,9)	463 (0,5)	509 (1,2)	557 (0,2)	448 (0,4)	533 (0,1)	547 (0,1)
378 (2,8)	320 (2,0)	320 (1,0)	462 (1,8)	574 (1,9)	368 (1,8)	349 (0,6)	448 (0,8)	491 (0,1)	539 (0,1)	417 (0,4)	522 (0,2)	532 (0,1)
368 (1,2)	292 (1,4)	292 (4,3)	447 (1,2)	559 (1,3)	330 (1,8)	304(11,5)	438 (0,8)	476 (0,8)	524 (0,3)	405 (8,0)	518 (0,1)	522 (1,0)
363 (3,5)	256 (3,3)	256 (1,3)	404(35,0)	516(25,0)	305 (2,4)	289 (2,1)	421 (1,3)	449 (1,7)	497 (0,8)	363 (1,7)	494(59,0)	494(59,4)
336 (1,8)	244 (100)	244(60,0)	388(18,0)	500(18,0)	304 (4,8)	286 (1,2)	410(36,0)	438 (0,4)	481 (1,5)	334(71,0)	475 (8,0)	489 (6,7)
320(34,5)	228(44,0)	228(25,0)	370 (1,5)	482 (1,1)	290 (2,1)	262 (1,8)	405 (6,7)	433 (5,7)	439 (0,4)	292 (1,5)	407 (2,0)	421 (1,3)
304(11,5)	210 (6,5)	210 (2,7)	368 (1,8)	468 (3,7)	286 (3,0)	244 (0,9)	368 (1,3)	410(33,0)	433 (0,2)	228(76,0)	388(45,0)	388(52,0)
286 (1,7)	202(22,4)	202(16,7)	356 (5,0)	452 (1,0)	263 (0,7)	233 (1,4)	320 (1,0)	368 (1,3)	410(11,0)	210(14,0)	370 (4,5)	370 (4,7)
278 (1,5)	196(65,0)	196(79,0)	340 (0,9)	424 (2,5)	262 (1,2)	202 (2,2)	304(40,0)	320 (1,3)	368 (0,6)	196 (100)	368 (9,3)	368 (5,0)
272 (2,4)	186 (5,0)	186(12,0)	336 (1,7)	392 (9,3)	244 (0,6)	196(29,0)	286 (4,6)	304(40,0)	304(11,5)	186 (6,7)	349 (2,5)	363 (0,3)
262 (2,4)	168(37,0)	168(19,0)	280(20,6)	368 (3,6)	238 (1,7)	154(12,5)	262 (5,3)	286 (5,3)	286 (1,8)	168(59,0)	305 (6,7)	360 (2,9)
256 (1,8)	154(41,0)	154(70,0)	262 (2,0)	336 (1,5)	233 (9,7)	149(30,0)	244 (3,0)	262 (5,3)	262 (1,9)	154(76,0)	280(40,0)	305 (8,0)
233(25,7)	149(92,0)	149 (100)	244 (8,5)	308 (4,6)	222 (1,1)	126 (3,0)	233 (1,2)	244 (4,8)	244 (1,2)	149(84,0)	262(19,0)	280(47,0)
230 (4,2)	142(15,0)	142(15,0)	233(27,0)	278 (1,3)	218 (1,5)	105(38,0)	196(93,0)	233 (1,5)	233 (0,6)	126(10,0)	244(13,3)	262(21,3)

.../...

TABLA 28 (continuación)

40	81	69	41	42	43	44	45	46	47	82	48	49
196(24,8)	126(10,0)	126(14,6)	202 (3,3)	262 (9,3)	215 (1,0)	91 (100)	154(32,0)	196 (100)	196(33,0)	105(39,0)	233 (3,0)	244(15,3)
154(12,4)	115(26,0)		197 (5,4)	244 (8,5)	206 (1,8)	77(35,0)	149(68,0)	154(31,0)	154(12,0)	91(61,0)	202 (6,6)	233 (1,8)
149(41,2)	105(28,0)	105(41,0)	154(37,5)	239 (6,0)	196 (9,7)	60(31,0)	126 (8,0)	149(63,0)	149(26,0)	84(15,0)	197(10,7)	202 (8,0)
126 (3,6)	91(33,0)	91(60,0)	149(58,0)	233(32,6)	176 (4,2)	45(38,0)	105(23,0)	126 (8,4)	126 (3,6)	77(22,0)	154(45,0)	197(12,0)
105(14,5)	84	84	127 (4,2)	197 (5,3)	170 (5,4)		91 (100)	105(23,0)	105(24,0)		127(19,0)	149(50,0)
91 (100)	82	82	126 (4,2)	154(25,3)	154 (6,7)		77 (9,0)	91(91,0)	91 (100)		126 (5,3)	127(16,0)
77 (7,6)	77(11,0)	77(38,0)	105(25,0)	149(36,0)	149(43,0)			77 (8,0)	77(21,0)		105(35,0)	126 (5,0)
43 (5,4)		43(80,0)	91 (100)	126 (2,6)	126 (3,0)						91 (100)	105(25,3)
			77(13,0)	105(26,0)	108(21,0)						77(16,0)	91 (100)
			57(18,5)	91 (100)	107(25,0)						57(10,7)	77(11,0)
				77(17,0)	106(41,0)							
				57(15,0)	105(50,0)							
					91 (100)							
					77(49,7)							
					60(83,0)							

sidad de estas señales es generalmente pequeña, como podría esperarse para este tipo de sustancias, con grupos fácilmente fragmentables. Asimismo, en la mayoría de los casos se observa una señal asignada al ión  $(M-H)^+$ , de intensidad similar a la del ión molecular.

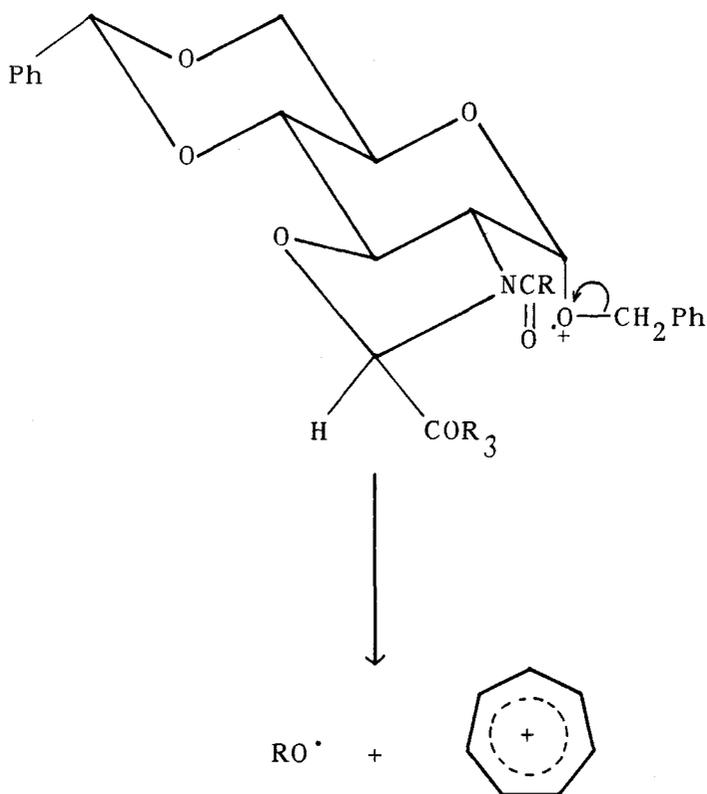
En los espectros de aquellos productos cuyo  $R_1 = Bn$  aparece como pico base el ión a  $m/z$  91 de fácil asignación al ión tropilio,<sup>109</sup>  $C_7H_7^+$ , excepto en el caso de la sustancia 46, en la cual, no obstante, representa el 91%. Incluso en los espectros de las sustancias en las que  $R_1 = Me$ , aparece el ión tropilio con una intensidad que varía entre el 33% y el 60%, procedente evidentemente del grupo bencilideno que protege las posiciones 4 y 6 del azúcar\*.

Este hecho hace pensar que en los demás compuestos en los cuales está presente siempre un grupo bencilideno, parte del ión tropilio que se registra se origina asimismo a partir de este grupo protector. Para probarlo, se ha realizado en el caso de la sustancia 40 una búsqueda de los iones-padre del ión tropilio, mediante un barrido ligado ajustando el espectrómetro a  $m/z$  91. El espectro resultante (Figura 79-A) indica que este ión procede fundamentalmente del ión  $m/z$  149 y en una pequeña proporción del ión  $m/z$  233.

---

\* En el caso de la sustancia 82 parte de este ión procederá probablemente del resto de fenilalanina presente en  $R_3$ .

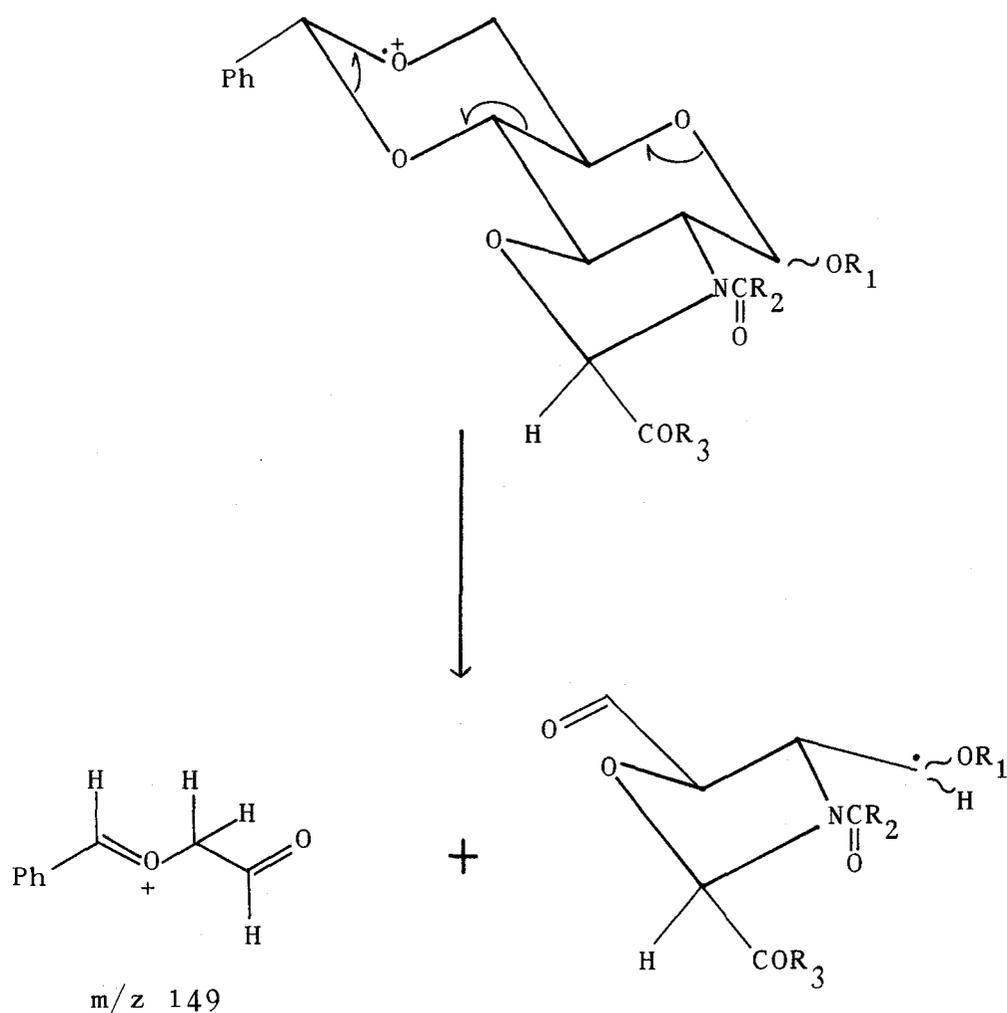
El hecho de que el ión molecular no aparezca como ión-padre del ión tropilio no debe interpretarse con un sentido excluyente. Más bien debe pensarse que el ión tropilio se forma a partir del ión molecular por una fragmentación heterolítica simple (Esquema 21), tan rápida (debido a la estabilidad del ión que se forma) que tiene lugar en toda su extensión en la cámara de ionización.\*



ESQUEMA 21

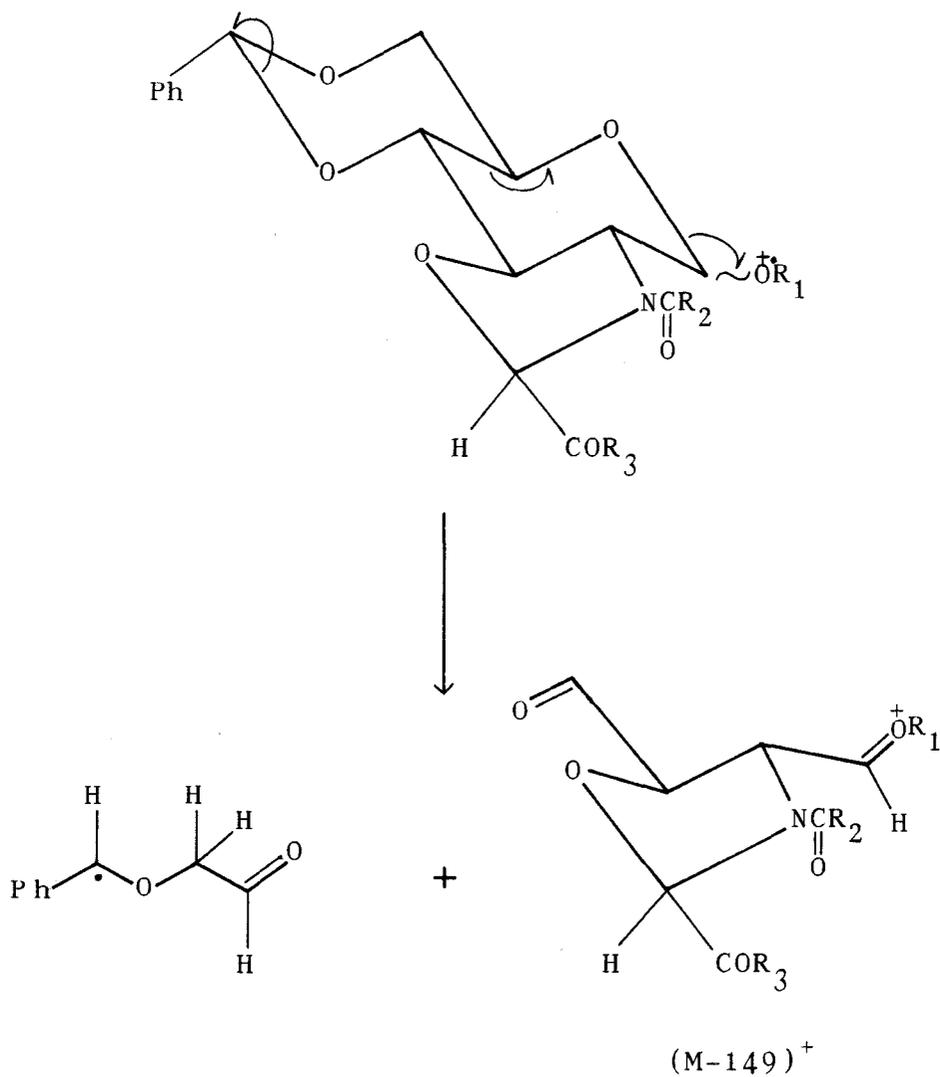
\* Esta explicación se adoptará de modo general en los casos similares que aparezcan en las páginas siguientes.

Es de destacar que, mientras que el ión  $m/z$  233 no es común a todos los espectros, el ión a  $m/z$  149 aparece como una de las señales principales en todos los casos. Este ión  $m/z$  149 se ha asignado al ión  $h_2^{110}$  procedente de la "ruptura h" del grupo bencilideno (Esquema 22).



ESQUEMA 22

Como era de esperar, de acuerdo con la bibliografía, también se detecta el ión  $h_1$  (M-149)<sup>+</sup> en todos los espectros estudiados (Esquema 23).



ESQUEMA 23

En la Tabla 29 se recogen las intensidades relativas para estos iones.

TABLA 29

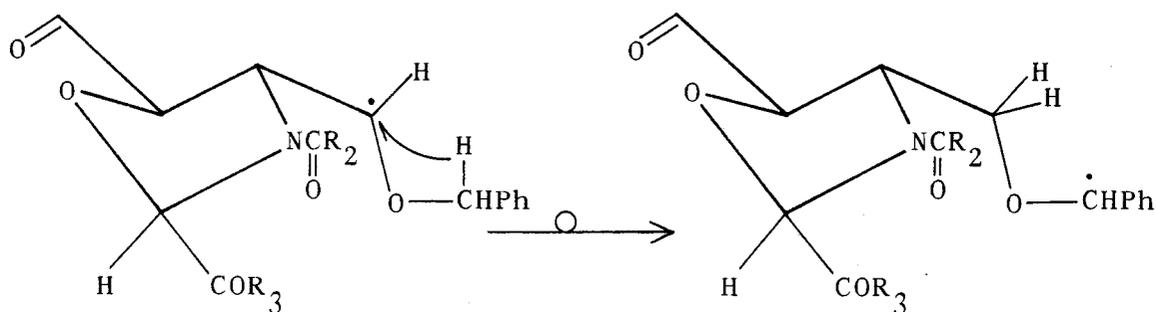
Intensidades relativas de los iones  $(M-149)^+$  y  $m/z$  149

	40	81	69	41	42	43	44	45	46	47	82	48	49
$(M-149)^+$	34,5	100	60	35	25	2,4	2,2	6,7	5,7	1,5	8	8	6,7
$m/z$ 149	41,2	92	100	58	36	43	30	68	63	26	84	63,5	62,7

En esta tabla se observa que para los compuestos  $\underline{81}$  y  $\underline{69}$  ( $R_3 = OCH_3$ ,  $R_1 = \alpha$  y  $\beta$ -Me respectivamente), en los cuales no existe la ruta de fragmentación que genera el ión tropilio a partir del ión molecular (para  $R_1 = Bn$ ) es esta ruptura la ruta de fragmentación dominante.

Hay que hacer notar, no obstante, que la abundancia relativa de estos iones ( $m/z$  149 y  $(M-149)^+$ ) es justamente la inversa de la que debería esperarse según la bibliografía consultada.<sup>110</sup> Según ésta, el ión  $(M-149)^+$  debe ser mucho más abundante que el ión  $m/z$  149 a causa de la estabilidad del radical bencilo producido en su formación (Esquema 23). Esta inversión podría justificarse, en principio, por dos motivos:

1.- En la bibliografía citada se trata de metilglicósidos en los que no existe la posibilidad de estabilización para el radical producido en la formación de  $m/z$  149 (Esquema 22), la cual si existe para bencilglicósidos por transposición de un hidrógeno desde el grupo bencilo presente en  $R_1$  (Esquema 24).



ESQUEMA 24

Esta hipótesis justifica las abundancias relativas observadas para estos iones en los casos de las sustancias análogas  $\tilde{40}$  ( $R_1 = \alpha Bn$ ) y  $\tilde{81}$  ( $R_1 = \alpha Me$ ).

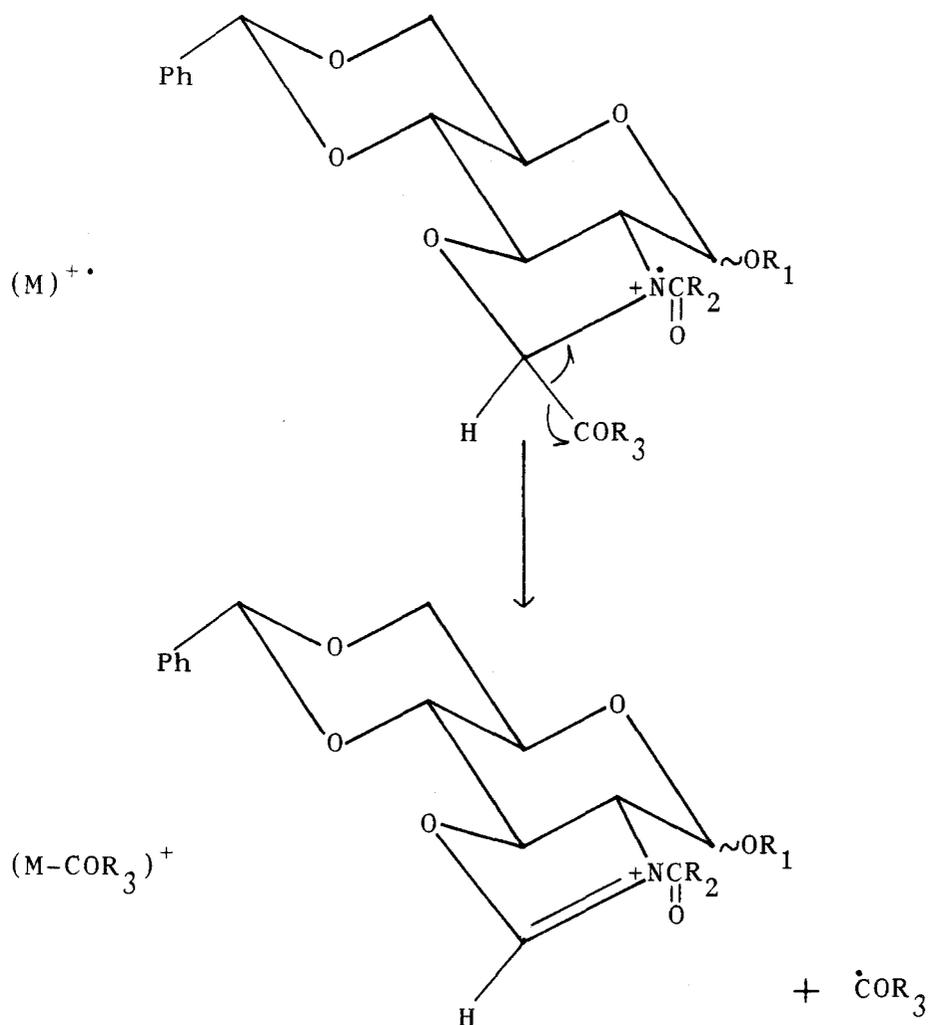
2.- Aunque en el caso de la sustancia  $\tilde{81}$  ( $R_1 = \alpha Me$ ) es en el único en el que la relación entre los iones  $m/z$  149 y  $(M-149)^+$  es concordante con la bibliografía, resalta la elevada intensidad relativa que presenta el ión  $m/z$  149, en comparación con otros  $\alpha$ -metil glicósidos tales como los metil 2,3-anhidro-4,6-O-bencilidén- $\alpha$ -D-mano y alopiranósido,

cuyos espectros de masas se recogen en el Apéndice (Figuras 80 y 81-A). En estas sustancias se observa cómo el ión  $(M-149)^+$ , que aparece a  $m/z$  115, es en ambos casos el pico base del espectro, mientras que el ión  $m/z$  149 no llega al 10% de intensidad.

En esta misma línea, se observa un fuerte incremento de la abundancia del ión  $m/z$  149 y un claro descenso del ión  $(M-149)^+$  al pasar de la sustancia 40 ( $R_3 = \text{OMe}$ ) a los productos 44, 45 y 46 ( $R_3 =$  éster etílico de glicina, L-alanina y L-valina respectivamente) y de la sustancia 41 ( $R_3 = \text{OMe}$ ) a las sustancias 48 y 49 ( $R_3 =$  éster etílico de glicina y L-alanina respectivamente).

Todo ello induce a pensar que el ión  $m/z$  149 se genera también en estos compuestos a partir de otra ruta de fragmentación, distinta a la ruptura  $h$ , relacionada evidentemente con la naturaleza de  $R_3$ . Para comprobarlo se realizó sobre la sustancia 40 una búsqueda de los iones-padre de este ión  $m/z$  149, sin obtenerse resultado alguno. Por ello, se volvió a repetir el experimento en una segunda ocasión, escogiéndose para ello la sustancia 69 la cual presenta el ión  $m/z$  149 como pico base de su espectro. El espectro resultante se recoge en el Apéndice (Figura 82-A) y en él se ve cómo el ión  $m/z$  334 aparece como principal ión-padre de  $m/z$  149.

Como se esperaba, el ión  $m/z$  334, cuya intensidad en el espectro de la sustancia 69 es del 57%, está relacionado con  $R_3$ , ya que se forma a partir del ión molecular por pérdida del grupo  $COR_3$  ( $R_3 = OMe$ ). Esta fragmentación primaria, que origina igualmente en los demás espectros estudiados una de las principales señales (Tabla 30), se representa en el Esquema 25.



ESQUEMA 25

TABLA 30

Relación masa-carga (m/z) y abundancia relativa (%) para el ión (M-COR<sub>3</sub>)<sup>+</sup>

	40	81	69	41	42	43	44	45	46	47	82	48	49
m/z	410	334	334	494	606	410	410	410	410	410	334	494	494
%	9,7	54,5	57,3	13,3	13,5	4,9	13,1	36,0	33,0	11,0	71,0	59,0	59,4

En esta tabla se observan diferencias interesantes tales como:

1.- Entre las sustancias 81 y 69 (R<sub>1</sub> = Me) y la sustancia 40 (R<sub>1</sub> = Bn) existe una clara diferencia en la intensidad del ión (M-COR<sub>3</sub>)<sup>+</sup>. Esto es debido, como ya se mencionó anteriormente, a que en estas sustancias (81 y 69) no existe la fragmentación primaria, de gran importancia en el resto, que da origen al ión tropilio, con lo que las rutas de fragmentación alternativas (ruptura h y escisión homolítica del grupo COR<sub>3</sub>) se ven potenciadas\*.

2.- Entre las sustancias en las que R<sub>1</sub> = Bn se observa una clara diferencia en la intensidad de (M-COR<sub>3</sub>)<sup>+</sup>. Así, cuando R<sub>3</sub> = OMe (sustancias 40, 41 y 42) dicha intensidad es aproximadamente del 10%, mientras que cuando R<sub>3</sub> = és-

\* El mismo efecto se observa al comparar las sustancias 47 y 82.

ter etílico de glicina, alanina o valina (sustancias 44, 45, 46, 48 y 49) esta intensidad aumenta. Aumento que se puede explicar debido a la presencia en  $R_3$  de grupos fácilmente fragmentables (ésteres etílicos de aminoácidos), los cuales pueden sufrir una primera fragmentación, tras la que dan lugar al ión  $(M-COR_3)^+$ . Así, en las sustancias 44, 49 y 82 se observan señales debidas a  $(M-45)^+$  y  $(M-73)^+$  correspondientes a la pérdida de  $\dot{O}Et$  y  $\dot{C}OOEt$  respectivamente, procedentes del resto de aminoácido (Tabla 31).

TABLA 31

Relación m/z y abundancia relativa (%) para  $(M-45)^+$  y  $(M-73)^+$

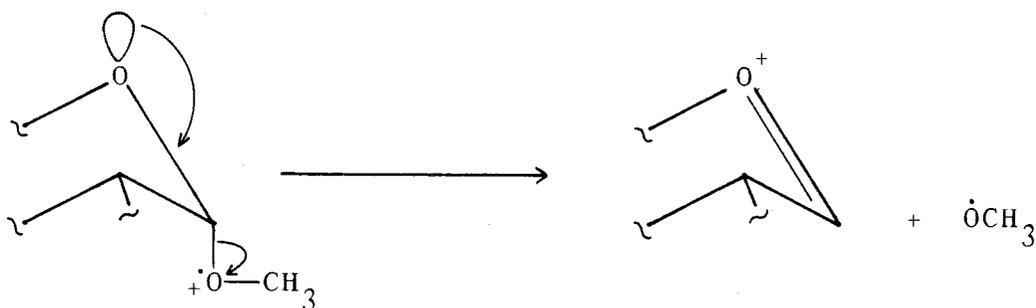
	44	45	46	47	82	48	49
$(M-45)^+$ (%)	495(1,1)	509(2,6)	537(1,4)	585(0,4)	509(1,8)	579(4,5)	593(3,4)
$(M-73)^+$ (%)		481(0,5)	509(1,2)	557(0,2)	481(3,1)	551(0,1)	565(0,1)

3.- Por otro lado, al comparar las sustancias 40 ( $R_3 = OMe$ ) y 43 ( $R_3 = NH_2$ ) se observa un descenso en la intensidad relativa de este ión  $(M-COR_3)^+$ , pasando del 9,7 al 4,9%. Este descenso está de acuerdo con la bibliografía,<sup>111</sup> en la cual se indica que el grupo amido presenta una menor tendencia a la fragmentación que el grupo éster.

A parte de las tres fragmentaciones primarias principales comentadas hasta el momento (formación de ión tropilio, ruptura h y escisión homolítica de  $\text{COR}_3$ ), aparecen otras de menor importancia en cuanto a su intensidad relativa, aunque son de gran valor para la caracterización estructural de estos compuestos.

Así, aunque el grupo bencilo tiene tendencia a fragmentarse dando origen al ión tropilio, también se puede fragmentar como radical, dando lugar al ión  $(\text{M}-91)^+$ , de baja intensidad en los casos en los que se observa (Tabla 32). Evidentemente, en los espectros de las sustancias 81 y 69 ( $\text{R}_1 = \text{Me}$ ) no aparece este ión, ni aún el análogo correspondiente  $(\text{M}-15)^+$ . En su lugar se observa en cada caso una señal a  $m/z$  362, con intensidades de 1,3 y 0,5% respectivamente, que corresponden a la pérdida del  $\text{OMe}$  de la posición anomérica (Tabla 32). Es de destacar que la diferencia entre las intensidades relativas de este ión  $(\text{M}-31)^+$  (casi tres veces más abundante en el anómero  $\alpha$ ) es debida a un efecto estereoelectrónico por la presencia de un par de electrones en posición *anti* al enlace glicosídico en el caso del anómero  $\alpha$ , lo cual facilita su ruptura (Esquema 26).<sup>112</sup>

Por último, otras fragmentaciones primarias menores son las que dan lugar a los iones  $(\text{M}-43)^+$  y  $(\text{M}-106)^+$  (Tabla 32).



ESQUEMA 26

TABLA 32

Fragmentaciones primarias de baja intensidad relativa (%)

	40	81	69	41	42	43	44	45	46	47	82	48	49	
(M-91) <sup>+</sup>	378 (2,8)			462 (1,8)	574 (1,9)		363 <sup>*</sup>		463 (0,5)	491 (0,1)	539 (0,1)		533 (0,1)	547 (0,1)
(M-31) <sup>+</sup>		362 (1,3)	362 (0,5)									523 (0,3)		
(M-43) <sup>+</sup>	426 (2,4)	350 (5,7)	350 (6,5)	510 (1,8)	622 (1,8)		411 <sup>**</sup>							
(M-106) <sup>+</sup>	363 (3,5)			447 (1,2)	559 (1,3)		348 <sup>*</sup>		448 (0,8)	476 (0,8)	524 (0,3)	448 (0,4)	518 (0,1)	532 (0,1)

\* m/z 91 saturado

\*\* Existe participación del isótopico de 410

Con objeto de establecer las diversas rutas de fragmentación que se originan a partir de los fragmentos primarios comentados, se ha realizado un amplio estudio de iones metastables mediante barridos ligados (búsqueda de

iones-padre, iones-hijo y pérdida de molécula neutra) en las sustancias 40 (Tabla 33), 69 (Tabla 34) y 49 (Tabla 35), gracias al cual se ha elaborado el esquema general de fragmentación que se propone en el Esquema 27.

TABLA 33

Iones-padre (P), hijo (H) y pérdida de molécula neutra de la sustancia 40

	99	105	149	(C) 154	233	(K) 272	(I) 278	(A) 304	(J) 336	(M-1) <sup>+</sup> 468	(M) <sup>+</sup> 469
57	N										
77		N									
91			P N		P						
(D) 126				N							
(B) 196				P N				PHN			
(L) 230									N		
(F) 262								H			
(G) 286								H			
(M-149) <sup>+</sup> 320							HN				
(M-106) <sup>+</sup> 363					H					H	HN
(M-R <sub>1</sub> ) <sup>+</sup> 378						PHN			HN		H
(M-COR <sub>3</sub> ) <sup>+</sup> 410								PHN			

N= 108, 106, 58, 42 y 28

TABLA 34

Iones-padre (P), hijo (H) y pérdida de molécula neutra (N) de la sustancia 69

	105	(D) 114	126	136	140	144	156	(F) 186	(B) 196	(I) 202	(G) 210	246	(M-COR <sub>3</sub> ) <sup>+</sup> 334 <sup>3</sup>
77	N												
82		N											
108			N										
112						N							
124							N						
149													P
(C) 154			N	N				P N	P N				
(H) 168				N	N			N			P		
214									N				
220										N			
224									N				
(A) 228								H	HN		HN	N	HN
230										N			
(M-149) <sup>+</sup> 244										PHN			
250						N							
(E) 292								P N					HN

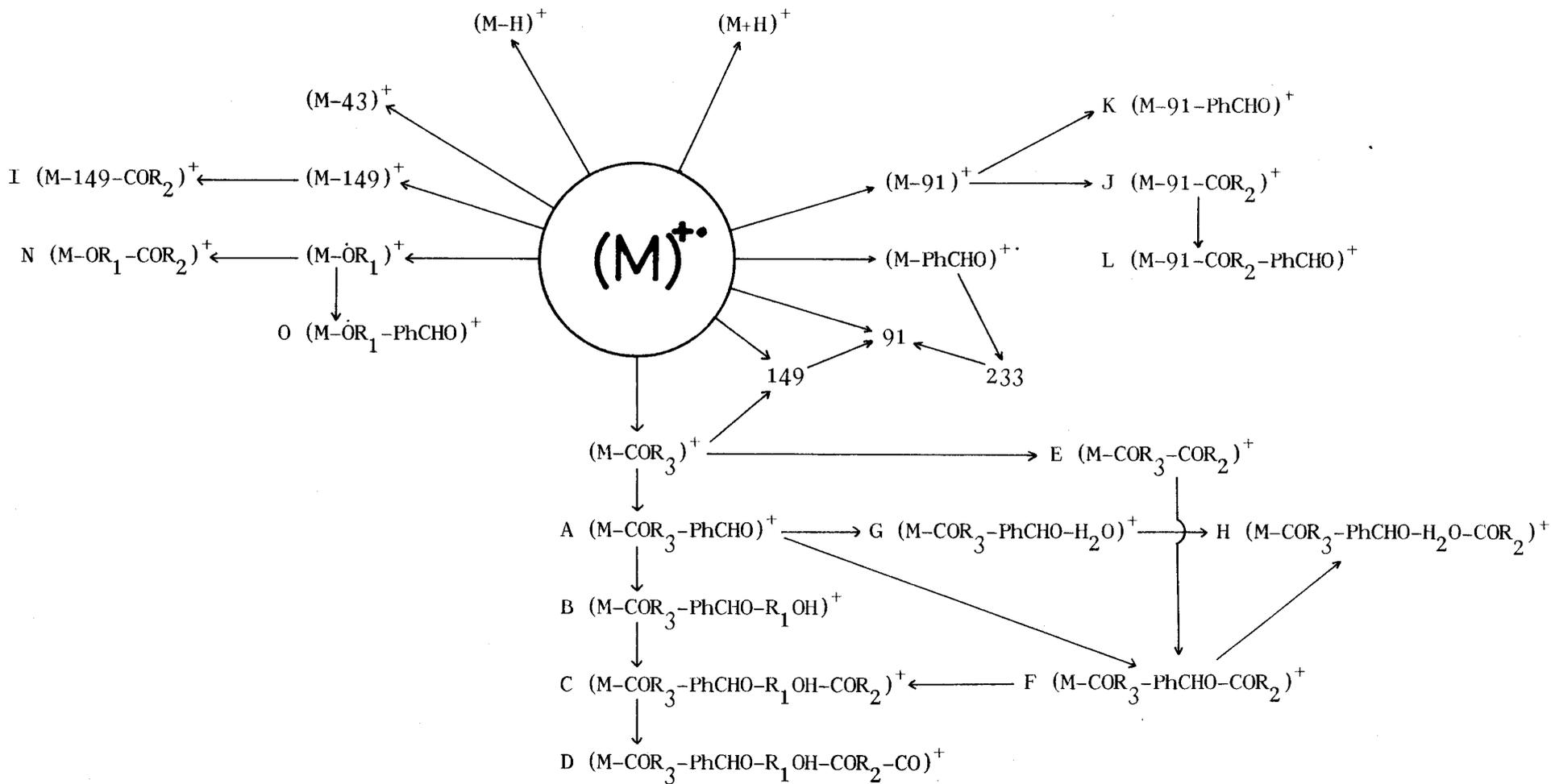
N= 106, 42, 32, 28 y 18

TABLA 35

Iones-padre (P), iones-hijo (H) de la sustancia 49

	149	197	(F) 262	(B) 280	360	(E) 368	(G) 370	(A) 388
(C) 154				P				
(A) 388			H	H	H		H	/
(M-COR <sub>3</sub> ) <sup>+</sup> 494	H	H				H		H

ESQUEMA 27



A partir de los datos tabulados (Tablas 33 a 35) y del Esquema de fragmentación propuesto, podemos reordenar las señales de los diferentes espectros, sumariadas en la Tabla 28, obteniendo como resultado la Tabla 36, a partir de la cual se propone como línea principal de fragmentación aquella en la que a partir del ión  $(M-COR_3)^+$  se produce la pérdida de forma sucesiva (y por este orden) de benzaldehído, alcohol bencílico (metílico para  $R_1 = Me$ ), cetena (o alquil-cetena) y monóxido de carbono, lo cual da origen a los iones A, B, C y D (Tablas 33 a 35; Esquema 27). Esta ruta se presenta en el Esquema 28.

TABLA 36

Iones de estructuras propuestas para diferentes señales registradas y su abundancia relativa (%) para las sustancias 40-49, 69, 81 y 82

	40	81	69	41	42	43	44	45	46	47	82	48	49
M	469 (0,9)	393 (0,9)	393 (1,2)	553 (1,5)	665 (2,6)	454 (0,8)	540 (0,4)	554 (1,6)	582 (2,3)	630 (4,2)	554(19,4)	624 (1,3)	638 (1,4)
M+H	470 (0,4)			554 (1,0)	661 (1,0)				583 (0,8)	631 (1,7)	555 (1,2)	625 (0,6)	
M-H	468 (0,8)	392 (2,2)	392 (1,7)	552 (1,0)	664 (1,2)	453 (0,4)		553 (1,3)	581 (0,7)	629 (0,2)	553 (0,5)		637 (1,0)
M-OR <sub>1</sub>		362 (1,3)	362 (0,5)								523 (0,3)		
M-43	426 (2,4)	350 (5,7)	350 (6,5)	510 (1,8)	622 (1,8)	411 (1,4)							
M-45							495 (1,1)	509 (2,6)	537 (1,4)	585 (0,4)	509 (1,8)	579 (4,5)	593 (3,4)
M-73								481 (0,5)	509 (1,2)	557 (0,2)	481 (3,1)	551 (0,1)	565 (0,1)
M-R <sub>1</sub>	378 (2,8)			462 (1,8)	574 (1,9)	363		463 (0,5)	491 (0,1)	539 (0,1)		533 (0,1)	547 (0,1)
M-106	363 (3,5)			447 (1,2)	559 (1,3)	348		448 (0,8)	476 (0,8)	524 (0,3)	448 (0,4)	518 (0,1)	532 (0,1)
M-149	320(34,5)	244 (100)	244(60,0)	404(35,0)	516(25,0)	305 (2,4)	391 (2,2)	405 (6,7)	433 (5,7)	481 (1,5)	405 (8,0)	475 (8,0)	489 (6,7)
M-COR <sub>3</sub>	410 (9,7)	334(54,5)	334(57,3)	494(13,3)	606(13,5)	410 (4,9)	410(13,1)	410(36,0)	410(33,0)	410(11,0)	334(71,0)	494(59,0)	494(59,4)
A	304(11,5)	228(44,0)	228(25,0)	388(18,0)	500(18,0)	304 (4,8)	304(11,5)	304(40,0)	304(40,0)	304(11,5)	228(76,0)	388(45,0)	388(52,0)
B	196(24,8)	196(65,0)	196(79,0)	280(20,6)	392 (9,3)	196 (9,7)	196(29,0)	196(93,0)	196 (100)	193(33,0)	196 (100)	280(40,0)	280(47,0)
C	154(12,4)	154(41,0)	154(70,0)	154(37,5)	154(25,3)	154 (6,7)	154(12,5)	154(32,0)	154(31,0)	154(12,0)	154(76,0)	154(45,0)	154(50,0)
D	126 (3,6)	126(10,0)	126(14,6)	126 (4,2)	126 (2,6)	126 (3,0)	126 (3,0)	126 (8,0)	126 (8,4)	126 (3,6)	126(10,0)	126 (5,3)	126 (5,0)
E	368 (1,2)	292 (1,4)	292 (4,3)	368 (1,8)	368 (4,0)	368 (1,8)	368 (0,9)	368 (1,3)	368 (1,3)	368 (0,6)	292 (1,5)	368 (9,3)	368 (5,0)
F	262 (2,4)	186 (5,0)	186(12,0)	262 (1,8)	262 (9,3)	262 (1,2)	262 (1,8)	262 (5,3)	262 (5,3)	262 (1,9)	186 (6,7)	262(19,0)	262(21,3)
G	286 (1,7)	210 (6,5)	210 (2,7)	370 (1,5)	482 (1,1)	286 (3,0)	286 (1,2)	286 (4,6)	286 (5,3)	286 (1,8)	210(14,0)	370 (4,5)	370 (4,7)

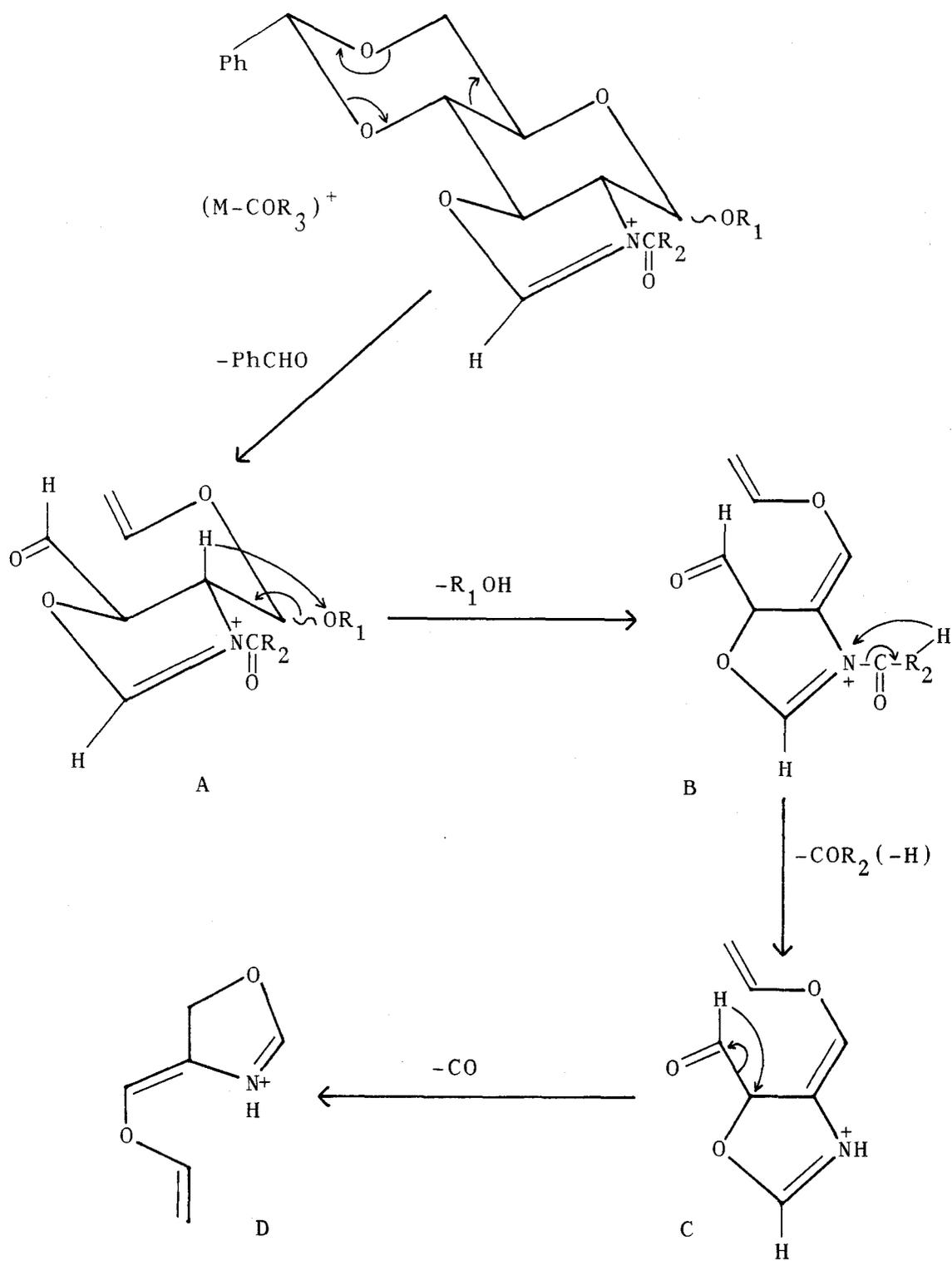
.../...

TABLA 36 (continuación)

	40	81	69	41	42	43	44	45	46	47	82	48	49
H	244 (0,9)	168(37,0)	168(19,0)	244 (8,5)	244 (8,5)	244 (0,6)	244 (0,9)	244 (3,0)	244 (4,8)	244 (1,2)	168(59,0)	244(13,3)	244(15,3)
I	278 (1,5)	202(22,4)	202(16,7)	278 (0,1)	278 (1,3)	263 (0,7)	349 (0,6)	363 (0,9)	391 (0,6)	439 (0,4)	363 (1,7)	349 (2,5)	363 (0,3)
J	336 (1,8)			336 (1,7)	336 (1,5)			421 (1,3)	449 (1,7)	497 (0,8)		407 (2,0)	421 (1,3)
K	272 (2,4)			356 (5,0)	468 (3,7)					433 (0,2)			
L	230 (4,2)					215 (1,0)							
N	320 (b)	320 (2,0)	320 (1,0)			305 (b)	391 (b)	405 (b)	433 (b)	481 (b)	481 (c)		
O	256 (1,8)	256 (3,3)	256 (1,3)	340 (0,9)	452 (1,0)						417 (0,4)		
m/z= 233	(25,7)			(27,0)	(32,6)	(9,7)	(1,4)	(1,2)	(1,5)	(0,6)		(3,0)	(1,8)
m/z= 149	(41,2)	(92,0)	(100)	(58,0)	(36,0)	(43,0)	(30,0)	(68,0)	(63,0)	(26,0)	(84,0)	(63,5)	(62,7)
m/z= 91	(100)	(33,0)	(60,0)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(91,0)	(100)	(61,0)	(100)	(100)

b.- Se solapa con la señal del ión (M-149)<sup>+</sup>

c.- Se solapa con la señal del ión (M-73)<sup>+</sup>



ESQUEMA 28

Es interesante destacar que la relación entre las intensidades relativas de los iones B y C depende de  $R_2$  (que es precisamente el grupo que se fragmenta). Así, cuando  $R_2 = \text{CH}_3$  esta relación es mayor que 1, mientras que cuando  $R_2 = (\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$  (siendo  $n = 6$  ó  $14$ ) la relación se invierte y se hace menor que 1\* (Tabla 37).

TABLA 37

Relación entre las intensidades relativas de los iones B Y C

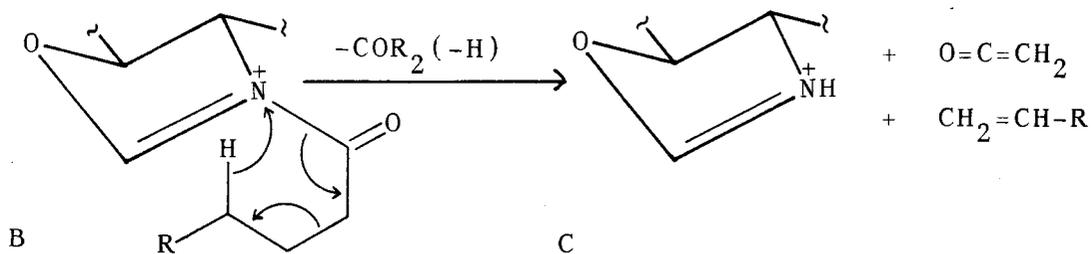
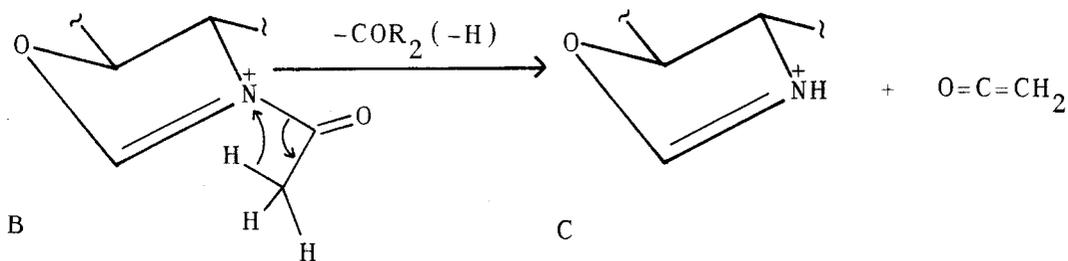
	40	81	69	41	42	43	44	45	46	47	82	48	49
B/C	2,0	1,6	1,1	0,5	0,4	1,5	2,3	2,2	2,8	2,7	1,3	0,8	0,9

La explicación de este hecho es la siguiente: Cuando  $R_2 = \text{CH}_3$ , el estado de transición a través del cual ocurre la fragmentación ha de ser necesariamente de cuatro miembros (Esquema 29), mientras que cuando  $R_2 = (\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$  (siendo  $n = 6$  ó  $14$ ), pueden existir otros estados de transición más favorecidos que faciliten la formación de este ión C. Así, por ejemplo, la fragmentación a través de un estado cíclico de seis miembros daría lugar al ión C con producción de cetena

---

\* En general, para estas sustancias, la relación entre las intensidades relativas de un ión X y su ión-hijo  $(X-\text{COR}_2)^+$  es mayor, a igualdad de otros sustituyentes, para  $R_2 = \text{CH}_3$

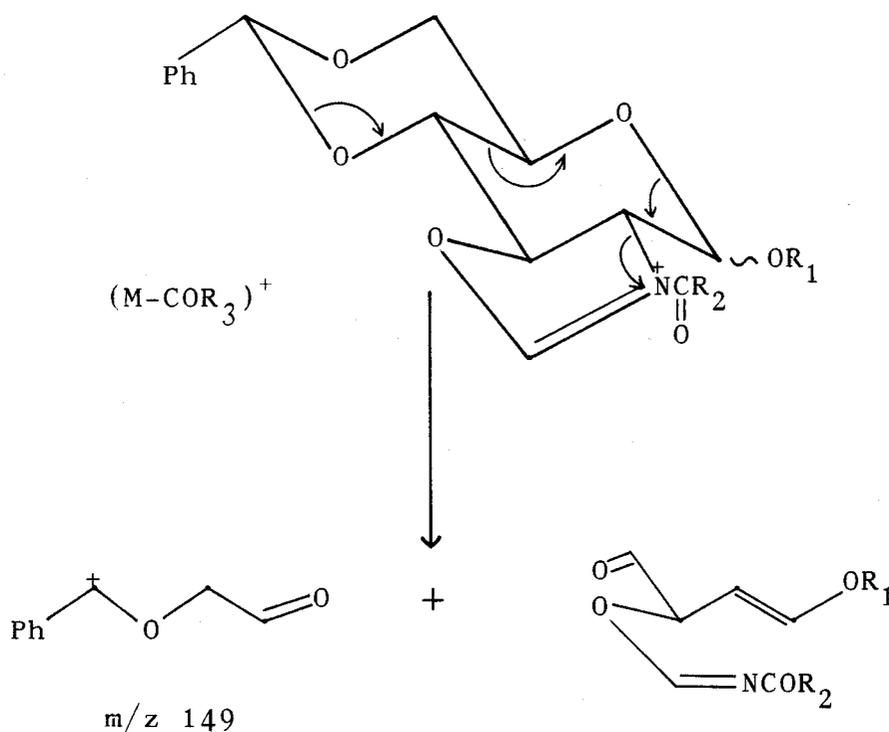
y una molécula neutra adicional de alqueno (Esquema 30).



Otras fragmentaciones secundarias de menor importancia en general, dentro de esta ruta principal de fragmentación son las pérdidas de cetena, agua, benzaldehído y alcohol bencílico (o metanol) en distinto orden al comentado, las cuales dan lugar a los iones E, F, G y H (Tablas 33 a

35; Esquema 27). Estos iones se presentan con mayor intensidad, como era de esperar, en aquellos casos en los que el ión  $(M-COR_3)^+$  es más intenso.

Por último, dentro de estas rutas que tienen su origen en el ión  $(M-COR_3)^+$ , señalar que, como ya se mencionó con anterioridad, este ión también da lugar al ión  $m/z$  149. Esta fragmentación se postula en el Esquema 31.



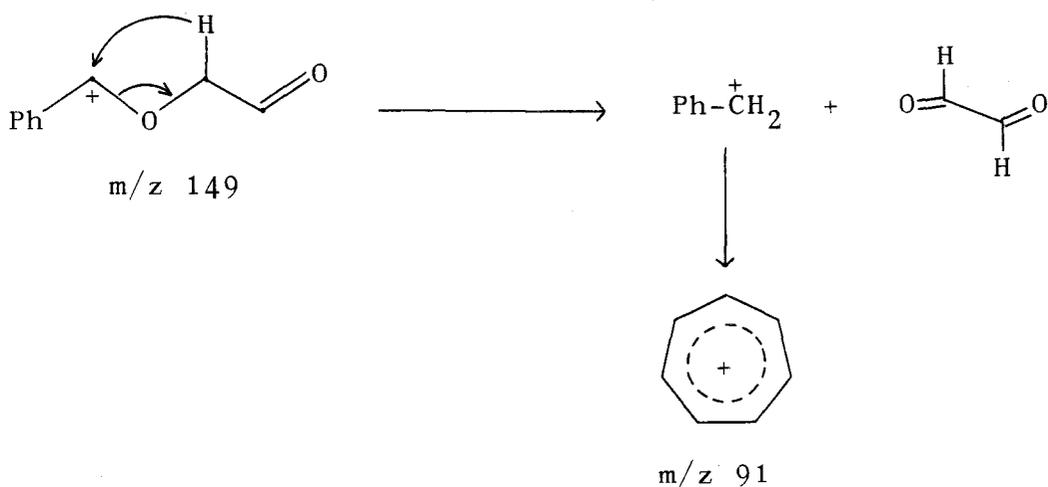
ESQUEMA 31

El ión  $m/z$  149 puede presentar otra forma resonante, tal como se muestra en el Esquema 32, lo cual explicaría la relativamente alta estabilidad de este ión.



ESQUEMA 32

De otra forma, su escisión para formar el ión tro-pilio ( $m/z$  91) estaría muy favorecida, con lo que su intensidad relativa tendría que ser más baja de lo que realmente es. De todas formas, esta escisión se produce (ya se comentó) y se representa en el Esquema 33.



ESQUEMA 33

Otras rutas de fragmentación de menor importancia tienen sus orígenes en los fragmentos primarios  $(M-149)^+$ ,  $(M-91)^+$ ,  $(M-OR_1)^+$  y  $(M-PhCHO)^+$ . Así, a partir del ión  $(M-149)^+$  se observa la pérdida de  $COR_2$  (ión I) de una forma similar a la comentada para otros casos (Tablas 33 a 35). A partir del fragmento primario  $(M-91)^+$  se observan sucesivamente señales metastables para la escisión del grupo  $COR_2$ , la cual origina iones J, de baja intensidad en los casos que aparece (Tabla 36). La eliminación de benzaldehído a partir de cualquiera de estos dos iones (J y  $(M-91)^+$ ) da origen respectivamente a los iones L y K, también de baja intensidad (Tablas 33 y 36).

Por último, en las sustancias 40, 41, 42 y 43 aparece una señal a  $m/z$  233 cuya intensidad varía entre el 10 y el 33%, originada a partir del ión  $(M-PhCHO)^+$  (ver en la Tabla 33 el ión  $m/z$  363 o  $(M-106)^+$ ). En esta ruta de fragmentación existen diversas peculiaridades tales como:

1.- En las sustancias 81 y 69 ( $R_1 = Me$ ) no aparece el ión  $(M-106)^+$  (ni el 233), lo cual hace sospechar que este ión se origina, no por la ruptura del grupo bencilideno presente en las posiciones 4 y 6 del azúcar, sino por eliminación del grupo  $OR_1$  (siendo  $R_1 = Bn$ ). Esta hipótesis viene corroborada por el hecho de que un análogo de la sustancia 40, el cual posee, en lugar de un grupo bencilideno, un gru-

po p-metoxibencilideno, presenta el ión  $(M-106)^{+\cdot}$  pero no el correspondiente  $(M-136)^{+\cdot}$  que se originaría por pérdida de este grupo protector. Además, en este caso se registra un ión a  $m/z$  263 y no a  $m/z$  233.\*

2.- Para el ión  $(M-106)^{+\cdot}$  se detectan señales metabasibles diversas. así, aparece como ión-hijo tanto del ión molecular, como del ión  $(M-H)^+$  (Tabla 33).

3.- El ión  $(M-106)^{+\cdot}$  presenta la singularidad de ser el único ión de naturaleza radicalaria, aparte del ión molecular, que se detecta en los espectros de este tipo de sustancias (esto es así ya que conserva la paridad del ión molecular, por lo que necesariamente debe conservar su naturaleza radicalaria).

4.- El ión  $m/z$  233 es, junto con los ya mencionados  $(M)^{+\cdot}$  y  $(M-106)^{+\cdot}$ , la única señal por encima de 200 que presenta una relación masa-carga impar.\*\* Este hecho hace pensar en dos posibilidades:

4.1.- El ión  $m/z$  233 es un ión-radical en cuya com

---

\* Resultados pertenecientes al trabajo experimental en curso de la Tesis Doctoral de J.L. Espartero.

\*\* Si bien es cierto que en el caso de la sustancia 43, el ión molecular y el ión  $(M-106)^{+\cdot}$  presentan una relación masa-carga par, ello es debido a que posee un número par de átomos de nitrógeno, y en el fondo no afecta a la discusión que se inicia a continuación.

posición permanece el átomo de nitrógeno oxazolidínico. Esta posibilidad es bastante improbable por la conjunción de tres factores:

a) Procede del ión  $(M-106)^+$ , el cual es de naturaleza radicalaria. Si la eliminación de una molécula neutra a partir del ión molecular es un proceso menos favorecido, por razones energéticas, que la eliminación de un radical, la eliminación consecutiva de dos moléculas neutras a partir del ión molecular, aunque no imposible, está muy desfavorecida.

b) La composición del ión  $m/z$  233 es independiente del grupo  $COR_2$  (las sustancias 40, 41 y 42 varían precisamente en la longitud de la cadena de  $R_2$ ) y del grupo  $COR_3$  (las sustancias 40 y 43 varían en  $R_3$ ). Es difícil pensar en una eliminación tal que se fragmenten conjuntamente los grupos  $COR_2$  y  $COR_3$  y permanezca el nitrógeno oxazolidínico. Incluso aunque éstas se produjeran, tendría que eliminarse algún otro grupo para llegar a producir el ión  $m/z$  233.

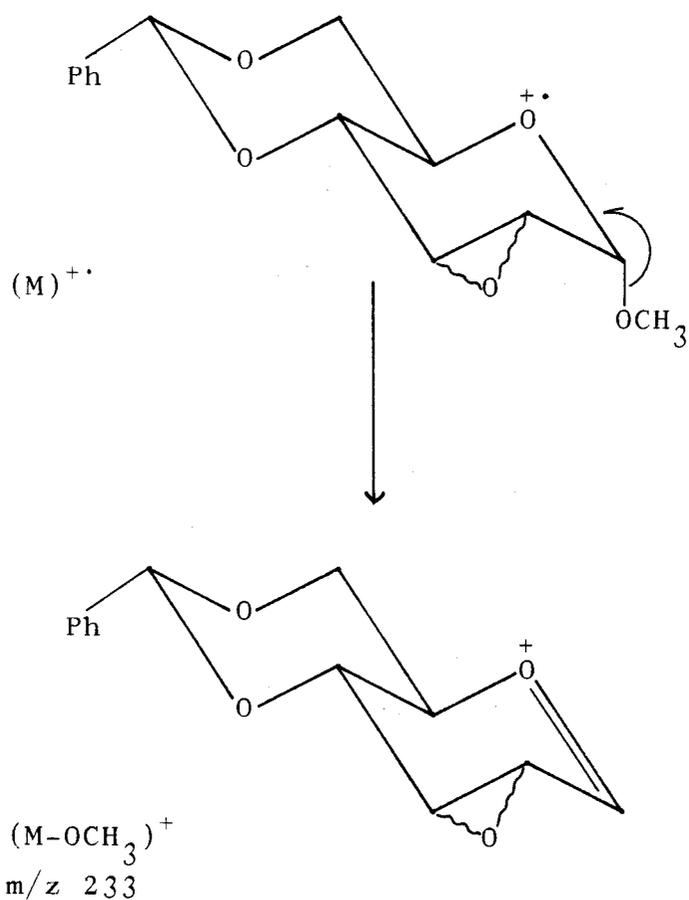
c) Aunque pudieran salvarse las dos razones anteriores, no hay que olvidar que este ión presenta una intensidad relativa lo suficientemente alta como para descartar esta posibilidad.

4.2.- El ión  $m/z$  233 es un ión de naturaleza no radicalaria, por lo que ha perdido el nitrógeno oxazolidínico. En favor de esta posibilidad se pueden alegar varias razones incluyendo todo lo dicho anteriormente:

a) En los anillos heterocíclicos con nitrógeno se observa generalmente la eliminación de  $\text{HCN}^{113}$ .

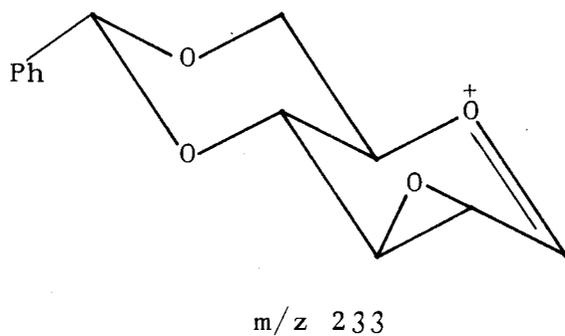
b) Una escisión del anillo de oxazolidina en las sustancias objeto de estudio podría conducir al ión  $m/z$  233. Dicha eliminación cumple todos los requisitos, ya que al escindirse el anillo de oxazolidina, se elimina conjuntamente el átomo de nitrógeno, el grupo  $\text{COR}_2$  y el grupo  $\text{COR}_3$ .

c) En los espectros de los metil 2,3-anhidro-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-mano y alopiranosido realizados con fines comparativos (Figuras 80-A y 81-A) se observa una señal a  $m/z$  233, de fácil asignación al ión  $(\text{M}-\text{OCH}_3)^+$  (Esquema 34).



ESQUEMA 34

Por todo ello proponemos tentativamente para el ión m/z 233, en nuestro caso, la estructura siguiente:



La composición atómica de la estructura propuesta para el ión  $m/z$  233 sería  $C_{13}H_{13}O_4$ , para la cual se ha encontrado una desviación de tan solo 0,8 ppm en un experimento de alta resolución para la sustancia 40 (vease Tabla 38).

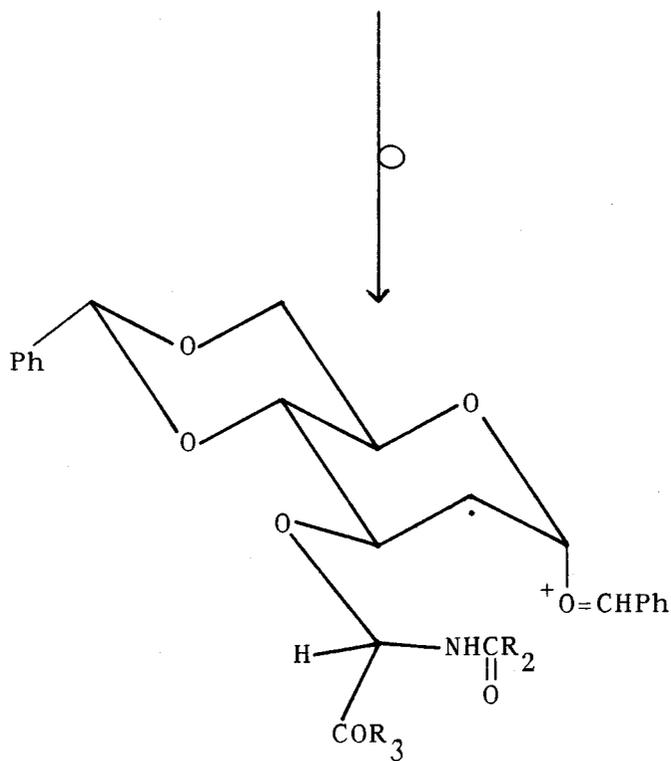
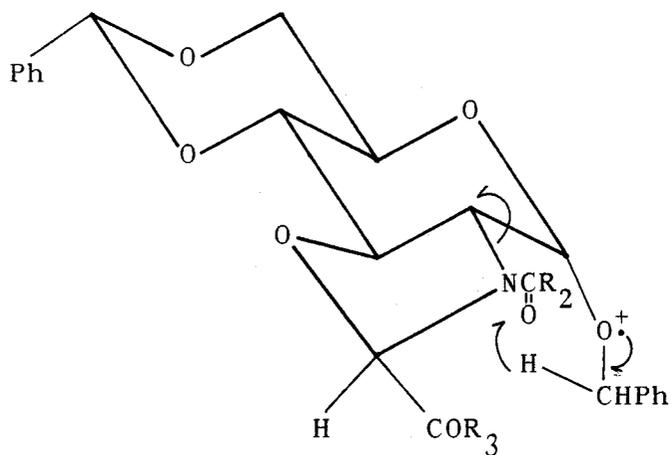
Una vez deducida la estructura de este ión, se puede explicar esta ruta de fragmentación como sigue:

En primer lugar debe ocurrir en el ión molecular una transposición de hidrógeno desde el grupo  $OR_1$  ( $R_1=CH_2Ph$ ) hacia otra zona del ión para que posteriormente se produzca la pérdida de 106 unidades de masa ( $PhCHO$ )\*. Se puede pensar en una transposición de este hidrógeno hacia el enlace amídico  $N-COR_2$  cercano (de hecho, si la transposición es hacia el átomo de nitrógeno, transcurriría a través de un estado de transición cíclico de seis miembros), tal como se muestra en el Esquema 35.

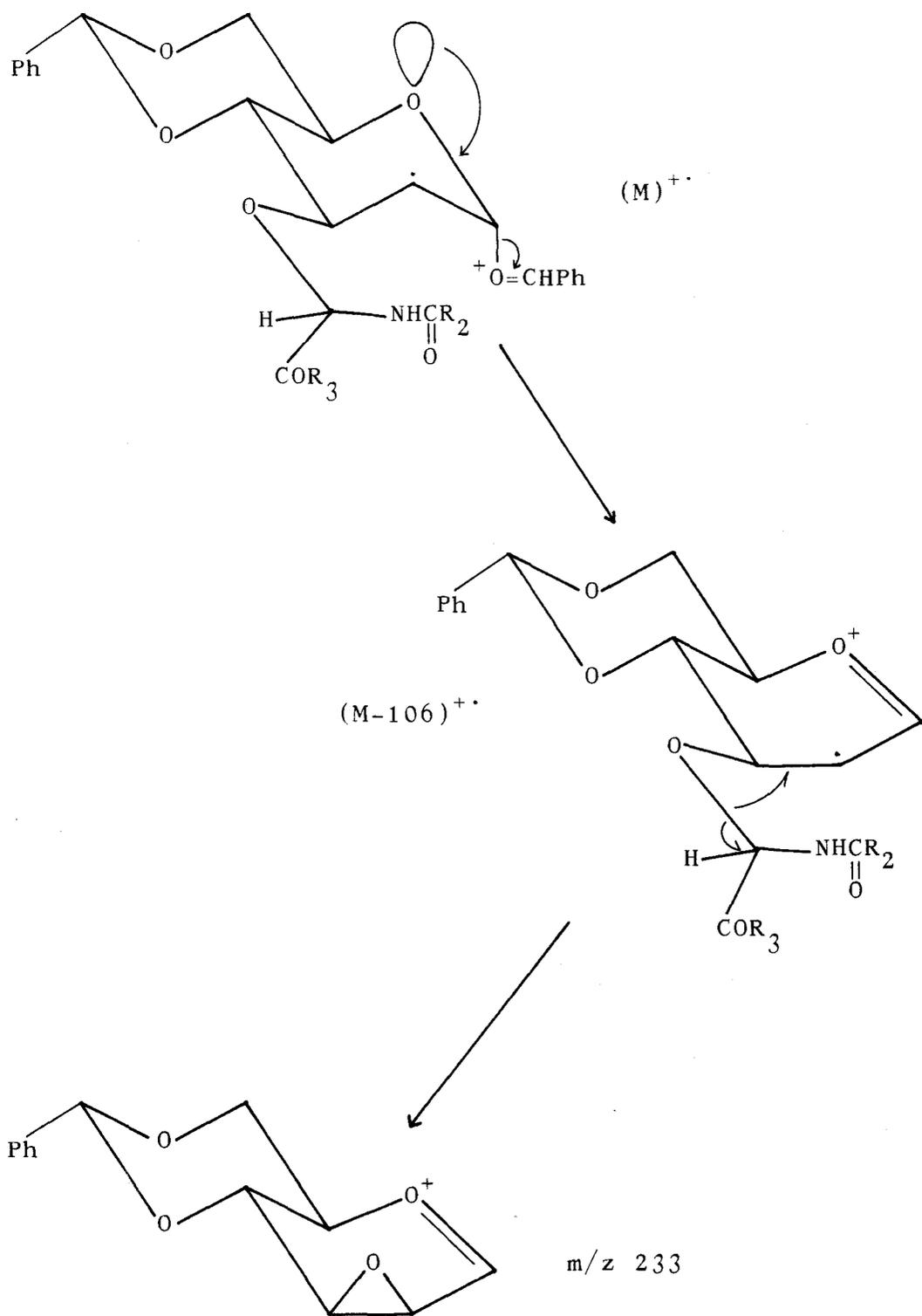
Posteriormente, la participación del par de electrones no enlazantes del oxígeno heterocíclico del anillo de piranosa en *anti* al enlace glicosídico daría lugar a la eliminación de benzaldehído, con producción del ión  $(M-106)^+$  (Esquema 36).

---

\* Evidentemente, en el caso de  $R_1=CH_3$  esta transposición está mucho más desfavorecida. Ello explicaría el hecho de que en las sustancias 81 y 69 no aparezca el ión análogo  $(M-30)^+$  ni su correspondiente ión-hijo  $m/z$  233.



ESQUEMA 35



ESQUEMA 36

La escisión posterior del enlace éter entre el oxígeno en posición 3 y el resto nitrogenado, junto con el reordenamiento por unión a la posición 2, daría lugar al ión  $m/z$  233 (Esquema 36).

Puede extrañar el hecho de que en las sustancias con  $R_1 = Bn$ , pero  $R_3 =$  éster etílico de aminoácido (44, 45, 46, 47, 48 y 49) no aparezca el ión  $m/z$  233 (o si aparece, su intensidad sea excepcionalmente baja), aún cuando en algunos de ellos se detecta el ión  $(M-106)^+$ . La explicación pudiera ser que en estas sustancias, la transposición de hidrógeno se da, pero en este caso con mayor facilidad hacia el grupo éster etílico presente, con lo que se produciría el ión  $(M-106)^+$  pero no el ión  $m/z$  233.

Finalmente en la Tabla 38 se recogen algunos datos seleccionados de los espectros de alta resolución realizados con las sustancias 40, 81 y 48, los cuales confirman las composiciones atómicas de los diversos iones propuestos.

TABLA 38

Datos seleccionados de los espectros de masas de alta resolución de 40, 81 y 48

Ión tipo	40			81			48		
	m/z	Compos.	ppm	m/z	Compos.	ppm	m/z	Compos.	ppm
(M) <sup>+</sup>	469	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>8</sub>	0,3	393	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>8</sub>	0,9	624	C <sub>34</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	0,7
(M-COR <sub>3</sub> ) <sup>+</sup>	410	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>6</sub>	-6,0	334	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>6</sub>	7,6	494	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> NO <sub>6</sub>	5,0
A	304	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>5</sub>	-9,2	228	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub>	-0,8	388	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> NO <sub>5</sub>	3,4
B	196	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>4</sub>	-3,4				280	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>4</sub>	-2,8
C	154	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	10,3				154	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	3,2
E							368	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>5</sub>	-7,6
F							262	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub>	-5,1
G	286	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub>	1,0						
(M-149) <sup>+</sup>	320	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>6</sub>	2,2	244	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>6</sub>	1,2			
m/z 149	149	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	7,7	149	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	4,4			
(M-91) <sup>+</sup>							533	C <sub>27</sub> H <sub>37</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	21,6
K							427	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	4,2
(M-106) <sup>+</sup>	363	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>7</sub>	-16,2				518	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	9,7
m/z 233	233	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub>	-0,8						

## II.3.4.2. SUSTANCIAS DESBENZALADAS

La estructura general de este grupo está representada en la Figura 20 y las sustancias objeto de estudio se recogen en la Tabla 39.

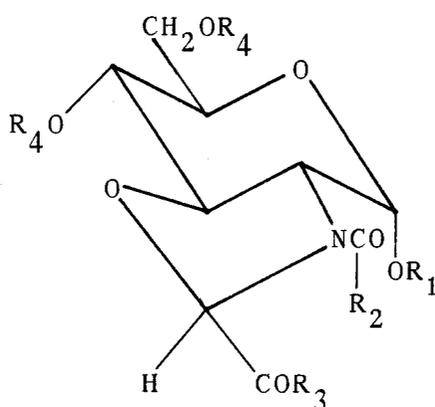


Figura 20

TABLA 39

Sustancia	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
55	Bn	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
56	Bn	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
60	Bn	CH <sub>3</sub>	NHCH(CH <sub>3</sub> )COOEt	H
57	Bn	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Bz
78	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	nBu

Los espectros de masas de las sustancias 55, 56, 60, 57 y 78 obtenidos por ionización por impacto electrónico se muestran en el Anexo (Figuras 83-A a 87-A). En la Tabla 40 se recogen las principales señales que aparecen en cada uno de ellos.

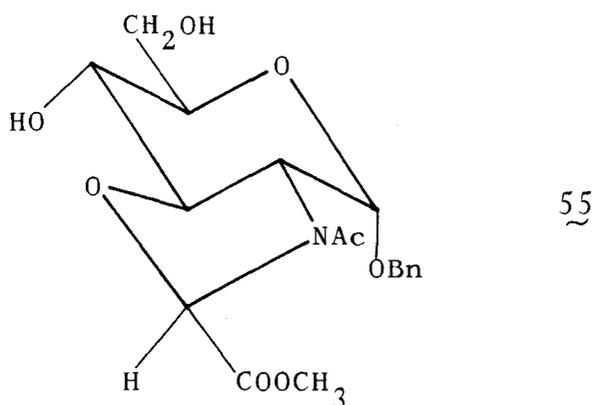
Las diferencias observadas en la interpretación de los espectros de masas de las sustancias de este grupo están en función de los sustituyentes  $R_1$  y  $R_4$  fundamentalmente. Para facilitar su estudio se comentará el espectro de masas de cada producto, para posteriormente hacer un balance conjunto de las vías de fragmentación coincidentes.

TABLA 40

Principales señales registradas y su abundancia relativa (%)

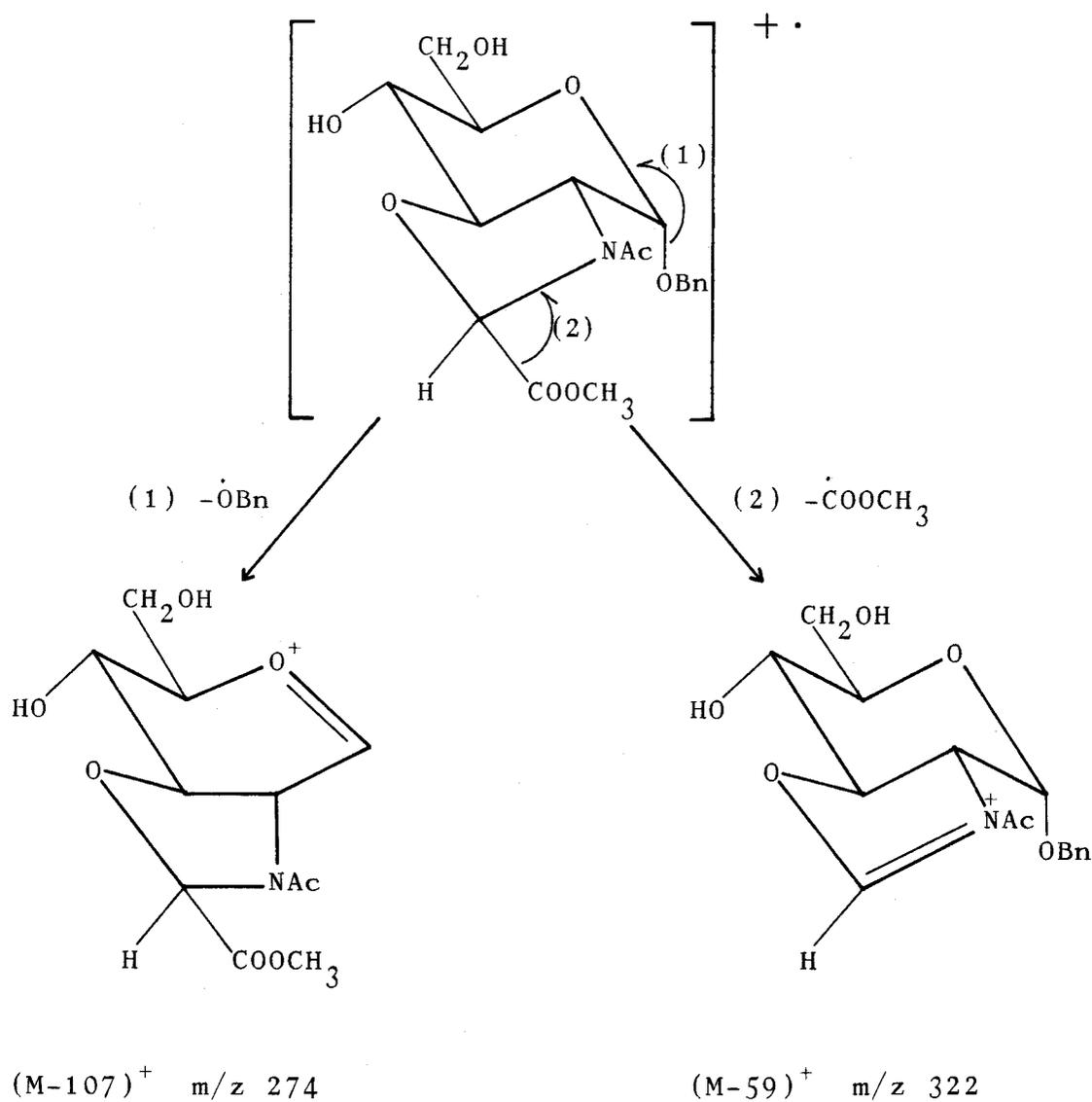
<u>55</u>	<u>56</u>	<u>60</u>	<u>57</u>	<u>78</u>
350 (5,4)	466 (0,2)	435 (1,2)	590 (0,4)	418 (0,3)
322 (24,2)	465 (0,5)	364 (1,4)	589 (0,6)	417 (0,5)
321 (1,4)	464 (0,4)	350 (0,9)	530 (14,0)	416 (0,2)
320 (2,4)	434 (7,6)	323 (10,3)	482 (3,0)	386 (1,8)
308 (1,5)	406 (45,4)	322 (17,9)	456 (0,5)	374 (2,4)
290 (1,8)	405 (2,4)	320 (2,4)	454 (0,5)	358 (13,3)
275 (3,0)	404 (3,8)	308 (2,4)	425 (1,0)	344 (2,7)
274 (7,4)	374 (3,0)	288 (5,4)	380 (1,3)	330 (27,3)
272 (1,8)	372 (8,2)	262 (13,3)	366 (6,7)	326 (35,1)
262 (22,4)	359 (2,4)	220 (6,4)	318 (1,8)	301 (10,3)
248 (1,7)	358 (6,0)	214 (16,7)	288 (2,9)	298 (6,0)
232 (5,3)	356 (4,4)	202 (5,4)	202 (3,0)	288 (2,0)
230 (6,8)	346 (31,2)	196 (6,0)	196 (2,3)	284 (2,4)
220 (10,9)	298 (21,8)	172 (8,2)	154 (3,3)	270 (2,8)
214 (27,3)	280 (16,3)	154 (8,5)	122 (14,5)	252 (14,5)
202 (9,1)	248 (5,0)	144 (7,9)	108 (7,3)	242 (100)
196 (7,3)	246 (6,1)	116 (7,8)	106 (15,1)	239 (4,2)
172 (13,4)	236 (7,3)	108 (25,4)	105 (100)	224 (7,3)
154 (9,9)	232 (7,9)	107 (19,4)	91 (59,4)	214 (6,7)
145 (17,0)	230 (9,1)	106 (9,7)	77 (28,8)	213 (9,4)
131 (9,4)	220 (26,7)	105 (11,5)	73 (14,5)	210 (15,2)
91 (100)	215 (24,2)	100 (11,4)	60 (22,4)	200 (29,1)
	214 (12,7)	91 (100)	45 (13,3)	183 (12,7)
	202 (8,5)	79 (14,5)		182 (9,7)
	172 (46,7)	77 (13,3)		172 (15,8)
	154 (26,0)	70 (10,9)		171 (13,3)
	145 (7,3)			154 (21,2)
	127 (33,5)			153 (78,2)
	91 (100)			144 (26,0)
	57 (10,3)			126 (19,4)
				116 (9,7)
				112 (37,6)
				99 (14,0)
				98 (14,5)
				87 (12,1)
				84 (23,6)
				70 (13,9)
				57 (55,8)

II.3.4.2.1. Estudio por espectrometría de masas de 3-acetil-2-metoxycarbonil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (55).



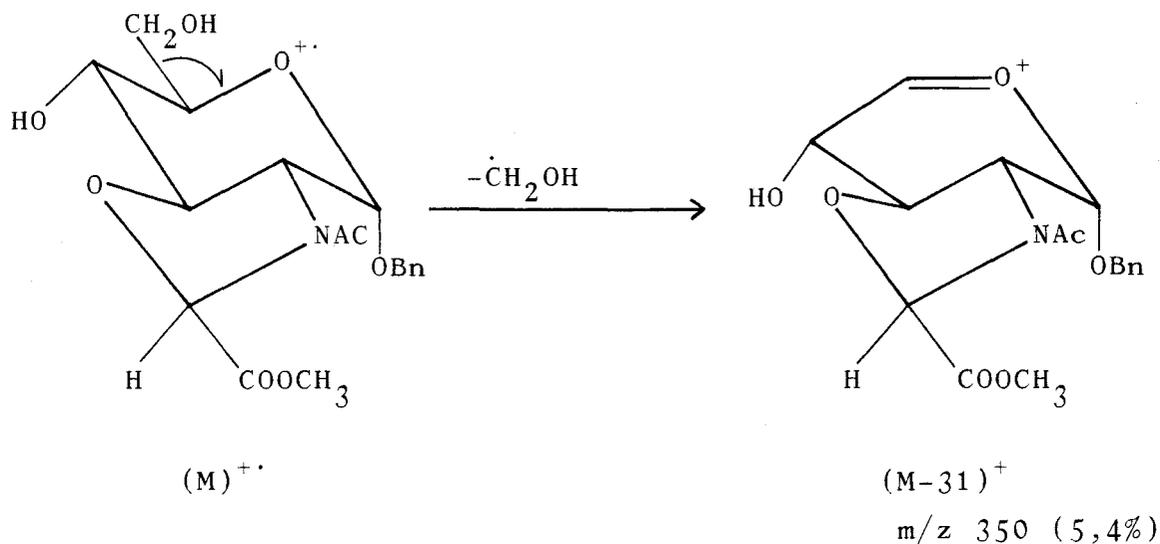
La sustancia 55, que puede considerarse el prototipo de este grupo, origina por impacto electrónico un espectro de masas (Figura 83-A) cuyo pico base, como era de esperar, es el ión tropilio,  $m/z$  91, procedente del grupo bencilo presente en la posición 1 del azúcar. Aunque, como se verá a continuación, el espectro confirma la estructura propuesta, no se observa el ión molecular, el cual debería aparecer a  $m/z$  381 (de acuerdo con el peso molecular calculado). Por ello, se ha realizado un segundo espectro, utilizando esta vez una ionización más suave, tal como la ionización química con isobutano. El espectro de ionización química resultante se recoge en la Figura 88-A y en él se observa el ión  $(M+H)^+$  a  $m/z$  382, asimismo, se detectan los iones primarios  $(M-107)^+$  a  $m/z$  274 y  $(M-59)^+$  a  $m/z$  322 como ocurre con

el espectro registrado por impacto electrónico. Estas dos fragmentaciones, producidas por impacto electrónico, se postulan en el Esquema 37.



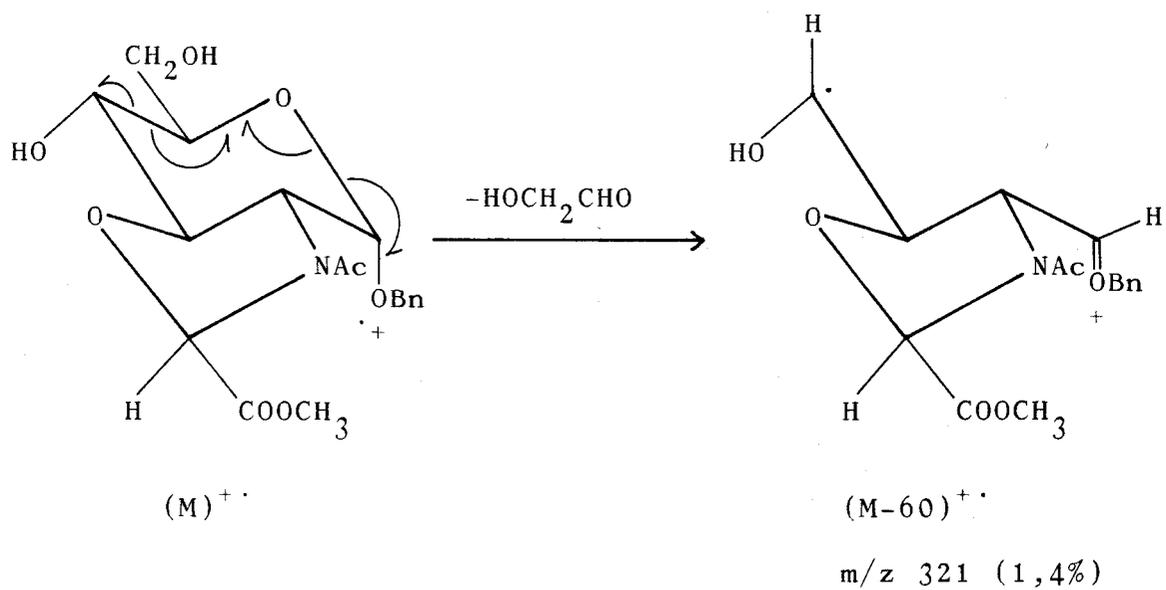
ESQUEMA 37

Otras fragmentaciones primarias menores, de gran importancia diagnóstica<sup>114,115</sup> en el espectro de esta sustancia son las que dan lugar a los iones a  $m/z$  350 y  $m/z$  321, por pérdida en el primero de la posición 6 del azúcar (Esquema 38), y de las posiciones 5 y 6 en el segundo (Esquema 39).

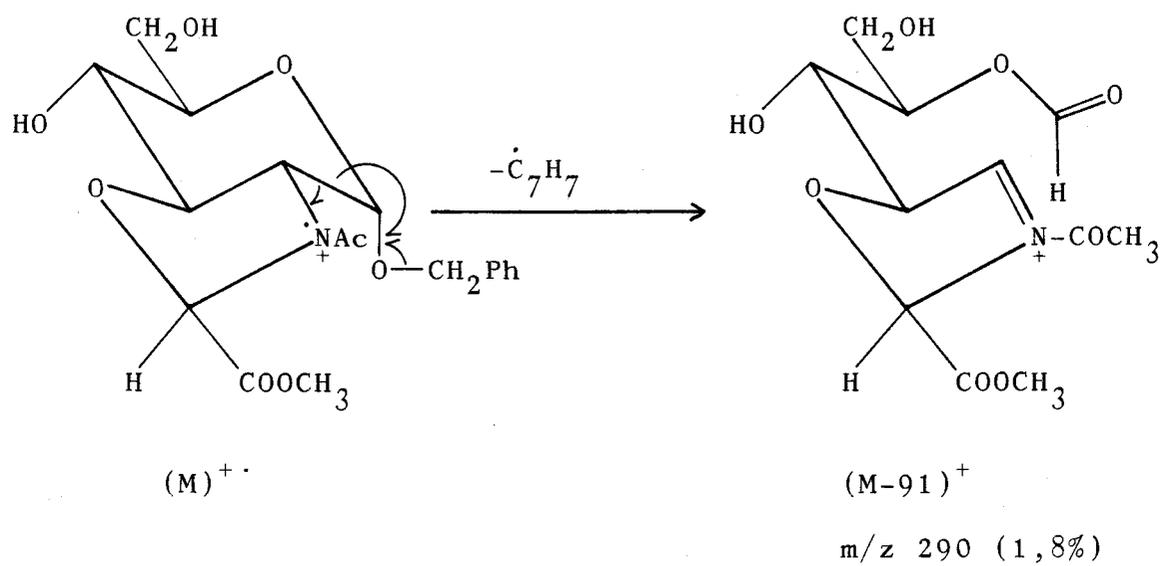


ESQUEMA 38

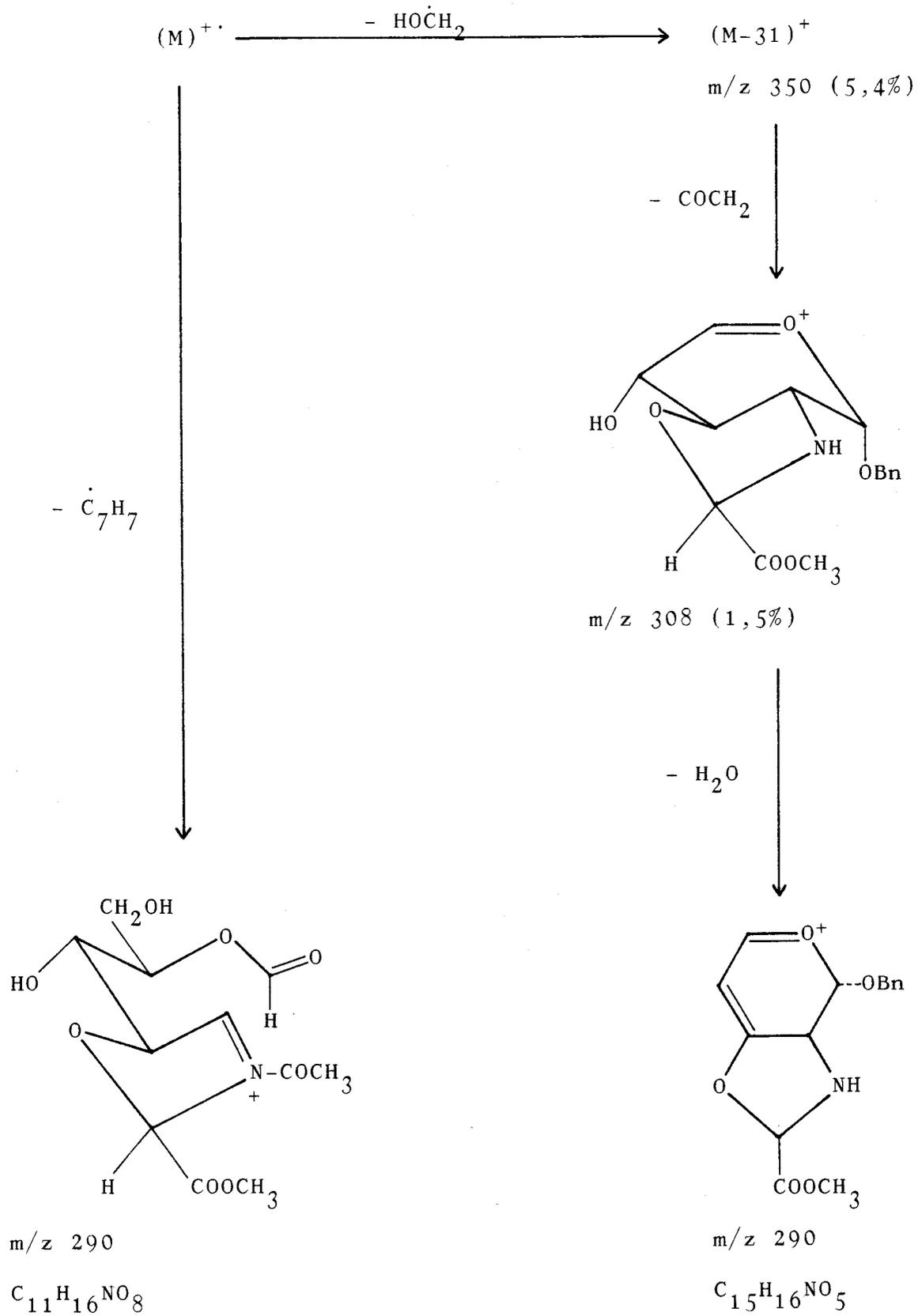
Asimismo, se observa en este espectro una señal a  $m/z$  290 de baja intensidad (1,8%) que se ha asignado al ión primario  $(M-91)^{+}$ . Esta fragmentación se postula en el Esquema 40. No obstante este ión a  $m/z$  290 podría suponerse procedente del ión primario  $(M-31)^{+}$  por pérdida sucesiva de cetona y agua tal como se indica en el Esquema 41.



ESQUEMA 39



ESQUEMA 40



ESQUEMA 41

De hecho el ión intermedio  $m/z$  308 que se origina a partir del ión  $(M-31)^+$  por pérdida de cetena, se registra con una intensidad del 1,5%, lo cual podría apoyar esta suposición.

Para comprobar si ambas rutas de fragmentación son posibles (Esquema 41), se ha estudiado el ión  $m/z$  290 por espectrometría de masas de alta resolución, aprovechando la diferente composición elemental de ambos fragmentos. El resultado de este estudio se recoge en la Figura 89-A, donde se observa que la señal a  $m/z$  290 se corresponde con una composición elemental de  $C_{11}H_{16}NO_8$  con una desviación de tan solo 3,4 ppm. Este hecho permite asignar con seguridad la señal a  $m/z$  290 al ión primario  $(M-91)^+$ . Por otra parte, se observa que, para una desviación menor de 5 ppm, no se encuentra la combinación correspondiente a la otra posibilidad.

Gracias a la espectrometría de masas de alta resolución (Tabla 41) y al estudio de metastables realizado mediante barridos ligados (Tabla 42) se ha elaborado el esquema de fragmentación que se expone a continuación (Esquema 42), y que permite explicar el espectro de masas que origina esta sustancia mediante ionización por impacto electrónico.

TABLA 41

Espectro de masas de alta resolución de 55

m/z	Composición	Desviación(ppm)
350	$C_{17}H_{20}NO_7$	-0,8
322	$C_{16}H_{20}NO_6$	0,8
321	$C_{16}H_{19}NO_6$	9,9
320	$C_{16}H_{18}NO_6$	0,3
290	$C_{11}H_{16}NO_8$	3,4
274	$C_{11}H_{16}NO_7$	-1,3
262	$C_{14}H_{16}NO_4$	2,6
232	$C_9H_{14}NO_6$	8,2
220	$C_{12}H_{14}NO_3$	1,1
214	$C_9H_{12}NO_5$	-4,4
230	$C_9H_{12}NO_6$	8,5
202	$C_{12}H_{12}NO_2$	-6,9
202	$C_9H_{14}O_5$	6,4
196	$C_9H_{10}NO_4$	-1,9
172	$C_7H_{10}NO_4$	4,8
154	$C_7H_8NO_3$	-7,2

TABLA 42

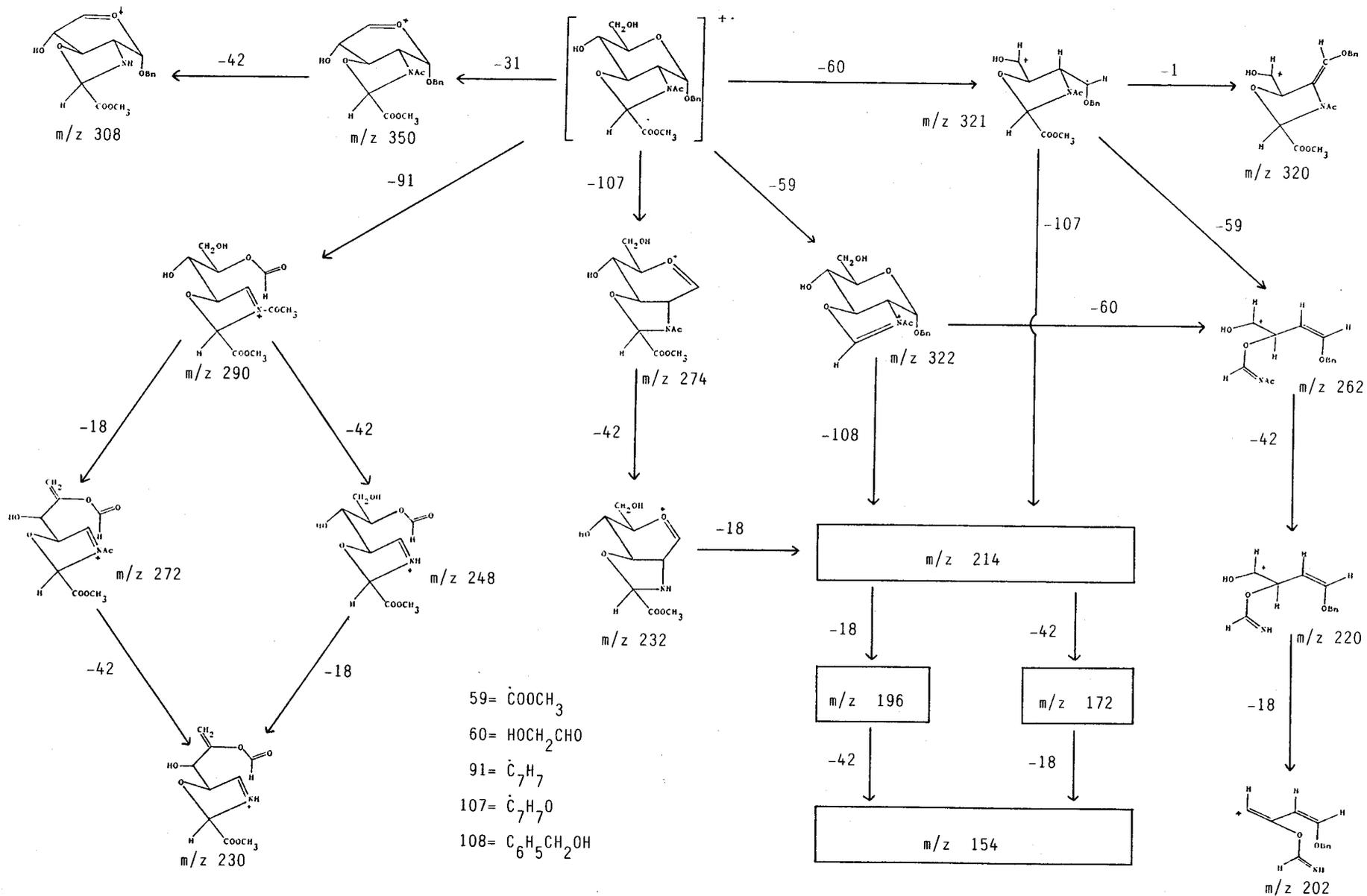
Iones-padre(P), hijo(H) y pérdida de molécula neutra(N) para 55

	172	196	220	232	248	262 <sup>*</sup>	321	322
154	P N	PH						
202			N			HN		
214		P N		P			PH	P N
215							H	
230					N			
262 <sup>*</sup>			H			/	H	N
320							H	

N= 18, 60 y 108

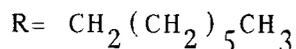
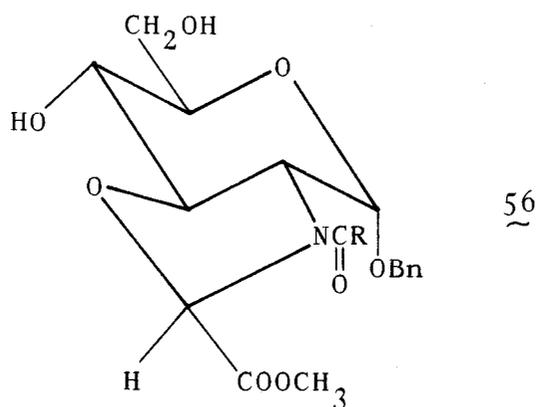
\* Ión en ordenada y abscisa

El hecho de que el ión  $m/z$  214 proceda de tres rutas de fragmentación diferentes (ver Tabla 42 y Esquema 42) hace pensar en la posibilidad de tres (o más) estructuras diferentes para este ión. No obstante, la composición elemental en los tres casos es exactamente la misma ( $C_9H_{12}NO_5$ ), lo cual impide estudiar por espectrometría de masas de alta resolución la importancia que cada una de estas rutas tiene en la intensidad relativa de este ión. Por otra parte, dada la diversidad estructural posible para este ión, se proponen igualmente diferentes estructuras para los iones a los que da lugar ( $m/z$  196, 172 y 154).



ESQUEMA 42

II.3.4.2.2. Espectro de masas de 2-metoxicarbonil-3-n-octanoil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (56).

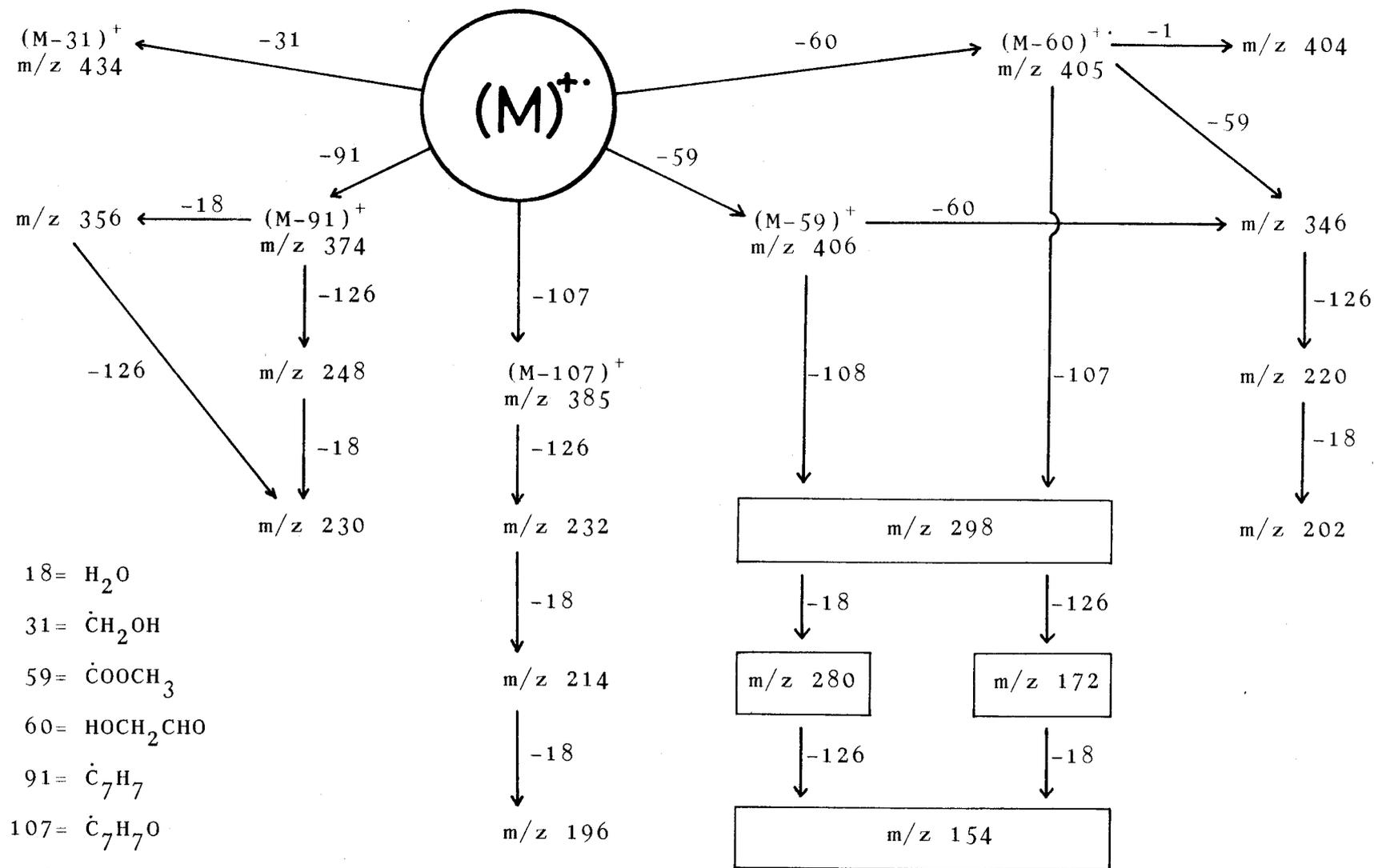


La sustancia 56, análoga a la estudiada anteriormente, en la que  $R_2 = (\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$  en lugar de  $\text{CH}_3$ , origina por impacto electrónico un espectro de masas (Figura 84-A) que está de acuerdo con la estructura propuesta.

De nuevo el pico base del espectro corresponde al ión tropilio ( $m/z$  91) procedente del grupo bencilo de la posición anomérica del azúcar. En la zona alta de masas se observa un grupo de señales que han sido asignadas a los iones  $(M-H)^+$  a  $m/z$  464,  $(M)^{++}$  a  $m/z$  465 y  $(M+H)^+$  a  $m/z$  466.

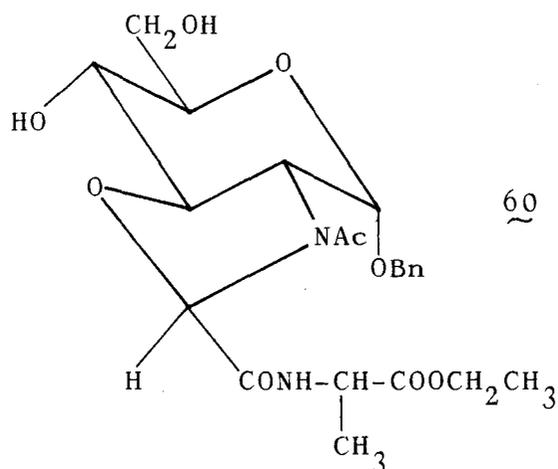
Asimismo, se registran todos los iones primarios mencionados en el caso anterior, es decir, los iones  $(M-31)^+$  a  $m/z$  434,  $(M-59)^+$  a  $m/z$  406,  $(M-60)^{++}$  a  $m/z$  405,  $(M-91)^+$  a  $m/z$  374 y  $(M-107)^+$  a  $m/z$  358.

El esquema de fragmentación de esta sustancia es en todo similar al anterior y se representa en el Esquema 43. La única diferencia existente es la mayor abundancia de todos los iones en general, y en particular de aquellos que se originan por eliminación de la cadena grasa sobre el nitrógeno. Esta cadena grasa se pone de manifiesto igualmente por la presencia de las señales a  $m/z$  127 y 57, que se asignan respectivamente a los iones  $O\equiv C^+-(CH_2)_6CH_3$  y  $CH_2^+-CH_2-CH_2-CH_3$ .



ESQUEMA 43

II.3.4.2.3. Espectro de masas del éster etílico de 3-acetil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanina (60).



El espectro de masas de la sustancia 60, obtenido por impacto electrónico, se recoge en la Figura 85-A. El pico base del espectro es nuevamente la señal  $m/z$  91 correspondiente al ión tropilio. Aunque no aparece el ión molecular (al igual que en la sustancia 55), el espectro está de acuerdo con la estructura propuesta.

En este espectro destacan dos circunstancias interesantes:

1.- Debido a que la sustancia presenta dos átomos de nitrógeno, en principio debería esperarse la aparición en

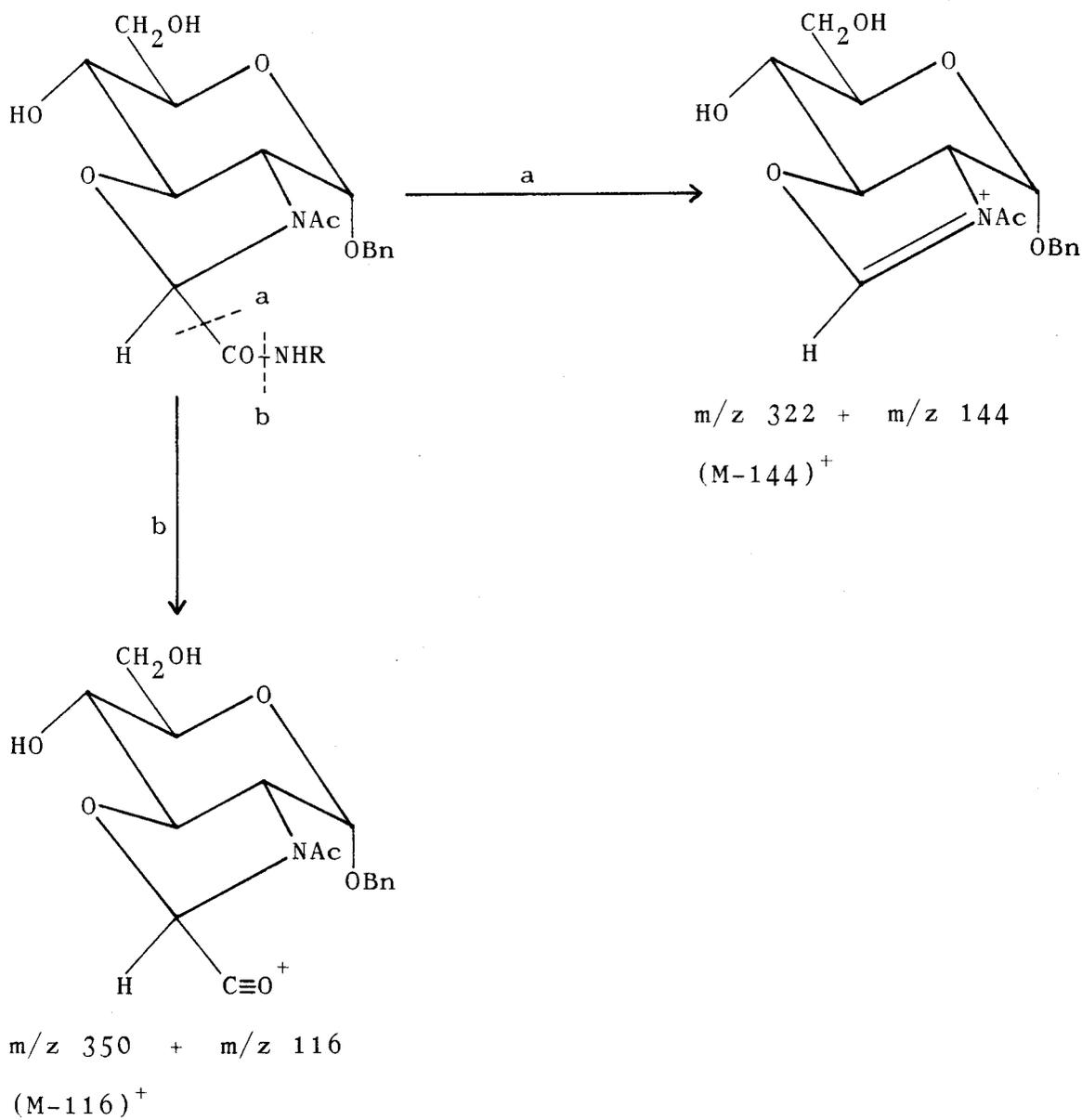
el espectro de gran número de señales con masa impar. Sin embargo este tipo de señales es muy escaso.

2.- Se observa una significativa abundancia de señales a masas bajas. Es decir, la distribución de las señales está desplazada hacia la izquierda del espectro (zona de masas bajas).

Estos dos hechos están relacionados entre sí y se pueden explicar como sigue: La casi exclusiva presencia de señales a  $m/z$  par, implica que los iones que las originan presentan un átomo de nitrógeno exclusivamente, por lo que la fragmentación principal, que da lugar a casi todas las señales del espectro, debe ocurrir de tal manera que se produzca la separación de los dos átomos de nitrógeno presentes originalmente. En el caso que nos ocupa se tratará pues de las rupturas "a" o "b" presentadas en el Esquema 44.

En la ruptura "a", cuando la carga queda sobre la porción azucarada, se origina el ión  $(M-144)^+$  a  $m/z$  322, equivalente al conocido  $(M-59)^+$  y que en general denominamos  $(M-COR_3)^+$ . En el caso de la ruptura "b" se produciría el ión  $(M-116)^+$  el cual, aunque con muy baja intensidad, se observa en el espectro a  $m/z$  350. Por otra parte, si la carga quedara del lado del aminoácido, aparecerían los iones  $m/z$  144 y 116 respectivamente. Estos iones efectivamente se observan

con una intensidad relativa cercana al 8% cada uno de ellos.



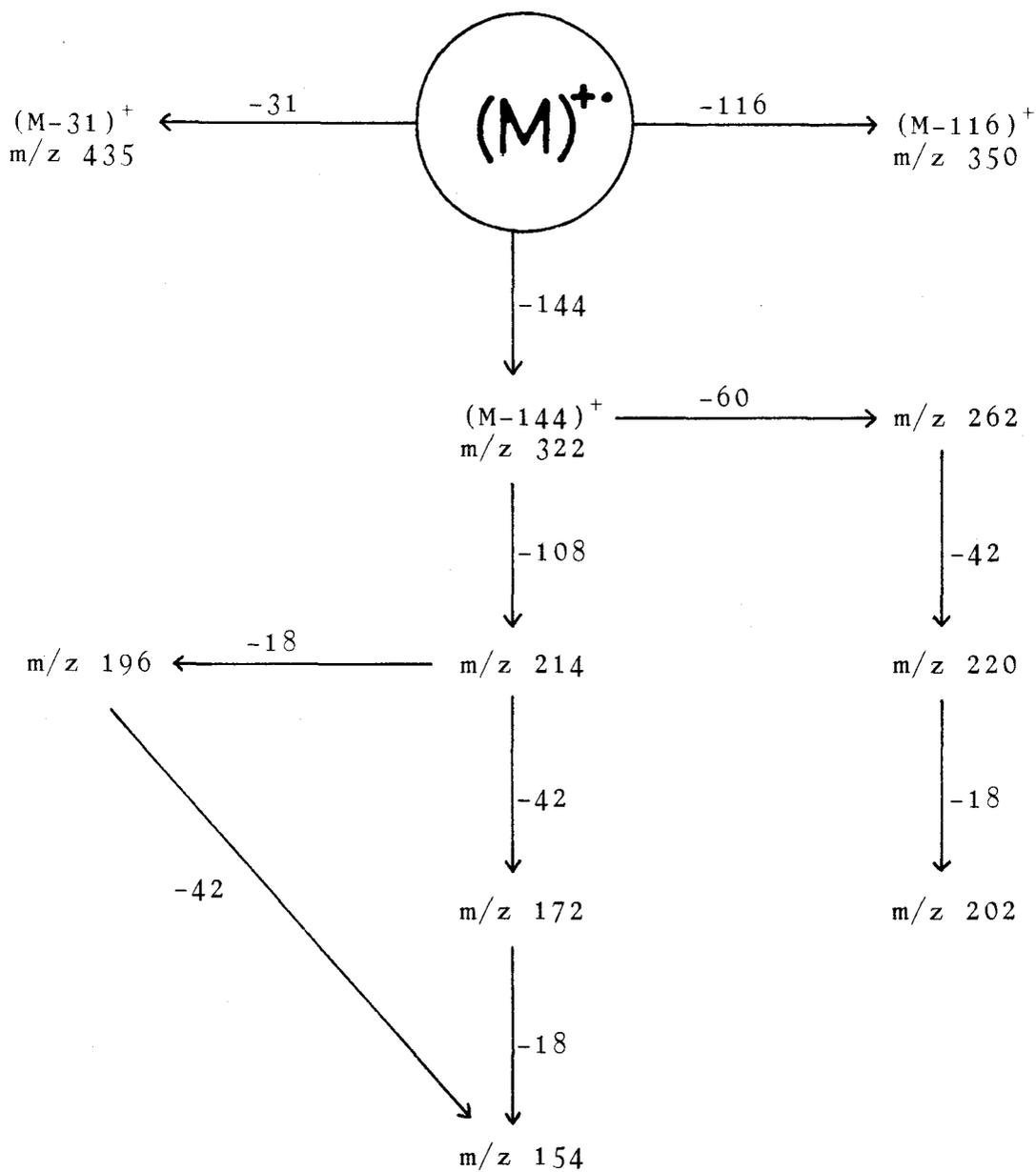
ESQUEMA 44

Otro grupo de señales a masas bajas son debidas a la presencia del grupo bencilo. Estas son, además del ión tropilio ( $m/z$  91) ya mencionado, las que aparecen a  $m/z$  77 (ión fenilo,  $C_6H_5$ ),  $m/z$  105 ( $O\equiv C^+C_6H_5, C_7H_5O$ ),  $m/z$  106 ( $C_7H_6O$ )  $m/z$  107 ( $C_7H_7O$ ) y  $m/z$  108 ( $C_7H_8O$ ).

A masas altas no se observan todas las señales que deberían aparecer según lo visto para las dos sustancias análogas anteriores. Aparte de los fragmentos primarios ya comentados ( $m/z$  350 y 322, Esquema 44) solo se detecta otro ión primario a  $m/z$  435 asignado al ya conocido (M-31)<sup>+</sup>.

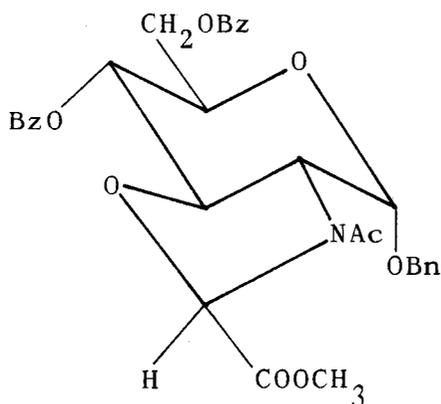
El resto del espectro se origina fundamentalmente a partir del ión (M-144)<sup>+</sup> a  $m/z$  322 de la misma forma que lo hacen las sustancias 55 y 56 ya estudiadas.

Por tanto, el esquema de fragmentación propuesto para esta sustancia es el recogido en el Esquema 45.



ESQUEMA 45

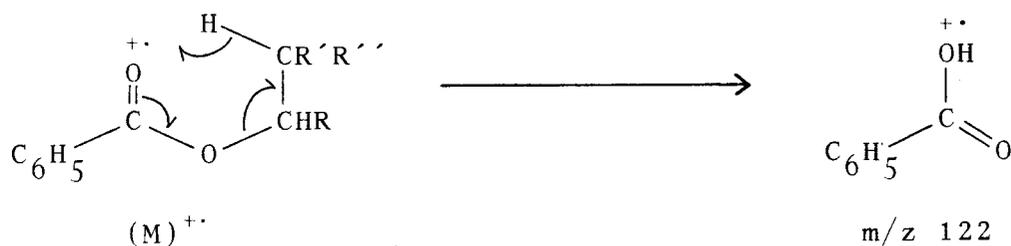
II.3.4.2.4. Espectro de masas de 3-acetil-2-metoxicarbonil-  
 -(1-0-bencil-4,6-di-0-benzoil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-  
 -|2,3-d|-oxazolidina (57).



57

La sustancia 57 origina por impacto electrónico un espectro de masas (Figura 86-A) que está de acuerdo con la estructura propuesta.

La existencia de dos grupos benzoato se detecta fácilmente por el hecho de que, en esta ocasión, el pico base del espectro es la señal a  $m/z$  105 asignada al ión benzoilo ( $O\equiv C-C_6H_5^+$ ), así como por la presencia de las señales a  $m/z$  77 ( $C_6H_5^+$ , ión fenilo) y a  $m/z$  122 ( $C_7H_6O_2^+$ ), asignada esta última al ión-radical del ácido benzoico producido por transposición de McLafferty, tal como se indica en el Esquema 46.



ESQUEMA 46

Por otra parte, se observa la señal debida al ión tropilio a  $m/z$  91, que indica la presencia del grupo bencilo

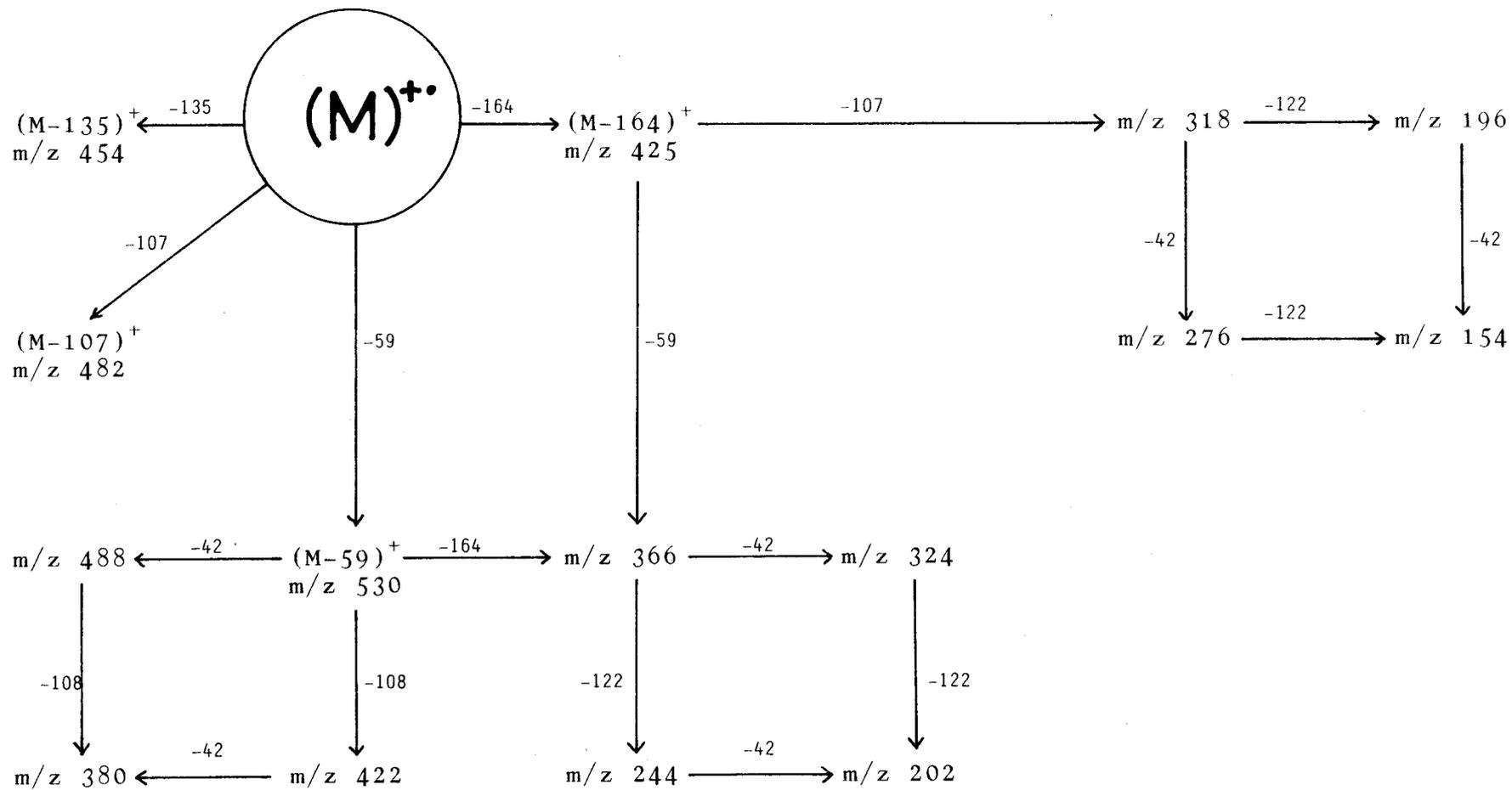
La gran estabilidad de los iones comentados hace que las señales debidas a iones con carga sobre la molécula de azúcar sean escasas y de baja intensidad. Por todo ello, el espectro de esta sustancia presenta una "desviación hacia la izquierda" aún más acusada que en la anterior sustancia estudiada y, evidentemente, motivada por otras causas.

No obstante, a masas relativamente altas se observa un número suficiente de señales como para poder confirmar la estructura propuesta. Así, la señal más alta que se registra aparece a  $m/z$  589, que coincide con el peso molecular, por lo que se ha asignado al ión molecular. Aparecen asimismo señales que se han asignado a los iones primarios  $(M-59)^+$  a  $m/z$  530,  $(M-107)^+$  a  $m/z$  482,  $(M-135)^+$  a  $m/z$  454 (equivale

al ión  $(M-31)^+$  de la sustancia 55) y  $(M-164)^+$  a  $m/z$  425 equivalente al ión  $(M-60)^+$  de la sustancia 55.

El resto del espectro se ajusta al esquema de fragmentación que se propone en el Esquema 47.

En la Tabla 43 se recogen algunos datos de interés de un espectro de alta resolución realizado para esta sustancia.



164 = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COOCH<sub>2</sub>CHO, 135 = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COOCH<sub>2</sub>, 122 = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COOH, 108 = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>OH

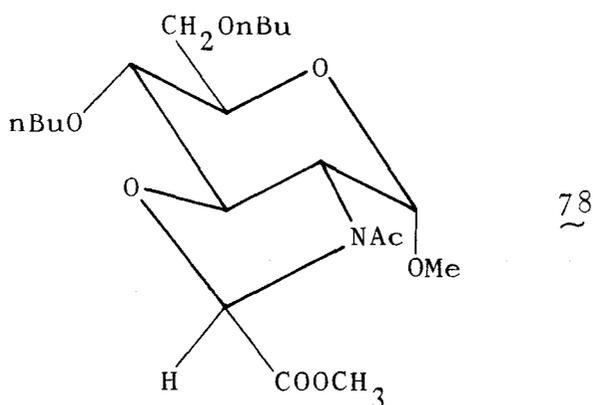
ESQUEMA 47

TABLA 43

Espectro de masas de alta resolución de 57

m z	Composición	Desviación(ppm)
589	$C_{32}H_{31}NO_{10}$	-8,3
530	$C_{30}H_{28}NO_8$	-4,3
488	$C_{28}H_{26}NO_7$	-4,1
482	$C_{25}H_{24}NO_9$	-0,4
454	$C_{24}H_{24}NO_8$	1,8
425	$C_{23}H_{23}NO_7$	4,6
380	$C_{21}H_{18}NO_6$	9,5
366	$C_{21}H_{20}NO_5$	3,5
318	$C_{16}H_{16}NO_6$	-14,3
244	$C_{14}H_{14}NO_3$	-2,3
202	$C_{12}H_{12}NO_2$	-1,0
196	$C_9H_{10}NO_4$	-0,4
154	$C_7H_8NO_3$	-1,4

II.3.4.2.5. Espectro de masas de 3-acetil-2-metoxicarbonil-  
-(4,6-di-O-n-butil-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-  
-|2,3-d|-oxazolidina (78).



El espectro de masas de la sustancia 78, obtenido por impacto electrónico, se recoge en el Apéndice (Figura 87-A).

La señal más alta del espectro se registra a  $m/z$  417, coincidiendo con el peso molecular calculado para esta sustancia, por lo que se asigna al ión molecular,  $(M)^+$ .

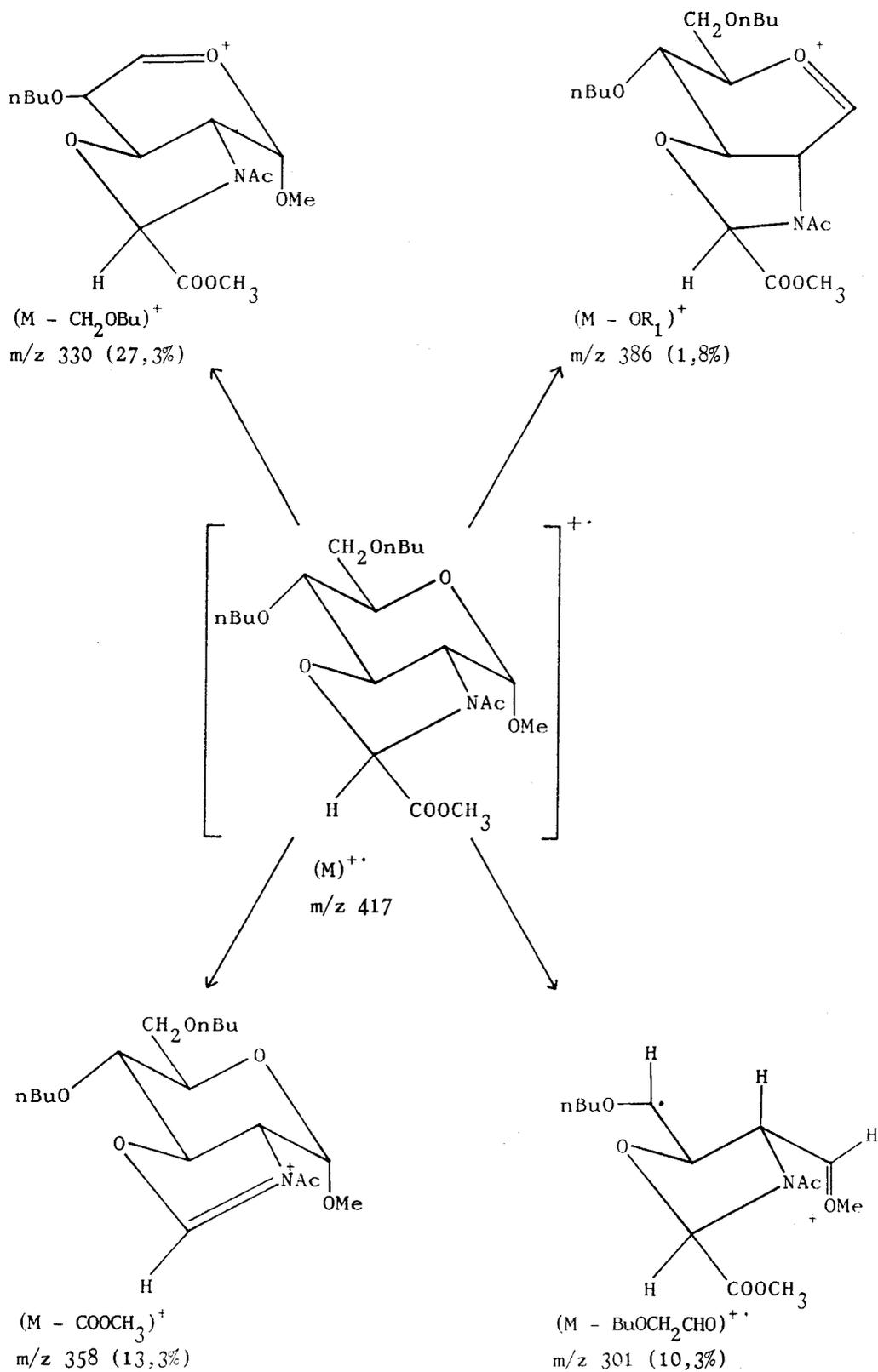
A masas bajas se observan señales a  $m/z$  57, 43 y 41, las cuales se han asignado a los iones n-butilio ( $C_4H_9^+$ ), n-propilio ( $C_3H_7^+$ ) y ciclopropilio ( $C_3H_5^+$ ), procedentes de las cadenas de n-butilo presentes en las posiciones 4 y 6 del azúcar.

El aspecto general del espectro, en el que las señales intensas están distribuidas a lo largo de todo el rango de masas, es lógico si se tiene en cuenta que en esta sustancia no existen sustituyentes de tipo aromático que puedan estabilizar la carga (como ocurría en los anteriores casos estudiados); ello implica que, en general, todas las señales presenten una intensidad relativa elevada (en comparación con los anteriores casos estudiados).

Tal situación induce a una complicación adicional del espectro, debido a que se amplía el número de rutas de fragmentación posibles para esta sustancia, con la consiguiente aparición de señales que en los anteriores casos no existen.

No obstante, los fragmentos primarios que se observan son equivalentes a los ya mencionados en las sustancias análogas anteriores. Así, aparecen los iones  $(M-OR_1)^+$  a  $m/z$  386,  $(M-R_4OCH_2CHO)^+$  a  $m/z$  301,  $(M-R_4OCH_2)^+$  a  $m/z$  330 y  $(M-COOCH_3)^+$  a  $m/z$  358 (ver Esquema 48).

Para esta sustancia se ha realizado un amplio estudio de iones metastables, cuyo resultado se recoge en la Tabla 44 y mediante el cual se ha elaborado el esquema de fragmentación que se propone (Esquema 49).



ESQUEMA 48

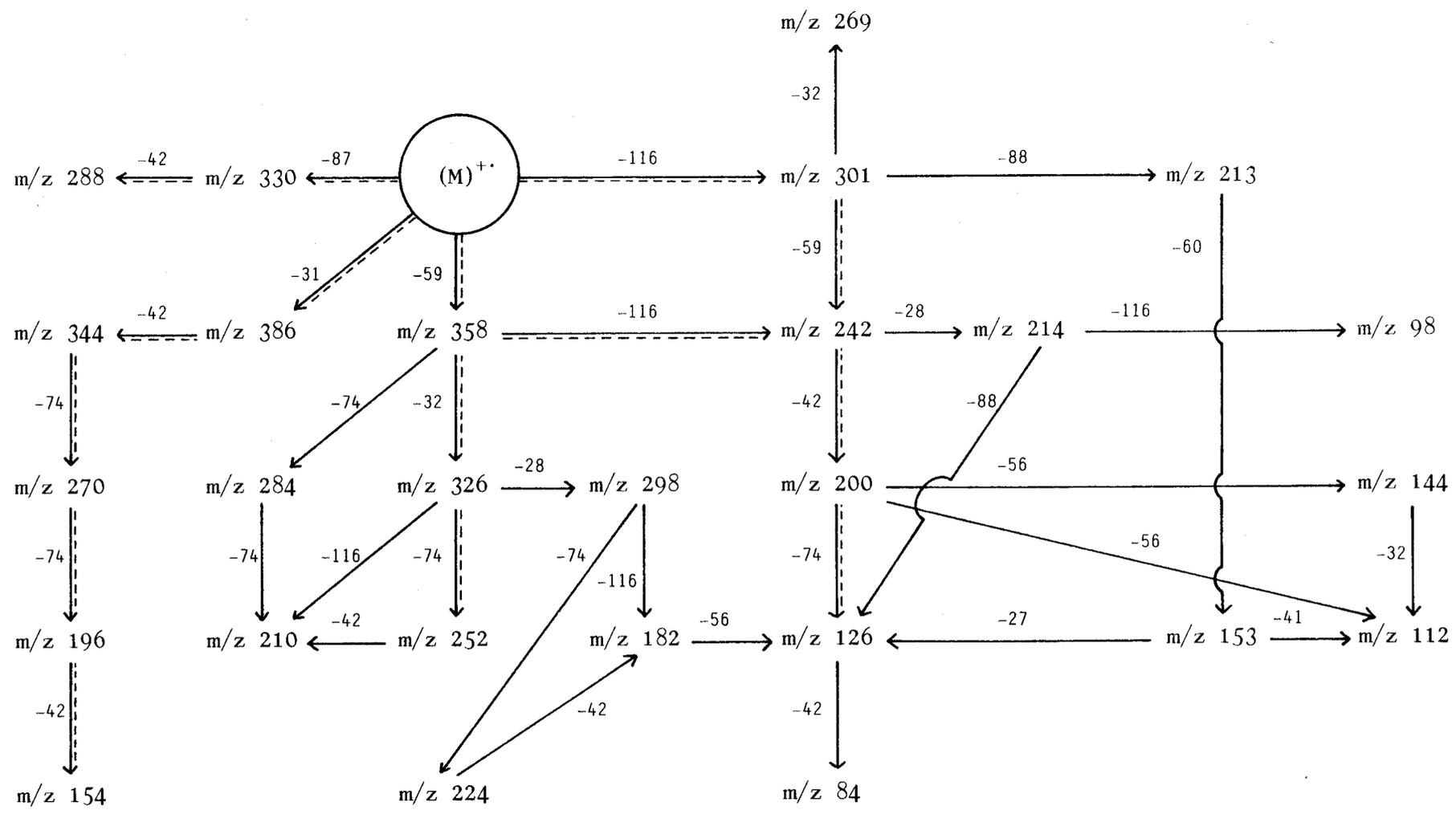
TABLA 44

Iones-padre (P), hijo (H) y pérdida de molécula neutra (N) para la sustancia 78

	98	112	126	172	196	200*	213	224	242*	252*	284*	298*	301*	326	330*	344	358*
84			N														
144		P N				P											
153		PH	PH				P										
154					N												
182			P					N				N					
200*		P N	P N			/			HN								
210										P N	P N			PHN			
214	N		P N	N					H								
242*			PHN						/				PH				H
252*										/				HN			
269													HN				
273																N	
284*											/						N
288															HN		
298*							N					/		H			
301*							HN						/				
330*				H											/		
358*														PHN			/
386																	P N

\* Ión en ordenada y abscisa

N= 32, 42, 74, 88, 116



ESQUEMA 49

II.3.4.2.6. Estudio comparativo de las sustancias englobadas en el apartado II.3.4.2.

De todo lo anteriormente comentado, se deduce que para las cinco sustancias contempladas en este apartado, existen rutas comunes de fragmentación, por lo que gran parte de las señales que se registran en sus respectivos espectros, se pueden reordenar (al igual que hicimos en el apartado II.3.4.1.) en diferentes tipos de iones. Esto es lo que se recoge en la Tabla 45.

De nuevo, al igual que ocurría en el anterior apartado (II.3.4.1.), el ión primario  $(M-COOR_3)^+$  es clave en el esquema de fragmentación de estas sustancias. A partir de este ión se originan los iones A, B, C y D por pérdida de alcohol bencílico (metanol en la sustancia 78), agua (ácido benzoico en 57 o butanol en 78) y cetena (alquilcetena en 56). Esta ruta de fragmentación se recoge en el Esquema 50.

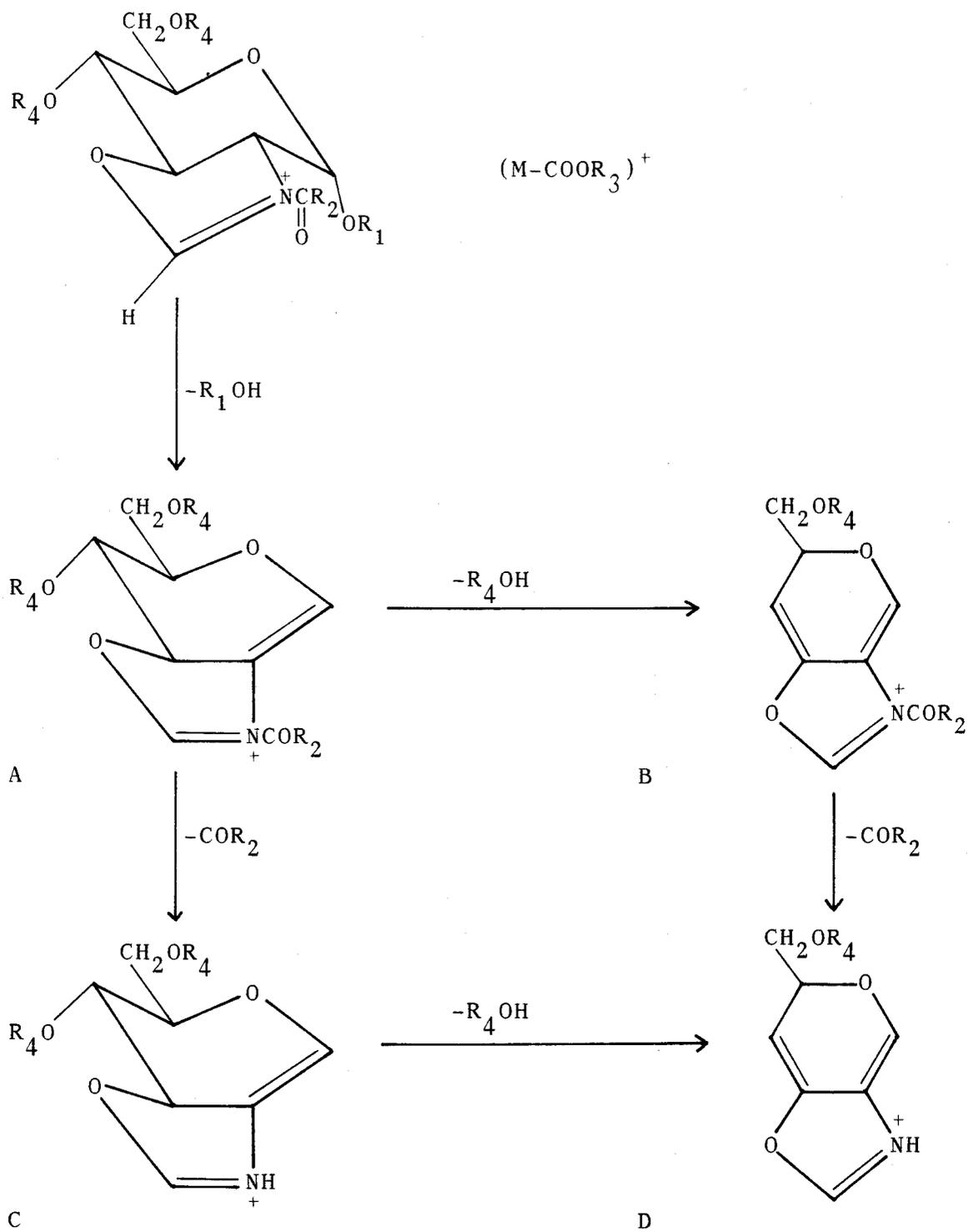
Asimismo, el ión  $(M-COOR_3)^+$  origina otra ruta importante de fragmentación por pérdida sucesiva de  $R_4OCH_2CHO$ , cetena (alquilcetena en 56) y agua (ácido benzoico en 57 o n-butanol en 78), dando lugar a los iones E, F, y G. Esta ruta se representa en el Esquema 51.

TABLA 45

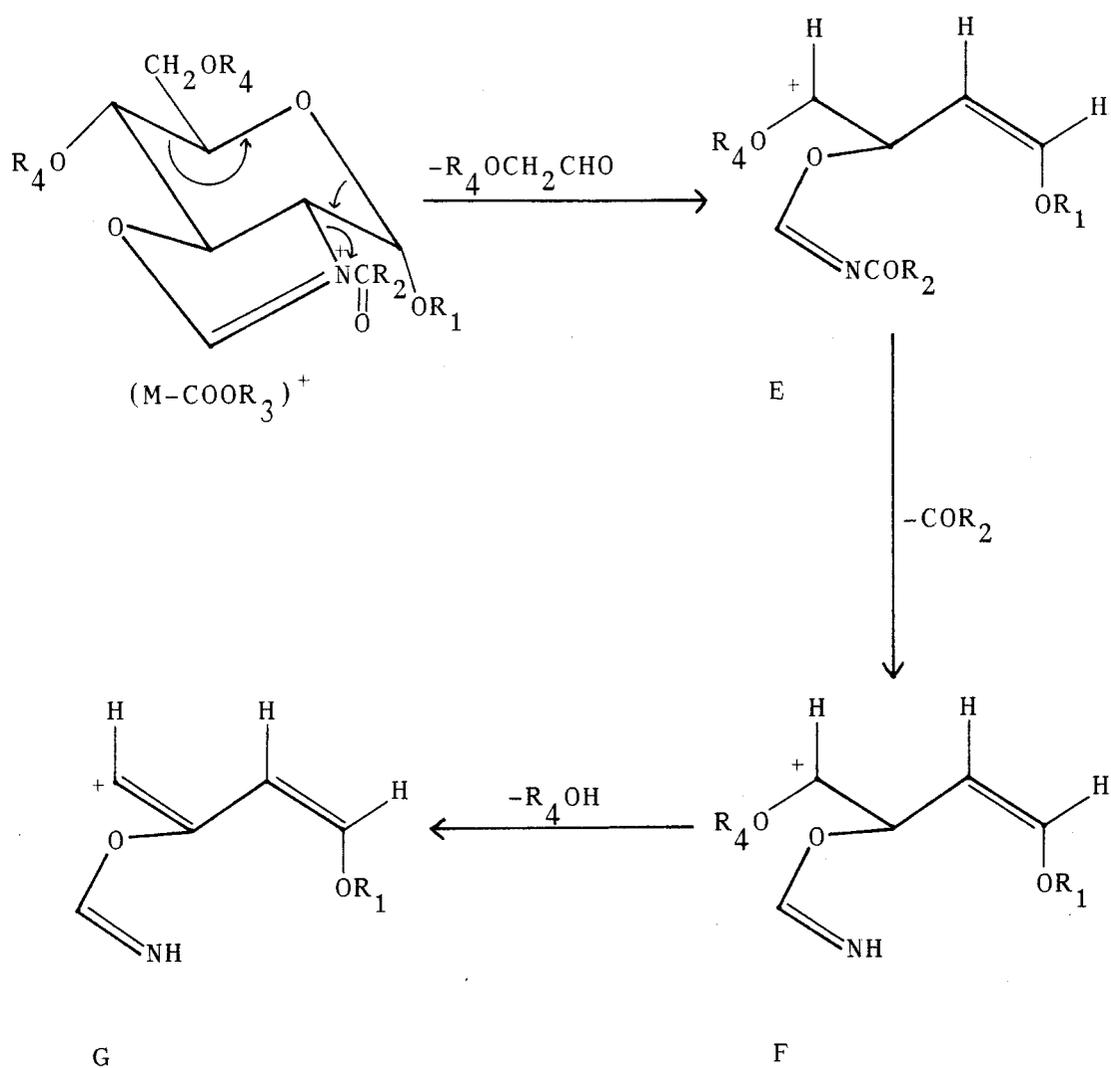
fragmentaciones comunes para las sustancias desbenzaladas

		<u>55</u>	<u>56</u>	<u>60</u>	<u>57</u>	<u>78</u>
(M) <sup>+</sup> *			465 (0,5)		589 (0,6)	417 (0,5)
(M-R <sub>4</sub> OCH <sub>2</sub> ) <sup>+</sup>		350 (5,4)	434 (7,6)	435 (1,2)	454 (0,5)	330(27,3)
(M-R <sub>4</sub> OCH <sub>2</sub> CHO) <sup>++</sup>		321 (1,4)	405 (2,4)		425 (1,0)	301(10,3)
(M-R <sub>1</sub> ) <sup>+</sup>		290 (1,8)	374 (3,0)			
(M-OR <sub>1</sub> ) <sup>+</sup>		274 (7,4)	358 (6,0)		482 (3,0)	386 (1,8)
(M-COOR <sub>3</sub> ) <sup>+</sup>		322(24,2)	406(45,4)	322(17,9)	530(14,0)	358(13,3)
(M-COOR <sub>3</sub> -R <sub>1</sub> OH) <sup>+</sup>	A	214(27,3)*	298(21,8)*	214(16,7)		326(35,1)
A-R <sub>4</sub> OH	B	196 (7,3)*	280(16,3)*	196 (6,0)		252(14,5)
A-COR <sub>2</sub>	C	172(13,4)*	172(46,7)*	172 (8,2)	280 (1,3)	
B-COR <sub>2</sub>	D	154 (9,9)*	154(26,0)*	154 (8,5)		210(15,2)
C-R <sub>4</sub> OH						
(M-COOR <sub>3</sub> -R <sub>4</sub> OCH <sub>2</sub> CHO) <sup>+</sup>	E	262(22,4)	346(31,2)	262(13,3)	366 (6,7)	242 (100)
(M-R <sub>4</sub> OCH <sub>2</sub> CHO-COOR <sub>3</sub> ) <sup>+</sup>						
E-COR <sub>2</sub>	F	220(10,9)	220(26,7)	220 (6,4)		200(29,1)
F-R <sub>4</sub> OH	G	202 (9,1)	202 (8,5)	202 (5,4)	202 (3,0)	126(19,4)
(M-R <sub>4</sub> OCH <sub>2</sub> CHO-OR <sub>1</sub> ) <sup>+</sup>	H	214(27,3)*	298(21,8)*		318 (1,8)	
H-COR <sub>2</sub>	I	172(13,4)*	172(46,7)*			
H-R <sub>4</sub> OH	J	196 (7,3)*	280(16,3)*		196 (2,3)	
I-R <sub>4</sub> OH	K	154 (9,9)*	154(26,0)*		154 (3,3)	
J-COR <sub>2</sub>						

\* Relación m/z repetida en su columna (Ej.: iones A y H de la sustancia 55)



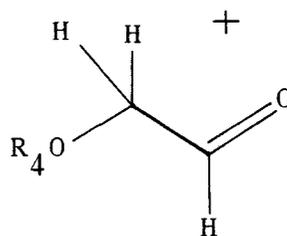
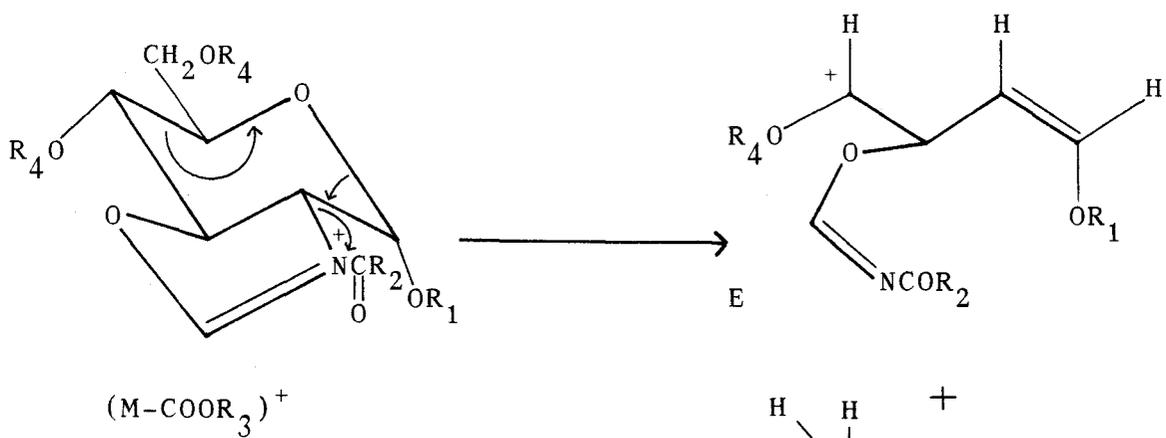
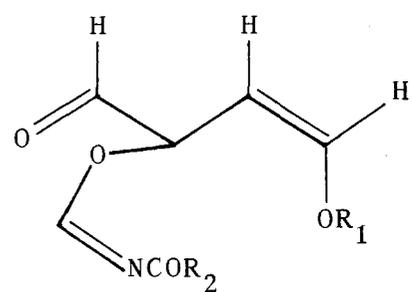
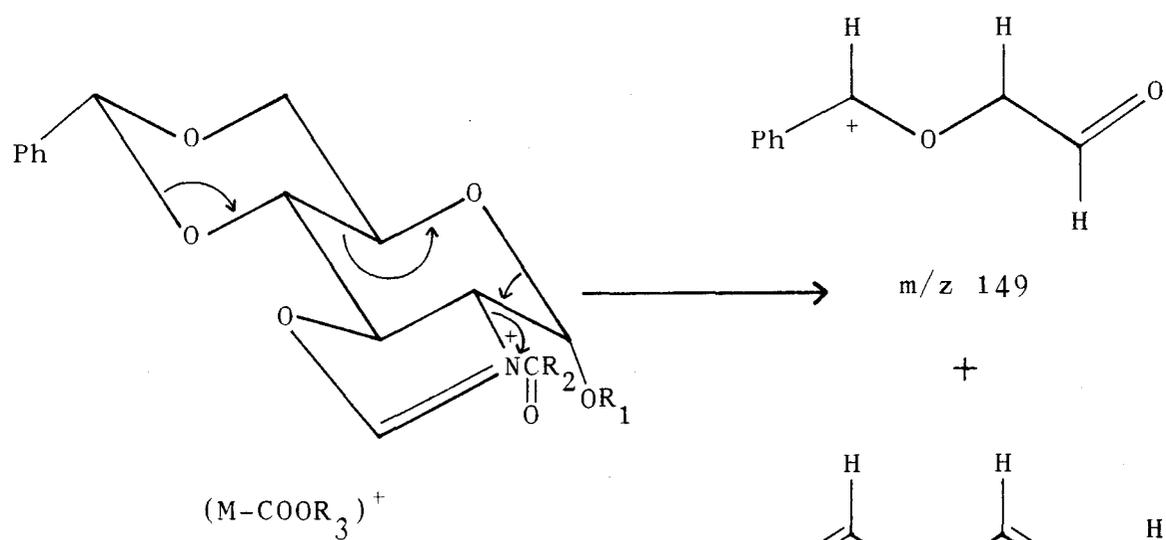
ESQUEMA 50



ESQUEMA 51

Evidentemente, la segunda ruta de fragmentación (representada en el Esquema 51) no se observa en los espectros de las sustancias del primer apartado (II.3.4.1.), ya que todos ellos presentan un grupo bencilideno entre las posiciones 4 y 6 del azúcar, lo cual hace que el paso del ión  $(M-COOR_3)^+$  al ión E no sea posible, apareciendo en su lugar el ión  $m/z$  149, como ya vimos. Estas fragmentaciones se comparan en el Esquema 52.

Si recordamos que el ión  $m/z$  149 presentaba su mayor intensidad cuando  $R_1 = Me$  ( $\alpha$  o  $\beta$ ), no debe extrañar que el ión E sea el pico base del espectro en la sustancia 78 ( $R_1 = \alpha Me$ ).



ESQUEMA 52

## II.3.4.3. ESTERES METILICOS DESBLOQUEADOS

En este apartado se estudian dos sustancias derivadas de los ésteres metílicos 40 y 41 por hidrogenación catalítica de los grupos protectores en la posición anomérica y 4 y 6 del azúcar. La estructura general del grupo se presenta en la Figura 21.

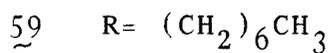
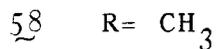
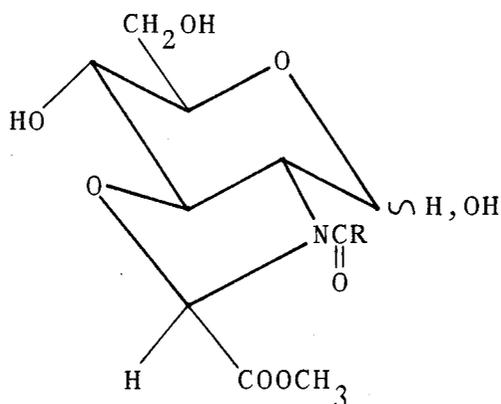


Figura 21

Los espectros de masas de las sustancias 58 y 59, obtenidos por ionización por impacto electrónico, están reco

gidos en la Figura 90-A y 91-A del Apéndice. En la Tabla 46 se recoge una selección de las relaciones  $m/z$  de los iones producidos en cada caso, así como su intensidad relativa (%) respecto al pico base del espectro.

En el caso de la sustancia 58 ( $R = CH_3$ ) la señal más alta registrada en el espectro (Figura 90-A) es inferior al peso molecular calculado. Pero en diferentes registros donde el pico base ( $m/z$  43) se encuentra saturado, se observan los iones  $m/z$  273 y  $m/z$  274 producidos respectivamente por pérdida de agua a partir del ión molecular  $(M)^+$  y del ión  $(M+H)^+$ . No obstante el espectro de masas obtenido por ionización química, usando isobutano como gas reactivo, muestra señal a  $m/z$  292 asignada al ión  $(M+H)^+$  con una intensidad relativa del 64,5% respecto al pico base, que en ionización química corresponde al ión  $m/z$  274 (Figura 92-A).

En el caso de la sustancia 59 ( $R = (CH_2)_6CH_3$ ) la señal más alta registrada coincide con el peso molecular calculado para dicha sustancia (375), por lo que se asigna al ión molecular. (Figura 91-A).

Las fragmentaciones primarias más interesantes a partir del ión molecular consisten en la formación del ión acílio y la pérdida del radical  $\dot{C}OOCH_3$ . La formación del ión acílio (Esquema 53) conduce en la sustancia 58 al pico base del espectro ( $m/z$  43) y en la sustancia 59 al segundo pico

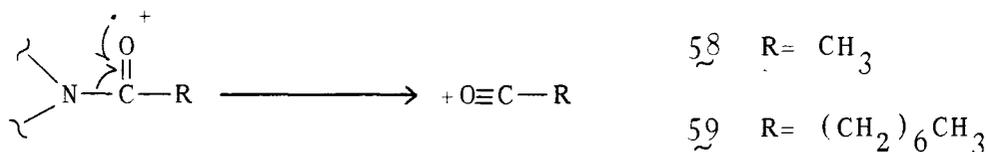
TABLA 46

Principales señales registradas y su abundancia relativa

		58	59		
(M+H) <sup>+</sup>		292 <sup>*</sup>	375 (5,3)	(M) <sup>+</sup>	
(M) <sup>+</sup>		291 <sup>*</sup>	316 (1,7)	(M-COOCH <sub>3</sub> ) <sup>+</sup>	A
(M+H-18) <sup>+</sup>		274 <sup>**</sup>	298 (0,1)	A-18	B
(M-18) <sup>+</sup>		273 <sup>**</sup>	256 (6,4)	A-60	
(M-COOCH <sub>3</sub> ) <sup>+</sup>	A	232 (2,0)	238 (2,4)	B-60	
A-18	B	214 (0,4)	226 (2,4)	A-90	C
A-COR	D	190 (1,5)	190 (4,8)	A-COR	D
D-18		172 (2,6)	172(29,7)	D-18	
B-60		154 (3,1)	130(57,0)	D-18-42	
A-90	C	142 (4,3)	127(95,3)	+O≡CR	
D-18-42		130 (1,1)	112 (8,5)	B-60-COR	
		126 (4,3)	100 (100)	C-COR	
		125(17,6)	88 (4,0)		
B-60-COR		112 (7,4)	84(21,3)		
C-COR		100 (7,3)	57(56,0)		
		88 (9,1)	72(10,9)		
		84 (7,9)	43(14,7)		
		83(28,0)			
		72 (6,4)			
+O≡CR		43 (100)			

\* Señal obtenida en registros por ionización química

\*\* Señal detectada en espectros con el pico base saturado



ESQUEMA 53

en importancia ( $m/z$  127) con una intensidad relativa del 95,3%. De la cadena grasa presente en la sustancia 59 se detectan dos señales significativas a  $m/z$  43 y 57, asignadas a los iones  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n^+$  ( $n= 2$  y  $3$  respectivamente).

La pérdida del radical  $\dot{\text{C}}\text{OOCH}_3$  conduce en ambos casos a la línea principal de fragmentación. El ión originado,  $(\text{M}-\text{COOCH}_3)^+$ , según el estudio de metastables efectuado sobre la sustancia 58, conduce a cuatro diferentes iones por pérdida de agua, cetena (o alquilcetena en la sustancia 59),  $\text{HOCH}_2\text{CHO}$  y  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ . Tales iones se detectan en la sustancia 58 a  $m/z$  214 (0,5%),  $m/z$  190 (1,5%),  $m/z$  172 (2,6%) y  $m/z$  142 (4,3%) respectivamente. Y en la sustancia 59 a  $m/z$  298 (0,1%),  $m/z$  190 (4,8%),  $m/z$  256 (6,4%) y  $m/z$  226 (2,4%).

En la Tabla 47 se recoge el estudio de metastables efectuado en la sustancia 58, a partir del cual se ha podido establecer la secuencia de fragmentación que se propone en el Esquema 54.

TABLA 47

Iones-hijo (H) y pérdida de molécula neutra (N) para la sustancia 58

	273	214	190	172*	142	130	112*	84	72
291	N								
232		H N	H N	H	H				
172*		H	N	/		N			
154		H		N			N		
112*						N	/	N	
100									N
88						N			

\* Ión en ordenada y abscisa

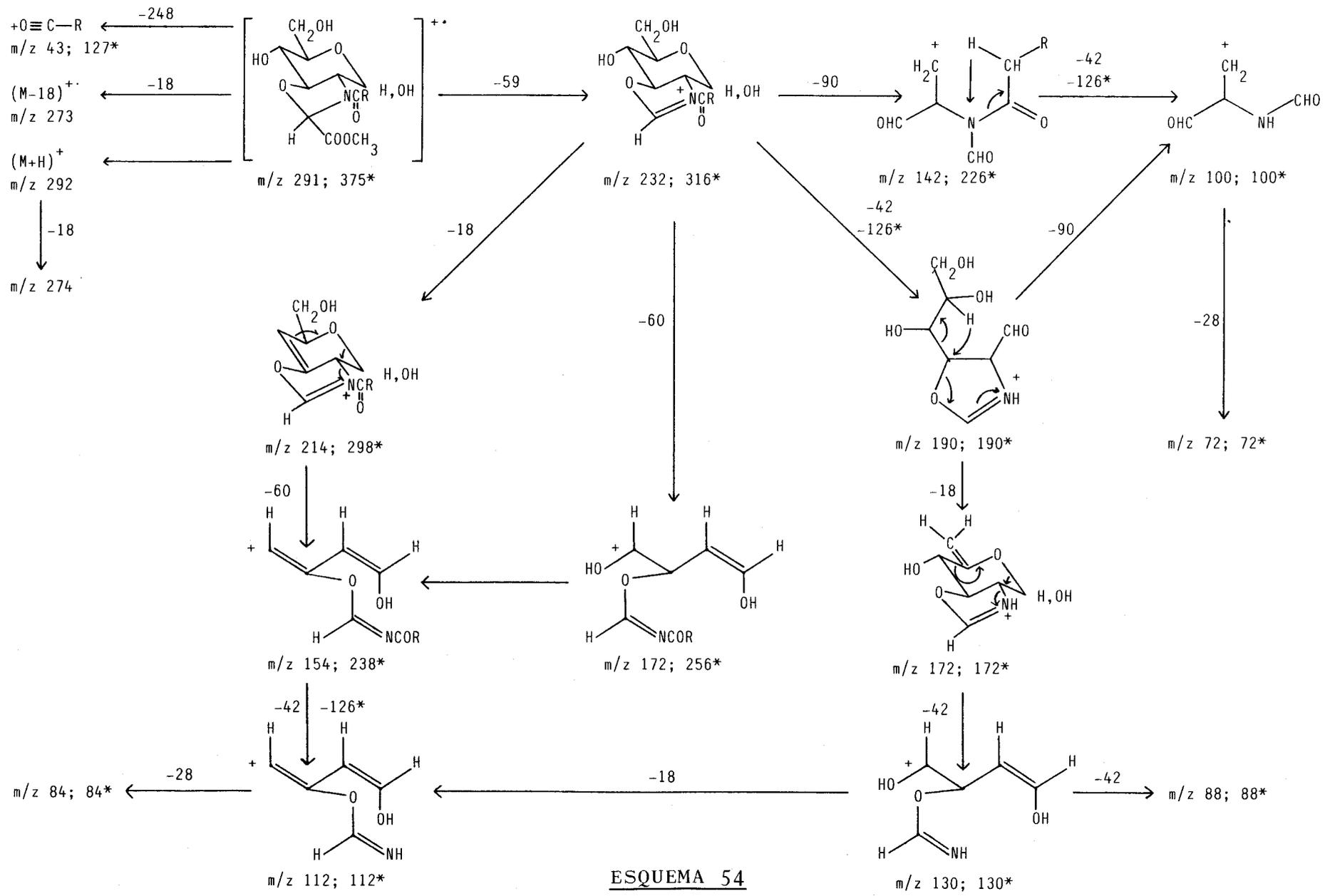
Como se observa en el Esquema 54, para ambas sustancias se propone la misma secuencia de fragmentación. El estudio de la intensidad relativa de los iones del esquema para la sustancia 58 ( $R = \text{CH}_3$ ) no muestra ninguna preferencia por ninguna de las rutas de fragmentación como era de esperar. En cambio, la sustancia 59 ( $R = (\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ) muestra una marcada preferencia por aquellas rutas de fragmentación que se ve prontamente afectada por la pérdida de la "larga" cadena alquílica de la amida. Una de estas rutas origina el pico base del espectro de masas de la sustancia 59 ( $m/z$  100) por la pérdida sucesiva a partir de  $(M - \text{COOCH}_3)^+$ , de 90 unidades de masa (dando lugar al ión  $m/z$  226) y alquilcetena.

Finalmente, en la Tabla 48 se muestra el estudio de masas de alta resolución efectuado en la sustancia 58.

TABLA 48

Estudio de masas de alta resolución de 58

m/z	Composición	Desviación (ppm)
292	$C_{11}H_{18}NO_8$	-5,0
291	$C_{11}H_{17}NO_8$	2,8
274	$C_{11}H_{16}NO_7$	-3,9
232	$C_9H_{14}NO_6$	3,4
214	$C_9H_{12}NO_5$	2,4
190	$C_7H_{12}NO_5$	-0,6
172	$C_7H_{10}NO_4$	0,0
154	$C_7H_8NO_3$	-5,7



ESQUEMA 54

## II.3.4.4. DERIVADOS RIGIDOS DEL MDP

La estructura general para este grupo está representada en la Figura 22, y las sustancias objeto de estudio se recogen en la Tabla 49.

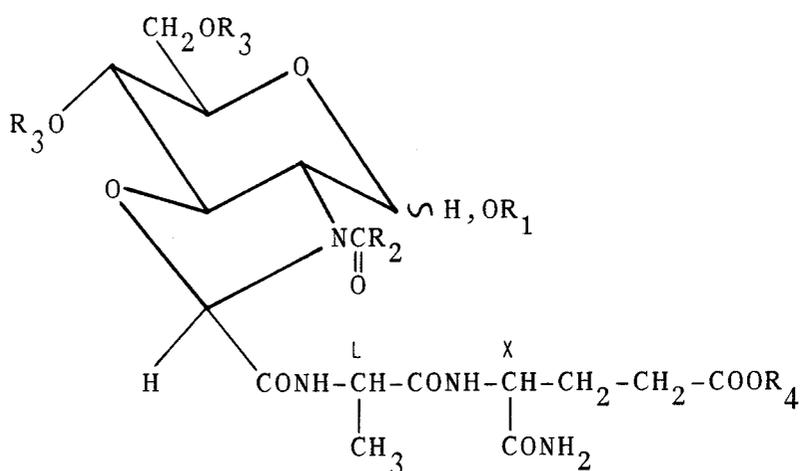


Figura 22

La presencia del resto de isoglutamina tiene una notable influencia en los espectros de masas de estos compuestos, comunicándoles una serie de rasgos diferenciadores de los compuestos estudiados con anterioridad. Entre éstos podemos mencionar:

TABLA 49

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	X	R <sub>4</sub>
52	αBn	CH <sub>3</sub>	PhCH=	L	Bn
53	αBn	CH <sub>3</sub>	PhCH=	D	Bn
62	αBn	CH <sub>3</sub>	H	L	Bn
61	αBn	CH <sub>3</sub>	H	D	Bn
65	αBn	CH <sub>3</sub>	H	D	H
26	H	CH <sub>3</sub>	H	D	H
54	αBn	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	PhCH=	D	Bn
63	αBn	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	H	L	Bn
64	αBn	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	H	D	Bn
70	βMe	CH <sub>3</sub>	PhCH=	D	Bn
28	βMe	CH <sub>3</sub>	H	D	H
79	αMe	CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	D	Bn
29	αMe	CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	D	H

1.- En ningún caso se observa el ión molecular esperado, cualquiera que sea el tipo de ionización utilizado (EI o CI) para el registro de los espectros. Debido a que los espectros obtenidos mediante ionización química presentan mayor información, nos vamos a referir exclusivamente a ellos. Estos espectros se recogen en el Apéndice (Figuras 93-A a 105-A). En la Tabla 50 se presenta las principales

TABLA 50

Principales señales registradas y su abundancia relativa (%)

<u>52</u>	<u>53</u>	<u>62</u>	<u>61</u>	<u>65</u>	<u>26</u>	<u>54</u>	<u>63</u>	<u>64</u>	<u>70</u>	<u>28</u>	<u>79</u>	<u>29</u>
551 (0,3)	509 (4,8)	421 (1,8)	490 (0,1)	462 (0,1)	403 (0,3)	593 (1,2)	438 (0,2)	522 (1,1)	554 (0,1)	413 (0,6)	635 (1,2)	515 (5,5)
509(12,1)	455 (0,7)	352 (3,9)	421 (0,9)	421 (0,6)	371 (1,2)	524 (2,3)	396(12,2)	505 (1,8)	433 (9,7)	351 (0,3)	585(13,3)	474(90,9)
455 (3,9)	400 (1,8)	312 (2,4)	352 (1,6)	367 (4,1)	312 (0,5)	484(13,3)	288 (5,5)	436(11,8)	379 (6,7)	139 (100)	474(15,8)	457(18,8)
400 (8,0)	129(58,2)	223 (6,7)	312 (3,8)	312 (2,7)	103(17,6)	340 (6,7)	198 (7,3)	396(28,5)	324(17,6)	129(51,5)	457(27,9)	442(32,7)
129(83,6)	108(25,5)	186 (6,8)	273 (7,1)	204 (7,9)	95(12,7)	273(10,9)	145(24,8)	378(12,7)	274 (9,7)	91(20,0)	425(17,9)	403(35,2)
108(23,0)	107(33,9)	129(55,1)	204 (9,2)	139(42,4)	91(25,5)	198 (7,3)	129 (100)	288(10,9)	242 (5,5)	79(35,4)	403 (7,3)	348(57,0)
107(44,8)	91 (100)	108(30,3)	129(54,3)	129 (100)	85(57,6)	147(24,2)	108(21,2)	252(13,9)	147(13,0)	69(56,4)	348(10,9)	316(67,9)
91 (100)	69(27,3)	107(25,5)	108(25,5)	108(14,5)	79(52,7)	129 (100)	107(10,9)	198(21,8)	129(81,2)	61(44,5)	316(18,8)	298(23,0)
69(24,8)	61(32,1)	91 (100)	107(10,9)	107(10,6)	69 (100)	91(70,3)	91(69,7)	145(57,0)	108(21,2)		129 (100)	139(29,1)
61(19,4)		69(10,9)	91 (100)	91(55,4)	61(22,4)		84(26,7)	129 (100)	107(48,5)		91(59,4)	129(56,4)
		61(23,6)	84(15,4)	60(32,1)			61 (5,2)	108(19,4)	91 (100)		84(29,1)	91(34,5)
			60 (8,5)					107(16,3)	84(30,3)		69(33,9)	69 (100)
								91(97,6)	69(46,1)			61(81,2)
								84(23,0)	61(18,8)			
								61 (9,1)				

señales de cada uno de ellos.

2.- En general, la señal más alta que se registra se corresponde con la pérdida de isoglutamina (ya sea en forma de éster bencílico o en forma de ácido), por lo que estas señales se han asignado en cada caso al ión (M-isoGln)<sup>+</sup>. La relación m/z de estos iones, así como su abundancia relativa se muestra en la Tabla 51.

TABLA 51

	<u>52</u>	<u>53</u>	<u>62</u>	<u>61</u>	<u>65</u>	<u>54</u>	<u>64</u>	<u>70</u>	<u>79</u>	<u>29</u>
(M-isoGln) <sup>+</sup>	509	509	421	421	421	593	505	433	457	457
(%)	(12,1)	(4,8)	(1,8)	(0,9)	(0,6)	(1,2)	(1,8)	(9,7)	(27,9)	(18,8)

3.- En general aparece una señal intensa a m/z 129 que en muchos casos llega a ser el pico base del espectro. Esta señal se ha asignado al ión representado en la Figura 23, procedente del resto de isoglutamina.

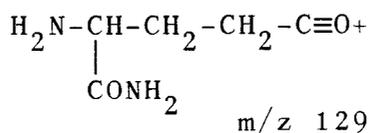


Figura 23

4.- En aquellos casos en los que existen restos aromáticos, éstos se ponen de manifiesto por la presencia de señales intensas a  $m/z$  108, 107 y 91, llegando a ser ésta última en varias ocasiones el pico base del espectro.

5.- A diferencia de las sustancias estudiadas en los tres apartados anteriores, las cuales presentaban, sin excepción, el ión  $(M-COR)^+$  (siendo  $R = OCH_3$ ,  $NH_2$  o aminoácido), clave en las posteriores fragmentaciones de los espectros de masas de cada sustancia considerada, y al que se le asignaba una estructura de 2,3-oxazolio, ninguna de las sustancias que se estudian en este apartado presenta en su espectro de masas dicho ión. Sin embargo, sus espectros presentan una señal común a todos ellos que se registra diez unidades de masa más baja que la correspondiente señal esperable para el ión  $(M-COR)^+$  en cada caso. Este hecho se recoge en la Tabla 52.

Ello nos hace suponer que en la estructura de este ión deben estar presentes los grupos  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$ . Por lo tanto, la estructura probable podría ser la representada en la Figura 24, lo cual supondría la ruptura del anillo de oxazolidina.

TABLA 52

	(M-COR) <sup>+</sup> esperable	Ión registrado
<u>52</u>	410	400 (8,0)
<u>53</u>	410	400 (1,8)
<u>62</u>	322	312 (2,4)
<u>61</u>	322	312 (3,8)
<u>65</u>	322	312 (1,5)
<u>26</u>	232	---
<u>54</u>	494	484(13,3)
<u>63</u>	406	396(13,2)
<u>64</u>	406	396(28,5)
<u>70</u>	334	324(17,6)
<u>28</u>	246	---
<u>79</u>	358	348(10,9)
<u>29</u>	358	348(57,0)

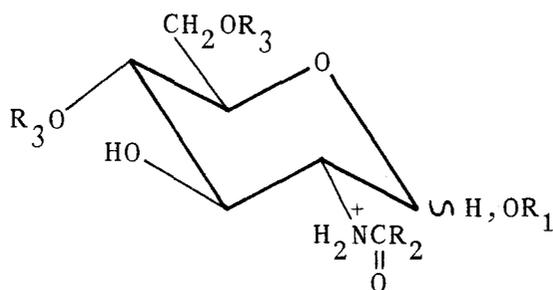


Figura 24

De todo lo dicho anteriormente, se puede extraer la siguiente conclusión: mientras que, en las sustancias estudiadas en los tres primeros apartados, la presencia del anillo de oxazolidina era, no sólo importante sino, clave para explicar las diversas rutas de fragmentación, en las sustancias de este apartado el anillo de oxazolidina sólo sirve como soporte de la cadena peptídica que es la que realmente dirige las posibles fragmentaciones con producción de iones exclusivos de este grupo de sustancias.

II.3.5. CARACTERIZACION POR ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA

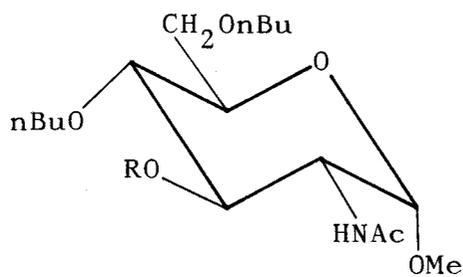
Se han estudiado los espectros de absorción infrarroja (IR) de las sustancias descritas, obtenidos a partir de muestras pulverizadas, mezcladas homogéneamente con KBr seco y posterior formación de comprimido.

Cuando la sustancia se describe como sirupo, la muestra se dispone directamente entre dos comprimidos de KBr formando una película delgada entre ambos soportes.

Los espectros obtenidos se recogen en el Apéndice, y la información obtenida se resume seguidamente en ocho tablas acompañadas de la estructura general a la que atiende el grupo considerado.

TABLA 53

Sust.	$\nu$ OH	$\nu$ NH	Sobretono $\delta$ NH	$\nu$ CH Ar	$\nu$ s,as CH <sub>3</sub> $\nu$ s,as CH <sub>2</sub>	Amida $\nu$ CO (I)	$\delta$ NH (II)	$\delta$ CH Ar
75		3.302		3.065 3.034	2.957 2.932 2.914 2.870	1.648	1.555	740 697
	3.600 a 3.150				2.956 2.933 2.873			
76	3.600 a 3.150	3.289	3.081		2.956 2.933 2.873	1.643	1.558	

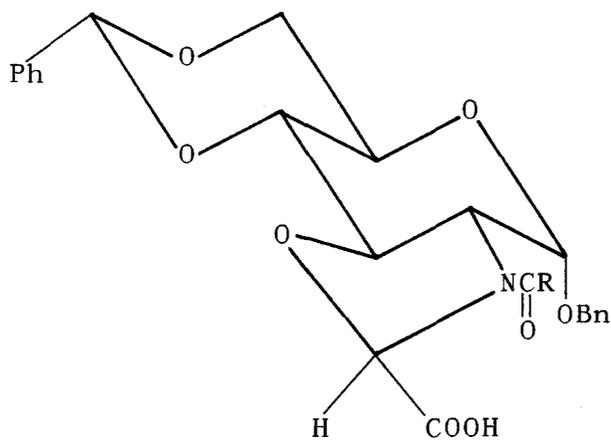


75      R= Bn

76      R= H

TABLA 54

Sust.	$\nu_{OH}$	$\nu_{CH\ Ar}$	$\nu_{s,as\ CH_3}$ $\nu_{s,as\ CH_2}$	Ester $\nu_{CO}$	Amida $\nu_{CO}$	$\delta_{CH\ Ar}$
37	3.360					
	2.732	3.090	2.929			
	2.612	3.066	2.909			756
	2.525	3.033	2.855	1.734	1.615	697
38			2.955			
		3.066	2.929			753
	3.576	3.034	2.858	1.730	1.662	696



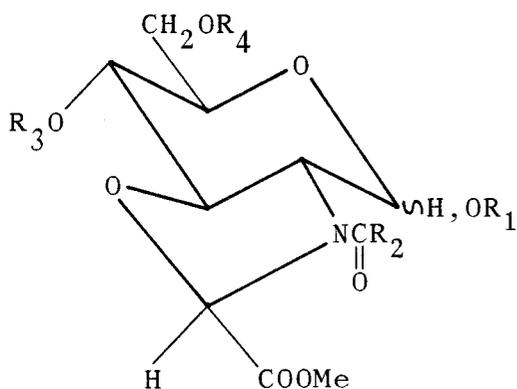
37      R=  $\text{CH}_3$

38      R=  $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$

TABLA 55

Sust.	$\nu_{\text{CH Ar}}$	$\nu_{\text{s,as CH}_3}$ $\nu_{\text{s,as CH}_2}$	Ester $\nu_{\text{CO}}$	Amida $\nu_{\text{CO}}$	$\delta_{\text{CH Ar}}$
40	3.067	2.957			754
	3.034	2.908	1.748	1.674	697
		2.860			
41	3.066	2.956			756
	3.035	2.920	1.747	1.675	697
42	3.065	2.955			753
	3.034	2.921	1.742	1.671	694
57	3.064	2.955	1.761		
	3.032	2.909	1.726*	1.663	712
69	3.077	2.986			
	3.059	2.947			764
	3.036	2.897	1.762	1.658	702
81		2.992			
		2.956			
78		2.907			761
	3.040	2.851	1.747	1.669	701
78		2.960			
		2.932			
		2.875	1.762	1.666	

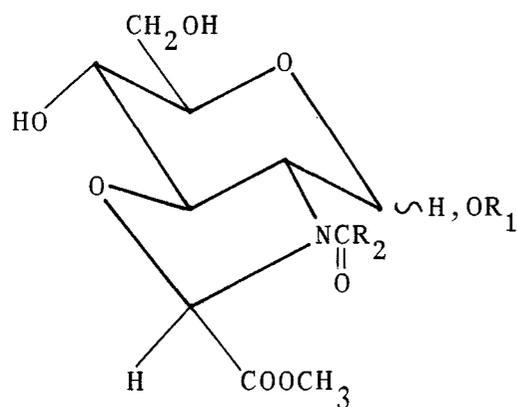
\* $\nu_{\text{CO}}$  del éster del ácido bezóico



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
40	$\alpha$ Bn	CH <sub>3</sub>	PhCH=	
41	$\alpha$ Bn	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	PhCH=	
42	$\alpha$ Bn	(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CH <sub>3</sub>	PhCH=	
57	$\alpha$ Bn	CH <sub>3</sub>	Bz	Bz
69	$\beta$ Me	CH <sub>3</sub>	PhCH=	
81	$\alpha$ Me	CH <sub>3</sub>	PhCH=	
78	$\alpha$ Me	CH <sub>3</sub>	Bu	Bu

TABLA 56

Sust.	$\nu_{OH}$	$\nu_{CH}$ Ar	$\nu_{s,as}$ CH <sub>3</sub> $\nu_{s,as}$ CH <sub>2</sub>	Ester $\nu_{CO}$	Amida $\nu_{CO}$	$\delta_{CH}$ Ar
55 ~	3.333	3.065	2.957	1.758	1.670	765
		3.034	2.931 2.892			704
58 ~	3.417		2.958	1.748	1.642	
			2.935			
59 ~	3.456		2.956 2.932 2.857	1.745	1.631	

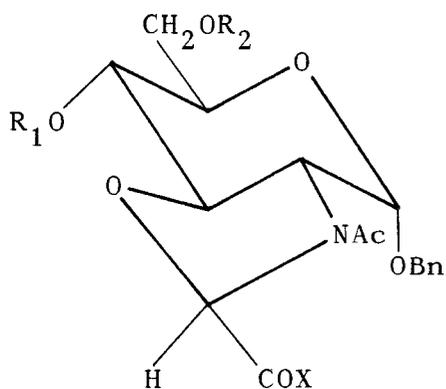


	<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>
55 ~	$\alpha$ Bn	CH <sub>3</sub>
58 ~	H	CH <sub>3</sub>
59 ~	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>

TABLA 57

Sust.	$\nu$ OH	$\nu$ NH	$\nu$ CH Ar	vs, as $\text{CH}_3$ vs, as $\text{CH}_2$	Ester $\nu$ CO	Amida $\nu$ CO	$\delta$ NH (II)	$\delta$ CH Ar
43 ~		3.338	3.065	2.970 2.906				756
		3.151	3.033	2.875		1.698	1.651	700
44 ~			3.091	2.978				757
		3.292	3.034	2.880	1.746	1.671	1.562	696
50 ~			3.100			1.675		759
	2.600	3.308	3.034	2.905	1.749*	1.629	1.572	701
45 ~			3.064	2.982				756
		3.296	3.033	2.938 2.880	1.740	1.674	1.553	700
46 ~			3.089	2.974				757
		3.283	3.032	2.906 2.881	1.737	1.670	1.556	698
47 ~			3.066	2.977				760
		3.323	3.037	2.920 2.883	1.746	1.673	1.544	700
60 ~	3.698 a		3.090	2.983				751
	3.135	3.325	3.034	2.932 2.855	1.743	1.676 1.630	1.577	696

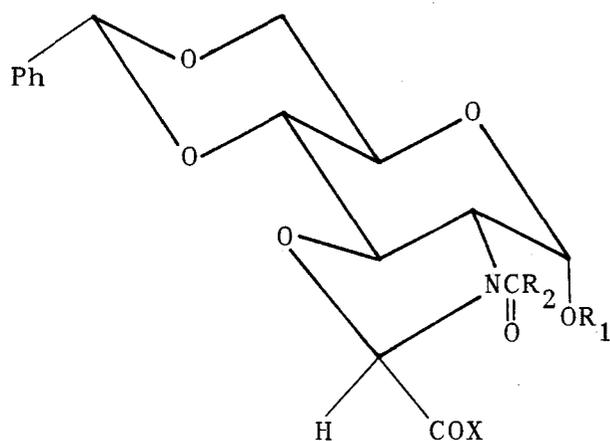
\*  $\nu$ CO de ácido



	$R_1$	$R_2$	X
43 ~	PhCH=		$\text{NH}_2$
44 ~	PhCH=		GlyEt
50 ~	PhCH=		Gly
45 ~	PhCH=		AlaEt
46 ~	PhCH=		ValEt
47 ~	PhCH=		PheEt
60 ~	H	H	AlaEt

TABLA 58

Sust.	$\nu_{OH}$	$\nu_{NH}$	$\nu_{CH}$ Ar	$\nu_{s,as}$ $CH_3$ $\nu_{s,as}$ $CH_2$	Ester $\nu_{CO}$	Amida $\nu_{CO}$	$\delta_{NH}$ (II)	$\delta_{CH}$ Ar
48 ~			3.092	2.956				754
		3.291	3.067	2.922	1.747	1.669	1.557	696
49 ~			3.093	2.955				753
		3.285	3.067	2.928	1.744	1.672	1.557	696
51 ~	2.645		3.090	2.955				752
	2.535	3.285	3.065	2.928	1.730*	1.674	1.554	695
82 ~				2.978				
			3.090	2.935	1.734			757
		3.300	3.066	2.922	1.723	1.674	1.557	701

\*  $\nu_{CO}$  de ácido

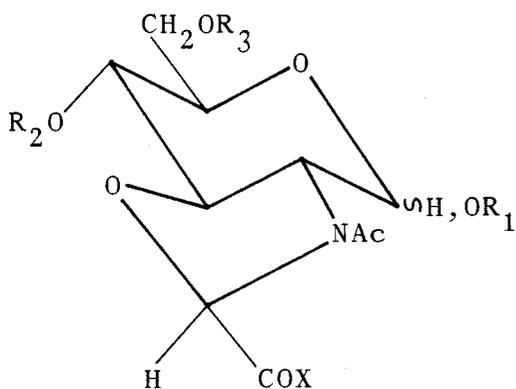
	$R_1$	$R_2$	X
48 ~	Bn	$(CH_2)_6CH_3$	GlyEt
49 ~	Bn	$(CH_2)_6CH_3$	AlaEt
51 ~	Bn	$(CH_2)_6CH_3$	Ala
82 ~	Me	$CH_3$	PheEt

TABLA 59

Sust.	$\nu_{OH}$	$\nu_{NH}$	$\nu_{CH\ Ar}$	$\nu_{s,as\ CH_3}$ $\nu_{s,as\ CH_2}$	Ester $\nu_{CO}$	Amida* $\nu_{CO}$	$\delta_{NH\ (II)}$	$\delta_{CH\ Ar}$
53 ~		3.409	3.090	2.977 2.938		1.674 1.648		758
		3.289	3.066	2.909		1.636	1.549	699
		3.205	3.034	2.879	1.736	1.636		
52 ~		3.413	3.085	2.977 2.936		1.680 1.665		755
		3.286	3.065	2.907		1.648	1.549	700
		3.204	3.034	2.870	1.732	1.648		
61 ~	3.700	3.406	3.089	2.974				
	a	3.283	3.066	2.933		1.679		728
	3.100	3.214	3.033	2.876	1.731	1.646	1.548	698
62 ~	3.700	3.420	3.088	2.972		1.670		739
	a	3.282	3.066	2.935		1.649	1.549	699
	3.100	3.207	3.033	2.874	1.732	1.649		
65 ~	3.750			2.975				
	a			2.929				
	3.080	3.312	3.077	2.869	1.671**	1.648	1.558	699
26 ~	3.700							
	a	3.403		2.930	1.671		1.566	

\* Existe participación de  $\delta_{NH_2}$

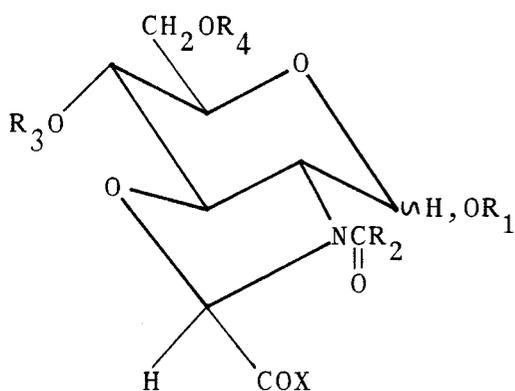
\*\*  $\nu_{CO}$  de ácido



	$R_1$	$R_2$	$R_3$	X
53 ~	$\alpha\ Bn$	$PhCH<$		L-Ala-D-isoGlnBn
52 ~	$\alpha\ Bn$	$PhCH<$		L-Ala-L-isoGlnBn
61 ~	$\alpha\ Bn$	H	H	L-Ala-D-isoGlnBn
62 ~	$\alpha\ Bn$	H	H	L-Ala-L-isoGlnBn
65 ~	$\alpha\ Bn$	H	H	L-Ala-D-isoGln
26 ~	H	H	H	L-Ala-D-isoGln

TABLA 60

Sust.	$\nu_{OH}$	$\nu_{NH}$	$\nu_{CH\ Ar}$	$\nu_{s,as\ CH_3}$ $\nu_{s,as\ CH_2}$	Ester $\nu_{CO}$	Amida $\nu_{CO}$	$\delta_{NH\ (II)}$	$\delta_{CH\ Ar}$
54 ~		3.416	3.090	2.959				
		3.283	3.065	2.926		1.671		750
		3.200	3.033	2.900	1.733	1.636	1.551	695
64 ~	3.700	3.412	3.088	2.950				
	a 3.100	3.295	3.064	2.927		1.672		735
63 ~			3.089	2.960				
	a 3.100	3.293	3.034	2.929	1.730	1.680	1.548	736
70 ~		3.363		2.978				
		3.282	3.068	2.937		1.673		757
28 ~		3.202	3.038	2.860	1.734	1.649	1.549	700
	3.775							
79 ~	a 3.075	3.349		2.933	1.673		1.566	
		3.360		2.959		1.681		750
29 ~		3.280	3.067	2.936		1.652	1.551	697
		3.204	3.035	2.874	1.735			
29 ~	3.750			2.960	1.663			
	a 3.100	3.286		2.934	1.644		1.558	
				2.875				



	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	X
54 ~	$\alpha Bn$	$(CH_2)_6CH_3$	$PhCH<$		L-Ala-D-isoGlnBn
64 ~	$\alpha Bn$	$(CH_2)_6CH_3$	H	H	L-Ala-D-isoGlnBn
63 ~	$\alpha Bn$	$(CH_2)_6CH_3$	H	H	L-Ala-L-isoGlnBn
70 ~	$\beta Me$	$CH_3$	$PhCH<$		L-Ala-D-isoGlnBn
28 ~	$\beta Me$	$CH_3$	H	H	L-ala-D-isoGln
79 ~	$\alpha Me$	$CH_3$	Bu	Bu	L-Ala-D-isoGlnBn
29 ~	$\alpha Me$	$CH_3$	Bu	Bu	L-Ala-D-isoGln

### III. PARTE EXPERIMENTAL

### III.1. METODOS GENERALES

Las evaporaciones de disolventes se efectuaron a temperaturas inferiores a 60°C a presión reducida (15 a 25mm de mercurio).

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato GALLENKAMP, están sin corregir.

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro automático PERKIN-ELMER 241-MC, empleando luz amarilla de sodio ( $\lambda = 589 \text{ nm}$ ). La notación utilizada para esta magnitud es  $|\alpha|_D^t$ .

Los análisis elementales han sido realizados en el Laboratorio de Microanálisis del Instituto de Química Orgánica General del C.S.I.C. de Madrid, en el Servicio de Análisis Elemental de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada y en el Servicio de Análisis Elemental del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla.

#### Cromatografía en capa fina (c.c.f.)

Esta técnica se ha utilizado como método analítico

cualitativo, empleando cromatoplasmas comerciales (Merck, 60F<sub>254</sub>) de un espesor de capa de 0,25 mm y cromatofolios Al (Merck, 60F<sub>254</sub>) de un espesor de capa de 0,20 mm.

Los reveladores empleados fueron ácido sulfúrico al 50%, yodo, verde de bromocresol y la mezcla: anisaldehído-ácido sulfúrico-ácido acético-etanol 95% (25:25:1:450). Las sustancias que absorben al UV se detectaron por exposición a una fuente de dicha luz de longitud de onda 254 nm.

Los eluyentes empleados fueron mezclas, en diferentes proporciones, de cloroformo-metanol y cloroformo-metanol-agua.

#### Cromatografía en columna

Este procedimiento se utilizó con fines preparativos. La técnica empleada ha sido la de la columna húmeda. El soporte empleado fue gel de sílice 60 (Merck) con una granulometría de 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM) y en una proporción de 30 a 40 gramos de gel de sílice por gramo de mezcla a separar. Las fracciones colectadas fueron analizadas por c.c.f.

### Espectros de absorción en el IR

Se registraron en espectrofotómetro BOMEM MICHELSON 100. Los espectros de muestras sólidas se registraron en comprimidos de bromuro potásico (KBr) y los de consistencia siruposa se registraron en estado puro (película).

### Espectros de $^1\text{H}$ - y $^{13}\text{C}$ -RMN

Se registraron en espectrómetros BRUKER WP-80-SY a 80 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 20,1 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) y VARIAN XL-200 a 200 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 50,3 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Se han empleado como disolventes  $\text{Cl}_3\text{CD}$  y  $\text{DMSO-d}_6$  y como referencia interna TMS. Para el desplazamiento químico se usa el parámetro  $\delta$ .

La interpretación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN se ha facilitado mediante experiencias de intercambio con deuterio y desacoplamiento homonuclear. Las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz y se han leído directamente sobre el espectro o en los listados del ordenador. La asignación de las señales en el caso de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN se facilitó mediante el empleo de las técnicas APT y DEPT.

### Espectros de masas

Se registraron en espectrómetro de masas KRATOS, modelo MS-80-RFA. Las muestras se introdujeron mediante una sonda de sólidos calentada de 30 a 280°C. La temperatura de la fuente de ionización fue de 150 a 250°C según las experiencias realizadas, que fueron las siguientes:

-Ionización por impacto electrónico a 70 eV, corriente de ionización de 100  $\mu$ A, voltaje acelerador de 4 KV, resolución 1.000 (definición del 10% de valle) y velocidad de barrido de 3 s/dec.

-Ionización por impacto electrónico a 70 eV, corriente de ionización de 100  $\mu$ A, voltaje acelerador de 4 KV, resolución 10.000 (definición del 10% de valle) y velocidad de barrido de 10 s/dec.

-Ionización química a 150 eV, usando como gas reactivo isobutano a una presión de 0,8 bar, corriente de ionización de 500  $\mu$ A, voltaje acelerador de 4 KV, velocidad de barrido 3 s/dec.

-Adquisición de metastables por ionización por impacto electrónico a 70 eV, corriente de ionización de 100 $\mu$ A, voltaje acelerador de 4 Kv, resolución 1.500 (definición del

10% de valle) y velocidad de barrido de 10 s/dec.

### III.2. SUSTANCIAS COMERCIALES

Se han utilizado las siguientes sustancias comerciales:

- Clorhidrato de 2-amino-2-desoxi-D-glucosa (Merck)
- Clorhidrato del éster etílico de glicina (Sigma)
- Clorhidrato del éster etílico de L-alanina (Sigma)
- Clorhidrato del éster etílico de L-valina (Ega)
- Clorhidrato del éster etílico de L-fenilalanina (Aldrich)
- Acido D-glutámico (Sigma)
- Acido L-glutámico (Sigma)
- N-Hidroxisuccinimida (Merck)
- N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (Merck)
- Acido dicloroacético (Merck)
- Alcohol bencílico (Merck)
- Sulfúrico 98% (Merck)
- Trietilamina (Sigma)
- Dicarbonato de di-terc-butilo (Fluka)
- Diciclohexilamina (Fluka)

- Acido p-toluensulfónico monohidrato (Fluka)
- Acido trifluoroacético (Merck)
- Acido clorhídrico 35% (Panreac)
- Cloroformiato de metilo (Merck)
- Benzaldehido (Panreac)
- Anhídrido acético (Panreac)
- Hidruro sódico (Merck)
- Bromuro de octanoilo (Merck)
- Bromuro de palmitoilo (Merck)
- cloruro de benzoilo (Merck)
- Bromuro de n-butilo (Aldrich)
- Paladio sobre carbón al 10% (Merck)
- Resina catiónica LEWATIT S100 G1 FII (Panreac)

### III.3. SUSTANCIAS DE PARTIDA PARA LA SINTESIS DE LOS COMPUESTOS DESCRITOS EN ESTA TESIS

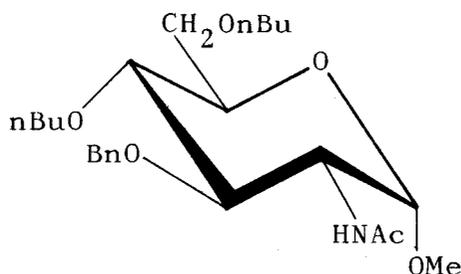
#### III.3.1. SUSTANCIAS DESCRITAS EN LA BIBLIOGRAFIA

- 2-Acetamido-2-desoxi-D-glucosa (31)<sup>83</sup>
- Bencil 2-acetamido-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (32)<sup>84</sup>
- Bencil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (33)<sup>85</sup>

- Bencil 2-amino-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (34)<sup>85</sup>
- Bencil 4,6-O-bencilidén-2-desoxi-2-octanamido- $\alpha$ -D-glucopiranosido (35)<sup>86</sup>
- Bencil 4,6-O-bencilidén-2-desoxi-2-palmitamido- $\alpha$ -D-glucopiranosido (36)<sup>86</sup>
- Metil 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido (66)<sup>90</sup>
- Metil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido (67)<sup>91</sup>
- Metil 2-acetamido-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (71)<sup>92</sup>
- Metil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (72)<sup>92</sup>
- Metil 2-acetamido-3-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (73)<sup>108</sup>
- Metil 2-acetamido-3-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (74)<sup>108</sup>
- N-terc-Butoxicarbonil-L-alanina<sup>116</sup>
- Ester  $\gamma$ -bencílico del ácido L(D)-glutámico<sup>117</sup>
- Ester  $\gamma$ -bencílico del ácido N-terc-butoxicarbonil-L(D)-glutámico<sup>118</sup>
- Ester bencílico de N-terc-butoxicarbonil-L(D)-isoglutamina<sup>119</sup>
- Clorhidrato del éster bencílico de L(D)-isoglutamina<sup>119</sup>
- Ester bencílico de N-terc-butoxicarbonil-L-alanil-L(D)-isoglutamina<sup>120</sup>
- p-Toluensulfonato del éster bencílico de L-alanil-L(D)-isoglutamina<sup>121</sup>

III.3.2. SUSTANCIAS DE PARTIDA NO DESCRITAS ANTERIORMENTE

III.3.2.1. Metil 2-acetamido-3-O-bencil-4,6-di-O-n-butil-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (75)



75

A una suspensión de metil 2-acetamido-3-O-bencil-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (74)<sup>108</sup> (4 g; 12,3 mmol) en dioxano seco (250 ml), conteniendo hidruro sódico (0,72 g; 30 mmol), se añade bromuro de n-butilo recién destilado (5,5 ml; 51,2 mmol). Después de cuatro horas a reflujo con buena agitación, se destruye el exceso de hidruro sódico por adición de agua (gota a gota). La suspensión resultante se filtra y evapora hasta un tercio de su volumen inicial. La disolución obtenida se vierte sobre agua-hielo. El sólido precipitado se filtra y seca. Cristaliza para análisis de etanol. Rendimiento, 4,9 g (92%). P.f. 148-149°C.  $[\alpha]_D^{19} +107^\circ$  (c 0,7; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{24}H_{39}NO_6$ :

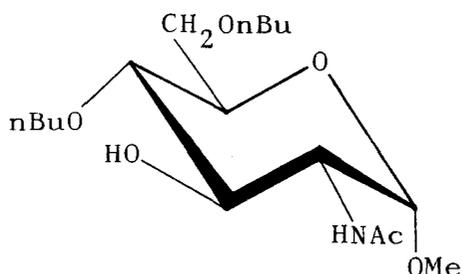
C, 65,88%; H, 8,98%; N, 3,20%

Encontrado:

C, 66,12%; H, 8,71%; N, 3,49%

Espectro IR: Tabla 53; Figura 106-A

III.3.2.2. Metil 2-acetamido-4,6-di-O-n-butil-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranósido (76)



A una disolución de metil 2-acetamido-3-O-bencil-4,6-di-O-n-butil-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranósido (75) (3 g; 6,8 mmol) en una mezcla de dioxano-metanol 1:1 (100 ml), se hidrogena a 40 psi en presencia de paladio sobre carbón al 10% (200 mg) durante 7 horas, al cabo de las cuales la c.c.f. indica la existencia de un solo compuesto. Se filtra el catalizador y se lava con metanol. El combinado de filtrados se concentra a sequedad. El sólido obtenido se purifica por cromatografía sobre columna de gel de sílice, utilizando cloroformo como eluyente. Rendimiento, 1,92 g (81%). P.f. 128-129°C.  $[\alpha]_D^{19} +56^\circ$  (C 0,99; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{17}H_{33}NO_6$ :

C, 58,77%; H, 9,57%; N, 4,03%

Encontrado:

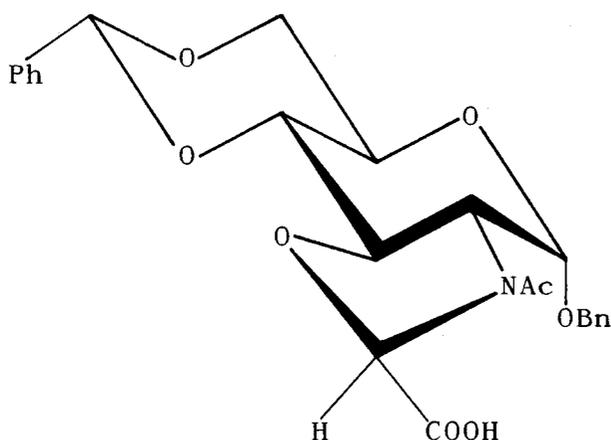
C, 59,06%; H, 9,23%; N, 4,12%

Espectro IR: Tabla 53; Figura 107-A

III.4. SINTESIS DE LOS COMPUESTOS OBJETOS DE ESTA TESIS

III.4.1. SINTESIS DE ANALOGOS RIGIDOS DEL ACIDO MURAMICO:  
FORMACION DEL ANILLO DE OXAZOLIDINA

III.4.1.1. 3-Acetil-2-carboxi-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (37)



37

Bencil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (33)<sup>85</sup> (5 g; 12,5 mmol) se disuelve en dioxano seco (350 ml). A esta disolución se adiciona cuidadosamente hidruro sódico (2,4 g; 100 mmol) y una disolución de ácido dicloroacético (3,1 ml; 37,5 mmol; exc. 200%) en dioxano seco (15 ml). La suspensión resultante se calienta a reflujo durante 4 horas con agitación vigorosa. Después de enfriar a temperatura ambiente se destruye el hidruro sódico excedente por adición de agua (gota a gota), se filtra y concentra hasta un tercio de su volumen. Con ayuda de agitación se le añade agua hasta turbidez incipiente. Por adición de pequeñas porciones de ácido clorhídrico al 8% se lleva la disolución a pH 3,5 y el sólido blanco obtenido se recoge

por filtración y lava con abundante agua. La sustancia obtenida está lo suficientemente pura como para ser usada con fines sintéticos. Rendimiento, 5,57 g (83%). Para análisis se cristaliza de etanol. P.f. 210-212°C (d).  $[\alpha]_D^{19} +126^\circ$  (c 0,27; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{24}H_{25}NO_8$ :

C, 63,29%; H, 5,53%; N, 3,08%

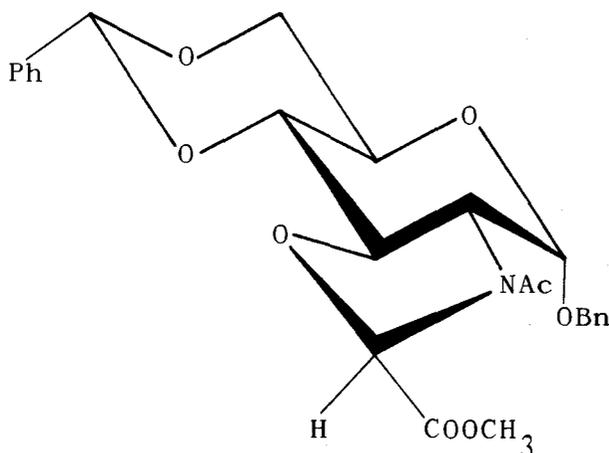
Encontrado:

C, 63,10%; H, 5,58%; N, 3,17%

Espectro de  $^1H$ -RMN: Tabla 6; Figura 1-A

Espectro IR : Tabla 54; Figura 108-A

III.4.1.2. 3-Acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (40)



40

A una disolución de 3-acetil-2-carboxi-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (37) (1 g; 2,2 mmol) en metanol (100 ml), enfriada en un baño de hielo, se le añade una dilución etérea de diazometano (0,5 g; 11,9 mmol). Se deja estar una noche a 0°C, tras lo cual se evapora el disolvente a presión reducida, obteniéndose un sólido blanco cromatográficamente puro. Rendimiento, 1,03 g (100%). Se cristaliza para análisis de metanol. P.f. 176-177°C (d).  $[\alpha]_D^{20} +136^\circ$  (c 0,83; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{25}H_{27}NO_8$ :

C, 63,96%; H, 5,80%; N, 2,98%

Encontrado:

C, 64,26%; H, 5,59%; N, 3,25%

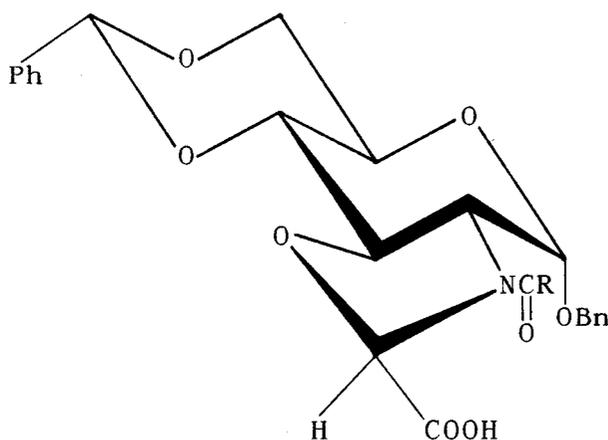
Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN : Tabla 7; Figura 2-A a 9-A

Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN: Tabla 9; Figura 12-A, 14-A y 15-A

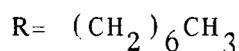
Espectro de masas : Tabla 36; Figura 66-A; Esquema 27

Espectro IR : Tabla 55; Figura 110-A

III.4.1.3. 2-Carboxi-3-n-octanoil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (38)



38



Una suspensión de bencil 4,6-0-bencilidén-2-desoxi-2-n-octanamido- $\alpha$ -D-glucopiránósido (35)<sup>86</sup> (430mg; 0,9mmol) e hidruro sódico (1,7 g; 7,2 mmol) en dioxano seco (25 ml) se refluje suavemente durante 15 minutos, tras lo cual se adiciona (gota a gota) una disolución de ácido dicloroacético (0,22 ml; 2,7 mmol) en dioxano seco (5 ml). La suspensión resultante se refluje durante cuatro horas con agitación vigorosa. Después de enfriar a temperatura ambiente se destruye el hidruro sódico excedente por adición de agua (gota a gota), se filtra y concentra hasta mitad de su volumen, se diluye con agua (200 ml) y el precipitado se filtra, lava con agua y seca. El sólido blanco obtenido se cristaliza de

metanol. Rendimiento, 460mg (91%). P.f. 201-203°C.  $[\alpha]_D^{19} +101^\circ$   
(c 0,91; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{30}H_{36}NO_8Na \cdot H_2O$ :

C, 62,05%; H, 6,77%; N, 2,41% Encontrado:

C, 62,41%; H, 6,79%; N, 2,85%

Esta sal sódica disuelta en la mínima cantidad de metanol y acidulada hasta pH 3 con clorhídrico concentrado, se vierte rápidamente sobre agua y filtra, lava con abundante agua y seca, obteniéndose la sustancia buscada. Se cristaliza de dioxano-agua. P.f. 136-137°C (d).  $[\alpha]_D^{19} +118^\circ$  (c 0,89; cloroformo).

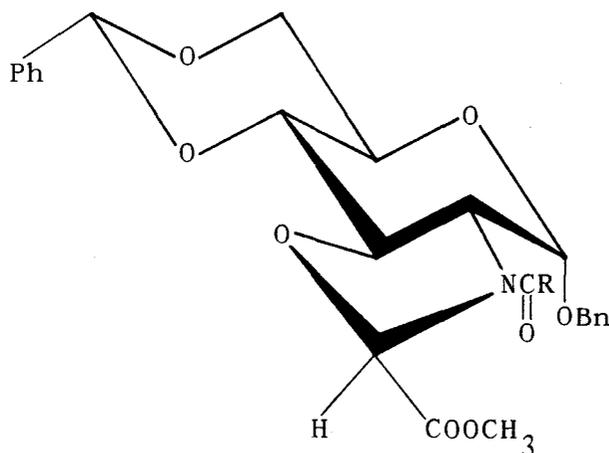
Análisis calculado para  $C_{30}H_{37}NO_8$ :

C, 66,77%; H, 6,91%; N, 2,60% Encontrado:

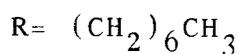
C, 66,53%; H, 6,73%; N, 2,79%

Espectro IR: Tabla 54; Figura 109-A

III.4.1.4. 2-Metoxicarbonil-3-n-octanoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina  
(41)



41



2-Carboxi-3-n-octanoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (38)  
(2,5 g; 4,6 mmol) se disuelve en metanol (240 ml). La disolución obtenida se enfría en baño de hielo y se le añade una disolución etérea de diazometano (1 g; 23 mmol). Se deja estar una noche a 0°C, tras lo cual se evapora el disolvente a presión reducida, obteniéndose un sólido blanco cromatográficamente puro. Se cristaliza para análisis de metanol. Rendimiento, 2,3 g (91%). P.f. 142-143°C.  $[\alpha]_D^{20} +119^\circ$  (c 1; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{31}H_{39}NO_8$ :

C, 67,25%; H, 7,10%; N, 2,53%

Encontrado:

C, 66,99%; H, 6,76%; N, 2,82%

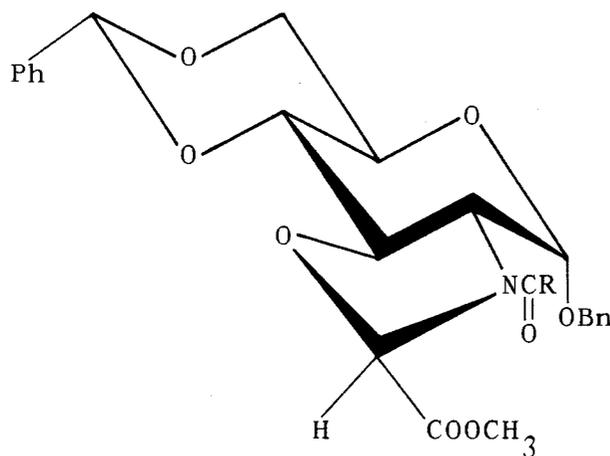
Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 8; Figura 10-A y 17-A

Espectro de  $^{13}C$ -RMN : Tabla 10; Figura 16-A

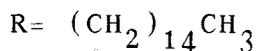
Espectro de masa : Tabla 36; Figura 69-A. Esquema 27

Espectro IR : Tabla 55; Figura 111-A

III.4.1.5. 2-Metoxicarbonil-3-palmitoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina  
(42)



42



A una suspensión de bencil 4,6-O-bencilidén-2-deso-xi-2-palmitamido- $\alpha$ -D-glucopiranósido (36)<sup>86</sup> (4 g; 6,72 mmol) en dioxano seco (400 ml) se le adiciona hidruro sódico (1,8g ; 75mmol) y se refluje suavemente durante 10 minutos. A esta suspensión se le adiciona una disolución de ácido dicloroacético (1,7 ml; 21,16 mmol; exc. 200%) en dioxano seco (15 ml) y se refluje con agitación durante tres días. Después de enfriar a temperatura ambiente, se destruye el hidruro sódico excedente por adición de agua (gota a gota), completando su volumen hasta un total de un litro. Se adiciona ácido clorhídrico al 8% hasta pH 3,5 y el precipitado obtenido se recoge por filtración y lava con abundante agua, seca y di-

suelve en cloroformo. La solución clorofórmica enfriada en baño de hielo se le añade una solución etérea de diazometano (1,4 g; 33,5 mmol). Se deja estar una noche a 0°C, tras lo cual se evapora el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando cloroformo como eluyente. Rendimiento, 3,5 g (79%). P.f. 116-117°C.  $[\alpha]_D^{19} +95^\circ$  (c 0,89; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{39}H_{55}NO_8$ :

C, 70,35%; H, 8,33%; N, 2,10%

Encontrado:

C, 70,83%; H, 8,54%; N, 1,89%

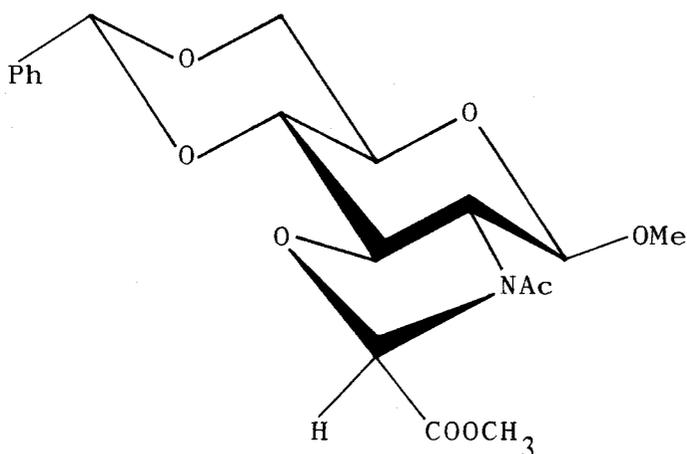
Espectro  $^1H$ -RMN : Tabla 8; Figura 11-A

Espectro  $^{13}C$ -RMN : Tabla 10; Figura 18-A

Espectro de masas: Tabla 36; Figura 70-A; Esquema 27

Espectro IR : Tabla 55; Figura 112-A

III.4.1.6. 3-Acetil-2-metoxycarbonil-(4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi-1-O-metil-β-D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (69)



69

A una disolución de metil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (67)<sup>91</sup> (2 g; 6,18 mmol) en dioxano seco (200 ml) se le adiciona cuidadosamente hidruro sódico (1,2 g; 50 mmol) y una disolución de ácido dicloroacético (1,5 ml; 18,5 mmol; exc. 200%) en dioxano seco (15 ml). La suspensión resultante se refluje con agitación durante cuatro horas. Después de enfriar a temperatura ambiente se destruye el hidruro sódico excedente por adición de agua (gota a gota) y se concentra a sequedad. Se disuelve en la mínima cantidad de agua y se acidula con ácido clorhídrico al 8% hasta pH 3,5, se filtra y lava con abundante agua. El sólido obtenido se disuelve en metanol, se enfría en baño de hielo, se añade una disolución etérea de diazometano

(1,26 g; 30 mmol) y se deja estar una noche a 0°C. Pasado este tiempo, se evapora el disolvente a presión reducida y el sólido obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando éter-hexano 3:1 como eluyente. Rendimiento, 1,9g (78%). P.f. 191-192°C.  $[\alpha]_D^{20} -54^\circ$  (c 0,10; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{19}H_{23}NO_8$ :

C, 58,00%; H, 5,89%; N, 3,56%

Encontrado:

C, 57,78%; H, 6,16%; N, 3,41%

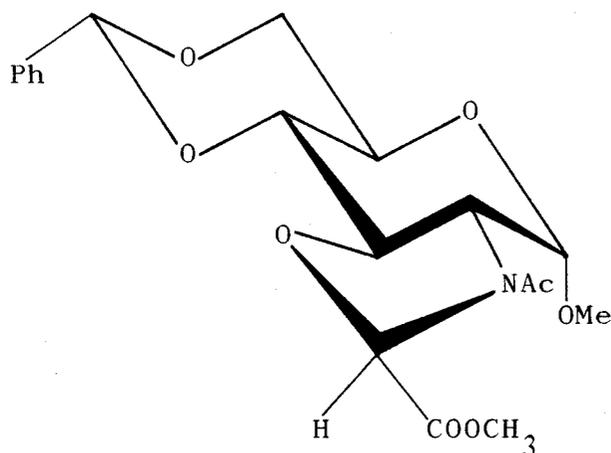
Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 11; Figura 19-A a 22-A

Espectro de  $^{13}C$ -RMN : Tabla 24; Figura 60-A y 61-A

Espectro de masas : Tabla 36; Figura 68-A; Esquema 27

Espectro IR : Tabla 55; Figura 114-A

III.4.1.7. 3-Acetil-2-metoxycarbonil-(4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (81)



81

A una disolución de metil 2-acetamido-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiránósido (72)<sup>92</sup> (1 g; 6,1 mmol) en dioxano seco (100 ml) se le adiciona cuidadosamente hidruro sódico (0,6 g; 25 mmol) y una disolución de ácido dicloroacético (0,75 ml; 9,3 mmol; exc. 200%) en dioxano seco (10 ml). La suspensión resultante se refluje en agitación durante cuatro horas. Después de enfriar a temperatura ambiente se destruye el hidruro sódico excedente por adición de agua (gota a gota) y se concentra a sequedad. Se disuelve en la mínima cantidad de agua y se acidula con ácido clorhídrico al 8% hasta pH 3,5, se filtra y lava con abundante agua. El sólido obtenido se disuelve en metanol, se enfría en baño de hielo y añade una disolución etérea de diazometano (0,7 g; 16,7

mmol). Se deja estar una noche a 0°C, tras lo cual se evapora el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando éter-hexano 3:1 como eluyente. Rendimiento, 0,97 g (80%). P.f. 173-174°C.  $[\alpha]_D^{20} +131^\circ$  (c 0,22; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{19}H_{23}NO_8$ :

C, 58,00%; H, 5,89%; N, 3,56%

Encontrado:

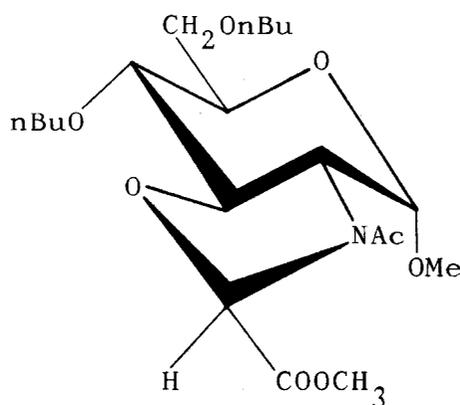
C, 58,12%; H, 6,26%; N, 3,25%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 11; Figura 23-A

Espectro de masas : Tabla 36; Figura 67-A; Esquema 27

Espectro IR : Tabla 55; Figura 115-A

III.4.1.8. 3-Acetil-2-metoxycarbonil-(4,6-di-O-n-butil-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (78)



78

A una suspensión de metil 2-acetamido-4,6-di-O-n-butil-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiránósido (76) (1,85 g; 5,33 mmol) en dioxano seco (200 ml) se le adiciona cuidadosamente hidruro sódico (1 g; 43 mmol). Se refluxe con agitación durante cinco minutos y se adiciona una disolución (gota a gota) de ácido dicloroacético (1,32 ml; 16 mmol) en dioxano seco (10 ml). La mezcla se refluxe con agitación durante 8 horas, se lleva a temperatura ambiente y se destruye el hidruro sódico excedente por adición de agua (gota a gota). Se concentra hasta un cuarto de su volumen a presión reducida, se diluye con agua y se acidula con ácido clorhídrico al 8% hasta pH 3,5. Se extrae con cuatro porciones de cloroformo (4 x 25 ml), la fracción clorofórmica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtra y lava con cloroformo. El combinado de filtrados se enfría en

baño de hielo y se metila con una disolución etérea de diazo metano (1,4 g; 26,6 mmol) durante una noche a 0°C. Se concen tra a presión reducida y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando diclo rometano como eluyente. Rendimiento, 1,36 g (60%) de una sus tancia siruposa.  $[\alpha]_D^{20} +149^\circ$  (c 1,26; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{20}H_{35}NO_8$ :

C, 57,54%; H, 8,45%; N, 3,35%

Encontrado:

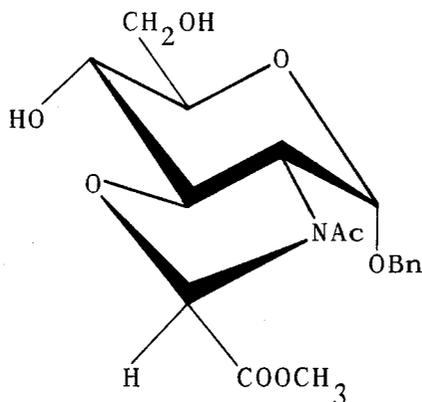
C, 57,62%; H, 8,31%; N, 3,24%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 11; Figura 24-A

Espectro de masas : Tabla 45; Figura 87-A; Esquema 49

Espectro IR : Tabla 55; Figura 116-A

III.4.1.9. 3-Acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (55)



55

Una disolución de 3-acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (40) (500 mg; 1,25 mmol) en metanol (50 ml) se hidrogena a una presión de 40 psi en presencia de paladio sobre carbón al 10% (150 mg) hasta que la c.c.f. desarrollada con cloroformo-metanol 10:1 indica la ausencia de 40. Se filtra el catalizador y se lava con metanol. El combinado de filtrados se lleva a sequedad, se disuelve en diclorometano (50 ml) y se extrae con cuatro porciones de agua destilada (4 x 25 ml). La fracción orgánica se recoge y seca con sulfato sódico, filtra, lava con diclorometano (25 ml) y concentra a presión reducida, obteniéndose la sustancia deseada lo suficientemente pura como para ser usada con fines sintéticos. Rendimiento, 409 mg (98%). Para análisis se purifica

por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente diclorometano-metanol 20:1. P.f. 146-148°C.  $[\alpha]_D^{20} +220^\circ$  (C 0,50; metanol).

Análisis calculado para  $C_{18}H_{23}NO_8 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ :

C, 55,38%; H, 6,19%; N, 3,59%

Encontrado:

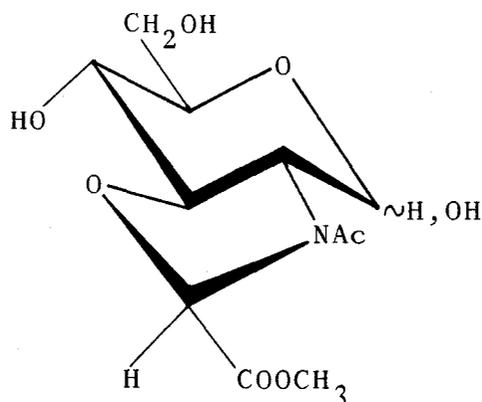
C, 55,32%; H, 6,23%; N, 3,66%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 12; Figura 25-A y 26-A

Espectro de masas : Tabla 45; Figura 83-A y 88-A; Esquema 42

Espectro IR : Tabla 56; Figura 117-A

III.4.1.10. 3-Acetil-2-metoxicarbonil-(2,3-didesoxi-D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (58)



58

Una disolución de 3-acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (40) (500 mg; 1,25 mmol) en metanol (50 ml) se hidrogena a una presión de 100 psi en presencia de paladio sobre carbón al 10% (150 mg) durante 96 horas, al término de las cuales se filtra el catalizador y lava con metanol. El combinado de filtrados se lleva a sequedad y el sirupo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente diclorometano-metanol 15:1. Rendimiento 198 mg (64%) de una sustancia sirupsa.  $[\alpha]_D^{19} +8^\circ$  (c 0,23; metanol).

Análisis calculado para  $C_{11}H_{17}NO_8 \cdot H_2O$ :

C, 42,72%; H, 6,19%; N, 4,53%

Encontrado:

C, 43,07%; H, 5,92%; N, 4,82%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Datos en pág.135; Figura 30-A a 32-A

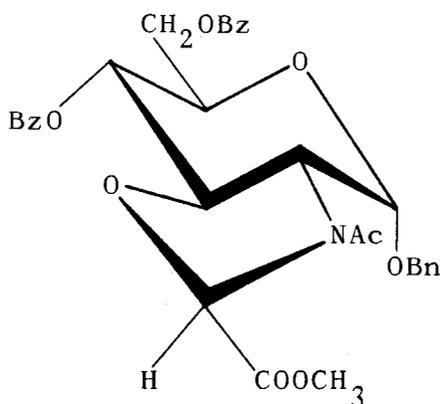
Espectro de masas : Tabla 46; Figura 90-A y 92-A

Esquema 54

Espectro IR : Tabla 56; Figura 118-A

III.4.1.11. 3-Acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-bencil-4,6-di-  
-O-benzoil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina

(57)



57

3-Acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (55) (0,8 g; 2,1 mmol) se disuelve en piridina (10 ml), se le añade cloruro de benzoilo (3 ml) y se deja estar 12 horas. La solución resultante se vierte sobre agua destilada (100 ml) y se extrae con cuatro porciones de cloroformo (4 X 30 ml). Se colectan las fracciones orgánicas y se lavan sucesivamente con agua (2 X 30 ml), ácido clorhídrico 2 N (3 x 30 ml), agua (2 x 30 ml), solución acuosa de bicarbonato sódico (3 x 30 ml) y finalmente con agua hasta pH neutro. Se recoge la fracción orgánica, seca con sulfato sódico, filtra y concentra a sequedad. El sirupo resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, usando diclorometano-acetona-hexano 1:1:5 como eluyente. Rendimiento, 667 mg (54%). P.f. 73-74°C.  $[\alpha]_D^{19} +99^\circ$  (c 0,82; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{32}H_{31}NO_{10}$ :

C, 65,19%; H, 5,30%; N, 2,38%

Encontrado:

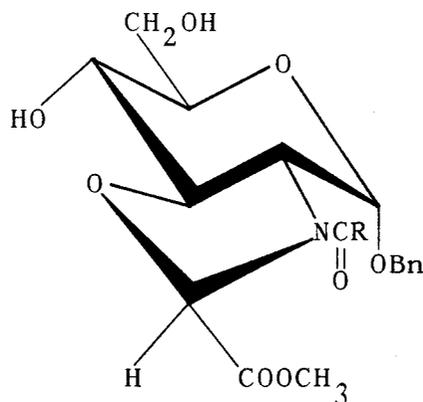
C, 65,56%; H, 4,99%; N, 2,64%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 12; Figura 27-A a 29-A

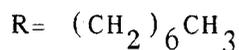
Espectro de masa : Tabla 45; Figura 86-A; Esquema 47

Espectro IR : Tabla 55; Figura 113-A

III.4.1.12. 2-Metoxicarbonil-3-n-octanoil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (56)



56



Una disolución de 2-metoxicarbonil-3-n-octanoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (41) (1 g; 1,8 mmol) en metanol-dioxano 3:1 (100 ml) se hidrogena a una presión de 40 psi en presencia de paladio sobre carbón al 10% (200 mg) durante 16 horas. Se filtra el catalizador y se lava con metanol. El combinado de filtrados se concentra a sequedad, obteniéndose un sólido blanco cromatográficamente puro. Se cristaliza de metanol-agua. Rendimiento, 810 mg (96%). P.f. 105-106°C.

Análisis calculado para  $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{NO}_8$ :

C, 61,92%; H, 7,58%; N, 3,01%

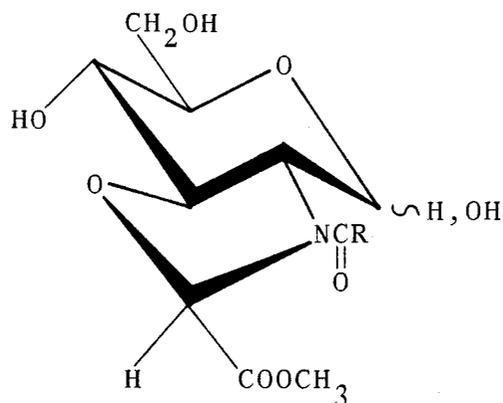
Encontrado:

C, 62,05%; H, 7,64%; N, 2,81%

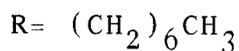
Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN : Tabla 13; Figura 33-A

Espectro de masas : Tabla 45; Figura 84-A; Esquema 43

III.4.1.13. 2-Metoxicarbonil-3-n-octanoil-(2,3-didesoxi-D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (59)



59



Una disolución de 2-metoxicarbonil-3-n-octanoil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (41) (1 g; 1,8 mmol) en dioxano-metanol 1:1 (150 ml) se hidrogena a una presión de 100 psi durante 96 horas en presencia de paladio sobre carbón al 10% (250mg) al término de las cuales se filtra el catalizador y lava con metanol. El combinado de filtrados se lleva a sequedad y el producto resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente diclorometano-metanol 15:1. Rendimiento, 460 mg (68%). P.f. 87-88°C.  $[\alpha]_D^{20} +11^\circ$  (c 0,35; metanol).

Análisis calculado para  $C_{17}H_{29}NO_8$ :

C, 54,39%; H, 7,79%; N, 3,73%

Encontrado:

C, 54,08%; H, 8,16%; N, 3,47%

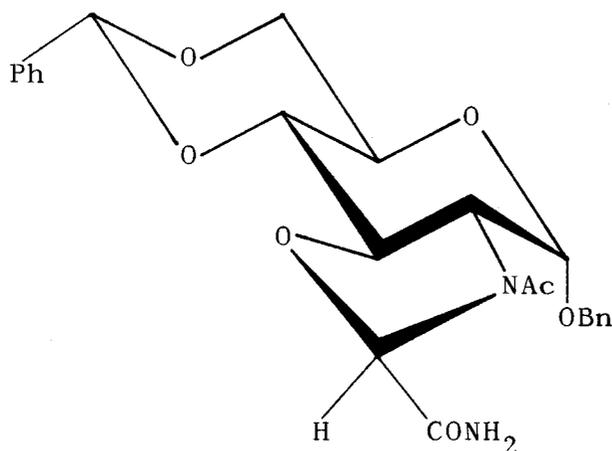
Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 13; Figura 34-A y 35-A

Espectro de masas : Tabla 46; Figura 91-A; Esquema 54

Espectro IR : Tabla 56; Figura 119-A

III.4.2. CONDENSACION DE ANALOGOS RIGIDOS DEL ACIDO MURAMICO  
CON AMONIACO Y AMINOACIDOS

III.4.2.1. 3-Acetil-2-carboxamido-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (43)



43

3-Acetil-2-carboxi-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (37) (0,96 g; 2,1 mmol) se disuelve en dioxano seco (30 ml). A esta disolución se le adiciona N-hidroxisuccinimida (304 mg; 2,6 mmol; exc. 25%) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (523 mg; 2,5 mmol; exc. 20%). La mezcla se mantiene 30 minutos en agitación tras lo cual se filtra la diciclohexilurea formada y lava con dioxano seco (10 ml). Sobre el combinado de filtrados se hace pasar una corriente de gas amoníaco seco durante 10 minutos. Inmediatamente aparece un abundante precipitado que se mantiene en agitación durante una noche. Se vierte sobre agua destilada (100 ml) y filtra. El sólido blanco obtenido se suspende en etanol en caliente (100 ml) y se deja

estar una noche. Se filtra y obtiene un producto cromatográficamente puro. Rendimiento, 717 mg (75%). Se cristaliza para análisis de etanol absoluto. P.f. 281-282°C.  $[\alpha]_D^{20} +114^\circ$  (c 0,34; dimetilsulfóxido).

Análisis calculado para  $C_{24}H_{26}N_2O_7$ :

C, 63,43%; H, 5,77%; N, 6,16%

Encontrado:

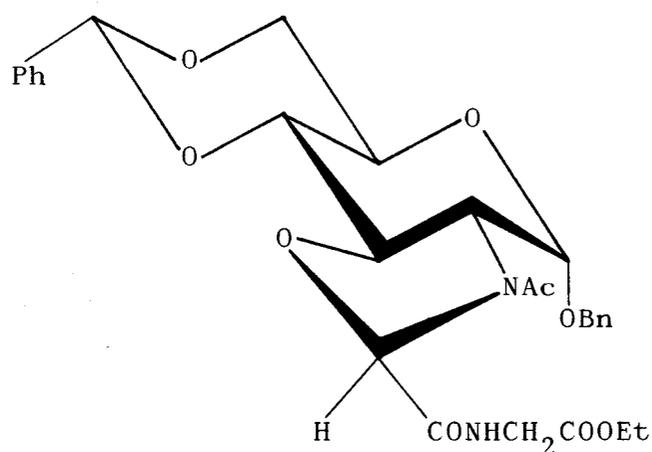
C, 63,20%; H, 6,01%; N, 5,85%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 14; Figura 36-A

Espectro de masas : Tabla 36; Figura 71-A; Esquema 27

Espectro IR : Tabla 57; Figura 120-A

III.4.2.2. Ester etílico de 3-acetil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonilglicina (44)



44

A una disolución de 3-acetil-2-carboxi-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (37) (600 mg; 1,32 mmol) en dioxano seco (10 ml) se le adiciona N-hidroxisuccinimida (186 mg; 1,65 mmol; exc. 25%) y N,N'-díciclohexilcarbodiimida (326 mg; 1,58 mmol; exc. 20%). La mezcla se mantiene 30 minutos en agitación, tras lo cual se filtra la díciclohexilurea formada y lava con dioxano seco (5 ml). Al combinado de filtrados se le adiciona clorhidrato del éster etílico de glicina (184 mg; 1,32 mmol) y trietilamina (0,18 ml; 1,32 mmol). Después de una noche en agitación a temperatura ambiente se adiciona agua destilada (25 ml). El precipitado obtenido se filtra y sus-

pende en etanol en caliente (40 ml), se deja enfriar a temperatura ambiente y filtra. Se obtiene un producto blanco cromatográficamente puro. Rendimiento, 512 mg (72%). Para análisis se cristaliza de cloroformo-acetato de etilo. P.f. 269-270°C (d).  $[\alpha]_D^{19} +93^\circ$  (c 0,4; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{28}H_{32}N_2O_9$ :

C, 62,21%; H, 5,97%; N, 5,18%

Encontrado:

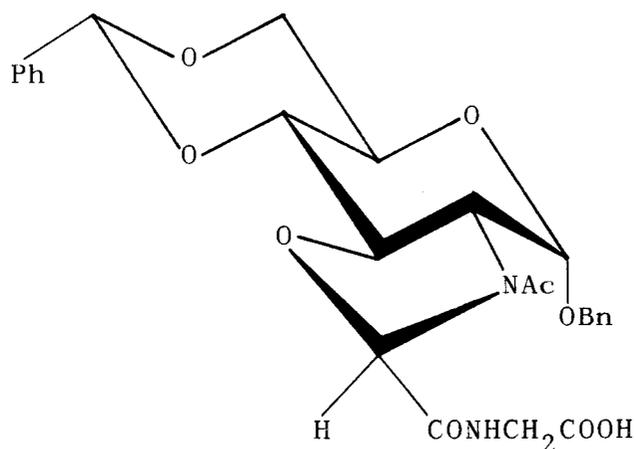
C, 62,60%; H, 6,05%; N, 5,29%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 14; Figura 37-A

Espectro de masas : Tabla 36; Figura 72-A; Esquema 27

Espectro IR : Tabla 57; Figura 121-A

III.4.2.3. 3-Acetil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-dideso-  
xi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonilglicina (50)



A una disolución del éster etílico de 3-acetil-(1-  
 -O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-  
 -d]-oxazolidín-2-carbonilglicina (44) (100 mg; 0,18 mmol) en  
 dioxano (30 ml) se le adiciona hidróxido sódico 0,5 N (2ml).  
 Se deja estar 30 minutos a temperatura ambiente y adiciona  
 agua destilada (30 ml) y ácido clorhídrico 0,5 N (2,5 ml).  
 El precipitado obtenido se filtra y lava con abundante agua  
 destilada. Se cristaliza de etanol absoluto. Rendimiento,  
 88 mg (93%). P.f. 224-225°C (d).

Análisis calculado para  $C_{26}H_{28}N_2O_9$ :

C, 60,93%; H, 5,51%; N, 4,47%

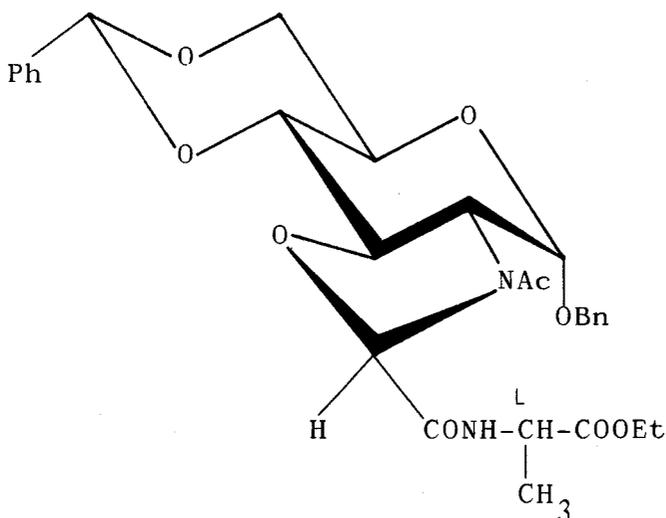
Encontrado:

C, 60,90%; H, 5,74%; N, 4,77%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 14; Figura 50-A

Espectro IR : Tabla 57; Figura 122-A

III.4.2.4. Ester etílico de 3-acetil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanina (45)



A una disolución de 3-acetil-2-carboxi-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (37) (1 g; 2,2 mmol) en dioxano seco (20 ml) se le adiciona N-hidroxisuccinimida (322 mg; 2,8 mmol) y N,N'-dici-clohexilcarbodiimida (543 mg; 2,63 mmol). La mezcla se mantiene 30 minutos en agitación, se filtra la dicitclohexilurea formada y lava con dioxano seco (10 ml). Al combinado de filtrados se le adiciona clorhidrato del éster etílico de L-alanina (337 mg; 2,2 mmol) y trietilamina (0,3 ml; 2,2 mmol). Después de una noche en agitación a temperatura ambiente, se adiciona agua destilada (50 ml) y se recoge por filtra-

ción el precipitado. El sólido obtenido se suspende en etanol en caliente (75 ml) y se deja estar una noche a temperatura ambiente, se filtra y obtiene un producto blanco cromatográficamente puro. Cristaliza de cloroformo. Rendimiento, 1 g (82%). P.f. 246-248°C (d).  $[\alpha]_D^{19} +81^\circ$  (c 1,11; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{29}H_{34}N_2O_9$ :

C, 62,80%; H, 6,17%; N, 5,05%

Encontrado:

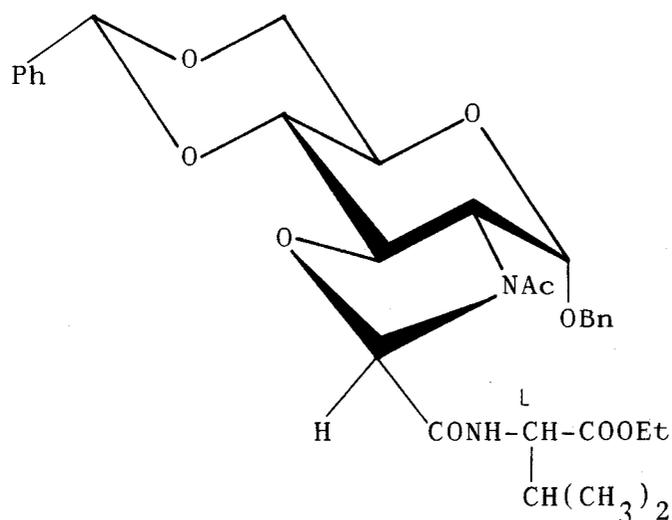
C, 62,45%; H, 5,87%; N, 5,34%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 15; Figura 39-A y 40-A

Espectro de masas : Tabla 36; Figura 73-A; Esquema 27

Espectro IR : Tabla 57; Figura 123-A

III.4.2.5. Ester etílico de 3-acetil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-valina (46)



A una disolución de 3-acetil-2-carboxi-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (37) (850 mg; 1,86 mmol) en dioxano seco (25 ml) se le adiciona N-hidroxisuccinimida (272 mg; 2,36 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (506 mg; 2,45 mmol). La mezcla se mantiene 30 minutos en agitación, tras lo cual se filtra la diciclohexilurea formada y se lava con dioxano seco (10 ml). Al combinado de filtrados se le adiciona clorhidrato del éster etílico de L-valina (338 mg; 1,86 mmol) y trietilamina (0,26 ml; 1,86 mmol). Después de una noche en agitación a temperatura ambiente, se adiciona agua destilada (50 ml) y

se recoge por filtración el precipitado. El sólido obtenido se suspende en etanol en caliente (50 ml) y se deja estar una noche, se filtra y obtiene un producto blanco cromatográficamente puro. Rendimiento, 845 mg (78%). Para análisis se cristaliza de cloroformo-acetato de etilo. P.f. 228-230°C (d).  $[\alpha]_D^{20} +91^\circ$  (c 0,55; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{31}H_{38}N_2O_9 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ :

C, 62,93%; H, 6,47%; N, 4,73%

Encontrado:

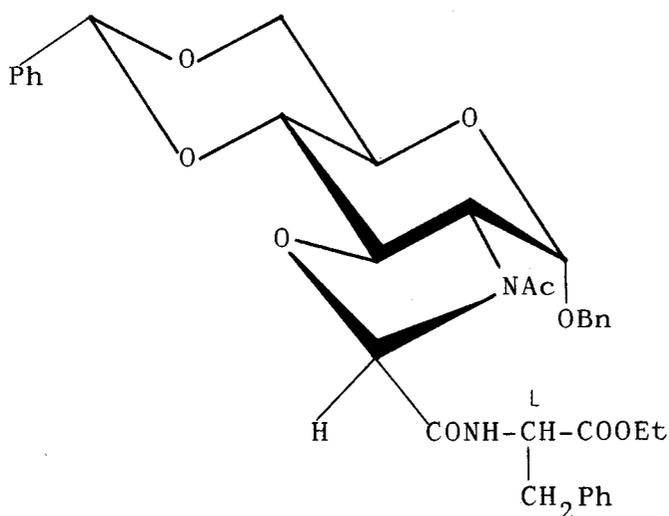
C, 62,95%; H, 6,48%; N, 4,81%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 15; Figura 42-A

Espectro de masa : Tabla 36; Figura 74-A; Esquema 27

Espectro IR : Tabla 57; Figura 124-A

III.4.2.6. Ester etílico de 3-acetil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-fenilalanina (47)



A una disolución de 3-acetil-2-carboxi-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (37) (500 mg; 1,1 mmol) en dioxano seco (20 ml) se le adiciona N-hidroxisuccinimida (161 mg; 1,4 mmol) y N,N'-dici-clohexilcarbodiimida (268 mg; 1,3 mmol). La mezcla se mantiene 30 minutos en agitación, tras lo cual se filtra la diciclohexilurea formada y se lava con dioxano seco (10 ml). Al combinado de filtrados se le adiciona clorhidrato del éster etílico de L-fenilalanina (253 mg; 1,1 mmol) y trietilamina (0,15 ml; 1,1 mmol). Después de una noche en agitación se adiciona agua destilada (50 ml) y se recoge por filtración

el precipitado. El sólido obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando diclorometano como eluyente. Rendimiento, 478 mg (69%). P.f. 223-225°C (d).  $[\alpha]_D^{20} +120^\circ$  (c 0,96; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{35}H_{38}N_2O_9$ :

C, 66,65%; H, 6,07%; N, 4,44%

Encontrado:

C, 66,43%; H, 6,36%; N, 4,17%

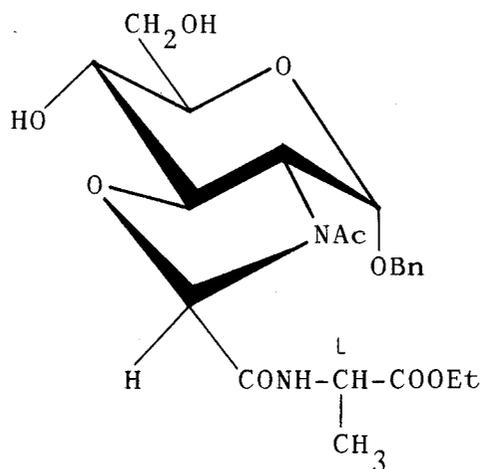
Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 15; Figura 41-A

Espectro de masas : Tabla 36; Figura 75-A; Esquema 27

Espectro IR : Tabla 57; Figura 125-A

III.4.2.7. Ester etílico de 3-acetil-(1-O-bencil-2,3-dideso-  
xi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanina.

(60)



A una disolución de 3-acetil-2-metoxicarbonil-(1-  
 -0-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina  
 (55) (1,17 g; 3,07 mmol) en metanol (50 ml) se le adiciona  
 NaOH 1 N (8 ml) y se deja estar a temperatura ambiente dos  
 horas, se neutraliza con resina catiónica (LEWATIT S100 G1  
 Fuerte II), se filtra, lava con metanol y concentra a seque-  
 dad a presión reducida. El ácido obtenido se disuelve en  
 N,N-dimetilformamida (15 ml) y tetrahidrofurano (40 ml). La  
 disolución obtenida, tras enfriar en baño de agua-hielo, se  
 le adiciona N-hidroxisuccinimida (441 mg; 3,83 mmol) y N,N'-  
 diciclohexilcarbodiimida (759 mg; 3,68 mmol). La mezcla se  
 mantiene 10 minutos en agitación y se le adiciona clorhidra-  
 to del éster etílico de L-alanina (467 mg; 3,07 mmol) y trie

tilamina (0,43 ml; 3,07 mmol). Se deja alcanzar la temperatura ambiente en agitación durante una noche. Con ayuda de una bomba de vacío se concentra a sequedad el producto. El residuo se disuelve en diclorometano (75 ml) y se extrae con tres porciones de agua destilada (3 x 50 ml). La fracción orgánica se recoge, seca con sulfato sódico, filtra y concentra a sequedad obteniéndose un compuesto blanco que se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente diclorometano-metanol 20:1. Rendimiento, 726 mg (51%). P.f. 147-149°C (d).  $[\alpha]_D^{20} +115^\circ$  (c 0,26, metanol).

Análisis calculado para  $C_{22}H_{30}N_2O_9$ :

C, 56,64%; H, 6,48%; N, 6,01%

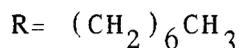
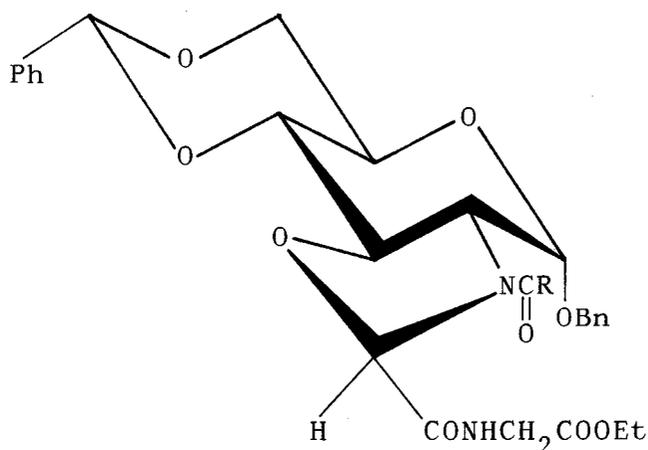
Encontrado:

C, 59,78%; H, 6,32%; N, 5,73%

Espectro de masas : Tabla 45; Figura 85-A. Esquema 45

Espectro IR : Tabla 57; Figura 126-A

III.4.2.8. Ester etílico de 3-n-octanoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonilglicina (48)



A una disolución de 2-carboxi-3-n-octanoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (38) (500 mg; 0,92 mmol) en tetrahidrofurano seco (20 ml) se adiciona N-hidroxisuccinimida (132 mg; 1,15 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (227 mg; 1,1 mmol). La mezcla se mantiene 30 minutos en agitación, tras lo cual se filtra la diciclohexilurea formada y lava con tetrahidrofurano seco (10 ml). Al combinado de filtrados se le adiciona clorhidrato del éster etílico de glicina (130 mg; 0,92 mmol) y trietilamina (0,15 ml; 0,92 mmol). Después de una noche a temperatura ambiente se filtra la suspensión y lava con te-

trahidrofurano. El filtrado se evapora hasta la mitad de su volumen, se diluye con agua y se filtra el sólido formado, lava con agua y seca. Se cristaliza de etanol. Rendimiento, 415 mg (72%). P.f. 225-226°C (d).  $[\alpha]_D^{19} +95^\circ$  (c 0,29; cloroforno).

Análisis calculado para  $C_{34}H_{44}N_2O_9$ :

C, 65,37%; H, 7,10%; N, 4,48%

Encontrado:

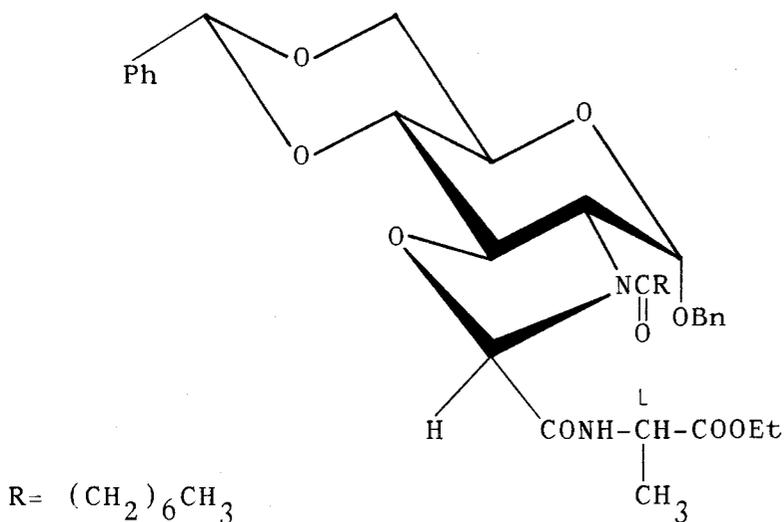
C, 65,27%; H, 7,19%; N, 4,40%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 16; Figura 43-A y 44-A

Espectro de masas : Tabla 36; Figura 77-A; Esquema 27

Espectro IR : Tabla 58; Figura 127-A

III.4.2.9. Ester etílico de 3-n-octanoil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanina (49)



A una disolución de 2-carboxi-3-n-octanoil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (38) (1 g; 1,85 mmol) en tetrahidrofurano seco (40 ml) se le adiciona N-hidroxisuccinimida (266 mg; 2,31 mmol) y N,N'-diciclohexilcabodiimida (458mg; 2,22mmol). La mezcla se mantiene 30 minutos en agitación, tras lo cual se filtra la diciclohexilurea formada y lava con tetrahidrofurano seco (15 ml). Al combinado de filtrados se le adiciona clorhidrato del éster etílico de L-alanina (300 mg; 1,85 mmol) y trietilamina (0,30 ml; 1,85 mmol). Después de una noche a temperatura ambiente se filtra la suspensión y lava

con tetrahidrofurano. El filtrado se vierte sobre agua desti-  
lada (200 ml) y filtra el sólido formado, lava con agua y  
seca. Se cristaliza de etanol. Rendimiento, 900 mg (76%).  
P.f. 231-233°C (d).  $[\alpha]_D^{20} +86^\circ$  (c 1,18; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{35}H_{46}N_2O_9$ :

C, 65,81%; H, 7,26%; N, 4,38%

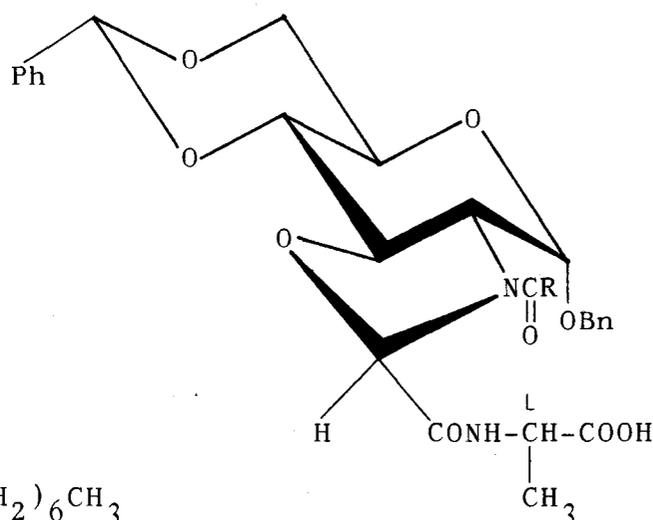
Encontrado:

C, 66,08%; H, 7,25%; N, 4,43%

Espectro de masas : Tabla 36; Figura 78-A; Esquema 27

Espectro IR : Tabla 58; Figura 128-A

III.4.2.10. 3-n-Octanoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L--alanina (51)



51

A una disolución del éster etílico de 3-n-octanoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanina (49) (2 g; 3,1 mmol) en dimetilsulfóxido (170 ml) se le adiciona hidróxido potásico 5 M (1,5 ml) y se mantiene en agitación durante dos horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se diluye con agua y acidula con ácido clorhídrico al 8%, precipitando un sólido que se filtra, lava con agua y seca. Se cristaliza de etanol. Rendimiento, 1,6 g (84%). Para análisis se cristaliza de acetato de etilo-cloroformo. P.f. 223-225°C (d).  $[\alpha]_D^{20} +101^\circ$  (c 0,34; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{33}H_{42}N_2O_9$ :

C, 64,90%; H, 6,93%; N, 4,59%

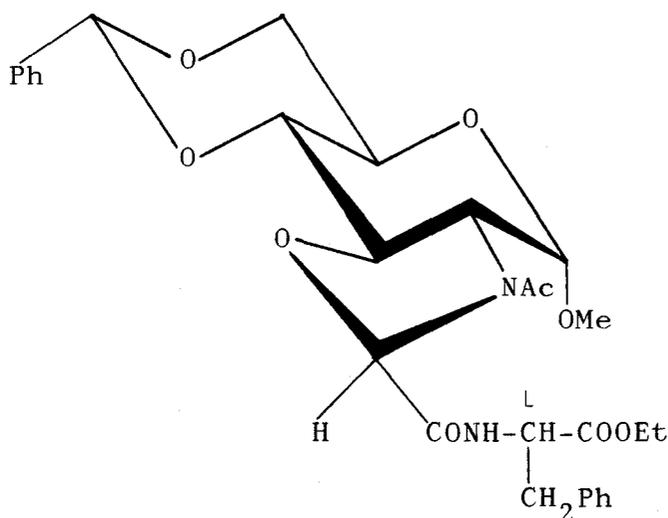
Encontrado:

C, 64,54%; H, 6,82%; N, 4,98%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 16; Figura 45-A

Espectro IR : Tabla 58; Figura 129-A

III.4.2.11. Ester etílico de 3-acetil-(4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-fenilalanina (82)



A una disolución de 3-acetil-2-carboxi-(4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (80) (1 g; 2,63 mmol) en dioxano seco (50 ml) se le adiciona N-hidroxisuccinimida (378 mg; 3,29 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (650 mg; 3,16 mmol). La mezcla se mantiene 30 minutos en agitación, tras lo cual se filtra la diciclohexilurea formada y lava con dioxano seco (10 ml). Al combinado de filtrados se le adiciona clorhidrato del éster etílico de L-fenilalanina (605 mg; 2,63 mmol). Después de una noche en agitación, se adiciona agua destilada (100 ml) y se recoge por filtración el precipitado. El sólido obteni-

do se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando diclorometano como eluyente. Rendimiento, 977 mg (67%). P.f. 230-231°C (d).  $[\alpha]_D^{20} +110^\circ$  (c 0,50; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{29}H_{34}N_2O_9$ :

C, 62,80%; H, 6,18%; N, 5,05%

Encontrado:

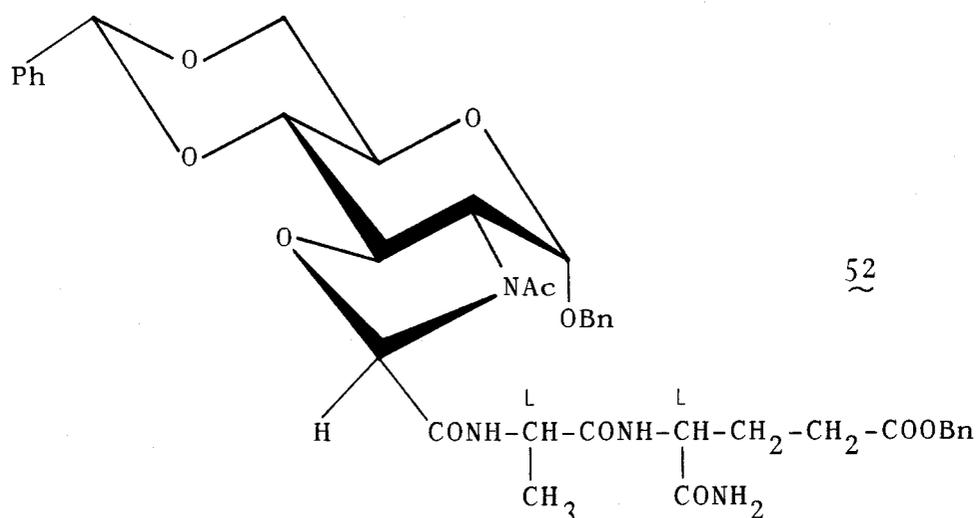
C, 62,45%; H, 6,29%; N, 5,31%

Espectro de masas : Tabla 36; Figura 76-A; Esquema 27

Espectro IR : Tabla 58; Figura 130-A

III.4.3. ANALOGOS RIGIDOS DEL MURAMOIL DIPEPTIDO

III.4.3.1. Ester bencílico de 3-acetil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-L-isoglutamina (52)



A una disolución de 3-acetil-2-carboxi-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (37) (674 mg; 1,48 mmol) en dioxano seco (30 ml) se le adiciona N-hidroxisuccinimida (213 mg; 1,85 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (367 mg; 1,78 mmol). La mezcla se mantiene 30 minutos en agitación, tras lo cual se filtra la diciclohexilurea formada y lava con dioxano seco (10 ml). Al combinado de filtrados se le adiciona una disolución de p-toluensulfonato del éster bencílico de L-alanil-L-isoglutamina (707 mg; 1,48 mmol) en N,N-dimetilformamida (1,3 ml), dioxano (12 ml) y trietilamina (0,2 ml; 1,48 mmol). Después

de una noche en agitación, se adiciona agua destilada (75ml) y filtra. El sólido obtenido se suspende en agua destilada en caliente (75 ml) y filtra, se vuelve a suspender en etanol en caliente (75 ml) y se deja alcanzar la temperatura ambiente. Se filtra y obtiene una sustancia blanca cromatográficamente pura. Rendimiento, 820 mg (75%). Para análisis se cristaliza de dioxano. P.f. 276-277°C (d).  $[\alpha]_D^{20} +44^\circ$  (c 0,40; dimetilsulfóxido).

Análisis calculado para  $C_{39}H_{44}N_4O_{11}$ :

C, 62,89%; H, 5,95%; N, 7,52%

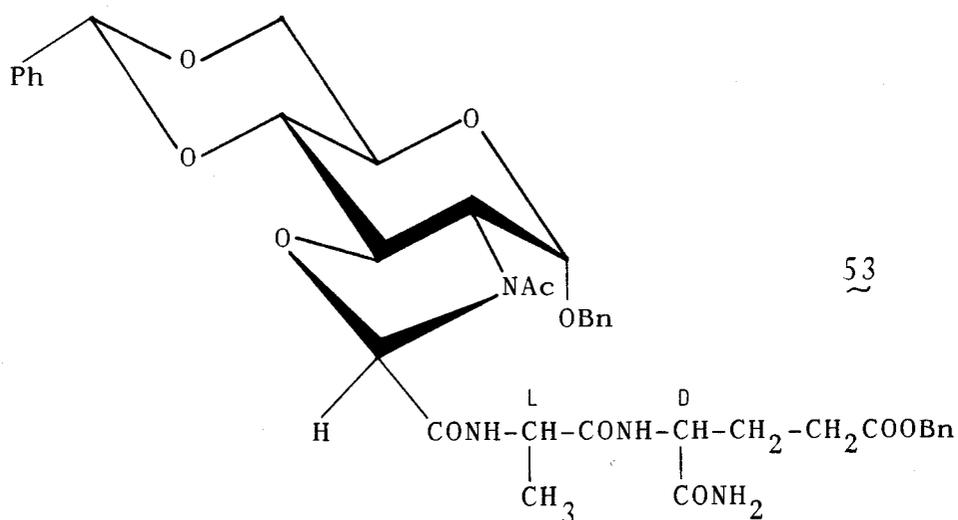
Encontrado:

C, 63,11%; H, 5,78%; N, 7,67%

Espectro IR : Tabla 59; Figura 132-A

Espectro de masas: Tabla 50; Figura 93-A

III.4.3.2. Ester bencílico de 3-acetil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (53)



A una disolución de 3-acetil-2-carboxi-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (37) (1 g; 2,2 mmol) en dioxano seco (60 ml) se le adiciona N-hidroxisuccinimida (316 mg; 2,75 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (525 mg; 2,64 mmol). La mezcla se mantiene 30 minutos en agitación, tras lo cual se filtra la diciclohexilurea formada y lava con dioxano seco (15 ml). Al combinado de filtrados se le adiciona una disolución de p-toluensulfonato del éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina (1,05 g; 2,2 mmol) en N,N-dimetilformamida (3 ml), dioxano (20 ml) y trietilamina (0,3 ml; 2,2 mmol). Después de

una noche en agitación se adiciona agua destilada en caliente (100 ml) y filtra. Se suspende nuevamente en etanol en caliente (75 ml) y se deja alcanzar la temperatura ambiente, se filtra y obtiene una sustancia blanca cromatográficamente pura. Rendimiento, 1,38 g (84%). Para análisis se cristaliza de dioxano. P.f. 283-284°C (d).  $[\alpha]_D^{19} +42^\circ$  (c 0,33; dimetilsulfóxido).

Análisis calculado para  $C_{39}H_{44}N_4O_{11}$ :

C, 62,89%; H, 5,95%; N, 7,52%

Encontrado:

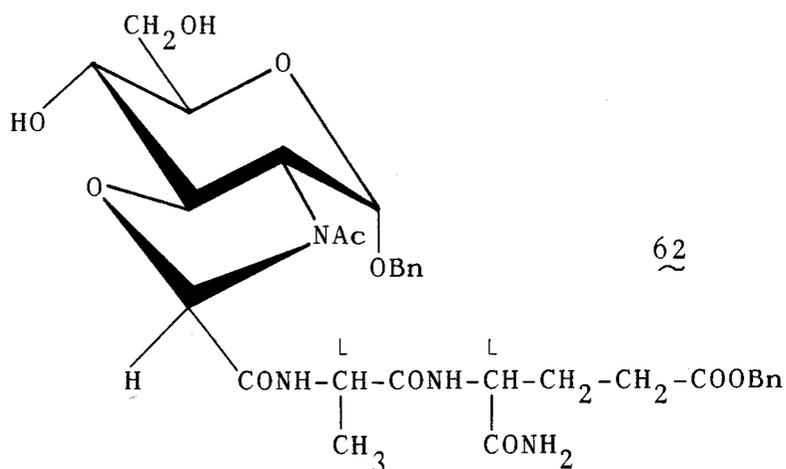
C, 63,16%; H, 6,21%; N, 7,34%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 17; Figura 46-A

Espectro de masas : Tabla 50; Figura 94-A

Espectro IR : Tabla 59; Figura 131-A

III.4.3.3. Ester bencílico de 3-acetil-(1-O-bencil-2,3-dideoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-L-isoglutamina (62)



A una disolución de 3-acetil-2-metoxicarbonil-(1--0-bencil-2,3-dideoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (55) (890 mg; 2,34 mmol) en metanol (50 ml) se le adiciona NaOH 1 N (8 ml) y se deja estar a temperatura ambiente dos horas. Pasado este tiempo se neutraliza con resina catiónica (LEWATIT S100 G1 Fuerte II), se filtra, lava con metanol y concentra a presión reducida. La sustancia obtenida se disuelve en N,N-dimetilformamida (10 ml) y tetrahidrofurano (25 ml), tras lo cual se enfría en baño de agua-hielo y adiciona N-hidroxisuccinimida (337 mg; 2,93 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (580 mg; 2,81 mmol). La mezcla se mantiene en agitación 15 minutos y se le adiciona una disolu-

ción de p-toluensulfonato del éster bencílico de L-alanil-L-isoglutamina (1,12 g; 2,34 mmol) en N,N-dimetilformamida (5 ml), tetrahidrofurano (15 ml) y trietilamina (0,33 ml; 2,34 mmol). Se deja alcanzar la temperatura ambiente en agitación durante una noche y filtra la dicitclohexilurea formada. Con ayuda de una bomba de vacío se concentra a sequedad el filtrado. El producto obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente diclorometano-metanol 15:1. Rendimiento, 841 mg (65%). P.f. 220-222°C (d).  $[\alpha]_D^{20} +65^\circ$  (c 0,26; metanol).

Análisis calculado para  $C_{32}H_{40}N_4O_{11} \cdot H_2O$ :

C, 56,96%; H, 6,27%; N, 8,30%

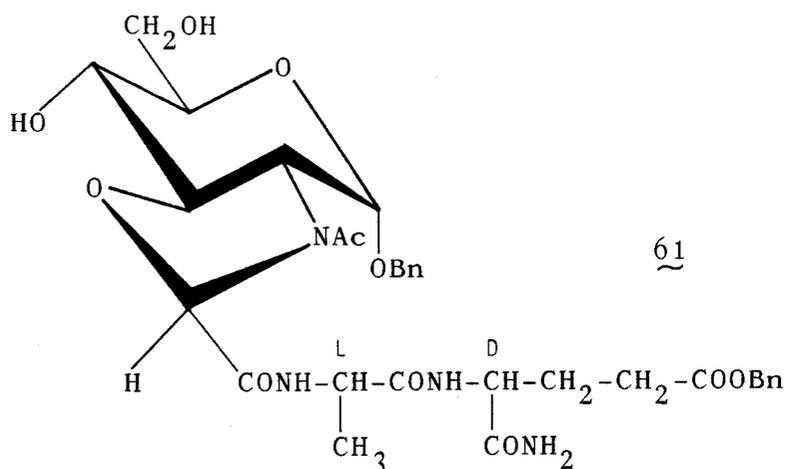
Encontrado:

C, 57,35%; H, 6,15%; N, 8,40%

Espectro IR : Tabla 59; Figura 134-A

Espectro de masas: Tabla 50; Figura 95-A

III.4.3.4. Ester bencílico de 3-acetil-(1-O-bencil-2,3-dideoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (61)



A una disolución de 3-acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-bencil-2,3-dideoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (55) (810 mg; 2,13 mmol) en metanol (50 ml) se le adiciona NaOH 1 N (8 ml) y se deja estar a temperatura ambiente 2 horas. Pasado este tiempo se neutraliza con resina catiónica (LEWATIT S100 G1 Fuerte II), se filtra, lava con metanol y concentra a presión reducida. La sustancia obtenida se disuelve en N,N-dimetilformamida (10 ml) y tetrahydrofurano (25 ml), tras lo cual se enfría en baño de agua-hielo y adiciona N-hidroxisuccinimida (306 mg; 266 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (527 mg; 2,55 mmol). La mezcla se mantiene en agitación 15 minutos y se le adiciona una disolu-

ción de p-toluensulfonato del éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina (1,02 g; 2,13 mmol) en N,N-dimetilformamida (5 ml), tetrahidrofurano (15 ml) y trietilamina (0,3 ml; 2,13 mmol). Se deja alcanzar la temperatura ambiente en agitación durante una noche y filtra la diciclohexilurea formada. Con ayuda de una bomba de vacío se concentra a sequedad el filtrado. La sustancia obtenida se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente diclorometano-metanol 15:1. Rendimiento, 741 mg (63%). P.f. 212-214°C (d).  $[\alpha]_D^{19} +70^\circ$  (c 0,32; metanol).

Análisis calculado para  $C_{32}H_{40}N_4O_{11} \cdot H_2O$ :

C, 56,96%; H, 6,27%; N, 8,30%

Encontrado:

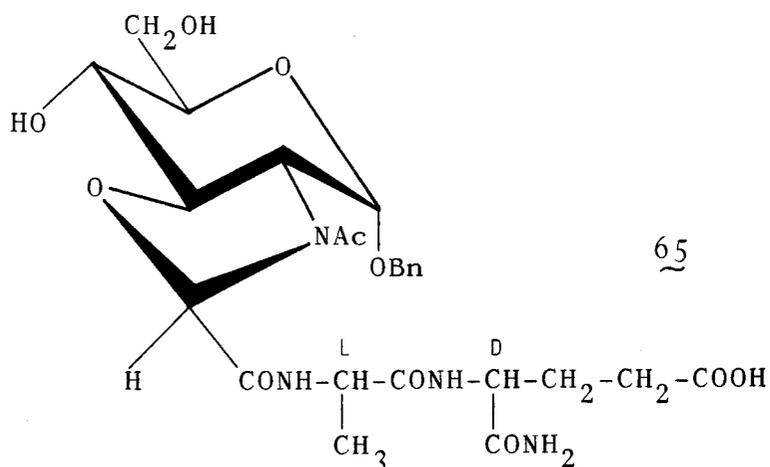
C, 56,83%; H, 6,26%; N, 8,57%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 18 y 19; Figuras 47-A a 49-A

Espectro de masas : Tabla 50; Figura 96-A

Espectro IR : Tabla 59; Figura 133-A

III.4.3.5. 3-Acetil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-  
-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (65)



A una disolución del éster bencílico de 3-acetil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (61) (300 mg; 0,46 mmol) en metanol (50 ml) se hidrogena a una presión de 40 psi en presencia de paladio sobre carbón al 10% (100 mg) durante 6 horas. Se filtra el catalizador y lava con metanol. El combinado de filtrados se lleva a sequedad y se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente diclorometano-metanol 5:3. Rendimiento, 160 mg (62%). P.f. 218-220°C (d).  $[\alpha]_D^{20} +63^\circ$  (c 0,16; dimetilsulfóxido).

Análisis calculado para  $C_{25}H_{34}N_4O_{11} \cdot H_2O$ :

C, 51,37%; H, 6,21%; N, 9,59%

Encontrado:

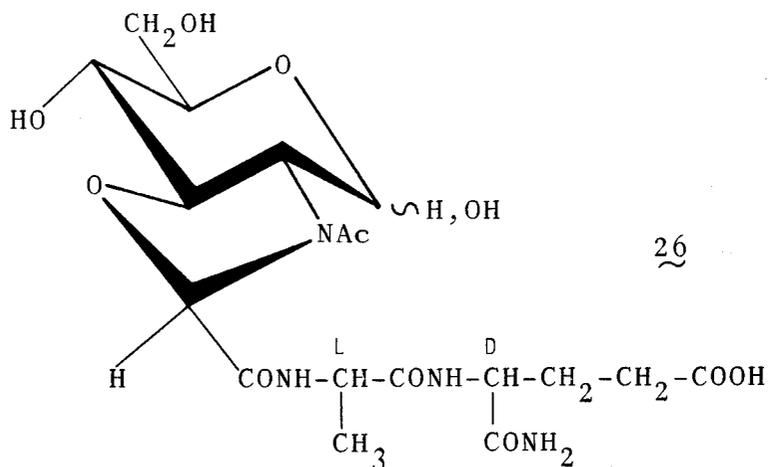
C, 51,72%; H, 5,95%; N, 9,17%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 20; Figuras 50-A y 51-A

Espectro de masas : Tabla 50; Figura 97-A

Espectro IR : Tabla 59; 135-A

III.4.3.6. 3-Acetil-(2,3-didesoxi-D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (26)



Una suspensión del éster bencílico de 3-acetil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (53) (900 mg; 1,21 mmol) en dioxano (150 ml) se hidrogena a una presión de 400 psi a 50°C en presencia de paladio sobre carbón al 10% (250 mg) durante 4 días. La mezcla de hidrogenación se lleva a sequedad a presión reducida, se disuelve en metanol (100 ml) y tras añadir nuevamente paladio sobre carbón al 10% (100 mg) se vuelve a hidrogenar en las mismas condiciones, ahora, durante cinco días. Al término de este tiempo se filtra el catalizador, lava con metanol-agua 2:1 y concentra a sequedad el filtrado. Se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente diclo-

rometano-metanol 1:1. Rendimiento, 296 mg (51%) de una sustancia siruposa.  $[\alpha]_D^{20} -13^\circ$  (c 1,41; metanol-agua 1:1).

Análisis calculado para  $C_{18}H_{28}N_4O_{11} \cdot 3H_2O$ :

C, 40,76%; H, 6,46%; N, 10,56%

Encontrado:

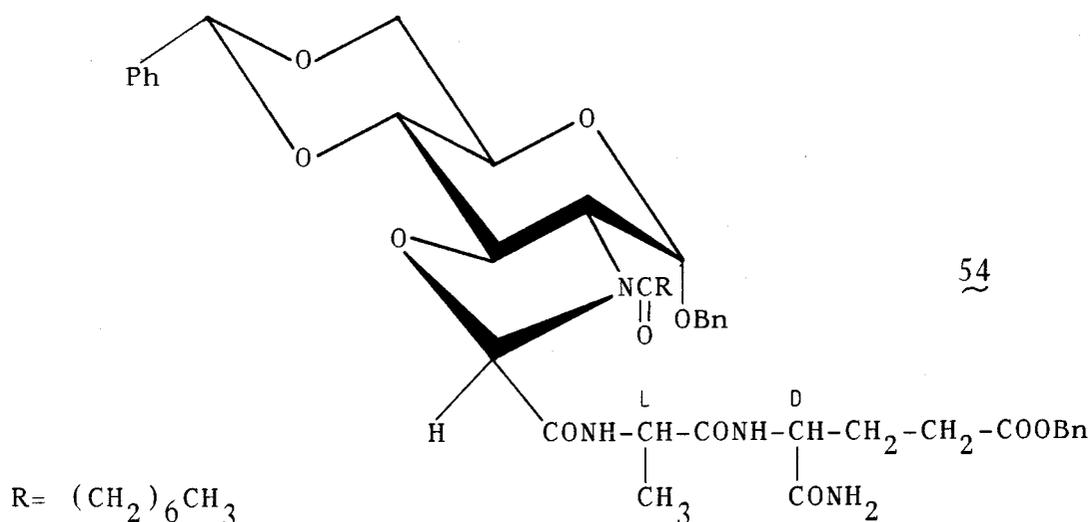
C, 40,41%; H, 6,59%; N, 10,17%

Espectro de  $^1H$ -RMN: Tabla 20; Figuras 52-A y 53-A

Espectro de masas : Tabla 50; Figura 98-A

Espectro IR : Tabla 59; Figura 136-A

III.4.3.7. Ester bencílico de 3-n-octanoil-(1-O-bencil-4,6-  
-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazoli-  
dín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (54)



Método A: a una disolución de 2-carboxi-3-n-octanoil-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (38) (930 mg; 1,72 mmol) en dioxano seco (30 ml) se le adiciona N-hidroxisuccinimida (247 mg; 2,15mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (426mg; 2,06mmol). La mezcla se mantiene 30 minutos en agitación, tras lo cual se filtra la diciclohexilurea formada y lava con dioxano (10 ml). Al combinado de filtrados se le adiciona una disolución de p-toluensulfonato del éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina (822 mg; 1,72 mmol) en N,N-dimetilformamida (3 ml), dioxano (12 ml) y trietilamina (0,23 ml; 1,72 mmol).

Después de una noche en agitación, la suspensión se evapora a sequedad y el residuo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente diclorometano al principio y diclorometano-metanol 50:1 posteriormente. Rendimiento, 1 g (77%). Se cristaliza para análisis de dioxano. P.f. 237-238°C (d).  $[\alpha]_D^{20} +30^\circ$  (c 0,23; dimetilsulfóxido)

Análisis calculado para  $C_{45}H_{56}N_4O_{11}$ :

C, 65,20%; H, 6,81%; N, 6,76%

Encontrado:

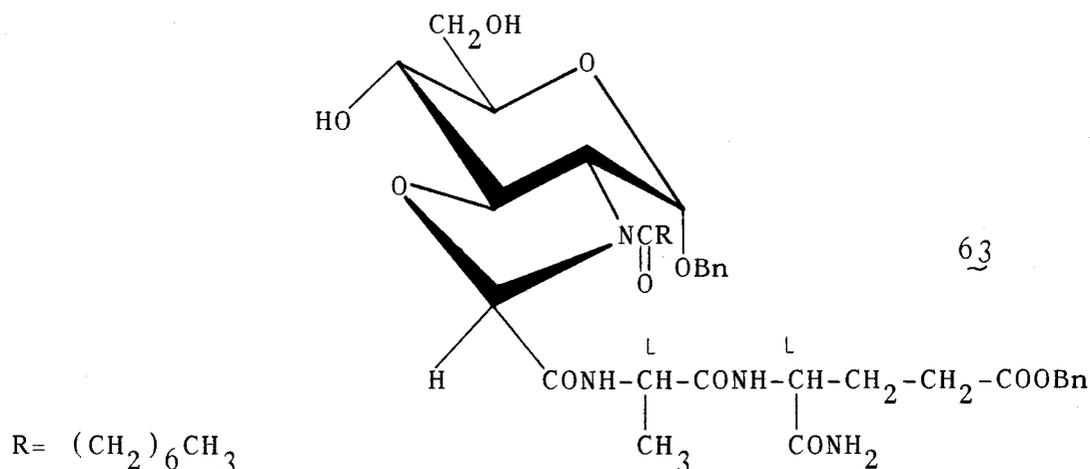
C, 64,96%; H, 6,90%; N, 6,61%

Método B: a una disolución de 3-n-octanoil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanina (51) (100 mg; 0,16 mmol) en dioxano seco (10 ml) se le adiciona N-hidoxisuccinimida (23 mg; 0,2 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (40 mg; 0,19 mmol). Al cabo de 30 minutos en agitación a temperatura ambiente, se filtra la diciclohexilurea formada. Al filtrado se le adiciona una disolución de clorhidrato del éster bencílico de D-isoglutamina (44 mg; 0,16 mmol) en N,N-dimetilformamida (1 ml), dioxano (5 ml) y trietilamina (0,02 ml; 0,16 mmol). La mezcla se mantiene una noche a temperatura ambiente, y la suspensión resultante se procesa igual que en el Método A. Rendimiento, 94 mg (69%).

Espectro de masas : Tabla 50; Figura 99-A

Espectro IR : Tabla 60; Figura 137-A

III.4.3.8. Ester bencílico de 3-n-octanoil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-L-isoglutamina (63)



A una disolución de 2-metoxicarbonil-3-n-octanoil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (56) (636 mg; 1,37 mmol) en metanol (50ml) se le adiciona NaOH 1 N (4 ml) y se deja estar a temperatura ambiente 2 horas. Pasado este tiempo se neutraliza con resina catiónica, se filtra, lava con metanol y concentra a presión reducida. La sustancia obtenida se disuelve en N,N-dimetilformamida (10 ml) y tetrahidrofurano (20 ml), tras lo cual se enfría en baño de agua-hielo y adiciona N-hidroxisuccinimida (196 mg; 1,71 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (339 mg; 1,64 mmol). La mezcla se mantiene en agitación 20 minutos y se le adiciona una disolución de p-toluensulfonato del éster

bencílico de L-alanil-L-isoglutamina (656 mg; 1,37 mmol) en N,N-dimetilformamida (5 ml), tetrahidrofurano (15 ml) y trietilamina (0,2 ml; 1,37 mmol). Se deja alcanzar la temperatura ambiente en agitación durante una noche y filtra la dicitclohexilurea formada. Con ayuda de una bomba de vacío se concentra a sequedad el filtrado. El producto obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente diclorometano-metanol 15:1. Rendimiento, 597mg (59%). P.f. 209-211°C (d).  $[\alpha]_D^{20} +64^\circ$  (c 0,36; metanol)

Análisis calculado para  $C_{38}H_{52}N_4O_{11}$ :

C, 61,61%; H, 7,07%; N, 7,56%

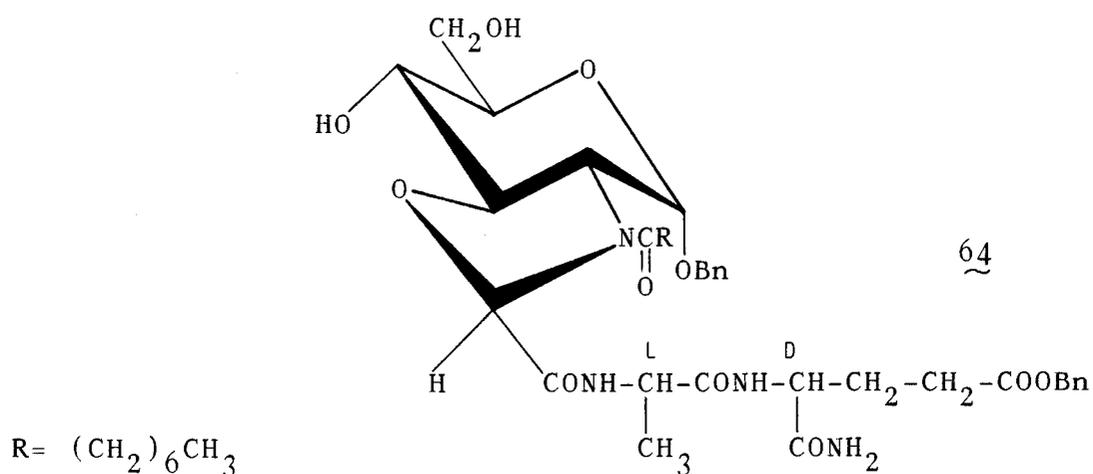
Encontrado:

C, 61,76%; H, 6,65%; N, 7,92%

Espectro de Masas : Tabla 50; Figura 100-A

Espectro IR : Tabla 60; Figura 139-A

III.4.3.9. Ester bencílico de 3-n-octanoil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (64)



A una disolución de 2-metoxicarbonil-3-n-octanoil-(1-O-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (56) (500 mg; 1,07 mmol) en metanol (50 ml) se le adiciona NaOH 1 N (4 ml) y se deja estar a temperatura ambiente 2 horas. Pasado este tiempo se neutraliza con resina catiónica y filtra, lava con metanol y concentra a presión reducida. La sustancia obtenida se disuelve en N,N-dimetilformamida (10 ml) y tetrahidrofurano (20 ml), tras lo cual se enfría en baño de agua-hielo y adiciona N-hidroxisuccinimida (154 mg; 1,34 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (265 mg; 1,28 mmol). La mezcla se mantiene en agitación 20 minutos y se adiciona una disolución de p-toluensulfonato del éster bencí

lico de L-alanil-D-isoglutamina (512 mg; 1,07 mmol) en N,N-dimetilformamida (5 ml), tetrahidrofurano (15 ml) y trietilamina (0,14 ml; 1,07 mmol). Se deja alcanzar la temperatura ambiente en agitación durante una noche y filtra la diciticlohexilurea formada. Con ayuda de una bomba de vacío se concentra a sequedad el filtrado. La sustancia obtenida se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente diclorometano-metanol 15:1. Rendimiento, 501 mg (63%). P.f. 190-192°C (d).  $[\alpha]_D^{20} +70^\circ$  (c 0,35; metanol).

Análisis calculado para  $C_{38}H_{52}N_4O_{11}\frac{1}{2}H_2O$ :

C, 60,87%; H, 7,12%; N, 7,47%

Encontrado:

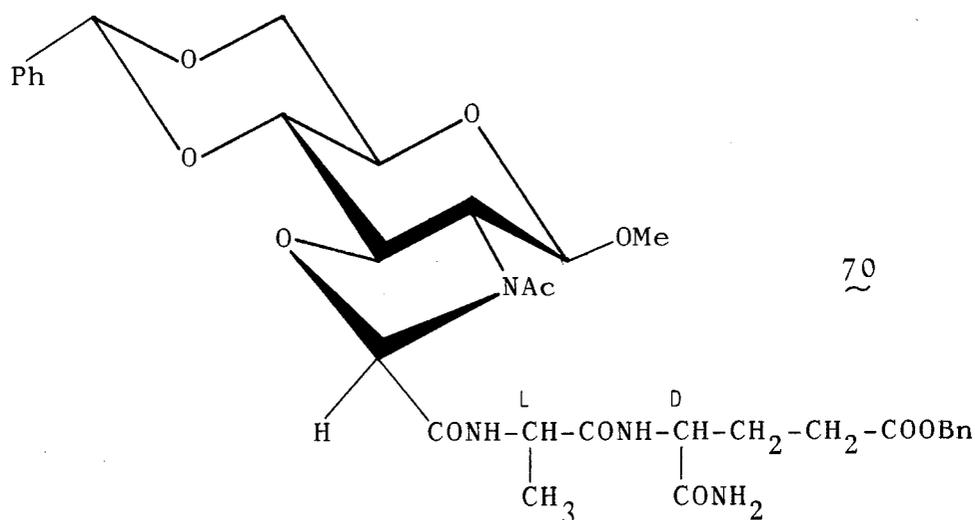
C, 60,56%; H, 7,36%; N, 7,22%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 21; Figuras 54-A y 55-A

Espectro de masas : Tabla 50; Figura 101-A

Espectro IR : Tabla 60; Figura 138-A

III.4.3.10. Ester bencílico de 3-acetil-(4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi-1-O-metil-β-D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (70)



A una disolución de 3-acetil-(4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi-1-O-metil-β-D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (68) (260 mg; 0,66 mmol) en dioxano seco (30 ml) se le adiciona N-hidroxisuccinimida (95 mg; 0,83 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (163 mg; 0,79 mmol). La mezcla se mantiene 30 minutos en agitación, tras lo cual se filtra la dicitolurea formada y lava con dioxano seco (10 ml). Al combinado de filtrados se le adiciona una disolución de p-toluensulfonato del éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina (316 mg; 0,66 mmol) en N,N-dimetilformamida (3 ml), dioxano (10

ml) y trietilamina (0,1 ml; 0,66 mmol). Después de una noche en agitación se adiciona agua destilada en caliente (50 ml) y filtra. La sustancia obtenida se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando diclorometano-metanol 30:1. Rendimiento 344 mg (76%). P.f. 251-252°C (d).  $[\alpha]_D^{20}$  -71° (c 0,41; dimetilsulfóxido).

Análisis calculado para  $C_{33}H_{40}N_4O_{11}$ :

C, 59,27%; H, 6,03%; N, 8,38%

Encontrado:

C, 59,36%; H, 5,92%; N, 8,69%

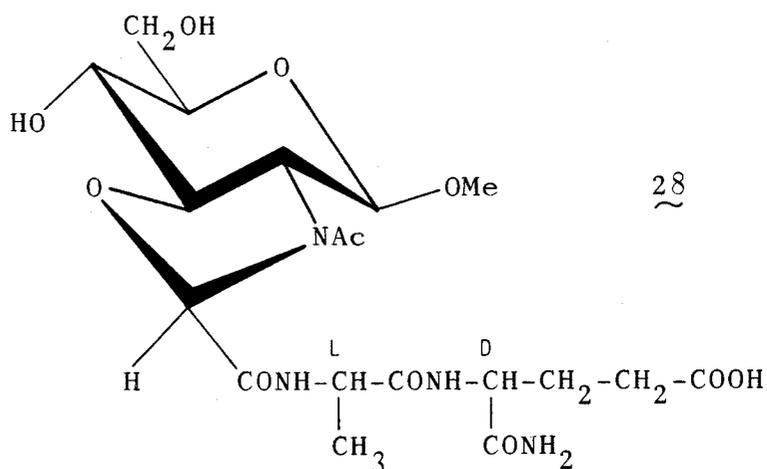
Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 22; Figuras 56-A y 57-A

Espectro de  $^{13}C$ -RMN: Tabla 24; Figura 62-A

Espectro de masas : Tabla 50; Figura 102-A

Espectro IR : Tabla 60; Figura 140-A

III.4.3.11. 3-Acetil-(2,3-didesoxi-1-O-metil-β-D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina  
(28)



Una disolución del éster bencílico de 3-acetil-(4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi-1-O-metil-β-D-glucopirán)--[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (70) (265 mg; 0,4 mmol) en dioxano-metanol 1:1 (150 ml) se hidrogena a una presión de 50 psi en presencia de paladio sobre carbón al 10% (200 mg) durante 24 horas. Se filtra el catalizador, lava con metanol y el combinado de filtrados se lleva a sequedad a presión reducida. La sustancia obtenida se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente diclorometano-metanol 2:1. Rendimiento, 130 mg (67%). P.f. 195-197°C (d).  $[\alpha]_D^{19} -48^\circ$  (c 0,22; metanol).

Análisis calculado para  $C_{19}H_{30}N_4O_{11}$ :

C, 46,52%; H, 6,16%; N, 11,42%

Encontrado:

C, 46,43%; H, 6,32%; N, 11,19%

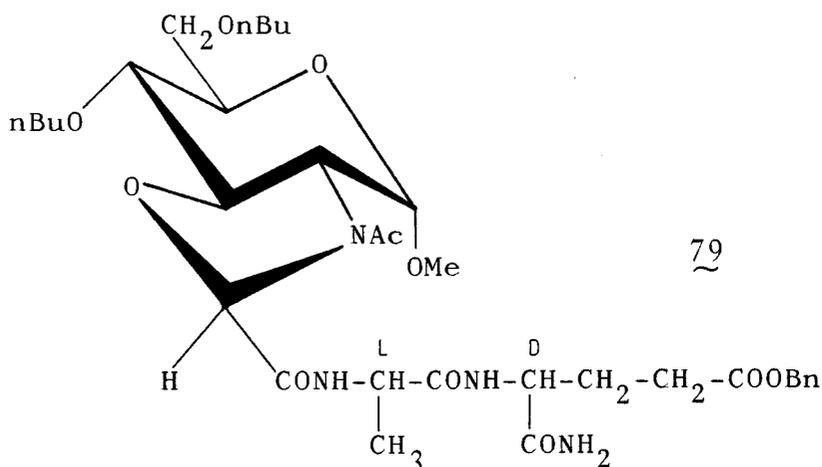
Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 23; Figuras 58-A y 59-A

Espectro de  $^{13}C$ -RMN: Tabla 24; Figura 63-A

Espectro de masas : Tabla 50; Figura 103-A

Espectro IR : Tabla 60; Figura 141-A

III.4.3.12. Ester bencílico de 3-acetil-(4,6-di-O-n-butil-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (79)



A una disolución de 3-acetil-2-metoxicarbonil-(4,6-di-O-n-butil-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)--[2,3-d]-oxazolidina (78) (480 mg; 1,15 mmol) en metanol (25 ml) se le adiciona NaOH 1 N (3 ml) y se deja estar 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se neutraliza con resina catiónica, filtra, lava con metanol y lleva a sequedad con ayuda de vacío. El residuo obtenido se disuelve en dioxano seco (30 ml) y añade N-hidroxisuccinimida (165 mg; 1,44 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (285 mg; 1,38 mmol). La mezcla se mantiene en agitación 30 minutos, filtra y lava con dioxano (10 ml). Al combinado de filtrados se le añade una disolución de p-toluensulfonato del éster bencílico

co de L-alanil-D-isoglutamina (550 mg; 1,15 mmol) en N,N-dimetilformamida (4 ml), dioxano (15 ml) y trietilamina (0,15 ml; 1,15 mmol). Después de una noche en agitación se adiciona agua destilada caliente (50 ml) y filtra el sólido obtenido. Se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando diclorometano-metanol 30:1 como eluyente. Rendimiento, 645 mg (81%). P.f. 191-193°C.  $[\alpha]_D^{19} +31^\circ$  (c 0,54 cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{34}H_{52}N_4O_{11}$ :

C, 58,94%; H, 7,57%; N, 8,09%

Encontrado:

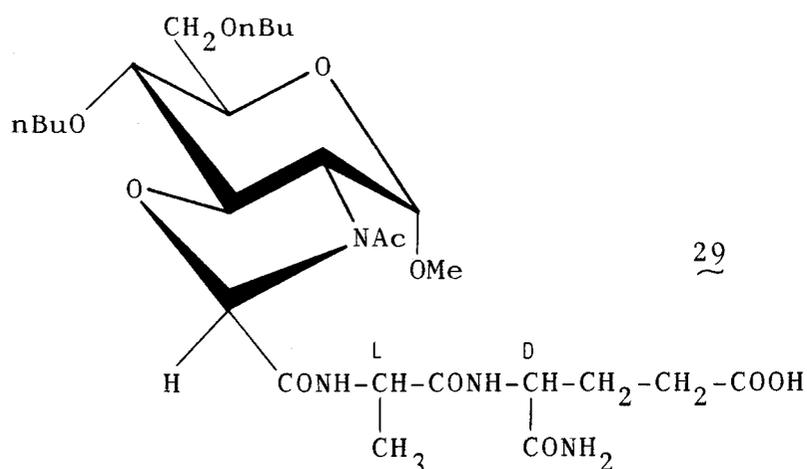
C, 59,08%; H, 7,41%; N, 7,78%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 25; Figura 64-A

Espectro de masas : Tabla 50; Figura 104-A

Espectro IR : Tabla 60; Figura 142-A

III.4.3.13. 3-Acetil-(4,6-di-O-n-butil-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (29)



A una disolución del éster bencílico de 3-acetil-(4,6-di-O-n-butil-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)--[2,3-d]-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (29) (500 mg; 0,72 mmol) en metanol (40 ml) se le añade NaOH 1 N (1 ml) y se deja estar 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se neutraliza con resina catiónica, filtra y lava con metanol. El combinado de filtrados se lleva a sequedad a presión reducida, el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente diclorometano-metanol 10:1. Rendimiento, 225 mg (73%). P.f. 186-188°C.  $[\alpha]_D^{20} +41^\circ$  (c 0,26; cloroformo).

Análisis calculado para  $C_{27}H_{46}N_4O_{11}$ :

C, 53,81%; H, 7,69%; N, 9,30%

Encontrado:

C, 53,58%; H, 8,04%; N, 9,14%

Espectro de  $^1H$ -RMN : Tabla 26; Figura 65-A

Espectro de masas : Tabla 50; Figura 105-A

Espectro IR : Tabla 60; Figura 143-A

#### IV. CONCLUSIONES

PRIMERA. Se describe la síntesis de 3-acetil(n-octanoil, palmitoil)-2-carboxi-(1-O-bencil-4,6-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-[2,3-d]-oxazolidina (37, 38, 39) por reacción de bencil 2-acetamido(octanamido, palmitamido)-4,6-O-bencilidén-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (33, 35, 36) con ácido dicloroacético (Tabla 61).

Por reacción de los ácidos 37, 38 y 39 con diazometano, amoníaco y aminoácidos se han obtenido los correspondientes ésteres metílicos (40, 41, 42) y amidas (43, 44, 45, 46, 47, 48, 49) (Tabla 61).

Asimismo, por condensación de éstos ácidos con el paratoluensulfonato del éster bencílico de la L-alanil-L-isoglutamina y paratoluensulfonato del éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina, se han obtenido los análogos rígidos del MDP totalmente bloqueados (52, 53, 54) (Tabla 61).



SEGUNDA. Se describe la síntesis de 3-acetil-2-carboxi-(4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi-1-0-metil-  $\beta$  (ó  $\alpha$  )-D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (68, 80) por reacción de metil 2-acetamido-4,6-0-bencilidén-2-desoxi- $\beta$  (ó  $\alpha$ )-D-glucopiranosido (68, 72) con ácido dicloroacético (Tabla 62).

Por reacción de éstos ácidos (68, 80) con diazometano y aminoácidos se han obtenido los correspondientes ésteres metílicos (69, 81) y amidas (82) (Tabla 62).

Asimismo, por condensación de 68 con el paratoluen sulfonato del éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina, se ha obtenido otro análogo rígido del MDP totalmente bloqueado (70) (Tabla 62).

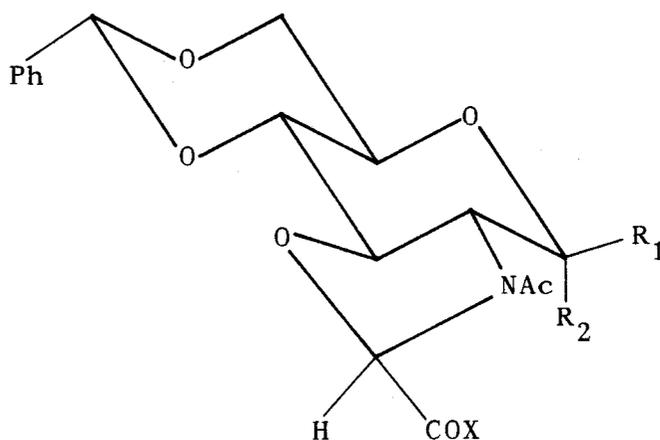


TABLA 62

	R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub>		X		
	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	L-PheEt L-Ala-D-isoGlnBn
68	x			x	x		
80		x	x		x		
69	x			x		x	
81		x	x			x	
82		x	x				x
70	x			x			x

TERCERA. Se describe la síntesis de 3-acetil-2-carboxi-(4,6-di-O-n-butyl-2,3-didesoxi-1-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|oxazolidina (77) por reacción de metil 2-acetamido-4,6-di-O-n-butyl-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (76) con ácido diclo roacético (Tabla 63).

Por reacción de 77 con diazometano, se ha obtenido el correspondiente éster metílico (78) (Tabla 63).

Asimismo, por condensación de 77 con paratoluensulfonato del éster bencílico de L-alanil-D-isoglutamina, se ha obtenido otro análogo rígido del MDP totalmente bloqueado (79) (Tabla 63).

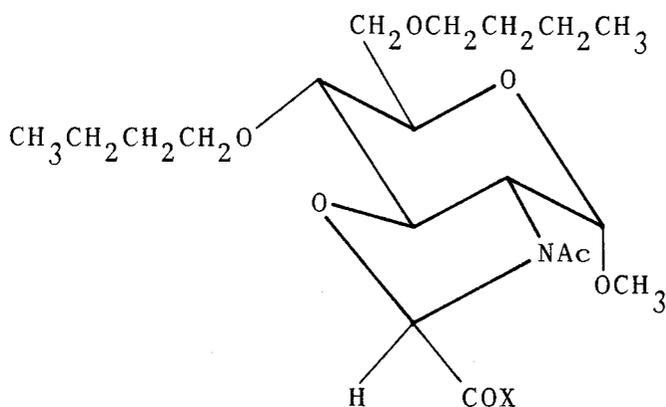


TABLA 63

77	X= OH
78	X= OCH <sub>3</sub>
79	X= L-Ala-D-isoGlnBn

CUARTA. Se ha estudiado la desprotección parcial de sustancias totalmente bloqueadas descritas en las conclusiones anteriores, obteniéndose los 3-acetil(n-octanoil)-2-metoxycarbonil-(1-0-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (55, 56) (Tabla 64) y el derivado del MDP parcialmente bloqueado 65 (Tabla 64).

Asimismo, se describe la síntesis de sustancias parcialmente desbloqueadas a partir de las sustancias 55 y 56, mediante saponificación, seguido de condensación con aminoácido (60) o dipéptidos adecuadamente bloqueados (paratoluensulfonato del éster bencílico de L-alanil-D(ó L)-isoglu-

tamina) (61, 62, 63, 64) (Tabla 64).

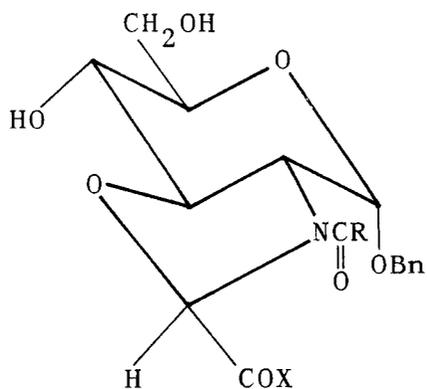


TABLA 64

	R = (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> CH <sub>3</sub>		X				
	n = 0	n = 6	OCH <sub>3</sub>	L-Ala-D-isoGln	L-AlaEt	L-Ala-D-isoGlnBn	L-Ala-L-isoGlnBn
55	x		x				
56		x	x				
65	x			x			
60	x				x		
61	x					x	
62	x						x
63		x					x
64		x				x	

QUINTA. Se ha estudiado la eliminación de todos los grupos protectores presentes en las sustancias descritas anteriormente. Se han obtenido de esta forma los 3-acetil(n-octanoil)-2-metoxicarbonil-(2,3-didesoxi-D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina (58, 59) y los análogos rígidos del MDP: 3-acetil-(2,3-didesoxi-D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (26), 3-acetil-(2,3-didesoxi-1-O-metil-β-D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (28) y 3-acetil-(4,6-di-O-n-butil-2,3-didesoxi-α-D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina (29) (Tabla 65).

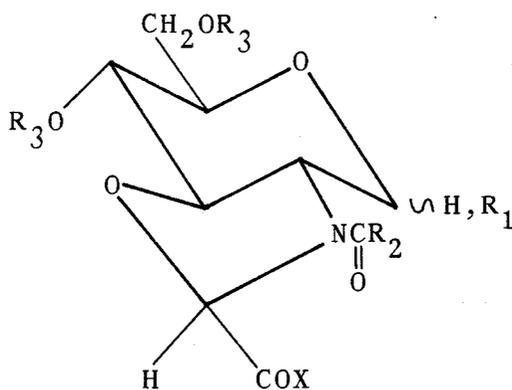


TABLA 65

	R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub> =(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> CH <sub>3</sub>		R <sub>3</sub>	X			
	OH	αOCH <sub>3</sub>	βOCH <sub>3</sub>	n= 0	n= 6	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	L-Ala-D-isoGln
58	x			x		x		x	
59	x				x	x		x	
26	x			x		x			x
28			x	x		x			x
29		x		x			x		x

SEXTA. Se han estudiado los espectros de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN de las sustancias descritas, llegándose a la conclusión de que en la reacción de obtención del anillo de oxazolidina sólo se obtiene uno de los dos diastereoisómeros posibles. Proponiéndose, por razones estereoelectrónicas, la asignación S para el nuevo centro quiral generado. El estudio espectroscópico efectuado confirma las estructuras propuestas.

SEPTIMA. Se ha hecho un amplio estudio de espectrometría de masas por impacto electrónico e ionización química, que comprende estudio de iones metastables y espectrometría de masas de alta resolución, lo que permite proponer los esquemas de fragmentación de las sustancias descritas, así como confirmar las estructuras propuestas.

V. BIBLIOGRAFIA

- 1.- G.Ramon, Bull. Soc. Centr. Med. Vet., 101 (1.925) 227.
- 2.- A. J. Johnson, S. Gaines y M. Landy, J. Exp. Med., 103 (1.956) 225.
- 3.- J. Freund, Ann. Rev. Microbiol., 1 (1.947) 201.
- 4.- J. Freund, J. Casals y E.P.Hosmer, Proc. Soc. Exp. Biol Med., 37 (1.937) 509.
- 5.- R. White, L. Bernstock, R. Johns y E. Lederer, Inmunology, 1 (1.958) 54.
- 6.- Arlette Adam y Edgar Lederer, Medical Research Reviews, 4 Nº 2 (1.984) 111.
- 7.- A. Adam, R. Ciorbaru, J. F. Petit y E. Lederer, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69 (1.972) 851.
- 8.- D. Migliore y P. Jollès, FEBS Lett., 25 (1.973) 301.
- 9.- I. J. Hiu, Nature New. Biol., 238 (1.972) 241.
- 10.- J. Freund, Adv. Tuberc. Res., 7 (1.956) 130.
- 11.- A. Adam, R. Ciorbaru, F. Ellouz, J.F. Petit y E.Lederer, Biochem. Biophys. Res. Commun., 56 (1.974) 561.
- 12.- C. Cauciel, J. Fleck, J. P. Martin y M.Mock, C.R. Acad. Sci., 276 Serie D (1.973) 3.499.
- 13.- F. Ellouz, A. Adam, R. Ciorbaru y E. Lederer, Biochem. Biophys. Res. Commun., 59 (1.974) 1.317.
- 14.- S. Kotani, Y. Watanable, F. Kinoshita, T. Shimono, I. Morisaki, T. Shiba, S. Kusumoto, Y.Tarumi y K. Ikenaka,

- Biken J., 18 (1.975) 105.
- 15.- C. Merser, P. Sinay y A. Adam, Biochem. Biophys. Res. Commun., 66 (1.975) 1.316.
- 16.- S. Kotani, H. Takada, M. Tsujimoto, T. Kubo, T. Ogawa, K. Masumoto, W. A. Siddiki, A. Tanaka, S. Nagao, O. Kohashi, S. Kanoh, T. Shiba y Kusumoto. En: Bacteria and Cancer, J. Jeljaszewics, G. Pulverer and W. Roszkowski (eds.), Academic, 1.982, p.67.
- 17.- H. S. Wawen, F. R. Vogel y L. A. Chedid, Ann. Rev. Immunol., 4 (1.986) 369.
- 18.- C. Lecler, F. Audibert y L. Chedid, Immunology, 35 (1.978) 963.
- 19.- F. Audibert, L. Chedid, P. Lefrancier y J. Choay, Cell. Immunol., 21 (1.976) 243.
- 20.- L. Chedid, F. Audibert, P. Lefrancier, J. Choay y E. Lederer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73 (1.976) 2.472.
- 21.- Irving L. Weissman, Leroy E. Hood y William B. Wood. En: Essential Concepts in Immunology, Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., 1.978. Ed. en Esp.: Inmunología Conceptos Básicos, Alhambra S.A. (ed.), 1.982.
- 22.- R. Bomford, Clin. Exp. Immunol., 39 (1.980) 426.
- 23.- H. Ohkumi, Y. Norose, M. Ohta, M. Hayama, Y. Kimura, M. Tsujimoto, S. Kotani, T. Shiba, S. Kusumoto, K. Yokogawa, S. Kawata, Infect. Immun., 24 (1.979) 313.

- 24.- T. Kishimoto, Y. Hirai, K. Nakanishi, I. Azuma, A. Nagamatsu, Y. Yamamura, J. Immunol., 123 (1.979) 2.709.
- 25.- I. Murisaki, M. S. Michalek, C. C. Harmon, M. Torii, S. Hamada, J. R. McGhee, Infect. Immun., 40 (1.983) 577.
- 26.- J. E. Butler, H. B. Richardson, P. A. Swanson, W. C. Kopp, M.T. Suelzer, Ann. NY Acad. Sci., 409 (1.983) 669
- 27.- J. M. Bernard, H. Gras-Masse, H. Drobecq, A. Tartar, P. Lefrancier, A. Hosmalin, C. Carrelli y L. Chedid, Int. J. Peptide Protein Res., 29 (1.987) 445.
- 28.- F. Audibert, C. Leclerc, L. Chedid. En: Biological Response Modifiers, P. F. Torrence (ed.), 1.981, p.307.
- 29.- R. Bonford, Clin. Exp. Immun., 39 (1.980) 435.
- 30.- K. Masek, M. Zaoral, J. Jezek, R. Straka, Experimentia, 34 (1.978) 1.363.
- 31.- S. Kotani, F. Kinoshita, I. Morisaki, T. Shimono, T. Okunaga, H. Takada, M. Tsujimoto, Y. Watanable, K. Kato, T. Shiba, S. Kusumoto, S. Okada, Biken J., 20 (1.977) 95.
- 32.- C. Leclerc, D. Juy, E. Bourgeois, L. Chedid, Cell. Immunology, 45 (1.979) 199.
- 33.- T. A. Fergusson, M. J. Krieger, A. Pesce y J. G. Michael, Infect Immun., 39 (1.983) 800.

- 34.- C. Lecler, E. Bourgeois y L. Chedid, Eur. J. Immun., 12 (1.982) 249.
- 35.- J. R. Pappenheimer, G. Koski, V. Fenci, M.L. Karnovsky, J. M. Krueger, J. Neurophysiol., 38 (1.975) 1.299.
- 36.- J. M. Krueger, J. R. Pappenheimer y M. L. Karnovsky, J. Biol. Chem., 257 (1.982) 1.664.
- 37.- J. M. Krueger, J. R. Pappenheimer y M. L. Karnovsky Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 (1.982) 6.102.
- 38.- A. Adam, M. Devis, V. Sonvannavog, P. Lefrancier, J. Choay y E. Lederer, Biochem. Biophys. Res. Commun., 72 (1.976) 339.
- 39.- P. Dukor, L. Tarksay y G. Bschang, Ann. Rep. in Med. chem., 14 (1.979) 146.
- 40.- S. Kotani, Y. Watanable, T. Shimono, K. Harada, T. Shiba, S. Kusumoto, K. Yokogawa y M. Taniguchi, Biken J., 19 (1.976) 9.
- 41.- Akira Hasegawa, Yuichi Hioki y Makoto Kiso, J. Carbohydrate Chemistry, 1(3) (1.982) 317.
- 42.- Akira Hasegawa, Yuichi Hioki y Makoto Kiso, Carbohydrate Research, 123 (1.983) 183.
- 43.- Akira Hasegawa, Eiji Seki, Yuichi Hioki y Makoto Kiso, Carb. Research, 131 (1.984) 61.

- 44.- Akira Hasegawa, Masakito Ozaki y Makoto Kiso, Carb. Chemistry, 3(2) (1.984) 331.
- 45.- Akira Hasegawa y Makoto Kiso, Carb. Res., 122 (1.983) 99.
- 46.- Ana Calvo-Mateo, María José Camarasa y Federico G. de las Heras, Tetrahedron, 42 (1.986) 4.049.
- 47.- Ana Calvo-Mateo y Federico de las Heras, Carb. Res., 115 (1.986) 226.
- 48.- Akira Hasegawa, Eiji Tanahashi y Makoto Kiso, Carb. Res 103 (1.982) 251.
- 49.- A. Hasegawa, H. Okumura, M. Kiso, I. Azuma, Y. Yamamura Carb. Res., 79 (1.980) c20.
- 50.- A. Hasegawa, H. Okumura, M.Kiso, I. Azuma y Y. Yamamura Agric. Chem., 44(6) (1.980) 1.309.
- 51.- Y. Nagai, K. Akiyama, S. Kotani, Y. Watanable, T. Shimo no, T. Shiba y S.Kusumoto, Cell. Immun., 35 (1.978) 168
- 52.- Mitree M. Pompipom y Kathleen M. Rupprecht, Carb. Res., 113 (1.983) 57.
- 53.- Akira Hasegawa, Y. Hioki y M. Kiso, Carb. Res., 123 (1.983) 63.
- 54.- Akira Hasegawa y Hiroyuki Okumura, Carb. Res., 97 (1.981) 337.

- 55.- Akira Hasegawa, Yoshini Kaneda, Yasuhiko Goh, K. Nishibori y M. Kiso, Carb. Res., 94 (1.981) 143.
- 56.- Hiroyuki Okumura, Yasuo Tokushima, Ikuo Saki, Ichiro Azuma, Makoto Kiso y Akira Hasegawa, Carb. Res., 122 (1.983) 87.
- 57.- Philippe L. Durette, Conrad P. Dorn, T. Y. Shen, Carb. Res., 108 (1.982) 139.
- 58.- Akira Hasegawa, Eiji Tanahashi, Yasuhico Goh, Makoto Kiso, Carb. Res., 92 (1.981) 75.
- 59.- M. Kiso, Y. Kaneda, Y. Goh, A. Hasegawa y I. Azuma, Agric. Biol. Chem., 44 (1.980) 1.971.
- 60.- A. Hasegawa, Y. Kaneda, M. Mano, M. Kiso y I. Azuma, Agric. Biol. Chem., 42 (1.978) 2.187.
- 61.- A. Hasegawa, Eiji Tanahashi, Yasuhiko Goh, Makoto Kiso, Carb. Res., 103 (1.982) 263.
- 62.- I. Azuma, K. Sugimura, M. Yamawaki, M. Vemiya, S. Kusumoto, S. Okada, T. Shiba y Y. Yamamura, Infect. Immun., 20 (1.978) 600.
- 63.- T. Shiba, S. Okada, S. Kusumoto, I. Azuma y Y. Yamamura Bull Chem. Soc. Jpn., 51 (1.978) 3.307.
- 64.- M. Vemiya, K. Sugimura, T. Kusama, I. Saiki, M. Yamawaki, I. Azuma y Y. Yamamura, Infect. Immun., 24 (1.979) 83.

- 65.- M. Inage, M. Imoto; Y. Kambayashi, S. Kusumoto y T. Shiba, Tetrahed. Lett., 21 (1.980) 3.767.
- 66.- S. Kusumoto, M. Inage, T. Shiba, I. Azuma y Y. Yamamura Tetrahed. Lett., 49 (1.978) 4.899.
- 67.- H. Okumura, K. Kamisango, I. Saiki, Y. Tanio, I. Azuma, M. Kiso, A. Hasegawa y Y. Yamamura, Agric. Biol. Chem., 46 (1.982) 507.
- 68.- Makoto Kiso, Yasuhiko Goh, Eiji Tanahashi, Akira Hasegawa, Carb. Res., 90 (1.981) c8.
- 69.- S. Kobayashi, T. Fukuda, I. Imada, M. Fujino, I. Azuma y Y. Yamamura, Chem. Pharm. Bull., 27 (1.979) 3.193.
- 70.- Masahiro Imoto, S. Kageyama, S. Kusumoto, M. Kohono, K. Matsumoto, S. Hashimoto, A. Tohgo y T. Shiba, Bull. Chem. Soc. Jpn., 59 (1.986) 3.207.
- 71.- P. Lefrancier, M. Petitou, M. Level, M. Derrien, J. Choay y E. Lederer, Int. J. Pep. Protein Res., 14 (1.979) 437.
- 72.- M. Parant, F. Audibert, L. Chedid, M. Level, P. Lefrancier, J. Choay y E. Lederer, Infect. Immun., 27 (1.980) 826.
- 73.- C. Carelli, F. Audibert y L. Chedid, Infect. Immun., 33 (1.981) 312.

- 74.- M. Vemiya, I. Saiki, T. Kusama, I. Azuma y Y. Yamamura, Microbiol. Immun., 23 (1.979) 821.
- 75.- K. Matsumoto, T. Otani, T. Une, Y. Osada, H. Ogawa y I. Azuma, Infect. Immunol., 39 (1.983) 1.029.
- 76.- W. Sackmann y F. M. Dietrich, Inc. Current. Chemoter. Immunother Am. Soc. Microbiol., 2 (1.981) 1.162.
- 77.- Jean Pierre Tenu, Jean Marie Bernard, Jean Francois Petit, Nigel Philips. (Agence Nationale de Valorisation de la Recherche) Fr.Demande FR 2,551,758 (Cl. C07H9/00) 15 Mar 1.985, Appl. 83/13,333, 16 Aug 1.983; 25pp.
- 78.- Edward S. Golub. En: The Cellular Basis of the Immune Response. An Approach to immunology, Sinauer Associates Inc Sunderland (eds.), Massachusetts. Ed. en Esp.: Base Celular de la Respuesta Inmunológica, Reverté S.A. (ed) 1.987.
- 79.- Todd-Sanford-Davidsohn. En: Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, John Bernard Henry (ed) W.B.Saunders Company, Filadelfia (17ª ed). Ed. en Esp.: Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio, Salvat Editores S.A., 1.984.
- 80.- Sir Macfarlane Burnet, G. J. V. Nossal, R. R. Porter, G.M. Edelman, J. D. Capra, A. B. Edmunson, P. Leder, N. K. Jerne, etc., Inmunología, Libros de Investigación y Ciencia; Ed. Labor S.A., 1.983, Barcelona.

- 81.- Arthur C. Guyton. En: Textbook of Medical Physiology, W. B. Saunders Company (ed.). Ed. Esp.: Tratado de Fisiología Médica, Emalsa S.A. (ed.), 1.984, Madrid.
- 82.- Manuel Litter. En: Compendio de Farmacología, El Ateneo (ed.), 1.980.
- 83.- Y. Inouye, K. Onodera, S. Kitaoka y S. Kiriki, Chem. Abstracts, 50 (1.956) 10.656.
- 84.- M. L. Shulman y A. Y. Khorlin, Carb. Res., 27 (1.973) 141.
- 85.- Gross y Jeanloz, J. Org. Chem., 32 (1.976) 2.759.
- 86.- J. M. Fernández-Bolaños, J. M. Vega y F.J. Ruiz, Grasas y Aceites, 36 (1.985) 321.
- 87.- John C. Sheema y George P. Hess, J. Am. Chem. Soc., 77 (1.955) 1.067.
- 88.- D. F. Elliot y D. W. Russell, Biochem. J., 66 (1.957) 498.
- 89.- George W. Anderson, Joan E. Zimmerman y Francis M. Callahan, J. Am. Chem. Soc., 86 (1.964) 1.839.
- 90.- A. B. Foster, D. Horton, N. Salim, M. Stacey y M. Webber, J. Chem. Soc., (1,960) 2.557.
- 91.- H. Masamune, T. Okuyama y H. Sinohara, Tohoku J. Exptl. Med., 68 (1.958) 181.

- 92.- H. M. Flowers y R.W. Jeanloz, J. Org. Chem., 28 (1.963)  
1.564.
- 93.- H. Günter. En NMR Spectroscopy. John Wiley and Sons  
(eds.). 1.980.
- 94.- W. E. Stewart, T. H. Siddall, Chemical Reviews, 70  
(1.970) 517.
- 95.- L. A. LaPlanche, M. T. Rogers, J. Amer. Chem. Soc., 85  
(1.963) 3.728.
- 96.- G. C. Levy y G. L. Nelson. En: Carbon-13 Nuclear Magnetic  
Resonance for Organic Chemists. John Wiley and Sons  
(eds). 1.972. Ed. Esp: Resonancia Magnética Nuclear de  
Carbono-13. Bellaterra S. A. (eds). 1.976.
- 97.- G. C. Levy y G.L. Nelson, J. Am. Chem. Soc., 94 (1.972)  
4.897.
- 98.- D. E. Dorman, F. A. Bovey, J.Org. Chem., 38 (1.973)  
1.719.
- 99.- D. A. Torchia, J. R. Lyerla, C. M. Deber, J. Am. Chem.  
Soc. 96 (1.974) 5.009.
- 100.- H.O. Kalinowski, W. Lubosch y D. Seebach, Chem. Ber.110  
(1.977) 3.733.
- 101.- Eberhard Breitmaier, Wolfgang Voelter. En: Carbon-13  
NMR Spectroscopy. VCH Publishers (eds). (1.987).

- 102.- B. F. Sagar, J. Chem. Soc., (1.967) 428.
- 103.- Serge Femandjan, Bruno perly, Michel Level y Pierre le francier, Carb. Res., 162 (1.987) 23.
- 104.- Klaus Bock y Christian Pedersen, Advances in Carb. Chem and Biochem., 41 (1.983) 27.
- 105.- Klaus Bock y Henning Thogersen, Ann. Reports NMR spec., 13 (1.982) 1.
- 106.- A. Delbarre, D. Migliore-Samour, G. H. Werner, B. P. Roques y P. Jolles, Eur J. Biochem., 118 (1.981) 355.
- 107.- Timothy D. J. Halls, Muppala S. Raju, Ernest Wenkert, Martin Zuber, Pierre Lefrancier y Edgar Lederer, Carb. Research, 81 (1.980) 173.
- 108.- A. S. Shashkov, A. Y. Evstigneev y V. A. Derevitskaya, Bioorg. Khim., 4 No.11 (1.974) 1.495.
- 109.- Joan T. Bursey, Maurice M. Bursey y David G. I. Kingston, Chemical Reviews, 73 No.3 (1.973) 191.
- 110.- O. S. Chizhov, L. S. Gulovkina y N. S. Wulfson, Carb. Res., 6 (1.968) 138.
- 111.- J. Seibl. En: Massenspektrometrie, Akademische Verlagsgesellschaft (eds) Francfort del Main, 1.970. Ed. Esp: Espectrometría de masas, Editorial Alhambra S. A., 1.973.

- 112.- J. R. Jocelyn Paré, Kvizystof Jan Kowsky y John W. Apsimon, Advances in Heterocyclic Chem., 42 (1.987) 335.
- 113.- David G. I. Kingston, Brice W. Hobrock, Maurice M. Bursey y Joan T. Bursey, Chem. Reviews, 75 No.6 (1.975) 693.
- 114.- N. K. Kochetkov y O. S. Chizhov, Methods in Carb. Chem. Vol VI (94) 541. (1.972)
- 115.- Samuel G. Zeller, Anello J. D'Ambra, Michael J. Rice y Gary R. Gray, Carb. Res., 182 (1.988) 53.
- 116.- L. Muroder, A. Hallett, E. Wuensch, O. Keller y G. Wersin, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357 (1.976) 1.651.
- 117.- S. Guttmann y R. A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta, 41 (1.958) 1.852.
- 118.- E. Schröder y E. Klieger, Ann. Chem., 673 (1.964) 196
- 119.- P. Lefrancier y E. Bricas, Bull Soc. Chim. Biol., 49 (1.967) 1.257.
- 120.- Schoichi Kusumoto, Yuzo Tarumi, Kazuiro Ikenaka y Tet-suo Shiba, Bull. Chem. Soc. Japam, 49 No.2 (1.976) 533.
- 121.- L. R. Phillips, O. Nishimura y B. A. Fraser, Carb. Res., 132 (1.984) 275.
- 122.- P. Sizun, B. Perly, M. Level, P. Lefrancier y S. Ferman djian, Tetrahedron, 44 (3) (1.988) 991.

VI. INDICE

I.	<u>INTRODUCCION</u> .....	1
II.	<u>PARTE TEORICA</u> .....	9
II.1.	CONCEPTOS BASICOS DE INMUNOLOGIA .....	11
II.2.	ANTECEDENTES .....	21
II.2.1.	ACTIVIDAD BIOLOGICA .....	27
II.2.1.1.	INDUCCION DE INMUNIDAD HUMORAL .....	28
II.2.1.2.	INDUCCION DE INMUNIDAD CELULAR .....	32
II.2.1.3.	MECANISMO DE ACCION .....	33
II.2.1.4.	OTRAS CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS .....	34
II.2.2.	RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD .....	37
II.2.2.1.	MODIFICACIONES EN LA CADENA LATERAL .....	39
II.2.2.2.	MODIFICACIONES EN LA FRACCION DE AZUCAR .....	41
II.2.2.3.	DERIVADOS LIPOFILICOS .....	46
II.3.	OBJETIVOS: SINTESIS Y CARACTERIZACION DE ANALOGOS RIGIDOS DEL MDP .....	55
II.3.1.	OBJETIVOS .....	55
II.3.2.	SINTESIS DE LOS DERIVADOS RIGIDOS DEL MDP ...	65
II.3.3.	CARACTERIZACION POR ESPECTROSCOPIA DE RMN ...	99
II.3.4.	CARACTERIZACION POR ESPECTROMETRIA DE MASAS .	191
II.3.4.1.	SUSTANCIAS TOTALMENTE PROTEGIDAS .....	192
II.3.4.2.	SUSTANCIAS DESBENZALADAS .....	231
II.3.4.3.	ESTERES METILICOS DESBLOQUEADOS .....	269

II.3.4.4.	DERIVADOS RIGIDOS DEL MDP .....	277
II.3.5.	CARACTERIZACION POR ESPECTROFOTOMETRIA	
	INFRARROJA .....	285
III.	<u>PARTE EXPERIMENTAL</u> .....	295
III.1.	METODOS GENERALES .....	297
III.2.	SUSTANCIAS COMERCIALES .....	301
III.3.	SUSTANCIAS DE PARTIDA PARA LA SINTESIS DE	
	LOS COMPUESTOS DESCRITOS EN ESTA TESIS .....	302
III.3.1.	SUSTANCIAS DESCRITAS EN LA BIBLIOGRAFIA .....	302
III.3.2.	<u>SUSTANCIAS DE PARTIDA NO DESCRITAS</u>	
	<u>ANTERIORMENTE</u> .....	305
III.3.2.1.	Metil 2-acetamido-3-O-bencil-4,6-di-O-n-	
	-butil-2-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido .....	307
III.3.2.2.	Metil 2-acetamido-4,6-di-O-n-butil-2-desoxi-	
	- $\alpha$ -D-glucopiranosido .....	308
III.4.	<u>SINTESIS DE LOS COMPUESTOS OBJETO DE ESTA</u>	
	<u>TESIS</u> .....	309
III.4.1.	<u>SINTESIS DE ANALOGOS RIGIDOS DEL ACIDO MURA-</u>	
	<u>MICO: FORMACION DEL ANILLO DE OXAZOLIDINA</u> ...	311
III.4.1.1.	3-Acetil-2-carboxi-(1-O-bencil-4,6-O-benci-	
	lidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)- 2,3-d -	
	-oxazolidina .....	313
III.4.1.2.	3-Acetil-2-metoxicarbonil-(1-O-bencil-4,6-	
	-O-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-	
	- 2,3-d -oxazolidina .....	315

- III.4.1.3. 2-Carboxi-3-n-octanoil-(1-0-bencil-4,6-0-  
-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-  
-|2,3-d|-oxazolidina ..... 317
- III.4.1.4. 2-Metoxicarbonil-3-n-octanoil-(1-0-bencil-  
-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopi-  
rán)-|2,3-d|-oxazolidina ..... 319
- III.4.1.5. 2-Metoxicarbonil-3-palmitoil-(1-0-bencil-  
-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopi-  
rán)-|2,3-d|-oxazolidina ..... 321
- III.4.1.6. 3-Acetil-2-metoxicarbonil-(4,6-0-bencilidén-  
-2,3-didesoxi-1-0-metil- $\beta$ -D-glucopirán)-  
-|2,3-d|-oxazolidina ..... 323
- III.4.1.7. 3-Acetil-2-metoxicarbonil-(4,6-0-bencilidén-  
-2,3-didesoxi-1-0-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-  
-|2,3-d|-oxazolidina ..... 325
- III.4.1.8. 3-Acetil-2-metoxicarbonil-(4,6-di-0-n-butyl-  
-2,3-didesoxi-1-0-metil- $\alpha$ -D-glucopiranósido)-  
-|2,3-d|-oxazolidina ..... 327
- III.4.1.9. 3-Acetil-2-metoxicarbonil-(1-0-bencil-2,3-  
-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina 329
- III.4.1.10. 3-Acetil-2-metoxicarbonil-(2,3-didesoxi-D-  
glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidina ..... 331
- III.4.1.11. 3-Acetil-2-metoxicarbonil-(1-0-bencil-4,6-  
-di-0-benzoil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-  
-|2,3-d|-oxazolidina ..... 333

III.4.1.12.	2-Metoxicarbonil-3-n-octanoil-(1-0-bencil- -2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)- 2,3-d -oxa- zolidina .....	335
III.4.1.13.	2-Metoxicarbonil-3-n-octanoil-(2,3-didesoxi- -D-glucopirán)- 2,3-d -oxazolidina .....	337
III.4.2.	<u>CONDENSACION DE ANALOGOS RIGIDOS DEL ACIDO</u> <u>MURAMICO CON AMONIACO Y AMINOACIDOS</u> .....	339
III.4.2.1.	3-Acetil-2-carboxamido-(1-0-bencil-4,6-0- -bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)- - 2,3-d -oxazolidina .....	341
III.4.2.2.	Ester etílico de 3-acetil-(1-0-bencil-4,6-0- -bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)- - 2,3-d -oxazolidín-2-carbonilglicina .....	343
III.4.2.3.	3-Acetil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3- -didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)- 2,3-d -oxazoli- dín-2-carbonilglicina .....	345
III.4.2.4.	Ester etílico de 3-acetil-(1-0-bencil-4,6-0- benciliden-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)- - 2,3-d -oxazolidín-2-carbonil-L-alanina ....	347
III.4.2.5.	Ester etílico de 3-acetil-(1-0-bencil-4,6-0- -bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)- - 2,3-d -oxazolidín-2-carbonil-L-valina .....	349
III.4.2.6.	Ester etílico de 3-acetil-(1-0-bencil-4,6-0- -bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)- - 2,3-d -oxazolidín-2-carbonil-L-fenilalanina	351

- III.4.2.7. Ester etílico de 3-acetil-(1-0-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanina ..... 353
- III.4.2.8. Ester etílico de 3-n-octanoil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonilglicina ... 355
- III.4.2.9. Ester etílico de 3-n-octanoil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanina 357
- III.4.2.10. 3-n-Octanoil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanina ..... 359
- III.4.2.11. Ester etílico de 3-acetil-(4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi-1-0-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-fenilalanina 361
- III.4.3 ANALOGOS RIGIDOS DEL MURAMOIL-DIPEPTIDO ..... 363
- III.4.3.1. Ester bencílico de 3-acetil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-L-isoglutamina ..... 365
- III.4.3.2. Ester bencílico de 3-acetil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina ..... 367
- III.4.3.3. Ester bencílico de 3-acetil-(1-0-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)-|2,3-d|-oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-L-isoglutamina ..... 369

III.4.3.4.	Ester bencílico de 3-acetil-(1-0-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)- 2,3-d -oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina . . . . .	371
III.4.3.5.	3-Acetil-(1-0-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)- 2,3-d -oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina . . . . .	373
III.4.3.6.	3-Acetil-(2,3-didesoxi-D-glucopirán)- 2,3-d -2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina . . . . .	375
III.4.3.7.	Ester bencílico de 3-n-octanoil-(1-0-bencil-4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)- 2,3-d -oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina . . . . .	377
III.4.3.8.	Ester bencílico de 3-n-octanoil-(1-0-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)- 2,3-d -oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-L-isoglutamina . . . . .	381
III.4.3.9.	Ester bencílico de 3-n-octanoil-(1-0-bencil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopirán)- 2,3-d -oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina . . . . .	383
III.4.3.10.	Ester bencílico de 3-acetil-(4,6-0-bencilidén-2,3-didesoxi-1-0-metil- $\beta$ -D-glucopirán)- 2,3-d -oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina . . . . .	385
III.4.3.11.	3-acetil-(2,3-didesoxi-1-0-metil- $\beta$ -D-glucopirán)- 2,3-d -oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina . . . . .	387

III.4.3.12.	Ester bencílico de 3-acet 1-(4,6-di-0-n-butil-2,3-didesoxi-1-0-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)- 2,3-d -oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina .....	389
III.4.3.13.	3-Acetil-(4,6-di-0-n-butil-2,3-didesoxi-1-0-metil- $\alpha$ -D-glucopirán)- 2,3-d -oxazolidín-2-carbonil-L-alanil-D-isoglutamina .....	391
IV.	<u>CONCLUSIONES</u> .....	393
V.	<u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	403

UNIVERSIDAD DE BURGOS

Reunido el Consejo de Gobierno de la Universidad de Burgos el día de hoy, se ha acordado la aprobación de  
D. Francisco José Ruiz Rodríguez  
titulado "Inmunocoadyuvantes. Síntesis de análogos  
rijidos del - - - (MDP)"

Apto "un anulo"

12

Junio

1990

El Viced.

~~Francisco José Ruiz Rodríguez~~

~~Mauricio~~

~~Francisco~~

~~Francisco~~

~~Francisco~~