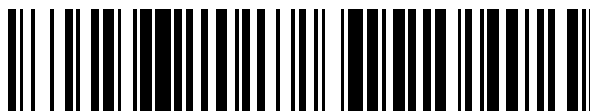


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 760**

51 Int. Cl.:

A01N 57/24 (2006.01)

C07F 9/09 (2006.01)

C07F 9/40 (2006.01)

C07H 11/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2012 E 12718320 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2701514**

54 Título: **Modificación de los niveles de trehalosa-6-fosfato en las plantas**

30 Prioridad:

26.04.2011 GB 201107031

05.08.2011 GB 201113642

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.07.2015

73 Titular/es:

**ISIS INNOVATION LIMITED (100.0%)
Ewert House Ewert Place, Summertown
Oxford, Oxfordshire OX2 7SG, GB**

72 Inventor/es:

**SAGAR, RAM;
PRIMAVESI, LUCIA F.;
PAUL, MATTHEW J. y
DAVIS, BENJAMIN G.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 541 760 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modificación de los niveles de trehalosa-6-fosfato en las plantas

La invención se refiere a compuestos que son precursores fotolábiles de trehalosa-6-fosfato y de trehalosa-6-fosfonato, y sales de los mismos, así como composiciones que contienen los compuestos, procedimientos de tratamiento de las plantas con los compuestos y el uso de los compuestos para aumentar la producción de almidón en las plantas.

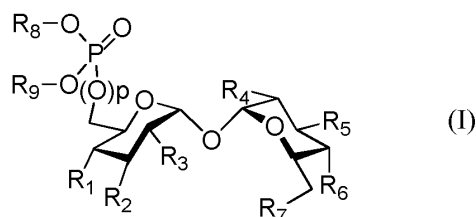
La trehalosa-6-fosfato es una molécula de señalización de azúcar en las plantas y tiene efectos significativos sobre el metabolismo, el crecimiento y el desarrollo. En la mayoría de las plantas, la trehalosa se encuentra en cantidades micromolares, al contrario que la sacarosa que está presente en cantidades milimolares. Esto ha sugerido que la ruta de la trehalosa está involucrada en los mecanismos de transducción de señal en las plantas. Esta sugerencia se ha confirmado además en diversas plantas mutantes y transgénicas.

Se sabe que una pareja de señalización de trehalosa-6-fosfato es la SnRK1 del grupo AMPK/SNF1 de las proteína-kinasas. Un modelo para la función de la trehalosa-6-fosfato es que la trehalosa-6-fosfato responde al suministro de sacarosa y, a través de la inhibición de la SnRK1, aumenta los procesos asociados con el crecimiento, ligando así la sacarosa con los procesos aguas abajo que utilizan carbono. La trehalosa-6-fosfato tiene, por tanto, efectos potentes y beneficiosos sobre los procesos de las plantas, en particular, la regulación de la utilización del azúcar y el metabolismo del almidón. La importancia de la trehalosa-6-fosfato en la regulación del metabolismo y el desarrollo de las plantas hace de ella una diana significativa para la modificación del rendimiento del cultivo.

Se han utilizado, previamente, enfoques genéticos (véase, p. ej., WO 97/42326) para modificar la ruta de la trehalosa. Por ejemplo, se ha sugerido que las plantas transgénicas sobreexpresan la trehalosa fosfato sintasa (TPS), dando como resultado la formación de más trehalosa-6-fosfato en la planta. Sin embargo, tales técnicas genéticas tienen desventajas significativas y no son totalmente aceptables.

Los autores de la presente invención, por el contrario, han proporcionado un enfoque de una intervención química para aumentar la concentración de la trehalosa-6-fosfato o de la trehalosa-6-fosfonato en las plantas. Los autores de la presente invención han utilizado un concepto de tipo profármaco para proporcionar compuestos que son por sí mismos típicamente biológicamente inertes, pero que se transforman en las plantas en trehalosa-6-fosfato o trehalosa-6-fosfonato activas. La transformación en trehalosa-6-fosfato o trehalosa-6-fosfonato en la planta se logra mediante fotoescisión, bien utilizando radiación aplicada o luz solar. El tratamiento de las plantas con los compuestos de la invención se ha demostrado que causa la liberación de trehalosa-6-fosfato o trehalosa-6-fosfonato en la planta y lleva a un aumento de la producción de almidón.

En consecuencia, la presente invención proporciona el uso de un compuesto que es un precursor de la trehalosa-6-fosfato o de la trehalosa-6-fosfonato de fórmula (I) o una sal de las mismas agrícolamente aceptable, en el aumento de la producción de almidón en una planta:



en la que:

p es 0 o 1;

R₁ a R₇ representan independientemente F, N₃, NR'R'', alquilo C₁₋₄, -(alquilo C₁₋₄)OH u OH,

en donde R' y R'' representan independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₄;

y R₈ y R₉ son iguales o diferentes y representan H o un grupo protector fotolábil, en donde al menos uno de R₈ y R₉ representa un grupo protector fotolábil.

La presente invención proporciona también un compuesto que es un precursor de fórmula (I) de trehalosa-6-fosfato o trehalosa-6-fosfonato como se define en el presente documento o una sal del mismo agrícolamente aceptable.

También proporciona una composición que comprende un compuesto de este tipo junto con un portador o diluyente agrícolamente aceptable, así como el uso de un compuesto o composición de este tipo en el aumento del rendimiento del cultivo. Los compuestos y composiciones de la invención son útiles también en la reducción de la incidencia de la germinación previa a la cosecha de un cultivo.

La presente invención proporciona también un procedimiento de aumentar la producción de almidón en una planta, cuyo procedimiento comprende el tratamiento de la planta o del locus de la planta con una cantidad eficaz de un compuesto o composición de la invención. También se proporciona un procedimiento de aumentar el rendimiento del cultivo, cuyo procedimiento comprende el tratamiento del cultivo o del locus del cultivo con una cantidad eficaz de un compuesto o una composición según la invención. También se proporciona un procedimiento de reducir la incidencia de la germinación previa a la cosecha de un cultivo, cuyo procedimiento comprende el tratamiento del cultivo, típicamente la parte cosechable del cultivo, o el locus del cultivo con una cantidad eficaz de un compuesto o una composición según la invención.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 proporciona los resultados de un ensayo con la SnRK1 llevado a cabo utilizando los Ejemplos 1 a 4 así como trehalosa-6-fosfato para comparación.

La Figura 2 muestra el espectro de P-NMR del Ejemplo 1 durante el curso de desprotección para eliminar los grupos fotolábiles.

La Figura 3 muestra la actividad de inhibición de la SnRK1 de la trehalosa-6-fosfato generada por la desprotección de un compuesto de la invención, en comparación con la trehalosa-6-fosfato.

La Figura 4 proporciona una curva de calibrado para trehalosa-6-fosfato utilizando 2DG6P como patrón interno.

La Figura 5 muestra cromatogramas generados de acuerdo con Ejemplo 9 de más adelante. La integración de las áreas de los picos se usó para determinar la concentración de T6P en la planta.

La Figura 6 muestra el efecto de un compuesto de la invención sobre los niveles de almidón en una planta.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento un grupo o resto alquilo C_{1-4} es un grupo o resto alquilo, lineal o ramificado, que contiene de 1 a 4 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 2 átomos de carbono. Ejemplos de tales grupos incluyen grupos y restos metilo, etilo, n-propilo e i-propilo. Un grupo o resto alquilo está no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes, típicamente 1, 2 o 3 sustituyentes, preferentemente 1 o 2 sustituyentes. Sustituyentes adecuados son los átomos de halógeno. Típicamente, los grupos y restos alquílicos son no sustituidos.

Como se usa en el presente documento, halógeno incluye flúor, cloro y bromo.

Como se usa en el presente documento, un grupo arilo incluye fenilo y naftilo.

Como se usa en el presente documento, un grupo heterociclo es un sistema de anillo saturado, parcialmente insaturado o insaturado, monocíclico o condensado, de 5 a 14 miembros en el que el anillo contiene al menos 1 heteroátomo. Típicamente, el grupo heterociclo está insaturado o parcialmente insaturado, por ejemplo puede estar insaturado. Típicamente, el anillo contiene hasta 3 o 4 heteroátomos, p. ej., 1 o 2 heteroátomos, seleccionados de O, S y N. Ejemplos de grupos heterociclos adecuados incluyen piridilo, furanilo, pirrolilo, tiofenilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, pirazolilo, imidazolilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, indolilo, indolinilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, benzimidazolilo, benzoxazolilo, benzopirazolilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, quinolinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, carbazolilo, dibenzofuranilo y 9H-tioxanteno. Ejemplos preferidos incluyen dibenzofuranilo, quinolinilo, indolinilo, y 9H-tioxanteno. En un aspecto, el grupo heterociclo puede ser un sistema de anillo de 5 o 6 miembros, saturado o parcialmente insaturado. Ejemplos de grupos heterociclos adecuados de 5 o 6 miembros, saturados o parcialmente insaturados, incluyen tetrahidrofuranilo, 1,3-dioxolanilo, pirrolidinilo, 1,3-dioxolilo, dihidrofuranilo, imidazolilo, dihidropirrolilo, dihidropiranilo y tetrahidropiperidinilo. Los preferidos son tetrahidrofuranilo, 1,3-dioxolanilo, dihidrofuranilo y 1,3-dioxolilo.

Un grupo arilo o heterociclo como se usa en el presente documento puede ser un grupo arilo o un grupo heterociclo de 5 a 14 miembros que tiene 1 o 2 átomos de carbono en el anillo que están reemplazados con un grupo $>C(=O)$. Ejemplos de tales grupos arilo y heterociclo incluyen cumarinilo y antracen-9,10-dionilo.

Un grupo arilo o un grupo heterociclo pueden estar no sustituidos o sustituidos. En el caso de un grupo heterociclo, los sustituyentes pueden ser transportados por un átomo de carbono en el anillo o por un heteroátomo en el anillo. Típicamente, un grupo heterociclo o arilo lleva hasta 3 sustituyentes, p. ej., 1 o 2 sustituyentes. El heterociclo puede estar conectado al resto de la molécula mediante un enlace en cualquiera de las posiciones disponibles del anillo.

Sustituyentes adecuados en un grupo arilo o heterociclo incluyen alquilo C_{1-4} , -OR', halógeno, CN, -NR'R", -COOR', -(alquilo C_{1-4})COOR' y -O(alquilo C_{1-4})COOR', en donde R' y R" son independientemente seleccionados de hidrógeno y alquilo C_{1-4} . Alternativamente, dos sustituyentes adyacentes en el grupo arilo o heterociclo pueden formar juntos un anillo heterociclo de 5 o 6 miembros (es decir, un anillo condensado más con el grupo arilo o heterociclo) que contiene uno o más heteroátomos seleccionados de N, O o S. Por ejemplo, dos sustituyentes adyacentes pueden formar un resto $-CH_2-O-CH_2-$ o $-O-CH_2-O-$. Típicamente, no más de dos, preferiblemente no más de un sustituyente CN está presente en ningún anillo arilo o heterociclo.

Como se usa en el presente documento y a menos que se especifique lo contrario, la abreviatura T6P se refiere tanto a trehalosa-6-fosfato como a trehalosa-6-fosfonato.

Los compuestos de la invención pueden ser precursores de trehalosa-6-fosfato. En este caso, p en la fórmula (I) representa 1. Alternativamente, los compuestos pueden ser precursores de la trehalosa-6-fosfonato. En este caso, p en la fórmula (I) representa 0.

En una realización de la invención, cada R_1 a R_7 representa hidroxilo. En esta realización, en la escisión del grupo protector fotolábil, se proporcionará trehalosa-6-fosfato o trehalosa-6-fosfonato.

En una realización alternativa, uno o más, preferentemente uno, de R_1 a R_7 representa F, N_3 , NR'R'', alquilo C_{1-4} , o - (alquilo C_{1-4})OH, en donde R' y R'' representan independientemente hidrógeno o alquilo C_{1-4} . El resto de los R_1 a R_7 típicamente representan OH. En esta realización, en la escisión del grupo protector fotolábil, se producirá un compuesto trehalosa-6-fosfato o trehalosa-6-fosfonato modificado. Esta realización proporciona la posibilidad de llevar a cabo estudios de imágenes, por ejemplo utilizando un precursor de trehalosa-6-fosfato o fosfonato marcadas en el que uno o más, preferentemente uno, de los R_1 a R_7 representa F. Tal precursor liberará trehalosa-6-fosfato o fosfonato marcada en la planta.

Típicamente, R_1 a R_7 representan independientemente F, N_3 , NH_2 , metilo, etilo, hidroximetilo, hidroxietilo u OH, por ejemplo R_1 a R_7 pueden representar independientemente F, N_3 , NH_2 , metilo u OH. Se prefiere que al menos 6 de R_1 a R_7 sean iguales y representen OH. Lo más preferiblemente, todos los R_1 a R_7 son iguales y representan OH.

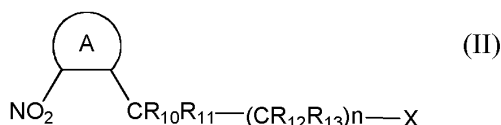
Los compuestos de la invención pueden contener uno o dos grupos protectores fotolábiles en las posiciones R_8 y/o R_9 . En una realización, dos grupos protectores fotolábiles están presentes en las posiciones R_8 y R_9 . Estos dos grupos protectores fotolábiles pueden estar ligados opcionalmente entre sí para formar un grupo protector fotolábil divalente, por ejemplo mediante la posición R_{10} en la fórmula (II) de más adelante. Donde estén presentes dos grupos protectores fotolábiles, estos pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, uno de R_8 y R_9 pueden representar un grupo fotolábil que es fácilmente escindido, mientras que el otro R_8 y R_9 puede representar un grupo fotolábil que se escinda más lentamente. Típicamente, los dos grupos protectores fotolábiles son iguales.

Como se usa en el presente documento, un grupo protector fotolábil es un grupo que es escindido de la parte principal de la molécula cuando se expone a la luz, típicamente cuando se expone a la luz solar. Preferentemente, el grupo fotolábil es escindido de la parte principal de la molécula cuando se expone a la radiación UV-Vis que tiene una longitud de onda en el intervalo de 100 nm a 800 nm, típicamente en el intervalo de 200 a 400 nm.

Los grupos fotolábiles son fácilmente identificables debido a su actividad cuando se exponen a la luz. Grupos adecuados son identificados, por ejemplo, por Mayer et al. (Andew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 4900-4921) y Yu et al. (Chem. Soc. Rev., 2010, 39, 464-473). Un ensayo sencillo se puede llevar a cabo para confirmar si un grupo es un grupo protector fotolábil de acuerdo con la presente invención. Un ensayo de este tipo implica proporcionar una solución acuosa de un compuesto de la invención que contiene un posible grupo protector fotolábil en la posición R_8 y/o R_9 . La solución se expone después a la luz solar durante un período de al menos 5 horas, preferentemente 8 horas (o a luz UV (200-400 nm) durante un período de al menos 15 minutos, preferentemente al menos 30 minutos) y se controla el aspecto de T6P, por ejemplo mediante el uso de P-NMR o espectrometría de masas. Antes de la exposición a la luz solar, pequeño o ningún pico correspondiente a T6P estará presente en la P-NMR o en el espectro de masas. Después de la exposición, sin embargo, si el grupo en cuestión es un grupo protector fotolábil de acuerdo con la invención, se verá un pico correspondiente a T6P, ya que el grupo fotolábil es eliminado durante la exposición a la luz solar. El procedimiento se describe en detalle con referencia a un número de compuestos particulares de la invención en el Ejemplo 6 de más adelante.

Un ensayo alternativo para determinar si un grupo es un grupo fotolábil de acuerdo con la invención es preparar un derivado simple de ácido carboxílico del grupo protector fotolábil potencial y observar la liberación del compuesto original de ácido carboxílico después de la fotólisis. En particular, el grupo protector fotolábil potencial puede estar enlazado a un ácido o-clorobenzoico por reacción del grupo protector fotolábil potencial que tiene un grupo hidroxilo en el punto de escisión (p. ej., X en la fórmula (II) de más adelante) con ácido 2-clorobenzoico y DMAP en diclorometano anhidro (véase, Sing et al., Tetrahedron 61 (2005) 10007-10012). El ácido carboxílico protegido resultante puede ser sometido a fotólisis (exposición a la luz solar durante al menos cinco horas, preferentemente al menos ocho horas o a la UV, longitud de onda 200-400 nm durante al menos 15 minutos, preferentemente al menos 30 minutos) y la aparición del compuesto ácido 2-clorobenzoico puede observarse, por ejemplo mediante análisis por HPLC. Los grupos protectores fotolábiles de acuerdo con la invención liberarán, cuando experimentan un ensayo de este tipo, el compuesto de ácido 2-clorobenzoico original después de fotólisis.

En una realización de la invención, el grupo protector fotolábil es un grupo de fórmula (II), en donde X representa la posición de unión al grupo trehalosa-6-fosfato o trehalosa-6-fosfonato (T6P):



en donde

5 el anillo A representa un grupo arilo o heterociclo;

bien (i) R_{10} y R_{11} son iguales o diferentes y se seleccionan de hidrógeno, alquilo C_{1-4} que está no sustituido o sustituido con uno o más átomos de halógeno, -OR', halógeno, -NR'R" o -CO₂R', en donde R' y R" se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_{1-4} , o (ii) dos grupos R_{10} en grupos protectores fotolábiles adyacentes forman juntos un enlace y R_{11} representa hidrógeno, alquilo C_{1-4} que está no sustituido o sustituido con uno o más átomos de halógeno, -OR', halógeno, -NR'R" o -CO₂R', en donde R' y R" se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_{1-4} .

n es 0 o 1; y

R_{12} y R_{13} son iguales o diferentes y se seleccionan de hidrógeno, alquilo C_{1-4} que está no sustituido o sustituido con uno o más átomos de halógeno, -OR', halógeno, -NR'R" o -CO₂R', en donde R' y R" se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_{1-4} ;

en donde X representa la unión al resto del compuesto de fórmula (I).

Típicamente, el anillo A representa un grupo arilo C_{6-10} o un grupo heterociclo de 5 a 14 miembros que contiene uno o más átomos seleccionados de N, O y S. Típicamente un grupo heterociclo contiene hasta 4 heteroátomos, por ejemplo 1 o 2 heteroátomos, seleccionados de N, O y S. Típicamente, el grupo heterociclo está insaturado o parcialmente insaturado, por ejemplo puede estar insaturado. Donde el anillo A representa un grupo heterociclo, el grupo nitro y los grupos -CR₁₀R₁₁ están típicamente unidos cada uno a un átomo de carbono en el anillo. El anillo A puede ser monocíclico o un sistema de anillos condensados.

Los grupos arilo preferidos son fenilo y naftilo. Un grupo heterociclo preferido es dibenzofuranilo. El anillo A es preferentemente un grupo fenilo, naftilo o dibenzofuranilo, en particular, un grupo fenilo.

El anillo A puede no estar sustituido o puede llevar uno o más sustituyentes, por ejemplo 1, 2 o 3 sustituyentes. Los sustituyentes en un grupo heterociclo son típicamente llevados por un átomo de carbono. Sustituyentes adecuados incluyen alquilo C_{1-4} , -OR', halógeno, CN, -NR'R", -COOR', -(alquilo C_{1-4})COOR' y -O(alquilo C_{1-4})COOR', en donde R' y R" se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_{1-4} . Alternativamente, dos sustituyentes adyacentes en el grupo arilo o heterociclo pueden formar juntos un anillo heterociclo de 5 o 6 miembros (es decir, un anillo condensado más) que contiene uno o más heteroátomos seleccionados de N, O o S. Por ejemplo, dos sustituyentes adyacentes pueden formar un resto -CH₂-O-CH₂- o -O-CH₂-O-.

Preferentemente el anillo A está no sustituido o lleva uno o dos sustituyentes seleccionados de -OR', Br, -NR'R", -COOR', -(alquilo C_{1-2})COOR' y -O(alquilo C_{1-2})COOR', en donde R' y R" se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_{1-2} , o dos posiciones adyacentes del anillo están sustituidas con un resto -CH₂-O-CH₂- o -O-CH₂-O-. Más preferentemente, el anillo A no está sustituido o lleva uno o dos grupos metoxi, o dos posiciones adyacentes del anillo están sustituidas con un resto -CH₂-O-CH₂-. Los sustituyentes son ellos mismos grupos o restos típicamente no sustituidos.

En un aspecto, R_{10} y R_{11} son iguales o diferentes y se seleccionan de hidrógeno; alquilo C_{1-4} que está no sustituido o sustituido con uno o más átomos de halógeno; -OR'; halógeno; -NR'R"; o -CO₂R'; en donde R' y R" se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_{1-4} .

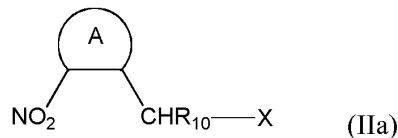
Preferentemente, R_{10} representa hidrógeno, metilo, etilo, CF₃, o -CO₂H. Preferentemente, R_{11} representa hidrógeno.

En un aspecto alternativo, dos grupos R_{10} en los grupos protectores fotolábiles adyacentes forman juntos un enlace. En este aspecto, R_{11} representa preferentemente hidrógeno.

Preferentemente n es 0.

45 Donde están presentes, R_{12} y R_{13} representan típicamente hidrógeno.

Grupos protectores fotolábiles preferidos de fórmula (II) son grupos de fórmula (IIa):



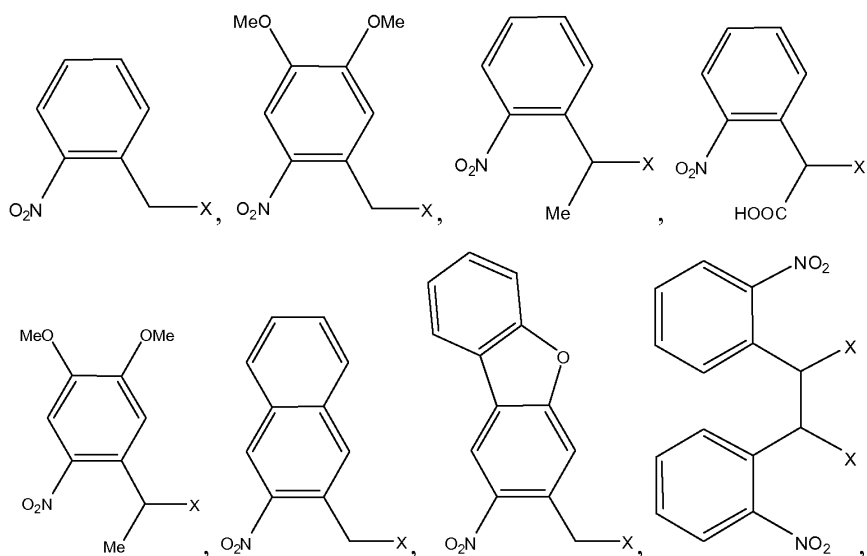
en donde

- 5 el anillo A representa un grupo no sustituido o sustituido seleccionado de fenilo, naftilo o dibenzofuranilo, en el que un grupo fenilo, naftilo o dibenzofuranilo sustituidos es un grupo fenilo, naftilo o dibenzofuranilo que tiene uno o dos sustituyentes metoxi, o un grupo fenilo, naftilo o dibenzofuranilo en el que dos posiciones adyacentes en el anillo están sustituidas por un resto $-\text{CH}_2\text{-O-CH}_2-$; y

R_{10} representa hidrógeno, metilo, $-\text{CF}_3$ o $-\text{COOH}$;

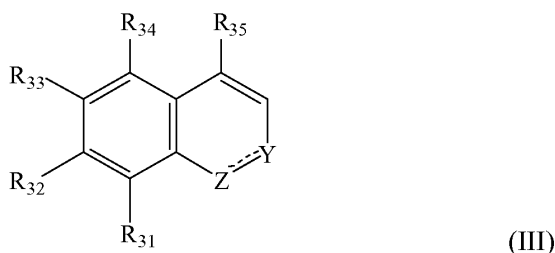
en donde X representa la unión al resto del compuesto de fórmula (I).

- 10 Ejemplos específicos de grupos protectores fotolábiles de fórmula (II) son:



en donde X representa un enlace a la posición R_8 y/o R_9 del compuesto de fórmula (I).

En una realización alternativa, el grupo protector fotolábil es de fórmula (III):



15

en donde

bien Z representa N, Y representa CR_{36} y Z e Y están enlazados por un enlace doble; o Z representa O, Y representa C=O y Z e Y están unidos mediante un enlace simple;

R_{36} representa $-\text{CR}_{37}\text{R}_{38}\text{X}$;

- 20 cuando Y representa CR_{36} , R_{35} representa hidrógeno, y cuando Y representa C=O , R_{35} representa $-\text{CR}_{37}\text{R}_{38}\text{X}$;

bien (i) R_{37} y R_{38} son iguales o diferentes y se seleccionan de hidrógeno, alquilo C_{1-4} que está no sustituido o sustituido con uno o más átomos de halógeno, $-\text{OR}'$, halógeno, $-\text{NR}'\text{R}''$ o $-\text{CO}_2\text{R}'$ en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_{1-4} , o (ii) dos grupos R_{37} en grupos protectores fotolábiles adyacentes forman juntos un enlace y R_{38} representa hidrógeno, alquilo C_{1-4} que está no sustituido o sustituido con uno o más

átomos de halógeno, -OR', halógeno, -NR'R" o -CO₂R' en donde R' y R" se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C₁₋₄;

R₃₂ representa -OR', -NR'R", -O(alquilo C₁₋₄)-COOR', -O(alquilo C₁₋₄)-OR' o -O(alquilo C₁₋₄)-NR'R", en donde R' y R" representan independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₄; y

- 5 R₃₁, R₃₃ y R₃₄ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, -OR', -NR'R", -O(alquilo C₁₋₄)-COOR', -O(alquilo C₁₋₄)-OR' o -O(alquilo C₁₋₄)-NR'R", en el que R' y R" representan independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₄;

en donde X representa la unión al resto del compuesto de fórmula (I).

- 10 En el grupo protector fotolábil de fórmula (III), en un aspecto Z representa O, Y representa C=O y Z e Y están unidos por un enlace simple, tal que la estructura del anillo es un anillo de cumarina. En este aspecto, R₃₅ representa -CR₃₇R₃₈X, en donde X es un enlace al resto de la fórmula (I).

En un aspecto alternativo, Z representa N, Y representa C-CR₃₇R₃₈X y Z e Y están unidos por un doble enlace, tal que la estructura de anillo forma un anillo de quinolina. En este aspecto, R₃₅ representa hidrógeno.

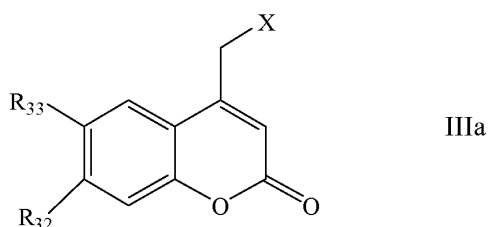
- 15 Típicamente, R₃₇ y R₃₈ son iguales o diferentes y se seleccionan de hidrógeno, alquilo C₁₋₄ que está no sustituido o sustituido con uno o más átomos de halógeno, -OR', halógeno, -NR'R" o -CO₂R', en donde R' y R" se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C₁₋₄; o R₃₈ es hidrógeno y dos grupos R₃₇ en grupos protectores fotolábiles adyacentes forman juntos un enlace.

- 20 Preferentemente, R₃₇ representa hidrógeno, metilo, etilo, CF₃, o -CO₂H. Más preferentemente, R₃₇ representa hidrógeno. Preferentemente, R₃₈ representa hidrógeno, metilo, etilo, CF₃, o -CO₂H. Más preferentemente, R₃₈ representa hidrógeno.

Típicamente, R₃₂ representa -OR', -NR'R" o -O(alquilo C₁₋₂)-COOR', en donde R' y R" representan independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₂. Preferentemente, R₃₂ representa -OR', -NR'R" o -O(CH₂)-COOH', en donde R' y R" representan independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₂.

- 25 Típicamente, R₃₁, R₃₃ y R₃₄ se seleccionan independientemente de hidrógeno, Br, -OR', -NR'R" o -O(alquilo C₁₋₂)-COOR', en donde R' y R" representan independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₂. Preferentemente, R₃₁ es hidrógeno o Br. Preferentemente, R₃₃ es hidrógeno, Br o -OCH₂CO₂H. Preferentemente, R₃₄ es hidrógeno.

Preferentemente, el grupo fotolábil de fórmula (III) es un grupo de fórmula (IIIa):



en donde

- 30 R₃₂ representa -OR', -NR'R", -O(alquilo C₁₋₄)-COOR', -O(alquilo C₁₋₄)-OR' o -O(alquilo C₁₋₄)-NR'R", en donde R' y R" representan independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₄; y

R₃₃ representa hidrógeno, halógeno, -OR', -NR'R", -O(alquilo C₁₋₄)-COOR', -O(alquilo C₁₋₄)-OR' o -O(alquilo C₁₋₄)-NR'R", en donde R' y R" representan independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₄;

en donde X representa la unión al resto del compuesto de fórmula (I).

- 35 En los grupos de fórmula (IIIb), preferentemente

R₃₂ representa -OR', -NR'R" o -O(alquilo C₁₋₄)-COOR', en donde R' y R" representan independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₂; y

R₃₃ representa hidrógeno, Br, -OR', -NR'R" o -O(alquilo C₁₋₄)-COOR', en donde R' y R" representan independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₂.

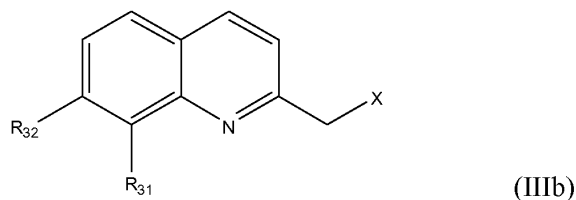
- 40 Ejemplos específicos de grupos protectores fotolábiles de fórmula (IIIa) son aquellos en los que:

a) R₃₃ representa H y R₃₂ representa OMe, NMe₂, NEt₂ o -OCH₂COOH

b) R_{33} representa Br y R_{32} representa OH; y

c) R_{33} y R_{32} ambos representan $-OCH_2COOH$.

Alternativamente, el grupo protector fotolábil de fórmula (III) puede ser un grupo de fórmula (IIIb):



5 en donde R_{31} y R_{32} son como se describe anteriormente para la fórmula (III).

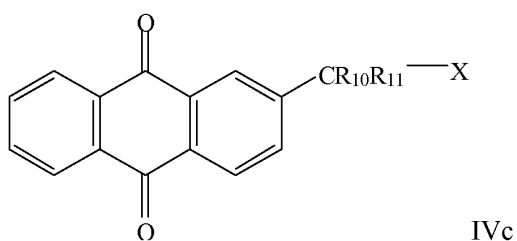
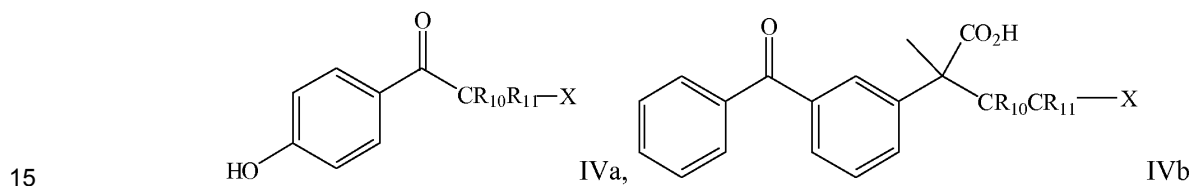
En los grupos de fórmula (IIIb), preferentemente

R_{32} representa $-OR'$, $-NR'R''$ o $-O(\text{alquilo } C_{1-4})-COOR'$, en donde R' y R'' representan independientemente hidrógeno o alquilo C_{1-2} ; y

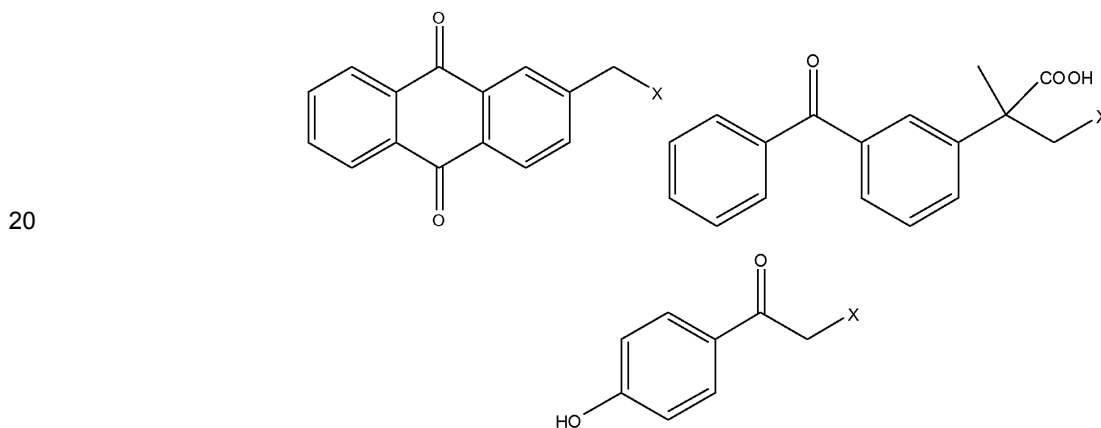
10 R_{31} representa hidrógeno, Br, $-OR'$, $-NR'R''$ o $-O(\text{alquilo } C_{1-4})-COOR'$, en donde R' y R'' representan independientemente hidrógeno o alquilo C_{1-2} .

Un ejemplo específico de un grupo protector fotolábil de fórmula (IIIb) es un grupo en donde R_{31} representa Br y R_{32} representa OH.

Grupos protectores fotolábiles adicionales que pueden usarse en las posiciones R_8 y/o R_9 en los compuestos de la invención incluyen:

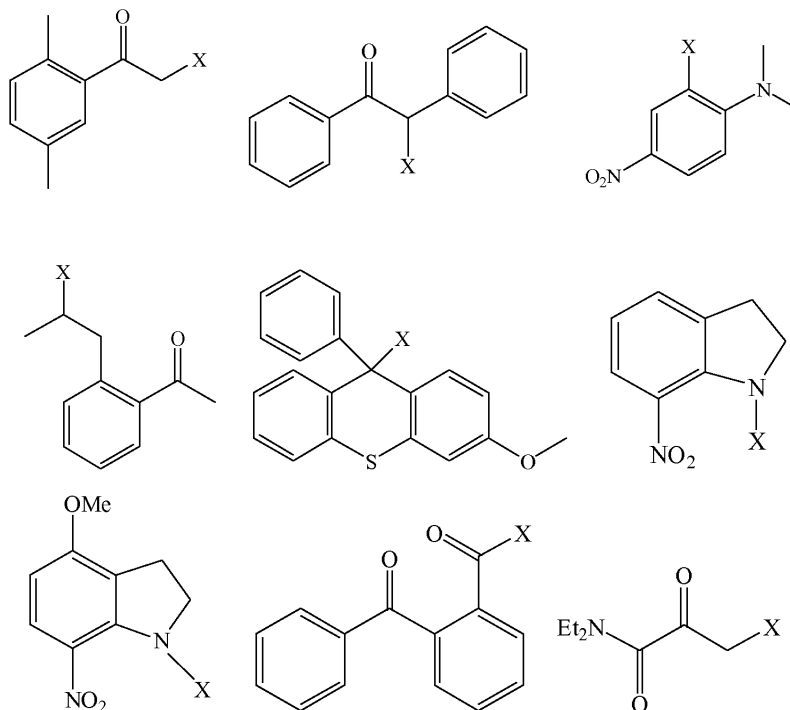


en donde R_{10} y R_{11} son como se define anteriormente para la fórmula (II). En los compuestos de fórmulas (IVa), (IVb) y (IVc), preferentemente R_{10} y R_{11} are hidrógeno. Ejemplos específicos incluyen:



Grupos protectores fotolábiles alternativos son los que se describen en Mayer et al. (Andew. Chem. Int. Ed. 2006,

45, 4900-4921) y Yu et al. (Chem. Soc. Rev., 2010, 39, 464-473). Ejemplos particulares incluyen



5

10

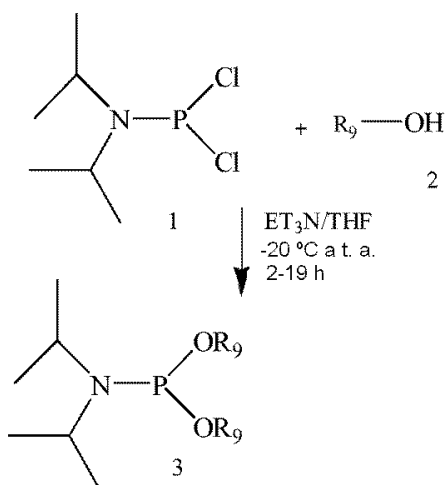
Los compuestos utilizados en la invención son derivados de D-trehalosa (α -D-glucopiranosil-[1,1]- α -D-glucopiranosido, es decir, un enlace α,α -1,1) y se usan preferentemente en forma enantioméricamente pura. Sin embargo, pueden estar presentes como una mezcla de isómeros, por ejemplo una mezcla conteniendo uno o más derivados de α -D-glucopiranosil-[1,1]- β -D-glucopiranosido, β -D-glucopiranosil-[1,1]- α -D-glucopiranosido y β -D-glucopiranosil-[1,1]- β -D-glucopiranosido. Típicamente, donde está presente una mezcla de isómeros, la forma α,α está presente en una cantidad de al menos 60 % en peso, preferentemente al menos 70 % en peso. Para evitar cualquier duda, los compuestos utilizados en la invención pueden usarse en cualquier forma tautómera. Además, para evitar cualquier duda, los compuestos de la invención pueden ser utilizados en forma de solvato o hidrato.

15

Salas agrícolamente aceptables adecuadas de los compuestos de la invención incluyen sales con bases agrícolamente aceptables tal como hidróxidos de metal alcalino (p. ej., sodio o potasio) y metal alcalinotérreo (p. ej., calcio o magnesio) y bases orgánicas tal como alquilaminas, aralquilaminas o aminas heterocíclicas. Donde sea apropiado, las sales pueden formarse también con ácidos agrícolamente aceptables, tanto ácidos inorgánicos tal como ácido hidrocórico, sulfúrico, fosfórico, difosfórico, hidrobromico o nítrico como ácidos orgánicos tal como ácido cítrico, fumárico, maleico, málico, ascórbico, succínico, tartárico, benzoico, acético, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico o p-toluensulfónico.

20

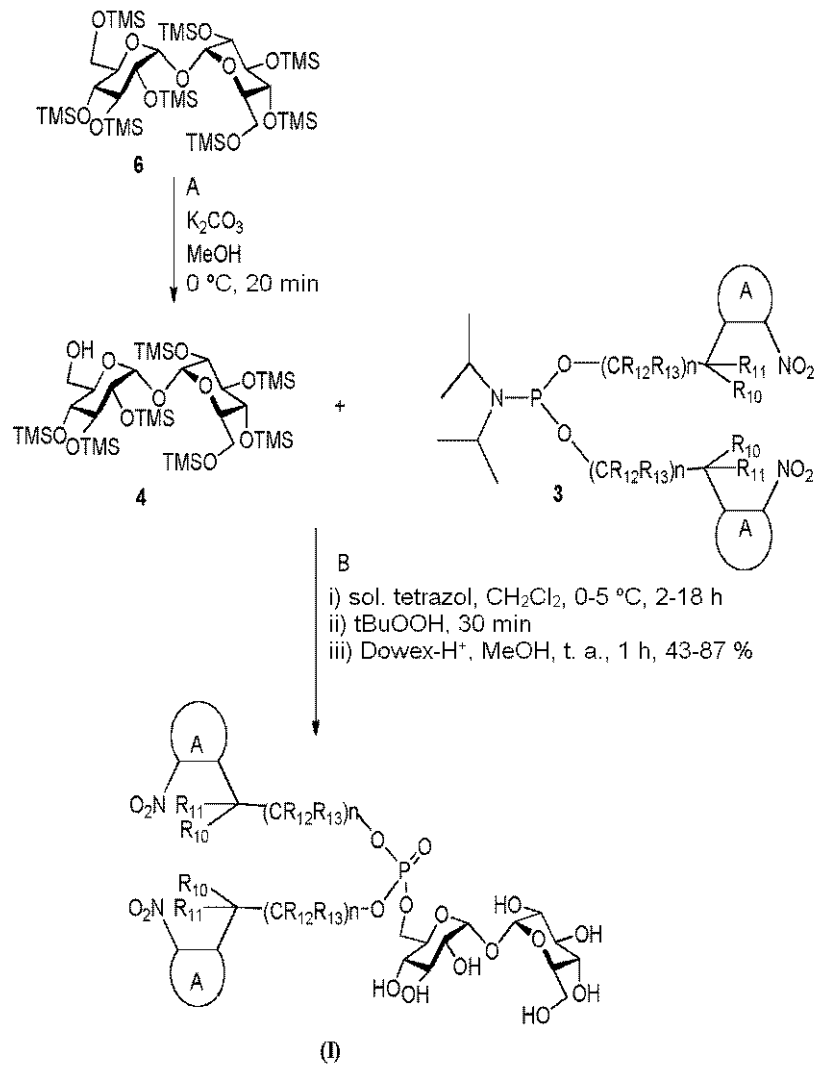
Los compuestos de la invención en donde R_1 a R_7 son OH, $p=1$ y R_8 y R_9 son idénticos, pueden ser sintetizados de acuerdo con los siguientes esquemas 1 y 2:



Esquema 1

5 Los compuestos de fosforamidita 3 pueden ser producidos a partir de cloruro diisopropilfosforamidoso 1, por tratamiento de 1,0 equivalente de cloruro diisopropilfosforamidoso 1 con 2,0 equivalentes de compuesto 2 en THF seco utilizando trietilamina como una base a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ a temperatura ambiente.

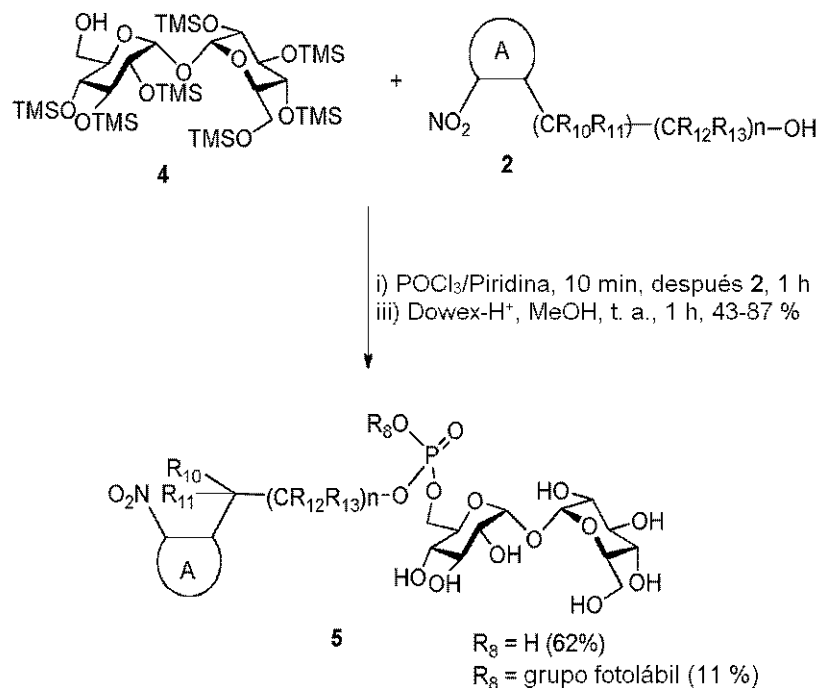
Los compuestos 3 de fosoramidita producidos pueden ser tranformados en compuestos de fórmula (I) de acuerdo con el esquema 2:



Esquema 2

- 5 2,3,4,2',3',4',6'-heptaquis-O-(trimetilsilil)-D-trehalosa 4 puede ser preparada por desprotección regioselectiva de D-trehalosa 6 persililada en condiciones ácidas (Ronnow et al, Carbohydr. Res. 260, 323-328 (1994)). Trehalosa 4 parcialmente desprotegida puede hacerse reaccionar después con compuesto 3 como se expone en el esquema 2, produciendo los compuestos de la invención.

En un enfoque alternativo, la etapa B del esquema 2 puede llevarse a cabo mediante el tratamiento de 4 con 1,0 equiv. de POCl_3 en piridina durante 10 minutos seguido de la adición de 2,0 equivalentes del compuesto 2 y agitando durante 1 hora. Este enfoque alternativo conduce a una mezcla de fosfatos mono- y di-sustituidos como se muestra en el esquema 3:



Esquema 3

5

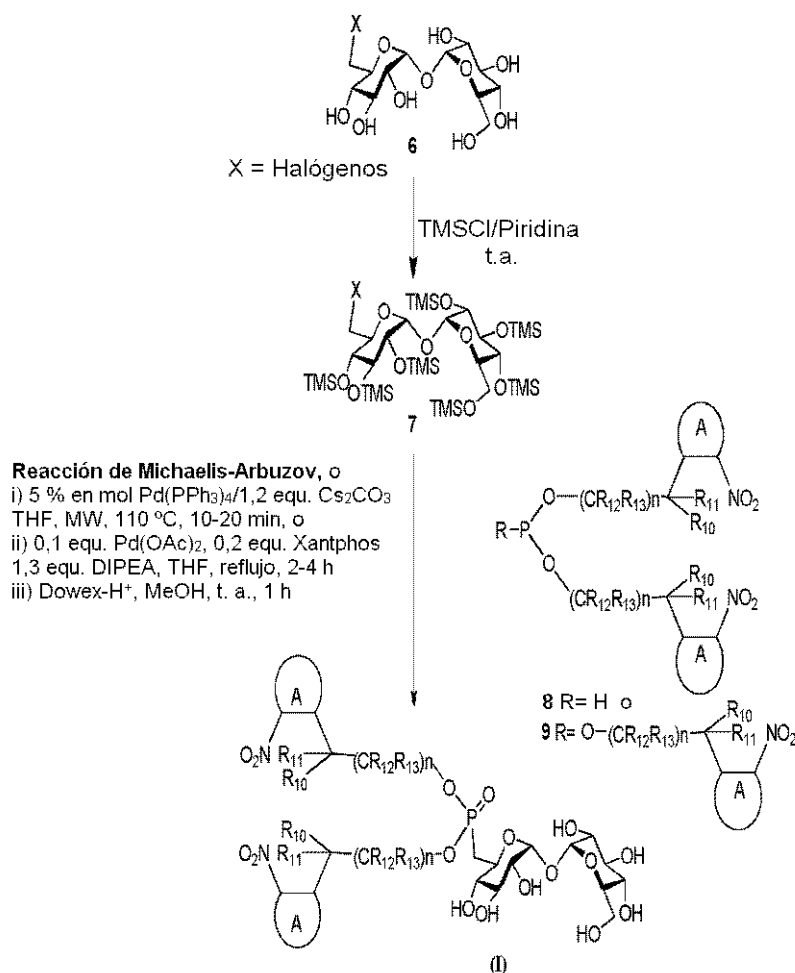
Los materiales de partida 1, 2 y 6 están comercialmente disponibles o pueden ser preparados por técnicas normalizadas.

Los compuestos de la invención en donde R_8 y R_9 son grupos protectores fotolábiles diferentes pueden prepararse siguiendo el esquema 3 anterior y además haciendo reaccionar los compuestos mono-sustituidos con un grupo de reacción fotolábil adicional $R_8\text{OH}$ para proporcionar un compuesto de la invención que tiene grupos protectores fotolábiles diferentes R_8 y R_9 .

Los compuestos de la invención en donde $p=0$, es decir, los compuestos que tienen un grupo fosfonato, pueden prepararse adoptando la reacción de Michaelis-Arbuzov sobre un sustrato 7 (véase el esquema 4 de más adelante). El sustrato 7 puede prepararse fácilmente a partir de trehalosa halogenada como por un procedimiento de la bibliografía (Nat. Chem. Biol. 2011, 7, 228 y ref. citadas en dicho documento). Los compuestos tri-O-alkilfosfato tipo 9 apropiados pueden ser tratados con sustrato 7 en condiciones térmicas o de microondas que den como resultado la formación del enlace C-P. Esto es seguido de la eliminación de los grupos OTMS para dar el compuesto (I). En un enfoque alternativo, el compuesto de la invención puede prepararse también a partir de sustrato 7 mediante la reacción de un reactivo di-O-alkilfosfito tipo 8 apropiado en presencia de catalizador de Pd, a saber, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ o $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (Org. Lett. 2008, 10, 4637 y Synlett. 2009, 225)

20

En el caso de que R_8 o R_9 sea H, los compuestos 8 y 9 son modificados reemplazando el átomo de hidrógeno de R_8 o R_9 con un grupo protector adecuado antes de la reacción. El grupo protector puede después ser retirado para producir los compuestos de fórmula (I).



5 Esquema 4

Los compuestos de la invención que tienen un grupo distinto de OH en una o más de las posiciones R_1 a R_7 pueden ser preparados por procesos análogos a los presentes en los esquemas 1 a 4 anteriores, pero utilizando como material de partida una trehalosa apropiadamente modificada. La trehalosa que está modificada en las posiciones R_1 a R_7 está comercialmente disponible o puede ser producida utilizando técnicas habituales en la técnica.

10 En uso, los compuestos de la invención se aplican a la planta o cultivo o al locus de la planta o cultivo. Esto puede hacerse, por ejemplo, aplicandolos a las semillas de las plantas o cultivo antes de sembrar, al medio (p. ej., suelo o agua) en el que las plantas o el cultivo se desarrollan, al follaje de las plantas o del cultivo, o a las partes de la planta o del cultivo que se cosechará, p. ej., semillas, fruto y tubérculos. La aplicación a las partes cosechables de la planta o del cultivo puede utilizarse para impedir o reducir la incidencia de la germinación previa a la cosecha de la semilla (un problema común de los cereales durante el tiempo húmedo durante el período de la cosecha) impidiendo la rotura del almidón que tiene lugar durante la germinación previa a la cosecha.

15 Los compuestos de la invención se proporcionan típicamente a la planta en forma de una solución acuosa. Sin embargo, están previstos también las formulaciones en gránulos, polvos gruesos o polvos finos. Los compuestos pueden, por tanto, proporcionarse en forma sólida, por ejemplo en forma de gránulos, polvos gruesos o polvos finos bien por aplicación directa o junto con instrucciones para reconstituir una solución adecuada en el momento de uso.

20 Alternativamente, los compuestos de la invención pueden ser proporcionados en forma de solución acuosa, ya sea una solución lista para su uso, o un concentrado que puede diluirse antes de usar. Una solución lista para su uso tendrá típicamente una concentración del compuesto de la invención en el intervalo de 0,1 a 10 mM. Un concentrado puede tener una mayor concentración del compuesto de la invención, por ejemplo al menos 100 mM y hasta 10 M.

25 La presente invención incluye una composición que comprende un compuesto de la invención, o una sal del mismo

agrícolamente aceptable, y un portador o diluyente inerte, agrícolamente aceptable. Cuando se usa un diluyente, se prefiere el agua.

5 Donde el compuesto se proporciona en forma de polvo grueso, este puede comprender el compuesto de la invención, o el compuesto puede ser proporcionado en una mezcla íntima finamente dividida de un compuesto de la invención, un portador sólido inerte y, si se desea, un agente tensioactivo. El portador sólido inerte se escoge normalmente de entre las arcillas atapulgita, las arcillas caolín, las arcillas montmorillonita, las tierras de diatomeas, la sílice finamente dividida y los silicatos purificados. Tensioactivos eficaces, que tienen capacidad humectante, penetrante y dispersante están presentes habitualmente en proporciones desde 0,5 a 10 por ciento en peso. Entre los agentes tensioactivos normalmente utilizados para este fin están las ligninas sulfonadas, naftalensulfonatos y naftalensulfonatos condensados, alquilbencensulfonatos, alquilsulfatos y tensioactivos no iónicos tales como los productos de condensación de óxido de etileno con alquilfenoles.

10 Composiciones sólidas tales como polvos gruesos que contienen un compuesto de la invención contienen deseablemente al menos 0,1 por ciento, p. ej., desde 0,1 a 95 por ciento en peso del compuesto de la invención y desde 0,1 a 75 por ciento de un portador o tensioactivo inerte.

15 Cuando un compuesto de la invención va a ser aplicado al terreno, las formulaciones granuladas o los polvos finos son a veces más convenientes que las pulverizaciones. Una formulación granulada típica comprende un compuesto de la invención dispersado en un soporte inerte tal como arcilla toscamente triturada, o arcilla que ha sido transformada en gránulos por tratamiento con un lecho removedor del material pulverizado con una pequeña cantidad de líquido (p. ej., agua) en un tambor de granulación. En el proceso habitual para preparar formulaciones granuladas, se pulverizó una solución del compuesto activo sobre los gránulos mientras estaban siendo agitados en un aparato mezclador adecuado, después de que los gránulos se secan con una corriente de aire durante agitación continua.

20 Los compuestos de la invención se pueden combinar con otros ingredientes activos utilizados para el tratamiento de las plantas, por ejemplo pueden ser incorporados en otros productos agroquímicos. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden ser utilizados en combinación con fertilizantes, agentes antifúngicos y pesticidas. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden ser incorporados en las composiciones de fertilizantes o en las composiciones de alimentación de las plantas.

30 Los compuestos de la invención son adecuados para la aplicación en cualquier planta. Plantas adecuadas a las que los compuestos de la invención pueden ser aplicados incluyen el cultivo de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas tales como maíz, brassica, alfalfa, arroz, girasol, algodón, cártamo, sorgo, trigo, tabaco, mijo, semilla de soja, patata, remolacha azucarera, caña de azúcar, avena y cebada, así como vegetales, plantas ornamentales, hierbas y árboles incluidas las coníferas. Las plantas tratadas con los compuestos de la invención pueden haber incrementado los niveles de T6P y habrán elevado también los niveles de los grupos protectores fotolábiles desdoblados en comparación con las plantas no tratadas. Las plantas tratadas con los compuestos de la invención en consecuencia producen mayores cantidades de almidón que las plantas no tratadas. Esto puede conducir a un crecimiento de la planta aumentado y en consecuencia un rendimientos del cultivo mejorados.

35 Los compuestos de la invención son particularmente adecuados para la aplicación a cultivos de semillas y de tallos, incluidos los cultivos de la patata. Las plantas preferidas a las que los compuestos de la invención pueden aplicarse en consecuencia incluyen maíz, brassica, alfalfa, arroz, girasol, cártamo, sorgo, trigo, mijo, semilla de soja, patata, remolacha azucarera, caña de azúcar, avena y cebada, así como vegetales de cultivo de semillas y de tallos.

Ejemplos

La invención se describirá a continuación con referencia a un número de ejemplos específicos. En los Ejemplos 1 a 10 y en las Figuras 1 a 6, la abreviatura T6P se refiere a trehalosa-6-fosfato.

Ejemplo de Referencia 1: bis-(2-nitrobencil)-N,N-diisopropilfosforamidita

45 El dicloruro diisopropilfosforamidoso (2,0 g, 9,90 mmol) se disolvió en 15 ml de THF y la solución resultante se añadió lentamente a una solución conteniendo 4,2 ml (29,7 mmol) de trietilamina y 3,03 g (19,8 mmol) de alcohol 2-nitrobencílico en 10 ml de THF a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min y después a 25 °C durante otras 2 h. El precipitado incoloro se aisló por filtración y el sólido se lavó con 100 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó sucesivamente con porciones de 15 ml de NaHCO₃ saturado y NaCl saturado y después se secó (MgSO₄) y se concentró a presión reducida a 25 °C. El residuo se precipitó en el seno de acetato de etilo/hexano, dando bis(2-nitrobencil)-N,N-diisopropilfosforamidita (3,0 g, 70 %) en forma de sólido incoloro.

Ejemplo de Referencia 2: bis-(4,5-dimetoxi-2-nitrobencil)-N,N-diisopropilfosforamidita

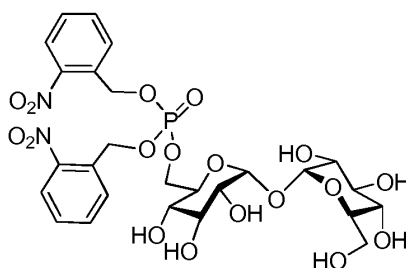
55 A una suspensión enfriada a -20 °C de alcohol 4,5-dimetoxi-2-nitrobencílico (2,1 g, 9,90 mmol) y trietilamina (1,5 ml, 10,8 mmol) en THF seco (10 ml) se añadió gota a gota una solución de dicloruro diisopropilfosforamidoso (1,0 g, 4,95 mmol) en THF seco (2 ml). La mezcla se dejó calentar a 20 °C, se agitó durante 18 h, y se añadió una solución saturada de NaHCO₃ ac. (15 ml). El sólido se filtró, se lavó con agua (20 ml) y se secó para dar 2,0 g (74 %) de bis-

(4,5-dimetoxi-2-nitrobenzil)-N,N-diisopropilfosforamidita.

Ejemplo de Referencia 3: bis-[1-(2-nitrofenil)-etil]-N,N-diisopropilfosforamidita

El dicloruro diisopropilfosforamidoso (1,0 g, 4,95 mmol) se disolvió en 5 ml de THF seco y la solución resultante se añadió lentamente a una solución conteniendo 1,5 ml (10,89 mmol) de trietilamina y 1,65 g (9,90 mmol) de alcohol 1-metil-2-nitrobenzílico en 10 ml de THF a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 min y después a 25 °C durante otras 18 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc. La fase orgánica se lavó sucesivamente con porciones de 15 ml de NaHCO₃ saturado y NaCl saturado y después se secó (MgSO₄) y se concentró a presión reducida a 25 °C para dar el producto crudo. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrápida de columna utilizando acetato de etilo/éter de petróleo (5:95 v/v), dando bis-[1-(2-nitrofenil)-etil]-N,N-diisopropilfosforamidita (1,6 g, 72 %) en forma de sólido incoloro. Se aisló en forma de mezcla diastereómera.

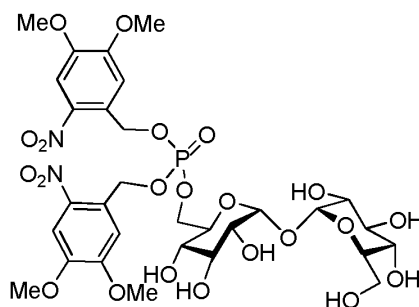
Ejemplo 1: NB-T6P



A una solución de 2,3,4,2',3',4',6'-heptakis-O-(trimetilsilil)-D-trehalosa (50 mg, 0,06 mmol, 1 equiv.) y 1H-tetrazol (84 mg, 0,12 mmol, 2,0 equiv.) en CH₂Cl₂ seco (3 ml) bajo atmósfera de argón a 0 °C, se añadió bis-[1-(2-nitrobenzil)-N,N-diisopropilfosforamidita preparada en el Ejemplo de Referencia 1 (39,1 mg, 0,09 mmol, 1,5 equiv.). La solución se agitó durante 30 min y el progreso de la reacción se controló mediante TLC (éter de petróleo:éter; 8:2) y espectrometría de masas. Después de la completa desaparición del material de partida, se añadió m-CPBA (20,7 mg, 0,12 mmol, 2,0 equiv.) a 0 °C. Después de 10 min la mezcla se diluyó con EtOAc (15 ml) y se lavó con soluciones de NaHCO₃ (2×5 ml) saturado y NaCl (3 × 5 ml) saturado. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se concentró en vacío y el residuo se agitó utilizando 30 mg de Dowex en metanol durante 1 h para obtener compuestos desprotegidos. Después de la filtración, el filtrado se concentró para obtener producto crudo completamente desprotegido que en la purificación por cromatografía ultrápida produjo NB-T6P (30 mg) con un rendimiento aislable del 75 %.

Ejemplo 1. [α]_D⁺ 80,6 (c 1,0, MeOH), ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8,02 (d, J = 8,0 Hz, 2H, ArH), 7,66-7,65 (m, 4H, ArH), 7,50-7,46 (m, 2H, ArH), 5,43 (d, J = 7,2 Hz, 4H, 2 × CH₂), 4,96 (d, J = 3,6 Hz, 1H, H-1), 4,93 (d, J = 3,6 Hz, 1H, H-1'), 4,29-4,24 (m, 2H, H-6), 3,93 (td, J = 8,4 Hz y J = 2,0 Hz, 1H), 3,73-3,65 (m, 4H), 3,58 (dd, J = 12,0 Hz y J = 5,2 Hz, 1H), 3,36-3,33 (m, 2H), 3,30-3,20 (m, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 147,7, 134,3, 132,1, 132,0, 129,4, 129,0, 128,9, 125,0, 94,4, 94,3, 73,5, 73,3, 72,8, 72,1, 72,0, 71,0, 70,9, 70,8, 70,1, 66,6, 61,6; ³¹P NMR (162 MHz, CD₃OD) δ -1,65; ESI-HRMS m/z calculado para C₂₆H₃₃N₂O₁₈P [M+ Na]⁺: 715,1368; encontrado 715,1368.

Ejemplo 2: DMNB-T6P

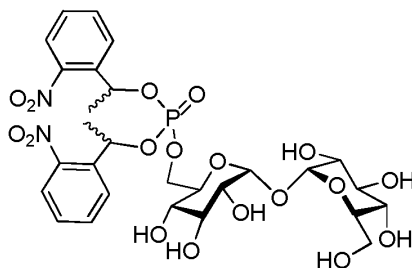


A una solución de 2,3,4,2',3',4',6'-heptakis-O-(trimetilsilil)-D-trehalosa (100 mg, 0,12 mmol, 1 equiv.) y 1H-tetrazol (210 mg, 3,0 mmol, 25 equiv.) en CH₃CN (5 ml) seco bajo atmósfera de argón a 0 °C, se añadió bis-(4,5-dimetoxi-2-nitrobenzil)-N,N-diisopropilfosforamidita preparada en el Ejemplo de Referencia 2 (100 mg, 0,18 mmol, 1,5 equiv.). La solución se agitó durante 30 min y el progreso de la reacción se controló mediante TLC (éter de petróleo:éter; 8:2) y espectrometría de masas. Después de la completa desaparición del material de partida, se añadió m-CPBA (41,5 mg, 0,24 mmol, 2,0 equiv.) a 0 °C. Después de 10 min la mezcla se diluyó con EtOAc (10 ml) y se lavó con soluciones de NaHCO₃ (2×5 ml) saturado y NaCl (3 × 5 ml) saturado. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se concentró en vacío hasta la mezcla de residuo obtenida. Así, la mezcla de residuo se desprotegió por simple agitación utilizando 25 mg de Dowex en metanol durante 1 h. Después de la filtración, el filtrado se concentró para

obtener producto crudo completamente desprotegido que en la purificación por cromatografía ultrarrápida produjo DMNB-T6P (29 mg) con un rendimiento aislable del 30 % junto con trehalosa.

Ejemplo 2. $[\alpha]_D + 64,8$ (c 1,1, MeOH), $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 7,53 (s, 2H, ArH), 7,03 (s, 2H, ArH), 5,37 (d, J = 8,0 Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 4,95 (d, J = 4,0 Hz, 1H, H-1), 4,91 (d, J = 4,0 Hz, 1H, H-1'), 4,33-4,28 (m, 2H, H-6), 3,94 (td, J = 10,0 Hz y J = 2,0 Hz, 1H), 3,81 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$), 3,78 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$), 3,73-3,65 (m, 4H), 3,58 (dd, J = 12,0 Hz y J = 5,2 Hz, 1H), 3,35 (dd, J = 8,4 Hz y J = 4,0 Hz, 1H), 3,32 (dd, J = 6,0 Hz y J = 2,0 Hz, 1H), 3,26-3,31 (m, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 154,2, 148,9, 143,7, 139,6, 126,8, 126,6, 110,4, 110,3, 108,2, 94,4, 94,3, 73,5, 73,3, 72,8, 72,1, 72,0, 70,8, 70,2, 65,4, 61,6, 56,1, 55,8; ^{31}P NMR (162 MHz, CD_3OD) δ -1,67; ESI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_{22}\text{P}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 835,1786; encontrado 835,1782.

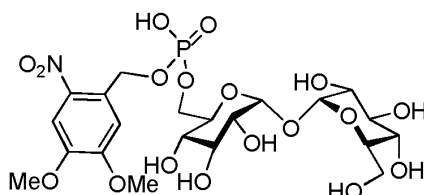
10 Ejemplo 3: NPE-T6P



A una solución de 2,3,4,2',3',4',6'-heptakis-O-(trimetilsilil)-D-trehalosa (100 mg, 0,12 mmol, 1 equiv.) y 1H-tetrazol (84 mg, 1,2 mmol, 10 equiv.) en CH_2Cl_2 (5 ml) seco bajo atmósfera de argón a 0 °C, se añadió bis-[1-(2-nitrofenil)-etil]-N,N-diisopropilfosforamidita preparada en el Ejemplo de Referencia 3 (83,5 mg, 0,18 mmol, 1,5 equiv.). La solución se agitó durante 30 min y el progreso de la reacción se controló mediante TLC (éter de petróleo: éter, 8:2) y espectrometría de masas. Después de la completa desaparición del material de partida, se añadió t-BuOOH (0,1 ml, 0,36 mmol, 3,0 equiv.) se añadió a 0 °C. Después de 10 min la mezcla se diluyó con EtOAc (10 ml) y se lavó con soluciones de NaHCO_3 (2×5 ml) saturado y NaCl (3×5 ml) saturado. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se concentró en vacío hasta la mezcla de residuo obtenida. Así, la mezcla de residuo se desprotegió por simple agitación utilizando 25 mg de Dowex en metanol durante 1 h. Después de la filtración, el filtrado se concentró para obtener producto crudo completamente desprotegido que en la purificación por cromatografía ultrrápida produjo NPE-T6P (40 mg) con un rendimiento aislable del 47 % junto con trehalosa.

Ejemplo 3. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7,91-7,05 (m, 8 H, ArH), 5,92-5,84 (m, 2H, CHMe), 5,04-4,94 (m, 2H, H-1 y H-1'), 4,16-3,99 (m, 2H, CHMe₂), 3,90-3,60 (m, 7H), 3,41-3,05 (m, 5H), 1,56-1,46 (m, 6H, CH₃); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 148,8, 148,3, 148,2, 148,1, 147,9, 145,4, 138,9, 238,3, 138,2, 135,4, 135,3, 135,2, 130,4, 130,3, 129,9, 129,3, 129,2, 128,8, 128,7, 128,6, 126,3, 125,6, 125,5, 95,4, 95,3, 79,8, 74,6, 74,4, 74,2, 73,9, 73,8, 73,1, 73,0, 71,8, 71,1, 68,3, 62,6, 62,1, 59,8, 30,7, 30,5, 24,7, 24,6. 23,5, 23,4 23,7, ^{31}P NMR (162 MHz, CD_3OD) δ -3,64, -3,96; ESI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_{18}\text{P}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 743,1677; encontrado 743,1676.

Ejemplo 4: Mono-DMNB-T6P



A una solución agitada de 2,3,4,2',3',4',6'-heptakis-O-(trimetilsilil)-D-trehalosa (100 mg, 0,12 mmol) en piridina (2 ml) a temperatura ambiente, se añadió y se agitó durante 10 min POCl_3 (0,012 ml, 0,132 mmol). Después de 10 min se añadió alcohol 4,5-dimetoxi-2-nitrobenílico (76,7 mg, 0,36 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró en vacío para obtener mezcla del producto crudo que después de tratamiento con Dowex (50 mg) en metanol (2 ml) se suministra una mezcla de DMNB-T6P (Ejemplo 2) y mono-DMNB-T6P (Ejemplo 4). Después de filtración, la concentración en vacío y la purificación por cromatografía ultrrápida produjeron DMNB-T6P (10 mg, 11 %) y Mono-DMNB-T6P (45 mg, 62 %) en forma de un sólido pegajoso puro.

Ejemplo 4. $[\alpha]_D + 48,7$ (c 1,1, MeOH), ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7,62 (s, 1H, ArH), 7,39 (s, 1H, ArH), 5,21 (d, J = 6,0 Hz, 2H, CH₂), 4,91 (d, J = 4,0 Hz, 1H, H-1), 4,87 (d, J = 4,0 Hz, 1H, H-1'), 4,00-3,98 (m, 2H, H-6), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 3,80 (s, 3H, OCH₃), 3,71-3,65 (m, 4H), 3,57 (dd, J = 12,0 Hz y J = 5,6 Hz, 1H), 3,35 (dd, J = 7,2 Hz y J = 3,6 Hz, 1H), 3,32 (dd, J = 6,8 Hz y J = 2,4 Hz, 1H), 3,22-3,21 (m, 3H); ^{31}P NMR (162 MHz, CD_3OD) δ -23,6; ESI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{NO}_{18}\text{P}$ $[\text{M-H}]^-$: 616,1279; encontrado 616,1273.

Ejemplo 5: Actividad biológica del compuesto protegido

Los compuestos sintetizados en los Ejemplos 1 a 4 se ensayaron frente a la diana conocida para T6P in vitro, es decir, SnRK1, utilizando el ensayo descrito en Plant Physiol. 2009, 149, 1860-1871. El ensayo se llevó a cabo por duplicado y quedó claro que los cuatro compuestos eran biológicamente inactivos. Estos compuestos no inhibían al SnRK1, en comparación con el T6P que muestra una inhibición típica (Figura 1). Este resultado sugiere claramente que los Ejemplos 1 a 4 protegidos sintetizados son ellos mismos inactivos.

Ejemplo 6: Desprotección in vitro

Se escogieron dos técnicas experimentales para estudiar el progreso de los experimentos de desprotección, es decir, i) Espectroscopía de Masas y TLC (manchas), y ii) P-NMR. El progreso de las reacciones se controló buscando la desaparición de pico correspondiente a los compuestos protegidos y la aparición del pico correspondiente al T6P. La estructura del compuesto completamente desbloqueado, es decir, T6P se estableció por ^1D y ^2D NMR.

Ambas técnicas experimentales fueron muy eficientes y reproducibles para analizar los experimentos de desprotección. Se prepararon soluciones cinco milimolar de los Ejemplos 1 a 4 en tampón fosfato (pH 7,4) y la solución resultante se expuso a diferentes longitudes de onda de luz UV y la luz solar para controlar la desprotección a intervalos de tiempos diferentes. El resumen de los experimentos de desprotección se da en la Tabla 1.

Tabla 1

Comp	Condiciones	125 W / 365 nm	125 W / 200-400 nm	8 W / 365 nm	8 W 254 nm	Luz solar
NB- T6P, Ej. 1		30 min	15 min	6 h	4 h	6 h
DMNB- T6P, Ej. 2		60 min	60 min	10 h	10 h	8 h
NPE- T6P, Ej. 3		20 min	10 min	90 min	90 min	90 min
Mono-DMNB- T6P, Ej. 4		45 min	45 min	6 h	10 h	6 h

La Figura 2 muestra los espectros P-NMR que siguen el desbloqueo del Ejemplo 1 (NB-T6P) (125 W/365 nm). Este muestra claramente la aparición del pico T6P y la desaparición del pico NB-T6P a lo largo de la reacción de desprotección.

La T6P desprotegida por tratamiento de NB-T6P (Ejemplo 1) en condiciones de desprotección de radiación de 125 W/365 nm se incluyó en los ensayos de la SnRK1 (llevados a cabo de acuerdo con Plant Physiol. 2009, 149, 1860-1871) para determinar su efecto de inhibición y se comparó con el T6P comercialmente disponible de Sigma. Los resultados se representan en la Figura 3. Como puede verse de la Figura, el T6P obtenido a partir de la desprotección del Ejemplo 1 inhibe la SnRK1 de la misma forma que el T6P comercialmente disponible a la concentración de 0,32 mM.

Ejemplo 7: Estudios sobre la absorción de la planta

Las soluciones acuosas de cada uno de los Ejemplos 1 a 4 se suministraron a raíces de plántulas de Arabidopsis thaliana y después de un cierto período de tiempo la parte aérea (el brote) de la plántula se cosechó cuidadosamente y se extrajo en H₂O:MeOH (1:1) bajo nitrógeno líquido para obtener extracto crudo reciente de la planta. El extracto crudo reciente de la planta así obtenido se analizó por espectrofotometría de masas y utilizando HPLC para cuantificar la cantidad de compuesto absorbido.

Una solución acuosa de NB-T6P (Ejemplo 1) se suministró a las plántulas, a una concentración final de 1 mM, cerca de la raíz y la absorción se controló en extracto recién preparado después de 24 h, 48 h y 72 h utilizando tanto técnicas de HPLC como de masas. Se encontró que había una absorción media de 2,63 µg/10 mg de la plántula en 24 h que se incrementa hasta 6,05 µg/10 mg de la plántula y 26,39 µg/10 mg de la plántula respectivamente en 48 y 72 h. Los incrementos en la cantidad de compuestos en la planta a lo largo del tiempo indicaban claramente que la absorción es irreversible.

De forma similar, los Ejemplos 2, 3 y 4 eran estudiados también en cuanto a la absorción y se encontró que todos los compuestos eran absorbidos por la planta en 72 h en diferentes cantidades dependiendo de la estructura química de la molécula. El DMNB-T6P (Ejemplo 2) se encontró en la planta en 3,18 µg/10 mg de concentración de la plántula en 72 h donde como mono-DMNB-T6P (Ejemplo 4) se observó en concentración de 3,60 µg/10 mg de la plántula en el mismo tiempo.

El análisis cuantitativo de los compuestos absorbidos por la planta se llevó a cabo utilizando extracto de planta recién preparado por LCMS y los datos resumidos se dan en la Tabla 2.

El % de absorción se refiere a la proporción de compuesto de ensayo suministrado a la planta que fue absorbido por la planta.

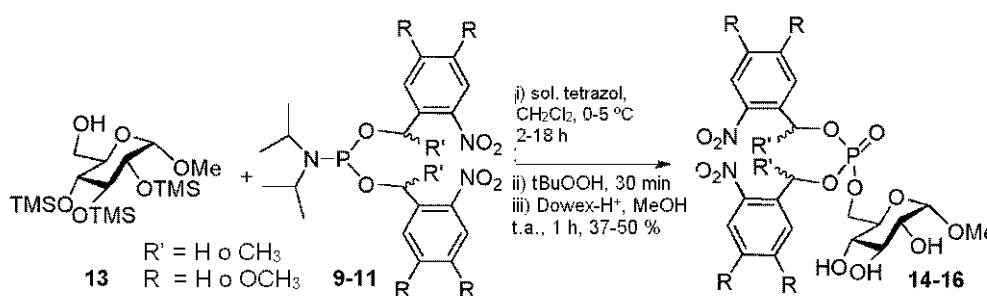
Tabla 2. Absorción de compuestos T6P protegida por las plántulas de Arabidopsis después de 72 h (3 días)

Ej. nº	Compuestos	absorción en µg / 10 mg de plántula	SEM, n = 3	Absorción %
1	NB-T6P, Ej. 1	26,39	6,81	14
2	DMNB-T6P, Ej. 2	3,18	1,52	1
3	NPE-T6P, Ej. 3	66,0	11,5	18
4	Mono-DMNB-T6P, Ej. 4	3,60	0,82	1
Comparativo	T6P	-	-	-

Ejemplo 8a: Síntesis de precursor bloqueado de glucosa-6-fosfato [G6P(1-OMe)]

Los compuestos de la invención liberan aldehído nitroso y cetona como un producto secundario junto con molécula activa T6P después de la desprotección. Los productos secundarios liberados son conocidos por ser biológicamente seguros, pero se realizaron experimentos sin embargo para confirmar si los productos secundarios liberados causan cualquier cambio fenotípico o realzan la producción de biomasa (amidón) en la planta. Con este fin, metilglicósidos bloqueados de glucosa-6-fosfato (G6P (1-OMe)) 14-16 fueron sintetizados e incluidos en estudios adicionales. La síntesis de estos G6P (1-OMe) bloqueados se empezó a partir de metil-2,3,4-tri-O-(trimetilsilil)-D-glucopiranosido 13 que fue obtenido a partir de la desprotección regioselectiva del grupo trimetilsililo sobre metil-D-glucopiranosido persililado (Meldal et al, Carbohydr. Res. 235, 115-127 (1992)).

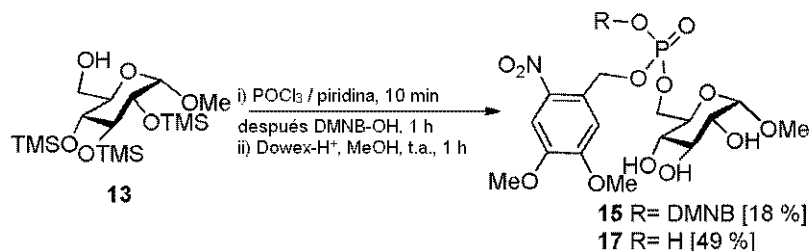
Así, el sustrato 13 y el reactivo bis(2-nitrobenzil)-N,N-diisopropilfosforamidita 9 se hicieron reaccionar en presencia de 5,0 equiv. de tetrazol (solución 0,45 M en CH₃CN) en CH₂Cl₂ a 0 °C- t. a. durante la noche seguido de oxidación con tBuOOH (0,1ml) durante 30 min y la mezcla resultante se trató con Dowex-H⁺ en metanol. La G6P(1-OMe) 14 bloqueada con NB deseada era producida con un rendimiento aislado del 50 % (Esquema 5). De forma similar, fosforamidita 10 y 11 fueron acopladas con sustrato 13 para proporcionar G6P (1-OMe) 15 bloqueada con DMNB y G6P(1-OMe) 16 bloqueada con NPE con un rendimiento aceptable junto con material de partida desprotegido.



Esquema 5. Síntesis de G6P(1-OMe) 14-16 bloqueada.

Cuando el sustrato 13 fue tratado con 1,0 equiv. de POCl₃ en piridina (Meldal et al, Carbohydr. Res. 235, 115-127 (1992)) durante 10 min seguido por la adición de 2,0 equiv. de alcohol 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzílico y agitando durante 1 h, se obtuvieron fosfatos disustituídos y monosustituídos. La mezcla resultante se agitó con Dowex-H⁺ en metanol que dio G6P(1-OMe) 15 bloqueado con DMNB y G6P(1-OMe) 17 bloqueado con mono-DMNB con

rendimientos aislables del 18 % y del 49 % respectivamente (esquema 5a).



Esquema 5a. Síntesis de G6P(1-OMe) 17 mono-bloqueada.

Ejemplo 8b: Desprotección de precursores de glucosa-6-fosfato (G6P(1-OMe) bloqueada) 14-17 in vitro:

Después del éxito de la síntesis de los compuestos G6P(1-OMe) protegidos se llevó a cabo su desprotección a varias longitudes de onda y energía de luz UV. La desprotección se hizo también bajo luz solar directa y los datos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Desprotección de G6P(1-OMe) bloqueada bajo diversas condiciones

Comp	Condic. de desprotección	125 W / 365 nm	125 W / 200-400 nm	8 W / 365 nm	8 W / 254 nm	Luz solar
	NB-G6P(1-OMe)		75 min	45 min	8 h	6 h
DMNB-G6P(1-OMe)		120 min	120 min	10 h	10 h	10 h
NPE-G6P(1-OMe)		75 min	45 min	2 h	2 h	10 h
Mono-DMNB-G6P(1-OMe)		75 min	75 min	10 h	10 h	8 h

Ejemplo 8c: Absorción de precursores protegidos de glucosa-6-fosfato (G6P(1-OMe) protegido)

Los compuestos G6P(1-OMe) protegidos se estudiaron en cuanto a la absorción por la planta utilizando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 7 y se encontró que el compuesto 14 era absorbido en cantidades trazas después de 72 h, mientras que los compuestos 15, 16 y 17 estaban presentes en una relativamente buena concentración después del mismo período. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Absorción de compuestos G6P(1-OMe) desprotegidos mediante plántulas de Arabidopsis después de 72 h (3 días)

Plántula nº	Compuestos	absorción en μg / 10 mg de plántula	SEM, n = 3	Absorción %
1	NB-G6P(1-OMe)	trazas	-	trazas
2	DMNB-G6P(1-OMe)	2,22	1,52	1
3	NPE-T6P(1-OMe)	26,36	0,75	11
4	Mono-DMNB-T6P(1-OMe)	1,59	0,50	1
Comparativo	T6P	-	-	-

Ejemplo 9: Liberación en la planta y cuantificación de T6P utilizando 2DG6P como patrón interno

5 Ejemplos 1 a 4 se suministraron a plantas Arabidopsis thaliana de tres semanas de edad y después de 72 h la plántula se irradió utilizando diferentes energía y longitud de luz UV, incluida la luz solar. Las plántulas se cosecharon y se preparó el extracto de la planta. El extracto de la planta recién preparado se procesó de acuerdo con los procedimientos descritos por Delatte et al. (Anal. Biochem. 2009, 389, 12-17), y el T6P liberado se cuantificó utilizando LCMS.

10 El cultivo de las plantas en medio agar en Phytatrays se trataron con uno de los Ejemplos 1 a 4 añadiendo 10 μl de solución 50 mM del compuesto escogido en agua para el medio agar, dando como resultado una concentración final de 1,0 mM en el medio agar para los Ejemplos 1, 2 y 4. En el caso de NPE-T6P (Ejemplo 3), la concentración final era de 0,1mM. Se evitó el contacto con las partes aéreas de las plantas. Las plantas se cultivaron durante tres días más (absorción, 72 h) y se fortalecieron para impedir el marchitamiento mediante la abertura en parte de las Phytatrays. En el tercer día las plantas se expusieron a tratamiento con UV o luz solar. Los tratamientos con UV consistieron en una exposición de 8 horas a la luz natural diurna, exposición de 8 horas a un proyector de UV de 100 W a una distancia de 18 cm o dos períodos de 8 horas de exposición a una bombilla de UV de 8 W a una distancia de 6 cm a lo largo de dos días. Las plantas de control (alimentadas con los compuestos) se trataron en las mismas condiciones pero sin luz UV (excepto para el tratamiento de la luz diurna). Después de la exposición a la luz, las partes aéreas de las plantas se cosecharon rápidamente, se pesaron y se congelaron en nitrógeno líquido.

El material de la planta cosechado se extrajo mediante extracción líquido/líquido (LLE) seguido de extracción en fase sólida (SPE) según Delatte et al. (Anal. Biochem. 389, 12-17 (2009)). Para las extracciones LLE/SPE se usaron alrededor de 25 mg de tejido de la planta combinados de varias plantas. Las muestras se disolvieron en 50 μl de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (1:1) y se sometieron a análisis de T6P utilizando 10 μl de inyección en condiciones de LC-MS (Quattro).

25 La cuantificación del T6P liberado en la planta se llevó a cabo utilizando una curva de calibrado que se registró utilizando 2DG6P (30 μM) como patrón interno con diferente concentración conocida de T6P como por el procedimiento descrito por Yang et al. (ChemBioChem 2005, 6, 346-357). A partir de los datos de registro del ion simple (SIR) obtenidos por LC-MS (Quattro), se generaron cromatogramas del ion extraídos utilizando 2DG6P como patrón interno correspondiente a T6P y 2DG6P (m/z 421 y 243). Estos se representaron en la Figura 5. La Figura 5(a) proporciona cromatogramas que muestran la presencia natural de T6P en cantidades traza junto con S6P (sacarosa-6-fosfato). La Figura 5(b) proporciona cromatogramas que muestran la mayor concentración de T6P liberado en la planta junto con patrón interno 2DG6P.

35 El área de pico de estos cromatogramas del ion extraídos se integró para determinar la relación T6P/2DG6P. Se generó una curva de calibrado de la relación de picos (T6P/2DG6P) frente a la concentración (μM). Siete puntos se usaron para generar la curva de calibrado utilizando una concentración de T6P en el intervalo desde 5 μM hasta 250 μM y una concentración constante de 30 μM de 2DG6P. A partir del análisis de la muestra, se determinaron las áreas de pico de T6P/2DG6P y la concentración de T6P fue después inferida de la curva de calibrado (Figura 4).

40 La cantidad de T6P liberado en la planta depende de la naturaleza del compuesto usado, de la fuente lumínica y de la potencia lumínica. Algo similar se encontró durante los experimentos in vitro. Las cantidades calculadas de T6P en la planta se resumen en la Tabla 5. De la Tabla quedó claro que había suficiente cantidad de T6P liberado en la planta dependiendo de la fuente lumínica. La cantidad máxima de T6P se liberó cuando las plantas alimentadas con productos químicos eran irradiadas con luz de 100 W en todos los casos. Especialmente, bajo la irradiación con luz solar todos los Ejemplos 1 a 4 liberaban T6P en la planta en suficiente cantidad que variaba de 61,0 a 153 μM . La liberación de T6P en la planta bajo la luz solar apoya además la aplicación directa de estos compuestos en la mejora del rendimiento del cultivo y el aumento en la producción de almidón en las plantas. La mayor concentración de T6P se observaba también en la plantas que eran alimentadas con compuestos de la invención y se desarrollaban con luz de crecimiento que indica que la liberación de T6P en la planta es muy eficiente. Más importante, la cantidad de

T6P en la planta puede ser controlada seleccionando las fuentes de luz y el tiempo de irradiación o seleccionando el compuesto apropiado. Estos datos indicaban que la liberación de T6P en la planta era de muy amplio espectro que es ventajoso para proporcionar control sobre los efectos en las plantas tratadas.

Tabla 5. Cantidad de T6P liberado en la planta bajo varias condiciones en μM y $\mu\text{g}/10$ mg de plántula

Ej. n°	Compuestos	100 W UV 8 h	8 W UV 16 h	Luz solar 8 h	Luz de crecimiento 8 h	Luz de crecimiento 16 h	
1	NB-T6P	T6P conc. (μM)	223,81	97,69	58,28	4,95	26,44
		T6P ($\mu\text{g}/10$ mg de plántula)	2,36	0,82	0,54	0,05	0,24
2	DMNB-T6P	T6P conc. (μM)	230,97	61,58	71,78	11,96	17,22
		T6P ($\mu\text{g}/10$ mg de plántula)	3,75	0,57	0,60	0,10	0,14
3‡	NPE-T6P	T6P conc. (μM)	22,11	17,20	19,97	12,62	9,93
		T6P ($\mu\text{g}/10$ mg de plántula)	0,23	0,13	0,17	0,09	0,07
4	Mono-DMNB- T6P	T6P conc. (μM)	234,16	75,12	148,07	30,45	83,31
		T6P ($\mu\text{g}/10$ mg de plántula)	3,09	0,64	1,25	0,23	1,84
Comparativo	T6P†	T6P conc. (μM)	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80
		T6P ($\mu\text{g}/10$ mg de plántula)	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
Comparativo	H ₂ O	T6P conc. (μM)	3,72	4,18	4,49	3,72	3,72
		T6P ($\mu\text{g}/10$ mg de plántula)	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03

† Estas plantas no se irradiaron con luz. ‡ El compuesto bloqueado con NPE se alimentó en una concentración final de 0,1 mM en comparación con los otros a los que se les dio en una concentración final de 1,0 mM.

5

Ejemplo 10: Producción de almidón aumentada

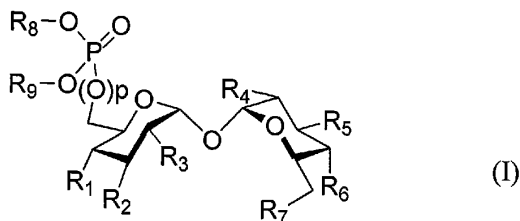
10

Se sembraron semillas de *Arabidopsis thaliana* pre-estratificadas en cultivo estéril en 0,5 ml de medio sólido (0,5x Murashige y Skoog con vitaminas de Gamborg, 0,5 % de agar) en tubos de 0,5 ml perforados con un pequeño agujero en el fondo. Los tubos se dispusieron en rejillas de poliestireno y se dejaron a flote en medio líquido sin haber añadido sacarosa en las Phytatrays. Las plántulas se cultivaron bajo 12 horas al día bajo luces fluorescentes dando $250 \mu\text{mo}/\text{m}^2/\text{s}$, y temperaturas de 23°C por el día/ 18°C por la noche. A los 16- 20 días después de sembrar, se retiró el medio líquido y los tubos se sellaron con cinta aislante. Todas las plantas fueron complementadas con 0,5 x de medio MS sin sacarosa. Las plantas se trataron con compuesto del Ejemplo 3, o agua añadiendo Ejemplo 3

5 hasta una concentración final de 0,1 mM en el medio. Al tercer día, las plantas se sometieron a luces de crecimiento
complementadas con luz UV (bombilla de UV de 8 W) desde un transiluminador Gelman (Modelo 51438) a una
distancia de 6 cm durante 8 h. las plantas se les permitió recuperarse durante un día más y las partes aéreas se
cosecharon al final del día, se pesaron y se congelaron en nitrógeno líquido. El almidón se extrajo según
procedimientos publicados, se transformó en glucosa y se midió como nmol de glucosa/gramos de peso en fresco
(Nature Protocol 2006, 1, 1342). Los resultados se representan en la Figura 6. Las plantas tratadas con Ejemplo 3
muestran niveles de almidón significativamente mayores comparadas con las plantas tratadas sólo con agua. El
aumento en la cantidad de almidón producido era diez veces mayor que la concentración de T6P liberado en la
10 planta del ejemplo 3 usado para producir este aumento de almidón. Este experimento muestra una alteración
biológica directa del metabolismo de la planta mediante la liberación controlada de la T6P.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto que es un precursor de trehalosa-6-fosfato o trehalosa-6-fosfonato de fórmula (I) o una sal del mismo agrícolamente aceptable, en el aumento de la producción de almidón en una planta:



5 en la que:

p es 0 o 1;

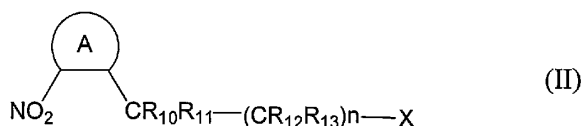
R₁ a R₇ representan independientemente F, N₃, NR'R'', alquilo C₁₋₄, -(alquilo C₁₋₄)OH u OH,

en donde R' y R'' representan independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₄; y

R₈ y R₉ son iguales o diferentes y representan H o un grupo protector fotolábil,

10 en donde al menos uno de R₈ y R₉ representa un grupo protector fotolábil.

2. Uso según la reivindicación 1, en la que bien (a) el grupo protector fotolábil es de fórmula (II):



en el que

el anillo A representa un grupo arilo o heterociclo;

15 bien (i) R₁₀ y R₁₁ son iguales o diferentes y se seleccionan de hidrógeno, alquilo C₁₋₄ que es no sustituido o sustituido con uno o más átomos de halógeno, -OR', halógeno, -NR'R'' o -CO₂R' en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C₁₋₄, o (ii) dos grupos R₁₀ en grupos protectores fotolábiles adyacentes forman juntos un enlace y R₁₁ representa hidrógeno, alquilo C₁₋₄ que está no sustituido o sustituido con uno o más átomos de halógeno, -OR', halógeno, -NR'R'' o -CO₂R' en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C₁₋₄;

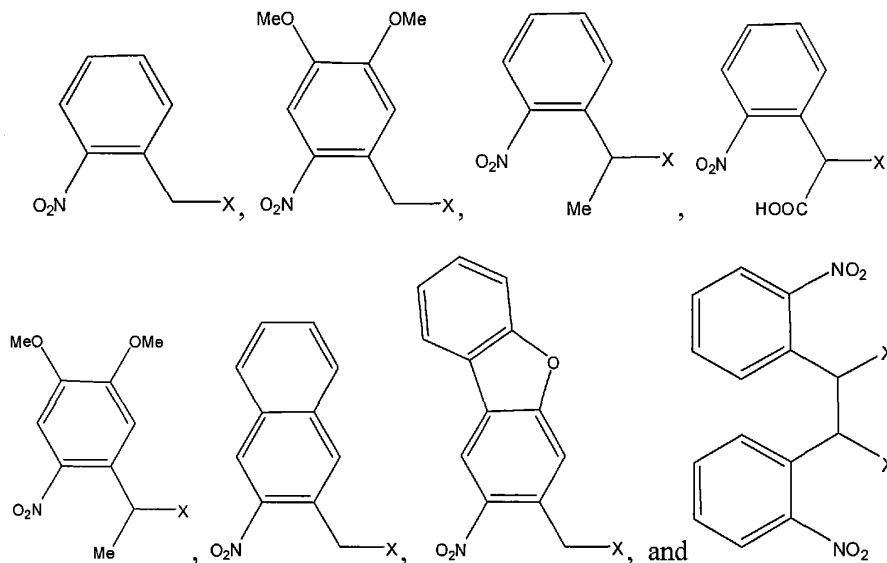
20

n es 0 o 1; y

R₁₂ y R₁₃ son iguales o diferentes y se seleccionan de hidrógeno, alquilo C₁₋₄ que está no sustituido o sustituido con uno o más átomos de halógeno, -OR', halógeno, -NR'R'' o -CO₂R' en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C₁₋₄;

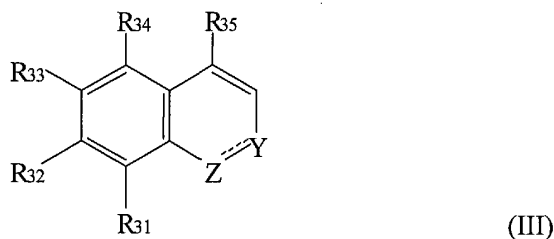
25 en donde X representa la unión al resto del compuesto de fórmula (I); o

(b) el grupo fotolábil se selecciona de



en donde X representa la unión al resto del compuesto de fórmula (I); o

5 (c) el grupo protector fotolábil es de fórmula (III):



en donde

bien Z represente N, Y representa CR₃₆ y Z e Y están unidas mediante un doble enlace; o

Z representa O, Y representa C=O y Z e Y están unidos mediante un enlace simple;

10 R₃₆ representa -CR₃₇R₃₈X;

cuando Y representa CR₃₆, R₃₅ representa hidrógeno, y cuando Y representa C=O, R₃₅ representa -CR₃₇R₃₈X;

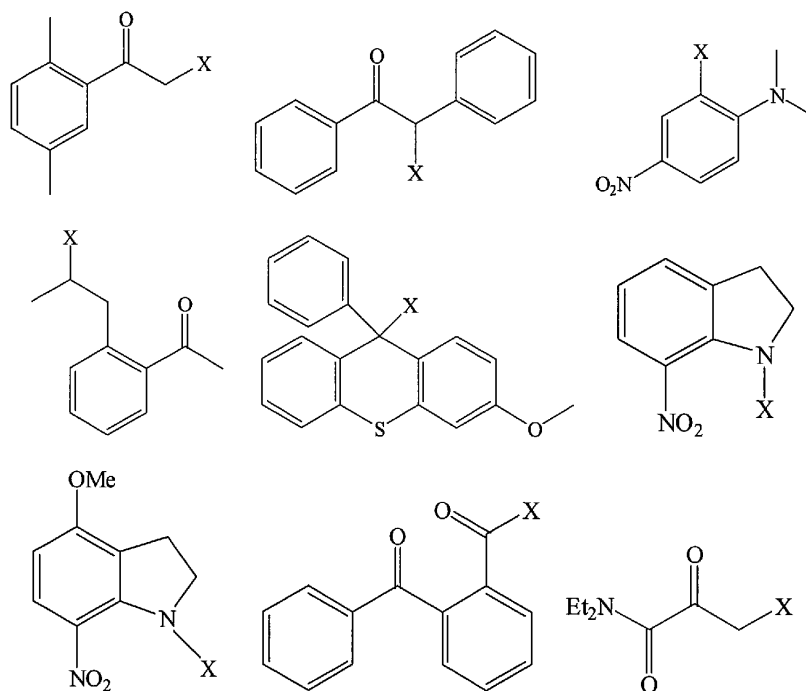
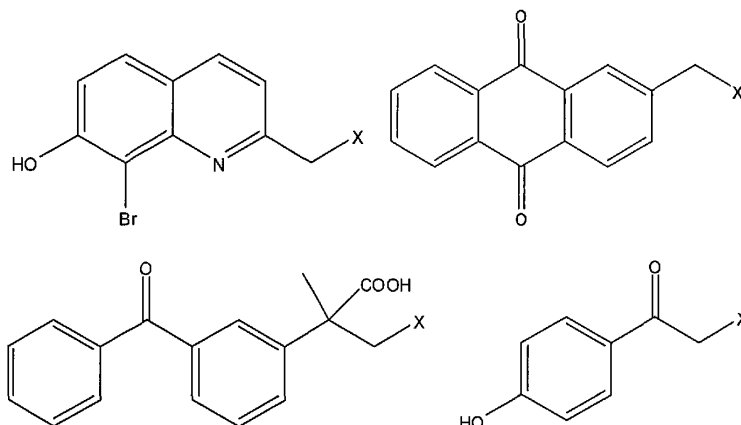
15 bien (i) R₃₇ y R₃₈ son iguales o diferentes y se seleccionan de hidrógeno, alquilo C₁₋₄ que está no sustituido o sustituido con uno o más átomos de halógeno, -OR', halógeno, -NR'R'' o -CO₂R', en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C₁₋₄, o (ii) dos grupos R₃₇ sobre grupos protectores fotolábiles adyacentes juntos forman un enlace y R₃₈ representa hidrógeno, alquilo C₁₋₄ que está no sustituido o sustituido con uno o más átomos de halógeno, -OR', halógeno, -NR'R'' o -CO₂R' en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C₁₋₄;

R₃₂ representa -OR', -NR'R'', -O(alquilo C₁₋₄)-COOR', -O(alquilo C₁₋₄)-OR' o -O(alquilo C₁₋₄)-NR'R'', en donde R' y R'' representan independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₄; y

20 R₃₁, R₃₃ y R₃₄ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, -OR', -NR'R'', -O(alquilo C₁₋₄)-COOR', -O(alquilo C₁₋₄)-OR' o -O(alquilo C₁₋₄)-NR'R'', en donde R' y R'' representan independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₄;

en donde X representa la unión al resto del compuesto de fórmula (I); o

(d) el grupo protector fotolábil se selecciona de



5

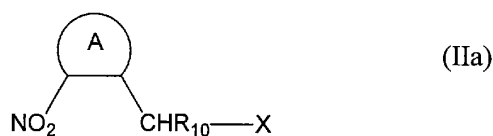
10

15

3. Uso según la reivindicación 2, en la que el grupo protector fotolábil es de fórmula (II) y el anillo A representa un grupo arilo C₆₋₁₀ o un grupo heterociclo de 5 a 14 miembros que contiene uno o más átomos seleccionados de N, O y S, en donde el grupo arilo o heterociclo está no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo C₁₋₄, -OR', halógeno, CN, -NR'R'', -COOR', -(alquilo C₁₋₄)COOR' y -O(alquilo C₁₋₄)COOR', en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C₁₋₄, o en donde dos sustituyentes adyacentes en el grupo arilo o heterociclo forman juntos un anillo heterociclo de 5 o 6 miembros que contiene uno o más heteroátomos seleccionados de N, O o S.

4. Uso según la reivindicación 2 o 3, en las que el grupo protector fotolábil es de fórmula (II) y el anillo A representa un anillo fenilo, naftalenilo o dibenzofuranilo.

5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que el grupo protector fotolábil es de fórmula (IIa):



en la que

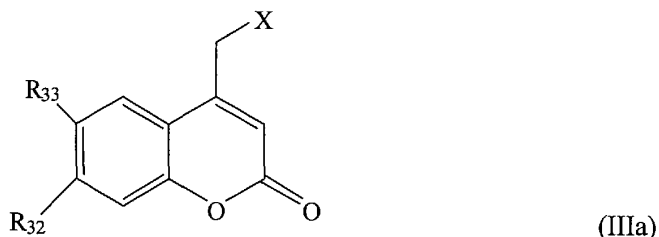
el anillo A representa un grupo no sustituido o sustituido seleccionado de fenilo, naftilo o dibenzofuranilo, en donde un grupo fenilo, naftilo o dibenzofuranilo sustituido es un grupo fenilo, naftilo o dibenzofuranilo que tiene uno o dos sustituyentes metoxi, o un grupo fenilo, naftilo o dibenzofuranilo en donde dos posiciones adyacentes del anillo están sustituidas con un resto $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$; y

5

R_{10} representa hidrógeno, metilo, $-\text{CF}_3$ o $-\text{COOH}$;

en donde X representa la unión al resto del compuesto de fórmula (I).

6. Uso según la reivindicación 2, en la que el grupo protector fotolábil es de fórmula (IIIa)



10 en la que

R_{32} representa $-\text{OR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$ o $-\text{O}(\text{alquilo } \text{C}_{1-4})-\text{COOR}'$, en donde R' y R'' representan independientemente hidrógeno o alquilo C_{1-2} ; y

R_{33} representa hidrógeno, Br, $-\text{OR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$ o $-\text{O}(\text{alquilo } \text{C}_{1-4})-\text{COOR}'$, en donde R' y R'' representan independientemente hidrógeno o alquilo C_{1-2} ;

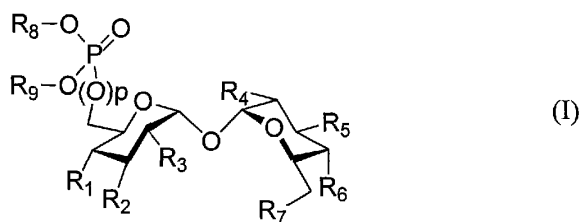
15 en donde X representa la unión al resto del compuesto de fórmula (I).

7. Uso según la reivindicación 6, en la que

- a) R_{33} representa H y R_{32} representa OH; o
- b) R_{33} representa Br y R_{32} representa OH; o
- c) R_{33} y R_{32} representan, ambos, $-\text{OCH}_2\text{COOH}$.

20 8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, (a) en las que R_1 a R_7 representan hidroxilo; y/o (b) en donde p es 1.

9. Un compuesto que es un precursor de trehalosa-6-fosfato o de trehalosa-6-fosfonato de fórmula (I) o unsa sal del mismo agrícolamente aceptable:



25 en la que:

R_1 a R_9 y p son como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

10. Una composición que comprende un compuesto como el definido en la reivindicación 9 junto con un portador o diluyente agrícolamente aceptable.

30 11. Un procedimiento para aumentar la producción de almidón en una planta, cuyo procedimiento comprende el tratamiento de la planta o del locus de la planta con una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 9 o una composición según la reivindicación 10.

12. Un procedimiento para aumentar el rendimiento del cultivo, cuyo procedimiento comprende el tratamiento del cultivo o del locus del cultivo con una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 9 o una composición según la reivindicación 10.

13. Un procedimiento para reducir la incidencia de la germinación previa a la cosecha de un cultivo, cuyo procedimiento comprende el tratamiento del cultivo o del locus del cultivo con una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 9 o una composición según la reivindicación 10.

5 14. Uso de un compuesto según la reivindicación 9 o una composición según la reivindicación 10 en el aumento del rendimiento del cultivo.

15. Uso de un compuesto según la reivindicación 9 o una composición según la reivindicación 10 en reducir la incidencia de la germinación previa a la cosecha de un cultivo.

Fig. 1

Ensayo de SnRK1 con Ejemplos 1-4 y T6P

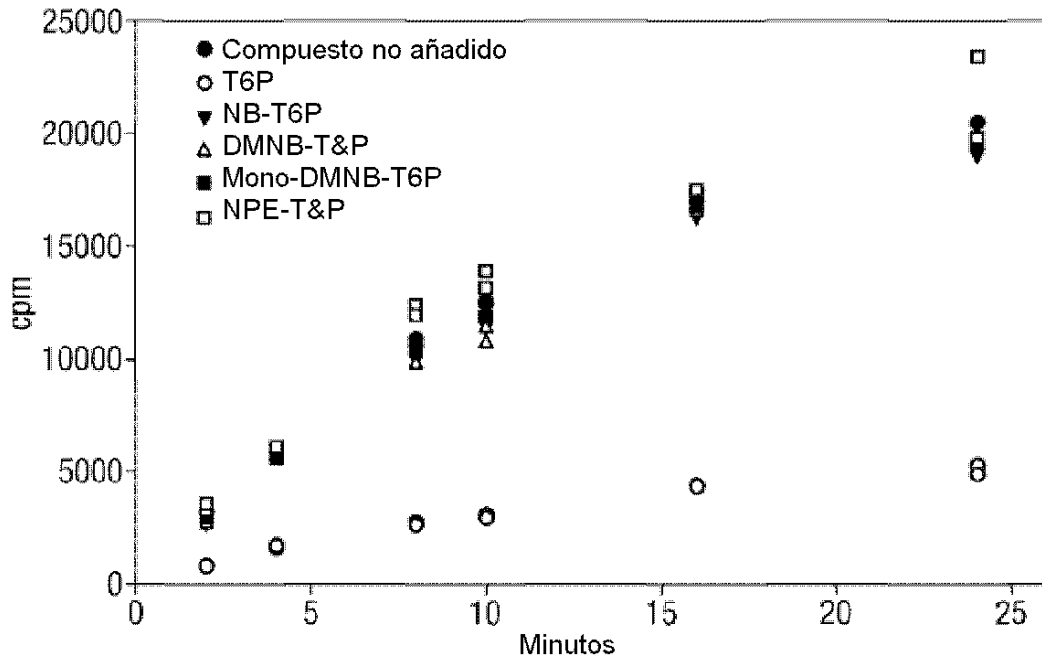


Fig. 2

P-NMR de la Desprotección del Ejemplo 1

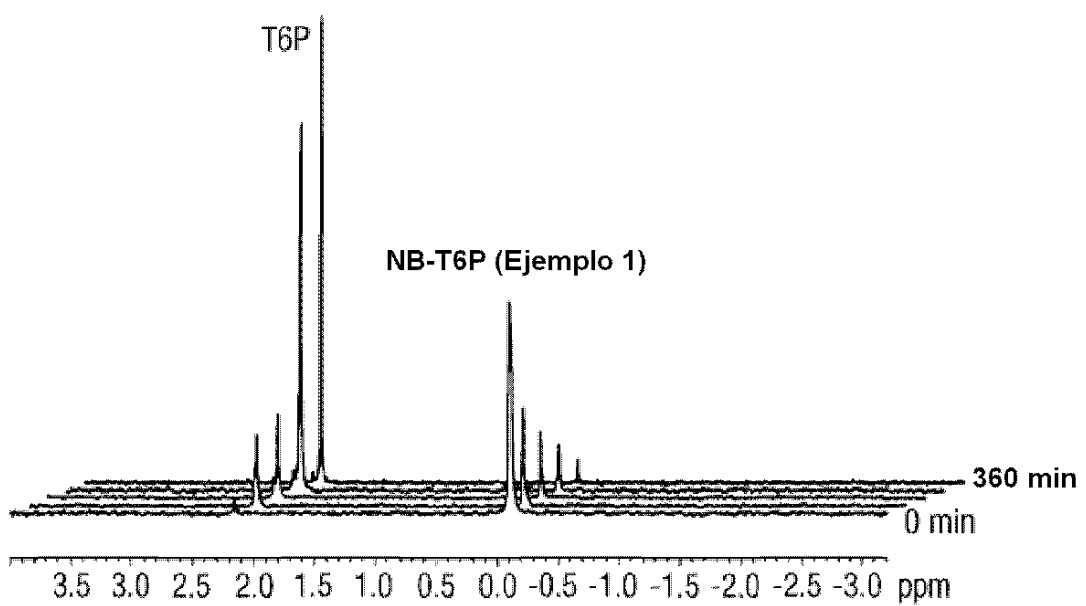


Fig. 3

Actividad de la SnRK1 en presencia de 0,32 nM de T6P desprotegida o T6P Sigma (SEM, n=6 para No T6P, n=3 para +T6P)

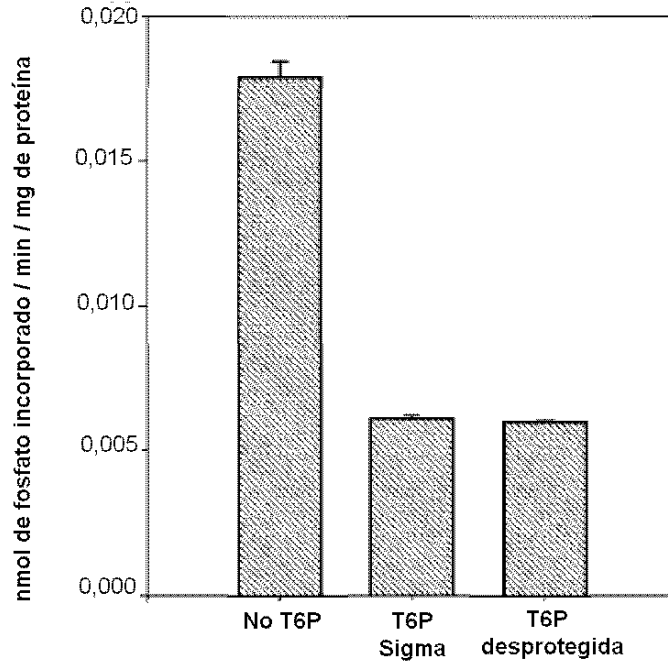


Fig. 4

Buena curva de calibrado para T6P utilizando 2DG6P como patrón interno

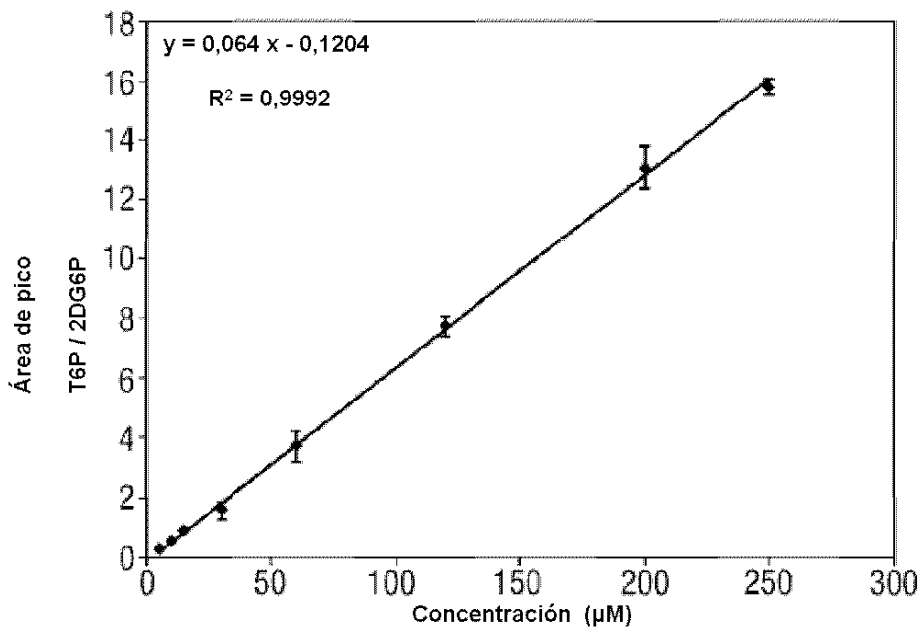


Fig. 5a

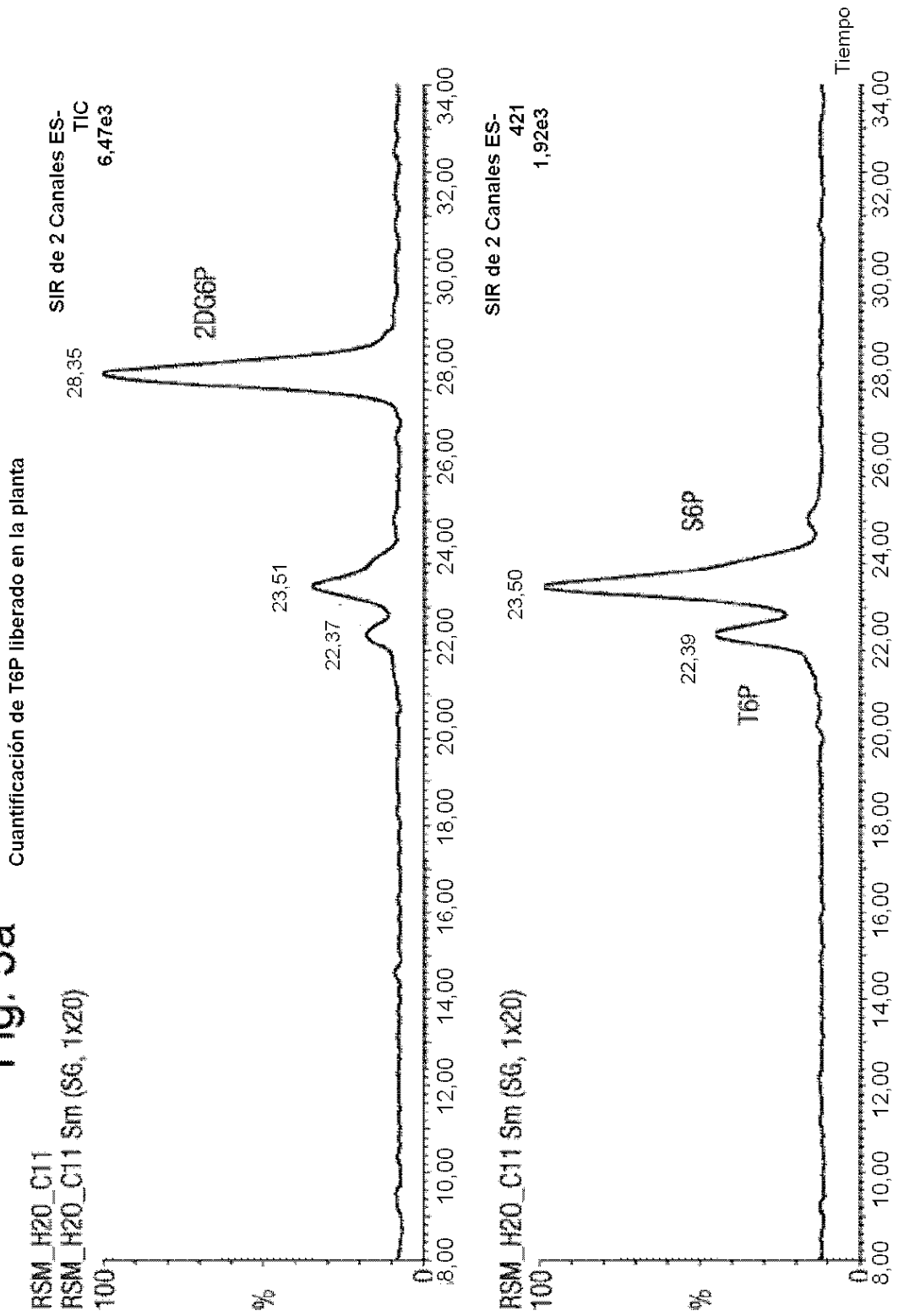


Fig. 5b Cuantificación de T6P liberado en la planta

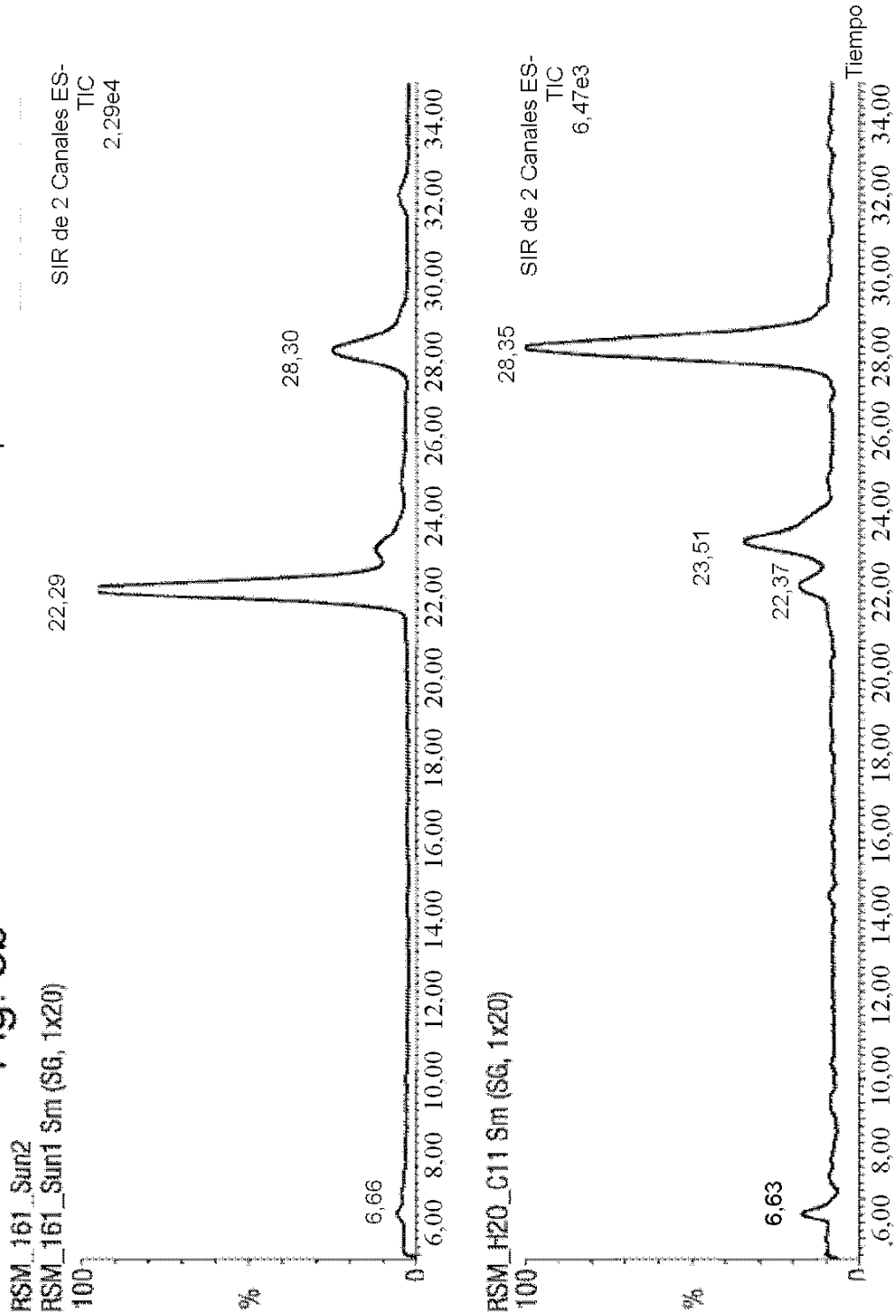


Fig. 6

Efecto del Ejemplo 3 sobre el nivel de almidón
Barras de error = SEM, n = 6

