

erren ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

# **Utilización de Reacciones de Cicloadición (3+2) en la Síntesis de Nuevas Entidades Químicas con Actividad Inhibitoria del Proteasoma**

**TESIS DOCTORAL**

**Amaia Larumbe Gárate**

**Donostia, 2015**



La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad del País Vasco (UPV-EHU), en colaboración con la empresa IkerChem y la Dra. Tamara Bello, en el centro Joxe Mari Korta bajo la dirección del Prof. Fernando P. Cossío (Catedrático de dicha Universidad) y la Dra. María de Gracia Retamosa.

La financiación de este trabajo ha provenido de una beca predoctoral del Gobierno de Navarra durante el periodo 2009-2013.

La numeración de figuras, tablas y citas bibliográficas presentes en esta memoria serán independientes para cada uno de los capítulos en los que se divide. En cambio, los productos llevarán una numeración correlativa a lo largo de toda la memoria sin tener en cuenta el capítulo 1 de Introducción.



## Lista de abreviaturas, siglas y acrónimos

*	Quiral / Centro de asimetría
Ac	Acetilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosin difosfato
Ala	Alanina, A
ALLN	Ac-Leu-Leu-Nle-CHO
AMC	7-Amido-4-metilcumarina
Ar	Arilo (grupo)
Asp	Ácido aspártico, D
ATCC	Centro de Biorecursos Globales (The Global Bioresource Center)
ATP	Adenosin trifosfato
AUC	Área bajo la curva
B	Base
Bn	Bencilo (grupo)
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo (grupo)
Bu	Butilo (grupo)
°C	Grados Celsius
c	Concentración
Cbz	Benciloxicarbonilo
CDK	Quinasa dependiente de ciclina (Cycline Dependent Kinase)
CKI	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (Cycline dependent Kinase Inhibitor)
CL	Aclaramiento plasmático
CL <sub>F</sub>	Aclaramiento plasmático en función de la fracción biodisponible
C <sub>max</sub>	Concentración máxima
Col.	Colaboradores
COSY	Espectroscopía de Correlación
CPCSEA	Comisión con el Propósito de Control y Supervisión de los Experimentos en Animales
CSA	Ácido canforsulfónico
CuAAC	Copper-accelerated azide-alkyne cycloaddition (Cicloaddición azida-alquino catalizada por cobre)

CYC	Ciclina
d	Doblete (RMN)
D	Dosis
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
dd	Doble doblete (RMN)
DEAD	Dietil azodicarboxilato
DEPC	Cianofosfonato de dietilo
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad
Diaster.	Diastereoisómero
DIBAL-H	Hidruro de diisobutilaluminio
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMEM	Medio EMEM modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
E1	Enzima activadora de ubiquitina
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina
E3	Enzima ligasa de ubiquitina
E <sup>+</sup>	Electrófilo
EC	Concentración efectiva
ECACC	Colección Europea de Cultivos Celulares (European Collection of Cell Cultures)
ed	Exceso diastereomérico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ee	Exceso enantiomérico
EMEM	Medio mínimo esencial de Eagle (Eagle's Minimal Essential Medium)
<i>ent</i> -	Enantiómero
Equiv.	equivalente
Et	Etilo (grupo)
Et <sub>3</sub> N	Trietilamina
EWG	Grupo electroattractor
F	Fracción biodisponible

FDA	Agencia de alimentos y medicamentos de EEUU (Food and Drug Administration)
G	Glicina, Gly
h	Hora
HATU	Hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]piridino-1-ilmetilén]- <i>N</i> -metilaminio
HBSS	Solución salina equilibrada de Hank (Hank's Balanced Salt Solution)
HDAC	Histona deacetilasa
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HOMO	Orbital molecular ocupado de mayor energía
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRMS	Espectroscopía de masas de alta resolución
HSQC	Heterocorrelación nuclear de cuanto simple
Hx	Hexano
Hz	Herzio
<sup><i>i</i></sup> Bu	<i>iso</i> -Butilo (grupo)
IC	Concentración inhibitoria
IFN $\gamma$	Interferón $\gamma$
I $\kappa$ B	Inhibidor de NF- $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B quinasa
INT	Intermedio de reacción
<sup><i>i</i></sup> Pr	<i>iso</i> -Propilo (grupo)
IR	Espectroscopía de infrarrojo
IV	Intravenoso
<i>J</i>	Constante de acoplamiento (RMN)
K	Lisina, Lys
K <sub>el</sub>	Constante de eliminación
KHMDS	Bis(trimetilsilil)amiduro de potasio
L*	Ligando quirral
LDA	Diisopropilamiduro de litio
Leu	Leucina, L
LUMO	Orbital molecular desocupado de menor energía
m	Multiplete (RMN)

M	Molar
MCL	Linfoma de las células del manto (Mantle Cell Lymphoma)
Me	Metilo (grupo)
Met	Metionina, M
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I
min	Minuto
MM	Mieloma Múltiple
MS	Tamiz molecular, Masas
Ms	Mesilo (metilsulfonilo)
MX	Sal metálica
N	Normal
NF-κB	Factor de transcripción
Nle	Norleucina
nM	Nanómetro
NMM	<i>N</i> -Metilmaleimida
PBS	Tampón Fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)
PEG	Polietilenglicol
P.F.	Punto de fusión
Ph	Fenilo (grupo)
ppm	Partes por millón (RMN)
pRb	Proteína del Retinoblastoma
PS	Poliestireno
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
PyBOP	Hexafluorofosfato de bonzotriazol-1-il-oxitripirrolidinfosfonio
q	Cuadruplete (RMN)
RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
RPMI	Medio de Roswell Park Memorial Institute (Roswell Park Memorial Institute Medium)
Rto.	Rendimiento
s	Singlete (RMN)
s <sub>a</sub>	Singlete ancho (RMN)
SBF	Fluido del cuerpo simulado (Simulated Body Fluid)
SDS	Dodecilsulfato sódico
Suc	Succinilo



t	Tiempo, triplete (RMN)
T	Temperatura
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media o semivida de eliminación
t.a.	Temperatura ambiente
TBAB	Bromuro de tetrabutilamonio
TBTU	Tetrafluoroborato de <i>O</i> -(1H-benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
TBS	<i>tert</i> -butildimetilsililo, TBDMS
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -Butilo (grupo)
TCIA	Ácido tricloroisocianúrico
TEMPO	Óxido de tetrametilpiperidino
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina, T
TLC	Cromatografía en capa fina
TMS	Trimetilsililo
Tol	Tolil
tr.	Tiempo de retención
TS	Estado de transición
Tyr	Tirosina, Y
Ub	Ubiquitina
UPS	Sistema ubiquitina-proteasoma (Ubiquitin Proteasome System)
Val	Valina, V
$V_d$	Volumen de distribución
$V_{dz}$	Volumen de distribución aparente
Viab.	Viabilidad celular
$V_{ss}$	Volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario
VS	Vinil sulfona
$\Delta$	Reflujo
Å	Amstrong
$\alpha$	Rotación óptica
$\delta$	Desplazamiento químico





<b>CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	57
2.1. Hipotesis .....	59
2.2. Objetivos .....	60
2.2.1. Diseño de inhibidores del proteasoma con estructura de ácido borónico y triazol .....	60
2.2.2. Diseño de inhibidores del proteasoma con estructura de ácido borónico y anillo pirrolidínico densamente sustituido .....	61
2.2.3. Diseño de inhibidores del proteasoma con estructura de $\beta$ -lactona o nitroalqueno y anillo pirrolidínico densamente sustituido .....	61
2.2.4. Evaluación biológica de los inhibidores del proteasoma sintetizados ..	62
 <b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	 63
3.1. Síntesis de ácidos borónicos con estructura de triazol .....	65
3.1.1. Síntesis de triazoles .....	65
3.1.1.1. Síntesis del alquino <b>5</b> .....	65
3.1.1.2. Síntesis de las azidas <b>10</b> y <i>ent</i> - <b>10</b> .....	67
3.1.1.3. Cicloadición 1,3-dipolar “click” entre el alquino <b>5</b> y las azidas <b>10</b> y <i>ent</i> - <b>10</b> .....	70
3.1.2. Desprotección de los ésteres borónicos .....	70
3.2. Síntesis de pirrolidinas precursoras de inhibidores proteasómicos .....	71
3.2.1. Síntesis del aminoboronato <b>15</b> .....	72
3.2.2. Síntesis Diastereoselectiva de pirrolidinas .....	73
3.2.2.1. Acoplamiento peptídico con <i>N</i> -Boc-Glicina y desprotección del grupo Boc .....	73
3.2.2.2. Síntesis del derivado imínico <b>19</b> .....	74
3.2.2.3. Cicloadición (3+2) diastereoselectiva .....	75
3.2.3. Síntesis Enantioselectiva de pirrolidinas .....	77
3.2.3.1. Síntesis de ligandos ferrocénicos quirales EhuPhos: Síntesis diastereoselectiva de pirrolidinas ferrocenil sustituidas enantiopuras .....	78
3.2.3.2. Método general de obtención de nitroalquenos aromáticos ..	81
3.2.3.3. Procedimiento general para la preparación de los $\alpha$ -iminoésteres .....	81
3.2.3.4. Procedimiento general para la cicloadición (3+2) enantioselectiva entre los $\alpha$ -iminoésteres y alquenos electrodeficientes .....	82

3.3.	Funcionalización de prolinas no naturales densamente sustituidas para la síntesis de nuevos inhibidores proteasómicos .....	88
3.3.1.	Síntesis de ácidos borónicos como electrófilos .....	88
3.3.1.1.	Síntesis de los ácidos pirrolidínicos .....	88
3.3.1.2.	Acoplamiento peptídico .....	92
3.3.1.3.	Desprotección de los ésteres borónicos .....	94
3.3.2.	Síntesis de $\beta$ -lactonas <b>45</b> como electrófilos .....	97
3.3.2.1.	Síntesis de la $\beta$ -lactona <b>48a</b> .....	97
3.3.2.2.	Síntesis de la $\beta$ -lactona <b>52a</b> .....	98
3.3.3.	Síntesis del nitroalqueno <b>59a</b> como electrófilo .....	99
3.3.3.1.	Síntesis del aldehído quiral <b>55</b> .....	100
3.3.3.2.	Reacción de Henry .....	100
3.3.3.3.	Desprotección del grupo Boc y acoplamiento con los derivados pirrolidínicos .....	101
3.3.3.4.	Eliminación de McMurry .....	102
3.4.	Evaluación biológica .....	104
3.4.1.	Ensayo enzimático <i>in vitro</i> de la actividad inhibidora del proteasoma .....	106
3.4.2.	Actividad biológica y viabilidad en líneas celulares de cáncer .....	109
3.4.3.	Estudio farmacocinético .....	115
3.4.3.1.	Introducción a la farmacocinética .....	115
3.4.3.2.	Resultados de la administración en rata de los compuestos <i>exo</i> -D- <b>43c</b> , <i>exo</i> -D- <b>43f</b> , <i>exo</i> -D- <b>43g</b> , <i>exo</i> -D- <b>43h</b> y <i>endo</i> -L- <b>43a</b> .....	118
3.4.4.	Test de Ames .....	121
<b>CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES</b> .....		123
<b>CAPÍTULO 5: SECCIÓN EXPERIMENTAL</b> .....		127
5.1.	Técnicas analíticas y reactivos químicos .....	129
5.2.	Ensayos biológicos .....	131
5.3.	Síntesis de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos .....	136
5.3.1.	Procedimiento general para la síntesis del compuesto <b>4</b> : Homologación Seyferth-Gilbert o Modificación Bestmann-Ohira ..	136
5.3.2.	Síntesis del alquino <b>5</b> : acoplamiento peptídico del compuesto <b>4</b> y el ácido 2-Pirazinoico .....	137
5.3.3.	Protección de (+)-Pinanodiol y (-)-Pinanodiol .....	138

5.3.4.	Síntesis de los compuestos <b>9a</b> y <i>ent</i> - <b>9a</b> : Homologación de ésteres borónicos terciarios .....	139
5.3.5.	Síntesis de las azidas <b>10</b> y <i>ent</i> - <b>10</b> .....	141
5.3.6.	Cicloadición 1,3-dipolar “click” entre el alquino <b>5</b> y las azidas <b>10</b> y <i>ent</i> - <b>10</b> .....	142
5.3.7.	Desprotección de los ésteres borónicos <b>12</b> y <b>13</b> .....	143
5.4.	Síntesis del aminoboronato <b>15</b> .....	145
5.4.1.	Síntesis del compuesto sililado <b>14</b> .....	145
5.4.2.	Síntesis del aminoboronato <b>15</b> .....	146
5.5.	Síntesis Diastereoselectiva de pirrolidinas .....	147
5.5.1.	Síntesis del compuesto <b>16</b> : Acoplamiento peptídico del compuesto <b>15</b> con <i>N</i> -Boc-Glicina .....	147
5.5.2.	Desprotección del grupo Boc del compuesto <b>16</b> .....	148
5.5.3.	Síntesis del derivado imínico <b>19</b> .....	148
5.6.	Síntesis de los ligandos ferrocénicos quirales NH-EhuPhos- <b>22</b> y NMe-EhuPhos- <b>31</b> .....	149
5.6.1.	Síntesis de los aldehídos quirales <b>29</b> y <i>ent</i> - <b>29</b> .....	149
5.6.2.	Síntesis de los ligandos quirales NMe-EhuPhos- <b>31</b> .....	154
5.6.3.	Síntesis de los $\alpha$ -iminoésteres quirales <b>33</b> y <i>ent</i> - <b>33</b> y los ligandos quirales NH-EhuPhos- <b>22</b> .....	156
5.7.	Síntesis de pirrolidinas altamente funcionalizadas mediante cicloadiciones (3+2) enantioselectivas entre iluros de azometino y alquenos electrodeficientes .....	158
5.7.1.	Método general de preparación de nitroalquenos aromáticos no comerciales <b>20</b> .....	158
5.7.2.	Procedimiento general para la preparación de los $\alpha$ -iminoésteres <b>34</b> .....	160
5.7.3.	Método general para las reacciones de cicloadición (3+2) enantioselectivas entre $\alpha$ -iminoésteres y alquenos electrodeficientes catalizadas por Cu(CH <sub>3</sub> CN) <sub>4</sub> PF <sub>6</sub> y los ligandos NMe-EhuPhos- <b>31</b> y NH-EhuPhos- <b>22</b> .....	162
5.7.3.1.	Síntesis de los cicloaductos <i>exo</i> - <b>35</b> .....	162
5.7.3.2.	Síntesis de los cicloaductos <i>endo</i> - <b>35</b> y <i>endo</i> - <b>38</b> .....	167
5.7.3.3.	Síntesis del cicloaducto <i>exo</i> '-L- <b>35a</b> .....	171
5.8.	Síntesis de ácidos borónicos con estructura de pirrolidina .....	172
5.8.1.	Procedimiento general para la síntesis de los ácidos pirrolidínicos ..	172
5.8.1.1.	Síntesis de los ácidos <i>exo</i> - <b>39</b> : hidrólisis básica con NaOH ..	172
5.8.1.2.	Síntesis de los ácidos <i>endo</i> - <b>40</b> : hidrólisis básica con hidróxido de trimetilestaño .....	177

5.8.1.3. Síntesis del ácido <i>exo</i> '-L- <b>39a</b> : hidrólisis básica con hidróxido de trimetilestaño .....	178
5.8.1.4. Síntesis de los ácidos <i>endo</i> - <b>39</b> : tratamiento en medio ácido .....	179
5.8.2. Procedimiento general para el acoplamiento peptídico de los ácidos pirrolidínicos <b>39</b> ó <b>40</b> y el aminoboronato <b>15</b> .....	180
5.8.3. Procedimiento general para la desprotección borónica de los productos acoplados <b>21</b> y <b>42</b> .....	181
5.9. Síntesis de β-lactonas como electrófilos .....	190
5.9.1. Síntesis de la β-lactona <b>48a</b> .....	190
5.9.2. Síntesis de la β lactona <b>52a</b> .....	191
5.9.2.1. Ciclación de la <i>N</i> -Boc-D-Serina <b>49</b> .....	191
5.9.2.2. Síntesis del tosilato <b>51</b> .....	192
5.9.2.3. Acoplamiento peptídico del compuesto <b>51</b> y el ácido <i>exo</i> -D- <b>39a</b> .....	192
5.10. Síntesis de nitroalqueno como electrófilo .....	193
5.10.1. Reducción del éster <b>53</b> al alcohol <b>54</b> .....	193
5.10.2. Oxidación del alcohol <b>54</b> al aldehído <b>55</b> .....	194
5.10.3. Síntesis del compuesto <b>56</b> : Reacción de Henry .....	195
5.10.4. Desprotección del grupo Boc del compuesto <b>56</b> .....	195
5.10.5. Acoplamiento peptídico del compuesto <b>57</b> y el ácido <i>exo</i> -D- <b>39a</b> ...	196
5.10.6. Síntesis del nitroalqueno <b>59a</b> : Eliminación de McMurry .....	197
 <b>ANEXOS</b> .....	 199
<b>Anexo A:</b> Selección de espectros de <sup>1</sup> H-RMN y <sup>13</sup> C-RMN .....	201
<b>Anexo B:</b> Patente, publicaciones y aportaciones en congresos .....	249





# 1

## Introducción

---

- 1.1. El proteasoma**
    - 1.1.1. Introducción general**
    - 1.1.2. El proteasoma y su importancia como diana terapéutica en oncología**
      - 1.1.2.1. Sistema ubiquitina-proteasoma
        - 1.1.2.1.1. Ubiquitinación
        - 1.1.2.1.2. Estructura y funcionamiento del proteasoma
        - 1.1.2.1.3. Funciones del sistema ubiquitina-proteasoma
    - 1.1.3. Inhibidores del proteasoma**
      - 1.1.3.1. Mecanismo de actuación
      - 1.1.3.2. Clasificación
        - 1.1.3.2.1. Inhibidores que forman enlaces covalentes con los sitios activos
        - 1.1.3.2.2. Inhibidores no covalentes
        - 1.1.3.2.3. Otros tipos de inhibidores
      - 1.1.3.3. Inhibidores en uso clínico
        - 1.1.3.3.1. Bortezomib
        - 1.1.3.3.2. Carfilzomib
        - 1.1.3.3.3. Otros inhibidores en ensayos clínicos
  - 1.2. Reacciones de cicloadición 1,3-dipolares**
    - 1.2.1. Aspectos generales**
    - 1.2.2. Azidas como dipolos**
    - 1.2.3. Iluros de azometino como dipolos**
      - 1.2.3.1. Control de la selectividad en la reacción de cicloadición 1,3-dipolar
      - 1.2.3.2. Mecanismo de las cicloadiciones (3+2)
-



## **1.1. El proteasoma**

### **1.1.1. Introducción general**

La palabra cáncer engloba a un amplio grupo de enfermedades de las que puede ser susceptible cualquier parte de un organismo. Se caracteriza por la desregulación del crecimiento celular o multiplicación rápida de células anormales, así como por la invasión de partes adyacentes o la propagación a otros órganos del cuerpo. Este último proceso es conocido con el nombre de metástasis y es la causa principal de muerte por cáncer. Existen más de 100 tipos de cáncer y en la actualidad es una de las enfermedades de mayor índice de mortalidad en todo el mundo. De todas las muertes registradas en 2012, 8,2 millones fueron causadas por esta enfermedad. Además, las predicciones anuncian que el número de defunciones por cáncer seguirá aumentando hasta superar los 22 millones en las próximas dos décadas.<sup>1</sup> Los tipos de cáncer que más muertes producen al año son los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama.

No todos los tipos de cáncer son iguales, sino que existen diferencias en el mecanismo molecular de cada uno, por lo que es necesario conocer bien dichos mecanismos de actuación específicos para conseguir una mayor eficacia a la hora de aplicar los distintos tratamientos.

Hasta hace unos años el tratamiento del cáncer se fundamentaba en tres pilares importantes: cirugía, quimioterapia y radioterapia. Actualmente, se está desarrollando la investigación de terapias dirigidas, con tratamientos que actúan sobre una diana concreta. Estos tratamientos pueden ser muy efectivos y complementar algunos de los citados anteriormente como la radioterapia o quimioterapia. Asimismo, pueden ser menos dañinos para las células normales debido a que se centran en cambios celulares y específicos asociados a procesos tumorales.

Debido a las numerosas dianas existentes en el organismo, cabe esperar multitud de terapias dirigidas. Una de las que ha cobrado una gran relevancia dentro de la oncología es la actuación sobre el sistema ubiquitina-proteasoma. El diseño de nuevos inhibidores proteasómicos y su actividad anticancerosa serán el objeto de investigación de la presente Tesis.

---

<sup>1</sup> Datos de la OMS 2012, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es>.

## 1.1.2. El proteasoma y su importancia como diana terapéutica en oncología

### 1.1.2.1. Sistema ubiquitina-proteasoma

El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) es una importante maquinaria celular compleja y dinámica, responsable de la degradación selectiva del 90% de las proteínas celulares eucariotas y juega un papel crucial manteniendo la homeostasis celular. Este sistema se encuentra tanto en el citosol como en el núcleo y presenta dos partes: el sistema de ubiquitinación y el proteasoma.

En los organismos existe un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de proteínas. Dicha degradación es llevada a cabo por los proteasomas, pero para ello los sustratos susceptibles a ser destruidos (proteínas dañadas, mal plegadas o que finalizan su vida útil) tienen que haber sido reconocidos por el sistema de ubiquitinación y marcados con cadenas poliubiquitínicas. Este proceso requiere gran cantidad de energía y genera oligopéptidos, que a su vez son reducidos a sus aminoácidos constituyentes (Figura 1.1).

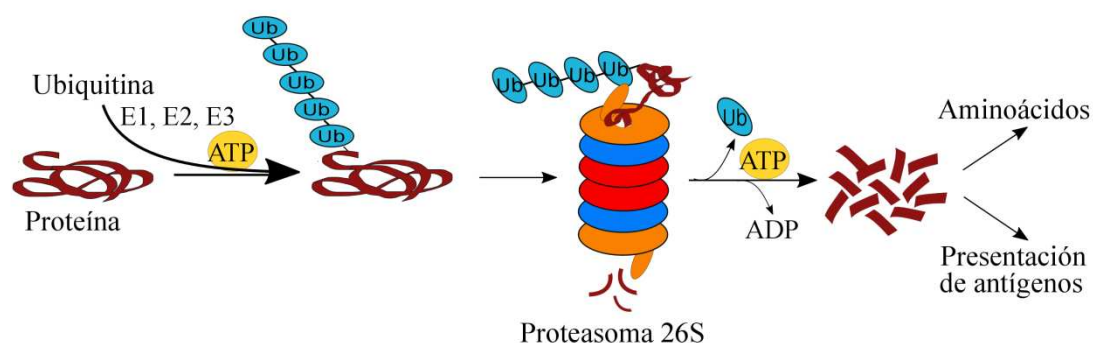


Figura 1.1. Sistema ubiquitina-proteasoma (UPS).<sup>2</sup>

Así pues, el UPS es un elemento clave en la regulación de gran cantidad de procesos que sustentan la vida celular. De esta forma, su mal funcionamiento está asociado a múltiples enfermedades (cáncer, fibrosis, diabetes de tipo II, entre otras) y patologías degenerativas (neuronal, muscular, inflamatorias, inmunitarias, ...).

<sup>2</sup> Ghobrial, I. M.; Richardson, P. G.; Anderson, K. C. Eds. *Bortezomib in the Treatment of Multiple Myeloma. Volume of Milestones in Drug Therapy*, Springer, 2011.

### 1.1.2.1.1. Ubiquitinación

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos y 8,5 kDa y su secuencia presenta siete residuos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) y uno de glicina (G76).<sup>3</sup> El proceso de ubiquitinación es de naturaleza enzimática (E1-E3) dependiente de ATP y en el último paso se transfiere la ubiquitina a una lisina de la proteína diana.<sup>4</sup> Existen sólo dos isoformas de E1 en humanos, mientras que hay unas 30 E2 y unas 300 E3.<sup>5</sup> Además hay una gran versatilidad de modelos de reconocimiento, lo que, unido al elevado número de combinaciones E2-E3 posibles, hace que exista una elevada selectividad y variabilidad en la regulación de la ubiquitinación de proteínas.<sup>4</sup>

De esta forma, la unión de la primera ubiquitina a la proteína a marcar se produce entre el residuo de glicina C-terminal de la ubiquitina (G76) y la cadena lateral ( $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>) de un residuo de lisina de dicha proteína, aunque a veces también puede unirse por su N-terminal.<sup>4,6</sup> Esta unión servirá como inicio para la formación de una cola de ubiquitina, que será reconocida por el proteasoma para su posterior degradación.

La ubiquitinación puede ocurrir de diferentes maneras. Dependiendo del residuo de lisina que se une a la glicina 76 de la siguiente ubiquitina y del tipo de ramificación de la cadena el resultado es diferente. Así pues, se puede producir la monoubiquitinación, la multiubiquitinación y la poliubiquitinación. Las dos primeras están relacionadas con la reparación del ADN, la regulación de la expresión génica y la endocitosis de receptores.<sup>7</sup> La última se produce tras la unión de varias moléculas de ubiquitina a una misma lisina del sustrato formando una cadena.

De las uniones posibles las K48 son mayoritarias y las cadenas poliubiquitinadas que las presentan dirigen el sustrato al proteasoma para su degradación. Se ha demostrado también que la longitud de las poliubiquitinas K48 es importante en su afinidad por el proteasoma. Las uniones K63 también son importantes y están ligadas a la regulación de la endocitosis, a la reparación del ADN y a la activación del NF- $\kappa$ B.

---

<sup>3</sup> Pickart, C. M.; Fushman, D. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2004**, 8, 610-616.

<sup>4</sup> Mani, A.; Gelmann, E. P. *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 4776-4789.

<sup>5</sup> Kale, A. J.; Moore, B. S. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 10317-10327.

<sup>6</sup> Ciechanover, A. *The EMBO Journal*. **1998**, 17, 7151-7160.

<sup>7</sup> Mayer, R. J.; Ciechanover, A.; Rechsteiner, M. Eds. *The Ubiquitin-Proteasome System and Disease. Volume 4 of Protein Degradation*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2008.

### 1.1.2.1.2. Estructura y funcionamiento del proteasoma

El proteasoma es un complejo proteico extremadamente complejo que se encuentra en el núcleo y citosol de las células eucariotas y en el nucleóide de las procariotas. Consta de múltiples subunidades y su función principal es la degradación de proteínas marcadas con cadenas poliubiquitínicas de unión K48. Dicho proceso es llevado a cabo de forma específica y eficiente y para ello se requiere consumo de ATP.<sup>4</sup> El sistema consta de dos tipos de subunidades: el complejo 20S y las unidades reguladoras.

#### a) Complejo 20S

El núcleo catalítico del proteasoma es el llamado complejo 20S y tiene actividad proteasa. Se trata de un complejo multienzimático de aproximadamente 700 kDa y está formado por 28 subunidades dispuestas en cuatro anillos apilados resultando una estructura cilíndrica. Los dos anillos externos están formados cada uno por siete subunidades  $\alpha$  distintas, y los dos internos por siete subunidades  $\beta$  distintas cada uno, quedando una estructura  $\alpha_{1-7}\text{-}\beta_{1-7}\text{-}\beta_{1-7}\text{-}\alpha_{1-7}$  (Figura 1.2). En procariotas todas las subunidades  $\alpha$  son idénticas entre ellas y las  $\beta$  también, por lo que la estequiometría de dicho proteasoma es  $\alpha_7\text{-}\beta_7\text{-}\beta_7\text{-}\alpha_7$ .<sup>8,9</sup>

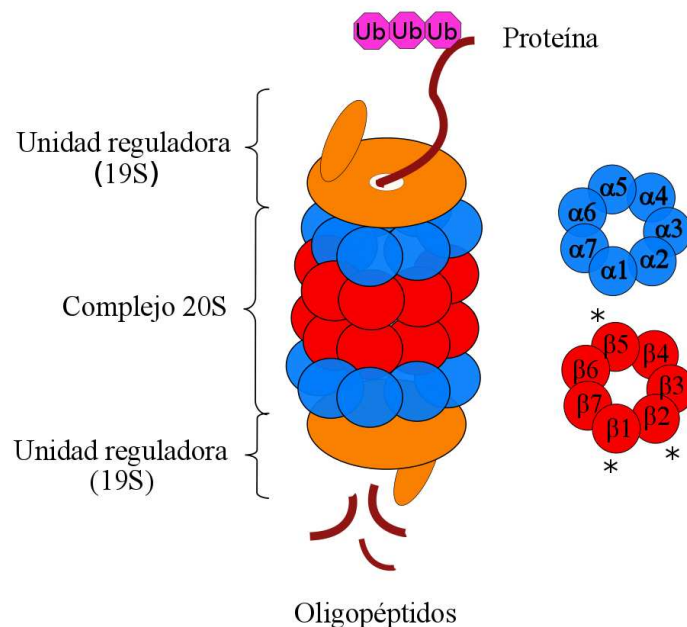
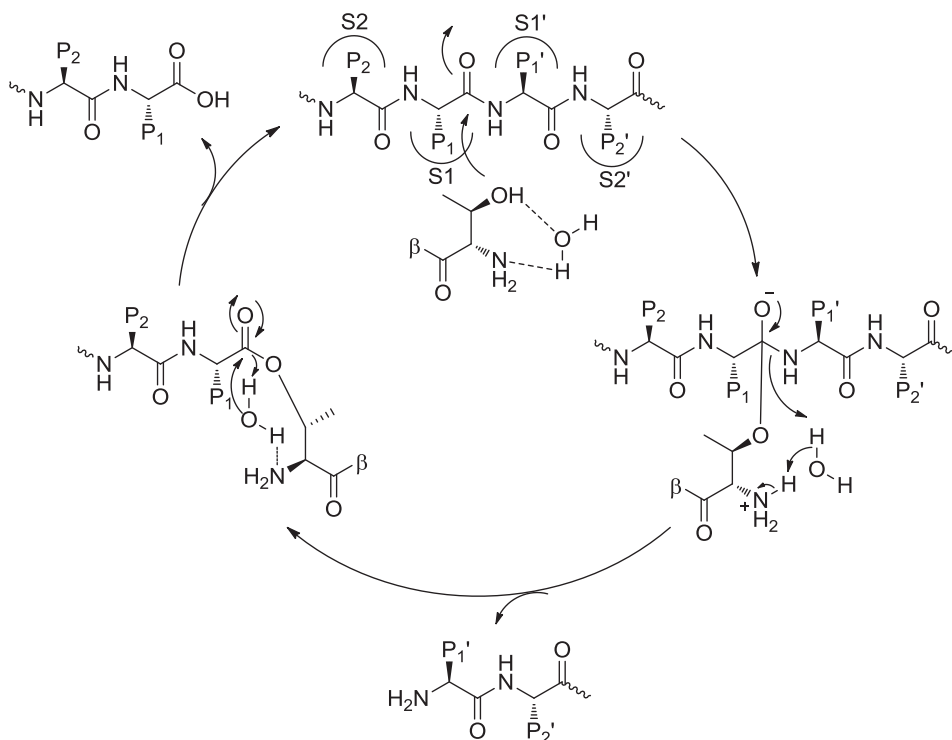


Figura 1.2. Representación del proteasoma 26S.<sup>5</sup> Las subunidades  $\beta$  con actividad catalítica están señaladas con un asterisco.

<sup>8</sup> Tanaka, K. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* **2009**, 85, 12-36.

<sup>9</sup> Konstantinova, I. M.; Tsimokha, A. S.; Mittenberg, A. G. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2008**, 267, 59-124.

La actividad proteolítica de los proteasomas reside en las subunidades  $\beta$ , concretamente en las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$  de los dos anillos internos para las células eucariotas. Estas tres subunidades contienen como extremo *N*-terminal libre un residuo de treonina, lo que permite al proteasoma hidrolizar enlaces peptídicos por el extremo *C*-terminal de los aminoácidos ácidos, básicos e hidrofóbicos (Esquema 1.1). La actividad caspasa proteasa corresponde a la subunidad  $\beta 1$  e hidroliza enlaces tras aminoácidos ácidos. La actividad tripsina proteasa corresponde a  $\beta 2$  y corta después de aminoácidos básicos y la actividad quimotripsina proteasa corresponde a la subunidad  $\beta 5$  e hidroliza tras aminoácidos hidrofóbicos. La actividad catalítica consiste en la formación de un enlace peptídico a través del residuo de treonina asistido por al menos una molécula de agua.<sup>10</sup>



Esquema 1.1. Mecanismo catalítico del proteasoma.<sup>11</sup>

Las preferencias de hidrólisis de las subunidades catalíticamente activas vienen determinadas por la naturaleza química de los bolsillos específicos de sustrato que poseen los proteasomas (S). Éstos son los que acomodan a las cadenas laterales de los ligandos o proteínas (P) haciendo que los tiempos de residencia de dichos ligandos en los canales de unión del sustrato sean mayores o menores.<sup>10</sup>

<sup>10</sup> Beck, P.; Dubiella, C.; Groll, M. *Biol. Chem.* **2012**, 393, 1101-1120.

<sup>11</sup> Kisselev, A. F.; van der Linden, W. A.; Overkleeft, H. S. *Chem. Biol.* **2012**, 19, 99-115.

Los nombres de los bolsillos específicos S1, S2, S3, ..., S<sub>n</sub> y S1', S2', S3', ..., S<sub>n</sub>' se refieren a los sitios de unión de los residuos de las proteínas al proteasoma y dependen de su proximidad a los centros activos (*n*). Se denotan S<sub>n</sub> a los que se encuentran antes del enlace peptídico que se hidroliza y S<sub>n</sub>' a los que se sitúan después. De la misma forma, los residuos del sustrato que interactúan con los bolsillos específicos del proteasoma se denominan con las mismas bases que dichos bolsillos (P1, P2, P3, ..., P<sub>n</sub> y P1', P2', P3', ..., P<sub>n</sub>') (Figura 1.3).<sup>12</sup>

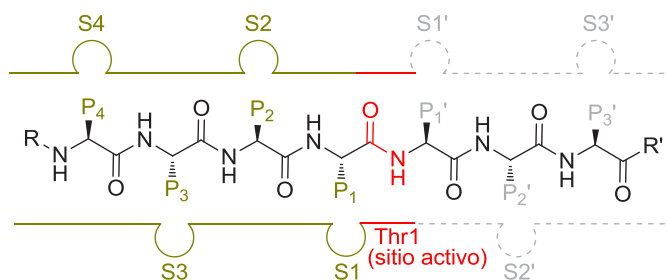


Figura 1.3. Representación esquemática del canal de unión al sustrato del proteasoma con un ligando peptídico.<sup>10</sup>

El acceso a los centros catalíticos de los anillos  $\beta$  está protegido por dos poros de aproximadamente 1.3 nm, uno a cada extremo del complejo cilíndrico. A través de ellos los sustratos que van a ser degradados acceden a la cavidad catalítica, cuyo acceso es controlado por las colas *N*-terminales de las subunidades  $\alpha$ . Esta estructura, así como diferentes partículas reguladoras, son las que protegen a la célula de la degradación no controlada o indiscriminada de proteínas.<sup>9</sup> Según este esquema y debido a sus dimensiones, el complejo 20S sólo sería capaz de degradar proteínas totalmente desplegadas y sin puentes disulfuro.

Los mamíferos tienen tres subunidades catalíticas  $\beta$  adicionales:  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i y  $\beta$ 5i que reemplazan a las subunidades constitutivas  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 5 en los proteasomas formados en presencia de interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Este tipo de proteasomas se denominan inmunoproteasomas y tienen más actividad hidrolítica tripsina y quimotripsina que caspasa, por lo que se incrementa la producción de péptidos con residuos *C*-terminales básicos e hidrofóbicos. Estos péptidos tienen una mayor capacidad para unirse al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC), mejorando la presentación antigénica y la respuesta inmune.<sup>8,9</sup>

<sup>12</sup> Borissenko, L.; Groll, M. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 687-717.



b) *Unidades reguladoras*

El complejo 20S por sí solo es inactivo, por lo que para su funcionamiento con actividad proteolítica es esencial la presencia de una o dos unidades reguladoras en los extremos, de las que existen diferentes tipos:

19S ó PA700

El complejo 20S puede estar unido a una o dos unidades reguladoras 19S formando el proteasoma 26S, para cuya formación y estabilidad se requiere ATP.

La partícula 19S o PA700 es la encargada del reconocimiento de las proteínas marcadas con las cadenas poliubiquitínicas, de la liberación de dichas cadenas del sustrato, del desplegamiento de la proteína diana, de la apertura del anillo externo de subunidades  $\alpha$  y de la translocación de la proteína desplegada al interior de la cavidad del complejo 20S para su degradación. Esta unidad está compuesta por dos partes: la base y la tapa (en inglés lid).<sup>8</sup>

La base está formada por seis AAA-ATPasas homólogas (Rpt1-6) que interaccionan con los anillos  $\alpha$  del proteasoma 20S. Tiene como funciones principales el desdoblamiento y translocación de las proteínas marcadas mediante ubiquitina al interior del canal catalítico, gracias a la apertura del anillo  $\alpha$ . Además, la base contiene cuatro subunidades no ATPasas (Rpn1, 2, 10 y 13) que se encargan del reconocimiento de dichas proteínas.

La tapa (lid) está compuesta por al menos nueve subunidades con capacidad no ATPasa (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12 y Rpn15) y está unida a la base mediante la subunidad Rpn10. Su función más importante es la de desubiquitinar las proteínas sustrato poliubiquitinadas, liberando las cadenas completas. Es aquí donde tiene especial importancia la subunidad Rpn11 ya que se encarga de acoplar la deubiquitinación con la degradación proteolítica, además del reciclado de las unidades de ubiquitina.<sup>8,13</sup>

---

<sup>13</sup> Sharon, M.; Taverner, T.; Ambroggio, X. I.; Deshaies, R. J.; Robinson, C. V. *PLoS Biol.* **2006**, *4*, 1314-1323.

### Otras partículas reguladoras

Además del complejo regulador 19S existen otras partículas que se unen al núcleo catalítico 20S y dan lugar a otros tipos de proteasoma. Ejemplos de ellas son la 11S (o PA28) y la PA200. La primera tiene forma cónica, está formada por tres partes,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , y se asocia al complejo 20S por los dos extremos. Su expresión está regulada por interferón- $\gamma$  (INF $\gamma$ ) y su función principal está relacionada con el procesamiento de antígenos MHC de clase I o la regulación del ciclo celular, división celular, carcinogénesis y la apoptosis.<sup>8,9</sup> PA200, en cambio, es una proteína de cadena simple que se expresa mayoritariamente en el núcleo e interacciona con casi todas las subunidades  $\alpha$  del anillo externo. Promueve la maduración del proteasoma, activa la hidrólisis de péptidos pero no de proteínas y parece tener cierta importancia en la estabilidad de la cromatina y en la reparación del ADN.<sup>8</sup> Por otra parte el proteasoma puede estar flanqueado por distintos complejos reguladores a la vez formando proteasomas mixtos o híbridos. Ejemplo de este sistema es el proteasoma formado por la triada PA700-20S-PA28.

#### **1.1.2.1.3. Funciones del sistema ubiquitina-proteasoma**

La función principal del proteasoma en eucariotas es la degradación de proteínas que intervienen en muchos procesos intra e intercelulares, entre los que se encuentran la regulación del ciclo celular, el desarrollo y diferenciación de las células, la apoptosis y angiogénesis, así como la respuesta inmune, la inflamación, la transcripción de factores de crecimiento y la señalización celular.<sup>9</sup>

La apoptosis está regulada a través de dos sistemas proteolíticos: las caspasas (familia de cisteín-proteasas) y los proteasomas. Estos últimos degradan proteínas reguladoras de la apoptosis. Realizan una proteólisis programada en la célula activando o desactivando funciones anti-apoptóticas o pro-apoptóticas. De esta forma, el proteasoma actúa como pieza clave manteniendo el balance crítico entre proteínas pro- y anti-apoptóticas.<sup>9</sup> Por ejemplo, se ha observado que la inhibición del proteasoma antes de la inducción de la apoptosis genera acumulación de proteínas anti-apoptóticas, lo que implica la supervivencia de las células. Sin embargo, la inhibición proteasómica después de la inducción de la apoptosis produce acumulación de proteínas pro-

apoptóticas y con ello la muerte celular.<sup>14</sup> Además se ha observado que la inhibición proteasómica con sustancias químicas tiene efectos diferentes dependiendo del tipo celular, del grado de inhibición así como del tiempo de tratamiento.<sup>15</sup>

Las proteínas mal plegadas o anormales son degradadas por el sistema ubiquitina-proteasoma. Este sistema proteolítico genera péptidos de antígenos intracelulares, que son presentados a las células T, de modo que juegan un papel central en la respuesta inmune de las células.<sup>9</sup> El IFN $\gamma$  controla las propiedades proteolíticas del proteasoma para adaptarlas a los requerimientos del sistema inmune. Así pues, un defecto en la regulación de estas proteínas clave puede desencadenar la estimulación de la proliferación celular, la angiogénesis, favorecer el crecimiento tumoral y la aparición de metástasis. Por ello, la inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma se ha convertido en un importante tema de estudio en el tratamiento del cáncer.

### 1.1.3. Inhibidores del proteasoma

La validación clínica del proteasoma como diana terapéutica en oncología fue lograda cuando el Bortezomib (Velcade<sup>®</sup>) se convirtió en el primer inhibidor proteasómico aprobado por la FDA en 2003 para el tratamiento del mieloma múltiple y el linfoma de células del manto.<sup>2</sup> La actividad del Bortezomib es debida a la inhibición de proteínas reguladoras y pro-apoptóticas. Este éxito ha hecho que los inhibidores proteasómicos sean candidatos muy prometedores como fármacos en terapia anticancerosa y que resulte necesario encontrar nuevos compuestos que posean mayor eficacia, buena biodisponibilidad oral y reducida toxicidad.

#### 1.1.3.1. Mecanismo de actuación

Tras el descubrimiento del complejo 20S, el primer paso fue analizar su mecanismo de acción frente a inhibidores de proteasa no específicos. Actualmente, varias moléculas con gran selectividad por el centro catalítico han sido objeto de estudio de las funciones del proteasoma en procesos biológicos tanto *in vivo* como *in vitro*. Esto

---

<sup>14</sup> (a) Sohn, D.; Totzke, G.; Essmann, F.; Schulze-Osthoff, K.; Levkau, B.; Jänicke, R. U. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 1967-1978. (b) Sohn, D.; Totzke, G.; Schulze-Osthoff, K.; Jänicke, R. U. *Cell Cycle* **2006**, *5*, 841-845.

<sup>15</sup> Meiners, S.; Ludwig, A.; Stangl, V.; Stangl, K. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 309-327.

ha generado nuevos conocimientos acerca de los diferentes mecanismos que pueden estar involucrados en las interacciones entre dichas moléculas y el protasoma así como de las vías que pueden quedar afectadas por dicha interacción. No obstante, todavía quedan muchas lagunas por resolver para poder diseñar fármacos más selectivos y efectivos.<sup>16</sup>

Se conocen diversos mecanismos de actuación, todos ellos relacionados entre sí. A continuación se van a describir algunos de los principales.

a) *Vía basada en el NF-κB*

Uno de los mecanismos más importantes sobre el que actúan los inhibidores proteasómicos es la inhibición del factor de transcripción NF-κB. Se trata de un complejo proteico que controla la transcripción del ADN y tiene importancia en la respuesta inflamatoria e inmune y en el proceso de proliferación y muerte celular. Este factor normalmente se encuentra como dímero en el citoplasma<sup>17</sup> y en condiciones normales está unido a su inhibidor, IκB, quedando por tanto desactivado o en forma latente. Para su activación es necesaria una estimulación celular, que puede ser generada por diversas señales extracelulares (estrés celular, determinadas enfermedades como el cáncer, algunos virus, factores de crecimiento, radioterapia, quimioterapia...). Es entonces cuando se induce el complejo quinasa, IKK, que produce la fosforilación del inhibidor IκB, que a su vez da lugar a la ubiquitinación, disociación del complejo IκB-NF-κB y la consiguiente degradación de IκB por el proteasoma. De esta forma se activa el factor de transcripción NF-κB, que una vez libre, se transloca dentro del núcleo, donde induce la transcripción de varios genes que conducen a cambios en la función de la célula (Figura 1.4).

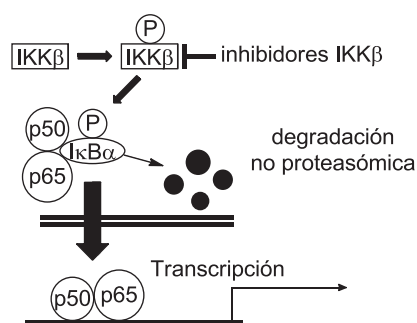


Figura 1.4. Posible mecanismo de la activación del factor NF-κB.<sup>2</sup>

<sup>16</sup> Groll, M.; Bochtler, M.; Brandstetter, H.; Clausen, T.; Huber, R. *ChemBioChem* **2005**, 6, 222-256.

<sup>17</sup> Weinberg, R. A. Ed. *The Biology of Cancer*, Garland Science, Taylor & Francis Group, 2007.

Además, este factor puede inducir la expresión de múltiples genes involucrados en la proliferación celular,<sup>18</sup> en la producción de factores angiogénicos y antiapoptóticos, lo que confiere a la célula potencial de malignidad e induce un riesgo importante de metástasis.<sup>19</sup> NF-κB es ampliamente utilizado por las células eucariotas como regulador de los genes que controlan la proliferación y supervivencia celular. En las células cancerosas, los proteasomas se encuentran altamente expresados, por lo que la vía de NF-κB se encuentra muy activada. Ello favorece la proliferación celular, además de proteger a dichas células de la apoptosis y conferirles resistencia a la radiación y a la quimioterapia.<sup>18</sup> El bloqueo de NF-κB hace que las células tumorales dejen de proliferar, que mueran (apoptosis) o que sean más sensibles a la acción de los agentes anti-tumorales. La inhibición del proteasoma inhibe la degradación de IκB lo que permite la acumulación en el citoplasma de su forma fosforilada. Además, este bloqueo es clave para la inducción de apoptosis. Por todo esto, NF-κB se ha convertido en el objeto de muchas terapias contra el cáncer.

La vía NF-κB activa gran cantidad de proteínas, de las cuales las más importantes relacionadas con la carcinogénesis son las ciclinas (CYC), especialmente las D y E, implicadas en el ciclo celular.<sup>18</sup>

*b) Vía basada en las ciclinas y el ciclo celular*

Las células se reproducen mediante división celular, proceso necesario para reemplazar las células eliminadas por desgaste, deterioro o muerte celular programada, pero para ello es imprescindible que la proliferación esté sujeta a controles muy estrictos.

Se puede definir el ciclo celular<sup>20</sup> como la secuencia ordenada de acontecimientos mediante los cuales la célula duplica su contenido y se divide en dos. Consiste en una serie de etapas (G1 → S → G2 → M) por las que atraviesa la célula, a lo largo de las cuales sufre cambios que culminan con la división del núcleo y la división celular (citocinesis) en la fase de mitosis (fase M) (Figura 1.5). El paso de la célula por las diferentes fases del ciclo celular<sup>20,21</sup> está coordinado y regulado por una

---

<sup>18</sup> Rastogi, N.; Mishra, D. P. *Cell Division* **2012**, *7*, 26.

<sup>19</sup> Spano, J. P.; Bay, J. O.; Blay, J. Y.; Rixe, O. *Bulletin du Cancer* **2005**, *92*, 945-952.

<sup>20</sup> Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. Eds. *Biología molecular de la célula*. 3ª edición, Omega S.A. Barcelona 1996.

<sup>21</sup> Weinberg, R. A. *Cell*. **1995**, *81*, 323-330.

serie de proteínas denominadas quinasas dependientes de ciclina, CDKs, (CDK4, CDK6, CDK2 y CDK1). Su actividad depende de la asociación de éstas a las ciclinas (proteínas activadoras) así como a moléculas inhibidoras (CKIs). La concentración de CDK/CYC aumenta y disminuye de una manera regular durante la progresión del ciclo celular. De este modo, los diferentes complejos CYC-CDK conducen a la célula por las diferentes fases de dicho ciclo (Figura 1.5).

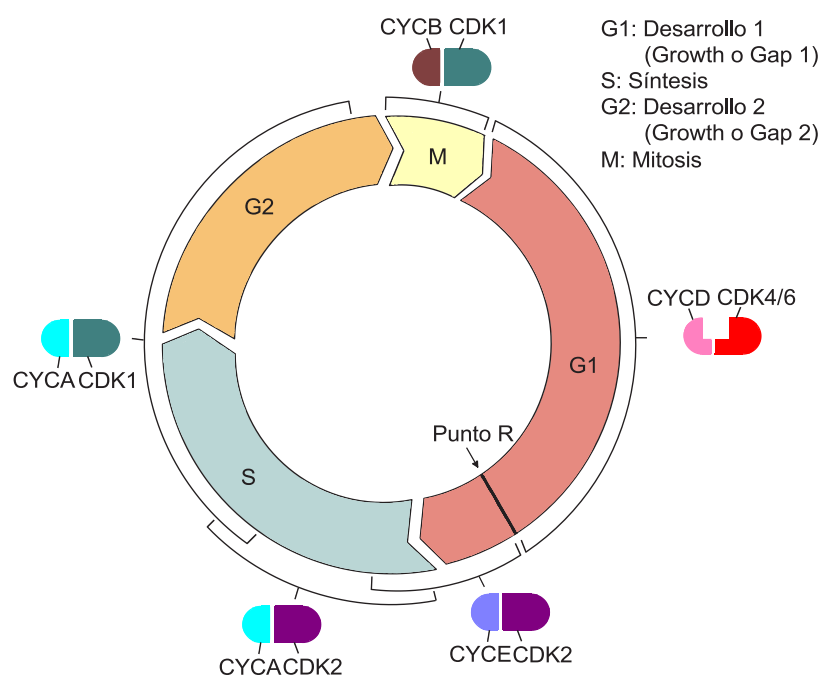


Figura 1.5. Fases del ciclo celular.

Durante el ciclo celular, existen puntos de control (*Checkpoints*) en los que la célula comprueba su estado y decide su continuidad en el ciclo o la salida del mismo.<sup>17,22</sup> Si estos puntos detectan anomalías, se detiene el ciclo y se intentan reparar. Si esto no fuera posible, la célula se elimina por apoptosis. El punto de control más importante es el llamado punto R (de restricción) que es el de decisión para la proliferación en condiciones normales.

Como se ha comentado anteriormente, las CDKs también están reguladas (negativamente) por CKIs, que se unen a ellas inactivándolas ya que impiden su unión a las ciclinas y además degradan los complejos CYC-CDK, lo que provoca la detención del ciclo celular.<sup>18</sup> Existen distintos CKIs, entre los que destacan las proteínas p21 y p27 que son inducidos en respuesta a diferentes procesos celulares.<sup>17,23</sup>

<sup>22</sup> Hartwell, L. H.; Weinert, T. A. *Science* **1989**, *246*, 629-634.

<sup>23</sup> Sherr, C. J.; Roberts, J. M. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1501-1512.

En las células cancerosas las ciclinas se encuentran sobreexpresadas. Esto es debido a que en procesos tumorales, determinados supresores (p53, p21 o p27) son degradados por el proteasoma, lo que provoca la baja expresión de los CKIs y la consiguiente acumulación de los complejos CYC-CDK.<sup>18</sup> Además, en estos casos alguno o varios de los puntos de control se encuentran inactivados o desregulados.<sup>17</sup> De esta forma se contribuye a la división descontrolada de las células cancerosas. Muchos de los mecanismos por los que las células transformadas son capaces de saltarse los puntos de control están muy relacionados con las funciones de las CDKs. Por ello, las ciclinas, las CDKs y los CKIs son dianas terapéuticas en estudio para el tratamiento del cáncer.

La desregulación del ciclo celular es uno de los estímulos más potentes para la inducción de apoptosis. Así pues, la utilización de inhibidores proteasómicos en esta vía permitirá que se acumulen los CKIs haciendo que se degraden las ciclinas, deteniendo o ralentizando el ciclo celular, induciendo así la apoptosis de las células malignas.

*c) Vía basada en pRb y el ciclo celular*

Uno de los sustratos que se fosforilan por acción del complejo CYC-CDK es la proteína del retinoblastoma (pRb). Se trata de una proteína que actúa como supresor tumoral, jugando un papel importante en la regulación del ciclo celular, en la replicación del ADN, así como en muchos otros procesos celulares.<sup>18</sup> Es la encargada de decidir si una célula prolifera o no y esto depende de su nivel de fosforilación, que a su vez es controlado por las ciclinas. Si la pRb está desfosforilada o hipofosforilada, el paso a través del punto R queda bloqueado impidiendo la proliferación celular. En cambio, si se encuentra hiperfosforilada, dicho paso queda abierto.<sup>17</sup> Por tanto, aquellos factores que modulen la fosforilación de la pRb son cruciales para la regulación de la progresión del ciclo celular.

En condiciones normales la pRb se localiza en su forma desfosforilada y unida a la familia de proteínas E2F. Como consecuencia de ello, las estabiliza y causa su represión transcripcional. De esta forma, E2F resulta inefectivo para la activación de genes requeridos en la síntesis de ADN y para la progresión del ciclo celular (fase S). Determinados factores de crecimiento activan ciertos complejos CYC-CDK e inician la fosforilación de pRb (hipofosforilación). Cuando la célula está preparada para dividirse

y se dan las condiciones adecuadas, el nivel de fosforilación de pRb va aumentando también hasta alcanzar la hiperfosforilación, dejándola inactiva y por tanto permitiendo el paso a través del punto R del ciclo celular (Figura 1.6). Además, al aumentar el nivel de fosforilación de pRb se va produciendo la disociación del complejo pRb-E2F, quedando libre E2F y facilitando así la transcripción de determinados genes necesarios para el paso del ciclo celular a la fase S.<sup>17</sup>

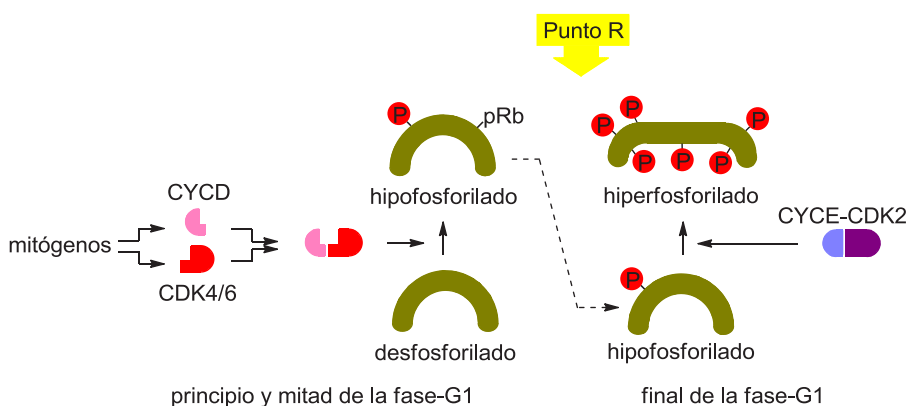


Figura 1.6. Control del punto de restricción R por la pRb.

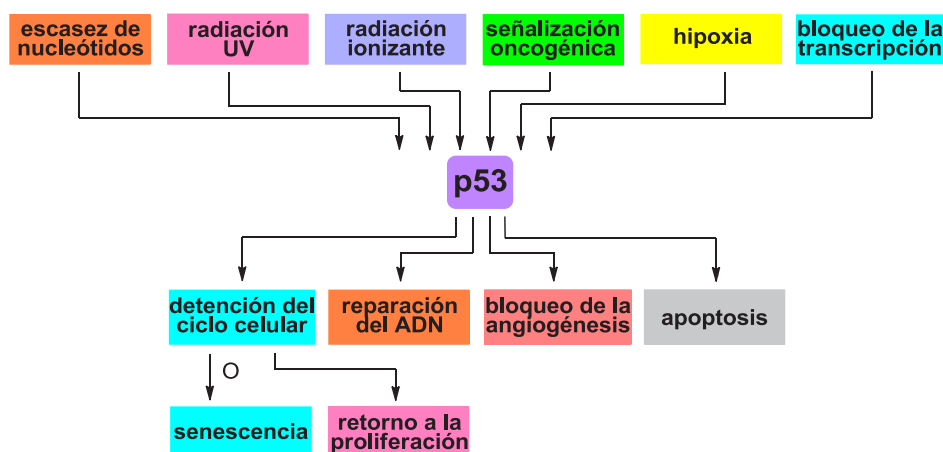
Versiones defectuosas de pRb están involucradas en diferentes tumores que operan asegurándose de que la proliferación celular no esté constreñida por pRb generando su hiperfosforilación y su consiguiente inactivación. En determinados tipos de tumores, pRb se degrada rápidamente, por lo que pierde su actividad supresora. Así pues, administrando inhibidores proteasómicos, se podría conseguir que las proteínas pRb escapasen de su degradación en los proteasomas y provocando la detención de la progresión de las células cancerígenas y su apoptosis.

d) *Vía basada en p53/p21*

La proteína p53 actúa como factor de transcripción y está estrechamente asociada con el proteasoma y con el ciclo celular. En las células normales el nivel de p53 es bajo, ya que se encuentra asociado a un tipo de ubiquitin-ligasa E3 denominada hdm2, produciendo esto su degradación por el proteasoma. Así, daños en el ADN y otras señales de estrés pueden hacer que p53 se fosforile y no se asocie a la proteína hdm2, lo que produce un incremento en su concentración y permite que realice su función como factor de transcripción.



Dentro de las funciones de p53 se encuentran la detención del ciclo celular y la activación de la apoptosis<sup>17</sup> (Esquema 1.2). Cuando se reconoce algún daño en el ADN dentro del ciclo celular, aumenta la concentración de p53, induciéndose así la expresión del gen que codifica la proteína p21 (CKI). Esta última inhibe los complejos CYC-CDK evitando la fosforilación de pRb e impidiendo así la proliferación celular. De esta forma la célula tiene el tiempo necesario para reparar los daños producidos en el ADN. Si éstos fuesen irreparables, p53 seguiría acumulándose y activaría la expresión de genes pro-apoptóticos.



Esquema 1.2. Factores que activan a la p53 y efectos que produce.

Por todo esto, la actividad de p53 tiene que eliminarse en aquellas células que quieren sobrevivir y prosperar. Esto explica por qué casi todas las células tumorales inactivan parcial o totalmente la respuesta de p53. Sin esta proteína, las células cancerígenas son capaces de tolerar situaciones gravemente adversas tales como la hipoxia, diversos daños en el genoma y la profunda desregulación del control del ciclo celular. Una vez que la célula ha adquirido resistencia a esos factores debilitantes, el camino queda libre para continuar con la proliferación de las células malignas.<sup>17</sup>

En las células cancerosas, la ligasa hdm2 se encuentra sobreexpresada, lo que hace que p53 sea rápidamente degradada por el proteasoma, produciéndose la proliferación de las células anormales y el desarrollo del cáncer.<sup>18</sup> En este caso, la inhibición proteasómica permitiría la acumulación de p53 y la consiguiente detención del ciclo celular de las células cancerosas.

### 1.1.3.2. Clasificación

En la bibliografía se han estudiado diferentes formas de inhibir la función del proteasoma. La mayor parte de las investigaciones se han encaminado a la actuación sobre la subunidad catalítica, aunque cada vez se está trabajando más en la inhibición de las subunidades reguladoras. Sin embargo en este trabajo nos vamos a centrar en la inhibición de la unidad catalítica, es decir del complejo 20S.

Dentro de los inhibidores del complejo 20S podemos distinguir dos grupos: los que interaccionan mediante enlace covalente con la treonina del centro catalítico de dicho complejo y los que actúan a través de enlaces no covalentes con la subunidad catalítica.

Otras clasificaciones que se han empleado para los inhibidores proteasómicos son en función de: a) la reversibilidad de la interacción entre dichos inhibidores y el centro catalítico (reversibles o irreversibles); b) la especificidad de los mismos por el proteasoma (inhibidores inespecíficos, inhibidores alostéricos e inhibidores sitio-específicos) y c) el tipo de grupo electrófilo que presentan (P1).

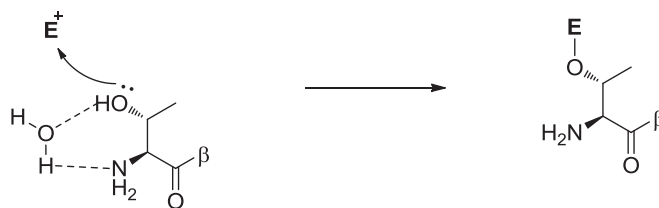
A continuación se van a describir los principales tipos de inhibidores proteasómicos en base a su unión covalente o no covalente al centro catalítico y en base a su especificidad. Dentro de cada uno de estos grupos, se ordenarán según el grupo electrófilo que presentan.

#### 1.1.3.2.1. Inhibidores que forman enlaces covalentes con los sitios activos

Los inhibidores covalentes incluyen una parte peptídica y un grupo electrofílico que forma un enlace covalente con el grupo hidroxilo de la treonina del sitio activo del complejo 20S. Dicha interacción, inhibe la actividad del proteasoma de forma reversible o irreversible, dependiendo de la fuerza del enlace que se forma (Esquema 1.3). La parte peptídica es la responsable de facilitar la interacción con los bolsillos específicos de la enzima.<sup>24</sup>

---

<sup>24</sup> Kisselev, A. F.; Goldberg, A. L. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 739-758.

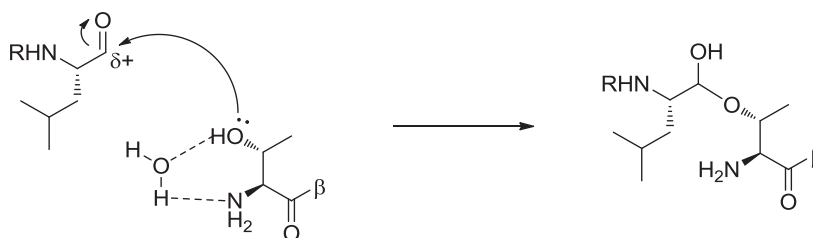


Esquema 1.3. Mecanismo de interacción entre la treonina del sitio catalítico y el inhibidor de proteasoma.

Dentro de este grupo se diferenciarán los distintos inhibidores en función del grupo electrófilo que presentan:

a) *Aldehídos peptídicos*

Los aldehídos peptídicos fueron los primeros en desarrollarse ya que estaban bien establecidos como inhibidores de proteasas de serina y cisteína. Estos potentes inhibidores son reversibles en condiciones fisiológicas y bloquean el proteasoma formando un hemiacetal con el grupo hidroxilo del residuo de treonina<sup>11</sup> de los seis sitios activos<sup>25</sup> (Esquema 1.4).



Esquema 1.4. Mecanismo de activación mediante inhibidores con estructura de aldehído peptídico.<sup>11</sup>

Aunque la mayor parte de estos aldehídos son sintéticos, también se han descubierto algunos naturales como por ejemplo Leupeptina, Tiropeptina A y Felutamida B<sup>11</sup> (Figura 1.7).

El primer aldehído peptídico descrito como inhibidor proteasómico fue el inhibidor de Calpaina I también conocido como ALLN (Figura 1.7). Además, la primera información sobre la estructura de los sitios proteolíticos se obtuvo gracias al complejo cristalino de ALLN-proteasoma de levadura. Desde entonces, se han sintetizado gran cantidad de aldehídos peptídicos como inhibidores proteasómicos. Ejemplos de los mismos son MG132 y BSc2118 (Figura 1.7). El compuesto comercial MG132 (Z-Leu-

<sup>25</sup> Genin, E.; Reboud-Ravaux, M.; Vidal, J. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 232-256.

Leu-Leu-CHO) es uno de los inhibidores proteasómicos más conocido, además de ser más potente y selectivo que el inhibidor de Calpaina I,<sup>12,25</sup> sin embargo, BSc2118 (Z-Leu-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-Leu-CHO) es todavía más potente debido al grupo voluminoso que tiene en P2.

También se han desarrollado compuestos que consisten en la unión de dos inhibidores (pueden ser iguales o distintos) mediante un espaciador polimérico (PEG) de longitud apropiada. De esta forma se pueden inhibir a la vez dos sitios activos. Un ejemplo de inhibidor de este tipo es la estructura resultante de la unión de dos inhibidores de Calpaina I por el *N*-terminal a un mismo espaciador PEG<sup>12</sup> (Figura 1.7).

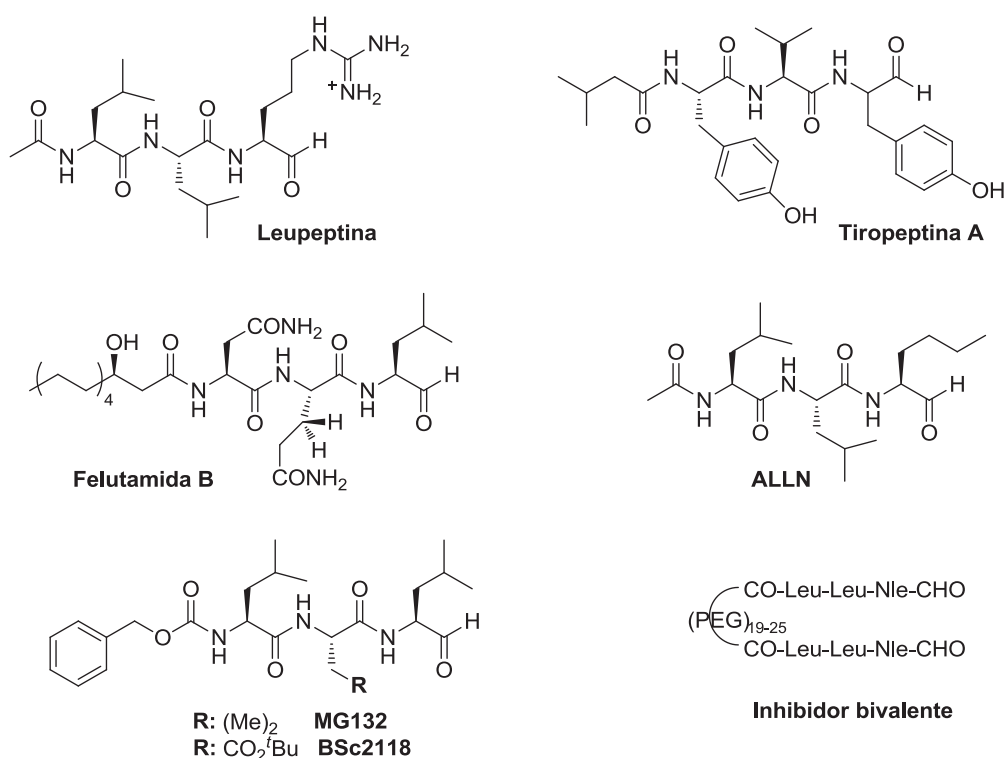
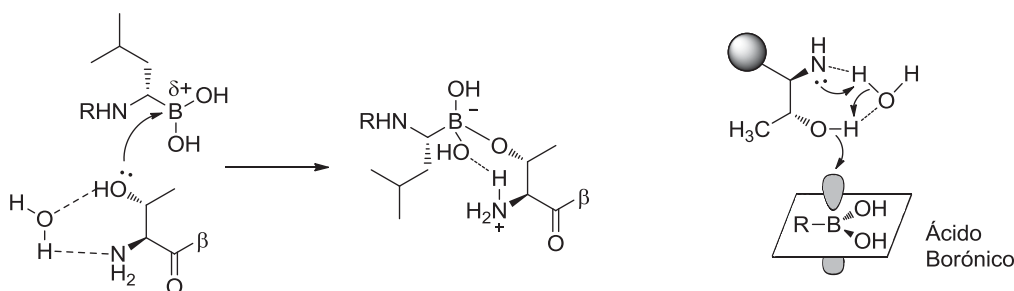


Figura 1.7. Inhibidores proteasómicos con estructura de aldehído peptídico.

Uno de los mayores inconvenientes que presentan estos aldehídos es su rápida oxidación a ácidos carboxílicos y su pérdida de actividad *in vivo*. La forma de solventar este problema consiste en la síntesis de prodrugs en forma de semicarbazonas que se hidrolizan a su forma activa dentro del organismo.<sup>11</sup> Otra de las grandes limitaciones de este grupo es que debido a la elevada reactividad del grupo funcional, no presentan una gran selectividad.<sup>12</sup> Estos inhibidores son muy utilizados en estudios *in vitro* e *in vivo* ya que los efectos que causan se revierten cuando éstos son eliminados.<sup>25</sup>

b) *Boronatos peptídicos*

Los boronatos peptídicos son unos inhibidores proteasómicos mucho más potentes que sus correspondientes aldehídos. Se trata de productos sintéticos que forman aductos tetrahédricos con la treonina de los sitios activos del proteasoma. El orbital *p* vacío del átomo de boro acepta al par electrónico libre del átomo de oxígeno del grupo hidroxilo del residuo de treonina. Además, dichos aductos son estabilizados mediante un enlace de hidrógeno entre el grupo *N*-amino terminal de la treonina y uno de los grupos hidroxilo del ácido borónico (Esquema 1.5), lo que explica la mayor potencia que presenta este grupo respecto a los aldehídos descritos anteriormente y respecto a las proteasas de serina.<sup>11</sup> Sin embargo, los boronatos son malos inhibidores de proteasas de cisteína, debido a las débiles interacciones entre los átomos de azufre y boro.<sup>12</sup>



Esquema 1.5. Mecanismo de activación mediante inhibidores con estructura de boronato peptídico.<sup>2,11</sup>

Los derivados borónicos dipeptídicos son adecuados para aplicaciones *in vivo*, además son biodisponibles y presentan relativa estabilidad en condiciones fisiológicas.<sup>12</sup> Estos boronatos son inhibidores reversibles pero la velocidad de disociación de los aductos boronato-proteasoma es mucho más lenta que la mostrada por los aldehídos. En condiciones fisiológicas los derivados borónicos inhiben preferentemente las subunidades  $\beta_5$  frente a las  $\beta_1$  tanto del proteasoma constitutivo como del inmunoproteasoma, siendo las  $\beta_2$  ligeramente o nada inhibidas.

Uno de los primeros derivados borónicos sintetizados como inhibidores del proteasoma fue MG262 (Figura 1.8). Se trata de una estructura análoga al aldehído MG132 citado anteriormente y que presentó una potencia 100 veces mayor que éste.<sup>12</sup> Tras esto se han desarrollado muchas otras estructuras pertenecientes a este grupo entre las que destaca el Bortezomib (Figura 1.8). Es un ácido borónico dipeptídico y fue el primer inhibidor proteasómico que entró en ensayos clínicos en pacientes. También fue

el primero aprobado por la FDA en el año 2003 para el tratamiento del mieloma múltiple, linfoma de células del manto y linfoma non-Hodgkiniano, mediante administración intravenosa.<sup>25</sup>

Otros ejemplos son el Ixazomib (MLN9708) y el Delanzomib (CEP18770) (Figura 1.8). Son inhibidores proteasómicos de segunda generación para el tratamiento del mieloma múltiple y se encuentran en desarrollo clínico. El primero es una prodroga que se hidroliza en el organismo a MLN2238 (Figura 1.8), la forma biológicamente activa, y ha sido el primero en administrarse por vía oral. El Delanzomib es otro inhibidor proteasómico que también se administra por vía oral.

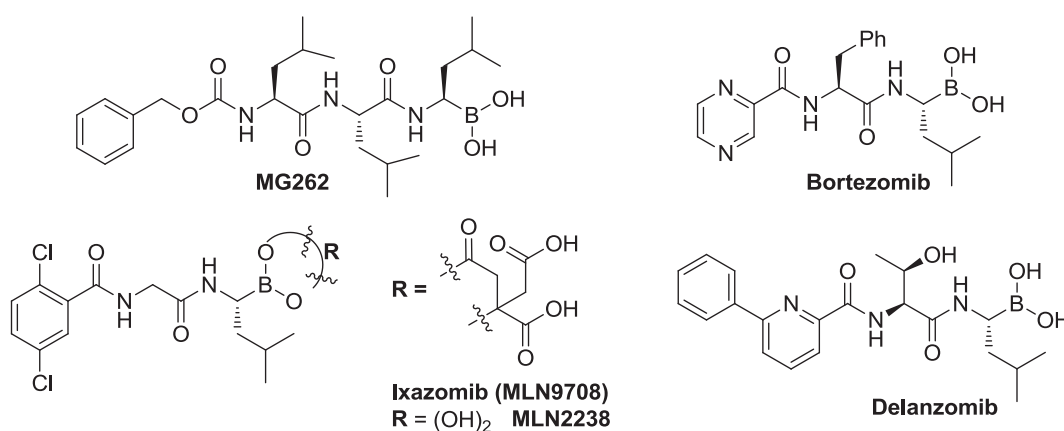


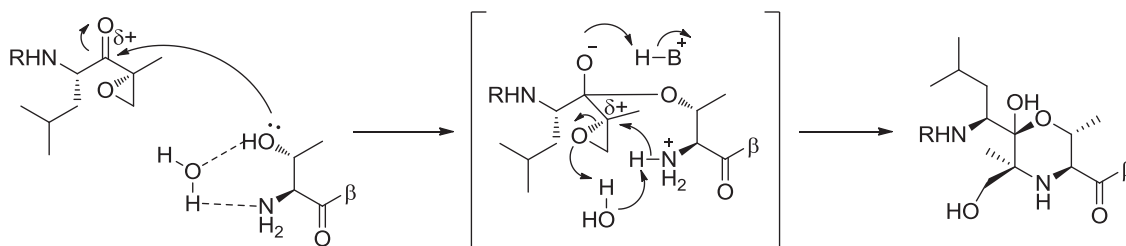
Figura 1.8. Inhibidores proteasómicos con estructura de ácido borónico.

### c) Epoxicetonas peptídicas

Las epoxicetonas representan una clase importante de inhibidores proteasómicos. Constan de una cadena peptídica de entre dos y cuatro aminoácidos, siendo uno de ellos normalmente o treonina o serina.<sup>26</sup> Estas epoxicetonas resultan ser los inhibidores de proteasoma más potentes y específicos conocidos hasta la actualidad. Son inhibidores irreversibles y aunque la gran mayoría son productos sintéticos, también pueden encontrarse en la naturaleza como por ejemplo la Epoxomicina y la Eponomicina (Figura 1.9). En este caso las epoxicetonas forman un anillo de morfolina de seis miembros con el grupo *N*-terminal de la treonina. Primeramente el hidroxilo de la treonina ataca al carbonilo del farmacóforo y tras esto, el grupo amino en posición  $\alpha$

<sup>26</sup> Rentsch, A.; Landsberg, D.; Brodmann, T.; Bülow, L.; Girbig, A. K.; Kalesse, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 5450-5488.

de la propia treonina se encarga de abrir el epóxido y completar así la formación del anillo de morfolina<sup>11</sup> (Esquema 1.6).



Esquema 1.6. Mecanismo de activación mediante inhibidores con estructura de epoxicetona peptídica.<sup>11</sup>

Este inusual mecanismo proporciona a estos inhibidores una ventaja adicional ya que por ejemplo, las proteasas de serina y cisteína no pueden interactuar de esta manera debido a que sus residuos clave no contienen un grupo amino libre en posición  $\alpha$ . Por tanto las epoxicetonas peptídicas presentan potencia y especificidad, además de ser accesibles mediante una síntesis relativamente sencilla. Estas características han hecho que se hayan sintetizado gran cantidad de inhibidores proteasómicos basados en esta estructura modificando las unidades P2 y P4.<sup>11</sup> Entre ellos destaca Carfilzomib (Figura 1.9), que ha sido el segundo inhibidor proteasómico aprobado por la FDA en 2012 para el tratamiento del mieloma múltiple recidivante y se administra de forma intravenosa. Otra epoxicetona que se encuentra en desarrollo clínico es el Oprozomib (ONX0912, Figura 1.9). Tiene estructura tripeptídica y se administra de forma oral.<sup>11,27</sup>

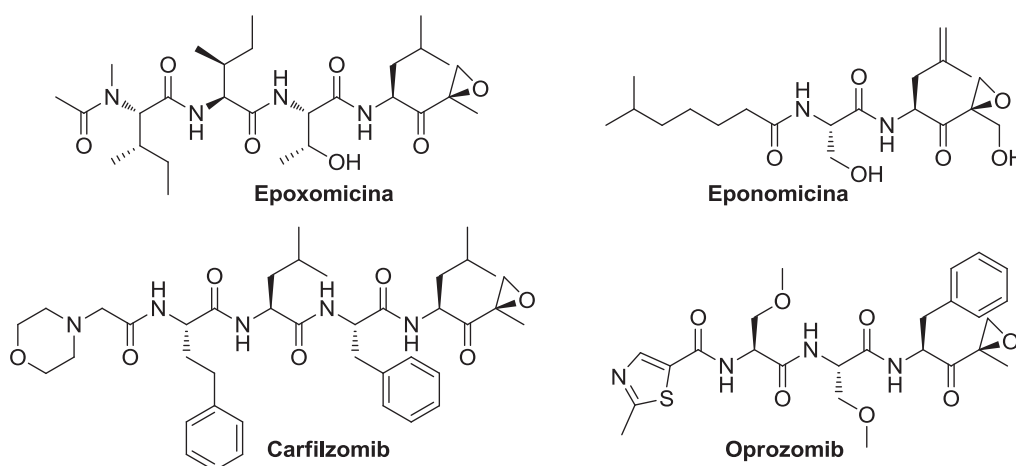
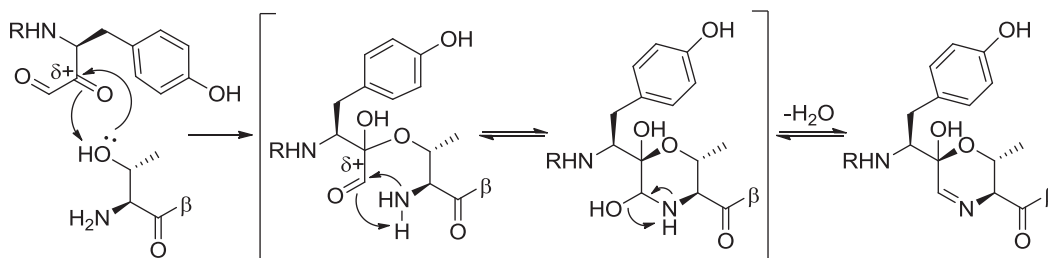


Figura 1.9. Inhibidores proteasómicos con estructura de epoxicetona peptídica.

<sup>27</sup> Bringhen, S.; Gay, F.; Donato, F.; Troia, R.; Mina, R.; Palumbo, A. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2014**, *23*, 1193-1209.

d) Cetoaldehídos peptídicos o glioxales

Los cetoaldehídos forman un anillo de seis miembros con el grupo *N*-terminal de la treonina mediante un mecanismo similar al de las epoxicetonas. Dicho anillo alberga a la vez un hemiacetal y una base de Schiff<sup>11</sup> (Esquema 1.7).



Esquema 1.7. Mecanismo de activación mediante inhibidores con estructura de cetoaldehído peptídico.<sup>11</sup>

Al igual que en el caso de las epoxicetonas, este mecanismo catalítico inusual de los proteasomas les confiere una mayor selectividad. Además, la presencia de la base de Schiff hace que sean inhibidores reversibles, por lo que la combinación de ambas propiedades les confiere mejores características, siendo inhibidores altamente selectivos, reversibles y de unión covalente. Hasta el momento los inhibidores específicos que se conocían eran irreversibles (epoxicetonas) y los que eran reversibles no eran específicos (aldehídos), de ahí la importancia de los cetoaldehídos.<sup>11</sup>

Algunos ejemplos de este tipo de inhibidores proteasómicos potentes son el Bz-Leu-Leu-Leu-COCHO y el Cbz-Leu-Leu-Tyr-COCHO (Figura 1.10), con actividades semejantes a las de su aldehído peptídico análogo MG132. Estos cetoaldehídos inhiben la subunidad  $\beta 5$  tanto del proteasoma constitutivo como del inmunoproteasoma.<sup>28</sup> Su inconveniente es que en solución acuosa se encuentran hidratados y por tanto este electrófilo es mucho menos reactivo que el de las epoxicetonas, ácidos borónicos,  $\beta$ -lactonas y aldehídos.

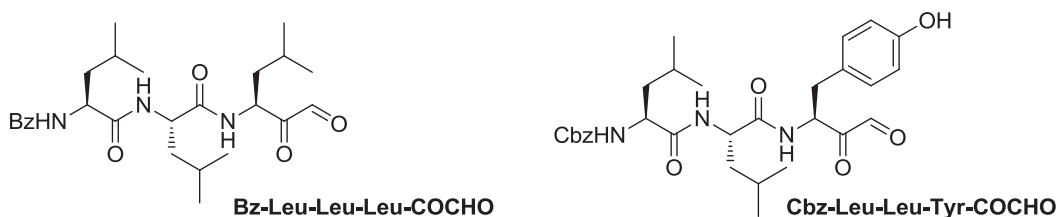


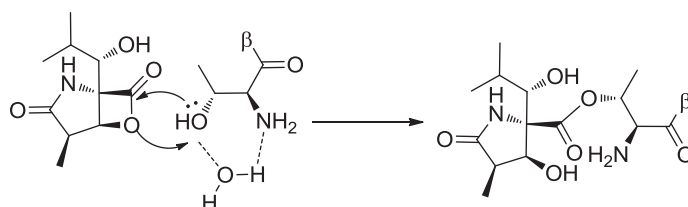
Figura 1.10. Inhibidores proteasómicos con estructura de cetoaldehído peptídico.

<sup>28</sup> Lynas, J. F.; Harriott, P.; Healy, A.; McKervey, M. A.; Walker, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 373-378.



e)  $\beta$ -Lactonas

Estos inhibidores son mucho más selectivos que los aldehídos pero no llegan a ser ni tan potentes ni tan selectivos como las epoxicetonas. Estas  $\beta$ -lactonas inactivan al proteasoma mediante una esterificación del grupo hidroxilo de la treonina del sitio catalítico<sup>11</sup> (Esquema 1.8). Son inhibidores irreversibles de la subunidad  $\beta 5$ , si bien, las actividades de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  también resultan bloqueadas, aunque en menor medida.<sup>12</sup> Además estas estructuras no inhiben la mayor parte de las proteasas de serina y cisteína. El mayor problema que presenta este tipo de inhibidores es su menor estabilidad. Aunque son inhibidores irreversibles, en condiciones de pH neutro las  $\beta$ -lactonas pueden ser hidrolizadas lentamente por el agua generando la reactivación del proteasoma.<sup>11</sup>



Esquema 1.8. Mecanismo de activación mediante inhibidores con estructura de  $\beta$ -lactona.<sup>11</sup>

El primer inhibidor proteasómico estudiado de este tipo fue de origen natural (Lactacistina, Figura 1.11). Éste no presenta una  $\beta$ -lactona en su estructura y no resulta activo. No obstante, en disoluciones acuosas con un  $\text{pH} \approx 8$  se hidroliza espontáneamente a *Omuralide*, que es el que actúa como inhibidor (Figura 1.11). *Omuralide* sólo se une covalentemente a la subunidad  $\beta 5$  y además forma enlaces de hidrógeno con el proteasoma. Tiene un farmacóforo menos reactivo que ALLN por lo que necesita más tiempo para reaccionar con Thr10 $\gamma$ . La gran selectividad de este inhibidor por la subunidad  $\beta 5$  se debe a la naturaleza apolar del bolsillo específico S1 de este sitio activo, que hace que se prolongue el tiempo de residencia del inhibidor en él, necesario para completar la unión covalente del residuo activo.<sup>12</sup>

Otro ejemplo de este grupo de inhibidores proteasómicos es la Salinosporamida A (Marizomib, Figura 1.11), metabolito secundario del microorganismo marino *Salinispora tropica*. Tiene una estructura relacionada con la del *Omuralide*, pero con sustituyentes diferentes que incrementan su potencia inhibitoria *in vitro* e *in vivo*.<sup>12</sup> Este inhibidor se une a las seis subunidades catalíticas y su mecanismo de actuación es el

mismo que el del *Omuralide*, pero con la variante de que, tras la apertura de la  $\beta$ -lactona, el inhibidor genera un desplazamiento nucleofílico del átomo de cloro cuyo resultado es la formación de un anillo de tetrahidrofurano, que estabiliza el aducto dando como resultado una inhibición más prolongada.<sup>11</sup> Además de la unión de la Thr10y de las subunidades catalíticas del proteasoma al farmacóforo, existen interacciones hidrofóbicas entre esta estructura y los residuos del bolsillo específico S1 que explican la mayor potencia del Marizomib respecto a la del *Omuralide*.<sup>12</sup> De hecho es el inhibidor proteasómico más potente de los que se encuentran en desarrollo clínico para el tratamiento del mieloma múltiple y otros tipos de cáncer.

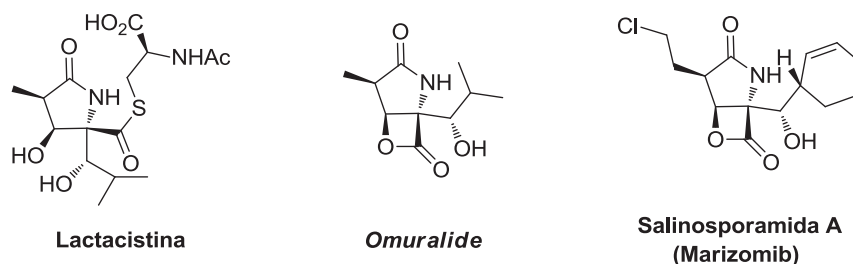
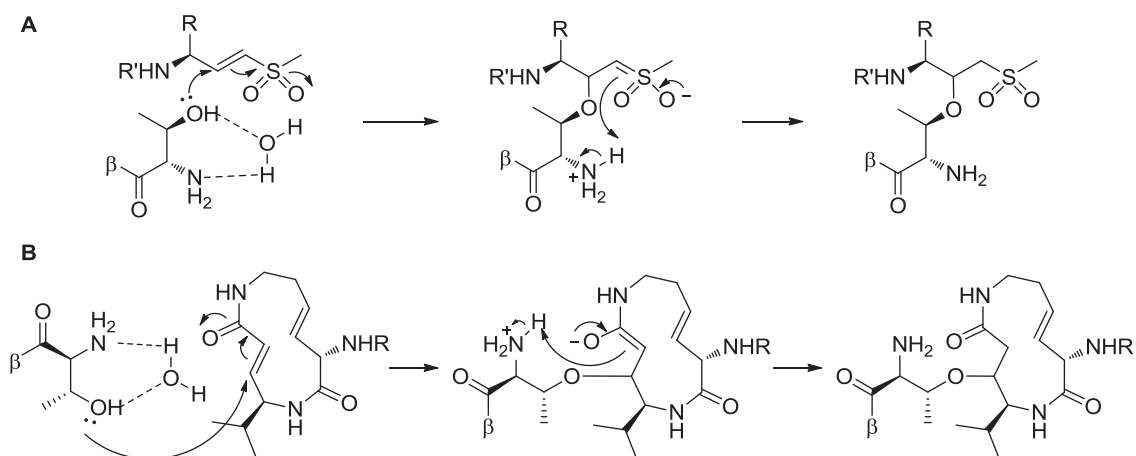


Figura 1.11. Inhibidores proteasómicos con estructura de  $\beta$ -lactona.

f) *Vinil sulfonas peptídicas y Vinil amidas o Sirbactinas*

Otras clases de inhibidores proteasómicos son los péptidos con estructura de vinil sulfona y las vinil amidas o Sirbactinas. Las últimas son compuestos que constan de un anillo lactámico de 12 miembros unido a una secuencia peptídica. Estos compuestos se unen de forma irreversible a los proteasomas pero son menos reactivos que los aldehídos.<sup>12</sup> Son inhibidores sintéticos que modifican covalentemente las subunidades catalíticas  $\beta$  del proteasoma. En estos casos el grupo hidroxilo de la treonina del sitio catalítico reacciona con el doble enlace de la vinil sulfona o el grupo amida  $\alpha,\beta$ -insaturada de las Sirbactinas mediante una adición 1,4 de tipo Michael<sup>11</sup> (Esquema 1.9).



Esquema 1.9. Mecanismos de activación mediante inhibidores con estructura de vinil sulfona (A) y vinil amida o Sirbactina (B).<sup>11</sup>

Estos inhibidores son menos potentes y específicos que las epoxicetonas. No inhiben proteasas de serina, pero sí de cisteína. La mayor ventaja que presentan es su facilidad de síntesis y su papel en el desarrollo de inhibidores sitio-específicos. La selectividad de su inhibición puede modificarse cambiando su parte peptídica.<sup>11</sup>

Dentro de este grupo, la vinil sulfona que presenta mayor potencia inhibitoria hasta el momento, es la AdaAhx<sub>3</sub>-L<sub>3</sub>-VS (Figura 1.12), e inhibe por igual las tres subunidades  $\beta$  tanto del proteasoma constitutivo como del inmunoproteasoma.<sup>12</sup> Dependiendo de la modificación del grupo *N*-terminal (P4), los péptidos que contienen la estructura vinil sulfona trileucínica (L<sub>3</sub>VS) bloquean tanto la subunidad  $\beta$ 2 como  $\beta$ 5. Un ejemplo de esta modificación es el NLVS (Figura 1.12).

Al grupo de vinil amidas pertenecen los productos naturales Siringolina A (SylA) y Glidobactina A (GlbA) (Figura 1.12). SylA inhibe las tres subunidades catalíticas del proteasoma, aunque con distinta potencia, mientras que GlbA sólo inhibe  $\beta$ 2 y  $\beta$ 5. Sin embargo, GlbA es la sirbactina más potente como inhibidor proteasómico de la subunidad  $\beta$ 5 y es 15 veces más activo que la SylA.

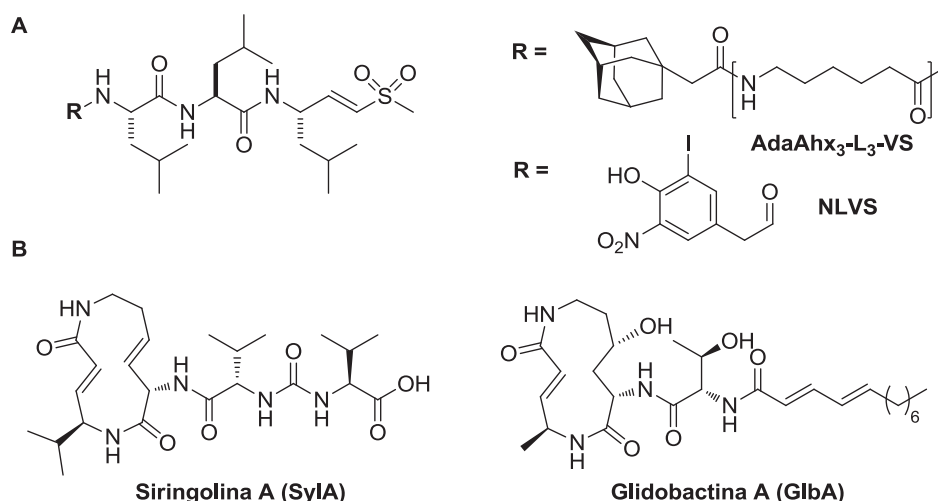


Figura 1.12. Inhibidores proteasómicos con estructura de vinil sulfona (A) y Sirbactina (B).

#### 1.1.3.2.2. Inhibidores no covalentes

Este tipo de inhibidores no dan lugar a una unión covalente con el sitio activo del proteasoma sino que interactúan de otras formas (enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals...), pero en todas ellas se consigue el mismo objetivo, inactivar el proteasoma de forma reversible.<sup>25</sup>

Ejemplos de este tipo son los péptidos cíclicos, acíclicos e isómeros peptídicos. Los primeros son productos naturales con estructura de ciclo peptídico constreñido, que interactúan con todos los sitios activos del proteasoma bloqueando la entrada del sustrato para que no interactúe con la treonina. Se han sintetizado diferentes inhibidores de este tipo con distintos grados de selectividad por el sitio activo. En este grupo se encuentran TMC95, Argirina A y Escitonimida A.<sup>11</sup> Los péptidos acíclicos e isómeros peptídicos poseen los grupos *N*- y *C*-terminales bloqueados y cada unidad del péptido de estos inhibidores bloquea los distintos bolsillos del proteasoma. Ejemplos de este grupo son el Ritonavir (inhibidor de la proteasa del VIH-1), los derivados de estatina y diversos inhibidores peptídicos bloqueados.

También se han descrito inhibidores no peptídicos, entre los que destacan los inhibidores proteasómicos derivados de la quinona,<sup>29</sup> como por ejemplo el PI083 y las

<sup>29</sup> Kaffy, J.; Bernadat, G.; Onger, S. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 4115-4130.

hidroxiureas.<sup>30</sup> Los primeros sólo actúan sobre los proteasomas de las células anormales pero no sobre las células sanas e inhiben los tres sitios activos de dichos proteasomas.<sup>11</sup> Los segundos son inhibidores reversibles y específicos de la actividad quimotripsina del proteasoma<sup>29</sup> y presentan grupos hidrofóbicos voluminosos que ocupan determinados bolsillos específicos de los mismos, pero no interaccionan directamente con la treonina del sitio activo.<sup>10,11,30</sup>

### 1.1.3.2.3. Otros tipos de inhibidores

Los agentes que inhiben el proteasoma no sólo están limitados a ser inhibidores específicos, sino que pueden actuar sobre otras dianas diferentes pero cuyo resultado es el mismo, inducir apoptosis en las células que proliferan.<sup>11</sup>

Ciertas moléculas inhiben la actividad proteolítica del complejo 20S actuando de forma alostérica mediante su unión a las subunidades  $\alpha$ . El PR-39 por ejemplo, es un péptido de 39 residuos rico en prolina y arginina que estimula la angiogénesis y la respuesta inflamatoria bloqueando la degradación de I $\kappa$ B.<sup>25</sup> Se une a las subunidades  $\alpha$ 7 del proteasoma y rompe su interacción con las subunidades reguladoras 19S,<sup>11</sup> lo que lo convierte en un inhibidor reversible y no competitivo. La 5-amino-8-hidroxiquinolina se une a las subunidades internas  $\alpha$  del proteasoma por los sitios no catalíticos.

La mayoría de los inhibidores que se han comentado hasta ahora bloquean principalmente la actividad quimotripsina de los proteasomas, pero también coinhíben a la vez la actividad caspasa y/o tripsina.<sup>11</sup> Por tanto también ha cobrado gran importancia el estudio de inhibidores sitio-específicos para dianas concretas, que actúen sobre un único sitio activo y ver los efectos que éstos tienen. Ejemplo de ellos son los inhibidores de la actividad quimotripsina, caspasa, tripsina e inhibidores selectivos de las subunidades del inmunoproteasoma y del proteasoma constitutivo.

### 1.1.3.3. Inhibidores en uso clínico

Como se ha comentado hasta ahora, son muchos los compuestos que se han diseñado y sintetizado como inhibidores proteasómicos para el tratamiento de

---

<sup>30</sup> Gallastegui, N.; Beck, P.; Arciniega, M.; Huber, R.; Hillebrand, S.; Groll, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 247-249.

enfermedades. De éstos algunos han sido aceptados, muchos rechazados y otros se encuentran en desarrollo clínico. Hasta el momento, solamente existen dos inhibidores comercializados: el Bortezomib (Velcade<sup>®</sup>) y el Carfilzomib (Kyprolis<sup>®</sup>). De los grupos descritos en los apartados anteriores, ambos compuestos pertenecen al grupo de inhibidores covalentes, siendo el primero perteneciente al subgrupo de boronatos peptídicos y el segundo al de epoxicetonas peptídicas. Por tanto, debido a su diferente estructura, poseen diferentes propiedades.

#### 1.1.3.3.1. Bortezomib

Bortezomib, también conocido como Velcade<sup>®</sup> o PS341, es un inhibidor proteasómico de primera generación del grupo de los boronatos peptídicos. Fue el primero aprobado por la FDA en 2003 para el tratamiento del mieloma múltiple en pacientes a los que no se puede realizar trasplante o en los que han sufrido una recaída tras dicho trasplante. En 2006, la FDA lo aprobó para el tratamiento de MCL (Linfoma de las células del manto).

El átomo de boro de este inhibidor forma un intermedio tetrahédrico mediante enlace covalente reversible con el oxígeno nucleofílico del grupo hidroxilo de la Thr1 del sitio catalítico del proteasoma. El NH de la Gly47 estabiliza el hueco oxianiónico mediante un enlace de hidrógeno con el grupo OH del boronato. Además, el NH de la Thr1 actúa de aceptor de protones formando un enlace de hidrógeno con el otro grupo OH del boronato.<sup>12</sup> A su vez, el esqueleto peptídico del inhibidor forma varios enlaces de hidrógeno con residuos clave del proteasoma (Gly47N, Thr21N, Thr21O y Ala49O). El grupo pirazínico forma un enlace de hidrógeno con la Thr22O $\gamma$  de la subunidad  $\beta$ 1 y con Asp114 de la subunidad  $\beta$ 6.<sup>12</sup>

Bortezomib presenta distintas potencias de inhibición para los tres sitios activos, siendo la mayor y preferente para la subunidad  $\beta$ 5 (actividad quimotripsina), intermedia para  $\beta$ 1 (actividad caspasa) y muy baja para la subunidad  $\beta$ 2 (actividad tripsina) ( $\beta$ 5> $\beta$ 1>> $\beta$ 2)<sup>12</sup> (Figura 1.13).

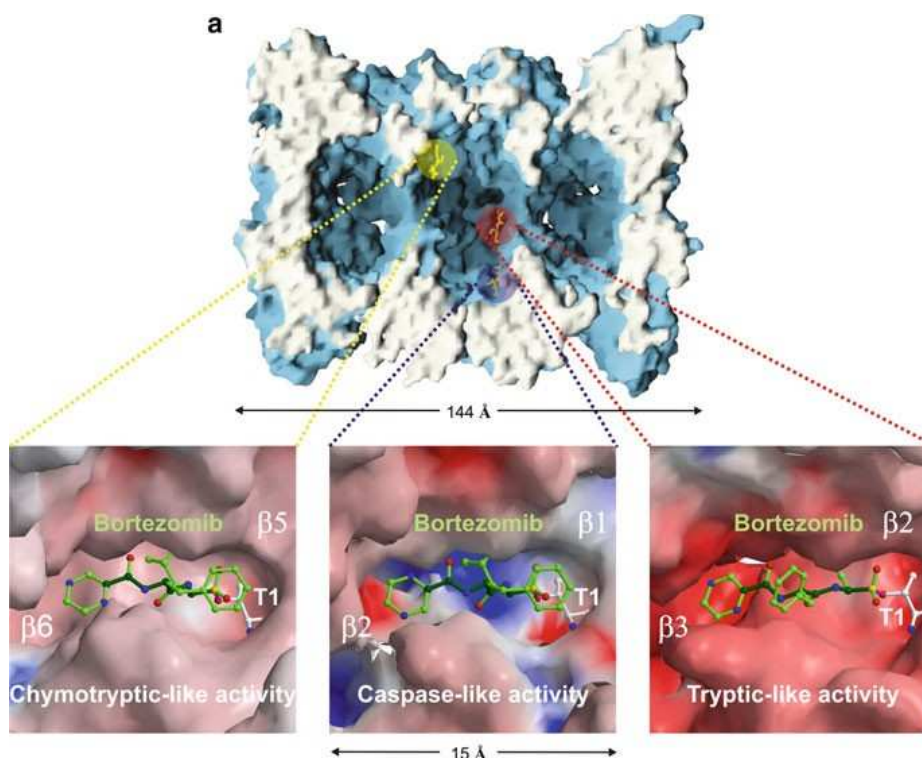


Figura 1.13. Representación estructural del Bortezomib unido a diferentes sitios activos del proteasoma 20S de levadura.<sup>31</sup>

Bortezomib se administra de forma intravenosa y subcutánea y presenta eficacia en el mieloma múltiple recurrente. Además tiene un efecto sinérgico al administrarlo junto con otros medicamentos como por ejemplo dexametasona, talidomida o inhibidores de HDACs. Un mecanismo central por el cual Bortezomib funciona en el tratamiento de dicha enfermedad es por la vía de inhibición de la degradación de I $\kappa$ B y la consecuente estabilización del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Ello previene la translocación de éste último al núcleo y por tanto inactiva muchos procesos importantes en la señalización del mieloma celular.<sup>2</sup> También disminuye la adhesión de las células plasmáticas del mieloma a las células del estroma, lo que incrementa la sensibilidad para la apoptosis e inhibe la angiogénesis y la reparación del ADN.

A pesar del éxito de Bortezomib, también tiene ciertas limitaciones y efectos secundarios. Entre los comunes se encuentran la fatiga, debilidad y desajustes gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea). Las más problemáticas y clínicamente significantes son la trombocitopenia y la neuropatía periférica. Bortezomib causa neuropatía periférica sensorial aproximadamente a 1/3 de los pacientes y aunque es reversible en la mayor parte de los casos, se debe tener cuidado para evitar la neuropatía

<sup>31</sup> Imagen obtenida de la referencia 2.

permanente. Este efecto secundario es especialmente acusado tras la administración intravenosa y se ve reducido tras la administración subcutánea.<sup>32</sup> Además, un 30% de los pacientes presenta trombocitopenia, que también es transitoria y reversible.<sup>33</sup> Bortezomib también provoca la disminución de la función cardíaca y complicaciones pulmonares severas, así como toxicidad hepática.<sup>32</sup> Otra limitación es que este inhibidor tiene una actividad más baja de la deseada en tumores sólidos. También se ha demostrado resistencia celular a Bortezomib y algunos pacientes no presentan sensibilidad al tratamiento o vuelven a recaer.<sup>2</sup>

#### 1.1.3.3.2. Carfilzomib

Carfilzomib, también conocido como Kyprolis<sup>®</sup> es el segundo inhibidor proteasómico aprobado por la FDA en 2012 para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple (MM) que no hayan respondido al menos a dos terapias más, incluyendo Bortezomib y un agente inmunomodulatorio (Talidomida).<sup>35</sup> Por tanto se trata de un inhibidor proteasómico selectivo e irreversible de segunda generación, del grupo de las epoxicetonas peptídicas. Este inhibidor se une irreversiblemente al sitio catalítico  $\beta 5$  del complejo 20S e inhibe la actividad quimiotripsina con un alto grado de especificidad, superior al de Bortezomib. De esta forma interrumpe los sistemas que dependen del proteasoma, induciendo respuestas de estrés e iniciando la apoptosis.

Aunque Carfilzomib es un tratamiento clínico efectivo, su efectividad está limitada por un tiempo de vida media corto y una solubilidad limitada, por lo que la administración es intravenosa.<sup>34</sup> Además está asociado con efectos secundarios, unos comunes y otros severos. Entre los comunes se encuentran las náuseas, fatiga, diarrea y disnea. Entre los severos están la anemia, trombocitopenia, linfopenia, neutropenia, neumonía, fallo renal, pirexia y fallo cardíaco.<sup>35</sup> Sin embargo, existen pocos casos con neuropatía periférica.<sup>32,35</sup> Además, Carfilzomib tiene la limitación de que hay que premedicar con esteroides y fluidos intravenosos antes y después de su administración.<sup>36</sup>

---

<sup>32</sup> Wang, H.; Guan, F.; Chen, D.; Dou, Q. P.; Yang, H. *Expert Opin. Drug Saf.* **2014**, *13*, 1-12.

<sup>33</sup> Field-Smith, A.; Morgan, G. J.; Davies, F. E. *Therapeutics and Clinical Risk Management.* **2006**, *2*, 271-279.

<sup>34</sup> Ashley, J. D.; Stefanick, J. F.; Schroeder, V. A.; Suckow, M. A.; Alves, N. J.; Suzuki, R.; Kikuchi, S.; Hideshima, T.; Anderson, K. C.; Kiziltepe, T.; Bilgicer, B. *J. Controlled Release.* **2014**, *196*, 113-121.

<sup>35</sup> Harvey, R. D. *Clin. Pharmacol. Advance and Appl.* **2014**, *6*, 87-96.

<sup>36</sup> Highsmith, K. N.; Chen, S. E.; Horowitz, S. *Pharmacotherapy* **2014**, *34*, 927-940.



### 1.1.3.3. Otros inhibidores en ensayos clínicos

Asímismo existen otros inhibidores de proteasoma de nueva generación para el tratamiento del mieloma múltiple y que se encuentran en diferentes fases de ensayo clínico y su administración puede ser de forma oral e intravenosa.<sup>27,37</sup> Entre ellos están los boronatos Ixazomib (MLN9708) y Delanzomib (CEP18770), la epoxicetona Oprozomib (ONX0812) y la  $\beta$ -lactona Marizomib. El primero se encuentra en fase III, los dos siguientes en fase I-II y el último en fase I.

Actualmente sigue siendo necesario el desarrollo de nuevos inhibidores que sean más potentes y selectivos y ofrezcan menos efectos secundarios tóxicos. Además, la mayoría se administran por vía intravenosa o subcutánea, por lo que también es necesario el desarrollo de inhibidores con mejores propiedades farmacocinéticas que permitan la administración oral de estos fármacos.

En este contexto, el objetivo principal de esta Tesis ha consistido en el desarrollo de nuevos inhibidores proteasómicos que presenten buena potencia y selectividad, así como un perfil ADME-Tox adecuado. La aproximación principal en la que hemos basado nuestro diseño ha consistido en la síntesis de candidatos conformacionalmente restringidos. Esto se ha conseguido mediante la síntesis de anillos de pirrolidina quirales. Dado que dichos heterociclos han sido generados mediante reacciones de cicloadición 1,3-dipolares, a continuación se comentan los aspectos más relevantes de este tipo de reacciones.

## 1.2. Reacciones de cicloadición 1,3-dipolares

### 1.2.1. Aspectos generales

Las reacciones de cicloadición (3+2) ó 1,3-dipolares constituyen uno de los métodos más eficaces para la síntesis de heterociclos de cinco miembros.<sup>38</sup> Estos procesos destacan por su eficiencia química y economía de átomos, ya que en una única etapa se generan dos o más enlaces carbono-carbono o carbono-heteroátomo y se crean

---

<sup>37</sup> Kubiczkova, L.; Pour, L.; Sedlarikova, L.; Hajek, R.; Sevcikova, S. *J. Cell. Mol. Med.* **2014**, *18*, 947-961.

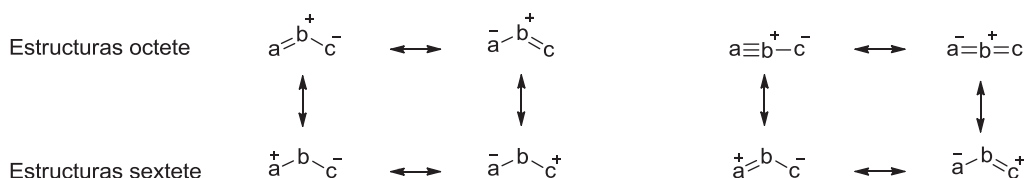
<sup>38</sup> (a) Padwa, A.; Pearson, W. H. Eds. *Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles and Natural Products*, John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2002. (b) Trost, B. M.; Fleming, I. Eds. *Comprehensive Organic Synthesis*, Pergamon Press: Oxford, 1991. (c) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565-598.

varios centros estereogénicos con elevado control regio- y estereoquímico<sup>39</sup>. Al reactivo que aporta cuatro electrones  $\pi$  se le denomina 1,3-dipolo y está formado por tres átomos, siendo al menos el central un heteroátomo, y el componente que aporta los dos electrones  $\pi$  es conocido como dipolarófilo, generalmente un alqueno o alquino, aunque también se pueden encontrar en la literatura algunos casos en los que el dipolarófilo contiene algún heteroátomo.<sup>40</sup> Estas reacciones consisten, al menos formalmente, en procesos  $[4\pi s+2\pi s]$  térmicamente permitidos de acuerdo con las reglas de simetría orbital descritas por Woodward y Hoffmann<sup>41</sup> (Esquema 1.10).



Esquema 1.10. Forma general de la reacción 1,3-dipolar.

El 1,3-dipolo puede representarse por cuatro estructuras resonantes zwitteriónicas de tipo anión alilo o anión propargilo/alenilo: dos de estructura octete donde la carga positiva está localizada sobre el átomo central y las negativas distribuidas entre los dos átomos terminales, y por dos de estructura sextete en las que dos de los cuatro electrones  $\pi$  se encuentran localizados sobre el átomo central. Las estructuras octete son con diferencia las que más contribuyen al sistema<sup>42</sup> (Esquema 1.11).



Esquema 1.11. Formas resonantes de los 1,3-dipolos.

<sup>39</sup> Kobayashi, S.; Jørgensen, K. A. Eds. *Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis*, Wiley-VCH: Weinheim, 2001.

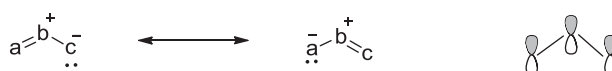
<sup>40</sup> (a) Viso, A.; Fernández de la Pradilla, R.; García, A.; Guerrero-Strachan, C.; Alonso, M.; Tortosa, M.; Flores, A.; Martínez-Ripoll, M.; Fonseca, I.; André, I.; Rodríguez, A. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2867-2876. (b) Lerestif, J. M.; Toupet, L.; Sinbandhit, S.; Tonnard, F.; Bazureau, J. P.; Hamelin, J. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6351-6364. (c) Viso, A.; Fernández de la Pradilla, R.; Guerrero-Strachan, C.; Alonso, M.; Martínez-Ripoll, M.; André, I. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2316-2317.

<sup>41</sup> (a) Woodward, R. B.; Hoffmann, R. Eds. *The Conservation of Orbital Symmetry*, Verlag Chemie: Weinheim, Germany, 1970. (b) Woodward, R. B.; Hoffmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 395-397. (c) Hoffmann, R.; Woodward, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2046-2048.

<sup>42</sup> (a) Kissane, M; Maguire, A. R. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 845-883. (b) Huisgen, R. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 403-419.

Existe una gran diversidad de 1,3-dipolos formados por varias combinaciones de átomos de carbono y heteroátomos (nitrógeno, oxígeno), clasificándose en dos grandes grupos en base a su estructura:<sup>42,43</sup>

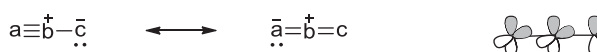
- Tipo alilo: su estructura es angular y poseen un único doble enlace resonando (cuatro electrones  $\pi$  deslocalizados en tres orbitales  $p_z$  paralelos entre sí y perpendiculares al plano del dipolo). En éstos, el átomo central  $b$  puede ser de N, P, O o S. A este grupo pertenecen los iluros de azometino (Esquema 1.12).<sup>42a</sup>



Esquema 1.12. 1,3-dipolos de tipo alilo.

Los iluros de azometino son de especial interés ya que mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar dan lugar a anillos pirrolidínicos, los cuales están presentes en la estructura de catalizadores quirales en síntesis asimétrica, así como de compuestos naturales y de interés farmacológico.<sup>38a,44</sup>

- Tipo propargilo/alenilo: poseen estructura lineal y se presentan en las dos formas resonantes tipo propargilo y tipo cumuleno. Este grupo tiene un orbital  $\pi$  extra en el plano ortogonal al orbital molecular del tipo propargilo. En este caso, el átomo central  $b$  sólo puede ser N. A este tipo pertenecen por ejemplo las azidas (Esquema 1.13).



Esquema 1.13. 1,3-dipolos de tipo propargilo/alenilo.

A continuación nos centraremos tanto en azidas como en iluros de azometino, ya que los nuevos inhibidores proteasómicos que serán de estudio en esta Memoria poseen en su estructura triazoles o anillos pirrolidínicos.

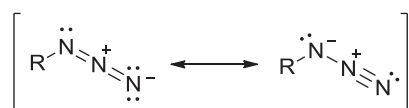
<sup>43</sup> Padwa, A. Ed. *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1984.

<sup>44</sup> (a) Seo, T. S.; Bai, X.; Ruparel, H.; Li, Z.; Turro, N. J.; Ju, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5488-5493. (b) Collman, J. P.; Devaraj, N. K.; Chidsey, C. E. D. *Langmuir* **2004**, *20*, 1051-1053. (c) Speers, A. E.; Adam, G. C.; Cravatt, B. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686-4687. (d) Brogini, G.; Zecchi, G. *Synthesis* **1999**, *6*, 905-917. (e) Michael, J. P. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 139-165.

### 1.2.2. Azidas como dipolos

Las azidas son dipolos del tipo propargilo/alenilo y por tanto son capaces de reaccionar con distintos dipolarófilos para dar lugar a heterociclos de cinco miembros.

Estos dipolos están formados por un átomo central de nitrógeno con carga positiva y dos átomos de nitrógeno terminales entre los que se distribuye la carga negativa y que son los que formarán los nuevos enlaces. La estructura de la azida puede describirse con dos estructuras resonantes (Esquema 1.14).



Esquema 1.14. Estructuras resonantes de la azida.

Los dipolarófilos más empleados en esta reacción son los alquenos y los alquinos. La reacción de cicloadición con alquenos genera triazolininas, mientras que con alquinos el producto obtenido es un triazol.<sup>38c</sup>

Los triazoles son estables; sin embargo, la mayor parte de las triazolininas no lo son, por lo que se descomponen eliminando nitrógeno molecular para formar una aziridina o una imina. Dicha formación depende de las condiciones y de la naturaleza de los sustituyentes tanto de la azida como del alqueno. En particular, la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos es una de las rutas más importantes y eficientes para proporcionar triazoles, estructuras con gran interés dentro de la medicina y biología.

La cicloadición térmica entre azidas y alquinos para dar lugar a triazoles se conoce desde los años 60, cuando fue descubierta por Huisgen.<sup>38c,45</sup> Sin embargo ha sido en la última década cuando el empleo y síntesis de estas estructuras ha ganado una considerable atención debido al estudio llevado a cabo de forma independiente, en 2001 por parte de Meldal<sup>46</sup> y Sharpless.<sup>47</sup> Ambos llegaron a la conclusión de que el Cu(I) catalizaba la reacción de cicloadición de azidas con alquinos. Este tipo de reacción se denominó “*Cu-accelerated azide-alkyne cycloaddition*” o “CuAAC”. Se trata de una reacción casi cuantitativa, muy robusta e insensible a las condiciones de reacción si el

<sup>45</sup> Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 633-696.

<sup>46</sup> Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.

<sup>47</sup> Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.



Los 1,2,3-triazoles disustituídos (Figura 1.14.A) han resultado ser estructuras muy interesantes ya que se han empleado como elementos de conjugación “click” para enlazar de modo covalente distintos componentes.<sup>52a,53</sup>

También han sido empleados en isostería de amidas (Figura 1.14.B)<sup>52a,53c</sup> ya que mimetizan el enlace peptídico. Algunas de las ventajas que presentan estos heterociclos frente a otros miméticos son su resistencia a la degradación metabólica, su gran estabilidad frente a la hidrólisis tanto básica como ácida e incluso enzimática y su poca reactividad en medios oxidantes o reductores. Por otra parte, los anillos de triazol poseen un mayor momento dipolar en comparación con el enlace amida y eso determina que los átomos N(2) y N(3) del triazol actúen como aceptores de enlaces de hidrógeno, lo que confiere una considerable acidez al hidrógeno en la posición 5. Además, el carácter aromático del heterociclo puede dar lugar a interacciones  $\pi$ -stacking, así como estabilizar estructuras peptídicas secundarias (giros, hélices y láminas).<sup>54</sup>

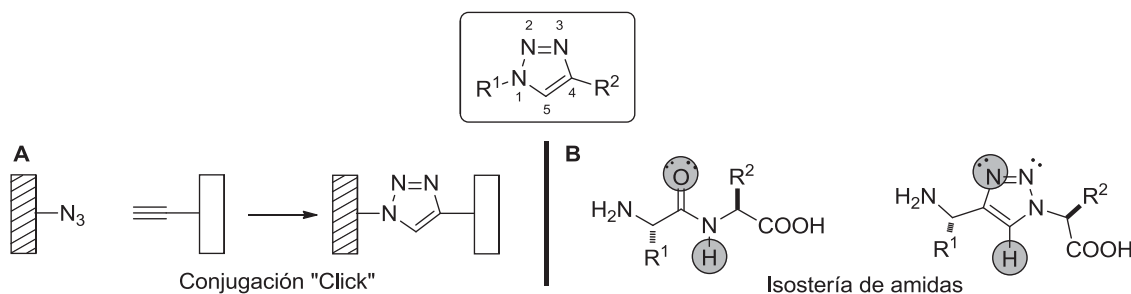


Figura 1.14. 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos: aplicaciones generales.

### 1.2.3. Iluros de azometino como dipolos

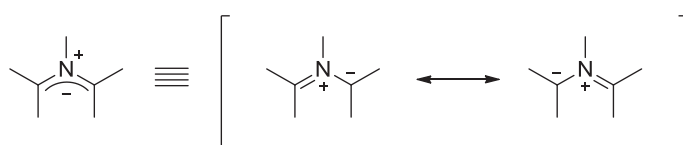
Uno de los dipolos más utilizados en este tipo de reacciones son los iluros de azometino. La importancia de éstos radica en que dan lugar a gran variedad de heterociclos nitrogenados mediante reacciones de cicloadición (3+2) con distintos dipolarófilos. Los anillos de pirrolidina son estructuras muy abundantes en la

<sup>53</sup> (a) Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128-1137. (b) Nandivada, H.; Jiang, X.; Lahann, J. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 2197-2208. (c) Angell, Y. L.; Burgess, K. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1674-1689. (d) Fournier, D.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1369-1380. (e) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249-1262. (f) Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 278-308. (g) El-Sagheer, A. H.; Brown, T. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388-1405. (h) Ko, E.; Liu, J.; Perez, L. M.; Lu, G.; Schaefer, A.; Burgess, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 462-477.

<sup>54</sup> (a) Oh, K.; Guan, Z. *Chem. Commun.* **2006**, 3069-3071. (b) Horne, W. S.; Yadav, M. K.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15366-15367. (c) Angelo, N. G.; Arora, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17134-17135.

naturaleza, entre las que destaca la familia de las prolinas.<sup>55</sup> Éstas poseen gran interés desde el punto de vista de sus aplicaciones, tanto en organocatálisis<sup>56</sup> y síntesis orgánica<sup>57</sup> como formando parte de la estructura de productos farmacéuticos (analgésicos, inhibidores de enzimas o anticancerígenos)<sup>58</sup> y alcaloides naturales (herbicidas, antifúngicos o insecticidas).<sup>59</sup>

Los iluros de azometino pertenecen al grupo de 1,3-dipolos de tipo alilo y están formados por un átomo central de nitrógeno con carga positiva y dos átomos de carbono terminales entre los que se distribuye la carga negativa, siendo éstos los que formarán los nuevos enlaces (Esquema 1.16).



Esquema 1.16. Estructura general de los iluros de azometino.

Según la naturaleza del tercer sustituyente del nitrógeno azometínico, el iluro de azometino puede clasificarse como *NH-iluro* (el sustituyente que está unido al átomo de nitrógeno central es un hidrógeno), clásico o *N-sustituído* o *N-metalado* (el átomo de nitrógeno citado está unido a un metal). Considerando otra clasificación, se puede distinguir entre iluros de azometino estabilizados y no estabilizados según si uno de los carbonos terminales del dipolo se encuentra sustituido por un grupo electroattractor o no. Dicha estabilización se debe a la mayor deslocalización de la carga negativa y a las consecuentes formas resonantes adicionales que aporta el grupo electroattractor. Los

<sup>55</sup> Nájera, C.; Sansano, J. M. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4584-4671.

<sup>56</sup> (a) Gröger, H.; Wilken, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 529-532. (b) Hiroi, K.; Suzuki, Y.; Abe, I. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1173-1188.

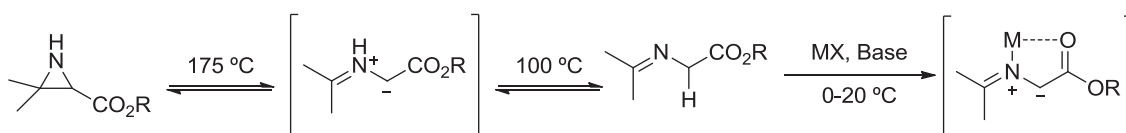
<sup>57</sup> (a) Cheng, Y.; Huang, Z. T.; Wang, M. X. *Curr. Org. Chem.* **2004**, *8*, 325-351. (b) Notz, W.; Tanaka, F.; Barbas III, C. F. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 580-591. (c) Felpin, F. X.; Lebreton, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3693-3712. (d) Jacobsen, E. N.; Pfaltz, A.; Yamamoto, H. Eds. *Comprehensive Asymmetric Catalysis*, Springer: Berlín, 1999, (volumes I-III) and 2004 (suplements I-II). (e) Dalko, P. I. Ed. *Enantioselective Organocatalysis*, Wiley-VCH: Weinheim, 2007. (f) Berkessel, A.; Gröger, H. Eds. *Asymmetric Organocatalysis-From Biomimetic Concepts to Applications in Asymmetric Synthesis*, Wiley-VCH: Weinheim, 2005.

<sup>58</sup> (a) Caliendo, G.; Greco, G.; Grieco, P.; Perissutti, E.; Santagada, V.; Ialenti, A.; Maffia, P.; Albrizio, S.; Santini, A. *Peptide Science* **1996**, *40*, 479-484. (b) Sinnott, M. L. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171-1202. (c) Hauser, F. M.; Ellenberger, S. R. *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 35-67. (d) Hosoya, Y.; Kameyama, T.; Naganawa, H.; Okami, Y.; Takeuchi, T. *J. Antibiotics*, **1993**, *46*, 1300-1302.

<sup>59</sup> (a) Nakajima, M.; Itoi, K.; Takamatsu, Y.; Kinoshita, T.; Okazaki, T.; Kawakubo, K.; Shindo, M.; Honma, T.; Tohjigamori, M.; Haneishi, T. *J. Antibiotics*, **1991**, *44*, 293-300. (b) Imada, A.; Kintaka, K.; Nakao, M.; Shinagawa, S. *J. Antibiotics*, **1982**, *35*, 1400-1403. (c) Bacos, D.; Basselier, J. J.; Celerier, J. P.; Lange, C.; Marx, E.; Lhomme, G.; Escoubas, P.; Lemaire, M.; Clement, J. L. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3061-3064.

iluros de azometino estabilizados, por un grupo carboxilo unido al carbono en  $\alpha$  son los que vamos a utilizar a lo largo de esta Memoria.

Los iluros de azometino tienen una naturaleza inestable, por lo que generalmente se preparan *in situ* a partir de las especies precursoras<sup>38a</sup> y se hacen reaccionar con el dipolarófilo sin llegar a aislarlos. Estos compuestos se pueden obtener mediante apertura térmica conrotatoria o fotolítica disrotatoria de anillos de aziridina convenientemente sustituidos, desililación de derivados de sililamina, descarboxilación-condensación de aminoácidos, desprotonación de sales de iminio, isomerización térmica convencional o mediante microondas de una imina derivada de un  $\alpha$ -aminoéster que contenga un hidrógeno enolizable, con el fin de dar un *NH*-iluro de azometino. Este último método también se puede desarrollar utilizando una base y una sal metálica en lugar de una fuente térmica, generando así como intermedio reactivo un iluro de azometino *N*-metalado (Esquema 1.17).



Esquema 1.17. Formación de un iluro de azometino metalado.

### 1.2.3.1. Control de la selectividad en la reacción de cicloadición 1,3-dipolar

En las reacciones de cicloadición 1,3-dipolares se generan dos nuevos enlaces carbono-carbono o carbono-heteroátomo y hasta cuatro nuevos centros quirales. Por lo tanto, en principio se podrían obtener hasta 32 posibles isómeros ( $2 \times VR_2^4$ ). Sin embargo, existen factores decisivos en el control de la estereoquímica absoluta del anillo que se forma como son la regioselectividad, la diastereoselectividad *endo:exo* y la enantioselectividad.

#### a) Regioselectividad

Cuando los reactivos no son simétricos, la reacción de cicloadición (3+2) puede darse a través de dos posibles regioisómeros. Según la clasificación de Sustmann,<sup>60</sup> y

<sup>60</sup> (a) Sustmann, R. *Pure Appl. Chem.* **1974**, *40*, 569-593. (b) Sustmann R.; Trill, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1972**, *11*, 838-840. (c) Sustmann, R. *Tetrahedron Lett.* **1971**, *29*, 2717-2720.



teniendo en cuenta la teoría de orbitales moleculares,<sup>61</sup> las cicloadiciones (3+2) pueden tener lugar según tres tipos de interacción entre los orbitales frontera del dipolo y del dipolarófilo (Figura 1.15):

- Tipo I: la interacción dominante tiene lugar entre el HOMO del dipolo y el LUMO del dipolarófilo, y se favorecen con grupos electrodonadores en el dipolo y electroattractores en el dipolarófilo. Dos de los dipolos pertenecientes a este grupo son los iluros de azometino y las iminas de azometino.
- Tipo II: ambas interacciones son de intensidad similar, pudiendo ser aceleradas por ambos tipos de sustituyentes en cada uno de los componentes. Ejemplo de dipolos de este grupo son las nitronas.
- Tipo III: son las controladas por la interacción entre el LUMO del dipolo y el HOMO del dipolarófilo, estando favorecidas con grupos electroattractores en el dipolo y electrodonadores en el dipolarófilo. De este tipo son las reacciones con ozono y óxido nitroso como dipolos.

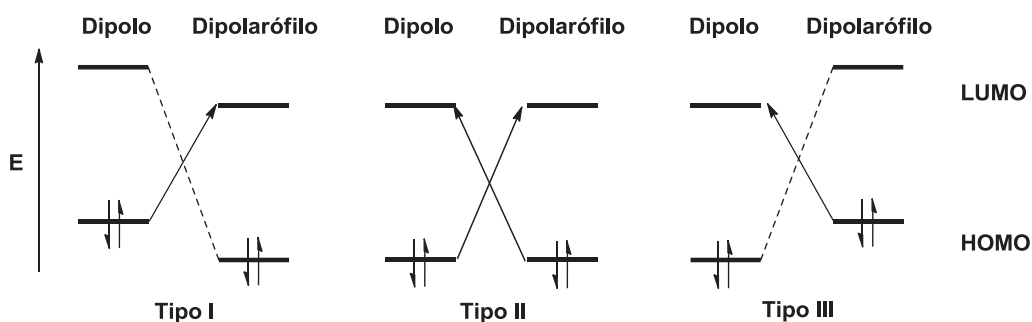


Figura 1.15. Tipos de cicloadiciones según la teoría de orbitales frontera.<sup>39</sup>

En general se puede decir que la regioquímica de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar viene determinada por los coeficientes de expansión de los orbitales frontera del dipolo y del dipolarófilo, pudiendo verse dificultada por efectos estéricos o del disolvente.<sup>62</sup> La interacción orbitalica más favorable será la que conduzca a un solapamiento mayor entre dichos orbitales y se da cuando el átomo de mayor coeficiente orbitalico del 1,3-dipolo reacciona con el átomo del dipolarófilo con el coeficiente de mayor valor.

<sup>61</sup> Fleming, I. Ed. *Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions*, John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1976.

<sup>62</sup> Cossío, F. P.; Morao, I.; Jiao, H.; Schleyer, P. v. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6737-6746.

b) *Diastereoselectividad*

La estereoquímica de los cicloaductos viene determinada por el modo de aproximación entre los dos componentes de la reacción. En las reacciones dipolares con dipolos de tipo anión alilo hay que considerar la formación de dos posibles diastereoisómeros, denominados aductos *endo* y *exo*. El estado de transición *endo* se encuentra estabilizado por pequeñas interacciones orbitálicas  $\pi$  secundarias que se producen entre el átomo central del dipolo y el sustituyente atractor o dador de electrones del dipolarófilo, mientras que en el estado de transición *exo* dichos grupos están en disposiciones opuestas. Esta selectividad *endo:exo* en la reacción de cicloadición 1,3-dipolar se ve condicionada principalmente por los efectos electrónicos y estéricos de los sustituyentes de los sustratos o por la presencia de un catalizador.

La diastereoselectividad en el proceso de cicloadición empleando iluros de azometino depende de si éstos son metalados y estabilizados por un grupo carboxilo, no metalados pero estabilizados por el grupo carboxilo o no metalados y no estabilizados. Así, en el primer caso el 1,3-dipolo mantendrá su geometría por efecto de la coordinación del grupo carbonilo y el metal (Figura 1.16.A). Lo mismo ocurre en el caso del iluro de azometino estabilizado de tipo *NH* en vez de metalado, donde se observa este mismo efecto, debido a la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular (Figura 1.16.B). Si el iluro de azometino no está metalado y tampoco está estabilizado por el grupo carboxilo, puede adquirir la conformación que se muestra en la Figura 1.16.C.

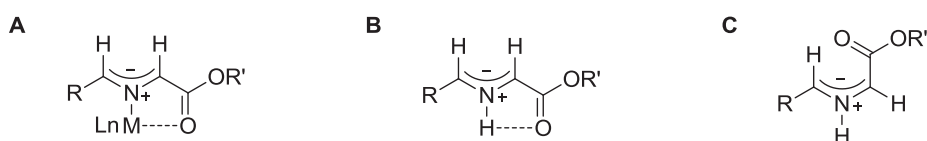
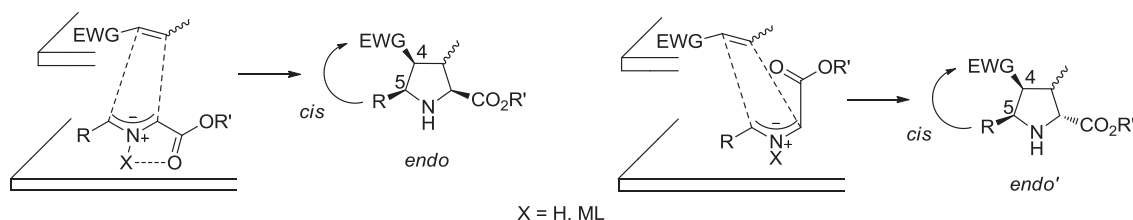


Figura 1.16. Las conformaciones que puede adoptar el iluro de azometino. *Ln* designa un número no determinado de ligandos coordinados al metal.

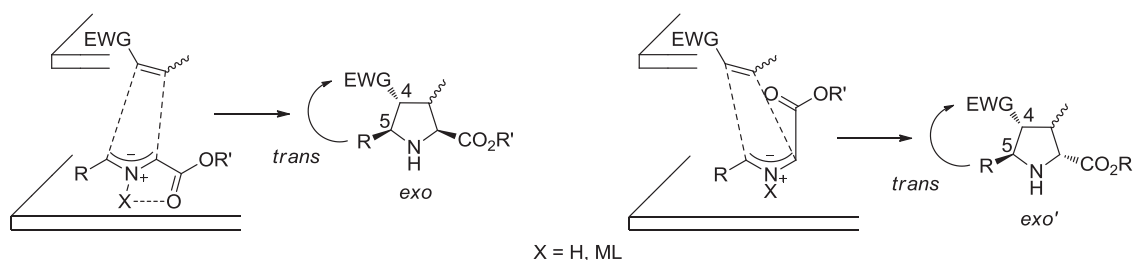
El dipolarófilo también conservará su configuración si reacciona de modo suprafacial, por lo que en presencia de metales se pueden postular dos modos de aproximación dipolo-dipolarófilo, que darán lugar a los dos únicos diastereoisómeros que se formarán en la mayor parte de estas reacciones.

- Aproximación *endo*: el grupo electroattractor del dipolarófilo (EWG) y los sustituyentes del dipolo se orientan hacia la misma cara del anillo en formación. Los sustituyentes de las posiciones 4 y 5 del cicloaducto obtenido estarán en *cis* (Esquema 1.18).



Esquema 1.18. Aproximaciones *endo* entre alquenos  $\pi$ -deficientes e iluros de azometino.

- Aproximación *exo*: el grupo electroattractor del dipolarófilo y los sustituyentes del dipolo se orientan hacia caras contrarias del anillo en formación. Los sustituyentes de las posiciones 4 y 5 del cicloaducto formado estarán en *trans* (Esquema 1.19).



Esquema 1.19. Aproximaciones *exo* entre alquenos  $\pi$ -deficientes e iluros de azometino.

Töke y col.<sup>63</sup> junto con nuestro grupo de investigación<sup>64</sup> encontraron que la estereoquímica de la cicloadición entre algunos iluros de azometino metalados y nitroolefinas arílicas puede invertirse en función del metal empleado. En el caso de los iluros de azometino metalados, se concluyó que la coordinación con litio promueve la formación preferente de cicloaductos *endo*, mientras que las sales de plata en condiciones térmicas, en presencia de una base terciaria y de acetonitrilo como disolvente, pueden favorecer la formación de aductos *exo* racémicos como estereoisómeros mayoritarios.

<sup>63</sup> (a) Nyerges, M.; Rudas, M.; Tóth, G.; Herényi, B.; Kádas, I.; Bitter, I.; Töke, L. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 13321-13330. (b) Nyerges, M.; Balázs, L.; Kádas, I.; Bitter, I.; Kövesdi, I.; Töke, L. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6783-6788.

<sup>64</sup> (a) Ayerbe, M.; Arrieta, A.; Cossío, F. P.; Linden, A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1795-1805. (b) Vivanco, S.; Lecea, B.; Arrieta, A.; Prieto, P.; Morao, I.; Linden, A.; Cossío, F. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6078-6092.

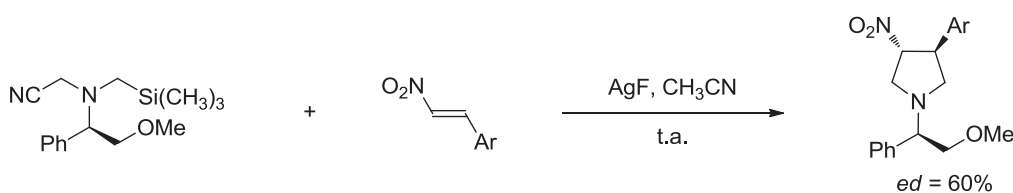
c) *Síntesis asimétrica*

Cuando una de las caras estereotópicas del dipolo o del dipolarófilo está bloqueada o discriminada se promueve la formación preferente de uno de los posibles estereoisómeros mediante inducción asimétrica. La inducción de quiralidad en esta reacción puede abordarse mediante dos vías diferentes:<sup>65</sup> síntesis diastereoselectiva y síntesis enantioselectiva.

- Reacciones 1,3-dipolares diastereoselectivas: creando inducción desde el dipolo o desde el dipolarófilo.

Una de las formas de llevar a cabo la reacción de cicloadición (3+2) diastereoselectiva es utilizando 1,3-dipolos quirales. En este tipo de reacciones el dipolo puede incorporar un auxiliar quiral, el cual se puede eliminar del producto final y recuperarlo, o ser sustratos quirales, cuya información asimétrica se mantiene en el cicloadducto formado.

El primer intento de inducción quiral en la reacción de cicloadición (3+2) usando un iluro de azometino quiral y un alqueno aquiral fue llevado a cabo por Padwa y col.<sup>66</sup> consiguiendo un exceso diastereomérico del 60% (Esquema 1.20). Desde entonces se ha ido mejorando la metodología,<sup>67</sup> llegando a alcanzar excesos mayores del 95%.



Esquema 1.20. Ejemplo de la primera cicloadición (3+2) asimétrica con un 1,3-dipolo quiral.

Existen abundantes ejemplos descritos<sup>68</sup> de iluros de azometino quirales que han sido utilizados en reacciones de cicloadición (3+2). Entre ellos se pueden destacar

<sup>65</sup> Gothelf, K. V.; Jørgensen, K. A. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 863-909.

<sup>66</sup> Padwa, A.; Chen, Y. Y.; Chiacchio, U.; Dent, W. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 3529-3535.

<sup>67</sup> (a) Alcaide, B.; Almendros, P.; Alonso, J. M.; Aly, M. F. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1351-1358. (b) Alcaide, B.; Almendros, P.; Alonso, J. M.; Aly, M. F. *Chem. Comm.* **2000**, 485-486.

<sup>68</sup> (a) Chinchilla, R.; Falvello, L. R.; Galindo, N.; Nájera, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3133-3140. (b) Dondas, H. A.; Fishwick, C. W. G.; Grigg, R.; Kilner, C. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3473-3485. (c) Bonini, B. F.; Boschi, F.; Franchini, M. C.; Fochi, M.; Fini, F.; Mazzanti, A.; Ricci, A. *Synlett* **2006**, *4*, 543-546. (d) Deprez, P.; Rouden, J.; Chiaroni, A.; Riche, C.; Royer, J.; Husson, H. P. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*,

diferentes dipolos o precursores de dipolos estabilizados **I-VIII** (Figura 1.17), que han permitido obtener los correspondientes cicloaductos con distintas diastereoselectividades, incluso aportando alguno de ellos una doble inducción asimétrica.

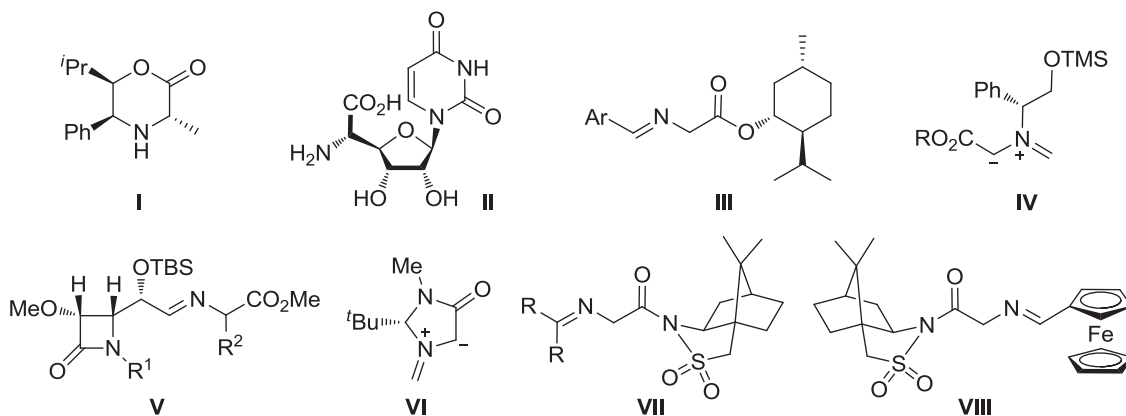
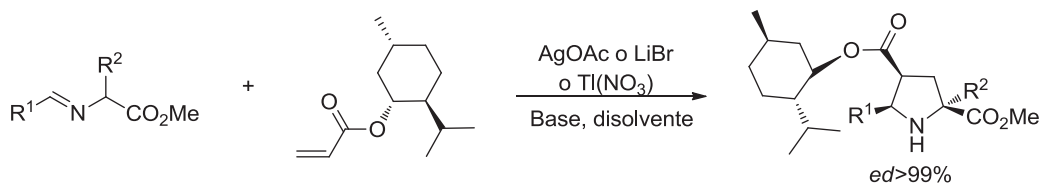


Figura 1.17. Ejemplos de 1,3-dipolos o sus precursores quirales.

La segunda opción para llevar a cabo la reacción 1,3-dipolar de forma diastereoselectiva es empleando dipolarófilos quirales. Uno de los primeros ejemplos efectivos fue el descrito por Grigg y col.<sup>69</sup> en el que se utilizaba acrilato de mentilo como dipolarófilo quiral y con el que se obtenía un total diastereocontrol en la síntesis de pirrolidinas mediante el empleo de sales de Ag(I), Li(I) o Tl(I) (Esquema 1.21).



Esquema 1.21. Reacción de cicloadición 1,3-dipolar diastereoselectiva empleando acrilato de mentilo.

Esta modalidad de inducción se ha estudiado mucho más que la anterior consiguiéndose en algunos casos completo diastereocontrol. Se han empleado muchos y

7531-7534. (e) Deprez, P.; Royer, J.; Husson, H. P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 1189-1192. (f) Alcaide, B.; Almendros, P.; Redondo, M. C.; Ruiz, M. P. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8890-8894. (g) Peyronel, J. F.; Grisoni, S.; Carboni, B.; Courgeon, T.; Carrié, R. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 189-198. (h) Oppolzer, W. *Pure Appl. Chem.* **1990**, *62*, 1241-1250. (i) Garner, P.; Dogan, O. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4-6. (j) Dogan, O.; Öner, I.; Ülkü, D.; Arici, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 2099-2104.

<sup>69</sup> (a) Barr, D. A.; Dorrity, M. J.; Grigg, R.; Hargreaves, S.; Malone, J. F.; Montgomery, J.; Redpath, J.; Stevenson, P.; Thornton-Pett, M. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 273-294. (b) Barr, D. A.; Dorrity, M. J.; Grigg, R.; Malone, J. F.; Montgomery, J.; Rajviroongit, S.; Stevenson, P. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6569-6572.

diversos dipolarófilos entre los cuales destacan: ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados,<sup>70</sup> amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas,<sup>71</sup> lactamas bicíclicas,<sup>72</sup> lactatos<sup>73</sup> o enonas<sup>74</sup> (Figura 1.18).

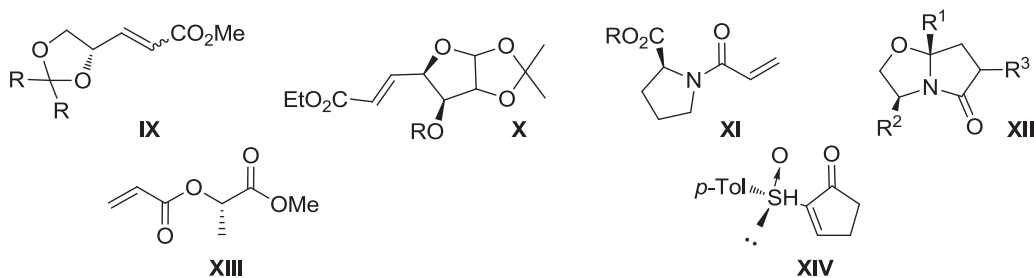
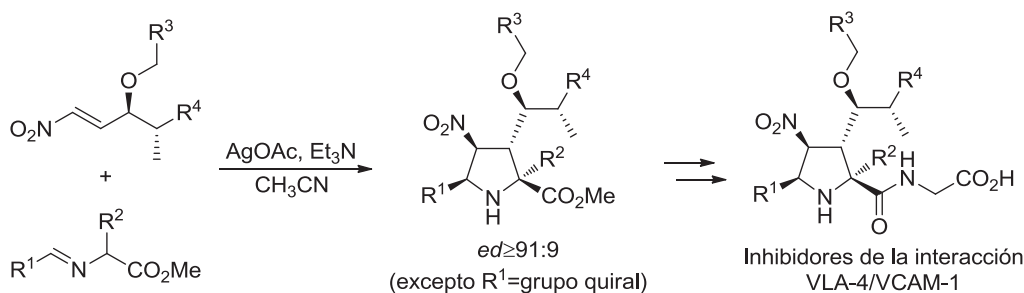


Figura 1.18. Ejemplos de dipolarófilos quirales.

Esta metodología fue empleada por nuestro grupo de investigación llevando a cabo reacciones de cicloadición (3+2) con nitroalquenos quirales e iminoésteres catalizadas por AgOAc, obteniéndose en la mayoría de los casos un total estereocontrol<sup>75</sup> (Esquema 1.22). Las pirrolidinas enantiopuras obtenidas fueron utilizadas para la síntesis de nuevos inhibidores de la interacción integrina/ligando VLA-4/VCAM-1, los cuales mostraron actividad antimetastásica *in vivo*.



Esquema 1.22. Síntesis de agentes antimetastáticos utilizando cicloadiciones (3+2) diastereoselectivas entre  $\alpha$ -iminoésteres y nitroalquenos quirales.

<sup>70</sup> (a) Annunziata, R.; Cinquini, M.; Cozzi, F.; Raimondi, L.; Pilati, T. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1991**, *2*, 1329-1342. (b) Wee, A. G. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1989**, 1363-1364. (c) Pandey, J.; Dwivedi, N.; Singh, N.; Srivastava, A. K.; Tamarkar, A.; Tripathi, R. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1321-1325.

<sup>71</sup> (a) Waldmann, H.; Bläser, E.; Jansen, M.; Letschert, H. P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 683-685. (b) Waldmann, H.; Bläser, E.; Jansen, M.; Letschert, H. P. *Chem. Eur. J.* **1995**, *1*, 150-154.

<sup>72</sup> (a) Fray, A. H.; Meyers, A. I. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3575-3578. (b) Fray, A. H.; Meyers, A. I. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3362-3374. (c) Kopach, M. E.; Fray, A. H.; Meyers, A. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9876-9883.

<sup>73</sup> (a) Nájera, C.; Retamosa, M. G.; Sansano, J. M.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1985-1989. (b) Nájera, C.; Retamosa, M. G.; Sansano, J. M.; de Cózar, A. Cossío, F. P. *Eur. J. Chem.* **2007**, *30*, 5038-5049.

<sup>74</sup> García Ruano, J. L.; Tito, A.; Peromingo, M. T. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 10013-10019.

<sup>75</sup> (a) Zubia, A.; Mendoza, L.; Vivanco, S.; Aldaba, E.; Carrascal, T.; Lecea, B.; Arrieta, A.; Zimmerman, T.; Vidal-Vanaclocha, F.; Cossío, F. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2903-2907. (b) San Sebastián, E.; Zimmerman, T.; Zubia, A.; Vara, Y.; Martín, E.; Sirockin, F.; Dejaegere, A.; Stote, R. H.; Lopez, X.; Pantoja-Uceda, D.; Valcárcel, M.; Mendoza, L.; Vidal-Vanaclocha, F.; Cossío, F. P.; Blanco, F. J. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 735-747.

- Reacciones 1,3-dipolares enantioselectivas:

Las reacciones 1,3-dipolares llevadas a cabo de forma enantioselectiva se han convertido en el proceso más importante para la síntesis de heterociclos de cinco eslabones ópticamente activos. Esta aproximación ofrece muchas ventajas respecto a los procesos diastereoselectivos, pero la más relevante es el empleo de cantidades subestequiométricas de un catalizador quiral. Existen distintas estrategias para llevar a cabo cicloadiciones enantioselectivas, como son el empleo de biocatalizadores,<sup>76</sup> organocatalizadores<sup>77</sup> y complejos metálicos quirales.<sup>78</sup>

La reacción de cicloadición entre iluros de azometino y alquenos pobres en electrones catalizada por ácidos de Lewis quirales constituye uno de los métodos más convergentes y versátiles para la síntesis enantioselectiva de pirrolidinas altamente funcionalizadas.<sup>79</sup> Existen diferentes métodos de sintetizar iluros de azometino, pero la metalación de  $\alpha$ -iminoésteres es sin duda la ruta más empleada debido a la acidez de la posición en  $\alpha$  al carbonilo, pudiéndose desprotonar en presencia de bases débiles. Una gran ventaja de este procedimiento es que la coordinación del ácido de Lewis quiral al átomo de nitrógeno y al grupo carbonilo del iminoéster hace que el iluro de azometino *N*-metalado resultante quede muy restringido conformacionalmente, facilitando así una diferenciación eficaz de las dos caras enantiotópicas durante el proceso de cicloadición.

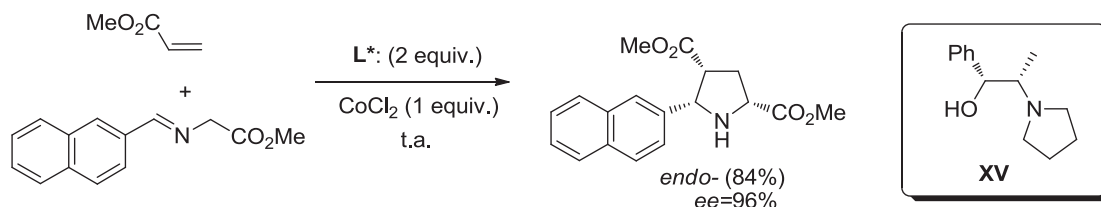
<sup>76</sup> (a) Reetz, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480-12496. (b) Bommarius, A. S.; Paye, M. F. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6534-6565. (c) Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. *Nature* **2012**, *485*, 185-194. (d) Bommarius, A. S.; Riebel, B. R. Eds. *Biocatalysis*, Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2004. (e) Wandrey, C.; Liese, A.; Kihumbu, D. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4*, 286-290.

<sup>77</sup> (a) Alemán, J.; Cabrera, S. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 774-793. (b) Carreira, E. M.; Yamamoto, H. Eds. *Comprehensive Chirality, Volume 6: Synthetic Methods V – Organocatalysis*, Elsevier, 2012. (c) Giacalone, F.; Gruttadauria, M.; Agrigento, P.; Noto, R. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2406-2447. (d) Albrecht, L.; Jiang, H.; Jørgensen, K. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8492-8509. (e) List, B. Ed. *Asymmetric Organocatalysis: Volume 291 of Topics in Current Chemistry*, Springer: Heidelberg, Germany, 2010. (f) Grondal, C.; Jeanty, M.; Enders, D. *Nature Chem.* **2010**, *2*, 167-178.

<sup>78</sup> (a) Holzwarth, M. S.; Plietker, B. *ChemCatChem* **2013**, *5*, 1650-1679. (b) Sandoval, C. A.; Noyori, R.; *An Overview of Recent Developments in Metal-Catalyzed Asymmetric Transformations*, en Ding, K.; Dai, L. X. Eds. *Organic Chemistry – Breakthroughs and Perspectives*, Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2012. (c) Crawley, M. L.; Trost, B. M. Eds. *Applications of Transition Metal Catalysis in Drug Discovery And Development: An Industrial Perspective*, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, 2012. (d) Pavlov, V. A.; Pavlova, T. N. *Russ. Chem. Rev.* **2012**, *81*, 823-854. (e) Kobayashi, S.; Yamashita, Y. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 58-71. (f) Zhang, W. H.; Chien, S. W.; Hor, T. S. A. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 1991-2024. (g) Ma, J. A.; Cahard, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4566-4583.

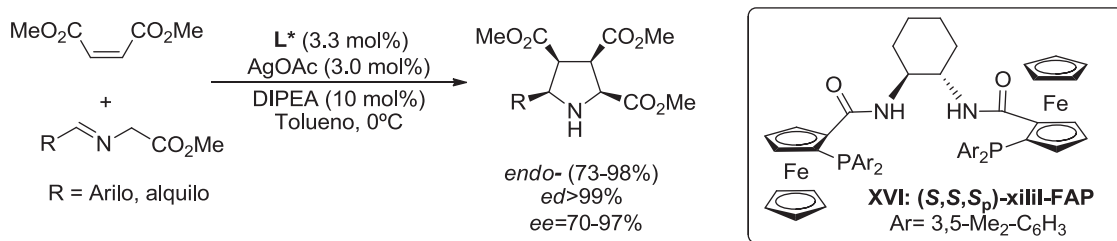
<sup>79</sup> (a) Parsons, A. T.; Smith, A. G.; Neel, A. J.; Johnson, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9688-9692. (b) Wang, Y. G.; Kumano, T.; Kano, T.; Maruoka, K. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2027-2029. (c) Bilke, J. L.; Moore, S. P.; O'Brien, P.; Gilday, J. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1935-1938. (d) Jackson, S. K.; Karadeolian, A.; Driega, A. B.; Kerr, M. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4196-4201.

En 1991, Grigg y col.<sup>80</sup> fueron los primeros en publicar un ejemplo de cicloadición 1,3-dipolar con iluros de azometino catalizada por metales empleando cantidades estequiométricas de ácido de Lewis quiral. Con este complejo quiral, derivado de efedrina, obtuvieron un exceso enantiomérico del 96% utilizando una sal de Co(II) y el dipolarófilo como disolvente de la reacción (Esquema 1.23).



Esquema 1.23. Primer ejemplo de reacción 1,3-dipolar enantioselectiva con iluros de azometino catalizada por un complejo metálico quiral en cantidad estequiométrica.

En 2002 Zhang y col.<sup>81</sup> llevaron a cabo la misma transformación pero usando cantidades subestequiométricas de catalizador. En este caso utilizaron un complejo quiral de Ag(I) formado por una difosfina ferrocénica y AgOAc en la reacción entre  $\alpha$ -iminoésteres derivados de glicina y maleato de dimetilo. De esta forma obtuvieron pirrolidinas *endo* con buenos resultados (Esquema 1.24).



Esquema 1.24. Primera reacción 1,3-dipolar enantioselectiva con iluros de azometino catalizada por un complejo metálico quiral en cantidad subestequiométrica.

Desde entonces, se han estudiado diversas cicloadiciones (3+2) asimétricas basadas en la combinación de distintas sales metálicas<sup>82</sup> (Ag(I), Cu(I), Cu(II), Au(I)),<sup>83</sup>

<sup>80</sup> Allway, P.; Grigg, R. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 5817-5820.

<sup>81</sup> Longmire, J. M.; Wang, B.; Zhang, X.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13400-13401.

<sup>82</sup> (a) Husinec, S.; Savic, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 2047-2061. (b) Xing, Y.; Wang, N. X. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, 256, 938-952. (c) Hassner, A. Ed. *Synthesis of Heterocycles via Cycloadditions I, volume 12 of Topics in Heterocyclic Chemistry*, Springer, 2008.

<sup>83</sup> (a) Melhado, A. D.; Luparia, M.; Toste, F. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12638-12639. (b) Martín-Rodríguez, M.; Nájera, C.; Sansano, J. M.; Wu, F. L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21, 1184-1186. (c) Martín-Rodríguez, M.; Nájera, C.; Sansano, J. M.; de Cózar, A.; Cossío, F. P. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 14224-14233. (d) Martín-Rodríguez, M.; Nájera, C.; Sansano, J. M.; de Cózar, A.; Cossío, F. P. *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, 7, 988-996.



Ni(II)<sup>84</sup> o Zn(II)<sup>85</sup>) y ligandos quirales. Los mejores resultados se han obtenido con Ag(I), Cu(I) y Cu(II), consiguiéndose excelentes enantioselectividades.

- Reacciones catalizadas por Ag (I)

Las sales de Ag(I) son ácidos de Lewis muy efectivos en las cicloadiciones empleando iluros de azometino como dipolos, alcanzándose altos rendimientos en tiempos de reacción relativamente cortos, lo que conlleva que la hidrólisis de la imina no sea una reacción secundaria significativa.

Tras la publicación de Zhang<sup>81</sup> en 2002 de la primera cicloadición dipolar asimétrica con cantidades subestequiométricas de un complejo metálico, han sido muchos los ejemplos que han ido apareciendo en la bibliografía. En la Tabla 1.1 se muestra un resumen de los procedimientos estereoselectivos catalizados por Ag(I) descritos.<sup>86,87,88,89,90,91,92</sup> Estos procedimientos emplean ligandos quirales ferrocénicos bidentados con coordinación P,N o P,P y quiralidad planar, derivados de binaftilo con quiralidad axial y ligandos monodentados de tipo fosforamidito, con cargas catalíticas bastante bajas (3-5 mol%). Los dipolarófilos empleados son monoactivados (acrilatos) y diactivados (maleimidias, maleatos y fumaratos).

Todos estos sistemas catalíticos basados en complejos de Ag(I) generan con buena diastéreo- y enantioselectividad los cicloadductos *endo*. Por tanto, se requiere un catalizador complementario para conseguir los correspondientes cicloadductos *exo* con altos rendimientos y estereoselectividades. Esta limitación de los complejos de Ag(I)

<sup>84</sup> (a) Shi, J. W.; Zhao, M. X.; Lei, Z. Y.; Shi, M. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 305-308. (b) Arai, T.; Yokoyama, N.; Mishiro, A.; Sato, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7895-7898.

<sup>85</sup> (a) Gothelf, A. S.; Gothelf, K. V.; Hazell, R. G.; Jørgensen, K. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4236-4238. (b) Dogan, O.; Koyuncu, H.; Garner, P.; Bulut, A.; Youngs, W. J.; Panzner, M. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4687-4690.

<sup>86</sup> Chen, C.; Li, X.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10174-10175.

<sup>87</sup> Knöpfel, T. F.; Aschwanden, P.; Ichikawa, T.; Watanabe, T.; Carreira, E. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5971-5973.

<sup>88</sup> Zeng, W.; Zhou, Y. G. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5055-5058.

<sup>89</sup> Zeng, W.; Chen, G. Y.; Zhou, Y. G.; Li, Y. X. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 750-751.

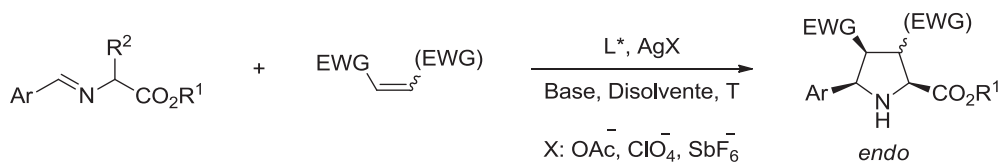
<sup>90</sup> (a) Nájera, C.; Retamosa, M. G.; Sansano, J. M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4025-4028. (b) Nájera, C.; Retamosa, M. G.; Sansano, J. M.; de Cózar, A.; Cossío, F. P. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2913-2923. (c) Martín-Rodríguez, M.; Nájera, C.; Sansano, J. M.; Costa, P. R. R.; Crizanto de Lima, E.; Dias A. G. *Synlett* **2010**, *6*, 962-966.

<sup>91</sup> (a) Nájera, C.; Retamosa, M. G.; Sansano, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6055-6058. (b) Nájera, C.; Retamosa, M. G.; Martín-Rodríguez, M.; Sansano, J. M.; de Cózar, A.; Cossío, F. P. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *32*, 5622-5634.

<sup>92</sup> Yu, S. B.; Hu, X. P.; Deng, J.; Wang, D. Y.; Duan, Z. C.; Zheng, Z. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, *20*, 621-625.

quirales para dichas cicloadiciones se pueden soslayar con los complejos quirales de Cu(I) y Cu(II).

Tabla 1.1. Ejemplos de reacciones de cicloadiciones 1,3-dipolares de iluros de azometino catalizadas por complejos quirales de Ag(I).

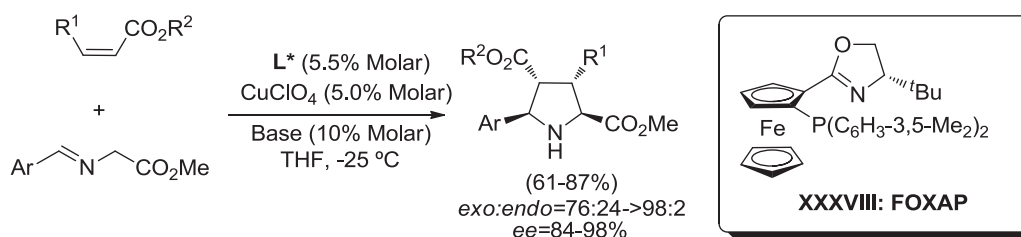


Dipolarófilo	Ligando quiral	Resultados	Grupo investigador
	 <b>XVII: (S)-Quinap</b>	77-98% <i>endo:exo</i> >95:5 77-96% <i>ee</i>	Schreiber <sup>86</sup>
	 <b>XVIII: O-(S)-Pinap</b>	88-94% <i>endo:exo</i> >95:5 92-95% <i>ee</i>	Carreira <sup>87</sup>
	 <b>XIX: FOXAP</b>	76-99% <i>endo:exo</i> >99:1 93-98% <i>ee</i>	Zhou <sup>88</sup>
	 <b>(S,R<sub>p</sub>)-XX</b> R = H, Me	90-98% <i>endo:exo</i> >99:1 85-92% <i>ee</i>	Zhou <sup>89</sup>
	 <b>XXI: (S)-Binap</b>	56-90% <i>endo:exo</i> >98:2 64->99% <i>ee</i>	Nájera <sup>90</sup>
	 <b>(S<sub>a</sub>,R,R)-XXII</b>	70-90% <i>endo:exo</i> >98:2 82->99% <i>ee</i>	Nájera <sup>91</sup>
	 <b>XXIII: (S,R,S<sub>a</sub>,R<sub>p</sub>)-PPFAPhos</b>	93-98% <i>endo:exo</i> 92:8-99:1 78-99% <i>ee</i>	Zheng <sup>92</sup>

- Reacciones catalizadas por Cu(I) y Cu(II)

El cobre se considera uno de los metales de transición más importantes dentro de la síntesis orgánica, debido a su versatilidad y tolerancia a una gran cantidad de grupos funcionales así como de condiciones de reacción. Las reacciones de cicloadición (3+2) con complejos de Cu(I) han sido más estudiadas que las realizadas con Cu(II) y en general se puede resaltar que con los complejos de Cu(I) los productos que se obtienen son cicloaductos *exo*, aunque en algunos casos se obtiene la estereoquímica *endo*.

En 2005, Zhang y col.<sup>93</sup> estudiaron la reacción de cicloadición entre iluros de azometino y diferentes acrilatos, utilizando por primera vez una sal de Cu(I). Para ello utilizaron como ligandos quirales fosfano-oxazolinas derivadas del ferroceno junto con la sal CuClO<sub>4</sub> (Esquema 1.25).

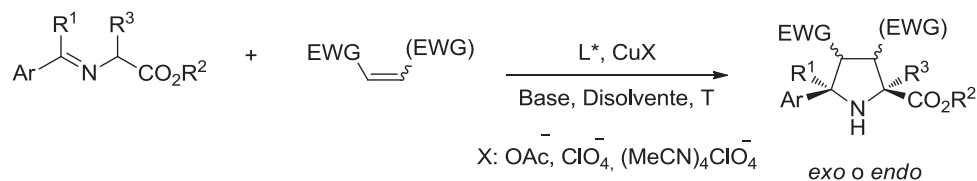


Esquema 1.25. Ejemplo de cicloadiciones (3+2) asimétricas con FOXAP y Cu(I).

A partir de este resultado, se han desarrollado gran cantidad de catalizadores quirales basados en complejos de Cu(I). En la Tabla 1.2 se resumen parte de los sistemas catalíticos basados en sales de Cu(I) más eficaces.

<sup>93</sup> Gao, W.; Zhang, X.; Raghunath, M. *Org. Lett.* **2005**, 7, 4241-4244.

Tabla 1.2. Ejemplos de reacciones de cicloadición 1,3-dipolar de iluros de azometino catalizada por complejos quirales de Cu(I).



Dipolarófilo	Ligando quiral	Resultados	Grupo investigador
	 <b>XXV: Fesulphos</b>	50-92% <i>exo:endo</i> <2:>98 80->99% <i>ee</i>	Carretero <sup>94</sup>
	 <b>XXVI: FOXAP</b>	70-97% <i>exo:endo</i> 86:14->99:<1 83-98% <i>ee</i>	Hou <sup>95</sup>
	 <b>XXVII</b>	60-89% <i>exo:endo</i> <1:>99 26-79% <i>ee</i>	Shi <sup>96</sup>
 	 <b>XXVIII: ClickFerrophos</b>	80-95% <i>exo:endo</i> 70:30-98:2 80-96% <i>ee</i>	Fukuzawa <sup>97</sup>

En cuanto a los trabajos realizados con fuentes de Cu(II), han sido mucho menos que los llevados a cabo con sales de Cu(I). Así pues, entre las pocas reacciones de cicloadición (3+2) enantioselectivas de iluros de azometino catalizadas por complejos de Cu(II) se encuentran las llevadas a cabo por Arai y col.<sup>98</sup> y Nájera y col.<sup>99</sup> Los primeros publicaron en 2010 un trabajo<sup>98</sup> en el que obtenían las pirrolidinas *endo* con excelentes excesos diastereo- y enantioméricos utilizando el ligando *N,N,N*-tridentado PyBidine (**XXIX**) con Cu(OTf)<sub>2</sub> (Esquema 1.26.A). Pocos años más tarde, el grupo de Nájera, utilizando la misma sal de cobre obtuvo los isómeros *exo* empleando como

<sup>94</sup> (a) Cabrera, S.; Gómez Arrayás, R.; Carretero, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16394-16395. (b) Cabrera, S.; Gómez Arrayás, R.; Martín-Matute, B.; Cossío, F. P.; Carretero, J. C. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6587-6602.

<sup>95</sup> Yan, X. X.; Peng, Q.; Zhang, Y.; Zhang, K.; Hong, W.; Hou, X. L.; Wu, Y. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1979-1983.

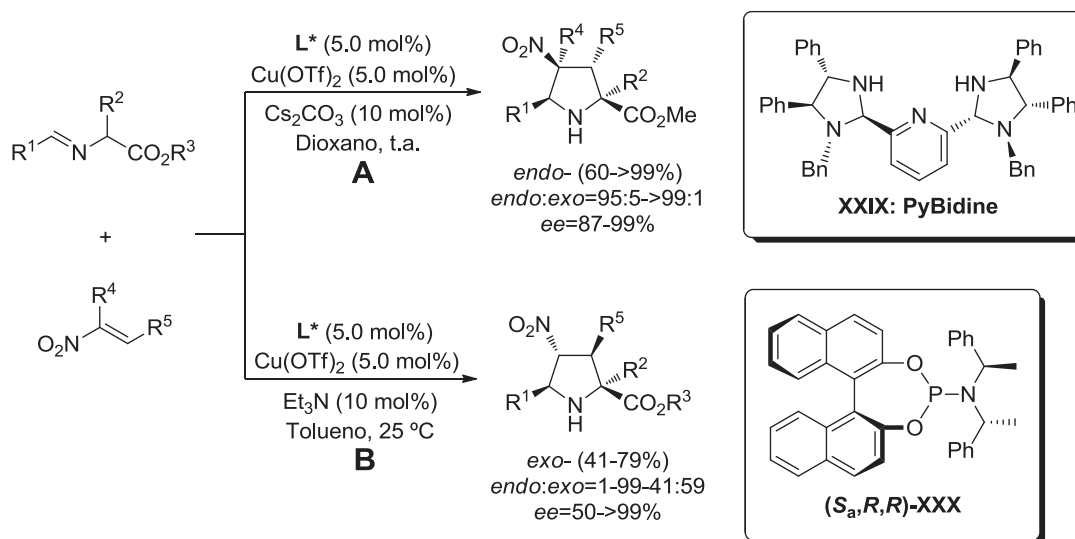
<sup>96</sup> Shi, M.; Shi, J. W. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 645-650.

<sup>97</sup> Fukuzawa, S. I.; Oki, H. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1747-1750.

<sup>98</sup> Arai, T.; Mishiro, A.; Yokoyama, N.; Suzuki, K.; Sato, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5338-5339.

<sup>99</sup> Castelló, L. M.; Nájera, C.; Sansano, J. M.; Larrañaga, O.; de Cózar, A.; Cossío, F. P. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2902-2905.

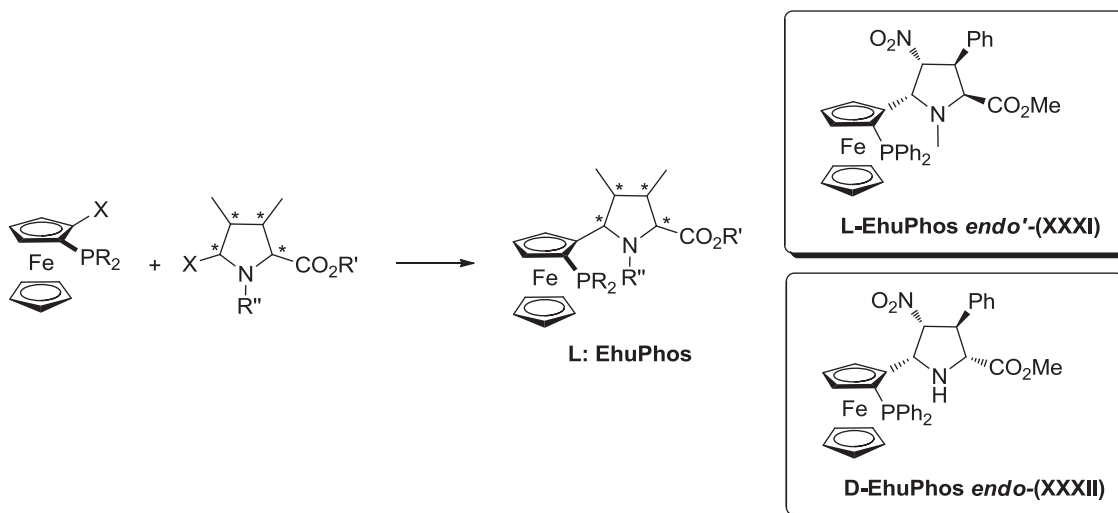
ligando el fosforamidito monodentado (*S<sub>a</sub>*,*R,R*)-**XXX** (Esquema 1.26.B). Así pues, se trata de dos trabajos en los que se han sintetizado ésteres de 4-nitro-prolinas *endo* o *exo* en función del ligando empleado.



Esquema 1.26. Ejemplo de cicloadiciones (3+2) enantioselectivas entre  $\alpha$ -iminoésteres y nitroalquenos con *PyBidine* y  $Cu(II)$  (A)<sup>98</sup> o (*S<sub>a</sub>*,*R,R*)-**XXX** y  $Cu(II)$  (B).<sup>99</sup>

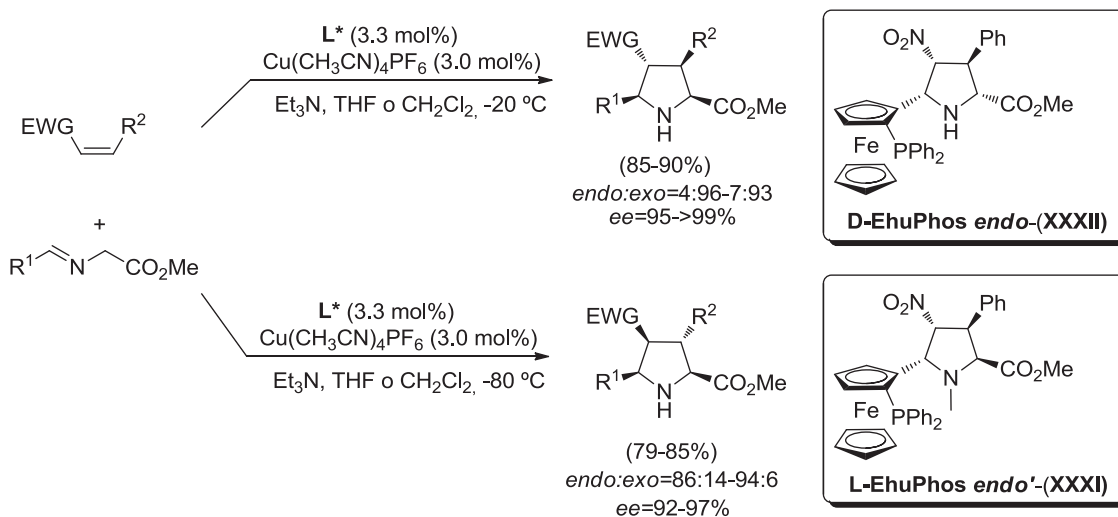
Para finalizar con estos procesos catalizados por complejos quirales de cobre, cabe citar el reciente trabajo de nuestro grupo de investigación en el que se han desarrollado ligandos derivados de prolinas no naturales y estructuras ferrocénicas (EhuPhos).<sup>100</sup> Estas pirrolidinas ferrocenil sustituidas incorporan en su misma estructura la suma de dos quiralidades: planar gracias a los ferrocenos 1,2-disustituidos y central debida a las prolinas no naturales y representan los ligandos que se van a utilizar a lo largo de la presente Tesis. De todos los posibles isómeros que incorporan esta estructura, los descritos en dicho trabajo son los dos mostrados en el Esquema 1.27.

<sup>100</sup> Conde, E.; Bello, D.; de Cózar, A.; Sánchez, M.; Vázquez, M. A.; Cossío, F. P. *Chem. Sci.* **2012**, 3,1486-1491.



Esquema 1.27. Ligandos ferroceno-pirrolina EhuPhos.

Estos ligandos de ferroceno quirales se estudiaron en reacciones entre diferentes iluros de azometino y alquenos  $\pi$ -deficientes (nitroalquenos, maleimidias, ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados y sulfonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas), en presencia de la sal  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$  como fuente de Cu(I). Estos ligandos promueven una diastereodivergencia dependiendo del sustituyente de su átomo de *N*-pirrolidínico. Así, empleando el ligando L-EhuPhos *endo'*-(XXXI) y nitroestireno como dipolarófilo, la reacción genera aductos *endo*. Por el contrario, utilizando el D-EhuPhos *endo*-XXXII, se promueve la formación de cicloaductos *exo*. En ambos casos los rendimientos obtenidos fueron superiores al 80% y las enantioselectividades en torno al 92-99% (Esquema 1.28).

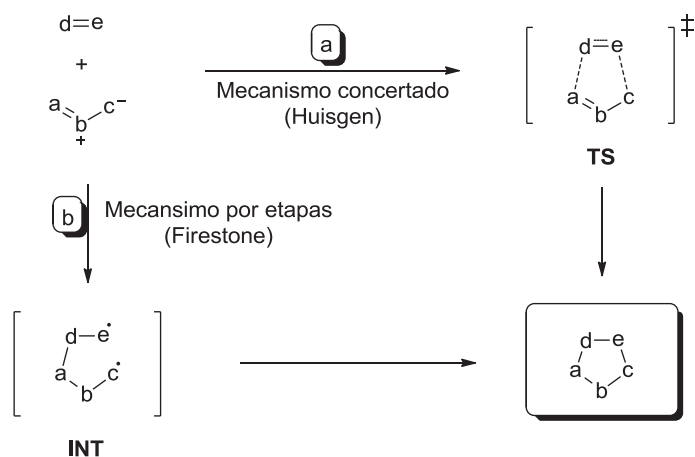


Esquema 1.28. Ejemplo de cicloadiciones (3+2) enantioselectivas con ferrocenil pirrolidinas (EhuPhos) y Cu(I).

En términos generales, se puede decir que las reacciones (3+2) asimétricas de alquinos de azometino catalizadas por complejos quirales de Cu(I) han demostrado ser más flexibles en términos de diastereocontrol que las de Ag(I). Estas cicloadiciones catalizadas por Cu(I) han dado lugar al desarrollo de variantes *endo* o *exo*-selectivas con excelentes inducciones asimétricas dependiendo del tipo y estructura del ligando así como de la naturaleza del dipolarófilo.

### 1.2.3.2. Mecanismo de las cicloadiciones 1,3-dipolares

Durante mucho tiempo el mecanismo de la reacción 1,3-dipolar ha sido objeto de debate.<sup>101</sup> Entre las décadas de los sesenta y ochenta, dos investigadores, Huisgen<sup>42b,45,102</sup> y Firestone,<sup>103</sup> defendían teorías contrapuestas. El primero propuso un mecanismo pericíclico *supra-supra* en el que la reacción transcurría de manera concertada a través de un único estado de transición. Sin embargo, el segundo era partidario de un proceso por etapas que involucraba un intermedio de reacción birradicalario (Esquema 1.29).



Esquema 1.29. Mecanismos posibles de la cicloadición (3+2). Ruta a) Mecanismo concertado. Ruta b) Mecanismo por etapas.

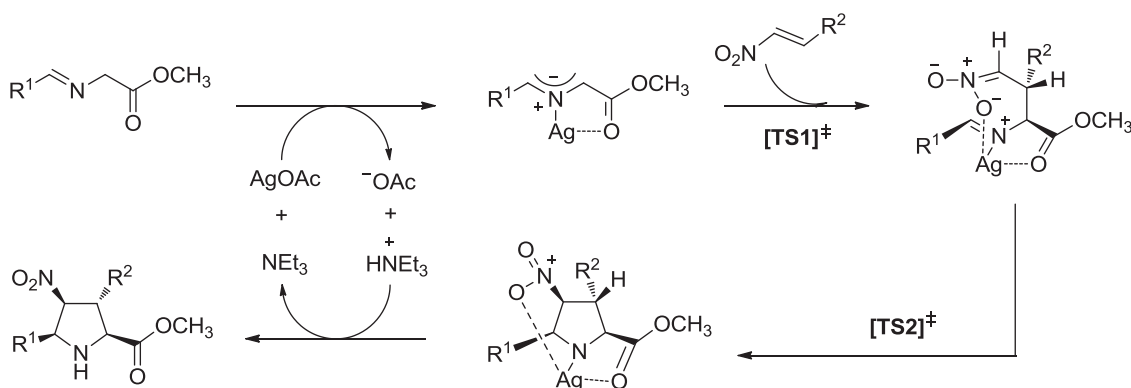
<sup>101</sup> Houk, K. N.; González, J.; Li, Y. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 81-90.

<sup>102</sup> Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1968**, *7*, 321-406.

<sup>103</sup> (a) Firestone, R. A. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 3009-3039. (b) Firestone, R. A. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2181-2191. (c) Firestone, R. A. *J. Chem. Soc.* **1970**, 1570-1575. (d) Firestone, R. A. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 2285-2290.

Posteriormente, tras una colaboración con Houk,<sup>104</sup> Firestone aceptó la teoría del mecanismo concertado sobre la base de la estereoespecificidad del proceso. En 1986, Huisgen<sup>105</sup> encontró un ejemplo claro de una reacción de cicloadición 1,3-dipolar que transcurría por etapas con especies de tipo zwitteriónico. En 1998, Schleyer y col.<sup>106</sup> demostraron que la reacción (3+2) aniónica transcurría por etapas.

Estudios realizados en los últimos años en nuestro grupo<sup>64</sup> sobre el mecanismo de las reacciones de cicloadición térmicas (3+2) entre iluros de azometino metalados y estabilizados y alquenos  $\pi$ -deficientes, demostraron que dichas reacciones transcurrían mediante un mecanismo por etapas. Como puede observarse en el Esquema 1.30, la primera etapa consiste en un ataque nucleofílico de tipo Michael desde el carbono  $\alpha$  del iluro de azometino, formado *in situ* a partir del  $\alpha$ -iminoéster correspondiente, sobre el carbono  $\beta$  del nitroalqueno. En una segunda etapa, el intermedio zwitteriónico formado cicla mediante una adición del nitronato metalado, a través de una reacción de Henry-Mannich intramolecular sobre el fragmento imínico.



Esquema 1.30. Mecanismo por etapas de la cicloadición (3+2).

Así pues, en muchos casos se admite un mecanismo concertado cuyo grado de asincronía varía en función de la naturaleza del dipolo y del dipolarófilo. En otros trabajos se ha demostrado que algunos de estos procesos transcurren en dos etapas a través de un intermedio zwitteriónico, habiendo llegado incluso a detectar y aislar algunos de estos intermedios de reacción.<sup>107</sup>

<sup>104</sup> Houk, K. N.; Firestone, R. A.; Munchausen, L. L.; Mueller, P. H.; Arison, B. H.; García, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7227-7228.

<sup>105</sup> (a) Huisgen, R.; Mloston, G.; Langhals, E. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4085-4087. (b) Huisgen, R.; Mloston, G.; Langhals, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6401-6402.

<sup>106</sup> Neumann, F.; Lambert, C.; Schleyer, P. v. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3357-3370.

<sup>107</sup> (a) Arrieta, A.; de la Torre, M. C.; de Cózar, A.; Sierra, M. A.; Cossío, F. P. *Synlett.* **2013**, *24*, 535-549. (b) de Cózar, A.; Cossío, F. P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 10858-10868.



# 2

## *Hipótesis y Objetivos*

---

### 2.1. Hipótesis

### 2.2. Objetivos

2.2.1. Diseño de inhibidores del proteasoma con estructura de ácido borónico y triazol

2.2.2. Diseño de inhibidores del proteasoma con estructura de ácido borónico y anillo pirrolidínico densamente sustituido

2.2.3. Diseño de inhibidores del proteasoma con estructura de  $\beta$ -lactona o nitroalqueno y anillo pirrolidínico densamente sustituido

2.2.4. Evaluación biológica de los inhibidores de proteasoma sintetizados

---



## 2.1. Hipótesis

Como se ha comentado en la introducción, existen resultados prometedores obtenidos con inhibidores proteasómicos como Bortezomib, Carfilzomib, Ixazomib, Delanzomib, Oprozomib y Marizomib. Sin embargo, esta diana terapéutica presenta problemas terapéuticos importantes, tales como resistencia, selectividad, toxicidad y efectos neurodegenerativos. Por lo tanto, es deseable contar con nuevos inhibidores del proteasoma con mejores perfiles terapéuticos.

El análisis de difracción de rayos X de la estructura de Bortezomib unido a la unidad 20S del proteasoma de levadura, revela que existe un enlace covalente entre el átomo de boro del inhibidor y el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de los residuos de Thr de las unidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$ , así como un puente de hidrógeno entre el fragmento de pirazina y los residuos Asp y Thr. El residuo de fenilalanina del Bortezomib no interactúa con la proteína que lo rodea, sino que ocupa un espacio hidrófobo vacío en una disposición tridimensional bien definida (Figura 2.1.A). Pensamos que la restricción conformacional alrededor de este residuo fenilo daría lugar a una estructura que estaría mejor preorganizada, minimizando así la penalización entrópica asociada a la interacción entre el inhibidor del proteasoma y las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$  de la unidad de 20S, como se muestra en las Figura 2.1.B y C.

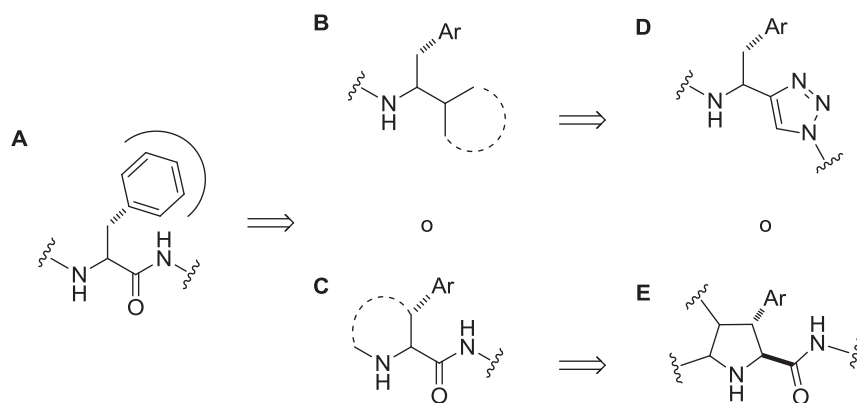


Figura 2.1. Posibles estructuras conformacionales para inhibidores del proteasoma.

Los anillos de cinco eslabones proporcionan un compromiso adecuado entre la restricción conformacional y la flexibilidad. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que cuando se incorpora al inhibidor proteasómico un anillo de triazol 1,4-disustituido (Figura 2.1.D) o un anillo de pirrolidina densamente sustituido que posee un grupo

carboxamida en C2 y un grupo arilo o heteroarilo en C3 (preferiblemente con configuración *R*, ver Figura 2.1.E), debería mejorarse el perfil terapéutico por favorecer el balance entrópico y el entálpico, así como por aumentar la selectividad de unión a diferentes unidades catalíticas del proteasoma.

Diversos grupos de investigación, incluido el nuestro, han desarrollado diferentes métodos para la síntesis regio-, diastereo- y enantiocontrolada de anillos de pirrolidina densamente sustituidos.<sup>1</sup> Además, los anillos de pirrolidina se han descrito como inhibidores del proteasoma.<sup>2</sup> Sin embargo, no se ha descrito hasta la fecha la actividad inhibitoria de las pirrolidinas tetrasustituidas enantiopuras. En particular, se desconoce el efecto de la configuración absoluta del átomo C4 del anillo de pirrolidina sobre la capacidad inhibidora de la molécula resultante.

## 2.2. Objetivos

Los objetivos propuestos para intentar verificar experimentalmente la hipótesis formulada se basan en el diseño, síntesis y evaluación de la actividad biológica de nuevos compuestos con electrófilos tales como ácido borónico,  $\beta$ -lactona o nitroalqueno. A su vez, dichas moléculas contendrán un anillo de triazol o de pirrolidina enantiopura densamente sustituido.

### 2.2.1. Diseño de inhibidores del proteasoma con estructura de ácido borónico y triazol

Se planteó como primer objetivo el diseño y la síntesis de compuestos que tuvieran a la vez una unidad de ácido borónico y un anillo de triazol 1,4-disustituido debido a que la estructura que resultaba era análoga a la del Bortezomib.

---

<sup>1</sup> (a) Conde, E.; Bello, D.; de Cózar, A.; Sánchez, M.; Vázquez, M. A.; Cossío, F. P. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1486-1491. (b) Castelló, L. M.; Nájera, C.; Sansano, J. M.; Larrañaga, O.; de Cózar, A.; Cossío, F. P. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2902-2905.

<sup>2</sup> Adams, J.; Stein, R.; Baevsky, M.; Grenier, L.; Plamondon, L. Boronic ester and acid compounds, synthesis and uses WO96/13266, 1995. (PCT/US95/14117).

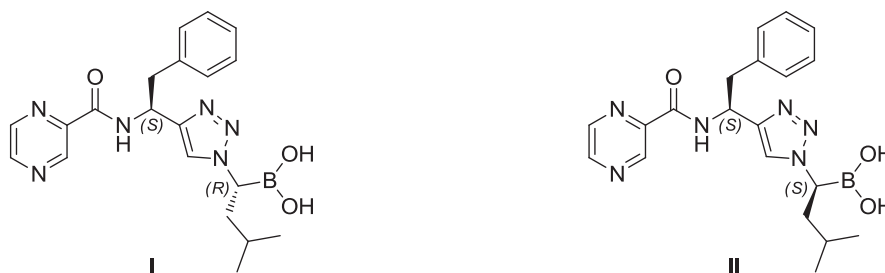


Figura 2.2. Estructuras triazólicas con unidad de ácido borónico.

### 2.2.2. Diseño de inhibidores del proteasoma con estructura de ácido borónico y anillo pirrolidínico densamente sustituido

El siguiente objetivo que nos planteamos fue la preparación de una quimioteca de nuevos inhibidores proteasómicos análogos al Bortezomib constituidos por una unidad de ácido borónico y un anillo de pirrolidina tetrasustituido.

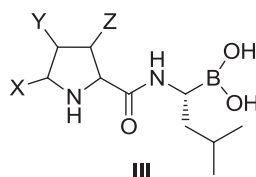


Figura 2.3. Estructura general de inhibidores de proteasoma con unidades de pirrolidina y ácido borónico.

### 2.2.3. Diseño de inhibidores del proteasoma con estructura de $\beta$ -lactona o nitroalqueno y anillo pirrolidínico densamente sustituido

Un nuevo objetivo fue la evaluación de otros grupos electrófilos distintos al ácido borónico. Para ello se planteó el diseño y síntesis de dos tipos de inhibidores proteasómicos. El primero incorporaría a la vez una unidad de  $\beta$ -lactona y un anillo pirrolidínico tetrasustituido y el segundo una unidad de nitroalqueno y el mismo anillo pirrolidínico.

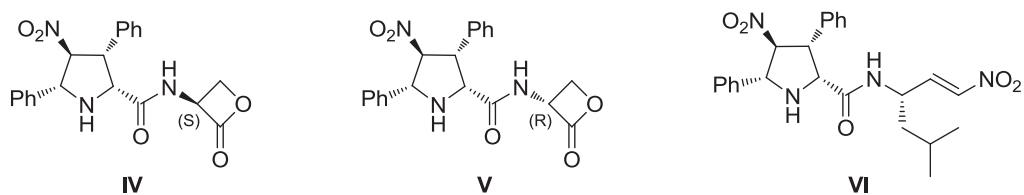


Figura 2.4. Estructuras análogas al Bortezomib que incorporan unidades de pirrolidina,  $\beta$ -lactona y nitroalqueno.

#### 2.2.4. Evaluación biológica de los inhibidores de proteasoma sintetizados

Como último objetivo nos propusimos conocer la actividad biológica de los compuestos sintetizados mediante experimentos “*in vitro*” de todos ellos. Aquellos que ofrecieran mejores resultados se analizarán frente a diversas líneas celulares y se estudiará su perfil farmacocinético y su actividad mutagénica.

# 3

## Resultados y Discusión

---

- 3.1. Síntesis de ácidos borónicos con estructura de triazol**
  - 3.1.1. Síntesis de triazoles**
    - 3.1.1.1. Síntesis del alquino **5**
    - 3.1.1.2. Síntesis de las azidas **10** y *ent-10*
    - 3.1.1.3. Cicloadición 1,3-dipolar “click” entre el alquino **5** y las azidas **10** y *ent-10*
  - 3.1.2. Desprotección de los ésteres borónicos**
- 3.2. Síntesis de pirrolidinas precursoras de inhibidores proteasómicos**
  - 3.2.1. Síntesis del aminoboronato **15****
  - 3.2.2. Síntesis Diastereoselectiva de pirrolidinas**
    - 3.2.2.1. Acoplamiento peptídico con *N*-Boc-Glicina y desprotección del grupo Boc
    - 3.2.2.2. Síntesis del derivado imínico **19**
    - 3.2.2.3. Cicloadición (3+2) diastereoselectiva
  - 3.2.3. Síntesis Enantioselectiva de pirrolidinas**
    - 3.2.3.1. Síntesis de ligandos ferrocénicos quirales EhuPhos: Síntesis diastereoselectiva de pirrolidinas ferrocenil sustituidas enantiopuras
    - 3.2.3.2. Método general de obtención de nitroalquenos aromáticos
    - 3.2.3.3. Procedimiento general para la preparación de los  $\alpha$ -iminoésteres
    - 3.2.3.4. Procedimiento general para la cicloadición (3+2) enantioselectiva entre los  $\alpha$ -iminoésteres y alquenos electrodeficientes

- 3.3. Funcionalización de prolinas no naturales densamente sustituidas para la síntesis de nuevos inhibidores proteasómicos**
    - 3.3.1. Síntesis de ácidos borónicos como electrófilos**
      - 3.3.1.1. Síntesis de los ácidos pirrolidínicos
      - 3.3.1.2. Acoplamiento peptídico
      - 3.3.1.3. Desprotección de los ésteres borónicos
    - 3.3.2. Síntesis de  $\beta$ -lactonas 45 como electrófilos**
      - 3.3.2.1. Síntesis de la  $\beta$ -lactona 48a
      - 3.3.2.2. Síntesis de la  $\beta$ -lactona 52a
    - 3.3.3. Síntesis del nitroalqueno 59a como electrófilo**
      - 3.3.3.1. Síntesis del aldehído quiral 55
      - 3.3.3.2. Reacción de Henry
      - 3.3.3.3. Desprotección del grupo Boc y acoplamiento con los derivados pirrolidínicos
      - 3.3.3.4. Eliminación de McMurry
  - 3.4. Evaluación biológica**
    - 3.4.1. Ensayo enzimático *in vitro* de la actividad inhibidora del proteasoma**
    - 3.4.2. Actividad biológica y viabilidad en líneas celulares de cáncer**
    - 3.4.3. Estudio farmacocinético**
      - 3.4.3.1. Introducción a la farmacocinética
      - 3.4.3.2. Resultados de la administración en rata de los compuestos *exo*-D-43c, *exo*-D-43f, *exo*-D-43g, *exo*-D-43h y *endo*-L-43a
    - 3.4.4. Test de Ames**
-



### 3.1. Síntesis de ácidos borónicos con estructura de triazol

#### 3.1.1. Síntesis de triazoles

Con los antecedentes descritos en el capítulo 1, tanto de inhibidores proteasómicos como de reacciones de cicloadición 1,3-dipolares con azidas como dipolos, se decidió en primer lugar llevar a cabo la síntesis de moléculas análogas al Bortezomib que incorporasen a la vez la estructura de triazol y la de ácido borónico (**1** y **2**). Se escogieron las estructuras que se muestran en la Figura 3.1 debido a su similitud con el Bortezomib. Éstas presentan diferente configuración en la parte del ácido borónico, lo cual puede ser útil a la hora de conocer la interacción de este grupo con el proteasoma.

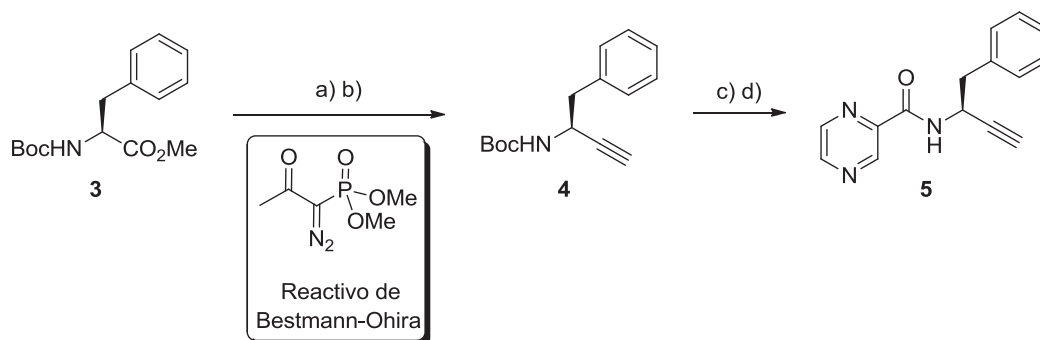


Figura 3.1. Estructuras triazólicas análogas al Bortezomib.

Para la obtención de estas moléculas se hizo uso de la reacción 1,3-dipolar “click”. Así, previamente hubo que sintetizar el correspondiente alquino y las correspondientes azidas como se expone a continuación.

##### 3.1.1.1. Síntesis del alquino **5**

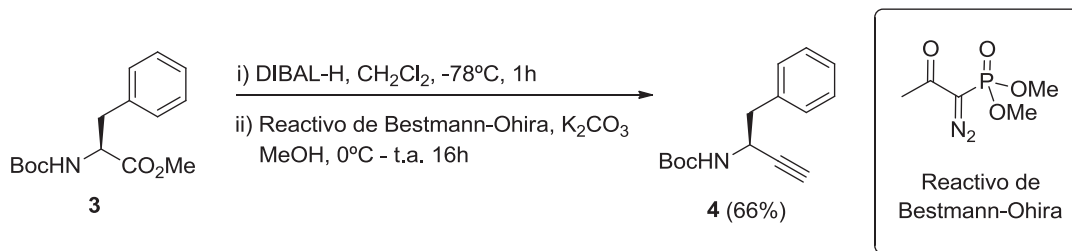
En primer lugar se sintetizó el alquino correspondiente **5** a través de dos etapas, una homologación de Seyferth-Gilbert (o modificación Bestmann-Ohira) seguida de un acoplamiento peptídico con ácido 2-Pirazinoico (Esquema 3.1).



Esquema 3.1. Síntesis del alquino **5**. Reactivos y condiciones: a) DIBAL-H,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78^\circ\text{C}$ , 1h. b) Reactivo de Bestmann-Ohira,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH,  $0^\circ\text{C}$  - t.a., 16h. c) TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 1h. d) Ácido 2-Pirazinoico, HATU, DIPEA, DMF, t.a., 1h.

a) Homologación Seyferth-Gilbert o Modificación Bestmann-Ohira<sup>1</sup>

Para obtener el alquino **4** se redujo con DIBAL-H el grupo éster del reactivo comercial *N*-Boc-L-fenilalaninato de metilo **3** a aldehído que posteriormente se trató *in situ* con el reactivo Bestmann-Ohira en presencia de metanol y carbonato potásico como base (Esquema 3.2).



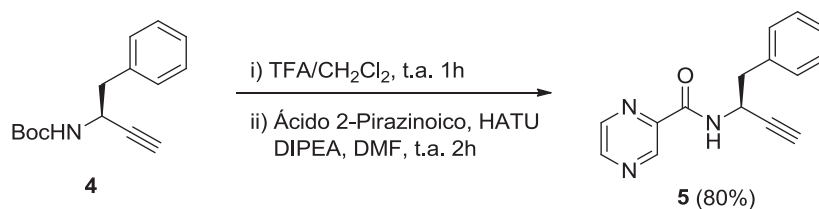
Esquema 3.2. Homologación de Seyferth-Gilbert.

De esta forma se obtuvo el alquino **4**, con buen rendimiento (66%), acorde a lo descrito en bibliografía.<sup>1b</sup>

<sup>1</sup> (a) Dickson, H. D.; Smith, S. C.; Hinkle, K. W. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5597-5599. (b) Proteau-Gagné, A.; Rochon, K.; Roy, M.; Albert, P. J.; Guérin, B.; Gendron, L.; Dory, Y. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5267-5269.

b) *Acoplamiento peptídico*

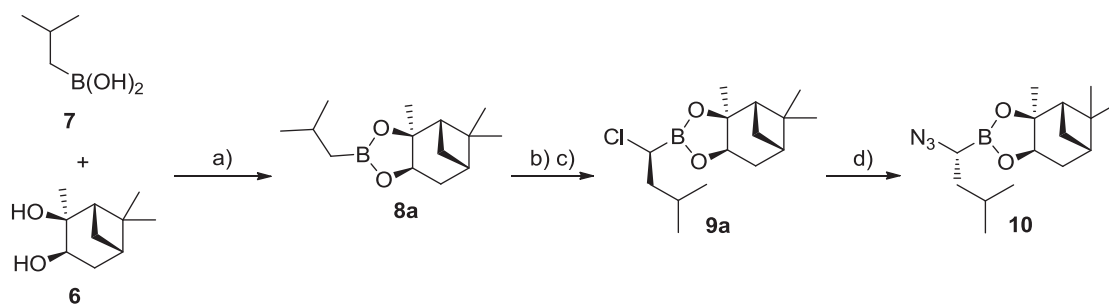
A continuación se eliminó el grupo protector Boc (*tert*-butiloxicarbonilo) de la estructura **4** mediante tratamiento con TFA y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La amina primaria generada se trató con ácido 2-Pirazinoico en presencia de HATU como agente de acoplamiento, DIPEA como base y *N,N*-Dimetilformamida como disolvente (Esquema 3.3).<sup>2</sup> De esta forma se generó el alquino **5** con buen rendimiento (80%).



Esquema 3.3. Acoplamiento peptídico con el ácido 2-Pirazinoico.

 3.1.1.2. Síntesis de las azidas **10** y *ent*-**10**

Para conseguir las estructuras triazólicas deseadas hubo que sintetizar la azida **10** y su enantiómero *ent*-**10**. Para ello se llevaron a cabo diferentes reacciones consecutivas partiendo de ácido isobutil borónico **7** y de diol **6** (Esquema 3.4).

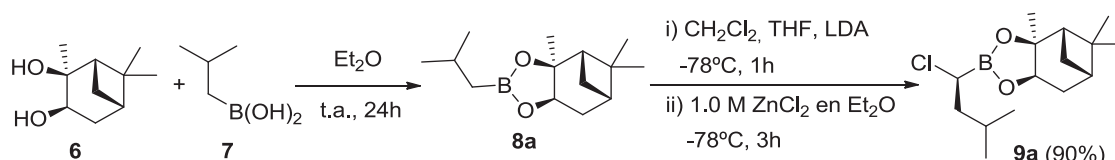


Esquema 3.4. Síntesis de la azida **10**. Reactivos y condiciones: a) Et<sub>2</sub>O, t.a., 24h. b), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, THF, LDA, -78 °C, 1h. c) ZnCl<sub>2</sub> 1M en Et<sub>2</sub>O, -78 °C, 3h. d) NaN<sub>3</sub>, TBAB, H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 3 días.

<sup>2</sup> Beierle, J. M.; Horne, W. S.; van Maarseveen, J. H.; Waser, B.; Reubi, J. C.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4725-4729.

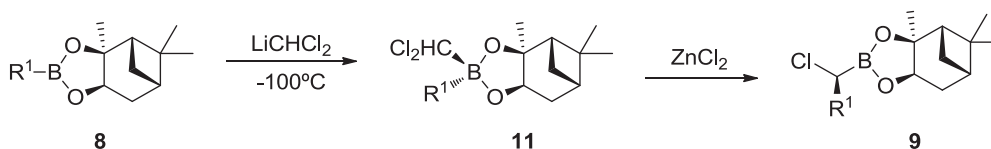
## a) Protección del (+)-Pinanodiol y homologación de ésteres borónicos terciarios

La primera etapa consistió en la protección del (+)-Pinanodiol **6** con ácido isobutil borónico **7**, obteniendo así el producto **8a**, con rendimiento cuantitativo.<sup>3</sup> Para ello se empleó Et<sub>2</sub>O como disolvente, a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación se llevó a cabo la reacción de homologación del éster borónico<sup>4</sup> (Esquema 3.5).



Esquema 3.5. Protección del (+)-Pinanodiol y Homologación de Matteson.

Dicha homologación conlleva la reacción del éster borónico asimétrico **8** con dicloroetil-litio seguido de la reorganización mediante la estructura **11**, catalizada por cloruro de Zn(II). De esta forma se genera un único éster borónico con un átomo de cloro en posición  $\alpha$  al átomo de boro, con una pureza diastereomérica normalmente superior al 99:1.<sup>5</sup> La estereoselección de este proceso ocurre durante la migración del grupo alquilo (R<sup>1</sup>) desde el átomo de boro al carbono adyacente (Esquema 3.6).



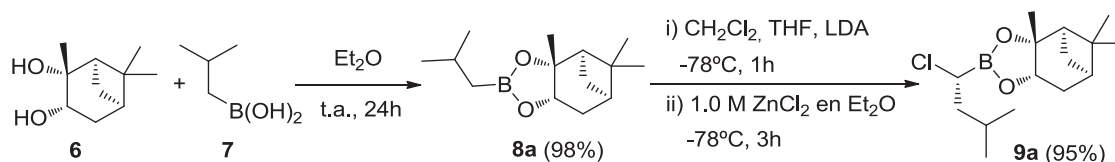
Esquema 3.6. Etapas de la Homologación de Matteson.

El compuesto **9a** se obtuvo con buen rendimiento (90%), semejante al descrito en la bibliografía.<sup>3</sup> Para la síntesis de las estructuras enantiómeras a las propuestas en el Esquema 3.5, se procedió de la misma manera pero partiendo del (-)-Pinanodiol en vez del (+)-Pinanodiol. Los rendimientos obtenidos en estas reacciones fueron del 98% y 95% para *ent*-**8a** y *ent*-**9a** respectivamente (Esquema 3.7).

<sup>3</sup> Dorsey, B. D.; Iqbal, M.; Chatterjee, S.; Menta, E.; Bernardini, R.; Bernareggi, A.; Cassarà, P. G.; D'Arasmo, G.; Ferretti, E.; De Munari, S.; Oliva, A.; Pezzoni, G.; Allievi, C.; Strepponi, I.; Ruggeri, B.; Ator, M. A.; Williams, M.; Mallamo, J. P. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1068-1072.

<sup>4</sup> Singh, R. P.; Matteson, D. S. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 6650-6653.

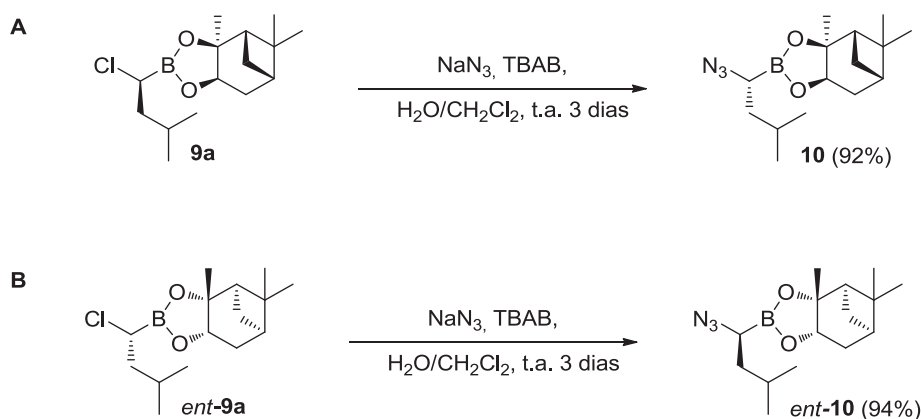
<sup>5</sup> Matteson, D. S.; Sadhu, K. M.; Peterson, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 810-819.



Esquema 3.7. Protección del (-)-Pinanodiol y Homologación de Matteson.

b) Síntesis de la azida **10**

El siguiente paso fue la sustitución nucleófila del átomo de cloro en  $\alpha$  al boro de la estructura **9a**. Esta sustitución puede llevarse a cabo con gran cantidad de nucleófilos, en nuestro caso la reacción se realizó con azida sódica,<sup>5</sup> generando la azida quiral deseada a través de una reacción  $S_N2$  con inversión de configuración (Esquema 3.8).

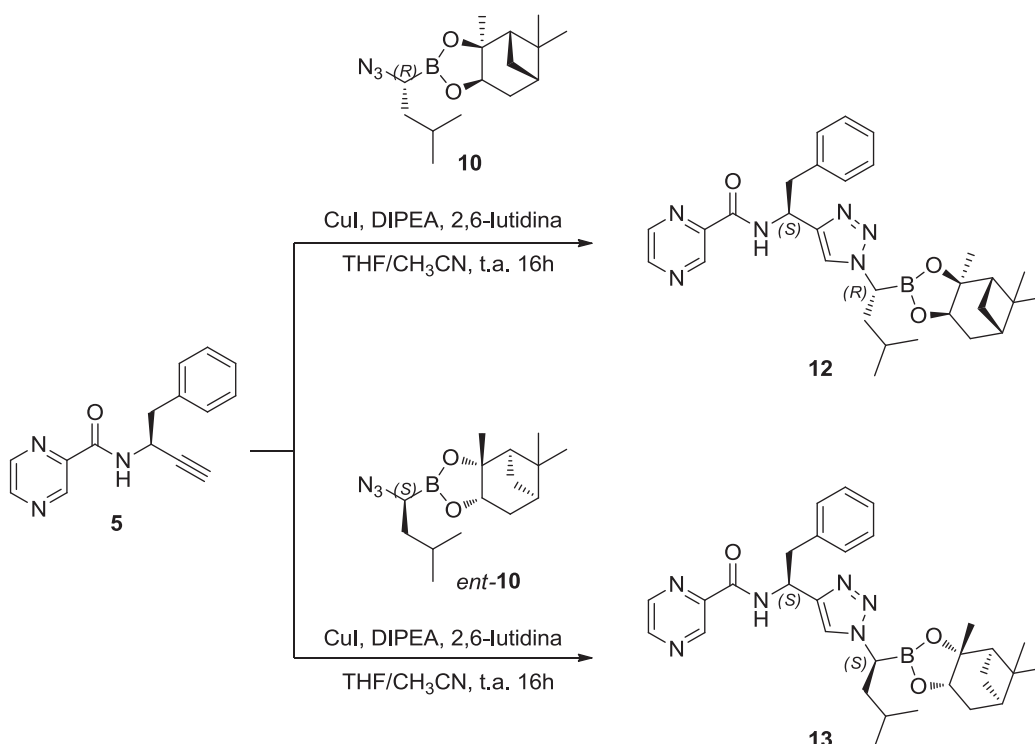


Esquema 3.8. (A) Síntesis de la azida **10**. (B) Síntesis de la azida *ent*-**10**.

El producto así obtenido se purificó mediante cromatografía en columna. De esta forma se consiguió la azida **10** con un rendimiento del 92%. La síntesis del compuesto *ent*-**10** se llevó a cabo de la misma forma pero partiendo de la estructura *ent*-**9a** y obteniéndose un rendimiento del 94%.

### 3.1.1.3. Cicloadición 1,3-dipolar “click” entre el alquino **5** y las azidas **10** y *ent*-**10**

Con el fin de obtener los productos **12** y **13** se empleó la reacción de cicloadición 1,3-dipolar “click” entre el alquino **5** y las azidas **10** y *ent*-**10**. Esta reacción se llevó a cabo en presencia de una sal de Cu(I) como catalizador, DIPEA y 2,6-lutidina como bases y una mezcla THF/CH<sub>3</sub>CN como disolvente (Esquema 3.9),<sup>6</sup> obteniéndose cuantitativamente los dos diastereoisómeros **12** y **13** que se utilizaron directamente en la siguiente etapa de desprotección.

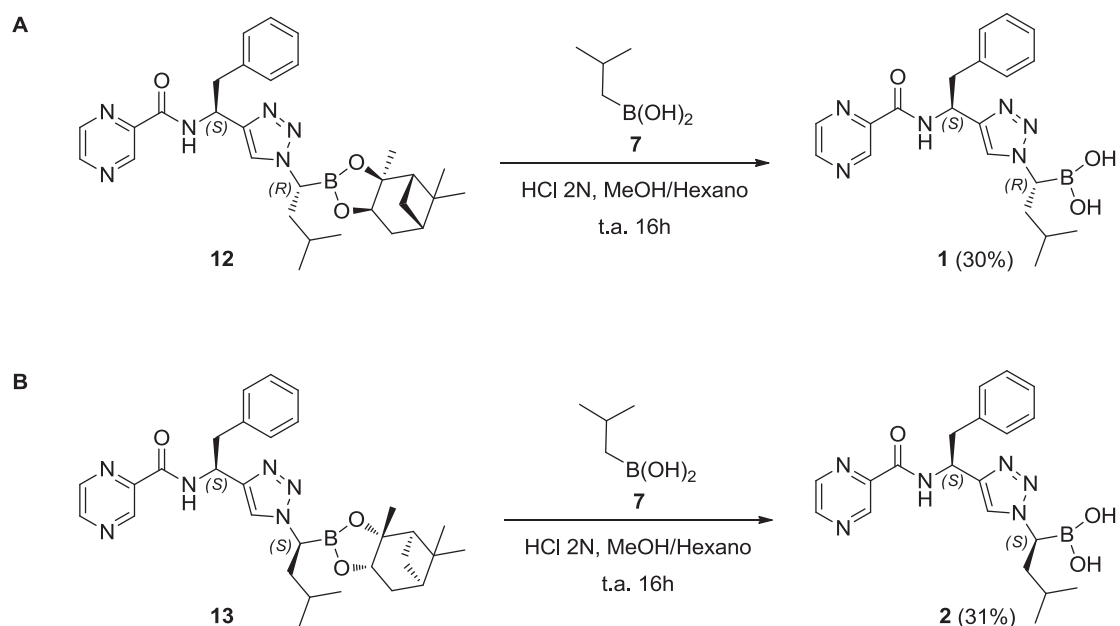


Esquema 3.9. Cicloadición 1,3-dipolar “click” entre el alquino **5** y las azidas **10** y *ent*-**10**.

### 3.1.2. Desprotección de los ésteres borónicos

Finalmente, los ésteres borónicos obtenidos en la etapa anterior **12** y **13** fueron desprotegidos mediante una transesterificación con ácido isobutil borónico **7** en una mezcla de disolventes (metanol y hexano) y medio ácido (Esquema 3.10).<sup>3</sup>

<sup>6</sup> Bock, V. D.; Perciaccante, R.; Jansen, T. P.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 919-922.



Esquema 3.10. (A) Desprotección borónica de la estructura triazólica **12**. (B) Desprotección borónica de la estructura triazólica **13**.

Las moléculas sintetizadas **1** y **2** se obtuvieron con rendimientos globales de las dos últimas etapas en torno al 30%.

### 3.2. Síntesis de pirrolidinas precursoras de inhibidores proteasómicos

Por otra parte, a partir de los precedentes descritos en el capítulo 1, tanto de inhibidores proteasómicos como de reacciones de cicloadición 1,3-dipolares, se decidió llevar a cabo la síntesis de moléculas análogas al Bortezomib que incorporasen a la vez, la estructura de pirrolidina y la de ácido borónico (Figura 3.2). Estos cicloaductos deberían poseer una mayor rigidez conformacional y una estabilidad configuracional en los 4 átomos de carbono del anillo de pirrolidina. Esta preorganización, cuando diera lugar a las geometrías adecuadas, debería generar a inhibidores especialmente activos.

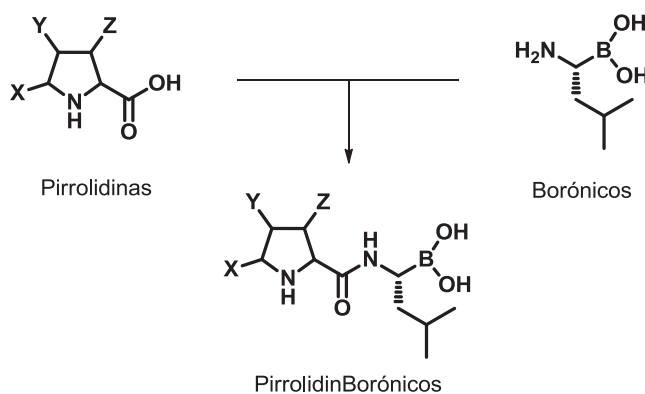


Figura 3.2. Búsqueda de nuevos compuestos análogos al Bortezomib mediante la unión de unidades de pirrolidina y ácido borónico a sintetizar u objetivo.

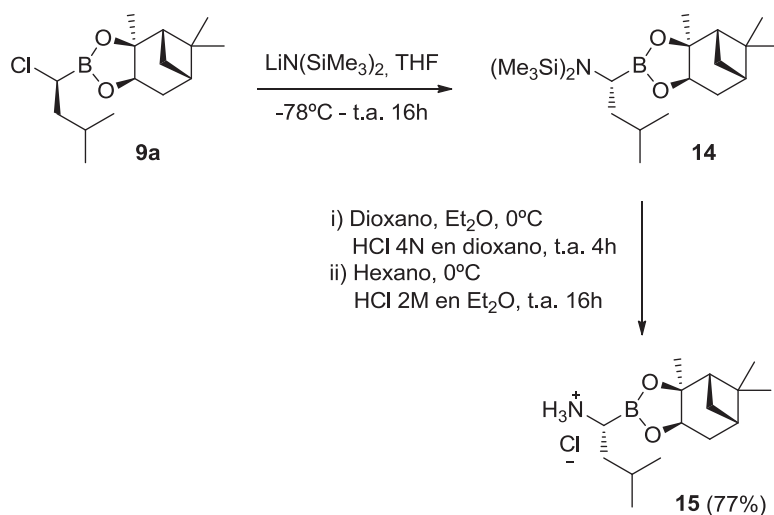
Para conseguir este tipo de estructuras, se pensó en llevar a cabo reacciones de cicloadición (3+2) diastereoselectivas, empleando iminoésteres quirales que incorporasen la parte borónica de la síntesis del Bortezomib como inductora de quiralidad. Para ello el primer paso consistió en la síntesis del aminoboronato **17**.

### 3.2.1. Síntesis del aminoboronato **15**

Primeramente se sintetizó la parte borónica descrita en la síntesis del Bortezomib para emplearla como auxiliar quiral en el iluro de azometino y así estudiar su efecto en la reacción de cicloadición (3+2) con diferentes dipolarófilos. La síntesis de esta estructura comenzó con el compuesto **9a** como materia prima, cuya síntesis se ha descrito anteriormente (*vide supra*).<sup>3</sup>

El tratamiento del compuesto clorado **9a** con bis(trimetilsilil) amiduro de litio condujo a la bis(trimetilsilil) amina **14**, que se desprotegió fácilmente en HCl para generar el aminoboronato **15** en forma de clorhidrato,<sup>3</sup> con un rendimiento tras estas dos etapas del 77% (Esquema 3.11). Es interesante señalar que este procedimiento permite llevar a cabo reacciones a escala multigramo (50 g).





Esquema 3.11. Síntesis del aminoboronato **15**.

### 3.2.2. Síntesis Diastereoselectiva de pirrolidinas

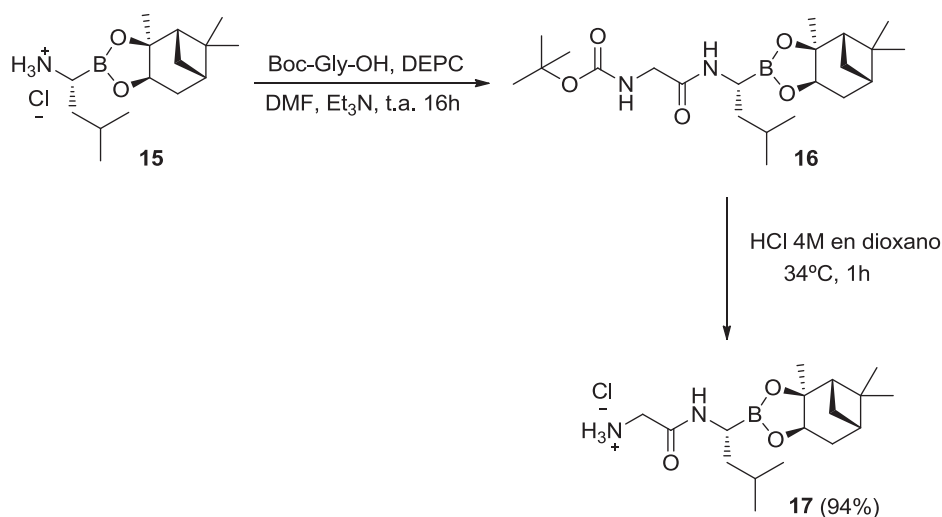
Tras la síntesis del aminoboronato **15**, y con idea de asemejar esta estructura a la del Bortezomib, se procedió a llevar a cabo una elongación en la estructura de aminoboronato **15** con un aminoácido más para dar lugar a la estructura **17**.

#### 3.2.2.1. Acoplamiento peptídico con *N*-Boc-Glicina y desprotección del grupo Boc

Inicialmente se llevó a cabo el acoplamiento del aminoboronato **15** y *N*-Boc-Glicina con DEPC como activador del grupo carboxilo.<sup>7</sup> De esta forma se obtuvo la estructura **16** de manera cuantitativa, la cual se desprotegió fácilmente en medio ácido dando lugar al aminoboronato **17** también en forma de clorhidrato y con un rendimiento del 94% (Esquema 3.12).<sup>8</sup>

<sup>7</sup> Aizpea Zubia: "Formación de enlaces carbono-carbono mediante catálisis de sales metálicas y de dendrímeros. Aplicación a la síntesis de inhibidores de interacciones proteína-proteína". Tesis Doctoral, Donostia-San Sebastián, **2003**.

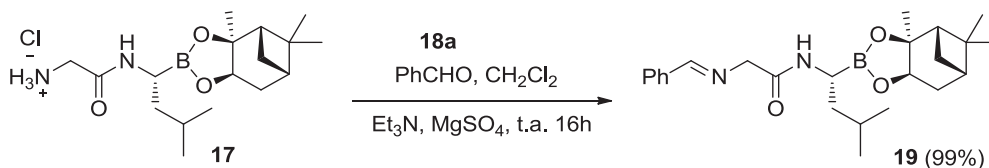
<sup>8</sup> Bernareggi, A.; Cassara, P. G.; Chatterjee, S.; Ferretti, E.; Iqbal, M.; Menta, E.; Messina McLaughlin, P.; Oliva, A. Proteasome Inhibitors and Methods of using the same. WO2005/021558, 2004. (PCT/US2004/026407).



Esquema 3.12. Síntesis del aminoboronato **17**.

### 3.2.2.2. Síntesis del derivado imínico **19**

Una vez obtenido el clorhidrato **17** se llevó a cabo la reacción de condensación del mismo con un aldehído sencillo como primera aproximación y según métodos descritos en nuestro grupo de investigación.<sup>9a</sup> En este caso, el aldehído comercial utilizado fue benzaldehído **18a** debido a la analogía que presenta la estructura resultante con la del Bortezomib (Esquema 3.13). De esta forma se obtuvo el derivado imínico **19** de forma cuantitativa.



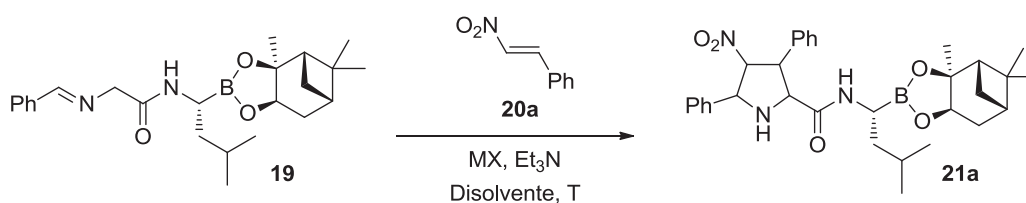
Esquema 3.13. Síntesis del derivado imínico **19**.

<sup>9</sup> (a) Ayerbe, M.; Arrieta, A.; Cossío, F. P.; Linden, A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1795-1805. (b) Vivanco, S.; Lecea, B.; Arrieta, A.; Prieto, P.; Morao, I.; Linden, A.; Cossío, F. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6078-6092.

### 3.2.2.3. Cicloadición (3+2) diastereoselectiva

Una vez obtenida la imina **19**, se hizo reaccionar con los dipolarófilos correspondientes para generar las moléculas análogas al Bortezomib que incorporaran a la vez las estructuras pirrolidínica y de ácido borónico.

Teniendo en cuenta la amplia experiencia de nuestro grupo de investigación en reacciones de cicloadición 1,3-dipolares entre iluros de azometino metalados y nitroalquenos, para la síntesis de dichas pirrolidinas se hizo uso de la metodología desarrollada en nuestro laboratorio.<sup>9</sup> Así, se hizo reaccionar el derivado imínico **19** con el  $\beta$ -nitroestireno **20a** empleando diferentes sales metálicas y Et<sub>3</sub>N como base (Esquema 3.14).



Esquema 3.14. Cicloadición (3+2) diastereoselectiva.

Para optimizar las condiciones de reacción se emplearon distintas sales metálicas, disolventes y ligandos tanto aquirales como quirales a diferentes temperaturas. Las sales metálicas empleadas fueron las siguientes: AgOAc, LiBr y Cu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, y los ligandos utilizados fueron: PPh<sub>3</sub>, (R)-BINAP y la pirrolidina ferrocenil sustituida NH-D-EhuPhos-**22** (Figura 3.3). En todos los sistemas ensayados se obtuvieron conversiones cuantitativas pero en forma de mezclas de al menos 4 diastereoisómeros de los cicloaductos deseados con una baja diastereoselectividad (Tabla 3.1).

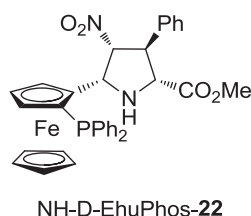


Figura 3.3. Ligando NH-D-EhuPhos-22.

Tabla 3.1. Resultados obtenidos en la cicloadición (3+2) entre el iluro de azometino **19** y el  $\beta$ -nitroestireno **20a** según el Esquema 3.14.

Entrada	Sal metálica	Ligando	Disolvente	T °C	t (h)	Nº Diaster. <sup>a</sup>
1	AgOAc (15 mol%)	-	CH <sub>3</sub> CN	t.a.	16	nd <sup>b</sup>
2	AgOAc (15 mol%)	-	Tolueno	t.a.	16	6
3	LiBr (150 mol%)	-	THF	t.a.	16	7
4	Cu(CH <sub>3</sub> CN) <sub>4</sub> PF <sub>6</sub> (5.0 mol%)	PPh <sub>3</sub> (5.5 mol%)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	t.a.	45	5
5	Cu(CH <sub>3</sub> CN) <sub>4</sub> PF <sub>6</sub> (3.0 mol%)	NH-D-EhuPhos- <b>22</b> (3.3 mol%)	THF	-20	24	4
6	AgOAc (3.0 mol%)	NH-D-EhuPhos- <b>22</b> (3.3 mol%)	Tolueno	-20	24	4
7	AgClO <sub>4</sub> (5.0 mol%)	( <i>R</i> )-BINAP (5.0 mol%)	Tolueno	t.a.	116	5

<sup>a</sup>Determinado por HPLC-masas. <sup>b</sup>No determinado por HPLC observándose al menos 4 diastereoisómeros mediante <sup>1</sup>H-RMN.

Se comenzó empleando las condiciones de reacción que en otras cicloadiciones 1,3-dipolares con iluros de azometino favorecían la formación de cicloaductos *exo* (entrada 1, Tabla 3.1). Al observar que la diastereoselectividad era baja, se procedió a utilizar las condiciones que generaban pirrolidinas *endo* (entradas 2 y 3, Tabla 3.1). De esta forma tampoco se mejoró la diastereoselectividad. Lo siguiente fue comprobar si la adición de un ligando coordinante al metal ofrecía alguna mejora. Se emplearon ligandos tanto aquirales (entrada 4, Tabla 3.1) como quirales (entradas 5-7, Tabla 3.1). Sin embargo, el resultado fue similar, dando lugar a mezclas de diastereoisómeros. Otra prueba realizada fue bajar la temperatura a -20 °C (entradas 5 y 6, Tabla 3.1), pero con ello tampoco se consiguió aumentar la diastereoselectividad.

Con estos ensayos se pretendió estudiar la influencia que la parte borónica quiral incorporada en el derivado imínico **19** podía tener en la reacción 1,3-dipolar, es decir, si actuaba como inductora de quiralidad o al estar tan alejada de los grupos que reaccionaban actuaba como mero grupo espectador. Con los resultados obtenidos pudimos concluir que debido a la elevada restricción conformacional y al alto

impedimento estérico de la estructura del  $\alpha$ -iminoéster, sólo los metales pequeños (Li(I) y Ag(I)) eran capaces de introducirse en el centro catalítico. Por tanto, los ligandos tampoco fueron capaces de interaccionar, lo que dio como resultado una mezcla de productos con bajo diastereocontrol.

Así pues, viendo que con esta metodología no se podían conseguir las pirrolidinas deseadas de manera selectiva (o productos con elevado diastéreo- y enantiocontrol), se pensó en la idea alternativa de obtener las moléculas mediante cicloadiciones 1,3-dipolares enantioselectivas y posterior acoplamiento peptídico. Dicha ruta se basaba también en el aminoboronato **15**, pero en este caso la síntesis era convergente. El acoplamiento se daba entre el aminoboronato y las pirrolidinas enantiopuras en forma de ácido, para generar tras la etapa de desprotección el correspondiente ácido borónico con estructura de pirrolidina. Debido al trabajo en paralelo llevado a cabo en nuestro laboratorio por el Dr. Conde y a los buenos resultados obtenidos, se decidió sintetizar las pirrolidinas enantiopuras utilizando los sistemas catalíticos formados por los ligandos quirales NH-D-EhuPhos-**22** o NH-L-EhuPhos-**22** y  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$  como fuente metálica para la formación *in situ* de iluros de azometino *N*-metalados.<sup>10</sup>

### 3.2.3. Síntesis Enantioselectiva de pirrolidinas

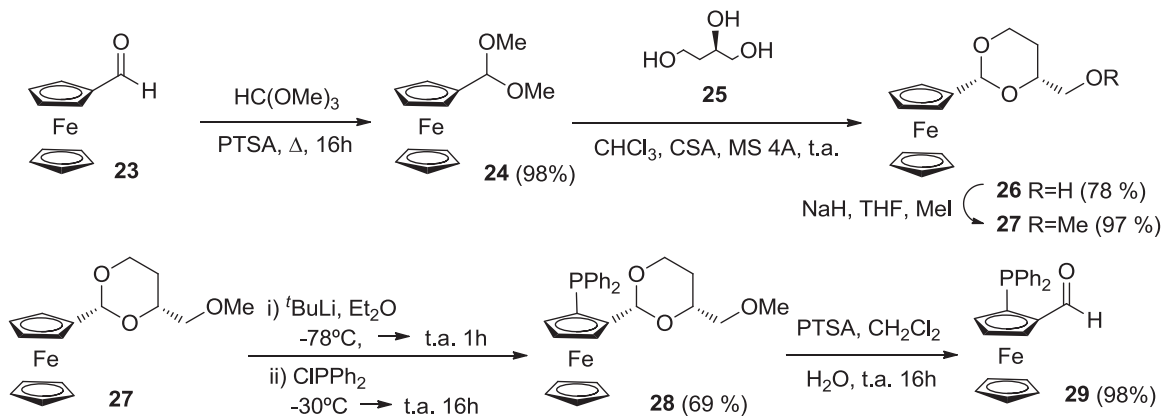
Para la obtención de pirrolidinas enantiopuras se prepararon en primer lugar los ligandos quirales NMe-L-EhuPhos-**31** y NH-D-EhuPhos-**22** y sus enantiómeros, así como los reactivos de partida necesarios para llevar a cabo la reacción de cicloadición 1,3-dipolar.

---

<sup>10</sup> Conde, E.; Bello, D.; de Cózar, A.; Sánchez, M.; Vázquez, M. A.; Cossío, F. P. *Chem. Sci.* **2012**, *3*,1486-1491.

### 3.2.3.1. Síntesis de ligandos ferrocénicos quirales EhuPhos: Síntesis diastereoselectiva de pirrolidinas ferrocenil sustituidas enantiopuras

Para obtener estos ligandos el primer paso llevado a cabo fue la síntesis de los aldehídos **29** y *ent*-**29** mediante la metodología descrita por Kagan y col.<sup>11</sup> mostrada en el Esquema 3.15.

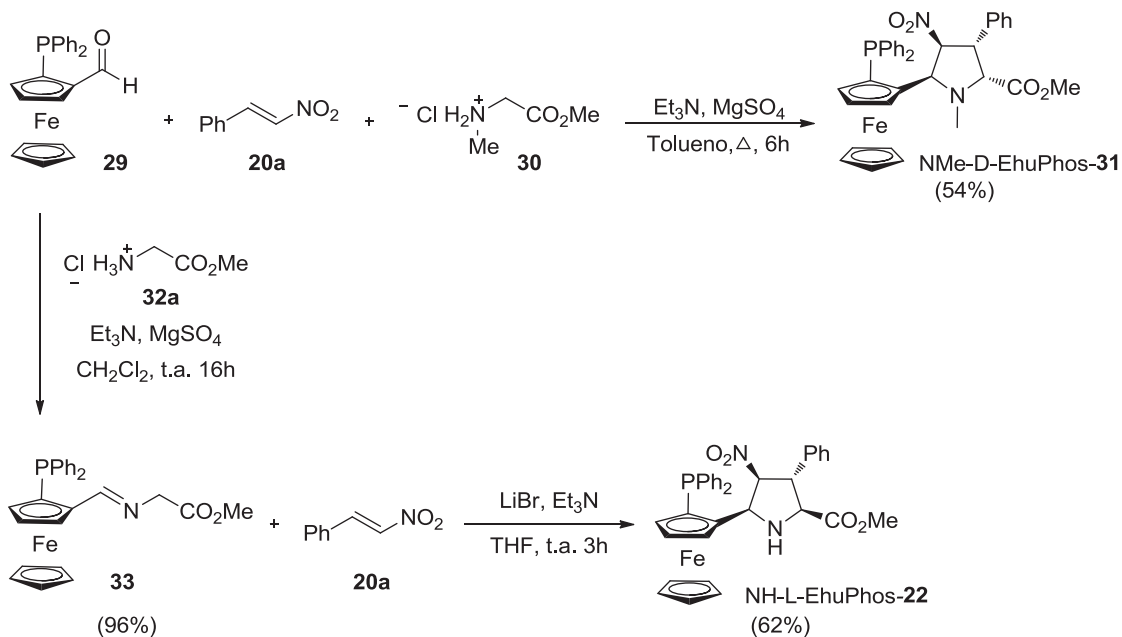


Esquema 3.15. Síntesis del ferrocenocarbaldehído quiral 1,2-disustituido **29**.

La síntesis de estos ligandos partía del (*R<sub>p</sub>*)- $\alpha$ -(difenilfosfino) ferrocenocarbaldehído **29** como materia prima. La reacción de tres componentes o *one-pot* (Esquema 3.16) entre **29**, clorhidrato del éster metílico de sarcosina **30** y *trans*- $\beta$ -nitroestireno **20a** bajo reflujo de tolueno y en presencia de Et<sub>3</sub>N generó el cicloadducto NMe-D-EhuPhos-**31** con total estereocontrol sobre los cuatro nuevos centros quirales del anillo de pirrolidina y con un 54% de rendimiento.

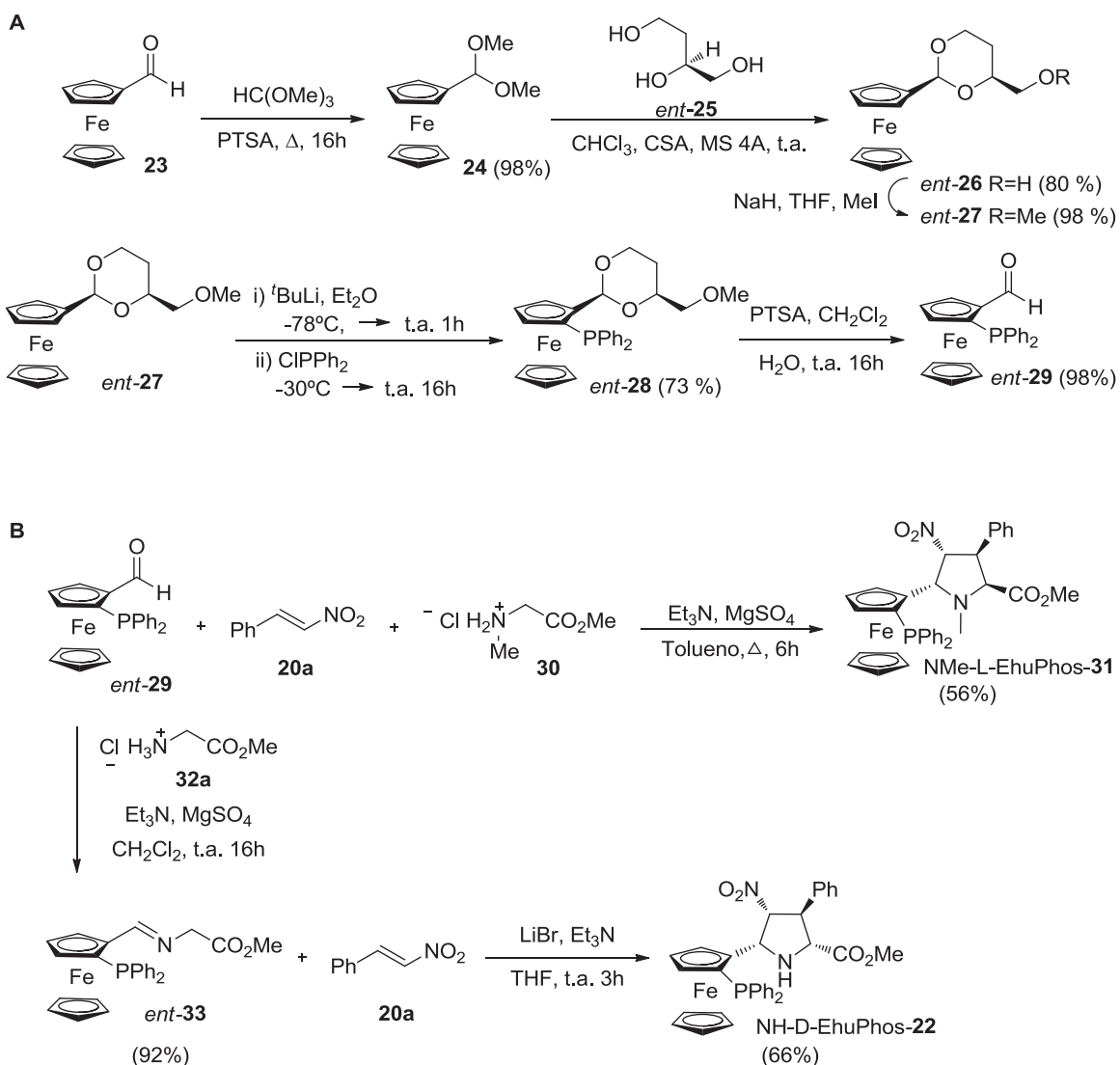
Una reacción similar con clorhidrato del éster metílico de glicina **32a** requirió la preparación previa y aislamiento del  $\alpha$ -iminoéster **33** para la subsiguiente etapa de cicloadición. En este caso la cicloadición (3+2) fue catalizada por LiBr como sal metálica y se generó así el cicloadducto NH-L-EhuPhos-**22** con un 62% de rendimiento (Esquema 3.16). Al igual que en el caso anterior la reacción ocurrió con total estereocontrol.

<sup>11</sup> Riant, O.; Samuel, O.; Flessner, T.; Taudien, S.; Kagan, H. B. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6733-6745.



Esquema 3.16. Síntesis de los ligandos quirales NMe-D-EhuPhos-31 y NH-L-EhuPhos-22.

Para la síntesis de los ligandos enantiómeros NMe-L-EhuPhos-31 y NH-D-EhuPhos-22, se llevó a cabo la misma ruta sintética arriba descrita, intercambiando el (*R*)-1,2,4-butanotriol **25** utilizado por su enantiómero, el (*S*)-1,2,4-butanotriol, consiguiéndose los productos deseados con unos rendimientos del 56% y 66% respectivamente (Esquema 3.17).



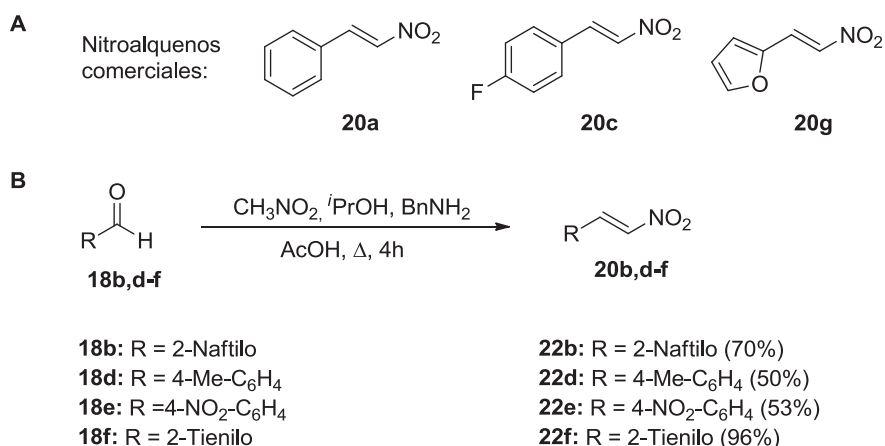
Esquema 3.17. (A) Síntesis del ferrocenocarbaldehído quiral 1,2-disustituído *ent*-29. (B) Síntesis de los ligandos quirales *NMe-L-EhuPhos-31* y *NH-D-EhuPhos-22*.

Una vez sintetizados los ligandos *NH-L-EhuPhos-22*, *NH-D-EhuPhos-22*, *NMe-D-EhuPhos-31* y *NMe-L-EhuPhos-31* respectivamente se procedió a su utilización en la síntesis de pirrolidinas enantiopuras. El primer paso consistió en la preparación de los reactivos de partida, los nitroalquenos y las iminas, necesarios para llevar a cabo la reacción de cicloadición 1,3-dipolar.



### 3.2.3.2. Método general de obtención de nitroalquenos aromáticos

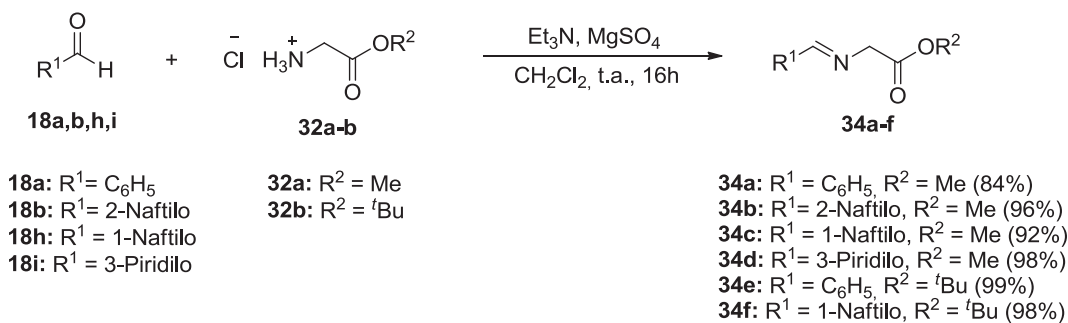
A pesar de que la mayoría de los nitroalquenos aromáticos utilizados (**20a,c,g**) son comercialmente accesibles (Esquema 3.18.A), algunos fueron sintetizados con rendimientos entre moderados y buenos empleando la metodología descrita por Bourguignon y col.<sup>12</sup> (Esquema 3.18.B), que consiste en la condensación entre los correspondientes aldehídos comerciales (**20b,d-f**) y nitrometano.



Esquema 3.18. (A) Nitroalquenos aromáticos comerciales utilizados (**20a,c,g**). (B) Procedimiento general para la síntesis de los nitroalquenos aromáticos **20b,d-f**.

### 3.2.3.3. Procedimiento general para la preparación de los $\alpha$ -iminoésteres

La siguiente etapa consistió en la preparación de los  $\alpha$ -iminoésteres aromáticos **34a-f** mediante condensación de los aldehídos **18a,b,h,i** con el clorhidrato del éster correspondiente de la glicina **32**, utilizando una metodología descrita en bibliografía,<sup>9a</sup> (Esquema 3.19). Los  $\alpha$ -iminoésteres no fueron purificados, dada su inestabilidad, y se utilizaron directamente en las etapas siguientes.



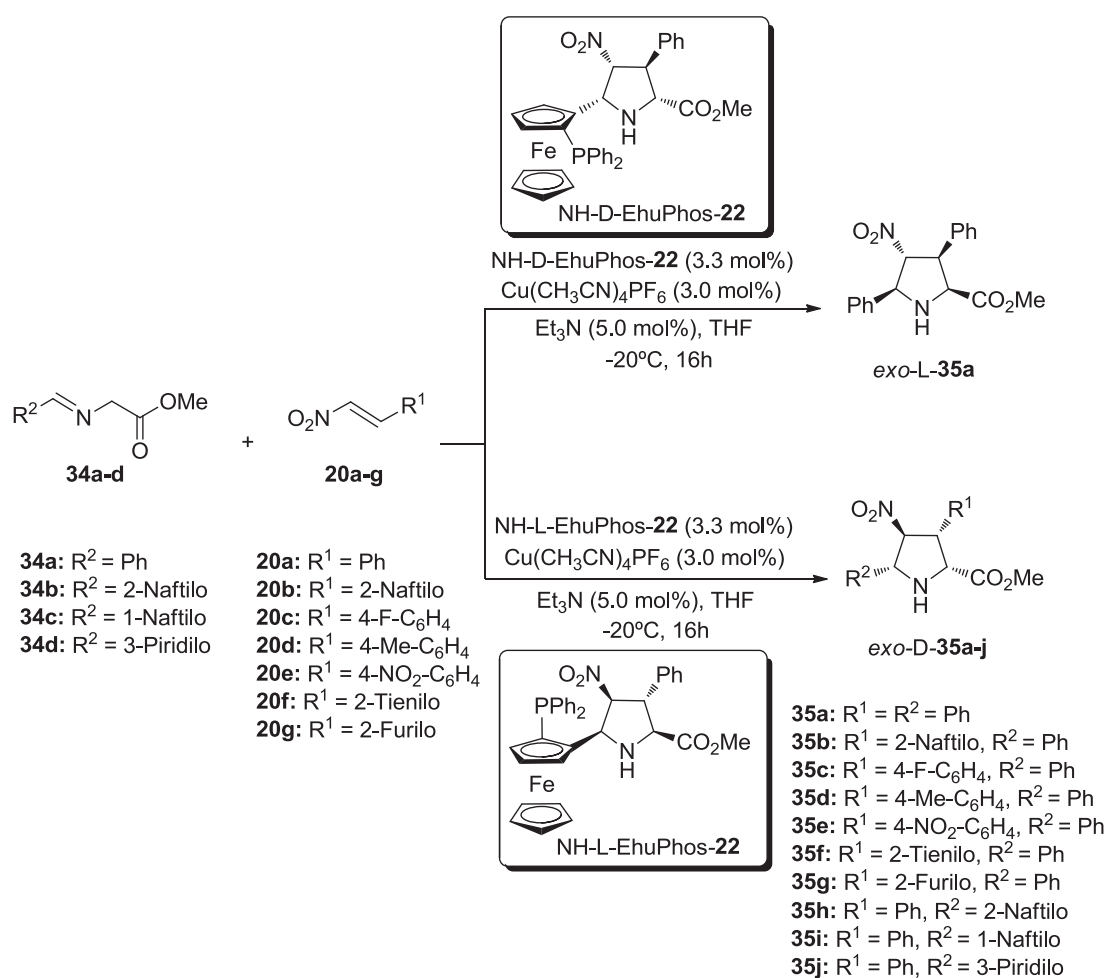
Esquema 3.19. Procedimiento general para la síntesis de los  $\alpha$ -iminoésteres aromáticos **34a-f**.

<sup>12</sup> Bourguignon, J.; Le Nard, G.; Queguiner, G. *Can. J. Chem.* **1985**, *63*, 2354-2361.

### 3.2.3.4. Procedimiento general para la cicloadición (3+2) enantioselectiva entre $\alpha$ -iminoésteres y alquenos electrodeficientes

#### a) Síntesis de los cicloaductos *exo*

Para la síntesis de las pirrolidinas *exo*-D se llevaron a cabo las reacciones de cicloadición (3+2) entre los  $\alpha$ -iminoésteres **34a-d** y los nitroalquenos **20a-g** correspondientes siguiendo la metodología descrita en nuestro grupo de investigación<sup>10</sup> (Esquema 3.20). Los experimentos se realizaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en presencia del ligando quiral NH-L-EhuPhos-**22**,  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$  como sal metálica,  $\text{Et}_3\text{N}$  como base y THF como disolvente.



Esquema 3.20. Síntesis de cicloaductos *exo*-L-**35a** y *exo*-D-**35a-j**.

Al usar el ligando NH-L-EhuPhos-**22** en la reacción asistida por Cu(I) se obtuvieron los cicloaductos de configuración *exo*-D en general con muy buena diastereoselectividad (11:89-5:95 *endo:exo*) y excelentes excesos enantioméricos (92-

>99% *ee*) (Tabla 3.2) salvo para el caso del  $\alpha$ -iminoéster 3-Piridilo sustituido **34d** (entrada 4, Tabla 3.2). El cicloaducto **35j**, que incorpora un grupo 3-piridilo en la posición 5 del anillo de pirrolidina, se obtuvo no solo con mala diastereoselectividad (43:57 *endo:exo*) si no también con baja enantioselectividad (42% *ee*, entrada 10, Tabla 3.2). Como era necesario obtener el producto enantiopuro, se procedió a su purificación mediante HPLC semipreparativa empleando una columna cromatográfica con fase estacionaria quiral, tras la que se consiguió una pureza enantiomérica del 100%. También se llevó a cabo la reacción con el ligando NH-D-EhuPhos-**22** obteniéndose el cicloaducto *exo*-L-**35a** con un buen rendimiento y alto exceso enantiomérico (entrada 11, Tabla 3.2).

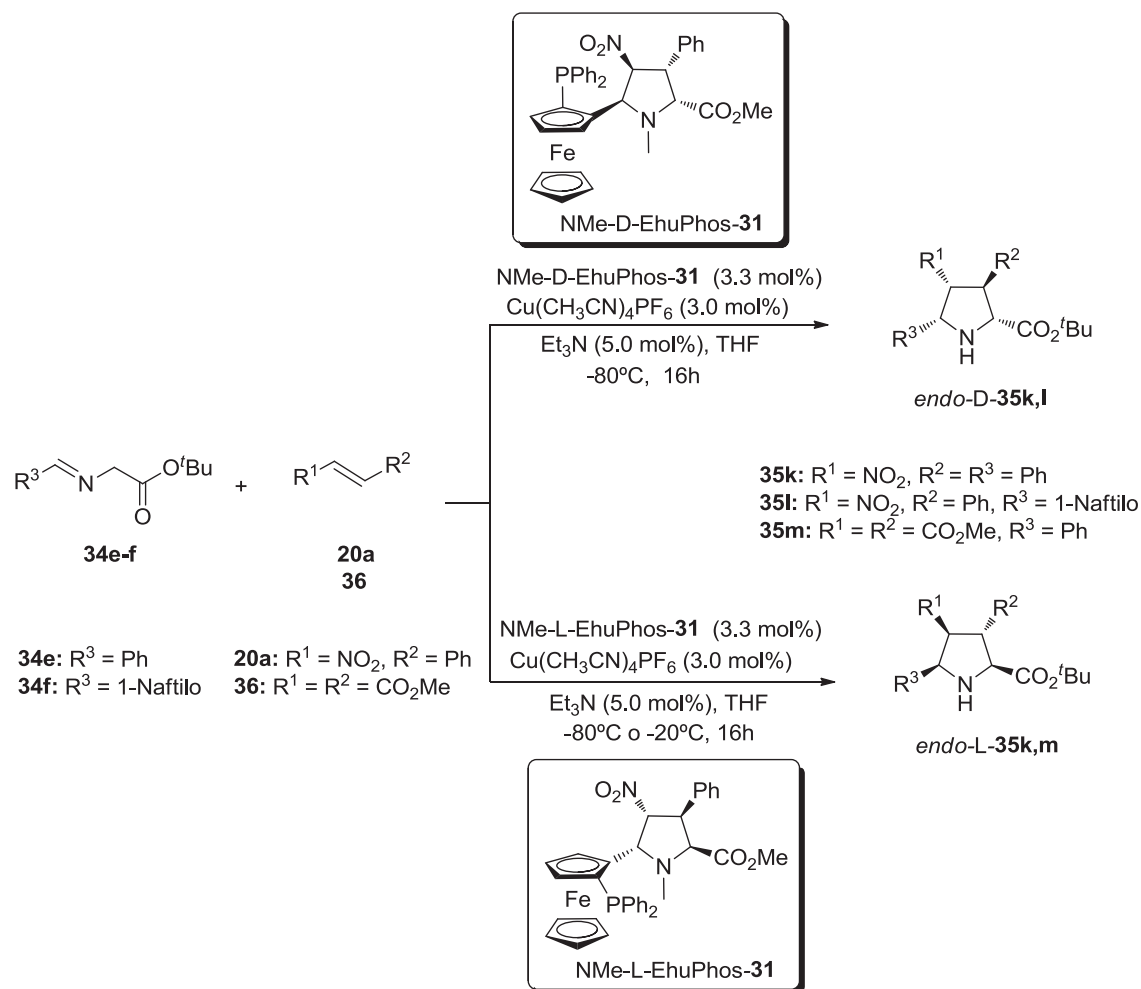
Tabla 3.2. Resultados obtenidos en la cicloadición (3+2) asimétrica entre diferentes iluros de azometino y dipolarófilos con el ligando NH-L-EhuPhos-**22**.

Entrada	Cicloaducto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	<i>endo:exo</i> <sup>a</sup>	Rto. (%) <sup>b</sup>	<i>ee</i> (%) <sup>c</sup>
1	<i>exo</i> -D- <b>35a</b>	Ph	Ph	5:95	84	96
2	<i>exo</i> -D- <b>35b</b>	2-Naftilo	Ph	10:90	70	99
3	<i>exo</i> -D- <b>35c</b>	4-F-Ph	Ph	5:95	83	98
4	<i>exo</i> -D- <b>35d</b>	4-Me-Ph	Ph	8:92	81	96
5	<i>exo</i> -D- <b>35e</b>	4-NO <sub>2</sub> -Ph	Ph	10:90	73	92
6	<i>exo</i> -D- <b>35f</b>	2-Tienilo	Ph	6:94	75	92
7	<i>exo</i> -D- <b>35g</b>	2-Furilo	Ph	11:89	80	92
8	<i>exo</i> -D- <b>35h</b>	Ph	2-Naftilo	5:95	88	96
9	<i>exo</i> -D- <b>35i</b>	Ph	1-Naftilo	9:91	67	98
10	<i>exo</i> -D- <b>35j</b>	Ph	3-Piridilo	43:57	34	42
11	<i>exo</i> -L- <b>35a</b> <sup>d</sup>	Ph	Ph	5:95	85	-97

<sup>a</sup>Determinado por <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción. <sup>b</sup>Rendimiento de producto puro *exo*-**35** aislado tras columna cromatográfica. <sup>c</sup>Exceso enantiomérico del producto medido por HPLC y calculado mediante la siguiente ecuación  $ee = 100([exo-D - exo-L]/[exo-D + exo-L])$ . <sup>d</sup>Sintetizado con el ligando NH-D-EhuPhos-**22**.

b) Síntesis de los cicloaductos *endo*

Para la síntesis de las pirrolidinas *endo*-**35** se empleó el mismo procedimiento que para la obtención de los cicloaductos *exo*-**35** pero utilizando en este caso los ligandos NMe-EhuPhos-**31** (Esquema 3.21).



Esquema 3.21. Síntesis de los cicloaductos *endo*-D-**35k,l** y *endo*-L-**35k,m**.

En este caso, la diferencia respecto a la síntesis de cicloaductos *exo*-**35** estriba, además del diferente ligando utilizado, en que el  $\alpha$ -iminoéster incorpora un grupo *tert*-butilo en vez de metilo. Este cambio se debe a la epimerización que se produce en C4 al emplear medio básico necesario para la hidrólisis del ester metílico en la siguiente etapa de reacción. Esta epimerización no ocurre al utilizar medio ácido para dicha hidrólisis, lo que exige emplear el iminoester *tert*-butílico para la síntesis de los cicloaductos *endo*-**35** (*vide infra*, apartado 3.3.1.1). En función del dipolarófilo, la

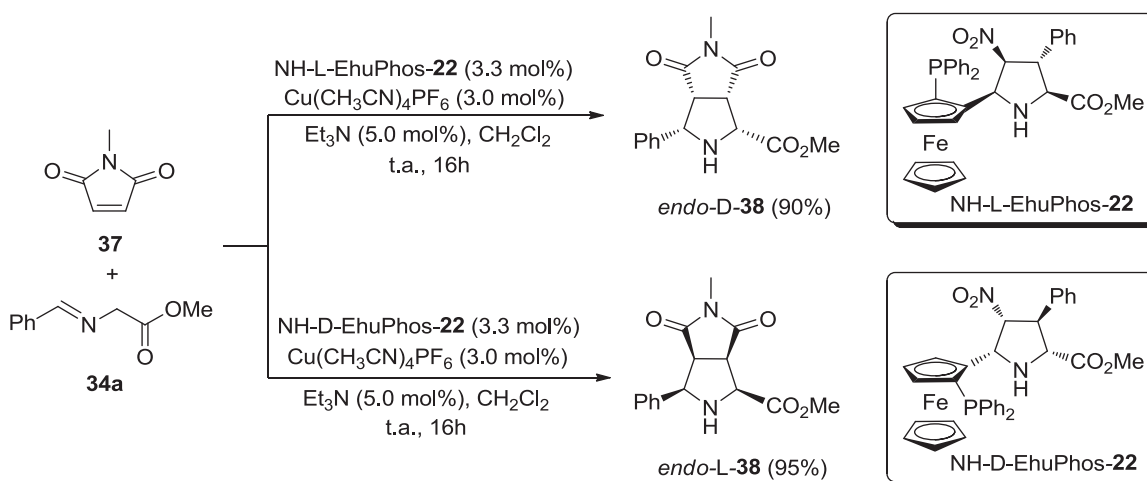
temperatura a la que se llevó a cabo la reacción fue de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para  $\beta$ -nitroestireno **20a**, o de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para fumarato de dimetilo **36**. Bajo estas condiciones, el ligando NMe-D-EhuPhos-**31** proporcionó ésteres de prolina no naturales *endo*-D y el ligando NMe-L-EhuPhos-**31** generó ésteres de prolina no naturales *endo*-L todos ellos con elevada diastereoselectividad (90:10-98:2 *endo:exo*) y elevados excesos enantioméricos (86-94% *ee*) (ver Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Resultados obtenidos en la cicloadición (3+2) asimétrica entre diferentes iluros de azometino y dipolarófilos con el ligando NMe-D-EhuPhos-**31**.

Entrada	Ciclooaducto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	<i>endo:exo</i> <sup>a</sup>	Rto. (%) <sup>b</sup>	<i>ee</i> (%) <sup>c</sup>
1	<i>endo</i> -D- <b>35k</b>	NO <sub>2</sub>	Ph	Ph	90:10	82	92
2	<i>endo</i> -D- <b>35l</b>	NO <sub>2</sub>	Ph	1-Naftilo	98:2	68	94
3	<i>endo</i> -L- <b>35k</b> <sup>d</sup>	NO <sub>2</sub>	Ph	Ph	91:9	88	-94
4	<i>endo</i> -L- <b>35m</b> <sup>d</sup>	CO <sub>2</sub> Me	CO <sub>2</sub> Me	Ph	90:10	46	-90

<sup>a</sup>Determinado por <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción. <sup>b</sup>Rendimiento de producto puro *endo*-**35** aislado tras columna cromatográfica. <sup>c</sup>Exceso enantiomérico del producto medido por HPLC y calculado mediante la siguiente ecuación  $ee = 100([endo-D] - [endo-L])/([endo-D] + [endo-L])$ . <sup>d</sup>Sintetizado con el ligando NH-D-EhuPhos-**31**.

La obtención de los ciclooaductos **38** se llevó a cabo utilizando la misma metodología que para las estructuras anteriores *exo*-**35** pero utilizando *N*-Metilmaleimida **37** como dipolarófilo, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como disolvente y temperatura ambiente (Esquema 3.22).



Esquema 3.22. Síntesis de los ciclooaductos *endo*-D-**38** y *endo*-L-**38**.

En los estudios previos de nuestro grupo<sup>10</sup> se ha demostrado que tanto los ligandos NH-EhuPhos-**22** como los NMe-EhuPhos-**31** dan lugar a los aductos *endo*-**38** con buena diastereoselectividad y rendimiento. No obstante los ligandos NH-EhuPhos-**22** han dado lugar a los aductos *endo* deseados con mayor enantiocontrol.

Para confirmar la formación del producto tanto en las pirrolidinas *endo* como en las anteriores *exo*, se compararon los datos obtenidos con los existentes en la literatura.<sup>10,13,14,15,16,17,18</sup>

c) *Síntesis del cicloaducto exo'-L-35a*

Un caso especial fue la síntesis de los cicloaductos *exo'*-L-**35a**, que no se llevó a cabo de manera asimétrica sino utilizando una metodología puesta a punto anteriormente por nuestro grupo<sup>9,19</sup> para la obtención de pirrolidinas de forma racémica. La reacción se realizó a temperatura ambiente, usando AgOAc como fuente de metal, Et<sub>3</sub>N como base y CH<sub>3</sub>CN como disolvente (Esquema 3.23).

---

<sup>13</sup> Yan, X. X.; Peng, Q.; Zhang, Y.; Zhang, K.; Hong, W.; Hou, X. L.; Wu, Y. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1979-1983.

<sup>14</sup> Kim, H. Y.; Li, J. Y.; Kim, S.; Oh, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20750-20753.

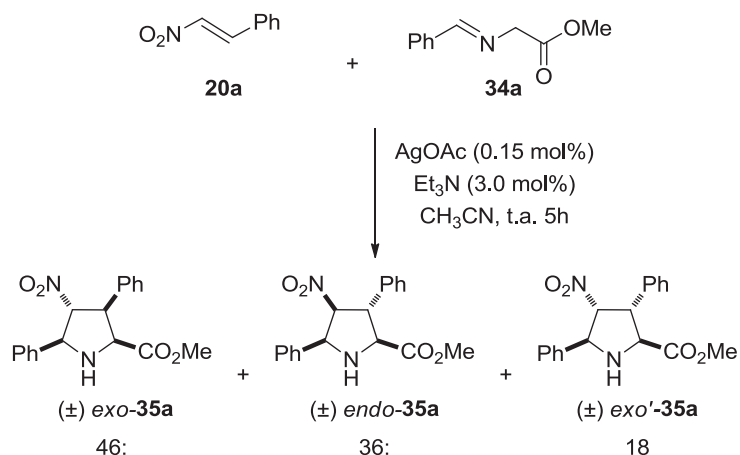
<sup>15</sup> Castelló, L. M.; Nájera, C.; Sansano, J. M.; Larrañaga, O.; de Cózar, A.; Cossío, F. P. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2902-2905.

<sup>16</sup> Tsubogo, T.; Saito, S.; Seki, K.; Yamashita, Y.; Kobayashi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13321-13332.

<sup>17</sup> Oderaotoshi, Y.; Cheng, W.; Fujitomi, S.; Kasano, Y.; Minakata, S.; Komatsu, M. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 5043-5046.

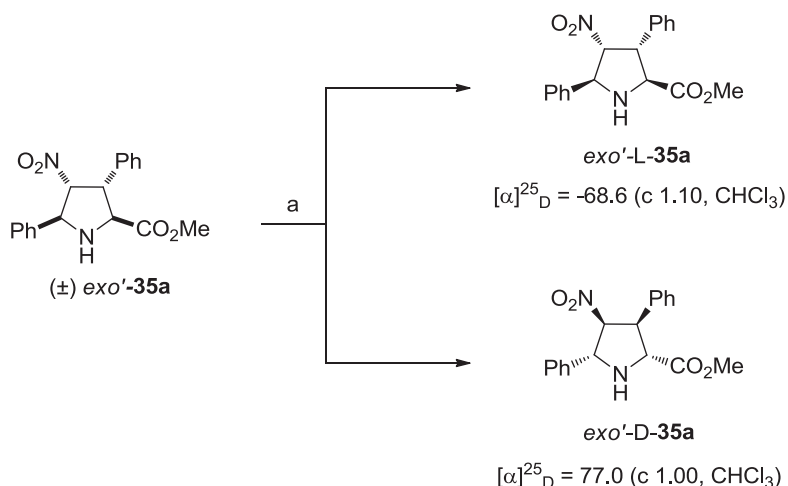
<sup>18</sup> Cabrera, S.; Gómez Arrayás, R.; Martín-Matute, B.; Cossío, F. P.; Carretero, J. C. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 6587-6602.

<sup>19</sup> Mirari Ayerbe: "Nuevos Estudios sobre Reacciones Secuenciales y Concertadas en Alquenos  $\pi$ -Deficientes". Tesis Doctoral, Donostia-San Sebastián, **2000**.



Esquema 3.23. Cicloadición (3+2) racémica entre  $\alpha$ -iminoéster **34a** y  $\beta$ -nitrostireno **20a**.

Como se ha citado anteriormente, mediante esta metodología se obtuvieron los cicloadductos racémicos *exo*-**35**, *endo*-**35** y *exo'*-**35** en forma de mezcla diastereomérica con proporciones 46:36:18. En este caso también se deseaba preparar el cicloadducto *exo'*-L-**35a** enantioméricamente puro, por lo que se procedió a la separación de los tres diastereoisómeros mediante cromatografía en columna para aislar la pirrolidina *exo'*-racémica-**35a** seguida de la separación de los dos enantiómeros mediante HPLC semipreparativa empleando una columna cromatográfica con fase estacionaria quiral<sup>20</sup> (Esquema 3.24).

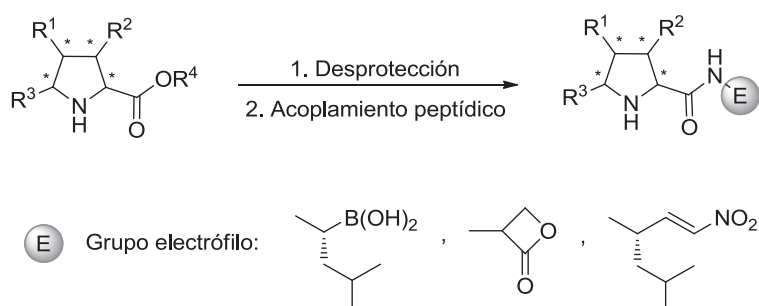


Esquema 3.24. Separación de los cicloadductos *exo'*-L-**35a** y *exo'*-D-**35a**. (a) Separación por HPLC semipreparativa empleando una columna Chiralpak<sup>®</sup> IB.

<sup>20</sup> Este procedimiento fue llevado a cabo por la Universidad de Zaragoza. Retamosa, M. de G.; de Cózar, A.; Sánchez, M.; Miranda, J. I.; Sansano, J. M.; Castelló, L. M.; Nájera, C.; Jiménez, A. I.; Sayago, F. J.; Cativiela, C.; Cossío, F. P. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2503-2516.

### 3.3. Funcionalización de prolina no naturales densamente sustituidas para la síntesis de nuevos inhibidores proteasómicos

Tras sintetizar los anillos de pirrolidina altamente sustituidos, el siguiente paso consistió en introducir un extremo electrófilo a los cicloaductos que interaccionase con los residuos Thr del proteasoma. Para ello se alternaron reacciones de desprotección y acoplamiento para que la cadena peptídica creciera de manera controlada (Esquema 3.25). Como grupos electrófilos se ensayaron ácidos borónicos,  $\beta$ -lactonas y nitroalquenos.



Esquema 3.25. Esquema general para la síntesis de los compuestos pirrolidínicos análogos al Bortezomib a partir de los ésteres de prolina.

#### 3.3.1. Síntesis de ácidos borónicos como electrófilos

Como se ha comentado en el apartado de introducción, un grupo muy importante de inhibidores proteasómicos es el que incorpora ácidos borónicos en su estructura. Éstos inhiben preferentemente y de forma covalente y reversible la actividad de la subunidad  $\beta$ 5 del proteasoma. No obstante, las unidades  $\beta$ 1 también resultan bloqueadas pero en menor medida y las  $\beta$ 2 ligeramente o nada inhibidas. Con estos precedentes, se comenzó sintetizando estructuras análogas al Bortezomib con núcleo pirrolidínico y con ácido borónico como grupo electrófilo.

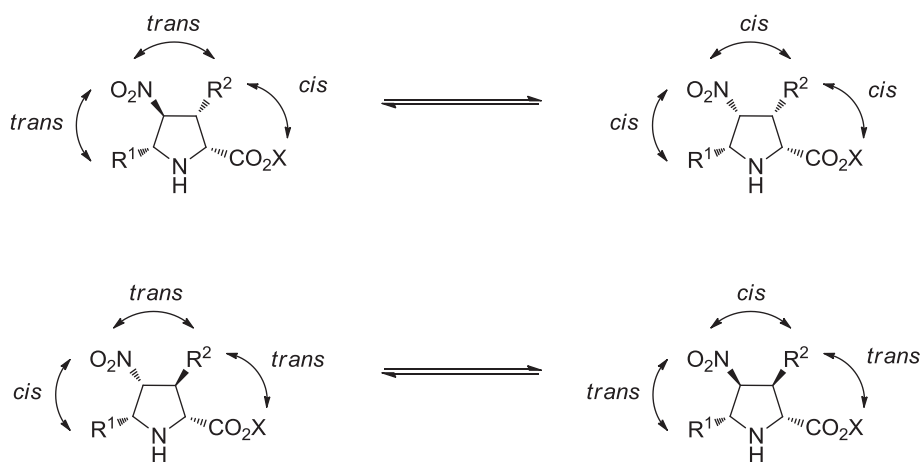
##### 3.3.1.1. Síntesis de los ácidos pirrolidínicos

La primera etapa de desprotección consistió en la hidrólisis en medio básico o tratamiento en medio ácido de los ésteres de las pirrolidinas para obtener los



cicloadductos en forma de ácidos libres, que pudieran reaccionar con el extremo amino de los compuestos electrófilos mediante un acoplamiento peptídico.

Esta etapa se llevó a cabo en medio básico o ácido, dependiendo de la configuración de los cicloadductos a tratar, debido a la posibilidad que presentan algunos de ellos de epimerizar en la posición C4.



Esquema 3.26. Posibles equilibrios debido a la epimerización.

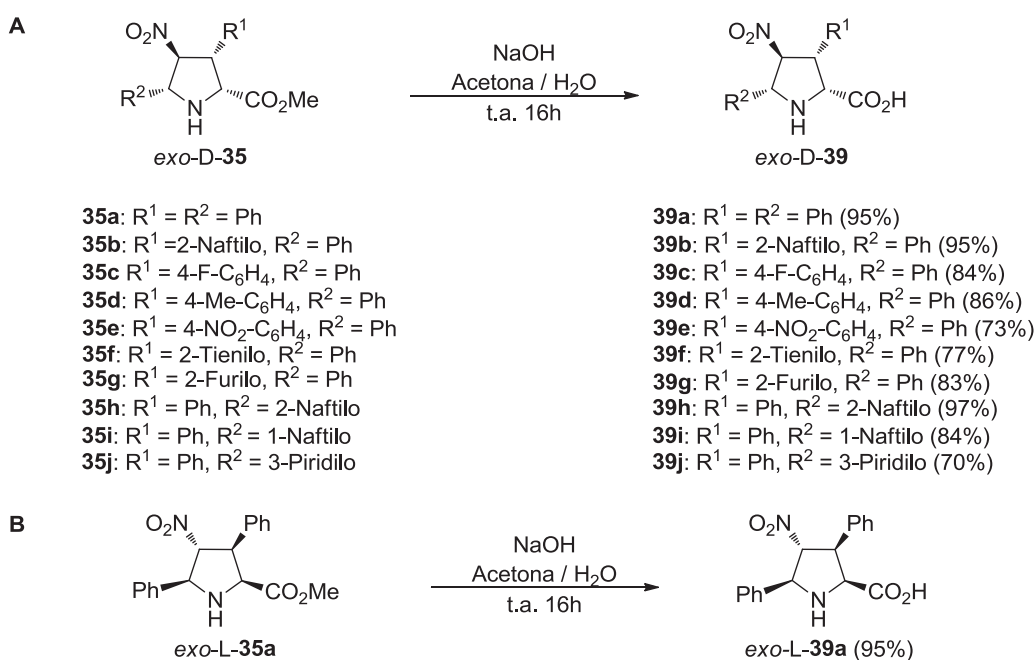
Para determinar el tipo de tratamiento a llevar a cabo hay que tener en cuenta dos aspectos: por un lado la accesibilidad y facilidad de abstracción del protón ácido adyacente al grupo funcional nitro por medio de una base y por otro la estabilidad de los epímeros formados.

En el caso de las pirrolidinas *exo*, el protón ácido adyacente al grupo nitro se encuentra en *cis* con respecto al resto de los grupos del anillo pirrolidínico, lo que hace que el impedimento estérico sea mayor y que la abstracción esté dificultada cinéticamente y termodinámicamente, ya que el producto de epimerización en C4 tiene todos los grupos en *cis* (Esquema 3.26). En los cicloadductos *endo* sin embargo, el protón ácido se encuentra mucho más accesible ya que se encuentra en disposición *trans* con respecto a dos de los tres grupos presentes, lo que hace que sea susceptible de ataque por la base y por tanto el centro estereogénico pierda su quiralidad y tenga lugar epimerización en dicho centro. Además, desde el punto de vista termodinámico, el balance *cis:trans* es similar en el cicloadducto de partida y en el producto de epimerización (Esquema 3.26).

De todo esto se deduce que los cicloaductos *endo*, al contrario que los *exo*, tienen un alto riesgo de sufrir epimerización. Así pues, la obtención de las pirrolidinas *exo* en forma de ácido puede llevarse a cabo mediante hidrólisis de sus ésteres en medio básico sin pérdida de integridad configuracional, mientras que para la síntesis de sus diastereoisómeros *endo* es necesario llevarla a cabo mediante tratamiento en medio ácido, para evitar así el riesgo de epimerización. Por lo tanto, y debido a la mejor accesibilidad comercial del éster metílico de glicina que del éster *terc*-butílico de glicina, para productos en los que no existía el riesgo de epimerización (*exo*) se utilizó el éster metílico, cuya hidrólisis se lleva a cabo en medio básico como se ha comentado anteriormente, dejando el éster *terc*-butílico para los cicloaductos *endo*, susceptibles de sufrir epimerización.

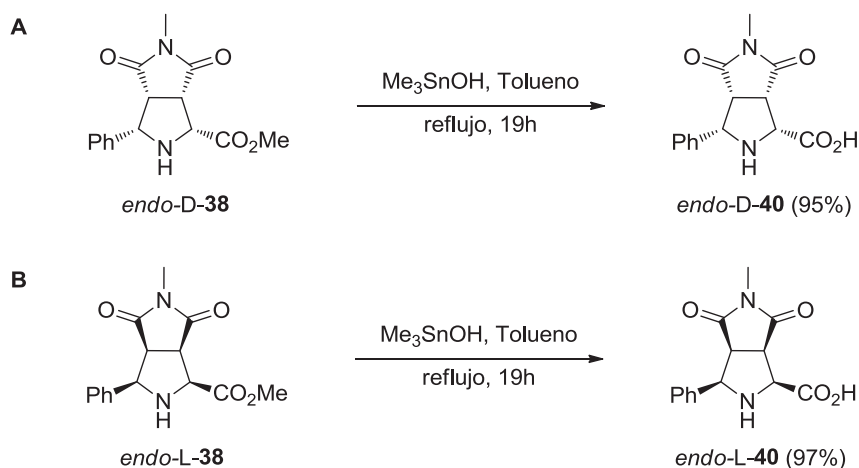
a) *Ésteres metílicos: hidrólisis básica*

La hidrólisis de los cicloaductos *exo*-**35** se llevó a cabo en medio básico, con NaOH en una disolución de acetona:agua (Esquema 3.27). Tras 16 horas, la mezcla se acidificó a 0 °C con una disolución 2N de HCl en agua hasta alcanzar un pH≈2, obteniéndose así los ácidos correspondientes *exo*-**39** como sólidos blancos en la mayoría de los casos y con rendimientos entre el 70 y el 97%.



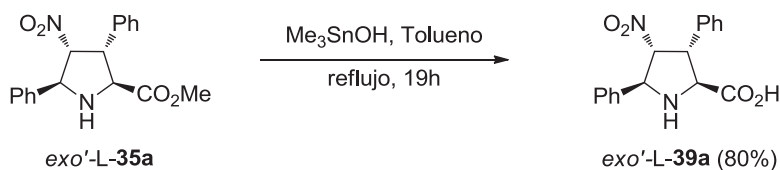
Esquema 3.27. (A) Síntesis de los ácidos *exo*-D-**39**. (B) Síntesis del ácido *exo*-L-**39a**.

Los ácidos *endo*-**40** se obtuvieron a partir de los ésteres metílicos correspondientes mediante reacción con hidróxido de trimetilestaño<sup>21</sup> a reflujo de tolueno. En este caso, al igual que en el de otros cicloaductos *endo*, la hidrólisis con hidróxido de sodio condujo a mezclas de epímeros. De esta forma se consiguieron los correspondientes ácidos *endo*-**D-40** y *endo*-**L-40** con rendimientos del 95 y 97% (Esquema 3.28).



Esquema 3.28 (A) Hidrólisis del cicloaducto *endo*-**D-40**. (B) Hidrólisis del cicloaducto *endo*-**L-40**.

Los mismos problemas se observaron en el caso de la hidrólisis de la pirrolidina *exo*'-**L-35a**, por lo que también se procedió mediante esta metodología obteniéndose el producto final *exo*'-**L-39a** con un rendimiento del 80% (Esquema 3.29).



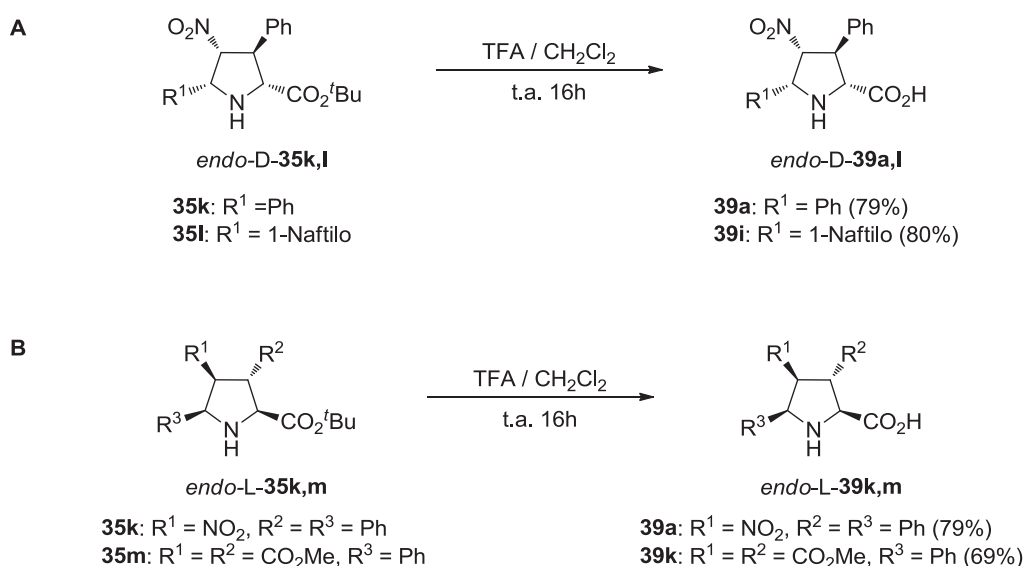
Esquema 3.29. Hidrólisis del éster metílico *exo*'-**L-35a**.

#### b) Ésteres *terc*-butílicos: tratamiento en medio ácido

Como alternativa a la hidrólisis básica de los cicloaductos *endo*-**35** se decidió llevar a cabo el tratamiento en medio ácido con los derivados de prolina que presentan el éster *terc*-butílico en su estructura. Así se evitaban las posibles epimerizaciones en la

<sup>21</sup> (a) Nicolau, K. C.; Estrada, A. A.; Zak, M.; Lee, S. H.; Safina, B. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1378-1382. (b) Méndez, L.; Testero, S. A.; Mata, E. G. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1757-1760.

posición C4 del anillo pirrolidínico observadas al utilizar NaOH además de no ser necesario el empleo de hidróxido de trimetilestaño. Para ello se disolvió el cicloaducto correspondiente en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se añadió TFA<sup>22</sup> (Esquema 3.30). Transcurridas 16 horas bajo agitación y tras la evaporación del disolvente, el producto formado fue purificado mediante precipitación. De esta forma se obtuvieron los ácidos *endo*-**39** como sólidos blancos, con rendimientos entre el 69% y el 80%.



Esquema 3.30. (A) Síntesis de los ácidos *endo*-D-**39**. (B) Síntesis de los ácidos *endo*-L-**39**.

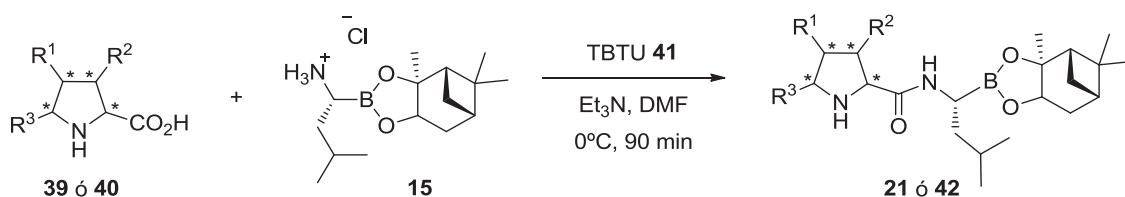
### 3.3.1.2. Acoplamiento peptídico

Una vez sintetizadas las prolinas densamente sustituidas mediante los tratamientos adecuados de los ésteres correspondientes, la siguiente etapa consistió en el acoplamiento entre los ácidos libres **39** y **40** con el clorhidrato del aminoboronato **15** descrito anteriormente (*vide supra*, apartado 3.2.1).

Dentro de nuestro grupo<sup>23</sup> se llevó a cabo un estudio sintético para obtener las condiciones experimentales más adecuadas para llevar a cabo esta reacción, concluyendo que el reactivo TBTU **41** es el que da los mejores resultados (Esquema 3.31).

<sup>22</sup> (a) Hoffman, R. V. *Organic Chemistry: An Intermediate Text*, 2<sup>nd</sup> Edition. John Wiley & Sons, New Jersey, 2004. (b) Weber, A. E.; Steiner, M. G.; Krieter, P. A.; Colletti, A. E.; Tata, J. R.; Halgren, T. A.; Ball, R. G.; Doyle, J. J.; Schorn, T. W.; Stearns, R. A.; Miller, R. R.; Siegl, P. K. S.; Greenlee, W. J.; Patchett, A. A. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3755-3773.

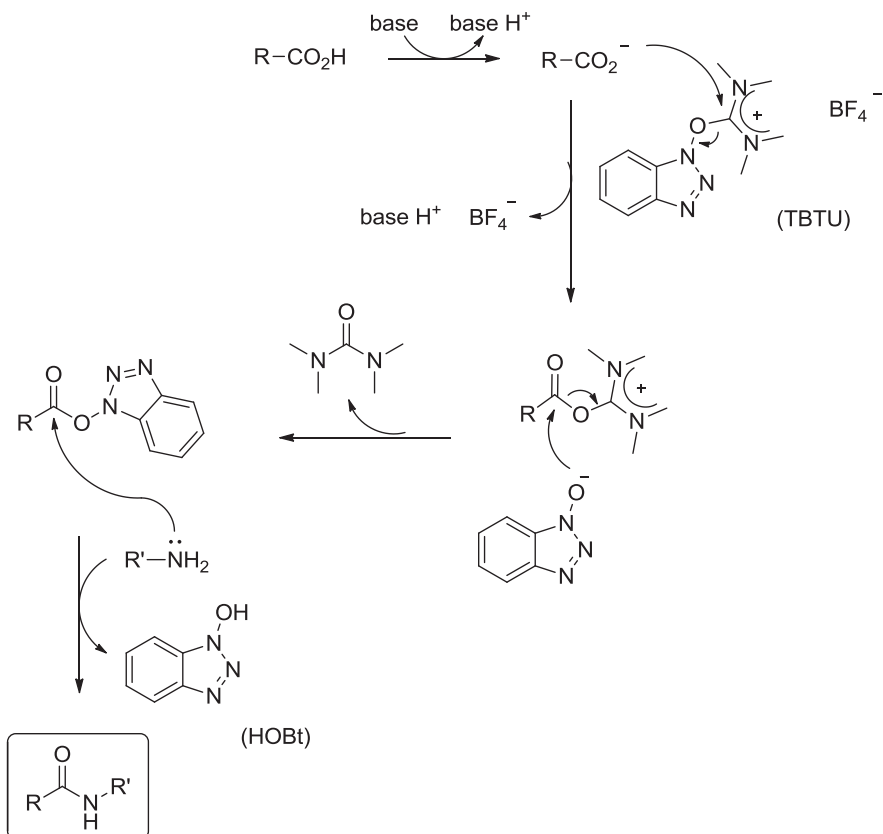
<sup>23</sup> Llevado a cabo por la doctoranda María Alcalá en la empresa IKERCHEM.



Esquema 3.31. Acoplamiento peptídico de los ácidos pirrolidínicos **39** ó **40** y el aminoboronato **15**.

La metodología de acoplamiento utilizada fue la misma para todos los diastereoisómeros, independientemente de su configuración. Para conseguir cada producto acoplado por separado simplemente se tomó como materia prima el diastereoisómero de pirrolidina **39** ó **40** correspondiente (*exo*-D, *exo*-L, *endo*-D, *endo*-L), puro y en forma de ácido, y se procedió según el método descrito en el Esquema 3.31. Las estructuras resultantes se consiguieron con conversiones cuantitativas y se utilizaron en la siguiente etapa sin purificar.

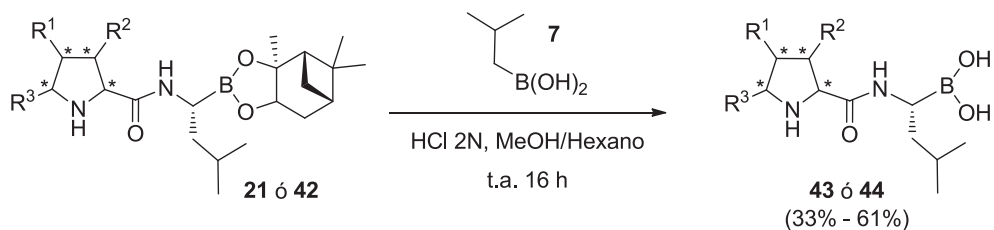
El agente de acoplamiento TBTU pertenece a la familia de reactivos desarrollados en torno a las sales de uronio. Con este reactivo se consigue el acoplamiento del ácido con la amina en presencia de base y sin dar lugar a reacciones de epimerización apreciables. Primeramente la base desprotona el ácido, que reacciona con TBTU generando la especie activa de acil uronio y HOBT. A continuación, esta especie reacciona con el ácido activado produciendo un éster reactivo que es el que experimenta la aminólisis (Esquema 3.32). La fuerza motriz de este proceso es la formación de la urea (en este caso *N,N,N',N'*-tetrametilurea) y la amida correspondiente, ambas de elevada estabilidad termodinámica.



Esquema 3.32. Mecanismo para el acoplamiento peptídico mediante el uso de TBTU.

### 3.3.1.3. Desprotección de los ésteres borónicos

Los productos de la etapa anterior **21** ó **42** se desprotegeron de la misma forma que el derivado del triazol descrito anteriormente (*vide supra*, Esquema 3.10)<sup>3</sup> para generar los correspondientes ácidos borónicos. En este caso el método de desprotección también fue común para todos los diastereoisómeros (Esquema 3.33).



Esquema 3.33. Desprotección borónica de los compuestos **21** y **42**.

Para la obtención de cada diastereoisómero por separado, se utilizó como producto de partida el diastereoisómero acoplado **21** ó **42** correspondiente (*exo*-D, *exo*-L, *endo*-D, *endo*-L) y se llevó a cabo el método de desprotección ya descrito.<sup>3</sup>

Estas estructuras borónicas finales son muy inestables, por lo que no permiten su purificación a través de columna cromatográfica de sílice. Debido a esto, fue necesario aislar los ácidos intermedios de partida con elevada pureza. De esa forma, las reacciones de acoplamiento peptídico y desprotección siguientes se dieron con menos productos secundarios y de degradación, pudiéndose purificar los productos finales mediante precipitación con mezclas de AcOEt:hexano:Et<sub>2</sub>O.

Los rendimientos globales de estas dos últimas etapas (acoplamiento y desprotección) fueron muy variables debido a los grupos presentes en el anillo de pirrolidina (Figura 3.4), estando comprendidos entre el 33 y el 61%.

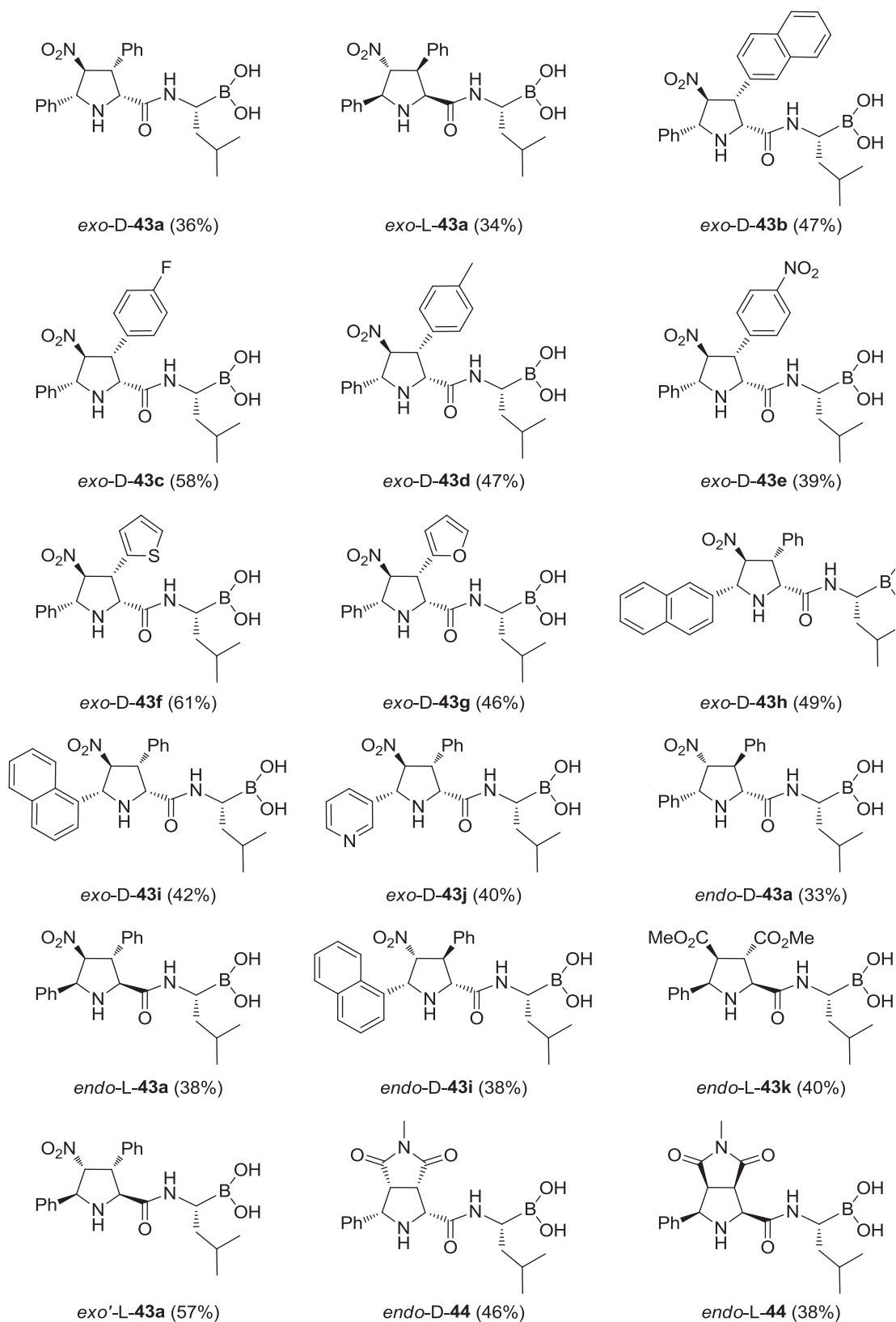


Figura 3.4. Ácidos borónicos con estructura de pirrolidina sintetizados.



### 3.3.2. Síntesis de $\beta$ -lactonas **45** como electrófilos

Como se ha comentado en el apartado de introducción, otro grupo importante de inhibidores proteasómicos es el de las  $\beta$ -lactonas. Éstos inhiben preferentemente y de forma covalente e irreversible la actividad de la subunidad  $\beta 5$  del proteasoma, aunque las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  también resultan bloqueadas en menor medida. De hecho, el compuesto Marizomib, basado en esta estructura de lactona se encuentra en fase I de ensayos clínicos.

Con estos precedentes, otros de los grupos electrófilos utilizados para la síntesis de estructuras con posible actividad inhibitoria de proteasoma con núcleo pirrolidínico fueron las  $\beta$ -lactonas. Dentro de este grupo podemos diferenciar entre las configuraciones *S* y *R* (Figura 3.5).

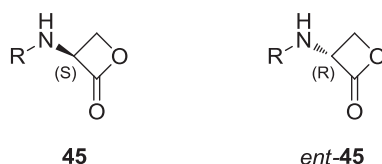
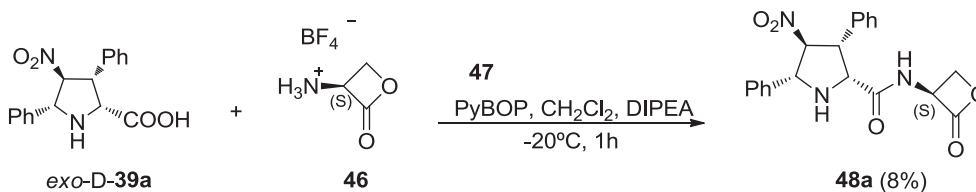


Figura 3.5. Estructuras de las  $\beta$ -lactonas **45** y *ent-45* de configuración *S* y *R*.

#### 3.3.2.1. Síntesis de la $\beta$ -lactona **48a**

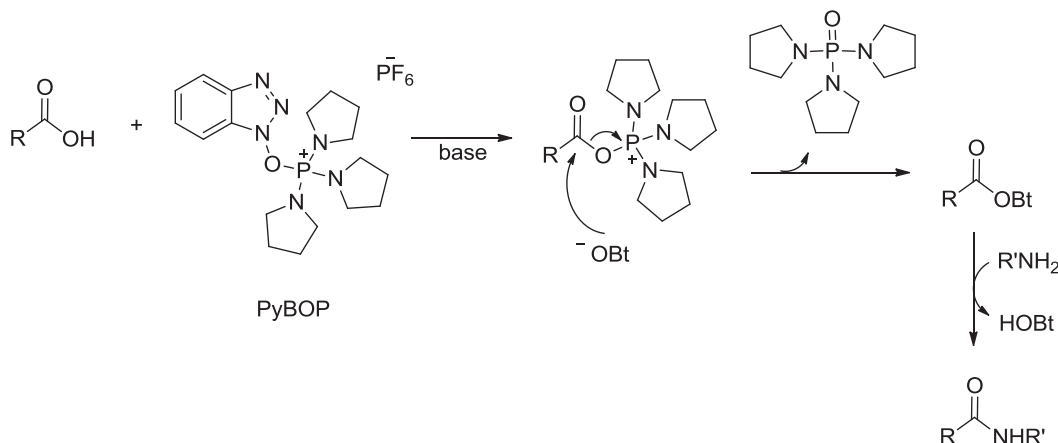
Para la síntesis de los derivados con  $\beta$ -lactonas de configuración *S*, el producto cíclico de partida necesario **46** era comercialmente asequible, por lo que mediante acoplamiento peptídico con la pirrolidina correspondiente en forma de ácido *exo-D-39a* se consiguió el producto final deseado **48a**.

Se comenzó usando TBTU como agente de acoplamiento en las mismas condiciones que para el caso de los ácidos borónicos (*vide supra*, apartado 3.3.1.2). Sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios, por lo que se decidió llevar a cabo el acoplamiento peptídico utilizando PyBOP como agente de activación del grupo carboxilo (Esquema 3.34).



Esquema 3.34. Síntesis de la  $\beta$ -lactona **48a** de configuración *S*.

El PyBOP **47** se trata de una sal de fosfonio análoga a la sal de uronio TBTU, cuyo mecanismo de acción es muy similar al de este último (Esquema 3.35). Mediante este procedimiento se consiguió obtener el producto final deseado **48a** en un tiempo de reacción no muy largo (1 hora). Cabe mencionar que en este caso el rendimiento de reacción fue muy bajo (8%) y la reproducibilidad muy variable.



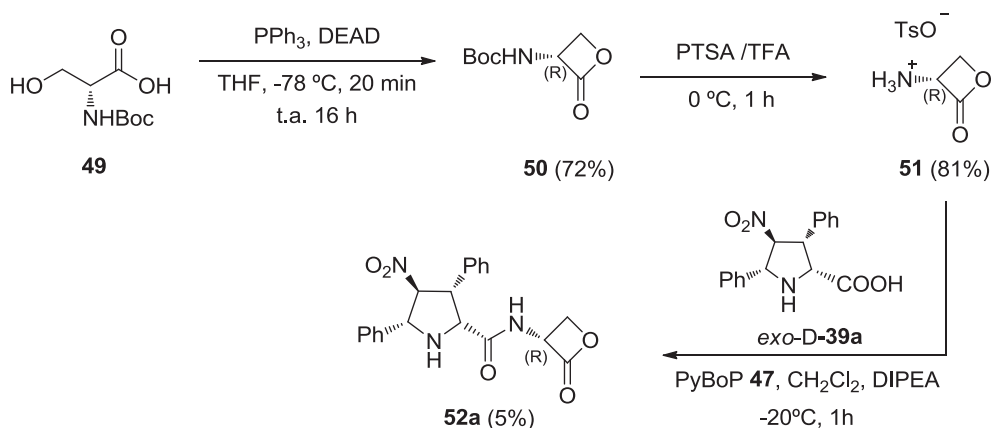
Esquema 3.35. Procedimiento de acoplamiento mediante PyBOP.

### 3.3.2.2. Síntesis de la $\beta$ -lactona **52a**

La síntesis de los derivados con  $\beta$ -lactonas de configuración *R*, requirió de un procedimiento con más etapas, ya que en este caso el producto de partida cíclico **46**, enantiómero al descrito anteriormente no era comercial. Así, hubo que sintetizarlo a partir de *N*-Boc-D-Serina **49** en tres etapas. La primera reacción consistió en la ciclación de Mitsunobu,<sup>24</sup> ciclación del producto de partida seguida de un cambio del grupo protector Boc por tosilato,<sup>25</sup> para finalizar con el acoplamiento peptídico de dicha lactona con la prolina no natural *exo*-D-**39a** (Esquema 3.36).

<sup>24</sup> (a) Solorzano, C.; Antonietti, F.; Duranti, A.; Tontini, A.; Rivara, S.; Lodola, A.; Vacondio, F.; Tarzia, G.; Piomelli, D.; Mor, M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5770-5781. (b) Arnold, L. D.; Kalantar, T. H.; Vederas, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7105-7109.

<sup>25</sup> Arnold, L. D.; May, R. G.; Vederas, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2237-2241.



Esquema 3.36. Síntesis de la  $\beta$ -lactona **52a** de configuración *R*.

La modificación de Mitsunobu se llevó a cabo a baja temperatura y utilizando  $\text{PPh}_3$  y DEAD, obteniendo la  $\beta$ -lactona **50** con un 72% de rendimiento. El cambio de grupo protector de la amina se realizó mediante una reacción con PTSA y TFA a  $0 ^\circ\text{C}$ , con un rendimiento del 81%. Los productos de estas dos reacciones están descritos en la bibliografía.<sup>24,25</sup> En este caso, como en el del derivado de la lactona de configuración *S* **46**, el acoplamiento peptídico se llevó a cabo mediante PyBOP como agente acoplante. De esta forma se obtuvo el producto final deseado pero también con un rendimiento muy bajo (5%).

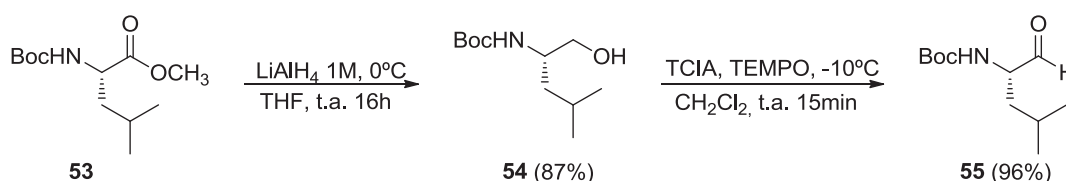
### 3.3.3. Síntesis del nitroalqueno **59a** como electrófilo

Otro de los grupos electrófilos utilizado para la síntesis de estructuras con posible actividad inhibitoria de proteasoma con núcleo pirrolidínico fue el nitroalqueno. Este grupo no ha sido descrito como inhibidor proteasómico. Sin embargo, debido a su carácter electrófilo, se pensó que podría tener potencial inhibitorio de la actividad proteasómica.

La síntesis de la estructura **59a** cuyo grupo quelante era el nitroalqueno se llevó a cabo en 6 etapas de reacción que se describirán a continuación:

### 3.3.3.1. Síntesis del aldehído quiral **55**

El primer paso consistió en la reducción del éster metílico del producto comercial (*N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*L*-leucinato de metilo **53** al alcohol utilizando  $\text{LiAlH}_4$ .<sup>26</sup> Seguidamente se oxidó el alcohol primario **54** al aldehído correspondiente **55** utilizando TCIA y TEMPO mediante el método desarrollado por De Luca y col.<sup>26b,27</sup> Las mejoras que este método ofrecía respecto a la oxidación de Swern fueron una reducción del tiempo de reacción de 3 horas a 15 minutos, una temperatura mayor ( $-10\text{ }^\circ\text{C}$  en vez de  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ ) y ausencia de atmósfera inerte, consiguiendo unos rendimientos similares (Esquema 3.37).



Esquema 3.37. Síntesis del aldehído quiral **55**.

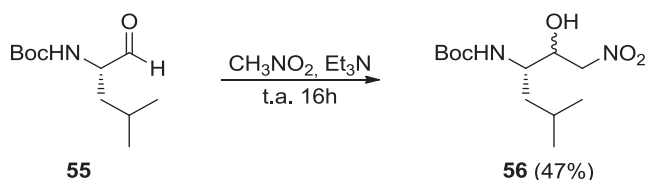
Estas etapas de reacción dieron lugar a los respectivos productos con elevada pureza y conversiones cuantitativas, por lo que no fue necesaria la purificación de los mismos para llevar a cabo las siguientes reacciones.

### 3.3.3.2. Reacción de Henry

Tras preparar el aldehído **55**, se procedió a la síntesis del nitroalqueno **59a**. Para ello se empleó una metodología desarrollada en nuestro grupo de investigación, basada en el procedimiento de Henry-McMurry. La reacción de Henry del aldehído **55** con nitrometano se llevó a cabo a temperatura ambiente y en presencia de cantidades catalíticas de  $\text{Et}_3\text{N}$ , con un rendimiento del 47% (Esquema 3.38).

<sup>26</sup> (a) Li, W. R.; Ewing, W. R.; Harris, B. D.; Joullié, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7659-7672. (b) Tesis de Eneko Aldaba "Nuevas Aplicaciones de las Cicloadiciones (3+2) en la Preparación de Compuestos de Interés en Biomedicina y en Ciencias de Materiales" Donostia, **2006**.

<sup>27</sup> De Luca, L.; Giacomelli, G.; Porcheddu, A. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3041-3043.



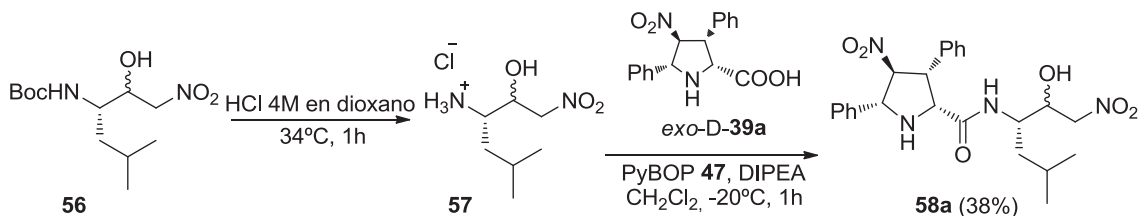
*Esquema 3.38. Reacción de Henry.*

El análisis de  $^1\text{H-RMN}$  del crudo de reacción obtenido reveló la presencia de dos nitroalcoholes diastereoisómeros *syn* y *anti*-**56**. En nuestro caso ese hecho no tenía mayor importancia ya que en la etapa posterior de eliminación (véase apartado 3.3.3.4) ese nuevo centro estereogénico iba a ser destruido, debido que ambos diastereoisómeros convergían en el mismo producto de eliminación final **59a**.

Aunque la presencia de los dos nitroalcoholes no fuera relevante, en este caso se purificó el crudo de reacción para eliminar los subproductos no deseados que pudieran influir en la posterior etapa de acoplamiento peptídico. Así, se empleó la mezcla de ambos diastereoisómeros para continuar con la siguiente etapa.

### 3.3.3.3. Desprotección del grupo Boc y acoplamiento con los derivados pirrolidínicos

A continuación se procedió a la eliminación del grupo protector Boc de la amina en medio ácido, obteniéndose el aminoalcohol **57** en forma de clorhidrato y con un rendimiento cuantitativo. Posteriormente éste fue acoplado directamente con *exo*-D-**39a** (Esquema 3.39).



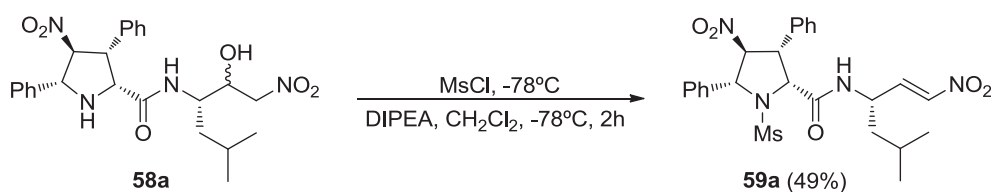
*Esquema 3.39. Desprotección del grupo Boc y acoplamiento con el ácido *exo*-D-39a.*

Siguiendo la metodología aplicada con las  $\beta$ -lactonas, la reacción de acoplamiento también se llevó a cabo utilizando PyBOP como agente acoplante. En este

caso, el rendimiento de la reacción fue algo superior al de las lactonas citadas, llegando hasta un 38%.

### 3.3.3.4. Eliminación de McMurry

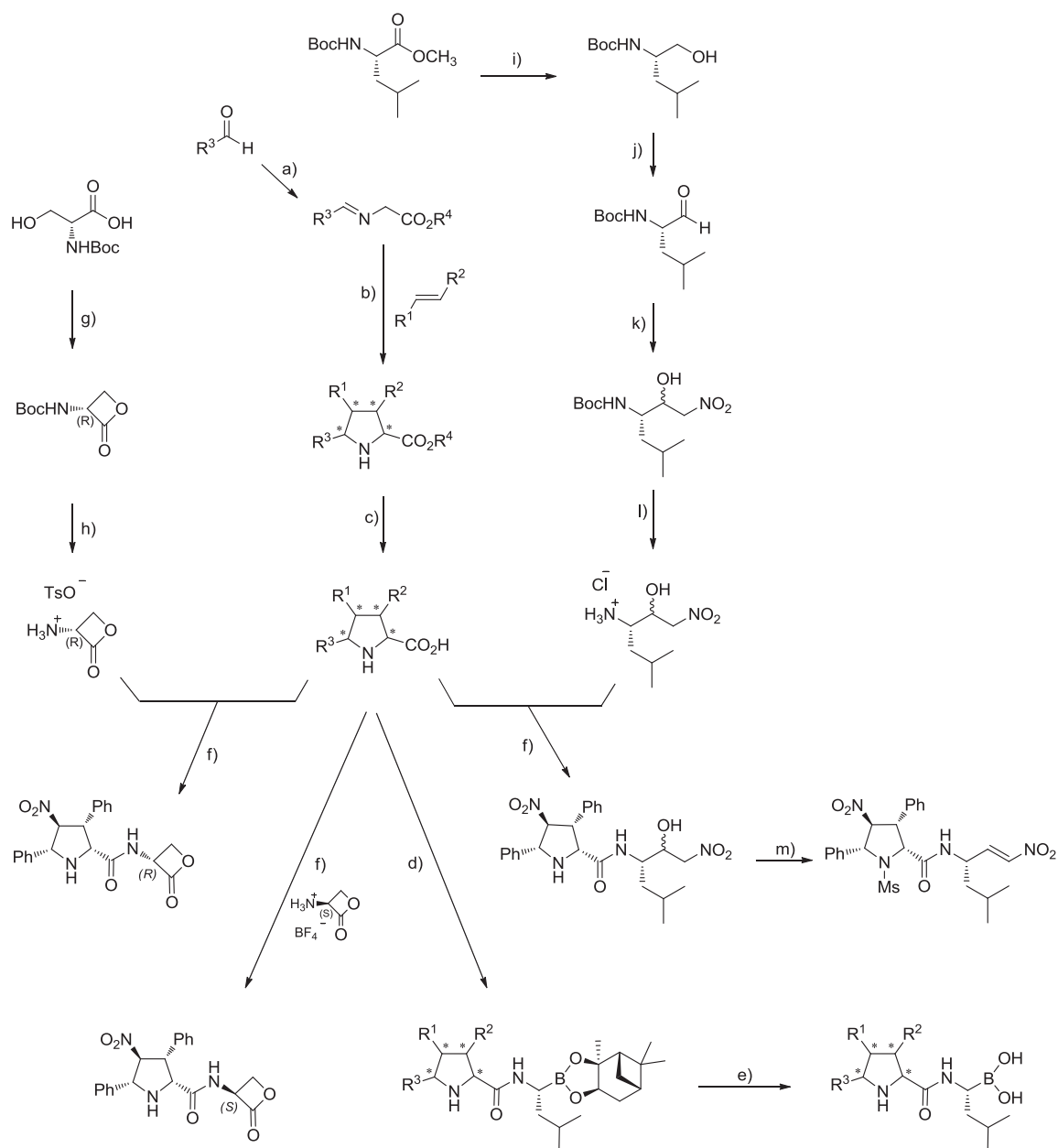
Finalmente se llevó a cabo la reacción de eliminación del compuesto **58a** en las condiciones descritas por McMurry,<sup>7</sup> a  $-78^{\circ}\text{C}$ , bajo atmósfera de argón en presencia de cloruro de metanosulfonilo como agente activante del grupo hidroxilo y DIPEA como base (Esquema 3.40). Se empleó esta amina en lugar de  $\text{Et}_3\text{N}$  por la mayor selectividad observada, dado que se consiguió el alqueno (*E*) como único producto.<sup>28</sup> También se observó la mesilación del grupo *NH* del anillo pirrolidínico (**59a**), que se intentó desproteger para conseguir el producto inicialmente deseado pero todos los intentos resultaron fallidos. Esta reacción tuvo lugar con un 49% de rendimiento.



Esquema 3.40. Síntesis del nitroalqueno quiral **59a** derivado de *L*-leucina. Eliminación de McMurry.

En resumen, se puede afirmar que se ha logrado una metodología para obtener compuestos derivados de prolinas no naturales altamente sustituidas que contienen en su estructura un ácido borónico, una  $\beta$ -lactona o un nitroalqueno como grupos electrófilos. Todas ellas han sido expuestas en este capítulo y se muestran, de manera resumida, en el Esquema 3.41.

<sup>28</sup> (a) Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Cossío, F. P.; García, J. M.; López, M. C.; Oiarbide, M. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2070-2078. (b) Ayerbe, M.; Cossío, F. P. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4447-4450.



Esquema 3.41. Esquema general de la síntesis de dipéptidos no naturales. Reactivos y condiciones: a) Clorhidratos de los ésteres metílico o terc-butílico de glicina,  $Et_3N$ ,  $MgSO_4$ ,  $CH_2Cl_2$ , t.a., 16h. b) NH-L-EhuPhos-22,  $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ ,  $Et_3N$ , THF,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , 16h o NMe-D-EhuPhos-31,  $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ ,  $Et_3N$ , THF,  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  ó  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , 16h o AgOAc,  $Et_3N$ ,  $CH_3CN$ , t.a., 5h o NH-L-EhuPhos-22,  $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ ,  $Et_3N$ ,  $CH_2Cl_2$ , t.a., 16h. c) NaOH, Acetona/ $H_2O$ , t.a., 16h o TFA,  $CH_2Cl_2$ , t.a., 16h o  $Me_3SnOH$ , tolueno, reflujo, 19h. d) Clorhidrato del aminoboronato 15, TBTU,  $Et_3N$ , DMF,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 90 min. e) Ácido isobutilborónico, HCl, metanol, hexano, t.a., 16h. f) PyBOP,  $CH_2Cl_2$ , DIPEA,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , 1h. g)  $PPh_3$ , DEAD, THF,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 20 min. t.a. 16h. h) PTSA, TFA,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min. - 2h. i)  $LiAlH_4$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , THF, t.a., 16h. j) TCIA, TEMPO,  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $CH_2Cl_2$ , t.a., 15 min. k)  $CH_3NO_2$ ,  $Et_3N$ , t.a., 16h. l) HCl en dioxano,  $34\text{ }^\circ\text{C}$ , 1h. m) MsCl,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $CH_2Cl_2$ , DIPEA,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 2h.

### 3.4. Evaluación biológica

Una vez sintetizados los compuestos mencionados anteriormente, se llevaron a cabo ensayos biológicos para determinar su actividad biológica. Estos ensayos biológicos se realizaron en Ricerca Biosciences, LLC (Taiwan) y Eurofins Panlabs Taiwan, Ltd. Los compuestos enviados se resumen en las Figuras 3.6, 3.7 y 3.8.

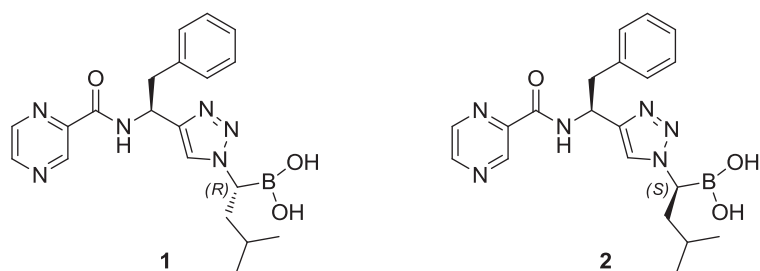


Figura 3.6. Ácidos borónicos con estructura de triazol evaluados en ensayos biológicos.

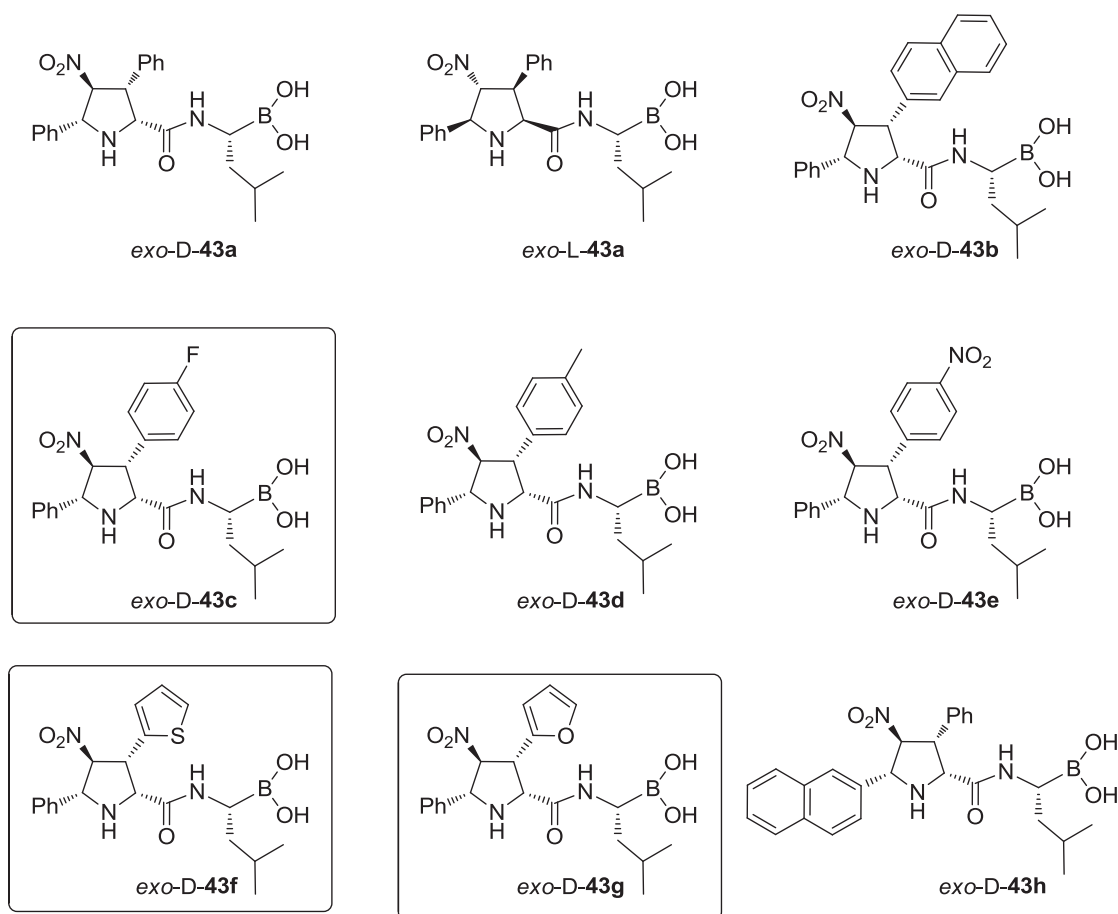


Figura 3.7. Ácidos borónicos con estructura de pirrolidina evaluados en ensayos biológicos.



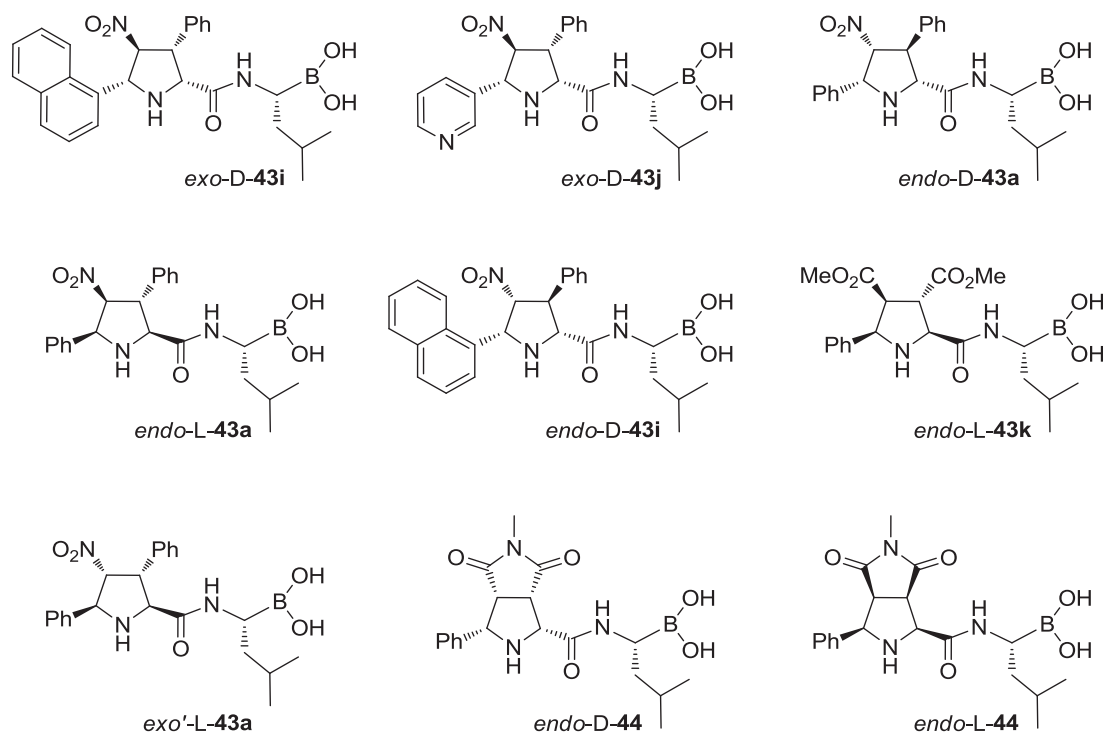


Figura 3.7. Ácidos borónicos con estructura de pirrolidina evaluados en ensayos biológicos. (Cont.)

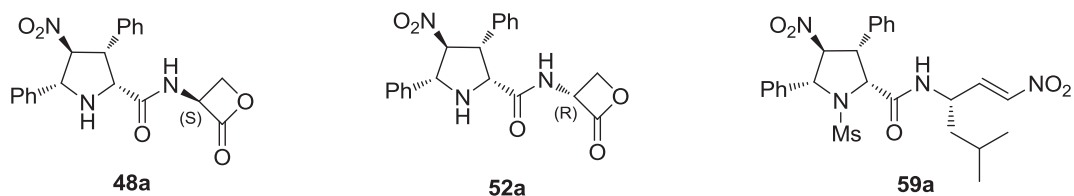


Figura 3.8.  $\beta$ -Lactonas y nitroalqueno con estructura de pirrolidina evaluados en ensayos biológicos.

La actividad de los compuestos descritos en los apartados 3.1.1 y 3.3 se comparó con la del Bortezomib **60** (Figura 3.9), obtenido en nuestro grupo según el procedimiento publicado en la patente WO96/13266.<sup>29</sup>

<sup>29</sup> Adams, J.; Stein, R.; Baevsky, M.; Grenier, L.; Plamondon, L. Boronic ester and acid compounds, synthesis and uses WO96/13266, 1995. (PCT/US95/14117).

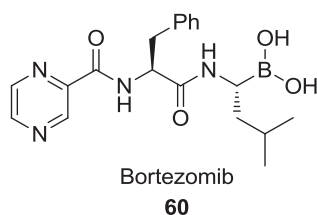


Figura 3.9. Estructura del Bortezomib **60**.

### 3.4.1. Ensayo enzimático *in vitro* de la actividad inhibidora del proteasoma

Inicialmente se realizaron ensayos enzimáticos *in vitro*. Para ello se utilizó como sustrato Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Figura 3.10); como tampón de ensayo 250 mM HEPES, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.03% SDS, 0.05% Igepal CA-630; y como enzima el proteasoma 20S de eritrocitos humanos. Se utilizó lactacistina como control positivo.

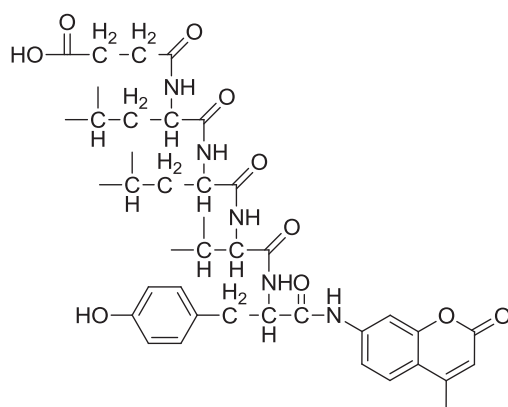


Figura 3.10. Estructura de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC.

Se utiliza este sustrato debido a que en presencia de actividad quimotripsina, el fluoróforo AMC (7-amido-4-metilcumarina) es liberado generando fluorescencia. La medida de dicha fluorescencia indica la actividad del compuesto analizado. Se emplea lactacistina como control positivo ya que es el primer y único inhibidor proteasómico no peptídico descubierto y ampliamente estudiado, que se une e inhibe específicamente las subunidades catalíticas del proteasoma sin inhibir otras proteasas testadas *in vitro*. Los resultados de la actividad inhibitoria obtenidos *in vitro* fueron los descritos en la Tabla 3.4:

Tabla 3.4. Resultados de la actividad inhibitoria obtenidos in vitro.

Entrada	Compuesto	Concentración (nM)	% Inhibición	IC <sub>50</sub> (nM)
1	<b>Bortezomib, 60</b>	10	74	4.46
2	<b>1</b>	500	8	-
3	<b>2</b>	500	1	-
4	<i>exo</i> -D- <b>43a</b>	100	73	39
5	<i>exo</i> -L- <b>43a</b>	1000	70	430
6	<i>endo</i> -D- <b>43a</b>	500	15	-
7	<i>endo</i> -L- <b>43a</b>	50	51	46
8	<i>exo'</i> -L- <b>43a</b>	50	69	21
9	<i>endo</i> -L- <b>43k</b>	500	20	-
10	<i>endo</i> -D- <b>44</b>	100	68	46
11	<i>endo</i> -L- <b>44</b>	1000	53	920
12	<i>exo</i> -D- <b>43b</b>	500	69	150
13	<i>exo</i> -D- <b>43c</b>	50	70	17
14	<i>exo</i> -D- <b>43d</b>	500	77	78
15	<i>exo</i> -D- <b>43e</b>	500	69	150
16	<i>exo</i> -D- <b>43f</b>	50	79	12
17	<i>exo</i> -D- <b>43g</b>	50	81	7.55
18	<i>exo</i> -D- <b>43h</b>	50	50	46
19	<i>exo</i> -D- <b>43i</b>	50	54	39
20	<i>exo</i> -D- <b>43j</b>	500	72	100
21	<i>endo</i> -D- <b>43i</b>	500	33	-
22	<b>48a</b>	500	0	-
23	<b>52a</b>	500	5	-
24	<b>59a</b>	500	4	-
25	<b>Lactacistina</b>	-	-	110

Primeramente se testaron los triazoles **1** y **2** (entradas 2 y 3, Tabla 3.4) ya que presentaban mayor semejanza estructural con el compuesto borónico conocido (Bortezomib). Los resultados mostraron una baja inhibición proteasómica para ambos diastereoisómeros, de ahí que se procediese a sintetizar y evaluar nuevos ácidos borónicos con unidad pirrolidínica (entradas 4-21, Tabla 3.4).

Como primera aproximación, se evaluaron las estructuras más sencillas **43a** para determinar la influencia de la configuración del anillo pirrolidínico (entradas 4-8, Tabla 3.4). Por ello se estudiaron los distintos diastereoisómeros de la estructura **43a** (*exo*-D, *exo*-L, *endo*-D, *endo*-L y *exo'*-L) observándose que esta diferencia de la configuración tenía gran importancia en la capacidad inhibitoria. Así el orden de capacidad inhibitoria encontrado fue *exo'*-L > *exo*-D > *endo*-L >> *exo*-L > *endo*-D, siendo los valores de IC<sub>50</sub> de las tres primeras muy próximos entre sí y al del Bortezomib y los de los dos últimos más elevados.

De estos resultados se pudo extraer, que para una mejor actividad proteasómica resulta de vital importancia que la configuración de C3 sea *R* (Figura 3.11).

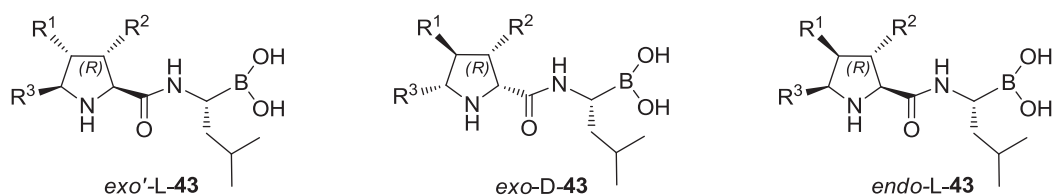


Figura 3.11. Configuración óptima de los compuestos **43** para dar actividad biológica.

La siguiente cuestión que nos planteamos fue averiguar la importancia del sustituyente en la posición C3. Para ello se evaluaron las estructuras *endo*-L-**43k**, *endo*-D-**44** y *endo*-L-**44**. Analizando los resultados se pudo observar que la presencia de un grupo ester metílico en lugar de fenilo disminuía considerablemente la actividad (entrada 9, Tabla 3.4). Sin embargo, la actividad de los compuestos **44** dependía de la configuración D o L del derivado de prolina, siendo la primera la que más inhibición de las dos generaba (entradas 10 y 11, Tabla 3.4). Por tanto, se puso de manifiesto que es necesaria una configuración *R* en C3 y que es preferible un grupo aromático en dicha posición.

Una vez determinado que las configuraciones *exo*-D, *endo*-L y *exo'*-L proporcionaban mayor actividad se decidió evaluar la influencia que ejercían los sustituyentes en dicha estructura. Para ello se llevaron a cabo modificaciones del anillo pirrolidínico de la configuración *exo*-D debido a su menor coste sintético. De esta forma se sintetizaron el resto de estructuras descritas en la Figura 3.7.

Como puede observarse en la Tabla 3.4, los compuestos que dieron mejores resultados en cuanto a capacidad inhibitoria fueron en orden de menor a mayor valor de

IC<sub>50</sub> el *exo-D-43g*, *exo-D-43f*, *exo-D-43c*, *exo'-L-43a*, *exo-D-43a*, *exo-D-43i*, *endo-L-43a* y *exo-D-43h* (entradas 17, 16, 13, 8, 4, 19, 7 y 18, Tabla 3.4), siendo estos valores comparables al del Bortezomib (IC<sub>50</sub> 4.46 nM).

Por tanto, mediante la síntesis estereocontrolada y enantioselectiva de pirrolidinas con cuatro centros quirales, ha sido posible generar ácidos borónicos con una actividad inhibitoria de proteasoma comparable a la de Bortezomib.

### 3.4.2. Actividad biológica y viabilidad en líneas celulares de cáncer

Con el fin de evaluar la capacidad de los compuestos descritos anteriormente para inhibir el crecimiento de células cancerosas se utilizaron ensayos llevados a cabo en Leitat, España, basados en cultivos con líneas celulares de diversos tipos de cáncer humano. Para ello se escogieron aquellas estructuras que habían presentado mayor actividad *in vitro*: *exo-D-43g*, *exo-D-43f*, *exo-D-43c*, *exo'-L-43a*, *exo-D-43a*, *endo-L-43a* y *exo-D-43h*. En cada línea celular se determinaron para cada compuesto los valores de EC<sub>50</sub> y la viabilidad celular tras 72 h en contacto con dicho compuesto, usando los métodos AlamarBlue<sup>®</sup> y/o Hexosaminidasa. En todos los casos los ensayos se realizaron con AlamarBlue, excepto los indicados con \* que fueron llevados a cabo con Hexosaminidasa). (Para más detalles, véase la Sección Experimental).

Tabla 3.5. Valores de  $EC_{50}$  y % de Viabilidad de los compuestos Bortezomib (60), *exo-D-43a*, *exo-D-43c*, *exo-D-43f* y *exo-D-43g* para distintas líneas celulares de cáncer humano. Los casos en que los inhibidores muestran una actividad comparable o superior a la de Bortezomib están remarcados en gris.

Entrada	Cáncer humano	Líneas celulares	Bortezomib, 60		<i>exo-D-43a</i>		<i>exo-D-43c</i>		<i>exo-D-43f</i>		<i>exo-D-43g</i>	
			$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	% Viab.	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	% Viab.	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	% Viab.	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	% Viab.	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	% Viab.
1		MDA-MB-231	0.032	0	5.1	0	11	0.6	2.8	5.2	1.1	4.1
2	Cáncer de mama	MDA-MB-468	0.0078	19	4.1	27	2.2	0	0.32	0	0.12	0
3		MCF-7	0.0147	0	0.7	0	1.9	45	0.49	41	0.28	39
4		SK-BR-3	0.0098	0	1.2	0	6.0*	5.7	0.44	10	0.11	11
5		T47D	0.013	12.1	10	0	21*	27	0.57	48	1.3	58
6	Cáncer de próstata	DU-145	0.011	0	1.9	3	3.5	19	0.91	21	0.57	21
7		PC-3	0.036	0	1.5	0	7.1	0	1.2	0	0.68	0
8		LNcaP	0.0043	7.6	0.39	6.5	1.8	0.1	0.38	0	0.15	0
9		HCT-116	0.0067	0	1.9	0	2.2	0	0.64	0	0.28	0
10		HT-29	0.01	5.8	3.5	6.2	27	42	3.5	41	2.5	44
11	Cáncer de colon	COLO 205	0.031	24	11	29	2.4	50	0.31	53	0.202	48
12		LoVo	0.018	0	6.7	0	15	9.9	2.5	10	0.66	5.7
13		SW480	0.0088	2.7	1.1	5.5	13*	5.3	2.3*	9.7	1.1*	6.8
14		LS174T	0.0056	0	0.72	0	1.9	4.6	0.43	18	0.14	18
15		A549	0.04	0	7.0	0	12*	11	2.6*	17	1.3*	22
16	Cáncer de pulmón	NCI-H1975	0.19	55	25	78	7.3*	14	1.1*	14	0.84*	10
17		NCI-H1650	0.0077	26	3.3	31	12*	14	1.8*	14	1.2*	15
18		NCI-H358	0.022	0	0.79	0	3.3	27	0.70	25	0.28	28
19	Cáncer de hígado	HepG2	0.36	0	1.4	0	3.1	21	0.56	29	0.22	25
20		SK-HEP-1	0.0031	0	0.49	0	1.9	0	0.49	0	0.007	0

Entrada	Cáncer humano	Líneas celulares	Bortezomib, 60		exo-D-43a		exo-D-43c		exo-D-43f		exo-D-43g	
			EC <sub>50</sub> (μM)	% Viab.	EC <sub>50</sub> (μM)	% Viab.	EC <sub>50</sub> (μM)	% Viab.	EC <sub>50</sub> (μM)	% Viab.	EC <sub>50</sub> (μM)	% Viab.
21	Fibrosarcoma	HT-1080	0.0099	0	1.7	0	16*	1.2	1.4	0	0.89	6
22	Cáncer de páncreas	MIA PaCa-2	0.019	0	5.7	0	83	48	2.4	44	0.85*	4
23		BxPC-3	0.016	1.6	4.6	0	5.8*	1	1.5*	1.6	0.7*	1.8
24		RWP-1	0.0082	0	24*	4.1	4.4	0	1.1	0	0.42	0
25	Melanoma	MDA-MB-435	0.01	0	1.0	0	1.1	0	0.31	0	0.17	0
26		SK-Mel-28	0.0087	0	1.3	0	13	29	1.6	48	0.80	48
27	Cáncer hematológico	K562	0.021	0	6.3	0	15	33	1.2	28	1.0	33
28		CCRF-CEM	0.0037	0	0.67	0	0.63	0	0.17	0	0.052	0
29		Jurkat	0.011	0	2.5	0.5	2.0	ND	0.08	ND	0.04	ND
30	Cáncer renal	RAMOS	0.0089	0	2.4	0	2.4	0	0.53	0	0.16	0
31		RCC 7860	0.024	0	4.7	0	12	45	0.43	6.6	1.0	4.8
32		143b	0.01	0	5.0	48	1.9	0	0.29	0	0.10	0
33	Cáncer de cerebro	Daoy	0.011	0	1.3	0	3.7	ND	0.78	ND	0.29	ND
34		U-373 MG	0.11	17	44	21	ND	7.4	5.8*	12	1.4*	14
35		U-87 MG	0.029*	1.6	12*	3.4	17*	8	2.8*	10	1.1*	11
36	Cáncer de ovario	SK-OV-3	0.012	24	4.1	31	13	17	1.3	17	0.33	19
37		OVCAR-3	0.005	0	0.74	0	2.2*	12	0.86*	4	0.28*	3.6
38	Cáncer de cuello de útero	HeLa	0.13	1	28	0	54	10	13	26	3.1	44
39	Mieloma múltiple	RPMI-8226	0.0054	0	0.15	0	1.3	2.7	0.06	10	0.06	8.8
40	Epidermoide	A431	0.017	12.1	0.97	0	2.8	0	0.69*	0	0.32	0

Tabla 3.6. Valores de  $EC_{50}$  y % de Viabilidad de los compuestos Bortezomib (60), *exo*-D-43h, *endo*-L-43a, y *exo*'-L-43a para distintas líneas celulares de cáncer humano. Los casos en que los inhibidores muestran una actividad comparable o superior a la de Bortezomib están remarcados en gris.

Entrada	Cáncer humano	Líneas celulares	Bortezomib, 60		<i>exo</i> -D-43h		<i>endo</i> -L-43a		<i>exo</i> '-L-43a	
			$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	% Viabilidad	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	% Viabilidad	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	% Viabilidad	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	% Viabilidad
1		MDA-MB-231	0.032	0	3.2	0	2.1	0	3.9	0
2	Cáncer de mama	MDA-MB-468	0.0078	19	1.0	30	0.79	20	0.92	18
3		MCF-7	0.0147	0	1.3	0	23	33	19	36
4		SK-BR-3	0.0098	0	0.57	0	0.76	0	1.2	0
5		T47D	0.013	12.1	2.1*	2.4	2.1	4.8	4.8	0.5
6	Cáncer de próstata	DU-145	0.011	0	0.35	19	1.2	0	2.0	0
7		PC-3	0.036	0	0.3	0	2.3	0	4.1	0
8		LNCaP	0.0043	7.6	0.12	5.1	0.11	5.5	0.26	5
9		HCT-116	0.0067	0	0.44	0	1.3	0	1.7	0
10		HT-29	0.01	5.8	0.85	0.8	1.5	9.4	2.752	6.5
11	Cáncer de colon	COLO 205	0.031	24	2.4	42	3.8	7.6	4.1	12
12		LoVo	0.018	0	1.7	0	3.09	0	4.7	0
13		SW480	0.0088	2.7	0.56	5.9	0.61	1.5	0.86	1.4
14		LS174T	0.0056	0	0.26	0	0.55	0	0.87	0
15		A549	0.04	0	5.8	4.6	4.0	0	10	0
16	Cáncer de pulmón	NCI-H1975	0.19	55	0.78	100	41	64	25	69
17		NCI-H1650	0.0077	26	0.37	33	0.79	22	0.92	18
18		NCI-H358	0.022	0	ND	ND	2.4	0	8.3	0
19	Cáncer de hígado	HepG2	0.36	0	0.5	0	0.38	0	0.44	0
20		SK-HEP-1	0.0031	0	0.16	0	0.29	0	0.35	0



Entrada	Cáncer humano	Líneas celulares	Bortezomib, 60		exo-D-43h		endo-L-43a		exo'-L-43a	
			EC <sub>50</sub> (μM)	% Viabilidad	EC <sub>50</sub> (μM)	% Viabilidad	EC <sub>50</sub> (μM)	% Viabilidad	EC <sub>50</sub> (μM)	% Viabilidad
21	Fibrosarcoma	HT-1080	0.0099	0	0.46	0	1.7	0	2.4	0
22	Cáncer de páncreas	MIA PaCa-2	0.019	0	1.9	7.1	3.0	0	3.0	0
23		BxPC-3	0.016	1.6	0.97	6.8	2.9	1.3	6.1	0.5
24		RWP-1	0.0082	0	ND	0	3.6	0	ND	0
25	Melanoma	MDA-MB-435	0.01	0	0.51	0	0.37	0	0.67	0
26		SK-Mel-28	0.0087	0	0.62	0	0.78	0	1.5	0
27	Cáncer hematológico	K562	0.021	0	2.7	0	2.0	0	3.0	0
28		CCRF-CEM	0.0037	0	0.14	0	0.33	0	0.6	0
29		Jurkat	0.011	0	0.8	0	1.7	0	2.2	0
30		RAMOS	0.0089	0	0.5	0	1.0	0	1.1	0
31	Cáncer renal	RCC 7860	0.024	0	2.4	0	1.7	0	2.4	0
32	Osteosarcoma	143b	0.01	0	0.37	38	2.0	0	2.3	17
33		Daoy	0.011	0	0.57	0	1.3	0	3.1	0
34	Cáncer de cerebro	U-373 MG	0.11	17	11	17	7.3	16	11	16
35		U-87 MG	0.029*	1.6	2.0*	9.1	4.2*	1.2	6.2*	1.4
36	Cáncer de ovario	SK-OV-3	0.012	24	1.4	23	2.2	34	4.7	21
37		OVCAR-3	0.005	0	0.33	0	0.89	0	ND	0
38	Cáncer de cuello de útero	HeLa	0.13	1	11	8.6	8.3	0	20	0
39	Mieloma múltiple	RPMI-8226	0.0054	0	0.31	0	0.27	0	0.27	0
40	Epidermoide	A431	0.017	12.1	0.41	0	0.97	4.8	1.745	0.5

En las Tablas 3.5 y 3.6 se puede observar, que en general, todos los compuestos analizados presentan una inhibición proteasómica menor que la del Bortezomib en todas las líneas celulares de cáncer estudiadas. Sin embargo, las estructuras *exo-D-43f* y *exo-D-43g* tienen una actividad comparable para las líneas HepG2 de cáncer de hígado, Jurkat de cáncer hematológico y A431 del epidermoide (entradas 19, 29 y 40, Tabla 3.5). Además, el compuesto *exo-D-43g* también tuvo una actividad comparable en el caso de la línea SK-HEP-1 de cáncer de hígado (entrada 20, Tabla 3.5). Asimismo, cabe destacar que para la línea HepG2 el valor de EC<sub>50</sub> del compuesto *exo-D-43g* no sólo es comparable al del Bortezomib si no que es incluso mejor (entrada 19, Tabla 3.5). Estos datos confirman lo esperado para dichas estructuras ya que ambas son las que presentaban los mejores resultados para la actividad *in vitro*.

Estos resultados son altamente prometedores ya que los datos de EC<sub>50</sub> obtenidos son muy bajos y similares a los del Bortezomib. Asimismo, presentan unos valores de viabilidad celular excelentes excepto para la línea HepG2 del cáncer de hígado, en la que el compuesto *exo-D-43f* tiene un valor de 29% y el *exo-D-43g* de 25% frente al 0% que presenta el Bortezomib (entrada 19, Tabla 3.5). Si bien para la línea SK-HEP-1 del mismo cáncer (entrada 20, Tabla 3.5) y para la línea A431 del cáncer epidermoide (entrada 40, Tabla 3.5), ambas estructuras *exo-D-43g* y *exo-D-43f* presentan un valor de 0% de viabilidad.

Por otro lado, como puede comprobarse en la Tabla 3.6, los compuestos *exo-D-43h*, *endo-L-43a* y *exo'-L-43a*, no dieron en su mayoría resultados tan favorables como los esperados tras su estudio de actividad *in vitro*. También se pudo observar que, en general, no siguieron el orden observado en los datos de IC<sub>50</sub> (*exo'-L-43a* < *endo-L-43a* < *exo-D-43h*). Sin embargo, los tres dieron lugar a muy buenos valores de actividad para la línea HepG2 de cáncer de hígado (entrada 19, Tabla 3.6). Además, los tres tienen un valor de viabilidad de 0% para dicha línea, igual que el del Bortezomib (entrada 19, Tabla 3.6). En cuanto a la viabilidad celular de los compuestos analizados frente al resto de líneas celulares de cáncer, los datos fueron en general más dispares (Tablas 3.5 y 3.6).

En resumen, cabe concluir que estos resultados son prometedores para el posible tratamiento de ciertas líneas celulares de cáncer, a falta de otros estudios preclínicos.

### 3.4.3. Estudio farmacocinético

Con estos precedentes, se procedió a realizar un estudio farmacocinético de las estructuras candidatas más favorables, *exo-D-43c*, *exo-D-43f*, *exo-D-43g*, *exo-D-43h*, y *endo-L-43a*, para evaluar el sistema de administración adecuado y sus propiedades en el organismo.

Se comenzará con una pequeña introducción a la farmacocinética, se seguirá con la descripción de los resultados de la administración de los compuestos citados y se finalizará con una comparativa de dichos resultados.

#### 3.4.3.1. Introducción a la farmacocinética

La farmacocinética tiene como objeto la caracterización de los procesos de absorción y disposición (distribución, metabolismo y excreción) de los fármacos en el organismo, conocidos como procesos ADME.<sup>30</sup> El conocimiento de los procesos de absorción y disposición es necesario para cuantificar el efecto que tiene el paciente, la propia enfermedad y los factores ambientales sobre el fármaco. La información obtenida de los estudios farmacocinéticos es utilizada para la selección de la vía de administración y los regímenes de dosificación más adecuados.

De entre los parámetros farmacocinéticos de mayor relevancia en farmacología, cabe destacar los siguientes:

- La constante de eliminación ( $K_{el}$ ): equivale al valor absoluto de la pendiente de la recta que relaciona los logaritmos de las concentraciones plasmáticas frente a los tiempos, obtenida por regresión lineal simple. La constante de eliminación se puede definir como:

$$K_{el} = \frac{\textit{velocidad eliminación fármaco}}{\textit{cantidad de fármaco remanente en organismo}}$$

[Ecuación 3.1]

- La semivida de eliminación o tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ): es el tiempo que tarda la concentración de fármaco en disminuir a la mitad. Se calcula a partir de la constante de eliminación ( $K_{el}$ ), estimada a partir de la pendiente de la recta de la fase

<sup>30</sup> Gibaldi, M.; Perrier, D. Pharmacokinetics, 2<sup>nd</sup> Edn. Dekker: New York, 1982.

terminal. La semivida de eliminación se puede calcular a partir de la siguiente expresión:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_{el}}$$

[Ecuación 3.2]

- El volumen de distribución ( $V_d$ ), también conocido como volumen aparente de distribución: es un término farmacológico usado para cuantificar la distribución de un fármaco en el organismo. Se define como el volumen en el cual la cantidad administrada de fármaco necesitaría estar uniformemente distribuída para que en todos los órganos o compartimientos haya una concentración de éste igual a la que hay en el plasma sanguíneo. El volumen de distribución se puede calcular a partir de la siguiente ecuación:

$$V_d = \frac{D}{C_0}$$

[Ecuación 3.3]

Donde D es la dosis y  $C_0$  la concentración de fármaco en plasma a tiempo cero.

- El aclaramiento plasmático ( $CL_p$ ): es un parámetro que nos da idea de la velocidad de eliminación de un fármaco del organismo (aclaramiento sistémico) o de un órgano. Representa el volumen de sangre totalmente depurado de fármaco por unidad de tiempo. El aclaramiento plasmático relaciona la velocidad de eliminación del fármaco con una concentración plasmática al mismo tiempo. El aclaramiento plasmático se puede calcular a partir de la siguiente ecuación:

$$CL_p = \frac{V_d}{K_{el}}$$

[Ecuación 3.4]

- El área bajo la curva de niveles plasmáticos  $AUC_{0-\infty}$ : su valor es representativo de la cantidad de un fármaco que se incorpora, en forma inalterada, al organismo tras la administración de una determinada dosis.

- La biodisponibilidad absoluta o fracción biodisponible ( $F$ ): es la fracción de dosis administrada que accede a circulación sistémica. Su valor es directamente

proporcional al área bajo la curva de niveles plasmáticos. La biodisponibilidad absoluta puede determinarse a partir de la relación de los valores de las áreas bajo la curva de niveles plasmáticos normalizadas por las dosis administradas (oral e intravenosa) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$F = \frac{AUC_{0 \rightarrow \infty}^{oral} * Dosis^{iv}}{AUC_{0 \rightarrow \infty}^{iv} * Dosis^{oral}} * 100$$

[Ecuación 3.5]

El estudio farmacocinético de los compuestos *exo-D-43c*, *exo-D-43f*, *exo-D-43g*, *exo-D-43h* y *endo-L-43a* se llevó a cabo en Sai Life Sciences Ltd, India. Se utilizaron ratas macho Wistar de 8-12 semanas de edad y entre 200 y 250 gramos de peso. Los animales se manipularon de acuerdo con las guías provenientes de la “Comisión con el Propósito de Control y Supervisión de los Experimentos en Animales (CPCSEA)”.<sup>31</sup>

Las ratas se dividieron en dos grupos, de 3 ratas cada uno, correspondientes al modo de administración de las dosis (intravenoso u oral).

A partir de los niveles de los compuestos a analizar en plasma se construyeron las curvas de niveles a lo largo del tiempo. Los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron mediante un análisis no compartimental utilizando el programa Phoenix WinNonlin<sup>®</sup> (versión 6.3). La concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ) y el tiempo al cual se alcanza esta concentración ( $T_{max}$ ) se obtuvieron directamente de los datos experimentales.

Las áreas bajo la curva ( $AUC_{0 \rightarrow t}$  y  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ) se calcularon mediante la regla trapezoidal lineal. La constante de eliminación ( $K_{el}$ ), el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), el aclaramiento plasmático (CL) el volumen aparente de distribución ( $V_d$ ) y la biodisponibilidad absoluta (F) se calcularon utilizando las ecuaciones 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5.

Para más datos de la metodología utilizada en este estudio véase el apartado 5.1.2 de la sección experimental.

<sup>31</sup> (a) <http://envfor.nic.in/division/committee-purpose-control-and-supervision-experiments-animals-cpcsea>. (b) [http://icmr.nic.in/bioethics/final\\_cpcsea.pdf](http://icmr.nic.in/bioethics/final_cpcsea.pdf).

### 3.4.3.2. Resultados de la administración en rata de los compuestos *exo-D-43c*, *exo-D-43f*, *exo-D-43g*, *exo-D-43h* y *endo-L-43a*

En la Figura 3.12. se recogen los perfiles de concentración de los compuestos *exo-D-43c*, *exo-D-43f*, *exo-D-43g*, *exo-D-43h* y *endo-L-43a* a lo largo del tiempo tras la administración intravenosa de una dosis de 5 mg/kg (o 2.5 mg/kg en el caso de *exo-D-4f*) y la administración oral de una dosis de 20 mg/kg a las ratas.

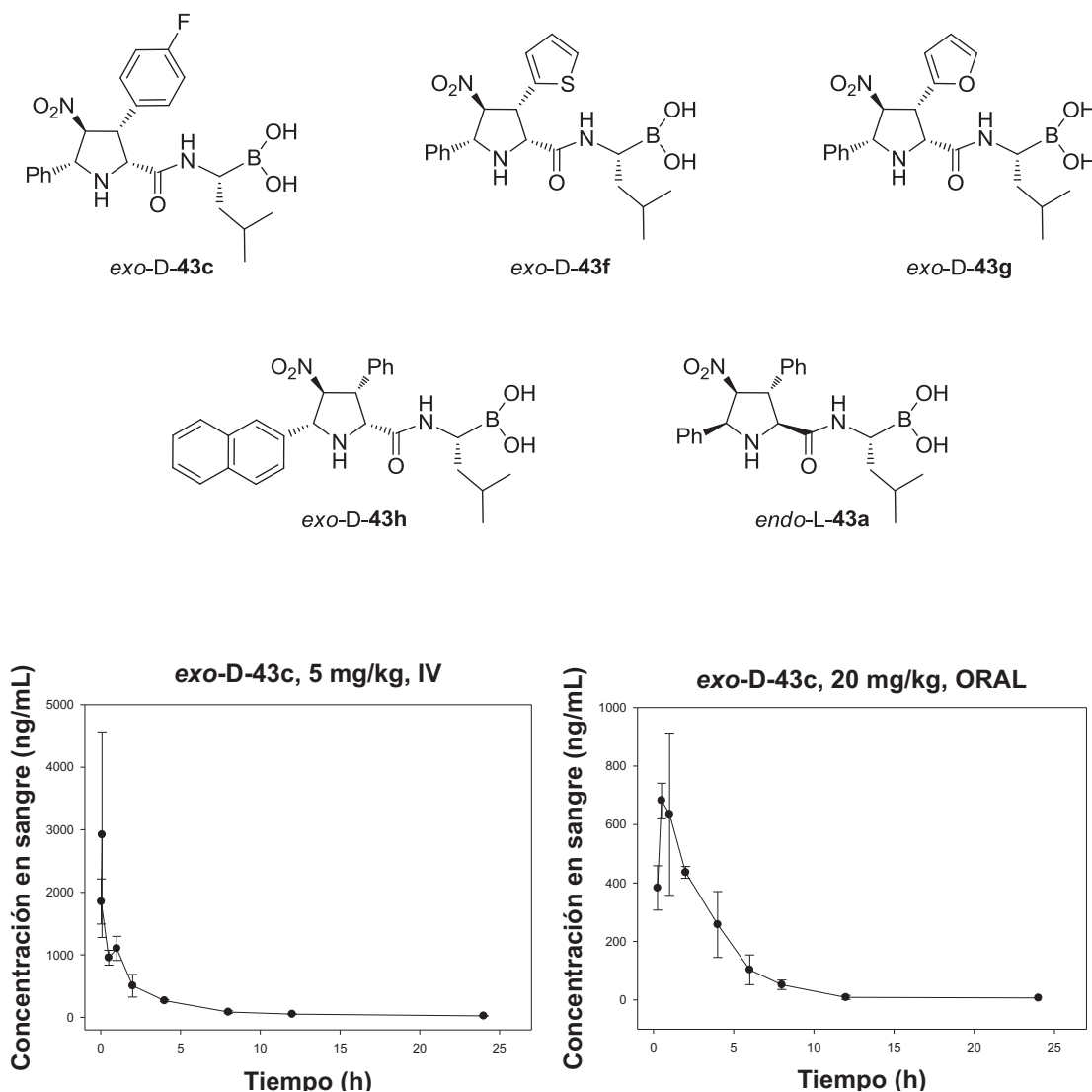


Figura 3.12. Niveles plasmáticos de los compuestos *exo-D-43c*, *exo-D-43f*, *exo-D-43g*, *exo-D-43h* y *endo-L-43a* medidos tras la administración intravenosa y oral a las ratas.

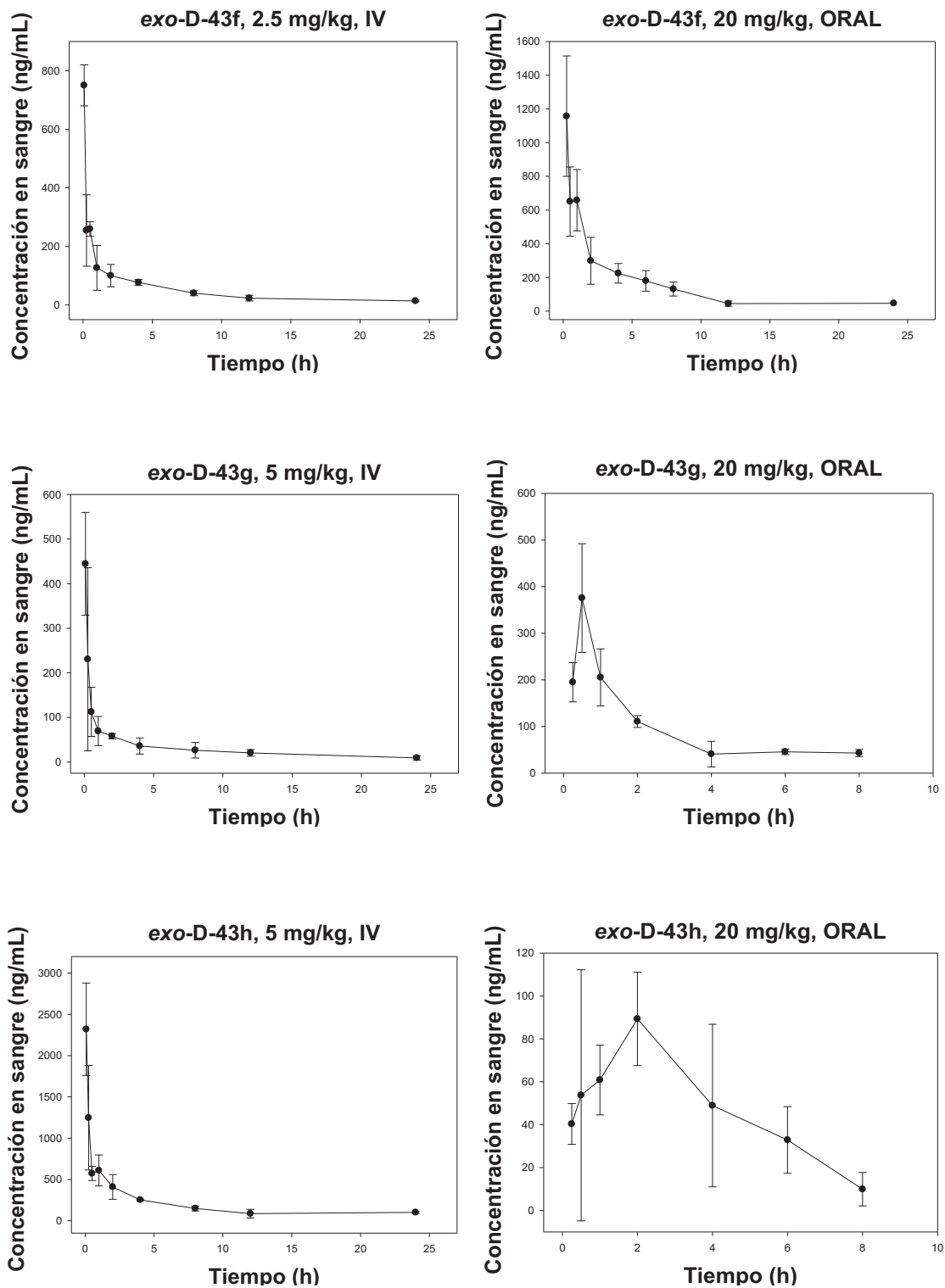


Figura 3.12. Niveles plasmáticos de los compuestos *exo-D-43c*, *exo-D-43f*, *exo-D-43g*, *exo-D-43h* y *endo-L-43a* medidos tras la administración intravenosa y oral a las ratas. (Cont.)

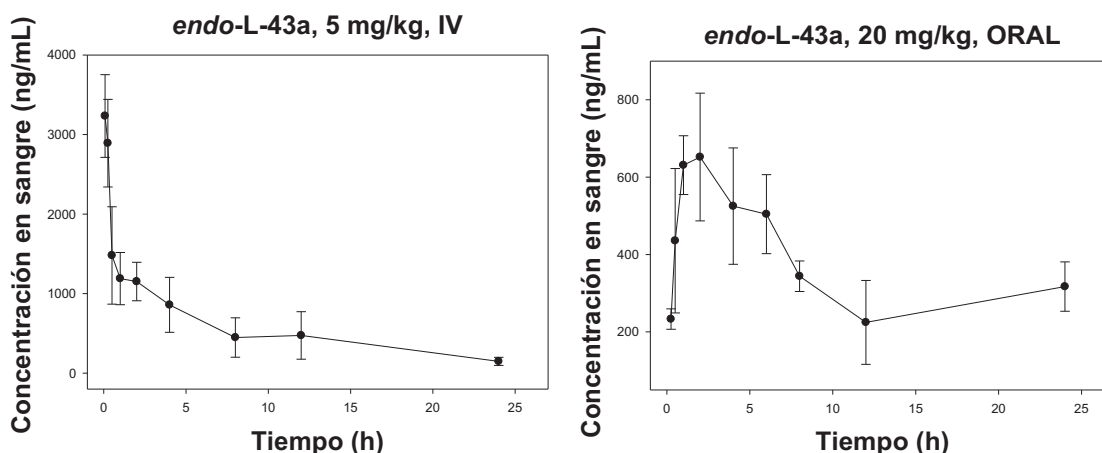


Figura 3.12. Niveles plasmáticos de los compuestos *exo-D-43c*, *exo-D-43f*, *exo-D-43g*, *exo-D-43h* y *endo-L-43a* medidos tras la administración intravenosa y oral a las ratas. (Cont.)

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos para ambas modalidades de administración se muestran en las Tablas 3.7 y 3.8 respectivamente.

Tabla 3.7. Parámetros farmacocinéticos de los compuestos *exo-D-43c*, *exo-D-43f*, *exo-D-43g*, *exo-D-43h* y *endo-L-43a* en rata tras la administración intravenosa de 5 mg/kg.

IV	<i>exo-D-43c</i>	<i>exo-D-43f</i> <sup>a</sup>	<i>exo-D-43g</i>	<i>exo-D-43h</i>	<i>endo-L-43a</i>
C <sub>max</sub>	2921.45	750.15	444.33	2319.17	3233.37
AUC <sub>0→t</sub> (ng h/mL)	4539.48	1203.42	748.30	4618.18	13368.68
AUC <sub>0→∞</sub> (ng h/mL)	4889.47	1246.39	904.42	NR	13897.52
T <sub>1/2</sub> (h)	9.81	4.85	11.96	3.74 <sup>b</sup>	4.47
CL (mL/min/kg)	17.10	33.52	98.10	15.39	6.09
V <sub>ss</sub> (L/kg)	6.44	13.30	79.74	10.97	3.04

<sup>a</sup>En este caso se administraron 2.5 mg/kg de compuesto.

<sup>b</sup>Promedio de dos valores considerado para el cálculo del tiempo de vida media.

NR valor no considerado por ser mayor al 20% de AUC.



Tabla 3.8. Parámetros farmacocinéticos de los compuestos *exo-D-43c*, *exo-D-43f*, *exo-D-43g*, *exo-D-43h* y *endo-L-43a* en rata tras la administración oral de 20 mg/kg.

ORAL	<i>exo-D-43c</i>	<i>exo-D-43f</i>	<i>exo-D-43g</i>	<i>exo-D-43h</i>	<i>endo-L-43a</i>
C <sub>max</sub>	682.16	1156.81	375.45	89.33	651.97
AUC <sub>0→t</sub> (ng h/mL)	2426.63	2967.68	724.79	383.30	8462.58
AUC <sub>0→∞</sub> (ng h/mL)	2450.99	3097.49	971.83	NR	8568.99
T <sub>1/2</sub> (h)	2.86	2.93	4.34	1.21 <sup>b</sup>	3.78
CL <sub>F</sub> (mL/min/kg)	143.22	113.70	354.67	721.46	38.99
Vd <sub>z</sub> (L/kg)	31.03	28.92	130.06	215.60	12.77
F <sup>a</sup> (%)	13	31	24	2	16

<sup>a</sup>AUC<sub>0→t</sub> considerado para el cálculo de la biodisponibilidad.

Teniendo en cuenta todos estos parámetros farmacocinéticos, podemos concluir que los compuestos *exo-D-43f* y *exo-D-43g*, debido a su mayor porcentaje de biodisponibilidad, pueden ser unos buenos candidatos para ser administrados por vía oral. Además, el *exo-D-43g* tiene el valor más elevado de volumen de distribución, lo que sugiere que este compuesto puede ser beneficioso para el tratamiento de tumores sólidos. A su vez, este último presenta el mayor tiempo de vida media de los cinco analizados, tanto para administración intravenosa como oral. Sin embargo, es el compuesto de eliminación más rápida y de menor concentración en plasma, siendo el *endo-L-43a*, por el contrario, el que más tiempo requiere para su completa eliminación y mayores niveles de concentración tiene. Para poder elegir un compuesto en base al estudio farmacocinético habría que llevar a cabo análisis de toxicidad.

#### 3.4.4. Test de Ames

La última etapa de estos estudios preliminares preclínicos consistió en llevar a cabo un estudio de mutagenicidad mediante el Test de Ames de los compuestos *exo-D-43c*, *exo-D-43f*, *exo-D-43g*, *exo-D-43h*, y *endo-L-43a*.

El Test de Ames se trata de un ensayo biológico diseñado para la detección del potencial mutagénico de sustancias o compuestos químicos a través de la inducción de

mutaciones reversas en el gen histidina de varias cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium* alteradas genéticamente.<sup>32</sup>

El test utiliza varias cepas de *Salmonella typhimurium* dependientes de histidina. Dichas cepas a su vez tienen diferentes mutaciones en varios genes implicados en la síntesis de histidina que actúan como focos para los mutágenos que dañan el ADN a través de diferentes mecanismos. Las cepas de *Salmonella* se cultivan con la mínima traza de histidina y con el compuesto químico cuyo efecto mutagénico se quiere comprobar. Esa pequeña cantidad de histidina permite a las bacterias comenzar a crecer y tener la oportunidad de mutar, pero cuando la histidina se agota, solo aquellas bacterias capaces de mutar (gracias a la capacidad del mutágeno), serán las únicas que sobrevivan y formen colonias.

Como *screening* de mutagenicidad de los compuestos sintetizados se utilizó una versión reducida del Test de Ames. En nuestro caso se usaron 2 cepas de *Salmonella Typhimurium*, TA 98 y TA 100. En ningún caso dicho ensayo dio resultado positivo, por lo tanto ningún compuesto de los analizados presenta potencial mutagénico.

---

<sup>32</sup> Flamand, N.; Meunier, J. R.; Meunier, P. A.; Agapakis-Caussé, C. *Toxicology in Vitro*, **2001**, *15*, 105-114.

4

*Conclusiones*



De los estudios experimentales descritos en el capítulo 3 sobre la síntesis de análogos al Bortezomib con restricción conformacional en su estructura se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- Se han sintetizado por vez primera dos ácidos borónicos con unidad de triazol, diastereoisómeros entre sí y análogos al Bortezomib (**1** y **2**). Para ello ha sido necesaria la obtención de sus precursores, un alquino terminal con segmento pirazínico y amida en su estructura (**5**) y dos azidas con grupo borónico protegido (**10** y *ent*-**10**).

2.- Se han llevado a cabo cicloadiciones (3+2) diastereo- y enantioselectivas entre  $\alpha$ -iminoésteres y alquenos  $\pi$ -deficientes catalizadas por la sal  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$  y los ligandos quirales NH-EhuPhos-**22** y NMe-EhuPhos-**31**. Estos ligandos sí han permitido la síntesis diastereodivergente de los correspondientes ésteres de prolinas (**35** y **38**) densamente sustituidas, obteniéndose los isómeros *exo* gracias al empleo de los ligandos NH-EhuPhos-**22** y sus análogos *endo* al utilizar los NMe-EhuPhos-**31**. Para ello ha habido que sintetizar los dos enantiómeros de estos ligandos.

3.- Se ha llevado a cabo el acoplamiento peptídico de los correspondientes ácidos **39** ó **40** con distintos grupos electrófilos: el aminoboronato **15**, las dos  $\beta$ -lactonas **46** y **51** o el nitroalqueno **59a**, generándose por vez primera 18 ácidos borónicos (**43** y **44**), dos  $\beta$ -lactonas (**48a** y **52a**) y un nitroalqueno (**59a**) con un anillo pirrolidínico en su estructura. En el caso del nitroalqueno se consiguió el compuesto mesilado en el nitrógeno del anillo de pirrolidina.

4.- Se ha evaluado la actividad biológica *in vitro* de los ácidos borónicos **1**, **2**, **43** y **44**, así como de las  $\beta$ -lactonas **48a** y **52a** y el nitroalqueno **59a**. Los compuestos que dieron mejores resultados fueron los ácidos borónicos con anillo de pirrolidina en su estructura, siendo el resto casi inactivos. Se ha demostrado que preferiblemente los ácidos borónicos **43** deben tener configuración *R* y un sustituyente aromático en el C3 para una mayor actividad biológica *in vitro* como inhibidores de proteasoma. Los compuestos **43** que mejores resultados han mostrado, en orden de menor a mayor valor de  $\text{IC}_{50}$  son: *exo*-D-**43g** < *exo*-D-**43f** < *exo*-D-**43c** < *exo*'-L-**43a** < *exo*-D-**43a** < *exo*-D-**43i** < *endo*-L-**43a** < *exo*-D-**43h**, con datos comparables al del Bortezomib.

5.- Se han analizado los resultados de la evaluación de actividad biológica y viabilidad en 40 líneas celulares de cáncer de los compuestos *exo-D-43a*, *exo-D-43c*, *exo-D-43f*, *exo-D-43g*, *exo-D-43h*, *endo-L-43a* y *exo'-L-43a*. Los que mejores resultados han dado son el *exo-D-43g* y *exo-D-43f* para las líneas celulares HepG2 de cáncer de hígado, Jurkat de cáncer hematológico y A431 de cáncer epidermoide. Además, el compuesto *exo-D-43g* también mostró buenos datos en el caso de la línea SK-HEP-1 de cáncer de hígado. Ambas estructuras presentan valores de EC<sub>50</sub> y viabilidad celular comparables a los del Bortezomib, excepto para la línea HepG2, en la que los datos de viabilidad han sido algo superiores. Además los compuestos *exo-D-43h*, *endo-L-43a* y *exo'-L-43a* también han presentado valores de EC<sub>50</sub> y viabilidad celular comparables a los del Bortezomib para la línea celular HepG2.

# 5

## Sección Experimental

- 
- 5.1. Técnicas analíticas y reactivos químicos**
  - 5.2. Ensayos biológicos**
  - 5.3. Síntesis de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos**
    - 5.3.1. Procedimiento general para la síntesis del compuesto **4**: Homologación Seyferth-Gilbert o Modificación Bestmann-Ohira
    - 5.3.2. Síntesis del alquino **5**: acoplamiento peptídico del compuesto **4** y el ácido 2-Pirazinoico
    - 5.3.3. Protección de (+)-Pinanodiol y (-)-Pinanodiol
    - 5.3.4. Síntesis de los compuestos **9a** y *ent*-**9a**: Homologación de ésteres borónicos terciarios
    - 5.3.5. Síntesis de las azidas **10** y *ent*-**10**
    - 5.3.6. Cicloadición 1,3-dipolar “click” entre el alquino **5** y las azidas **10** y *ent*-**10**
    - 5.3.7. Desprotección de los ésteres borónicos **12** y **13**
  - 5.4. Síntesis del aminoboronato **15****
    - 5.4.1. Síntesis del compuesto sililado **14**
    - 5.4.2. Síntesis del aminoboronato **15**
  - 5.5. Síntesis Diastereoselectiva de pirrolidinas**
    - 5.5.1. Síntesis del compuesto **16**: Acoplamiento peptídico del compuesto **15** con *N*-Boc-Glicina
    - 5.5.2. Desprotección del grupo Boc del compuesto **16**
    - 5.5.3. Síntesis del derivado imínico **19**

- 5.6. Síntesis de los ligandos ferrocénicos quirales NH-EhuPhos-22 y NMe-EhuPhos-31**
- 5.6.1. Síntesis de los aldehídos quirales **29** y *ent*-**29**
  - 5.6.2. Síntesis de los ligandos quirales NMe-EhuPhos-**31**
  - 5.6.3. Síntesis de los  $\alpha$ -iminoésteres quirales **33** y *ent*-**33** y los ligandos quirales NH-EhuPhos-**22**
- 5.7. Síntesis de pirrolidinas altamente funcionalizadas mediante cicloadiciones (3+2) enantioselectivas entre iluros de azometino y alquenos electrodeficientes**
- 5.7.1. Método general de preparación de nitroalquenos aromáticos no comerciales **20**
  - 5.7.2. Procedimiento general para la preparación de los  $\alpha$ -iminoésteres **34**
  - 5.7.3. Método general para las reacciones de cicloadición (3+2) enantioselectivas entre  $\alpha$ -iminoésteres y alquenos electrodeficientes catalizadas por  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$  y los ligandos NMe-EhuPhos-**31** y NH-EhuPhos-**22**
    - 5.7.3.1. Síntesis de los cicloaductos *exo*-**35**
    - 5.7.3.2. Síntesis de los cicloaductos *endo*-**35** y *endo*-**38**
    - 5.7.3.3. Síntesis del cicloaducto *exo*'-L-**35a**
- 5.8. Síntesis de ácidos borónicos con estructura de pirrolidina**
- 5.8.1. Procedimiento general para la síntesis de los ácidos pirrolidínicos
    - 5.8.1.1. Síntesis de los ácidos *exo*-**39**: hidrólisis básica con NaOH
    - 5.8.1.2. Síntesis de los ácidos *endo*-**40**: hidrólisis básica con hidróxido de trimetilestano
    - 5.8.1.3. Síntesis del ácido *exo*'-L-**39a**: hidrólisis básica con hidróxido de trimetilestano
    - 5.8.1.4. Síntesis de los ácidos *endo*-**39**: tratamiento en medio ácido
  - 5.8.2. Procedimiento general para el acoplamiento peptídico de los ácidos pirrolidínicos **39** ó **40** y el aminoboronato **15**
  - 5.8.3. Procedimiento general para la desprotección borónica de los productos acoplados **21** y **42**
- 5.9. Síntesis de  $\beta$ -lactonas como electrófilos**
- 5.9.1. Síntesis de la  $\beta$ -lactona **48a**
  - 5.9.2. Síntesis de la  $\beta$ -lactona **52a**
    - 5.9.2.1. Ciclación de la *N*-Boc-D-Serina **49**
    - 5.9.2.2. Síntesis del tosilato **51**
    - 5.9.2.3. Acoplamiento peptídico del compuesto **51** y el ácido *exo*-D-**39a**
- 5.10. Síntesis de nitroalqueno como electrófilo**
- 5.10.1. Reducción del éster **53** al alcohol **54**
  - 5.10.2. Oxidación del alcohol **54** al aldehído **55**
  - 5.10.3. Síntesis del compuesto **56**: Reacción de Henry
  - 5.10.4. Desprotección del grupo Boc del compuesto **56**
  - 5.10.5. Acoplamiento peptídico del compuesto **57** y el ácido *exo*-D-**39a**
  - 5.10.6. Síntesis del nitroalqueno **59a**: Eliminación de McMurry
-



### 5.1. Técnicas analíticas y reactivos químicos

Los reactivos comerciales fueron utilizados sin purificación previa. Algunas de las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de argón y con disolventes anhidros (tetrahidrofurano y éter dietílico) obtenidos directamente del sistema Solvent Purification System (SPS-400-6) de la casa Innovative Technology. El resto de disolventes utilizados como acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, agua, *iso*-propanol, cloroformo, diclorometano, 1,4-dioxano, hexano, metanol, *N,N*-dimetilformamida y tolueno, se emplearon sin previa purificación al tratarse de disolventes con un grado de pureza superior al 99%.

Las fases orgánicas se secaron sobre sulfato sódico anhidro o sulfato magnésico anhidro y la eliminación de los disolventes a vacío se llevó a cabo en rotavapores IKA RV-HB10 y Büchi R-114 utilizando bombas de vacío Büchi VWR-CVC3000 y Büchi V-500.

Las destilaciones a presión reducida se realizaron en un aparato KugelRohr Büchi B-585 conectados a una bomba de vacío Vacubrand RZ5.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Büchi B-540 y no fueron corregidos.

**Cromatografía:** Las purificaciones mediante cromatografía en columna se llevaron a cabo empleando gel de sílice (Merck, Kiesegel 60, 230-400 mesh) y diferentes mezclas de disolventes. Se usaron placas de gel de sílice soportadas sobre vidrio (PLC Silica gel F254, 1mm) para realizar algunas purificaciones. La cromatografía en capa fina se llevó a cabo utilizando TLC-aluminio con 0.2 mm de gel de sílice Merck Kiesegel 60F-254 y Panreac silicagel 60F-254.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizó en un cromatógrafo Waters Delta Prep 4000, equipado con un detector ultravioleta con lámpara de deuterio ( $\lambda=254$  nm) modelo Waters 2487. Las muestras se disolvieron en disolventes de pureza válida para HPLC y se filtraron previamente a la inyección con filtros de 0.20  $\mu\text{m}$  de poro. La cromatografía líquida preparativa de alta resolución empleada para la purificación de productos se realizó con una columna Hichrom Kromasil Si60 (10  $\mu\text{m}$ ) de 25 cm x 3.5 cm. Las columnas de fase estacionaria quiral empleadas para medir los excesos enantioméricos mediante HPLC de forma analítica

fueron de la marca Daicel Chiralpack de tipo IA, IB y AD-H de 25 cm de longitud. Para la fase móvil se usaron disolventes (hexano, <sup>i</sup>PrOH, AcOEt y cloroformo) de pureza válida para HPLC.

**IR:** Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrofotómetro FT-IR Alpha de Bruker.

**Masas:** Los análisis de masas se han realizado en un cromatógrafo de líquidos ultrarrápido de Water modelo Acquity, UPLC-Espectrometría de Masas QTOF de Waters, modelo SYNAPTTM G2 HDMSTM. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrómetro de masas UPLC-DAD-QTOF de la casa comercial Waters Cromatografía S.A. con ionización por electrospray (ESI) en modo positivo. Se llevaron a cabo por la unidad de análisis de los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la UPV/EHU.

**Polarimetría:** La actividad óptica fue medida en un polarímetro *Jasco P-200* Perkin Elmer 243B y se expresan como valores específicos [ $\alpha$ ] (longitud de línea empleada: línea D del sodio) con indicación del disolvente, la temperatura y la concentración utilizadas (g/100 mL).

**RMN:** Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y <sup>31</sup>P fueron registrados en los siguientes espectrómetros: Bruker Avance Ultrashield 400 de 400 MHz y Bruker Avance Ultrashield 500 de 500 MHz. Los disolventes utilizados fueron acetona deuterada (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (acetona-*d*<sub>6</sub>), acetonitrilo deuterado (CD<sub>3</sub>CN), agua deuterada (D<sub>2</sub>O), cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>) y metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD). Los desplazamientos químicos,  $\delta$ , se expresan en partes por millón (ppm) con respecto a una referencia interna de trimetilsilano ( $\delta$ = 0.00ppm), o los propios (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO ( $\delta$ = 2.05 ppm), CD<sub>3</sub>CN ( $\delta$ = 1.94 ppm), D<sub>2</sub>O ( $\delta$ = 4.79 ppm), CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$ = 7.26 ppm), DMSO-*d*<sub>6</sub> ( $\delta$ = 2.50 ppm) o CD<sub>3</sub>OD ( $\delta$ = 3.31 ppm) para los espectros de <sup>1</sup>H. En cuanto al <sup>13</sup>C tanto la (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO ( $\delta$ = 206.26 ó 29.84 ppm), como el CD<sub>3</sub>CN ( $\delta$ = 118.26 ó 1.32 ppm), el CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$ = 77.16ppm), el DMSO-*d*<sub>6</sub> ( $\delta$ = 39.52 ppm) o el CD<sub>3</sub>OD ( $\delta$ = 49.00 ppm) se emplearon como referencia. Las constantes de acoplamiento, *J*, se expresan en Hz. El procesado y la edición de los espectros registrados se realizó mediante el programa MestReNova 8.1.2.

## 5.2. Ensayos biológicos

### Procedimiento de ensayo enzimático *in vitro*

La actividad inhibidora *in vitro* del proteasoma que presentan los compuestos descritos anteriormente se evaluó mediante cuantificación espectrofluorimétrica de AMC.

Los compuestos a testar y/o el vehículo se disolvieron en DMSO y se preincubaron con 2.5 mg/mL de enzima (proteasoma 20S de eritrocitos humanos) en tampón HEPES modificado de pH 7.5 y concentración final 1% de DMSO durante 15 minutos a 37 °C. La reacción se inició por adición de 10 µM de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC y se dejó durante otro periodo de incubación de 30 minutos a 37 °C.

La determinación de la liberación de AMC se midió espectrofotométricamente (excitación, 380 nm; emisión, 460 nm) y los valores de IC<sub>50</sub> se determinaron por un análisis de regresión no-lineal de mínimos cuadrados utilizando MathIQ™ (ID Business Solutions Ltd., Reino Unido).

La lactacistina se utilizó como control positivo.

### Procedimiento de ensayo enzimático en líneas celulares de cáncer

Las células se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC). Se descongelaron en sus medios de cultivo adecuados con suplementos (Tabla 5.1). Se pasaron a confluencia lavándolas una vez con HBSS libre de cationes seguido de una incubación de 3 minutos con una solución de tripsina ([0.5 µg/mL]/EDTA [0.2 µg/mL]) (Gibco-BRL, 15400054) en HBSS a 37 °C (excepto las líneas celulares no adherentes-hematológicas), y se transfirieron a sus medios de cultivo correspondientes con suplementos. Antes de la siembra a una concentración de células definida, las células se recuperaron en el medio, se centrifugaron, se recogieron en el medio y se contaron.

Las soluciones madre de los compuestos enviados se prepararon en DMSO.

Tabla 5.1. Medios de cultivo y suplementos para las células.

Línea celular	Fuente	Medio de cultivo	Células/pocillo
143B	ECACC-91112502	A	10000
A431	ECACC-85090402	B	10000
A549	ATCC-CCL-185	B	5000
BxPC-3	ECACC-93120816	B	10000
CCRF-CEM	ECACC-85112105	C	20000
COLO 205	ECACC-87061208	B	10000
Daoy	ECACC-58483215	B	5000
DU-145	ATCC-HTB-81	B	10000
HCT-116	ECACC-91091005	B	5000
HeLa	ECACC-93021013	B	10000
Hep-G2	ECACC-85011430	A	10000
HT-1080	ECACC-85111505	B	10000
HT-29	ECACC-91072201	B	10000
Jurkat	ECACC-88042803	B	10000
K562	ECACC-89121407	C	20000
LNCaP	ECACC-89110211	C	10000
LoVo	ATCC-CCL-229	B	10000
LS174T	ECACC-87060401	A	10000
MCF-7	ECACC-86012803	A	5000
MDA-MB-231	ECACC-92020424	B	10000
MDA-MB-435	ATCC-129	B	5000
MDA-MB-468	ATCC-HTB-132	B	5000
MIA PaCa-2	ECACC-85062806	B	10000
NCI-H1650	ATCC-CRL-5883	C	5000
NCI-H1975	ATCC-CRL-5908	C	5000
NCI-H358	ATCC-CRL-5807	C	10000
OVCAR-3	ATCC-HTB-161	B	10000
PANC-1	ECACC-87092802	B	5000
PC3	ECACC-90112714	B	10000
RAMOS	ECACC-85030802	C	10000
RCC 786-O	ATCC-CRL-1932	B	10000
RPMI-8226	ECACC-87012702	C	20000
RWP-1	ECACC-87012702	B	10000
SK-BR-3	ATCC-HTB-30	B	10000
SK-Hep-1	ECACC-91091986	A	5000
SK-Mel-28	ATCC-HTB-72	B	5000
SK-OV-3	ECACC-91091004	D	5000
SW480	ECACC-87092801	B	5000
T47D	ECACC-85102201	B	10000
U-373 MG	ATCC-HTB17-1055	B	5000
U-87 MG	ECACC-89081402	B	10000

A) EMEM + 2mM Glutamina + 1%Aminoácidos no esenciales + 10 SBF

B) DMEM alto en glucosa (4500 mg/l) + 10 SBF

C) RPMI + 2mM Glutamina + 10% SBF

D) McCoy + 2mM Glutamina – 15% SBF

En cada línea celular se determinaron para cada compuesto los valores de EC<sub>50</sub> tras 72 horas de tratamiento usando los métodos AlamarBlue<sup>®</sup> y/o Hexosaminidasa. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Los experimentos se llevaron a cabo en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Cultek) y las líneas celulares se sembraron a la densidad mencionada en la tabla anterior y se cultivaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurridas 24 horas, los medios se suplementaron con 100 µl/pocillo del compuesto a testar diluido a concentraciones finales variables, y se incubaron durante 72 horas. Después se añadió el reactivo AlamarBlue<sup>®</sup> (Biosource DAL1100) a cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 4 horas. En un lector de placas Cytofluor (Millipore) se leyó la intensidad relativa de fluorescencia a 535/590 nm (excitación/emisión) que se correlaciona con el número de células vivas. Después de leer la señal de AlamarBlue<sup>®</sup>, se midió la actividad hexosaminidasa según el siguiente protocolo: se eliminó el medio y las células se lavaron una vez con PBS. En cada pocillo se añadieron 60 µl de solución de sustrato (*p*-nitrofenol-*N*-acetil-beta-D-glucosaminida 7.5 nM [Sigma N-9376], citrato sódico 0.1 M, pH 5.0, 0.25% de Triton X-100) y se incubaron a 37 °C durante 1-2 horas; después de este tiempo de incubación, aparece un color amarillo brillante; a continuación, se revelaron las placas mediante la adición de 90 µl de solución de revelado (glicina 50 nM, pH 10.4; EDTA 5 mM), y se registró la absorbancia a 405 nM.

Para la determinación del EC<sub>50</sub>, los datos se representaron gráficamente utilizando GraphPad Prism 5.0, y las curvas de dosis-respuesta se ajustaron utilizando un modelo de regresión lineal con una ecuación dosis-respuesta sigmoideal (de pendiente variable).

#### **Procedimiento de ensayo del estudio farmacocinético**

Se utilizaron ratas macho Wistar de 8-12 semanas de edad y entre 200 y 250 gramos de peso. Las ratas se dividieron en dos grupos, de 3 ratas cada uno, correspondientes al modo de administración de las dosis (intravenoso u oral).

Los compuestos *exo*-D-43c, *exo*-D-43f, *exo*-D-43g, *exo*-D-43h y *endo*-L-43a se disolvieron en una mezcla de polietilenglicol 400 (PEG 400), propilenglicol (PG), glicerina y polisorbato 80 (Tween 80) en agua ultrapura tanto para la administración intravenosa como para la oral.

Las dosis administradas en el caso de las administraciones intravenosas fueron de 5 mg/kg en todos los casos excepto para el compuesto *exo*-D-**43f** (2.5 mg/kg) y la administración se llevó a cabo a través de la vena de la cola. A tiempos predeterminados (antes de administrar la dosis, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h y 24 h) se extrajeron muestras de sangre de 120 µL.

En los casos de las administraciones orales, se administraron dosis de 20 mg/kg y los tiempos de extracción de muestras de sangre fueron a: antes de administrar la dosis, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h y 24 h.

Las muestras se recogieron en micro-tubos que contenían K<sub>2</sub>EDTA (al 20%) como anticoagulante y se centrifugaron a 4000 r.p.m durante 10 min a 4 ± 2 °C y el plasma obtenido se congeló a -70 °C hasta su posterior análisis. El análisis de las muestras de plasma se determinó mediante HPLC/MS-MS.

Como se ha comentado en el apartado 3.4.3.1, a partir de los niveles de los compuestos **43** en plasma se contruyeron las curvas de niveles a lo largo del tiempo. Los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron mediante un análisis no compartimental utilizando el programa Phoenix WinNonlin<sup>®</sup> (versión 6.3). La concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ) y el tiempo al cual se alcanza esta concentración ( $T_{max}$ ) se obtuvieron directamente de los datos experimentales. Las áreas bajo la curva ( $AUC_{0 \rightarrow t}$  y  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ) fueron calculadas mediante la regla trapezoidal lineal. La constante de eliminación ( $K_{el}$ ), el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), el aclaramiento plasmático (CL) el volumen aparente de distribución ( $V_d$ ) y la biodisponibilidad absoluta (F) se calcularon utilizando las ecuaciones 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5.

#### **Procedimiento de ensayo del mini Test de Ames**

Se emplearon las cepas TA 98, que posee un tipo de mutación en el operón histidina D3052 y la cepa TA 100 que presenta la mutación en el operón histidina G46. Las cepas TA 98 y T 100 de la bacteria *Salmonella typhimurium* fueron inoculadas y cultivadas en la fase de crecimiento exponencial tardío. Tres concentraciones del compuesto a analizar (250 µg/placa, 100 µg/placa y 50 µg/placa) fueron combinadas con la cepa bacteriana y con agar en presencia y ausencia de la mezcla de activación enzimática (S9) y se vertieron en placas de agar glucosado. Un control negativo y controles positivos específicos a cada cepa fueron tratados de la misma manera y a las

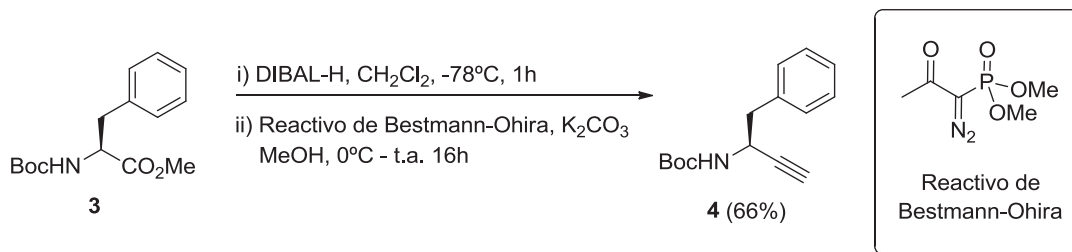
mismas concentraciones. Las placas se incubaron a 37 °C durante 72 horas y se contaron las colonias que habían crecido por placa utilizando un contador digital de colonias.

En este estudio se utilizaron como mutágenos estándar azida sódica (2 µg/placa para la cepa TA 98) y 2-Nitrofluoreno (1 µg/placa para la cepa TA 100) en los ensayos sin S9, y 2-Aminoantraceno (2 µg/placa) en las experiencias con S9 para ambas cepas.

Se consideran resultados positivos los incrementos del doble del número de colonias en comparación con el control. Se utilizó DMSO como disolvente tanto para la preparación de las muestras como para los controles.

### 5.3. Síntesis de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos

#### 5.3.1. Procedimiento general para la síntesis del compuesto 4: Homologación Seyferth-Gilbert o Modificación Bestmann-Ohira



Esquema 5.1. Homologación Seyferth-Gilbert o Modificación Bestmann-Ohira.

En un matraz esférico y bajo atmósfera inerte se disolvió el éster metílico de *N*-Boc-*L*-Fenilalanina **3** (500 mg, 1.8 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (4 mL) y la mezcla resultante se enfrió a -78°C. A continuación se añadió una disolución 1M en hexano de DIBAL-H (2.7 mL, 2.7 mmol) y se dejó agitando a esa temperatura durante 1 hora. Tras ese tiempo se añadió lentamente MeOH seco (2 mL) y se transfirió el matraz a un baño de agua y hielo (0°C). Seguidamente se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (500 mL, 3.6 mmol), el reactivo de Bestmann-Ohira (330 µL, 2.2 mmol) y MeOH seco (2 mL) dejando la mezcla resultante reaccionando a temperatura ambiente durante 16 horas.

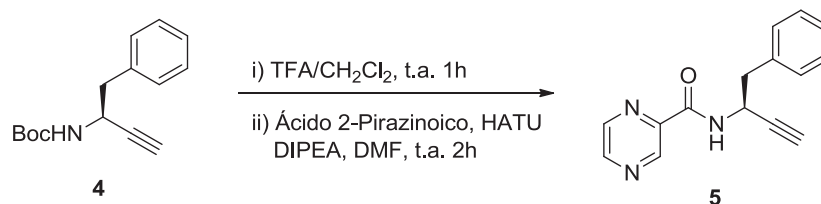
Pasado ese tiempo se diluyó en Et<sub>2</sub>O (20 mL) y se lavó la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) y la fase acuosa fue extraída dos veces más con Et<sub>2</sub>O (2x10 mL). La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl (10 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. A continuación se purificó mediante columna cromatográfica (AcOEt:Hexano = 1:4) obteniéndose el producto deseado **4** en forma de sólido blanco.

**(S)-terc-butil-(1-fenilbut-3-in-2-il) carbamato, 4:**<sup>1</sup> Rto.: 66%. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.34 - 7.23 (m, 5H), 4.68 (s<sub>a</sub>, 2H), 3.05 - 2.88 (m, 2H), 2.27 (s, 1H), 1.43 (s, 9H).

<sup>1</sup> Proteau-Gagné, A.; Rochon, K.; Roy, M.; Albert, P. J.; Guérin, B.; Gendron, L.; Dory, Y. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5267-5269.



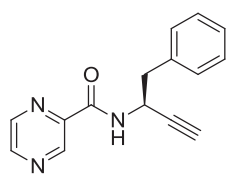
### 5.3.2. Síntesis del alquino **5**: acoplamiento peptídico del compuesto **4** y el ácido 2-Pirazinoico



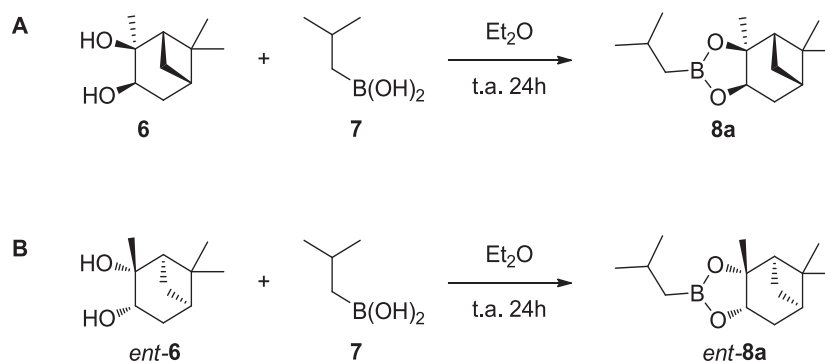
Esquema 5.2. Síntesis del alquino **5**.

En un matraz esférico se disolvió el derivado alquínico **4** sintetizado en la etapa anterior (450 mg, 1.83 mmol) en una disolución con proporción 1:1 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:TFA (19 mL) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida, se añadieron 5 mL de agua al matraz y el residuo aceitoso obtenido se extrajo con CHCl<sub>3</sub> (3x10 mL). Se juntaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniéndose la amina que se utilizó directamente en el siguiente paso.

En otro matraz esférico se disolvió el ácido 2-Pirazinoico (272 mg, 2.20 mmol) en DMF seca (7.5 mL) y se le adicionó HATU (767 mg, 2.01 mmol) y DIPEA (907 μL, 5.49 mmol). Dicha suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Al mismo tiempo se disolvió la amina sintetizada en el paso anterior en DMF seca (8 mL) y se le añadió DIPEA (303 μL, 1.83 mmol). Esta disolución se adicionó bajo atmósfera inerte al matraz que contenía ácido pirazinoico y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se trató con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) y la mezcla resultante se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3x25 mL). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purificó mediante columna cromatográfica (AcOEt:Hexano = 2:1) para dar lugar al producto deseado **5** puro en forma de sólido blanco.

**(S)-N-(1-fenilbut-3-in-2-il) pirazin-2-carboxamida, (5):**


Rto.: 80%. Sólido blanco, p.f.: 100-101 °C. IR (puro) 3376, 3350, 1660, 1513, 1021, 698  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 9.40 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.52 – 8.51 (m, 1H), 7.96 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.32 (s, 5H), 5.21 (dd,  $J$  = 13.4, 5.5 Hz, 1H), 3.15 – 3.08 (m, 2H), 2.34 (s, 1H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 162.2, 147.7, 144.7, 144.2, 142.8, 136.2, 130.0, 128.6, 127.3, 82.1, 72.9, 42.8, 41.6.  $[\alpha]_D^{25}$  : -7.4 (c 0.73,  $\text{CHCl}_3$ ). HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  Calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}$ : 252.1137; Hallado: 252.1141.

**5.3.3. Protección de (+)-Pinanodiol y (-)-Pinanodiol**


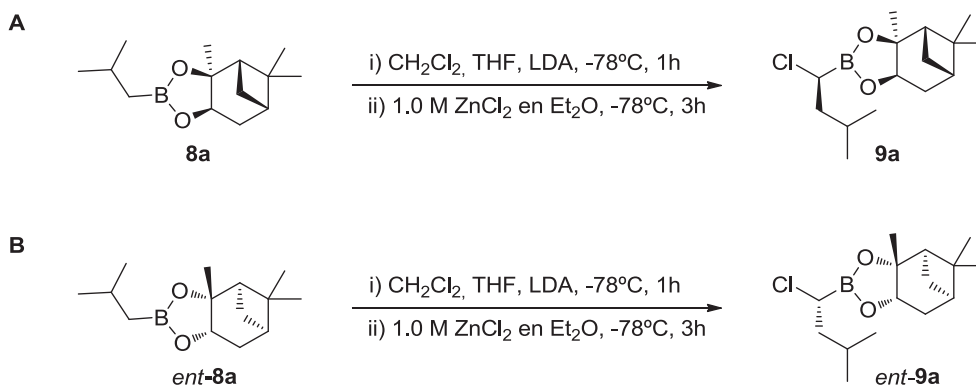
Esquema 5.3. (A) Protección del (+)-Pinanodiol. (B) Protección de (-)-Pinanodiol.

En un matraz esférico se disolvieron (+)-Pinanodiol **6** (5.0 g, 29.3 mmol) y ácido isobutil borónico **7** (3.0 g, 29.3 mmol) en  $\text{Et}_2\text{O}$  seco (65 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla resultante se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. Tras analizar el crudo de reacción mediante  $^1\text{H-RMN}$ , se purificó mediante columna cromatográfica ( $\text{AcOEt}:\text{Hexano} = 1:9$ ) obteniendo el producto deseado en forma de aceite amarillo transparente con un rendimiento del 97%. Para la síntesis de la estructura *ent-8a* se procedió de la misma forma partiendo de (-)-Pinanodiol *ent-6* (Rto. = 98%).

**2-(2-metilpropil)-(3a*S*,4*S*,6*S*,7a*R*)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol, 8a:**<sup>2</sup> Rto.: 97%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 4.28 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 2.33 - 2.27 (m, 1H), 2.21 - 2.15 (m, 1H), 1.96 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 1.88 - 1.85 (m, 1H), 1.78 (dt, *J* = 13.4, 6.7 Hz, 1H), 1.68 - 1.66 (m, 1H), 1.31 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.02 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 0.90 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 0.82 (s, 3H), 0.69 (dd, *J* = 7.0, 2.8 Hz, 2H).

**2-(2-metilpropil)-(3a*R*,4*R*,6*R*,7a*S*)-hexahidro-3a,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol, *ent*-8a:** Rto.: 98%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 4.25 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 2.37 - 2.31 (m, 1H), 2.26 - 2.19 (m, 1H), 2.08 - 2.02 (m, 1H), 1.93 - 1.81 (m, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.14 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 0.95 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 0.85 (s, 3H), 0.78 (dd, *J* = 7.1, 2.2 Hz, 2H).

#### 5.3.4. Síntesis de los compuestos 9a y *ent*-9a: Homologación de ésteres borónicos terciarios



Esquema 5.4. (A) Síntesis del compuesto 9a. (B) Síntesis del compuesto *ent*-9a.

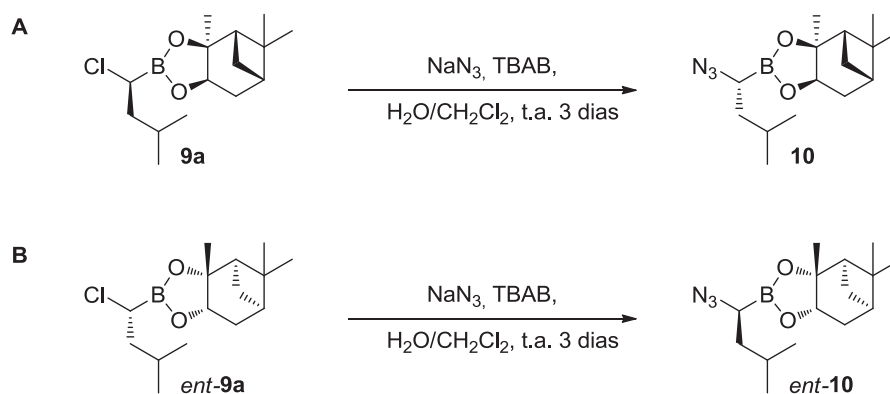
A una disolución de diisopropilamina (4.8 mL, 34.0 mmol) en THF seco (8 mL) con una punta de espátula de 1,10-fenantrolina como indicador y a 0°C se adicionó lentamente una disolución 2.5M de <sup>n</sup>BuLi en hexano hasta que la mezcla adquirió una tonalidad granate. A continuación se añadió la cantidad exacta de *n*-butil litio (13.6 mL, 34.0 mmol) y la suspensión resultante se agitó a esa temperatura durante 30 minutos.

<sup>2</sup> Dorsey, B. D.; Iqbal, M.; Chatterjee, S.; Menta, E.; Bernardini, R.; Bernareggi, A.; Cassarà, P. G.; D'Arasmo, G.; Ferretti, E.; De Munari, S.; Oliva, A.; Pezzoni, G.; Allievi, C.; Streponi, I.; Ruggeri, B.; Ator, M. A.; Williams, M.; Mallamo, J. P. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1068-1072.

Transcurrido ese tiempo dicha mezcla se transfirió lentamente a una disolución del producto anterior **8a** (6.7 g, 28.4 mol) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6.7 mL, 113.6 mmol) en THF seco (94 mL) y enfriada a -78°C. Tras 1 hora de agitación a -78°C, se adicionó lentamente una disolución 1.0M de ZnCl<sub>2</sub> anhidro en Et<sub>2</sub>O (45.4 mL, 45.4 mmol) y se agitó a esa temperatura durante 3 horas. A continuación se apagó el baño criostático y se dejó que la mezcla adquiriera temperatura ambiente muy lentamente manteniéndola en el baño. Pasado este tiempo se disolvió el crudo en hexano (135 mL) y se lavó con una disolución acuosa al 10% de NH<sub>4</sub>Cl (108 mL). La fase acuosa se extrajo varias veces con hexano (4x40 mL) y las fases orgánicas se juntaron, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. Se obtuvo el producto **9a** como un aceite marrón con un rendimiento del 90%, que presentó un espectro de <sup>1</sup>H-RMN de pureza adecuada y se utilizó inmediatamente en la siguiente etapa. Para la síntesis de la estructura *ent-9a* se procedió de la misma forma partiendo del *ent-8a* (Rto. = 95%).

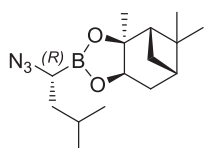
**2-[(1*S*)-1-cloro-3-metilbutil]-(3*aS*,4*S*,6*S*,7*aR*)-hexahidro-3*a*,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol, **9a**:**<sup>2</sup> Rto.: 90%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 4.42 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 3.59 (dd, *J* = 9.3, 6.4 Hz, 1H), 2.38 - 2.28 (m, 1H), 2.24 - 2.15 (m, 1H); 2.01 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 1.91 - 1.84 (m, 1H), 1.80 - 1.55 (m, 4H), 1.34 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.09 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 0.88 (dd, *J* = 8.0, 6.6 Hz, 6H), 0.82 (s, 3H).

**2-[(1*R*)-1-cloro-3-metilbutil]-(3*aR*,4*R*,6*R*,7*aS*)-hexahidro-3*a*,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol, *ent-9a*:** Rto.: 95%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 4.36 (dd, *J* = 8.8, 1.9 Hz, 1H), 3.53 (dd, *J* = 10.0, 5.9 Hz, 1H), 2.38 - 2.32 (m, 1H), 2.28 - 2.21 (m, 1H); 2.09 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 1.95 - 1.76 (m, 4H), 1.66 - 1.58 (m, 1H), 1.41 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.19 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.90 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.84 (s, 3H).

5.3.5. Síntesis de las azidas **10** y *ent*-**10**

 Esquema 5.5. Síntesis de la azida **10**.

En un matraz esférico se disolvió el  $\alpha$ -cloroboronato **9a** (3.0 g, 10.6 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 mL) y se adicionó bromuro de tetrabutilamonio (342 mg, 1.06 mmol) y azida sódica (1.34 g, 21.2 mmol) disuelta en agua (50 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días, tras los cuales se separaron las fases, se lavó la fase orgánica con agua (3x50 mL), con una disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (3x50 mL) y con una disolución acuosa saturada de  $\text{NaCl}$  (3x50 mL), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. Tras analizar el crudo de reacción mediante  $^1\text{H}$ -RMN, se purificó mediante columna cromatográfica (AcOEt:Hexano = 1:10) obteniendo el producto deseado **10** en forma de aceite. Para la síntesis de la estructura *ent*-**10** se procedió de la misma forma partiendo del compuesto *ent*-**9a**.

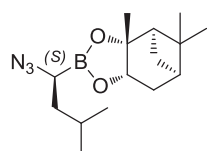
**(3a*S*,4*S*,6*S*,7a*R*)-2-((*R*)-1azido-3-metilbutil)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol (10):**



Rto.: 92%. Aceite amarillo transparente. IR (puro) 2953, 2921, 2089, 1369, 1029  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 4.35 (dd,  $J$  = 8.8, 1.7 Hz, 1H), 3.13 (dd,  $J$  = 9.9, 5.3 Hz, 1H), 2.39 - 2.31 (m, 1H), 2.29 - 2.22 (m, 1H), 2.08 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 1.96 - 1.86 (m, 2H), 1.84 - 1.76 (m, 1H), 1.68 - 1.61 (m, 1H), 1.50 - 1.43 (m, 1H), 1.42 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.11 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 1H), 0.94 (dd,  $J$  = 6.5, 5.2 Hz, 6H), 0.87 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 86.9, 78.6, 77.6, 51.2, 39.6, 39.3, 38.2, 35.4, 28.7, 27.1, 26.6, 25.7, 24.1, 23.2, 21.7.

$[\alpha]$  : +5.9 (c 0.95,  $\text{CHCl}_3$ ). HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  Calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{BN}_3\text{O}_2$ : 292.2118; Hallado: 292.2120.

**(3aR,4R,6R,7aS)-2-((S)-1azido-3-metilbutil)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol (*ent*-10):**



Rto.: 94%. Aceite amarillo transparente.  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

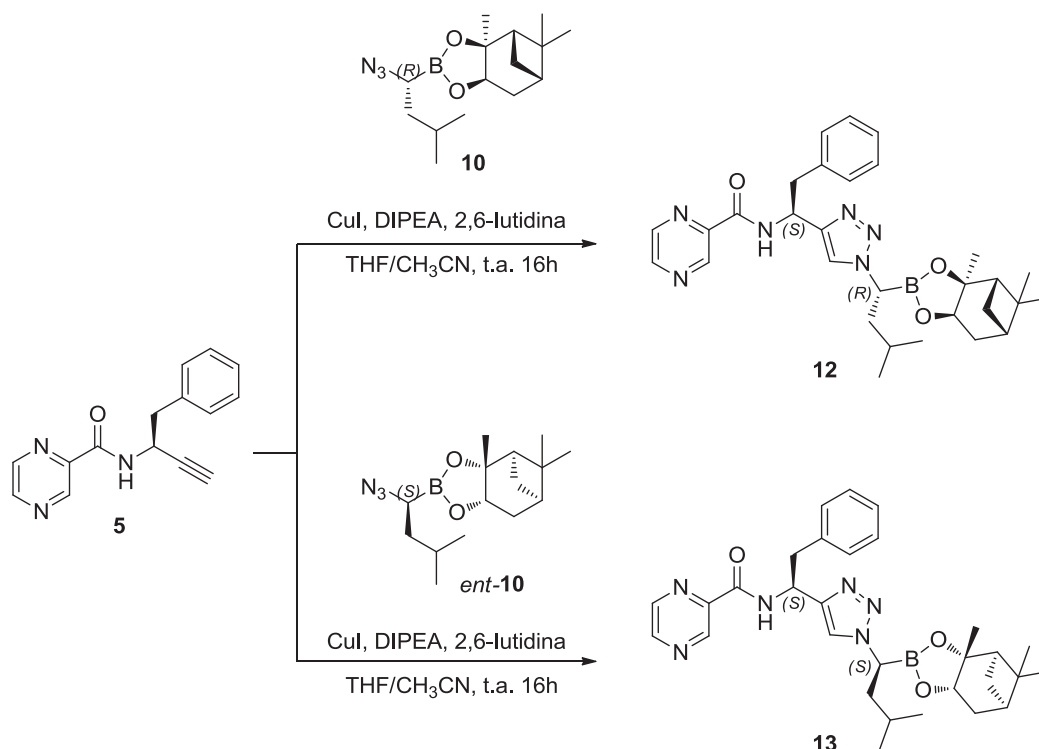
$\delta$  = 4.32 (dd,  $J$  = 8.9, 2.0 Hz, 1H), 3.09 (dd,  $J$  = 10.0, 5.4 Hz, 1H),

2.35 - 2.29 (m, 1H), 2.25 - 2.19 (m, 1H), 2.05 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 1.92

- 1.83 (m, 2H), 1.80 - 1.73 (m, 1H), 1.64 - 1.57 (m, 1H), 1.46 - 1.40 (m, 1H), 1.38 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.08 (d,  $J$  = 11.1 Hz, 1H), 0.91 (dd,  $J$  = 6.7, 5.3 Hz, 6H), 0.81 (s, 3H).

$[\alpha]$  : -7.5 (c 0.80,  $\text{CHCl}_3$ ).

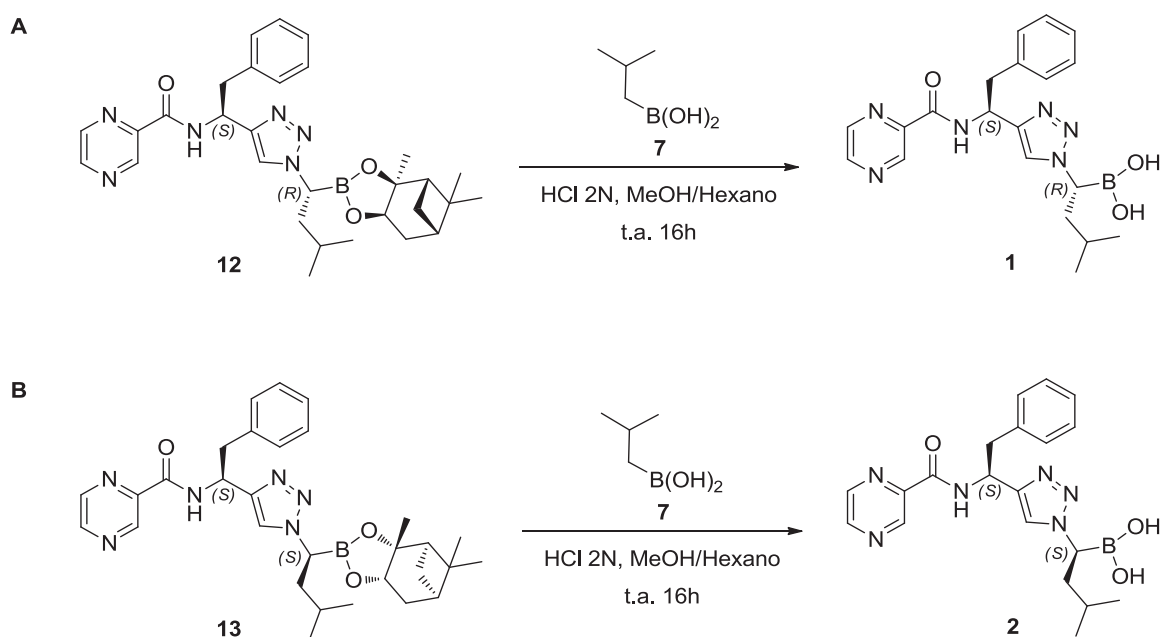
**5.3.6. Cicloadición 1,3-dipolar “click” entre el alquino 5 y las azidas 10 y *ent*-10**



Esquema 5.6. Cicloadición 1,3-dipolar “click” entre el alquino 5 y las azidas 10 y *ent*-10.

En un matraz esférico se disolvieron el alquino **5** (370 mg, 1.47 mmol) y la azida correspondiente **10** o *ent*-**10** (512.5 mg, 1.76 mmol) en 9 mL de una mezcla 1:5 de THF:CH<sub>3</sub>CN, previamente desgasificada bajo argón. A continuación se añadieron DIPEA (486  $\mu$ L, 2.94 mmol), 2,6-lutidina (342  $\mu$ L, 2.94 mmol) y CuI (28.6 mg, 0.15 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Tras esto se concentró el crudo de reacción hasta  $\frac{1}{4}$  del volumen, se trató con una disolución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl (7 mL) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x15 mL). La fase orgánica se lavó varias veces con una mezcla 3:7 de amoníaco:agua hasta observar la desaparición del color azul debido al cobre de la fase acuosa. Las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> y una disolución acuosa saturada de NaCl, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. Tras confirmar por <sup>1</sup>H-RMN que los productos **12** ó **13** presentaban una pureza adecuada se utilizaron directamente en la siguiente etapa.

### 5.3.7. Desprotección de los ésteres borónicos **12** y **13**

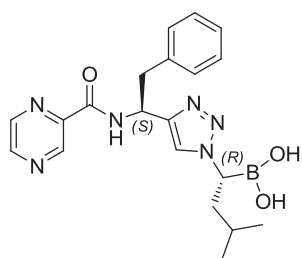


Esquema 5.7. (A) Desprotección del éster borónico **12**. (B) Desprotección del éster borónico **13**.

El crudo de reacción **12** ó **13** (797.4 mg, 1.47 mmol) resultante del acoplamiento peptídico de la etapa anterior se disolvió en 20 mL de una mezcla 1:1 de

metanol:hexano. Seguidamente se añadió ácido isobutil borónico **7** (383.5 mg, 3.7 mmol) y una disolución 2N de HCl en agua (1.47 mL, 2.94 mmol) y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. A continuación se separaron las dos fases y se concentró a presión reducida la fase metanólica. El residuo aceitoso obtenido se disolvió en AcOEt (30 mL) y se lavó con una disolución de NaHCO<sub>3</sub> al 8% en agua (3x10 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. Tras analizar el crudo de reacción mediante <sup>1</sup>H-RMN, se purificó mediante precipitación con AcOEt:Et<sub>2</sub>O:Hexano obteniéndose el producto puro **1** ó **2** en forma de sólido.

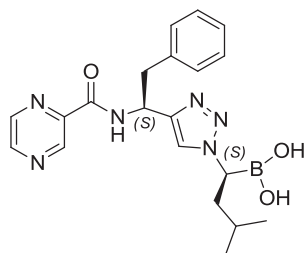
**Ácido ((R)-3-metil-1-(4-((S)-2-fenil-1-(pirazin-2-carboxamido)etil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)butyl) borónico (1):**



Rto.: 30% (2 reacciones). Sólido blanco. IR (puro) 3372, 2954, 1667, 1519, 1454, 1403, 1020, 699 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CH<sub>3</sub>OH) δ = 9.19 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 7.76 (s<sub>a</sub>, 1H), 7.22 - 7.12 (m, 6H), 5.59 (s<sub>a</sub>, 1H), 4.43 (s<sub>a</sub>, 1H), 3.35 - 3.26 (m, 2H, determinado por COSY y HSQC), 1.88 - 1.76 (m, 1H), 1.67 - 1.57 (m, 1H), 1.18 - 1.08 (m, 1H), 0.89 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.82 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, CH<sub>3</sub>OH) δ = 164.6, 148.7, 146.2, 144.9 (señal correspondiente a dos carbonos no equivalentes, determinado por HSQC), 138.8, 130.7 (señal correspondiente a dos carbonos no equivalentes, determinado por HSQC), 129.4, 127.7, 67.0, 49.1 (determinado por HSQC), 42.2, 42.1, 26.3, 23.7, 21.7. [α]<sub>D</sub> : -27.7 (c 0.60, CH<sub>3</sub>OH). HRMS [M+H]<sup>+</sup> Calculado para C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>BN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: 409.2159; Hallado: 409.2166.



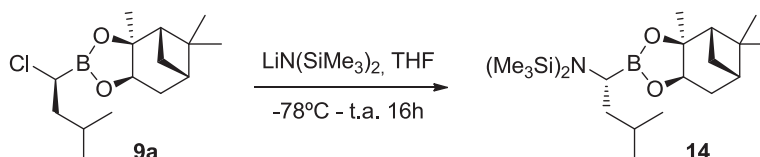
**Ácido ((S)-3-metil-1-(4-((S)-2-fenil-1-(pirazin-2-carboxamido)etil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)butyl) borónico (2):**



Rto.: 31% (2 reacciones). Sólido blanco. Sólido blanco. IR (puro) 3378, 2952, 1664, 1518, 1402, 1019, 700  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $\delta$  = 9.20 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.82 ( $s_a$ , 1H), 7.23 - 7.10 (m, 6H), 5.59 ( $s_a$ , 1H), 4.51 ( $s_a$ , 1H), 3.36 - 3.32 (m, 2H, determinado por COSY), 1.86 - 1.76 (m, 1H), 1.69 - 1.61 (m, 1H), 1.20 - 1.09 (m, 1H), 0.92 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3H), 0.82 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $\delta$  = 164.7, 148.8, 146.2, 145.0, 144.9, 138.8, 130.7 (señal correspondiente a dos carbonos no equivalentes, determinado por HSQC), 129.5, 127.8, 49.3 (determinado por HSQC), 42.1, 42.0, 26.2, 23.6, 21.6.  $[\alpha]_D^{25}$  : -11.8 (c 0.51,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  Calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{BN}_6\text{O}_3$ : 409.2159; Hallado: 409.2162.

#### 5.4. Síntesis del aminoboronato 15

##### 5.4.1. Síntesis del compuesto sililado 14



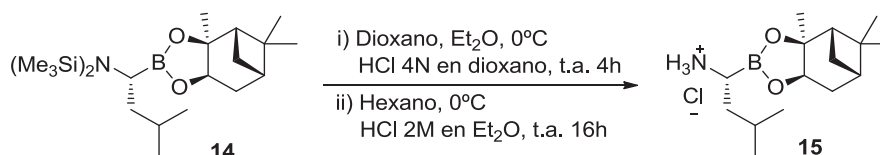
Esquema 5.8. Síntesis del compuesto sililado 14.

En un matraz esférico se disolvió el  $\alpha$ -cloroboronato **9a** (6.6 g, 23.4 mmol) en THF seco (72 mL), se enfrió la mezcla de reacción a  $-78^\circ\text{C}$  y se le adicionó lentamente una disolución 1.0 M en THF seco de bis(trimetilsilil) amiduro de litio (23.4 mL, 23.4 mmol). A continuación se apagó el baño criostático y se dejó que la mezcla adquiriera temperatura ambiente muy lentamente manteniéndola en el baño. Tras ese tiempo se concentró a presión reducida y se redisolvió en hexano seco (100 mL). La suspensión resultante se dejó agitando durante 2 horas a temperatura ambiente, se filtró sobre un lecho de celita, se lavó con hexano seco (3x30 mL) y se evaporó a presión reducida. El producto **14** se obtuvo como un aceite marrón que tras confirmar mediante  $^1\text{H}$ -RMN

que el producto presentaba una pureza adecuada se empleó inmediatamente en la siguiente reacción.

***N,N*-Bis(trimetilsilil)-(1*R*)-1-[(3*aS*,4*S*,6*S*,7*aR*)-hexahidro-3*a*,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutilamina, 14:**<sup>2</sup> Rto.: 93%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 4.33 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 2.60 - 2.56 (m, 1H), 2.34 - 2.26 (m, 1H), 2.22 - 2.15 (m, 1H), 1.95 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 1.88 - 1.84 (m, 1H), 1.80 - 1.65 (m, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.21 - 1.14 (m, 1H), 1.01 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 0.85 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.83 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.08 (s, 18H).

#### 5.4.2. Síntesis del aminoboronato 15



Esquema 5.9. Síntesis del aminoboronato 15.

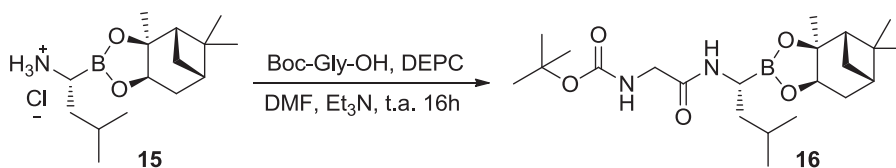
En un matraz esférico se disolvió el crudo obtenido en la etapa anterior **14** (8.2 g, 20.1 mmol) en 30 mL de una mezcla 1:2 de dioxano/Et<sub>2</sub>O y se llevó a 0°C. A continuación se añadió una disolución 4N de HCl en dioxano (20 mL, 80.3 mmol), se sacó el matraz del baño y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, tras las cuales se concentró a presión reducida. El residuo formado se disolvió en hexano seco (52 mL), se enfrió a 0 °C y se le adicionó una disolución 2M de HCl en Et<sub>2</sub>O (5 mL, 10.0 mmol). La mezcla resultante fue agitada a esa temperatura durante 1 hora, tras la cual se concentró a presión reducida y se redisolvió en hexano seco. La suspensión resultante fue agitada a temperatura ambiente 16 horas. El precipitado generado se filtró y se secó a vacío obteniéndose el producto deseado **15** en forma de sólido blanco.

**Clorhidrato de (1*R*)-1-[(3*aS*,4*S*,6*S*,7*aR*)-hexahidro-3*a*,5,5-trimetil-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il]-3-metilbutilamina, 15:**<sup>2</sup> Rto.: 83%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 7.85 (s<sub>a</sub>, 3H), 4.45 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 2.82 - 2.74 (m, 1H), 2.37 - 2.31 (m, 1H), 2.24 - 2.18 (m, 1H), 2.01 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 1.91 - 1.87 (m, 1H), 1.79 -

1.69 (m, 2H), 1.53 - 1.43 (m, 2H), 1.37 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.11 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 0.87 (dd,  $J = 6.6, 1.9$  Hz, 6H), 0.83 (s, 3H).

## 5.5. Síntesis Diastereoselectiva de pirrolidinas

### 5.5.1. Síntesis del compuesto 16: Acoplamiento peptídico del compuesto 15 con *N*-Boc-Glicina



Esquema 5.10. Acoplamiento peptídico del aminoboronato **15** y la *N*-Boc-Glicina.

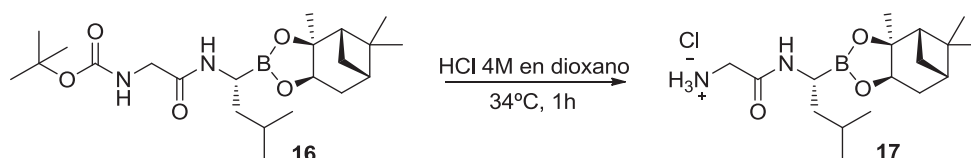
En un matraz esférico y bajo atmosfera inerte se disolvieron *N*-Boc-Glicina (115.6 mg, 0.66 mmol) y el clorhidrato de aminoboronato **15** descrito anteriormente (200 mg, 0.66 mmol) en DMF seca (2 mL). A continuación se bajó la temperatura a 0 °C y se adicionó lentamente una disolución de cianofosfonato de dietilo (119  $\mu$ L, 0.73 mmol) en DMF seca (330  $\mu$ L) y Et<sub>3</sub>N (276  $\mu$ L, 1.98 mmol). La suspensión se agitó 2 horas a 0 °C y 16 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo aceitoso en 66 mL de AcOEt. Se lavó la fase orgánica con una disolución acuosa 1N de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (3x10 mL), con agua (3x10 mL), con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3x10 mL) y con una disolución acuosa saturada de NaCl (3x10 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó bajo presión reducida. El producto de acoplamiento formado **16** se utilizó directamente en la siguiente etapa.

**terc-butyl [2-(((*R*)-3-metil-1-((3*aS*,4*S*,6*S*,7*aR*)-3*a*,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il)butil)amino)-2-oxoetil] carbamato, 16:**<sup>3</sup> Rto.: 97%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 6.26$  (s<sub>a</sub>, 1H), 5.11 (s<sub>a</sub>, 1H), 4.30 (dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, 1H), 3.79 (dd,  $J = 5.8, 2.7$  Hz, 2H), 3.25 - 3.18 (m, 1H), 2.36 - 2.30 (m, 1H), 2.22 - 2.16 (m,

<sup>3</sup> Bernareggi, A.; Cassara, P. G.; Chatterjee, S.; Ferretti, E.; Iqbal, M.; Menta, E.; Messina McLaughlin, P.; Oliva, A. Proteasome Inhibitors and Methods of using the same. WO2005/021558, 2004. (PCT/US2004/026407).

1H), 2.03 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 1.92 - 1.88 (m, 1H), 1.87 - 1.81 (m, 1H), 1.69 - 1.60 (m, 1H), 1.50 - 1.46 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.40 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.25 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 0.92 (dd,  $J = 6.5, 3.0$  Hz, 6H), 0.84 (s, 3H).

### 5.5.2. Desprotección del grupo Boc del compuesto 16

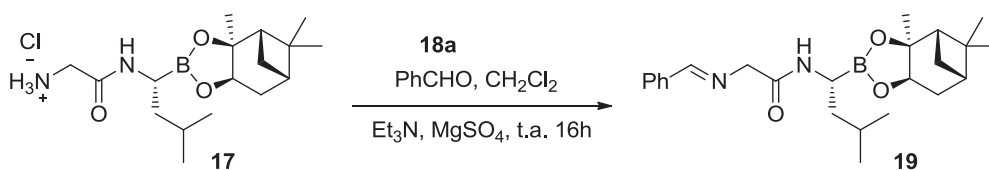


Esquema 5.11. Síntesis del aminoboronato 17.

El compuesto **16** (149 mg, 0.35 mmol) obtenido en la etapa anterior se disolvió en HCl 4M en dioxano (1.4 mL, 5.6 mmol) y se agitó a 34°C durante 1 hora. A continuación se evaporó la mezcla a presión reducida y se lavó varias veces con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y Et<sub>2</sub>O. Tras confirmar por <sup>1</sup>H-RMN que el producto presentaba una pureza adecuada se utilizó directamente en la siguiente etapa.

**Clorhidrato de 2-(((R)-3-metil-1-((3a*S*,4*S*,6*S*,7a*R*)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il)butil)amino)-2-oxoetano, 17:**<sup>3</sup> Rto.: 94%.  
<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 8.25$  (s<sub>a</sub>, 2H), 8.12 (s<sub>a</sub>, 1H), 4.32 (dd,  $J = 8.8, 2.2$  Hz, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.24 - 3.16 (m, 1H), 2.36 - 2.27 (m, 1H), 2.22 - 2.14 (m, 1H), 2.03 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 1.92 - 1.78 (m, 2H), 1.76 - 1.68 (m, 1H), 1.60 - 1.51 (m, 1H), 1.45 - 1.41 (m, 1H), 1.40 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.24 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 0.90 (dd,  $J = 6.6, 3.2$  Hz, 6H), 0.83 (s, 3H).

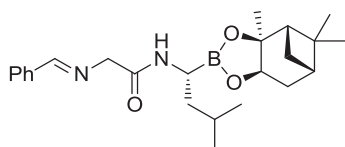
### 5.5.3. Síntesis del derivado imínico 19



Esquema 5.12. Síntesis del derivado imínico 19.

En un matraz esférico se disolvió el clorhidrato **17** (430.6 mg, 1.2 mmol) sintetizado en la etapa anterior en 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. A continuación se añadieron una punta de espátula de MgSO<sub>4</sub> y Et<sub>3</sub>N (167 μL, 1.2 mmol). La suspensión resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual se adicionó benzaldehído **18a** (102 μL, 1 mmol) y se dejó reaccionar durante 16 horas con agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se filtró la suspensión para eliminar el MgSO<sub>4</sub> y se lavó el filtrado con agua (3x2 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida, obteniéndose el producto en forma de aceite.

**2-((E)-bencilidenamino)-N-((R)-3metil-1-((3a*S*,4*S*,6*S*,7a*R*)-3a,5,5-trimetilhexahidro-4,6-metano-1,3,2-benzodioxaborol-2-il)butil) acetamida (**19**):**



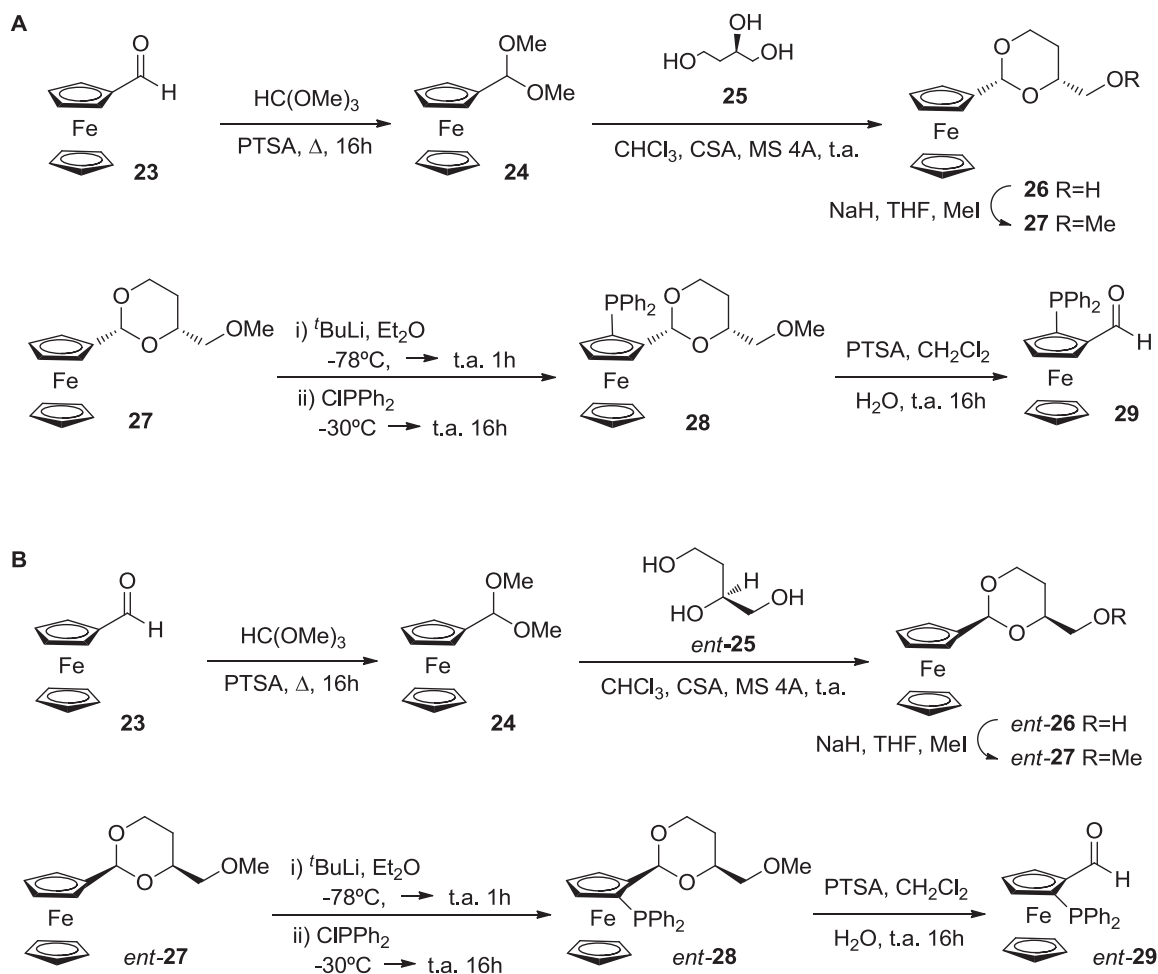
Rto.: 99%. Aceite amarillo oscuro. IR (puro) 2951, 2921, 1649, 1121, 692 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.30 (s, 1H), 7.78 - 7.73 (m, 2H), 7.50 - 7.43 (m, 3H), 7.17 (s<sub>a</sub>, 1H), 4.33 - 4.31 (m, 2H), 4.31 - 4.29 (m, 1H), 3.12 - 3.07 (m, 1H), 2.37 - 2.30 (m, 1H), 2.20 - 2.14 (m, 1H), 2.03 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 1.92 - 1.83 (m, 2H), 1.73 - 1.64 (m, 1H), 1.53 - 1.49 (m, 2H), 1.43 (s, 3H), 1.35 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 1.28 (s, 3H), 0.94 (dd, *J* = 6.5, 1.6 Hz, 6H), 0.85 (s, 3H). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 171.4, 163.9, 135.5, 131.5, 128.8, 128.3, 85.3, 77.6, 61.6, 51.7, 40.4, 40.1, 39.7, 35.8, 28.8, 27.3, 26.3, 25.9, 24.2, 23.1, 22.3. HRMS [M+H]<sup>+</sup> Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>BN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 411.2819; Hallado: 411.2827.

**5.6. Síntesis de los ligandos ferrocénicos quirales NH-EhuPhos-22 y NMe-EhuPhos-31**

**5.6.1. Síntesis de los aldehídos quirales **29** y *ent*-**29****

Los aldehídos quirales **29** y *ent*-**29** y todos los precursores necesarios para su síntesis se prepararon según una metodología sintética descrita en la bibliografía,<sup>4</sup> la cual se muestra a continuación.

<sup>4</sup> Riant, O.; Samuel, O.; Flessner, T.; Taudien, S.; Kagan, H. B. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6733-6745.



Esquema 5.13. (A) Síntesis del ferrocenocarbaldehído quiral 1,2-disustituido **29**. (B) Síntesis del ferrocenocarbaldehído quiral 1,2-disustituido *ent*-**29**.

**(2*R*,4*R*)-4-(Hidroximetil)-2-ferrocenil-1,3-dioxano (**26**):**

A una disolución de ferrocenocarbaldehído **23** (11g, 50 mmol) en ortoformiato de trimetilo (66 mL) se le añadió una cantidad catalítica de PTSA monohidratado (480 mg, 2.5 mmol). La disolución oscura se agitó a 80°C durante 15 horas. Transcurrido este tiempo se adicionó K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro y se mantuvo la agitación hasta alcanzar temperatura ambiente. La suspensión resultante se diluyó en Et<sub>2</sub>O, se filtró a través de un lecho de celita y se lavó con Et<sub>2</sub>O varias veces. A continuación se concentró a presión reducida y se secó en bomba de vacío durante 16 horas. El acetal **24** se aisló cuantitativamente como aceite marrón y se utilizó directamente en la siguiente reacción. En otro matraz esférico se secó el 1,2,4-butanotriol correspondiente **25** o *ent*-**25** (5.06 g, 47 mmol) con tolueno eliminando el disolvente en una línea de vacío durante 16 horas. Una vez seco

se disolvió en CHCl<sub>3</sub> (66 mL) y se adicionó tamiz molecular activado de 4 Å (30.2 g) y una cantidad catalítica de CSA (540 mg, 2.35 mmol). El acetal **24** obtenido anteriormente se disolvió en CHCl<sub>3</sub> (21 mL) y se añadió al matraz de la mezcla anterior (triol). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, tras las cuales se trató con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro y se filtró sobre un lecho de celita. Se lavó varias veces con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para arrastrar todo el producto y el filtrado se concentró a presión reducida. El crudo cristalino se recristalizó en 50 mL de tolueno y se dejó en el congelador durante 3 días. El precipitado formado se filtró, lavando con la mínima cantidad de tolueno frío y se secó, obteniéndose finalmente el producto deseado como un sólido amarillo.

**(2R,4R)-4-(Hidroximetil)-2-ferrocenil-1,3-dioxano, 26:** Rto.: 78%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 5.41 (s, 1H), 4.36 – 4.31 (m, 2H), 4.24 (dd, *J* = 11.5, 4.8 Hz, 1H), 4.17 (s, 5H), 4.14 (s, 2H), 3.98 - 3.87 (m, 2H), 3.72 - 3.60 (m, 2H), 2.00 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 1.86 (dd, *J* = 12.6, 5.0 Hz, 1H), 1.41 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H).

**(2S,4S)-4-(Hidroximetil)-2-ferrocenil-1,3-dioxano, ent-26:** Rto.: 80%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 5.41 (s, 1H), 4.34 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 4.24 (dd, *J* = 11.5, 4.6 Hz, 1H), 4.17 (s, 5H), 4.14 (s, 2H), 3.98 - 3.86 (m, 2H), 3.72 - 3.59 (m, 2H), 2.07 - 2.04 (m, 1H), 1.85 (ddd, *J* = 24.6, 12.6, 5.2 Hz, 1H), 1.44 - 1.36 (m, 1H).

**(2R,4R)-4-(Metoximetil)-2-ferrocenil-1,3-dioxano (27):**

En un matraz esférico previamente secado y bajo atmósfera inerte se disolvió NaH (60% en aceite mineral, 8.78 g, 29 mmol) en THF seco (15 mL) y se enfrió a 0 °C. El compuesto correspondiente **26** o *ent-26* (8.78 g, 29.05 mmol) se disolvió en THF seco (80 mL) y se adicionó lentamente sobre la suspensión anterior. A continuación se añadió CH<sub>3</sub>I (2.81 mL, 43.58 mmol) a la mezcla y se dejó agitando a temperatura ambiente durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, el exceso de NaH y CH<sub>3</sub>I se destruyó a 0°C mediante adición lenta de MeOH y H<sub>2</sub>O. Los disolventes se evaporaron a presión reducida obteniéndose un residuo que se disolvió en Et<sub>2</sub>O y se lavó con agua y una disolución acuosa saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró sobre un lecho de sílica, se lavó con Et<sub>2</sub>O y se evaporó el disolvente a

presión reducida, obteniéndose el acetal **27** o *ent-27* como aceite marrón con un rendimiento de reacción cuantitativo.

**(2R,4R)-4-(Metoximetil)-2-ferrocenil-1,3-dioxano, 27:**  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 5.37 (s, 1H), 4.36 – 4.31 (m, 2H), 4.22 (dd,  $J$  = 11.5, 4.5 Hz, 1H), 4.17 (s, 5H), 4.11 (s, 2H), 4.03 - 3.96 (m, 1H), 3.91 (td,  $J$  = 12.5, 2.6 Hz, 1H), 3.54 (dd,  $J$  = 10.2, 6.1 Hz, 1H), 3.45 - 3.39 (m, 4H), 1.78 (dd,  $J$  = 12.35, 5.0 Hz, 1H), 1.52 - 1.46 (m, 1H).

**(2S,4S)-4-(Metoximetil)-2-ferrocenil-1,3-dioxano, ent-27:**  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 5.37 (s, 1H), 4.33 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 4.22 (dt,  $J$  = 9.2, 4.5 Hz, 1H), 4.17 (s, 5H), 4.10 (s, 2H), 4.02 - 3.95 (m, 1H), 3.89 (td,  $J$  = 12.4, 2.4 Hz, 1H), 3.53 (dd,  $J$  = 10.4, 6.0 Hz, 1H), 3.47 - 3.37 (m, 4H), 1.78 (ddd,  $J$  = 24.8, 12.5, 5.1 Hz, 1H), 1.51 - 1.46 (m, 1H).

**(2R,4R,*R*<sub>p</sub>)-4-(Metoximetil)-2-[2-(difenilfosfino)-ferrocenil]-1,3-dioxano (28):**

En un matraz esférico previamente secado y bajo atmósfera inerte se introdujo el acetal correspondiente **27** o *ent-27* (28.9 mmol), se añadió  $\text{Et}_2\text{O}$  seco (150 mL) y se enfrió a  $-78^\circ\text{C}$ . Se adicionó goteando muy lentamente una disolución 1.7 M en hexano de  $t\text{-BuLi}$  (19 mL, 31.83 mmol) obteniéndose un precipitado de color amarillo-naranja. Tras 10 minutos de agitación a  $-78^\circ\text{C}$ , la disolución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. En este tiempo el precipitado amarillo se redisolvió y gradualmente se formó un precipitado naranja del acetal litiado, observándose en algunos casos aglomeración del precipitado. A continuación, la mezcla se enfrió a  $-30^\circ\text{C}$ , se añadió  $\text{Ph}_2\text{PCl}$  (6.42 mL, 34.73 mmol) y se agitó durante 10 minutos a esa temperatura y 16 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se adicionó una disolución 1N de NaOH en agua (11 mL) para eliminar el exceso de  $t\text{-BuLi}$ , se lavó con agua (3x30 mL) y una disolución acuosa saturada de NaCl (2x30 mL). La fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purificó mediante columna cromatográfica ( $\text{AcOEt}:\text{Hexano} = 1:4$ ) para dar lugar al producto puro **28** o *ent-28* en forma de sólido marrón oscuro.



**(2R,4R,R<sub>p</sub>)-4-(Metoximetil)-2-[2-(difenilfosfino)-ferrocenil]-1,3-dioxano, 28:** Rto.: 69%. <sup>31</sup>P-RMN (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = -20.14 (s). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.63 - 7.55 (m, 2H), 7.45 - 7.38 (m, 3H), 7.27 - 7.20 (m, 5H), 5.68 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 4.71 (s, 1H), 4.34 - 4.24 (m, 2H), 4.10 (s, 5H), 3.94 (td, *J* = 12.0, 2.7 Hz, 1H), 3.82 - 3.74 (m, 1H), 3.72 (s, 1H), 3.11 (s, 3H), 2.97 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 1.79 - 1.74 (m, 1H), 1.46 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H).

**(2S,4S,S<sub>p</sub>)-4-(Metoximetil)-2-[2-(difenilfosfino)-ferrocenil]-1,3-dioxano, ent-28:** Rto.: 73%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.57 - 7.51 (m, 2H), 7.36 - 7.31 (m, 3H), 7.20 - 7.14 (m, 5H), 5.65 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 4.68 (s, 1H), 4.25 - 4.19 (m, 2H), 4.05 (s, 5H), 3.87 (td, *J* = 12.3, 2.3 Hz, 1H), 3.73 (dtd, *J* = 7.2, 5.0, 2.3 Hz, 1H), 3.68 (s, 1H), 3.06 (s, 3H), 2.93 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H), 1.71 (qt, *J* = 16.1, 8.1 Hz, 1H), 1.40 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H).

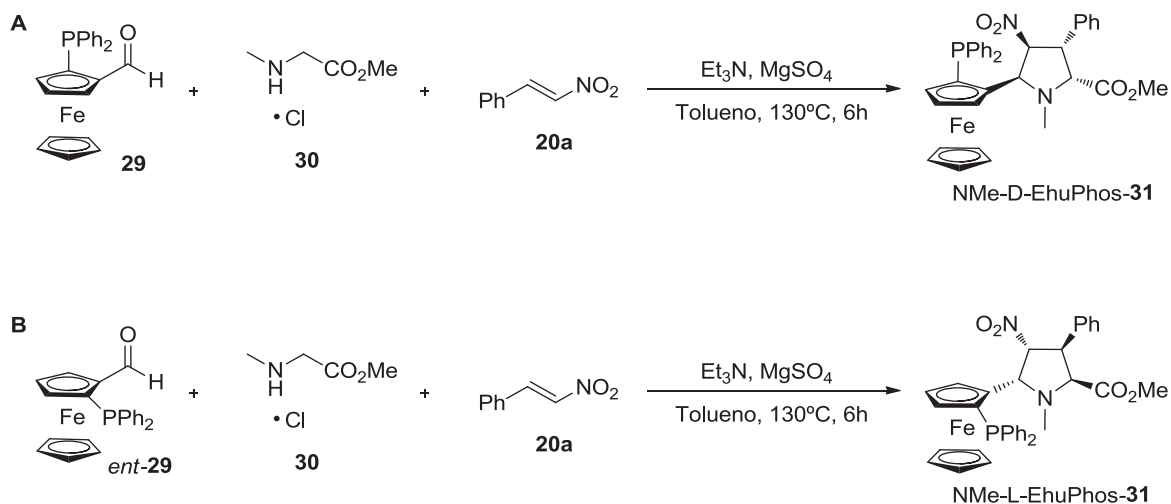
#### **(R<sub>p</sub>)-2-(Difenilfosfino)-ferrocenilcarboxaldehído (29)**

En un matraz esférico y bajo atmósfera inerte se disolvieron 10.35 g del acetal puro correspondiente **28** o *ent-28* (20.69 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> previamente desgasificado (130 mL) y se le añadió agua destilada (52 mL) y PTSA monohidratado (3.88 g, 20.05 mmol). La disolución bifásica oscura se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 16 horas hasta observar la desaparición del producto de partida (reacción seguida por TLC). Transcurrido este tiempo se evaporó el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a presión reducida y el crudo se disolvió en AcOEt y se lavó con agua (4x10 mL) y una disolución acuosa saturada de NaCl (2x10 mL). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se trituró en Et<sub>2</sub>O, aislando el aldehído quiral puro **29** o *ent-29* como un sólido rojo con un rendimiento cuantitativo.

**(R<sub>p</sub>)-2-(Difenilfosfino)-ferrocenilcarboxaldehído, 29:** <sup>31</sup>P-RMN (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = -22.34 (s). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 10.21 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 7.58 - 7.52 (m, 2H), 7.43 - 7.39 (m, 2H), 7.28 - 7.24 (m, 3H), 7.19 - 7.14 (m, 2H), 5.10 (dt, *J* = 2.6, 1.3 Hz, 1H), 4.70 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 4.21 (s, 5H), 4.06 (dt, *J* = 2.7, 1.3 Hz, 1H).

**(S<sub>p</sub>)-2-(Difenilfosfino)-ferrocenilcarboxaldehído, *ent*-29:** <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 10.21 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.59 - 7.49 (m, 2H), 7.44 - 7.37 (m, 2H), 7.29 - 7.21 (m, 3H), 7.22 - 7.09 (m, 2H), 5.12 (dt, *J* = 2.6, 1.4 Hz, 1H), 4.71 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.21 (s, 5H), 4.08 (dt, *J* = 2.6, 1.3 Hz, 1H).

### 5.6.2. Síntesis de los ligandos quirales NMe-EhuPhos-31<sup>5</sup>



Esquema 5.14. (A) Síntesis one-pot de la pirrolidina ferrocenil sustituida enantiopura NMe-D-EhuPhos-31. (B) Síntesis one-pot de la pirrolidina ferrocenil sustituida enantiopura NMe-L-EhuPhos-31.

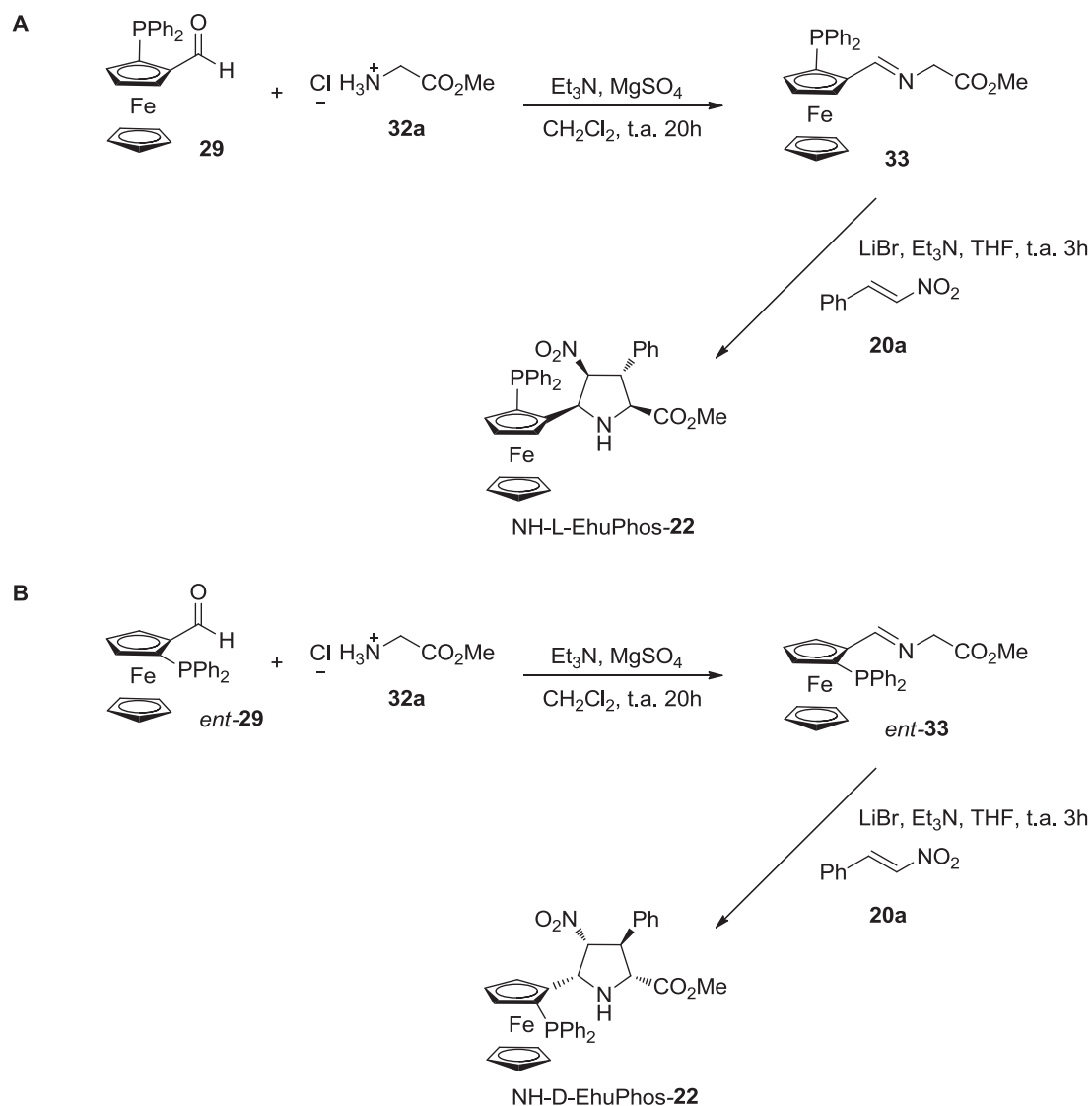
En un matraz esférico se disolvieron en 100 mL de tolueno el aldehído quiral correspondiente **29** o *ent*-**29** (2.90 g, 7.28 mmol), el clorhidrato del éster metílico de sarcosina **30** (1.32 g, 9.46 mmol) y *trans*-β-nitroestireno **20a** (1.41 g, 9.45 mmol). A continuación se añadieron MgSO<sub>4</sub> y Et<sub>3</sub>N (1.32 mL, 9.46 mmol). La mezcla se mantuvo a reflujo vigoroso durante 7 horas (se siguió la reacción por TLC). Transcurrido este tiempo se dejó que la disolución alcanzara temperatura ambiente, se filtró para eliminar el MgSO<sub>4</sub> y se lavó el filtrado con agua (3x55mL). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. Tras analizar el crudo de reacción por <sup>1</sup>H-RMN, se purificó mediante columna cromatográfica (AcOEt:Hexano = 1:4), obteniendo el producto deseado puro NMe-D-EhuPhos-**31** o NMe-L-EhuPhos-**31** en forma de sólido naranja.

<sup>5</sup> Conde, E.; Bello, D.; de Cózar, A.; Sánchez, M.; Vázquez, M. A.; Cossío, F. P. *Chem. Sci.* **2012**, 3,1486-1491.

**NH-D-EhuPhos-31:** Rto.: 54%.  $^{31}\text{P}$ -RMN (202 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = -23.15$  (s).  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 7.74 - 7.69$  (m, 2H), 7.42 - 7.34 (m, 5H), 7.28 - 7.19 (m, 6H), 7.06 (dd,  $J = 6.8, 1.9$  Hz, 2H), 5.42 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 5.20 (dd,  $J = 8.1, 4.9$  Hz, 1H), 4.48 (t,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 4.47 - 4.45 (m, 1H), 4.40 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 4.35 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.32 - 4.30 (m, 1H), 3.84 (s, 5H), 3.33 (s, 3H), 2.92 (s, 3H).

**NH-L-EhuPhos-31:** Rto.: 56%.  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 7.75 - 7.68$  (m, 2H), 7.43 - 7.34 (m, 5H), 7.26 - 7.19 (m, 6H), 7.08 - 7.04 (m, 2H), 5.42 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 5.22 (dd,  $J = 8.1, 5.0$  Hz, 1H), 4.48 (t,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 4.46 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H), 4.40 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 4.35 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.33 - 4.29 (m, 1H), 3.84 (s, 5H), 3.33 (s, 3H), 2.95 (s, 3H).

### 5.6.3. Síntesis de los $\alpha$ -iminoésteres quirales **33** y *ent*-**33** y de los ligandos quirales NH-EhuPhos-**22**<sup>5</sup>



Esquema 5.15. (A) Síntesis del  $\alpha$ -iminoéster **33** y de la pirrolidina ferrocenil sustituida enantiopura NH-L-EhuPhos-**22**. (B) Síntesis del  $\alpha$ -iminoéster *ent*-**33** y de la pirrolidina ferrocenil sustituida enantiopura NH-D-EhuPhos-**22**.

#### (*E*)-*N*-((*R<sub>p</sub>*)-2-(Difenilfosfino)-ferrocenilmetilén)glicinato de metilo (**33**):

En un matraz esférico se disolvieron 1.37 g de clorhidrato del éster metílico de glicina **32a** (7.28 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (18 mL) y se le añadió una punta de espátula de MgSO<sub>4</sub> y Et<sub>3</sub>N (1.52 mL, 10.92 mmol). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora tras lo cual se le adicionó el aldehído quiral **29** (2.90 g, 7.28 mmol). La mezcla formada se dejó reaccionar a temperatura ambiente

durante 20 horas. Transcurrido este tiempo la suspensión se filtró para eliminar el MgSO<sub>4</sub> y el filtrado se lavo con agua (3x5 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener el producto puro en forma de aceite naranja, empleado directamente en la siguiente reacción.

**(E)-N-((R<sub>p</sub>)-2-(Difenilfosfino)-ferrocenilmetilen)glicinato de metilo, 33:** Rto.: 96%. <sup>31</sup>P-RMN (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = -22.34 (s). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.48 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.60 - 7.53 (m, 2H), 7.44 - 7.39 (m, 3H), 7.28 - 7.22 (m, 3H), 7.17 - 7.12 (m, 2H), 5.23 - 5.19 (m, 1H), 4.56 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 4.33 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 4.15 (s, 5H), 4.12 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 3.93 - 3.90 (m, 1H), 3.74 (s, 3H).

**(E)-N-((S<sub>p</sub>)-2-(Difenilfosfino)-ferrocenilmetilen)glicinato de metilo, ent-33:** Rto.: 92%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.47 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.59 - 7.53 (m, 2H), 7.42 - 7.39 (m, 3H), 7.25 - 7.21 (m, 3H), 7.18 - 7.12 (m, 2H), 5.20 (dt, *J* = 2.5, 1.3 Hz, 1H), 4.56 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.31 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 4.15 (s, 5H), 4.12 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 3.91 (dt, *J* = 2.5, 1.2 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H).

**(2S,3R,4S,5R)-5-((R<sub>p</sub>)-2-(difenilfosfino)ferrocenil)-3-fenil-2-metoxicarbonil-4-nitropirrolidina (22)**

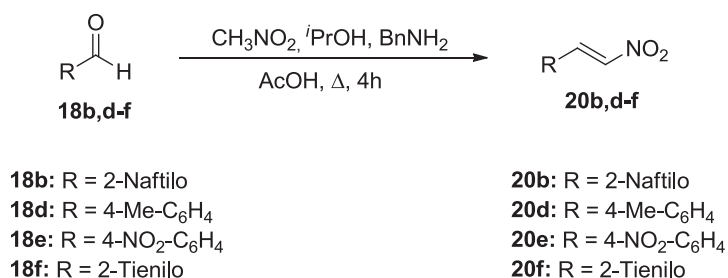
En un matraz esférico se agitó una mezcla del correspondiente α-iminoéster **33** o *ent-33* (3.30 g, 7.10 mmol), *trans*-β-nitroestireno **20a** (1.27 g, 8.52 mmol), LiBr (920 mg, 10.64 mmol) y Et<sub>3</sub>N (1 mL, 7.10 mmol) disueltos en THF seco (70 mL) a temperatura ambiente durante 3 horas (la reacción se siguió mediante TLC). Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente a presión reducida y se disolvió la mezcla resultante en AcOEt (200 mL), tras lo cual se lavó con una disolución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl (2x30 mL) y otra disolución acuosa saturada de NaCl (2x30 mL). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. Tras analizar el crudo de reacción por <sup>1</sup>H-RMN, se purificó mediante columna cromatográfica (AcOEt:Hexano = 1:4) y se precipitó en Et<sub>2</sub>O, obteniendo el producto deseado puro **22** o *ent-22* en forma de sólido amarillo.

**(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-((*R<sub>p</sub>*)-2-(difenilfosfino)ferrocenil)-3-fenil-2-metoxicarbonil-4-nitropirrolidina, 22:** Rto.: 62%. <sup>31</sup>P-RMN (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = -24.42 (s). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.61 - 7.56 (m, 2H), 7.42 - 7.37 (m, 3H), 7.35 - 7.19 (m, 8H), 7.08 - 7.03 (m, 2H), 4.94 (dt, *J* = 11.3, 5.6 Hz, 1H), 4.50 - 4.47 (m, 1H), 4.35 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.22 (dd, *J* = 5.5, 1.3 Hz, 1H), 4.17 (s, 5H), 4.04 - 3.98 (m, 2H), 3.88 - 3.86 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.31 - 3.24 (m, 1H).

**(2*R*,3*S*,4*R*,5*S*)-5-((*S<sub>p</sub>*)-2-(difenilfosfino)ferrocenil)-3-fenil-2-metoxicarbonil-4-nitropirrolidina, 22:** Rto.: 66%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.60 - 7.57 (m, 2H), 7.42 - 7.37 (m, 3H), 7.35 - 7.18 (m, 8H), 7.08 - 7.03 (m, 2H), 4.94 (dt, *J* = 11.4, 5.6 Hz, 1H), 4.50 - 4.47 (m, 1H), 4.35 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.22 (dd, *J* = 5.4, 1.2 Hz, 1H), 4.17 (s, 5H), 4.03 - 3.98 (m, 2H), 3.88 - 3.85 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.27 (dd, *J* = 10.8, 8.1 Hz, 1H).

## 5.7. Síntesis de pirrolidinas altamente funcionalizadas mediante cicloadiciones (3+2) enantioselectivas entre iluros de azometino y alquenos electrodeficientes

### 5.7.1. Método general de preparación de nitroalquenos aromáticos no comerciales 20



Esquema 5.16. Método general para la síntesis de los nitroalquenos aromáticos **20b,d-f**.

En un matraz esférico equipado con un refrigerante de reflujo se introdujeron 13 mmoles de aldehído correspondiente **18**, 52 mmoles de nitrometano, 1.58 mL de *iso*-propanol, 0.09 mL (0.84 mmoles) de bencilamina y 0.078 mL de ácido acético. La mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas. La disolución color rojizo obtenida se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se observó la formación de un

precipitado que se filtró y lavó con *iso*-propanol. Los diferentes nitroalquenos se recrystalizaron en etanol al 95%. Finalmente se obtuvieron por filtración unos sólidos que se dejaron secar al aire.

**(E)-2-(2-Nitrovinil)-naftaleno, 20b:**<sup>6</sup> Rto.: 70%. Sólido amarillo. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.20 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.94 - 7.88 (m, 3H), 7.73 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 7.65 - 7.56 (m, 3H).

**(E)-4-metil-β-nitroestireno, 20d:**<sup>7</sup> Rto.: 50%. Sólido amarillo. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.97 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 2.40 (s, 3H).

**(E)-4-nitro-β-nitroestireno, 20e:**<sup>8</sup> Rto.: 53%. Sólido amarillo. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.04 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H).

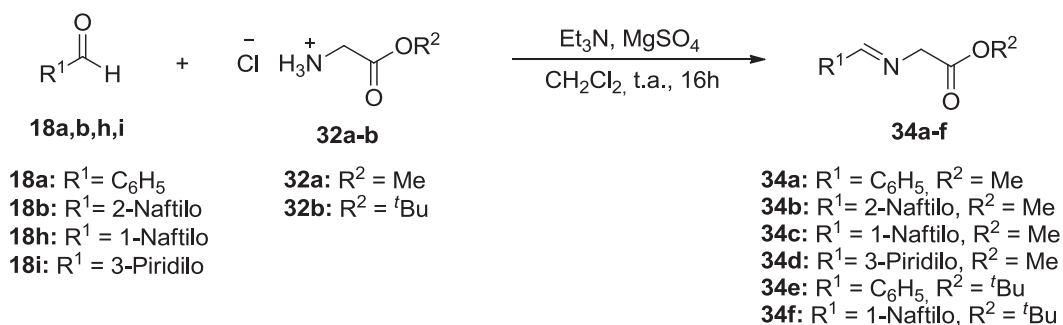
**(E)-2-(2-nitrovinil)-tiofeno, 20f:**<sup>9</sup> Rto.: 96%. Sólido marrón. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.14 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.45 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J* = 4.7, 4.2 Hz, 1H).

<sup>6</sup> Jakubec, P.; Cockfield, D. M.; Hynes, P. S.; Cleator, E.; Dixon, D. J. *Tetrahedron. Asymmetry*. **2011**, *22*, 1147-1155.

<sup>7</sup> Silvia Vivanco: “Estudio sobre el Mecanismo de la Cicloadición (3+2) entre Iluros de Azometino y Nitroalquenos. Aplicación a la Síntesis de Desintegrinas No Naturales”. Tesis Doctoral, Donostia-San Sebastián, **2002**.

<sup>8</sup> Oh, H. K.; Yang, J. H.; Sung, D. D.; Lee, I. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 101-105.

<sup>9</sup> Dorleta Otaegui: “Diseño, Síntesis, Evaluación de la Actividad Biológica y Farmacocinética de Nuevos Inhibidores de Desacetilasas de Histonas”. Tesis Doctoral, Donostia-San Sebastián, **2009**.

5.7.2. Procedimiento general para la preparación de los  $\alpha$ -iminoésteres 34

 Esquema 5.17. Procedimiento general para la síntesis de los  $\alpha$ -iminoésteres 34a-f.

En un matraz esférico se disolvieron 8.0 mmoles de clorhidrato del correspondiente  $\alpha$ -aminoéster **32** (metílico y *terc*-butílico) en 13 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. A continuación se añadieron una punta de espátula de MgSO<sub>4</sub> y 1.11 mL (8.0 mmoles) de Et<sub>3</sub>N. La suspensión resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 6.6 mmoles de aldehído correspondiente **18** y se dejó reaccionar durante 16 horas con agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se filtró la suspensión para eliminar el MgSO<sub>4</sub> y se lavó el filtrado con agua (3x13 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida. Los  $\alpha$ -iminoésteres obtenidos presentaron espectros de <sup>1</sup>H-RMN satisfactorios y se utilizaron directamente en las siguiente reacción.

**(E)-N-(Benciliden)glicinato de metilo, 34a:**<sup>10</sup> Rto.: 84%. Aceite incoloro. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 8.30 (s, 1H), 7.78 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 2H), 7.47 - 7.40 (m, 3H), 4.42 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H).

**(E)-N-[(2-Naftil)metilen]glicinato de metilo, 34b:**<sup>10</sup> Rto.: 96%. Sólido Amarillo. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 8.45 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.92 - 7.82 (m, 3H), 7.58 - 7.45 (m, 2H), 4.48 (s, 2H), 3.80 (s, 3H).

**(E)-N-[(1-Naftil)metilen]glicinato de metilo, 34c:**<sup>10</sup> Rto.: 92%. Aceite amarillo. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 8.93 (s, 1H), 8.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.60 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.56 - 7.50 (m, 2H), 4.54 (s, 2H), 3.81 (s, 3H).

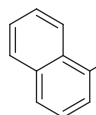
<sup>10</sup> Wang, C. -J.; Xue, Z. Y.; Liang, G.; Lu, Z. *Chem. Commun.* **2009**, 2905-2907.



**(E)-N-[(3-Piridil)metilen]glicinato de metilo, 34d:**<sup>10</sup> Rto.: 98%. Aceite amarillo.  
<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.90 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.68 (dd, *J* = 4.7, 1.6 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.20 - 8.17 (m, 1H), 7.37 (dd, *J* = 7.8, 4.8 Hz, 1H), 4.45 (d, *J* = 1.1 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H).

**(E)-N-(Benciliden)glicinato de *terc*-butilo, 34e:**<sup>11</sup> Rto.: 99%. Aceite Amarillo.  
<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.27 (s, 1H), 7.78 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 2H), 7.44 - 7.39 (m, 3H), 4.31 (d, *J* = 1.1 Hz, 2H), 1.50 (s, 9H).

**(E)-N-[(1-Naftil)metilen]glicinato de *terc*-butilo (34f):**<sup>12</sup>



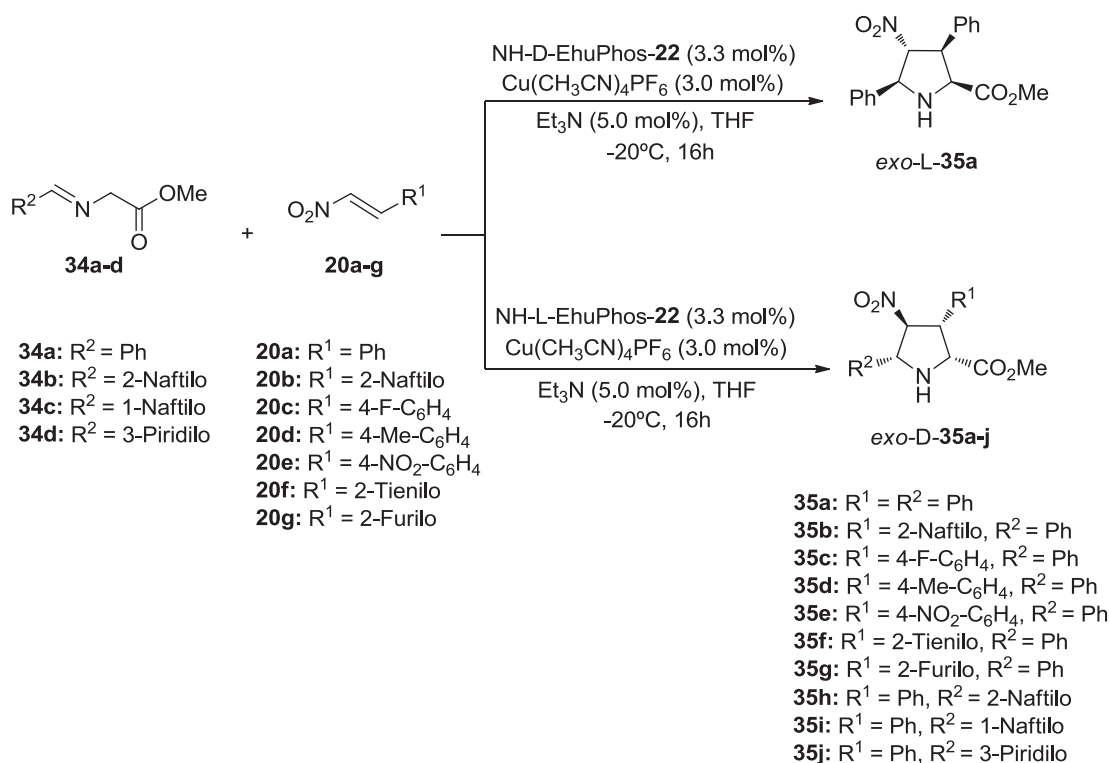
Rto.: 98%. Aceite amarillo. IR (puro) 2976, 1736, 1148, 773. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.90 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.88 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 11.2, 4.0 Hz, 1H), 7.55 - 7.48 (m, 2H), 4.44 (s, 2H), 1.53 (s, 9H).  
<sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 169.6, 164.8, 134.0, 131.6, 131.5, 129.4, 128.7, 127.5, 126.2, 125.3, 124.6, 81.6, 63.8, 28.3.

<sup>11</sup> Saito, S.; Tsubogo, T.; Kobayashi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5364-5365.

<sup>12</sup> Chen, H.; Chen, Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, *33*, 848-853.

### 5.7.3. Método general para las reacciones de cicloadición (3+2) enantioselectivas entre $\alpha$ -iminoésteres y alquenos electrodeficientes catalizadas por $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$ y los ligandos NMe-EhuPhos-31 y NH-EhuPhos-22

#### 5.7.3.1. Síntesis de los cicloaductos *exo*-35



Esquema 5.18. Cicloadiciones (3+2) enantioselectivas entre  $\alpha$ -iminoésteres y nitroalquenos catalizadas por los sistemas catalíticos  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6/\text{NH-D-EhuPhos-22}$  o  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6/\text{NH-L-EhuPhos-22}$ .

En un matraz esférico bajo atmósfera inerte se disolvieron 5.2 mg (0.014 mmoles) de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$  y 0.015 mmoles de ligando quiral NH-D-EhuPhos-22 o NH-L-EhuPhos-22, en 1 mL de THF seco. La suspensión resultante se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente y otros 15 minutos a  $-20^\circ\text{C}$ . Después se añadió el  $\alpha$ -iminoéster correspondiente **34** (0.45 mmoles) disuelto en 2 mL de THF seco, 3.2  $\mu\text{L}$  de  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.23 mmoles) y el nitroalqueno correspondiente **20** (0.5 mmoles) disuelto en 2 mL del mismo disolvente y preenfriado a  $-20^\circ\text{C}$ . Se siguió el curso de la reacción por TLC y tras consumirse el sustrato de partida limitante la mezcla se filtró sobre un lecho de celita y el disolvente se evaporó a presión reducida. Tras analizar el crudo de reacción mediante  $^1\text{H-RMN}$ , se purificó mediante columna cromatográfica

(AcOEt:Hexano) obteniendo el correspondiente cicloaducto *exo*-**35** puro. Los excesos enantioméricos fueron determinados comparandolos con los cromatogramas de las mezclas racémicas de los correspondientes cicloaductos.

**(2R,3R,4S,5R)-3,5-difenil-2-metoxicarbonil-4-nitropirrolidina, *exo*-D-35a:**<sup>13</sup> Rto.: 84%. Sólido blanco. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.57 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.45 - 7.36 (m, 3H), 7.34 - 7.27 (m, 3H), 7.26 - 7.22 (m, 2H), 5.22 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.77 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.51 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.39 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.30 (s, 3H), 2.75 (s<sub>a</sub>, 1H). 96% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IB, *iso*-propanol/hexano 20/80, flujo = 1.0 mL/min, t<sub>r</sub>: 9.6 min (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*) y 18.2 min (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*), 254 nm.

**(2S,3S,4R,5S)-3,5-difenil-2-metoxicarbonil-4-nitropirrolidina, *exo*-L-35a:**<sup>14</sup> Rto.: 85%. Sólido blanco. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.50 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.37 - 7.30 (m, 3H), 7.27 - 7.17 (m, 5H), 5.15 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.70 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.44 (dd, *J* = 8.8, 5.8 Hz, 1H), 4.32 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.23 (s, 3H), 2.67 (s<sub>a</sub>, 1H). 97% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IB, *iso*-propanol/hexano 20/80, flujo = 1.0 mL/min, t<sub>r</sub>: 7.0 min (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*) y 11.7 min (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*), 254 nm.

**(2R,3R,4S,5R)-5-fenil-3-(4-fluorofenil)-2-metoxicarbonil-4-nitropirrolidina, *exo*-D-35c:**<sup>13</sup> Rto.: 83%. Sólido blanco. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.55 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.44 - 7.36 (m, 3H), 7.25 (dd, *J* = 5.5, 2.5 Hz, 2H), 7.01 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.13 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.76 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.35 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 3.34 (s, 3H), 2.70 (s<sub>a</sub>, 1H). 98% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IB, *iso*-propanol/hexano 20/80, flujo = 1.0 mL/min, t<sub>r</sub>: 9.9 min (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*) y 18.3 min (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*), 254 nm.

**(2R,3R,4S,5R)-5-fenil-2-metoxicarbonil-4-nitro-3-(4-tolil)-pirrolidina, *exo*-D-35d:**<sup>13</sup> Rto.: 81%. Sólido blanco. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.56 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.45 - 7.35 (m, 3H), 7.15 - 7.08 (m, 4H), 5.20 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.78 - 4.73 (m, 1H), 4.48 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.35 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.34 (s, 3H), 2.72 (s<sub>a</sub>, 1H), 2.31 (s, 3H). 96% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IB, *iso*-propanol/hexano 20/80, flujo = 1.0 mL/min, t<sub>r</sub>: 8.7 min (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*) y 20.3 min (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*), 254 nm.

<sup>13</sup> Kim, H. Y.; Li, J. Y.; Kim, S.; Oh, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20750-20753.

<sup>14</sup> Yan, X. X.; Peng, Q.; Zhang, Y.; Zhang, K.; Hong, W.; Hou, X. L.; Wu, Y. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1979-1983.

**(2R,3R,4S,5R)-5-fenil-2-metoxycarbonil-3-(4-nitrofenil)-4-nitropirrolidina,**

**exo-D-35e:**<sup>14</sup> Rto.: 73%. Sólido amarillo. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.19 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.55 - 7.36 (m, 7H), 5.08 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.44 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.36 (s, 3H). 92% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak AD-H, *iso*-propanol/hexano 30/70, flujo = 0.7 mL/min, *t*<sub>r</sub>: 20.9 min (2R,3R,4S,5R) y 34.7 min (2S,3S,4R,5S), 254 nm.

**(2R,3R,4S,5R)-5-fenil-2-metoxycarbonil-4-nitro-3-(2-tienil)-pirrolidina, exo-D-35f:**<sup>13</sup>

Rto.: 75%. Sólido blanco. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.56 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.45 - 7.35 (m, 3H), 7.24 - 7.20 (m, 1H), 6.94 (s, 2H), 5.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.72 - 4.65 (m, 2H), 4.49 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.48 (s, 3H), 2.79 (s<sub>a</sub>, 1H). 92% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IB, *iso*-propanol/hexano 20/80, flujo = 1.0 mL/min, *t*<sub>r</sub>: 11.8 min (2S,3S,4R,5S) y 29.6 min (2R,3R,4S,5R), 254 nm.

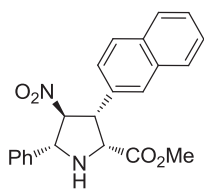
**(2R,3R,4S,5R)-5-fenil-3-(2-furil)-2-metoxycarbonil-4-nitropirrolidina, exo-D-35g:**<sup>15</sup>

Rto.: 80%. Sólido amarillo. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.60 - 7.26 (m, 6H), 6.30 (dd, *J* = 3.1, 1.8 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 5.23 (dd, *J* = 7.7, 7.0 Hz, 1H), 4.64 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.48 (dd, *J* = 8.3, 7.1 Hz, 1H), 4.40 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 2.77 (s<sub>a</sub>, 1H). 92% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IB, *iso*-propanol/hexano 20/80, flujo = 1.0 mL/min, *t*<sub>r</sub>: 10.9 min (2S,3S,4R,5S) y 20.0 min (2R,3R,4S,5R), 254 nm.

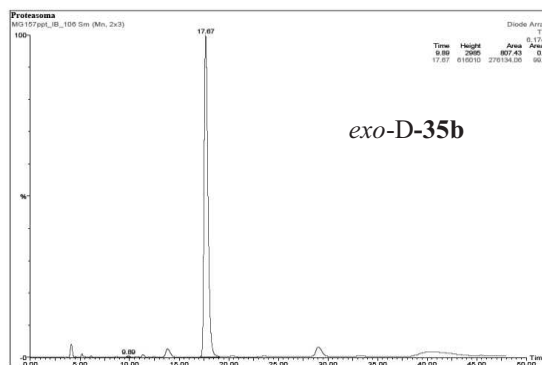
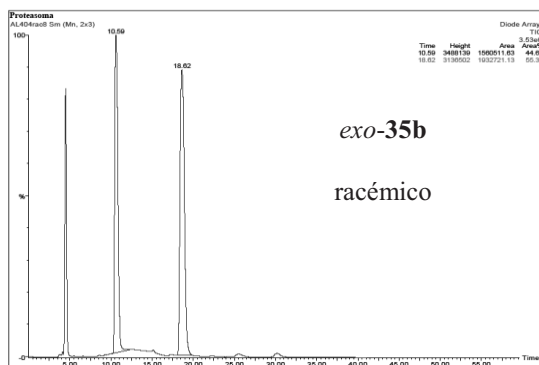
**(2R,3R,4S,5R)-3-fenil-2-metoxycarbonil-5-(2-naftil)-4-nitropirrolidina, exo-D-35h:**<sup>14</sup>

Rto.: 88%. Sólido amarillo pálido. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.98 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.90 - 7.84 (m, 2H), 7.72 (dd, *J* = 8.5, 1.6 Hz, 1H), 7.56 - 7.49 (m, 2H), 7.36 - 7.25 (m, 5H), 5.32 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.94 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.57 (dd, *J* = 8.8, 5.1 Hz, 1H), 4.44 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.33 (s, 3H), 2.84 (s<sub>a</sub>, 1H). 96% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IB, *iso*-propanol/hexano 20/80, flujo = 1.0 mL/min, *t*<sub>r</sub>: 12.7 min (2S,3S,4R,5S) y 14.2 min (2R,3R,4S,5R), 254 nm.

<sup>15</sup> (a) Egoitz Conde: "Síntesis de Pirrolidinas Ferrocenil Sustituidas mediante Cicloadiciones (3+2). Aplicación de la Catálisis de Reacciones Enantioselectivas de Adición y Cicloadición". Tesis Doctoral, Donostia-San Sebastián, **2014**. (b) Castelló, L. M.; Nájera, C.; Sansano, J. M.; Larrañaga, O.; de Cózar, A.; Cossío, F. P. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2902-2905.

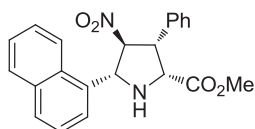
**(2R,3R,4S,5R)-5-fenil-2-metoxicarbonil-3-(2-naftil)-4-nitropirrolidina (exo-D-35b):**


Rto.: 70%. Sólido amarillo pálido, p.f. 150-151 °C. IR (puro) 3282, 1742, 1549, 747. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.83 - 7.78 (m, 3H), 7.71 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.51 - 7.36 (m, 6H), 5.34 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.62 - 4.55 (m, 2H), 3.21 (s, 3H). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 172.2, 137.8, 133.4, 133.3, 133.1, 129.3, 129.2, 128.8, 128.1, 127.8, 127.3, 127.1, 126.7, 126.6, 125.6, 95.3, 67.8, 64.4, 54.1, 52.1. [α]<sub>D</sub>: -118.5 (*c* 1.00, CHCl<sub>3</sub>), 99% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IB, *iso*-propanol/hexano 20/80, flujo = 1.0 mL/min, t<sub>r</sub>: 9.9 min (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*) y 17.7 min (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*), 254 nm. HRMS [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 377.1501; Hallado: 377.1509.



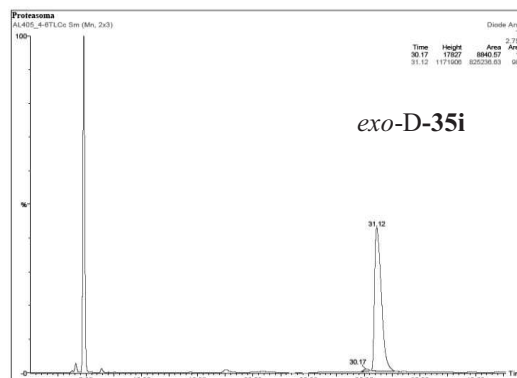
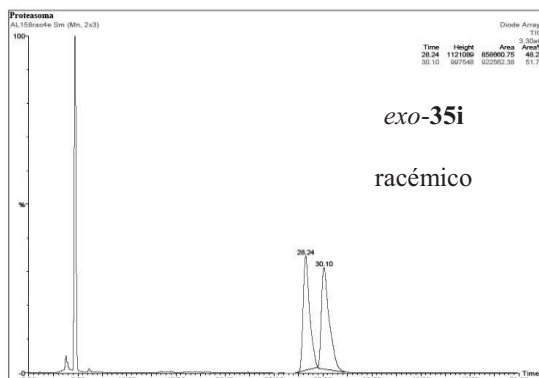
Time	Height	Area	Area%
10.59	3488139	1560511.63	44.67
18.62	3136502	1932721.13	55.33

Time	Height	Area	Area%
9.89	2985	807.43	0.29
17.67	616010	276134.06	99.71

**(2R,3R,4S,5R)-3-fenil-2-metoxicarbonil-5-(1-naftil)-4-nitropirrolidina (exo-D-35i):**


Rto.: 67%. Sólido blanco, p.f. 112-113 °C. IR (puro) 3283, 1732, 1545, 778, 698. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.20 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.92 - 7.87 (m, 2H), 7.60 - 7.49 (m, 3H), 7.37 - 7.29 (m, 5H), 5.59 (dt, *J* = 23.9, 8.5 Hz, 2H), 4.62 (dd, *J* = 9.1, 6.0 Hz, 1H), 4.50 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.27 (s, 3H), 2.75 (s<sub>a</sub>, 1H). <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 172.2, 135.9, 134.1, 133.0, 132.1, 129.7, 129.0, 128.5, 128.1, 127.0, 126.3, 125.7, 123.8, 123.3, 93.4, 64.4, 63.4, 54.5, 52.1. [α]<sub>D</sub>: -147.7 (*c* 0.43, CHCl<sub>3</sub>). 98% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IB, *iso*-propanol/hexano 5/95, flujo = 1.0 mL/min, t<sub>r</sub>: 30.2 min

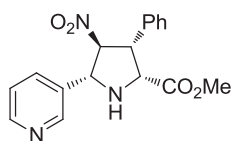
(2*S*,3*S*,4*R*,5*S*) y 31.1 min (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*), 254 nm. HRMS  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{22}H_{21}N_2O_4$ : 377.1501; Hallado: 377.1511.



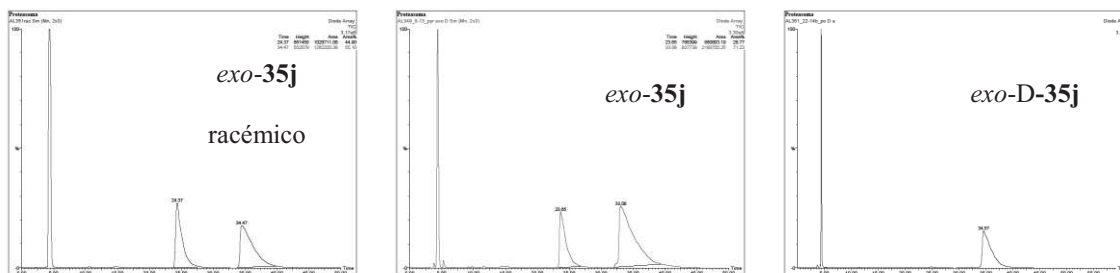
Time	Height	Area	Area%
28.24	1121089	858660.75	48.21
30.10	997548	922562.38	51.79

Time	Height	Area	Area%
30.17	17827	8840.57	1.06
31.12	1171906	825236.63	98.94

**(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3-fenil-2-metoxicarbonil-4-nitro-5-(3-piridil)pirrolidina (*exo*-D-35j):**



Rto.: 34%. Sólido blanco, p.f. 137-138 °C. IR (puro) 3312, 1728, 1547, 718, 697  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -RMN (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 8.78 (s<sub>a</sub>, 1H), 8.65 (s<sub>a</sub>, 1H), 8.00 (d<sub>a</sub>,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.41 - 7.36 (m, 1H), 7.35 - 7.23 (m, 5H), 5.23 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 4.82 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 1H), 4.52 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 4.41 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 3.31 (s, 3H), 2.71 (s<sub>a</sub>, 1H).  $^{13}C$ -RMN (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 171.9, 150.7, 149.1, 135.7, 134.8, 134.0, 129.1, 128.5, 128.1, 124.1, 94.7, 65.2, 64.4, 53.5, 52.1.  $[\alpha]$  : -113.6 ( $c$  0.70,  $CHCl_3$ ), 42% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IB, *iso*-propanol/hexano 20/80, flujo = 1.0 mL/min,  $t_r$ : 23.7 min (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*) y 33.1 min (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*), 254 nm. > 99% *ee* tras HPLC semipreparativo: Daicel Chiralpak IB, *iso*-propanol/hexano 20/80, flujo = 8.0 mL/min. HRMS  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{17}H_{18}N_3O_4$ : 328.1297; Hallado: 328.1300.

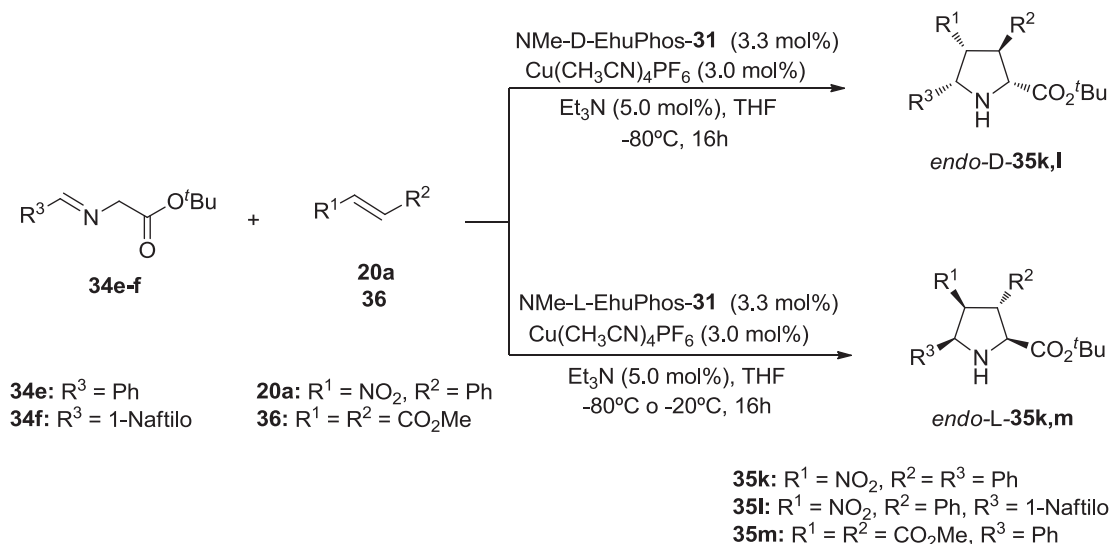


Time	Height	Area	Area%
24.37	861458	1028711.88	44.90
34.47	552079	1262220.38	55.10

Time	Height	Area	Area%
23.65	768399	880803.19	28.77
33.08	837739	2180755.25	71.23

### 5.7.3.2. Síntesis de los cicloadductos *endo-35* y *endo-38*

#### a) Dipolarófilos acíclicos: $\beta$ -Nitroestireno y Fumarato de dimetilo



Esquema 5.19. Cicloadiciones (3+2) enantioselectivas entre  $\alpha$ -iminoésteres y alquenos electrodeficientes catalizadas por los sistemas catalíticos  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6/\text{NMe-D-EhuPhos-31}$  y  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6/\text{NMe-L-EhuPhos-31}$ .

En un matraz esférico bajo atmósfera inerte se disolvieron 5.2 mg (0.014 mmoles) de la sal  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$  y 0.015 mmoles de ligando quiral NMe-D-EhuPhos-31 o NMe-L-EhuPhos-31 en 2 mL de THF seco. La suspensión resultante se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente y otros 15 minutos a  $-80^\circ\text{C}$  excepto cuando se empleó fumarato de dimetilo como dipolarófilo que se agitó a  $-20^\circ\text{C}$ . Después se añadió el  $\alpha$ -iminoéster correspondiente **34** (0.45 mmoles) disuelto en

2 mL de THF seco, 3.2  $\mu$ L de Et<sub>3</sub>N (0.23 mmoles) y el dipolarófilo correspondiente (0.5 mmoles) preenfriado y también disuelto en 2 mL de THF seco. Se siguió el curso de la reacción por TLC y tras consumirse el sustrato de partida limitante (aproximadamente 16 horas), la mezcla se filtró sobre un lecho de celita y el filtrado se evaporó a presión reducida. Tras analizar el crudo de reacción mediante <sup>1</sup>H-RMN, se purificó mediante columna cromatográfica (AcOEt:Hexano = 1:2) obteniendo el correspondiente cicloaducto *endo*-**35** puro. Los excesos enantioméricos fueron determinados comparándolos con los cromatogramas de las mezclas racémicas de los correspondientes cicloaductos.

**(2R,3S,4R,5R)-2-(terc-butoxicarbonil)-3,5-difenil-4-nitropirrolidina, endo-D-35k:**<sup>16</sup> Rto.: 82%. Sólido amarillo, <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 7.42 - 7.23 (m, 10H), 5.30 (dd,  $J$  = 6.5, 4.0 Hz, 1H), 4.92 (dd,  $J$  = 10.8, 6.7 Hz, 1H), 4.10 (dd,  $J$  = 7.3, 3.9 Hz, 1H), 4.01 (t,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 3.34 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 1.45 (s, 9H). 92% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IA, *iso*-propanol/hexano 20/80, flujo = 1.0 mL/min,  $t_r$ : 7.1 min (2R,3S,4R,5R) y 9.0 min (2S,3R,4S,5S), 254 nm.

**(2S,3R,4S,5S)-2-(terc-butoxicarbonil)-3,5-difenil-4-nitropirrolidina, endo-L-35k:**<sup>16</sup> Rto.: 88%. Sólido amarillo. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 7.45 - 7.22 (m, 10H), 5.28 (dd,  $J$  = 6.3, 3.9 Hz, 1H), 4.95 (dd,  $J$  = 10.9, 6.5 Hz, 1H), 4.08 (dd,  $J$  = 7.5, 4.1 Hz, 1H), 3.97 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 3.32 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 1H), 1.47 (s, 9H). 94% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IA, *iso*-propanol/hexano 20/80, flujo = 1.0 mL/min,  $t_r$ : 7.3 min (2R,3S,4R,5R) y 9.3 min (2S,3R,4S,5S), 254 nm.

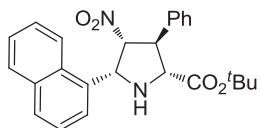
**(2S,3S,4S,5R)-5-fenil-3,4-bis(metoxicarbonil)-2-(terc-butoxicarbonil) pirrolidina, endo-L-35m:**<sup>17</sup> Rto.: 46%. Aceite amarillo. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 7.35 - 7.24 (m, 5H), 4.68 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 4.02 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.64 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 3.52 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 3.21 (s, 3H), 2.79 (s<sub>a</sub>, 1H), 1.52 (s, 9H). 90% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IA, *iso*-propanol/hexano 10/90, flujo = 1.0 mL/min,  $t_r$ : 15.7 min (2S,3S,4S,5R) y 23.5 min (2R,3R,4R,5S), 254 nm.

<sup>16</sup> Retamosa, M. de G.; de Cózar, A.; Sánchez, M.; Miranda, J. I.; Sansano, J. M.; Castelló, L. M.; Nájera, C.; Jiménez, A. I.; Sayago, F. J.; Cativiela, C.; Cossío, F. P. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2503-2516.

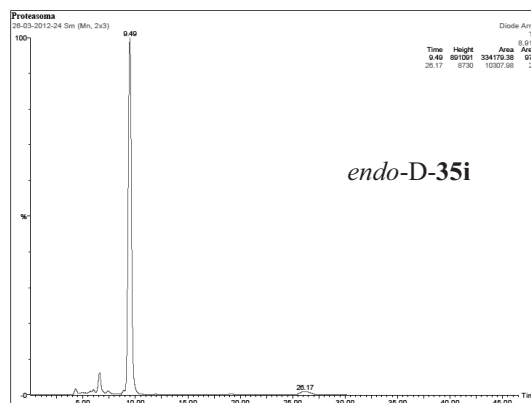
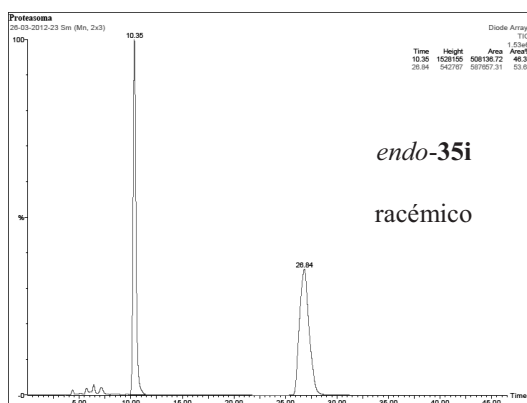
<sup>17</sup> Tsubogo, T.; Saito, S.; Seki, K.; Yamashita, Y.; Kobayashi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13321-13332.



**(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2-(*tert*-butoxicarbonil)-3-fenil-5-(1-naftil)-4-nitropirrolidina  
(*endo*-D-35i):**

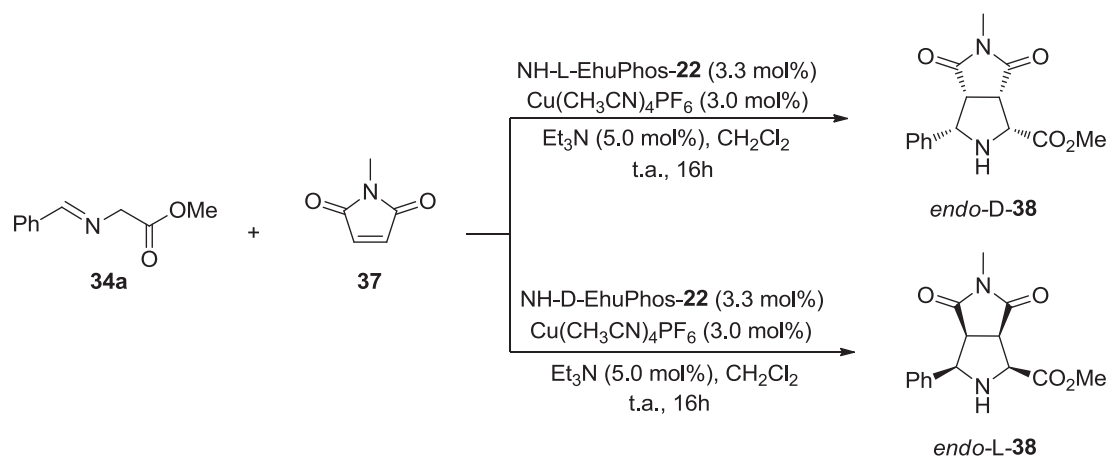


Rto.: 68%. Aceite amarillo. IR (puro) 2976, 1728, 1547, 1366, 1153, 699.  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.90 (t,  $J$  = 9.3 Hz, 2H), 7.84 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.64 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.58 - 7.55 (m, 1H), 7.53 - 7.44 (m, 4H), 7.40 - 7.35 (m, 3H), 5.68 - 5.62 (m, 1H), 5.55 (dd,  $J$  = 6.4, 3.4 Hz, 1H), 4.23 (dd,  $J$  = 7.5, 3.3 Hz, 1H), 4.15 - 4.08 (m, 1H), 3.53 (s<sub>a</sub>, 1H), 1.49 (s, 9H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 170.6, 139.4, 133.8, 130.9, 130.0, 129.6, 129.5, 128.2, 127.8, 127.0, 126.1, 125.6, 123.7, 122.0, 96.9, 82.7, 68.2, 64.4, 56.5, 28.2.  $[\alpha]_D^{25}$  : -30.9 ( $c$  1.00,  $\text{CHCl}_3$ ). 94% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IA, *iso*-propanol/hexano 30/70, flujo = 1.0 mL/min,  $t_r$ : 9.5 min (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*) y 26.2 min (2*S*,3*R*,4*S*,5*S*), 254 nm. HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado. para  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$ : 419.1971; Hallado: 419.1975.



Time	Height	Area	Area %
10.35	1528155	508136.72	46.37
26.84	542767	587657.31	53.63

Time	Height	Area	Area %
9.49	891091	334179.38	97.01
26.17	8730	10307.98	2.99

**b) Dipolarófilos cíclicos: *N*-Metilmaleimida**


Esquema 5.20. Cicloadiciones (3+2) enantioselectivas entre el  $\alpha$ -iminoéster **34a** y la *N*-Metilmaleimida **37** catalizadas por los sistemas catalíticos Cu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>/NH-L-EhuPhos-**22** o Cu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>/NH-D-EhuPhos-**22**.

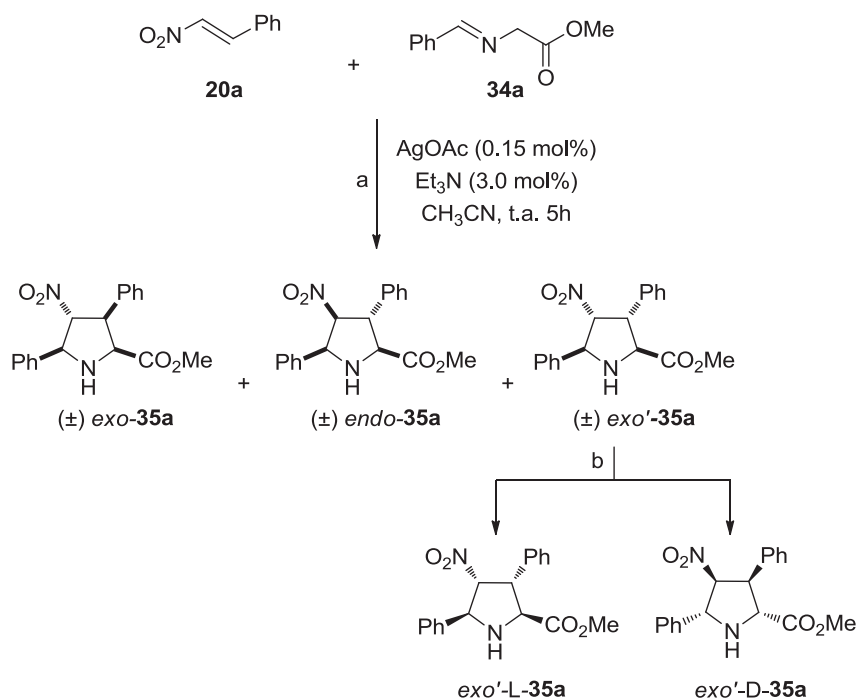
El procedimiento para la síntesis de los compuestos **38** fue el mismo utilizado para los *exo*-**35**, pero usando en este caso el  $\alpha$ -iminoéster **34a** como dipolo, la *N*-Metilmaleimida **37** como dipolarófilo, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco como disolvente y llevando a cabo la reacción a temperatura ambiente.

**(1*R*,3*S*,3*aR*,6*aS*)-3-fenil-5-metil-1-metoxicarbonil-4,6-dioxo-octahidropirrolo[3,4-*c*]pirrol, *endo*-D-**38****:<sup>18</sup> Rto.: 90%. Sólido blanco. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 7.42 - 7.30 (m, 5H), 4.51 (dd, *J* = 8.7, 5.6 Hz, 1H), 4.07 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.57 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.44 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 2.87 (s, 3H), 2.43 (s<sub>a</sub>, 1H). 90% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IA, *iso*-propanol/hexano 30/70, flujo = 1.0 mL/min, t<sub>r</sub>: 13.5 min (1*R*,3*S*,3*aR*,6*aS*) y 18.3 min (1*S*,3*R*,3*aS*,6*aR*), 254 nm.

**(1*S*,3*R*,3*aS*,6*aR*)-3-fenil-5-metil-1-metoxicarbonil-4,6-dioxo-octahidropirrolo[3,4-*c*]pirrol, *endo*-L-**38****:<sup>19</sup> Rto.: 95%. Sólido blanco. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 7.38 - 7.29 (m, 5H), 4.50 (dd, *J* = 8.5, 5.5 Hz, 1H), 4.09 - 4.03 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.56 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.43 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 2.87 (s, 3H), 2.41 (s<sub>a</sub>, 1H). 93% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IA, *iso*-propanol/hexano 30/70, flujo = 1.0 mL/min, t<sub>r</sub>: 11.2 min (1*R*,3*S*,3*aR*,6*aS*) y 13.0 min (1*S*,3*R*,3*aS*,6*aR*), 254 nm.

<sup>18</sup> Oderaotoshi, Y.; Cheng, W.; Fujitomi, S.; Kasano, Y.; Minakata, S.; Komatsu, M. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 5043-5046.

<sup>19</sup> Cabrera, S.; Gómez Arrayás, R.; Martín-Matute, B.; Cossío, F. P.; Carretero, J. C. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 6587-6602.

5.7.3.3. Síntesis del cicloaducto *exo'*-L-35a<sup>16</sup>


Esquema 5.21. (a) Cicloadición (3+2) entre el  $\alpha$ -iminoéster **34a** y el  $\beta$ -nitroestireno **20a** catalizada por AgOAc. (b) Separación por HPLC semipreparativa empleando una columna Chiralpak<sup>®</sup> IB.

En un matraz esférico se disolvieron en 50 mL de CH<sub>3</sub>CN el  $\alpha$ -iminoéster **34a** (886 mg, 5 mmol) y el  $\beta$ -nitroestireno **20a** (746 mg, 5 mmol). A continuación se añadió Et<sub>3</sub>N (1.4 mL, 10 mmol) y AgOAc (130 mg, 0.75 mmol). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y en ausencia de luz. La reacción fue seguida por TLC y tras observarse la completa desaparición de los reactivos de partida (~5 horas) la mezcla fue filtrada sobre un lecho de celita. El filtrado fue lavado con una disolución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl (2x10 mL) y con agua (2x10 mL). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía flash (AcOEt:Hexano) obteniéndose así los cicloaductos *exo*, *endo* y *exo'*-**35a** en una relación diastereomérica 46:36:18 y todos ellos en su forma racémica.

La resolución por HPLC del cicloaducto *exo'*-L-**35a** se llevó a cabo en un cromatógrafo "Waters 600 HPLC", sistema equipado con un detector de 2996 fotodiodos de array y con un detector de longitud de onda dual de absorbancia 2487. La resolución semipreparativa se llevó a cabo en una columna Chiralpak<sup>®</sup> IB de 250 x 20

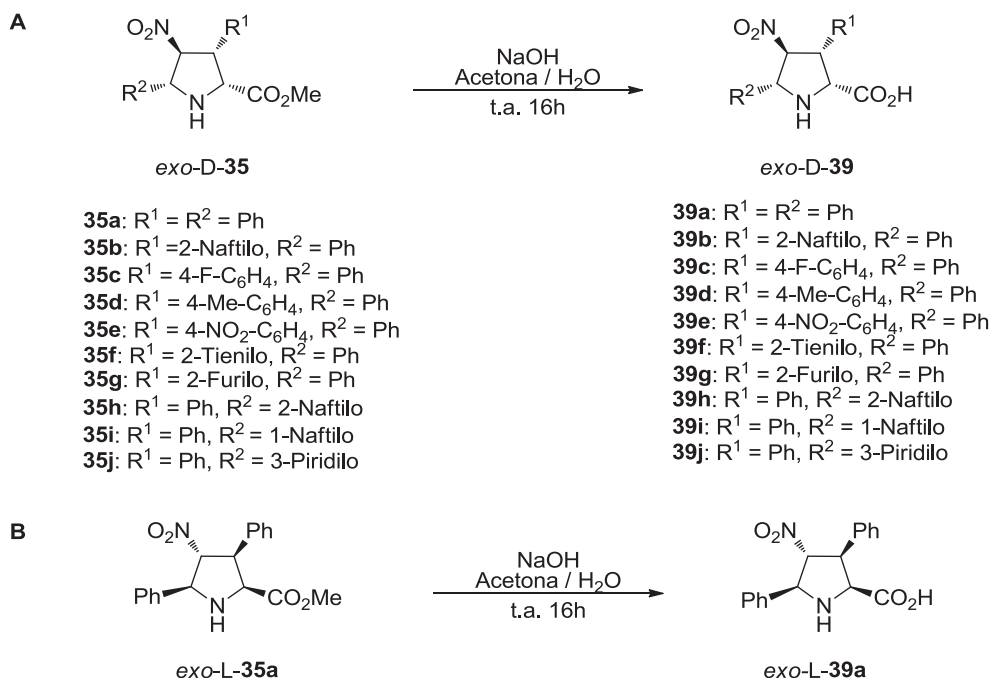
mm, eluyendo con una mezcla de *n*-hexano/*iso*-propanol/cloroformo en relación 82:5:13, con un flujo de 18 mL/min. El proceso fue monitorizado por absorción UV a 230 nm.<sup>20</sup>

**(2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,5-difenil-2-metoxicarbonil-4-nitropirrolidina (*exo*'-L-35a):**<sup>16</sup> Rto.: 8%. Sólido amarillo pálido. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.56 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.44 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.39 - 7.31 (m, 4H), 7.27 (t, *J* = 4.3 Hz, 2H), 5.15 (dd, *J* = 7.5, 3.9 Hz, 1H), 5.09 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.73 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 4.08 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 2.93 (s, 1H). 100% *ee*. HPLC: Daicel Chiralpak IA, *iso*-propanol/hexano/cloroformo 5/82/13, flujo = 1.0 mL/min, t<sub>r</sub>: 6.8 min (2*S*,3*R*,4*R*,5*S*) y 15.0 min (2*R*,3*S*,4*S*,5*R*), 230 nm.

## 5.8. Síntesis de ácidos borónicos con estructura de pirrolidina

### 5.8.1. Procedimiento general para la síntesis de los ácidos pirrolidínicos

#### 5.8.1.1. Síntesis de los ácidos *exo*-39: hidrólisis básica con NaOH



Esquema 5.22. (A) Hidrólisis básica con NaOH de los cicloductos *exo*-D-35a-j. (B) Hidrólisis básica con NaOH del cicloducto *exo*-L-35a.

<sup>20</sup> Este procedimiento fue llevado a cabo por la Universidad de Zaragoza.

En un matraz esférico se disolvió en 3 mL de acetona el correspondiente cicloaducto *exo*-35 que presenta un ester metílico en posición 2 (1 mmol). A continuación se añadió una disolución de NaOH (88 mg, 2.2 mmoles) en agua (3 mL) y la suspensión resultante se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se enfrió la mezcla de reacción a 0°C y se acidificó con una disolución 2N de HCl en agua hasta ajustar a pH $\approx$ 2, obteniendo el producto como un precipitado sólido en la disolución. Tras 15 minutos en el baño para completar la precipitación se filtró el sólido, se lavó con pequeñas cantidades de agua y se secó a presión reducida obteniéndose el producto puro deseado *exo*-39.

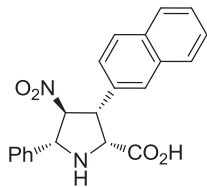
**Ácido (2R,3R,4S,5R)-3,5-difenil-4-nitro-2-pirrolidinocarboxílico (*exo*-D-39a):**<sup>16</sup>

Rto.: 87%. Sólido Blanco. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 7.75 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.50 - 7.42 (m, 3H), 7.37 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.35 - 7.28 (m, 1H), 5.72 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 5.13 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.80 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 4.66 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H).

**Ácido (2S,3S,4R,5S)-3,5-difenil-4-nitro-2-pirrolidinocarboxílico (*exo*-L-39a):**<sup>16</sup> Rto.:

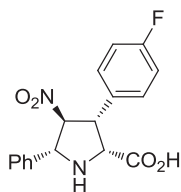
83%. Sólido blanco. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 7.80 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.48 - 7.41 (m, 3H), 7.39 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.37 - 7.27 (m, 1H), 5.70 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.13 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 4.77 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.68 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H).

**Ácido (2R,3R,4S,5R)-5-fenil-3-(2-naftil)-4-nitro-2-pirrolidinocarboxílico (*exo*-D-39b):**



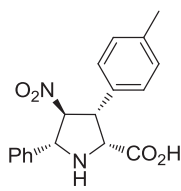
Rto.: 95%. Sólido blanco, p.f. 168-169 °C. IR (puro) 3368, 1639, 1548, 746, 695 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 7.94 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 7.7 Hz, 3H), 7.67 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.52 - 7.47 (m, 2H), 7.44 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.46 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.89 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.71 - 4.64 (m, 2H). <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 172.8, 140.2, 135.2, 134.3, 134.0, 129.7, 129.5, 129.2, 128.8, 128.5, 128.2, 128.1, 127.3, 127.2, 127.1, 96.5, 68.0, 64.5, 54.3. [ $\alpha$ ] : -111.5 (*c* 0.45, DMF). HRMS [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 363.1345; Hallado: 363.1347.

**Ácido (2R,3R,4S,5R)-5-fenil-3-(4-fluorofenil)-4-nitro-2-pirrolidinocarboxílico (exo-D-39c):**



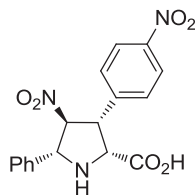
Rto.: 84%. Sólido blanco, p.f. 167-168 °C. IR (puro) 3223, 1649, 1551, 1368, 696  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  = 7.62 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 7.55 - 7.47 (m, 2H), 7.45 - 7.35 (m, 3H), 7.10 (t,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 5.30 (t,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 4.85 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 4.58 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 4.51 (t,  $J$  = 8.7 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 201.3, 171.1, 161.7 (d,  $^1J$  = 244.2 Hz), 132.4, 130.4 (d,  $^4J$  = 8.3 Hz), 128.7 (d,  $^3J$  = 12.7 Hz), 127.7, 115.2 (d,  $^2J$  = 21.5 Hz), 93.5, 65.1, 62.9, 50.6.  $[\alpha]$  : -84.92 ( $c$  0.75, acetona). HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{FN}_2\text{O}_4$ : 331.1094; Hallado: 331.1107.

**Ácido (2R,3R,4S,5R)-5-fenil-4-nitro-3-(4-tolil)-2-pirrolidinocarboxílico (exo-D-39d):**



Rto.: 86%. Sólido blanco, p.f. 157-158 °C. IR (puro) 3392, 1641, 1550, 1329, 699  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.54 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 7.41 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 7.36 (dd,  $J$  = 8.4, 6.1 Hz, 1H), 7.26 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 7.12 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 2H), 5.25 - 5.19 (m, 1H), 4.67 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 4.33 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 172.5, 139.5, 136.7, 133.5, 129.0, 128.6, 128.3, 128.0, 127.1, 95.3, 66.4, 63.4, 52.1, 20.6.  $[\alpha]$  : -62.6 ( $c$  1.00, acetona). HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4$ : 327.1345; Hallado: 327.1356.

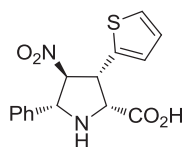
**Ácido (2R,3R,4S,5R)-5-fenil-4-nitro-3-(4-nitrofenil)-2-pirrolidinocarboxílico (exo-D-39e):**



Rto.: 73%. Sólido blanco, p.f. 158-159 °C. IR (puro) 3365, 1735, 1561, 1519, 1347, 852  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  = 8.32 - 8.24 (m, 2H), 8.03 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 7.95 - 7.87 (m, 2H), 7.58 - 7.49 (m, 3H), 6.36 (t,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 5.55 (d,  $J$  = 9.9 Hz, 1H), 5.18 (d,  $J$  = 9.8 Hz, 1H), 5.10 (t,  $J$  = 9.8 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  = 172.2, 148.5, 146.1, 140.1, 130.8, 129.7, 129.5, 128.2, 124.4, 96.2, 67.9, 64.5, 53.1.  $[\alpha]$  :

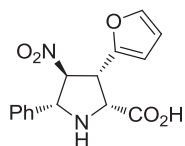
-69.5 (*c* 0.75, acetona). HRMS  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{17}H_{16}N_3O_6$ : 358.1039; Hallado: 358.1040.

**Ácido (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-fenil-4-nitro-3-(2-tiofenil)-2-pirrolidinocarboxílico (exo-D-39f):**



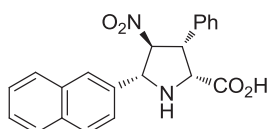
Rto.: 77%. Sólido amarillo oscuro, p.f. 155-156 °C. IR (puro) 3026, 1647, 1550, 1438, 698  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -RMN (500 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  = 7.63 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 7.42 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 7.37 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 2H), 7.14 (d,  $J$  = 3.2 Hz, 1H), 6.97 (dd,  $J$  = 5.1, 3.6 Hz, 1H), 5.26 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 4.81 (dd,  $J$  = 13.1, 5.0 Hz, 2H), 4.56 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H).  $^{13}C$ -RMN (125 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  = 172.3, 140.0, 139.1, 129.7, 129.5, 128.2, 127.8, 127.7, 126.5, 97.5, 67.8, 64.6, 49.4.  $[\alpha]$  : -60.9 (*c* 0.75, acetona). HRMS  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{15}H_{15}N_2O_4S$ : 319.0753; Hallado: 319.0760.

**Ácido (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-fenil-3-(2-furil)-4-nitro-2-pirrolidinocarboxílico (exo-D-39g):**



Rto.: 83%. Sólido marrón, p.f. 154-155 °C. IR (puro) 3033, 1650, 1550, 744, 698  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -RMN (400 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  = 7.60 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.46 - 7.34 (m, 3H), 6.40 - 6.35 (m, 2H), 5.30 (t,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 4.76 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 4.64 (t,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 4.49 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H).  $^{13}C$ -RMN (100 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  = 172.5, 150.6, 143.9, 139.9, 129.7, 129.5, 128.1, 111.4, 109.2, 95.1, 68.3, 63.2, 48.3.  $[\alpha]$  : -54.2 (*c* 1.00, acetona). HRMS  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{15}H_{15}N_2O_5$ : 303.0981; Hallado: 303.0987.

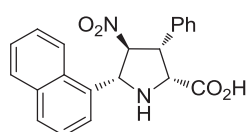
**Ácido (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3-fenil-5-(2-naftil)-4-nitro-2-pirrolidinocarboxílico (exo-D-39h):**



Rto.: 97%. Sólido blanco, p.f. 142-143 °C. IR (puro) 3364, 3057, 1638, 1549, 747, 697  $cm^{-1}$ .  $^1H$ -RMN (500 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  = 8.07 (s, 1H), 7.99 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.97 - 7.90 (m, 2H), 7.85 (dd,  $J$  = 8.5, 1.6 Hz, 1H), 7.57 - 7.51 (m, 2H), 7.48 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 7.33 (t,  $J$  = 7.4

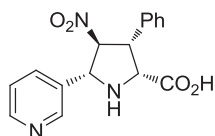
Hz, 2H), 7.30 - 7.24 (m, 1H), 5.45 (t,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 5.02 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 4.65 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 4.56 (t,  $J = 8.8$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta = 172.9, 137.8, 137.6, 134.6, 134.3, 129.6, 129.5, 129.3, 129.0, 128.7, 128.6, 127.5, 127.3, 127.2, 125.7, 96.4, 68.1, 64.5, 54.1$ .  $[\alpha] : -32.6$  ( $c$  0.75, acetona). HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4$ : 363.1345; Hallado: 363.1346.

**Ácido (2R,3R,4S,5R)-3-fenil-5-(1-naftil)-4-nitro-2-pirrolidinocarboxílico (exo-D-39i):**



Rto.: 84%. Sólido blanco, p.f. 145-146 °C. IR (puro) 3431, 3057, 1643, 1549, 771, 698  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta = 8.30$  (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 8.20 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 7.96 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.65 - 7.48 (m, 5H), 7.36 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 7.31 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 5.77 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 5.69 (t,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 4.75 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 4.65 (t,  $J = 9.0$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta = 172.7, 137.6, 135.1, 134.9, 132.8, 130.1, 129.9, 129.7, 129.4, 129.1, 127.7, 127.1, 126.8, 125.7, 123.8, 95.6, 64.2, 62.8, 54.1$ .  $[\alpha] : -30.2$  ( $c$  0.40,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ). HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4$ : 363.1345; Hallado: 363.1348.

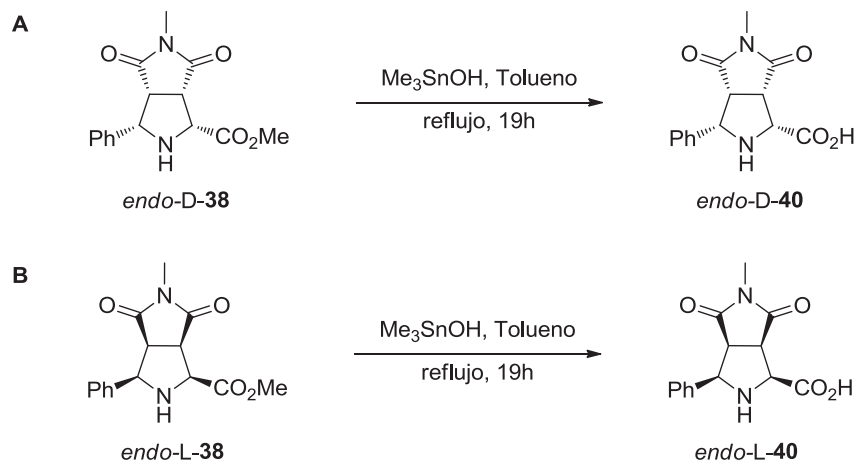
**Ácido (2R,3R,4S,5R)-3-fenil-4-nitro-5-(3-piridil)-2-pirrolidinocarboxílico (exo-D-39j):**



Rto.: 70%. Sólido amarillo pálido, p.f. 150-151 °C (descompone). IR (puro) 3324, 1726, 1545, 699  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta = 8.78 - 8.76$  (m, 1H), 8.58 - 8.56 (m, 1H), 8.12 - 8.08 (m, 1H), 7.46 - 7.39 (m, 3H), 7.34 - 7.27 (m, 3H), 5.43 (t,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.92 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 4.61 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 4.54 (t,  $J = 8.7$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta = 173.0, 150.1, 149.5, 137.2, 136.9, 136.8, 129.7, 129.3, 129.1, 125.1, 95.5, 64.9, 64.4, 53.4$ .  $[\alpha] : -62.5$  ( $c$  0.60,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ). HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4$ : 314.1141; Hallado: 314.1147.



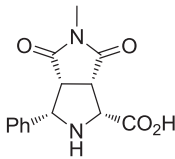
### 5.8.1.2. Síntesis de los ácidos *endo*-40: hidrólisis básica con hidróxido de trimetilestano



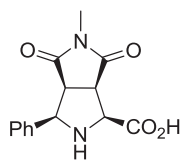
Esquema 5.23. (A) Hidrólisis básica con  $\text{Me}_3\text{SnOH}$  del compuesto *endo*-D-38. (B) Hidrólisis básica con  $\text{Me}_3\text{SnOH}$  del compuesto *endo*-L-38.

En un matraz esférico se puso a reflujo una suspensión del compuesto correspondiente *endo*-D-38 o *endo*-L-38 (1.0 mmol, 288 mg) y  $\text{Me}_3\text{SnOH}$  (4 mmol, 724 mg) en tolueno (35 mL) durante 19 horas. Una vez transcurrido este tiempo, y a temperatura ambiente, la mezcla se acidificó con una solución 1N de HCl en agua hasta ajustar a  $\text{pH} \approx 2$ , obteniéndose el producto como un precipitado sólido en la disolución. Dicho sólido se filtró, se lavó con pequeñas cantidades de agua y se secó a presión reducida para obtener el producto puro deseado *endo*-D-40 o *endo*-L-40.

#### Ácido (1*R*,3*S*,3*aR*,6*aS*)-3-fenil-5-metil-4,6-dioxooctahidropirrol[3,4-*c*]pirrol-1-carboxílico (*endo*-D-40):

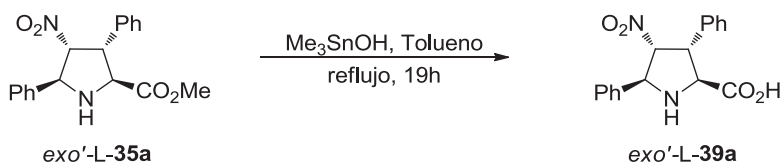
 Rto.: 95%. Sólido blanco, p.f. 224-225 °C. IR (puro) 3365, 1701, 1608, 689  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 7.37 - 7.26 (m, 5H), 4.57 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 4.09 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 3.69 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 3.56 (t,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 2.82 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 178.4, 177.1, 174.5, 137.8, 129.4, 129.1, 128.5, 65.3, 64.3, 51.0, 48.9 (determinado por HSQC), 25.3.  $[\alpha]_D^{25}$  : -36.0 ( $c$  0.75, acetona). HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4$ : 275.1032; Hallado: 275.1036.

**Ácido (1*S*,3*R*,3*aS*,6*aR*)-3-fenil 5-metil-4,6-dioxooctahidropirrolo[3,4-*c*]pirrol-1-carboxílico (*endo*-L-40):**



Rto.: 97%. Sólido blanco.  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 7.36 - 7.25$  (m, 5H), 4.54 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 4.04 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 3.67 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 3.55 (t,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 2.83 (s, 3H).  $[\alpha]_D^{25} : +16.8$  ( $c$  0.95, acetona).

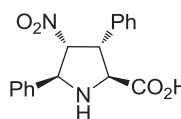
**5.8.1.3. Síntesis del ácido *exo'*-L-39a: hidrólisis básica con hidróxido de trimetilestaño**



Esquema 5.24. Hidrólisis básica con  $\text{Me}_3\text{SnOH}$  del cicloaducto *exo'*-L-35a.

El procedimiento utilizado para la hidrólisis del éster metílico del cicloaducto *exo'*-L-35a fue el mismo que para los derivados de prolina *endo*-38. En este caso también se obtuvo el producto como precipitado sólido, el cual se filtró, se lavó con pequeñas cantidades de agua y se secó a presión reducida para obtener el producto puro deseado *exo'*-L-39a.

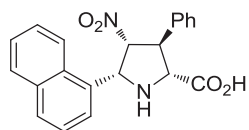
**Ácido (2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,5-difenil-4-nitro-2-pirrolidinocarboxílico (*exo'*-L-39a):**



Rto.: 80%. Sólido amarillo pálido, p.f. 146-147 °C (descompone). IR (puro) 2933, 1559, 1356, 695  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 7.66 - 7.62$  (m, 2H), 7.59 - 7.54 (m, 3H), 7.45 - 7.37 (m, 5H), 5.85 (dd,  $J = 8.3, 4.7$  Hz, 1H), 5.78 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H), 5.27 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 4.64 (dd,  $J = 11.4, 8.3$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 173.1, 137.9, 134.7, 130.5, 130.4, 129.9, 129.7, 129.6, 128.7, 96.2, 66.8, 64.6, 53.4$ .  $[\alpha]_D^{25} : +25.2$  ( $c$  0.50,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4$ : 313.1188; Hallado: 313.1191.

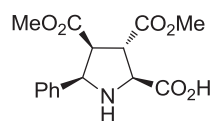


**Ácido (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3-fenil-5-(1-naftil)-4-nitro-2-pirrolidinocarboxílico (endo-D-39i):**



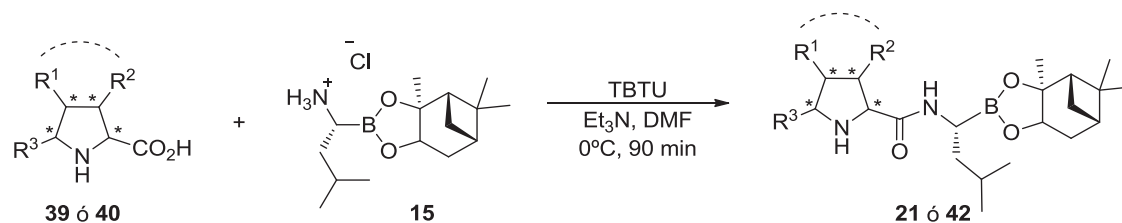
Rto.: 80%. Sólido blanco, p.f. 170-171 °C. IR (puro) 3350, 2807, 1706, 1550, 1377, 697  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  = 8.23 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 7.94 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.89 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.60 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 7.59 - 7.50 (m, 3H), 7.45 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 7.37 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 5.99 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 5.78 (dd,  $J$  = 7.2, 4.5 Hz, 1H), 4.43 (dd,  $J$  = 8.2, 4.2 Hz, 1H), 4.34 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  = 172.9, 140.2, 134.6, 132.9, 132.1, 130.0, 129.8, 129.7, 129.1, 128.7, 127.4, 126.7, 126.2, 125.5, 123.8, 97.3, 66.8, 63.5, 56.0.  $[\alpha]$  : -53.8 ( $c$  0.50, DMF). HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4$ : 363.1345; Hallado: 363.1354.

**Ácido (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*)-5-fenil-3,4-bis(metoxicarbonil)-2-pirrolidinocarboxílico (endo-L-39k):**



Rto.: 69%. Sólido blanco, p.f. 195-196 °C. IR (puro) 3066, 1732, 1573, 1226, 1180, 696  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  = 7.42 - 7.22 (m, 5H), 4.76 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 4.22 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.67 - 3.56 (m, 2H), 3.17 (s, 3H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  = 171.5, 171.4, 169.2, 130.2, 130.1, 129.3, 126.9, 64.4, 61.1, 53.9, 53.1, 50.8, 48.0.  $[\alpha]$  : +1.6 ( $c$  0.40,  $\text{H}_2\text{O}$ ). HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{NO}_6$ : 308.1134; Hallado: 308.1140.

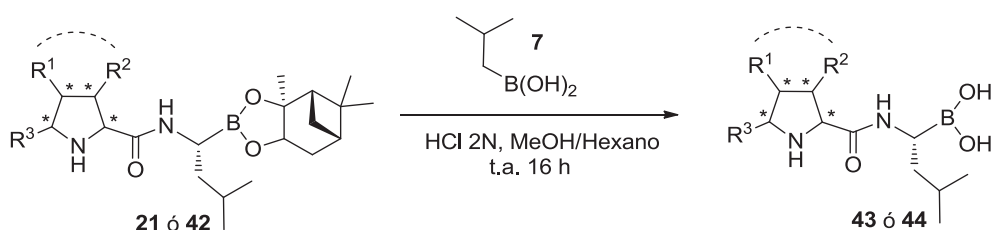
**5.8.2. Procedimiento general para el acoplamiento peptídico de los ácidos pirrolidínicos 39 ó 40 y el aminoboronato 15**



Esquema 5.26. Acoplamiento peptídico entre los ácidos pirrolidínicos 39 ó 40 y el aminoboronato 15.

En un matraz esférico y bajo atmósfera inerte se disolvió en 1.8 mL de DMF seca el ácido pirrolidínico **39** ó **40** correspondiente (1.0 mmol), el clorhidrato de aminoboronato **15** (301 mg, 1.0 mmol) y TBTU (353 mg, 1.1 mmol). La suspensión se agitó a 0 °C y sobre ésta se fue adicionando lentamente una disolución de Et<sub>3</sub>N (0.42 mL, 3.0 mmol) en DMF seca (1 mL). La mezcla resultante se agitó durante 90 minutos a 0 °C. A continuación se evaporó el disolvente a presión reducida, se redisolvió el residuo en AcOEt (30 mL) y se lavó la fase orgánica con agua (8x3 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. Los productos de acoplamiento así obtenidos **21** ó **42** se utilizaron directamente en la siguiente reacción.

### 5.8.3. Procedimiento general para la desprotección borónica de los productos acoplados **21** y **42**

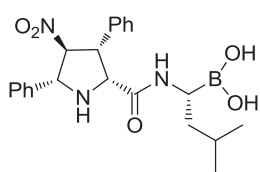


Esquema 5.27. Desprotección borónica de los compuestos **21** y **42**.

El crudo de reacción resultante del acoplamiento peptídico de la etapa anterior **21** ó **42** (1 mmol) se disolvió en 14 mL de una mezcla 1:1 de metanol:hexano y se añadió ácido isobutil borónico **7** (256 mg, 2.5 mmol) y una disolución 2N de HCl en agua (1 mL, 2 mmol). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Pasado ese tiempo se separaron las dos fases y se concentró a presión reducida la de metanol. El residuo se disolvió en AcOEt (20 mL) y se lavó con una disolución al 8% en agua de NaHCO<sub>3</sub> (3x7 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. Tras analizar el crudo de reacción mediante <sup>1</sup>H-RMN, se purificó mediante precipitación con AcOEt:Et<sub>2</sub>O:Hexano obteniéndose los productos puros **43** ó **44** en forma de sólidos.

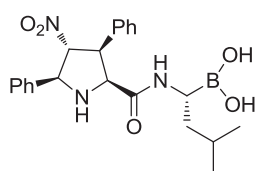
Para las estructuras **43** y **44** se ha omitido el dato de p.f. debido a que a alta temperatura los ácidos borónicos sufren deshidratación y por lo tanto el dato no sería correcto.

**Ácido** **(R)-3-metil-1-[(2R,3R,4S,5R)-3,5-difenil-4-nitropirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (exo-D-43a):**



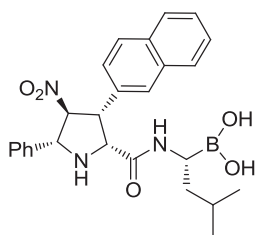
Rto.: 36%. Sólido blanco. IR (puro) 3340, 2951, 1655, 1616, 1550, 1390, 1364, 1195, 697  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 7.64 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 7.42 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 7.38 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 7.35 - 7.25 (m, 5H), 5.25 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 4.84 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 4.63 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 4.47 (t,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 2.47 - 2.38 (m, 1H), 1.51 - 1.46 (m, 1H), 1.08 - 0.92 (m, 2H), 0.85 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H), 0.82 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 177.0, 140.3, 137.2, 129.9, 129.8, 129.7, 129.3, 128.2, 96.9, 68.2, 62.3, 54.2, 40.5, 26.8, 23.6, 22.4.  $[\alpha]_D^{25}$  : -82.6 ( $c$  0.72,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}-1]$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{BN}_3\text{O}_5$ : 424.21; Hallado: 424.29. HRMS  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+]$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{BN}_3\text{O}_4$ : 408.2095; Hallado: 408.2100.

**Ácido** **(R)-3-metil-1-[(2S,3S,4R,5S)-3,5-difenil-4-nitropirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (exo-L-43a):**



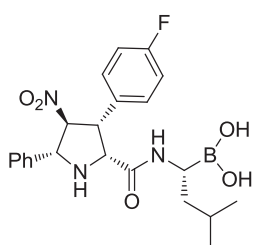
Rto.: 34%. Sólido blanco. IR (puro) 3365, 2953, 1655, 1616, 1550, 1365, 697  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 7.64 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 7.43 - 7.26 (m, 8H), 5.33 (t,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 4.84 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 4.62 (d,  $J$  = 9.3 Hz, 1H), 4.52 (t,  $J$  = 9.1 Hz, 1H), 2.43 (dd,  $J$  = 9.0, 6.3 Hz, 1H), 1.35 - 1.25 (m, 1H), 1.06 - 0.96 (m, 1H), 0.95 - 0.84 (m, 1H), 0.81 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H), 0.78 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 177.8, 140.5, 136.6, 130.2, 130.0, 129.9, 129.7, 129.5, 128.5, 96.3, 68.3, 61.9, 54.5, 40.6, 26.8, 23.8, 22.4.  $[\alpha]_D^{25}$  : +41.5 ( $c$  0.35,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}-1]$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{BN}_3\text{O}_5$ : 424.21; Hallado: 424.29. HRMS  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+]$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{BN}_3\text{O}_4$ : 408.2095; Hallado: 408.2104.

**Ácido (R)-3-metil-1-[(2R,3R,4S,5R)-5-fenil-3-(2-naftil)-4-nitropirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (*exo*-D-43b):**



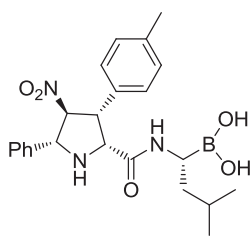
Rto.: 47%. Sólido blanco. IR (puro) 3324, 2953, 1700, 1677, 1554, 1383, 1357, 766, 696  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz, 70°C, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.97 - 7.72 (m, 7H), 7.56 - 7.43 (m, 5H), 6.40 - 6.22 (m, 1H), 5.31 - 5.19 (m, 1H), 4.98 - 4.82 (m, 1H), 4.73 - 4.66 (m, 1H), 3.00 - 2.90 (m, 1H), 0.81 - 0.71 (m, 1H), 0.71 - 0.50 (m, 1H), 0.42 - 0.30 (m, 1H), 0.26 (s<sub>a</sub>, 3H), 0.15 (s<sub>a</sub>, 3H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 165.3, 132.8, 132.7, 130.0, 129.0, 128.1, 127.9, 127.5, 127.0, 126.3, 126.2, 89.1, 63.4, 61.8, 50.9, 37.5, 23.5, 22.5, 21.0.  $[\alpha]$  : -42.7 (*c* 0.60, CH<sub>3</sub>OH). HRMS [M-1] calculado para C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>BN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 474.23; Hallado: 474.00. HRMS [M-H<sub>2</sub>O+H<sup>+</sup>] calculado para C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>BN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 458.2251; Hallado: 458.2261.

**Ácido (R)-3-metil-1-[(2R,3R,4S,5R)-5-fenil-3-(4-fluorofenil)-4-nitropirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (*exo*-D-43c):**



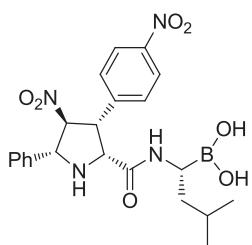
Rto.: 58%. Sólido blanco. IR (puro) 3356, 2953, 1547, 1379, 699  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 7.64 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.43 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.40 - 7.33 (m, 3H), 7.05 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.47 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 2.42 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 1.50 - 1.45 (m, 1H), 1.07 - 1.01 (m, 1H), 0.97 - 0.92 (m, 1H), 0.85 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.83 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 177.0, 164.1 (d,  $^1J_{\text{C-F}}$  = 245.9 Hz), 140.3, 133.5 (d,  $^4J_{\text{C-F}}$  = 2.7 Hz), 131.9 (d,  $^3J_{\text{C-F}}$  = 8.2 Hz), 130.0, 129.9, 128.3, 116.5 (d,  $^2J_{\text{C-F}}$  = 21.7 Hz), 97.1, 68.2, 62.5, 53.5, 40.8, 26.9, 23.7, 22.5.  $[\alpha]$  : -62.7 (*c* 0.45, CH<sub>3</sub>OH). HRMS [M-1] calculado para C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>BFN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 442.20; Hallado: 442.02. HRMS [M-H<sub>2</sub>O+H<sup>+</sup>] calculado para C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>BFN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 426.2000; Hallado: 426.2011.

**Ácido (R)-3-metil-1-[(2R,3R,4S,5R)-5-fenil-3-(4-tolil)-4-nitropirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (*exo*-D-43d):**



Rto.: 47%. Sólido blanco. IR (puro) 3321, 2955, 1677, 1556, 1391, 1351, 816, 699  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 7.85 - 7.81 (m, 2H), 7.59 - 7.54 (m, 3H), 7.32 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.24 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 2H), 6.21 (t,  $J$  = 10.5 Hz, 1H), 5.30 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H), 4.81 (d,  $J$  = 9.3 Hz, 1H), 4.69 - 4.63 (m, 1H), 3.05 - 2.99 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.06 - 1.04 (m, 2H), 0.90 - 0.84 (m, 1H), 0.74 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H), 0.69 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 167.1, 140.5, 132.2, 132.0, 131.1, 130.9, 130.3, 129.6, 129.1, 90.3, 66.1, 63.2, 52.9, 40.2, 26.3, 23.6, 22.5, 21.4.  $[\alpha]$  : -4.4 ( $c$  0.30,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}-1]$  calculado para  $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{BN}_3\text{O}_5$ : 438.22; Hallado: 438.02.

**Ácido (R)-3-metil-1-[(2R,3R,4S,5R)-5-fenil-4-nitro-3-(4-nitrofenil)-pirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (*exo*-D-43e):**

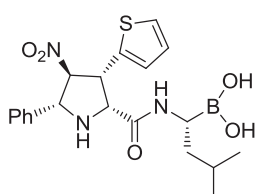


Rto.: 39%.. Sólido amarillo. IR (puro) 3352, 2954, 1657, 1602, 1542, 1519, 1345, 854, 697  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-RMN}$ <sup>21</sup>.  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 171.0, 149.2, 145.1, 131.3, 131.1, 130.1, 130.0, 128.4, 124.8, 96.2, 68.2, 62.5, 53.5, 41.0, 26.6, 23.5, 22.6.  $[\alpha]$  : -1.9 ( $c$  0.85,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}-1]$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{BN}_4\text{O}_7$ : 469.19; Hallado: 469.09.

<sup>21</sup> Se llevó a cabo el análisis mediante  $^1\text{H-RMN}$  en MeOD a t.a. no permitiendo un espectro adecuado debido a coalescencia. Al realizar el estudio de  $^1\text{H-RMN}$  en  $\text{DMSO}-d_6$  a  $70^\circ\text{C}$  se observó descomposición del producto.

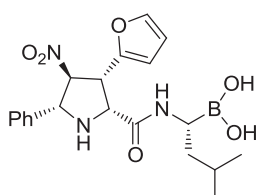


**Ácido (R)-3-metil-1-[(2R,3R,4S,5R)-5-fenil-4-nitro-3-(2-tiofenil)-pirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (exo-D-43f):**



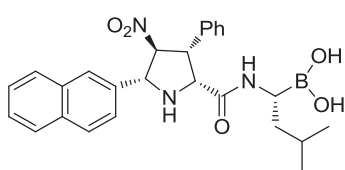
Rto.: 61%. Sólido blanco. IR (puro) 3302, 2953, 1677, 1556, 1384, 1351, 711, 695  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 7.65 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 7.42 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 7.36 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.34 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H), 7.04 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 1H), 6.98 - 6.94 (m, 1H), 5.15 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 4.81 - 4.77 (m, 2H), 4.59 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 2.52 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 1.59 - 1.48 (m, 1H), 1.12 - 0.98 (m, 2H), 0.86 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 176.7, 140.4, 139.0, 130.0, 129.9, 128.8, 128.4, 128.2, 127.1, 98.1, 68.3, 62.6, 40.8, 27.0, 23.8, 22.5.  $[\alpha]$  : -26.6 ( $c$  0.65,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}-1]$  calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{BN}_3\text{O}_5\text{S}$ : 430.16; Hallado: 430.09.

**Ácido (R)-3-metil-1-[(2R,3R,4S,5R)-5-fenil-3-(2-furil)-4-nitropirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (exo-D-43g):**



Rto.: 46%. Sólido blanco. IR (puro) 3340, 2953, 1680, 1557, 1386, 1350, 750, 696  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 7.79 (s<sub>a</sub>, 2H), 7.58 - 7.54 (m, 4H), 6.54 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.07 - 6.01 (m, 1H), 5.33 (d,  $J$  = 9.8 Hz, 1H), 3.21 (dd,  $J$  = 14.5, 7.3 Hz, 2H), 3.09 - 3.03 (m, 1H), 1.32 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 1.27 - 1.18 (m, 2H), 0.86 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H), 0.83 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 3H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 166.8, 145.4, 132.1, 130.8, 130.2, 112.2, 111.7, 90.0, 65.9, 61.9, 46.8, 40.5, 26.5, 23.6, 22.6.  $[\alpha]$  : -17.6 ( $c$  0.45,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}-1]$  calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{BN}_3\text{O}_6$ : 414.19; Hallado: 414.08.

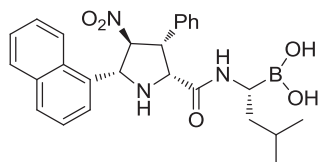
**Ácido (R)-3-metil-1-[(2R,3R,4S,5R)-3-fenil-5-(2-naftil)-4-nitropirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (exo-D-43h):**



Rto.: 49%. Sólido blanco. IR (puro) 3324, 2952, 1674, 1556, 1383, 1366, 746, 698  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 8.27 (s, 1H), 8.08 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 8.02 - 7.95 (m, 3H), 7.63 - 7.58 (m, 2H), 7.50 - 7.40 (m, 5H),

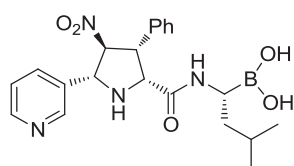
6.30 (t,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 5.45 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 4.87 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 4.75 (t,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 2.98 - 2.94 (m, 1H), 1.10 - 0.91 (m, 3H), 0.75 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H), 0.71 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 167.1, 135.7, 134.5, 132.2, 130.8, 130.3, 129.6, 129.5, 128.9, 128.8, 128.2, 125.9, 89.9, 66.2, 63.1, 52.9, 40.1, 26.1, 23.4, 22.5$ .  $[\alpha]_D^{25}$ : -28.3 ( $c$  0.30,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}-1]$  calculado para  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{BN}_3\text{O}_5$ : 474.23; Hallado: 474.31. HRMS  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+]$  calculado para  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{BN}_3\text{O}_4$ : 458.2251; Hallado: 458.2258.

**Ácido** **(*R*)-3-metil-1-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3-fenil-5-(1-naftil)-4-nitropirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (*exo*-D-43i):**



Rto.: 42%. Sólido blanco. IR (puro) 3330, 2956, 1670, 1544, 1368, 750, 697  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 8.28$  (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 8.10 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.92 (t,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.61 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.57 - 7.50 (m, 2H), 7.42 - 7.30 (m, 5H), 5.79 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 5.48 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 4.76 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 4.58 (t,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 2.43 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 1.52 - 1.45 (m, 1H), 1.09 - 0.95 (m, 2H), 0.85 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.82 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 168.5, 130.2, 129.9, 129.8, 129.7, 129.3, 129.2, 127.8, 127.6, 126.9, 126.7, 125.8, 123.5, 89.0, 65.2, 63.4, 54.8, 40.5, 26.8, 23.6, 22.4$ .  $[\alpha]_D^{25}$ : -29.1 ( $c$  0.45,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}-1]$  calculado para  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{BN}_3\text{O}_5$ : 474.23; Hallado: 474.08. HRMS  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+]$  calculado para  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{BN}_3\text{O}_4$ : 458.2251; Hallado: 458.2256.

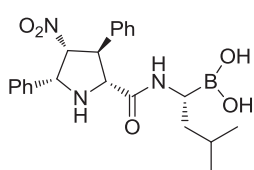
**Ácido** **(*R*)-3-metil-1-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3-fenil-4-nitro-5-(3-piridil)pirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (*exo*-D-43j):**



Rto.: 40%. Sólido blanco. IR (puro) 3380, 2952, 1651, 1549, 1365, 698  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 8.77$  (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 8.55 (t,  $J = 4.7$  Hz, 1H), 8.24 - 8.22 (m, 1H), 7.54 - 7.50 (m, 1H), 7.37 - 7.29 (m, 5H), 5.38 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 4.94 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 4.65 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 4.56 (t,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 2.41 - 2.38 (m, 1H), 1.52 - 1.47 (m, 1H), 1.06 - 0.95 (m, 2H), 0.85 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 0.82 (d,  $J =$

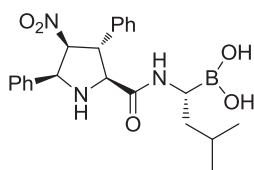
6.8 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 177.2, 150.4, 149.5, 137.5, 130.2, 130.1, 129.8, 129.7, 129.5, 125.6, 96.1, 65.6, 62.3, 54.0, 40.7, 26.9, 23.7, 22.6$ .  $[\alpha]_D^{25} : -60.6$  ( $c$  0.45,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}-1]$  calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{BN}_4\text{O}_5$ : 425.20; Hallado: 425.20. HRMS  $[\text{M}+\text{H}^+]$  calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{BN}_4\text{O}_5$ : 427.2153; Hallado: 427.2160.

**Ácido** **(*R*)-3-metil-1-[(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,5-difenil-4-nitropirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (*endo*-D-43a):**



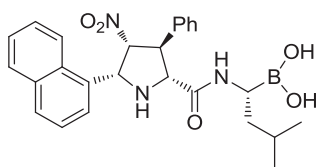
Rto.: 33%. Sólido blanco. IR (puro) 3278, 2966, 1636, 1546, 1363, 696  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 7.51$  (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 7.45 - 7.39 (m, 4H), 7.37 - 7.27 (m, 4H), 5.40 (dd,  $J = 7.3, 4.1$  Hz, 1H), 5.17 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 4.31 - 4.24 (m, 2H), 2.82 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 1.76 - 1.70 (m, 1H), 1.53 - 1.41 (m, 2H), 0.96 (dd,  $J = 6.6, 1.5$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 179.0, 139.9, 138.1, 130.4, 129.6, 129.5, 129.3, 129.2, 128.6, 97.1, 67.1, 64.7, 55.2, 41.2, 27.3, 23.8, 22.9$ .  $[\alpha]_D^{25} : -56.4$  ( $c$  0.66,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}-1]$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{BN}_3\text{O}_5$ : 424.21; Hallado: 424.08. HRMS  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+]$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{BN}_3\text{O}_4$ : 408.2095; Hallado: 408.2109.

**Ácido** **(*R*)-3-metil-1-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*)-3,5-difenil-4-nitropirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (*endo*-L-43a):**



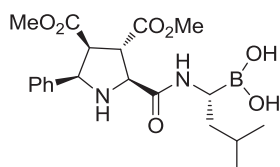
Rto.: 38%. Sólido blanco. IR (puro) 3360, 2953, 1657, 1614, 1551, 1365, 697  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 7.52$  (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.45 - 7.39 (m, 4H), 7.38 - 7.29 (m, 4H), 5.47 (dd,  $J = 7.4, 4.3$  Hz, 1H), 5.14 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 4.26 - 4.20 (m, 2H), 2.83 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 1.62 - 1.55 (m, 1H), 1.36 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 0.92 (d,  $J = 2.2$  Hz, 3H), 0.89 (d,  $J = 2.3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 178.3, 139.4, 137.8, 130.4, 129.6, 129.5, 129.3, 129.2, 128.6, 97.2, 67.2, 65.2, 55.8, 41.1, 27.1, 23.7, 22.8$ .  $[\alpha]_D^{25} : -75.2$  ( $c$  0.15,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}-1]$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{BN}_3\text{O}_5$ : 424.21; Hallado: 424.08. HRMS  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+]$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{BN}_3\text{O}_4$ : 408.2095; Hallado: 408.2105.

**Ácido (R)-3-metil-1-[(2R,3S,4R,5R)-3-fenil-5-(1-naftil)-4-nitropirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (*endo*-D-43i):**



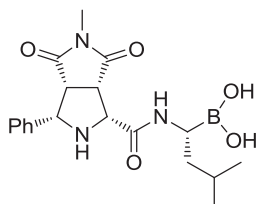
Rto.: 38%. Sólido blanco. IR (puro) 3350, 2953, 1655, 1617, 1551, 1386, 1364, 771, 699  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 8.05 - 8.01 (m, 2H), 7.90 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.85 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.58 - 7.45 (m, 7H), 7.42 - 7.36 (m, 1H), 5.98 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 1H), 5.59 (dd,  $J$  = 6.9, 3.4 Hz, 1H), 4.42 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 1H), 4.40 - 4.35 (m, 1H), 2.86 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 1.82 - 1.74 (m, 1H), 1.56 - 1.46 (m, 2H), 0.99 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 179.3, 140.3, 135.2, 133.2, 132.5, 130.5, 130.1, 129.4, 129.2, 127.8, 126.5, 126.1, 123.4, 96.3, 64.2, 63.3, 55.6, 41.2, 27.3, 23.8, 23.0.  $[\alpha]$  : -110.4 ( $c$  0.50,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS [M-1] calculado para  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{BN}_3\text{O}_5$ : 474.23; Hallado: 474.28. HRMS [M- $\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+$ ] calculado para  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{BN}_3\text{O}_4$ : 458.2251; Hallado: 458.2266.

**Ácido (R)-3-metil-1-[(2S,3S,4S,5R)-5-fenil-3,4-bis(metoxicarbonil)-pirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (*endo*-L-43k):**



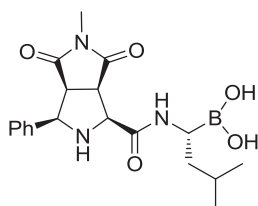
Rto.: 40%. Sólido blanco. IR (puro) 3315, 2952, 1731, 1664, 1435, 1199, 1170, 699  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 7.41 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 7.31 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 7.26 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 1H), 4.77 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 4.31 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.67 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 3.60 (dd,  $J$  = 8.1, 5.5 Hz, 1H), 3.20 (s, 3H), 2.87 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 1.78 - 1.71 (m, 1H), 1.43 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 0.97 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 179.1, 173.7, 173.1, 140.6, 129.3, 129.0, 128.5, 65.8, 60.9, 54.5, 53.3, 52.2, 51.5, 41.0, 27.3, 23.7, 23.0.  $[\alpha]$  : +23.6 ( $c$  0.45,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS [M-1] calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{BN}_2\text{O}_7$ : 419.21; Hallado: 419.25. HRMS [M- $\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+$ ] calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{BN}_2\text{O}_6$ : 403.2040; Hallado: 403.2045.

**Ácido (R)-3-metil-1-[(1R,3S,3aR,6aS)-3-fenil-5-metil-4,6-dioxooctahidropirrol-3,4-c]pirrol-1-carboxamido]butil borónico (*endo*-D-44):**



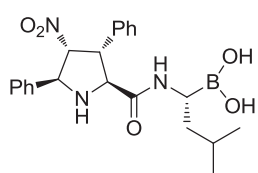
Rto.: 46%. Sólido blanco. IR (puro) 3320, 2953, 1701, 1381, 1365, 698  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 7.48 - 7.41 (m, 5H), 5.23 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 4.72 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 4.15 - 4.00 (m, 2H), 2.89 (s, 3H), 1.86 - 1.74 (m, 1H), 1.64 - 1.43 (m, 2H), 0.99 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 174.7, 174.4, 131.6, 130.3, 129.8, 128.5, 64.8, 62.8, 48.3, 46.9, 40.7, 26.9, 25.7, 23.7, 22.8.  $[\alpha]$  : -48.4 ( $c$  0.70,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}-1]$  calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{BN}_3\text{O}_5$ : 386.20; Hallado: 386.27. HRMS  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+]$  calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{BN}_3\text{O}_4$ : 370.1938; Hallado: 370.1947.

**Ácido (R)-3-metil-1-[(1S,3R,3aS,6aR)-3-fenil 5-metil-4,6-dioxooctahidropirrol-3,4-c]pirrol-1-carboxamido]butil borónico (*endo*-L-44):**



Rto.: 38%. Sólido blanco. IR (puro) 3311, 2953, 1698, 1382, 697  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 7.40 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 7.30 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 7.27 - 7.23 (m, 1H), 4.55 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 4.14 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 3.66 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 3.50 (t,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 2.85 (dd,  $J$  = 13.6, 5.9 Hz, 1H), 2.80 (s, 3H), 1.75 - 1.68 (m, 1H), 1.45 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H), 0.94 (dd,  $J$  = 6.6, 1.9 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 177.3, 139.5, 129.3, 128.9, 128.7, 65.1, 64.3, 60.5, 51.0, 50.7, 40.5, 27.3, 25.1, 23.4.  $[\alpha]$  : +62.9 ( $c$  0.30,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}-1]$  calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{BN}_3\text{O}_5$ : 386.20; Hallado: 386.27. HRMS  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+]$  calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{BN}_3\text{O}_4$ : 370.1938; Hallado: 370.1941.

**Ácido (R)-3-metil-1-[(2S,3R,4R,5S)-3,5-difenil-4-nitropirrolidin-2-carboxamido]butil borónico (*exo'*-L-43a):**

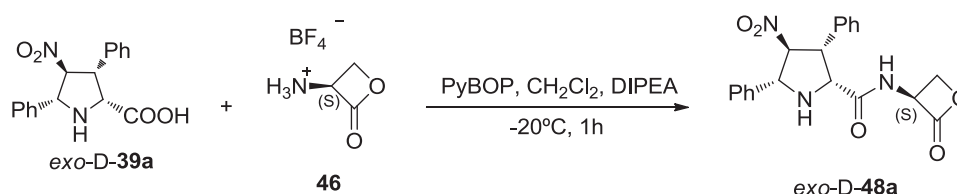


Rto.: 57%. Sólido blanco. IR (puro) 3233, 2953, 1665, 1555, 1366, 696  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 7.73 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 7.58 - 7.48 (m, 3H), 7.43 - 7.35 (m, 5H), 5.50 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.97 (d,  $J$  = 10.9 Hz, 1H), 4.34 (dd,  $J$  =

10.7, 7.2 Hz, 1H), 3.01 - 2.93 (m, 1H), 1.48 - 1.42 (m, 1H), 1.35 - 1.21 (m, 2H), 0.85 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 0.82 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 130.8$ , 130.5, 130.4, 130.2, 130.1, 129.7, 129.3, 128.8, 96.6, 67.3, 62.4, 54.1, 40.8, 26.8, 23.8, 22.4.  $[\alpha]_D^{25}$ : +26.0 ( $c$  0.41,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). HRMS  $[\text{M}-1]$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{BN}_3\text{O}_5$ : 424.21; Hallado: 424.29. HRMS  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+]$  calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{BN}_3\text{O}_4$ : 408.2095; Hallado: 408.2105.

## 5.9. Síntesis de $\beta$ -lactonas como electrófilos

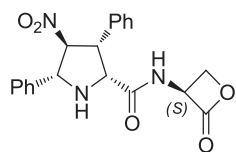
### 5.9.1. Síntesis de la $\beta$ -lactona 48a



Esquema 5.28. Acoplamiento peptídico entre el ácido *exo*-D-39a y la  $\beta$ -lactona de configuración S 46.

En un matraz esférico se disolvió la  $\beta$ -lactona en forma de sal **46** (70 mg, 0.40 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3.3 mL) y se enfrió a  $-20^\circ\text{C}$ . A continuación se añadió la pirrolidina en forma de ácido *exo*-D-39a (150 mg, 0.48 mmol), PyBOP (416 mg, 0.8 mmol) y DIPEA (209  $\mu\text{L}$ , 1.20 mmol). La suspensión resultante se agitó a  $-20^\circ\text{C}$  durante una hora. Transcurrido ese tiempo se adicionó  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a la mezcla, se lavó con una disolución 1N de HCl en agua (3x2 mL), una disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2x2 mL) y una disolución acuosa saturada de NaCl (1x2 mL), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. Tras analizar el crudo de reacción mediante  $^1\text{H}$ -RMN, se purificó mediante columna cromatográfica flash de fase reversa ( $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ ) obteniendo el producto puro deseado en forma de sólido blanco.

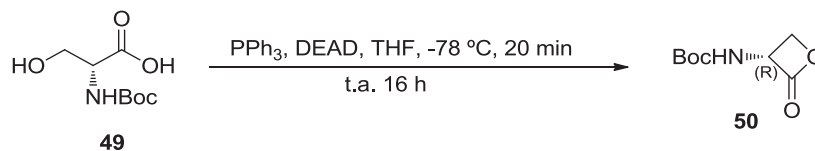
**(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-nitro-*N*-((*S*)-2-oxetanona-3-il)-3,5-difenilpirrolidin-2-carboxamida (48a):**<sup>22</sup>



Rto.: 8%. Sólido blanco. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.52 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.43 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.30 – 7.23 (m, 5H), 7.18 (s<sub>a</sub>, 1H), 5.90 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 5.33 (dd, *J* = 7.5, 5.0 Hz, 1H), 5.08 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 4.47 - 4.38 (m, 2H), 3.98 (dd, *J* = 11.2, 4.4 Hz, 1H), 3.94 - 3.87 (m, 1H).

## 5.9.2. Síntesis de la β-lactona 52a

### 5.9.2.1. Ciclación de la *N*-Boc-*D*-Serina 49



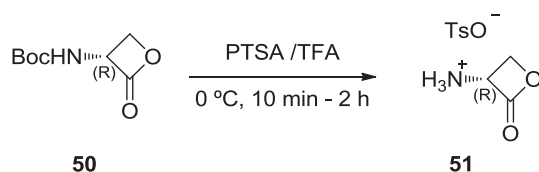
Esquema 5.29. Ciclación de la *N*-Boc-*D*-Serina 49.

En un matraz esférico se disolvió PPh<sub>3</sub> (1277 mg, 4.87 mmol) en THF seco (20 mL) y se llevó la suspensión a -78°C. A continuación se le adicionó DEAD (848 mg, 4.87 mmol, 2.12 mL al 40% en tolueno) y se dejó agitando 20 minutos. Seguidamente se añadió lentamente una disolución de *N*-Boc-*D*-Serina 49 (1000 mg, 4.87mmol) en THF seco (20 mL) y la mezcla resultante fue agitada durante 20 minutos a -78°C y 16 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente a presión reducida y tras analizar el crudo de reacción mediante <sup>1</sup>H-RMN, se purificó mediante columna cromatográfica (AcOEt:Hexano = 1:3) seguida de otra columna cromatográfica (AcOEt:Hexano = 1:2), obteniendo el producto deseado 50.

**(*R*)-*tert*-butil-(2-oxoetan-3-il) carbamato, 50:**<sup>23</sup> Rto.: 72%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 5.22-5.07 (m, 1H), 4.48-4.39 (m, 2H), 1.47 (s, 9H).

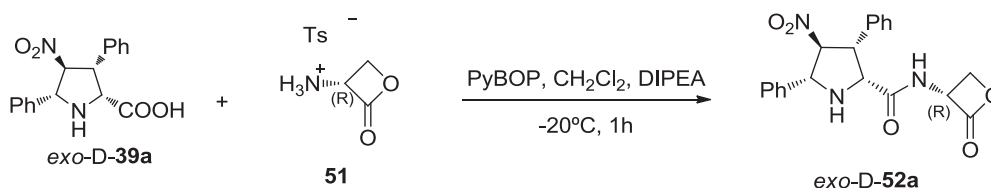
<sup>22</sup> En este caso no se pudieron llevar a cabo los análisis de IR, <sup>13</sup>C-RMN, polarimetría óptica y masas debido al bajo rendimiento y mala reproducibilidad de la reacción.

<sup>23</sup> Solorzano, C.; Antonietti, F.; Duranti, A.; Tontini, A.; Rivara, S.; Lodola, A.; Vacondio, F.; Tarzia, G.; Piomelli, D.; Mor, M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5770-5781.

5.9.2.2. Síntesis del tosilato **51**

 Esquema 5.30. Síntesis del tosilato **51**.

En un matraz esférico se introdujeron bajo atmósfera inerte el producto de la etapa anterior **50** (1.32 g, 7.05 mmol) y ácido *p*-toluensulfónico anhidro (1.27 g, 7.40 mmol) y se añadió goteando lentamente TFA (22 mL). La mezcla se dejó agitando a 0°C durante una hora. A continuación se concentró a presión reducida por debajo de 30 °C, y cuando estuvo bien seco se precipitó en Et<sub>2</sub>O varias veces para conseguir el producto puro deseado **51**.

***p*-toluensulfato de (*R*)-3-amino-2-oxoetanona, **51**:**<sup>24</sup> Rto.: 81%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, MeOD)  $\delta$  = 7.71 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 2H), 7.24 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 2H), 5.16 (dd,  $J$  = 6.4, 4.3 Hz, 1H), 4.61 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 1H), 4.39 (dd,  $J$  = 6.4, 4.4 Hz, 1H), 2.37 (s, 3H).

 5.9.2.3. Acoplamiento peptídico del compuesto **51** y ácido *exo*-D-**39a**

 Esquema 5.31. Acoplamiento peptídico entre el ácido *exo*-D-**39a** y el tosilato **51**.

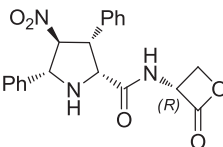
En un matraz esférico se disolvió en 4.3 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> la β-lactona en forma de tosilato **51** (137 mg, 0.53 mmol) obtenida en la etapa anterior y se enfrió a -20°C. A continuación se añadió la pirrolidina en forma de ácido *exo*-D-**39a** (250 mg, 0.80 mmol), PyBOP (552 mg, 1.06 mmol) y DIPEA (277 μL, 1.59 mmol). La suspensión resultante se agitó a -20°C durante una hora. Transcurrido ese tiempo se adicionó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a la mezcla, se lavó con una disolución 1N de HCl en agua (3x2 mL), una

<sup>24</sup> Arnold, L. D.; May, R. G.; Vederas, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2237-2241.



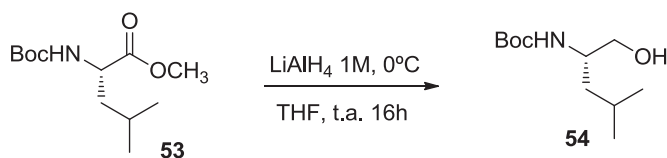
disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2x2 mL) y una disolución acuosa saturada de  $\text{NaCl}$  (1x2 mL), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. Tras analizar el crudo de reacción mediante  $^1\text{H}$ -RMN, se purificó mediante columna cromatográfica flash de fase reversa ( $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ ) obteniendo el producto puro deseado en forma de sólido blanco.

**(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-nitro-*N*-((*R*)-2-oxetanona-3-il)-3,5-difenilpirrolidin-2-carboxamida (52a):**<sup>22</sup>


 Rto.: 5%. Sólido blanco.  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8.24 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.66 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.47 - 7.35 (m, 5H), 7.35 - 7.26 (m, 3H), 5.32 (t,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 5.19 - 5.13 (m, 1H), 4.84 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 4.53 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 1H), 4.46 (t,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 4.08 (dd,  $J$  = 6.7, 4.6 Hz, 1H), 3.88 (t,  $J$  = 4.7 Hz, 1H).

## 5.10. Síntesis del nitroalqueno 59a como electrófilo

### 5.10.1. Reducción del éster 53 al alcohol 54

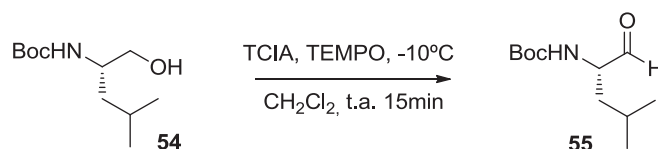


Esquema 5.32. Síntesis del alcohol 54.

A una disolución de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*L*-leucinato de metilo **53** (1.7 g, 76.8 mmol) en 14 mL de THF seco, bajo atmósfera inerte y a  $0^\circ\text{C}$  se añadió lentamente una disolución 1M de  $\text{LiAlH}_4$  en THF (10.2 mL, 10.2 mmol). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo se enfrió a  $0^\circ\text{C}$ , se añadió agua (3.6 mL) y se filtró sobre lecho de celita. El filtrado se evaporó a presión reducida, se redisolvió en 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se lavó con agua (3x6 mL), se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. Tras confirmar por  $^1\text{H}$ -RMN que el producto presentaba una pureza adecuada se utilizó directamente en la siguiente etapa.

**(S)-*tert*-butil-(1-hidroxi-4-metilpentan-2-il) carbamato, 54:**<sup>25</sup> Rto.: 97%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 4.53 (s<sub>a</sub>, 1H), 3.76 - 3.56 (m, 2H), 3.53 - 3.41 (m, 1H), 1.70 - 1.58 (m, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.32 - 1.25 (m, 2H), 0.91 (dd, *J* = 6.3, 1.8 Hz, 6H).

### 5.10.2. Oxidación del alcohol 54 al aldehído 55



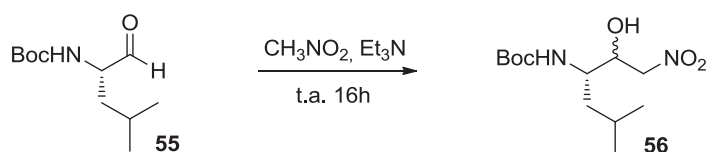
Esquema 5.33. Oxidación del alcohol 54 al aldehído 55.

En un matraz esférico se disolvió el producto 54 sin previa purificación (1.1 g, 5.0 mmol) en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. A dicha mezcla se adicionó TCIA (1.1 g, 5.6 mmol), tamiz molecular y se enfrió a -10°C. A continuación se añadió TEMPO (8.7 mg, 0.056 mmol) lentamente y se agitó la suspensión resultante a temperatura ambiente durante 15 minutos observándose la formación de HCl gas. Seguidamente se filtró la mezcla sobre lecho de celita y se lavó el filtrado con una disolución acuosa saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3x3 mL), una disolución 1N de HCl en agua (3x3 mL) y una disolución acuosa saturada de NaCl (3x3 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. Tras confirmar por <sup>1</sup>H-RMN que el producto presentaba una pureza adecuada se utilizó directamente en la siguiente etapa.

**(S)-*tert*-butil (4-metil-1-oxopentan-2-il) carbamato, 55:**<sup>26</sup> Rto.: 98%. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 9.60 (s<sub>a</sub>, 1H), 4.90 (s<sub>a</sub>, 1H), 4.69 (dd, *J* = 10.3, 3.6 Hz, 1H), 4.25 (m, 1H), 1.80 - 1.30 (m, 3H), 1.47 (s, 9H), 0.96 (d, *J* = 6.6Hz, 6H).

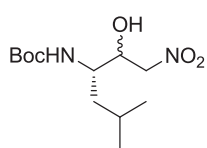
<sup>25</sup> Blomberg, D.; Brickmann, K.; Kihlberg, J. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 10937-10944.

<sup>26</sup> Alfaro, R.; Yuste, F.; Ortiz, B.; Sánchez-Obregón, R.; García Ruano, J. L. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 357-363.

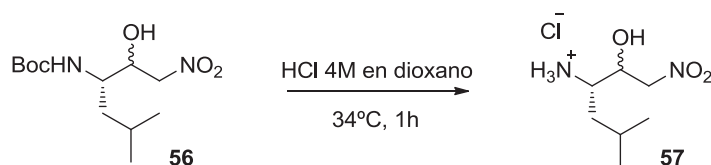
5.10.3. Síntesis del compuesto **56**: Reacción de Henry


Esquema 5.34. Reacción de Henry.

En un matraz esférico se disolvió el aldehído **55** (923 mg, 4.29 mmol) en nitrometano (2.3 mL, 43.0 mmol) y se le añadió Et<sub>3</sub>N (180 µL, 1.3 mmol). La mezcla de reacción se dejó agitando 16 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó mediante columna cromatográfica (AcOEt:Hexano = 1:2) obteniéndose el producto deseado en forma de aceite amarillo y como mezcla 1:1 de dos diastereoisómeros (*sin* y *anti*-**56**).

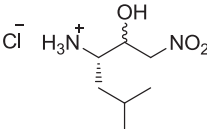
**Terc-butil-((3*S*)-2-hidroxi-5-metil-1-nitrohexan-3-il) carbamato (**56**):**


Rto.: 47% (mezcla de diastereoisómeros 1:1). Aceite amarillo.  
<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 4.64 (d, *J* = 9.4, 1H), 4.57 - 4.49 (m, 1H), 4.41 (dd, *J* = 13.6, 9.1 Hz, 2H), 4.32 - 4.23 (m, 2H), 3.76 - 3.64 (m, 2H), 3.01 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 1.70 - 1.57 (m, 2H), 1.43 (s, 18H), 1.38 - 1.31 (m, 1H), 1.26 - 1.20 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 6.7 Hz, 12H). <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 156.9, 156.3, 80.9, 80.3, 79.5, 78.6, 72.7, 71.0, 52.3, 50.8, 41.3, 39.7, 25.0, 24.9, 23.6, 23.2, 22.3, 21.7.

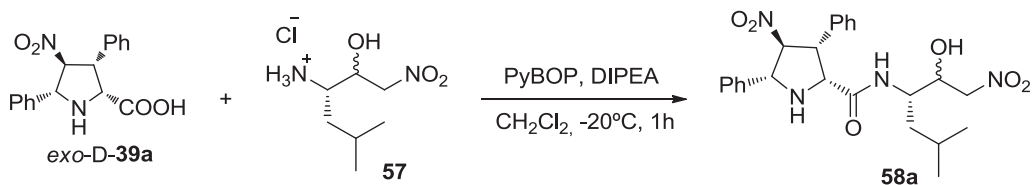
 5.10.4. Desprotección del grupo Boc del compuesto **56**

 Esquema 5.35. Síntesis del clorhidrato **57**.

El compuesto de la etapa anterior **56** (428 mg, 1.55 mmol) se disolvió en HCl 4M en dioxano (6.5 mL, 26 mmol) y se dejó agitando a 34°C durante 1 hora. A continuación se evaporó la mezcla a presión reducida y tras confirmar mediante <sup>1</sup>H-RMN que el producto presentaba una pureza adecuada se empleó directamente en la siguiente etapa.

#### Clorhidrato de (3*S*)-2-hidroxi-5-metil-1-nitrohexano amonio (**57**):


 Rto.: 98% (mezcla de diastereoisómeros 1:1). Aceite amarillo. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>OH) δ = 4.74 (td, *J* = 12.4, 11.7, 3.2 Hz, 2H), 4.68 - 4.59 (m, 2H), 4.52 (dd, *J* = 12.6, 9.7 Hz, 1H), 4.39 - 4.34 (m, 2H), 3.74 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.68 - 3.64 (m, 3H), 3.58 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 3.48 - 3.43 (m, 1H), 1.80 - 1.73 (m, 2H), 1.65 - 1.58 (m, 2H), 1.57 - 1.50 (m, 2H), 1.02 - 0.99 (m, 12H).

#### 5.10.5. Acoplamiento peptídico del compuesto **57** y ácido *exo*-D-**39a**

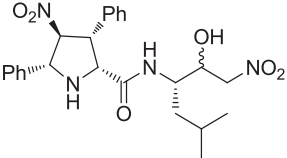


Esquema 5.36. Acoplamiento peptídico entre el ácido *exo*-D-**39a** y el clorhidrato **57**.

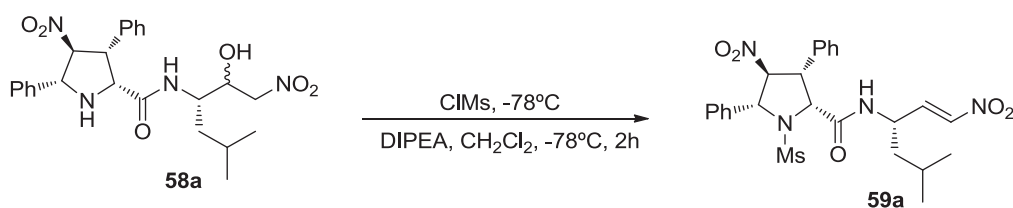
En un matraz esférico se disolvió el crudo de la reacción anterior **57** (206 mg, 0.97 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 mL) y se enfrió a -20°C. A continuación se añadió el ácido *exo*-D-**39a** (302 mg, 0.97 mmol), PyBOP (656 mg, 1.26 mmol) y DIPEA (507 μL, 2.91 mmol). La suspensión resultante se agitó a -20°C durante una hora. Transcurrido este tiempo se adicionó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a la mezcla, se lavó con una disolución 1N de HCl en agua (3x5 mL), una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2x5 mL) y una disolución acuosa saturada de NaCl (1x5 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. Tras analizar el crudo de reacción por <sup>1</sup>H-RMN, se purificó mediante columna cromatográfica (AcOEt:Hexano = 1:1) obteniendo el

producto deseado **58a** en forma de aceite amarillo y como mezcla 1:1 de dos diastereoisómeros (*sin* y *anti*-**58a**).

**(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-*N*-((3*S*)-2-hidroxi-5-metil-1-nitrohexan-3-il)-3,5-difenil-4-nitropirrolidin-2-carboxamida (**58a**):**


 Rto.: 38% (mezcla de diastereoisómeros 1:1). Aceite amarillo.  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.60 – 7.53 (m, 6H), 7.51 – 7.40 (m, 6H), 7.37 – 7.22 (m, 8H), 6.49 (d,  $J$  = 9.4 Hz, 1H), 6.45 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 5.18 – 5.11 (m, 2H), 4.89 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 4.85 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 4.52 (t,  $J$  = 9.4 Hz, 2H), 4.37 – 4.29 (m, 2H), 4.17 – 4.06 (m, 3H), 3.98 – 3.93 (m, 2H), 3.78 – 3.70 (m, 3H), 3.58 – 3.51 (m, 1H), 2.94 (dd,  $J$  = 14.5, 10.0 Hz, 1H), 1.42 – 1.28 (m, 2H), 1.26 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 4H), 0.90 – 0.78 (m, 12H).

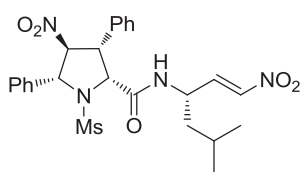
**5.10.6. Síntesis del nitroalqueno **59a**: Eliminación de McMurry**



Esquema 5.37. Eliminación de McMurry.

El compuesto **58a** obtenido en la etapa anterior (108 mg, 0.23 mmol) se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (450  $\mu\text{L}$ ), bajo atmósfera inerte y la mezcla resultante se llevó a  $-78^\circ\text{C}$ . A continuación se adicionó a goteo cloruro de mesilo (18  $\mu\text{L}$ , 0.23 mmol) y tras esto se añadió lentamente una disolución de DIPEA (96  $\mu\text{L}$ , 0.55 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (115  $\mu\text{L}$ ). La suspensión se agitó a  $-78^\circ\text{C}$  durante 2 horas, tras las cuales se dejó que alcanzara temperatura ambiente, se adicionó más  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se lavó con agua (3x1 mL), con una disolución 1N de HCl en agua (3x1 mL) y con una disolución acuosa saturada de NaCl (3x1 mL). Se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. Tras analizar el crudo de reacción mediante  $^1\text{H-RMN}$ , se purificó mediante columna cromatográfica (AcOEt:Hexano = 1:1) obteniendo el producto **59a** en forma de sólido blanco.

**(2R,3S,4S,5R)-N-((S,E)-5-metil-1-nitrohex-1-en-3-il)-1-(metilsulfonil)-3,5-difenil-4-nitropirrolidin-2-carboxamida (59a):**



Rto.: 49%. Sólido blanco. IR (puro) 2957, 1686, 1553, 1525, 1350, 1330, 1148, 697  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.81 (dd,  $J$  = 8.9, 6.8 Hz, 2H), 7.50 - 7.43 (m, 3H), 7.39 - 7.32 (m, 5H), 7.03 (s<sub>a</sub>, 2H), 6.12 (dd,  $J$  = 12.2, 9.0 Hz, 1H), 5.57 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 5.31 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 4.98 (d,  $J$  = 9.3 Hz, 1H), 4.54 - 4.47 (m, 1H), 4.43 - 4.36 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.23 - 1.16 (m, 1H), 1.04 - 0.97 (m, 1H), 0.91 - 0.85 (m, 1H), 0.72 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 3H), 0.61 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 168.8, 141.6, 139.9, 135.1, 131.1, 130.4, 129.6, 129.5, 129.3, 129.2, 128.3, 92.1, 67.5, 65.0, 50.7, 46.5, 42.8, 42.5, 24.3, 22.8, 22.0.  $[\alpha]_D^{25}$  : -33.1 ( $c$  0.45,  $\text{CHCl}_3$ ). HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$ : 531.1913; Hallado: 531.1929.

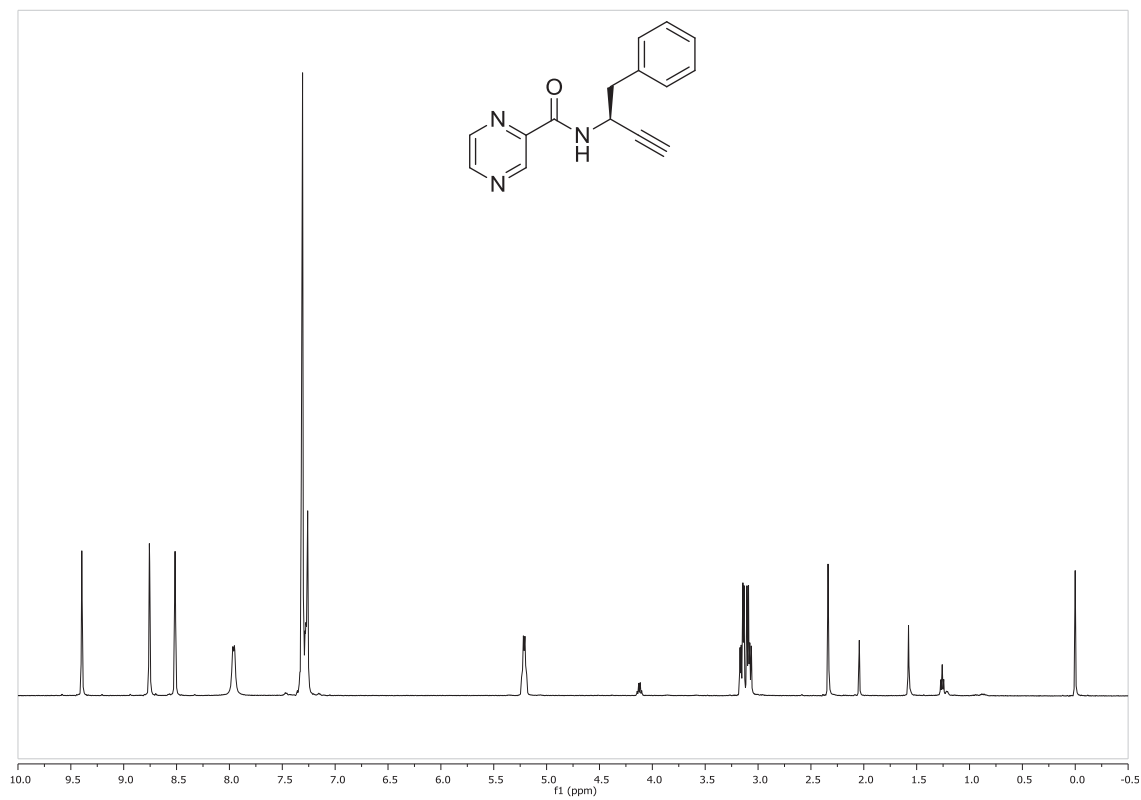
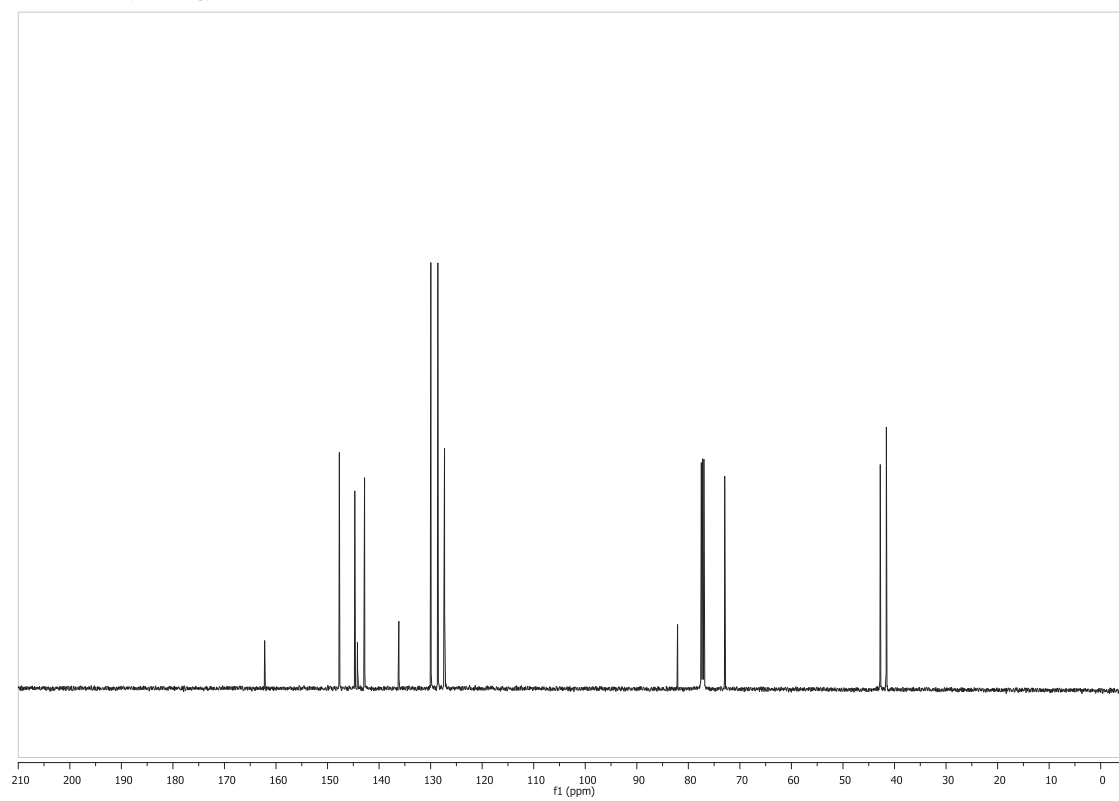
*Anexos*

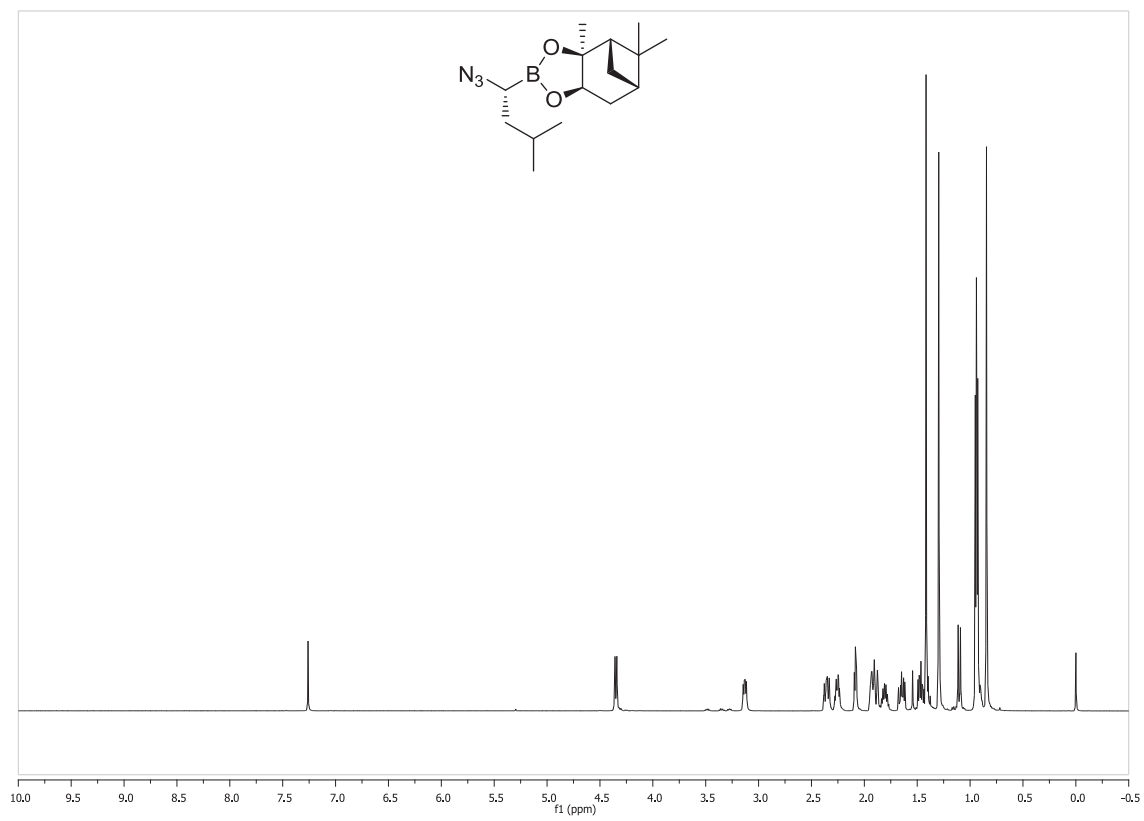
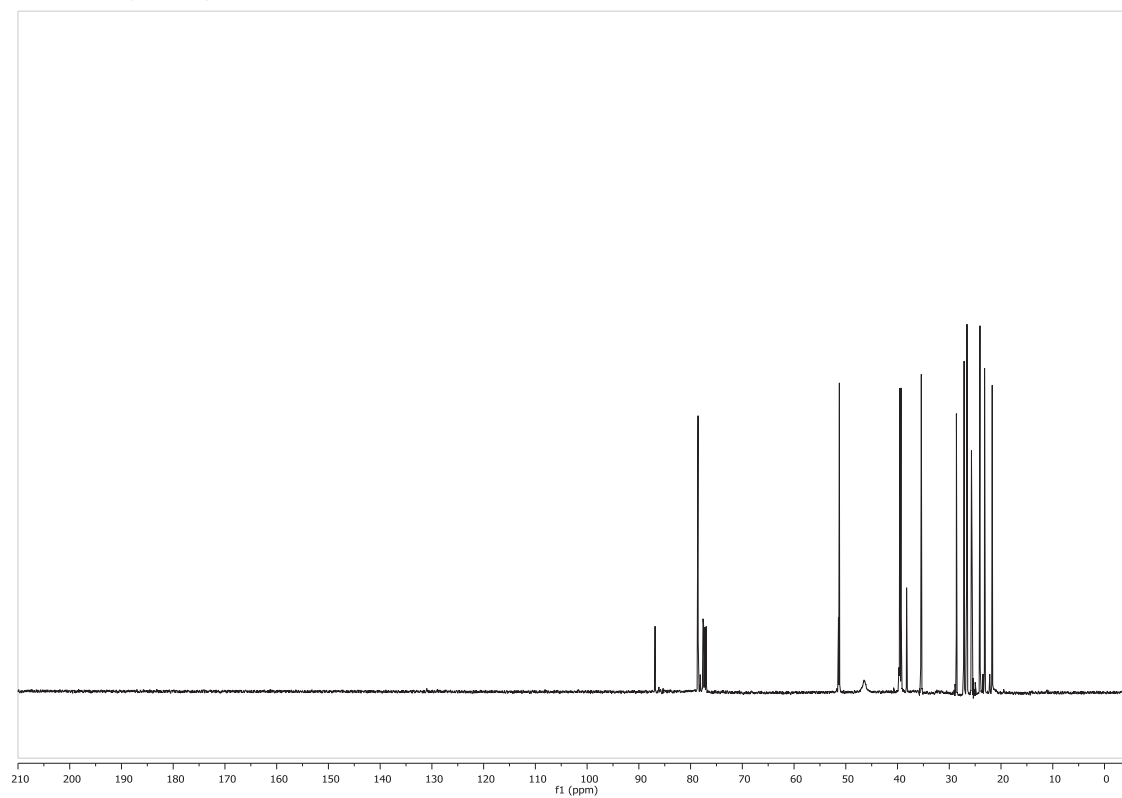




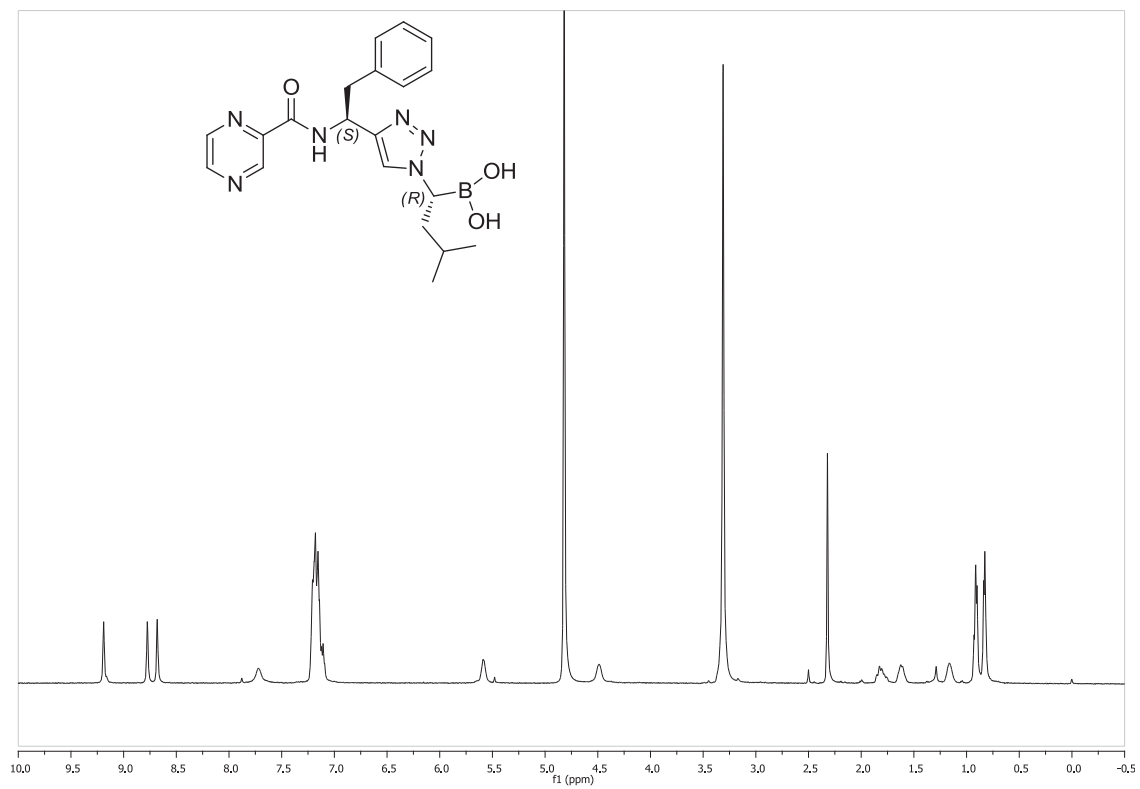
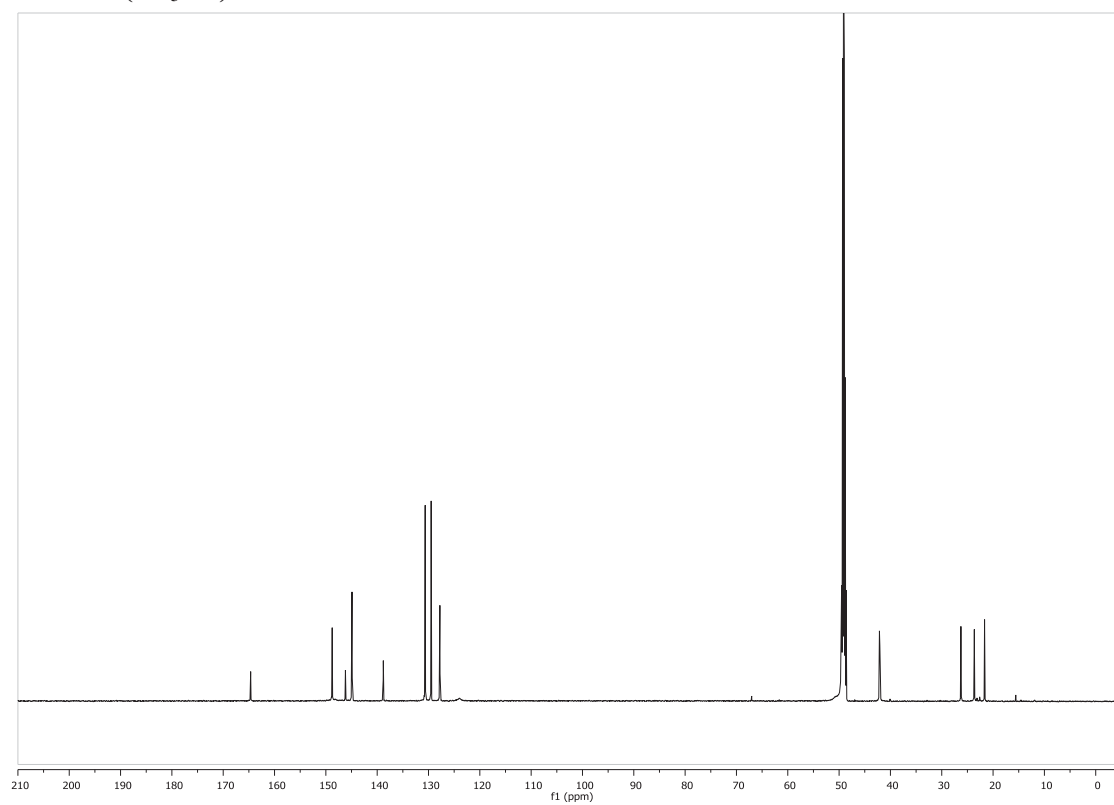
Anexo A: Selección de espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN

## Compuesto 5

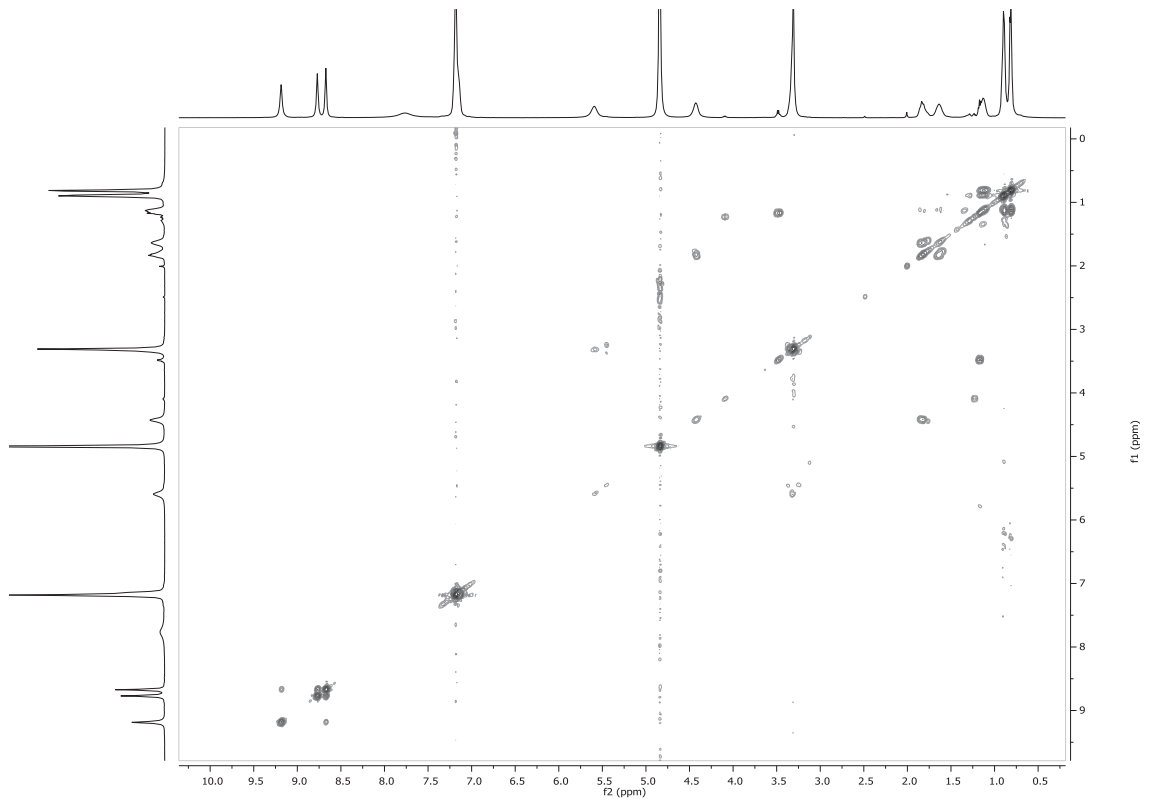
 $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )

Compuesto **10** $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )

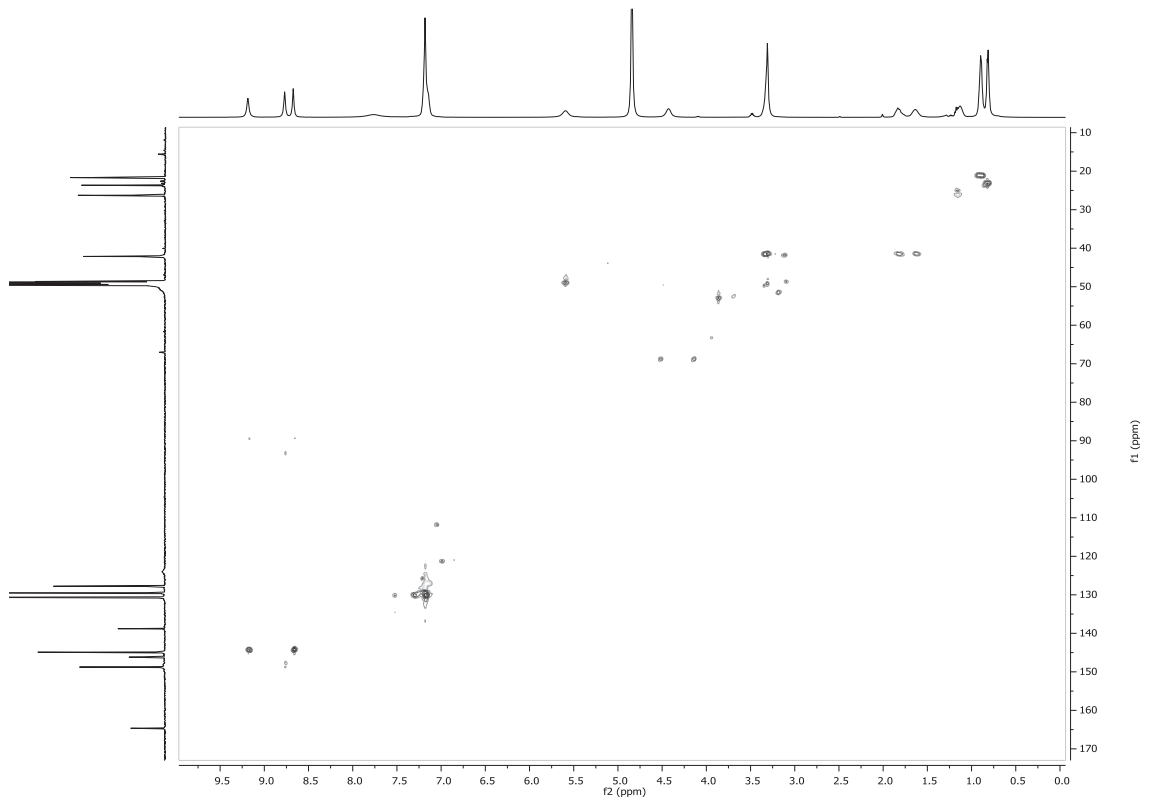
## Compuesto 1

 $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

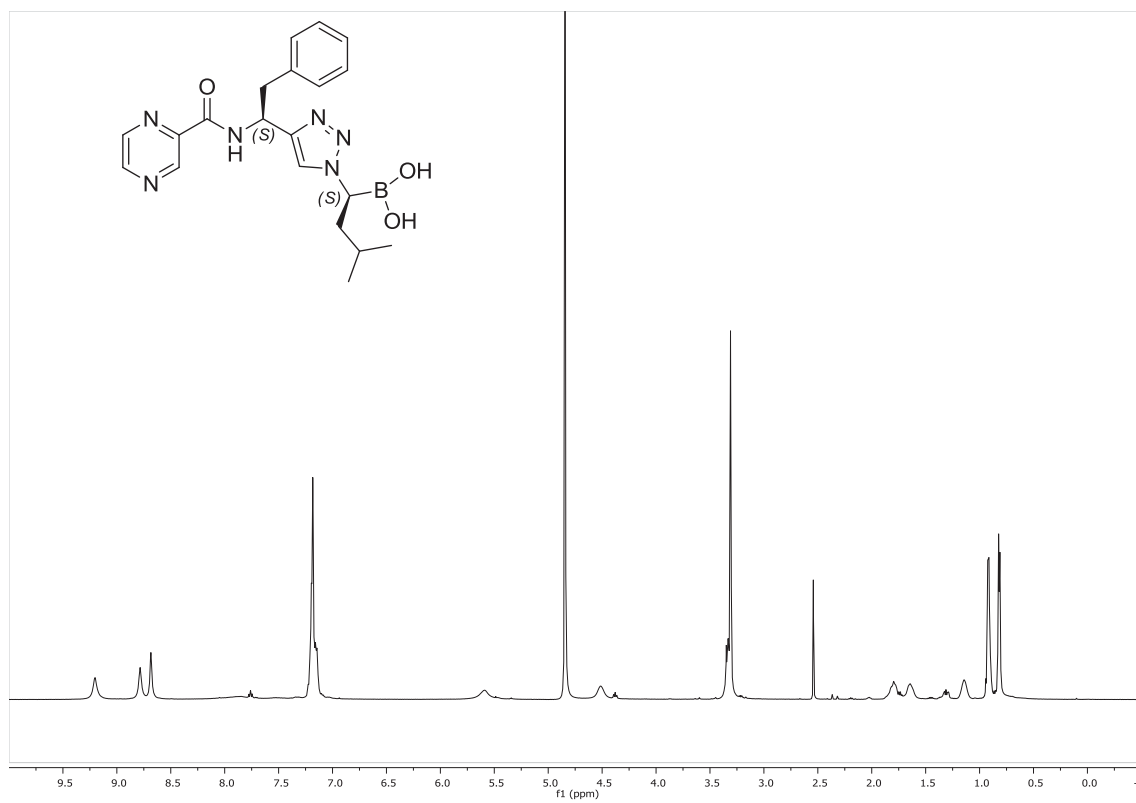
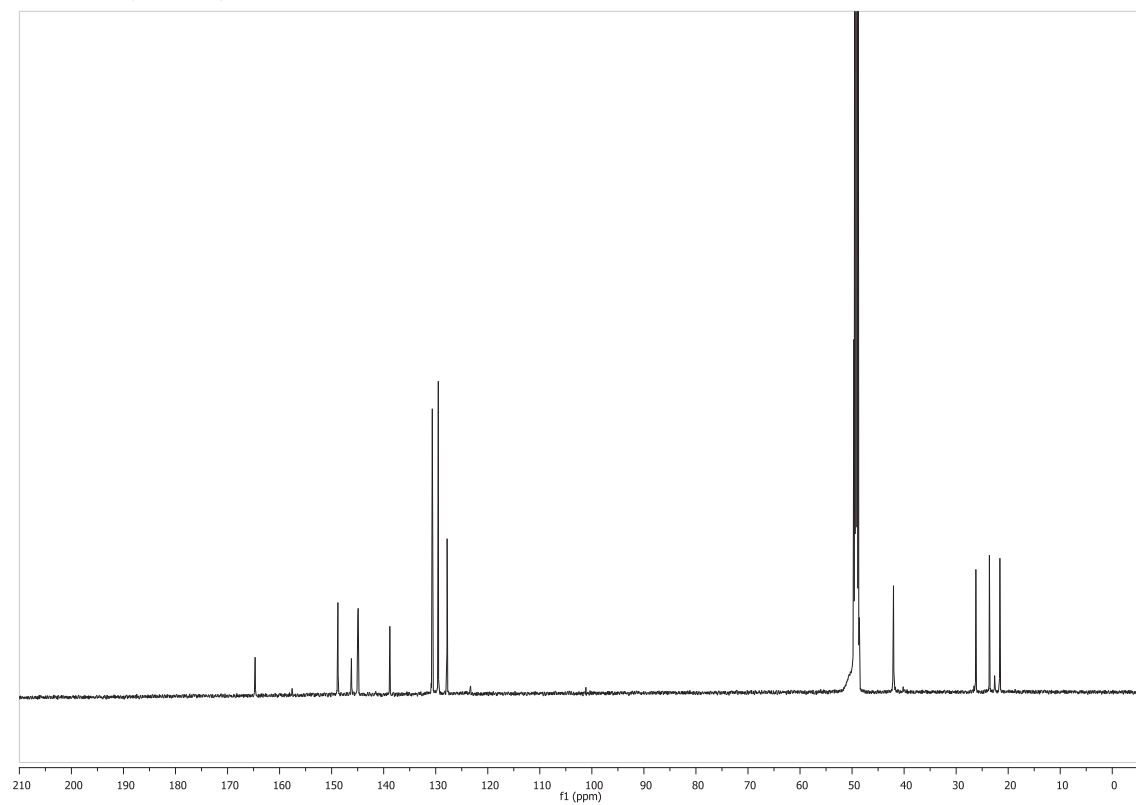
**Espectro COSY (CD<sub>3</sub>OD)**



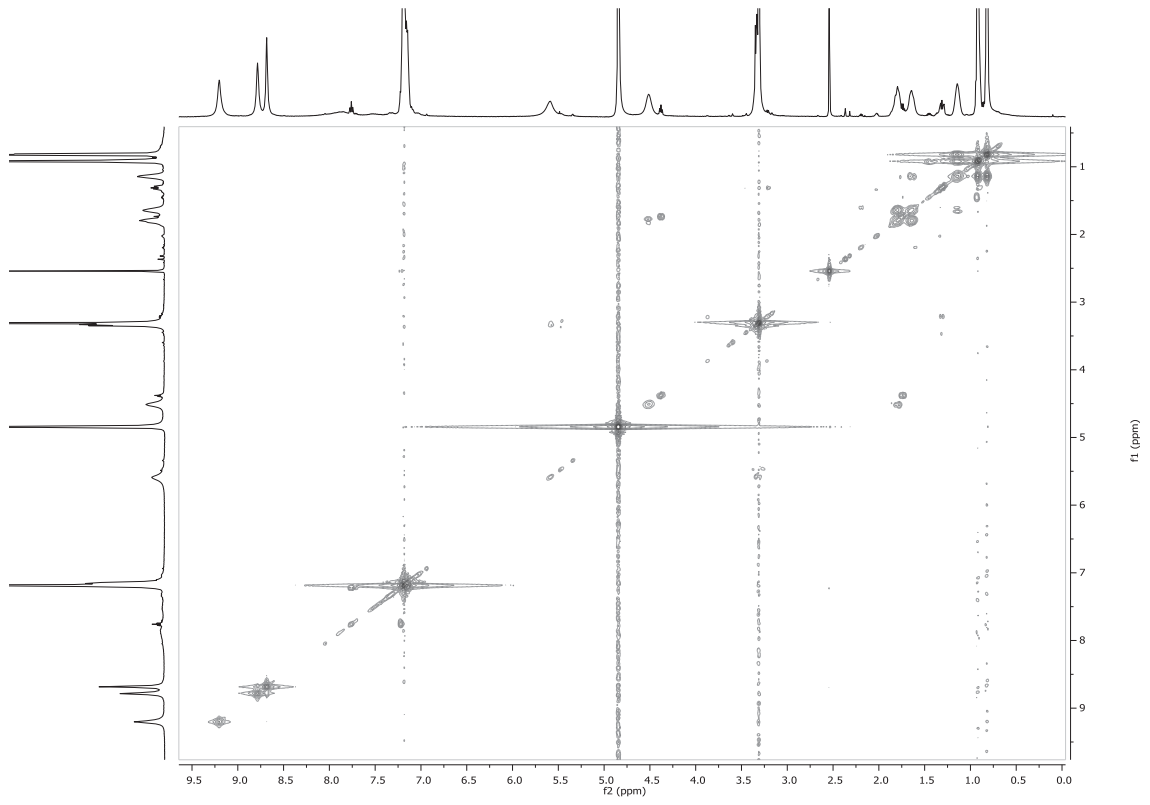
**Espectro HSQC (CD<sub>3</sub>OD)**



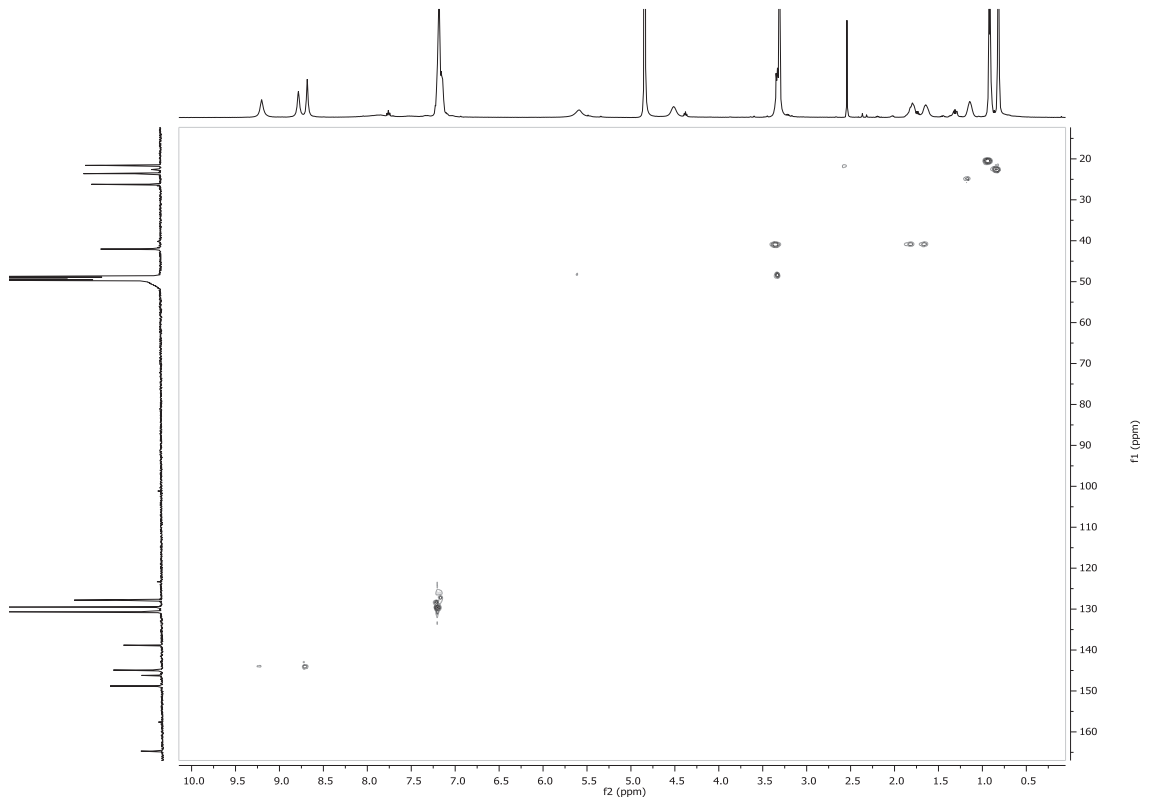
## Compuesto 2

 $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

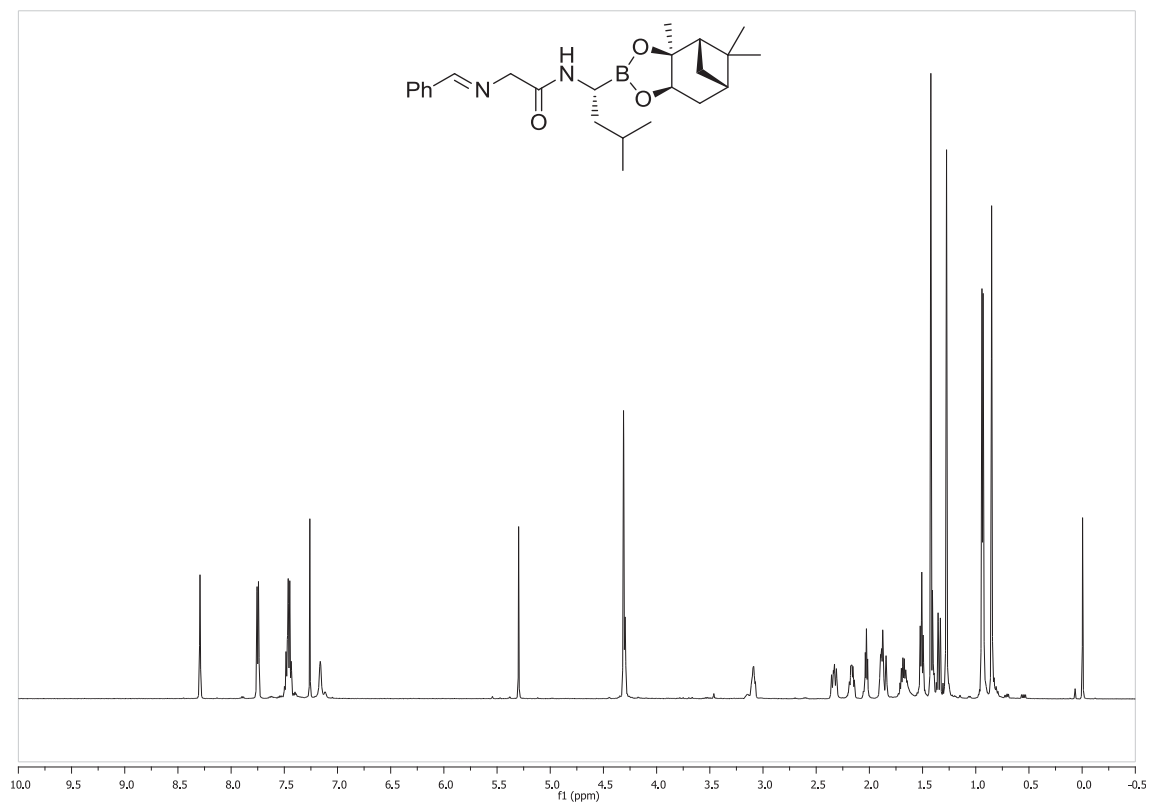
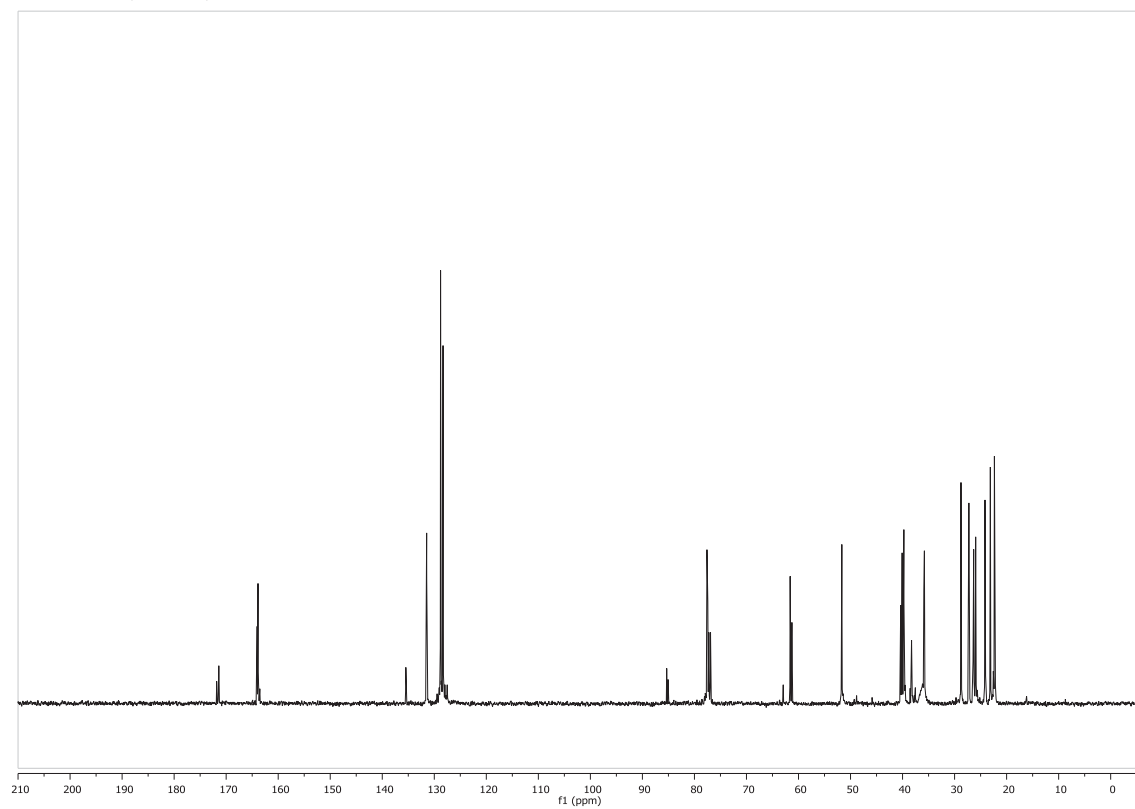
**Espectro COSY (CD<sub>3</sub>OD)**

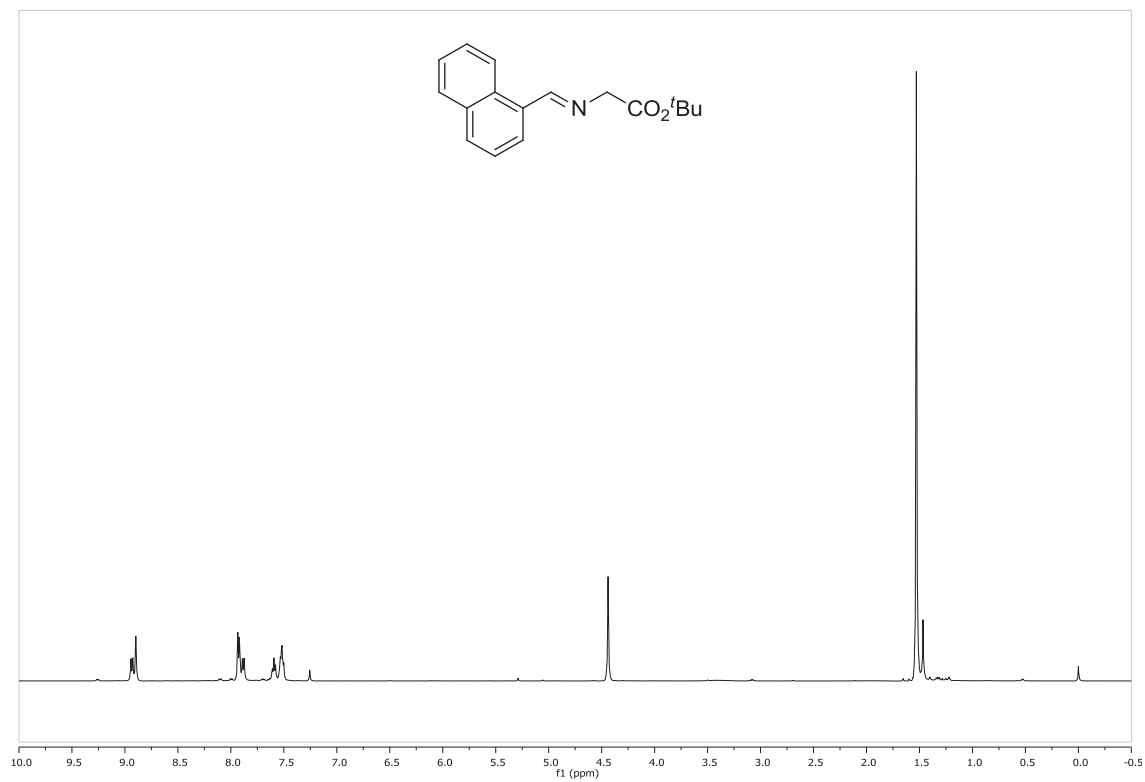
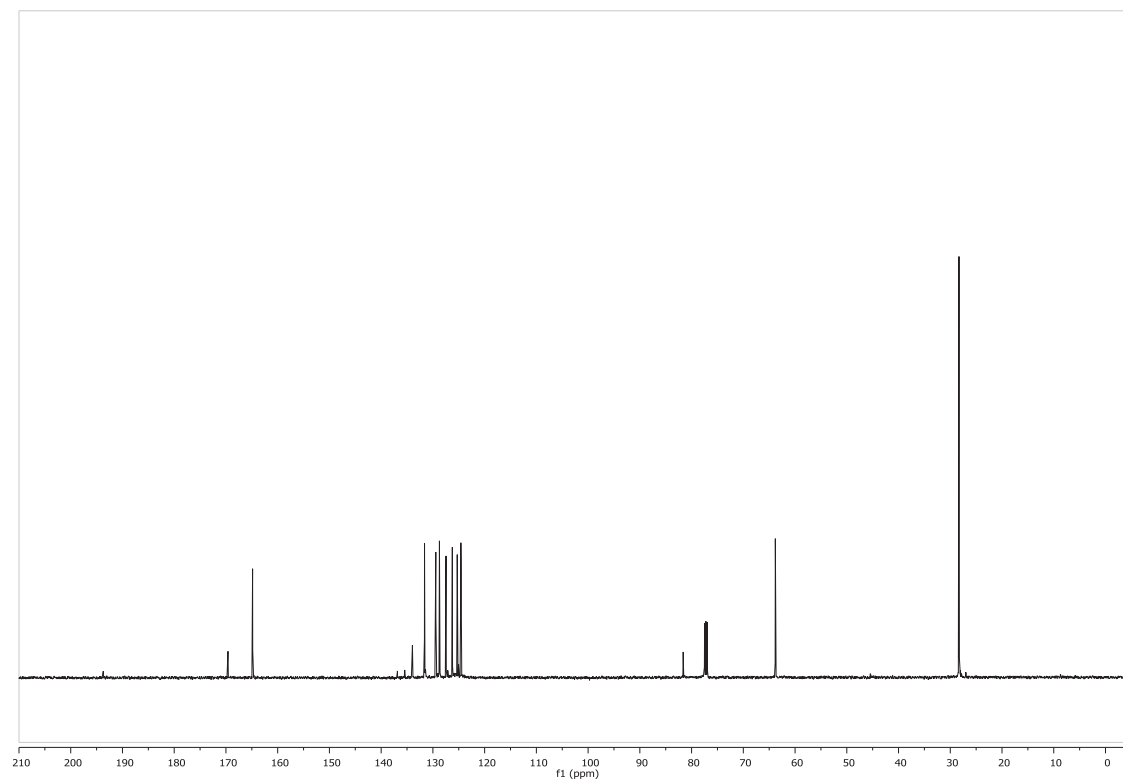


**Espectro HSQC (CD<sub>3</sub>OD)**

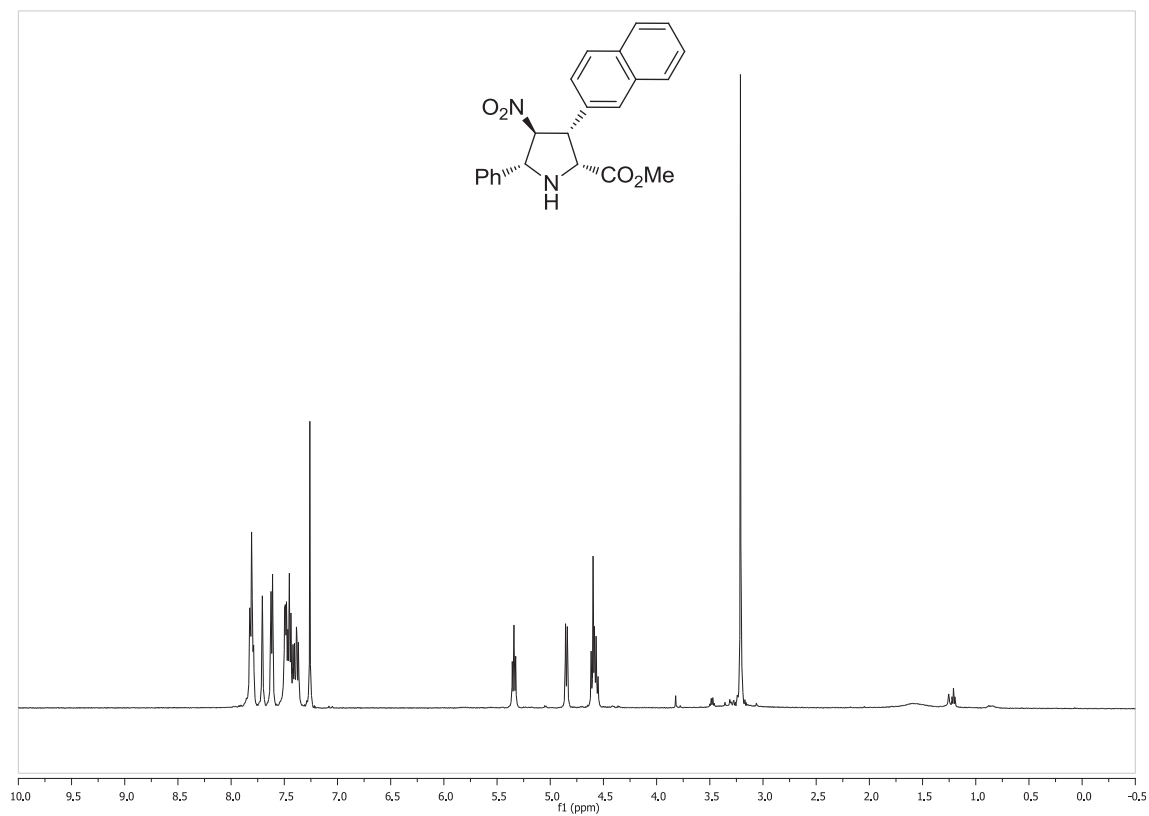
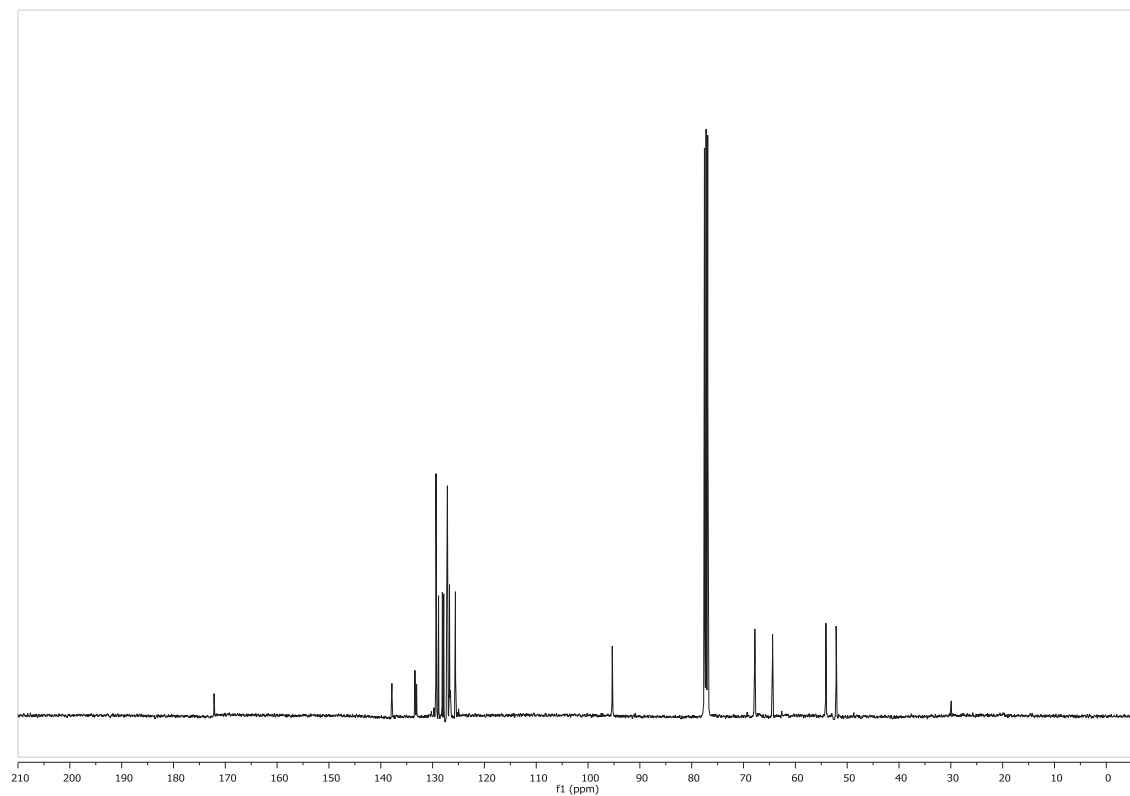


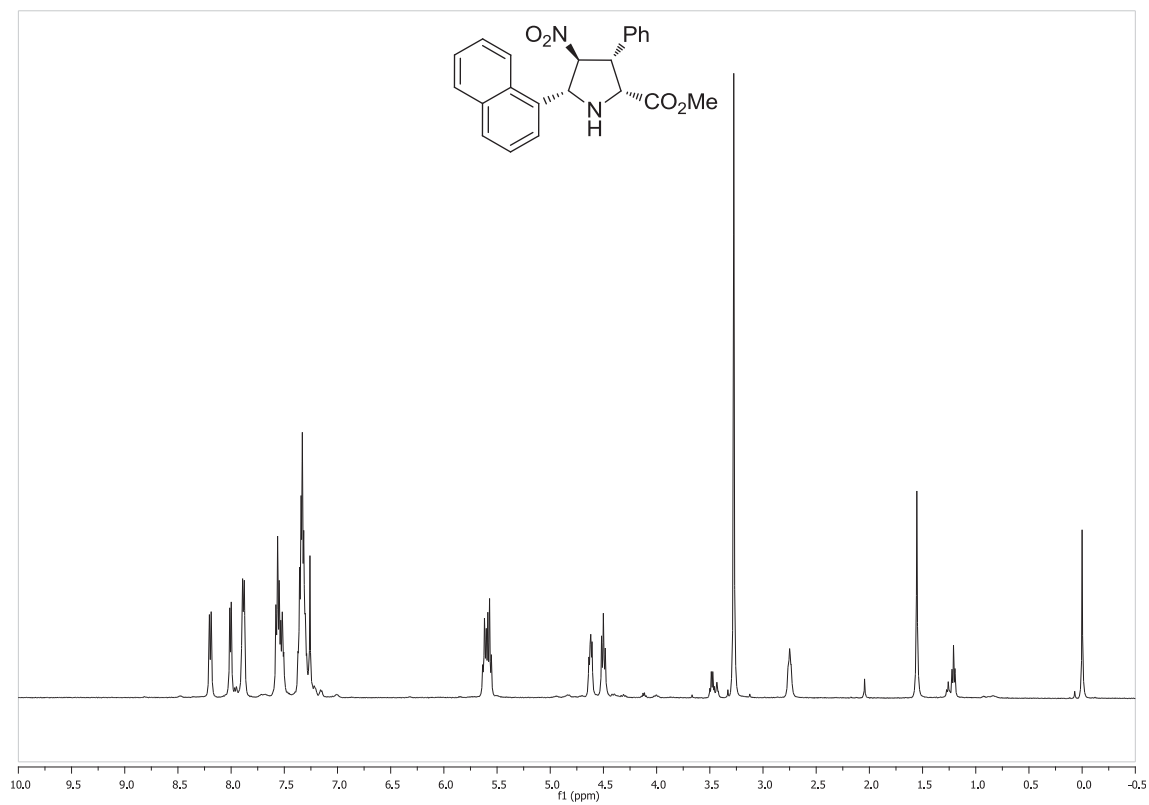
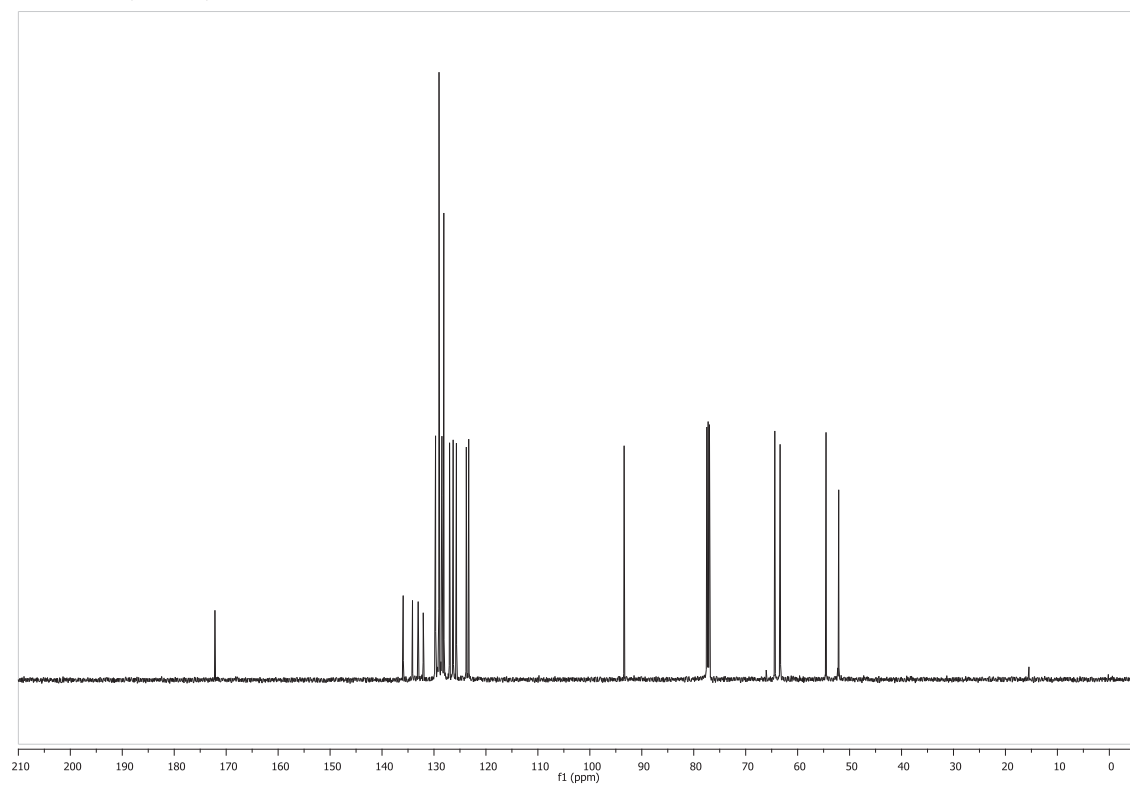
## Compuesto 19

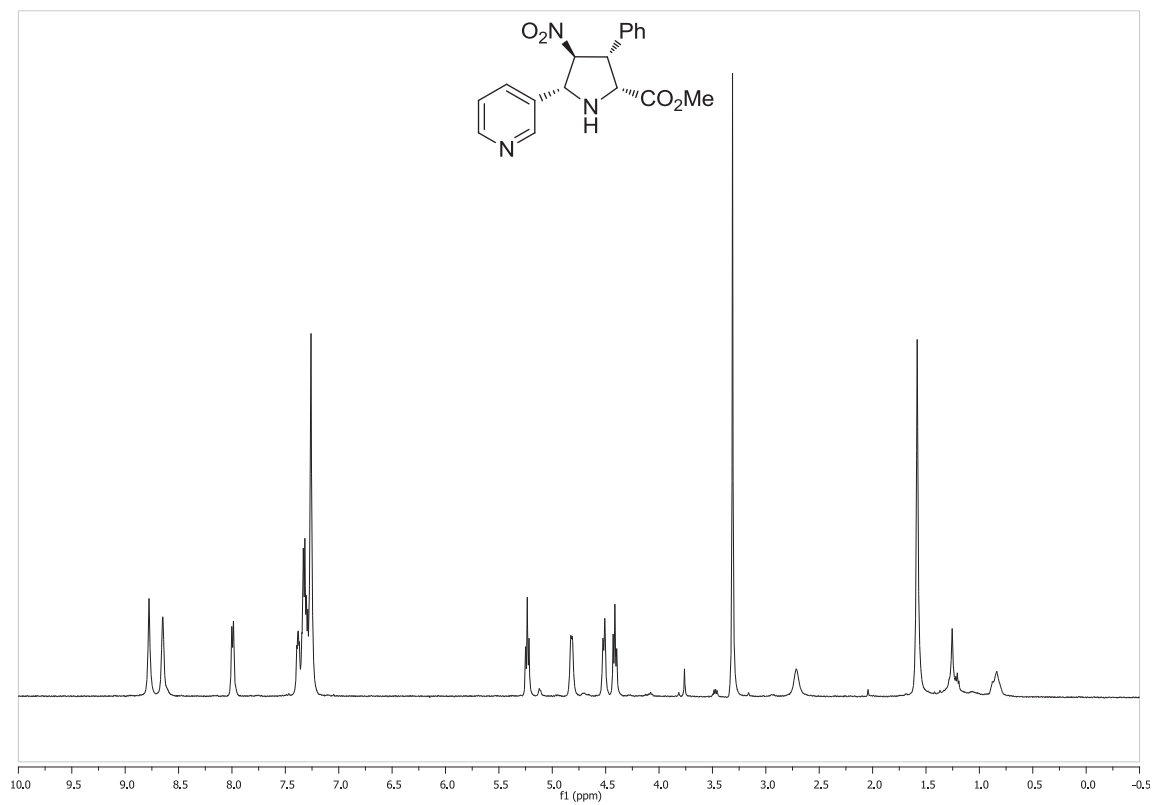
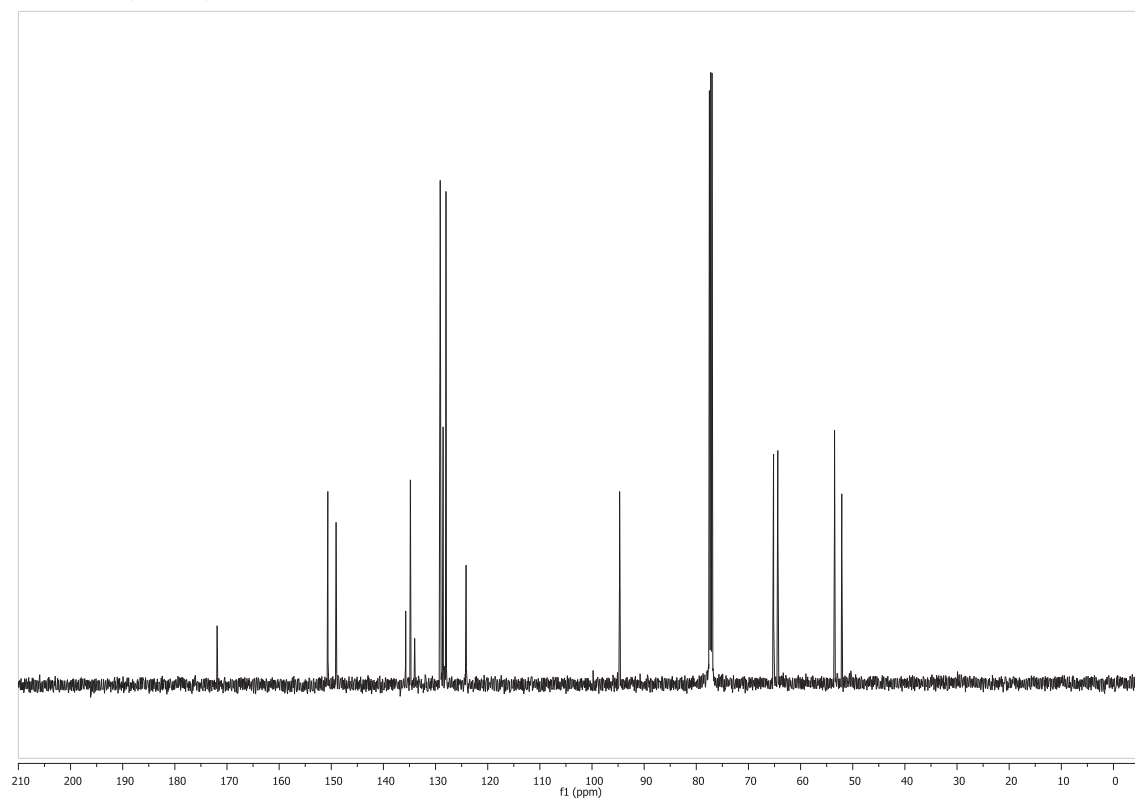
 $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )

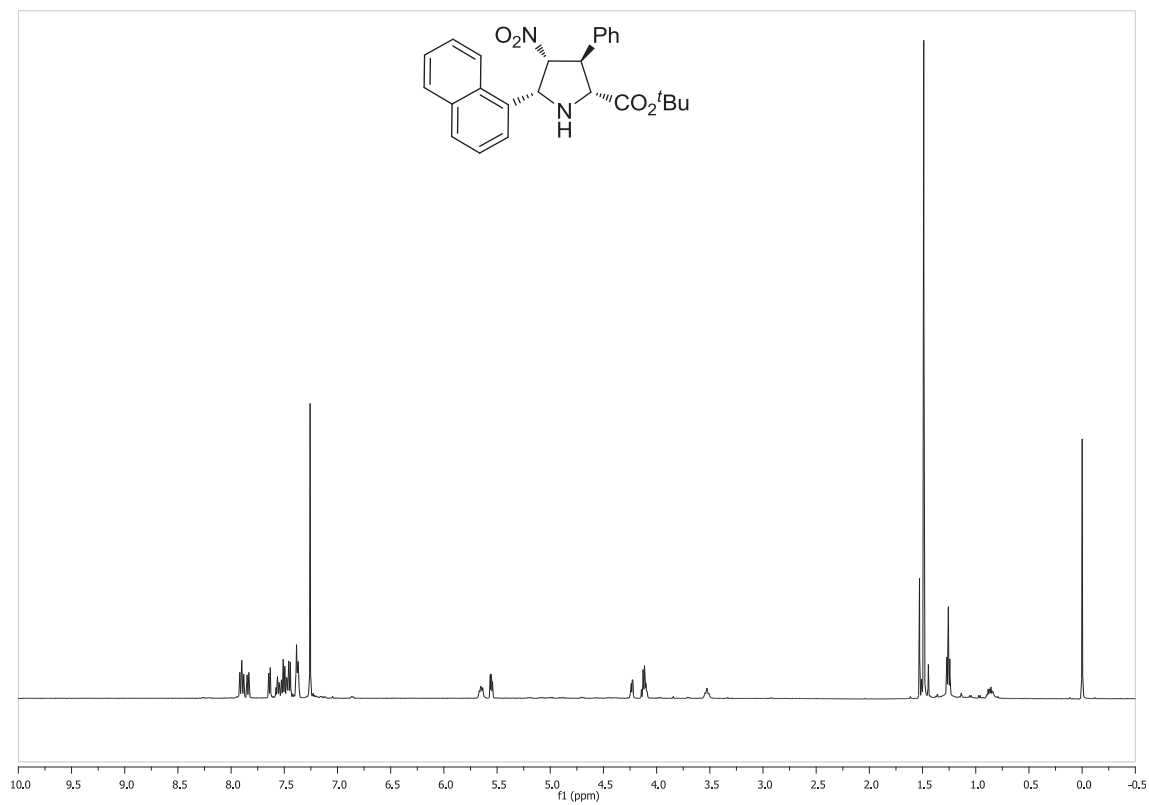
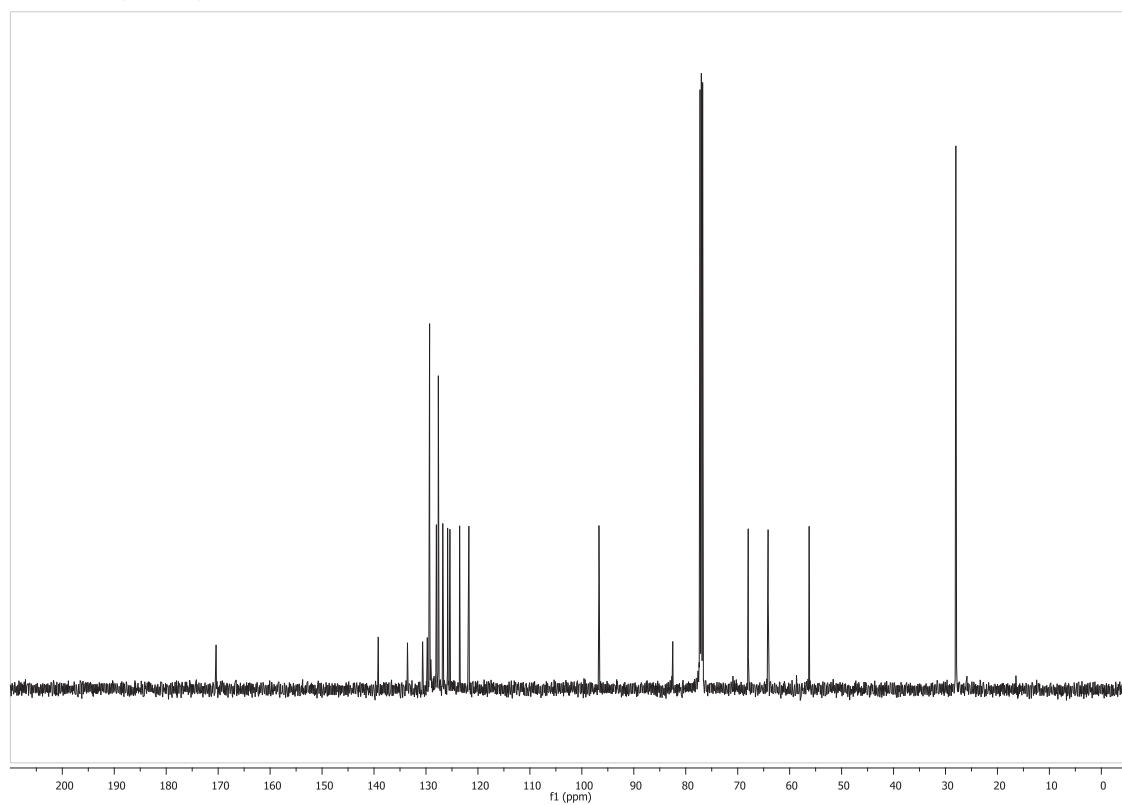
Compuesto **34f** $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )

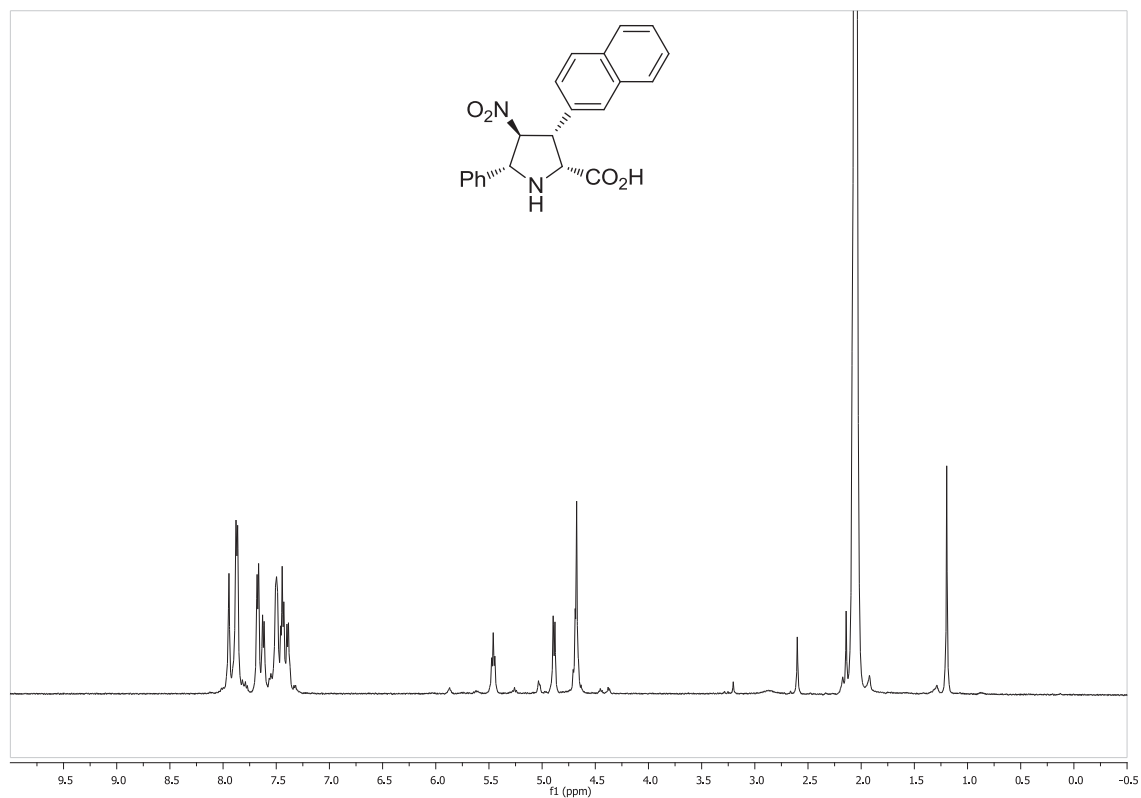
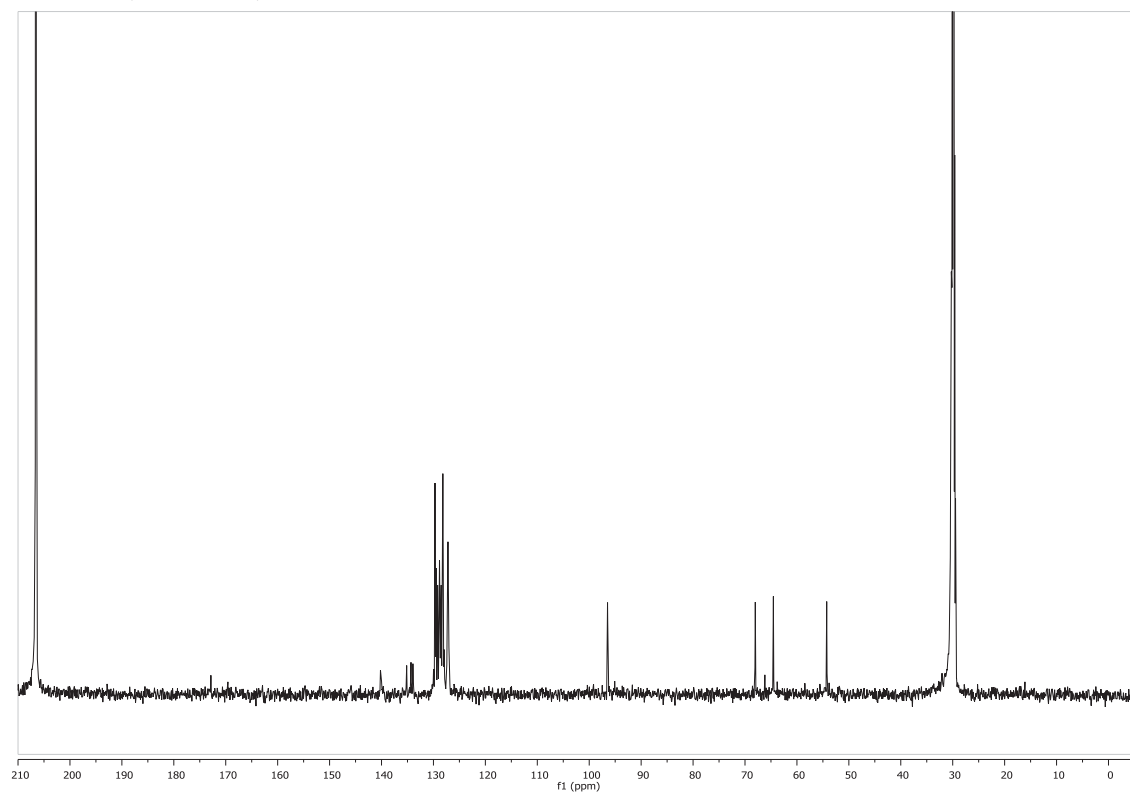


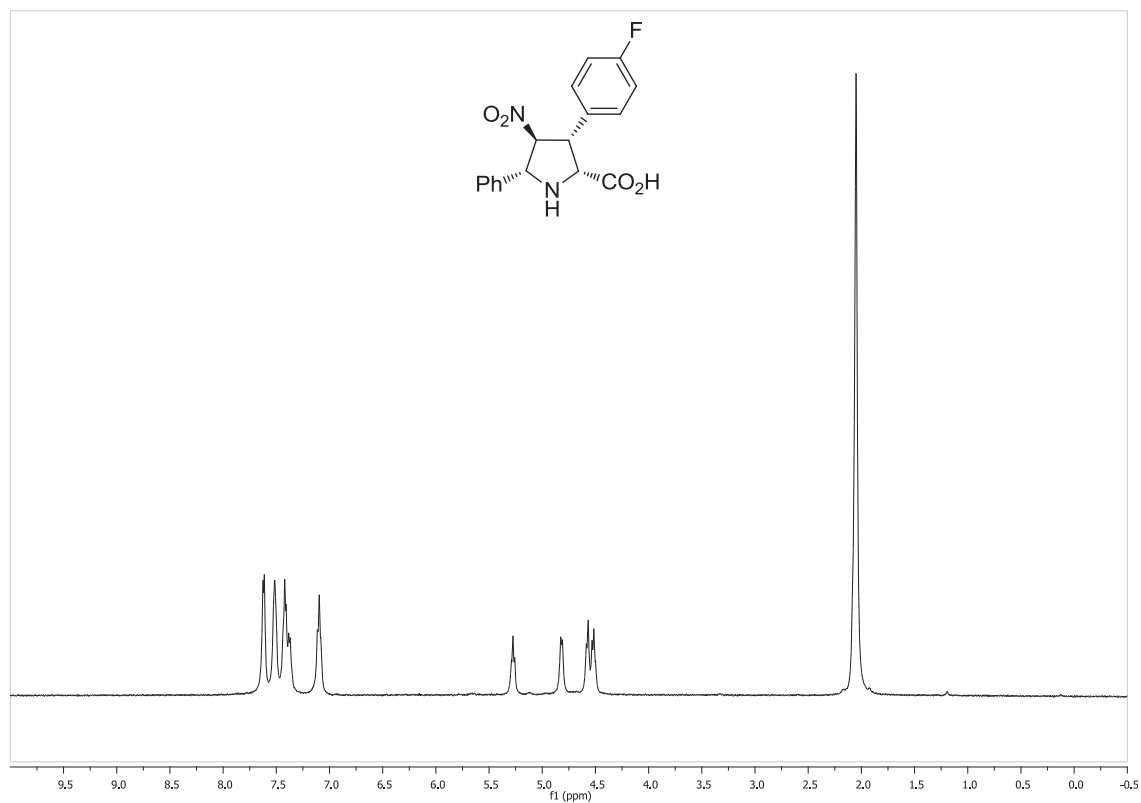
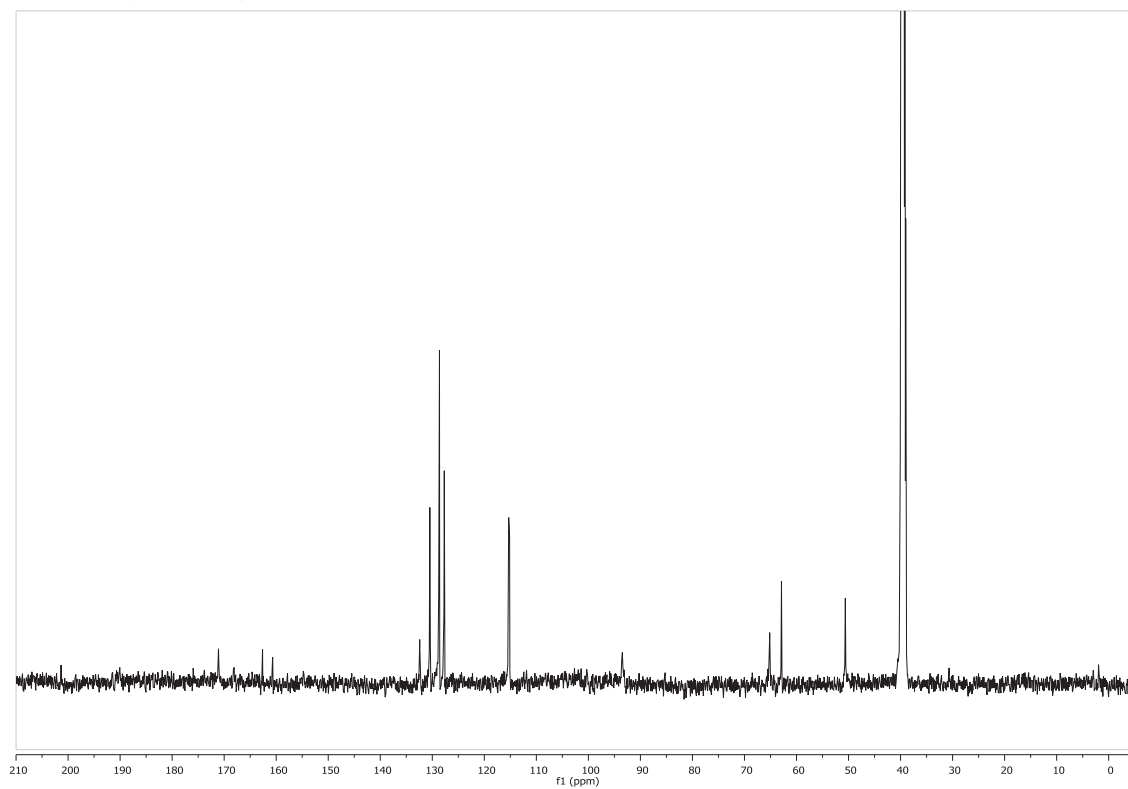
Compuesto *exo*-D-35b $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )

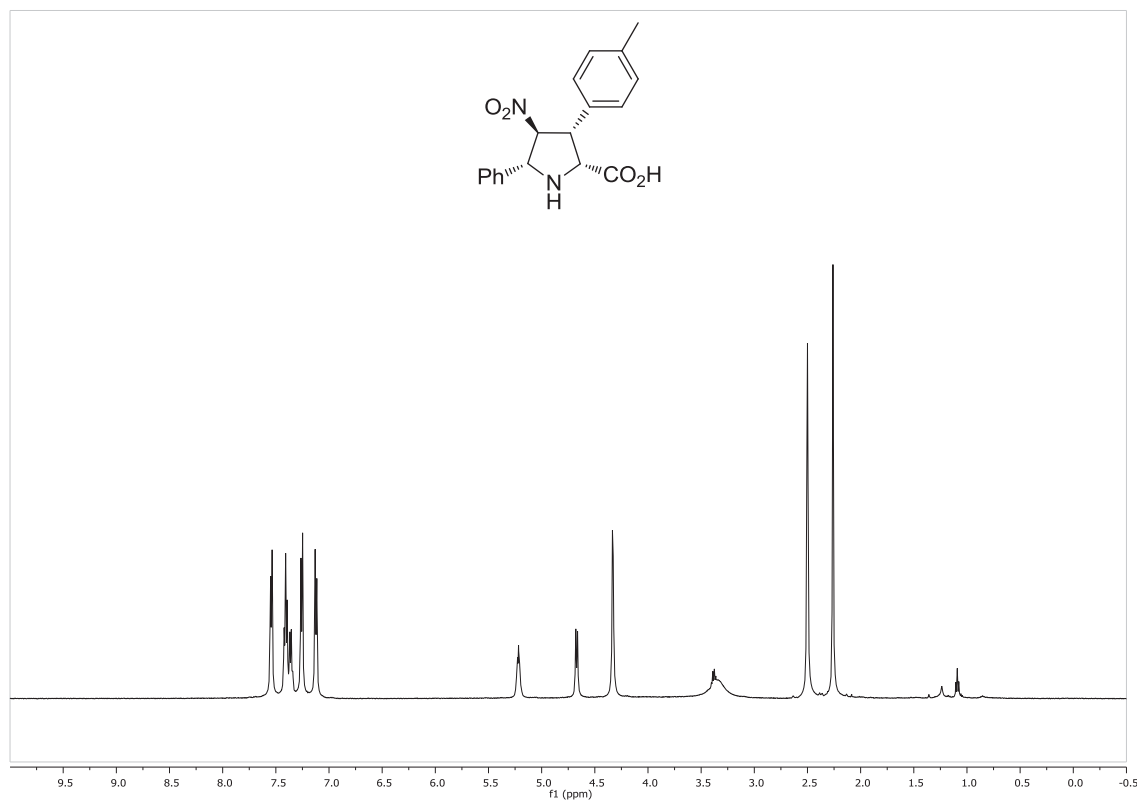
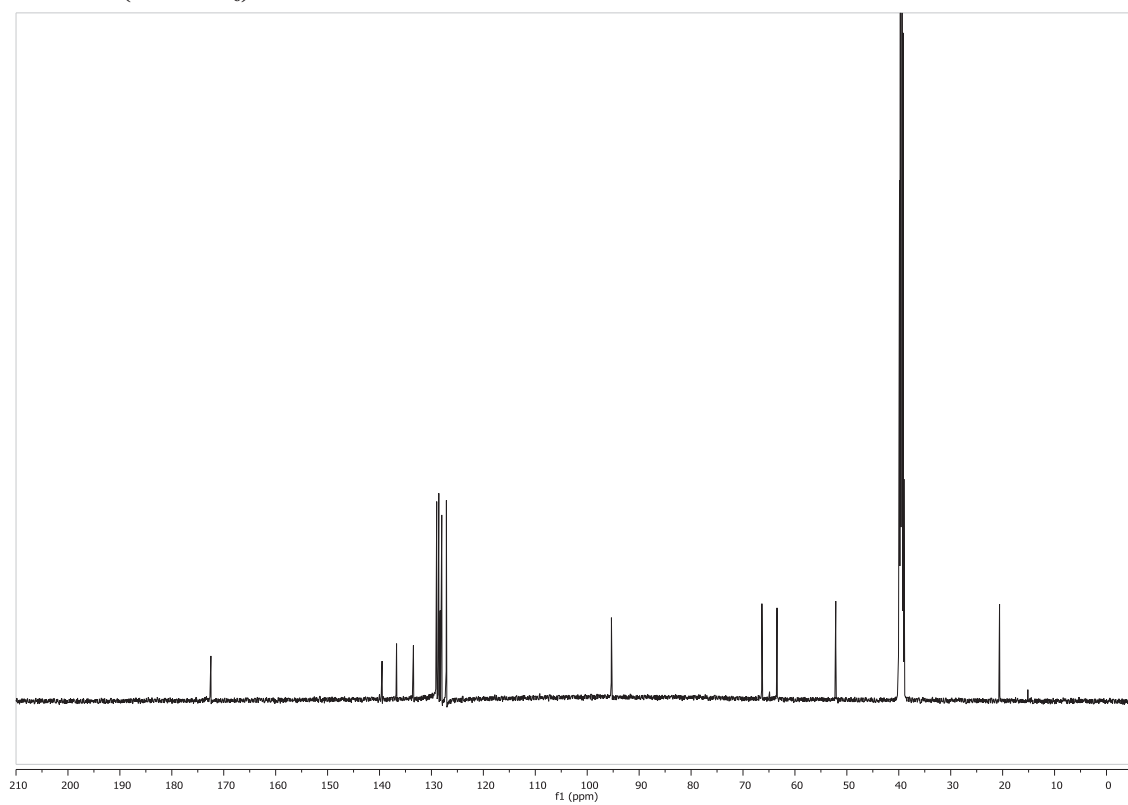
Compuesto *exo*-D-35i $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )

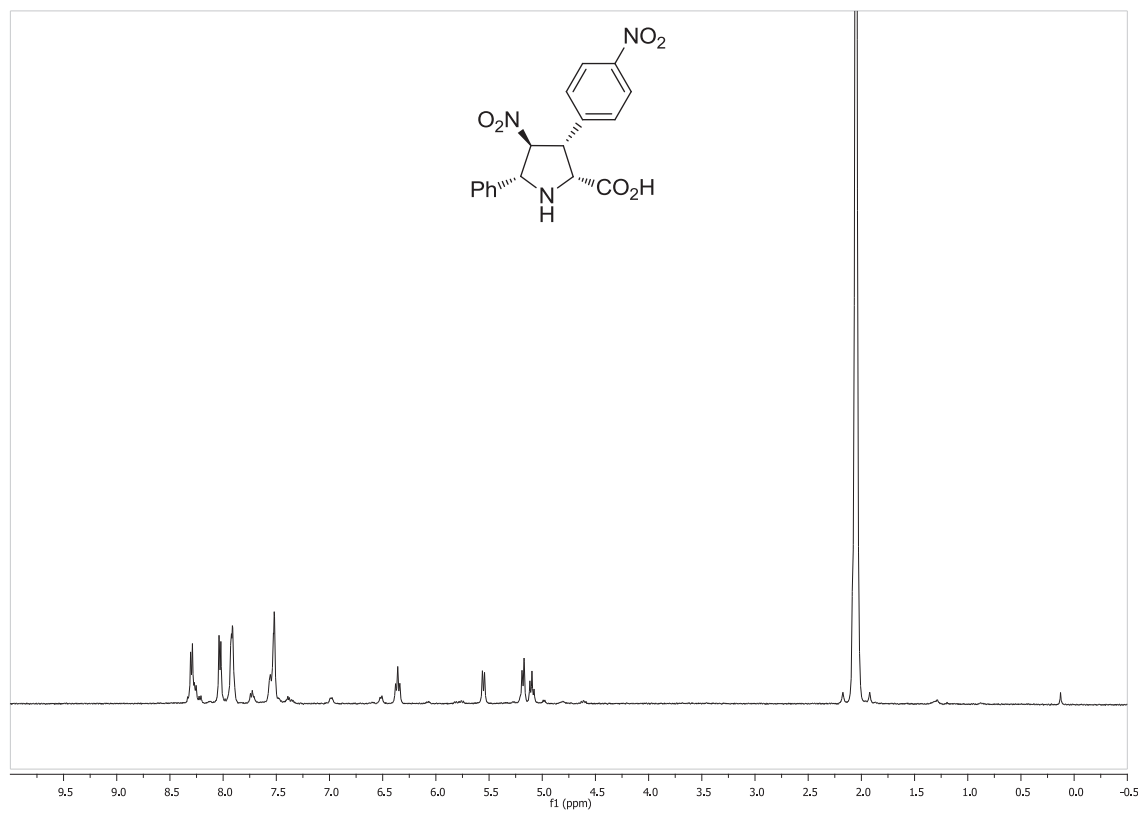
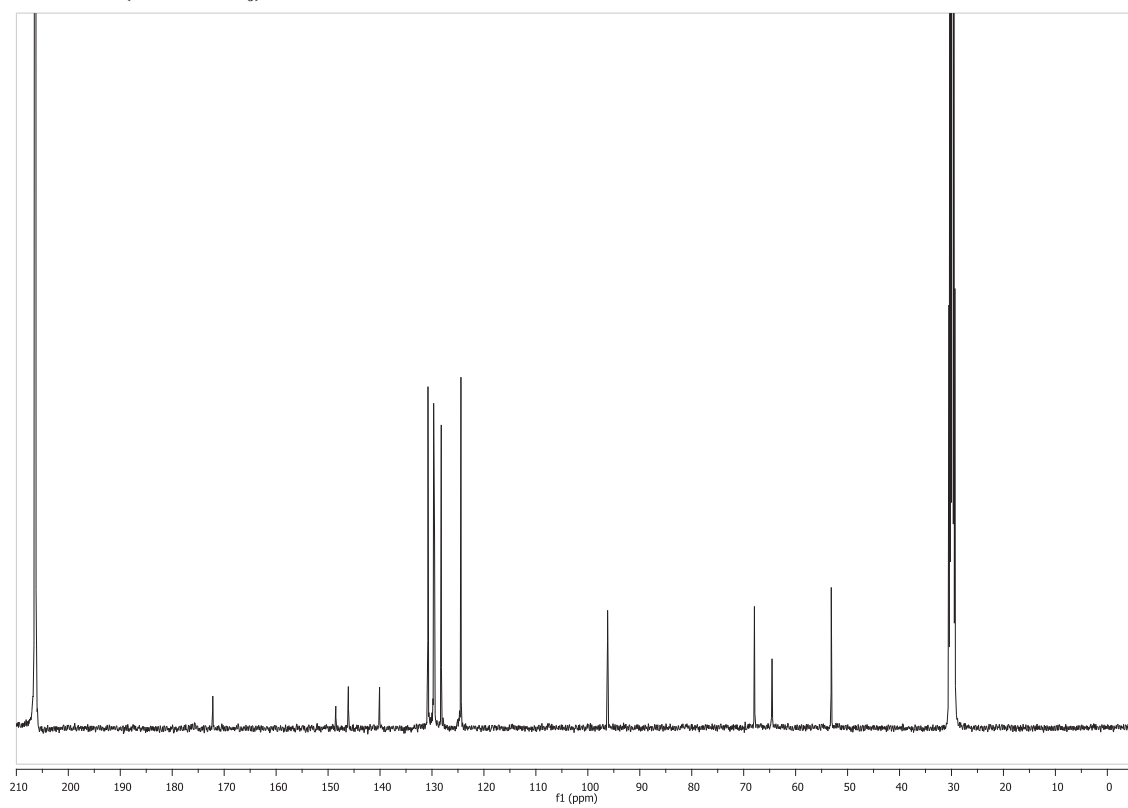
Compuesto *exo*-D-35j $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )

Compuesto *endo*-D-351 $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )

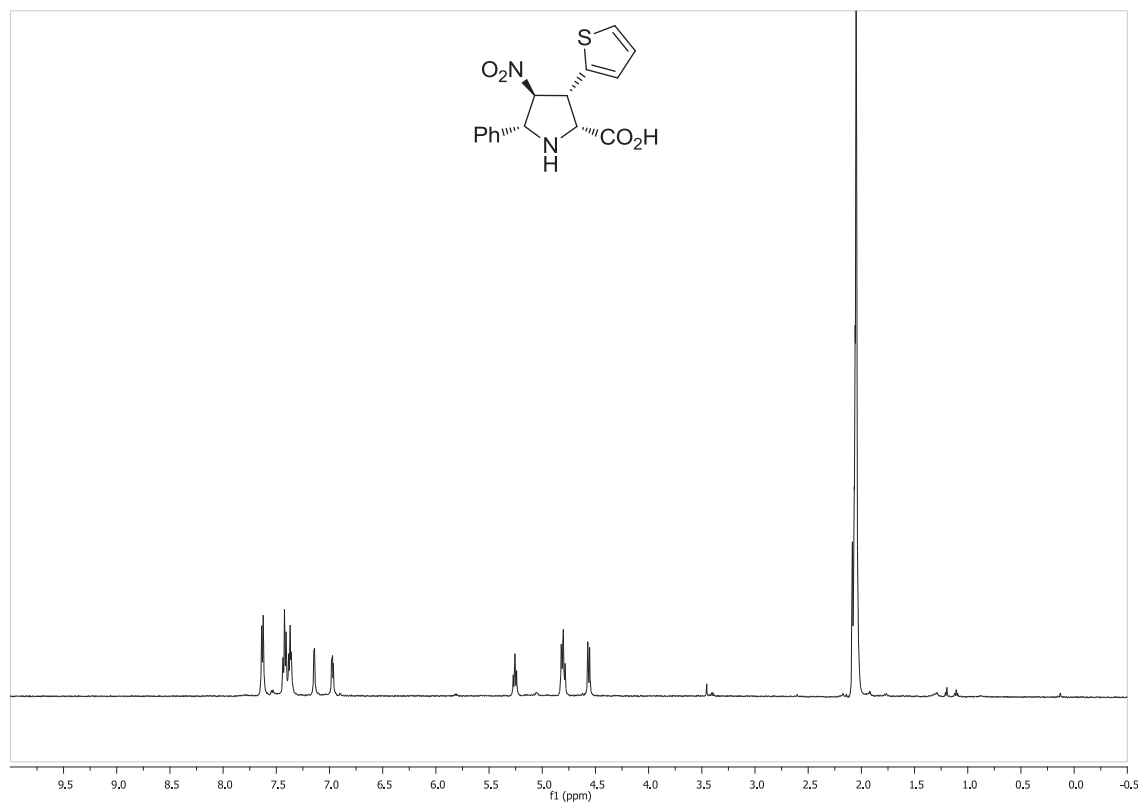
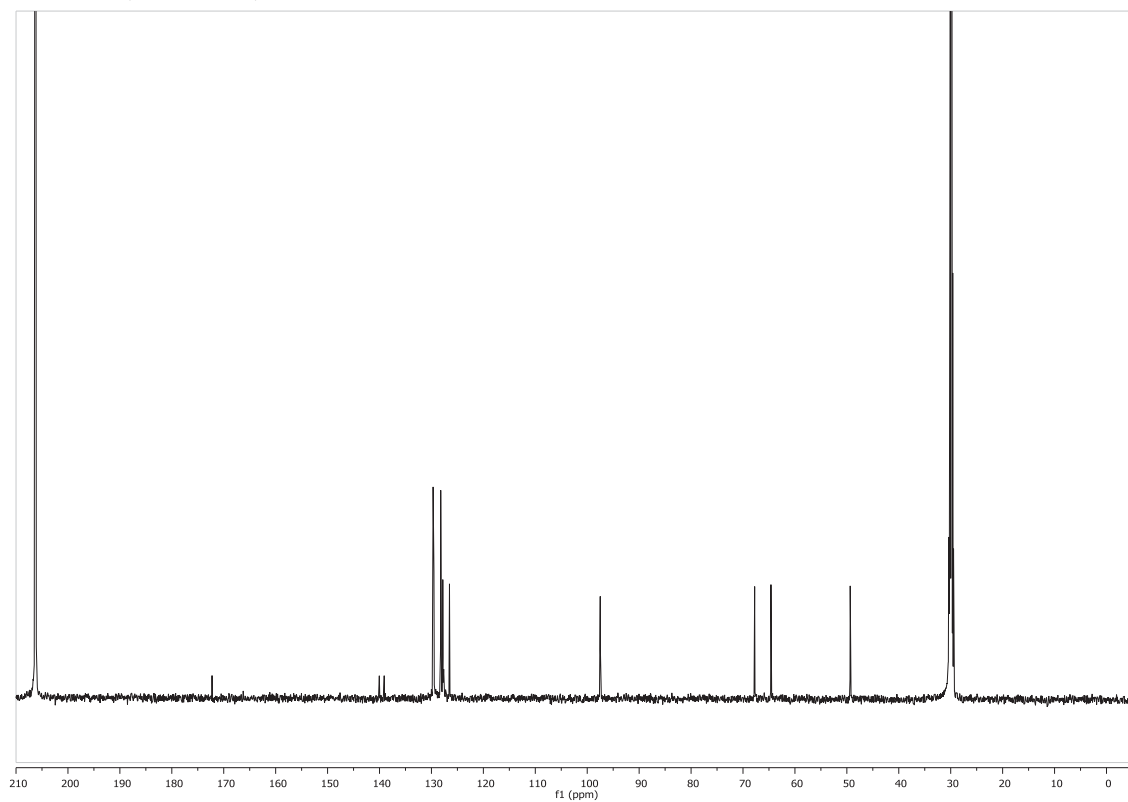
Compuesto *exo*-D-39b<sup>1</sup>H-RMN (Acetona-*d*<sub>6</sub>)<sup>13</sup>C-RMN (Acetona-*d*<sub>6</sub>)

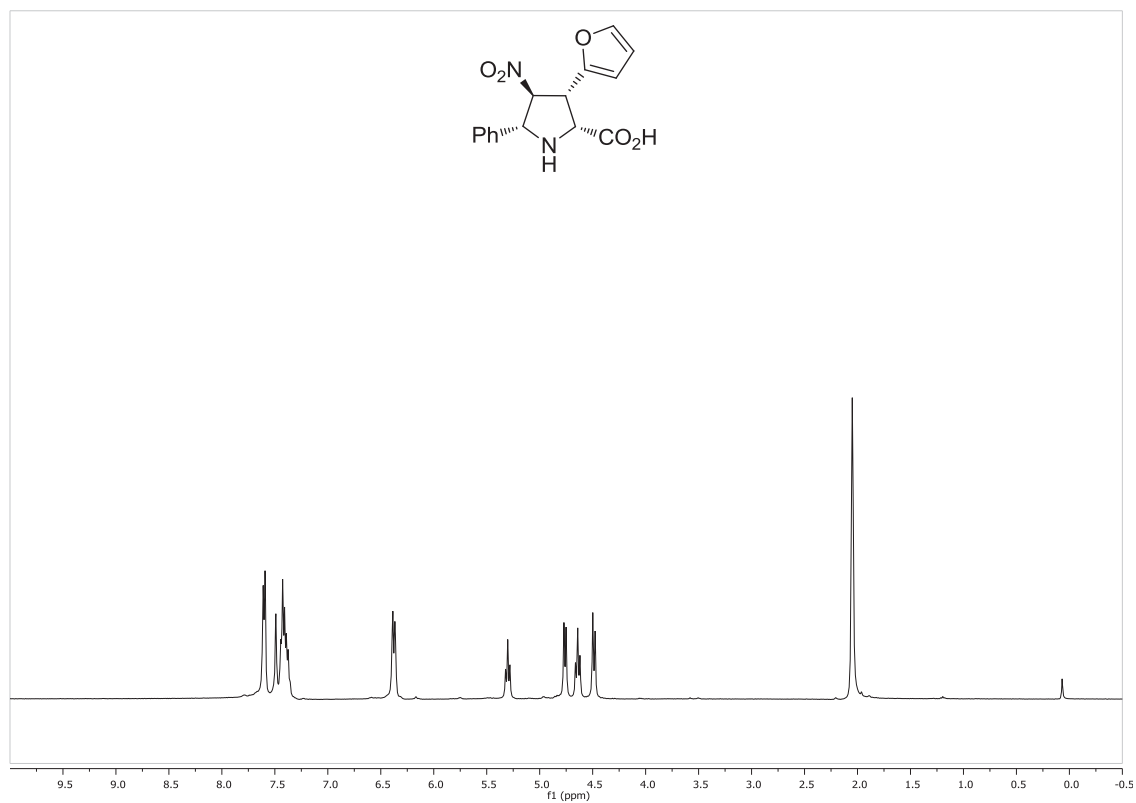
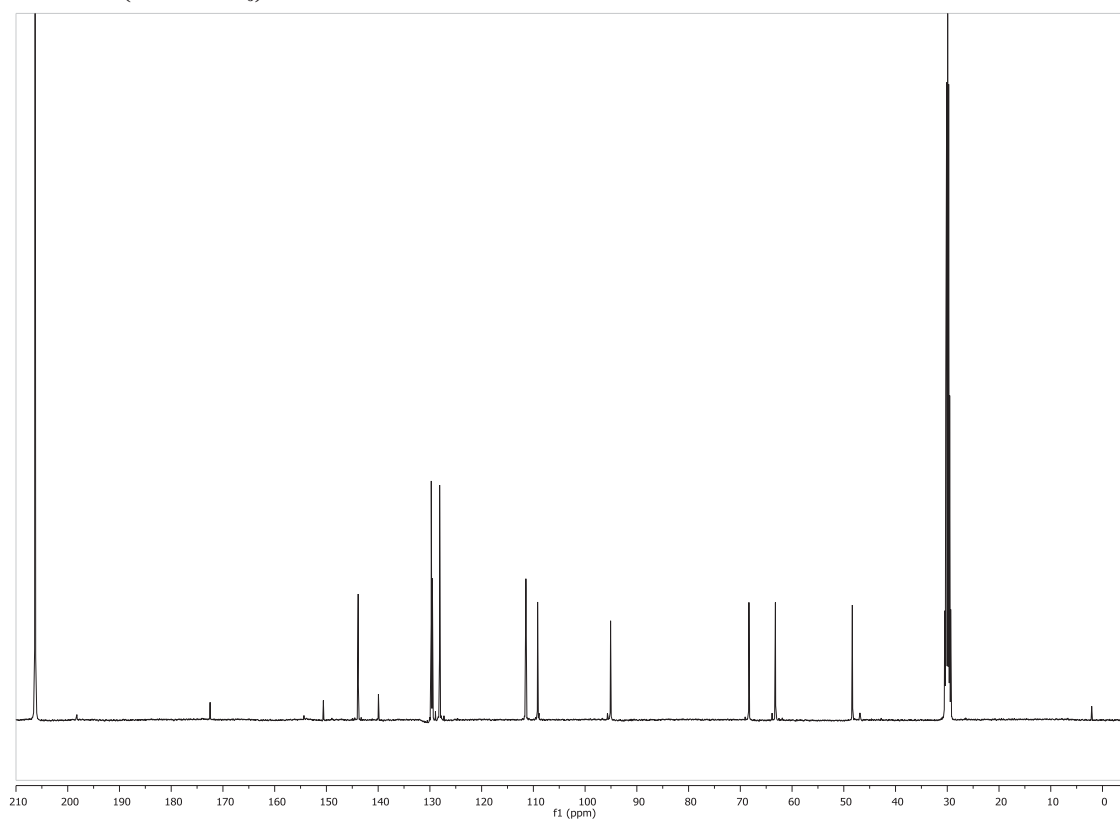
Compuesto *exo*-D-39c $^1\text{H}$ -RMN (Acetona- $d_6$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ )

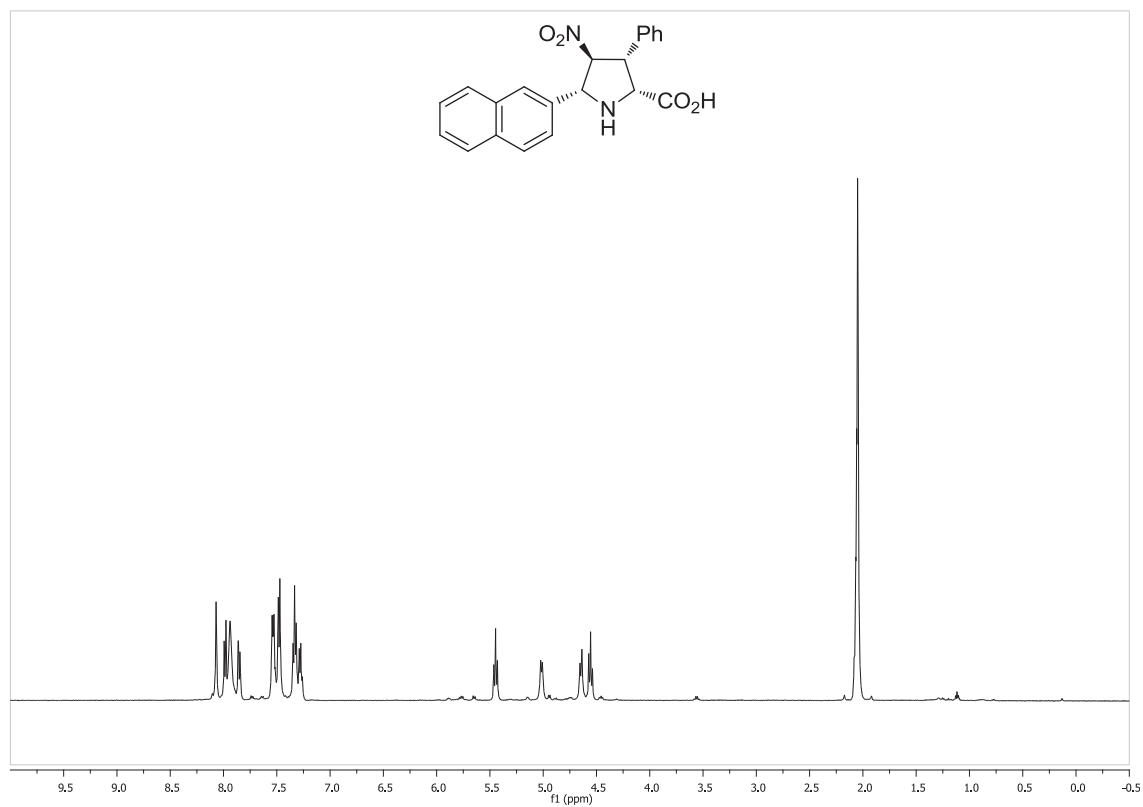
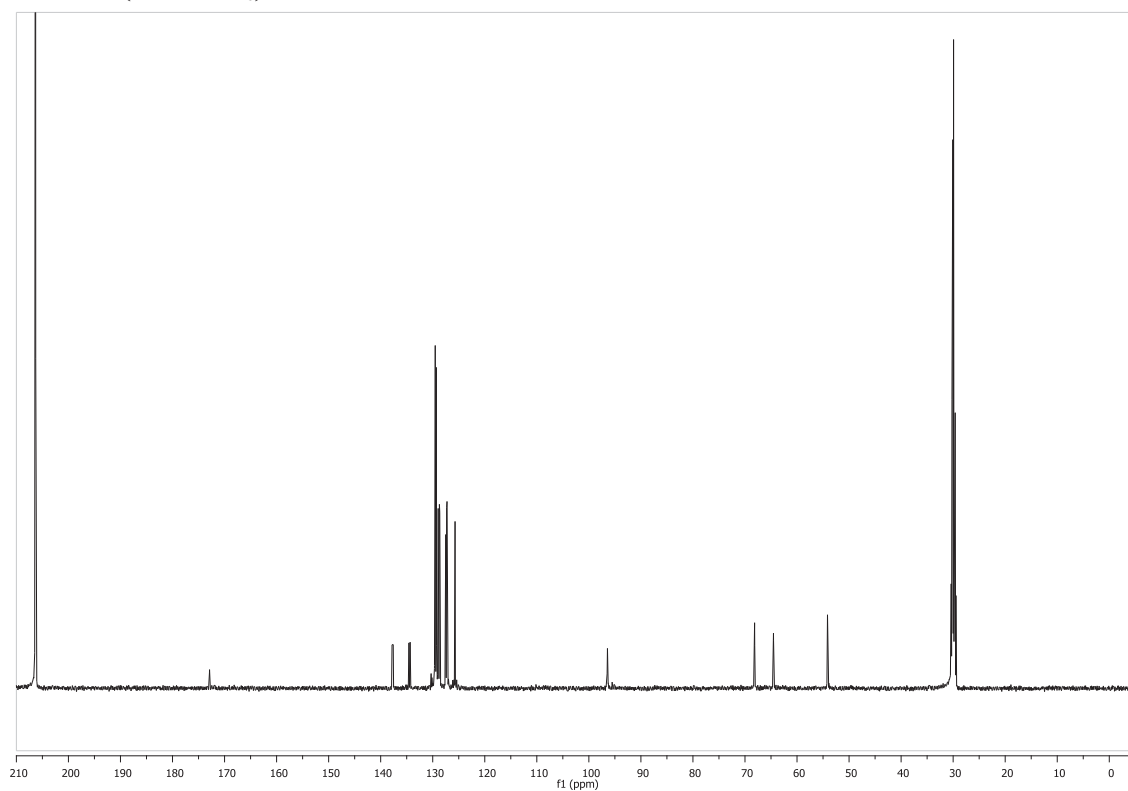
Compuesto *exo*-D-39d $^1\text{H}$ -RMN (DMSO- $d_6$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ )

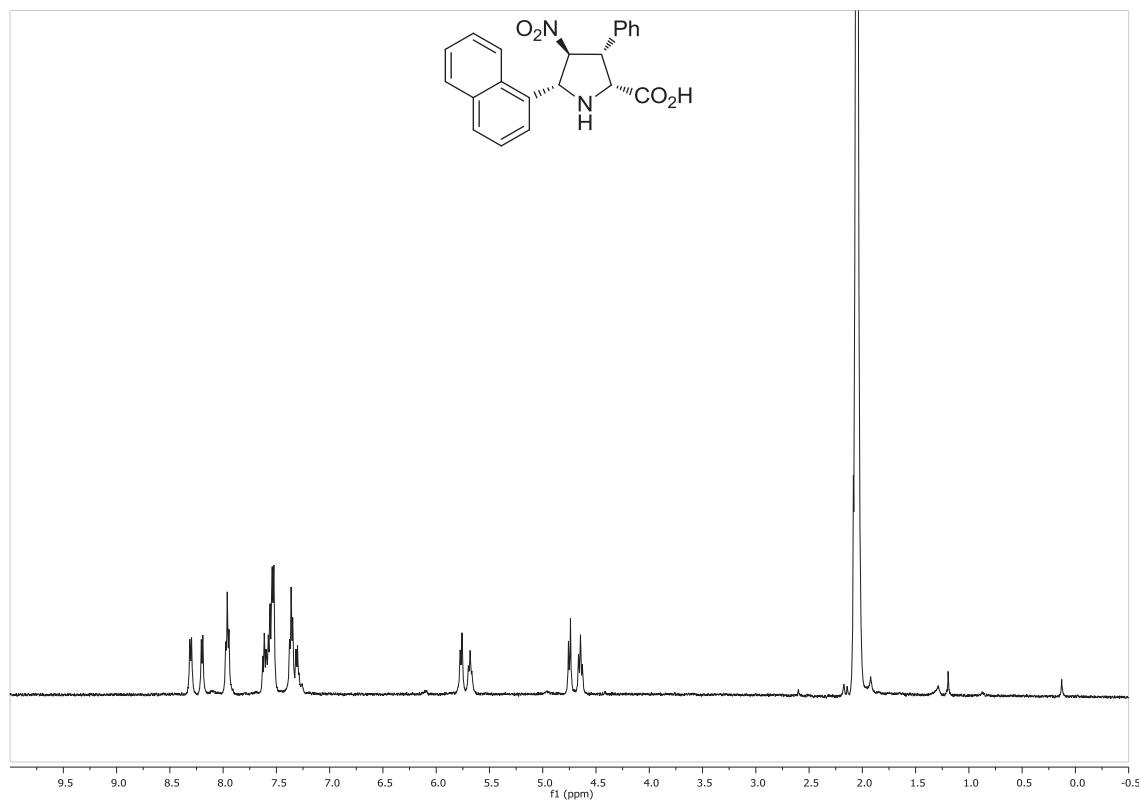
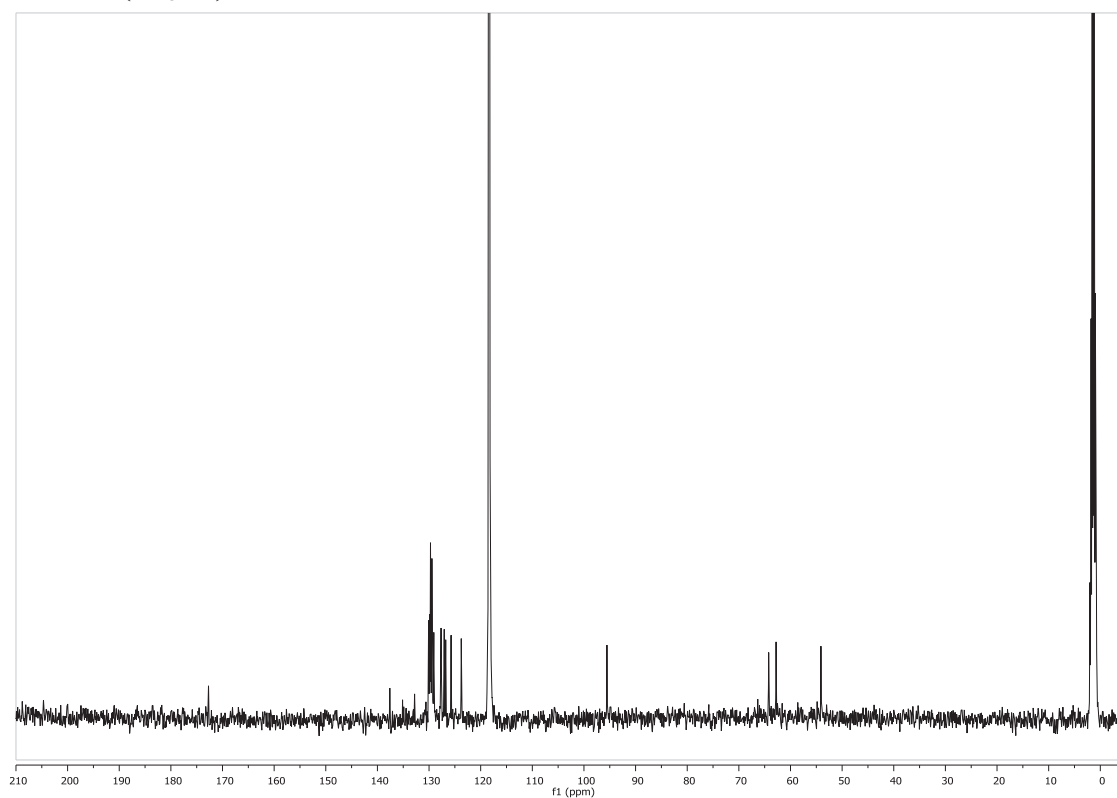
Compuesto *exo*-D-39e $^1\text{H}$ -RMN (Acetona- $d_6$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN (Acetona- $d_6$ )

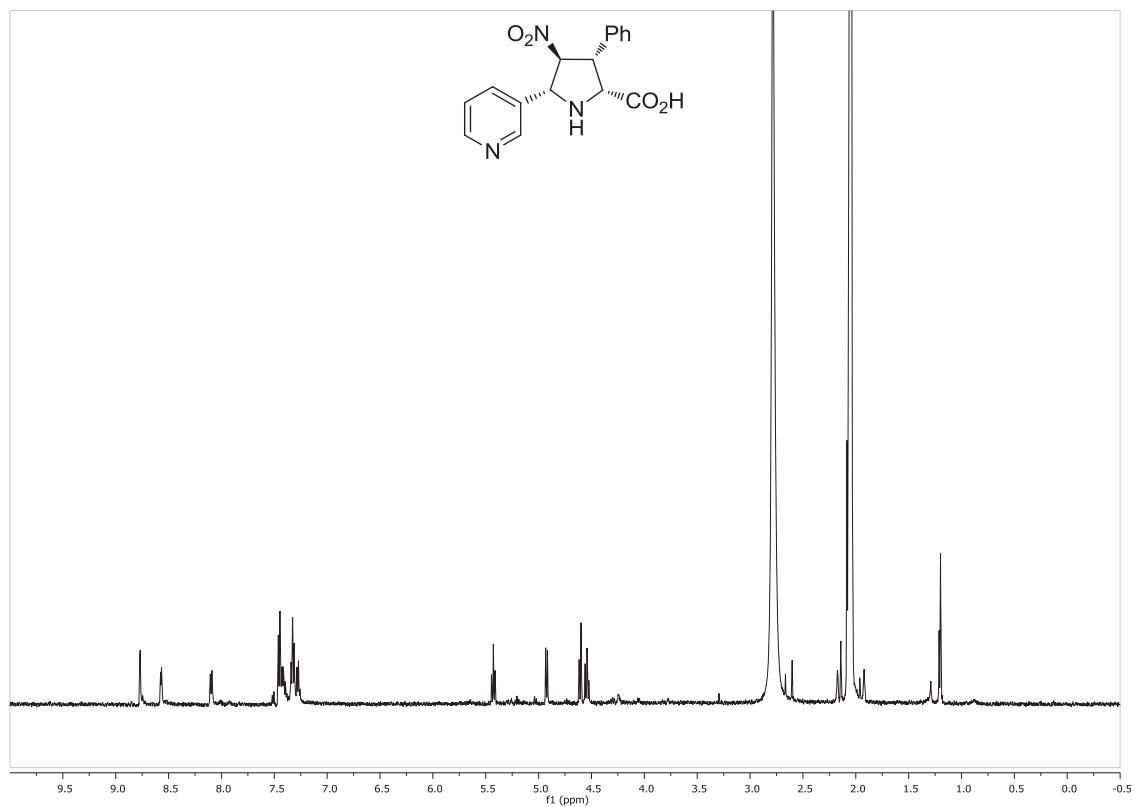
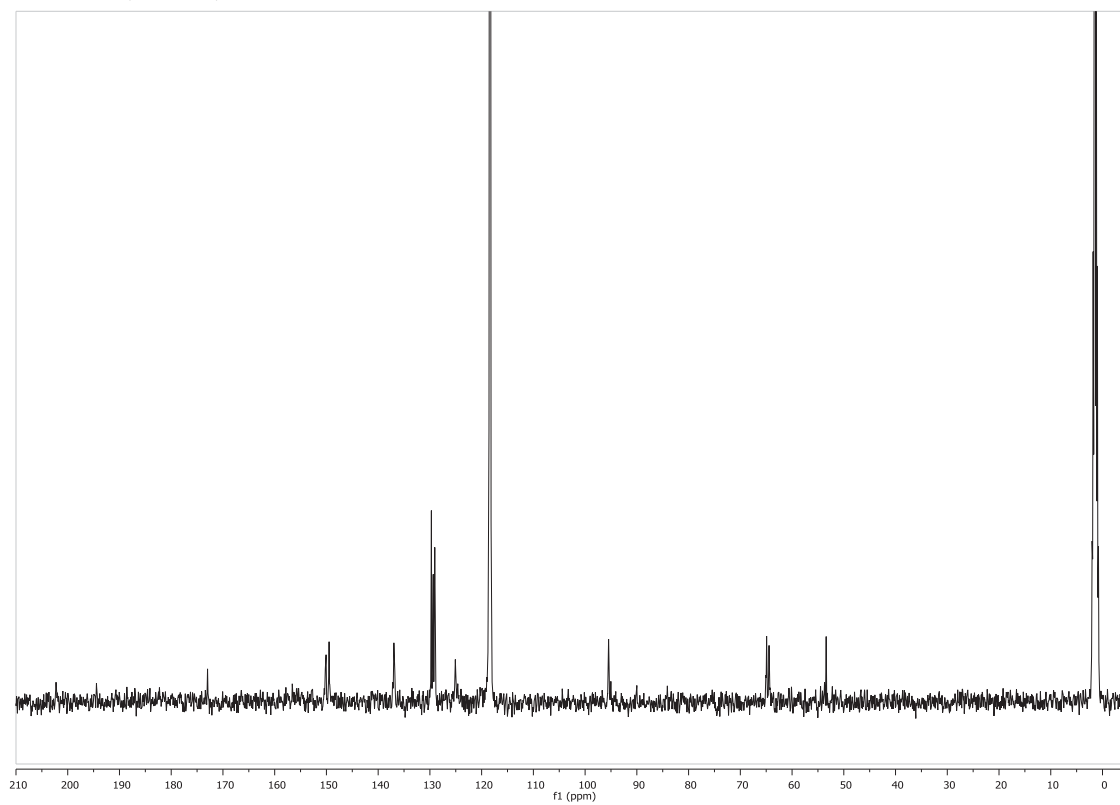


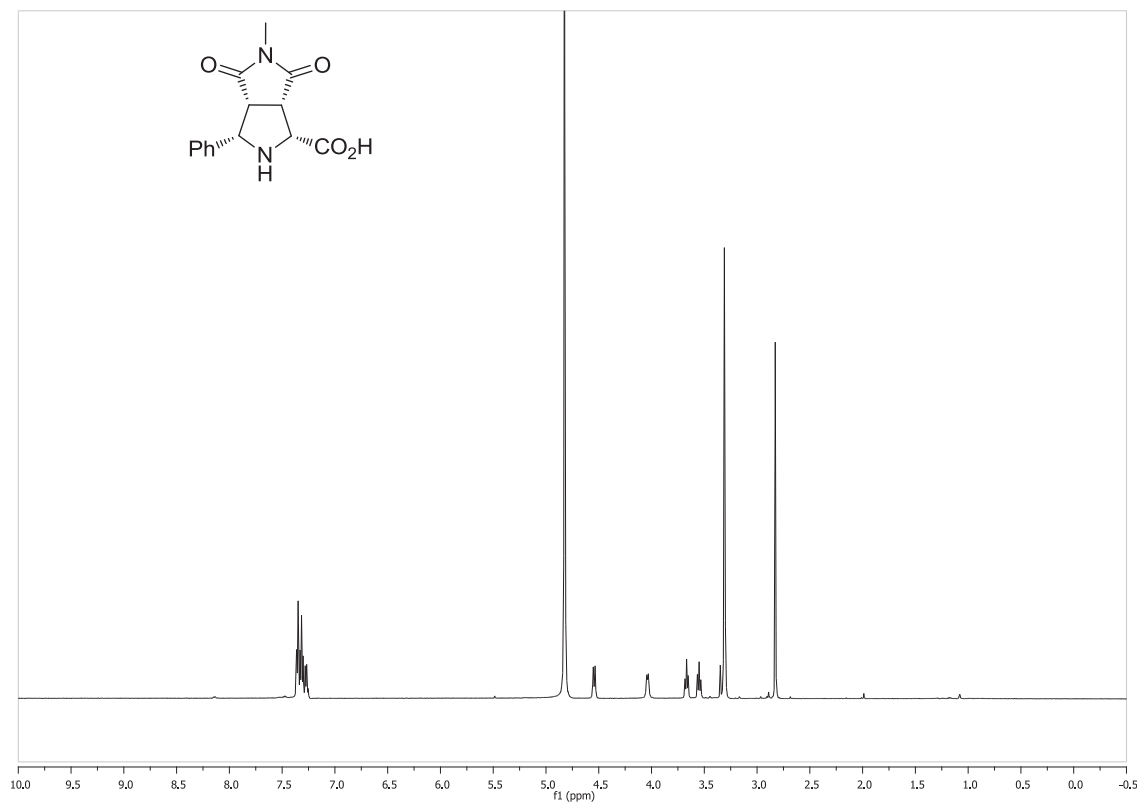
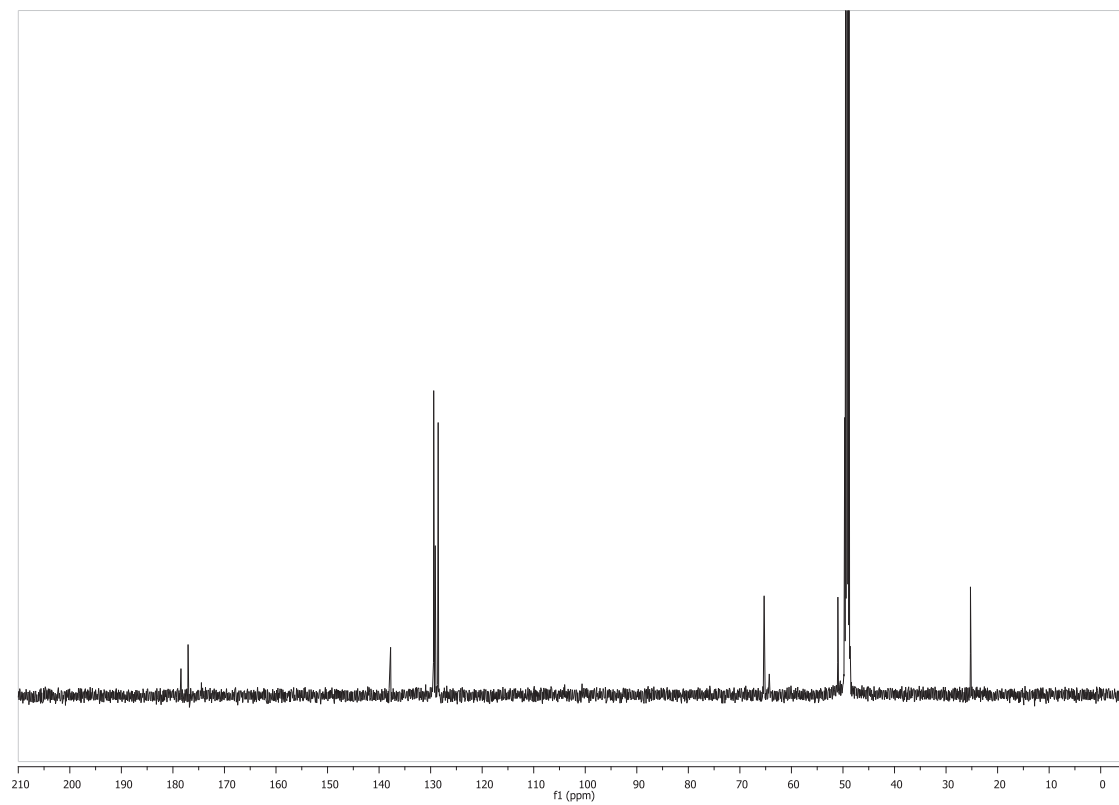
Compuesto *exo*-D-39f $^1\text{H}$ -RMN (Acetona- $d_6$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN (Acetona- $d_6$ )

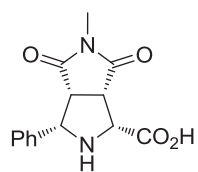
Compuesto *exo*-D-39g<sup>1</sup>H-RMN (Acetona-*d*<sub>6</sub>)<sup>13</sup>C-RMN (Acetona-*d*<sub>6</sub>)

Compuesto *exo*-D-39h $^1\text{H}$ -RMN (Acetona- $d_6$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN (Acetona- $d_6$ )

Compuesto *exo*-D-39i $^1\text{H}$ -RMN (Acetona- $d_6$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )

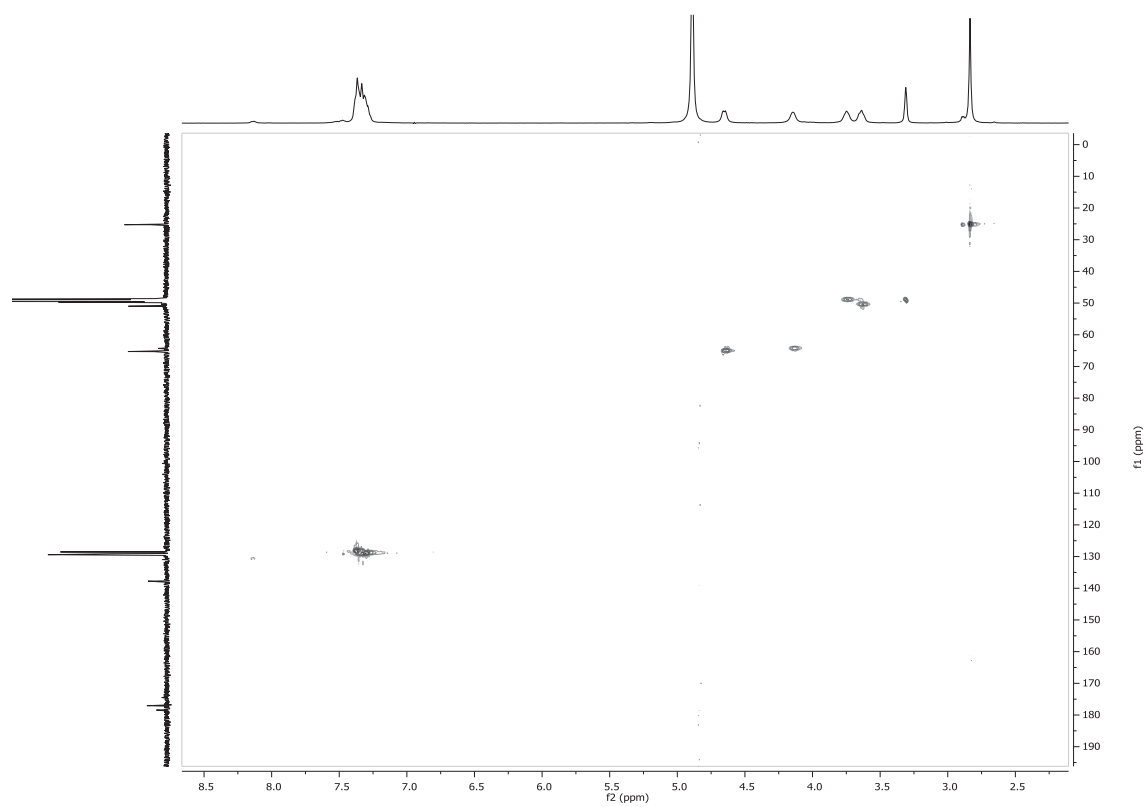
Compuesto *exo*-D-39j $^1\text{H}$ -RMN (Acetona- $d_6$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )

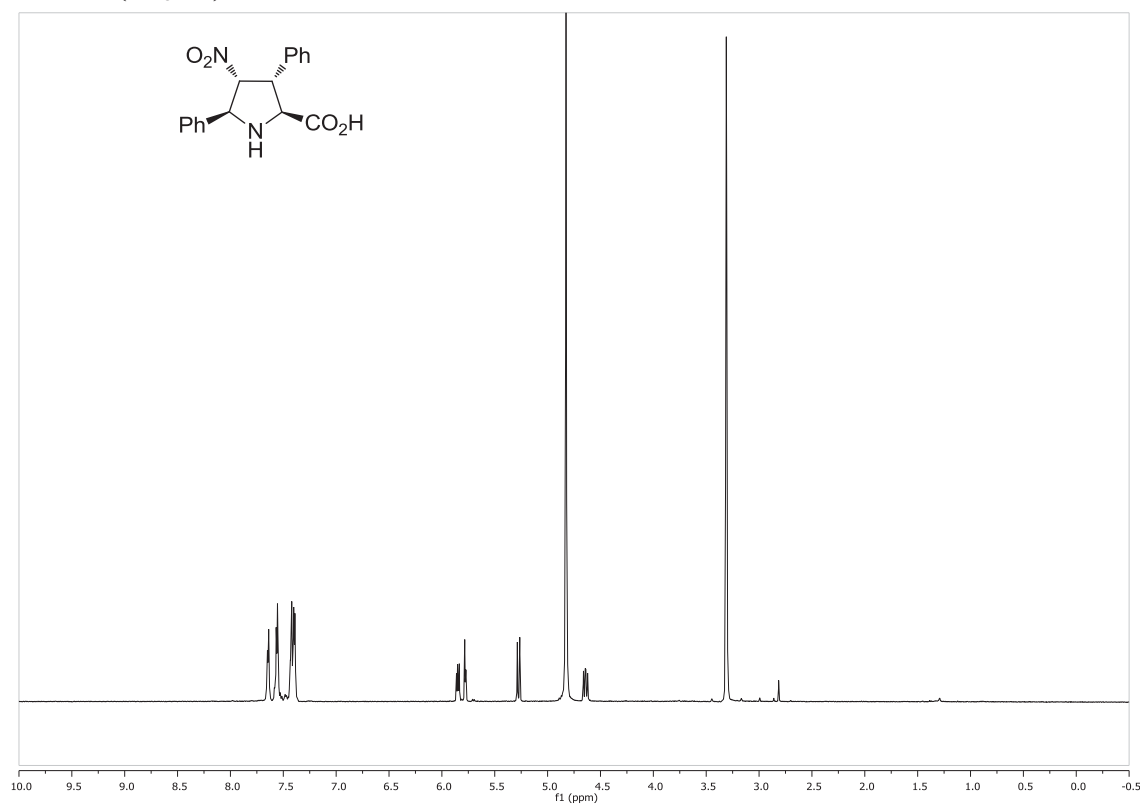
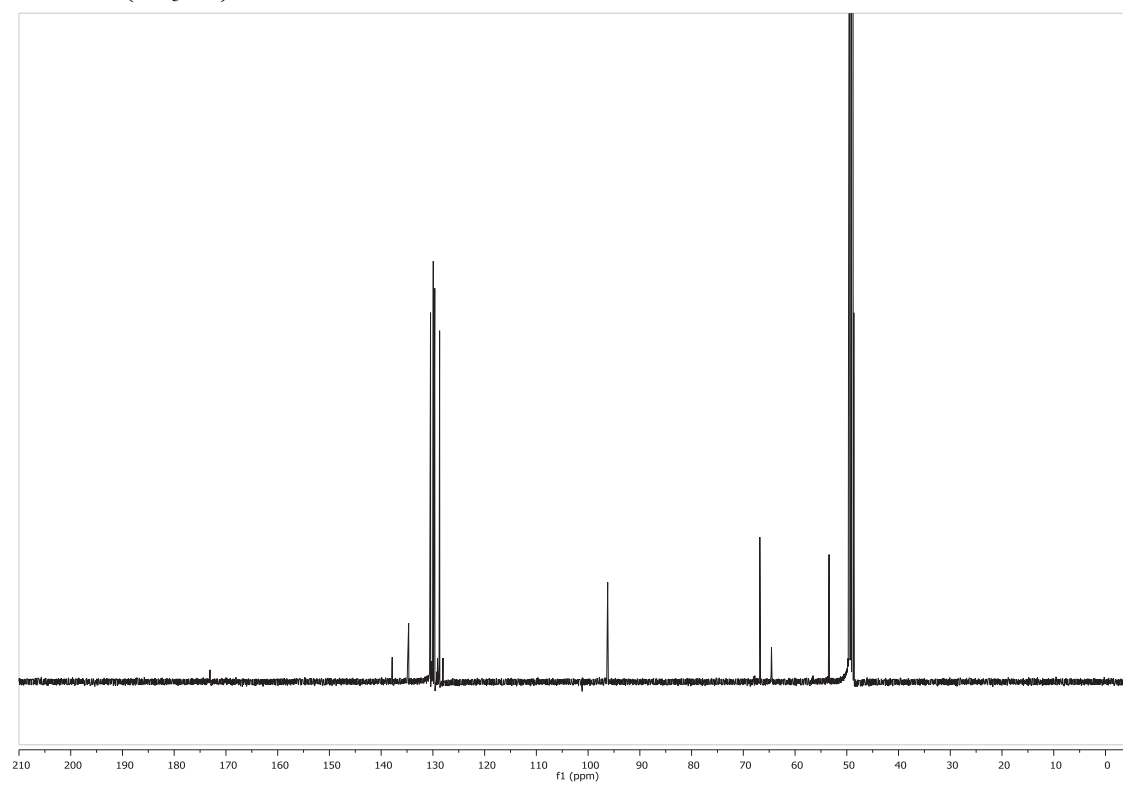
Compuesto *endo*-D-40<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD)<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD)



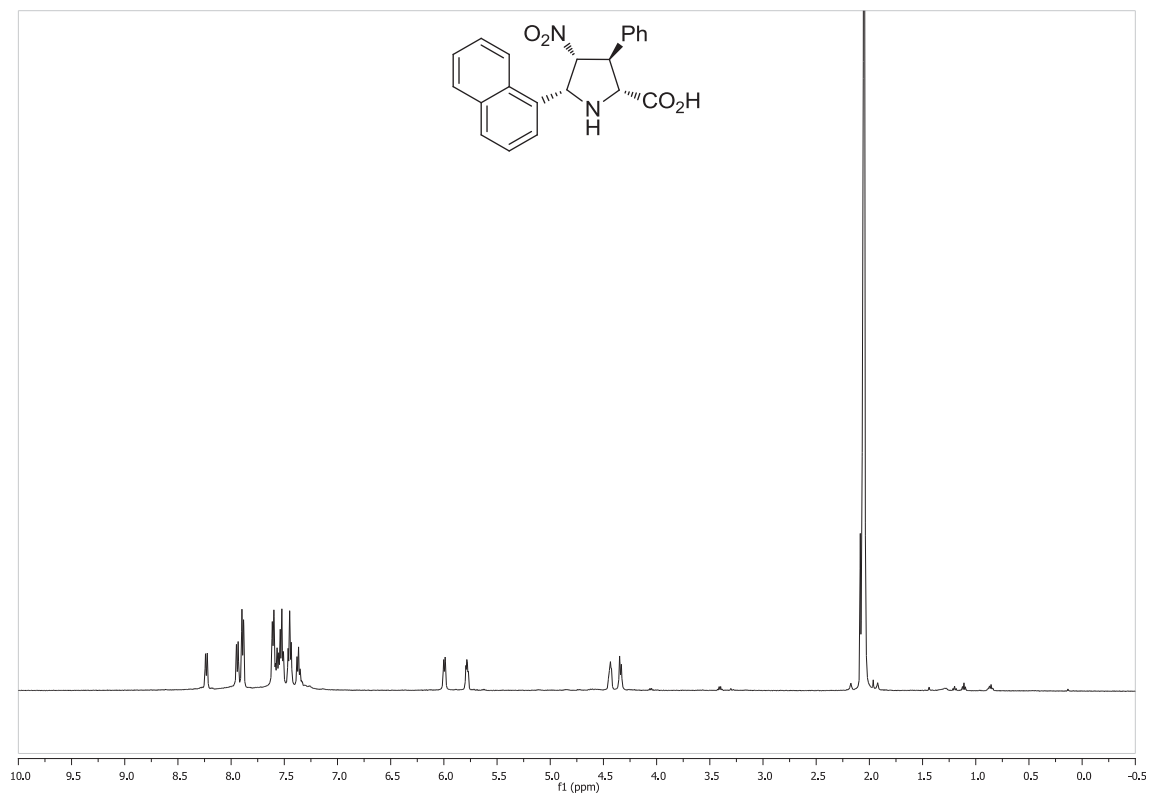
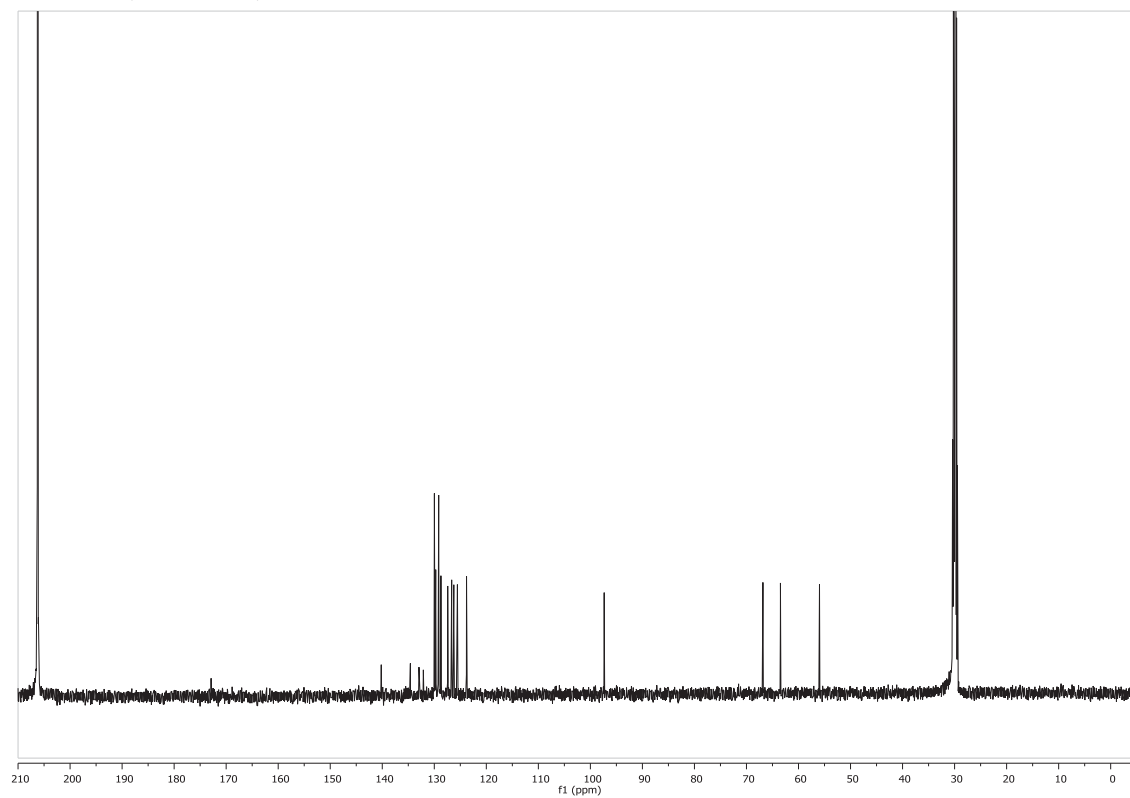
Compuesto *endo*-D-40

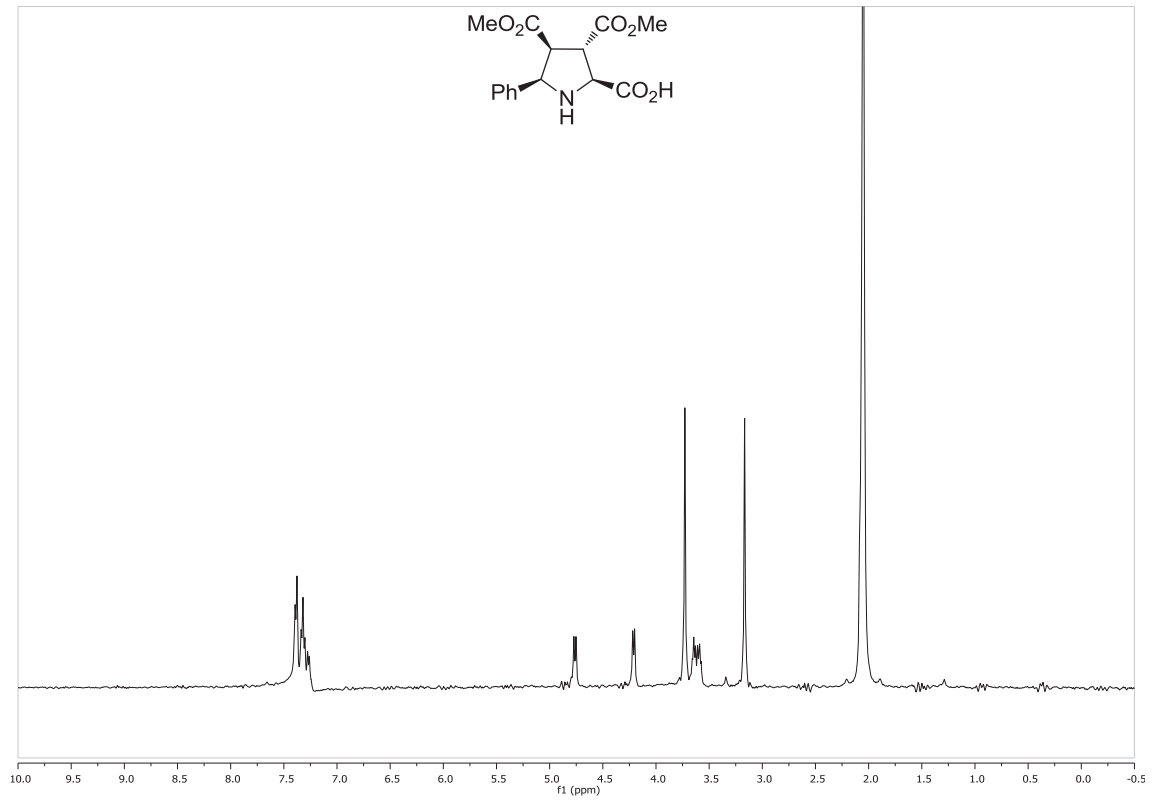
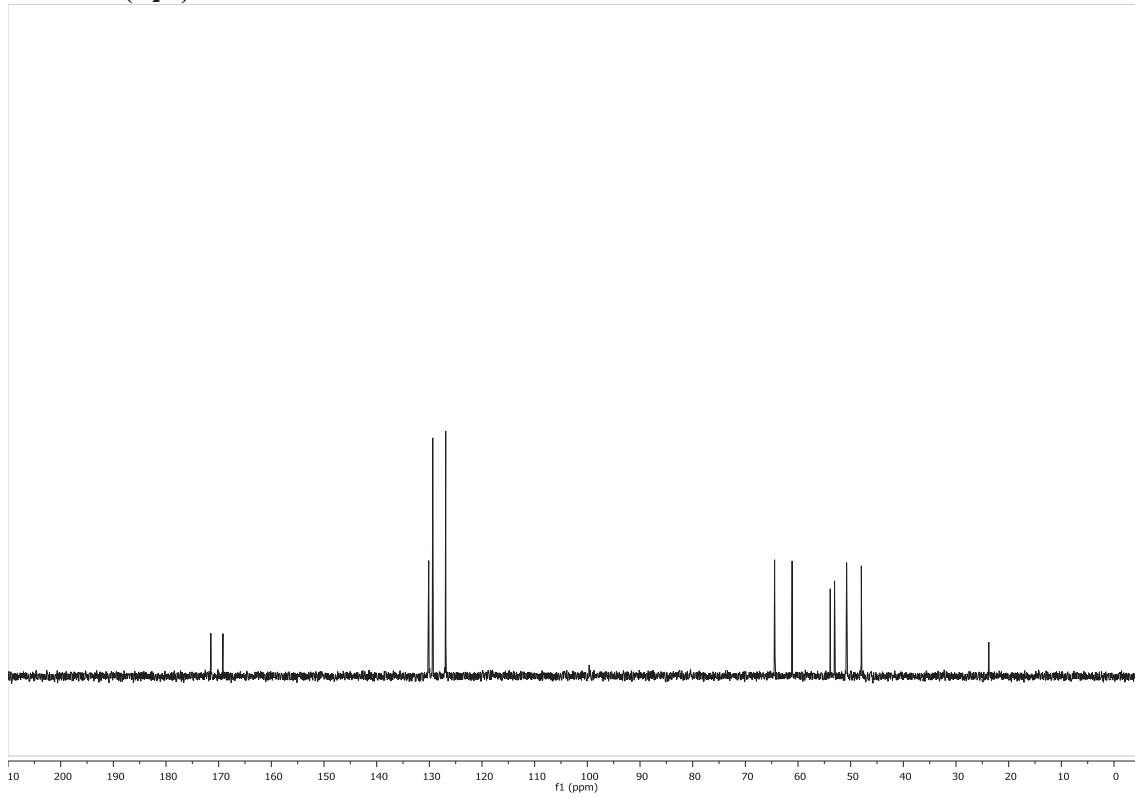
Espectro HSQC (CD<sub>3</sub>OD)

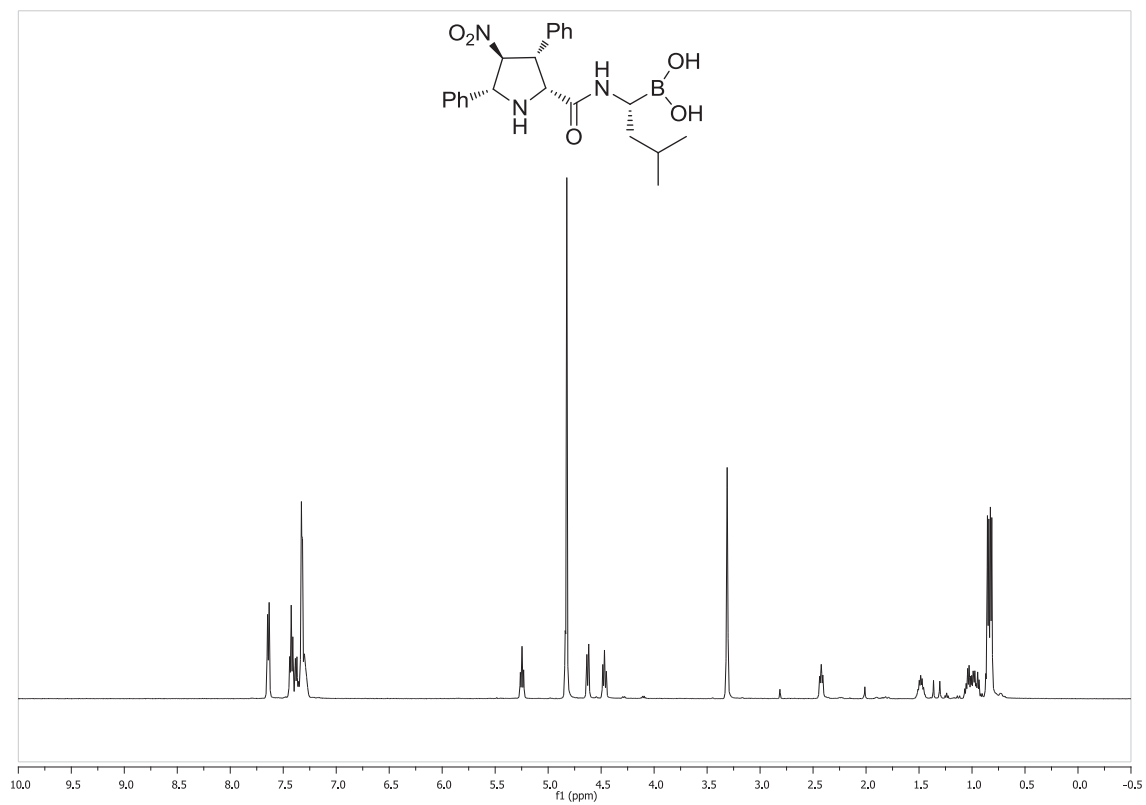
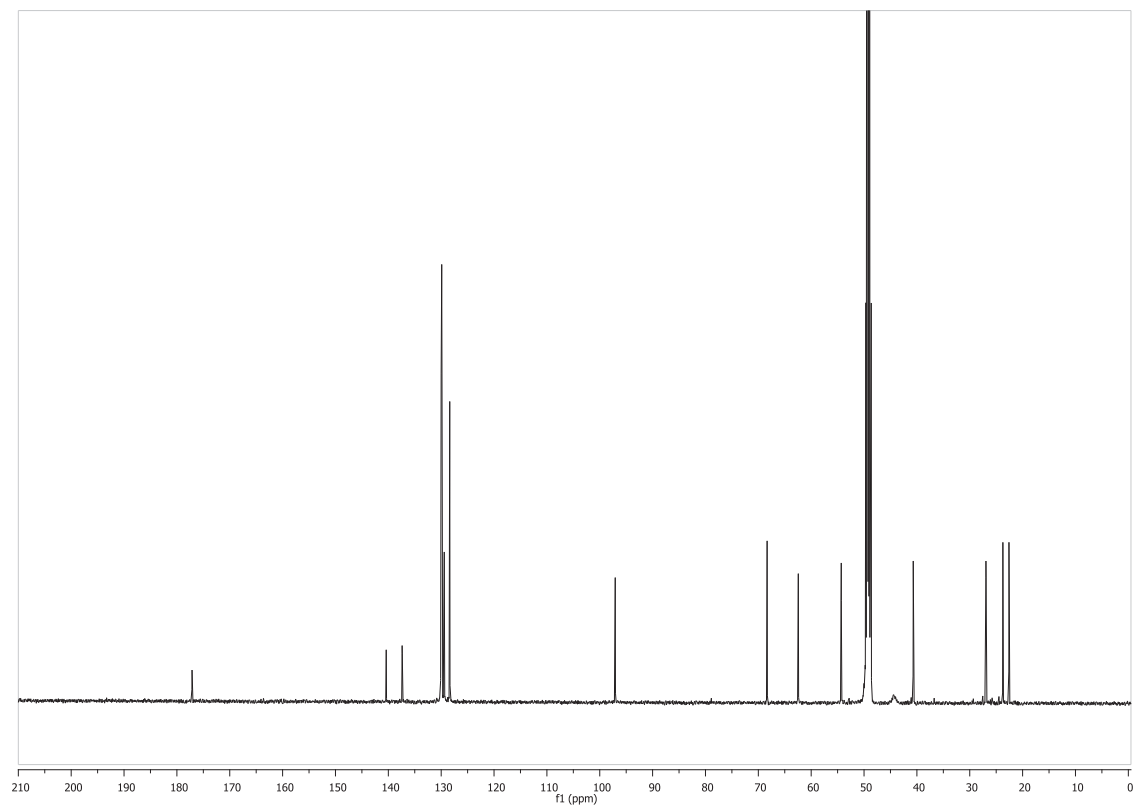


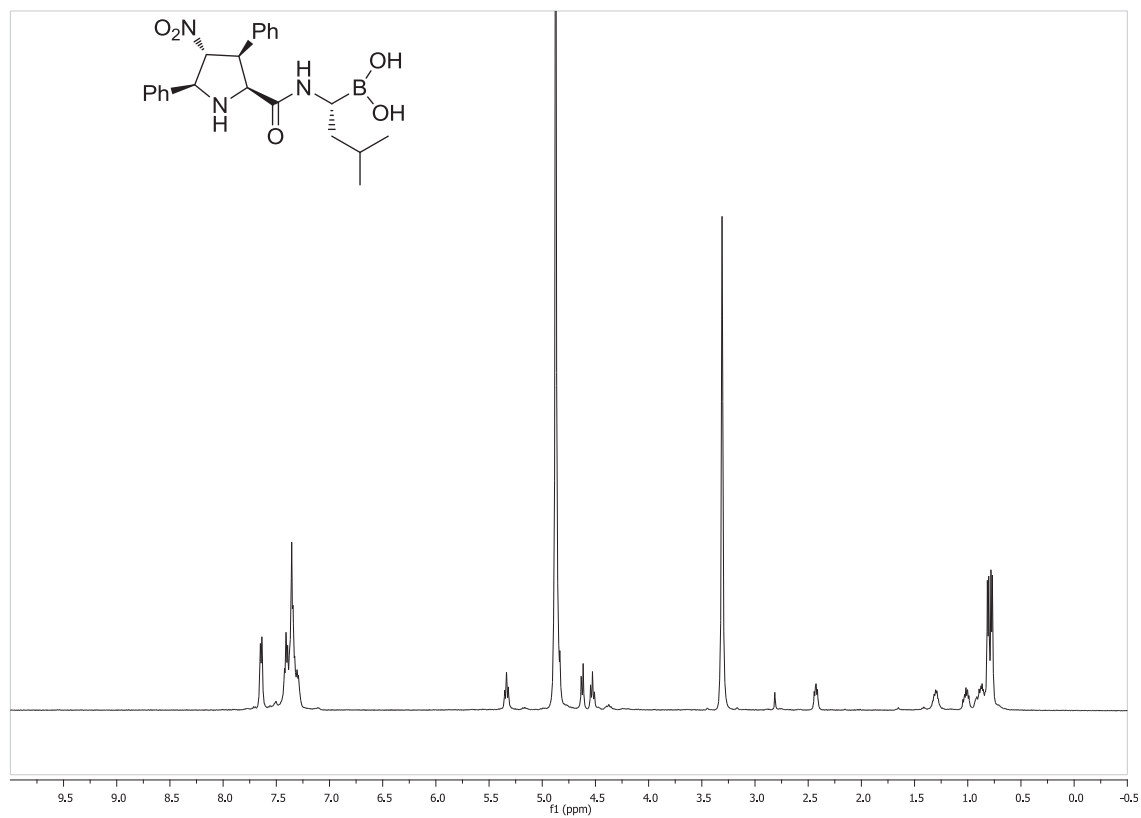
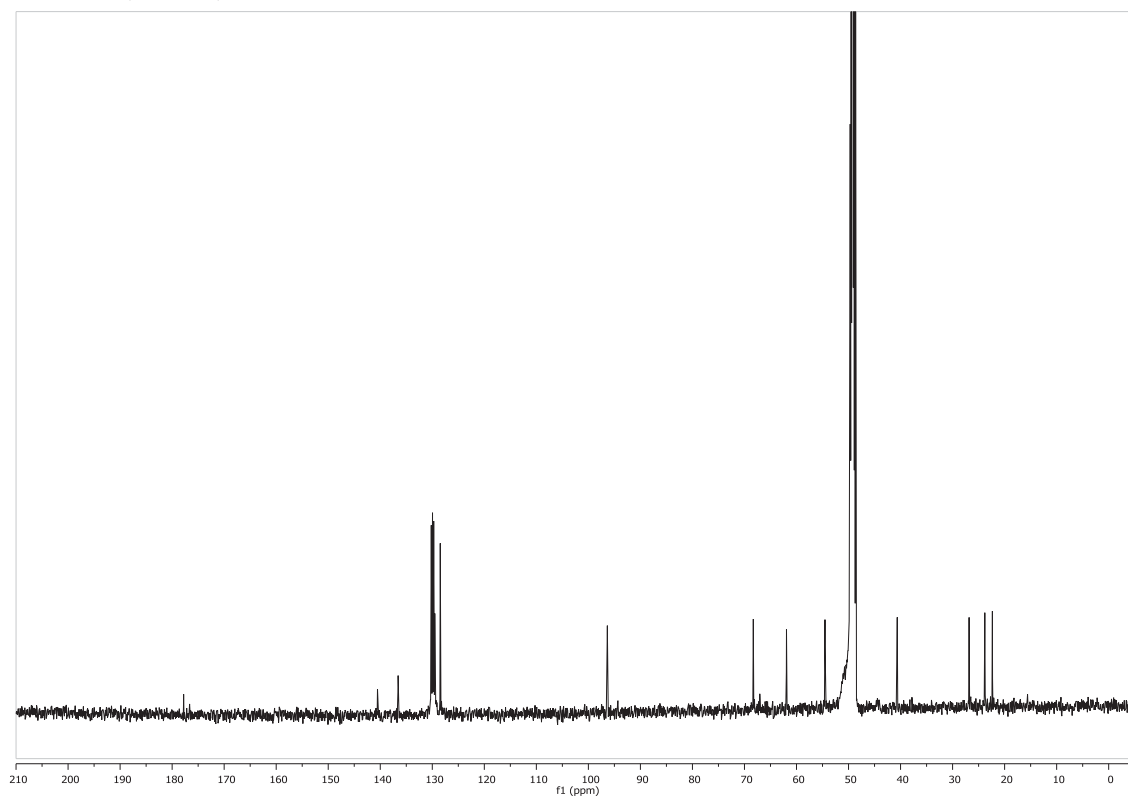
Compuesto *exo*'-L-39a<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD)<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD)

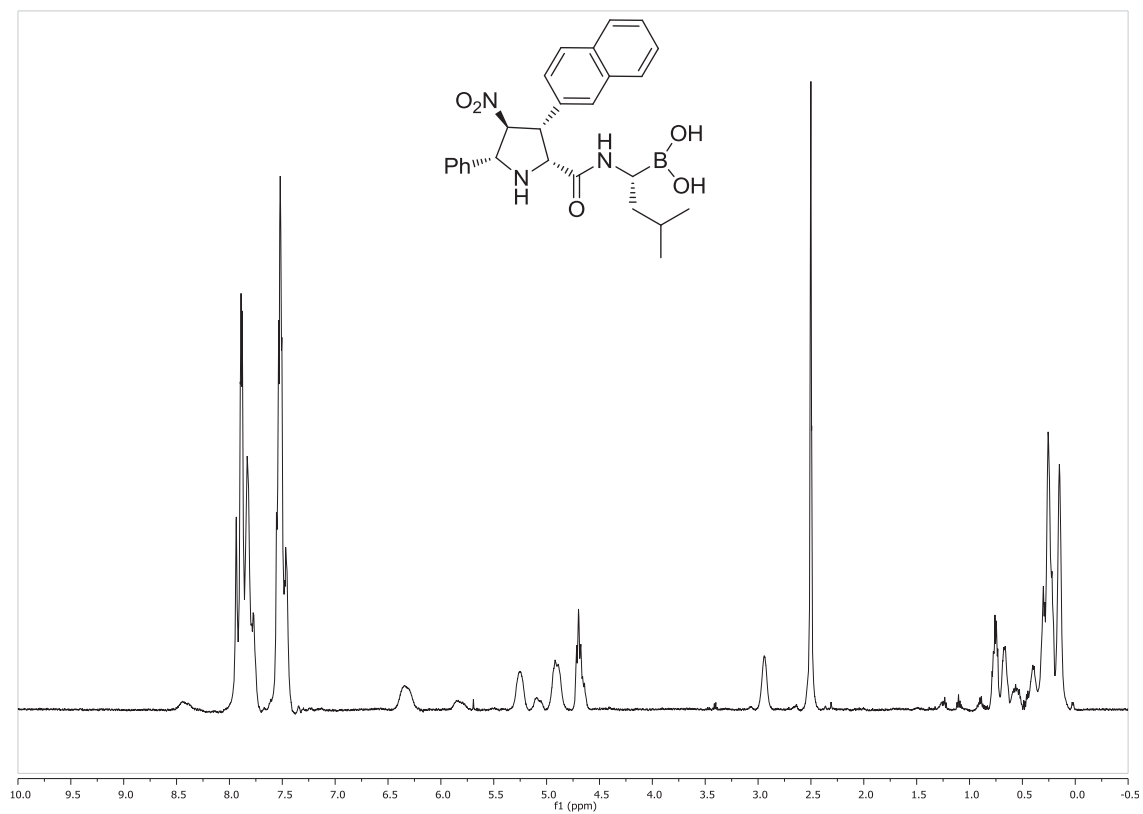
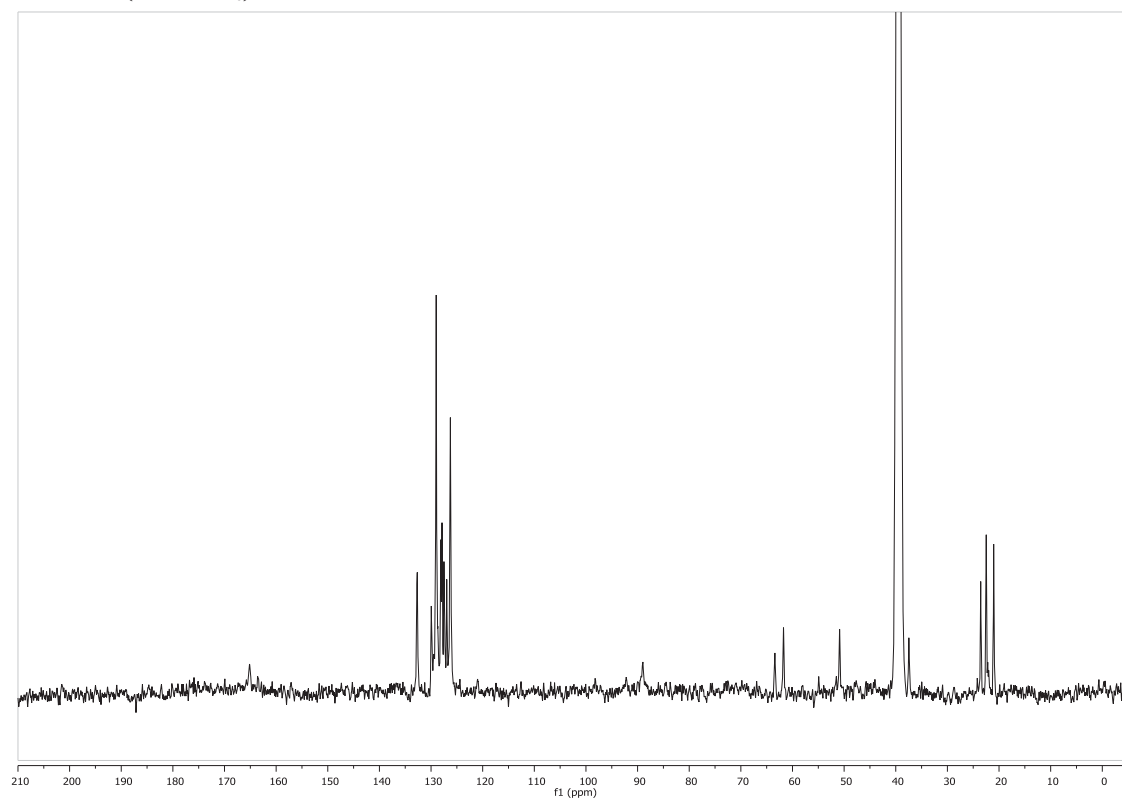


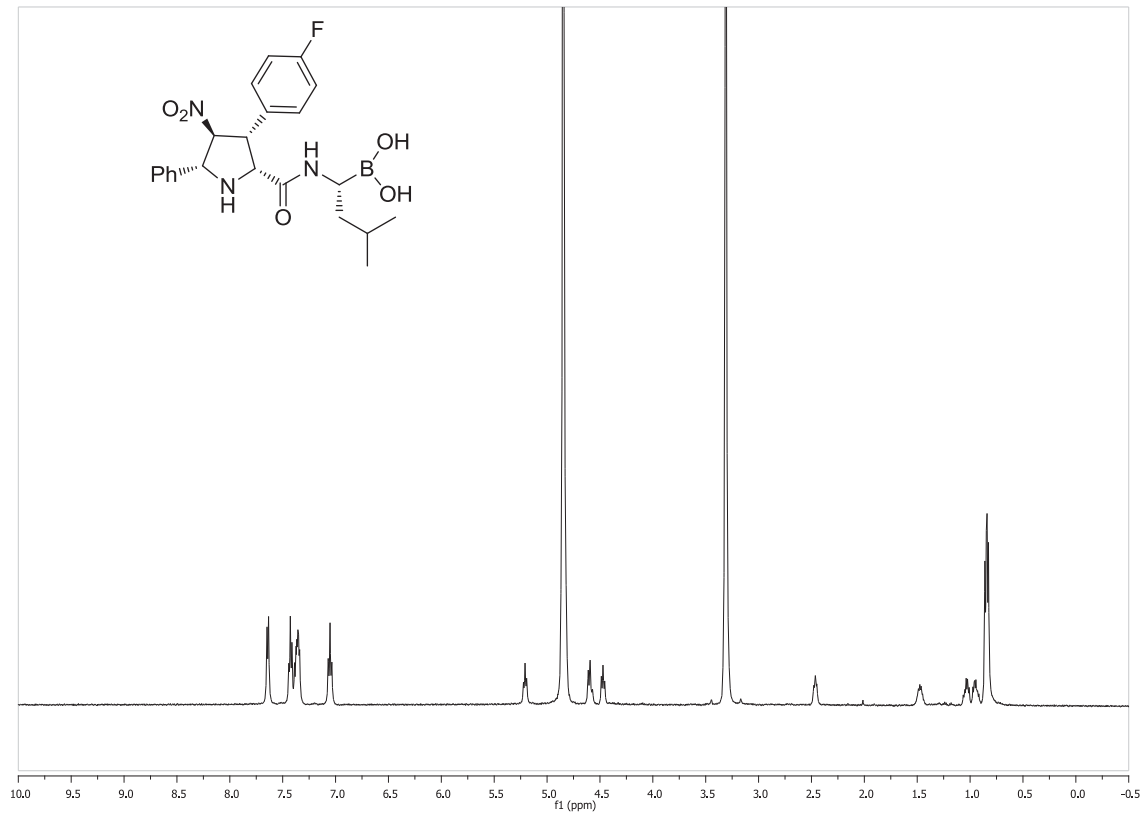
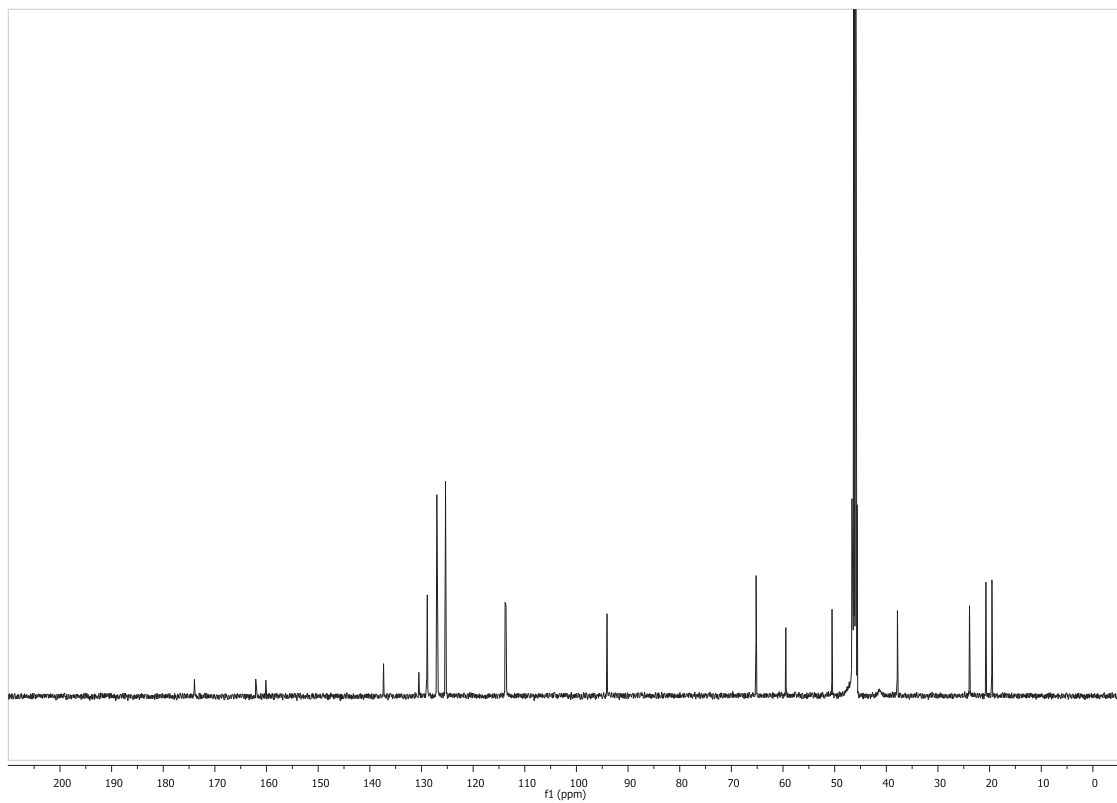
Compuesto *endo*-D-39i<sup>1</sup>H-RMN (Acetona-*d*<sub>6</sub>)<sup>13</sup>C-RMN (Acetona-*d*<sub>6</sub>)

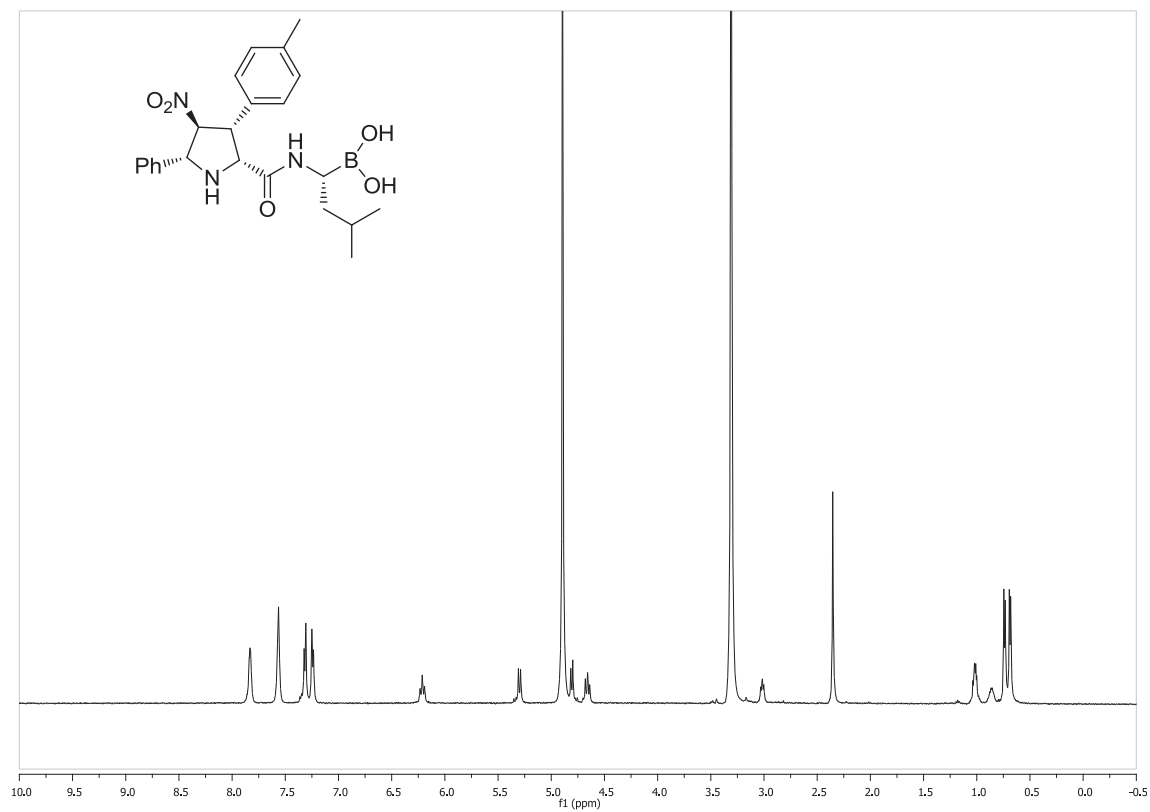
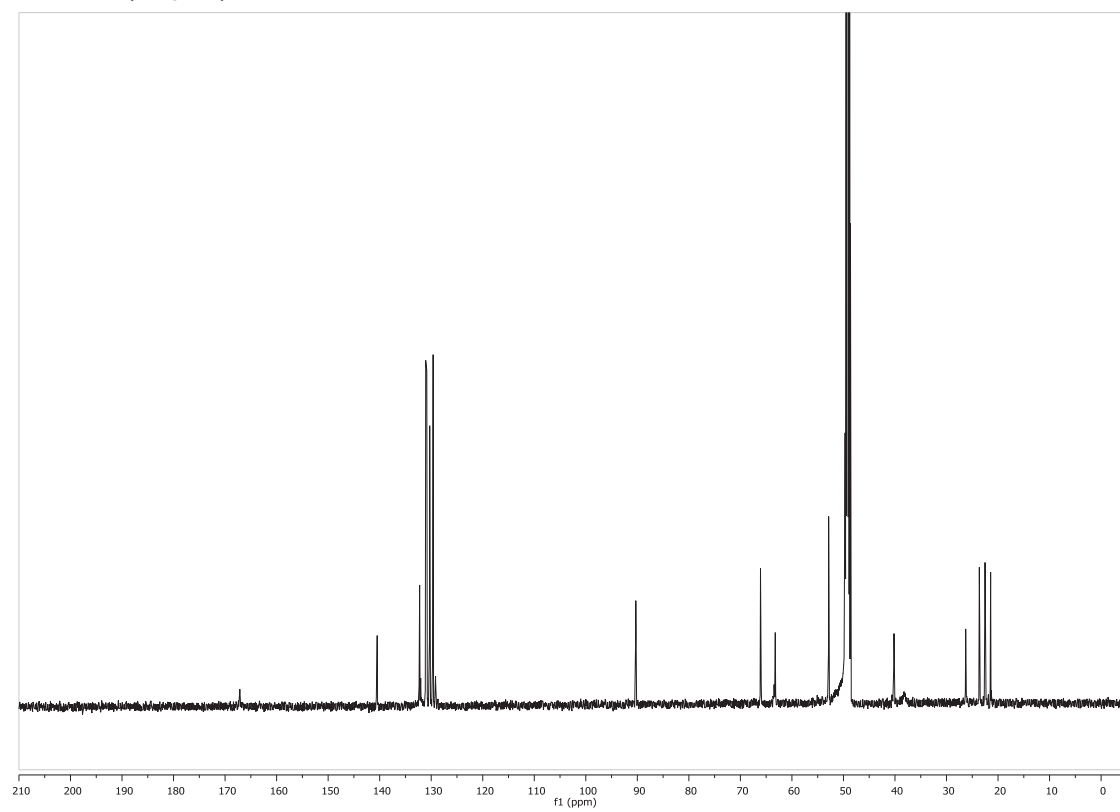
Compuesto *endo*-L-39k $^1\text{H}$ -RMN (Acetona- $d_6$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ )

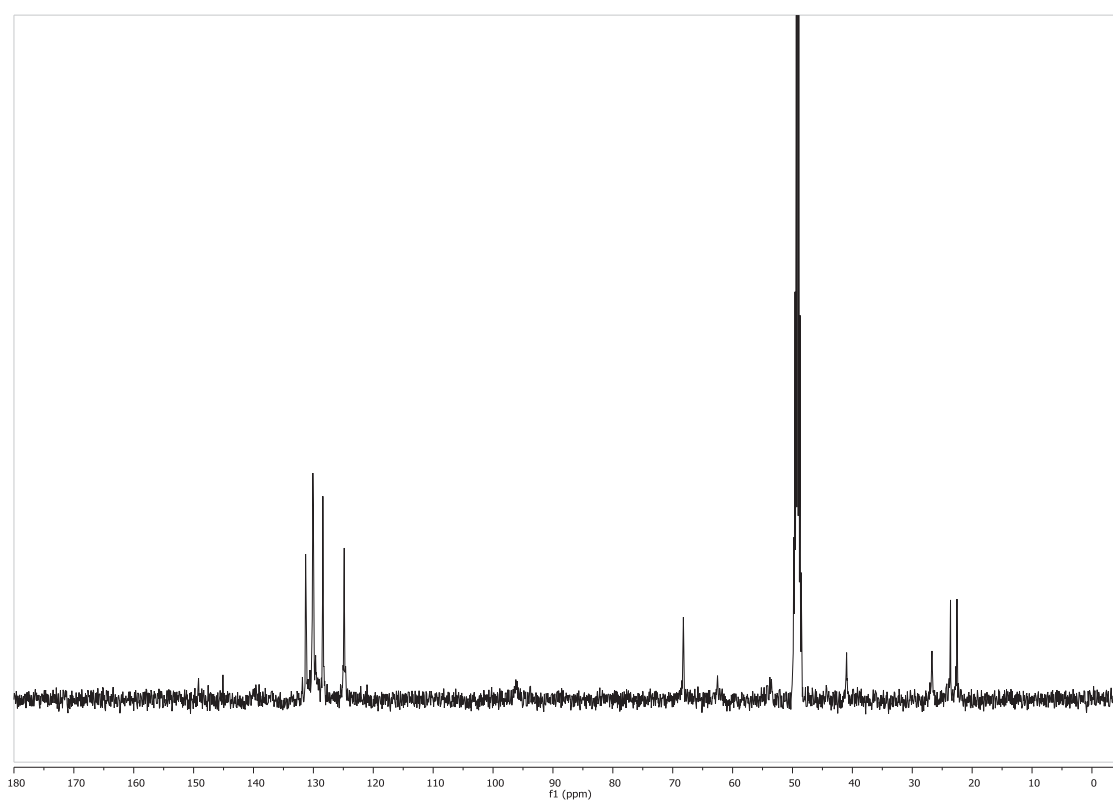
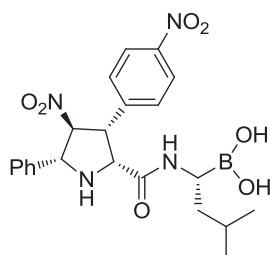
Compuesto *exo*-D-43a<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD)<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD)

Compuesto *exo*-L-43a $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

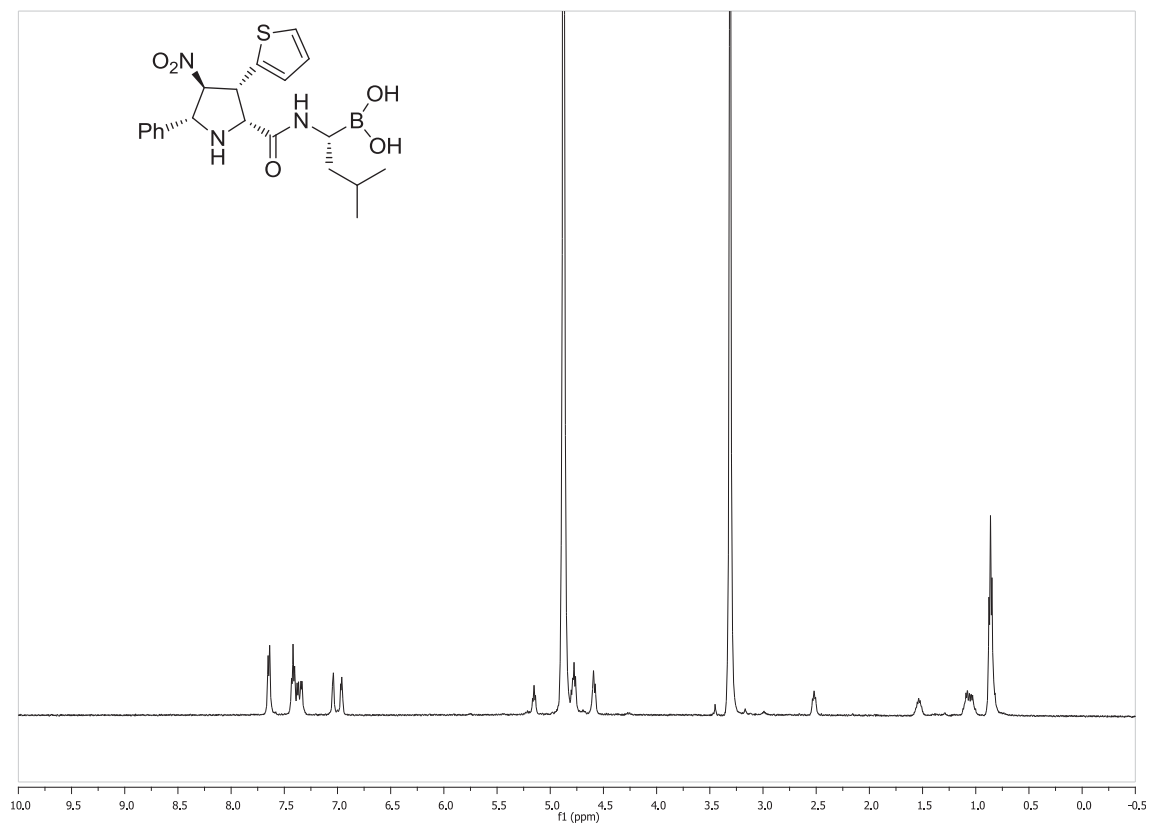
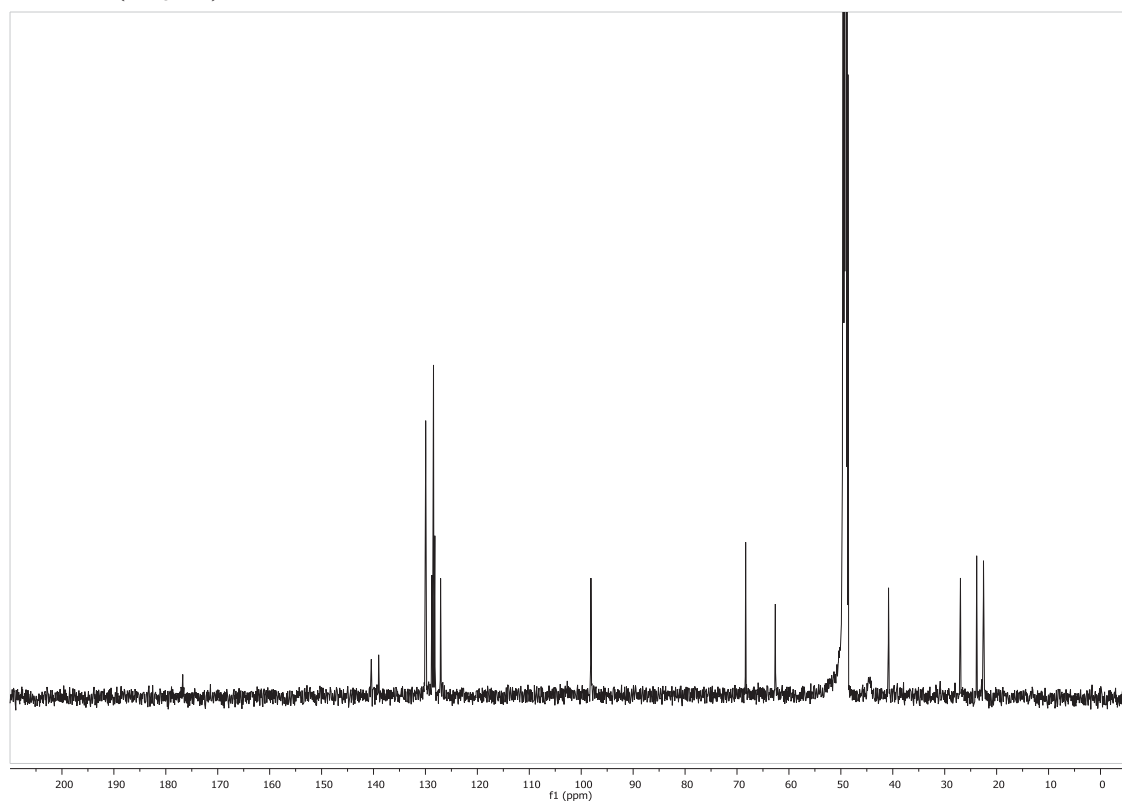
Compuesto *exo*-D-43b $^1\text{H}$ -RMN (70°C, DMSO- $d_6$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ )

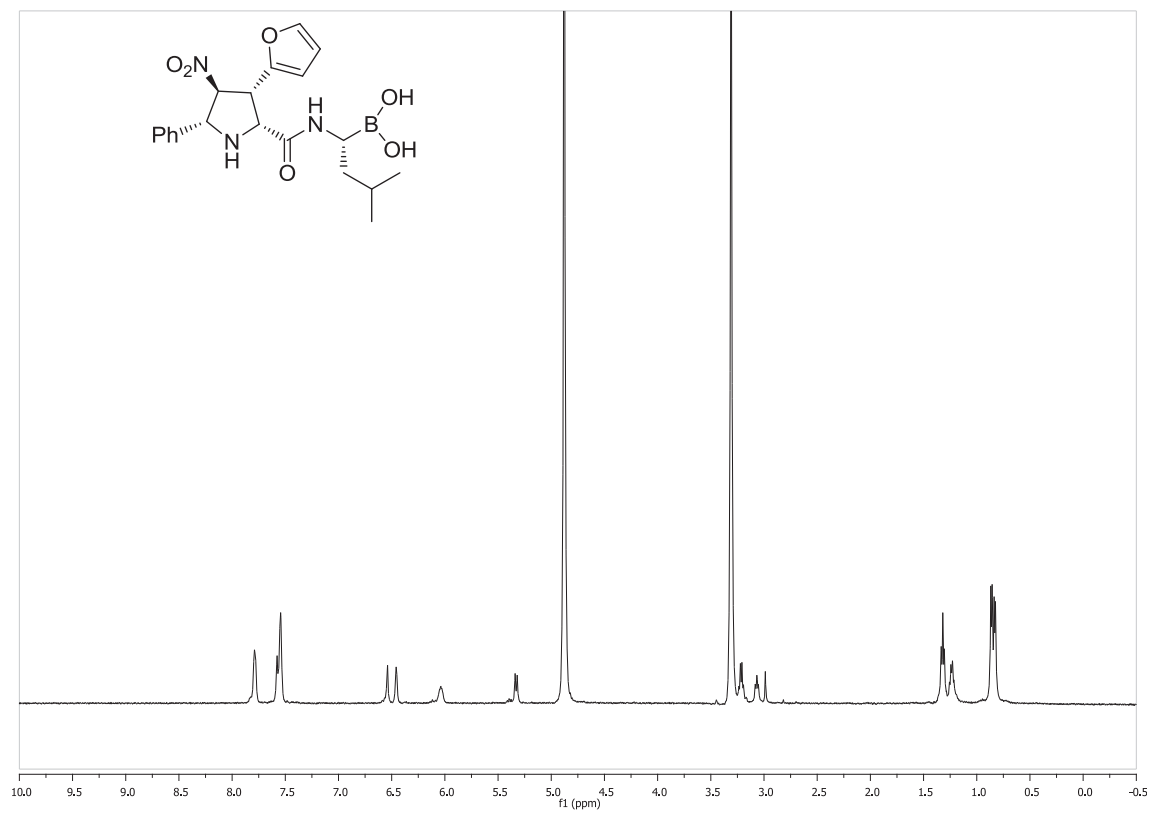
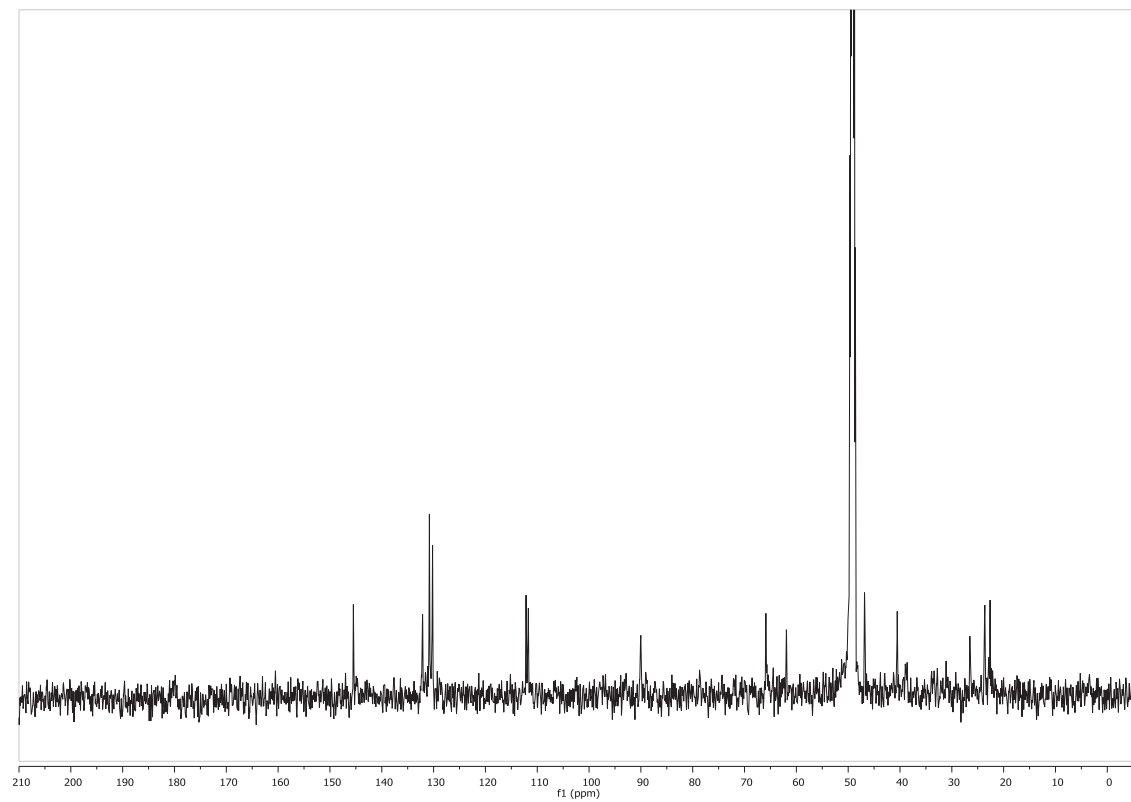
Compuesto *exo*-D-43c $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

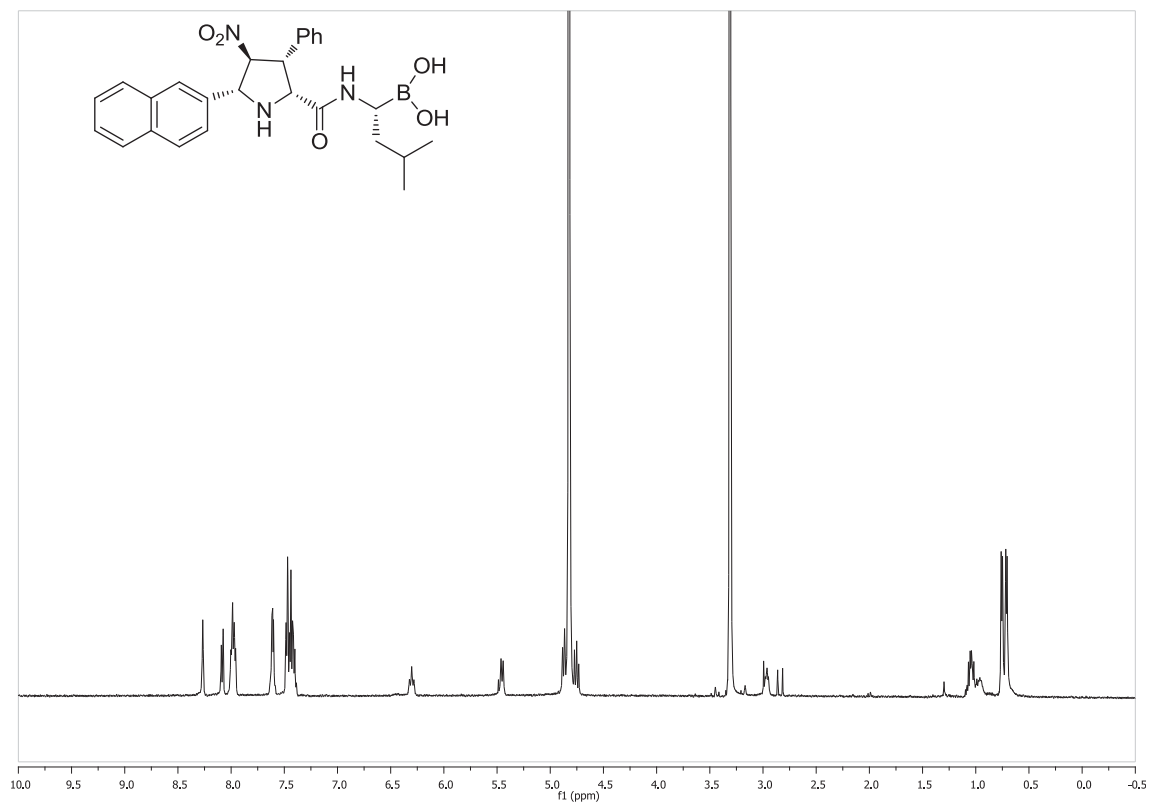
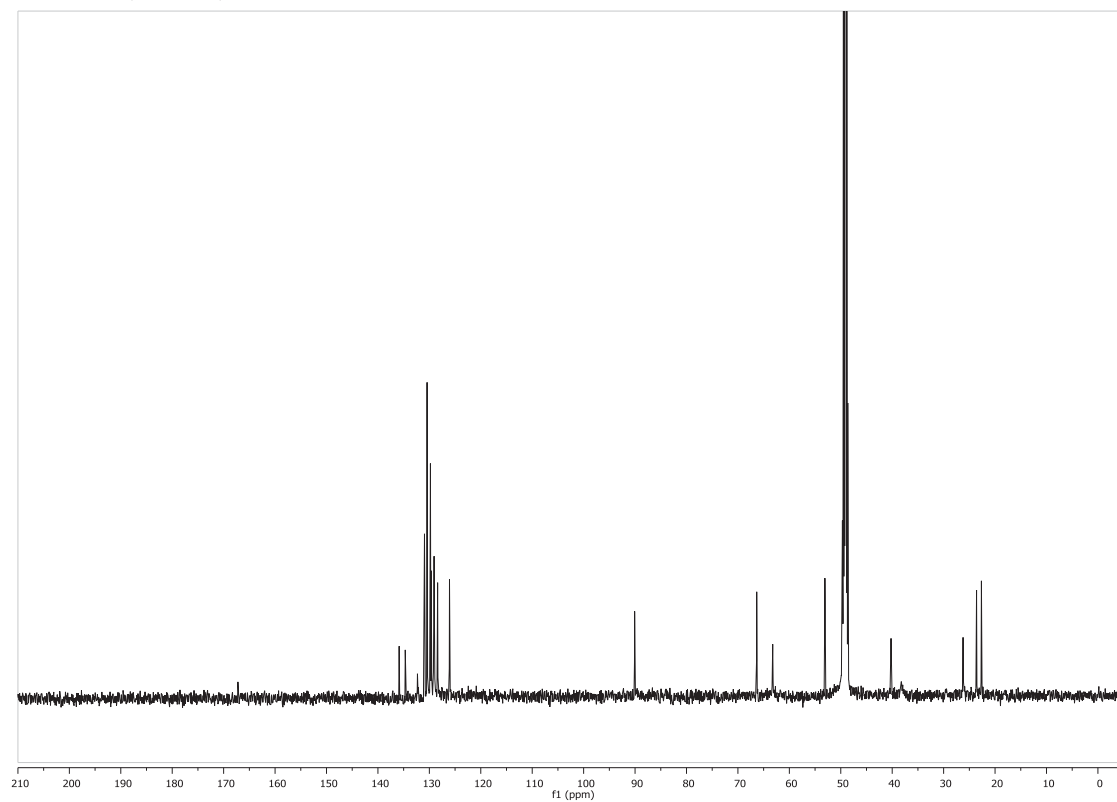
Compuesto *exo*-D-43d $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

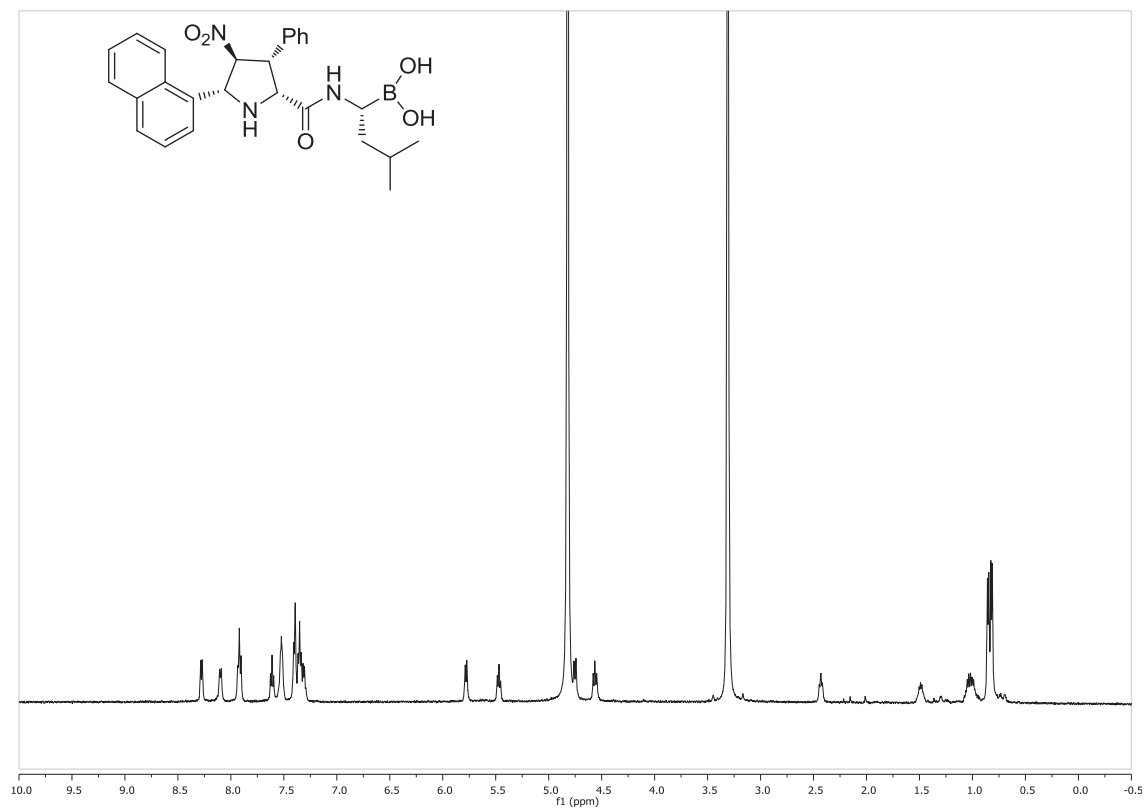
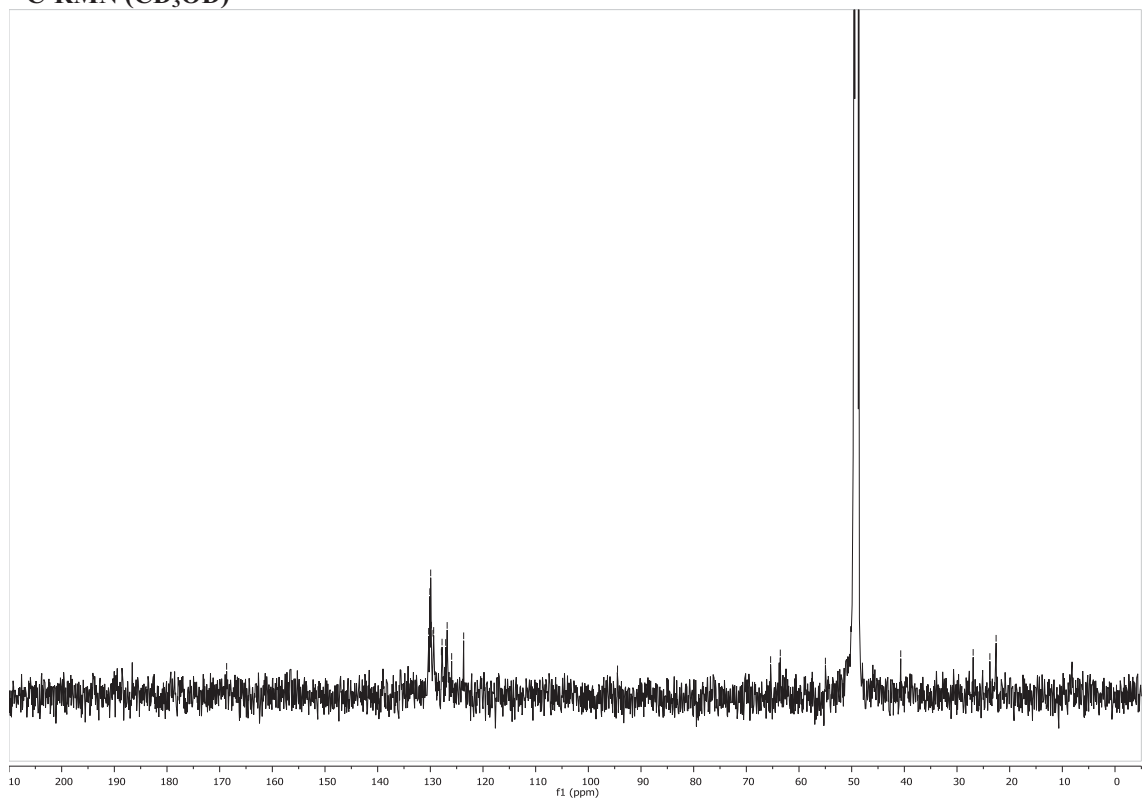
Compuesto *exo*-D-43e $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

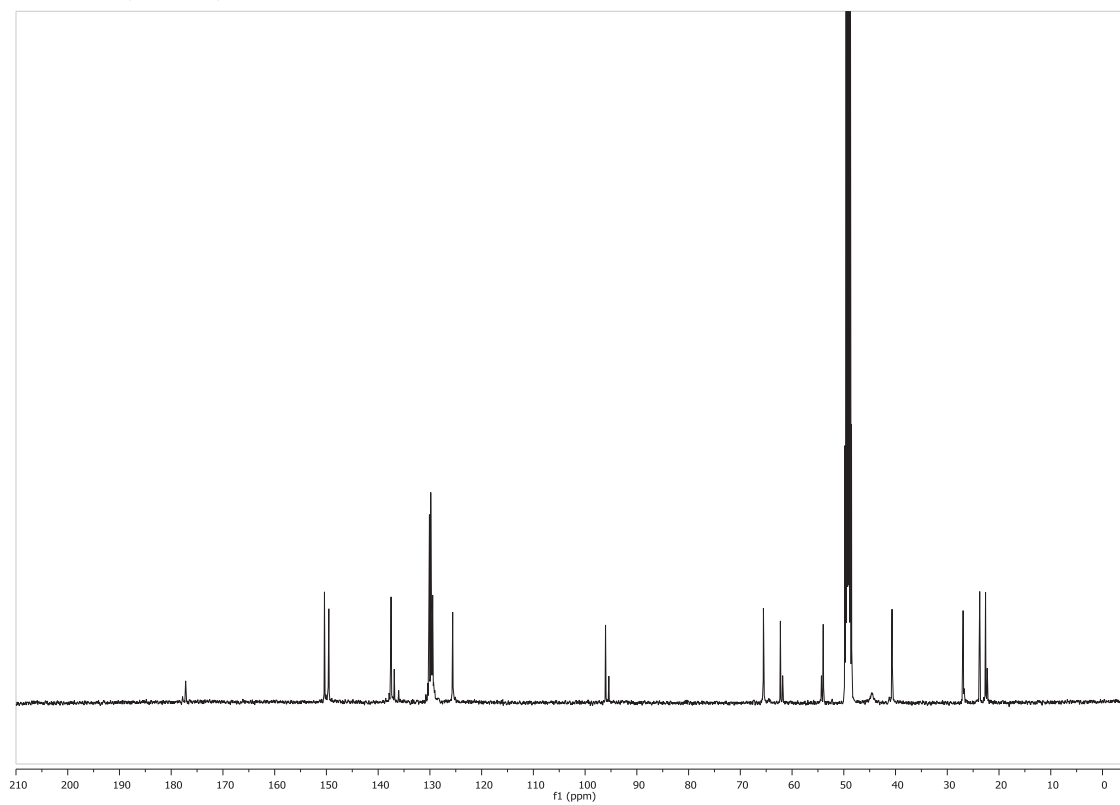


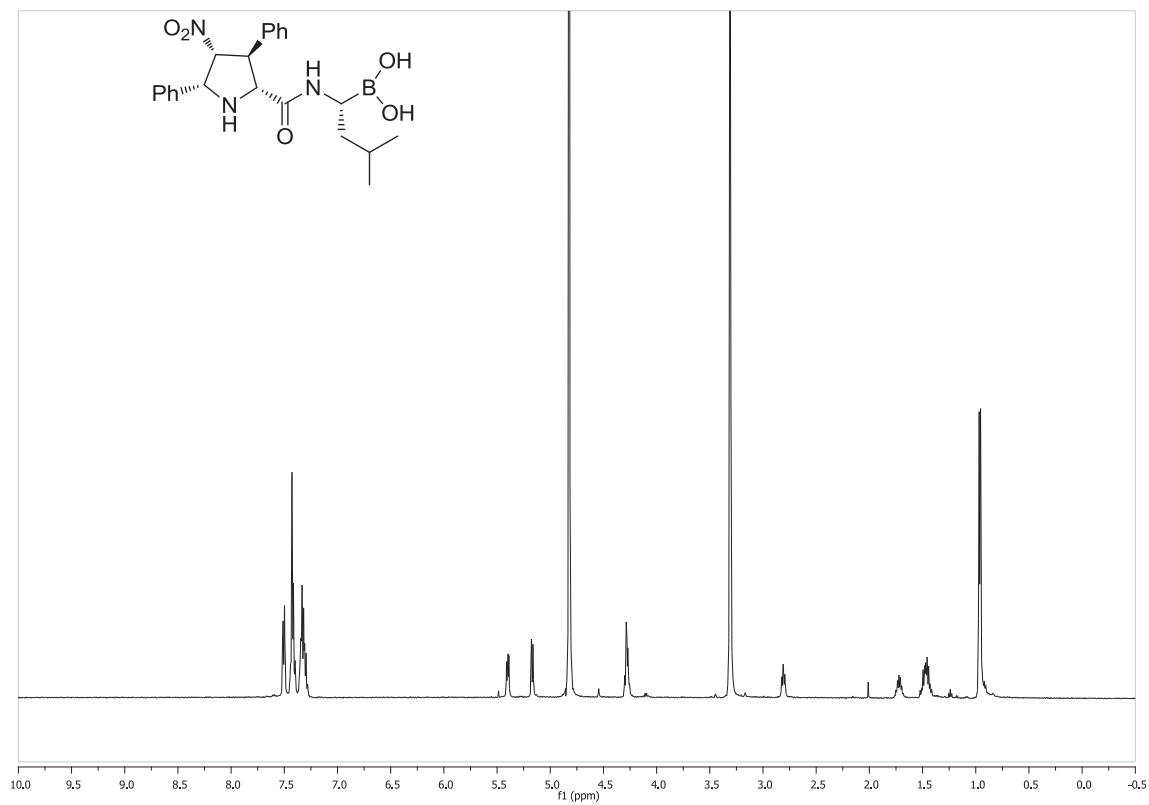
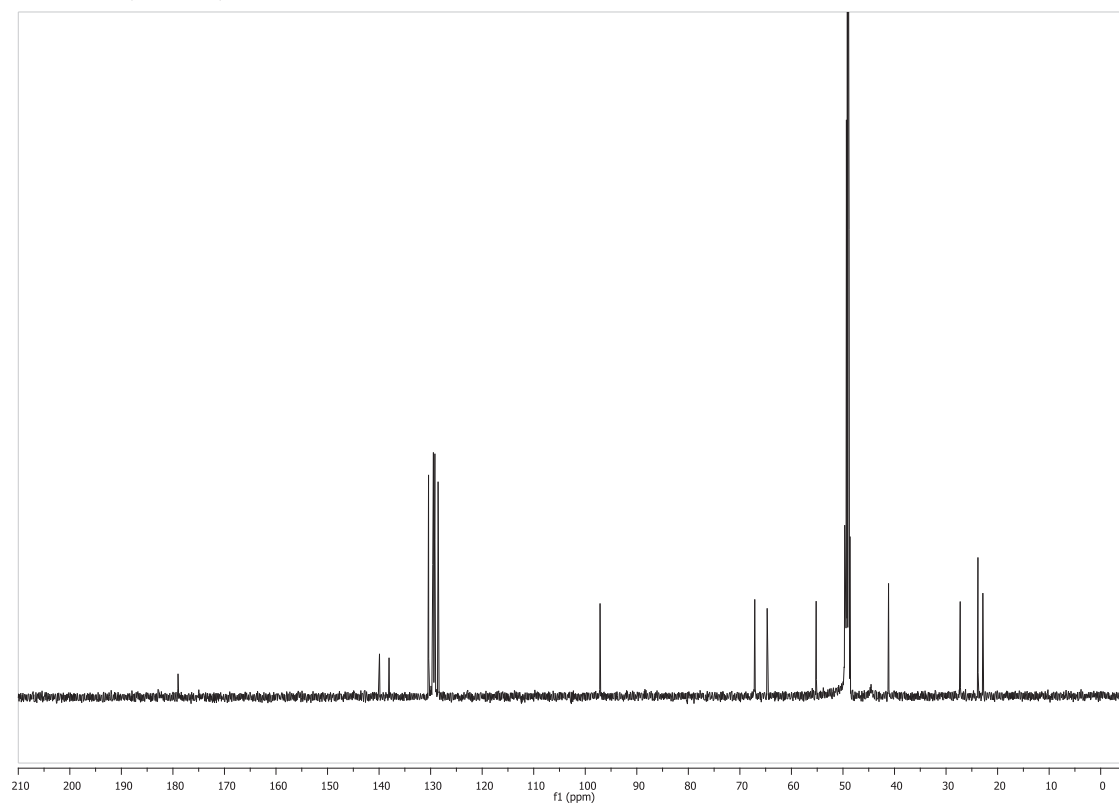
Compuesto *exo*-D-43f<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD)<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD)

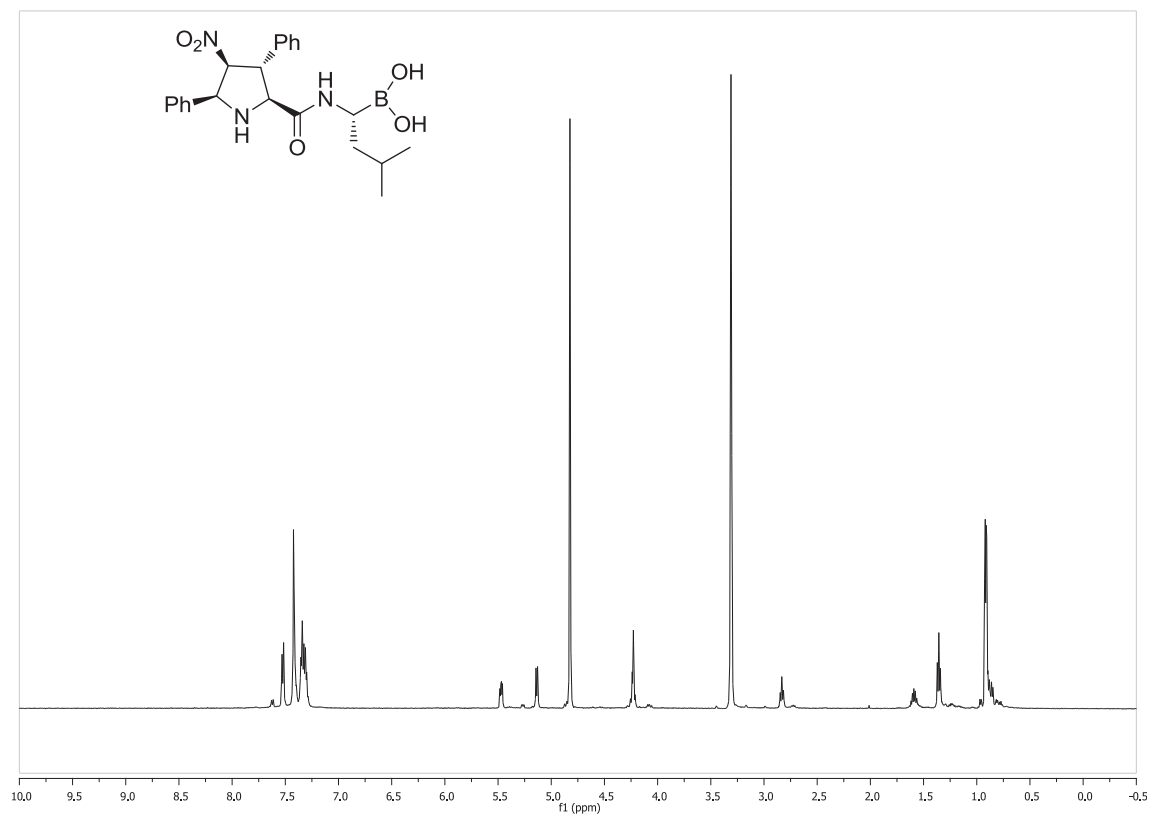
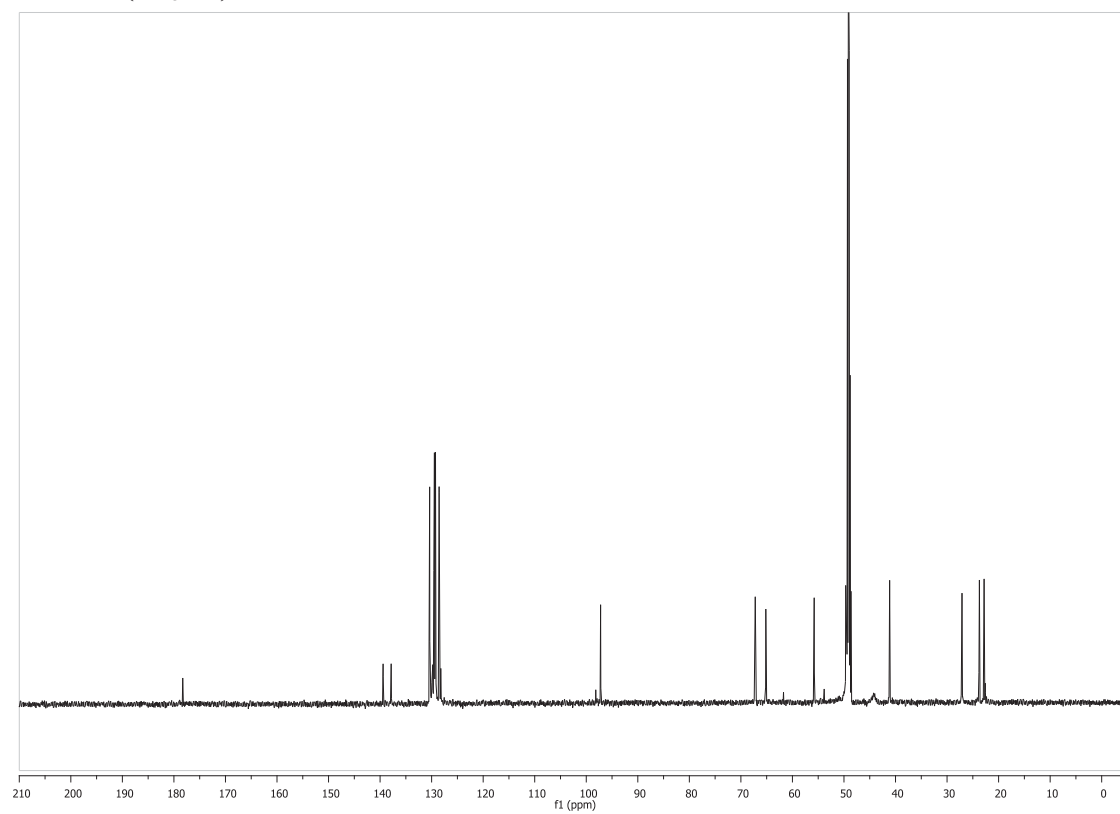
Compuesto *exo*-D-43g $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

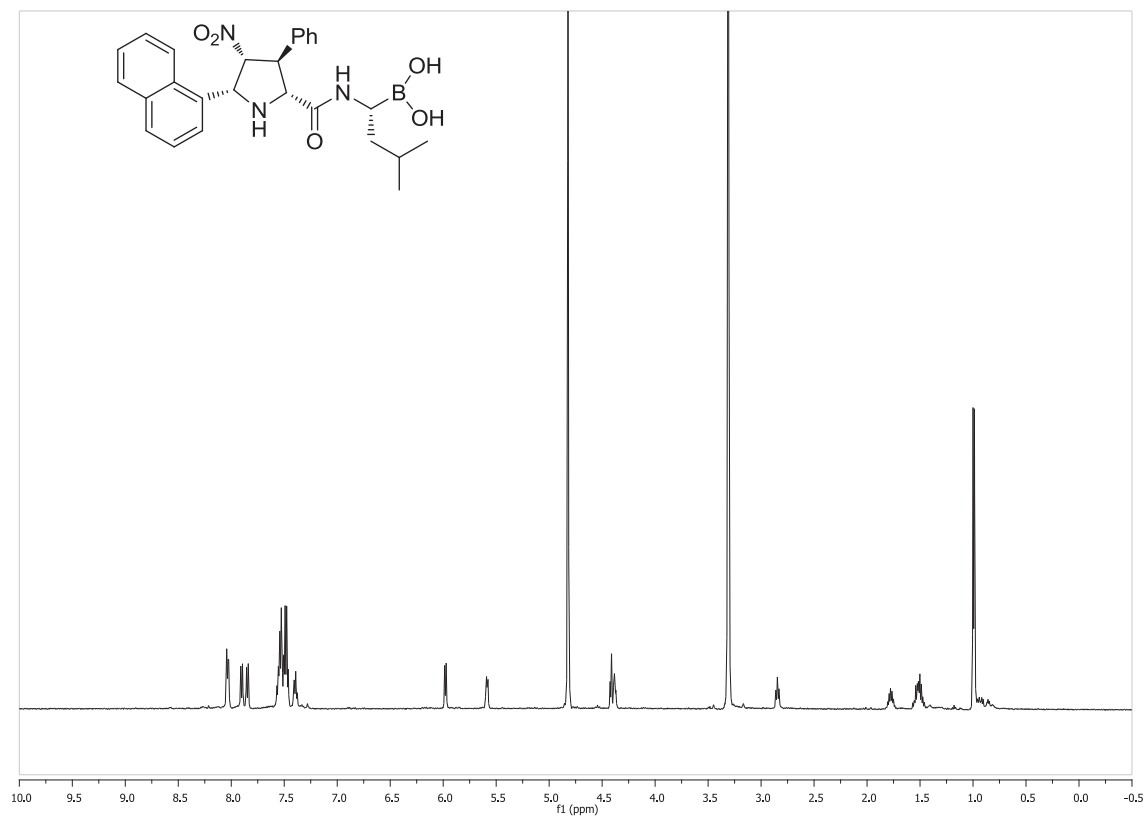
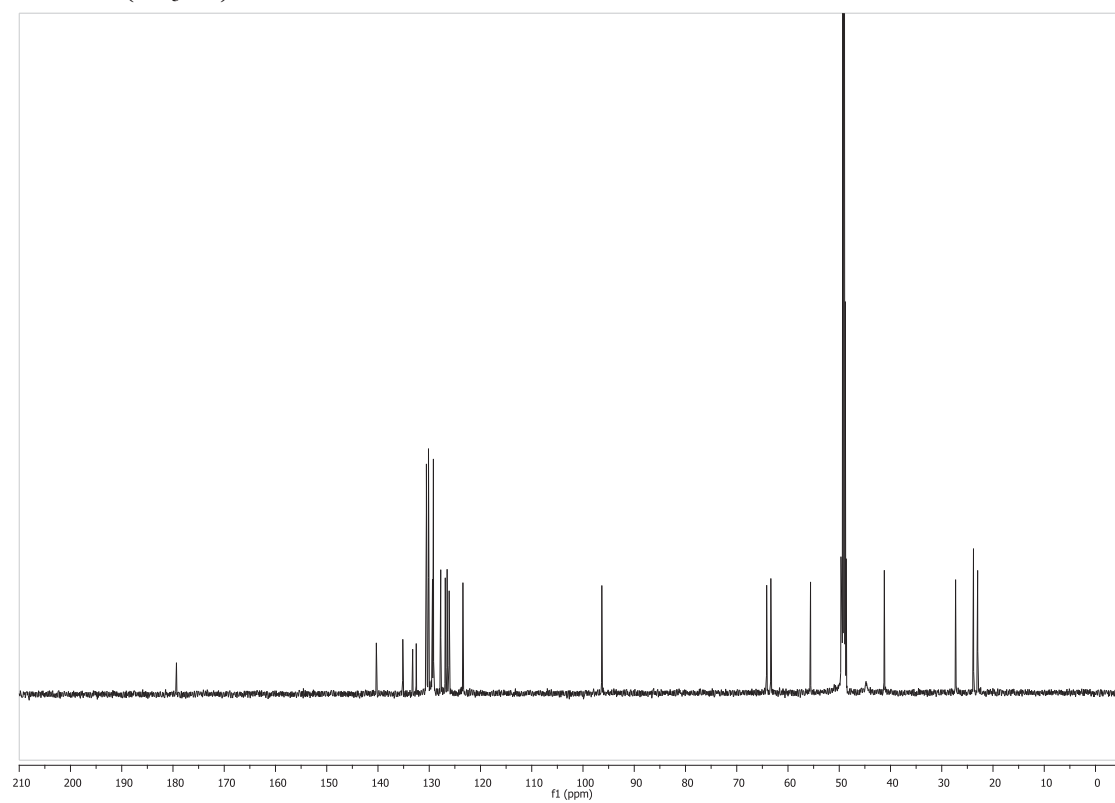
Compuesto *exo*-D-43h $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Compuesto *exo*-D-43i $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

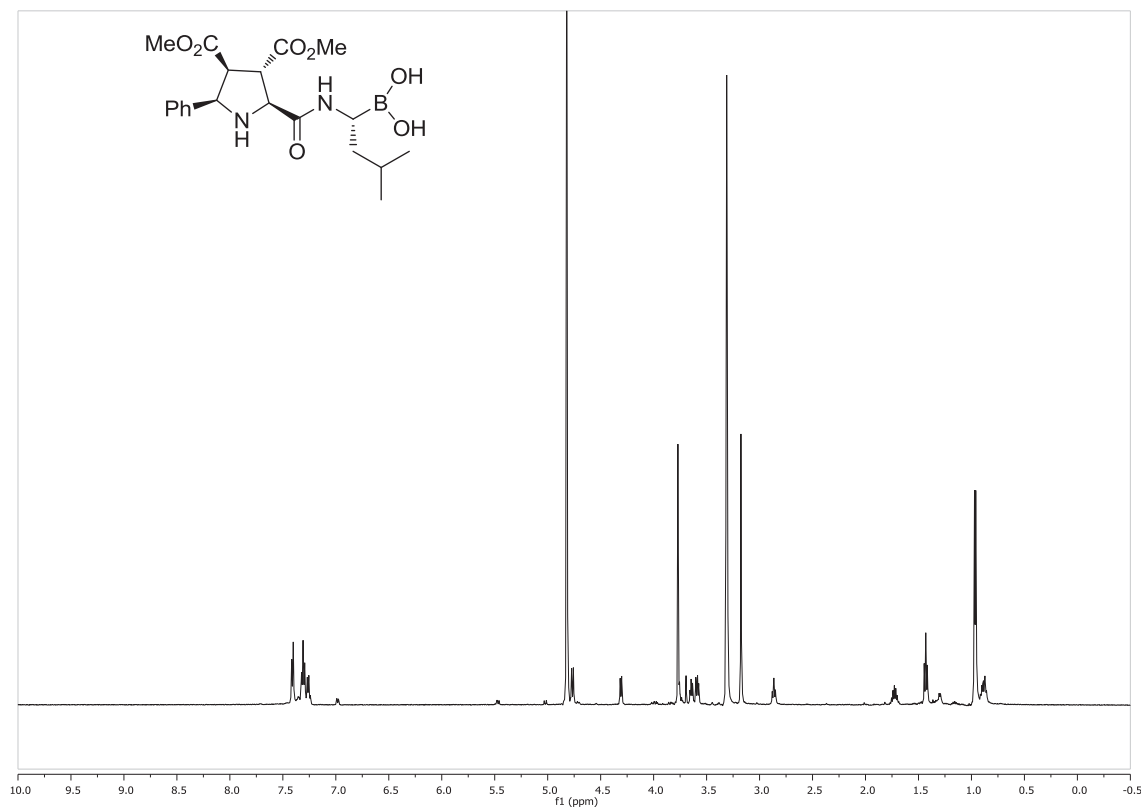
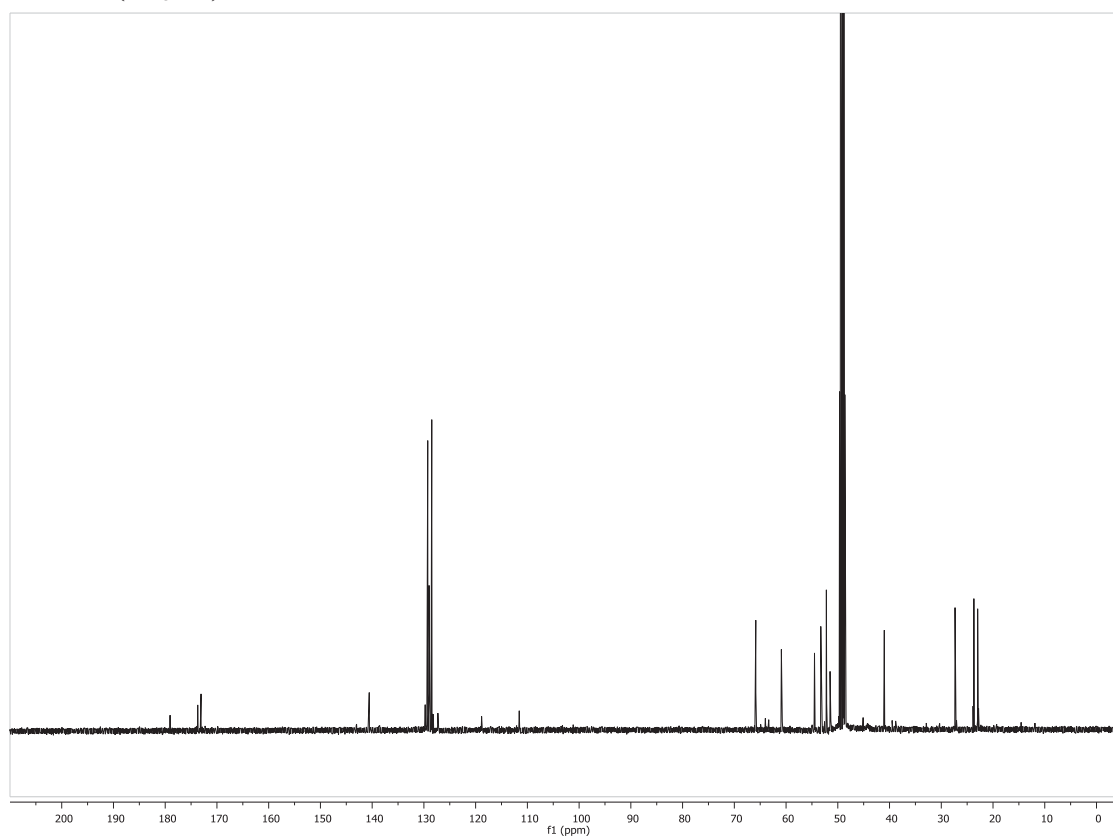
Compuesto *exo*-D-43j<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD)<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD)

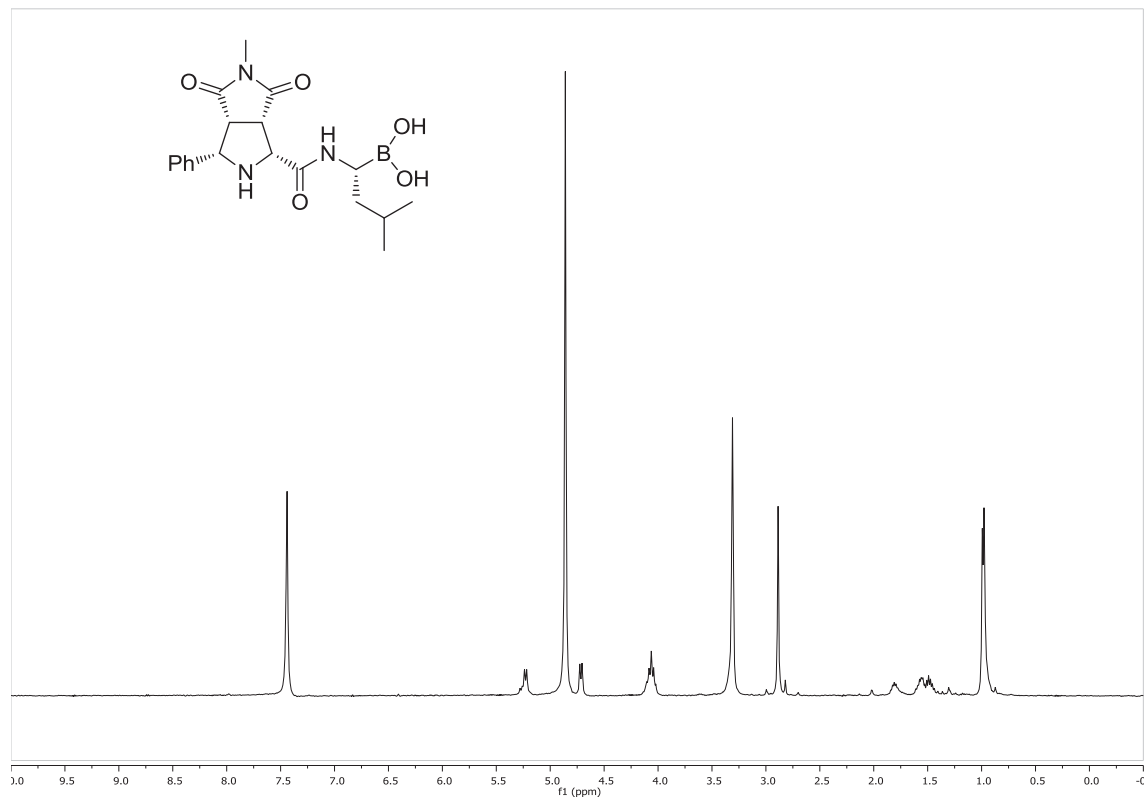
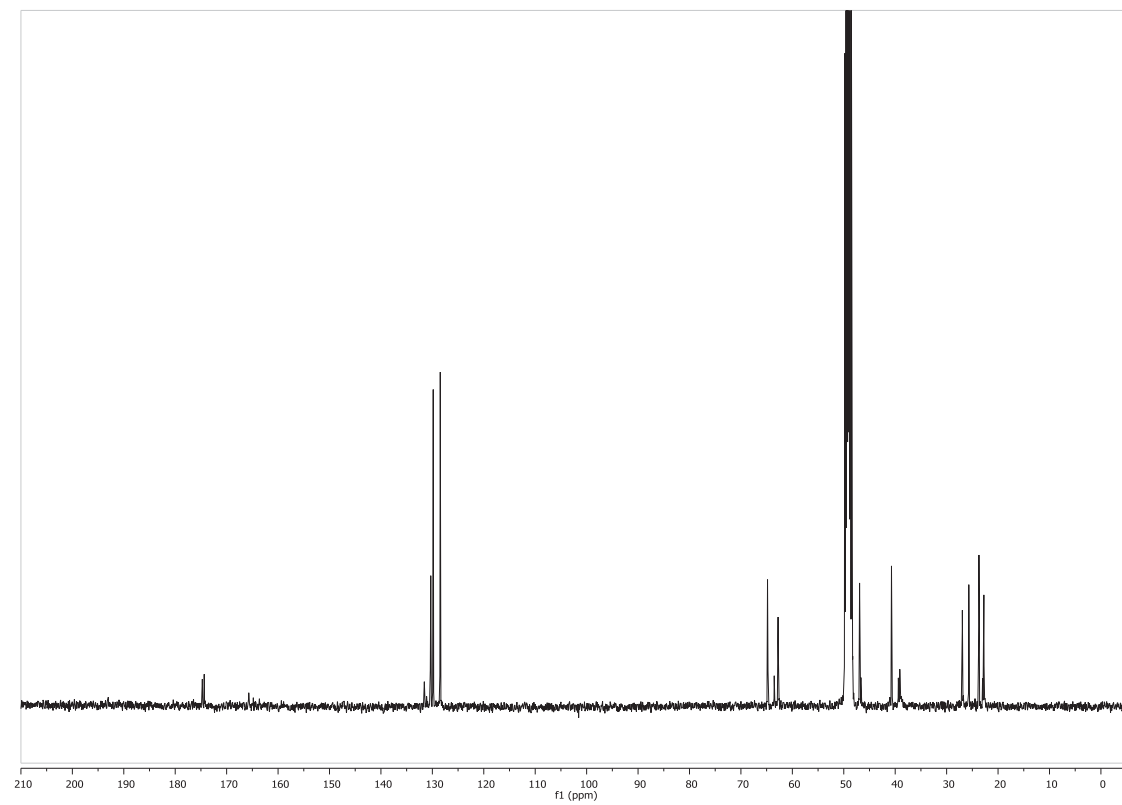
Compuesto *endo*-D-43a $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

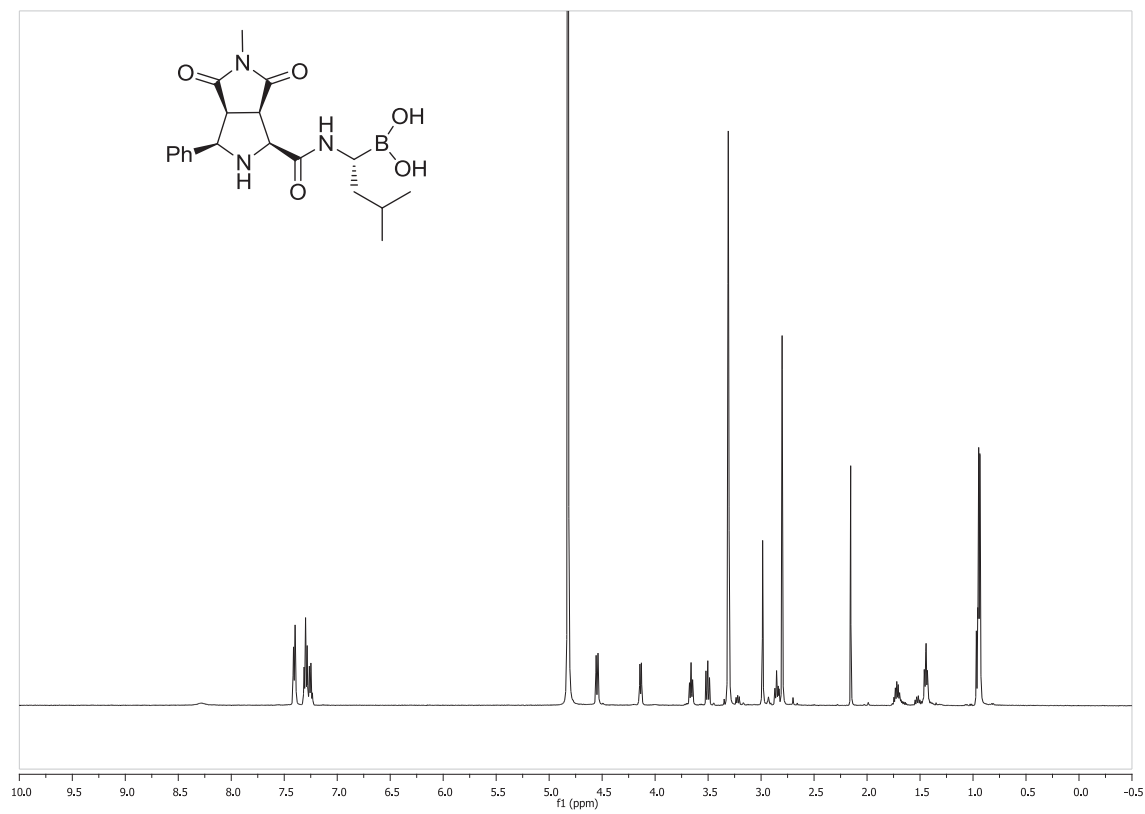
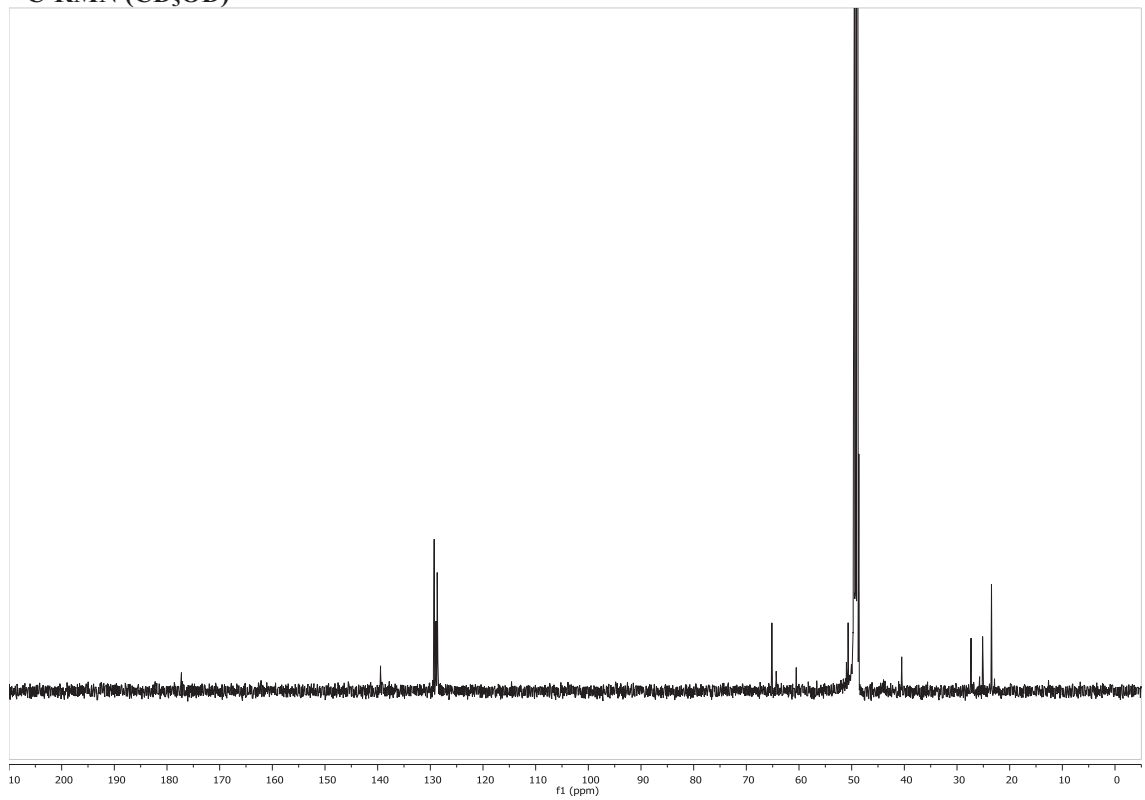
Compuesto *endo*-L-43a $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

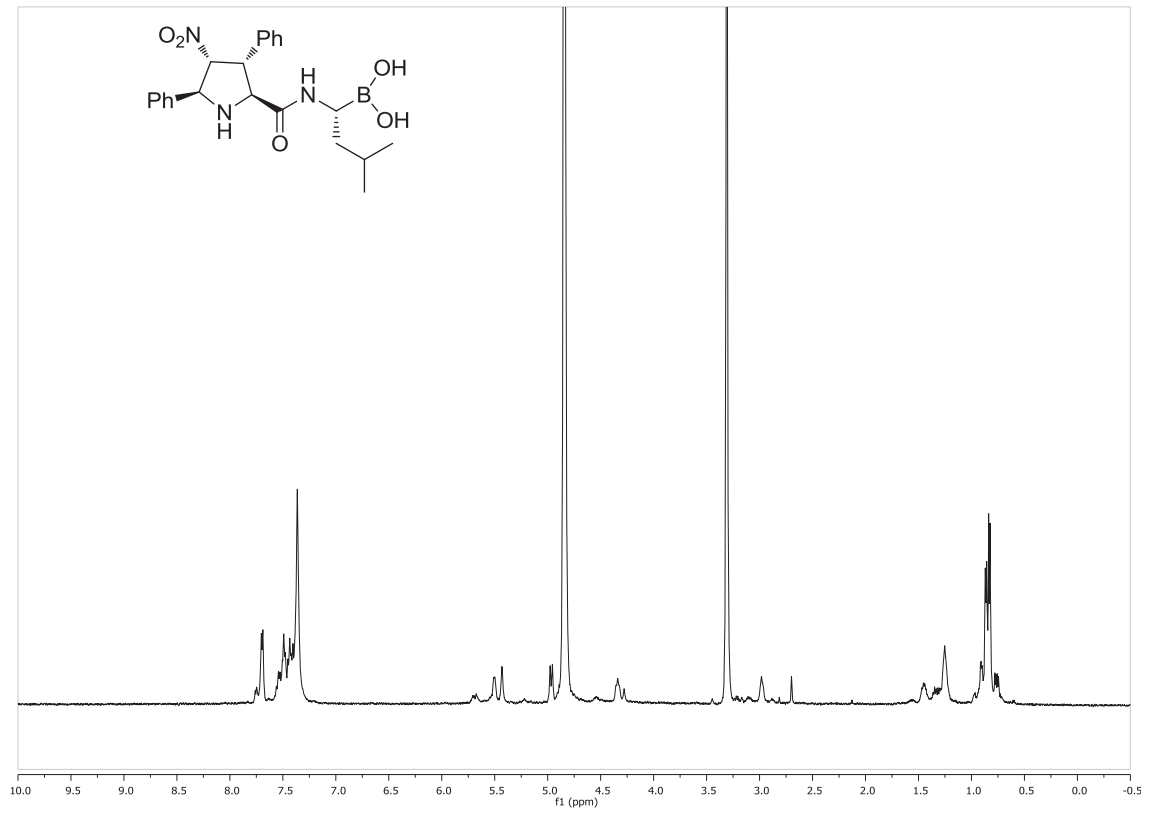
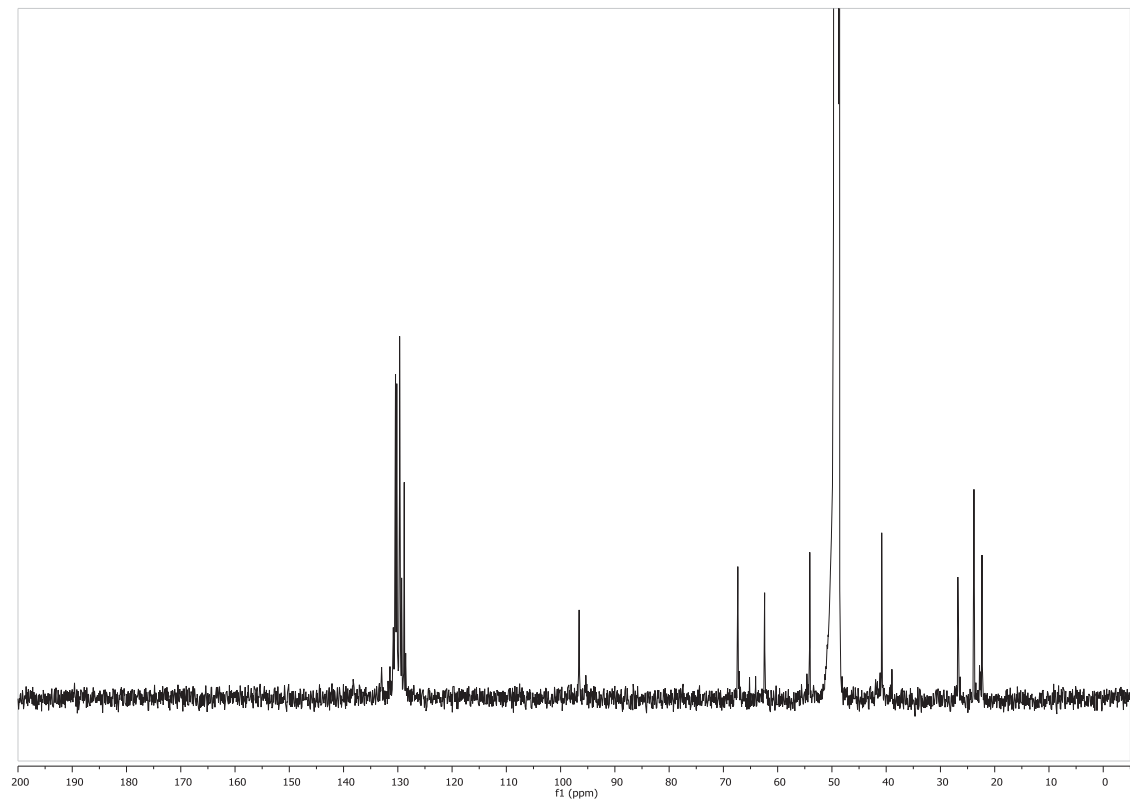
Compuesto *endo*-D-43i $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

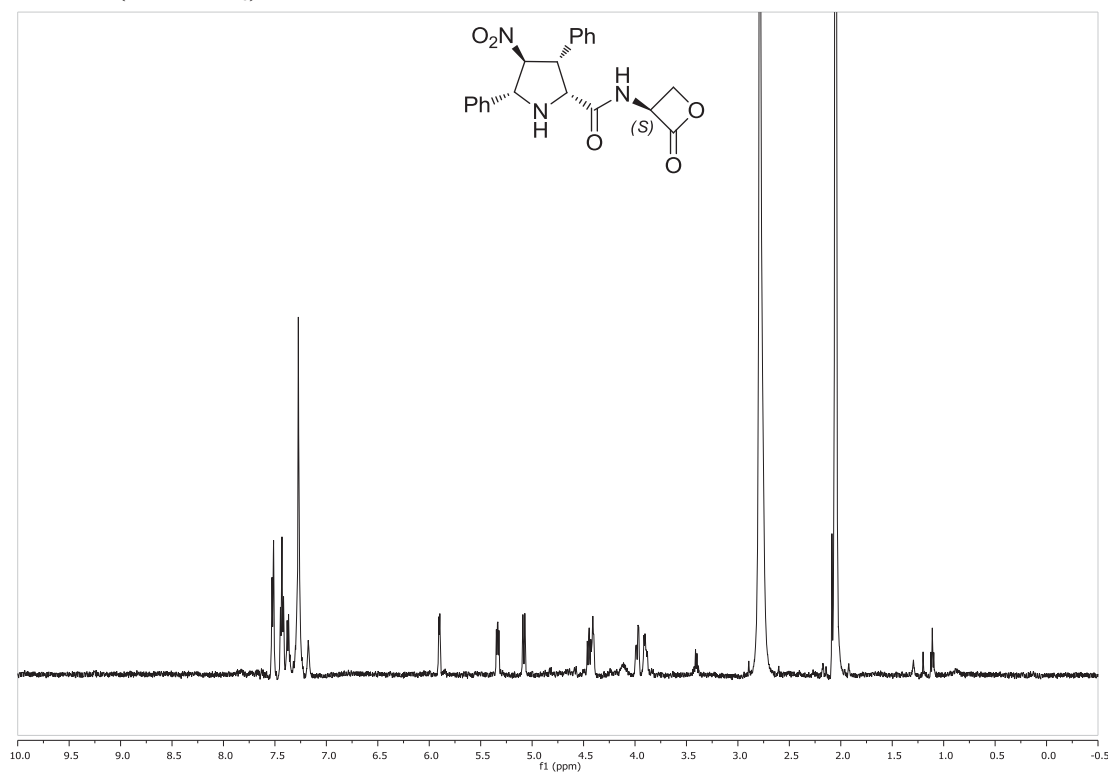
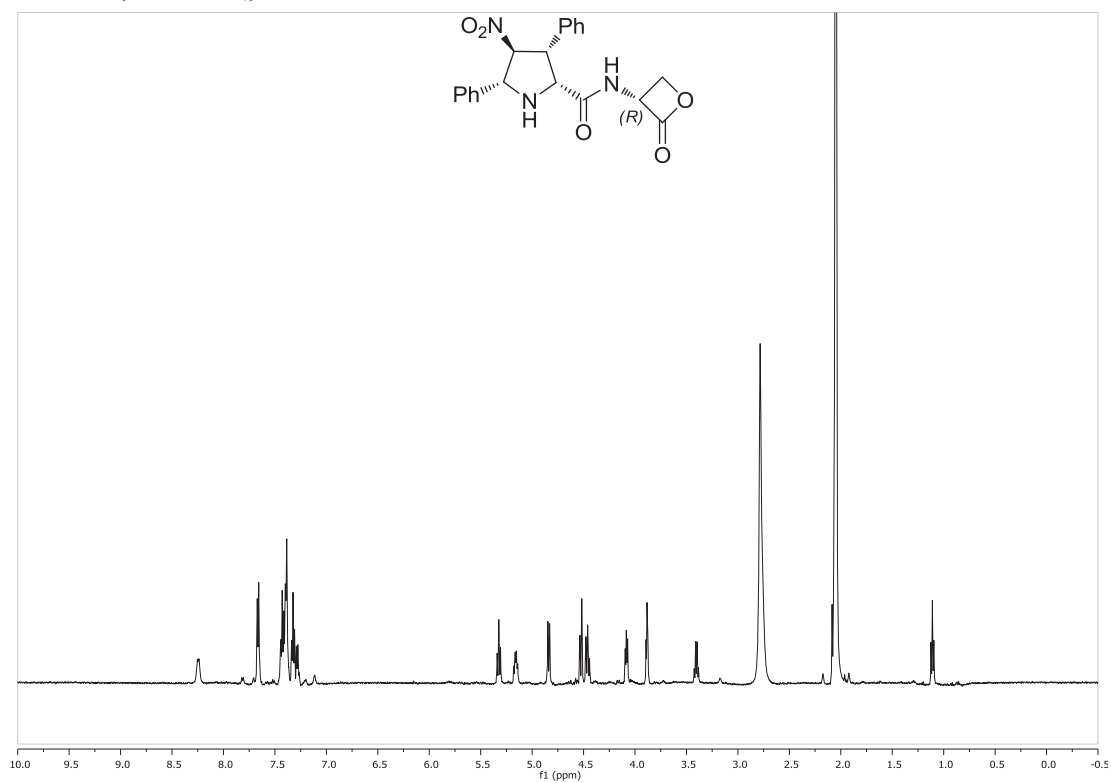


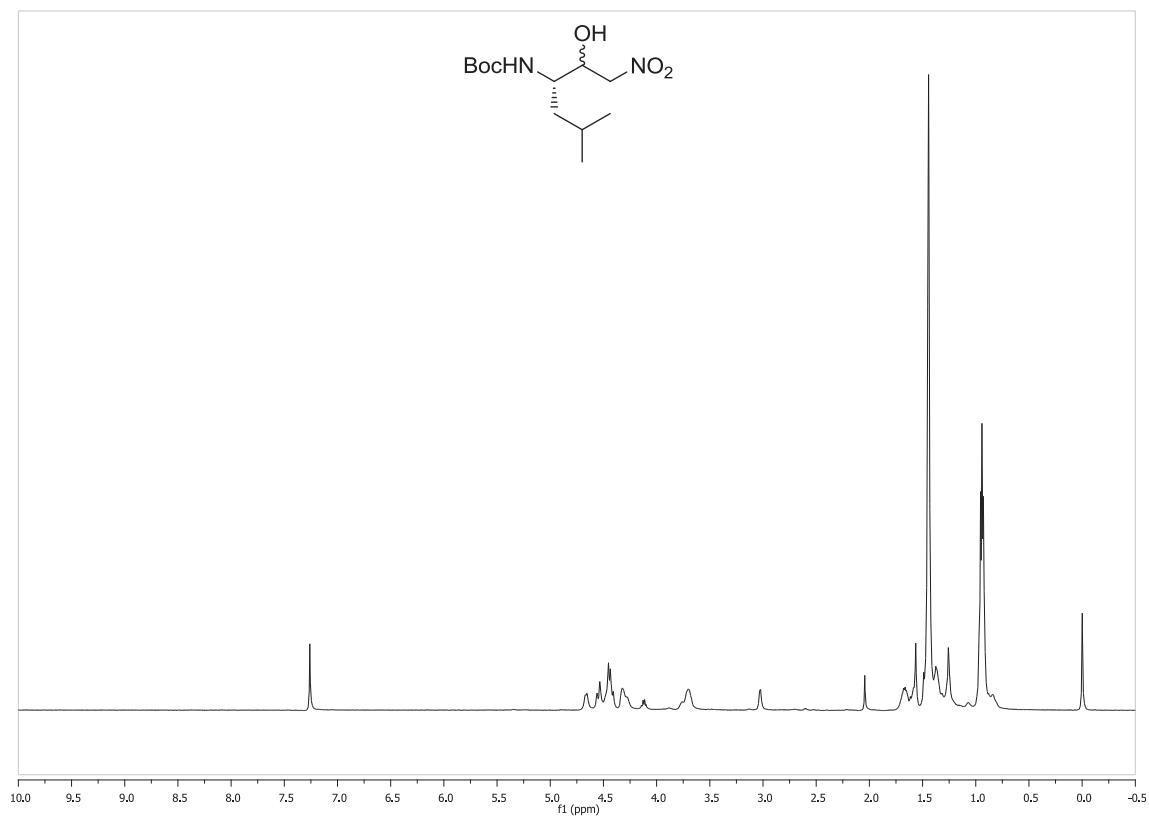
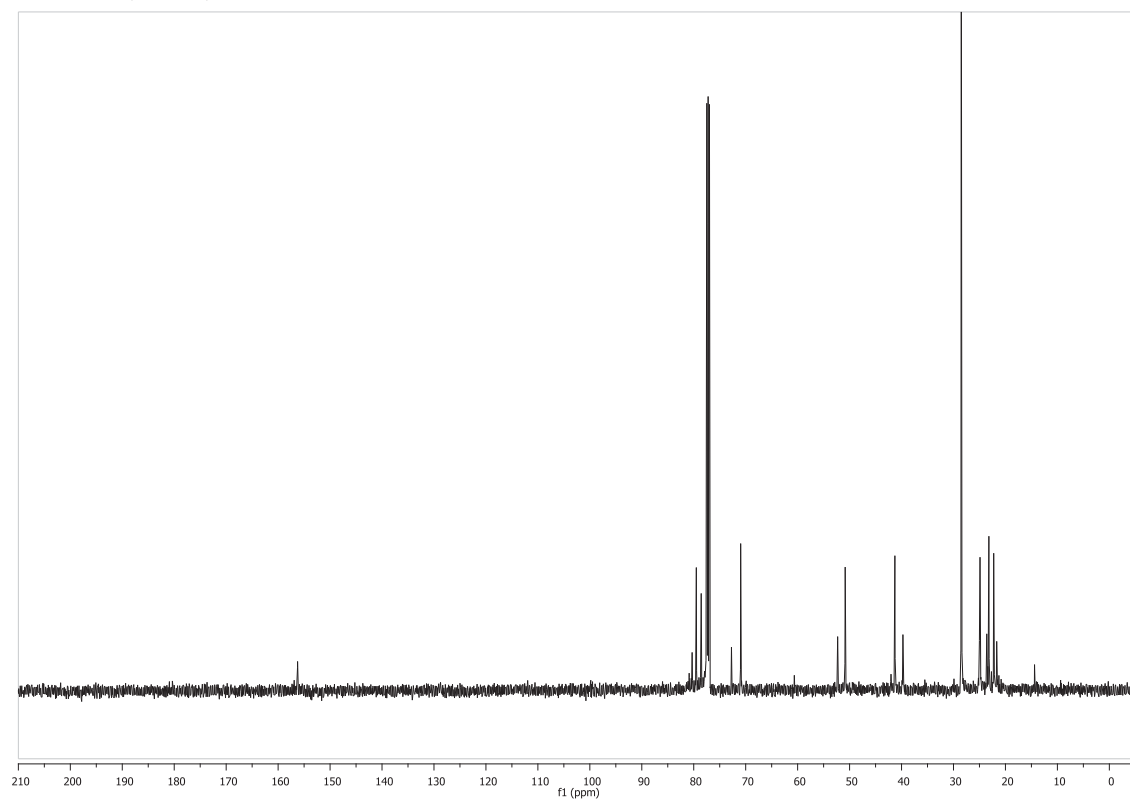
Compuesto *endo*-L-43k $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Compuesto *exo*-D-44 $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Compuesto *exo*-D-44 $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Compuesto *exo*'-L-43a $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

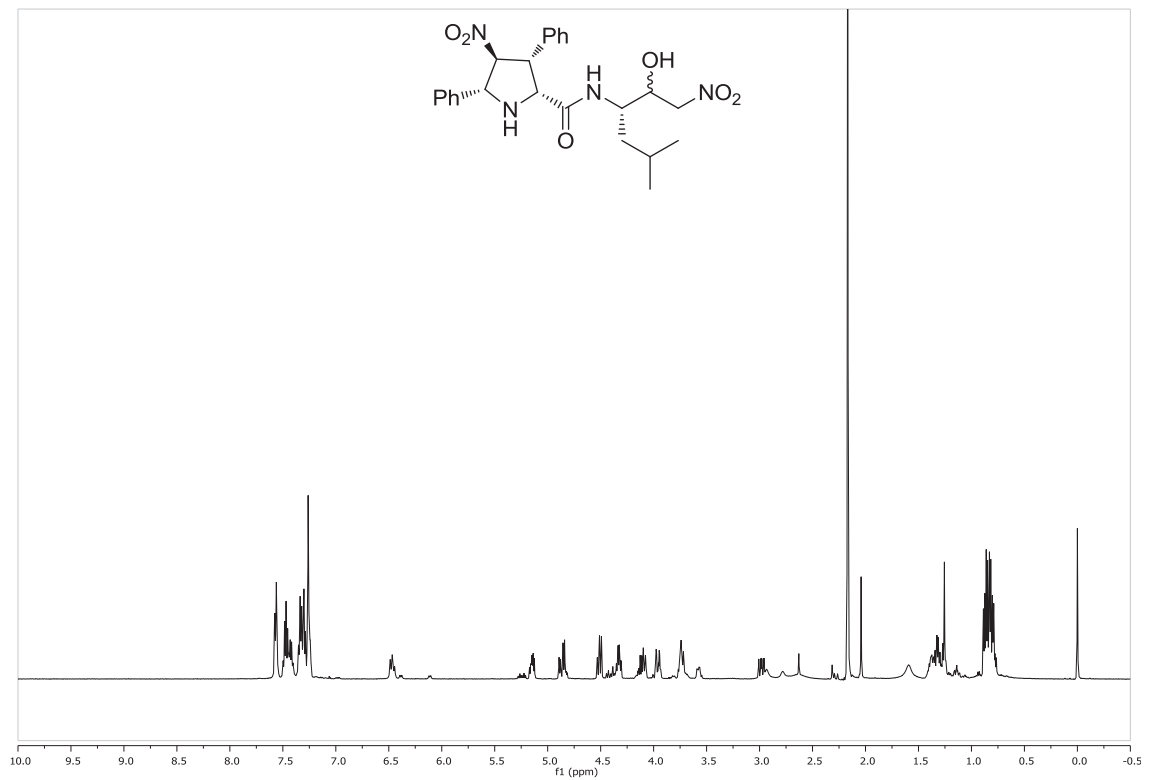
Compuesto **48a** $^1\text{H-RMN}$  (Acetona- $d_6$ )Compuesto **52a** $^1\text{H-RMN}$  (Acetona- $d_6$ )

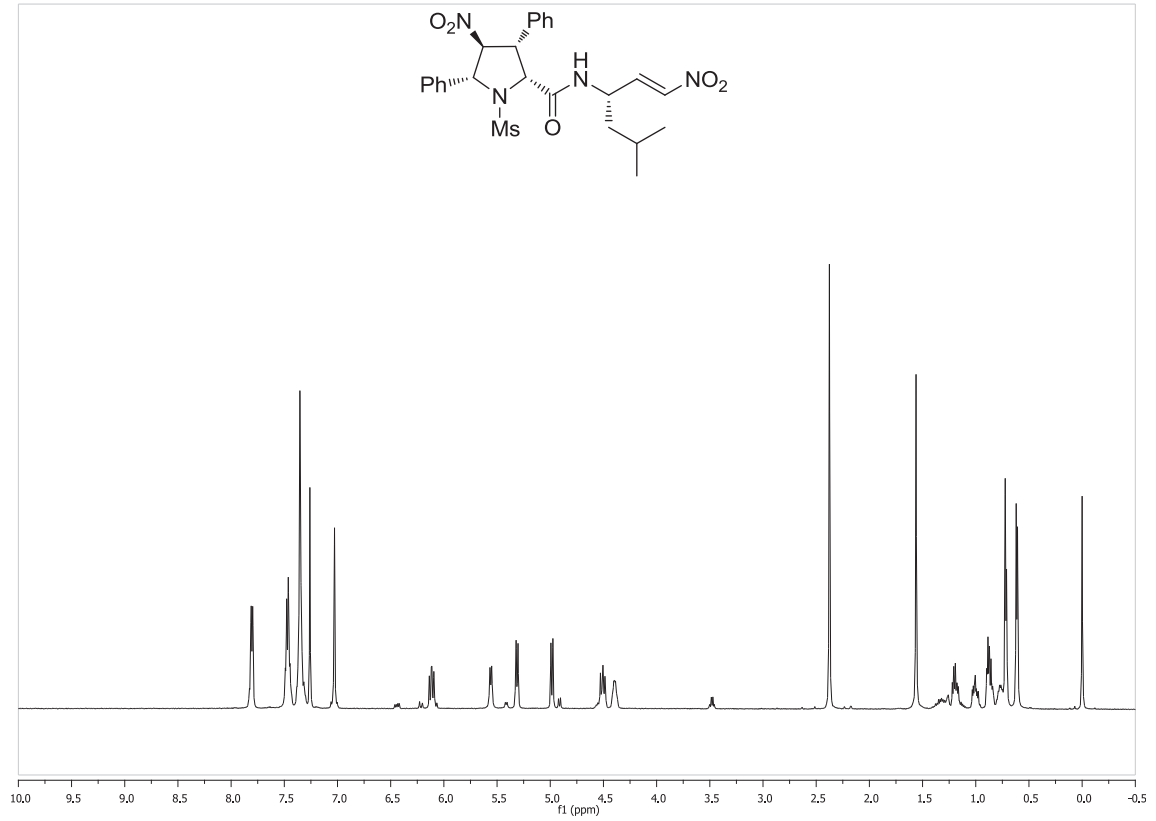
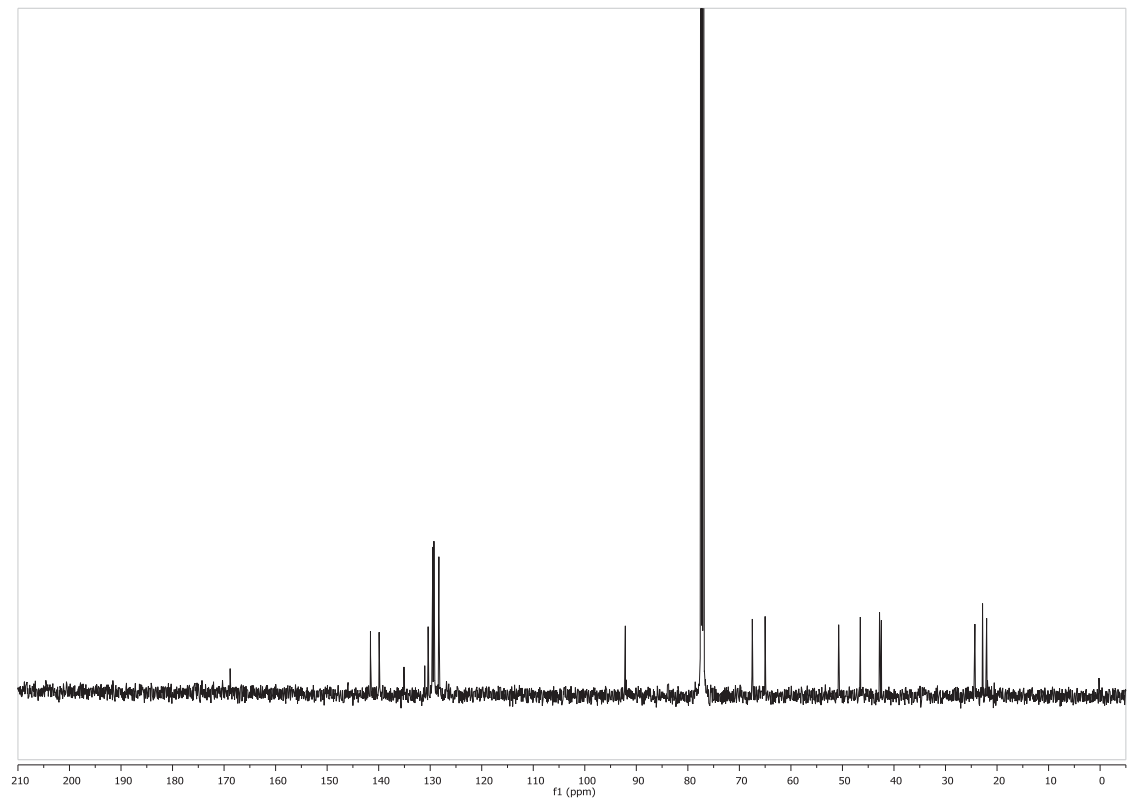
Compuesto **56** $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )

## Compuesto 57

 $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

## Compuesto 58a

 $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )

Compuesto **59a** $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )



**Anexo B:** Patente, publicaciones y aportaciones en congresos

## 1. Patente:

Fernando P. Cossío, María de Gracia Retamosa, Amaia Larumbe, Aizpea Zubia, Tamara Bello, Yosu Ion Vara, Carme Masdeu, Eneko Aldaba. WO2015/124663, **2015**. “Enantiopure tetrasubstituted pyrrolidines as scaffolds for proteasome inhibitors and medicinal applications thereof”. Titulares: UPV/EHU, IKERCHEM S.L.

## 2. Publicaciones:

- “Enantiodivergent Synthesis of Bis-Spiropyrrolidines via Sequential Interrupted and Completed (3+2) Cycloadditions”. Egoitz Conde, Iván Rivilla, Amaia Larumbe, Fernando P. Cossío. *J. Org. Chem.* **2015** (aceptado).
- “Stereochemical Effects in Proteasome Inhibitors Based upon Unnatural Densely Functionalized Proline Derivatives”. María de Gracia Retamosa, Amaia Larumbe, Tamara Bello, Fernando P. Cossío. (manuscrito en preparación).

## 3. Congresos:

- Amaia Larumbe, María de Gracia Retamosa, Tamara Bello, Aizpea Zubia, Yosu I. Vara, Carme Masdeu, Eneko Aldaba, Fernando P. Cossío. 4<sup>th</sup> Brazil-Spain Workshop on Organic Chemistry 4-BSWOC, **2014**. Póster: “Densely substituted pyrrolidine derivatives as scaffolds for novel and potent proteasome inhibitors”.
- Aitor Lacambra, Iván Rivilla, Amaia Larumbe, Miguel A. Claudio-Catalán, Fernando P. Cossío. 4<sup>th</sup> Brazil-Spain Workshop on Organic Chemistry 4-BSWOC, **2014**. Póster: “Synthesis of Novel Catalysts via (2+2) and (3+2) cycloadditions”.
- Iván Rivilla, Amaia Larumbe, Miguel A. Claudio-Catalán, Aitor Lacambra, Fernando P. Cossío. 20<sup>th</sup> EuCheMS Conference on Organometallic Chemistry,

**2013.** Póster: “Synthesis of novel catalysts via (2+2) and (3+2) cycloadditions”.

- Amaia Larumbe, Egoitz Conde, Fernando P. Cossío. VI International School On Organometallic Chemistry Marcial Moreno Mañas, **2013.** Comunicación flash: “Synthesis of novel catalysts via (3+2) cycloadditions”.