



Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea

**KIMIKA FAKULTATEA**  
FACULTAD DE QUÍMICA

**Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea**

**Facultad de Química/Kimika Fakultatea**

Grado en Química

TRABAJO FIN DE GRADO

**Preparación de ligandos bimetálicos conjugados con  
biotina como precursores de proteínas con actividad  
Huisgenasa**

**Autor/a:** Ainhoa Villoria Barcena

**Director:** Fernando P. Cossío

**Co-Director externo DIPC:** Iván Rivilla de la Cruz

San Sebastián, Julio de 2021  
GIPUZKOAKO KANPUSA  
Pº Manuel Lardizabal, 3  
200018 DONOSTIA-SAN SEBASTIÁN  
GIPUZKOA



## ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
Atm	Atmósfera
°C	Grado Celsius
cat.	Catalizador
dd	Doble doblete
ddd	Doble doble doblete
ddt	Doble doble triplete
dt	Doble triplete
DMF	N,N-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EA	Energía de activación
EDCI	N-(3-Dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida)
Et	Etilo (Grupo)
eq.	Equivalente
EWG	Grupo electrón atrayente (de sus siglas en inglés Electron Withrawing Group)
<i>g</i> -COSY	Espectroscopia de correlación (de sus siglas en inglés <i>Gradient COrrelation SpectrosopY</i> )
<i>g</i> -HSQC	Correlación heteronuclear de cuanto simple ( de sus siglas en ingles <i>Gradient Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> )
h	Horas
Hex	Hexano
HOBt	Hidroxibenzotriol
IPA	Isopropil alcohol
IR	Espectroscopía de infrarrojo ( de sus siglas en ingles <i>Infrared Spectroscopy</i> )
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K <sub>d</sub>	Constante de disociación

L	Ligando
M	Molaridad
m	Multiplete
Me	Metilo (grupo)
mL	Mililitro
mmol	Milimol
MeOH	Metanol
PBS	Tampón fosfato salino (De sus siglas en inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
Ph	Fenilo (grupo)
ppm	Partes por millón
R	Radical (grupo)
Rdto.	Rendimiento
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singlete
t.amb	Temperatura ambiente
TBTU	Hexafluorofosfato de (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina (De sus siglas en inglés thin layer chromatography)

## Tabla de contenido

ABREVIATURAS .....	i
RESUMEN .....	v
SUMMARY .....	vi
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Enzimas .....	1
1.1.1 Nomenclatura y clasificación.....	5
1.2 Cicloadición 1,3-dipolar: Aspectos generales.....	9
1.3 Reacción dipolar entre iluros de azometino y alquenos .....	11
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Resultados y discusión .....</b>	<b>15</b>
3.1 Síntesis de ligandos bimetálicos conjugados con biotina.....	15
3.1.1 Síntesis de [2,2'-bipiridin]-3-amina ( <b>4</b> ) .....	15
3.1.2 Síntesis de N-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida ( <b>6</b> ) .....	17
3.1.3 N-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida ( <b>10</b> ).....	19
3.1.1 Síntesis de N-([2,2'-bipiridin]-3-il)-6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamida ( <b>14</b> ).....	23
3.2 Reacciones de cicloadición.....	25
3.2.1 Diseño inicial de ligandos .....	25
3.2.2 Reacciones de cicloadición 3+2 entre N-bencilidenglicinato de metilo ( <b>14</b> ) y (E)- $\beta$ -nitroestireno ( <b>15</b> ).....	27
<b>4. Conclusiones.....</b>	<b>32</b>
<b>Conclusions .....</b>	<b>33</b>
<b>5. Desarrollo experimental .....</b>	<b>34</b>
5.1 Técnicas analíticas, materiales y métodos generales.....	34
5.1.1 Reactivos y disolventes.....	34
5.1.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	34
5.1.3 Cromatografía .....	35
5.1.4 Espectroscopía de Infrarrojo (IR).....	35

5.1.5	Espectrometría de masas .....	35
5.1.6	Métodos generales.....	35
5.2	Procedimiento para la síntesis de ligandos bimetálicos conjugados con biotina .....	36
5.2.1.1	Procedimiento para la síntesis del precursor 3-nitro-[2'-bipiridina] ( <b>3</b> ).....	36
5.2.1.2	Procedimiento para la síntesis de la [2,2'-bipiridin]-3-amina ( <b>4</b> ) .....	36
5.2.2	Síntesis de N-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida ( <b>6</b> ) .....	37
5.2.3	Procedimiento para la síntesis de 4-((5-((3aS, 4S, 6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno [3,4-d]imidazol-4-il) pentanamido)metil)benzoato de metilo ( <b>7</b> ) .....	38
5.2.4	Procedimiento para la síntesis del ácido-4-((5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzoico ( <b>9</b> ) .....	38
5.2.5	Procedimiento para la síntesis de N-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida ( <b>10</b> ).....	39
5.2.6	Procedimiento para la síntesis de 6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno [3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanoato de metilo ( <b>12</b> ).....	40
5.2.7	Procedimiento para la síntesis de Ácido 6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno [3,4-d]imidazol-4-il) pentanamido) hexanoico ( <b>13</b> ) .....	40
5.2.8	Procedimiento para la síntesis de N-([2,2'-bipiridin]-3-il)-6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamida ( <b>14</b> ) .....	41
5.3	Procedimiento general para la cicloadición 1,3-dipolar entre N-benciliden glicinato de metilo ( <b>14</b> ) y (E) -β- nitroestireno ( <b>15</b> ).....	42
<b>6.</b>	<b>Espectros de RMN.....</b>	<b>44</b>
<b>7.</b>	<b>Anexo .....</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>60</b>

## RESUMEN

Recientemente, el grupo de investigación del Prof. Fernando P. Cossío, en colaboración con los grupos de investigación de los Profs. Cortajarena y Jiménez-Barbero, ha demostrado que las proteínas de repetición tetratricopeptídica consensuada (CTPR) exhiben actividad Huisgenasa en disolución de THF, obteniéndose hasta cuatro cicloaductos racémicos en la reacción entre *N*-bencilidenglicinato de metilo y (*E*)- $\beta$ -nitroestireno. Teniendo en cuenta este precedente, el principal objetivo de este proyecto es continuar con esta línea de investigación mediante la modificación de proteínas para convertirlas en catalizadores de cicloadiciones (3+2), en su versión enantioselectiva. Con este fin, se han preparado distintos ligandos bimetálicos con biotina cuya unión a proteínas debe dar lugar a actividad Huisgenasa.

## SUMMARY

Recently, the research group of Prof. Fernando P. Cossío, in collaboration with the research groups of Profs. Cortajarena and Jiménez-Barbero, have shown that consensual tetratricopeptide repeat proteins (CTPR) exhibit Huisgenase activity in THF solution, obtaining up to four racemic cycloadducts in the reaction between methylbenzylidene glycinate and (*E*)- $\beta$ -nitrostyrene. Taking this precedent into account, the main objective of this project is to continue this line of research by modifying proteins to convert them into (3 + 2) cycloaddition catalysts, in their enantioselective version. Within this context, different bimetallic ligands with one biotin unit have been synthesized as suitable ligands to be bonded to proteins which should exhibit Huisgenase activity.



## 1. Introducción

Las proteínas son moléculas de gran tamaño, polímeros de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos (Figura 1).

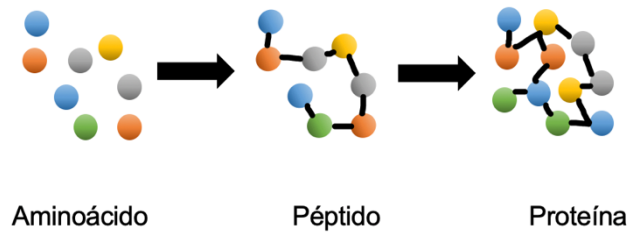


Figura 1: Estructura básica de las proteínas<sup>a</sup>

La variación en el número de aminoácidos y su orden (20 aminoácidos naturales disponibles) determinan cómo se pliega la cadena hasta alcanzar un estado termodinámicamente estable con una estructura tridimensional particular. Esta estructura define los sitios activos de la macromolécula y permite que las proteínas realicen sus diversas funciones con una alta eficiencia. Entre ellas, cabe destacar la función de las proteínas como catalizadores, en cuyo caso, se denominan enzimas.<sup>1</sup> La comprensión de los mecanismos de acción enzimática ha inspirado a los científicos a desarrollar y explorar complejos sintéticos o proteínas modificadas, lo que permite el uso de la naturaleza macromolecular única de las biomoléculas para catalizar reacciones que no disponen de enzimas para tal fin. Para comprender cómo funcionan es necesario conocer los aspectos generales de su estructura.

### 1.1 Enzimas

Las enzimas son proteínas con estructuras únicas que se pliegan para crear sitios tridimensionales proporcionando un reconocimiento específico de los sustratos.<sup>2</sup> Son catalizadores biológicos que, en condiciones suaves de temperatura, pH y presión, llevan a cabo reacciones químicas a gran velocidad.<sup>3</sup>

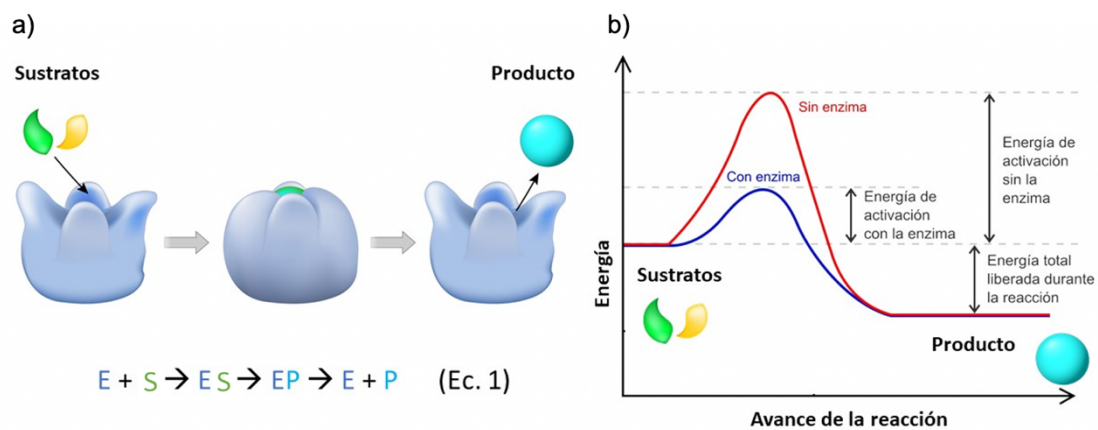
<sup>1</sup>Bhatia, S. Introduction to enzymes and their applications. *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology*, Volume 2. IOP Science, **2018**, 1-29.

<sup>2</sup> Bhagavan, N. V.; Ha, C.E. Enzymes and Enzyme Regulation, *Essentials of Medical Biochemistry*. Elsevier, **2015**, 63-84.

<sup>3</sup> Blanco, A.; Blanco, G. Enzymes. *Medical Biochemistry*. Elsevier, **2017**, 153-175.

<sup>a</sup> Derechos de reproducción de la Figura 1 adaptada de Depositphotos®. ID 22297100.

Desempeñan esta función mediante la formación de complejos entre la enzima y los reactivos. En el primer paso de la ecuación 1 (Figura 2a), la enzima (E) se combina con el reactivo (S), llamado sustrato, para formar un complejo enzima-sustrato, (ES). Luego, ES se transforma en el complejo enzima-producto (EP) que se descompone para dar el producto (P), liberando la enzima que queda disponible para el siguiente ciclo catalítico.<sup>4</sup> Al igual que los catalizadores químicos, las enzimas aumentan la velocidad de reacción al disminuir su energía de activación (EA), lo que hace que los productos se formen más rápidamente y las reacciones alcancen antes su estado de equilibrio (ver Figura 2b).



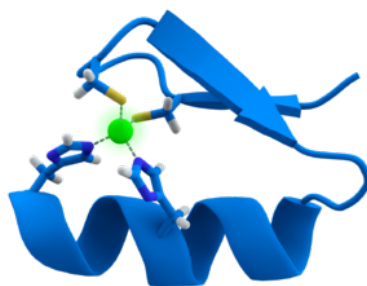
**Figura 2:** (a) Representación del funcionamiento de una enzima (b) Diagrama de reacción enzimática: catalizada (en azul) y sin catalizar (en rojo).<sup>b</sup>

Para su actividad catalítica, ciertas enzimas dependen únicamente de la disponibilidad de una estructura proteica, mientras que otras requieren, además, de estructuras no proteicas. Estas estructuras se denominan cofactores y pueden clasificarse en dos grupos: (a) metales o compuestos metaloorgánicos; y (b) moléculas orgánicas o coenzimas. Cuando las enzimas contienen iones metálicos en su sitio activo, entonces se les denomina metaloenzimas (Figura 3).<sup>5</sup>

<sup>4</sup> Ainsworth, S. Enzymes as Biological Catalysts. *Steady-State Enzyme Kinetics*. Macmillan Publishers, 1977, 1–28.

<sup>5</sup> Robinson P.K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem*, 2015, 59, 1-41.

<sup>b</sup> Derechos de reproducción de la Figura 2 adaptada de Depositphotos®. ID 22297100.



**Figura 3:** Representación de una metaloenzima, en la que podemos observar el átomo metálico coordinado a dos Hys y Cys.<sup>c</sup>

Las metaloenzimas artificiales (ArM) resultan del anclaje de un resto que contiene un metal dentro de una estructura macromolecular (proteína u oligonucleótido). El catalizador resultante combina características atractivas tanto de catalizadores homogéneos como de enzimas. Sin embargo, la mayoría de esos catalizadores no pueden encajar directamente en los sitios activos de las enzimas nativas por lo que para ampliar el alcance del diseño, se han desarrollado varios tipos de anclajes, aprovechando así las ventajas que confieren los armazones de proteínas.<sup>6</sup>

Una herramienta poderosa para diseñar esos anclajes se basa en la alta afinidad que presentan algunas proteínas por ligandos específicos. La alta afinidad en el reconocimiento y la transformación molecular es un componente clave de las biomoléculas más comunes (por ejemplo, entre proteína y ligando, o antígeno y anticuerpo).<sup>7</sup> Ejemplo de ello es la proteína de unión a maltodextrina (Maltosin Binding Protein, MBP). Dicha proteína pertenece a la familia de proteínas de unión periplásmicas cuya función se basa en el transporte de maltodextrinas. Se ha demostrado que la proteína de unión a maltosa (MBP) es un buen sustrato para la ingeniería de proteínas, ya que conduce a una mayor afinidad. Otro ejemplo serían las cucurbitáceas, una familia de moléculas huésped macrocíclicas sintéticas compuestas por n

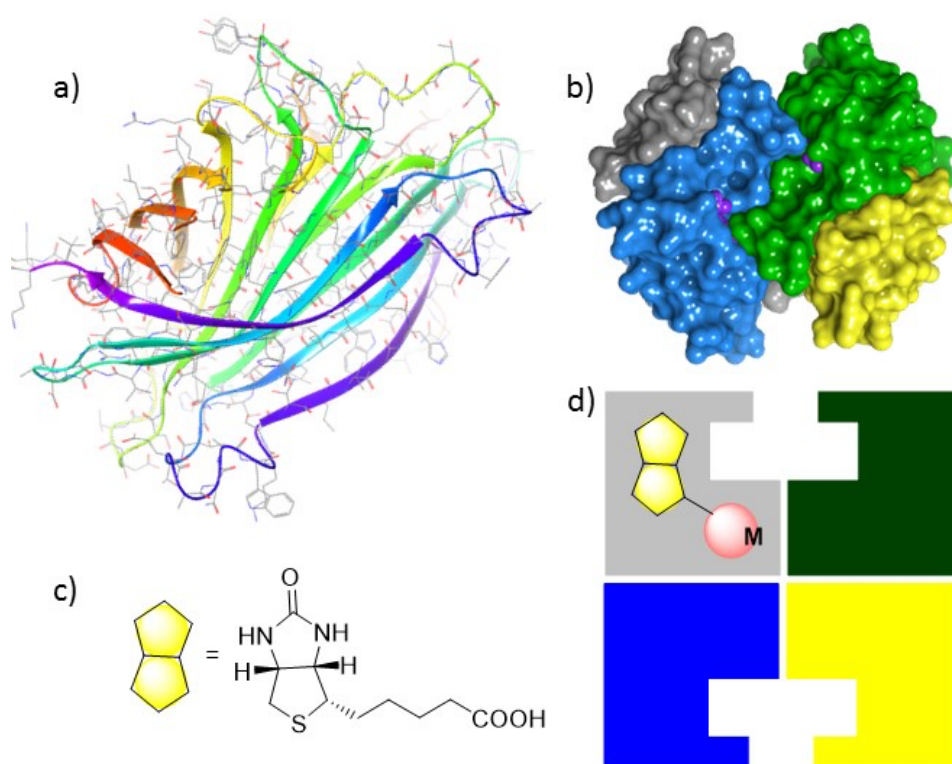
---

<sup>6</sup> Large B.; Baranska N. G.; Booth R. L.; Wilson K. S.; Duhme-Klair A. K.; Artificial metalloenzymes: The powerful alliance between protein scaffolds and organometallic catalysts. *Curr Opin Green Sustain Chem.* **2021**, *28*, 100420.

<sup>7</sup> Walker, I. H.; Hsieh, P.; Riggs, P. D. Mutations in maltose-binding protein that alter affinity and solubility properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2010**, *88*, 187–197.

<sup>c</sup> Derechos de reproducción de la Figura 3 adaptada de Depositphotos®. ID 22297100.

unidades de glicolurilo. Isaacs et al, informaron que esta familia anfitrión forma complejos excepcionalmente estables.<sup>8</sup> No obstante, uno de los más conocidos y empleados, es el sistema biotina-(estrept)avidina del que fueron pioneros Whitesides y Ward.<sup>9</sup> La estreptavidina (Sav), es una proteína compuesta por 4 subunidades idénticas (Figuras 4 a y b) cada una de las cuales, muestra una gran afinidad por la biotina. Esta situación permite la síntesis química de metaloenzimas artificiales mediante la incorporación de un complejo metal-heterociclo unido a través de un espaciador anclado a la proteína a través de un residuo de biotina (Figuras 4 c y d).<sup>6</sup>

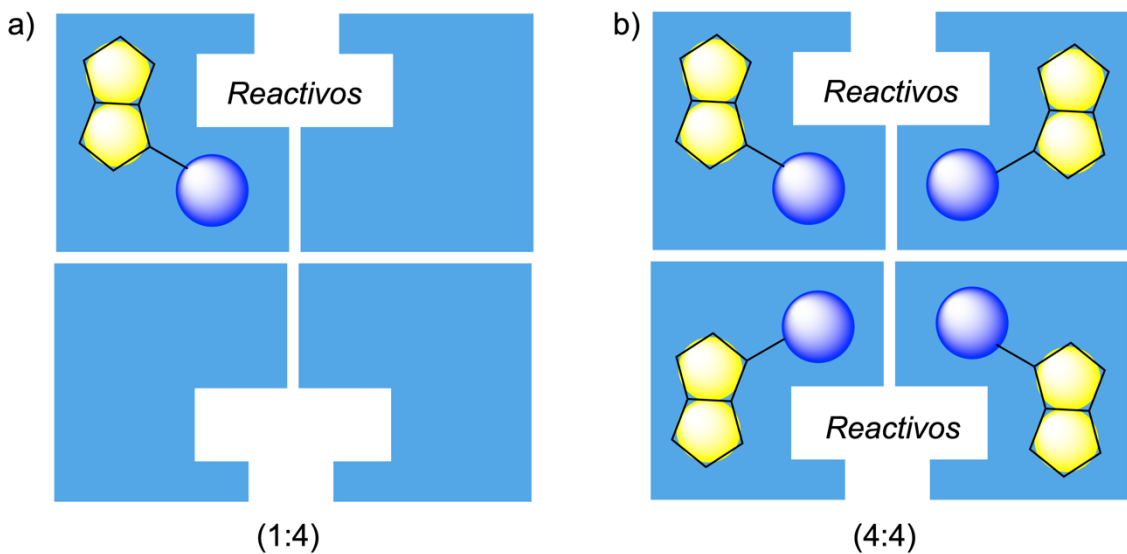


**Figura 4:** (a) PDB 3RY2 wild-type estreptavidina. (b) Representación en forma de superficie potencial de la estreptavidina. (c) Estructura química de la biotina. Sistema de anclaje a la estreptavidina. (d) Esquema de la interacción entre el catalizador (biotina-espaciador-centro-metálico) y la estreptavidina.

<sup>8</sup> Shetty, D.; Khedkar, J. K.; Park, K. M.; Kim, K. Can we beat the biotin-avidin pair?: Cucurbit[7]uril-based ultrahigh affinity host-guest complexes and their applications. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 8747–8761.

<sup>9</sup> Heinisch, T.; Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes Based on the Biotin–Streptavidin Technology: Challenges and Opportunities. *Acc. Chem. Res.*, **2016**, *49*, 1711–1721.

La unión covalente tras la adición estequiométrica de (estrept)avidina asegura que el resto metálico se incorpore cuantitativamente dentro de la proteína huésped.<sup>6</sup> En su versión más sencilla, un monómero de estreptavidina estable y funcional debería ser un reactivo útil para diseñar nuevos sistemas de detección basados en la interacción de biotina monovalente (Figura 5a). Por otra parte, la saturación de los cuatro residuos de la estreptavidina debería permitir la incorporación de hasta cuatro centros activos por proteína (Figura 5b).



**Figura 5:** Posibles tipos de sistemas de unión para la catalizador-estreptavidina. a) Relación 1:4. b) Relación 4:4.

### 1.1.1 Nomenclatura y clasificación

Para tratar de poner orden y dar lugar a un criterio uniforme de clasificación, la Enzyme Comisión, (E.C.), redactó una serie de reglas a partir de las cuales la denominación de las distintas enzimas fuera inequívoca. Esta comisión divide las enzimas en 6 grupos (Tabla 1).<sup>10</sup>

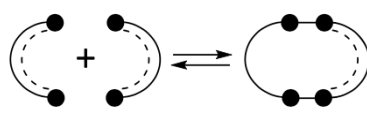
1. **Oxidorreductasas.** Catalizan reacciones de oxidación-reducción en las cuales cambia el estado de oxidación de uno o más átomos en una

<sup>10</sup> Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Enzimas. Principios de bioquímica*. Omega, 2009, 184-188

molécula. Tienen lugar a través de la transferencia de electrones de un dador (reductor) a un aceptor (oxidante).

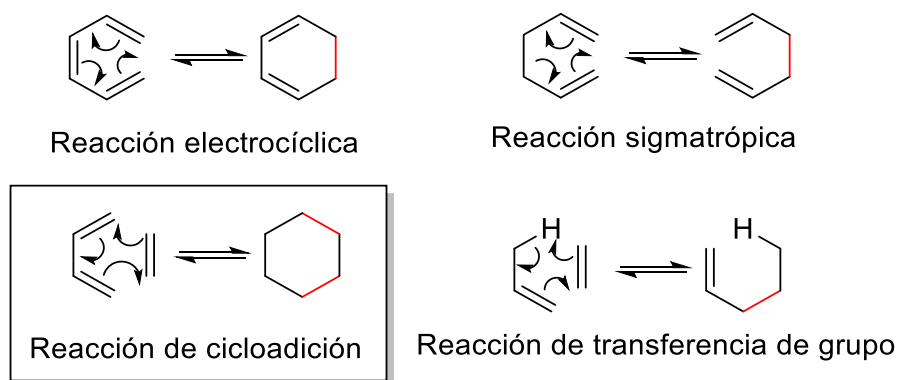
2. **Transferasas.** Son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo funcional de una molécula donadora a una aceptora por ejemplo, grupos como el metilo, el carboxilo o el carbonilo entre otros.
3. **Hidrolasas.** Las hidrolasas catalizan reacciones de hidrólisis. Es decir, este grupo de enzimas permite la rotura de enlaces como C-O, C-N y O-P mediante la adición de agua.
4. **Liasas.** Catalizan reacciones en las que se eliminan grupos (p. ej., H<sub>2</sub>O, CO y NH) para formar un doble enlace. Este grupo también incluye la reacción inversa de adición a un doble enlace.
5. **Isomerasas.** Se trata de un grupo heterogéneo de enzimas. Las isomerasas catalizan varios tipos de reordenamientos intramoleculares.
6. **Ligasas.** Las ligasas catalizan la formación de enlaces entre dos moléculas de sustrato.

**Tabla 1:** Clasificación de las enzimas.

Entrada	Tipo de enzima	Reacción	
1	Oxidorreductasas	Oxidación-reducción	$A_{red} + B_{ox} \rightarrow A_{ox} + B_{red}$
2	Transferasas	Transferencia de grupos	$AB + C \rightarrow A + BC$
3	Hidrolasas	Ruptura de un enlace por medio de H <sub>2</sub> O	$AB + H_2O \rightarrow AH + BOH$
4	Liasas	Ruptura de enlaces	$A-B-C \rightarrow A=B + C$
5	Isomerasas	Isomerización	$A-B-C \rightarrow A-C-B$
6	Ligasas	Catalizan la unión de dos sustratos	$A + B \rightarrow A-B$ 

Recientemente, una colaboración entre los laboratorios de los Profs. Tang, Houk y Garg de la Universidad de California, ha descubierto y caracterizado una nueva subfamilia de enzimas llamadas periciclasas.<sup>11</sup> Las periciclasas son ligasas que catalizan reacciones pericíclicas.<sup>12</sup> Las reacciones pericíclicas, son reacciones que proceden de manera concertada a través de un estado de transición cíclico. Este tipo de reacciones constituye una de las herramientas sintéticas más poderosas para la formación de enlaces carbono-carbono y carbono-heteroátomo de manera regio- y estereoselectiva.<sup>13</sup> Se han aplicado ampliamente a la síntesis de productos naturales complejos biológicamente activos. Sin embargo, y a pesar de su importancia en la síntesis total, sólo se han caracterizado tres ejemplos enzimáticos naturales: la reacción intramolecular de Diels-Alder y los reordenamientos de Cope y Claisen.<sup>6</sup>

Entre las reacciones pericíclicas, se han descrito cuatro familias principales: reordenamientos sigmatrópicos, reacciones electrocíclicas, cicloadiciones y reacciones de transferencia de grupo (Figura 6).<sup>9</sup>



**Figura 6:** Tipos de reacciones pericíclicas

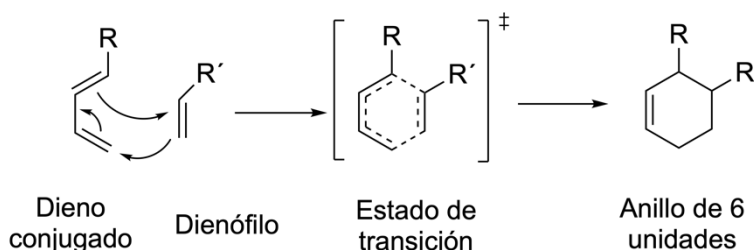
<sup>11</sup> Ohashi, M.; Jamieson, C.S.; Cai, Y. *et al.* An enzymatic Alder-ene reaction. *Nature*, **2020**, *586*, 64–69

<sup>12</sup> Ohashi, M.; Liu, F.; Hai, Y. *et al.* SAM-dependent enzyme-catalysed pericyclic reactions in natural product biosynthesis. *Nature*, **2017**, *549*, 502–506.

<sup>13</sup> Kumar, S.; Kumar, V.; Singh, S.P. *Pericyclic Reactions and Molecular Orbital Symmetry. Pericyclic Reactions: A Mechanistic and Problem-Solving Approach.* Elsevier, **2016**, 1-21.

Dentro del grupo de las periclasas, las reacciones de cicloadición son las más abundantes. Una reacción de cicloadición es la combinación de dos sistemas de electrones  $\pi$  para formar un aducto cíclico que tiene dos enlaces  $\sigma$  nuevos y dos enlaces  $\pi$  menos. Las cicloadiciones se designan mediante convenciones de electrones y átomos. La designación  $[l + m]$  describe el número de electrones que participan en la cicloadición, mientras que  $(l + m)$  indica el número de átomos.<sup>14</sup> Entre ellas, la actividad Diels-Alder es la más conocida.

La reacción de Diels-Alder, también conocida como cicloadición (4+2), se refiere a la reacción entre un dieno conjugado y un dienófilo para obtener ciclos de seis eslabones.



**Esquema 1:** Reacción Diels-Alder

En cambio, si nos referimos a las cicloadiciones (3+2), también denominadas reacciones de Huisgen o cicloadiciones 1,3-dipolares, con las que se forman ciclos de cinco eslabones, no se ha descrito ninguna enzima que tenga esta actividad catalítica. Recientemente, Cossío et al. demostraron que las proteínas de repetición tetratricopeptídica consensuada (CTPR) exhiben actividad Huisgenasa en disolución de THF.<sup>15</sup> El mismo grupo también ha demostrado que el ADN modificado con complejos bimetálicos puede catalizar la reacción.<sup>16</sup>

<sup>14</sup> Mandal, D. Pericyclic Reactions: Introduction, Classification and the Woodward-Hoffmann Rules. *Pericyclic chemistry: Orbital Mechanisms and Stereochemistry*. Elsevier, **2018**, 63-106.

<sup>15</sup> Rivilla, I.; Odriozola-Gimeno, M.; Aires, A.; Gimeno, A.; Jiménez-Barbero, J.; Torrent-Sucarrat, M.; Cortajarena, A. L.; Cossío, F. P. Discovering Biomolecules with Huisgenase Activity: Designed Repeat Proteins as Biocatalysts for (3 + 2) Cycloadditions. *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*, 762-776.

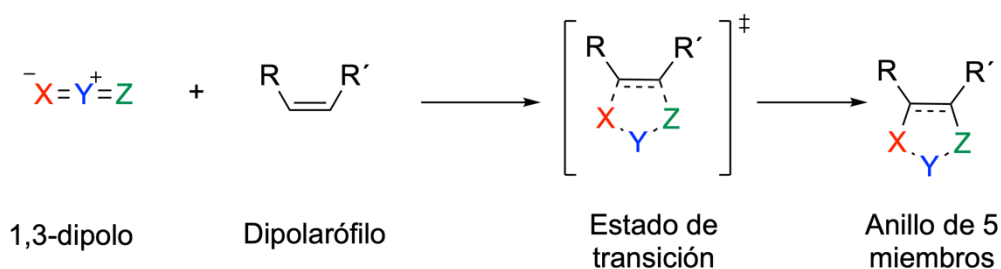
<sup>16</sup> Rivilla, I.; De Cózar, A.; Schäfer, T.; Hernandez, F. J.; Bittner, A. M.; Eleta-Lopez, A.; Aboudzadeh, A.; Santos, J. I.; Miranda, J. I.; Cossío, F. P. Catalysis of a 1,3-dipolar reaction by distorted DNA incorporating a heterobimetallic platinum(II) and copper(II) complex. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 7038-7046.



## 1.2 Cicloadición 1,3-dipolar: Aspectos generales

Hace 60 años Rolf Huisgen acuñó el concepto de cicloadiciones 1,3-dipolares. Tales reacciones se habían observado antes, sobre todo con azidas y diazo compuestos. Desde entonces, las cicloadiciones 1,3-dipolares (“reacciones de Huisgen”) han demostrado estar entre los métodos más poderosos para la síntesis de heterociclos de cinco eslabones.<sup>17</sup>

La adición 1,3-dipolar consiste en la unión de un 1,3-dipolo con fórmula general “X-Y-Z” a un sistema de enlaces múltiples llamado dipolarófilo, para formar un anillo de cinco eslabones (Esquema 2). El 1,3-dipolo aporta cuatro electrones y el dipolarófilo dos, dando lugar a una interacción doble suprafacial de tipo  $[\pi 4s + \pi 2s]$ , lo que resulta en un proceso de seis electrones a través de un estado de transición aromático.<sup>18</sup>

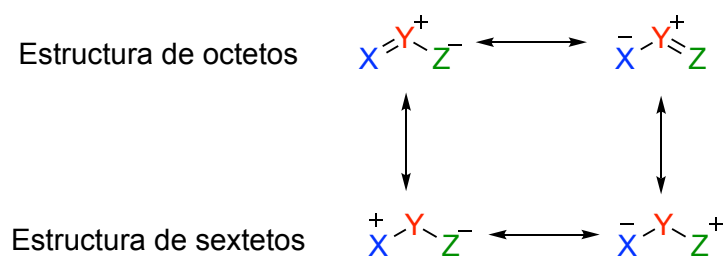


Esquema 2: Forma general de la reacción 1,3-dipolar

El 1,3-dipolo es un sistema de electrones de tres átomos, con cuatro electrones  $\pi$  –deslocalizados sobre los tres átomos. Puede estar representado por dos estructuras de octetos, en las que la carga positiva se encuentra en el átomo central y la carga negativa se distribuye sobre los dos átomos terminales. Y dos estructuras de sexteto, en las que dos de los cuatro electrones  $\pi$  están localizados en el átomo central (Esquema 3).<sup>12</sup>

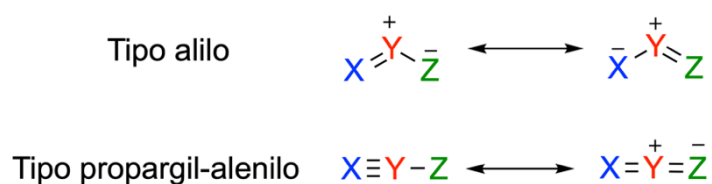
<sup>17</sup> Trauner D., ‘Rolf Huisgen (1920–2020)’, *Nature*, **2020**, *7*, 711–711

<sup>18</sup> a) De Cózar, A.; Cossío, F. P. Stereocontrolled (3+2) cycloadditions between azomethine ylides and dipolarophiles: A fruitful interplay between theory and experiment. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 10858–10868. b) Schleyer, P. V. R.; Wu, J. I.; Cossío, F. P.; Fernández, I. Aromaticity in transition structures. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 4909–4921.



Esquema 3: Formas resonantes del 1,3-dipolo

Los 1,3-dipolos se pueden clasificar en dos tipos; el tipo alilo y el tipo propargilo-alenilo. El primero se caracteriza por cuatro electrones en tres orbitales  $p_z$  paralelos perpendiculares al plano del dipolo. Los 1,3-dipolos del tipo alilo están doblados, mientras que la presencia de un doble enlace ortogonal al sistema  $\pi$  –deslocalizado en el tipo propargil-alenilo confiere linealidad al dipolo (Esquema 4).<sup>12</sup>



Esquema 4: tipos de 1,3-dipolos

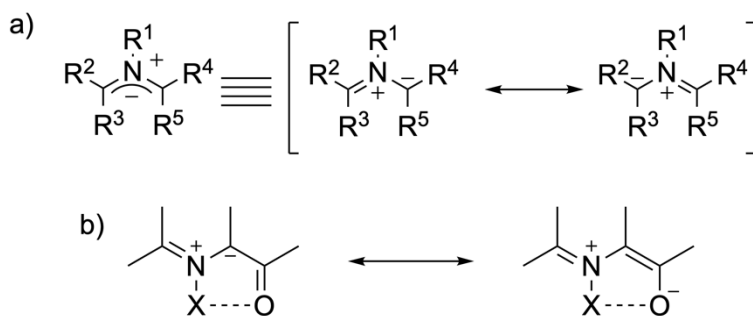
Para los dipolos de tipo alilo, el átomo central Y puede ser un elemento del grupo V (por ejemplo, N o P) o un elemento del grupo VI (por ejemplo, O o S). Para los tipos propargilo /alenilo en cambio, el papel de Y está restringido a los elementos del grupo V, ya que solo un átomo de este grupo puede tener una carga positiva en el estado tetravalente. Al restringir X y Z a los elementos de la segunda fila (C, N, O), se pueden formar seis dipolos del tipo propargilo- alenilo y doce del tipo alilo.<sup>12</sup>

El componente  $2\pi$  de la cicloadición 1,3-dipolar se conoce comúnmente como dipolarófilo, que puede ser casi cualquier molécula que contenga un enlace doble o triple, que contenga una funcionalidad como  $\text{C}\equiv\text{C}$ ,  $\text{C}=\text{C}$ ,  $\text{C}\equiv\text{N}$ ,  $\text{C}=\text{N}$ ,  $\text{C}=\text{O}$ , y  $\text{C}=\text{S}$ . El enlace  $\pi$  puede estar aislado, conjugado o ser parte de un

sistema cumuleno. La variedad estructural de dipolarófilos hace que las cicloadiciones 1,3-dipolares sean reacciones muy valiosas y versátiles en la síntesis heterocíclica.<sup>12</sup>

### 1.3 Reacción dipolar entre iluros de azometino y alquenos

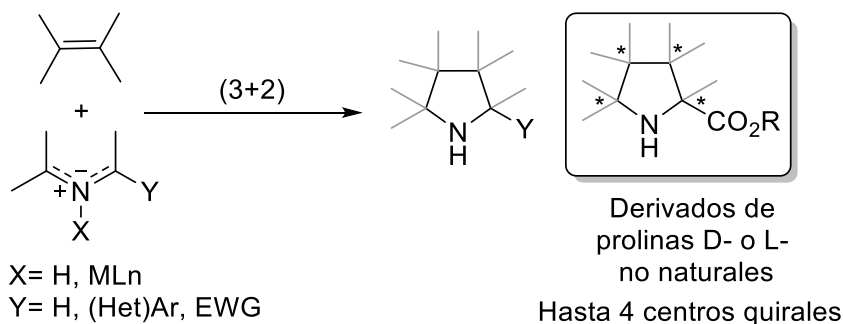
Uno de los dipolos más utilizados en este tipo de reacciones son los iluros de azometino, que contienen cuatro electrones distribuidos sobre los orbitales  $\pi$  de un sistema C-N-C (Esquema 5a). Los iluros de azometino pueden estar estabilizados por interacciones favorables entre el sustituyente del nitrógeno central ( $R^1 = H, ML_n$ ) y un grupo  $R^2$  o  $R^4$  capaz de interactuar con  $R^1$  (Esquema 5b).



**Esquema 5:** (a) Estructura general de los iluros de azometino. (b) Estructura general de un iluro estabilizado

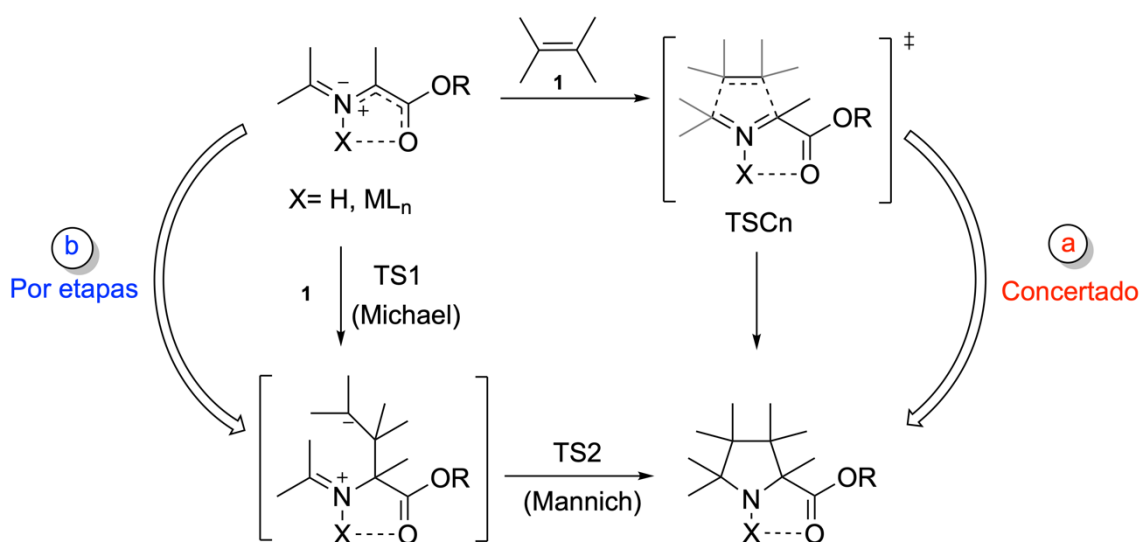
La reacción de cicloadición 1,3-dipolar más frecuente de iluros de azometino es con alquenil o alquinil dipolarófilos sustituidos con grupos sustractores de electrones (Electron withdrawing groups, EWG), proporcionando acceso a moléculas biológicas que contienen pirrolidina.<sup>13</sup> Los anillos de pirrolidina son estructuras muy abundantes en la naturaleza, entre las que destaca la familia de las prolina. Estas poseen gran interés desde el punto de vista de sus aplicaciones, tanto en organocatálisis y síntesis orgánica como formando parte de la estructura de productos farmacéuticos y alcaloides naturales. La cicloadición (3 + 2) entre iluros de azometino y alquenos es un método eficaz, convergente y estereocontrolado para la síntesis de armazones de pirrolidina y prolina no naturales. Cuando el iluro de azometino se estabiliza mediante un

grupo alcoxycarbonilo, el correspondiente cicloaducto (3 + 2) es un armazón de prolina que puede incorporar muchos grupos diferentes, permitiendo así la síntesis de derivados de prolina no naturales funcionalizados y densamente sustituidos (Esquema 6).<sup>19</sup>



**Esquema 6:** Síntesis de pirrolidinas y, en particular, prolina densamente sustituidas mediante cicloadición formal (3 + 2) entre iluros de azometino y alquenos.

La reacción del dipolo con el alqueno se produce a través de un proceso concertado en condiciones térmicas y, probablemente, de manera escalonada (una reacción de adición tipo Michael seguida de ciclación intramolecular) cuando un 1,3-dipolo N-metilado está involucrado (Figura 7).



**Figura 7:** Mecanismo de la reacción

<sup>19</sup> Arrastia, I.; Arrieta, A.; Cossío, F. P. Application of 1,3-Dipolar Reactions between Azomethine Ylides and Alkenes to the Synthesis of Catalysts and Biologically Active Compounds. *Eur. J. Org. Chem.*, **2018**, *43*, 5889–5904.

En la última década, el grupo del Prof. Cossío ha investigado los  $\alpha$ -aminoácidos monocíclicos no naturales como posibles organocatalizadores, que se obtienen mediante cicloadición (3 + 2) entre alquenos  $\pi$  deficientes e iluros de azometino. En 2012, Conde et al, describieron la síntesis de nuevos compuestos híbridos, ferrocenilfosfino pirrolidinas quirales, los cuales en presencia de Cu (I), eran capaces de catalizar reacciones de cicloadición (3 + 2) entre iluros de azometino y nitroalquenos, de una manera diastereo- y enantioselectiva.<sup>20</sup> Dentro de la búsqueda de nuevos sistemas catalíticos capaces de llevar a cabo reacciones de cicloadición (3 + 2), en 2019, el grupo del Prof. Cossío, en colaboración con los grupos de investigación de los Profs. Cortajarena y Jiménez-Barbero, demostraron que proteínas de repetición tetratricopeptídica consensuada, denominadas como CTPR, eran capaces de catalizar reacciones de cicloadición entre N-bencilidenglicinato de metilo y (*E*)- $\beta$ -nitroestireno, en THF, obteniéndose hasta cuatro cicloaductos racémicos.<sup>15</sup> En este momento se introdujo el termino Huisgenasa, en honor al químico alemán Rolf Huisgen para denominar a este tipo de proteínas, capaces de catalizar reacciones de cicloadición en medios no convencionales para ellas.

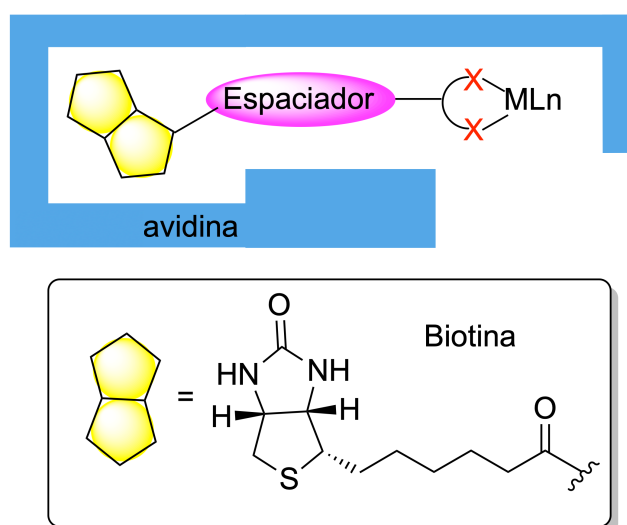
---

<sup>20</sup> Conde, E.; Bello, D.; de Cózar, A.; Sánchez, M.; Vázquez, M. A.; Cossío, F. P. Densely substituted unnatural l- and d-prolines as catalysts for highly enantioselective stereodivergent (3 + 2) cycloadditions and aldol reactions. *Chem. Sci.*, **2012**, *3*, 1486–1491.

## 2. Objetivos

El principal objetivo de este Trabajo de Fin de Grado (TFG) consiste en adquirir conocimientos básicos en síntesis orgánica que permitan desenvolverse en un laboratorio de investigación, impregnándose de los conocimientos necesarios para llevar a cabo una labor investigadora; aprendiendo a solventar los retos que plantea la investigación de manera individual y colectiva. Ello conlleva un primer contacto con las técnicas habituales para dicha investigación, como pueden ser el manejo de diferentes compuestos químicos, el empleo de técnicas de purificación y saber hacer buen uso del material de trabajo, desde el material de vidrio hasta equipos más complejos de técnicas de caracterización estructural, como pueden ser la resonancia magnética nuclear (RMN), la espectroscopía infrarroja (IR) y la espectroscopía de masas (EM) entre otros.

Por otro lado, el objetivo científico trata de continuar con la línea de investigación abierta en el Grupo de Química Bioorgánica y Modelización Molecular (QBBM) de la UPV/EHU, cuyo objetivo es la modificación de proteínas para convertirlas en catalizadores de cicloadiciones (3+2). Para ello, se prepararán distintos ligandos bimetálicos con biotina como precursores de proteínas con actividad Huisgenasa. Además, se estudiará cómo afecta la variación del resto biotina-espaciador-ligando en su unión con la avidina (Figura 8).



**Figura 8:** Representación gráfica del sistema catalítico avidina-BIOT-Ln. L y M denotan un ligando y un centro metálico, respectivamente.

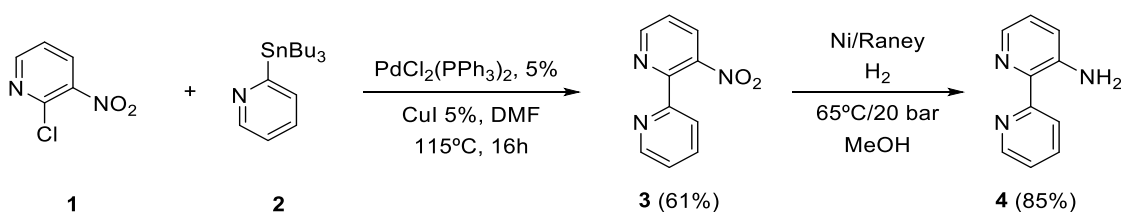
### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Síntesis de ligandos bimetálicos conjugados con biotina

En un primer enfoque, se seleccionó la [2,2'-bipiridin]-3-amina **4** como intercalador aromático para hacer de unión entre los distintos ligandos y el centro metálico. Para la síntesis de dichos ligandos fue necesario obtener previamente el precursor **4** (Esquema 7).

##### 3.1.1 Síntesis de [2,2'-bipiridin]-3-amina (**4**)

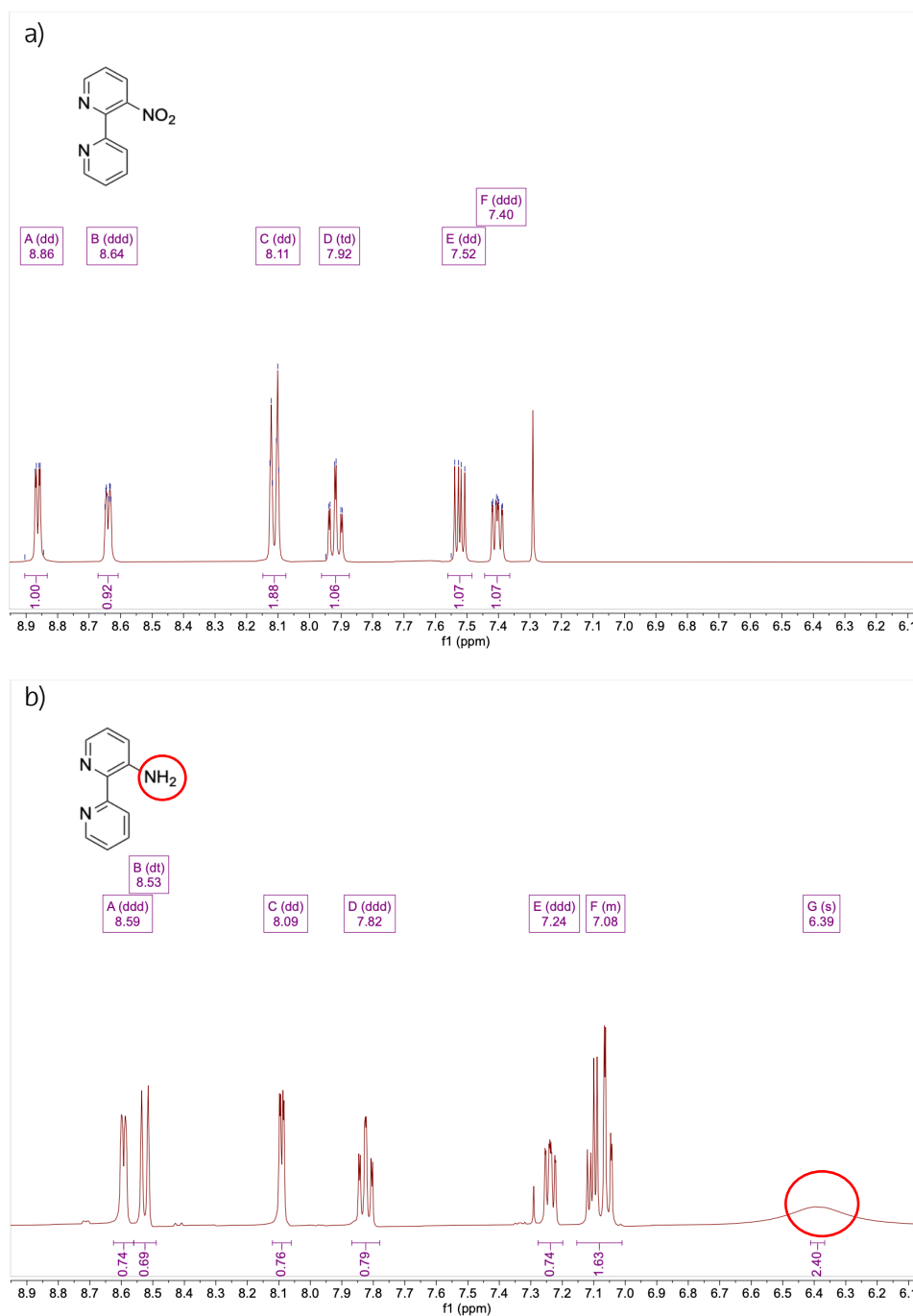
Para la preparación del compuesto **4**, primero se sintetizó la 3-nitro-2,2'-bipiridina a través de un acoplamiento de Stille entre la cloronitropiridina **1** y la 2-(tributilestanil)piridina **2**.<sup>21</sup> Para ello, se utilizó PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como catalizador, CuI como co-catalizador y N,N-dimetilformamida (DMF) como disolvente. La reacción se llevó a cabo en atmósfera inerte y se dejó en agitación durante 18 h a 115°C. Después, se adicionaron a la mezcla de reacción 5 mL de una disolución saturada de KF y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo la disolución se filtró por celita y se añadió Et<sub>2</sub>O para arrastrar los restos de productos que se hubiesen quedado en la misma. El filtrado se concentró a vacío y se purificó mediante cromatografía en columna obteniéndose un sólido de color marrón y un rendimiento del 61%. Posteriormente, el grupo NO<sub>2</sub> de la 3-nitro-2,2'-bipiridina **3** fue reducido a NH<sub>2</sub>, con alto rendimiento (85%) mediante el uso de un sistema de hidrogenación H-Cube® Pro de ThalesNano, el cual genera H<sub>2</sub> a partir de la hidrólisis del agua. Como catalizador se utilizó un cartucho de Ni/Raney a 65°C, 20 bares y utilizando metanol como disolvente.



Esquema 7: Síntesis de [2,2'-bipiridin]-3-amina (**4**)

<sup>21</sup> Nyffenegger, C.; Pasquinet, E.; Suzenet, F.; Poullain, D.; Jarry, C.; Léger, J.M.; Guillaumet, G. An efficient route to polynitrogen-fused tricycles via a nitrene-mediated N–N bond formation under microwave irradiation. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 9567–9573.

La reacción se monitorizó mediante  $^1\text{H}$ -RMN, observándose la desaparición del producto de partida (**3**), pudiendo observar un cambio en el número de protones pasando de seis señales correspondientes a los siete protones de la molécula (Figura 9a), a la aparición de una señal más, debida a la hidrogenación del grupo nitro (Figura 9b), consistente en un singlete ancho a 6.39 ppm.



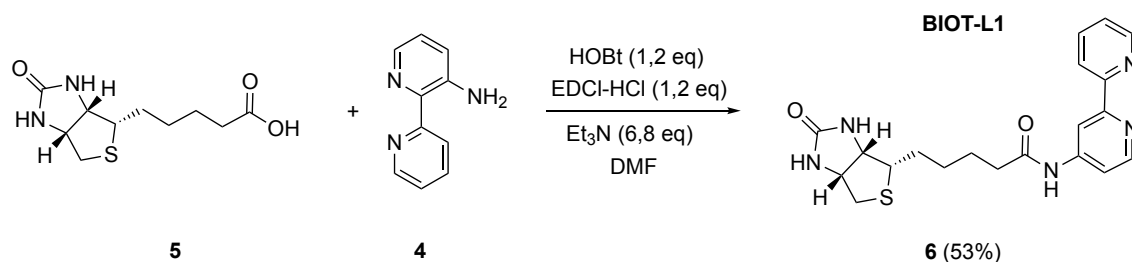
**Figura 9:** (a) Espectro de la 3-nitro-2,2'-bipiridina (**3**); (b) Espectro de la [2,2'-bipiridin]-3-amina (**4**)



### 3.1.2 Síntesis de *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida (**6**)

Una vez obtenido el compuesto **4**, se procedió a conseguir el primer miembro de esta nueva serie de ligandos conjugados con biotina **6**, también denominado a partir de ahora como BIOT-L1.

Siguiendo el esquema de reacción 8, se preparó una suspensión de biotina, HOBt y EDCI-HCl en DMF, que se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió **4** y finalmente se agregó trietilamina al medio. La disolución resultante se dejó con agitación 16 h, transcurridas las cuales se eliminó el disolvente, dando lugar a un aceite marrón. La purificación mediante cromatografía en columna dio lugar a un sólido amarillo con un rendimiento del 53%.



**Esquema 8:** Síntesis de *N*-([2,2'-bipiridin]-3-yl)-4-((5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida (**6**)

En el espectro <sup>1</sup>H-RMN obtenido, se observa un singlete a 13.2 ppm, que integra para un protón. Esta resonancia es muy característica para compuestos en los que existe un enlace amida (-NHCO-) y se asigna al protón del grupo NH (Figura 10). Otro desplazamiento muy característico, en IR, es el que se observa alrededor de 1680 cm<sup>-1</sup>, propio de las amidias secundarias debido a la vibración del carbonilo. En nuestro caso, la vibración del grupo C=O de nuestra amida secundaria se observó 1687 cm<sup>-1</sup>. La banda C=O del grupo urea de la biotina se observó a 1707 cm<sup>-1</sup> (Figura 11).

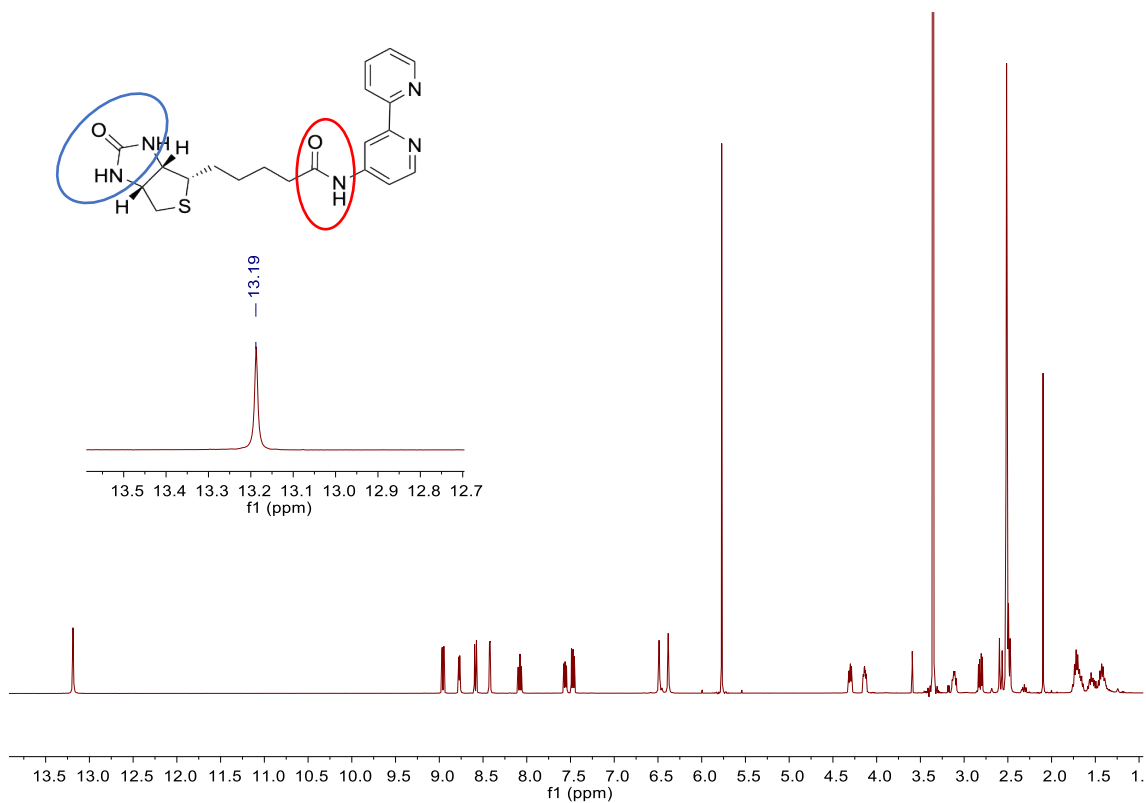


Figura 10: espectro  $^1\text{H-NMR}$  de *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3*a,S*,4*S*,6*a,R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida (**6**)

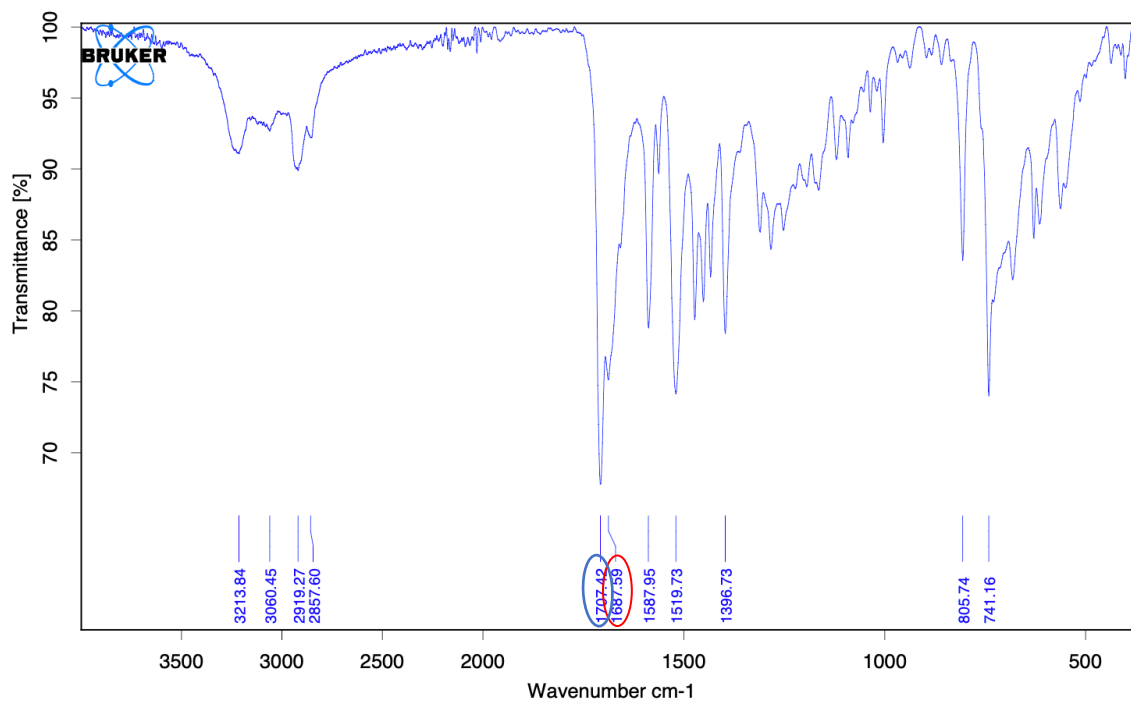
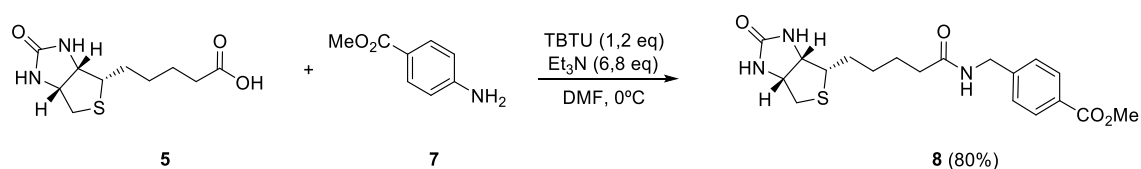


Figura 11: espectro IR de *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3*a,S*,4*S*,6*a,R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida (**6**)

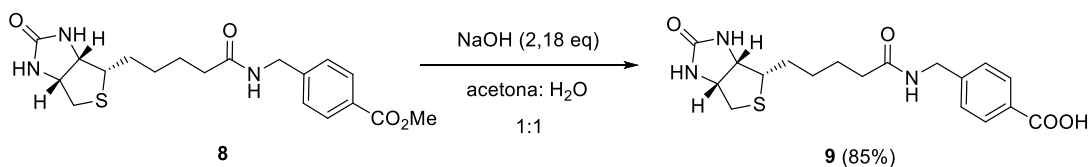
### 3.1.3 *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida (**10**)

Para la síntesis del segundo de los ligandos, primeramente se realizó el acoplamiento peptídico entre la biotina **5** y 4-aminobenzoato de metilo **7** (Esquema 9). Ambos reactivos se disolvieron en DMF y se añadieron Et<sub>3</sub>N y el agente de acoplamiento TBTU. La reacción se agitó durante 16 h a 0°C. El disolvente de la mezcla de reacción se evaporó a presión reducida dando lugar a un aceite amarillo. El producto final **8**, se obtuvo mediante la purificación por cromatografía en columna, aislando un sólido de color blanco con un rendimiento del 80%



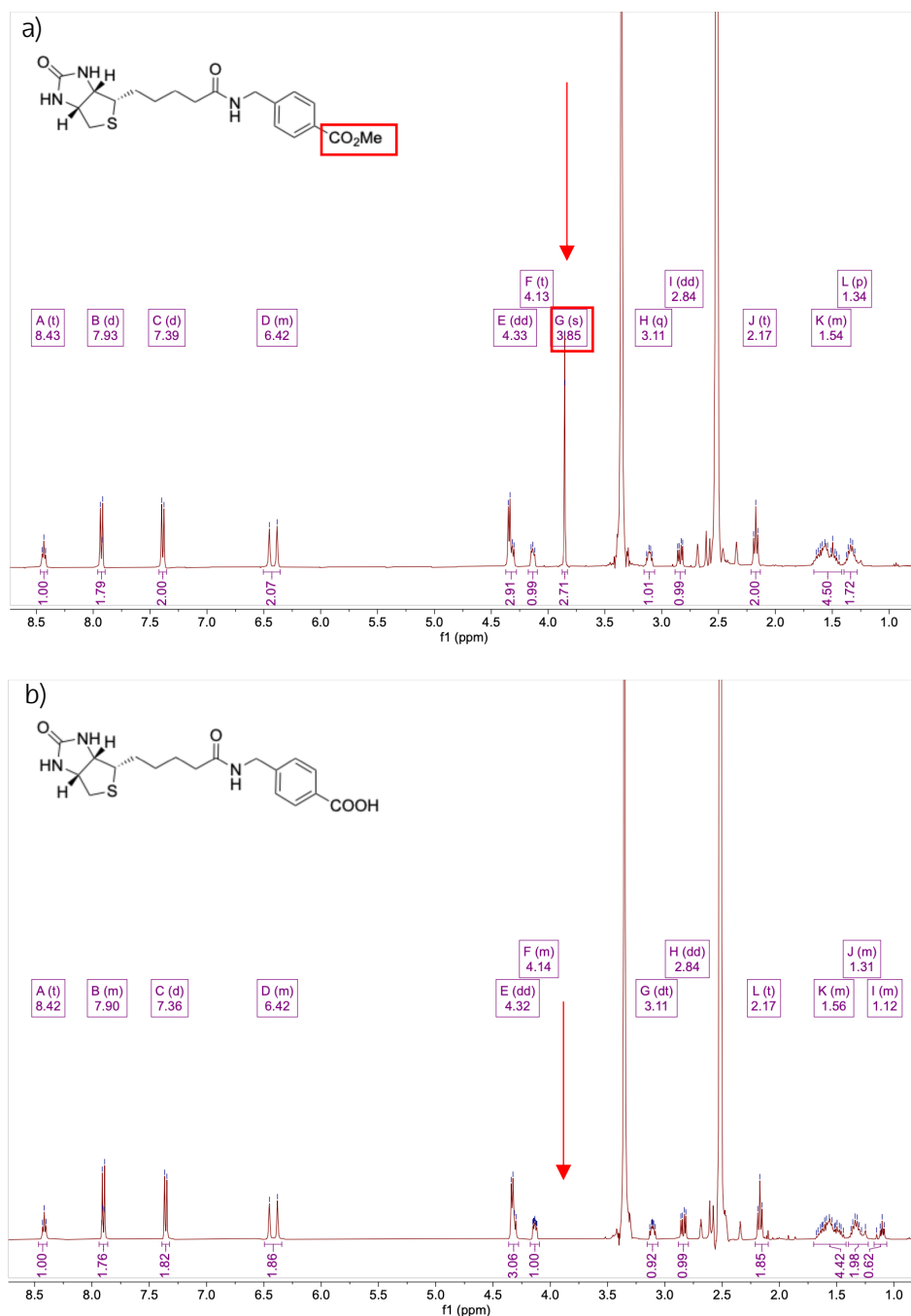
**Esquema 9:** 4-((5-((3*aS*, 4*S*, 6*aR*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno [3,4-*d*]imidazol-4-il) pentanamido)metil)benzoato de metilo (**8**)

Una vez purificado el precursor **8**, se llevó a cabo una hidrólisis sobre el grupo CO<sub>2</sub>Me (Esquema 10). Para ello, el compuesto **8** fue disuelto en acetona. Paralelamente, se preparó una disolución de NaOH en agua. Después, ambas disoluciones se mezclaron. La adición al medio de reacción de HCl (1N), provocó la aparición de un precipitado. El sólido resultante se filtró en placa y se secó. Finalmente se obtuvo el compuesto **9** mediante purificación por cromatografía en columna con un rendimiento del 85%.



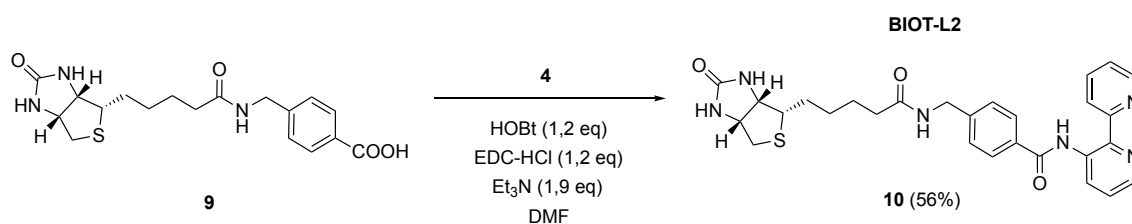
**Esquema 10:** Síntesis de Ácido-4-((5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzoico (**9**)

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se puede apreciar la desaparición de un singlete característico de los protones del grupo metilo del éster que posee un desplazamiento químico a 3.85 ppm (Figura 12).



**Figura 12:** (a) Espectro de la 4-((5-((3a*S*, 4*S*, 6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno [3,4-*d*]imidazol-4-il) pentanamido)metil)benzoato de metilo (**8**); (b) Espectro del ácido-4-((5-((3a*S*, 4*S*, 6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzoico (**9**)

Por último, se procedió al acoplamiento peptídico entre **9** y la biperidina **4** previamente sintetizada (Esquema 11). Ambos reactivos se disolvieron en DMF y se añadieron Et<sub>3</sub>N y el agente de acoplamiento EDC-HCl usando HOBt como aditivo. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, el disolvente de la mezcla de reacción se evaporó dando lugar a un aceite marrón. El producto **10** (BIOT-L2) fue obtenido tras purificación en cromatografía en columna con un rendimiento del 56%.



**Esquema 11:** *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3*a*,4*S*,6*a**R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida (**10**)

Al igual que con el compuesto **6**, el espectro de <sup>1</sup>H-RMN, muestra la señal característica de este tipo de compuesto para el protón del grupo NH del enlace amida entre **4** y **9**. En este caso, dicha señal se observó a 14.3 ppm (Figura 13). Además, el espectro IR muestra la vibración del carbonilo de C=O característica de una amida secundaria a 1702 cm<sup>-1</sup>. Aquí se observaron múltiples señales debidas a los dos grupos amida y al carbonilo de la urea de la unidad de biotina (Figura 14).

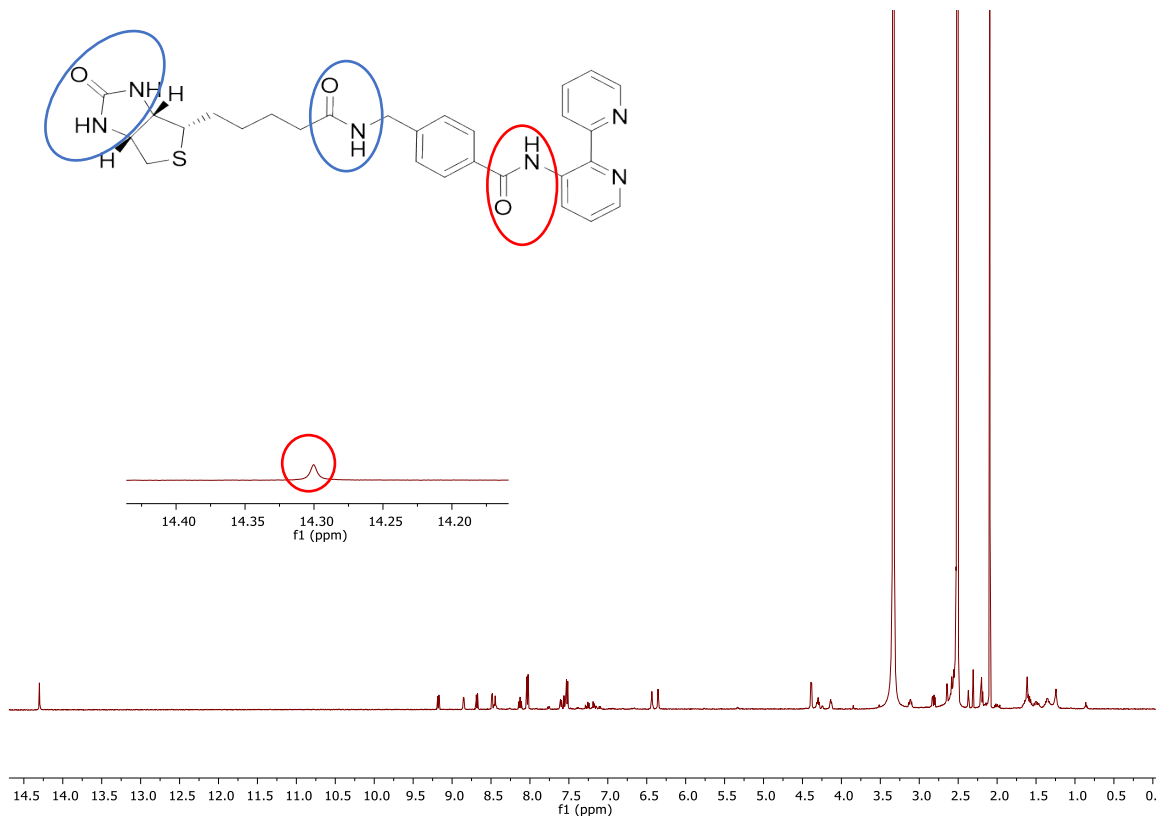


Figura 13: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3*a*,4*S*,5*S*,6*a**R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida (**10**)

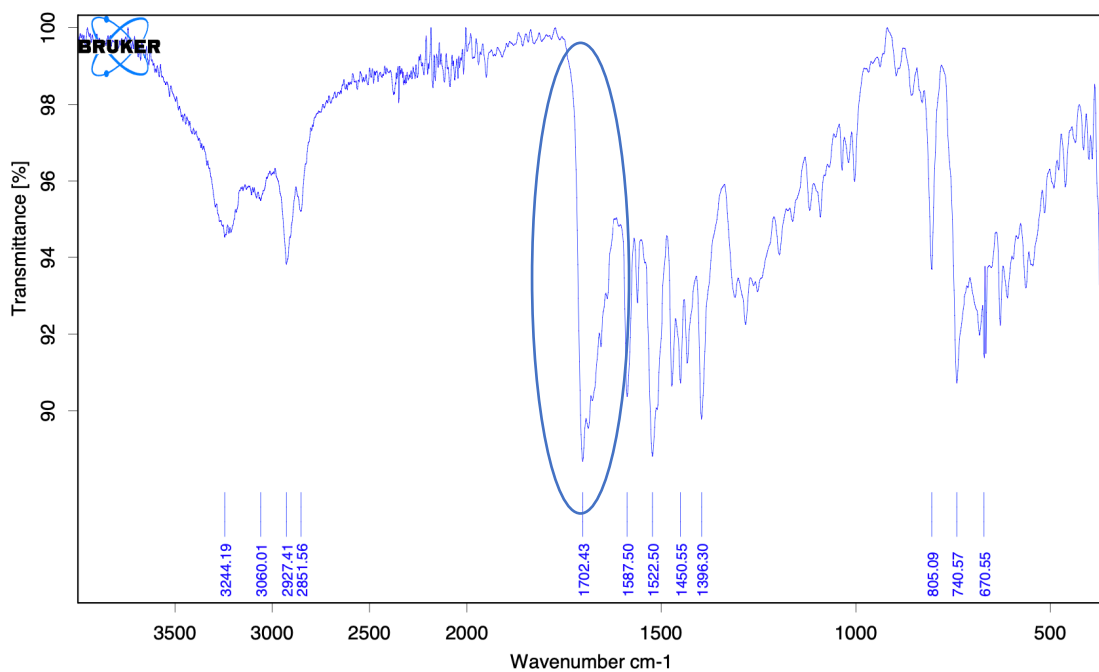
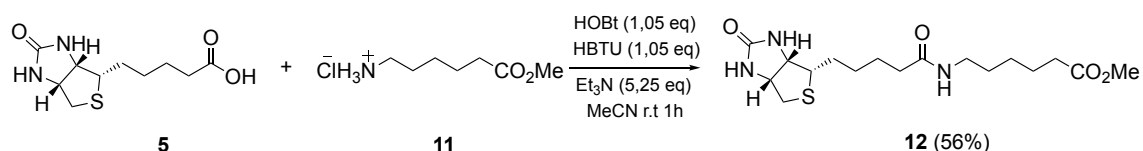


Figura 14: Espectro IR de *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3*a*,4*S*,5*S*,6*a**R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida (**10**)

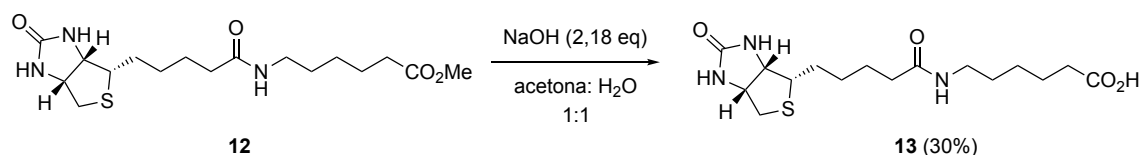
### 3.1.1 Síntesis de *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-6-(5-((3*a**S*,4*S*,6*a**R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamida (**14**)

Para la síntesis del ligando **14**, BIOT-L3, el último de nuestra serie, se procedió de manera similar a los otros dos compuestos (Esquema 12). A una disolución de **11**, biotina y trietilamina en acetonitrilo se añadió HBTU y HOBT. Después de 30 minutos de agitación a temperatura ambiente, se formó un precipitado. La disolución se evaporó dando lugar a un aceite de color amarillo. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía en columna obteniendo el producto **12** como un aceite de color amarillo con un rendimiento del 56%



**Esquema 12:** Síntesis de 6-(5-((3*a**S*,4*S*,6*a**R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno [3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido) hexanoato de metilo (**12**)

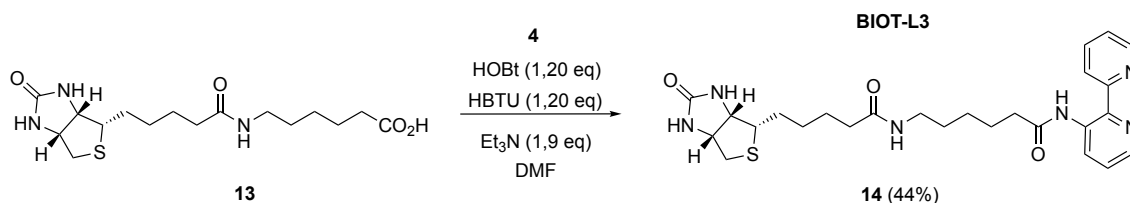
Una vez purificado el intermedio anterior, se procedió a la hidrólisis del grupo éster de la misma manera que se hizo para la obtención del compuesto **9** (Esquema 13). El producto, un sólido amarillo, se filtró y se purificó mediante cromatografía en columna con un rendimiento del 30%.



**Esquema 13:** Ácido 6-(5-((3*a**S*,4*S*,6*a**R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno [3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido) hexanoico (**13**)

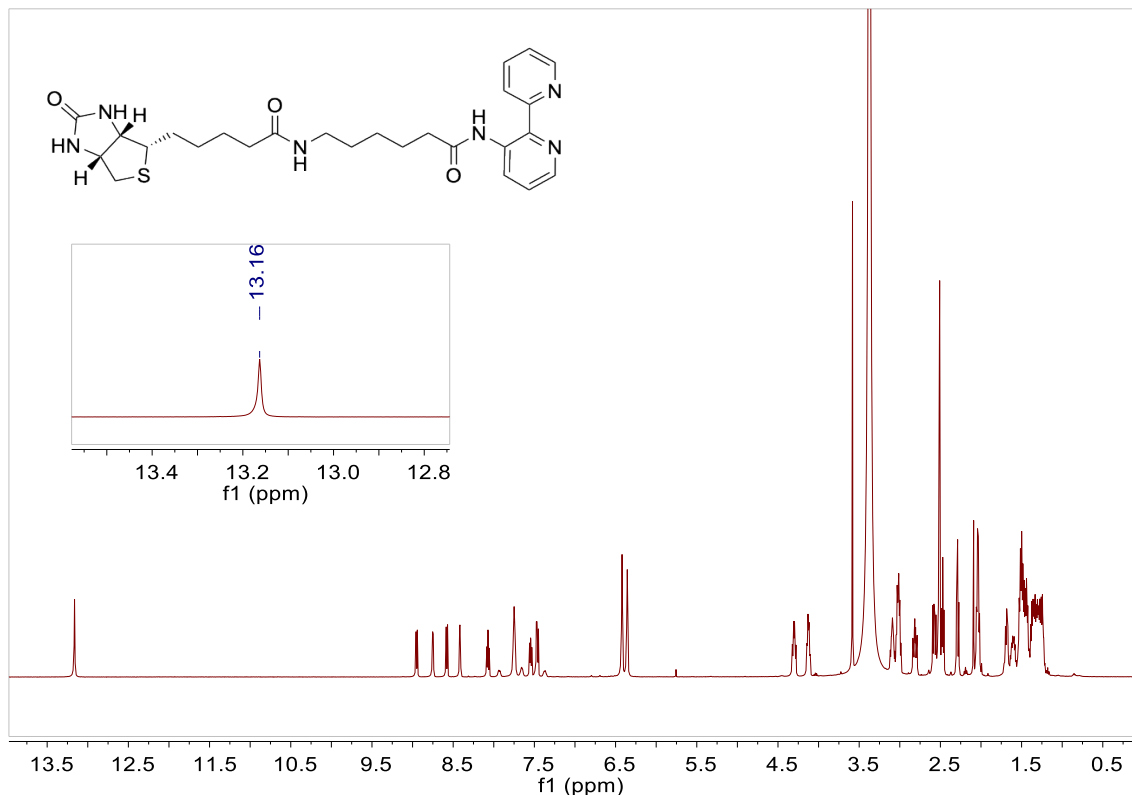
Por último, la reacción de acoplamiento peptídico entre **13** y la bipiridina **4** (Esquema 14), se llevó a cabo mediante la metodología descrita anteriormente. Para ello, se preparó una suspensión de **12**, HOBT y HBTU en DMF. La disolución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se adicionó

trietilamina al medio. La disolución resultante se dejó en agitación 16 h, se evaporó a vacío y el residuo fue purificado por cromatografía obteniendo un sólido amarillo con un rendimiento del 44%.



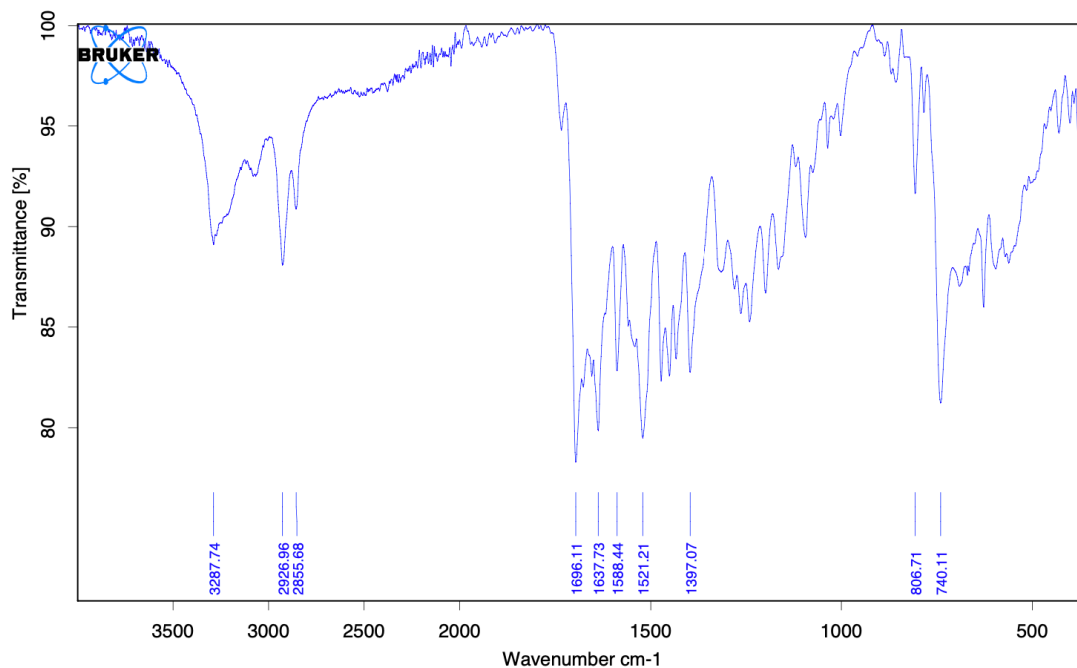
**Esquema 14:** *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-6-(5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamida (**14**)

En este caso, también se pudo observar en el espectro  $^1\text{H}$ -RMN la resonancia del protón del grupo NH del enlace amida entre **4** y **13** que, para nuestro compuesto, aparece a 13.16 ppm (Figura 15). Además, el IR muestra la vibración característica del grupo carbonilo C=O característica de una amida secundaria a  $1696\text{ cm}^{-1}$ , junto con las otras dos bandas anteriormente comentadas (Figura 16).



**Figura 15:** *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-6-(5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamida (**14**)





**Figura 16:** *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-6-(5-((3*a,S*,4*S*,6*a,R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamida (**14**)

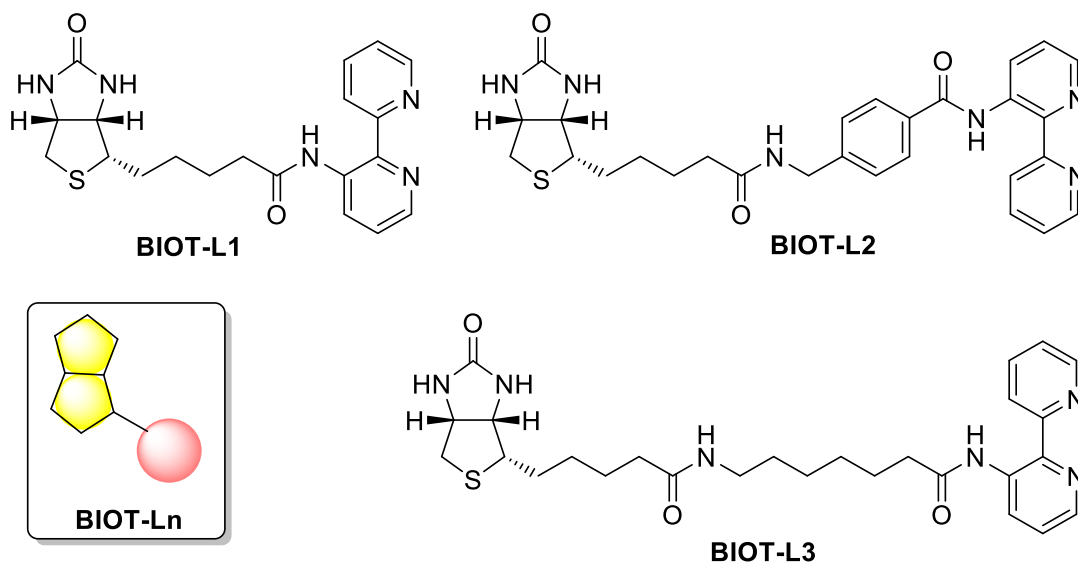
## 3.2 Reacciones de cicloadición

### 3.2.1 Diseño inicial de ligandos

La estreptavidina (Sav), tal y como se explica en la introducción, es una proteína homotetramérica que muestra una gran afinidad por la biotina ( $K_d = 10^{-14}$ ). La estreptavidina y sus homólogos se utilizan ampliamente debido a su interacción altamente selectiva y estable con la biotina ya que mantiene su función y estructura cuaternaria aún en presencia de varios agentes caotrópicos (pH, temperatura, etc.).<sup>22</sup>

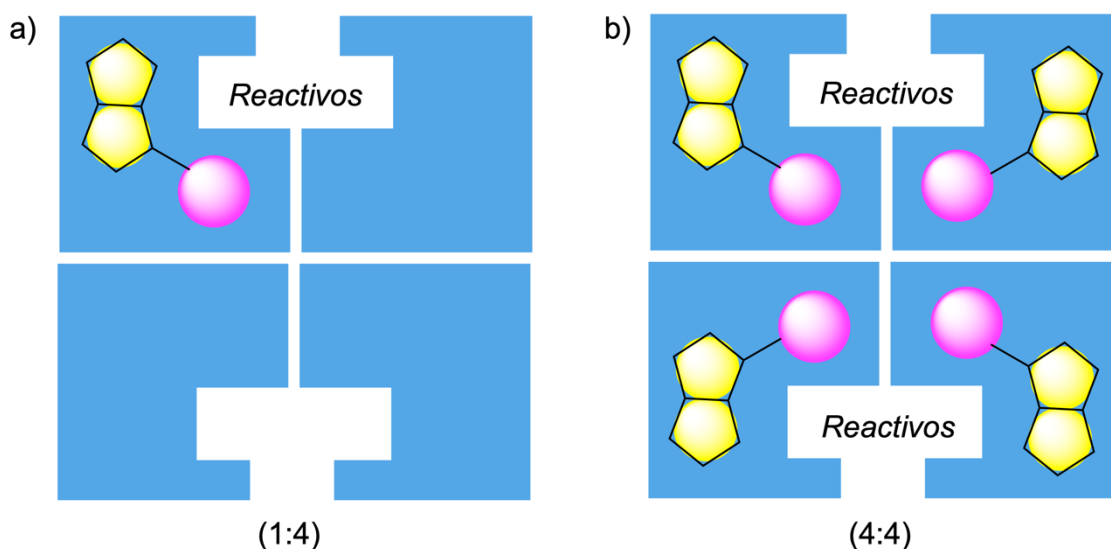
Por ello, para asegurar la localización del cofactor dentro de Sav, sintetizamos tres complejos que incluyeran un punto de anclaje formado por una unidad de biotina, BIOT-L1-3 (Figura 16).

<sup>22</sup> Prier, C. K.; Arnold, F. H. Chemomimetic Biocatalysis: Exploiting the Synthetic Potential of Cofactor-Dependent Enzymes to Create New Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 13992–14006.



**Figura 16:** Ligandos bimetálicos con biotina como precursores de proteínas con actividad Huisgenasa.

Además, para estudiar el efecto que pudiese tener la estreptavidina sobre la base de la reacción catalizada se diseñaron dos tipos de catalizadores. Uno, compuesto por una subunidad de BIOT-Ln ( $n=1-3$ ) anclada a una subunidad de la estreptavidina (ver Figura 17 a) y otro, en la que cuatro moléculas de BIOT-Ln se unen a los 4 huecos de estreptavidina (Figura 17 b).

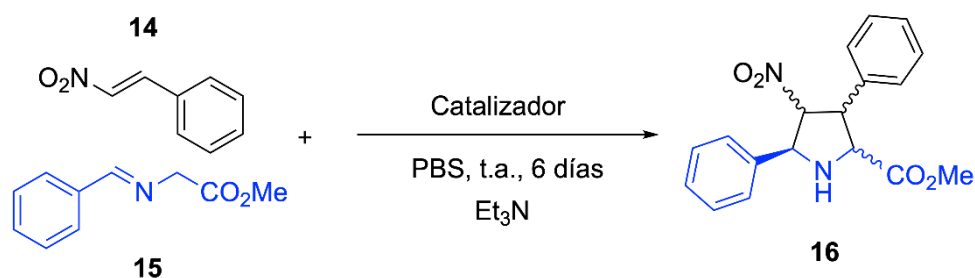


**Figura 17:** Representación de las dos posibles estructuras del catalizador (a) una subunidad de BIOT-Ln ( $n=1-3$ ) anclada a una subunidad de Sav (b) cuatro subunidades de BIOT-Ln unidas a los 4 sitios activos de Sav.

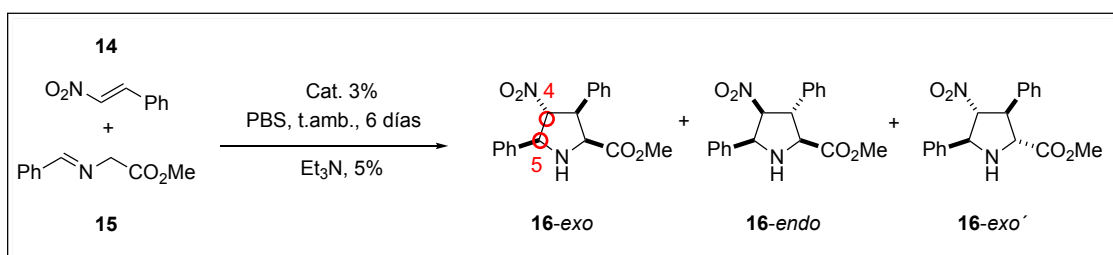
La unión de los ligandos a la estreptavidina se llevó a cabo en colaboración con el grupo de la Prof.<sup>a</sup> Ikerbasque Aitziber L. Cortajarena del CIC BIOMAGUNE.

### 3.2.2 Reacciones de cicloadición 3+2 entre N-bencilidenglicinato de metilo (**14**) y (*E*)- $\beta$ -nitroestireno (**15**).

La actividad catalítica de los ligandos conjugados con biotina se estudió en la reacción entre N-bencilidenglicinato de metilo (**14**) y (*E*)- $\beta$ -nitroestireno (**15**) a temperatura ambiente (t.a.) durante 6 días en PBS y utilizando un agitador orbital (Esquema 14). Después del tiempo de reacción, el disolvente se evaporó y el producto resultante, fue purificado por cromatografía en columna (Acetato de etilo/Hexano 1: 4) para aislar tres estereoisómeros, **16-exó**, **16-exo**, y **16-endo** (Esquema 15). La caracterización de estos tres compuestos se llevó a cabo mediante la comparación de los datos espectroscópicos obtenidos en nuestro estudio, con los datos ya descritos en literatura.<sup>23</sup>



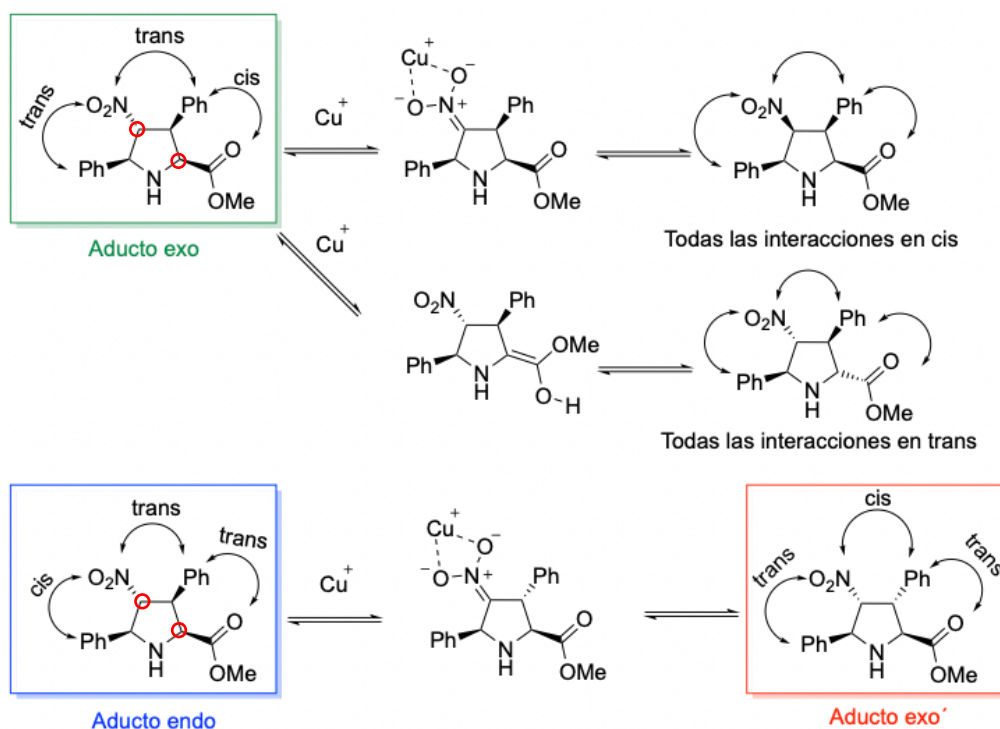
**Esquema 14:** Cicloadición (3 + 2) entre N-Bencilidenglicinato de metilo (**15**) y (*E*)- $\beta$ -Nitroestireno (**14**)



**Esquema 15:** Esquema general de la reacción de cicloadición (3 + 2) catalizada por los diferentes BIOTn, para dar los tres estereoisómeros, **16-exo**, **16-endo** y **16-exo'**.

<sup>23</sup> Arai, T.; Mishiro, A.; Yokoyama, N.; Suzuki, K.; Sato, H. Chiral Bis(imidazolidine)pyridine-Cu(OTf)<sub>2</sub>: Catalytic Asymmetric Endo-Selective [3 + 2] Cycloaddition of Imino Esters with Nitroalkenes *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5338- 5339.

La terminología "*endo*" y "*exo*" hacen referencia a la posición relativa de los sustituyentes en C4 (el grupo electron atractor, -NO<sub>2</sub>) y C5 marcados en rojo en el esquema 15. En el esquema 16, presentado a continuación, se explica brevemente la formación de los tres diastereómeros.



**Esquema 16:** Ilustración de todos los posibles equilibrios entre los diastereómeros formados en la reacción de cicloadición.

Las moléculas encuadradas corresponden a los tres productos obtenidos en la reacción entre **14** y **15** en las condiciones de reacción descritas anteriormente (Esquema 15). En presencia del ion de Cu (I) y Et<sub>3</sub>N, puede producirse una desprotonación en las posiciones indicadas en rojo en el Esquema 16, y una coordinación de Cu con el grupo nitro, formando un grupo nitronato de cobre. Este último, puede conducir a la formación de diferentes aductos de prolina. El aducto *exo* (resaltado en verde en el Esquema 16) puede establecer dos equilibrios que pueden resultar en la formación de dos aductos diferentes, uno que muestra todas las interacciones cis y otro con todas las interacciones trans. Si bien la formación del primero es improbable debido al impedimento estérico soportado en el mismo lado del anillo, el otro es aparentemente estable. Sin

embargo, el equilibrio anterior no permite su formación, por lo que este producto no ha sido observado. La formación del aducto *exo* puede tener lugar a partir del aducto *endo*, mediante la formación de un nitronato intermedio. Por otra parte, no hay que olvidar que los cicloaductos *exo* y *endo* pueden formarse directamente a partir de la ciclación [ $\pi 4s + \pi 2s$ ] entre el 1,3-dipolo y el (*E*)-nitroestireno, que conservaría su configuración trans entre los grupos nitro y fenilo. El cicloaducto *exo'* tiene interacciones trans-cis-trans entre los sustituyentes del anillo, lo que da lugar a una situación bastante estable. A pesar de ello, este producto se forma pero en una cantidad menor en comparación con los aductos *exo* y *endo*.

Los experimentos de control se llevaron a cabo utilizando diferentes combinaciones de los ligandos (BIOT-L1-3), Cu (I, II) y estreptavidina, incluyendo reacciones en ausencia de alguno de los tres componentes. Todos estos experimentos en condiciones de reacción idénticas a las utilizadas en la cicloadición entre la imina **15** y el nitroalqueno **14** en presencia de los distintos catalizadores. Ninguno de los experimentos permitió observar actividad Huisgenasa después de seis días de reacción en PBS a temperatura ambiente. En cambio, se observaron restos de los materiales de partida **14** y **15**.

**Tabla 2:** Resultados de la cicloadición

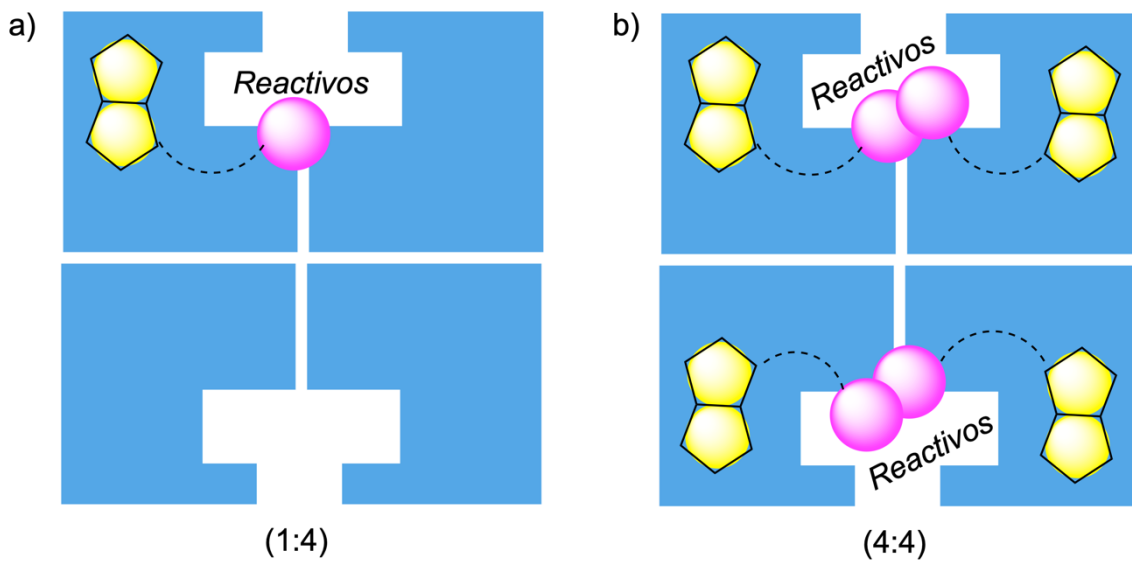
	Biot:Strep	Rendimiento global	EXO'	EXO	ENDO
BIOT-L1	1:4	10%	6% <sup>a</sup>		4%
BIOT-L1 + Cu		12%	n.d.		
BIOT-L1	4:4	10%	6% <sup>a</sup>		4%
BIOT-L1 + Cu		15%	5%	5%	5%
BIOT-L2	1:4	11%	4%	3%	4%
BIOT-L2 + Cu		60%	10%	25%	25%
BIOT-L2	4:4	20%	n.d.		
BIOT-L2 + Cu		16%	4%	8%	4%
BIOT-L3	1:4	24%	9%	9%	6%
BIOT-L3 + Cu		45%	4%	20%	21%
BIOT-L3	4:4	18%	5%	7%	6%
BIOT-L3 + Cu		20%	7%	7%	6%

<sup>a</sup>EXO' + EXO no separados; n.d. = no determinado; las reacciones control se han llevado a cabo con: ligando (BIOT-L1-3), Cu (I, II), estreptavidina, así como las diferentes combinaciones entre ellos. En ningún caso se obtuvieron los productos de cicloadición. El cobre al que se hace referencia en la tabla es Cu (I). En todos los casos los productos obtenidos resultaron ser una mezcla racémica de los diferentes cicloaductos. (columna-IB, 80/20 (Hex/IPA) F=1 mL/min).

Tal como se muestra en la Tabla 2, los ligandos con estequiometría 4:4 no aumentan el rendimiento 4 veces tal como cabría esperar. Esto puede deberse a un efecto alostérico negativo, fenómeno mostrado por enzimas o receptores que tienen múltiples sitios de unión. Cuando la afinidad de los sitios de unión por un ligando aumenta, se dice que la cooperatividad es positiva, mientras que la modulación alostérica negativa (también conocida como inhibición alostérica)

ocurre cuando la unión de un ligando disminuye la afinidad por el sustrato en otros sitios activos.<sup>24</sup>

Otra posibilidad puede deberse a que los volúmenes de los dos ligandos interfieran en el espacio dando lugar a una congestión estérica en la que los ligandos se estorban mutuamente, dificultándose la interacción con los reactivos (Figura 18).



**Figura 18:** Representación de cómo los volúmenes de los ligandos pueden interferir en el espacio cuando (a) Sistema Biot-Sav es 1:4, (b) Sistema Biot-Sav es 4:4.

<sup>24</sup> Monod, J.; Changeux, J. P.; Jacob, F. Allosteric proteins and cellular control systems. *Journal of Molecular Biology*, **1963**, *6*, 306–329.

## 4. Conclusiones

Las principales conclusiones tras el trabajo realizado son:

1. No tiene lugar ninguna reacción en ausencia de nuestro sistema catalítico en la reacción (3+2) entre N-bencilidenglicinato de metilo (**14**) y (*E*)- $\beta$ -nitroestireno (**15**) a temperatura ambiente durante 6 días en PBS y utilizando un agitador orbital.
2. Las características de las proteínas diseñadas han demostrado ser las responsables de la actividad Huisgenasa.
3. La cadena que conecta la biotina con las 2,2'-bipiridinas podría no tener las características óptimas, por lo que la coordinación entre el iluro de azometino y el dipolarófilo no es la idónea.
4. En el caso de los complejos (1:4) la reacción puede ocurrir con buen rendimiento, pero con baja selectividad y nulo esterocontrol.
5. En el caso de los complejos (4:4), los resultados son peores ya que los dos ligandos compiten dos a dos, dificultando la interacción con los reactivos. (Efecto alostérico negativo).
6. En la actualidad se está trabajando en el diseño de nuevos sistemas catalíticos, para poder estudiar y determinar las mejores condiciones para el control de la reacción desde el punto de vista diastereo- y enantioselectivo.



## Conclusions

The main conclusions after the work carried out are:

1. No reaction takes place in the absence of our catalytic system in the (3+2) reaction between methyl N-benzylideneglycinate (**14**) and (*E*)- $\beta$ -nitrostyrene (**15**) at room temperature for 6 days in PBS using an orbital shaker.
2. The features of the designed proteins have been shown to be responsible for Huisgenase activity.
3. The chain that connects the biotin with the 2,2'-bipyridines could not have the optimal length, so the coordination between the azomethine ylide and the dipolarophile is not ideal.
4. In the case of complexes (1: 4) the reaction can occur with good yield, but with low selectivity and without enantiocontrol.
5. In the case of complexes (4: 4), the results are worse most likely because two contiguous ligands compete two by two, making interaction with the reagents difficult. (Negative allosteric effect).
6. Currently, new designs of the catalytic system are under design and development in order to study and determine the best conditions to control the reaction from the diastereo- and enantioselective standpoints.

## 5. Desarrollo experimental

### 5.1 Técnicas analíticas, materiales y métodos generales

La eliminación de disolventes se hizo mediante rotavapores Büchi P-114 utilizando una bomba de vacío Büchi V-500 y IKA® HB 10 Basic con la bomba de vacío VWR3000.

#### 5.1.1 Reactivos y disolventes

Los reactivos comerciales se obtuvieron de diferentes proveedores como Sigma-Aldrich y Fluorochem entre otros. Se almacenaron según las respectivas indicaciones de las casas comerciales y se utilizaron sin previa purificación.

Los disolventes empleados para las distintas síntesis han sido: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, THF, acetona, AcOEt, Hex, MeOH, ACN, DME y tolueno. Se adquieren con calidad de grado de reactivo y se emplearon directamente sin previo secado.

El CDCl<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O, DMSO-d<sub>6</sub> y CD<sub>3</sub>OD se emplearon con una pureza analítica de la casa comercial Sigma-Aldrich (≥99%).

#### 5.1.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros <sup>1</sup>H-RMN, (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H)-COSY, (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C)-HSQC <sup>13</sup>C-RMN fueron registrados mediante un espectrómetro Bruker advance UltraShield de 400 MHz y 500 MHz. Los valores de desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) respecto a una referencia interna de trimetilsilano (δ=0,00 ppm). En cuanto al <sup>13</sup>C-RMN, CDCl<sub>3</sub> fue utilizado como referencia (δ=77,16 ppm en <sup>13</sup>C). Las constantes de acoplamiento de las señales J vienen dadas en Hz. Para poder describir las señales se han utilizados las abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (tripleto), q (cuadruplete), m (multiplete).

El tratamiento de datos del espectrómetro (procesado y editado de espectros) se realizó con el programa MestReNova 5.1.0.

### 5.1.3 Cromatografía

El seguimiento de las reacciones junto con las purificaciones de columnas cromatográficas fue observado mediante cromatografía en capa fina (TLC) utilizando un gel de sílica (Merck, Kieselgel 60 F-254) que está soportada sobre placas de aluminio. El revelado de dichas TLCs se realizaron principalmente con la lámpara de luz ultravioleta ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ). No obstante, en algunos casos se hizo uso de reveladores por calefacción tras el contacto previo con una disolución reveladora como son la vainillina o el permanganato de potasio.

La purificación mediante el empleo de columnas cromatográficas se hizo sobre gel de sílice (Merck Rocc 60Å de poro, 0,040-0,063 mm de partícula) como fase estacionaria. Como eluyente se emplearon dos mezclas en proporciones adecuadas de disolvente, una mezcla entre acetato de etilo/hexano y otra de diclorometano/metanol.

### 5.1.4 Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

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

### 5.1.5 Espectrometría de masas

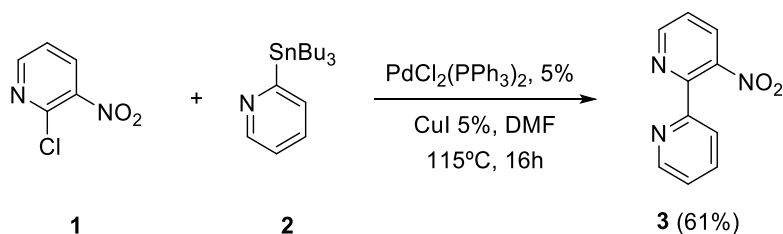
El análisis se realizó con un LC/TOF con fuente de ionización ESI Agilent Jet Stream.

### 5.1.6 Métodos generales

Las reacciones que necesitaban elevadas temperaturas se realizaron mediante una placa calefactora controlando la temperatura con un termopar. Estas placas, además, poseen un imán magnético que se puede regular para que la reacción se esté mezclando de manera homogénea. Mientras que en las reacciones que implican el uso de 0°C se hizo mediante baños de hielo.

## 5.2 Procedimiento para la síntesis de ligandos bimetálicos conjugados con biotina

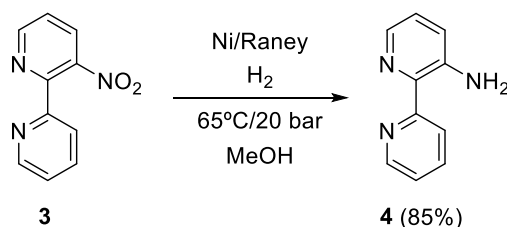
### 5.2.1.1 Procedimiento para la síntesis del precursor 3-nitro-[2,2'-bipiridina] (3)



Esquema 6: Síntesis de 3-nitro-2,2'-bipiridina (3)

Se preparó una disolución de cloronitropiridina (6,3 mmol; 1000 mg; 1 eq) y 2-(tributielstanil)piridina (6,9 mmol; 2,2 mL; 1,1 eq) en 10 mL de DMF junto con  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (0,3 mmol; 221,1 mg) y  $\text{CuI}$  (0,6 mmol; 132,1 mg) como catalizador y co-catalizador respectivamente, en atmósfera inerte. Después de agitar durante 18 h a  $115^\circ\text{C}$ , se añadieron 5 mL de fluoruro de potasio acuoso y la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo la disolución se filtró por celita y se añadió  $\text{Et}_2\text{O}$  para arrastrar los restos de productos que se hubiesen quedado en la misma. El filtrado se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna. **Rendimiento:** 61% (386,6 mg y 1,9 mmol).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.61 (ddd,  $J = 4.9, 1.9, 0.9$  Hz, 1H), 8.53 (dt,  $J = 8.2, 1.1$  Hz, 1H), 8.10 (dd,  $J = 4.2, 1.6$  Hz, 1H), 7.84 (ddd,  $J = 8.3, 7.4, 1.9$  Hz, 1H), 7.26 (ddd,  $J = 7.5, 4.9, 1.2$  Hz, 1H), 7.16 – 7.00 (m, 2H).

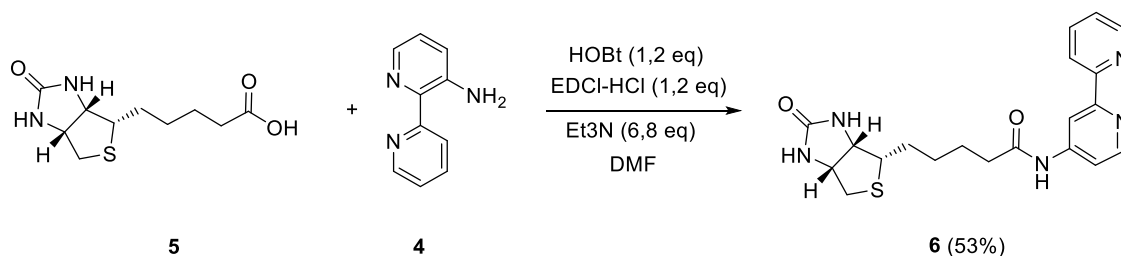
### 5.2.1.2 Procedimiento para la síntesis de la [2,2'-bipiridin]-3-amina (4)



Esquema 7: Síntesis de [2,2'-bipiridin]-3-amina (4)

Posteriormente, la 3-nitro-2,2'-bipiridina (773,2 mg y 3,8 mmol) el grupo NO<sub>2</sub> de la 3-nitro-2,2'-bipiridina **3** fue reducido a NH<sub>2</sub>, mediante el uso de un sistema de hidrogenación H-Cube® Pro de ThalesNano, el cual genera H<sub>2</sub> a partir de la hidrólisis del agua. Como catalizador se utilizó Ni/Raney a 65°C, 20 bares y utilizando metanol como disolvente. **Rendimiento:** 85% (558,8 mg, 3,3 mmol). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.61 – 8.59 (m, 1H), 8.52 (dt, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 4.3, 1.6 Hz, 1H), 7.84 (ddd, *J* = 8.2, 7.4, 1.9 Hz, 1H), 7.30 – 7.23 (m, 1H), 7.15 – 7.05 (m, 2H), 6.39 (s, 2H).

### 5.2.2 Síntesis de *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida (**6**)

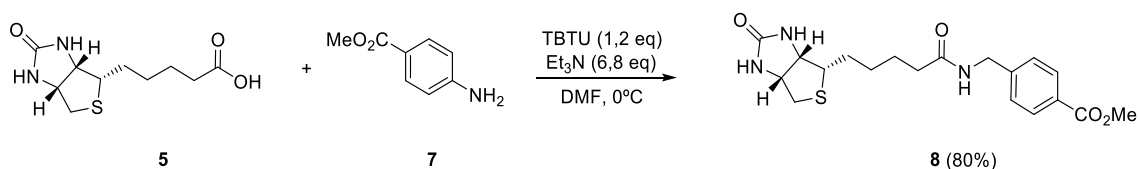


**Esquema 7:** Síntesis de *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida (**6**)

Se preparó una suspensión de biotina (0,7 mmol; 170,9 mg; 1 eq), HOBT (0,8 mmol; 113,5 mg; 1,2 eq) y EDCI-HCl (0,8 mmol; 160,9 mg; 1, 2 eq) en 13 mL de DMF. Se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente, a continuación se añadió **4** (0,7 mmol; 119,8 mg; 1 eq) y finalmente se agregó trietilamina (1,3 mmol; 0,2 mL; 6,8 eq) al medio. La disolución resultante se dejó en agitación 16 h y se purificó mediante cromatografía en columna. **Rendimiento:** 53% (147,3 mg, 0,4 mmol). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.19 (s, 1H), 8.96 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 8.77 (ddd, *J* = 4.9, 1.9, 0.9 Hz, 1H), 8.59 (dt, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 1H), 8.42 (dd, *J* = 4.5, 1.5 Hz, 1H), 8.08 (ddd, *J* = 8.2, 7.5, 1.8 Hz, 1H), 7.56 (ddd, *J* = 7.5, 4.9, 1.2 Hz, 1H), 7.47 (dd, *J* = 8.5, 4.4 Hz, 1H), 6.50 – 6.36 (m, 2H), 5.77 (s, 2H), 4.34 – 4.26 (m, 1H), 4.14 (ddd, *J* = 7.8, 4.5, 1.9 Hz, 1H), 3.21 – 3.07 (m, 1H), 2.81 (dd, *J* = 12.4, 5.1 Hz, 1H), 2.58 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 1.70 (tt, *J* = 15.9, 6.2 Hz, 3H), 1.61 – 1.41 (m, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171.9, 162.7, 157.2, 147.1, 143.2, 143.1, 139.0, 138.2, 138.2, 138.2, 135.6, 127.9, 127.9, 124.7, 124.6, 123.8, 122.9, 61.0, 59.2, 55.4, 55.3, 54.9, 40.1, 40.02,

39.9, 39.9, 39.8, 39.7, 39.6, 39.5, 39.4, 39.4, 39.2, 39.1, 39.0, 37.6, 30.7, 28.1, 28.1, 28.0, 25.0. **MS (m/z) = 398,16 (M<sup>+</sup>)**

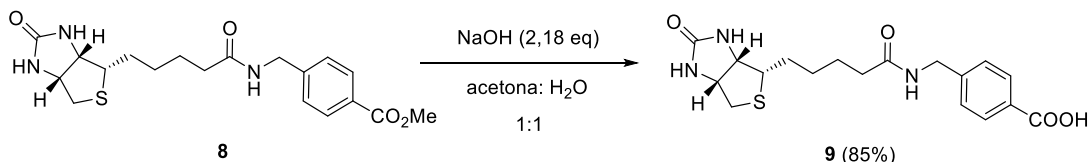
### 5.2.3 Procedimiento para la síntesis de 4-((5-((3a*S*, 4*S*, 6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno [3,4-*d*]imidazol-4-il) pentanamido)metil)benzoato de metilo (**7**)



**Esquema 8:** 4-((5-((3a*S*, 4*S*, 6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno [3,4-*d*]imidazol-4-il) pentanamido)metil)benzoato de metilo (**7**)

La biotina **5** (0,4 mmol; 92,8 mg; 1 eq) y el 4-aminobenzoato de metilo (0,4 mmol; 57,4 mg; 1 eq) se disolvieron en 17 mL de DMF y se añadieron Et<sub>3</sub>N (2,6 mmol; 0,4 mL; 6,8 eq) y el agente de acoplamiento TBTU (0,5 mmol; 146,4 mg; 1,2 eq). La reacción se agitó durante la noche a 0°C para producir el precursor **8**, que se purificó mediante cromatografía en columna. **Rendimiento:** 80% (120,2 mg; 0,3 mmol) <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.43 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.50 – 6.36 (m, 2H), 4.33 (dd, *J* = 14.0, 6.1 Hz, 3H), 4.13 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 3.85 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H), 3.11 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 2.84 (dd, *J* = 12.4, 5.0 Hz, 1H), 2.17 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.66 – 1.42 (m, 5H), 1.34 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H).

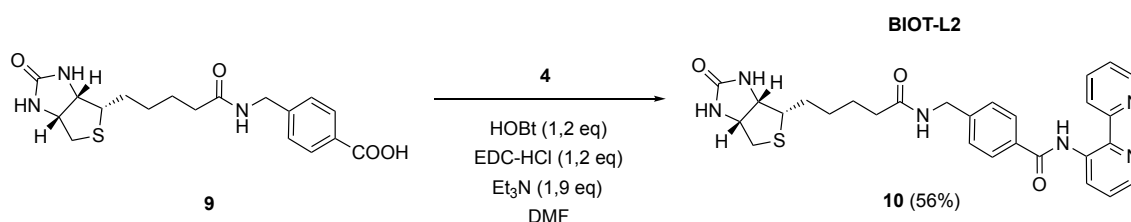
### 5.2.4 Procedimiento para la síntesis del ácido-4-((5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzoico (**9**)



**Esquema 9:** Síntesis de Ácido-4-((5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzoico (**9**)

Para la hidrólisis, fue necesario disolver el precursor **8** (0,3 mmol; 122,0 mg; 1 eq) en 5 mL de acetona, y el hidróxido de sodio (0,6 mmol; 25,5 mg; 2,2 eq) en 5 mL de agua. Después ambas disoluciones se mezclaron y el compuesto **9** se obtuvo por precipitación a medida que se adicionaba HCl 1N. El producto se filtró y se purificó mediante cromatografía en columna. **Rendimiento:** 85% (98,0 mg, 0,2 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.42 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 7.94 – 7.86 (m, 2H), 7.36 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 6.49 – 6.34 (m, 2H), 4.32 (dd,  $J$  = 10.8, 5.5 Hz, 3H), 4.18 – 4.09 (m, 1H), 3.11 (dt,  $J$  = 8.7, 5.7 Hz, 1H), 2.84 (dd,  $J$  = 12.4, 5.1 Hz, 1H), 2.17 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 1.70 – 1.42 (m, 4H), 1.40 – 1.22 (m, 2H), 1.17 – 1.06 (m, 1H).

### 5.2.5 Procedimiento para la síntesis de *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida (**10**)

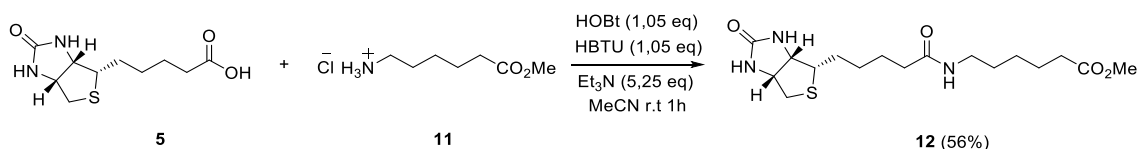


**Esquema 10:** Síntesis de *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-4-((5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)metil)benzamida (**10**)

Por último, se procedió con el acoplamiento peptídico entre **9** (0,2 mmol; 98,0 mg; 1 eq) y la bipiridina **4** (0,2 mmol; 42,6 mg; 1 eq). Ambos reactivos se disolvieron en 15 mL de DMF y se añadieron Et<sub>3</sub>N (0,5 mmol; 0,06 mL; 1,9 eq) y el agente de acoplamiento EDC-HCl (0,3 mmol; 57,1 mg; 1,2 eq) usando HOBT (0,3 mmol; 40,3 mg; 1,2 eq) como aditivo. La reacción se agitó durante la noche para producir el compuesto **9**. **Rendimiento:** 56% (74,5 mg, 0,1 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  14.30 (s, 1H), 9.18 (dd,  $J$  = 8.5, 1.6 Hz, 1H), 8.85 (dt,  $J$  = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.68 (dt,  $J$  = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 8.49 (dd,  $J$  = 4.5, 1.5 Hz, 1H), 8.45 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 8.16 – 8.09 (m, 1H), 8.06 – 8.01 (m, 2H), 7.61 (ddd,  $J$  = 7.5, 4.9, 1.2 Hz, 1H), 7.52 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 6.45 – 6.35 (m, 3H), 4.39 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), 4.33 – 4.27 (m, 1H), 4.16 – 4.10 (m, 1H), 3.15 – 3.08 (m, 1H), 2.82 (dd,  $J$  = 12.4, 5.1 Hz, 1H), 2.31 (s, 1H), 2.20 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 1.67 – 1.45 (m, 5H), 1.36 (p,  $J$  = 7.1 Hz, 1H), 1.24 (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (126

MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  61.6, 59.7, 56.3, 55.9, 55.9, 53.2, 42.2, 40.4, 40.3, 40.2, 40.2, 40.0, 39.9, 39.8, 39.7, 39.7, 39.5, 39.5, 39.4, 35.6, 31.2, 28.7, 28.5, 25.7. **MS (m/z)** = 510,21 ( $M^+$ )

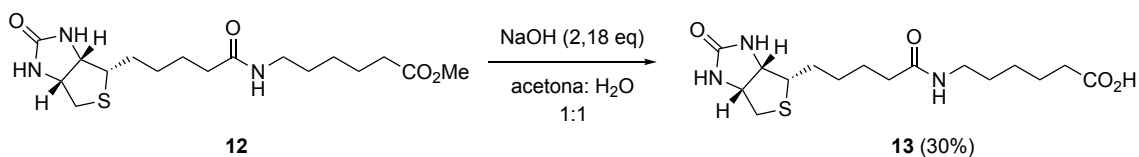
### 5.2.6 Procedimiento para la síntesis de 6-(5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno [3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)hexanoato de metilo (**12**)



### Esquema 9: Síntesis de 6-(5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno [3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido) hexanoato de metilo (**12**)

Se preparó una solución de **10** (2,0 mmol; 372,4 mg; 1 eq), biotina (2,0 mmol; 500,8 mg; 1 eq) HBTU (2,1 mmol; 816,3 mg; 1,05 eq) HOBt (2,1 mmol; 290,5 mg; 1,05 eq) y trietilamina (10,8 mmol; 1,5 mL; 5,25 eq) en 20 mL de acetonitrilo. Después de 30 minutos de agitación a temperatura ambiente, se formó un precipitado. La disolución se evaporó hasta sequedad y el crudo se purificó por cromatografía en columna. **Rendimiento:** 56 % (1,1 mmol; 425,1 mg).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.75 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 6.46 – 6.35 (m, 2H), 5.76 (s, 1H), 4.32 (dd,  $J = 7.7, 5.0$  Hz, 1H), 4.18 – 4.07 (m, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.11 – 2.98 (m, 3H), 2.83 (dd,  $J = 12.5, 5.1$  Hz, 1H), 2.59 (d,  $J = 12.4$  Hz, 1H), 2.29 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.05 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.69 – 1.09 (m, 13H).

### 5.2.7 Procedimiento para la síntesis de Ácido 6-(5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno [3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido) hexanoico (**13**)

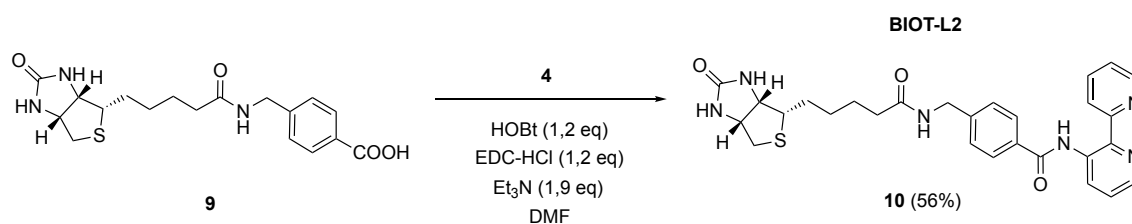


### Esquema 10: Ácido 6-(5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno [3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido) hexanoico (**13**)



Una vez puro, el precursor **11** (1,1 mmol; 425,1 mg; 1 eq) se disolvió en 5 mL de acetona, y la cantidad correspondiente de hidróxido de sodio (2,5 mmol; 99,4 mg; 2,18 eq) en 5 mL de agua. Después ambas disoluciones se mezclaron y el compuesto se obtuvo por precipitación a medida que se añadía HCL (1N) poco a poco sobre un baño de hielo. El producto se filtró y se purificó mediante cromatografía en columna. **Rendimiento:** 30% (122,2 mg, 0,3 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.74 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 6.46 – 6.33 (m, 2H), 4.35 – 4.28 (m, 1H), 4.14 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 1H), 3.15 – 2.97 (m, 3H), 2.83 (dd,  $J$  = 12.4, 5.1 Hz, 1H), 2.20 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.12 – 1.97 (m, 3H), 1.72 – 1.21 (m, 12H).

#### 5.2.8 Procedimiento para la síntesis de *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-6-(5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamida (**14**)

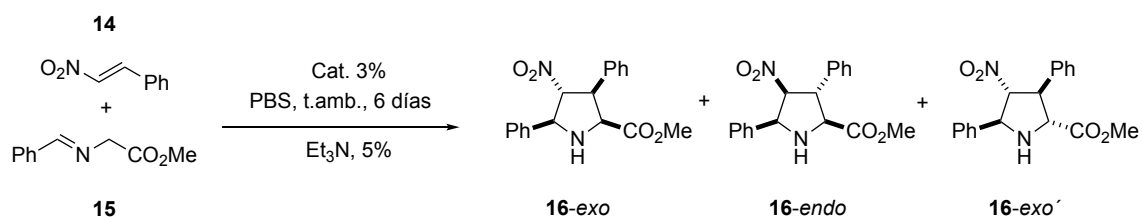


**Esquema 11:** *N*-([2,2'-bipiridin]-3-il)-6-(5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamida (**14**)

Por último, se preparó una suspensión de **12** (0,3 mmol; 122,2 mg; 1 eq), HOBT (0,4 mmol; 54,3mg; 1,2 eq) y EDCI-HCl (0,4 mmol; 62,4 mg; 1,2 eq) en 20 mL de DMF. La disolución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se agregó la bipyridina **4** (0,3 mmol; 57,4 mg; 1 eq) y trietilamina (0,6 mmol; 0,1 mL; 1,9 eq) al medio. **Rendimiento:** 44% (76,5 mg, 0,2 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.16 (s, 1H), 8.95 (dd,  $J$  = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 8.75 (dd,  $J$  = 4.9, 1.7 Hz, 1H), 8.58 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 8.41 (dd,  $J$  = 4.4, 1.6 Hz, 1H), 8.07 (td,  $J$  = 7.8, 1.9 Hz, 1H), 7.74 (dd,  $J$  = 5.7, 3.0 Hz, 1H), 7.56 – 7.51 (m, 1H), 7.46 (dd,  $J$  = 8.5, 4.4 Hz, 1H), 6.42 – 6.35 (m, 2H), 4.31 – 4.29 (m, 1H), 4.12 (ddt,  $J$  = 7.1, 4.4, 2.2 Hz, 1H), 3.12 – 3.06 (m, 2H), 3.02 – 2.96 (m, 2H), 2.83 – 2.79 (m, 1H), 2.59 – 2.54 (m, 2H), 2.03 (dd,  $J$  = 7.5, 5.2 Hz, 2H), 1.54 – 1.25 (m, 12H).  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  173.8, 172.4, 172.3, 163.2, 157.6, 147.5, 143.6, 139.4, 138.7, 136.1, 128.3, 128.2, 125.1, 124.7, 124.2,

123.4, 119.4, 110.3, 61.5, 59.6, 55.9, 51.6, 40.5, 40.4, 40.4, 40.3, 40.2, 40.1, 40.0, 39.9, 39.8, 39.6, 39.5, 38.7, 38.6, 38.2, 35.7, 34.1, 33.7, 31.2, 29.4, 29.3, 28.7, 28.5, 26.4, 26.3, 25.8, 25.1, 24.6. **MS (m/z) = 531,22 (M<sup>+</sup>)**

### 5.3 Procedimiento general para la cicloadición 1,3-dipolar entre N-benciliden glicinato de metilo (**14**) y (E)-β-nitroestireno (**15**)



**Esquema 12:** cicloadición 1,3-dipolar entre N-benciliden glicinato de metilo (**14**) y (E)-β-nitroestireno (**15**)

A una solución de N-benciliden glicinato de metilo (0,06 mmol; 11,0 mg; 1 eq) (**14**) y (E)-β-nitroestireno (0,06 mmol; 9,3 mg; 1 eq) (**15**) en 1 mL de PBS se añadió trietilamina (0,003 mmol, 0,4 μl) y el catalizador (0,002 mmol; 100 μl). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 días.

Las disoluciones que contenían Cu (I) estuvieron 15 minutos en agitación con el catalizador antes de añadir los reactivos.

#### (2*S*, 3*R*, 4*R*, 5*S*)-4-nitro-3,5-difenilpirrolidina-2-carboxilato de metilo (16-*exo'*-*rac*)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.56 (dd, *J* = 7.2, 1.8 Hz, 2H), 7.49 – 7.24 (m, 7H), 5.15 (dd, *J* = 7.6, 4.0 Hz, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.73 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 4.08 (dd, *J* = 9.1, 7.6 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 2.93 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.2, 140.4, 133.3, 129.3, 129.1, 128.6, 128.3, 127.0, 96.8, 77.5, 77.3, 77.0, 65.9, 63.3, 52.9, 52.6, 1.3. **MS (m/z) = 326,13 (M<sup>+</sup>)**

#### (2*S*, 3*S*, 4*R*, 5*S*)-4-nitro-3,5-difenilpirrolidina-2-carboxilato de metilo (16-*exo*-*rac*)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.53 – 7.47 (m, 2H), 7.42 – 7.14 (m, 8H), 5.15 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.70 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.44 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 4.35 – 4.28 (m, 1H), 3.23 (s,

3H), 2.67 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.1, 137.9, 136.1, 129.8, 129.3, 129.2, 129.0, 128.4, 128.3, 128.1, 127.1, 127.0, 95.3, 77.5, 77.4, 77.2, 77.0, 67.9, 64.5, 54.0, 52.1, 1.3. MS (m/z) = 326,13 ( $\text{M}^+$ )

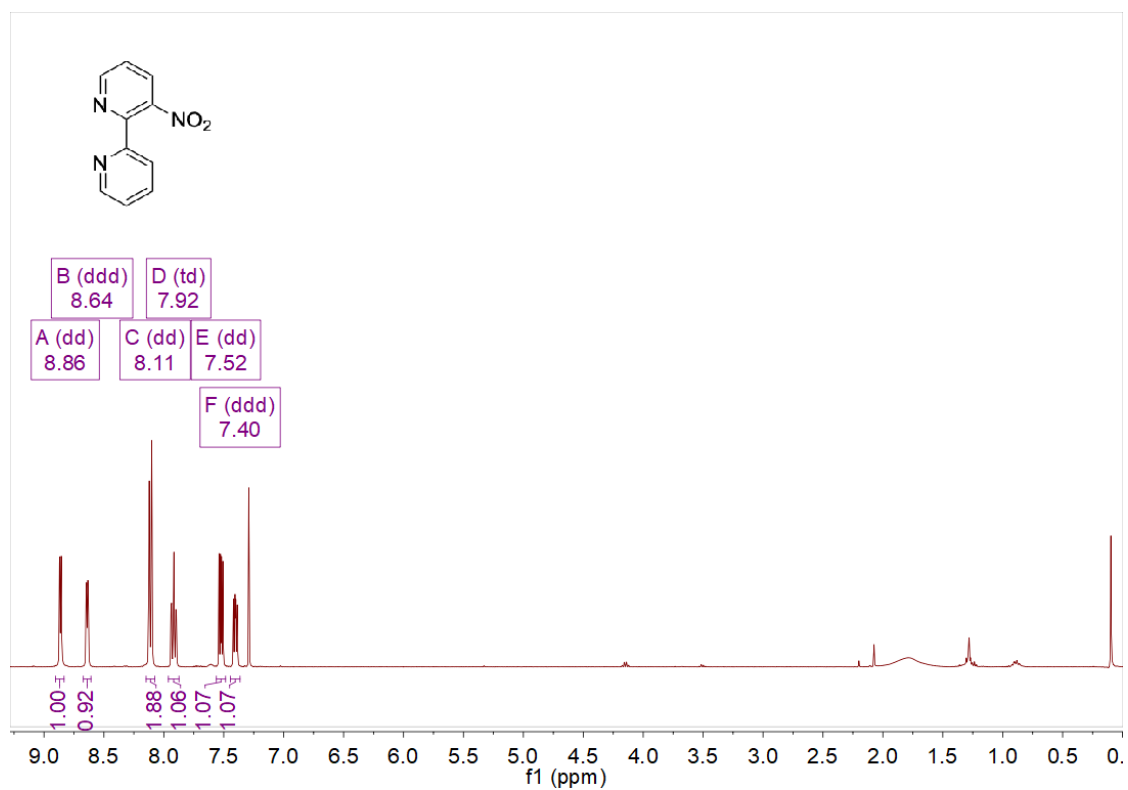
**(2*S*, 3*R*, 4*S*, 5*S*)-4-nitro-3,5-difenilpirrolidina-2-carboxilato de metilo (16-endo-rac)**

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.38 – 7.17 (m, 8H), 5.21 (dd,  $J$  = 6.5, 3.6 Hz, 1H), 4.85 (dd,  $J$  = 10.5, 6.5 Hz, 1H), 4.15 (dd,  $J$  = 7.4, 3.5 Hz, 1H), 4.09 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.29 (t,  $J$  = 9.9 Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.7, 138.6, 134.4, 129.3, 128.8, 128.1, 127.5, 126.5, 97.0, 77.2, 77.2, 77.0, 76.7, 67.8, 67.5, 55.4, 52.7. MS (m/z) = 326,13 ( $\text{M}^+$ )

## 6. Espectros de RMN

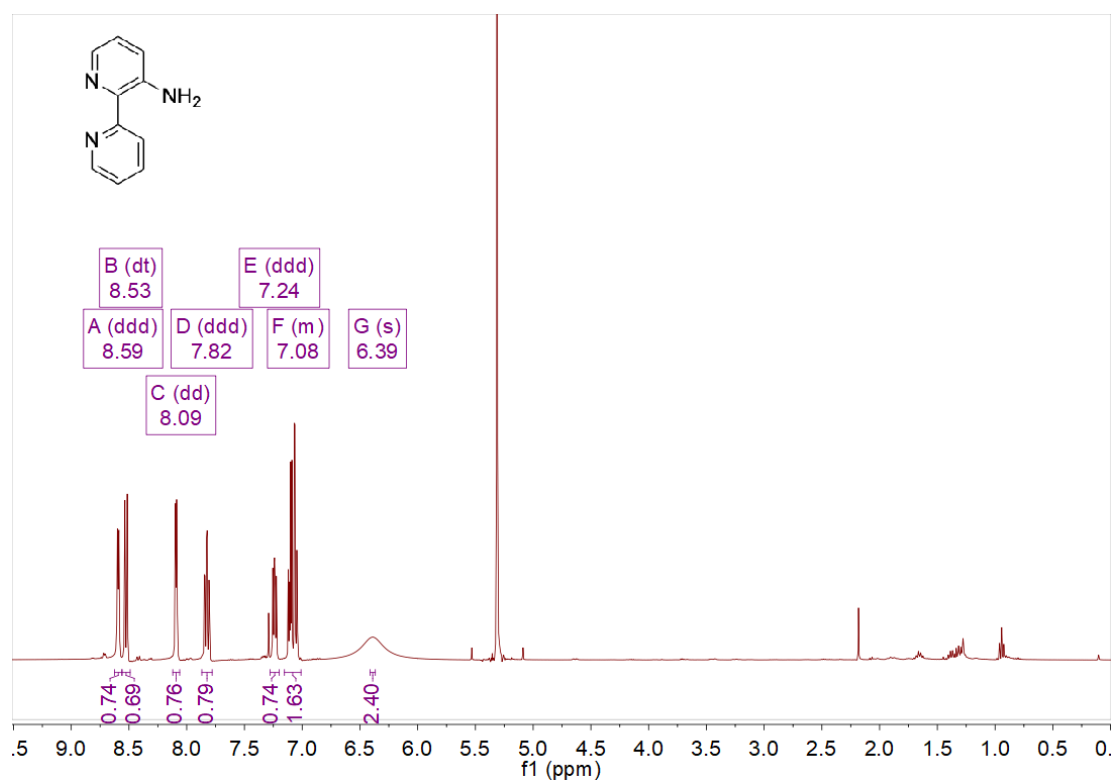
### 3-nitro-2,2'-bipiridina (3)

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):



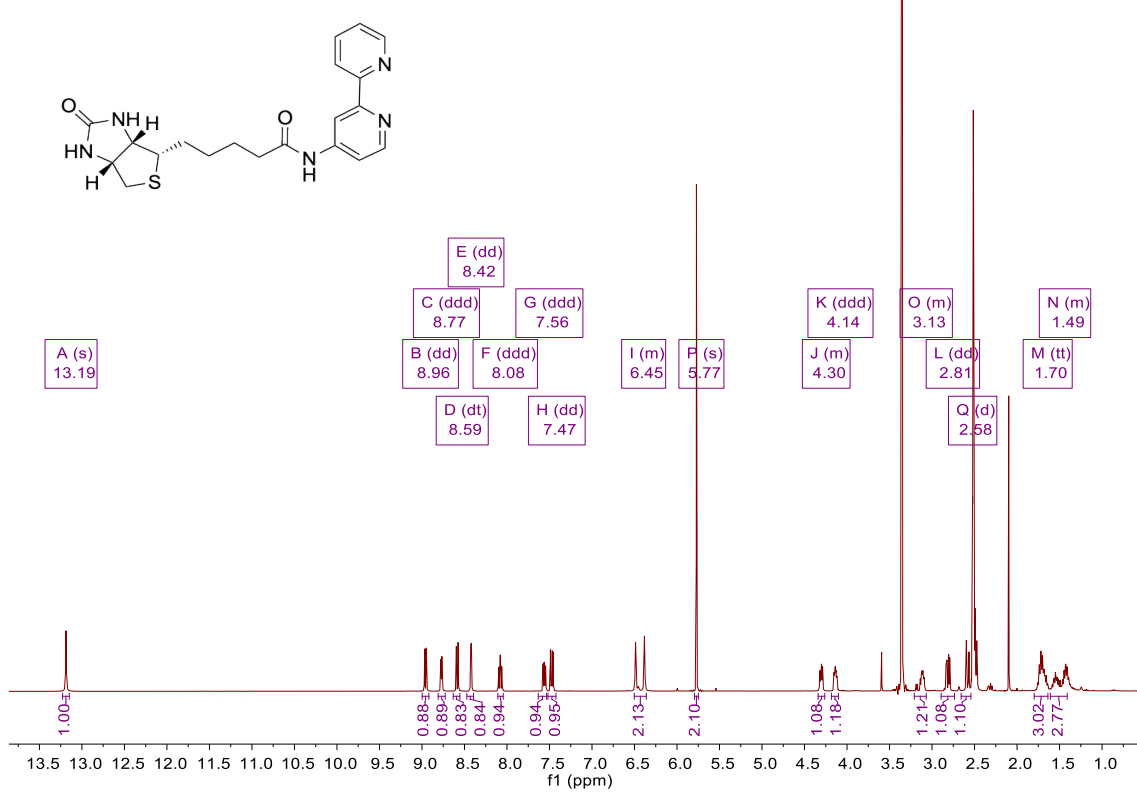
### [2,2'-bipiridin]-3-amina (4)

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):

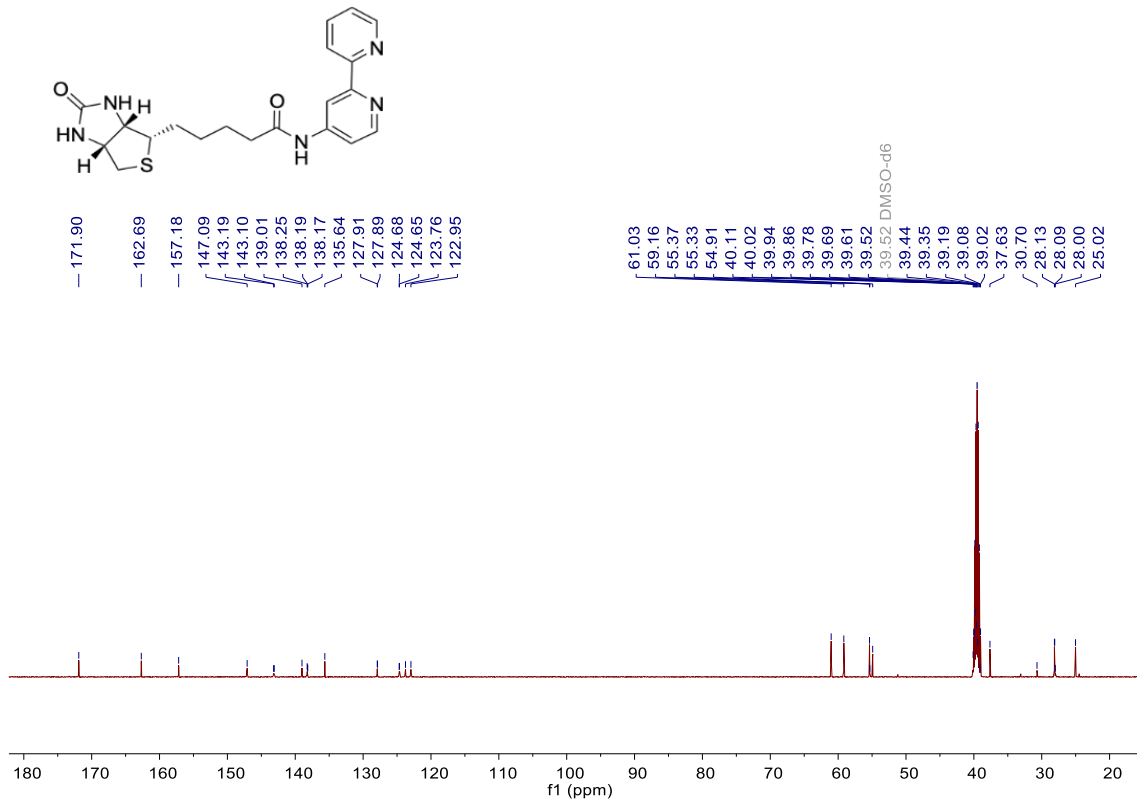


BIOTL-1 (6)

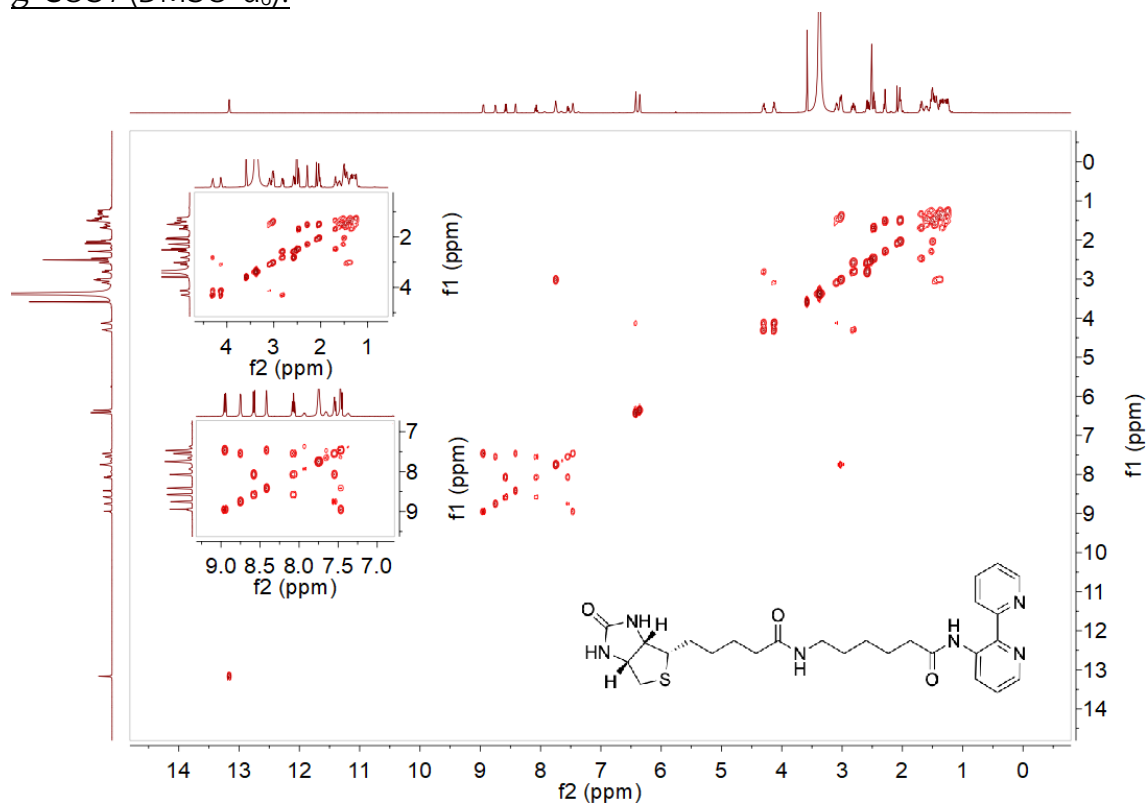
<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>):



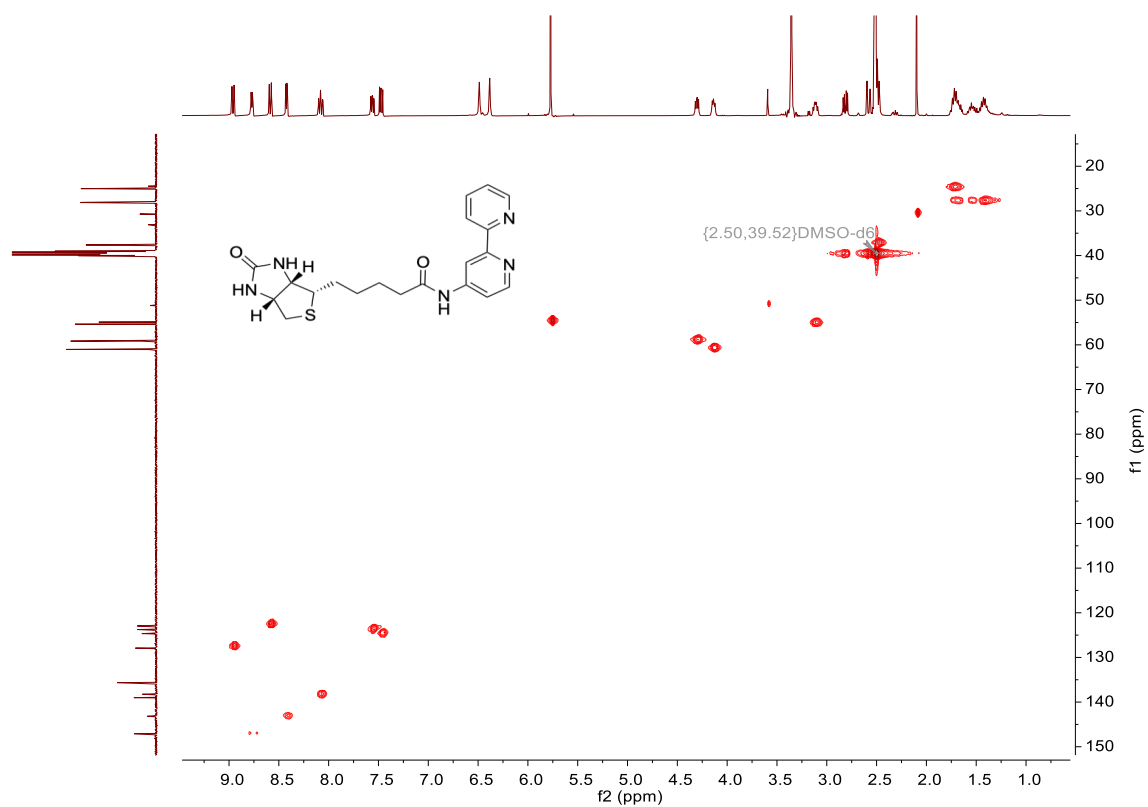
<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>):



$g$ -COSY (DMSO- $d_6$ ):

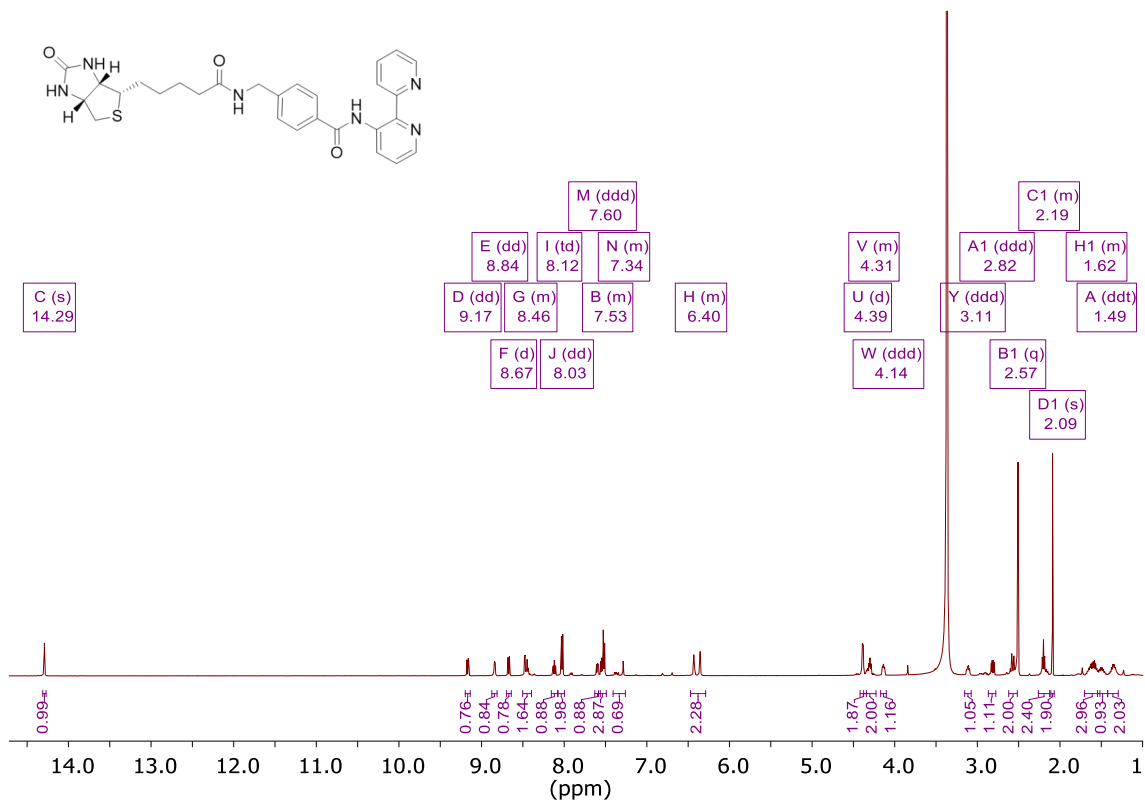


$g$ -HSQC (DMSO- $d_6$ ):

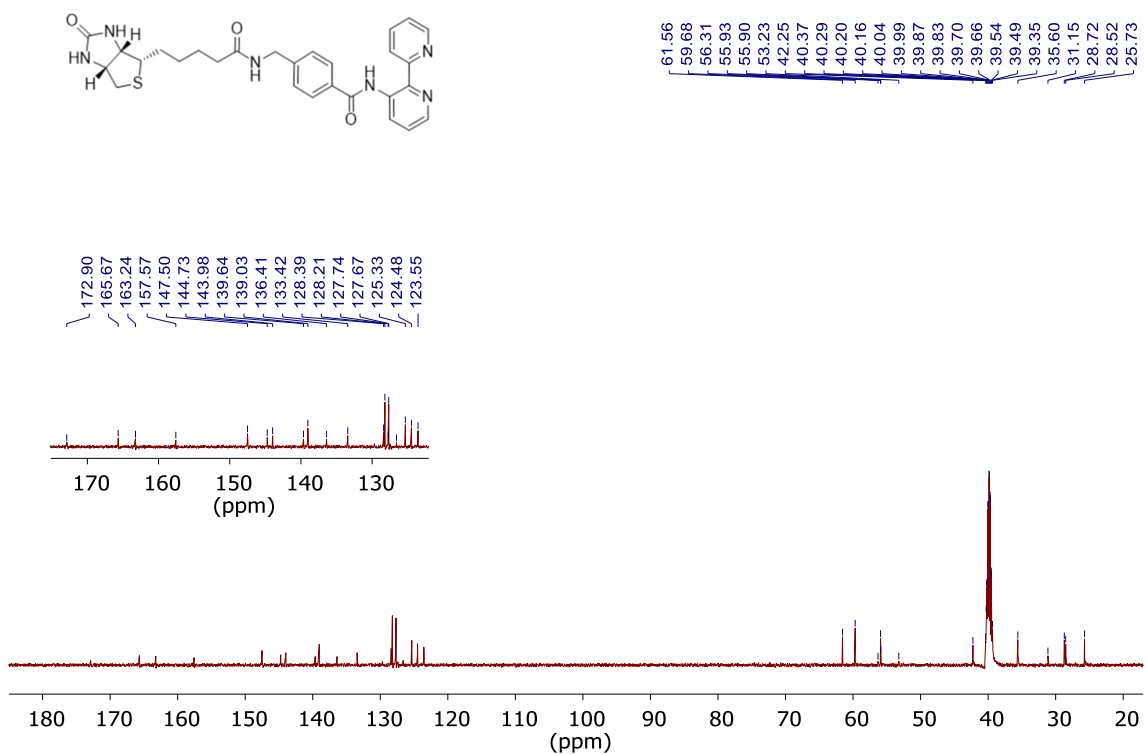


# BIOTL-2 (10)

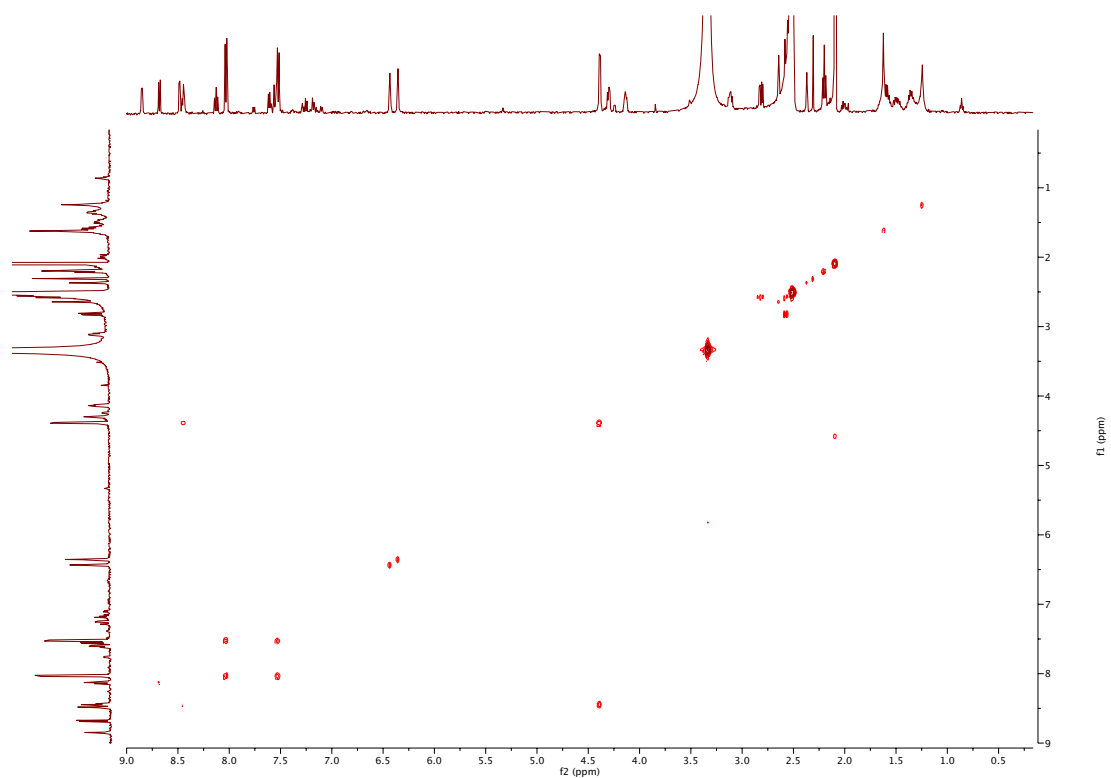
<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>):



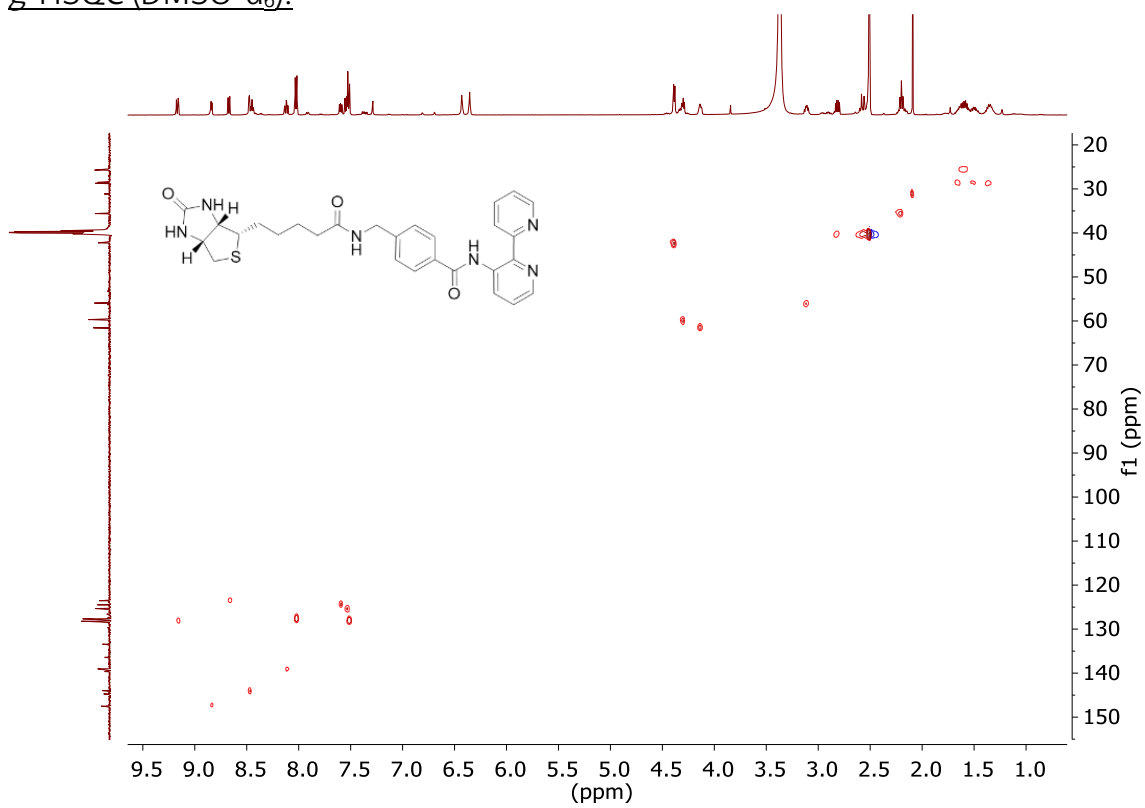
<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>):



$g$ -COSY (DMSO- $d_6$ ):



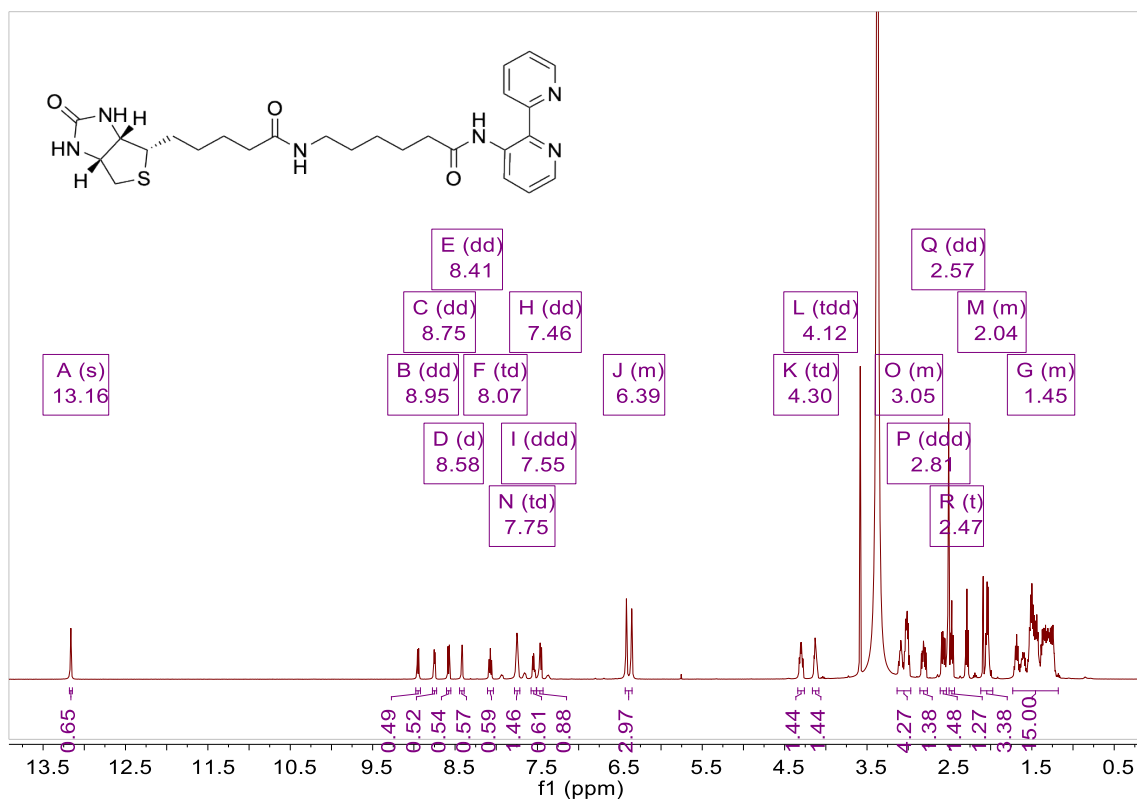
$g$ -HSQC (DMSO- $d_6$ ):



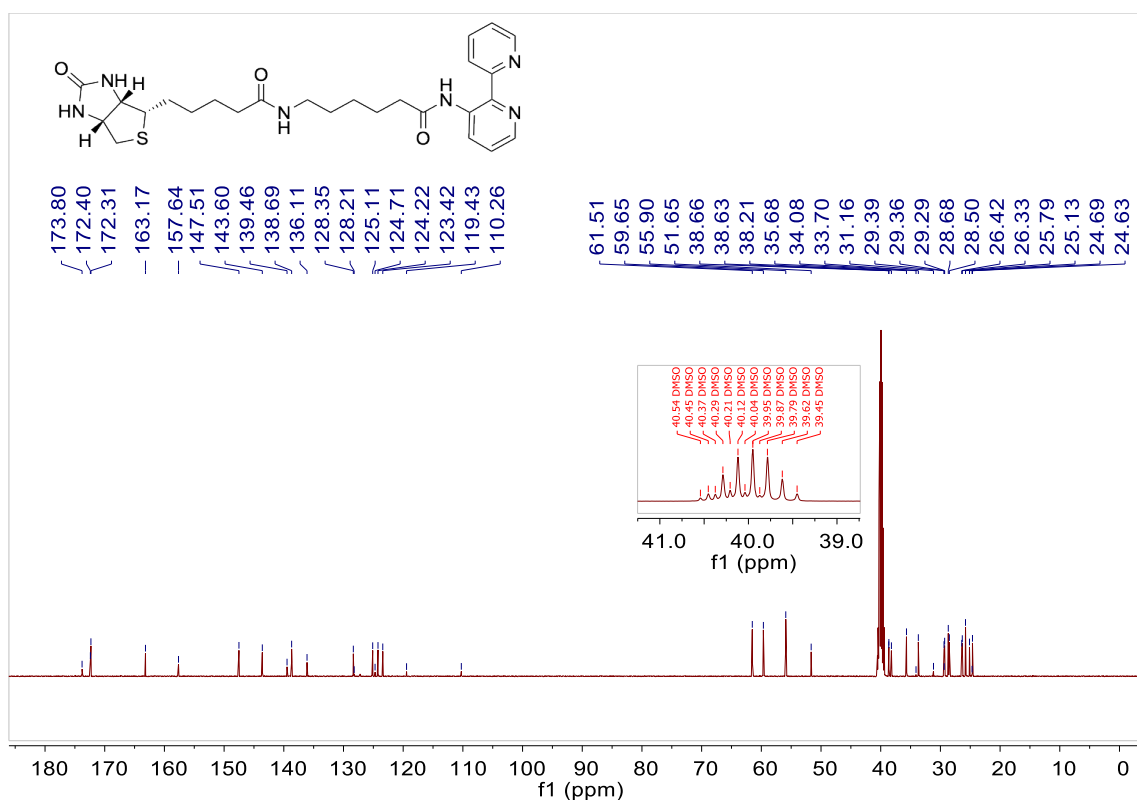


# BIOTL-3 (14)

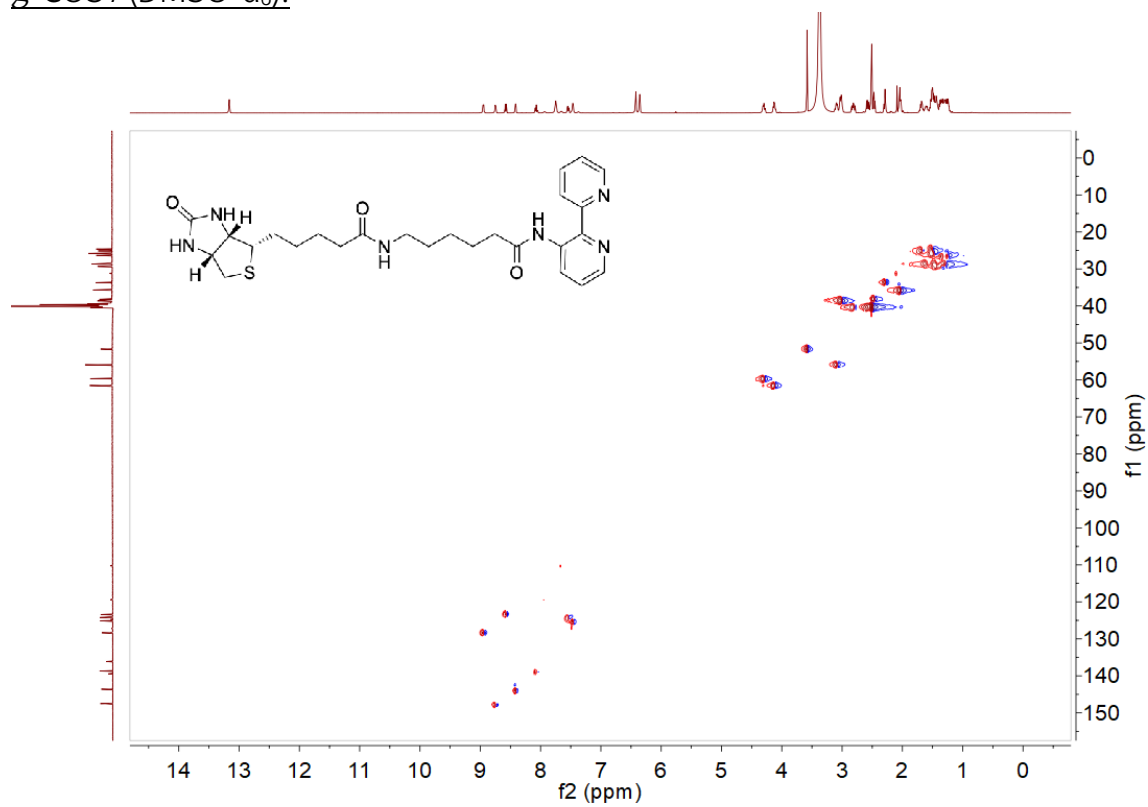
<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>):



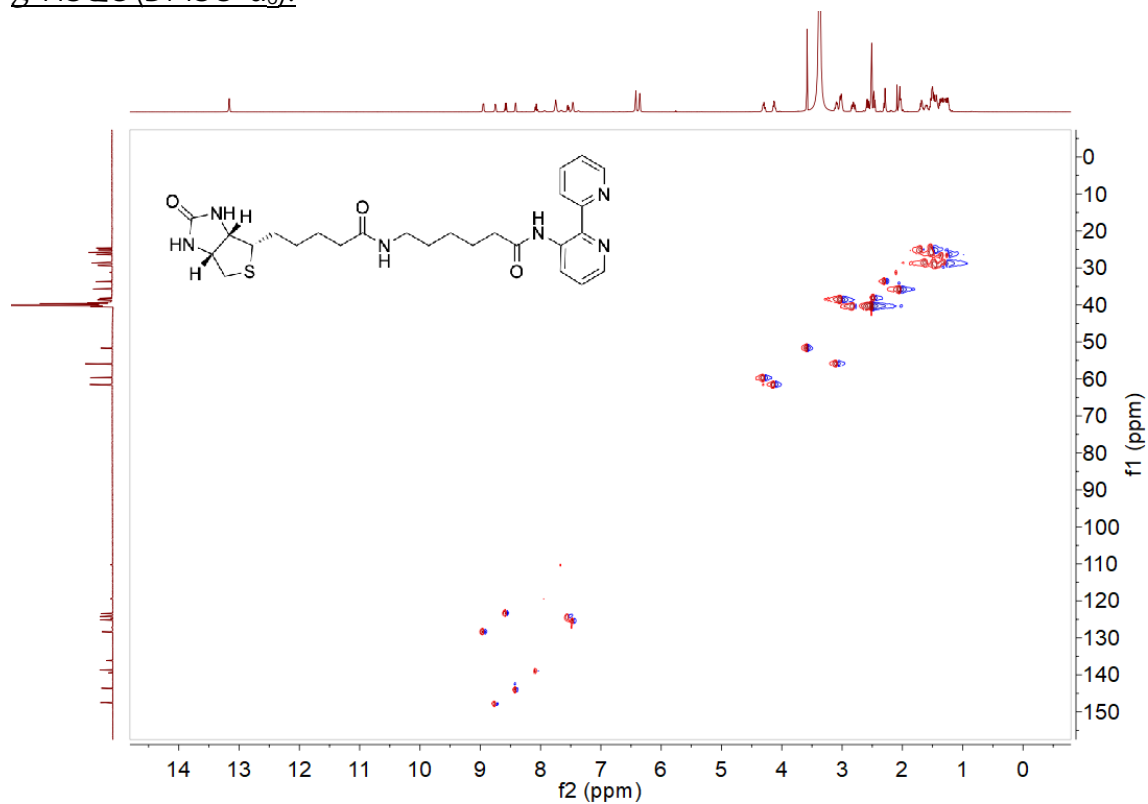
<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>):



*g*-COSY (DMSO- $d_6$ ):

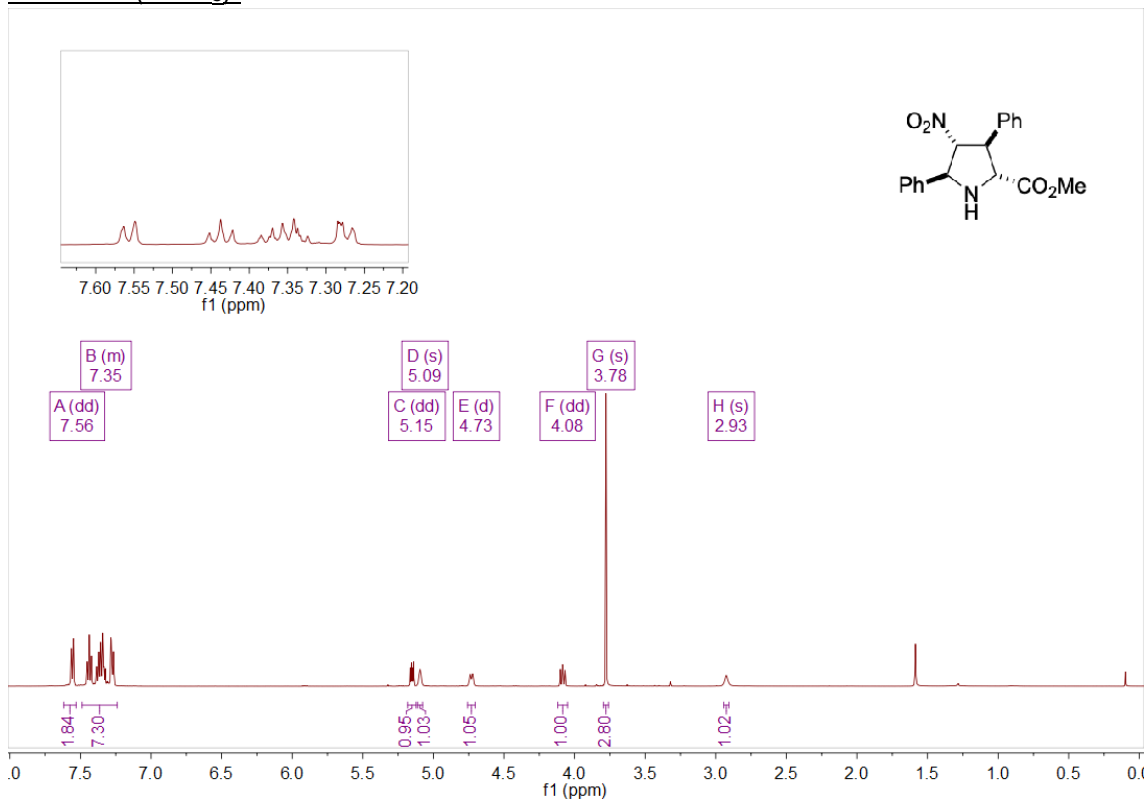


*g*-HSQC (DMSO- $d_6$ ):

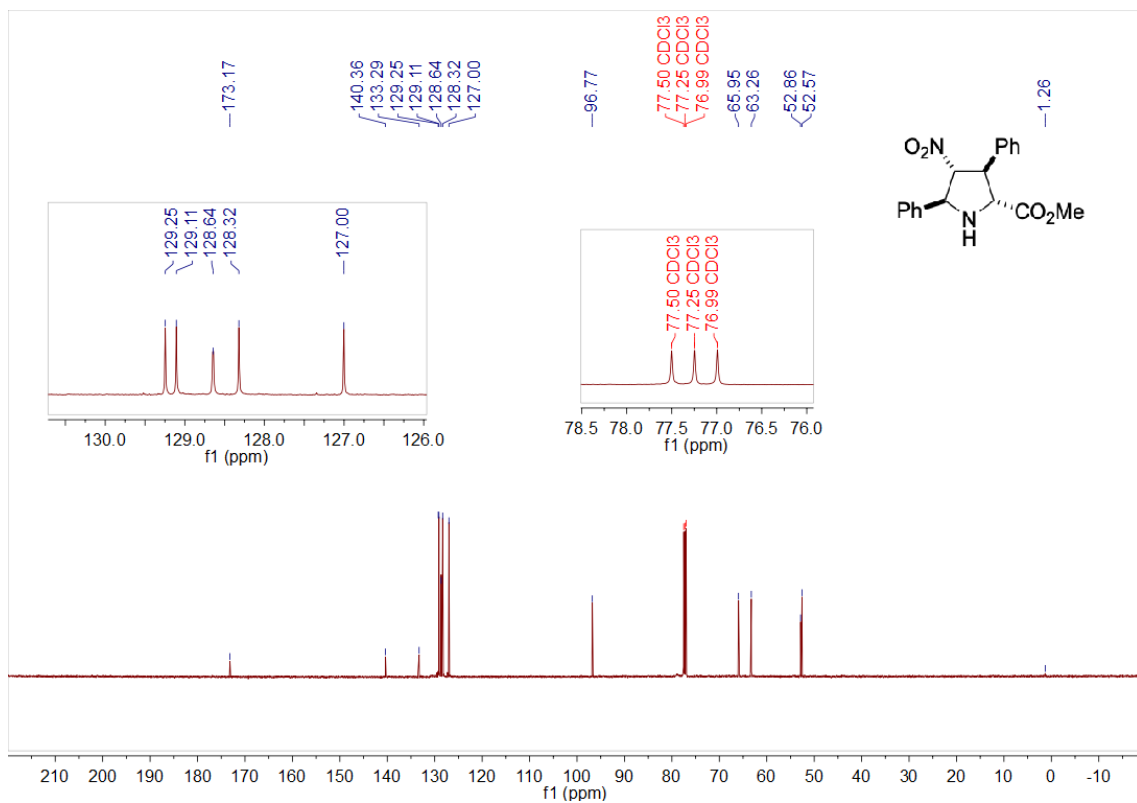


16- *exo*

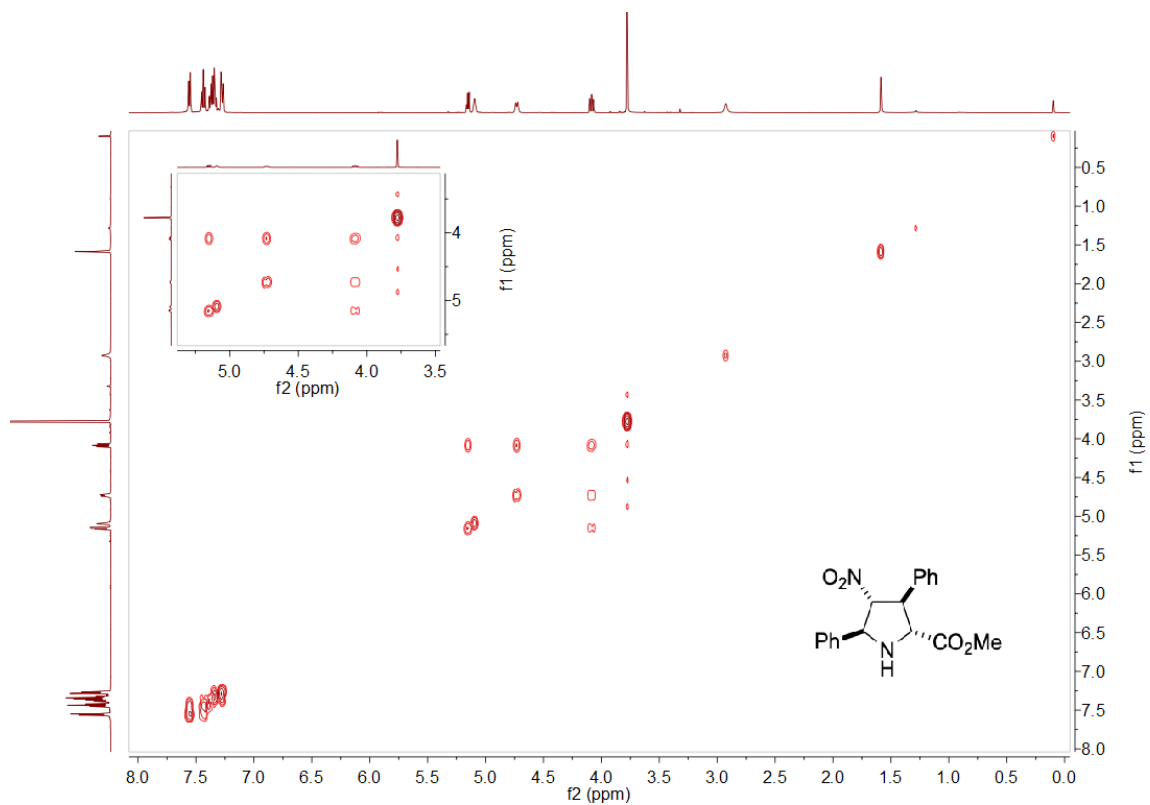
$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ):



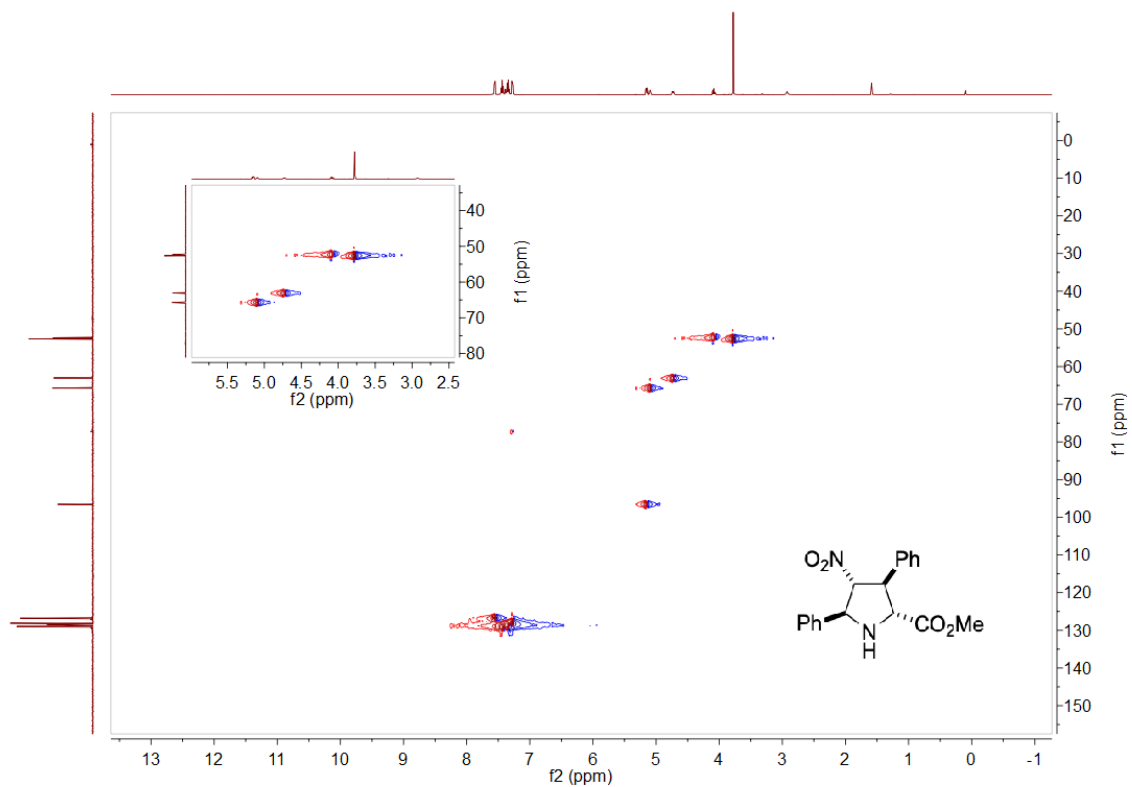
$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ):



$g$ -COSY ( $\text{CDCl}_3$ ):

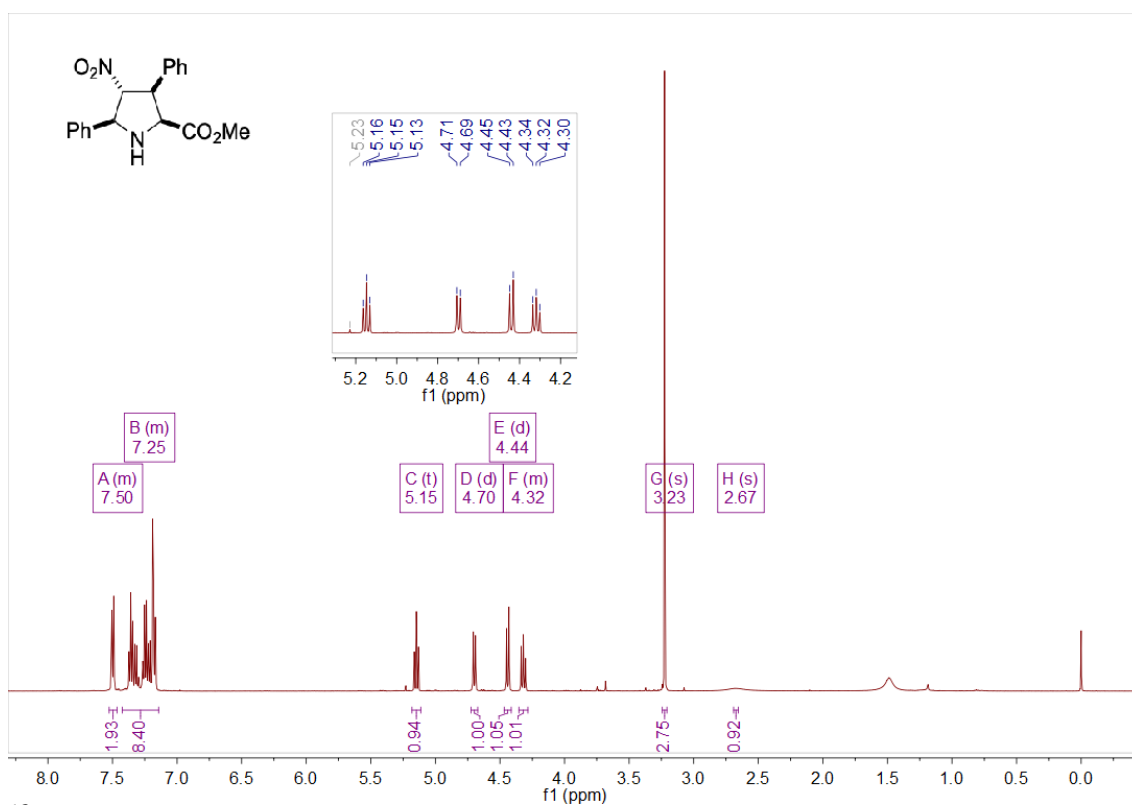


*g*-HSQC ( $\text{CDCl}_3$ ):

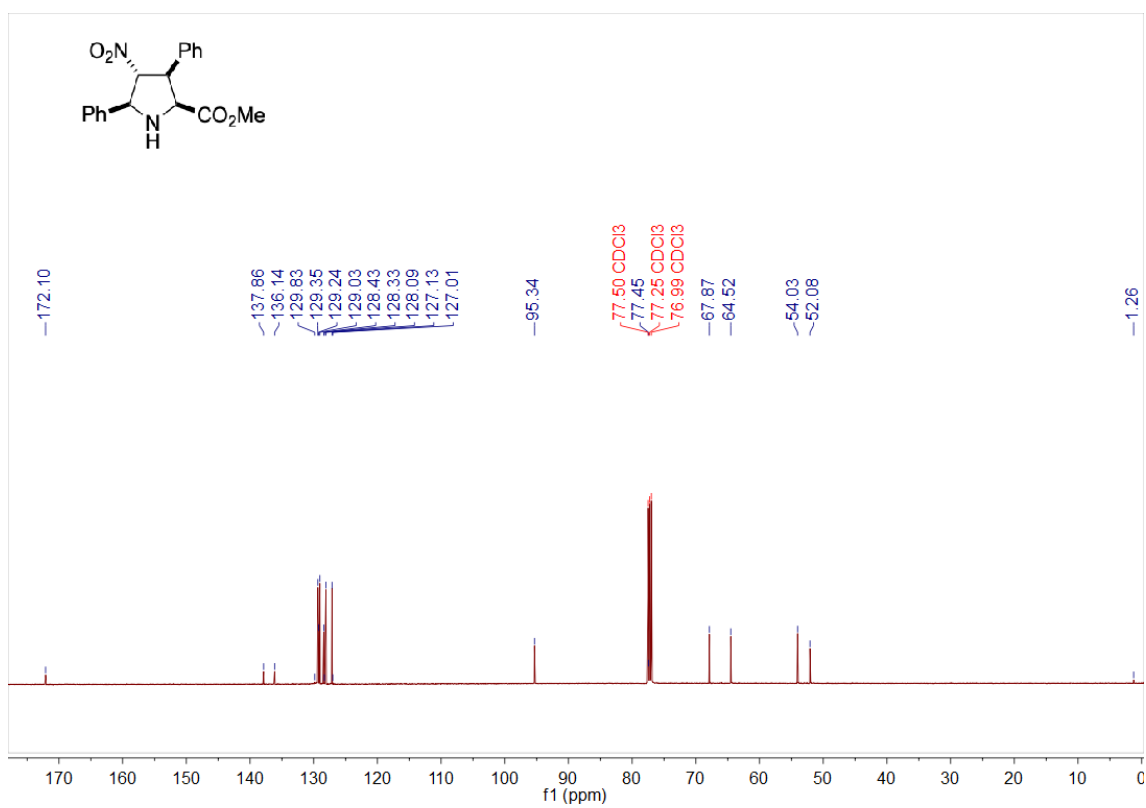


16-*exo*

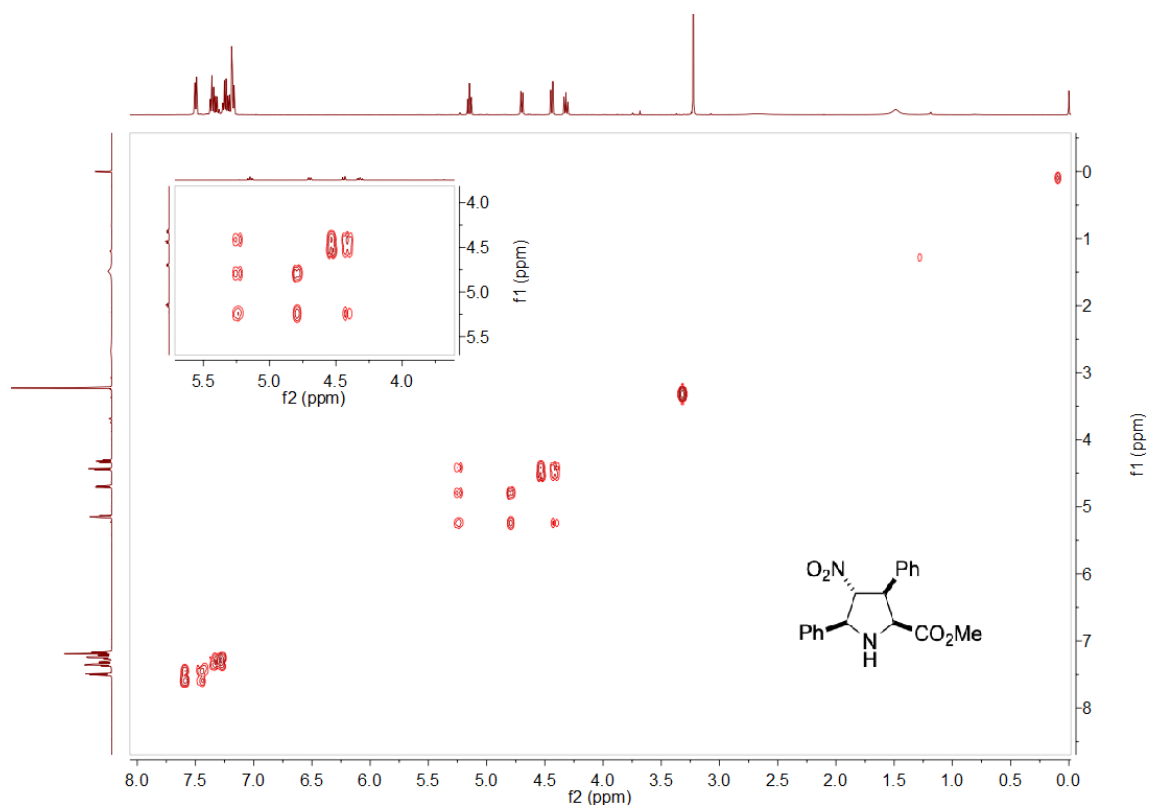
$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ):



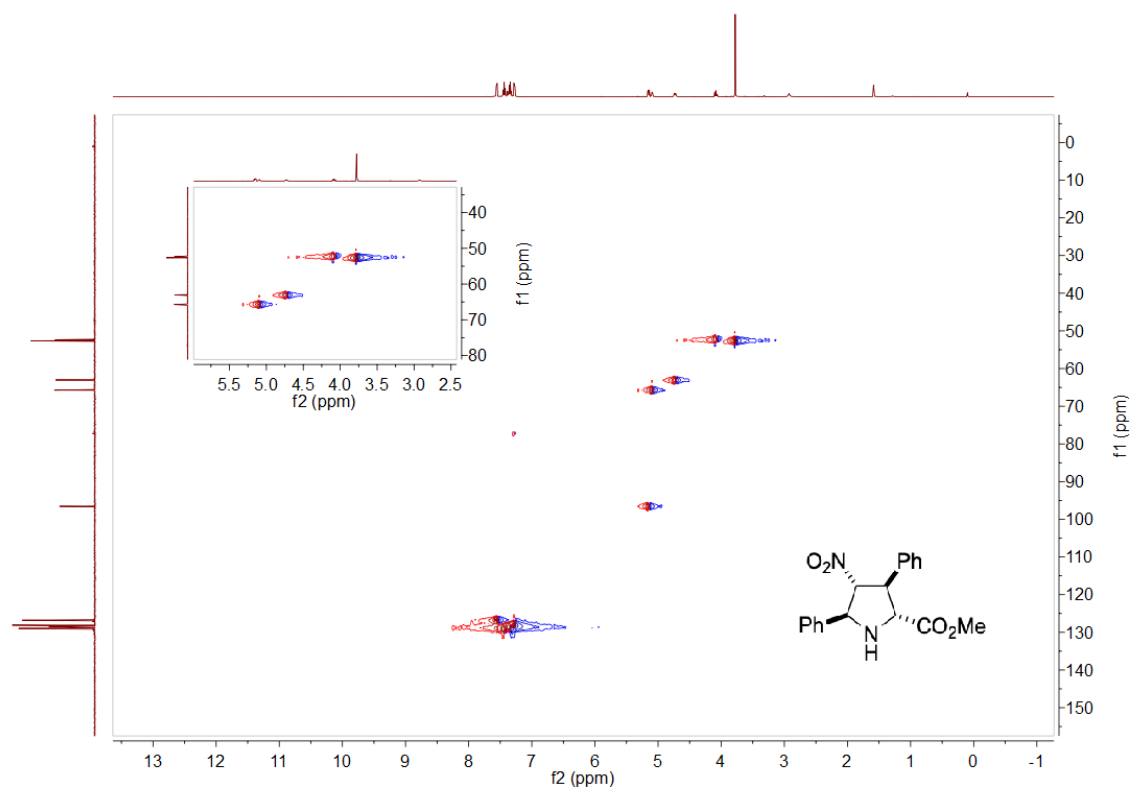
$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ):



*g*-COSY (CDCl<sub>3</sub>):

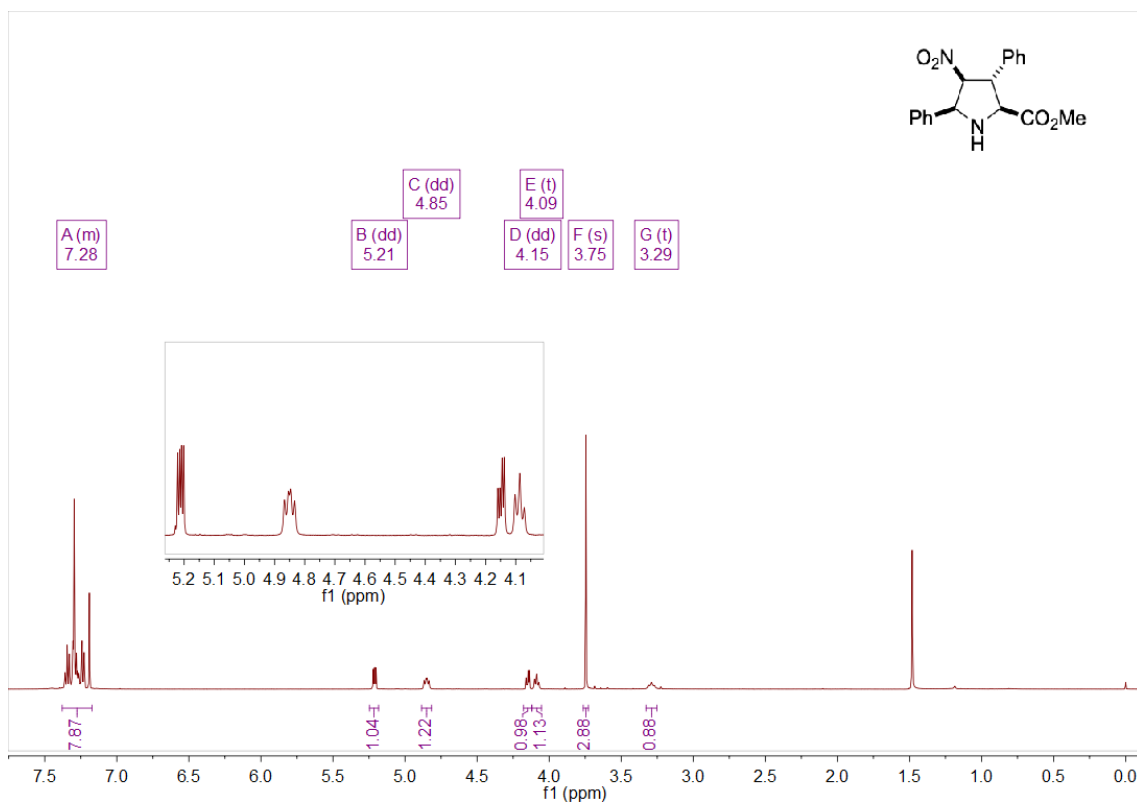


*g*-HSQC (CDCl<sub>3</sub>):

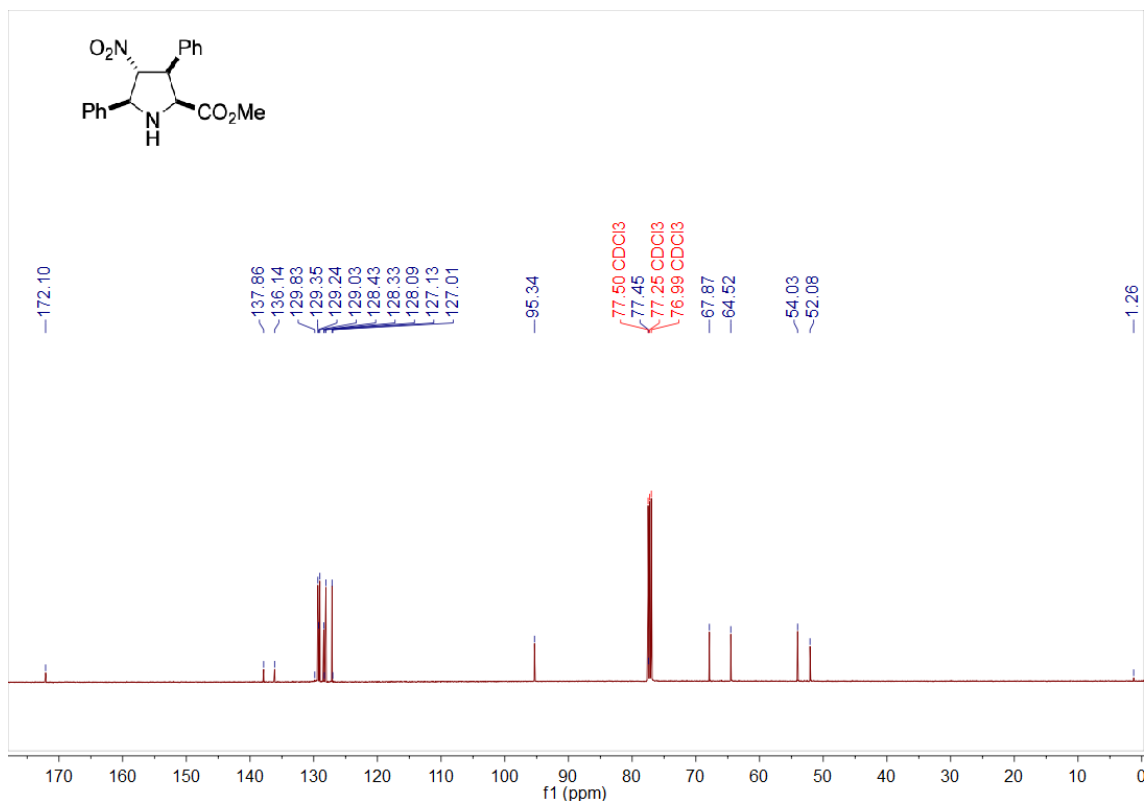


# 16-endo

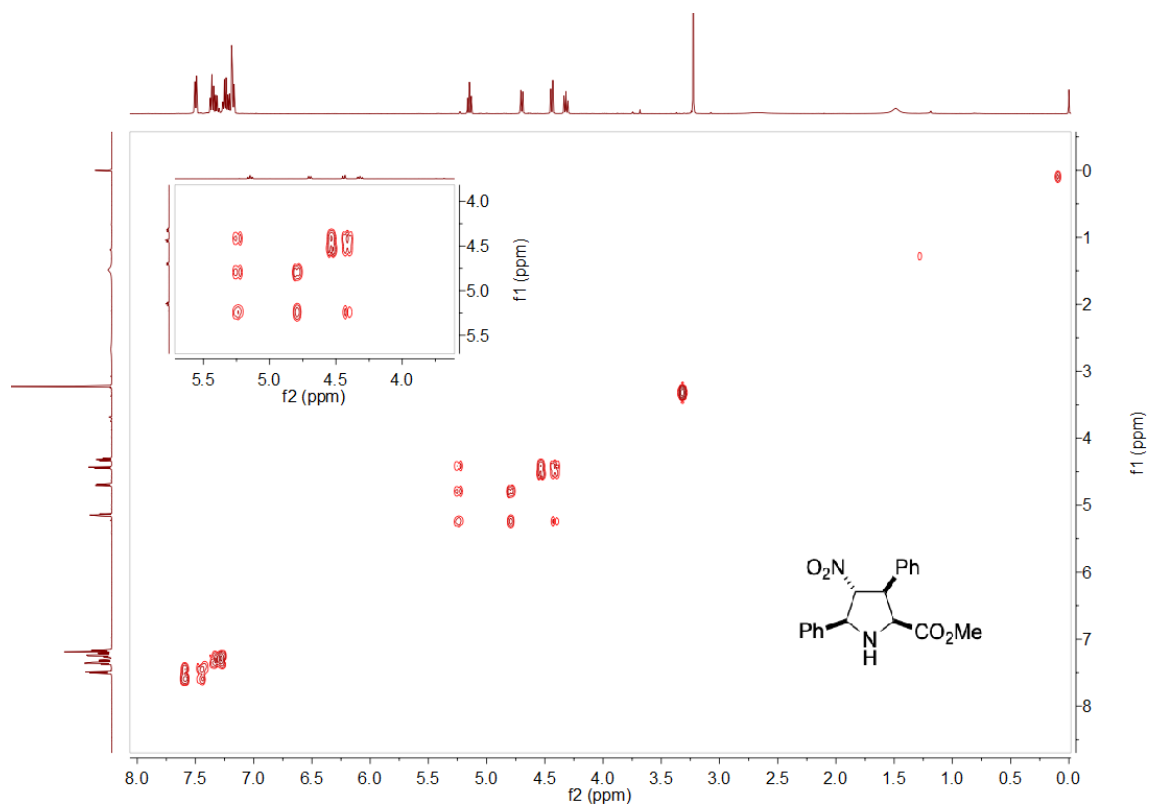
$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ):



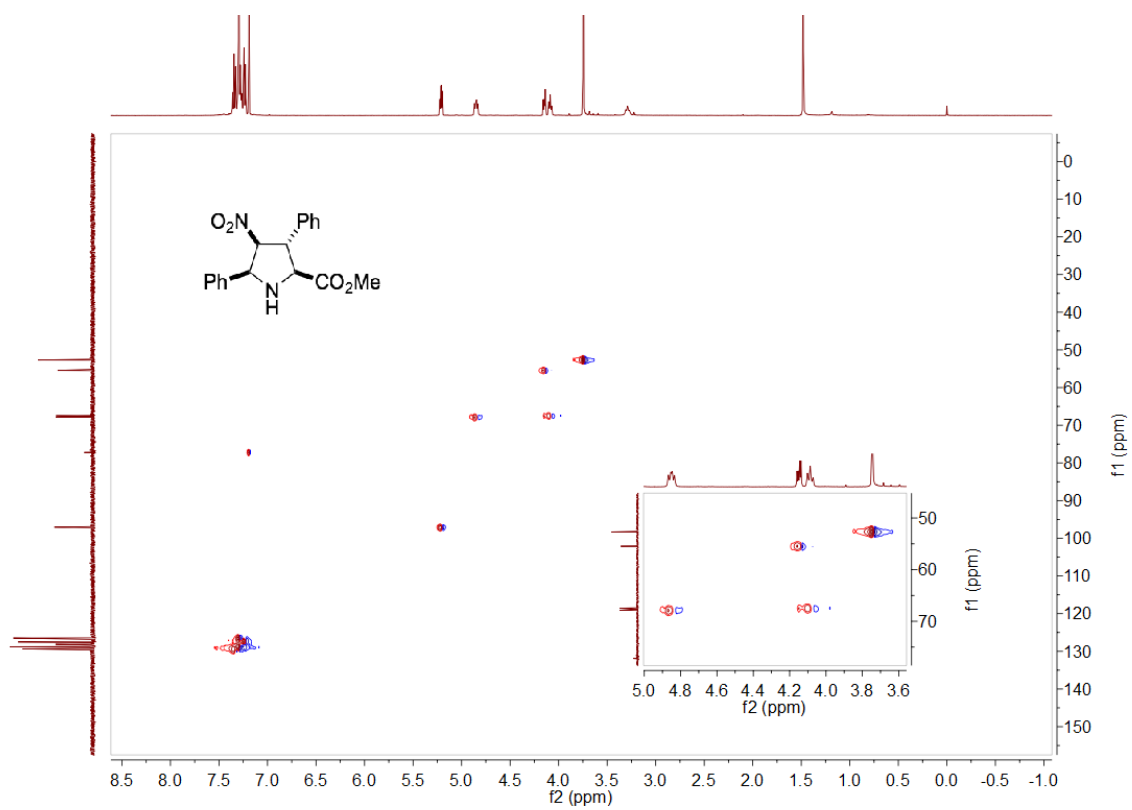
$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ):



*g*-COSY (CDCl<sub>3</sub>):



*g*-HSQC (CDCl<sub>3</sub>):

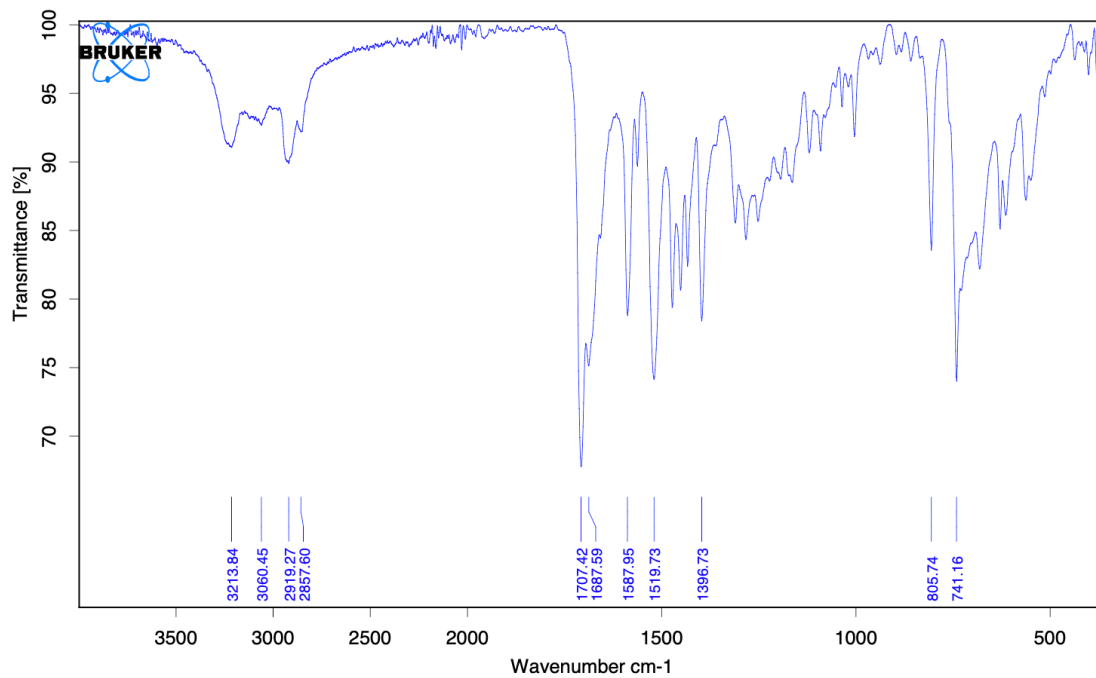




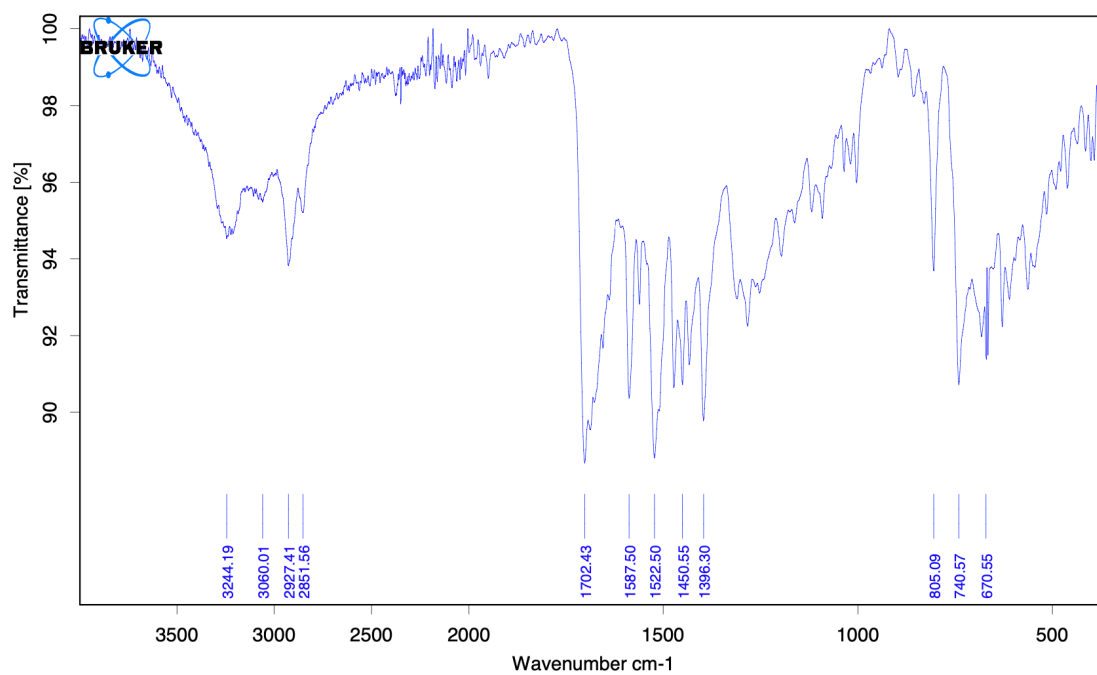
## 7. Anexo

Espectros IR

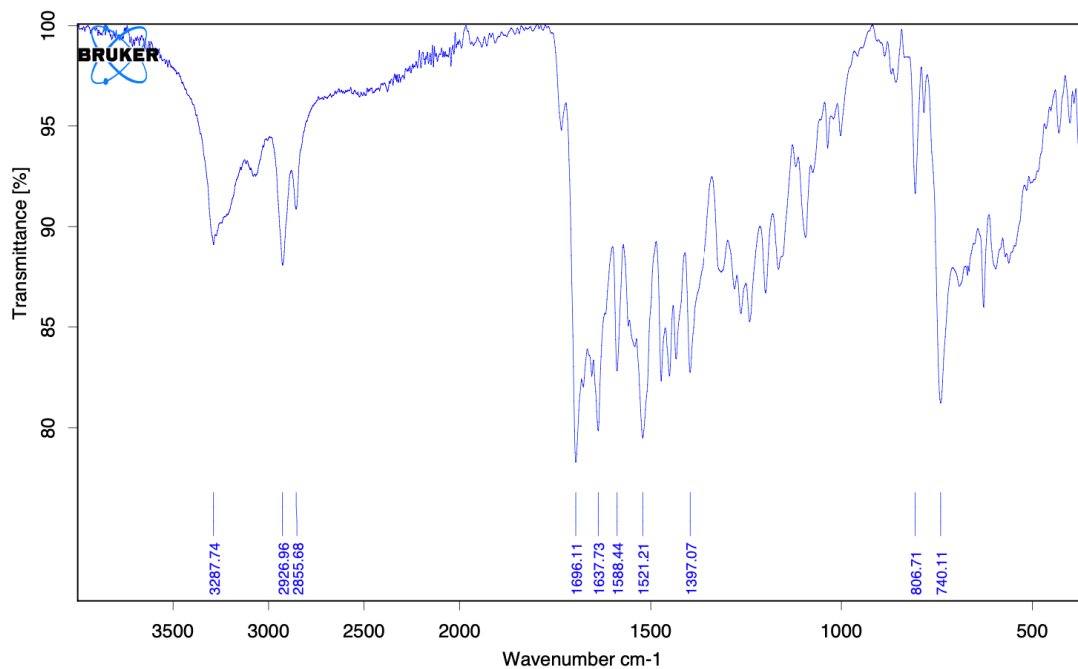
BIOT-L1 (6)



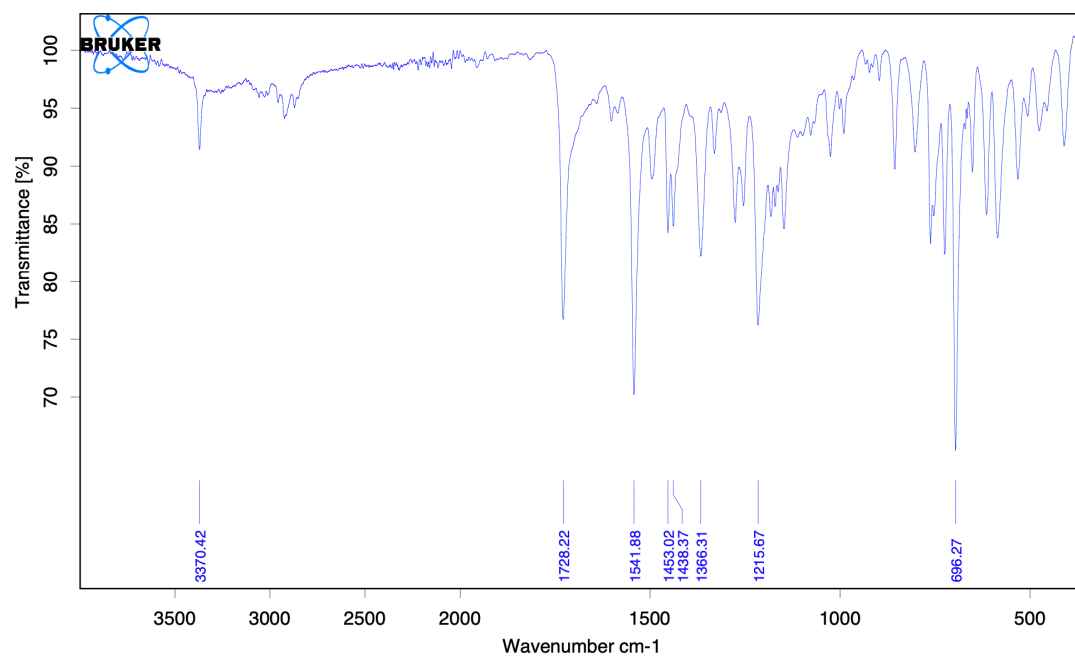
BIOT-L2 (10)



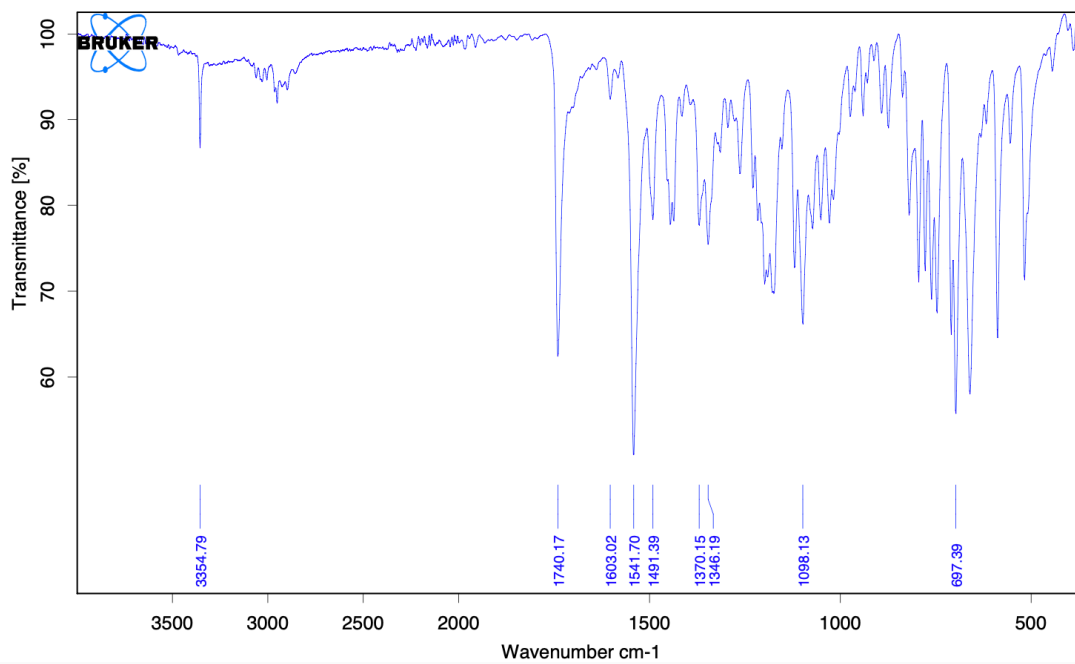
# BIOT-L3 (14)



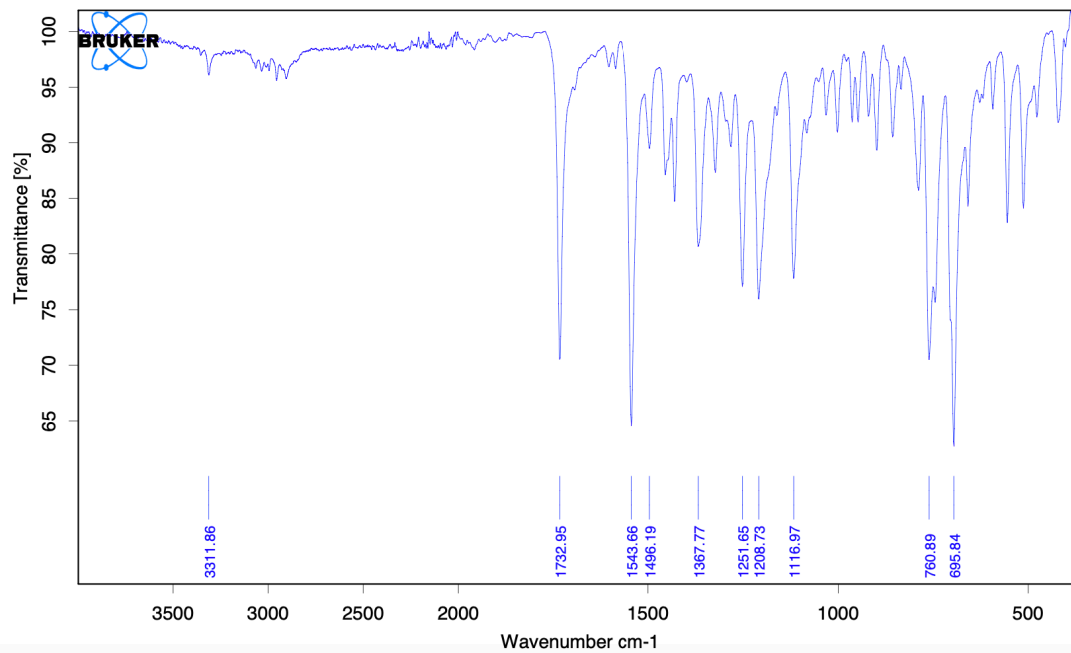
# 16-exo'



16-*exo*



16-*endo*



## 8. Bibliografía

1. Bhatia, S. Introduction to enzymes and their applications. *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology*. IOP Science, **2018**, 1-29.
2. Bhagavan, N. V.; Ha, C.E. Enzymes and Enzyme Regulation. *Essentials of Medical Biochemistry*. Elsevier, **2015**, 63–84.
3. Blanco, A.; Blanco, G. Enzymes. *Medical Biochemistry*. Elsevier, **2017**, 153–175.
4. Ainsworth, S., Enzymes as Biological Catalysts. *Steady-State Enzyme Kinetics*. Macmillan Publishers, **1977**, 1–28.
5. Robinson, P.K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* **2015**, 59, 1-41.
6. Large B, Baranska N.G.; Booth, R.L.; Wilson, K. S.; Duhme-Klair, A. K. Artificial metalloenzymes: The powerful alliance between protein scaffolds and organometallic catalysts. *Curr Opin Green Sustain Chem.* **2021**, 28, 100420
7. Walker, I.H.; Hsieh, P.; Riggs, P. D. Mutations in maltose-binding protein that alter affinity and solubility properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2010**, 88, 187–197.
8. Shetty, D.; Khedkar, J. K.; Park, K. M.; Kim, K. Can we beat the biotin-avidin pair?: Cucurbit[7]uril-based ultrahigh affinity host-guest complexes and their applications. *Chem.Soc. Revi.*, **2015**, 44, 8747–8761.
9. Heinisch, T.; Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes Based on the Biotin–Streptavidin Technology: Challenges and Opportunities. *Acc. Chem. Res.* **2016**, 49, 1711–1721.
10. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., L. Enzimas. *Principios de bioquímica*. Omega, **2009**, 184-188
11. Ohashi, M.; Liu, F.; Hai, Y. et al. SAM-dependent enzyme-catalysed pericyclic reactions in natural product biosynthesis. *Nature*, **2017**, 549, 502–506.
12. Ohashi, M.; Jamieson, C.S.; Cai, Y. et al. An enzymatic Alder-ene reaction. *Nature*, **2020**, 586, 64–69

13. Kumar, S.; Kumar, V.; Singh, S.P. Pericyclic Reactions and Molecular Orbital Symmetry. *Pericyclic Reactions: A Mechanistic and Problem-Solving Approach*. Elsevier, **2016**, 1-21.
14. Mandal, D. Pericyclic Reactions: Introduction, Classification and the Woodward–Hoffmann Rules. *Pericyclic chemistry: Orbital Mechanisms and Stereochemistry*. Elsevier, **2018**, 63-106.
15. Rivilla, I.; Odriozola-Gimeno, M.; Aires, A.; Gimeno, A.; Jiménez-Barbero, J.; Torrent-Sucarrat, M.; Cortajarena, A. L.; Cossío, F. P. Discovering Biomolecules with Huisgenase Activity: Designed Repeat Proteins as Biocatalysts for (3 + 2) Cycloadditions. *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*, 762–776.
16. Rivilla, I.; De Cózar, A.; Schäfer, T.; Hernandez, F. J.; Bittner, A. M.; Eleta-Lopez, A.; Aboudzadeh, A.; Santos, J. I.; Miranda, J. I.; Cossío, F. P. Catalysis of a 1,3-dipolar reaction by distorted DNA incorporating a heterobimetallic platinum(II) and copper(II) complex. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 7038–7046.
17. Trauner, D., 'Rolf Huisgen (1920–2020)', *Nature*, **2020**, *16*, 711–711.
18. a) De Cózar, A.; Cossío, F. P. Stereocontrolled (3+2) cycloadditions between azomethine ylides and dipolarophiles: A fruitful interplay between theory and experiment. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 10858–10868. b) Schleyer, P. V. R.; Wu, J. I.; Cossío, F. P.; Fernández, I. Aromaticity in transition structures. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 4909–4921.
19. Arrastia, I.; Arrieta, A.; Cossío, F. P. Application of 1,3-Dipolar Reactions between Azomethine Ylides and Alkenes to the Synthesis of Catalysts and Biologically Active Compounds. *European Journal of Organic Chemistry*, **2018**, *43*, 5889–5904.
20. Conde, E.; Bello, D.; de Cózar, A.; Sánchez, M.; Vázquez, M. A.; Cossío, F. P. Densely substituted unnatural l- and d-prolines as catalysts for highly enantioselective stereodivergent (3 + 2) cycloadditions and aldol reactions. *Chem. Sci.*, **2012**, *3*, 1486–1491.
21. Nyffenegger, C.; Pasquinet, E.; Suzenet, F.; Poullain, D.; Jarry, C.; Léger, J. M.; Guillaumet, G. An efficient route to polynitrogen-fused tricycles via a

- nitrene-mediated N–N bond formation under microwave irradiation. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 9567–9573.
22. Prier, C. K.; Arnold, F. H. Chemomimetic Biocatalysis: Exploiting the Synthetic Potential of Cofactor-Dependent Enzymes to Create New Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 13992–14006.
23. Arai, T.; Mishiro, A.; Yokoyama, N.; Suzuki, K.; Sato, H. Chiral Bis(imidazolidine)pyridine–Cu(OTf)<sub>2</sub>: Catalytic Asymmetric Endo-Selective [3 + 2] Cycloaddition of Imino Esters with Nitroalkenes *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5338–5339.
24. Monod, J.; Changeux, J. P.; Jacob, F. Allosteric proteins and cellular control systems. *Journal of Molecular Biology*, **1963**, *6*, 306–329.